

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-73260

(P2012-73260A)

(43) 公開日 平成24年4月12日(2012.4.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 Z N A A	4 B O 2 4
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 B	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 有 請求項の数 53 O L 外国語出願 (全 103 頁)

(21) 出願番号	特願2011-237699 (P2011-237699)	(71) 出願人	508178490
(22) 出願日	平成23年10月28日 (2011.10.28)		アトラス・アンティボディーズ・アクチボラゲット
(62) 分割の表示	特願2009-512511 (P2009-512511) の分割		Atlas Antibodies AB
原出願日	平成19年6月4日 (2007.6.4)		スウェーデン、エスエー-106 91ストックホルム、アルバノヴァ・ユニヴェルシテーツセントルム
(31) 優先権主張番号	06114954.8	(74) 代理人	100062144
(32) 優先日	平成18年6月2日 (2006.6.2)		弁理士 青山 稜
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100101454
(31) 優先権主張番号	60/816, 613		弁理士 山田 卓二
(32) 優先日	平成18年6月27日 (2006.6.27)	(74) 代理人	100106518
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 松谷 道子
		(74) 代理人	100138911
			弁理士 櫻井 陽子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結腸直腸癌のためのマーカーとしてのタンパク質 S A T B 2 の使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 結腸直腸癌の診断および/または予後にとって有用なマーカーとなる S A T B 2 転写因子タンパク質を提供する。

【解決手段】 S A T B 2 タンパク質の結腸直腸癌タイプ用のマーカーとしての同定を介した結腸直腸癌の検出、特徴づけおよび予後に関連する新たな方法、手段および使用を提供する。患者における S A T B 2 の発現の低い値と結腸直腸癌の侵襲性が高まるかまたは高リスクの形態との間に相関が認められる。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

結腸直腸癌を有するかまたは有すると疑われる哺乳類対象での結腸直腸癌における予後が不良であるか否かを判定するための方法であって、

a) 前記対象由来の試料を提供するステップと、

b) 前記試料中に存在する S A T B 2 タンパク質の量を定量して標本値を得るステップと、

c) ステップ b) で得られた前記標本値を参照値と比較するステップと、

前記標本値が前記参照値よりも低い場合、

d) 前記対象での結腸直腸癌における予後が不良であることを結論づけるステップと、  
を含む、方法。 10

## 【請求項 2】

ステップ d) における前記不良な予後が 65% もしくはそれ未満の 5 年生存率の可能性に対応する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

ステップ d) における前記不良な予後が 60% もしくはそれ未満の 5 年生存率の可能性に対応する、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

治療を必要とする対象における結腸直腸癌の治療の方法であって、

a) 前記対象由来の試料を提供するステップと、 20

b) 前記試料中に存在する S A T B 2 タンパク質の量を定量して標本値を得るステップと、

c) ステップ b) で得られた前記標本値を参照値と比較するステップと、

前記標本値が前記参照値よりも低い場合、

d) 前記対象を結腸直腸癌の不良な予後に適した治療法で治療するステップと、  
を含む、方法。

## 【請求項 5】

前記治療法が、化学療法、ネオアジュバント療法およびそれらの組み合わせから選択される、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】 30

前記治療法がネオアジュバント療法である、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記ネオアジュバント療法が、i) 放射線療法単独および ii) 化学療法を併用した放射線療法から選択される、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記結腸直腸癌がリンパ節陰性である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記結腸直腸癌がデュークスステージ A もしくは B にある、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 10】 40

前記結腸直腸癌が結腸直腸腺腫である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記結腸直腸癌が結腸直腸癌腫である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記結腸直腸癌が転移しつつある、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記結腸直腸癌がデュークスステージ C にある、請求項 1 ~ 7 および 12 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記対象がヒトである、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。 50

- 【請求項 15】  
前記対象が女性である、請求項 14 に記載の方法。
- 【請求項 16】  
前記参照値が参照試料中の S A T B 2 の発現量に対応する規定値である、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 17】  
前記参照値が 50% の S A T B 2 陽性細胞の画分スコアである、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 18】  
前記参照値が 25% の S A T B 2 陽性細胞の画分スコアである、請求項 17 に記載の方法。 10
- 【請求項 19】  
前記参照値が 70 の S A T B 2 の発現のオートスコア値である、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 20】  
前記参照値が 50 の S A T B 2 の発現のオートスコア値である、請求項 19 に記載の方法。
- 【請求項 21】  
前記試料が体液試料である、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 22】  
前記体液が、血液、血漿、血清、脳脊髄液、尿、精液および滲出液からなる群から選択される、請求項 21 に記載の方法。 20
- 【請求項 23】  
前記試料が排泄物試料である、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 24】  
前記試料が組織試料である、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 25】  
前記組織試料が結腸直腸組織試料である、請求項 24 に記載の方法。
- 【請求項 26】  
前記試料が細胞学的試料である、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。 30
- 【請求項 27】  
前記 S A T B 2 タンパク質の前記アミノ酸配列が、  
i) 配列番号 1、および  
i i) 配列番号 1 に対して少なくとも 85% 同一の配列  
から選択される配列を含む、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 28】  
前記 S A T B 2 タンパク質の前記アミノ酸配列が、  
i) 配列番号 2、および  
i i) 配列番号 2 に対して少なくとも 85% 同一の配列  
から選択される配列を含む、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。 40
- 【請求項 29】  
ステップ b) が、  
b 1) 前記試料に定量されるべき前記 S A T B 2 タンパク質との選択的相互作用を行うことが可能な定量可能な親和性リガンドを適用するステップであって、前記適用は前記親和性リガンドと前記試料中に存在する S A T B 2 タンパク質との結合を可能にする条件下で行われる、ステップと、  
b 2) 結合されていない親和性リガンドを除去するステップと、  
b 3) 前記試料との会合状態を維持する親和性リガンドを定量するステップと、  
を含む、請求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 30】 50

前記定量可能な親和性リガンドが、抗体、その断片およびその誘導体からなる群から選択される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記定量可能な親和性リガンドが、ブドウ球菌プロテイン A およびそのドメイン、リポカリン、アンキリン反復ドメイン、セルロース結合ドメイン、クリスタリン、緑色蛍光タンパク質、ヒト細胞毒性 T リンパ球関連抗原 4、プロテアーゼ阻害剤、PDZ ドメイン、ペプチドアプタマー、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、テンダミスタット、フィブロネクチン III 型ドメインならびにジンクフィンガーからなる群から選択される足場に由来するタンパク質リガンドである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

前記定量可能な親和性リガンドがオリゴヌクレオチド分子である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 33】

前記定量可能な親和性リガンドが、蛍光色素および金属、発色色素、化学発光化合物および生物発光タンパク質、酵素、放射性同位体および粒子からなる群から選択される標識を含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 34】

前記定量可能な親和性リガンドが、前記定量可能な親和性リガンドを認識可能な第二の親和性リガンドを用いて検出される、請求項 29 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記定量可能な親和性リガンドを認識可能な前記第二の親和性リガンドが、蛍光色素および金属、発色色素、化学発光化合物および生物発光タンパク質、酵素、放射性同位体および粒子からなる群から選択される標識を含む、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法を実施するためのキットであって、

a) S A T B 2 タンパク質との選択的相互作用を行うことが可能な定量可能な親和性リガンドと、

b) 前記親和性リガンドの量を定量するのに必要な試薬と、  
を含む、キット。

【請求項 37】

前記定量可能な親和性リガンドが、抗体、その断片およびその誘導体からなる群から選択される、請求項 36 に記載のキット。

【請求項 38】

前記定量可能な親和性リガンドが、ブドウ球菌プロテイン A およびそのドメイン、リポカリン、アンキリン反復ドメイン、セルロース結合ドメイン、クリスタリン、緑色蛍光タンパク質、ヒト細胞毒性 T リンパ球関連抗原 4、プロテアーゼ阻害剤、PDZ ドメイン、ペプチドアプタマー、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、テンダミスタット、フィブロネクチン III 型ドメインならびにジンクフィンガーからなる群から選択される足場に由来するタンパク質リガンドである、請求項 36 に記載のキット。

【請求項 39】

前記定量可能な親和性リガンドがオリゴヌクレオチド分子である、請求項 36 に記載のキット。

【請求項 40】

前記検出可能な親和性リガンドが、蛍光色素および金属、発色色素、化学発光化合物および生物発光タンパク質、酵素、放射性同位体および粒子からなる群から選択される標識を含む、請求項 36 ~ 39 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 41】

前記親和性リガンドの量を定量するのに必要な前記試薬が、前記定量可能な親和性リガンドを認識可能な第二の親和性リガンドを含む、請求項 36 ~ 39 のいずれか一項に記載のキット。

10

20

30

40

50

## 【請求項 4 2】

前記定量可能な親和性リガンドを認識可能な前記第二の親和性リガンドが、蛍光色素または金属、発色色素、化学発光化合物および生物発光タンパク質、酵素、放射性同位体および粒子からなる群から選択される標識を含む、請求項 4 1 に記載のキット。

## 【請求項 4 3】

前記参照値を提供するために参照試料をさらに含む、請求項 3 6 ~ 4 2 のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 4 4】

予後マーカーとしての S A T B 2 タンパク質の使用。

## 【請求項 4 5】

結腸直腸癌に対する予後マーカーとしての S A T B 2 タンパク質の使用。

## 【請求項 4 6】

結腸直腸癌の予後の予後剤の製造における、S A T B 2 タンパク質または抗原活性を示すその断片の使用。

## 【請求項 4 7】

前記 S A T B 2 タンパク質の前記アミノ酸配列が、

i ) 配列番号 1、および

i i ) 配列番号 1 に対して少なくとも 8 5 % 同一の配列

から選択される配列を含む、請求項 4 4 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の使用。

## 【請求項 4 8】

前記 S A T B 2 タンパク質の前記アミノ酸配列が、

i ) 配列番号 2、および

i i ) 配列番号 2 に対して少なくとも 8 5 % 同一の配列

から選択される配列を含む、請求項 4 4 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の使用。

## 【請求項 4 9】

抗体またはその断片もしくは誘導体である、S A T B 2 タンパク質との選択的相互作用を行うことが可能な親和性リガンド。

## 【請求項 5 0】

アミノ酸配列が配列番号 1 の配列を含むタンパク質で動物を免疫するステップを含むプロセスにより得られうる、請求項 4 9 に記載の親和性リガンド。

## 【請求項 5 1】

予後剤としての、請求項 4 9 および 5 0 のいずれか一項に記載の親和性リガンドの使用。

## 【請求項 5 2】

結腸直腸癌の予後のための、請求項 4 9 および 5 0 のいずれか一項に記載の親和性リガンドの使用。

## 【請求項 5 3】

結腸直腸癌の予後の予後剤の製造における、請求項 4 9 および 5 0 のいずれか一項に記載の親和性リガンドの使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、癌の診断および予後の分野に関する。特に本発明は、S A T B 2 タンパク質をこの癌タイプ用のマーカーとして同定することによる結腸直腸癌の検出および特徴づけにおいて用いられる新たな手段を提供する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

S A T B 2

特定の A T リッチの配列に結合するタンパク質 2 ( S A T B 2 ) をコードする遺伝子がヒトゲノムの配列決定に多大な努力が払われた期間中の 1 9 9 9 年に同定された ( キクノ

10

20

30

40

50

R. (Kikuno R.)ら(1999年)DNA Res. 6:197-205頁)。  
それ以来、SATB2遺伝子は主に神経組織内に発現されるものと考えられている。

【0003】

SATB2は、核マトリックスの一部を形成する転写因子であり、かつ、マトリックス結合領域(MAR)とも称されるATリッチの配列との相互作用を通じて高次クロマチン構造を調節することにより、組織特異的な様式で遺伝子の発現を組織化する(ディッキンソン L.A. (Dickinson L.A.)ら(1992年)Cell 70、631-45頁; フィッツパトリック D.R. (FitzPatrick D.R.)ら(2003年)Hum. Mol. Genet. 12、2491-501頁; ヤスイ D. (Yasui D.)、(2002年)Nature 419、641-5頁; ボード J. (Bode J.) (2000年)Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 10、73-90頁)。

10

【0004】

この遺伝子およびそのタンパク質産物すなわちSATB2タンパク質に関する試験によると、神経組織内の転写因子としての遺伝子発現の調節への関与が指摘大まかに示されている(ドブレバ G. (Dobrova G.)ら(2003年)Genes Dev. 17:3048-3061頁; ブリタノバ O. (Britanova O.)ら(2005年)Eur. J. Neurosci. 21:658-668頁)。SATB2遺伝子については、口蓋の発生および口蓋裂における役割を有するとの記載もなされている(フィッツパトリック D.R. (FitzPatrick D.R.)ら(2003年)Human Mol. Genet. 12:2491-2501頁; ヴァン・ブヒエンハウト G. (van Buggenhout G.)ら(2005年)Eur. J. Med. Genet. 48:276-289頁)。

20

【0005】

サラショア (Salahshor)らは、大腸腺腫性ポリポーシス(APC)の遺伝子突然変異を有する患者について試験を行った(サラショア (Salahshor)ら(2005年)BMC cancer 5:66頁)。APC患者は、若年で異常な量の大腸腺腫を発症し、それは最終的には未治療である場合に結腸直腸癌に進行することになる。グローバルな遺伝子発現プロファイリングによると、SATB2を含む84遺伝子の群が腺腫においては正常な粘膜と比べて有意に改変された発現を有することが示された。SATB2は、有意に下方制御されることが見出されたが、任意のさらなる分析において選択されることはなかった。同様に、Int J Cancerにおける結腸直腸癌に関する最近の発現プロファイリング試験によると、SATB2においてはmRNAレベルで発現状態が改変されることが示された(グローン J. (Groene J.)ら(2006年)Int J Cancer 119、1829-1836頁)。

30

【0006】

PCT公開の国際公開第03/022126号パンフレットおよび国際公開第2006/015742号パンフレットでは、癌細胞の発現プロファイリングを目的とした他の類似試験についての記載がある。SATB2を含む多数の遺伝子の発現が分析され、全体的な発現パターンから結論が得られている。

40

【0007】

重要なこととして、上記で述べた試験は、SATB2タンパク質の特異的な結腸直腸マーカーとしての使用またはSATB2の結腸直腸癌に対する予後ツールとしての使用に関し、全く示唆を与えていない。

【0008】

癌

癌は西洋世界では疾患および死亡の最も一般的な原因の1つである。一般に、発生率が癌の大部分の形態において年齢とともに上昇する。ヒト集団において全般的な健康状態の増進により寿命が伸び続けるにつれ、癌はますます多くの個人に影響を与えることになる。最も一般的な癌タイプの原因は概して未知であるが、環境因子(食事、喫煙、UV放射

50

など)および遺伝因子(例えば p53、APC、BRCA1、XPなどの「癌遺伝子」における生殖細胞系突然変異)と癌の発生に対するリスクとの間の関連性をもたらす一連の知識は増えつつある。

#### 【0009】

癌については、癌が本質的に細胞性疾患でありかつ正味の細胞成長および利己的な挙動を伴う形質転換された細胞集団として定義されるという事実はあるが、細胞生物学的観点からすると全体として満足のいく定義は全く存在しない。悪性の形質転換は、不可逆的な遺伝子改変に基づく悪性の表現型への遷移を表す。これは正式には証明されていないが、悪性の形質転換は1つの細胞内に生じ、次いで細胞から発達した腫瘍が生じると考えられている(「癌のクローン性」のドグマ)。発癌は、癌が生成されるプロセスであり、最終的に悪性腫瘍の成長に至る複数の事象を含むと一般に理解されている。この多段階プロセスは、いくつかの律速ステップ、例えば突然変異の付加や場合により後成的事象も含み、前癌性増殖のステージ後に癌の形成をもたらす。最も一般的な形態の癌が体細胞内で発生し、それは主に上皮(皮膚、前立腺、胸部、結腸および肺)由来の癌と、次いで造血系由来の癌(白血病およびリンパ腫)および間葉細胞由来の癌(肉腫)である。段階的变化は、細胞分裂、利己的挙動および細胞死を決定づける、重要な調節経路におけるエラー(突然変異)の蓄積を含む。これらの各変化は、周囲の細胞に対して選択的なダーウィンの成長の有利性を提供し、腫瘍細胞集団の正味の成長をもたらす。悪性腫瘍が形質転換された腫瘍細胞自体だけでなく支持的な間質として作用する周囲の正常細胞からもなることを強調することは重要である。この動員された癌間質は結合組織、血管および様々な他の正常細胞、例えば炎症性細胞からなり、それらは協調し、形質転換された腫瘍細胞に持続的な腫瘍成長にとって必要なシグナルを供給する。

10

20

#### 【0010】

##### 癌の診断

腫瘍から採取された組織切片の顕微鏡検査は、依然として癌の診断を確定するためのゴールドスタンダードである。ゲノムDNA、転写遺伝子および発現タンパク質の分析は全て、顕微鏡で検出される組織学的特徴に重要な情報を加える。将来の診断、予後情報および治療の選択は、ほとんどの場合、核酸およびタンパク質の分析とともに形態の全体評価に基づくことになる。既に今日ではヒトゲノム配列および組織内の細胞内および細胞間でのシグナル伝達を含む生化学的経路に基づく知識が高度化していることから、腫瘍形成における異なるステージならびに表現型のバリエーション(異なるタイプの癌を規定する)に内在する機序の一部を解析することが可能である。

30

#### 【0011】

分子生物学における目覚ましい進歩にもかかわらず、癌の診断は依然として光学顕微鏡の使用に依存する。分子ツールの発達はまだ発展途上であるが、癌細胞を正常細胞から識別するための重要な役割を果たしている。組織切片の組織化学的染色に加えて最も一般的に用いられる方法が免疫組織化学である。免疫組織化学により、特異的抗体を用いて組織や細胞内でのタンパク質の発現パターンが検出可能になる。臨床診断において免疫組織化学を用いることで、組織構造や細胞形態を分析だけでなく異なる細胞集団内での免疫反応性を検出するという可能性が提供されている。これは、異なる一次腫瘍の正確なグレーディングおよび分類をサポートすることに加え、未知の発生源の転移に関する診断において重要とされている。今日の臨床において最も一般的に用いられる抗体は、細胞タイプマーカー、例えばPSA、MelanA、サイログロブリンに対する抗体、ならびに中間径フィラメント、クラスター分化(cluster of differentiation)(CD)抗原などや悪性度についてのマーカー、例えばKi67、p53、HER-2を認識する抗体を含む。免疫組織化学に加え、突然変異分析において遺伝子増幅を検出しかつ遺伝子の配列決定を行うためのインサイチュ・ハイブリダイゼーションの使用は、癌の診断において進化途上の技術である。

40

#### 【0012】

##### 結腸直腸癌

50

結腸直腸癌は、世界中でヒト癌の最も一般的な形態の1つである。パーキン(Parkin)らにより提示されたGLOBOCAM 2002データベースからのデータによると、結腸直腸癌における約100万の新たな症例が毎年見出されることが示されている(パーキン(Parkin)ら(2007年)CA Cancer J Clin 55、74-108頁)。さらに、世界における結腸直腸癌の発生率はすべての癌の約9.4%であり、結腸直腸癌は西洋世界における一般的な死亡原因としては2番目である。結腸直腸癌の5年生存率は西洋世界では約60%であるが、東欧やインドでは30%の低さである。

#### 【0013】

腫瘍の早期検出および切除を伴う手術は、現在、好ましい予後にとって極めて重要である。徴候については、遠位胃腸管内での腫瘍が位置する場所に依存し、腸の苦痛、下痢、便秘、疼痛および貧血(腫瘍から腸への出血に続発)を含む。悪性腫瘍については、異なる分類スキーム、例えばTNM/UICC分類I-IVまたはデュークス(Dukes)ステージA~Cによるいくつかのステージに分類されうる。最小の悪性腫瘍(デュークスステージAおよびB)が適度に好ましい転帰を有する一方、その対極では転移を伴う一部の極めて悪性の腫瘍(デュークスステージC)の生存率は低い。現行の診断は、患者の病歴、診察および内視鏡検査(直腸鏡検査および結腸鏡検査)と、場合によりその後の腫瘍成長の広がりを見極めるための放射線マッピングに基づくものである。内視鏡検査とともに、疑わしい病変から組織生検が行われる。

10

#### 【0014】

顕微鏡診断においては、疑わしい腫瘍に由来する生検材料が採取されかつ顕微鏡下で検査される。確定診断を得るため、次いで腫瘍組織がホルマリンに固定され、組織処理され、かつパラフィン包埋される。得られたパラフィンブロックから組織切片が生成され、組織化学的方法および免疫組織化学的方法の双方を用いて染色されうる。

20

#### 【0015】

限局された腫瘍、すなわち転移性疾患に進行していない腫瘍においては、腫瘍および周囲の腸および組織の根本的切除を伴う手術的介入がなされる。次いで、手術標本を巨視的分析および微視的分析のために病理学者に送る。この分析は腫瘍のステージングのための基礎を形成する。結腸直腸癌の群を抜いて最も一般的な形態は腺由来の腫瘍を表す腺癌であり、その識別の可能性は高いか、中程度であるかまたは低い。

30

#### 【0016】

一次腫瘍においては、ヘマトキシリン-エオシン染色された組織切片が、異なる結腸直腸癌の分類に準じた正確な診断および分類を可能にするのに十分である。しかし、結腸直腸癌は極めて一般的であり、検出前にかなりの大きさに成長していることが多いことから、転移は稀ではない。腫瘍は典型的には局所リンパ節に転移するが、肝臓および肺への遠隔転移は稀ではない。癌に伴う一般的な臨床的問題が未知の発生源の転移を示す患者である。転移が腺癌である症例では、いくつかの考えられる一次腫瘍が、例えば乳癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌および結腸直腸癌であることが疑われうる。鑑別診断においては、発生源の細胞内に固有の特徴を認識する免疫組織化学的マーカーが用いられうる。現在では、サイトケラチン20(CK20)、胃腸管の腺細胞内に豊富に中間フィラメントマーカーを用い、結腸直腸癌の特徴づけが行われる。しかし、いくつかの他の腺癌もCK20抗体に対して陽性でありうる一方、すべての結腸直腸癌が陽性であるとは限らない。さらに今日、生存の見込みが低下した極めて悪性の腫瘍からの転移に対し、悪性グレードが低かつリスクが低い腫瘍を識別可能な利用可能なマーカーは全く存在しない。

40

#### 【発明の概要】

#### 【0017】

医師が癌の正確なタイプに対する特定の治療をできるだけ早期に提供するため、結腸直腸癌のみに特異的でありかつ患者を異なるリスクのカテゴリーに区別する可能性を与える新たな分子マーカーを提供することが重要である。要するに、結腸直腸癌の診断およびスクリーニングを向上させるための新たな手段に対する大きな需要が存在する。

50

## 【 0 0 1 8 】

対象における結腸直腸癌の診断および／または予後にとって有用なマーカーの提供を通じてこの要求を満たすことが本発明の目的である。

## 【 0 0 1 9 】

結腸直腸癌と他のタイプの癌を識別するのに有用なマーカーを提供することが本発明に関連した目的である。

## 【 0 0 2 0 】

結腸直腸癌の診断、予後および／または治療における新たな方法を提供することが本発明の別の目的である。

## 【 0 0 2 1 】

結腸直腸癌の診断、予後および／または治療における方法と併用可能なキットを提供することが本発明に関連した目的である。

## 【 0 0 2 2 】

本発明の別の目的は、結腸直腸癌の診断、予後および／または治療にとって有用な新規化合物を提供することである。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 2 3 】

【 図 1 】 追加の 9 4 の異なるヒトタンパク質を 2 通りに有するタンパク質マイクロチップ上での S A T B 2 断片（配列番号 1）に対して産生される抗体の特異性を図示する。

【 図 2 】 精製された単一特異性抗体における組織のウエスタンブロット分析を示す。全タンパク質抽出物は、ヒト細胞系の R T - 4（レーン 1）、E F O - 2 1（レーン 2）および A - 4 3 1（レーン 3）、ならびに正常なヒト肝臓（レーン 4）および正常なヒト扁桃腺（レーン 5）に由来するものである。

【 図 3 A 】 正常な大脳皮質および海馬における細胞核内での S A T B 2 の免疫組織化学的染色を示す。

【 図 3 B 】 正常な睾丸における細胞核内での S A T B 2 の免疫組織化学的染色を示す。

【 図 3 C 】 虫垂における粘膜内の腺細胞（正常な対象由来）内での S A T B 2 の染色を示す。

【 図 3 D 】 結腸における粘膜内の腺細胞（正常な対象由来）内での S A T B 2 の染色を示す。

【 図 3 E 】 直腸における粘膜内の腺細胞（正常な対象由来）内での S A T B 2 の染色を示す。

【 図 3 F 】 結腸粘膜内での染色をより高い倍率で示す。

【 図 4 A 】 1 1 の試験対象の結腸直腸癌試料の全部（2 通り）における S A T B 2 の免疫組織化学的染色を示す。

【 図 4 B 】 図 4 A に示される癌試料のうちの 6 つをより高い倍率で示す。

【 図 5 】 中間的に識別された結腸直腸腺癌の免疫組織化学的染色を示す。図 5 A は S A T B 2 の発現が存在する場合の切片を示し（左）、図 5 B は S A T B 2 の発現が不在である場合の切片を示す（右）。腫瘍試料は 2 通りに示される。

【 図 6 A 】 結腸直腸癌であると診断された 1 2 2 の対象の免疫組織化学的染色に基づく生存分析の結果を示す。組織コアが、低いかまたは高い S A T B 2 レベルに対してスコア化された。実線は 2 5 % を超える核の画分である。点線は 2 5 % 未満の核の画分である。組織は、全患者に由来するものである。

【 図 6 B 】 結腸直腸癌であると診断された 1 2 2 の対象の免疫組織化学的染色に基づく生存分析の結果を示す。組織コアが、低いかまたは高い S A T B 2 レベルに対してスコア化された。実線は 2 5 % を超える核の画分である。点線は 2 5 % 未満の核の画分である。組織は、女性のみ由来するものである。

【 図 6 C 】 結腸直腸癌であると診断された 1 2 2 の対象の免疫組織化学的染色に基づく生存分析の結果を示す。組織コアが、低いかまたは高い S A T B 2 レベルに対してスコア化された。実線は 2 5 % を超える核の画分である。点線は 2 5 % 未満の核の画分である。組

10

20

30

40

50

織は、リンパ節陰性の全患者に由来するものである。

【図6D】結腸直腸癌であると診断された122の対象の免疫組織化学的染色に基づく生存分析の結果を示す。組織コアが、低いかまたは高いSATB2レベルに対してスコア化された。実線は25%を超える核の画分である。点線は25%未満の核の画分である。組織は、リンパ節陰性の女性に由来するものである。

【図7】SATB2の発現および従来の結腸癌マーカーであるCEA、CK20、CDX2、p53、Ki67およびサイクリンB1(CCNB1)の発現のために免疫組織化学的に染色された216の癌組織から得られた発現データの階層的クラスタリングの結果を示す。

【図8】結腸直腸癌であると診断された122の対象由来の組織の免疫組織化学的染色に基づくCK20およびSATB2の発現の詳細な比較を示す。組織コアが、低いかまたは高いSATB2レベルと低いかまたは高いCK20レベルに対してスコア化された。

【図9】結腸直腸癌であると診断された17の対象由来のリンパ節転移の免疫組織化学的染色に基づくCK20およびSATB2の発現の比較を示す。組織コアが、SATB2の核の画分およびCK20の染色に対してスコア化された。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明は、その種々の態様で、これらの目的や当業者にとっては本開示から明白である他の目的において、結腸直腸癌の状態および予後を判定するための、かつそれを治療するための新たな手段を提供する。

【0025】

したがって第1の態様では、本発明は、結腸直腸癌を有するかまたは有すると疑われる哺乳類対象での結腸直腸癌における予後が不良であるか否かを判定するための方法であって、

a) 対象由来の試料を提供するステップと、

b) 前記試料中に存在するSATB2タンパク質の量を定量して標本値を得るステップと、

c) ステップb)で得られた標本値を参照値と比較するステップと、

前記標本値が前記参照値よりも低い場合、

d) 前記対象での結腸直腸癌における予後が不良であることを結論づけるステップと、を含む、方法を提供する。

【0026】

本発明のこの第1の態様は、結腸直腸癌を有するかまたは有すると疑われる対象由来の試料中のSATB2タンパク質の発現が対象における病状の指標として機能するという従来認識されていなかった事実に基づくものである。より詳細には、本発明は、最初に、一方でのSATB2の発現の低い値と他方での結腸直腸癌の侵襲性が高まるかまたは高リスクの形態との間の相関について同定する。結腸直腸癌の予後の指標としてのSATB2の発現に基づく本発明は多くの利点を有する。一般に癌においては、侵襲性が高い形態の早期検出は治癒を可能にすることから極めて重要である。これは特に結腸直腸癌に当てはまり、それについてはいくつかの大規模試験で、早期癌、すなわちステージ1およびステージ2の腫瘍(本質的にデュクスAおよびB)を表す癌を有する対象が後期ステージの腫瘍を有する対象よりも実質的に良好な予後を有することが示されている。あらゆるタイプの結腸直腸癌に対して根本的切除がなされることから、この差異は治療の様式に依存しない。それどころか、生存における大きな差異は、明らかに早期検出、正確な診断および適切な外科治療に関連する。特定のレベルの発現が疾患の進行の特定のパターンと相関する場合のマーカーとしてのSATB2タンパク質は、例えば一連の転移の鑑別診断において大きな可能性を有する。

【0027】

本発明の実施形態では、不良な予後のステップd)における結論は、前記対象が低いSATB2の発現値を示さなかった場合に仮定される状況よりも短い予想寿命を有すること

10

20

30

40

50

を立証するステップを含みうる。その代わりまたはそれに加え、不良な予後という結論は、対象が低いSATB2の発現値を示さなかった場合に仮定される状況よりも低い5年生存率の可能性を立証するステップを含みうる。例えば、結論は、前記対象が65%もしくはそれ未満、例えば60%もしくはそれ未満、50%もしくはそれ未満、40%もしくはそれ未満または30%もしくはそれ未満の5年生存率の可能性を有することでありうる。

【0028】

さらに、リンパ節陰性腫瘍を有するかまたは有すると疑われる対象に関しては、結論は前記対象が73%もしくはそれ未満、例えば70%もしくはそれ未満、例えば60%もしくはそれ未満、50%もしくはそれ未満、40%もしくはそれ未満または30%もしくはそれ未満の5年生存率の可能性を有することでありうる。女性対象に関しては、結論は、前記対象が74%もしくはそれ未満、例えば70%もしくはそれ未満、例えば60%もしくはそれ未満、50%もしくはそれ未満、40%もしくはそれ未満または30%もしくはそれ未満の5年生存率の可能性を有することでありうる。リンパ節陰性腫瘍を有するかまたは有すると疑われる女性患者に関しては、結論は、前記対象が80%もしくはそれ未満、例えば75%もしくはそれ未満、例えば70%もしくはそれ未満、例えば60%もしくはそれ未満、50%もしくはそれ未満、40%もしくはそれ未満または30%もしくはそれ未満の5年生存率の可能性を有することでありうる。

10

【0029】

結腸直腸癌の低いSATB2の発現と高リスクの形態との間の同定された相関はまた、対象の治療において、対象が低いSATB2の発現値を示さなかった場合に仮定される状況とは異なるレジメンを適用するための決定を行う上での基礎を形成しうる。したがって第2の態様では、本発明は、治療を必要とする対象における結腸直腸癌の治療の方法であって、

20

a) 対象由来の試料を提供するステップと、

b) 前記試料中に存在するSATB2タンパク質の量を定量して標本値を得るステップと、

c) ステップb)で得られた前記標本値を参照値と比較するステップと、前記標本値が前記参照値よりも低い場合、

d) 前記対象を結腸直腸癌の不良な予後に適した治療法で治療するステップと、を含む、方法を提供する。

30

【0030】

本発明の一実施形態では、治療法は、化学療法、ネオアジュバント療法およびそれらの組み合わせから選択される。

【0031】

したがって、治療法はネオアジュバント療法でありうる。かかるネオアジュバント療法は、放射線療法単独または化学療法と併用した放射線療法からなりうる。

【0032】

上記の本発明の方法の態様では、対象は異なる形態および/またはステージの結腸直腸癌を有するかまたは有すると疑われる場合がある。

【0033】

これらの態様のいくつかの実施形態では、問題の結腸直腸癌は、リンパ節陰性の結腸直腸癌、すなわちリンパ節転移ステージまで進行していない結腸直腸癌である。他の類似の実施形態では、問題の結腸直腸癌は、デュークスステージAもしくはBのいずれかにあるものとして特徴づけられる。さらに他の実施形態では、問題の結腸直腸癌は結腸直腸腺腫または結腸直腸癌腫である。これらの実施形態では、対象が低いSATB2の発現を示すことを判定することは、疾患の将来の進行における予後にとって極めて重要であることから、将来の疾患管理に関して十分な情報を得た上での決定にとっての基礎を形成しうる。かかる比較的早期のステージの疾患を患う対象の群内では、低いSATB2の発現を有する対象がより高い侵襲性の疾患を発症するリスクが比較的高い傾向がある。したがって、リンパ節陰性の結腸直腸癌またはデュークスステージAもしくはBの結腸直腸癌を有する

