

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6698537号

(P6698537)

(45) 発行日 令和2年5月27日 (2020.5.27)

(24) 登録日 令和2年5月1日 (2020.5.1)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N
CO 7 K 14/47 (2006.01)	CO 7 K 14/47 Z N A

請求項の数 15 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2016-551044 (P2016-551044)	(73) 特許権者	516132046
(86) (22) 出願日	平成26年11月5日 (2014.11.5)		バード1アーゲー エスアー
(65) 公表番号	特表2016-536622 (P2016-536622A)		スイス国 ツェーハー 1205 ジュネーヴ, プールヴァード デュ ポンダルヴ 28
(43) 公表日	平成28年11月24日 (2016.11.24)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/073834	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開番号	W02015/067666		弁理士 小林 浩
(87) 国際公開日	平成27年5月14日 (2015.5.14)	(74) 代理人	100120134
審査請求日	平成29年10月31日 (2017.10.31)		弁理士 大森 規雄
(31) 優先権主張番号	13191739.5	(74) 代理人	100149010
(32) 優先日	平成25年11月6日 (2013.11.6)		弁理士 星川 亮
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺がん診断

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類対象における肺がんの診断を補助するためのインビトロ及び／またはエクスビロ方法であって、

a) 前記哺乳類対象から採取した血液または血清試料に基づいて、ヒト B A R D 1 のひと続きのアミノ酸配列及び／またはそのアイソフォームを含む少なくとも 11 個の異なるペプチドの組み合わせに特異的に結合している自己抗体の量に関するパラメーターを決定するステップと；

b) 前のステップで得られた前記パラメーターに基づいて、前記哺乳類対象が肺がんを患っているかどうかを診断するための情報を提供するステップと

を含み、

前記少なくとも 11 個の異なるペプチドの組み合わせが 41 個のペプチドの群から選択され、各ペプチドがそれぞれ配列番号 1～41 からなる群の 41 個のアミノ酸配列の 1 つを含む、またはから本質的になる、方法。

【請求項 2】

対象が肺がんを患う可能性及び／またはリスクの評価を補助する方法であって、

a) 前記対象から採取した血液または血清試料に基づいて、ヒト B A R D 1 のひと続きのアミノ酸配列及び／またはそのアイソフォームを含む少なくとも 11 個の異なるペプチドの組み合わせに特異的に結合している自己抗体の量に関するパラメーターを決定するステップと；

10

20

b) ステップ a) で測定した前記パラメーターから前記対象が肺がんを患う可能性及び／またはリスクを評価するための情報を提供するステップと
を含み、

前記少なくとも 11 個の異なるペプチドの組み合わせが 41 個のペプチドの群から選択され、各ペプチドがそれぞれ配列番号 1～41 からなる群の 41 個のアミノ酸配列の 1 つを含む、またはから本質的になる、方法。

【請求項 3】

肺がんのモニタリング、または診断を補助するためのインビトロ及び／またはエキスピボ方法における、ヒト BARD1 のひと続きのアミノ酸配列及び／またはそのアイソフォームを含む少なくとも 11 個の異なるペプチドの組み合わせ（前記少なくとも 11 個の異なるペプチドの組み合わせが 41 個のペプチドの群から選択され、各ペプチドがそれぞれ配列番号 1～41 からなる群の 41 個のアミノ酸配列の 1 つを含む、またはから本質的になる）の使用。

【請求項 4】

各個別のパラメーターが前記異なるペプチドの 1 つの特定のペプチドに結合している複数の抗体の量に関係する複数のパラメーターを得るように、自己抗体の量に関係する前記パラメーターをペプチドごとに別々に決定する、請求項 1 もしくは 2 に記載の方法、または請求項 3 に記載の使用。

【請求項 5】

前記ステップ b) が、前記パラメーターに基づいて、かつ、各ペプチドに特有の統計的に決定された係数から、前記哺乳類対象または前記対象の試験値を算出するステップを含む、請求項 1、2 および 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記ペプチドが、独立して、8～250 個または 8～50 個のアミノ酸の長さを有する、請求項 1、2、4 および 5 のいずれか 1 項に記載の方法、または請求項 3 もしくは 4 に記載の使用。

【請求項 7】

前記異なるペプチドが、11～30 個または 17～28 個の異なるペプチドからなる、請求項 1、2 および 4～6 のいずれか 1 項に記載の方法、または請求項 3、4 および 6 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 8】

前記異なるペプチドが、いくつかの群のペプチド、A 群のペプチド、B 群のペプチド、C 群のペプチド、D 群のペプチド、及び E 群のペプチドを含み、

前記 A 群が、配列番号 1（#286）；配列番号 2（#720）；配列番号 3（#493）；配列番号 4（#68/524）；配列番号 5（#140）；配列番号 6（#139）；配列番号 7（#349）；配列番号 8（#117）；配列番号 9（#5）；及び配列番号 10（#-4）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、または、から実質的になる 1 つ以上のペプチドを含み、前記 B 群が、配列番号 11（#16）；配列番号 12（#453）；配列番号 13（EX4. . 2）；配列番号 14（#BRC T 2. 2）；配列番号 15（#15）；配列番号 16（#523）；及び配列番号 17（#109）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、または、から実質的になる 1 つ以上のペプチドを含み、前記 C 群が、配列番号 18（#117/635）；配列番号 19（#368）；配列番号 20（BRC T. 1. .）；配列番号 21（EX4. . 1）；配列番号 22（#188）；配列番号 23（LINK）；配列番号 24（#A21/635）；及び配列番号 25（RING）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、または、から実質的になる 1 つ以上のペプチドを含み、前記 D 群が、配列番号 26（Ank）；配列番号 27（#A20/122）；配列番号 28（#54）；配列番号 29（#48/522）；配列番号 30（#149）；配列番号 31（#73）；配列番号 32（#A-4）；配列番号 33（#3ORF）；及び配列番号 34（#557）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、または、から実質的になる 1 つ以上のペプチドを含み、前記 E 群が、配列

10

20

30

40

50

番号35（#319）；配列番号36（#702）；配列番号37（#175）；配列番号38（#84）；配列番号39（#A29）；配列番号40（#542）；及び配列番号41（#309）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、または、から実質的になる1つ以上のペプチドを含み、ペプチドの前記組み合わせが、前記A群から選択された1つ以上のペプチドと、前記B群、C群、D群、及び／またはE群の前記いずれか1つから選択された1つ以上のペプチドとを含む、請求項1、2および4～7のいずれか1項に記載の方法、または請求項3、4、6および7のいずれか1項に記載の使用。

【請求項9】

前記異なるペプチドが、前記A群から選択された5つ以上のペプチドと；B群から選択された2つ以上のペプチドと；及びC群から選択された2つ以上のペプチドとを含む、請求項8に記載の方法、または請求項8に記載の使用。

10

【請求項10】

前記異なるペプチドが、配列番号1～4、11～13、および18～20からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、請求項1、2および4～9のいずれか1項に記載の方法、または請求項3、4および6～9のいずれか1項に記載の使用。

【請求項11】

女性ヒト対象における肺がんの診断を補助するためのインビトロ及び／またはエキスビロ方法であって、

- 前記女性ヒト対象から採取した血液または血清試料に基づいて、少なくとも19個の異なるペプチド（前記ペプチドは、それぞれ、配列番号1～配列番号6；配列番号11～配列番号14；配列番号18～配列番号21；配列番号26～配列番号30のアミノ酸配列から本質的になるペプチドである）に特異的に結合している自己抗体の量に関するパラメーターを決定するステップと；

20

- 前のステップで得られた前記パラメーターに基づいて、前記女性ヒト対象が肺がんを患っているかどうかを診断するための情報を提供するステップとを含む、方法。

【請求項12】

男性ヒト対象における肺がんの診断を補助するためのインビトロ及び／またはエキスビロ方法であって、

- 前記男性ヒト対象から採取した血液または血清試料に基づいて、少なくとも22個の異なるペプチド（前記ペプチドが、それぞれ、配列番号1～配列番号5；配列番号7；配列番号8；配列番号11～配列番号13；配列番号15；配列番号18～配列番号20；配列番号22；配列番号23；配列番号26；配列番号27；及び配列番号31～配列番号34のアミノ酸配列から本質的になるペプチドである）に特異的に結合している自己抗体の量に関するパラメーターを決定するステップと；

30

- 前のステップで得られた前記パラメーターに基づいて、前記男性ヒト対象が肺がんを患っているかどうかを診断するための情報を提供するステップとを含む、方法。

【請求項13】

肺がんを診断するのを補助するための診断検査キットであって、前記診断検査キットは、少なくとも11個の異なるペプチドの組み合わせを含み、各ペプチドは、ヒトBARD1のひと続きのアミノ酸配列及び／またはそのアイソフォームを含み、

40

前記少なくとも11個の異なるペプチドの組み合わせが41個のペプチドの群から選択され、各ペプチドがそれぞれ配列番号1～41からなる群の41個のアミノ酸配列の1つを含む、またはから本質的になる、キット。

【請求項14】

肺がんのスクリーニングの臨床効率を高める方法であって、

a) 対象から採取した血液または血清試料に基づいて、ヒトBARD1のひと続きのアミノ酸配列及び／またはそのアイソフォームをそれぞれ含む少なくとも11個の異なるペプチドの組み合わせ（前記少なくとも11個の異なるペプチドの組み合わせが41個のペ

50

プチドの群から選択され、各ペプチドがそれぞれ配列番号1～41からなる群の41個のアミノ酸配列の1つを含む、またはから本質的になる)に特異的に結合している自己抗体の量に関係するパラメーターを決定することと;

b) 前のステップで得られた前記パラメーターに基づいて、前記対象が肺がんを患うリスク及び/または可能性が増しているかどうかを決定するための情報を提供すること、を含む、方法。

【請求項15】

肺がんの発生と関連付けられた自己抗体のレベルを検出する及び/または測定するインビトロ及び/またはエクスピボ方法であって、

a) 対象から採取した血液または血清試料に基づいて、ヒトBARD1のひと続きのアミノ酸配列及び/またはそのアイソフォームをそれぞれ含む少なくとも11個の異なるペプチドの組み合わせに特異的に結合している自己抗体の量に関係するパラメーターを決定するステップ

を含み、

前記少なくとも11個の異なるペプチドの組み合わせが41個のペプチドの群から選択され、各ペプチドがそれぞれ配列番号1～41からなる群の41個のアミノ酸配列の1つを含む、またはから本質的になる、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、肺がんの診断方法、肺がんの検出方法、抗体の検出方法、さらなる方法及び検出キット並びに診断検査キットに関する。

