

(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2020-515826

(P2020-515826A)

(43) 公表日 令和2年5月28日(2020.5.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	4 C 0 8 6
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/44 (2006.01)	A 6 1 K 31/44	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 54 頁) 最終頁に続く		

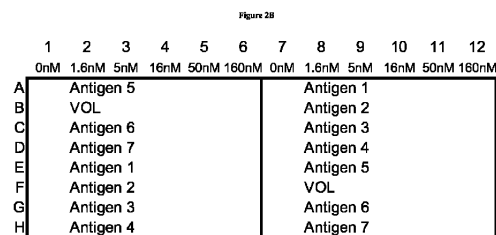
(21) 出願番号	特願2019-548777 (P2019-548777)	(71) 出願人	519187263
(86) (22) 出願日	平成29年11月24日 (2017.11.24)		オンシミュレーション リミテッド
(85) 翻訳文提出日	令和1年7月22日 (2019.7.22)		英国 エヌジー5 1 ビージー ノッティンガム ハックネル ロード シティ ホスピタル クリニカル サイエンス ビルディング
(86) 国際出願番号	PCT/GB2017/053541	(74) 代理人	100097456
(87) 国際公開番号	W02018/096351		弁理士 石川 徹
(87) 国際公開日	平成30年5月31日 (2018.5.31)	(72) 発明者	ジャレド アレン
(31) 優先権主張番号	1619954.9		英国 エヌジー5 1 ビージー ノッティンガム ハックネル ロード シティ ホスピタル クリニカル サイエンス ビルディング シー/オー オンシミュレーション リミテッド
(32) 優先日	平成28年11月25日 (2016.11.25)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗体アッセイ

(57) 【要約】

本発明は、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の抗体(ここでは、該抗体は、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体である)を検出することによって哺乳類対象における肝癌を検出する方法であって、該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと;腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップとを含み、前記複合体の存在が、肝癌の存在を示すものである前記方法に関する。本発明内に含まれるのはまた、哺乳類対象における肝癌を診断及び治療する対応する方法、抗肝癌治療に対する反応を予測する対応する方法、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の抗体を検出する対応する方法、及び本発明の方法を実施するのに適したキットである。

【選択図】 図 2 B



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の抗体(ここでは、該抗体は、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体である)を検出することによって哺乳類対象における肝癌を検出する方法であって:

(a)該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと;

(b)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと;

を含み、前記複合体の存在が、肝癌の存在を示すものである前記方法。

10

【請求項 2】

哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の抗体(ここでは、該抗体は、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体である)を検出する方法であって:

(a)該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと;

(b)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと

を含む前記方法。

20

【請求項 3】

前記哺乳類対象が、肝癌を有する疑いがある、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

前記哺乳類対象が、 α フェトプロテイン(AFP)、デス- γ -カルボキシプロトロンビン(DCP)、又はレクチン反応性 α フェトプロテイン(AFP-L3)について検査で陽性と示されている、請求項1又は請求項3記載の方法。

【請求項 5】

前記哺乳類対象が、超音波サーベイランスを使用して肝癌について検査で陽性と示されている、請求項1又は請求項3記載の方法。

【請求項 6】

前記哺乳類対象が、肝硬変、非アルコール性脂肪性肝疾患、アルコール性肝疾患、ウィルソン病、遺伝性ヘモクロマトーシス、自己免疫性肝炎、B型肝炎、C型肝炎、確認されたアフラトキシン曝露、住血吸虫症、又は糖尿病を有する、請求項1又は請求項3記載の方法。

30

【請求項 7】

2種以上の自己抗体が検出される、請求項1～6のいずれか1項記載の方法であって:

(a)前記検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原、及び前記自己抗体の少なくとも1つに対して免疫学的に特異的な1種以上のさらなる腫瘍マーカー抗原を含む、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルと接触させるステップ

を含む前記方法。

40

【請求項 8】

前記パネルが、別々の抗原である2種以上の腫瘍マーカー抗原を含む、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

前記パネルが、1種以上の別々の抗原の2種以上の抗原変異体を含む、請求項8記載の方法。

【請求項 10】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bを含む、請求項7又は請求項8記載の方法。

50

【請求項 1 1】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、Ra1A、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SPP1、SSX2、及びTGFB1からなる群から選択される1種以上の腫瘍マーカー抗原を含む、請求項7～9のいずれか1項記載の方法。

【請求項 1 2】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、Ra1A、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、及びAIF1を含む、請求項11記載の方法。

10

【請求項 1 3】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、Ra1A、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、及びAIF1からなる、請求項12記載の方法。

【請求項 1 4】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、Ra1A、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2、及びAFPを含む、請求項11記載の方法。

【請求項 1 5】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、Ra1A、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2、及びAFPからなる、請求項14記載の方法。

20

【請求項 1 6】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、ビメンチン、HNRNP-L、及びトランスフェリンを含む、請求項11記載の方法。

【請求項 1 7】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、ビメンチン、HNRNP-L、及びトランスフェリンからなる、請求項16記載の方法。

【請求項 1 8】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、AIF1、EpCAM、HSPA4、及びCPS1を含む、請求項11記載の方法。

30

【請求項 1 9】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、AIF1、EpCAM、HSPA4、及びCPS1からなる、請求項18記載の方法。

【請求項 2 0】

前記対象が、女性である、請求項18又は請求項19記載の方法。

【請求項 2 1】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、EpCAM、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA2、HSPA4、及びHNRNP-Lを含む、請求項11記載の方法。

40

【請求項 2 2】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、EpCAM、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA2、HSPA4、及びHNRNP-Lからなる、請求項21記載の方法。

【請求項 2 3】

前記対象が、男性である、請求項21又は請求項22記載の方法。

【請求項 2 4】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、Ra1A、及びSOX2を含む、請求項11記載の方法。

【請求項 2 5】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE

50

A4、NY-ESO-1、CAGE、RaiA、及びSOX2からなる、請求項24記載の方法。

【請求項 2 6】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、EpCAM、CAGE、SOX2、RaiA、MAGE A4、DDX3X、及びNY-ESO-1を含む、請求項11記載の方法。

【請求項 2 7】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、EpCAM、CAGE、SOX2、RaiA、MAGE A4、DDX3X、及びNY-ESO-1からなる、請求項26記載の方法。

【請求項 2 8】

前記対象が、男性である、請求項26又は請求項27記載の方法。

【請求項 2 9】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4、及びトランスフェリンを含む、請求項11記載の方法。

【請求項 3 0】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4、及びトランスフェリンからなる、請求項29記載の方法。

【請求項 3 1】

前記対象が、女性である、請求項29又は請求項30記載の方法。

【請求項 3 2】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RaiA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SPP1、SSX2、及びTGFB1を含む、請求項11記載の方法。

【請求項 3 3】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RaiA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SPP1、SSX2、及びTGFB1を含む、請求項32記載の方法。

【請求項 3 4】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RaiA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SPP1、SSX2、及びTGFB1からなる、請求項33記載の方法。

【請求項 3 5】

(c)検査試料中に存在する腫瘍マーカー抗原と自己抗体との間の特異的結合の量を検出するステップ

(ここでは、前記自己抗体の有無は、観察される特異的結合の量と、あらかじめ決定されたカットオフ値との比較に基づく)

をさらに含む、請求項1～34のいずれか1項記載の方法。

【請求項 3 6】

前記腫瘍マーカー抗原が、複数の異なる量で提供される、請求項1～35のいずれか1項記載の方法であって：

(a)検査試料を、複数の異なる量の腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと；

(b)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと；

(c)腫瘍マーカー抗原と自己抗体との間の特異的結合の量を検出するステップと；

(d)ステップ(a)で使用された腫瘍マーカー抗原のそれぞれの量について、腫瘍マーカー抗原の量に対する特異的結合の量の曲線をプロット又は算出するステップと；

(e)使用される腫瘍マーカー抗原のそれぞれの異なる量での腫瘍マーカー抗原と自己抗体との間の特異的結合の量に基づいて、自己抗体の有無を決定するステップとを含む前記方法。

【請求項 37】

前記自己抗体の有無が、使用される腫瘍マーカー抗原の量のすべてに対する特異的結合の量の集合的値に基づいて決定される、請求項36記載の方法。

【請求項 38】

前記自己抗体の有無が、ステップ(d)のプロットを、用量反応曲線の存在についてスクリーニングすることによって決定される、請求項36記載の方法。

【請求項 39】

前記用量反応曲線が、概ねS字型又はシグモイド曲線である、請求項38記載の方法。

【請求項 40】

(d1)ステップ(c)においてプロット又は算出された曲線から、二次的曲線パラメータを算出するステップと;

(e)以下の組み合わせ:

(i)ステップ(b)において決定される、自己抗体と腫瘍マーカー抗原との間の特異的結合の量;及び

(ii)ステップ(d1)において決定される二次的曲線パラメータに基づいて自己抗体の有無を決定するステップと

をさらに含む、請求項36~39のいずれか1項記載の方法。

【請求項 41】

前記二次的曲線パラメータが、傾き、切片、AUC、SlopeMax、及び解離定数(Kd)からなる群から選択される、請求項40記載の方法。

【請求項 42】

前記二次的曲線パラメータが、線形又は対数回帰曲線から算出される、請求項41記載の方法。

【請求項 43】

前記二次的曲線パラメータが、ステップ(c)においてプロット又は算出された各曲線に適合させたロジスティック曲線の最大漸近線、最小漸近線、Hill Slope(又は傾き係数)、又は変曲点である、請求項40~42のいずれか1項記載の方法。

【請求項 44】

哺乳類対象からの体液を含む検査試料における、肝癌を患う個人の抗体プロファイル(ここでは、該抗体は、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体である)を決定するインビトロ方法であって:

a)該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと;

b)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと

を含み、抗体産生のプロファイルを構築するために繰り返される前記方法。

【請求項 45】

哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の抗体(ここでは、該抗体は、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体である)を検出することによって、哺乳類対象における肝癌を診断及び治療する方法であって:

(a)該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと;

(b)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと;

(c)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体が検出される場

10

20

30

40

50

合に、対象を肝癌と診断するステップと；

(d) 診断された対象に肝癌治療を施すステップと

を含む前記方法。

【請求項 4 6】

哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の抗体(ここでは、該抗体は、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体である)を検出することを含む、抗肝癌治療に対する反応を予測する方法であって：

(a) 該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと；

(b) 腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと；

(c) 腫瘍マーカー抗原と検査試料中に存在する自己抗体との間の特異的結合の量を検出するステップと；

(d) 腫瘍マーカー抗原と自己抗体との間の特異的結合の量を、該結合の量と、起こる可能性が高い治療結果との間のあらかじめ立証された関係性と比較するステップと；

を含み、対照と比較した場合の該特異的結合の量の変化が、該患者が抗肝癌治療に反応することとなるかならないかということ予測する前記方法。

【請求項 4 7】

前記肝癌治療が、化学療法、ラジオ波焼灼療法、肝切除、肝移植、ワクチン接種、抗増殖因子又はシグナル伝達療法、内分泌療法、ヒト抗体療法、肝動脈化学塞栓療法、経皮的エタノール注入、マイクロ波アブレーション、ソラフェニブ投与、及び放射線塞栓療法からなる群から選択される、請求項45又は請求項46記載の方法。

【請求項 4 8】

2種以上の自己抗体が検出される、請求項44～47のいずれか1項記載の方法であって：

(a) 前記検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原、及び前記自己抗体の少なくとも1つに対して免疫学的に特異的な1種以上のさらなる腫瘍マーカー抗原を含む2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルと接触させるステップを含む前記方法。

【請求項 4 9】

前記パネルが、別々の抗原である2種以上の腫瘍マーカー抗原を含む、請求項48記載の方法。

【請求項 5 0】

前記パネルが、1種以上の別々の抗原の2種以上の抗原変異体を含む、請求項49記載の方法。

【請求項 5 1】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bを含む、請求項49記載の方法。

【請求項 5 2】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RaiA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SPP1、SSX2、及びTGF B1からなる群から選択される1種以上の腫瘍マーカー抗原を含む、請求項48～50のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5 3】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、RaiA、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、及びAIF1を含む、請求項52記載の方法。

【請求項 5 4】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、Ra1A、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、及びAIF1からなる、請求項53記載の方法。

【請求項 5 5】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、Ra1A、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2、及びAFPを含む、請求項52記載の方法。

【請求項 5 6】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、Ra1A、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2、及びAFPからなる、請求項55記載の方法。 10

【請求項 5 7】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、ビメンチン、HNRNP-L、及びトランスフェリンを含む、請求項52記載の方法。

【請求項 5 8】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、ビメンチン、HNRNP-L、及びトランスフェリンからなる、請求項57記載の方法。

【請求項 5 9】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、AIF1、EpCAM、HSPA4、及びCPS1を含む、請求項52記載の方法。 20

【請求項 6 0】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、AIF1、EpCAM、HSPA4、及びCPS1からなる、請求項59記載の方法。

【請求項 6 1】

前記対象が、女性である、請求項59又は請求項60記載の方法。

【請求項 6 2】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、EpCAM、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA2、HSPA4、及びHNRNP-Lを含む、請求項52記載の方法。

【請求項 6 3】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、EpCAM、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA2、HSPA4、及びHNRNP-Lからなる、請求項62記載の方法。 30

【請求項 6 4】

前記対象が、男性である、請求項62又は請求項63記載の方法。

【請求項 6 5】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、Ra1A、及びSOX2を含む、請求項52記載の方法。

【請求項 6 6】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、Ra1A、及びSOX2からなる、請求項65記載の方法。

【請求項 6 7】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、EpCAM、CAGE、SOX2、Ra1A、MAGE A4、DDX 3X、及びNY-ESO-1を含む、請求項52記載の方法。 40

【請求項 6 8】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、EpCAM、CAGE、SOX2、Ra1A、MAGE A4、DDX 3X、及びNY-ESO-1からなる、請求項67記載の方法。

【請求項 6 9】

前記対象が、男性である、請求項67又は請求項68記載の方法。

【請求項 7 0】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4、及びトランスフェリンを含む、請求項52記載の方法。 50

【請求項 7 1】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4、及びトランスフェリンからなる、請求項70記載の方法。

【請求項 7 2】

前記対象が、女性である、請求項70又は請求項71記載の方法。

【請求項 7 3】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RaiA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SPP1、SSX2、及びTGF B1を含む、請求項52記載の方法。 10

【請求項 7 4】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RaiA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SPP1、SSX2、及びTGFB1を含む、請求項73記載の方法。

【請求項 7 5】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RaiA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SPP1、SSX2、及びTGFB1からなる、請求項74記載の方法。 20

【請求項 7 6】

前記腫瘍マーカー抗原が、複数の異なる量で提供される、請求項48～75のいずれか1項記載の方法であって：

- (a) 検査試料を、複数の異なる量の腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと；
 - (b) 腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと；
 - (c) 腫瘍マーカー抗原と自己抗体との間の特異的結合の量を検出するステップと； 30
 - (d) ステップ(a)で使用された腫瘍マーカー抗原の量について、腫瘍マーカー抗原の量に対する特異的結合の量の曲線をプロット又は算出するステップと；
 - (e) 使用される腫瘍マーカー抗原のそれぞれの異なる量での腫瘍マーカー抗原と自己抗体との間の特異的結合の量に基づいて、抗体産生のプロファイルを構築する又は対象を肝癌と診断するステップと；任意選択で
 - (f) 診断された対象に肝癌治療を施すステップと
- を含む前記方法。