40

50

対象の中での低いSATB2の発現は、これらの対象が低いSATB2の発現を示さない対象より綿密に監視されおよび/または異なる治療がなされるべきであることを示しうる。したがって、本発明に記載の方法は、SATB2マーカーによって与えられる追加の予後情報のおかげで、かかる対象における特定の期間を超える生存および/またはより長い寿命といった機会が高まる可能性をもたらす。

【0034】

他の実施形態では、問題の結腸直腸癌は転移性の結腸直腸癌である。他の類似の実施形態では、問題の結腸直腸癌はデュークスステージCにあるものとして特徴づけられる。

【0035】

本発明の実施形態では、対象はヒト、例えば女性である。添付の実施例に示されるように、SATB2マーカーの予後値は、結腸直腸癌のリンパ節陰性の形態を有するヒト、女性対象の群内で特に顕著である。

10

【0036】

SATB2タンパク質の発現の標本値が参照値よりも低いことの判定が、本明細書中で「低いSATB2の発現」の判定と称される場合がある。

【0037】

本発明の方法では、対象における標本値との比較として用いられる参照値は様々な方法で確定されうる。一非限定例として、参照値は、予後または治療の段階の対象の健常組織内でのSATB2の発現量に対応しうる。別の例として、参照値は、別の比較可能な対象由来の正常組織の標準試料中で測定されるSATB2の発現量により提供可能である。別の例として、参照値は、腫瘍組織、例えばデュークスステージAもしくはBの癌由来の組織の標準試料中で測定されるSATB2の発現量により提供可能である。

20

【0038】

参照値は、本発明の上記の態様に記載の方法を実施する過程で得られうる。あるいは、参照値は参照試料から得られる規定値であり、前記参照試料中でのSATB2の発現量に対応している。

【0039】

試料中でのSATB2の発現の定量のための1つの代替案が、特定のレベルを超えるSATB2の発現を示す試料中での細胞の画分の測定である。この測定は、例えば下記の実施例、4項の「画分スコア(fraction score)」の定義に記載のように実施可能である。本発明の上記の態様の方法の実施形態では、ステップd)での結論における基準は、SATB2陽性細胞の核の画分における標本値、すなわち「画分スコア」であり、それは50%の参照値よりも低く、例えば40%よりも低く、例えば30%よりも低く、例えば25%よりも低く、例えば20%よりも低く、例えば15%よりも低く、例えば10%よりも低く、例えば5%よりも低く、例えば1%よりも低い。さらに、不良な予後の判定は、試料中での本質的に存在しないSATB2陽性細胞の検出、すなわち本質的にゼロの「画分スコア」に対応しうる。

30

【0040】

試料中でのSATB2の発現の定量のための別の代替案が、自動スキャナーおよび画像処理ソフトウェアを用いる、SATB2の発現におけるオートスコア(autoscore)の自動測定である。この測定は、例えば下記の実施例、5項の「オートスコア」の定義に記載のように実施可能である。本発明の上記の態様の方法の実施形態では、ステップd)での結論における基準は、試料細胞内でのSATB2の発現における標本値、すなわち「オートスコア」であり、それは70の参照値よりも低く、例えば60よりも低く、例えば50よりも低く、例えば40よりも低く、例えば30よりも低く、例えば25よりも低く、例えば20よりも低く、例えば15よりも低く、例えば10よりも低く、例えば5よりも低い。

40

【0041】

本発明のいくつかの実施形態では、標本値および/または参照値の測定は、画分スコアであってもオートスコアであっても、上記の変数またはいくつかの他の既知の変数もしくは

50

は適合変数として、対象由来の遠位胃腸管、すなわち虫垂、結腸および/もしくは直腸から得られる腺細胞上でかつ/または結腸直腸癌細胞上で行われる。

【0042】

本発明の別の実施形態では、不良な予後の判定が、対象由来の遠位胃腸管から得られる腺細胞内でS A T B 2の発現が検出不可であることに対応する。

【0043】

本発明との関連では、「標本値」および「参照値」という用語は広義に解釈されるべきである。上記のように、これらの値を得るためのS A T B 2の発現の定量は、自動的手段または試料の目視もしくは顕微鏡検査に基づくスコアリングシステムを介して実施可能である。しかし、当業者、例えば組織病理学の当業者が、単なる例えばS A T B 2の発現を対象に染色されている組織スライドの検査により試料および参照値を判定することも可能である。したがって、参照値よりも低い標本値についての判定は、目視または顕微鏡検査時に、試料組織スライドが参照の組織スライドの場合と比べ、低い密度に染色されかつ/または少ない染色細胞を呈するという判定に対応しうる。この場合、標本値および参照値は当業者が検査時および比較時に判定するメンタルな値(mental values)と考えられる。したがって、本発明は自動分析の使用に限定されない。

【0044】

本発明の方法におけるS A T B 2タンパク質の発現の検出に用いられる特定の手順は、任意の特定の方法に限定されない。本発明に記載の方法のいくつかの実施形態では、ステップb)は、

b 1) 試料に対し、定量されるべきS A T B 2タンパク質との選択的相互作用を行うことが可能な定量可能な親和性リガンドを適用するステップであって、前記適用は親和性リガンドと試料中に存在するS A T B 2タンパク質との結合を可能にする条件下で行われる、ステップと、

b 2) 結合されていない親和性リガンドを除去するステップと、

b 3) 試料との会合状態を維持する親和性リガンドを定量するステップと、を含む。

【0045】

本発明のかかる実施形態では、対象由来の試料は、体液試料、例えば血液、血漿、血清、脳脊髄液、尿、精液および滲出液の試料でありうる。あるいは、本発明に記載の方法では、試料は、排泄物試料、細胞試料または組織試料、例えば結腸直腸組織の試料でありうる。

【0046】

好ましい実施形態では、本発明に記載の方法はインビトロで実施される。

【0047】

当業者は、本発明の有用性が、S A T B 2タンパク質が関連遺伝子によってコードされかつ発現の関連パターンを提示する限り、問題の対象内に存在するS A T B 2タンパク質の任意の特定の変異体の定量に限定されないことを理解するであろう。非限定例として、S A T B 2タンパク質は、

i) 配列番号1、および

i i) 配列番号1に対して少なくとも85%同一の配列から選択される配列を含むアミノ酸配列を有する。

【0048】

いくつかの実施形態では、上記の配列i i)は、配列番号1に対して少なくとも90%同一であるか、少なくとも91%同一であるか、少なくとも92%同一であるか、少なくとも93%同一であるか、少なくとも94%同一であるか、少なくとも95%同一であるか、少なくとも96%同一であるか、少なくとも97%同一であるか、少なくとも98%同一であるかまたは少なくとも99%同一である。

【0049】

別の非限定例として、S A T B 2タンパク質は、

10

20

30

40

50

i) 配列番号 2、および

ii) 配列番号 2 に対して少なくとも 85% 同一である配列から選択される配列を含むアミノ酸配列を有する。

【0050】

いくつかの実施形態では、上記の配列 ii) は、配列番号 2 に対して少なくとも 90% 同一であるか、少なくとも 91% 同一であるか、少なくとも 92% 同一であるか、少なくとも 93% 同一であるか、少なくとも 94% 同一であるか、少なくとも 95% 同一であるか、少なくとも 96% 同一であるか、少なくとも 97% 同一であるか、少なくとも 98% 同一であるかまたは少なくとも 99% 同一である。

【0051】

本発明に記載の方法の実施形態では、S A T B 2 タンパク質は、S A T B 2 タンパク質との特異的または選択的な相互作用が可能である、検出可能かつ/または定量可能な親和性リガンドの試料に対する適用を通じて検出および/または定量がなされる。親和性リガンドの適用は、試料中での親和性リガンドと S A T B 2 タンパク質の結合を可能にする条件下で行われる。一旦、S A T B 2 と結腸直腸癌との間の関連性が本開示の教示内容を通して認知されると、適切な親和性リガンドに対する選択または作製や、検出および/または定量に適する形式および条件に対する選択については当業者が有する能力の範囲内であると見なされる。そうであっても、有用であると判明しうる親和性リガンドの例、ならびに検出および/または定量のための形式および条件の例が、例示目的で下記に示される。

【0052】

したがって、本発明のいくつかの実施形態では、抗体、その断片およびその誘導体からなる群から選択される親和性リガンド、すなわち免疫グロブリンの足場に基づく親和性リガンドが用いられる。抗体は、マウス、ヒトおよび他の抗体を含む任意の供給源のモノクローナルおよびポリクローナル抗体、ならびに異なる種由来の配列を含むキメラ抗体、例えば部分的なヒト化マウス抗体を含む。ポリクローナル抗体は選択される抗原による動物の免疫により産生される一方、限定された特異性を有するモノクローナル抗体はケラー (Koe h l e r) およびミルスタイン (M i l s t e i n) により開発されたハイブリドーマ技術を用いて産生可能である (ケラー G. (Koe h l e r G.) およびミルスタイン C. (M i l s t e i n C.) (1976年) Eur. J. Immunol. 6: 511 - 519 頁)。抗体の断片および誘導体は、無傷免疫グロブリンタンパク質の重鎖の第 1 の定常ドメイン (C H 1)、軽鎖の定常ドメイン (C L)、重鎖の可変ドメイン (V H) および軽鎖の可変ドメイン (V L) からなる F a b 断片; 2 つの可変抗体ドメインの V H および V L からなる F v 断片 (スケラ A. (S k e r r a A.) およびブリュックタン A. (P l u e c k t h u n A.) (1988年) Science 240: 1038 - 1041 頁)、柔軟なペプチドリッカーにより互いに連結された 2 つの V H および V L ドメインからなる一本鎖 F v 断片 (s c F v) (バード R. E. (B i r d R. E.) およびウォーカー B. W. (W a l k e r B. W.) (1991年) Trends Biotechnol. 9: 132 - 137 頁)、ベンスジョーンズ (Bence Jones) 二量体 (スティーブンス F. J. (S t e v e n s F. J.) ら (1991年) Biochemistry 30: 6803 - 6805 頁)、カメリド (c a m e l i d) 重鎖二量体 (ハマーズ-カステルマン C. (H a m e r s - C a s t e r m a n C.) ら (1993年) Nature 363: 446 - 448 頁) および単一可変ドメイン (カイ X. (C a i X.) およびガレン A. (G a r e n A.) (1996年) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93: 6280 - 6285 頁; マサト L. (M a s a t L.) ら (1994年) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91: 893 - 896 頁)、ならびに例えばテングザメ由来のニュー・アンティジェン・レセプター (New Antigen Receptor) (N A R) のような単一ドメイン足場 (ドゥーレイ H. (D o o l e y H.) ら (2003年) Mol. Immunol. 40: 25 - 33 頁) および可変

10

20

30

40

50

重鎖ドメインに基づくミニボディ (minibody) (スケラ A. (Skerra A.) およびプリュックタン A. (Plueckthun A.) (1988年) Science 240:1038-1041頁) を含む。

【0053】

ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、ならびにそれらの断片および誘導体は、例えば本発明に記載のS A T B 2タンパク質の検出および/または定量における、選択的な生体分子の認識を必要とする用途における従来の選択される親和性リガンドを表す。しかし、当業者は、特異的な結合リガンドの高スループットでの産生および低コストでの産生系に対する需要の高まりを受けて、ここ10年間で新しい生体分子のダイバーシティー (diversity) 技術が開発されていることを認知している。これは免疫グロブリンおよび非免疫グロブリンの双方に由来する新たなタイプの親和性リガンドの産生を可能にしており、それらは生体分子認識用途における結合リガンドとして等しく有用であることが判明しており、かつ免疫グロブリンの代替使用またはその併用が可能である。

10

【0054】

親和性リガンドの選択にとって必要とされる生体分子のダイバーシティーが複数の有望な足場分子のうちの一つのコンビナトリアルエンジニアリングにより得られる場合があり、次いで特異的かつ/または選択的な親和性リガンドが適切な選択プラットフォームを用いて選択される。足場分子は、免疫グロブリンタンパク質由来 (ブラッドベリー A. R. (Bradbury A. R.) およびマークス J. D. (Marks J. D.) (2004年) J. Immunol. Meths. 290:29-49頁)、非免疫グロブリンタンパク質由来 (ニグレン P. A. (Nygren P. A.) およびスケラ A. (Skerra A.) (2004年) J. Immunol. Meths. 290:3-28頁)、またはオリゴヌクレオチド由来 (ゴールド L. (Gold L.) ら (1995年) Annu. Rev. Biochem. 64:763-797頁) でありうる。

20

【0055】

多数の非免疫グロブリンタンパク質足場が、新規の結合タンパク質の開発における支持構造として用いられている。本発明で用いられるS A T B 2に対する親和性リガンドの産生に有用なかかる構造の非限定例として、ブドウ球菌プロテインAおよびそのドメインおよびこれらのドメインの誘導体、例えば、プロテインZ (ノード K. (Nord K.) ら (1997年) Nat. Biotechnol. 15:772-777頁)、リボカリン (ベステ G. (Beste G.) ら (1999年) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:1898-1903頁)、アンキリン反復ドメイン (ビンズ H. K. (Binz H. K.) ら (2003年) J. Mol. Biol. 332:489-503頁)、セルロース結合ドメイン (CBD) (スミス G. P. (Smith G. P.) ら (1998年) J. Mol. Biol. 277:317-332頁; レーティオ J. (Lehtioe J.) ら (2000年) Proteins 41:316-322頁)、クリスタリン (フィードラー U. (Fiedler U.) およびルドルフ R. (Rudolph R.)、国際公開第01/04144号パンフレット)、緑色蛍光タンパク質 (GFP) (ピーレ B. (Peelle B.) ら (2001年) Chem. Biol. 8:521-534頁)、ヒト細胞毒性Tリンパ球関連抗原4 (CTLA-4) (ハフトン S. E. (Hufton S. E.) ら (2000年) FEBS Lett. 475:225-231頁; アービング R. A. (Irving R. A.) ら (2001年) J. Immunol. Meth. 248:31-45頁)、プロテアーゼ阻害剤、例えばKnottinタンパク質 (ウェンツェル A. (Wentzel A.) ら (2001年) J. Bacteriol. 183:7273-7284頁; バッジオ R. (Baggio R.) ら (2002年) J. Mol. Recognit. 15:126-134頁) およびクニッツ (Kunitz) ドメイン (ロバーツ B. L. (Roberts B. L.) ら (1992年) Gene 121:9-15頁; デニス M. S. (Dennis M. S.) およびラザラス R. A. (Laz

30

40

50

arus R. A.) (1994年) J. Biol. Chem. 269: 22137 - 22144頁)、PDZドメイン(シュナイダー S. (Schneider S.)ら(1999年) Nat. Biotechnol. 17: 170 - 175頁)、ペプチドアプタマー、例えばチオレドキシン(ル Z. (Lu Z.)ら(1995年) Biotechnology 13: 366 - 372頁; クレベンツ B. (Klevenz B.)ら(2002年) Cell. Mol. Life Sci. 59: 1993 - 1998頁)、ブドウ球菌ヌクレアーゼ(ノルマン T. C. (Norman T. C.)ら(1999年) Science 285: 591 - 595頁)、テンダミスタット(tendamistat)(マッコネル S. J. (McConeil S. J.)およびヘス R. H. (Hoess R. H.) (1995年) J. Mol. Biol. 250: 460 - 479頁; リ R. (Li R.)ら(2003年) Protein Eng. 16: 65 - 72頁)、フィブロネクチンIII型ドメインに基づくトリネクチン(trinectin)(コイデ A. (Koide A.)ら(1998年) J. Mol. Biol. 284: 1141 - 1151頁; クス L. (Xu L.)ら(2002年) Chem. Biol. 9: 933 - 942頁)、およびジンクフィンガー(ピアンキ E. (Bianchi E.)ら(1995年) J. Mol. Biol. 247: 154 - 160頁; クルーグ A. (Klug A.) (1999年) J. Mol. Biol. 293: 215 - 218頁; セガル D. J. (Segal D. J.)ら(2003年) Biochemistry 42: 2137 - 2148頁)が挙げられる。

10

20

## 【0056】

非免疫グロブリンタンパク質足場の上記の例は、新規の結合特異性の生成のために用いられる単一のランダム化されたループを提示する足場タンパク質、タンパク質表面から突出する側鎖が新規の結合特異性の生成のためにランダム化される場合に堅い二次構造を有するタンパク質足場、および新規の結合特異性の生成のために用いられる隣接していない超可変ループ領域を提示する足場を含む。

## 【0057】

非免疫グロブリンタンパク質に加え、オリゴヌクレオチドも親和性リガンドとして使用可能である。アプタマーまたはデコイ(decoy)と称される一本鎖核酸が、明瞭な三次元構造に折り畳み、その標的に高い親和性および特異性で結合する(エリングトン A. D. (Ellington A. D.)およびスゾスタク J. W. (Szostak J. W.) (1990年) Nature 346: 818 - 822頁; プロディ E. N. (Brody E. N.)およびゴールド L. (Gold L.) (2000年) J. Biotechnol. 74: 5 - 13頁; メイヤー G. (Mayer G.)およびジェニー A. (Jenne A.) (2004年) BioDrugs 18: 351 - 359頁)。オリゴヌクレオチドリガンドは、RNAまたはDNAのいずれかであり、広範囲の標的分子のクラスに結合する可能性がある。

30

40

50

## 【0058】

上記の足場構造のいずれかの変異体プールからの所望の親和性リガンドの選択においては、多数の選択プラットフォームが、選択される標的タンパク質に対して特異的な新規のリガンドを単離するために使用可能である。選択プラットフォームは、限定はされないが、ファージディスプレイ(スミス G. P. (Smith G. P.) (1985年) Science 228: 1315 - 1317頁)、リボソームディスプレイ(ハネス J. (Hanes J.)およびプリュックタン A. (Plueckthun A.) (1997年) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94: 4937 - 4942頁)、酵母ツーハイブリッド(two-hybrid)システム(フィールズ S. (Fields S.)およびソング O. (Song O.) (1989年) Nature 340: 245 - 246頁)、mRNAディスプレイ(ロバーツ R. W. (Roberts R. W.)およびスゾスタク J. W. (Szostak J. W.) (1997年) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94: 12297 - 12302頁)、SELEX(System Evolution of Liga

nds by Exponential Enrichment) (チュエルク C. (Tuerk C.) およびゴールド L. (Gold L.) (1990年) Science 249: 505 - 510頁) およびタンパク質断片相補性アッセイ (PCA) (レミー I. (Remy I.) およびミシュニック S.W. (Michnick S.W.) (1999年) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 5394 - 5399頁) を含む。

【0059】

したがって、本発明の実施形態では、親和性リガンドが使用可能であり、それは上掲のタンパク質足場のいずれかに由来する非免疫グロブリンの親和性リガンド、またはオリゴヌクレオチド分子である。

【0060】

本発明に記載の方法のいくつかの実施形態では、SATB2タンパク質との選択的相互作用を行うことが可能な親和性リガンドが検出可能でありかつ/または定量可能である。かかる親和性リガンドの検出および/または定量は、生物学的相互作用に基づくアッセイにおける結合試薬の検出および/または定量のための当業者に既知の任意の方法で行われうる。したがって、前項に記載のように、任意の親和性リガンドを量的または質的に用いることでSATB2タンパク質の存在の検出が可能である。これらの「第一」親和性リガンドは、様々なマーカーでそれ自体の標識が可能であるか、または次いで第二の標識された親和性リガンドにより検出されることで検出、画像化および/または定量が可能である。これは、当業者に既知の多数の技術のうちの任意の1つもしくは複数をを用い、SATB2と相互作用を行うことが可能な親和性リガンドまたは任意の第二の親和性リガンドに複合可能な多数の標識のうちの任意の1つもしくは複数をを用いて実施可能であり、それ故にいかなる必要以上の実験も要しない。

【0061】

第一および/または第二の親和性リガンドに複合可能な標識の非限定例として、蛍光色素もしくは金属(例えば、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリン、フルオレサミン)、発色色素(例えばロドプシン)、化学発光化合物(例えば、ルミナル、イミダゾール)および生物発光タンパク質(例えば、ルシフェリン、ルシフェラーゼ)、ハプテン(例えばビオチン)が挙げられる。種々の他の有用な蛍光剤および発色団が、ストライヤー L. (Stryer L.) (1968年) Science 162: 526 - 533頁およびブランド L. (Brand L.) およびゴールケ J.R. (Gohlke J.R.) (1972年) Annu. Rev. Biochem. 41: 843 - 868頁において記載されている。親和性リガンドはまた、酵素(例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ラクタマーゼ)、放射性同位体(例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ もしくは $^{125}\text{I}$ ) および粒子(例えば金)で標識可能である。異なるタイプの標識が、様々な化学反応、例えばアミン反応またはチオール反応を用いて親和性リガンドに複合可能である。また一方、アミンおよびチオール以外の反応基、例えばアルデヒド、カルボキシル酸およびグルタミンの使用が可能である。

【0062】

本発明の方法の態様はいくつかの既知の形式および設定のいずれかにおいて利用される場合があり、その非限定的な選択が以下に考察される。

【0063】

組織学に基づく設定では、標識された親和性リガンドとそのSATB2標的との結合についての検出、局在化および/または定量は、可視的技術、例えば光学顕微鏡検査または免疫蛍光顕微鏡検査を含みうる。他の方法としては、フローサイトメトリーまたはルミノメトリー(luminometry)を介した検出を含みうる。

【0064】

上で説明したように、対象におけるSATB2タンパク質の検出および/または定量は、対象由来の生物学的試料、例えば組織試料(生検)を、例えば結腸直腸組織、血液試料、脳脊髄液、尿または排泄物から取り出すことにより行われうる。親和性リガンドは、S

10

20

30

40

50

A T B 2 マーカータンパク質の検出および/または定量のために生物学的試料に適用される。この手順によると、S A T B 2 タンパク質の検出が可能になるだけでなく、その発現の分布および相対レベルが示されうる。

【0065】

親和性リガンド上での標識の可視化の方法は、限定はされないが、蛍光、ルミノメトリーおよび/または酵素技術を含みうる。蛍光標識を特定の波長の光に暴露し、その後特定の波長の放射光を検出しかつ/または定量することにより、蛍光の検出および/または定量がなされる。発光標識された親和性リガンドの存在は、化学反応の間に生じる発光により検出および/または定量がなされうる。酵素反応の検出は、化学反応から生じる試料中での色ずれによるものである。当業者は、種々の異なるプロトコルが適切な検出および/または定量を目的に改良可能であることを理解している。

10

【0066】

本発明に記載の方法では、生物学的試料が、固相支持体または担体、例えばニトロセルロースまたはそれに適用される生物学的試料中に存在する任意のS A T B 2 タンパク質を固定化可能な任意の他の固体支持体マトリックスの上部に固定化されうる。本発明で有用なくつかの周知の固相支持体材料が、ガラス、炭水化物(例えばS e p h a r o s e)、ナイロン、プラスチック、ウール、ポリスチレン、ポリエテン(p o l y e t h e n e)、ポリプロピレン、デキストラン、アミラーゼ、フィルム、樹脂、セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、アルミナ、斑糲岩およびマグネタイトを含む。第一の親和性リガンドが本質的に標識されない場合、その後支持マトリックスは当該技術分野で既知の様々な緩衝液で洗浄され、次いで第二の標識された親和性リガンドに暴露され、再度緩衝液で洗浄されることで未結合の親和性リガンドが除去可能であり、その後、従来の方法を用い、選択的な親和性リガンドの検出および/または定量がなされうる。親和性リガンドにおける結合特性が固相支持体の一方から他方へ変化することになるが、当業者は通常の実験による各測定における有効かつ最適なアッセイ条件を決定できるであろう。

20

【0067】

本発明で必要とされるS A T B 2 タンパク質を検出しかつ/または定量するための方法は、親和性リガンドを後に酵素イムノアッセイ(E I AまたはE L I S Aなど)で検出および/または定量が可能な酵素に連結することによるものである。かかる技術は十分に確立されており、そうした認識から当業者が何らかの過度に困難な状況に置かれることはない。かかる方法では、生物学的試料は、固体材料またはS A T B 2 タンパク質に対する親和性リガンドに複合された固体材料との接触状態に至り、次いで酵素標識された第二の親和性リガンドによる検出および/または定量がなされる。この後、適切な緩衝液中で適切な基質と酵素標識との反応がもたらされることで化学的部分(c h e m i c a l m o i e t y)が生成され、例えば、分光光度計、蛍光計、照度計の使用かまたは目視手段による検出および/または定量がなされる。

30

【0068】

上記のように、第一および任意の第二の親和性リガンドが放射性同位体で標識されることで検出および/または定量が可能になる。本発明において適切な放射性標識の非限定例が、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ または $^{125}\text{I}$ である。標識された親和性リガンドの比活性は、放射性標識の半減期、同位体純度、および標識が親和性リガンドにいかに取り込まれているかに依存する。親和性リガンドは、好ましくは周知の技術(ヴェンゼル T . G . ( W e n s e l T . G . ) およびメアレス C . F . ( M e a r e s C . F . ) ( 1 9 8 3 年 ) 「 R a d i o i m m u n o i m a g i n g a n d R a d i o i m m u n o t h e r a p y 」 ( パーキエル S . W . ( B u r c h i e l S . W . ) およびローデス B . A . ( R h o d e s B . A . ) 編) ニューヨーク ( N e w Y o r k ) のエルゼビア ( E l s e v i e r ) 、 1 8 5 - 1 9 6 頁 ) を用いて標識される。このように放射性標識された親和性リガンドを用い、インビボまたはインビトロでの放射能の検出によりS A T B 2 タンパク質を画像化することが可能である。インビボおよびインビトロでの検出における、例えば カメラ、磁気共鳴分光学またはエミッショントモグラフィー

40

50

の機能による放射性核 ( r a d i o n u c l e a r ) の走査の一方で、 / カウンター、シンチレーションカウンターおよびラジオグラフィーのインビトロでの使用も可能である。

【 0 0 6 9 】

本発明のさらなる態様は、上記の本発明の方法の態様に記載の方法を実施するためのキットを提供し、キットは、

a ) S A T B 2 タンパク質と選択的相互作用を行うことが可能な定量可能な親和性リガンド、および

b ) 前記親和性リガンドの量を定量するのに必要な試薬を含む。

10

【 0 0 7 0 】

本発明に記載のキットの様々な成分は、本発明の方法の態様と関連して上記のように選択されかつ特定される。

【 0 0 7 1 】

したがって、本発明に記載のキットは、S A T B 2 に対する親和性リガンド、ならびにそれが特異的かつ / または選択的に S A T B 2 に結合した後での特異的かつ / または選択的な親和性リガンドの定量に役立つ他の手段を含む。例えば、本発明のキットは、任意の S A T B 2 タンパク質により形成された複合体の検出および / または定量のための第二の親和性リガンド、ならびに S A T B 2 タンパク質と選択的相互作用を行うことが可能な親和性リガンドを有しうる。本発明のキットは親和性リガンド以外の様々な補助剤も有する場合があります、それによりキットの容易かつ効率的な使用が可能になる。補助剤の例として、キットの凍結乾燥されたタンパク質成分を溶解または再構成するための溶媒、洗浄緩衝液、酵素が標識として用いられる場合に酵素活性を測定するための物質、およびイムノアッセイ試薬キットにおいて一般に用いられる反応停止剤などの物質が挙げられる。

20

【 0 0 7 2 】

本発明に記載のキットはまた、有利には標本値との比較において用いられるべき参照値を提供するための参照試料も含みうる。かかる参照試料は、例えば所定量の S A T B 2 タンパク質を有する組織の試料により構成される場合があります、そこで病理学の当業者がそれを用い、試料中での S A T B 2 の発現状態を、参照試料中および対象試料中での発現レベルの目視または自動的な比較による試験で判定できる。

30

【 0 0 7 3 】

本発明のさらなる態様として、予後マーカーとしての S A T B 2 タンパク質の使用が提供される。また、結腸直腸癌に対する予後マーカーとしての S A T B 2 タンパク質の使用が提供される。

【 0 0 7 4 】

本発明に関連する態様として、結腸直腸癌の予後用の予後剤の製造における、S A T B 2 タンパク質または抗原活性を示すその断片の使用が提供される。S A T B 2 タンパク質の抗原活性を示す断片は、断片を含む S A T B 2 タンパク質と相互作用することになる親和性リガンド、例えば抗体の産生において有効な、十分なサイズの断片である。

40

【 0 0 7 5 】

本発明のこれらの使用についての態様の実施形態では、S A T B 2 タンパク質は、非限定例として、

i ) 配列番号 1、および

i i ) 配列番号 1 に対して少なくとも 8 5 % 同一の配列から選択される配列を含むアミノ酸配列を有しうる。

【 0 0 7 6 】

いくつかの実施形態では、上記の配列 i i ) は、配列番号 1 に対し、少なくとも 9 0 % 同一であるか、少なくとも 9 1 % 同一であるか、少なくとも 9 2 % 同一であるか、少なくとも 9 3 % 同一であるか、少なくとも 9 4 % 同一であるか、少なくとも 9 5 % 同一であるか、少なくとも 9 6 % 同一であるか、少なくとも 9 7 % 同一であるか、少なくとも 9 8 %

50

同一であるかまたは少なくとも99%同一である。

【0077】

別の非限定例として、SATB2タンパク質は、

i) 配列番号2、および

ii) 配列番号2に対して少なくとも85%同一の配列

から選択される配列を含むアミノ酸配列を有する。

【0078】

いくつかの実施形態では、上記の配列ii)は、配列番号2に対し、少なくとも90%同一であるか、少なくとも91%同一であるか、少なくとも92%同一であるか、少なくとも93%同一であるか、少なくとも94%同一であるか、少なくとも95%同一であるか、少なくとも96%同一であるか、少なくとも97%同一であるか、少なくとも98%同一であるかまたは少なくとも99%同一である。

10

【0079】

本発明は、そのさらなる態様として、SATB2タンパク質と選択的相互作用を行うことが可能な親和性リガンドを提供し、それは抗体またはその断片もしくは誘導体である。かかる抗体またはその断片もしくは誘導体は、例えばアミノ酸配列が配列番号1の配列を含むタンパク質で動物を免疫するステップを含むプロセスにより得られうるものでありうる。所定の標的に対する抗体またはその断片もしくは誘導体を産生するためのプロセスは当該技術分野で既知であり、本発明のこの態様と関連して適用可能である。上で考察されたSATB2タンパク質(配列番号2)の変異体のいずれかまたは抗原活性を示すその断片(配列番号1)については、当然のことながら抗体またはその断片もしくは誘導体を産生するためのかかるプロセスにおいて使用可能である。

20

【0080】

本発明は、そのさらなる態様として、予後剤としての本発明に記載の親和性リガンドの使用を提供する。この使用の好ましい実施形態は、結腸直腸癌の予後用の予後剤としての親和性リガンドの使用である。本発明はまた、結腸直腸癌の予後用の親和性リガンドの使用を提供する。それに関連した態様として、本発明は、結腸直腸癌の予後用の予後剤の製造における、本発明に記載の親和性リガンドの使用を提供する。

【0081】

本発明は、その別の態様では、結腸直腸癌を診断するための方法であって、SATB2タンパク質を検出するステップを含む、方法も提供する。本発明のこの態様は、SATB2が一般に結腸直腸組織、特に結腸直腸癌に対するタンパク質マーカーとして作用するという発見に基づくものである。さらに下記に詳述のように、SATB2タンパク質の断片に対して産生される抗体が、遠位胃腸管、すなわち虫垂、結腸および直腸から得られる腺細胞内や結腸直腸癌内の核で強力かつ選択的な免疫反応性を示す。最も顕著な発見は、結腸直腸癌の11の内の11において明白である。結腸直腸癌以外の他の腫瘍においては、弱陽性または中程度の陽性であるものは極めてわずかに過ぎなかった。