【背景技術】

【0002】

背景技術及び本発明の根底にある課題

肺がんは、世界中のがんによる死亡の主要原因である。手術以外の治療方法は、あまり効果的ではなく、耐性につながる。そのため、肺がんの病因やその進行についての見識が至急必要とされている。大腸がんは、がん関連死の別の主要原因であり、世界中で4番目に最も一般的なものである。大腸がん患者の生存率及び予後は、診断時の腫瘍のステージに依存する。早期ステージの大腸がんは治癒可能である。残念なことに、57%以上は、診断時に疾患が周辺に広がっていたり、あるいは遠隔転移していたりする。がんの管理における多額の投資や進歩にもかかわらず、5年生存率は、進行期の大腸がん患者でわずか15%である。

【0003】

近年、多くのグループは、腫瘍におけるタンパク質、RNA、及びマイクロRNAを健全組織と比較することで、肺がんを促進するメカニズムに対処してきた。肺がんでは最も頻繁に欠失されるかまたは変異した遺伝子であるTP53に加えて、p53-ARF経路の構成要素も一貫して欠失、変異、または後成的に修飾される。大腸がんに関して、課題は、分子基盤を理解し、発生を引き起こし、進行を促進する因子を決定することである。大腸がんの発症及び転移進行に関与する分子事象は、ほんの一部しか解明されていない。近年の研究では、大腸がんにおいて分子及び生化学的マーカーに利用できる可能性を明らかにし、MLH1、MSH2、 β -カテニン、及びp53などの化学療法に対する成果及び応答を予測している。

【0004】

分子プロファイルは、非小細胞肺がん(NSCLC)の予測及び予後パラメーターとして出現しており、ERCC1、RRM1、及びBRCA1などの、DNA損傷修復に関与する遺伝子が含まれる。乳がん素因遺伝子であるBRCA1のアップレギュレート発現は、NSCLCにおける治療に応答する予後及び予測マーカーとして提案された。大腸がん

10

20

30

40

50

に関して、BRCA1の研究は、大腸がんリスク及びBRCA1変異に主に限定される。いくつかの研究は、BRCA1変異と大腸がんリスクを相関させようと試みたが、明確な結論は得られなかった。現在の限られた利用可能な証拠に基づく、BRCA変異キャリアは、大腸がんのリスクが高いと見なすべきである。しかしながら、大腸がんにおけるBRCA1発現の特異的役割は不明である。

【0005】

BRCA1は、多くの増殖細胞で発現され、DNA修復経路及び細胞周期制御における腫瘍抑制因子として作用する。BRCA1タンパク質の安定性及び機能は、BARD1 (BRCA1関連RINGドメインタンパク質1) との相互作用に依存する。BRCA1-BARD1ヘテロ二量体は、E3ユビキチンリガーゼ活性を有するため、ユビキチン化を介して主要な標的タンパク質の安定性を制御する。BARD1は、p53依存性アポトーシスにも関与しており、ほとんどの肺がんで欠乏している。BARD1は、p53を安定させ、そのリン酸化を促進し、BARD1の発現は、アポトーシスに向かって信号伝達する適切なp53機能に必要とされる。そのため、BARD1は、BRCA1及びp53双方の結合パートナーとして、腫瘍抑制における二重の役割を果たす。いくつかの研究では、BARD1は、有糸分裂中に、E2Fによって転写的に、かつ、リン酸化によって翻訳後にアップレギュレートされることが示されており、重要なのは、これが、有糸分裂に不可欠なことである。他の研究によれば、BRCA1及びBARD1双方が、遺伝性非ポリポーシス大腸がん(HNPCC)と一般に関連付けられた遺伝子であるhMSH2と相互作用することが示され、hMSH2の変異は、HNPCCのおおよそ30~40%を占めるように思われる。BRCA1-hMSH2信号伝達過程における欠失は、腫瘍形成への感受性増大をもたらす。

【0006】

WO98/12327 (ボード・オブ・リージェンツ、ザ・ユニバーシテイ・オブ・テキサス・システム) には、乳がんタンパク質であるBRCA1への結合に基づいてスクリーニングアッセイで同定されたいくつかの遺伝子が開示されている。これらの遺伝子の1つは、BARD1と呼ばれ、これは、BRCA1と相互作用し、種々のがん関連の診断及び治療方法、特に、乳房、卵巣、及び子宮がんに関連したものの使用が考えられるRINGタンパク質である。

【0007】

WO2008/119802 (ジュネーヴ大学) には、婦人科がんにおいて、BARD1の欠失保持アイソフォームが過剰発現され、細胞質に異常に局在化され、それらの発現は、乳房及び卵巣がんの予後不良と相関していることが開示されている。これらのアイソフォームの構造分析により、それらは、BRCA1と相互作用するかまたはアポトーシスを誘発する領域が欠けていることが示された。これらのアイソフォームは、婦人科がんの特異的であり、アイソフォーム α 、 β 、 η 、 γ 、 ε 、 ϕ 、 δ 、及び Ω と呼ばれる。

【0008】

WO2012/023112 には、肺及び結腸がんで特異的に発生する、BARD1の新規アイソフォームが開示されている。これらのアイソフォームの検出方法が開示されている。

【0009】

肺がんの重症度により、対象における肺がんの効果的な診断方法を提供することが至急必要とされている。進行した状況にある対象のがんは治癒ができないことにより、肺がんを早期診断することが可能な方法を提供することが至急必要とされている。早期診断は、肺がんを患っている対象の予後を著しく改善させる。

【0010】

本発明の目的は、非侵襲であるかまたは最小侵襲手順を要する診断方法を提供することである。血液試料に基づいて行うことができる診断検査が有益であろう。

【0011】

本発明の別の目的は、肺がんを診断するための迅速で、信頼性が高く、感受性があり、

10

20

30

40

50

かつ特異的な検査を提供することである。

【0012】

本発明は、上記の問題に対処する。

【発明の概要】

【0013】

本発明は、肺がんの診断に適する方法、キット、及びアッセイを提供する。

【0014】

一態様では、本発明は、血液及び／または血清試料中の抗体のレベルの検出及び／または測定方法を提供し、異なるペプチドに特異的に結合する抗体のレベルを測定し、前記ペプチドは、ヒトBARD1のひと続きのアミノ酸配列（配列番号42）及び／またはそのアイソフォーム（配列番号43～51）を含む。

10

【0015】

一態様では、本発明は、哺乳類対象の循環抗体のレベルの検出及び／または測定方法を提供し、多くの異なるペプチドに特異的な抗体を検出し、前記ペプチドは、BARD1に關係する、及び／またはBARD1のアミノ酸配列またはそのアイソフォームのいずれか1つの断片を含む。

【0016】

ヒトBARD1のアミノ酸配列（全長）は、含まれる配列リストの配列番号42で提供される。BARD1のアイソフォームは、アイソフォームα（アルファ）（配列番号43）；アイソフォームπ（パイ）（配列番号44）；アイソフォームβ（ベータ）（配列番号45）；アイソフォームκ（配列番号46）；アイソフォームγ（配列番号47）；アイソフォームλ（配列番号48）；アイソフォームφ（ファイ）（配列番号49）；アイソフォームε（イプシロン）（配列番号50）；及びアイソフォームη（イータ）（配列番号51）を包含する。

20

【0017】

一態様では、本発明は、哺乳類対象における循環抗体のレベルを検出することによる肺がんの診断方法を提供し、多くの異なるペプチドに特異的な抗体を検出し、前記ペプチドは、BARD1に關係する、及び／またはBARD1のアミノ酸配列またはそのアイソフォームのいずれか1つの断片を含む。

【0018】

一態様では、本発明は、哺乳類対象における循環抗体のレベルを測定する及び／または検出するインビトロ及び／またはエキスピボ方法を提供し、本方法は、a) 対象から採取した血液または血清試料に基づいて、ヒトBARD1のひと続きのアミノ酸配列（配列番号42）及び／またはそのアイソフォーム（配列番号43～51）を含む異なるペプチドに特異的に結合している循環血清抗体の量に關係するパラメーターを決定するステップを含む。

30

【0019】

一態様では、本発明は、哺乳類対象における肺がんのインビトロ及び／またはエキスピボ診断方法を提供し、本方法は、a) 対象から採取した血液または血清試料に基づいて、ヒトBARD1のひと続きのアミノ酸配列（配列番号42）及び／またはそのアイソフォーム（配列番号43～51）を含む異なるペプチドに特異的に結合している循環血清抗体の量に關係するパラメーターを決定するステップと；b) 前のステップで得られたパラメーターに基づいて、前記対象が肺がんを患っているかどうかを診断するステップとを含む。

40

【0020】

一態様では、本発明は、肺がんの発生と関連付けられた抗体のレベルを検出する及び／または測定するインビトロ及び／またはエキスピボ方法を提供し、本方法は、a) 対象から採取した前記血液または血清試料に基づいて、ヒトBARD1のひと続きのアミノ酸配列（配列番号42）及び／またはそのアイソフォーム（配列番号43～51）を含む異なるペプチドに特異的に結合している抗体の量に關係するパラメーターを決定するステップ

50

を含む。

【0021】

一態様では、本発明は、対象が肺がんを患う可能性及び／またはリスクの評価方法を提供し、本方法は、a) 対象から採取した血液または血清試料に基づいて、ヒトBARD1のひと続きのアミノ酸配列(配列番号42)及び／またはそのアイソフォーム(配列番号43～51)を含む異なるペプチドに特異的に結合している抗体の量に関するパラメーターを決定するステップと；ステップa)で測定したパラメーターから前記対象が肺がんを患う可能性及び／またはリスクを評価するステップとを含む。

【0022】

一態様では、本発明は、本発明のインビトロ及び／またはエキスビボ方法、例えば、肺がんのスクリーニング、モニタリング、診断、予後、予測、及び再発のための方法、及び／または、肺がんのスクリーニング、モニタリング、診断、予後、予測、及び再発の臨床効率を高める方法において、ヒトBARD1のひと続きのアミノ酸配列(配列番号42)及び／またはそのアイソフォーム(配列番号43～51)を含む異なるペプチドの組み合わせの使用を提供する。

【0023】

一態様では、本発明は、血液及び／または血清試料中に存在する抗体のレベルの検出及び／または決定方法を提供し、本方法は、哺乳類対象から血液または血清試料を提供するステップと；前記血液または血清試料を、異なるペプチドであって、ヒトBARD1のひと続きのアミノ酸配列(配列番号42)及び／またはそのアイソフォーム(配列番号43～51)を含む、ペプチドが結合している1つ以上の表面及び／または固体マトリックスに接触させるステップであって、接触ステップは、前記試料中に存在する抗体を、抗原抗体相互作用を介して異なるペプチドに結合させるのに十分な条件下である、接触ステップと；1つ以上の表面または固体マトリックスから任意の非結合抗体を除去するための血液または血清試料を除去するステップと；前記表面及び／またはマトリックスに結合している抗原-抗体複合体のレベルを決定するステップとを含む。

