

(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2017-520763

(P2017-520763A)

(43) 公表日 平成29年7月27日(2017.7.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	4 B O 2 9
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 Z N A F	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2016-571689 (P2016-571689)	(71) 出願人	516365633 ドラゴン ヴィクトリー ディベロップメント リミテッド 中華人民共和国 香港 ション ワン ヒリアー ストリート 27 フー ファイ コマーシャル センター 23/エフ ルーム 2301
(86) (22) 出願日	平成26年7月31日 (2014.7.31)	(74) 代理人	100086771 弁理士 西島 孝喜
(85) 翻訳文提出日	平成28年12月5日 (2016.12.5)	(74) 代理人	100088694 弁理士 弟子丸 健
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/049038	(74) 代理人	100094569 弁理士 田中 伸一郎
(87) 国際公開番号	W02016/003479	(74) 代理人	100084663 弁理士 箱田 篤
(87) 国際公開日	平成28年1月7日 (2016.1.7)		
(31) 優先権主張番号	14/321, 867		
(32) 優先日	平成26年7月2日 (2014.7.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	14/321, 870		
(32) 優先日	平成26年7月2日 (2014.7.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝臓癌の非侵襲性診断のための特異的バイオマーカーセット

(57) 【要約】

肝臓腫瘍塊内部の細胞は、当該腫瘍と近接した正常肝臓組織の上皮細胞と比較するとき、固有のタンパク質/腫瘍抗原セットを含む。腫瘍抗原の存在はこれら腫瘍抗原に対する自己抗体の産生と一致する。本発明は、肝臓癌の診断及び予後判定のための新規なマーカーセットとして機能するタンパク質セットの識別及び解明に関する。特に、本発明は肝臓癌患者の血清中の自己抗体の診断的及び予後判定的測定を可能にするキットに関する。本発明は、検証実施肝臓癌タンパク質/腫瘍抗原セット (Bmi1、VCC1、SUMO-4、RhoA、TXN、ET-1、UBE2C、HDGF 2、FGF21、LECT2、SOD1、STMN4、ミッドカイン、IL-17A 及びIL26を含む) の評価によって、非侵襲的、特異的、鋭敏かつ費用効率の良い検出及び定量方法を提供し、通常の診断方法を補完する。

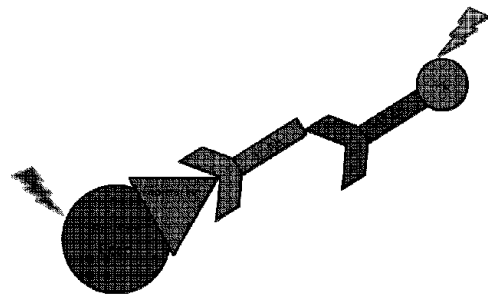


FIG. 7

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

肝臓癌の診断及び病期決定を目的とする、複数の腫瘍バイオマーカ―に対する自己抗体を検出及び定量する方法であって、

腫瘍細胞を正常細胞と比較して、前記癌に特異的な複数のバイオマーカ―として腫瘍細胞に固有であるが正常細胞では固有ではないタンパク質セットを評価する工程；

対になる患者生検サンプルの当該タンパク質セットを、二次元又は質量分析系技術を用いることによって識別する工程；

当該タンパク質セットを肝臓癌の診断のために検証する工程、
を含み、

当該タンパク質セットは、cDNAクローンから発現され、精製され、さらに種々の放射波長を有する蛍光微小球ビーズに結合させてタンパク質-ビーズ結合物が形成され、

患者の血清に存在する当該タンパク質セットに対する自己抗体が当該タンパク質-ビーズ結合物と免疫学的に結合する、

前記方法。

【請求項 2】

自己抗体を続いてPE-結合二次抗体と相互反応させ、微小球ビーズに特異的な蛍光シグナルが当該タンパク質-ビーズ結合物のための識別因子として機能する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

複合体のPE-結合二次抗体によって提供される蛍光強度を測定して、自己抗体の検出及び定量を可能にする、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

患者と健康な対象者との間で血清を比較して、該当するバイオマーカ―に対する自己抗体のレベルを決定する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

種々の病期の種々の患者から入手した種々の血清を比較して、病期決定のためのシグネチャーパターンを作製する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

タンパク質セットが配列番号:1から15のアミノ酸配列の少なくとも1つを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

複数の腫瘍マ―カ―が、Bmi1、VCC1、SUMO-4、RhoA、TXN、ET-1、UBE2C、HDGF2、FGF21、LECT2、SOD1、STMN4、ミッドカイン、IL-17A及びIL26を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

腫瘍細胞が肝細胞癌（HCC）腫に由来する細胞を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

蛍光微小球ビーズの各々が、ある特異的腫瘍バイオマーカ―の存在と対応するタンパク質の各々に特異的な固有の蛍光放射波長を有し、一方、当該特異的腫瘍バイオマーカ―のためのタンパク質の各々のタンパク質-ビーズ結合物と結合したPE-結合二次抗体から発生するPEシグナルが患者血清中に産生された自己抗体の存在の指標であり、さらにPEシグナルの蛍光強度が当該特異的腫瘍マ―カ―の豊富さと比例する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

自己抗体に存在する当該腫瘍バイオマーカ―の各々が約0.15ng/mLの低さで存在する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

複数の腫瘍バイオマーカ―に対する患者の自己抗体を検出及び定量することによって肝臓癌を診断及び病期決定するためのキットであって、cDNAクローンから発現され、精製され、さらに種々の放射波長を有する蛍光微小球ビーズと結合されてタンパク質-ビーズ結合物を形成したタンパク質セットを含み、当該タンパク質-ビーズ結合物が当該自己抗体

10

20

30

40

50

と免疫学的に結合し、続いてPE-結合二次抗体の標的になって蛍光シグナル及び強度が測定され、正常対象者と比較した患者の自己抗体レベルが決定される、前記キット。

【請求項 1 2】

タンパク質セットが配列番号:1から15のアミノ酸配列の少なくとも1つを含む、請求項 1 1 に記載のキット。

【請求項 1 3】

腫瘍バイオマーカーが、Bmi1、VCC1、SUMO-4、RhoA、TXN、ET-1、UBE2C、HDGF2、FGF21、LECT2、SOD1、STMN4、ミッドカイン、IL-17A及びIL26を含む、請求項 1 1 に記載のキット。

【請求項 1 4】

cDNAクローンの各々が、自己抗体と免疫学的に結合して続いてPE-結合二次抗体の標的になるタンパク質-ビーズ結合体を形成するために、種々の放射波長を有する蛍光微小球ビーズと結合されている、コンピテント細胞で発現されるタンパク質に対応するcDNA挿入物を含むHisタグ付きプラスミドを含む、請求項 1 1 に記載のキット。

【請求項 1 5】

個々に固有の蛍光を提供する種々の蛍光微小球の多重混合物をすでに述べたように発現させ精製したタンパク質セットと結合させて、タンパク質-ビーズ結合体を形成し、さらに前記タンパク質-ビーズ結合体を容器のウェルに予めロードし、各ウェルに自己抗体を含む患者の血清をロードし、当該タンパク質-ビーズ結合体と相互作用させ、続いてPE-結合二次抗体を添加して当該自己抗体と結合させ、続いて一切の過剰な二次抗体を洗い流し、タンパク質-ビーズ結合体及び連なった抗体を含む複合体が個々に測定され、当該タンパク質-ビーズ結合体の固有の蛍光シグナルにより特異的な腫瘍バイオマーカーの存在が明らかにされ、一方、当該複合体の二次抗体由来のPEシグナルにより自己抗体の存在及び患者血清中の前記腫瘍バイオマーカーの相対的濃度が示される、請求項 1 1 に記載のキット。

【請求項 1 6】

自己抗体に存在する腫瘍バイオマーカーの各々が約0.15ng/mLの低さで存在する、請求項 1 1 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(著作権表示 / 許諾)

本特許文書の内容の一部は著作権保護の対象である情報を含む。本著作権者は、特許商標庁の出願書類又は記録そのままの特許書類又は特許明細書の何人による複製にも異議を申し立てないが、それ以外は如何なるものについても全著作権を保留する。下記表示は、以下に記載の工程、実験及びデータ並びに前記に添付される図面に適用される：著作権 2014, Vision Global Holdings Limited, 不許複製

(関連出願) 本出願は、米国非仮特許出願14/321,867 (2014年7月2日出願) 及び米国非仮特許出願14/321,870 (2014年7月2日出願) に関し優先権を主張し、さらに前記の内容は参照によりその全体が本明細書に含まれる。

(技術分野)

本発明は、肝臓癌患者の血清で該当する自己抗体を測定することによる、特異的かつ新規な肝細胞癌 (HCC) 腫瘍バイオマーカー一覧の検出及び定量方法を開示する。当該バイオマーカーセットは、Bmi1、VCC1、SUMO-4、RhoA、TXN、ET-1、UBE2C、HDGF2、FGF21、LECT2、SOD1、STMN4、ミッドカイン、IL-17A及びIL26を含む。より具体的には、本発明はさらに、処理能力が高くかつ鋭敏な試験キットの設計を開示する。前記キットは、当該バイオマーカーセットから選択されるバイオマーカーの少なくとも1つに対する自己抗体を測定することによって肝臓癌を早期にかつ非侵襲的態様で検出するために、患者の末梢血清採取に容易に利用できる。本発明はさらに、病期決定のためのシグネチャーバイオマーカーパターンの識別を、化学療法処置後のモニタリング期間における再発の検出とともに可

