

(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2019-500618

(P2019-500618A)

(43) 公表日 平成31年1月10日(2019.1.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁)

(21) 出願番号	特願2018-538961 (P2018-538961)	(71) 出願人	518135995 シズル バイオテクノロジー リミテッド イギリス国, ワイオー10 5ディーディ ー ヨークシャー ヘスリントン, ヘスリ ントン ホール
(86) (22) 出願日	平成28年10月14日 (2016.10.14)	(74) 代理人	100079108 弁理士 稲葉 良幸
(85) 翻訳文提出日	平成30年6月4日 (2018.6.4)	(74) 代理人	100109346 弁理士 大貫 敏史
(86) 国際出願番号	PCT/GB2016/053203	(74) 代理人	100117189 弁理士 江口 昭彦
(87) 国際公開番号	W02017/068330	(74) 代理人	100134120 弁理士 内藤 和彦
(87) 国際公開日	平成29年4月27日 (2017.4.27)		
(31) 優先権主張番号	1518466.6		
(32) 優先日	平成27年10月19日 (2015.10.19)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C i z 1 b 変異体を検出するためのフィブリノゲン捕捉剤の使用

(57) 【要約】

本発明は、C i z 1 b 変異体を検出するアッセイにおけるフィブリノゲン捕捉剤又はフィブリノゲン検出剤の使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C i z 1 b 変異体を検出するアッセイにおけるフィブリノゲン捕捉剤又はフィブリノゲン検出剤の使用。

【請求項 2】

前記アッセイが酵素結合免疫吸着アッセイである、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記フィブリノゲン捕捉剤又はフィブリノゲン検出剤が、フィブリノゲンに特異的に結合する、抗体又はその断片、非タンパク質足場、アダプター又は C i z 1 b 変異体ペプチドである、請求項 1 又は 2 に記載の使用。

10

【請求項 4】

前記フィブリノゲン捕捉剤又はフィブリノゲン検出剤が、フィブリノゲンに特異的に結合する抗体又はその断片である、請求項 1 又は 2 に記載の使用。

【請求項 5】

前記フィブリノゲン捕捉剤が、フィブリノゲンに特異的に結合する C i z 1 b 変異体ペプチドである、請求項 1 又は 2 に記載の使用。

【請求項 6】

前記フィブリノゲンがフィブリノゲン鎖である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 7】

20

前記 C i z 1 b 変異体が、以下のステップ：

a) フィブリノゲン捕捉剤を使用してフィブリノゲン / C i z 1 b 変異体複合体を捕捉するステップ；及び

b) C i z 1 b 変異体検出剤を使用して C i z 1 b 変異体を検出するステップ；又は

a) C i z 1 b 変異体捕捉剤を使用してフィブリノゲン / C i z 1 b 変異体複合体を捕捉するステップ；及び

b) フィブリノゲン検出剤を使用してフィブリノゲンを検出するステップ、を含む方法によって検出される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 8】

30

対象由来の試料中における C i z 1 b 変異体ペプチドを検出することを含む、対象の癌を診断する方法であって、前記試料中の C i z 1 b 変異体ペプチドの存在は、前記対象が癌を有することを指示し、及び前記方法が、前記試料からフィブリノゲン / C i z 1 b 変異体ペプチド複合体を捕捉するステップを含む、方法。

【請求項 9】

対象由来の試料中における C i z 1 b 変異体ペプチドを検出することを含む、対象の癌を診断する方法であって、前記試料中の C i z 1 b 変異体ペプチドの存在は、前記対象が癌を有することを指示し、及び前記 C i z 1 b 変異体ペプチドは、配列番号 1 1 として示される配列又は配列番号 1 1 の 3 6 ~ 3 8 位に示されるとおりの E V R を含むその断片である、方法。

40

【請求項 10】

以下のステップ：

a) フィブリノゲン捕捉剤を使用してフィブリノゲン / C i z 1 b 変異体複合体を捕捉するステップ；及び

b) C i z 1 b 変異体検出剤を使用して C i z 1 b 変異体を検出するステップ；又は

a) C i z 1 b 変異体捕捉剤を使用してフィブリノゲン / C i z 1 b 変異体複合体を捕捉するステップ；及び

b) フィブリノゲン検出剤を使用してフィブリノゲンを検出するステップ、を含む、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

50

- 【請求項 1 1】
前記 C i z 1 b 変異体捕捉剤が、C i z 1 b 変異体に特異的に結合する抗体又はその断片、又は非タンパク質足場である、請求項 1 0 に記載の方法。
- 【請求項 1 2】
前記 C i z 1 b 変異体捕捉剤が、C i z 1 b 変異体に特異的に結合する抗体である、請求項 1 0 に記載の方法。
- 【請求項 1 3】
前記 C i z 1 b 変異体ペプチド又はフィブリノゲンを検出する前記ステップが、抗体ベースのアレイ、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)、非抗体タンパク質足場、ラジオイムノアッセイ (R I A)、ウエスタンブロッティング、アプタマー又は質量分析を用いる、請求項 8 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。 10
- 【請求項 1 4】
前記試料のエキソソームコンパートメントから C i z 1 b 変異体ペプチド及び / 又はフィブリノゲン / C i z 1 b 変異体複合体を放出させるステップを更に含む、請求項 8 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 1 5】
前記 C i z 1 b 変異体ペプチド及び / 又はフィブリノゲン / C i z 1 b 変異体複合体が界面活性剤処理によって前記エキソソームコンパートメントから放出される、請求項 1 4 に記載の方法。
- 【請求項 1 6】 20
前記試料から前記エキソソーム画分をエンリッチするステップを更に含む、請求項 1 4 又は 1 5 に記載の方法。
- 【請求項 1 7】
前記エキソソーム画分を濃縮する前記ステップが、超遠心分離、限外ろ過、連続フロー電気泳動、クロマトグラフィー、沈殿又はクロスフロー限外ろ過を含む、請求項 1 6 に記載の方法。
- 【請求項 1 8】
前記癌が、肺癌、リンパ腫、腎癌、乳癌、肝癌、膀胱癌、卵巣癌又は甲状腺癌から選択される、請求項 1 0 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 1 9】 30
前記癌が肺癌である、請求項 1 8 に記載の方法。
- 【請求項 2 0】
癌療法薬を対象に投与することを含む、癌を有する対象を治療する方法であって、前記対象が、請求項 1 0 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法によって癌を有すると同定されている、方法。
- 【請求項 2 1】
癌の治療に使用される抗癌薬であって、前記対象が、請求項 1 0 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法によって癌を有すると同定されている、抗癌薬。
- 【請求項 2 2】 40
肺癌の治療に使用される肺癌抗癌薬であって、前記対象が、請求項 1 9 に記載の方法によって肺癌を有すると同定されている、肺癌抗癌薬。
- 【請求項 2 3】
試料のエキソソームコンパートメントから C i z 1 b 変異体及び / 又はフィブリノゲン / C i z 1 b 変異体複合体を放出させるための界面活性剤の使用。
- 【請求項 2 4】
試料中の C i z 1 b 変異体を検出する方法であって、前記試料を界面活性剤で処理することにより前記試料のエキソソームコンパートメントから C i z 1 b 変異体及び / 又はフィブリノゲン / C i z 1 b 変異体複合体を放出させるステップと、前記試料中に前記 C i z 1 b 変異体が存在するかどうかを検出するステップとを含む方法。
- 【請求項 2 5】 50

前記 C i z 1 b 変異体がフィブリノゲンとの複合体である、請求項 2 3 に記載の使用又は請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記 C i z 1 b 変異体を放出させる前に前記試料から前記エキソソーム画分を濃縮するステップを含む、請求項 2 3 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の使用又は方法。

【請求項 2 7】

前記エキソソーム画分を濃縮する前記ステップが、超遠心分離、限外ろ過、連続フロー電気泳動、クロマトグラフィー、沈殿又はクロスフロー限外ろ過を含む、請求項 2 6 に記載の使用又は方法。

【請求項 2 8】

フィブリノゲンに特異的に結合する薬剤と C i z 1 b 変異体に特異的に結合する薬剤とを含むキット。

【請求項 2 9】

前記フィブリノゲンがフィブリノゲン鎖である、請求項 2 8 に記載のキット。

【請求項 3 0】

フィブリノゲンに特異的に結合する前記薬剤及び/又は C i z 1 b 変異体に特異的に結合する前記薬剤が、抗体又はその断片、非タンパク質足場又はアダプターである、請求項 2 8 又は 2 9 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、試料中の C i p 1 相互作用ジンクフィンガータンパク質 (C i z 1) の検出に有用なアッセイ及び方法に関する。詳細には、本発明は、癌の診断へのかかるアッセイ及び方法の使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

C i p 1 相互作用ジンクフィンガータンパク質 1 (C i z 1) (N C B I 参照配列 : N M _ 0 0 1 1 3 1 0 1 6 . 1 によって例示される) は細胞増殖に必須である。 C i z 1 は S 期初期の間に D N A 複製部位を形成する核マトリックス結合フォーカスに局在し、サイクリン A / サイクリン依存性キナーゼ (C D K) 2、サイクリン E / C D K 2 及び p 2 1 c i p 1 を含めた細胞周期調節因子に関連して D N A 複製の開始を促進する。転写との関連では、 C I Z 1 はそれ自体がエストロゲン受容体 (E R) の正の補因子であるエストロゲン応答性遺伝子であり、標的クロマチンへの E R の動員を増進する能力を有する。マウス及びヒトにおいては、 C i z 1 が選択的スプライシングを受けると保存されたアイソフォームが産生される。正常な C i z 1 タンパク質は少なくとも 2 つの定義付けられた機能ドメイン、「複製」ドメイン及び「固定化」ドメインを含む。

【0 0 0 3】

C i z 1 エクソン 1 4 の選択的スプライシングによる C i z 1 b 変異体の生成が、小細胞肺癌 (S C L C)、非小細胞肺癌 (N S C L C)、リンパ腫、甲状腺癌、腎癌及び肝癌を含めた様々な癌で明らかにされている。 C i z 1 の複製ドメイン又は固定化ドメインのいずれかの過剰発現もまた、癌、例えば、 N S C L C、乳癌、結腸癌、腎癌、肝癌、膀胱癌及び甲状腺癌で示されている。ドメイン発現と癌のステージとの相関もまた明らかにされている (国際公開第 2 0 1 2 / 0 7 8 2 0 8 号を参照)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 4】

本発明は、新規バイオマーカー及び標的によって肺癌などの癌に罹患している患者の生存率を改善する診断検査及び治療の開発が依然として必要とされていることに対処するも

10

20

30

40

50

のである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

発明の概要

本発明者らは、C i z 1 b変異体がフィブリノゲンとの複合体として存在することを明らかにした。これにより、本発明者らは、対象におけるC i z 1 b変異体の存在を検出するための新規アッセイを開発することが可能になった。

【0006】

更に、本発明者らは、C i z 1 b変異体がペプチド断片として存在し得ることを明らかにした。更に、本発明者らは、C i z 1 b変異体及び/又はフィブリノゲン/C i z 1 b変異体複合体が血液試料のエキソソームコンパートメントに存在し得ることを明らかにした。

10

【0007】

これらの知見から、単独である場合又はフィブリノゲンとの複合体である場合のいずれかであるC i z 1 b変異体ペプチドの検出アッセイの設計が指南される。

【0008】

詳細には、C i z 1 b変異体がフィブリノゲンと複合体化するという知見により、フィブリノゲン/C i z 1 b変異体複合体を単離するための最初のステップとしてフィブリノゲン又はC i z 1 b変異体の捕捉を利用する検出アッセイ、詳細には診断アッセイを提供することが可能になった。このアッセイは、フィブリノゲン捕捉剤を使用したフィブリノゲン/C i z 1 b変異体複合体の単離と、続くC i z 1 b変異体検出剤を使用した、前記単離された複体内にあり得るC i z 1 b変異体の検出を含み得る。或いは、このアッセイは、C i z 1 b変異体捕捉剤を使用したフィブリノゲン/C i z 1 b変異体複合体の単離と、続くフィブリノゲン検出剤を使用した、前記単離された複体内にあり得るフィブリノゲンの検出を含み得る。

20

【0009】

従って、第1の態様において本発明は、C i z 1 b変異体を検出するアッセイにおけるフィブリノゲン捕捉剤又はフィブリノゲン検出剤の使用に関する。

【0010】

本明細書で使用されるとき、捕捉剤とは、試料からフィブリノゲン/C i z 1 b変異体複合体を単離（即ち濃縮（enrich））するために用いられる薬剤を指す。例えば、試料は、対象から単離された試料であってもよい。詳細には、試料は、対象から単離された血液試料（例えば血漿試料）であってもよい。

30

【0011】

本明細書で使用されるとき、検出剤とは、捕捉剤を使用して試料から単離（即ち濃縮）された後のフィブリノゲン/C i z 1 b変異体複合体に結合させるために用いられる薬剤を指す。このように、検出剤は典型的には捕捉ステップの後に、単離（即ち濃縮）されたフィブリノゲン/C i z 1 b変異体複合体の存在を決定するために使用される。

【0012】

好適には、本アッセイは酵素結合免疫吸着アッセイであってもよい。

40

【0013】

フィブリノゲン捕捉剤又はフィブリノゲン検出剤は、フィブリノゲンに特異的に結合する抗体又はその断片、非タンパク質足場、アプタマー又はC i z 1 b変異体ペプチドであってもよい。

【0014】

好ましい実施形態において、フィブリノゲン捕捉剤又はフィブリノゲン検出剤は、フィブリノゲンに特異的に結合する抗体又はその断片である。別の好ましい実施形態において、フィブリノゲン捕捉剤は、フィブリノゲンに特異的に結合するC i z 1 b変異体ペプチドである。

【0015】

50

フィブリノゲンはフィブリノゲン鎖であってもよい。

【0016】

C i z 1 b 変異体は、対象由来の試料、例えば、血液、尿、唾液又は気管支肺胞洗浄試料中に検出され得る。

【0017】

好ましい実施形態において試料は対象由来の血液試料である。特に好ましい実施形態において試料は血漿試料である。

【0018】

C i z 1 b 変異体は、以下のステップ：a) フィブリノゲン捕捉剤を使用してフィブリノゲン/C i z 1 b 変異体複合体を捕捉するステップ；及びb) C i z 1 b 変異体検出剤を使用してC i z 1 b 変異体を検出するステップ；又はa) C i z 1 b 変異体捕捉剤を使用してフィブリノゲン/C i z 1 b 変異体複合体を捕捉するステップ；及びb) フィブリノゲン検出剤を使用してフィブリノゲンを検出するステップを含む方法によって検出され得る。

