

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4665069号
(P4665069)

(45) 発行日 平成23年4月6日(2011.4.6)

(24) 登録日 平成23年1月21日(2011.1.21)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A
CO 7 K 14/47 (2006.01)	CO 7 K 14/47
C 1 2 N 5/0781 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 K

請求項の数 46 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2000-587190 (P2000-587190)	(73) 特許権者	507390893
(86) (22) 出願日	平成11年12月10日 (1999.12.10)		オーエヌシーイミュン リミテッド
(65) 公表番号	特表2002-532686 (P2002-532686A)		イギリス国 ノッティンガム エヌジー5
(43) 公表日	平成14年10月2日 (2002.10.2)		1 ビービー ハックナル ロード シテ
(86) 国際出願番号	PCT/GB1999/004182		ィ ホスピタル クリニカル サイエンス
(87) 国際公開番号	W02000/034787		ズ ビルディング
(87) 国際公開日	平成12年6月15日 (2000.6.15)	(74) 代理人	100062144
審査請求日	平成18年11月29日 (2006.11.29)		弁理士 青山 稜
(31) 優先権主張番号	9827228.9	(74) 代理人	100101454
(32) 優先日	平成10年12月10日 (1998.12.10)		弁理士 山田 卓二
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100106518
			弁理士 松谷 道子
		(74) 代理人	100067035
			弁理士 岩崎 光隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌検出法および試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物の体液中に存在する癌関連マーカートンパク質を検出する体外試験法であって、

(a) 該哺乳動物の体液試料を該マーカートンパク質の少なくとも1個のエピトープに対する抗体と接触させること、および

(b) 該抗体と該試料中の何れかのマーカートンパク質との間で形成された何れかの複合体の存在を検出すること、

の各段階を包含し、該抗体が、該試料が得られた哺乳動物と同一種から誘導された、該癌関連マーカートンパク質に対する哺乳動物自己抗体であって、該癌関連マーカートンパク質が野生型タンパク質の修飾形態である、方法。

【請求項 2】

該試料が、前新生物または癌に対して実質的に無症候性である哺乳動物から得られている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

該試料が、癌に対して症候性である哺乳動物から得られている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

該試料が、癌の治療を受けた哺乳動物から得られている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

10

20

該哺乳動物がヒトであり、かつ該自己抗体がヒト自己抗体である、請求項 1 ないし 4 の何れかに記載の方法。

【請求項 6】

該体液が血漿、血清、全血、尿、糞、リンパ液、脳脊髄液または吸引乳である、請求項 1 ないし 5 の何れかに記載の方法。

【請求項 7】

該癌関連マーカートンパク質が、リンパ腫、白血病、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、前立腺癌、子宮頸部癌、卵巣癌、子宮内膜癌または皮膚癌関連である、請求項 1 ないし 6 の何れかに記載の方法。

【請求項 8】

該癌関連マーカートンパク質が乳癌関連マーカートンパク質である請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

該癌関連マーカートンパク質が癌関連形態の MUC 1、BRCA 1、p53、c-myc、c-erbB2 または Ras タンパク質である請求項 1 ないし 8 の何れかに記載の方法。

【請求項 10】

該癌関連マーカートンパク質が、初期乳癌に関連する癌関連形態の MUC 1、BRCA 1、BRCA 2、p53、c-myc、c-erbB2 または Ras タンパク質である請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

該癌関連マーカートンパク質が、進行乳癌に関連する癌関連形態の MUC 1、BRCA 1、BRCA 2、p53、c-myc、c-erbB2 または Ras タンパク質である請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

該自己抗体が初期乳癌の患者から単離された単球から得られる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

該自己抗体が進行乳癌の患者から単離された単球から得られる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

該自己抗体が不死化細胞または細胞群によって産生されている、請求項 1 ないし 13 の何れかに記載の方法。

【請求項 15】

該自己抗体がポリクローナル抗体である、請求項 1 ないし 14 の何れかに記載の抗体。

【請求項 16】

該自己抗体が固体表面に固定されている、請求項 1 ないし 15 の何れかに記載の方法。

【請求項 17】

該自己抗体と、該試料中に存在する何れかの癌関連マーカートンパク質との間で形成された何れかの複合体が、該マーカートンパク質の少なくとも 1 個のエピトープに特異的な 2 次抗体もしくは自己抗体を用いて検出され、該 2 次自己抗体が検出可能な標識を付されている、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

該試料に加えて、該自己抗体によって認識される少なくとも 1 個のエピトープを有する、標識された癌関連マーカートンパク質が加えられている、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

処置後に癌の再発をスクリーンし、全身的処置を監視しまたは処置を選択するための、請求項 1 ないし 18 の何れかに記載された方法の使用。

【請求項 20】

哺乳動物の野生型タンパク質の修飾形態である癌関連マーカートンパク質の少なくとも

10

20

30

40

50

1 個のエピトープに特異性を有する哺乳動物自己抗体を含む診断用試薬。

【請求項 2 1】

体液試料中の哺乳動物癌関連マーカータンパク質の存在を検出するために使用する、請求項 2 0 に記載の診断用試薬。

【請求項 2 2】

該自己抗体がヒト自己抗体であり、かつ該マーカータンパク質がヒト癌関連マーカータンパク質である、請求項 2 0 または 2 1 に記載の試薬。

【請求項 2 3】

該自己抗体が、リンパ腫、白血病、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、前立腺癌、子宮頸部癌、卵巣癌、子宮内膜癌または皮膚癌に関連する癌関連マーカータンパク質の少なくとも 1 個のエピトープに特異性を有する、請求項 2 1 または 2 2 の何れかに記載の試薬。

10

【請求項 2 4】

該自己抗体が、乳癌関連マーカータンパク質の少なくとも 1 個のエピトープに特異性を有する、請求項 2 3 に記載の試薬。

【請求項 2 5】

該マーカータンパク質が、癌関連形態の MUC 1、BRCA 1、BRCA 2、p53、c-myc、c-erb 2 または Ras タンパク質である、請求項 2 0 ないし 2 4 の何れかに記載の試薬。

【請求項 2 6】

該マーカータンパク質が、初期乳癌に関連する癌関連形態の MUC 1、BRCA 1、BRCA 2、p53、c-myc、c-erb 2 または Ras タンパク質である、請求項 2 4 に記載の試薬。

20

【請求項 2 7】

該マーカータンパク質が、進行乳癌に関連する癌関連形態の MUC 1、BRCA 1、BRCA 2、p53、c-myc、c-erb 2 または Ras タンパク質である、請求項 2 4 に記載の試薬。