30

【0082】

さらに、SATB2は他のタイプの癌内に存在することが比較的少ない一方で、SATB2に特異的な親和性リガンドが結腸直腸癌を他の癌から特異的に識別するための極めて興味深いツールとなる。大部分の結腸直腸癌が腺由来であることから、腺癌として分類される。これは典型的な癌タイプであり、同様に様々な他の器官から発生しうる。したがって、本発明の発見は、器官における腫瘍の発生源が未知であることが多い場合、腫瘍の転移をタイプ分けするのに用いられる場合に極めて興味深いものである。現在、結腸直腸癌において使用可能な分子マーカーは他の腺癌に対して交差反応性を示し、それ故に腫瘍の位置を確認し、かつ転移の発生源を同定することは困難である。本発明に記載の特異的な結腸直腸癌マーカーにより、医師が癌の位置を効率的に確認し、より効率的な治療を提供し、最終的に患者へのより信頼できる予後の提供を促進することが可能になる。

40

【0083】

本発明の別の態様は、癌試料のSATB2およびCK20マーカーに対する同時試験を

50

含む。実施例の6項にて詳述されるように、結腸直腸癌の識別におけるS A T B 2およびC K 2 0の発現の双方に対する試験の組み合わせにおける予測値は、単独で行われた各マーカーに対する試験における予測値を上回る。したがって、本発明は、この態様では、結腸直腸癌を診断する方法であって、S A T B 2タンパク質を検出するステップと、C K 2 0タンパク質を検出するステップと、を含む、方法を提供する。さらに、本発明は、S A T B 2タンパク質および/またはC K 2 0タンパク質の存在を検出することによる、転移が結腸直腸癌に由来するか否かを検出するための方法を提供する。患者は、C K 2 0およびS A T B 2の双方から得られる情報を組み合わせれば結腸直腸疾患に対する正確な診断をより容易に得ることになる。当業者であれば、本発明のこの態様に記載の方法に対するS A T B 2の検出に関する本明細書中の教示内容に適應できることになり、かつ、本明細書中の記載内容および例えば免疫組織化学の分野における知識のおかげで過度な負荷をかけることなく、S A T B 2およびC K 2 0の同時的または連続的な検出および/または定量を行うことができる。

10

20

30

40

50

#### 【0084】

本発明の態様では、癌患者においてS A T B 2タンパク質が血漿中および排泄物中に漏れることが予測される点が興味深い。比較として、健康な患者であっても周知の前立腺癌マーカーであるP S A（正常な前立腺内にも発現される）が前立腺から血漿へ漏れる。しかし、多数の前立腺癌患者がその血漿中のP S Aレベルが上昇することから、血中で上昇したP S Aレベルのスクリーニングが、前立腺癌の発生リスク群内での男性に対するについて一般的な早期スクリーニング手順である。同じことがS A T B 2と結腸直腸癌との間の関連性にも該当することが予測される。したがって、S A T B 2は、本発明における試料としてヒト血漿または他の体液または排泄物を用いることによる、結腸直腸癌のスクリーニング用のツールとしても有用である。これに関し、本発明は、あまりに不快であることから多くの人々が米国癌協会（American Cancer Institute）が結腸癌のリスク群に対して定期検査を推奨しているという事実に対してスキップするという、ここでの結腸直腸癌のスクリーニング、例えば結腸直腸鏡検査またはS状結腸鏡検査における有意義な拡張に対応するだけでなく可能性としては交換にも対応する。S A T B 2を結腸直腸癌におけるマーカータンパク質として用いる、本発明に基づくスクリーニング方法が、このタイプの癌に苦しんでいる患者のスクリーニング、早期検出および治療に対して有意な効果をもたらす。

#### 【0085】

「予後」は、本発明との関連では、疾患の経過または転帰およびその治療の予測を示す。予後はまた、疾患からの生存または回復の見込みの判定ならびに対象の予想される生存時間の予測を示しうる。予後は、詳細には、将来にかけてのある期間、例えば3年、5年、10年もしくは任意の他の期間にわたる対象の生存における可能性を明確にすることを含む。

#### 【0086】

「診断」は、本発明との関連では、疾患もしくは障害の存在の判定または疾患もしくは障害の同定を示す。診断はまた、そのプロセスを通じて到達する結論を示す。これに関連し、「診断」は疾患の存在または性質の判定に関係しかつそれに役立つことを意味する。本発明との関連では、「診断（diagnosis）」および「診断の（diagnostic）」は、疾患における経時的な任意の自然発生的変化または治療に起因する任意の変化を監視することも意味する。

#### 【0087】

上記の定義から明白なように、「予後」および「診断」という用語は重複した意味を有し、互いに排他的なものでない。

#### 【0088】

本発明との関連で、例えば親和性リガンドのその標的または抗原との「特異的」または「選択的」相互作用とは、特異的相互作用と非特異的相互作用との間または選択的相互作用と非選択的相互作用との間の区別が重要になるような相互作用であることを意味する。

2つのタンパク質の間の相互作用は解離定数により測定される場合がある。解離定数は2分子間の結合（または親和性）の強さを記述する。典型的には、抗体とその抗原の間の解離定数は $10^{-7} \sim 10^{-11}$  Mである。しかし、高い特異性は必ずしも高い親和性を必要としない。対応物に対して（モル範囲内で）低い親和性を有する分子が、はるかに高めの親和性を有する分子と同程度に特異的であることが示されている。本発明の場合、特異的または選択的な相互作用は、特定の方法を用い、天然体液または処理体液の試料中、他のタンパク質の存在下での所定の条件下で、特定のタンパク質、標的タンパク質またはその断片における存在および/または量を測定可能である範囲を示す。換言すれば、特異性または選択性は関連タンパク質間を識別する能力である。特異的と選択的とは、本明細書中で同義的に用いられる場合がある。

10

#### 【0089】

本発明との関連で、「単一特異性抗体」は、それ自体の抗原上で親和性精製されているポリクローナル抗体の集団の1つであり、それによりかかる単一特異性抗体は他の抗血清タンパク質および非特異的抗体から分離される。この親和性精製の結果、その抗原に選択的に結合する抗体が得られる。本発明の場合、ポリクローナル抗血清は2ステップの免疫親和性に基づくプロトコルにより精製され、標的タンパク質に対して選択的な単一特異性抗体が得られる。抗原断片の一般の親和性タグに特異的な抗体が、固定化されたタグタンパク質を捕捉剤として用いる第1の減少ステップで除去される。抗原に対して特異的な抗体について濃縮するため、第1の減少ステップ後、血清は抗原を捕捉剤として用い、第2の親和性カラム上に負荷される（ニルソン P. (Nilsson P.)ら(2005年) Proteomics 5: 4327 - 4337頁も参照)。

20

#### 【実施例】

#### 【0090】

正常および癌試料中でSATB2を検出するためのSATB2に対する単一特異性抗体の産生およびその使用

##### 1) 抗原の産生

##### a. 材料および方法

Ensembl Gene ID ENSG00000119042によってコードされる標的タンパク質の適切な断片を、鋳型としてヒトゲノム配列を用いるバイオインフォマティクスツールを用いて設計した（リンドスコグ M. (Lindskog M.)ら(2005年) Biotechniques 38: 723 - 727頁、Ensembl、www.ensembl.org）。タンパク質SATB2（配列番号2；Ensembl登録番号ENSP00000260926）のアミノ酸377 - 499に対応する123のアミノ酸（配列番号1）からなる断片を設計した。標的タンパク質をコードする、長いSATB2遺伝子転写産物のヌクレオチド1542 - 1910（配列番号3；Ensembl登録番号ENST00000260926）を有するポリヌクレオチドを、Platinum（登録商標）Taq（インビトロジェン（Invitrogen））および鋳型としてのヒト全RNAプールパネル（Human Total RNA Panel IV、BDバイオサイエンス・クローンテック（BD Biosciences Clontech）を有するSuperscript（商標）One-Step RT-PCR増幅キットにより単離した。フランキング制限部位NotIおよびAscIをPCR増幅プライマーを通じて断片に導入し、発現ベクターへのインフレームでのクローニングを可能にした（フォワードプライマー：GTGTC CCAAGCTGTC TTTG、リバープライマー：CTTG G C C T T T T C A T C T C C）。次いで、下流プライマーをビオチン化し、上記の固相クローニングを可能にし、得られたビオチン化PCR産物をDynabeads M280 Streptavidin（ダイナル・バイオテック（Dyna1 Biotech））上に固定化した（ラーソン M. (Larsson M.)ら(2000年) J. Biotechnol. 80: 143 - 157頁）。断片を、NotI - AscI消化（ニュー・イングランド・バイオラブズ（New England Biolabs））により固体支持体から放出し、固定化金属イオンクロマトグラ

30

40

50

フィー (IMAC) 精製におけるヘキサヒスチジル (hexahistidyl) タグおよび連鎖球菌 (streptococcal) プロテイン G 由来の免疫増強性のアルブミン結合タンパク質 (ABP) からなる二重親和性タグを用いてインフレイムで pAff8c ベクター (ラーソン M. (Larsson M.) ら、上記) にライゲートし (シャランダー A. (Sjolander A.) ら (1997年) J. Immunol. Methods 201: 115 - 123 頁; スタール S. (Stahl S.) ら (1999年) 「Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation」 (フレッキングー M. C. (Fleckinger M. C.) およびドリュー S. W. (Drew S. W.) 編) ジョン・ワイリー・アンド・サンズ (John Wiley and Sons Inc.)、ニューヨーク (New York)、49 - 63 頁)、大腸菌 (E. coli) の BL21 (DE3) 細胞 (ノバゲン (Novagen)) に形質転換した。クローンの配列を、製造業者の推奨に従い、TempliPhi DNA 配列決定増幅キット (スウェーデン、ウップサーラ (Uppsala) の GEヘルスケア (GE Healthcare)) を用いて増幅されたプラスミド DNA の色素 - ターミネーターサイクル配列決定により検証した。

10

## 【0091】

発現ベクターを保有する BL21 (DE3) 細胞を、5 g/l の酵母抽出物 (メルク (Merck KGaA)) および 50 mg/l のカナマイシン (シグマ - アルドリッチ (Sigma - Aldrich)) を補充した 30 g/l のトリプシンソイブロス (soy broth) (メルク (Merck KGaA)) 100 ml 中に同培地内への一晚培養物 1 ml の添加により接種した。細胞培養物を、1 リットルの振とうフラスコ内、37 および 150 rpm で 600 nm での光学濃度が 0.5 ~ 1.5 に達するまでインキュベートした。次いで、タンパク質の発現を、イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド (アポロ・サイエンティフィック (Apollo Scientific)) を 1 mM の最終濃度まで添加することにより誘発し、インキュベーションを 25 および 150 rpm で一晚継続した。細胞を 2400 g での遠心分離により収穫し、ペレットを溶解緩衝液 (7 M 塩酸グアニジン、47 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、2.65 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、10 mM トリス - HCl、100 mM NaCl、20 mM -メルカプトエタノール; pH = 8.0) 5 ml 中に再懸濁し、37 および 150 rpm で 2 時間インキュベートした。35300 g で遠心分離後、変性され可溶化された遺伝子産物を含有する上清を回収した。

20

30

## 【0092】

His<sub>6</sub> でタグ化された融合タンパク質を、ASPEC XL4 (商標) (ギルソン (Gilson)) 上での自動タンパク質精製手順 (ステーン J. (Steen J.) ら (2006年) Protein Expr. Purif. 46: 173 - 178 頁) を用いる、Talon (登録商標) 金属 ( $\text{Co}^{2+}$ ) 親和性樹脂 (BD バイオサイエンシーズ・クロンテック (BD Biosciences Clontech)) 1 ml を有するカラム上での固定化金属イオン親和性クロマトグラフィー (IMAC) により精製した。樹脂を、変性用洗浄緩衝液 (6 M 塩酸グアニジン、46.6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、3.4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、300 mM NaCl、pH 8.0 ~ 8.2) 20 ml で平衡化した。次いで樹脂を、溶出緩衝液 (6 M 尿素、50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、100 mM NaCl、30 mM 酢酸、70 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.0) 2.5 ml 中への溶出に先立ち、最小限の洗浄緩衝液 31.5 ml で洗浄した。溶出した材料を 500  $\mu\text{l}$ 、700  $\mu\text{l}$  および 1300  $\mu\text{l}$  の 3 つのプールに分画した。抗原を含有する 700  $\mu\text{l}$  の画分およびプールされた 500  $\mu\text{l}$  および 1300  $\mu\text{l}$  の画分をさらなる使用のために保存した。

40

## 【0093】

抗原画分をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 1.9 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、154 mM NaCl) で 1 M 尿素的最終濃度まで希釈した後、75

50

00Daでの分子量カットオフを有するVivaporeの10/20mlの濃縮器(ピバサイエンス(Vivascience AG))を用いる、タンパク質濃度を増加させるための濃縮ステップを行った。タンパク質濃度を、ウシ血清アルブミンの標準を用いるピシンコニン酸(BCA)のマイクロアッセイプロトコル(ピアス(Pierce))を用い、製造業者の推奨に従って測定した。タンパク質の品質を、Protein50もしくは200アッセイ(アジレント・テクノロジー(Agilent Technologies))を用いるBioanalyzer機器上で分析した。

#### 【0094】

##### b) 結果

SATB2遺伝子の長い転写産物のヌクレオチド1542~1910(配列番号3)に対応しかつ標的タンパク質SATB2(配列番号2)のアミノ酸377~499からなるペプチド(配列番号1)をコードする遺伝子断片を、タンパク質断片に対して特異的なプライマーを用いるヒトRNAプールからのRT-PCRによって単離することに成功した。しかし、EnsemblからのENSG00000119042の配列と比べて、配列内に1つの単一のサイレントヌクレオチド突然変異が存在した。標的タンパク質(配列番号2)の123のアミノ酸断片(配列番号1)の設計においては、膜透過領域を欠如させることで大腸菌(E. coli)内での十分な発現を保証し、かつ任意のシグナルペプチドを欠如させたが、これは、それらが成熟タンパク質内で切断されることが理由である。さらに、タンパク質断片を他のヒトタンパク質との相同性が低い固有の配列からなり、産生された親和性試薬との交差反応性を最小限にし、立体エピトープの形成やさらには細菌系での効率的なクローニングおよび発現を可能にするのに適切な大きさであるように設計した。

#### 【0095】

正確なアミノ酸配列をコードするクローンを同定し、大腸菌(E. coli)内での発現時に正確な大きさの単一のタンパク質を生成し、次いで固定化金属イオンクロマトグラフィーを用いて精製した。溶出された試料を1M尿素の最終濃度および1mlまでの試料の濃度に希釈した後、タンパク質断片の濃度は7.4mg/mlであると判定し、純度分析によると98%の純度であった。

#### 【0096】

##### 2) 抗体の産生

##### a) 材料および方法

上記のようにして得られた精製SATB2断片を抗原として用い、国の指針(スウェーデンの許可番号A84-02)に従ってウサギを免疫した。ウサギを、一次免疫としてフロインドの(Freund)完全アジュバント中の200µgの抗原で筋肉内に免疫し、フロインドの不完全アジュバント中の100µgの抗原で4週間の間隔で3回免疫増強した。

#### 【0097】

免疫した動物由来の抗血清を3つのステップの免疫親和性に基づくプロトコルにより精製した(アガトン C. (Agaton C.)ら(2004年) J. Chromatogr. A 1043: 33-40頁; ニルソン P. (Nilsson P.)ら(2005年) Proteomics 5: 4327-4337頁)。第1ステップでは、全抗血清10mlを、1xPBS(1.9mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、154mM NaCl)の最終濃度にまで10xPBSで緩衝化し、0.46µmの孔サイズのフィルタ(Acrodisc(登録商標)、ライフ・サイエンス(Life Science))を用いて濾過し、pAff8cベクターから発現された二重親和性タグタンパク質His<sub>6</sub>-ABP(ヘキサヒスチジルタグおよびアルブミン結合タンパク質タグ)に共役されたN-ヒドロキシサクシニミド-活性化Sephrose(商標)4 Fast Flow(GEヘルスケア(GE Healthcare))5mlを含有する親和性カラムに適用し、抗原タンパク質断片に対する上記と同様の方法で精製した。第2のステップでは、二重親和性タグHis<sub>6</sub>-ABPに対する貫流するわずかな抗体を

10

20

30

40

50

、免疫における抗原として用いられるSATB2タンパク質断片(配列番号1)に共役された1mlのHi-Trap NHS-活性化HPカラム(GEヘルスケア(GE Healthcare))上に0.5ml/分の流速で負荷した。His<sub>6</sub>-ABPタンパク質およびタンパク質断片抗原は、製造業者による推奨に従い、NHSで活性化されたマトリックスに共役させていた。未結合の材料を1xPBST(1xPBS、0.1%トウイン20、pH7.25)で洗い流し、捕捉された抗体を低いpHのグリシン緩衝液(0.2Mグリシン、1mM EGTA、pH2.5)を用いて溶出させた。第3のステップで、溶出された抗体画分を、自動的に回収し、効率的な緩衝液交換のために直列的に接続された2つの5mlのHiTrap(商標)脱塩カラム(GEヘルスケア(GE Healthcare))上に負荷した。第2および第3の精製ステップを、AKTApres(商標)プラットフォーム(GEヘルスケア(GE Healthcare))上で実施した。抗原選択的(単一特異的)抗体(msAb)を、-20での長期保存のため、グリセロールおよびNaN<sub>3</sub>を各最終濃度が50%および0.02%になるまで補充したPBS緩衝液で溶出させた(ニルソン P.(Nilsson P.)ら(2005年)Proteomics 5:4327-4337頁)。

10

**【0098】**

タンパク質アレイの設定では、親和性精製された抗体画分の特異性および選択性を抗原自体および94の他のヒトタンパク質断片に対する結合分析により分析した(ニルソン P.(Nilsson P.)ら(2005年)Proteomics 5:4327-4337頁)。タンパク質断片を0.1M尿素および1xPBS(pH7.4)中で40μg/mlに希釈し、各50μlを96ウェルのスポットティングプレートのウェルに移した。ピン・アンド・リング(pin-and-ring)のアレイヤー(Affymetrix 427)を用い、タンパク質断片をスポットしてエポキシ製スライド(SuperEpoxy、テレケム(TeleChem))上に固定化した。スライドを1xPBSで洗浄し(5分)、次いで表面を30分間ブロックした(SuperBlock(登録商標)、ピアス(Pierce))。接着性の16ウェルのシリコンマスク(シュライチャー(Schleicher)およびシュエル(Schuell))を、単一特異性抗体を添加する(1xPBST中で1:2000に希釈して約50ng/mlにする)前にスライドガラスに適用し、振とう器上で60分間インキュベートした。各スポット内でタンパク質の量を定量するため、親和性タグに特異的なIgY抗体を単一特異性抗体とともにインキュベートした。スライドを1xPBSTおよび1xPBSで各々10分間、2回洗浄した。二次抗体(Alexa647と複合されたヤギ抗ウサギ抗体およびAlexa555と複合されたヤギ抗ニワトリ抗体、モレキュラー・プローブス(Molecular Probes))を1xPBST中で1:60000に希釈して30ng/mlにし、60分間インキュベートした。第1のインキュベーションについて同じ洗浄手順を行った後、スライドを脱水し、走査し(G2565BAアレイスキャナー、アジレント(Agilent))、画像を画像解析ソフトウェア(GenePix 5.1、アクソン・インスツルメンツ(Axon Instruments))を用いて定量した。結果を下記で考察し、図1に示す。

20

30

**【0099】**

さらに、親和性精製された抗体の特異性および選択性をウエスタンブロットにより分析した。還元条件下で、予め成形された10~20%のCriterion(商標)SDS-PAGE勾配ゲル(バイオ・ラッド・ラボラトリーズ(Bio-Rad Laboratories))上で選択されたヒト細胞系および組織から全タンパク質抽出物を分離してから、製造業者の推奨に従ってPVDf膜(バイオ・ラッド・ラボラトリーズ(Bio-Rad Laboratories))に電子転写することにより、ウエスタンブロットを行った。膜を室温で1時間ブロックし(5%ドライミルク、1xTBST;0.1Mトリス-HCl、0.5M NaCl、0.5%トウイン20)、ブロッキング緩衝液中で1:500に希釈した、親和性精製された一次抗体とともにインキュベートし、TBST中で洗浄した。HRPと複合された二次抗体(ブタ抗ウサギ免疫グロブリン/HRP

40

50

、ダコ・サイトメーション ( Dako Cytomation ) をブロッキング緩衝液中で 1 : 3000 に希釈し、Chemidoc ( 商標 ) CCDカメラ ( バイオ・ラッド・ラボラトリーズ ( Bio-Rad Laboratories ) ) および Super Signal ( 登録商標 ) West Dura Extended Duration 基質 ( ピアス ( Pierce ) ) を用い、製造業者のプロトコルに従って化学発光検出を行った。結果を下記で考察し、図 2 に示す。

【 0100 】

b) 結果

ポリクローナル抗体製剤の品質は抗体精製におけるストリンジェンシーの程度に依存することが判明し、標的タンパク質に由来するものではないエピトープに特異的な抗体の減少が他のタンパク質との交差反応およびバックグラウンド結合を回避するのに必要であることが過去に示されている ( アガトン C. ( Agaton C. ) ら ( 2004 年 ) J. Chromatogr. A 1043 : 33 - 40 頁 )。

10

【 0101 】

したがって、タンパク質マイクロアレイ分析を行うことで、特異性が高い単一特異性ポリクローナル抗体が His<sub>6</sub>-タグに特異的な抗体ならびに ABP-タグに特異的な抗体の減少により産生されたことを確認した。この後に固定化抗原を有する親和性カラム上で抗原選択的な抗体の親和性捕捉を行った。

【 0102 】

タンパク質アレイの各スポット内でタンパク質の量を定量するため、一次および二次抗体を併用して 2 色の色素標識系を用いた。ニワトリにて産生されたタグ特異的な IgY 抗体を Alexa 555 蛍光色素で標識した二次ヤギ抗ニワトリ抗体で検出した。ウサギ mAb とアレイ上のその抗原との特異的結合を、蛍光的に Alexa 647 で標識したヤギ抗ウサギ抗体で検出した。図 1 では、アレイの結果をアレイの各スポットから検出された Alexa 647 の蛍光強度の量に対応する棒 ( y 軸 ) として示す。各タンパク質断片を 2 通りにスポットし、図面の x 軸上の各棒は 1 つのタンパク質スポットを表す。タンパク質アレイ分析によると、SATB2 に対する親和性精製された単一特異性抗体が正確なタンパク質断片に対して高度に選択的であることが示され、かつアレイ上で分析される他のすべてのタンパク質断片に対するバックグラウンドが極めて低いことが示される。

20

【 0103 】

ウエスタンブロット分析の結果 ( 図 2 ) は、抗体が膀胱腫瘍細胞系 ( RT-4 )、卵巣嚢胞腺癌細胞系 ( EFO-21 ) および類表皮細胞系 ( A-431 ) ( レーン 1 ~ 3 ) において約 100 kDa の単一バンドを特異的に検出することを示している。さらに、特異性が低下したバンドが肝臓および扁桃腺組織試料 ( レーン 4 ~ 5 ) において見られる。SATB2 の理論分子量は ( SATB2 のアミノ酸配列、配列番号 2 からの計算によると ) 82 kDa であり、分析対象のタンパク質がグリコシル化されるかまたはそれ以外では分析の条件下で修飾される場合があるという事実を考慮して得られた結果に十分に対応している。

30

【 0104 】

3) 免疫組織化学による組織プロファイリング

40

a) 材料および方法

ヒト組織を含有する全部で 576 のパラフィンコアを単一特異性抗体試料を用いて分析した。組織マイクロアレイ ( TMA ) の作製のためのドナーブロックとして用いられる全組織を、地方倫理委員会 ( local ethical committee ) からの認可に従う、ウップサラ ( Uppsala ) の大学病院 ( University Hospital )、病理学教室 ( Department of Pathology ) のアーカイブから選択した。対応する組織切片を検査し、診断を確定しかつドナーブロック内の代表的領域を選択した。正常組織を、顕微鏡的に正常 ( 非腫瘍性 ) と定義し、外科的に摘出された腫瘍周辺から採取された標本から選択することが最も多かった。癌組織を診断および分類のために精査した。診断目的で、全組織をホルマリン固定し、パラフィン包埋し、

50

切断した。

【0105】

TMAの作製を本質的には過去に記載のように行った(コノネン J. (Kononen J.)ら(1998年)Nature Med. 4: 844-847頁;カリオニエミ O.P. (Kallioniemi O.P.)ら(2001年)Hum. Mol. Genet. 10: 657-662頁)。つまり、レシピエントのTMAブロック内に孔を作製した。ドナーブロックから円筒状のコア組織試料を取得し、レシピエントのTMAブロック内に置いた。これをビーチャー・インスツルメント(Beecher Instrument)から入手した自動化された組織アレイヤー(ATA-27、米国カリフォルニア州サンレーリー(Sun Prairie)のビーチャー・インスツルメント(Beecher Instruments))内で完全なTMAのデザインが作製されるまで繰り返した。TMAのレシピエントブロックを切断の2時間前に42℃でベーキングした。

10

【0106】

TMAの設計では、広範囲の代表的な正常組織由来の試料を得て、代表的な癌組織を含めることに重点を置いた。これについては過去にカンブ C. (Kampf C.)ら(2004年)Clin. Proteomics 1: 285-300頁において詳細な記載がなされている。つまり、48の正常組織由来の試料および20のヒトに作用する最も一般的な癌タイプ由来の試料を選択した。合計で、TMAブロックの8つの異なるデザイン(各々が1mmの直径を有する72の組織コアを有する)を作製した。TMAのうちの2つは正常組織を表し、異なる個体由来の3通りの48の異なる正常組織に対応するものであった。残りの6つのTMAは20の異なる癌タイプ由来の癌組織を表すものであった。癌タイプの20のうち17については12の個別に異なる腫瘍をサンプリングし、残りの3つの癌タイプについては4つの個別に異なる腫瘍をサンプリングした(すべてを同じ腫瘍から2通りに)。免疫組織化学的分析のため、TMAブロックをウォーターフォール・マイクローム(waterfall microtome)(ライカ(Leica))を用いて4μmの厚みで切断し、SuperFrost(登録商標)(ロシュ・アプライド・サイエンス(Roche Applied Science))のスライドグラス上に置いた。

20

【0107】

自動化された免疫組織化学分析を上記のように行った(カンブ C. (Kampf C.)ら(2004年)Clin. Proteomics 1: 285-300頁)。つまり、スライドグラスを60℃で45分間インキュベートし、キシレン中で脱パラフィン処理し(2×15分)、等級化したアルコールに水和した。抗原の回復(retrieval)においては、スライドをTRS(ターゲットリトリバル溶液(Target Retrieval Solution)、pH6.0、ダコ・サイトメーション(Dako Cytomation))中に浸漬し、Decloaking chamber(登録商標)(バイオケア・メディカル(Biocare Medical))内、125℃で4分間沸騰させた。スライドをAutostainer(登録商標)(ダコ・サイトメーション(Dako Cytomation))内に置き、内因性ペルオキシダーゼを最初にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>でブロックした(ダコ・サイトメーション(Dako Cytomation))。一次抗体およびヤギ抗ウサギペルオキシダーゼと複合させたEnvision(登録商標)を各々、室温で30分間インキュベートした。全ステップの間、スライドを洗浄緩衝液(ダコ・サイトメーション(Dako Cytomation))中ですすいだ。最後に、ジアミノベンジジン(ダコ・サイトメーション(Dako Cytomation))を色素原として用い、Harrisヘマトキシリン(シグマ・アルドリッチ(Sigma-Aldrich))を対比染色用に用いた。スライドにPertex(登録商標)(ヒストラブ(Histolab))を載せた。

30

40

【0108】

8つの異なるTMAから得た免疫組織化学的に染色した全切片を、ScanScope

50

T2の自動スライド走査システム(アペリオ・テクノロジーズ(Aperio Technologies))を用いて走査した。8つのTMAの中身全体を現すため、576枚のデジタル画像を生成した。走査を20倍の倍率で行った。元データを保存するため、デジタル画像を別々のタグ画像ファイルフォーマット(TIFF)ファイルとして分離し抽出した。ウェブベースのアノテーションシステム内での画像処理を可能にするため、各画像をTIFFフォーマットからJPEGフォーマットに圧縮した。免疫組織化学的に染色した組織の全画像を顕微鏡下でマニュアルで評価し、認定病理専門医(board certified pathologist)または専門教育を受けた人員(specially educated personnel)(その後、病理学者が検証した)によりアノテートした。異なる正常組織および癌組織の各々のアノテーションを、免疫組織化学的転帰の分類のための簡素化されたスキームを用いて行った。各組織における代表性(representativity)および免疫反応性について検査した。各正常組織タイプ内に含まれる異なる組織特異的な細胞タイプをアノテートした。各癌においては、腫瘍細胞および間質をアノテートした。基本的なアノテーションパラメータは、i)染色強度、ii)染色細胞の画分およびiii)細胞内局在化(核および/または細胞質/膜)の評価を含んだ。染色強度を臨床組織病理学的診断で用いられる基準に従って主観的に評価し、転帰を、陰性=免疫反応性なし、弱い=わずかな免疫反応性あり、中程度=中程度の免疫反応性あり、または強力=明確かつ強力な免疫反応性ありとして分類した。染色細胞の画分を、代表的な細胞集団に対し、<2%、2~25%、26~75%または>75%の免疫応答性細胞として分類した。免疫応答性細胞の強度および画分の双方に基づき、各組織試料に対し、0=陰性、1=弱い、2=中程度、および3=強いという「染色スコア」を与えた。

10

20

【0109】

b) 結果

ヒト標的タンパク質SATB2の組換えタンパク質断片に対して産生された単一特異性抗体の場合の組織プロファイリングからの結果は、いくつかの正常組織内および結腸直腸癌内で特定の免疫反応性(暗灰色)を示す(表1~4および図3~4)。

【0110】

表1は、正常なヒト組織内でのSATB2タンパク質の発現パターンを示す。免疫組織化学およびTMA技術を用い、48の異なるタイプの正常組織を表す144のスポット(直径1mm)におけるSATB2の発現についてスクリーニングした。表1は、異なる組織内での発現レベルを示す。強力な発現(染色スコア3)が、遠位胃腸管由来の組織内および脳の2つの領域内で見出された。発現の中程度(染色スコア2)レベルが睾丸および副睾丸において検出された。巣状リンパ球様細胞が、中程度のまたは弱い(染色スコア1)発現を示した。すべての他の細胞および組織が陰性(染色スコア0)であった。N.R.は代表的な組織が全く存在しなかったことを意味する。SATB2は一部の神経組織および睾丸においても発現される。

30

【0111】

【表 1 - 1】

表 1: 正常組織内での SATB2 の発現パターン		
組織タイプ	細胞タイプ	染色スコア
副腎	皮質細胞	0
	髄質細胞	測定不可
虫垂	腺細胞	3
	リンパ様組織	0
骨髄	骨髄ポエチック(poetic)細胞	0
胸部	腺細胞	0
気管支	表面上皮細胞	0
小脳	顆粒層細胞	0
	分子層細胞	0
	プルキンエ細胞	0
大脳皮質	神経細胞	3
	非神経細胞	0
子宮頸部	腺細胞	0
	表面上皮細胞 (扁平上皮)	測定不可
結腸	腺細胞	3
十二指腸	腺細胞	0
子宮内膜 1	子宮内膜間質細胞/ECM	0
	子宮筋層細胞/ECM	0
	腺細胞	0
子宮内膜 2	子宮内膜間質細胞/ECM	0
	子宮筋層細胞/ECM	0
	腺細胞	0
副睾丸	腺細胞	2
食道	表面上皮細胞	0
ファロピウス管	腺細胞	0
胆嚢	腺細胞	0
心筋	筋細胞	0
海馬	神経細胞	3
	非神経細胞	0
腎臓	糸球体細胞	0
	細管細胞	0
側脳室	神経細胞	0
	非神経細胞	0
肝臓	胆管細胞	0
	肝細胞	0
肺	肺胞細胞	0
	マクロファージ	0
リンパ節	濾胞細胞(皮質)	0
	非濾胞性細胞(副皮質)	2
鼻咽頭	表面上皮細胞	0
口腔粘膜	表面上皮細胞	0
卵巣	濾胞細胞	0
	卵巣間質細胞	0
膵臓	膵臓外分泌腺	0
	島細胞	0
副甲状腺	腺細胞	0
胎盤	脱落膜細胞	0
	栄養膜細胞	0
前立腺	腺細胞	0

