

(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2020-513852
(P2020-513852A)

(43) 公表日 令和2年5月21日(2020.5.21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z	2 G 0 4 3
C 1 2 Q 1/6886 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6886 Z N A Z	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851 Z	4 B 0 6 3
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-572339 (P2019-572339)
 (86) (22) 出願日 平成30年3月14日 (2018. 3. 14)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年11月1日 (2019. 11. 1)
 (86) 国際出願番号 PCT/PT2018/050007
 (87) 国際公開番号 WO2018/169423
 (87) 国際公開日 平成30年9月20日 (2018. 9. 20)
 (31) 優先権主張番号 109971
 (32) 優先日 平成29年3月14日 (2017. 3. 14)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 ポルトガル (PT)

(71) 出願人 519331590
 インスティテュート デ パトロジア エ
 イムノロジーア ダ ユニバーシダーデ
 ド ポルト (アイピーエーティーアイ
 エムユービー)
 ポルトガル国, ポルト 4 2 0 0 - 1 3 5
 - ルア ジュリオ アマラル デ カ
 ルヴァーリョ 4 5
 (74) 代理人 100079108
 弁理士 稲葉 良幸
 (74) 代理人 100109346
 弁理士 大貫 敏史
 (74) 代理人 100117189
 弁理士 江口 昭彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胃癌用のマイクロバイオームマーカー

(57) 【要約】

【課題】胃癌用のマイクロバイオームマーカーに関する。

【解決手段】本発明は、特定の細菌に由来する核酸又は代謝産物の検出により、新生物発生前の良性状態から胃癌を識別するための方法に関する。言及した方法は、前記特定の細菌の核酸又は代謝機能に由来する代謝産物との反応物の検出及び増幅用のプライマーを含む反応組成物を使用する。本発明の別の態様は、前記特定の細菌の核酸に対して高い特異性を示す配列（配列番号1～配列番号18として識別される）による上述した方法の実施で使用されるプライマー、及びこのプライマーを含む組成物に関する。本発明はさらに、本発明の方法を実行することにより特定の細菌に由来する核酸又は代謝産物を検出するための上述した組成物を含むキットに関する。本発明の方法、遺伝子配列、組成物及びキットは、生体サンプル中での新生物発生前の良性状態からの胃癌の識別に有利に使用され得、このことは、本発明の方法、遺伝子配列、組成物及びキットの、そのような識別に関する高い感度及び特異性に起因する。従って、本発明を、新生物発生前の良性状態（例えば、慢性胃炎、腸上皮化生及び異形成）を有する患者のモニタリングで適用して、胃癌の発生を検出するか又は予測し得、最終的には、適切な処置設定のための基盤を提供し得る。そのため、本発明は、医学、薬学、分子生物学、生化学、及び細菌関連の遺伝学の技術分野に含まれる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

胃癌と新生物発生前の良性状態との識別のためのヌクレオチド配列のセットであって、配列番号 1 ~ 配列番号 18、又は少なくとも配列番号 1 ~ 配列番号 2 及び / 又は配列番号 3 ~ 4 及び / 又は配列番号 5 ~ 配列番号 6 及び / 又は配列番号 7 ~ 配列番号 8 及び / 又は配列番号 9 ~ 配列番号 10 及び / 又は配列番号 11 ~ 配列番号 12 及び / 又は配列番号 13 ~ 14 及び / 又は配列番号 15 ~ 配列番号 16 及び / 又は配列番号 17 ~ 配列番号 18 を含むことを特徴とするセット。

【請求項 2】

リアルタイム PCR 定量による胃癌と新生物発生前の良性状態との識別のための反応用の組成物であって、リアルタイム PCR 用の試薬溶液に加えて、請求項 1 に記載のヌクレオチド配列配列番号 1 ~ 配列番号 18、又は少なくとも配列番号 1 ~ 配列番号 2 及び / 又は配列番号 3 ~ 4 及び / 又は配列番号 5 ~ 配列番号 6 及び / 又は配列番号 7 ~ 配列番号 8 及び / 又は配列番号 9 ~ 配列番号 10 及び / 又は配列番号 11 ~ 配列番号 12 及び / 又は配列番号 13 ~ 14 及び / 又は配列番号 15 ~ 配列番号 16 及び / 又は配列番号 17 ~ 配列番号 18 を含むことを特徴とする組成物。