【請求項 2 8】

該自己抗体が、初期乳癌患者から単離された単球から得られる、請求項 2 6 に記載の試薬。

【請求項 2 9】

該自己抗体が、進行乳癌患者から単離された単球から得られる、請求項 2 7 に記載の試薬。

30

【請求項 3 0】

哺乳動物の野生型タンパク質の修飾形態である癌関連マーカータンパク質の少なくとも 1 個のエピトープに対する自己抗体を産生し得る、固定化細胞群。

【請求項 3 1】

ヒト癌関連マーカータンパク質の少なくとも 1 個のエピトープに対する自己抗体を産生し得る、請求項 3 0 に記載の固定化細胞群。

【請求項 3 2】

該自己抗体が、リンパ腫、白血病、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、前立腺癌、子宮頸部癌、卵巣癌、子宮内膜癌または皮膚癌に関連する癌関連マーカータンパク質の少なくとも 1 個のエピトープに対するものである、請求項 3 1 に記載の固定化細胞群。

40

【請求項 3 3】

該自己抗体が、乳癌関連マーカータンパク質のエピトープに対するものである、請求項 3 2 に記載の固定化細胞群。

【請求項 3 4】

該自己抗体が、癌関連形態の MUC 1、BRCA 1、BRCA 2、p53、c-myc、c-erb 2 または Ras タンパク質に対するものである、請求項 3 1 から 3 3 の何れかに記載の固定化細胞群。

【請求項 3 5】

50

該自己抗体が、初期乳癌に関連する癌関連形態のMUC1、BRCA1、BRCA2、p53、c-myc、c-erbB2またはRasタンパク質に対するものである、請求項33に記載の固定化細胞群。

【請求項36】

該自己抗体が、進行乳癌に関連する癌関連形態のMUC1、BRCA1、BRCA2、p53、c-myc、c-erbB2またはRasタンパク質に対するものである、請求項33に記載の固定化細胞群。

【請求項37】

癌または他の新生物を有する患者または患者群から単離されたBリンパ球から得られる、請求項30から36の何れかに記載の固定化細胞群。

10

【請求項38】

該細胞群が、初期乳癌の患者または患者群から単離されたBリンパ球から得られる、請求項35に記載の固定化細胞群。

【請求項39】

該細胞群が、進行乳癌の患者または患者群から単離されたBリンパ球から得られる、請求項36に記載の固定化細胞群。

【請求項40】

(a)自己抗体としての同じ種由来の癌関連マーカータンパク質に対する哺乳動物自己抗体；および

(b)該自己抗体と該癌関連マーカータンパク質の間の複合体の形成を検出する手段：を含む、哺乳動物の体液に存在する野生型タンパク質の修飾形態である癌関連マーカータンパク質の検出用キット。

20

【請求項41】

該自己抗体がヒト自己抗体である、請求項40に記載のキット。

【請求項42】

該マーカータンパク質がリンパ腫、白血病、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、前立腺癌、子宮頸部癌、卵巣癌、子宮内膜癌または皮膚癌に関連する癌関連タンパク質である、請求項40または41に記載のキット。

【請求項43】

該マーカータンパク質が乳癌関連マーカータンパク質である、請求項42に記載のキット。

30

【請求項44】

該マーカータンパク質が癌関連形態のMUC1、BRCA1、BRCA2、p53、c-myc、c-erbB2またはRasタンパク質である、請求項40から43の何れかに記載のキット。

【請求項45】

該マーカータンパク質が初期乳癌に関連する癌関連形態のMUC1、BRCA1、BRCA2、p53、c-myc、c-erbB2またはRasタンパク質である、請求項44に記載のキット。

【請求項46】

該マーカータンパク質が進行乳癌に関連する癌関連形態のMUC1、BRCA1、BRCA2、p53、c-myc、c-erbB2またはRasタンパク質である、請求項44に記載のキット。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、哺乳動物の体液中で癌マーカータンパク質の存在を検出するための高感度かつ高特異的方法、該方法において使用する自己抗体類、これらの自己抗体類を得るための不死化細胞、および該方法を実施するためのキットに関する。これらの方法は、無症候性患者における発癌性または発癌前(pre-neoplastic)変化の早期検出、癌進展状況のモニター

50

、以前に抗 癌処置を受けたことのある患者の病状再発スクリーニング、患者の全身的処置の効力モニター、および個々の患者に最適の処置決定、に有用である。

【 0 0 0 2 】

(背景技術)

癌細胞および前新生物細胞は、癌関連マーカータンパク質を産生する特徴がある。これらは、しばしば野生型タンパク質の変形した形態を構成するが、それらは遺伝子変異または翻訳後のプロセッシングの変化の結果として癌細胞により産生されるものである。あるいは、癌マーカーは、通常、遺伝子増幅または異常転写規制の結果として、腫瘍細胞中で過剰発現したタンパク質でもあり得る。ある場合には、これら2種の現象は同時に生起し、病状進展中を通じて修飾タンパク質を集積し続ける。例えば、R a s、p 5 3、c - m y c、M U C - 1、c - e r b 2などの修飾形態が、各種の癌に関連するものとして見出されている。

10

【 0 0 0 3 】

癌関連タンパク質は、前癌細胞または癌細胞を保有する個体の組織および体液中の何れにおいても見出されている。それらのレベルは発癌過程の早期段階においては極めて低いが、病状が進展する間に増加する。これらのタンパク質の検出は、日常の検査において癌の診断に都合良く用いられているが、残念なことに、これらのアッセイには種々の制約がある。殊に、標準的な検査用に入手できる抗体商品は、通例、処置が最も効果的な病状のごく早期の段階、例えば無症候性患者で見られるような低レベルの癌関連タンパク質の検出には感度が不十分である。加えて、大部分の抗体商品は、癌関連マーカーの修飾形態には特異的でなく、これらのタンパク質の野生型形態と交叉反応する。そのため、これらの抗体商品は、通例、癌が進行した段階で起こる、癌マーカータンパク質の血清レベル中での実質的増加の検出においてのみ有用であるに過ぎなかった。

