

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-519290

(P2012-519290A)

(43) 公表日 平成24年8月23日 (2012. 8. 23)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006. 01)	GO 1 N 33/574 A	2 GO 4 5
GO 1 N 33/48 (2006. 01)	GO 1 N 33/48 P	
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 Y	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2011-552357 (P2011-552357)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成22年3月2日 (2010. 3. 2)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成23年9月2日 (2011. 9. 2)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2010/001270		E AKTIENGESSELLSCHAF
(87) 国際公開番号	W02010/099923		T
(87) 国際公開日	平成22年9月10日 (2010. 9. 10)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(31) 優先権主張番号	09003092.5		グレンツァーヘルストラッセ124
(32) 優先日	平成21年3月4日 (2009. 3. 4)	(74) 代理人	100095832
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 細田 芳徳
		(72) 発明者	レスラー, マルクス
			ドイツ連邦共和国 ゲルメリング 821
			10 アイヒェンシュトラッセ 9アー
		(72) 発明者	マントバーニー-エンドル, リリアナ
			ドイツ連邦共和国 ヴァイルハイム 82
			362 ウルメンシュトラッセ 12
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺の扁平上皮癌のためのマーカーとしてのセルピンB13

(57) 【要約】

本発明は、扁平上皮癌 (=SCC) の評価を補助する方法に関する。本発明は、SCCのマーカーとしてのタンパク質セルピンB13の使用を開示する。さらに、本発明は、非小細胞肺癌 (=NSCLC) を有する患者由来の組織試料において肺癌を評価するため、およびSCCを、肺の腺癌または大細胞癌と識別するための方法に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

a) 試験試料中のセルピンB13を測定する工程、および
b) 工程(a)の測定結果を肺の扁平上皮癌の評価に使用する工程、ここで、セルピンB13の陽性測定結果は、肺の扁平上皮癌を示す、
を含む、肺の扁平上皮癌をインビトロで評価するための方法。

【請求項 2】

a) 試験試料中のセルピンB13を測定する工程、
b) 対照試料中のセルピンB13を測定する工程、ならびに
c) 工程(a)および(b)の測定結果を肺の扁平上皮癌の評価において比較する工程、ここで、対照試料中のレベルと比較したときの前記試験試料中のセルピンBのレベルの上昇は肺の扁平上皮癌を示す、
を含む、肺の扁平上皮癌をインビトロで評価するための方法。

10

【請求項 3】

a) 非小細胞肺癌細胞を含む試験試料中のセルピンB13を測定する工程、および
b) 工程(a)の測定結果を、他のNSCLCと比較する扁平上皮癌の鑑別診断に使用する工程、ここで、セルピンB13の陽性測定結果は肺の扁平上皮癌を示し、セルピンB13の陰性測定結果は他のNSCLCを示す、
を含む、他の非小細胞肺癌(NSCLC)と比較したときの肺の扁平上皮癌のインビトロでの鑑別診断のための方法。

20

【請求項 4】

前記試験試料が生検によって得られる組織片である、請求項1～3いずれか記載の方法。

【請求項 5】

前記試験試料が組織切片である、請求項4記載の方法。

【請求項 6】

前記試験試料が気管支肺胞洗浄液または細胞外上皮層液である、請求項1～3いずれか記載の方法。

【請求項 7】

試験試料を顕微鏡スライド上に載せる、請求項4～6いずれか記載の方法。

30

【請求項 8】

試験試料がホルマリン固定され、パラフィン包埋される、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

試験試料が、新生物性細胞を含むことが疑われる、または新生物性細胞を含むことがわかっている、請求項1、3～8いずれか記載の方法。

【請求項 10】

セルピンB13が免疫染色法によって測定される、請求項1～9いずれか記載の方法。

【請求項 11】

試験試料がセルピンB13を放出するように処理され、セルピンB13がイムノアッセイ手順によって測定される、請求項1～6いずれか記載の方法。

40

【請求項 12】

イムノアッセイ手順がELISAまたはウエスタンブロットから選択される、請求項11記載の方法。

【請求項 13】

肺の扁平上皮癌の評価におけるマーカーセルピンB13の使用。

【請求項 14】

事前に非小細胞肺癌を有すると分類された患者由来の組織試料において、肺の扁平上皮癌を肺の腺癌と識別するためのマーカーセルピンB13の使用。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、扁平上皮癌(=SCC)の評価における補助方法に関する。本発明には、SCCのマーカーとしてのタンパク質セルピンB13の使用が開示される。さらに、本発明は、非小細胞肺癌(=NSCLC)を有する患者由来の組織試料における肺癌の評価のための方法、およびSCCを腺癌または肺の大細胞癌から区別する方法に関する。

【0002】

検出および治療の進歩に関わらず、癌は主要な公衆衛生課題のままである。様々な種類の癌の中でも、LCは西洋で頻度の高い癌であり、中でも癌関連致死率の最も頻度の高い原因である。これは、米国において男性と女性の両方に最も一般的な癌関連死の原因である。これは、高齢者に優先的な疾患であり、加齢に伴い発病率は増加し、65歳より高齢の男性では100,000人当たり482人に達し、75歳でピークに達し、100,000人当たり502人になる。65歳の男性は、25歳の男性よりも50倍高い肺癌の発症のリスクを有し、45～64歳の男性よりも3～4倍高いリスクを有する。

10

【0003】

肺癌症例の男性における約90%および女性における80%は喫煙が原因である。肺癌のリスクは、喫煙の総年数に関連し、喫煙により、喫煙者は発癌物質および促進因子に曝される。また、加齢関連の細胞のDNA修復の欠損のために、高齢者でリスクが増加する。喫煙への最初の曝露から臨床的顕示まで、肺癌はおそらく15～20年の自然な進展を有する。

【0004】

LC腫瘍の大部分は、小細胞肺癌(SCLC)および非小細胞肺癌(NSCLC)に分類することができ、さらに3つの主要な組織学的腫瘍型、すなわち扁平上皮癌、腺癌および大細胞癌に分類される。

20

【0005】

SCLCは全ての肺癌症例の約20～25%を占める。SCLCは攻撃性神経内分泌型のLCであり、早期病期で検出されたとしても非常に不良な予後を有する。SCLCはまれに切除による治療処置に従順である。疾患が進行する速度のために、SCLCは、より複雑なTNM病期分類システムよりも2つの病期、即ち、限定疾患および広範疾患を用いて一般的に分類される(以下参照)。

【0006】

約75～80%のLC症例は扁平上皮癌(癌=CA)、腺CA(小葉CA、乳頭CA、肺胞腫瘍、固形腫瘍のサブクラス、および混合型サブタイプを含む)、ならびに大細胞癌(巨大細胞腫瘍、明細胞CA、扁平上皮腺CA、および未分化CAのサブクラスを含む)を含むNSCLCのクラスにグループ化される。

30

【0007】

NSCLCは、後期病期で検出される場合、非常に乏しい予後を有する。癌の病期分類は、程度、進行、細胞型および腫瘍の等級の点における疾患の分類である。これは癌患者をグループ化するので、予後および治療の選択について一般化が行われ得る。

