



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 28 040 T2 2006.11.23**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 200 832 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 28 040.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/21514**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 952 594.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/011372**

(86) PCT-Anmeldetag: **04.08.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **15.02.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.05.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **17.05.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.11.2006**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/68 (2006.01)**

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

370337 06.08.1999 US

(73) Patentinhaber:

**The Regents of the University of Michigan, Ann
Arbor, Mich., US**

(74) Vertreter:

Kador & Partner, 80469 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**HANASH, M., Samir, Ann Arbor, MI 48105, US;
MISEK, David, Ann Arbor, MI 48108, US;
HINDERER, Robert, Flint, MI 15911, US; BEER,
David, Chelsea, MI 48118, US; BRICHORY, Franck,
Ann Arbor, MI 48105, US**

(54) Bezeichnung: **ANNEXIN-PROTEINE UND AUTO-ANTIKÖRPER ALS SERUMMARKER FÜR LUNGENKREBS UND ÖSOPHAGUSKREBS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Spezifikation

1. Einleitung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Screeningverfahren für die Diagnose, Prognose oder Empfindlichkeit von Lungen- und Ösophaguskrebs in einem Subjekt, indem die Anwesenheit von Serumantikörpern gegen spezifische Annexinproteinantigene in den Seren von Subjekten nachgewiesen wird. Die vorliegende Erfindung stellt auch Screeningverfahren für die Diagnose und Prognose von Lungen- und Ösophaguskrebs in einem Subjekt bereit, indem erhöhte Expressionslevel von Annexinproteinen in biologischen Proben des Subjektes nachgewiesen werden. Das Verfahren der vorliegenden Erfindung kann auch verwendet werden, um Subjekte zu identifizieren, die gefährdet sind Lungen- und Ösophaguskrebs zu entwickeln. Das Verfahren der Erfindung involviert die Verwendung von aus dem Subjekt gewonnenen biologischen Proben, um das Auftreten und den Expressionslevel von Annexinproteinen oder die Expression von Annexin-abgeleiteten Peptiden oder Antigenen, und/oder das Auftreten und die Zirkulationslevel von Autoantikörpern gegen bestimmte Annexinproteinantigene zu bestimmen. Die Erfindung wird mittels Beispielen veranschaulicht, in welchen erhöhte Level von Annexinprotein und erhöhte Level an zirkulierenden Autoantikörpern, die gegen Annexinproteine reaktiv sind, in Seren von Krebssubjekten beobachtet wurden.

2. Hintergrund der Erfindung

[0002] Für eine Zahl von zellulären Proteinen wurde gezeigt, dass sie mit erhöhten Leveln in Körperflüssigkeiten von Subjekten mit verschiedenen Krebsstypen auftreten. Die erhöhten Level solcher Proteine in Krebssubjekten stellen diagnostische und prognostische Nachweise für die Anwesenheit von Krebs dar. Zum Beispiel werden erhöhte Level des prostataspezifischen Antigens (PSA) häufig als ein Indikator für die Anwesenheit von Prostatakrebs beim Menschen verwendet.

[0003] Es ist bekannt, dass Autoantikörper gegen normale oder modifizierte zelluläre Proteine von Patienten bei bestimmten Erkrankungen hergestellt werden, wie bei Autoimmunerkrankungen und kardiovaskulären Fehlfunktionen, in manchen Fällen sogar bevor die Erkrankung offenkundige Symptome gebildet hat. Es gibt auch einen zunehmenden Beweis für eine humorale Immunantwort gegen Krebsarten beim Menschen, wie es durch die Identifikation von Antikörpern gegen eine Zahl von intrazellulären Antigenen und Oberflächenantigenen in Patienten mit verschiedenen Tumoren gezeigt wurde (Gourevitch et al., 1995, Br. J. Cancer 72: 934–938; Yama-

moto et al., 1996, Int. J. Cancer, 69: 283–289; Stockert et al., 1998, J. Exp. Med. 187: 1349–1354; Gure et al., 1998, Cancer Res. 58: 1034–1041). Zum Beispiel lösen somatische Veränderungen in dem p53-Gen eine humorale Antwort in 30–40% der betroffenen Patienten aus (Soussi, 1996, Immunol. Today 17: 354–356). In einigen Beispielen kann der Nachweis von anti-p53-Antikörpern der Krebsdiagnose vorausgehen (Lubin et al., 1995, Nat. Med. 7: 701–702; Cawley et al., 1998, Gastroenterology 115: 19–27). Das Patent der Vereinigten Staaten. Nr. 5,405,749 offenbart ein Verfahren zum Screenen von krebsassoziierten Retinopathieantigenen und zum Testen eines Patientenserums auf Autoantikörper gegen das Autoantigen. Zusätzlich wurden Zunahmen der relativen Syntheseraten von wichtigen Zytoskelettproteinen auf der Oberfläche von Leukämiezellen und Lymphozyten, transformiert durch Mitogene und den Eppstein-Barr-Virus beobachtet (Bachvaroff, R. J. et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 4979–4983).

[0004] Die Mehrzahl der tumorabstammenden Antigene, die identifiziert worden sind und die eine humorale Antwort auslösen, sind nicht das Produkt modifizierter Genen. Sie umfassen die Differenzierungsantigene und andere Genprodukte, die in Tumoren überexprimiert sind (Old und Chen, 1998, J. Exp. Med. 187: 1163–1167). Es ist nicht klar, warum nur ein Bruchteil der Patienten mit einem Tumortyp eine humorale Antwort gegen ein bestimmtes Antigen entwickelt. Faktoren, die die Immunantwort beeinflussen, können die Variabilität unter den Individuen in dem Haupthistokompatibilitätskomplexmolekülen einschließen. Es ist auch möglich, dass die Proteine, nachdem sie posttranslationale Modifikation durchlaufen haben, immunogen werden, ein Prozess, der unter Tumoren eines ähnlichen Typs variabel sein kann.

[0005] Lungenkrebs ist der häufigste Krebs in den Vereinigten Staaten und macht über ein Viertel (28%) der Todesfälle durch Krebs in den US aus (Travis et al., 1996, Cancer 77: 2464–2470). Es wurde eine Zahl von molekularen Veränderungen, einschließlich der c-myc-Amplifikation, Ki-ras- oder p53-Mutationen, identifiziert, die das Tumorverhalten beeinflussen können (Mao et al., 1994, Cancer Res 54: 1634–1637, Mills et al., 1995, J. Natl. Cancer Inst. 87: 1056–1060, Gao et al., 1997, Carcinogenesis 18: 473–478). Es wurde von Serumantigenen gegen die Produktonkogene und Tumorsuppressorgene, so wie c-myc (Ben-Mahrez et al., 1990, Int. J. Cancer 46: 35–38), c-myb (Sorokine et al., 1991, Int. J. Cancer 47: 665–669), c-erbB-2 (Pupa et al., 1993, Cancer Res 53: 5864–5866), ras (Takahashi et al., 1995, Clin. Cancer 1: 107) und p53 (Peyrat et al., 1995, Lancet 345: 621–622; Iizasa et al., 1998, Cancer Immunol. Immunother. 46: 345–349), in Patienten mit verschiedenen bösartigen Erkrankungen berichtet. Es wurde von Autoantikörpern gegen die L-myc-On-

kogenprodukte in 10% der Seren von Patienten mit Lungenkrebs berichtet (Yamamoto et al., 1996, *Int. J. Cancer* 69: 283–289). Es wurden auch Serumautoantikörper gegen p53 in Seren von Patienten mit einem nicht kleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC für Englisch: non-small-cell lung cancer) nachgewiesen (Iizasa et al., 1998, *Cancer Immunol. Immunother.* 46: 345–349). Es waren erhöhte Titer von anti-p53-Antikörpern in etwa 20% der (NSCLC)-Fälle vorhanden, und das Auftreten dieser Antikörper spiegelt die Anwesenheit von p53-Mutationen und einer p53-Überexpression wider. Elevated serum titers of anti-p53 autoantibodies were present in approximately 20% of the cases of (NSCLC), and the occurrence of these autoantibodies reflect the presence of p53 mutations and p53 over expression (Yamamoto et al., 1996, *Int. J. Cancer* 69: 283–289).

[0006] Der Nachweis von Autoantikörpern gegen zelluläre Antigene und die Identifikation von Proteinen, die die Antikörper hervorgerufen haben, wurde durch die Verwendung einer Vielzahl von Ansätzen bewerkstelligt. Zum Beispiel wurde das proliferierende Zellkernantigen (PCNA für Englisch: Proliferating Cell Nuclear Antigen) als erstes als ein nukläeres Antigen beschrieben, das Antikörper von einigen Patienten mit lupus erythematosus gebunden hat (Miyachi, K., Fritzler, M. J., und Tan, E. M., 1978, *J. Immunol* 121: 2228–2234). Es wurde anschließend beobachtet, dass ruhende Lymphozyten nicht mit dem Antikörper reagierten, im Gegensatz zu mitogenstimulierten Lymphozyten, die eine Kernfärbung auswiesen. Dies führte letztendlich zu der Identifikation des Proteins, bezeichnet mit PCNA, welches von diesem Antikörper im Lupus erkannt wird (Tan, E. M., Ogata, K., and Takasaki, Y., 1987, *J. Rheumatol.*, 13: 89–96). In einigen anderen Fällen wurden Kandidatenproteine ausgesondert und in Bezug auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Antikörper in Patienten zu induzieren, wie es für p53 untersucht worden ist (Crawford, L. V., Firm, D. C., Bulbrook, R. D., 1984, *Int J Cancer* 30: 403–408). Zusätzlich beruht eine Technik genannt SEREX auf der serologischen Analyse von rekombinanten cDNA Expressions-Bibliotheken, um Tumorentigene zu identifizieren (Old, L., et al. 1998, *J. Exp. Med.* 187: 1163–1167). Folglich sind viele Ansätze gefolgt, um nach Proteinen zu suchen, gegen welche Autoantikörper gebildet werden können.

[0007] Annexine sind eine Familie von kalzium-abhängigen phospholipidbindenden Proteinen, die ubiquitär in verschiedenen Geweben und Zelltypen von höheren und niedrigeren Eukaryoten exprimiert werden (Benz, J. and Hofmann, A., 1997, *Biol. Chem* 378: 177–183). Es wurden wenigstens zwölf Annexinproteine identifiziert. Unter den vielen Aufgaben, die für die Proteine der Annexinfamilie vorgeschlagen wurden, bleiben die am meisten überzeugenden jene, die die Proteine in die regulierte Exozytose mit einbeziehen (Donnelly, S R und Moss S E, *Cell.*,

1997, *Mol. Life Sci.* 53: 533–538). Ein typisches Annexinprotein ist durch zwei verschiedene Merkmale gekennzeichnet, (i) Ca^{2+} -abhängige Bindung an Phospholipide; und (ii) die Anwesenheit von einem konserviertem Sequenzelement von etwa 70 Aminosäuren, welches vier- oder achtmal bei einem gegebenen Mitglied der Familie wiederholt ist. Immunzytochemische Untersuchungen der Annexine haben gezeigt, dass sie unten an den Plasmamembranen verweilen, nahe den kalziumabsondernden intrazellulären Organellen (Gerke, V and Moss, S E, 1997, *Biochimica et Biophysica Acta* 1357: 129–154). Die physikalischen Eigenschaften, die mit Annexinen verbunden sind, schließen die Inhibition der Phospholipase A_2 , eine antikoagulierende Aktivität, die Bindung an Zytoskelettproteine, die Aggregation von Membranen und Vesikeln und eine kalziumselektive Kanalaktivität ein. Es wurde herausgefunden, dass erhöhte Annexinlevel mit einer Zahl von Erkrankungen verbunden sind, einschließlich multipler Sklerose und experimenteller Neuritis.