【0024】

一態様では、本発明は、哺乳類対象における肺がんの診断方法を提供し、本方法は、哺乳類対象から血液または血清試料を提供するステップと；前記血液または血清試料を、異なるペプチドであって、ヒトBARD1のひと続きのアミノ酸配列(配列番号42)及び／またはそのアイソフォーム(配列番号43～51)を含む、ペプチドが結合している1つ及び／またはそれ以上の表面または固体マトリックスに接触させるステップであって、接触ステップは、前記試料中に存在する抗体を、抗原抗体相互作用を介して異なるペプチドに結合させるのに十分な条件下である、接触ステップと；表面及び／またはマトリックスから任意の非結合抗体を除去するための血液または血清試料を除去するステップと；前記表面及び／またはマトリックスに結合している抗原-抗体複合体のレベルを決定するステップと；前のステップで得られたレベルに基づいて、前記対象が肺がんを患っているかどうかを診断するステップとを含む。

【0025】

一態様では、本発明は、女性ヒト対象における肺がんのインビトロ及び／またはエキスビボ診断方法を提供する。好ましい実施形態では、方法は、女性対象から採取した血液または血清試料に基づいて、少なくとも19個の異なるペプチドに特異的に結合している抗体の量に関するパラメーターを決定するステップであって、前記ペプチドは、それぞれ、配列番号1～配列番号6；配列番号11～配列番号14；配列番号18～配列番号21；配列番号26～配列番号30のアミノ酸配列を含むペプチドである、決定するステップと；前のステップで得られた前記パラメーターに基づいて、前記女性対象が肺がんを患っているかどうかを診断するステップとを含む。

【0026】

一態様では、本発明は、男性ヒト対象における肺がんのインビトロ及び／またはエキスビボ診断方法を提供する。好ましい実施形態では、この方法は、男性対象から採取した血

10

20

30

40

50

液または血清試料に基づいて、少なくとも22個の異なるペプチドに特異的に結合している抗体の量に関係するパラメーターを決定するステップであって、前記ペプチドは、それぞれ、配列番号1～配列番号5；配列番号7；配列番号8；配列番号11～配列番号13；配列番号15；配列番号18～配列番号20；配列番号22；配列番号23；配列番号26；配列番号27；及び配列番号31～配列番号34のアミノ酸配列を含むペプチドである、決定するステップと；前のステップで得られた前記パラメーターに基づいて、前記男性対象が肺がんを患っているかどうかを診断するステップとを含む。

【0027】

一態様では、本発明は、対象における肺がんのインビトロ及び／またはエクスビボ診断方法を提供し、本方法は、

a) - 異なるペプチドの組み合わせを、対象の血液または血清試料に暴露させるステップであって、前記ペプチドは、ヒトBAR D 1のアミノ酸配列のひと続きのアミノ酸配列（配列番号42）またはそのアイソフォームのアミノ酸配列（配列番号43～51）を含むペプチドから選択され、前記ペプチドは、独立して、4～300個のアミノ酸の長さを有する、曝露させるステップと；

- 前記ペプチドの各々に結合している前記試料中の抗体の量に関係するパラメーターを決定するステップと；

b) 前のステップで得られたパラメーターから、前記対象が肺がんに対して陽性または陰性と診断されるかどうかを決定するステップとを含む。

【0028】

いくつかの態様では、本発明は、本発明の方法を行うためのキットを提供する。キットは、少なくとも4つの異なるペプチドを含むのが好ましい。

【0029】

一態様では、本発明は、肺がんの診断用の診断検査キットを提供し、前記診断検査キットは、少なくとも11個の異なるペプチドの組み合わせを含み、各ペプチドは、ヒトBAR D 1のひと続きのアミノ酸配列（配列番号42）及び／またはそのアイソフォーム（配列番号43～51）を含む。一実施形態では、前記異なるペプチドは、配列番号1～41のいずれか1つによるアミノ酸配列を含むペプチドの群から選択される。

【0030】

本発明のさらなる態様及び好ましい実施形態は、以下及び添付の特許請求の範囲に規定される。本発明のさらなる特徴及び利点は、下記の好ましい実施形態の説明から当業者に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】近似モデル（ここでは、ロジスティック回帰モデル）の逸脱度を示す。示すモデルは、肺がんの診断キットの品質（判別力の意味における）の尺度であり、本発明の実施形態による異なるモデルを比較するのに用いる。

【図2A】図2A～2Cは、本発明による診断検査モデルの実施形態による受信者動作特性（ROC）曲線と曲線下面積（AUC）値（高い方がより良い、最大＝1）とを示す。

（A）最適な25個のペプチドモデル（分）、 $AUC = 0.966$ 、優れた識別能を示し；
（B）17個のペプチドモデル（1秒）、 $AUC = 0.927$ 、良好な識別能を示し；
（C）10個のペプチドモデル（ $AUC < 0.828$ ）；低い識別能を示す。

【図2B】前記の通りである。

【図2C】前記の通りである。

【図3A】図3A～3Cは、それぞれ、40個、30個、及び10個のペプチド（変数）に基づいたサポートベクターマシン（SVM）分類子の性能を示す。図3A～3Cの各々は、左から右に、代表的なROC曲線；がん及び対照試料の相対信号値の分布を示す箱ひげ図；100個のモデリングシリーズ（平均は約0.83）におけるAUC値分布を示す箱ひげ図である。

【図3B】前記の通りである。

【図 3 C】前記の通りである。

【発明を実施するための形態】

【0032】

いくつかの実施形態では、本発明は、診断方法及び診断の使用、哺乳類対象の血液及び／または血清抗体の検出方法、肺がんの発生と関連付けられた抗体のレベルの検出及び／または測定方法、対象が肺がんを患う可能性及び／またはリスクの評価方法に関する。本発明は、使用及びキットにも関する。

【0033】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、血液及び／または血清試料中の抗体のレベルを検出する及び／または測定するステップを含む。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、哺乳類対象の循環抗体のレベルを検出する及び／または測定するステップを含む。抗体は、自己免疫抗体であるのが好ましい。

10

【0034】

一実施形態では、本発明の方法は、エキスピボ及び／またはインピトロ方法である。本発明の方法は、ヒトまたは動物体で直接行わないのが好ましい。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、血液試料を提供するステップを含む。血液試料を採取する、例えば、血液ランセットを用いた、例えば、毛細管採血によって、例えば、数滴の血液を吸引するのが好ましい。血液試料は、静脈採血（静脈穿刺）によって提供してもよい。本発明の方法は、常用手技によって対象から予め採取された試料に基づいて行うのが好ましい。いくつかの実施形態では、採血するステップは、本発明の方法の一部ではない。

20

【0035】

従って、いくつかの実施形態では、本発明の方法は、血液または血清試料を提供するステップを含む。血液及び／または血清試料は、哺乳類対象から採取するのが好ましい。

【0036】

本発明の目的のため、対象は、哺乳動物またはヒトであるのが好ましい。対象は、ヒトであるのが最も好ましい。一実施形態によれば、対象は、喫煙歴を有するヒトである。従って、診断方法は、喫煙者であるかまたは以前に喫煙者であったヒトに限定して設計されているのが好ましい。好ましい実施形態では、診断方法は、多量の喫煙歴があるヒトに限定して設計されているのが好ましい。

【0037】

30

血液試料中の抗体のレベルは、例えば、定量的及び／または半定量的に測定してもよい。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、試料中の抗体の量、及び／または循環抗体の量に関係するパラメーターを決定するステップを含む。パラメーターは、試料中に存在する抗体の量に関係する数値であるのが好ましい。数値は、この明細書中のどこかに例示されるように、適当な読み取り装置及びデータ処理装置を用いて自動化処理で生成されるのが好ましい。

【0038】

一実施形態では、本発明の方法は、a) 対象から採取した血液または血清試料に基づいて、ヒトBAR D1のひと続きのアミノ酸配列（配列番号42）及び／またはそのアイソフォーム（配列番号43～51）を含む異なるペプチドに特異的に結合している循環血清抗体の量に関係するパラメーターを決定するステップを含む。血清抗体の量に関係するパラメーターは、前記試料中の抗体のレベルを表す及び／または該レベルに対応してもよい。

40

【0039】

本発明のペプチドは、単離された及び／または精製されたペプチドであるのが好ましい。好ましい実施形態によれば、ペプチドは、組み換えペプチドである。一実施形態によれば、ペプチドは、合成ペプチドである。固相ペプチド合成などの合成化学法を用いて、本発明によるポリペプチドを合成することができる。これらのペプチドの精製は、タンパク質／ペプチド精製の当該技術分野で公知の任意の技術によって行ってもよい。技術の例としては、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、及び免疫

50

親和法が挙げられる。

【0040】

本発明の一実施形態では、血液試料中の抗体のレベルを決定するステップ、及び／または前記ステップa)は、

1) 前記血液または血清試料を、前記異なるペプチドが結合している1つ以上の表面及び／または固体マトリックスに接触させるステップであって、接触ステップは、前記試料中に存在する抗体を、抗原抗体相互作用を介して異なるペプチドに結合させるのに十分な条件下である、接触ステップと；

2) 1つ以上の表面または固体マトリックスから任意の非結合抗体を除去するための血液または血清試料を除去するステップと；

3) 前記表面及び／またはマトリックスに結合している抗原-抗体複合体のレベルを測定することで、循環血清抗体の量に関係する前記パラメーターを決定するステップとを含む。

【0041】

「固体マトリックス (solid matrix)」及び「固体マトリックス (solid matrices)」という表現には、免疫測定法または本発明による方法を実施するのに適切な任意の固相支持体が含まれる。それには、ビーズ、微粒子、ナノ粒子、管、織物またはプレート、フィルム、スライド、ウェル、ガラスから形成されたかまたはガラスで被膜されたもの、ポリスチレン、ポリプロピレン、ニトロセルロース、石英、セラミック、デキストラン、または他の材料が挙げられる。例えば、固体マトリックスは、96ウェルまたは312ウェルのマイクロタイタープレートなどのマイクロタイターウェルの形態である。いくつかの実施形態では、「固体マトリックス」及び／または表面とは、例えば、電気化学発光アッセイにおいて電極材として適切な炭素材または他の材料のことを言う。