20

【 0 0 0 4 】

例えば、商品アッセイC A 1 5 - 3は、M U C 1の修飾および非修飾形態の両方を検出し、M U C 1の血清レベルの上昇がその特徴である、転移乳癌の診断には有用である。しかしながら、このアッセイは、新生物または初期(primary)乳癌のスクリーニングには、これらの段階においてはM U C 1の血清レベルが健常者におけるそれと有意に異ならないので、使用できない(Robertson et al. (1990), Eur. J. Cancer 26: 1127-1132)。他のマーカー、例えば、癌胎児抗原(C E A)およびマーカーC A 1 9 . 9は、転移乳癌および結腸直腸癌を有する患者の血清中で上昇するが、初期癌の患者ではそうならないと報告されている(Robertson et al. (1991), Cancer Immunol.Immunother. 133: 403-410; Thomas et al. (1991) Br. J. Cancer 63: 975-976)。これらの癌マーカーの場合、また、入手可能なアッセイ商品は、タンパク質の修飾形態と野生型形態とを区別できないため、使用上の制約がある。さらに、入手可能な抗体商品は、正常形態の癌関連タンパク質と交叉反応することにより、偽陽性結果を導くこともある。従って、この分野では、これらのアッセイに使用し、前癌性および早期の発癌性修飾を検出するための、より鋭敏でかつ特異的な抗体が必要とされている。

30

【 0 0 0 5 】

(発明の開示)

本明細書中で使用するとき、「癌関連マーカータンパク質」、「癌関連タンパク質」、「マーカータンパク質」または「癌マーカー」の各用語は、すべて、癌関連の野生型タンパク質の修飾形態を意味する。

40

【 0 0 0 6 】

癌マーカーは、しばしば、個体の免疫系により異種分子と認識され、自己免疫応答を誘発させるといように、対応する野生型タンパク質と相違する。この免疫応答は、体液性であり、癌マーカータンパク質に対する自己抗体を産生させ得る。自己抗体は、実際は当該個体由来の抗原であっても当該個体の免疫系が異種のもので認識する抗原に対して自然に生じる抗体である。例えば、p 5 3、M U C - 1、c - m y c、c - e r b 2およびR a sタンパク質などの修飾形態は、自己抗体の産生を誘発し得る。本明細書中で使用す

50

るとき、「自己抗体」の用語は、その抗体が、個体の循環系内に天然に生じる自己起源抗原に対する抗体であるか、または、天然に生じる抗体の特性を示しそれ故に当該自己起源抗原を認識するが、例えば不死化細胞により体外で産生させた抗体、であることを意味する。

【0007】

下記の実施例に記載するように、驚くべきことに本発明者は、癌患者がつくる自己抗体が、同じ患者または他の癌患者に由来する癌関連マーカーを特異的に認識し、これらのタンパク質の野生型と非常に低い交叉反応性を示すことを見出した。さらに、本発明者は、上記自己抗体は、通常の試験で現在用いられている抗体よりも大変高い感受性を有し、したがって少量の癌関連マーカータンパク質を検出することができることを見出した。癌患者がつくる自己抗体を用いると、従来と異なる信頼性の高い感度のよい試験法を設計して、個体における前新生物的变化または発癌性変化の検出を、その非常に初期の段階からなし得る。このアッセイはまた、ヒト以外の哺乳動物における癌または前段階の腫瘍を検出にも適用できる。それには、試験しようとする動物と同種の哺乳動物がつくる自己抗体、またはそれと同じ特性を有する自己抗体を使用する。

10

【0008】

本発明は、前新生物または癌を検出するための感度のよい特異的アッセイ系を提供する。これによって、癌関連マーカータンパク質の検出が癌の初期段階から可能となる。

【0009】

従って、第1態様において、本発明は、哺乳動物の体液中に存在する癌関連マーカータンパク質を検出する体外試験法を提供する。この方法は下記の段階を包含する。

20

【0010】

(a) 該哺乳動物の体液試料を該マーカータンパク質の少なくとも1個のエピトープに対する抗体と接触させること、および

【0011】

(b) 該抗体と該試料中の何れかのマーカータンパク質との間で形成された何れかの複合体の存在を検出すること。

【0012】

なお、該抗体は、該試料が得られた哺乳動物と同一種から誘導された該癌関連マーカータンパク質に対する哺乳動物自己抗体である。

30

【0013】

該複合体の存在は、該哺乳動物中の癌関連マーカータンパク質の存在についての指標である。

【0014】

本明細書の用語「誘導された」は、該種から単離された自己抗体(単数および複数)、または該種から単離された自己抗体(単数および複数)と同じ特性を有する自己抗体(単数および複数)を意味する。

【0015】

本発明の方法は、特定の癌関連マーカータンパク質に対する単一の自己抗体を用い得る。あるいは、多数の癌関連マーカータンパク質を認識する自己抗体のパネルを、特定の個体に存在する癌マーカーのプロファイルを得るために使用できる。この方法は、信頼性の高い診断法であり、各個体についての最も適切な処置の選択において有用な情報を提供する。

40

【0016】

本発明のアッセイ法は、検出しようとする癌の性質に応じて、患者の体液試料について行われる。体液としては、血漿、血清、全血、尿、糞、リンパ液、脳脊髄液、吸引乳などがある。このアッセイは、身体を傷つけないので、前新生物的または発癌性の変化を選別するために必要に応じて何回も繰り返すことができる。さらに、疾患の進展の追跡、疾患の再発の検査、処置効果の確認、各患者にとっての最も適切な処置の選択のために繰り返して行うことができる。

50

【 0 0 1 7 】

本発明方法は、免疫化学の分野の当業者によく知られた免疫学的技術を用いて行い得る。例えば、E L I S Aや放射免疫検定法などの方法を用い得る。一般的に、適当な自己抗体を固体表面に固定し、試験する試料を自己抗体に接触するようにする。自己抗体により認識される癌マーカータンパク質が試料中に存在すると、自己抗体 - マーカー複合体が形成する。次いで複合体を、例えば、マーカータンパク質のエピトープを特異的に認識する標識2次抗体に配向させるか、それを用いて定量測定を行う。2次抗体は、例えば、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ(H R P)やアルカリホスファターゼ(A P)などの生化学的マーカーで標識できる。そして、複合体の検出は、比色産物、化学ルミネッセンス産物あるいは蛍光産物をつくる酵素の基質を加えて完了できる。あるいは、複合体の存在は、検出可能標識、例えば、適当な酵素で標識されたマーカータンパク質を加えて測定できる。この場合、測定された酵素活性の量は、形成した複合体の量に逆比例し、試料中の抗原の存在を測定するために参照として負のコントロールを必要とする。複合体を検出する別の方法では、放射性同位元素で標識された抗体または抗原を使用し、放射活性を測定する。

