

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6096813号
(P6096813)

(45) 発行日 平成29年3月15日 (2017.3.15)

(24) 登録日 平成29年2月24日 (2017.2.24)

(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 W
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 C
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/545 A
請求項の数 23 (全 16 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2014-559839 (P2014-559839)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月8日 (2013.3.8)
 (65) 公表番号 特表2015-511002 (P2015-511002A)
 (43) 公表日 平成27年4月13日 (2015.4.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2013/001911
 (87) 国際公開番号 W02013/133675
 (87) 国際公開日 平成25年9月12日 (2013.9.12)
 審査請求日 平成26年9月2日 (2014.9.2)
 (31) 優先権主張番号 10-2012-0023703
 (32) 優先日 平成24年3月8日 (2012.3.8)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 514222503
 バイオメディアン カンパニー リミテッド
 大韓民国, 462-807 キョンギード,
 ソンナムーシ, チュンウォンーグ, サギ
 マクコルーロ, 137, #802
 (73) 特許権者 514222499
 ソウル ナショナル ユニバーシティ ア
 ール アンド ディービー ファウンデー
 ション
 大韓民国, 151-010 ソウル, クア
 ナクーク, クアナンーロ, 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳癌診断用マルチバイオマーカーセット、その検出方法、及びそれに対する抗体を含む乳癌診断キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 の配列を有するアポリポタンパク質 C 1、配列番号 2 の配列を有するアポリポタンパク質 (a)、配列番号 3 の配列を有する神経細胞接着分子 L 1 類似タンパク質、配列番号 4 の配列を有する炭酸脱水酵素 1、及び配列番号 5 の配列を有するフィブロネクチンの、タンパク質マーカーからなる、乳癌診断用バイオマーカーセット。

【請求項 2】

非患者対照群に比べてアポリポタンパク質 C 1 の発現量の減少、アポリポタンパク質 (a) の発現量の増加、神経細胞接着分子 L 1 類似タンパク質の発現量の増加、炭酸脱水酵素 1 の発現量の増加、及びフィブロネクチンの発現量の増加が乳癌の発病を示す、請求項 1 に記載の乳癌診断用バイオマーカーセット。

【請求項 3】

三重四極子質量分析計を利用した多重反応モニタリング (Multiple Reaction Monitoring) により血液試料から請求項 1 に記載の乳癌診断用バイオマーカーセットを検出する方法。

【請求項 4】

1) 被検者の血液試料及び対照群血液試料のタンパク質をペプチド切片にする段階と ;
 2) 前記ペプチド切片を三重四極子質量分析計に注入してアポリポタンパク質 C 1、アポリポタンパク質 (a)、神経細胞接着分子 L 1 類似タンパク質、炭酸脱水酵素 1、及びフィブロネクチンをそれぞれ代表するターゲットペプチドに対して多重反応モニタリングを

行う段階と；

3) 前記多重反応モニタリングの結果を内部標準物質に対する割合にて表示する段階；及び

4) 被検者と対照群に対する検出結果を比較する段階とを含むことを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項5】

アポリポタンパク質C-1を代表するターゲットペプチドは配列番号6の配列を有し、ターゲットペプチドの親イオン/娘イオンの対はそれぞれm/z 526.8とm/z 605.3であり、アポリポタンパク質(a)を代表するターゲットペプチドは配列番号7の配列を有し、ターゲットペプチドの親イオン/娘イオンの対はそれぞれm/z 521.8とm/z 634.3であり、神経細胞接着分子L1類似タンパク質を代表するターゲットペプチドは配列番号8の配列を有し、ターゲットペプチドの親イオン/娘イオンの対はそれぞれm/z 642.8とm/z 836.4であり、炭酸脱水酵素1を代表するターゲットペプチドは配列番号9の配列を有し、ターゲットペプチドの親イオン/娘イオンの対はそれぞれm/z 485.8とm/z 758.4であり、フィブロネクチンを代表するターゲットペプチドは配列番号10の配列を有し、ターゲットペプチドの親イオン/娘イオンの対はそれぞれm/z 555.8とm/z 821.4であることを特徴とする請求項4に記載の方法。

10

【請求項6】

内部標準物質として大腸菌-ガラクトシダーゼが用いられ、大腸菌-ガラクトシダーゼを代表するターゲットペプチドは配列番号11の配列を有し且つ親イオンと娘イオンはそれぞれm/z 542.3とm/z 636.3であることを特徴とする請求項4または5に記載の方法。

20

【請求項7】

試料は血漿または血清であることを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項8】

多重反応モニタリング技法を用いて血液試料から請求項1に記載の乳癌診断用バイオマーカーセットを検出するために必要な各タンパク質のターゲットペプチド及びターゲットペプチドの親イオン/娘イオンの対に関する情報を含む、乳癌診断キット。

【請求項9】

乳癌診断タンパク質マーカーであるアポリポタンパク質C1、アポリポタンパク質(a)、神経細胞接着分子L1類似タンパク質、炭酸脱水酵素1及びフィブロネクチンのそれぞれに特異的に結合する抗体を含み、血液試料から前記タンパク質マーカーを検出するためのものである乳癌診断キット。

30

【請求項10】

前記抗体が多クローン抗体または単クローン抗体であることを特徴とする請求項9に記載の乳癌診断キット。

【請求項11】

基質との反応によって発色する標識体が接合された二次抗体接合体；前記標識体と発色反応する発色基質溶液；洗浄液；及び酵素反応停止液をさらに含むことを特徴とする請求項9に記載の乳癌診断キット。

40

【請求項12】

二次抗体接合体の標識体がHRP(horseradish peroxidase)、アルカリフォスファターゼ(alkaline phosphatase)、コロイドゴールド(colloid gold)、蛍光物質(fluorescein)、及び色素(dye)からなる群より選ばれることを特徴とする請求項11に記載の乳癌診断キット。

【請求項13】

発色基質がTMB(3,3',5,5'-テトラメチルベジジン)、ABTS[2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)]及びOPD(o-フェニレン

50

ジアミン) からなる群より選ばれることを特徴とする請求項 1 1 に記載の乳癌診断キット。

【請求項 1 4】

前記バイオマーカーのそれぞれに特異的に結合する抗体を利用した抗原-抗体結合反応によって、血液試料から、請求項 1 に記載のバイオマーカーセットを検出する方法。

【請求項 1 5】

1) 被検者の血液試料及び対照群血液試料のタンパク質を固定体にコートするか固定させる段階と；

2) 前記固定体に前記バイオマーカーセットのそれぞれのタンパク質に特異的な抗体を添加して抗原-抗体結合反応を行う段階と；

3) 前記抗原-抗体結合反応によって生成された抗原-抗体結合反応物を二次抗体接合体 (conjugate) 及び発色基質溶液を利用して検出する段階；及び

4) 被検者血液試料と対照群血液試料に対する検出結果を比較する段階とを含むことを特徴とする請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

段階 3) の発色基質が TMB、ABTS 及び OPD からなる群より選ばれることを特徴とする請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

段階 1) の血液試料が血清または血漿であることを特徴とする請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

段階 1) の固定体がニトロセルロース膜、PVDF 膜、ポリビニル (polyvinyl) またはポリスチレン (polystyrene) 樹脂で合成されたウェルプレート、及びガラスからなるスライドガラスからなる群より選ばれることを特徴とする請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 9】