【請求項 7 7】

前記肝癌の有無が、使用される腫瘍マーカー抗原の量のすべてに対する特異的結合の量の集合的値に基づいて決定される、請求項76記載の方法。 40

【請求項 7 8】

前記対象が、ステップ(d)のプロットを用量反応曲線の存在についてスクリーニングすることによって、肝癌と診断される、請求項77記載の方法。

【請求項 7 9】

前記用量反応曲線が、概ねS字型又はシグモイド曲線である、請求項78記載の方法。

【請求項 8 0】

(d1) ステップ(d)においてプロット又は算出された曲線から、二次的曲線パラメータを算出するステップと

(e) 以下の組み合わせ：

(i) ステップ(c)において決定される、自己抗体と腫瘍マーカー抗原との間の特異的結合の 50

量;及び

(ii)ステップ(d1)において決定される二次的曲線パラメータ

に基づいて肝癌を診断するステップと

をさらに含む、請求項76～79のいずれか1項記載の方法。

【請求項81】

前記二次的曲線パラメータが、傾き、切片、AUC、SlopeMax、及び解離定数(Kd)からなる群から選択される、請求項80記載の方法。

【請求項82】

前記二次的曲線パラメータが、線形又は対数回帰曲線から算出される、請求項81記載の方法。

10

【請求項83】

前記二次的曲線パラメータが、ステップ(d)においてプロット又は算出された各曲線に適合させたロジスティック曲線の最大漸近線、最小漸近線、Hill Slope(又は傾き係数)、又は変曲点である、請求項80～82のいずれか1項記載の方法。

【請求項84】

前記腫瘍マーカー抗原が、天然に存在するタンパク質若しくはポリペプチド、組換えタンパク質若しくはポリペプチド、合成のタンパク質若しくはポリペプチド、合成のペプチド、ペプチド模倣体、多糖、又は核酸である、請求項1～83のいずれか1項記載の方法。

【請求項85】

前記肝癌が、肝細胞癌(HCC)である、請求項1及び3～75のいずれか1項記載の方法。

20

【請求項86】

前記体液が、血漿、血清、全血、尿、汗、リンパ、大便、脳脊髄液、腹水、胸水、精液、痰、乳頭吸引液、術後漿液腫、唾液、羊水、涙、及び創部ドレナージ液からなる群から選択される、請求項1～85のいずれか1項記載の方法。

【請求項87】

前記方法が、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中のαフェトプロテイン(AFP)、デス-γ-カルボキシプロトロンビン(DCP)、又はレクチン反応性αフェトプロテイン(AFP-L3)を検出することをさらに含む、請求項1～86のいずれか1項記載の方法。

【請求項88】

前記方法が、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中のαフェトプロテイン(AFP)を検出することを含む、請求項87記載の方法。

30

【請求項89】

前記腫瘍マーカータンパク質CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、Ral A、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、及びAIF1に対して免疫学的に特異的な自己抗体が、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中で検出される、請求項88記載の方法。

【請求項90】

前記腫瘍マーカータンパク質CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、Ral A、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2、及びAFPに対して免疫学的に特異的な自己抗体が、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中で検出される、請求項88記載の方法。

40

【請求項91】

前記体液が、血液である、請求項87～90のいずれか1項記載の方法。

【請求項92】

哺乳類対象からの体液を含む検査試料中のMMP9、AIF1、EpCAM、又はCDKN1Bに対して免疫学的に特異的な自己抗体を検出することによって哺乳類対象における肝癌を検出する方法であって:

(a)該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと;

(b)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定す

50

るステップと

を含み、前記複合体の存在が、肝癌の存在を示すものである前記方法における、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原の使用。

【請求項 9 3】

(a)1種以上の腫瘍マーカー抗原と；

(b)該腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体を検出することが可能な試薬と

を含む、請求項1～92のいずれか1項記載の方法を実施するのに適したキット。

【請求項 9 4】

(a)MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と；

(b)該腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体を検出することが可能な試薬と

を含む、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の自己抗体の検出のためのキット。

【請求項 9 5】

(c)前記腫瘍マーカー抗原を、哺乳類対象からの体液を含む検査試料と接触させるための手段

をさらに含む、請求項93又は請求項94記載の方法。

【請求項 9 6】

前記腫瘍マーカー抗原を、哺乳類対象からの体液を含む検査試料と接触させるための手段が、チップ、スライド、プレート、マイクロタイタープレートのウェル、ビーズ、膜、又はナノ粒子上に固定された腫瘍マーカー抗原を含む、請求項95記載のキット。

【請求項 9 7】

前記腫瘍マーカー抗原が、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネル内に存在する、請求項93～96のいずれか1項記載のキット

【請求項 9 8】

前記パネルが、別々の抗原である2種以上の腫瘍マーカー抗原を含む、請求項97記載のキット。

【請求項 9 9】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bを含む、請求項97又は請求項98記載のキット。

【請求項 1 0 0】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RaiA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SPP1、SSX2、及びTGF B1からなる群から選択される1種以上の腫瘍マーカー抗原を含む、請求項97～99のいずれか1項記載のキット。

【請求項 1 0 1】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、RaiA、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、及びAIF1を含む、請求項100記載のキット。

【請求項 1 0 2】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、RaiA、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、及びAIF1からなる、請求項101記載のキット。

【請求項 1 0 3】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、RaiA、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2、及びAFPを含む、請求項100記載のキット。

【請求項 1 0 4】

10

20

30

40

50

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、RaiA、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2、及びAFPからなる、請求項103記載のキット。

【請求項105】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、ビメンチン、HNRNP-L、及びトランスフェリンを含む、請求項100記載のキット。

【請求項106】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、ビメンチン、HNRNP-L、及びトランスフェリンからなる、請求項105記載のキット。

【請求項107】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、AIF1、EpCAM、HSPA4、及びCPS1を含む、請求項100記載のキット。

【請求項108】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、AIF1、EpCAM、HSPA4、及びCPS1からなる、請求項107記載のキット。

【請求項109】

前記対象が、女性である、請求項107又は請求項108記載のキット。

【請求項110】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、EpCAM、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA2、HSPA4、及びHNRNP-Lを含む、請求項100記載のキット。

【請求項111】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、EpCAM、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA2、HSPA4、及びHNRNP-Lからなる、請求項110記載のキット。

【請求項112】

前記対象が、男性である、請求項110又は請求項111記載のキット。

【請求項113】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RaiA、及びSOX2を含む、請求項100記載のキット。

【請求項114】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RaiA、及びSOX2からなる、請求項113記載のキット。

【請求項115】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、EpCAM、CAGE、SOX2、RaiA、MAGE A4、DDX3X、及びNY-ESO-1を含む、請求項100記載のキット。

【請求項116】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、EpCAM、CAGE、SOX2、RaiA、MAGE A4、DDX3X、及びNY-ESO-1からなる、請求項115記載のキット。

【請求項117】

前記対象が、男性である、請求項115又は請求項116記載のキット。

【請求項118】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4、及びトランスフェリンを含む、請求項100記載のキット。

【請求項119】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4、及びトランスフェリンからなる、請求項118記載のキット。

【請求項120】

前記対象が、女性である、請求項118又は請求項119記載のキット。

【請求項121】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X

10

20

30

40

50

、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SPP1、SSX2、及びTGF B1を含む、請求項100記載のキット。

【請求項 1 2 2】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SPP1、SSX2、及びTGFB1を含む、請求項121記載のキット。

【請求項 1 2 3】

前記2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルが、MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SPP1、SSX2、及びTGFB1からなる、請求項122記載のキット。

【請求項 1 2 4】

肝癌の検出のための、請求項93～123のいずれか1項記載のキット。

【請求項 1 2 5】

前記体液が、血漿、血清、全血、尿、汗、リンパ、大便、脳脊髄液、腹水、胸水、精液、痰、乳頭吸引液、術後漿液腫、唾液、羊水、涙、及び創部ドレナージ液からなる群から選択される、請求項93～124のいずれか1項記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、概して抗体検出の分野に関し、詳細には、患者体液を含む試料中の肝癌に関連する自己抗体の検出のためのアッセイに関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

多くの診断、予後、及び/又はモニタリングアッセイは、特定の病態又は疾患感受性の生物学的マーカーの検出に依存する。こうした生物学的マーカーは、一般に、特定の疾患に特有である又は疾患に対する感受性との関係があるタンパク質又はポリペプチドであり、しばしば、肝癌を含めた癌の検出のために使用される。

【0003】

肝癌、特に肝細胞癌(HCC)は、世界中で6番目に多い癌であるが、癌による死亡の2番目に多い原因である。高い死亡率は、(しばしば転移後の)遅い診断、及び既存の肝疾患によって引き起こされる。遅い診断は、初期症状、及び診断に使用するための準最適な画像化技術の少なさが原因である。

【0004】

血中 α フェトプロテイン(AFP)濃度の超音波スクリーニング及び評価が、現在、肝癌に対する最も広く使用されているスクリーニング手段である。しかし、その不十分な性能によって、肝癌のための改善された早期検出/スクリーニング検査に対する大きな隔たりが強調される。

【0005】

肝癌の存在について効率的にスクリーニングするための臨床的に有用な検査は、それが肝癌を早期に診断されるようにするであろうから、歓迎されるであろうことが明らかである。さらに、体液の試料、例えば血液試料に対して実施される診断検査は、他の技術に対して迅速かつ比較的に非侵襲性であり、スクリーニング参加率を増大させるであろう。初期段階の疾患検出は、それほど深刻ではない副作用を伴い、より広い範囲の治療の選択肢

10

20

30

40

50

を切り開く。中等度段階の肝臓のための現在の治療経路は、完全な肝移植を含み、初期段階疾患を有する患者の、より早期の特定は、臓器提供登録者に対する負担を和らげることとなる。

【0006】

肝臓の割合は、世界中で増大しているので、肝臓のための改善されたスクリーニング検査は、世界中で有用であろう。現在、中国は、すべてのHCC症例のおよそ50%を占めるのに対して、エジプトも、非常に高い割合のHCCを有する。これらの国々におけるHCCの高い有病率は、中国ではB型肝炎の高い発症率、エジプトではC型肝炎の高い有病率に、ある程度起因すると考えられている。B型肝炎及びC型肝炎は、肝硬変、非アルコール性脂肪性肝疾患、アルコール性肝疾患、ウィルソン病、遺伝性ヘモクロマトーシス、自己免疫性肝炎、確認されたアフラトキシン曝露(documented aflatoxin exposure)、住血吸虫症、及び糖尿病と共に、肝臓の公知の危険因子である。世界中でのこれらの状態の増大する有病率は、肝臓のための迅速かつ非侵襲性の検査が考案されることを避けられないものになっている。

【0007】

近年、抗体、特に自己抗体が、疾患又は疾患感受性の生物学的マーカーとして役立つことができることが明らかになっている。自己抗体は、個人の免疫系が、実際にはその抗原がその個人が起源であるとしても、異質と認識する抗原に誘導される、天然に存在する抗体である。自己抗体は、循環する遊離の自己抗体として、又はその標的タンパク質に結合した自己抗体からなる循環する免疫複合体の形態で、血液循環内に存在することができる。「正常な」細胞によって発現された野生型のタンパク質と、罹患した細胞によって又は疾患過程で産生された改変形態のタンパク質との間の違いは、場合によっては、個人の免疫系によって「非自己」と認識される改変されたタンパク質をもたらす、したがって、その個人における免疫応答を誘発する可能性がある。これは、改変されたタンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体の産生をもたらす、体液性(すなわちB細胞性)免疫応答であり得る。

【0008】

自己抗体産生に関する腫瘍マーカータンパク質の存在に対する個人の免疫応答を測定するアッセイは、体液中の腫瘍マーカータンパク質の直接的測定又は検出に代わるものを提供する。こうしたアッセイは、本質的に、腫瘍マーカータンパク質の存在の間接的検出を構成する。この免疫応答の性質は、自己抗体が、非常に少量の循環腫瘍マーカータンパク質によって誘発される可能性がある可能性が高いことを意味し、したがって、腫瘍マーカータンパク質に対する免疫応答を検出することに頼る間接的方法是、体液中の腫瘍マーカータンパク質レベルの直接的測定のための方法よりも高感度であることとなる。したがって、自己抗体の検出に基づくアッセイ方法は、疾患過程の早期に特に価値が高いものであり得る。

【0009】

本発明者らは、驚いたことに、以前は肝臓と関係があることが公知ではなかった4種の腫瘍マーカー抗原を決定した。1種以上の追加の腫瘍マーカー抗原と任意選択で組み合わせた、これらの腫瘍マーカー抗原のいずれか1種に誘導される自己抗体の検出を通して、本発明者らは、肝臓のための有効かつ非侵襲性のスクリーニング方法、及び対応するキットを考案した。

【発明の概要】

【0010】

本発明者らは、驚いたことに、腫瘍マーカータンパク質マトリックスメタロペプチダーゼ9(MMP9)、アログラフト炎症因子1(AIF1)、上皮細胞接着分子(EpCAM)、及びサイクリン依存性キナーゼ阻害因子1B(CDKN1B)のいずれか1つに対して免疫学的に特異的な自己抗体が、肝臓の存在を示すものであることを立証した。したがって、これらの腫瘍マーカータンパク質のいずれか1つに対して免疫学的に特異的な自己抗体の検出は、肝臓の診断のために使用することができる。

【0011】

本発明の第1の態様によれば、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の抗体(ここでは、該抗体は、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体である)を検出する方法であって:

- (a)該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと;
 - (b)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと
- を含む前記方法が提供される。

【0012】

この態様内では、対象は、肝癌を有する疑いがあることが好ましい。

【0013】

本発明の第2の態様によれば、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の抗体(ここでは、該抗体は、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体である)を検出することによって哺乳類対象における肝癌を検出する方法であって:

- (a)該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと;
 - (b)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと
- を含み、前記複合体の存在が、肝癌の存在を示すものである前記方法が提供される。

【0014】

本発明の第3の態様によれば、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の抗体(ここでは、該抗体は、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体である)を検出することによって哺乳類対象における肝癌を診断及び治療する方法であって:

- (a)該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと;
 - (b)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと;
 - (c)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体が検出される場合に、対象を肝癌と診断するステップと;
 - (d)診断された対象に肝癌治療を施すステップと
- を含む前記方法が提供される。

【0015】

本発明の第4の態様によれば、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の抗体(ここでは、該抗体は、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体である)を検出することを含む、抗肝癌治療に対する反応を予測する方法であって:

- (a)該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと;
 - (b)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと;
 - (c)腫瘍マーカー抗原と検査試料中に存在する自己抗体との間の特異的結合の量を検出するステップと;
 - (d)腫瘍マーカー抗原と自己抗体との間の特異的結合の量を、該結合の量と、起こる可能性が高い治療結果との間のあらかじめ立証された関係性と比較するステップと
- を含み、対照と比較した場合の該特異的結合の量の変化が、該患者が抗肝癌治療に反応することとなるかならないかということを予測する前記方法が提供される。

【0016】

本発明のこの態様内では、抗肝癌治療は、化学療法、ラジオ波焼灼療法、肝切除、肝移植、ワクチン接種、抗増殖因子又はシグナル伝達療法、内分泌療法、ヒト抗体療法、肝動脈化学塞栓療法(transcatheter arterial chemoembolization)、経皮的エタノール注入、マイクロ波アブレーション、ソラフェニブ投与、及び放射線塞栓療法からなる群から選択することができる。

【0017】

本発明の第5の態様によれば、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中のMMP9、AIF1、EpCAM、又はCDKN1Bに対して免疫学的に特異的な自己抗体を検出することによって哺乳類対象における肝癌を検出する方法であって：

(a)該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと；

(b)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと；

を含み、前記複合体の存在が、肝癌の存在を示すものである前記方法における、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原の使用が提供される。