10

【0019】

C i z 1 b 変異体捕捉剤は、C i z 1 b 変異体に特異的に結合する抗体又はその断片、又は非タンパク質足場であってもよい。

【0020】

C i z 1 b 変異体捕捉剤は、C i z 1 b 変異体に特異的に結合する抗体又はその断片であってもよい。

20

【0021】

更なる態様において本発明は、対象由来の試料中のC i z 1 b 変異体ペプチドを検出することを含む、対象の癌を診断する方法に関し、試料中のC i z 1 b 変異体ペプチドの存在は、対象が癌を有することを示し、及びこの方法は、試料からフィブリノゲン/C i z 1 b 変異体ペプチド複合体を捕捉するステップを含む。

【0022】

更なる態様において本発明は、対象由来の試料中のC i z 1 b 変異体ペプチドを検出することを含む、対象の癌を診断する方法に関し、試料中のC i z 1 b 変異体ペプチドの存在は、対象が癌を有することを指示し、及びC i z 1 b 変異体ペプチドは、配列番号11として示される配列又は配列番号11の36~38位に示されるとおりのEVRを含むその断片である。

30

【0023】

別の態様において本発明は、試料中のC i z 1 b 変異体ペプチドを検出する、例えば対象由来の試料中のC i z 1 b 変異体ペプチドを検出する方法に関し、この方法は、試料からフィブリノゲン/C i z 1 b 変異体ペプチド複合体を捕捉するステップを含む。

【0024】

本方法は、フィブリノゲン捕捉剤を使用してフィブリノゲン/C i z 1 b 変異体複合体を捕捉するステップ；及びC i z 1 b 変異体検出剤を使用してC i z 1 b 変異体を検出するステップ；又はC i z 1 b 変異体捕捉剤を使用してフィブリノゲン/C i z 1 b 変異体複合体を捕捉するステップ；及びフィブリノゲン検出剤を使用してフィブリノゲンを検出するステップを含み得る。

40

【0025】

好適には、C i z 1 b 変異体ペプチド又はフィブリノゲンを検出するステップは、抗体ベースのアレイ、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)、非抗体タンパク質足場、ラジオイムノアッセイ (R I A)、ウエスタンブロットティング、アプタマー又は質量分析を用い得る。

【0026】

本方法は、試料のエキソソーム成分からC i z 1 b 変異体ペプチド及び/又はフィブリノゲン/C i z 1 b 変異体ペプチド複合体を放出させるステップを更に含み得る。

【0027】

50

C i z 1 b 変異体ペプチド及び/又はフィブリノゲン/C i z 1 b 変異体ペプチド複合体は、S D S 処理などの界面活性剤処理によってエキソソーム成分から放出させてもよい。

【0028】

本方法は、試料からエキソソーム画分を濃縮するステップを更に含み得る。

【0029】

例えば、エキソソーム画分を濃縮するステップは、超遠心分離、限外ろ過、連続フロー電気泳動、クロマトグラフィー又はクロスフロー限外ろ過を含み得る。

【0030】

癌は、肺癌、リンパ腫、腎癌、乳癌、肝癌、膀胱癌、卵巣癌又は甲状腺癌から選択されてもよい。

10

【0031】

詳細には、癌は肺癌であってもよい。

【0032】

本発明は更に、癌療法薬を対象に投与することを含む、癌を有する対象を治療する方法に関し；ここで対象は、本発明の方法によって癌を有すると同定されている。

【0033】

本発明はまた、癌の治療に使用される抗癌薬も提供し、ここで対象は、本発明の方法によって癌を有すると同定されている。

【0034】

本発明は更に、肺癌の治療に使用される肺癌抗癌薬を提供し、ここで対象は、本発明の方法によって肺癌を有すると同定されている。

20

【0035】

更なる態様において本発明は、試料のエキソソームコンパートメントからC i z 1 b 変異体及び/又はフィブリノゲン/C i z 1 b 変異体複合体を放出させるための界面活性剤の使用を提供する。

【0036】

別の態様において本発明は、試料中のC i z 1 b 変異体を検出する方法に関し、この方法は、試料を界面活性剤で処理することにより試料のエキソソームコンパートメントからC i z 1 b 変異体及び/又はフィブリノゲン/C i z 1 b 変異体複合体を放出させるステップ及び試料中にC i z 1 b 変異体が存在するかどうかを検出するステップを含む。本方法は、C i z 1 b 変異体を放出させる前に試料からエキソソーム画分を濃縮するステップを更に含み得る。

30

【0037】

エキソソーム画分を濃縮するステップは、超遠心分離、限外ろ過、連続フロー電気泳動、クロマトグラフィー又はクロスフロー限外ろ過を含み得る。

【0038】

更なる態様において本発明は、フィブリノゲンに特異的に結合する薬剤とC i z 1 b 変異体に特異的に結合する薬剤とを含むキットを提供する。

【0039】

フィブリノゲンはフィブリノゲン鎖であってもよい。

40

【0040】

フィブリノゲンに特異的に結合する薬剤及び/又はC i z 1 b 変異体に特異的に結合する薬剤は、抗体又はその断片、非タンパク質足場又はアプタマーであってもよい。

【0041】

フィブリノゲンに特異的に結合する薬剤はC i z 1 b 変異体ペプチドであってもよい。

【0042】

本発明の上記の態様のいずれかによれば、C i z 1 b 変異体は、配列番号11として示されるC i z 1 b 変異体ペプチド又は配列番号11の36~38位に示されるとおり

50

の EVR を含むその断片であり得る。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】 a) スプライスジャンクション選択的抗 C i z 1 ウサギポリクローナル抗体 0 4 3 で検出された、C i z 1 b 変異体エピトープ含有種。0 4 3 は、抗体 2 B について記載されるとおり作成してバリデートしたものであり (Higgins et al.; (2012); PNAS; Nov 6; 109(45):E3128-35)、肺癌患者由来の血漿中にウエスタンブロットによって C i z 1 b 変異体を検出する能力を有する。ウエスタンブロットは、5 人の肺癌患者 (様々なステージ) からの代表的な試料 0 . 5 u l 及び無疾患患者からの 5 例で実施したもので、C i z 1 b 変異体を明らかにする。b) 製造者が推奨するとおり使用した Invitrogen 全エキソソーム単離キット (カタログ番号 4 4 8 4 4 5 0) を用いた、肺癌患者由来の血漿のここに例示されるエキソソームコンパートメントと可溶性コンパートメントとへの分離。画分は SDS - PAGE によって分離し、C i z 1 b 変異体を明らかにするため 0 4 3 でプローブするか、又はタンパク質の他のどこかにあるエピトープを認識する「汎用」C i z 1 抗体でプローブした (ここに示すデータは、C i z 1 の C 末端を検出する NB 1 0 0 - 7 4 6 2 4 (Nov 4)、Novus Biologicals で生成されている)。レーン 1、未処理血漿 (0 . 5 u l)、レーン 2、低速クリアリングスピン後 (0 . 5 u l)、レーン 3、高速クリアリングスピン後 (0 . 5 u l)、レーン 4、エキソソーム試薬添加後 (0 . 5 u l 当量)、レーン 5、高速スピン上清 (SN、0 . 5 u l 当量)、レーン 6、高速スピペレット (0 . 5 u l 当量)、レーン 7、高速スピペレット (P、1 u l 当量)、レーン 8、高速スピペレット (2 u l 当量)。赤色の矢印は重要なレーンを示し、C i z 1 エピトープの異なる分配を示す。M、分子量マーカー。c) C i z 1 b 変異体がエキソソーム画分のみにあるタイプ 1 血漿試料と、C i z 1 b 変異体の画分が可溶性画分にあるタイプ 2 パターンを示すまれな患者との比較。d) プロトタイプサンドイッチ ELISA (試料を界面活性剤で処理しない) を用いて生成した定量的免疫分析、c で示されたタイプ 2 血漿試料におけるシグナルの増加を示す。e) 未処理タイプ 1 血漿、及び 3 % SDS で処理した後 (プロテアーゼ阻害薬、PI、又は 1 0 m M EDTA の存在下で試験した) における C i z 1 b 変異体の分配、可溶性画分へのエピトープのシフトが明らかである。青色の矢印は、エキソソーム単離プロトコルを適用した後の可溶性画分を示す。右側に MW マーカーを示す。SN = 上清、P = ペレット (エキソソーム)。f) ELISA イムノアッセイにおける SDS 処理したタイプ 1 血漿の癌特異的シグナルの増強。

10

20

30

40

50

【図 2 - 1】 C i z 1 配列

【図 2 - 2】 C i z 1 配列

【図 3】 C i z 1 b 変異体約 6 5 ~ 7 0 k D a 種は、C i z 1 b 変異体ペプチドの抗原性を増大させ得るキャリアタンパク質に安定に結合する C i z 1 b 変異体ペプチドである。a) 従来記載されるとおりの (Higgins et al.; 上記)、抗 C i z 1 b 変異体抗体 2 B によって認識される癌選択的エピトープを示すウエスタンブロット。b) 0 . 5 u l の非癌血漿と混合した合成 b 変異体ペプチド (5 0 n m o l の E I A G Q D E D H F I T V D A V G C F E G D E E E E D D E D E E E I E V R S R D I S R E E W K G S E T Y S P N T A Y G V D F L V - 配列番号 1 2) からの C i z 1 b 変異体エピトープの再構成。遊離ペプチドは予想よりも 3 ~ 4 倍大きい MW (7 . 6 k D a ではなく約 3 0 k D a) を示す移動度で移動する (青色の矢印によって示す)。血漿中でインキュベートすると移動度は低下し、抗原性が増加し、及び約 8 0 k D a に新規の種が作り出される (赤色の矢印によって示す)。c) 別個の抗 C i z 1 b 変異体モノクローナル抗体でも同様の結果が生成された。d) 参考として、デュプリケートのプロットをエクソン 1 4 a パージョンのペプチド (E I A G Q D E D H F I T V D A V G C F E G D E E E E D D E D E E E I E V E E E L C K Q R S R D I S R E E W K G S E T Y S P N T A Y G V D F L V - 配列番号 1 3) に選択的なモノクローナル抗体でプローブすると、レーン 1 及び 3 にペプチドの検出が示される。凡例: レーン 1、WT ペプチドのみ。レーン 2、B 変異体ペプチドのみ。レーン 3、WT ペプチド + 正常血漿。レーン 4、B 変異体ペプチド + 正常血

漿。レーン5、正常血漿のみ。結果は、正常血漿がb変異体ペプチドを加えたとき約80 kDaにCiz1 b変異体シグナルを獲得するが、a変異体ペプチドを加えても獲得しないことを示している。e) ショートb変異体ペプチド(DEEEIEVRSRDIS - 配列番号2)を用いると、癌血漿又は非癌血漿のいずれと組み合わせるときも、同様の結果が得られた。ウエスタンブロットは、抗Ciz1 b変異体モノクローナル抗体(左)又は抗Ciz1 b変異体ポリクローナル抗体043(右)による結果を示す。凡例:レーン1、B変異体ペプチドのみ。レーン2、B変異体ペプチド+正常血漿。レーン3、B変異体ペプチド+肺癌血漿。レーン4、正常血漿単独。レーン5、肺癌血漿単独。新規シグナルの移動度が癌患者血漿の内因性シグナルと同様であることに留意されたい。F) 抗Ciz1 b変異体モノクローナル抗体(上)又は抗Ciz1 b変異体ポリクローナル抗体043(下)で検出した、ショートペプチド(DEEEIEVRSRDIS - 配列番号2)の癌患者血漿へのタイトレーションを示すウエスタンブロット。グラフは、正常血漿(N)のシグナルを1に設定した、デンストメトリーによる結果の定量化を示す。結果は、キャリアタンパク質が4nmolペプチド/0.5ul血漿まで制限的でないことを示している。全体的に見て、結果は、抗Ciz1 b変異体抗体によって検出された内因性b-var65種が、1つの単一の65kDa Ciz1 b変異体種でなく、65kDaに近いMWのCiz1 b変異体断片とキャリアタンパク質との安定複合体である可能性が高いことを示している。

10

【図4】二次元ゲル手法を用いた単離から、キャリアタンパク質がフィブリノゲンであることが示される。a) 200mM b-メルカプトエタノール含有及び不含の2%SDS試料緩衝液中でインキュベートした後の癌(C)及び非癌(N)血漿試料のウエスタンブロット。還元剤の存在下では、抗b変異体抗体により約65kDaの癌特異的シグナルが生じ、一方、還元剤の非存在下では、癌特異的シグナルは約340kDaにまで遅れる。b) 一次元ゲル(還元剤なし)を用いてCiz1 b変異体エピトープを含有する約340kDaバンドを単離する。c) 還元剤でインキュベートした後バンドを更に分離すると、構成ポリペプチド及び約70kDa成分のCiz1 b変異体エピトープの移動が明らかになる。このバンドを質量分析用に切り出した。d) MASCOTは、トリプシン消化後の2つの別個のペプチド質量に基づき1つの有意なアイデンティティを割り当てた。アイデンティティ:フィブリノゲン鎖。

20

【図5】精製フィブリノゲン及び合成ペプチドからのCiz1 b変異体エピトープの再構成。a) 還元剤の非存在下(2%SDSローディング緩衝液中)における電気泳動後の、6nmolの精製フィブリノゲン複合体(Sigma、カタログ番号F3879)を示す銀染色ゲル(左)。この実験にはペプチドを含めるが(100pmol/レーン)、それらのアミノ酸含有量に起因して銀で十分に染色されない。右側に、2つの抗b変異体抗体でプローブした並行ゲルのウエスタンブロットを示す。L、ロングCiz1 b変異体ペプチドE I A G Q D E D H F I T V D A V G C F E G D E E E E E D D E D E E E I E V R S R D I S R E E W K G S E T Y S P N T A Y G V D F L V (配列番号12)。S、ショートCiz1 b変異体ペプチドD E E E I E V R S R D I S (配列番号2)。b) フィブリノゲンと複合体になったとき、同じ抗体に対して反応性のエピトープを形成する能力に関して様々なCiz1 b変異体及びa変異体ペプチドを比較する同様の実験。凡例: 1、添加なし。2、ロングCiz1 b変異体ペプチドE I A G Q D E D H F I T V D A V G C F E G D E E E E E D D E D E E E I E V R S R D I S R E E W K G S E T Y S P N T A Y G V D F L V (配列番号12)。3、WTロングペプチドE I A G Q D E D H F I T V D A V G C F E G D E E E E E D D E D E E E I E V E E E E L C K Q R S R D I S R E E W K G S E T Y S P N T A Y G V D F L V (配列番号13)。4、添加なし。5、ショートCiz1 b変異体D E E E I E V R S R D I S (配列番号2)。6、C-DEEIEVRSRDIS-coNH₂(配列番号14)。7、C-DEEIEVRSRDIS-coNH₂(配列番号23)。8、C-D I VRSRDIS-coNH₂(配列番号15)。

