

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6174035号  
(P6174035)

(45) 発行日 平成29年8月2日(2017.8.2)

(24) 登録日 平成29年7月14日(2017.7.14)

(51) Int.Cl.	F I	
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50	P
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/50	G
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/569	L

請求項の数 14 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-542462 (P2014-542462)	(73) 特許権者	513046814
(86) (22) 出願日	平成24年11月15日(2012.11.15)		ユニヴァーシティ・オヴ・マイアミ
(65) 公表番号	特表2014-533372 (P2014-533372A)		アメリカ合衆国フロリダ州33136, マ
(43) 公表日	平成26年12月11日(2014.12.11)		イアミ, ノースウェスト・セブンス・アヴ
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/065282		ェニュー 1951, スイート 110
(87) 国際公開番号	W02013/074793	(74) 代理人	100099623
(87) 国際公開日	平成25年5月23日(2013.5.23)		弁理士 奥山 尚一
審査請求日	平成27年11月16日(2015.11.16)	(74) 代理人	100096769
(31) 優先権主張番号	61/559, 974		弁理士 有原 幸一
(32) 優先日	平成23年11月15日(2011.11.15)	(74) 代理人	100107319
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 松島 鉄男
(31) 優先権主張番号	61/654, 595	(74) 代理人	100114591
(32) 優先日	平成24年6月1日(2012.6.1)		弁理士 河村 英文
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100125380
			弁理士 中村 綾子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトパピローマウイルスを検出し頭頸部扁平上皮癌を予後予測する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトパピローマウイルスに感染した対象の体液から得た試料を分析する方法であって、  
 a) 前記試料の s o l C D 4 4 の濃度を免疫学的に測定する工程と、  
 b) 前記試料の総タンパク質の濃度を測定する工程と、  
 c) 前記測定した s o l C D 4 4 の濃度と総タンパク質の濃度と前記対象のヒトパピローマウイルス ( H P V ) の感染状態とを組み合わせ、複合的なスコアを得る工程と、  
 d) 前記複合的なスコアを、頭頸部扁平上皮癌のリスクが高くなるしきい値と比較して、前記複合的なスコアが前記しきい値を超えているかを決定する工程であって、前記しきい値は、頭頸部扁平上皮癌のリスクが高い集団から測定した s o l C D 4 4 と総タンパク質と H P V の感染状態とを統計的に分析して得たものである工程とを含む方法。

【請求項 2】

前記体液が唾液である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記試料が、含嗽した液である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 s o l C D 4 4 の濃度の測定が、E L I S A 法により行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 s o l C D 4 4 の濃度の測定が、側方流動免疫測定法により行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記試料のヒアルロン酸 ( H A ) およびヒアルロニダーゼ ( H A a s e ) のうちの少なくとも 1 つの濃度を測定する工程を更に含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

ヒトパピローマウイルスが p 1 6 <sup>I N K 4 a</sup> の検出により検出される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

ヒトパピローマウイルスが、HPV の DNA もしくは RNA、HPV タンパク質、又は後成的変化の検出により検出される請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 9】

p 1 6 <sup>I N K 4 a</sup> に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗体と、  
C D 4 4 に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗体と、  
試料中の総タンパク質濃度を測定する試薬と  
を備えるキット。

【請求項 10】

p 1 6 <sup>I N K 4 a</sup> に特異的に結合する前記少なくとも 1 つの抗体が、E 6 H 4 抗体クローンのイディオタイプを含む請求項 9 に記載のキット。

【請求項 11】

C D 4 4 基準試料、p 1 6 基準試料、又はこれらの組み合わせを更に備える請求項 9 に記載のキット。 20

【請求項 12】

p 1 6 <sup>I N K 4 a</sup> に特異的に結合する前記抗体、C D 4 4 に特異的に結合する前記抗体、又はこれらの組み合わせを検出するための 1 つ又は複数の比色剤を更に備える請求項 9 に記載のキット。

【請求項 13】

前記キットが側方流動免疫測定法である請求項 9 に記載のキット。

【請求項 14】

前記キットが、p 1 6 <sup>I N K 4 a</sup> に特異的に結合する前記抗体、C D 4 4 に特異的に結合する前記抗体、又はこれらの組み合わせにより任意選択的に被覆されているマルチウェルプレートを備える請求項 9 に記載のキット。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[ 関連出願の相互参照 ]

本出願は、2011年11月15日に提出された米国特許仮出願第 61 / 559 , 974 号、および 2012年6月1日に提出された米国特許仮出願第 61 / 654 , 595 号の優先権の利益を主張し、各々がその全体の参照により本明細書に組み込まれる。 40

【0002】

[ 政府支援の承認 ]

本発明は、国立衛生研究所からの政府支援を受けて、助成金番号 R 0 1 C A 1 1 8 5 8 4 - N I H の下で、なされたものである。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

[ 発明の分野 ]

本明細書に開示の対象は、概して、頭頸部扁平上皮癌を検出する、治療する、および予後予測する方法ならびにそのキットに関する。

【背景技術】

【0004】

頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）には、毎年、米国では50,000人が、また世界中では600,000人が罹患している。主要な危険因子としては、タバコおよび飲酒およびヒトパピローマウイルス（HPV）感染が挙げられる。

【0005】

今日まで、HNSCCスクリーニングプログラムまたは検査は広く認められておらず（例えば、Vokesら、N Engl J Med、328：184-94（1993）；Lingenら、Curr Opin Oncol、13：176-82（2001）；Forastiereら、N Engl J Med 345：1890-1900（2001）；Patton、Orol Oncol、39：708-723（2003）；O'Haraら、Clin Otolaryngol、27：133-4（2002）；Smart、Cancer 72：1061-5（1993）；Sankaranarayananら、Cancer、88：664-73（2000）；Sankaranarayananら、Lancet 365：1927-33（2005）を参照のこと）、これは究極の判断基準、健康診断後の生検によるスクリーニングが、その感度および特異度に限界があったこと（それぞれ64%および74%）（Brocklehurstら、Cochrane Database Syst Rev、11：CD004150（2010））、また分子診断検査が、いまだ開発途中である（Nagler、Oral Oncol、45：1006-10（2009）；Mahfouzら、Eur Arch Otorhinolaryngol、267：851-60（2010））ことによる。口腔癌検出用の補助的手法（染色、自己蛍光、または剥離細胞診を使用）が有効であるが、最近の研究ではこれらの手法が早期発見率を高めるかどうか疑問であると報告されている（Pattonら、J Am Dent Assoc、139：896-905（2008）；Lingenら、Oral Oncol 44：10-22（2008））。したがって、分子診断ツールに労力が注ぎ込まれてきた。RNA発現プロファイル（Liら、Clin Cancer Res、10：8442-8450（2004））、microRNAの発見（Parkら、Clin Cancer Res、15：5473-5477（2009））およびプロテオーム解析（Huら、Clin Cancer Res、14：6246-6252（2008））のために唾液を検査するいくつかの研究は、見込みはあるが多少複雑であり、また確証されていない（Nagler、Oral Oncol、45：1006-10（2009）；Mahfouzら、Eur Arch Otorhinolaryngol、267：851-60（2010））。その結果、患者の大多数が、治療率が40%以下である末期で診断される。したがって早期発見検査が必要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Vokesら、N Engl J Med、328：184-94（1993）

【非特許文献2】Lingenら、Curr Opin Oncol、13：176-82（2001）

【非特許文献3】Forastiereら、N Engl J Med 345：1890-1900（2001）

【非特許文献4】Patton、Orol Oncol、39：708-723（2003）

【非特許文献5】O'Haraら、Clin Otolaryngol、27：133-4（2002）

【非特許文献6】Smart、Cancer 72：1061-5（1993）

【非特許文献7】Sankaranarayananら、Cancer、88：664-73（2000）

【非特許文献8】Sankaranarayananら、Lancet 365：192

10

20

30

40

50

7 - 3 3 ( 2 0 0 5 )

【非特許文献9】Brocklehurst<sup>5</sup>、Cochrane Database Syst Rev、11:CD004150 (2010)

【非特許文献10】Nagler、Oral Oncol.、45:1006-10 (2009)

【非特許文献11】Mahfouz<sup>5</sup>、Eur Arch Otorhinolaryngol、267:851-60 (2010)

【非特許文献12】Patton<sup>5</sup>、J Am Dent Assoc、139:896-905 (2008)

【非特許文献13】Lingen<sup>5</sup>、Oral Oncol 44:10-22 (2008) 10

【非特許文献14】Li<sup>5</sup>、Clin Cancer Res、10:8442-8450 (2004)

【非特許文献15】Park<sup>5</sup>、Clin Cancer Res、15:5473-5477 (2009)

【非特許文献16】Hu<sup>5</sup>、Clin Cancer Res、14:6246-6252 (2008)

【発明の概要】

【0007】

本開示の材料、化合物、組成物、および方法の目的によれば、本明細書に具現化および 20  
広く記載されるように、本開示の対象は、1つの態様では、頭頸部扁平上皮癌を検出、治療、およびその予後予測する方法ならびにキットに関する。

【0008】

さらなる利点は、以下の説明に部分的に記載され、部分的に本記載から当然明らかであり、または以下に記載の態様の実践により理解されよう。以下に記載の利点は、添付の特許請求の範囲に具体的に示す構成要素および組み合わせにより十分に理解され、達成されるであろう。前述の概要および以下の詳細な説明の両方は、例示的かつ説明的にすぎず、限定的なものではないことが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1A~1Bは、本研究での患者の無増悪生存(PFS)(図1A)および全生存(OS)(図1B)を表すグラフである。図1Cは、中央値PFS、および12、24、および36ヶ月でのPFS率およびOS率を示す表である。図1Dは、OSおよびPFSの総数、中間値、最小値、最大値、平均値、および標準偏差を示す表である。 30

【図2】図2A~2RRは、以下に特徴付けられる対象でのPFS(図2A、2C、2E、2G、2I、2K、2M、2O、2Q、2S、2U、2W、2Y、2AA、2CC、2EE、2GG、2II、2KK、2MM、2OO、2QQ)およびOS(図2B、2D、2F、2H、2J、2L、2N、2P、2R、2T、2V、2X、2Z、2BB、2DD、2FF、2HH、2JJ、2LL、2NN、2PP、2RR)を示すグラフである：p 40  
16核対細胞質/非染色(図2A~2B)、p16<sup>+</sup>対p16<sup>-</sup>染色(図2C~2D)、solCD44の10ng/ml以上対10ng/ml未満(図2E~2F)、総タンパク質の1mg/ml未満対1mg/ml以上(図2G~2H)、CD44の染色対非染色(図2I~2J)、CD44の膜のみ/全体染色対非染色/その他(図2K~2L)、EGFRの膜および細胞質染色対非染色/その他(図2M~2N)、EGFRの膜および細胞質対その他対非染色(図2O~2P)、EGFRの膜対細胞質/非染色(図2Q~2R)、EGFRの膜対細胞質のみ対非染色(図2S~2T)、角化対非角化(図2U~2V)、現喫煙者対非/前喫煙者(図2W~2X)、非アルコール対軽度/中程度のアルコール対重度のアルコール曝露(図2Y~2Z)、重度対軽度/非アルコール曝露(図2AA~2BB)、口唇および口腔癌対口腔咽頭癌(図2CC~2DD)、病期I/II対病期III/IVの癌(図2EE~2FF)、病期I/II/III対病期IVの癌(図2G 50

G ~ 2 H H)、T 1 ~ T 3 対 T 4 の癌 ( 図 2 I I ~ 2 J J )、N 0 対 N 1 ~ N 3、N x ( 図 2 K K ~ 2 L L )、女性対男性 ( 図 2 M M ~ 2 N N )、白人対黒人 ( 図 2 O O ~ 2 P P )、またはヒスパニック系対非ヒスパニック系 ( 図 2 Q Q ~ 2 R R )。

【図 3】図 3 A ~ 3 C は、C D 4 4 過剰発現が増殖 ( 図 3 A )、遊走 ( 図 3 B )、およびシスプラチン抵抗性 ( 図 3 C ) を増進させたことを示すグラフである。