10

20

30

40

50

能にする。本発明は自動データ解析を援けることとなろう。

【背景技術】

【0002】

肝細胞癌（HCC）は中国では二番目に多い癌であり、全人口の5.7%を占める[1]。ほとんどのHCC患者は高い死亡率をもたらす急速な腫瘍進行を示す。全生存期間を改善するために、本疾患の早期診断は必須となっている。これまでのところ、もっとも一般的なHCC検出方法は、HCC腫瘍マーカー（例えばアルファフェトプロテイン（AFP））のレベルを測定する血液検査である。AFPは血漿タンパク質であり、胎児発育期の卵黄嚢及び肝臓で生成され血清アルブミンのように機能する。正常な状態では、AFPレベルは出生後徐々に低下し、成人では低レベルで維持される。腫瘍マーカーレベルの増加は肝臓癌の可能性を示す。しかしながら、AFP検査の主要な課題は過剰な偽陽性である。その理由は、HCCがAFPレベル上昇の唯一の原因ではなく、アルコール性肝炎、慢性肝炎又は肝硬変もまたAFPの増加に関係しているということである。

AFP検査が肝臓癌の診断のために一般的に提唱されているにもかかわらず、その結果は決定的ではない。疑いのある患者は、さらなる確認のために超音波画像診断、CTスキャン又はコントラストMRIスキャンの実施を必要とするであろう。肝生検を実施して、腫瘍が良性か又は悪性かが識別されるであろう。しかしながら、HCCの通常的検出はいくつかの限界を伴う。（a）肝臓癌の約20%は一般的に用いられるHCC腫瘍マーカーのレベル上昇を生じない[2]。（b）ウイルス性肝硬変は血液検査で偽陽性結果をもたらす[3]。（c）超音波は小さな腫瘍を検出できない[4]。（d）CTスキャンは高い放射線量を必要とし、1cm未満の腫瘍に対しては感度が低い[5]。（e）MRIスキャンは高価であり、処理手順は多くの時間を要する。これらの限界のために、HCCの早期診断及び/又はHCCの予後判定を目的とする感度及び特異性が高い新規なバイオマーカースクリーンを開発し通常的方法を補完することが希求される。

HCC腫瘍細胞は、腫瘍と並べて正常な肝上皮細胞を比較したとき固有のタンパク質セットを産生する傾向がある。検証された腫瘍バイオマーカーの評価は高い潜在能力を有し、HCCの診断を容易にする。しかしながら、全てのバイオマーカーそのものを簡便な診断用血清又は尿で見出すことができるとは限らない。また別に、バイオマーカーに特異的な自己抗体は当該バイオマーカーの発現を評価する機会を提供する。腫瘍バイオマーカーの存在は、これらの腫瘍抗原に対する自己抗体の産生と一致することが多くの癌で示されている[6-8]。患者血清における自己抗体の検出は、我々がバイオマーカーの存在をより効率的に調査することを可能にするであろう。理想的には、末梢血で自己抗体を調べることは、肝臓癌の早期かつ非侵襲的態様での検出の証明となろう。バイオマーカーの臨床使用を妨げる1つの一般的な障害は、それらは発見後に未だに検証されていないということである。しかしながらいったん検証されれば、そのような検査は費用効率がよくかつ正確となる。プロトタイプ的设计もまた高処理スクリーニングを促進する。前記は通常的な肝臓癌診断に必要な費用を軽減しうる。

【0003】

以下は本明細書で時に引用される参考文献リストである。これら参考文献のそれぞれの内容は参照によりその全体が本明細書に含まれる。

- (1) Chen JG, Zhang SW. Liver cancer epidemic in China: past, present and future. *Semin Cancer Biol.* 2011; 21(1):59-69
- (2) Okuda K, Peters RL. Human alpha-1 fetoprotein. *Hepatocellular Carcinoma.* 1976:353-67
- (3) Lok AS, Lai CL. Alpha-fetoprotein monitoring in Chinese patients with chronic hepatitis E virus infection: role in the early detection of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1989;9:110-115
- (4) Colombo M, de Franchis R, Del Ninno E, Sangiovanni A, De Fazio C, Tommasini M, Donato MF, Piva A, Di Carlo V, Dioguardi N. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med.* 1991;325:675-80

(5) Sahani DV, Kalva SP. Imaging the Liver. The Oncologist. 2004; 9 (4): 385-397

(6) Masutomi K, Kaneko S, Yasukawa M, Arai K, Murakami S, Kobayashi K. Identification of serum anti-human telomerase reverse transcriptase (hTERT) auto-antibodies during progression to hepatocellular carcinoma. Oncogene. 2002 Aug 29;21(38):5946-50.

(7) Karanikas V, Khalil S, Kerenidi T, Gourgoulisianis KI, Germenis AE. Anti-survivin antibody responses in lung cancer. Cancer Lett. 2009 Sep 18;282(2):159-66.

(8) Wang YQ, Zhang HH, Liu CL, Xia Q, Wu H, Yu XH, Kong W. Correlation between auto-antibodies to survivin and MUC1 variable number tandem repeats in colorectal cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(11):5557-62.

10

【発明の概要】

【0004】

本発明では、癌の診断及び病期決定を目的として、特異的腫瘍バイオマーカー一覧に対する自己抗体を検出及び定量する方法が提供される。正常な肝上皮細胞と比較して、HCC腫瘍細胞は固有のタンパク質セットを産生する傾向がある。当該固有のタンパク質セット（複数のバイオマーカー）の評価は通常的な診断方法を補完し、癌の早期発見を促進するであろう。

二次元/質量分析に基づく方法を用いることによって、対になる患者生検（腫瘍生検対近接正常組織）に由来する肝臓癌バイオマーカーセット（Bmi1、VCC1、SUMO-4、RhoA、TXN、ET-1、UBE2C、HDGF2、FGF21、LECT2、SOD1、STMN4、ミッドカイン、IL-17A及びIL26を含む）が本発明で識別される。

20

この肝臓癌バイオマーカーセットの特異性及び正確性を続いて検証し、肝臓癌の診断のために一つにまとめる。本発明では、このバイオマーカー一覧のタンパク質はcDNAクローンから発現され、精製され、種々の放射波長を有する蛍光微小球ビーズに結合される。患者の血清に存在する当該タンパク質に対する自己抗体は、このタンパク質-ビーズ結合物と免疫学的に結合する。この自己抗体を続いてPE-結合二次抗体と相互反応させる。微小球ビーズの特異的蛍光シグナルは、結合させたバイオマーカーのための識別因子として働く。当該複合体のPE-結合二次抗体によって提供される蛍光強度を測定することによって、自己抗体の検出及び定量が可能である。自己抗体は患者の血清でHCC腫瘍細胞のバイオマーカーの豊富さに比例して産生されるので、高濃度の自己抗体からもたらされる蛍光強度が高ければ高いほど、対応するバイオマーカーの発現が高いことが示される。全血清自己抗体に対する各バイオマーカーの最低検出限界は約0.15ng/mLである。

30

健康な対象者の血清と比較すると、標的バイオマーカーに対する自己抗体のレベルは癌患者でより高濃度である。さらにまた、種々の病期の肝臓癌患者の種々の血清を比較して、病期決定のためのシグネチャーパターンを作製することができる。したがって、本発明は、標的とする肝臓癌バイオマーカーの非侵襲的評価を可能にする。これは、初期病期におけるHCCの検出及びシグネチャーバイオマーカーパターンの病期決定のための識別とともに、化学療法処置後のモニタリング期間における再発の検出を可能にする。

本発明の実施態様は図面を参考にして以降でより詳しく記載される。当該図面は以下のとおりである：

40

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図1】腫瘍生検と近接正常組織との間のタンパク質発現パターンの相違を二次元/質量分析によって示す（前記分析は、肝臓癌でアップレギュレートされる15の特異的バイオマーカーの識別をもたらす）。矢印は質量分析二次元ゲルで識別されるスポットの位置を示す。

【図2】本発明で標的にして測定した、検証実施15肝臓癌バイオマーカーのセット及びそれらの対応する分子量を示す。

【図3】cDNAクローンからバイオマーカーを発現するワークフローを示す。

50

【図4】大腸菌(E.coli)から発現されるバイオマーカーを精製するワークフローを示す。

【図5】バイオプレックス(BioPlex)システムによって自己抗体を測定するワークフローを示す。

【図6】バイオマーカーとバイオプレックスとの結合を示す。

【図7】一次抗体及びPE-結合二次抗体と免疫反応しているバイオマーカー-バイオプレックスビーズ結合体の複合物のイラストを示す。

【図8】制限酵素HindIII及びBamH1によって切断されたプラスミドから遊離したDNA挿入物のゲル電気泳動を示す。

【図9】以下のバイオマーカーのIPTG誘発を証明するクーマシーブルー染色SDS-PAGEを示す：(a) Bmi1、(b) SOD1、(c) IL-17A、(d) TXN、及び(e) ミッドカイン。

【図10(a)】AKTAにおける、Bmi1の溶出プロフィールを示す。

【図10(b)】AKTAにおける、SOD-1の溶出プロフィールを示す。

【図10(c)】AKTAにおけるIL-17Aの溶出プロフィールを示す。

【図11(a)】Hisタグ付加Bmi1バイオマーカーの精製を証明するクーマシーブルー染色SDS-PAGEを示す。画分Cは細菌溶解物である。

【図11(b)】Hisタグ付加SOD-1バイオマーカーの精製を証明するクーマシーブルー染色SDS-PAGEを示す。画分BはIPTG誘発を実施した細菌、画分Cは細菌溶解物である。

【図11(c)】Hisタグ付加IL-17Aバイオマーカーの精製を証明するクーマシーブルー染色SDS-PAGEを示す。画分AはIPTG誘発を実施していない細菌、画分BはIPTG誘発を実施した細菌、画分Cは細菌溶解物である。

【図12】抗Bmi1抗体濃度に対する蛍光強度を示す標準曲線を示す。

【図13】当該検査の設計を示す模式図である。自己抗体を含む患者血清を、バイオマーカーセットの15のバイオマーカーに該当する15タイプのビーズを含むウェルで混合し、続いてPE-結合二次抗体を添加する。

【発明を実施するための形態】

【0006】

定義

“バイオマーカー”という用語は、正常な上皮細胞と比較して腫瘍で固有に発現されるか又はアップレギュレートされるタンパク質を指す。

“バイオマーカーセット”という用語は、対になる患者生検(腫瘍生検対近接正常組織)から識別されるバイオマーカーの特異的な組み合わせを指し、本発明の測定の標的である。