【0042】

例えば、本発明の方法及びキットにおける、本発明によるペプチドの固体マトリックスへの固定及び／または結合は、固相支持体への吸着または化学的結合によって行ってもよい。タンパク質またはペプチドを固体支持体に固定化するための当該技術分野で公知の任意の手段を用いることができる。本発明によるペプチドは、アミドまたはエステル結合または吸着を介して、共有結合などの技術によって固体マトリックスに共有的または非共有的に結合することができる。ペプチドは、ビオチンとアビジンまたは抗体と抗原などの結合対を用いて結合することができる。ペプチドを固体マトリックスに固定した後、固体マトリックスをブロッキング溶液（ウシ血清アルブミンなどのブロッキングタンパク質を含む）でインキュベートし、検査試料中の抗体の支持体表面への非特異的吸着を減らすことができる。一実施形態によれば、本発明によるペプチドは、例えば、本発明のキットの固体マトリックス上で直接合成することができる。

【0043】

本明細書の目的のため、「抗原-抗体複合体」という表現は、試料中の抗体の本発明のペプチドへの結合によって形成される複合体のことを言い、表面及び／または固体支持体上に提供されるのが好ましい。従って、「抗原-抗体複合体」とは、本明細書の目的のため、「ペプチド-抗体複合体」とも呼ばれる。前記ステップ3)にて、表面及び／またはマトリックス上に保持される抗体は、抗原-抗体複合体を形成するものであるのが好ましく、前記ペプチドは、前記抗体の抗原として機能する。

【0044】

前記血液及び／または血清試料を除去するステップ2)は、1つ以上の表面及び／または固体マトリックスを、例えば、PBSなどの適切な洗浄緩衝液で洗浄及び／または濯ぐことで行うのが好ましい。このステップは、ステップ1)で発生したかもしれない抗原-抗体を乱さないのが好ましい。

【0045】

一実施形態では、ステップ3)は、ステップ1)及び／またはステップ2)の後に、マ

10

20

30

40

50

ーカー分子を1つ以上の表面または固体マトリックスに加えるステップを含み、前記マー
カーは、前記表面及び／またはマトリックスに結合している抗原－抗体複合体を形成する
血液または血清試料の抗体と相互作用する、及び／または、該抗体に結合している。

【0046】

マーカ分子は、信号読み取りステップで読み取ることができる信号を生成するかまた
は該信号を生成するように誘発することができるエンティティであるのが好ましい。一般
に、マーカ分子は、抗体、特に、抗原－抗体複合体に関連している、または何らかの方
法で関連付けられている。従って、マーカの存在は、一般に、抗原－抗体複合体の存在
、より詳細には、ペプチドに特異的な抗体の存在を示すものである。

【0047】

10

マーカは、染料などの信号生成化合物または分子に共有結合した抗体または抗体断片
を含んでもよい。あるいは、マーカは、表面及び／または固体マトリックス上で抗原－
抗体複合体の形態で結合した抗体に直接コンジュゲートすることができる分子であっても
よい。

【0048】

当業者に利用可能な多くの種類のマーカがあり、例えば、光信号（染料）、磁気信号
（例えば、磁気ビーズ）、及び放射性信号（例えば、放射免疫測定用の放射性標識）を生
成するマーカなどである。

【0049】

一実施形態では、本発明の方法（例えば、ステップa）は、それぞれのペプチドの各
々に結合している前記試料中の抗体の量に関する信号を生成する及び／または測定する
ステップを含む。一実施形態では、方法は、前記表面及び／またはマトリックスに結合し
ている抗原－抗体複合体の存在及び／または量に依存する信号を測定するステップを含む
。

20

【0050】

好ましい実施形態では、マーカ分子を誘発して、適切な読み取り装置で読み取ること
ができる信号を生成することができる。従って、いくつかの実施形態では、本発明の方
法は、前記表面及び／またはマトリックスに結合している抗原－抗体複合体の存在及び／
または量に依存する及び／または影響を受ける信号を生成し、測定するステップを含み、
前記複合体の量は、前記信号の性質、強度、及び／または強さに影響を及ぼす。

30

【0051】

使用するマーカ分子に応じて、当業者は、信号を生成するのに適切な方法、例えば、
E L I S Aの場合には酵素に対する基質、または電気化学発光の場合には電気の印加など
を選択するであろう。

【0052】

信号の読み取りは、適切な読み取り装置を用いて自動化処理で行うのが好ましい。プレ
ートリーダーを信号の測定に用いるのが好ましい。例えば、光信号を測定する場合、読み
取り装置は、光センサー、例えば、光電子増倍管及び／またはカメラを含み得る。例えば
、電荷結合素子（C C D）カメラを用いてもよい。

【0053】

40

読み取り装置は、一般に、信号の測定から、血液試料中の抗体の量に関する数値パラ
メーターを直接算出または決定する。電気化学発光検出（M e s o S c a l e D i s c
o v e r y, U S A）の場合、S E C T O R I m a g e r 6 0 0 0及び2 4 0 0は、
市販のイメージング検出システムである。そのような装置は、アッセイプレート上で読み
取られた信号から数値を直接算出する適切なソフトウェアで実行される。E L I S Aの場
合、例えば、従来のE L I S Aプレートリーダーを、抗体の量に関する数値パラメーター
を決定するのに使用してもよい。

【0054】

一般的な言葉で述べると、ステップa）を行う、及び／または、血液試料中の抗体のレ
ベルを測定する方法は、光学検出法（例えば、E L I S A）、質量変化検出（例えば、表

50

面プラズモン共鳴、質量分析)、及び電気検出(例えば、インピーダンス、分光、電気化学)技術を含む。

【0055】

一実施形態では、血液試料中の抗体のレベルは、例えば、放射免疫測定法、免疫蛍光測定法によって、または、例えば、酵素結合免疫吸着法、及びタンパク質への抗体に基づく免疫測定法によって免疫化学的に決定される。

【0056】

当業者には理解されるように、単数形における「ペプチド」という言葉の使用には、複数の同じ及び／または同一ペプチドが、例えば、マイクロタイタープレートの1スポット上に固定された(配列及び／または構造という観点から)複数の同一ペプチドのことを言うことを含む。

10

【0057】

「異なるペプチド」という表現は、一般に、異なる構造、及び／または、アミノ酸配列を有するペプチドのことを言う。一般に、「異なるペプチド」という表現は、より詳細には、いくつかの複数または群のペプチド(複数の複数)のことを言い、各複数または各群は、その複数及び／または群内のペプチドのアミノ酸配列及び／または構造の同一性によって特徴付けられる。一方、「異なるペプチド」は、異なる複数及び／または群に含まれ、それらが含むペプチドが、異なる構造及び／または異なる配列を有する点で異なっている。従って、「異なるペプチド」という表現は、本明細書の目的のため、「同じアミノ酸配列を有する異なる個々のペプチド分子」を意味するものではない。

20

【0058】

一実施形態によれば、各個別のパラメーターが前記異なるペプチドの1つの特定のペプチドに結合している抗体の量に関係する複数の前記パラメーターを得るように、抗体の量に関係するパラメーターをペプチドごとに別々に決定する。

【0059】

一実施形態では、前記異なるペプチドは、異なるペプチドの組み合わせである。

【0060】

本発明の方法の一実施形態では、抗体の量は、前記異なるペプチドごとに別々に決定される。特に、本発明の方法、キット、及び／またはアッセイの一部であるペプチドの各々において、試料中に存在する抗体の量に関係する値及び／またはパラメーターが生成される。異なるペプチドの各々において、ペプチドに特異的に結合している抗体のレベルを決定するのが好ましい。

30

【0061】

本発明の方法は、複数の異なるペプチドの使用と、異なるペプチドの各々に結合している抗体のレベルを測定することを含む。

【0062】

一実施形態では、前記ペプチドは、マイクロタイタープレートの1つ以上のウェルで提供される。本発明の方法では、前記対象の試料を前記1つ以上のウェルに加えるのが好ましい。一実施形態では、各ウェルは、いくつかの領域を含み、各領域は、前記異なるペプチドの組み合わせから選択される複数の特異的な、定義されたペプチドを含む。

40

【0063】

一実施形態では、前記異なるペプチドの全てのペプチドは、独立して、4～300個、好ましくは8～250個のアミノ酸の長さを有する。好ましい実施形態では、前記ペプチドは、8～200個、より好ましくは8～150個、さらにより好ましくは8～100個、及び最も好ましくは8～50個のアミノ酸の長さを有する。

【0064】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、約6～30個のアミノ酸長の短断片であり、例えば、他の実施形態では、ペプチドは、例えば、100～300個、好ましくは130～260個のアミノ酸長を有する長い断片である。いくつかの実施形態では、本発明の方法及びキットで用いるペプチドは、短い及び長い断片、あるいは上記範囲の間にある長さ、

50

例えば、30～100個のアミノ酸長を有する断片を含む。

【0065】

一実施形態では、前記異なるペプチドは、5～35個、好ましくは11～30個、及び最も好ましくは17～28個の異なるペプチドからなる。好ましい実施形態によれば、前記異なるペプチドは、11個以上の異なるペプチドを含む。

【0066】

好ましい実施形態では、前記異なるペプチドは、41個のペプチドの群から選択され、41個のペプチドの前記群の各ペプチドは、それぞれ、配列番号1～41からなる前記群の41個のアミノ酸配列の1つを含む、及び／または、から実質的になる。前記異なるペプチドは、異なるペプチドの組み合わせであるのが好ましく、前記組み合わせは、それぞれ、41個の異なるペプチドからなり、各ペプチドは、配列番号1～41からなる前記群の41個のアミノ酸配列の1つを含む、及び／または、から実質的になる。

【0067】

本明細書の目的のため、「から実質的になる」という表現は、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは97%以上の配列同一性のことを言う。例えば、「から実質的になる」とは、98%、99%、最も好ましくは99.5%の配列同一性のことを言う。本明細書の目的のため、配列同一性率は、予め設定された標準パラメーター及びデータベース選択によるインターネット (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 上の基本Protein BLASTを用いて決定される。この配列比較ツールは、以下の2つの刊行物に詳述されているアルゴリズムに基づくものである：Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. Stephen F. Altschul, John C. Wootten, E. Michael Gertz, Richa Agarwala, Aleksandr Morgulis, Alejandro A. Schaffer, and Yi-Kuo Yu (2005) "Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices", FEBS J. 272: 5101-5109。

【0068】

標準パラメーターには、blastpの選択（タンパク質-タンパク質BLAST、短い入力配列に対するパラメーターの自動調節；期待閾値10、ワードサイズ3、マトリックスBLOSUM62の使用；ギャップコスト：存在：11、拡張 1；条件付き組成スコアマトリックス調整、フィルターなし、マスクなし）が含まれる。例えば、比較配列または初期配列のいずれか1つが、アミノ酸残基を欠いている、さらなるアミノ酸残基を有する、及び／または、別の残基で置換された1つ以上のアミノ酸残基を有する場合、初期配列に対する比較配列の配列同一性は減少する。本明細書で定義したように任意の配列と80%程度の配列同一性を有する配列は、まだ機能性を提供することができ、すなわち、本発明のキット及び方法においてペプチドとして適している。