段階 2) の前記抗原-抗体結合反応が酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay、ELISA)、放射能免疫測定法 (radioimmunoassay、RIA)、サンドイッチ測定法 (sandwich assay)、ウェスタンブロットティング、免疫沈降法、免疫組織化学染色法 (immunohistochemical staining)、蛍光免疫法、酵素基質発色法、抗原-抗体凝集法からなる群より選ばれることを特徴とする請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 0】

段階 3) の二次抗体接合体の標識体が HRP、アルカリフォスファターゼ、コロイドゴールド、蛍光物質、及び色素からなる群より選ばれることを特徴とする請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記タンパク質マーカーのそれぞれに特異的に結合する抗体を含む、請求項 1 に記載のバイオマーカーセットを検出するための乳癌診断試薬。

【請求項 2 2】

アポリポタンパク質 C 1、アポリポタンパク質 (a)、神経細胞接着分子 L 1 類似タンパク質、炭酸脱水酵素 1 及びフィブロネクチン のそれぞれに特異的に結合する抗体が固形基質に集積された乳癌診断用バイオチップ。

【請求項 2 3】

固形基質はプラスチック、ガラス、金属、及びシリコンからなる群より選ばれることを特徴とする請求項 2 2 に記載のバイオチップ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は乳癌診断に関する。より具体的に、本発明は血液から乳癌発病の有無を選択的

10

20

30

40

50

に診断することができるマルチバイオマーカーセット及びその検出方法、及びそれを特異的に認識する抗体を含む乳癌診断キットに関する。

【背景技術】

【0002】

乳癌の原因については明確に解明されていないが、女性ホルモン、家族力、過去力、出産力、食生活習慣などの様々な因子が挙げられている。2005年統計庁の調査によると、韓国女性の乳癌の発病が最近急増しており、1998年に子宮頸部癌を追い越して以来、2001年には、発病した韓国女性癌患者の16.1%を占めるなど、胃癌を追い抜いて女性癌1位になった。特に、2002年には2001年比べて乳癌(11.1%)が最も急増した癌であると示され、低出産、短い授乳期間、早い月経、遅い閉経などの生理的に旺盛な身体的変化を経験する時期の女性では女性ホルモンの刺激を受ける回数の急激な増加による乳腺組織の敏感度の増加、食生活の西欧化、生活環境の汚染などの理由から乳癌の発病が急増している。

10

【0003】

このような乳癌の発病率及び乳癌による死亡率の増加は、現在の西欧化実態からみて、今後も相当期間持続すると予想される。乳癌は癌細胞の成長による周辺組織への浸潤またはリンパ節転移などの症状をきたすのが普通であるが、その大半は何らの症状がなくても自己検診にて診断することができる。したがって、乳癌による死亡率を減らすためには、乳癌を有効に早期診断するのが何より重要である(Tuli et al., Breast J. 12: 343-348, 2006)。

20

【0004】

乳癌を診断するために様々な方法が複合的に用いられており、現在までのところ、乳癌患者の70%が自己診断によって来院している。しかし、このような自己診断方法では悪性腫瘍と良性腫瘍とを区分するのが非常に難しいという不具合がある。その他、乳癌の診断方法としてX線乳房撮影法、超音波検査法、微細針吸引細胞検査法、磁気共鳴撮影法などがあり、最終的には組織検査により確認するのが重要である。X線乳房撮影法はX線で乳房を撮影して検査する方法であって、腫瘍が良性なのか悪性なのかを鑑別するうえで優れているだけでなく、隠れている腫瘍を発見する方法として、自己診断で腫瘍が感じられる以前に初期乳癌を診断するうえで最も有効な方法である。しかし、乳房撮影法は若い女性のように乳腺が多く発達していたり、乳房が小さく繊維質の多い我が国の女性には診断率が落ちるといった短所があり、また頻りに撮影するとむしろ乳癌が誘発されることもあるという不具合がある。このような乳房撮影法の代案として超音波検査法が用いられているが、該超音波検査法は、結節腫と硬い腫瘍とを区別するうえでは効果的であるが、悪性腫瘍と良性腫瘍とを鑑別する能力に劣る。

30

【0005】

このような既存の診断方法の短所を補完するための方法として、患者の血液から腫瘍標識子(marker)の濃度を測定して乳癌を診断しようとする試みがあった(Clinton et al., Biomed Sci. Instrum. 39: 408-414, 2003; Rui et al., Proteomics. 3: 433-439, 2003; Soletormos et al., 48: 229-255, 2001)。しかし、このような腫瘍標識子の診断的または予後因子としての価値が研究されているものの、未だ制限的に用いられているだけであって、公式的に勧奨されている乳癌標識子はないのが実情である。

40

そこで、本発明者らは、乳癌患者の血液で特異的に量が変化するマーカータンパク質を乳癌の診断に利用する方法を開発するために鋭意研究を重ねた結果、複数のバイオマーカーからなるマーカーセットの乳癌による変化パターンを比較することが、単一のバイオマーカーの変化による方法よりも乳癌を効果的に診断することができるという事実を見出し、このような複数のタンパク質マーカーを効率的に追跡するために多重反応モニタリング技法にてそれぞれのバイオマーカータンパク質を代表することができるペプチドの発現程度をモニタリングすることにより、乳癌を簡易に診断することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、本発明の目的は、血液中に存在する複数のバイオマーカセットの乳癌発病の有無による変化様相を用いて簡易に乳癌を確認することができる方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

前記目的を達成するために、本発明は、乳癌診断用タンパク質マーカセットを提供する。

【0008】

また、本発明は、三重四極子質量分析計を利用した多重反応モニタリングにより血液試料から前記バイオマーカセットを検出する方法を提供する。

さらに、本発明は、前記バイオマーカセットを構成するそれぞれのマーカに特異的な抗体を含む乳癌診断キットを提供する。

さらにまた、本発明は、前記バイオマーカセットを構成するそれぞれのマーカに特異的な抗体を利用した抗原-抗体結合反応によって血液試料から前記バイオマーカセットを検出する方法を提供する。

【0009】

以下、本発明を詳しく説明することにする。

【0010】

本発明の一態様に従い、本発明は、乳癌診断のための、下記の表1に表された5種のタンパク質マーカのうちの2種以上からなるバイオマーカセットを提供する。好ましくは、本発明のバイオマーカセットは、下記の5種のタンパク質マーカのうちの3種からなり、より好ましくは4種からなり、最も好ましくは5種のタンパク質マーカからなる。

【0011】

【表1】

認識番号	MRM ratio (cancer/normal)		ターゲットタンパク質
	乳癌	第1期乳癌	
BM0001	0.71	0.69	アポリポタンパク質C-1
BM0002	1.35	2.01	アポリポタンパク質(a)
BM0003	1.43	1.4	神経細胞接着分子L1類似タンパク質
BM0004	1.6	1.61	炭酸脱水酵素1
BM0005	1.56	1.54	フィブロネクチン
BM0006	内部標準物質		大腸菌β-ガラクトシダーゼ

