

(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2015-509186

(P2015-509186A)

(43) 公表日 平成27年3月26日 (2015. 3. 26)

|                                     |                       |             |
|-------------------------------------|-----------------------|-------------|
| (51) Int. Cl.                       | F I                   | テーマコード (参考) |
| <b>GO 1 N 33/574 (2006. 01)</b>     | GO 1 N 33/574 Z N A A | 4 B O 2 4   |
| <b>GO 1 N 33/53 (2006. 01)</b>      | GO 1 N 33/53 M        | 4 B O 6 3   |
| <b>A 6 1 K 45/06 (2006. 01)</b>     | A 6 1 K 45/06         | 4 C O 8 4   |
| <b>A 6 1 P 35/00 (2006. 01)</b>     | A 6 1 P 35/00         | 4 C O 8 6   |
| <b>A 6 1 P 15/00 (2006. 01)</b>     | A 6 1 P 15/00         |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 63 頁) 最終頁に続く |                       |             |

|               |                              |          |                         |
|---------------|------------------------------|----------|-------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2014-548197 (P2014-548197) | (71) 出願人 | 514157526               |
| (86) (22) 出願日 | 平成24年12月20日 (2012. 12. 20)   |          | ザ ヨーロピアン モレキュラー バイオ     |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成26年8月20日 (2014. 8. 20)     |          | ロジー ラボラトリー              |
| (86) 国際出願番号   | PCT/GB2012/053223            |          | ドイツ連邦共和国 6 9 1 1 7 ハイデル |
| (87) 国際公開番号   | W02013/093489                |          | ベルク マイヤーホフシュトラッセ 1      |
| (87) 国際公開日    | 平成25年6月27日 (2013. 6. 27)     | (71) 出願人 | 506417186               |
| (31) 優先権主張番号  | 1121924. 3                   |          | ユーシーエル ビジネス パブリック リ     |
| (32) 優先日      | 平成23年12月20日 (2011. 12. 20)   |          | ミテッド カンパニー              |
| (33) 優先権主張国   | 英国 (GB)                      |          | イギリス国、ダブリュ1ティー 4ティー     |
|               |                              |          | ビー、ロンドン、トッテナム コート ロ     |
|               |                              |          | ード 97、ザ ネットワーク ビルディ     |
|               |                              |          | ング                      |
|               |                              | 最終頁に続く   |                         |

(54) 【発明の名称】 乳癌の検出及び処置

## (57) 【要約】

本発明は、患者の乳房前駆病変が浸潤性乳癌に進行するリスク及び／又は再発性非浸潤性疾患のリスクを判定する方法であって、患者から得られた乳房組織サンプル中の P A P P A 及び／又は P A P P A 機能活性の存在及び／又はレベルを検出することを含み、P A P P A が存在しない又は対照より低いレベルで存在する場合、浸潤癌への進行リスク及び／又は再発性疾患のリスクがある、方法に関する。別の実施形態では、診断は、患者サンプル中の前期又は前中期にある有糸分裂細胞の割合を同定することにより行うことができ、前期又は前中期にある細胞の割合が30%以上である場合、これは浸潤性乳癌への進行リスク及び／又は再発性疾患のリスクを示す。本発明は更に、有糸分裂の正常な進行を回復することにより抗増殖剤、好ましくは抗有糸分裂剤に対して有糸分裂遅延乳癌を感受性にするることができる。この実施形態では、第1の薬物を投与して乳癌細胞を有糸分裂ブロックから解除し、増殖細胞に影響を与える第2の薬物を逐次投与して癌細胞を殺す。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

患者の増殖性病変が浸潤性乳癌に進行するリスク及び／又は再発性非浸潤性疾患のリスクを判定する方法であって、前記患者から得られた乳房組織サンプル中の P A P P A の存在及び／又はレベルを検出することを含み、P A P P A が存在しない又は対照より低いレベルで存在する場合、浸潤癌への進行リスク及び／又は再発性疾患のリスクがある、方法。

**【請求項 2】**

患者の増殖性病変が浸潤性乳癌に進行するリスク及び／又は再発性非浸潤性疾患のリスクを判定する方法であって、前記患者から得られたサンプル中における P A P P A 遺伝子又はその制御若しくはプロモーター配列中の機能喪失に関連する遺伝子変化の存在を検出することを含み、遺伝子変化が存在する場合、浸潤癌への進行リスク及び／又は再発性疾患のリスクがある、方法。

10

**【請求項 3】**

前記 P A P P A 遺伝子又はその制御若しくはプロモーター配列中の機能喪失に関連する遺伝子変化がメチル化である、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記 P A P P A の存在が、P A P P A 特異的抗体、又は P A P P A の遺伝子、m R N A、若しくは特異的 P A P P A 変異に対するプローブを用いて同定される、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

**【請求項 5】**

患者の増殖性病変が浸潤性乳癌に進行するリスク及び／又は再発性非浸潤性疾患のリスクを判定する方法であって、前記患者から得られた乳房組織サンプル中の前期又は前中期にある有糸分裂細胞の割合を同定し、予め定められたカットオフ値と比較することを含み、前記前期又は前中期にある細胞の割合が前記カットオフ値より大きい場合、浸潤性乳癌への進行リスク及び／又は再発性疾患のリスクがある、方法。

**【請求項 6】**

前記カットオフ値が、前記サンプル中の有糸分裂細胞の少なくとも 30 % である、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記組織サンプル中の細胞の少なくとも 5 個が有糸分裂中である、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

30

**【請求項 8】**

前記前期又は前中期にある細胞の割合が、免疫検出を用いて決定される、請求項 5 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記免疫検出が、H 3 S 1 0 p h 抗体を用いて行われる、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記組織サンプルが、増殖性病変を示す乳房組織である、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

**【請求項 11】**

前記増殖性病変が、乳管上皮内癌 ( D C I S )、小葉上皮内癌 ( L C I S )、及び乳首のパジェット病を含む前浸潤性病変、並びに小葉新生物、小葉上皮内新生物、異型小葉過形成 ( A L H )、平坦型上皮異型 ( F E A )、異型乳管過形成 ( A D H ) 微小浸潤癌、乳管内乳頭新生物、及び葉状腫瘍を含む悪性度の不明な増殖性病変から選択される、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

請求項 5 に従属する場合、前記患者から得られた乳房組織サンプル中の P A P P A の存在及び／又はレベルを検出することを更に含み、P A P P A が存在しない又は対照より低いレベルで存在する場合、浸潤性乳癌への進行リスク及び／又は再発性疾患のリスクがあ

50

る、請求項 5 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記 P A P P A の存在が、P A P P A 特異的抗体を用いて同定される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

請求項 5 に従属する場合、前記患者から得られた乳房組織サンプル中の P A P P A 遺伝子又はその制御若しくはプロモーター配列のメチル化の存在を検出することを更に含み、メチル化が存在する場合、浸潤性乳癌への進行リスク及び / 又は再発性疾患のリスクがある、請求項 5 ～ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前駆病変から浸潤性乳癌への進行のリスク及び / 又は再発性疾患のリスクを判定するための H 3 S 1 0 p h 免疫検出の使用。

【請求項 16】

- i . 有糸分裂遅延細胞を解除する第 1 の薬物を投与すること ; 及び
  - i i . 化学療法剤である第 2 の薬物を逐次投与すること
- を含む、患者の乳癌を処置又は防止するための治療レジメン。

【請求項 17】

前記第 1 の薬物が、P A P P A タンパク質、機能的 P A P P A をコードする核酸、I G F 受容体アゴニスト ( 例えば、I G F - 1 )、又は脱メチル化剤である、請求項 16 に記載の治療レジメン。

【請求項 18】

前記第 2 の薬物が、タキサン及びビンカルカロイドを含む群から選択される、請求項 16 又は 17 に記載の治療レジメン。

【請求項 19】

前記患者が、

- i . 前記患者から得られた乳房組織サンプル中の前期又は前中期にある有糸分裂細胞の割合を同定すること ; 及び
  - i i . 予め定められたカットオフ値と比較すること、
- により前記有糸分裂遅延表現型を示すとして最初に同定され、

前記前期又は前中期にある細胞の割合が前記カットオフ値より大きい場合、前記有糸分裂遅延表現型が同定され、前記組織サンプルが少なくとも 5 個の有糸分裂細胞を含む、請求項 16 ～ 18 のいずれか一項に記載の治療レジメン。

【請求項 20】

前記カットオフ値が、前記乳房組織サンプル内の有糸分裂細胞の少なくとも 30 % である、請求項 19 に記載の治療レジメン。

【請求項 21】

前記患者が、前記患者から得られたサンプル中における P A P P A 消失又は P A P P A 遺伝子若しくはその制御若しくはプロモーター配列中の機能喪失に関連する遺伝子変化の存在を検出することにより、治療レジメンに係る処置に好適な候補であるとして最初に同定され、P A P P A 消失又は遺伝子変化がある場合、前記患者は治療レジメンに係る処置に好適な候補であるとして同定される、請求項 16 ～ 20 のいずれか一項に記載の治療レジメン。

【請求項 22】

P A P P A 消失又は P A P P 遺伝子若しくはその制御若しくはプロモーター配列中の機能喪失に関連する遺伝子変化がメチル化によるものである、請求項 21 に記載の治療レジメン。

【請求項 23】

乳癌の処置又は防止に用いるための、細胞分裂中の分子イベントを標的とする化学療法剤であって、細胞を有糸分裂遅延から解除する分子で先に処置された患者に投与される、化学療法剤。

10

20

30

40

50

## 【請求項 2 4】

タキサン及びビンカルカロイドを含む群から選択される、請求項 2 3 に記載の使用のための化学療法剤。

## 【請求項 2 5】

前記分子が、脱メチル化剤、I G F 受容体アゴニスト、好ましくは I G F - 1、又は P A P P A タンパク質である、請求項 2 3 又は 2 4 に記載の使用のための化学療法剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、乳房組織における増殖性病変の予後評価のため並びに増殖性病変が浸潤性乳癌に進行するリスク及び / 又は再発性疾患の発症リスクを同定するための特異的な生物学的マーカーの使用並びにその後の処置に関する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

新生物及び癌は細胞の異常な成長である。癌細胞は、空間の制約、他の細胞により共有される栄養素、又は体から送られる複製停止シグナルにも関わらず急速に複製する。癌細胞は、しばしば、健康な細胞とは異なる形状をし、適切に機能せず、体の多くの領域に広がり得る。腫瘍と呼ばれる組織の異常な成長は、調節不能に成長及び分裂できる細胞のクラスターである。腫瘍は良性（非癌性）又は悪性（癌性）であり得る。良性腫瘍は、ゆっくりと成長する傾向があり、広がらない。悪性腫瘍は急速に成長して近くの正常組織に浸潤してこれを破壊することができ、体全体に広がり得る。悪性度が不明な前浸潤病変又は増殖性病変等の前駆病変とは、良性様式の挙動をすることもあれば浸潤悪性癌へと進行することもある組織の異常な成長を意味する。悪性癌は局所的に浸潤性且つ転移性であり得る。

## 【0 0 0 3】

乳癌は一般的な癌の一例であり、その形態学的及び生物学的異質性のため、複雑な疾患であり、化学療法抵抗性を獲得し易いこと及び複数の分子機構が存在することがその病態形成を際立たせている。乳癌の局所領域処置を受ける女性の半分は再発がないが、残りの半分は最終的に転移性疾患により死亡する。したがって、最適な臨床管理にはこれら 2 グループの患者を明確に区別することが必須である。浸潤性乳癌へ進行するリスクが高い前駆病変を有する患者を同定するための予後マーカーを同定することも緊急に必要である。しかし、残念なことに、乳癌の予後マーカーは限られている。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0 0 0 4】

乳癌の処置は癌の進行段階に応じて異なり得る。乳癌はしばしば初期に検出され、この時、癌は、例えば乳管上皮内癌（D C I S）では、前浸潤性と言われ、癌細胞又は非癌性異常細胞は隣接する正常組織に浸潤していない。処置の複雑さは、例えば D C I S の場合のように、全ての前浸潤癌が進行して浸潤性（又は転移性）になるのではないので、全ての患者を同じように処置する必要がないことである。問題は、現在、前浸潤性のまま留まる癌（又は異常細胞）を有する患者と浸潤癌に進行する患者を区別することが困難なことである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0 0 0 5】

本発明は、有糸分裂の正常な進行に妊娠関連血漿タンパク質 A（P A P P A）が必要であること及び P A P P A のサイレンシングが浸潤性乳癌中及び浸潤性になり易い前浸潤性病変中に非常に多いという発見に基づく。したがって、本発明により、乳癌の生物学的原因の非常に重要な理解がもたらされ、より焦点の合った効率的な方法でその後の乳癌を検出及び処置することが可能になる。有糸分裂の正常な進行に P A P P A が必要であること及びその発現消失又は機能障害が有意に癌状態、特に前浸潤癌から浸潤癌への進行の一因

10

20

30

40

50

となるという理解から、P A P P A レベルのモニタリングによる乳癌の検出が可能になり、内因性 P A P P A レベルを上昇させるターゲティング療法による処置が可能になる。

【 0 0 0 6 】

乳房組織内の増殖性病変中、P A P P A のレベル又は活性がない又は低下しており且つ有糸分裂中で停止している細胞は浸潤性の性質を発生し易い。したがって、本発明は、P A P P A のレベル / 機能活性に基づいて又は有糸分裂遅延の表現型を示す細胞を同定することにより浸潤性乳癌を発症し易い患者の同定を可能にする。したがって、乳房組織サンプル内の増殖性病変は、非浸潤性のままである可能性が高い又は浸潤性になり易いのいずれかとして分類することができる。

【 0 0 0 7 】

本発明の第 1 の態様は、患者の増殖性病変が浸潤性乳癌に進行するリスク及び / 又は再発性非浸潤性疾患のリスクを判定する方法であって、患者から得られた乳房組織サンプル中の P A P P A の存在及び / 又はレベルを検出することを含み、P A P P A が存在しない又は対照より低いレベルで存在する場合、浸潤癌への進行リスク及び / 又は再発性疾患のリスクがある、方法に関する。

【 0 0 0 8 】

本発明の第 2 の態様は、患者の増殖性疾患が浸潤性乳癌に進行するリスク及び / 又は再発性非浸潤性疾患のリスクを判定する方法であって、患者から得られたサンプル中の P A P P A 遺伝子中又はその制御配列若しくはプロモーター配列中の機能喪失に関連する遺伝子変化の存在を検出することを含み、遺伝子変化が存在する場合、浸潤癌への進行リスク及び / 又は再発性疾患のリスクがある、方法に関する。

【 0 0 0 9 】

本発明の第 3 の態様は、患者の増殖性疾患が浸潤性乳癌に進行するリスク及び / 又は再発性非浸潤性疾患のリスクを判定する方法であって、患者から得られた乳房組織サンプル中の前期又は前中期にある有糸分裂細胞の割合を同定することを含み、前期又は前中期にある細胞の割合が 3 0 % 以上である場合、これが浸潤性乳癌への進行リスク及び / 又は再発性疾患のリスクを示す、方法に関する。

【 0 0 1 0 】

本発明の第 4 の態様は、患者の増殖性病変が浸潤性乳癌に進行するリスク及び / 又は再発性疾患のリスクを判定するための H 3 S 1 0 p h 免疫検出の利用に関する。

【 0 0 1 1 】

本発明の第 5 の態様は、患者の乳癌を処置又は防止するための治療レジメンであって、( i ) 有糸分裂遅延細胞を解除する第 1 の薬物を投与すること ; 及び ( i i ) 化学療法剤である第 2 の薬物を逐次投与すること、を含む治療レジメンに関する。

【 0 0 1 2 】

第 6 の態様では、本発明は、乳癌の処置又は防止に用いるための、細胞分裂中の分子イベントを標的とする化学療法剤であって、有糸分裂遅延から細胞を解除する治療剤で先に処置された患者に投与される、化学療法剤を提供する。

【 0 0 1 3 】

以下に添付の図を参照して本発明を説明する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 4 】

【 図 1 a 】 ヒトの癌における有糸分裂期の分布を示す図である。1 a は、外科的生検標本の組織切片中で H 3 S 1 0 p h 免疫標識により別個の有糸分裂期を同定している代表的画像である ( 拡大率 1 0 0 0 倍 ) 。

【 図 1 b 】 ヒトの癌における有糸分裂期の分布を示す図である。1 b は、正常乳房 ( n = 患者 5 例 ) 、リンパ腫 ( n = 患者 2 9 例 ) 、乳癌 ( n = 患者 1 5 6 例 ) 、肺癌 ( n = 患者 3 0 例 ) 、膀胱癌 ( n = 患者 2 7 例 ) 、及び結腸癌 ( n = 患者 4 1 例 ) の各有糸分裂期に割り当てられる有糸分裂細胞のパーセンテージを示す円グラフである。

【 図 1 c 】 ヒトの癌における有糸分裂期の分布を示す図である。1 c は、膀胱癌 ( 拡大率

10

20

30

40

50

1000倍；スケールバー20 $\mu$ m）及び他の種類の癌（図示せず）と比べて初期分裂像が多い乳癌（拡大率400倍；スケールバー50 $\mu$ m）及び非浸潤性の乳管上皮内癌（DCIS；拡大率400倍；スケールバー50 $\mu$ m）の代表的症例を示す図である。

【図2】有糸分裂マーカーとしてのホスホヒストンH3（H3S10ph）の特異性を示す図である。二重チミジンブロックによりHeLa Kyoto細胞をG1/S移行期で同調させ、5 $\mu$ M Plk-1阻害剤BI2536（セレックケム社（Seleckchem）社製）処理により前中期に同調させた。非同調的増殖（UT）、チミジン停止、及びBI2536処理細胞をホスホヒストンH3（H3S10ph）について免疫標識した。ホスホヒストンH3は、免疫蛍光法又は発色性染色によりチミジン停止細胞中に検出されなかったが、BI2536処理細胞は、H3S10phに陽性の前中期細胞（矢印）の濃縮を示した。右のパネルはDNA含有量のフローサイトメトリー分析を示す。

【図3】有糸分裂細胞の最低数を5とした、前期/前中期フラクシオンの受信者動作特性曲線を示す図である。

【図4】乳癌、DCIS、及び他の癌（プール）における前期/前中期フラクシオンの分布を示す図である。

【図5a】乳癌における初期有糸分裂像の濃縮を示す図である。5aは、様々なヒト癌の前期/前中期にある有糸分裂細胞のパーセンテージを示すボックスプロットである。乳癌は、他の腫瘍タイプと比べて前期/前中期の有糸分裂細胞の割合が高いことで特徴づけられる（ $P < 0.0001$ ）。中央値（黒い実線）、四分位範囲（ボックス）、範囲（線の範囲内）を示す。範囲外のケースを孤立した点として示す。

【図5b】乳癌における初期有糸分裂像の濃縮を示す図である。5bは、ホスホヒストンH3（H3S10ph）について免疫標識され、別個の有糸分裂期に割り当てられた、正常乳房、乳癌、及び他の種類の癌の代表例の顕微鏡写真を示す（下部の凡例参照；拡大率1000倍、スケールバー20 $\mu$ m）。

【図6a】有糸分裂遅延表現型の獲得が多段階の乳房腫瘍進行の初期に起こることを示す図である。6aは、正常な有糸分裂期分布（左パネル）及び前期/前中期の有糸分裂細胞の高い割合（右パネル）を示す、ホスホヒストンH3（H3S10ph）を免疫染色した非浸潤性の乳管上皮内癌（DCIS）の代表的症例の顕微鏡写真を示す（拡大率1000倍；スケールバー20 $\mu$ m）。

【図6b】有糸分裂遅延表現型の獲得が多段階の乳房腫瘍進行の初期に起こることを示す図である。6bは、前期/前中期遅延を示す正常乳房、DCIS、及び乳癌の症例のパーセンテージを示す棒グラフである。症例は、前期/前中期の有糸分裂細胞の割合が少なくとも3分の1である場合に遅延と定義した。このカットポイントは、非遅延型（94.1%）として適切に分類される他の悪性腫瘍を合わせたグループ中の標本の割合が、遅延型（94.9%）として適切に分類される乳癌標本の割合とほぼ等しくなるように選択された。

【図6c】有糸分裂遅延表現型の獲得が多段階の乳房腫瘍進行の初期に起こることを示す図である。6cは、正常乳房、DCIS、及び乳癌における前期/前中期にある有糸分裂細胞のパーセンテージを示すボックスプロットである。正常乳房から浸潤性乳癌への移行中に初期有糸分裂遅延が増大する傾向がある（ $P < 0.001$ ）。

【図7】更なる研究のためのMitochek前期/前中期クラス遺伝子の選択を示す図である。蛍光染色体マーカー（ヒストン2B-GFP）を安定に発現する生きたHeLa Kyoto細胞の微速度蛍光顕微鏡法により、ゲノムワイドなMitochek RNAiスクリーニングを行った（1）。siRNAトランスフェクト細胞の自動蛍光イメージング後、デジタル画像から有糸分裂期及び有糸分裂異常をコンピューターにより表現型決定した（2）。時間分解フェノプリント（phenoprint）を解析して候補遺伝子を表現型によりクラスター化した（3）。Mitochek前期/前中期クラス遺伝子のデータマイニングにより、初期有糸分裂期進行に関連した41個の遺伝子が明らかになった（4、5）。複数の除外基準（例えば、二次表現型として大規模な細胞死がない）を用いて候補のリストを7遺伝子まで絞り、これらのノックダウンは前期/前中期に

10

20

30

40

50

ある有糸分裂細胞のパーセンテージを急激に上昇させた（６、７）。

【図８a】図８aは、一次表現型として前中期停止／遅延、次いで二次表現型（二核性、多葉性、ブドウ状、及び細胞死）を示す、HeLa細胞でゲノムワイドなMitochondriaスクリーニングにより同定された７個の候補遺伝子の時間分解ヒートマップを示す図である。

【図８b】図８bは、７個の候補遺伝子ノックダウンが全て、前期／前中期にある有糸分裂細胞のパーセンテージを有意に上昇させたことを示す。

【図９a】PAPPAのサイレンシングがプロモーターのメチル化を介して乳癌における有糸分裂遅延に関連付けられることを示す図である。9aは、正常乳房（n = 患者３０例）、低悪性度（n = 患者３９例）及び高悪性度（n = 患者３６例）の非浸潤性DCIS乳房病変、並びに浸潤性乳癌（n = 患者１７３例）における７個のMitochondria候補遺伝子のプロモーターのメチル化状態（メチル化基準遺伝子に対するパーセンテージ [PMR] としてMethylightアッセイにより決定される）を示すヒートマップである。PMR値は、パネルの下の方例に示されるように色の付いたバーで表される。

【図９b】PAPPAのサイレンシングがプロモーターのメチル化を介して乳癌における有糸分裂遅延に関連付けられることを示す図である。9bは、PAPPAプロモーターのメチル化レベルによりランク付けした正常乳房（n = 患者３０例）、DCIS（n = 患者７５例）、及び乳癌（n = 患者１７３例）の症例を示す積み上げ棒グラフである。

【図９c】PAPPAのサイレンシングがプロモーターのメチル化を介して乳癌における有糸分裂遅延に関連付けられることを示す図である。9cは、有糸分裂遅延表現型及びPAPPAプロモーターメチル化状態に関連した、正常増殖（妊娠）乳房、DCIS、及び乳癌の症例におけるPAPPAタンパク質発現を示す図である（拡大率１０００倍；スケールバー１０μm）。ペプチドブロッキングによりPAPPA抗体の特異性を確認した（右下パネル）。

【図９d】PAPPAのサイレンシングがプロモーターのメチル化を介して乳癌における有糸分裂遅延に関連付けられることを示す図である。9dは、培養初代乳房細胞、不死化乳房細胞、及び形質転換乳房細胞における７個のMitochondria候補遺伝子のプロモーターメチル化状態を示すヒートマップである。

【図９e】PAPPAのサイレンシングがプロモーターのメチル化を介して乳癌における有糸分裂遅延に関連付けられることを示す図である。9eは、パネル（d）に示した培養乳房細胞におけるウェスタンブロットによるPAPPAタンパク質の検出を示す。

【図９f】PAPPAのサイレンシングがプロモーターのメチル化を介して乳癌における有糸分裂遅延に関連付けられることを示す図である。9fは、別個の有糸分裂期に割り振ったパネル（d）に示した培養乳房細胞における有糸分裂細胞のパーセンテージを示す積み上げ棒グラフである。

【図１０a】PAPPAに対して作製されたウサギポリクローナル抗体の特徴解析を示す図である。10aは、MCF10A及びBT549細胞から調製した全細胞抽出物中における内因性PAPPAのウェスタンブロット検出である。ブロッキングペプチドとのプレインキュベーションによりPAPPA抗体の特異性が確認され、一方、免疫前血清では内因性PAPPAは検出されなかった。

【図１０b】PAPPAに対して作製されたウサギポリクローナル抗体の特徴解析を示す図である。10bは、非処理（UT）、ZMPSTE24過剰発現（CO）、及びPAPPA過剰発現（PAPPA+）T47D細胞から調製した全細胞抽出物のPAPPA抗体を用いたウェスタンブロット分析である。特に、T47D細胞は、PAPPAプロモーターのハイパーメチル化を示し、内因性タンパク質を発現しない。

【図１０c】PAPPAに対して作製されたウサギポリクローナル抗体の特徴解析を示す図である。10cは、トランスフェクション７２時間後のPAPPA過剰発現T47D細胞集団（PAPPA+）から得られた細胞培養培地からのPAPPAタンパク質の免疫沈降を示す。市販のPAPPAウサギポリクローナル抗体（ダコ社製）でPAPPAタンパク質を免疫沈降し、研究室で作製したPAPPA抗体を用いたウェスタンブロットによ

10

20

30

40

50

り検出した。F T：抗体コートビーズと共に一晚インキュベートした後のフロースルー；溶出：ローディングバッファーでビーズから溶離した結合タンパク質。

【図 1 1 a】P A P P A 発現の実験的操作により初期有糸分裂の移行が調節されることを示す図である。1 1 a は、B T 5 4 9 細胞において R N A i により P A P P A 転写産物レベルをノックダウン (K D) することにより、非処理 (U T) 及び対照トランスフェクト (C O) 細胞と比べて P A P P A タンパク質が枯渇されたことを示している。

【図 1 1 b】P A P P A 発現の実験的操作により初期有糸分裂の移行が調節されることを示す図である。1 1 b は、P A P P A 発現コンストラクト (P A P P A +) によるトランスフェクト後に T 4 7 D 細胞 (プロモーターのメチル化により P A P P A 遺伝子がエピジェネティックにサイレンシングされている) 中で P A P P - A タンパク質レベルが回復したことを示している。T 4 7 D 細胞を、P A P P A と同様にメトジンシンファミリーのメンバーである無関係のメタロプロテイナーゼ (Z M P S T E 2 4) の発現コンストラクトで対照トランスフェクトした (C O)。

【図 1 1 c】P A P P A 発現の実験的操作により初期有糸分裂の移行が調節されることを示す図である。1 1 c は、B T 5 4 9 細胞の P A P P A に対する R N A i が、サイトスピン調製物のホスホヒストン H 3 (H 3 S 1 0 p h) 免疫標識による決定で、初期有糸分裂像の顕著な増加と関連しており、一方、外因的に発現させた P A P P A が T 4 7 D 細胞において正常な有糸分裂期分布を回復させたことを示している。

【図 1 1 d】P A P P A 発現の実験的操作により初期有糸分裂の移行が調節されることを示す図である。1 d は、U T、C O、及び K D の B T 5 4 9 細胞で測定された、記載の時間における細胞数を示している。

【図 1 1 e】P A P P A 発現の実験的操作により初期有糸分裂の移行が調節されることを示す図である。1 1 e は、トランスフェクションの 4 8 及び 7 2 時間後における U T、C O、及び K D の B T 5 4 9 細胞の D N A 含有量を示している。