“自己抗体”という用語は、患者の身体によって産生され当該腫瘍バイオマーカーの発現と対になる抗体を指し、前記は循環中に存在し末梢血清で収集することができる。

Bmi1(ポリコムリングフィンガー)は、ポリコムグループ(PcG)マルチタンパク質PRC1様複合体のタンパク質成分である。前記は、発生を通して多くの遺伝子(Hox遺伝子を含む)の転写抑制状態の維持に必要である。前記調節は、発現を提供する、ヒストンH2A‘Lys-119’の一ユビキチン付加(ヒストンを改変し、クロマチンを再構築する)を介する。

VCC1又はCXCL17(ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド17)は、血管形成で、さらにおそらくは腫瘍の発育で必須の役割を有する。さらにまた、前記は非活性化血液単球及び未熟な樹状突起細胞の組織への補充を調節するハウスキーピングケモカインであると提唱されている。前記はまた、感染に対する先天的防御で役割を果たし得る。VCC1の機能不全は十二指腸炎及びコレラと密接に関係する。

SUMO-4(小ユビキチン様改変因子4)は小ユビキチン関連改変因子ファミリーに属し細胞質に位置する。前記は、標的タンパク質、IKBAに共有結合により接着してその細胞内局在、安定性又は活性を制御する。これは最終的には、IL12B遺伝子のNF-カッパ-B-依存転写の負の調節をもたらす。

【0007】

10

20

30

40

50

RhoA (RasホモロークファミリーメンバーA)は、形質膜受容体を接着班とアクチンストレスファイバーとの集合に連携させるシグナリング経路を調節する。前記はまた、細胞周期における細胞質分裂の最中に必須の微小管依存シグナリング、並びに、微小管の安定並びに細胞遊走及び接着に必要な他のシグナリング経路にも関与する。

TXN (チオレドキシン)はホモダイマーを形成し、その活性中心ジチオールのジスルフィドへの可逆的酸化における酸化還元反応に必要とされ、ジチオール-ジスルフィド交換反応を触媒する。チオレドキシンは乳房粘液性癌腫と関連すると報告された。

ET-1 (エンドセリン1)は、血管内皮細胞によって産生される強力な血管収縮因子である。前記は、全ての組織(非血管構造物、例えば上皮細胞、グリア、及びニューロンを含む)で広く発現されるエンドセリン受容体と結合する。血管緊張維持におけるその主要な役割はさておき、ET-1はまた有糸分裂共助活性を有し他の増殖因子の作用を強化すると提唱されている。

10

UBE2C (ユビキチン結合酵素E2C)は、E2ユビキチン結合酵素ファミリーに属する。前記はユビキチン付加(分解のために異常タンパク質を標的とする重要な細胞機構である)に必要とされる3つの酵素の1つである。より具体的には、UBE2Cは有糸分裂期サイクリンの標的としての分解及び細胞周期の進行のために必要である。したがって、このタンパク質はまた癌進行に関与しうると考えられている。

HDGF2はヘパトーマ由来増殖因子2と称される。多様な腫瘍で高度に発現されるこのタンパク質は、いくつかの腫瘍の発育及び進行で中枢的役割を果たすと報告されている。そのメカニズムはこれまで同定されてはいないが、HDGF2は有糸分裂促進活性、血管形成活性、神経栄養活性、抗アポトーシス活性を有すると提唱されている。

20

EGF21 (線維芽細胞増殖因子21)はEGFファミリーのファミリーメンバーである。EGFファミリーは、胚の発育、細胞増殖、形態形成、組織修復、腫瘍の増殖及び侵襲を含む様々な生物学的プロセスに関与する。より具体的には、EGF21は、グルコース輸送因子SLC2A1/GLUT1発現の誘発を介して、種々の脂肪細胞のグルコースアップデートを刺激する。EGF21は脂肪性肝疾患と関係することが報告されている。

【0008】

LECT2 (白血球細胞由来ケモタキシン1)は、好中球への走化性因子として働く分泌性タンパク質であり、軟骨細胞及び骨芽球の増殖を刺激する。このタンパク質は急性肝不全に関係する。

30

SOD1 (スーパーオキシドジスムターゼ1)はCu/Zn含有抗酸化酵素であり、サイトゾル、核及びミトコンドリアの膜間隙で遊離超酸化ラジカルを分子性酸素及び過酸化水素に分解するために必要である。前記は、サイトゾルの超酸化物を低レベルで維持し、したがって酸化ストレス及びそれに続く細胞死から細胞を保護するために重要である。

STMN4 (スタスミン様4)は小さな調節性タンパク質であり、前記は、多様な細胞内シグナリング経路統合を中継し、順繰りに細胞の増殖、分化及び機能を制御すると考えられる。このタンパク質はまた、微小管の重合の阻害及び/又は微小管の脱重合の促進によって微小管の動的変化の制御に寄与することが示されている。

ミッドカイン又はNEGF2 (神経突起増殖促進因子2)は、ヘパリンと結合しレチノイン酸に応答性である分泌性増殖因子である。ミッドカインは、細胞増殖、遊走、及び血管形成を特に腫瘍発生時に促進する。ミッドカインは乳房の腺癌及び軟組織肉腫と関係することが既に示されている。

40

IL-17A (インターロイキン17A)は、活性化T細胞によって産生される炎症誘発性サイトカインである。IL-17Aは、NF-カッパB及びマイトジェン活性化タンパク質キナーゼの活性を調節し、IL6及びシクロオキシゲナーゼ2の発現を刺激し、さらに一酸化窒素の生成を強化する。いくつかの慢性炎症及び硬化症は通常IL-17Aの上昇と関係している。

IL-26 (インターロイキン26)はIL-10サイトカインファミリーに属し、活性化T細胞によって産生され、シグナルトランスダクションに関して上皮細胞を標的とする。IL-26は、細胞表面のグリコサミノグリカン(例えばヘパリン、ヘパラン硫酸、及びデルマタン硫酸)と強力に結合する(グリコサミノグリカンは生成細胞及び標的細胞の表面でIL-26を

50

濃縮するためにコレセプターと同様に働く)。

【0009】

発明の詳細な説明

以下の記述では、一バイオマーカ- / 複数バイオマーカ-、好ましい例としての検出 / 検証 / 識別 / 定量方法の対応する実施態様が示される。改変 (付加及び / 又は置換を含む) が本発明の範囲及び趣旨を外れることなく実施できることは当業者には理解されるであろう。具体的な詳細は本発明を曖昧にしないようにして省略されることがあるが、しかしながら本開示は、煩雑な実験を行うことなく本明細書の教示を当業者が実行できるように記載される。

本発明では、肝臓癌の検出及び定量用の肝臓腫瘍バイオマーカ-セットがまず初めに、対になる患者生検 (腫瘍生検対近接正常組織) 間におけるタンパク質発現パターンの相違を解明する二次元 / 質量分析によって識別される (図1)。これらバイオマーカ-は、パラフィン切片HCCブロックでの免疫組織染色、及びHCC患者血清のウェスタンブロット分析によって検証される。これによって、肝臓癌診断の目的のために本発明で評価される15のバイオマーカ-の最終的一覧が得られる (図2)。

標的とされるバイオマーカ-のアミノ酸配列に基づいて、業者により合成されたcDNAクローンをバイオマーカ-セットの発現に利用した (図3)。続いてcDNAクローンから発現されたタンパク質を一連の精製工程に付した (図4)。続いて前記精製バイオマーカ-を安定なアミド結合を介してバイオプレックスビーズと結合させる。バイオプレックスは蛍光微小球ビーズのタイプであり、多重構成群における識別のために個々に固有の蛍光シグナルを提供するパネルとして入手できる。ビーズ上のバイオマーカ-は、特異的な一次抗体によって認識され、前記一次抗体は続いてPE結合抗ヒト二次抗体と結合される (図7)。したがって、バイオプレックス装置は複合体から生じる2つのシグナルを同時に測定する。バイオプレックスビーズによって提供される蛍光は識別因子として機能し、一方、PEから生じるシグナルは複合体にバイオマーカ-が存在することを示す。これはまた、連なった抗体が結合したバイオマーカ-ビーズ結合物を、抗体との非免疫反応によるバイオマーカ-ビーズから区別するために役立つ。

【0010】

本発明のバイオマーカ-の意義を証明するために、cDNAクローンを制限酵素切断によって確認する (図8)。形質転換細菌をIPTGによって誘発しバイオマーカ-タンパク質を発現する。SDS-PAGE及びクーマシーブルー染色によって実証したタンパク質発現は当該タンパク質バンドを示す (図9a - e)、Hisタグ付きBmiI、SOD1及びIL-17Aタンパク質をAKTAによって精製し (図10a - c)、続いてSDS-PAGE及びクーマシーブルー染色によって検証する (図11a - c)。

前記試験の感度は抗体の連続希釈でスパイクすることによって測定される。シグナルを提供することができる添加抗体の最も低い濃度が、該当する個々のバイオマーカ-の感度を示す。他方で、抗体の連続希釈に対するPEの蛍光強度を示す標準曲線を構築する (図12)。標準曲線は、PE強度を比較することによって患者血清中のバイオマーカ-特異的自己抗体の濃度の概算に用いられるであろう。

本発明では、個々に固有の蛍光を提供する15の異なるバイオプレックスビーズの多重混合物をバイオマーカ-セットに結合させ、プレートのウェルに予めロードする (図13)。自己抗体を含む患者血清をウェルにロードし、バイオマーカ-結合物と相互作用させる。続いてPE結合二次抗体を添加し、自己抗体と結合させる。この装置で、過剰な二次抗体を洗い流し、バイオマーカ-ビーズ結合物及び連なった抗体を含む複合体を個々に測定する。バイオプレックスビーズの固有の蛍光はバイオマーカ-を識別し、一方、同じ複合体のPEシグナルは一次抗体として自己抗体の存在を示す (図7)。総合すれば、この測定は、患者血清中の自己抗体の存在及び相対的濃度を示唆するであろう。