【図 4】図 4 A は、下方制御された C D 4 4 をもつ安定クローンからのウエスタンブロットである。図 4 B は、スクランブル型または野生型 C A L 2 7 と比較して、C D 4 4 s i R N A クローンの 2 種類について、ヌードマウスでの腫瘍成長が抑制されることを示すグラフである。

【図 5】図 5 は、C D 4 4 s i R N A またはスクランブル配列による治療後の C A L 2 7 異種移植片での C D 4 4、E G F R、および p E G F R ( Y 1 0 6 8 ) 染色を示す組織構造のスライドである。C D 4 4 下方制御は、C A L 2 7 異種移植片で、E G F R 発現およびそのリン酸化 ( Y 1 0 6 8 ) を阻害する。

10

【図 6】図 6 は、p 1 6<sup>+</sup> 癌での p 1 6、C D 4 4、および E G F R の免疫組織化学 ( I H C ) 染色を示し、ここで p 1 6 染色は細胞質内であり拡散している。この場合、C D 4 4 は膜に染色し、腫瘍全体にわたり一様に染色している。C D 4 4 および E G F R は細胞膜で共同在化し、E G F R の細胞質のいくらかで同様に染色が存在する。

【図 7】図 7 は、p 1 6<sup>+</sup> 腫瘍での p 1 6、C D 4 4、および E G F R の I H C 染色を示し、ここで、p 1 6 についての核染色が強力であり、いくらかの細胞質染色も同様に存在する。しかし、C D 4 4 膜染色はなく、侵入リンパ球のみが C D 4 4 発現を保持している。E G F R 発現は、全く見られない。

20

【発明を実施するための形態】

【0010】

本明細書に記載の材料、化合物、組成物、および方法は、開示した対象の固有の態様についての以下の詳細な説明および本明細書に含まれる実施例の参照により、より容易に理解され得る。

【0011】

本発明の材料、化合物、組成物、および方法を開示および説明する前に、以下に記載の態様が固有の合成方法または固有の試薬を限定するものではなく、それ自体がもちろん変更し得ることが理解されるべきである。また、本明細書の専門用語が特定の態様のみを説明する目的に使用され、限定を意図しないことも、理解されるべきである。

30

【0012】

また、本明細書の全体にわたり、様々な刊行物が参照される。これらの刊行物のその全体の開示が、開示の対象が関連する最先端の技術をより完全に説明するために、本明細書に参照により本明細書に組み込まれる。開示の参考文献はまた、その参考文献に含まれる材料 ( その参考文献が信頼される文章中に説明される ) について、個々に具体的に、本明細書の参照により組み込まれる。

【0013】

[ 定義 ]

本明細書およびそれ以降の特許請求の範囲で、いくつかの用語について言及するが、これらの用語は、以下の意味をもつように定義するものとする。

40

【0014】

明細書および特許請求の範囲の全体にわたり、「含む ( c o m p r i s e ) 」という単語およびこの単語の他の形態 ( 「含むこと ( c o m p r i s i n g ) 」および「含む ( c o m p r i s e s ) 」等) は、含むこと ( i n c l u d i n g ) を意味し、これらに限定されるものではないが、例えば、他の添加剤、成分、整数、または段階を除外することを意図しない。

【0015】

説明および添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「a」、「an」、および「the」は、その内容について別段のはっきりした指示がない限り、複数の指示対象

50

を含む。

【0016】

「任意選択の (Optional)」または「任意選択的に (optionally)」は、続いて記載される事象または出来事 (circumstance) が生じ得る、または生じ得ないことを意味し、本説明には、その事象または出来事が起こる事例および起こらない事例が含まれる。

【0017】

範囲は、本明細書では、1つの「約 (about)」特定の値からおよび/または別の「約 (about)」特定の値として表し得る。「約」は、表示の値の5%以内を意味し得る。そのような範囲を表す場合、別の態様として、ある特定の値からおよび/またはその他の特定の値が含まれる。同様に、値が前述の「約」を用いて近似値として表される場合、特定の値が別の態様を形成することが理解されよう。さらに、その範囲の各端点が、他の端点に関連して、および他の端点と無関係に、ともに重要であることが理解され得る。また、本明細書に開示の値は多数存在し、各値もまた、値それ自体に加えてその「約」特定の値として本明細書に開示されていることが理解される。例えば、値「2000」が開示される場合、「約2000」も開示される。また、値が開示される場合、当業者に適切に理解されるように、その値「以下」、「その値以上」および値間のあり得る範囲もまた、開示されることが理解される。例えば、値「2000」が開示される場合、「2000以下」ならびに「2000以上」も開示される。また、本出願の全体にわたり、データが、多数の異なるフォーマットで提供され、また、このデータは、端点および起点およびデータ点のいずれの組み合わせの範囲を表すことが理解される。例えば、ある特定のデータ点「10」およびある特定のデータ点「15」が開示される場合、10および15を超える、それ以上、それ未満、それ以下、およびそれと同等の値が、10および15間の値と同様に開示されていると見なされることが理解される。また、2つの特定単位間の各単位もまた、開示されることが理解される。例えば、10および15が開示される場合、11、12、13、および14もまた、開示される。

【0018】

明細書および結びの特許請求の範囲での、組成物中の特定の構成要素または成分の重量部への言及は、重量部が示される組成物または物品の構成要素または成分と、いずれの他の構成要素または成分との重量の関連性を示すものである。したがって、成分Xの2重量部と成分Yの5重量部を含む化合物では、XおよびYが2:5の重量比で存在し、さらなる成分が組成物に含まれているかは関係なくその比率で存在する。

【0019】

成分の重量パーセント (wt.%) は、反対のはっきりした指示がない限り、成分を含む処方物または組成物の総重量に基づく。

【0020】

「個人 (individual)」、「宿主」、「対象」および「患者」という用語は、診断、予後、投与、または治療の標的となるいずれの個人を指すために、同じ意味で使用される。対象は、脊椎動物、例えば哺乳類であり得る。したがって、対象は、ヒトまたは動物の患者であり得る。

【0021】

「バイオマーカー」は、組織または細胞での発現量が、正常もしくは健康な細胞または組織と比較して変化する、いずれの遺伝子またはタンパク質である。

【0022】

「予後」という用語は、当技術分野で認められたものであり、起こり得る病気の経過または病気進行、特に病気の寛解、病気再発 (再燃)、腫瘍再発、転移、および死亡の可能性に関する予測を包含する。「良好な予後」は、癌 (頭頸部扁平上皮癌等) に悩む患者が無病のままである可能性を指す (すなわち、無癌状態)。「予後不良」は、原因となる癌もしくは腫瘍の再燃もしくは再発、転移、または死亡の可能性を意味することが意図される。「良好な転帰」と分類された癌患者は、原因となる癌または腫瘍が存在しないまま

10

20

30

40

50

の状態である。これに対して、「不良な転帰」の癌患者は、病気が再燃、腫瘍が再発、転移、または死亡する。特定の実施形態では、予後および転帰を評価する時間枠は、例えば、1年未満、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、15年、20年またはそれ以上である。本明細書で使用する場合、予後または無病生存期間の評価に関連する期間は、腫瘍の外科的切除もしくは抑制、緩和、または腫瘍成長の抑制から始まる。したがって、例えば、特定の実施形態では、「良好な予後」は、頭頸部扁平上皮癌患者の、原因となる癌または腫瘍が存在しない状態が少なくとも5年、より具体的には、少なくとも10年続く可能性を指す。本発明のさらなる態様では、「不良な予後」は、頭頸部扁平上皮癌患者が5年未満、より具体的には10年未満以内に病気が再燃、腫瘍が再発、転移、または死亡する可能性を指す。上に定められた予後および転帰を評価する時間枠は例示であり、限定されることを意図しない。

10

**【0023】**

「治療」という用語は、病気、病態、または障害を治癒する、改善する、安定させる、または予防する意図による患者の医学的管理を指す。この用語には、積極的治療、すなわち、具体的には病気、病態、または障害の改善のための治療が含まれ、また、原因治療、すなわち、関連する病気、病態、または障害の原因を取り除くための治療も含まれる。さらに、この用語には、緩和治療、すなわち、病気、病態、または障害の治癒よりむしろ症状の軽減のために考案された治療；予防治療、すなわち、関連する病気、病態、または障害の発症を最小限にする治療、または部分的もしくは完全に阻害するための治療；および補助治療、すなわち、関連する病気、病態、または障害の改善のために、別の特異的療法を補って行われる治療が含まれる。

20

**【0024】**

「抗体」という用語は、標的抗原に選択的に結合する自然抗体または合成抗体を指す。この用語には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。完全免疫グロブリン分子に加えて、「抗体」という用語には、それらの免疫グロブリン分子のフラグメントまたはポリマー、および選択的に標的抗原に結合する免疫グロブリン分子のヒト型またはヒト化型も含まれる。

**【0025】**

また、本明細書には、開示の方法および組成物のために使用し得る、これらを併用して使用し得る、これらを調製する際に使用し得る、またはこれらの生成物である材料、化合物、組成物、および成分が開示される。これらの材料および他の材料が本明細書に開示され、また、これらの材料の組み合わせ、サブセット、相互作用、群等が開示される場合、これらの化合物の各々のおよび集合的な組み合わせならびに順列(permutation)の具体的な言及が明確に開示されていなくても、各々は本明細書に具体的に是認および記載されることが理解される。例えば、組成物が開示され、組成物の複数の成分にいくつかの変更を与え得ることが記載されている場合、可能性のある各々および全ての組み合わせならびに順列は、特にそれとは反対の指示がない限り、具体的に是認される。この概念は本開示の全ての態様(これらに限定されるものではないが、組成物および開示の組成物を作製および使用する方法の段階等)に適用する。したがって、実行され得る種々の付加的な段階が存在する場合、これらの付加的段階の各々が、開示の方法のいずれの固有の態様または態様の組み合わせにより実施され得、また、そのような組み合わせの各々が具体的に是認され、開示していると見なされるべきであることが理解される。

30

40

**【0026】**

本開示の材料、化合物、組成物、成分、装置、物品、および方法の固有の態様をここで詳細に言及するが、これらの態様は以下の説明および実施例、ならびに図およびその前後の説明に例証される。

**【0027】****[バイオマーカー分析]**

頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)の予後を診断および判定する、有効で、安価で、非侵襲的な分析を記載する。開示の分析は、対象の試料で、CD44(例えば、可溶性CD4

50

4 ( s o l C D 4 4 ) ) 等の1つ以上のバイオマーカーの検出を伴う。F r a n z m a n nらによる米国特許第8,088,591号が、対象のHNSCCを診断および監視するために使用され得るバイオマーカーの説明のために、その全体が参照により組み込まれる。これらのバイオマーカーの上昇した濃度は、高精度かつ特異的に対照から癌患者を識別することが可能である。しかし、これらのバイオマーカーは、HNSCCの存在にかかわらず、ある対象集団において減少する。

【0028】

したがって、HNSCC分析の精度および特異度を向上させるために使用してもよいさらなるバイオマーカーおよび危険因子を開示する。例えば、組み合わせたs o l C D 4 4濃度および総タンパク質濃度は、どちらのマーカー単独よりも、対照からHNSCCを識別するのにより有効であることが示されている。しかし、s o l C D 4 4濃度は、ヒトパピローマウイルス(HPV)感染により、対象では低下する可能性がある。実際に、s o l C D 4 4濃度および総タンパク質濃度を使用する二変量解析は、黒人で最も作用し、この場合、HPV感染はあまり見られない。したがって、多変量解析でのHPV状態を組み入れることにより、分析の感度および精度を向上させ、HPV + HNSCCの検出を可能にする。