【 0 1 1 2 】

10

20

30

40

【表 1 - 2】

直腸	腺細胞	3
唾液腺	腺細胞	0
精囊	腺細胞	0
骨格筋	筋細胞	0
皮膚	付属器細胞	0
	表皮細胞	0
小腸	腺細胞	0
平滑筋	平滑筋細胞	0
軟組織 1	間葉細胞	0
軟組織 2	間葉細胞	0
脾臓	赤色髄内細胞	0
	白色髄内細胞	0
胃 1	腺細胞	0
胃 2	腺細胞	0
睾丸	精細管細胞	2
	ライディツヒ細胞	0
甲状腺	腺細胞	0
扁桃腺	濾胞性細胞(皮質)	0
	非濾胞性細胞 (副皮質)	1
	表面上皮細胞	0
膀胱	表面上皮細胞	0
膣	表面上皮細胞	0
外陰/肛門皮膚	表面上皮細胞	0

10

20

## 【 0 1 1 3 】

図 3 A は、顕微鏡拡大像を示し、大脳皮質および海馬に由来するニューロン内の核が陽性であること（暗灰色）を示す。周囲組織およびグリア細胞は陰性（明灰色）であった。睾丸由来の組織切片は、舌下腺管において主に核が中程度に陽性であること（暗灰色）を示した（図 3 B）。

30

## 【 0 1 1 4 】

本発明を含む組織学的アレイにおける具体的発見が、虫垂（図 3 C）、結腸（図 3 D）および直腸（図 3 E）における粘膜の腺細胞内で見出された明瞭かつ強い陽性（暗灰色）の核であった。粘膜内にも存在する他の細胞タイプ、例えば炎症性細胞、内皮細胞における陰性の染色（明灰色）に着目すること。図 3 F は結腸粘膜の 2 つの高出力の拡大像を示し、それはすべての腺細胞が有する核における S A T B 2 タンパク質の発現が強力であること（暗灰色）を示している。

## 【 0 1 1 5 】

表 2 は、216 の異なる癌組織内での S A T B 2 の発現レベルを示す。表される全部で 11 の結腸直腸癌が陽性を示し、これらのうちの 8 つにおける発現は強力であった。分析対象の 11 の症例での結腸直腸癌を示す免疫組織化学的に染色された組織切片の場合での低出力の顕微鏡拡大像を図 4 A に示す一方、結腸直腸癌のうちの 6 つに由来する代表的領域の高出力の拡大像を図 4 B に示す。正常細胞を有する周囲組織が陰性（明灰色）であったのと比べて、大多数の癌細胞が核では強力な染色（暗灰色）を示し、それは高レベルの S A T B 2 の発現を示した。

40

## 【 0 1 1 6 】

【表 2】

表 2:20 の癌タイプ内での SATB2 の発現パターン												
癌タイプ	対象番号											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
乳癌	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	測定不可
子宮頸癌	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
結腸直腸癌	3	3	3	3	3	3	3	3	2	1	1	測定不可
子宮内膜癌	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
頭頸部癌	0	0	0	0								
腎臓癌	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	測定不可
肝癌	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
肺癌	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
悪性カルチノイド	0	0	0	0								
悪性神経膠腫	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
悪性リンパ腫	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
悪性黒色腫	0	0	0	0	0	0	0	0	0	測定不可	測定不可	測定不可
卵巣癌	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
膀胱癌	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	測定不可
前立腺癌	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
皮膚癌	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
胃癌	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
睾丸癌	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	測定不可
甲状腺癌	0	0	0	0								
尿路上皮癌	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	測定不可

10

20

## 【0117】

## 4) 結腸直腸癌 TMA

## a) 材料および方法

1999年～2002年の間に結腸直腸癌と診断された患者122名（女性63名および男性59名）由来のホルマリン固定されたパラフィン包埋組織のアーカイブをスウェーデンのマルメ大学病院（Malmö University Hospital）、病理学教室（Department of Pathology）から収集した。患者の中央年齢が75（32～88）歳であった。39の腫瘍がデュークスステージAであり、42がデュークスステージBであり、かつ41がデュークスステージCであった。死亡日に関する情報を全患者に対する死亡原因における地方登録所から得た。倫理的認可を地方倫理委員会（Local Ethics Committee）から得た。

30

## 【0118】

全部で122の結腸直腸癌の症例を、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色されたスライド上で組織病理学的に再評価した。次いでTMAを、1症例当たり2×1.0mmのコアを非侵襲性癌を代表する領域からサンプリングすることにより作製した。上記の2項に記載のように調製したSATB2抗体を用い、上記の3項に記載のようにTMAを調製し、自動化された免疫組織化学的分析を行った。

40

## 【0119】

組織アノテーションを、染色強度が陰性（免疫反応性が全くないかもしくはわずか）または陽性（反応性が中程度もしくは強力）のいずれかであると考えられる場合を除いて本質的には上記の3項に記載のように行った。次いで、細胞核内で陽性の染色強度を示す細胞の画分について計算を行い、試料における「画分スコア」と称される値を生成した。したがって、「画分スコア」は、この項における定義により陽性の染色強度を示す試料中の細胞の百分率に対応する。

## 【0120】

50

あらゆる異なる層における生存傾向に基づき、さらなる統計分析のために二分変数を作成し、高い/陽性のSATB2の発現を25%を超える陽性の核としてかつ低い/陰性SATB2の発現を25%未満の陽性の核として定義した。次いで、試料を、分割の基準として25%の画分スコアを用い、画分スコアに基づいて2群に分類した。したがって、組織試料(コア)中の25%未満の細胞内で全くシグナルがないかまたは染色強度が陽性であることによりその試料が「25%未満」の群内に分類される一方、コア中の25%を超える細胞内で染色強度が陽性であることによりその試料が「25%を超える」群内に分類される。

#### 【0121】

試料における上記の分類を、 Kaplan-Meier (Kaplan-Meier) 評価による全体的な生存分析に用い、対数順位検定を用い、異なる層内で生存を比較した。すべての統計的検定は両側でありかつ0.05%未満のp値を有意と考えた。すべての計算を統計パッケージSPSS 12.0 (米国イリノイ州のSPSS Inc.)を用いて行った。

10

#### 【0122】

##### b) 結果

122の結腸直腸癌についての組織マイクロアレイに基づく分析によると、99の腫瘍(81%)がSATB2に対して陽性であることが示された。驚くべきことに、図5で見られるように、SATB2の発現が低いかまたは全くないことを通常の切断および組織化学的染色によっては予測できなかった。両方の腫瘍試料(2通りに示される切片)を中間的に識別された結腸直腸腺癌として診断した。図5Aは強力なSATB2の発現を伴う切片を示し、図5Bにおける試料ではSATB2の発現が欠如している。

20

#### 【0123】

生存分析の結果を図6に示し、ここで図面は患者の異なる集団における経時的な累積的生存(cumulative survival)について示す。コホート全体に基づく生存分析によると、SATB2の発現が低い腫瘍を有する患者において全生存(OS)が短縮される傾向( $p = 0.14$ )が示された(図6A)。SATB2の発現と臨床病理学的変数である性別およびデュークスステージとの関係についても検討した。SATB2の発現が低い腫瘍を有する女性患者( $n = 63$ )は、全コホートと比べてOSがさらに短縮されるという傾向が高まること( $p = 0.11$ )が示された(図6B)。図6Cは、リンパ節陰性(デュークスステージAおよびB)患者( $n = 80$ )において同様の傾向( $p = 0.10$ )が観察されることを示す。リンパ節陰性の女性( $n = 44$ )のサブグループでは、この傾向は有意であった( $p = 0.04$ )(図6D)。

30

#### 【0124】

生存分析データを提示するための別の方法としては、上記の3項に記載の「染色スコア」の使用によるものでありうる。次いで、0および1としてスコア化された試料であれば低いSATB2の発現として定義され、2および3としてスコア化された試料であれば高いSATB2の発現として定義されることになる。図6に見られる結果と同様の結果が予想される。

#### 【0125】

##### 5) TMAデータの定量的画像分析

発現の定量的測定値を得るため、Aperio ScanScope CS Slide Scanner (米国カリフォルニア州ビスタ(Vista)のアペリオ・テクノロジーズ(Aperio Technologies))システムを用い、上記の4項に記載のように調製したハイブリダイズされたTMAスライドのデジタル画像を捕捉する。走査を20倍の倍率で行い、画像をマルチレイヤーTIFFとして保存する。これらのデジタル画像をImageScope (アペリオ(Aperio))を用いて閲覧し、分析に適するものと判断する。画像をばらし(de-arrayed)、各組織コアをTMA Lab (アペリオ(Aperio))を用いて画像化する。最初に、Color Decconvolutionアルゴリズム(アペリオ(Aperio))を用い、各画像を3つ

40

50

のチャンネル、すなわち赤、緑および青 (RGB) に分離する。これにより各染色の測定が別々に可能になることから、ジアミノベンジジン色原体 (chromogene) 染色からヘマトキシリン対比染色を差し引くことが可能になる。

#### 【0126】

次いで、多数の異なるアルゴリズムを用い、核、細胞質または膜の染色を定量する。IHC Nuclearアルゴリズム (アペリオ (Aperio)) を用い、SATB2の核染色を定量する。核を強度に基づいて同定した。核の縁部を、エッジ画素の平均により自動的に閾値を調節するエッジ閾値手法を用いて同定する。全部のアルゴリズムの完全な記述がアペリオ・テクノロジーズ (Aperio Technologies) から入手可能である。TMA上の各コアの擬似色のマークアップ画像を生成し、評価し、各アルゴリズムの正確さを確認する。

10

#### 【0127】

Nuclearアルゴリズムからの出力値は、TMAスライド上の各コアにおける陽性の核の百分率および核のRGB強度値である。各組織コア上でのSATB2の発現レベルについては、オートスコア (AS) を、各コアについて陽性の核の百分率と核のRGB強度を掛け合わせるにより計算する。AS分析を癌のTMA試料、例えば上記の4項に記載の試料について行い、全生存をカプラン・メイヤー (Kaplan-Meier) の方法により評価する。対数順位検定を用い、異なる層内で生存を比較する。統計計算を統計パッケージSPSS 12.0 (米国イリノイ州のSPSS Inc.) を用いて行う。

20

#### 【0128】

### 6) クラスタリング分析

#### a) 材料および方法

結腸癌における既知のマーカーとSATB2との間のタンパク質の発現における整合性を検討するため、階層的クラスタリングを行った。クラスタリングは、初期マイニングステップでデータにおける傾向および構造を評価するのに適した方法である。階層的クラスタリングのような教師なしの方法の使用により、データセットのブラウジングだけでは明白でない集団およびカテゴリーが容易に検出可能である。ライフサイエンスでは、クラスタリングはRNA転写分析、例えばマイクロアレイデータにおいてかなり幅広く用いられている。

30

#### 【0129】

3項に記載の6つの癌のTMAを再度、すなわち全部で216の癌組織試料中で用いた。上記の2項のように調製したSATB2を認識する抗体に加え、従来のマーカーであるCEA (デンマーク、グロストラップ (Glostrup) のダコ (DAKO))、CK20 (デンマーク、グロストラップ (Glostrup) のダコ (DAKO))、CDX2 (英国ニューキャッスル・アポン・タイン (Newcastle upon Tyne) のノボカストラ (Novocastra))、p53 (デンマーク、グロストラップ (Glostrup) のダコ (DAKO))、Ki67 (デンマーク、グロストラップ (Glostrup) のダコ (DAKO)) およびサイクリンB1 (米国レキシントン (Lexington) のトランスダクション・ラボラトリーズ (Transduction Laboratories)) に対する抗体を3項に記載のような自動化された免疫組織化学法を用いて試験した。

40

#### 【0130】

病理学者が、TMAを3項に示されるようにアノテートし、0~3のスケール (3は強力な染色 (黒) であり、0は染色なし (白) である) を用いて各コアに対して染色スコアを与えた。クラスタリングを、統計コンピューティング言語Rを用いて行った。クラスタリングアルゴリズムを二次元のデータマトリックス、組織および抗体に対して用いた。クラスタリング法では全部で7つの抗体および216の組織を用いた。8つの組織を発現レベルを定量可能と思われる画像を全く有しないことから除去した。クラスタリングを、クラスター間の距離が各ステージで平均連鎖に基づきランス・ウィリアムズ (Lance-Williams) の非類似性における新たな式により再計算される、ユークリッド距離

50

計量に基づく平均集積を用いるトップダウンの階層的方法を用いて行った。アルゴリズムでは、より緊密なクラスターが各ノードの左側に提示されるように、クラスタリング順序においてサブツリーを用いた。

#### 【0131】

S A T B 2 と C K 2 0 との間の差異および類似性をさらに試験するため、免疫組織化学分析を4項に記載の122の癌コアを有する癌のT M Aを用いて行った。T M Aを、2項のように調製したS A T B 2抗体およびダコ(D A K O)(グロストラップ(G l o s t r u p)、デンマーク)から入手したC K 2 0抗体で染色した。2つのT M Aを、4項で定義した「画分スコア」に従ってアノテートした後、比較した。

#### 【0132】

##### b) 結果

S A T B 2の結腸直腸癌に対するマーカーとしての、従来のマーカーC E A、C K 2 0、C D X 2、p 5 3、K i 6 7およびサイクリンB 1と比べた場合の特異性について、216の異なる腫瘍において検討した。これら7つの異なるタンパク質の発現プロファイルからのデータの階層的クラスタリングの結果としてヒートマップが得られ、それに伴う樹状図を図7に示す。腫瘍のヒートマップおよび樹状図から、大部分の結腸直腸癌がS A T B 2、C K 2 0、C D X 2およびC E Aの高い発現レベルに基づき最高レベルで分離されたクラスターを形成することは明白である。さらに分析によると、C K 2 0およびC D X 2クラスターとともにS A T B 2クラスターのすべてがより一般的な発現パターンを示した他の試験対象のマーカーよりも特異的な発現を有することが示される。8つの結腸直腸癌のクラスターでは、1つの子宮頸部腺癌および胆管細胞肝癌の1症例についてもS A T B 2に対して強い陽性を示した。このクラスター以外では、3つの結腸直腸癌がS A T B 2に対して陰性であった。興味深いことに、S A T B 2の発現パターンにおけるC K 2 0の発現との相関が明確でないことから、S A T B 2の発現パターンは結腸直腸癌の特徴づけの過程ではC K 2 0に対する補体として機能しうると思われる。

#### 【0133】

S A T B 2およびC K 2 0における4項に記載の122の癌のT M Aについてより詳細に分析した。25%を超える画分スコアを有する122の結腸直腸癌において、C K 2 0単独で86%(105/122)、S A T B 2単独で81%(99/122)が確認された(図8)。興味深いことに、両マーカーにおける染色から得たデータを組み合わせることにより、結腸直腸癌の93%(113/122)がマーカーの一方または両方において明らかに陽性であった。C K 2 0またはS A T B 2のいずれの発現も全くなかった患者は5名に過ぎなかった。癌に伴う一般的な臨床的問題が未知の発生源の転移を示す患者であることから、癌を診断する場合、より具体的には転移の同定を試みる場合、この情報は興味深い。したがって、患者が、C K 2 0およびS A T B 2の双方からの情報を組み合わせるのであれば結腸直腸腺癌に対する正確な診断をより容易に得ることになる。

#### 【0134】

さらに、結腸直腸癌を有する患者17名からのリンパ節転移におけるS A T B 2およびC K 2 0の発現を分析した。C K 2 0単独で、2もしくは3の染色スコアで転移の88%(15/17)の発生源が確認された。S A T B 2単独で、25%を超える画分スコアで転移の82%(14/17)の発生源が確認された(図9)。両マーカーにおける染色から得たデータを組み合わせることにより、転移の94%(16/17)の発生源が確認された。これはさらに、転移が結腸直腸癌から生じるか否かを判定する場合、S A T B 2およびC K 2 0の双方における発現に関する情報が望ましいという点を支持している。

#### 【0135】

##### 本発明の実施形態の項目別リスト

以下は、本発明の実施形態の非限定的な項目別リストであり、本発明により提供される特定のその態様における様々な特徴および組み合わせに関するさらなる情報を提供するために示されるものである。

10

20

30

40

50

1. 結腸直腸癌を診断するための方法であって、S A T B 2 タンパク質を検出するステップを含む、方法。
2. 前記 S A T B 2 タンパク質の前記アミノ酸配列が、
  - i) 配列番号 1、および
  - ii) 配列番号 1 に対して少なくとも 85% 同一の配列から選択される配列を含む、項目 1 に記載の方法。
3. 前記 S A T B 2 タンパク質の前記アミノ酸配列が、
  - i) 配列番号 2、および
  - ii) 配列番号 2 に対して少なくとも 85% 同一の配列から選択される配列を含む、項目 1 または 2 に記載の方法。
4.
  - a) 結腸直腸癌を有すると疑われる患者由来の試料を提供するステップと、
  - b) 前記試料に検出されるべき前記 S A T B 2 タンパク質との選択的相互作用を行うことが可能な検出可能な親和性リガンドを適用するステップであって、前記適用は前記親和性リガンドと前記試料中に存在する S A T B 2 タンパク質とを結合可能な条件下で行われる、ステップと、
  - c) 結合されていない親和性リガンドを除去するステップと、
  - d) 前記試料との会合状態を維持する親和性リガンドを検出するステップと、を含む、項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。
5. 前記試料が体液試料である、項目 4 に記載の方法。
6. 前記体液が、血液、血漿、血清、脳脊髄液、尿、精液および滲出液からなる群から選択される、項目 5 に記載の方法。
7. 前記試料が排泄物試料である、項目 4 に記載の方法。
8. 前記試料が組織試料である、項目 4 に記載の方法。
9. 前記試料が細胞学的試料である、項目 4 に記載の方法。
10. 前記検出可能な親和性リガンドが、抗体、その断片およびその誘導体からなる群から選択される、項目 4 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。
11. 前記検出可能な親和性リガンドが、ブドウ球菌プロテイン A およびそのドメイン、リボカリン、アンキリン反復ドメイン、セルロース結合ドメイン、クリスタリン、緑色蛍光タンパク質、ヒト細胞毒性 T リンパ球関連抗原 4、プロテアーゼ阻害剤、PDZ ドメイン、ペプチドアプタマー、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、テンダミスタット、フィブロネクチン III 型ドメインならびにジンクフィンガーからなる群から選択される足場に由来するタンパク質リガンドである、項目 4 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。
12. 前記検出可能な親和性リガンドがオリゴヌクレオチド分子である、項目 4 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。
13. 前記検出可能な親和性リガンドが、蛍光色素および金属、発色色素、化学発光化合物および生物発光タンパク質、酵素、放射性同位体および粒子からなる群から選択される標識を含む、項目 4 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

14．前記検出可能な親和性リガンドが、前記検出可能な親和性リガンドを認識可能な第二の親和性リガンドを用いて検出される、項目4～12のいずれか一項に記載の方法。

15．前記検出可能な親和性リガンドを認識可能な前記第二の親和性リガンドが、蛍光色素および金属、発色色素、化学発光化合物および生物発光タンパク質、酵素、放射性同位体および粒子からなる群から選択される標識を含む、項目14に記載の方法。

16．項目1～15のいずれか一項に記載の方法を実施するためのキットであって、  
a) S A T B 2 タンパク質との選択的相互作用を行うことが可能な検出可能な親和性リガンドと、  
b) 前記親和性リガンドの存在を検出するのに必要な試薬と、  
を含む、キット。

10

17．前記検出可能な親和性リガンドが、抗体、その断片およびその誘導体からなる群から選択される、項目16に記載のキット。

18．前記検出可能な親和性リガンドが、ブドウ球菌プロテインAおよびそのドメイン、リポカリン、アンキリン反復ドメイン、セルロース結合ドメイン、クリスタリン、緑色蛍光タンパク質、ヒト細胞毒性Tリンパ球関連抗原4、プロテアーゼ阻害剤、PDZドメイン、ペプチドアダプター、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、テンダミスタット、フィブロネクチンIII型ドメインならびにジンクフィンガーからなる群から選択される足場に由来するタンパク質リガンドである、項目16に記載のキット。

20

19．前記検出可能な親和性リガンドがオリゴヌクレオチド分子である、項目16に記載のキット。

20．前記検出可能な親和性リガンドが、蛍光色素および金属、発色色素、化学発光化合物および生物発光タンパク質、酵素、放射性同位体および粒子からなる群から選択される標識を含む、項目16～19のいずれか一項に記載のキット。

30

21．前記親和性リガンドの存在を検出するのに必要な前記試薬が、前記検出可能な親和性リガンドを認識可能な第二の親和性リガンドを含む、項目16～19のいずれか一項に記載のキット。

22．前記検出可能な親和性リガンドを認識可能な前記第二の親和性リガンドが、蛍光色素または金属、発色色素、化学発光化合物および生物発光タンパク質、酵素、放射性同位体および粒子からなる群から選択される標識を含む、項目21に記載のキット。

23．結腸直腸癌に対する診断マーカーとしてのS A T B 2 タンパク質の使用。

40

24．結腸直腸癌の診断用の診断剤の製造における、S A T B 2 タンパク質または抗原活性を示すその断片の使用。

25．前記S A T B 2 タンパク質の前記アミノ酸配列が、  
i) 配列番号1、および  
ii) 配列番号1に対して少なくとも85%同一の配列  
から選択される配列を含む、項目23および24のいずれか一項に記載の使用。

26．前記S A T B 2 タンパク質の前記アミノ酸配列が、  
i) 配列番号2、および

50

i i ) 配列番号 2 に対して少なくとも 85 % 同一の配列から選択される配列を含む、項目 23 および 24 のいずれか一項に記載の使用。

27 . 抗体またはその断片もしくは誘導体である、S A T B 2 タンパク質との選択的相互作用を行うことが可能な親和性リガンド。

28 . アミノ酸配列が配列番号 1 の配列を含むタンパク質で動物を免疫するステップを含むプロセスにより得られうる、項目 27 に記載の親和性リガンド。

29 . 診断剤としての、項目 27 ~ 28 のいずれか一項に記載の親和性リガンドの使用。

10

30 . 結腸直腸癌の診断用の診断剤の製造における、項目 27 ~ 28 のいずれか一項に記載の親和性リガンドの使用。

【 図 1 】

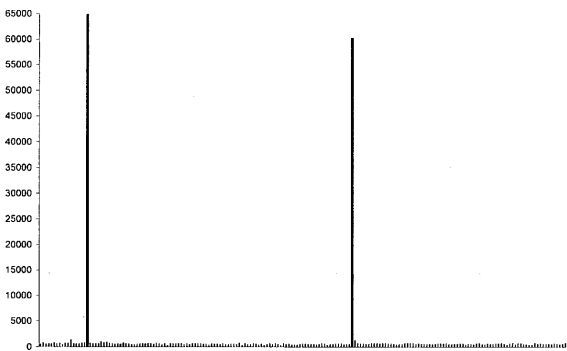


図 1

【 図 2 】

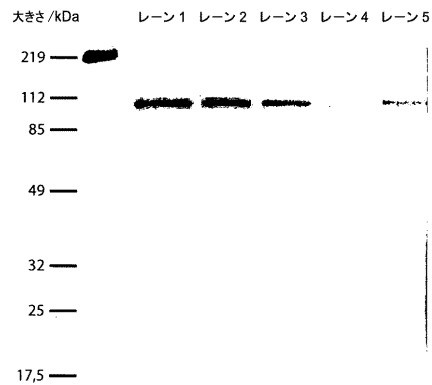


図 2

【 図 3 A 】

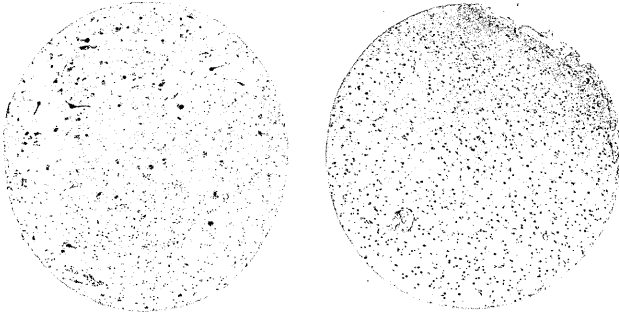


図3A

【 図 3 C 】



図3C

【 図 3 B 】



図3B

【 図 3 D 】

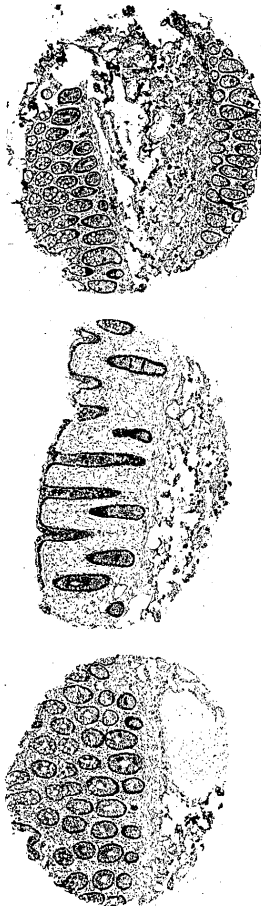


図3D

【 図 3 E 】



図3E

【 图 3 F 】



图 3 F

【 图 4 A 】

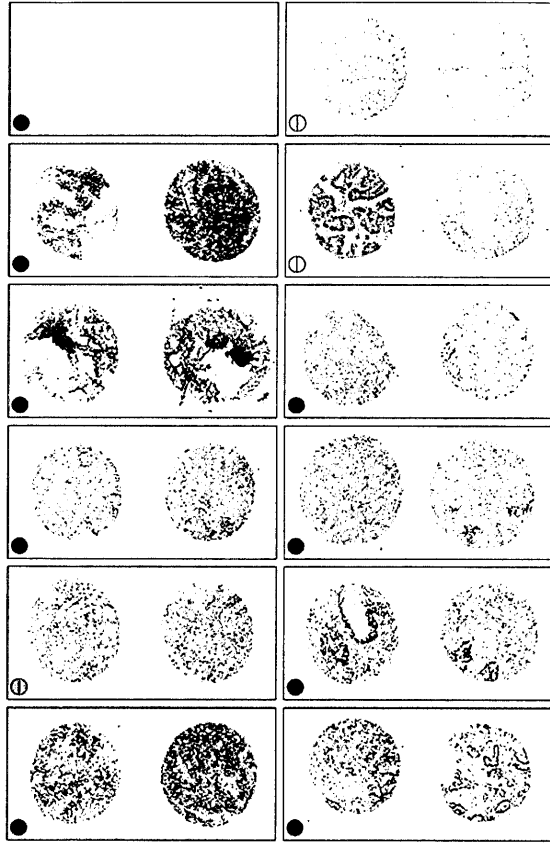


图 4 A

【 图 4 B 】

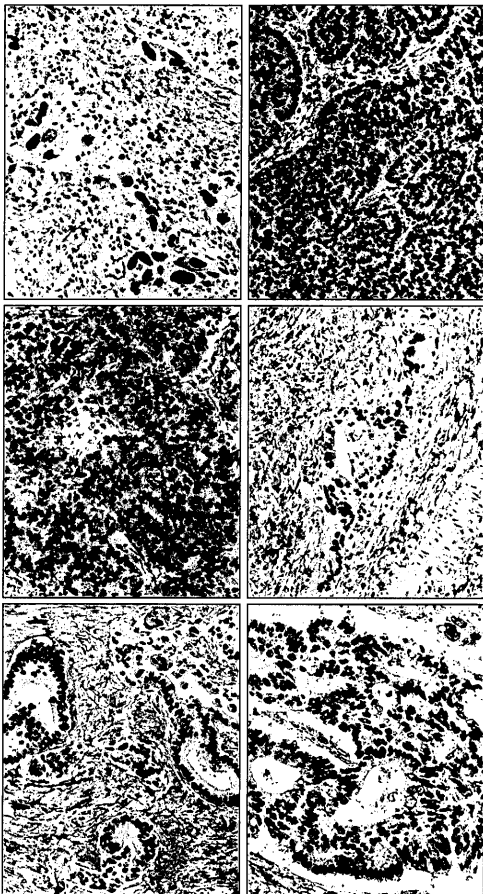


图 4 B

【 图 5 】

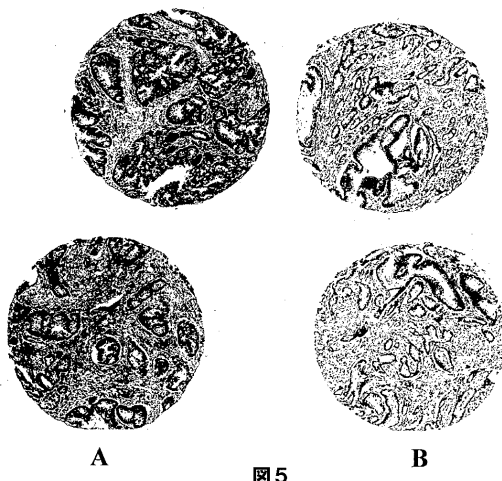
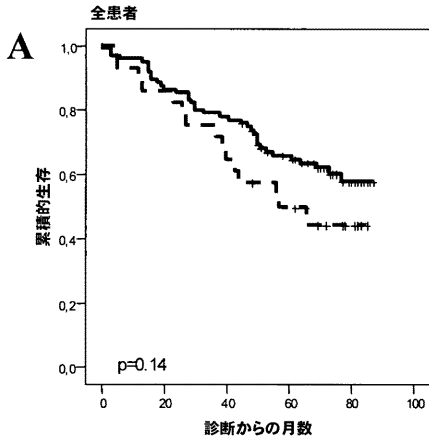
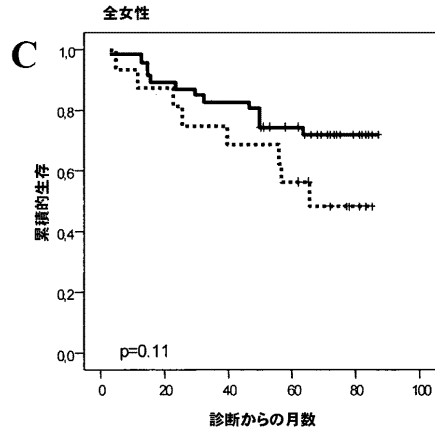


图 5

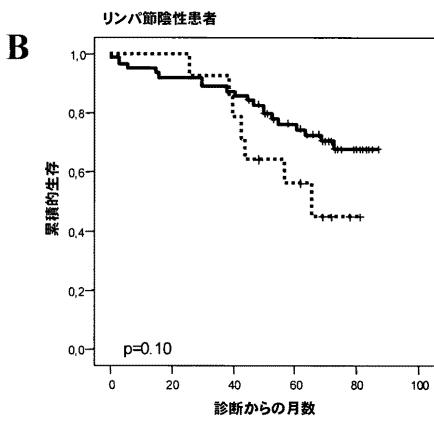
【図 6 A】



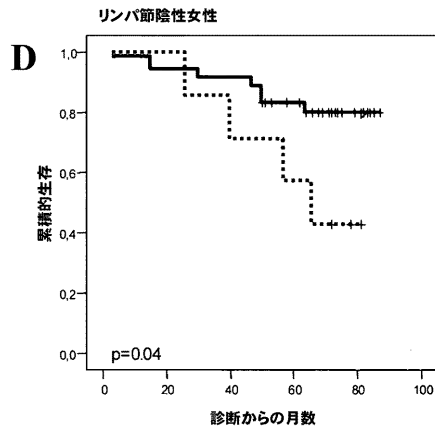
【図 6 C】



【図 6 B】



【図 6 D】



【図 8】

		SATB2 の核の画分				合計
		0-1%	2-25%	26-75%	>75%	
CK20 の核の画分	0-1%	5	1	4	7	17
	2-25%	3		5	12	20
	26-75%	4	1	6	21	32
	>75%	11	3	16	23	53
	合計	23	5	31	63	122

図 8

【図 9】

カウント	CK20 核画分	リンパ節における Satb2 対 CK20				合計
		0-1%	26-75%	>75%	合計	
0	0	1	2	1	4	
1	1	1	3	5	9	
2	2	1	3	5	9	
3	3	3	5	9	17	
合計	合計	5	10	10	25	

図 9

【 図 7 】

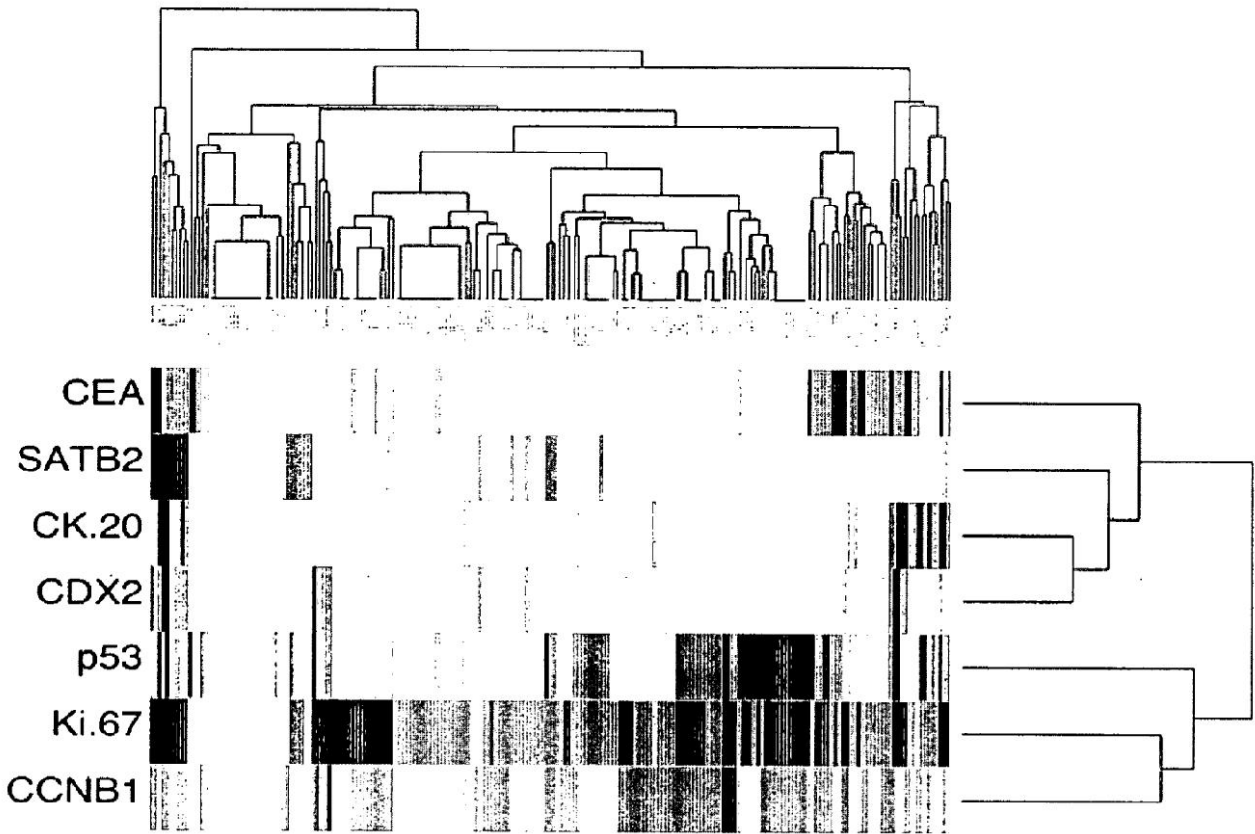


図 7

【 配列表 】

2012073260000001 . app

---

フロントページの続き

(72)発明者 マティアス・ウーレン

スウェーデン、エス - 1 8 2 7 9ストックスンド、ヴィッラヴェーゲン 1 3 番

(72)発明者 フレデリック・ポンテン

スウェーデン、エス - 7 5 2 3 7ウブサラ、ソルダトヘムスヴェーゲン 2 1 番

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA20 DA06 EA04 GA11

【外国語明細書】

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

## USE OF PROTEIN SATB2 AS A MARKER FOR COLORECTAL CANCER

Field of the invention

The present invention relates to the field of cancer diagnostics and prognosis. In particular, it provides a new means for use in detection and characterization of colo-rectal cancer, via the identification of the SATB2  
5 protein as a marker for this cancer type.

