

(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2014-527816

(P2014-527816A)

(43) 公表日 平成26年10月23日 (2014. 10. 23)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A	2 G 0 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/00 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A	4 B 0 6 3
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-530760 (P2014-530760)
 (86) (22) 出願日 平成24年9月12日 (2012. 9. 12)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年4月30日 (2014. 4. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/054914
 (87) 国際公開番号 W02013/040071
 (87) 国際公開日 平成25年3月21日 (2013. 3. 21)
 (31) 優先権主張番号 61/535, 309
 (32) 優先日 平成23年9月15日 (2011. 9. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504043048
 ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 900
 15, ロサンゼルス, サウス オリー
 ブ ストリート 1150, スイート
 2300
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 初期卵巣がんの検出マーカーとしての精子タンパク質

(57) 【要約】

本開示は、バイオマーカーとして S P 1 7 を利用する、患者が卵巣癌を経験する可能性が高いかその可能性が低いかを決定するための方法を提供する。本開示はまた、卵巣癌のリスクがあると同定された、あるいはより不良な予後を有すると同定された患者を処置するための方法および治療を提供する。患者が卵巣癌を経験する可能性が高いかその可能性が低いかを決定するための方法が提供され、この方法は、上記患者から単離された試料における S P 1 7 遺伝子の発現レベルを決定するステップを含み、ここで S P 1 7 遺伝子発現レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高いレベルが、上記患者を、卵巣癌を経験する可能性がより高いものとして同定し、S P 1 7 遺伝子発現の非存在または上記所定の第 1 の値よりも低い S P 1 7 遺伝子発現が、上記患者を、卵巣癌を経験する可能性が低いものとして同定する。

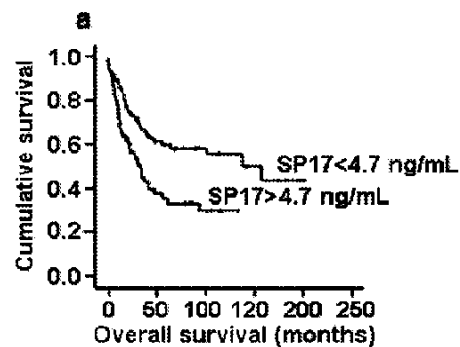


FIGURE 2A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者が卵巣癌を経験する可能性が高いかその可能性が低いかを決定するための方法であって、前記患者から単離された試料における S P 1 7 遺伝子の発現レベルを決定するステップを含み、ここで S P 1 7 遺伝子発現レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高いレベルが、前記患者を、卵巣癌を経験する可能性がより高いものとして同定し、S P 1 7 遺伝子発現の非存在または前記所定の第 1 の値よりも低い S P 1 7 遺伝子発現が、前記患者を、卵巣癌を経験する可能性が低いものとして同定する、方法。

【請求項 2】

前記患者から単離された試料における C A 1 2 5 遺伝子の発現レベルを決定するステップをさらに含み、

10

a . S P 1 7 レベルおよび C A 1 2 5 レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高い S P 1 7 レベルおよび C A 1 2 5 レベルが、前記患者を、卵巣癌を経験する可能性がより高いものとして同定し、

b . C A 1 2 5 レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高い C A 1 2 5 レベルかつ S P 1 7 レベルの非存在または前記所定の第 1 の値よりも低い S P 1 7 レベルが、前記患者を、卵巣癌を経験する可能性が低いものとして同定する、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

卵巣癌患者がより長いまたはより短い全生存期間を経験する可能性が高いかその可能性が低いかを決定するための方法であって、前記患者から単離された試料における S P 1 7 遺伝子の発現レベルを決定するステップを含み、ここで S P 1 7 遺伝子発現レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高いレベルが、前記患者を、より短い全生存期間を経験する可能性がより高いものとして同定し、S P 1 7 遺伝子発現の非存在または前記所定の第 1 の値よりも低い S P 1 7 遺伝子発現が、前記患者を、より長い全生存期間を経験する可能性が高いものとして同定する、方法。

20

【請求項 4】

前記患者から単離された試料における C A 1 2 5 遺伝子の発現レベルを決定するステップをさらに含み、

a . S P 1 7 レベルおよび C A 1 2 5 レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高い S P 1 7 レベルおよび C A 1 2 5 レベルが、前記患者を、より長い全生存期間の可能性がより低いものとして同定し、

30

b . C A 1 2 5 レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高い C A 1 2 5 レベルかつ S P 1 7 レベルの非存在または前記所定の第 1 の値よりも低い S P 1 7 レベルが、前記患者を、より長い全生存期間の可能性がより高いものとして同定する、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

処置を必要とする卵巣癌患者を処置するための方法であって、有効量の適した治療を前記患者に投与するステップを含み、ここで前記患者が、前記患者から単離された試料における S P 1 7 遺伝子の発現レベルを決定することを含む方法によって前記処置を必要とするものとして同定され、ここで S P 1 7 遺伝子発現レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高いレベルが、前記患者を、前記処置を必要とするものとして同定する、方法。

40

【請求項 6】

前記患者から単離された試料における C A 1 2 5 遺伝子の発現レベルを決定するステップをさらに含み、S P 1 7 レベルおよび C A 1 2 5 レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高い S P 1 7 レベルおよび C A 1 2 5 レベルが、前記患者を、前記処置を必要とするものとして同定する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記遺伝子発現レベルが、前記試料における、前記遺伝子から転写される m R N A の量を決定するステップ、および / または S P 1 7 タンパク質の量を決定するステップを含む

50

方法により決定される、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記遺伝子発現レベルが、mRNA in situ ハイブリダイゼーション、PCR、リアルタイム PCR またはマイクロアレイのうち 1 種または複数種を含む方法により決定される、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

前記遺伝子発現レベルが、免疫組織化学によりポリペプチドを検出するステップを含む方法により決定される、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記患者が、ヒト患者である、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 11】

前記試料が、血液、血清または尿から選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

卵巢癌患者の診断、予後および / または処置において用いるためのキットであって、患者試料における SP17 遺伝子の発現レベルおよび任意選択で CA125 遺伝子の発現レベルの決定に適した試薬と、前記患者の診断、予後および / または処置のための説明書を含む、キット。

【請求項 13】

前記患者が、動物、哺乳動物、ウシ、ヒツジ、ブタ、マウス、イヌ、ウマまたはヒト患者である、請求項 12 に記載のキット。

20

【請求項 14】

ある量の、前記卵巢癌患者を処置するために有効な治療をさらに含む、請求項 12 または 13 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、米国特許法 § 119 (e) の下、2011 年 9 月 15 日に出願された米国仮出願第 61 / 535,309 号 (この内容は、参考として本開示へ援用される) への優先権を主張する。

30

【背景技術】

【0002】

本開示を通して、様々な刊行物、特許および公開特許明細書が、それを特定する引用、または代替的にアラビア数字により参照されている。これらの引用の完全な文献目録情報は、特許請求の範囲の直前の参考文献の節に見ることができる。本文において参照またはアラビア数字により参照されているあらゆる刊行物、特許および公開特許明細書の開示は、これにより本開示において、本発明が属する技術の水準をより十分に説明するために、ここに本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する。

【0003】

40

卵巢がんは、女性にとって最も重大な健康上の懸念の一つであり、雌性におけるがん関連死の主要原因において 5 番目にランク付けされ、婦人科系悪性疾患関連死全体の 2 番目にランク付けされる (1 (非特許文献 1))。現在、血清 CA125 は、良性および悪性卵巢病変の間を識別し、再発を検出し、処置に対する応答をモニターするために最も広範に用いられているバイオマーカーである (2 (非特許文献 2))。しかし、初期卵巢がんの最大 50% および進行期卵巢がんの 10% は、正常 CA125 レベルを有するため、このマーカーは限界を示す (2、3 (非特許文献 2、3))。この疾患の死亡率は、過去 10 年間有意に変化しなかったため (4 (非特許文献 4))、卵巢がんの診断および予後のための革新的なツールに対する差し迫った必要がある。

【0004】

50

初期の無症状期に疾患を検出することのできる検査は、大半の患者を救うであろうが、多大な努力にもかかわらず、この方向に向けた進歩は不十分であり、現在のスクリーニング技法が、卵巣がん死亡率を低下させることの証拠はない(5)。CA125は、治療に対する応答および再発の評価に有用であるが、その低い特異性(約20%、試験に依存する)のために診断目的には不適である(6~8)。CA125検査の改善を目標とし、卵巣がんの新規バイオマーカーを同定するために莫大な努力が為されている(9)。現在のところ、同定されたバイオマーカーのいずれも、その臨床応用が正当であると証明するために必要とされる感度および特異性のレベルを達成すると示されていない(9、10)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

10

【0005】

【非特許文献1】Jemal Aら、Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin 2010; 60: 277~300

【非特許文献2】Stany MPら、Clinical decision making using ovarian cancer risk assessment. AJR Am J Roentgenol (2010); 194: 337~42

【非特許文献3】Staff ACら、Growth differentiation factor-15 as a prognostic biomarker in ovarian cancer. Gynecol Oncol (2010); 118: 237~43

20

【非特許文献4】Berrino Fら、Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EURO CARE-4 study. Lancet Oncol (2007); 8: 773~83

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

CA125(MUC16)は、卵巣がんにおける疾患および処置応答のモニターに唯一利用できるバイオマーカーである。本出願人は、がん/精巣抗原(CTA)ファミリーのメンバーであるSP17(11)が、卵巣がん細胞から正常卵巣の識別(12、13)および異種移植マウスモデルにおける卵巣がん疾患の追跡(14)を可能にする有望なバイオマーカーであることを以前に示した。未だにほんの数例の研究しか、腫瘍バイオマーカーとしてのSP17の潜在能力および有用性を調査しておらず(14~18)、そのいずれも末梢血におけるSP17発現を評価しなかった。そこで、本出願人は、ステージI~IV卵巣がん患者、良性卵巣病変および健康な女性のコホートにおける予後および診断ツールとして、自由に循環している血清SP17レベル測定値の統計的有意性を評価した。本出願人らの試験に基づき、腫瘍関連抗原、精子タンパク質17(SP17)が、卵巣がんにおいて異常に発現されるが、正常な卵巣組織には存在せず、これにより卵巣がんの新規予後および診断バイオマーカーとなることが開示される。

30

40

【0007】

本明細書においてより詳細に記述する通り、本出願人は、RT-PCRおよび免疫組織化学により、卵巣がん患者、良性卵巣病変および健康な被験体由来の原発性卵巣組織におけるSP17発現を解析した。同一被験体の血清におけるSP17レベルおよびCA125レベルをELISAアッセイにより測定した。この解析から、本開示は、患者が卵巣がんを経験する可能性が高いか(即ち、卵巣がんを発症するリスクがあるか)その可能性が低いかを決定するための方法であって、前記患者から単離された試料におけるSP17遺伝子の発現レベルを決定するステップを含み、または代替的にこれから本質的になり、またはさらにまたこれからなり、SP17遺伝子発現レベルの存在または所定の第1の値よりも高いSP17レベルが、前記患者を、卵巣がんを経験する可能性がより高いものと

50

して同定し、S P 1 7 遺伝子発現の非存在または前記所定の第 1 の値よりも低い S P 1 7 遺伝子発現が、前記患者を、卵巣がんを経験する可能性が低いものとして同定する、方法を提供する。さらなる態様において、この方法は、前記患者から単離された試料における C A 1 2 5 遺伝子の発現レベルを決定するステップをさらに含み、または代替的にこれから本質的になり、またはさらにまたこれからなり、S P 1 7 レベルおよび C A 1 2 5 レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高い S P 1 7 レベルおよび C A 1 2 5 レベルが、前記患者を、卵巣がんを経験する可能性がより高いものとして同定し、C A 1 2 5 レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高い C A 1 2 5 レベルかつ S P 1 7 レベルの非存在または前記所定の第 1 の値よりも低い S P 1 7 レベルが、前記患者を、卵巣がんを経験する可能性が低いものとして同定する。

10

【0008】

卵巣がん患者がより長いまたはより短い全生存期間を経験する可能性が高いかその可能性が低いかを決定するための方法であって、前記患者から単離された試料における S P 1 7 遺伝子の発現レベルを決定するステップを含み、または代替的にこれから本質的になり、またはさらにまたこれからなり、S P 1 7 遺伝子発現レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高いレベルが、前記患者を、より短い全生存期間を経験する可能性がより高いものとして同定し、S P 1 7 遺伝子発現の非存在または前記所定の第 1 の値よりも低い S P 1 7 遺伝子発現が、前記患者を、より長い全生存期間を経験する可能性が高いものとして同定する、方法もまた提供される。さらなる態様において、この方法は、前記患者から単離された試料における C A 1 2 5 遺伝子の発現レベルを決定するステップをさらに含み、または代替的にこれから本質的になり、またはさらにまたこれからなり、S P 1 7 レベルおよび C A 1 2 5 レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高い S P 1 7 レベルおよび C A 1 2 5 レベルが、前記患者を、より長い全生存期間の可能性がより低いものとして同定し、C A 1 2 5 レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高い C A 1 2 5 レベルかつ S P 1 7 レベルの非存在または前記所定の第 1 の値よりも低い S P 1 7 レベルが、前記患者を、より長い全生存期間の可能性がより高いものとして同定する。

20

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図 1】図 1 A および図 1 B は、原発性卵巣がん細胞における S P 1 7 発現を示す。図 1 A。様々な試料において P C R を行い、正常卵巣、良性卵巣腫瘍状態、卵巣がん患者および S k o v - 3 卵巣がん細胞株における S P 1 7 の存在を解析した。精巢は、内部陽性対照であった。陽性バンドシグナルは、精巢、卵巣がん患者の試料および S k o v - 3 細胞株において検出可能であった。図 1 B。様々な卵巣試料における I H C。正常卵巣および良性卵巣腫瘍状態は、染色なしであったが、一方、陽性褐色染色は、全卵巣がんステージにおいて示される。表示されている写真は、全ステージにおける様々な腫瘍の代表である。

30

【図 2】図 2 A および図 2 B は、カプラン・マイヤー生存曲線を示す。両方のマーカーに対するロジランク検定 (l o g - r a n k t e s t) $p < 0.001$ 。