【0012】

本発明のバイオマーカセットを構成する第一のタンパク質は配列番号1に示されるアポリポタンパク質C1であって、これは遊離脂肪酸と結合して細胞中でこれらのエステル化を減少させる(Westerterp M. et al., J. Lipid Res., 48:1353-1361, 2007)。第二のタンパク質は配列番号2に示されるアポリポタンパク質(a)であって、これはセリンプロテイナーゼの活性を有しており自己タンパク質分解作用をしたりもする(Salonen E.M. et al., EMBO J., 8:4035-4040, 1989)。第三のタンパク質は配列番号3に示される神経細胞接着分子L1類似タンパク質であって、これは細胞の外基質と細胞との粘着に関するタンパク質であって、主に神経系の発達とシナプス可塑性において重要な役割をする(Wei M.H. et al., Hum. Genet., 103:355-364, 1998)。第四のタンパク質は配列番号4に示される炭酸脱水酵素1であって、これは二酸化炭素の可逆的水和反応とシアナミドを水和してユレアに変形させる(Briganti F. et al., J. Biol. Inorg. Chem., 4:528-536, 1999)。最後の第五のタンパク質は配列番号5に示されるフィブロネクチンであって、これは細胞と基質の接着に際してタンパク質付着を提供し細胞を膠質側へ浸透させる機

10

20

30

40

50

能をする (Morla A. et al., Nature, 367:193-196, 1994)。

【0013】

一方、三重四極子質量分析計 (triple quadrupole mass spectrometry) を利用した多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring; MRM) は、特定の分析物質を選択的に分離して検出し定量することでその濃度変化をモニタリングすることができる分析技法である。MRM は既に小さい分子の定量分析に活用され特定の遺伝病の診断に用いられてきている。MRM 技法は多数のペプチドの同時測定が容易であり、且つ標準品や抗体なしで正常人と癌患者間でのタンパク質診断マーカー候補の相対的濃度の差を確認することができるという長所がある。また感度と選択性に優れ、特に、質量分析計を利用したプロテオーム分析にて血液中にある複雑なタンパク質とペプチドの分析のために MRM 分析技法が導入されている (Anderson L. et al., Mol Cell Proteomics, 5: 375-88, 2006; DeSouza, L. V. et al., Anal. Chem., 81: 3462-70, 2009)。

10

【0014】

本発明者らは、乳癌患者の血液で特異的にその量が変化して乳癌の診断に有用に用いることができる診断マーカータンパク質セットを選抜するために、80名の乳癌患者と80名の非患者対照群から血液試料を得、三重四極子質量分析計を利用した多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring; MRM) を行うことで定量分析した。その結果、アポリポタンパク質 C1、アポリポタンパク質 (a)、神経細胞接着分子 L1 類似タンパク質、炭酸脱水酵素 1、及びフィブロネクチンが、非患者対照群の血液に比べて乳癌患者の血液で量の変化が見られ、これにより、乳癌患者を効果的に区分可能であることを確認した。

20

【0015】

本発明で確認された5種のタンパク質のうち2種以上からなるマルチバイオマーカーセットを乳癌診断のために使用した場合、相互補完によって一層優れた診断正確性を確保することができ、特に、5種タンパク質からなるマルチバイオマーカーセットは単一のマーカーとは比べ物にならないほど優れた診断正確性を確保することができるようになる。また、前記マーカータンパク質セットは、血液から検出が可能であることから生検 (biopsy) を行わなくて済み、その結果、患者に不便をかけることなく簡易な方法にて乳癌を診断するのに活用することができる。

30

【0016】

本発明の他の態様に従い、本発明は、三重四極子質量分析計を利用した多重反応モニタリングによって血液試料からアポリポタンパク質 C1、アポリポタンパク質 (a)、神経細胞接着分子 L1 類似タンパク質、炭酸脱水酵素 1、及びフィブロネクチンのうちの2種以上のタンパク質マーカーを検出する方法を提供する。

【0017】

好ましくは、本方法は、

- 1) 被検者の血液試料及び対照群血液試料のタンパク質をペプチド切片にする段階と;
- 2) 前記ペプチド切片を三重四極子質量分析計に注入してアポリポタンパク質 C1、アポリポタンパク質 (a)、神経細胞接着分子 L1 類似タンパク質、炭酸脱水酵素 1、及びフィブロネクチンをそれぞれ代表するターゲットペプチドのうち2種以上に対して多重反応モニタリングを行う段階;
- 3) 前記多重反応モニタリング結果を内部標準物質に対する割合にて表示する段階; 及び
- 4) 被検者と対照群に対する検出結果を比較する段階とを含む。

40

【0018】

本発明の一実施例によれば、被検者の血液試料を採取し、前記アポリポタンパク質 C1、アポリポタンパク質 (a)、神経細胞接着分子 L1 類似タンパク質、炭酸脱水酵素 1、及びフィブロネクチンのうちの2種以上を被検者の血液試料から MRM 技法にて検出し、非患者対照群の検出結果と比較することでタンパク質量の増減の有無を確認することにより、乳癌の発病の有無を確認することができ、好ましくは、アポリポタンパク質 C1、ア

50

ポリポタンパク質 (a)、神経細胞接着分子 L 1 類似タンパク質、炭酸脱水酵素 1、及びフィブロネクチンを被検者の血液試料から M R M 技法にて検出し、非患者対照群の検出結果と比較することで前記 5 種のタンパク質マーカーの量の増減の有無を確認することにより、乳癌の発病の有無を確認することができる。

【 0 0 1 9 】

本発明の目的上、ターゲットタンパク質を M R M 技法にて検出するためには、各タンパク質を代表することができる特定のペプチドの選定と各ペプチドの M R M モニタリングターゲットである親イオン / 娘イオンの対の選定が先に行われる必要がある。本発明の 5 種のマーカータンパク質の場合、アポリポタンパク質 C - 1 を代表するターゲットペプチドは配列番号 6 の配列を有し、ターゲットペプチドの親イオン / 娘イオンの対はそれぞれ m / z 5 2 6 . 8 と m / z 6 0 5 . 3 であり、アポリポタンパク質 (a) を代表するターゲットペプチドは配列番号 7 の配列を有し、ターゲットペプチドの親イオン / 娘イオンの対はそれぞれ m / z 5 2 1 . 8 と m / z 6 3 4 . 3 であり、神経細胞接着分子 L 1 類似タンパク質を代表するターゲットペプチドは配列番号 8 の配列を有し、ターゲットペプチドの親イオン / 娘イオンの対はそれぞれ m / z 6 4 2 . 8 と m / z 8 3 6 . 4 であり、炭酸脱水酵素 1 を代表するターゲットペプチドは配列番号 9 の配列を有し、ターゲットペプチドの親イオン / 娘イオンの対はそれぞれ m / z 4 8 5 . 8 と m / z 7 5 8 . 4 であり、フィブロネクチンを代表するターゲットペプチドは配列番号 1 0 の配列を有し、ターゲットペプチドの親イオン / 娘イオンの対はそれぞれ m / z 5 5 5 . 8 と m / z 8 2 1 . 4 である。