【0069】

一実施形態では、本発明は、本発明の方法で 사용할 ことができる、特に、肺がんの診断用のペプチドの選択に関する。いくつかの実施形態では、異なる群のペプチドは、本発明により確立され、前記異なるペプチドは、ペプチドのこれらの群の1つ以上から選択してもよい。前記ペプチドは、A群～E群である5つの群に分類されるのが好ましい。

【0070】

従って、一実施形態では、前記異なるペプチドは、いくつかの群のペプチド、A群のペプチド、B群のペプチド、C群のペプチド、D群のペプチド、及びE群のペプチドを含む

。

【0071】

一実施形態では、前記A群は、配列番号1（#286）；配列番号2（#720）；配列番号3（#493）；配列番号4（#68／524）；配列番号5（#140）；配列番号6（#139）；配列番号7（#349）；及び配列番号8（#117）；配列番号9（#5）；及び配列番号10（#－4）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、または、から実質的になるペプチドを含む。

【0072】

一実施形態では、前記B群は、配列番号11（#16）；配列番号12（#453）；配列番号13（EX4. . 2）；配列番号14（#BRC T 2. . ）；配列番号15（#15）；配列番号16（#523）；及び配列番号17（#109）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、または、から実質的になる1つ以上のペプチドを含む。

10

【0073】

一実施形態では、前記C群は、配列番号18（#117／635）；配列番号19（#368）；配列番号20（BRC T. 1. ）；配列番号21（EX4. . 1）；配列番号22（#188）；配列番号23（LINK）；配列番号24（#A21／635）；及び配列番号25（RING）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、または、から実質的になる1つ以上のペプチドを含む。

【0074】

一実施形態では、前記D群は、配列番号26（Ank）；配列番号27（#A20／122）；配列番号28（#54）；配列番号29（#48／522）；配列番号30（#149）；配列番号31（#73）；配列番号32（#A－4）；配列番号33（#3ORF）；及び配列番号34（#557）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、または、から実質的になる1つ以上のペプチドを含む。

20

【0075】

一実施形態では、前記E群は、配列番号35（#319）；配列番号36（#702）；配列番号37（#175）；配列番号38（#84）；配列番号39（#A29）；配列番号40（#542）；及び配列番号41（#309）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、または、から実質的になる1つ以上のペプチドを含む。

【0076】

一実施形態では、前記異なるペプチドは、前記A群から選択された1つ以上のペプチドと、前記B群、C群、D群、及び／またはE群の前記いずれか1つから選択された1つ以上のペプチドとを含む。

30

【0077】

一実施形態では、前記異なるペプチドは、前記A群から選択された1つ以上のペプチドと、前記B群から選択された1つ以上のペプチドと、前記C群、D群、及び／またはE群から選択された1つ以上のペプチドとを含む。

【0078】

一実施形態では、前記異なるペプチドは、前記A群から選択された1つ以上のペプチドと、前記B群から選択された1つ以上のペプチドと、前記C群から選択された1つ以上のペプチドと、前記D群及び／またはE群から選択された1つ以上のペプチドとを含む。

40

【0079】

一実施形態では、前記異なるペプチドは、前記A群から選択された3つ以上のペプチドと、前記B群、C群、D群、及び／またはE群の前記いずれか1つから選択された3つ以上のペプチドとを含む。

【0080】

一実施形態では、前記異なるペプチドは、前記A群から選択された3つ以上のペプチドと、前記B群から選択された2つ以上のペプチドと、前記C群、D群、及び／またはE群から選択された2つ以上のペプチドとを含む。

【0081】

50

一実施形態では、前記異なるペプチドは、前記A群から選択された3つ以上のペプチドと、前記B群から選択された2つ以上のペプチドと、前記C群から選択された2つ以上のペプチドと、前記D群及び／またはE群から選択された2つ以上のペプチドとを含む。

【0082】

一実施形態では、前記異なるペプチドの組み合わせは、前記A群から選択された5つ以上のペプチドと；B群から選択された2つ以上のペプチドと、C群から選択された2つ以上のペプチドとを含む。

【0083】

一実施形態では、前記異なるペプチドの組み合わせは、E群からの任意のペプチドが無い。

10

【0084】

一実施形態では、前記異なるペプチドは、配列番号1～5から選択されたアミノ酸配列を含む2つ以上のペプチドと；配列番号11～13から選択された1つ以上のペプチドと；配列番号18～20から選択された1つ以上のペプチドとを含む。

【0085】

一実施形態では、前記異なるペプチドは、配列番号1～5から選択されたアミノ酸配列を含む3つ以上のペプチドと；配列番号11～13から選択された2つ以上のペプチドと；配列番号18～20から選択された2つ以上のペプチドとを含む。

【0086】

一実施形態では、前記異なるペプチドは、配列番号1～5から選択されたアミノ酸配列を含む4つ以上のペプチドと；配列番号11～13から選択された3つ以上のペプチドと；配列番号18～20から選択された3つ以上のペプチドとを含む。

20

【0087】

一実施形態では、前記異なるペプチドの組み合わせは、11個以上の異なるペプチドを含み、前記ペプチドは、それぞれ、配列番号1～5；11～13、及び18～20のアミノ酸配列を含む。

【0088】

一実施形態では、前記異なるペプチドの組み合わせは、少なくとも10個の異なるペプチドを含み、前記10個のペプチドの各々は、それぞれ、配列番号1～10からなる群から選択される1つのアミノ酸配列を含む、または、から実質的になる。

30

【0089】

一実施形態では、前記異なるペプチドの組み合わせは、少なくとも17個の異なるペプチドを含み、前記17個のペプチドの各々は、それぞれ、配列番号1～配列番号17からなる群から選択される1つのアミノ酸配列を含む、または、から実質的になる。

【0090】

一実施形態では、前記異なるペプチドの組み合わせは、少なくとも25個の異なるペプチドを含み、前記25個のペプチドの各々は、それぞれ、配列番号1～配列番号25からなる群から選択される1つのアミノ酸配列を含む、または、から実質的になる。

【0091】

一実施形態では、本発明の方法は、ヒト女性対象における肺がんの診断方法である。別の実施形態では、本発明の方法は、ヒト男性対象における肺がんの診断方法である。

40

【0092】

方法が特にヒト女性対象に関する場合、異なるペプチドは、好ましくは19個の異なるペプチドを含み、前記異なるペプチドは、それぞれ、配列番号1～配列番号6；配列番号11～配列番号14；配列番号18～配列番号21；配列番号26～配列番号30のアミノ酸配列を含む。

【0093】

方法が特にヒト男性対象に関する場合、異なるペプチドは、好ましくは22個の異なるペプチドを含み、前記異なるペプチドは、それぞれ、配列番号1～配列番号5；配列番号7；配列番号8；配列番号11～配列番号13；配列番号15；配列番号18～配列番号

50

20；配列番号22；配列番号23；配列番号26；配列番号27；及び配列番号31～配列番号34のアミノ酸配列を含む。

【0094】

一実施形態では、本発明の方法は、前記対象が肺がんを患っているかどうかを診断するステップを含む。診断は、前記血清及び／または血液試料中の抗体のレベルに基づいて、及び／または、循環血清抗体の量に関係するパラメーターに基づいて行うのが好ましい。

【0095】

一実施形態では、本発明の方法は、前記パラメーター及び／または前記信号に基づいて、かつ、各ペプチドに特有の統計的に決定された係数から対象の試験値を算出するステップを含む。本発明の方法は、前記試験値を閾値と比較することで、前記対象が肺がんを患っているかどうかを診断するステップを含んでもよい。

10

【0096】

別の実施形態では、本発明の方法は、前記試験値を1つ以上の閾値と比較することで、対象が肺がんを患う可能性及び／またはリスクを評価するステップを含む。

【0097】

別の実施形態では、本発明の方法は、前記試験値を1つ以上の閾値と比較することで、肺がんのスクリーニング、モニタリング、診断、予後、予測、及び再発の臨床効率を高めるステップを含む。次いで、前記スクリーニング、モニタリング、診断、予後、予測の結果または成果は、試験値が閾値よりも高いかまたは低いかに依存する。例えば、閾値を超える試験値は、一般に、対象が肺がんを患っていることの診断、予測、及び／または予後の臨床効率を示す及び／または高める。

20

【0098】

ペプチドごとの係数は、統計的に決定するのが好ましい。一実施形態では、ペプチドごとの係数は、Ribbing J, Nyberg J, Caster O & Jonsson EN (2007) The lasso-a novel method for predictive covariate model building in nonlinear mixed effects models. J Pharmacokinet Pharmacodyn 34: 485-517に開示される「Lassoモデル」を用いて決定される。好ましいペプチドの具体的な係数は、以下に記載の実施例に開示している。

30

【0099】

抗体のレベル及び／または各抗体の量に関係するパラメーターは、数値に変換するのが好ましい。アッセイのペプチドごとの係数、及びペプチドごとに別々に決定された数値に基づいて、所与の対象に特有の試験値が決定される。

【0100】

診断ステップは、対象の試験値を所定の閾値と比較することで行われる。閾値は、例えば、Lassoモデルを用いて統計的に決定されるのも好ましい。特に、閾値は、肺がんを患っているか患っていないかが分かっている多くの個人からの血液及び／または血清試料を用いることで統計的に決定することができる。閾値を決定するため、血液及び／または血清試料中の抗体のレベルの測定に用いた方法を考慮するのが好ましい。

40

【0101】

いくつかの態様では、本発明は、検査キットに関する。「キット」という表現には、本明細書に記載されるように、固体マトリックスに結合されるかまたはすでに結合している本発明による少なくとも1つのペプチドまたはその変異体もしくはその組み合わせ及び必要に応じて指示書を含む。キットは、異なるペプチドが沈着される及び／または固定される固体支持表面を含むのが好ましい。例えば、表面は、プレート、フィルム、スライド、及び／またはウェル上に提供される。キットに用いるペプチドの支持体は、抗体結合アッセイを行うようになっているのが好ましい。特に、支持体は、ペプチドに例えば、共有的に、結合し、及び血液及び／または血清試料に暴露されるようになっている。好ましくは、キットの支持体表面及び／またはマトリックスは、非結合抗体を除去するために洗浄し

50

、かつマーカーに暴露するのに適しているのが好ましい。ペプチドを含む支持体及び／またはマトリックスは、非共有相互作用によって形成されたペプチド-抗体複合体のレベル及び／または量を検出する及び測定するのに適切な装置によって読み取られるようになっているのが好ましい。