【図 3】図 3 A から図 3 E は、S P 1 7 および C A 1 2 5 検査の診断性能を例証する。A から D は、S P 1 7 および C A 1 2 5 の R O C 曲線を示す。z 検定により各設定における S P 1 7 の A U C を C A 1 2 5 A U C と比較した。A。S P 1 7 A U C = 0.985、C A 1 2 5 A U C = 0.869、z 検定 $p = 0.047$ ；B。S P 1 7 A U C = 0.988、C A 1 2 5 A U C = 0.969、z 検定 $p = 0.992$ ；C。S P 1 7 A U C = 0.991、C A 1 2 5 A U C = 0.941、z 検定 $p = 0.997$ ；D。S P 1 7 A U C = 0.992、C A 1 2 5 A U C = 0.982、z 検定 $p = 0.917$ ；E。卵巣がんの初期検出のための C A 1 2 5 および S P 1 7 検査を組み合わせたアルゴリズム。

40

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明の実施は、他に断りがなければ、当該分野の技術の範囲内で分子生物学（組換え

50

技法を包含)、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来技法を用いる。このような技法は、文献において、例えば、次の刊行物において十分に説明される。例えば、Sambrook and Russell 編、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第3版(2001年);シリーズCURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(F. M. Ausubelら編(2007年));シリーズMETHODS IN ENZYMOLOGY(Academic Press, Inc., N.Y.);PCR 1: A PRACTICAL APPROACH(M. MacPhersonら、IRL Press at Oxford University Press(1991年));PCR 2: A PRACTICAL APPROACH(M. J. MacPhe 10
rson, B. D. Hames and G. R. Taylor 編(1995年));ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL(Harlow and Lane 編(1999年));CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE(R. I. Freshney 第5版(2005年));OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS(M. J. Gait 編(1984年));Mullisら、米国特許第4,683,195号;NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION(B. D. HamesおよびS. J. Higgins 編(1984年));NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION(M. L. M. Anderson(1999年));TRANSCRIPTION AND TRANSLATION(B. D. Ha 20
mesおよびS. J. Higgins 編(1984年));IMMOBILIZED CELLS AND ENZYMES(IRL Press(1986年));B. Perbal、A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING(1984年);GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS(J. H. MillerおよびM. P. Calos 編(1987年) Cold Spring Harbor Laboratory);GENE TRANSFER AND EXPRESSION IN MAMMALIAN CELLS(S. C. Makrides 編(2003年))IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY(MayerおよびWalker 編、Academic Press、London 30
(1987年));WEIR'S HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY(L. A. Herzenbergら編(1996年))を参照されたい。

【0011】

定義

本明細書において、ある特定の用語は、次に定義される意義を有し得る。本明細書および特許請求の範囲において、単数形(「a」、「an」および「the」)は、文脈がそれ以外を明らかに指示しない限り、単数および複数の言及を包含する。例えば、用語「(単数の)細胞」は、単一の細胞と共に複数の細胞を包含し、これらの混合物を包含する。

【0012】

本明細書において、用語「を含む」は、組成物および方法が、列挙されている要素を包含するが、その他を除外しないことを意味するように企図される。「から本質的になる」は、組成物および方法を定義するよう用いられる場合、係る組成物または方法にとっていずれかの本質的な重要性を有する他の要素を除外することを意味するものとする。「からなる」は、請求されている組成物の他の成分の微量を上回る要素および実質的な方法ステップを除外することを意味するものとする。これら移行部の用語(transition term)のそれぞれにより定義される実施形態は、本発明の範囲内に収まる。従って、方法および組成物が、追加的なステップおよび構成成分を包含し得る(を含む)こと、または代替的に重要性がないステップおよび組成物を包含する(から本質的になる)ことが企図される、または代替的に記述されている方法ステップもしくは組成物のみを企図す 40
50

る（からなる）。

【0013】

範囲を包含するあらゆる数字表示、例えば、pH、温度、時間、濃度および分子量は、0.1の増分で（+）または（-）変動される近似値である。常に明確に記されているとは限らないが、あらゆる数字表示の前に用語「約」があると理解されたい。用語「約」は、「 $X + 0.1$ 」または「 $X - 0.1$ 」等、正確な値「 X 」とそれに加えて「 X 」の僅かな増分も包含する。常に明確に記されているとは限らないが、本明細書に記載されている試薬は、単なる例示であり、その均等物が当該分野において公知であることも理解されたい。

【0014】

用語「同定する」または「同定すること」とは、患者を、処置に対し同一または同様の臨床応答を経験する可能性が高い患者の群または集団に密接に関連または参入させることである。

【0015】

用語「アジュバント」がん患者は、外科手術による腫瘍の除去後に治療または化学療法レジメン（通例、アジュバント化学療法と呼ばれる）の投与がなされた患者を指す。アジュバント治療は、通常、可能性のあるがん再発生を最小化または予防するために与えられる。代替的に、「ネオアジュバント」治療は、通常、外科手術に先立ち腫瘍を縮小させて、係る手技において除去される組織の程度を最小化する試みにおける、外科手術前の治療または化学療法レジメンの投与を指す。

【0016】

本明細書において、用語「患者」は、動物、哺乳動物、またはさらにはヒト患者を企図する。単なる例証目的のため、哺乳動物として、ヒト、サル、マウス、ウシ、ウマ、ブタまたはヒツジが挙げられるがこれらに限定されない。

【0017】

精子タンパク質17（SP17）は、精巣および精子における高度に保存された哺乳動物タンパク質であり、種々のヒト悪性疾患における腫瘍関連抗原として特徴付けられてきた。

【0018】

用語「遺伝マーカー」または「バイオマーカー」は、目的の遺伝子の多型領域の対立遺伝子改変体および/または目的の遺伝子の発現レベルを指す。

【0019】

用語「野生型対立遺伝子」は、被験体において2コピーで存在する場合、野生型表現型を生じる遺伝子の対立遺伝子を指す。遺伝子におけるある種のヌクレオチド変化は、このヌクレオチド変化を有する遺伝子を2コピー有する被験体の表現型に影響を与えない可能性があるため、特定の遺伝子の数種の異なる野生型対立遺伝子が存在し得る。

【0020】

用語「多型性」は、遺伝子またはその一部の2種以上の形態の共存を指す。少なくとも2種の異なる形態、即ち、2種の異なるヌクレオチド配列が存在する遺伝子の一部は、「遺伝子の多型領域」と称される。多型領域は、単一のヌクレオチドであってよく、その正体は、異なる対立遺伝子において異なる。

【0021】

「多型遺伝子」は、少なくとも1個の多型領域を有する遺伝子を指す。

【0022】

「ハプロタイプ」は、一単位として通例受け継がれる、密接に連鎖した遺伝子群の対立遺伝子のセットである。用語「目的の遺伝子の多型領域の対立遺伝子改変体」は、他の個体における目的の遺伝子のある領域に見られる複数のヌクレオチド配列のうち1種を有する、目的の遺伝子の領域を指す。

【0023】

用語「遺伝子型」は、細胞全体またはある特定の遺伝子の特異的対立遺伝子組成を指し

10

20

30

40

50

、一部の態様においては該遺伝子に関連する特異的多型性を指し、一方、用語「表現型」は、特異的遺伝子型の検出可能な外向きの顕在化を指す。

【0024】

遺伝子に適用される「発現」は、遺伝子から転写された mRNA または遺伝子にコードされるタンパク質産物の産生を指す。遺伝子の発現レベルは、細胞または組織試料における mRNA またはタンパク質の量を測定することにより決定することができる。一態様において、遺伝子の発現レベルは、内部対照としてのハウスキーピング遺伝子と比較した相対レベルにより表される。別の態様において、ある一試料由来の遺伝子の発現レベルは、サンプリング誤差を除くために内部対照を用いて、異なる試料由来の該遺伝子の発現レベルと直接的に比較することができる。

10

【0025】

「内部対照」または「ハウスキーピング」遺伝子は、いずれかの構成的にまたは全体的に発現される遺伝子を指す。係る遺伝子の例として、 β -アクチン、トランスフェリン受容体遺伝子、GAPDH 遺伝子またはこれらの等価物が挙げられるがこれらに限定されない。本発明の一態様において、内部対照遺伝子は、 β -アクチンである。

【0026】

「過剰発現」または「過小発現」は、対照試料における遺伝子の発現レベルと比較した、試験試料における該遺伝子の発現の増大もしくは減少、または差次的発現を指す。一態様において、試験試料は病的細胞であり、対照試料は正常細胞である。別の態様において、試験試料は、実験的に操作されたまたは生物学的に変更された細胞であり、対照試料は、実験操作または生物学的変更の前の細胞である。また別の態様において、試験試料は、患者由来の試料であり、対照試料は、健康な個体由来の同様の試料である。またさらなる態様において、試験試料は、患者由来の試料であり、対照試料は、所望の臨床成績を持たない患者由来の同様の試料である。一態様において、差次的発現は、対照試料において検出される発現レベルよりも約 1.5 倍、または代替的に約 2.0 倍、または代替的に約 2.5 倍、または代替的に約 3.0 倍、または代替的に約 5 倍、または代替的に約 10 倍、または代替的に約 50 倍、またはまたさらに代替的に約 100 倍を超えて高いまたは低い。代替的に、遺伝子は、「過剰発現される」または「過小発現される」と称される。代替的に、遺伝子は、「上方制御される」または「下方制御される」と言ってもよい。

20

【0027】

本明細書における遺伝子の「所定の値」は、所定の値よりも高い該遺伝子の発現レベルを有する患者が、所定の値よりも低い同遺伝子の発現レベルを有する患者よりも望ましいもしくは望ましくない臨床成績を経験する可能性が高いように、またはその逆となるように選ばれる。本発明に開示されている遺伝子等、遺伝子の発現レベルは、臨床成績に関連する。当業者であれば、より望ましい臨床成績を有する患者における遺伝子の発現レベルを、より望ましくない臨床成績を有する患者と比較することにより、遺伝子の所定の値を決定することができる。一態様において、所定の値は、患者をより望ましい臨床成績を有する群と、より望ましくない臨床成績を有する群とに最も良く分ける遺伝子発現値である。係る遺伝子発現値は、当該分野において周知の方法により数学的にまたは統計的に決定することができる。

30

40

【0028】

代替的に、所定の値よりも高い遺伝子発現が単純に「高発現」と称される、または所定の値よりも低い遺伝子発現が単純に「低発現」と称される。

【0029】

「細胞」、「宿主細胞」または「組換え宿主細胞」は、本明細書において互換的に用いられる用語である。このような用語は、特定の対象細胞のみを指すのではなく、係る細胞の後代または潜在的な後代を指すことが理解される。変異または環境影響のいずれかによりある特定の改変が後の世代で起こり得るため、係る後代は、実際には、親細胞と同一ではない可能性があるが、依然として、本明細書におけるこの用語の範囲内に包含される。

【0030】

50

語句「ポリヌクレオチドの増幅」は、PCR、ライゲーション増幅（またはリガーゼ連鎖反応、LCR）および増幅方法等の方法を包含する。これらの方法は、公知のものであり、当該分野で広く実施されている。例えば、米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号ならびにInnisら、1990年（PCRに関して）；およびWu, D.Y.ら（1989年）Genomics 4巻：560～569頁（LCRに関して）を参照されたい。一般に、PCR手順は、(i) DNA試料（またはライブラリ）内の特異的遺伝子へのプライマーの配列特異的ハイブリダイゼーション、(ii) DNAポリメラーゼを用いた複数ラウンドのアニーリング、伸長および変性を伴う、その後の増幅、ならびに(iii) 正確なサイズのバンドについてのPCR産物のスクリーニング、で構成される遺伝子増幅方法を記載する。用いられるプライマーは、重合の開始を提供するのに十分な長さおよび適切な配列のオリゴヌクレオチドである、即ち、各プライマーは、増幅しようとするゲノム遺伝子座の各鎖に相補的となるよう特異的に設計される。

10

【0031】

PCRを行うための試薬およびハードウェアは、市販されている。特定の遺伝子領域由来の配列の増幅に有用なプライマーは、好ましくは、標的領域またはその隣接領域における配列に相補的であり、これに特異的にハイブリダイズする。増幅により作製される核酸配列は、直接的に配列決定することができる。代替的に、増幅された配列（複数可）は、配列解析前にクローニングすることができる。酵素により増幅されたゲノムセグメントの直接クローニングおよび配列解析のための方法は、当該分野において公知のものである。

20

【0032】

本明細書における用語「単離された」は、他の材料を実質的に含まない分子または生物学的もしくは細胞材料を指す。一態様において、用語「単離された」は、天然の供給源に存在する他のDNAもしくはRNAまたはタンパク質もしくはポリペプチドまたは細胞もしくは細胞小器官または組織もしくは器官からそれぞれ分離された、DNAもしくはRNA等の核酸またはタンパク質もしくはポリペプチドまたは細胞もしくは細胞小器官または組織もしくは器官を指す。用語「単離された」は、組換えDNA技法により産生される場合は細胞材料、ウイルス材料もしくは培養培地を実質的に含まない、または化学的に合成される場合は化学的前駆物質もしくは他の化学物質を実質的に含まない核酸またはペプチドも指す。さらに、「単離された核酸」は、断片として天然に存在せず、天然の状態では見いだされない核酸断片の包含を意図する。用語「単離された」はまた、他の細胞タンパク質から単離されたポリペプチドを指すよう本明細書において用いられ、精製されたポリペプチドおよび組換えポリペプチドの両方の網羅を意図する。用語「単離された」はまた、他の細胞または組織から単離された細胞または組織を指すよう本明細書において用いられ、培養および操作された細胞または組織の両方の網羅を意図する。

30

【0033】

遺伝子もしくは遺伝マーカーの発現レベルまたは多型性が、本明細書に記載されている処置のために患者を選択するための基盤として用いられる場合、遺伝マーカーの発現レベルまたは多型性は、処置の前および/または間に測定され、得られた値は、臨床医により次のいずれかの評価において用いられる：(a) 個体が処置（複数可）を初めて受けるのに適切である可能性があるもしくはその可能性が高い；(b) 個体が処置（複数可）を初めて受けるのに不適切である可能性があるもしくはその可能性が高い；(c) 処置に対する応答性；(d) 個体が処置（複数可）を受け続けるのに適切である可能性があるもしくはその可能性が高い；(e) 個体が処置（複数可）を受け続けるのに不適切である可能性があるもしくはその可能性が高い；(f) 投薬量の調整；(g) 臨床的利益の尤度の予測；または(h) 毒性。当業者であれば十分に理解できる通り、臨床背景における遺伝マーカーまたは多型性の測定値は、このパラメータが、本明細書に記載されている処置の投与を開始、継続、調整および/または中断するための基盤として用いられたことの明らかな指標である。

