

(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2016-505137

(P2016-505137A)

(43) 公表日 平成28年2月18日 (2016.2.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	4 H O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
CO 7 K 16/26 (2006.01)	CO 7 K 16/26 Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2015-551195 (P2015-551195)	(71) 出願人	514122524
(86) (22) 出願日	平成26年1月7日 (2014.1.7)		シュピーンゴテック ゲゼルシャフト ミ
(85) 翻訳文提出日	平成27年9月7日 (2015.9.7)		ット ベシュレンクテル ハフツング
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/050144		ドイツ連邦共和国, 1 6 7 6 1 ヘニッヒ
(87) 国際公開番号	W02014/108397		スドルフ, ノイエンドルフシュトラッセ
(87) 国際公開日	平成26年7月17日 (2014.7.17)		1 5 アー
(31) 優先権主張番号	13150564.6	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	平成25年1月8日 (2013.1.8)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 対象における癌となる危険性を予測し又は癌と診断する方法

(57) 【要約】

本発明の主題は、癌を被っていない対象において癌となる危険性を予測し又はあるいは対象において癌であると診断するための方法であって、 - 該対象から得られた体液中の、サブスタンス P 及びニューロキニンを含む、プロ - タキキニン、そのスプライス改変体又はその少なくとも 5 つのアミノ酸の断片のレベルを決定し；及び - プロ - タキキニン、そのスプライス改変体又はその断片の該レベルを癌となる危険性と関連させることを含み、ここで、レベルの減少は、癌となる危険性の増大を予測し又はあるいは癌であると診断し、レベルの減少は癌の診断と関連する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

癌を被っていない対象において癌となる危険性を予測する方法であって、下記：

- 該対象から得られた体液中のプロ - タキキニン、そのスプライス改変体又はその少なくとも 5 つのアミノ酸の断片のレベルを決定し；及び

- 該プロ - タキキニン、そのスプライス改変体又はその断片のレベルと癌となる危険性を相関させる

ことを含み、ここで、レベルの減少は、癌となる危険性の増大を予測する上記方法。

【請求項 2】

以下の工程：

10

- 前記対象から得られた体液中のプロ - ニューロテンシン又はその少なくとも 5 つのアミノ酸の断片のレベルを決定し；及び

- 追加的に、プロ - ニューロテンシン又はその少なくとも 5 つのアミノ酸の断片と癌となる危険性を相関させる

ことを含み、ここで、プロ - ニューロテンシン又はその断片のレベルの増加は、癌となる危険性の増大を予測する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

以下の工程：

- 前記対象から得られた体液中のプロ - エンケファリン又はその少なくとも 5 つのアミノ酸の断片のレベルを決定し；及び

20

- 追加的に、プロ - エンケファリン又はその少なくとも 5 つのアミノ酸の断片と癌となる危険性を相関させる

ことをさらに含み、ここで、プロ - エンケファリン又はその断片のレベルの減少は、癌となる危険性の増大を予測する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

以下の工程：

- 前記対象から得られた体液中のインスリンのレベルを決定し；及び

- 追加的に、インスリンと癌となる危険性を相関させる

ことをさらに含み、ここで、インスリンのレベルの減少は、癌となる危険性の増大を予測する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 5】

追加的に相関させることが、個々のバイオマーカーによって得られた癌発症についての相対的な危険因子を考慮することによって、決定されたバイオマーカーレベルの組み合わせた分析を意味する、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

プロ - タキキニン、そのスプライス改変体又はその断片のレベルの減少は、閾値を下回るレベルであり、閾値は、約 100 pmol / L 以下、好ましくは約 80 pmol / L 以下、好ましくは約 60 pmol / L 以下、好ましくは約 50 pmol / L 以下、好ましくは約 45 . 6 pmol / L 以下、好ましくは約 40 pmol / L である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 7】

プロ - ニューロテンシン又はその断片のレベルの増加は、閾値を上回るレベルであり、閾値は、約 78 pmol / L 以上、好ましくは 100 pmol / L 以上、より好ましくは約 150 pmol / L である、請求項 2 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

プロ - エンケファリン又はその断片のレベルの減少は、閾値を下回るレベルであり、閾値は、約 100 pmol / L 以下、好ましくは 75 pmol / L 以下、好ましくは約 50 pmol / L 以下、好ましくは約 40 . 4 pmol / L である、請求項 3 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

50

インスリンのレベルの減少は、閾値を下回るレベルであり、閾値は約 70 pmol/L である、請求項 4 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記対象が女性である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記癌が乳癌である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記癌が肺癌である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

体液試料が該対象から採取された時点で、該対象が癌の診断歴がない、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 14】

体液試料が該対象から採取された時点で、該対象が、癌の診断歴を有し、治療されていて、癌となる再発の危険性が決定され又はあるいは乳癌の再発が決定される、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

体液試料が該対象から採取された時点で、該対象が、心臓血管疾患又は糖尿病を有すると診断されている、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

： 年齢、真性糖尿病の存在、現在の喫煙を含む群から選択される追加的に少なくとも 1 つの臨床パラメータが決定される、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 17】

プロ - タキキニン、そのスプライス改変体若しくはその断片、及びプロ - ニューロテンシン若しくはその断片、及び / 又はプロ - エンケファリン若しくはその断片、及び / 又はインスリンのレベルがイムノアッセイによって測定される、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

対象において癌となる危険性をモニターするために、又は治療経過をモニターするために、1 回を超えて該方法が行われる、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

採用された予防的及び / 又は治療的測定に対する該対象の応答を評価するために、該モニターリングが行われる、請求項 18 に記載の方法。

30

【請求項 20】

該対象を危険群に分類するための、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

体液が、血液又は血漿又は血清である、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

プロ - タキキニン 1 - 37 (配列番号 2) であるプロ - タキキニンの領域内の 2 つの異なる領域に結合する 2 つの結合剤を含む試料において、プロ - タキキニン、そのスプライス改変体又はその少なくとも 5 つのアミノ酸の断片を決定するためのアッセイ。

40

【請求項 23】

前記アッセイが、追加的に、プロ - ニューロテンシン 1 - 117 (配列番号 18) であるプロ - ニューロテンシンの領域内の 2 つの異なる領域に結合する 2 つの結合剤をさらに含む試料において、プロ - ニューロテンシン又はその少なくとも 5 つのアミノ酸の断片を決定するためのものである、請求項 22 に記載のプロ - タキキニン、そのスプライス改変体又はその少なくとも 5 つのアミノ酸の断片を決定するためのアッセイ。

【請求項 24】

前記アッセイが、それぞれの領域が少なくとも 4 又は 5 つのアミノ酸を含む、アミノ酸 133 - 140 (L K E L L E T G、配列番号 20) とアミノ酸 152 - 159 (S D N E E E V S、配列番号 23) である、プロ - エンケファリンの領域内の 2 つの異なる領域

50

に結合する２つの結合剤を含む試料において、プロ・エンケファリンとプロ・エンケファリン断片を追加的に決定するためのものである、請求項２２又は２３に記載のプロ・タキキニン、そのスプライス改変体又はその少なくとも５つのアミノ酸の断片を決定するためのアッセイ。

【請求項２５】

前記アッセイが、インスリンの２つの異なる領域に結合する２つの結合剤を含む試料においてインスリンを追加的に決定するためのものである、請求項２２～２４のいずれか１項に記載のプロ・タキキニン、そのスプライス改変体又はその少なくとも５つのアミノ酸の断片を決定するためのアッセイ。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【０００１】

本発明の主題は、癌を被っていない対象において癌となる危険性を予測し又はあるいは対象において癌であると診断するための方法であって、

- 該対象から得られた体液中の、サブスタンスＰ及びニューロキニンを含む、プロ・タキキニン又はその少なくとも５つのアミノ酸の断片のレベルを決定し；及び

- プロ・タキキニン又はその断片の該レベルを癌となる危険性と相関させる

ことを含み、

ここで、レベルの減少は、癌となる危険性の増大を予測し又はあるいは癌であると診断し、レベルの減少は、癌の診断と相関する。

20

【背景技術】

【０００２】

サブスタンスＰ（ＳＰ）は神経ペプチドであり、神経伝達物質として、及び神経調節物質として機能するウンデカペプチドである。これは、タキキニン神経ペプチドファミリーに属する。サブスタンスＰ及びその密接に関連した神経ペプチドニューロキニンＡ（ＮＫＡ）は、プレプロ・タキキニンＡ遺伝子の異なるスプライシング後に、ポリタンパク質前駆体から産生される。ＣＮＳにおいて、サブスタンスＰは、疼痛伝達系に関与する。

【０００３】

サブスタンスＰは、炎症過程で役割を果たし（Ang et al, 2011）、癌細胞において抗アポトーシス活性を有する（Munoz et al, 2005）。

30

【０００４】

サブスタンスＰ受容体（ニューロキニン１受容体）は、癌の発症において重要な役割を果たす（Fries et al, 2003; Munoz et al, 2010; Rameshwar, 2007; Schulz et al, 2006）。サブスタンスＰ経路をブロックすることにより、インビトロで細胞増殖を顕著に減少させた（概説については、Munoz and Rossow, 2009参照）。

【０００５】

男性における癌の危険性を予測するための血管作動性ペプチドの使用は、Belting et al, Cancer, Epidemiology, Biomarkers & Preventionによって報告されている。MR-プロ・ANP、MR-プロ・ADP及びコペプチンは、１９９１～１９９４年におけるベースライン試験前の癌でない、Malmö Diet and Cancer Studyの参加者からの空腹時血漿において測定された（男性１７６８人及び女性２２９３人）。著者は、女性の間で、バイオマーカーと癌発生率の間には関係がなかったと述べている。

40

【発明の概要】

【０００６】

本発明の主題は、癌発生率を予測し、及び癌の再発の危険性を予測するためのプロ・タキキニンの予後及び診断力を調査することであつた。この問題に対処するに、空腹時血漿中のプロ・タキキニンの安定な断片（Ernst et al., 2008）は、スウェーデンの予測されたコホート研究（Malmö Diet and Cancer St

50

udy)において測定され、フォローアップ15年間に乳癌の発生率にこのバイオマーカーのベースラインレベルを関連付けた。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】図1は、典型的なPTA用量/シグナル曲線を示す。標準的な曲線PTA。

【図2】図2は、カプラン・マイヤーグラフであり、女性における累積的な乳癌診断を示す。四分位数(Q)1(45.6 pmol/Lを下回る)、四分位数2(45.6 - 55.3 pmol/L)、四分位数3(55.4 - 65.9 pmol/L)、四分位数4(65.9 pmol/Lを上回る)。PTAの減少は、乳癌発症の長期危険性の増加を示す。基準(血液サンプリング)の日に癌病歴を有するいかなる女性も除いたため、PTAは、将来的な乳癌発症について高く予測する。全体として、Q1からの女性は、Q4からの女性より乳癌を発症する危険性が2.1倍高い。

10

【図3】図3は、典型的なPNT用量/シグナル曲線を示す。標準的な曲線PNT。

【図4】図4は、典型的なMRPENK用量/シグナル曲線を示す。標準的な曲線MRPENK。

【図5】乳癌予測についてのPTA及びPNTの組み合わせ分析の例証的な実施例であり、危険群は表9に定義されるように表示される。

【発明を実施するための形態】

【0008】

驚くべきことに、プロ・タキキニンは、対象において癌となる危険性を予測し、又はあるいは対象において癌と診断するための強力かつ非常に重要なバイオマーカーであることが示されている。