Background of the inventionSATB2

10 The gene encoding special AT-rich sequence-binding protein 2 (SATB2) was identified in 1999 during the massive effort of sequencing the human genome (Kikuno R *et al* (1999) DNA Res. 6:197-205). Since then, the SATB2 gene has been considered as expressed mainly in neuronal tissue.

SATB2 is a transcription factor that form parts of the nuclear matrix and  
15 orchestrates gene expression in a tissue-specific manner by regulating high-order chromatin structure through interaction with AT-rich sequences, also referred to as matrix attachment regions (MARs) (Dickinson LA *et al* (1992) Cell 70, 631-45; FitzPatrick DR *et al* (2003) Hum. Mol. Genet. 12, 2491-501; Yasui D, (2002) Nature 419, 641-5; Bode, J (2000) Crit. Rev. Eukaryot. Gene.  
20 Expr. 10, 73-90).

Studies of the gene and its protein product, the SATB2 protein, point towards an involvement in regulation of gene expression as a transcription factor in neuronal tissue (Dobrev G *et al* (2003) Genes Dev. 17:3048-3061; Britanova O *et al* (2005) Eur. J. Neurosci. 21:658-668). The SATB2 gene has  
25 also been described to have a role in palate development and cleft palate (FitzPatrick DR *et al* (2003) Human Mol. Genet. 12:2491-2501; van Buggenhout G *et al* (2005) Eur. J. Med. Genet. 48:276-289).

Salahshor *et al* studied a patient with the adenomatous polyposis coli (APC) gene mutation (Salahshor *et al* (2005) BMC cancer 5:66). APC  
30 patients develop an abnormal amount of colonic adenomas at a young age that eventually, if left untreated, will progress to colo-rectal cancer. Global gene expression profiling revealed that a group of 84 genes, including SATB2, had a significantly altered expression in adenomas compared to normal mucosa. SATB2 was found significantly down-regulated but was not

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

2

selected for any further analysis. A recent expression profiling study of colorectal cancer in *Int J Cancer* likewise indicated an altered expression status for SATB2 at the mRNA level (Groene J *et al* (2006) *Int J Cancer* 119, 1829-1836).

5 PCT publications WO03/022126 and WO2006/015742 describe other, similar studies directed to expression profiling of cancer cells. The expression of a multitude of genes, including SATB2, is analyzed and conclusions are drawn from the overall expression patterns.

10 Importantly, the studies referred to above provide no suggestions concerning the use of the SATB2 protein as a specific colo-rectal marker or the use of SATB2 as a prognostic tool for colo-rectal cancer.

### *Cancer*

15 Cancer is one of the most common causes of disease and death in the western world. In general, incidence rates increase with age for most forms of cancer. As human populations continue to live longer, due to an increase of the general health status, cancer will affect an increasing number of individuals. The cause of most common cancer types is still at large unknown, although there is an increasing body of knowledge providing a link between  
20 environmental factors (dietary, tobacco smoke, UV radiation etc) as well as genetic factors (germ line mutations in "cancer genes" such as p53, APC, BRCA1, XP etc) and the risk for development of cancer.

No definition of cancer is entirely satisfactory from a cell biological point of view, despite the fact that cancer is essentially a cellular disease and  
25 defined as a transformed cell population with net cell growth and anti-social behavior. Malignant transformation represents the transition to a malignant phenotype based on irreversible genetic alterations. Although this has not been formally proven, malignant transformation is believed to take place in one cell, from which a subsequently developed tumor originates (the "clonality  
30 of cancer" dogma). Carcinogenesis is the process by which cancer is generated and is generally accepted to include multiple events which ultimately lead to growth of a malignant tumor. This multi-step process includes several rate-limiting steps, such as addition of mutations and possibly also epigenetic events, leading to formation of cancer following  
35 stages of precancerous proliferation. The most common forms of cancer arise in somatic cells and are predominantly of epithelial origin (skin, prostate, breast, colon and lung) followed by cancers originating from the hematopoietic

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

3

lineage (leukemia and lymphoma) and mesenchymal cells (sarcomas). The stepwise changes involve accumulation of errors (mutations) in vital regulatory pathways that determine cell division, asocial behavior and cell death. Each of these changes provides a selective Darwinian growth  
5 advantage compared to surrounding cells, resulting in a net growth of the tumor cell population. It is important to emphasize that a malignant tumor does not only consist of the transformed tumor cells themselves but also surrounding normal cells which act as a supportive stroma. This recruited cancer stroma consists of connective tissue, blood vessels and various other  
10 normal cells, e.g. inflammatory cells, which act in concert to supply the transformed tumor cells with signals necessary for continued tumor growth.

#### *Cancer diagnostics*

Microscopic evaluation of a tissue section taken from a tumor remains  
15 the golden standard for determining a diagnosis of cancer. Analysis of genomic DNA, transcribed genes and expressed proteins all add important information to the histological features detected in the microscope. Tomorrow's diagnosis, prognostic information and choice of treatment will in all likelihood be based on a synoptic evaluation of morphology in conjunction  
20 with analyses of nucleic acids and proteins. Already today, evolving knowledge based on the human genome sequence and biochemical pathways, including signaling inside and between cells in a tissue, enable the dissection of some of the mechanisms that underlie different stages in tumor formation as well as variation of phenotypes, which define the different types  
25 of cancer.

Despite remarkable progress within molecular biology, cancer diagnostics still relies on the use of light microscopy. The development of molecular tools has played an important, although as of yet incremental, role to discriminate a cancer cell from a normal cell. The most commonly used  
30 method in addition to histochemical staining of tissue sections is immunohistochemistry. Immunohistochemistry allows the detection of protein expression patterns in tissues and cells using specific antibodies. The use of immunohistochemistry in clinical diagnostics has provided a possibility to not only analyze tissue architecture and cellular morphology, but also to detect  
35 immunoreactivity in different cell populations. This has been important to support accurate grading and classification of different primary tumors as well as in the diagnostics of metastases of unknown origin. The most commonly

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

4

used antibodies in clinical practice today include antibodies against cell type markers, e.g. PSA, MelanA, Thyroglobulin and antibodies recognizing intermediate filaments, cluster of differentiation (CD) antigens etc. and markers of malignant potential, e.g. Ki67, p53, HER-2. Aside from  
5 immunohistochemistry, the use of *in situ* hybridization for detecting gene amplification and gene sequencing for mutation analysis are evolving technologies within cancer diagnostics.

#### *Colo-rectal cancer*

10 Colo-rectal cancer is one of the most common forms of human cancer worldwide. Data from the GLOBOCAM 2002 database presented by Parkin *et al* show that around 1 million new cases of colo-rectal cancer are found yearly (Parkin *et al* (2007) CA Cancer J Clin 55, 74-108). Further, the incidence of  
15 colo-rectal cancer in the world is approximately 9.4 % of all cancers, and colo-rectal cancer constitutes the second most common cause of death in the western world. The five-year survival rate of colo-rectal cancer is approximately 60 % in the western world but as low as 30 % in Eastern Europe and India.

20 Early detection and surgery with excision of the tumor is currently of critical importance for a favorable prognosis. Symptoms depend on where in the distal gastro-intestinal tract the tumor is located, and include bowel distress, diarrhea, constipation, pain and anemia (secondary to bleeding from the tumor into the bowel). Malignant tumors may be categorized into several stages according to different classification schemes, such as the TNM/UICC  
25 classification I-IV or Dukes' stages A-C. The least malignant tumors (Dukes' stages A and B) have a reasonably favorable outcome, while on the other end some highly malignant tumors with metastasis (Dukes' stage C) have poor survival rates. Current diagnostics are based on patient history, clinical and endoscopic examination (rectoscopy and colonoscopy) optionally followed by  
30 radiological mapping to determine extensiveness of tumor growth. In conjunction with endoscopic examination, tissue biopsies are performed from dubious lesions.

For microscopic diagnosis, biopsy material from suspected tumors is collected and examined under a microscope. To obtain a firm diagnosis, the  
35 tumor tissue is then fixated in formalin, histo-processed and paraffin embedded. From the resulting paraffin block, tissue sections can be produced and stained using both histochemical and immunohistochemical methods.

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

5

For localized tumors, i.e. tumors that have not evolved into a metastasizing disease, surgical intervention with radical resection of the tumor and surrounding bowel and tissues is performed. The surgical specimen is then sent to pathology for gross and microscopical analysis. This analysis forms the basis for staging of the tumor. The by far most common form of colo-rectal cancer is adenocarcinoma, representing a tumor of glandular origin, which can be highly, moderately or lowly differentiated.

For primary tumors, hematoxylin-eosin stained tissue sections are sufficient to enable a correct diagnosis and classification according to the different colo-rectal cancer classifications. However, as colo-rectal cancer is very common and has often grown to a considerable size before detection, metastases are not uncommon. The tumor typically metastasizes to regional lymph nodes, but distant metastasis in the liver and lung is not unusual. A common clinical problem with cancer is patients that present a metastasis of unknown origin. In the case where a metastasis is an adenocarcinoma, several possible primary tumors can be suspected, e.g. breast, prostate, pancreatic, stomach and colo-rectal cancer. For differential diagnostics, immunohistochemical markers can be used that recognize features inherent in the cell of origin. At present, cytokeratin 20 (CK20), an intermediate filament marker abundant in the glandular cells of the GI-tract, is used to characterize colo-rectal cancer. However, several other adenocarcinomas can also be positive for CK20 antibodies, whereas not all colo-rectal cancers are positive. Furthermore, there are no markers available today that can distinguish tumors of low malignancy grade and low risk for metastasis from highly malignant tumors with a reduced chance of survival.

In order for doctors to give specific treatment for the right type of cancer and as early as possible, the provision of new molecular markers that are specific to colo-rectal cancer alone, and affords the possibility of differentiating patients into different risk categories is crucial. In summary, there is a great demand for new means to advance the diagnostics and screening of colo-rectal cancer.

#### Disclosure of the invention

It is an object of the present invention to meet this demand through the provision of a marker useful for the diagnosis and/or prognosis of colo-rectal cancer in a subject.

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

6

It is a related object of the invention to provide a marker which is useful for distinguishing between colo-rectal cancers and other types of cancer.

It is another object of the present invention to provide new methods for the diagnosis, prognosis and/or treatment of colo-rectal cancer.

5 It is a related object of the present invention to provide a kit that can be used in connection with methods for the diagnosis, prognosis and/or treatment of colo-rectal cancer.

Another object of the present invention is to provide novel compounds useful for diagnosis, prognosis and/or therapy of colo-rectal cancer.

10 For these and other objects apparent to the skilled person from the present disclosure, the present invention provides, in its different aspects, new means for determining the status and prognosis of colo-rectal cancer, and for the treatment thereof.

Thus, in a first aspect, the present invention provides a method for  
15 determining whether a prognosis for colo-rectal cancer in a mammalian subject having or suspected of having colo-rectal cancer is poor, comprising the steps of:

- a) providing a sample from the subject;
- b) quantifying the amount of SATB2 protein present in said sample to  
20 yield a sample value;
- c) comparing the sample value obtained in step b) with a reference value; and, if said sample value is lower than said reference value,
- d) concluding that the prognosis for colo-rectal cancer in said subject is  
poor.

25 This first aspect of the present invention is based on the previously unrecognized fact that the expression of SATB2 protein in samples from a subject having or suspected of having colo-rectal cancer may serve as an indicator of disease status in subjects. More particularly, the present invention identifies for the first time a correlation between a low value of SATB2  
30 expression on the one hand and more aggressive or high-risk forms of colo-rectal cancer on the other. The present invention based on SATB2 expression as an indicator of colo-rectal cancer prognosis has a number of benefits. For cancer in general, early detection of aggressive forms is of vital importance as it enables curing treatment. This is particularly true for colo-rectal cancer, for  
35 which several large studies have shown that subjects with early cancers, i.e. representing stage 1 and stage 2 tumors (essentially Dukes' A and B), have a substantially better prognosis as compared to subjects with late stage tumors.

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

7

This difference is not dependent on the mode of treatment since radical resection is performed for all types of colo-rectal cancer. Rather, the large difference in survival is clearly related to early detection, correct diagnosis and adequate surgical treatment. The SATB2 protein, as a marker for which a certain level of expression is correlated with a certain pattern of disease progression, has a great potential for example in a panel for differential diagnostics of metastasis.

In an embodiment of the invention, the conclusion in step d) of a poor prognosis may involve establishing that said subject has a shorter expected survival time than would have been the case if the subject had not exhibited a low SATB2 expression value. Alternatively or also, the conclusion of a poor prognosis may involve establishing a lower likelihood of five-year survival than would have been the case if the subject had not exhibited a low SATB2 expression value. For example, the conclusion may be that said subject has a likelihood of five-year survival of 65 % or lower, for example 60 % or lower, 50 % or lower, 40 % or lower or 30 % or lower.

Further, regarding subjects having or suspected of having node negative tumors, the conclusion may be that said subject has a likelihood of five-year survival of 73 % or lower, for example 70 % or lower, for example 60 % or lower, 50 % or lower, 40 % or lower or 30 % or lower. Regarding female subjects, the conclusion may be that said subject has a likelihood of five-year survival of 74 % or lower, for example 70 % or lower, for example 60 % or lower, 50 % or lower, 40 % or lower or 30 % or lower. Regarding female patients having or suspected of having node negative tumors, the conclusion may be that said subject has a likelihood of five-year survival of 80 % or lower, for example 75 % or lower, for example 70 % or lower, for example 60 % or lower, 50 % or lower, 40 % or lower or 30 % or lower.

The identified correlation between low SATB2 expression and high-risk forms of colo-rectal cancer may also form the basis for a decision to apply a different regime for treatment of the subject than would have been the case if the subject had not exhibited a low SATB2 expression value. Thus, in a second aspect, the present invention provides a method of treatment of colo-rectal cancer in a subject in need thereof, comprising

- a) providing a sample from the subject;
- b) quantifying the amount of SATB2 protein present in said sample to yield a sample value;

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

8

c) comparing the sample value obtained in step b) with a reference value; and, if said sample value is lower than said reference value,

d) treating said subject with a treatment regimen adapted to a poor prognosis of colo-rectal cancer

5 In one embodiment of the invention, the treatment regimen is selected from chemotherapy, neo-adjuvant therapy and combinations thereof.

Thus, the treatment regimen may be neo-adjuvant therapy. Such neo-adjuvant therapy may consist of radiation therapy only or of radiation therapy in combination with chemotherapy.

10 In the method aspects of the present invention described above, the subject may have, or be suspected of having, colo-rectal cancer in different forms and/or stages.

In some embodiments of these aspects, the colo-rectal cancer in question is a node-negative colo-rectal cancer, i.e. colo-rectal cancer that has not progressed to the lymph node metastazing stage. In other similar  
15 embodiments, the colo-rectal cancer in question is characterized as being in either Dukes' stage A or B. In yet other embodiments, the colo-rectal cancer in question is colo-rectal adenoma or colo-rectal carcinoma. In these  
20 embodiments, determining that the subject exhibits low SATB2 expression may be of great value for the prognosis of future progression of the disease and thus form the basis for an informed decision with regard to future disease management. Within a group of subjects afflicted with such a comparatively  
25 early stage of disease, subjects with low SATB2 expression likely are at a comparatively high risk of developing a more aggressive disease. Low SATB2 expression among subjects having node-negative colo-rectal cancer or  
30 Dukes' stage A or B colo-rectal cancer may therefore indicate that these subjects should be monitored more closely and/or treated differently than subjects that do not exhibit low SATB2 expression. The methods according to the invention therefore offers the possibility of a greater chance for survival  
over a certain period of time and/or longer survival time for such subjects, owing to the additional prognostic information given by the SATB2 marker.

In other embodiments, the colo-rectal cancer in question is metastazing colo-rectal cancer. In other similar embodiments, the colo-rectal cancer in question is characterized as being in Dukes' stage C.

35 In embodiments of the invention, the subject is a human, such as a woman. As shown in the appended examples, the prognostic value of the

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

9

SATB2 marker is especially marked in the group of human, female subjects having node-negative forms of colo-rectal cancer.

A determination that the sample value of SATB2 protein expression is lower than the reference value is sometimes referred to herein as a  
5 determination of "low SATB2 expression".

In the methods of the invention, the reference value for use as comparison with the sample value for a subject may be established in various ways. As one non-limiting example, the reference value may correspond to the amount of SATB2 expression in healthy tissue of the subject undergoing  
10 the prognosis or therapy. As another example, the reference value may be provided by the amount of SATB2 expression measured in a standard sample of normal tissue from another, comparable subject. As another example, the reference value may be provided by the amount of SATB2 expression measured in a standard sample of tumor tissue, such as tissue from a Dukes'  
15 stage A or B cancer.

The reference value may be obtained in the course of carrying out the method according to the above aspects of the present invention. Alternatively, the reference value is a predetermined value obtained from a reference sample and corresponding to the amount of SATB2 expression in said  
20 reference sample.

One alternative for the quantification of SATB2 expression in a sample is the determination of the fraction of cells in the sample exhibit SATB2 expression over a certain level. This determination may for example be performed as described below in the Examples, section 4, definition of  
25 "fraction score". In embodiments of the methods of the above aspects of the present invention, the criterion for the conclusion in step d) is a sample value for the nuclear fraction of SATB2 positive cells, i.e. a "fraction score", which is lower than the reference value of 50 %, such as lower than 40 %, such as lower than 30 %, such as lower than 25 %, such as lower than 20 %, such as  
30 lower than 15 %, such as lower than 10 %, such as lower than 5 %, such as lower than 1 %. Further, the determination of a poor prognosis may correspond to a detection of essentially no SATB2 positive cells in a sample, i.e. a "fraction score" of essentially zero.

Another alternative for the quantification of SATB2 expression in a  
35 sample is the automated measurement of an autoscore for SATB2 expression using an automated scanner and image processing software. This determination may for example be performed as described below in the

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

10

Examples, section 5, definition of "autoscore". In embodiments of the methods of the above aspects of the present invention, the criterion for the conclusion in step d) is a sample value for the expression of SATB2 in the sample cells, i.e. an "autoscore", which is lower than the reference value of  
5 70, such as lower than 60, such as lower than 50, such as lower than 40, such as lower than 30, such as lower than 25, such as lower than 20, such as lower than 15, such as lower than 10, such as lower than 5.

In some embodiments of the invention, the measurement of sample value and/or reference value, whether as a fraction score or autoscore as  
10 above or as some other known or adapted variable, is performed on glandular cells from the distal gastro-intestinal tract from a subject, i.e. appendix, colon and/or rectum, and/or on colo-rectal cancer cells.

In another embodiment of the invention, a determination of poor prognosis corresponds to no detectable SATB2 expression in glandular cells  
15 from the distal gastro-intestinal tract from a subject.

In the context of the present invention, the terms "sample value" and "reference value" are to be interpreted broadly. As described above, the quantification of SATB2 expression to obtain these values may be done via automatic means, or via a scoring system based on visual or microscopic  
20 inspection of samples. However, it is also possible for a skilled person, such as a person skilled in the art of histopathology, to determine the sample and reference values merely by inspection of e.g. tissue slides that have been stained for SATB2 expression. The determination of the sample value being  
25 lower than the reference value may thus correspond to the determination, upon visual or microscopic inspection, that a sample tissue slide is less densely stained and/or exhibit fewer stained cells than is the case for a reference tissue slide. In this case, the sample and reference values are thought of as mental values that the skilled person determines upon  
30 inspection and comparison. Thus, the invention is not limited to the use of automatic analysis.

The particular procedure used for detection of the expression of SATB2 protein in the methods of the present invention is not limited in any particular way. In some embodiments of the methods according to the invention, step b) comprises:

35 b1) applying to the sample a quantifiable affinity ligand capable of selective interaction with the SATB2 protein to be quantified, said application

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

11

being performed under conditions that enable binding of the affinity ligand to any SATB2 protein present in the sample;

b2) removing non-bound affinity ligand; and

5 b3) quantifying any affinity ligand remaining in association with the sample.

In such embodiments of the invention, the sample from the subject may be a body fluid sample, such as a sample of blood, plasma, serum, cerebral fluid, urine, semen and exudate. In the method according to the invention, the sample may, alternatively, be a stool sample, a cytology sample  
10 or a tissue sample, such as a sample of colo-rectal tissue.

In a preferred embodiment, the method according to the invention is carried out *in vitro*.

The skilled person will recognize that the usefulness of the present invention is not limited to the quantification of any particular variant of the  
15 SATB2 protein present in the subject in question, as long as the protein is encoded by the relevant gene and presents the relevant pattern of expression. As a non-limiting example, the SATB2 protein has an amino acid sequence which comprises a sequence selected from:

- i) SEQ ID NO:1; and
- 20 ii) a sequence which is at least 85 % identical to SEQ ID NO:1.

In some embodiments, sequence ii) above is at least 90 % identical, at least 91 % identical, at least 92 % identical, at least 93 % identical, at least 94 % identical, at least 95 % identical, at least 96 % identical, at least 97 % identical, at least 98 % identical or at least 99 % identical to SEQ ID NO:1.

25 As another non-limiting example, the SATB2 protein has an amino acid sequence which comprises a sequence selected from:

- i) SEQ ID NO:2; and
- ii) a sequence which is at least 85 % identical to SEQ ID NO:2.

In some embodiments, sequence ii) above is at least 90 % identical, at  
30 least 91 % identical, at least 92 % identical, at least 93 % identical, at least 94 % identical, at least 95 % identical, at least 96 % identical, at least 97 % identical, at least 98 % identical or at least 99 % identical to SEQ ID NO:2.

In embodiments of the methods according to the invention, the SATB2 protein is detected and/or quantified through the application to a sample of a  
35 detectable and/or quantifiable affinity ligand, which is capable of specific or selective interaction with the SATB2 protein. The application of the affinity ligand is performed under conditions that enable binding of the affinity ligand

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

12

to any SATB2 protein in the sample. It is regarded as within the capabilities of those of ordinary skill in the art to select or manufacture the proper affinity ligand and to select the proper format and conditions for detection and/or quantification, once the connection between SATB2 and colo-rectal cancer is known through the teaching of the present disclosure. Nevertheless, examples of affinity ligands that may prove useful, as well as examples of formats and conditions for detection and/or quantification, are given below for the sake of illustration.

Thus, in some embodiments of the invention, an affinity ligand is used, which is selected from the group consisting of antibodies, fragments thereof and derivatives thereof, i.e. affinity ligands based on an immunoglobulin scaffold. Antibodies comprise monoclonal and polyclonal antibodies of any origin, including murine, human and other antibodies, as well as chimeric antibodies comprising sequences from different species, such as partly humanized mouse antibodies. Polyclonal antibodies are produced by immunization of animals with the antigen of choice, whereas monoclonal antibodies of defined specificity can be produced using the hybridoma technology developed by Köhler and Milstein (Köhler G and Milstein C (1976) Eur. J. Immunol. 6:511-519). Antibody fragments and derivatives comprise Fab fragments, consisting of the first constant domain of the heavy chain (CH1), the constant domain of the light chain (CL), the variable domain of the heavy chain (VH) and the variable domain of the light chain (VL) of an intact immunoglobulin protein; Fv fragments, consisting of the two variable antibody domains VH and VL (Skerra A and Plückthun A (1988) Science 240:1038-1041); single chain Fv fragments (scFv), consisting of the two VH and VL domains linked together by a flexible peptide linker (Bird RE and Walker BW (1991) Trends Biotechnol. 9:132-137); Bence Jones dimers (Stevens FJ *et al* (1991) Biochemistry 30:6803-6805); camelid heavy-chain dimers (Hamers-Casterman C *et al* (1993) Nature 363:446-448) and single variable domains (Cai X and Garen A (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:6280-6285; Masat L *et al* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:893-896), and single domain scaffolds like e.g. the New Antigen Receptor (NAR) from the nurse shark (Dooley H *et al* (2003) Mol. Immunol. 40:25-33) and minibodies based on a variable heavy domain (Skerra A and Plückthun A (1988) Science 240:1038-1041).

Polyclonal and monoclonal antibodies, as well as their fragments and derivatives, represent the traditional choice of affinity ligands in applications

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

13

requiring selective biomolecular recognition, such as in the detection and/or quantification of SATB2 protein according to the invention. However, those of skill in the art know that, due to the increasing demand of high throughput generation of specific binding ligands and low cost production systems, new biomolecular diversity technologies have been developed during the last decade. This has enabled a generation of novel types of affinity ligands of both immunoglobulin as well as non-immunoglobulin origin that have proven equally useful as binding ligands in biomolecular recognition applications and can be used instead of, or together with, immunoglobulins.

10 The biomolecular diversity needed for selection of affinity ligands may be generated by combinatorial engineering of one of a plurality of possible scaffold molecules, and specific and/or selective affinity ligands are then selected using a suitable selection platform. The scaffold molecule may be of immunoglobulin protein origin (Bradbury AR and Marks JD (2004) *J. Immunol. Meths.* 290:29-49), of non-immunoglobulin protein origin (Nygren PÅ and Skerra A (2004) *J. Immunol. Meths.* 290:3-28), or of an oligonucleotide origin (Gold L *et al* (1995) *Annu. Rev. Biochem.* 64:763-797).

A large number of non-immunoglobulin protein scaffolds have been used as supporting structures in development of novel binding proteins. Non-limiting examples of such structures, useful for generating affinity ligands against SATB2 for use in the present invention, are staphylococcal protein A and domains thereof and derivatives of these domains, such as protein Z (Nord K *et al* (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:772-777); lipocalins (Beste G *et al* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:1898-1903); ankyrin repeat domains (Binz HK *et al* (2003) *J. Mol. Biol.* 332:489-503); cellulose binding domains (CBD) (Smith GP *et al* (1998) *J. Mol. Biol.* 277:317-332; Lehtiö J *et al* (2000) *Proteins* 41:316-322);  $\gamma$  crystallines (Fiedler U and Rudolph R, WO01/04144); green fluorescent protein (GFP) (Peelle B *et al* (2001) *Chem. Biol.* 8:521-534); human cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) (Hufton SE *et al* (2000) *FEBS Lett.* 475:225-231; Irving RA *et al* (2001) *J. Immunol. Meth.* 248:31-45); protease inhibitors, such as Knottin proteins (Wentzel A *et al* (2001) *J. Bacteriol.* 183:7273-7284; Baggio R *et al* (2002) *J. Mol. Recognit.* 15:126-134) and Kunitz domains (Roberts BL *et al* (1992) *Gene* 121:9-15; Dennis MS and Lazarus RA (1994) *J. Biol. Chem.* 269:22137-22144); PDZ domains (Schneider S *et al* (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:170-175); peptide aptamers, such as thioredoxin (Lu Z *et al* (1995) *Biotechnology* 13:366-372; Klevenz B *et al* (2002) *Cell. Mol. Life Sci.* 59:1993-1998); staphylococcal

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

14

nuclease (Norman TC *et al* (1999) *Science* 285:591-595); tendamistats (McConell SJ and Hoess RH (1995) *J. Mol. Biol.* 250:460-479; Li R *et al* (2003) *Protein Eng.* 16:65-72); trinectins based on the fibronectin type III domain (Koide A *et al* (1998) *J. Mol. Biol.* 284:1141-1151; Xu L *et al* (2002) 5 *Chem. Biol.* 9:933-942); and zinc fingers (Bianchi E *et al* (1995) *J. Mol. Biol.* 247:154-160; Klug A (1999) *J. Mol. Biol.* 293:215-218; Segal DJ *et al* (2003) *Biochemistry* 42:2137-2148).

The above mentioned examples of non-immunoglobulin protein scaffolds include scaffold proteins presenting a single randomized loop used 10 for the generation of novel binding specificities, protein scaffolds with a rigid secondary structure where side chains protruding from the protein surface are randomized for the generation of novel binding specificities, and scaffolds exhibiting a non-contiguous hyper-variable loop region used for the generation of novel binding specificities.

15 In addition to non-immunoglobulin proteins, oligonucleotides may also be used as affinity ligands. Single stranded nucleic acids, called aptamers or decoys, fold into well-defined three-dimensional structures and bind to their target with high affinity and specificity. (Ellington AD and Szostak JW (1990) *Nature* 346:818-822; Brody EN and Gold L (2000) *J. Biotechnol.* 74:5-13; 20 Mayer G and Jenne A (2004) *BioDrugs* 18:351-359). The oligonucleotide ligands can be either RNA or DNA and can bind to a wide range of target molecule classes.

For selection of the desired affinity ligand from a pool of variants of any of the scaffold structures mentioned above, a number of selection platforms 25 are available for the isolation of a specific novel ligand against a target protein of choice. Selection platforms include, but are not limited to, phage display (Smith GP (1985) *Science* 228:1315-1317), ribosome display (Hanes J and Plückthun A (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:4937-4942), yeast two-hybrid system (Fields S and Song O (1989) *Nature* 340:245-246), mRNA 30 display (Roberts RW and Szostak JW (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12297-12302), SELEX (System Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (Tuerk C and Gold L (1990) *Science* 249:505-510) and protein fragment complementation assays (PCA) (Remy I and Michnick SW (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:5394-5399).