40

【0034】

本明細書における用語「処置すること」は、状態または疾患の少なくとも1種の症状の

50

治癒と共に寛解を網羅するよう企図される。例えば、がんの場合、処置に対する応答は、国立がん研究所 (National Cancer Institute) および米国食品医薬品局 (U.S. Food and Drug Administration) による新薬承認のための標準設定によりそれぞれ測定される、悪液質の低下、生存時間の増大、腫瘍進行までの時間の伸長、腫瘍体積の低下、全身腫瘍組織量の低下および/または腫瘍転移までの時間、腫瘍再発までの時間の延長、腫瘍応答、完全応答、部分応答、安定病態、進行性疾患、無増悪生存期間、全生存期間を包含する。Johnsonら (2003年) J. Clin. Oncol. 21巻 (7号): 1404~1411頁を参照されたい。

【0035】

「有効量」は、処置に対し所望の応答をもたらす可能性が最もある、患者に投与または送達される化合物または薬剤の量を示すことを企図する。量は、疾患ステージ、年齢、性別、組織学および腫瘍再発尤度等が挙げられるがこれらに限定されない、患者の臨床パラメータにより経験的に決定される。

【0036】

用語「臨床成績」、「臨床パラメータ」、「臨床応答」または「臨床エンドポイント」は、治療に対する患者の反応に関係する任意の臨床所見または尺度を指す。臨床成績の非限定的な例として、腫瘍応答 (TR)、全生存期間 (OS)、無増悪生存期間 (PFS)、無病生存期間、腫瘍再発までの時間 (TTR)、腫瘍進行までの時間 (TTP)、相対リスク (RR)、毒性または副作用が挙げられる。

【0037】

用語「応答する可能性が高い」は、ある遺伝子型の患者が、同様の状態に置かれた該遺伝子型がない患者よりも完全応答または部分応答を経験する可能性が相対的に高いことを意味することを企図する。代替的に、用語「応答する可能性が低い」は、ある遺伝子型の患者が、同様の状態に置かれた該遺伝子型がない患者よりも完全応答または部分応答を経験する可能性が相対的に低いことを意味することを企図する。

【0038】

用語「治療に適している」または「治療により適宜処置される」は、同一疾患を有し、同一治療を受けるが、比較目的のために考慮されている異なる特徴を持つ患者 (単数または複数) と比較して、患者が、1種または複数種の望ましい臨床成績を提示する可能性が高いことを意味するものである。一態様において、考慮されている特徴は、遺伝的多型または体細胞変異である。別の態様において、考慮されている特徴は、遺伝子またはポリペプチドの発現レベルである。一態様において、より望ましい臨床成績は、腫瘍負荷低下等、相対的により高い腫瘍応答の尤度または相対的により優れた腫瘍応答である。別の態様において、より望ましい臨床成績は、相対的により長い全生存期間である。また別の態様において、より望ましい臨床成績は、相対的により長い無増悪生存期間または腫瘍進行までの時間である。また別の態様において、より望ましい臨床成績は、相対的により長い無病生存期間である。さらなる態様において、より望ましい臨床成績は、腫瘍再発の相対的な低下または遅延である。別の態様において、より望ましい臨床成績は、相対的に減少した転移である。別の態様において、より望ましい臨床成績は、相対的により低い相対リスクである。また別の態様において、より望ましい臨床成績は、相対的に低下した毒性または副作用である。一部の実施形態において、2種以上の臨床成績が同時に考慮される。係る一態様において、遺伝的多型の遺伝子型等の特徴を持つ患者は、同一疾患を有し、同一治療を受けるが、この特徴を持たない患者 (単数または複数) と比較して、2種以上のより望ましい臨床成績を提示し得る。本明細書に定義されている通り、患者は、治療に適しているとみなされる。別の係る一態様において、ある特徴を持つ患者は、1種または複数種のより望ましい臨床成績を提示し得るが、1種または複数種のより望ましくない臨床成績を同時に提示し得る。そこで、臨床成績は、総合的に考慮され、従って、患者の特異的な状況および臨床成績の関連性を考慮に入れつつ、患者が治療に適しているかに関する決定が為されることになる。一部の実施形態において、無増悪生存期間また

10

20

30

40

50

は全生存期間は、総合的意思決定において腫瘍応答よりも重きを置かれる。

【0039】

「同一のがんを有すること」は、ある患者を別の患者と、または代替的にある患者集団を別の患者集団と比較する場合に用いられる。例えば、この2つの患者または患者集団はそれぞれ、結腸がんを有するまたはこれを持っている。

【0040】

治療に対する「完全応答」(CR)は、その腫瘍およびあらゆる疾患エビデンスが消失した、評価可能であるが測定不可能な疾患を有する患者を定義する。

【0041】

治療に対する「部分応答」(PR)は、部分応答を実証するとして単純にカテゴリー化される、完全応答に満たない患者を定義する。

【0042】

「安定病態」(SD)は、患者が安定的であることを示す。

【0043】

「進行性疾患」(PD)は、処置後に腫瘍が成長し(即ち、大きくなり)、拡散した(即ち、別の組織または器官へと転移した)こと、またはがん全体が悪化したことを示す。例えば、処置開始以来20パーセントを超える腫瘍成長は通常、進行性疾患を示す。「無病生存期間」は、患者ががんまたは腫瘍の徴候なしで生存する、がんまたは腫瘍の処置後の時間の長さを示す。

【0044】

治療に対する「無応答」(NR)は、腫瘍または疾患エビデンスが、一定のままである、または進行した患者を定義する。

【0045】

「全生存期間」(OS)は、無処理または未処置個体または患者と比較した、平均余命の延長を企図する。

【0046】

「無増悪生存期間」(PFS)または「腫瘍進行までの時間」(TTP)は、処置の間および後におけるがんが成長しない時間の長さを示す。無増悪生存期間は、患者が完全応答または部分応答を経験した時間の量と共に、患者が安定病態を経験した時間の量を包含する。

【0047】

「相関なし」は、多型領域の対立遺伝子改変体または遺伝子発現レベルと、臨床パラメータとの間に関係性を示さない統計解析を指す。

【0048】

本明細書における、また、国立がん研究所により定義されている「腫瘍再発」は、通例、がんが検出できなかった期間の後に再発した(再び起きた)がんである。がんは、本来の(原発性)腫瘍と同じ場所または身体の別の場所に再び起きうる。これは、再発性のがんとも呼ばれる。

【0049】

「腫瘍再発までの時間」(TTR)は、がんの診断の日付から最初の再発、死亡の日付までの時間、または患者が最後の接触時にいかなる腫瘍再発もない場合は、最後の接触までの時間として定義される。患者が再発しなかった場合、TTRは死亡時にまたは最後の経過観察時に審査される。

【0050】

統計および数学的疫学において、「相対リスク」(RR)は、曝露に対するイベントの(または疾患を発症する)リスクを指す。相対リスクは、曝露群対非曝露群におけるイベントが起こる確率の比である。

【0051】

本明細書において、用語「ステージIがん」、「ステージIIがん」、「ステージIIIがん」および「ステージIV」は、TNM分類によるがんの分類法を指す。ステージI

10

20

30

40

50

がんは通常、原発性腫瘍が、起始器官に限定されることを同定する。ステージⅡは、原発性腫瘍が、周囲の組織および腫瘍領域に直接流出するリンパ節へと拡散したことを企図する。ステージⅢは、原発性腫瘍が大きく、より深部構造に固着することを企図する。ステージⅣは、原発性腫瘍が大きく、より深部構造に固着することを企図する。C A N C E R B I O L O G Y、第2版、O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s (1 9 8 7 年) 2 0 および 2 1 頁を参照されたい。

【0052】

「腫瘍」は、制御されない進行性の細胞増殖に起因する、生理機能に寄与しない組織の異常成長である。「腫瘍」は、新生物 (n e o p l a s m) としても公知のものである。

【0053】

用語「血液」は、赤血球、白血球、血漿、凝固因子、小分子タンパク質、血小板および/または寒冷沈降物等を包含するがこれらに限定されない、被験体中を循環する血液のあらゆる構成成分を包含する血液を指す。これは通常、ヒト患者が血を与える際に献血される種類の血液である。

【0054】

記述的实施形態

本発明は、少なくとも一部には、本明細書において同定された目的の遺伝子の発現レベルの決定に基づく、診断、予後および治療方法をさらに提供する。

【0055】

例えば、本明細書に記載されている診断アッセイを用いて得られる情報は、被験体が所定の種類のがん処置に適しているか、または腫瘍再発もしくはより長い全生存期間を経験する可能性が高いかを決定するのに有用である。予後情報に基づき、医師は、患者における悪性腫瘍 (m a l i g n a n t m a s s) もしくは腫瘍の低下または個体におけるがんの処置に有用な治療プロトコルを推奨することができる。

【0056】

代替的に、被験体が、より長いまたはより短い全生存期間を経験する可能性がより高いまたはより低いと決定することは、被験体を、腫瘍再発を経験する可能性がより高いと同定すること、または被験体を、腫瘍再発を経験する可能性がより低いと同定することと表現することができる。

【0057】

本明細書に記載されている診断アッセイを用いて得られる情報は、単独で用いても、被験体の他の遺伝子の遺伝子型もしくは発現レベル、臨床化学的パラメータ、病理組織学的パラメータまたは年齢、性別および体重等が挙げられるがこれらに限定されない、他の情報と組み合わせて用いてもよいことを理解されたい。単独で用いる場合、本明細書に記載されている診断アッセイを用いて得られる情報は、処置の臨床成績の決定もしくは同定、処置のための患者の選択または患者の処置等に有用である。他方では、他の情報と組み合わせて用いる場合、本明細書に記載されている診断アッセイを用いて得られる情報は、処置の臨床成績の決定もしくは同定に役立つ、処置のための患者の選択に役立つまたは患者の処置に役立つため等に有用である。特定の態様において、本明細書に開示されている1種または複数種の遺伝子の遺伝子型または発現レベルは、そのそれぞれが最終診断、予後

【0058】

患者が卵巣がんを経験する可能性が高いかその可能性が低いかを決定するための方法であって、前記患者から単離された試料における S P 1 7 遺伝子の発現レベルを決定するステップを含み、または代替的にこれから本質的になる、またはさらにまたこれからなる、S P 1 7 遺伝子発現レベルの存在または所定の第1の値よりも高いレベルが、前記患者を、卵巣がんを経験する可能性がより高いものとして同定し、S P 1 7 遺伝子発現の非存在または前記所定の第1の値よりも低い S P 1 7 遺伝子発現が、前記患者を、卵巣がんを経験する可能性が低いものとして同定するステップを含む、方法が、本明細書において提供される。さらなる態様において、この方法は、前記患者から単離された試料における C A

10

20

30

40

50

1 2 5 遺伝子の発現レベルを決定するステップをさらに含み、または代替的にこれから本質的になり、またはさらにまたこれからなり、S P 1 7 レベルおよびC A 1 2 5 レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高いS P 1 7 レベルおよびC A 1 2 5 レベルが、前記患者を、卵巣がんを経験する可能性がより高いものとして同定し、C A 1 2 5 レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高いC A 1 2 5 レベルかつS P 1 7 レベルの非存在または前記所定の第 1 の値よりも低いS P 1 7 レベルが、前記患者を、卵巣がんを経験する可能性が低いものとして同定する。

【 0 0 5 9 】

卵巣がん患者がより長いまたはより短い全生存期間を経験する可能性が高いかその可能性が低いかを決定するための方法であって、前記患者から単離された試料におけるS P 1 7 遺伝子の発現レベルを決定するステップを含み、または代替的にこれから本質的になり、またはさらにまたこれからなり、S P 1 7 遺伝子発現レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高いレベルが、前記患者を、より短い全生存期間を経験する可能性がより高いものとして同定し、S P 1 7 遺伝子発現の非存在または前記所定の第 1 の値よりも低いS P 1 7 遺伝子発現が、前記患者を、より長い全生存期間を経験する可能性が高いものとして同定する、方法も提供される。さらなる態様において、この方法は、前記患者から単離された試料におけるC A 1 2 5 遺伝子の発現レベルを決定するステップをさらに含み、または代替的にこれから本質的になり、またはさらにまたこれからなり、S P 1 7 レベルおよびC A 1 2 5 レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高いS P 1 7 レベルおよびC A 1 2 5 レベルが、前記患者を、より長い全生存期間の可能性がより低いものとして同定し、C A 1 2 5 レベルの存在または所定の第 1 の値よりも高いC A 1 2 5 レベルかつS P 1 7 レベルの非存在または前記所定の第 1 の値よりも低いS P 1 7 レベルが、前記患者を、より長い全生存期間の可能性がより高いものとして同定する。

10

20

【 0 0 6 0 】

簡潔に説明すると、また、単なる例証目的のため、当業者は、より望ましい臨床パラメータを有する患者における遺伝子の発現値を、より望ましくない臨床パラメータを有する患者の値と比較することにより、所定の値を決定することができる。一態様において、所定の値は、より望ましい臨床パラメータを有する群と、より望ましくない臨床パラメータを有する群とに患者を最も良く分ける遺伝子発現値である。係る遺伝子発現値は、当該分野において周知の方法により、数学的にまたは統計的に決定することができる。

30

【 0 0 6 1 】

本発明の方法における使用に適した試料として、血液試料、尿試料または血清試料が挙げられるがこれらに限定されない。

【 0 0 6 2 】

遺伝子発現レベルを決定するための方法は、当該分野において公知のものであり、本明細書に簡潔に記載されている。これらの方法の非限定的な例として、遺伝子から転写されたmRNAの量を決定するステップを含む、または代替的にこれから本質的になる、またはまたさらにこれからなる方法、mRNA in situハイブリダイゼーション、PCR、リアルタイムPCRまたはマイクロアレイが挙げられる。この方法は、動物、哺乳動物またはさらにはヒト患者等の患者の補助において有用である。単なる例証目的のため、哺乳動物として、サル、マウス、ヒツジ、ウマ、イヌ、ウシ、ブタまたはヒト患者が挙げられるがこれらに限定されない。

40

【 0 0 6 3 】

上に記す発明それぞれの代替的な実施形態として、適した患者試料は、非転移性腫瘍組織、非転移性腫瘍細胞、転移性腫瘍組織または転移性腫瘍細胞から選択される組織または細胞を含む、または代替的にこれから本質的になる、またはさらにまたこれからなる。別の一態様において、患者試料は、腫瘍に近接して単離される正常組織となり得る。

【 0 0 6 4 】

S P 1 7 およびC A 1 2 5 タンパク質に対する抗体も、疾患診断および予後において用いることができる。係る診断方法は、ペプチド発現レベルにおける異常、またはペプチド