【 0 0 2 0 】

また、ターゲットタンパク質を検出するために M R M 技法にてモニタリングする一部のアミノ酸が安定同位元素で置換された特定のペプチドを合成し、M R M 分析の際に内部標準物質として使用すると、ターゲットタンパク質の血液中の絶対量も測定することができる、より正確な分析結果を導出することができる。本発明における内部標準物質は、M R M 分析の際に一般に用いられる任意の内部標準物質が用いられてよく、例えば、大腸菌 - ガラクトシダーゼが用いられてよい。ターゲットタンパク質の血液中の絶対量を測定するために一部のアミノ酸が安定同位元素で置換された特定のペプチドを内部標準物質として合成する場合、同位元素で置換されたアミノ酸はリジン (L y s i n e) やアルギニン (A r g i n i n e) が好ましいが、これらに制限されるものではない。合成されたペプチドは、9 5 % 以上の純粋分離されたペプチドを用いることが好ましい。本発明に係る 5 種のタンパク質マーカーのうち 2 種以上からなるバイオマーカーセットを M R M 技法にて検出する方法は、患者の血液を用いるといった新規な診断技法であって、感度性に優れるだけでなく、抗原抗体を用いる既存の免疫化学的方法よりも検出したいタンパク質に対する選択性が極めて高く且つ生検を用いることなく血液を対象に簡易に分析することができ、また単一のマーカーを利用するものに比べて乳癌発病の有無の確認正確度が遥かに優れ、その結果、乳癌の早期診断に有用に用いることができる。

【 0 0 2 1 】

また、本発明は、M R M 技法にて前記 5 種のタンパク質マーカーのうち 2 種以上からなるバイオマーカーセットを血液試料から検出するための診断キットを提供する。本診断キットは、M R M 技法にてアポリポタンパク質 C 1、アポリポタンパク質 (a)、神経細胞接着分子 L 1 類似タンパク質、炭酸脱水酵素 1、及びフィブロネクチンのうち 2 種以上のタンパク質マーカーを検出するために必要な 2 種以上のタンパク質のそれぞれのターゲットペプチド及び該ターゲットペプチドの親イオン / 娘イオンの対に関する情報を含み、当分野において質量分析の際に一般に使用される道具、試薬などが含まれる。最も好ましくは、本診断キットは、前記 5 種のタンパク質マーカーのいずれものためのターゲットペプチドと該ターゲットペプチドの親イオン / 娘イオンの対に関する情報を含む。

【 0 0 2 2 】

一方、本発明に係るバイオマーカーセットは、M R M 技法だけでなく、抗原 - 抗体結合

反応によっても血液試料から検出することができる。したがって、本発明に係る他の態様に従い、本発明は、アポリポタンパク質C 1、アポリポタンパク質(a)、神経細胞接着分子L 1類似タンパク質、炭酸脱水酵素1、及びフィブロネクチンのそれぞれに特異的な抗体のうちの2種以上の抗体を含み、血液試料から2種以上のタンパク質マーカーを検出するための乳癌診断試薬及び乳癌診断キットを提供する。好ましくは、本発明に係る診断試薬及び診断キットは、前記5種のタンパク質マーカーのそれぞれに特異的な抗体のうちの3種の抗体を含み、より好ましくは、4種の抗体を含み、最も好ましくは、5種の抗体を含む。

【0023】

前記タンパク質マーカーのそれぞれに選択的に結合する抗体を製造するためには、前記タンパク質マーカーの入手が先に行われる必要があり、これは、本発明の配列番号1～配列番号5のアミノ酸配列を用いて合成するかまたは遺伝子組み換えを用いて微生物から産生することができ、または血液から直接分離して準備することもできる。

【0024】

本発明の目的上、前記抗体は、多クローン抗体及び単クローン抗体をいずれも含んでいてよいが、抗原とより特異的に結合することができる単クローン抗体が好ましい。

【0025】

多クローン抗体は、当業者に公知の従来方法に従い、免疫原(antigen)としてのタンパク質マーカーまたはその断片を外部の宿主に注射することで調製してよい。このような外部の宿主としては、マウス、ラット、ヤギ、ウサギのような哺乳動物が挙げられ、免疫原は一般に抗原性を増加させるための補助剤(adjuvant)とともに筋肉内、腹腔内または皮下注射などの方法で投与され、外部の宿主を免疫化させる。免疫化された外部の宿主から定期的に血清を採取し、向上した力価及び抗原に対する特異性を示す血清を回収するか、またはこれらから抗体を分離・精製し、マーカータンパク質に特異的な多クローン抗体を調製することができる。

単クローン抗体は、当業者に公知の融合(fusion)による不滅化された細胞株生成方法(Kohler G. et al., Nature, 256: 495-497, 1975)にて調製することができる。該方法について簡略に説明すると、先ず純粋なマーカータンパク質またはその断片でマウスを免疫化するか、またはそのペプチドを合成してウシ血清アルブミンと結合させてマウスを免疫化する。免疫化されたマウスから分離した抗体-産生Bリンパ球をヒトまたはマウスの骨髓腫細胞と融合して不滅化されたハイブリドーマ細胞を生成する。次いで、酵素免疫測定法(ELISA; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)にてハイブリドーマ細胞の単クローン抗体の生成の有無を調査して陽性クローンを選抜し、これを培養した後、抗体を分離・精製するかまたはマウスの腹腔に注入してから複数を採取して、マーカータンパク質に特異的な単クローン抗体を調製することができる。

【0026】

本発明に係るタンパク質マーカーの検出に用いられる抗体は、2個の全長の軽鎖及び2個の全長の中鎖を有する完全な形態だけでなく、抗体分子の機能的な断片を含む。抗体分子の機能的な断片とは、少なくとも抗原結合能を持っている断片のことを意味し、Fab、F(ab')、F(ab')₂及びFvなどがある。

本発明に係る乳癌診断キットには、5種のタンパク質マーカーのそれぞれを選択的に認知する抗体だけでなく、当分野において免疫学的分析に一般に使用される道具、試薬などが含まれる。

【0027】

本発明の一実施例によれば、前記乳癌診断キットは、5種のタンパク質マーカーのそれぞれに特異的な5種の抗体のうちの2種以上；基質との反応によって発色する標識体が接合された二次抗体接合体(conjugate)；前記標識体と発色反応する発色基質溶液；洗浄液；及び酵素反応停止液を含んでいてよい。

また、本発明に係る乳癌診断キットは、前記5種のマーカータンパク質標準抗原を含む陽

10

20

30

40

50

性対照群と前記抗原が注入されていない動物の抗血清を含む陰性対照群とをさらに含んでよい。

【0028】

本発明に係る乳癌診断キットは、抗原-抗体結合反応によって抗体タンパク質に対する抗原を定量または定性分析することで乳癌を診断することができ、前記抗原-抗体結合反応は、通常の酵素免疫測定法 (ELISA)、放射免疫測定法 (radioimmunoassay、RIA)、サンドイッチ測定法 (sandwich assay)、ウェスタンブロッティング、免疫沈降法、免疫組織化学染色法 (immunohistochemical staining)、蛍光免疫法、酵素基質発色法、抗原-抗体凝集法などの方法を用いて測定することができる。例えば、検体及び対照群を表面にコートした96ウェルマイクロタイタープレートなどを利用して組み換え単クローン抗体タンパク質と反応するELISAを行うように前記診断キットを提供してよい。

10

抗原-抗体結合反応のための固定体としては、ニトロセルロース膜、PVDF膜、ポリビニル樹脂またはポリスチレン樹脂で合成されたウェルプレート、ガラスからなるスライドガラスなどが使用されていてよい。