35 Thus, in embodiments of the invention, an affinity ligand may be used, which is a non-immunoglobulin affinity ligand derived from any of the protein scaffolds listed above, or an oligonucleotide molecule.

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

15

In some embodiments of the methods according to the invention, an affinity ligand capable of selective interaction with the SATB2 protein is detectable and/or quantifiable. The detection and/or quantification of such an affinity ligand may be accomplished in any way known to the skilled person  
5 for detection and/or quantification of binding reagents in assays based on biological interactions. Thus, any affinity ligand, as described in the previous section, may be used quantitatively or qualitatively to detect the presence of the SATB2 protein. These "primary" affinity ligands may be labeled themselves with various markers or are in turn detected by secondary,  
10 labeled affinity ligands to allow detection, visualization and/or quantification. This can be accomplished using any one or more of a multitude of labels, which can be conjugated to the affinity ligand capable of interaction with SATB2 or to any secondary affinity ligand, using any one or more of a multitude of techniques known to the skilled person, and not as such involving  
15 any undue experimentation.

Non-limiting examples of labels that can be conjugated to primary and/or secondary affinity ligands include fluorescent dyes or metals (e.g. fluorescein, rhodamine, phycoerythrin, fluorescamine), chromophoric dyes (e.g. rhodopsin), chemiluminescent compounds (e.g. luminal, imidazole) and  
20 bioluminescent proteins (e.g. luciferin, luciferase), haptens (e.g. biotin). A variety of other useful fluorescers and chromophores are described in Stryer L (1968) *Science* 162:526-533 and Brand L and Gohlke JR (1972) *Annu. Rev. Biochem.* 41:843-868. Affinity ligands can also be labeled with enzymes (e.g. horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, beta-lactamase),  
25 radioisotopes (e.g.  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  or  $^{125}\text{I}$ ) and particles (e.g. gold). The different types of labels can be conjugated to an affinity ligand using various chemistries, e.g. the amine reaction or the thiol reaction. However, other reactive groups than amines and thiols can be used, e.g. aldehydes, carboxylic acids and glutamine.

30 The method aspects of the invention may be put to use in any of several known formats and set-ups, of which a non-limiting selection are discussed below.

In a set-up based on histology, the detection, localization and/or quantification of a labeled affinity ligand bound to its SATB2 target may  
35 involve visual techniques, such as light microscopy or immunofluorescence microscopy. Other methods may involve the detection via flow cytometry or luminometry.

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

16

As explained above, detection and/or quantification of SATB2 protein in a subject may be accomplished by removing a biological sample from the subject, such as a tissue sample (biopsy), for example from colo-rectal tissue, blood sample, cerebral fluid, urine or stool. The affinity ligand is applied to the biological sample for detection and/or quantification of the SATB2 marker protein. This procedure enables not only detection of SATB2 protein, but may in addition show the distribution and relative level of expression thereof.

The method of visualization of labels on the affinity ligand may include, but is not restricted to, fluorometric, luminometric and/or enzymatic techniques. Fluorescence is detected and/or quantified by exposing fluorescent labels to light of a specific wavelength and thereafter detecting and/or quantifying the emitted light of a specific wavelength. The presence of a luminescently tagged affinity ligand may be detected and/or quantified by luminescence developed during a chemical reaction. Detection of an enzymatic reaction is due to a color shift in the sample arising from chemical reaction. Those of skill in the art are aware that a variety of different protocols can be modified in order for proper detection and/or quantification.

In the method according to the invention, a biological sample may be immobilized onto a solid phase support or carrier, such as nitrocellulose or any other solid support matrix capable of immobilizing any SATB2 protein present in the biological sample applied to it. Some well-known solid state support materials useful in the present invention include glass, carbohydrate (e.g. Sepharose), nylon, plastic, wool, polystyrene, polyethylene, polypropylene, dextran, amylose, films, resins, cellulose, polyacrylamide, agarose, alumina, gabbros and magnetite. If the primary affinity ligand is not labeled in itself, the supporting matrix can thereafter be washed with various buffers known in the art and then exposed to a secondary labeled affinity ligand, washed once again with buffers to remove unbound affinity ligands, and thereafter selective affinity ligands can be detected and/or quantified with conventional methods. The binding properties for an affinity ligand will vary from one solid state support to the other, but those skilled in the art will be able to determine operative and optimal assay conditions for each determination by routine experimentation.

A method to detect and/or quantify the SATB2 protein as required by the present invention is by linking the affinity ligand to an enzyme that can then later be detected and/or quantified in an enzyme immunoassay (such as an EIA or ELISA). Such techniques are well established, and their realization

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

17

does not present any undue difficulties to the skilled person. In such methods, the biological sample is brought into contact with a solid material or with a solid material conjugated to an affinity ligand against the SATB2 protein, which is then detected and/or quantified with an enzymatically labeled  
5 secondary affinity ligand. Following this, an appropriate substrate is brought to react in appropriate buffers with the enzymatic label to produce a chemical moiety, which for example is detected and/or quantified using a spectrophotometer, fluorometer, luminometer or by visual means.

As stated above, primary and any secondary affinity ligands can be  
10 labeled with radioisotopes to enable detection and/or quantification. Non-limiting examples of appropriate radiolabels in the current invention are  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  or  $^{125}\text{I}$ . The specific activity of the labeled affinity ligand is dependent upon the half-life of the radiolabel, isotopic purity, and how the label has been incorporated into the affinity ligand. Affinity ligands are  
15 preferably labeled using well known techniques (Wensel TG and Meares CF (1983) in: *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy* (Burchiel SW and Rhodes BA eds.) Elsevier, New York, pp 185-196). A thus radiolabeled affinity ligand can be used to visualize SATB2 protein by detection of radioactivity *in vivo* or *in vitro*. Radionuclear scanning with e.g. gamma  
20 camera, magnetic resonance spectroscopy or emission tomography function for detection *in vivo* and *in vitro*, while gamma/beta counters, scintillation counters and radiographies are also used *in vitro*.

A further aspect of the present invention provides a kit for carrying out the methods according to the method aspects of the invention above, which  
25 kit comprises:

- a) a quantifiable affinity ligand capable of selective interaction with an SATB2 protein; and
- b) reagents necessary for quantifying the amount of the affinity ligand.

The various components of the kit according to the invention are  
30 selected and specified as described above in connection with the method aspects of the present invention.

Thus, the kit according to the invention comprises an affinity ligand against SATB2, as well as other means that help to quantify the specific and/or selective affinity ligand after it has bound specifically and/or selectively  
35 to SATB2. For example, the kit of the present invention may contain a secondary affinity ligand for detecting and/or quantifying a complex formed by any SATB2 protein and the affinity ligand capable of selective interaction with

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

18

an SATB2 protein. The kit of the present invention may also contain various auxiliary substances other than affinity ligands, to enable the kit to be used easily and efficiently. Examples of auxiliary substances include solvents for dissolving or reconstituting lyophilized protein components of the kit, wash  
5 buffers, substrates for measuring enzyme activity in cases where an enzyme is used as a label, and substances such as reaction arresters that are commonly used in immunoassay reagent kits.

The kit according to the invention may also advantageously comprise a reference sample for provision of the reference value to be used for  
10 comparison with the sample value. Such a reference sample may for example be constituted by a sample of tissue having a predetermined amount of SATB2 protein, which may then be used by the person of skill in the art of pathology to determine the SATB2 expression status in the sample being studied, by ocular or automated comparison of expression levels in the  
15 reference sample and the subject sample.

As a further aspect of the present invention, there is provided the use of an SATB2 protein as a prognostic marker. Also provided is the use of an SATB2 protein as a prognostic marker for colo-rectal cancer.

As a related aspect of the invention, there is provided the use of an  
20 SATB2 protein, or an antigenically active fragment thereof, in the manufacture of a prognostic agent for the prognosis of colo-rectal cancer. An antigenically active fragment of an SATB2 protein is a fragment of sufficient size to be useful for the generation of an affinity ligand, e.g. an antibody, which will interact with an SATB2 protein comprising the fragment.

25 In embodiments of these use aspects of the invention, the SATB2 protein may, as a non-limiting example, have an amino acid sequence which comprises a sequence selected from:

- i) SEQ ID NO:1; and
- ii) a sequence which is at least 85 % identical to SEQ ID NO:1.

30 In some embodiments, sequence ii) above is at least 90 % identical, at least 91 % identical, at least 92 % identical, at least 93 % identical, at least 94 % identical, at least 95 % identical, at least 96 % identical, at least 97 % identical, at least 98 % identical or at least 99 % identical to SEQ ID NO:1.

As another non-limiting example, the SATB2 protein has an amino acid  
35 sequence which comprises a sequence selected from:

- i) SEQ ID NO:2; and
- ii) a sequence which is at least 85 % identical to SEQ ID NO:2.

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

19

In some embodiments, sequence ii) above is at least 90 % identical, at least 91 % identical, at least 92 % identical, at least 93 % identical, at least 94 % identical, at least 95 % identical, at least 96 % identical, at least 97 % identical, at least 98 % identical or at least 99 % identical to SEQ ID NO:2.

5 As a further aspect thereof, the present invention provides an affinity ligand capable of selective interaction with an SATB2 protein, which is an antibody or a fragment or a derivative thereof. Such an antibody, or fragment or derivative thereof, may for example be one that is obtainable by a process comprising a step of immunizing an animal with a protein whose amino acid  
10 sequence comprises the sequence SEQ ID NO:1. Processes for the production of antibodies or fragments or derivatives thereof against a given target are known in the art, and may be applied in connection with this aspect of the present invention. Any of those variants of the SATB2 protein (SEQ ID NO:2) or the antigenically active fragment thereof (SEQ ID NO:1) that are  
15 discussed above may, of course, be used in such a process for generating an antibody or a fragment or derivative thereof.

As a further aspect thereof, the present invention provides use of the affinity ligand according to the invention as a prognostic agent. A preferred embodiment of this use is use of the affinity ligand as a prognostic agent for  
20 the prognosis of colo-rectal cancer. The present invention also provides use of the affinity ligand for the prognosis of colo-rectal cancer. As a related aspect thereof, the present invention provides use of the affinity ligand according to the invention in the manufacture of a prognostic agent for the prognosis of colo-rectal cancer.

25 The present invention also provides, in another aspect thereof, a method for the diagnosis of colo-rectal cancer, comprising a step of detecting an SATB2 protein. This aspect of the present invention is based on the finding that SATB2 can serve as a protein marker for colo-rectal tissue in general, and for colo-rectal cancer in particular. As detailed further below,  
30 antibodies generated towards a fragment of the SATB2 protein show a strong and selective nuclear immunoreactivity in glandular cells from the distal gastro-intestinal tract, i.e. the appendix, colon and rectum, and in colo-rectal cancer. The most striking finding is positivity in 11 out of 11 colo-rectal carcinomas. Aside from colo-rectal cancer, only very few other tumors were  
35 weak or moderately positive.

In addition, SATB2 is relatively little present in other types of cancer, which in turn makes affinity ligands directed against SATB2 highly interesting

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

20

tools for specifically distinguishing colo-rectal cancer from other cancers. Most colo-rectal cancers are gland-derived and therefore classified as adenocarcinomas. This is a typical cancer type, and can derive from various other organs as well. Therefore, the finding of the present invention is highly  
5 interesting when used to type the tumor metastasis, where the organ origin of the tumor is often unknown. At present, the available molecular markers for colo-rectal cancer are cross-reactive with respect to other adenocarcinomas, and therefore it is difficult to locate a tumor and to identify the origin of a metastasis. The specific colo-rectal cancer marker according to the invention  
10 will enable a doctor to locate cancer efficiently, provide more efficient treatment, and eventually help give patients more dependable prognosis.

Another aspect of the present invention involves the simultaneous testing of cancer samples for the SATB2 and CK20 markers. As detailed in the Examples, section 6, the predictive value of the combination of testing for  
15 both SATB2 and CK20 expression in distinguishing colo-rectal cancer exceeds that of testing for each of the markers taken by themselves. Thus, the invention provides, in this aspect, a method of diagnosing colo-rectal cancer, comprising the steps of detecting the SATB2 protein and detecting the CK20 protein. Further, the invention provides a method for detecting if a  
20 metastasis is originating from a colo-rectal cancer by detecting the presence of the SATB2 protein and/or the CK20 protein. By combining the information from both CK20 and SATB2, patients would more easily obtain an accurate diagnosis for colo-rectal disease. The skilled person would be able to adapt the teachings herein relating to the detection of SATB2 to the method  
25 according to this aspect of the invention, and could perform the simultaneous or sequential detection and/or quantification of SATB2 and CK20 without undue burden in the light of the description herein and in the light of the knowledge in the field of for example immunohistochemistry.

An interesting aspect of the present invention is the predicted leakage  
30 of the SATB2 protein into plasma and stool in cancer patients. As a comparison, a well-known prostate cancer marker, PSA, which is also expressed in normal prostate, leaks from the prostate to plasma even in healthy patients. However, many prostate cancer patients have an elevated PSA level in their plasma, and therefore screening elevated levels of PSA in  
35 the blood is a common early screening procedure for men in the risk group for developing prostata cancer. It is predicted that the same is true also for the link between SATB2 and colo-rectal cancer. Thus, SATB2 is also useful as a

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

21

tool for screening colo-rectal cancer by using human plasma or other body fluid or stool as the sample in the present invention. In this regard, the present invention corresponds to a valuable extension and possibly even replacement for the present colo-rectal cancer screens such as colo-rectoscopy or sigmoidoscopy, which are so uncomfortable that many people skip them, in spite of the fact that the American Cancer Institute recommends regular check-ups for colo-cancer risk groups. A screening method based on the present invention, using SATB2 as a marker protein for colo-rectal cancer, brings significant benefit for screening, early detection and treatment of patients that have been afflicted by this type of cancer.

In the context of the present invention, "prognosis" refers to the prediction of the course or outcome of a disease and its treatment. Prognosis may also refer to a determination of chance of survival or recovery from a disease, as well as to a prediction of the expected survival time of a subject. A prognosis may, specifically, involve establishing the likelihood for survival of a subject during a period of time into the future, such as three years, five years, ten years or any other period of time.

In the context of the present invention, "diagnosis" refers to the determination of the presence of, or the identification of, a disease or disorder. Diagnosis also refers to the conclusion reached through that process. In this context, "diagnostic" means relating to and aiding in the determination of the existence or nature of a disease. In the context of the present invention, "diagnosis" and "diagnostic" also mean monitoring any naturally occurring changes in a disease over time or any changes due to treatment.

As evident from the above definitions, the terms "prognosis" and "diagnosis" have overlapping meanings and are not mutually exclusive.

In the context of the present invention, "specific" or "selective" interaction of e.g. an affinity ligand with its target or antigen means that the interaction is such that a distinction between specific and non-specific, or between selective and non-selective, interaction becomes meaningful. The interaction between two proteins is sometimes measured by the dissociation constant. The dissociation constant describes the strength of binding (or affinity) between two molecules. Typically the dissociation constant between an antibody and its antigen is from  $10^{-7}$  to  $10^{-11}$  M. However, high specificity does not necessarily require high affinity. Molecules with low affinity (in the molar range) for its counterpart have been shown to be as specific as

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

22

molecules with much higher affinity. In the case of the present invention, a specific or selective interaction refers to the extent to which a particular method can be used to determine the presence and/or amount of a specific protein, the target protein or a fragment thereof, under given conditions in the presence of other proteins in a sample of a naturally occurring or processed biological fluid. In other words, specificity or selectivity is the capacity to distinguish between related proteins. Specific and selective are sometimes used interchangeably in the present description.

In the context of the present invention, a "mono-specific antibody" is one of a population of polyclonal antibodies which has been affinity purified on its own antigen, thereby separating such mono-specific antibodies from other antiserum proteins and non-specific antibodies. This affinity purification results in antibodies that bind selectively to its antigen. In the case of the present invention, the polyclonal antisera are purified by a two-step immunoaffinity based protocol to obtain mono-specific antibodies selective for the target protein. Antibodies directed against generic affinity tags of antigen fragments are removed in a primary depletion step, using the immobilized tag protein as the capturing agent. Following the first depletion step, the serum is loaded on a second affinity column with the antigen as capturing agent, in order to enrich for antibodies specific for the antigen (see also Nilsson P *et al* (2005) *Proteomics* 5:4327-4337).

#### Brief description of the figures

Figure 1 illustrates the specificity of the antibody generated against an SATB2 fragment (SEQ ID NO:1) on a protein microchip containing an additional 94 different human proteins in duplicates.

Figure 2 shows a tissue Western blot analysis of the purified mono-specific antibody. Total protein extracts from human cell lines RT-4 (lane 1), EFO-21 (lane 2) and A-431 (lane 3), as well as from normal human liver (lane 4) and normal human tonsil (lane 5).

Figures 3A and 3B show immunohistochemical staining of SATB2 in the cell nuclei of (A) normal cerebral cortex and hippocampus and (B) normal testis. Figures 3C-3E show staining of SATB2 in glandular cells in mucosa of (C) appendix, (D) colon, and (E) rectum, all from normal subjects. Figure 3F shows a higher magnification of the staining in colonic mucosa.

Figure 4A shows immunohistochemical staining of SATB2 in all of eleven tested colo-rectal cancer samples (duplicates). Figure 4B shows a higher magnification of six of the cancer samples shown in Figure 4A.

Figure 5 shows immunohistochemical staining of intermediately  
5 differentiated colo-rectal adenocarcinoma. Figure 5A (left) shows a section with SATB2 expression, whereas Figure 5B (right) shows a section wherein SATB2 expression is absent. Both tumor samples are shown in duplicate.

Figure 6 shows the results of a survival analysis based on  
10 immunohistochemical staining of 122 subjects diagnosed with colo-rectal carcinomas. Tissue cores were scored for low or high SATB2 level. Solid lines: nuclear fraction > 25 %. Dashed/dotted lines: nuclear fraction < 25 %. Tissues from (A) all patients, (B) females only, (C) all node-negative patients, (D) node-negative females.

Figure 7 shows the result of hierarchical clustering of expression data  
15 from 216 cancer tissues that were immunohistochemically stained for SATB2 expression and for expression of the conventional colon cancer markers CEA, CK20, CDX2, p53, Ki67 and Cyclin B1 (CCNB1).

Figure 8 shows a detailed comparison of CK20 and SATB2 expression  
20 based on immunohistochemical stainings of tissue from 122 subjects diagnosed with colo-rectal carcinomas. Tissue cores were scored for low or high SATB2 level and low or high CK20 level.

Figure 9 shows a comparison of CK20 and SATB2 expression based  
25 on immunohistochemical stainings of lymph node metastases from 17 subjects diagnosed with colo-rectal carcinoma. Tissue cores were scored for SATB2 nuclear fraction and CK20 staining.

### Examples

#### Generation of mono-specific antibodies against SATB2 and use thereof to detect SATB2 in normal and cancerous samples

30

##### 1) Generation of antigen

###### *a. Materials and methods*

A suitable fragment of the target protein encoded by the Ensembl  
Gene ID ENSG00000119042 was designed using bioinformatic tools with the  
35 human genome sequence as template (Lindskog M *et al* (2005)  
Biotechniques 38:723-727, Ensembl, www.ensembl.org). A fragment  
consisting of 123 amino acids corresponding to amino acids 377-499 (SEQ ID

NO:1) of the protein SATB2 (SEQ ID NO:2; EnsEMBL entry no. ENSP00000260926) was designed. A polynucleotide encoding the target protein, which polynucleotide contained nucleotides 1542-1910 of the long SATB2 gene transcript (SEQ ID NO:3; EnsEMBL entry no. 5 ENST00000260926), was isolated by a Superscript™ One-Step RT-PCR amplification kit with Platinum® Taq (Invitrogen) and a human total RNA pool panel as template (Human Total RNA Panel IV, BD Biosciences Clontech). Flanking restriction sites NotI and Ascl were introduced into the fragment through the PCR amplification primers, to allow in-frame cloning into the 10 expression vector (forward primer: GTGTCCCAAGCTGTCTTTG, reverse primer: CTTGGCCCTTTTCATCTCC). Then, the downstream primer was biotinylated to allow solid-phase cloning as previously described, and the resulting biotinylated PCR product was immobilized onto Dynabeads M280 Streptavidin (DynaL Biotech) (Larsson M *et al* (2000) J. Biotechnol. 80:143-15 157). The fragment was released from the solid support by NotI-Ascl digestion (New England Biolabs), ligated into the pAff8c vector (Larsson M *et al, supra*) in frame with a dual affinity tag consisting of a hexahistidyl tag for immobilized metal ion chromatography (IMAC) purification and an immunopotentiating albumin binding protein (ABP) from streptococcal protein 20 G (Sjölander A *et al* (1997) J. Immunol. Methods 201:115-123; Ståhl S *et al* (1999) Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation (Fleckinger MC and Drew SW, eds) John Wiley and Sons Inc., New York, pp 49-63), and transformed into *E. coli* BL21(DE3) cells (Novagen). The sequences of the clones were verified by dye-terminator 25 cycle sequencing of plasmid DNA amplified using TempliPhi DNA sequencing amplification kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's recommendations.

BL21(DE3) cells harboring the expression vector were inoculated in 100 ml 30 g/l tryptic soy broth (Merck KGaA) supplemented with 5 g/l yeast 30 extract (Merck KGaA) and 50 mg/l kanamycin (Sigma-Aldrich) by addition of 1 ml of an overnight culture in the same culture medium. The cell culture was incubated in a 1 liter shake flask at 37 °C and 150 rpm until the optical density at 600 nm reached 0.5-1.5. Protein expression was then induced by addition of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (Apollo Scientific) to a final 35 concentration of 1 mM, and the incubation was continued overnight at 25 °C and 150 rpm. The cells were harvested by centrifugation at 2400 g, and the pellet was re-suspended in 5 ml lysis buffer (7 M guanidine hydrochloride, 47

mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.65 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20 mM β-mercaptoethanol; pH = 8.0) and incubated for 2 hours at 37 °C and 150 rpm. After centrifugation at 35300 g, the supernatant containing the denatured and solubilized gene products was collected.

5           The His<sub>6</sub>-tagged fusion protein was purified by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) on columns with 1 ml Talon® metal (Co<sup>2+</sup>) affinity resin (BD Biosciences Clontech) using an automated protein purification procedure (Steen J *et al* (2006) *Protein Expr. Purif.* 46:173-178) on an ASPEC XL4™ (Gilson). The resin was equilibrated with 20 ml  
10   denaturing washing buffer (6 M guanidine hydrochloride, 46.6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 8.0-8.2). The resin was then washed with a minimum of 31.5 ml washing buffer prior to elution in 2.5 ml elution buffer (6 M urea, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 30 mM acetic acid, 70 mM Na-acetate, pH 5.0). The eluted material was fractionated in three pools of 500,  
15   700 and 1300 μl. The 700 μl fraction, containing the antigen, and the pooled 500 and 1300 μl fractions were stored for further use.

          The antigen fraction was diluted to a final concentration of 1 M urea with phosphate buffered saline (PBS; 1.9 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 154 mM NaCl) followed by a concentration step to increase the protein  
20   concentration using Vivapore 10/20 ml concentrator with molecular weight cut off at 7500 Da (Vivascience AG). The protein concentration was determined using a bicinchoninic acid (BCA) micro assay protocol (Pierce) with a bovine serum albumin standard according to the manufacturer's recommendations. The protein quality was analyzed on a Bioanalyzer instrument using the  
25   Protein 50 or 200 assay (Agilent Technologies).

#### *b) Results*

          A gene fragment corresponding to nucleotides 1542-1910 of the long transcript (SEQ ID NO:3) of the SATB2 gene and encoding a peptide (SEQ ID  
30   NO:1) consisting of amino acids 377 to 499 of the target protein SATB2 (SEQ ID NO:2) was successfully isolated by RT-PCR from a human RNA pool using primers specific for the protein fragment. However, there was one single silent nucleotide mutation in the sequence compared to the sequence of ENSG00000119042 from EnSEMBL. The 123 amino acid fragment (SEQ ID  
35   NO:1) of the target protein (SEQ ID NO:2) was designed to lack transmembrane regions to ensure efficient expression in *E. coli*, and to lack any signal peptide, since those are cleaved off in the mature protein. In

addition, the protein fragment was designed to consist of a unique sequence with low homology with other human proteins, to minimize cross reactivity of generated affinity reagents, and to be of a suitable size to allow the formation of conformational epitopes and still allow efficient cloning and expression in bacterial systems.

5 A clone encoding the correct amino acid sequence was identified, and, upon expression in *E. coli*, a single protein of the correct size was produced and subsequently purified using immobilized metal ion chromatography. After dilution of the eluted sample to a final concentration of 1 M urea and  
10 concentration of the sample to 1 ml, the concentration of the protein fragment was determined to be 7,4 mg/ml and was 98 % pure according to purity analysis.

## 2) Generation of antibodies

### 15 a) *Materials and methods*

The purified SATB2 fragment as obtained above was used as antigen to immunize a rabbit in accordance with the national guidelines (Swedish permit no. A 84-02). The rabbit was immunized intramuscularly with 200 µg of antigen in Freund's complete adjuvant as the primary immunization, and  
20 boosted three times in four week intervals with 100 µg antigen in Freund's incomplete adjuvant.

Antiserum from the immunized animal was purified by a three-step immunoaffinity based protocol (Agaton C *et al* (2004) *J. Chromatogr. A* 1043:33-40; Nilsson P *et al* (2005) *Proteomics* 5:4327-4337). In the first step,  
25 10 ml of total antiserum was buffered with 10x PBS to a final concentration of 1x PBS (1.9 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 154 mM NaCl), filtered using a 0.46 µm pore-size filter (Acrodisc®, Life Science) and applied to a an affinity column containing 5 ml N-hydroxysuccinimide-activated Sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare) coupled to the dual affinity tag protein His<sub>6</sub>-ABP (a  
30 hexahistidyl tag and an albumin binding protein tag) expressed from the pAff8c vector and purified in the same way as described above for the antigen protein fragment. In the second step, the flow-through, depleted of antibodies against the dual affinity tag His<sub>6</sub>-ABP, was loaded at a flow rate of 0.5 ml/min on a 1 ml Hi-Trap NHS-activated HP column (GE Healthcare) coupled to the  
35 SATB2 protein fragment used as antigen for immunization (SEQ ID NO:1). The His<sub>6</sub>-ABP protein and the protein fragment antigen had been coupled to the NHS activated matrix as recommended by the manufacturer. Unbound

material was washed away with 1x PBST (1x PBS, 0.1 % Tween20, pH 7.25), and captured antibodies were eluted using a low pH glycine buffer (0.2 M glycine, 1 mM EGTA, pH 2.5). The eluted antibody fraction was collected automatically, and loaded onto two 5 ml HiTrap™ desalting columns (GE Healthcare) connected in series for efficient buffer exchange in the third step. The second and third purification steps were run on the ÄKTAexpress™ platform (GE Healthcare). The antigen selective (mono-specific) antibodies (msAbs) were eluted with PBS buffer, supplemented with glycerol and NaN<sub>3</sub> to final concentrations of 50 % and 0.02 %, respectively, for long term storage at -20 °C (Nilsson P *et al* (2005) Proteomics 5:4327-4337).

The specificity and selectivity of the affinity purified antibody fraction were analyzed by binding analysis against the antigen itself and against 94 other human protein fragments in a protein array set-up (Nilsson P *et al* (2005) Proteomics 5:4327-4337). The protein fragments were diluted to 40 µg/ml in 0.1 M urea and 1x PBS (pH 7.4) and 50 µl of each was transferred to the wells of a 96-well spotting plate. The protein fragments were spotted and immobilized onto epoxy slides (SuperEpoxy, TeleChem) using a pin-and-ring arrayer (Affymetrix 427). The slide was washed in 1x PBS (5 min) and the surface was then blocked (SuperBlock®, Pierce) for 30 minutes. An adhesive 16-well silicone mask (Schleicher & Schuell) was applied to the glass before the mono-specific antibodies were added (diluted 1:2000 in 1x PBST to appr. 50 ng/ml) and incubated on a shaker for 60 min. Affinity tag-specific IgY antibodies were co-incubated with the mono-specific antibodies in order to quantify the amount of protein in each spot. The slide was washed with 1x PBST and 1x PBS twice for 10 min each. Secondary antibodies (goat anti-rabbit antibody conjugated with Alexa 647 and goat anti-chicken antibody conjugated with Alexa 555, Molecular Probes) were diluted 1:60000 to 30 ng/ml in 1x PBST and incubated for 60 min. After the same washing procedure as for the first incubation, the slide was spinned dry and scanned (G2565BA array scanner, Agilent) and images were quantified using image analysis software (GenePix 5.1, Axon Instruments). The results are discussed below and presented in Figure 1.

In addition, the specificity and selectivity of the affinity purified antibody were analyzed by Western blot. Western blot was performed by separation of total protein extracts from selected human cell lines and tissues on pre-cast 10-20 % Criterion™ SDS-PAGE gradient gels (Bio-Rad Laboratories) under reducing conditions, followed by electro-transfer to PVDF membranes (Bio-

Rad Laboratories) according to the manufacturer's recommendations. The membranes were blocked (5 % dry milk, 1x TBST; 0.1 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.5 % Tween20) for 1 h at room temperature, incubated with the primary affinity purified antibody diluted 1:500 in blocking buffer and washed  
5 in TBST. The secondary HRP-conjugated antibody (swine anti-rabbit immunoglobulin/HRP, DakoCytomation) was diluted 1:3000 in blocking buffer and chemiluminescence detection was carried out using a Chemidoc™ CCD camera (Bio-Rad Laboratories) and SuperSignal® West Dura Extended Duration substrate (Pierce), according to the manufacturer's protocol. The  
10 results are discussed below and presented in Figure 2.

#### *b) Results*

The quality of polyclonal antibody preparations has proven to be dependent on the degree of stringency in the antibody purifications, and it has  
15 previously been shown that depletion of antibodies directed against epitopes not originated from the target protein is necessary to avoid cross-reactivity to other proteins and background binding (Agaton C *et al* (2004) J. Chromatogr. A 1043:33-40).

Thus, a protein microarray analysis was performed to ensure that  
20 mono-specific polyclonal antibodies of high specificity had been generated by depletion of antibodies directed against the His<sub>6</sub>-tag as well as of antibodies against the ABP-tag. This was followed by affinity capture of antigen selective antibodies on an affinity column with immobilized antigen.

To quantify the amount of protein in each spot of the protein array, a  
25 two color dye labeling system was used, with a combination of primary and secondary antibodies. Tag-specific IgY antibodies generated in hen were detected with a secondary goat anti-hen antibody labeled with Alexa 555 fluorescent dye. The specific binding of the rabbit msAb to its antigen on the array was detected with a fluorescently Alexa 647 labeled goat anti-rabbit  
30 antibody. In Figure 1, the array results are shown as bars corresponding to the amount of Alexa 647 fluorescence intensity (y axis) detected from each spot of the array. Each protein fragment is spotted in duplicates, and each bar on the x axis of the diagram represents one protein spot. The protein array analysis shows that the affinity purified mono-specific antibody against  
35 SATB2 is highly selective to the correct protein fragment and shows a very low background to all other protein fragments analyzed on the array.

The result of the Western blot analysis (Figure 2) shows that the antibody specifically detects a single band of approximately 100 kDa in a bladder tumor cell line (RT-4), an ovary cystadenocarcinoma cell line (EFO-21) and an epidermoid cell line (A-431) (lanes 1-3). In addition, a weaker specific band is seen in liver and tonsil tissue samples (lanes 4-5). The theoretical molecular weight of SATB2 is 82 kDa (as calculated from the SATB2 amino acid sequence SEQ ID NO:2), corresponding well to the results obtained with account taken of the fact that the analyzed protein may be glycosylated or otherwise modified under the conditions of the analysis.

10

### 3) Tissue profiling by immunohistochemistry

#### a) *Material and Methods*

In total, 576 paraffin cores containing human tissues were analyzed using the mono-specific antibody sample. All tissues used as donor blocks for tissue microarray (TMA) production were selected from the archives at the Department of Pathology, University Hospital, Uppsala, in agreement with approval from the local ethical committee. Corresponding tissue sections were examined to determine diagnosis and to select representative areas in donor blocks. Normal tissue was defined as microscopically normal (non-neoplastic) and was most often selected from specimens collected from the vicinity of surgically removed tumors. Cancer tissue was reviewed for diagnosis and classification. All tissues were formalin fixated, paraffin embedded, and sectioned for diagnostic purposes.