【0008】

今日、TNMシステムは、癌の解剖学的程度に基づいて最も広く使用される分類システムである。これは国際的に受け入れられた統一病期分類システムを表す。3つの基本変数:T(原発腫瘍の程度)、N(局所リンパ節の状態)、およびM(遠隔転移の有無)がある。TNM基準はUICC(国際対がん協会)により公開されている(Sobin, L.H. and Fleming, I.D., TNM Classification of Malignant Tumors, Fifth Edition (1997), pp. 1803-1804)。

40

【0009】

原発腫瘍の外科切除は早期病期NSCLCのための治療選択として広く受け入れられている。NSCLCが進行するにつれて、より具体的に、病期IIIIa(T3N1M0、T1N2M0、T2N2M0、T3N2M0)からIIIIb(T4N0M0、T4N1M0、T4N2M0)への移行につれて、医師のアプローチの有意なシフトが早められる。しかし、癌がより早期病期(Ia～IIIIa;好ましくは病期T3N1M0まで)に検出される場合、5年の生存率は35%～80%で変化する。病期Ia((T1N0M0);小腫瘍サイズ、

50

転移なし)での検出は、80%までの5年の生存を有する最良の予後を明白に有する。

【0010】

NSCLCの病期IIIb~IVの管理に手術が使用されるのは、あるとしてもまれである。病期IVは、遠隔転移、即ち、肺および局部リンパ節を超える疾患の拡散に相当する。後期病期IIIおよびIVにおける5年の生存率は1%~15%未満に落ちる。

【0011】

特に重要なことは、NSCLCの早期診断により予後がかなり良好に解釈されることである。病期Ia(T1N0M0)、Ib(T2N0M0)、IIa(T1N1M0)、IIb、(T3N0M0)、およびIIIa(T3N1M0)ほどの早期に診断された患者は、適切に治療された場合に、診断後に80%までの5年の生存可能性を有する。これは、遠隔転移が既に存在すると診断された患者についての1%未満の5年の生存率と比較される必要がある。

10

【0012】

LCが早期に診断されるほど、長期間生存の機会は良好になる。

【0013】

上述のように、病理学者は、肺癌を4つの主要な組織学的パターン、すなわち扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌(要するに=NSCLC)、および小細胞癌に分類する。しかしながら、しばしばこれらのパターンの2つ以上が同時に起こり、組織学的分類が担当の病理学者の技術に極端に依存することに注意することが非常に重要である。

【0014】

より再現性の高い種々の型の肺癌の分類を補助し得るさらなる手段が早急に必要である。特に、NSCLC腫瘍の群のSCCを示すマーカーは、かかる診断を補助するための重要なツールである。

20

【0015】

驚くべきことに、マーカーセルピンB13は肺癌の評価に優れたツールを示すことが見出された。マーカーセルピンB13を使用することで、例えば扁平上皮癌を他の組織学的型の肺癌、例えば腺癌から区別することが可能である。

【発明の概要】

【0016】

発明の概要

一態様において、本発明は、(a) 試験試料中のセルピンB13を測定する工程、および(b) 肺の扁平上皮癌(SCC)の評価において工程(a)の測定結果を使用する工程を含み、セルピンB13についての陽性の測定結果が肺の扁平上皮癌を示す、肺の扁平上皮癌をインビトロで評価する方法に関する。

30

【0017】

さらに、(a) 試験試料中のセルピンB 13を測定する工程、(b) 対照試料中のセルピンB 13を測定する工程、ならびに(c) 肺の扁平上皮癌の評価において工程(a)および(b)の測定結果を比較する工程を含み、対照試料中のレベルと比較して前記試験試料中のセルピンBのレベルの上昇は、肺の扁平上皮癌を示す、肺の扁平上皮癌をインビトロで評価する方法が記載される。

【0018】

本発明はさらに、(a) 非小細胞肺癌細胞を含む試験試料中のセルピンB 13を測定する工程、ならびに(b) 他のNSCLCと比較した扁平上皮癌の鑑別診断において工程(a)の測定結果を使用する工程を含み、セルピンB 13についての陽性の測定結果が肺の扁平上皮癌を示し、セルピンB 13についての陰性の測定結果が他のNSCLCを示す、他の非小細胞肺癌(NSCLC)と比較した肺の扁平上皮癌のインビトロにおける鑑別診断のための方法を開示する。

40

【0019】

本発明はまた、肺の扁平上皮癌の評価における、および肺の扁平上皮癌を他の型のNSCLC、例えば肺の腺癌から区別するためのマーカーセルピンB 13の使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0020】

50

【図1】図1は、SCCを有する10名の患者および腺癌を有する10名の患者のそれぞれのウェスタンブロットの結果（セルピンB13の免疫染色）を示す。明らかに、セルピンB13のシグナル強度は、SCCと分類された10名すべての患者の腫瘍組織溶解物において増大したが、腺癌では、セルピンB13タンパク質は1名の患者において検出可能であるにすぎないか、または全く存在しなかった。

【図2】図2は、SCCを有すると分類された肺癌患者由来の組織切片を、肺の腺癌を有すると分類された肺癌患者由来のものと比較したものである。3名の異なるSCC患者（パネルA）および3名の異なる腺癌患者（パネルB）のそれぞれの組織切片の結果を示す。強いセルピンB13特異的染色がすべてのSCC試料において観察されるが、腺癌切片では可視的な染色はない。正常肺組織（例えば、SCCの腫瘍組織に隣接）はセルピンB13について陰性である。

10

【発明を実施するための形態】

【0021】

発明の詳細な説明

好ましい態様において、本発明は、(a) 試験試料中のセルピンB 13を測定する工程、および(b) 肺の扁平上皮癌の評価において工程(a)の測定結果を使用する工程を含み、セルピンB 13についての陽性の結果が肺の扁平上皮癌を示す、肺の扁平上皮癌をインビトロで評価する方法に関する。

【0022】

用語「測定する」または「測定」は、試料中のセルピンB 13の定性的または定量的測定に関する。好ましい態様において、測定は、定性的または半定量的測定であり、即ち、セルピンB 13が存在するかどうか決定されるか、またはセルピンB 13の濃度がカットオフ値より上にあるか下にあるかが決定される。当業者に認識されるように、はい(存在)またはいいえ(非存在)アッセイで、アッセイ感度は、通常、カットオフ値に適合するように設定される。例えばカットオフ値は、健常個体の群の試験から決定され得る。好ましくは、カットオフは90%の特異性をもたらすように設定され、また好ましくはカットオフは95%の特異性をもたらすように設定され、あるいはまた好ましくはカットオフは98%の特異性をもたらすように設定される。カットオフ値より上に値があることは、例えば肺の扁平上皮癌の存在を示し得る。測定値がカットオフよりも上にある場合、測定結果は陽性と分類される。