10

【 0 0 1 8 】

本発明の方法を、サンプル中における癌マーカータンパク質の存在または非存在を測定する定性形式、またはさらに加えて、サンプル中に存在する癌マーカータンパク質の量の測定値を得ることができる定量形式で実施することができる。サンプル中に存在するマーカータンパク質の量を、上記の何れの技術を利用して測定してもよい。この場合は、アッセイを行なう前に、このアッセイで使用されるものと同じ検出反応を使用して、既知濃度の癌マーカータンパク質を含む一連の標準サンプルから、得られたシグナルの測定による標準曲線を描く必要がある。サンプル中に存在するスクリーンされる癌マーカーの量を、こうして、標準曲線に補間する。

20

【 0 0 1 9 】

サンプル中、たくさんの癌マーカータンパク質の存在を検証することが必要である場合は、本発明のアッセイを、マルチウェルアッセイプレート中で、利用される異なる自己抗体それぞれを異なるウェル中に入れて行なってもよい。

【 0 0 2 0 】

本発明の方法を、様々な臨床的状況、例えば、癌の進展に対する個々の疾病素質の評価、無症候性患者における前新生物のまたは発癌性修飾の検出、初期または2次癌の診断、患者における疾患の進行のモニタリング、以前に癌細胞を保有すると診断され、そしてこれらの細胞の数を減少させる治療を経験している患者における発癌性修飾の再発のスクリーニング、または癌を罹患する患者に対するより適切な抗癌処置の選択など、で使用することができる。本発明の方法は、上記記載の、同じ臨床状況における獣医学での使用にも適切である。

30

【 0 0 2 1 】

本発明のアッセイ方法を使用して、多様な癌、例えばリンパ腫、白血病、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、前立腺癌、子宮頸部癌、卵巣癌、子宮内膜癌、および皮膚癌など、に関連する癌マーカータンパク質を検出してもよい。

40

本発明の方法は、特に、初期乳癌(P B C)および進行乳癌(A B C)の検出およびモニターに適している。

【 0 0 2 2 】

本発明の第2の態様では、自己抗体およびアッセイで使用される該自己抗体を含む薬剤を提供し、これは哺乳動物の癌関連マーカータンパク質の少なくとも1つのエピトープを本質的に認識する。このような自己抗体を、該哺乳動物(好ましくはヒト)の血液または末梢血単球から単離してもよい。あるいは、この自己抗体を不死化されたBリンパ球から調製し、そして哺乳動物自身に起因する抗原を検出することができる。本発明の態様による自己抗体を含む薬剤は、特に、体液中の、哺乳動物の癌関連マーカータンパク質の検出での使用に適切である。アッセイの使用に好ましい自己抗体として、糖タンパク質M U C

50

1 (Batra, SK. et al. (1992) Int J. Pancreatol. 12: 271-283)、シグナル伝達 / 細胞周期調節タンパク質 c - m y c (Blackwood, E. M. et al. (1994) Molecular Biology of the Cell 5: 597-609)、p 5 3 (Matlashewski, G. et al. (1984) EMBO J. 3: 3257-3262)、c - e r b 2 (Dsouza, B. et al. (1993) Oncogene 8: 1797-1806)および R a s (Gnudi, L. et al. (1997) Mol. Endocrinol. 11: 67-76)の癌関連形態に対するものが含まれる。しかしながら、その他の癌関連マーカータンパク質に対する自己抗体をアッセイで使用してもよい。乳癌の検出に特に好ましいものは、初期乳癌に関連する、修飾された M U C 1、B R C A 1、B R C A 2、p 5 3、c - m y c、c - e r b 2、または R a sタンパク質に対する自己抗体、および進行乳癌に関連する、修飾された M U C 1、B R C A 1、B R C A 2、p 5 3、c - m y c、c e r b 2、または R a sタンパク質に対する自己抗体である。これらの自己抗体は、好ましくは癌マーカータンパク質が関連するものと同型の癌と診断された患者から得たものである。

10

【 0 0 2 3 】

本発明は、上記の自己抗体を調製することができる不死化した細胞群も提供する。

本発明の細胞群を、当業者に知られている何れの方法で調製してもよい。以下の実施例 1 に詳述するように、癌と診断された患者の B 細胞を、例えば、エプスタイン・バーウイルスを用いて不死化してもよい。E L I S A または何れと同様の技術を実施して、固体担体上で固定化された、癌に冒された患者から得られるマーカータンパク質を利用して、自己抗体の産生をスクリーンしてもよい。

【 0 0 2 4 】

20

本発明は、さらに、哺乳動物の生物学的体液中の 1 またはそれ以上の癌関連マーカータンパク質の検出用キットを提供する。このようなキットは、少なくとも、癌関連マーカータンパク質の 1 またはそれ以上のエピトープに対する哺乳動物の自己抗体、および自己抗体と癌関連マーカータンパク質との複合体形成の検出手段を含む。好ましくは、自己抗体は固体表面で固定化される。

【 0 0 2 5 】

本発明は、後記の実施例および添付図面の記載によってさらに理解される：

図 1 は、乳癌を有すると診断された 6 人の患者 (1 ないし 4、初期乳癌を有する、7 および 1 1、進行乳癌を有する) に由来する B 細胞によって産生された自己抗体の応答性を試験するための E L I S A 検定の結果を示す。自己抗体の各群について、B 細胞を取得した同じ患者から、他の患者からまたは通常の被験者から精製された M U C 1 タンパク質を、固定化された抗原として使用した。平行検定において、マウスモノクローナル B 5 5 抗 M U C 1 抗体の応答性が、比較コントロールとして含まれる。P B S または 4 人の健康な被験者 (N 1 0、N 1 2、N 1 3 および N 1 4) に由来する B リンパ球によって産生された抗体を、ネガティブコントロールとして使用する。0.25 M のグリシン p H 2.5 を使用して、M U C 1 をイムノアフィニティーカラムから抽出した。

30

【 0 0 2 6 】

図 2 は、初期乳癌を有すると診断された患者に由来する B 細胞から取得した自己抗体の応答性を、様々な起源の M U C 1 タンパク質で評価する E L I S A 検定の結果を示す。B 5 5 の応答性は、比較コントロールとして含まれる。P B S をネガティブコントロールとして使用する。

40

【 0 0 2 7 】

図 3 は、初期乳癌を有すると診断された患者に由来する B 細胞によって産生された自己抗体の、(a) 進行乳癌を有する患者の血清からまたは (b) 正常の個体の尿から単離された M U C 1 タンパク質に対する結合を測定する、表面プラスモン共鳴実験の結果を示す。