15

20

The TMA production was performed essentially as previously described (Kononen J *et al* (1998) *Nature Med.* 4:844-847; Kallioniemi OP *et al* (2001) *Hum. Mol. Genet.* 10:657-662). Briefly, a hole was made in the recipient TMA block. A cylindrical core tissue sample from the donor block was acquired and deposited in the recipient TMA block. This was repeated in an automated tissue arrayer from Beecher Instrument (ATA-27, Beecher Instruments, Sun Prairie, CA, USA) until a complete TMA design was produced. TMA recipient blocks were baked at 42 °C for 2 h prior to sectioning.

25

30

The design of TMA:s was focused on obtaining samples from a large range of representative normal tissues, and on including representative cancer tissues. This has previously been described in detail in Kampf C *et al* (2004) *Clin. Proteomics* 1:285-300. In brief, samples from 48 normal tissues and from 20 of the most common cancer types affecting humans were

35

selected. In total, eight different designs of TMA blocks, each containing 72 cores of tissue with 1 mm diameter, were produced. Two of the TMA:s represented normal tissues, corresponding to 48 different normal tissues in triplicates from different individuals. The remaining 6 TMA:s represented cancer tissue from 20 different types of cancer. For 17 of the 20 cancer types, 12 individually different tumors were sampled, and for the remaining 3 cancer types, 4 individually different tumors were sampled, all in duplicates from the same tumor. The TMA blocks were sectioned with 4  $\mu$ m thickness using a waterfall microtome (Leica), and placed onto SuperFrost® (Roche Applied Science) glass slides for immunohistochemical analysis.

Automated immunohistochemistry was performed as previously described (Kampf C *et al* (2004) Clin. Proteomics 1:285-300). In brief, the glass slides were incubated for 45 min in 60 °C, de-paraffinized in xylene (2 x 15 min) and hydrated in graded alcohols. For antigen retrieval, slides were immersed in TRS (Target Retrieval Solution, pH 6.0, DakoCytomation) and boiled for 4 min at 125 °C in a Decloaking chamber® (Biocare Medical). Slides were placed in the Autostainer® (DakoCytomation) and endogenous peroxidase was initially blocked with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DakoCytomation). The primary antibody and goat anti-rabbit peroxidase conjugated Envision® were incubated for 30 min each at room temperature. Between all steps, slides were rinsed in wash buffer (DakoCytomation). Finally, diaminobenzidine (DakoCytomation) was used as chromogen and Harris hematoxylin (Sigma-Aldrich) was used for counterstaining. The slides were mounted with Pertex® (Histolab).

All immunohistochemically stained sections from the eight different TMA:s were scanned using a ScanScope T2 automated slide-scanning systems (Aperio Technologies). In order to represent the total content of the eight TMA:s, 576 digital images were generated. Scanning was performed at 20 times magnification. Digital images were separated and extracted as individual tagged image file format (TIFF) files for storage of original data. In order to be able to handle the images in a web-based annotation system, the individual images were compressed from TIFF format into JPEG format. All images of immunohistochemically stained tissue were manually evaluated under the microscope and annotated by a board certified pathologist or by specially educated personnel (followed by verification of a pathologist). Annotation of each different normal and cancer tissue was performed using a simplified scheme for classification of immunohistochemical outcome. Each

tissue was examined for representativity and immunoreactivity. The different tissue specific cell types included in each normal tissue type were annotated. For each cancer, tumor cells and stroma were annotated. Basic annotation parameters included an evaluation of i) staining intensity, ii) fraction of stained cells and iii) subcellular localization (nuclear and/or cytoplasmic/membranous). Staining intensity was subjectively evaluated in accordance to standards used in clinical histo-pathological diagnostics and outcome was classified as: negative = no immunoreactivity, weak = faint immunoreactivity, moderate = medium immunoreactivity or strong = distinct and strong immunoreactivity. The fraction of stained cells was classified as < 2 %, 2-25 %, 26-75 % or > 75 % immunoreactive cells of the representative cell population. Based on both the intensity and fraction of immunoreactive cells, a "staining score" was given for each tissue sample: 0 = negative, 1 = weak, 2 = moderate and 3 = strong.

15

#### *b) Results*

The results from tissue profiling with the mono-specific antibody generated towards a recombinant protein fragment of the human target protein SATB2 shows a particular immunoreactivity (dark grey) in several normal tissues and in colo-rectal cancer (Tables 1-4 and Figures 3-4).

20

Table 1 shows the SATB2 protein expression pattern in normal human tissues. Using immunohistochemistry and TMA technology, 144 spots (1 mm in diameter) representing 48 different types of normal tissue were screened for expression of SATB2. Table 1 shows the level of expression in the different tissues. Strong expression (staining score 3) was found in tissues from the distal GI-tract and in two areas of the brain. Moderate (staining score 2) levels of expression was detected in the testis and epididymis. Focal lymphoid cells showed moderate or weak (staining score 1) expression. All other cells and tissues were negative (staining score 0). N.R. means that no representative tissues were present. SATB2 is also expressed in some neuronal tissues and testis.

25

30

Table 1: Expression pattern of SATB2 in normal tissues		
Tissue type	Cell type	Staining score
Adrenal gland	cortical cells	0
	medullar cells	N.R.
Appendix	glandular cells	3
	lymphoid tissue	0
Bone marrow	bone marrow poetic cells	0
Breast	glandular cells	0
Bronchus	surface epithelial cells	0
Cerebellum	cells in granular layer	0
	cells in molecular layer	0
	purkinje cells	0
Cerebral cortex	neuronal cells	3
	non-neuronal cells	0
Cervix, uterine	glandular cells	0
	surface epithelial cells (squamous)	N.R.
Colon	glandular cells	3
Duodenum	glandular cells	0
Endometrium 1	cells in endometrial stroma/ECM	0
	cells in myometrium/ECM	0
	glandular cells	0
Endometrium 2	cells in endometrial stroma/ECM	0
	cells in myometrium/ECM	0
	glandular cells	0
Epididymis	glandular cells	2
Esophagus	surface epithelial cells	0
Fallopian tube	glandular cells	0
Gall bladder	glandular cells	0
Heart muscle	myocytes	0
Hippocampus	neuronal cells	3
	non-neuronal cells	0
Kidney	cells in glomeruli	0
	cells in tubuli	0
Lateral ventricle	neuronal cells	0
	non-neuronal cells	0
Liver	bile duct cells	0
	hepatocytes	0
Lung	alveolar cells	0
	macrophages	0
Lymph node	follicle cells (cortex)	0
	non-follicle cells (paracortex)	2
Nasopharynx	surface epithelial cells	0
Oral mucosa	surface epithelial cells	0
Ovary	follicle cells	0
	ovarian stromal cells	0
Pancreas	exocrine pancreas	0
	islet cells	0
Parathyroid gland	glandular cells	0
Placenta	decidual cells	0
	trophoblastic cells	0
Prostate	glandular cells	0

<b>Rectum</b>	glandular cells	3
<b>Salivary gland</b>	glandular cells	0
<b>Seminal vesicle</b>	glandular cells	0
<b>Skeletal muscle</b>	myocytes	0
<b>Skin</b>	adnexal cells	0
	epidermal cells	0
<b>Small intestine</b>	glandular cells	0
<b>Smooth muscle</b>	smooth muscle cells	0
<b>Soft tissue 1</b>	mesenchymal cells	0
<b>Soft tissue 2</b>	mesenchymal cells	0
<b>Spleen</b>	cells in red pulp	0
	cells in white pulp	0
<b>Stomach 1</b>	glandular cells	0
<b>Stomach 2</b>	glandular cells	0
<b>Testis</b>	cells in ductus seminiferus	2
	leydig cells	0
<b>Thyroid gland</b>	glandular cells	0
<b>Tonsil</b>	follicle cells (cortex)	0
	non-follicle cells (paracortex)	1
	surface epithelial cells	0
<b>Urinary bladder</b>	surface epithelial cells	0
<b>Vagina</b>	surface epithelial cells	0
<b>Vulva/anal skin</b>	surface epithelial cells	0

Figure 3A shows a microscopic enlargement, which exhibits nuclear positivity (dark grey) in neurons from cerebral cortex and hippocampus. Surrounding tissue and glial cells were negative (light grey). Tissue sections from testis showed a moderate and mainly nuclear positivity (dark grey) in the *ductus seminiferous* (Figure 3B).

A specific finding in the histological array involving this invention was the distinct, strong nuclear positivity (dark grey) found in glandular cells of the mucosa in appendix (Figure 3C), colon (3D) and rectum (3E). Note the negative staining (light grey) of other cell types, e.g. inflammatory cells, endothelial cells, also present in the mucosa. Figure 3F shows two high power magnifications of the colonic mucosa showing that all glandular cells have strong nuclear expression (dark grey) of the SATB2 protein.

Table 2 shows the level of SATB2 expression in 216 different cancer tissues. All 11 colo-rectal carcinomas represented showed positivity, and in 8 of these the expression was strong. Low power microscopic magnifications with immunohistochemically stained tissue sections showing the analyzed 11 cases of colo-rectal carcinoma are shown in Figure 4A, while high power magnifications of representative areas from six of the colo-rectal carcinomas are shown in 4B. A vast majority of the cancer cells showed strong nuclear staining (dark grey) indicating a high level of SATB2 expression as compared to the surrounding negative (light grey) tissue containing normal cells.

Cancer type	Subject number											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Breast cancer	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N.R.
Cervical cancer	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Colo-rectal cancer	3	3	3	3	3	3	3	3	2	1	1	N.R.
Endometrial cancer	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Head & neck cancer	0	0	0	0								
Kidney cancer	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	N.R.
Liver cancer	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lung cancer	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Malignant carcinoid	0	0	0	0								
Malignant glioma	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Malignant lymphoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Malignant melanoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N.R.	N.R.	N.R.
Ovarian cancer	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pancreatic cancer	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N.R.
Prostate cancer	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Skin cancer	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Stomach cancer	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Testis cancer	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N.R.
Thyroid cancer	0	0	0	0								
Urothelial cancer	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N.R.

#### 4) Colo-rectal cancer TMA

##### a) *Material and methods*

- 5 Archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue from 122 patients (63 women and 59 men) diagnosed with colo-rectal carcinoma between 1999 and 2002 was collected from the Department of Pathology, Malmö University Hospital, Sweden. The median age of patients was 75 (32-88) years. 39 tumors were Dukes' stage A, 42 Dukes' stage B and 41 Dukes' stage C.
- 10 Information regarding the date of death was obtained from the regional cause-of-death registries for all patients. Ethical permission was obtained from the Local Ethics Committee.

- All 122 cases of colo-rectal carcinoma were histopathologically re-evaluated on slides stained with hematoxylin and eosin. TMA:s were then
- 15 constructed by sampling 2 x 1.0 mm cores per case from areas representative of invasive cancer. The TMA:s were prepared and automated IMMUNOHISTOCHEMISTRY was performed as described in section 3 above, using the SATB2 antibody prepared as described in section 2 above.

- Tissue annotation was essentially done as described in section 3
- 20 above, with the exception that staining intensity was considered either

negative (no or faint immunoreactivity) or positive (moderate or strong reactivity). The fraction of cells exhibiting positive staining intensity in the cell nucleus was then calculated, yielding a value referred to as the "fraction score" for the sample. Thus, the "fraction score" corresponds to the percentage of cells in a sample that exhibits a positive staining intensity according to the definition in this section.

Based on the survival trends for all different strata, a dichotomized variable was constructed for further statistical analyses, defining a high/positive SATB2 expression as > 25 % positive nuclei and a low/negative SATB2 expression as < 25 % positive nuclei. Samples were then classified in two groups based on the fraction score, using 25 % fraction score as the dividing criterion. Thus, no signal at all or a positive staining intensity in < 25 % of the cells in a tissue sample (core) classifies that sample in the group "< 25 %", whereas a positive staining intensity in > 25 % of the cells in a core classifies that sample in the group "> 25 %".

The above classification of samples was used for overall survival analysis according to the Kaplan-Meier estimator, and the log-rank test was used to compare survival in different strata. All statistical tests were two-sided, and p-values of < 0.05 % were considered significant. All calculations were made with the statistical package SPSS 12.0 (SPSS Inc. Illinois, USA).

#### *b) Results*

Tissue microarray based analysis of 122 colo-rectal carcinomas showed that 99 tumors (81 %) were positive for SATB2. Surprisingly, low or no expression of SATB2 was not possible to predict by routine sectioning and histochemical staining, as seen in Figure 5. Both tumor samples (sections shown in duplicate) were diagnosed as intermediately differentiated colo-rectal adenocarcinoma. Figure 5A shows a section with strong SATB2 expression, and in Figure 5B, the sample lacks SATB2 expression.

The results of the survival analysis are shown in Figure 6, where the diagrams show the cumulative survival in different groupings of patients over time. Survival analysis based on the entire cohort revealed a trend ( $p = 0.14$ ) towards a shorter overall survival (OS) for patients having tumors with low SATB2 expression (Figure 6A). The relationship between SATB2 expression and the clinicopathological variables sex and Dukes' stage was also examined. Female patients ( $n = 63$ ) having tumors with low SATB2 expression showed an increased trend ( $p = 0.11$ ) for even shorter OS

compared to the whole cohort (Figure 6B). Figure 6C shows that a similar trend ( $p = 0.10$ ) was observed in node-negative (Dukes' stage A and B) patients ( $n = 80$ ). In the subgroup of node-negative women ( $n = 44$ ), this trend was significant ( $p = 0.04$ ) (Figure 6D).

5 Another way to present the survival analysis data could be by using the "staining score" described in section 3 above. Then, samples scored as 0 and 1 would be defined as low SATB2 expression and samples scored as 2 and 3 would be defined as high SATB2 expression. A similar result as that seen in Figure 6 is expected.

10

#### 5) Quantitative image analysis of TMA data

In order to obtain a quantitative expression measurement, the Aperio ScanScope CS Slide Scanner (Aperio Technologies, Vista, CA, USA) system is used to capture digital images of the hybridized TMA slides prepared as described in section 4 above. Scanning is performed at 20 times  
15 magnification and images are stored as multilayered TIFF:s. These digital images are viewed using ImageScope (Aperio) and deemed suitable for analysis. The images are de-arrayed to visualize individual tissue cores using TMA Lab (Aperio). Initially, the Color Deconvolution algorithm (Aperio) is used  
20 to separate each image into three channels, i.e. red, green and blue (RGB). This enables each stain to be separately measured and thus makes it possible to subtract the hematoxylin counterstain from the diaminobenzidine chromogene staining.

Subsequently, a number of different algorithms are used to quantify  
25 nuclear, cytoplasmic or membranous staining. The IHC Nuclear algorithm (Aperio) is used to quantify nuclear staining of SATB2. Nuclei were identified based on intensity. Edges of the nuclei are identified using an edge threshold method, which automatically adjusts the threshold according to the mean of the edge pixels. A full description of all algorithms is available from Aperio  
30 Technologies. A pseudo-color mark-up image of each core on the TMA is generated and evaluated to confirm the accuracy of each algorithm.

The output values from the Nuclear algorithm are a percentage of  
positive nuclei and a nuclear RGB intensity value for each core on the TMA slide. An autoscore (AS) is calculated for the level of SATB2 expression on  
35 each tissue core, by multiplying the percentage positive nuclei by the nuclear RGB intensity for each core. AS analysis is made on cancer TMA samples, e.g. those described in section 4 above, and overall survival estimated

according to Kaplan-Meier's method. The log-rank test is used to compare survival in different strata. Statistical calculations are made with the statistical package SPSS 12.0 (SPSS Inc. Illinois, USA).

5 6) Clustering analysis

a) *Material and methods*

In order to investigate the concordance in protein expression between known markers for colon cancer and SATB2, hierarchical clustering was performed. Clustering is a suitable method for evaluating trends and  
10 structures in data in initial mining steps. Groupings and categories that are not obvious by just browsing the data set can easily be detected by using unsupervised methods like hierarchical clustering. In life science, clustering has been used quite extensively in RNA transcriptional analysis, such as  
15 microarray data.

The 6 cancer TMA:s described in section 3 were used again, i.e. in total 216 cancer tissue samples. Besides the antibodies recognizing SATB2 prepared as per section 2 above, antibodies against the established markers CEA (DAKO, Glostrup, Denmark), CK20 (DAKO, Glostrup, Denmark), CDX2 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), p53 (DAKO, Glostrup, Denmark),  
20 Ki67 (DAKO, Glostrup, Denmark) and Cyclin B1 (Transduction laboratories, Lexington, USA) were tested using an automated IMMUNOHISTOCHEMISTRY method analogous to that described in section 3.

Pathologists annotated the TMA:s as presented in section 3 and gave  
25 a staining score to each core using a scale from 0-3, where 3 is a strong (black) staining and 0 is no (white) staining. Clustering was performed using the statistical computing language R. The clustering algorithm was used on the two dimensions of the data matrix, tissues and antibodies. In total, 7 antibodies and 216 tissues were used in the clustering procedure. Eight  
30 tissues were removed due to having no images that could quantify the expression levels. The clustering was made using a top-down hierarchical method with average agglomeration based on an Euclidian distance metric, where the distances between clusters are recomputed at each stage by the Lance-Williams dissimilarity update formula according to the average linkage.  
35 The algorithm used in the clustering orders the sub-trees so that the tighter cluster is displayed on the left hand side of each node.

To further study difference and similarities between SATB2 and CK20, IMMUNOHISTOCHEMISTRY analysis was made using the cancer TMA with 122 carcinoma cores described in section 4. TMA:s were stained with SATB2 antibody prepared as in section 2 and with CK20 antibody obtained from DAKO (Glostrup, Denmark). The two TMA:s were compared after being annotated according to the "fraction score" defined in section 4.

#### *b) Results*

The specificity of SATB2 as a marker for colo-rectal carcinoma as compared to the established markers CEA, CK20, CDX2, p53, Ki67 and Cyclin B1 was examined in 216 different tumors. Hierarchical clustering of data from expression profiles of these 7 different proteins resulted in the heatmap and accompanying dendrograms shown in Figure 7. From the heatmap and dendrogram of tumors, it is clear that a vast majority of colo-rectal carcinomas form a cluster that is separated at the highest level based on high expression levels of SATB2, CK20, CDX2 and CEA. Further, the analysis shows that SATB2 clusters together with the CK20 and CDX2 cluster, all having a more specific expression than other tested markers that showed a more general expression pattern. In the cluster of 8 colo-rectal carcinomas, there was also one cervical adenocarcinoma and one case of cholangiocellular liver carcinoma that were strongly positive for SATB2. Outside of this cluster, there were three colo-rectal carcinomas negative for SATB2. Interestingly, the SATB2 expression pattern is not clearly correlated to the expression of CK20, and could therefore function as a complement to CK20 during characterization of colo-rectal cancer.

SATB2 and CK20 were analyzed in more detail on the 122 carcinoma TMA described in section 4. CK20 alone confirmed 86 % (105/122) and SATB2 alone confirmed 81 % (99/122) of the 122 colo-rectal carcinomas with a fraction score of > 25 % (Figure 8). Interestingly, by combining the data from staining for both markers, 93 % (113/122) of the colo-rectal cancers were clearly positive for one or both of the markers. Only 5 patients completely lacked expression of either CK20 or SATB2. This information is of interest when diagnosing a cancer and, more specifically, when trying to identify a metastasis, as a common clinical problem with cancer is patients that present a metastasis of unknown origin. Thus, by combining the information from both CK20 and SATB2, patients would more easily obtain an accurate diagnosis for colo-rectal adenocarcinoma.

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

39

Further, the SATB2 and CK20 expression in lymph node metastases from 17 patients with colo-rectal cancer was analyzed. CK20 alone confirmed the origin of 88 % (15/17) of the metastases with a staining score of 2 or 3. SATB2 alone confirmed the origin of 82 % (14/17) of the metastases with a fraction score of > 25 % (Figure 9). Combining the data from staining for both markers, the origin of 94 % (16/17) of the metastases was confirmed. This further supports that information regarding both SATB2 and CK20 expression is desirable when determining if a metastasis originates from a colo-rectal cancer.

10

## ITEMIZED LISTING OF EMBODIMENTS OF THE INVENTION

The following is a non-limiting and itemized listing of embodiments of the invention, presented for the purpose of providing further information regarding the various features and combinations provided by the invention in certain of its aspects.

1. Method for the diagnosis of colo-rectal cancer, comprising a step of detecting an SATB2 protein.

2. Method according to item 1, wherein the amino acid sequence of the SATB2 protein comprises a sequence selected from:

- i) SEQ ID NO:1; and
- ii) a sequence which is at least 85 % identical to SEQ ID NO:1.

3. Method according to any preceding item, wherein the amino acid sequence of the SATB2 protein comprises a sequence selected from:

- i) SEQ ID NO:2; and
- ii) a sequence which is at least 85 % identical to SEQ ID NO:2.

4. Method according to any preceding item, comprising the steps of:  
a) providing a sample from a patient suspected of having colo-rectal cancer;

b) applying to the sample a detectable affinity ligand capable of selective interaction with the SATB2 protein to be detected, said application being performed under conditions that enable binding of the affinity ligand to any SATB2 protein present in the sample;

c) removing non-bound affinity ligand; and  
d) detecting any affinity ligand remaining in association with the sample.

5. Method according to item 4, in which the sample is a body fluid sample.

6. Method according to item 5, in which the body fluid is selected from the group consisting of blood, plasma, serum, cerebral fluid, urine, semen and exudate.

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

41

7. Method according to item 4, in which the sample is a stool sample.

8. Method according to item 4, in which the sample is a tissue sample.

5

9. Method according to item 4, in which the sample is a cytology sample.

10. Method according to any one of items 4-9, wherein the detectable affinity ligand is selected from the group consisting of antibodies, fragments thereof and derivatives thereof.

10

11. Method according to any one of items 4-9, wherein the detectable affinity ligand is a protein ligand derived from a scaffold selected from the group consisting of staphylococcal protein A and domains thereof, lipocalins, ankyrin repeat domains, cellulose binding domains,  $\gamma$  crystallines, green fluorescent protein, human cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, protease inhibitors, PDZ domains, peptide aptamers, staphylococcal nuclease, tendamistats, fibronectin type III domain and zinc fingers.

15

20

12. Method according to any one of items 4-9, wherein the detectable affinity ligand is an oligonucleotide molecule.

13. Method according to any one of items 4-12, wherein the detectable affinity ligand comprises a label selected from the group consisting of fluorescent dyes and metals, chromophoric dyes, chemiluminescent compounds and bioluminescent proteins, enzymes, radioisotopes and particles.

25

14. Method according to any one of items 4-12, in which said detectable affinity ligand is detected using a secondary affinity ligand capable of recognizing the detectable affinity ligand.

30

15. Method according to item 14, in which said secondary affinity ligand capable of recognizing the detectable affinity ligand comprises a label selected from the group consisting of fluorescent dyes and metals,

35

chromophoric dyes, chemiluminescent compounds and bioluminescent proteins, enzymes, radioisotopes and particles.

16. Kit for carrying out the method according to any one of items 1-15,  
5 which comprises
- a) a detectable affinity ligand capable of selective interaction with an SATB2 protein; and
  - b) reagents necessary for detecting the presence of the affinity ligand.

- 10 17. Kit according to item 16, in which the detectable affinity ligand is selected from the group consisting of antibodies, fragments thereof and derivatives thereof.

- 15 18. Kit according to item 16, in which the detectable affinity ligand is a protein ligand derived from a scaffold selected from the group consisting of staphylococcal protein A and domains thereof, lipocalins, ankyrin repeat domains, cellulose binding domains,  $\gamma$  crystallines, green fluorescent protein, human cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, protease inhibitors, PDZ domains, peptide aptamers, staphylococcal nuclease, tendamistats,  
20 fibronectin type III domain and zinc fingers.

19. Kit according to item 16, wherein the detectable affinity ligand is an oligonucleotide molecule.

- 25 20. Kit according to any one of items 16-19, in which the detectable affinity ligand comprises a label selected from the group consisting of fluorescent dyes and metals, chromophoric dyes, chemiluminescent compounds and bioluminescent proteins, enzymes, radioisotopes and particles.

- 30 21. Kit according to any one of items 16-19, in which said reagents necessary for detecting the presence of the affinity ligand comprise a secondary affinity ligand capable of recognizing the detectable affinity ligand.

- 35 22. Kit according to item 21, in which said secondary affinity ligand capable of recognizing the detectable affinity ligand comprises a label selected from the group consisting of fluorescent dyes or metals,

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

43

chromophoric dyes, chemiluminescent compounds and bioluminescent proteins, enzymes, radioisotopes and particles.

5 23. Use of an SATB2 protein as a diagnostic marker for colo-rectal cancer.

10 24. Use of an SATB2 protein, or an antigenically active fragment thereof, in the manufacture of a diagnostic agent for the diagnosis of colo-rectal cancer.

15 25. Use according any one of items 23 and 24, wherein the amino acid sequence of the SATB2 protein comprises a sequence selected from:  
i) SEQ ID NO:1; and  
ii) a sequence which is at least 85 % identical to SEQ ID NO:1.

20 26. Use according any one of items 23 and 24, wherein the amino acid sequence of the SATB2 protein comprises a sequence selected from:  
i) SEQ ID NO:2; and  
ii) a sequence which is at least 85 % identical to SEQ ID NO:2.

25 27. Affinity ligand capable of selective interaction with an SATB2 protein, which is an antibody or a fragment or a derivative thereof.

30 28. Affinity ligand according to item 27, which is obtainable by a process comprising a step of immunizing an animal with a protein whose amino acid sequence comprises the sequence SEQ ID NO:1.

35 29. Use of an affinity ligand according to any one of items 27-28 as a diagnostic agent.

40 30. Use of an affinity ligand according to any one of items 27-28 in the manufacture of a diagnostic agent for the diagnosis of colo-rectal cancer.

21031658.ST25.txt  
SEQUENCE LISTING

<110> Atlas Antibodies AB

<120> NEW METHODS

<130> 21031658

<150> EP06114954.8

<151> 2006-06-02

<150> US 60/816 613

<151> 2006-06-27

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Val Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly  
1 5 10 15

Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser  
20 25 30

Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu  
35 40 45

Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser  
50 55 60

Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser  
65 70 75 80

Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu  
85 90 95

Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile Thr Ala Ala Ile Tyr  
100 105 110

Asp Glu Ile Gln Gln Glu Met Lys Arg Ala Lys  
115 120

<210> 2

<211> 733

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Arg Arg Ser Glu Ser Pro Cys Leu Arg Asp Ser Pro Asp Arg  
1 5 10 15

21031658.ST25.txt  
 Arg Ser Gly Ser Pro Asp Val Lys Gly Pro Pro Pro Val Lys Val Ala  
 20 25 30  
 Arg Leu Glu Gln Asn Gly Ser Pro Met Gly Ala Arg Gly Arg Pro Asn  
 35 40 45  
 Gly Ala Val Ala Lys Ala Val Gly Gly Leu Met Ile Pro Val Phe Cys  
 50 55 60  
 Val Val Glu Gln Leu Asp Gly Ser Leu Glu Tyr Asp Asn Arg Glu Glu  
 65 70 75 80  
 His Ala Glu Phe Val Leu Val Arg Lys Asp Val Leu Phe Ser Gln Leu  
 85 90 95  
 Val Glu Thr Ala Leu Leu Ala Leu Gly Tyr Ser His Ser Ser Ala Ala  
 100 105 110  
 Gln Ala Gln Gly Ile Ile Lys Leu Gly Arg Trp Asn Pro Leu Pro Leu  
 115 120 125  
 Ser Tyr Val Thr Asp Ala Pro Asp Ala Thr Val Ala Asp Met Leu Gln  
 130 135 140  
 Asp Val Tyr His Val Val Thr Leu Lys Ile Gln Leu Gln Ser Cys Ser  
 145 150 155 160  
 Lys Leu Glu Asp Leu Pro Ala Glu Gln Trp Asn His Ala Thr Val Arg  
 165 170 175  
 Asn Ala Leu Lys Glu Leu Leu Lys Glu Met Asn Gln Ser Thr Leu Ala  
 180 185 190  
 Lys Glu Cys Pro Leu Ser Gln Ser Met Ile Ser Ser Ile Val Asn Ser  
 195 200 205  
 Thr Tyr Tyr Ala Asn Val Ser Ala Thr Lys Cys Gln Glu Phe Gly Arg  
 210 215 220  
 Trp Tyr Lys Lys Tyr Lys Lys Ile Lys Val Glu Arg Val Glu Arg Glu  
 225 230 235 240  
 Asn Leu Ser Asp Tyr Cys Val Leu Gly Gln Arg Pro Met His Leu Pro  
 245 250 255  
 Asn Met Asn Gln Leu Ala Ser Leu Gly Lys Thr Asn Glu Gln Ser Pro  
 260 265 270  
 His Ser Gln Ile His His Ser Thr Pro Ile Arg Asn Gln Val Pro Ala  
 275 280 285

21031658.ST25.txt

Leu Gln Pro Ile Met Ser Pro Gly Leu Leu Ser Pro Gln Leu Ser Pro  
 290 295 300

Gln Leu Val Arg Gln Gln Ile Ala Met Ala His Leu Ile Asn Gln Gln  
 305 310 315 320

Ile Ala Val Ser Arg Leu Leu Ala His Gln His Pro Gln Ala Ile Asn  
 325 330 335

Gln Gln Phe Leu Asn His Pro Pro Ile Pro Arg Ala Val Lys Pro Glu  
 340 345 350

Pro Thr Asn Ser Ser Val Glu Val Ser Pro Asp Ile Tyr Gln Gln Val  
 355 360 365

Arg Asp Glu Leu Lys Arg Ala Ser Val Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg  
 370 375 380

Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys  
 385 390 400

Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg  
 405 410 415

Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile  
 420 425 430

Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val  
 435 440 445

Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys  
 450 455 460

Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn  
 465 470 475 480

Ile Asn Ile Thr Ala Ala Ile Tyr Asp Glu Ile Gln Gln Glu Met Lys  
 485 490 495

Arg Ala Lys Val Ser Gln Ala Leu Phe Ala Lys Val Ala Ala Asn Lys  
 500 505 510

Ser Gln Gly Trp Leu Cys Glu Leu Leu Arg Trp Lys Glu Asn Pro Ser  
 515 520 525

Pro Glu Asn Arg Thr Leu Trp Glu Asn Leu Cys Thr Ile Arg Arg Phe  
 530 535 540

Leu Asn Leu Pro Gln His Glu Arg Asp Val Ile Tyr Glu Glu Glu Ser  
 545 550 555 560

21031658.ST25.txt

Arg His His His Ser Glu Arg Met Gln His Val Val Gln Leu Pro Pro  
 565 570 575

Glu Pro Val Gln Val Leu His Arg Gln Gln Ser Gln Pro Ala Lys Glu  
 580 585 590

Ser Ser Pro Pro Arg Glu Glu Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro Thr Glu  
 595 600 605

Asp Ser Cys Ala Lys Lys Pro Arg Ser Arg Thr Lys Ile Ser Leu Glu  
 610 615 620

Ala Leu Gly Ile Leu Gln Ser Phe Ile His Asp Val Gly Leu Tyr Pro  
 625 630 635 640

Asp Gln Glu Ala Ile His Thr Leu Ser Ala Gln Leu Asp Leu Pro Lys  
 645 650 655

His Thr Ile Ile Lys Phe Phe Gln Asn Gln Arg Tyr His Val Lys His  
 660 665 670

His Gly Lys Leu Lys Glu His Leu Gly Ser Ala Val Asp Val Ala Glu  
 675 680 685

Tyr Lys Asp Glu Glu Leu Leu Thr Glu Ser Glu Glu Asn Asp Ser Glu  
 690 695 700

Glu Gly Ser Glu Glu Met Tyr Lys Val Glu Ala Glu Glu Glu Asn Ala  
 705 710 715 720

Asp Lys Ser Lys Ala Ala Pro Ala Glu Ile Asp Gln Arg  
 725 730

<210> 3  
 <211> 5318  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 3  
 gagagagaga gagagagact gagaaagtcg aactcgagct taggtaacca acaaacccaa 60  
 ttactaggct ttattgatac taaaaggaaa agttcccctc gtaaaatttc tctgagctta 120  
 ttagttattt aaatcagccc cagggttgga cgcgtgacgc cgaaggcacc ttctgtcggc 180  
 tcctggaggt gagcagccag cgtccctgcg cgcaccaca gccctcgct ccgtcctggg 240  
 cacttggggc gaaggcgggc gcagcgagcc gagaagtact gaactcctaa taccaccaat 300  
 tcttctaagt tcctggacat tgatccggag gaggattcgc agttcaacat caaggtcctc 360  
 gtgctgttta ttgcgacctg ccggtgggaa cttgtctcc gagtcggagc agcatggagc 420  
 ggcggagcga gagcccgtgt ctgcgggaca gccccgaccg gcggagcggc agcccggagc 480  
 tcaaggggccc tccccagtg aaggtggccc ggctggagca gaacggcagc cccatgggag 540