20

【0009】

したがって、本発明の主題は、癌を被っていない対象において癌となる危険性を予測し、又はあるいは対象において癌であると診断するための方法であって、

- 該対象から得られた体液中のサブスタンスP及びニューロキニンを含む、プロ・タキキニン又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片のレベルを決定し；及び

- プロ・タキキニン又はその断片の該レベルを癌となる危険性と関連させる

ことを含み、

ここで、レベルの減少は、癌となる危険性の増大を予測し、又はあるいは癌であると診断されることを予測し、レベルの減少は、癌の診断と関連する。

30

【0010】

本発明の別の主題は、以下の工程：

- 該対象から得られた体液中のプロ・ニューロテンシン又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片のレベルを追加的に決定し；及び

- プロ・ニューロテンシン又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片の該レベルと、癌となる危険性をさらに関連させる

ことをさらに含み、ここで、プロ・ニューロテンシン又はその断片のレベルの増加は、癌となる危険性の増加を予測し、又はあるいは癌と診断されることを予測し、プロ・ニューロテンシン又はその断片のレベルの増加は、癌の診断と関連される。

40

【0011】

本発明の別の実施形態によれば、上記方法は、さらに、以下の方法：

- 該対象から得られた体液中のプロ・エンケファリン又はその断片を追加的に決定し；及び

- 追加的なプロ・エンケファリン又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片と、癌となる危険性を関連させる

ことを含んでもよく、ここで、プロ・エンケファリン又はその断片のレベルの減少は、癌となる危険性の増大を予測し、又はあるいは癌であると診断し、プロ・エンケファリン又はその断片のレベルの減少は、癌の診断と関連させる。

【0012】

50

本発明の別の実施形態によれば、上記方法は、さらに、以下の工程：

- 該対象から得られた体液中のインスリンのレベルを追加的に決定し；及び
- インスリンの該レベルと、癌となる危険性を追加的に相関させる

ことを含んでもよく、ここで、インスリンのレベルの減少は、癌となる危険性の増大を予測し又はあるいは癌であると診断し、レベルの減少は、癌の診断と相関される。

【0013】

したがって、本発明の方法は、体液中の、サブスタンスP及びニューロキニンを含む、プロ-タキキニン、そのスプライス改変体又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片のレベルを決定することを含み、場合により、以下：

- プロ-ニューロテンシン又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片のレベルを決定し、及び

- プロ-エンケファリン又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片のレベルを決定し、及び

- インスリンのレベルを決定すること

を含む群から選択される癌の危険性の少なくとも1つの更なる決定と追加の相関をさらに含んでもよい。

【0014】

本発明の一実施形態において、前述のさらなるバイオマーカーの少なくとも1つをさらに決定し、追加的に、サブスタンスP及びニューロキニンを含む、プロ-タキキニン、そのスプライス改変体もしくはその少なくとも5つのアミノ酸の断片に加えて、該癌の危険性を相関させる。本発明の一実施形態において、前述のさらなるバイオマーカーの少なくとも2つをさらに決定し、追加的に、サブスタンスP及びニューロキニンを含む、プロ-タキキニン、そのスプライス改変体もしくはその少なくとも5つのアミノ酸の断片に加えて、該危険性を相関させる。一実施形態において、上記の4つのバイオマーカーの全てが決定される。

【0015】

サブスタンスP及びニューロキニンを含む、プロ-タキキニン、そのスプライス改変体又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片に加えて、更なるバイオマーカーが決定され、該危険性と相関させる具体的な一実施形態において、「追加的に相関すること」とは、個々のバイオマーカーによって得られた癌の発症についての相対的な危険因子を考慮することによって、決定されたバイオマーカーレベルの組み合わせ分析を意味する。

【0016】

1を超えるバイオマーカーの組み合わせ分析は、実施例5において説明されている例である。当業者は、1を超えるマーカー又はパラメータの組み合わせ分析を行ってもよい統計学的方法を知っている。

【0017】

上記方法の一実施形態において、プロ-タキキニン、そのスプライス改変体又はその断片のレベルの減少は、閾値を下回るレベルであり、該閾値は、約100 pmol/L以下、好ましくは約80 pmol/L以下、好ましくは約60 pmol/L以下、好ましくは約50 pmol/L以下、好ましくは約45.6 pmol/L以下、好ましくは約40 pmol/L以下である。

【0018】

上記方法の一実施形態において、プロ-ニューロテンシン又はその断片のレベルの増加は、閾値を上回るレベルであり、閾値は、約78 pmol/L PNT、好ましくは100 pmol/L以上、より好ましくは約150 pmol/L以上である。

【0019】

上記方法の一実施形態において、プロ-エンケファリン又はその断片のレベルの減少は、閾値を下回るレベルであり、閾値は、約100 pmol/L以下、好ましくは75 pmol/L以下、好ましくは約50 pmol/L以下、好ましくは約40.4 pmol/L以下である。

10

20

30

40

50

【0020】

上記方法の一実施形態において、インスリンのレベルの減少は、閾値を下回るレベルであり、閾値は約70 pmol/Lである。

【0021】

閾値は、使用される較正方法に照らして見る必要があり、上記値は、本実施例1、3及び4において使用されるアッセイ及び較正方法に照らして見る必要がある。

【0022】

具体的な一実施形態において、該対象は女性である。具体的な一実施形態において、該対象は女性であり、癌は乳癌である。

【0023】

具体的な一実施形態において、該癌は肺癌である。

【0024】

癌の更なる例は、乳癌、肺癌、膵臓癌及び結腸癌を含む群から選択されてもよい。

【0025】

明細書を通じて、プロ-タキキニン及びプロ-タキキニンA (PTA) なる用語は、同義的に使用される。該用語は、プロ-タキキニンAの全ての種スプライス改変体、すなわち α PTA、 β PTA、 γ PTA、及び δ PTAを含む。明細書を通じて、プロ-タキキニンの断片なる用語はまた、サブスタンスP及びニューロキニンを含むことが理解されるべきである。

【0026】

用語「サブスタンスP及びニューロキニンを含む、プロ-タキキニン、そのスプライス改変体又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片を決定すること」とは、通常、前述の分子内の領域に対する免疫反応性が決定されることを意味する。これは、特定の断片が選択的に測定されることは必要ないことを意味する。サブスタンスP及びニューロキニンを含む、プロ-タキキニン又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片のレベルを決定するために使用される結合剤は、該結合剤の結合領域を含む任意の断片に結合することが理解される。該結合剤は、抗体又は抗体断片又は非IgG足場であってもよい。

【0027】

したがって、本発明の主題は、一実施形態において、癌、例えば、乳癌、肺癌などを獲得する、男性又は女性の感受性の決定である。

【0028】

Malmo研究において得られたデータは、男性対象において癌となる危険性と、該男性対象から得られた体液中のプロ-タキキニン又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片のレベルとの相関を示した；しかしながら、この相関は、現データセットに対して統計学的に有意ではないが、男性において、プロ-タキキニン又はそのスプライス改変体又はその断片のレベルの減少で、癌の危険性の増加について明確な傾向があった。したがって、男性対象に対しても本発明の方法は価値があるが、本研究において、観察された効果は、女性と比較して、男性に対して強いものではなかった。これは、主には、男性人口における癌発症率の低値による可能性がある。

【0029】

用語「対象」とは、本明細書で使用する時、生きているヒト又は非ヒト生物を意味する。好ましくは、本明細書では、対象はヒト対象である。

【0030】

用語「レベルの減少」とは、特定の閾値レベルを下回るレベルを意味する。用語「レベルの増加」とは、特定の閾値を上回るレベルを意味する。体液は、血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液(CSF)、及び唾液を含む群から選択することができる。

【0031】

具体的な実施形態において、該体液は、血液、血清又は血漿である。

【0032】

本発明の一実施形態において、該対象は、体液試料が該対象から採取された時点で、癌

10

20

30

40

50

であると診断されたとはいえない。

【0033】

別の実施形態において、対象は、以前に癌であると診断され、体液の試料が該対象から採取された時点で治癒しており、癌となる再発の危険性が決定され、又はあるいは癌の再発が予測される。

【0034】

プロ - タキキニン は、以下の配列を有してもよい：

配列番号 1 (プロ - タキキニン A (1 - 107))

EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPF EHL LQRIARR
PKPQQFFGLMGKR DADSSIEKQVALLKALYGHGQISHKRH
KTDSFVGLMGKRALNSVAYERSAMQNYERRR

10

体液において決定され得るプロ - タキキニンの断片は、例えば、以下の断片の群から選択されてもよい：

配列番号 2 (プロ - タキキニン 1 - 37、P37)

EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPF EHL LQRI A

配列番号 3 (サブスタンス P)

RPKPQQFFGLM (-NH2)

配列番号 4 (神経ペプチド K)

DADSSIEKQVALLKALYGHGQISHKRHKTDSFVGLM (-NH2)

20

配列番号 5 (神経ペプチドガンマ)

GHGQISHKRHKTDSFVGLM (-NH2)

配列番号 6 (ニューロキニン 1)

HKTDSFVGLM (-NH2)

配列番号 7 (C末端フランキングペプチド、PTA 192 - 107)

ALNSVAYERSAMQNYE

配列番号 8 (PTA アイソフォーム α)

EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPF EHL LQRIARR
PKPQQFFGLMGKR DADSSIE KQVALLKALYGHGQISHKM
AYERSAMQNYERRR

30

配列番号 9 (PTA アイソフォーム ベータ)

EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPF EHL LQRIARR
PKPQQFFGLMGKR DADSSIEKQVALLKALYGHGQISHKRH
KTDSFVGLMGKRALNSVAYERSAMQNYERRR

配列番号 10 (PTA アイソフォーム デルタ)

EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPF EHL LQRIARR
PKPQQFFGLMGKR DADAGHGQISHKMA YERSAMQNYERRR

配列番号 11 (PTA アイソフォーム ガンマ)

EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPF EHL LQRIARR
PKPQQFFGLMGKR DADAGHGQISHKRHKTDSFVGLMGKRALN
SVAYERSAMQNYERRRSEQ

40

配列番号 12 (PTA 3 - 22)

GANDDLNYWSDWYDSDQIK

配列番号 13 (PTA 21 - 36)

IKEELPEPF EHL LQRI

【0035】

PTA、そのスプライス改変体又はその断片のレベルを決定することは、サブスタンス P 及びニューロキニンを含む、PTA 又はその断片に対する免疫反応性が決定されることを意味し得る。結合領域に依存して、PTA、又はそのスプライス改変体又はその断片を決定するために使用される結合剤は、上記で示された分子の 1 個を超えて結合してもよい

50

。これは、当業者に明らかである。

【0036】

本発明に方法のより具体的な実施形態において、p 37 (PTA 1 - 37、配列番号 2、EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFELHL LQRIA) のレベルが決定される。本発明のさらにより具体的な実施形態において、PTA 1 - 37、配列番号 2、EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFELHL LQRIA 内の 2 つの異なる領域に好ましくは結合する 1 を超える結合剤の場合において、PTA 1 - 37、配列番号 2、EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFELHL LQRIA に結合する少なくとも 1 又は 2 つの結合剤が使用される。該結合剤 (単数又は複数) は、好ましくは、抗体又はその結合断片であってもよい。

10

【0037】

さらにより具体的な実施形態において、結合剤 (単数又は複数) は、PTA 1 - 37 内の以下の領域の、それぞれ、1 つ又は両方に結合する PTA、その改変体又は断片を決定するために使用される。