【0029】

二次抗体の標識体は、発色反応をする通常の発色剤が好ましく、HRP (horseradish peroxidase)、アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase)、コロイドゴールド (colloid gold)、FITC (ポリ-L-リジン-フルオレセインイソチオシアネート)、RITC (ローダミン-B-イソチオシアネート) などの蛍光物質 (fluorescein) 及び色素 (dye) などの標識体が用いられてよい。

20

【0030】

発色を誘導するための発色基質は、発色反応をする標識体に応じて用いることが好ましく、TMB (3,3',5,5'-テトラメチルベジジン)、ABTS [2,2'-アジノ--ピス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)]、OPD (o-フェニレンジアミン) などを用いてよい。このとき、発色基質は、緩衝溶液 (0.1M NaAc、pH 5.5) に溶解された状態で提供されるのがより好ましい。TMBのような発色基質は、二次抗体接合体の標識体として用いられたHRPによって分解され発色沈積体を生成し、該発色沈積体の沈積程度を目視して確認することで前記マーカートンパク質の存在の有無を検出する。

30

【0031】

洗浄液は、リン酸塩緩衝溶液、NaCl及びツイン20 (Tween 20) を含むものが好ましく、0.02Mのリン酸塩緩衝溶液、0.13MのNaCl、及び0.05%のツイン20からなる緩衝溶液 (PBST) がより好ましい。洗浄液は、抗原-抗体の結合反応後、抗原-抗体結合体に二次抗体を反応させた後に適量を固定体に添加して3~6回洗浄する。反応停止液は、硫酸溶液 (H₂SO₄) が好ましく用いられる。

【0032】

さらに、本発明のまた他の態様は、アポリポタンパク質C1、アポリポタンパク質 (a)、神経細胞接着分子L1類似タンパク質、炭酸脱水酵素1、及びフィブロネクチンのそれぞれのタンパク質に特異的な抗体を利用した抗原-抗体結合反応によって血液試料から前記タンパク質マーカーのうち2種以上を検出する方法を提供する。好ましくは、本発明は、前記5種のタンパク質のそれぞれに特異的な抗体を利用した抗原-抗体結合反応によって血液試料から3種のタンパク質マーカーを検出する方法を提供し、より好ましくは、4種のタンパク質マーカーを検出する方法を提供し、最も好ましくは、5種のタンパク質マーカーを検出する方法を提供する。

40

【0033】

前記検出方法は、血液中のタンパク質を固定化させるか、または電気泳動 (SDS-PAGE) で分離させてからPVDF膜に転移させ、前記タンパク質マーカー群のタンパク

50

質を選択的に認知する抗体と接触させて、抗原-抗体結合反応によってマーカートンパク質群の存在を間接的に確認することを含む。前記抗原-抗体結合反応としては、酵素免疫測定法（ELISA）、放射免疫分析法（RIA）、サンドイッチ測定、ウェスタンブロッティング、免疫沈降法、免疫組織化学染色法、蛍光免疫法、酵素基質発色法、抗原-抗体凝集法などが挙げられる。試料としては、血清、血漿、または血液を用いてよく、血漿が最も好ましい。

【0034】

本発明の好適な実施例によれば、前記検出方法は、

- 1) 被検者の血液試料及び対照群血液試料のタンパク質を固定体にコートするかまたは固定させる段階と；
- 2) 前記固定体にアポリポタンパク質C1、アポリポタンパク質(a)、神経細胞接着分子L1類似タンパク質、炭酸脱水酵素1、及びフィブロネクチンのそれぞれのタンパク質に特異的な抗体のうちの2種以上を添加して抗原-抗体結合反応を行う段階；
- 3) 前記抗原-抗体結合反応によって生成された抗原-抗体結合反応物を二次抗体接合体(conjugate)及び発色基質溶液を利用して検出する段階；及び
- 4) 被検者血液試料と対照群血液試料に対する検出結果を比較する段階とを含んでいてよい。

【0035】

前記検出方法の一実施例としては、先ず血液試料から血漿タンパク質を電気泳動などによって分子量に応じて分離し、該分離されたタンパク質をPVDf膜のような固定体に転移させて固定する。次いで、固定されたタンパク質抗原にそれぞれのマーカートンパク質に特異的な抗体を加えて抗原-抗体結合反応を行う。血液試料にマーカートンパク質が存在すれば、前記タンパク質が固定された膜に、マーカートンパク質に特異的な抗体が加えられたとき、抗原-抗体結合反応が起こるようになる。マーカートンパク質とこれに対する抗体の結合程度を測定するために、マーカートンパク質抗体に親和性を持つ二次抗体、例えば抗ヒトIgG-HRPと結合させる段階を行い、二次抗体に接合されたHRP(horse radish peroxidase)が基質であるECL(enhanced chemiluminescence)と反応して発色反応を起こすか否かやその程度を対照群と比べることで血液試料中の乳癌診断タンパク質マーカの存在の有無及び対照群に比べてのその量の増減の有無を検出するようになる。

一方、本発明に係る5種のタンパク質マーカのそれぞれに特異的な抗体のうちの2種以上を生物学的マイクロチップ(biological microchip)上に固定させた後、対象者から分離された血液試料と反応させて前記抗体タンパク質に対する抗原を検出することができる生物学的マイクロチップ及び自動化されたマイクロアレイシステム(microarray system)を利用すれば、一回の分析で大量の試料を分析することができるという長所がある。したがって、本発明は、本発明に係る5種のタンパク質マーカのそれぞれに特異的に結合する抗体のうちの2種以上が固形基質に集積されたバイオチップを提供する。バイオチップの固形基質の例としては、プラスチック、ガラス、金属、シリコンなどが挙げられる。

【発明の効果】

【0036】

前述したように、本発明に係る5種の乳癌診断用タンパク質マーカのうちの2種以上からなるバイオマーカセットを血液試料からMRM技法にて検出する方法は、患者の血液を用いるといった新規な診断技法であって、敏感度に優れるだけでなく、抗原抗体を用いる既存の免疫化学的方法よりも検出したいタンパク質に対する選択性が極めて高く且つ生検を用いることなく血液を対象に簡易に分析することができ、また、前記バイオマーカセットに対する抗体を用いた乳癌診断キット及び診断方法も比較的採取が容易な血液を試料とするため、生検を対象とする既存の乳癌診断方法とは異なり、患者に負担を与えることなく極めて簡易に乳癌を診断することができるだけでなく、診断の正確度及び敏感度が高く、さらに、このようなバイオマーカセットをMRM技法または抗原抗体反応によ

10

20

30

40

50

って検出する方法は、単一マーカーを利用する診断法に比べて極めて高い正確度及び感度を提供することができるため、乳癌の早期診断に有用に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1a】アポリタンパク質C-1マーカータンパク質を、80名の乳癌患者と80名の非患者対照群に対してMRM技法にて測定した抗原の濃度（大腸菌 -ガラクトシダーゼに対する割合）を示す図であって、図1aは箱図表であり、図1bはROC曲線である。

【図1b】アポリタンパク質C-1マーカータンパク質を、80名の乳癌患者と80名の非患者対照群に対してMRM技法にて測定した抗原の濃度（大腸菌 -ガラクトシダーゼに対する割合）を示す図であって、図1aは箱図表であり、図1bはROC曲線である。