【図 1 2 a】B T 5 4 9 乳癌細胞における R N A i 特異性対照及びレスキュー実験を示す図である。1 2 a は、Z M P S T E 2 4 発現コンストラクトでトランスフェクトされた細胞 (C O) を基準とした、非処理 (U T) 細胞、P A P P A - s i R N A 1 0 4 0 2 8 (K D 2 8)、又は P A P P A - s i R N A 1 0 0 4 2 (K D 4 2) トランスフェクト細胞における及び P A P P A s i R N A 存在下に P A P P A R N A i レスキューコンストラクトでトランスフェクトした細胞 (P A P P A + <sup>m u t</sup> / K D 2 8 又は P A P P A + <sup>m u t</sup> / K D 4 2) における P A P P A 転写産物レベルを示している。

【図 1 2 b】B T 5 4 9 乳癌細胞における R N A i 特異性対照及びレスキュー実験を示す図である。1 2 b は、トランスフェクションの 7 2 時間後の U T、C O、K D 2 8、K D 4 2、P A P P A + <sup>m u t</sup> / K D 2 8、及び P A P P A + <sup>m u t</sup> / K D 4 2 細胞から調製した全細胞抽出物における P A P P - A タンパク質のウェスタンブロット分析である。

【図 1 2 c】B T 5 4 9 乳癌細胞における R N A i 特異性対照及びレスキュー実験を示す図である。1 2 c は、スライドガラス上にサイトスピンし、ホスホヒストン H 3 (H 3 S 1 0 p h) 免疫標識により有糸分裂細胞を検出した U T、C O、K D 2 8、K D 4 2、P A P P A + <sup>m u t</sup> / K D 2 8、及び P A P P A + <sup>m u t</sup> / K D 4 2 細胞を示している。

【図 1 2 d】B T 5 4 9 乳癌細胞における R N A i 特異性対照及びレスキュー実験を示す図である。1 2 d は、別個の有糸分裂期にある U T、C O、K D 2 8、K D 4 2、P A P P A + <sup>m u t</sup> / K D 2 8、及び P A P P A + <sup>m u t</sup> / K D 4 2 細胞のパーセンテージを示す積み上げ棒グラフである。

【図 1 3 a】P A P P A 発現レベルが乳癌細胞系の浸潤能に影響を与えることを示す図である。1 3 a は、B T 5 4 9 及び T 4 7 D 細胞における P A P P A 発現が図 1 1 のレジェンドに記載されているように実験操作されたこと及び B o y d e n C h a m b e r アッセイで測定された細胞の浸潤性を示している。

【図 1 3 b】P A P P A 発現レベルが乳癌細胞系の浸潤能に影響を与えることを示す図である。1 3 b は、非処理 (U T) 及び対照トランスフェクト (C O) 細胞と比べた、P A P P A 枯渇 (K D) B T 5 4 9 細胞及び P A P P A 過剰発現 (P A P P A +) T 4 7 D 細胞

10

20

30

40

50

胞のクリスタルバイオレット染色された Boyden Chamber インサートを示している。

【図 13c】PAPPA 発現レベルが乳癌細胞系の浸潤能に影響を与えることを示す図である。13c は、CO 及び KD BT 549 細胞における表面  $\beta 1$  - インテグリンレベルを示している。

【図 13d】PAPPA 発現レベルが乳癌細胞系の浸潤能に影響を与えることを示す図である。13d は、浸潤アッセイ期間中に培養培地に抗  $\beta 1$  - インテグリンブロッキング抗体を添加することで BT 549 細胞における PAPPA 枯渇に関連する浸潤性増大が逆転されたことを示している。

【図 14 (A)】T47D 細胞における細胞成長特性及び PAPPA 発現を示す図である。(A) は、T47D 細胞の Brightfield 画像である (対物レンズ 20 倍)。Countess (商標) 自動細胞計数装置 (ライフテクノロジーズ社製) を用いて算出された集団倍加時間は 44 時間であった。

【図 14 (B)】T47D 細胞における細胞成長特性及び PAPPA 発現を示す図である。(B) は、PI 染色後の非処理 T47D 細胞の DNA 含有量を示している。示されているデータは、Multicycle AV ソフトウェアを用いて解析された。

【図 14 (C)】T47D 細胞における細胞成長特性及び PAPPA 発現を示す図である。(C) 定量 PCR を用いて、T47D 及び BT 549 細胞中の PAPPA をコードする mRNA の相対レベルを測定した。エキソン 14 ~ 15 にまたがるプライマーを用いて PAPPA を検出し、エキソン 4 ~ 5 にまたがるプライマーを用いて内部対照 RPLP0 を検出した。

【図 14 (D)】T47D 細胞における細胞成長特性及び PAPPA 発現を示す図である。(D) (C) に記載の実験で得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にかけた。

【図 14 (E)】T47D 細胞における細胞成長特性及び PAPPA 発現を示す図である。(E) は、ウサギポリクローナル抗 PAPPA - A1 抗体でプローブした、T47D 及び BT 549 細胞質ゾル画分のウェスタンブロットを示す。 $\beta$  - アクチンローディング対照を下のパネルに示す。

【図 14 (F)】T47D 細胞における細胞成長特性及び PAPPA 発現を示す図である。(F) T47D 及び BT 549 細胞から単離したゲノム DNA サンプルで MethyLight アッセイを行った。PMR は、サンプルの PAPPA : COL2A1 比を SSSI 処理ヒト白血球細胞 DNA の PAPPA : COL2A1 で割り、100 を乗じることで得られる、メチル化基準に対するパーセンテージを指す。

【図 15 (A)】外因性 IGF - 1 が T47D 細胞において観察される有糸分裂遅延表現型を逆転させることを示す図である。(A) は、H3S10ph 抗体で免疫染色された対照及び IGF - 1 処理 T47D 細胞の代表的な画像 (原拡大率、200 倍) を示している。矢印で示されているのは前期 / 前中期にある有糸分裂細胞である。

【図 15 (B)】外因性 IGF - 1 が T47D 細胞において観察される有糸分裂遅延表現型を逆転させることを示す図である。(B) は、T47D 対照及び IGF - 1 処理細胞における前期 / 前中期にある全有糸分裂細胞のパーセンテージを示している。

【発明を実施するための形態】

【0015】

「患者」という用語は、診断の受け手となる任意の動物 (例えば哺乳動物)、例えば、限定されるものではないが、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、齧歯類等を意味する。典型的には、「患者」という用語は本明細書中においてヒト対象を指して用いられる。

【0016】

「癌」及び「癌性」という用語は、制御されない細胞成長により細胞の集団が特徴付けられる哺乳動物における生理学的状態を指す又は述べている。

【0017】

「癌細胞」及び「腫瘍細胞」という用語は文法的に同等であり、腫瘍又は前癌病変に由来する細胞の全集団を意味する。

10

20

30

40

50

## 【0018】

「乳癌」という用語は、浸潤性乳管癌、浸潤性小葉癌、管状癌、髄様癌、肺胞癌、固形異型癌 (solid variant carcinoma)、印環細胞癌、化生性癌を含む全ての形態の原発性乳癌を含む。

## 【0019】

「浸潤癌」という用語は、それが発生した原発性腫瘍を超えて広がり、周囲の健康な組織癌中で成長している癌を指す。浸潤癌は、侵襲性癌と呼ばれることもある。この用語は、特に指定のない浸潤性乳管癌 (IDC) 及び IDC サブタイプ (例えば、混合型、多形性、破骨細胞型)、浸潤性小葉癌 (ILC)、管状癌、粘液性癌、髄様癌、神経内分泌腫瘍、浸潤性乳頭篩状癌、並びに浸潤性アポクリン、化生、及び膨大細胞サブタイプを含む全ての原発性浸潤性乳癌を含むことが意図される。

10

## 【0020】

本発明において、「浸潤癌のリスク」という語句は、上皮内非浸潤性癌から浸潤癌への進行リスクを意味する。浸潤癌のリスクは、再発性上皮内非浸潤性癌のリスクを意味することもある。

## 【0021】

本発明において、「再発性疾患のリスク」という語句は、患者の乳房組織内の異なる位置で起こる上皮内非浸潤性増殖性病変のリスクを意味する。

## 【0022】

好ましくは、患者から得られ、本発明のインビトロの方法で使用される組織サンプルは、増殖性病変を示す乳房組織サンプルである。本発明において、「増殖性病変」という用語は異型性を示す病変を指す。異型性を示す増殖性病変とは、浸潤性乳癌の前駆病変を意味する。前駆病変は、大まかに2つのグループ、すなわち「前浸潤性病変」及び「悪性度不明の増殖性病変」に分類することができる。これら2グループの実体は、乳房実質構造内での異型又は悪性の細胞の増殖であるが、基底膜を超える浸潤の証拠はないものを意味する。前浸潤性病変は、乳管上皮内癌 (DCIS)、小葉上皮内癌 (LCIS)、及び乳頭のパジェット病を含む。悪性度不明の増殖性病変は、小葉新生物、小葉上皮内新生物、異型小葉過形成 (ALH)、平坦型上皮異型 (FEA)、異型乳管過形成 (ADH) 微小浸潤癌、乳管内乳頭新生物、及び葉状腫瘍等の実体を含む。これらの実体は当該技術分野でよく特徴解析されており、ルーチンな臨床的病理学的実務で用いられている。

20

30

## 【0023】

本明細書に記載の発明の方法はインビトロで行われる。誤解のないように、「インビトロ」という用語は、当該技術分野におけるその通常の意味を有し、組織サンプルを得た患者の体の外側の人工的環境中の組織中又は組織上で行われる方法を指す。

## 【0024】

「イムノアッセイ」、「免疫検出 (immuno-detection)」、及び「免疫学的アッセイ」という用語は本明細書中で交換可能に用いられており、サンプル中のタンパク質の存在又はレベルを同定するための抗体に基づく技術を指す。

## 【0025】

「抗体」という用語は、重鎖及び軽鎖の免疫グロブリン可変ドメイン ( $V_H$  S 及び  $V_L$  S)、より具体的には相補性決定領域 (CDR) の結合特性により決定されるように標的上のエピトープを特異的に認識する免疫グロブリンを指す。多くの潜在的な抗体形態が当該技術分野で知られており、それには、限定されるものではないが、複数のインタクトなモノクローナル抗体又はインタクトなモノクローナル抗体を含むポリクローナル混合物、抗体断片 (例えば  $F_{ab}$ 、 $F_{ab}'$ 、及び  $F_r$  断片、線状抗体、単鎖抗体、及び抗体断片を含む多特異性抗体)、単鎖可変断片 (scFv S)、多特異性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、及び標的上の所与のエピトープの認識に必要なドメインを含む融合タンパク質が含まれる。抗体はまた、診断効果のための種々の部分、例えば、限定されるものではないが、放射性核種、フルオロフォア、又は色素にコンジュゲートしてよい。

40

## 【0026】

50

抗体 - エピトープ相互作用の文脈における、「特異的に認識する」という用語は、抗体とエピトープが、抗体又はエピトープのいずれかが別の物質、例えば無関係のタンパク質で代用された時よりも、頻繁に、急速に、長い期間、大きなアフィニティー、又は上記の任意の組合せで会合する相互作用を指す。必ずではないが、一般的に、結合への言及は特異的認識を意味する。

【0027】

「有糸分裂」という用語は当該技術分野におけるその通常の意味を有する。有糸分裂は、真核細胞がその細胞核中で染色体を2つの別個の核中の2つの同一な対に分離するプロセスである。有糸分裂及び細胞質分裂は一緒に、細胞周期の有糸分裂(M)期を定義する。有糸分裂のプロセスは、1セットの活動の完了と次の活動の開始に対応するステージに特徴づけられる。これらのステージは、前期、前中期、中期、後期、及び終期である。

【0028】

「前期」という用語は当該技術分野におけるその通常の意味を有する。前期は、核の中のクロマチンが密に巻きつけられ、別個の染色体へと凝縮するステージを指す。

【0029】

「前中期」という用語は当該技術分野におけるその通常の意味を有する。前中期中、核膜が分解され、微小管が核のスペースに侵入する。

【0030】

本発明は内因性PAPPAレベルの抑制が乳癌の発症に関わることを確認した。より具体的には、本発明は、PAPPAの抑制が乳癌の「浸潤性」に関わることを確認した。これは、「リスクのある」患者を同定すること及び標的化された様式で治療法を開発することを可能にするので、乳癌の検出及び処置における重要なブレイクスルーである。

【0031】

本発明は、妊娠関連血漿タンパク質A(PAPPA)の有無、遺伝子若しくはそのプロモーター配列のメチル化状態、又はPAPPAの機能喪失の検出に基づいて患者の乳癌のリスクを判定する方法を開発することを可能にする。

【0032】

PAPPAは、妊娠女性の体内で高濃度で循環している胎盤起源の4つのタンパク質の1つとして1974年に同定され、その後、ダウン症候群妊娠のバイオマーカーとして臨床的に有用であることが見出された。抑制性インスリン様成長因子結合タンパク質-4(IGFBP-4)の切断を介してIGFのバイオアベイラビリティを制御するプロテアーゼとして同定されるまでの四半世紀の間、その生物学的機能は謎のままであった。幅広い種類の細胞(例えば、線維芽細胞、骨芽細胞、及び血管平滑筋細胞)におけるIGFBP-4プロテアーゼとしてのその役割は、脊椎動物の高度に保存されたアミノ酸配列と共に、PAPPAが胎盤の生理機能を超えた基本的機能を果たすことを示していた。本発明者は今回、乳房組織中で有糸分裂の正常な進行のためにPAPPAが必要であることを示した。PAPPAの内因的抑制は、有糸分裂の初期段階における遅延又は停止を引き起こし、サイクル中の細胞を前期/前中期で止めた。これは、内因性PAPPA遺伝子の発現を増大させることにより又はPAPPAを発現する人工コンストラクトを導入することにより逆転させることができる。

【0033】

乳癌細胞中でのPAPPA抑制による有糸分裂の遅れは一見、腫瘍の成長に不利に見える。しかし、付随する浸潤能獲得の増大により、有糸分裂の遅れた新生物性乳房細胞は大きな生物学的利点を得る。乳癌標本中、PAPPAのサイレンシングに関連付けられる有糸分裂の遅延は浸潤癌のほぼすべての症例及び一部の非浸潤性病変で検出することができる。したがって、PAPPAの消失による浸潤能の獲得は、非浸潤癌から浸潤癌への移行中、多段階の乳房腫瘍進行の初期に起こる。臨床的生検標本中におけるPAPPA調節解除及び有糸分裂遅延の検出は、浸潤性疾患を発症するリスクが高い、乳管上皮内癌、異型過形成、又は非浸潤性の小葉上皮内癌等の前浸潤性病変を有する乳癌患者の同定における重要な進歩をもたらす。したがって、本発明を用いて、前浸潤性病変を示す患者を、浸潤

10

20

30

40

50

性表現型へと進行しないであろう病変を有する（追加的な治療を必要としないであろう）患者及び浸潤性表現型になり易い（したがって、追加的な治療が必要となり得る）患者に区別することができる。

#### 【0034】

本発明者らは、乳癌細胞（又は前癌細胞）中におけるPAPPA抑制の原因の1つがそのDNA、主にPAPPAプロモーター領域のメチル化によるものであることを突き止めた。CpGジヌクレオチド内のシトシンへのメチル基の共有結合による付加により主に生じるDNAのメチル化は、遺伝子のプロモーター領域中で主に起こり、これはそこに大部分のCpGアイランドが見出されるからである。ハイパーメチル化は転写のサイレンシングを引き起こす。

10

#### 【0035】

特定の遺伝子のメチル化状態を決定することによる癌の有無の検出は公知であり（ただし、PAPPAとの関連ではない）、これを行うための従来の方法を本発明における使用に適合させることができる。例えば、メチル化特異的PCR（MSP）が特異的遺伝子のメチル化状態を決定するために用いられてきた。この技術は、Methylightとも呼ばれ、それぞれの内容を参照により本明細書に援用するEads et al, Nucleic Acids Res. 2000; 28(8)及びWidschwendler et al, Cancer Res., 2004; 64:3807-3813に記載されている。代替的方法には、Combined Bisulphate Restriction Analysis法、Methylation-sensitive Single Nucleotide Primer Extension法、及びCpGアイランドマイクロアレイの使用が含まれる。DNAメチル化を調べるための市販のキットが利用可能である。したがって、本発明は、患者の浸潤性乳癌に進行するリスク又は乳癌を判定するための、PAPPA遺伝子又はその制御プロモーター配列のメチル化状態を決定する従来の方法を用いる。

20

#### 【0036】

Methylightは、PCRステップ後に更なる操作を必要としない、蛍光に基づくリアルタイムPCR（TaqMan（登録商標））技術を利用するハイスループットな定量的メチル化アッセイである。Methylightは、10,000倍過剰の非メチル化アレルの存在下でメチル化アレルを検出できる高感度アッセイである。このアッセイは更に、非常に定量的であり、非常に少量の鋳型DNAを用いてDNAメチル化の特定のパターンの相対的な頻度（prevalence）を非常に正確に決定することができる。

30

#### 【0037】

本発明によれば、Methylightを用いて、患者のサンプルについて得られたゲノムDNAサンプル中のPAPPA遺伝子又は制御若しくはプロモーター領域のメチル化状態を決定することができる。PAPPA遺伝子のメチル化状態の決定は以下のステップを含み得る：

i. 乳房組織サンプルからゲノムDNAを抽出し、重亜硫酸ナトリウムで処理して非メチル化シトシンをウラシル残基に変換するステップ（メチル化残基は保護されている）；

ii. 表2に詳細に記載されているようなバイサルファイト改変DNAに特異的に設計されたプライマー及びプローブを用いてバイサルファイト標的化DNAサンプルを増幅するステップ：用いられるプライマー/プローブセットは、PAPPA遺伝子に特異的なメチル化セット（例えば、表2の配列番号7～9参照）及び参照遺伝子（COL2A1）に特異的なセット（例えば、表2の配列番号31～33参照）を含む；

40

iii. 例えばABI Step one plusソフトウェアを用いて、データを分析し、Ct値を計算するステップ；

iv. サンプルのPAPPA:COL2A1比を陽性対照サンプル（例えば、SssI処理HeLaゲノムDNA）のPAPPA:COL2A1比で割り、100を乗じることでより特異的座位における完全にメチル化されたPAPPA分子のパーセンテージを計算するステップ。

#### 【0038】

50

M e t h y L i g h t 反応はパイサルファイト変換DNAに特異的であるので、偽陽性結果の発生が除かれる。

#### 【0039】

DNAメチル化(ハイパーメチル化)はPAPPA抑制の原因の1つであるが、他の原因もあり得る。例えば、PAPPA遺伝子(又はその制御配列)が、転写サイレンシングにつながるように変異している可能性がある。点変異、欠失、ヘテロ接合性の消失、転座等は全てPAPPA遺伝子の転写活性を失わせ得る。遺伝子レベルでの改変がPAPPAの発現を低減(又は消失)させ得るが、遺伝子レベルでの改変(変異)により機能的活性が低減又は消失したPAPPAの発現が生じることもあり得る。したがって、本発明は、PAPPA活性レベルが診断を助けるために用いられると予想する。活性消失の原因となる変異ホットスポットが同定されてもよく、患者サンプル中のそのようなホットスポットの同定も診断に寄与し得る。

10

#### 【0040】

ヘテロ接合性の消失は、種々の技術、例えば半定量的RT-PCR分析により測定することができる。PAPPAはヒト染色体9q32-33.1に局在する。全RNAは市販のRNA抽出キットを用いて抽出することができ、逆転写は逆転写酵素を用いて行うことができる。PAPPA遺伝子領域内で固有のプライマーを設計することができ、RT-PCR反応をサーマルサイクラー中で行うことができる。PAPPA遺伝子の発現レベルは、内部対照と比べたPAPP-A遺伝子のバンド強度の割合により決定することができる。

20

#### 【0041】

当業者に理解されるように、RT-PCRで得られた結果を定量的に確認するためにリアルタイムPCR反応を行うこともできる。固有プライマーをPAPPA及び内部対照用に設計することができる。リアルタイムPCRを行って、調べる各遺伝子について標準曲線を作製することができる。PAPPAの低減倍率は、内部対照を基準に標準化して、各サンプル中のRNA量について補正し、更に逆転写反応の効率の差を考慮することができる。

#### 【0042】

ヘテロ接合性の消失の検出に用いられる他の方法は、キャピラリー電気泳動システムを用いた高分解能PCRに基づく蛍光定量法;放射標識ヌクレオチドを用いたPCRによるマイクロサテライトの増幅後のオートラジオグラフィー、及び次世代シーケンシング(Ion Torrent(商標)、ライフテクノロジーズ社)である。

30

#### 【0043】

以前に述べたように、点変異がPAPPAの消失又はPAPPAの機能的活性消失の原因であり得る。分子診断において、点変異を検出する種々の方法が利用可能である。使用される方法の選択は、分析される標本、方法がどの程度信頼できるか、検出される変異が分析前に知られているかどうか、及び野生型と変異型のアレルの比率によって決まる。

#### 【0044】

変性グラジエントゲル電気泳動が、変異、特に点変異を検出するための更なる技術である。長時間(48時間)プロテイナーゼK消化法又はDNA easyキット(キアゲン社製)を用いてゲノムDNAを抽出することができる。PAPPAコード領域全体をカバーするマルチプレックスPCR反応により二本鎖DNA(1kbのPCR断片)を作製することができる。検出効率を上げるために、GCクランプをPCRプライマーの一方に付加してよい。次いで、DNAは、ゲル電気泳動装置中の、尿素又はホルムアミド等の濃度勾配変性剤に供され得る。濃度勾配変性剤により、DNA中のドメインがその融解温度(T<sub>m</sub>)に従って解離する。1kbのDNAハイブリッドは通常約3~4個のドメインを含み、それぞれは異なる温度で融解する。そのようなドメイン中における鎖の解離は電気泳動の移動性を低下させ、1bpの差はT<sub>m</sub>を変化させるのに充分である。ヘテロ二本鎖中の塩基ミスマッチはドメインを著しく不安定化し、その結果、ホモ二本鎖分子とヘテロ二本鎖分子の間でT<sub>m</sub>に差が生じる。ホモ及びヘテロ二本鎖はゲル電気泳動後の銀染色によ

40

50

り検出される。この方法には、センス鎖及びアンチセンス鎖からヘテロ二本鎖が生成された時に100%の点変異を検出できるという利点がある(Cotton RG, Current methods of mutation detection, Mutat Res 1993; 285: 125-44)。

#### 【0045】

点変異の検出に利用可能な別の方法としては、PCR-一本鎖コンホメーション多形、ヘテロ二本鎖分析、タンパク質切断試験、RNA SEA切断法、化学的/酵素ミスマッチ切断、DNAチップ上でのアレルト異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、ブロッキング試薬を用いた(野生型アレルの増幅を抑制するため)アレルト異的PCRと続いてのリアルタイムPCR、PCR産物の直接シーケンシング、パイロシーケンシング、及び次世代シーケンシングシステムが含まれる。

10

#### 【0046】

前述したように、PAPPAの消失及び/又はPAPPAの機能的活性の消失は、挿入、欠失、及びフレームシフト変異によるものであり得る。パイロシーケンシングの技術を用いて挿入、欠失、フレームシフト変異を検出することができる。パイロシーケンシングは合成時読解(sequencing-by-synthesis)の原理に基づく。この方法では、一本鎖PCR/RT-PCR断片を反応の鋳型として用いる。ヌクレオチド取込み後のDNA複製プロセス中、放出されたPPi(無機リン酸)が酵素カスケード、APSの存在下でPPiをATPに変換するATPスルフィラーゼにより光に変換される。このATPは更に、ルシフェリンから可視光を生成するオキシルルシフェリンへのルシフェラーゼにより仲介される変換を駆動させ、この可視光はCCDセンサーで検出することができ、パイログラム中のピークとして見ることができる(Ronaghi, M., Uhlen, M., and Nyren, P, A sequencing method based on real-time pyrophosphate, Science; 1998b 281: 363-365)。生成した光シグナルは、取り込まれたヌクレオチドに直線的に比例する。

20

#### 【0047】

長時間(48時間)プロテイナーゼK消化法又はDNA easyキット(キアゲン社製)を用いて患者の組織サンプルからゲノムDNAを抽出することができる。パイロシーケンシングで使用するために、PAPP-A遺伝子用のPCRプライマー及びシーケンシングプライマーを設計することができる。PCR産物は、ストレプトアビジン-セファロースに結合させ、精製、洗浄され、NaOH溶液を用いて変性され、再度洗浄され得る。次いで、パイロシーケンシングプライマーを一本鎖PCR産物にアニーリングさせ、反応を、例えばPyroMark IDシステム(キアゲン社製)をメーカーの取扱説明書に従って用いて行うことができる。

30

#### 【0048】

挿入/欠失及びフレームシフト変異を検出するために利用可能な他の方法としては、big dye terminatorシーケンシング、次世代シーケンシングシステム、及びキャピラリー/マイクロチップベースの電気泳動を用いたヘテロ二本鎖分析が挙げられる。

#### 【0049】

本発明の別の方法では、患者乳房組織サンプル中のPAPPAの存在(又は非存在)又はレベルを決定する必要がある。これは、タンパク質レベルを決定することにより又はタンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを調べることによりなされ得る。本発明において、「発現レベル」という用語は、乳房組織サンプル中の指定されたタンパク質(又はタンパク質をコードするmRNA)の量を指す。その後、発現レベルは対照と比較される。対照は、癌を有さないことが知られている人の組織サンプルであってもよく、あるいは基準値であってもよい。対照と試験サンプルの発現レベルを比較することで、試験サンプル及び対照中の発現レベルが同様であるか異なっているか、したがって患者が浸潤性乳癌のリスクを有するかどうかを決定することができることは当業者には明白である。

40

#### 【0050】

生物学的サンプル由来のタンパク質の発現レベルを測定する方法は当該技術分野で周知

50

であり、任意の好適な方法が用いられ得る。サンプル由来のタンパク質又は核酸を分析して発現レベルを決定することができ、好適な方法の例としては、半定量的方法、例えば組織又は細胞調製物中の mRNA を検出するための *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 蛍光法及び *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH)、並びにこれらの方法の変種；ノーザンブロッティング、並びに定量的 PCR 反応が含まれる。遺伝子発現レベルを検出するためのノーザンブロッティング技術又は定量的 PCR の使用は当該技術分野で周知である。定量的 PCR に基づく遺伝子発現解析用のキット、例えばキアゲン社製の Quantitect システムが市販されている。ハイブリダイゼーションに基づく核酸アレイシステムを用いた複数のサンプル中の発現レベルの同時解析が当該技術分野で周知であり、これも本発明の範囲内である。当業者に理解されるように、変異特異的 PCR を用いることもできる。

10

#### 【0051】

従来の抗 P A P P A 抗体を用いて、従来の免疫学的検出技術を用いて、乳房組織サンプル中の P A P P A レベルを決定することができる。P A P P A に対する特異性を有する抗体又はそのような抗体に結合する二次抗体は検出可能に標識され得る。好適な標識としては、限定されるものではないが、放射性核種（例えば、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、又は  $^{14}\text{C}$ ）、フルオロフォア（例えば、フルオレセイン、FITC、又はローダミン）、発光部分（例えば、カリフォルニア州パロアルトのクオンタムドット社 (Quantum Dot Corporation) から供給されている Qdot ナノ粒子）、又は酵素（例えば、アルカリホスファターゼ又は西洋ワサビペルオキシダーゼ）が含まれる。

20

#### 【0052】

P A P P A を検出するための免疫学的アッセイは、サンドウィッチアッセイ、例えば、(ELISA)、競合アッセイ（競合RIA）、ブリッジ免疫アッセイ (bridge immunoassay)、免疫組織化学 (IHC)、及び免疫細胞化学 (ICC) を含む種々のアッセイフォーマットで行うことができる。P A P P A を検出する方法は、患者サンプルを P A P P A に結合する抗体と接触させること及び結合を検出することを含む。P A P P A に対する特異性を有する抗体を従来の方法を用いて支持体材料上に固定することができる。表面プラズモン共鳴（ピアコア社、スウェーデン）を用いて支持体上の抗体への P A P P A の結合を検出することができる。抗 P A P P A 抗体は市販されている（例えば、シグマ アルドリッチ社の H P A 0 0 1 6 6 7、サーモサイエンティフィック社の M A 1 - 4 6 4 2 5 (5H9)、アビバシステムズバイオロジー社の O A S A O 3 2 0 8、及びダコ社の A O 2 3 0）。P A P P A の免疫検出は、その内容を参照により本明細書に援用する米国特許第 6 1 7 2 1 9 8 号にも開示されている。