【0038】

【表 1】

GANDDLNYWSDWYDSDQIK	PTA 3-22 (配列番号 12)
IKEELPEPFELHL LQRI	PTA 21-36 (配列番号 13)

20

【0039】

具体的な実施形態において、PTA、そのスプライス改変体又はその断片のレベルは、PTA、そのスプライス改変体又はその断片に結合する抗体又は抗体の断片を用いたイムノアッセイにより測定される。PTA、そのスプライス改変体又はその少なくとも 5 つのアミノ酸の断片の決定に有用であり得るイムノアッセイは、実施例 1 に概説されるステップを含んでもよい。全ての閾値及び値は、実施例 1 に従って使用される試験及び校正に相関して見る必要がある。当業者は、閾値の絶対値が使用される校正によって影響される可能性があることを知っている可能性がある。これは、本明細書で与えられる値及び閾値が、本明細書で使用される校正との関連で理解されるべきであることを意味する (実施例 1)。

30

【0040】

本発明によれば、PTA に対する診断的結合剤又は他の追加のバイオマーカーは、抗体、例えば、IgG、典型的な全長イムノグロブリン、又は、例えば、化学的に結合された抗体 (断片抗原結合) のように、重鎖及び / 又は軽鎖の少なくとも F 可変領域を含有する抗体断片、例えば、限定されないが、Fab 断片、例えば Fab ミニボディ、一本鎖 Fab 抗体、エピトープタグを有する一価 Fab 抗体、例えば、Fab - V5Sx2 ; CH3 ドメインで二量体化された二価 Fab (ミニ抗体) ; 二価 Fab 又は多価 Fab、例えば、異種ドメインの助けを借りた多量体化を介して形成されたもの、例えば dHLX ドメインの二量体化を介したもの、例えば、Fab - dHLX - FSx2 ; F (ab')₂ - 断片、scFv - 断片、多量体化された多価又は / 及び多重特異的 scFv - 断片、二価及び / 又は二重特異的ダイアボディ、BITE (登録商標) (二重特異的 T 細胞エンゲージャー (engager))、三機能性抗体、多価抗体、例えば、G とは異なるクラス由来のもの ; 単ドメイン抗体、例えば、ラクダ又は魚類のイムノグロブリン由来のナノボディからなる群から選択される。

40

【0041】

具体的な実施形態において、PTA、そのスプライス改変体若しくはその断片、又は他の更なるバイオマーカーのレベルは、PTA、そのスプライス改変体若しくはその断片、又はあるいは更なるバイオマーカーに結合する、より詳細には以下に記載される、アプタ

50

マー、非 I g 足場を含む群から選択される結合剤を用いたアッセイにより測定される。

【0042】

P T A、そのスプライス改変体又はその断片のレベルを決定するために使用され得る結合剤は、少なくとも 10^7M^{-1} 、好ましくは 10^8M^{-1} の P T A、そのスプライス改変体又はその断片に対する親和性定数を示し、好ましい親和性定数は、 10^9M^{-1} より大きく、最も好ましくは 10^{10}M^{-1} を超える。当業者は、より高い用量の化合物を適用することによって、より低い親和性を相殺されることが考えられる可能性があり、この測定が、本発明の範囲外をもたらさないことを知っている。結合親和性は、サーブス分析、例えば、B i a f f m , K a s s e l , G e r m a n y (<http://www.biaffm.com/de/>) として提供される、B i a c o r e 法を用いて決定されてもよい。

10

【0043】

親和性定数

抗体の親和性を決定するために、固定された抗体に対する、P T A、そのスプライス改変体又はその断片の結合の動力学は、B i a c o r e 2000 システム (G E H e a l t h c a r e E u r o p e G m b H , F r e i b u r g , G e r m a n y) を用いて、標識なしの表面プラズモン共鳴によって決定された。抗体の可逆的固定化は、製造業者の説明書 (マウス抗体捕捉キット ; G E H e a l t h c a r e) に従って、C M 5 センサー表面に高密度で共有結合させた抗マウス F c 抗体を用いて行われた。

(L o r e n z e t a l . " F u n c t i o n a l A n t i b o d i e s T a r g e t i n g I s a A o f S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s A u g m e n t H o s t I m m u n e R e s p o n s e a n d O p e n N e w P e r s p e c t i v e s f o r A n t i b a c t e r i a l T h e r a p y " ; A n t i m i c r o b A g e n t s C h e m o t h e r . 2011 J a n u a r y ; 55 (1) : 165 - 173) 。

20

【0044】

ヒト P T A 対照試料は、I C I - D i a g n o s t i c s , B e r l i n , G e r m a n y <http://www.ici-diagnostics.com/> によって利用可能である。また、アッセイは、合成 (本発明者らの実験では、合成の P 37、配列番号 2) 又は組換え P T A、そのスプライス改変体又はその断片によって較正されてもよい。

【0045】

本発明の方法による、女性対象において乳癌となる危険性を決定し、又は女性対象における乳癌と診断するための P T A、そのスプライス改変体又はその断片の閾値は、 100pmol/L 未満、好ましくは 80pmol/L 未満、好ましくは 60pmol/L 未満、好ましくは 50pmol/L 未満、好ましくは 45.6pmol/L 未満、好ましくは 40pmol/L 未満である。これらの閾値は、上述した較正方法に関連する。閾値を下回る P T A 値は、対象が、癌となる危険性が増大し又はすでに癌であることを意味する。

30

【0046】

本発明の一実施形態において、該方法は、女性対象において乳癌となる危険性をモニターするため、又は治療経過をモニターするために、1 回を超えて行われる。具体的な一実施形態において、該モニターリングは、採用された予防的及び / 又は治療的測定に対して、該女性対象の応答を評価するために行われる。

40

【0047】

本発明の一実施形態において、該方法は、危険群に該対象を分類するために使用される。

【0048】

さらに、本発明の主題は、それぞれの領域が少なくとも 4 又は 5 つのアミノ酸を含む、アミノ酸 3 - 22 (G A N D D L N Y W S D W Y D S D Q I K、配列番号 12) とアミノ酸 21 - 36 (I K E E L P E P F E H L L Q R I、配列番号 13) である P T A の領域内の 2 つの異なる領域に結合する 2 つの結合剤を含む試料において、P T A、そのスプライス改変体又はその断片を決定するためのアッセイである。

50

【0049】

本発明による試料中のPTA、そのスプライス改変体又はその断片を決定するためのアッセイの一実施形態において、該アッセイのその分析的アッセイ感受性は、健常な対象のPTA、そのスプライス改変体又はPTA断片を定量することができ、 $< 20 \text{ pmol/L}$ 、好ましくは $< 10 \text{ pmol/L}$ 、及びより好ましくは $< 5 \text{ pmol/L}$ である。

【0050】

本発明に従って試料中のPTA、そのスプライス改変体又は断片を決定するためのアッセイの一実施形態において、このようなアッセイは、サンドイッチアッセイ、好ましくは完全に自動化されたアッセイである。それは、ELISA、完全に自動化されたアッセイ又は手動アッセイであってもよい。それは、いわゆるPOC検定（ポイントオブケア）であってよい。自動化又は完全に自動化されたアッセイの例としては、以下のシステム：Roche Elecsys（登録商標）、Abbott Architect（登録商標）、Siemens Centaur（登録商標）、Brahms Kryptor（登録商標）、Biomerieux Vidas（登録商標）、Aleris Triage（登録商標）の1つについて使用されてもよいアッセイが挙げられる。試験フォーマットの例は、上記で与えられている。

10

【0051】

本発明に従って試料中のPTA、そのスプライス改変体又は断片を決定するためのアッセイの一実施形態において、該2つの結合剤のうちの少なくとも1つは、検出されるために標識される。標識の例は、上記で与えられている。

20

【0052】

本発明に従って試料中のPTA、そのスプライス改変体又は断片を決定するためのアッセイの一実施形態において、該2つの結合剤のうちの少なくとも1つは、固相に結合される。固相の例は、磁気ビーズ、ポリスチレンチューブ又はマイクロタイタープレートである。一実施形態において、均質アッセイが使用され、例えば、Time Resolved Amplified Cryptate Emission (TRACE) が使用される。

【0053】

本発明に従って試料中のPTA、そのスプライス改変体又は断片を決定するためのアッセイの一実施形態において、該標識は、化学発光標識、酵素標識、蛍光標識、放射性ヨウ素標識を含む群から選択される。

30

【0054】

本発明のさらなる主題は、該アッセイの成分が、1つ以上の容器に含まれていてもよい本発明のアッセイを含むキットである。

【0055】

本発明の主題はまた、女性において癌となる危険性を予測し、又は先行する実施形態のいずれかによる癌となる危険性が増大した対象を同定するための方法であり、ここで、単独で又は他の予測実験室若しくは臨床パラメータと併せて、該対象から得られた体液中のPTA、そのスプライス改変体又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片のレベルは、以下の選択肢から選択されてもよい方法によって、有害事象となる対象の危険性を予測するために使用される：

40

- 「健常な」又は「見かけ上健常な」対象の集団において予め決定された試料の集合において、対象から得られた体液中のPTA、そのスプライス改変体又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片のレベルの中央値との比較。

- 「健常な」又は「見かけ上健常な」対象の集団において予め決定された試料の集合において、対象から得られた体液中のPTA、そのスプライス改変体又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片のレベルの分位点との比較。

- Cox Proportional Hazard分析に基づく、又はNRI (Net Reclassification Index) 若しくはIDI (Integrated Discrimination Index) などの危険指標計算を用いること

50

による計算。

【 0 0 5 6 】

主題の一実施形態において、本発明はまた、女性における癌となる危険性を予測し、又は先行する実施形態のいずれかによる癌となる危険性が増大した対象を同定する方法であり、ここで、単独で又は他の予測バイオマーカーと併せて、該対象から得られた体液中の P T A、そのスプライス改変体又はその少なくとも 5 つのアミノ酸の断片のレベルであってもよい。

【 0 0 5 7 】

このような有用な追加のバイオマーカーは、プロ - ニューロテンシン及びその少なくとも 5 つのアミノ酸の断片、又はプロ - エンケファリン及びその少なくとも 5 つの断片、又はインスリンであってもよい。

【 0 0 5 8 】

本発明による方法の具体的な一実施形態において、プロ - ニューロテンシン 1 - 1 1 7 又はその断片のレベルは、P T A、そのスプライス改変体又はその断片の決定に加えて決定される。

【 0 0 5 9 】

本出願を通じて断片に言及するとき、該断片は、少なくとも 4 つ又は 5 つのアミノ酸を含む。

【 0 0 6 0 】

したがって、本発明の主題はまた、以下：

- 該対象から得られた体液中の、サブスタンス P 及びニューロキニンを含む、P T A、そのスプライス改変体又はその少なくとも 5 つのアミノ酸の断片のレベルの決定；及び
- 該対象から得られた体液中のプロ - ニューロテンシン又はその少なくとも 5 つのアミノ酸の断片のレベルの決定；及び
- P T A、そのスプライス改変体又はその断片の該レベル及びプロ - ニューロテンシン又はその少なくとも 5 つのアミノ酸の断片と、癌となる危険性との相関を含む、癌を被っていない対象において癌となる危険性を予測し、又はあるいは対象において癌であると診断するための方法であり、ここで、P T A、そのスプライス改変体又はその断片のレベルの減少は、癌である危険性の増大を予測し、又はあるいは癌であると診断し、P T A、そのスプライス改変体又はその断片のレベルの減少は、癌の診断と相関し、及びプロ - ニューロテンシン及びその断片のレベルの増加は、癌となる危険性の増大又はあるいは癌の診断を予期し、プロ - ニューロテンシン及びその断片のレベルの図岡は、癌の診断と相関する。