10

【0029】

HNSCC検出または予後に関連する他のバイオマーカーを、開示の方法の感度および/または精度を向上させるために、総タンパク質、s o l C D 4 4、およびHPV検出を組み合わせ使用してもよい。例えば、s o l C D 4 4濃度は、年齢および喫煙状態に基づき変化し得る。多変量解析で使用してもよいHNSCC危険因子および人口統計学的因子の例としては、タバコ曝露、アルコール曝露、人種、民族性、口腔衛生、性別、教育水準、年齢、一般的健康状態、癌の家族歴、セックス歴および社会経済的地位等が挙げられ、多変量解析で1つ以上の危険因子または人口統計学的因子を使用して、複合スコアを決定する。

20

【0030】

したがって、個々の対象についての複合スコアを決定する本開示のバイオマーカーおよび危険因子の多変量解析を伴う、診断および予後のための分析、およびその分析を使用する方法が開示される。次いで、複合スコアを使用して、対象でのHNSCCの有無、またはHNSCC再発のリスクを判定し得る。特に、複合スコアのカットオフ値は、陽性対照値と陰性対照値を比較することにより、実験的に決定され得る。

30

【0031】

本明細書に記載のバイオマーカーとしては、遺伝子およびタンパク質が挙げられる。そのようなバイオマーカーとしては、バイオマーカーをコードする核酸配列またはそのような配列の相補鎖の完全配列または部分配列を含むDNAが挙げられる。バイオマーカーの核酸としてはまた、該当する核酸配列のいずれかの完全配列または部分配列を含むRNAが挙げられる。バイオマーカーのタンパク質は、本発明のDNAバイオマーカーによりコードされた、またはこれに対応するタンパク質である。バイオマーカーのタンパク質は、バイオマーカーのタンパク質またはポリペプチドのいずれかの完全アミノ酸配列または部分アミノ酸配列を含む。バイオマーカー遺伝子およびタンパク質のフラグメントおよびその変異体もまた、本発明に包含される。「フラグメント」は、ポリヌクレオチドの一部またはアミノ酸配列の一部を意図し、したがってタンパク質がコードされている。バイオマーカーヌクレオチド配列のフラグメントであるポリヌクレオチドは、概して、少なくとも10、15、20、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、または1,400の近接したヌクレオチド、または最大で本明細書に開示の完全長バイオマーカーポリヌクレオチドに存在するヌクレオチド数を含む。バイオマーカーポリヌクレオチドのフラグメントは、概して、少なくとも15、25、30、50、100、150、200、または250の近接するアミノ酸、または最大で本発明の完全長バイオマーカーのタンパク質に存在するアミノ酸の総数をコ

40

50

ードする。「変異体」は、実質的に同様の配列を意味することが意図される。概して、本発明の特定のバイオマーカーの変異体は、配列アライメントプログラムにより決定されたバイオマーカーの配列と少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性をもつ。

#### 【0032】

本明細書に記載のバイオマーカーは、その過剰発現が癌、特にHNSCCの予後に相關する遺伝子およびタンパク質である。特定の実施形態では、患者試料での該当するバイオマーカーまたはバイオマーカーの組み合わせの選択的な過剰発現が、癌の予後不良を示す。「予後不良を示す」は、本明細書で上に定義したように、特定のバイオマーカーまたはバイオマーカーの組み合わせの過剰発現が、原因となる癌もしくは腫瘍が再燃または再発する、転移する、または死亡する増進した可能性に関連することを意図する。例えば、「予後不良を示す」は、5年、より具体的には10年以内に、原因となる癌または腫瘍が再燃もしくは再発する、転移する、または死亡する増進した可能性を指してもよい。予後不良を示すバイオマーカーは、本明細書において、「不良な転帰のバイオマーカー」を指してもよい。他の実施形態では、該当するバイオマーカーまたはバイオマーカーの組み合わせの過剰発現の不在は、良好な予後を示す。本明細書で使用する場合、「良好な予後を示す」は、本明細書で上に定義したように、患者が無癌のままである増進した可能性を指す。いくつかの実施形態では、「良好な予後を示す」は、患者が、少なくとも5年、より具体的には少なくとも10年間、無癌のままである増進した可能性を指す。そのようなバイオマーカーは、「良好な転帰のバイオマーカー」を指してもよい。

#### 【0033】

本開示のバイオマーカーには、その過剰発現（対照と比較して）がHNSCCの予後に相關する遺伝子および/またはタンパク質が含まれる。遺伝子またはタンパク質は、対照と比較して、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、またはそれ以上、過剰発現され得る。バイオマーカーには、HNSCCの不良な予後を示す遺伝子およびタンパク質（すなわち、不良な転帰のバイオマーカー）、ならびに良好な予後を示す遺伝子およびタンパク質（すなわち、良好な転帰のバイオマーカー）が含まれる。特定の該当するバイオマーカーには、細胞成長および増殖の調節、細胞周期制御、DNA複製および転写、アポトーシス、情報伝達、血管新生/リンパ形成、または転移を伴う遺伝子およびタンパク質が含まれる。いくつかの実施形態では、バイオマーカーは、組織再構築、細胞外マトリックス分解、および隣接組織浸潤に關与するプロテアーゼ系を制御する。その他のバイオマーカーには、遺伝子発現の調節因子（過剰メチル化またはmicroRNA等）が含まれる。その発現パターンがHNSCC予後を示すいずれのバイオマーカーも、開示の方法および分析を實踐するために使用し得るが、特定の実施形態では、バイオマーカーは、HPV、総タンパク質、およびCD44からなる群から選択される。1つの実施形態では、CD44バイオマーカーはsolCD44である。

#### 【0034】

HPV感染は、HPVを直接または間接的に測定することにより判定され得る。分子分析の3つのカテゴリが、組織試料および剥離細胞試料でのHPV感染の検出に利用可能である。その全てがHPVのDNAの検出に基づくものであり、以下が挙げられる：(1)非増幅のハイブリダイゼーション法（サザン法（Southern transfer）ハイブリダイゼーション、（STH）、ドットプロットハイブリダイゼーション法（DB）およびin situハイブリダイゼーション法（ISH））；(2)シグナル増幅ハイブリダイゼーション法（ハイブリッドキャプチャ法等）；および(3)標的増幅法（PCR法およびin situPCR法等）。サザンプロットハイブリダイゼーション法は大量のDNAを必要とし、多くの時間と労力を要し、また再現性がなく、一方でin situハイブリダイゼーション法はHPVに中程度の感度しかない。HPVのPCRに基づく検出は、極めて感受性があり特異的である。この手法を用いて、ウイルスDNAをD

10

20

30

40

50

NAポリメラーゼにより *in vitro* で増幅し、標的の十分な量を生成し、次いで標的をゲル上に直接可視化、または(より固有の手法)従来のハイブリダイゼーション法を用いて固有のプロープにより検出する。実際には、PCRに基づく方法の感度は、100 ng 細胞DNAのバックグラウンドで、約10~100 HPVウイルスゲノムである。PCRはDNA(10~100 ng)のごく少量で実施され得ることから、低DNA量の標本の使用に最適である。

#### 【0035】

現在、唯一利用できるFDAが認可したHPV検出法は、Hybrid capture II分析(Qiagen、Valencia、CA)である。この分析では、HPVのDNAをRNAプロープにハイブリダイズし、RNA-DNAハイブリッドを化学発光系により捕捉し検出する。この分析の感度は、PCRに基づく分析と同様であり、標的増幅よりむしろシグナル増幅により高い感度が得られる。現在のHC II分析は、1 ml 試料あたり1 pgのHPV(約50、000コピー)を検出する感度をもつ。適切な試料回収は、最大の感度を得るために不可欠であり、ブラッシング採取器具が最適であることが示されている。HC II法は、13種の高リスク(16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、および68型)および5種の低リスク(6、11、42、43、44型)のHPV型のゲノム配列と相補的な合成RNAプロープを含有する。

10

#### 【0036】

あるいは、HPV感染は、ウイルスのmRNA転写物の検出または細胞タンパク質p16の検出により判定されてもよい。癌を引き起こすHPVには、持続的な感染およびウイルスの癌遺伝子E6およびE7の高濃度発現を可能にする細胞環境(最初に基底細胞層、次いで上皮全体にわたる)が必要である。したがって、E6/E7 mRNAの検出は、DNA手法と比較してより臨床的に有意な感染を特定する可能性がある。

20

#### 【0037】

サイクリン依存性キナーゼ阻害因子2A(CDKN2A、p16<sup>Ink4A</sup>、p16)は、発がん性のE6/E7 mRNAの増進した発現の細胞内関連要因である。HPV癌遺伝子の主作用は、E6によるp53の分解、およびその結果によるアポトーシスの抑止(abrogation)ならびに細胞周期の持続的な活性化を導くpRbからのE2Fの放出である。生理学的には、E2F活性化は、Rbタンパク質のリン酸化により介在される。この経路は、一連のサイクリン依存性キナーゼ阻害因子、なかでもpRB(サイクリン依存性キナーゼ)をリン酸化する酵素を阻害するp16により厳密に制御される。形質転換するHPV感染中の細胞では、Rb-E2F経路の調節はE7により妨げられ、p16の活性化は下流効果をもたない。結果として、p16は、強力に過剰発現され、細胞内に蓄積する。p16の過剰発現は、頸部の前癌状態および癌の大部分で示されたが、正常組織ではp16の発現は、稀にしか認められなかった。

30

#### 【0038】

HPV感染の後成的作用もまた、HPVを検出するために使用されてもよい。HPV<sup>+</sup>とHPV<sup>-</sup>とのHNSCC細胞株間での別個にメチル化された座(loci)がSartor MAら、Epigenetics 6(6):777-87(2011)に記載されている(これらの後成的プロファイルについて参照により組み込まれる)。

40

#### 【0039】

したがって、HPV感染は、p16<sup>Ink4A</sup>に特異的に結合する抗体を使用して検出され得る。あるいは、HPV感染は、HPV DNA、RNA、またはタンパク質の検出により判定され得る。同様に、HPV感染は、ウイルスの癌遺伝子(例えば、E6/E7)の検出または後成的変化により判定され得る。

#### 【0040】

##### [方法]

対象でHNSCCを診断する、対象でのHNSCC腫瘍の病期を診断する、HNSCC治療の有効性を監視する、またはHNSCCと診断された対象の予後を判定する、または

50

対象でのHNSCCの再発を予測する方法を開示する。これらの方法は各々、対象からの身体試料を、総タンパク質、s o l C D 4 4、およびHPVの有無について分析する工程を含む。総タンパク質、HPV、およびCD44濃度の組み合わせを多変量解析に使用して、複合スコアを決定してもよい。方法はさらに、身体試料をヒアルロン酸(HA)、ヒアルロニダーゼ(HAase)、IL-8、またはその組み合わせの有無について評価する工程を含んでもよい。HNSCC危険因子および/または人口統計学的因子もまた、本開示の方法の感度および/または精度を向上させるために、総タンパク質、s o l C D 4 4、およびHPVの検出と組み合わせで使用してもよい。

#### 【0041】

多変量解析は、多変量統計の統計的原理に基づくものであり、1を超える転帰の統計的変量を同時に観測および分析することを含む。例えば、多変量解析と使用され得るいくつかの回帰法があるが、これらは、限定されるものではないが、一般化線形および非線形回帰、ロジスティックおよびポアソン回帰、教師あり機械学習アルゴリズム、ニューラルネットワーク、サポートベクターマシン、応答曲面モデル、および多変量適応型回帰スプラインが挙げられる。いくつかの実施形態では、ロジスティック回帰が使用される。

#### 【0042】

例えば、多変量解析はまず、総タンパク質、s o l C D 4 4、およびp16濃度が、リスク変数(人種、性別、喫煙および飲酒等)に基づき、どのように変化するのかを明らかにする必要があり得る。次いで、数学モデルを展開してもよい(その項にはバイオマーカー濃度および癌の可能性を予測するリスク変数が含まれる)。項に関連する統計的有意性は、予測に関する重要度を反映している。次いで、数学モデルを、予測スコア(癌の全体的な確率スコアを展開できるようにする)を推定するために使用してもよい。例えば、マーカー濃度およびリスク変数(例えば、人種、性別、喫煙および飲酒)がどのように転帰に関連しているか(相合作用を含む)を調査した後に、バイオマーカーのログオッズおよび共変量に関連づける適合するモデルを取得し得る。このモデルに基づき、スコアまたは癌をもつ予測的な可能性を、モデルに含まれる全ての変数の特定の値に推定し得る。