30

#### 【0053】

乳房組織サンプル内の P A P P A の免疫組織化学的検出を可能にするために、ホルマリン固定及びパラフィン包埋された乳房組織切片を調製し、Super Frost ++ 帯電スライド上にマウントする。タンパク質消化によるエピトープ賦活化後、内因性ペルオキシダーゼ活性をクエンチし、切片を一次抗 P A P P A 抗体（例えばダコ社から入手可能）とインキュベートする。次いで、切片を、ポリマー連結二次抗体と、DAB 添加後の発色シグナルの現像を可能にするペルオキシダーゼと共に更にインキュベートすることにより、P A P P A タンパク質への一次抗体の結合を視覚的に検出することが可能になる。上記の免疫組織化学的方法は市販の免疫染色装置を用いて完全に自動化することができる。

40

#### 【0054】

従来の方法を用いて P A P P A タンパク質発現を分類することができ、例えば、以下のスコア化システムを用いて膜及び細胞質の染色強度を評価することができる：陰性 (0)、染色が観察されない；弱い陽性 (1+)、25% を超える細胞で膜/細胞質の知覚可能な染色がかすかに検出される/ほとんど検出されない；中程度陽性 (2+)、25% を超える細胞で弱い染色が検出される；強い陽性 (3+)、25% を超える細胞で強い膜/細胞質の染色が検出される。25% 未満の腫瘍細胞の局所的染色は 1+ と見なす。

50

## 【 0 0 5 5 】

比較的少数の P A P P A タンパク質の分析では、ウェスタンブロット又は E L I S A 等の定量的イムノアッセイを用いて乳房組織サンプル中のタンパク質の量（したがって発現レベル）を検出することができる。I H C 及び I C C 等の半定量的方法も用いることができる。

## 【 0 0 5 6 】

より多くのサンプルの同時分析にはタンパク質アレイが用いられ得る。タンパク質アレイは当該技術分野で周知であり、核酸アレイと同様に機能し、主に公知の固定化タンパク質（プローブ）を用いて目的のタンパク質を「捕捉」する。タンパク質アレイは複数の固定化されたプローブタンパク質を含む。アレイは、P A P P A に対する親和性を有するプローブタンパク質を含む。

10

## 【 0 0 5 7 】

あるいは、2次元ゲル電気泳動を用いて P A P P A の発現レベルを同時に分析することができる。この方法は当該技術分野で周知であり、多数のタンパク質を含むサンプルは通常、等電点電気泳動で1次元目に、サイズで二次元目に分離される。各タンパク質は得られたゲル上の固有の位置（「スポット」）に存在する。各スポット中のタンパク質の量、したがって発現レベルは、複数の技術を用いて決定することができる。好適な技術の例としては、ゲルの銀染色後のバイオ・ラッド社製 F X スキャナーを用いたスキャンニング及び M E L A N I E 3 . 0 ソフトウェア（ジーンバイオ社（GeneBio）製）を用いたコンピューター支援解析が挙げられる。あるいは、ディファレンスゲル電気泳動（D I G E）を用いて発現レベルを定量化することができる（Von Eggeling et al; Int. J. Mol Med. 2001 Oct; 8(4):373-7参照）。

20

## 【 0 0 5 8 】

典型的には、P A P P A が存在しない又は対照と比べて90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、又は20%未満のレベルで存在する場合、浸潤性乳癌に進行するリスク及び／又は再発性非浸潤性疾患のリスクがある。より典型的には、患者が浸潤性乳癌への進行リスク及び／又は再発性非浸潤性疾患を有する場合、P A P P A は対照の40～80%の量で存在する。最も典型的には、P A P P A は対照と比べて50～70%、例えば約60%のレベルで存在する。対照は正常乳房組織から得られた患者サンプル又は基準値であり得る。

30

## 【 0 0 5 9 】

本発明の第1の態様の方法は、典型的には、P A P P A が組織サンプル中に対照より低いレベルで存在するかどうかを確認するために行われる。P A P P A タンパク質は正常レベル又はそれに近いレベルで存在しているが、発現されるタンパク質が不活性である又は活性レベルが低減しているということも考えられる。したがって、本発明は、P A P P A の活性のモニタリングを包含する。この文脈において、P A P P A が対照と比べて存在する（又は低減したレベルで存在する）かどうかについての言及は、P A P P A の機能的活性を包含する。

## 【 0 0 6 0 】

P A P P A 活性は従来技術を用いて測定することができる。例えば、サンプル中の I G F B P - 4 タンパク質分解活性を調べることにより P A P P A 活性を決定することができる。P A P P A 活性を検出する方法が、その内容を参照により本明細書に援用する米国特許出願公開第2005/0272034号に開示されている。あるいは、変異特異的 P C R 分析により P A P P A 活性の消失を決定することもできる。

40

## 【 0 0 6 1 】

一実施形態では、P A P P A 活性はイムノプロットティングを用いたその基質 I G F B P - 4 のタンパク質切断のスクリーニングにより検出することができる。培地中に分泌された P A P P A は、I G F B P - 4 を補充した50mM T r i s (pH 7.5)等のバッファー中で培地サンプルをインキュベートすることにより検出することができる。次いで、サンプルをインキュベートし（例えば、37℃で4時間）し、I G B P 4 タンパク質に

50

対する市販の抗体を用いたイムノブロットングによりタンパク質分解生成物を検出することができる。

【0062】

あるいは、PAPPAに対する特異的抗体をマイクロタイタープレートのウェル中に固定化するELISA（酵素結合免疫吸着測定法）を用いてPAPPA活性を検出することができる。非結合タンパク質を洗い流した後、PAPPAとその抗体との間での特異的一次反応が起こり且つ結合したPAPPAが活性である場合にのみ発色性生成物を遊離する合成基質を用いてPAPPA活性を測定することができる。現像された色はマイクロプレートリーダーを用いて分光測定により定量化される。

【0063】

あるいは、PAPPAとその基質IGFBP-4との間の相互作用は、Biacore（表面プラズモン共鳴技術）又は蛍光偏光アッセイを用いて評価することもできる。これらの方法は、感度及び特異性が非常に高いという利点があり、ハイスループットアッセイに容易に適應させることができる。

【0064】

上記方法の対照として、タンパク質分解的に不活性な変異PAPP-Aタンパク質（E483Q）が用いられ得る。

【0065】

PAPPA活性は、浸潤性乳癌のリスクがある患者の組織サンプル中で対照と比べて20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超、又は90%超低減してよい。

【0066】

本発明の別の態様は、乳房組織サンプル中の細胞が有糸分裂中で停止しているかどうかを決定することに関する。本発明は、有糸分裂遅延表現型を同定することによる、乳房細胞が有糸分裂中で停止しているかどうかを決定するためのインビトロの方法を提供する。この表現型の同定は、患者から得られた組織サンプル中の前期又は前中期にある有糸分裂細胞の割合を同定すること及び予め定められたカットオフ値と比較することを含む。

【0067】

予め定められたカットオフ値は少なくとも30%、好ましくは少なくとも33%である。したがって、組織サンプル中の有糸分裂細胞の少なくとも30%が前期又は前中期にあるとして同定された場合、組織サンプル中に有糸分裂遅延表現型が同定される。予め定められたカットオフ値は、これより高く設定されてもよく、例えば少なくとも35%、40%、50%、60%、70%以上に設定されてもよい。

【0068】

分析が統計的に有意であるには、組織サンプル中の細胞の少なくとも5個が有糸分裂中でなければならない。これら5個の有糸分裂細胞の少なくとも30%が前期又は前中期にあるとして同定された場合、組織サンプルは有糸分裂遅延表現型を示すとして同定される。

【0069】

本発明の別の関連する態様では、患者から得られた乳房組織サンプル中の前期又は前中期にある有糸分裂細胞の割合を同定し、予め定められたカットオフ値と比較することにより、増殖性病変が浸潤性乳癌に進行するリスク及び/又は再発性非浸潤性疾患のリスクを判定するための診断を行うことができる。

【0070】

予め定められたカットオフ値は少なくとも30%、好ましくは少なくとも33%である。したがって、組織サンプル中の有糸分裂細胞の少なくとも30%が前期又は前中期にあるとして同定された場合、浸潤癌への進行リスク及び/又は再発性非浸潤性疾患のリスクがある。

【0071】

分析が統計的に有意であるためには、組織サンプル内の細胞の少なくとも5個が有糸分

10

20

30

40

50

裂中でなければならない。これら少なくとも5個の有糸分裂細胞の少なくとも30%が前期又は前中期にあるとして同定された場合、組織サンプルは有糸分裂遅延表現型であると見なされる。

【0072】

本発明の一態様では、有糸分裂遅延表現型が同定された場合、これは、浸潤性乳癌に進行する増殖性病変のリスク及び／又は再発性非浸潤性疾患のリスクがあることを示している。例えば、組織サンプル内の細胞の5個が有糸分裂中であるとして同定された場合、有糸分裂遅延表現型が同定されるため並びに／又は浸潤癌に進行する増殖性病変のリスク及び／若しくは再発性非浸潤性疾患のリスクが判定されるためには、これらの細胞の少なくとも2個が前期／前中期になければならない。より好ましくは、有糸分裂遅延表現型を示す患者に由来する乳房組織サンプル中の前期／前中期にある有糸分裂細胞の割合は33%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%超である。典型的には、有糸分裂中の非浸潤性健康乳房組織細胞の「対照」値は前期／前中期にある約10～25%、例えば23%の細胞である。

10

【0073】

組織サンプル中で有糸分裂中の細胞が5個より少なかった場合、前期／前中期にある有糸分裂細胞の割合の分析は、本発明の方法に従い有糸分裂遅延表現型の同定を可能にするのに十分な有意性がない。したがって、方法には、分析時に分析されている組織サンプル中に少なくとも5個の有糸分裂細胞があることが必要である。

20

【0074】

組織サンプルの細胞が前期又は前中期にあるかどうかの検出は、当該技術分野の従来の技術を用いて行うことができる。例えば、特異的抗体を用いた免疫検出技術がしばしば細胞の有糸分裂期を特徴解析するために用いられる。免疫組織化学(IHC)とは免疫検出技術であり、抗体-抗原相互作用を可視化することにより組織切片の細胞中の抗原を検出するプロセスを指す。これは、レポーター部分、好ましくはフルオロフォア等の視覚的レポーターで抗体をタグ化することにより(「免疫蛍光法」と命名されている)又は検出及び観察可能な発色反応を触媒できるペルオキシダーゼ等の酵素に抗体をコンジュゲートすることにより、達成される。

【0075】

H3S10リン酸化(H3S10ph)が有糸分裂の開始に必須な有糸分裂特異的修飾であり、ヒストンH3のセリン10のリン酸化は染色体の凝縮に重要である。H3S10phに特異的な抗体は市販されており(例えば、ミリポア社及びアクティブモチーフ社(Active Motif))、有糸分裂アッセイを行うためのキットも市販されている。

30

【0076】

したがって、本発明の更なる態様では、浸潤性乳癌に進行する増殖性病変のリスク及び／又は再発性非浸潤性疾患のリスクを判定するために免疫検出が用いられる。好ましくは、免疫検出はH3S10ph抗体を用いて行われる。

【0077】

有糸分裂の代替的マーカーも市販されており、本発明の方法に用いられ得る。当業者に理解されるように、有糸分裂の異なる期の特徴解析は当該技術分野で周知である。

40

【0078】

分析は、組織サンプルについて有糸分裂の種々の期の「スナップショット」が得られるように行うことができる。このようにすることで、有糸分裂期の分布分析が得られ、次いでこれを用いて前期又は前中期にある有糸分裂細胞の割合を特徴付けることができる。

【0079】

有糸分裂マーカー(H3S10ph等)の免疫組織化学的検出を可能にするために、ホルマリン固定及びパラフィン包埋した乳房組織切片を調製し、SuperFrost++帯電スライド上にマウントする。熱を介したエピトープ賦活化後、内因性ペルオキシダーゼ活性をクエンチし、切片を、有糸分裂細胞内の有糸分裂マーカー(リン酸化H3S10

50

等)を特異的に認識する一次抗体(好適なH3S10pH抗体が例えばミリポア社から入手可能)とインキュベートする。次いで、ポリマー連結二次抗体と、DAB添加後の発色シグナルの現像を可能にするペルオキシダーゼと共に切片を更にインキュベートすることにより、有糸分裂マーカーへの一次抗体の結合が視覚的に検出できる。上記の免疫組織化学的方法は市販の免疫染色装置を用いて完全に自動化することができる。

#### 【0080】

乳房組織サンプル、他の患者サンプル(例えば、乳頭吸引液)、又は培養細胞系中の有糸分裂期分布を分析するために、各サンプルから得られた少なくとも2つの連続切片及び各細胞系又は体液(例えば、吸引液)について少なくとも2つのサイトスピン調製物を前述のように免疫標識し、高倍率(拡大率400倍)の5~20個のフィールドの画像を取得し、各サンプルについて最低5個の有糸分裂細胞を用いて有糸分裂期分布を決定する。取得されたフィールド内の全ての有糸分裂細胞は、古典的形態基準に従い、染色体形態に基づいて前期/前中期、中期、後期、及び終期に分類することができる。有糸分裂細胞の少なくとも30%が前期/前中期にある場合、細胞集団を「遅延」として分類する。

10

#### 【0081】

本明細書に記載の方法のいずれかにより分析される乳房組織サンプルは、増殖性病変を示す患者から採取される。組織サンプルは、前浸潤性病変、例えば乳管上皮内癌(DCIS)、小葉上皮内癌(LCIS)、及び乳頭のパジェット病、並びに悪性度が不明の増殖性病変、例えば小葉新生物、小葉上皮内新生物、異型小葉過形成(ALH)、平坦型上皮異型(FEA)、異型乳管過形成(ADH)微小浸潤癌、乳管内乳頭新生物、及び葉状腫瘍等を含み得る。最も好ましくは、組織サンプルはDCISを示す。患者からサンプルを採取する方法(生検)は当業者に明らかである。

20

#### 【0082】

本発明の診断方法に加え、本発明は、乳癌の処置に使用するための、細胞中のPAPPA活性レベル/機能を置換する又は増大させることができる分子を提供する。例えば、PAPPAタンパク質、PAPPAを発現できる核酸、又はIGF受容体のアゴニスト(例えば、IGF-1)が、患者中のPAPPA抑制効果を相殺するために用いられ得る。生物中の部位にタンパク質又は核酸を送達する方法が周知であり、本発明中で用いられ得る。

30

#### 【0083】

DNAのメチル化はエピジェネティックな修飾であり、細胞のPAPPA発現及び正常な有糸分裂進行が可能になるように逆転させることができるので、脱メチル化薬が、有糸分裂細胞の分裂を促進するための魅力的な治療選択肢である。したがって、抑制がPAPPA DNAのハイパーメチル化により生じている場合、治療薬は以下のものであり得る：

- i . PAPPA遺伝子又は制御若しくはプロモーター配列のメチル化を逆転させることができる分子；
- ii . メチル基に競合的に結合する及び/又はシトシンのメチル化を防止する部分を含む薬剤(すなわち、DNAメチル化の阻害剤)；
- iii . DNAメチルトランスフェラーゼ(DMT)のアンタゴニスト/阻害剤；又は
- iv . CPGアイランドを含むPAPPA遺伝子プロモーター領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド。

40

#### 【0084】

PAPPAプロモーター上のCpG部位のメチル化又は脱メチル化に関連する及び/又は影響を与えるこれらの薬剤の1つ、複数、又は全てが本発明に係る治療薬として用いられ得る。アンタゴニスト又は阻害剤は、標的生物活性に拮抗する又はこれを阻害することができる任意の分子であり得る。したがって、アンタゴニスト又は阻害剤は、例えば小分子、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、オリゴヌクレオチド、脂質、炭水化物、ポリマー等であり得る。

#### 【0085】

50

好適な脱メチル化薬としては、デシタピン（５ - アザ - ２' - デオキシシチジン）、ファラザピン、アザイチジン（５ - アザシチジン）、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（ヒドロキサム酸等（例えば、トリコスタチンＡ）、環状テトラペプチド（例えば、トラボキシシンＢ）、デプシペプチド、ベンズアミド、求電子ケトン、脂肪族系酸化合物（例えば、フェニルブチラート及びバルプロ酸）、ヒドロキサム酸（例えば、ポリノスタット、ペリノスタット、及びパノビノスタット）、及びベンズアミド）、及びフェニルブチラートが含まれる。

【００８６】

好適な脱メチル化薬をＰＡＰＰＡ遺伝子又はプロモーター配列にターゲティングすることが可能であり、そのための化合物は本発明の範囲に含まれる。

10

【００８７】

脱メチル化剤は、任意の送達方法、例えば全身投与により送達され得る。送達は患者の乳管への管内送達であってもよい。乳管への送達は、例えば、カテーテル又はカニューレ等の送達ツールを用いて、好適な溶媒又は溶液中の脱メチル化剤を注入して標的管上皮細胞に接触させることによりなされ得る。薬剤の量は異なり得るが、管中の全ての異型細胞を標的化するのに十分な量であり、標的管上皮細胞中で発現されるＰＡＰＰＡプロモーター上のＤＮＡメチル化を阻害又は逆転するのに十分な量である。

【００８８】

本発明は従来の化学療法薬の投与も可能とし、これらの有効性を増大させる。例えば、多くの化学療法薬が、有糸分裂中の細胞に作用し、前期／前中期に続く有糸分裂期にある細胞に特異的に作用する。これらは、癌細胞が有糸分裂中に停止している場合にはさほど有効でない。癌細胞の有糸分裂の進行を可能にすることができる薬剤を投与することにより、従来の化学療法薬が細胞に作用できるようになる。したがって、癌細胞は、有糸分裂不活性による薬物処置の回避ができない。有糸分裂ブロックを解除させた後に投与され得る好適な化学療法薬としては、タキサン（タキソール）及びビンカルカロイド（例えば、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビンデシン、及びビノレルビン）が含まれる。

20

【００８９】

本発明の更なる態様は、患者の乳癌を処置又は防止する治療レジメン（又は治療方法）を提供する。レジメンは、２つの薬物、すなわち有糸分裂が遅延している癌細胞を解除し、前期、前中期、中期、後期、終期、及び細胞質分裂の正常な通過を促進する第１の薬物；及び化学療法剤、好ましくは前期／前中期より後の有糸分裂を標的とする化学療法剤である第２の薬物、の逐次投与を含む。

30

【００９０】

本発明のこの態様は、前期／前中期で停止した（本明細書中では「有糸分裂ブロック」と呼ぶ）有糸分裂中の乳房細胞が、前期／前中期より後の有糸分裂期の分裂細胞に対する活性を有する化学療法剤に対して感受性でないという観察結果に基づく。したがって、有糸分裂ブロックから有糸分裂細胞を解除する薬物を最初に患者に投与することにより、細胞は正常な有糸分裂サイクル（すなわち、前期／前中期から中期、後期、終期（及び細胞質分裂））を進行でき、それにより、その後／逐次投与される化学療法剤に感受性になる。

40

【００９１】

第１の薬物はＰＡＰＰＡタンパク質、機能的ＰＡＰＰＡをコードする核酸、ＩＧＦ受容体アゴニスト（例えば、ＩＧＦ - １）、又は脱メチル化剤であり得る。第２の薬物は、増殖中の細胞に影響を与える任意の薬物であり得、好ましくは、前中期より後の有糸分裂を標的とする抗有糸分裂化学療法剤である。好ましくは、第２の薬物はタキサン及びビンカルカロイドを含む群から選択される。

【００９２】

「逐次」という用語は、第１及び第２の薬物がある特定の順序でそれらのそれぞれの生物学的効果を発揮しなければならないことを意味すると理解される。第１の薬物の投与の効果は、有糸分裂ブロックを解除することにより有糸分裂が前中期を超えて進行できるよ

50

うにし、第2の薬物が前期/前中期後の有糸分裂を標的とするウィンドウ・オブ・オポチュニティを開くことである。第1及び第2の薬物は、第1の薬物が第2の薬物より前に効果を現せば、同時投与されても逐次投与されてもよい。例えば、一緒に投与される場合、第2の薬物は、有糸分裂ブロックが解除された後にだけ活性であるように遅延放出形態であり得る。

【0093】

第1及び第2の薬物を投与する前に、本発明の治療レジメンに係る処置に患者が反応性でありそうかどうか決定することが好ましい。

【0094】

一実施形態では、本発明の治療レジメンに係る処置の好適な患者候補は、患者から得られた乳房組織サンプル内の有糸分裂細胞の有糸分裂が遅延しているかどうかを決定する（すなわち、患者が有糸分裂遅延表現型を示すかどうかを決定する）ことにより同定される。したがって、一実施形態では、治療レジメンは、(i)患者から得られた乳房組織サンプル中の前期又は前中期にある有糸分裂細胞の割合を同定すること；及び(ii)予め定められたカットオフ値と比較すること；により患者の有糸分裂表現型を同定する最初のステップを含む。前期又は前中期にある細胞の割合がカットオフ値より大きい場合、有糸分裂遅延表現型が同定される。カットオフ値は、好ましくは前述したように乳房組織サンプル内の有糸分裂細胞の少なくとも30%、より好ましくは少なくとも33%である。これも前述したように、結果が統計的意義があるために組織サンプルは少なくとも5個の有糸分裂細胞を含まなければならない。

10

20

【0095】

別の実施形態では、治療レジメンは、患者から得られた乳房組織サンプル中のPAPPA遺伝子又はその制御若しくはプロモーター配列中における機能喪失に関連する遺伝子変化あるいはPAPPAの消失を検出することによる、患者が治療レジメンに係る処置に好適な候補であるかどうかを同定する最初のステップを含む。遺伝子変化が存在する場合、患者は本発明の治療レジメンに係る処置の好適な候補であるとして同定される。好ましくは、PAPPA遺伝子又はその制御若しくはプロモーター配列中の機能喪失に関連する遺伝子変化あるいはPAPPAの消失はメチル化によるものである。

【0096】

好ましい実施形態では、患者は、本発明の方法に従って浸潤性乳癌のリスクがあるとして同定され、その後、本明細書に記載の治療的適用又はレジメンの1又は複数を用いて処置される。

30

【0097】

本発明は更に、乳癌の浸潤性を低減するための処置を想定する。前述したように、PAPPA抑制により有糸分裂中に停止した癌細胞は浸潤能を獲得することができる。有糸分裂ブロックを解除することにより、細胞の浸潤能が低減した。これは患者に治療上の利点をもたらす。

【0098】

更に別のアプローチでは、好適な発現技術を用いて内因性PAPPAをコードする遺伝子の発現をアップレギュレートすることができる。公知の技術としては、内因性遺伝子を人工的代替物で置換する遺伝子コンストラクトの使用が含まれる。あるいは、プロモーター又はコントロール配列を内因性遺伝子上流に挿入してもよい。これは従来の方法を用いて行うことができる。

40

【0099】

本発明は更に、PAPPAをアップレギュレートする化合物を検出するためのスクリーニング法で使用するための、メチル化PAPPA遺伝子プロモーターを含む乳房細胞系を提供する。細胞は乳癌細胞又は非浸潤性異常乳房細胞であり得る。スクリーニング法は、細胞を潜在的治療剤と接触させること及び潜在的治療剤が細胞中のPAPPAをアップレギュレートするかどうかを決定することを含み得る。潜在的治療剤は、例えば脱メチル化剤であり得、又は細胞内でPAPPAを発現する核酸コンストラクトであり得る。

50

## 【0100】

本発明は更に、制御配列に作動可能に連結された機能的PAPPA発現核酸を含む、乳癌の処置で用いるための単離された遺伝子コンストラクトを提供する。そのようなコンストラクトは、当業者に理解されるように、従来の技術を用いて作製することができる。PAPPA遺伝子及びプロモーター配列は公知であるので、当業者は好適なコンストラクトの作製方法を容易に知ることができる。PAPPA mRNA配列はNCBIアクセッション番号NM\_002581.3で同定され、タンパク質配列はNCBIアクセッション番号NP\_002572.2で同定される。NCBIデータベース上又はMitochondriaデータベース(www.mitochondria.org)上でヒト又は他の種におけるホモログを見出すことができる。

10

## 【0101】

本発明に係る治療薬及び診断薬は乳癌の治療及び診断に有用である。

## 【0102】

PAPPA又は他の治療活性薬剤は好適な医薬キャリアと組み合わせて製剤化され得る。そのような製剤は、治療有効量のタンパク質(又は他の剤)、及び薬学的に許容されるキャリア又は補形剤を含む。そのようなキャリアとしては、限定されるものではないが、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、及びこれらの組合せが含まれる。製剤は投与形態に適しているべきであり、当該技術分野の技能の範囲内である。本発明は更に、本明細書に記載の組成物の材料の1又は複数が詰められた1又は複数の容器を含む医薬パック及びキットに関する。

20

## 【0103】

本発明のタンパク質及び他の化合物は、単独で用いてもよく、治療化合物等のその他の化合物と併用してもよい。

## 【0104】

医薬組成物の全身投与の好ましい形態は、典型的には静脈内注射による、注射を含む。他の注射経路、例えば皮下、筋肉内、又は腹腔内を用いることもできる。全身投与のための別の手段としては、浸透剤、例えば胆汁酸塩、フシジン酸、又は他の界面活性剤を用いた経粘膜及び経皮投与が含まれる。更に、腸溶性又はカプセル化された製剤として適切に製剤化された場合、経口投与も可能であり得る。

## 【0105】

必要な投与量範囲は、タンパク質(又は他の活性物質)の選択、投与経路、製剤の性質、対象の状態の性質、及び主治医の判断によって決まる。しかし、好適な投与量は、対象1kg当たり0.1~100µgである。しかし、様々な化合物が利用可能であり、種々の投与経路の効率が異なるため、必要な投与量の広い変動が予想される。例えば、経口投与は、静脈内注射による投与より多くの投与量が必要であると予想される。これらの投与量レベルの変動は、当該技術分野でよく理解されているように、最適化のための標準的な実験ルーチンにより調整することができる。

30

## 【0106】

前述したように「遺伝子治療」と呼ばれることの多い処置様式では、処置に用いられるタンパク質が対象の内部で生成してもよい。したがって、例えば、対象由来の細胞が、例えばレトロウイルスプラスミドベクターを用いて、タンパク質をコードするDNA又はRNA等のポリヌクレオチドで生体外で改変され得る。その後、細胞は対象に導入される。

40

## 【0107】

医薬組成物は、ヒト医学及び獣医学においてヒト又は動物に使用されるものであり得、典型的には、薬学的に許容される希釈剤、キャリア、又は補形剤の1又は複数を含む。治療で使用するための許容可能なキャリア又は希釈剤は製薬分野で周知であり、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)に記載されている。医薬的キャリア、補形剤、又は希釈剤は、意図する投与経路及び標準的な医薬実務に関連して選択することができる。医薬組成物は、キャリア、補形剤、又は希釈剤として、又はそれに加えて、任意の好適な結合剤、滑沢剤、懸濁化剤、コーティン

50

グ剤、可溶化剤を含み得る。

【0108】

保存剤、安定化剤、色素、及び更には着香料が医薬組成物に付加され得る。保存剤の例としては、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、及びヒドロキシ安息香酸のエステルが含まれる。抗酸化剤及び懸濁化剤も用いられ得る。

【0109】

種々の送達系に応じて組成物／製剤に対する要求は様々であり得る。

【0110】

適切な場合、医薬組成物は、非経口的に、例えば静脈内、筋肉内、又は皮下に注射され得る。非経口投与では、組成物は、他の物質、例えば溶液を血液と等張にするのに十分な塩又は単糖類を含んでよい無菌水溶液の形態で用いられ得る。