30

40

【図6-1】表1:NCBI参照配列:NM_001131016.1からの(V E E E

50

LCKQ - 配列番号10を除くことによって特定される)エクソン14b/エクソン15ジャンクションを含むCiz1 b変異体ペプチド。

【図6-2】表1:NCBI参照配列:NM_001131016.1からの(VEEELCKQ - 配列番号10を除くことによって特定される)エクソン14b/エクソン15ジャンクションを含むCiz1 b変異体ペプチド。

【図7】エクソンジャンクション特異抗体が肺癌患者血漿中のCIZ1 bを検出する。

A)CIZ1の翻訳エクソンのマップ、エクソン14の選択的スプライシングにより指示される8アミノ酸(位置はNCBI参照配列:NM_012127.2に基づく)が除かれることによって14b(CIZ1b)が生じることを示す。また、Bで使用される抗体によって検出されるエピトープの位置も示す。B)SDS-PAGE用に変性後のNSCLC患者(LC)及び正常対照(N)からの代表的な血漿試料のウエスタンブロット、CIZ1b抗体2B及び043によって検出されたLCにおける65~70kDaのCIZ1bバンド(赤色の矢印、「*」印付き)、及びエクソン8及びエクソン17のエピトープによって検出された、N及びLCの両方における55kDaの「汎用」CIZ1抗体反応性バンドを示す。また、フィブリノゲン鎖も示される。C)CIZ1b抗体2Bで分析した4人の個体からの対の血漿(P)及び血清(S)試料におけるCIZ1bレベルの比較。ヒストグラムは、トリPLICATE試料から導かれた、65~70kDa及び55kDa実体に関して定量化したバンド強度を標準偏差と共に示す。血清は65~70kDa CIZ1bバンドを欠いていることに留意されたい。D)Bのデータの最も単純な解釈を示すモデル、但し、広範な選択的スプライシング及び起こり得る二次修飾は、血漿中における55kDa実体の正確なアイデンティティは未確認であることを意味する。E)肺癌試験セットAに関する2B及び043ウエスタンブロット結果についての曲線下面積(AUC)値を示す受診者動作特性(ROC)曲線。ドットプロットは2つのデータセット(date sets)間の相関を示す(LC試料をオレンジ色とする)。閾値(黒色の点線)は、セット中の非癌試料の平均値+1SDに設定している。これらから、20例の肺癌試料及び20例の非癌試料のこのセットについての感度/特異性推定値:2B、85/67.5;043、90/77.5が得られる。両方の抗体によって特定される任意閾値を使用すると、これらは90/87.5である。

【図8】CIZ1bエピトープに対する変性効果。A)左、完全に未変性の条件下(SDS又は還元剤の非存在下)で分離した、代表的な肺癌(C)及び正常(N)血漿試料(2ul)のクマシーブルー染色ゲル。mはマーカーレーンを示す。中央、ボンソーSで染色したニトロセルロースへの転写後の並行ゲル。右、CIZ1b抗体043でプローブした同じ膜。下側のパネルは、同様に043でプローブした、変性SDS-PAGEによって分離した同じ2つの試料(赤色の矢印)を示す。B)未変性ゲル一次元を4xSDS-PAGEローディング緩衝液中に加熱せずに30分間浸漬し、サイズによって更に分離した(二次元)。ウエスタンブロットによると、非癌試料において抗体2Bと反応性の55kDaの1つのバンド、及び癌試料において2つのバンド(55及び70kDa)が見られる。同じように処理した2つの追加的な癌血漿試料を下側に示す。C)指示されるとおり還元剤(200mM(β-メルカプトエタノール、ME)有り及び無しで2%SDSの存在下、指示温度で予めインキュベートした後の、非変性ゲルを通じた代表的癌(C)及び非癌(N)血漿試料中の043反応性バンドの移動。癌特異的バンド(赤色の囲み線)の還元剤の非存在下における約340kDaの相対移動度から還元剤の存在下における約70kDaへのシフト(還元剤の非存在下であらゆる試料で検出された「汎用」バンドの完全な喪失を伴う)に留意されたい。D)指示濃度のDTT、又は10倍過剰のMEを伴い37℃で30分間1%SDSとインキュベートした後の043反応性バンドを示す肺癌患者の血漿。反応性バンドは、それが340kDaから70kDaにシフトし、次に最大還元条件下で失われるものとして示される。抗体F8512で検出した同じ試料中のフィブリノゲンの挙動を比較として示す。E)CIZ1bペプチド(b66、表2)を正常(非癌)血漿と組み合わせることにより生成した合成CIZ1bエピトープ(図10を参照)は内因性エピトープと同様の挙動を示し、高分子量複合体から約70kDa種に解

10

20

30

40

50

離し、次に最大還元条件下で消失する。フィブリノゲンは抗体 A F 4 7 8 6 で検出する。

M E 濃度は、2 0 0 m M の S D S - P A G E で使用した標準濃度の倍数に基づく。

【図 9】C I Z 1 b バイオマーカーの分解及びイムノアッセイ設計 A) 図 8 に示す結果の概略図、C I Z 1 b エピトープ (赤色のバー、「*」印付き) が血漿中にある未変性複合体の複雑性、並びに界面活性剤及び還元剤の破壊効果を示す。未変性条件下では、C I Z 1 b は、脂質小胞内に包含されている可能性が最も高い 7 2 0 k D a を上回る複合体の一部である。S D S はエピトープを 3 4 0 k D a にシフトさせ、及び還元剤はそれを更に、標準 S D S - P A G E ゲルで典型的に観察される移動度 (6 5 ~ 7 0 k D a) までシフトさせる。過剰な還元剤の存在下では、2 B 及び 0 4 3 C I Z 1 b 抗体の両方についてウエスタンブロットエピトープが失われる。B) A に要約した情報に基づくサンドイッチ E L I S A フォーマットの概略図。

【図 10】精製成分からの C I Z 1 b バイオマーカーの再構成 A) 2 つの独立した肺癌患者血漿を 1 % S D S (還元剤なし) とインキュベートした後に分離して、染色したゲルから 3 4 0 k D a バンドを単離した (左)。バンドのアイデンティティをボンソー S 染色と、続く並行ゲルの抗 C I Z 1 b 抗体 0 4 3 によるウエスタンブロットによって確認した (右)。B) ゲル切片を 2 % S D S - P A G E ローディング緩衝液 (2 0 0 m M M E 含有) に浸漬し、変性ゲルで分離して 7 0 k D a の 0 4 3 反応性種を回収した。ゲル切片としてロードした試料は、溶液中にロードされるマーカーと比較してやや遅れることに留意されたい。クマシーブルー染色により 5 つの優勢なバンドが現れ、その中には 7 0 k D a のものが含まれ、これを単離して、トリプシン (癌血漿 1、C 1) 又は A s p N (癌血漿 2、C 2) のいずれかで消化した。C) 正常ヒト血漿 (非癌、N) のウエスタンブロット、等価な C I Z 1 a ペプチド (表 2) との間では起こらない、血漿中のキャリアタンパク質と指示される長さの合成 C I Z 1 b ペプチドとの間の複合体形成による C I Z 1 b エピトープの再構成を示す。遊離ペプチドが還元 S D S - P A G E で予想の 3 倍の相対移動度で移動する (b 6 6 について 7 . 6 k D a ではなく約 2 1 k D a、b 1 3 について 1 . 6 ではなく約 5 k D a) ことに留意されたい。いずれも、キャリアタンパク質と複合体化しない限り、ウエスタンブロットで C I Z 1 b 抗体によって認識されない。C I Z 1 b 6 6 ペプチドについて、約 8 0 k D a に新規の反応性種が作り出され、一方、C I Z 1 b 1 3 ペプチドは、肺癌血漿中の内因性エピトープ (C、レーン 1) と同じ移動度に抗原性を増加させる。D) 指示されるとおりの C I Z 1 b 抗体でプローブした、1 0 0 p m o l の指示ペプチド (表 2) との事前のインキュベーション有り及び無しでの、全てのレーンで精製フィブリノゲン (6 n m o l) (上) を示す非還元 S D S - P A G E ゲルのウエスタンブロット。非還元条件下ではフィブリノゲンは約 3 4 0 k D a の見かけの分子量で移動し、これは C I Z 1 b シグナルと共に移動する。E) モル当量の予め形成したペプチド/フィブリノゲン複合体を分析物として使用した、指示されるとおりの C I Z 1 b 抗体 2 B 又は 0 4 3 によって生成された平均 A 4 5 0 n m (トリプリケート分析、S E M と共に) を示すダイレクト E L I S A。* * T 検定 $p < 0 . 0 5$ 。

【図 11】肺癌血漿及び対照 (n = 3 9 非癌、1 3 肺癌) を使用したイムノアッセイバリデーション。A) 抗体 0 4 3 による C I Z 1 b ウエスタンブロット。B) 0 4 3 捕捉抗体及び抗フィブリノゲン検出抗体を使用した、血漿中の C I Z 1 b 抗原についてのサンドイッチ E L I S A フォーマット。C) 対のフィブリノゲン抗体を使用した同じ試料中のフィブリノゲンの定量的検出、D) B に示すものと同様のサンドイッチフォーマットで抗フィブリノゲンを抗ヒト I g G に置き換えたもの。E) ダイレクト E L I S A による血漿中の I g G の検出。F) G のデータに対する C のデータの正規化。いずれの場合にも、受診者動作特性曲線 (R O C) は、真陽性率及び偽陽性率との間の関係 (黒色の点) 及びフィッティングした R O C 曲線の 9 5 % 信頼区間 (灰色の点)、及び太字の曲線下面積 (A U C) 値を示している。箱ひげ図は、最小値及び最大値、下位四分位点、中央値、及び上位四分位点、及び外れ値を示す。

【発明を実施するための形態】

【0 0 4 4】

10

20

30

40

50

発明の詳細な説明

C I Z 1

C i p 1 相互作用ジンクフィンガータンパク質 (C i z 1) は、ヒトでは C I Z 1 遺伝子によってコードされるタンパク質である。

【 0 0 4 5 】

C i z 1 は哺乳類 D N A 複製の開始を促進し、そこで C i z 1 はサイクリン E 依存性及び A 依存性プロテインキナーゼの逐次的機能が協調するように助ける (Coverley et al; J Cell Sci. 2005; 118(Pt 1):101-112)。 C i z 1 はサイクリン E 及び A、 C D K 2、及びサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p 2 1 と直接相互作用し、また、サイクリン D を含めた、細胞増殖に影響を及ぼす遺伝子の発現を調節することにより、 D N A 複製において間接的な役割も果たす (den Hollander et al; Cancer Res. 2006;66(22):11021-11029)。 C i z 1 は多くの場合に、「核マトリックス」と称される核の塩耐性及びヌクレアーゼ耐性タンパク質成分に結合しており、 D N A 複製部位と部分的に共存するフォーカス内にあり (Ainscough; J Cell Sci. 2007;120(Pt 1):115-124)、 D N A 複製の空間的組織化における C i z 1 の関与が示唆される。

10

【 0 0 4 6 】

C i z 1 の様々なスプライス変異体が当該技術分野において公知である。例えば、国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 1 2 6 9 号及び Rahman et al. (BMC Cancer; 2010; 10:482) に記載されるとおり。

【 0 0 4 7 】

C i z 1 エクソン 1 4 の選択的スプライシングによる C i z 1 b 変異体アイソフォームの生成が、これまで様々な癌で実証されている ((国際公開第 2 0 1 2 / 0 1 7 2 0 8 号) 及び (Higgins et al.; PNAS; Nov 6;109(45):E3128-35))。

20

【 0 0 4 8 】

本明細書に記載されるとおり、 C i z 1 b 変異体アイソフォームは、本明細書においてエクソン 1 4 b (配列番号 3) と称されるエクソン 1 4 の変異体を含む C i z 1 m R N A 転写物に由来する。 C i z 1 エクソン 1 4 b は、エクソン 1 4 a (配列番号 4) と称される完全長エクソン 1 4 と比較して 3 ' 末端の 2 4 ヌクレオチドを欠いている。エクソン 1 4 a (a 変異体) よりむしろエクソン 1 4 b を発現する C i z 1 転写物が、本明細書では、 C i z 1 b 変異体、 C I Z 1 b 又は単に b 変異体と称される。 C i z 1 エクソン 1 4 b 及び 1 4 a の対応するアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 5 (L K S L E K E I A G Q D E D H F I T V D A V G C F E G D E E E E E D D E D E E E I E) 及び配列番号 6 (L K S L E K E I A G Q D E D H F I T V D A V G C F E G D E E E E E D D E D E E E I E V E E E L C K Q) として示される (図 2 を参照のこと)。

30

【 0 0 4 9 】

従ってエクソン 1 4 b 及びエクソン 1 5 のスプライスジャンクションにわたる配列は、エクソン 1 4 a 及びエクソン 1 5 のスプライスジャンクションにわたる配列と異なる。詳細には、エクソン 1 4 b 及びエクソン 1 5 のジャンクションは、 C i z 1 a 変異体タンパク質のエクソン 1 4 a とエクソン 1 5 との間のジャンクションに存在する配列 V E E E L C K Q (配列番号 1 0) を欠いている。

40

【 0 0 5 0 】

本発明者らは、 C i z 1 b 変異体ペプチドがフィブリノゲンとの複合体として存在することを明らかにした。詳細には、エクソン 1 4 b / エクソン 1 5 ジャンクションにわたる C i z 1 b 変異体ペプチドがフィブリノゲンに結合可能であることが示された。対照的に、 C i z 1 a 変異体ペプチドはフィブリノゲンに結合することができない。

【 0 0 5 1 】

従って、本明細書に記載されるとき、 C i z 1 b 変異体ペプチドとは、 C i z 1 a 変異体タンパク質ではなく、 C i z 1 b 変異体タンパク質に由来し得るペプチドを指す。換言すれば、 C i z 1 b 変異体ペプチドとは、 C i z 1 b 変異体タンパク質のエクソン 1 4 b 及びエクソン 1 5 に由来する、従ってスプライスジャンクションに配列 V E E

50

E L C K Q (配列番号 10) を欠いている C i z 1 b 変異体タンパク質の一部を指す。

【0052】

詳細には、C i z 1 b 変異体ペプチドはエクソン 14 b / エクソン 15 スプライスジャンクションを含む。換言すれば、c i z 1 b 変異体ペプチドは、C i z 1 エクソン 14 b (配列番号 5) 及び C i z 1 エクソン 15 (配列番号 7) に由来するアミノ酸配列を含み、且つ配列番号 11 の 36 ~ 38 位に示されるとおりの配列 E V R を含む。

配列番号 11

E I A G Q D E D H F I T V D A V G C F E G D E E E E D D E D E E E I E V R S R
D I S R E E W K G S E T Y S P N T A Y G V D F L V P

10

【0053】

特に、C i z 1 b 変異体ペプチドは C i z 1 a 変異体タンパク質に特異的なアミノ酸を含まず、従って配列 V E E E L C K Q (配列番号 10) を含まない。