【 0 0 2 8 】

図 4 は、進行乳癌を有する患者の血清からの、イムノアフィニティー精製 M U C 1 抗体に対して使用されたペプチドの配列を示す。

【 0 0 2 9 】

図 5 は、(2) 初期乳癌または (3) 進行乳癌を有する患者からの固定化された自己抗体を使

50

用して、進行乳癌を有すると診断された患者の血清からまたは健康な個体の尿から精製されたMUC1タンパク質を検出するELISA検定の結果を示す。抗MUC1のC595抗体(1)を利用する平行の結果は、比較例として含まれる。

【0030】

図6は、初期乳癌を有する患者のB細胞からの固定化された自己抗体を利用して、健康な個体からまたは初期もしくは進行乳癌を有すると診断された患者からの血清試料におけるMUCタンパク質を検出するELISA検定の結果を示す。平行検定においてC595抗体で取得された結果は、比較例に含まれる。

【0031】

図7は、初期乳癌を有する患者のB細胞からの固定化された自己抗体を使用して、疾患の進行全期にわたって、進行乳癌を有する患者からの逐次血清試料におけるMUC1タンパク質を検出するELISA検定の結果を示す。平行検定においてモノクローナルC595抗体でまたは商業的CA15-3検定で取得された結果は、比較例として含まれる。

【0032】

図8は、乳癌患者からの血清の応答性をABC MUC1および尿のMUC1で定量するいくつかの結果を示す。

【0033】

実施例1：単核細胞の不死化

製造業者の指示に詳しく記載されている通り、リンパ球分離媒体(ICNフロー)を使用して、末梢血単核細胞を患者または健康な個体由来のヘパリン処置した血液試料4mlから精製した。単離した単核細胞をPBSで洗浄して、B95-8マームセットの形質転換した白血球のEBV産生セルライン由来のエプスタイン・バーウイルス(EBV)の半精製した調製物1mlに再び懸濁させた。次いで、5%CO₂中、その細胞を37℃で1時間インキュベートして、17000rpmで遠心分離した。EBV上清を除去して、その単核細胞をRPMI媒体で3回洗浄し、10%ウシ胎児血清および5μg/mlフィトヘムアグルチニン(PHA-P)を補ったRPMI媒体に再び懸濁させて、マルチウェル組織培養プレートに播種した。その媒体を3日毎に交換して、自己抗体源として使用した。

【0034】

実施例2：自己抗体と様々な源由来のMUC1抗原との反応性の評価

方法：

1) MUC1抗原の免疫親和性精製

次のプロトコルに従って、初期乳癌もしくは進行乳癌と診断された患者の血清から、または健康な被験者の尿から、MUC1を精製した。

【0035】

マウスのモノクローナルB55抗体(Ellisら(1984)Histopathology 8:501-516により、そして国際特許出願番号WO89/01153に記載されている通り、NCRC 11としても知られている)をCNBrセファロースビーズにコンジュゲートさせた。血清または尿試料をPBSで1/10に希釈して、抗体をコンジュゲートさせたセファロースビーズと共に回転させながら4℃で一晩インキュベートした。そのビーズを遠心分離して、上清を除去した。そのビーズへ非特異的に結合した分子を全て除去するために、これらをPBSで5回または洗浄用緩衝液が280nmで吸光度を示さなくなるまで洗浄した。そのビーズをPBSに再び懸濁させ、10分間回転させ、遠心分離して、上清を除去することにより、各々の洗浄を行った。洗浄したビーズを0.25Mグリシン(pH2.5)に再び懸濁させ、室温で10分間回転させて、遠心分離した。上清を除去し、TRISの添加によりpH7に調節して、標識した「グリシン画分」を4℃で保存した。次いで、そのビーズを25mMジエチルアミン(DEA)(pH11)に再び懸濁させ、室温で10分間回転させて、遠心分離した。上清を再び除去し、TRISの添加によりpH7に調節して、標識した「25DEA画分」を4℃で保存した。最後に、そのビーズを100mMDEA(pH11)に再び懸濁させ、室温で10分間回転させて、遠心分離した。上清を除去し、TRISの添加によりpH7に調節して、標識した「100DEA画分」を4℃で保存した。

10

20

30

40

50

モノクローナル抗体 B 5 5 または C 5 9 5 (Cancer Research Campaign から入手可能な、N C R C としても知られている) を使用して、3 つの画分における M U C 1 の存在を E L I S A により確認した。混入している免疫グロブリンを除去するために、画分を D T T (5 0 m M まで) と共に 3 0 分間インキュベートし、次いで、ヨードアセトアミド (7 5 m M まで) と共にインキュベートした後、S 3 0 0 カラムでゲル濾過にかけた。画分を E L I S A により M U C 1 含量に関してアッセイした。先のバッチと同等の吸光度が得られるよう、M U C 1 を含む画分を 力価測定 した。

【 0 0 3 6 】

2) E L I S A アッセイ

上記のようにして得た、様々な M U C 1 調製物を P B S で適当に希釈し、9 6 ウェルのマイクロタイターアッセイプレートに 1 ウェルあたり 5 0 μ l で入れ、一晩放置して乾燥させた。次いで、そのプレートを P B S / Tween で 1 回洗浄して、残留する塩の結晶を除去し、P B S 中の 2 % (w / v) ポリビニルピロリドン (P V P) の新たな溶液で 6 0 分間ブロックして、P B S / Tween で 3 回洗浄した。初期または二次乳癌と診断された患者から得られた、不死化したリンパ球の培養液上清を 1 ウェルあたり 5 0 μ l で 3 回に分けて入れた。比較コントロールとして、マウスのモノクローナル抗 M U C 1 抗体 B 5 5 も 3 回に分けて入れた。そのプレートを振盪しながら室温で 6 0 分間インキュベートして、P N S / Tween で 4 回洗浄した。H R P をコンジュゲートした抗ヒトまたは抗マウスの二次抗体 (D a k o から得られる) 5 0 μ l を製造業者により推奨される希釈で各々のウェルに加えて、振盪しながら室温で 6 0 分間インキュベートした。次いで、そのプレートを再び P B S / Tween で 4 回洗浄した。テトラメチルベンジジン (T M B) 5 0 μ l を各々のウェルに加えて、そのアッセイプレートの各々のウェルに関する 6 5 0 n m での光学密度 (O D) を 1 0 分間にわたり動態学的に読取った。

【 0 0 3 7 】

結果

図 1 は、該抗体を採取した同じ患者から、もしくは別の患者もしくは健康な対象から、精製した M U C 1 抗体を用いて、乳癌と診断された 6 人の患者 (初期乳癌に対して 1 ~ 4 、進行乳癌に対して 7 および 1 1) から得たリンパ球によって産生された自己抗体の反応性を評価するための E L S I A アッセイの結果を示す。この実験で使用した健康な対象は、臨床的におよび / もしくはマモグラフィ法の乳癌の形跡を示さない女性であった。モノクローナル抗 M U C - 1 B 5 5 抗体の反応性を、比較コントロールとして測定した。4 人の健康な対象 (N 1 0 から N 1 4) から得たリンパ球によって産生された抗体を、負のコントロールとして使用した。