10

【請求項 3】

発色アッセイ、発光アッセイ又は蛍光アッセイによる胃癌と新生物発生前の良性状態との識別のための反応用の組成物であって、代謝産物である硝酸塩及び / 又は亜硝酸塩及び / 又は酸化窒素及び / 又は p - クレゾール及び / 又はインドール及び / 又は 3 - ヒドロキシアントラニル酸及び / 又はデオキシコール酸及び / 又はフェノールのうちの少なくとも 1 つに対する少なくとも 1 種の反応物、例えば、硫酸鉄、水酸化ナトリウム、ジフェニルアミン、硫酸、オゾン又は他のものを、前記代謝産物の存在下で発色反応、蛍光反応又は発光反応を生じることが知られている他の既知の化学反応物を除外することなく、含むことを特徴とする組成物。

20

【請求項 4】

酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) による胃癌と新生物発生前の良性状態との識別のための反応用の組成物であって、代謝産物である硝酸塩及び / 又は亜硝酸塩及び / 又は酸化窒素及び / 又は p - クレゾール及び / 又はインドール及び / 又は 3 - ヒドロキシアントラニル酸及び / 又はデオキシコール酸及び / 又はフェノールのうちの少なくとも 1 つに対する親和性を有する少なくとも 1 種の抗体を含むことを特徴とする組成物。

30

【請求項 5】

胃癌と新生物発生前の良性状態との識別のための組成物であって、インビトロでの生体サンプルから得られる核酸に加えて、請求項 2 に記載の少なくとも 1 種の組成物を含むことを特徴とする組成物。

【請求項 6】

胃癌と新生物発生前の良性状態との識別のための組成物であって、インビトロでの生体サンプル中において硝酸レダクターゼ機能及び / 又は亜硝酸レダクターゼ機能から得られる化合物に加えて、請求項 3 又は 4 に記載の反応用の組成物の少なくとも 1 種を含むことを特徴とする組成物。

40

【請求項 7】

胃癌と新生物発生前の良性状態との識別のための組成物であって、インビトロでの生体サンプル中においてインビボでの細菌の硝酸レダクターゼ機能及び / 又は亜硝酸レダクターゼ機能から得られる化合物に加えて、請求項 3 又は 4 に記載の代謝産物反応用の組成物の少なくとも 1 種を含むことを特徴とする組成物。

【請求項 8】

胃癌と新生物発生前の良性状態との識別のためのキットであって、請求項 2 ~ 7 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 種の組成物を含むことを特徴とするキット。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のキットであって、胃癌と新生物発生前の良性状態とを識別する、少な

50

くとも1種の細菌に由来する核酸及び/又は代謝産物を含むコントロールサンプル及び/又はキャリブレーションサンプルをさらに含むことを特徴とするキット。

【請求項10】

胃癌と新生物発生前の良性状態との識別のためのインビトロでの方法であって、

a) 請求項2に記載の少なくとも1種の反応組成物の調製、及び、言及した識別のために試験するインビトロの生体サンプルから抽出したDNAと、請求項6に記載の反応組成物との接触の促進の工程、

b) リアルタイムPCR反応による増幅の工程、

c) 蛍光シグナルの定量、並びに陽性結果を得た場合には胃癌の存在に関する陽性に対応する、アクロモバクター (*Achromobacter*) 種及び/又はシトロバクター (*Citrobacter*) 種及び/又はクロストリジウム (*Clostridium*) 種及び/又はロドコッカス (*Rhodococcus*) 種及び/又はラクトバチルス (*Lactobacillus*) 種及び/又はフィロバクテリウム (*Phyllobacterium*) 種に由来する核酸の相対存在量と、ヘリコバクター (*Helicobacter*) 種及び/又はナイセリア (*Neisseria*) 種由来の核酸の相対存在量との比の \log_{10} の算出による、b) で得られた増幅の分析の工程を含むことを特徴とする方法。

10

【請求項11】

前記増幅の条件は下記のとおりである、請求項10に記載の方法：

・ 第1ステージ：50 で2分及び続いて95 で10分を1サイクル、

・ 第2ステージ：シグナルの取得を伴う、95 で15秒及び60 で1分を含む40サイクル、

・ 第3ステージ：15秒にわたり95 、1分にわたり60 、30秒にわたり95 及び15秒にわたり60 を1サイクル。

20

【請求項12】

胃癌と新生物発生前の良性状態との識別のためのインビトロでの方法であって、

a) 請求項3又は4に記載の少なくとも1種の反応組成物の調製、及び、言及した識別のために試験するインビトロの生体サンプルで得られた硝酸レダクターゼ機能及び/又は亜硝酸レダクターゼ機能に由来する代謝産物と、請求項6又は7に記載の反応組成物との接触の促進の工程、

b) 発色反応、発光反応、蛍光反応又はELISA反応をインキュベートする工程、

c) 正常範囲と比べて値が高い場合には胃癌の存在に関して陽性に対応する吸光度又は発光シグナル若しくは蛍光シグナルの定量により、b) で得られた反応の結果を分析する工程