【0054】

このように、C i z 1 b 変異体ペプチドは、配列番号 11 として示される C i z 1 b 変異体ペプチド又は配列番号 11 の 36 ~ 38 位に示されるとおりの E V R を含むその断片であってもよい。

【0055】

好適には、C i z 1 b 変異体ペプチドは、配列番号 11 の少なくとも 3、少なくとも 5、少なくとも 10、少なくとも 20、少なくとも 30、少なくとも 40、少なくとも 50 又は少なくとも 60 個の連続アミノ酸を含み、且つ配列番号 11 の 36 ~ 38 位に示されるとおりの E V R を含んでもよい。

20

【0056】

好適には、C i z 1 b 変異体ペプチドは、配列番号 11 の 3 ~ 60、5 ~ 60、5 ~ 50、10 ~ 50、10 ~ 40、10 ~ 30、15 ~ 30 又は 10 ~ 20 個の連続アミノ酸を含むか又はそれからなり、且つ配列番号 11 の 36 ~ 38 位に示されるとおりの E V R を含んでもよい。

【0057】

好適には、C i z 1 b 変異体ペプチドは、配列番号 11 の 10 ~ 20 個の連続アミノ酸を含むか又はそれからなり、且つ配列番号 11 の 36 ~ 38 位に示されるとおりの E V R を含んでもよい。

30

【0058】

好適には、C i z 1 b 変異体ペプチドは表 1 (図 6 を参照) に示されるペプチドであってもよい。

【0059】

フィブリノゲン

一態様において、本発明は、C i z 1 b 変異体を検出するアッセイにおけるフィブリノゲン捕捉剤又はフィブリノゲン検出剤の使用に関する。

【0060】

一態様において、本発明は、C i z 1 b 変異体を検出するアッセイにおけるフィブリノゲン結合剤の使用に関する。

40

【0061】

フィブリノゲン結合剤は、フィブリノゲンに特異的に結合する抗体又はその断片、非タンパク質足場又はアプタマーであってもよい。

【0062】

詳細には、本発明は、C i z 1 b 変異体を検出するアッセイにおけるフィブリノゲンに結合する抗体又はその断片の使用を提供する。

【0063】

フィブリノゲンは、血液凝固、線維素溶解、細胞・マトリックス相互作用、炎症反応、創傷治癒及び新形成に關与する。

50

【0064】

フィブリノゲン分子は、各々がコイルドコイルセグメントによって中央のEドメインに結び付いた2つの外側Dドメインからなる細長い45nmの構造体である。この分子は、N末端Eドメインで5つの対称なジスルフィド架橋によって共につながった、
、及び
と呼ばれる3つのポリペプチド鎖のセットを2組含む。非対称のジスルフィド架橋はこの領域に「ジスルフィド環」を形成する (Mosesson; 2005; Journal of Thrombosis and Haemostasis; 3(8); 1894-1940)。

【0065】

フィブリノゲン分子が重合すると、不溶性のフィブリンマトリックスが形成される。フィブリノゲンからフィブリンへの変換はトロンビンによって惹起され、トロンビンが鎖及び鎖からフィブリノペプチドA及びBを切断し、ひいては軟凝血塊の形成に關与するN末端重合部位が露出する。軟凝血塊は、種々のモノマーの鎖間(より強固)及び鎖間(より脆弱)の(グルタミル)リジン架橋結合を触媒する第XIIIA因子によって硬い凝血塊に変換される。

10

【0066】

鎖は610残基、鎖は461残基、及び主要な鎖型であるAは411残基からなる。各フィブリノゲン鎖はN末端フィブリノペプチドA(FPA)配列を含み、これがトロンビンによって切断されると、EAと呼ばれる重合部位が露出することによりフィブリンアセンブリが惹起される。EAの一つの部分は、残基17~20gly-pro-arg-val(GPRV)を含むフィブリン鎖のN末端にあり、もう一つの部分はフィブリン鎖の残基15~42の間に位置する。各EA部位は、337~379に位置する隣接分子のDドメインにおける構成的相補結合ポケット(Da)と組み合わせになる。初期EA:Da会合により、末端が中央にずれて重なり合うドメイン配置でフィブリン分子が整列して二本鎖のねじれた原繊維を形成する。原繊維はまた横方向にも会合を起こして多重鎖繊維を作り出す (Mosesson; 上記)。

20

【0067】

例示的なフィブリノゲンタンパク質は、UniProtKB受託番号P02671のヒトフィブリノゲンタンパク質である。この例示される配列は866アミノ酸長であり、そのうちアミノ酸1~19がシグナルペプチドを形成する。

【0068】

例示的なフィブリノゲンタンパク質は、UniProtKB受託番号P02675のヒトフィブリノゲンタンパク質である。この例示される配列は491アミノ酸長であり、そのうちアミノ酸1~30がシグナルペプチドを形成する。

30

【0069】

例示的なフィブリノゲンタンパク質は、UniProtKB受託番号P02679のヒトフィブリノゲンタンパク質である。この例示される配列は453アミノ酸長であり、そのうちアミノ酸1~26がシグナルペプチドを形成する。

【0070】

用語「フィブリノゲン」は、2つの鎖、2つの鎖及び2つの鎖を含む複合体又はそのサブ複合体(例えば完全なフィブリノゲン複合体の全ての鎖を含まないもの)を指し得る。

40

【0071】

本発明者らは、Ciz1b変異体ペプチドがフィブリノゲン鎖との結合能を有することを明らかにしている。このように、詳細な実施形態において、本アッセイ及び方法はフィブリノゲン鎖の捕捉又は検出を含み得る。例えば本アッセイ及び方法は、フィブリノゲン/Ciz1b変異体複合体におけるCiz1b変異体の捕捉後のフィブリノゲン(例えばフィブリノゲン鎖)の検出を含み得る。

【0072】

「フィブリノゲン/Ciz1b変異体複合体」には、本明細書において参照されるとき、フィブリノゲン及び/又はCiz1b変異体ペプチドに加えて他のペプチド及び/

50

又はタンパク質が含まれ得る。

【0073】

本明細書で使用されるとき、捕捉剤とは、試料からフィブリノゲン/Ciz1 b変異体複合体を単離（即ち濃縮）するために用いられる薬剤を指す。例えば、試料は、対象から単離された試料であってもよい。詳細には、試料は、対象から単離された血液試料（例えば血漿試料）であってもよい。

【0074】

「フィブリノゲン捕捉剤」は、フィブリノゲン/Ciz1 b変異体複合体との結合能を有する実体を指す。好ましくは、「フィブリノゲン捕捉剤」は、フィブリノゲンとの特異的結合能を有する、試料からフィブリノゲン/Ciz1 b変異体複合体を単離（即ち濃縮）するために用いられる実体である。かかる特異的結合は、試料からのフィブリノゲンの単離/濃縮を可能にし得る。詳細な実施形態において、フィブリノゲン捕捉剤はフィブリノゲン鎖との特異的結合能を有し得る。

10

【0075】

フィブリノゲン捕捉剤は、フィブリノゲンに特異的に結合する抗体又はその断片、非タンパク質足場、アプタマー又はCiz1 b変異体ペプチドであってもよい。

【0076】

本明細書で使用されるとき、検出剤とは、捕捉剤を使用して試料から単離（即ち濃縮）された後のフィブリノゲン/Ciz1 b変異体複合体に結合させるために用いられる薬剤を指す。このように、検出剤は典型的には捕捉ステップの後に、単離（即ち濃縮）されたフィブリノゲン/Ciz1 b変異体複合体の存在を決定するために使用される。

20

【0077】

「フィブリノゲン検出剤」は、フィブリノゲンとの結合能を有する実体を指す。好ましくは、「フィブリノゲン検出剤」は、フィブリノゲンとの特異的結合能を有する実体である。かかる特異的結合は、フィブリノゲン/Ciz1 b変異体複合体におけるCiz1 b変異体の捕捉後のフィブリノゲンの検出を可能にする。詳細な実施形態において、フィブリノゲン捕捉剤又はフィブリノゲン検出剤はフィブリノゲン鎖との特異的結合能を有し得る。

【0078】

フィブリノゲン検出剤は、フィブリノゲンに特異的に結合する抗体又はその断片、非タンパク質足場、又はアプタマーであってもよい。

30

【0079】

フィブリノゲン検出剤は、本明細書に記載されるとおりのアッセイにおけるその検出を可能にする実体で標識されてもよい。例えば、フィブリノゲン検出剤は、本明細書に記載されるとおりの蛍光実体又は酵素-基質標識で標識されてもよい。

【0080】

抗体

抗体又はその断片とは、親抗体と同じ抗原標的に結合する能力を保持している抗体の任意の一部を指す - 例えばフィブリノゲン抗体又はその断片はフィブリノゲンに結合することが可能である。

40

【0081】

フィブリノゲン抗体は当該技術分野において公知である。例えば、ヒツジ抗フィブリノゲンpAb (AF4786, R&D systems)、ab58207 (Abcam)；抗フィブリノゲン、クローン85D4 (カタログ番号F9902；Sigma Aldrich)；及びフィブリノゲン抗体 (MFB-HB) (カタログ番号MA1-35371；Life Technologies)。

【0082】

フィブリノゲン鎖抗体もまた当該技術分野において公知である。例えば、EPR2918 (ab108616；Abcam)；フィブリノゲン抗体 (5C5) (LF-MA0108；Pierce)；及びEPR2919 (TA307697；Origene)。

【0083】

50

本発明はまた、C i z 1 b 変異体に結合する抗体又はその断片にC i z 1 b 変異体を接触させることによりC i z 1 b 変異体を検出するステップ又はC i z 1 b 変異体/フィブリノゲン複合体を捕捉するステップを含む方法も包含する。C i z 1 b 変異体ペプチドに特異的に結合する抗体は、抗体 2 B について従来記載されるとおり生成し得る (Higgins et al; 2012; PNAS; Nov 6;109(45):E3128-35)。

【0084】

抗体はキメラ抗体であってもよい。キメラ抗体は、ある種(例えばマウス)由来の抗体可変ドメインを別の種(例えばヒト)由来の抗体定常ドメインに移植することによって作製し得る。

【0085】

抗体は、完全長の古典的抗体であってもよい。例えば抗体は、I g G、I g M 又は I g A 分子であってもよい。

【0086】

抗体は機能的抗体断片であってもよい。特異的抗体断片としては、限定はされないが、(i) V L、V H、C L 及び C H I ドメインからなる F a b 断片、(i i) V H 及び C H I ドメインからなる F d 断片、(i i i) 単一抗体の V L 及び V H ドメインからなる F v 断片、(i v) 単一可変ドメインからなる d A b 断片、(v) 単離 C D R 領域、(v i) 2 つの連結された F a b 断片を含む二価断片である F (a b ') 2 断片、(v i i) V H ドメインと V L ドメインとが、これらの 2 つのドメインの会合による抗原結合部位の形成を可能にするペプチドリンカーによって連結されている単鎖 F v 分子 (s c F v)、(v i i i) 二重特異性単鎖 F v 二量体、及び (i x) 遺伝子融合によって構築された多価又は多重特異性断片である「ダイアボディ」又は「トリアボディ」が挙げられる。抗体断片は修飾されてもよい。例えば、これらの分子は、V H 及び V L ドメインを連結するジスルフィド架橋の取り込みによって安定化させることができる。

【0087】

本明細書に記載される抗体は、多重特異性抗体、特に、「ダイアボディ」と称されることもある二重特異性抗体であってもよい。ダイアボディは、2 つ(又はそれ以上)の異なる抗原に結合する抗体である。ダイアボディは当該技術分野において公知の種々の方法で製造することができ、例えば、化学的に調製するか、又はハイブリッドハイブリドーマから調製することができる。本抗体はミニボディであってもよい。ミニボディは、s c F v が C H 3 ドメインにつなぎ合わされたものを含む最小化された抗体様タンパク質である。ある場合には、s c F v を F c 領域につなぎ合わせることができ、及びヒンジ領域の一部又は全てを含んでもよい。

【0088】

本抗体はドメイン抗体(シングルドメイン抗体又はナノボディとも称される)であってもよい。これは、単一モノマーの単一の可変抗体ドメインを含む抗体断片である。シングルドメイン抗体の例としては、限定はされないが、当初ラクダ科動物で見付かった V H H 断片及び当初軟骨魚類で見付かった V N A R 断片が挙げられる。シングルドメイン抗体はまた、共通の I g G 分子からの二量体可変ドメインをモノマーに分割することによって生成することもできる。

【0089】

抗体は合成抗体(抗体ミメティクスとも称される)であってもよい。抗体ミメティクスとしては、限定はされないが、アフィボディ(Affibody)、DARPin、アンチカリン(Anticalin)、アビマー(Avimer)、パーサボディ(Versabody)及びデュオカリン(Duocalin)が挙げられる。

【0090】

アダマー

フィブリノゲン又はC i z 1 b 変異体の特異的に認識するアダマーは、標準的な核酸合成法を用いて合成してもよく、又は大規模ランダム配列プールから、例えば試験管内進化(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: S E L E X)法

10

20

30

40

50

を用いて選択してもよい。

【0091】

アプタマーは、ステム、ループ、四重鎖、シュードノット、バルジ、又はヘアピンの組み合わせを有するユニークな三次元構造に折り置まれる一本鎖DNA又はRNA配列であり得る。アプタマーの分子認識は、芳香環のスタッキング、静電相互作用及びファンデルワールス相互作用、又は標的化合物との水素結合など、分子間相互作用から生じる。加えて、アプタマーとその標的との間の特異的相互作用は誘導適合機構を通じて補完され、これによりアプタマーはその標的に対してユニークな折り畳み構造をとることが要求される。アプタマーは、色素などの標識分子を連結するため修飾することができ、又は異なる適用向けにビーズ又は基材の表面上に固定化することができる。

10

【0092】

アプタマーは、所与の試料における定量化のためナノテクノロジー、マイクロアレイ、マイクロフルイディクス、質量分析及び他の技術と組み合わせてもよい。

【0093】

典型的には、フィブリノゲン捕捉剤又はCiz1 b変異体捕捉剤はアレイなどの支持体上に固定化されるか、又はビーズなどの固体支持体上に捕捉されることになる。次に、捕捉剤を含む支持体と共に被験試料をインキュベートすると、試料からCiz1 b変異体/フィブリノゲン複合体を単離/濃縮することができる。支持体(例えば固体支持体)は種々の材料-ガラス、シリカ、プラスチック、ナイロン又はニトロセルロースなどで作られてもよい。固体支持体に取り付ける場合、それは好ましくは剛性であり、平らな表面を有する。

20

【0094】

フィブリノゲン捕捉剤又はCiz1 b変異体捕捉剤は、ストレプトアビジンビーズによって捕捉することのできるビオチン部分など、固体表面に捕捉されることのできる部分を含み得る。かかる実施形態において、支持体への捕捉は、捕捉剤を試料とインキュベートした後起こり得る。