【0018】

本発明の第6の態様によれば、

(a)MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と；

(b)この腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体を検出することが可能な試薬と

を含む、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の自己抗体の検出のためのキットが提供される。

【0019】

本発明の第7の態様によれば、哺乳類対象からの体液を含む検査試料における、肝癌を患う個人の抗体プロファイル(ここでは、該抗体は、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体である)を決定するインビトロ方法であって：

a)該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと；

b)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと

を含み、抗体産生のプロファイルを構築するために繰り返される前記方法が提供される。

【0020】

本発明のすべての態様では、哺乳類対象は、ヒトであることが好ましい。本明細書では、用語「哺乳類対象」及び「対象」は、哺乳類、好ましくはヒトである対象を指すために互換的に使用されることとなる。

【0021】

本発明のすべての態様では、この方法は、哺乳類対象から得られた又は調製された体液を含む検査試料に対してインビトロで行われることが好ましい。

【0022】

MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体を、肝癌に対するマーカーとして使用することができるという驚くべき発見により、肝癌を検出及び診断するために使用することができるこうした自己抗体の検出のための方法を、本発明者らが考案することが可能になった。こうした検出は、キットを使用して実施することができ、これらの方法及びキットは、本発明の核を成す。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】二次的曲線パラメータの導出を示すための図的表現を示す図である：図1A=傾き、

10

20

30

40

50

切片、曲線下面積(AUC)、及びSlopeMax;図1B=解離定数(Kd)。

【図2】自己抗体マイクロタイプレート配置示す図である:図2A=ハイスループットアッセイ(HTPA)配置;図2B=力価測定配置。

【発明を実施するための形態】

【0024】

(発明の詳細な説明)

本発明は、概して、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体を検出するためのイムノアッセイ方法を提供する。このイムノアッセイ方法は、肝癌を検出又は診断するために使用することができる。

【0025】

(自己抗体を検出する方法)

本発明の第1の態様によれば、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の抗体(ここでは、該抗体は、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体である)を検出する方法であって:

(a)該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと;

(b)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと

を含む前記方法が提供される。

【0026】

本明細書で使用される用語「自己抗体」とは、実際にはその個人に由来する抗原であっても個人の免疫系が異質と認識する抗原に誘導される、天然に存在する抗体をいう。一般に、自己抗体には、罹患した細胞によって又は疾患過程で産生される、改変形態の天然に存在するタンパク質に対して誘導される抗体が含まれる。改変形態のタンパク質は、個人において生じるが、個人の免疫系によって「非自己」とみなされる可能性があり、したがって、その個人において、改変されたタンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体の形態で免疫応答を誘発する。タンパク質のこうした改変形態には、例えば、改変されたアミノ酸配列を有する変異体(二次、三次、又は四次構造の変化を場合によっては伴う)、切断型、スプライスバリエント、改変されたグリコフォームなどが含まれ得る。他の実施態様では、自己抗体を、ある病態において又は遺伝子増幅又は異常な転写調節の結果として過剰発現されるタンパク質に誘導させることができる。免疫系の細胞によって通常は起こらない、かなりの量のタンパク質の過剰発現は、自己抗体産生をもたらす免疫応答を誘発することができる。さらなる実施態様では、自己抗体を、ある病態において発現されるようになる胎児型のタンパク質に誘導させることができる。通常は発生の初期段階でしか発現されない胎児タンパク質が、免疫系が機能性となる前に、ある病態において発現されるようになるならば、十分に発達したヒトにおいてある病態において発現されるその胎児型は、免疫系によって「異質」と認識され、自己抗体産生をもたらす免疫応答を誘発することができる。いっそうさらなる実施態様では、自己抗体を、ある病態における異なる位置で発現されるタンパク質に対して誘導することができる。例えば、このタンパク質は、健康な個人では体内部位に発現するが、ある病態においては表面の露出した位置に発現し、その結果、このタンパク質は、その病態では循環、したがって、免疫系に曝露されるが健康な個人では曝露されない。本明細書では、自己抗体が誘導されるタンパク質を、「腫瘍マーカータンパク質」ということとする。

【0027】

本発明の範囲内では、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bのいずれか1つに対して免疫学的に特異的な自己抗体を検出することができることが意図される。本発明はまた、これらの腫瘍マーカータンパク質の3番目に対して免疫学的に特異的である自己抗体の検出、及びさらに任意選択でこれらの腫瘍マーカータンパク質の4番目に対して免疫学的に特異的である自己抗体の検出と任意選択で組み合わせた、これらの腫瘍マーカータンパク質のうち

10

20

30

40

50

の1つに対して免疫学的に特異的である自己抗体、及びこれらの腫瘍マーカータンパク質の2番目に対して免疫学的に特異的である自己抗体の検出を意図する。しかし、本発明は、これに関して少しも限定されない。2又は3種の特定された腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的である自己抗体が検出される場合、2又は3種の腫瘍マーカータンパク質のすべての組み合わせが意図される。

【0028】

本発明の状況では、用語「抗原」は、検査試料中に存在する自己抗体と複合体形成する免疫特異的な試薬をいうために使用される。抗原は、検出することが所望される標的自己抗体と特異的に相互作用することが可能な少なくとも1つの抗原決定基又はエピトープを含む物質、又は前記自己抗体の可変領域若しくは相補性決定領域と特異的に相互作用するあらゆる捕捉剤である。抗原は、典型的には、例えば、タンパク質若しくはペプチド、多糖、又は核酸などの、天然に存在する又は合成の生体高分子であることとなり、抗イディオタイプ抗体などの抗体又はその断片が含まれ得る。「腫瘍マーカー抗原」は、癌、特に、この文脈では肝癌を有する対象において増加する抗原である。本明細書では、用語「腫瘍マーカー抗原」と「抗原」は、互換的に使用されることとなる。

【0029】

本明細書で使用する場合、用語「体液」には、本発明の方法を使用して自己抗体の存在について検査されることとなる材料をいう場合、特に、血漿、血清、全血、尿、汗、リンパ、大便、脳脊髄液、腹水、胸水、精液、痰、乳頭吸引液、術後漿液腫、唾液、羊水、涙、又は創部ドレナージ液が含まれる。前述の通り、本発明の方法は、被験対象から取り出した体液を含む検査試料に対してインビトロで行われることが好ましい。使用される体液の種類は、検査されることとなる自己抗体のアイデンティティ、及びアッセイが使用される臨床的状况に応じて変動し得る。一般に、血清又は血漿の試料に対してアッセイを実施することが好ましい。検査試料は、体液に加えて、例えば希釈剤、保存剤、安定化剤、緩衝液などの、さらなる構成成分を含むことができる。

【0030】

ある種の実施態様では、本発明の方法は、

(c)腫瘍マーカー抗原と検査試料中に存在する自己抗体との間の特異的結合の量を検出するステップ

(ここでは、自己抗体の有無は、観察される特異的結合の量と、あらかじめ決定されたカットオフ値との比較に基づく)

をさらに含むことができる。この実施態様内では、腫瘍マーカー抗原と検査試料中に存在する自己抗体との間の特異的結合の量は、結合の相対量又は結合の絶対量であり得る。

【0031】

本明細書では、腫瘍マーカー抗原と検査試料中に存在する自己抗体との間の特異的結合の量が、あらかじめ決定されたカットオフよりも大きい又は小さいならば、自己抗体は存在するとみなすことができる。しかし、一般に、自己抗体は、腫瘍マーカー抗原と検査試料中に存在する自己抗体との間の特異的結合の量が、あらかじめ決定されたカットオフよりも大きいならば、存在するとみなされる。あらかじめ決定されたカットオフは、症例対照研究において、陰性と分かっている試料(例えば正常な個人)に対して対照アッセイを実施することによって決定することができる。これらの「正常な」個人は、好ましくは、臨床的、画像的、及び/又は生化学的基準に基づいて肝癌の診断をまったく有しない同年齢の対照であることとなる。ある種の実施態様では、陰性と分かっている試料は、良性肝疾患を有する個人、すなわち肝癌のリスクが高いが肝癌のエビデンスはまったく示されていない個人から得ることができる。好ましくは、正常な個人は、いかなる癌の診断もまったく有しない。本明細書では、腫瘍マーカー抗原と、正常な患者からの検査試料中に存在する自己抗体との間の特異的結合の量を検出して平均し、あらかじめ決定されたカットオフを提供する。ある種の実施態様では、あらかじめ決定されたカットオフは、90%を超える特異度を保つ、最大のYoudenの値を与えるカットオフ値を選択することによって決定することができる。

【0032】

本発明者らは、驚いたことに、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bのいずれか1つに対して免疫学的に特異的な自己抗体が、肝臓と関係があることを発見した。したがって、ある種の実施態様では、対象は、肝臓を有する疑いがある可能性がある。対象が肝臓を有する可能性があることを疑うあらゆる理由が意図される。

【0033】

本発明のすべての態様内では、肝臓は、肝細胞癌(HCC)であり得る。

【0034】

ある種の実施態様では、哺乳類対象は、肝臓検診において以前に検査で陽性と示されているので、肝臓を有する疑いがある可能性がある。ここでは、あらゆる肝臓検診が意図される。ある種の実施態様では、対象は、 α フェトプロテイン(AFP)について以前に検査で陽性と示されている可能性がある。一般に、AFP濃度は、対象から採取された血液試料において検出されるので、対象は、血液試料においてAFPについて以前に検査で陽性と示されている可能性がある。しかし、あらゆるAFP検出技術が意図される。代替実施態様では、対象は、デス- γ -カルボキシプロトロンビン(DCP)又はレクチン反応性 α フェトプロテイン(AFP-L3)について以前に検査で陽性と示されている可能性がある。一般に、DCP及びAFP-L3濃度は、対象から採取された血液試料において検出されるので、対象は、血液試料においてDCP又はAFP-L3について以前に検査で陽性と示されている可能性がある。しかし、あらゆるDCP又はAFP-L3検出技術が意図される。

【0035】

他の実施態様では、対象は、超音波サーベイランス又は任意の他の画像化方法を使用して、肝臓について検査で陽性と示されている可能性がある。

【0036】

本発明の範囲内では、対象は、本発明の方法の実施の前のいずれかの時点で、肝臓検診において検査で陽性と示されている可能性がある。例えば、肝臓検診は、本発明の方法の実施の1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、24時間、2日、3日、4日、5日、6日、1週、2週、3週、4週、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、又はそれ以上前に実施されている可能性がある。

【0037】

本発明の目的では、肝臓の治療を受けている、又は肝臓の治療を以前に受けていた対象は、依然として「肝臓を有する疑いがある」とみなされる可能性がある。本明細書では、肝臓の治療は、いずれかの時点で実施されている可能性があり、対象は、その後、肝臓の存在について検査されている可能性もされていない可能性もある。

【0038】

対象は、肝臓の公知の危険因子の存在に起因して、肝臓を有する疑いがある可能性がある。ある種の実施態様では、対象は、肝硬変、非アルコール性脂肪性肝疾患、アルコール性肝疾患、ウィルソン病、遺伝性ヘモクロマトーシス、自己免疫性肝炎、B型肝炎、C型肝炎、確認されたアフラトキシン曝露、住血吸虫症、又は糖尿病を有する可能性がある。これらの危険因子を決定するあらゆる方法が意図され、対象は、危険因子に関連する治療を受けている又は受けていた可能性も受けていない又は受けていなかった可能性もある。

【0039】

本発明者らは、驚いたことに、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bに対して免疫学的に特異的な自己抗体が、肝臓と関係があることを確認したので、これらの腫瘍マーカータンパク質のいずれか1つに対して免疫学的に特異的な自己抗体の、検査試料における検出を、肝臓を検出する方法において使用することができる。したがって、一態様では、本発明は、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の抗体(ここでは、該抗体は、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体である)を検出することによって哺乳類対象における肝臓を検出する方法であって：

(a)該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと；

(b)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと；

を含み、前記複合体の存在が、肝癌の存在を示すものである前記方法を提供する。

【0040】

その最も広い態様では、本発明は、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bのいずれか1つに対して免疫学的に特異的な自己抗体を検出するための方法に関し、肝癌の診断又はあらゆるその後の治療に限定されない。しかし、一態様では、本発明は、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の抗体(ここでは、該抗体は、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体である)を検出することによって、哺乳類対象における肝癌を診断及び治療する方法であって：

(a)該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと；

(b)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと；

(c)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体が検出される場合に、対象を肝癌と診断するステップと；

(d)診断された対象に肝癌治療を施すステップと

を含む前記方法を提供する。

【0041】

この態様内では、腫瘍マーカー抗原と検査試料中に存在する自己抗体との間の特異的結合の量が、先に説明した通り、あらかじめ決定されたカットオフよりも大きい又は小さいならば、自己抗体は存在するとみなすことができる。

【0042】

本発明の範囲内では、肝癌の診断後のいずれかの時点で、肝癌治療が施される可能性がある。例えば、肝癌治療は、肝癌の診断の1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、24時間、2日、3日、4日、5日、6日、1週、2週、3週、4週、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、1年後、又はそれ以上後に施される可能性がある。一巡の治療の間のいずれかの間隔を伴う肝癌治療の複数回施与も意図される。

【0043】

肝癌診断が実施された地理的位置とは異なる地理的位置での肝癌治療の施与が意図される。さらに、肝癌治療は、診断及び治療が同じ地理的位置で実施されるか異なる地理的位置で実施されるにかかわらず、診断を実施する人物と異なる人物によって施すことができる。

【0044】

一態様では、本発明の自己抗体検出方法は、治療層別化のために、すなわちある特定の患者又は患者のグループが、ある特定の抗肝癌治療に反応する可能性が高いか低いかを決定するために使用することができる。例えば、本発明の自己抗体検出方法は、対象の抗肝癌治療に対する反応を予測するために使用することができる。

【0045】

したがって、本発明は、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の抗体(ここでは、該抗体は、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体である)を検出することを含む、抗肝癌治療に対する反応を予測する方法であって：

(a)該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと；

(b)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと；

(c)腫瘍マーカー抗原と検査試料中に存在する自己抗体との間の特異的結合の量を検出するステップと;

(d)腫瘍マーカー抗原と自己抗体との間の特異的結合の量を、該結合の量と、起こる可能性が高い治療結果との間のあらかじめ立証された関係性と比較するステップとを含み、対照と比較した場合の該特異的結合の量の変化が、該患者が抗肝癌治療に反応することとなるかならないかということを予測する前記方法を提供する。

【0046】

本明細書では、対照は、肝癌を有することが分かっている、かつ検査される抗肝癌治療に反応しないことが分かっている、すなわち非反応対照となる対象に由来する体液の試料であることが好ましい。

【0047】

本発明は、何らかの特定の肝癌治療に少しも限定されないことに留意すべきである。ある種の実施態様では、肝癌治療は、化学療法、ラジオ波焼灼療法、肝切除、肝移植、ワクチン接種、抗増殖因子又はシグナル伝達療法、内分泌療法、ヒト抗体療法、肝動脈化学塞栓療法、経皮的エタノール注入、マイクロ波アブレーション、ソラフェニブ投与、及び放射線塞栓療法からなる群から選択することができる。

【0048】

先に記載した本発明の態様は、通常は1回、実施されることとなる。しかし、インビトロイムノアッセイは、非侵襲性であり、「リスクがある」個人のスクリーニングの場合のように肝癌の発症の前に、又は疾患の過程全体を通して、患者における自己抗体産生のプロファイルを構築するために必要であると考えられる回数、繰り返すことができる。

【0049】

したがって、本発明は、哺乳類対象からの体液を含む検査試料における、肝癌を患う個人の抗体プロファイル(ここでは、該抗体は、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体である)を決定するインビトロ方法であって:

a)該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと;

b)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと

を含み、抗体産生のプロファイルを構築するために繰り返される前記方法を提供する。

【0050】

(2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネル)

本発明のある種の実施態様では、この方法は、2種以上の自己抗体を検出することができる。例えば、この方法は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38種、又はそれ以上の自己抗体を検出することができる。本発明の核心によれば、これらの自己抗体の1つは、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的である。