50

の構造および／もしくは組織、細胞もしくは細胞内 (s u b c e l l u l a r) の位置における異常の検出に用いることができる。これは、例えば、光学顕微鏡、フローサイトメトリーまたは蛍光定量的検出と合わせた、蛍光標識した抗体を用いた免疫蛍光技法により達成することができる。本発明において有用な抗体 (またはその断片) は、さらに、ペプチドまたはその対立遺伝子改変体の i n s i t u 検出のために、免疫蛍光または免疫電子顕微鏡検査下で組織学的に用いることができる。 i n s i t u 検出は、患者から組織学的標本を取り出し、そこに本発明の標識抗体を添加することにより達成することができる。抗体 (または断片) は、好ましくは、標識抗体 (または断片) を生物試料上に重層することにより添加される。このような手順の使用により、対象ポリペプチドの存在のみならず、試験されている組織におけるその分布を決定することも可能になる。本発明を用いて、当業者であれば、このような i n s i t u 検出を達成するために、多種多様な組織学的方法 (染色手順等) のいずれかを改変してよいことを容易に認知するであろう。

10

【 0 0 6 5 】

一実施形態において、試料における目的の遺伝子の多型領域の同定に先立ち、目的の遺伝子の少なくとも一部を最初に増幅することが必要である。増幅は、例えば、当該分野において公知の方法に従った P C R および／または L C R により行うことができる。 P C R の様々な非限定的な例として、本明細書に記載されている方法が挙げられる。

【 0 0 6 6 】

アセンブリ P C R またはポリメラーゼサイクリングアセンブリ (P C A) は、短い重複セグメントを有する長いオリゴヌクレオチドのプールにおいて P C R を行うことによる、長い D N A 配列の人工合成である。オリゴヌクレオチドは、センス方向とアンチセンス方向とで交互になっており、重複セグメントは、 P C R 断片の順序を決定し、これにより選択的に最終的な長い D N A 産物を作製する (S t e m m e r ら (1 9 9 5 年) G e n e 1 6 4 巻 (1 号) : 4 9 ~ 5 3 頁および米国特許第 6 , 3 3 5 , 1 6 0 号、同第 7 , 0 5 8 , 5 0 4 号または同第 7 , 3 2 3 , 3 3 6 号を参照) 。

20

【 0 0 6 7 】

非対称 P C R は、本来の D N A の一方の鎖を他方の鎖よりも優先的に増幅するために用いられる。これは、2本の相補鎖のうち一方のみを有することが要求される、ある種の配列決定およびハイブリダイゼーション探索における用途が見出される。 P C R は、選んだ鎖のプライマーを大幅に過剰に用いる以外は通常通り行われる。制限プライマーを使い切った後の反応後半のゆっくりした増幅のため、余分な P C R サイクルが要求される (I n n i s ら (1 9 8 8 年) P r o c N a t l A c a d S c i U . S . A . 8 5 巻 (2 4 号) : 9 4 3 6 ~ 9 4 4 0 頁および米国特許第 5 , 5 7 6 , 1 8 0 号、同第 6 , 1 0 6 , 7 7 7 号または同第 7 , 1 7 9 , 6 0 0 号を参照) 。指数関数後比例 (L i n e a r - A f t e r - T h e - E x p o n e n t i a l) - P C R (L A T E - P C R) として公知であるこのプロセスの近年の改正版は、反応効率を維持するために過剰プライマーよりも高い融解温度 (T_m) を有する制限プライマーを用いるが、その理由として、制限プライマー濃度は、中間反応 (m i d - r e a c t i o n) を減少させるためである (P i e r c e ら (2 0 0 7 年) M e t h o d s M o l . M e d . 1 3 2 巻 : 6 5 ~ 8 5 頁) 。

30

40

【 0 0 6 8 】

コロニー P C R は、例えば E . c o l i の細菌コロニーを用い、これは、正確な D N A ベクター構築物の P C R により迅速にスクリーニングすることができる。選択された細菌コロニーは、滅菌楊枝により採取され、 P C R マスターミックスまたは滅菌水中に軽く塗りつけられる。この P C R は、標準ポリメラーゼが用いられる場合、延長した時間の 9 5 で開始され、または短縮された 1 0 0 の変性ステップと特殊なキメラ D N A ポリメラーゼを用いて開始される (P a v l o v ら (2 0 0 6 年) 「 T h e r m o s t a b l e D N A P o l y m e r a s e s f o r a W i d e S p e c t r u m o f A p p l i c a t i o n s : C o m p a r i s o n o f a R o b u s t H y b r i d T o p o T a q t o o t h e r e n z y m e s 」、K i e l e c z a w a

50

J : DNA Sequencing II : Optimizing Preparation and Cleanup. Jones and Bartlettにおける、241～257頁)。

【0069】

ヘリカーゼ依存性増幅は、変性およびアニーリング/伸長サイクルによるサイクリングではなく一定温度を用いる以外は、伝統的PCRと同様のものである。DNAを巻き戻す酵素であるDNAヘリカーゼが、熱変性の代わりに用いられる(Myriamら(2004年)EMBO reports 5巻(8号):795～800頁および米国特許第7,282,328号を参照)。

【0070】

ホットスタートPCRは、PCRの初期セットアップ段階における非特異的増幅を低下させる技法である。この技法は、ポリメラーゼを添加する前に融解温度(例えば、95)まで反応構成成分を加熱することにより、手作業で行うことができる(Chouら(1992年)Nucleic Acids Research 20巻:1717～1723頁ならびに米国特許第5,576,197号および同第6,265,169号)。抗体の結合(Sharkeyら(1994年)Bio/Technology 12巻:506～509頁)、または高温活性化ステップ後に初めて解離する共有結合した阻害剤の存在のいずれかにより周囲温度におけるポリメラーゼ活性を阻害する、特殊化された酵素系が開発された。ホットスタート/コールドフィニッシュ(cold-finish)PCRは、周囲温度では不活性であり、伸長温度で即座に活性化される新たなハイブリッドポリメラーゼにより達成される。

【0071】

配列間(Interscience)特異的(ISSR)PCRは、いくつかの単純配列反復間の領域を増幅して、増幅断片長の独自のフィンガープリントを作製する、DNAフィンガープリントのための方法である(Zietkiewiczら(1994年)Genomics 20巻(2号):176～83頁)。

【0072】

インバースPCRは、一内部配列のみが公知である場合にPCRを達成するために用いられる方法である。これは、様々なゲノムインサートに隣接する配列の同定において特に有用である。これは、未知の配列のいずれかの末端に公知の配列をもたらず、一連のDNA消化およびセルフライゲーションを伴う(Ochmanら(1988年)Genetics 120巻:621～623頁および米国特許第6,013,486号、同第6,106,843号または同第7,132,587号)。

【0073】

ライゲーション媒介PCRは、目的のDNAにライゲーションされた小型のDNAリンカーおよびDNAリンカーにアニーリングする複数のプライマーを用いる。これは、DNA配列決定、ゲノムウォーキングおよびDNAフットプリンティングのために用いられてきた(Muellerら(1988年)Science 246巻:780～786頁)。

【0074】

メチル化特異的PCR(MSP)は、ゲノムDNAにおけるCpGアイランドのメチル化の検出に用いられる(Hermanら(1996年)Proc Natl Acad Sci U.S.A. 93巻(13号):9821～9826頁および米国特許第6,811,982号、同第6,835,541号または同第7,125,673号)。DNAは、まず亜硫酸水素ナトリウムで処理され、これにより、非メチル化シトシン塩基を、PCRプライマーによりチミンとして認識されるウラシルへと変換する。続いて、このように改変されたDNAにおいて、プライマー配列内の任意のCpGアイランドにおける配列以外は同一のプライマーセットを用いた2通りのPCRが行われる。これらの点において、一方のプライマーセットは、シトシンを有するDNAを認識してメチル化DNAを増幅し、もう一方のセットは、ウラシルまたはチミンを有するDNAを認識して非メチル化D

10

20

30

40

50

NAを増幅する。qPCRを用いたMSPを行って、メチル化に関する定性的ではなく定量的な情報を得ることもできる。

【0075】

マルチプレックスライゲーション依存性プローブ増幅(MLPA)は、単一のプライマー対のみを用いて複数の標的が増幅されることを可能にし、これによりマルチプレックスPCRの分解能限界を回避する(後述を参照)。

【0076】

マルチプレックスPCRは、単一PCR混合物内の複数の独自のプライマーセットを用いて、異なるDNA配列に特異的な変動するサイズのアンプリコンを作製する(米国特許第5,882,856号、同第6,531,282号または同第7,118,867号を参照)。複数の遺伝子を一度に標的化することにより、他の方法では数倍の試薬とさらなる実施時間が必要となる追加的な情報を1回のテストランから獲得することができる。プライマーセットそれぞれのアニリング温度は、単一の反応で正確に働くよう最適化しなければならない、アンプリコンサイズ、即ち、それらの塩基対の長さは、ゲル電気泳動により可視化した際に別個のバンドを形成するよう十分に異なっている必要がある。

【0077】

ネステッドPCRは、DNAの非特異的増幅によるバックグラウンドを低下させることにより、DNA増幅の特異性を増大させる。2回の連続的PCRにおいて2セットのプライマーが用いられている。第1の反応において、1対のプライマーが用いられ、企図される標的に加えて非特異的に増幅されたDNA断片からなる可能性もあるDNA産物を作製する。続いて、その結合部位が、第1の反応において用いたプライマーとは完全にまたは部分的に異なり、第1の反応において用いたプライマーそれぞれの3'に位置するプライマーセットを用いた第2のPCRにおいて、この産物(複数可)を用いる(米国特許第5,994,006号、同第7,262,030号または同第7,329,493号を参照)。ネステッドPCRは多くの場合、長いDNA断片の特異的な増幅に従来のPCRよりも成功を収めるが、この手法は、標的配列のより詳細な知識を必要とする。

【0078】

重複伸長PCRは、最長の実用的プライマー長の限界を超えて挿入された変更を有するDNA配列の構築を可能にする遺伝子操作技法である。

【0079】

RQ-PCR、QRT-PCRおよびRTQ-PCRとしても公知の定量的PCR(Q-PCR)は、反応後のまたはリアルタイムでのPCR産物の量の測定に用いられる。米国特許第6,258,540号、同第7,101,663号または同第7,188,030号を参照されたい。Q-PCRは、DNA、cDNAまたはRNAの出発量を定量的に測定するための選択方法である。Q-PCRは一般に、DNA配列が試料中に存在するかを決定、また、試料中のそのコピー数を決定するために用いられる。現在最高レベルの精度を備える方法は、米国特許第6,440,705号;米国特許出願公開第2007/0202525号;Dressmanら(2003年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100巻(15号):8817~8822頁およびVogelsteinら(1999年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96巻(16号):9236~9241頁に記載されているデジタルPCRである。より一般には、RT-PCRは、逆転写PCR(後述を参照)を指し、多くの場合Q-PCRと併せて用いられる。QRT-PCR方法は、Sybr Green等の蛍光色素またはTaqMan等のフルオロフォア含有DNAプローブを用いて、リアルタイムで増幅産物の量を測定する。

【0080】

逆転写PCR(RT-PCR)は、細胞または組織RNAから公知配列の増幅、単離または同定に用いるための方法である(米国特許第6,759,195号、同第7,179,600号または同第7,317,111号を参照)。PCRに先行して、逆転写酵素を用いてRNAをcDNAに変換する反応が行われる。RT-PCRは、発現プロファイリ

10

20

30

40

50

ングに広く用いられて、遺伝子の発現を決定する、または転写開始および終結部位を包含するRNA転写産物の配列を同定し、遺伝子のゲノムDNA配列が公知であれば、該遺伝子におけるエクソンおよびイントロンの位置をマッピングする。遺伝子の5'端(転写開始部位に相当する)は通常、cDNA端の急速増幅(Rapid Amplification of cDNA Ends)(RACE-PCR)と命名されるRT-PCR方法により同定される。

【0081】

熱非対称インターレース(Thermal asymmetric interlaced)PCR(TAIL-PCR)は、公知の配列に隣接する未知の配列の単離に用いられる。公知の配列内において、TAIL-PCRは、異なるアニーリング温度を有する入れ子状態のプライマー対を用いる。縮重プライマーが用いられて、未知の配列から他の方向を増幅する(Liuら(1995年)Genomics 25巻(3号):674~81頁)。

10

【0082】

タッチダウンPCRは、PCRサイクリングが進行するにつれアニーリング温度を徐々に低減させることによる、非特異的バックグラウンドの低下を目標とするPCRの変法である。初期サイクルにおけるアニーリング温度は通例、用いるプライマーの T_m を数度(3~5)上回るが、一方、より後期のサイクルでは、プライマー T_m を数度(3~5)下回る。より高い温度は、プライマー結合のためにより優れた特異性を与え、より低い温度は、初期サイクルにおいて形成された特異的産物からのより効率的な増幅を可能にする(Donら(1991年)Nucleic Acids Res 19巻:4008頁および米国特許第6,232,063号)。

20

【0083】

本発明の一実施形態において、プローブは、いわゆる「分子ビーコン」を形成するための2種の蛍光色素分子で標識される(Tyagi, S.およびKramer, F.R.(1996年)Nat. Biotechnol. 14巻:303~8頁)。係る分子ビーコンは、オリゴヌクレオチドプローブの両端に結合した色素間の分子内蛍光クエンチングの除去により、相補的核酸配列への結合の証拠となる。同時的な複数ビーコンの使用(Marras, S.A.(1999年)Genet. Anal. 14巻:151~6頁)と同様に、遺伝子型判定をするための分子ビーコンの使用が記載された(Kostrikis, L.G.(1998年)Science 279巻:1228~9頁)。分子ビーコンにおける等、クエンチング分子とフルオロフォアが互いに近位に保持されている場合、または約1~約25ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドプローブの両端に付着している場合、クエンチング分子は、特定のフルオロフォアの蛍光を実質的に阻害するのに十分なスペクトル重複を有するのであれば、そのフルオロフォアと併用するのに有用である。

30

【0084】

遺伝子の増幅または目的の抗体と併せて標識プローブを用いることもできる(Hollandら(1991年)Proc. Natl. Acad. Sci. 88巻:7276~7280頁)。Gelfandらによる米国特許第5,210,015号は、PCRの間に増幅産物のリアルタイム測定を提供する蛍光に基づくアプローチについて記載する。係るアプローチは、存在する二本鎖DNAの量を示すためにインターカレート色素(エチジウムブロマイド等)を用いた、または、増幅の間にプローブが切断されて、蛍光分子を放出し、その濃度が存在する二本鎖DNAの量に比例する、蛍光-クエンチャー対を含有するプローブを用いた(「Taq-Man」アプローチとも称される)。増幅の間に、プローブは、標的配列にハイブリダイズするとポリメラーゼのヌクレアーゼ活性により消化されて、クエンチャー分子から蛍光分子を分離させ、これによりレポーター分子から蛍光を出現させる。Taq-Manアプローチは、多型性を含有する標的ポリヌクレオチドの領域に特異的にアニーリングする、レポーター分子-クエンチャー分子対を含有するプローブを用いる。