#### 【0043】

いくつかの実施形態では、複合(予測)スコアのカットオフ値(しきい値)を超える増加は、HNSCCの対象を、HNSCCでないまたは将来のその発症が低リスクである対象と識別する。いくつかの実施形態では、複合スコアのカットオフ値を超える増加は、HNSCC腫瘍の病期を特定、HNSCC治療の有効性を予測、HNSCCと診断された対象の予後を予測、またはHNSCC再発のリスクを予測する。例えば、スコアのカットオフ値を超える増加は、予後不良または再発の可能性と関連していてもよい。

#### 【0044】

本開示の分析および方法は、HNSCCである対象またはHNSCCの発症リスクをもつ対象の治療を導くために使用してもよい。例えば、低い複合スコアである対象には、組み合わせ療法よりむしろ単独のモダリティ治療(外科的手術単独または放射線単独等)が施されてもよい。その結果、治療関連死亡率を低減させる。これに対して、高い複合スコアの対象には、その病気による死亡のリスクがより高いことを考えると、治療関連死亡率が高くなるのは当然であることから、より積極的な治療(外科的手術、放射線療法および化学療法等)を提示してもよい。したがって、本開示の方法はさらに、HNSCCと診断されたまたはHNSCCの予後不良を有すると判断された対象を、外科的療法、放射線療法、化学療法、光線力学的治療法、標的療法、またはそれらのいずれの組み合わせにより治療すること、を含んでもよい。

#### 【0045】

本開示の各バイオマーカーは、対象で、身体試料を使用して検出され得る。「身体試料」は、バイオマーカーの発現を検出し得る細胞、組織、または体液のいずれの採取試料を意味する。そのような身体試料の例としては、これに限定されないが、血液、リンパ液、尿、婦人科学的体液、生検、および塗抹標本が挙げられる。本発明に有用な体液としては、血液、尿、唾液、乳頭吸引液、洗浄液またはその他の分泌液もしくはその派生物が挙げ

10

20

30

40

50

られる。血液としては、全血、血漿、血清、また血液のいずれの派生物が挙げられ得る。好ましい実施形態では、身体試料は、含嗽液 (oral rinse) を含む。様々な身体試料を採取する方法は、当技術分野で周知である。

#### 【0046】

本方法は、個人の頭頸部癌のリスク（例えば、喫煙者、アルコール中毒者、およびHPVウイルスに曝露された対象）を検出するのに有用である。本明細書に記載の方法によりまた、他の公知の予後指標の分析と比較して、HNSCC予後の評価を高めることが可能となる。特定の態様では、感度および特異度は、公知の癌の予後評価方法のものと同等またはそれ以上である。特異度および感度を評価する終点は、本発明の方法を使用して予測した予後または転帰（すなわち、診断時またはほぼ診断時）と実際の臨床転帰（すなわち、患者が無癌のままであったか、または特定期間内に再発したかどうか）との比較である。本明細書で使用する場合、「特異度」は、本発明の方法が正確に真陰性を特定し得る水準を指す。臨床試験では、特異度は、真陰性数を真陰性と偽陽性との合計で除算することにより算出される。「感度」は、本発明の方法が真陽性である試料を正確に特定し得る水準を意図する。感度は、臨床試験で、真陽性数を真陽性と偽陰性との合計で除算することにより算出される。いくつかの実施形態では、HNSCCの評価のための本開示の方法の感度は、少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上である。さらにまた、本方法の特異度は、好ましくは少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上である。さらなる実施形態では、本発明の予後予測方法のために組み合わせた感度および特異度の値を評価する。「組み合わせた感度および特異度の値」は、本明細書で上に定義したように、個人の特異度と感度の値の合計を意味する。本方法の組み合わせた感度および特異度の値は、好ましくは少なくとも約105%、110%、115%、120%、130%、140%、150%、160%またはそれ以上である。

#### 【0047】

本明細書で使用する場合、「真」および「偽」陽性ならびに陰性の定義は、検討中のバイオマーカーまたはバイオマーカーの組み合わせが良好な転帰のバイオマーカーであるかまたは不良な転帰のバイオマーカーであるかによる。すなわち、良好な転帰のバイオマーカー（すなわち良好な予後を示すもの）である場合、「真陽性」は、健康診断とその後の生検により判定されるように、該当するバイオマーカーに過剰発現が見られる試料を指す。病理学上の陽性生検は、試料が陽性または陰性であることを示し得る。

#### 【0048】

上述のように、いくつかの実施形態では、2以上のバイオマーカーが使用され、より好ましくは、2以上の相補的バイオマーカーが使用される。「相補的」とは、バイオマーカーの組み合わせを身体試料で検出することにより、1種類のみバイオマーカーを使用した場合に特定されるものと比較して、より高い比率の事例で、癌予後のより正確な判定がもたらされることを意味する。したがって、場合によっては、少なくとも2種類の開示のバイオマーカーを使用して、より正確な癌予後が判定され得る。

#### 【0049】

当技術分野で利用可能でありバイオマーカーの発現を検出するいずれの方法も、本明細書に包含される。本発明のバイオマーカーの発現は、核酸濃度またはタンパク質濃度で検出され得る。「発現を検出すること」は、バイオマーカー遺伝子またはタンパク質の量または有無を判定することを意味する。したがって、「発現を検出すること」は、バイオマーカーが発現していない、検出可能には発現していない、低レベルに発現している、正常レベルに発現している、または過剰発現していることを判定する事例を包含する。過剰発現を判定するために、試験を行う身体試料は、対応する試料と比較し得る。例えば、健常者に由来する対応する身体試料。すなわち、発現の「正常」水準とは、例えばHNSCC

10

20

30

40

50

に罹患していないヒト対象または患者からの試料での、バイオマーカーの発現水準である。身体試料はまた、HNSCCの治療を受けた対象からの対応する身体試料と比較され得る。そのような試料は、標準化された形態で存在し得る。いくつかの実施形態では、バイオマーカー過剰発現の判定は、身体試料と健常者に由来する対応する身体試料との比較を必要としない。例えば、腫瘍試料での予後不良を示すバイオマーカーの過剰発現の検出は、健常者に由来する対応する試料と比較する必要性を除外してもよい。さらに、本発明のいくつかの態様では、該当するバイオマーカーまたはバイオマーカーの組み合わせの非発現、低発現、または正常発現（すなわち、過剰発現が存在しない）により、患者の予後に関する有用な情報が得られる。

#### 【0050】

本発明のバイオマーカーの発現を検出する方法は、バイオマーカーの核酸またはタンパク質濃度の定量または存在を判定するいずれの方法を含む。そのような方法は、当技術分野で周知であり、これに限定されないが、側方流動「試験紙」、ウエスタンブロット法、ノーザンブロット法、サザンブロット法、ELISA、免疫沈降、免疫蛍光法、フローサイトメトリ、免疫組織化学法、核酸ハイブリダイゼーション法、核酸逆転写法、および核酸増幅法（例えば、PCR）が挙げられる。特定の実施形態では、バイオマーカーの発現は、例えば固有のバイオマーカータンパク質に対する抗体を使用して、タンパク質濃度で検出される。これらの抗体は、様々な方法（ウエスタンブロット法、ELISA、免疫沈降、または免疫組織化学法等）で使用され得る。同様に、組織の免疫染色が、臨床情報、従来の予後予測方法、および当技術分野に周知の分子マーカー（例えば、p16<sup>INK4</sup><sup>a</sup> およびsolCD44）の発現の評価と併用し得る。このように、開示の方法により、HNSCC予後のより正確な判定が可能となり得る。

#### 【0051】

##### [キット]

対象をHNSCCと診断する、またはHNSCCの対象の予後を判定するキットもまた、本明細書で提供される。キットには、p16<sup>INK4</sup><sup>a</sup>、solCD44、および/または総タンパク質を測定する手段が含まれ得る。例えば、キットには、p16<sup>INK4</sup><sup>a</sup>に特異的に結合する複数の抗体が含まれ得る。いくつかの実施形態では、抗体は、E6H4抗体クローンのイディオタイプが含まれる。キットにはさらに、含有する抗体を検出する検出剤（例えば、二次抗体および/または比色剤（colorimetric agent））が含まれ得る。キットにはさらに、CD44（例えば、solCD44）と特異的に結合する複数の抗体が含まれ得る。キットにはさらに、試料中の総タンパク質濃度を判定する試薬が含まれ得る。キットにはまた、p16<sup>INK4</sup><sup>a</sup>および/またはsolCD44の基準試料が含まれ得る。キットには、さらに、キットの使用説明書（例えば、対象を診断する指示書）、容器、および/または担体が含まれ得る。具体的には、キットには、検出値を複合スコアに変換するためのアルゴリズムと参照表を使用するコンピュータ可読媒体またはハイパーリンクが含まれ得る。いくつかの実施形態では、キットは側方流動免疫測定法である。あるいは、キットは、マルチウェルプレート（任意選択的にp16<sup>INK4</sup><sup>a</sup>に特異的に結合する抗体、CD44に特異的に結合する抗体、またはその組み合わせで被覆されている）を含み得る。

#### 【0052】

以下の実施例は、本明細書に記載の方法および組成物のある態様をさらに例示することを意図し、特許請求の範囲を制限することを意図しない。

##### 【実施例】

#### 【0053】

次の実施例を、本開示の対象による方法および結果を例示するために以下に記載する。これらの実施例は、本明細書に開示の対象の全ての態様を含むものではなく、むしろ代表的な方法および結果を例示することを意図する。これらの実施例は、当業者には明白な本発明の等価物および変形を除外することを意図しない。

#### 【0054】

数量（例えば、量、温度等）に関する精度を確実にするための努力を行ったが、いくつかの誤差および偏差を説明すべきである。別段の指示がない限り、部は重量部であり、温度は または周囲温度であり、また圧力は大気圧下かその付近である。反応条件（例えば成分濃度、温度、圧力）と、記載された方法から得られる生成物の純度および収率を最適化するために使用され得る他の反応範囲および反応条件との多くの変形および組み合わせが存在する。合理的で慣例の実験のみ、そのようなプロセス条件を最適化する必要がある。

【0055】

[実施例1]

本明細書に記載のマーカが、p16<sup>INK4a</sup>に陽性である腫瘍をもつ患者でどのように増進するかを調べることにより、本明細書に記載の試験とHPV関連HNSCCとの関連性を検討した。口腔咽頭癌の14対象を評価した。各対象で、腫瘍組織からp16<sup>INK4a</sup>免疫組織化学法の結果を、また含嗽液からsolCD44およびタンパク質の結果を得た。solCD44およびタンパク質濃度の平均濃度は、HPV<sup>+</sup>例でより低い(CD44:3.17対4.2、p=0.55、タンパク質:0.83対1.07、p=0.49)が、その差は統計的有意性には至らなかった。含嗽液の上清を使用して測定したsolCD44およびタンパク質試験を、同じ含嗽液のペレットを使用して検出したp16<sup>INK4a</sup>濃度と組み合わせた。