【0051】

これらの実施態様内では、この方法は、

(a)検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原、及び前記自己抗体の少なくとも1つに対して免疫学的に特異的な1種以上のさらなる腫瘍マーカー抗原を含む2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルと接触させるステップを含む。

【0052】

これらの方法は、以下、「パネルアッセイ」ということができる。こうしたアッセイは、一般に、単一の腫瘍マーカー抗原に対する自己抗体の検出よりも高感度であり、偽陰性の結果の頻度のはるかに小さくなる(その内容が参照により本明細書に組み込まれるWO 99/58978、WO 2004/044590、及びWO2006/126008を参照のこと)。

10

20

30

40

50

【0053】

アッセイの感度が、複数の自己抗体の存在について検査することによって高められることとなるのが一般に受け入れられている。したがって、いくつかの実施態様では、本発明の方法は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38種、又はそれ以上の腫瘍マーカー抗原などの、複数の腫瘍マーカー抗原を含むパネルの使用を意図する。

【0054】

このパネル実施態様を、自己抗体を検出する方法、肝癌を検出する方法、肝癌を診断及び治療する方法、抗肝癌治療に対する反応を予測する方法、及び抗体プロファイルを決定する方法を含めた、本発明の全ての方法と共に使用できることに留意すべきである。

10

【0055】

ある種の実施態様では、パネルは、別々の抗原である2種以上の腫瘍マーカー抗原を含むことができる。本明細書では、用語「別々の抗原」は、異なるタンパク質又はポリペプチドに由来する抗原(異なる遺伝子によってコードされる関連性のないタンパク質に由来する抗原など)を包含する。

【0056】

本発明はまた、1種以上の別々の抗原の2種以上の抗原変異体を含むパネルを利用する方法も意図する。用語「抗原変異体」は、本明細書では、単一の抗原、例えば先に定義した通りの単一のタンパク質抗原の、対立遺伝子又は他の変異体をいうために使用される。抗原変異体は、一般に、単一の遺伝子に由来することとなり、異なる抗原変異体は、異なるメンバーの集団において、又は異なる病態において発現される可能性がある。抗原変異体は、アミノ酸配列によって、又はグリコシル化、リン酸化、又はアセチル化などの翻訳後修飾によって異なる可能性がある。さらに、用語「抗原変異体」は、アミノ酸置換、付加、又は欠失などの抗原変異を包含する。一般に、抗原変異体は、野生型の抗原に対して、5個未満(例えば4個未満、3個未満、2個未満、又は1個未満)の変異を含有することとなる。

20

【0057】

パネル実施態様内では、「1種以上のさらなる腫瘍マーカー抗原」は、以下にさらに論じる通り、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体以外の自己抗体に対して免疫学的に特異的であることが好ましい。しかし、本発明は、これに関して少しも限定されないが、本発明は、これらの4種の腫瘍マーカータンパク質の3番目に対して免疫学的に特異的である自己抗体の検出、及びさらに任意選択でこれらの4種の腫瘍マーカータンパク質の4番目に対して免疫学的に特異的である自己抗体の検出と任意選択で組み合わせた、これらの4種の腫瘍マーカータンパク質のうちの1つに対して免疫学的に特異的である自己抗体、及びこれらの4種の腫瘍マーカータンパク質の2番目に対して免疫学的に特異的である自己抗体の検出を確かに意図する。

30

【0058】

2又は3種の特定された腫瘍マーカータンパク質に対して免疫学的に特異的な自己抗体が検出される場合、2又は3種の腫瘍マーカータンパク質のすべての組み合わせが意図される。したがって、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される、2、3、又は4種の腫瘍マーカー抗原を含むことができる。ある種の具体的実施態様では、パネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bを含むことができる。さらなる具体的実施態様では、パネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bで構成され得る。

40

【0059】

一実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、NY-ESO-1、ビメンチン、HSP A4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、Ra1A、GBU4-5、サイクリンB1、AFP、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD4

50

4、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SPP1、S
SX2、及びTGFB1からなる群から選択される1種以上の腫瘍マーカー抗原を含むことができ
る。この実施態様内では、パネルは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14
、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、又
は34種の列挙された腫瘍マーカー抗原を含むことができる。本発明によれば、パネルはま
た、MMP9、AIF1、EpCAM、又はCDKN1Bを含むこととなり、これらの腫瘍マーカー抗原の1、
2、3、又は4種を含むことができる。これらの腫瘍マーカー抗原の2又は3種がパネルに含
まれる実施態様では、2又は3種のこれらの抗原のすべての組み合わせが意図される。具
体的実施態様では、パネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bを含むことができる。

【0060】

10

一実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO
-1、HSPA4、ビメンチン、HNRNP-L、及びトランスフェリンを含むことができる。別の実施
態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA
4、ビメンチン、HNRNP-L、及びトランスフェリンで構成され得る。

【0061】

別の実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、AIF1、EpCAM、HSPA4、及
びCPS1を含むことができる。別の実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは
、AIF1、EpCAM、HSPA4、及びCPS1で構成され得る。

【0062】

さらなる実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、EpCAM、NY-ESO-1、ビ
メンチン、HSPA2、HSPA4、及びHNRNP-Lを含むことができる。別の実施態様では、2種以上
の腫瘍マーカー抗原のパネルは、EpCAM、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA2、HSPA4、及びHNR
NP-Lで構成され得る。

20

【0063】

いっそうさらなる実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、MMP9、AIF1
、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA、及びSOX2を含むことができ
る。別の実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3
X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA、及びSOX2で構成され得る。

【0064】

いっそうさらなる実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、EpCAM、CAGE
、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X、及びNY-ESO-1を含むことができる。別の実施態様では、
2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X、及
びNY-ESO-1で構成され得る。

30

【0065】

いっそうさらなる実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、AIF1、CAGE
、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4、及びトランスフェリンを含むことができる。別の実施態
様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSP
A4、及びトランスフェリンで構成され得る。

【0066】

ある種の具体的実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、対象の性別、
すなわち対象が男性であるか女性であるかということに応じて異なる可能性がある。この
実施態様内では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、対象が女性である場合、AIF1
、EpCAM、HSPA4、及びCPS1、又はAIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4、及びトラン
スフェリンを含む又はこれらで構成され得る。さらにこの実施態様内では、2種以上の腫
瘍マーカー抗原のパネルは、対象が男性である場合、EpCAM、NY-ESO-1、ビメンチン、HSP
A2、HSPA4、及びHNRNP-L、又はEpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X、及びNY-ESO-
1を含む又はこれらで構成され得る。

40

【0067】

具体的実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、NY-ESO-1、ビメンチン
、HSPA4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、N

50

PM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RaiA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SP P1、SSX2、及びTGFB1を含むことができる。本発明によれば、このパネルはまた、MMP9、AIF1、EpCAM、又はCDKN1Bを含むこととなり、これらの腫瘍マーカー抗原の1、2、3、又は4種を含むことができる。これらの腫瘍マーカー抗原の2又は3種がパネルに含まれる実施態様では、2又は3種のこれらの抗原のすべての組み合わせが意図される。

【0068】

具体的実施態様では、パネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bを含むことができる。例えば、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RaiA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SPP1、SSX2、及びTGFB1を含むことができる。

10

【0069】

具体的実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RaiA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SPP1、SSX2、及びTGFB1で構成され得る。

【0070】

20

具体的実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、RaiA、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、及びAIF1を含むことができる。別の実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、RaiA、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、及びAIF1で構成され得る。

【0071】

具体的実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、RaiA、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2、及びAFPを含むことができる。別の実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、RaiA、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2、及びAFPで構成され得る。

30

【0072】

(追加のスクリーニングステップ)

本発明のある種の実施態様では、本発明の方法は、肝臓と関係がある追加のマーカーについてスクリーニングすることをさらに含むことができる。この実施態様内では、肝臓と関係があることが公知であるあらゆるマーカーについてスクリーニングするあらゆる方法が意図される。

【0073】

例えば、この方法は、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の α フェトプロテイン(AFP)、デス- γ -カルボキシプロトロンビン(DCP)、又はレクチン反応性 α フェトプロテイン(AFP-L3)を検出することをさらに含むことができる。好ましくは、体液は、血液である。この方法が哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の α フェトプロテイン(AFP)を検出することをさらに含む実施態様では、体液は、血液であることが好ましく、陽性を評価するために200ng/mlのカットオフが適用されることが好ましい。

40

【0074】

(抗原力価測定)

WO2006/126008(その内容を参照により本明細書に組み込む)では、疾患の生物学的マーカーとしての自己抗体の検出に基づくアッセイの性能、より具体的には臨床的有用性及び信頼性を、抗原力価測定ステップを含めることによって劇的に改善することができることが確認された。一連の異なる量の抗原に対する自己抗体を含有する疑いがある試料を検査

50

し、力価測定曲線を作成することによって、試料中に存在する自己抗体の絶対量とは無関係に、真陽性スクリーニング結果を確実に明らかにすることが可能である。W02006/126008の抗原力価測定方法は、単一の抗原濃度での自己抗体の反応性を測定すること、又は抗原ではなく血清試料が力価測定される方法よりも高い特異度及び感度を提供する。

【0075】

したがって、ある種の実施態様では、本発明は、腫瘍マーカー抗原が、複数の異なる量で提供される方法であって：

- (a) 検査試料を、複数の異なる量の腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと；
- (b) 腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと；
- (c) 腫瘍マーカー抗原と自己抗体との間の特異的結合の量を検出するステップと；
- (d) ステップ(a)で使用された腫瘍マーカー抗原のそれぞれの量について、腫瘍マーカー抗原の量に対する特異的結合の量の曲線をプロット又は算出するステップと；
- (e) 使用される腫瘍マーカー抗原のそれぞれの異なる量での腫瘍マーカー抗原と自己抗体との間の特異的結合の量に基づいて、自己抗体の有無を決定するステップとを含む前記方法を意図する。

【0076】

実際には、異なる量の腫瘍マーカー抗原は、一般に、利用される腫瘍マーカー抗原の濃度を変えることによって提供されることがとなる。したがって、用語「異なる量」及び「異なる濃度」は、互換的に使用することができる。しかし、本発明の範囲内では、腫瘍マーカー抗原の量を変える、あらゆる方法が意図される。当業者は、本発明の方法では、標的自己抗体への結合に利用可能な抗原決定基又はエピトープの量が、力価測定系列(すなわち、異なる量で提供される抗原のセット)を確立することによって重要であることを認識するであろう。多くのアッセイ形式では、結合に利用可能な抗原決定基又はエピトープの量は、存在する抗原分子の量と直接的に相関する。しかし、ある種の固相アッセイ系などの他の実施態様では、曝露される抗原決定基又はエピトープの量は、抗原の量と直接的に相関しない可能性があるが、固体表面への付着及び立体構造の存在などの他の要因に依存する可能性がある。これらの実施態様では、力価測定系列における「異なる量の抗原」への本明細書での言及は、異なる量の抗原決定基又はエピトープを指すために用いることができる。特定の実施態様では、抗原の量の変動は、試料がそれに対して検査される抗原又はエピトープ密度を変化させることによって、又は、抗原又はエピトープ密度を維持するが抗原がそれに対して固定される表面積を増大させることによって、又はこれらの両方によって達成することができる。

【0077】

この実施態様内では、「抗原のセット」とは、本発明の方法において異なる量で検査されることとなる単一の抗原をいう。

【0078】

複数の抗原が意図される実施態様では、「別々の抗原のセット」とは、各抗原が、先に定義した通りの異なるタンパク質又はポリペプチドに由来する「別々の抗原」(異なる遺伝子によってコードされる関連性のないタンパク質に由来する抗原など)である、本発明の方法において異なる量で検査されることとなる単一の抗原をいう。所与のマイクロアレイは、異なるタンパク質又はポリペプチドに由来する別々の抗原のセットのみ、又は単一のタンパク質又はポリペプチドの異なるペプチドエピトープに由来する別々の抗原のセットのみ、又は任意の割合の2つの混合物を含むことができる。本発明のあらゆる実施態様における異なる量のそれぞれ個々の抗原のセットは、一般に、その混合物ではなく1種だけの抗原を含むこととなることに留意するべきである。

【0079】

抗原変異体のセットとは、本発明の方法において異なる量で検査されることとなる単一の抗原変異体をいう。

【0080】

ある種の実施態様では、自己抗体の有無を、使用される腫瘍マーカー抗原の量のすべてに対する特異的結合の量の集合的値に基づいて決定することができる。本発明の方法の間、自己抗体と抗原との間の特異的結合の相対又は絶対量が、検査されるそれぞれの異なる量の抗原(抗原決定基又はエピトープ)に対して決定され、検査されるそれぞれの量の抗原についての抗原の量に対する特異的結合の(相対的又は絶対的)量の曲線をプロット又は算出するために使用される。アッセイに使用される抗原と反応性のある自己抗体の、検査試料中の存在は、各抗原量で観察される特異的結合の量に基づいて決定され、一般に、典型的にはS字型又はシグモイドである用量反応曲線によって示される。したがって、ある種の実施態様では、自己抗体の有無は、一般にS字型又はシグモイド曲線などの用量反応曲線が存在するかどうか、プロットをスクリーニングすることによって決定される。検査される異なる量の抗原に対する検出可能な結合の変動が存在しないならば、これは、検出可能な量の自己抗体の非存在として記録することができる。

10

【0081】

一実施態様では、自己抗体の有無は、自己抗体と抗原との間の特異的結合の量と、あらかじめ決定されたカットオフ値との比較によって決定される。ここでは、力価測定系列において使用されるそれぞれの量の抗原についての抗原の量に対する特異的結合の量の曲線がプロットされ、陽性と分かっている試料(例えば、疾患を有する患者の集団)における結合のレベルが、症例対照研究において、陰性と分かっている試料(例えば、正常な個人)において観察される結合のレベルと比較される。高い特異度(ほんのわずかな偽陽性)を保ちつつ感度を最大にする(ほんのわずかな偽陰性)、力価測定曲線上の1以上の点での自己抗体結合に対するカットオフ値が選択される。力価測定系列において使用されるそれぞれの量の抗原についての抗原の量に対する特異的結合の量の曲線が用量反応曲線であるとする

20

【0082】

この抗原力価測定実施態様は、自己抗体を検出する方法、肝癌を検出する方法、肝癌を診断及び治療する方法、抗肝癌治療に対する反応を予測する方法、及び抗体プロフィールを決定する方法を含めた、本発明の全ての方法と共に使用できることに留意するべきである。さらに、抗原力価測定は、単一の自己抗体のみが検出される実施態様において、また、複数の自己抗体を検出するために抗原のパネルが使用される実施態様において使用することができる。

30

【0083】

(ダブルカットオフ)

アッセイの感度が、複数の抗原に対する自己抗体を測定することによって高められることとなるのが一般に受け入れられている。しかし、この感度の向上は、通常、特異度の比例的増大と関係があるので、アッセイ方法の使用可能な抗原の数は限られている可能性がある。ある種の実施態様では、本発明の方法は、陽性として分類されるこれらの測定基準の両方について、カットオフ点と比較した場合に陽性とみなされる検査結果のみを用いて自己抗体と抗原との間の特異的結合のレベルを決定する抗原力価測定方法、及び二次的曲線パラメータの評価を使用することによって、特異度の低下を埋め合わせることができる。この方法は、本明細書では、「ダブルカットオフ」方法ということとし、W02015/193678(その内容を参照により本明細書に組み込む)に完全に記載されている。

40

【0084】

ある種の実施態様では、本発明の方法は、
(d1) ステップ(c)においてプロット又は算出された曲線から、二次的曲線パラメータを算出するステップと;
(e) 以下の組み合わせ:

50

(i) ステップ(b)において決定される、自己抗体と腫瘍マーカー抗原との間の特異的結合の量;及び

(ii) ステップ(d1)において決定される二次的曲線パラメータに基づいて自己抗体の有無を決定するステップとをさらに含む。

【0085】

ダブルカットオフ方法は、先に記載した抗原力価測定方法論を利用する。力価測定系列において使用されるそれぞれの量の抗原での抗原/自己抗体結合の量の検出、及び力価測定系列において使用されるそれぞれの量の抗原についての抗原の量に対する特異的結合の量の曲線のプロット後、二次的曲線パラメータが算出される。二次的曲線パラメータは、線形又は対数回帰曲線から算出することができる。本明細書では、二次的曲線パラメータは、曲線の性質を示す、あらゆる算出された値である。例えば、二次的曲線パラメータは、傾き、切片、AUC、SlopeMax、又は解離定数(Kd)であり得る。これらの二次的曲線パラメータを、図1に例示する。

10

【0086】

傾きは、式:

【数1】

$$b = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2}$$

20

を使用して算出される。式中、bは傾きであり、xは抗原濃度(nM)を指し、yは吸光度単位(AU)でのOD値を指す。

【0087】

傾きは、各試料について、線形又は対数回帰曲線から、又は線形と対数回帰曲線の両方から算出することができる。

【0088】

回帰直線の切片は、x=0である場合のy軸での線の値である。

【0089】

切片は、各試料について、線形又は対数回帰曲線から、又は線形と対数回帰曲線の両方から算出することができる。

30

【0090】

AUCは、式:

【数2】

$$\int_a^b f(x) dx \approx (b - a) \left[\frac{f(a) + f(b)}{2} \right]$$

に従って、各セットの抗原濃度の間の定積分を推定することによって実現することができる。積算型の台形公式を使用して算出することができる。この計算は、連続する抗原濃度の各対について繰り返され、得られた値を合計して、AUCについての値の総量を与える。

40

【0091】

AUCは、各試料について、線形又は対数回帰曲線から、又は線形と対数回帰曲線の両方から算出することができる。

【0092】

SlopeMaxは、先に論じた、傾きと同じ式を使用して算出することができる。しかし、各試料についての傾きについて、可能性のある最も大きな値を求めるために、傾き値は、連続する抗原濃度の各対に対して得られ、最大の大きさの傾き値が、SlopeMaxに相当する。

【0093】

50

SlopeMaxは、各試料について、線形又は対数回帰曲線から、又は線形と対数回帰曲線の両方から算出することができる。

【0094】

解離定数(Kd)は、4パラメータロジスティック曲線を各セットの力価測定点に適合させることによって算出することができ、式 $F(x) = ((A-D)/(1+((x/C)^B))) + D$ (残差平方和は最小限にされる)を使用して最小漸近線(A)、傾き係数(B)、変曲点(C)、及び最大漸近線(D)パラメータについての値を与えるために反復解法が使用される。この解析されたデータについての変曲点が、抗原/自己抗体結合のKdに相当する。

【0095】

ある種の実施態様では、二次的曲線パラメータは、4パラメータロジスティック曲線などのロジスティック曲線を、力価測定系列において使用される各量の抗原に対する、抗原の量に対する特異的結合の量の曲線に適合させることによって決定することができる。この実施態様では、二次的曲線パラメータは、最大漸近線、最小漸近線、Hill Slope(若しくは傾き係数)、又は変曲点であり得る。

【0096】

4パラメータロジスティック(4PL)曲線は、式:

$$F(x) = ((A-D)/(1+((x/C)^B))) + D$$

によって定義される曲線であり、

式中、A=最小漸近線、B=Hill Slope(又は傾き係数)、C=変曲点、及びD=最大漸近線である。

【0097】

この実施態様において二次的曲線パラメータを決定するために、反復解法関数を使用して、各試料及び抗原について、4PL曲線が算出される。ここでは、4パラメータは、次の制約を伴って、それぞれに対する予想される値に近い値に設定される:最小漸近線の値は0に固定され、Hill Slopeの値は正の値に限定され、変曲点は1000という最大値に制限される。

【0098】

次いで、力価測定曲線の各点と、4PL曲線上の対応する点(式 $F(x) = ((A-D)/(1+((x/C)^B))) + D$ によって戻される)との間の差を算出し、その差を2乗し、2乗したすべての差の値を合計することができる。

【0099】

次いで、4つの二次的曲線パラメータのために使用した値を調整し、2乗した平均の合計がゼロにできるだけ近づくまで、反復方式で繰り返し算出する。反復解法は、Microsoft ExcelのSOLVER機能を使用して実施することができる。

【0100】

二次的曲線パラメータが得られたら、自己抗体の有無を決定するために、これを、抗原/自己抗体結合データと組み合わせることとなる。ここでは、自己抗体と抗原との間の特異的結合の量が、先に記載した通りのあらかじめ決定されたカットオフ値と比較されることとなる。

【0101】

二次的曲線パラメータについてのカットオフは、陽性と分かっている試料(例えば、疾患を有する患者のコホートからなる一連の症例対照試料セット)及び陰性と分かっている試料(例えば、症例対照研究における正常な個人のコホート)を使用して決定される。各試料について、力価測定系列において使用されるそれぞれの量の抗原についての抗原の量に対する特異的結合の量の曲線がプロットされ、陽性と分かっている試料(例えば、疾患を有する患者)において認められる二次的曲線パラメータが、陰性と分かっている試料(例えば、正常な個人)において認められる二次的曲線パラメータと比較される。先に論じた抗原/自己抗体結合についてのカットオフと組み合わせて使用される場合、特異度を最大にする(ほんのわずかな偽陽性)二次的曲線パラメータに対するカットオフ値が選択される。

【0102】

二次的曲線パラメータについてのカットオフ値を算出する際、陽性の読み取りのために必要とされる方向性、すなわち、カットオフよりも大きい又は小さい値が陽性とみなされるかどうかも決定される。陽性の読み取りのために必要とされるこの方向性は、抗原及び二次的曲線パラメータに依存することとなる。

【0103】

測定は、抗原/自己抗体結合についてのどちらのカットオフよりも大きく、かつ二次的曲線パラメータについてのカットオフと比較して陽性の読み取りのために必要とされる方向性を示すならば、最終的に陽性である、すなわち、検査試料中の自己抗体の存在を示すものであるとみなされる。

【0104】

W02015/193678(その内容を参照により本明細書に組み込む)にさらに記載されている通り、アッセイ方法論に二次的曲線パラメータを含めることは、イムノアッセイの特異度を高め、検査試料中の自己抗体間の特異的結合の量のみに基づく代替方法と比較して陽性的中率(PPV)を増大させる。

【0105】

本明細書に含まれるダブルカットオフ方法の説明は、抗原/自己抗体結合の量の測定と組み合わせた単一の二次的曲線パラメータの使用に焦点が合わせられているが、複数の二次的曲線パラメータの使用が意図されることを理解するべきである。したがって、ある種の実施態様では、本発明の方法は、2、3、4、5、6、7、8、又はそれ以上二次的曲線パラメータを利用する。

【0106】

ダブルカットオフ方法は、存在する標的自己抗体の絶対量、及び標的自己抗体の非存在下で観察される結合のレベルが患者ごとに大きく異なる可能性がある、臨床診断、予後、予測、及び/又はモニタリングアッセイに使用するために好都合である。こうしたアッセイが、単一の量/濃度の検査抗原を使用する自己抗体結合の検出に基づくならば、集団にわたる自己抗体の量の正常な生理的範囲の最下限又は最上限である量の自己抗体を含有する患者試料は、アッセイ方法論の制限に起因して、見逃される可能性がある;少量の自己抗体を含む試料は、偽陰性の結果として記録される可能性があるのに対し、非常に高いレベルの自己抗体を含むものは、選択されたアッセイ方法論内の正確な検出の上限を超えている可能性がある。二次的曲線パラメータの算出と組み合わせた力価測定方法の使用は、これらの観察される自己抗体レベルの差及び結合のレベルの差を埋め合わせることができる。

【0107】

このダブルカットオフ実施態様は、自己抗体を検出する方法、肝癌を検出する方法、肝癌を診断及び治療する方法、抗肝癌治療に対する反応を予測する方法、及び抗体プロファイルを決定する方法を含めた、本発明のすべての方法と共に使用できることに留意するべきである。さらに、ダブルカットオフ方法は、単一の自己抗体のみが検出される実施態様において、また、複数の自己抗体を検出するために抗原のパネルが使用される実施態様において使用することができる。パネル実施態様では、パネル内の各抗原について算出される二次的曲線パラメータは、必ずしも同じである必要はないことに留意するべきである。しかし、いくつかの実施態様では、パネル内の各抗原について算出される二次的曲線パラメータは、同じであり得る。

【0108】

(アッセイ形式)

イムノアッセイ、例えばELISA、ラジオイムノアッセイなどの一般的特徴は、当業者に周知である(その内容が参照により本明細書に組み込まれるE.Diamandis及びT.Christopoulosの文献「イムノアッセイ(Immunoassay)」Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996を参照のこと)。

【0109】

特定の免疫学的特異性を有する自己抗体の検出のためのイムノアッセイは、一般に、関

10

20

30

40

50

連する自己抗体との特異的な免疫学的反応性を呈する試薬(抗原)の使用を必要とする。アッセイの形式に応じて、この抗原は、固形状支持体上に固定することができる。検査試料は、抗原と接触され、必要とされる免疫学的特異性をもつ自己抗体が試料中に存在するならば、これらは抗原と免疫学的に反応して抗原/自己抗体複合体を形成することとなり、次いで、これを検出又は定量的に測定することができる。

【0110】

本発明の方法は、自己抗体を含有する疑いがある検査試料と抗原との間の接触を可能にする、あらゆる好適な形式で行うことができる。好都合には、検査試料と抗原との間の接触は、マイクロタイタープレートのウェルなどの別の反応チャンバー内で起こり、異なる抗原又は異なる量の抗原が必要に応じて並行して検定されることが可能になる可能性がある。様々な量の抗原が必要とされる実施態様では、これらを、マイクロタイタープレートのウェルにわたって抗原のストックからの段階希釈物を調製することによって、マイクロタイタープレートのウェルにコーティングすることができる。抗原のストックは、公知又は未知の濃度のものであり得る。次いで、検査試料の一定分量を、検査試料の体積及び希釈を、各ウェルにおいて一定に保ちながら、プレートのウェルに添加することができる。マイクロタイタープレートのウェルに添加される抗原の絶対量は、当業者によって認識される通り標的自己抗体の性質、検査試料の性質、検査試料の希釈などの因子に応じて変動し得る。一般に、抗原の量及び検査試料の希釈は、この方法における抗原/自己抗体結合の検出のために選択される読み取りの許容し得る検出範囲に含まれる範囲のシグナル強度をもたらすように選択されることとなる。好都合には、抗原の検査される量は、1.6nMから160mMまでの範囲内で変動し得る。

【0111】

本発明のさらなる実施態様では、抗原は、固形状支持体上の別個の位置又は反応部位に固定することができる。異なる量の抗原が必要とされる実施態様では、これらはそれぞれ、固形状支持体上の別個の位置又は反応部位に固定することができる。次いで、支持体全体を、検査試料と接触させ、自己抗体と抗原との結合を、別個の位置又は反応部位のそれぞれで、別々に検出又は測定することができる。好適な固形状支持体としては、マイクロアレイが挙げられる。異なる量の抗原が必要とされる場合、マイクロアレイは、アレイ上の別個の解像可能な反応部位に、異なる量の特定の抗原を固定することによって調製することができる。他の実施態様では、固定された抗原分子の実際の量は、実質的に一定であり続けることができるが、アレイ上の部位又はスポットのサイズは、利用可能な結合エピトープの量を変えるために変化させ、異なる量の利用可能な結合エピトープを有する部位又はスポットの力価測定系列を提供することができる。こうした実施態様では、抗原の絶対量ではなく、抗原上の結合エピトープ(1又は複数)の二次元表面濃度が、力価測定系列の調製において重要である。タンパク質/ペプチドマイクロアレイの調製及び照合のための技術は、一般に、当技術分野で公知である。

【0112】

マイクロアレイは、単一の試料に対する異なる特異性の自己抗体についての複数のアッセイを並行して実施するために使用することができる。これは、複数の抗原又は抗原のセットを含むアレイを使用して行うことができる。

【0113】

ある種の抗原は、限定はされないが、患者組織又は体液から単離されたタンパク質ポリペプチド(例えば、血漿、血清、全血、尿、汗、リンパ、大便、脳脊髄液、腹水、胸水、精液、痰、乳頭吸引液、術後漿液腫、及び創部ドレナージ液)を含めた、天然の起源から単離されたタンパク質又はポリペプチドを含む又はこれらに由来し得る。こうした実施態様では、抗原は、天然に存在するタンパク質、すなわち、実質的に、天然の起源から単離された又は天然に存在するタンパク質の断片を含むことができる形態の、タンパク質の実質的にすべてを含むことができる。本発明の方法における抗原として有効であるためには、任意のこうした断片が、検査するために使用されることとなる自己抗体との免疫学的反応性を保持しなければならない。好適な断片は、例えば、単離されたタンパク質の化学的

又は酵素的切断によって調製することができる。

【0114】

ある種の実施態様では、また、使用されることとなるアッセイの厳密な性質に応じて、抗原は、そのタンパク質には天然には存在しないいくつかの望ましい特性を与える1つ以上のさらなる分子と連結された、天然に存在するタンパク質、又はその断片を含むことができる。例えば、タンパク質又は断片は、明らかにする標識、例えば、例として蛍光標識、着色標識、発光標識、放射性標識、又は重金属、例えば金コロイドと結合させることができる。他の実施態様では、タンパク質又は断片は、組換えによって産生された融合タンパク質として発現させることができる。例として、融合タンパク質は、組換えによって発現された抗原の精製を助けるために、N-又はC-末端にタグペプチドを含むことができる。

10

【0115】

使用されることとなるアッセイの形式に応じて、抗原を、例えば、チップ、スライド、マイクロタイタープレートのウェル、ビーズ、膜、又はナノ粒子などの固形状支持体上に固定することができる。固定化は、非共有結合性吸着、共有結合を介して、又はタグを介して実施することができる。

【0116】

これが、抗原が標的自己抗体と免疫学的に反応する能力にかなりの程度まで悪影響を与えないという条件で、あらゆる好適な付着手段を使用することができる。

【0117】

本発明は、固相アッセイに限定されず、全体的に又は部分的に液相内で行われるアッセイ、例えば溶液相ビーズアッセイ又は競合アッセイも包含する。

20

【0118】

一実施態様では、抗原を、ビオチンなどの、固定化を容易にするであろうリガンドで標識することができる。次いで、この抗原を、好適な力価測定範囲に希釈し、溶液中の患者試料中の自己抗体と反応させることができる。次いで、得られた免疫複合体を、リガンド-受容体相互作用(例えば、ビオチン-ストレプトアビジン)を介して、固形状支持体上に固定し、アッセイの残りを、以下に記載した通りに実施することができる。

【0119】

本発明のアッセイ方法に使用するためのビオチン標識された抗原の産生を容易にするために、完全長抗原をコードするcDNA、その切断型、又はその抗原断片を、例えば酵素反応を介してビオチン補因子が付着することができるタンパク質又はポリペプチドタグで標識された融合タンパク質として発現させることができる。

30

【0120】

組換え型のビオチン標識された抗原の産生のためのベクターは、いくつかの供給源から市販品として入手できる。或いは、ビオチン標識された抗原は、発現及び精製後にビオチンと抗原分子との共有結合によって産生することができる。