【0011】

標準的な任意抽出試験設計では、健康グループと肝臓癌と診断された患者との間の自己抗体の相対的レベルの平均が比較される。スチューデントt検定を用いて、変動有意性を

10

20

30

40

50

分析する。有意差は、当該バイオマーカーが肝臓癌で特異的であることを示す。検証試験後、バイオマーカー特異的自己抗体の濃度範囲が肝臓癌陽性及び陰性患者について得られ、将来の診断のための参照点として供される。他方で、自己抗体の発現パターンもまた種々の病期の肝臓癌患者間で比較される。バイオマーカー発現のシグネチャーパターンはHC Cの病期を示すであろう。

相対的自己抗体レベル及びバイオマーカーの発現パターンを総合すれば、本発明は通常的な肝臓癌診断を補完する種々の手段を示す。本発明はさらに本発明の患者血清における検証された標的に対する自己抗体の非侵襲的検出を可能にし、前記非侵襲的検出は当該患者の程度及び特徴を識別する。I期肝臓癌の早期検出はさておき、本発明はまた、病期決定のためのシグネチャーパターンの作製、及び乳房切除術後又は化学療法処置後のモニタリング期間における再発の検出を可能にする。

10

実施例

以下の実施例は、本発明の範囲を限定する意図無しに本発明の具体的な実施態様を記述することによって提供される。

【実施例1】

【0012】

実施例1a：患者生検からのタンパク質抽出

500mgの対になる患者生検（腫瘍生検対近接正常組織）を収集し、PBSで洗浄する。前記組織を液体窒素に沈めることによって凍結させ、直ちに乳鉢と乳棒で均質にする。この均質化サンプルに、溶解溶液（8M尿素、4% CHAPS、2% IPG緩衝液、0.2mg/mL PMSF）を添加し、続いて組織が完全に分散するまで少なくとも5分間ボルテックスミキサーにかける。続いて、溶解物を14,000rpmで10分間、4 で遠心分離することによって清澄にする。上清をさらに2Dクリーンアップキット（Amersham）で清浄にして、塩及び不純物を除去する。ペレットを最小体積の再水和溶液（DTT無し及びIPG緩衝液添加）で再懸濁させる。続いてタンパク質濃度をBio-Radタンパク質アッセイで測定し、200g/チューブのアリコットを-70 で保存する。

20

実施例1b：二次元電気泳動によるタンパク質分離

1mLの再水和ストック溶液に、2.8mgのDTT、5 µLのファーマライト又はIPG緩衝液、及び2 µLのプロモフェノールブルーを添加する。50 - 100 µgのタンパク質サンプルを、250 µLの再水和溶液を含有する13cmのイモビロンドライストリップ（Immobiline DryStrip）（IPG細片）に添加する。保護カバーを除去した後、ゲル側の面を下にしてこのIPG細片を細片ホルダーに適切に置き、カバー液を重層して電気泳動時の脱水を防ぐ。続いて、等電点電気泳動（一次元電気泳動）のために前記細片をEttan IPGphor（Amersham）に配置する。

30

一次元電気泳動後、このIPG細片を平衡溶液（6M尿素、2% SDS、50mMトリスHCl（pH6.8）、30%グリセロール、0.002%プロモフェノールブルー、100mgDTT/10mL緩衝液、及び250mg IAA/10mL緩衝液）で平衡化させ、続いて1x SDS泳動緩衝液で4 - 5回洗浄する。このIPG細片を二次元ゲルの上に置き、シーリング溶液（1x SDS泳動緩衝液中に0.5%の低温融解アガロース、0.002%のプロモフェノールブルー）を重層する。続いて、二次元電気泳動を最初に30mAで15分、続いて60mAで3 - 4時間実施する。

40

二次元電気泳動完了時に、当該ゲルをカセットから取り出し、固定し硝酸銀で染色する。15のアプレギュレートされたタンパク質を表す15のスポットを識別する（図1）。タンパク質の識別のために（図2）、銀染色したゲルスライスを脱染色し、さらにトリプシン消化してMALDI-TOF分析のためにゲルからタンパク質を遊離させる。

【実施例2】

【0013】

実施例2a（配列番号:1）

Bmi1のアミノ酸配列

MHRTRTRIKITELNPHLMCVLCGGYFIDATTIIECLHSFCKTCIVRYLETISKYCPICDVQVHKTRPLLNI RSDKTLQDIVY
KLVPLGFKNEMKRRRDFYAAHPSADAANGSNEDRGEVADEDKRIITDDEIISLSIEFFDQNRRLDRKVNKDKESKEEVND

50

KRYLRCPAAMTVMHLRKFRLSKMDI PNTFQI DVMYEEEEPLKDYYTLMDI AYI YTWRRNGPLPLKYRVRPTCKRMKISHQR
DGLTNAGELESDSGSDKANSPAGGIPSTSSCLPSPSTPVQSPHPQFPHI SSTMNGTSNSPSGNHQSSFANRPRKSSVNGS
SATSSG

実施例2b (配列番号:2)

VCC1のアミノ酸配列

MKVLISSLLLLLPLMLMSVSSSLNPGVARGHRDRGQASRRWLQEGGQECECKDWFLRAPRRKFMTVSGLPKKQCPCDHF
KGNVKKTRHQRRHHRKPNKHSRACQQFLKQCQLRSFALPL

実施例2c (配列番号:3)

SUMO-4のアミノ酸配列

MANEKPTEEVKTENNHI NLKVAGQDGSVVQFKIKRQTPLSKLMKAYCEPRGLSVKQIRFRFGGQPI SGTDKPAQLEMED
EDTIDVFQQPTGGVY

10

実施例2d (配列番号:4)

RhoAのアミノ酸配列

MAAIRKKLVI VGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVI
LMCFSIDSPDSLENI PEKWTPEVKHFPCNPVIILVGNKKDLRNDEHTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGYMECS
AKTKDGVREVFEMATRAALQARRGKKKSGCLVL

実施例2e (配列番号:5)

TXNのアミノ酸配列

MVKQIESKTAQEALDAAGDKLVVDFSATWCGPCKMI KPFFHSLSEKYSNVIFLEVDVDDCQDVASECEVKCMPTFQFF
KKGQKVGFEFSGANKEKLEATINELV

20

実施例2f (配列番号:6)

ET-1のアミノ酸配列

MDYLLMIFSLFLVACQGAPETAVLGAELSAVGENGGEKPTSPWPRLRRSKRCSLMDKECVYFCHLDI IWWNTPEHV
VPYGLGSPRSKRALENLLPTKATDRENRQCASQDKKCCWNFCQAGKELRAEDI MEKDWNNHKKGKDCSKLGKKCI YQQL
VRGRKIRRSSEHLRQTRSETMRNSVKSSFHDPKLGKNSRERYVTHNRAHW

実施例2g (配列番号:7)

UBE2Cのアミノ酸配列

MASQNRDPAATSVAARKGAEPSSGGAARGPVGKRLQQELMTLMMSGDKGISAFPESDNLFKVVGTIHGAAGTVYEDLRYK
LSLEFPSPGYPNAPTIVKFLTPCYHPNVDTQGNICLDILKEKWSALYDVRTILLSIQSLLGEPNIDSPLNTHAAELWKNPT
AFKKYLQETYSKQVTSQEP

30

実施例2h (配列番号:8)

HDGF2のアミノ酸配列

MARPRPREYKAGDLVFAKMKGYPHWPARIDELPEGAVKPPANKYPI FFFGTHETAFLGPKDLFPYKEYKDKFGKSNKRKG
FNEGLWEI ENNPGVKFTGYQAI QQQSSSETEGEGGNTADASSEEEGDRVEEDGKGRKNEKAGSKRKKSYTSKSSKQSR
KSPGDEDDKDCKEENKSSSEGGDAGNDRNTTSDLQKTSEGT

実施例2i (配列番号:9)

FGF21のアミノ酸配列

MDSDETFEHSGLWVSVLAGLLLGACQHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESL
LQKALKPGVI QILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRG
PARFLPLPGLPPALPEPPGI LAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS

40

実施例2j (配列番号:10)

LECT2のアミノ酸配列

MFSTKALLLAGLI STALAGPWANI CAGKSSNEIRTCDRHGGCQYSAQRSQRPHQGVLDVLCASGSTVYAPFTGMI VGQEKP
YQNKNAI NNGVRI SGRGFCVKMFYIKPI KYKGPICKGEKLGTLPLQKVYPGI QSHVHI ENCDSSDPTAYL

実施例2k (配列番号:11)

SOD1のアミノ酸配列

MATKAVCVLKGDPVQGI IINFEQKESNGPVKVVWGSIKGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGCTSAGPHFNPLSRKHGGPKDEER
HVGDLGNVTADKDGVDVSI EDVI SLSGDHCI IGRTLVVHEKADDLGKGGNEESTKTGNAGSRLACGVI GIAQ

実施例2l (配列番号:12)

STMN4のアミノ酸配列

50

MTLAAAYKEKMKELPLVSLFCSCFLADPLNKSSYKYEADTVDLNWCV I SDMEV I ELNKCTSGQSFEV I LKPPSFDGVPEFN
ASLPRRRDPSLEE I QKKLEAAEERRKYQEAELLKHLAEKREHEREV I QKA I EENNNF I KMAKEKLAQKMESNKENREHL
AAMLERLQEKDKHAEVVRKNKELKEEASR

実施例2m (配列番号:13)

ミッドカインのアミノ酸配列

MQHRGFLLL TLLALLALTSAVAKKKDKVKKGGPGSECAEWAWGPTPSSKDCGVGFREGTCGAQTQR I RCRVPCNWKKEF
GADCKYKFENWGACDGGTGTKVRQGTLLKARYNAQCQET I RVTKPCTPKTKAKAKAKKGGKGD

実施例2n (配列番号:14)

IL-17Aのアミノ酸配列

MTPGKTSLSVLLLLLSLEA I VKAG I T I PRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLN I HNRNTNTNPKRSSDYNNRSTSPWNLHRNE
DPERYPSV I WEAKCRHLGC I NADGNVDYHMNSVP I QQE I LVLRRREPPHCPNSFRLEK I LVSVGCTCVTP I VHHVA