[0008] Davis, R. G. et al. beschreibt im *J Immunol methods*, 188, (1995) 91–95 den Nachweis von extrazellulärem Annexin II in verschiedenen Krebszellen unter Verwendung von eines Radioimmunoassays.

[0009] Pencil, S. D. et al. beobachtete in *Clin Exp Metastasis*, 16 (1998) 113–120 eine Annexin I-Immunreaktivität in einer Subpopulation von humanen Brustkrebsprimärtumoren.

[0010] Bastian, B. C. et al. beobachtete in *J Dermatol Science*, 8 (1994) 194–202, dass Autoantikörper, die gegen verschiedene Annexine gerichtet sind sowohl in Kontrollgruppen sowie in den Erkrankungsgruppen nachweisbar waren, ohne dass sie eine signifikante Korrelation zu irgendeinem der Erkrankungszustände aufwiesen, welche Autoimmunerkrankungen, Psoriasis, Beingeschwüre, malignes Melanom und diverse Erkrankungen einschließen.

[0011] Das US Patent Nr. 5 316 915 beschreibt ein Verfahren für die Bestimmung von Antikörpern gegen Lipokortine (Annexine), welches eine Mischung aus Lipokortin I und Lipokortin II (Annexin I & und Annexin II) einsetzt. Es wird aber keine Verbindung mit einem spezifischen Erkrankungszustand erwähnt.

[0012] Es ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung Screeningverfahren für die diagnostische und prognostische Beurteilung von Lungen- und Ösophaguskrebs, für die Identifikation von Subjekten, die eine Prädisposition von Lungen- und Ösophaguskrebs haben und für die Überwachung von Patienten, die eine Lungen- und Ösophaguskrebsbehandlung durchlaufen bereit zu stellen, basierend auf dem Nachweis von erhöhten Annexin-Autoantikörpern-Leveln in biologischen Proben der Subjekte. Die

Erfindung stellt auch Verfahren zum Nachweis einer Überproduktion von Annexinproteinen und/oder Überexpression von Gruppen der Annexinproteine als ein diagnostischer oder prognostischer Indikator für Lungen- und Ösophaguskrebs bereit.

[0013] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Diagnostizierung von Lungenkrebs in einem Subjekt, umfassend:

- (i) Kontaktierung einer Serumprobe, die aus dem Subjekt gewonnen wird, mit einem oder mehreren Proteinantigenen unter Bedingungen, sodass eine immunspezifische Antigen-Antikörper-Bindungsreaktion stattfinden kann, worin die besagten Proteinantigene Annexin I- und Annexin II-Proteinantigene sind; und
- (ii) Nachweis der immunspezifischen Bindung von Annexin I- oder Annexin II-Autoantikörpern in der Serumprobe;

worin ein Anstieg in dem Level der immunspezifischen Bindung, der in Schritt (ii) nachgewiesen wird, ein Indikator für Lungenkrebs ist, wenn dieser mit einer Kontrollserumprobe verglichen wird.

[0014] Die Erfindung bezieht sich auch auf ein Verfahren zur Diagnostizierung von Ösophaguskrebs in einem Subjekt, umfassend:

- (i) Kontaktierung einer Serumprobe, die aus dem Subjekt gewonnen wird, mit einem oder mehreren Proteinantigenen unter Bedingungen, sodass eine immunspezifische Antigen-Antikörper-Bindungsreaktion stattfinden kann, worin die besagten Proteinantigene Annexin I-Antigene sind; und
- (ii) Nachweis der immunspezifischen Bindung von Annexin I-Autoantikörpern in der Serumprobe;

worin ein Anstieg in dem Level der immunspezifischen Bindung, die in Schritt (ii) nachgewiesen wird, ein Indikator für Ösophaguskrebs ist, wenn dieser mit einer Kontrollserumprobe verglichen wird.

[0015] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Entdeckung, dass die Expressionslevel von Annexin I und Annexin II in Tumorgewebeproben erhöht sind, die aus Subjekten mit pulmonalem Adenokarzinom oder Plattenepithelkarzinom der Lunge (Englisch: squamous cell lung cancer) stammen. Zusätzlich wurden erhöhte Level von Autoantikörpern gegen Annexin I und II in dem Serum von Subjekten mit einem Lungenadenokarzinom und Plattenepithelkarzinom (Englisch: squamous cell carcinoma) nachgewiesen. Die Entdeckung, dass die Level der Annexinproteine und Autoantikörper in Proben erhöht sind, die von Krebssubjekten stammen, stellt eine Grundlage für die Entwicklung von diagnostischen und prognostischen Verfahren bereit, sowie Mittel für die Überwachung und die Effizienz von verschiedenen therapeutischen Behandlungen für Krebs.

4. Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0016] Fig. 1. Zweidimensionale Gelelektrophorese von A549-Zelllysaten. Das Gel wurde mit Silber gefärbt, um die Proteine sichtbar zu machen.

[0017] Fig. 2. Western-Blot einer Auftrennung auf einem zweidimensionalen Gel eines A549-Zelllysats, das mit Serum von einem Lungenkrebspatienten behandelt worden ist. Es wurde eine Reaktivität in einer Gruppe von benachbarten Proteinflecken, bezeichnet mit A1, mit einem pI zwischen 6,3 und 6,8 und einem Molekulargewicht von 37 kDa beobachtet.

[0018] Fig. 3. IgM-Immunreaktivität gegen Lungenkrebsproteine. Western-Blot einer Auftrennung auf einem zweidimensionalen Gel eines A549-Lysats mit Serum von Lungenkrebspatienten. Die Membranen wurden anschließend mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Schaf antihumanem IgM-Antikörper hybridisiert.

[0019] Fig. 4. Immunreaktivität des IgG-Subtyps gegen Lungenkrebspatientenseren. Western-Blot einer Auftrennung auf einem zweidimensionalen Gel von A549-Lysaten mit Serum von Lungenkrebspatienten. Die Membranen wurden anschließend mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Maus anti-humanem IgG1-, IgG2-, IgG3- oder IgG4-Antikörper hybridisiert.

[0020] Fig. 5. Spezifität von A1- und A2-IgG-Antikörpern für Lungenkrebspatientenseren. Es wurden Membranen, die A549-Lysate enthielten, mit Seren von Patienten mit Melanom, Brustkrebs, Leberkrebs oder Ösophaguskrebs hybridisiert. Keines der Seren wies eine IgG-basierte Immunreaktivität gegen A2 auf. A1-Proteine wurde mit Seren von Patienten mit Ösophaguskrebs (5/8) und Brustkrebs (1/11) beobachtet, waren aber von Seren von Patienten mit Melanom (0/7) und Leberkrebs (0/11) abwesend.

[0021] Fig. 6. Anti-Annexin I- und Anti-Annexin II-Antikörper sind gegen Proteine in den A1- beziehungsweise A2-Flecken immunreaktiv.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0022] Die vorliegende Erfindung erreicht einen hoch wünschenswerten Gegenstand, nämlich die Bereitstellung von Verfahren für die diagnostische und prognostische Beurteilung von Subjekten mit Lungen- und Ösophaguskrebs und die Identifikation von Subjekten, die eine Prädisposition aufweisen Lungen- und Ösophaguskrebs zu entwickeln. Die Nachweise der Erfindung umfassen Verfahren, die konzipiert sind erhöhte Level einer Annexinproteinproduktion oder die Anwesenheit von Annexinautoantikörpern in Serum oder anderen biologischen Proben aus einem Subjekt nachzuweisen. Für die Zwe-

cke der vorliegenden Erfindung sind die Annexinproteine durch ein kanonisches Motif gekennzeichnet, in welchem ein Bereich von etwa 70 Aminosäuren wenigstens viermal wiederholt ist (Wallner, B. P. et al., 1986, Nature 320: 77–80; Weber, K. and Johnson, N., 1986, FEBS Lett. 203: 95–98; Saris, C. J. M. et al., 1986, Cell 46: 201–212; Huang K. S. et al., 1986, Cell 46: 191–199).

[0023] Spezifisch umfasst die Erfindung ein Verfahren zur Diagnose und Prognose von Lungen- und Ösophaguskrebs in einem Subjekt, umfassend:

- (a) quantitativer Nachweis von Annexinprotein in einer biologischen Probe, die aus einem Subjekt stammt; und
- (b) Vergleich der Proteinlevel, die in der Subjektprobe nachgewiesen werden, mit dem Proteinlevel, der in einer normalen Kontrolle nachgewiesen wird,

worin eine Zunahme des Annexinproteinlevels, der in der Subjektprobe nachgewiesen wird, wenn er mit Kontrollproben verglichen wird, ein Indikator für ein Subjekt mit Krebs oder ein erhöhtes Risiko für Lungen- und Ösophaguskrebs ist. Zusätzlich zu dem Nachweis von Annexinprotein können von Annexin abgeleitete Peptide, Antigene oder unterschiedlich modifizierte Proteine für die Diagnose und/oder Prognose von Lungen- und Ösophaguskrebs nachgewiesen werden.

[0024] Es kann eine große Vielfalt an Proteinmischungen, die Annexinproteine enthalten können, hergestellt oder hinsichtlich des Proteinexpressionslevels untersucht werden.

[0025] Die vorliegende Erfindung umfasst ein Verfahren zur Diagnose und Prognose von Lungen- und Ösophaguskrebs in einem Subjekt, umfassend:

- (a) Kontaktierung einer antikörperenthaltenden biologischen Probe, die aus einem Subjekt stammt, mit einer Probe, die Annexinproteinantigene und Bedingungen enthält, sodass eine immunspezifische Antigen-Antikörper Bindungsreaktion stattfinden kann; und
- (b) Nachweis der Anwesenheit einer immunspezifischen Bindung von Autoantikörpern, die in der biologischen Probe des Subjekts vorhanden sind, an Annexinprotein,

worin die Anwesenheit einer immunspezifischen Bindung von Autoantikörpern die Anwesenheit von Lungen- und Ösophaguskrebs in dem Subjekt anzeigt.

[0026] In einer spezifischen Ausführungsform der Erfindung, werden Annexinproteine, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, Annexin I und II und davon abgeleitete Peptide, gereinigt und verwendet, um das Serum eines Subjektes auf die Anwesenheit von zirkulierenden Autoantikörpern gegen solche Protei-

ne mittels eines sensitiven und schnellen Immunabsorbent-Nachweises oder anderen Verfahren zu screenen.

[0027] Die Verfahren können zum Beispiel unter Verwendung von vorgefertigten diagnostischen Kits durchgeführt werden, die wenigstens ein Reagenz zum Nachweis von Annexinprotein umfassen, wie einen anti-Annexinantikörper. Alternativ umfassen die diagnostischen Kits ein Annexinprotein oder antigenes Proteinfragment für den Nachweis von Annexinantikörpern in einer aus einem Subjekt stammenden Probe.