10

【0111】

以下に非限定的な例を用いて、添付の図面を参照して本発明を説明する。

【実施例】

【0112】

方法

組織標本

ホルマリン固定及びパラフィン包埋された組織を、UCLの病理学部 (Department of Pathology) (UCL病院、英国、ロンドン) のアーカイブから取得し、これには以下が含まれた：浸潤性乳癌 (n = 182、このうち156例を有糸分裂期分布の分析に含めた)；乳管上皮内癌 (DCIS；n = 81、69例が評価可能)；乳房縮小術標本に由来する正常乳房組織 (n = 33、評価可能性、不適)；妊娠患者に由来する正常乳房組織 (n = 5、全て評価可能)；結腸腺癌 (n = 41、全て評価可能)；膀胱移行上皮癌 (n = 27、全て評価可能)；陰茎扁平細胞癌 (n = 33、全て評価可能)；胃腺癌 (n = 21、全て評価可能)；悪性黒色腫 (n = 21、全て評価可能)；小細胞肺癌 (n = 30、全て評価可能)；及び非ホジキンリンパ腫 (n = 29、全て評価可能)。利用可能な組織学的材料及び臨床病理学的情報に基づいて症例を選択した。組織標本は、診断時に資格を有する病理学者に検査され、世界保健機関 (WHO) の基準に従って組織学的サブタイプ及び核異型度を評価されたものである。標本上に少なくとも5個の有糸分裂細胞が見られた場合、症例は有糸分裂期分布の分析に評価可能とした。Joint UCL/UCLH Committees on the Ethics of Human Researchから倫理的承認を得た。

20

30

【0113】

サイトスピン調製物

細胞単分子層を調製するために、 $0.5 \times 10^6$  個の細胞を、Cytospin 4 cytocentrifuge (サーモサイエンティフィック社製) を用いて  $800 \times g$  で5分間スライドガラス上にサイトスピンし、風乾し、4%中性緩衝ホルマリン中で一晚固定した。

【0114】

抗体

28日間の免疫化プロトコール (ユーロジェンテック社 (Eurogentec) ) に従ってPAPP-Aウサギポリクローナル抗体 (PAPP-A PAAb) を合成ペプチド (aa1384~1399) に対して産生させた。使用したその他の抗体には、ミリポア社のセリン10でリン酸化されたヒストンH3 (H3S10ph；06-570)、ダコ社のPAPP-A (A0230)、シグマ社のβアクチン (AC-15)、BDファーマンゲン社のCD29 (HUTS-21)、ケミコン社のβ1-インテグリン (MAB1959)、及びインビトロジェン社のAlexa Fluor 594が含まれる。

40

【0115】

免疫組織化学

切片の脱パラフィン、抗原賦活化、及び免疫染色はBond III Autostainer及びBond Polymer Refine Detectionキット (ラ

50

イカ社製)をメーカーの指示書に従って用いて行った。熱を介した抗原賦活化及びタンパク質消化をそれぞれH3S10ph及びPAPPA抗原に用いた。以下の希釈で一次抗体を40分間アブライした:PAPPA-A、1/200;H3S10ph、1/4000。脱パラフィンステップのない同じプロトコールでサイトスピン調製物を免疫染色した。一次抗体なしのインキュベーションを陰性対照とし、扁桃腺及び胎盤の切片をそれぞれH3S10ph及びPAPPA抗体の陽性対照として用いた。

#### 【0116】

##### 有糸分裂期分布分析

各組織サンプルに由来する2つの連続切片及び各細胞系につき2つのサイトスピン調製物を、有糸分裂期分布を分析するためにH3S10phについて免疫染色した。拡大率400倍の5~20個のフィールドから得られた最低5個の有糸分裂細胞をCV12 CCDカメラ及びイメージキャプチャーソフトウェア(image capturing software: SIS)を用いて取り込んだ。標本上の有糸分裂細胞が5個未満であった場合、症例を分析から除外した。従来の形態学的基準に従って有糸分裂細胞を前期/前中期、中期、後期、又は終期に分類した。

#### 【0117】

##### 組織解剖

組織切片を脱パラフィンし、マイヤーヘマトキシリンで5秒間染色し、風乾した。拡大率100倍のフィールドを針頭微解剖(needle micro-dissect)し、1mg/mlのプロテイナーゼK(シグマ アルドリッチ社製)55µl中、55で48時間インキュベートした後、ゲノムDNAを抽出した。

#### 【0118】

##### DNAメチル化分析

浸潤性乳癌(n=182)、DCIS(n=81)、及び正常乳房(n=34)の細胞系及び症例に由来するゲノムDNAをMethyLight分析(Widschwendter, M. et al. Cancer research (2004) 64, 3807-3813)に用いた。浸潤性乳癌の9例、DCISの6例、及び正常乳房の4例はDNA抽出に十分な材料が標本上に見られなかったため分析から除外した。NanoDrop分光測定法によりDNA濃度を決定し、参照遺伝子を用いたqPCRによりDNAの品質を検証した。全ての乳房サンプルの平均遺伝子増幅は34.39サイクル(SD=2.07)と算出された。全てのサンプルについて、EZ DNA Methylation-Goldキット(ザイモリサーチ社(Zymo Research)製)をメーカーの指示書に従って用いて400ngのゲノムDNAをバイサルファイトで改変した。非改変SssI処理ゲノムDNA(ニュー・イングランド・バイオラボ社製)を陽性対照として用いた。バイサルファイト改変DNAは使用時まで-80で保存した。MethyLightを用いた定量的PCR分析を全てのサンプルに行った。MethyLightのプライマー及びプローブのヌクレオチド配列は、目的の遺伝子のプロモーター又は5'末端領域中に設計した。特異的座位での各MethyLight反応は平均5~10個のCpGジヌクレオチドをカバーした。分析した全座位のプライマー及びプローブ(メタビオン社(Metabion)製)の詳細なリストを表1及び2に示す。バイサルファイト改変DNAに特異的に設計された2セット(目的の遺伝子用及びインプットDNAを標準化するための参照遺伝子(COL2A1)用のメチル化セット)のプライマー及びプローブを各座位に用いた。SssI処置ヒト白血球細胞DNA(高度にメチル化されている)を用いてメチル化DNAに対する反応の特異性を別個に確認した。サンプルの目的の遺伝子:COL2A1比をSssI処理ヒト白血球細胞DNAの目的の遺伝子:COL2A1比で割り、100を乗じることにより、特異的座位で完全にメチル化されている分子のパーセンテージ(PMR;メチル化基準に対するパーセンテージ)を計算した。

#### 【0119】

##### 細胞培養

BT549、T47D、BT474、MDAMB157、MDAMB453、MCF1

10

20

30

40

50

0 A、ヒト乳房上皮細胞 (HMEpC) はRodriguez-Acebes et al, Am. J. Pathol, 2010; 177:2034-2045に記載されているように培養した。HeLa Kyoto細胞は、10% FCS (インビトロジェン社製) を補充したDMEM (インビトロジェン社製) 中、37℃、5% CO<sub>2</sub> で培養した。

【0120】

細胞の同調

二重チミジンブロック (シグマ社) によりHeLa Kyoto細胞をS期で同調させた。簡潔に述べると、終濃度3 mMのチミジンを培養培地に18時間添加した後、新鮮な培養培地に9時間放出し、3 mMチミジンを用いて2回目のブロックを17時間行った。終濃度5 ng/mlのPlk1阻害剤BI2536 (セレックテム社製) で24時間処理することによりHeLa Kyoto細胞をM期で同調させた。細胞の同調をフローサイトメトリーで確認した。

【0121】

【表1】

表1. MitoCheck 候補遺伝子についてのCpGアイランドの位置

| 遺伝子 <sup>a</sup> | 遺伝子座                                  | CpGアイランドの位置 <sup>b</sup> | CpGアイランドの長さ(bp) | CpGアイランド中のCG(数) | CpGの観測値/CpGの期待値 | GC含量(%) |
|------------------|---------------------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------|
| PLK1             | chr16:23,590,521-23,616,371 (16p12.1) | 23597103 - 23598423      | 1320            | 88              | 0.768           | 60.6    |
| TPX2             | chr20:29,751,378-29,892,452 (20q11.2) | 29790413 - 29791269      | 856             | 48              | 0.823           | 55.0    |
| KIF111           | chr10:94,327,431-94,420,670 (10q23.3) | 94341250 - 94341728      | 478             | 38              | 1.052           | 55.0    |
| KIF112           | chr10:94,327,431-94,420,670 (10q23.3) | 94341912 - 94343451      | 1539            | 89              | 0.793           | 54.3    |
| PAPP-A           | chr9:117,893,759-118,266,552 (9q33.1) | 117955868 - 117957241    | 1373            | 115             | 0.852           | 64.5    |
| SGOL1            | chr3:20,177,087-20,202,687 (3p24.3)   | 20176596 - 20177594      | 998             | 65              | 0.876           | 55.0    |
| PSMD8            | chr19:43,557,030-43,566,304 (19q13.2) | 43556706 - 43558018      | 1312            | 81              | 0.747           | 59.4    |
| TUBB2C           | chr9:139,255,532-139,257,980 (9q34)   | 139254197 - 139256673    | 2476            | 225             | 0.817           | 67.3    |

<sup>a</sup> ヒトゲノム解析機構の遺伝子名

<sup>b</sup> DNA配列はgenome.ucsc.eduを用いて得た。CpGアイランドの位置は、cpgislands.usc.eduを用いて同定した。

【0122】

10

20

30

【表 2】

表2. Methylation反応に用いたプライマー及びプローブ

| 遺伝子          | フォワードプライマーの塩基配列5'-3'                      | リバースプライマーの塩基配列5'-3'                     | プローブの塩基配列5'-3'                                                |
|--------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| KIF11        | CGACGTTGTATGTTGGGATT SEQ ID NO. 1         | CGCAACGAACGATAACATCTCA SEQ ID NO. 2     | 6-FAM-AACTACGCAACATCCGCCG-BHQ-1 SEQ ID NO. 3                  |
| PAPPA (I)    | GCGTCGAGGTTTTTAAAGTTGGTA SEQ ID NO. 4     | CCCAACTCCAAACCCGCATAT SEQ ID NO. 5      | 6-FAM-CCCTACACCCGCCACCGAA-BHQ-1 SEQ ID NO. 6                  |
| PAPPA (II)   | GCGTGTGTTGTCGAGAGTTGT SEQ ID NO. 7        | CGCCTTCGGAATATACCAATT SEQ ID NO. 8      | 6-FAM-TCGCCCCGAATATCTCTACGCGCT-BHQ-1 SEQ ID NO. 9             |
| PLK1 (I)     | GTTCCGGCGTTCGTGTTAAT SEQ ID NO. 10        | GCCGCGCAACACCATAA SEQ ID NO. 11         | 6-FAM-CCCTACGCAACAAACCTTTAAACCG-BHQ-1 SEQ ID NO. 12           |
| PLK1 (II)    | GGTTTATCGCGAAAGAGATT SEQ ID NO. 13        | CGACCCCGCACATAACG SEQ ID NO. 14         | 6-FAM-CCGACTAGTAAATCCACTAAACCT-BHQ-1 SEQ ID NO. 15            |
| PLK1 (III)   | CGCGTTTCGTGTTAGATTGAG SEQ ID NO. 16       | AAAAACCCGCGCCCTAATA SEQ ID NO. 17       | 6-FAM-CTTCCACGACTCACCCTAACCTG-BHQ-1 SEQ ID NO. 18             |
| TPX2         | TGGCGATAGGATTTTGTGTA SEQ ID NO. 19        | GACAACCTCCCGCAACTCTTT SEQ ID NO. 20     | 6-FAM-TTTCCTCCGTTTCCCGAAGAA-BHQ-1 SEQ ID NO. 21               |
| TUBB2C       | AACGACGCGCAAAATACTACA SEQ ID NO. 22       | CGTTTGTGTAATTTTCGAGATTAGC SEQ ID NO. 23 | 6-FAM-CCGACGCTCCGCCAAGCTTA-BHQ-1 SEQ ID NO. 24                |
| SGOL1        | CGCACATTCGCTCAATCC SEQ ID NO. 25          | CGTCGAGATTCGATCGTAGGTT SEQ ID NO. 26    | 6-FAM-CATCGGAACATCCACCTAACCTAAACG-BHQ-1 SEQ ID NO. 27         |
| PSMD8        | TTCGTCGGGTAAGCGTTTGTA SEQ ID NO. 28       | GCGACCGCCATCTTACGTAA SEQ ID NO. 29      | 6-FAM-CGGCGTTGTCGTAATAGGCGGTT-BHQ-1 SEQ ID NO. 30             |
| COL2A1 (mod) | TCTAACAAATTATAAATCCAAACCAAA SEQ ID NO. 31 | GGAAGATGGGATAGAGGGAATAT SEQ ID NO. 32   | 6-FAM-CCCTTCTTCTTAACCAATACCTATCCACCTCTAAA-BHQ-1 SEQ ID NO. 33 |
| COL2A1 (gen) | TCCGTAAAGTGCAGCTTCTTTTG SEQ ID NO. 34     | TGGAGCCCCACAACCTGTCAGA SEQ ID NO. 35    | 6-FAM-CAAAGTACAGAGTCAAGAGTTCCAAAGCCACAGA-BHQ-1 SEQ ID NO. 36  |

a ヒトゲノム断片断の遺伝子名

10

20

30

40

【 0 1 2 3 】

細胞集団増加評価及び細胞周期分析

細胞増殖評価及びフローサイトメトリーによる細胞周期分析はRodriguez-Acebes et al , Am. J. Pathol, 2010; 177:2034-2045に記載されている通りに行った。

【 0 1 2 4 】

R N A 干渉

P A P P A m R N A を標的とする特異的 R N A 二本鎖 ( アンピオン社の s 1 0 0 4 2

50

；センス5' - G A G C C U A C U U G G A U G U U A A t t - 3' (配列番号37) 及びアンチセンス5' - U U A A C A U C C A A G U A G G C U C t g - 3' (配列番号38)、あるいは二本鎖のプール(ON TARGETplus SMARTpool、Dharmacon社製)を用いたRNAiによりPAPPAのサイレンシングを行った。非標的化siRNA(Stealth RNAi Negative Control Med GC、インビトロジェン社製)を陰性対照として用いた。全てのトランスフェクションはLipofectamine 2000(インビトロジェン社製)を用いて行った。終濃度100nMのPAPPA siRNAを用いて効率的なノックダウンを達成した。トランスフェクション後の記載の時点で細胞を回収した。qRT-PCR及び/又はウェスタンブロットによりノックダウン効率を評価した。

10

#### 【0125】

##### リアルタイムPCR

Tudzarova et al, EMBO J., 2010; 29:3381-3394に記載されているように、細胞から全RNAを単離し、100ngの全RNAを用いてqRT-PCRを行った。プライマー配列は以下の通りである：PAPPAフォワード5' - A C A G G C T A C G T G C T C C A G A T - 3' (配列番号39) 及びリバー5' - C T C A C A G G C C A C C T G C T T A T - 3' (配列番号40)；RPLPO(インバリアント対照として使用されるリボソームタンパク質)フォワード5' - C C T C A T A T C C G G G G G A A T G T G - 3' (配列番号41) 及びリバー5' - G C A G C A G C T G G C A C C T T A T T G - 3' (配列番号42)。

20

#### 【0126】

##### 免疫蛍光

免疫蛍光では、HeLa Kyoto細胞をカバースリップ(12mm #1 VWRインターナショナル社製)上で成長させ、前述したように同調させた。同調させた細胞をPBSですすぎ、1%PFA中で固定し、0.1%トリトンX-100/0.02%SDSを用いて透過処理し、2%BSA中でブロックした。ブロックステップ後、ホスホヒストンH3(H3S10ph)抗体を1/500希釈で1時間アブライシ、PBSで3回洗浄した後、Alexa Fluor 594抗体を1/300希釈で1時間添加した。カバースリップをPBSで3回洗浄し、減衰しないDAPIの入ったVectashield(ベクターラボラトリーズ社製)を用いてマウントした。

30

#### 【0127】

##### 細胞集団増加評価及び細胞周期分析

細胞増殖評価及びフローサイトメトリーによる細胞周期分析は上記のRodriguez-Acebesに記載されているように行った。

#### 【0128】

##### T47D細胞中におけるPAPPA及びZMPSTE24過剰発現

PAPPA及びZMPSTE24(対照)はメトジンシンスーパーファミリーの亜鉛依存性メタロプロテイナーゼである。全長ヒトPAPPA cDNA(NM\_002581.3)及びZMPSTE24 cDNA(NM\_005857.2)をpCMV6-XL5ベクター(オリジーン社製)にクローニングした。T75フラスコ中で培養した約 $2 \times 10^6$ のT47D細胞を40µgのPAPPA又はZMPSTE24 cDNAでトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後及び72時間後に細胞を回収した。qRT-PCR及びウェスタンブロットによりPAPPA及びZMPSTE24発現レベルを決定した。

40

#### 【0129】

##### RNAiレスキュー実験

2つの異なるPAPPA siRNA(アンピオン社のs10042及び104028)の標的となる領域内のヒトPAPPA cDNA(NM\_002581.3)の2つの別個の部位に8個のサイレント変異を導入した。変異cDNAをpCMV6-XL5ベクター(オリジーン社製)にクローニングし、BT549細胞を20µgのPAPPAレ

50

スキューラスミドでトランスフェクトした。PAPPA + <sup>m u t</sup> 過剰発現の24時間後に、100 nMのPAPPA特異的 siRNA (アンピオン社の s10042 又は104028) を用いて内因性 mRNA をノックダウンした。内因性 mRNA ノックダウンの48時間後に細胞を回収した。

#### 【0130】

##### 浸潤アッセイ

細胞外マトリックス (ECマトリックス) を介した浸潤を Boyden chamber アッセイ (QCM Invasion Assay、ミリポア社製) をメーカーの指示書に従って用いて測定した。簡潔に述べると、無血清培地中で24時間、PAPPA ON-TARGETplus SMARTpool 又は対照オリゴでBT549細胞をトランスフェクトした。T47D細胞をPAPPA又はZMPSTE24発現コンストラクトで24時間トランスフェクトした後、無血清培地中で24時間飢餓状態にした。5% BSAを含むRPMI培地中にBT549及びT47D細胞を回収し、カウントし、 $2.5 \times 10^5$  細胞を各浸潤チャンバー中に播種した。48時間 (BT549) 又は72時間 (T47D) インキュベートした後、浸潤チャンバーインサートをPBSで洗浄し、4% パラホルムアルデヒド中で5分間固定し、0.1% クリスタルバイオレットで染色し、フィルター上のランダムな領域に由来する細胞をカウントした。アッセイは3連で行った。

#### 【0131】

##### β1 - インテグリンの細胞表面発現

(Rizki, A. et al., J. Cancer research (2007) 67, 11106-11110に記載されているように) 生きた細胞を懸濁液中で免疫染色し、2% PFA中で固定し、Rodriguez-Acebes et al, Am. J. Pathol, 2010; 177:2034-2045に記載されているようにFACSを行った。蛍光ピークを中央値の値で評価し、一次抗体 (抗CD29 HUTS-21、BDファニングゲン社製) と一緒にインキュベートしなかったサンプルを用いて補正した。β1 - インテグリンをマスキングするために、浸潤アッセイの間、 $20 \mu\text{g/ml}$  のブロックング抗体 (抗β1 - インテグリンMAB1959、ケミコン社製; Vincourt, J. B. et al. (2010) Cancer research 70, 4739-4748) を培養培地に加えた。

#### 【0132】

##### 統計解析

前悪性及び悪性組織の各標本について前期 / 前中期にある有糸分裂細胞の割合を計算した。種々の最低数の有糸分裂細胞について、前期 / 前中期にある細胞の割合を用いて (プールされた) 他の悪性腫瘍に由来する分化中の乳癌の受信者動作特性 (ROC) 曲線を作製した。最低必要数をたった5個の有糸分裂細胞とすることでROC曲線が損なわれないことが明らかになった (図3)。可能な限り多くの標本を用いるために、有糸分裂遅延の分析の評価可能性閾値は、標本1個当たりに観察される有糸分裂細胞少なくとも5個に設定した。有糸分裂細胞の少なくとも3分の1が前期 / 前中期にあった場合、標本を「遅延」とした。この条件は、乳癌と他の悪性腫瘍との区別に関する感度と特異性のバランスをとることにより導かれた: 評価可能な乳癌標本の94.9%で有糸分裂細胞の少なくとも3分の1が前期 / 前中期にあり、評価可能な他の悪性腫瘍の94.1%で前期 / 前中期にある有糸分裂細胞が3分の1未満であった (図4)。ピアソンのカイ二乗検定及びイエーツの連続補正を用いて、有糸分裂遅延のある評価可能な標本の割合を標本の出所 (乳癌、DCIS、他の悪性腫瘍) 間で比較した。マン・ホイットニー検定を用いて前期 / 前中期にある有糸分裂細胞の割合の中央値を標本の出所間で比較した。記載されている全ての有意性の確率は両側検定である。

#### 【0133】

有糸分裂遅延と腫瘍分化及び結節転移の関係についてはノンパラメトリックなヨルクヒール・タブストラの傾向性検定を用いて、有糸分裂遅延と形態学的サブタイプ及び分子サブタイプの関係についてはクラサル・ワリスの分散分析検定を用いて、有糸分裂遅延とエストロゲン / プロゲステロン受容体状態及び異数性の関係についてはマン・ホイットニー検定を用いて評価した。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 3 4 】

## 結果

乳癌では初期有糸分裂像が多い

皮膚、肺、結腸、胃、膀胱、陰茎、及びリンパの癌を含む7つの一般的なヒト腫瘍タイプに由来する評価可能な組織標本 (n = 患者 202 例) において、有糸分裂細胞の大部分は中期にあった (図 1 a ~ b 及び図 5 a ~ b)。顕著に対照的に、本発明者らは、他の悪性腫瘍を合わせた群のたった 6 % (202 例中 12 例) に対し、乳癌の 95 % (評価可能患者 156 例のうち 148 例) で強い前期 / 前中期濃縮 (前期 / 前中期にある少なくとも 3 分の 1 の有糸分裂細胞と定義される) を見出した ( $P < 0.0001$ 、ピアソン検定及びイエーツ補正)。有糸分裂細胞の割合の平均は乳癌では 58 % (中央値 56 %) であり、他の悪性腫瘍では 23 % (中央値 23 %) であった ( $P < 0.0001$ 、マン・ホイットニー検定) (図 1 b ~ c 及び図 5 a)。このことは、初期の有糸分裂の遅延又は停止が乳癌の特徴であることを示している。これは、正常に増殖している乳房組織は有糸分裂期分布が乱れておらず、有糸分裂細胞の 23 % (中央値 24 %) が前期 / 前中期にあったので、疾患組織に特異的であった (図 1 b 及び図 5 b)。重要なことに、本発明者らは、非浸潤性の乳管上皮内癌 (DCIS) 病変の 80 % (評価可能患者 69 例のうち 55 例) で既に明確な有糸分裂遅延表現型を検出できることを見出した (他の悪性腫瘍の群との比較で  $P < 0.0001$ )、DCIS 病変では、前期 / 前中期にある有糸分裂細胞の割合の平均が 48 % (中央値 45 %) であった (他の悪性腫瘍の群との比較で  $P < 0.0001$ ) (図 1 c 及び図 6)。したがって、細胞培養モデルにおける遺伝子サイレンシングによって最初に観察された (Neumann, B. et al. Nature (2010) 464, 721-727) 特定の有糸分裂表現型についての腫瘍スクリーニングにより、試験したほぼ全ての乳癌において予想外に高頻度な初期有糸分裂像 (前期 / 前中期) が同定され、以前には認識されていなかったこの種の腫瘍における有糸分裂進行の遅延が明らかとなった。

## 【 0 1 3 5 】

M i t o C h e c k での乳癌様有糸分裂表現型のヒット

M i t o C h e c k スクリーニング (Neumann, B. et al.) において初期有糸分裂遅延は非常に特異的且つ比較的珍しい有糸分裂表現型であった。本発明者らが乳癌で観察したのと同様な初期有糸分裂表現型となる候補遺伝子を培養ヒト細胞におけるダウンレギュレーションにより同定するために、乳癌組織において本発明者らが観察した表現型に形態学的に最も似ている前期 / 前中期クラスに特にフォーカスして M i t o C h e c k データベース (www.mitocheck.org でアクセス可能) をサーチした (図 7)。ゲノム全体のデータセット中、K I F 1 1、P L K 1、T U B B 2 C、T P X 2、P A P P A、S G O L 1、及び P S M D 8 が前期 / 前中期クラスの有意な増加を示し (図 8)、これは乳癌で検出されたような前期 / 前中期における遅延又は停止を示している。これらの個々の遺伝子のノックダウンに対する時間分解的な表現型の応答を定量的にスコア化したところ、7つの遺伝子全てについて、一次表現型としての前中期停止、次いで二次表現型 (例えば、細胞死又は多葉状の核形状) が示された (図 8)。K I F 1 1、P L K 1、T U B B 2 C、及び T P X 2 を標的とした R N A i 実験では、トランスフェクションの 12 ~ 25 時間後には既に前中期にある細胞のパーセンテージが高く、一方、P A P P A、S G O L 1、及び P S M D 8 のノックダウンは前中期表現型の浸透率がそれより低かったが、全体的に同様な表現型プロファイルを示した (図 8)。有糸分裂表現型の結果としての細胞死が P A P P A 及び S G O L 1 を除く全ての遺伝子で有意であり (図 8)、このことから、これらは有糸分裂異常が細胞死によりクリアされないと予想される腫瘍抑制遺伝子の最も有力な候補である。

## 【 0 1 3 6 】

乳癌において P A P P A 消失が有糸分裂遅延と関連している

プロモーターのメチル化は、癌発生中の腫瘍抑制因子の機能喪失の一般的なメカニズムであるので、本発明者らは、7つの M i t o C h e c k 候補遺伝子のいずれかのエピジェネティックなサイレンシングを、本発明者らが乳癌で発見した有糸分裂遅延表現型に関連

付けられるという仮説を立てた。実際、M e t h y L i g h t アッセイ (Widschwendter, M. et al. Cancer research (2004) 64, 3807-3813) により、7つの候補遺伝子のうち、P A P P Aのみが浸潤性乳癌及び非浸潤性D C I S病変において遺伝子の5'制御領域が強くハイパーメチル化されていることが示された(図9 a)。乳癌の46%(メチル化を評価した患者173例中80例)及びD C I S病変の45%(評価した患者75例中34例)がP A P P Aのハイパーメチル化を示した(P M R > 1;メチル化基準遺伝子に対するパーセンテージ)。対照的に、P A P P Aは正常乳房組織サンプルの大部分(評価した患者30例中27例)においてメチル化されていなかった(図9 b;乳癌9例、D C I S 6例、及び正常乳房4例はD N Aの保存性が悪かったためM e t h y L i g h t分析に利用可能でなかった)。このことから、P A P P Aが乳癌に見られる強い前期/前中期遅延を説明する最も有力な候補となった。P A P P Aプロモーターのメチル化が実際に遺伝子サイレンシングを引き起こしたかどうかを調べるために、本発明者らは、市販の抗P A P P A抗体(ダコ社製)を用いて組織切片の免疫標識を行い、アフィニティー精製されたウサギ抗P A P P A P A b(図10)を用いてウェスタンブロッティングを行った。免疫発現分析により、メチル化P A P P Aプロモーターを有し且つ有糸分裂遅延表現型を示す非浸潤性及び浸潤性の乳癌の実に96%(患者84例中81例)がP A P P Aタンパク質を発現していないことが示された(図9 c)。対照的に、非遅延/P A P P A非メチル化乳癌の大部分(73%、患者11例中7例)及び正常増殖妊娠乳房組織(n=患者5例)は、主に細胞膜で強いP A P P A免疫染色を示し、これは分泌型タンパク質と一致する(図9 c)。