10

実施例2o (配列番号:15)

IL-26のアミノ酸配列

MLVNF I LRCGLLLVTLSLA I AKHKQSSFTKSCYPRGTLTSAVDALY I KAAWLKAT I PEDR I KN I RLLKKTCKQFMKNCQ
FQEQLLSFFMEDVFGQLQLQGCKK I RFVEDFHSLRQKLSHC I SCASSAREMKS I TRMKR I FYR I GNKG I YKA I SELD I LL
SWIKKLESSQ

【実施例3】

【0014】

実施例3a: バイオマーカセットの発現

バイオマーカセットをコードするcDNA挿入物を含むHisタグ付加プラスミドでDH5コン
ピテント細胞を形質転換する(301、図3)。単独コロニーを採取し細菌培養で増殖させる
。プラスミド数を増加させ、ミニプレップにより細菌から抽出する。このプラスミドでさ
らにBL21DE3又はBL21DE3pLysSコンピテント細胞を形質転換する。形質転換細菌を選別し
、2X 100mL LB培地で増殖させる。細菌培養が0.06の光学密度に達したとき、200 μMのIPT
Gを100mLの細菌培養に添加する(303)。IPTGを含まない別の100mLの細菌培養を陰性コン
トロールとして用いる。これら細菌培養を振盪しながら30 でインキュベートする。イン
キュベーション3時間後及び一晩インキュベートした翌朝に500 μLの細菌培養を取り置き
、-20 で保存する。

20

IPTG誘発及び非誘発細菌培養を500mLの遠心分離瓶で一緒に混合する。9000rpmで20分間
4 にて遠心分離して細菌細胞を収集する(304)。500 μLの上清を別の陰性コントロール
として取り置き、残りの上清を廃棄する。種々の時点で収集した細菌培養及び陰性コント
ロールをSDS-PAGEで泳動し、タンパク質を分離する(305)。続いてゲルを一晩クーマシ
ーブルーで染色する。ゲルを脱染色した後で、タンパク質の誘発を、サイズのチェック及
び陰性コントロールとの比較によって確認することができる。

30

実施例3b: バイオマーカセットのタンパク質精製

細菌の細胞ペレットをボルテックスミキサーにより室温で10mLの可溶性緩衝液に再懸濁
する。前記再懸濁細胞を氷上で50mLの遠心分離管で維持し、細胞を超音波(振幅70%、30
秒の10ラウンド、30秒間隔)によって完全に溶解する(401、図4)。溶解細胞を10,000rp
mで1時間、4 で遠心分離する(402)。上清を透析チューブに移し、1Lの非ろ過開始緩衝
液に沈め4 で4-6時間持続的に攪拌する(403)。さらにもう1Lの開始緩衝液で透析を一
晩続行する。さらに上清を0.22 μmのフィルターディスク及び注射器でろ過する。0.1Mの
硫酸ニッケルを充填したHiTrapキレートカラムを備えたAKTA装置(404)に、ろ過サンプ
ルをロードする(405)。溶離液が自動的に収集されるようにプログラムをAKTA装置に設
定する(406)。種々の分画の精製タンパク質をSDS-PAGE分析でチェックする(407)。

40

【実施例4】

【0015】

実施例4a: バイオレックスビーズとタンパク質の結合

製造業者のマニュアルにしたがい、バイオマーカセットの精製タンパク質をバイオ
レックスビーズ(Bio-Rad)に結合させる(501)。略記すれば、未結合ビーズを30秒ボル
テックスミキサーにかけ、続いて15秒間超音波処理する。100 μLのビーズを最大速度で4

50

分間遠心分離して、1,250,000個のビーズを反応管に収集する。100 μ Lのビーズ洗浄緩衝液で遠心分離により洗浄した後、このビーズを80 μ Lのビーズ活性化緩衝液に再懸濁する。前記ビーズに、新しく調製した50mg/mLのS-NHS (10 μ L) 及び新しく調製した50mg/mLのEDAC (10 μ L) を添加し、続いて暗所で室温にて20分間インキュベートする (図6)。続いてビーズを150 μ LのPBSで2回洗浄する。

前記洗浄ビーズに、10 μ gのタンパク質を添加し、全体積をPBSで500 μ Lにし、暗所で振盪しながら2時間インキュベートする。最大速度で4分間遠心分離した後、上清を除去する。250 μ Lのブロッキング緩衝液を前記ビーズに添加して30分間暗所で振盪し、続いて最大速度で4分間遠心分離し上清を除去する。このビーズをざっと洗浄し、続いて保存緩衝液に再懸濁し4 で保存する。ビーズの数を血球計算盤で計測する。

10

実施例4b：タンパク質-ビーズ結合の検証

HTS 96ウェルプレートに、50 μ Lの結合済みバイオプレックスビーズ (100ビーズ/ μ L) を添加し、一次抗体、続いて二次抗体を反応させる (502)。市場で入手できる当該バイオマーカーセットに対する一次抗体の連続希釈を、8,000、4,000、1,000、250、62.5、15.625、3.906、0.977、0.244及び0.061ng/mLのように調製する。50 μ Lの各希釈物を各ウェルに添加する。ウェルから一次抗体除去及び一次抗体と二次抗体の両抗体除去によって2つの陰性コントロールを実施する。続いて金属箔でプレートを封じ、350rpmで30分間光への曝露を避けてシェーカー上で維持する。

インキュベーション後、150 μ LのPBSで3回ビーズを洗浄する。50 μ LのPE-結合二次抗体 (8,000ng/mL) を、陰性コントロールを除いて各ウェルに添加する。プレートを再び封じ、暗所で振盪しながら30分間インキュベートする。続いて過剰な抗体をPBSで洗い流す。バイオプレックス装置の目盛りをカリブレーションキット及び検証キットで調整する。当該装置にHTSプレートをロードした後、バイオプレックスビーズ及び二次抗体結合PE (503) の両方のシグナルを測定する (模式図は図7に示されている)。検定曲線はLogistic-5PLによって作成される。

20

実施例4c：血清サンプルの収集及びバイオプレックスシステムによる自己抗体の測定

全血サンプルを37 で1時間静置して凝固させる。室温で10分間1000gにて遠心分離した後、上清の自己抗体を含む血清を収集する。必要な時は血清をPBSで希釈する。バイオマーカーセットを結合させたバイオプレックスビーズを予めロードしたHTSプレートに、血清サンプルをロードし、振盪しながら30分間インキュベートする (図13)。実施例4bに記載した工程と同様に、50 μ LのPE-結合二次抗体 (8000ng/mL) をPBS洗浄ビーズに添加し、続いてさらに30分間振盪する。3ラウンドの洗浄後、プレートをバイオプレックス装置にロードし、蛍光シグナルを測定する (504)。続いて自己抗体の濃度を標準曲線から計算する。

30

本発明のこれまでの記載は例示及び説明のために提供されてきた。網羅することも又は開示した厳密な形態に本発明を制限することも前記は意図していない。多くの改変及び変型が当業者には明白であろう。

本発明の原理及びその実際の適用をもっともよく説明し、それによって意図される具体的な使用に適切な多様な実施態様及び多様な改変について当業者の理解を可能にするために、本実施態様は選択され記述されている。本発明の範囲は以下の特許請求の範囲及びそれらの等価物によって規定されることが意図される。

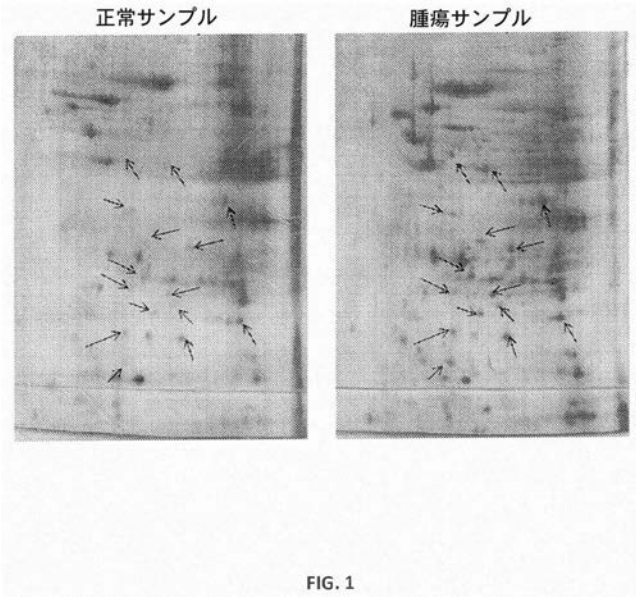
40

【0016】

工業的応用

ここに特許請求される方法及び15の識別バイオマーカーを含むキットは、肝臓癌を検出し及び/又は病期を決定するために患者の血清で自己抗体の存在を識別及び定量するために用いることができるだけでなく、肝臓癌の特異的な治療のためにこれらのマーカーを標的とする医薬を開発するためにもまた有用である。

【 図 1 】



【 図 2 】

スポット	タンパク質	MW (kD)
1	Bmi1	37
2	VCC1	13.6
3	SUMO-4	11
4	RhoA	22
5	TXN	12
6	ET-1	24
7	UBE2C	20
8	HDGF2	74
9	FGF21	20
10	LECT2	16
11	SOD1	16
12	STMN4	22
13	ミッドカイン	19
14	IL-17A	17.5
15	IL-26	20