10

【図2a】アポリタンパク質(a)マーカータンパク質を、80名の乳癌患者と80名の非患者対照群に対してMRM技法にて測定した抗原の濃度（大腸菌 -ガラクトシダーゼに対する割合）を示す図であって、図2aは箱図表であり、図2bはROC曲線である。

【図2b】アポリタンパク質(a)マーカータンパク質を、80名の乳癌患者と80名の非患者対照群に対してMRM技法にて測定した抗原の濃度（大腸菌 -ガラクトシダーゼに対する割合）を示す図であって、図2aは箱図表であり、図2bはROC曲線である。

20

【図3a】神経細胞接着分子L1類似タンパク質を、80名の乳癌患者と80名の非患者対照群に対してMRM技法にて測定した抗原の濃度（大腸菌 -ガラクトシダーゼに対する割合）を示す図であって、図3aは箱図表であり、図3bはROC曲線である。

【図3b】神経細胞接着分子L1類似タンパク質を、80名の乳癌患者と80名の非患者対照群に対してMRM技法にて測定した抗原の濃度（大腸菌 -ガラクトシダーゼに対する割合）を示す図であって、図3aは箱図表であり、図3bはROC曲線である。

【図4a】炭酸脱水酵素1マーカータンパク質を、80名の乳癌患者と80名の非患者対照群に対してMRM技法にて測定した抗原の濃度（大腸菌 -ガラクトシダーゼに対する割合）を示す図であって、図4aは箱図表であり、図4bはROC曲線である。

【図4b】炭酸脱水酵素1マーカータンパク質を、80名の乳癌患者と80名の非患者対照群に対してMRM技法にて測定した抗原の濃度（大腸菌 -ガラクトシダーゼに対する割合）を示す図であって、図4aは箱図表であり、図4bはROC曲線である。

30

【図5a】フィブロネクチンマーカータンパク質を、80名の乳癌患者と80名の非患者対照群に対してMRM技法にて測定した抗原の濃度（大腸菌 -ガラクトシダーゼに対する割合）を示す図であって、図5aは箱図表であり、図5bはROC曲線である。

【図5b】フィブロネクチンマーカータンパク質を、80名の乳癌患者と80名の非患者対照群に対してMRM技法にて測定した抗原の濃度（大腸菌 -ガラクトシダーゼに対する割合）を示す図であって、図5aは箱図表であり、図5bはROC曲線である。

【図6a】表1に表されたバイオマーカーセットを、80名の乳癌患者と80名の非患者対照群に対してMRM技法にて測定した抗原の濃度（大腸菌 -ガラクトシダーゼに対する割合）をROC曲線で示した図である。

40

【図6b】表1に表されたバイオマーカーセットを、37名の第1期乳癌患者と80名の非患者対照群に対してMRM技法にて測定した抗原の濃度（大腸菌 -ガラクトシダーゼに対する割合）をROC曲線で示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0038】

以下、実施例を挙げて本発明をより詳しく説明することにする。なお、これらの実施例は本発明をより具体的に説明するためのものであるに過ぎず、本発明の範囲がこれらの実施例によって制限されるものではない。

実施例1．多重反応モニタリング (Multiple Reaction Monito

50

r i n g ; M R M) 技法を用いた乳癌診断のためのバイオマーカーセットの検出
本発明者らは、前記表 1 に表されたタンパク質群を血液から乳癌の選択的診断のためのマ
ーカーとして使用することができるか否かを確認するために、次のように三重四極子質量
分析計を利用した多重反応モニタリング技法にて定量分析する方法を用いた (Anderson L
. et al., Mol Cell Proteomics, 5: 375-88, 2006)。M R M とは、質量分析計を利用し
た定量に主に用いられる技法であって、関心のある親イオンから生成された特定の娘イ
オンを観察して情報を得る技法である。例えば、 m/z 1000 を有する幾つかの親イ
オンのうちの 1 個のイオンだけが m/z 500 の娘イオンを有するとした場合、そのよう
なイオンを追跡するために m/z 1000 を有する親イオンを選択して断片化させ、 m
 $/z$ 500 の娘イオンを調査することが M R M である。

10

1. 1 試料の準備

本発明に係る 5 種のバイオマーカータンパク質の効率性を確認するために、乳癌患者 8
0 名と非患者対照群 8 0 名から得た血液試料におけるタンパク質の発現程度を確認し、統
計処理して、バイオマーカーセットの乳癌診断効率を確認した。160 名から得た血液か
らそれぞれ 200 μ g のタンパク質試料を準備した。準備された試料毎に 10 mM のジチ
オトレイトールを処理してから 1 時間反応させ、タンパク質をペプチド切片にする過程を
妨害し得るタンパク質中のアミノ酸のうちのシスチンのチオール (t h i o l -) 残基間
の結合を切断した。このようにして切断されたチオール結合は、60 mM のヨードアセト
アミドを処理してから暗所で 1 時間反応させ、チオール残基間の再結合を防いだ。準備さ
れたタンパク質試料にタンパク質 200 μ g 全体の 1 / 50 に該当する量の 4 μ g のトリ
プシン 20 μ l (プロメガ (P r o m e g a) 社製、U S A) を添加し、37 $^{\circ}$ C で 16 時
間処理を施して複数のペプチド切片に分離した。このようにして得たペプチド切片を、C
18 カートリッジを利用して塩を除去することで質量分析のための最終試料として準備し
た。

20

1. 2 三重四極子質量分析計を利用した多重反応モニタリングの実施

M R M 分析のためには、特定のタンパク質を代表することができるペプチドの選定と該
ペプチドから断片化によって生成された娘イオン、すなわちターゲットペプチドを効果的
にモニタリングできる親イオンと娘イオンの対を先に選定する必要がある。表 1 に表され
た 5 個のタンパク質の親イオンと娘イオンの対を選定するために、血液試料をそのままタ
ンデム質量分析にかけてアポリポタンパク質 C - 1 とアポリポタンパク質 (a) を同定し
た。このタンデム質量分析スペクトルからアポリポタンパク質 C - 1 を代表することがで
きる配列番号 6 のペプチドと、アポリポタンパク質 (a) を代表することができる配列番
号 7 のペプチドを選定し、これらの各ペプチドの親イオン / 娘イオンの対を選定して下記
の表 2 に表した。血液試料をそのままタンデム質量分析にかけることでは確認すること
ができなかった残りの 3 個のタンパク質のカラムにおける残留時間と、タンデム質量分析
スペクトルを確認するために残りの 3 個のタンパク質 (神経細胞接着分子 L 1 類似タンパク
質、炭酸脱水酵素 1、フィブロネクチン) のそれぞれを代表することができるペプチドを
合成した (ジェイピーティーペプチドテクノロジー (J P T P e p t i d e T e c h
n o l o g i e s G m b H) 社製、G e r m a n y) 。その結果、神経細胞接着分子 L
1 類似タンパク質は配列番号 8 に示されるペプチドを、炭酸脱水酵素 1 は配列番号 9 に示
されるペプチドを、フィブロネクチンは配列番号 10 に示されるペプチドを選定し、これ
らの各ペプチドの親イオン / 娘イオンの対を選定して下記の表 2 に表した。