30

を含むことを特徴とする方法。

【請求項13】

胃癌と新生物発生前の良性状態との識別のためのインビトロでの方法であって、

a) 言及した識別のために試験するインビトロの生体サンプル中における硝酸レダクターゼ機能及び/又は亜硝酸レダクターゼ機能に由来する代謝産物を得る工程、

b) 前記サンプルを質量分析に供する工程、

c) 硝酸塩及び/又は亜硝酸塩及び/又は酸化窒素及び/又はp-クレゾール及び/又はインドール及び/又は3-ヒドロキシアントラニル酸及び/又はデオキシコール酸及び/又はフェノールの存在量の定量により、b) で得られた結果を分析する工程であって、正常範囲と比べて値が高い場合には胃癌の存在に関して陽性に対応する、工程、を含むことを特徴とする方法。

40

【請求項14】

前記(a)の生体サンプルは、ヒトの組織、胃洗浄液、血清、血漿、尿、呼気凝縮液又は呼気に由来する、請求項10～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

アクロモバクター (*Achromobacter*) 種及び/又はシトロバクター (*Citrobacter*) 種及び/又はクロストリジウム (*Clostridium*) 種及び/又はロドコッカス (*Rhodococcus*) 種

50

及び／又はラクトバチルス (Lactobacillus) 種及び／又はフィロバクテリウム (Phyllobacterium) 種に適した抗生物質を含むことを特徴とする処置用の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特定の細菌に由来する核酸又は代謝産物の検出により新生物発生前の良性状態から胃癌を識別するための方法、増幅用のプライマー又は特定の細菌機能由来の代謝産物との反応物を含む反応組成物、この細菌の核酸に対して高い特異性を示すように設計された、配列番号1～配列番号18と称される配列、及び言及した方法を実施するためのそのような組成物を含むキットに関する。

10

【0002】

本発明は、本方法の高い感度、並びに作成した遺伝子配列及び反応する代謝産物の特異性に起因して、生体サンプル中における及びインビトロでの新生物発生前の状態からの胃癌の識別に有利に使用され得、それにより、新生物発生前の状態（例えば、慢性胃炎、腸上皮化生及び異形成）を有する胃癌患者をモニタリングして、胃癌の発生を検出するか又は予測することが可能になり、最終的には、適切な処置設定のための基盤を提供する。

【0003】

そのため、本発明は、医学、薬学、分子生物学、生化学、及び細菌関連の遺伝学の技術分野に含まれる。

20

【背景技術】

【0004】

胃癌は世界的規模の主要な健康問題であり、毎年100万の新規の症例が推定される[1]。この悪性腫瘍は、世界的規模の癌関連死の5番目に多い且つ3番目の主な原因である[1]。

【0005】

胃癌は、H.ピロリ (H. pylori) 感染により引き起こされる、長い、多因子性の且つ多段階のプロセスである。

【0006】

持続性のH.ピロリ (H. pylori) 感染により、全ての感染者の胃上皮に慢性炎症が誘発されるが、一部の感染者は酸産生腺 (acid-producing gland) の数の減少 (萎縮) を示し、そのため腸上皮化生が発生しやすく、この腸上皮化生は異形成へと進行する可能性があり、最終的には胃癌へと進行する可能性がある[2]。

30

【0007】

感染者の数と、胃癌の発症へと進む感染者の数との間の不均衡は、H.ピロリ (H. pylori) の病原性、宿主の遺伝的感受性、及び環境因子の差異の影響に起因している[2～5]。

【0008】

慢性炎症 / 胃炎はH.ピロリ (H. pylori) により誘発されると考えられており[6, 7]、発症の最終段階ではH.ピロリ (H. pylori) のコロニー形成が減少する (及び最終的には喪失することから、胃癌の発症は、ある特定の時点からH.ピロリ (H. pylori) に依存しないことが示唆されている[8]。

40

【0009】

加えて、H.ピロリ (H. pylori) の除菌研究により、除菌が成功しても、前癌病変を有する患者での胃癌の発症が完全には予防されないことが分かっている[9～11]。この観察は、H.ピロリ (H. pylori) 以外の因子が胃発癌に関与することを示唆する。