【0102】

キットのペプチドは、本発明の方法で用いるものと同じであるのが好ましい。従って、本明細書のどこかで定義される実施形態及び好ましい実施形態が、特に、本発明の方法とともに、本発明のキットに適用される。このことは、特に、使用するペプチドの選択だけでなく、サイズや数などの一般的なペプチドの特徴にも適用される。

【0103】

一実施形態では、キットは、本発明による方法を実施するためのキットである。

【0104】

一実施形態では、本発明の検査キットは、複数のウェルを含むマイクロタイタープレートを含み、各ウェルは、複数の領域を含み、複数の1つの特定のペプチドが、前記ウェルの特定領域に提供されるため、各領域は、特定のペプチドに特有である。例えば、本発明のキットは、Meso Scale Discovery社、USAから市販のものなどのマルチスポット及び／またはマルチアレイプレートを含む。例えば、プレートの各ウェルは、いくつかのスポットを含んでもよく、各スポットは、ペプチドで被膜されるかまたは被膜することができる。

【実施例】

【0105】

実施例1：ペプチド選択および合成

BARD1（配列番号42～51）のアイソフォームの発現の研究後、配列番号1～41を含む41個の異なるペプチドを定義し、選択した。これらの実験には、1つのアイソフォームのsiRNAベースの特異的抑制、ウェスタンブロットでの潜在的な翻訳産物の抑制の確認、アイソフォームの過剰発現、及び正しいサイズの内因性タンパク質の発現の確認を伴った。

【0106】

アイソフォームγ（配列番号47）の研究により、例えば、このアイソフォームがエクソン1～3でコードされたタンパク質を発現することが確認された（エクソン4及びエクソン5～11の欠失は、エクソン5中の停止コドンにより発現されなかった）。これらの研究に基づいて、41個のペプチドを定義した（配列番号1～41）。

【0107】

配列番号1～41の41個の異なるペプチドを、当業者に公知の標準ペプチド固相合成手順によって合成した。ペプチドの純度は、少なくとも80%であった。ペプチドを緩衝液中1mg/mLの原液に溶解させ、200mLのアリコートで-20℃にて保存した。ペプチドをpH9.6の炭酸系緩衝液に保存した。

【0108】

配列番号1～41のほとんどのペプチドは、8～約30個のアミノ酸長の短断片である。大きな断片は、配列番号13（EX4...2）、配列番号14（BRC T...2）、配列番号20（BRC T...1）、配列番号21（EX4...1）、配列番号23（LINK）、配列番号26（Ank）である。

【0109】

実施例2：ペプチドを用いたアッセイの調製

実施例1の41個のペプチドを、Meso Scale MSD技術プラットフォーム（Mesoscale, MD 20850～3173, Rockville, USA）を用いてマイクロタイターウェル上に沈着させた。特に、各ペプチドを、マルチスポットプレートのスポット上に所定量で沈着させた。各マルチスポットアレイは、ペプチドを沈着する炭素被覆作用電極を含む。抗体結合の検出では、電気刺激により、スルホタグマーカー分子（ルテニウムIIトリスービピリジン-（4-メチルスルホナート）NSHエス

10

20

30

40

50

テルを介した光生成をもたらす。ペプチドのプレーティングは、Mesoscaleで行った。各ウェルには、10個の異なるスポットを含むため、10個の異なるペプチドを、96-ウェルマイクロタイタープレートの1つのウェルにプレートした。

【0110】

実施例3：患者及び対照対象の血液試料の分析

血液試料を肺（n = 178）、結腸（n = 80）、良性乳房（n = 9）、悪性乳房（n = 14）、良性卵巣（n = 50）、悪性卵巣（n = 43）、及び神経芽細胞腫（n = 20）のヒトがん患者及び健常対照（n = 266）から収集した。性別及び年齢は、大部分の対象から分かっていた。

【0111】

実施例2に記載のペプチド被覆マイクロタイタープレートを用いて血液試料を分析した。Mesoscale SECTOR Imager 2400（SI2400）装置とDiscovery Workbench 3.0ソフトウェアを用いて、血液試料中の抗体の量に関係する数値を生成した。

【0112】

全ての患者の血清が、BARD1の同じエピトープに対する抗体を含むわけではなかったが、がん患者で陽性だったエピトープ／ペプチドの異なる組み合わせについて広範な分布があったことが、データ分析により示された。一番特徴的な及び一番特徴的ではないペプチドをこれらの結果から決定した。

【0113】

抗体がBARD1アイソフォーム上に存在したペプチドと特異的に反応したことを確認するため、短いペプチド断片と同じ方法で長い断片をスポットした。血清抗体の長い断片との反応性により、ペプチドで観察された結果が確認された。

【0114】

短ペプチドとBARDアイソフォームの長い断片との組み合わせにより、より多くのがん患者を検出できることが分かった。

【0115】

実施例4：統計分析及びモデル構築

実施例3で得られたデータを統計的に分析した。データセットは、少なくとも1組の変数が測定されている379個の固有の試料からなる。いくつかの試料では、2回または3回の別々の測定を行い、平均をとった。変数は、血液試料を40個のペプチドの1つに暴露させた時に測定された信号から得られた数値である。言い換えると、変数は、ペプチドの1つに特異的に結合している試料中の抗体の量に関係する値である。全体で、データセットは、40個の変数の測定を含み、各々が10個の変数の4つのサブセットに分割する（10個の異なるペプチドを、1つのウェルの10個の異なるスポットとしてプレートする）。各プレートは、1つのそのようなサブセットからペプチドの測定値を含み、4枚のプレートは、サブセットごとに分析されている。プレートは、分析した日付けで示されるであろう。いくつかの試料では、変数の1つのサブセットのみを測定したが、他の試料では、いくつかのサブセットの測定値が存在する。同じ変数が異なるプレート上で何回も測定されているいくつかの試料も存在する。性別及び年齢についての情報は、研究試料の大部分において入手可能である。がん試料については、より詳細な診断情報も提供する。

【0116】

対照（健常）と肺がんの血液血清試料を判別する検査システムの予測力に着目した分析結果の概要を以下に示す。方法論と分析結果の違いについて論じる。

【0117】

「Lasso」法は、異なるペプチド選択を用いて、モデルを構築するのに近年用いられ、その後、これらのモデルの予測能力を比較した（図1）。小さなデータセットを分析する場合、段階的共変量モデリング手順（SCM）は、選択バイアスと低い予測性能という問題がある共変量モデルを生成する場合がある。SCMと比べて、Lassoは、小さなデータセットまたは小さな部分群で予測共変量モデルを得る場合に、SCMよりも優れ

10

20

30

40

50

ている (Ribbing J, Nyberg J, Caster O & Jonsson EN (2007) The lasso—a novel method for predictive covariate model building in nonlinear mixed effects models. J Pharmacokinet Pharmacodyn 34: 485-517)。交差検証を用いて、Lassoは、共変量モデルの検証を提供し、ユーザーが選択のためにP値を特定する必要はない。この方法により、がん試料と対照試料を区別するためのオリゴペプチドとBARD1断片の最適な組み合わせを得ることができた。最終的には、これは、がん試料と対照試料を区別することができる最良のペプチド組み合わせの選択をもたらす。最適を超えてペプチド数が増加しても、より強い予測力は生まないことが、図にも示されている。最適な25個の変数（短ペプチド及び長い断片）を用いたモデリングは、90個の肺がん試料対94個の対照試料について行い、AUC=0.966が得られた。

10

【0118】

Lassoモデル構築及び特徴選択をR-package: glmnetを用いて交差検証した。3つのモデルは、25個（配列番号1～25）、17個（配列番号1～17）または10個（配列番号1～10）のペプチドで構築されている。

【0119】

図1は、近似モデルの二項式の逸脱度を示す。モデルに使用したペプチド数を上部に示す。交差検証した最良のモデルは、この曲線（26個のペプチド）の最小値（第1の垂直点線）である。第2の点線は、モデル（この場合、11個のペプチド）への交差検証に関してモデルが有意に異なっていない（エラーバーに示すように1標準誤差（1se）内）値である。従って、17個のペプチドのモデルは、統計的に意義があるが、10個のペプチドのモデルは、統計的に意義がない。

20

【0120】

25個の変数（短ペプチド及び長い断片）（配列番号1～25）を用いたモデリングは、90個の肺がん試料対94個の対照試料について行い、AUC=0.966が得られた（図2A）。モデリングのためのこれらの試料は、上述した全部で379個の入手可能な試料から選択した。また、このモデリングは、がんと対照を $p > 0.05$ で区別するのに十分な最小セットのペプチドを見つけるためにも行った。図2Bに示すAOC曲線では、17個のペプチド（配列番号1～17）のモデルを使用し、図3Cでは、10個のペプチド（配列番号1～10）のモデルを使用した。

30

【0121】

Lasso法を用いて、対照対象とがん患者を区別するために共変量モデルを構築した。結果は、100モデリングシリーズ（モデリングは100回繰り返した）において、それぞれ、図A、B、及びCで40個、30個、及び10個のペプチドを用いて図3A～3Cに示す。図A～Cの各々は、左から右に、代表的なROC曲線；がん及び対照試料の相対信号値の分布を示す箱ひげ図；100個のモデリングシリーズ（平均AUCは約0.83）におけるAUC値分布を示す箱ひげ図である。

【0122】

実施例5：25個のペプチドのモデルに対するペプチド係数及びカットオフ値

40

以下の表1に示すように、予測因子値の算出を示すこの実施例は、各ペプチドに起因する係数に基づくものである。

【0123】

予測因子 = $1.878155 \times \log_{10}(\#16 \text{ 値}) - 49.108 \times \log_{10}(\#117 \text{ 値}) - 16.4289 \times \log_{10}(\#286 \text{ 値}) + 24.11767 \times \log_{10}(\#493 \text{ 値}) - 3.74674 \times \log_{10}(\#523 \text{ 値}) + 39.89181 \times \log_{10}(\#720 \text{ 値}) + 3.49733 \times \log_{10}(\#117/635 \text{ 値}) - 3.21744 \times \log_{10}(\#5 \text{ 値}) - 13.1504 \times \log_{10}(\#349 \text{ 値}) - 19.78 \times \log_{10}(\#453 \text{ 値}) + 10.3537 \times \log_{10}(A21/635 \text{ 値}) + 27.37549 \times \log_{10}(\#68/524 \text{ 値}) - 12.5612 \times \log_{10}(\#$