【0095】

Ciz1 b変異体の検出又はCiz1 b変異体の捕捉

好適には、Ciz1 b変異体は、本明細書に記載されるとおりのCiz1 b変異体ペプチドであってもよい。

30

【0096】

Ciz1 b変異体は当該技術分野において公知の種々の好適な方法及び技法を用いて検出し得る。

【0097】

本方法は、以下のステップ：a)フィブリノゲン捕捉剤を使用してフィブリノゲン/Ciz1 b変異体複合体を捕捉するステップ；及びb)Ciz1 b変異体検出剤を使用してCiz1 b変異体を検出するステップを含み得る。

【0098】

本方法は、以下のステップ：a)Ciz1 b変異体捕捉剤を使用してフィブリノゲン/Ciz1 b変異体複合体を捕捉するステップ；及びb)フィブリノゲン検出剤を使用してフィブリノゲンを検出するステップを含み得る。

40

【0099】

本明細書で使用されるとき、「Ciz1 b変異体捕捉剤」は、Ciz1 b変異体との結合能を有する、試料からフィブリノゲン/Ciz1 b変異体複合体を単離(即ち濃縮)するために用いられる実体を指す。好ましくは、「Ciz1 b変異体捕捉剤」は、Ciz1 b変異体との特異的結合能を有する実体である。かかる特異的結合は、試料からのフィブリノゲン/Ciz1 b変異体複合体の単離/濃縮を可能にする。

【0100】

Ciz1 b変異体捕捉剤は、フィブリノゲンに特異的に結合する抗体又はその断片、非タンパク質足場、アプタマー又はCiz1 b変異体ペプチドであってもよい。

50

【0101】

詳細な実施形態において、C i z 1 b 変異体 / フィブリノゲン複合体は、C i z 1 b 変異体ペプチドに結合する抗体又はその断片を用いて捕捉し得る。C i z 1 b 変異体ペプチドに特異的に結合する抗体は、抗体 2 B について従来記載されるとおり生成し得る (Higgins et al; 2012; PNAS; Nov 6; 109(45):E3128-35)。

【0102】

「C i z 1 b 変異体検出剤」は、C i z 1 b 変異体との結合能を有する、捕捉剤を使用して試料から単離 (即ち濃縮) された後のフィブリノゲン / C i z 1 b 変異体複合体に結合させるために用いられる実体を指す。好ましくは、「C i z 1 b 変異体検出剤」は、C i z 1 b 変異体との特異的結合能を有する実体である。かかる特異的結合は、

10

【0103】

C i z 1 b 変異体検出剤は、C i z 1 b 変異体に特異的に結合する抗体又はその断片、非タンパク質足場、又はアプタマーであってもよい。

【0104】

C i z 1 b 変異体検出剤は、本明細書に記載されるとおりのアッセイにおけるその検出を可能にする実体で標識されてもよい。例えば、C i z 1 b 変異体検出剤は、本明細書に記載されるとおりの蛍光実体又は酵素 - 基質標識で標識されてもよい。

20

【0105】

例えば、C i z 1 b 変異体を検出する方法は、抗体ベースのアレイ、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)、非抗体タンパク質足場、ラジオイムノアッセイ (R I A)、ウエスタンブロッティング、アプタマー又は質量分析を用い得る。

【0106】

E L I S A は、当該技術分野において公知の一般的な方法に従い実施し得る。例えば、E L I S A はサンドイッチ又は競合 E L I S A であってもよい。

【0107】

サンドイッチ E L I S A は以下のステップを含み得る：

- 表面 (即ちマイクロタイタープレートウェル) に既知量の捕捉剤を結合させて調製する (例えば C i z 1 b 変異体捕捉剤又はフィブリノゲン捕捉剤) ;
- 表面上のあらゆる非特異的結合部位をブロックする ;
- C i z 1 b 変異体を含む試料をプレートに加える ;
- プレートを洗浄して未結合の抗原を取り除く ;
- フィブリノゲン又は C i z 1 b 変異体との特異的結合能を有する一次抗体を添加し、抗原に結合させる ;
- 抗体 F c 領域に特異的に結合する酵素結合二次抗体を検出抗体として加える ;
- プレートを洗浄して未結合の抗体 - 酵素コンジュゲートを取り除いた後、酵素によって色又は蛍光又は電気化学的シグナルに変換される化学物質を添加する ;
- プレートウェルの吸光度又は蛍光又は電気化学的シグナルを計測して抗原の存在及び量を決定する。

30

40

【0108】

詳細な実施形態において、本方法は、本明細書に記載されるとおりのフィブリノゲン捕捉剤又は C i z 1 b 変異体捕捉剤を使用してフィブリノゲン / C i z 1 b 変異体複合体を捕捉するステップを含む。

【0109】

一実施形態において、本方法は、本明細書に記載されるとおりの C i z 1 b 変異体捕捉剤を使用してフィブリノゲン / C i z 1 b 変異体複合体を捕捉するステップと、本明細書に記載されるとおりのフィブリノゲン検出剤を使用してフィブリノゲン / C i z 1 b 変異体複合体を検出するステップとを含むサンドイッチ E L I S A を含む。

【0110】

50

競合 E L I S A は以下のステップを含み得る：

- C i z 1 b 変異体を含む試料の存在下で、C i z 1 b 変異体に特異的に結合する標識抗体をインキュベートする；
- 次に結合した抗体 / 抗原複合体を抗原コーティングウェルに添加する；
- プレートを洗浄し、そのため未結合の抗体が取り除かれる；
- 一次抗体に特異的な、且つ酵素にカップリングされた二次抗体を添加する；
- 酵素の基質を添加し、及び酵素のその基質との反応によって発色又は蛍光シグナルが生じる；
- 反応を停止させてシグナルの最終的な飽和を防ぐ。

【 0 1 1 1 】

例えば米国特許第 4 , 2 7 5 , 1 4 9 号に開示されるとおり、様々な酵素 - 基質標識が利用可能である。一般に酵素は、検出し得る発色基質の化学的变化を触媒する。例えば、酵素は基質の色の变化を触媒することができ、又は基質の蛍光若しくは化学発光を変化させることができる。酵素標識の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P O) などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 - ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ (例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ)、複素環式オキシダーゼ (ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼなど)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどが挙げられる。酵素を抗体にコンジュゲートする技法は周知である。

【 0 1 1 2 】

C i z 1 b 変異体ペプチドの検出は、C i z 1 b 変異体ペプチドに結合する抗体又はその断片に前記 C i z 1 b 変異体ペプチドを接触させることを含み得る。C i z 1 b 変異体ペプチドに特異的に結合する抗体は、抗体 2 B について従来記載されるとおり生成し得る (Higgins et al; 2012; PNAS; Nov 6; 109(45):E3128-35)。

【 0 1 1 3 】

一部の実施形態において、b 変異体特異抗体は、配列番号 1 1 の 3 6 ~ 3 8 位に示される E V R 配列を含むエピトープに結合し得る。

【 0 1 1 4 】

一部の実施形態において、抗体は、D E E E I E V R S R D I S (配列番号 2) を含むアミノ酸配列に特異的に結合するが、D E E E I E V E E E L C K Q V R S R D I S (配列番号 9) を含むアミノ酸配列には特異的に結合しない。

【 0 1 1 5 】

しかしながら、一部の実施形態において、b 変異体特異抗体が結合する配列は C i z 1 エクソン 1 4 a (配列番号 6) 及び C i z 1 エクソン 1 4 b (配列番号 5) の両方に存在し得る。かかる実施形態において、b 変異体特異抗体は、V E E E L C K Q 配列 (配列番号 1 0) の存在が抗体結合を妨げるため C i z 1 a 変異体に結合することができなくてもよい。他の実施形態において、抗体は、配列が b 変異体特異的コンホメーション又は構造を呈するため、C i z 1 エクソン 1 4 a 及び C i z 1 エクソン 1 4 b の両方に存在する配列に結合し得る。

【 0 1 1 6 】

一部の実施形態において、b 変異体特異抗体は、C i z 1 b 変異体ペプチド / フィブリノゲン複合体によって形成されるエピトープに結合し得る。

【 0 1 1 7 】

理論によって拘束されるものではないが、C i z 1 b 変異体がフィブリノゲンに結合すると、C i z 1 エクソン 1 4 a (配列番号 6) と C i z 1 エクソン 1 4 b (配列番号 5) との間で共通するアミノ酸配列を含むエピトープがフィブリノゲン / C i z 1 b 変異体にユニークなコンホメーションで露出し得る。従ってかかる立体エピトープは C i z 1 a 変異体には存在しないことになる。

【 0 1 1 8 】

試料

10

20

30

40

50

特定の実施形態において、本発明は、対象から単離された試料を利用する。この試料は「被験試料」と称され得る。従って本方法は、典型的にはヒト又は動物の体外で、例えば試験下の対象から事前に入手した試料に対して実施される。

【0119】

試料は、血液、尿、唾液又は気管支肺胞洗浄試料であってもよい。

【0120】

好ましい実施形態において、試料は血液試料である。好適には、血液試料は全血試料であってもよい。好適には、血液試料は血液画分、例えば血漿試料であってもよい。

【0121】

血液試料の採取技法及び血液画分の分離技法は当該技術分野において周知である。例えば、静脈血試料は患者から針を使用して採取し、プラスチックチューブに入れることができる。採取チューブには、例えば、分離のための抗凝固薬、スプレーコーティングシリカ、又はポリマーゲルが入っていてもよい。血漿は、室温で1300RCFで10分間遠心することにより分離して、小さいプラスチックチューブ内において-80で保存することができる。

10

【0122】

好ましい実施形態において、試料は血液試料、詳細には血漿試料である。好ましい実施形態において、血液試料は採取後、抗凝固薬（例えばヘパリン）で処理される。

【0123】

界面活性剤

一実施形態において、本方法は、Ciz1 b変異体及び/又はフィブリノゲン/Ciz1 b変異体複合体を放出させるため試料を界面活性剤で処理することを含み得る。

20

【0124】

界面活性剤の例としては、限定はされないが、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)及びポリソルベート20が挙げられる。例えば、試料は約1~5%、好ましくは1~2% SDSで処理され得る。

【0125】

好適には、本方法は、Ciz1 b変異体及び/又はフィブリノゲン/Ciz1 b変異体複合体を更に精製するため試料を還元剤で処理することを更に含み得る。好適な還元剤の例としては、限定はされないが、ジチオスレイトール(DTT)（これは例えば約10mM DTTの濃度で使用されてもよい）が挙げられる。

30

【0126】

エキソソーム

本方法は、試料のエキソソームコンパートメントからCiz1 b変異体及び/又はフィブリノゲン/Ciz1 b変異体複合体を放出させるステップを含み得る。好適には、本方法は、試料のエキソソームコンパートメントからCiz1 b変異体ペプチドを放出させるステップを含み得る。

【0127】

エキソソームは、尿、血液（血漿及び血清の両方）、腹水、及び脳脊髄液など、多くの生体液に見られるナノメートルサイズ（30~100nm）の小胞である。エキソソームは、細胞における多小胞体(MVB)の内部小胞として生じ、初めは赤血球及びリンパ球などの循環血液細胞の産物として記載された。

40

【0128】

エキソソームは、比較的高いレベルのコレステロール、スフィンゴミエリン、及びセラミドを含有し、且つ界面活性剤耐性膜ドメイン（脂質ラフト）を含有するリン脂質膜に取り囲まれている(Mathivanan et al., 2010; J Proteomics 73:1907-1920)。

【0129】

エキソソームは、膜輸送及び膜融合に関与するタンパク質、例えば、Rab、GTPアーゼ、アネキシン、及びフロチリン、エンドソーム選別輸送複合体(endosomal sorting complex required for transport: ESCRT)の成分、例えば、Alix、腫瘍感受性

50

遺伝子 101 (T S G 1 0 1)、熱ショックタンパク質 (H S P)、インテグリン、及びテトラスパニン、例えば、C D 6 3、C D 8 1、及び C D 8 2 などの存在によって特徴付けられる (van der Pol et al.; 2012; 64(3); 676-705)。

【 0 1 3 0 】

エキソソームコンパートメントから C i z 1 b 変異体及び / 又はフィブリノゲン / C i z 1 b 変異体複合体を放出させるとは、エキソソームの構造的完全性を破壊して、それまでエキソソームの内部構造の中に隠れていた C i z 1 b 変異体エピトープを結合のため露出させることを指す。

【 0 1 3 1 】

好適には、エキソソームコンパートメントから C i z 1 b 変異体及び / 又はフィブリノゲン / C i z 1 b 変異体複合体を放出させるとは、試料を界面活性剤で処理することを指し得る。界面活性剤の例としては、限定はされないが、ドデシル硫酸ナトリウム (S D S) 及びポリソルベート 2 0 が挙げられる。

10

【 0 1 3 2 】

一実施形態において、試料は、エキソソームコンパートメントから C i z 1 b 変異体及び / 又はフィブリノゲン / C i z 1 b 変異体複合体を放出させるのに好適な濃度の界面活性剤で処理され得る。例えば、試料は、約 1 ~ 5 %、好ましくは 1 ~ 2 % S D S で処理され得る。

【 0 1 3 3 】

エキソソームエンリッチメント

本方法は、試料からエキソソーム画分を濃縮することを含み得る。

20

【 0 1 3 4 】

本明細書で使用されるとき、エキソソーム画分を濃縮 (enrich) するとは、エキソソーム画分を精製又は単離することと同義である。

【 0 1 3 5 】

エキソソームは、超遠心分離 (Pisitkun et al (2004) PNAS 101:13368-13373) 又は限外ろ過 (Cheruvanky et al (2007) Am. J. Physiol. Renal Physiol. 292:F1657-F1661) など、当該技術分野において公知の方法により精製し得る。遠心に先立ち得る連続フロー電気泳動及びクロマトグラフィー手順が関わる方法もまた公知である (Taylor and Gerce I-Taylor (2005) Br J Cancer 92:305-311)。クロスフロー限外ろ過もまた、エキソソーム精製方法の一環として用いられ得る (Lamparski et al (2002) J Immunol. Methods 270:211-226)。

30

【 0 1 3 6 】

エキソソームを単離するための市販のキット、例えば Invitrogen が供給する全エキソソーム単離キットもまた利用可能である。

【 0 1 3 7 】

エキソソームは、分画遠心、膜ろ過、濃縮、レートゾーナル遠心及び免疫捕捉を組み合わせることにより、数多くの細胞株及び体液から単離することができる、エキソソーム (Simpson et al.; Proteomics, 8 (2008), pp. 4083-4099)。

40

【 0 1 3 8 】

エキソソームは、腫瘍感受性遺伝子 (T S G 1 0 1)、アクアポーリン - 2 (A Q P 2)、ニューロン特異的エノラーゼ (N E S)、アネキシン V、ポドカリキシン (P O D X L) 及び C D 9 など、そのエキソソームマーカーの発現に基づき検出及び / 又は精製することができる。例えば、エキソソームはマイクロプレート上に、例えばイムノアフィニティー捕捉によって捕捉し得る。