【 0 0 6 1 】

プロ - ニューロテンシン及び断片は、以下の配列を有してもよい：

配列番号 1 4 (プロ - ニューロキニン 1 - 1 4 7)

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

配列番号 1 5 (プロ - ニューロテンシン 1 - 1 2 5 (ラージニューロメジン N))

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

配列番号 1 6 (ニューロメジン N)

K I P Y I L

配列番号 1 7 (ニューロテンシン)

ピロ Q L Y E N K P R R P Y I L

配列番号 1 8 (プロ - ニューロテンシン 1 - 1 1 7)

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

配列番号 19 (プロ - ニューロテンシン 1 - 132)

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

配列番号 20 (プロ - ニューロテンシン 120 - 140)

K I P Y I L K R Q L Y E N K P R R P Y I L

配列番号 21 (プロ - ニューロテンシン 120 - 147)

K I P Y I L K R Q L Y E N K P R R P Y I L K R D S Y Y Y

配列番号 22 (プロ - ニューロテンシン 128 - 147)

Q L Y E N K P R R P Y I L K R D S Y Y Y

【0062】

具体的な実施形態において、プロ - ニューロテンシンのレベルは、イムノアッセイを用いて測定される。より具体的には、イムノアッセイは、エルンストラ (Peptides (2006), (27) 1787 - 1793) に記載されるように使用される。プロ - ニューロテンシン又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片のレベルの決定に有用であり得るイムノアッセイは、実施例3に概説されている工程を含んでもよい。全ての閾値及び値は、実施例3に従って使用される試験及び校正と相関して見る必要がある。当業者は、閾値の絶対値が、使用される校正によって影響を及ぼされ得ることを知っている可能性がある。これは、本明細書で与えられる値と閾値が、本明細書で使用される校正との関連で理解されるべきことを意味する (実施例3)。ヒトプロ - ニューロテンシン校正因子は、ICI - Diagnostics, Berlin, Germanyによって利用可能である。あるいは、アッセイはまた、合成又は組換え P - NT 1 - 117 又はその断片によって校正されてもよい (Ems tら、2006も参照)。

【0063】

プロ - ニューロテンシン又はその断片のレベルを決定するために使用されてもよい結合剤は、少なくとも 10^7M^{-1} 、好ましくは 10^8M^{-1} のプロ - ニューロテンシン又はその断片に対する親和性を示し、好ましい親和性は 10^9M^{-1} より大きく、最も好ましくは 10^{10}M^{-1} より大きい。当業者は、より高い用量の化合物を適用することによって、より低い親和性を相殺されることが考えられる可能性があり、この測定が、本発明の範囲外をもたらさないことを知っている。結合親和性は、サービス分析、例えば、Biaffm, Kassel, Germany (<http://www.biaffm.com/de/>) として提供される、Biacore法を用いて決定されてもよい。

【0064】

本発明の方法に従って、対象における癌となる危険性を決定し、又は対象における癌、具体的には女性対象における乳癌を診断するための閾値は、約 78pmol/L 以上の PNT、好ましくは約 100pmol/L 以上、より好ましくは約 150pmol/L 以上である。具体的な実施形態において、閾値は、約 100pmol/L 以上である。これらの閾値は、下記の校正方法に関連する。該閾値を上回る PNT 値は、対象が、癌となる危険性が増大しており、又はすでの癌であることを意味する。

【0065】

対象から得られた体液中の、サブスタンス P 及びニューロキニンを含む、PTA、そのスプライス改変体又はその断片のレベルの決定に加えて；及び/又は該対象から得られた体液中のプロ - ニューロテンシン (PNT) 又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片の決定に加えて、プロ - エンケファリン (PENK) 又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片は、該対象から得られた体液中で測定されてもよい。PTA、そのスプライス改変体又はその少なくとも5つの断片のレベルの決定に加えて、プロ - エンケファリン又はその

10

20

30

40

50

少なくとも5つのアミノ酸の断片が、該対象から得られた体液中で測定されてもよいことは理解されなければならない。これは、PTA単独又はPENK若しくはPNTのいずれかと合わせたPTAのレベルが測定され、又はPTAとPNTとPENKの決定が組み合わせられ、該危険性と相関させる。

【0066】

本発明の方法のより具体的な実施形態において、プロ-エンケファリン(PENK)又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片のレベルは、プロ-ニューロテンシン1-117のレベルの決定に加えて、及びPTA、そのスプライス改変体又はその断片の決定に加えて決定される。

【0067】

したがって、本発明の主題はまた、癌を被っていない対象において癌となる危険性を予測し、又はあるいは対象において癌であると診断する方法であり、以下：

- 該対象から得られた体液中の、サブスタンスP及びニューロキニンを含む、PTA、そのスプライス改変体又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片のレベルを決定し；及び
- 該対象から得られた体液中のプロ-ニューロテンシン又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片のレベルを決定し；及び/又は
- 該対象から得られた体液中のプロ-エンケファリン又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片のレベルを決定し；及び

PTA、そのスプライス改変体又はその断片及びプロ-ニューロテンシン又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片及び/又はプロ-エンケファリン又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片と、癌となる危険性を相関させることを含み、

ここで、PTA、そのスプライス改変体又はその断片のレベルの減少が、癌となる危険性の増大又はあるいは癌であるとの診断を予測し、PTA、そのスプライス改変体又はその断片のレベルの減少が、癌の診断と相関し、プロ-ニューロテンシン及びその断片のレベルの増加が、癌となる危険性の増大又はあるいは癌と診断を予測し、プロ-ニューロテンシン及びその断片が、癌の診断と相関され、プロ-エンケファリン又はその断片のレベルの減少が、癌となる危険性の増大又はあるいは癌の診断を予測し、プロ-エンケファリン又はその断片のレベルの減少が、癌の診断と相関する。

【0068】

具体的には、対象は女性であってもよく、癌は乳癌である。女性における上記バイオマーカー及びバイオマーカーの組み合わせ及び乳癌事象の間の相関は、特に注目に値し、本発明によるすべての方法にとって具体的な実施形態である。

【0069】

プロ-エンケファリン又は断片は、以下の配列を有してもよい：

配列番号23(プロ-エンケファリン(1-243))

ECSQDCATCSYRLVRPADINFLACVMECEGKLP SLKIWE
TCKELLQLSKPELPQDGTSTLRENSKPEEESHLLAKRYGGF
MKRYGGFMKKMDELYPMEPEEEANGSEILAKRYGGFMKKD
AEEDDSLANSDDLKELLETDGDNRE RSHHQDGS DNEEEVS
KRYGGFM RGLKRS PQLEDEAKE LQKRYGGFMRRVGRPEWW
MDYQKRYGGFLKRFAEALPSDEEGESYSKEVPEMEKRYGG
FMR F

【0070】

体液において決定されてもよいプロ-エンケファリンの断片は、例えば、以下の断片の群から選択されてもよい：

配列番号24(Synエンケファリン、プロ-エンケファリン1-73)

ECSQDCATCSYRLVRPADENFLACVMECEGKLP SLKIWE
TCKELLQLSKPELPQDGTSTLRENSKPEEESHLLA

配列番号25(Metエンケファリン)

Y G G F M

配列番号 26 (L e u - エンケファリン)

Y G G F L

配列番号 27 (プロ - エンケファリン 90 - 109)

M D E L Y P M E P E E E A N G S E I L A

配列番号 28 (プロ - エンケファリン 119 - 159、中間領域プロ - エンケファリン、M R P E N K)

D A E E D D S L A N S S D L L K E L L E T G D N R E R S H H Q D G S D N E E E V S

配列番号 29 (M e t - エンケファリン - A r g - G l y - L e u)

10

Y G G F M R G L

配列番号 30 (プロ - エンケファリン 172 - 183)

S P Q L E D E A K E L Q

配列番号 9 (プロ - エンケファリン 193 - 203)

V G R P E W W M D Y Q

配列番号 31 (プロ - エンケファリン 213 - 234)

F A E A L P S D E E G E S Y S K E V P E M E

配列番号 32 (プロ - エンケファリン 213 - 241)

F A E A L P S D E E G E S Y S K E V P E M E K R Y G G F M

配列番号 33 (M e t - エンケファリン - A r g - P h e)

20

Y G G F M R F

【 0 0 7 1 】

L e u - エンケファリン及び M e t - エンケファリン又はそれらの断片を含むプロ - エンケファリンのレベルを決定することは、L e u - エンケファリン及び M e t - エンケファリンを含むプロ - エンケファリン又はその断片に向かった免疫反応性を決定することを意味する。結合の領域に依存して、L e u - エンケファリン及び M e t - エンケファリン又はそれらの断片を含むプロ - エンケファリンを決定するために使用される結合剤は、上記に提示された分子の 1 つを超えるものに結合し得る。これは、当業者には明らかである。

【 0 0 7 2 】

30

本発明による方法のより具体的な実施形態において、

D A E E D D S L A N S S D L L K E L L E T G D N R E R S H H Q D G S D N E E E V S

である M R P E N K (配列番号 28 : プロ - エンケファリン 119 - 159、中間領域プロ - エンケファリン - 断片、M R P E N K) が決定される。

【 0 0 7 3 】

具体的な実施形態において、プロ - エンケファリン又はその断片のレベルは、プロ - エンケファリン又はその断片に結合する抗体又は抗体の断片を用いたイムノアッセイにより測定される。プロ - エンケファリンはその少なくとも 5 つのアミノ酸の断片の決定に有用であり得るイムノアッセイは、実施例 4 に概説される工程を含んでもよい。全ての閾値及び値は、実施例 4 に従って使用される試験及び校正に相関して見る必要がある。当業者は、閾値の絶対値が、使用される校正によって影響を及ぼされ得ることを知っている可能性がある。これは、本明細書に与えられた全ての値及び閾値は、本明細書において使用される校正との関連で理解されなければならないことを意味する (実施例 4) 。

40

【 0 0 7 4 】

本発明によれば、プロ - エンケファリン (及び / 又はプロ - ニューロテンシン及びその断片) に対する診断的結合剤は、抗体、例えば、I g G、典型的な全長イムノグロブリン、又は、例えば、化学的に結合された抗体 (断片抗原結合) のように、重鎖及び / 又は軽鎖の少なくとも F 可変領域を含有する抗体断片、例えば、限定されないが、F a b 断片、例えば F a b ミニボディ、一本鎖 F a b 抗体、エピトープタグを有する一価 F a b 抗体、

50

例えば、F a b - V 5 S x 2 ; C H 3 ドメインで二量体化された二価 F a b (ミニ抗体) ; 二価 F a b 又は多価 F a b、例えば、異種ドメインの助けを借りた多量体化を介して形成されたもの、例えば d H L X ドメインの二量体化を介したもの、例えば、F a b - d H L X - F S x 2 ; F (a b ') 2 - 断片、s c F v - 断片、多量体化された多価又は / 及び多重特異的 s c F v - 断片、二価及び / 又は二重特異的ダイアボディ、B I T E (登録商標) (二重特異的 T 細胞エンゲージャー)、三機能性抗体、多価抗体、例えば、G とは異なるクラス由来のもの ; 単ドメイン抗体、例えば、ラクダ又は魚類のイムノグロブリン由来のナノボディからなる群から選択される。