【0010】

近年、H.ピロリ (H. pylori) により順に引き起こされる炎症及び胃上皮の分解により、悪性転換に寄与する新規の微生物叢の確立が可能である胃発癌のモデルが提案されている[12]。

【0011】

50

このモデルは、以前の研究 [13、14]、及び H . ピロリ (H. pylori) により誘発された胃癌が複雑な胃微生物叢の存在により促進されることを示した高ガストリン血症 (hypergastrinaemic) I N S - G A S トランスジェニックマウスモデル (この動物は、H . ピロリ (H. pylori) に単一感染した無菌マウスと比べて多くの腫瘍を発症した) での研究により支持されている [15、16]。

【 0 0 1 2 】

今までのところ、健康及び疾患におけるヒトの胃微生物叢の特徴を明らかにする研究はほんのごくわずかであった。これらの研究の主な発見は、H . ピロリ (H. pylori) 陰性の対象は多様な微生物叢を含んでいるが、H . ピロリ (H. pylori) 感染患者はこの種に支配されており、そのため全体的な多様性が低下していることであった [17 ~ 20]。

【 0 0 1 3 】

胃癌に関連して、わずか 3 件の研究が行なわれており、胃癌に関与していると特定されている胃微生物叢の特定の構成要素は存在しない。

【 0 0 1 4 】

これらの研究の欠点は、最も重要なことに、感度及び特異性の限界であり、そのため、臨床的に有用な試験を作ることが困難である。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 5 】

そのため、生体サンプル中での胃の発生の検出を可能にするのに十分な感度及び特異性を有する方法を開発する必要がある。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 6 】

胃癌での細菌の相対存在量及びその代謝機能の定性的特性及び定量的特性を考慮して、本発明は、特定の細菌に由来する核酸及び / 又は代謝産物の検出による、新生物発生前の状態から胃癌を識別するための方法、組成物、プライマー配列、及びキットに関する。

【 0 0 1 7 】

本発明の概要

本発明は、新生物発生前の良性状態からの胃癌の識別において高度に敏感であり且つ特異的であるアクロモバクター (Achromobacter) 種及び / 又はシトロバクター (Citrobacter) 種及び / 又はクロストリジウム (Clostridium) 種及び / 又はロドコッカス (Rhodococcus) 種及び / 又はラクトバチルス (Lactobacillus) 種及び / 又はフィロバクテリウム (Phyllobacterium) 種及び / 又はヘリコバクター (Helicobacter) 種及び / 又はナイセリア (Neisseria) 種を含む細菌に由来する核酸の特異的検出及び定量的のために設計された、請求項 1 に記載のプライマーセット (配列番号 1 ~ 配列番号 18) に関する。

【 0 0 1 8 】

これらのプライマーは、そのような細菌の検出で高い特異性を有することから、新生物発生前の良性状態からの胃癌の識別での高い感度及び特異性のための方法での使用が可能である。

【 0 0 1 9 】

本発明はまた、請求項 2 に記載のプライマーの言及した配列を含むリアルタイム PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) の技術を使用する、細菌由来の DNA の増幅及び定量的のための組成物にも関する。

【 0 0 2 0 】

本発明はまた、請求項 3 ~ 4 に記載の、硝酸レダクターゼ細菌代謝機能及び / 又は亜硝酸レダクターゼ細菌代謝機能に由来する代謝産物による発色アッセイ、発光アッセイ、蛍光アッセイ又は酵素結合免疫吸着アッセイのための反応組成物であって、硝酸塩及び / 又は亜硝酸塩及び / 又は酸化窒素及び / 又は p - クレゾール及び / 又はインドール及び / 又は 3 - ヒドロキシアントラニル酸及び / 又はデオキシコール酸及び / 又はフェノールとの反応物 (例えば、前記代謝産物と反応することが知られている他の既知の反応物を除外す

10

20

30

40

50

ることなく、硫酸鉄、水酸化ナトリウム、ジフェニルアミン、硫酸、オゾン、抗体又は他のもの)を含む反応組成物に関する。

【0021】

予め調製され得るか又は本発明の方法の実施時に調製され得るこの組成物は、新生物発生前の良性病変からの胃癌の識別に適用可能である。

【0022】

本発明の別の態様は、新生物発生前の良性病変から胃癌を識別するための組成物であって、この組成物と、試験する生体サンプルとを含む組成物に関する。

【0023】

この組成物では、この生体サンプルは、特定の細菌に由来する分子(例えば、インピトロで得られる細菌の核酸、及び/又は硝酸レダクターゼ細菌代謝機能により生じる代謝産物(インピトロで若しくはインピボでの細菌代謝により得られる))を含み、且つ請求項5~7のいずれか一項に記載のインピトロの試験サンプル中に存在する。