【 0 1 3 9 】

単離されたエキソソームの特徴付けは、典型的には、電子顕微鏡法、F A C S、L C - M S / M S、ウエスタンブロッティング又は E L I S A を用いて実施される (Simpson et al.; 上記) 及び (van Niel et al; J Biochem (Tokyo), 140 (2006), pp. 13-21)。

【 0 1 4 0 】

50

癌

一 態様において、本発明は、対象の癌を診断する方法に関する。

【0141】

本明細書で使用されるとき、用語「癌」又は「癌性」は、自律的増殖能を有する細胞、即ち、急速に増殖する細胞成長によって特徴付けられる異常状態又は条件を指す。この用語には、病理組織学的タイプ又は侵襲性のステージとは無関係に、あらゆる種類の癌性成長又は発癌過程、転移性組織又は悪性形質転換細胞、組織、若しくは器官を含むことが意図される。用語「癌」には、様々な器官系の悪性病変、例えば、肺、乳房、甲状腺、リンパ系、胃腸、生殖器系及び泌尿生殖器系に発症するものなど、並びに悪性病変を含む腺癌、例えば、多くの結腸癌、腎細胞癌、前立腺癌及び/又は精巣腫瘍、非肺小細胞癌、小腸癌及び食道癌などが含まれる。

10

【0142】

好適には、癌は、肺癌、リンパ腫、腎癌、乳癌、肝癌、膀胱癌、卵巣癌又は甲状腺癌であり得る。

【0143】

一 実施形態において、癌は肺癌である。肺癌は小細胞肺癌であり得る。肺癌は非小細胞肺癌であり得る。

【0144】

対象

対象はヒト又は動物対象であり得る。好ましくは、対象はヒトである。

20

【0145】

対象は、本明細書に記載されるとおりの癌を有するか、又は癌のリスクがあり得る。「癌のリスクがある」とは、疾患のいかなる症状も示していない対象を指す。この対象は癌の素因を有し得るか、又は癌を発症するリスクがあると考えられ得る。

【0146】

治療

一 態様において本発明は、癌療法薬を対象に投与することを含む、癌を有する対象を治療する方法に関し；ここで対象は、本発明の方法によって癌を有すると同定されている。

【0147】

別の態様において本発明は、癌の治療に使用される抗癌薬を提供し、ここで対象は本発明の方法によって癌を有すると同定されている。更なる態様において、本発明は、肺癌の治療に使用される肺癌抗癌薬に関し、ここで対象は、本発明の方法によって肺癌を有すると同定されている。

30

【0148】

「治療する」又は「治療すること」は、癌療法薬又は抗癌剤の治療的使用を指す。本明細書では、癌療法薬又は抗癌剤は、既存の疾患又は病態を有する対象に、疾患に関連する少なくとも1つの症状を軽減し、抑制し又は改善するため、及び/又は疾患の進行を減速させ、抑制し又は阻止するために投与され得る。

【0149】

抗癌薬

「抗癌薬」は癌療法薬と同義であり、癌の治療に使用し得る実体を指す。

40

【0150】

抗癌薬は、限定はされないが、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-13、IL-6、CSF-1、M-CSF、GM-CSF、IFN、IFN、IFN、IL-10、IL-12、VEGF、骨形態形成タンパク質、FGF、TNF及びTGFを含めたサイトカイン又は造血因子であり得る。

【0151】

抗癌薬は化学療法剤であってもよく、これは細胞傷害性薬物であり得る。企図される化学療法剤としては、限定なしに、アルキル化剤、ニトロソウレア類、エチレンイミン類/メチルメラミン、スルホン酸アルキル、代謝拮抗薬、ピリミジン類似体、エピボドフィロ

50

トキシン類、L - アスパラギナーゼなどの酵素；生物学的反応修飾物質、例えば、IFN、IL - 2、G - C S F 及び GM - C S F；シスプラチン及びカルボプラチンなどの白金 (platinum) 配位錯体、アントラセンジオン類、ヒドロキシウレアなどの置換尿素、N - メチルヒドラジン (M I H) 及びプロカルバジンを含めたメチルヒドラジン誘導體、ミトタン (o, p' - D D D) 及びアミノグルテチミドなどの副腎皮質抑制薬；プレドニゾン及び等価物、デキサメタゾン及びアミノグルテチミドなどの副腎皮質ステロイド拮抗薬を含めたホルモン及び拮抗薬；カブロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン及び酢酸メゲストロールなどのプロゲステン；ジエチルスチルベストロール及びエチニルエストラジオール等価物などのエストロゲン；タモキシフェンなどの抗エストロゲン薬；プロピオン酸テストステロン及びフルオキシメステロン / 等価物を含めたアンドロゲン類；フルタミド、ゴナドトロピン放出ホルモン類似体及びロイプロリドなどの抗アンドロゲン薬；及びフルタミドなどの非ステロイド系抗アンドロゲン薬が挙げられる。

【0152】

抗癌薬は s i R N A 又は s h R N A であり得る。

【0153】

好適には、抗癌薬は肺癌抗癌薬であり得る。肺癌抗癌薬は、肺癌の治療に使用し得る実体を指す。

【0154】

キット

一態様において、本発明は、フィブリノゲンに特異的に結合する薬剤と C i z 1 b 変異体に特異的に結合する薬剤とを含むキットを提供する。

【0155】

フィブリノゲンに特異的に結合する薬剤は、本明細書に記載されるとおりのフィブリノゲン捕捉剤であり得る。

【0156】

C i z 1 b 変異体に特異的に結合する薬剤は、本明細書に記載されるとおりの C i z 1 b 変異体検出剤であり得る。

【0157】

用語「～を含んでいる (comprising)」、「～を含む (comprises)」及び「～を含む (comprised of)」は、本明細書で使用されるとき、「～を包含している (including)」、「～を包含する (includes)」又は「～を含有している (containing)」、「～を含有する (contains)」と同義であり、包含的又は非制限的であって、追加の記載されていないメンバー、要素又は方法ステップを除外しない。用語「～を含んでいる (comprising)」、「～を含む (comprises)」及び「～を含む (comprised of)」にはまた、用語「～からなる (consisting of)」も包含される。

【0158】

ここで実施例を用いて本発明を更に説明するが、これらの実施例は当業者による本発明の実施を補助する役割を果たすことが意図され、いかなる形であれ本発明の範囲を限定することは意図されない。

【実施例】

【0159】

実施例

実施例 1 - 血液試料からのエキソソーム画分における C i z 1 b 変異体のエンリッチメント

抗体 2 B について従来記載されるとおり (Higgins et al; PNAS 2012; Nov 6;109(45): E3128-35)、抗体 0 4 3 を作成してバリデートした。この抗体は、肺癌患者由来の血漿中におけるウエスタンブロットによる C i z - 1 b 変異ポリペプチドの検出能を有した (図 1 a を参照)。

【0160】

10

20

30

40

50

製造者が推奨するとおり使用したInvitrogen全エキソソーム単離キット（カタログ番号4484450）を用いて肺癌患者由来の血漿をエキソソームコンパートメントと可溶性コンパートメントとに分離した。画分をSDS-PAGEによって分離し、043抗体又はタンパク質中の他のどこかにあるエピトープを認識する「汎用」CIZ1抗体でプローブした（図1bに示されるデータはNB100-74624（Nov4）、Novus Biologicalsで生成される）。

【0161】

Ciz1 b変異体エピトープ含有種は約70kDaの相対移動度で移動した。Ciz1 b変異体エピトープ含有種は肺癌患者においてエキソソーム画分と共に分画された（図1bを参照のこと、赤色及び青色の矢印が、Ciz1アイソフォームの異なる分配を示すレーンを示す）。まれな患者において、Ciz1 b変異体エピトープ含有種は部分的に非エキソソーム画分と共に分配される（タイプ2、図1c）。これらの患者の血漿は、Ciz1 b変異体サンドイッチELISAで、エキソソームを溶解するためのいかなる前処理もなしに陽性シグナルを生じた。Ciz1 b変異体エピトープ含有種が全てエキソソーム画分にある患者については、アッセイ前に血漿（タイプ1）を界面活性剤で処理することによりCiz1 b変異体エピトープに到達し得る（図1e、図1f）。

10

【0162】

実施例2 - 合成b変異体ペプチド及びフィブリノゲンからのエピトープの再構成

抗体2B（図3a）及び043（図1a）は、エクソン14bと15との間のユニークなジャンクションの領域にあるCiz1 b変異体を認識する。これらは正常血漿中の約70kDaの相対移動度の種と反応しないが（図3B、図3C）、合成b変異体ペプチドとは実に弱く反応する（図3B、図3C）。しかしながら組み合わせると、合成b変異体ペプチドと正常血漿とが約80kDaの新規の高反応性種を生成する。異なる長さの合成b変異体ペプチド（図3e）、定量的に生成するエピトープ（図3f）でも同様の結果が得られる。

20

【0163】

癌患者由来の血漿中の内因性b変異体エピトープの移動度は還元剤に感受性を有し、DTTの非存在下で約340kDaに移動し、DTTの存在下で約70kDaに移動する（図4a）。340kDa複合体（図4b）の切り出しと、続く還元時の構成ポリペプチドへの更なる分離により、エピトープは約70kDaにシフトする（図4c）。このバンドを切り出して溶出すると、質量分析によりフィブリノゲン鎖が同定された（図4d）。

30

【0164】

精製フィブリノゲン複合体（図5a）を合成b変異体ペプチドとインキュベートすると、フィブリノゲン複合体と同様の移動度のb変異体エピトープが生成される（図5a）。a変異体ペプチド、又はb変異体ペプチドのカルボキシル化誘導体、又は異なる長さのb変異体ペプチドとの比較から、i) エピトープの再構成がb変異体含有ペプチドに特異的である、ii) スプライスジャンクション近傍の特定のE残基のカルボキシル化がエピトープの再構成に影響を及ぼす、iii) 種々の長さのb変異体ジャンクション含有ペプチドがヒト血漿中に天然に存在するエピトープを構成し得ることが示された。

40

【0165】

実施例3 - Ciz-1 b変異体のバイオマーカーとしての特徴付け

配列

【化1】

DEEEIEVRSRDIS

（配列番号2 - ジャンクションは下線を引いたバリンによって示される）の、選択的にスプライシングされた14b - 15ジャンクションにわたる短いユニークなペプチド（図7A）に対して産生された抗ペプチドウサギポリクローナル抗体2Bで、CIZ1 bの分析を行った。生成、バリデーション及び精製戦略は従来記載されたとおりとした（Higgin

50

s et al., 上記)。2 Bのウエスタンブロット反応性プロファイルには、肺癌患者由来の血漿のSDS-PAGEにおける65~70 kDa実体に加えて、全ての人の血漿中の55 kDa実体が含まれる(図7B)。癌特異的65~70 kDa種が、本明細書及びHiggins et al.によって言及されるCIZ1 bバイオマーカーである。血漿と対照的に、このタンパク質は同じ肺癌患者由来の血清試料中に検出することができなかった(図7C)ことから、CIZ1 bバイオマーカーは凝固血液中では隔離されていることが示唆される。特に55 kDa汎用バンドはCIZ1 spec7)と共に移動することから、55 kDa種は完全長hCIZ1(これは99 kDaの予想完全長MWを有する、NCBI参照配列: NM_012127.2)の変異体又はタンパク質分解断片と同定される。エクソン8及びエクソン17で検出されたバンドの幅は異なり、恐らくこれは、エクソン8エ

10

【0166】

ピトープが選択的スプライシング領域内にあるためであり、一方、エクソン17で検出すれば、エクソン8における選択的スプライシング有り又は無しの種が明らかになり得る。従って癌試料及び同様に非癌血漿試料においても循環系には少なくとも1つの形態のCIZ1タンパク質が存在し、それが正常な生理の一部であることが示唆される。

20

【0167】

エクソン17及びエクソン8エピトープは、癌患者においてCIZ1 b抗体2 Bによって認識される65~70 kDa種には存在せず、これは、このタンパク質にCIZ1 bエピトープの上流及び下流の両方の配列が欠損していることを意味する。このデータは、65~70 kDa種が複雑なCIZ1スプライス変異体であるか、又はCIZ1のCIZ1 b断片とキャリアタンパク質との間のSDS安定複合体であるか、いずれかであることを示唆している(図7D)。

30

【0168】

2 Bと同じ免疫プロトコルを使用して(Higgins et al., 上記を参照)、更なる一組のウサギ抗体を生成した。これにより抗体043が得られ、これは癌患者の65~70 kDaバンドときれいに且つユニークに反応する(図7B)。従って043は、ELISAを含めた他のアッセイフォーマットで適用性がある検出ツールを提供する。55 kDa種を認識しないことから、2 Bと比較してジャンクションランキング配列がそのエピトープにそれほど寄与しないことが示唆され、55 kDa種がCIZ1 bジャンクションを含有しないことが示唆される。

【0169】

実施例4 - Ciz-1 b変異体バイオマーカーの安定性

これらのデータは、CIZ1 bが肺癌の強力な循環バイオマーカーであり、臨床実践における応用に大きな潜在的可能性を有するという主張を裏付けている。この潜在的可能性を実現するには、それが多忙な病院で起こる試料処理及び採取レジームのばらつきに耐えるだけの十分な口バラスト性を有しなければならない。従って、抗体2 Bを使用して血漿及び全血中の65~70 kDa癌選択的CIZ1 b種の安定性を試験し、55 kDa種と比較した。このデータは、37 でインキュベートしたときの単離血漿中における少なくとも6時間にわたる安定性を示しており、その後、両方の種で徐々に崩壊する。同様に50 までの温度で1時間にわたって比較的变化がなく、及び少なくとも3回の凍結融解サイクルにわたって安定していた。更に、全血を分画せずに最長24時間まで卓上に放置したときシグナルの喪失はなく、これらは全て、それが様々な臨床状況における応用に好適な口バラストなバイオマーカーであることを示している。

40

【0170】

50

実施例 5 - C i z - 1 b 変異体バイオマーカー複合体の解離

未変性条件下で 2 B 及び 0 4 3 の両方が、血漿中に豊富にあるタンパク質と共に移動する 7 2 0 k D a を上回る複合体を検出し (図 8 A)、しかし癌血漿と非癌血漿との間はほとんど識別されない。変性条件下で二次元で更に分離すると、癌特異的 6 5 ~ 7 0 k D a 種が明らかになり、及び (2 B について) 5 5 k D a 汎用バンドと分離される (図 8 B)。従って完全に未変性のイムノアッセイフォーマットにおける C I Z 1 b の癌特異的検出は、0 4 3 であっても見込みがない。癌特異的シグナルを明らかにする 3 つの主要な変性作用因子 (熱、S D S、還元剤) を、0 4 3 による C I Z 1 b の移動度及び識別へのそれらの効果に関して評価した。これにより、1 % S D S が主要な反応性種を未変性ゲルの > 7 2 0 k D a から約 3 4 0 k D a にシフトさせることが示され (図 8 C、右)、癌特異的シグナル、並びに癌試料及び非癌試料の両方で約 2 0 0 k D a の非特異的バンドが明らかになった。インキュベーション温度を上昇させると、癌特異的種に有害効果があり、3 7 で差が最大に達する。還元剤を含めると、癌特異的シグナルの移動度は 6 5 ~ 7 0 k D a の予想位置に更にシフトした (図 8 C、左)。