40

50

【0085】

プローブは、「遺伝子チップ」として用いるために表面に固定することができる。係る遺伝子チップは、当業者に公知の多数の技法による遺伝的変動の検出に用いることができる。米国特許第6,025,136号および同第6,018,041号に概要を述べたもの等、一技法において、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションアプローチにより配列決定してDNA配列を決定するために遺伝子チップ上に整列される。本発明のプローブは、遺伝的配列の蛍光検出のために用いることもできる。係る技法は、例えば、米国特許第5,968,740号および同第5,858,659号において記載されている。プローブは、Kayemらによる米国特許第5,952,172号およびKelley, S.O.らによる(1999年)Nucleic Acids Res. 27巻:4830~4837頁の記載等、核酸配列の電気化学的検出のために電極表面に固定することもできる。

10

【0086】

本発明は、本明細書において同定される目的の遺伝子から選択されるがこれらに限定されない遺伝マーカーの予後パネルも提供する。予後パネルは、単独でまたはCA125と組み合わせてSP17の増幅に用いるおよび/またはその分子構造を決定するために用いることができるプローブまたはプライマーを含む。プローブまたはプライマーは、遺伝子チップまたはマイクロアレイ等が挙げられるがこれらに限定されない固相支持体に付着するまたはこれに支持させることができる。プローブまたはプライマーは、検出可能に標識することができる。

20

【0087】

一態様において、パネルは、本明細書において同定されるプローブまたはプライマーと共に、他のプローブまたはプライマーを含有する。代替的な態様において、パネルは、上に記すプローブまたはプライマーのうち1種または複数種およびその他を包含する。さらなる態様において、パネルは、上に記すプローブまたはプライマーのみからなる。

【0088】

プライマーまたはプローブは、「遺伝子チップ」または「マイクロアレイ」として用いるために表面に固定することができる。係る遺伝子チップまたはマイクロアレイは、当業者に公知の多数の技法により遺伝的変動の検出に用いることができる。米国特許第6,025,136号および同第6,018,041号において概要を述べたもの等、一技法において、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションアプローチにより配列決定してDNA配列を決定するために遺伝子チップ上に整列される。本発明のプローブは、遺伝的配列の蛍光検出のために用いることもできる。係る技法は、例えば、米国特許第5,968,740号および同第5,858,659号において記載されている。プローブは、Kayemらによる米国特許第5,952,172号およびKelleyらによる(1999年)Nucleic Acids Res. 27巻:4830~4837頁の記載等、核酸配列の電気化学的検出のために電極表面に固定することもできる。

30

【0089】

様々な「遺伝子チップ」または「マイクロアレイ」および同様の技術は、当該分野において公知のものである。係る技術の例として、LabCard (ACLARA Bio Sciences Inc.); GeneChip (Affymetric, Inc.); LabChip (Caliper Technologies Corp.); 電気化学的センシングを備える低密度アレイ (Clinical Micro Sensors); LabCD System (Gamera Bioscience Corp.); Omni Grid (Gene Machines); Q Array (Genetix Ltd.); 液相発現技術によるハイスループット自動質量分析システム (Gene Trace Systems, Inc.); サーマルジェットスポッティングシステム (Hewlett Packard Company); Hyseq HyChip (Hyseq, Inc.); Bead Array (Illumina, Inc.); GEM (Incyte Microarray Systems); 複数のスライドガラスに12~64

40

50

スポットを分注することができるハイスループットマイクロアレイシステム (Intelligent Bio-Instruments); Molecular Biology Workstation and NanoChip (Nanogen, Inc.); マイクロ流体ガラスチップ (Orchid biosciences, Inc.); 4 個の PiezoTip 圧電気ドロップ・オン・デマンド先端部を備える BioChip Arrayer (Packard Instruments, Inc.); FlexJet (Rosetta Inpharmatic, Inc.); MALDI-TOF 質量分析機 (Sequonome); ChipMaker 2 および ChipMaker 3 (TeleChem International, Inc.); ならびに Heller (2002 年) Annu. Rev. Biomed. Eng. 4 巻: 129~153 頁に同定および記載されている GenoSensor (Vysis, Inc.) が挙げられるがこれらに限定されない。「遺伝子チップ」または「マイクロアレイ」の例は、米国特許出願公開第 2007/0111322 号、同第 2007/0099198 号、同第 2007/0084997 号、同第 2007/0059769 号および同第 2007/0059765 号ならびに米国特許第 7,138,506 号、同第 7,070,740 号および同第 6,989,267 号にも記載されている。

10

【0090】

一態様において、目的の遺伝子のためのプローブまたはプライマーを含有する「遺伝子チップ」または「マイクロアレイ」は、単独で、または他のプローブおよび/もしくはプライマーと組み合わせて提供される。適した試料は、患者からのゲノム DNA、RNA またはこれらのいずれかの組合せの抽出から得られ、必要であれば増幅される。DNA または RNA 試料は、遺伝子チップまたはマイクロアレイ上に含有されるプローブ (複数可) またはプライマー (複数可) への目的の遺伝子 (複数可) のハイブリダイゼーションに適した条件下で、遺伝子チップまたはマイクロアレイパネルに接触させられる。プローブまたはプライマーを検出可能に標識し、これにより目的の遺伝子 (複数可) における多型性を同定することができる。代替的に、化学的または生物学的反応を用いて、目的の遺伝子 (複数可) の DNA または RNA とハイブリダイズしたプローブまたはプライマーを同定することができる。続いて、前述の装置および方法の助けにより、患者の遺伝的プロファイルが決定される。

20

【0091】

30

治療方法

本発明は、本明細書に開示されている方法により、卵巣がんを有する可能性が高い、または卵巣がんを有しており、相対的により短い全生存時間等、より予後不良であると同定された患者の処置も提供する。本明細書に記載されている方法を反復することにより、有効量の適した治療が患者に投与され、患者の予後をモニターすることができる。「有効量」は、有益または所望の結果をもたらすのに十分な量である。有効量は、1 回または複数回の投与、適用または投薬量で投与することができる。処置のために承認された薬物は、ウェブサイト上に収載されている: cancer.gov/cancertopics/druginfo/ovariancancer、最終アクセス、2011 年 9 月 12 日。係る薬物の非限定的な例として、アドリアマイシン PFS、アドリアマイシン RDF、BEP およびカルボプラチンが挙げられる。これらは、本明細書における方法により、治療に適していると同定された被験体または個体に投与することができ、治療量は、経験的に決定することができ、処置されている疾病、処置されている被験体ならびに薬剤の有効性および毒性により変動し得る。

40

【0092】

キット

本明細書に記載されている通り、本発明は、SP17 の発現レベルを単独でまたは CA125 と組み合わせて決定するための診断方法を提供する。一部の実施形態において、本方法は、目的の遺伝子と相補的なヌクレオチド配列を含むプローブまたはプライマーを用いる。従って、本発明は、これらの方法を行うためのキットと共に、本発明の方法を実施

50

するための説明書を提供する。よって、一態様において、本発明は、卵巣がん患者ならびに別々に、腫瘍再発および／またはより長いもしくはより短い全生存期間を有する可能性がより高い卵巣がん患者の同定において用いるためのキットであって、S P 1 7 の発現レベルを単独でまたはC A 1 2 5 と組み合わせて決定するために適したプライマーもしくはプローブまたはマイクロアレイと、そこで用いるための説明書とを含む、または代替的にこれから本質的になる、またはさらにまたこれからなるキットも提供する。

【0093】

一態様において、S P 1 7 発現レベルが、検出されるもしくは所定の第1の値よりも高い場合、または、C A 1 2 5 およびS P 1 7 遺伝子発現レベルが、存在するまたは所定の値よりも高い場合、キットの構成成分および説明書は、腫瘍再発またはより短い全生存期間を経験する可能性がより高いと患者を同定する。一態様において、処置プロトコールおよび／または治療が、キットにさらに提供される。

10

【0094】

特定の一態様において、キットの構成成分および説明書は、本明細書に記載されている方法を行うために適した試薬と、使用説明書とを含む、または代替的にこれから本質的になる、またはさらにまたこれからなる、患者における卵巣がんの診断に用いられる。一態様において、処置プロトコールおよび／または治療が、キットにさらに提供される。

【0095】

さらなる態様において、S P 1 7 遺伝子発現が、存在しないもしくは所定の第1の値よりも低い場合、またはC A 1 2 5 レベルが、存在するまたは所定の値よりも高いが、S P 1 7 レベルが、存在しないまたは所定の値よりも低い場合、キットの構成成分および説明書は、腫瘍再発またはより長い全生存期間を経験する可能性がより低いと患者を決定するために用いられる。

20

【0096】

簡潔に説明すると、また、単なる例証目的のため、当業者は、より望ましい臨床パラメータを有する患者における遺伝子の発現値を、より望ましくない臨床パラメータを有する患者の値と比較することにより、第1および第2の所定の値を決定することができる。一態様において、所定の値は、より望ましい臨床パラメータを有する群と、より望ましくない臨床パラメータを有する群とに患者を最も良く分ける遺伝子発現値である。係る遺伝子発現値は、当該分野において周知の方法により数学的にまたは統計的に決定することができる。

30

【0097】

本方法は、動物、哺乳動物、さらにはヒト患者の補助において有用である。単なる例証目的のため、哺乳動物として、サル、マウス、ウシ、ウマ、ブタまたはヒツジが挙げられるがこれらに限定されない。卵巣がんは、転移性となることができ、がんは、ステージI、ステージII、ステージIIIまたはステージIVとなることができ。

【0098】

キットの方法における使用に適した試料として、血液、血清もしくは尿またはこれらの組合せが挙げられるがこれらに限定されない。

【0099】

キットは、S P 1 7 に特異的にハイブリダイズすることができる少なくとも1種のプローブもしくはプライマー単独、またはC A 1 2 5 遺伝子の発現レベルを決定するためのプローブおよび／またはプライマーと組み合わせた該プローブまたはプライマーと、使用説明書とを含むことができる。キットは、好ましくは、上述の核酸のうち少なくとも1種を含む。目的の遺伝子のうち少なくとも一部を増幅するための好ましいキットは、その少なくとも一方が対立遺伝子変体配列とハイブリダイズすることができる、2種のプライマーを含む。係るキットは、例えば、蛍光検出による、電気化学的検出によるまたは他の検出による遺伝子型の検出に適している。

40

【0100】

キットに含有されるオリゴヌクレオチドは、プローブとして用いるのであれプライマー

50

として用いるのであれ、検出可能に標識することができる。標識は、例えば蛍光標識のため直接的に、または間接的に検出することができる。間接的検出は、ビオチン - アビジン相互作用、抗体結合その他等、当業者に公知のいずれかの検出方法を包含することができる。蛍光標識されたオリゴヌクレオチドは、クエンチング分子を含有することもできる。オリゴヌクレオチドは、表面に結合してよい。一実施形態において、好ましい表面は、シリカまたはガラスである。別の一実施形態において、表面は、金属電極である。

【0101】

本発明のさらに他のキットは、アッセイの実施に必要な少なくとも1種の試薬を含む。例えば、キットは、酵素を含むことができる。代替的に、キットは、バッファーまたはその他の任意の必要な試薬を含むことができる。

10

【0102】

試験試料と核酸プローブをインキュベートするための条件は、アッセイに用いられる型式、使用される検出方法ならびにアッセイに使用される核酸プローブの種類および性質に依存する。当業者であれば、一般に利用されるハイブリダイゼーション、増幅または免疫学的アッセイ型式のいずれか1種を、本発明における使用のための核酸プローブを用いるために容易に適応できることを認識するであろう。係るアッセイの例は、Chard, T. (1986年) AN INTRODUCTION TO RADIOIMMUNOASSAY AND RELATED TECHNIQUES Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands; Bullock, G.R.ら、TECHNIQUES IN IMMUNOCYTOCHEMISTRY Academic Press, Orlando, FL 1巻(1982年)、2巻(1983年)、3巻(1985年); Tijssen, P. (1985年) PRACTICE AND THEORY OF IMMUNOASSAYS: LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlandsにおいて見出すことができる。

20

【0103】

診断キットにおいて用いられる試験試料は、細胞、細胞のタンパク質もしくは膜抽出物または痰、血液、血清、血漿もしくは尿等の生体液を包含する。上述の方法において用いられる試験試料は、アッセイ型式、検出方法の性質およびアッセイされる試料として用いる組織、細胞または抽出物に基づき変動するであろう。細胞のタンパク質抽出物または膜抽出物を調製するための方法は、当該分野において公知のものであり、利用されるシステムと適合する試料を得るために容易に適応させることができる。

30

【0104】

キットは、目的の遺伝子の発現レベルを決定するための本明細書に記載されている陽性対照、陰性対照、試薬、プライマー、配列決定マーカー、プローブおよび抗体の全てまたは一部を包含することができる。

【0105】

容認される通り、これらの示唆されるキット構成成分は、当業者による使用に習慣的な様式で包装することができる。例えば、これらの示唆されるキット構成成分は、溶液においてまたは液体分散物その他として提供することができる。

40

【0106】

遺伝子発現レベルを決定するための方法は、当該分野において公知であり、本明細書に簡潔に記載されている。これらの方法の非限定的な例として、遺伝子から転写されるmRNAの量を決定するステップを含む、または代替的にそれから本質になる、またはさらにまたそれからなる方法、mRNA in situハイブリダイゼーション、遺伝子チップもしくはマイクロアレイの使用、PCR、リアルタイムPCRまたはマイクロアレイが挙げられる。本方法は、動物、哺乳動物またはさらにはヒト患者等、患者の補助において有用である。単なる例証目的のため、哺乳動物として、サル、マウス、ヒツジ、ウマ、

50

イヌ、ウシ、ブタまたはヒト患者が挙げられるがこれらに限定されない。一態様において、患者は、ステージ2がん患者であり、外科手術または外科的切除後にいかなる追加的な治療も未だ受けていない。代替的な態様において、患者は、ステージ3がん患者であり、外科手術もしくは外科的切除後に追加的な治療を受けることになる、またはそれを受けた。