20

30

【0023】

セルピンB 13タンパク質（プロテイナーゼインヒビター13、HaCaT UV抑制性セルピン、hurpin、headpin；セルピンB 13；SWISS-PROT受託番号Q9UIV8）は、44.3kDaタンパク質であり、391アミノ酸からなり、配列番号:1を特徴とする。選択的スプライシングにより生成される1つのアイソフォーム(38.4kDa、339aa)は、文献に報告されている(配列番号:2)。セルピン13は、セルピン（セリンプロテアーゼインヒビター）の広く分布するタンパク質スーパーファミリーに属する。一般に、セルピンは、コンホメーション変化を使用して、標的酵素、主にセリンプロテアーゼを阻害するプロテアーゼインヒビターである。特に、セルピンB 13は、カテプシンKおよびLのそれぞれを阻害することが報告された(Welss, T. et al., Biochemistry 42 (2003) 7381-7389; Jayakumar, A. et al., Arch. Biochem . Biophys. 409 (2003) 367-374)。

40

【0024】

セルピン13は、初めにHaCaT細胞中のUV抑制性遺伝子として発見された(Abts, H.F. et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 29-39)。独立して、他の著者により、セルピン13は「headpin」と記載され、対応する遺伝子が染色体18q上にマッピングされた(Spring, P. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 264 (1999) 299-304)。この研究において、ノザンブロット解析および相対的RT-PCRにより、セルピンB 13 mRNA発現は、口腔の正常扁平上皮と比較して扁平上皮癌で下方制御されることが明らかにされた。

【0025】

RT-PCR解析に基づく初期の研究により、乾癬に苦しむ患者の罹患皮膚において、罹患し

50

ていない皮膚と比べてセルピンB 13の過剰発現が明らかにされた(Abts, H.F. et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 29-39)。これらの所見は、最近の多くの研究において、ウエスタンブロットおよびIHCによりタンパク質レベルで確認された。正常皮膚において、セルピンB 13は主に基底層に発現していた(Moussali, H. et al., Exp. Dermatol. 14 (2005) 420-428)。乾癬皮膚においてはセルピンB 13の分布および発現レベルは異なっており、顆粒層で最大の発現が見られる。同じ研究において、著者は、紅斑性狼瘡および悪性皮膚腫瘍においてセルピンB 13の過剰発現を報告している。さらに、該著者は、彼らの所見をRT-PCRで確認した。セルピンB 13の発現とその標的プロテアーゼCat Lとの相関が別の研究で解析された(Bylaite, M. et al., Exp. Dermatol. 15 (2006) 110-118)。著者はさらに、セルピンB 13発現は、正常組織と比較して皮膚の悪性腫瘍において促進され再分布されることを示しているが、セルピンB 13とCat Lの発現に直接的な相関はなかった。

10

【0026】

最近、Walz, M.ら(Exp. Dermatol. 16 (2007) 715-723)は、内因性マウスセルピンB 13に加えてヒトセルピンB 13を発現するトランスジェニックマウスを作製した。これらのトランスジェニックマウスは、異常な腹部柔毛、および化学的発癌物質後に高い皮膚癌の罹病性を特徴とした。これらの所見により、皮膚疾患の発症におけるセルピンB 13の重要な役割が示唆された。

【0027】

当業者に明らかなように、本発明は配列番号:1の全長セルピンB 13タンパク質に限定されることを意図しない。セルピンB 13の生理学的断片または人工断片、セルピンB 13の二次的修飾物ならびにセルピンB 13の対立遺伝子バリエーションも本発明に包含される。ポリペプチドのバリエーションは、同じ遺伝子によってコードされるが、例えば選択的mRNAまたはブレ mRNAのプロセッシングの結果として等電点(=PI)または分子量(=MW)あるいは両方で異なってもよい。バリエーションのアミノ酸配列は、対応するマーカー配列に95%以上同一である。好ましくは、人工断片は、合成により生成されるかまたは組み換え技術により生成されたペプチドを含み、配列番号:1に開示される配列に由来する場合少なくとも6、7、8、9または10個の連続したアミノ酸からなる診断対象の少なくとも1つのエピトープを含む。かかる断片は、抗体の作製に、または免疫アッセイの標準として有利に使用され得る。

20

【0028】

本明細書で使用する場合、以下の用語のそれぞれは、このセクションにおける意味と関連した意味を有する。

30

【0029】

冠詞「a」および「an」は、1つまたは1つより多く(即ち少なくとも1つ)の冠詞の文法的目的語を示すために本明細書で使用される。例として、「マーカー(a marker)」は、1つのマーカーまたは1つより多くのマーカーを意味する。用語「少なくとも」は、任意に1つ以上のさらなる目的語が存在し得ることを示すために使用される。

【0030】

表現「1つ以上」は、1~50、好ましくは1~20、また好ましくは2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、または15を示す。

【0031】

用語「マーカー」または「生化学マーカー」は、本明細書で使用される場合、患者の試験試料を分析するための標的として使用される分子のことをいう。一態様において、かかる分子標的の例は、タンパク質またはポリペプチドである。本発明でマーカーとして使用されるタンパク質またはポリペプチドは、前記タンパク質の天然バリエーションおよび前記タンパク質または前記バリエーションの断片、特に免疫学的に検出可能な断片を含むことが想定される。免疫学的に検出可能な断片は、好ましくは前記マーカーポリペプチドの少なくとも6、7、8、10、12、15または20個の連続アミノ酸を含む。当業者は、細胞によって放出されるタンパク質または細胞外マトリックスに存在するタンパク質が、例えば炎症中に損傷され得、かかる断片に分解または切断され得ることを理解しよう。特定のマーカーは不活性化形態で合成され、次にタンパク質分解によって活性化され得る。当業者に認識され

40

50

るように、タンパク質またはその断片は複合体の一部としても存在し得る。また、かかる複合体は、本発明の意味において、マーカーとして使用され得る。付加的にまたは代替的に、マーカーポリペプチドまたはそのバリエーションは、翻訳後修飾を有し得る。好ましい翻訳後修飾は、グリコシル化、アシル化および/またはリン酸化である。

【0032】

好ましくは、マーカーセルピンB 13は、特異的結合剤の使用によって試料から特異的に測定される。

【0033】

特異的結合剤は、例えばセルピンB 13のレセプター、セルピンB 13に結合するレクチン、またはセルピンB 13に対する抗体である。好ましくは、セルピンB 13のいずれのアイソフォームにも結合する特異的結合剤が使用される。特異的結合剤は、その対応する標的分子に対して少なくとも 10^7 l/molの親和性を有する。特異的結合剤は、好ましくはその標的分子に対して 10^8 l/molあるいはまた好ましくは 10^9 l/molの親和性を有する。当業者に認識されるように、用語特異的は試料中に存在する他の生体分子がセルピンB 13に特異的な結合剤に有意に結合しないことを示すために使用される。好ましくは、標的分子以外の生体分子に結合するレベルは、標的分子に対する親和性の最大わずか10%以下、わずか5%以下、わずか2%以下、またはわずか1%以下それぞれの結合親和性を生じる。好ましい特異的結合剤は、親和性および特異性についての上記最小基準の両方を満たす。