【0121】

前述の通り、本発明による自己抗体を検出するために使用されるイムノアッセイは、当技術分野で公知の標準の技術に基づくことができる。最も好ましい実施態様では、イムノアッセイは、ELISAであり得る。ELISAは、概して、当技術分野で周知である。典型的な間接的ELISAでは、被験の自己抗体に対する特異性を有する抗原は、固体表面(例えば、標準のマイクロタイターアッセイプレートのウェル、又はマイクロビーズ若しくはマイクロアレイの表面)上に固定され、自己抗体の存在について検査されることとなる体液を含む試料が、固定化された抗原と接触される。試料中に存在する所望の特異性のあらゆる自己抗体が、固定化された抗原と結合することとなる。次いで、結合した抗原/自己抗体複合体を、任意の好適な方法を使用して検出することができる。ある好ましい実施態様では、1以上のクラスのヒト免疫グロブリンに共通のエピトープを特異的に認識する、標識された抗ヒト免疫グロブリン二次抗体が、抗原/自己抗体複合体を検出するために使用される。典型的には、二次抗体は、抗IgG又は抗IgMとなる。二次抗体は通常、検出可能なマーカー、典型的には、例えばペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼなどの酵素マーカー

40

50

で標識され、検出可能な産物、例えば着色、化学発光、又は蛍光産物を産生する、酵素に対する基質の添加による定量的検出が可能になる。同等の効果を有する当技術分野で公知の他の種類の検出可能な標識を使用することができる。

【0122】

(本発明の方法の適用)

本発明は、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中のMMP9、AIF1、EpCAM、又はCDKN1Bに対して免疫学的に特異的な自己抗体を検出することによって哺乳類対象における肝癌を検出する方法であって：

(a)該検査試料を、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と接触させるステップと；

(b)腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体の有無を決定するステップと；

を含み、前記複合体の存在が、肝癌の存在を示すものである前記方法における、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原の使用を提供する。

【0123】

本発明のこの実施態様内では、本発明の種々の方法に関して先に論じたすべての制約は、この使用に関して意図される。

【0124】

本発明によるアッセイ方法は、様々な異なる臨床的状況で用いることができる。特に、この方法は、肝癌の検出又は診断において、肝癌と診断された患者の予後を評価することにおいて、治療法に対する反応を予測することにおいて、患者における肝癌の進行をモニタリングすることにおいて、肝癌の存在を診断するために無症候性のヒト対象の集団をスクリーニングすることにおいて、抗肝癌治療(例えば、化学療法、ラジオ波焼灼療法、肝切除、肝移植、ワクチン接種、抗増殖因子又はシグナル伝達療法、内分泌療法、ヒト抗体療法、肝動脈化学塞栓療法、経皮的エタノール注入、マイクロ波アブレーション、ソラフェニブ投与、及び放射線塞栓療法)に対する肝癌患者の反応を予測することにおいて、抗肝癌治療(例えば、化学療法、ラジオ波焼灼療法、肝切除、肝移植、ワクチン接種、抗増殖因子又はシグナル伝達療法、内分泌療法、ヒト抗体療法、肝動脈化学塞栓療法、経皮的エタノール注入、マイクロ波アブレーション、ソラフェニブ投与、及び放射線塞栓療法)に対する肝癌患者の反応をモニタリングすることにおいて、存在する肝癌の量を低下させるための抗肝癌治療を受けている、肝癌を有すると以前に診断された患者における再発性の疾患の検出において、ある特定の患者に使用するための抗肝癌療法(例えば、化学療法、ラジオ波焼灼療法、肝切除、肝移植、ワクチン接種、抗増殖因子又はシグナル伝達療法、内分泌療法、ヒト抗体療法、肝動脈化学塞栓療法、経皮的エタノール注入、マイクロ波アブレーション、ソラフェニブ投与、及び放射線塞栓療法)の選択において、又は、肝癌を有する又は有する疑いがある患者における抗体プロフィールを決定することにおいて、使用することができる。

【0125】

(キット)

本発明は、

(a)1種以上の腫瘍マーカー抗原と；

(b)該腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体を検出することが可能な試薬と

を含む、本発明の方法のいずれか1つを実施するのに適したキットを包含する。

【0126】

本発明はまた、

(a)MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bからなる群から選択される腫瘍マーカー抗原と；

(b)該腫瘍マーカー抗原が検査試料中に存在する自己抗体に結合した複合体を検出することが可能な試薬と

を含む、哺乳類対象からの体液を含む検査試料中の自己抗体の検出のためのキットを包含

10

20

30

40

50

する。

【0127】

ある種の実施態様では、キットは、

(c)腫瘍マーカー抗原を、哺乳類対象からの体液を含む検査試料と接触させるための手段をさらに含むことができる。

【0128】

腫瘍マーカー抗原を、哺乳類対象からの体液を含む検査試料と接触させるための手段の例としては、チップ、スライド、プレート、マイクロタイタープレートのウェル、ビーズ、膜、又はナノ粒子上の腫瘍マーカー抗原の固定化が挙げられる。

【0129】

いくつかの実施態様では、キット内の腫瘍マーカー抗原は、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネル内に存在することができる。この実施態様内では、キットは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38種、又はそれ以上の抗原を含むことができる。これらの抗原は、別々の抗原であり得、ここでは、別々の抗原は、先に定義した通りの、異なるタンパク質又はポリペプチドに由来する抗原(異なる遺伝子によってコードされる関連性のないタンパク質に由来する抗原など)、又は単一のタンパク質又はポリペプチドの異なるペプチドエпитープに由来する抗原である。

【0130】

一実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bを含むことができる。ある種の具体的実施態様では、該パネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bで構成され得る。

【0131】

一実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、NY-ESO-1、ビメンチン、HSP A4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RaiA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SPP1、SSX2、及びTGFB1からなる群から選択される1種以上の腫瘍マーカー抗原を含むことができる。この実施態様内では、該パネルは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、又は34種の列挙された腫瘍マーカー抗原を含むことができる。本発明によれば、該パネルはまた、MMP9、AIF1、EpCAM、又はCDKN1Bを含むこととなり、これらの腫瘍マーカー抗原の1、2、3、又は4種を含むことができる。これらの腫瘍マーカー抗原の2又は3種がパネルに含まれる実施態様では、2又は3種のこれらの抗原のすべての組み合わせが意図される。具体的実施態様では、パネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bを含むことができる。

【0132】

一実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、ビメンチン、HNRNP-L、及びトランスフェリンを含むことができる。別の実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、ビメンチン、HNRNP-L、及びトランスフェリンで構成され得る。

【0133】

別の実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、AIF1、EpCAM、HSPA4、及びCPS1を含むことができる。別の実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、AIF1、EpCAM、HSPA4、及びCPS1で構成され得る。

【0134】

さらなる実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、EpCAM、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA2、HSPA4、及びHNRNP-Lを含むことができる。別の実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、EpCAM、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA2、HSPA4、及びHNRNP-Lで構成され得る。

【0135】

いっそうさらなる実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA、及びSOX2を含むことができる。別の実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA、及びSOX2で構成され得る。

【0136】

いっそうさらなる実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X、及びNY-ESO-1を含むことができる。別の実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X、及びNY-ESO-1で構成され得る。

【0137】

いっそうさらなる実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4、及びトランスフェリンを含むことができる。別の実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4、及びトランスフェリンで構成され得る。

【0138】

具体的実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SP P1、SSX2、及びTGFB1を含むことができる。本発明によれば、このパネルはまた、MMP9、AIF1、EpCAM、又はCDKN1Bを含むこととなり、これらの腫瘍マーカー抗原の1、2、3、又は4種を含むことができる。これらの腫瘍マーカー抗原の2又は3種がパネルに含まれる実施態様では、2又は3種のこれらの抗原のすべての組み合わせが意図される。具体的実施態様では、パネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、及びCDKN1Bを含むことができる。例えば、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SPP1、SSX2、及びTGFB1を含むことができる。或いは、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA4、トランスフェリン、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、サイクリンB1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、アポA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、プロラクチン、RGN、SPP1、SSX2、及びTGFB1で構成され得る。

【0139】

具体的実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、及びAIF1を含むことができる。別の実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、及びAIF1で構成され得る。

【0140】

具体的実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2、及びAFPを含むことができる。別の実施態様では、2種以上の腫瘍マーカー抗原のパネルは、CAGE、NY-ESO-1、MMP9、トランスフェリン、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、サイクリンB1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2、及びAFPで構成され得る。

【0141】

本発明のキットは、肝癌の検出に適切であり得る。

【0142】

ある種の実施態様では、キットは、肝癌の検出のためのものであり得る。

10

20

30

40

50

【0143】

本発明のキット内では、体液は、血漿、血清、全血、尿、汗、リンパ、大便、脳脊髄液、腹水、胸水、精液、痰、乳頭吸引液、術後漿液腫、唾液、羊水、涙、及び創部ドレナージ液からなる群から選択することができる。

【0144】

本発明は、以下の非限定的な実験例を参照して、さらに理解されることとなる。

【実施例】

【0145】

(実施例)

(実施例1-腫瘍関連タンパク質に対する自己抗体を測定するための一般プロトコル)

腫瘍マーカー抗原の試料は、WO 99/58978(その内容を参照により本明細書に組み込む)に記載された方法と類似の方法に従って、組換え体発現によって調製することができる。簡単に言うと、対象のマーカー抗原をコードするcDNAを、発現されたタンパク質の精製を助けるためのビオチンタグ及び6xヒスチジンタグをコードするように改変したpET21ベクター(Invitrogen社)にクローニングした。得られたクローンを、BL21(DE3)大腸菌(E.coli)中で増殖させ、続いてこの細菌を溶解した。発現した抗原を、製造業者のプロトコルに従って、ニッケルキレートアフィニティカラム(HiTrap、GE Healthcare社から市販品として入手できる)を介して回収した。発現したタンパク質の純度、特異性、及び収量を、SDS-PAGE、ウェスタンブロット、及びタンパク質アッセイによって評価し、その後、保管した。

【0146】

陰性対照タンパク質、VOLを、BL21(DE3)大腸菌を、空のpET21ベクター(すなわち腫瘍関連抗原をコードするcDNAを含まない)で形質転換することによって産生した。発現及び精製されたタンパク質は、組換え型の腫瘍関連抗原に見られる同じHis及びビオチンタグ配列を含み、残留する細菌夾雑物への非特異的な自己抗体結合に対する補正を可能にする。

【0147】

いくつかのマーカーcDNAのGenBank受託番号は、次の通りである：

AFP:NM_001134.1

AIF1:NM_001623.3

AKR1B10:NM_020299.4.

アポA1:NM_000039.1.

BCL2:NM_000633.2

CAGE:NM_182699

CALR:NM_004343.3

CD44:NM_001001389

CDKN1B:NM_004064.4

CK18:NM_000224

CPS1:NM_001875.4

CCNB1:NM_031966.2

サイクリンB1:NM_031966.2

DDX3X:NM_001356.3

EpCAM:NM_002354

FUCA1:NM_000147.4

GLUL:NM_001033044.2

HNRNP-A2:NM_002137.3

HNRNP-L:NM_001533.2

HSPA2:NM_021979.3.

HSPA4:NM_002154.3

HSPD1:NM_002156.4

IL8:NM_000584.3

10

20

30

40

50

MAGE A4:NM_001011548.1
MDM2:NM_002392.5
MMP9:NM_004994.2.
NPM1:NM_002520.6
NY-ESO-1:NM_001327
PEBP1:NM_002567.2
P62:NM_001007225.1
プロラクチン:NM_000948.5
RaiA:NM_005402.2
RGN:NM_004683.5
SALL4:NM_020436.3.
SOX2:NM_003106
SPP1:NM_001040058.1
SSX2:NM_175698.1
TGFB1:NM_000660.5
トランスフェリン:NM_001063.3
ビメンチン:NM_003380.3
YWHAZ:NM_001135699.1

10

【0148】

抗原及びVOL(陰性対照)を、高リン酸結合緩衝液で適切な濃度に希釈し、次いで、2つの別のタンパク質濃度(ハイスループットアッセイ(HTPA)形式(図2A)の場合のように)、又は片対数力価測定範囲(力価測定アッセイ形式(図2B)の場合のように)を提供するために希釈した。自動リキッドハンドリングシステムを使用して、プレート配置(図2A及び2B)に従って、Falconマイクロタイタープレートの列に50 µl/ウェルで抗原希釈物を分配した。プレートをカバーし、18~22℃で18~24時間保管した。

20

【0149】

プレートを、200 µl/ウェルの豚皮ゼラチン結合緩衝液(PSGBB、PBS+0.1%豚皮ゼラチン+0.05%アジ化ナトリウム)で1時間ブロックした。血清試料を解凍し、ボルテックス処理し、18~22℃のPSGBBで1/110希釈した。プレートを吸引し、ティッシュペーパー上で叩いて乾燥させた。それぞれの希釈した血清試料を、自動リキッドハンドリング装置を使用して、マイクロタイタープレートのすべてのウェルに、50 µl/ウェルで分配した。プレートをカバーし、振盪しながら室温で1.5時間インキュベートした。

30

【0150】

洗浄ステップ:プレートを、自動プレートウォッシャーを使用して、PBS+0.1% tween 20中で3回洗浄し、次いで、ティッシュペーパー上で叩いて乾燥させた。

【0151】

西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ウサギ抗ヒト免疫グロブリン(Dako社、1/5,000(PSGBB中))を、マイクロタイタープレートのすべてのウェルに、50 µl/ウェルで分配した。次いで、プレートを、振盪しながら室温で1時間インキュベートした。プレートを、先に記載した通りに洗浄した。

40

【0152】

各プレートに、あらかじめ調製したTMB基質を、50 µl/ウェルで添加し、卓上で15分間インキュベートした。プレートを軽く叩いて混合した。各ウェルの光学密度を、標準の分光光度プレートリーダーを使用して、650nmで決定した。

【0153】

(実施例2-HTPAによる肝細胞癌(HCC)における自己抗体の検出)

次のデータは、HTPA形式を使用するHCCの検出における自己抗体アッセイのパネルの感度及び特異度を評価するための予備研究から得られた。この研究に含められる対象の臨床状態及び人口統計学的状態を、表1~4に与える。

【0154】

50

表1-実施例2に記載する研究に含まれる患者の人口統計学的状態

【表 1】

人口統計学的因子	HCC 患者	良性肝疾患患者	悪性腫瘍のエビデンスを有しない個人
数	99	99	99
平均年齢	62.3	58.1	62.2
年齢幅	30-91	30-89	30-87
男性(%)	69	69	69

10

【0155】

表2-HCC患者に存在する原発腫瘍のサイズ

【表 2】

	利用可能な患者の数	平均	最小-最大
原発腫瘍サイズ (cm)	88	5.9	0.4-19

【0156】

表3-TNMステージ分類を使用するHCC患者の腫瘍ステージ

【表 3】

TNMステージ	数
1	35
2	21
3	21
4	2
N/A	20

20

TNM=悪性腫瘍ステージ分類システムのTNM分類;N/A=利用可能ではない

【0157】

30

表4- 良性肝疾患患者に存在する肝疾患

【表 4】

良性バックグラウンド	数
C型肝炎ウイルス感染	67
B型肝炎ウイルス感染	22
アルコール性肝疾患	6
自己免疫性肝炎	2
ヘモクロマトーシス	1
原発性胆汁性肝硬変	1
合計	99

40

【0158】

アッセイは、表5に列挙した抗原を使用して、実施例1で与えられたプロトコルに従って行った。アッセイカットオフは、90%を超える個々のマーカー特異度を保ちながら最大のYoudenの値を与えるカットオフ値を選択することによって決定した。結果を表5に示す。いくつかのこれらの自己抗体マーカーが、HCCを有する患者において、良性肝疾患を有する患者又は健康な対照よりも高いレベルの陽性)を示すことが明らかであり、したがって、これらは、HCC患者を、悪性腫瘍のエビデンスを有しない患者から識別する能力を有する