【 0 0 3 8 】

得られた結果によると、乳癌患者から得た B リンパ球は、同一もしくは異なる患者の双方から単離された M U C 1 タンパク質を認識し得る自己抗体を産生することが示される。さらに、これらの自己抗体は、高い特異性によって癌患者に存在する M U C 1 と結合し、健康な個人から単離された M U C 1 との反応性をほぼ完全に示さない。これらの結果は再現性が高く、異なる自己抗体は、異なった供給源から精製された M U C 1 タンパク質と非常に似た反応性プロファイルを示す。また、さらに、得られた該結果は、癌関連 M U C 1 に対する自己抗体の感受性が、モノクローナル B 5 5 抗体で観察された感受性以上に強いことを示す。さらに、正常患者のリンパ球によって産生された抗体は、このプロファイルを示さなかった。

【 0 0 3 9 】

図 2 は、B 5 5 の反応性と比較した異なる供給源からの M U C 1 タンパク質を有する初期乳癌患者から誘導された不死化 B リンパ球によって分泌された自己抗体の反応性を示す。異なる自己抗体の反応性プロファイルもまた、再現性が高い。自己抗体は、癌患者の血漿に存在する M U C 1 に関して高い特異性を示し、健康な個人から、もしくは乳癌細胞系 Z R 7 5 - 1 から単離された M U C 1 に対する親和性を殆ど示さない。さらに、初期乳癌もしくは進行乳癌どちらにも関連する M U C 1 タンパク質に対する自己抗体親和性は、B

55 に関して測定した親和性以上に高い。

【0040】

実施例3：表面プラスモン共鳴による自己抗体の親和性測定
方法

表面プラスモン共鳴は、lasys Biosensor Plus (Affinity Sensor由来)で行なった。進行乳癌患者および正常な個人からのMUC1タンパク質を、使用説明書にしたがってアミノシラン被覆細胞に付着させ、該細胞を1%(w/v)ポリビニルピロリドン(PVP)によってブロックした。1%PVPによってのみ被覆されたコントロール細胞も作った。初期乳癌患者のB細胞から得た異なる希釈率の培養上清の結合を、以下の実験条件を用いて測定した：

サンプリング間隔：	0.3 msec
攪拌速度：	70 rpm
温度：	24
結合時間：	3分
PBSによる分離：	2分
20mM HClによる再生：	3分
PBSによる再平衡：	5分

【0041】

結果

図3は、初期乳癌患者から得たBリンパ球により生じた自己抗体が、他の癌患者から単離されたMUC1に対し、健常者から単離したMUC1よりもより高い親和性で結合することを示す。

【0042】

実施例4：自己抗体を使用するELISAアッセイにおけるMUC1抗原の検出方法：

1)血清由来の抗-MUC1自己抗体の精製

図4に示した配列を伴う、MUC1ペプチドTAP2をCNBr-セファロースビーズに結合させた。進行乳癌と診断された患者からプールの血清をPBSで1/10に希釈し、ローリングしながら一晩4で結合セファロースビーズでインキュベーションした(ビーズ1mlに対し血清25mlの割合)。遠心分離後、上清を除きビーズを5回PBSで、または280nm吸収がゼロになるまで洗浄した。各洗浄は、PBS中にビーズを再懸濁し、10分間ローリングし、遠心分離し、そして上清を除くことにより行った。当該ビーズをPBS中の3Mチオシアン酸ナトリウム1ml中に再懸濁し、10分間室温でローリングし、遠心分離した。当該上清を取り出し、4のPBSで透析した。次いで、抗-MUC1成分を、配列APDTRTPAPGを有しBSAと複合化したMUC1ペプチドおよび進行乳癌患者から単離したMUC1の両方を固定化抗原として用いるELISAにより確認した。

【0043】

2)抗-MUC1自己抗体のビオチン化

上記のように得られた自己抗体を、遠心分離フィルターを用い100μlの体積にまで濃縮し、次いで、0.1四ホウ酸ナトリウム緩衝液pH8.8で体積1mlに希釈した。N-ヒドロキシスクシンイミドビオチン20μgを添加し、自己抗体/ビオチン溶液をローリングしながら室温で4時間インキュベーションした。当該反応は、1M NH₄Cl 10μlを加えることにより停止し、10分間インキュベーションした。次いで当該自己抗体を6時間30分間4でPBSで透析し、非結合ビオチンを除去した。自己抗体溶液のアリコート凍結し、使用するまで暗室で-20で保存した。

【0044】

3)ELISAアッセイ

初期乳癌または進行乳癌の患者から得られたリンパ球またはモノクローナル抗-MUC1 C595抗体の培養上清を96ウェルマイクロタイターアッセイプレートにウェルあたり50μlでプレートし、4で一晩インキュベーションした。次いで、当該プレートを

10

20

30

40

50

PBS/Tweenで4回洗浄し、PBS中の2%(w/v)ポリビニルピロリドン(PVP)の新しい溶液で60分間ブロッキングし、PBS/Tweenで2回洗浄した。種々の源からのMUC1をウェルあたり50 μ l加えた。室温で60分間のインキュベーション後、当該プレートを再びPBS/Tweenで4回洗浄した。適当なビオチン化二次抗体50 μ l、上記のように調製した、C595または進行乳癌患者由来の血清のプールから精製した自己抗体を各ウェルに添加し、室温で60分間インキュベーションした。PBS/Tweenで4回洗浄後、ストレプトアビジン-HRP50 μ lを各ウェルに加え、室温で60分間インキュベーションした。当該プレートを再び4回洗浄し、TMB50 μ lを各ウェルに加え、アッセイプレートの各ウェルについて650nmで光学濃度(OD)を10分間にわたり動力学的に読み取った。

10

【0045】

結果

図5は、モノクローナル抗-MUC1 C595抗体によるパラレルアッセイにおいて得られたものと比較する、初期乳癌または進行乳癌患者から得たBリンパ球により生じた自己抗体を固定化抗体として使用するELISAアッセイの結果を示す。当該データは、乳癌患者由来の自己抗体が癌に関連するMUC1タンパク質の修飾形態を特異的に検出するELISAアッセイに使用され得ることを示唆する。これらのアッセイは、より感受性が高く、モノクローナル抗体C595を使用するものより高い特異性を示す。