10

【0034】

特異的結合剤は、好ましくはセルピンB 13と反応性である抗体である。用語抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、かかる抗体の抗原結合断片、単鎖抗体ならびに抗体の結合ドメインを含む遺伝子構築物のことをいう。

20

【0035】

特異的結合剤の上記基準を有する任意の抗体断片が使用され得る。抗体は、当該技術の水準の方法によって、例えばTijssen(Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays, 11, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam、本全体、特に43-78頁)に記載されるように作製される。また、当業者は、抗体の特異的単離に使用され得る免疫吸着剤に基づく方法を知っている。これらの手段によって、ポリクローナル抗体の質および従って免疫アッセイにおけるそれらの性能が高められ得る(Tijssen, P., 上掲、108-115頁)。

30

【0036】

本発明に開示される成果のためには、ウサギにおいて惹起されたポリクローナル抗体が使用され得る。しかし、明らかに、異なる種、例えばラットまたはモルモット由来のポリクローナル抗体、およびモノクローナル抗体も使用され得る。モノクローナル抗体は任意の必要量で一定した性質で生成され得るために、これらは臨床ルーチンのアッセイの開発における理想的なツールになる。本発明の方法におけるセルピンB13に対するモノクローナル抗体の作製およびその使用のそれぞれは、さらに他の好ましい態様を表す。

【0037】

本明細書で使用される場合、用語「試験試料」は、インビトロ評価のために個体から得られた生物学的試料のことをいう。

40

【0038】

用語「肺の扁平上皮癌の評価」は、本発明の方法が(単独で、または他のマーカーもしくは変数、例えばUICC(上記参照)に記載される基準設定と組み合わせて)、医師がSCCの有無を確立または確認することを補助することを示すために使用される。

【0039】

当業者が理解するように、任意のかかる評価はインビトロにおいてなされる。患者試料は後で廃棄される。患者試料は、本発明のインビトロ診断方法だけに使用され、患者試料の物質は、患者の体に戻されない。典型的に、試料は、細胞を含む試料である。

【0040】

免疫組織化学の分野において、特定の環境条件、例えば相対湿度における色素ロットの

50

違いおよび変動性は、本発明の方法を使用して、異なる時点で得られる結果に影響を及ぼし得ることが当業者に理解されよう。本発明の方法の特定の態様において、試薬およびロット同士の変動性は、試験試料細胞の染色に同じ試薬を使用することおよび適切な対照試料細胞を使用することで制御される。

【0041】

好ましい態様において、本発明は、単一試験試料においてセルピンB 13を測定する工程、およびSCCの評価において該測定結果を使用する工程を含む、インビトロでSCCを評価する方法に関する。いくつかの状況において、患者から得られた試験試料に加えて対照試料を準備することも有用であり得る。かかる対照試料は、陰性対照試料、陽性対照試料またはこれらの型の対照の1つ以上を含む混合対照であり得る。好ましくは、陰性対照試料は、正常肺組織、肺の小細胞癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の大細胞癌などの種々のサブタイプの肺癌、またはそれらの種々の組合せを含む。好ましくは、陽性対照試料は、肺の扁平上皮癌と分類された組織を含む。

10

【0042】

好ましい態様において、本発明は、(a) 試験試料中のセルピンB 13を測定する工程、(b) 陰性対照試料中のセルピンB 13を測定する工程、ならびに肺の扁平上皮癌の評価において工程(a)および(b)の測定結果を比較する工程を含み、陰性対照試料中のレベルと比較して前記試験試料中のセルピンBのレベルの上昇が肺の扁平上皮癌を示す、肺の扁平上皮癌をインビトロで評価する方法を開示する。

20

【0043】

先に示されるように、特定の設定において肺の扁平上皮癌を含む試料は、陽性対照として使用され得、好ましくは、調査対象の試料と並行してアッセイされ得る。かかる設定において、陽性対照試料中のセルピンB 13についての陽性結果は、試験手順が技術水準において行なわれたことを示す。これらの条件試験試料下でのセルピンB 13についての試験試料の陽性染色は、既存の悪性がSCCであることを示す。

【0044】

本発明の発明者らは、驚くべきことに、マーカータンパク質セルピンB 13が肺の扁平上皮癌と強い関連性を示すことを実証し得た。種々の型の肺癌、特にSCCの分類の不確定性を考慮すると、セルピンB13についての染色は、NSCLCを有する患者の評価ならびに該患者のSCCおよび他の「非SCC」肺癌への分類において、中心的な基準の1つとなり得るであろう。

30

【0045】

特定の臨床的（疾患）実体の評価の理想的なシナリオは、単一の事象またはプロセスがそれぞれの疾患例えばほとんどの場合において感染性疾患を引き起こす状況である。全ての他の症例において、正確な診断は、特に疾患の病因が、LCについて当てはまるように十分に理解されていない場合に非常に困難であり得る。当業者が理解するように、所定の多要因疾患、例えばLCについて100%特異性と同時に100%感度を有する生化学マーカーはない。むしろ、生化学マーカー、例えばCYFRA 21-1、CEA、NSE、proGRPまたは本明細書に示されるセルピンB 13が、特定の可能性または予測値で、例えば疾患の存在、非存在または重症度を評価するために使用され得る。従って、日常業務の臨床診断では、一般的に様々な臨床症状および生物学的マーカーは、基礎にある疾患の評価において共に考慮される。

40

【0046】

当業者は、肺癌を小細胞肺癌および非小細胞肺癌の二つの主要なカテゴリーに容易に分類し得る。しかしながら、特に最初にNSCLCを有すると見出された患者について腫瘍サブタイプをさらに細かく分類することは困難である。上述のように、NSCLCは、3つの主要な疾患亜群、扁平上皮癌、腺CAおよび大細胞癌を含むと理解されよう。扁平上皮癌を全ての他の型のNSCLC（すなわちSCCでないNSCLC）から区別するのに有用な診断手段が本発明に開示される。

【0047】

さらなる態様において、本発明は、(a) 非小細胞肺癌細胞を含む試験試料においてセル

50

ピンB 13を測定する工程、および(b) 他のNSCLCと比較した扁平上皮癌の鑑別診断において工程(a)の測定結果を使用する工程を含み、セルピンB 13についての陽性測定結果が肺の扁平上皮癌を示し、セルピンB 13についての陰性測定結果が他の型のNSCLCを示す、他の型のNSCLCと比較した扁平上皮癌のインピトロにおける鑑別診断のための方法を開示する。

【0048】

本発明の方法において、試験試料または患者試料は、好ましくは細胞、例えば組織試料を含む試料である。

【0049】

好ましくは、試験試料は、生体組織検査または手術により得られた組織の一部である。かかる試験試料が組織切片であることも好ましい。

【0050】

代替的に、細胞は、気管支肺胞洗浄液を得ることにより肺由来であり得るか、上皮層(lining)液(細胞を含む)を回収するための適切なデバイスにより吸引され得るか、または唾液から入手され得る。好ましい態様において、本発明および本明細書に開示される種々の方法は、従って、気管支肺胞洗浄液または上皮層液由来である細胞を含む試験試料に関する。