[0028] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Entdeckung, dass die Level der Annexin I- und II-Proteine in Tumoren des Adenokarzinoms und des Plattenepithelkarzinoms der Lunge (Englisch: squamous cell lung cancer) erhöht sind, die aus Subjekten mit Lungen- und Ösophaguskrebs stammen. Zusätzlich wurden erhöhte Level von zirkulierenden Autoantikörper, die gegen Annexinproteine reaktiv sind, in dem Serum von Subjekten nachgewiesen, die Adenokarzinom- und des Plattenepithelkarzinomtumore der Lunge hatten.

5.1 Assays zum Nachweis der Annexinherstellung

[0029] In Übereinstimmung mit der Erfindung kann die Messung der Annexinproteinlevel in Proben, die aus einem Subjekt stammen, für die frühe Diagnose von Erkrankungen wie Lungen- und Ösophaguskrebs verwendet werden. Darüber hinaus kann die Überwachung und Quantifizierung der Annexinproteinlevel prognostisch verwendet werden, um die Progression der Erkrankung und einzustufen und die Wirksamkeit von Mitteln zu beurteilen, die verwendet werden, um ein Subjekt mit Lungen- und Ösophaguskrebs zu behandeln.

[0030] Der Nachweis von Annexinproteinen in einer Probe aus einem Subjekt kann durch eine Vielzahl von Verfahren bewerkstelligt werden. Bevorzugte diagnostische Verfahren für den Nachweis von Annexinproteinen in der biologischen Probe eines Subjektes kann zum Beispiel Immunoassays mit einbeziehen, worin die Annexinproteine durch ihre Interaktion mit einem annexinspezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Antikörper, die in der vorliegenden Erfindung nützlich sind, können verwendet werden, um quantitativ oder qualitativ die Anwesenheit von Annexinen oder antigenen Fragmenten davon nachzuweisen. Zusätzlich können Reagenzien, die keine Antikörper sind, wie zum Beispiel Polypeptide, die spezifisch an Annexinproteine binden, in den Assays verwendet werden, um den Level der Annexinproteinexpression nachzuweisen. Alternativ kann der Nachweis der Annexinproteine durch den Nachweis und die Messung des Levels der biologischen Eigenschaften bewerkstelligt werden, die mit den Annexin-

proteinen verbunden sind, zum Beispiel Phospholipase A und antikoagulierende Aktivität.

[0031] Immunoassays, die bei der Anwendung der Erfindung nützlich sind, schließen, sind aber nicht darauf beschränkt, Nachweissysteme ein, die Techniken wie Western-Blots, Radioimmunoassays, ELISA (Englisch: enzyme linked immunosorbent assay), „Sandwich“-Immunoassays, Immunpräzipitationsassays, Präzipitinreaktionen, Geldiffusionspräzipitinreaktionen, Immundiffusionsassays, Agglutinationsassays, Komplementfixierungsassays, immunradiometrische Assays, Fluoreszenz-Immunoassays, Protein A Immunoassays, um einige zu nennen, verwenden.

[0032] Eine biologische Probe, die Annexinprotein enthalten kann, wird von einem Subjekt erhalten, das einen bestimmten Krebs hat oder ein Risiko für Lungen- und Ösophaguskrebs hat. Es werden Aliquots von Gesamtgewebe oder Zellen aufgelöst, wobei irgendeiner aus einer Vielfalt von Cocktails zum Lösen verwendet wird, die Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind. Zum Beispiel, kann Gewebe durch die Zugabe von Lysepuffer löslich gemacht werden, der (pro Liter) 8 M Harnstoff, 20 ml Nonident P-40 oberflächenaktiven Stoff, 20 ml Ampholyte (pH 3,5–19), 20 ml 2-Merkaptoethanol und 0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in destilliertem deionisiertem Wasser umfasst.

[0033] Immunoassays zum Nachweis der Annexinproteinexpression umfassen typischerweise die Kontaktierung der biologischen Probe mit einem anti-Annexinantikörper und Bedingungen, sodass eine immunspezifische Antigen-Antikörper Bindungsreaktion stattfinden kann, und den Nachweis oder die Messung der Menge einer immunspezifischen Bindung durch den Antikörper. In einem bestimmten Aspekt der Erfindung kann eine solche Antikörperbindung zum Beispiel dafür verwendet werden, um die Anwesenheit und die vermehrte Produktion von Annexinproteinen nachzuweisen, worin der Nachweis einer vermehrten Produktion von Annexinproteinen eine Indikationen für einen erkrankten Zustand ist. Die Annexinproteinlevel in einer biologischen Probe werden mit Standards verglichen, die für Alter und Geschlecht-abgestimmte normale Individuen und für Subjekte mit einer Vielfalt an nicht kanzerogenen oder präkanzerogenen Erkrankungsstadien etabliert wurden.

[0034] In einer Ausführungsform der Erfindung wird die biologische Probe mit einer Festphasenvorrichtung oder einem Festphasenträger wie Nitrozellulose in Verbindung gebracht, damit beliebige Proteine in der Probe immobilisiert werden. Die Vorrichtung wird dann mit geeigneten Puffern gewaschen, gefolgt von einer Behandlung mit einem nachweisbar markierten annexinspezifischen Antikörper. Die Festphasenvor-

richtung wird dann mit dem Puffer ein zweites Mal gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Menge an gebundenem Antikörper auf der Festphasenvorrichtung wird dann entsprechend gut bekannten Verfahren bestimmt. Fachleute auf dem Gebiet werden in der Lage sein optionale Assaybedingungen für jede Bestimmung zu bestimmen, indem sie routinemäßiges Experimentieren einsetzen.

[0035] Eine der Möglichkeiten wie Annexinantikörper nachweisbar markiert werden können ist den Antikörper an ein Enzym zu koppeln, wie zum Beispiel für die Verwendung in einem Enzymimmunoassay (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", 1978, Diagnostic Horizons 2: 1–7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md.; Voller, A., et al., 1978, J. Clin. Pathol. 31: 507–520; Butler, J. E., 1981, Meth. Enzymol. 73: 482–523). Das Enzym, welches an den Antikörper gebunden ist, wird mit einem geeigneten Substrat, vorzugsweise einem chromogenen Substrat, auf eine solche Weise reagieren, dass es eine chemische Hälfte bildet, die nachgewiesen werden kann, zum Beispiel durch Spektrophotometrie, fluorimetrische oder durch visuelle Mittel. Die Enzyme, die verwendet werden können, um Antikörper nachweisbar zu markieren, schließen die Meerrettichperoxidase und die alkalische Phosphatase ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Der Nachweis kann auch durch kolorimetrische Verfahren bewerkstelligt werden, die ein chromogenes Substrat für das Enzym einsetzen.

[0036] Der Nachweis von Annexinantikörpern kann auch unter Verwendung einer Vielfalt von anderen Verfahren bewerkstelligt werden. Zum Beispiel durch radioaktive Markierung der Antikörper oder der Antikörperfragmente ist es möglich die Annexinproteinexpression durch die Verwendung eines Radioimmunoassays (RIA) nachzuweisen (siehe zum Beispiel, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March 1986). Das radioaktive Isotop kann anhand der Verwendung eines Gammazählers oder eines Szintillationszählers oder durch Autoradiographie nachgewiesen werden.

[0037] Der Antikörper kann auch mit einer Fluoreszenzverbindung markiert sein. Unter den am häufigsten verwendeten Verbindungen für die Fluoreszenzmarkierung sind Fluoreszeinisothiocyanat, Rhodamin, Phycoerythrin und Fluoreszamin. Ebenso kann eine Biolumineszenzverbindung verwendet werden, um den Annexinantikörper zu markieren. Die Anwesenheit eines Biolumineszenzproteins wird durch den Nachweis einer Lumineszenzanwesenheit bestimmt. Wichtige Biolumineszenzverbindungen zum Zwecke einer Markierung sind Luziferin, Luziferase und Aequorin.

[0038] In einer spezifischen Ausführungsform der Erfindung können die Level der Annexinproteine in biologischen Proben durch zweidimensionale Gelelektrophorese analysiert werden. Verfahren für eine zweidimensionale Gelelektrophorese sind Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Biologische Proben wie Gewebeprobe werden in der ersten Dimension auf die elektrophoretischen Gele für eine Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt geladen, welche die Proteine basierend auf ihrer Ladung trennt. Es kann eine Zahl von Gelherstellungen für die erste Dimension verwendet werden, einschließlich von Tube-Gele, um ampholyt-basierte Auftrennungen zu tragen, oder Gelstreifen, um gradient-basierte Auftrennungen zu immobilisieren. Nach der Auftrennung in der ersten Dimension werden die Proteine auf das Gel für die zweite Dimension transferiert, anschließend an ein Äquilibriumverfahren, und unter Verwendung eines SDS-PAGE aufgetrennt, welches die Proteine basierend auf ihrem Molekulargewicht trennt. Wenn die biologischen Proben verglichen werden, die aus verschiedenen Subjekten stammen, werden mehrere Gele von individuellen Proben hergestellt (einschließlich Proben von normalen Kontrollen).

[0039] Anschließend an die Auftrennung werden die Proteine von den zweidimensionalen Gelen auf Membranen, die gewöhnlich für Western-Blots verwendet werden, transferiert. Die Techniken des Western-Blottings und die anschließende Visualisierung der Proteine sind im Stand der Technik gut bekannt (Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", zweite Auflage, Band 3, 1989, Cold Spring Harbor). Es können die Standardverfahren verwendet werden, oder die Verfahren können modifiziert werden, wie es im Stand der Technik für die Identifizierung von Proteinen eines bestimmten Typs, wie zum Beispiel von hoch basischen oder aziden Proteinen oder lipidlöslichen Proteinen etc., bekannt ist (siehe zum Beispiel Ausubel, et al., 1999, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley & Sons, Inc., N. Y.). Es werden Antikörper in einem Inkubationsschritt verwendet, die an Annexinproteine binden, wie in dem Verfahren für die Western-Blot-Analyse. Ein zweiter Antikörper, der für den ersten Antikörper spezifisch ist, wird in dem Verfahren der Western-Blot-Analyse verwendet, um die Proteine zu visualisieren, die mit dem ersten Antikörper reagiert haben.

[0040] Der Nachweis der Annexinproteinlevel in biologische Proben kann auch verwendet werden, um die Wirksamkeit von Antikrebsmitteln während der Behandlung zu überwachen. Zum Beispiel kann der Level der Annexinproteinproduktion vor und während der Behandlung bestimmt werden. Die Wirksamkeit des Mittels kann durch den Vergleich der Annexinexpression während des Behandlungsverlaufs verfolgt werden. Mittel, die eine Wirksamkeit aufweisen sind jene, welche den Level der Annexinproteinproduktion

vermindern, während die Behandlung mit dem Mittel fortschreitet.

[0041] Die vorliegende Erfindung wird mittels Beispielen dargelegt, worin erhöhte Annexinproteinlevel in Gewebeprobe nachgewiesen wurden, die aus Patienten mit einem Lungenadenokarzinom und einem Plattenepithelkarzinom der Lunge (Englisch: squamous cell lung cancer) gewonnen wurden. Insbesondere wurden erhöhte Level von Annexin I und II in Proben nachgewiesen, die aus Lungenkrebspatienten stammen. Der Nachweis und/oder die quantitative Messung der Annexinproteine in biologischen Proben kann beim Screenen von Subjekten verwendet werden, die ein Risiko haben bestimmte Krebsarten oder andere proliferative Störungen zu entwickeln, bei welchen die Annexinproteine überexprimiert sind. Zusätzlich können qualitative Unterschiede von verschiedenen Mitgliedern der Annexinproteinfamilie in den Mustern ihres Auftretens in dem Serum oder biologischen Flüssigkeiten als ein Screening-, diagnostischer oder prognostischer Indikator für Lungen- und Ösophaguskrebs oder ein Krebsrisiko verwendet werden.