10

【0056】

*in vitro*分析を、含嗽液ペレットからの溶解試料中のヒトp16<sup>INK4a</sup>タンパク質を定量するために実施した。試料ペレットを、可溶性p16<sup>INK4a</sup>の安定化のため、プロテアーゼ阻害剤(Thermo Scientific)を含有する200μlの細胞溶解緩衝液(SIGMA)に入れた。次いで、試料を95℃で10分間加熱し、p16<sup>INK4a</sup>の検出を向上させるために細胞を完全に溶解するようにした。p16<sup>INK4a</sup>タンパク質を、p16<sup>INK4a</sup>特異的モノクローナル抗体E6H4(商標)(Roche mtm laboratories AG)およびHRP標識されたp16<sup>INK4a</sup>特異的二次モノクローナル抗体で被覆したマイクロタイターストリップを使用する比色ELISAのサンドイッチ法で定量した。定量化は、既知のp16<sup>INK4a</sup>濃度(標準1~6)に基づき標準曲線を作成することにより実施した。試験試料の濃度は、標準曲線に基づく補間により決定された。マイクロタイタープレートリーダーを使用して、450nmの波長(参照波長:620nm)での各ウェルの吸光度を測定した。4パラメータ法に基づく算出プログラムを使用して、最終p16<sup>INK4a</sup>試料濃度を得た。結果は、U/mLで示し、また、試験試料を2連で、各100μL容積で測定した。15U/mLのカットオフ値を適正な閾値であると実証して、個々の臨床材料を、多施設臨床試験(Protocol #9502-06-REG-DE-001)によりCervatec(商標)p16<sup>INK4a</sup>ELISA(Roche mtm laboratories AG)結果について、陽性と分類した。

20

30

【0057】

この組み合わせ方法を使用して、CD44およびタンパク質を組み合わせたp16<sup>INK4a</sup>を、口腔もしくは口腔咽頭扁平上皮癌(CA)または未知の原発性癌(UK1CA)に罹患した患者を含むHNSCCの14患者で試験した。3人の健常ボランティア(HV)もまた、試験した(表1参照)。CD44(カットオフ値を2.7ng/mLに設定)およびタンパク質(カットオフ値を1.0mg/mLに設定)の濃度が低い2患者では、p16<sup>INK4a</sup>濃度が15U/mLのカットオフ値を超えていた。CD44およびタンパク質はまた、それぞれ、他の試験により検出されなかった腫瘍を特定した。したがって、p16<sup>INK4a</sup>のパネルへの追加は、感度を向上させた。全ての試験を行った3人の健常ボランティアでは、各マーカで、カットオフ値より低い濃度であった。

40

【0058】

## 【表1】

表1

N	濃度 U/ml* p16INK4a	濃度 ng/ml CD44 (x5)	濃度 mg/ml タンパク質	試料	群**	性別	年齢	人種	民族性
1	0	1.6	0.63	17	UK 1 CA	女性	47	白人	ヒスパニック系
2	3.099	4.19	0.398	79	CA	女性	65	白人	非ヒスパニック系
3	16.981	2.536	0.583	167	CA	女性	50	白人	ヒスパニック系
4	12.554	4.29	0.716	262	UK 1 CA	男性	56	白人	非ヒスパニック系
5	3.529	8.88	0.892	86	CA	男性	67	白人	ヒスパニック系
6	7.758	3.355	0.781	24	UK 1 CA	男性	66	黒人	非ヒスパニック系
7	0	1.645	1.054	221	UK 1 CA	男性	50	白人	ヒスパニック系
8	5.687	4	1.262	239	UK 1 CA	男性	58	白人	ヒスパニック系
9	0	10.325	1.309	273	CA	男性	46	白人	非ヒスパニック系
10	6.896	1.13	0.604	345	CA	男性	59	白人	非ヒスパニック系
11	5.123	0.93	0.472	367	CA	男性	58	白人	非ヒスパニック系
12	16.752	1.18	0.469	370	CA	男性	62	白人	ヒスパニック系
13	8.812	4.555	0.792	374	CA	男性	60	白人	ヒスパニック系
14	9.421	2.56	1.037	377	CA	女性	63	白人	非ヒスパニック系
NL1	0	1.645	0.797	UM001	HV	女性	41	白人	非ヒスパニック系
NL2	0	1.295	0.329	UM009	HV	女性	49	白人	ヒスパニック系
NL3	0.141	0.545	0.378	UM030	HV	女性	57	アジア人	非ヒスパニック系

\*1 U/ml=2.8 pg/ml の p16 INK4a タンパク質。

\*\*CA: 癌、UK 1 CA: 未知の原発性癌、HV: 健常ボランティア

## 【0059】

## [実施例2]

口腔癌組織に免疫組織化学法を使用して、マーカー（CD44およびEGFR）（予後不良に関連する）のパネルを評価した。発明者らは、組織中のCD44、EGFR、およびp16（HPVの代替マーカー）の発現の関連性を、含嗽液のsol CD44およびタンパク質濃度により判定した。

## 【0060】

10

20

30

【表 2】

表 2. 患者の人口統計学データおよび他の特徴

変数	N	%
<b>年齢 (歳)</b>		
平均 (標準偏差)	60.4	(9.8)
中央値 (最小値~最大値)	61	(40- 83)
<b>性別</b>		
女性	6	16.2
男性	31	83.8
<b>民族性</b>		
ヒスパニック系	22	59.5
非ヒスパニック系	15	40.5
<b>人種</b>		
白人	29	78.4
黒人	8	21.6
<b>喫煙</b>		
非喫煙者	5	13.5
前喫煙者	8	21.6
現喫煙者	24	64.9
<b>アルコール、過去</b>		
未飲酒者	8	22.2
少量飲酒者 (3 杯未満/日)	10	27.8
大量飲酒者 (3 杯以上/日)	18	50.0
欠測者	1	
<b>アルコール、現在</b>		
非飲酒者	12	37.5
少量飲酒者	8	25.0
大量飲酒者	12	37.5
欠測者	5	
<b>健康管理</b>		
よい	20	54.1
悪い	17	45.9
<b>学歴</b>		
グレード 1~8 (初等教育)	6	16.2
グレード 9~11 (ある程度の高校)	5	13.5
グレード 12 または GED (高校卒業)	12	32.4
大学 1~3 年 (ある程度の大学/専門学校)	6	16.2
大学 4+ 年 (大学卒業)	8	21.6
<b>職業</b>		
被雇用者	7	19.4
自営業	6	16.7
退職者	8	22.2
労働不能者	6	16.7
1 年未満の失業者	3	8.3
1 年超の失業者	6	16.7
欠測者	1	
<b>所得</b>		
\$10,000 未満	16	57.1
\$10,000 以上\$15,000 未満	1	3.6
\$20,000 以上\$25,000 未満	2	7.1
\$25,000 以上\$35,000 未満	2	7.1
\$35,000 以上\$50,000 未満	2	7.1
\$50,000 以上\$75,000 未満	2	7.1
\$75,000 以上	3	10.7
欠測者	9	

【 0 0 6 1 】

【表 3】

表 3. 病気の特徴、治療、および転帰

変数	N	%	変数	N	%
<b>病気</b>					
口唇および口腔癌	13	35.1			
口腔咽頭癌	24	64.9			
<b>病期</b>					
I	3	8.11			
II	1	2.7			
III	8	21.6			
IV	9	24.3			
IVA	12	32.4			
IVB	4	10.8			
<b>T 病期</b>					
T1	5	13.5			
T2	5	13.5			
T3	11	29.7			
T4	4	10.8			
T4a	10	27.0			
T4b	2	5.4			
<b>N 病期</b>					
Nx	1	2.7			
N0	14	37.8			
N1	3	8.1			
N2a	1	2.7			
N2b	6	16.2			
N2c	9	24.3			
N3	3	8.1			
<b>M 病期</b>					
M0	33	89.2			
Mx	4	10.8			
<b>治療</b>					
化学療法/RT	16	43.2			
外科的療法/化学療法/RT	9	24.3			
外科的療法	5	13.5			
外科的療法/RT	2	5.4			
外科的療法/化学療法	1	2.7			
化学療法	1	2.7			
未治療/欠測者	2	5.4			
<b>病理</b>					
生検	25	67.6			
外科的切除 (全断端陰性)	12	32.4			
<b>リンパ管</b>					
あり	2	16.7			
なし	10	83.3			
欠測者	25				
<b>神経周囲</b>					
あり	3	25.0			
なし	9	75.0			
欠測者	25				
<b>分化 (Velos)</b>					
十分	6	18.8			
中程度	17	53.1			
中程度～不十分	2	6.3			
不十分	7	21.9			
欠測者	5				
<b>浸潤 (Velos)</b>					
あり (5、10、15、22 mm)	5	17.2			
なし	24	82.8			
欠測者	8				
<b>転帰</b>					
進行/再発	21	56.8			
無症候 (Event-free)	16	43.2			
<b>状態</b>					
死亡	16	43.2			
生存	21	56.8			

10

20

30

【 0 0 6 2 】

【表4】

表4. IHC 変数による含嗽液中の CD44、Log2 CD44、およびタンパク質、PD 状態 および生命状態

	CD44					log2CD44					タンパク質				
	N	平均	SD	SE	P	N	平均	SD	SE	P	N	平均	SD	SE	P
総数	36	7.91	10.85	1.81		36	2.35	1.20	0.20		36	1.03	0.58	0.10	
<b>p16</b>															
陽性	16	9.15	14.32	3.58	0.578	16	2.47	1.26	0.31	0.603	16	1.10	0.64	0.16	0.557
陰性	20	6.92	7.25	1.62		20	2.26	1.18	0.26		20	0.98	0.53	0.12	
<b>P16の新規定義</b>															
核/ 核+細胞質	14	6.06	4.34	1.16	0.335	14	2.29	0.97	0.26	0.811	14	1.12	0.61	0.16	0.474
細胞質のみ/ 非染色	22	9.09	13.45	2.87		22	2.39	1.35	0.29		22	0.98	0.57	0.12	
<b>CD44</b>															
膜	22	9.26	13.42	2.86		22	2.45	1.31	0.28		22	1.05	0.64	0.14	
細胞質	2	10.69	6.52	4.61		2	3.27	0.94	0.67		2	1.30	0.70	0.49	
膜および細胞 質	2	3.53	3.06	2.17		2	1.48	1.46	1.03		2	0.62	0.34	0.24	
非染色	10	5.27	3.66	1.16		10	2.13	0.91	0.29		10	1.04	0.48	0.15	
CD44 染色	26	8.93	12.49	2.45	0.186	26	2.44	1.30	0.26	0.506	26	1.03	0.62	0.12	0.986
非染色	10	5.27	3.66	1.16		10	2.13	0.91	0.29		10	1.04	0.48	0.15	
膜のみ、一様 に	21	9.58	13.67	2.98		21	2.50	1.32	0.29		21	1.05	0.65	0.14	
その他	5	6.20	5.47	2.45		5	2.17	1.33	0.59		5	0.94	0.52	0.23	
非染色	10	5.27	3.66	1.16		10	2.13	0.91	0.29		10	1.04	0.48	0.15	
膜のみ、一様 に	21	9.58	13.67	2.98	0.219	21	2.50	1.32	0.29	0.392	21	1.05	0.65	0.14	0.804
その他/非染色	15	5.58	4.17	1.08		15	2.15	1.02	0.26		15	1.00	0.48	0.12	
<b>EGFR</b>															
膜	3	3.55	1.83	1.06		3	1.68	0.83	0.48		3	1.31	0.85	0.49	
細胞質	8	12.32	20.05	7.09		8	2.59	1.62	0.57		8	1.25	0.71	0.25	
膜および細胞 質	21	7.68	7.07	1.54		21	2.49	1.10	0.24		21	0.98	0.51	0.11	
非染色	4	3.57	1.84	0.92		4	1.66	0.88	0.44		4	0.67	0.31	0.15	
EGFR 染色	32	8.46	11.39	2.01	0.035	32	2.44	1.22	0.22	0.223	32	1.08	0.59	0.10	0.186
非染色	4	3.57	1.84	0.92		4	1.66	0.88	0.44		4	0.67	0.31	0.15	
膜&細胞質、 一様に	19	6.90	6.10	1.40		19	2.39	1.03	0.24		19	0.94	0.51	0.12	
その他	13	10.73	16.44	4.56		13	2.51	1.49	0.41		13	1.28	0.66	0.18	
非染色	4	3.57	1.84	0.92		4	1.66	0.88	0.44		4	0.67	0.31	0.15	
膜&細胞質、 一様に	19	6.90	6.10	1.40	0.579	19	2.39	1.03	0.24	0.850	19	0.94	0.51	0.12	0.314
その他/非染色	17	9.04	14.60	3.54		17	2.31	1.40	0.34		17	1.14	0.64	0.16	
角化	14	10.37	15.97	4.27	0.284	14	2.46	1.49	0.40	0.681	14	1.04	0.67	0.18	0.949
非角化	22	6.35	5.62	1.20		22	2.29	1.01	0.21		22	1.03	0.53	0.11	
PD (進行性 疾患)	21	10.80	13.61	2.97	0.043	21	2.67	1.46	0.32	0.068	21	1.19	0.71	0.15	0.030
非 PD	16	4.34	1.74	0.43		16	2.01	0.59	0.15		16	0.82	0.18	0.04	
死亡	16	11.17	14.75	3.69	0.118	16	2.74	1.41	0.35	0.118	16	1.26	0.72	0.18	0.050
生存	21	5.60	5.40	1.18		21	2.11	0.96	0.21		21	0.86	0.35	0.08	