30

40

【 0 0 3 9 】

【表 2】

マーカー	ターゲットペプチド	MRM transition (m/z)	
		親イオン	娘イオン
アポリポタンパク質 C-1	EFGNTLEDK	526.8	605.3
アポリポタンパク質 (a)	GYSTTVTGR	521.8	634.3
神経細胞接着分子 L 1 類似タンパク質	GDLYFANVEEK	642.8	836.4
炭酸脱水酵素 1	VLDALQAIK	485.8	758.4
フィブロネクチン	STTPDITGYR	555.8	821.4
大腸菌 β -ガラクトシダーゼ	GDFQFNISR	542.3	636.3

10

【0040】

実施例 1. 1 で準備された最終試料を逆相樹脂クロマトグラフィーにかけて血漿ペプチド切片を分離し、三重四極子質量分析計（機器：5500 Q trap、AB Sciex 社製、USA）を使用して各ペプチドの MRM スペクトルを得た。このとき、逆相樹脂クロマトグラフィーは、C18 コラムとしての HALOTM（Eksigent 社製、USA）で 45 分間 5% ~ 40% のアセトニトリル濃度勾配を用いて実施した。コンピューター定量分析プログラムとしての MultiQuantTM（AB Sciex 社製、USA）にてターゲットペプチドの MRM クロマトグラムピーク面積を計算することで定量情報を確認した。このとき、各ターゲットペプチドの定量値は、内部標準物質として注入した大腸菌 β -ガラクトシダーゼ（表 2）の MRM クロマトグラムピーク面積に対する割合にて表した。各ペプチドの MRM クロマトグラム面積比を求めることで乳癌患者と非患者対照群間でのタンパク質の発現量の差を確認することができた。

20

【0041】

前記方法にて測定された 5 個のマーカータンパク質のそれぞれの濃度をグラフで図示した。具体的に、配列番号 1 に示されるアポリポタンパク質 C-1 の場合、図 1 a に示したように箱図表にて図示した結果、前記マーカータンパク質が、非患者対照群に比べて乳癌患者群で 1.41 倍減少することを確認した。また、図 1 b に示したように受信者操作特性（ROC）グラフにて図示した結果、前記マーカータンパク質の AUC（area under the curve）は 0.71 と示された。

配列番号 2 に示されるアポリポタンパク質 (a) の場合、図 2 a に示したように箱図表にて図示した結果、前記マーカータンパク質が、非患者対照群に比べて乳癌患者群で 1.35 倍増加することを確認した。また、図 2 b に示したように受信者操作特性（ROC）グラフにて図示した結果、前記マーカータンパク質の AUC（area under the curve）は 0.64 と示された。

30

【0042】

配列番号 3 に示される神経細胞接着分子 L 1 類似タンパク質の場合、図 3 a に示したように箱図表にて図示した結果、前記マーカータンパク質が、非患者対照群に比べて乳癌患者群で 1.43 倍増加することを確認した。また、図 3 b に示したように受信者操作特性（ROC）グラフにて図示した結果、前記マーカータンパク質の AUC（area under the curve）は 0.75 と示された。

40

配列番号 4 に示される炭酸脱水酵素 1 の場合、図 4 a に示したように箱図表にて図示した結果、前記マーカータンパク質が、非患者対照群に比べて乳癌患者群で 1.60 倍増加することを確認した。また、図 4 b に示したように受信者操作特性（ROC）グラフにて図示した結果、前記マーカータンパク質の AUC（area under the curve）は 0.72 と示された。

【0043】

最後に、配列番号 5 に示されるフィブロネクチンの場合、図 5 a に示したように箱図表にて図示した結果、前記マーカータンパク質が、非患者対照群に比べて乳癌患者群で 1.56 倍増加することを確認した。また、図 5 b に示すように受信者操作特性（ROC）グラフにて図示した結果、前記マーカータンパク質の AUC（area under the

50

e curve) は 0.70 と示された。

参考として、ROC グラフは観察されたデータの全範囲に亘って判定閾値を連続して変化させて得られる全ての感受性 / 特異性の対のグラフであって、主に試験の正確度を示す (Zweig et al., Clin. Chem. 39:561-577, 1993)。

1.3 バイオマーカーセットによる乳癌の診断

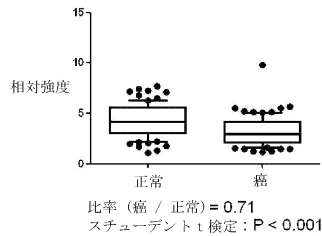
前記実施例 1.2 で確認された 5 個のマーカートンパク質群の定量結果をロジスティック回帰分析にて一つにまとめて多数のマーカから構成された一つの診断マーカー (多標識マーカー) を作成し、これを用いて乳癌診断効率を確認した。

その結果、図 6 a に示すように、多標識マーカーを 80 名の乳癌患者と 80 名の非患者対照群に対する受信者操作特性 (ROC) グラフにて図示した結果、AUC (area under the curve) は 0.86 と示された。また、80%の特異度で 75%の感度を示し、前記分析が既存の単一標識マーカーに比べて高い感度と正確性を兼ね備えていることが分かった。

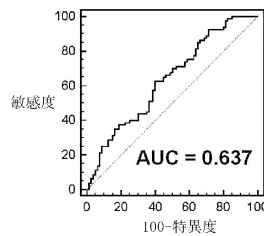
10

さらに、図 6 b に示すように、前記多標識マーカーを 80 名の非患者対照群と 37 名の第 1 期乳癌患者に対する受信者操作特性 (ROC) グラフにて図示した結果、AUC (area under the curve) は 0.92 と示された。また、80%の特異度で 92%の感度を示し、前記分析が初期乳癌患者の診断に極めて有効であることが分かった。