FIG. 2

【 図 3 】

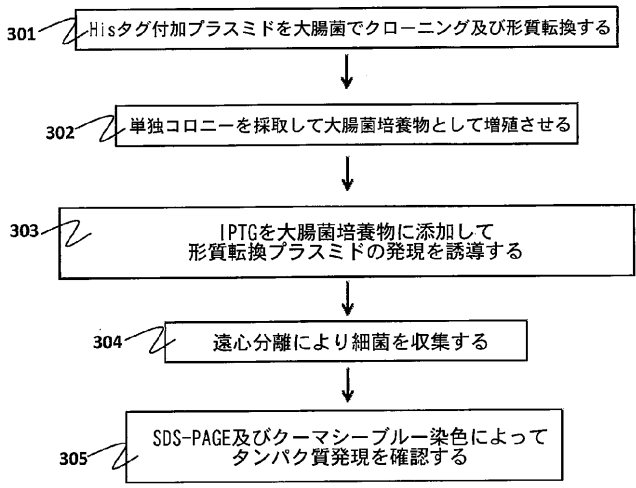


FIG. 3

【 図 4 】

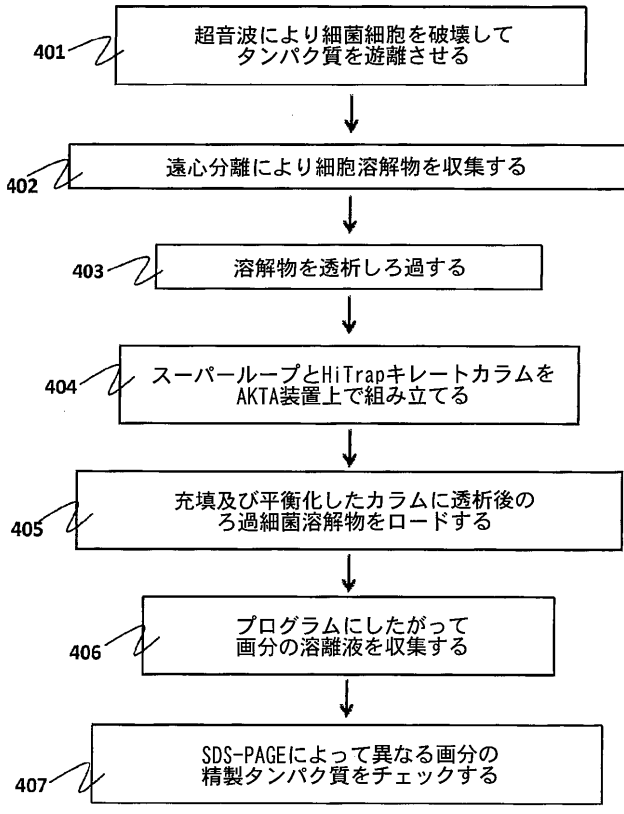


FIG. 4

【 図 5 】

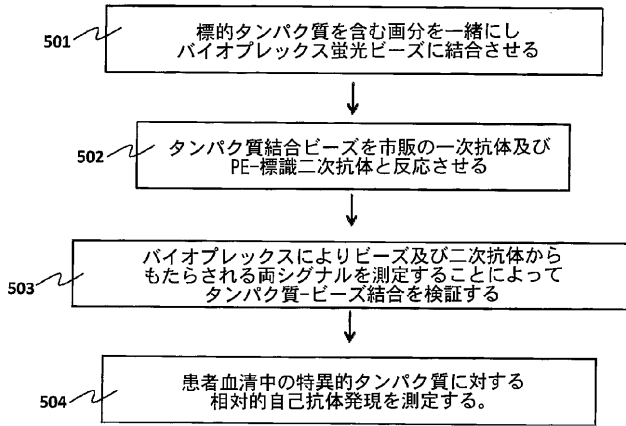
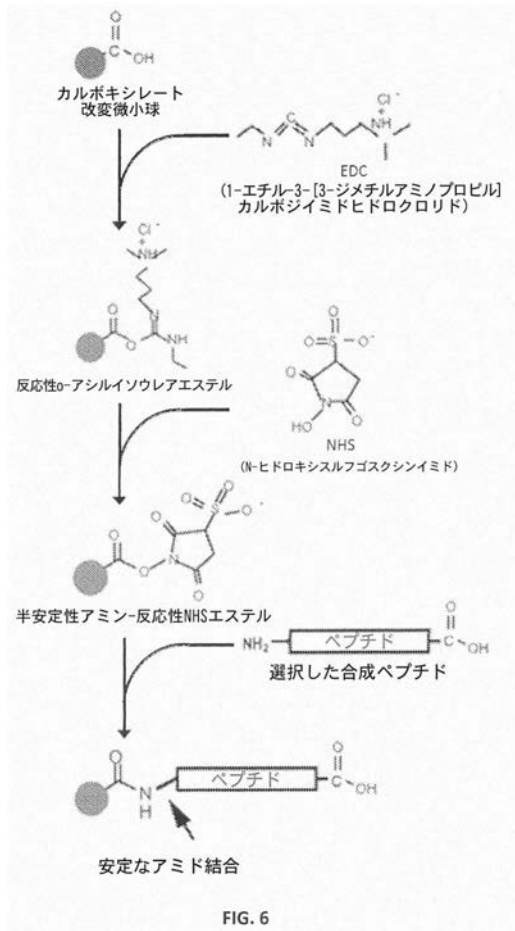
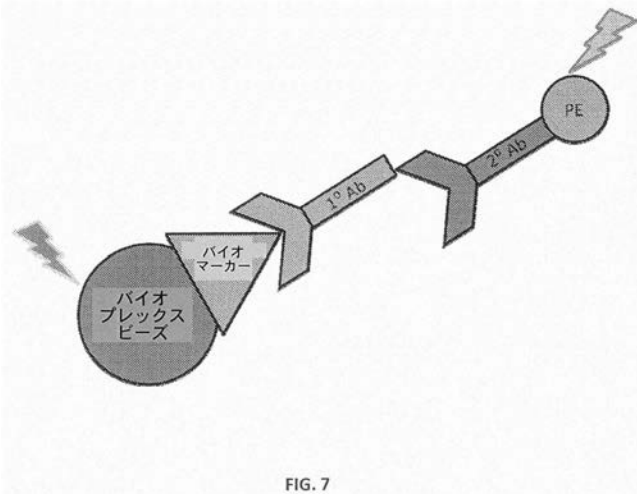


FIG. 5

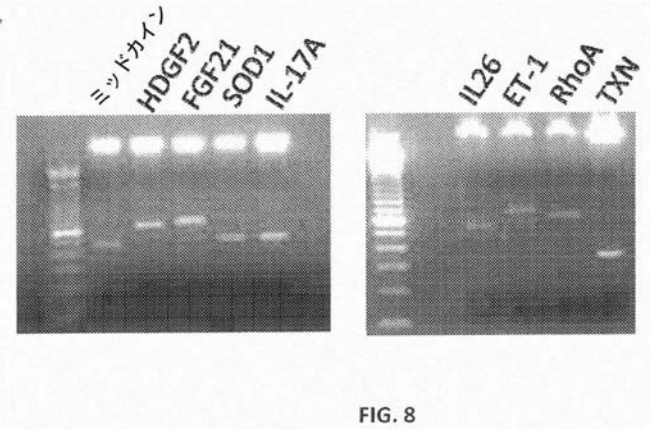
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】

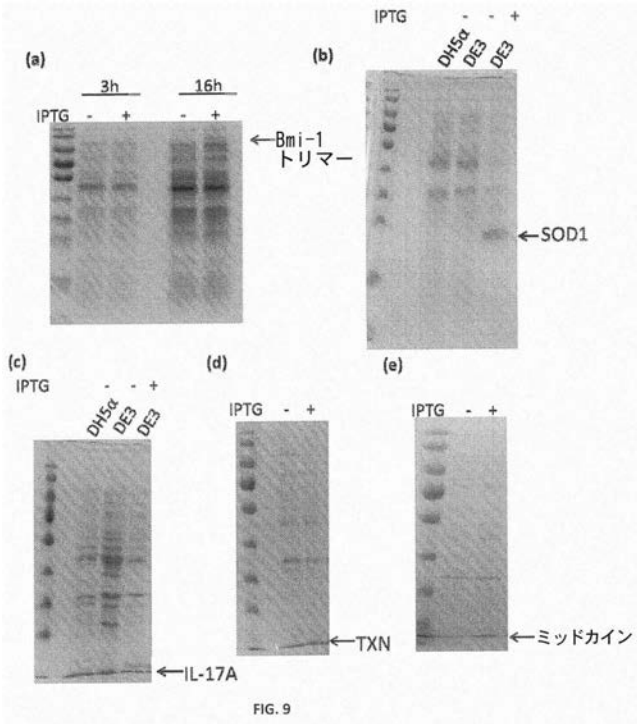


FIG. 9

【 図 10 (a) 】

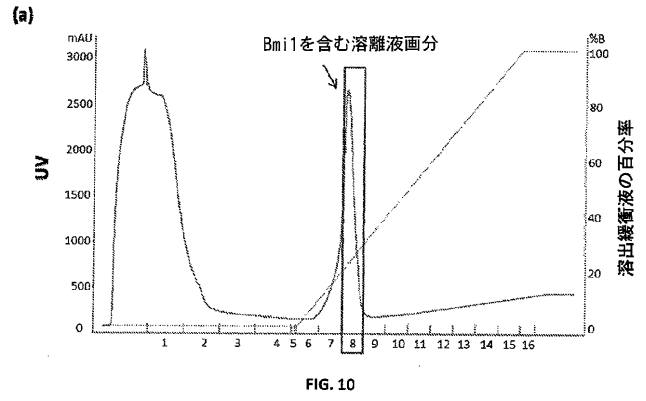


FIG. 10

【 図 10 (b) 】

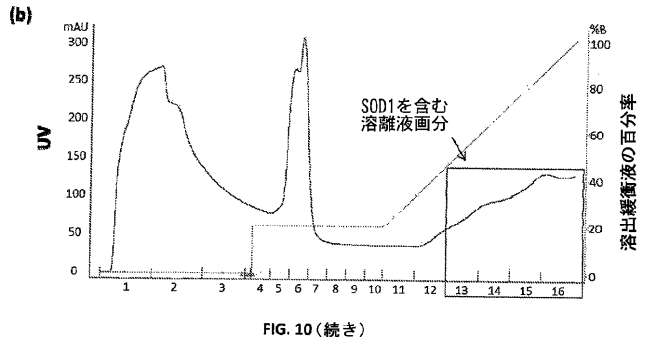


FIG. 10(続き)