CD44 は ng/ml (x5)、タンパク質は mg/ml 単位

SD: 標準偏差, SE: 標準誤差, P: Student の t 検定による P 値。

## 【0063】

p16 の核染色は、HPV 感染の有効な指標である。Sol CD44 濃度は、HPV<sup>+</sup> より HPV<sup>-</sup> で高い。

## 【0064】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5. PFS および OS に対する、潜在的な予後予測因子の一変量効果

予後予測因子	PFS		OS	
	HR (95% CI)	P 値	HR (95% CI)	P 値
Log2 CD44 1-単位の増加	1.407 (0.989, 2.001)	0.0574	1.638 (1.081, 2.482)	0.0200
タンパク質 1-単位の増加	3.607 (1.626, 7.999)	0.0016	3.897 (1.701, 8.928)	0.0013
CD44 $\geq$ 10 対 $<$ 10	3.180 (1.306, 7.742)	0.0108	4.595 (1.601, 13.186)	0.0046
タンパク質 $\geq$ 1 対 $<$ 1	3.243 (1.349, 7.798)	0.0086	3.379 (1.239, 9.214)	0.0173
喫煙: 現喫煙者 対 非喫煙者	0.911 (0.155, 4.993)	0.9148	3.099 (0.346, 27.738)	0.3117
喫煙: 前喫煙者 対 非喫煙者	1.410 (0.321, 6.198)	0.6496	2.750 (0.355, 21.328)	0.3331
喫煙: 現喫煙者 対 非喫煙者/前喫煙者	1.501 (0.575, 3.915)	0.4069	1.261 (0.436, 3.642)	0.6688
アルコール: 重度 対 非/軽度	2.236 (0.919, 5.439)	0.0759	2.775 (0.959, 8.031)	0.0598
P16 <sup>+</sup> 対 p16 <sup>-</sup>	0.674 (0.268, 1.693)	0.4014	0.748 (0.265, 2.113)	0.5831
P16 核 対 cyst のみ/非染色	0.628 (0.240, 1.640)	0.3420	0.765 (0.261, 2.242)	0.6251
CD44: memb のみ、一様 対 その他	1.763 (0.698, 4.452)	0.2304	2.407 (0.765, 7.579)	0.1333
EGFR: memb & cyt、一様 対 その他	1.691 (0.686, 4.173)	0.2539	1.203 (0.427, 2.289)	0.7269
病期 IV 対 I-III	2.994 (1.005, 8.921)	0.0490	2.824 (0.802, 9.939)	0.1059
病期 III-IV 対 I-II	2.732 (0.367, 20.355)	0.3268	2.164 (0.285, 16.415)	0.4552
T4- 対 T1-3	3.055 (1.260, 7.408)	0.0135	2.973 (1.078, 8.204)	0.0353
黒人 対 白人	5.432 (2.152, 13.714)	0.0003	6.530 (2.286, 18.658)	0.0005
非ヒスパニック系 対 ヒスパニック系	3.001 (1.254, 7.182)	0.0136	4.009 (1.431, 11.234)	0.0083
性別: 女性 対 男性	2.388 (0.924, 6.170)	0.0723	1.770 (0.494, 6.338)	0.3801
年齢 1-単位の増加	1.003 (0.961, 1.047)	0.8778	1.043 (0.991, 1.096)	0.1046

HR (95% CI) : 一変量 Cox モデルからの予測したハザード比 および対応する 95%信頼区間。

【 0 0 6 5 】

表 5 の囲み部分は、マーカー濃度および予後変数の有意な関連性を示す。

【 0 0 6 6 】

10

20

30

40

【表 6】

表 6. 二変量 Cox 回帰モデル				
予後予測因子	PFS		OS	
	HR (95% CI)	P 値	HR (95% CI)	P 値
CD44 $\geq$ 10 対 <10	2.327 (0.891, 6.078)	0.0847	4.370 (1.489, 12.824)	0.0073
病期 IV 対 I-III	2.197 (0.675, 7.148)	0.1910	1.487 (0.188, 11.784)	0.7073
CD44 $\geq$ 10 対 <10	2.949 (1.195, 7.281)	0.0190	3.610 (1.164, 11.194)	0.0262
病期 III-IV 対 I-II	2.014 (0.262, 15.498)	0.5014	1.894 (0.488, 7.348)	0.3558
タンパク質 $\geq$ 1 対 <1	2.470 (0.956, 6.381)	0.0619	2.710 (0.921, 7.974)	0.0702
病期 IV 対 I-III	2.059 (0.630, 6.734)	0.2321	1.886 (0.486, 7.319)	0.3589
タンパク質 $\geq$ 1 対 <1	3.018 (1.223, 7.446)	0.0165	3.256 (1.139, 9.305)	0.0276
病期 III-IV 対 I-II	1.728 (0.219, 13.667)	0.6040	1.260 (0.151, 10.506)	0.8312

10

20

## 【 0 0 6 7 】

無増悪生存 ( P F S ) および全生存 ( O S ) での s o l C D 4 4 および総タンパク質の効果は、病期と無関係であると思われる。

## 【 0 0 6 8 】

## [ 実施例 3 ]

簡便で、安価で、非侵襲的な、HNSCCの早期発見検査の必要性は極めて大きい。CD44、すなわち重要なHNSCC腫瘍発生マーカーとして浮上している膜貫通糖タンパク質に、以前より労力が注ぎ込まれてきた。SCC-25細胞(低CD44)をCD44標準型でトランスフェクトすると、CD44の過剰発現の結果、増殖、遊走およびシスプラチン抵抗性の増加が見られた(図3A、3B、3C)。さらに、高CD44およびEGFRの細胞株CAL27を使用してCD44をノックアウトさせた結果、ヌードマウスで腫瘍成長が大幅に減衰した(図4A、2B)( $P < 0.05$ )。CD44は、成長および遊走を誘導するEGFR(セツキシマブ療法の標的)等の重要なチロシンキナーゼと相互作用することが示された。図5に開示のデータには、総EGFRおよびそのリン酸化形態(Y1068)は、2種類の分子が機能的に関係していることを示すCD44-siRNA異種移植片で、減少していることが示された。

30

## 【 0 0 6 9 】

早期発見検査、およびCD44が可溶型に開裂され得るという知見が極めて必要であることから、癌患者および対照からの含嗽液で、solCD44を評価した。26例のHNSCC患者および10例の健常ボランティアを含む予備研究では、solCD44が含嗽液で検出され得、浸潤性疾患の患者を、正常ボランティアから、79%の感度および100%の特異度で識別し得ることが示された。本検査が高リスク集団で機能するかどうかを判定するため、喫煙および/または飲酒歴、および頭頸部の良性疾患をもつ対照コホートを作成した。102例のHNSCCおよび69例の対照による本研究で、solCD44のELISA試験は62%の感度および88%の特異度をもつことが示され、また良性疾患は結果に有意な影響を与えないことが示された。発症率が少なく上気道消化管(UADT)のより遠位側にある喉頭/下咽頭腫瘍を有する対象では、マーカー濃度が低下するこ

40

50

とが判明した。

【 0 0 7 0 】

感度を向上させるため、さらなるマーカーを検討した。総タンパク質（簡便な Lowry 法のような分析で測定し、水和状態にする正常化剤（normalizer）として元来使用される）は、対照と比較して HNSCC で上昇することが認められた。同コホートを評価すると、組み合わせた s o l C D 4 4 濃度および総タンパク質濃度が、いずれのマーカー単独よりも、HNSCC を対照と識別するのにより有効であることが、初めて示された。39 例の対照および 40 例のコホートでの最近の研究により、他のリスク変数（歯の欠損および学歴等）を含むと本試験は向上し、結果として多変量解析の曲線下面積（AUC）は 0.85 となることが実証された。

10

【 0 0 7 1 】

【表 7】

表 7. 年齢で調整したロジスティックモデル

群	症例数	対照数	モデル	変数	OR	p	AUC
黒人男性	15	15	1	Log2 CD44	2.878	0.0457	0.853
			2	タンパク質	13.378	0.0250	0.862
			3	Log2 CD44 & タンパク質	2.078 5.450	0.2405 0.1582	0.889
白人男性	90	76	1	Log2 CD44	2.410	<.0001	0.723
			2	タンパク質	2.101	0.0594	0.609
			3	Log2CD44 & タンパク質	2.965 0.468	<.0001 0.1768	0.739
黒人女性	7	17	1	Log2CD44	1.963	0.2204	0.647
			2	タンパク質	3.796	0.2238	0.672
			3	Log2CD44 & タンパク質	1.554 1.747	0.6705 0.7916	0.689
白人女性	19	14	1	Log2CD44	1.262	0.6988	0.600
			2	タンパク質	1.896	0.3557	0.594
			3	Log2CD44 & タンパク質	0.989 1.919	0.9823 0.5364	0.594

20

30

【 0 0 7 2 】

【表 8】

表 8. 含嗽液中の SolCD44、log2solCD44 および タンパク質濃度

	癌 (N=132)				対照 (N=124)			P 値
	N	平均値	SD	SE	平均値	SD	SE	
CD44	132	5.83	7.19	0.63	2.95	1.92	0.17	<.0001
Log2 CD44	132	2.01	1.16	0.10	1.30	0.87	0.08	<.0001
タンパク質	132	0.98	0.55	0.05	0.77	0.41	0.04	<.001

40

【 0 0 7 3 】

本研究では、症例対照設計を使用して、口腔咽頭および口腔 HNSCC の 150 例の患者および 150 例の対照の重要な変数と一致する度数について、HNSCC の可溶化マーカーを評価した。表 7 は、132 の症例および 124 例の対照での s o l C D 4 4、l o g 2 s o l C D 4 4 および総タンパク質濃度の中間解析を示す。症例および対照は、年齢、性別、人種および民族性について成功裏に一致した度数であった（ $p > 0.5$ ）。s o l C D 4 4 濃度および総タンパク質濃度の両方が、著しく上昇している。表 8 でのロジスティックモデルは全て、年齢で調整している。本試験は、黒人男性で、口腔癌を最良に

50

検出した。黒人女性については、試料数が比較的小さかった。単独または併用でのマーカーの著しい効果はなかったが、対応するオッズ比は、黒人男性の傾向と同様であった。白人男性の間では、 $\log 2$  CD44の効果は、それ自身によりまたはタンパク質を加えた場合に著しかった。モデル1と比較してモデル3で、わずかに向上していた。最後に、白人女性の間では、マーカーは最も効果がなく、0.60前後のAUCであった。マーカー試験は黒人男性（HPV感染が稀である群）で最も機能したため、HPV発現を、口腔癌症例で検討した。