【 0 1 7 1 】

顕著には、還元剤の濃度が高いほど C I Z 1 b シグナルの喪失につながった (図 8 D、図 8 E)。まとめると、これらのデータは、6 5 ~ 7 0 k D a 実体がそれ自体、標準的な S D S P A G E 変性条件 (1 0 m M D T T) には耐性があるものの、より攻撃的な処理 (5 0 0 m M D T T) には耐えられない複合体であること、及びそれが通常、3 4 0 k D a のより高次の複合体 (それ自体が 7 2 0 k D a を上回る更に大きい複合体から S D S によって放出される (図 9 A に示される)) の中に存在することを示唆している。実際、血漿の分画によってエキソソームコンパートメントをエンリッチすると、5 5 k D a 種 (エクソン 1 7 で検出される) と 6 5 ~ 7 0 k D a 種 (0 4 3 で検出される) とが差次的に分配され、6 5 ~ 7 0 k D a 種は、エキソソームを含む複合体画分であるペレットにのみ検出された。

【 0 1 7 2 】

実施例 6 - C i z - 1 b 変異体バイオマーカー複合体の同定

これらの観察結果から、6 5 ~ 7 0 k D a C I Z 1 b バンドに対する二段階ゲル精製戦略が可能となる。第一に、2 つの独立した肺癌患者血漿から 3 4 0 k D a 種を単離し (図 1 0 A)、続いて還元剤の存在下で更に分離した (図 1 0 B)。質量分析 (M S) による同定のため、癌特異的ウエスタンブロットシグナルに対応する 6 5 ~ 7 0 k D a バンドを切り出し、トリプシン又は A s p - N エンドプロテアーゼのいずれかで消化した。両方の酵素消化及び 2 人の患者について、M a s c o t データベース検索すると単一の有意な同定 (P < 0 . 0 5) が返され、これは U n i p r o t P 0 2 6 7 1 ; ヒトフィブリノゲン 鎖に対応した。内因性フィブリノゲン分子は、それぞれ 6 7、5 1 及び 4 5 k D a の 3 つの異なる鎖 (、 、 及び) のセットを 2 組含む、切断前式量 3 2 6 k D a 及び相対移動度約 3 4 0 k D a の六量体糖タンパク質である。

【 0 1 7 3 】

顕著には、いずれの酵素による消化後にも、C I Z 1 b はバンドに同定されなかった。存在する場合に診断的 C I Z 1 b 断片を M S によって観察できるかどうかを決定するため、ショート合成 C I Z 1 b ペプチド (b 1 3) 及びロング C I Z 1 b ペプチド (b 6 6、表 2) を A s p - N (C I Z 1 b エクソンジャンクションの両側を切断することにより診断的断片 D E E E I E V R S R (配列番号 1 6) を生成する) で消化した。ペプチドは b 1 3 及び b 6 6 の消化後に M A L D I - M S / M S によって陽性と同定されたが、消化物中の他のペプチドと比べて強度が低かった。データ依存的取得 (D D A) 及びターゲット選択反応モニタリング (S R M) の両方を用いた L C - M S / M S によって更なる分析を実施し、これにより他の全てのプリカーサーを除外した、D E E E I E V R S R (配列番号 1 6) の予想される 2 + 及び 3 + イオンのフラグメンテーションによるサイクルに分析を集中させ、この分析の特異性及び感度を最大化した。D D A 及び S R M の両方の分析で D E E E I E V R S R (配列番号 1 6) が同定されたことから、化学的に合成したペプチ

10

20

30

40

50

ド (SRMクロマトグラム) から切り出したときこの診断的ペプチドがMSによって観察可能であることが示される。

【0174】

しかしながら、同じペプチドを正常ヒト血漿にスパイクしてCIZ1bを再構成したとき、切り出した65~70kDaバンドに診断的DEEEIEVRSR (配列番号16) ペプチドは検出されなかった。同定されなかったということは、i) CIZ1b診断的ペプチドの予想質量を変化させる又は酵素消化を損なう二次的修飾、ii) 試料中のより豊富にあるタンパク質、主にフィブリノゲン鎖が、イオン抑制を引き起したこと、又はiii) PAGE及び消化ステップによって被った損失後に絶対存在量が計測手段の検出限界を下回ったことを反映したものであり得た。ペプチドは強酸性であり、ポジティブモードMSではこれがイオン化効率を低下させる可能性があり、そのためSRMであっても存在量の僅かな減少によって検出限界を下回り得ることに留意しなければならない。スパイクしたペプチドを生理学的に意味のあるレベルで確実に検出することができなかつた場合、内因性CIZ1bを検出できない可能性が高いと結論付けられ、従って下記の別の手法に従った。

【0175】

【表1】

表2

名称	配列
ショート CIZ1b (b13)	CDEEEIEVRSRDIS-NH2 (配列番号22)
スーパーショート CIZ1b (b7)	CEIEVRSR-NH2 (配列番号17)
ショート CIZ1a (a22)	CDEEEIEVEEELCKQVRSRDISR-NH2 (配列番号18)
ロング CIZ1b ペプチド (b66)	EIAGQDEDHFITVDAVGC FEGDEEEEDDEDEEEIEVRSRDISREEWKGSETYSPNTAYGV DFLVP (配列番号11)
ロング CIZ1a ペプチド (a74)	EIAGQDEDHFITVDAVGC FEGDEEEEDDEDEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSETY SPNTAYGVDFLVP (配列番号19)
GLA3	CDEE γ IEVRSRDIS-NH2 (配列番号14)
GLA4	CDE γ EIEVRSRDIS-NH2 (配列番号23)
GLA6	CD $\gamma\gamma\gamma$ lyVRSRDIS-NH2 (配列番号15)
エクソン17	C-TSSGRPPSQPNTQDKTPSK (配列番号20) C-TARPSQPPLPRRSTRLKT (配列番号21)

選択的スプライシングを受けていない配列においてCIZ1bからスプライスアウトされる8アミノ酸に下線を引き、及びそれらが存在しないことにより作り出されるジャンクションをCIZ1b配列中にVによって示す。指示される場合、ペプチドは追加のN末端システイン残基、及びC末端のアミド化を含む。カルボキシル化グルタミン酸残基は γ によって示す。

【0176】

実施例7 - Ciz-1 b変異体バイオマーカー複合体のエピトープ再構成

65~70kDa癌特異的エピトープが実際にCIZ1b配列を含むことを確認するため、エピトープ再構成戦略を取った。これを達成するため、エクソン14/15ジャンクションにわたる一対の合成ペプチド (CIZ1b13、及び選択的にスプライシングされる介在配列を含むCIZ1a22、表2) を正常ヒト血漿とインキュベートし (図10C)、結果を肺癌患者血漿と比較した。CIZ1bペプチドは内因性エピトープと同等な移

動度 (65 ~ 70 kDa) の 043 及び 2B 反応性エピトープを生成したが、CIZ1a は生成しなかった。このエピトープは遊離ペプチドの相対分子質量をはるかに上回り、反応物の個々の成分のいずれにも存在しないものである (ペプチドレーン 6、7、又は血漿レーン 3)。これは、CIZ1b ペプチドがヒト血漿中のキャリアタンパク質と SDS / DTT 耐性複合体を形成し、2B 及び 043 によって認識される CIZ1b バイオマーカーを再び作り出すことを示唆している。内因性エピトープ (癌血漿レーン 1) と再構成エピトープとの間に移動度の差が検出されなかったため、このデータはまた、65 ~ 70 kDa 癌特異的種に寄与する CIZ1b 断片が極めて短く、10 ~ 20 アミノ酸長程度であることも含意している。更に、個々の分子が必ずしも一様な分子境界を有するわけではなく、このバンドの往々にして拡散する性質を説明する可能性がある。

10

【0177】

モル当量のはるかに長い CIZ1b ペプチド (b66、表 2) は反応性エピトープを再構成したが効率が低く、2B によってのみ検出可能であった (図 10C レーン 2、及びより高濃度で)。このペプチドでは、再構成されたシグナルは、より高い相対分子質量、約 80 kDa に移動し、寄与ペプチドのサイズの増加と一致した。重要なことには、再構成された CIZ1b エピトープは、内因性エピトープと同様に、標準変性 SDS - PAGE 条件 (10 mM DTT、2% SDS、90) に耐えるが、より攻撃的な還元環境によっては解離する。まとめると、これらのデータは、インビボで癌特異的エピトープが、それ自体が 65 ~ 70 kDa 種の質量の大半を占めるフィブリノゲン鎖にマウントした、エクソン 14b / 15 ジャンクションを包含する CIZ1 の比較的短い断片で構成されることを示唆している。これを更に確かめるため、精製ヒトフィブリノゲンでエピトープ再構成実験を実施した (図 10D)。両方の抗体について、フィブリノゲン複合体の移動度 (非還元ゲルで 340 kDa) に反応性エピトープが生成され、等価な CIZ1a ペプチドとの反応性がないことによりシグナルの特異性が確認された。モル当量の CIZ1a 及び CIZ1b ペプチドと複合体化したヒトフィブリノゲンを用いたダイレクト ELISA により (図 10E)、i) ペプチド a22 と比べた b13 によるエピトープ再構成の特異性、ii) フィブリノゲン単独による無視できるシグナル、及び iii) ペプチドをフィブリノゲンにマウントしたときのより高い反応性が確認された。更に、極めて短い CIZ1b ペプチド b7 (表 2) を含めると、2B と 043 との違いが明らかになった; 2B は b7 を認識するが、043 はフィブリノゲンの存在とは無関係な形で認識しない。フィブリノゲンとの複合体としての CIZ1b エピトープの存在は、凝固血液から単離した血清試料ではこのバイオマーカーが枯渇しているという先の観察結果と一致する (図 7C)。

20

30

【0178】

実施例 8 - CIZ1b イムノアッセイ

CIZ1b バイオマーカーの組成の知識に基づき、部分的に変性した血漿における定量的検出能力を有するサンドイッチイムノアッセイフォーマットを設計した。5 µl の血漿からの CIZ1b 抗体 043 による抗原捕捉及びフィブリノゲン鎖による検出により、癌特異的シグナルが生成された。具体的には、043 を用いたウエスタンブロットによって ROC AUC = 0.823 (P = 0.0002)、及び 043 / 抗フィブリノゲンをを用いた ELISA によって 0.830 (P = 0.0007、図 11A、図 11B) という結果が生じた。従って、これらの 2 つの方法は極めて良く似た結果を生み出し、データは有意に相関する。

40

【0179】

フィブリノゲン単独は肺癌のバイオマーカーとしての何らかの潜在的可能性が報告されているため (Allin et al.; 2016; Int J Cancer 139(7):1493-1500)、ヨーク病院 (York Hospital) 呼吸器内科クリニックにかかる幅広い条件の患者を代表するこのデータセットを使用して、このアッセイの CIZ1b 成分の寄与もまた評価した。線形範囲におけるフィブリノゲンの定量的検出から、このセットにわたる幾らかの識別能力が返されたが、ROC AUC は 0.628 と比較的低かった (p = 0.225)。これは、肺癌患者と悪性疾患を有しない者との間でほとんど差を示さなかったフィブリノゲンのウエスタン

50

プロット評価と一致する。従って、C I Z 1 b の捕捉は、このアッセイへの癌選択性の大部分に寄与する要素である。0 4 3 による捕捉後の試料セットを、但し抗フィブリノゲン検出抗体を抗ヒト I g G に置き換えて分析することにより、この構成の特異性を更に試験した (図 1 1 D) 。結果は、患者血漿と対照血漿とが識別されないことを示し、抗フィブリノゲンが、C I Z 1 b によって取り戻された癌選択的複合体を特異的に検出する情報性のある検出試薬であることが確認される。最後に、ダイレクト E L I S A によるセット B にわたる全 I g G レベルの計測 (図 1 1 E) を用いて 0 4 3 / フィブリノゲンによる生成結果を正規化した。もたらされた識別の改善は僅かで、R O C A U C 0 . 8 4 5 であった ($p = 0 . 0 0 0 2$ 、図 1 1 F) 。

【 0 1 8 0 】

0 . 5 m M P M S F (プロテアーゼ阻害薬) を補足した P B S 中 1 0 0 u l の 0 . 5 % t w e e n 2 0 、 1 % S D S において 5 u l の血漿を部分的に変性し、ボルテックスを繰り返しながら 2 0 で 3 0 分間インキュベートした後に、C I Z 1 b - フィブリノゲン鎖複合体 E L I S A をサンドイッチ E L I S A として実施した。プレート (Nunc Maxisorb、4 4 2 4 0 4) を 1 0 0 u l の 5 0 m M 炭酸塩 p H 9 . 6 中、1 u g の 0 4 3 C I Z 1 b p A b プロテイン A 画分によって 4 で一晩コーティングし、次に P B S 中 3 0 0 u l のろ過済み 1 % B S A によって室温で 2 時間ブロックした。P B S 中 3 0 0 u l の 0 . 0 5 % t w e e n 2 0 で 3 回洗浄した後、分析物を穏やかに振盪しながら室温で 2 時間かけて添加した。5 回洗浄した後、捕捉された複合体をヒツジ抗フィブリノゲン p A b (A F 4 7 8 6、R&D systems) と、続く抗ヒツジ H R P (Jackson ImmunoResearch、2 1 3 - 0 3 2 - 1 7 7) で検出し、結果を 1 0 0 u l の Sure Blue (KPL、5 2 0 0 0 1) を使用して発色させ、FLUOstar OPTIMA プレートリーダー (BMG Labtech) を使用して A 4 5 0 n m で検出した。

【 0 1 8 1 】

フィブリノゲンの計測について捕捉抗体はニワトリ I g Y (1 u g / ウェル、Genway、1 5 - 2 8 8 - 2 2 8 5 6) とし、及び分析物濃度は段階希釈によって 5 桁低下させた。ダイレクト E L I S A におけるヒト I g G の計測については、0 . 5 u l の血漿を 1 0 0 u l の 5 0 m M 炭酸塩緩衝液 p H 9 . 6 中でプレートに直接コーティングし、ブロックし、洗浄し、及び抗 I g G (Jackson Immuno Research、7 0 9 - 0 3 5 - 1 4 9) で検出した。合成分析物のダイレクト E L I S A については、1 0 0 p m o l ペプチドと複合体化した 0 . 5 u g 精製フィブリノゲン (Sigma、F 3 8 7 9) を上記のとおり 1 0 0 u l の 5 0 m M 炭酸塩 p H 9 . 6 中でプレートにコーティングし、0 4 3 又は 2 B でプローブし、抗ウサギ H R P (Jackson ImmunoResearch) で検出した。

