

(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2006-503589

(P2006-503589A)

(43) 公表日 平成18年2月2日(2006.2.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	2G045
C12Q 1/06 (2006.01)	C12Q 1/06	4B024
GO1N 33/48 (2006.01)	GO1N 33/48 M	4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/48 P	
GO1N 33/566 (2006.01)	GO1N 33/53 D	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-501536 (P2005-501536)
 (86) (22) 出願日 平成15年10月21日 (2003.10.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年3月1日 (2005.3.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/050738
 (87) 国際公開番号 W02004/038418
 (87) 国際公開日 平成16年5月6日 (2004.5.6)
 (31) 優先権主張番号 02024030.5
 (32) 優先日 平成14年10月28日 (2002.10.28)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 03100584.6
 (32) 優先日 平成15年3月7日 (2003.3.7)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 504341793
 エムティーエム ラボラトリーズ アクチ
 エンゲゼルシャフト
 ドイツ国 69120 ハイデルベルク,
 イム ノイエンハイマー フェルト 5
 83
 (71) 出願人 505076016
 ダコーサイトメーション デンマーク エ
 ーエス
 デンマーク国 ディーコー-2600 グ
 ローストロップ, プロダクションスヴァ
 イ 42
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 形成異常の改善された診断方法

(57) 【要約】

本発明は、INK4a 遺伝子産物および細胞増殖についての少なくとも1つのマーカーの同時検出に基づいた形成異常の改善された診断のための方法に関する。特に本発明は、それぞれの細胞の増殖特性を特徴付けるのに適したマーカーの検出によって、INK4a 遺伝子産物を過剰発現する形成異常細胞を、形成異常なしにINK4a 遺伝子産物を過剰発現する細胞から識別する方法を提供する。増殖特性の特徴付けは、活性な細胞増殖に特徴的なマーカーもしくはマーカーのセットおよび/または遅延したかもしくは中断した細胞増殖に特徴的なマーカーもしくはマーカーのセットの検出を包含し得る。従って、本明細書に提示された方法は、組織学的かつ細胞学的な試料における形成異常の特異的な診断を可能にする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物学的サンプル内で、INK4a 遺伝子産物を過剰発現する形成異常細胞を、INK4a 遺伝子産物を検出可能なレベルで発現する他の細胞から識別するための方法であって、該方法は、少なくとも1つの単一の細胞内での少なくとも2つのマーカー分子の同時発現を、細胞学的試験手順または組織学的試験手順で決定する工程を包含し、ここで、少なくとも1つのマーカー分子は、INK4a 遺伝子によってコードされる発現産物であって、かつ、少なくとも1つのさらなるマーカー分子は、細胞増殖マーカーであって、ここで、少なくとも1つのINK4a 遺伝子産物の過剰発現および該単一の細胞内での検出可能なレベルでの活性な細胞増殖に対する少なくとも1つのマーカーの発現は、該細胞の形成異常状態の指標であって、ここで、該単一の細胞内における少なくとも1つのINK4a 遺伝子産物の過剰発現、および老化、細胞末期分化、アポトーシスまたは細胞周期停止についての少なくとも1つのマーカーの検出可能なレベルでの発現は、細胞の非形成異常状態の指標である、方法。

10

【請求項 2】

2つ以上の細胞増殖マーカーのセットが検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

少なくとも1つのINK4a 遺伝子産物が、13kDaと19kDaとの間の分子量を有する、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

少なくとも1つのINK4a 遺伝子産物が、p16^{INK4a} および p14ARF を含む群から選択される、請求項 1 ~ 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

少なくとも1つの細胞増殖マーカーが、細胞増殖の維持に必要な増殖マーカー、DNA複製に関係する増殖マーカー、進行中の複製フォークのメンバーであるかもしくは進行中の複製フォークのメンバーをコードする増殖マーカー、老化マーカー、細胞周期停止マーカーおよびアポトーシスマーカーを含む群から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞増殖の維持に必要な遺伝子産物が、Ki67分子、Ki-S5分子およびKi-S2分子を含む群から選択される分子である、請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記DNA複製に関係する遺伝子産物が、ヘリカーゼもしくはそのサブユニット、細胞分裂サイクル(cdc)分子、ホスファターゼ分子およびキナーゼ分子を含む群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ヘリカーゼまたはそのサブユニットが、MCM2、MCM3、MCM4、MCM5、MCM6、MCM7 およびHELD1を含む群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記cdc分子、キナーゼおよびホスファターゼが、CDC6、CDC7、プロテインキナーゼ、Dbf4、CDC14プロテインホスファターゼ、CDC45 およびMCM10を含む群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 10】

進行中の複製フォークに関係する前記分子が、PCNA およびPOLDを含む群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 11】

前記遺伝子産物が、ポリペプチドまたは核酸分子である、請求項 1 ~ 10 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 12】

50

少なくとも1つのさらなるマーカー分子が診断または予後の評価の改善のためにさらに検出される、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

前記さらなるマーカー分子が少なくとも1つのさらなる増殖マーカー分子である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記さらなるマーカー分子が、老化マーカー、アポトーシスマーカー、細胞周期停止マーカー、細胞の末期分化に対するマーカー、ウイルス感染に対するマーカー、ウイルス活性に対するマーカー、細胞周期調節タンパク質、細胞増殖の維持に必要な遺伝子産物、DNA複製に関係する遺伝子産物、進行中の複製フォークのメンバーである遺伝子産物を含む群から選択される、請求項12または請求項13に記載の方法。 10

【請求項15】

DAPI、キナクリン、クロモマイシン、アザン、アクリジン-オレンジ、ヘマトキシリン、エオシン、スダン赤、トルイジン青およびチオニンからなる群から選択される少なくとも1つの色素を使用するさらなる細胞学的な染色手順、または、PAP染色、ギムザ染色、ヘマトキシリン-エオシン染色、ワンギーソン染色、シッフ染色、金属沈殿物による染色、ターンブル青染色および金属シアン化物による染色を含む群から選択される染色方法が適用される、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

前記形成異常細胞が癌性病変または前癌性病変の細胞である、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。 20

【請求項17】

前記形成異常細胞が乳頭腫ウイルスと関連する形成異常の細胞である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記乳頭腫ウイルスが、HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV56、HPV58、HPV59、HPV66およびHPV68を含む群から選択される危険性の高いヒト乳頭腫ウイルスである、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記病変が、肛門性器道の病変、気道の病変ならびに皮膚およびその付属器の病変を含む群から選択される、請求項16～18のいずれか1項に記載の方法。 30

【請求項20】

前記病変が、子宮頸の病変、膣の病変、外陰の病変、陰茎の病変、肛門の病変、直腸の病変、気管支の病変、肺の病変、腹腔の病変、鼻咽頭腔の病変、口腔の病変または皮膚の病変を含む群から選択される、請求項17または請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記生物学的サンプルが、肛門性器道、気道または皮膚およびその付属体に由来する細胞を含有するサンプルである、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

前記細胞が、子宮頸、膣、外陰、陰茎、肛門、直腸、気管支、肺、鼻咽頭腔、口腔または皮膚に由来する細胞である、請求項21に記載の方法。 40

【請求項23】

前記生物学的サンプルが、細胞学的調製物または組織学的調製物である、請求項1～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】

前記INK4a遺伝子産物および/または前記細胞増殖マーカー分子の検出が、検出されるべきそれぞれの分子を少なくとも1つ特異的に識別する少なくとも1つのプローブを使用して実施される、請求項1～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

少なくとも1つのプローブが検出可能に標識される、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

少なくとも1つの標識が、放射性同位体、生物発光化合物、化学発光化合物、蛍光化合物、金属キレート剤または酵素からなる群から選択される請求項25に記載の方法。

【請求項27】

少なくとも1つのプローブがタンパク質および/または核酸である、請求項24～26のいずれか1項に記載の方法。

【請求項28】

少なくとも1つのプローブがINK4aをコードする遺伝子産物または細胞増殖マーカー遺伝子産物に対して指向された抗体である、請求項27に記載の方法。

10

【請求項29】

免疫細胞化学染色手順を包含する、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

少なくとも1つのプローブがINK4a遺伝子産物または細胞増殖マーカー遺伝子産物に特異的にハイブリダイズする核酸である、請求項25または請求項26に記載の方法。

【請求項31】

インサイチュハイブリダーゼーション反応を包含する、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

核酸増幅反応を包含する、請求項30に記載の方法。

【請求項33】

前記核酸増幅反応がPCR、NASBAまたはLCRである、請求項32に記載の方法。

20

【請求項34】

核酸プローブおよびポリペプチドプローブを使用する検出反応が同時に実施される、請求項1～33のいずれか1項に記載の方法。

【請求項35】

請求項1～34のいずれか1項に記載の方法を実施するためのキットであって、生物学的サンプル中の少なくとも1つのINK4a遺伝子産物および少なくとも1つの細胞増殖マーカー遺伝子産物の存在もしくは非存在および/または過剰発現のレベルの検出のための少なくとも1つ以上のプローブを備える、診断キットまたは研究キット。

【請求項36】

前記INK4a遺伝子産物が、p16^{INK4a}およびp14ARFを含む群から選択される、請求項35に記載のキット。

30

【請求項37】

前記細胞増殖マーカー遺伝子産物が、CDC6、MCM3、MCM3、MCM4、MCM5、MCM6、MCM7、CDC7プロテインキナーゼ、Dbf4、CDC14プロテインホスファターゼ、CDC45およびMCM10、Ki67、Ki-S2、PCNAまたはPOLDを含む群から選択される、請求項35または請求項36に記載のキット。

【請求項38】

請求項35～37に記載のキットであって、該キットは、以下

- a. ポジティブコントロール反応を行なうためのp16^{INK4a}サンプル
- b. ポジティブコントロール反応を行なうためのp14ARFサンプル
- c. ポジティブコントロール反応を行なうためのKi67サンプル
- d. ポジティブコントロール反応を行なうためのKi-S2サンプル
- e. ポジティブコントロール反応を行なうためのMCM5サンプル
- f. ポジティブコントロール反応を行なうためのMCM2サンプル
- g. ポジティブコントロール反応を行なうためのPCNAサンプル
- h. p16INK4aの存在もしくは非存在および/またはレベルの検出のための試薬
- i. p14ARFの存在もしくは非存在および/またはレベルの検出のための試薬
- j. Ki67の存在もしくは非存在および/またはレベルの検出のための試薬
- k. Ki-S2の存在もしくは非存在および/またはレベルの検出のための試薬

40

50

- l . M C M 5 の存在もしくは非存在および / またはレベルの検出のための試薬
- m . M C M 2 の存在もしくは非存在および / またはレベルの検出のための試薬
- n . P C N A の存在もしくは非存在および / またはレベルの検出のための試薬
- o . ポジティブコントロール反応を実施するための I N K 4 a 遺伝子産物の 1 つ以上のサンプル
- p . ポジティブコントロール反応を実施するための細胞増殖マーカー遺伝子産物の 1 つ以上のサンプル
- q . 他の I N K 4 a 遺伝子産物の存在もしくは非存在および / またはレベルの検出のための 1 つ以上の試薬
- r . 他の細胞増殖マーカー遺伝子産物の存在もしくは非存在および / またはレベルの検出のための 1 つ以上の試薬
- 10 内の少なくとも 1 つをさらに備える、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、I N K 4 a 遺伝子産物と細胞増殖に関する少なくとも 1 つのマーカーとの同時検出に基づいた、形成異常 (d y s p l a s t i c) の改善された診断方法に関する。特に本発明は、それぞれの細胞の増殖特性を特徴付けるのに適したマーカーの検出によって、I N K 4 a 遺伝子産物を過剰発現する形成異常細胞を、形成異常せずに I N K 4 a 遺伝子産物を過剰発現する細胞から識別する方法を提供する。増殖特性の特徴付けは、活発な細胞増殖に特徴的なマーカーもしくはマーカーのセットおよび / または遅延したかもしくは中断した細胞増殖に特徴的なマーカーもしくはマーカーのセットの検出を包含し得る。従って、本明細書に提示された方法は、組織学的かつ細胞学的な試料における形成異常の特異的な診断を可能にする。

20

【背景技術】

【0002】

生物学的サンプルにおける p 1 6 ^{I N K 4 a} の過剰発現の検出は、肛門性器の病変 (例えば、子宮頸の癌腫 (W O 0 0 / 0 1 8 4 5 ; K l a e s ら、I n t . J . C a n c e r : 9 2、2 7 6 ~ 2 8 4 (2 0 0 1) を参照のこと)) の検出において有用なマーカーであると証明されている。p 1 6 ^{I N K 4 a} 特異的免疫化学染色に基づいた方法は、組織切片および細胞学的サンプルにおける感度が良く、かつ特異的な形成異常細胞の同定を可能にする。