【0046】

実施例5：患者の血清試料におけるMUC1タンパク質を検出するためのアッセイの使用

20

ELISAアッセイを、実施例4に記載のように、健康個体または、初期または進行乳癌の患者からの血清試料で、固定化抗体として、初期乳癌の患者由来のBリンパ球から作った自己抗体を使用して行った。モノクローナル抗-MUC1抗体C595を使用したパラレルアッセイを、同じ試料で行った。図6に示す結果は、自己抗体を使用したアッセイが、乳癌の患者の血中に循環しているMUC1で高感受性で検出できることを示す。加えて、モノクローナル抗体C595の使用とは反対に、このアッセイはMUC1の癌関連形に非常に高い特異性を有する。

【0047】

実施例6：疾患の進行をモニターするためのアッセイの使用。

30

ELISAアッセイを、実施例4のように、疾患の進行を通して、転移癌と診断された患者由来の連続血清試料において、固定化抗体として初期乳癌の患者由来のBリンパ球から作った自己抗体、またはモノクローナル抗-MUC1 C595を使用して行った。市販のアッセイCA15-3も同じ試料で行った。図7は、自己抗体を用いるアッセイが患者における癌の進行の追跡に使用できることを示し、アッセイで検出されたMUC1の増加したレベルが、疾患の悪化を示す。データは、自己抗体の使用が、C959抗体またはCA15-3アッセイのいずれかで得られるよりも疾患の発症をより良く表す結果を導くことも証明する。

【0048】

実施例7：尿またはABC MUC1への抗-MUC1自己抗体の特異性の比較方法：

40

ABC MUC1(進行乳癌と診断された患者の血清から単離したMUC1)および尿MUC1の調製物は、実施例2に記載のように調製した。

【0049】

一定量のABCおよび尿MUC1調製物をマイクロタイタープレートウェル上に、別々に等量のNCR C-11結合となる濃度で乾燥させた。2%PVPでブロック後、乳癌の患者から採取し、PC Sで1/100に希釈した血漿試料をウェルに添加し、血漿中の抗-MUC1抗体を結合させた。洗浄後、結合抗体を抗-ヒトIgM-HRPおよび抗-ヒトIgG-HRP接合体とプローブさせた。

【0050】

結果

50

図8は、乳癌患者由来の血清のABCと尿MUC1との多数の反応性の測定の結果を示す。大多数の患者由来の血漿は、尿MUC1と比較して、ABC MUC1に大きな特異性を明らかに示す。

【図面の簡単な説明】

【図1】 乳癌を有すると診断された6人の患者(1ないし4、初期乳癌を有する、7および11、進行乳癌を有する)に由来するB細胞によって産生された自己抗体の応答性を試験するためのELISA検定の結果を示す。自己抗体の各群について、B細胞を取得した同じ患者から、他の患者からまたは通常の被験者から精製されたMUC1タンパク質を、固定化された抗原として使用した。平行検定において、マウスモノクローナルB55抗MUC1抗体の応答性が、比較コントロールとして含まれる。PBSまたは4人の健康な被験者(N10、N12、N13およびN14)に由来するBリンパ球によって産生された抗体を、ネガティブコントロールとして使用する。0.25MのグリシンpH2.5を使用して、MUC1をイムノアフィニティーカラムから抽出した。

10

【図2】 初期乳癌を有すると診断された患者に由来するB細胞から取得した自己抗体の応答性を、様々な起源のMUC1タンパク質で評価するELISA検定の結果を示す。B55の応答性は、比較コントロールとして含まれる。PBSをネガティブコントロールとして使用する。

【図3】 初期乳癌を有すると診断された患者に由来するB細胞によって産生された自己抗体の、(a)進行乳癌を有する患者の血清からまたは(b)正常の個体の尿から単離されたMUC1タンパク質に対する結合を測定する、表面プラスモン共鳴実験の結果を示す。

20

【図4】 進行乳癌を有する患者の血清からの、イムノアフィニティー精製MUC1抗体に対して使用されたペプチドの配列を示す。

【図5】 (2)初期乳癌または(3)進行乳癌を有する患者からの固定化された自己抗体を使用して、進行乳癌を有すると診断された患者の血清からまたは健康な個体の尿から精製されたMUC1タンパク質を検出するELISA検定の結果を示す。抗MUC1のC595抗体(1)を利用する平行の結果は、比較例として含まれる。

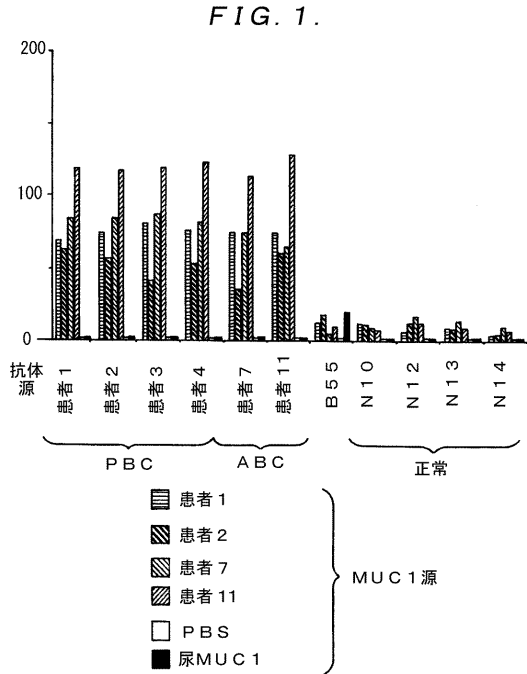
【図6】 初期乳癌を有する患者のB細胞からの固定化された自己抗体を利用して、健康な個体からまたは初期もしくは進行乳癌を有すると診断された患者からの血清試料におけるMUCタンパク質を検出するELISA検定の結果を示す。平行検定においてC595抗体で取得された結果は、比較例に含まれる。