10

20

30

40

50

#### 【0137】

乳癌においてP A P P Aの発現消失が有糸分裂遅延を引き起こすという仮説を検証するために、実験で確認可能な系が必要である。したがって、本発明者らは、P A P P 遺伝子サイレンシングと有糸分裂遅延表現型との間の関連が培養乳房細胞において維持されているかどうかを調べた。本発明者らのインビボでの知見と一致し、非メチル化P A P P Aプロモーター及び検出可能なP A P P Aタンパク質を有する細胞、例えば一次ヒト乳腺上皮細胞(H M E p C)、不死化M C F 10 A細胞、並びにB T 5 4 9及びM D A M B 1 5 7乳癌細胞系は、組織スクリーニング(図2)に用いたのと同じホスホヒストンH3(H3 S 10 p h)抗体で免疫標識したサイトスピン調製物の形態分析で、正常な有糸分裂期分布を示した(図9 d ~ f)。対照的に、高度にメチル化されたP A P P Aプロモーター(P M R > 50)を有しP A P P Aタンパク質が大きく低減した細胞系、例えばB T 4 7 4、M D A M B 4 5 3、及びT 4 7 D乳癌細胞系は全て有糸分裂遅延表現型を示し、有糸分裂細胞の約80%が前期/前中期にあった(図9 d ~ f)。

#### 【0138】

乳癌細胞における初期有糸分裂進行にはP A P P Aが必要である

本発明者らは、患者組織で観察されたP A P P A発現消失と有糸分裂遅延との間の関連を再現した乳癌細胞系を入手し、R N A iによるP A P P Aノックダウンが、プロモーターのメチル化により遺伝子がサイレンシングされていないB T 5 4 9中で前期/前中期の遅延を誘発するかどうかを最初に調べた(図9 e ~ f)。対照s i R N Aと比べ、P A P P A m R N Aを標的とした4つのR N A二本鎖のプールによるB T 5 4 9細胞のトランスフェクションは、転写産物レベルを約70%、P A P P - Aタンパク質レベルを約60%低下させた(図11 a)。ホスホヒストンH3(H3 S 10 p h)について免疫標識されたB T 5 4 9サイトスピン調製物の分析により、実際、P A P P Aのノックダウンがこの細胞系において、強く前期/前中期遅延表現型を誘発することが明らかとなり(図11 c)、これはM i t o C h e c kスクリーニングにおいてH e L a細胞で観察された表現型と非常に似ていた(Neumann, B. et al. Nature (2010) 464, 721-727)。前期/前中期にある有糸分裂B T 5 4 9細胞の割合増加と一致して、P A P P Aノックダウンは、細胞集団倍加時間を顕著に長くし(図11 d)、同時にG2/MのD N A含有量の細胞の割合が約2倍に増え(図11 e)、有糸分裂指数が3倍上昇した。本発明者らは、転写産物の異なる領域を標的とする単一s i R N A二本鎖(s i R N A - 28及びs i R N A - 4

2) で B T 5 4 9 細胞をトランスフェクトすることにより、P A P P - A 枯渇により生じる前期 / 前中期遅延表現型を検証した ( 図 1 2 )。R N A i 表現型が P A P P A 枯渇による特異的なものであることを確認するために、本発明者らは、s i R N A - 2 8 及び s i R N A - 4 2 に抵抗性の P A P P A c D N A バリエーションを過剰発現させた。このコンストラクトの発現は P A P P A タンパク質発現を回復させ、2 つの単一 s i R N A 二本鎖のいずれかにより生じた有糸分裂遅延表現型をレスキューした ( 図 1 2 )。T 4 7 D 細胞等のハイパーメチル化 P A P P A プロモーターを有する乳癌細胞における有糸分裂遅延表現型を P A P P A 消失が引き起こす場合 ( 図 9 d ~ e )、本発明者らは、この実験系中、P A P P A 過剰発現が表現型をレスキューするはずであると考えた。実際、T 4 7 D 細胞を P A P P A c D N A ( P A P P A + ) でトランスフェクトすると P A P P A の m R N A 及びタンパク質のレベルが回復し ( 図 1 1 b )、有糸分裂遅延表現型が完全に逆転し、P A P P A の発現が正常な B T 5 4 9 細胞と非常に似た有糸分裂期分布となった ( 図 1 1 c )。総合すると、これらの結果は、初期有糸分裂の進行に P A P P A が必要であること及びエピジェネティックなサイレンシングを介した P A P P A ダウンレギュレーション ( T 4 7 D 細胞 ) 又は R N A i による実験的 P A P P A ダウンレギュレーション ( B T 5 4 9 細胞 ) が強い前期 / 前中期遅延表現型を引き起こすことを示している。

10

#### 【 0 1 3 9 】

P A P P A 消失は乳癌細胞の浸潤性を増大させる。

次に、本発明者らは、初期有糸分裂進行の混乱が新生物乳房細胞にどのような生物学的利点をもたらすのかと考えた。この疑問に取り組むために、通常の臨床調査中に各乳癌標本について決定された有糸分裂遅延表現型と臨床病理学的特徴との関連を探ることから始めた ( n = 評価可能患者 1 5 6 例 )。この分析により、有糸分裂遅延と腫瘍分化 ( グレード )、形態学的サブタイプ ( 浸潤性管、小葉、混合型、粘液性、及び微小乳頭 )、分子サブタイプ ( l u m i n a l、H e r - 2、又はトリプルネガティブ / b a s a l - l i k e )、エストロゲン / プロゲステロン受容体状態、結節転移、又は異数性との間には関連がないことが明らかになった。しかし、特に、有糸分裂遅延表現型が、調べたほぼ全ての浸潤性乳癌標本に存在するが ( 9 5 %、評価可能患者 1 5 6 例中 1 4 8 例 )、非浸潤性 D C I S 病変では一部にしか存在しない ( 8 0 %、6 9 例中 5 5 例 ) ことから、この有糸分裂異常は浸潤性の獲得に関連している可能性が考えられる。この具体的な仮説を試験するために、本発明者らは、P A P P A ノックダウンにより B T 5 4 9 細胞中で有糸分裂遅延表現型を誘発し (あるいは、外因性 P A P P A 発現により T 4 7 D 細胞中で正常な有糸分裂進行を回復させ)、マトリゲルコート B o y d e n c h a m b e r アッセイにより操作細胞の浸潤性を測定した。並行して、本発明者らは、フローサイトメトリーを用いて、よく特徴付けられている乳癌の浸潤マーカーである  $\beta$  1 - インテグリンの細胞表面レベルを決定した。P A P P A のサイレンシングは、浸潤細胞数の顕著な ( 2 倍 ) 増加と関連した ( 図 1 3 a ~ b )。P A P P - A 枯渇 B T 5 4 9 細胞の浸潤性増大は  $\beta$  1 - インテグリン細胞表面レベルの増加にも反映されていた ( 図 1 3 c )。特に、P A P P A ノックダウンに関連する浸潤性の増大は、細胞を B o y d e n c h a m b e r に移す前に  $\beta$  1 - インテグリンブロッキング抗体で B T 5 4 9 細胞を処理することで完全に逆転された ( 図 1 3 d )。逆に、外因性 P A P P A 発現による正常有糸分裂期分布の再確立は T 4 7 D 細胞の浸潤性を強く低減した ( 図 1 3 a ~ b )。これらの結果は、P A P P A 機能の消失が、初期有糸分裂の進行を遅らせ、乳癌細胞がより浸潤性になる能力を増大させることを示している。

20

30

40

#### 【 0 1 4 0 】

##### 実施例 2

外因的に添加された I G F - 1 は、前期 / 前中期遅延表現型を示す乳癌細胞において有糸分裂の正常な進行を回復させる。

#### 【 0 1 4 1 】

P A P P A の知られている機能は、捕捉性抑制性結合タンパク質 ( s e q u e s t e r i n g i n h i b i t o r y b i n d i n g p r o t e i n ) I G F B P - 4 から

50

ホルモン IGF - 1 を放出させることである。細胞表面の IGF - 1 の局所的バイオアベイラビリティを増大させることにより、PAPPA 活性は、IGF 依存性シグナル伝達を増大させ、細胞成長及び増殖を促進する。したがって、PAPPA は IGF 経路を介したシグナル伝達を調節することにより乳癌細胞中における有糸分裂進行に影響を与える可能性があるという仮説を立てることができる。このことから、生体内で腫瘍細胞と非常に似ている（すなわち、PAPPA プロモーターメチル化及び有糸分裂遅延表現型を示す；図 14）T47D 乳癌細胞を組換え IGF - 1 で処置することにより、この細胞系において有糸分裂の正常な進行が回復すると考えられる。これらの実験のために、T47D 細胞を 48 時間血清飢餓にした。トリパンブルー生体染色を用いて細胞の生存率を確認した。終濃度 100  $\mu$ M の組換えヒト IGF - 1（Imgenex 社製）で細胞を処理し、回収した。細胞は 24 時間後に回収し、PBS に再度懸濁し、スライドガラス上にサイトスピンし、前述したように H3S10ph 免疫染色を行った。実際、IGF - 1 の添加は前期 / 前中期にある有糸分裂 T47D 細胞の割合を約半分に低減し（図 15）、これは PAPPA を発現する BT549 乳癌細胞で見られるレベルに近い。この発見から、当業者は、抗有糸分裂剤を用いた追跡処置が癌細胞殺作用を増強すると推論することができる。したがって、有糸分裂ブロックを取り除く第 1 の薬物及び前中期段階後の有糸分裂を標的とする第 2 の薬物を用いた逐次処置により、腫瘍細胞が第 2 の薬物に対して化学療法剤感受性になる。

#### 【0142】

##### 方法

##### 細胞培養

T47D 細胞は、10% FCS 及び 10  $\mu$ g / ml インスリンを補充した RPMI 培地（ATCC）を用いて培養した。細胞は 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、湿度 95% 以上で培養した。TrypLE（商標）Express（ライフテクノロジーズ社製）とインキュベートした後、細胞を回収した。Countess（登録商標）Automated Cell Counter（ライフテクノロジーズ社製）を用いてトリパンブルー排除により細胞密度及び生存率を決定した。PDT = (t2 - t1) / 3.32  $\times$  (log n2 - log n1)（式中、t はサンプリング時間、n はサンプリング時の細胞密度である）により集団倍加時間を計算した。図 14A に示す顕微鏡写真は、ライカ社製倒立顕微鏡に装着したパナソニック社製デジタルカメラを用いて撮影した。

#### 【0143】

##### 細胞周期分析

60 ~ 70% のコンフルエンスに達した T47D 細胞をトリプシン処理により回収した。培地上清を、トリプシン処理細胞と共にプールし、194  $\times$  g で 3 分間遠心した（このステップは、全ての有糸分裂細胞の保持を確実にするため及び有糸分裂シェイクオフによるロスを回避するために含めた）。細胞ペレットを洗浄し、PBS に再懸濁し、濃度を 2  $\times$  10<sup>6</sup> 細胞 / ml とした。次いで、再懸濁した細胞を Coulter フローサイトメトリーチューブに移し、ボルテックスを用いて攪拌しながら 1.5 ml の氷冷 100% エタノールを滴下することにより固定した。次いで、細胞を氷上に 30 分間置いて固定した。エタノール固定後、194  $\times$  g で 5 分間遠心することにより細胞をペレット化した。上清を注意深く除去し、細胞を 2 ml の PBS（ボルテックスで攪拌しながら滴下）で洗浄した。細胞を最終的に 300  $\mu$ l の DNA Prep PI 溶液（ベックマン・コールター社製）に再懸濁し、暗黒下、室温で 10 分間インキュベートした後、Navios Flow Cytometer を用いて細胞周期を分析した。Multicycle - AV ソフトウェアを用いてデータを分析した。

#### 【0144】

##### qRT - PCR 分析

Ambion PureLink RNA Mini キット（ライフテクノロジーズ社製）をメーカーの指示書に従って用いて全細胞 RNA を単離した。qPCR 反応は、SuperScript III Platinum SYBR Green One - Ste

10

20

30

40

50

p q R T - P C R キット（ライフテクノロジーズ社製）をメーカーの指示書に従って用いて行った。P C R 反応は S t e p O n e P l u s R e a l T i m e P C R システム（ライフテクノロジーズ社製）を用いて行った。4 0 0 n g の鋳型 R N A 及び 2 0 0 n M の最終プライマー濃度を個々の各 P C R 反応に用いた。P C R 産物を更に、図 1 4 D に示すようにアガロースゲル電気泳動にかけた。

【 0 1 4 5 】

本研究に用いたプライマーを以下の表 3 に示す。

【 0 1 4 6 】

【表 3】

表 3.

| 遺伝子    | フォワードプライマーの塩基配列 5'-3'                 | リバースプライマーの塩基配列 5'-3'                  |
|--------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| PAPP-A | ACAGGCTACGTGCTCCAGAT (SEQ ID NO. 39)  | CTCACAGGCCACCTGCTTAT (SEQ ID NO. 40)  |
| RPLP0  | CCTCATATCCGGGGGAATGTG (SEQ ID NO. 41) | GCAGCAGCTGGCACCTTATTG (SEQ ID NO. 42) |

10

20

【 0 1 4 7 】

イムノプロットティング

B r a d f o r d タンパク質アッセイキット（ピアス社製）をメーカーのプロトコールに従って用いてタンパク質濃度を決定した。N o v e x （登録商標）4 - 2 0 % T r i s - グリシン S D S P A G E （ライフテクノロジーズ社製）により、2 0 ~ 3 0 μ g の細胞質ゾルタンパク質及び M a g i c M a r k （商標）（ライフテクノロジーズ社製）を分離した。i B l o t （登録商標）ドライエレクトロプロットティングシステム（ライフテクノロジーズ社製）を用いてタンパク質をポリアクリルアミドゲルから P V D F メンブレン上に転写した。簡潔に述べると、1 0 % ミルクを補充した P B S 中でメンブレンを 1 時間ブロッキングした。ポリクローナル抗 P A P P - A 抗体（アカデミックな協力者からの寄贈）を用いて更にメンブレンをプローブした。このステップは穏やかに攪拌しながら 4 で一晩行った。一次抗体とのインキュベート後、メンブレンを P B S で 1 0 分間、5 回洗浄した。1 0 % ミルクの入った P B S 中の H R P コンジュゲート二次ヤギ抗ウサギ抗体（ダコ社製）をメンブレンに加え、室温で 1 時間インキュベートした。E C L S e l e c t （商標）キット（GEヘルスケア社製）の等体積の試薬 A 及び B をメンブレンに加え、室温で 3 分間インキュベートした。図 1 4 E に示す画像は G e n e G n o m e 化学発光検出システム（シンジーン社（S y n g e n e）製）を用いて取得した。メンブレンを抗 β アクチン（シグマ アルドリッチ社製）抗体で再度プローブして、各レーン中の全タンパク質のローディングが等しくなるようにした。

30

40

【 0 1 4 8 】

M e t h y l i g h t アッセイ

Q I A a m p D N A キット（キアゲン社製）をメーカーのプロトコールに従って用いて T 4 7 D 細胞からゲノム D N A を抽出した。単離した D N A を、N a n o V u e 分光光度計を用いて定量化した。各反応について E Z D N A M e t h y l a t i o n - G o l d k i t （ザイモリサーチ社製）をメーカーの指示書に従って用いて 4 0 0 ~ 5 0 0 n g のゲノム D N A をバイサルファイト改変した。バイサルファイト改変 D N A は必要時まで - 8 0 で保存した。非改変 S s s I 処理ゲノム D N A （ニュー・イングランド・バイオラボ社製）を陽性対照として用いた。バイサルファイト改変 D N A 用に 2 セットのブ

50

ライマー及びプローブを設計した：インプットDNAについて標準化するためのPAPP-A及びコラーゲン2A1用のメチル化セット。TaqMan（登録商標）Universal PCR Master Mix、No AmpErase（登録商標）UNG（ライフテクノロジーズ社製）を20ngのDNA、0.3μMのプローブ、並びに0.9μMのフォワード及びリバース両方のプライマーと用いてqPCR反応を行った。

【0149】

本研究に用いたプライマーを以下の表4に示す。

【0150】

【表4】

表4.

| 遺伝子    | フォワードプライマーの塩基配列 5'-3'                            | リバースプライマーの塩基配列 5'-3'                          | プローブの塩基配列 5'-3'                                                     |
|--------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| PAPP-A | GCGTGTTTGTGCGAGAG<br>TTGT (SEQ ID NO. 7)         | CGCCTTCCGAATATACC<br>CATT (SEQ ID NO. 8)      | 6-FAM-TCGCCCCGAATATCTCTACGCC<br>GCT-BHQ-1 (SEQ ID NO. 9)            |
| COL2A1 | TCTAACAATTATAAACTC<br>CAACCACCAA (SEQ ID NO. 31) | GGGAAGATGGGATAGAA<br>GGGAATAT (SEQ ID NO. 32) | 6-FAM-CCTTCATTCTAACCCAATACCT<br>ATCCACCTCTAAA-BHQ-1 (SEQ ID NO. 33) |

【0151】

反応はStepOne Plus Real Time PCRシステム（ライフテクノロジーズ社製）を用いて行った。サイクリング条件は、95（10分）；次いで95（15秒）、60（1分）を50サイクルとした。qPCR反応の結果はStepOneソフトウェアを用いて分析した（DDC<sub>T</sub>及びRQ計算値）。完全にメチル化されたPAPP-A分子のパーセンテージは、サンプルのPAPP-A：COL2A1比をSssI処理ゲノムDNAのPAPP-A：COL2A1比で割ることにより算出した。

【0152】

T47D細胞のIGF-1処理

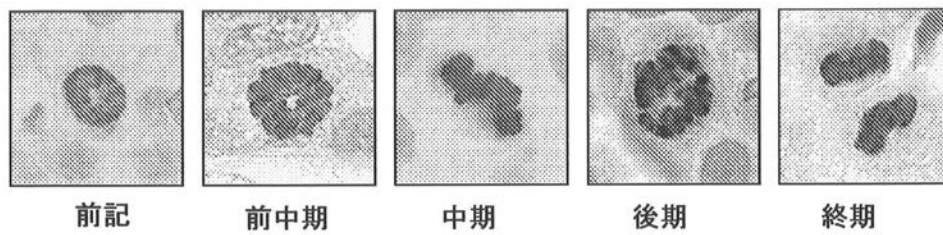
T47D細胞を実験前に48時間血清飢餓状態にした。Countess（商標）自動細胞計数装置（ライフテクノロジーズ社製）を用い、生体染色トリパンブルーを用いて細胞の生存率を決定した。細胞を終濃度100μMの組換えヒトIGF-1（IMR-233、Imgenex社製）で処理した。24時間後にTryple express（商標）（ライフテクノロジーズ社製）を用いて細胞を回収し、PBSに再懸濁した。次いで、細胞をスライドガラス上にサイトスピンし、前述したようにH3S10ph免疫染色した。

【0153】

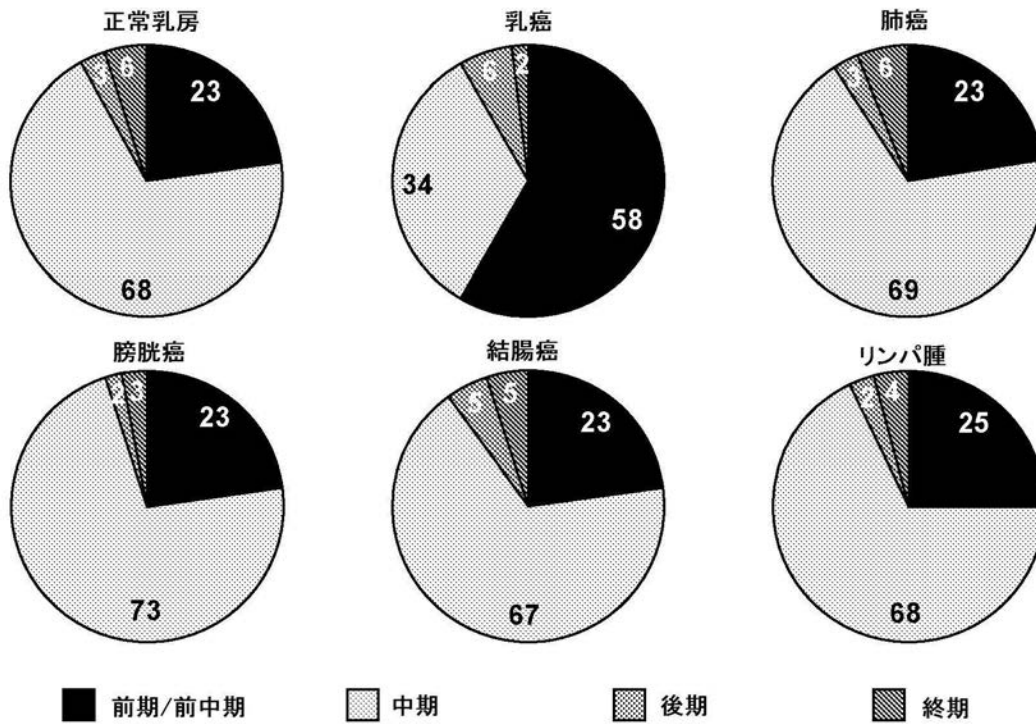
## 結果

結果を図14及び15に示す。外因性IGF-1はT47D細胞において有糸分裂遅延表現型を逆転させることにより、細胞の有糸分裂を可能にする。したがって、有糸分裂中に作用する化学療法剤を細胞に標的化させて有効な治療法を提供することができる。