【0051】

細胞を含む試験試料は、種々の経路の解析に供され得る。好ましい一態様において、セルピンB 13はインサイチュで、すなわち試験試料の細胞または組織中で測定され、別の好ましい態様において、試験試料の細胞は可溶化され得、セルピンB13は細胞または組織の溶解物中で測定され得る。

【0052】

セルピンB 13のインサイチュでの測定のためには、調査対象の細胞を含む試験試料が顕微鏡スライドにマウントされることが好ましい。一態様において、かかる試料は、それぞれ、ホルムアルデヒドで固定されず、封入されない、例えばパラフィンに封入されない試料、例えば新鮮な組織試料であるかまたは新鮮な凍結組織試料であることが当業者に分かっている試料であり得る。

【0053】

しかしながら、臨床的日常業務では、細胞を含む試料は、標準化された固定および/または包埋手順に供されることが好ましい。好ましい様式では、本発明による方法は、ホルマリン固定され、パラフィン包埋された試験試料に対して行なわれる。当業者には、事前に固定され、包埋された試料は、少なくとも包埋物質を除去するために前処理されなければならないことが明らかであろう。さらに必要とされる場合は、免疫組織化学の技術分野において、例えば、免疫学的に検出可能なエピトープを回復させるために、使用され得る種々の方法があやうくなる(at stake)。かかる方法は、当業者に、集散的に抗原回復法として公知である。

【0054】

本発明による方法は、肺の新生物性細胞を含む可能性がある試験試料または肺の新生物性細胞を含むことが疑われる試験試料を調べる必要がある場合に、確実に使用されるべきである。好ましい態様において、本発明は、新生物性細胞を含むことが疑われる試験試料で実施される。

【0055】

セルピンB13がインサイチュ(細胞上または細胞内部、組織切片内など)で測定される場合はいつでも、かかる測定に使用される方法は、好ましくは、免疫組織化学の任意の適切な手順である。好ましい態様において、セルピンB13は、免疫染色法によって測定される。

【0056】

癌診断は、疾患の初期診断およびその後の治療前、治療中または治療後の疾患の経過のモニタリングは両方とも、患者から取り出された細胞または組織試料の組織学的検査によ

10

20

30

40

50

って従来通りに確認される。決定は、しばしば、適当な患者治療過程を選択するための根拠を形成するため、臨床病理医は、かかる試料が良性であるか悪性であるかを正確に決定し得る必要があり、悪性であると思われる腫瘍試料の浸潤性(aggressiveness)を分類し得る必要がある。同様に、病理医は、癌が増殖した程度または特に治療の結果、最も特別には化学療法剤もしくは生物製剤での治療の結果として寛解になった程度を検出し得る必要がある。

【 0 0 5 7 】

組織学的検査は、伝統的に、試料の形態学的特徴を光学顕微鏡下で容易に観察することが可能な組織染色手順を含む。病理医は、染色試料の検査後、典型的に、腫瘍試料が悪性であるかどうかの定性的決定を行なう。しかしながら、腫瘍の浸潤性は、しばしば、タンパク質の発現または抑制およびタンパク質活性化などの、試料の形態構造によって反映されることもあり、反映されないこともある腫瘍内の細胞の生化学の結果であるため、腫瘍の浸潤性を単に試料の組織学的検査によって確認することは困難である。したがって、腫瘍試料内の細胞の生化学を評価できることは重要である。さらに、腫瘍に関連する遺伝子またはタンパク質の両方をそれぞれ観察および定量できることは望ましい。

10

【 0 0 5 8 】

本発明の方法の実施において、セルピンB13は、特異的試薬、最も好ましくは、それ自体が検出可能に標識された抗体を用いて、または非標識セルピンB13特異的抗体および検出可能に標識され、セルピンB13特異的抗体を認識する二次抗体を用いて検出され得る。染色された細胞または組織試料は、通常、顕微鏡下で当業者の病理医によって評価される。

20

【 0 0 5 9 】

本発明の方法の好ましい態様では、セルピンB13と組織または細胞試料を、染色されたセルピンB13が対比染色された組織または細胞試料と、より容易に識別され得るように識別的に染色するために二成分免疫組織化学的染色系が使用される。免疫組織化学的染色後、次いで、好ましくはコンピュータ支援画像解析システムによって作成された組織または細胞試料の光学画像は光学顕微鏡下で拡大され、1対の画像に分離される。分離された画像は、1対の光学的フィルターを用いて増強され、該フィルターは、一方が染色に対応する最大吸収を有し、他方が対比染色に対応する最大吸収を有し、それにより、2つの染色間に最適な識別が提供される。当該技術分野で公知の自動(コンピュータ支援)画像解析システムは、試料の視覚的検査を増強し得る。代表的なシステムでは、細胞または組織試料は、特定の生物学的マーカーに特異的な検出可能に標識された試薬に曝露され、次いで、電荷結合素子(CCD)またはテレビカメラなどのカメラから細胞の拡大画像が画像を受信したコンピュータによって処理される。かかるシステムは、試料中のセルピンB13のレベルを検出および測定するために使用され得る。この方法論により、組織学的敵に同定された癌細胞において、癌のより正確な診断および遺伝子発現のより良好な特徴付けが提供される。

30

【 0 0 6 0 】

組織試料の定量的免疫組織化学的画像解析のための例示的な手順の説明は、一般的にWO 01/51924およびWO01/51928に見られ得、これらはともに、参照によりその全体が本明細書に援用される。一例として、定量的画像解析は、Becton Dickinson Company、Mountain View、Califから入手可能なCell Ana溶解Systems Model 200において行なわれ得る。本発明に包含される定量的画像解析は、限定されないが、ChromaVision Medical Systems (San Juan Capistrano, Calif.)などの他の供給元のシステムで行なってもよい。

40

【 0 0 6 1 】

特定の態様において、本発明の方法は、以下のものなどの画像解析システムを用いて実施される。上記の免疫組織化学的染色後、染色された試料の顕微鏡画像をデジタル化し、デジタル化された画像の各画素(ピクセル)の光強度の値を、染色された細胞成分(核など)の割合に対応する光学密度の値に変換することにより、発現細胞の割合の定量測定が行なわれ得る。より具体的には、コンピュータ処理された画像解析は、デジタルグレイス

50

ケール画像を用いて特定の染色を有する細胞の量を測定するために使用され得る。グレイスケール画像は、試験下で特定の標的に結合し、それにより、標的の光学的増幅および可視化を可能にする色原体などの光学的増強因子の量を表す。