30

【0003】

組織の免疫組織化学的検査において、形成異常細胞および新生物細胞は、p 1 6 ^{I N K 4 a} 特異的抗体媒介性染色手順を使用して染色され得る。従って、新生物病変の組織学的な診断は、肛門性器病変における細胞の形質転換に特徴的な分子マーカーに基づいた染色手順によって支持される。これらの手順における、細胞が新生物細胞であるか否かの診断は、p 1 6 ^{I N K 4 a} 特異的染色に基づくだけでなく、組織学的情報にもまた依存している。

【0004】

このことは、サンプルの約 2 0 ~ 3 0 % において、化生 (m e t a p l a s t i c) 細胞が、p 1 6 ^{I N K 4 a} 特異的抗体とある程度の免疫反応性を示し、従ってその手順の過程で染色されるという事実に起因する。しかし、これらの化生細胞から産生される染色パターンは、新生物病変から提供されるパターンとは異なる。化生細胞は、斑点状または限局的な染色パターンを生じるが、新生物病変は、散在性の染色パターンを生じる。さらに、化生細胞の染色強度は、大部分は、新生物細胞の染色強度より小さい。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

形成異常および / または新生物形成の初期の検出のためのスクリーニング試験に使用さ

50

れる一般的な方法は、組織学に基づいた試験は使用せず、むしろ細胞学的な試験手順に依存している。しかし、特に、組織の構造に関する入手可能な組織学的な情報が存在しない場合（例えば、細胞学的試験において）、p 1 6^{I N K 4 a} 過剰発現のみに関する試験は、偽陽性の結果につながり得る。これは、p 1 6^{I N K 4 a} を検出可能な程度に上昇したレベルで発現する化生細胞の画分は組織学的基準によっては分化し得ないためである。

【0006】

p 1 6^{I N K 4 a} の過剰発現を示す細胞の割合は、形成異常の出現の過程で増加する。従って、新生物段階または前新生物（pre-neoplastic）段階において、新生物細胞または前新生物細胞の制限された集団のみがサンプル中に存在する場合、p 1 6^{I N K 4 a} の免疫反応性は弱いこともある。この弱い免疫反応性は、化生細胞によって引き起こされるレベルとほぼ同じレベルとなることもある。形成異常のより後期の段階では、p 1 6^{I N K 4 a} の全体の免疫反応性は、より強く、そのため、新生物病変は、細胞学的試験形式においてでさえ、化生から容易に識別可能である。このことは、p 1 6^{I N K 4 a} を発現する化生細胞の存在が新生物細胞の存在と混同される場合、この手順は、偽陽性の結果を生じるという問題につながり得る。

10

【0007】

特にスクリーニング試験において、初期段階の新形成の検出が望ましい場合、この状態は、全く好ましくない。このことは、p 1 6^{I N K 4 a} に基づいた診断が組織学的試験における有用なツールであることが証明され、そして、細胞学に基づいたスクリーニング手順における適用がこれらの確立された手順を向上し得るので、特にあてはまる。

20

【課題を解決するための手段】

【0008】

細胞学的試験形式における偽陽性の結果を減少させるためおよび p 1 6^{I N K 4 a} に媒介される肛門性器病変の診断の忠実度をさらに向上させるために、新生物病変および形成異常病変から化生病変を識別する方法が所望される。新生物病変および前新生物病変から化生病変を識別するための方法は、本発明に基づいて特許請求された実施形態において提供される。

【0009】

p 1 6^{I N K 4 a} の過剰発現に基づいた試験手順における新生物病変からの化生の識別を支持するために、新生物の細胞および組織ならびに / または前新生物の細胞および組織で発現し、かつ、1つの化生細胞内で I N K 4 a 遺伝子産物と同時に発現しないマーカー分子が所望される。

30

【0010】

当該分野に存在する問題の解決策が、本発明に基づいて特許請求された方法によって提供される。本発明につながる実験の過程において、本発明者らは、細胞増殖に対する少なくとも1つのマーカー（例えば、Ki 6 7、Ki - S 2、m c m 5 または m c m 2）と組み合わせた p 1 6^{I N K 4 a} の存在または非存在の検出および / または p 1 6^{I N K 4 a} のレベルの検出の組み合わせが、当該分野に存在する問題を解決し得ることを発見した。

【0011】

形成異常の改善された診断のための分子マーカーの組合せの使用に関する、当該分野における2、3の文書が存在する。W O 0 2 0 8 7 6 4 において、H P V マーカーと細胞増殖またはウイルス活性に対するマーカーとの組合せを使用する子宮頸悪性腫瘍の改善された診断のための方法が開示される。p 1 6^{I N K 4 a} は、この発明との関連において、H P V マーカーと組み合わせられるべきウイルス活性マーカーとして言及されている。

40

【0012】

E P 1 2 1 7 3 7 7 において、1つより多いマーカー分子の検出によって媒介される子宮頸悪性腫瘍の自動検出のための方法が開示される。いくつかの規定されたマーカーの組合せは、この文書内で挙げられる。この文書には、組合せに対する適切なマーカーの選択に関する開示は存在しない。この適用における組合せの目的は、生物学的細胞学的試料における染色パターンの自動化された分析の忠実度を改善することである。この文書は、p

50

16^{INK4a} と他の腫瘍マーカーとの組合せにも言及している。

【0013】

WO02059616は、子宮頸悪性腫瘍の改善された診断のための細胞周期の乱れの検出方法を開示する。この文書は、形成異常細胞が、細胞周期制御における乱れを示すので、細胞におけるG1後物質と一緒にサイクリンE型タンパク質を検出する手段によって同定され得ることを開示する。

【0014】

「Ki67, Cyclin E, and p16^{INK4a} Are Complementary Surrogate Biomarkers for human papilloma Virus-Related Cervical Neoplasia」(American Journal of Surgical Pathology 25(7): 884~891, 2001)において、Jeffrey Keatingは、子宮頸形成異常の診断の過程におけるp16^{INK4a}、Ki67およびサイクリンEの使用の相補性を開示する。この文書は、形成異常および状態の検出における各単一マーカーの問題を言及し、細胞学的試料が試験下に存在する場合には特に、サイクリンEと組み合わせたp16^{INK4a}が単一マーカー分子の欠点を克服するために適している場合があると言及している。増殖細胞に特徴的なマーカー(例えば、Ki67)と合わせたp16^{INK4a}の使用を教示する開示は、示されていない。この文書は、診断方法における使用のためのp16^{INK4a}の組合せを教示しない;さらに、この開示は、子宮頸の鑑別診断におけるKi67の限定された使用に関係し、従って、子宮頸悪性腫瘍の診断におけるこのマーカーの使用から離れて教示する。

【0015】

当該分野では、p16^{INK4a} ポジティブ非形成異常細胞をp16^{INK4a} ポジティブ形成異常細胞から識別するための改善された識別方法に使用するための、p16^{INK4a} を細胞増殖に特徴的なマーカーと組み合わせた使用を教示する開示は存在しない。WO02059616は、形成異常細胞増殖の検出におけるp16^{INK4a}の使用についてのがかりを与えない。EP1217377は、分析プロセスの自動化以外に、検出の過程における腫瘍マーカーの組合せの目的を教示しない。子宮頸試料における、例えば、化生細胞からの形成異常細胞の識別のような特異的な識別目的についての組合せの利点に関係する開示は存在しない。

【0016】

本発明の発明者らは、種々の形成異常において過剰発現するp16^{INK4a}がいくつかの他の非形成異常細胞においても検出され得るという当該分野に存在する欠点を克服することを追求した。非形成異常p16^{INK4a} ポジティブ細胞とp16^{INK4a}を過剰発現する形成異常細胞との間の識別は、それぞれの細胞の増殖特徴に基づいたものであり得る。正常に制御された細胞では、p16^{INK4a}はcdk4を阻害し、従って増殖を阻害する。対照的に、形成異常細胞では、この調節は、弱められる。従って、p16^{INK4a}は、その極めて高い発現レベルにも関わらず、細胞増殖の阻害を導かない。

【0017】

本発明の発明者らは、p16^{INK4a}と細胞増殖に特徴的なマーカーとの同時検出によって、形成異常細胞が制御された細胞増殖を示す細胞から識別され得ることを見出した。正常細胞において、p16^{INK4a}の上昇したレベルが細胞増殖を阻害するという事実起因して、p16^{INK4a}を過剰発現する細胞は、それらが活発な細胞増殖の特徴を示す場合、形成異常であるとして分類され得る。

【0018】

本発明は、細胞増殖マーカーと同時にp16^{INK4a}遺伝子を生物学的サンプル中で発現する細胞の存在または非存在の検出に基づいた組織学的試験手順または細胞学的試験手順において、生物学的サンプル中の新生物病変、前新生物病変および/または形成異常病変を、上昇したレベルのp16^{INK4a}を示す非形成異常細胞から識別するための方法に関する。細胞増殖に対して適したマーカーは、例えば、Ki67、Ki-S2、Ki

- S5、mcm5またはmcm2であってもよい。本発明の1つの実施形態において、細胞増殖に対するマーカーのタンパク質またはmRNAは、サンプルにおける初期形成異常病変または前新生物病変からの化生の識別のためのマーカーとして役目を果たし得る。

【0019】

本発明の1つの局面は、生物学的サンプルにおいて、INK4a遺伝子産物を過剰発現する形成異常細胞を、INK4a遺伝子産物を検出可能なレベルで発現する他の細胞から識別するための方法を提供することであり、この方法は、細胞学的試験手順または組織学的試験手順において、少なくとも1つの単一細胞内で同時発現する少なくとも2つのマーカー分子を決定する工程を包含し、ここで、少なくとも1つのマーカー分子は、INK4a遺伝子によってコードされる発現産物であって、かつ、少なくとも1つのさらなるマーカー分子は細胞増殖マーカーであって、ここで、少なくとも1つのINK4a遺伝子産物の過剰発現およびこの単一細胞内の免疫化学的に検出可能なレベルでの活発な細胞増殖に対する少なくとも1つのマーカーの発現は、細胞の形成異常の指標であって、ここで、この単一の細胞内での少なくとも1つのINK4a遺伝子産物の過剰発現および老化、細胞分化の終点、アポトーシスまたは細胞周期の停止に対する少なくとも1つのマーカーの検出可能なレベルでの発現は、細胞の非形成異常状態の指標である。

10

【0020】

本発明の第2の局面は、本明細書に開示された方法に基づいて、サンプル中の形成異常を決定するための試験キットに関する。

【0021】

本発明につながる実験の間に、特定の状況下で、非形成異常細胞はp16^{INK4a}に対する免疫反応性を示し得ることが見いだされた。発明者らは、INK4a遺伝子産物のレベルの上昇に反応して、細胞増殖の順序付けた制御を示すこれらの細胞が、成長停止を受けることを見出した。従って、これらの個々の細胞は、細胞増殖のマーカーに対して免疫反応性を示さない。対照的に、p16^{INK4a}を過剰発現する形質転換した細胞は、細胞増殖の無調節な制御を示し、増殖の停止によってp16^{INK4a}の上昇したレベルには反応しない。従って、これらの形成異常細胞は、細胞増殖に対するマーカーとp16^{INK4a}との同時発現を示す。従って、発明者らはp16^{INK4a}と細胞増殖に対するマーカーとの同時検出が、p16^{INK4a}を過剰発現する停止した細胞（例えば、化生細胞）から形成異常細胞を識別するのに役立ち得ることを見出した。

20

30

【0022】

種々の形成異常におけるp16^{INK4a}の過剰発現は、他のいくつかの非形成異常細胞でもまた検出され得るという発見により、本発明の発明者らは、それぞれの細胞の増殖特徴に基づいて、非形成異常p16^{INK4a}ポジティブ細胞とp16^{INK4a}を過剰発現する形成異常細胞とを識別する技術を確立した。正常に制御された細胞では、p16^{INK4a}は、cdk4を阻害し、従って細胞増殖を阻害するのに対して、形成異常細胞では、これはあてはまらない。従って、形成異常細胞において、p16^{INK4a}はその極めて高い発現レベルにも関わらず、細胞増殖の阻害をもたらさない。

【0023】

本明細書に開示された方法は、INK4a遺伝子産物（例えば、p16^{INK4a}）の細胞増殖に特徴的なマーカーとの同時検出によって、形成異常細胞が、正常に制御された細胞増殖を示す細胞から識別され得るという事実に基づいている。