【0107】

様々な「遺伝子チップ」または「マイクロアレイ」および同様の技術は、当該分野において公知のものである。係る技術の例として、LabCard (ACLARA Bio Sciences Inc.) ; GeneChip (Affymetric, Inc.) ; LabChip (Caliper Technologies Corp.) ; 電気化学的センシングを備える低密度アレイ (Clinical Micro Sensors) ; LabCD System (Gamera Bioscience Corp.) ; Omni Grid (Gene Machines) ; Q Array (Genetix Ltd.) ; 液相発現技術によるハイスループット自動質量分析システム (Gene Trace Systems, Inc.) ; サーマルジェットスポッティングシステム (Hewlett Packard Company) ; Hyseq HyChip (Hyseq, Inc.) ; BeadArray (Illumina, Inc.) ; GEM (Incyte Microarray Systems) ; 12~64スポットを複数のスライドガラス上に分注することができるハイスループットマイクロアレイシステム (Intelligent Bio-Instruments) ; Molecular Biology Workstation and NanoChip (Nanogen, Inc.) ; マイクロ流体ガラスチップ (Orchid biosciences, Inc.) ; 4個のPiezoTip圧電気ドロップ・オン・デマンド先端部を備えるBioChip Arrayer (Packard Instruments, Inc.) ; FlexJet (Rosetta Inpharmatic, Inc.) ; MALDI-TOF質量分析機 (Sequenome) ; ChipMaker 2およびChipMaker 3 (TeleChem International, Inc.) ; ならびにHeller (2002年) Annu. Rev. Biomed. Eng. 4巻: 129~153頁において同定および記載されているGenoSensor (Vysis, Inc.) が挙げられるがこれらに限定されない。「遺伝子チップ」または「マイクロアレイ」の例は、米国特許出願公開第2007/0111322号、同第2007/0099198号、同第2007/0084997号、同第2007/0059769号および同第2007/0059765号ならびに米国特許第7,138,506号、同第7,070,740号および同第6,989,267号にも記載されている。

【0108】

一態様において、目的の遺伝子のプローブまたはプライマーを含有する「遺伝子チップ」または「マイクロアレイ」は、単独で、または他のプローブおよび/もしくはプライマーと組み合わせて提供される。適した試料は、患者からのゲノムDNA、RNAまたはこれらのいずれかの組合せの抽出から得られ、必要であれば増幅される。DNAまたはRNA試料は、遺伝子チップまたはマイクロアレイ上に含有されるプローブ(複数可)またはプライマー(複数可)への目的の遺伝子(複数可)のハイブリダイゼーションに適した条件下で、遺伝子チップまたはマイクロアレイパネルと接触させられる。プローブまたはプライマーを検出可能に標識し、これにより目的の遺伝子(複数可)における多型性を同定することができる。代替的に、化学的または生物学的反応を用いて、目的の遺伝子(複数可)のDNAまたはRNAとハイブリダイズしたプローブまたはプライマーを同定することができる。続いて、前述の装置および方法の助けにより、患者の遺伝的プロファイルが決定される。

【0109】

本発明を一般的に記載してきたが、本発明は、次の実施例を参照することにより、より容易に理解できよう。実施例は、本発明のある特定の態様および実施形態の単なる例証目

的のために包含されており、本発明の限定を企図しない。

【実施例】

【0110】

実験方法

ヒト被験体の登録

本出願人らは、ステージⅠ～Ⅴ OC、良性卵巢腫瘍および健康対照を包含する、323名の被験体の集団を試験した。

【0111】

施設内審査委員会承認

あらゆる臨床材料は、地域倫理委員会（フローニンゲン大学病院（University Hospital of Groningen）およびテキサス工科大学健康科学センター（Texas Tech University Health Sciences Center））の承認ならびに患者の同意のもとに得た。

10

【0112】

RT-PCR

以前に記載された標準技法¹⁹、²⁰により逆転写PCRを行った。SP17転写産物のためのプライマーは、5'-GGATCCATGTCGATTCCATTCTC-3'（配列番号1）および5'-CTCGAGTCACTTGTTTTCCTCTTTTTC-3'（配列番号2）であった。

20

【0113】

免疫組織化学

脱パラフィンおよび再水和後に、以前に記載された通りに¹⁹、²¹組織切片に対し抗原賦活化および染色を行った。ヘマトキシリン（Fisher Scientific、PA、USA）で対比染色した後に、光学顕微鏡（Leica DMLA、IL、USA）により写真を撮った。

【0114】

SP17のELISA

1μLの血清を50μLの標準カーボネート緩衝食塩水（コーティングバッファー）において希釈することにより、ELISAを行った。希釈した血清を、96ウェルプレートに3連で添加し、一晚4℃でインキュベートした。PBS中1%W/V BSAと共にプレートを2時間、室温にてインキュベートすることにより、非特異的部位を飽和させた。BSAを除去し、50μLのマウス抗SP17一次抗体（本出願人らの研究室で開発し、PBSにおいて1:50希釈した。この抗体は、GenBank受託番号NP_059121.1のヒトSP17タンパク質に対して産生された）¹³を添加し、37℃で2時間インキュベートした。プレートをPBS+0.025%Tween-20（PBS-t）で3回洗浄し、HRPに連結した抗マウス二次抗体（Abcam、PBSにおいて1:4000希釈、50μL/ウェル）と共に2時間インキュベートした。PBS-t（300μL/ウェル）による3回の洗浄ステップの後、発色性基質を添加し、5分間暗所でインキュベートさせた。続いて、405nmにおける吸光度を読み取った。精製した抗原の系列希釈を用いて、血清におけるSP17濃度を決定した。

30

40

【0115】

CA125のELISA

FDA認定の方法ARCHITECT CA 125 II（商標）アッセイ（Abbott Park、IL、USA）を用いて、製造者の指示書に従ってCA125を測定した。

【0116】

統計解析

GraphPad 5統計ソフトウェア（GraphPad Software, Inc.、CA、USA）を用いて、0.05に等しい有意性レベルを設定して統計解析を行った。

50

【0117】

結果

試験コホートの特徴

本出願人らは、合計323名の被験体（136名の卵巢がん患者、45名の良性卵巢腫瘍および142名の年齢を合わせた（age-matched）健康なボランティア）を試験した。被験体の分布は次のようであった。13%ステージⅠ、6%ステージⅡ、20%ステージⅢ、4%ステージⅣ、44%健康、13%良性卵巢腫瘍。卵巢がんの44%は、グレードⅠ/Ⅱであり、55%はグレードⅢであった。卵巢がん患者、卵巢良性腫瘍患者および健康な対照の年齢中央値は、59歳であった。

【0118】

SP17は、健康な被験体、良性卵巢腫瘍および卵巢がん病変由来の初代細胞において異なるレベルで発現する

正常卵巢、良性卵巢腫瘍試料および卵巢がん初代細胞におけるSP17 mRNAを評価した（図1A）。陽性バンドは、卵巢がん患者由来の試料において検出可能であったが、良性卵巢腫瘍試料および健康な対照においてこの転写産物は存在しなかった。タンパク質レベルでは、SP17は、ステージⅠ～Ⅳに及ぶ全卵巢がん試料において検出可能であったが、一方、正常卵巢において（図1B）、または45個の解析した良性卵巢病変のいずれにおいても（図1B）タンパク質発現は示されなかった。

【0119】

血清SP17濃度は、年齢を合わせた健康な女性または良性卵巢腫瘍を有する女性と比較して、卵巢がん患者において有意により高い

表Ⅰは、診断時に健康な対照、良性卵巢腫瘍または卵巢がん患者において測定された平均SP17およびCA125血清濃度を示す。一元配置ANOVAにより確認される通り、平均SP17レベルおよびCA125レベルは、群間で有意に異なっていた。Dunnの多重比較検定は、SP17およびCA125が、卵巢がん患者と比較して健康および良性群において有意により低いことを明らかにした（表Ⅰ）。卵巢がんステージ間に、または健康および良性群の間に有意差は検出されなかった（ $p > 0.05$ ）。

【0120】

SP17血清濃度は、全生存期間に関連する

SP17血清測定値が、生存時間の適した予後指標たり得るか評価するため、カプラン・マイヤー生存曲線を作成し（図2Aおよび図2B）、ログランク検定を行った（ $\alpha = 0.05$ ）。CA125レベルが生存時間と相関することは公知であるため、陽性対照としてCA125値を用いて同等の解析を行った。全生存期間は、最初の外科手術から卵巢がんによる死亡または最後の経過観察の日付までの時間として定義した。本出願人らは、健康な対照群における平均SP17血清濃度プラス2標準偏差（95位のパーセンタイル）として、 4.7 ng/mL のカットオフレベルを確立した。CA125の平行解析を行い、 40 U/mL のカットオフ値を得た。その 4.7 ng/mL を上回るまたは下回るSP17値、または 40 U/mL よりも高いまたは低いCA125値に従って、卵巢がん患者を2群にクラスタリングした。SP17レベルおよびCA125レベルの両方が、全生存時間と関連した（図2Aおよび図2B）。

【0121】

SP17検査は、初期卵巢がんおよび良性卵巢腫瘍の間の識別においてCA125よりも優れた感度を表示する

初期または進行期卵巢がん（それぞれステージⅠ/ⅡおよびⅢ/Ⅳ）の正確な診断におけるSP17およびCA125検査の性能を比較するため、次の4種の異なる設定でROC（受信者動作特性）曲線を作成した（図3A～図3D）。SP17およびCA125検査を、初期または進行期卵巢がんから良性腫瘍の識別（図3Aおよび図3B）および初期または進行期卵巢がんから健康な対照の識別（図3Cおよび図3D）において評価した。良性腫瘍およびステージⅠ/Ⅱ卵巢がんの間を識別する場合、SP17曲線下面積（AUC）は、z検定により比較すると、CA125の曲線下面積よりも有意に高か

10

20

30

40

50

った ($p < 0.05$)。検査した他のあらゆる条件において、SP17およびCA125は、同様のAUCを生じた ($p > 0.05$)。99.9%に等しい固定された特異性にて検査を比較する場合、SP17感度は、ステージI/II卵巣がんから良性卵巣腫瘍の識別において、CA125よりも40倍高かった (SP17感度 = 88.3%、CA125感度 = 2.2%)。感度における統計的有意差は、他のあらゆる検査した設定において検出されなかった。

【0122】

組み合わせたCA125およびSP17検査は、良性卵巣腫瘍または健康な対照から初期卵巣がんの識別において高い特異性および感度を生じる

組み合わせたCA125およびSP17検査の特異性および感度を、異なる閾値を用いて計算した。CA125の35KU/LカットオフおよびSP17の4.6ng/mLカットオフにより、検査の最適な性能が得られた。図3Eは、組み合わせた検査のアルゴリズムを表示する。生存解析において用いられるレベルとは異なるカットオフレベルを用いることにより、組み合わせた検査の最高の特異性および感度が得られた (CA125の35対40KU/LおよびSP17の4.6対4.7ng/mL)。CA125レベルが、35KU/Lよりも高ければ、被験体は、潜在的卵巣がん患者として分類され、SP17評価を行う。SP17レベルが、4.6ng/mLよりも高ければ、診断が確認され、それ以外であれば、被験体は、健康または良性卵巣腫瘍を有する可能性があるとして分類される。本出願人は、次の通り異なる群間の識別における検査性能を評価した。ステージI/II卵巣がん対良性腫瘍、ステージI/II卵巣がん対健康、ステージI/II卵巣がん対悪性疾患なし (良性腫瘍および健康な対照)。進行期 (III/IV) 卵巣がんに対し、また全ステージ (I~IV) 卵巣がんに対しても同等な解析を行った。CA125およびSP17を組み合わせる診断検査の性能を評価するため、特異性、感度、陽性適中度 (PPV) および陰性適中度 (NPV) を計算した (表II)。

【0123】

考察

本報告は、CTA SP17が、卵巣がん患者における予後および診断目的のための信頼できるバイオマーカーであることを実証する。本出願人は、CTA SP17が、予後が良好な良性卵巣腫瘍および卵巣癌の間を識別することを示す。最後に、本出願人は、CA125と組み合わせたSP17が、悪性病変の初期検出を可能にするこのエビデンスを提供する。

【0124】

現在、卵巣がんスクリーニングは、疾患有病率が合理的に高い場合にのみ、即ち、BRCA1/2変異を保有するまたは乳がんもしくは卵巣がんの家族歴を有する女性に対してのみ臨床的に検証されている (9)。疾患の経過をモニターするための潜在的なバイオマーカーとして1981年に発見されて以来 (22)、単独でまたは経膈超音波検査 (TVU) と共に行うCA125測定は、卵巣がんの初期検出の診断検査として広く調査されてきており、ある程度の成功を収めた (23~25)。CA125検査の特異性および感度を改善するための新規腫瘍バイオマーカーの同定のために、益々の努力が為されている (8)。30種を超える血清バイオマーカーが、単独でまたはCA125と組み合わせる試験されており (9)、そのうち最も有望なものは、HE4 (26)、メソテリン (27) およびIL-7 (28) である。CA125と共に行う血清HE4アッセイは、健康な対照、子宮内膜症および卵巣がんを包含するコホートにおいて92.9%感度および95%特異性を生じると報告された (26)。評価されているコホートにおける卵巣がん有病率に基づき、予想されるPPVは、57.2%であった。卵巣がん患者を健康な対照と比較すると、CA125と組み合わせたメソテリン検査は、予想される89.5%PPVで、86.5%感度および98%特異性を有していた (27)。本出願人は、ステージI~IV卵巣がんを、年齢を合わせた良性卵巣腫瘍を保有する女性と比較する場合、IL-7およびCA125に基づく検査が、100%の予想されるPPVで、69%感度および100%特異性を生じたことを以前に示した (28)。