5.2 Assay zum Nachweis von anti-Annexin Autoantikörpern

[0042] Die vorliegende Erfindung stellt diagnostische und prognostische Verfahren für Erkrankungen wie Lungen- und Ösophaguskrebs bereit, basierend auf dem Nachweis von zirkulierenden Annexin-Autoantikörpern in einem Subjekt. Das Verfahren wird durch die Verwendung einer biologischen Probe aus einem Subjekt mit Krebs und Kontrollen mit passendem Alter und Geschlecht ohne Krebs bestätigt. Eine biologische Probe, die Autoantikörper enthalten kann, so wie Serum, wird aus einem Subjekt erhalten, von dem angenommen wird, dass es Krebs hat, oder von dem angenommen wird prädisponiert zu sein Lungen- und Ösophaguskrebs zu entwickeln. Eine ähnliche Körperflüssigkeit wird von einem Kontrollsubjekt erhalten, welches keinen Krebs hat.

[0043] In Übereinstimmung mit der Erfindung kann die Messung von Autoantikörpern, die gegen die Annexinproteinantigene reaktiv sind, für eine frühe Diagnose von Erkrankungen wie Lungen- und Ösophaguskrebs verwendet werden. Darüber hinaus kann die Überwachung der Autoantikörperlevel prognostisch verwendet werden, um die Progression der Erkrankung einzustufen. Der Nachweis von Autoantikörpern in einer Serumprobe aus von einem Patienten kann durch irgendeines einer Zahl von Verfahren bewerkstelligt werden. Solche Verfahren schließen Immunoassays ein, welche Nachweissysteme einschließen, aber nicht darauf beschränkt sind, die Techniken wie Western-Blots, Radioimmunoassays, ELISA (Englisch: enzyme linked immunosorbent assay), „Sandwich“-Immunoassays, Immunpräzipitati-

onsassays, Präzipitinreaktionen, Geldiffusionspräzipitinreaktionen, Immundiffusionsassays, Agglutinationsassays, Komplementfixierungsassays, immunradio-metrische Assays, Fluoreszenz-Immunoassays, Protein A Immunoassays, um einige zu nennen, verwenden.

[0044] Solche ein Immunoassay wird durch ein Verfahren durchgeführt, welches die Kontaktierung einer Serumprobe aus einem Subjekt mit einer Probe umfasst, die Annexinproteinantigene enthält, unter Bedingungen, dass eine solche immunspezifische Antigen-Antikörper Bindungsreaktion stattfinden kann, und den Nachweis oder die Messung der Menge irgendeiner immunspezifischen Bindung durch den Autoantikörper. In einem spezifischen Aspekt kann eine solche Bindung von Autoantikörpern durch zum Beispiel Gewebeschnitte verwendet werden, um die Anwesenheit von Autoantikörpern nachzuweisen, worin der Nachweis von Autoantikörpern eine Indikation für einen Erkrankungszustand ist. Die Level der Autoantikörper in einer Serumprobe werden mit den Leveln, die in analogen Serumproben aus einem Subjekt, das keine Störung hat, vorhanden sind, verglichen.

[0045] Die Immunoassays können auf vielen Wegen durchgeführt werden. Zum Beispiel bezieht ein Verfahren, um solche Nachweise durchzuführen, die Verankerung des Annexinproteins an einen festen Träger und den Nachweis von spezifisch gebunden anti-Annexin Antikörpern daran ein. Die Annexinproteine, die in den Assays der Erfindung verwendet werden sollen, können mittels rekombinanter DNA-Techniken, die im Stand der Technik gut bekannt sind, hergestellt werden. Zum Beispiel kann ein DNA-Molekül, das für ein Annexinprotein oder antigenes Fragment davon kodiert, gentechnisch in einen geeigneten Expressionsvektor für eine Herstellung des Annexinproteins im großen Stil eingebracht werden. Es kann vorteilhaft sein Fusionsproteine zu konstruieren, die die Markierung, die Immobilisierung oder den Nachweis des Annexinproteins erleichtern. Siehe zum Beispiel die Techniken, beschrieben in Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. Alternativ kann das Annexinprotein aus natürlichen Quellen aufgereinigt werden, zum Beispiel aus Zellen aufgereinigt werden, wobei Proteinseparationstechniken, die im Stand der Technik gut bekannt sind, verwendet werden. Solche Aufreinigungstechniken können eine Molekularsiebchromatographie und/oder Ionenaustauscherchromatographie einschließen, sind aber nicht darauf beschränkt. In der Praxis werden zweckmäßig Mikrotiterplatten als der feste Träger für die Annexinproteine verwendet. Die Oberflächen können im Voraus vorbereitet sein und aufbewahrt werden.

[0046] Die vorliegende Erfindung wird mittels Bei-

spielen dargelegt, worin erhöhte Level von zirkulierenden Autoantikörpern, die gegen mehrere Annexinproteinantigene reaktiv sind, in Seren von Krebspatienten nachgewiesen worden sind. Der Nachweis und/oder die quantitative Messung der zirkulierenden anti-Annexin Autoantikörper in dem Serum kann beim Screenen von Subjekten, die ein Risiko für Lungen- und Ösophaguskrebs haben, bei welchem die Annexinproteinlevel erhöht sind, verwendet werden.

6. Beispiele: Nachweis der Autoantikörper, die spezifisch für Annexinproteine sind, und erhöhte Level der Annexinexpression in Proben, die aus Krebspatienten stammen

[0047] Unter Verwendung von Verfahren der vorliegenden Erfindung wurden Seren aus Subjekten mit Krebs auf eine Reaktivität gegen Annexinproteine gescreent. Für die Serumproben aus den Subjekten mit Krebs wurde gefunden, dass sie reaktiv gegen Annexinproteine sind. Zusätzlich wurden erhöhte Level einer Annexinproduktion in Gewebeproben beobachtet, die von Subjekten mit Krebs stammen, beobachtet.

6.1 Materialien und Methoden

6.1.1 Reagenzien

[0048] Alle Kulturreagenzien, einschließlich Dulbecco's modifiziertem Eagle's-Medium (DMEM, das L-Glutamin, Natriumpyruvat und Pyridoxinhydrochlorid enthält), Dulbecco's phosphatgepufferter Saline (PBS), fötales Kälberserum und Penicillin/Streptomycin wurden von GIBCO-BRL (Grand Island, N. Y.) erhalten. Die monoklonalen Maus anti-Annexin I- und II-Antikörper wurden von ICN (Costa Mesa, C. A.) erhalten. Die monoklonalen Maus anti-human IgM-Antikörper wurden von der Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) bezogen. Die Meerrettichperoxidase-konjugierten Maus anti-human IgG1-, IgG2-, IgG3- und IgG4-Antikörper wurden von der Zymed Company (San Francisco, C. A.) bezogen. Die Meerrettichperoxidase-konjugierten Schaf anti-human IgG und die anti-Maus IgG monoklonalen Antikörper, der Kit für eine ECL (Erhöhte Chemilumineszenz für Englisch: Enhanced Chemiluminescence) und der Hyperfilm MP wurden von Amersham (Arlington Heights, IL) erhalten. Die Immobilon-P PVDF-(Polyvinylidenfluorid) Membranen wurden von der Millipore Corp. (Bedford, Mass.) bezogen. Das Akrylamid, das bei der Elektrophorese in der ersten Dimension verwendet wurde, Harnstoff, Ammoniumpersulfat und PDA (Piperazindiakrylamid) wurden alle von Bio-Rad (Rockville Center, N. Y.) bezogen. Das Akrylamid, das für die Elektrophorese in der zweiten Dimension verwendet wurde, wurde von Serva (Crescent Chemical, Hauppauge, N. Y.) und die Trägerampholyte (pH 4 bis 8) und NP-40 wurden beide von Gallard/Schlessinger (Carle Place, N. Y.) bezogen.

Alle anderen Reagenzien und Chemikalien wurden entweder von Fisher oder Sigma erhalten und hatten die höchste erhältliche Reinheit.

6.1.2 Zellkultur und Herstellung von Extrakten

[0049] Es wurden A549 humane Adenokarzinomzelllinien bei 37°C in einer 6% CO₂-befeuchteten Inkubator in DMEM kultiviert, ergänzt mit 10% fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin. Die Zellen wurden wöchentlich, nachdem sie eine Konfluenz von 70–80% erreicht hatten, passagiert.

[0050] Es wurde frisches Tumorgewebe (dass heißt, Biopsiegewebe) zum Zeitpunkt der Diagnose von Patienten mit Lungenkrebs erhalten. Das experimentelle Protokoll wurde von dem University of Michigan Review Board for Approved Research, der humane Subjekte einschließt, genehmigt. Es wurde vor der Studie eine Einverständniserklärung von den Patienten (oder deren Familien) eingeholt. Nach dem Ausschneiden wurde das Tumorgewebe sofort bei –80°C eingefroren, wonach kleine Mengen des Tumorgewebes in Lösungspuffer gelöst und bei –80°C bis zur Verwendung aufbewahrt wurden. Die kultivierten Zellen wurden durch die Zugabe von 200 µl Lösungspuffer lysiert, der 8 M Harnstoff, 2% NP-40, 2% Trägerampholyte (pH 4 bis 8), 2% β-Merkaptoethanol und 10 mM PMSF umfasst, und geerntet, wobei ein Zellschaber verwendet wurde. Nachdem weitere 100 µl Lösungspuffer zugegeben worden waren, wurde die Lösung, die die Zellextrakte enthielt, in Mikrofugen-Röhrchen transferiert und bei –80°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