50

ことができる。

【0159】

さらに、AAbのパネルの測定は、HCC患者を、非癌性の肝疾患を有する患者から識別する能力を、いずれかの単一のAAb単独と比較して高めることが明らかである。パネル1及び2(表6及び10)は、様々な臨床的必要性を満たすためにある種の特性を最適にしながら同様の性能を達成するために、AAbの異なるセットを組み合わせることが可能となる方法を示す。パネル1(表6)は、すべての患者に有用なマーカーを含有する。パネル2(表10)の場合のように、性別によってパネルに含まれるマーカーを最適化することは、わずかな感度の低下を有するパネル1と比較して特異度を高める。これは、様々な臨床的必要性を満たすための異なるパネルを構築する能力を実証する。表7及び11は、それぞれのパネルが、HCCの有効な治療をもたらす重大な早期診断であるステージ1及び2の癌を有する患者を検出できることを示す。

10

【0160】

表5-各群における個々のAAbマーカーの陽性

【表 5】

	HCC		良性		正常	
	陽性	%	陽性	%	陽性	%
AIF1	2	2.0	0	0	0	0
AKR1B10	1	1.0	0	0	0	0
アポA1	1	1.0	0	0	0	0
BCL2	3	3.0	1	1.0	1	1.0
CD44	1	1.0	0	0	0	0
CDKN1B	2	2.0	0	0	1	1.0
CK18	1	1.0	0	0	0	0
CPS1	2	2.0	1	1.0	0	0
DDX3X	3	3.0	1	1.0	2	2.0
EpCAM	5	5.1	1	1.0	6	6.1
FUCA1	1	1.0	0	0	0	0
GLUL	1	1.0	0	0	0	0
HNRNP-A2	1	1.0	0	0	0	0
HNRNP-L	3	3.0	2	2.0	0	0
HSPA2	1	1.0	0	0	0	0
HSPA4	5	5.1	1	1.0	0	0
HSPD1	2	2.0	2	2.0	0	0
IL-8	5	5.1	4	4.0	4	4.0
MDM2	2	2.0	1	1.0	0	0
MMP9	3	3.0	1	1.0	1	1.0
NPM1	2	2.0	1	1.0	0	0
NY-ESO-1	7	7.1	0	0	1	1.0
PEBP1	1	1.0	0	0	0	0
プロラクチン	2	2.0	1	1.0	1	1.0
RGN	1	1.0	0	0	0	0
SALL4	1	1.0	0	0	0	0
SPP1	1	1.0	1	1.0	0	0
SSX2	3	3.0	1	1.0	1	1.0
TF	2	2.0	0	0	0	0
TGFB1	1	1.0	0	0	0	0
ビメンチン	7	7.1	3	3.0	6	6.1
YWHAZ	2	2.0	1	1.0	2	2.0

【0161】

(パネル1-全般的パネル)

パネル1は、NRI(Net Reclassification Improvement)を使用して形成し、腫瘍マーカー抗原EpCAM、AIF1、及びMMP9と共に、NY-ESO-1、HSPA4、ビメンチン、HNRNP-L、及びトランスフェリンを含有する。ここでは、所与のAAb濃度のいずれかが、実施例2に記載した通

りに生じたそのカットオフよりも大きいならば、結果は陽性である。表6及び7は、実施例2に記載した試料セットにおけるパネルの性能を示す。

【0162】

表6- パネル1の性能及び構成

【表6】

パネル1	感度 (%)	特異度(良性)(%)	特異度(正常)(%)
NY-ESO-1, EpCAM, HSPA4, ビメンチン, HNRNP-L, トランスフェリン, AIF1, MMP9	28.3	94	87.9

10

【0163】

表7-TNMステージによるパネル1の性能

【表7】

ステージ	陽性	陰性	感度
1	8	27	23
2	4	17	19
3	8	13	38
4	0	2	0

20

【0164】

(パネル2-男性及び女性に対する個々のパネル)

パネル2は、実施例2に記載した試料セットを別々の性別群に分け、各群に対して別のNR Iを実施することによって形成した。パネル2は、腫瘍マーカー抗原EpCAM、AIF1、及びMMP9と共に、HSPA4、CPS1、NY-ESO-1、ビメンチン、HSPA2、及びHNRNP-Lを含有する。患者が女性であり、かつHSPA4、AIF1、EpCAM、又はCPS1のいずれかが、実施例2に記載した通りに生じたカットオフよりも大きいならば、又は、患者が男性であり、かつNY-ESO-1、ビメンチン、EpCAM、HSPA2、HSPA4、又はHNRNP-Lのいずれかが、実施例2に記載した通りに生じたカットオフよりも大きいならば、結果は陽性である。表10及び11は、実施例2に記載した試料セットにおけるパネル2の性能を示す。

30

【0165】

表8- パネル2aの性能及び構成-女性

【表8】

パネル2a	感度 (%)	特異度(良性)(%)	特異度(正常)(%)
HSPA4, AIF1 EpCAM, CPS1	22.6	100	100

40

【0166】

表9- パネル2bの性能及び構成-男性

【表 9】

パネル2b	感度 (%)	特異度(良性)(%)	特異度(正常) (%)
NY-ESO-1, ビメンチン,EpCAM, HSPA2, HSPA4, HNRNP-L	25	97.1	92.6

【0167】

10

表10- パネル2の性能及び構成-組み合わせ

【表 10】

パネル2	感度 (%)	特異度(良性) (%)	特異度(正常) (%)
2a + 2b	24.2	98	94.9

【0168】

表11-TNMステージによるパネル2の性能

【表 11】

ステージ	陽性	陰性	感度 (%)
1	6	29	17.1
2	4	17	19
3	6	15	28.6
4	0	2	0

20

【0169】

(実施例3-HTPAによって測定される自己抗体と組み合わせたAFPの追加の測定)

市販品として入手できるELISA(Aviva Systems Biology社)を使用して、実施例2に記載した試料セットについて、血清試料中の循環αフェトプロテイン(AFP)を測定した。200ng/mlという一般に使用されるカットオフを適用して、陽性を評価した。表12は、実施例2に示したパネル1及び2にAFPを加えた結果を示す。これらの結果から、AAbパネルと組み合わせたAFPの性能が、AFP又はAAbパネル単独の性能よりも高いことが明らかである。

30

【0170】

表12-AFP単独、及び実施例2に記載したパネルに加えた場合の性能

【表 12】

マーカーの組み合わせ	感度	特異度(良性)	特異度(正常)
AFP	35.4	100	100
パネル1 + AFP	52.5	93.9	87.9
パネル2 (組み合わせ)+AFP	49.5	97.9	94.9

40

【0171】

(実施例4-力価測定アッセイによる肝細胞癌(HCC)における自己抗体の検出)

力価測定プレート形式(図2B)を使用するHCCの検出における、自己抗体アッセイのパネルの感度及び特異度を評価するための研究から、次のデータを得た。この研究に含められる対象の臨床状態及び人口統計学的状態を、表13~16に与える。

【0172】

表13- 実施例4に記載する研究に含められる患者の人口統計学的状態

【表 1 3】

人口統計学的因子	HCC 患者	良性肝疾患患者	悪性腫瘍のエビデンスを有しない個人
数	98	99	95
平均年齢	62.6	50.7	62.7
年齢幅	30-91	30-82	30-84
男性(%)	69	69	68

【0 1 7 3】

10

表14-HCC患者に存在する原発腫瘍のサイズ

【表 1 4】

	利用可能な患者の数	平均	最小-最大
原発腫瘍サイズ (cm)	86	6.02	0.4-19

【0 1 7 4】

表15-TNMステージ分類を使用するHCC患者の腫瘍ステージ

【表 1 5】

20

TNMステージ	数
1	35
2	20
3	21
4	2
N/A	20

N/A=適用可能ではない

【0 1 7 5】

30

表16- 良性肝疾患患者に存在する肝疾患

【表 1 6】

良性バックグラウンド	数
C型肝炎ウイルス感染	58
B型肝炎ウイルス感染	31
アルコール性肝疾患	6
自己免疫性肝炎	2
ヘモクロマトーシス	1
原発性胆汁性肝硬変	1
合計	99

40

【0 1 7 6】

アッセイは、表17に列挙した抗原を使用して、実施例1で与えられたプロトコルに従って行った。アッセイカットオフは、90%を超える個々のマーカー特異度を保ちながら最大のYoudenの値を与えるカットオフ値を選択することによって決定した。結果を表17に示す。これらの自己抗体マーカーのいくつかは、HCCを有する患者において、良性肝疾患を有する患者又は健康な対照よりも高いレベルの陽性を示すことが明らかであり、したがって、これらは、HCCを、悪性疾患のエビデンスを有しない患者から識別する能力を有するこ

50

とができる。実施例2に示した研究において癌/正常の識別を示すことが判明したAAbは、HCC患者を、非癌性肝疾患を有する患者(良性)及び健康な対照(正常)から識別する能力を示し続けている。さらに、パネルの測定はやはり、HCC患者を識別する能力を、いずれかの単一のマーカー単独と比較して高めることが明らかである。

【0177】

パネル3(表18)及びパネル4(表22)は、様々な臨床的必要性を満たすためにある種の特性を最適にしながら同様の性能を達成するために、マーカーの異なるセットを組み合わせることが可能となる方法を示す。パネル3が、すべての患者に使用可能なマーカーを含有するのに対し、パネル4は、感度を維持しながら特異度を高める、性別によって異なるマーカーを指定する(表20及び21)。これは、様々な臨床的必要性を満たすための異なるパネルを構築する能力を実証する。実施例のパネルはそれぞれ、ステージ1及び2の癌を有する患者を検出することができ、これは、HCCの早期診断、したがって有効な治療にとって重大である(表19及び23)。

【0178】

表17-各群における個々のAAbマーカーの陽性

【表17】

	HCC		良性		正常	
	陽性	%	陽性	%	陽性	%
AIF1	1	1.0	0	0	0	0
CAGE	12	12.2	3	3.0	9	9.5
CDKN1B	14	14.3	13	13.0	21	22.1
DDX3X	5	5.1	2	2.0	2	2.1
EpCAM	3	3.1	0	0	3	3.2
HNRNP-A2	6	6.1	4	4.0	6	6.3
HSPA4	4	4.1	1	1.0	0	0
HSPD1	7	7.1	5	5.0	3	3.2
MAGE A4	3	3.1	0	0	0	0
MMP9	2	2.0	1	1.0	0	0
NY-ESO-1	8	8.2	0	0	4	4.2
p62	9	9.2	5	5.0	2	2.1
RalA	4	4.1	1	1.0	4	4.2
SALL4	6	6.1	3	3.0	1	1.1
SOX2	3	3.1	0	0	1	1.1
トランスフェリン	7	7.1	5	5.0	1	1.1
YWHAZ	6	(6.1)	4	(4.0)	5	(5.3)

【0179】

(パネル3)

パネル3は、NRIを使用して形成し、腫瘍マーカー抗原EpCAM、AIF1、及びMMP9と共に、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA、及びSOX2を含有する。ここでは、所与のAAb濃度のいずれかが、実施例4に記載した通りに生じたそのカットオフよりも大きいならば、結果は陽性である。表18及び19は、実施例4に記載した試料セットにおけるパネルの性能を示す。

【0180】

表18-パネル3の性能及び構成

【表 1 8】

	感度 (%)	特異度(良性)(%)	特異度(正常)(%)
DDX3X, SALL4, MAGE A4, MMP9, AIF1, NY-ESO-1, CAGE, RalA, EpCAM, SOX2	36.7	89.9	84.2

10

【0 1 8 1】

表19-TNMステージによるパネル3の性能

【表 1 9】

ステージ	陽性	陰性	感度 (%)
1	10	25	28.6
2	8	12	40
3	8	13	38
4	1	1	100

20

【0 1 8 2】

(パネル4-男性及び女性に対する個々のパネル)

パネル4は、実施例2に記載した試料セットを別の性別群に分け、各群に対して別のNRIを実施することによって形成した。パネル4は、腫瘍マーカー抗原EpCAM及びAIF1と共に、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X、NY-ESO-1、HSPD1、SALL4、HSPA4、及びトランスフェリンを含有する。患者が女性であり、かつCAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、AIF1、HSPA4、又はトランスフェリンのいずれかが、実施例4に記載した通りに生じたカットオフよりも大きいならば、又は、患者が男性であり、かつCAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X、NY-ESO-1、又はEpCAMのいずれかが、実施例4に記載した通りに生じたカットオフよりも大きいならば、結果は陽性である。表10及び11は、実施例4に記載した試料セットにおけるパネル4の性能を示す。

30

【0 1 8 3】

表20- パネル4aの性能及び構成- 男性

【表 2 0】

	感度 (%)	特異度(良性) (%)	特異度(正常) (%)
CAGE, SOX2, RalA, MAGE A4, DDX3X, NY-ESO-1, EpCAM	32.4	95.6	86.2

40

【0 1 8 4】

表21- パネル4bの性能及び構成- 女性

【表 2 1】

	感度 (%)	特異度(良性) (%)	特異度(正常) (%)
CAGE, HSPD1, SOX2, SALL4, AIF1, HSPA4, トランスフェリン	50	90.3	90

【0185】

10

表22-パネル4の性能及び構成-組み合わせ

【表 2 2】

	感度 (%)	特異度(良性) (%)	特異度(正常) (%)
4a + 4b	37	93.8	87.4

【0186】

20

表23-TNMステージによるパネル4の性能

【表 2 3】

ステージ	陽性	陰性	感度 (%)
1	12	23	34.3
2	7	13	35
3	7	14	30
4	1	1	50

【0187】

30

(実施例5-力価測定アッセイによって測定される、自己抗体と組み合わせたAFPの追加の測定)

市販品として入手できるELISA(Aviva Systems Biology社)を使用して、実施例4に記載した試料セットについて、血清試料中の循環αフェトプロテイン(AFP)を測定した。200ng/mlという一般に使用されるカットオフを適用して、陽性を評価した。表24は、実施例4に示したパネル3及び4にAFPを加えた結果を示す。これらの結果から、AAbパネルと組み合わせたAFPの性能が、AFP又はAAbパネル単独の性能よりも高いことが明らかである。

【0188】

表24-AFP単独、及び実施例4に記載したパネルに加えた場合の性能

【表 2 4】

マーカーの組み合わせ	感度 (%)	特異度(良性) (%)	特異度(正常) (%)
AFP	31.6	100	100
パネル3 + AFP	55.1	89.9	84.2
パネル4 (組み合わせ) + AFP	55.1	93.8	87.4

40

【0189】

(実施例6-早期CDT-肝臓LDTの設計及び開発のための訓練(Training)研究)

50

力価測定プレート形式(図2B)を使用するHCCの検出における、自己抗体アッセイのパネルの感度及び特異度を評価するための研究から、次のデータを得た。対象の人口統計学的状態及び良性コホート(先の実施例で使用したものとは異なるコホート)の肝硬変状態を、表25～26に与える。

【0190】

表25-実施例6で使用する患者コホートの人口統計学的状態

【表25】

人口統計学的因子	HCC 患者 (HCC)	良性肝疾患患者 (良性)	悪性腫瘍の エビデンスを 有しない個人 (正常)
数	169	184	191
平均年齢(年齢幅)	59.8 (32-81)	54.7 (20-76)	59.9 (31-81)
男性(%)	85.2	70.1	84.3