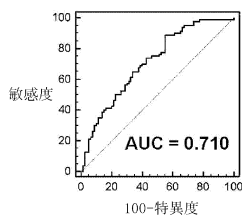
【図 1 a】



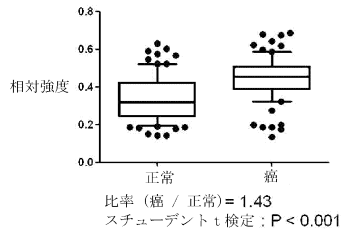
【図 2 b】



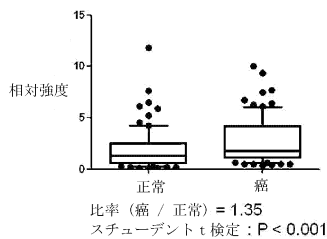
【図 1 b】



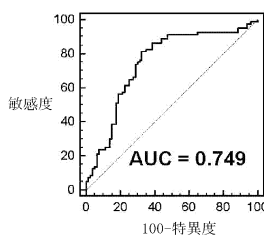
【図 3 a】



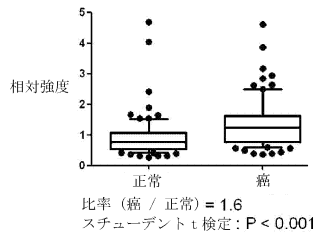
【図 2 a】



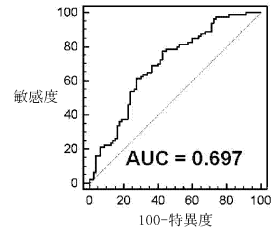
【図 3 b】



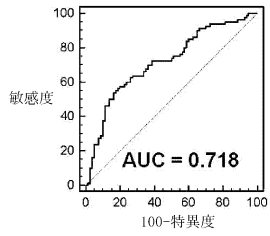
【図 4 a】



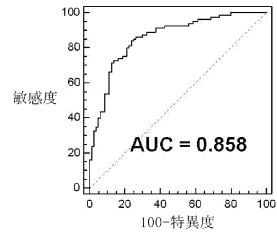
【図 5 b】



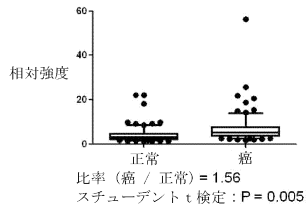
【図 4 b】



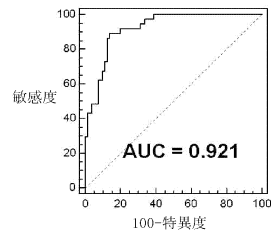
【図 6 a】



【図 5 a】



【図 6 b】



【配列表】

0006096813000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 G 0 1 N 27/62 (2006.01) G 0 1 N 27/62 Z N A V

(74)代理人 110000338

特許業務法人HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK

(72)発明者 イ, ホン ス

大韓民国, 4 6 3 - 8 6 3 キョンギ - ド, ソンナム - シ, プンダン - グ, チョンジャイル - ロ, 2 4 8 , 6 0 1 - 2 2 0 4

(72)発明者 シン, ヘ スン

大韓民国, 4 6 3 - 7 5 2 キョンギ - ド, ソンナム - シ, プンダン - グ, チョンジャ - ロ, 1 4 4 , 4 0 1 - 1 1 0 1

(72)発明者 カン, ウン - ボム

大韓民国, 1 5 0 - 8 5 0 ソウル, ヨンドウンポ - グ, トリム - ロ 8 1 - キル, 9 , 6 0 1

(72)発明者 ノ, ドン - ヨン

大韓民国, 1 5 0 - 7 9 3 ソウル, ヨンドウンポ - グ, ヨウイナル - ロ, 1 2 1 , 1 - 1 2 0 6

(72)発明者 ムン, ヒョン - ゴン

大韓民国, 1 3 6 - 7 5 1 ソウル, ソンブク - ク, ソンブン - ロ 4 - キル, 5 2 , 2 0 1 - 1 5 0 5

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 1 7 3 7 8 8 (U S , A 1)

特表 2 0 0 9 - 5 1 1 9 1 5 (J P , A)

特表 2 0 0 7 - 5 0 6 0 7 5 (J P , A)

米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 2 3 3 8 1 5 (U S , A 1)

E Ruiz-Garcia et al. , Gene expression profiling identifies Fibronectin 1 and CXCL9 as candidate biomarkers for breast cancer screening , British Journal of Cancer , 2 0 1 0 年 1 月 1 2 日 , Vol.102,No.3 , Page.462-468

Narges K. Tafreshi et al. , Noninvasive Detection of Breast Cancer Lymph Node Metastasis Using Carbonic Anhydrases IX and XII Targeted Imaging Probes , Clinical Cancer Research , 2 0 1 2 年 1 月 1 日 , Vol.18,No.1 , Page.207-219 , Epub 2011 Oct 20

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	用于乳腺癌诊断的多生物标志物，其检测方法和包括其抗体的乳腺癌诊断试剂盒		
公开(公告)号	JP6096813B2	公开(公告)日	2017-03-15
申请号	JP2014559839	申请日	2013-03-08
[标]申请(专利权)人(译)	生物位数有限公司 SN用户厄尔 & D基金会蜂		
申请(专利权)人(译)	生物位数有限公司 Esuenyu伯爵 & D基金会蜂		
当前申请(专利权)人(译)	生物位数有限公司 首尔国立大学的R & DIBI基金会		
[标]发明人	イホンス シンヘスン カンウンボム ノドンヨン ムンヒョンゴン		
发明人	イ,ホンス シン,ヘスン カン,ウン-ボム ノ,ドン-ヨン ムン,ヒョン-ゴン		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N33/536 G01N33/543 G01N33/545 G01N27/62		
CPC分类号	G01N33/57415 G01N33/6848 G01N33/92 G01N2333/705 G01N2333/70503 G01N2333/775 G01N2333/78 G01N2333/938 G01N2333/988 G01N2800/60		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/53.W G01N33/536.C G01N33/543.545.A G01N33/545.A G01N27/62.ZNA.V		
优先权	1020120023703 2012-03-08 KR		
其他公开文献	JP2015511002A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的载脂蛋白C1，载脂蛋白(a)中，神经细胞黏附分子L1相似的蛋白质，乳腺癌诊断的生物标志物组，其包含碳酸酐酶1的两个或多个蛋白标志物，和纤连蛋白，所述生物标志物集合对于使用抗体结合反应检测来自血液设置标记的蛋白质的方法 - 的从血液样品的多重反应监测技术和乳腺癌诊断试剂盒，和抗原包含特异于所述生物标志物组的蛋白的抗体检测的方法上。MRM技术或抗原 - 方法和诊断试剂盒用于检测乳腺癌诊断蛋白标记组从由抗体的血液样品在本发明的结合的诊断的反应，灵敏度和准确度相比，使用单个标记物的诊断方法是多，但也可以使用患者的血液很容易地诊断乳腺癌，它可以有效地用于乳腺癌的早期诊断。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6096813号 (P6096813)
(45) 発行日 平成29年3月15日(2017.3.15)	(24) 登録日 平成29年2月24日(2017.2.24)	
(51) Int. Cl.	F I	
G01N 33/574 (2006.01)	G01N 33/574 A	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 W	
G01N 33/536 (2006.01)	G01N 33/536 C	
G01N 33/543 (2006.01)	G01N 33/543 545A	
G01N 33/545 (2006.01)	G01N 33/545 A	
請求項の数 23 (全 16 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2014-559839 (P2014-559839)	(73) 特許権者 514222503	
(86) (22) 出願日 平成25年3月8日(2013.3.8)	バイオメディアカンパニー リミテッド	
(65) 公表番号 特表2015-511002 (P2015-511002A)	大韓民国, 462-807 キョンギド	
(43) 公表日 平成27年4月13日(2015.4.13)	, ソンナム-ジ, チュンウォン-グ, サギ	
(86) 国際出願番号 PCT/KR2013/001911	マクコロ-ロ, 137, #802	
(87) 国際公開番号 W02013/133675	(73) 特許権者 514222499	
(87) 国際公開日 平成25年9月12日(2013.9.12)	ソウル ナショナル ユニバーシティ	
審査請求日 平成26年9月2日(2014.9.2)	ール アンド ディーピー ファウンダー	
(31) 優先権主張番号 10-2012-0023703	ション	
(32) 優先日 平成24年3月8日(2012.3.8)	大韓民国, 151-010 ソウル, ク	
(33) 優先権主張国 韓国 (KR)	ナクク, クァナン-ロ, 1	
最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】 乳癌診断用マルチバイオマーカーセット、その検出方法、及びそれに対する抗体を含む乳癌診断キット