#### 【0074】

37症例を、利用可能なFFPE組織により特定した。経過観察が13.9ヶ月の1患者を除き、生存中の20患者全てが、27~54.4ヶ月の経過観察を有した（中央値37ヶ月）。16死亡例のうち14例は、経過観察の開始2年以内で生じた。solCD44濃度および総タンパク質濃度を、含嗽液で評価し、CD44、EGFRおよびp16（HPV感染の代替として）の様々な染色パターンを、IHCを使用して検討した。無増悪および全生存期間との関連性もまた、判定した。重要な人口統計学データおよび危険因子挙動（性別、人種、民族性、タバコおよび飲酒等）もまた、評価した。このコホートは、以下の人口統計学データを有した：平均年齢は60.4歳であり、16.2%が女性であり、59.5%がヒスパニック系であり、21.6%が黒人であり、64.9%が現喫煙者であり、50%が重度の飲酒をしており、57.1%が年間10,000ドル未満の所得であった。群の疾病特性は以下のとおりであった：35.1%が口腔癌（OC）でありかつ残りは口腔咽頭癌（OP）であり；対象のうち32.4%のみが病期IIIまたはそれ以下であり；患者は化学放射線療法（43.2%）、外科的療法と化学放射線療法（24.3%）、外科的療法のみ（13.5%）、外科的療法と放射線療法（5.4%）、外科的療法と化学療法（2.7%）、化学療法のみ（2.7%）で治療され、また無治療またはデータ欠測者である（5.4%）。57%近くが再発または進行し、43.2%が死亡した。

#### 【0075】

腫瘍の44%が、p16<sup>+</sup>（腫瘍細胞の50%以上がp16に陽性に染色されると定義される）であった。IHCパターンの比較により、陽性のp16染色、CD44膜の無染色、EGFR膜および細胞質の染色パターンの欠如、および非角化腫瘍が、OC腫瘍と比較して、OPと有意に関連していることが明らかになった。腫瘍部位により、病期の診断または転帰に、差異はなかった。染色の局在化に関し、p16陽性は、細胞質染色のみまたは非染色に対して、核p16染色または核および細胞質p16染色と有意に関連していた（ $p < 0.0001$ ）。同様に一様なCD44膜染色の欠如（ $p < 0.0001$ ）は、p16陽性に関連していた。p16陽性腫瘍での一様なEGFR膜および細胞質染色の欠如もまた、統計的有意性に達していた（ $p = 0.02$ ）。角化、性別、民族性、人種、喫煙および飲酒は、本研究では、p16陽性に有意に関係していなかった。

#### 【0076】

含嗽液のsolCD44および総タンパク質濃度は、p16<sup>+</sup>が、1)50%以上の腫瘍細胞であるp16<sup>+</sup>または2)細胞質のみ/非染色に対するいずれの核p16染色である、という定義を使用していたかというp16状態に基づく、有意な差異を示さなかった。しかし、solCD44および総タンパク質の両方に関して、有意な濃度上昇が再発または進行に関連していた（CD44：10.8対4.3、 $p = 0.043$ 、タンパク質1.2対0.8、 $p = 0.030$ ）。Kaplan-Meier、ログランク検定、およびCox回帰分析に基づき、無増悪生存の有意な予測因子は、CD44（10対<10、HR = 3.18、 $p = 0.011$ ）、タンパク質（1対<1、HR = 3.24、 $p = 0.009$ ）、T病期（T4対T1~III、HR = 2.99、 $p < 0.049$ ）、人種（黒人対白人、HR = 5.43、 $p < 0.0001$ ）および民族性（非ヒスパニック系対ヒスパニック系、HR = 3.00、 $p < 0.014$ ）であった。性別はほぼ有意性に達していた（女性対男性、HR = 2.39、 $p < 0.072$ ）。同様に全生存期間の有意な予測因子は、10以上のCD44（HR = 4.60、 $p = 0.005$ ）、1以上のタンパク質

10

20

30

40

50

(HR = 3.38、p = 0.17)、T4病期(HR = 2.97、p = 0.035)、黒人種(HR = 6.53、p < 0.001)および非ヒスパニック系民族性(HR = 4.01、p = 0.008)であった。以下の変数は、無増悪生存および全生存の予測因子として有意性を示さなかった：p16状態、CD44染パターン、EGFR染色パターン、角化、喫煙歴、飲酒歴、部位(口腔対中咽頭)、結節状態、および年齢。さらに、CD44およびタンパク質は、病期を含む二変量解析で、効果の程度と有意性を保持していた。

【0077】

このHNSCC群では、5対象のみが未喫煙者であり；これらのうち4対象がHPV<sup>+</sup>であった。HPV<sup>+</sup>のうち、未喫煙者の全てが生存し、1対象が再発していた。したがって、いくつかの研究によりHPV<sup>+</sup>の非喫煙者が、HPV<sup>+</sup>の喫煙者と比較して極めて予後が良いことが示されているので、p16状態と予後とに関連性が低いのは、本研究で未喫煙者が少ないためと考えられる。

10

【0078】

p16、CD44、およびEGFR局在化の重要な関係性をさらに調査するため、免疫蛍光染色を実施した。図6には、具体的なp16-IHC染色が示される(染色は細胞質であり、拡散している)。この場合、CD44は、膜内で染色し、腫瘍全体にわたり一様に染色している。CD44およびEGFRは細胞膜に共局在化し、EGFRのいくらかの細胞質染色が同様に存在する。

【0079】

しかし、腫瘍がp16<sup>+</sup>である場合、図7に示すように、p16について強力に核染色し、細胞質にも同様にいくらかの染色が見られる。しかし、CD44膜染色は低下し、侵入リンパ球のみがCD44発現を保持している。EGFR発現は、全く見られない。

20

【0080】

添付の特許請求の範囲の方法は、本明細書に記載の固有の方法により、その範囲が制限されるものではなく、本開示の特許請求の範囲内において、特許請求の範囲の多少の態様および機能的に等価であるいずれの方法の例示を意図する。本明細書に示されるおよび記載の方法に加えて、様々な変形が、添付の特許請求の範囲内に含まれることを意図する。さらには、ある代表的な方法およびこれら方法の態様のみが具体的に記載されているが、具体的記載がなくても、その他の方法およびその方法の様々な特徴の組み合わせが、添付の特許請求の範囲内に含まれることを意図する。したがって、段階、構成要素、成分、または構築物の組み合わせが本明細書中に明確に記載され得るが；段階、構成要素、成分、および構築物の他の全ての組み合わせは、明白に記載されていなくとも、これを包含する。

30

。

【図1】

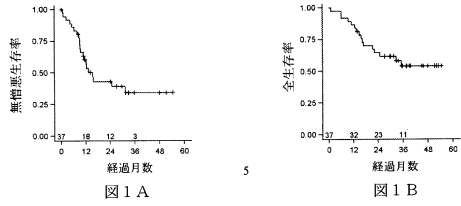


図1 A

図1 B

	PFS	OS
中央値	15.4 ヶ月 (9.6, -)	未到達
1 2ヶ月での比率	60.3% (42.3, 74.3%)	86.5% (70.5, 94.1%)
2 4ヶ月での比率	43.1% (25.8, 59.2%)	64.3% (46.6, 77.5%)
3 6ヶ月での比率	34.3% (17.7, 51.5%)	53.8% (35.4, 69.0%)

図1 C

	N	中央値	最小値	最大値	平均値	標準偏差
os_月数	総数 37	29.8	1.0	54.4	28.6	14.7
	死亡 16	15.2	1.0	35.0	16.2	9.2
	生存 21	37.4	13.9	54.4	38.1	10.2
pfs_月数	総数 37	11.7	0.3	54.4	17.5	14.2
	pd 16	28.3	0.3	54.4	26.5	16.1
	非pd 21	9.4	0.8	31.2	10.6	7.2