【 0 1 2 5 】

免疫組織化学および R T - P C R により行われた独立的解析は、S P 1 7 が、悪性卵巣がんにおいて選択的に発現されることを確認した。高い発現特異性は、S P 1 7 染色が、生検組織試料における良性状態および卵巣がんの間の信頼できる識別の助けになり得ることを示した。M A G E、G A G E および B A G E 等、S P 1 7 以外の C T A も検出され、卵巣がんにおける可能な予後マーカーとして提案された (2 9)。近年、E - カドヘリン (3 0)、C D 1 5 7 (3 1)、ステロイドおよび生体異物受容体 (S X R) (3 2)、H M G - コエンザイム A 還元酵素 (3 3)、R C A S 1 (3 4)、マンマグロビン B (3 5)、グリピカン - 3 (3 6) および I L - 7 (2 8) 等、組織学的評価および卵巣がんの予後のための多数の有望な非 C T A バイオマーカーも報告されている。これらは、腫瘍ステージまたは分化グレードと関連することが示されてきたが、そのいずれも、完全な特異性を生じなかった。したがって、S P 1 7 を包含するマーカーのパネルが、卵巣腫瘍における最高の予後指数をもたらす最良の免疫組織学的ツールであることが判明する可能性が高い。S P 1 7 が、卵巣がん試料のみに選択的に発現されたという知見は、以前の試験と一致し、S P 1 7 が、この疾患のマウスモデルにおける卵巣がんの追跡を可能にすること (1 4)、また、原発性卵巣腫瘍の 8 3 % において発現されるが、卵巣の正常細胞によっては発現されない (2 0) ことを示す。これらの結果に基づき、本出願人らは、卵巣がんおよび良性卵巣腫瘍患者、または健康な対照の末梢血における自由に循環する S P 1 7 タンパク質の存在を調査した。データは、血清 S P 1 7 レベルが、健康または良性群よりも卵巣がんにおいて有意に高いことを明らかに示した。C A 1 2 5 に対し同様の結果が得られ、C A 1 2 5 は、検証された血清学的予後指標であるため、本試験を通じて参照として用いた (3 7、3 8)。健康な個体およびがん患者の血清において S P 1 7 タンパク質が解析されたのは、初めてのことである。

10

20

【 0 1 2 6 】

生存曲線は、S P 1 7 が、全生存期間の独立的予後指標であったことを示す。卵巣がんの管理のための臨床決定プロセスにおける重要な点は、悪性疾患のリスク指数 (R M I) に基づく (3 9)、または A C O G - S G O 指針に基づく (4 0) 悪性疾患のリスクの決定である (3 7)。どちらの基準も、C A 1 2 5 の測定を包含するため、本出願人らは、この見積もりの陽性適中度を改善するための S P 1 7 検査の使用を保証する。

30

【 0 1 2 7 】

S P 1 7 が、悪性卵巣がん細胞において発現されるが、健康な卵巣組織においては発現されないことを実証する以前の試験に基づき (1 2、2 0)、また、本明細書に提示される予後検証に基づき、本出願人らは、E L I S A による卵巣がんの初期検出のための新規血清バイオマーカーとして S P 1 7 を評価した。このデータは、初期卵巣がんおよび良性卵巣腫瘍または健康な被験体の差次的診断のため、C A 1 2 5 検査と組み合わせた S P 1 7 が、I L - 7 を例外として (そうであるにもかかわらず、これは C A 1 2 5 / S P 1 7 検査の感度と比較してより低い感度を生じた ^{2 8})、記述されている血清バイオマーカーの中で最高 P P V を生じた (それぞれ 6 9 % 対 8 3 . 3 %) ことを示す。

【 0 1 2 8 】

要約すると、本出願人らは、E L I S A アッセイによる S P 1 7 血清濃度の測定が、異なる予後を有する被験体の間、特に、良性卵巣腫瘍および卵巣癌の間に有意な識別を生じられることを示し、本出願人らは、S P 1 7 血清レベルが、無増悪生存期間および全生存期間の両方の予後指標であることのエビデンスを提供する。本出願人らは、大規模スクリーニングにおいて潜在的に適用可能な、初期卵巣がんの診断に適した血清バイオマーカーを初めて示す。

40

【 0 1 2 9 】

【表 1】

表

	健康	良性	OC	p*	p [†]
SP17	3.7 ^a (3.6-3.8) ^b	3.9 (3.7-4.1)	5.5 (5.4-5.7)	P < 0.001	P < 0.001
CA125	17.49 (15.6-19.3)	32.8 (19.9-45.8)	1,289 (901.9-1,676)	P < 0.001	P < 0.001

10

表 I. SP17 および CA125 血清レベルの測定。SP17 (ng/mL) および CA125 (KU/L) の平均血清濃度 (a) および 95% 信頼区間 (b)。p*、健康対卵巣がん群の Dunn 検定 p 値；p[†]、良性対 OC 群の Dunn 検定 p 値。

【0130】

【表 2】

対	OCステージI/II	OCステージIII/IV	OC全ステージ
良性卵巣腫瘍	Sens= 83.3% Spec= 89.0% PPV= 90.9% NPV= 80.0%	Sens= 96.0% Spec= 89.0% PPV= 92.0% NPV= 94.4%	Sens= 90.4% Spec= 88.9% PPV= 91.6% NPV= 87.4%
健康な対照	Sens= 83.3% Spec= 100% PPV= 100% NPV= 93.4%	Sens= 96.0% Spec= 100% PPV= 100% NPV= 98.4%	Sens= 90.4% Spec= 100% PPV= 100% NPV= 96.1%
良性+健康	Sens= 83.3% Spec= 98.9% PPV= 96.1% NPV= 94.9%	Sens= 96.0% Spec= 98.9% PPV= 96.6% NPV= 98.8%	Sens= 88.9% Spec= 98.9% PPV= 96.4% NPV= 96.5%

20

30

表 II. 組み合わせた CA125 および SP17 検査の性能。CA125 および SP17 検査結果を組み合わせたアルゴリズムを用いて、良性状態または健康な対照から OC を識別する際の感度 (Sens)、特異性 (Spec)、陽性適中度 (PPV) および陰性適中度 (NPV) を計算した。

40

【0131】

本発明のいくつかの実施形態が、本明細書に詳細に記載されているが、当業者であれば、本発明の趣旨または添付の特許請求の範囲から逸脱することなく、これに変更を行ってよいことを理解されよう。

【0132】

本明細書に例証的に記載されている本発明は、本明細書において特に開示されていない要素 (単数または複数)、限定 (単数または複数) なしで適宜実施することができる。よって、例えば、用語「を含む」「を包含する」「を含有する」等は、広く、限定せずに解

50

釈されたい。さらに、本明細書に用いられている用語および表現は、限定ではなく説明の用語として用いられており、係る用語および表現の使用において、示され記載されている特色のいかなる均等物またはその一部も除外する意図はないが、請求されている本発明の範囲内で様々な改変が可能であることが認識される。

【 0 1 3 3 】

よって、本発明を好ましい実施形態および任意選択の特色により特に開示してきたが、そこに具体化され、本明細書において開示される本発明の改変、改善および変更が、当業者により用いられてよいこと、また、係る改変、改善および変更が、本発明の範囲内に収まると考慮されることを理解されたい。本明細書に提供されている材料、方法および実施例は、好ましい実施形態の代表であり、例示的であり、本発明の範囲に関する限定として企図されていない。

10

【 0 1 3 4 】

本発明は、本明細書において広範かつ包括的に記載されてきた。属 (g e n e r i c) の開示の内に収まるより狭い種 (s p e c i e s) および亜属 (s u b g e n e r i c) のグループ分けのそれぞれもまた、本発明の一部を構成する。これは、切り取られた材料が本明細書において特に列挙されているか否かに関わりなく、属 (g e n u s) からいずれかの主題を除去する条件付きまたは否定による限定 (n e g a t i v e l i m i t a t i o n) による本発明の属の記載を包含する。

【 0 1 3 5 】

加えて、本発明の特色または態様が、マーカッシュ群の観点から記載されている場合、当業者は、本発明が、これによりマーカッシュ群のいずれかの個々のメンバーまたはメンバーの部分群の観点からも記載されることを認識するであろう。

20

【 0 1 3 6 】

本明細書において言及されているあらゆる刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、あたかもそのそれぞれが参照により個々に援用されているのと同じ程度まで、参照によりその全内容を明確に援用する。矛盾する場合は、定義を包含する本明細書が調節するであろう。

【 0 1 3 7 】

【化 1】

参考文献

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60:277-300.
2. Stany MP, Maxwell GL, Rose GS. Clinical decision making using ovarian cancer risk assessment. *AJR Am J Roentgenol* 2010;194:337-42. 10
3. Staff AC, Bock AJ, Becker C, Kempf T, Wollert KC, Davidson B. Growth differentiation factor-15 as a prognostic biomarker in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2010;118:237-43.
4. Berrino F, De Angelis R, Sant M, et al. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EURO CARE-4 study. *Lancet Oncol* 2007;8:773-83. 20
5. Hogg R, Friedlander M. Biology of epithelial ovarian cancer: implications for screening women at high genetic risk. *J Clin Oncol* 2004;22:1315-27.
6. Hogdall E. Cancer antigen 125 and prognosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008;20:4-8.
7. Nick AM, Sood AK. The ROC 'n' role of the multiplex assay for early detection of ovarian cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2008;5:568-9.
8. Hussein zadeh N. Status of tumor markers in epithelial ovarian cancer has there been any progress? A review. *Gynecol Oncol* 2010. 30
9. Schorge JO, Modesitt SC, Coleman RL, et al. SGO White Paper on ovarian cancer: etiology, screening and surveillance. *Gynecol Oncol* 2010;119:7-17.
10. Helzlsouer KJ, Bush TL, Alberg AJ, Bass KM, Zacur H, Comstock GW. Prospective study of serum CA-125 levels as markers of ovarian cancer. *JAMA* 1993;269:1123-6.
11. Chiriva-Internati M, Wang Z, Salati E, Bumm K, Barlogie B, Lim SH. Sperm protein 17 (Sp17) is a suitable target for immunotherapy of multiple myeloma. *Blood* 2002;100:961-5. 40
12. Chiriva-Internati M, Wang Z, Salati E, Timmins P, Lim SH. Tumor vaccine for ovarian carcinoma targeting sperm protein 17. *Cancer* 2002;94:2447-53.
13. Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, et al. Cancer testis antigen vaccination affords long-term protection in a murine model of ovarian cancer. *PLoS One* 2010;5:e10471.

【化 2】

14. Chiriva-Internati M, Grizzi F, Weidanz JA, et al. A NOD/SCID tumor model for human ovarian cancer that allows tracking of tumor progression through the biomarker Sp17. *J Immunol Methods* 2007;321:86-93.

15. Bumm K, Grizzi F, Franceschini B, et al. Sperm protein 17 expression defines 2 subsets of primary esthesioneuroblastoma. *Hum Pathol* 2005;36:1289-93.

16. Grizzi F, Gactani P, Franceschini B, et al. Sperm protein 17 is expressed in human nervous system tumours. *BMC Cancer* 2006;6:23.

10

17. Gupta G, Sharma R, Chattopadhyay TK, Gupta SD, Ralhan R. Clinical significance of sperm protein 17 expression and immunogenicity in esophageal cancer. *Int J Cancer* 2007;120:1739-47.

18. Li FQ, Liu Q, Han YL, Wu B, Yin HL. Sperm protein 17 is highly expressed in endometrial and cervical cancers. *BMC Cancer* 2010;10:429.

20

19. Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, et al. Cancer testis antigen vaccination affords long-term protection in a murine model of ovarian cancer. *PLoS One* 2010;5.

20. Straughn JM, Jr., Shaw DR, Guerrero A, et al. Expression of sperm protein 17 (Sp17) in ovarian cancer. *Int J Cancer* 2004;108:805-11.

21. Li F-q, Liu Q, Han Y-l, Wu B, Yin H-l. Sperm protein 17 is highly expressed in endometrial and cervical cancers. *BMC Cancer* 2010;10:429.

30

22. Bast RC, Jr., Klug TL, St John E, et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 1983;309:883-7.

23. Stirling D, Evans DG, Pichert G, et al. Screening for familial ovarian cancer: failure of current protocols to detect ovarian cancer at an early stage according to the international Federation of gynecology and obstetrics system. *J Clin Oncol* 2005;23:5588-96.

24. Hermssen BB, Olivier RI, Verheijen RH, et al. No efficacy of annual gynaecological screening in BRCA1/2 mutation carriers; an observational follow-up study. *Br J Cancer* 2007;96:1335-42.

40

25. Kobayashi H, Yamada Y, Sado T, et al. A randomized study of screening for ovarian cancer: a multicenter study in Japan. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18:414-20.

26. Huhtinen K, Suvitie P, Hiissa J, et al. Serum HE4 concentration differentiates malignant ovarian tumours from ovarian endometriotic cysts. *Br J Cancer* 2009;100:1315-9.

【 0 1 3 9 】

【化 3】

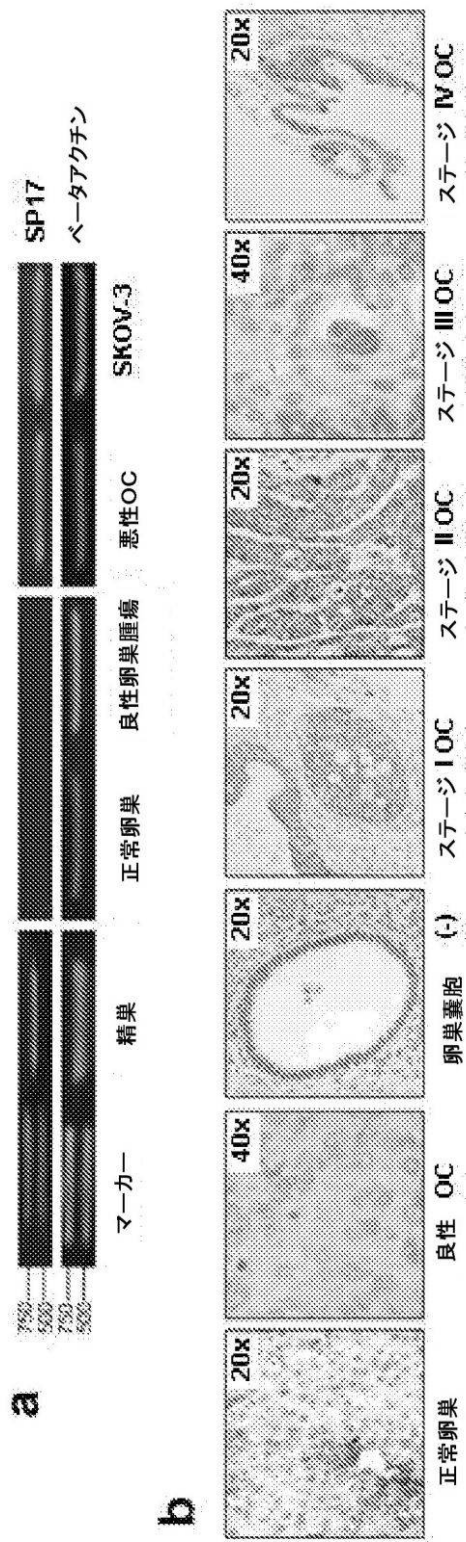
27. McIntosh MW, Drescher C, Karlan B, et al. Combining CA 125 and SMR serum markers for diagnosis and early detection of ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;95:9-15.
28. Lambeck AJ, Crijns AP, Leffers N, et al. Serum cytokine profiling as a diagnostic and prognostic tool in ovarian cancer: a potential role for interleukin 7. *Clin Cancer Res* 2007;13:2385-91.
29. Zhang S, Zhou X, Yu H, Yu Y. Expression of tumor-specific antigen MAGE, GAGE and BAGE in ovarian cancer tissues and cell lines. *BMC Cancer* 2010;10:163. 10
30. Dian D, Bruning A, Mylonas I. E-cadherin as a prognostic marker in human serous carcinomas of the ovary: an immunohistochemical analysis. *Arch Gynecol Obstet* 2010;29:29.
31. Ortolan E, Arisio R, Morone S, et al. Functional role and prognostic significance of CD157 in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:1160-77.
32. Yue X, Akahira J, Utsunomiya H, et al. Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR) as a possible prognostic marker in epithelial ovarian cancer. *Pathol Int* 2010;60:400-6. 20
33. Brennan DJ, Brandstedt J, Rexhepaj E, et al. Tumour-specific HMG-CoAR is an independent predictor of recurrence free survival in epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 2010;10:125.
34. Sonoda K, Miyamoto S, Kobayashi H, et al. The level of RCAS1 expression is inversely correlated with the number of vimentin-positive stromal cells in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2009;19:838-43. 30
35. Tassi RA, Calza S, Ravaggi A, et al. Mammaglobin B is an independent prognostic marker in epithelial ovarian cancer and its expression is associated with reduced risk of disease recurrence. *BMC Cancer* 2009;9:253.
36. Maeda D, Ota S, Takazawa Y, et al. Glypican-3 expression in clear cell adenocarcinoma of the ovary. *Mod Pathol* 2009;22:824-32.
37. Stany MP, Maxwell GL, Rose GS. Clinical Decision Making Using Ovarian Cancer Risk Assessment. *Am J Roentgenol* 2010;194:337-42. 40
38. Morris RT, Monk BJ. Ovarian cancer: relevant therapy, not timing, is paramount. *The Lancet* 2010;376:1120-2.
39. Geomini P, Kruitwagen R, Bremer GL, Cnossen J, Mol BW. The accuracy of risk scores in predicting ovarian malignancy: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2009;113:384-94.