【 図 10 (c) 】

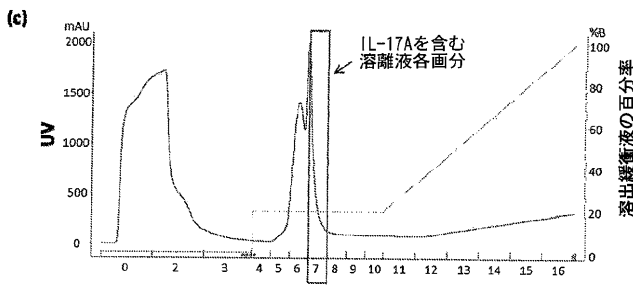


FIG. 10(続き)

【 図 11 (b) 】

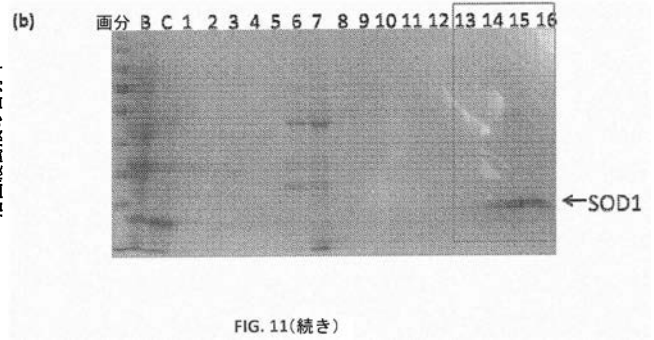


FIG. 11(続き)

【 図 11 (c) 】

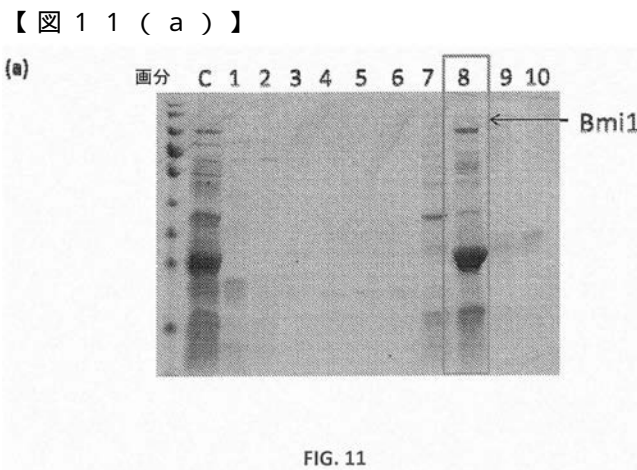


FIG. 11

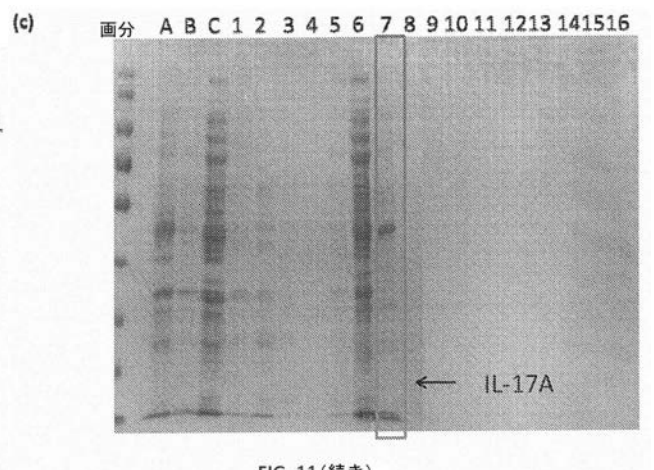


FIG. 11(続き)

【 図 1 2 】

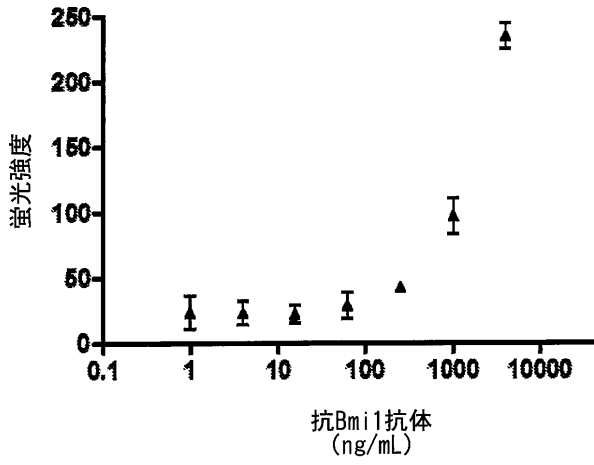


FIG. 12

【 図 1 3 】

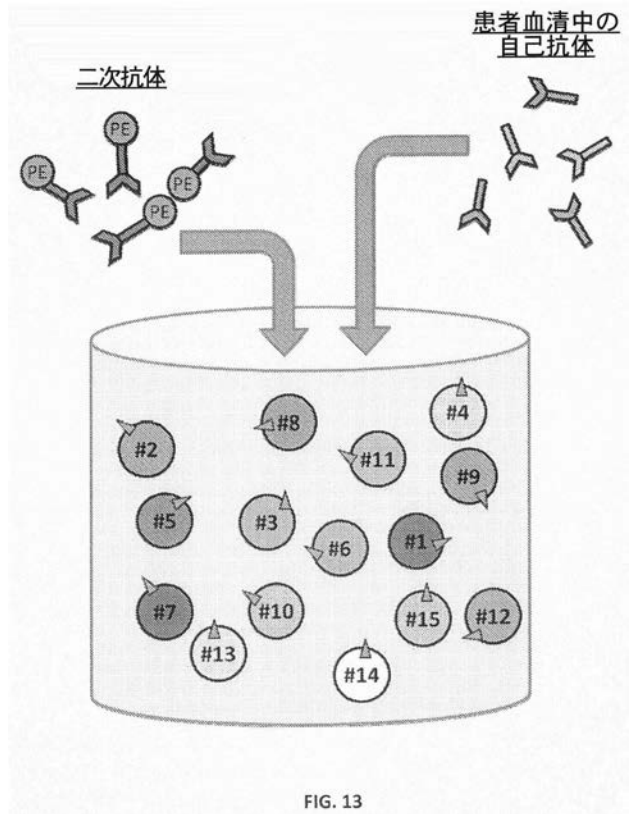


FIG. 13

【 配 列 表 】

[2017520763000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US14/49038
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/52, 33/53, 55/537 (2015.01) CPC - G01N 33/53, 33/537, 33/543 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): G01N 33/52, 33/53, 55/537, 33/538, 33/543 (2015.01) CPC: G01N 33/53, 33/537, 33/543 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO); Google Scholar; Dialog ProQuest; Entrez PubMed; liver, hepatic, tumor, cancer, malignancy, neoplasia, bead, sphere, 'cdNA', 'rt-PCR', 'ng/ml', 'pg/ml', 'B/ml-1', 'VCC1', 'SUMO-4', 'RhoA', 'TXN', 'ET-1', 'UBE2C', 'HDGF2', 'FGF21', 'FGF-21', 'LECT2', 'SOD1', 'STMN4', 'Midkine', 'IL-17A', 'IL-26'		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y — A	US 2004/0059519 A1 (CHANDLER, VS et al.) March 25, 2004; paragraphs [0022], [0029], [0177], [0092], [0090], [0429], [0091], [0024], [0025], [0028], [0034], [0037], [0199], [0181], [0338], Claims 20, 26	1-6, 8-12, 14-16 — 7, 13
Y — A	US 2004/0241653 A1 (FEINSTEIN, E. et al.) 2 December 2004; paragraphs [0008], [0058], [0010], [0040], [0038], [0197], [0161]	1-6, 8-12, 14-16 — 7, 13
Y	US 8153421 B2 (MAITLAND, NJ et al.) April 10, 2012; abstract, figure 3, column 10, lines 17-23, SEQ ID NO: 1	6, 12
Y	US 8512963 B2 (GRAHAM, DR et al.) August 20, 2013, column 1, lines 52-54, column 2, lines 52-58, SEQ ID NO: 3	6, 12
Y	US 2012/0077688 A1 (BERGO, VB, et al.) March 29, 2012, paragraphs [0045], [0046], [0036], [0092], [0179]	8, 14
Y	SALAMA O, et al. Chemiluminescent Optical Fiber Immunosensor For Detection Of Autoantibodies To Ovarian And Breast Cancer-Associated Antigens. Biosensors and Bioelectronics. 09 August 2006, Vol 22; pages 1508-1516. abstract.	10, 16
A	WO 2012/115885 A1 (CARIÉ LIFE SCIENCES LUXEMBOURG HOLDINGS, S.A.R.L.) August 30, 2012; paragraphs [0019], [00785], [001086], [00961], [00655], [00424], [00469] Tables 5, 9	7, 13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 January 2015 (30.01.2015)		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">19 FEB 2015</div>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: <div style="text-align: center;">Shane Thomas</div> PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/49038

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
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.:
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:

-**-Please See Supplemental Page-**-

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:

Group I: Claims 1-5, 6 (in-part), 7-11, 12 (in-part), 13-16 + SEQ ID NO: 1
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

International application No.

PCT/US14/49038

-***-Continued from Box No. III: Observations Where Unity of Invention Is Lacking:

The method and kit for diagnosing and staging liver cancers by detecting and quantifying auto-antibodies from patients against a plurality of tumor biomarkers will be searched to the extent that the plurality of biomarkers encompass the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (Homo sapiens amino acid sequence). It is believed that Claims 1-5, 6 (in-part), 7-11, 12 (in-part) and 13-16 encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (Homo sapiens amino acid sequence). Additional marker sequences can be searched upon the payment of additional fees. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An Exemplary Election would be: a marker comprising the sequence of SEQ ID NO: 2 (Homo sapiens amino acid sequence).