【 0 0 7 5 】

具体的な実施形態において、プロ - エンケファリン又その断片 (及び / 又はニューロテンシン及びその断片) は、プロ - エンケファリン又はその断片に結合する、より詳細には以下に記載される、アプタマー、非 I g 足場を含む群から選択される結合剤を用いたアッセイにより測定される。

【 0 0 7 6 】

プロ - エンケファリン又は断片 (及び / 又はプロ - ニューロテンシン及びその断片) のレベルを決定するために使用され得る結合剤は、少なくとも 10^7 M^{-1} 、好ましくは 10^8 M^{-1} のプロ - エンケファリン (及び / 又はプロ - ニューロテンシン及びその断片) に対する親和性定数を示し、好ましい親和性定数は、 10^9 M^{-1} より大きく、最も好ましくは 10^{10} M^{-1} を超える。当業者は、より高い用量の化合物を適用することによって、より低い親和性を相殺されることが考えられる可能性があり、この測定が、本発明の範囲外をもたらさないことを知っている。結合親和性は、サービス分析、例えば、B i a f f m , K a s s e l , G e r m a n y (<http://www.biaffm.com/de/>) として提供される、B i a c o r e 法を用いて決定されてもよく、同様に上記を参照されたい。

【 0 0 7 7 】

ヒトプロ - エンケファリン対照試料は、I C I - D i a g n o s t i c s , B e r l i n , G e r m a n y <http://www.ici-diagnostics.com/> によって利用可能である。また、アッセイは、合成 (M R P E N K、配列番号 2 8) 又は組換えプロ - エンケファリン又はその断片によって較正されてもよい。

【 0 0 7 8 】

本発明の方法による、対象における癌、具体的には乳癌となる危険性を決定し、又は対象における癌、具体的には乳癌と診断するためのプロ - エンケファリンの閾値は、約 100 p m o l / L 以下、好ましくは約 75 p m o l / L 以下、好ましくは約 50 p m o l / L 以下、好ましくは 40.4 p m o l / L 以下である。具体的な実施形態において、閾値は、約 40.4 p m o l / L である。これらの閾値は、上述した較正方法に関連する。閾値を下回る P E N K 値は、対象が、癌となる危険性が増大し又はすでに癌であることを意味する。

【 0 0 7 9 】

本発明の一実施形態において、該方法は、女性対象において癌、具体的には乳癌となる危険性をモニターするため、又は治療経過をモニターするために、1 回を超えて行われる。具体的な一実施形態において、該モニターリングは、採用された予防的及び / 又は治療的測定に対して、該対象の応答を評価するために行われる。

【 0 0 8 0 】

本発明の一実施形態において、該方法は、危険群に該対象、具体的には女性対象を分類するために使用される。

【 0 0 8 1 】

本発明の主題はまた、対象において癌となる危険性、具体的には女性対象において乳癌となる危険性を予測し、又は先行する実施形態のいずれかによる癌、具体的には乳癌となる危険性が増大した対象、具体的には女性対象を同定するための方法であり、ここで、単独で又は他の予測実験室若しくは臨床パラメータと併せて、該対象から得られた体液中の

10

20

30

40

50

プロ - ニューロテンシン、そのスプライス改変体又はその少なくとも 5 つのアミノ酸の断片のレベルは、以下の選択肢から選択されてもよい方法によって、癌となる対象の危険性を予測するために使用される：

- 「健常な」又は「見かけ上健常な」対象の集団において予め決定された試料の集合において、対象から得られた体液中のプロ - タキキニン、そのスプライス改変体又はその少なくとも 5 つのアミノ酸のその断片のレベルの中央値との比較。

- 「健常な」又は「見かけ上健常な」対象の集団において予め決定された試料の集合において、対象から得られた体液中のプロ - タキキニン、そのスプライス改変体又はその少なくとも 5 つのアミノ酸のその断片のレベルの分位点との比較。

- Cox Proportional Hazard 分析に基づく、又は NRI (Net Reclassification Index) 若しくは IDI (Integrated Discrimination Index) などの危険指標計算を用いることによる計算。

【0082】

本発明の一実施形態において、該方法は、対象において癌となる危険性、具体的には女性対象において乳癌となる危険性をモニターするため、又は治療経過をモニターするために、1 回を超えて行われる。具体的な一実施形態において、該モニターリングは、採用された予防的及び / 又は治療的測定に対して、該対象の応答を評価するために行われる。

【0083】

本発明の一実施形態において、該方法は、危険群に該対象を分類するために使用される。

【0084】

本発明の一実施形態において、癌は、乳癌、及び肺癌を含む群から選択される。

【実施例】

【0085】

実施例 1

PTA - イムノアッセイ

抗 PTA 抗体の生成

免疫化のためのペプチド / コンジュゲート：

免疫化のためのペプチドを、ウシ血清アルブミン (BSA) へのペプチドのコンジュゲートのために、追加の N 末端システイン残基を用いて合成した (JPT Technologies, Berlin, Germany)。そのペプチドを、Sulfo-SMCC (Perbio-science, Bonn, Germany) を使用することによって BSA に共有結合で連結した。カップリング手順を、Perbio のマニュアルに従って実施した。

【0086】

【表 2】

表 1：

免疫化のためのペプチド	PTA 配列
(C) GANDDLNYSDWYDSDQIK	3-22 (配列番号 1 2)
(C) IKEELPEPFEHLLQRI	21-36 (配列番号 1 3)

【0087】

抗体を、以下の方法に従って作製した：

BALB / c マウスを、0 及び 14 日目に 100 μ g のペプチド - BSA コンジュゲート (100 μ l の完全フロイントアジュバント中に乳化)、21 及び 28 日目に 50 μ g (100 μ l の不完全フロイントアジュバント中) で免疫した。融合実験を実施する 3 日

10

20

30

40

50

前に、動物に、1回の腹腔内注射及び1回の静脈内注射として与えられる、100 μ lの生理食塩水中に溶解した50 μ gのコンジュゲートを与えた。

【0088】

免疫したマウスからの脾細胞と、骨髓腫細胞株SP2/0の細胞を37℃にて30分間、1mlの50%ポリエチレングリコールを用いて融合した。洗浄後に、細胞を96ウェル細胞培養プレートに播種した。ハイブリッドクローンをHAT培地中での成長によって選択した[20%のウシ胎仔血清及びHATサブプリメントを補ったRPMI 1640培地]。2週間後に、HAT培地を、3回の継代の間、HT培地に置き換え、それに続いて正常細胞培養培地に置き換えた。

【0089】

融合の3週間後に、細胞培養上清を抗原に特異的なIgG抗体について一次スクリーニングした。陽性の試験微量培養を繁殖のために24ウェルプレートに移した。再試験後に、選択した培養物をクローニングし、限界希釈を使用することで再びクローニングし、アイソタイプを決定した。

【0090】

(Lane, R.D. "A short-duration polyethylene glycol mediated technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas", J. Immunol. Meth. 81:223-228; (1985), Ziegler, B. et al. "Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies", Horm. Metab. Res. 28:11-15, (1996)).

【0091】

モノクローナル抗体産生

抗体を標準的な抗体製造法によって産生させ(Marx et al, Monoclonal Antibody Production, ATLA 25, 121, 1997)、Protein A-クロマトグラフィーによって精製した。抗体純度は、SDSゲル電気泳動分析に基づき>95%であった。

【0092】

抗体の標識及びコーティング

以下の手法に従って、アクリジニウムエステルを用いて全ての抗体を標識した：

標識された化合物(トレーサー、抗PTA3-22)：100 μ g (100 μ l)抗体(PBS中1mg/ml、pH7.4)を10 μ lのアクリジニウムNHS-エステル(アセトニトリル中1mg/ml、In Vent GmbH, Germany)(EP0353971)と混合し、室温で20分間インキュベートした。標識された抗体をBio-Sil SEC400-5(Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)上のゲル濾過HPLCによって精製した。精製された標識抗体を(300mmol/lのリン酸カリウム、100mmol/lのNaCl、10mmol/lのNa-EDTA、5g/lウシ血清アルブミン、pH7.0)に希釈した。最終濃度は、200 μ lあたり、標識化合物の約800,000相対光単位(RLU)(約20ngの標識抗体)であった。アクリジニウムエステルの化学発光は、AutoLumat LB953(Berthold Technologies GmbH & Co. KG)を用いて測定された。

【0093】

固相抗体(コーティングされた抗体)：

固相：ポリスチレンチューブ(Greiner Bio-One Internati

10

20

30

40

50

onal AG, Austria) を抗PTA22-36抗体(1.5 µg抗体/0.3 ml 100 mmol/L NaCl、50 mmol/l Tris/HCl、pH 7.8) でコーティングした(18時間室温)。5%ウシ血清アルブミンでブロッキングした後、チューブをPBS、pH 7.4で洗浄し、真空乾燥させた。

【0094】

PTAイムノアッセイ：

50 µlのサンプル(又は校正因子)をコーティングしたチューブにピペットで入れ、標識抗体(200 µl)を添加後、チューブを2時間18~25 でインキュベートした。非結合のトレーサーを洗浄溶液(20 mmol/l PBS、pH 7.4、0.1% Triton X-100)で5回(各1 ml)洗浄することによって除去した。チューブに結合した標識抗体は、Luminometer LB953、Berthold、Germanyを用いて測定された。

10

【0095】

校正：

20 mM K₂PO₄、6 mM EDTA、0.5% BSA、50 µM アムスタチン、100 µM ロイペプチン、pH 8.0中で希釈した合成P37の希釈物を用いてアッセイを校正した。PTA対照血漿は、ICI-diagnostics、Berlin、Germanyで入手可能である。

【0096】

図1は、典型的なPTA用量/シグナル曲線を示す。

20

【0097】

分析アッセイ感度は、(0-校正因子(PTAの添加なし)+2SD)標準偏差(SD)の20個の決定によって生じた中央値シグナル、対応するPTA濃度は標準曲線から計算される)4.4 pmol/Lであった。

【0098】

実施例2

集団研究/PTA

方法

本発明者らは、1991~1994年のMalmö Diet and Cancer Study基準試験ベースの集団(年齢58±6歳)の2559人の女性の参加者からの空腹時血漿中のPTAを測定した。本発明者らは、12年を超える中央値経過観察期間中の最初の事象の試験終点のそれぞれに対する、基準PTA(対数変換PTAの標準偏差増大毎あたりのハザード比)を関連付けるために、多変数補正された(すべての従来の心疾患リスク因子、糖尿病リスク因子、癌の分析において癌の遺伝も同様である)コックス比例ハザードモデルを使用した。終点は、Swedish National Hospital Discharge Registry, the Swedish Myocardial Infarction Registry, the Stroke in Malmö Registry and the Swedish Cancer Registryを通じて検索した。これらの登録簿を通じた終点の検索は、正当性が立証され、且つ、正確であることがわかっていた(Belting et al Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 1-10, 2012 ACRも参照されたい)。インスリンは、標準実験室法によって測定された。

30

40

【0099】

【表 3】

表 2 :