6.1.3 2-D PAGE und Western-Blotting

[0051] Proteine, die aus Extrakten von sowohl kultivierten Zellen als auch von soliden Tumoren stammen, wurden wie zuvor beschrieben (Strahler et al., 1989, Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In "Protein Structure: A Practical Approach" T. E. Creighton (Herausgeber) IRL Press, Oxford, U. K., S. 65–92) mit einigen Modifikationen in Dimensionen aufgetrennt. Kurz, im Anschluß an die Zellyse in Lösungspuffer wurden 35 Aliquots des gelösten Tumorgewebes oder der kultivierten Zellen, die von etwa $2,5 \times 10^6$ Zellen stammen, auf Gele aufgetragen, die nach dem isoelektrischen Punkt aufzutrennen. Die Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt wurde unter Verwendung eines pH 4 bis 8 Trägerampholytes bei 700 V für 16 h durchgeführt, gefolgt von 1000 V für weitere 2 h. Das Tube-Gel für die erste Dimension wurde auf eine Kassette geladen, die das Gel für die zweite Dimension enthielt, nach einer Äquilibrierung in dem Probenpuffer für die zweite Dimension (125 mM Tris (pH 6,8), das 10% Glyzerol, 2% SDS, 1% Dithiothreitol und Bromphenolbleu enthielt). Für die Auftrennung in der zweiten Dimen-

sion wurde ein Akrylamidgradient von 11% zu 14% verwendet, und die Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt, bis die Farbstofffront das gegenüberliegende Ende des Gels erreicht hatte. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Immobilon-P PVDF-Membran transferiert. Die Proteinmuster in manchen Gelen wurden mittels Silberfärbung und auf einigen Immobilon-P-Membranen durch Coomassie-Blau-Färbung auf den Membranen visualisiert. Nicht gefärbte Membranen, die für die Hybridisierung hergestellt worden waren, wurden für 2 h mit Blockierpuffer inkubiert (umfassend Tris-gepufferte Saline (TBS), die 1,8% nicht fettige Trockenmilch und 0,1% Tween 20 enthielt), dann gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Serum inkubiert, das entweder von Patienten erhalten wurde oder mit normalem Kontrollserum (300 µl Serum mit einer 1:100 Verdünnung). Im Anschluß an drei Wäschen mit Blockierpuffer wurden die Membranen für 30 min bei Raumtemperatur mit einem Meerrettichperoxidase-konjugiertem Schaf anti-human IgG-Antikörper (in einer Verdünnung 1:1000) inkubiert. Die Membranen wurden 5 mal mit TBS gewaschen, das 0,1% Tween 20 enthielt, und einmal in TBS, kurz in ECL inkubiert und zu einem Hyperfilm™ MP für 10–30 min exponiert. Die Muster, die nach der Hybridisierung mit Patientenseren visualisiert wurden, wurden direkt mit sowohl dem Coomassie-Blau-gefärbten Blots von derselben Probe verglichen, um die Korrelation mit den Proteinen zu bestimmen, sowie mit den Mustern, die durch die Hybridisierung der Blots erhalten wurden, die von derselben Probe mit den Seren von Patienten mit anderen soliden Tumoren oder Kontrollseren stammen, um die Spezifität der Autoantigene zu bestimmen. Alternativ wurden die Membranen mit einem Meerrettichperoxidase-konjugiertem Schaf anti-human IgM-Antikörper inkubiert und wie für die Inkubationen mit einem anti-human IgG-Antikörper weiter verfahren.

[0052] Die Proteinflecken in sowohl Tumorlysaten als auch in Lysaten von Lungenadenokarzinomzelllinien, welche mit Patientenseren, aber nicht mit den Kontrollseren sichtbar gemacht wurden, wurden weiter charakterisiert. Es wurden A549-Zellysate einem 2-D PAGE unterworfen, nach welchem die aufgetrennten Proteine auf Immobilon-P-Membranen transferiert und anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt wurden. Die Proteinflecken von Interesse wurden aus der Membran ausgeschnitten und einer N-terminalen Aminosäuresequenzierung und massenspektrometrischen Analyse unterworfen. Die resultierenden Sequenzen und Peptidmassen wurden für Datenbankdurchsuchungen zur Identifikation des Proteins verwendet.

6.1.4 Annexin I- und II-Nachweis mittels Immunblotting

[0053] Es wurden zwei monoklonale anti-Annexin I-

und II-Antikörper verwendet. Diese primären Antikörper wurden einer Verdünnung von 1:5000 in Immunblottingassays verwendet und es wurde wie für die Inkubation mit den Patientenserum weiterverfahren.

6.2 Ergebnisse

6.2.1 Reaktivität der Seren von Lungenkrebspatienten mit einem Lungenkrebsprotein, nachgewiesen mittels Wetsern-Blot-Analyse

[0054] Es wurden A549-Zellproteine mittels 2-D PAGE aufgetrennt und auf Immobilon-P-Membranen transferiert. Für die Western-Blot-Analyse wurde jede Membran mit einer Serumprobe behandelt. Die Proben umfassten Seren, die zum Zeitpunkt der Diagnose von 18 Patienten mit Lungenadenokarzinom, 11 Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Lunge (Englisch: squamous cell lung cancer), 4 mit einem kleinzelligen Lungenkarzinom, 2 mit einem großzelligem Lungenkarzinom, 19 mit unklassifiziertem Lungenkrebs; 37 Patienten mit anderen Krebsarten (11 Brustkrebs, 7 Melanome, 11 Leberkrebs und 8 Ösophaguskrebs); und von 15 gesunden Subjekten ohne vorherige Krebsgeschichte oder Autoimmunerkrankung erhalten wurden.

[0055] Ein Beispiel für ein 2-D Gel von A549-Zellen, gefärbt mit Silber, ist in [Fig. 1](#) gezeigt. Die Hybridisierung der Membranen unter Verwendung von Patientenserum als der primäre Antikörper und Schaf anti-human IgG als sekundären Antikörper enthüllte veränderliche Reaktivitätsmuster unter Patientenserum mit Lungenkrebs. Dublikathybridisierungen führten zu ähnlichen Mustern. Im Allgemeinen wurden mehrere reaktive Flecken mit den meisten Seren beobachtet. Einige der reaktiven Flecken wurden mit den Kontrollseren beobachtet und daher wurde angenommen, dass sie eine nicht spezifische Reaktivität repräsentieren. Andere waren auf die Seren der Lungenkrebspatienten beschränkt. Die auffälligste unter den Letzteren war eine intensive Reaktivität in einer Gruppe aus benachbarten Proteinflecken, bezeichnet mit A1, mit einem pI zwischen 6,3 und 6,8 und einem Molekulargewicht von 37 kDa ([Fig. 2](#)), welche mit Seren von 8 der 18 Lungenadenokarzinompatienten, 4 der 11 Plattenepithelkarzinompatienten der Lunge, 1 der 4 kleinzelligen Lungenkarzinompatienten und 2 der 19 unklassifizierten Lungenkrebspatienten beobachtet wurde und welche aber in A549-Membranen abwesend waren, die mit Seren von normalen Individuen hybridisiert worden waren. Eine zweite Gruppe aus benachbarten Proteinflecken, bezeichnet mit A2 ([Fig. 3](#)), mit einem pI zwischen 7,2 und 7,8 und einem Molekulargewicht von etwa 36 kDa, wurde mit Seren von 7 der 18 Lungenadenokarzinompatienten, 3 der 11 Plattenepithelkarzinompatienten der Lunge, 2 der 4 kleinzelligen Lungenkarzinompatienten und 6 der 19 unklassifizierten Lungenkrebspatienten beobachtet, war aber abwe-

send in Seren aus normalen Individuen. Insgesamt wiesen 11 der 18 Seren von Patienten mit Lungenadenokarzinom, 6 der 11 Seren von Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Lunge, und 3 der 4 Seren von Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom eine Reaktivität für A1 und/oder A2 auf.

6.2.2 IgM-Immunreaktivität gegen Lungenkrebsproteine

[0056] Um zu bestimmen, ob Seren, die eine IgG-basierte Immunreaktivität gegen A1- und/oder A2-Proteine aufwies, auch eine IgM-basierte Immunreaktivität ausweisen, wurde Serum von drei Patienten mit einem Lungenadenokarzinom, das eine IgG-basierte Immunreaktivität gegen A1 und/oder A2 aufwies, und von zwei Negativkontrollen in diese Analyse eingeschlossen. Membranen, die A549-Lysate enthielten, wurden mit Patienten- und Kontrollseren hybridisiert und anschließend mit einem Meerrettichperoxidase-konjugiertem Schaf anti-human IgM-Antikörper inkubiert. Nur das Patientenserum, das eine IgG-basierte Reaktivität gegen A1 und A2 aufwies, wies eine IgM-basierte Reaktivität gegen diese zwei benachbarten Proteinssets auf ([Fig. 3](#)).

6.2.3 Immunreaktivität von IgG-Subtypen gegen Lungenkrebsproteine

[0057] Um einen Serum IgG-Subtyp zu bestimmen, der eine IgG-basierte Immunreaktivität gegen A1- und/oder A2-Proteine aufwies, wurde Serum von drei Patienten mit einem Lungenadenokarzinom, das eine IgG-basierte Immunreaktivität gegen A1- und/oder A2-Proteine aufwies, und von zwei Negativkontrollen in diese Analyse eingeschlossen. Membranen, die A549-Lysate enthielten, wurden mit Patienten- und Kontrollseren hybridisiert und anschließend mit einem Meerrettichperoxidase-konjugiertem Maus anti-human IgG1-, IgG2-, IgG3- oder IgG4-Antikörper inkubiert. Nur die Patientenserum, die eine IgG-basierte Reaktivität gegen A1 und/oder A2 aufwies, wies eine IgG1-basierte Reaktivität gegen diese zwei benachbarten Proteinssets auf ([Fig. 4](#)).

6.2.4 Spezifität von A1- und A2-IgG Antikörpern gegenüber Lungenkrebs

[0058] Es wurden Membranen, die A549-Lysate enthielten, mit Seren von Patienten mit Melanom, Brustkrebs, Leberkrebs und Ösophaguskrebs hybridisiert. Keines der Seren wies eine IgG-basierte Immunreaktivität gegen A2 auf und das A1-Protein mit Seren von Patienten mit Ösophaguskrebs (5/8) ([Fig. 5](#)), mit Seren von Patienten mit Brustkrebs (1/11), aber nicht in Seren von Patienten mit Melanom (0/7) und Leberkrebs (0/11).

6.2.5 Reaktivität oder Lungenkrebspatientenseren mit Annexin I und II Isoformen

[0059] Um die Identität von den A1- und A2-Proteinen zu bestimmen, wurden zusätzliche Membranen mit A549 Lungenadenokarzinom-Zelllysaten hergestellt und die Proteine mittels Coomassie-Blau-Färbung sichtbar gemacht. Die A1- und A2-Flecken wurden aus den Membranen ausgeschnitten, eluiert und einem Trypsinverdau unterworfen. Die Peptidfragmente wurden mittels Massenspektroskopie analysiert. Vier benachbarte Sektionen, bezeichnet mit A1a, A1b (gleich links von A1a, dass heißt azider), A1c (gleich links von A1b, dass heißt azider) und A1d (gleich links von A1c, dass heißt azider) wurden aus den Blots ausgeschnitten. Diese vier Bereiche umfassten im Gesamten die ganze A1-Region, die immunreaktiv war. Die massenspektrometrische Analyse der Peptide, die aus diesen Sektionen stammen, enthüllte, dass die Annexin I- und Annexin II-Varianten die vorherrschenden Annexin I-Isoformen, die vorlagen, waren, mit Ausnahme von Sektion A1a, welche kein Ergebnis produzierte. Für die A2-Proteine wurden zwei benachbarte Sektionen, bezeichnet mit A2a und A2b (gleich links von A2a, dass heißt azider) aus den Blots ausgeschnitten. Die massenspektrometrische Analyse der Peptide, die aus diesen Sektionen stammen, enthüllte, dass die Annexin II-Variante (A2a) und die Annexin II-Variante (A2b) die vorherrschenden Annexin II-Isoformen, die vorlagen, waren. Zusätzlich wurden A1- und A2-Flecken aus den Membranen ausgeschnitten und einer N-terminalen Sequenzierung unterworfen. Da die Annexine N-terminal durch Azetylierung blockiert werden, wurden keine Ergebnisse erhalten.