40

【0024】

用語マーカーならびにマーカー分子とは一般的に、本明細書中では、増殖マーカー遺伝子発現産物ならびにINK4a遺伝子発現産物に関して使用される。

【0025】

本文を通して遺伝子に対して示される名称は一部、任意の生物体から発見された遺伝子またはタンパク質に関する。本発明との関連では、この名称は、本明細書で開示された方法について特に問題になっている生物体内の指定されたマーカーのそれぞれの相同物を与える。本発明の特定の実施形態において、この生物体は哺乳動物であって、1つの実施形

50

態では、ヒトであり得る。本発明のこのような1つの実施形態では、指定されたマーカーは、それぞれの名称のマーカーのヒトホモログである。

【0026】

一般的に、本文を通して、種々の文法形態の用語「(細胞)増殖マーカー」または「細胞増殖のためのマーカー」は、タンパク質マーカーならびに核酸マーカーを称するために使用される。マーカー(例えば、「複製タンパク質」)のタンパク質名称が本明細書中で使用される場合、この使用は、換喩的であり、かつ特定のタンパク質をコードする核酸マーカー分子についてのタンパク質に関係することも理解される。

【0027】

本発明に基づく有用なマーカーは、遺伝子から転写された任意の分子かまたはそのような転写産物から翻訳された任意の分子であり得る。従って、本発明に関して使用される遺伝子産物としては、ポリヌクレオチド(例えば、DNAまたはRNA)およびポリペプチド(例えば、タンパク質、プロテオグリカン、ペプチドなど)が挙げられ得る。本発明に関して使用される発現産物(単数または複数)としては、任意のリーディングフレーム、スプライシング改変体を含む順方向または逆方向の遺伝子座の任意の転写産物が挙げられる。従って、本明細書中で使用される場合、発現産物は、特定の遺伝子座の核酸によってコードされる任意の別の産物を含む。

10

【0028】

本発明に関して使用される場合、INK4aをコードする遺伝子産物とは、INK4a遺伝子座から転写された任意のmRNAかまたはこのようなmRNAから翻訳された任意のポリペプチドであり得る。本発明の1つの実施形態において、INK4a遺伝子によってコードされる発現産物は、約5~40kDaの分子量またはその間の任意の値の分子量を示し、好ましくは、約10~20kDaまたはその間の任意の値の分子量を示し、最も好ましくは、約14~約19kDaまたはその間の任意の値の分子量を、それぞれ示し得る。

20

【0029】

本発明に基づいた方法に適したINK4a遺伝子産物としては、例えば、遺伝子産物(例えば、p16^{INK4a}およびp14ARF)が挙げられ得る。

【0030】

本発明に関して使用される場合、用語「(細胞)増殖マーカー」または「細胞増殖に関するマーカー」は、細胞の増殖状態に特徴的である当該分野で公知の任意のマーカー分子を含み得る。増殖状態は例えば、遅延した細胞増殖、停止した細胞増殖、老化した細胞、分化末期の細胞、アポトーシス細胞などの活発に増殖する細胞の状態であり得る。本発明の1つの実施形態において、細胞増殖マーカーは、活発な細胞増殖に特徴的なマーカー分子である。本発明の別の実施形態において、増殖マーカー分子は、停止した細胞、分化末期の細胞、老化細胞またはアポトーシス細胞に対して特徴的な分子であり得る。

30

【0031】

特定の実施形態において、本発明に関して使用される増殖マーカーは、DNA複製に関与する遺伝子(例えば、前開始複合体のタンパク質または複製フォークのタンパク質)を含み得る。このような分子としては、例えば、真核生物のヘリカーゼまたはMCMタンパク質(MCM2、MCM3、MCM4、MCM5、MCM6、MCM7)、WO0050451およびWO0217947に開示されるタンパク質TP(HELAD1、Pomf112、Unc-53とも称される)、複製プロセスに関与するキナーゼまたはホスファターゼ(例えば、CDC6プロテインキナーゼ、CDC7プロテインキナーゼ、Dbf4プロテインホスファターゼ、CDC14プロテインホスファターゼ、CDC45およびMCM10)が挙げられ得る。さらなる増殖マーカーとしては、進行中の複製フォークに関与するタンパク質(例えば、PCNAまたはDNAポリメラーゼ、複製タンパク質A(RPA)、複製因子C(RFC)、FEN1)が挙げられ得る。

40

【0032】

他の実施形態において、増殖マーカーは、細胞増殖の維持に必要な分子(例えば、Ki

50

67、Ki-S5またはKi-S2)を含み得る。この実施形態において、タンパク質は、例えば、細胞周期全体を通して存在し得る。それらが活発な細胞増殖に特徴的であって、かつ、停止状態の細胞、分化末期状態の細胞、アポトーシス細胞または老化状態の細胞では顕著に発現しない場合、それらは、本発明に基づいた方法を実施するために有用である。本明細書で使用される場合、Ki67、Ki-S2およびKi-S5は、それぞれの抗体ならびにこれらの抗原をコードする核酸によって検出されるタンパク質マーカー分子を称する。

【0033】

別の実施形態において、本発明に基づいた方法において使用するための細胞増殖マーカーは、遅延したかまたは停止した細胞増殖に特徴的なマーカー分子(例えば、老化マーカー、細胞周期停止マーカー、分化末期細胞に特徴的なマーカーまたはアポトーシスマーカー)であり得る。このような分子としては、例えば、p21、p27、カスパーゼ、BAD、CD95、fasリガンド、parpタンパク質などが挙げられる。

10

【0034】

本発明に関して使用される場合、識別とは、サンプルが1つの方向または別の方向のどちらに分類されるかの評価を含む。本発明の1つの実施形態において、識別は、組織または組織の構成要素が形成異常であるかまたは形成異常ではないかの評価に関する。従って、識別は、本明細書で使用される場合、生物学的サンプルの細胞の増殖特徴についての判断である。

【0035】

本発明の1つの実施形態において、識別は、活発な細胞増殖に特徴的なマーカーの発現の検出と同時にI NK 4 a遺伝子産物の発現の検出を含む。この場合、両方のマーカー分子を同時発現する細胞は、形成異常として分類される。

20

【0036】

本発明の別の実施形態において、識別は、静止したか、停止したかまたは遅延した細胞増殖に特徴的なマーカーの発現の検出と同時にI NK 4 a遺伝子産物の検出を含む。この場合、両方のマーカー分子を同時発現する細胞は、非形成異常として分類される。

【0037】

本発明の特定の実施形態において、2つより多いマーカー分子の存在もしくは非存在および/またはそのレベルを検出することが有用である。1つの実施形態において、1つのI NK 4 a遺伝子発現産物は、細胞増殖に対する2つ以上のマーカーと合わせて検出される。このことは、サンプル中のI NK 4 a遺伝子産物を発現する細胞の増殖特性の同定を向上させるのに有用である。いくつかの増殖マーカーは、細胞周期の特定の相に限定されるかまたは細胞に少量しか存在しない。この事実のために、いくつかの場合、I NK 4 a遺伝子産物を発現する増殖細胞の検出は、2つ以上の増殖マーカーの検出によって改善され得る。このような場合、例えば、増殖性細胞周期全体の間が発現される1つの増殖は、特異的細胞周期相に特徴的であるマーカーと同時に検出され得る。例えば、Ki67、Ki-S5またはKi-S2は、mcm5、mcm2、PCNA、rpA、rfCなどと一緒に検出され得る。他の場合には、例えば、DNA複製に関与するタンパク質は、Ki67、Ki-S5またはKi-S2と一緒に検出され得る。なお別の場合には、Ki67は、Ki-S2と一緒に検出され得る。これらの例は、例示的な組合せの可能性を意図し、包括的ではないことが理解されるべきであり、そのため、増殖マーカーの他の種々の組合せが同様に有用であり、本発明に基づいた方法の手順において適していることが理解されるべきである。

30

40

【0038】

場合によっては、2つ以上の細胞増殖マーカー分子の組合せが、本明細書に開示された方法に適用され得る。別の実施形態において、細胞周期のより長い期間にわたってまたは全細胞周期にわたってさえ、または活発に増殖する細胞において検出され得る2つ以上のマーカー分子は、本明細書に開示された方法と合わせて検出され得る。1つより多い細胞増殖マーカー分子の組合せは、一般的に、細胞の増殖特性の検出の感受性の改善に対し

50

て有用であり得る。

【0039】

本発明の特定の実施形態において、組合せはさらに、他のマーカー分子（例えば、老化マーカー分子、停止細胞に対するマーカー、分化末期細胞に対するマーカー、アポトーシス細胞に対するマーカー、ウイルス感染に対するマーカーもしくは細胞内のウイルス活性に対するマーカーまたはマーカーとしての細胞周期調節タンパク質）を含み得る。HPV感染と関連する形成異常を伴う特定の実施形態において、HPVと関連したマーカー分子またはウイルス活性に対するマーカーの検出は、形成異常の検出のために有用であり得る。サンプルのHPV感染の検出に有用な方法は、当業者に公知である。これらの方法は、HPV薬剤に特異的なプローブを使用する方法を包含し得るか、または、核酸増幅反応を使用し得る。ウイルス感染の検出は、INK4aおよび増殖マーカー分子の検出と同時に、またはそれに続いて実施され得る。

10

【0040】

本発明に関して使用される場合、形成異常とは、軽い形成異常から重篤な形成異常およびその前段階、ならびに癌腫（例えば、インサイチュ癌腫または浸潤癌腫および散在する腫瘍細胞）をいう。従って、形成異常とは、本明細書中で使用される場合、初期段階および前段階の形成異常および癌腫も含む。

【0041】

形成異常なし（本明細書中で使用される場合、非形成異常の）でINK4a遺伝子産物を過剰発現する細胞は、本明細書中で言及される場合、例えば、化生細胞、老化細胞、分化末期細胞、上昇したレベルのINK4a遺伝子産物を示す細胞周期の特定の段階の細胞を含み得る。特定の細胞において、上昇したレベルのINK4a遺伝子産物はさらに、外部シグナル（例えば、ホルモン、伝達物質など）に対する反応として誘発され得る。本発明の1つの実施形態において、INK4a遺伝子産物を過剰発現する非形成異常細胞としては、例えば、化生細胞、子宮内膜細胞などが挙げられる。

20

【0042】

INK4aをコードする遺伝子産物および/または本発明に基づく増殖マーカー遺伝子産物の発現レベルの検出方法は、例えば、生物学的サンプルにおける非常に少量の特異的生物学的分子の検出に適し得る任意の方法である（しかし、必ずしもその必要はない）。本発明に基づいた検出反応は、核酸のレベルの検出かまたはポリペプチドのレベルの検出のどちらかである。

30

【0043】

本発明に関して使用される場合、マーカー分子は、そのマーカーが適切な検出手順（例えば、インサイチュハイブリダイゼーション、免疫化学染色、ハイブリッドキャプチャーアッセイ（hybrid capture assay）など）の過程において検出され得るならば、検出可能であると言われる。マーカー分子の発現のレベルは、適切なレポーター反応（例えば、色素に基づいた（chromogenic based）免疫化学染色もしくは蛍光に基づいた免疫化学染色または顕微鏡分析または自動化分析のためのインサイチュハイブリダイゼーション手順）を用いて検出可能になされ得る。当業者に公知のレポーターシグナルを増強するための適切な方法が、本発明に基づく方法の過程において適用され得る。従ってそのマーカーは、染色が、意味のある染色結果を産生するための免疫化学染色手順において本質的に得られるそれぞれのバックグラウンド染色に取って代わる場合、検出可能であると言われる。

40

【0044】

マーカー分子は、これらの分子を特異的に識別する試薬を使用して検出され得る。INK4a遺伝子産物および/または増殖マーカー遺伝子産物に対する検出反応は、初期マーカー分子を識別するかまたは他の分子を識別するために使用される先行分子を識別するかのどちらかの検出試薬との1つ以上の反応を含み得る。

【0045】

本発明の特定の実施形態において、1つの単一のマーカー分子の検出のために、2つ以

50

上のプローブが使用され得る。例えば、2つ以上の異なった結合物質（例えば、抗体）または1つの単一のマーカー分子に対して指向されたオリゴヌクレオチドプローブ（異なったエピトープまたは異なった配列に対して指向され得る場合）が本明細書に開示された方法の過程において使用され得る。

【0046】

異なった遺伝子産物の検出は、1つの反応容器もしくは封じ込め（containment）、または種々の封じ込めを同時にもしくは後に使用して実施され得る。従って、異なった遺伝子産物が、両方の産物を同時に発現する1つの細胞で同時に検出され得る。他に、細胞において単一のマーカーをそれぞれ検出するために、遺伝子産物を同時に発現する細胞が、分離検出反応（空間的、または時間的に分離）に使用され得る。別の実施形態では、どれか1つのマーカーを発現する細胞が存在し得る。種々の細胞におけるマーカー分子の検出も、時間および/または空間において、同時に、または別々に実施され得る。