10

【0191】

表26-良性コホート患者の肝硬変状態

【表26】

肝硬変状態	数
肝硬変	87
非肝硬変性肝疾患	81
不明	16
合計	184

20

【0192】

アッセイは、表27に列挙した抗原を使用して、実施例1で与えられたプロトコルに従って行った。各マーカーについてのカットオフは、特異度を>85%に制限してMonte Carlo直接探索法を適用することによって決定した。結果を表27に示す。これらの自己抗体マーカーのいくつかは、HCCを有する患者において、良性又は正常なコホートよりも高いレベルの陽性)を示すことが明らかであり、したがって、これらは、HCCを、悪性疾患のエビデンスを有しない患者から識別する能力を有する。実施例2に示した研究において癌/正常の識別を示すことが判明したAAbは、HCC患者を、非癌性肝疾患を有する患者(良性)及び健康な対照(正常)から識別する能力を示し続けている。さらに、パネルの測定はやはり、HCC患者を識別する能力を、いずれかの単一のマーカー単独と比較して高めることが明らかである。このパネルは、ステージ1及び2の癌を有する患者を、40～45%の感度で検出することができ、これは、HCCの早期診断、したがって有効な治療にとって重大である(表28)。

30

【0193】

表27-各群における個々のAAbマーカーの陽性

40

【表 2 7】

自己抗体	HCC		良性		正常	
	陽性	(%)	陽性	(%)	陽性	(%)
AIF1	2	1.2	0	0.0	0	0.0
CAGE	33	19.5	7	3.8	5	2.6
サイクリン B1	8	4.7	8	4.3	2	1.0
DDX3X	3	1.8	0	0.0	0	0.0
EpCAM	5	3.0	2	1.1	1	0.5
HSPA4	12	7.1	6	3.3	2	1.0
MAGE A4	14	8.3	6	3.3	3	1.6
MMP9	17	10.1	5	2.7	6	3.1
NY-ESO-1	21	12.4	11	6.0	4	2.1
RalA	12	7.1	7	3.8	6	3.1
SALL4	11	6.5	7	3.8	4	2.1
トランスフェリン	15	8.9	5	2.7	10	5.2
パネル	78	46.2	24	87	26	86.4

10

20

【0 1 9 4】

表28-HCCコホートに対するステージによるAAbパネルの性能:ステージによる患者の数(n)及び生じた感度

【表 2 8】

ステージ	n	陽性	感度(%)
BCLC 0	1	0	0.0
BCLC A	30	12	40.0
BCLC B	71	32	45.1
BCLC C	28	19	67.9
BCLC D	8	5	62.5
不明	31	10	32.3

30

BCLC=バルセロナ臨床肝臓癌(Barcelona Clinic Liver Cancer)(BCLC)ステージ分類システム

【0 1 9 5】

市販品として入手できるELISA(Monobind社)を使用して、実施例6に記載した試料セットについて、血清試料中の循環αフェトプロテイン(AFP)を測定した。200ng/mlという一般に使用されるカットオフを適用して、陽性を評価し、これを、表29におけるステージに分類した。AFP抗原感度は、このコホートに対するステージと共に向上し、初期段階疾患に対する感度は、後期段階疾患よりもかなり低かった。初期段階疾患に対する感度が、AFP抗原について、この実施例に関するAAbパネルと比較してかなり低いのに対して、後期段階の性能は同様であることも注目に値する。

40

【0 1 9 6】

表29-HCCコホートに対するステージによるAFP抗原の性能:ステージによる患者の数(n)及び生じた感度

【表 2 9】

ステージ	n	陽性	感度 (%)
BCLC 0	1	0	0.0
BCLC A	30	3	10.0
BCLC B	71	25	35.2
BCLC C	28	16	57.1
BCLC D	8	5	62.5
不明	31	3	9.7

10

【0 1 9 7】

実施例6におけるHCCコホートに対する陽性及び感度は、AFP抗原をAAbパネル結果と組み合わせることによって高めることができ(表30)、初期段階疾患と後期段階疾患のどちらについても感度が改善される。これらの結果から、AAbパネルと組み合わせたAFPの性能が、AFP又はAAbパネル単独の性能(表31)よりも高いことが明らかである。AAbパネルをAFPと組み合わせることは、特異度に対する最小限の効果を有する。

【0 1 9 8】

表30-HCCコホートに対するステージによるAAbパネル+AFP抗原の性能:ステージによる患者の数(n)及び生じた感度

【表 3 0】

20

ステージ	n	陽性	感度 (%)
BCLC 0	1	0	0.0
BCLC A	30	13	43.0
BCLC B	71	42	59.2
BCLC C	28	25	89.3
BCLC D	8	6	75.0
不明	31	11	35.5

【0 1 9 9】

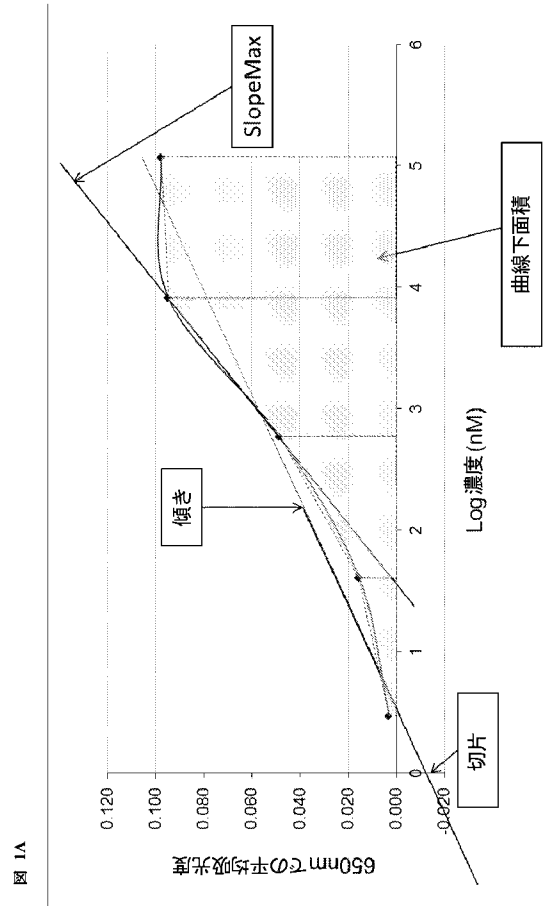
30

表31-AFP単独、及び実施例6に記載したAAbパネルに加えた場合の性能

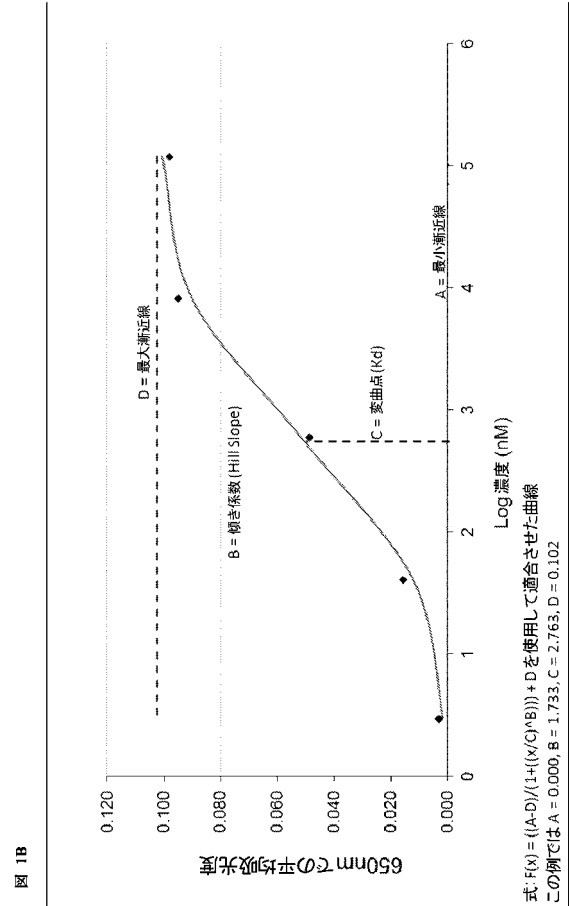
【表 3 1】

マーカーの組み合わせ	感度	特異度(良性)	特異度(正常)
AAb パネル	46.2	87.0	86.4
AFP 抗原	30.8	99.5	100.0
AAb パネル + AFP 抗原	57.4	86.4	86.4

【図 1 A】



【図 1 B】



【図 2 A】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	160nm	160nm	160nm	160nm	160nm	160nm	50nm	50nm	50nm	50nm	50nm	50nm
A	フランクVOL	1	2	3	4	フランクVOL	1	2	3	4		
B	5	6	7	8	9	10	5	6	7	8	9	10
C	11	12	13	14	15	16	11	12	13	14	15	16
D	17	18	19	20	21	22	17	18	19	20	21	22
E	23	24	25	26	27	28	23	24	25	26	27	28
F	29	30	31	32	33	34	29	30	31	32	33	34
G	35	36	37	38	39	40	35	36	37	38	39	40
H	41	42	43	44	45	46	41	42	43	44	45	46

【図 2 B】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0nM	1.6nM	5nM	16nM	50nM	160nM	0nM	1.6nM	5nM	16nM	50nM	160nM
B	抗原 5						抗原 1					
C	VOL						抗原 2					
D	抗原 6						抗原 3					
E	抗原 7						抗原 4					
F	抗原 1						抗原 5					
G	抗原 2						VOL					
H	抗原 3						抗原 6					
I	抗原 4						抗原 7					

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2017/053541

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/574

ADD.

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

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, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, COMPENDEX, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/043165 A2 (XEPTAGEN S P A [IT]; PONTISSO PATRIZIA [IT]; BENEDEUCE LUCA [IT]; FASSI) 12 May 2005 (2005-05-12) claims 1,8-11,14 ----- -/--	1,4-92



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

30 January 2018

Date of mailing of the international search report

04/04/2018

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

Tuynman, Antonin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2017/053541

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MUHAMMAD WASIF SAIF ET AL: "The clinical significance of autoantibodies in gastrointestinal malignancies: an overview", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, vol. 7, no. 4, 21 March 2007 (2007-03-21), pages 493-507, XP055445424, ASHLEY, LONDON; GB ISSN: 1471-2598, DOI: 10.1517/14712598.7.4.493 the whole document in particular: 2nd full paragraph; page 494, left-hand column -----	1,4-92
A	WO 2015/193678 A1 (ONCIMMUNE LTD [GB]) 23 December 2015 (2015-12-23) cited in the application example 5 claims 1,11,22 -----	1,4-92
A	WO 2015/071669 A2 (ELECTROPHORETICS LTD [GB]; KING S COLLEGE HOSPITAL NHS FOUNDATION TRUS) 21 May 2015 (2015-05-21) page 100, line 20 - line 26 -----	1,4-92
A	WO 03/024304 A2 (UNIV MICHIGAN [US]; HANASH SAMIR M [US]; BERETTA LAURA [US]; LENAOUR F) 27 March 2003 (2003-03-27) claims 1,3,7 example 5 -----	1,4-92
A	YOON S K: "Recent advances in tumor markers of human hepatocellular carcinoma", INTERVIROLOGY 200806 CH, vol. 51, no. SUPPL. 1, June 2008 (2008-06) , pages 34-41, XP009503138, ISSN: 0300-5526 abstract -----	1,4-92

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2017/053541**Box No. II** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 5.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 44-92(completely); 4-43(partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/GB2017/053541

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1, 44-92(completely); 4-43(partially)

Group 1: Liver cancer related detection methods.

2. claims: 2, 3, 93-125(completely); 4-43(partially)

Group 2.1: Antibody detection methods and kits wherein the tumour marker protein is MMP9.

3. claims: 2, 3, 93-125(completely); 4-43(partially)

Group 2.2: Antibody detection methods and kits wherein the tumour marker protein is AIF1.

4. claims: 2, 3, 93-125(completely); 4-43(partially)

Group 2.3: Antibody detection methods and kits wherein the tumour marker protein is EpCAM.

5. claims: 2, 3, 93-125(completely); 4-43(partially)

Group 2.4: Antibody detection methods and kits wherein the tumour marker protein is CDKN1B.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2017/053541

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005043165	A2	12-05-2005	AT 557276 T 15-05-2012 EP 1678503 A2 12-07-2006 EP 2339345 A1 29-06-2011 EP 2367005 A1 21-09-2011 WO 2005043165 A2 12-05-2005
WO 2015193678	A1	23-12-2015	CN 106662586 A 10-05-2017 EP 3158336 A1 26-04-2017 US 2017138951 A1 18-05-2017 WO 2015193678 A1 23-12-2015
WO 2015071669	A2	21-05-2015	CA 2928510 A1 21-05-2015 EP 3069142 A2 21-09-2016 JP 2016538545 A 08-12-2016 US 2016320395 A1 03-11-2016 WO 2015071669 A2 21-05-2015
WO 03024304	A2	27-03-2003	AU 2002327643 A1 01-04-2003 US 2003108553 A1 12-06-2003 WO 03024304 A2 27-03-2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C O 7 K 16/18	(2006.01)	C O 7 K 16/18		
C O 7 K 14/47	(2006.01)	C O 7 K 14/47		

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(72)発明者 イザベル マクドナルド
英国 エヌジー 5 1 ピージー ノッティンガム ハックネル ロード シティ ホスピタル ク
リニカル サイエンス ビルディング シー／オー オンシミュン リミテッド

(72)発明者 アンドレア マーレイ
英国 エヌジー 5 1 ピージー ノッティンガム ハックネル ロード シティ ホスピタル ク
リニカル サイエンス ビルディング シー／オー オンシミュン リミテッド

(72)発明者 クリストファー ウェルベリー
英国 エヌジー 5 1 ピージー ノッティンガム ハックネル ロード シティ ホスピタル ク
リニカル サイエンス ビルディング シー／オー オンシミュン リミテッド

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BC17 MA01 MA04 NA05 ZA75 ZB26
4H045 AA11 AA40 BA10 CA40 DA75 DA86 EA20 EA50 FA74 GA26
GA31

专利名称(译)	抗体测定		
公开(公告)号	JP2020515826A	公开(公告)日	2020-05-28
申请号	JP2019548777	申请日	2017-11-24
发明人	ジャレド アレン イザベル マクドナルド アンドレア マーレイ クリストファー ウェルベリー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 A61K31/44 A61P35/00 A61P1/16 C07K16/18 C07K14/47		
CPC分类号	G01N33/57438 G01N33/57484 G01N33/6893 G01N2800/50 G01N33/564 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/574.A A61K31/44 A61P35/00 A61P1/16 C07K16/18 C07K14/47		
F-TERM分类号	4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC17 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/ZA75 4C086/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA40 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26 4H045/GA31		
代理人(译)	石川 彻		
优先权	2016019954 2016-11-25 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了包含来自哺乳动物受试者的体液的测试样品中的抗体，其中所述抗体对选自MMP9，AIF1，EpCAM和CDKN1B的肿瘤标记蛋白具有免疫特异性。是一种用于检测哺乳动物受试者肝癌的特异性自身抗体)，其中将测试样品与选自MMP9，AIF1，EpCAM和CDKN1B的肿瘤标志物抗原接触。一种确定存在或不存在复合物的步骤，其中在与自身抗体结合的测试样品中存在肿瘤标志物抗原，所述复合物的存在指示肝癌的存在。本发明还包括诊断和治疗哺乳动物受试者中肝癌的相应方法，预测对抗肝癌治疗的反应，检测测试样品中的抗体（包括来自哺乳动物受试者的体液）的相应方法。它是适于执行相应方法和本发明方法的试剂盒。[选择图]图2B

Figure 2B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	0nM	1.6nM	5nM	16nM	50nM	160nM	0nM	1.6nM	5nM	16nM	50nM	160nM
A	Antigen 5						Antigen 1					
B	VOL						Antigen 2					
C	Antigen 6						Antigen 3					
D	Antigen 7						Antigen 4					
E	Antigen 1						Antigen 5					
F	Antigen 2						VOL					
G	Antigen 3						Antigen 6					
H	Antigen 4						Antigen 7					