本研究における女性の臨床的特徴

記述的統計			
	N	平均	標準偏差
MDGSスクリーニング時の年齢	2559	57.554	5.9403
収縮期血圧 (mmHg)	2559	140.50	19.311
拡張期血圧 (mmHg)	2559	85.65	9.117
ボディーマスインデックス (体重/kg×kg)	2559	25.5196	4.19083
胸囲 (cm)	2559	76.99	10.245
グルコース (mmol/l)	2559	5.0418	1.21798
トリグリセリド (mmol/l)	2559	1.2245	0.58404
高密度リポタンパク質 (mmol/l)	2559	1.5123	0.36949
低密度リポタンパク質 (mmol/l)	2559	4.2016	1.04762
P-インスリン	2512	7.223	5.4223

10

20

【0100】

女性集団におけるPTAの分布 (N = 2559) :

女性人口におけるPTAの平均値は、 54.3 pmol/L 、標準偏差 $\pm 1.4 \text{ pmol/L}$ であった。すべての結果は、アッセイの測定範囲内であった。最も低いPTA5濃度は 9.1 pmol/L であった。これらの結果は、使用したアッセイの適合性を指示する (アッセイ感度 4.4 pmol/L)。

【0101】

PTA及び乳癌の予測

本発明者らは、PTAと乳癌の関係性を評価した (表3)。以前に癌を患っていた全ての女性 (N = 459) を評価から除外した。PTAと女性における乳癌の間に強い関係があった。完全に調整されたモデルにおいて、PTAの疾患の各SD (本発明者らは逆四分位、revPTAを使用した。表3/4参照) は、将来の乳癌の危険性を28.2%増加と関連付け (表3)、PTAの最高の四分位対最低の四分位は、乳癌の危険性において2.1倍を超える差があると特定した (表5と図2参照)。方程式中のPTAなしのインスリンは、将来の乳癌発症と有意に関連しなかったが、驚くべきことに、PTAが方程式の一部である場合、インスリンは有意になった ($p = 0.035$)。インスリンの増加は、将来の乳癌のSDあたり34.6%の危険性の減少と関連した。PTAの予測力はインスリンによって影響されなかった。

30

【0102】

【表 4】

表 3 :

方程式中の変数

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% CI より下
年齢	-.003	.016	.035	1	.851	.997	.966
BMI_B	.027	.025	1.194	1	.275	1.027	.979
LNINS	-.423	.200	4.465	1	.035	.655	.442
HER_癌_0	-.006	.184	.001	1	.973	.994	.693
Q_REV_PTA	.249	.085	8.629	1	.003	1.282	1.086

10

【0103】

【表 5】

表 4 :

PTA四分位分析 :

四分位	逆四分位	N	濃度範囲 (pmol PTA/l)
1	4	535	<45.6
2	3	535	45.6-55.3
3	2	535	55.4-65.9
4	1	535	>65.9

20

【0104】

【表 6】

表 5 : 基準PTA対乳癌の発症における多変量コックス比例ハザードモデル

	1SDあたりのHR	P値	四分位4	四分位3	四分位2	四分位1
女性 (2140/137)	1.22 (0.84-1.67)	0.013	1.0 (ref)	1.60 (1.21-2.22)	1.6 (1.24-2.27)	2.2 (1.82-3.6)

30

【0105】

実施例 3

プロ - ニューロテンシンアッセイ

抗体を上記のように作製した。標識用抗体 (LA) は、P - NT 1 - 19 (H - C S D S E E E M K A L E A D F L T N M H (配列番号 33)) に対して作製され、固相抗体 (SPA) は、ペプチド P - NT 44 - 62 (C N L N S P A E E T G E V H E E E L V A (配列番号 34)) に対して作製された。抗体の開発及び製造を上記のように行った。

40

【0106】

ヒトプロ - ニューロテンシンの定量化のためのアッセイ

使用された技術は、アクリジニウムエステル標識に基づいて、サンドイッチ被覆されたチューブ発光イムノアッセイであった。

【0107】

標識された化合物 (トレーサー) : 100 μ g (100 μ l) LA (PBS 中 1 mg / ml、pH 7.4) を 10 μ l のアクリジニウム NHS - エステル (アセトニトリル中 1 mg / ml、In Vent GmbH, Germany) (EP 0353971) と混

50

合し、室温で20分間インキュベートした。標識されたLAをBio-Sil SEC 400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) 上のゲル濾過HPLCによって精製した。精製されたLAを(300 mmol/lのリン酸カリウム、100 mmol/lのNaCl、10 mmol/lのNa-EDTA、5 g/lウシ血清アルブミン、pH 7.0)に希釈した。最終濃度は、200 µlあたり、標識化合物の約800,000相対光単位(RLU)(約20 ngの標識抗体)であった。アクリジニウムエステルの化学発光は、AutoLumat LB953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG)を用いて測定された。

【0108】

固相：ポリスチレンチューブ(Greiner Bio-One International AG, Austria)をSPA(1.5 µg SPA/0.3 ml 100 mmol/l NaCl、50 mmol/l Tris/HCl、pH 7.8)でコーティングした(18時間室温)。5%ウシ血清アルブミンでブロッキングした後、チューブをPBS、pH 7.4で洗浄し、真空乾燥させた。

【0109】

校正：

ヒト血清を含有するプロ-ニューロテンシンの希釈物を用いて、アッセイを校正した。高いプロ-ニューロテンシン免疫反応性を有するヒト血清のプール(InVent Diagnostika, Hennigsdorf, Germany)は、ウマ血清(Biochrom AG, Deutschland)(アッセイ標準)を用いて希釈された。標準は、ヒトプロ-ニューロテンシン-校正因子(ICI-Diagnostics, Berlin, Germany)の使用によって校正された。あるいは、アッセイは、アッセイは、合成若しくは組換えP-NT1-117又はその断片によって校正されてもよい(Emsstra, 2006も参照)。

【0110】

プロNTイムノアッセイ：

50 µlのサンプル(又は校正因子)をSPAコーティングしたチューブにピペットで入れ、標識LA(200 µl)を添加後、チューブを16~22時間18~25℃でインキュベートした。非結合のトレーサーを洗浄溶液(20 mmol/l PBS、pH 7.4、0.1% Triton X-100)で5回(各1 ml)洗浄することによって除去した。チューブに結合したLAは、Luminometer LB953を用いて測定された。結果は、校正曲線から計算された。典型的な校正曲線を図3に示す。

【0111】

実施例 4

プロ-エンケファリンイムノアッセイ

抗体の開発

免疫化のためのペプチド/コンジュゲート：

免疫化のためのペプチドを、ウシ血清アルブミン(BSA)へのペプチドのコンジュゲートのために、追加のN末端システイン残基を用いて合成した(JPT Technologies, Berlin, Germany)。そのペプチドを、Sulfo-SMCC (Perbio-science, Bonn, Germany)を使用することによってBSAに共有結合で連結した。カップリング手順を、Perbioのマニュアルに従って実施した。

【0112】

10

20

30

40

【表 7】

表 6 :

免疫化のためのペプチド	プロ-エンケファリン配列
(C) LKELLETG (配列番号 35)	133-140
(C) SDNEEEVS (配列番号 36)	152-159

【0113】

10

抗体を、以下の方法に従って作製した：

BALB/cマウスを、0及び14日目に100μgのペプチド-BSAコンジュゲート(100μlの完全フロイントアジュバント中に乳化)、21及び28日目に50μg(100μlの不完全フロイントアジュバント中)で免疫した。融合融合実験を実施する3日前に、動物に、1回の腹腔内注射及び1回の静脈内注射として与えられる、100μlの生理食塩水中に溶解した50μgのコンジュゲートを与えた。

【0114】

免疫したマウスからの脾細胞と、骨髓腫細胞株SP2/0の細胞を37℃にて30分間、1mlの50%ポリエチレングリコールを用いて融合した。洗浄後に、細胞を96ウェル細胞培養プレートに播種した。ハイブリッドクローンをHAT培地中での成長によって選択した[20%のウシ胎仔血清及びHATサプリメントを補ったRPMI 1640培地]。2週間後に、HAT培地を、3回の継代の間、HT培地に置き換え、それに続いて正常細胞培養培地に置き換えた。

20

【0115】

融合の3週間後に、細胞培養上清を抗原に特異的なIgG抗体について一次スクリーニングした。陽性の試験微量培養を繁殖のために24ウェルプレートに移した。再試験後に、選択した培養物をクローニングし、限界希釈を使用することで再びクローニングし、アイソタイプを決定した。

【0116】

(Lane, R.D. "A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas", J. Immunol. Meth. 81:223-228; (1985), Ziegler, B. et al. "Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies", Horm. Metab. Res. 28:11-15, (1996)).

30

40

【0117】

【表 8】

表 7 :

免疫化のためのペプチド	プレプロエンケファリン配列	抗体名称
(C) LKELLETG (配列番号 35)	133-140	MR-MRPENK (被覆されたチューブ抗体として使用)
(C) SDNEEEVS (配列番号 36)	152-159	CT-MRPENK (標識抗体として使用)

10

【0118】

モノクローナル抗体産生

抗体を標準的な抗体製造法によって産生させ (Marx et al, Monoclonal Antibody Production, ATLA 25, 121, 1997)、Protein A - クロマトグラフィーによって精製した。抗体純度は、SDSゲル電気泳動分析に基づき > 95% であった。

【0119】

抗体の標識及びコーティング

標識された化合物 (トレーサー、CT-MRPENK 抗体) : 100 µg (100 µl) 抗体 (PBS 中 1 mg/ml、pH 7.4) を 10 µl のアクリジニウム NHS - エステル (アセトニトリル中 1 mg/ml、In Vent GmbH, Germany) (EP0353971) と混合し、室温で 20 分間インキュベートした。標識された抗体を Bio-Sil SEC400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) 上のゲル濾過 HPLC によって精製した。精製された標識抗体を (300 mmol/l のリン酸カリウム、100 mmol/l の NaCl、10 mmol/l の Na-EDTA、5 g/l ウシ血清アルブミン、pH 7.0) に希釈した。最終濃度は、200 µl あたり、標識化合物の約 800,000 相対光単位 (RLU) (約 20 ng の標識抗体) であった。アクリジニウムエステルの化学発光は、AutoLumat LB953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG) を用いて測定された。

20

30

【0120】

固相抗体 (コーティングされたチューブ抗体、MR-MRPENK 抗体) :

固相 : ポリスチレンチューブ (Greiner Bio-One International AG, Austria) を抗体 (1.5 µg 抗体 / 0.3 ml 100 mmol/l NaCl、50 mmol/l Tris/HCl、pH 7.8) でコーティングした (18 時間室温)。5% ウシ血清アルブミンでブロッキングした後、チューブを PBS、pH 7.4 で洗浄し、真空乾燥させた。

【0121】

プロ - エンケファリンイムノアッセイ :

50 µl のサンプル (又は校正因子) をコーティングしたチューブにピペットで入れ、標識抗体 (200 µl) を添加後、チューブを 2 時間 18 ~ 25 °C でインキュベートした。非結合のトレーサーを洗浄溶液 (20 mmol/l PBS、pH 7.4、0.1% Triton X-100) で 5 回 (各 1 ml) 洗浄することによって除去した。チューブに結合した標識抗体は、Luminometer LB953、Berthold、Germany を用いて測定された。

40

【0122】

校正 :

20 mM K₂PO₄、6 mM EDTA、0.5% BSA、50 µM アムスタチン、100 µM ロイペプチン、pH 8.0 中で希釈した合成 P37 の希釈物を用いてアッセイを校正した。プロ - エンケファリン対照血漿は、ICI - diagnostics、Be