【0062】

第1の工程において、細胞内の任意の発現された標的タンパク質は、標的タンパク質に特異的な検出可能に標識された一次抗体、あるいは、非標識一次抗体および一次抗体に特異的な検出可能に標識された二次抗体を添加することにより同定される。抗体は試料とともに、これらの抗原が存在する場合は複合体が形成される時間インキュベートされる。次いで、複合体は、標識を直接検出すること、または、検出可能な標識が酵素である場合は、切片を色原体などの化合物とともに適切な条件下でインキュベートすることのいずれかによって可視化される。一例として、一次抗体は、後で色原体DABの使用を伴うペルオキシダーゼで標識され得る。第2工程では、組織は、限定されないがエチルグリーンなどの別の光学的増強因子で対比染色される。ペルオキシダーゼおよびエチルグリーンを使用する染色技術は例示であるが、他の染色および光学的増強因子も適当である。例えば、他の色原体は、ペルオキシダーゼ、例えば限定されないが、赤色に発色する3-アミノ-9-エチルカルバゾール（AEC）、および4-クロロ-1-ナフトールとともに使用され得る。また、一次抗体を標識するために使用され得る他の酵素は本発明に包含され、限定されないが、アルカリホスファターゼが挙げられる。アルカリホスファターゼとともに使用され得る色原体の例としては、限定されないが、ファーストレッド、ファーストグリーン、および5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート/ニトロブルーテトラゾリウム（BCIP/NBT）が挙げられる。また、蛍光色素の使用は本発明の方法に包含される。蛍光色素の非限定的な例はフルオレセイン（フルオレセインイソチオシアネートまたはFITC）およびローダミンである。

10

20

【0063】

さらに、エチルグリーンの使用は対比染色の例示であるが、他の対比染色を本発明の方法に使用してもよい。例えば、さらなる対比染色の非限定的なリストとしては、ヘマトキシリン、ファーストレッド、メチルグリーンが挙げられる。対比染色は、2つの別々の波長でフィルタリングが達成され得るように達成され得るスペクトル分離に基づいた特定の染色のために選択される。例えば、エチルグリーンは、以下により詳細に記載するように、DAB沈殿物からの良好なスペクトル分離を提供する。良好なスペクトル分離を提供する染色/対比染色ペアの他の例としては、限定されないが、ファーストレッドとヘマトキシリン、AECとヘマトキシリン、およびFITCとテキサスレッドが挙げられる。当業者には、染色および対比染色のこのリストは単なる例示であり、したがって、本発明を限定する機能を果たさないことが認識されよう。

30

【0064】

上記のように、セルピンB13はまた、細胞を可溶化または別の方法で処理してセルピンB13を放出させた試験試料から測定され得る。好ましい態様において、試験試料は、セルピンB13を放出するように処理され、セルピンB13は、イムノアッセイ手順によって測定される。セルピンB13が可溶化試料中で測定され得る好ましいイムノアッセイ法は、酵素免疫測定法（ELISA）、化学発光に基づくイムノアッセイ（例えば、Roche製Elecsys（登録商標））またはウエスタンブロットである。

40

【0065】

肺の扁平上皮癌の評価におけるマーカーセルピンB13の使用は、本発明によるさらなる好ましい態様を表す。

【0066】

また、非小細胞肺癌を有すると事前に分類された患者由来の組織試料において、肺の扁平上皮癌を他の型の肺の非小細胞癌と識別するためにマーカーセルピンB13を使用することが好ましい。

【0067】

以下の実施例、配列表および図面は、本発明の理解を補助するために提供し、本発明の

50

真の範囲は添付の特許請求の範囲に示される。示した手順において、本発明の精神を逸脱することなく変形が行なわれ得ることは理解されよう。

【0068】

配列表の記載

配列番号：1は、セルピンB13タンパク質（44.3kDa；391アミノ酸；SWISS-PROT Acc.No.：Q9UIV8）のアミノ酸配列を示す。

配列番号：2は、選択的スプライシングによって生成されたセルピンB13タンパク質アイソフォーム（38.4kDa、339アミノ酸）のアミノ酸配列を示す。

配列番号：3は、フォワードプライマー-LC5for-EcoRIである（EcoRIクローニング部位、リボソーム結合部位および、配列番号：5に示すN末端ペプチド伸長部の特徴）。 10

配列番号：4は、リバースプライマー-LC5rev-HindIIIである。

配列番号：5は、N末端ペプチド伸長部である。

【実施例】

【0069】

実施例1

セルピンB13に対する抗体の作製

免疫検出アッセイ、例えばウエスタンブロッティングおよびIHCにおける抗体のさらなる使用のため、セルピンB13に対するポリクローナル抗体を作製する。

【0070】

a) 大腸菌における組換えタンパク質発現： 20

セルピンB13に対する抗体を作製するため、大腸菌において組換え抗原を生成させる。したがって、セルピンB13コード領域は、German Resource Center for Genome Research（RZPD、Berlin、Germany）から得られる完全長cDNAクローンDKFZp686E1318Q2から、フォワードプライマー-LC5for-EcoRI、

5' ATGCGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACATTGAAGCCGTGATTCACTTGGCGCCGTCAGCACTC（配列番号：3）（EcoRI-部位および開始コドンに下線）、およびリバースプライマー-LC5rev-HindIII、

5' GCATAAGCTTTCATTAAAGGAGAAGAAAATCTGCCGAAGAAG（配列番号：4）（HindIII-部位に下線）

を用いてPCR増幅される。 30

【0071】

フォワードプライマーは（EcoRIクローニング部位およびリボソーム結合部位に加えて）セルピンB13ポリペプチドにインフレームで導入されたN末端MRGSHHHHHHIEGR（配列番号：5）ペプチド伸長部をコードするオリゴヌクレオチドを特徴とする。EcoRI/HindIII消化PCR断片を、対応するpQE-30（Qiagen、Hilden、Germany）ベクター断片にライゲートし、続いて、これで大腸菌XL1-blue有能細胞を形質転換する。配列解析後、pQEベクターシリーズのIPTG誘導T5プロモーター下での発現のために、製造業者の使用説明書に従ってプラスミドで大腸菌BL21有能細胞を形質転換する。

【0072】

MRGSHHHHHHIEGR-セルピンB13融合タンパク質の精製のため、1lの一晩誘導細菌培養物を遠心分離によってペレット化し、細胞ペレットを100mMリン酸ナトリウムバッファー、pH8.0、7M塩酸グアニジウム、5mMイミダゾール、20mMチオグリセロール中への再懸濁によって溶解させる。不溶性物質を遠心分離によってペレット化し、上清みをNi-ニトリロ三酢酸（Ni-NTA）金属-アフィニティークロマトグラフィーに適用する。カラムを数床容量の溶解バッファーで洗浄した後、a) 100mMリン酸ナトリウムバッファー、pH8.0、10mM Tris-HCl、pH8.0、8M尿素、20mMチオグリセロール；b) 100mMリン酸ナトリウムバッファー、pH8.0、0.5%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、20mMチオグリセロール；およびc) 100mMリン酸ナトリウムバッファー、pH8.0、0.1%SDS、20mMチオグリセロールで洗浄する。最後に、結合した抗原を、100mMリン酸ナトリウムバッファー、pH5.0、0.1%SDS、20mMチオグリセロールを用いて、酸性条件下で溶出し、同じバッファー中に4℃で保存する。 40