10

【0047】

検出反応はさらに、マーカー分子遺伝子産物の存在もしくは非存在および/またはそのレベルを示すレポーター反応を含み得る。レポーター反応は、例えば、着色化合物を産生する反応、生物発光反応、蛍光反応、一般に、放射線放射反応などであり得る。

【0048】

特定の実施形態において、種々のレポーターシグナルを産生する薬剤によって種々のマーカー分子が識別され得、従ってシグナルとは、識別され得るマーカー分子をいう。本発明の1つの好ましい実施形態において、2つ以上のINK4a遺伝子産物および/または増殖マーカー遺伝子産物の発現の検出は、同時に行なわれる。この場合、レポーター反応は、例えば、種々の検出される分子に対する種々の蛍光標識を使用し得る。

20

【0049】

しかし、本発明に関して、どれか1つの増殖マーカーまたはINK4aマーカー遺伝子産物が細胞で発現しているか否かについて必ずしも回答しなくてもよい。特定の実施形態において、問題は、何らかの増殖マーカーおよび/またはINK4a遺伝子産物が発現するか否かである。そのような実験の過程において、増殖マーカーの存在の指標として同一の蛍光シグナルを生じる手順が選択され得る。この手順は、細胞増殖特徴（活発な細胞増殖に対して特徴的な種々のマーカー）の検出感度を改善するために適切である。場合によっては、その手順は、細胞増殖に特徴的である3つ、4つまたはそれより多いマーカー分子に対する1つの検出可能なシグナルを与えるために適用され得る。類似または同一の手順が、特定の条件下では、INK4a遺伝子発現産物にあてはまり得る。場合によっては、種々の増殖マーカー分子に対する種々の染色シグナルが所望され得ることが理解されるべきである。この手順は、それぞれの実験の必需品に適用され得る。

30

【0050】

本発明の特定の実施形態において、1つ以上（例えば、2つの異なる）INK4a遺伝子産物の組合せは、1つ以上、例えば、2つのセット、3つのセット、4つのセット、5つのセットまたはそれより多いセットの細胞増殖に対するマーカーの組合せを用いて検出され得る。場合によっては、細胞増殖に対するマーカー分子の検出は、1つのレポーターシグナルのみを与え得る。他の場合には、細胞増殖に対する各単一マーカーが特定のレポーターシグナルを与え得るかまたはマーカー分子の群が特定のレポーターシグナルを与え得る。

40

【0051】

免疫反応性の存在の指標のためのシグナルは、当該分野で公知の種々の方法によって産生される呈色（chromogenic）シグナルであり得る。あるいは、蛍光シグナルが使用され得るか、またはさらに蛍光シグナルと組み合わせて使用され得る。適切なレポーターシグナルとしては、例えばフルオレセイン、ローダミンなどのような蛍光標識が挙げられる。

【0052】

本発明に基づく検出反応のための適用可能な形式は、プロッティング技術（例えば、ウ

50

エスタンプロット、サザンプロット、ノーザンプロット、免疫細胞化学手順または免疫組織化学手順)であり得る。プロッティング技術は、当業者に公知であって、例えば、電気プロット、半乾燥プロット、真空プロットまたはドットプロットとして実施され得る。免疫細胞/組織化学染色手順は、当業者に公知であって、結合物質媒介性ポリペプチドの検出ならびにインサイチュハイブリダーゼーション技術を含み得る。両方の異なる技術が、同時にさえ適用され得る。特定の実施形態において、核酸のハイブリッドキャプチャーが、検出のために使用され得る。増幅反応もまた、例えば核酸分子の検出に適用可能である。

【0053】

本発明の1つの実施形態において、INK4aおよび/または増殖マーカー遺伝子産物のレベルの検出は、サンプル中に存在するそれぞれの核酸(例えば、mRNA)またはそのフラグメントの検出によって行なわれる。核酸分子の検出のための手段は、当業者に公知である。核酸の検出のための手段は、例えば、検出されるべき分子の相補的核酸プローブに対する結合反応、核酸に対して結合特異性を有するタンパク質またはこの核酸を特異的に識別し、結合する他の任意の物により行われ得る。1つの実施形態において、サンプル中の核酸に対するオリゴヌクレオチドプローブのインサイチュハイブリダイゼーションが、発現産物またはマーカーの検出のために使用され得る。

【0054】

本発明に関して使用される場合、プローブは、分子に特異的に結合する任意の薬剤であり得る。核酸の場合には、プローブは特定の配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであり得る。1つの実施形態において、プローブは、例えば、プライマーであり得る。ポリペプチドまたはタンパク質の検出の場合には、本明細書中で使用されるプローブは、例えば、結合剤(例えば、抗体)であり得る。本発明の特定の実施形態において、プローブは、検出可能に標識され得る。この標識は、放射性同位元素、生物発光化合物、化学発光化合物、蛍光化合物、金属キレート剤または酵素を含む群から選択され得る。プローブは、当該分野で公知の任意の検出手順(例えば、インサイチュハイブリダイゼーション手順の過程、ハイブリッドキャプチャーアッセイの過程、免疫化学染色反応の過程、プロッティング技術の過程など)に適用され得る。

【0055】

この方法は、インビトロだけでなく、インサイチュで直接的にも(例えば、染色反応検出の過程において)実施され得る。本発明に基づいた方法で実施されるサンプル中のマーカーmRNAを検出する別の方法は、核酸の増幅反応であって、これは、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応のような量的な様式で実施され得る。本発明の好ましい実施形態において、形成異常または腫瘍のサンプル(細胞サンプルまたは組織サンプル)中のマーカーmRNAのレベルを定量するために、リアルタイムRT-PCRが使用され得る。

【0056】

本発明の別の好ましい実施形態において、INK4aおよび/または増殖マーカー遺伝子産物のレベルの検出は、タンパク質またはそのフラグメントの発現のレベルを決定することによって行われる。タンパク質レベルにおけるマーカー遺伝子産物の検出は、例えば、特定のマーカーポリペプチドの検出に特異的な結合剤を含有する試薬において行われ得る。

【0057】

この結合剤は、多くの異なった検出技術(例えば、ウエスタンプロット、ELISAまたは免疫沈降)において使用され得る。一般に、ポリペプチド結合剤ベースの検出は、インビトロと同様にインサイチュで(例えば、免疫化学染色反応の過程において、)直接実行され得る。生物学的サンプル中の特定のポリペプチドの量を決定するための他の任意の方法は、本発明に従って決定される。

【0058】

本発明に関する使用のための免疫細胞化学画像化手順は、例えば、細胞学的調製物または組織学的調製物の、呈色(chromogenic)色素または蛍光色素を用いた染色

工程を包含し得る。染色工程は、例えば、検出されるべき分子の、一次結合剤による結合工程を包含し得、この一次結合剤は、それ自体が標識され得る二次結合剤によって検出される。特定の実施形態において、一次結合剤は核酸結合剤またはタンパク質結合剤（例えば、抗体）であり得、そして二次結合剤は、例えば、一次結合剤を識別する二次抗体であり得る。

【0059】

細胞化学染色または組織化学染色の染色工程を実行するための、当該分野で公知の任意の方法が、本発明に従った方法の過程で適用され得る。

【0060】

p16^{INK4a}ポリペプチドまたはp14ARFポリペプチドのようなINK4aポリペプチド、および例えば、mcm5ポリペプチド、mcm2ポリペプチド、KI67ポリペプチド、Ki-S5ポリペプチド、PCNAポリペプチドまたはKi-S2ポリペプチドのような増殖マーカーポリペプチドのレベルの検出のために、本発明に関して使用される結合剤としては、抗体および抗原結合フラグメント、二機能性ハイブリッド抗体、最小抗原結合エピトープを含むペプチド模倣物、抗culline（抗calineTM）などが挙げられ得る。

【0061】

本明細書中で開示されるタンパク質と検出可能レベルで反応する場合、そして他のタンパク質と有意に反応しない場合、抗体または抗原結合剤は、特異的に反応すると言われる。本発明に従う抗体は、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよい。本明細書中で使用される場合、抗体またはモノクローナル抗体という用語は、インタクトな分子および抗体フラグメントを意味する。さらに、本発明の抗体としては、キメラ抗体、単鎖抗体、およびヒト化抗体が挙げられる。

【0062】

本発明に従い、結合剤は、単離されて使用されてもまたは組み合わせて使用されてもよい。組み合わせによって、より高い程度の感受性を達成することが可能である。抗体という用語は、好ましくは、明らかなモノクローナル抗体調製物と同様、異なったエピトープ特異性を有するプールされたモノクローナル抗体から本質的に成る抗体に関する。

【0063】

モノクローナル抗体は、本発明のポリペプチドのフラグメントを含む抗原から、当業者に公知の種々の技術のいずれかを用いて作製される；例えば、HarlowおよびLane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照のこと。このような技術の1つにおいて、抗原ポリペプチドまたはその合成部分を含むイムノゲンが、広範な種々の哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジおよびヤギ）のいずれかに最初に注射される。この工程において、本発明のポリペプチドは、改変のないイムノゲンとして寄与し得る。あるいは、特に、比較的短いポリペプチドについて、このペプチドがキャリアタンパク質（例えば、ウシ血清アルブミンまたはキーホールリンペットヘモシアニン）と結合する場合、より高い免疫反応が誘発され得る。イムノゲンは、好ましくは1回以上の追加免疫を組み込んだ所定の計画に従って哺乳動物宿主内に注射され、そしてこの動物は、定期的に採血される。次いで、このポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体を、このような血清から、例えば、適切な固体支持体に結合したポリペプチドを使用するアフニティクロマトグラフィーによって精製する。

【0064】

本発明の文脈において、どの1つの増殖マーカーが細胞内で発現するか否かは、必ずしも答えられなければならない訳ではない。特定の実施形態において、主な疑問は、なんらかの増殖マーカーが発現されるか否かであり得る。このような実験の過程において、増殖マーカーの存在の指標と同じ蛍光シグナルを与える手順が、選択された。この手順は、細胞増殖特徴の検出の感度を改善するために適する。この手順が適用され得る場合、3、4、またはより多くの細胞増殖特徴的マーカー分子について検出可能な1つのシグナルを与

える。同様に、特定の環境下で、INK4a 遺伝子発現産物について、同じことがあてはまることがある。異なった増殖マーカー分子について、異なった染色シグナルであり得る場合が、所望であり得ることが理解されなければならない。この手順は、関連する実験の必要性のために適用され得る。

【0065】

INK4a 遺伝子産物および/または増殖マーカー遺伝子産物は、本発明に従って、同時に検出され得る。この文脈において、本発明に従って、同時とは、文字通り同じ時間または同じ試験手順の間を意味するべきであり、これにより、単一の検出工程が、一時的に継続する。

【0066】

本発明に従う検出手順は、細胞または細胞区画の呈色染色または蛍光染色を与える細胞化学染色手順をさらに包含し得る。このような染色手順は、当業者に公知であり、そして例えば、細胞学的試料における亜細胞領域の好酸性構造または好塩基性構造（例えば、核、ミトコンドリア、ゴルジ、細胞質など）についての、特定の分子（染色体、脂質、糖タンパク質、多糖類など）の染色工程を包含する。例えば、DAPI、キナクリン（Quinacrine）、クロモミシン（Chromomycin）などのような蛍光色素が、使用され得る。さらに、例えば、アザン（Azan）、アクリジン-オレンジ（Acridin-orange）、ヘマトキシリン、エオシン、スダン赤（Sudan-red）、チアジン染色（トルイジン青（Toluidin-blue）、チオニン）のような呈色色素が、適用され得る。他の実施形態において、以下のような染色手順が、本明細書中で開示される方法の過程において使用され得る：パップ染色、ギムザ染色、ヘマトキシリン-エオシン染色、バン-ギーセン（van-Gieson）染色、シッフ染色（シッフ試薬を用いる）、金属（例えば、硝酸銀を使用する染色手順における銀）の沈殿を使用する染色手順または例えば、ターンブル青（または他の不溶の金属シアン化物）の染色のような不溶染色。挙げた色素および染色方法は、適用可能な方法の例であるべきであり、そして当該分野で公知の任意の他の方法が、本明細書中で開示される方法に適用され得ることが、理解されなければならない。