50

rlin、Germanyで入手可能である。

【0123】

図4は、典型的なプロ-エンケファリン用量/シグナル曲線を示す。

【0124】

分析アッセイ感度(0-校正因子(MRPENKの添加なし)+2SD2標準偏差(SD)の20個の決定)は、5.5 pmol/Lであった。

【0125】

実施例5

乳癌予測のためのPTA、プロ-ニューロテンシンとHRT、及びPTA、プロ-ニューロテンシンとプロ-エンケファリンの組み合わせアッセイ

最近、プロ-ニューロテンシンとプロ-エンケファリンが乳癌について高度に予測的であることが示されたため、本発明者らは、乳癌予測についてこれらのバイオマーカーを組み合わせた。本発明者らは、PTAの増分値を示すために、乳癌について既知の危険因子として、HRT(ホルモン補充療法)を加えた。

【0126】

最初に、本発明者らは、PTA/プロニューロテンシン/HRT/インスリンを組み合わせた：

PTAとプロ-ニューロテンシンの間に有意な相関はなかった($p = 0.71$)。PTAとPNTを用いたインスリン及びホルモン補充療法(HRT)を含む組み合わせモデルにおいて(表8)、本発明者らは、乳癌予測においてそれらはともに独立であることを見出した。両マーカーは、非常に有意であった(PTAについて $p = 0.05$ 、PNTについて $p < 0.001$)。

【0127】

完全に調整されたモデルにおいて、PNTの各SD増加は、将来の乳癌の危険性を4.5.5%と関連付けた。PTAの各SD増加は、将来の乳癌の危険性を18.9%と関連付けた。

【0128】

予期した通り、HRTは、同モデルにおいて有意であったが、インスリンは、驚くべきことに、乳癌の予測に上位であった($p = 0.027$)。インスリンの各SD増加は、将来の乳癌の減少を35.7%と関連付けた。

【0129】

これらのデータは、PTA、PNT、インスリン及びHRTは、それぞれ、乳癌予測に関する有意な情報を加えることを示す。

【0130】

【表9】

表8：乳癌予測についてのPNTとPTAの組み合わせ分析
方程式中の変数

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% CI
							より下
年齢	-.004	.016	.048	1	.826	.996	.966
BMI_B	.029	.025	1.342	1	.247	1.029	.980
LNINS	-.441	.199	4.889	1	.027	.643	.435
hrt_curr	.612	.197	9.656	1	.002	1.844	1.254
HER_癌_0	-.014	.184	.006	1	.938	1.014	.707
ZLN_PTA	-.210	.075	7.925	1	.005	.811	.700
ZLN_PNT	.375	.089	17.938	1	.000	1.455	1.223

10

20

30

40

50

【 0 1 3 1 】

カプランマイヤー分析において、本発明者らは、PTAとPNTの組み合わせ情報、表9及び図5を示す。

【 0 1 3 2 】

本発明者らは、PTAとPNTの四分位を組み合わせた：

低いPTA値が乳癌発症の危険性の増加を示すため、本発明者らは、PTA四分位を逆転させた(revPTA)：第1四分位PTA = 第4四分位PTA revPTA；第2四分位PTA = 第3四分位 revPTA；第3四分位PTA = 第2四分位 revPTA；第4四分位PTA = 第1四分位 revPTA(表9)。

【 0 1 3 3 】

10

【表10】

表9：

revPTA/PNT	対象のN	15年の乳癌発症	危険率(%)	相対的危険率 (最も低い グループ=1)
Q1/Q1 (グループ1)	117	3	2.6	1
Q1/Q2及び Q2/Q1 Q1/Q3 Q2/Q2 Q3/Q1 (グループ2)	673	27	4.0	1.54
Q1/Q4 Q2/Q3 Q3/Q2 Q4/Q1 (グループ3)	583	42	7.2	2.8
Q2/Q4 Q3/Q3 Q4/Q2 (グループ4)	377	25	6.6	2.5
Q3/Q4 Q4/Q3 (グループ5)	263	24	9.1	3.5
Q4/Q4 (グループ6)	127	16	12.6	4.9

20

30

40

【 0 1 3 4 】

最も高い四分位のPNTと最も低いPTA四分位(グループ6)の組み合わせ対最も低いPNTと最も高いPTA四分位(グループ1)は、将来の乳癌について4.9の組み合わせ危険性を示した(図5参照)。

【 0 1 3 5 】

女性集団におけるPTA、プロエンケファリン、HRT、インスリン及びPNTの組み合わせ分析：

PTAとプロ-エンケファリンの間に有意な相関があった($p = 0.001$ 、 $r = 0.35$)。インスリン、PTA、PNTとプロ-エンケファリンを含む組み合わせモデルにおいて、本発明者らは、全てのマーカーが、乳癌予測についての情報を独立して追加する

50

ことを見出した(表10)。全てのマーカーは、非常に有意であった(P T Aについて $p = 0.028$ 、P N Tについて $p < 0.001$ 、インスリンについて $p = 0.009$ 、及びプロエンケファリンについて $p < 0.001$)。P T Aは独立したままであるが、それは、プロエンケファリンに非常に相関する。

【0136】

完全に調整されたモデルにおいて、P N Tの各S D増加は、将来の乳癌の47.8%危険性増加と関連付けた。P T Aの増加は、将来の乳癌の15.8%危険性減少(S Dあたり)と関連付けた。プロ-エンケファリンの増加は、将来の乳癌の26.4%危険性減少(S Dあたり)と関連付け、インスリンの増加は、将来の乳癌の40.4%危険性減少(S Dあたり)と関連付けた。

10

【0137】

これらのデータは、P T A、P N T、プロ-エンケファリン及びインスリンによる、強い独立性と将来の乳癌発症に関する追加情報を示す。

【0138】

【表11】

表10：P T A、プロ-エンケファリン、インスリンとP N Tの組み合わせ分析
方程式中の変数

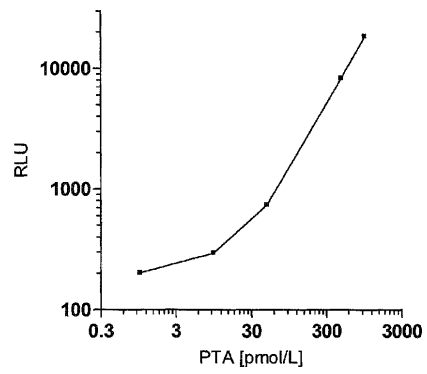
	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% CI
							より下
年齢	-.001	.016	.002	1	.966	.999	.969
BMI_B	.019	.025	.568	1	.451	1.019	.970
LNINS	-.518	.200	6.739	1	.009	.596	.403
HER_癌_0	-.021	.185	.012	1	.911	.980	.682
ZLN_PTA	-.171	.078	4.827	1	.028	.842	.723
ZLN_PNT	.390	.089	19.328	1	.000	1.478	1.242
ZLN_PENK	-.309	.087	12.655	1	.000	.734	.619

20

30

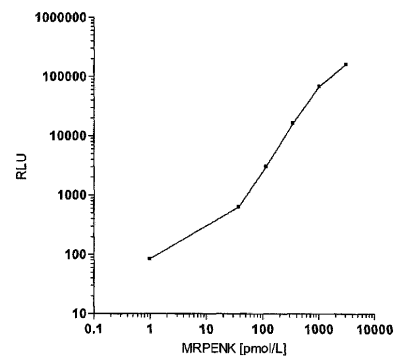
【 図 1 】

Fig. 1:



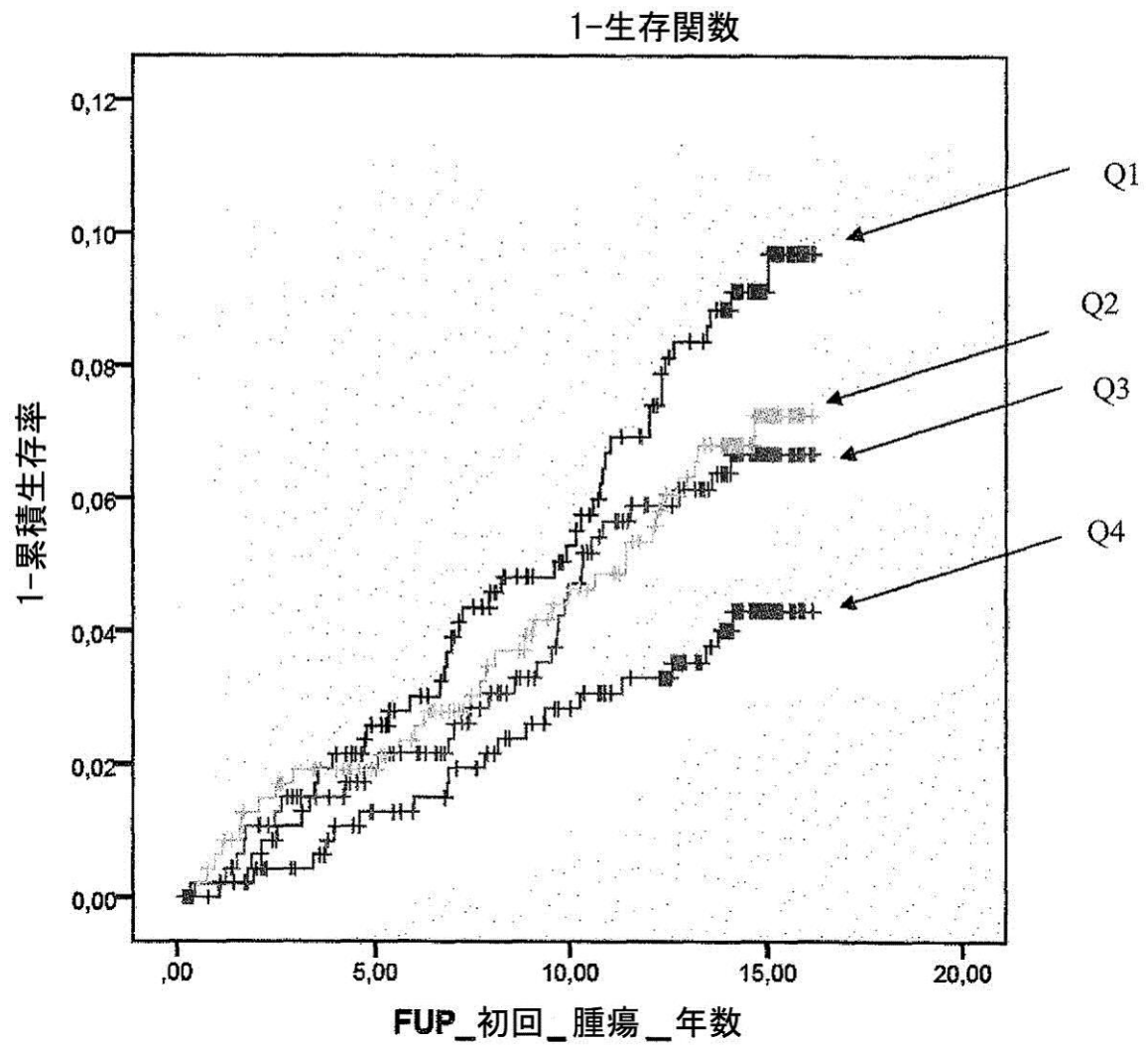
【 図 4 】

Fig. 4:



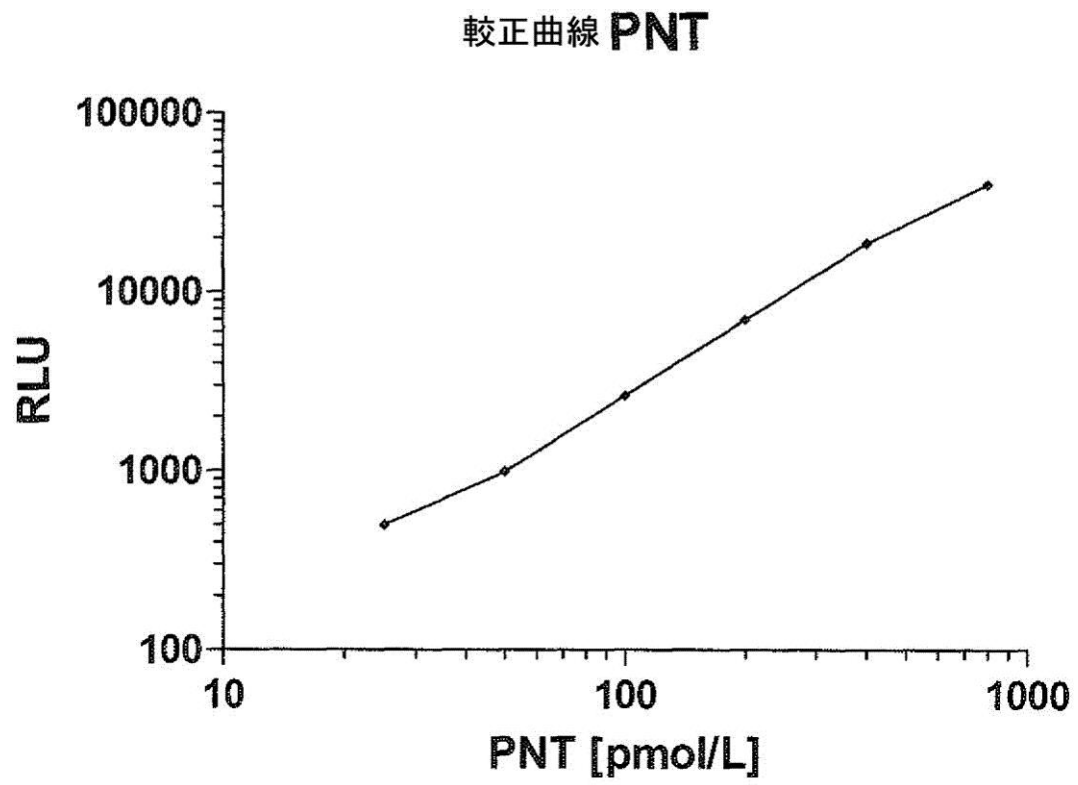
【 図 2 】

Fig. 2:



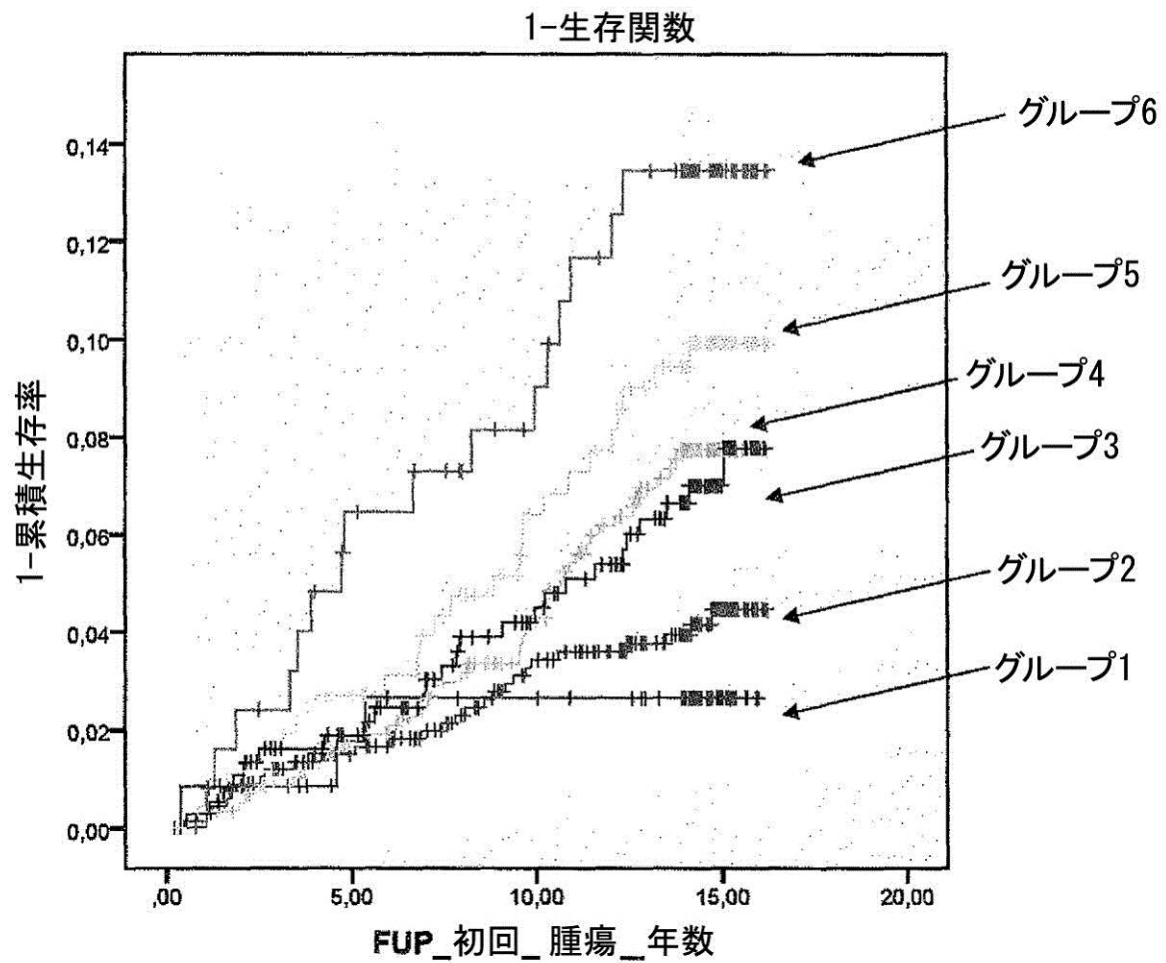
【 図 3 】

Fig. 3:



【 図 5 】

Fig. 5:



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/050144

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. 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)

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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2005/103712 A2 (SPHINGOTEC GMBH [DE]; BERGMANN ANDREAS [DE]; ERNST ANDREA [DE]) 3 November 2005 (2005-11-03) figure 10; example 10	1,6, 10-16, 18-22 2-5,7-9, 17,23-25
X A	----- TURNER G B ET AL: "Circulating markers of prognosis and response to treatment in patients with midgut carcinoid tumours", GUT, vol. 55, no. 11, November 2006 (2006-11), pages 1586-1591, XP002725115, ISSN: 0017-5749 abstract ----- -/--	1,6, 10-16, 18-22 2-5,7-9, 17,23-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 May 2014

Date of mailing of the international search report

17/06/2014

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

Griesinger, Irina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/050144

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. ARDILL ET AL: "The importance of the measurement of circulating markers in patients with neuroendocrine tumours of the pancreas and gut", ENDOCRINE RELATED CANCER, vol. 10, no. 4, 1 December 2003 (2003-12-01), pages 459-462, XP055120126, ISSN: 1351-0088, DOI: 10.1677/erc.0.0100459	1,6, 10-16, 18-22
A	abstract; table 2	2-5,7-9, 17,23-25
X	----- PRANELA RAMESHWAR ET AL: "Neurokinin receptors as potential targets in breast cancer treatment", CURRENT DRUG DISCOVERY TECHNOLOGIES, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 5, no. 1, 1 January 2008 (2008-01-01) , pages 15-19, XP009145163, ISSN: 1570-1638	1,6, 10-16, 18-22
A	abstract	2-5,7-9, 17,23-25
X	----- KHAN IRFAN ULLAH ET AL: "Targeted tumor diagnosis and therapy with peptide hormones as radiopharmaceuticals", ANTI-CANCER AGENTS IN MEDICINAL CHEMISTRY, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS LTD, NL, vol. 8, no. 2, 1 February 2008 (2008-02-01), pages 186-199, XP009163917, ISSN: 1871-5206 points 4.5 and 4.8; abstract	1-25
X	----- ALUMETS J ET AL: "NEURO HORMONAL PEPTIDES IN ENDOCRINE TUMORS OF THE PANCREAS STOMACH AND UPPER SMALL INTESTINE 1. AN IMMUNO HISTOCHEMICAL STUDY OF 27 CASES", ULTRASTRUCTURAL PATHOLOGY, HEMISPHERE, WASHINGTON, DC, US, vol. 5, no. 1, 1 January 1983 (1983-01-01) , pages 55-72, XP009178200, ISSN: 0191-3123 abstract; table 3	1-25
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/050144

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NESLAND J M ET AL: "C-ERB-B-2 PROTEIN AND NEUROENDOCRINE EXPRESSION IN BREAST CARCINOMAS", ANTICANCER RESEARCH - INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND TREATMENT, INTERNATIONAL INSTITUTE OF ANTICANCER RESEARCH, GR, vol. 11, no. 1, 1 January 1991 (1991-01-01), pages 161-167, XP009178201, ISSN: 0250-7005 abstract; table 1 -----	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2014/050144

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- ☒ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☐ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☒ subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/050144

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005103712 A2	03-11-2005	EP 1740957 A2	10-01-2007
		EP 2369350 A2	28-09-2011
		EP 2518510 A1	31-10-2012
		JP 5095391 B2	12-12-2012
		JP 2007533985 A	22-11-2007
		JP 2012112978 A	14-06-2012
		US 2008260640 A1	23-10-2008
		US 2011275091 A1	10-11-2011
		WO 2005103712 A2	03-11-2005

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, 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, 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, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(72)発明者 アンドレアス ベルクマン

ドイツ連邦共和国, 1 3 6 4 5 ベルリン, アム ローゼンアンガー 7 8

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA51 FA71 GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2016505137A5	公开(公告)日	2016-09-15
申请号	JP2015551195	申请日	2014-01-07
[标]申请(专利权)人(译)	思芬构技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	格哈德·戈尔抛丸科技GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	アンドレアスベルクマン		
发明人	アンドレアス ベルクマン		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 C07K16/26		
CPC分类号	G01N33/57415 G01N33/57423 G01N33/57488 G01N33/74 G01N2333/70 G01N33/577 G01N33/68 G01N2333/62 G01N2410/00		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/53.D C07K16/26.ZNA		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA51 4H045/FA71 4H045/GA26		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 中岛胜 武井良太郎		
优先权	2013150564 2013-01-08 EP		
其他公开文献	JP2016505137A JP6317763B2		

摘要(译)

本发明的主题是一种用于在未患有癌症的个体中预测罹患癌症的风险或可替代地在该个体中诊断癌症的方法，所述方法包括从所述个体获得的体液中的物质 确定促激肽原，其剪接变体或其至少5个氨基酸的片段（包括P和神经激肽）的水平；和-在促激肽原，其剪接变体或其片段的水平上癌变的风险。与性相关 其中降低的水平预示着罹患癌症或被诊断为癌症的风险增加，并且降低的水平与癌症的诊断相关。