【 0 0 7 3 】

b) ポリクローナル抗体の作製：

免疫化：

免疫化のため、新鮮なタンパク質溶液（100 μ g/ml タンパク質セルピンB13）と完全フロイントアジュバントの1：1の比のエマルジョンを調製する。各ウサギを、1mlのこのエマルジョンで1、7、14および30、60および90日目に免疫化する。血液を抜き取り、得られた抗セルピンB13血清を、実施例2および3に記載のさらなる実験に使用する。

【 0 0 7 4 】

実施例2

実施例1に記載のポリクローナル抗体を用いたヒト肺癌組織中のセルピンB13の検出のためのウエスタンブロッティング

組織の調製：

0.8～1.2gの凍結組織を小片に切断し、ミキサーボールミルの冷却した粉碎用ジャーに移し、液体窒素によって完全に凍結させる。組織をボールミル内で粉碎し、10倍容量（w/v）の溶解バッファー（40mMクエン酸Na、5mM MgCl₂、1%Genapol X-080、0.02%アジ化Na、Complete（登録商標）EDTA無含有[Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Cat. No. 1 873 580]）中に溶解し、続いて、Wheaton（登録商標）ガラスホモジナイザー（20 x ルースフィッティング、20 x タイトフィッティング）内でホモジナイズする。ホモジネートを遠心分離（5,000 x gで10分）に供し、上清みを別のバイアルに移し、再度、遠心分離（20,000 x gで15分）に供する。得られた上清みは可溶性タンパク質を含み、さらなる解析に使用される。

【 0 0 7 5 】

SDS-PAGEおよびウエスタンブロッティングは、Invitrogen、Karlsruhe、Germanyの試薬および装置を用いて行なう。試験した各組織試料について、15 μ gの組織溶解物を還元性NuPAGE（登録商標）（Invitrogen）SDS試料バッファー中で希釈し、95℃で10分間加熱する。試料を、MES移動バッファー系中の4～12%NuPAGE（登録商標）ゲル（Tris-グリシン）上で移動させる。ゲル分離タンパク質混合物を、Invitrogen XCell II™ Blot Module（Invitrogen）およびNuPAGE（登録商標）転移バッファー系を用いてニトロセスローズ膜上にブロットさせる。PBS/0.05%Tween-20中で膜を3回洗浄し、Roti（登録商標）-Blockブロックバッファー（A151.1；Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany）で2時間ブロックする。一次抗体、ポリクローナルウサギ抗セルピンB13血清（実施例2に記載の作製）を、Roti（登録商標）-Blockブロックバッファー中で1：30,000に希釈し、膜とともに1時間インキュベートする。PBS/0.05%Tween-20中で膜を6回洗浄する。特異的に結合したウサギ一次抗体を、0.5 x Roti（登録商標）-Blockブロックバッファー中で10mU/mlに希釈したPODコンジュゲートポリクローナルヒツジ抗ウサギIgG 抗体で標識する。1時間のインキュベーション後、PBS/0.05%Tween-20中で膜を6回洗浄する。結合したPODコンジュゲート抗ウサギ抗体の検出のため、膜を、Lumi-Light^{PLUS}ウエスタンブロッティング基質（Order-No. 2015196、Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany）とともにインキュベートし、オートラジオグラフィフィルムに露光する。

【 0 0 7 6 】

SCCを有する10名の患者および腺癌を有する10名の患者のそれぞれを、WBで解析した（図1）。明らかに、セルピンB13のシグナル強度は、10名すべての患者の腫瘍組織溶解物において増大したが、腺癌では、セルピンB13 発現は、あったとしても1名の患者において検出可能であるにすぎなかった。したがって、腫瘍組織におけるセルピンB13のSCC特異的過剰発現は、ウエスタンブロッティング解析によって明白に示される。

【 0 0 7 7 】

実施例3

実施例1に記載のポリクローナル抗体を用いたヒト肺癌組織におけるセルピンB13の検出のための免疫組織化学（IHC）解析

パラフィン包埋組織を2 μ m連続切片に切断し、キシレン中で脱パラフィン化し（3 x 5

10

20

30

40

50

分)、一連の段階的エタノールの後、脱イオン水およびPBS(1×2分)での2回の洗浄工程によって再水和した。Retrivit pH4.0(Innogenex)を用いて抗原回復を97~100で20分間行なった。スライドを20分間冷却し、PBS(2×1分)で濯いだ。内因性ペルオキシダーゼ活性を、3%H₂O₂含有PBS中での5分間のインキュベーションによってブロックし、次いで、スライドをPBSで2回、続いてTBS+Tween 20(LabVision 1666789)で1回3分間濯いだ。ウマ血清1%含有PBS(Horse-Blocking Serum、Vectastain ABCキット、Elite Universal、Vector PK6200)を用いて、免疫グロブリン非特異的結合のブロックを室温で20分間行なった。Biotin Blocking System(Dako X0590)により、製造業者の使用説明書に従って内因性ビオチンをブロックした。セルピンB13特異的染色のため、切片をAntibody-Diluent(Dako S2022)中で0.5 µg/mlに希釈したポリクローナル抗体とともに4で一晩インキュベートした。スライドをTBS+Tween 20(LabVision 1666789)(3×2分)で洗浄し、次いで、ビオチン化二次抗体(5mlのPBS+1%ウマ血清中1滴)(Vectastain ABCキット、Elite Universal、Vector PK6200)とともに室温で30分間インキュベートした。TBS+Tween 20(3×2分)で洗浄後、切片をABC試薬(5mlのPBS中1滴の試薬A+1滴の試薬B)とともに室温で30分間インキュベートした。スライドをTBS+Tween 20(2×2分)で洗浄し、最後に、ジアミノベンジジン色原体溶液(DAB plus、Dako K3467)と5分間反応させ、蒸留水で濯いだ後、ヘマトキシリンで対比染色し、マウントした。ウサギIgG画分(Dako X0903)を陰性対照として使用した。