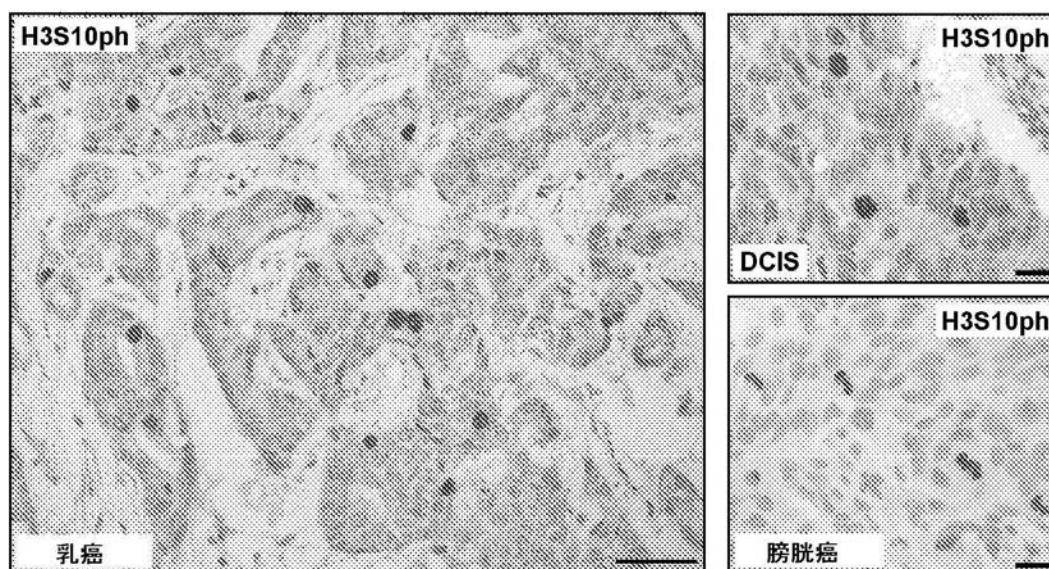
【図 1 a】



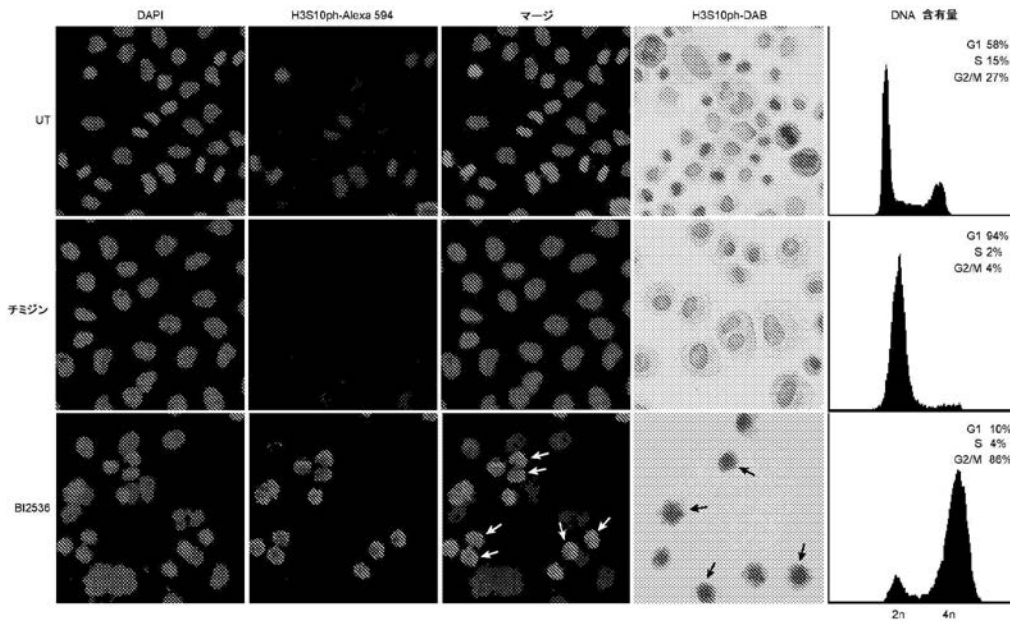
【図 1 b】



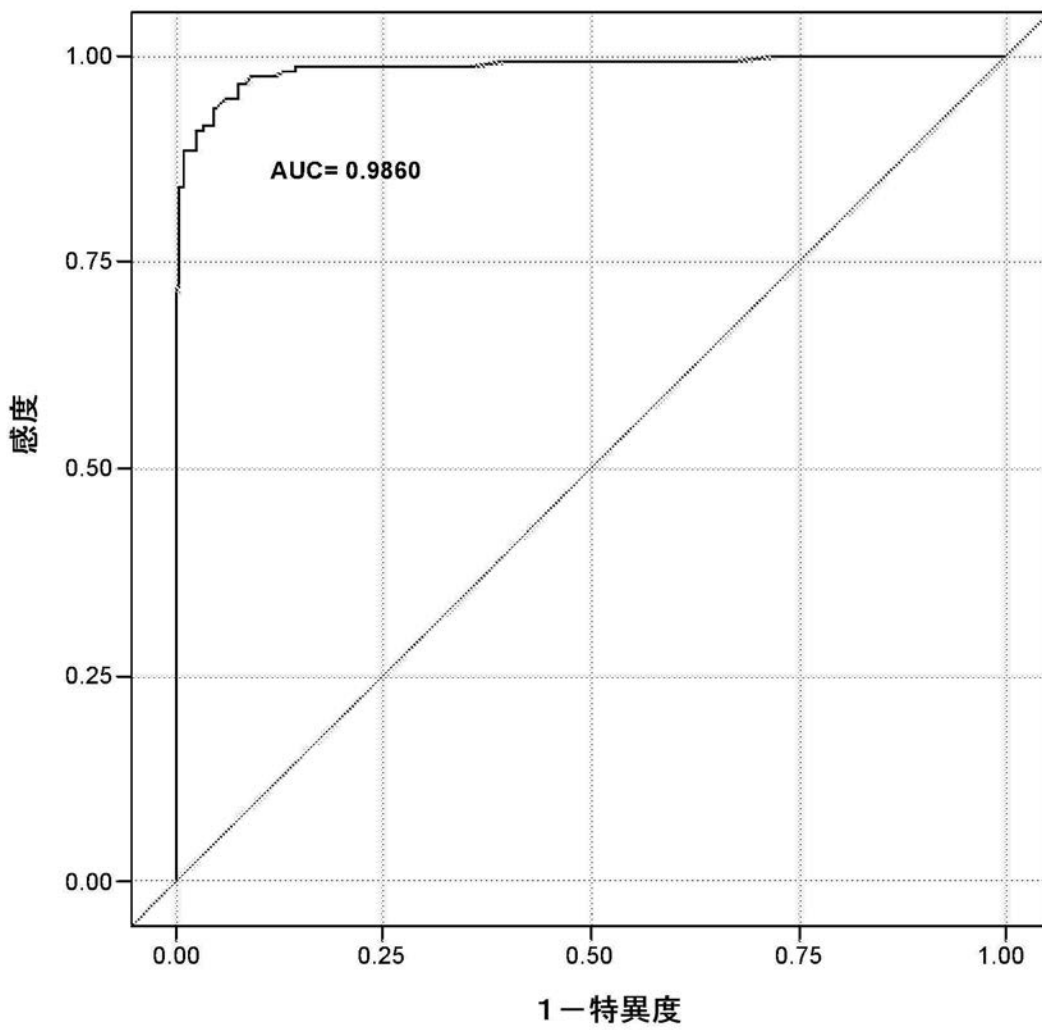
【図 1 c】



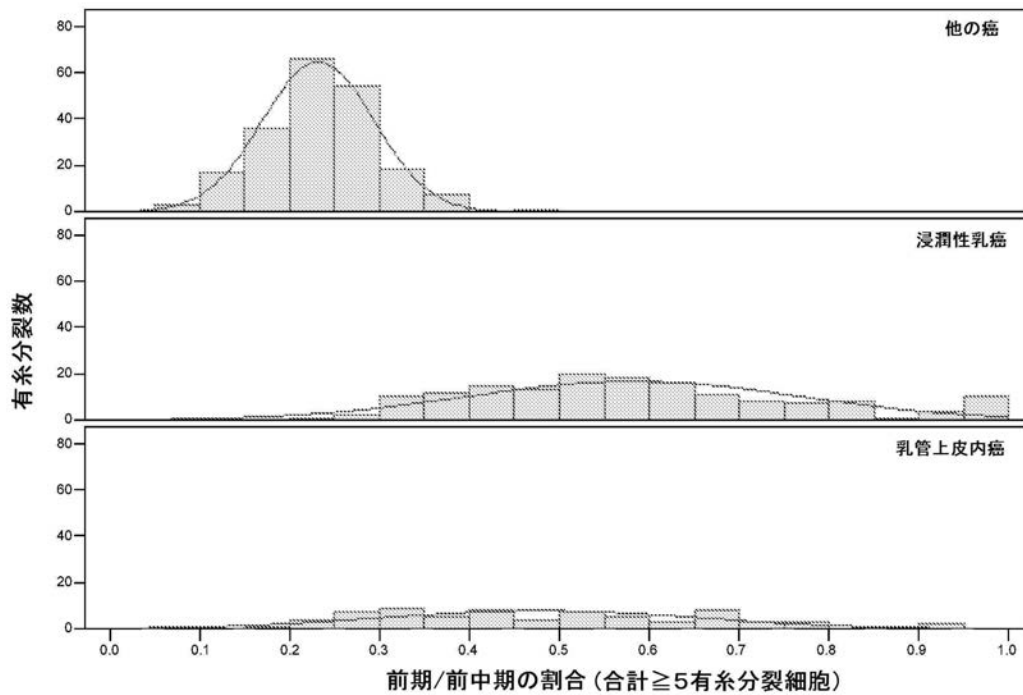
【 図 2 】



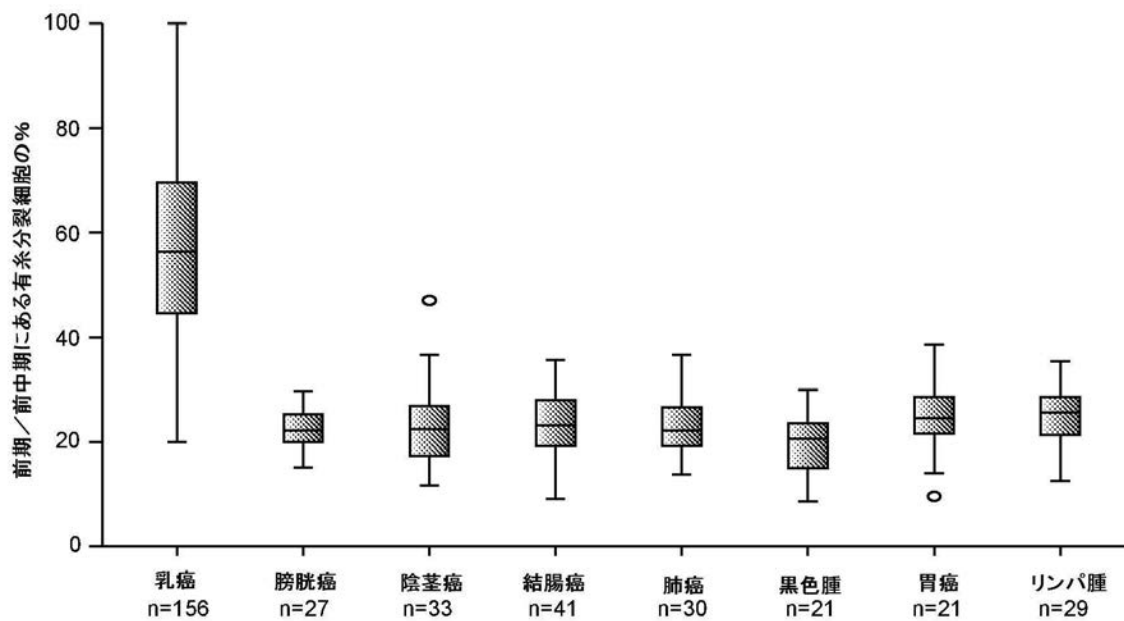
【 図 3 】



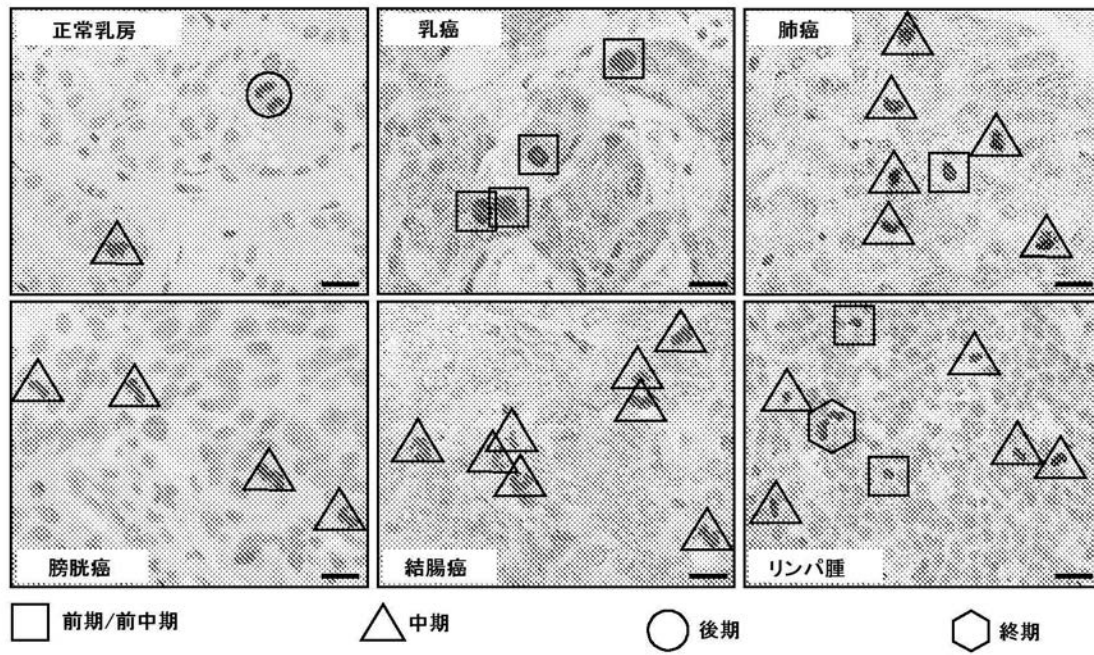
【 図 4 】



【 図 5 a 】



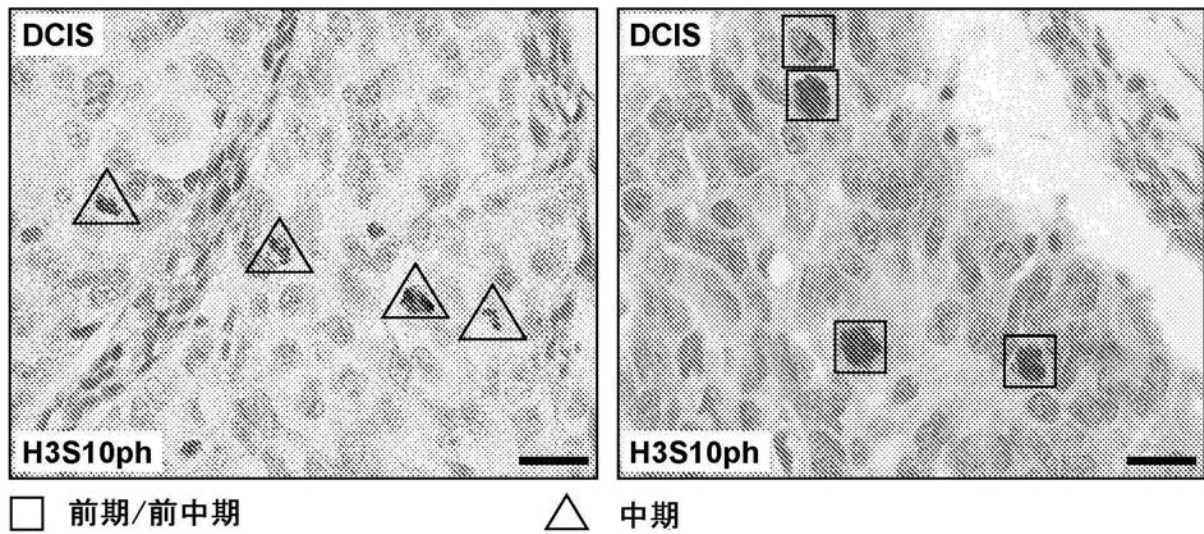
【図 5 b】



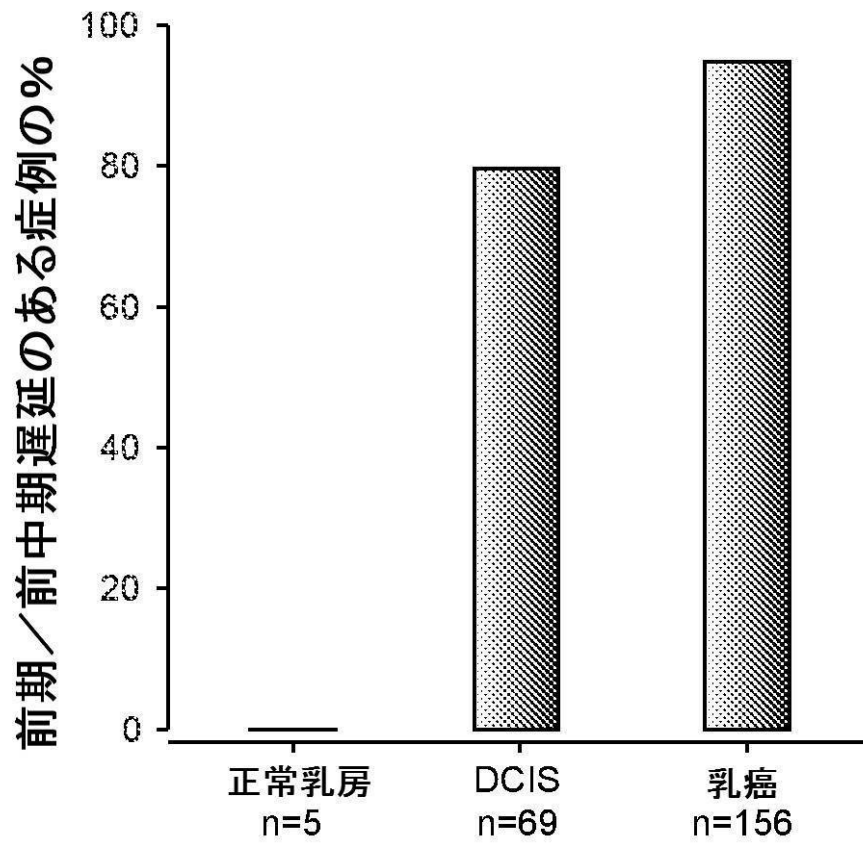
【図 6 a】

正常有糸分裂期分布

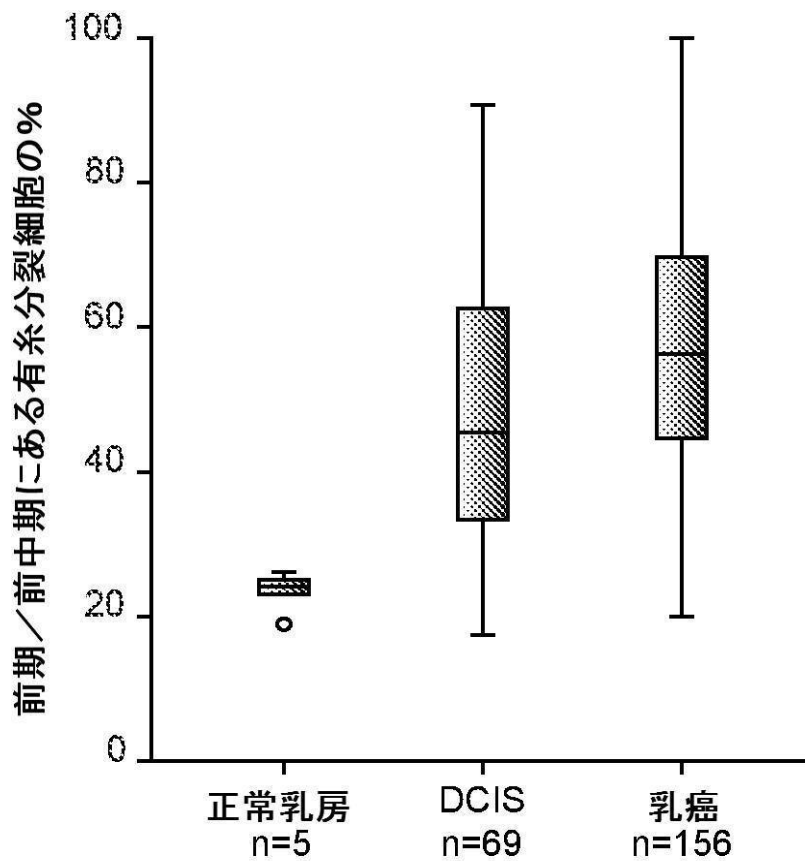
前期/前中期遅延



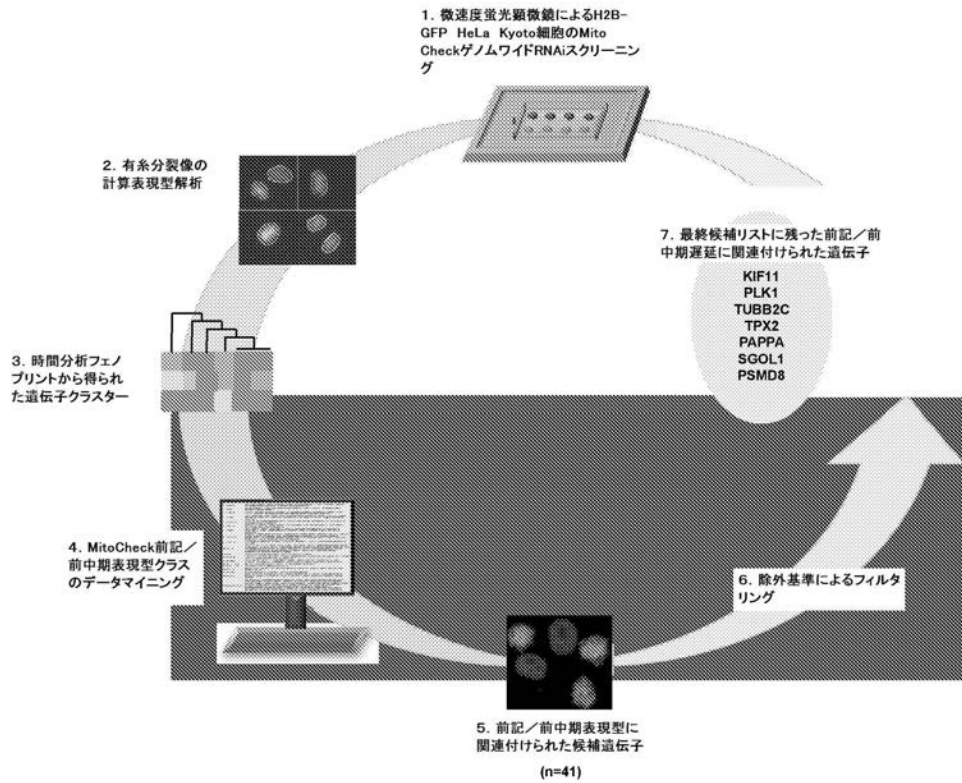
【図 6 b】



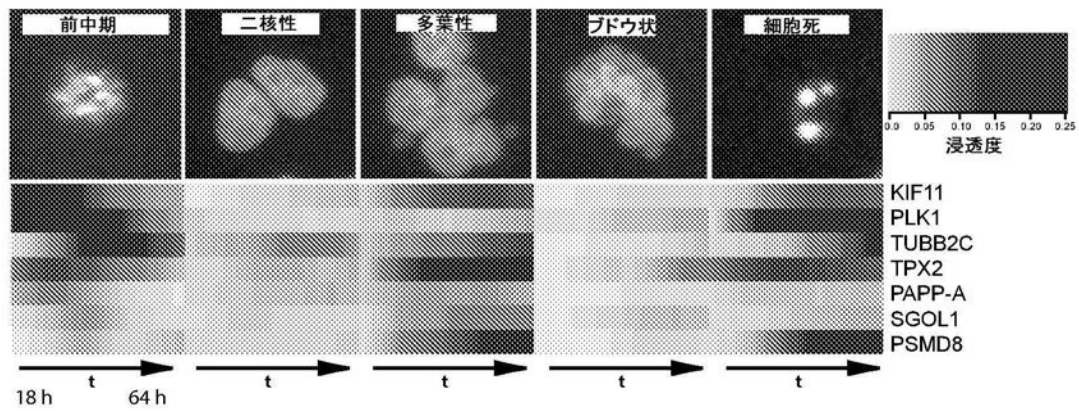
【図 6 c】



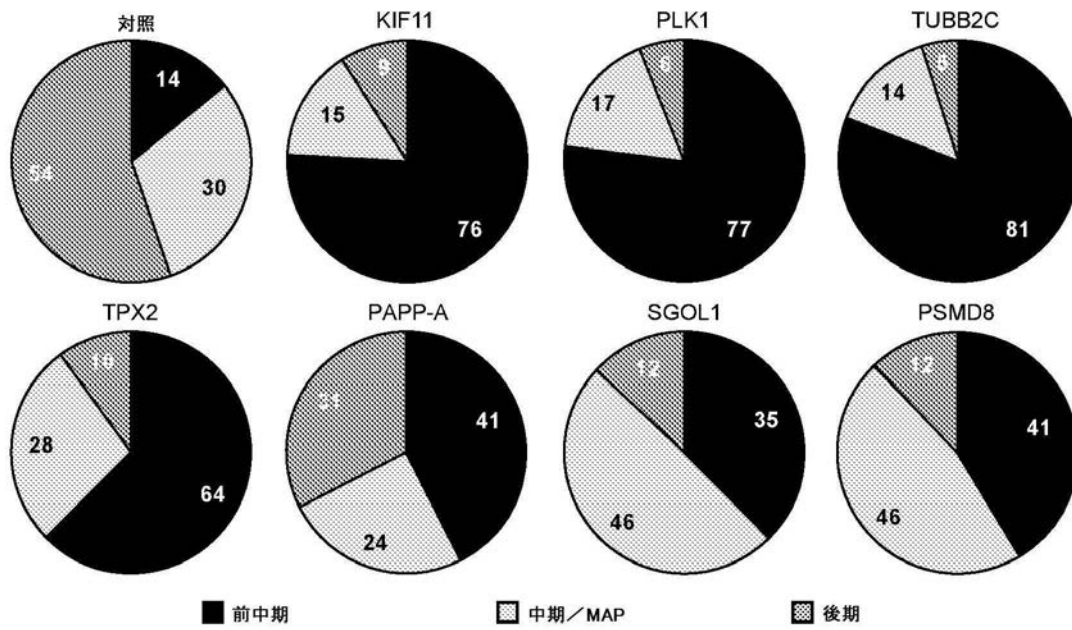
【図7】



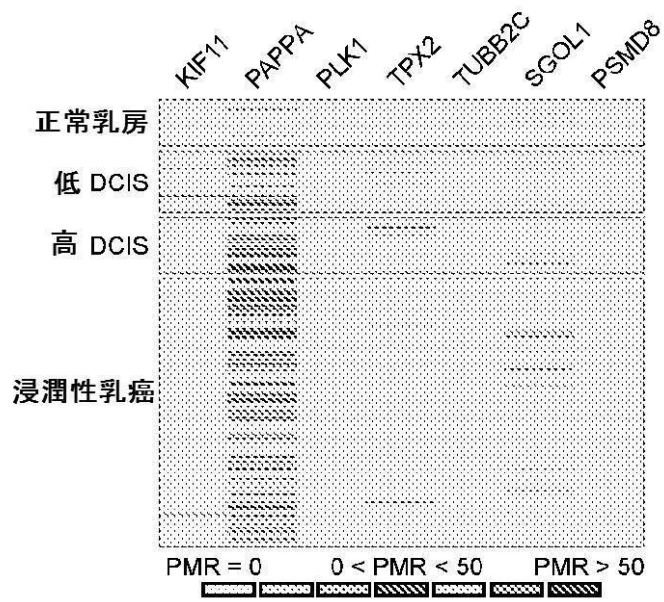
【図8a】



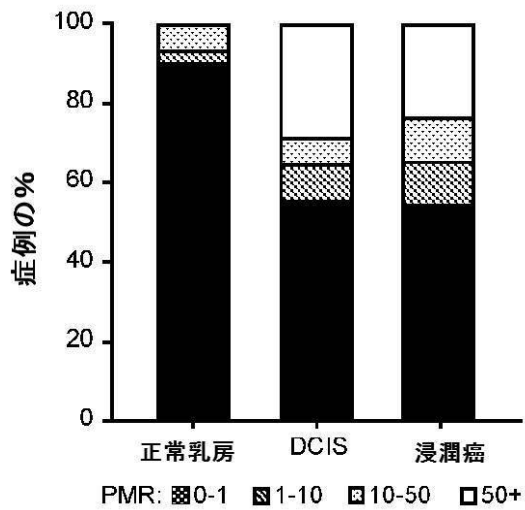
【 図 8 b 】



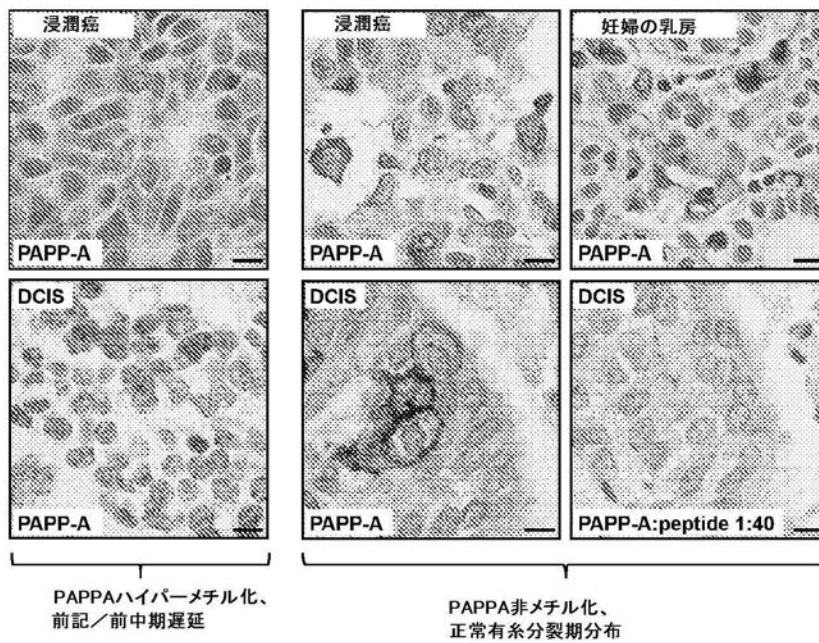
【 図 9 a 】



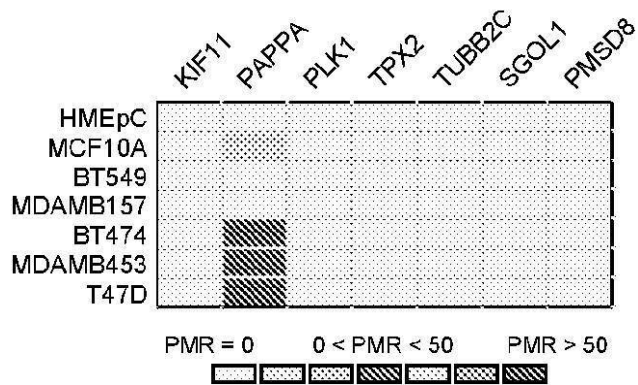
【図 9 b】



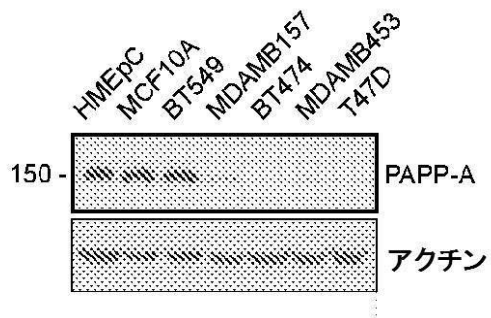
【図 9 c】



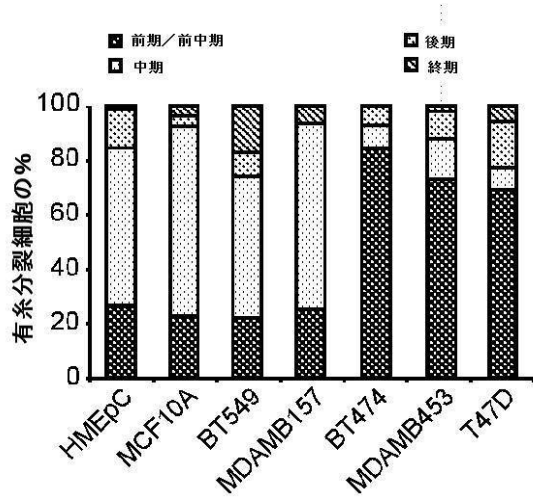
【図 9 d】



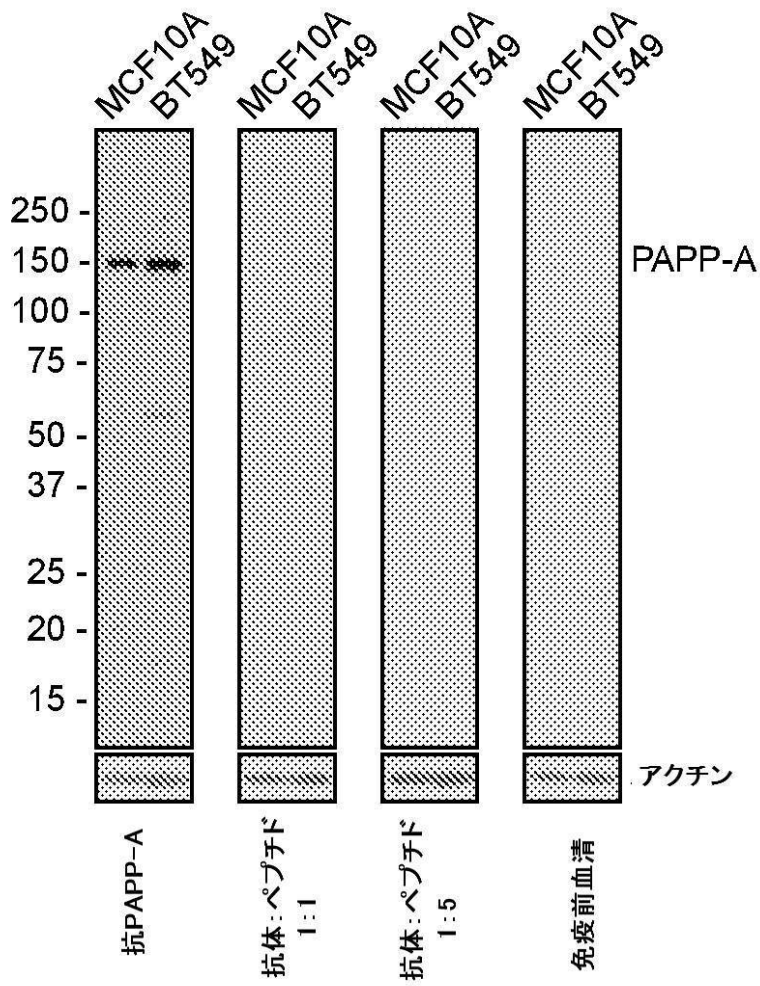
【図 9 e】



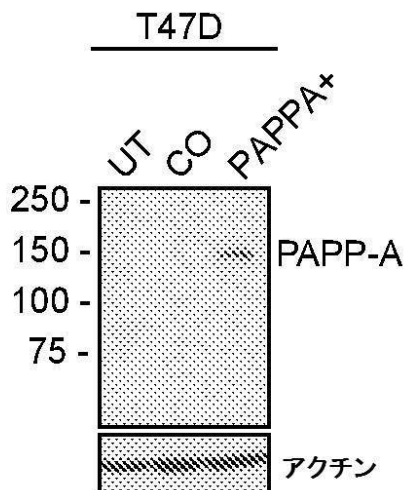
【図 9 f】



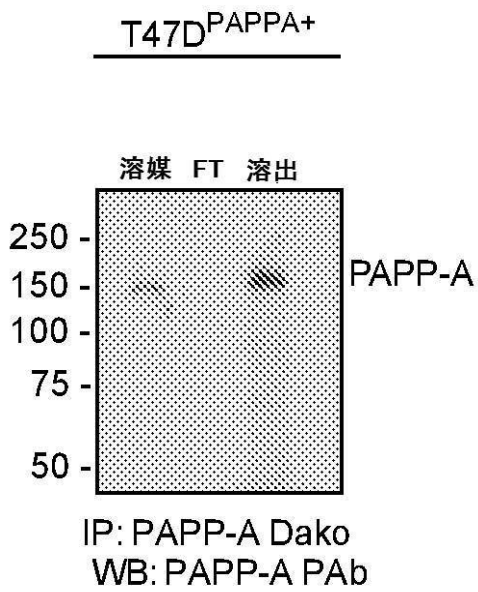
【図10a】



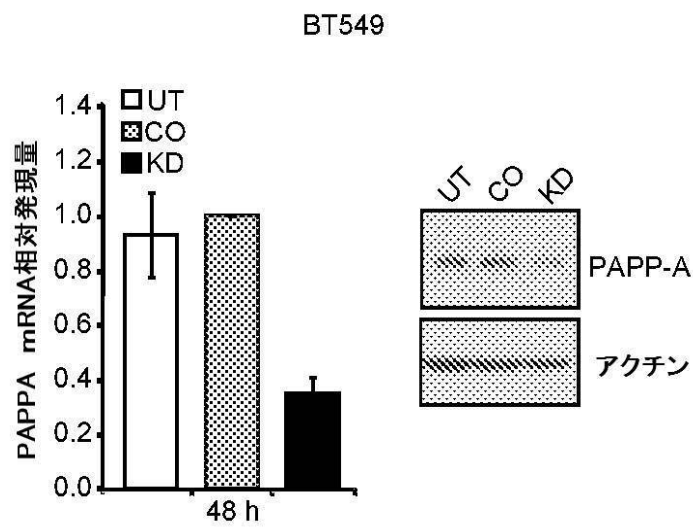
【図10b】



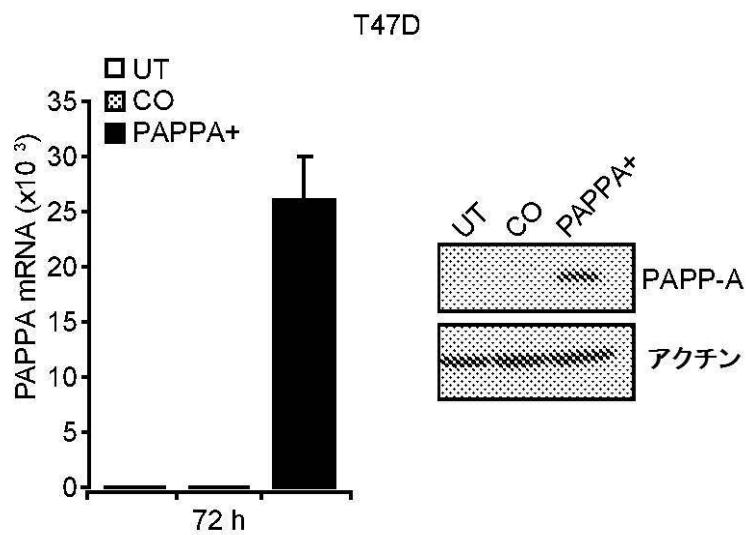
【図 1 0 c】



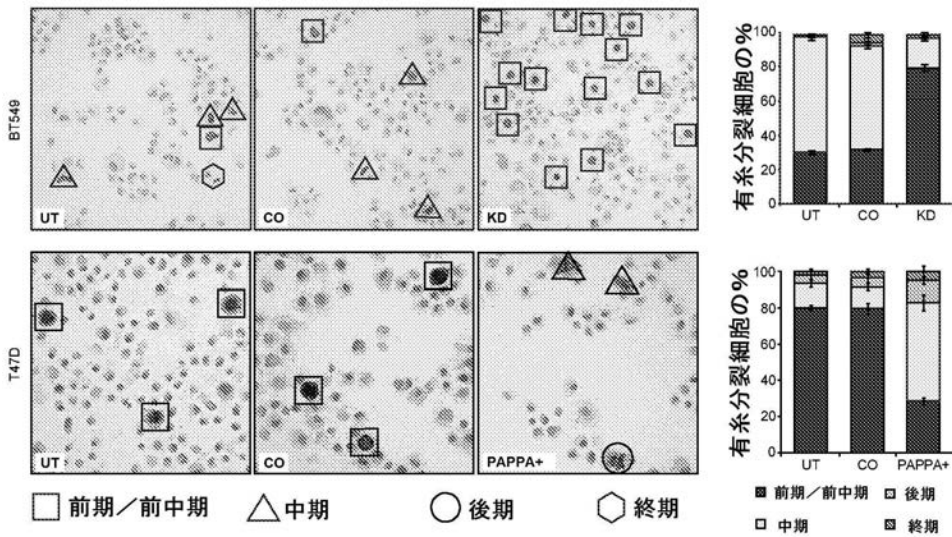
【図 1 1 a】



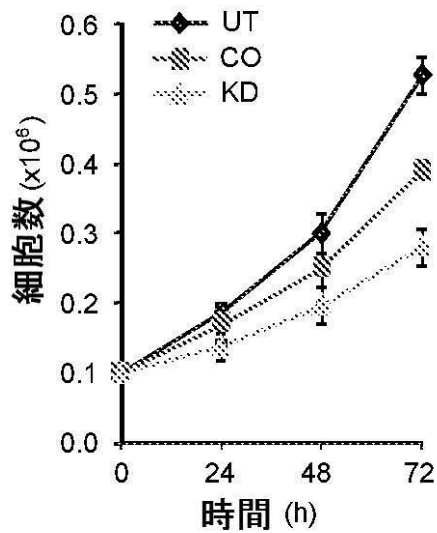
【図 1 1 b】



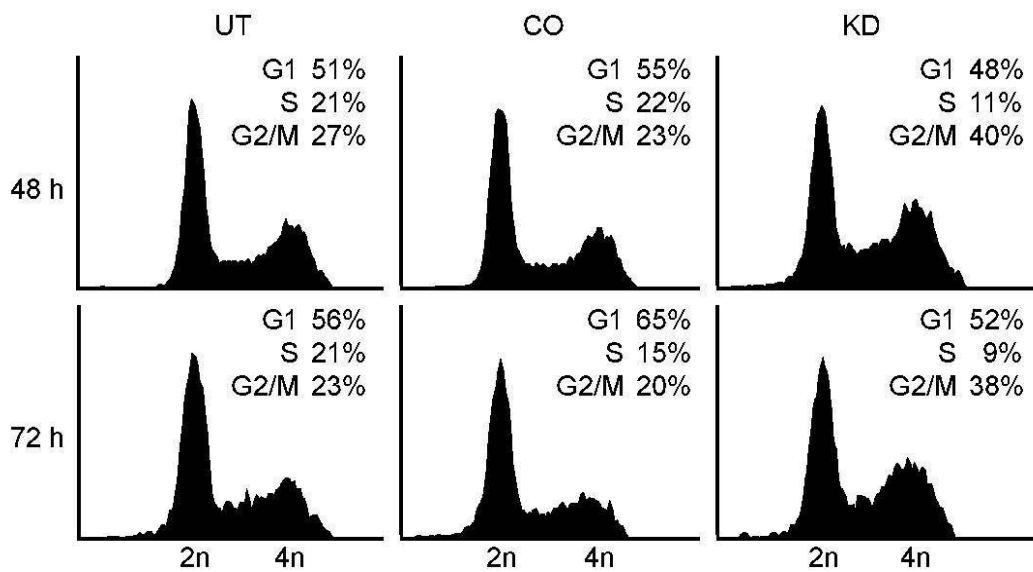
【図 1 1 c】



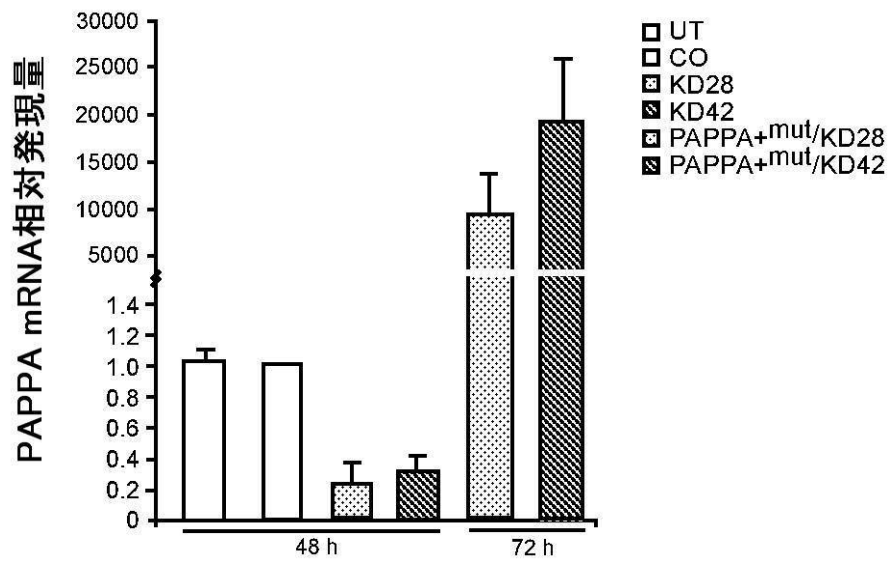
【図 1 1 d】



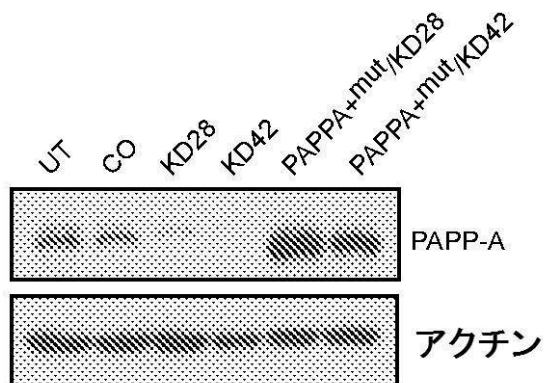
【図 1 1 e】



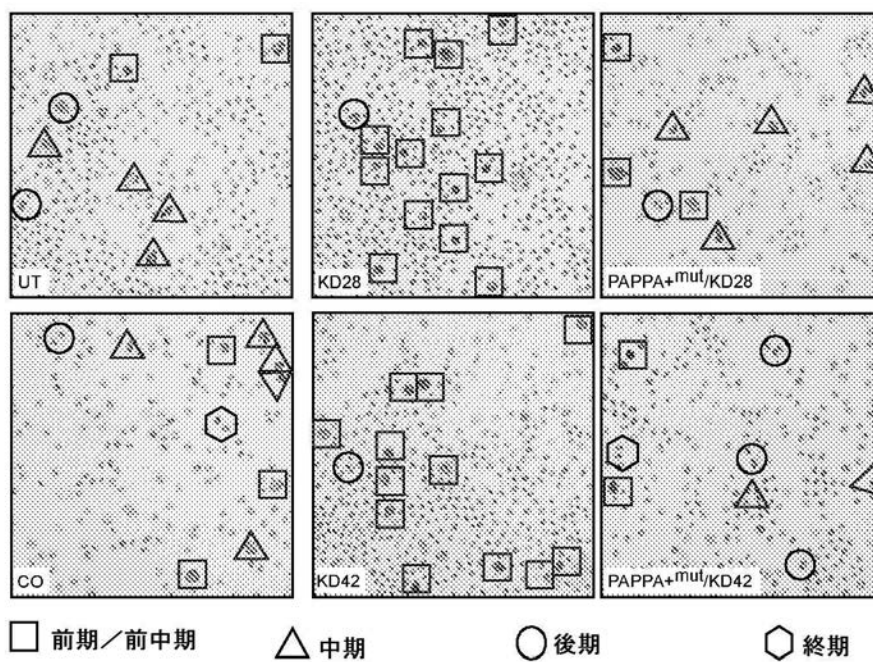
【図 1 2 a】



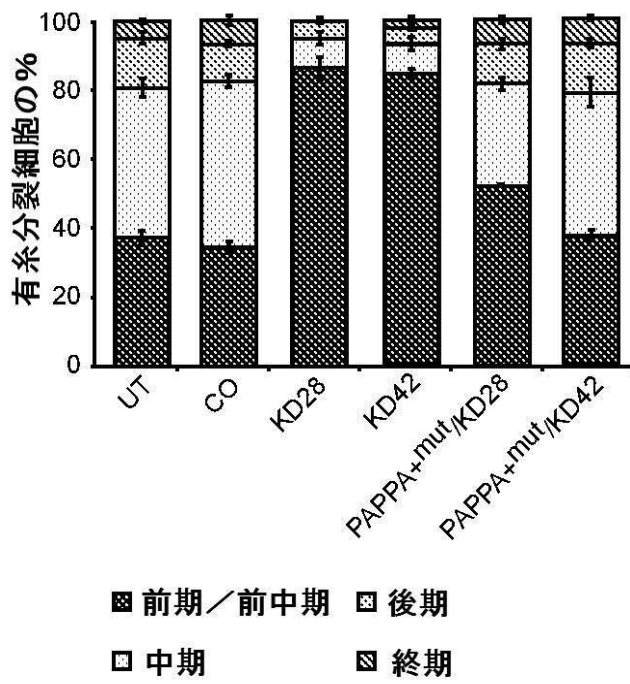
【図 1 2 b】



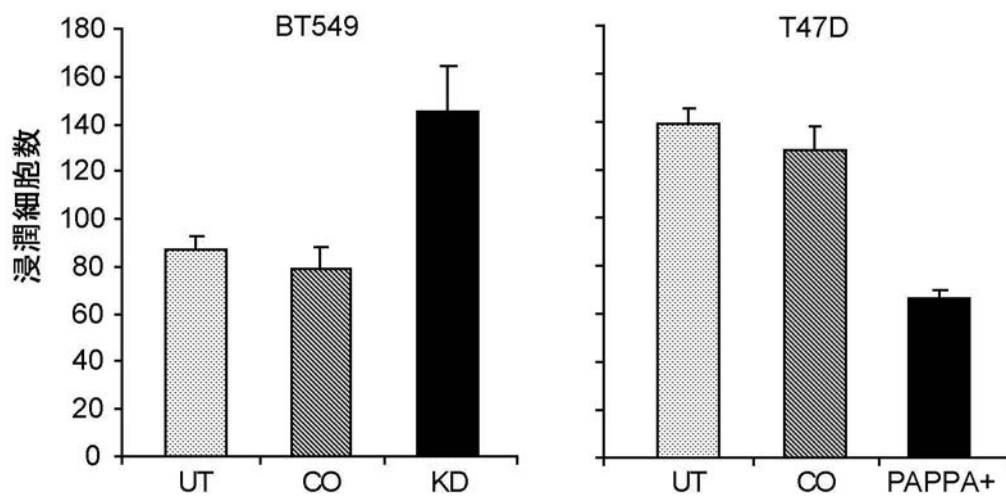
【図 1 2 c】



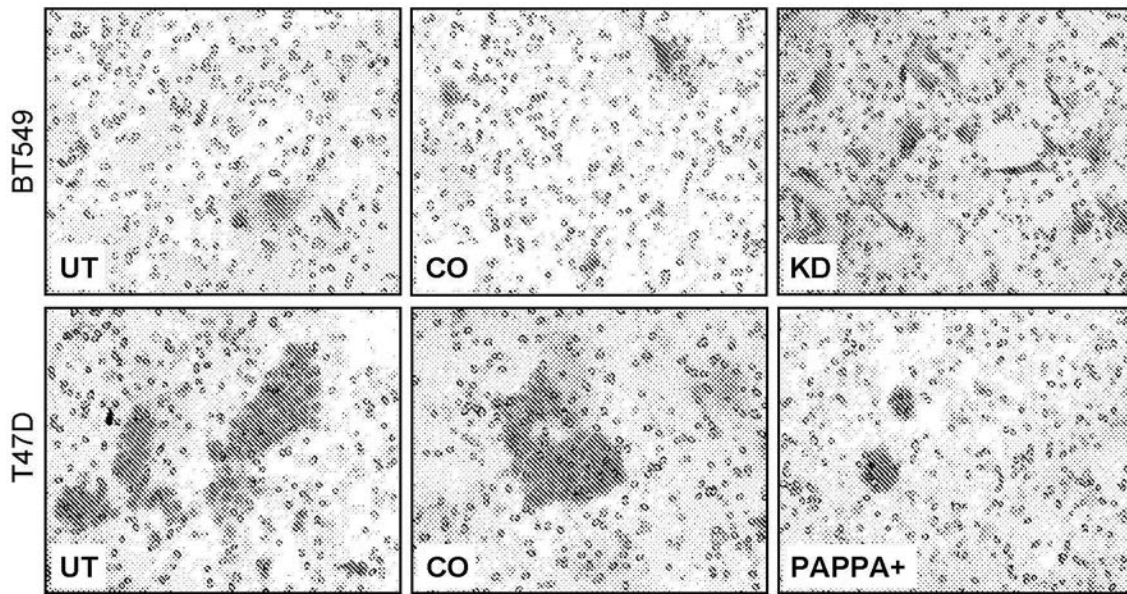
【図 1 2 d】



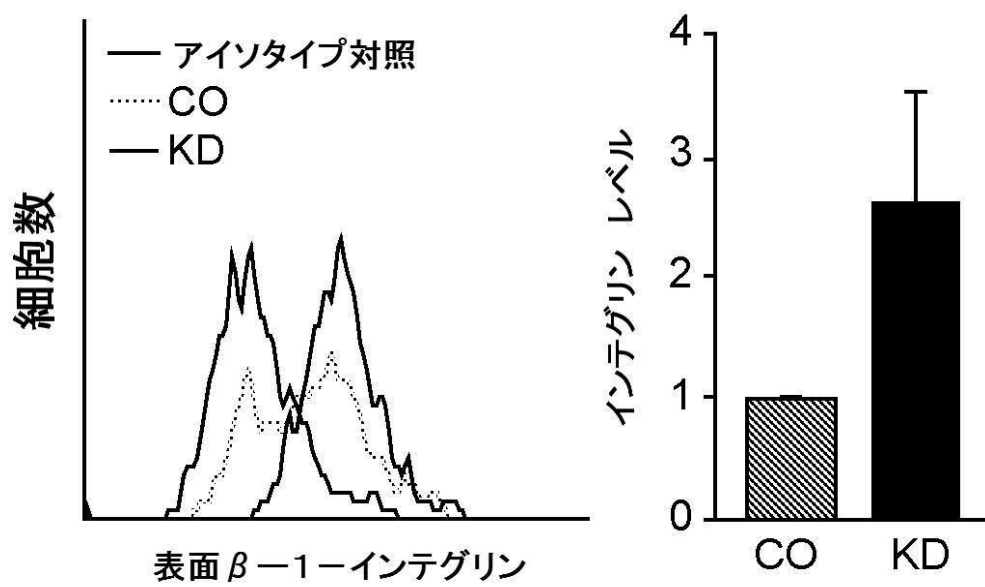
【図 1 3 a】



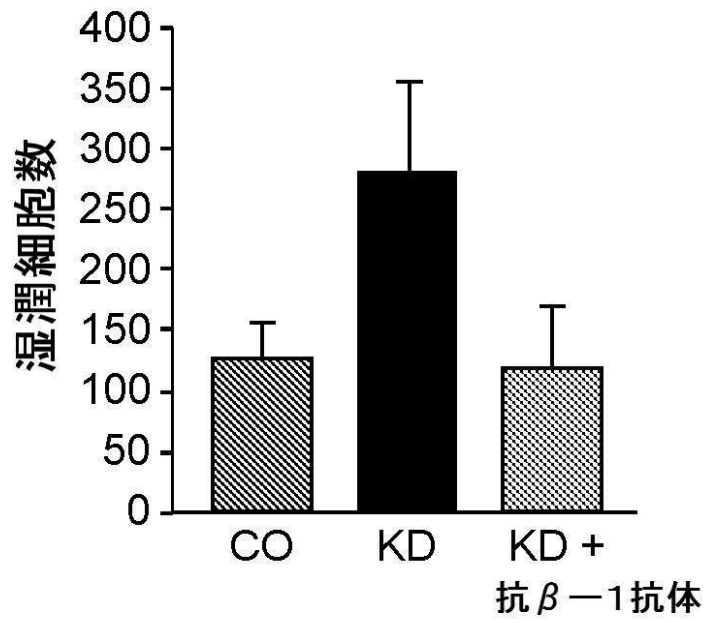
【図 1 3 b】



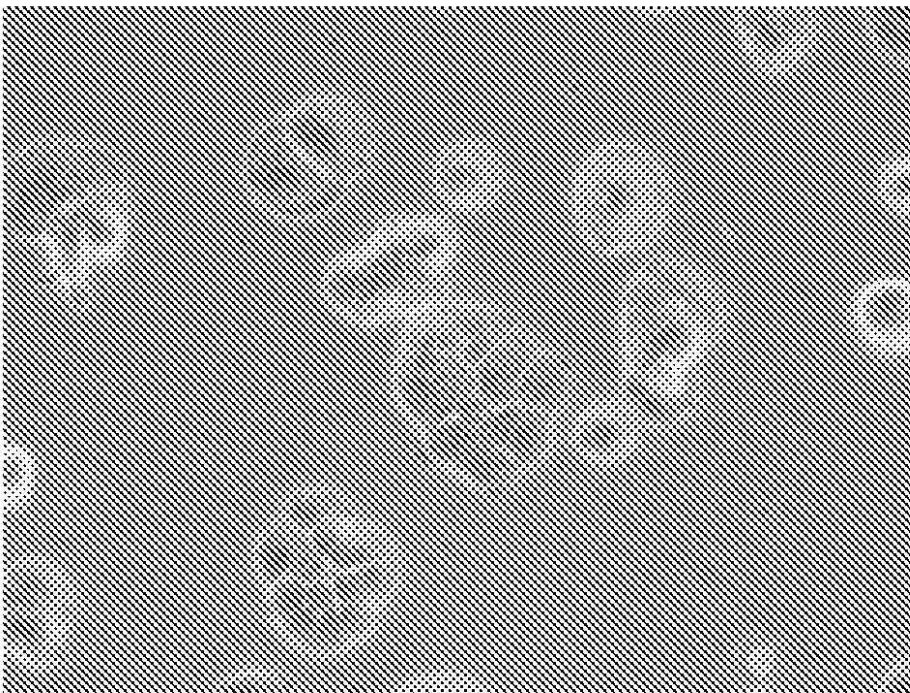
【図 1 3 c】



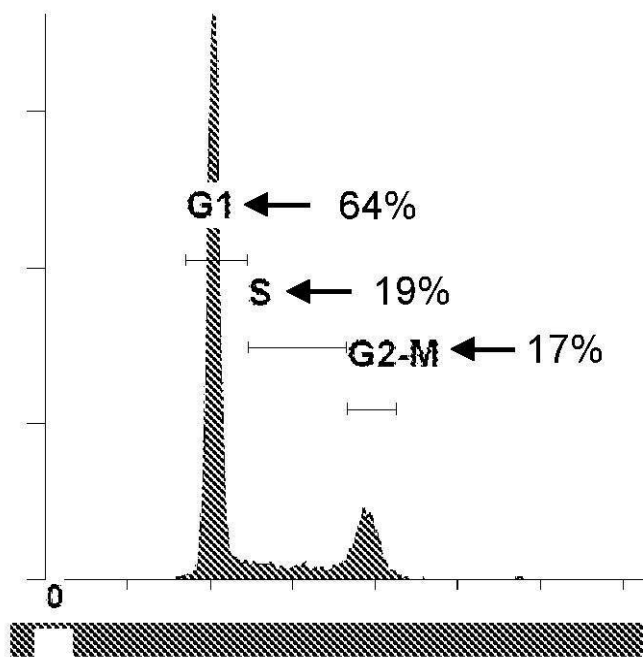
【図 1 3 d】



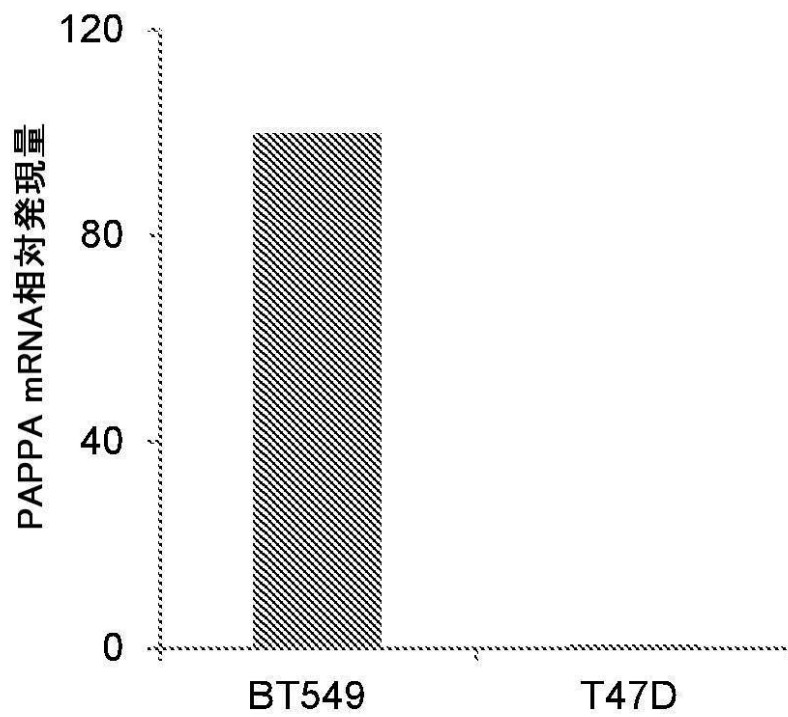
【図 1 4 ( A )】



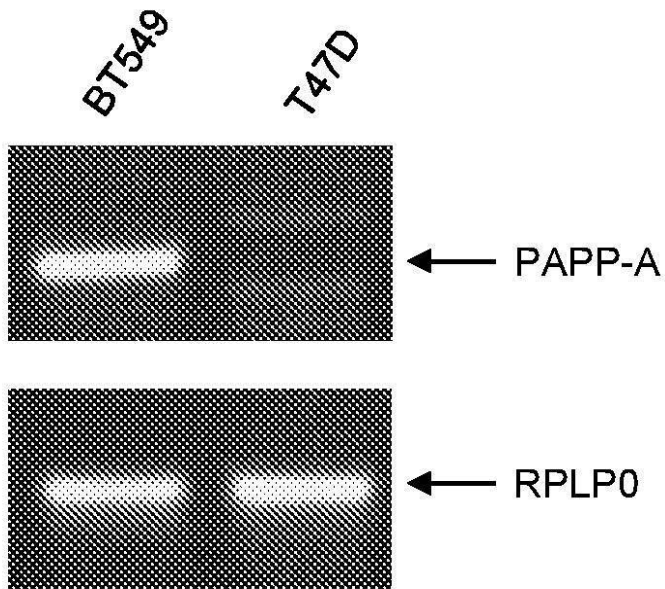
【図 14 ( B )】



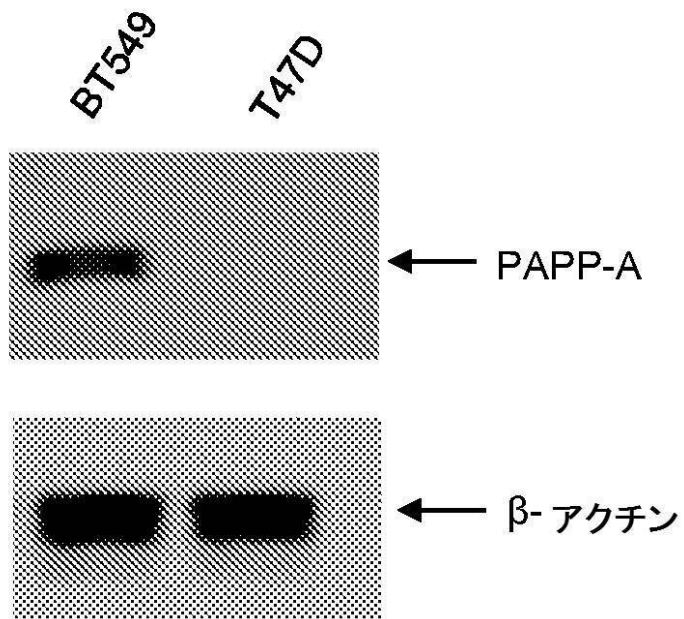
【図 14 ( C )】



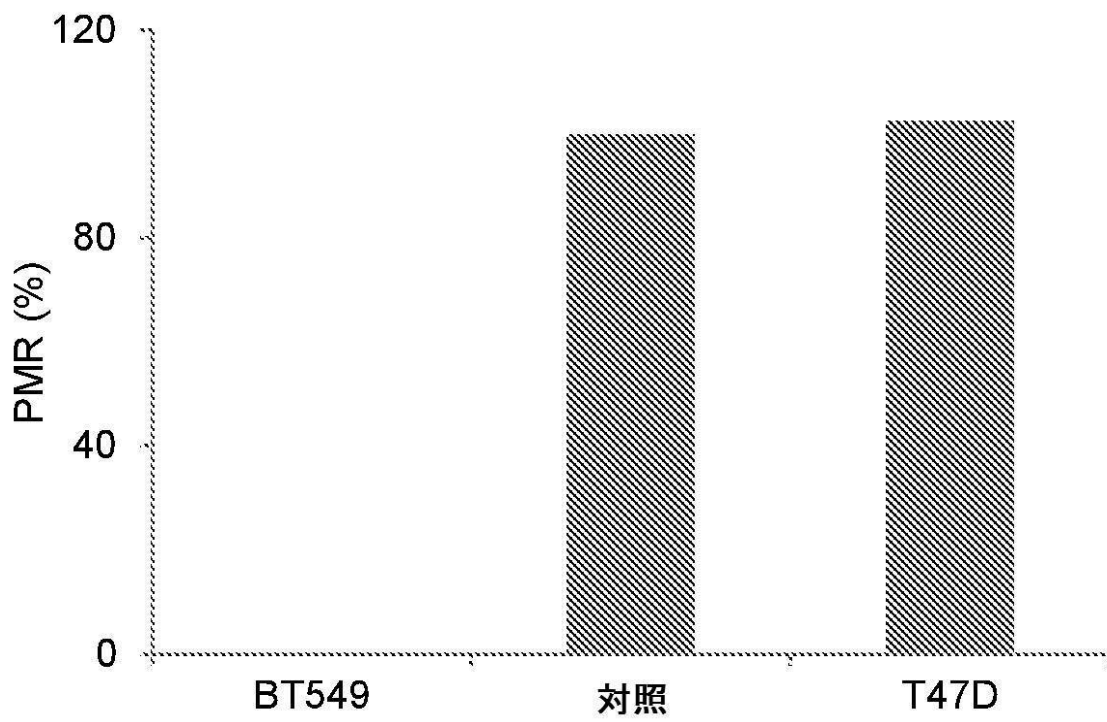
【図 14 ( D )】



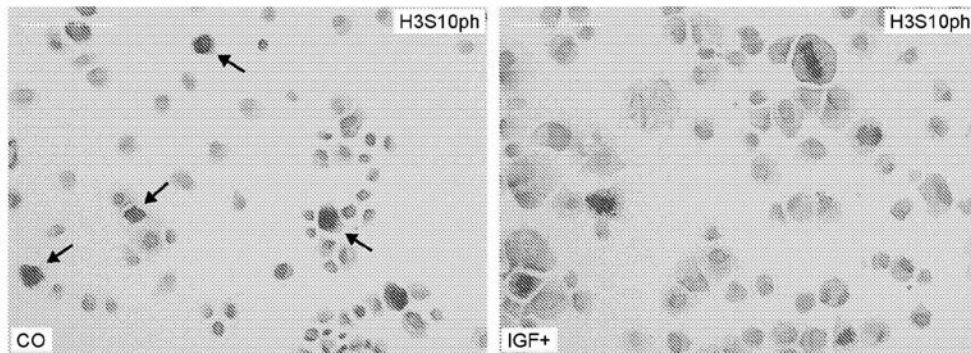
【図 14 ( E )】



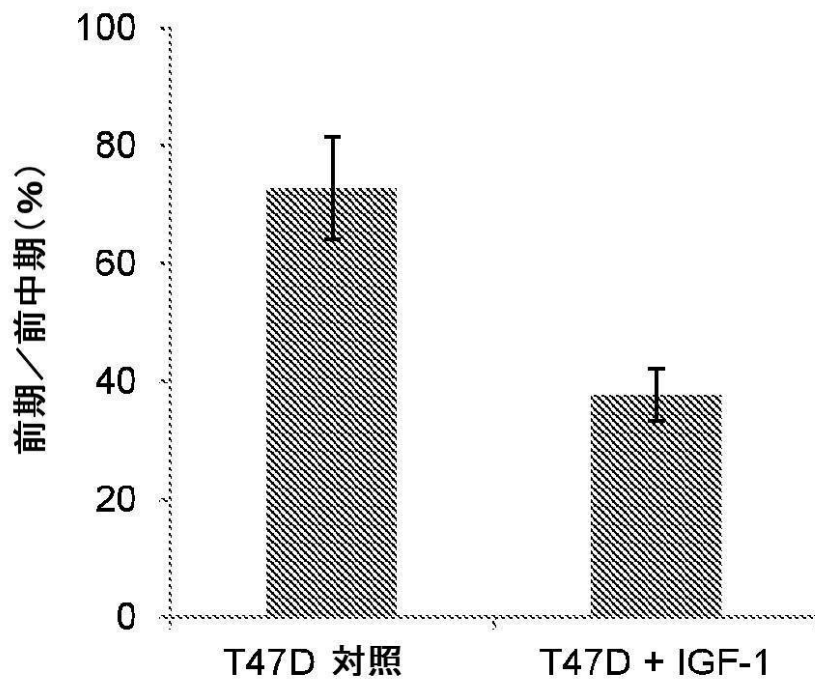
【図 14 ( F )】



【図 15 ( A )】



【図 15 (B)】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2012/053223

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/574 A61K38/17 C07K14/47 C12Q1/68  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N A61K C07K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                            | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | US 2005/009136 A1 (NIXON ANDREW [US] ET AL) 13 January 2005 (2005-01-13)<br>the whole document<br>paragraphs [0081] - [0090], [0107] - [0109], [0243] - [0249], [0253] - [0260]; claims 16-29<br>-----<br>-/- | 1-14,<br>16-22, 25    |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent 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

12 June 2013

Date of mailing of the international search report

27/06/2013

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

Boiangiu, Clara

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2012/053223

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | <p>RYAN A J ET AL: "Expression of a protease-resistant insulin-like growth factor-binding protein-4 inhibits tumour growth in a murine model of breast cancer",<br/>BRITISH JOURNAL OF CANCER, HARCOURT PUBLISHERS,<br/>vol. 101, no. 2, 16 June 2009 (2009-06-16)<br/>, pages 278-286, XP002601322,<br/>ISSN: 0007-0920, DOI:<br/>10.1038/SJ.BJC.6605141<br/>[retrieved on 2009-06-16]<br/>the whole document<br/>abstract<br/>page 280, right-hand column, last<br/>paragraph - page 281, left-hand column,<br/>paragraph first; figures 1,3<br/>pages 2283,284</p> <p>-----</p> | 1-25                  |
| Y         | <p>KR 2011 0091423 A (NAT CANCER CT [KR];<br/>SHIN CHANG HO [KR]; UNIV SUNGKYUNKWAN<br/>FOUND [KR]) 11 August 2011 (2011-08-11)<br/>the whole document<br/>paragraphs [0006], [0013], [0014],<br/>[0022] - [0032], [0046], [0058] -<br/>[0067]; claims 1-16</p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 5-11                  |
| X         | <p>WO 2008/018642 A2 (ONCOTHERAPY SCIENCE INC<br/>[JP]; UNIV TOKYO [JP]; NAKAMURA YUSUKE<br/>[JP]; K) 14 February 2008 (2008-02-14)<br/>the whole document</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 15                    |
| Y         | <p>page 25, line 31 - page 26, line 19;<br/>figures 8,9<br/>pages 18,19; figures 14,15<br/>page 154, line 15 - page 156, line 2<br/>claims 1-109</p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 5-11                  |
| X         | <p>WO 2011/143665 A1 (GENENTECH INC [US];<br/>HOFFMANN LA ROCHE [CH]; PATEL PREMAL H<br/>[US]; PETER) 17 November 2011 (2011-11-17)<br/>the whole document</p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 23                    |
| Y         | <p>the whole document</p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 24,25                 |
| X         | <p>WO 2008/076373 A1 (ABRAXIS BIOSCIENCE LLC<br/>[US]; DESAI NEIL P [US]; SOON-SHIONG<br/>PATRICK [U] 26 June 2008 (2008-06-26)<br/>the whole document</p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 23                    |
| Y         | <p>the whole document</p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 24,25                 |
| X         | <p>WO 2006/089290 A1 (AMERICAN BIOSCIENCE INC<br/>[US]; DESAI NEIL P [US]; SOON-SHIONG<br/>PATRICK [U] 24 August 2006 (2006-08-24)<br/>the whole document</p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 23                    |
| Y         | <p>the whole document</p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 24,25                 |
|           | -/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                       |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2012/053223

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | US 2006/205651 A1 (HARMEY JUDITH [IE])<br>14 September 2006 (2006-09-14)<br>the whole document<br>paragraphs [0047] - [0050]; claims 1-21<br>-----                                                                                                                                                                                                                   | 1-25                  |
| Y         | HARISH CHANDER ET AL: "Skp2B<br>Overexpression Alters a Prohibitin-p53<br>Axis and the Transcription of PAPP-A, the<br>Protease of Insulin-Like Growth Factor<br>Binding Protein 4",<br>PLOS ONE,<br>vol. 6, no. 8, 4 August 2011 (2011-08-04),<br>page e22456, XP055059001,<br>ISSN: 1932-6203, DOI:<br>10.1371/journal.pone.0022456<br>the whole document<br>----- | 1-25                  |
| Y         | WO 2009/092806 A2 (UNIV AARHUS [DK]; OXVIG<br>CLAUS [DK]; MIKKELSEN JAKOB HAUGE [DK];<br>NIELSE) 30 July 2009 (2009-07-30)<br>the whole document<br>claims 1-223<br>claims 208,212-214<br>-----                                                                                                                                                                      | 1-25                  |
| Y         | WO 94/21686 A1 (NORTH SYDNEY AREA HEALTH<br>SERV [AU]; SINOSICH MICHAEL JOSEPH [AU])<br>29 September 1994 (1994-09-29)<br>the whole document<br>page 1; claim 24<br>-----                                                                                                                                                                                            | 1-25                  |
| Y         | WO 2004/022163 A1 (UNIV MANITOBA [CA];<br>BRANDES LORNE J [CA])<br>18 March 2004 (2004-03-18)<br>the whole document<br>page 6 - page 26<br>-----                                                                                                                                                                                                                     | 1-25                  |