6.2.6 Weitere Bestätigung der Annexin I und Annexin II-Isoformen

[0060] Um zu Bestätigen, dass die Flecken A1 und A2 aus einer Mischung aus Annexin I beziehungsweise Annexin II bestanden, wurden Membranen, die für beide mit der A549-Adenokarzinomzelllinie hergestellt wurden, mit entweder einem kommerziell erhältlichen monoklonalen Mausantikörper, der mit Annexin I reagiert, oder dem monoklonalen Maus Annexin II-Antikörper hybridisiert. Die erhaltenen Immunreaktivitätsmuster wurden sowohl mit Coomassie-Blau-gefärbten Blots des selben Zelllysates sowie mit Immunreaktivitätsmustern verglichen, die mit Seren von Patienten mit Lungenkrebs beobachtet wurden. Die Anti-Annexin I- und Anti-Annexin II-Antikörper immunreagierten mit Proteinen in dem A1- beziehungsweise A2-Flecken, welche mit Seren von Lungenkrebspatienten visualisiert wurden (**Fig. 6**). Auffallen ist, dass mehrere zusätzliche immunreaktive Flecken mit niedrigem Molekulargewicht beobachtet wurden, die aus der Hybridisierung der beiden verwendeten monoklonalen anti-Annexin I- und anti-Annexin II-Antikörper resultierten. Für diese Fle-

cken wurde gezeigt, dass sie eine Immunreaktivität mit irgendwelche getesteten Patientenseren auswiesen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Diagnostizierung von Lungenkrebs in einem Subjekt, umfassend:

(i) Kontaktierung einer Serumprobe, die aus dem Subjekt stammen, mit einem oder mehreren Proteinantigenen unter Bedingungen, sodass eine immun-spezifische Antigen-Antikörper-Bindungsreaktion stattfinden kann, worin die besagten Proteinantigene Annexin I- und Annexin II-Proteinantigene sind; und
(ii) Nachweis der immunspezifischen Bindung von Annexin I- oder Annexin II-Autoantikörpern in der Serumprobe; worin ein Anstieg in dem Level der immunspezifischen Bindung, der in Schritt (ii) nachgewiesen wird, ein Indikator für Lungenkrebs ist, wenn dieser mit einer Kontrollserumprobe verglichen wird.

2. Verfahren zur Diagnostizierung von Ösophaguskrebs in einem Subjekt, umfassend:

(i) Kontaktierung einer Serumprobe, die aus dem Subjekt stammen, mit einem oder mehreren Proteinantigenen unter Bedingungen, sodass eine immun-spezifische Antigen-Antikörper-Bindungsreaktion stattfinden kann, worin die besagten Proteinantigene Annexin I-Antigene sind; und
(ii) Nachweis der immunspezifischen Bindung von Annexin I-Autoantikörpern in der Serumprobe; worin ein Anstieg in dem Level der immunspezifischen Bindung, die in Schritt (ii) nachgewiesen wird, ein Indikator für Ösophaguskrebs ist, wenn dieser mit einer Kontrollserumprobe verglichen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, worin die Annexin I- oder Annexin II-Autoantikörper unter Verwendung eines Immunoassays detektiert werden.

4. Verfahren nach Anspruch 3, worin die Annexin I- und Annexin II-Autoantikörper unter Verwendung eines Immunoassays detektiert werden, umfassend;

(a) Immobilisierung eines oder mehrerer Annexinproteine auf einem Substrat oder einer Membran, worin die besagten Annexinproteine Annexin I und Annexin II sind;

(b) Kontaktierung des Substrats oder der Membran mit der Serumprobe des Subjekts; und

(c) Nachweis der Anwesenheit von Annexin I- und Annexin II-Autoantikörpern, die an das Substrat gebunden sind.

5. Verfahren nach Anspruch 3, worin die Anwesenheit von Annexin I- und Annexin II-Autoantikörpern unter Verwendung eines markierten Reagenzes nachweisen wird, das an die Autoantikörper bindet.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