30

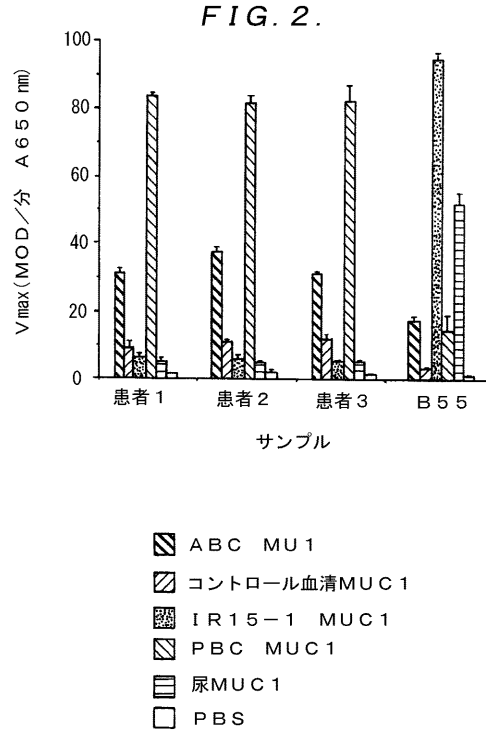
【図7】 初期乳癌を有する患者のB細胞からの固定化された自己抗体を使用して、疾患の進行全期にわたって、進行乳癌を有する患者からの逐次血清試料におけるMUC1タンパク質を検出するELISA検定の結果を示す。平行検定においてモノクローナルC595抗体でまたは商業的CA15-3検定で取得された結果は、比較例として含まれる。

【図8】 乳癌患者からの血清の応答性をABC MUC1および尿のMUC1で定量するいくつかの結果を示す。

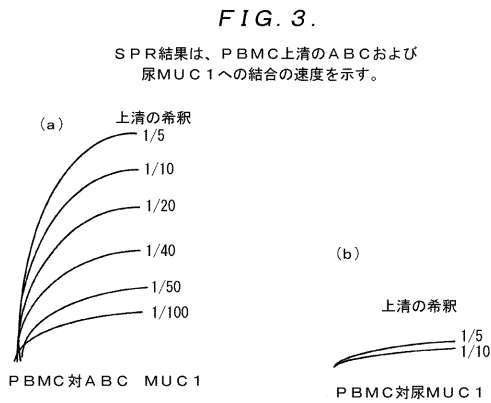
【 図 1 】



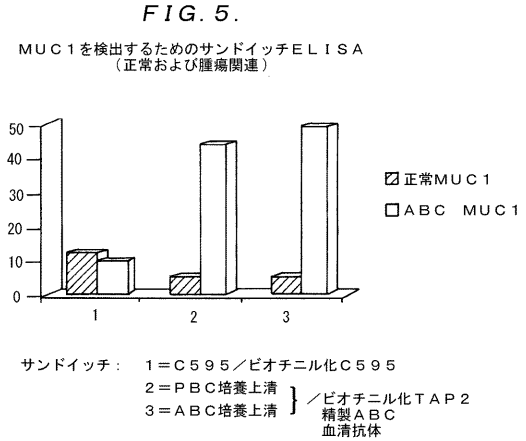
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 5 】



【 図 4 】

FIG. 4.

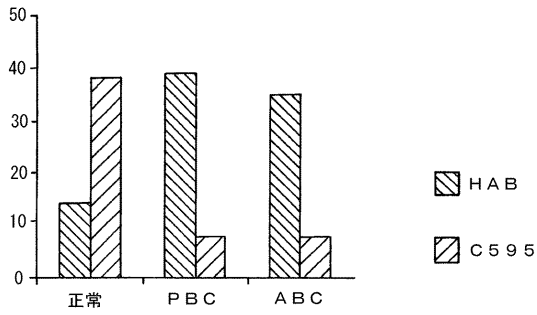
TAPPAHGVT*SAPDTRPAPGST*APPA

T*は、N-アセチル-ガラクトサミン-α-グリコシル化

【 図 6 】

FIG. 6.

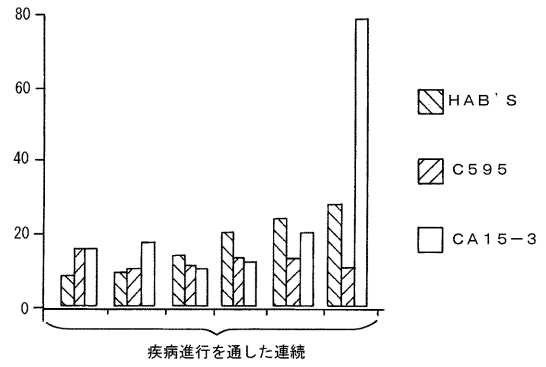
正常および癌試料で行った
サンドイッチELISA



【 図 7 】

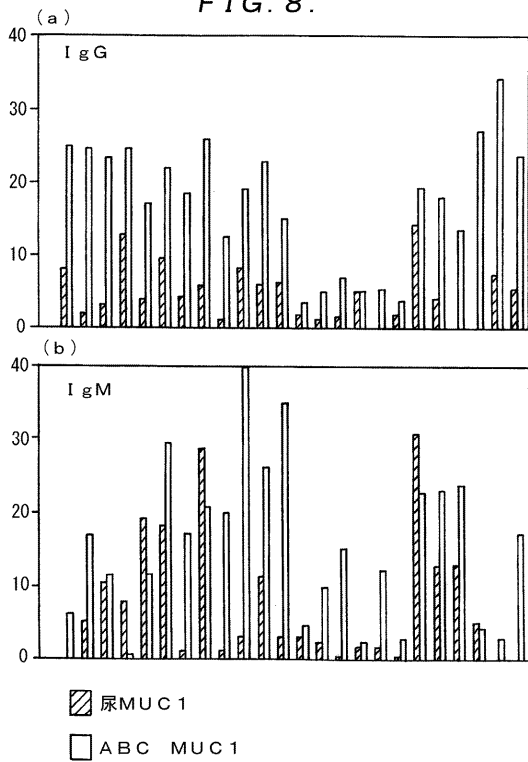
FIG. 7.

転移乳癌の患者由来の連続試料で行ったサンドイッチELISA。



【 図 8 】

FIG. 8.



フロントページの続き

- (72)発明者 ジョン・ラッセル・ロバートソン
イギリス、エヌジー 9・6 エイエフ、ノッティンガム、アッテンバラ、バラット・レイン 16 番
- (72)発明者 キャサリン・ロザモンド・ルイズ・グレイブズ
イギリス、エヌジー 7・3 アールディー、ノッティンガム、キヌールトン、リンディ・クロース 6 番
- (72)発明者 マイケル・ローリング・プライス
イギリス、ノッティンガム、ダービー・ロード 3 5 1 番

審査官 山村 祥子

- (56)参考文献 PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 1987年, 28, 358
E.PETRAKOU, INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, 米国, 1997年, V11 N SUPPL., P902, 0
N ADVANCES IN ONCOLOGY ATHENS
European Journal of Cancer, 1996年, Vol.32A, No.8, p.1325-1331
European Journal of Cancer, 1996年, Vol.32A, No.12, p.2155-2163

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

G01N 33/574
C07K 14/47
C12N 5/00