10

20

【0067】

染色手順は、光学顕微鏡検査のための呈色染色または蛍光顕微鏡条件下の検査のための蛍光染色を生成し得る。本発明の放射線放出手順の別の実施形態において、サンプル中の細胞学的状態を画像化するために、放射線の透過を減じる物質または他の造影剤を使用する手順（例えば、（微小）オートラジオグラフィ像の作製または（微小）X線写真撮影のような手段による最適な像の作製）が、本発明に従う方法のために有用であり得る。

30

【0068】

全ての染色および画像化手順が、顕微鏡的手順における分析についてのみでなく、フローサイトメトリー、自動化（コンピューター化またはコンピューター補助の）顕微鏡分析、または染色細胞学的試料の分析のための任意の他の方法のような自動化分析手順における分析のためにも、使用され得る。

【0069】

異なった手順の染色結果または画像化結果の分析は、1つの分析工程または異なったその後の工程群において実行され得る。例えば、試料の光学顕微鏡検査は、試料の蛍光顕微鏡検査の前または後に行われ得る。蛍光顕微鏡観察において、異なった励起波長の異なった染色の分析は、同時にまたは引き続いて分析され得る。他の画像化方法は、名を挙げた手順と同時にまたは引き続いて使用され得る。

40

【0070】

異なった染色方法の組み合わせが適切である、種々の状況があり得る。例えば、十分な細胞学的染色結果が免疫化学的染色によって達成され得ない場合、一般的細胞学的染色技術のさらなる適用が、適切であり得る。

【0071】

本発明の方法に従うサンプルは、細胞を含む任意のサンプルを含み得る。サンプルは、

50

例えば、分泌物、スミア (s m e a r)、体液、および細胞サンプルまたは組織サンプルを含み得る。

【 0 0 7 2 】

本発明の1つの実施形態において、サンプルは、肛門性器道、気道、または皮膚およびその付属器の細胞を含む。特定の実施形態において、細胞は、子宮頸、膣、外陰、陰茎、肛門、直腸、気管支、肺、腹膜、腹膜腔 (p e r i t o n e a l s p a c e)、鼻咽頭腔、口腔または皮膚の細胞であり得る。本発明の特定の実施形態において、サンプルは、組織学的サンプル、試料、または細胞学的サンプル (例えば、スミア、スワップ (s w a b)、洗浄液、細胞を含む体液 (痰、分泌液、唾液など)) であり得る。本発明の特定の実施形態において、サンプルは、乳糖腫ウイルスに感染している細胞を含み得る。特定の実施形態におけるサンプルとしては、子宮頸のスミア、気管支肺胞洗浄液 (b r o n c h i o a l v e o l a r l a v a g e) などが挙げられる。

10

【 0 0 7 3 】

本発明の特定の特別な実施形態において、サンプルは、細胞学的試料の単層または薄層の調製物として調製され得る。細胞学における単層または薄層の調製物の調製に関連する方法は、当業者に周知である。1つの実施形態において、調製物は、例えば、ThinPrep技術を含み得る。他の方法としては、従来のスミアまたは細胞学的試料の調製のために細胞の懸濁液を使用する方法が、挙げられる。

【 0 0 7 4 】

サンプルの調製は、例えば、組織のサンプル、体液のサンプル、細胞のサンプルを患者から取得する工程を包含し得る。本発明に従って、サンプルの調製はまた、サンプルのさらなる調製の幾つかの工程 (例えば、解剖物 (d i s s e c t i o n) の調製、細胞懸濁物の調製、検査されるべき細胞の顕微鏡スライドへの塗り広げすなわち塗布、組織アレイの調製、ポリペプチドまたは核酸の単離、ペプチドもしくは核酸を固定した固相の調製または決定されるべき分子が共有結合または非共有結合したビーズ、膜、またはスライドの調製) を包含し得る。

20

【 0 0 7 5 】

本発明の特定の実施形態において、本方法は、自動化様式において行われ得る。方法の自動化は、顕微鏡的手段による固相表面上の組織学的試料または細胞学的試料の自動化染色および自動化分析によって達成され得る。別の実施形態において、自動化は、溶液内の細胞の染色のフローサイトメトリー分析を包含し得る。

30

【 0 0 7 6 】

本発明の方法が適用され得る形成異常病変は、I N K 4 a 遺伝子産物 (例えば、p 1 6 I N K 4 a または p 1 4 A R F) の過剰発現によって特徴付けられる任意の形成異常病変を含む。特定の実施形態において、これらの病変は、HPVのような乳糖腫ウイルスによる感染に伴う形成異常である。1つの実施形態において、HPVは、HPV 1 6、HPV 1 8、HPV 3 1、HPV 3 3、HPV 3 5、HPV 3 9、HPV 4 5、HPV 5 1、HPV 5 2、HPV 5 6、HPV 5 8、HPV 5 9、HPV 6 6、HPV 6 8 などのような、高危険度HPVサブタイプであり得る。1つの実施形態において、本発明に従って検出され得る形成異常病変としては、肛門性器病変、気道の病変、頭部および首の病変、または皮膚およびその付属器の病変が挙げられる。このような病変としては、例えば、肛門または直腸の形成異常、外陰の形成異常、膣の形成異常、子宮頸または陰茎の形成異常、気管支、肺、口腔または鼻咽頭腔の形成異常が、挙げられる。

40

【 0 0 7 7 】

本発明の別の局面は、本発明に従う方法を実践するキットを試験することである。このキットは、例えば、診断キットまたは研究キットであり得る。

【 0 0 7 8 】

本発明に従うキットは、I N K 4 a 遺伝子産物を検出するために適した、少なくとも1つの薬剤を含む。

【 0 0 7 9 】

50

従って、本発明に従うキットは、以下を含み得る：

1つ以上のINK4a遺伝子産物の検出のための試薬

1つ以上の増殖マーカー遺伝子産物の検出のための試薬

検出反応を行うために一般に使用される試薬および緩衝液（例えば、緩衝液、レポーター反応物（色素など）、キャリア物質他）

ポジティブコントロール反応を行うためのINK4a遺伝子産物サンプル

ポジティブコントロール反応を行うための増殖マーカー遺伝子産物サンプル。

【0080】

マーカー遺伝子産物の検出のための試薬としては、マーカー遺伝子産物に結合可能な任意の薬剤が挙げられ得る。このような試薬としては、タンパク質、ポリペプチド、核酸、
10 ペプチド核酸、糖タンパク質、プロテオグリカン、多糖類または脂質が挙げられ得る。

【0081】

ポジティブコントロールを行うためのINK4a遺伝子産物サンプルおよび増殖マーカー遺伝子産物サンプルとしては、例えば、適用可能形態（例えば、溶液または塩）の核酸、適用可能形態のペプチド、組織切片サンプルまたはポジティブ細胞が挙げられ得る。

【0082】

本発明の好ましい実施形態において、マーカー遺伝子産物の検出は、ポリペプチドのレベルにおいて実施される。この実施形態において、結合剤は、例えば、マーカー遺伝子産物またはそのフラグメントに特異的な抗体であり得る。

【0083】

試験キットの別の実施形態において、マーカー遺伝子産物の検出は、核酸レベルにおいて実施される。本発明のこの実施形態において、検出のための試薬は、例えば、核酸プローブまたは該マーカー核酸に対する逆相補的なプライマーであり得る。
20

【0084】

本発明は、新生物病変および/または形成異常病変および前新生物病変の識別のための方法を提供し、これらは、p16^{INK4a}の過剰発現の評価によって、やはり検出可能にp16^{INK4a}を発現する他の細胞から、組織学的試験手順および/または細胞学的試験手順の過程で同定され得る。この方法は、2つ以上のINK4a遺伝子産物の発現された遺伝子産物の検出に基づく。

【0085】

従って、解決すべき問題は、形成異常細胞および悪性増殖能を有さない他の細胞との間を識別するための方法の提供である。この方法は、形成異常の任意の段階で適用され得、p16^{INK4a}過剰発現に基づく細胞学的診断方法が、化生細胞の同定のためのさらなる情報を必要とする場合、特に初期段階では有用で有り得る。
30

【0086】

その上、本発明は、本発明に従う方法を行うキットを提供する。

【0087】

以下の実施例は、例示の目的でのみ提示されており、本明細書中で開示される発明の範囲を限定することを意図しない。例示の目的のために、本明細書中で開示される方法は、組織学的調製物を用いて例証される。組織学的実施例は、どの方法において染色される細胞が、形成異常または化生として分類されるか否かを判定することを助ける。プロトコル適切な様式に改変することによって、この方法を、容易に細胞学的試料に移行し得る。これらの改変は、当業者に公知である。
40

【実施例】

【0088】

（実施例1：子宮頸のサンプルにおけるp16^{INK4a}およびKi67の過剰発現の免疫蛍光検出（二重染色））

ホルマリン固定し、パラフィン包埋した子宮頸の組織サンプルの切片を、p16^{INK4a}およびKi67に特異的な抗体を用いて免疫蛍光染色した。

【0089】

組織切片を、キシレンおよび段階的なエタノール中でのインキュベーションを通して再水和し、Aqua bidestに移した。抗原検索 (Antigen Retrieval) を、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) で、p16^{INK4a} および Ki67 について行った。その結果、スライドを 95 ~ 98 の湯浴中で 40 分間熱した。スライドを、室温まで 20 分間冷却し、洗浄緩衝液 (50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、0.05% Tween 20 / Dako Cytomation: コード番号 S3006) に移した。

【0090】

二次抗体 (種: ヤギ) の非特異結合を避けるために、試料を、10% ヤギ血清と共に 30 分間室温でインキュベートした。

【0091】

次いで、スライドを、一次抗体であるマウス抗ヒト p16^{INK4a} 抗体 (3.48 μg/ml) およびウサギ抗 Ki67 (1:25) と共に室温で 30 分間インキュベートし、次いで、スライドを洗浄緩衝液でリンスし、そして新鮮な緩衝液浴中に 5 分間置いた。過剰な緩衝液を捨て、そして各試料を、Alexa Fluor (登録商標) 488 が結合したヤギ抗マウス抗体および Alexa Fluor (登録商標) 546 が結合したヤギ抗ウサギ抗体を含有する二次試薬 200 μl で覆い、次いで、室温で 30 分間インキュベートした。次いで、スライドを以前のように 2 回洗浄し、そして蛍光のための特別なマウンティング培地 (special mounting medium) で直接マウントした。

【0092】

スライドの顕微鏡検査は、p16^{INK4a} に対して免疫反応性でありかつ Ki67 についても免疫反応性である細胞が、形成異常病変のサンプルとして顕微鏡的に同定され得るサンプル中にのみ見出され得ることを明らかにする。化生に由来する p16^{INK4a} 特異的の反応によって染色された細胞は、Ki67 に特異的な反応によって染色されない。細胞増殖マーカー染色の顕微鏡検査は、p16^{INK4a} を過剰増殖する化生細胞が、Ki67 に対する抗体に対して免疫反応性でないことを示す。対照的に、形成異常組織領域を含むサンプルは、Ki67 に免疫反応性であり、かつ p16^{INK4a} に対する抗体に免疫反応性である細胞を含む。従って、形成異常とは対照的に、化生 (metaplasia) において、Ki67 特異的抗体および p16^{INK4a} 特異的抗体を用いて二重染色される細胞は存在しない。

【0093】

図 1 ~ 6 は、子宮頸の重篤な形成異常および扁平上皮化生についての Ki67 に対する抗体および p16^{INK4a} に対する抗体を用いた染色結果を示す。Ki67 についての免疫反応性は、赤色蛍光を与え、p16^{INK4a} についての免疫反応性は、緑色蛍光を与え、そして赤色および緑色の蛍光の重なりは、黄色の蛍光を与える。形成異常試料 (図 1 ~ 3) において、形成異常の多くの細胞は、Ki67 について核がポジティブであること、および p16^{INK4a} についてポジティブであることを示し、従って、黄色蛍光を生じる (図 3 参照)。対照的に、化生試料 (図 4 ~ 6) において、p16^{INK4a} をポジティブに発現する領域は、Ki67 に対していかなるポジティブな染色も示さず、これらの領域において抗原の発現を欠くことを示す。二重染色は、この試料において観察され得 (図 6)、その結果、この試料において黄色蛍光を生じる細胞はない。

【0094】

この結果は、Ki67 に特異的な試薬による細胞の二重染色が、形成異常からの p16^{INK4a} 過剰発現する化生の識別を可能にすることを示す。

【0095】

(実施例 2: インサイチュハイブリダイゼーションによる、子宮頸のサンプル中の p14 ARF および mcm2 を同時発現する細胞の検出)