21031658.ST25.txt

```

cccgcgggag gcccaacggc gccgtggcca aggccgtggg aggtttgatg attcctgtct 600
tttgtgtcgt ggagcagttg gacggctctc ttgaatatga caacagagaa gaacacgccg 660
agtttgtcct ggtgcggaaa gatgtgcttt ttagccagct ggtggagact gcgctcctgg 720
ccctggggta ttctcacagc tctgcgccc aggcccaagg aataatcaag ctgggaaggt 780
ggaacctctt cccctcagt tatgtgacag atgcaccga cgcgacagt gccgacatgc 840
tacaagatgt ctatcatggt gtgacgttga aatccaatt acaaagttgt tcaaagttgg 900
aagacttgcc tgcggagcag tgaaccatg ccacagtccg caatgcctta aaggaactgc 960
tcaaagagat gaaccagagc acattagcca aagaatgcc tctctcccag agtatgattt 1020
catccattgt aaatagcaca tattatgcca atgtgtcagc aaccaagtgc caggagtgtg 1080
ggagatggta taaaaagtac aagaagatta aagtggaaag agtggaacga gaaaaccttt 1140
cagactattg tgttctgggc cagcgtccaa tgcatttacc aaatatgaac cagctggcat 1200
ccctggggaa aaccaacgaa cagtctctc acagccaaat tcaccacagt actccaatcc 1260
gaaaccaagt gcccgatta cagcccatca tgagccctgg tcttctttct cccagctta 1320
gtccacaact tgtaaggcaa caaatagcca tggcccatct gataaaccaa cagattgccg 1380
ttagccggct cctggctcac cagcatctc aagccatcaa ccagcagttc ctgaaccatc 1440
cacccatccc cagagcagtt aagccagagc caaccaactc tccgtggaa gtctctccag 1500
atatctacca gcaagtcaga gatgagctga agagggccag tgtgtcccaa gctgtctttg 1560
caagagtggc attcaaccgc acacagggat tgttgtctga gattctcgt aaggaagaag 1620
accctcggac agcctctcag tctctctag taaacctgag ggccatgcag aatttctca 1680
atctgccaga agtggagcga gatcgcattc accaggatga gagggagcgg agcatgaatc 1740
ccaatgtgag catggtctcc tcggcctcca gcagtcccag ctctctccga acccctcagg 1800
ccaaaacctc gacaccgaca acagacctcc ctattaaggt ggacggcggc aacatcaaca 1860
tcacagctgc catttatgac gagatccaac aggagatgaa aagggccaag gtgtctcaag 1920
ccctgtttgc caaagtggct gcaataaaaa gtcagggctg gctgtgtgaa ctgctccgct 1980
ggaaggagaa cccaagccca gaaaaccgca ccctctggga aaacctctgt accatccgtc 2040
gcttctgaa ccttccccag catgagaggg atgtcatcta tgaggaggag tcaaggcatc 2100
accacagcga acgcatgcaa cacgtggtcc agcttcccc tgagccggtg caggtacttc 2160
atagacagca gtctcagcca gcccaaggaga gtccccctcc cagagaagaa gcgcctcccc 2220
cacctcctcc gactgaagac agttgtgcca aaaagccccg gtctcgaca aagatctcct 2280
tagaagccct ggggatcctc caaagcttta ttcagatgt aggcctgtac ccagaccagg 2340
aagccatcca cactctttcg gctcagctgg atctcccaa acacaccatc atcaagttct 2400
tccagaacca gcggtaccac gtgaagcacc acgggaagct gaaagagcac ctgggctccg 2460
cggtgacgt ggctgaatat aaggacgagg agctgctgac cgagtcagag gagaacgaca 2520
gcgaggaagg ctccgaggag atgtacaaag tggaggctga ggaggaaaat gctgacaaaa 2580

```

21031658.ST25.txt

gcaaggcagc	acctgccgaa	attgaccaga	gataatgtga	acttctacta	ggcaaagcaa	2640
tacatcggtc	caaggatfff	ctgctttcat	ttcttataaa	gttttttggt	agtttgtttt	2700
ttgtttttgt	ttttgggttt	ttttggcttt	atftttgtct	ttttatgtct	gttttgtttt	2760
tcttaccctt	ttggacattt	ctttggttga	caggatacac	ctatagactg	aataagttca	2820
gtatttccga	atcagacatc	gccttggcaa	agacactaaa	gcgttacact	ttatcccgtc	2880
tctatgactg	gatcatagtc	attataatca	caggagactc	tgccttcatt	atccttgcac	2940
ttaacggaag	ttacatcagg	caagtaccag	gatgaaaaga	actatgaaat	aatgaagga	3000
agctacaagt	gtgtgtgtat	atgtatatgt	atatatctct	atatttacat	atatatatta	3060
aaattgcatg	ggacagagac	tttgcaatcc	gaaagaatag	actgtgaaat	gagttcttaa	3120
agaaaagact	tgtttatgta	ttaaaaaac	cacttcacag	tgagtcgctt	tggctttttg	3180
ataaactgcg	gcctgctctc	agggtggggt	gactatfttt	gaattcctat	ttattttttg	3240
tgtttgccc	tgatfttttt	tttttaattc	tatggcttcc	tatctggcag	cttaatgggt	3300
aatttttgag	gtatgtatft	aacaaaataa	acgacactgc	cgaaaaaaa	aaaagtgaag	3360
tgaaaaaat	cagggcacat	taaaatgata	caagtcaaat	aatctttaa	gacacaatgc	3420
acacttaaaa	tgactcaata	aatgacttg	ctacgttccg	ttattcaatt	tgtcattact	3480
gtagtgaaca	gatgcatttc	tgtggaattc	caaataagta	aaactgaaat	tcagtgcaga	3540
gaaaactttg	tccactagtg	caagtcttga	tcaaatgaca	ttttgacatt	ggacatatgg	3600
aattcatagt	atgagccaca	ttttgttgtg	aaatttattt	acctgcttgt	ggcttcaaat	3660
ctgaaaatta	ataagcctgc	tcgtttaaaa	gttgtttggt	gttgctggtt	ttttgtcttt	3720
ttgtttttta	ctagaaaata	gttcagtgta	atattaagtt	agaaaagaag	ttgctgcca	3780
gttaaagggg	ctcctctca	aataaatctc	catccttccc	tctcccaaaa	gacatttctg	3840
atfttctgctt	cactttgggc	ttcctcttct	tcgtacacat	tccatctacc	taatcaaaca	3900
ttttcagtcc	ctgatctctc	ctgtcccttt	tcttgggatg	acagccctaa	caagaactgt	3960
ttttgaaatc	ttgtgcagct	ccaggcaata	gagtatgtga	agcgatttca	gtagaatcac	4020
ttactcatcc	taaaagaaaa	cattatccca	gttacctaca	tcgcaattac	cttatgtaaa	4080
gcagaactaa	tgctgactgg	atgtttaatg	ggatgagcat	taaagctgca	atctactata	4140
gtactccaga	tctctttcgg	cttcttatga	gaaacaccag	aagcattact	ttccacttct	4200
acttacagta	attgcaagag	gagacctcac	attcaggact	ggcctagtga	acgtaatcca	4260
tgctttaaac	tggccattaa	acagtcccac	atggttggat	tttttttttt	tttttgagtt	4320
gtgctttcac	aaaaccttgt	caaagacctc	atgcaatatc	actttgaaag	ttattttctg	4380
tttactacac	aaacattgta	atataactgt	taatactatt	tatatatttg	aaaggataaa	4440
aaggtaggag	ttaaaaaaa	aacctctatg	tgtagatatt	aactcagaac	ttacaatata	4500
cagggagaag	acatgttga	atacaagcta	attctagctg	ctcagtaacc	tctggagttt	4560
ttaaagggac	atfttctgt	actftttcaa	ataatgatgt	ttaaaaatta	tcttgacata	4620

21031658.ST25.txt  
agcgtcatat acctttgcaa aaggatgggt gtttgcagtt agccctggcc ccatccttcc 4680  
tatttctgta gtatgctgca gctttaatca gaaagtccat ggttgctgct tcctgatctc 4740  
cgagttactc tttccaaatt gtcttcttac actgttgctg aaggtcactc tgtacacgta 4800  
atggaaactg attttgccaa gctcttacia ggtggttcat ctatcgatgg catccgcatt 4860  
tggatcttt tacacttcaa ccaaaaattt attaggtatt tttcaatgct aagtcttgcc 4920  
ttttattttt taatttctact gccaaagttg cagtggttct aagtgaatct gtgggcattt 4980  
tagcctgtgg tcttgccaga tctttgcaa ttacaatgca tatatgtcta tttattcaat 5040  
atctgtcata taatatctat ttggaagaag aaactttctc ttgtagtgcc tcttgacaaa 5100  
gcacaatttc cgccttttt tttttttgt gaaatgaaaa aaacaaattg tgttttattg 5160  
cggatcaac aatgtgaata aggattaaca tattgtaaat gttctttttt ccatgtaaat 5220  
caactatctt tgttatcact aagtgataat taatttttaa cttatgtgca ttgttaggct 5280  
gttagaattt tttggttgtt aaaataaacg cattcaat 5318

## 44

## CLAIMS

1. Method for determining whether a prognosis for colo-rectal cancer in a mammalian subject having or suspected of having colo-rectal cancer is  
5 poor, comprising the steps of:  
a) providing a sample from the subject;  
b) quantifying the amount of SATB2 protein present in said sample to yield a sample value;  
c) comparing the sample value obtained in step b) with a reference  
10 value; and, if said sample value is lower than said reference value,  
d) concluding that the prognosis for colo-rectal cancer in said subject is poor.
2. Method according to claim 1, wherein the poor prognosis in step d)  
15 corresponds to a likelihood of five-year survival of 65 % or lower.
3. Method according to claim 2, wherein the poor prognosis in step d) corresponds to a likelihood of five-year survival of 60 % or lower.
- 20 4. Method of treatment of colo-rectal cancer in a subject in need thereof, comprising  
a) providing a sample from the subject;  
b) quantifying the amount of SATB2 protein present in said sample to yield a sample value;  
25 c) comparing the sample value obtained in step b) with a reference value; and, if said sample value is lower than said reference value,  
d) treating said subject with a treatment regimen adapted to a poor prognosis of colo-rectal cancer.
- 30 5. Method according to claim 4, in which said treatment regimen is selected from chemotherapy, neo-adjuvant therapy and combinations thereof.
6. Method according to claim 5, in which said treatment regimen is neo-adjuvant therapy.

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

45

7. Method according to claim 6, in which said neo-adjuvant therapy is selected from i) radiation therapy only and ii) radiation therapy in combination with chemotherapy.

5           8. Method according to any preceding claim, wherein said colo-rectal cancer is node-negative.

9. Method according to any preceding claim, wherein said colo-rectal cancer is in Dukes' stage A or B.

10

10. Method according to any preceding claim, wherein said colo-rectal cancer is colo-rectal adenoma.

11. Method according to any one of claims 1-9, wherein said colo-rectal cancer is colo-rectal carcinoma.

15

12. Method according to any one of claims 1-7, wherein said colo-rectal cancer is metastazing.

13. Method according to any one of claims 1-7 and 12, wherein said colo-rectal cancer is in Dukes' stage C.

20

14. Method according to any preceding claim, wherein said subject is a human.

25

15. Method according to claim 14, wherein said subject is a woman.

16. Method according to any preceding claim, wherein said reference value is a predetermined value corresponding to the amount of SATB2 expression in a reference sample.

30

17. Method according to any preceding claim, wherein said reference value is a fraction score of 50 % SATB2 positive cells.

18. Method according to claim 17, wherein said reference value is a fraction score of 25 % SATB2 positive cells.

35

19. Method according to any one of claims 1-16, wherein said reference value is an SATB2 expression autoscore value of 70.

20. Method according to claim 19, wherein said reference value is an  
5 SATB2 expression autoscore value of 50.

21. Method according to any preceding claim, in which the sample is a body fluid sample.

10 22. Method according to claim 21, in which the body fluid is selected from the group consisting of blood, plasma, serum, cerebral fluid, urine, semen and exudate.

15 23. Method according to any one of claims 1-20, in which the sample is a stool sample.

24. Method according to any one of claims 1-20, in which the sample is a tissue sample.

20 25. Method according to claim 24, in which the tissue sample is a colorectal tissue sample.

26. Method according to any one of claims 1-20, in which the sample is a cytology sample.

25

27. Method according to any preceding claim, wherein the amino acid sequence of the SATB2 protein comprises a sequence selected from:

- i) SEQ ID NO:1; and
- ii) a sequence which is at least 85 % identical to SEQ ID NO:1.

30

28. Method according to any preceding claim, wherein the amino acid sequence of the SATB2 protein comprises a sequence selected from:

- i) SEQ ID NO:2; and
- ii) a sequence which is at least 85 % identical to SEQ ID NO:2.

35

29. Method according to any preceding claim, wherein step b) comprises:

b1) applying to the sample a quantifiable affinity ligand capable of selective interaction with the SATB2 protein to be quantified, said application being performed under conditions that enable binding of the affinity ligand to any SATB2 protein present in the sample;

5        b2) removing non-bound affinity ligand; and

b3) quantifying any affinity ligand remaining in association with the sample.

10        30. Method according to claim 29, wherein the quantifiable affinity ligand is selected from the group consisting of antibodies, fragments thereof and derivatives thereof.

15        31. Method according to claim 29, wherein the quantifiable affinity ligand is a protein ligand derived from a scaffold selected from the group consisting of staphylococcal protein A and domains thereof, lipocalins, ankyrin repeat domains, cellulose binding domains,  $\gamma$  crystallines, green fluorescent protein, human cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, protease inhibitors, PDZ domains, peptide aptamers, staphylococcal nuclease, tendamistats, fibronectin type III domain and zinc fingers.

20

32. Method according to claim 29, wherein the quantifiable affinity ligand is an oligonucleotide molecule.

25        33. Method according to claim 29, wherein the quantifiable affinity ligand comprises a label selected from the group consisting of fluorescent dyes and metals, chromophoric dyes, chemiluminescent compounds and bioluminescent proteins, enzymes, radioisotopes and particles.

30        34. Method according to any one of claims 29-33, in which said quantifiable affinity ligand is detected using a secondary affinity ligand capable of recognizing the quantifiable affinity ligand.

35        35. Method according to claim 34, in which said secondary affinity ligand capable of recognizing the quantifiable affinity ligand comprises a label selected from the group consisting of fluorescent dyes and metals, chromophoric dyes, chemiluminescent compounds and bioluminescent proteins, enzymes, radioisotopes and particles.

36. Kit for carrying out the method according to any preceding claim, which comprises

- 5 a) a quantifiable affinity ligand capable of selective interaction with an SATB2 protein; and  
b) reagents necessary for quantifying the amount of the affinity ligand.

10 37. Kit according to claim 36, in which the quantifiable affinity ligand is selected from the group consisting of antibodies, fragments thereof and derivatives thereof.

15 38. Kit according to claim 36, in which the quantifiable affinity ligand is a protein ligand derived from a scaffold selected from the group consisting of staphylococcal protein A and domains thereof, lipocalins, ankyrin repeat domains, cellulose binding domains,  $\gamma$  crystallines, green fluorescent protein, human cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, protease inhibitors, PDZ domains, peptide aptamers, staphylococcal nuclease, tendamistats, fibronectin type III domain and zinc fingers.

20 39. Kit according to claim 36, wherein the quantifiable affinity ligand is an oligonucleotide molecule.

25 40. Kit according to any one of claims 36-39, in which the detectable affinity ligand comprises a label selected from the group consisting of fluorescent dyes and metals, chromophoric dyes, chemiluminescent compounds and bioluminescent proteins, enzymes, radioisotopes and particles.

30 41. Kit according to any one of claims 36-39, in which said reagents necessary for quantifying the amount of the affinity ligand comprise a secondary affinity ligand capable of recognizing the quantifiable affinity ligand.

35 42. Kit according to claim 41, in which said secondary affinity ligand capable of recognizing the quantifiable affinity ligand comprises a label selected from the group consisting of fluorescent dyes or metals, chromophoric dyes, chemiluminescent compounds and bioluminescent proteins, enzymes, radioisotopes and particles.

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

49

43. Kit according to any one of claims 36-42, further comprising a reference sample for provision of the reference value.

5 44. Use of an SATB2 protein as a prognostic marker.

45. Use of an SATB2 protein as a prognostic marker for colo-rectal cancer.

10 46. Use of an SATB2 protein, or an antigenically active fragment thereof, in the manufacture of a prognostic agent for the prognosis of colo-rectal cancer.

15 47. Use according any one of claims 44-46, wherein the amino acid sequence of the SATB2 protein comprises a sequence selected from:

- i) SEQ ID NO:1; and
- ii) a sequence which is at least 85 % identical to SEQ ID NO:1.

20 48. Use according any one of claims 44-46, wherein the amino acid sequence of the SATB2 protein comprises a sequence selected from:

- i) SEQ ID NO:2; and
- ii) a sequence which is at least 85 % identical to SEQ ID NO:2.

25 49. Affinity ligand capable of selective interaction with an SATB2 protein, which is an antibody or a fragment or a derivative thereof.

50. Affinity ligand according to claim 49, which is obtainable by a process comprising a step of immunizing an animal with a protein whose amino acid sequence comprises the sequence SEQ ID NO:1.

30

51. Use of an affinity ligand according to any one of claims 49 and 50 as a prognostic agent.

35 52. Use of an affinity ligand according to any one of claims 49 and 50 for the prognosis of colo-rectal cancer.

53. Use of a an affinity ligand according to any one of claims 49 and 50 in the manufacture of a prognostic agent for the prognosis of colo-rectal cancer.

(57) Abstract: The invention provides new methods, means and uses in connection with detection, characterization and prognosis of colo-rectal cancer, via the identification of the SATB2 protein as a marker for this cancer type.

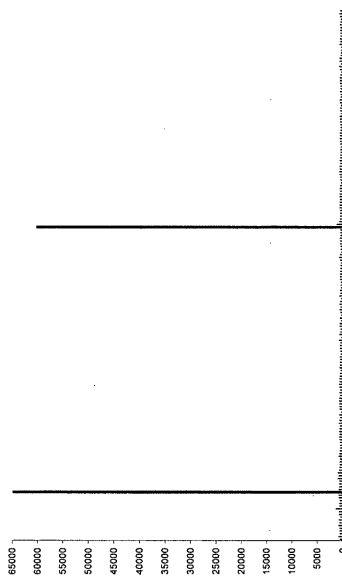


FIGURE 1

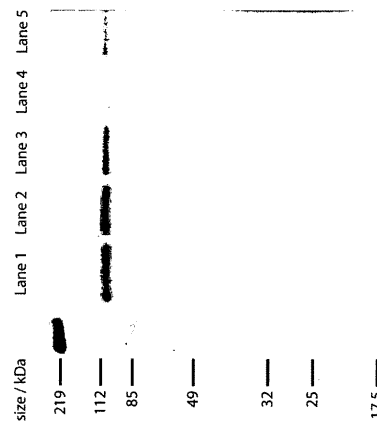


FIGURE 2

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

3/16

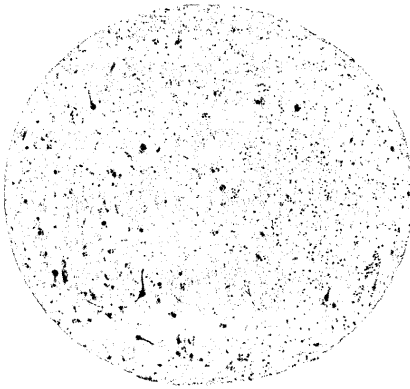
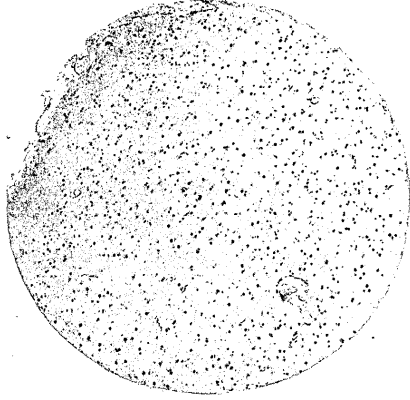


FIGURE 3A

4/16

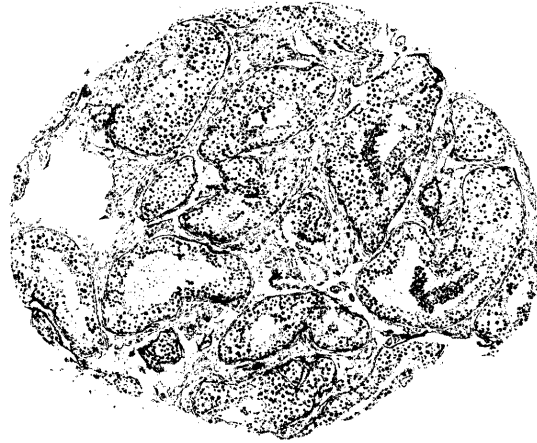


FIGURE 3B

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

5/16



FIGURE 3C

6/16

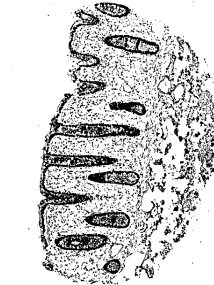


FIGURE 3D

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

7/16



FIGURE 3E

8/16



FIGURE 3F

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

WO 2007/140966

PCT/EP2007/004931

9/16

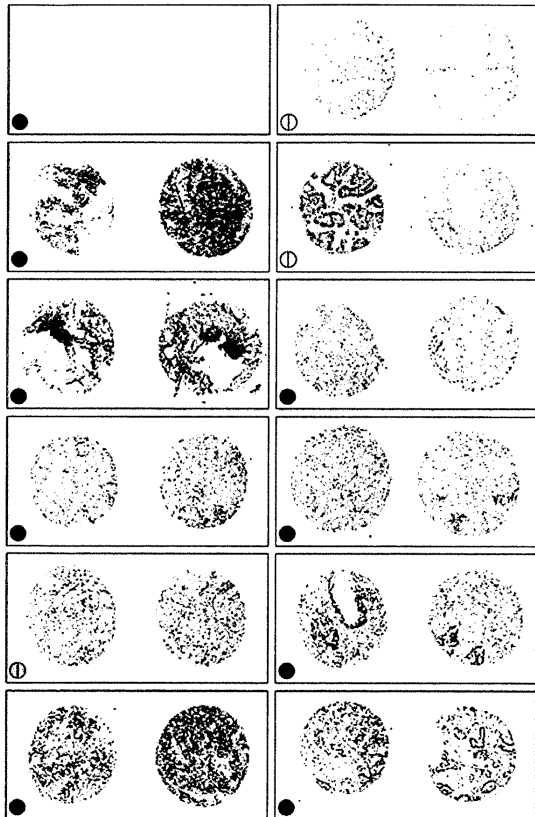


FIGURE 4A

10/16

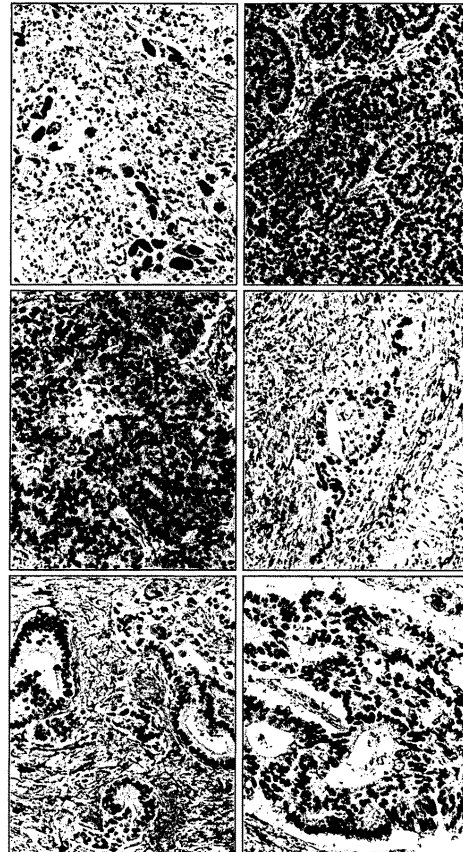


FIGURE 4B

WO 2007/140966

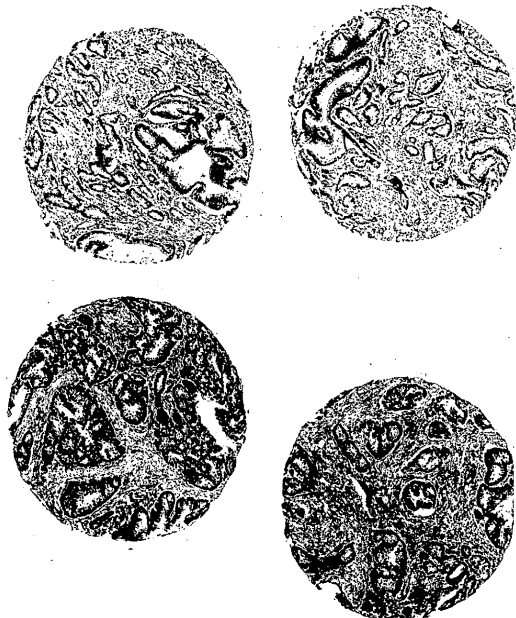
PCT/EP2007/004931

WO 2007/140966

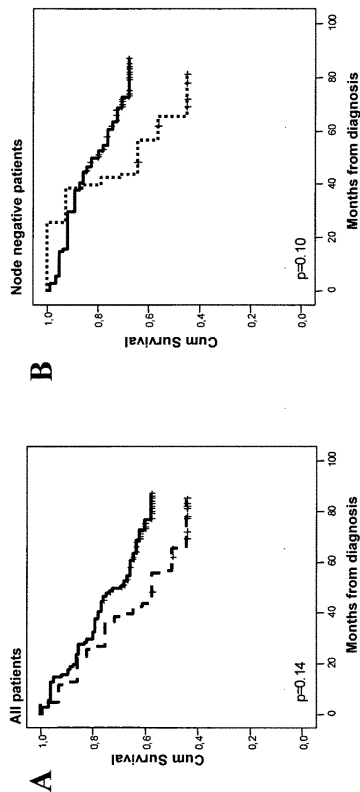
PCT/EP2007/004931

11/16

12/16



**FIGURE 5**



**FIGURES 6A & 6B**

WO 2007/140966

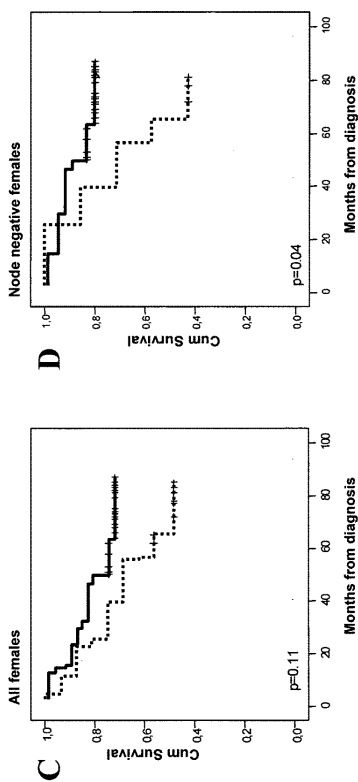
PCT/EP2007/004931

WO 2007/140966

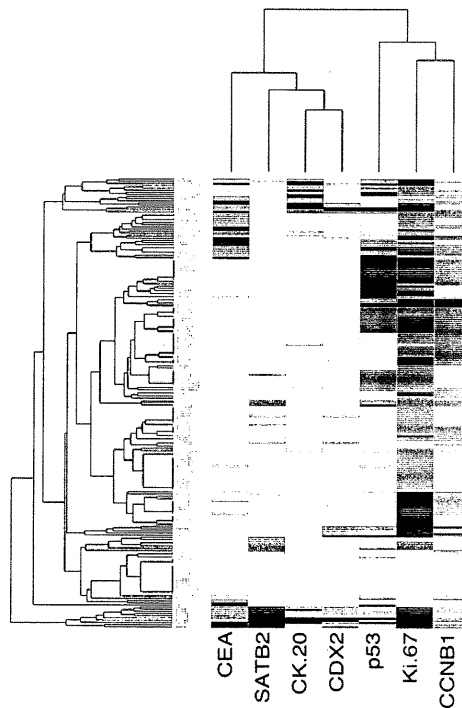
PCT/EP2007/004931

13/16

14/16



**FIGURES 6C & 6D**



**FIGURE 7**

	SATB2 Nuclear fraction				total
	0-1%	2-25%	26-75%	>75%	
0-1%	5	1	4	7	17
2-25%	3		5	12	20
26-75%	4	1	6	21	32
>75%	11	3	16	23	53
<b>total</b>	23	5	31	63	122

**FIGURE 8**

Satb2 vs CK20 in lymph nodes

Count	Satb2 nuclear fraction			Total
	0-1%	26-75%	>75%	
CK20 nuclear fraction 0	1			1
CK20 nuclear fraction 1			1	1
CK20 nuclear fraction 2	1	2	3	6
CK20 nuclear fraction 3	1	3	5	9
<b>Total</b>	3	5	9	17

**FIGURE 9**

专利名称(译)	蛋白质satb2作为结直肠癌标志物的用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012073260A</a>	公开(公告)日	2012-04-12
申请号	JP2011237699	申请日	2011-10-28
[标]申请(专利权)人(译)	阿特拉斯抗体有限公司		
申请(专利权)人(译)	阿特拉斯赌注人体的活化剂宝来获得		
[标]发明人	マティアスウーレン フレデリックポンテン		
发明人	マティアスウーレン フレデリックポンテン		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/536 C12N15/09		
CPC分类号	A61P35/00 G01N33/57419 G01N2333/4703		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.A G01N33/536.B C12N15/00.A C12N15/12 C12N15/63.Z C12Q1/686.Z C12Q1/6886.Z G01N33/574.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11		
代理人(译)	山田卓司 櫻井洋子		
优先权	2006114954 2006-06-02 EP 60/816613 2006-06-27 US		
其他公开文献	JP5301630B2 JP2012073260A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供SATB2转录因子蛋白，该蛋白可用于诊断和/或预测结直肠癌。提供了与通过鉴定SATB2蛋白作为结直肠癌类型的标志物来检测，表征和预测结直肠癌有关的新方法，手段和用途。患者中较低的SATB2表达水平与更具侵略性或高风险形式的结直肠癌之间存在相关性。[选择图]无

表 1: 正常組織内での SATB2 の発現パターン

組織タイプ	細胞タイプ	染色スコア
脳幹	皮質細胞	0
	線粒体細胞	測定不可
虫歯	線粒体	3
	リンパ球細胞	0
骨髄	骨髄芽エリトシス(poetic)細胞	0
胸腺	胸腺細胞	0
気管支	気管支上皮細胞	0
小腸	腸上皮細胞	0
	分子層細胞	0
	ブルキニエ細胞	0
大腸皮質	腸細胞	3
	非神経細胞	0
子宮頸部	腸細胞	0
	腸上皮細胞 (扁平上皮)	測定不可
結核	腸細胞	3
十二指腸	腸細胞	0
子宮内膜 1	子宮内膜間質細胞/ECM	0
	子宮筋層細胞/ECM	0
	線粒体	0
子宮内膜 2	子宮内膜間質細胞/ECM	0
	子宮筋層細胞/ECM	0
	線粒体	0
卵巣	腸細胞	2
腎臓	腸上皮細胞	0
プロピウス管	腸細胞	0
胆嚢	腸細胞	0
心臓	筋細胞	0
海馬	神経細胞	3
	非神経細胞	0
腎臓	糸球体細胞	0
	腎皮細胞	0
側線室	神経細胞	0
肝臓	非神経細胞	0
	線粒体	0
肺	肺細胞	0
	肺細胞	0
	マクロファージ	0
リンパ節	濾胞細胞(皮質)	0
	濾胞性細胞(副皮質)	2
鼻咽頭	腸上皮細胞	0
口腔粘膜	腸上皮細胞	0
脾臓	濾胞細胞	0
	脾臓間質細胞	0
脾臓	脾臓分子層	0
副甲状腺	腸細胞	0
前庭	腸細胞	0
	腸上皮細胞	0
前立腺	腸細胞	0