| A         | WO 2009/089548 A2 (H LEE MOFFITT CANCER &<br>RES INS [US]; UNIV SOUTH FLORIDA [US];<br>CHEN DUN) 16 July 2009 (2009-07-16)<br>claims 1-12,22,36,37<br>-----                                                                                                                                                                                                          | 1-25                  |
| A         | US 2009/197259 A1 (GUO NANCY LAN [US])<br>6 August 2009 (2009-08-06)<br>claims 11-25<br>-----                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1-25                  |
| A         | US 2010/317533 A1 (LOU YUANMEI [CA] ET AL)<br>16 December 2010 (2010-12-16)<br>claims 5-10<br>-----                                                                                                                                                                                                                                                                  | 1-25                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/GB2012/053223**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.:

**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/ GB2012/ 053223

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

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

1. claims: 1-4, 12-14(completely); 5-11, 16-22, 25(partially)

Therapeutic regimen for treating /preventing breast cancer and Method for determining the risk of progression of a proliferative lesion to invasive breast cancer and/or the risk of recurrent non-invasive disease in a patient, relating to PAPP gene and/or protein

---

2. claims: 5-11(partially)

A method for determining the risk of progression of a proliferative lesion to invasive breast cancer and/or the risk of recurrent non-invasive disease in a patient, not relating to PAPP gene and/or protein

---

3. claim: 15

Use of H3S10ph immuno-detection to determine the risk of progression from precursor lesions to invasive breast cancer and/or risk of recurrent disease.

---

4. claims: 23, 24(completely); 25(partially)

A chemotherapeutic agent that targets molecular events during cell division, for use in the treatment or prevention of breast cancer.

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2012/053223

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Publication<br>date                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| US 2005009136 A1                          | 13-01-2005          | US 2005009136 A1<br>WO 2005035732 A2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 13-01-2005<br>21-04-2005                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| KR 20110091423 A                          | 11-08-2011          | KR 20110091423 A<br>KR 20110091476 A<br>US 2013045486 A1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 11-08-2011<br>11-08-2011<br>21-02-2013                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| WO 2008018642 A2                          | 14-02-2008          | CA 2660438 A1<br>EP 2057187 A2<br>EP 2444417 A1<br>JP 2010500003 A<br>KR 20090064378 A<br>SG 174071 A1<br>US 2011135647 A1<br>WO 2008018642 A2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 14-02-2008<br>13-05-2009<br>25-04-2012<br>07-01-2010<br>18-06-2009<br>29-09-2011<br>09-06-2011<br>14-02-2008                                                                                                                                                                                                                                               |
| WO 2011143665 A1                          | 17-11-2011          | AU 2011252804 A1<br>CA 2793545 A1<br>CN 103025353 A<br>EP 2569014 A1<br>SG 185426 A1<br>US 2011287003 A1<br>WO 2011143665 A1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 04-10-2012<br>17-11-2011<br>03-04-2013<br>20-03-2013<br>28-12-2012<br>24-11-2011<br>17-11-2011                                                                                                                                                                                                                                                             |
| WO 2008076373 A1                          | 26-06-2008          | AU 2007334360 A1<br>CA 2672618 A1<br>CN 101605535 A<br>EP 2117520 A1<br>JP 2010513284 A<br>US 2010048499 A1<br>WO 2008076373 A1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 26-06-2008<br>26-06-2008<br>16-12-2009<br>18-11-2009<br>30-04-2010<br>25-02-2010<br>26-06-2008                                                                                                                                                                                                                                                             |
| WO 2006089290 A1                          | 24-08-2006          | AT 531365 T<br>AU 2006213999 A1<br>BR PI0607809 A2<br>CA 2598239 A1<br>CN 101160123 A<br>DK 1853250 T3<br>EP 1853250 A1<br>EP 2301531 A2<br>ES 2375828 T3<br>HK 1109589 A1<br>JP 2008530248 A<br>JP 2012193205 A<br>JP 2013064014 A<br>KR 20070114753 A<br>NZ 560879 A<br>PT 1853250 E<br>SG 166775 A1<br>SI 1853250 T1<br>US 2006263434 A1<br>US 2007116774 A1<br>US 2008063724 A1<br>US 2009098210 A1<br>US 2012177743 A1<br>WO 2006089290 A1<br>ZA 200707491 A | 15-11-2011<br>24-08-2006<br>13-06-2009<br>24-08-2006<br>09-04-2008<br>23-01-2012<br>14-11-2007<br>30-03-2011<br>06-03-2012<br>06-01-2012<br>07-08-2008<br>11-10-2012<br>11-04-2013<br>04-12-2007<br>30-04-2010<br>03-02-2012<br>29-12-2010<br>31-01-2012<br>23-11-2006<br>24-05-2007<br>13-03-2008<br>16-04-2009<br>12-07-2012<br>24-08-2006<br>31-12-2008 |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2012/053223

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)                                                                                                                                                             | Publication<br>date                                                                                                                      |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| US 2006205651 A1                          | 14-09-2006          | NONE                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                          |
| WO 2009092806 A2                          | 30-07-2009          | AU 2009207645 A1<br>CA 2713055 A1<br>CN 102037007 A<br>EP 2245052 A2<br>JP 2011510619 A<br>KR 20110005681 A<br>NZ 587506 A<br>US 2010310646 A1<br>WO 2009092806 A2                     | 30-07-2009<br>30-07-2009<br>27-04-2011<br>03-11-2010<br>07-04-2011<br>18-01-2011<br>28-09-2012<br>09-12-2010<br>30-07-2009               |
| WO 9421686 A1                             | 29-09-1994          | GB 2291059 A<br>US 6172198 B1<br>WO 9421686 A1                                                                                                                                         | 17-01-1996<br>09-01-2001<br>29-09-1994                                                                                                   |
| WO 2004022163 A1                          | 18-03-2004          | AT 378089 T<br>AU 2003269621 A1<br>CA 2497246 A1<br>DE 60317537 T2<br>EP 1545709 A1<br>JP 2006516532 A<br>KR 20060039387 A<br>US 2006160755 A1<br>US 2008318880 A1<br>WO 2004022163 A1 | 15-11-2007<br>29-03-2004<br>18-03-2004<br>23-10-2008<br>29-06-2005<br>06-07-2006<br>08-05-2006<br>20-07-2006<br>25-12-2008<br>18-03-2004 |