50

#15値) - 7.82582 × log10 (#109値) + 15.05732 × log10 (#139値) + 11.3804 × log10 (#140値) + 4.024697 × log10 (#188値) - 8.8073 × log10 (#368値) + 0.246625 × log10 (RING値) - 0.23952 × log10 (EX4.1値) - 5.00989 × log10 (EX4.2値) - 0.17352 × log10 (LINK値) + 0.726563 × log10 (BRCT1値) + 1.645815 × log10 (BRCT2値) + 3.05931 × log10 (#-4値) - 15.0948

【0124】

値、例えば、「#16値」は、Meso Scale SECTOR Imagerによって決定されたパラメーターの数値に対応する。数値を上記の式「予測因子」に挿入することで、予測因子値を得て、これをカットオフ及び／または閾値と比較する。

【0125】

【表1】

表1：25個のペプチドモデル

25個のペプチドモデル		
ペプチド同定 (配列番号)	ペプチド同定 (内部)	係数
	(切片)	-15.0948
22	#16	1.878155
8	#117	-49.108
1	#286	-16.4289
3	#493	24.11767
16	#523	-3.74674
2	#720	39.89181
18	#117/635	3.49733
9	#5	-3.21744
7	#349	-13.1504
12	#453	-19.78
24	#A21/635	10.3537
4	#68/524	27.37549
15	#15	-12.5612
17	#109	-7.82582
6	#139	15.05732
5	#140	11.3804
22	#188	4.024697
19	#368	-8.8073
25	RING	0.246625
21	EX4. . 1.	-0.23952
13	EX4. . 2.	-5.00989
23	LINK	-0.17352
20	BRCT. 1.	0.726563
14	BRCT. 2.	1.645815
10	#-4	3.05931

【0126】

種々のカットオフを推定し、陽性と陰性の区別に用いてもよい。各カットオフの選択は、モデルの特異性及び／または感度に影響を及ぼす。最大の特異性及び感度では、カットオフ=0.08131021である。

【0127】

カットオフ値は、診断検査の結果に対する閾値を表す。算出した予測因子が>0.08131021である場合、対象は、がんと診断される（陽性検査結果）。算出した予測因

子が<0.08131021である場合、検査結果は陰性である。

【0128】

実施例6：肺がん女性対健常女性を区別するためのモデル

実施例4に記載のLasso法を用いて、特に女性の肺がんを診断するためのモデルを開発した。このモデルでは、統計的に有意であり、優れたAUC値をもたらすモデルを得るために、19個のペプチドが必要であることが分かった。19個の異なるペプチドは、配列：配列番号1～配列番号6；配列番号11～配列番号14；配列番号18～配列番号21；配列番号26～配列番号30を有するペプチドである。

【0129】

実施例7：肺がん男性対健常男性を区別するためのモデル

実施例4に記載のLasso法を用いて、特に男性の肺がんを診断するためのモデルを開発した。このモデルでは、統計的に有意であり、優れたAUC値をもたらすモデルを得るために、22個のペプチドが必要であることが分かった。22個の異なるペプチドは、配列：配列番号1～配列番号5；配列番号7；配列番号8；配列番号11～配列番号13；配列番号15；配列番号18～配列番号20；配列番号22；配列番号23；配列番号26；配列番号27；及び配列番号31～配列番号34を有するペプチドである。

【0130】

結論

178個の肺がん試料と266個の対照試料を分析した。データセットは、少なくとも1組の変数（ペプチドまたはポリペプチド）が測定されている379個の固有の試料からなる。全体で、データセットは、40個の変数の測定を含み、各々が10個の変数の4つのサブセットに分割する。

【0131】

40個のペプチドの生データから、「Lasso」法を用いた独自分析を行い、異なるペプチド選択を統計的に評価した。例えば、20個の選択されたペプチドを用いて、肺がん診断の予測性能が>95%（0.97ROC）で得られることが分かった。

【0132】

これは、非常に決定的な結果であり、無症候者における肺がんの診断レベルの予測に十分な精度(>95%)を全て示唆するものである。これは、特に、長年にわたる多量の喫煙歴がある個人に当てはまる。

以下の態様を包含し得る。

[1] 哺乳類対象における肺がんのインビトロ及び／またはエキスビボ診断方法であって、

a) 前記対象から採取した血液または血清試料に基づいて、ヒトBARD1のひと続きのアミノ酸配列（配列番号42）及び／またはそのアイソフォーム（配列番号43～51）を含む異なるペプチドに特異的に結合している抗体の量に関するパラメーターを決定するステップと；

b) 前のステップで得られた前記パラメーターに基づいて、前記対象が肺がんを患っているかどうかを診断するステップとを含む、方法。

[2] 対象が肺がんを患う可能性及び／またはリスクの評価方法であって、

a) 前記対象から採取した血液または血清試料に基づいて、ヒトBARD1のひと続きのアミノ酸配列（配列番号42）及び／またはそのアイソフォーム（配列番号43～51）を含む異なるペプチドに特異的に結合している抗体の量に関するパラメーターを決定するステップと；

b) ステップa)で測定した前記パラメーターから前記対象が肺がんを患う可能性及び／またはリスクを評価するステップとを含む、方法。

[3] 肺がんのスクリーニング、モニタリング、診断、予後、予測、及び再発のための

インビトロ及び／またはエキスピボ方法、及び／または、肺がんのスクリーニング、モニタリング、診断、予後、予測、及び再発の臨床効率を高める方法における、ヒトBAR D 1のひと続きのアミノ酸配列（配列番号42）及び／またはそのアイソフォーム（配列番号43～51）を含む異なるペプチドの組み合わせの使用。

〔4〕 各個別のパラメーターが前記異なるペプチドの1つの特定のペプチドに結合している抗体の量に関係する複数のパラメーターを得るように、抗体の量に関係する前記パラメーターをペプチドごとに別々に決定する、上記〔1〕～〔3〕のいずれか1項に記載の方法。

〔5〕 前記異なるペプチドが、異なるペプチドの組み合わせである、上記〔1〕～〔4〕のいずれか1項に記載の方法。

〔6〕 前記ステップb)が、前記パラメーターに基づいて、かつ、各ペプチドに特有の統計的に決定された係数から、前記対象の試験値を算出するステップを含む、上記〔1〕～〔5〕のいずれか1項に記載の方法。

〔7〕 前記試験値を閾値と比較することで、前記対象が肺がんを患っているかどうかを診断するステップをさらに含む、上記〔6〕に記載の方法。

〔8〕 前記ペプチドが、独立して、4～300個、好ましくは8～250個のアミノ酸の長さを有する、上記〔1〕～〔7〕のいずれか1項に記載の方法。

〔9〕 前記異なるペプチドが、5～35個、好ましくは11～30個、及びより好ましくは17～28個の異なるペプチドからなる、上記〔1〕～〔8〕のいずれか1項に記載の方法。

〔10〕 異なるペプチドの組み合わせが、41個のペプチドの群から選択され、41個のペプチドの前記群の各ペプチドが、それぞれ、配列番号1～41からなる前記群の41個のアミノ酸配列の1つを含む、及び／または、から実質的になる、上記〔1〕～〔9〕のいずれか1項に記載の方法。

〔11〕 前記異なるペプチドが、いくつかの群のペプチド、A群のペプチド、B群のペプチド、C群のペプチド、D群のペプチド、及びE群のペプチドを含む、上記〔1〕～〔10〕のいずれか1項に記載の方法。

〔12〕 前記A群が、配列番号1（＃286）；配列番号2（＃720）；配列番号3（＃493）；配列番号4（＃68／524）；配列番号5（＃140）；配列番号6（＃139）；配列番号7（＃349）；及び配列番号8（＃117）；配列番号9（＃5）；及び配列番号10（＃－4）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、または、から実質的になる1つ以上のペプチドを含み、前記B群が、配列番号11（＃16）；配列番号12（＃453）；配列番号13（EX4．．2）；配列番号14（＃BRC T 2．2）；配列番号15（＃15）；配列番号16（＃523）；及び配列番号17（＃109）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、または、から実質的になる1つ以上のペプチドを含み、前記C群が、配列番号18（＃117／635）；配列番号19（＃368）；配列番号20（BRC T．1．）；配列番号21（EX4．．1）；配列番号22（＃188）；配列番号23（LINK）；配列番号24（＃A21／635）；及び配列番号25（RING）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、または、から実質的になる1つ以上のペプチドを含み、前記D群が、配列番号26（Ank）；配列番号27（＃A20／122）；配列番号28（＃54）；配列番号29（＃48／522）；配列番号30（＃149）；配列番号31（＃73）；配列番号32（＃A－4）；配列番号33（＃3ORF）；及び配列番号34（＃557）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、または、から実質的になる1つ以上のペプチドを含み、前記E群が、配列番号35（＃319）；配列番号36（＃702）；配列番号37（＃175）；配列番号38（＃84）；配列番号39（＃A29）；配列番号40（＃542）；及び配列番号41（＃309）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、または、から実質的になる1つ以上のペプチドを含み、ペプチドの前記組み合わせが、前記A群から選択された1つ以上のペプチドと、前記B群、C群、D群、及び／またはE群の前記いずれか1つから選択された1つ以上のペプチドとを含む、上記〔11〕に記載の方法。

10

20

30

40

50

[13] 前記異なるペプチドが、前記A群から選択された5つ以上のペプチドと；B群から選択された2つ以上のペプチドと；及びC群から選択された2つ以上のペプチドとを含む、上記[1]～[12]のいずれか1項に記載の方法。

[14] 前記異なるペプチドが、少なくとも10個の異なるペプチドを含み、前記10個のペプチドの各々が、それぞれ、配列番号1～10からなる群から選択される1つのアミノ酸配列を含む、または、から実質的になる、上記[1]～[13]のいずれか1項に記載の方法。

[15] 前記異なるペプチドが、配列番号1～4；11～13；18～20からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、上記[1]～[14]のいずれか1項に記載の方法。

[16] 女性ヒト対象における肺がんのインビトロ及び／またはエクスビボ診断方法であって、

- 前記女性対象から採取した血液または血清試料に基づいて、少なくとも19個の異なるペプチドに特異的に結合している抗体の量に関するパラメーターを決定するステップであって、前記ペプチドが、それぞれ、配列番号1～配列番号6；配列番号11～配列番号14；配列番号18～配列番号21；配列番号26～配列番号30のアミノ酸配列を含むペプチドである、決定するステップと；

- 前のステップで得られた前記パラメーターに基づいて、前記女性対象が肺がんを患っているかどうかを診断するステップとを含む、方法。

[17] 男性ヒト対象における肺がんのインビトロ及び／またはエクスビボ診断方法であって、

- 前記女性対象から採取した血液または血清試料に基づいて、少なくとも22個の異なるペプチドに特異的に結合している抗体の量に関するパラメーターを決定するステップであって、前記ペプチドが、それぞれ、配列番号1～配列番号5；配列番号7；配列番号8；配列番号11～配列番号13；配列番号15；配列番号18～配列番号20；配列番号22；配列番号23；配列番号26；配列番号27；及び配列番号31～配列番号34のアミノ酸配列を含むペプチドである、決定するステップと；