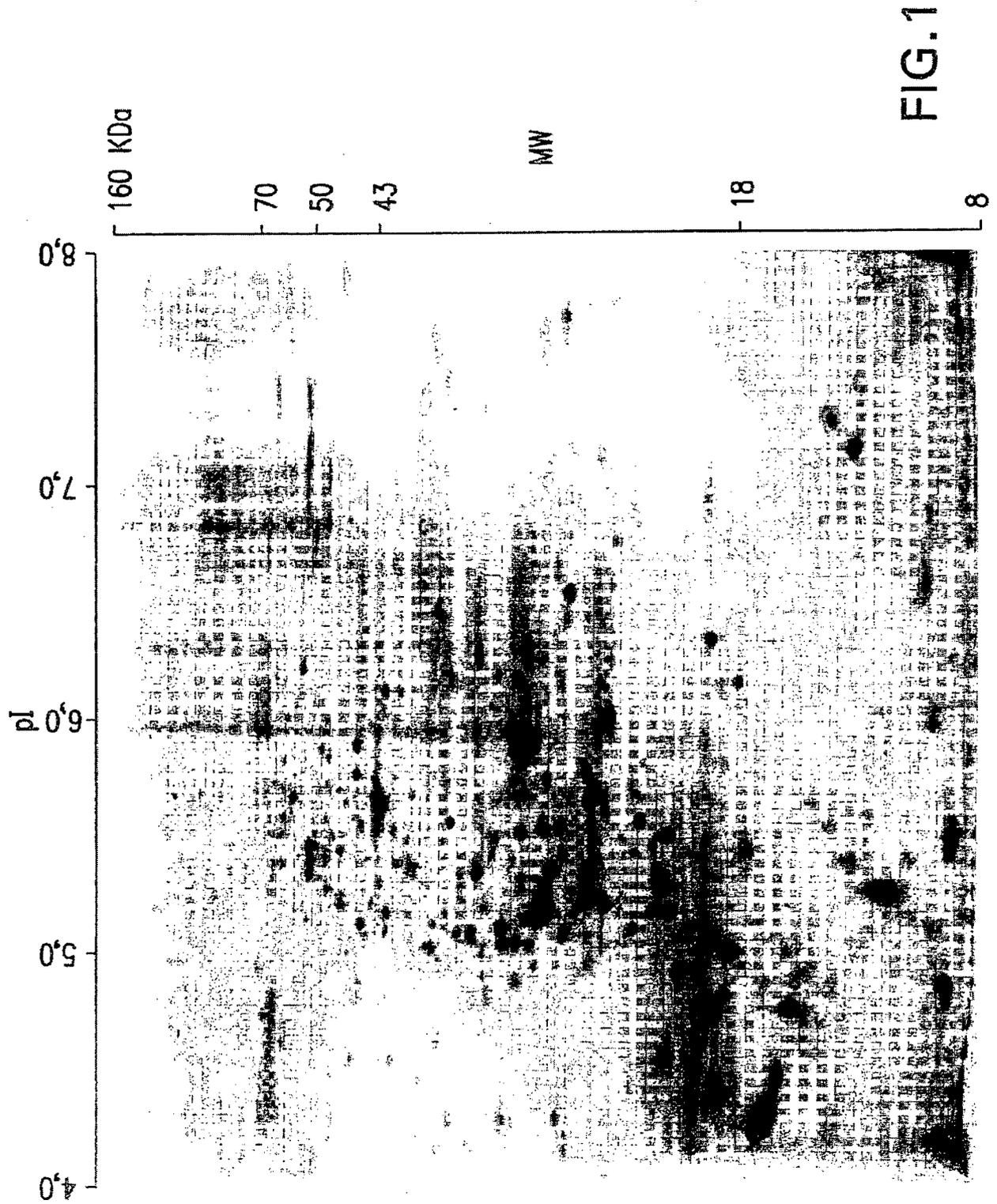


FIG.1

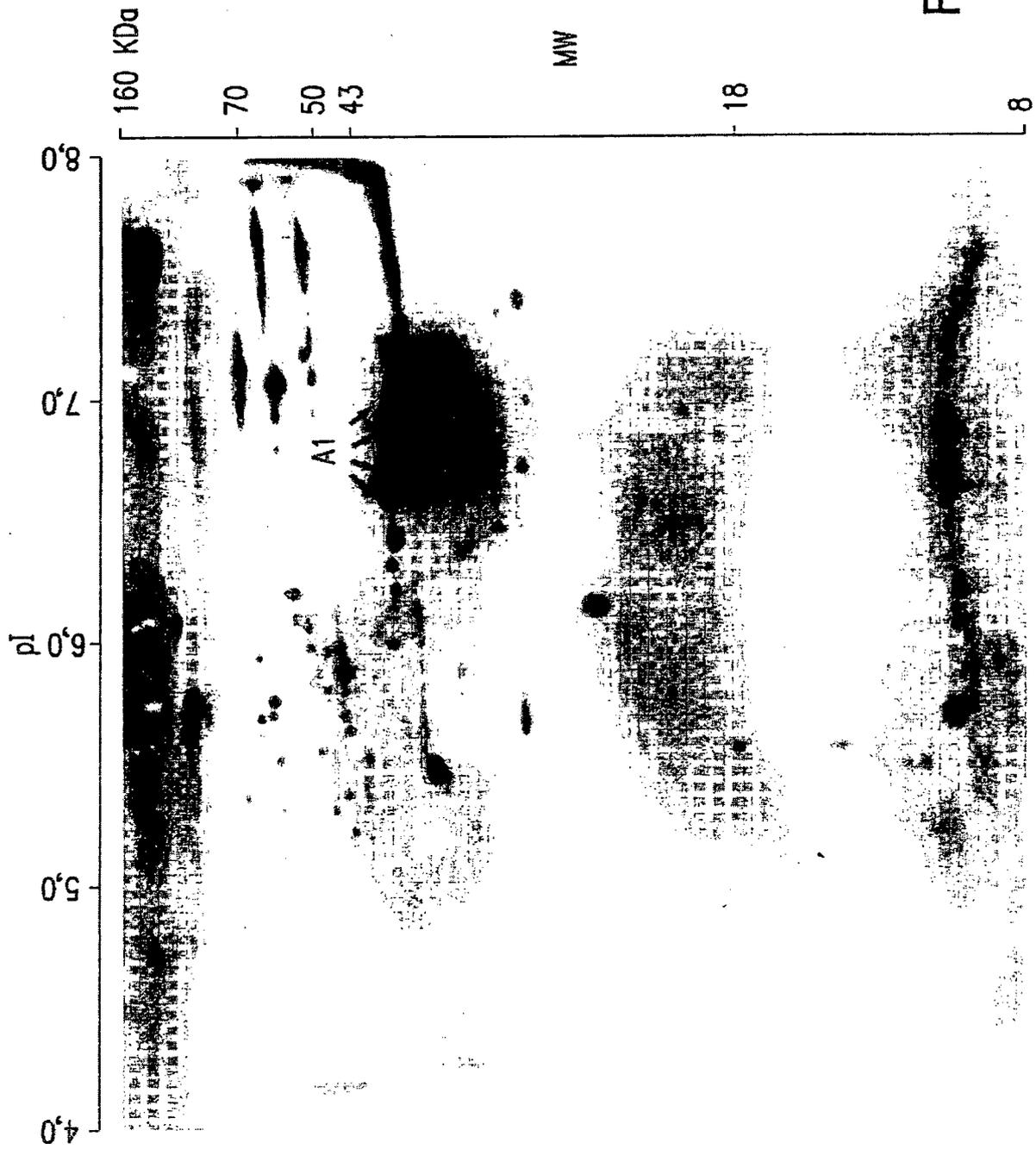


FIG.2

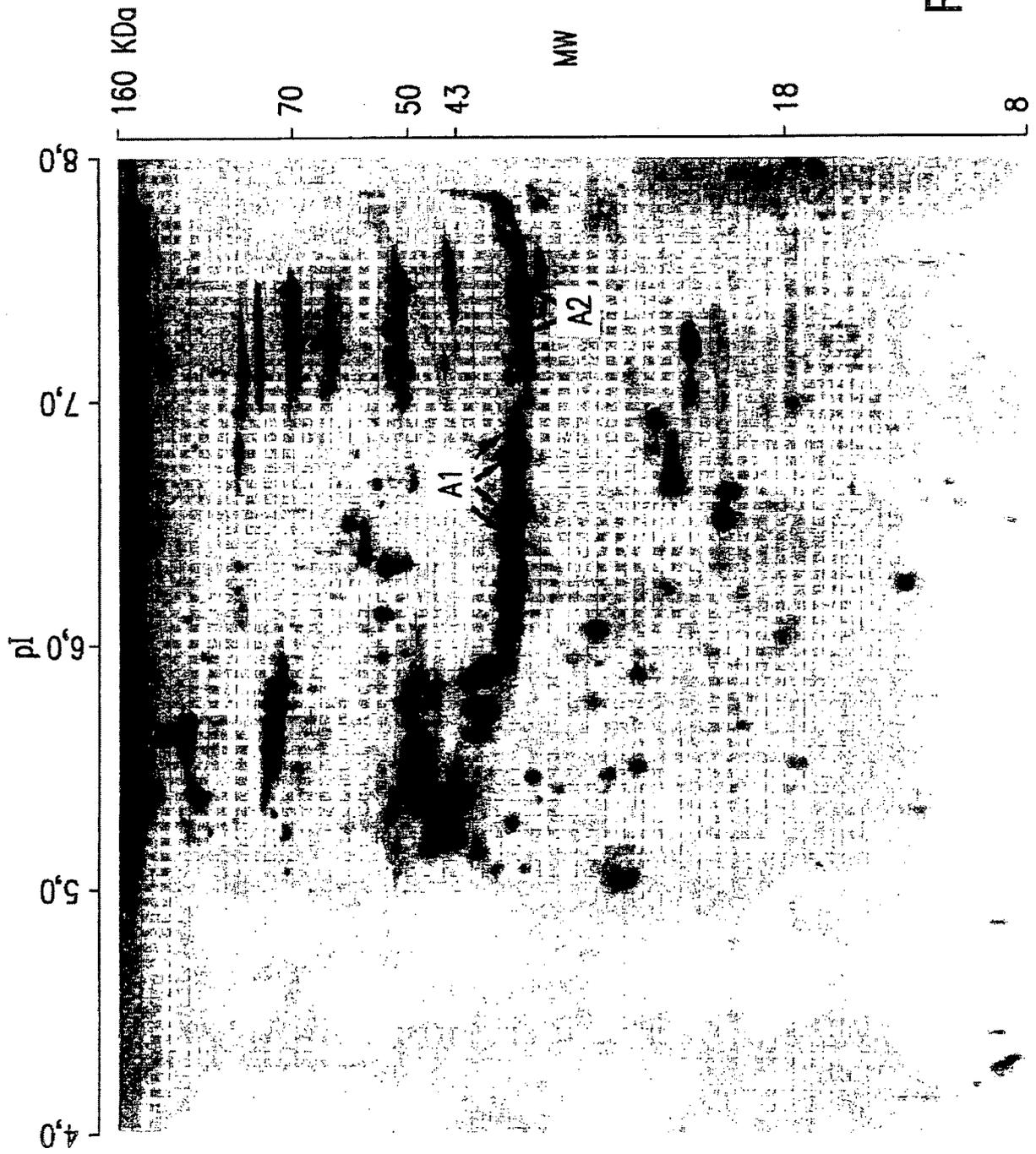


FIG.3

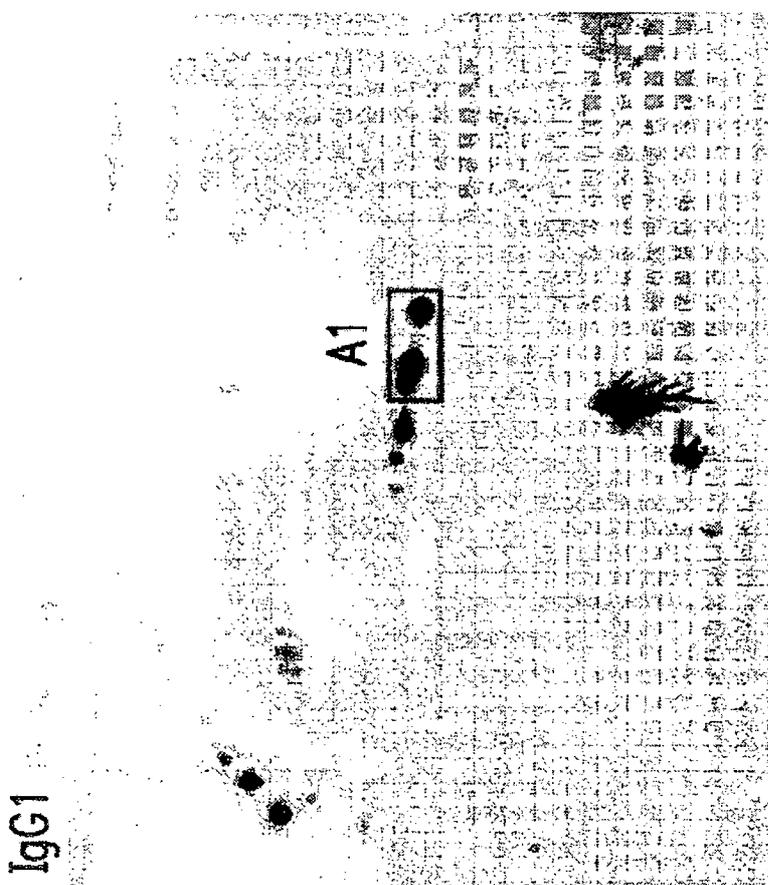
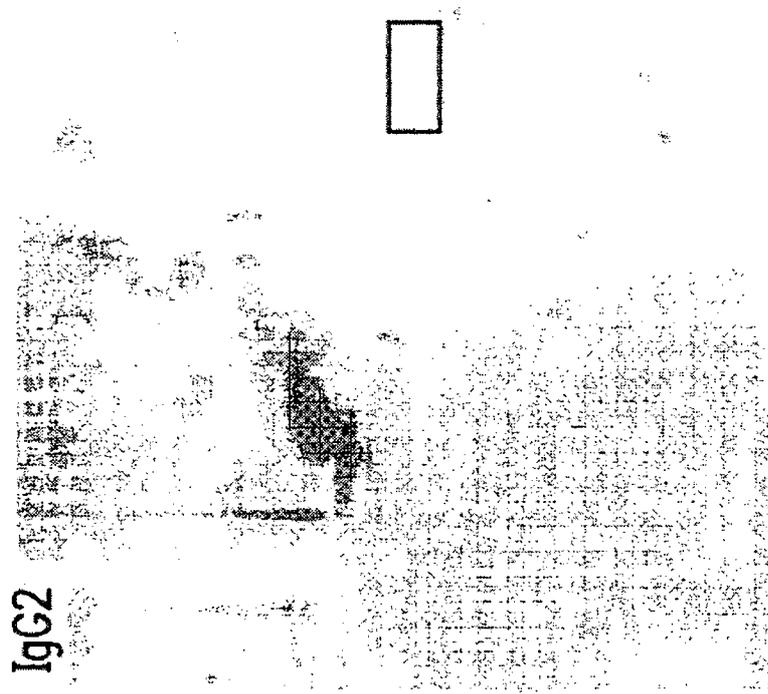


FIG.4B

FIG.4A



FIG. 4D

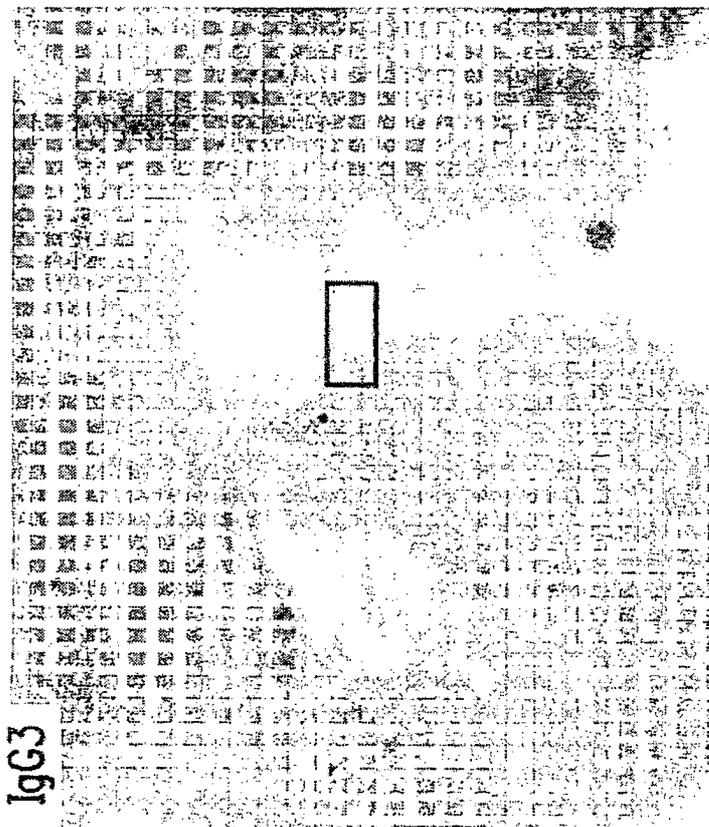
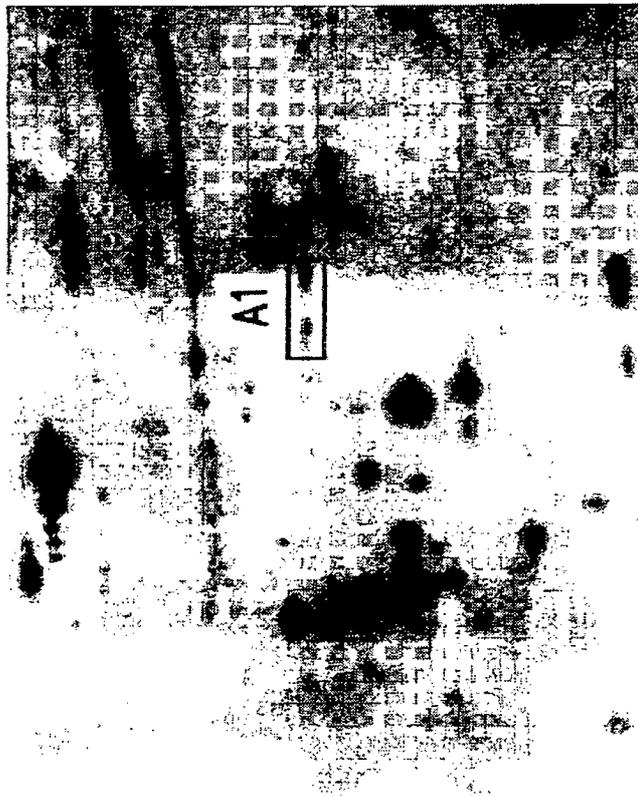