| WO 2009089548 A2                          | 16-07-2009          | US 2011039723 A1<br>WO 2009089548 A2                                                                                                                                                   | 17-02-2011<br>16-07-2009                                                                                                                 |
| US 2009197259 A1                          | 06-08-2009          | US 2009197259 A1<br>US 2011224908 A1<br>US 2012123105 A1                                                                                                                               | 06-08-2009<br>15-09-2011<br>17-05-2012                                                                                                   |
| US 2010317533 A1                          | 16-12-2010          | US 2010317533 A1<br>US 2012301891 A1                                                                                                                                                   | 16-12-2010<br>29-11-2012                                                                                                                 |

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.              | F I             | テーマコード (参考) |
|---------------------------|-----------------|-------------|
| A 6 1 K 38/00 (2006.01)   | A 6 1 K 37/02   |             |
| A 6 1 K 48/00 (2006.01)   | A 6 1 K 48/00   |             |
| A 6 1 K 31/7088 (2006.01) | A 6 1 K 31/7088 |             |
| A 6 1 K 31/337 (2006.01)  | A 6 1 K 31/337  |             |
| A 6 1 K 31/475 (2006.01)  | A 6 1 K 31/475  |             |
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01)    | C 1 2 Q 1/68    | A           |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01)   | C 1 2 N 15/00   | A           |

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, 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, RS, 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, BN, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(71) 出願人 514157537  
 フェイ ガーティーン ラボラトリーズ リミテッド  
 アイルランド共和国 ダブリン 2 デイム ストリート 40

(74) 代理人 100100549  
 弁理士 川口 嘉之

(74) 代理人 100126505  
 弁理士 佐貫 伸一

(74) 代理人 100131392  
 弁理士 丹羽 武司

(74) 代理人 100151596  
 弁理士 下田 俊明

(72) 発明者 エレンベルグ, ジャン  
 ドイツ連邦共和国 69117 ハイデルベルク マイヤーホフシュトラッセ 1 ザ ヨーロピ  
 アン モレキュラー バイオロジー ラボラトリー

(72) 発明者 ノイマン, ベアテ  
 ドイツ連邦共和国 69117 ハイデルベルク マイヤーホフシュトラッセ 1 ザ ヨーロピ  
 アン モレキュラー バイオロジー ラボラトリー

(72) 発明者 ロッド, マルコ  
 イギリス グレーター ロンドン W1T 4TP ロンドン トッテナム コート ロード 9  
 7 ザ ネットワーク ビルディング ユーシーエル ビジネス パブリック リミテッド カン  
 パニー

(72) 発明者 ウィリアムス, ガレス  
 イギリス グレーター ロンドン W1T 4TP ロンドン トッテナム コート ロード 9  
 7 ザ ネットワーク ビルディング ユーシーエル ビジネス パブリック リミテッド カン  
 パニー

(72) 発明者 ストーパー, カイ  
 イギリス グレーター ロンドン W1T 4TP ロンドン トッテナム コート ロード 9  
 7 ザ ネットワーク ビルディング ユーシーエル ビジネス パブリック リミテッド カン  
 パニー

(72) 発明者 ヴェラマカニ, サロジ  
 イギリス CB25 9TN ケンブリッジ ケンブリッジ リサーチ パーク 7300 フェ

## イ ガーティーン ラボラトリーズ リミテッド

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA80 CA02 CA09 CA11 HA12 HA17  
4B063 QA01 QA19 QQ43 QQ53 QR32 QR36 QR55 QR62 QS25 QS34  
QX02  
4C084 AA02 AA03 AA13 AA19 AA20 BA44 CA62 MA02 MA16 MA52  
MA55 MA56 MA63 MA66 NA05 ZA811 ZA812 ZB261 ZB262  
4C086 AA01 AA02 BA02 CB21 EA16 MA02 MA04 NA05 ZA81 ZB26

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         |            |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 乳腺癌的检测和治疗                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2015509186A</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 公开(公告)日 | 2015-03-26 |
| 申请号            | JP2014548197                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 申请日     | 2012-12-20 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 欧洲分子生物学实验室<br>UCL商业有限公司<br>王菲噶尔青少年实验室有限公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 欧洲分子生物学实验室<br>Yushieru商务公共有限公司<br>王菲噶尔青少年实验室有限公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |         |            |
| [标]发明人         | エレンベルグジャン<br>ノイマンベアテ<br>ロッドマルコ<br>ウィリアムスガレス<br>ストーバーカイ<br>ヴェラマカニサロジ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |         |            |
| 发明人            | エレンベルグ,ジャン<br>ノイマン,ベアテ<br>ロッド,マルコ<br>ウィリアムス,ガレス<br>ストーバー,カイ<br>ヴェラマカニ,サロジ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/574 G01N33/53 A61K45/06 A61P35/00 A61P15/00 A61K38/00 A61K48/00 A61K31/7088<br>A61K31/337 A61K31/475 C12Q1/68 C12N15/09                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |         |            |
| CPC分类号         | A61K38/1709 A61K38/1754 A61K38/30 A61K45/06 A61P15/00 C07K14/4715 C12Q1/6886 C12Q2600<br>/118 C12Q2600/154 C12Q2600/156 C12Q2600/158 G01N33/57415 A61K2300/00 A61K38/17 C07K14<br>/4702 G01N33/574                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |         |            |
| FI分类号          | G01N33/574.ZNA.A G01N33/53.M A61K45/06 A61P35/00 A61P15/00 A61K37/02 A61K48/00 A61K31<br>/7088 A61K31/337 A61K31/475 C12Q1/68.A C12N15/00.A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA12 4B024<br>/HA17 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR55<br>4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA13 4C084<br>/AA19 4C084/AA20 4C084/BA44 4C084/CA62 4C084/MA02 4C084/MA16 4C084/MA52 4C084/MA55<br>4C084/MA56 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/ZA811 4C084/ZA812 4C084/ZB261<br>4C084/ZB262 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BA02 4C086/CB21 4C086/EA16 4C086/MA02 4C086<br>/MA04 4C086/NA05 4C086/ZA81 4C086/ZB26 |         |            |
| 代理人(译)         | 川口义行                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
| 优先权            | 2011021924 2011-12-20 GB                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |         |            |
| 其他公开文献         | JP2015509186A5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及一种风险和/或方法用于确定复发性非侵入性疾病患者的乳房前驱病变的风险发展为浸润性乳腺癌，PAPP-和/或在乳房从患者获得组织样本包括检测PAPP-A的功能活性的存在和/或水平，如果存在于PAPP-A为不存在或低于对照水平时，有进展的风

险和/或复发性疾病为浸润癌的风险，一种方法。在另一个实施方案中，诊断可以通过识别在患者样品中的前一年或前中期有丝分裂细胞的比例来进行，细胞在上年或前中期的百分比为30%或更多，这表明存在发展为浸润性乳腺癌和/或复发性疾病风险的风险。通过恢复有丝分裂的正常进展，本发明可以进一步使有丝分裂延迟的乳腺癌对抗增殖剂，优选抗有丝分裂剂敏感。在本实施例中，第一药物的施用，以释放乳腺癌细胞有丝分裂块中，通过施用影响增殖细胞顺序的第二药物杀死癌细胞。

表 1. MitoCheck 候補遺伝子についての CpG アイランドの位置

| 遺伝子 <sup>a</sup> | 遺伝子座                                  | CpG アイランドの位置 <sup>b</sup> | CpG アイランドの長さ (bp) | CpG アイランド中の CG (数) | CpG の観測値 / CpG の期待値 | GC 含量 (%) |
|------------------|---------------------------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------|-----------|
| PLK1             | chr16:23,590,521-23,616,371 (16p12.1) | 23597103 - 23598423       | 1320              | 88                 | 0.768               | 60.6      |
| TPX2             | chr20:29,751,378-29,892,452 (20q11.2) | 29790413 - 29791269       | 856               | 48                 | 0.823               | 55.0      |
| KIF111           | chr10:94,327,431-94,420,670 (10q23.3) | 94341250 - 94341728       | 478               | 38                 | 1.052               | 55.0      |
| KIF112           | chr10:94,327,431-94,420,670 (10q23.3) | 94341912 - 94343451       | 1539              | 89                 | 0.793               | 54.3      |
| PAPP-A           | chr9:117,893,759-118,266,552 (9q33.1) | 117955868 - 117957241     | 1373              | 115                | 0.852               | 64.5      |
| SGOL1            | chr3:20,177,087-20,202,687 (3p24.3)   | 20176596 - 20177594       | 998               | 65                 | 0.876               | 55.0      |
| PSMD8            | chr19:43,557,030-43,566,304 (19q13.2) | 43556706 - 43558018       | 1312              | 81                 | 0.747               | 59.4      |
| TUBB2C           | chr9:139,255,532-139,257,980 (9q34)   | 139254197 - 139256673     | 2476              | 225                | 0.817               | 67.3      |

<sup>a</sup> ヒトゲノム解析機構の遺伝子名

<sup>b</sup> DNA配列はgenome.ucsc.eduを用いて得た。CpGアイランドの位置は、cpislands.usc.eduを用いて同定した。