【 0 1 4 0 】

【化 4】

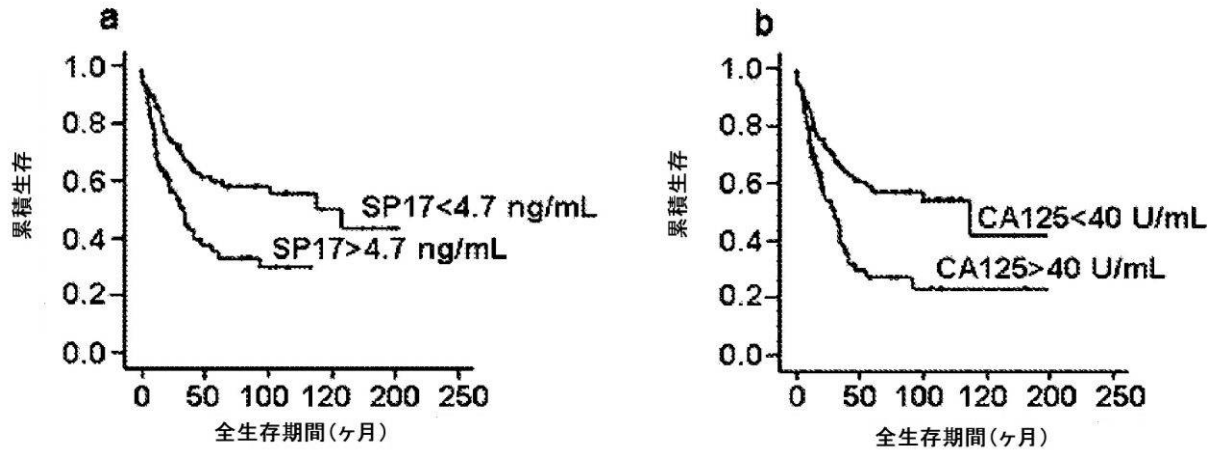
40. Dearing AC, Aletti GD, McGree ME, Weaver AL, Sommerfield MK, Cliby WA. How relevant are ACOG and SGO guidelines for referral of adnexal mass? *Obstet Gynecol* 2007;110:841-8.

【図 1】



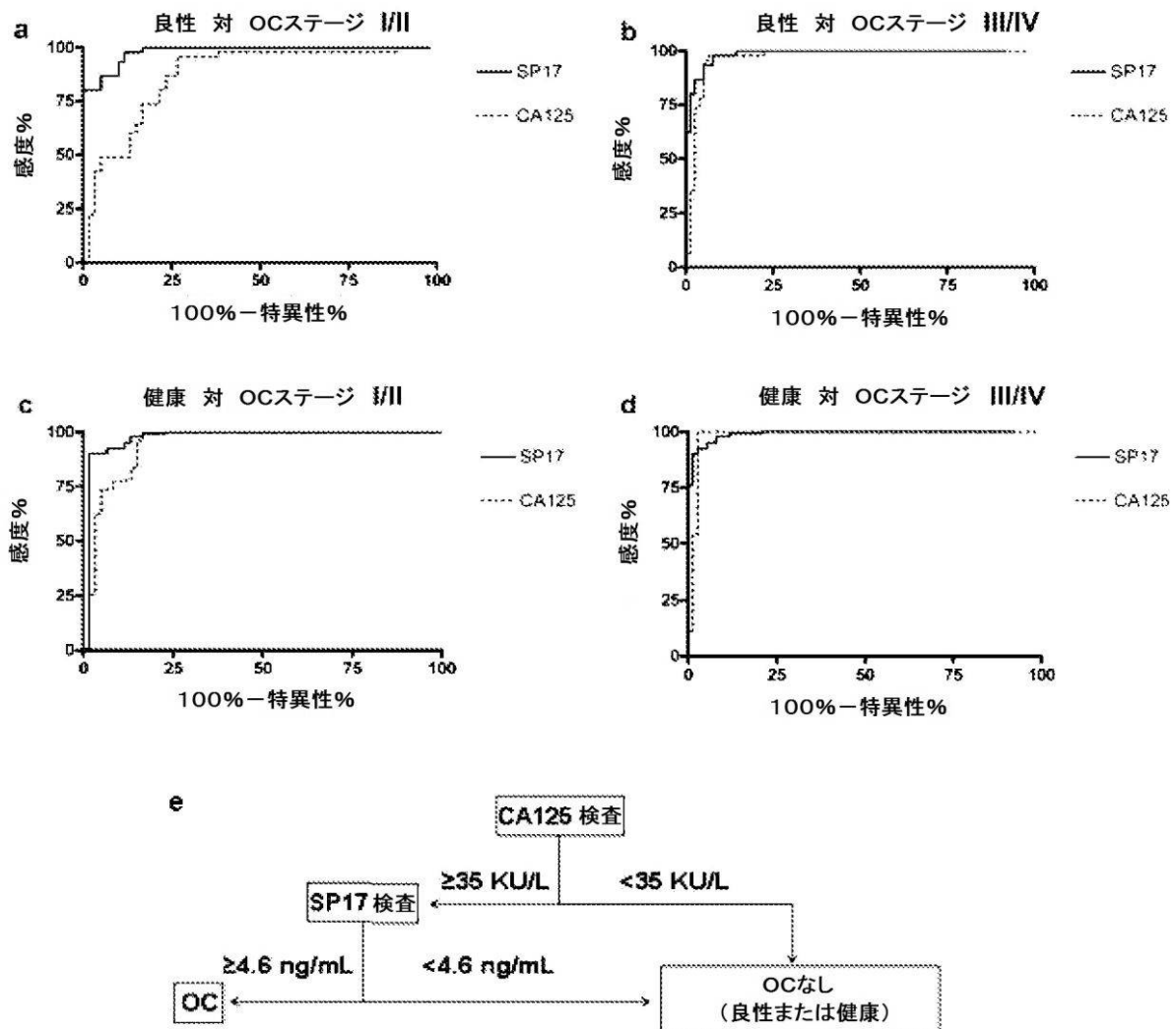
FIGURES 1A AND 1B

【図 2】



FIGURES 2A and 2B

【図 3】



FIGURES 3A through 3E

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2012/054914
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i</i>		
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) C12Q 1/68; A61P 15/00; A61K 38/17; G01N 33/574		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: ovarian cancer, SP17 gene, CA125 gene, kit, treatment, diagnosis, prognosis		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STRAUGHN et al., 'Expression of sperm protein 17 (Sp17) in ovarian cancer' International Journal of Cancer, Vol.108, No.6, pp. 805-811 (01 March 2004) See whole document.	12-14
A	WO 2006-079136 A1 (VITATEQ BIOTECHNOLOGY GMBH et al.) 03 August 2006 See claims 1, 2 and 9; pages 1 and 13.	12-14
A	US 2009-0060931 A1 (COELINGH BENNINK et al.) 05 March 2009 See paragraph [0017].	12-14
A	BUMM et al., 'Sperm protein 17 expression defines 2 subsets of primary esthesioneuroblastoma' Human Pathology, Vol.36, No.12, pp.1289-1293 (December 2005) See abstract; page 1292, column 2 - page 1293, column 1.	12-14
A	CHIRIVA-INTERNATI et al., 'A NOD/SCID tumor model for human ovarian cancer that allows tracking of tumor progression through the biomarker Sp17.' Journal of Immunological Methods, Vol.321, pp.86-93 (09 February 2007) See whole document.	12-14
☐ 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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of 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 18 MARCH 2013 (18.03.2013)		Date of mailing of the international search report 19 MARCH 2013 (19.03.2013)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer KIM, Seung Beom Telephone No. 82-42-481-3371 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/054914

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.: 1-11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-11 pertain to methods for treatment of the human body by therapy, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 10-11
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/054914

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006-079136 A1	03.08.2006	AT 406579 T	15.09.2008
		AT 501348 A1	15.08.2006
		AT 501348 B1	15.10.2008
		AU 2006-209250 A1	03.08.2006
		CA 2595447 A1	03.08.2006
		DE 602006002490 D1	09.10.2008
		EP 1844335 A1	17.10.2007
		EP 1844335 B1	27.08.2008
		ES 2313605 T3	01.03.2009
		JP 05-001859 B2	25.05.2012
		JP 2008-528133 A	31.07.2008
		US 2008-0166737 A1	10.07.2008
		US 2010-0196924 A1	05.08.2010
		US 7767406 B2	03.08.2010
		US 8129129 B2	06.03.2012
US 2009-0060931 A1	05.03.2009	AT 473756 T	15.07.2010
		CA 2630175 A1	24.05.2007
		CN 101365473 A	11.02.2009
		DE 602006015508 D1	26.08.2010
		EP 1951283 A1	06.08.2008
		EP 1951283 B1	14.07.2010
		US 7968514 B2	28.06.2011
		WO 2007-058536 A1	24.05.2007

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 15/00 (2006.01)		A 6 1 P 15/00		
A 6 1 K 45/06 (2006.01)		A 6 1 K 45/06		
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		G 0 1 N 33/574	A	
G 0 1 N 33/48 (2006.01)		G 0 1 N 33/48	P	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	Y	

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

(74) 代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72) 発明者 カスト, ヴェイブ マルティン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 90015, ロサンゼルス, サウス オリーブ ストリート 1150, スイート 2300, ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア 気付

(72) 発明者 キリーヴァ - インテルナーティ, マウリツィオ

アメリカ合衆国 テキサス 79430, ラボック, 4 ティーエイチ ストリート 3601, エムエス 9410, テキサス テック ユニバーシティ 気付

F ターム(参考) 2G045 AA26 BA14 BB24 CB02 DA36 FA16 FB03

4B024 AA12 BA80 CA09 CA12 HA12

4B063 QA01 QA19 QQ42 QQ53 QR32 QR56 QR62 QS25 QS34 QX02

4C084 AA17 AA20 NA14 ZA811 ZB261

专利名称(译)	精子蛋白作为早期卵巢癌的检测标志物		
公开(公告)号	JP2014527816A	公开(公告)日	2014-10-23
申请号	JP2014530760	申请日	2012-09-12
[标]申请(专利权)人(译)	南加利福尼亚大学		
申请(专利权)人(译)	南加州大学		
[标]发明人	カストヴェイブマルティン キリーヴァインテルナーティマウリツィオ		
发明人	カスト, ヴェイブ マルティン キリーヴァ-インテルナーティ, マウリツィオ		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C12N15/00 A61P35/00 A61K45/00 A61P15/00 A61K45/06 G01N33/574 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N33/57449 G01N33/57473 G01N2333/47 A61P15/00 C12Q2600/118 G01N2333/705		
FI分类号	C12Q1/68.A C12N15/00.A C12N15/00.ZNA A61P35/00 A61K45/00 A61P15/00 A61K45/06 G01N33/574.A G01N33/48.P G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/BA14 2G045/BB24 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FB03 4B024/AA12 4B024/BA80 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/AA20 4C084/NA14 4C084/ZA811 4C084/ZB261		
代理人(译)	夏木森下 飯田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/535309 2011-09-15 US		
其他公开文献	JP2014527816A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开内容提供了用于确定患者是否可能经历卵巢癌或不太可能利用SP17作为生物标志物的方法。本公开内容还提供了用于治疗被鉴定为具有卵巢癌风险或预后较差的患者的方法和疗法。患者提供了一种方法，用于确定是否存在低可能性高或经历卵巢癌的可能性，步骤确定从分离的样品中的基因SP17表达水平的所述患者的方法其中SP17基因表达水平的存在或高于预定第一值的水平确定患者更可能发展卵巢癌并且表明SP17基因表达的存在或不存在SP17基因表达低于预定的第一值，将患者识别为不太可能经历卵巢癌。

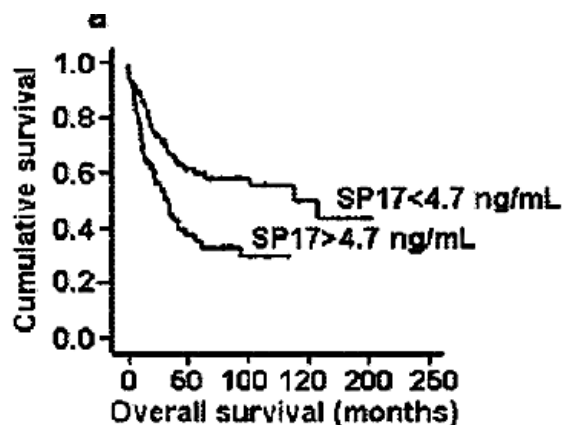


FIGURE 2A