子宮頸のスメアを、インサイチュ染色反応において、p16^{INK4a} および mcm2 の mRNA レベルについて半定量的に分析し得る。染色反応は、以下のように行う：

10

20

30

40

50

再水和のために、スプレー固定したスメア (spray-fixed smear) を、新鮮な 50% EtOH において震盪デバイス上でインキュベートする。固定手順によって産生された PEG フィルムを、徹底したリンスによって除去する。次いで、スメアを aqua bidest 中でリンスする。スメアを、プロテイナーゼ K (PBS 中 10 μ g/ml) と共に 37 で 10 分間インキュベートする。次いで、スライドを洗浄緩衝液 (PBS/0.1% Tween 20) に移し、そして最後に、細胞を含む領域を脂質ペンシル (lipid-pencil) で囲った。

【0096】

ハイブリダイゼーション混合物を、50 μ l の調製済み (ready to use) ハイブリダイゼーション緩衝液 (DAKO A/S, Glostrup, Denmark) と約 5 ~ 10 pmol のプローブとを混合することにより調製する。プローブは、それぞれの mRNA に対して相補的な配列のビオチン標識化オリゴヌクレオチドおよびジゴキシゲニン標識化オリゴヌクレオチドである。

10

【0097】

ハイブリダイゼーション混合物を、95 まで加熱し、そしてその後、37 で平衡化する。煮沸手順の後、スメアを各 50 μ l のハイブリダイゼーション混合物とともに 42 で 4 時間インキュベートする。サンプルを、過剰量の洗浄緩衝液中で (2xSSC 中 37 で 15 分間を 2 回、1xSSC 中 37 で 15 分間を 1 回) 洗浄する。次いで、スメアを 2xSSC 中で室温で 2 回リンスする。この洗浄手順後、解剖物をブロッキング緩衝液 (NEN, Blocking buffer) と共に室温で 30 分間インキュベートする。次いで、続けて 1:100 希釈 (ブロッキング緩衝液中、上記参照) ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼおよびモノクローナルマウス HRP 標識化抗ジゴキシゲニン抗体 (Molecular Probes) と共に 1 時間インキュベーションする。次いで、スメアを 1xPBS/0.1% Triton X-100 において室温で 10 分間 2 回洗浄し、続けて 1xPBS、50 mM MgCl₂ (pH 9.2) で室温で 10 分間の洗浄工程を 1 回行う。次いで、ELF 97 ホスフェート (Molecular Probes) を用いて室温で 10 秒間 ~ 7 分間の染色反応を行う。過剰な基質を、1xPBS/0.1% Triton X-100 で室温で 10 分間 3 回洗浄する。第 2 の染色工程において、切片を、Tyramides-Alexa-Fluor 594 と共に 10 秒間 ~ 7 分間インキュベートする。過剰な基質を、1xPBS/0.1% Triton X-100 で室温で 10 分間 3 回洗浄する。最後に、スメアを H₂O bidest. 中に浸し、そして蛍光マウンティング培地 (Dako Cytomation) で包埋する。次いで、染色した解剖物を、蛍光顕微鏡によって分析し得る。

20

30

【0098】

スライドの顕微鏡検査は、p16^{INK4a} の発現についてポジティブでありかつ mcm2 を発現する細胞が、顕微鏡的に形成異常病変のサンプルとして同定され得るサンプルにおいてのみ見出され得ることを明らかにする。p16^{INK4a} 特異的反応 (化生として同定可能である) によって染色された細胞は、mcm2 特異的反応によって染色されない。mRNA ハイブリダイゼーションの顕微鏡検査は、p16^{INK4a} を過剰発現する化生細胞が、mcm2 の mRNA を有意に発現しないことを示す。対照的に、形成異常細胞は、mcm2 に特異的なプローブおよび p16^{INK4a} に対するプローブでのインサイチュハイブリダイゼーションによって染色され得る。従って、形成異常細胞におけるのは対照的に、化生細胞において、Ki67 特異的プローブおよび p16^{INK4a} 特異的プローブを用いた観察され得る二重染色は、存在しない。

40

【0099】

この結果は、mcm2 について特異的な試薬を用いた細胞の二重染色は、p16^{INK4a} を過剰発現する化生の形成異常からの識別を可能にする。

【0100】

(実施例 3: 子宮頸のサンプルにおける p16^{INK4a} および Ki-S2 の過剰発現の免疫蛍光検出 (二重染色))

50

Merckofix (登録商標) 固定した子宮頸の細胞学的サンプル (従来のなスミアおよび液体ベースの細胞学 (ThinPreps (登録商標))) を、p16^{INK4a} およびKi-S2 に特異的な抗体を用いて免疫蛍光染色した。

【0101】

従来のなスミアおよび液体ベースの細胞学的サンプル (ThinPreps (登録商標)) を、エタノール (50%) 中で10分間再水和し、そしてAquadest 中に移した。抗原検索を、10mMクエン酸緩衝液 (pH 6.0) で、p16^{INK4a} およびKi67 について行った。次いで、スライドを95 ~ 98 の湯浴中で40分間加熱した。スライドを、室温まで20分間冷却し、洗浄緩衝液 (50mM Tris-HCl、150mM NaCl、0.05% Tween 20/DakoCytomation: コード番号S3006) に移し、そして最後に、サンプルを脂質ペンシル (lipid-pencil) で囲った。

10

【0102】

二次抗体 (種: ヤギ) の非特異結合を避けるために、試料を、10% ヤギ血清と共に30分間室温でインキュベートした。

【0103】

次いで、スライドを、一次抗体であるマウス抗ヒトp16^{INK4a} 抗体 (クローンE6H4) (3.48 μg/ml) およびウサギ抗Ki-S2 (1:25) と共に室温で30分間インキュベートし、次いで、スライドを洗浄緩衝液でリンスし、そして新鮮な緩衝液浴中に5分間置いた。過剰な緩衝液を捨て、そして各試料を、AlexaFluor (登録商標) 488 が結合したヤギ抗マウス抗体およびAlexaFluor (登録商標) 546 が結合したヤギ抗ウサギ抗体を含有する二次試薬200 μl で覆い、次いで、室温で30分間インキュベートした。次いで、スライドを以前のように2回洗浄し、そして蛍光のための特別なマウンティング培地 (special mounting medium) で直接マウントした。

20

【0104】

スライドの顕微鏡検査は、p16^{INK4a} に対して免疫反応性でありかつKi-S2 についても免疫反応性である細胞は、形成異常細胞として顕微鏡的に同定され得ることを明らかにする。化生に由来するp16^{INK4a} 特異的の反応によって染色された細胞は、Ki-S2 に特異的な反応によって染色されず、熟練した病理学者によって化生起源であるかまたは子宮内膜起源であるかのどちらかに分類され得る。細胞増殖マーカー染色の顕微鏡検査は、p16^{INK4a} を過剰発現する化生細胞が、Ki-S2 に対する抗体に対して免疫反応性でないことを示す。対照的に、形成異常細胞は、Ki-S2 に免疫反応性であり、そしてp16^{INK4a} に対する抗体に免疫反応性である。従って、形成異常細胞におけるのは対照的に、化生において、Ki-S2 特異的の抗体およびp16^{INK4a} 特異的の抗体を用いて二重染色され得る細胞は存在しない。

30

【0105】

この結果は、Ki-S2 に特異的な試薬を用いる細胞の二重染色が、p16^{INK4a} を過剰発現する化生細胞を形成異常細胞から識別することを可能にすることを示す。

【0106】

(実施例4: 小細胞肺癌と診断された個体の気管支肺胞洗浄液のサンプルにおけるp16^{INK4a}、Ki67 およびPCNAの過剰発現の免疫蛍光検出 (二重染色))

患者の気管支肺胞洗浄液試料に含まれる細胞を、ThinPrep 技術に従って調製した。小細胞肺癌と診断された患者の洗浄液のMerckofix (登録商標) 固定した細胞学的サンプルを、p16^{INK4a}、Ki67 およびPCNA に特異的な抗体を用いて免疫蛍光染色した。

40

【0107】

この実験において、2つの増殖マーカーPCNAとKi67 とに対する免疫反応性由来する染色の間を識別しない手順を使用した。本発明の文脈において、細胞において、どれか1つの増殖マーカーが発現されるか否かを必ずしも答えなければいけない訳ではない

50

。主な疑問は、何らかの増殖マーカーが発現されるか否かである。このように、実験の過程において、増殖マーカーの存在の指標である同じ蛍光シグナルを生じる手順を選択した。この手順は、細胞増殖特徴の検出感度を改善するために適している。場合によっては、この手順を、3つ、4つまたはそれより多い細胞増殖を特徴付けるマーカー分子についての1つの検出可能シグナルを与えるように適用し得る。同様に、特定の状況下で、INK4a遺伝子発現産物についても同じことがいえることがある。場合によっては、異なった増殖マーカー分子についての異なった染色シグナルが、所望され得ることが理解されなければならない。この手順は、それぞれの実験の必需品に適用され得る。

【0108】

組織切片を、キシレンおよび段階的なエタノール中でのインキュベーションを通して再水和し、Aqua bidestに移した。従来のスマアおよび液体ベースの細胞学サンプル(Thin Preps (登録商標))を、エタノール(50%)中で10分間再水和し、そしてAqua bidest中に移した。抗原検索を、10mMクエン酸緩衝液(pH 6.0)で、p16^{INK4a}、Ki67およびPCNAについて行った。次いで、スライドを95~98の湯浴中で40分間加熱した。スライドを、室温まで20分間冷却し、洗浄緩衝液(50mM Tris-HCl、150mM NaCl、0.05% Tween 20/Dako Cytomation:コード番号S3006)に移し、そして最後に、サンプルを脂質ペンシル(lipid-pencil)で囲った。

10

【0109】

二次抗体(種:ヤギ)の非特異結合を避けるために、試料を、10%ヤギ血清と共に30分間室温でインキュベートした。

20

【0110】

次いで、スライドを、一次抗体であるマウス抗ヒトp16^{INK4a}抗体(3.48 μg/ml)、ウサギ抗Ki67およびウサギ抗PCNA(各1:25)と共に室温で30分間インキュベートし、次いで、スライドを洗浄緩衝液でリンスし、そして新鮮な緩衝液浴中に5分間置いた。過剰な緩衝液を捨て、そして各試料を、Alexa Fluor(登録商標)488が結合したヤギ抗マウス抗体およびAlexa Fluor(登録商標)546が結合したヤギ抗ウサギ抗体を含有する二次試薬200 μlで覆い、次いで、室温で30分間インキュベートした。次いで、スライドを以前のように2回洗浄し、そして蛍光のための特別なマウンティング培地(special mounting medium)で直接マウントした。

30

【0111】

スライドの顕微鏡検査は、p16^{INK4a}に対して免疫反応性でありかつKi67またはPCNAについても免疫反応性である細胞は、小細胞肺癌の細胞として顕微鏡的に同定され得ることを明らかにする。化生に由来するp16^{INK4a}特異的反応によって染色された細胞は、Ki67およびPCNAに特異的な反応によっては染色されない。細胞増殖マーカー染色の顕微鏡検査は、p16^{INK4a}を過剰発現する化生細胞が、Ki67およびPCNAに対する抗体に対して免疫反応性でないことを示す。対照的に、形成異常細胞を含むサンプルは、Ki67/PCNAに免疫反応性であり、かつp16^{INK4a}に対する抗体に免疫反応性である細胞を含む。従って、形成異常におけるのとは対照的に、化生において、Ki67およびPCNAならびにp16^{INK4a}に特異的な抗体を用いて三重染色され得る細胞は存在しない。

40

【0112】

この結果は、Ki67/PCNAに特異的な試薬を用いた細胞の三重染色が、p16^{INK4a}過剰発現非形成異常細胞を形成異常細胞から識別することを可能にすることを示す。

【0113】

(実施例5:子宮頸由来細胞におけるmcm5 mRNA、p14ARFタンパク質およびKi67タンパク質の同時検出による形成異常細胞のフローサイトメトリー検出)