10

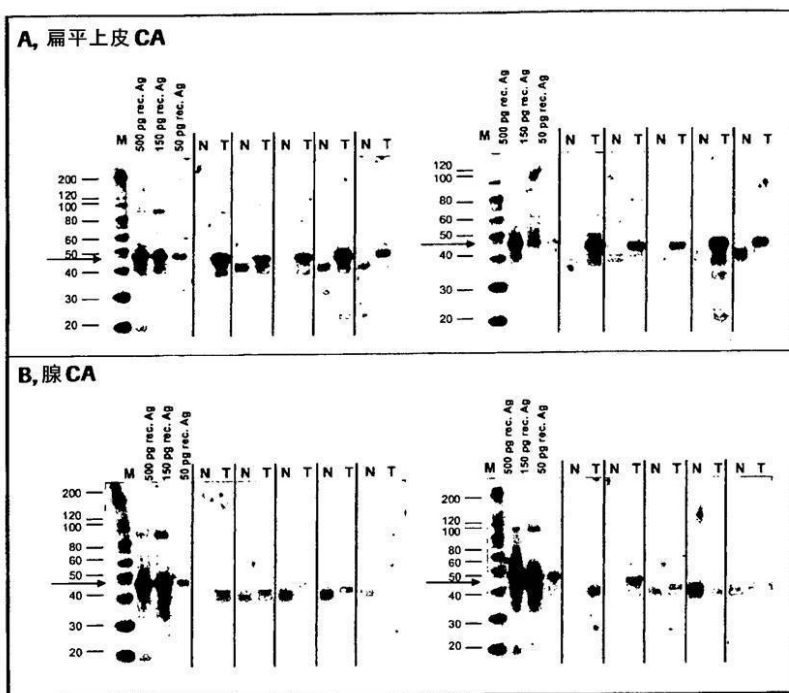
【0078】

SCC由来の組織切片を腺癌由来のものと比較した。例示的には、図2は、3名の異なるSCC患者(パネルA)および3名の腺癌患者(パネルB)のそれぞれの切片の結果を示す。セルピンB13特異的染色はすべてのSCC試料において観察されるが、腺癌切片では染色はない。したがって、SCC腫瘍組織におけるセルピンB13の特異的発現はIHC解析によって明白に確認される。

20

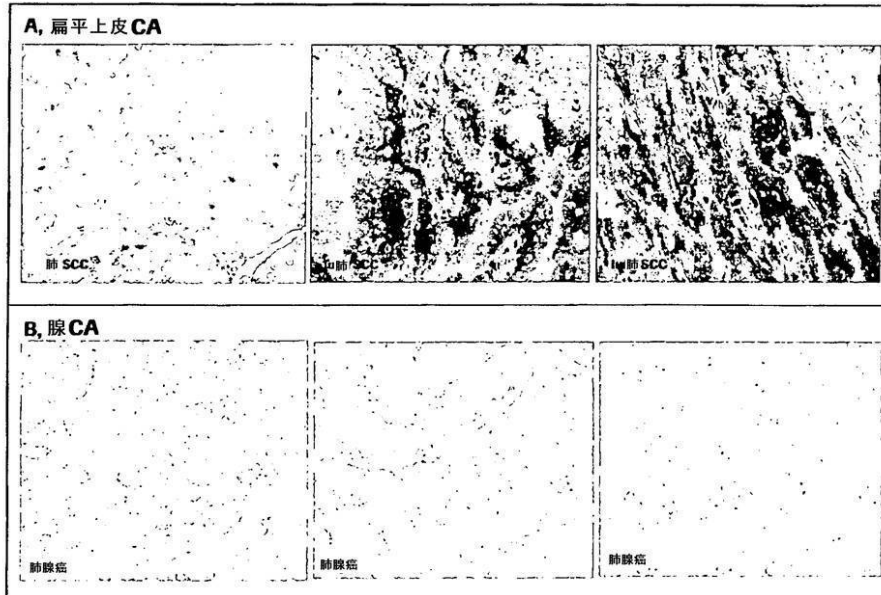
【図1】

Fig. 1



【 図 2 】

Fig. 2



【 配 列 表 】

20125192900000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/001270

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/574
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/015613 A (US SECRETARY OF HEALTH AND HU [US]; GENZYME CORP [US]; UNIV JOHNS HOP) 27 February 2003 (2003-02-27) claims 1,17 ----- -/-	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 May 2010

Date of mailing of the international search report

01/06/2010

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wiesner, Martina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/001270

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SMITH SHIRLEY L ET AL: "Maspin - the most commonly-expressed gene of the 18q21.3 serpin cluster in lung cancer - is strongly expressed in preneoplastic bronchial lesions." ONCOGENE 27 NOV 2003, vol. 22, no. 54, 27 November 2003 (2003-11-27), pages 8677-8687, XP002524838 ISSN: 0950-9232 page 8678, right-hand column, paragraph 3; table 1 page 8683, right-hand column, line 6 - line 7 page 8685	1-14
A	WO 2008/151110 A (UNIV NORTH CAROLINA [US]; UNIV UTAH RES FOUND [US]; HAYES DAVID N [US]) 11 December 2008 (2008-12-11) claims 1-5	1-14
A	BADOLA S ET AL: "Correlation of serpin-protease expression by comparative analysis of real-time PCR profiling data" GENOMICS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, US, vol. 88, no. 2, 1 August 2006 (2006-08-01), pages 173-184, XP024929504 ISSN: 0888-7543 [retrieved on 2006-08-01] page 182	1-14
A	BYLAITE M ET AL: "Expression of cathepsin L and its inhibitor hurpin in inflammatory and neoplastic skin diseases." EXPERIMENTAL DERMATOLOGY FEB 2006, vol. 15, no. 2, February 2006 (2006-02), pages 110-118, XP002524839 ISSN: 0906-6705 page 111, right-hand column, paragraph 2 - paragraph 5	1-14
A	MOUSSALI H ET AL: "Expression of hurpin, a serine proteinase inhibitor, in normal and pathological skin: overexpression and redistribution in psoriasis and cutaneous carcinomas" EXPERIMENTAL DERMATOLOGY, vol. 14, 2005, pages 420-428, XP008105694 page 421, right-hand column, paragraph 2 - page 422, left-hand column, paragraph 1	1-14
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/001270

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ASKEW D J ET AL: "Comparative genomic analysis of the clade B serpin cluster at human chromosome 18q21: amplification within the mouse squamous cell carcinoma antigen gene locus" GENOMICS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, US, vol. 84, no. 1, 1 July 2004 (2004-07-01), pages 176-184, XP004519115 ISSN: 0888-7543 the whole document	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2010/001270

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/001270

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03015613	A	27-02-2003	AT 449187 T AU 2002355963 A1 CA 2456334 A1 EP 1453977 A2 JP 2005503145 T	15-12-2009 03-03-2003 27-02-2003 08-09-2004 03-02-2005
WO 2008151110	A	11-12-2008	NONE	

フロントページの続き

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

(72)発明者 タツケ, ミヒアエル

ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 8 0 6 8 9 ガイゼンフェルダー シュトラーセ 7

Fターム(参考) 2G045 AA26 BB01 BB24 CB01 DA36 FB03

专利名称(译)	Serpine B 13作为肺鳞状细胞癌的标志物		
公开(公告)号	JP2012519290A	公开(公告)日	2012-08-23
申请号	JP2011552357	申请日	2010-03-02
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	レスラーマルクス マントバーニエンドルリリアナ タツケミヒアエル		
发明人	レスラー,マルクス マントバーニ-エンドル,リリアナ タツケ,ミヒアエル		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/57423 G01N2333/8121		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/48.P G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/BB01 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03		
优先权	2009003092 2009-03-04 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种辅助评估鳞状细胞癌 (= SCC) 的方法。本发明公开了蛋白质serpin B13作为SCC标记物的用途。此外, 本发明涉及评估来自患有非小细胞肺癌 (= NSCLC) 的患者的组织样品中的肺癌以及用于区分SCC与肺腺癌或肺的大细胞癌的方法。