- 前のステップで得られた前記パラメーターに基づいて、前記男性対象が肺がんを患っているかどうかを診断するステップとを含む、方法。

[18] 肺がんを診断するための診断検査キットであって、前記診断検査キットは、少なくとも11個の異なるペプチドの組み合わせを含み、各ペプチドは、ヒトBARD1のひと続きのアミノ酸配列（配列番号42）及び／またはそのアイソフォーム（配列番号43～51）を含む、診断検査キット。

[19] 肺がんのスクリーニング、モニタリング、診断、予後、予測、及び再発の臨床効率を高める方法であって、

a) 前記対象から採取した血液または血清試料に基づいて、ヒトBARD1のひと続きのアミノ酸配列（配列番号42）及び／またはそのアイソフォーム（配列番号43～51）を含む異なるペプチドに特異的に結合している抗体の量に関するパラメーターを決定することと；

b)、前のステップで得られた前記パラメーターに基づいて、前記対象が肺がんを患うリスク及び／または可能性が増しているかどうかを決定すること、を含む、方法。

[20] 肺がんの発生と関連付けられた抗体のレベルを検出する及び／または測定するインビトロ及び／またはエクスビボ方法であって、

a) 前記対象から採取した前記血液または血清試料に基づいて、ヒトBARD1のひと続きのアミノ酸配列（配列番号42）及び／またはそのアイソフォーム（配列番号43～51）を含む異なるペプチドに特異的に結合している抗体の量に関するパラメーターを決定するステップ

10

20

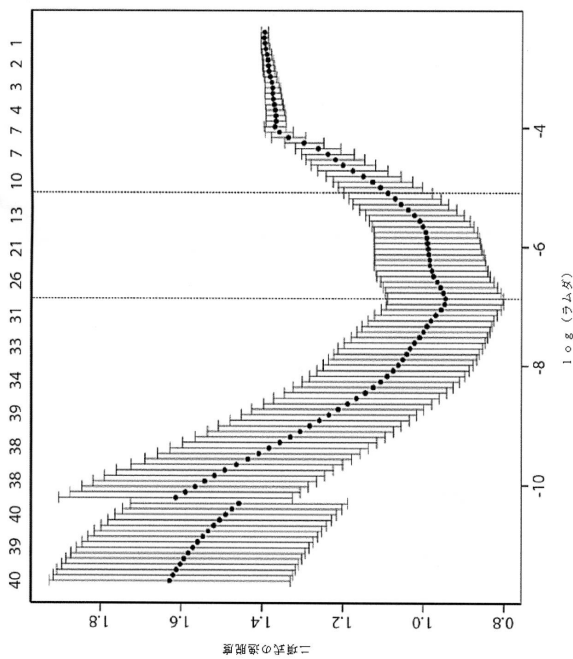
30

40

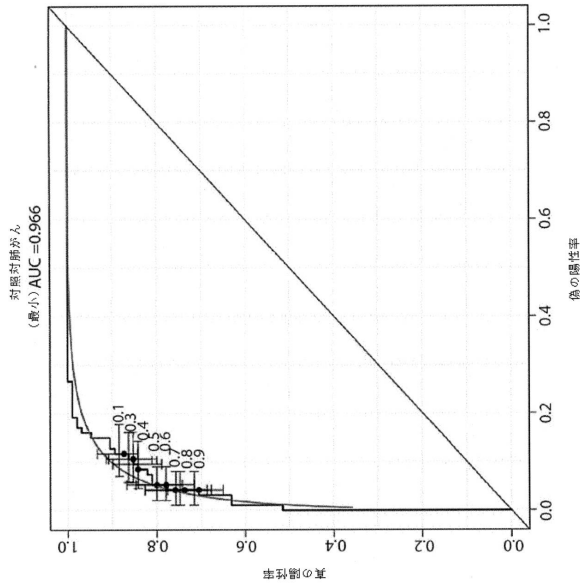
50

を含む、方法。

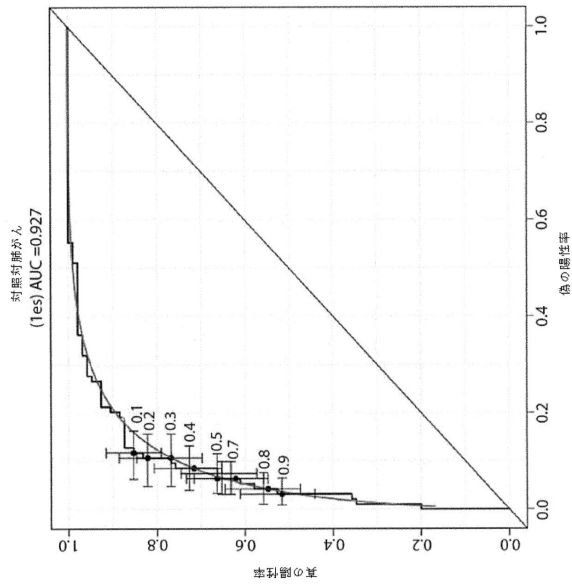
【図 1】



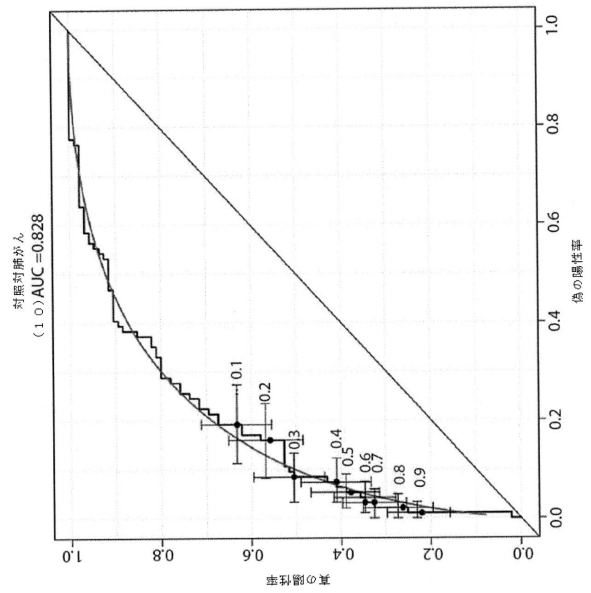
【図 2 A】



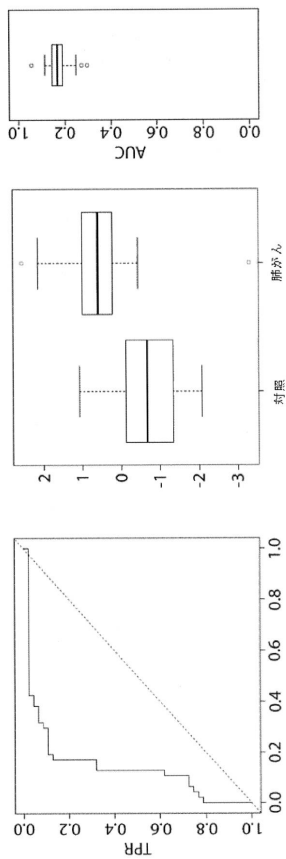
【図 2 B】



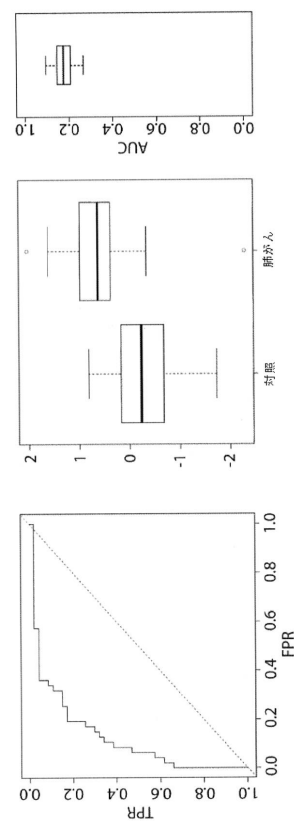
【図 2 C】



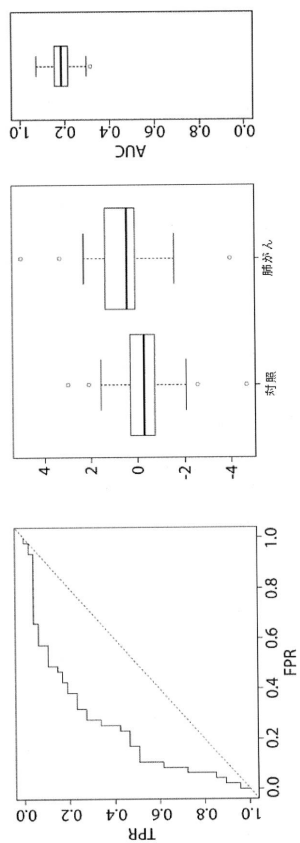
【図 3 A】



【図 3 B】



【図 3 C】



【配列表】

0006698537000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 イルミンガーフィンガー, イルムガルド
スイス国 ツェーハー 1207 ジュネーヴ, リュ ヴィオリエ 10
- (72)発明者 ピリュンギン, マキシム
スイス国 ツェーハー 1203 ジュネーヴ, アヴェニュー ソレット 4
- (72)発明者 アンドレ, ピエールアラン
スイス国 ツェーハー 1180 ロール, リュ オーガスト マトリンジ 17

審査官 西浦 昌哉

- (56)参考文献 国際公開第2012/038932 (WO, A2)
特表2013-535696 (JP, A)
IRMINGER-FINGER I; P-A ANDRE; PILYUGIN M; HEGEDUS B; LAURENT G J; BIANCO A, ABSTRACT B44: DEVELOPMENT OF A SERUM TEST FOR THE DETECTION OF LUNG CANCER BASED ON ONCOGENIC BARD1 ISOFORM EXPRESSION, CLINICAL CANCER RESEARCH, ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 2012年 2月 1日, VOL:18, NR:3-SUPPLEMENT, PAGE(S):B44, URL, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.12AACRIASLC-B44>
IRMGARD IRMINGER-FINGER; PIERRE-ALAIN ANDRE; MAXIM PIYUGIN; ET AL, CANCER-ASSOCIATED ONCOGENIC BARD1 ISOFORMS: FROM BIOMARKER EXPRESSION STUDIES TO DEVELOPMENT OF A BLOOD TEST FOR EARLY DETECTION OF LUNG CANCER, EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL, 2012年 9月 1日, VOL:40, NR:56, PAGE(S):1640

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-33/98
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)