子宮頸の細胞学的サンプル(PBS(pH 7.4)中の細胞懸濁物)を、p14AR

50

F 特異的抗体および Ki-67 特異的抗体、ならびに mcm-5 についてのオリゴプローブを用いて蛍光染色し、3色蛍光 FACS 分析によって評価した。

【0114】

細胞を遠心分離し、上清をデカントし、そして 100 ml の Permeafix (Ortho Diagnostic, Raitan, NJ, USA) を用いて、室温で 1 時間、固定および透過処理した。細胞を、滅菌した PBS (pH 7.4) 中で洗浄し、ペレットにし、そして 100 ml の Permeafix 中に室温で 1 時間再懸濁した。細胞を滅菌した PBS (pH 7.4) 中で洗浄し、ペレットにし、そして滅菌した PBS 中に再懸濁した。これらを、PE 結合体化抗 p14 ARF 抗体および PE-Cy5-結合体化抗 Ki67 抗体と共に、+4 で 1 時間インキュベートした。細胞を滅菌した PBS (pH 7.4) 中で洗浄し、ペレットにし、そして 100 ml の Permeafix 中に室温で 30 分間再懸濁した。細胞を滅菌した PBS 中で洗浄し、遠心分離によってペレットにし、次いで、2x 標準クエン酸生理食塩水 (SSC) 中で再度洗浄した。遠心分離後、細胞ペレットを 500 ng の 5-カルボキシ-フルオレセイン両端標識 mcm5 特異的オリゴヌクレオチドプローブ含有のハイブリダイゼーション溶液 (2x SSC、30% ホルムアミド、超音波処理したサケ精子、酵母運搬 DNA) 中に再懸濁した。細胞間ハイブリダイゼーションを 42 で 1 時間実行し、その後、続けて 2x SSC、0.5% Triton X-100 中および 1x SSC、0.5% Triton X-100 中で、42 で洗浄した。細胞を、分析のために PBS (pH 8.3) 中に再懸濁し、そしてフローサイトメーター (FACSscan, Becton Dickinson, IS) で分析した。各分析につき、30,000 ~ 100,000 のゲート通過事象 (gated event) を収集した。データ分析を、CellQuest (Becton Dickinson, IS) を用いて行った。

【0115】

フローサイトメーター分析は、p14 ARF に対して免疫反応性でありかつ Ki-67 および / または mcm5 のオリゴプローブについても免疫反応性である細胞が、子宮頸の形成異常病変を有する患者のサンプルにおいてのみ見出され得ることを明らかにする。形成異常病変を有さない女性由来のサンプルは、p14 ARF と Ki67 または mcm5 との同時染色を示さなかった。この結果は、Ki67 および / または mcm5 に特異的な試薬を用いた細胞の二重染色または三重染色が、p14 ARF 過剰発現形成異常細胞からの p14 ARF 過剰発現非形成異常細胞の識別を可能にすることを示す。

【0116】

(実施例 6 : 子宮頸の組織学的サンプルにおける p16^{INK4a} および Ki67 の過剰発現の免疫酵素学的検出 (連続的二重染色))

ホルマリン固定し、パラフィン包埋した子宮頸の組織サンプルの切片を、p16^{INK4a} および Ki67 に特異的な抗体を用いて免疫酵素学的二重染色した。

【0117】

組織切片を、キシレンおよび段階的なエタノール中でのインキュベーションを通して再水和し、Aqua bidest に移した。抗原検索を、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) で、p16^{INK4a} および Ki67 について行った。次いで、スライドを 95 ~ 98 の湯浴中で 40 分間加熱した。スライドを、室温まで 20 分間冷却し、洗浄緩衝液 (Dako Cytomation) に移した。

【0118】

内因性ペルオキシダーゼ活性を、3% H₂O₂ (Dako Cytomation) で室温で 5 分間ブロックした。

【0119】

室温で 5 分間スライドを洗浄した後、これらを、一次抗体であるマウス抗ヒト p16^{INK4a} 抗体 (MTM) と共に室温で 30 分間インキュベートし、次いで、洗浄緩衝液でリンスし、そして新鮮な緩衝液浴中に 5 分間置いた。過剰な緩衝液を捨て、そして各試料を 200 μl の二次試薬 (EnVision ヤギ抗マウス-ペルオキシダーゼ / Dako

Cytomation)で覆い、室温で30分間インキュベートした。次いで、スライドを以前のように3回洗浄した。DAB(DakoCytomation)を使用し、スライドを基質色素原(chromogen)複合体と共に室温で10分間インキュベートすることにより、呈色可視化した。反応を脱イオン化水中で停止させ、スライドを洗浄緩衝液中に置いた。

【0120】

洗浄後、スライドを二次抗体(ウサギ抗ヒトKi67抗体(Dianova, clone Ab-3))と共に室温で30分間インキュベートし、次いで、洗浄緩衝液でリンスし、新鮮な緩衝液浴中に5分間置いた。過剰な緩衝液を捨て、そして各試料を200 μ lの二次試薬(ヤギ抗ウサギ-アルカリホスファターゼ標識/DakoCytomation)で覆い、室温で30分間インキュベートした。次いで、スライドを以前のように3回洗浄した。FastRed(BioGenex)を使用し、スライドを基質色素原複合体と共に室温で30分間インキュベートすることにより、呈色可視化した。反応を脱イオン化水中で停止させた。

10

【0121】

ヘマトキシリン(DakoCytomation)による室温で2分間の対比染色後、スライドを水道水の流水中で室温で10分間インキュベートし、次いで、水性マウンティング培地(Aquatex/MERCK)でマウントした。

【0122】

スライドの顕微鏡検査は、p16^{INK4a}に対して免疫反応性でありかつKi67についても免疫反応性である細胞は、形成異常病変のサンプルとして顕微鏡的に同定され得るサンプル中のみ見出され得ることを明らかにする。化生に由来するp16^{INK4a}特異的反応によって染色された細胞は、Ki67に特異的な反応によって染色されない。細胞増殖マーカー染色の顕微鏡検査は、p16^{INK4a}を過剰発現する化生細胞が、Ki67に対する抗体に対して免疫反応性でないことを示す。対照的に、形成異常組織領域を含むサンプルは、Ki67に免疫反応性であり、そしてp16^{INK4a}に対する抗体に免疫反応性である細胞を含む。従って、形成異常におけるのは対照的に、化生において、Ki67特異的抗体およびp16^{INK4a}特異的抗体を用いて二重染色され得る細胞はない。

20

【0123】

図7において示される結果は、Ki67およびp16^{INK4a}に特異的な試薬を用いた細胞の二重染色が、呈色染色手順においてもまた、特異的の二重染色パターンを可能にすることを示す。

30

【0124】

(実施例7:子宮頸の細胞学的サンプルにおけるp16^{INK4a}およびKi67の過剰発現の免疫酵素学的検出(連続的の二重染色))

Merckofix(登録商標)固定した子宮頸の細胞学的サンプル(従来のなスメアおよび液体ベースの細胞学的サンプル(ThinPreps(登録商標)))を、p16^{INK4a}およびKi67に特異的な抗体を用いて免疫酵素学的の二重染色した。

【0125】

従来のなスメアおよび液体ベースの細胞学的サンプルを、エタノール(50%)中で室温で10分間再水和し、そしてAquadest中に移した。抗原検索を、10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)で、p16^{INK4a}およびKi67について行った。次いで、スライドを95~98の湯浴中で40分間加熱した。スライドを、室温まで20分間冷却し、洗浄緩衝液に移した。

40

【0126】

内因性ペルオキシダーゼ活性を、3% H₂O₂で室温で5分間ブロックした。

【0127】

スライドを洗浄した後、これらを、一次抗体であるマウス抗ヒトp16^{INK4a}抗体と共に室温で30分間インキュベートし、次いで、洗浄緩衝液でリンスし、そして新鮮な

50

緩衝液浴中に5分間置いた。過剰な緩衝液を捨て、そして各試料を200 μ lの二次試薬(EnVisionヤギ抗マウス-ペルオキシダーゼ)で覆い、室温で30分間インキュベートした。次いで、スライドを以前のように3回洗浄した。DAB(DakoCytomation)を使用し、スライドを基質色素原複合体と共に室温で10分間インキュベートすることにより、呈色可視化した。反応を脱イオン化水中で停止させ、スライドを洗浄緩衝液中に置いた。

【0128】

洗浄後、スライドを二次抗体(ウサギ抗ヒトKi67抗体(Dianova, clone Ab-3))と共に室温で30分間インキュベートし、次いで、洗浄緩衝液でリンスし、新鮮な緩衝液浴中に5分間置いた。過剰な緩衝液を捨て、そして各試料を200 μ lの二次試薬(ヤギ抗ウサギ-アルカリホスファターゼ標識/DakoCytomation)で覆い、室温で30分間インキュベートした。次いで、スライドを以前のように3回洗浄した。FastRed(BioGenex)を使用し、スライドを基質色素原複合体と共に室温で30分間インキュベートすることにより、呈色可視化した。反応を脱イオン化水中で停止させた。

10

【0129】

ヘマトキシリン(DakoCytomation)による室温での2分間の対比染色後、スライドを水道水の流水中で室温で10分間インキュベートし、次いで、水性マウンティング培地(Aquatex/MERCK)でマウントした。

【0130】

スライドの顕微鏡検査は、p16^{INK4a}に対して免疫反応性でありかつKi67についても免疫反応性である細胞は、それらの形態学に基づいて形成異常細胞と同定されることを明らかにする。化生に由来するp16^{INK4a}特異的反応によって染色された細胞は、Ki67に特異的な反応によって染色されない。細胞増殖マーカー染色の顕微鏡検査は、p16^{INK4a}を過剰増殖する化生細胞が、Ki67に対する抗体に対して免疫反応性でないことを示す。対照的に、形成異常細胞は、Ki67に免疫反応性であり、そしてp16^{INK4a}に対する抗体に免疫反応性である。従って、化生細胞とは対照的に、形成異常細胞における1細胞の二重染色は、Ki67特異的抗体およびp16^{INK4a}特異的抗体を用いて産生され得る。

20

【0131】

図8において示される結果は、Ki67およびp16^{INK4a}に特異的な試薬を用いた細胞の二重染色が、呈色染色手順においてもまた、特異的の二重染色パターンを可能にすることを示す。

30

【図面の簡単な説明】

【0132】

【図1】子宮頸の組織学的試料の蛍光染色；図1は、p16^{INK4a}に対する抗体を使用する重篤な形成異常の染色を示す；実験の詳細に関しては実施例1を参照のこと；p16^{INK4a}についての免疫反応性は、緑色蛍光を与える。病変のほぼ全ての細胞は、細胞質および核において、拡散的にポジティブに染まる。

【図2】子宮頸の組織学的試料の蛍光染色；図2は、Ki67に対する抗体を使用する重篤な形成異常の染色を示す；実験の詳細に関しては実施例1を参照のこと；Ki67についての免疫反応性は、赤色蛍光を与える。形成異常の多くの細胞は、Ki67についてポジティブな核を示す。

40

【図3】子宮頸の組織学的試料の蛍光二重染色；図3は、Ki67に対する抗体およびp16^{INK4a}に対する抗体を使用する重篤な形成異常の染色を示す；実験の詳細に関しては実施例1を参照のこと；Ki67についての免疫反応性は、赤色蛍光を与える；p16^{INK4a}についての免疫反応性は、緑色蛍光を与える；赤色蛍光と緑色蛍光の重なりは、黄色蛍光を与える。形成異常の多くの細胞は、Ki67およびp16^{INK4a}についてポジティブである核を示し、黄色蛍光を生じる。

【図4】子宮頸の組織学的試料の蛍光染色；図4は、p16^{INK4a}に対する抗体を使

50

用する扁平上皮化生の染色を示す；実験の詳細に関しては実施例 1 を参照のこと；p 1 6^{I N K 4 a} についての免疫反応性は、緑色蛍光を与える。化生の幾つかの細胞は、細胞質および核において、拡散的にポジティブに染まる。

【図 5】子宮頸の組織学的試料の蛍光染色；図 5 は、K i 6 7 に対する抗体を使用する扁平上皮化生の染色を示す；実験の詳細に関しては実施例 1 を参照のこと；K i 6 7 についての免疫反応性は、赤色蛍光を与える。扁平上皮化生の多数の細胞が K i 6 7 についてポジティブな核を示す。p 1 6^{I N K 4 a} をポジティブに発現することが同定されている領域は、K i 6 7 についてのいかなるポジティブの染色も示さず、これは、それらの領域における抗原の発現の欠損を示す。

【図 6】子宮頸の組織学的試料の蛍光二重染色；図 6 は、K i 6 7 に対する抗体および p 1 6^{I N K 4 a} に対する抗体を使用する扁平上皮化生の染色を示す；実験の詳細に関しては実施例 1 を参照のこと；K i 6 7 についての免疫反応性は、赤色蛍光を与える；p 1 6^{I N K 4 a} についての免疫反応性は、緑色蛍光を与える；赤色蛍光と緑色蛍光の重なりは、黄色蛍光を与える。p 1 6^{I N K 4 a} をポジティブに発現する領域は、K i 6 7 についてのいかなるポジティブの染色も示さず、これは、それらの領域における抗原の発現の欠損を示す。試料において、黄色蛍光を生じる細胞は存在しない。