図1 D

【図2 - 1】

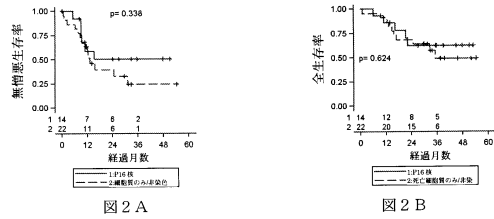


図2 A

図2 B

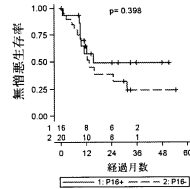


図2 C

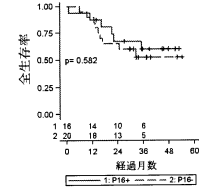


図2 D

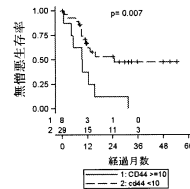


図2 E

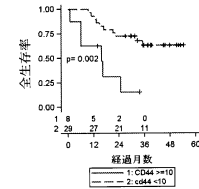


図2 F

【図2 - 2】

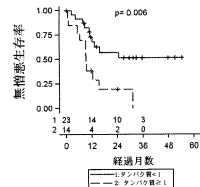


図2 G

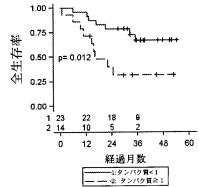


図2 H

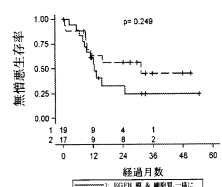


図2 M

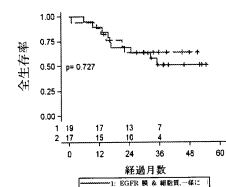


図2 N

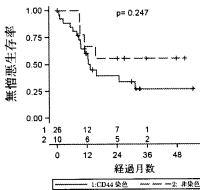


図2 I

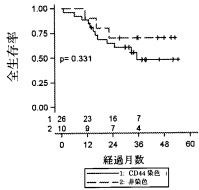


図2 J

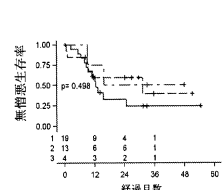


図2 O

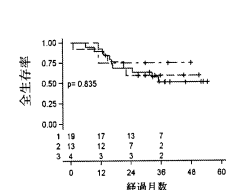


図2 P

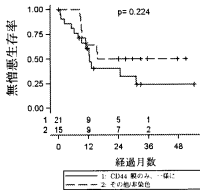


図2 K

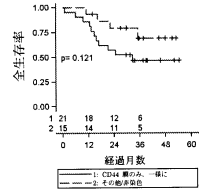


図2 L

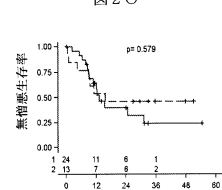


図2 Q

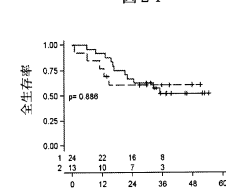


図2 R

【図2 - 3】

【図 2 - 4】

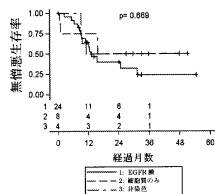


図 2 S

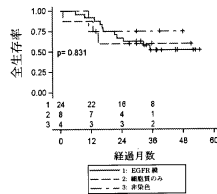


図 2 T

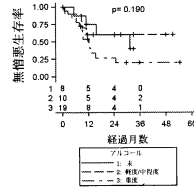


図 2 Y

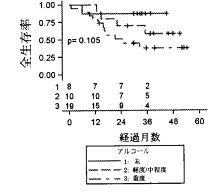


図 2 Z

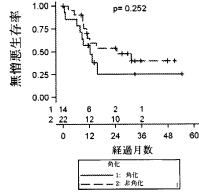


図 2 U

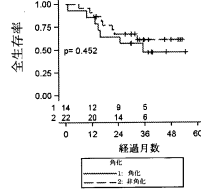


図 2 V

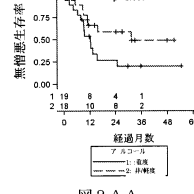


図 2 AA

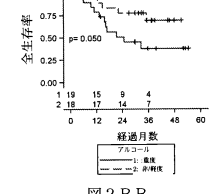


図 2 BB

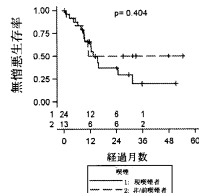


図 2 W

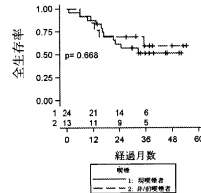


図 2 X

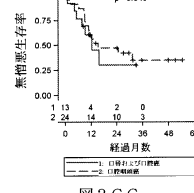


図 2 CC

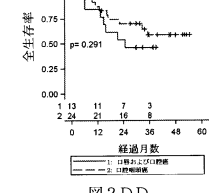


図 2 DD

【図 2 - 6】

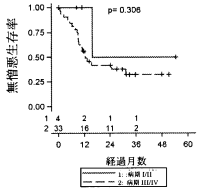


図 2 EE

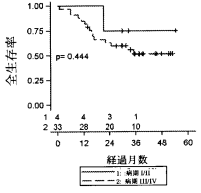


図 2 FF

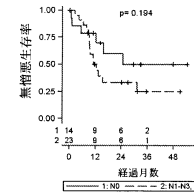


図 2 KK

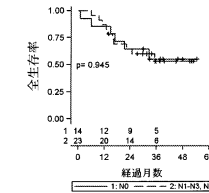


図 2 LL

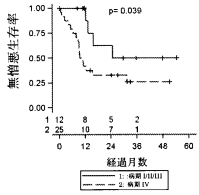


図 2 GG

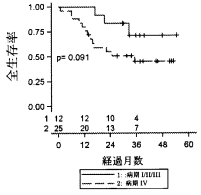


図 2 HH

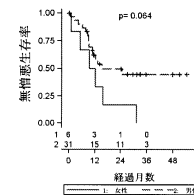


図 2 MM

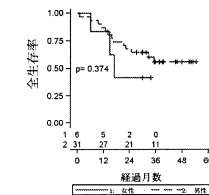


図 2 NN

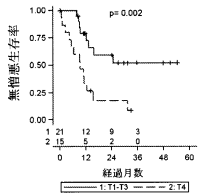


図 2 II

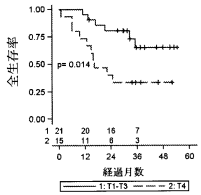


図 2 JJ

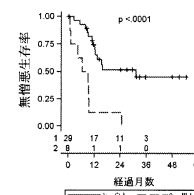


図 2 OO

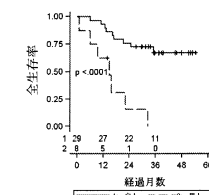


図 2 PP

【図 2 - 7】

【 図 2 - 8 】

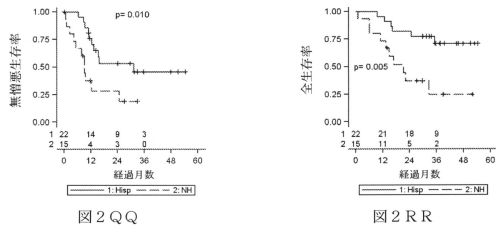


図 2 Q Q

図 2 R R

【 図 3 - 2 】

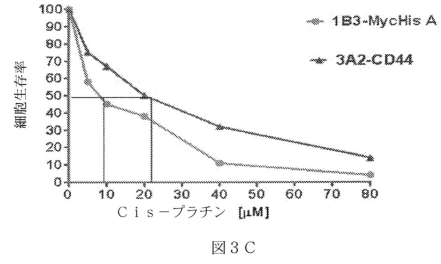


図 3 C

【 図 3 - 1 】

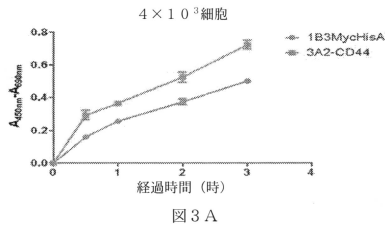


図 3 A

【 図 4 】

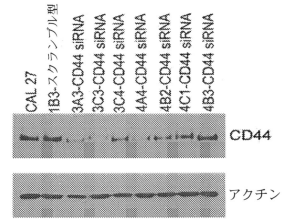


図 4 A

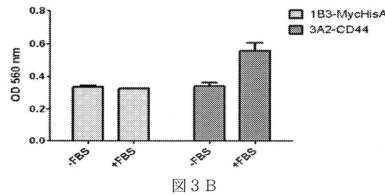


図 3 B

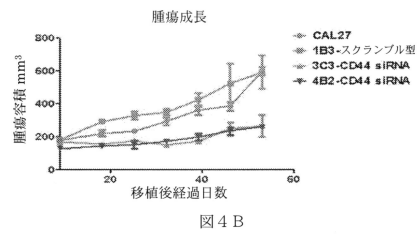


図 4 B

【 図 5 】

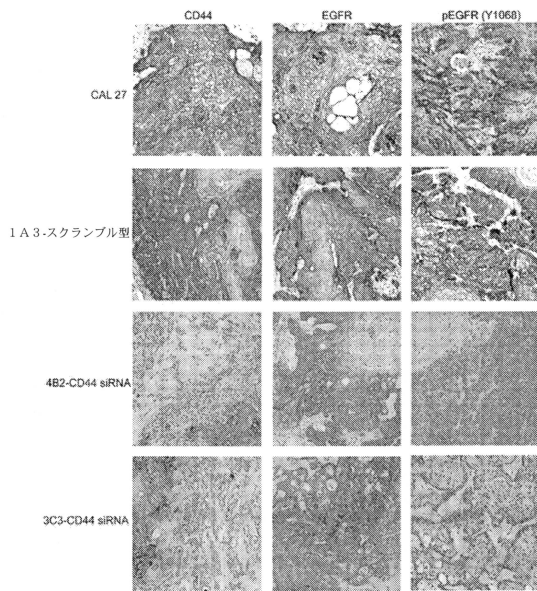


図 5

【 図 6 】

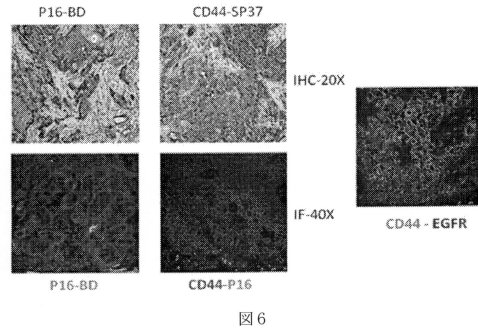


図 6

【 図 7 】

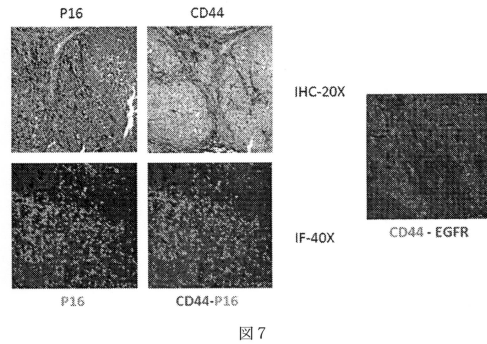


図 7

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I			
G 0 1 N	33/543	(2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	G 0 1 N	33/543	5 2 1
			C 1 2 Q	1/68	A

- (74)代理人 100142996  
弁理士 森本 聡二
- (74)代理人 100154298  
弁理士 角田 恭子
- (74)代理人 100166268  
弁理士 田中 祐
- (74)代理人 100170379  
弁理士 徳本 浩一
- (74)代理人 100161001  
弁理士 渡辺 篤司
- (74)代理人 100179154  
弁理士 児玉 真衣
- (74)代理人 100180231  
弁理士 水島 亜希子
- (74)代理人 100184424  
弁理士 増屋 徹
- (72)発明者 フランツマン, エリザベス  
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 7 7 2 6 , マナラパン, エリザベス・プレイス 5
- (72)発明者 ペレイラ, ルーテシア  
アメリカ合衆国フロリダ州 3 3 1 3 6 , マイアミ, ノースウェスト・テンス・アヴェニュー 1 4  
0 0 , スウィート 1 2 0 0 , オフィス・オヴ・テクノロジー・トランスファー
- (72)発明者 レイス, イシルディナ・エム  
アメリカ合衆国フロリダ州 3 3 1 3 6 , マイアミ, ノースウェスト・テンス・アヴェニュー 1 4  
0 0 , スウィート 1 2 0 0 , オフィス・オヴ・テクノロジー・トランスファー
- (72)発明者 ダンカン, ロバート・シー  
アメリカ合衆国フロリダ州 3 3 1 3 6 , マイアミ, ノースウェスト・1 4 ・ストリート 1 1 2 0  
, ルーム 1 0 6 3

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 3 2 5 2 0 1 ( U S , A 1 )  
Elizabeth J. Franzmann et al. , Head Neck , 2 0 1 1 年 7 月 1 1 日 , 34(5) , 687-695  
Harriet C. HAFKAMP et al. , International Journal of Cancer , 2 0 0 3 年 8 月 6 日 , Vo  
l. 107, Issue 3, 394-400

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8  
C 1 2 Q 1 / 6 8  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
P u b M e d

专利名称(译)	检测人乳头瘤病毒和预测头颈部鳞状细胞癌的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6174035B2</a>	公开(公告)日	2017-08-02
申请号	JP2014542462	申请日	2012-11-15
[标]申请(专利权)人(译)	迈阿密大学		
申请(专利权)人(译)	盐湖城OVU迈阿密		
当前申请(专利权)人(译)	盐湖城OVU迈阿密		
[标]发明人	フランツマンエリザベス ペレイラルーテシア レイスイシルディナエム ダンカンロバートシー		
发明人	フランツマン,エリザベス ペレイラ,ルーテシア レイス,イシルディナ・エム ダンカン,ロバート・シー		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/574 G01N33/543 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N33/57488 G01N33/5743 G01N2333/025 G01N2333/70585 G01N2800/50		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/50.P G01N33/50.G G01N33/53.D G01N33/569.L G01N33/574.A G01N33/543.521 C12Q1/68.A		
代理人(译)	河村 英文 中村綾子 角田恭子 田中宇 徳本光一 渡边淳		
优先权	61/559974 2011-11-15 US 61/654595 2012-06-01 US		
其他公开文献	JP2014533372A JP2014533372A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

描述了诊断和确定头颈部鳞状细胞癌预后的方法和试剂盒。用于诊断受试者头部和颈部鳞状细胞癌 ( HNSCC ) 的示例性方法可包括测定来自受试者的唾液样品中总蛋白, soI CD44和HPV的存在, 并使用总蛋白, HPV和CD44的组合通过多变量分析确定综合得分, 由此得分高于截断点的增加区分具有HNSCC的受试者或其未来发生风险升高的受试者与没有HNSCC的受试者或其将来发生的低风险。

(5) Int. Cl.		F I
GO I N	33/68 (2006.01)	GO I N 33/68
GO I N	33/60 (2006.01)	GO I N 33/50 P
GO I N	33/63 (2006.01)	GO I N 33/50 G
GO I N	33/669 (2006.01)	GO I N 33/53 D
GO I N	33/574 (2006.01)	GO I N 33/569 L

請求項の数 14 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-542462 (P2014-542462)	(73) 特許権者	513046814
(86) (22) 出願日	平成24年11月15日 (2012.11.15)		ユニヴァーシティ・オブ・マイアミ
(65) 公表番号	特表2014-533372 (P2014-533372A)		アメリカ合衆国フロリダ州33136, マ
(43) 公表日	平成26年12月11日 (2014.12.11)		イアミ、ノースウエスト・セブンス・アウ
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/065282		エニュー 1951, スイート 110
(87) 国際公開番号	W02013/074793	(74) 代理人	100099623
(87) 国際公開日	平成25年5月23日 (2013.5.23)		弁理士 奥山 尚一
審査請求日	平成27年11月16日 (2015.11.16)	(74) 代理人	100096769
(31) 優先権主張番号	61/559,974		弁理士 有原 幸一
(32) 優先日	平成23年11月15日 (2011.11.15)	(74) 代理人	100107319
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 松島 鉄男
(31) 優先権主張番号	61/654,595	(74) 代理人	100114591
(32) 優先日	平成24年6月1日 (2012.6.1)		弁理士 河村 英文
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100125380
			弁理士 中村 綾子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトパピローマウイルスを検出し顔頸部扁平上皮癌を予後予測する方法