FIG. 4C



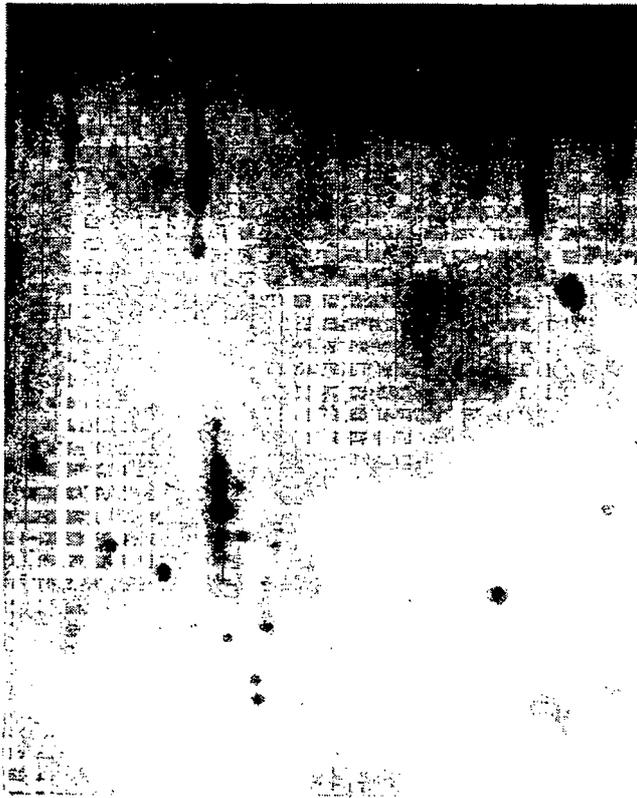
Serum von einem Patient mit Ösophaguskrebs

FIG. 5A



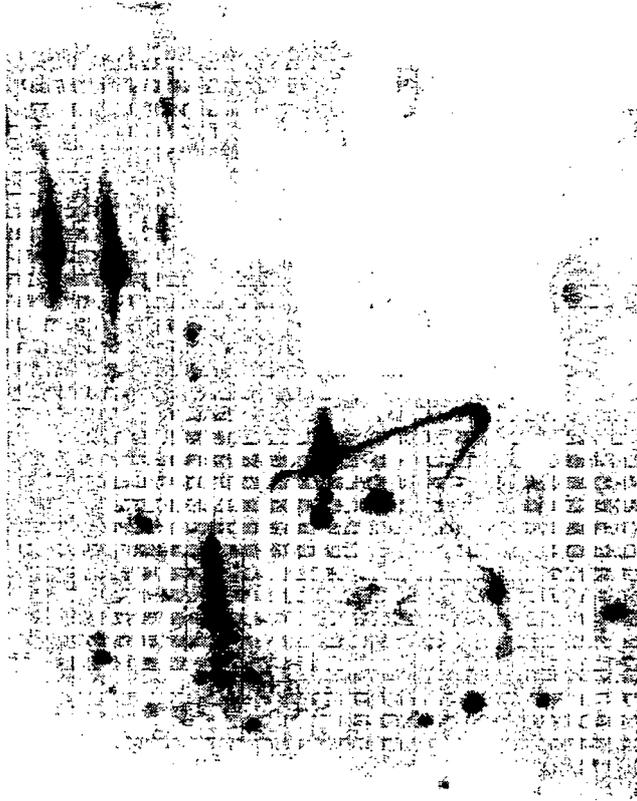
Serum von einem Patient mit Brustkrebs

FIG. 5B



Serum von einem Patient mit Melanomkrebs

FIG. 5C



Serum von einem Patient mit Leberkrebs

FIG. 5D

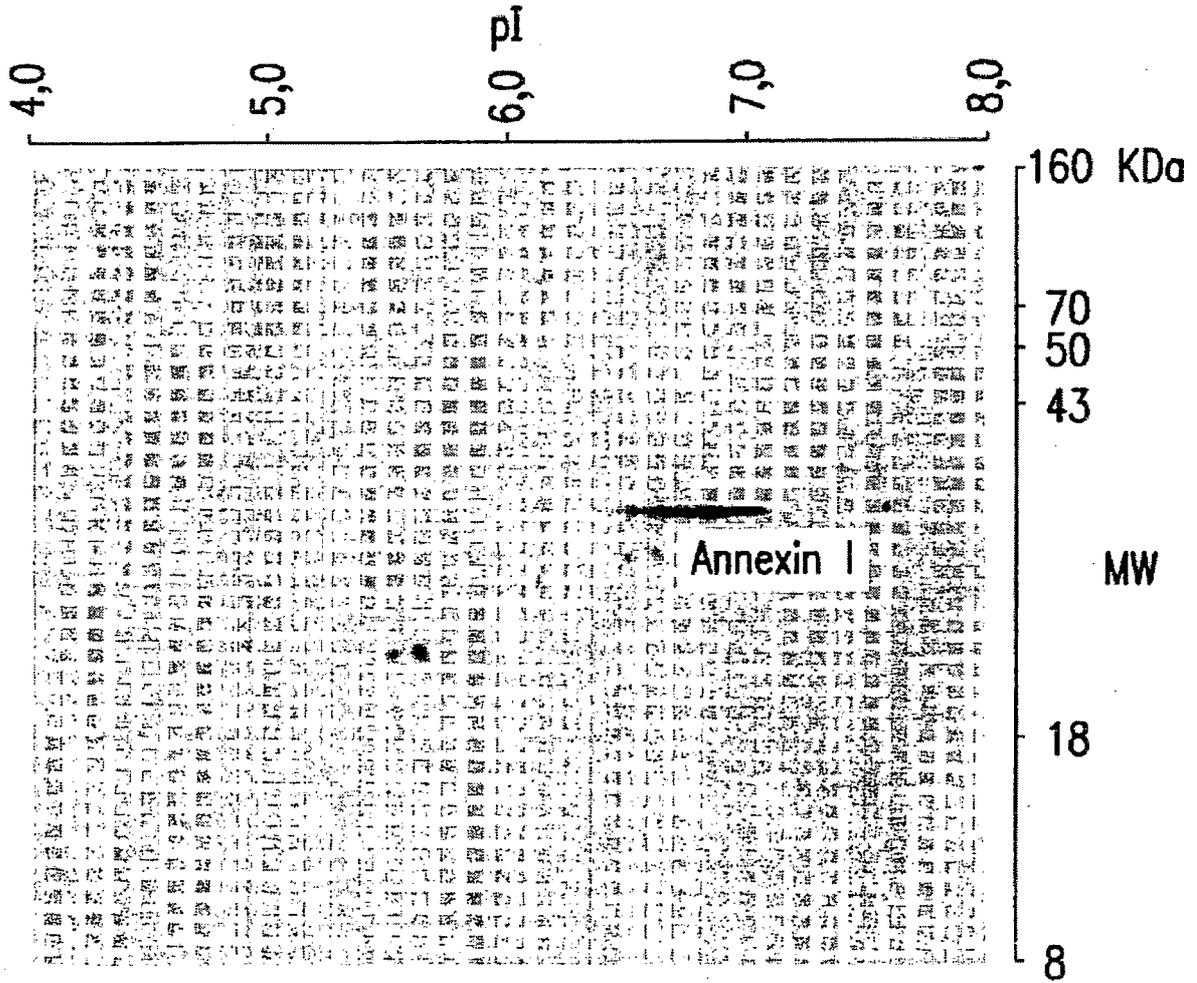


FIG. 6A

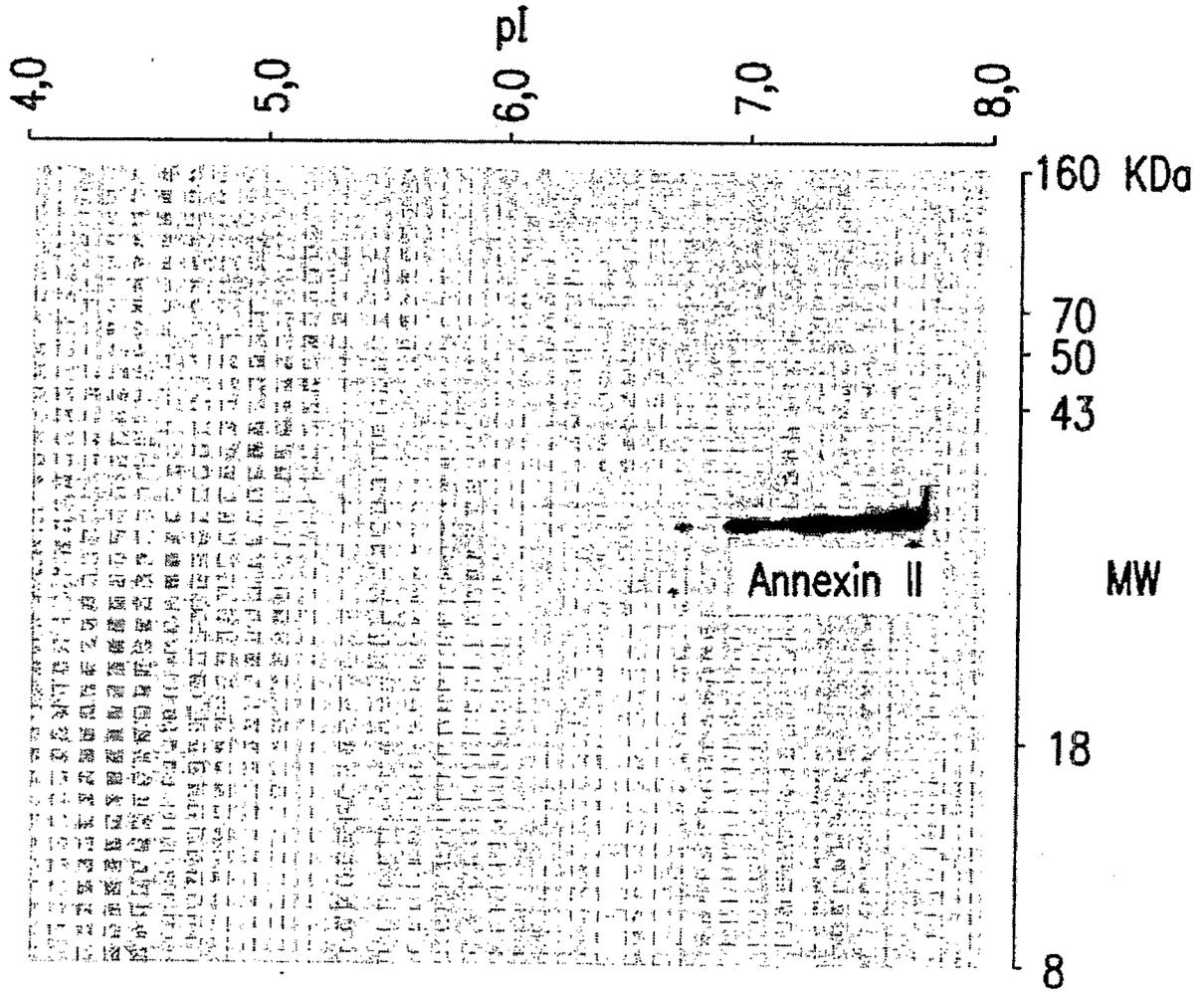


FIG. 6B