【図 7】子宮頸の組織学的試料の呈色二重染色；図 7 は、K i 6 7 に対する抗体および p 1 6^{I N K 4 a} に対する抗体を使用する重篤な形成異常の染色を示す；実験の詳細に関しては実施例 6 を参照のこと；K i 6 7 についての免疫反応性は、赤色核染色を与える；p 1 6^{I N K 4 a} についての免疫反応性は、細胞全体にわたって茶色の染色を与える；二重染色は、赤色の核を有する茶色の細胞を与える。形成異常の多くの細胞は、核について K i 6 7 ポジティブでありそして p 1 6^{I N K 4 a} についてポジティブであることを示し、従って、赤色の核を有する茶色の細胞のパターンを生じる。

【図 8】子宮頸の細胞学的試料の呈色二重染色；図 8 は、K i 6 7 に対する抗体および p 1 6^{I N K 4 a} に対する抗体を使用する重篤な形成異常の染色を示す；実験の詳細に関しては実施例 7 を参照のこと；K i 6 7 についての免疫反応性は、赤色核染色を与える；p 1 6^{I N K 4 a} についての免疫反応性は、細胞全体にわたって茶色の染色を与える；二重染色は、赤い核を有する茶色の細胞を与える。形成異常の多くの細胞は、核について K i 6 7 ポジティブでありそして p 1 6^{I N K 4 a} ポジティブであることを示し、従って、赤い核を有する茶色の細胞のパターンを生じる。

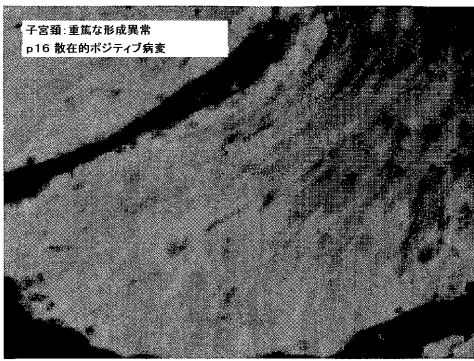
10

20

30

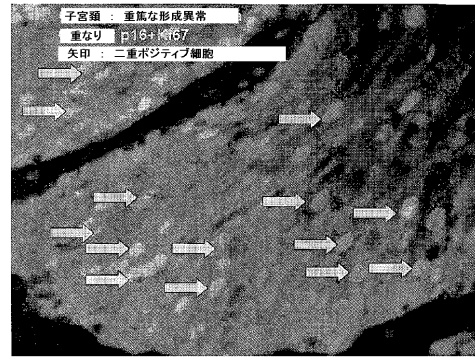
【 図 1 】

Figure 1:



【 図 3 】

Figure 3:



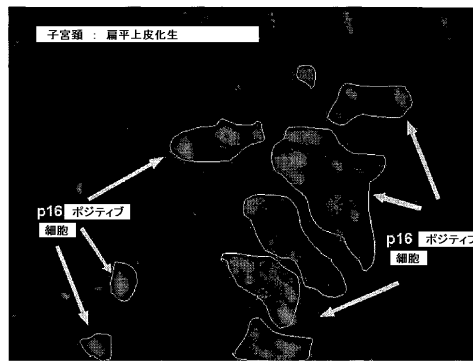
【 図 2 】

Figure 2:



【 図 4 】

Figure 4:



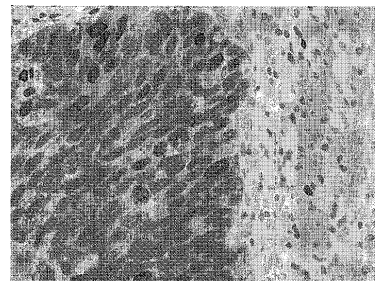
【 図 5 】

Figure 5:



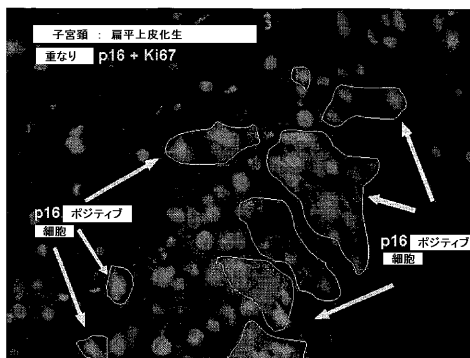
【 図 7 】

Figure 7:



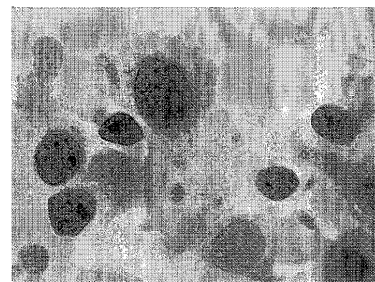
【 図 6 】

Figure 6:



【 図 8 】

Figure 8:



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP 03/50738

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/574		
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) IPC 7 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, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RIETHDORF LUTZ ET AL: "Human papillomaviruses, expression of p16INK4A, and early endocervical glandular neoplasia." HUMAN PATHOLOGY, vol. 33, no. 9, September 2002 (2002-09), pages 899-904, XP009008281 ISSN: 0046-8177	35-38
A	abstract; tables 1-4 ----- -/--	1-34
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 16 March 2004		Date of mailing of the international search report 30/03/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Luis Alves, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/50738

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BEPLER G ET AL: "Mcm2: A novel diagnostic marker for early detection of premalignant lesions of the lung." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, vol. 42, March 2001 (2001-03), page 356, XP001146358 92nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; New Orleans, LA, USA; March 24-28, 2001, March, 2001 ISSN: 0197-016X abstract</p>	8
A	<p>VON KNEBEL DOEBERITZ MAGNUS: "New markers to identify HPV-transformed dysplastic cervical epithelia." ACTA CYTOLOGICA, vol. 46, no. 1 Supplement, January 2002 (2002-01), page 156, XP009008277 14th International Congress of Cytology; Amsterdam, Netherlands; May 27-31, 2001, January-February, 2002 ISSN: 0001-5547 abstract</p>	9
A	<p>SIMONART THIERRY ET AL: "Antiproliferative and apoptotic effects of iron chelators on human cervical carcinoma cells." GYNECOLOGIC ONCOLOGY, vol. 85, no. 1, April 2002 (2002-04), pages 95-102, XP002236573 April, 2002 ISSN: 0090-8258 abstract</p>	10
A	<p>KLAES R ET AL: "Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER. UNITED STATES 15 APR 2001, vol. 92, no. 2, 15 April 2001 (2001-04-15), pages 276-284, XP002236574 ISSN: 0020-7136 abstract</p>	1-38
P,A	<p>US 2003/143646 A1 (WILLIAMS GARETH H ET AL) 31 July 2003 (2003-07-31) examples</p>	8,9,37,38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/50738

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	RIDDER R ET AL: "Novel biomarkers for HPV associated lesions" 1 April 2003 (2003-04-01), GYNAKOLOGE 01 APR 2003 GERMANY, VOL. 36, NR. 4, PAGE(S) 323-330, XP0001179800 ISSN: 0017-5994 page 325, left-hand column, last paragraph - page 328, middle column, paragraph 1 -----	1-38
P,A	KLAES RUEDIGER ET AL: "p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia." AMERICAN JOURNAL OF SURGICAL PATHOLOGY, vol. 26, no. 11, 20 November 2002 (2002-11-20), pages 1389-1399, XP0009008266 ISSN: 0147-5185 abstract -----	1-38
E	EP 1 387 173 A (MTM LAB AG) 4 February 2004 (2004-02-04) abstract -----	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/50738

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003143646	A1 31-07-2003	US 6303323 B1	16-10-2001
		AU 751754 B2	29-08-2002
		AU 9550298 A	10-05-1999
		BR 9813127 A	15-08-2000
		CA 2305872 A1	29-04-1999
		CN 1282422 T	31-01-2001
		EP 1025444 A1	09-08-2000
		WO 9921014 A1	29-04-1999
		GB 2332515 A , B	23-06-1999
		HU 0004134 A2	28-03-2001
		JP 2000511291 T	29-08-2000
		JP 2003240786 A	27-08-2003
		NO 20002044 A	07-06-2000
		NZ 503996 A	26-04-2002
		PL 340057 A1	15-01-2001
		SK 5592000 A3	09-10-2000
		ZA 9809413 A	15-04-1999
EP 1387173	A 04-02-2004	EP 1387173 A1	04-02-2004
		WO 2004013631 A2	12-02-2004

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
			G 0 1 N 33/566	
			C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74) 代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72) 発明者 リダー, リューディガー

ドイツ国 6 9 1 9 8 シュリースハイム, ウンテレ キップシュトラーセ 5 階

(72) 発明者 ライヒェルト, アンヤ

ドイツ国 6 9 2 2 6 ヌスロッホ, オーダーヴェーク 1 1

(72) 発明者 トゥルンク - ゲーマッハー, マルクス

ドイツ国 6 9 1 1 5 ハイデルベルク, ベルクハイマー シュトラーセ 1 3 2

(72) 発明者 バトルラ, リヒャルト

ドイツ国 6 9 1 2 0 ハイデルベルク, カステルヴェーク 3 2

F ターム (参考) 2G045 AA25 BA11 BB24 CB01 CB07 CB08 CB09 DA12 DA13 DA14

DA36 DA77 FA16 FA37 FB02 FB03 FB12

4B024 AA11 BA80 CA09 CA12 HA13 HA14

4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ08 QQ21 QQ53 QQ79 QR08 QR32 QR35

QR40 QR42 QR48 QR56 QR62 QR66 QS16 QS25 QS33 QS34

QS36 QX01 QX02

专利名称(译)	诊断方法改善发育不良		
公开(公告)号	JP2006503589A	公开(公告)日	2006-02-02
申请号	JP2005501536	申请日	2003-10-21
[标]申请(专利权)人(译)	MTM实验室公司 DakoCytomation丹麦Eesu		
申请(专利权)人(译)	EM T恤EM实验室股份公司 Dako公司 - Cytomation公司丹麦Eesu		
[标]发明人	リダーリュウディガー ライヒェルトアンヤ トゥルンクゲーマツハーマルクス バトルラリヒャルト		
发明人	リダー, リュウディガー ライヒェルト, アンヤ トゥルンク-ゲーマツハー, マルクス バトルラ, リヒャルト		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/06 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/566 C12N15/09 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/574 G01N33/57411 G01N33/57484 C12Q1/6886		
FI分类号	C12Q1/68.A C12Q1/06 G01N33/48.M G01N33/48.P G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BA11 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/CB07 2G045/CB08 2G045/CB09 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FA16 2G045/FA37 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA13 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	2002024030 2002-10-28 EP 2003100584 2003-03-07 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及基于同时检测INK4a基因产物和至少一种细胞增殖标志物来改善发育不良诊断的方法。特别地，本发明提供了一种方法，用于区分过表达INK4a基因产物的过表达INK4a基因产物的发育异常细胞，而不是通过检测适于表征相应细胞增殖特性的标记而发育不良。增殖特性的表征可以包括检测活性细胞增殖特征的标记物或一组标记物和/或延迟或停止细胞增殖特征的标记物或一组标记物。因此，本文提出的方法能够对组织学和细胞学标本中的发育异常进行特异性诊断。

(61) Int. Cl.		F I	テーマコード (参考)
C12Q	1/68 (2006.01)	C12Q 1/68	A 2G045
C12Q	1/06 (2006.01)	C12Q 1/06	4B024
GO1N	33/48 (2006.01)	GO1N 33/48	M 4B063
GO1N	33/53 (2006.01)	GO1N 33/48	P
GO1N	33/56 (2006.01)	GO1N 33/53	D
		審査請求 有	予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-501536 (P2005-501536)	(71) 出願人	504341793
(86) (22) 出願日	平成15年10月21日 (2003.10.21)		エムティーエム、ラボラトリーズ アクチ
(85) 翻訳文提出日	平成17年3月1日 (2005.3.1)		エンゲゼルシャフト
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/050738		ドイツ国 69120 ハイデルベルク、
(87) 国際公開番号	W02004/038418		イム ノイエンハイマー フェルト 5
(87) 国際公開日	平成16年5月6日 (2004.5.6)		83
(31) 優先権主張番号	02024030.5	(71) 出願人	505076016
(32) 優先日	平成14年10月28日 (2002.10.28)		ダコ-サイトメーション デンマーク エ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ーエス
(31) 優先権主張番号	03100584.6		デンマーク国 ティーコー-2600 グ
(32) 優先日	平成15年3月7日 (2003.3.7)		ローストロップ、 プロダクションスヴァ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀敏

最終頁に続く