【 0 1 8 2 】

従って、このサンドイッチ E L I S A フォーマットは病院プラットフォームでのハイスループット適用に好適であり、且つ循環 C I Z 1 b バイオマーカーを確実に定量化することができ、且つ初期肺癌患者の同定に使用することができる。

【 0 1 8 3 】

上記の明細書において言及される全ての刊行物は、本明細書において参照により援用される。当業者には、本発明の範囲及び趣旨から逸脱することなく、本発明の記載される方法及びシステムの様々な改良例及び変形例が明らかであろう。本発明は具体的な好ましい実施形態に関連して説明されているが、特許請求されるとおりの本発明がかかる具体的な実施形態に過度に限定されるべきではないことが理解されなければならない。実際、分子生物学又は関連分野の当業者には自明の、記載される本発明の実施方法の様々な改良例が、以下の特許請求の範囲内にあることが意図される。

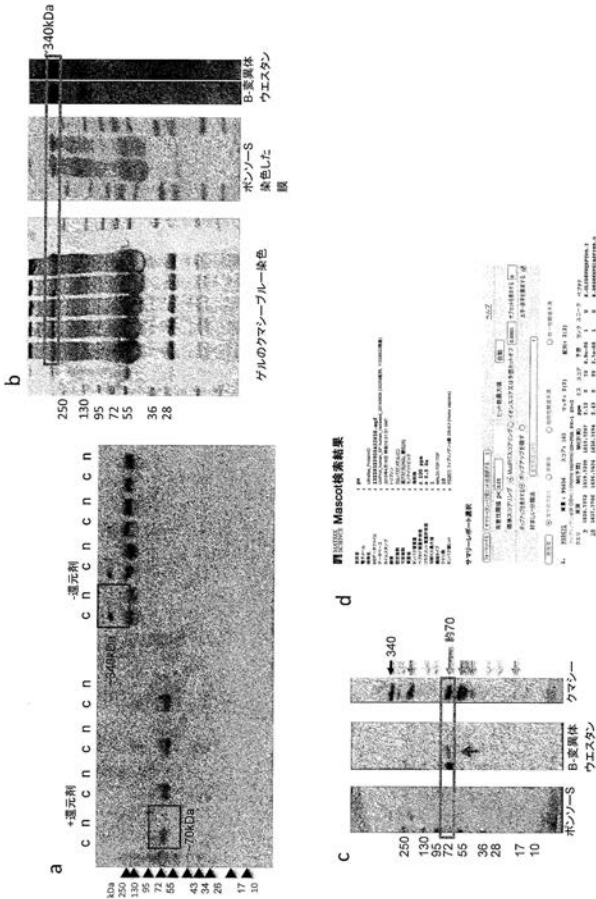
10

20

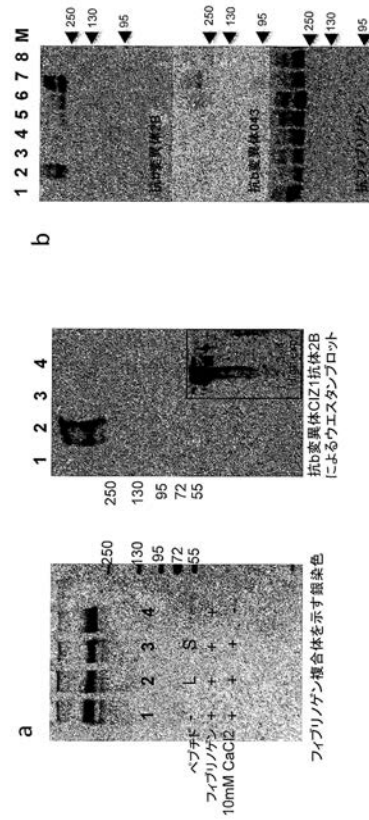
30

40

【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 - 1 】

表1

NCBI参照配列:NM_001131016.1からのVEEELCKQを除くことにより特定される(エクソン14b/エクソン15ジャンクションを含む)Ciz1 b変異体ペプチド

```

EIAQGQDEDFHITVDVAVGCFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
IAGQDEDFHITVDVAVGCFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
AGQDEDFHITVDVAVGCFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
QDEDFHITVDVAVGCFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
QDEDFHITVDVAVGCFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
DEDFHITVDVAVGCFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
EDHFTVDVAVGCFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
DHFITVDVAVGCFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
HFITVDVAVGCFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
FITVDVAVGCFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
ITVDVAVGCFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
TVDAVAVGCFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
VDAVAVGCFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
DAVAVGCFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
AVGCFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
VGCDFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
GCFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
CFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
FEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
EGDEEEEEDEDEEEIEVRS
GDEEEEEDEDEEEIEVRS
DEEEEEDEDEEEIEVRS
EEEEDEDEEEIEVRS
EEDEDEDEEEIEVRS
EDDEDEEEIEVRS
EDDEDEEEIEVRS
DEDEEEIEVRS
DEEEIEVRS
DEEEIEVRS
EEIEVRS
IEVRS
EVR

```

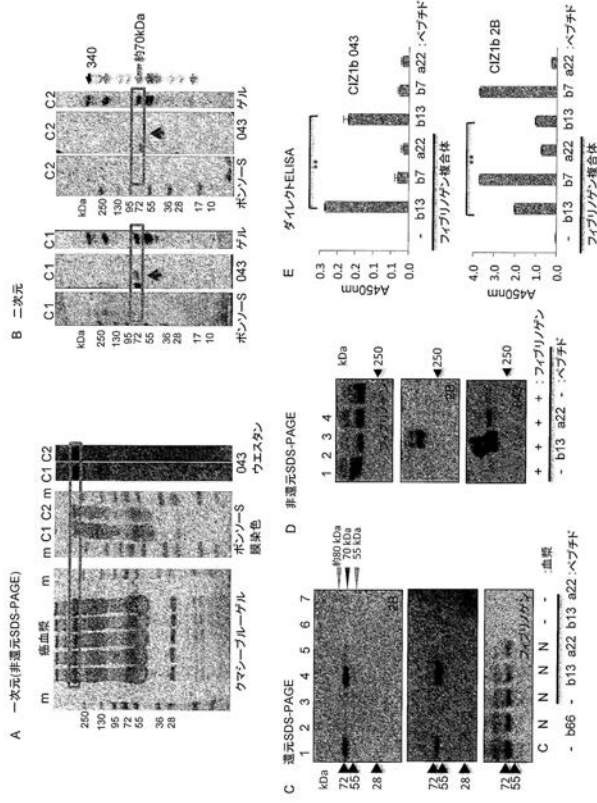
【 図 6 - 2 】

```

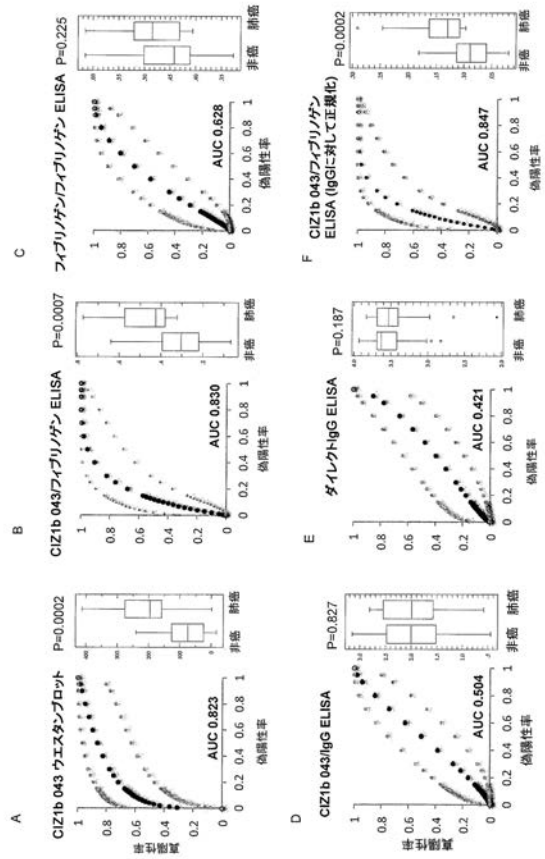
DAVAVGCFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
AVGCFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
VGCDFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
CFEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
FEGDEEEEEDEDEEEIEVRS
EGDEEEEEDEDEEEIEVRS
GDEEEEEDEDEEEIEVRS
DEEEEEDEDEEEIEVRS
EEEEDEDEEEIEVRS
EDDEDEEEIEVRS
EDDEDEEEIEVRS
DEDEEEIEVRS
DEEEIEVRS
DEEEIEVRS
EEIEVRS
IEVRS
EVR

```


【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【 配列表 】

201950061800001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2016/053203

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/75 G01N33/574 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) C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, COMPENDEX, FSTA, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	G. HIGGINS ET AL: "Variant Ciz1 is a circulating biomarker for early-stage lung cancer", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 109, no. 45, 16 October 2012 (2012-10-16), pages E3128-E3135, XP055333175, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1210107109 cited in the application the whole document abstract figure 1B page E3128, right column, paragraph 3 -/--	1-8, 10-30
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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		Date of mailing of the international search report
10 January 2017		16/03/2017
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 Gall-Truchot, A

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2016/053203

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>& G. HIGGINS ET AL: "Variant Ciz1 is a circulating biomarker for early-stage lung cancer: Supporting information", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 109, no. 45, 16 October 2012 (2012-10-16), pages E3128-E3135, XP055333445, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1210107109 cited in the application the whole document figure S2</p> <p>-----</p>	1-8, 10-30
A	<p>WO 2012/017208 A1 (CIZZLE BIOTECHNOLOGY LTD [GB]; COVERLEY DAWN ALISON [GB]) 9 February 2012 (2012-02-09) cited in the application the whole document abstract claims 1, 49-62, 72-79 claims 80, 88-91</p> <p>-----</p>	1-8, 10-30
A	<p>WO 2010/089559 A1 (CIZZLE BIOTECHNOLOGY LTD [GB]; COVERLEY DAWN [GB]) 12 August 2010 (2010-08-12) the whole document abstract example 3, on pages 31-32 and figure 10</p> <p>-----</p>	1-8, 10-30
A	<p>Ahn ET AL: "J Mol Biomark Diagn Protein & Prognostic Biomarkers ISSN: 2155-9929 JMBD, an open access journal Molecular Biomarkers & Diagnosis", J Mol Biomark Diagn, 11 March 2013 (2013-03-11), pages 1-7, XP055107049, DOI: 10.4172/2155-9929.S4-001 Retrieved from the Internet: URL:http://omicsonline.org/current-serum-1-ung-cancer-biomarkers-2155-9929.S4-001.pdf [retrieved on 2014-03-11] the whole document page 4, left column, section "p21(Cip1)-interacting zinc finger protein (Ciz1)"</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-8, 10-30

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2016/053203

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	DAWN COVERLEY ET AL: "A quantitative immunoassay for lung cancer biomarker CIZ1b in patient plasma", CLINICAL BIOCHEMISTRY, 17 November 2016 (2016-11-17), XP055333177, US, CA ISSN: 0009-9120, DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2016.11.015 the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2016/053203**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.:
1-8, 10-12, 25, 28-30(completely); 13-24, 26, 27(partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/GB2016/053203

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-8, 10-12, 25, 28-30(completely); 13-24, 26, 27(partially)

Detection and diagnostic methods wherein a fibrinogen capture/detection agent is used to detect a Ciz1 b-variant; other uses thereof

2. claims: 9(completely); 13-24, 26, 27(partially)

Methods of diagnosing cancer in a subject comprising detecting a Ciz1 b-variant peptide

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2016/053203

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012017208 A1	09-02-2012	AU 2011287430 A1 CA 2807440 A1 CN 103328500 A EP 2601212 A1 JP 5952815 B2 JP 2013539534 A KR 20140016230 A US 2013210663 A1 WO 2012017208 A1	21-03-2013 09-02-2012 25-09-2013 12-06-2013 13-07-2016 24-10-2013 07-02-2014 15-08-2013 09-02-2012
-----	-----	-----	-----
WO 2010089559 A1	12-08-2010	EP 2393498 A1 WO 2010089559 A1	14-12-2011 12-08-2010
-----	-----	-----	-----

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, KM, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72)発明者 コーバーリー , ドーン アリソン

イギリス国 , ワイオー 1 0 5 ディーディー ヨークシャー ヘスリントン , ヘスリントン ホール , シズル バイオテクノロジー リミテッド内

Fターム(参考) 2G045 AA26 BB29 CA26 CB03 CB07 DA36 DA40 FB03

专利名称(译)	使用纤维蛋白原清除剂检测Ciz1b突变体		
公开(公告)号	JP2019500618A	公开(公告)日	2019-01-10
申请号	JP2018538961	申请日	2016-10-14
申请(专利权)人(译)	啾啾声生物科技有限公司		
[标]发明人	コーバーリードーンアリソン		
发明人	コーバーリー, ドーン アリソン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/57423 A21D8/04 A61K38/363 C07K14/75 C12N9/2414 C12Y302/01133 G01N33/5076 G01N33/574		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/574.A G01N33/68		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/BB29 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/DA36 2G045/DA40 2G045/FB03		
代理人(译)	江口明彦 内藤一彦		
優先権	2015018466 2015-10-19 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及纤维蛋白原清除剂或纤维蛋白原检测剂在用于检测Ciz1b变体的测定中的用途。

(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2019-500618
(P2019-500618A)
(43) 公表日 平成31年1月10日(2019.1.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Z N A D 2 G 0 4 5
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	A
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁)

(21) 出願番号	特願2018-538961 (P2018-538961)	(71) 出願人	518135995
(86) (22) 出願日	平成28年10月14日 (2016.10.14)		シズル バイオテックノロジー リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成30年6月4日 (2018.6.4)		イギリス国、ワイオー10 5デューディ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2016/053203		ー ヨークシャー ヘスリントン、ヘスリ
(87) 国際公開番号	W02017/068330		ントン ホール
(87) 国際公開日	平成29年4月27日 (2017.4.27)	(74) 代理人	100079108
(31) 優先権主張番号	1518466.6		弁理士 稲葉 良幸
(32) 優先日	平成27年10月19日 (2015.10.19)	(74) 代理人	100109346
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 大貫 敏史
		(74) 代理人	100117189
			弁理士 江口 昭彦
		(74) 代理人	100134120
			弁理士 内藤 和彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C i z 1 b 変異体を検出するためのフィブリノゲン捕捉剤の使用