Groups I+ share the technical features including a method for detecting and quantifying auto-antibodies against a plurality of tumor biomarkers aiming for diagnosing and staging liver cancers comprising: comparing tumor cells with normal cells to evaluate a set of proteins which is unique in tumor cells but not in normal cells as a plurality of specific biomarkers for said cancers; identifying the set of proteins from paired patients' biopsy samples by using a two-dimensional or mass spectrometry based technique; validating the set of proteins for diagnosis of liver cancers, wherein the set of proteins are expressed from cDNA clones, purified and coupled to fluorescent microsphere beads with different emission wavelengths to form a protein-bead conjugate, wherein the auto-antibodies present in patients' sera against the set of proteins immunologically bind to the protein-bead conjugate; and a kit for diagnosing and staging liver cancers by detecting and quantifying auto-antibodies from patients against a plurality of tumor biomarkers, the kit comprising a set of proteins expressed from cDNA clones, purified and coupled to fluorescent microsphere beads with different emission wavelengths to form a protein-bead conjugate for immunologically binding the auto-antibodies and subsequently being targeted by PE-conjugated secondary antibody such that fluorescent signal and intensity are measured to determine level of auto-antibodies in the patients compared with normal subjects.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2004/0059519 A1 to Chandler, et al. (hereinafter 'Chandler') in view of US 2004/0241653 A1 to Feinstein, et al. (hereinafter 'Feinstein').

Chandler discloses a method for detecting (detecting; paragraph [0022]) and quantifying (quantitative analysis (quantifying); paragraph [0029]) auto-antibodies (auto-antibodies; paragraph [0177]; Claim 26) against a plurality of tumor biomarkers (against a panel of tumor markers (against a plurality of tumor biomarkers); paragraph [0092]) aiming for diagnosing (diagnosing; abstract; paragraph [0090]) cancers (tumors and malignancies (cancer); paragraph [0092]; Claim 20) comprising: a set of proteins which is unique in tumor cells but not in normal cells as a plurality of specific biomarkers for said cancers (a tumor marker panel including tumor antigens; paragraph [0092]); wherein the set of proteins are tumor antigens (paragraphs [0091], [0092]), and coupled to (paragraph [0025]) fluorescent (fluorochromic; paragraph [0028]) microsphere (paragraph [0037]) beads (paragraphs [0024], [0028], [0037]) with different emission wavelengths (paragraphs [0024], [0028], [0199]) to form a protein-bead conjugate (paragraphs [0025], [0092]), wherein the auto-antibodies present (wherein autoantibodies in clinical samples; paragraph [0177]; Claim 26) in patient's sera (in patients' sera; paragraph [0181]) against the set of proteins (paragraph [0092], Claim 26) immunologically bind to the protein-bead conjugate (paragraph [0092], Claim 26); and a kit (a commercial kit; paragraph [0033]) for diagnosing (abstract; paragraph [0090]) cancers (tumors and malignancies (cancer); paragraph [0092]; Claim 20) by detecting (paragraph [0022]) and quantifying (quantitative analysis; paragraph [0029]) auto-antibodies from patients (paragraph [0177]; Claim 26) against a plurality of tumor biomarkers (paragraph [0092]), the kit comprising a set of proteins (a panel of tumor markers; paragraph [0092]) coupled to (paragraphs [0025], [0092]) fluorescent (paragraphs [0024], [0028]) microsphere (paragraph [0037]) beads (paragraphs [0024], [0028], [0037], [0092]) with different emission wavelengths (paragraphs [0024], [0028], [0199]) to form a protein-bead conjugate (paragraphs [0025], [0092]; Claim 26) for immunologically binding the auto-antibodies (paragraph [0177], Claim 26) and subsequently being targeted by a conjugated secondary antibody (paragraph [0034]) such that fluorescent signal and intensity are measured (paragraph [0026]) to determine level of auto-antibodies in the patients (paragraph [0177]; Claim 26) and those of normal subjects (biopsies of normal, malignant and suspect tissues; paragraph [0429]); the coupling of purified antigens to microspheres (coupling of purified antigens to microspheres; paragraph [0260]); and wherein the beads (beads; paragraph [0028]) and/or secondary antibodies (secondary antibodies; paragraph [0034]) may comprise PE (phycoerythrin) (may bear the measurement fluorochrome comprising phycoerythrin; paragraphs [0028], [0034]).

Chandler does not disclose staging liver cancers; comparing tumor cells with normal cells to evaluate a set of proteins which is unique in tumor cells but not in normal cells as a plurality of specific biomarkers for said cancers; identifying the set of proteins from paired patients' biopsy samples by using a two-dimensional or mass spectrometry based technique; validating the set of proteins for diagnosis of liver cancers; wherein the set of proteins are expressed from cDNA clones; PE-conjugated secondary antibody.

Feinstein discloses staging (determining the stage of a cancer (staging); paragraph [0008]) liver cancers (paragraph [0058]), comparing tumor cells with normal cells (comparing the level of a polypeptide in a sample from a cancer subject to the level of a polypeptide free of cancer; paragraph [0010]) to evaluate (to identify; paragraph [0008]) a set of proteins which is unique in tumor cells but not in normal cells (tissue-specific tumor markers; paragraphs [0008], [0010]) as a plurality of specific biomarkers for said cancers (paragraphs [0008], [0048]); identifying the set of proteins (detecting polypeptides; paragraph [0030]) from paired patients' biopsy samples (from samples from cancer patients and cancer-free controls; paragraph [0010]) by using a two-dimensional or mass spectrometry based technique (using mass spectrometry; paragraph [0030]); validating the set of proteins for diagnosis (validating the diagnosis using the set of markers; paragraphs [0008], [0035], [0048]) of liver cancers (paragraph [0058]); and wherein the set of proteins are expressed from cDNA clones (monitoring expression of translation products from transcripts, including cDNA produced by RT-PCR; paragraphs [0008], [0014]).

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/49038

***-Continued from Previous Supplemental Page:

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the previous disclosure of Chandler, for implementing the use of a PE-conjugated secondary antibody, in order to amplify the output of a signal produced from PE-comprising nanobeads, for enabling improved detection of low levels the biomarkers. Furthermore, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the previous disclosure of Chandler, for modifying the methods previously disclosed by Feinstein, for establishing a set of biomarkers for a target cancer to be diagnosed or staged, such as liver cancer, as previously disclosed by Feinstein, including purifying the antigens expressed from the identified markers before conjugating said antigens to the beads, as previously disclosed by Chandler, for producing microbeads having a single purified antigen conjugated thereto for accurate and reliable identification of autoantibodies thereto in samples from patients, for enabling the diagnosis and staging of cancer, as well as a subject's capacity to produce anti-tumor autoantibodies, or lack of said capacity, in order to provide an accurate prognosis for the patient.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Chandler and Feinstein references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(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, KM, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信

(74)代理人 100111501
弁理士 滝澤 敏雄

(72)発明者 マン コルネリア ウィン イン
中華人民共和国 香港 ボックフォーラム チー フー ファ ユエン 1エイ ブロック 5

(72)発明者 ウァイ ノーマン ファン マン
カナダ ヴィ6エス 1イー1 ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー ウェスト ナイン
ティーンズ アヴェニュー 3906

(72)発明者 ウァイ ベンジャミン チー イン
カナダ ヴィ5ジェイ 0ビー6 ブリティッシュコロンビア州 バーナビー グレンライオン
パークウェイ 8508 ユニット 168

(72)発明者 ウォン ビン ルー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92606 アーバイン サウス モール ストリート 3
592

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB15 BB17 CC13 FA12

专利名称(译)	特异性生物标志物用于肝癌的无创诊断		
公开(公告)号	JP2017520763A	公开(公告)日	2017-07-27
申请号	JP2016571689	申请日	2014-07-31
[标]发明人	マンコルネリアウインイン ウアイノーマンファンマン ウアイベンジャミンチーイン ウォンビンルー		
发明人	マン コルネリア ウイン イン ウアイ ノーマン ファン マン ウアイ ベンジャミン チー イン ウォン ビン ルー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 G01N33/543 C12M1/34		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/57438 G01N33/57488 G01N33/582 G01N33/6803 G01N33/6863 G01N33/6869 A61P35/00 G01N33/564 G01N2800/56 G01N2800/60 G01N33/57484		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/574.A G01N33/543.541.Z C12M1/34.ZNA.F		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB15 4B029/BB17 4B029/CC13 4B029/FA12		
代理人(译)	西岛隆义 田中真一郎 山崎 一夫 服部博信		
优先权	14/321867 2014-07-02 US 14/321870 2014-07-02 US		
其他公开文献	JP2017520763A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

当与紧邻肿瘤的正常肝组织的上皮细胞相比时，肝肿瘤块内的细胞含有一组独特的蛋白质/肿瘤抗原。肿瘤抗原的存在与针对这些肿瘤抗原的自身抗体的产生是一致的。本发明涉及蛋白质组的鉴定和阐明，该蛋白质组可以用作用于肝癌的诊断和预后的新型标记物组。特别地，本发明涉及试剂盒，其允许诊断和预后确定肝癌患者血清中的自身抗体。本发明验证了肝癌蛋白/肿瘤抗原集 (Bmi1 , VCC1 , SUMO-4 , RhoA , TXN , ET-1 , UBE2C , HDGF2 , FGF21 , LECT2 , SOD1 , STMN4 , midkine , IL-17A和IL26。 (包括) 提供了非侵入性，特异性，灵敏且具有成本效益的检测和定量方法，并补充了常规诊断方法。

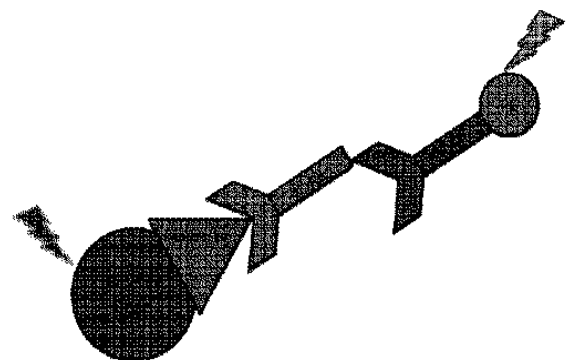


FIG. 7