10

【0024】

本発明の別の態様は、請求項8に記載の、予め調製された、新生物発生前の良性病変から胃癌を識別するためにプライマー及び/又は代謝産物反応組成物を含むキットに関する。

【0025】

このキットは、前記識別のために試験するサンプルを添加することにより、迅速且つ信頼性のある方法で、新生物発生前の良性病変から胃癌を識別する敏感で且つ特異的な方法を開発するという利点を有する。

20

【0026】

本発明の別の態様は、請求項10~14のいずれか一項に記載の、反応が細菌の核酸又は細菌の代謝産物に対して特異的である増幅用のプライマー又は代謝産物用の反応物を含む反応組成物を使用する、新生物発生前の良性状態から胃癌を識別する方法に関する。

【0027】

この方法を有利に使用して、生体サンプル中において新生物発生前の良性状態から胃癌を識別し得、このことは、この目的のために設計された、遺伝子配列、反応組成物、及び識別のために使用される計算により付与されるこの方法の高い感度及び特異性に起因する。

30

【0028】

そのため、本発明を、新生物発生前の良性状態(例えば、慢性胃炎、腸上皮化生及び異形成)を有する患者のモニタリングで適用して、胃癌の発生を検出するか又は予測し得、最終的には、適切な処置設定のための基盤を提供し得る。

【0029】

そのため、本発明の別の態様は、請求項15に記載の、前記胃癌に特異的な細菌のうちの少なくとも1種に適した抗生物質が個体で使用される処置用の組成物に関する。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】胃癌生体サンプルと慢性胃炎生体サンプルとの間での特定の細菌の相対存在量の有意差の実証を示す図である。この図は、慢性胃炎と比較して胃癌でのヘリコバクター(Helicobacter)種及びナイセリア(Nisseria)種由来のDNAの有意な減少、並びに慢性胃炎と比較して胃癌でのアクロモバクター(Achromobacter)種、フィロバクテリウム(Phyllobacterium)種、クロストリジウム(Clostridium)種、ロドコッカス(Rhodococcus)種及びラクトバチルス(Lactobacillus)種由来のDNAの有意な富化を実証する。

40

A - ヘリコバクター(Helicobacter)種 B - ナイセリア(Nisseria)種 C - アクロモバクター(Achromobacter)種 D - フィロバクテリウム(Phyllobacterium)種 E - クロストリジウム(Clostridium)種 F - ロドコッカス(Rhodococcus)種 G - ラクトバチルス(Lactobacillus)種 X軸: CG - 慢性胃炎; GC - 胃癌 Y軸: 相対存在量(特定の細菌由来のDNAの存在量とサンプル中の細菌DNAの「全」存在量との比の平均

50

の \log_{10})。

【図2】個々の細菌属に基づく本方法の識別能力の実証を示す図である。この図では、胃癌を検出するために、受信者動作特性 (ROC) 分析を使用して各特定の微生物由来の DNA の相対存在量の識別能力を測定した。アクロモバクター (Achromobacter) 種、シトロバクター (Citrobacter) 種、ラクトパチルス (Lactobacillus) 種、フィロバクテリウム (Phyllobacterium) 種、クロストリジウム (Clostridium) 種及びロドコッカス (Rhodococcus) 種に関して得られた曲線下の面積 (AUC) はそれぞれ、0.85 (95% CI、0.78 ~ 0.92) ; 0.80 (95% CI 0.71 ~ 0.88) 、0.74 (95% CI 0.65 ~ 0.84) ; 0.66 (95% CI 0.57 ~ 0.76) ; 0.64 (95% CI 0.54 ~ 0.73) ; 及び0.62 (95% CI 0.52 ~ 0.72) であった。 A - アクロモバクター (Achromobacter) 種 B - シトロバクター (Citrobacter) 種 C - ラクトパチルス (Lactobacillus) 種 D - フィロバクテリウム (Phyllobacterium) 種 E - クロストリジウム (Clostridium) 種 F - ロドコッカス (Rhodococcus) 種 X 軸 - 100 - 特異度 (%) Y 軸 - 感度 (%)

10

【図3】胃癌で富む細菌由来の DNA の相対存在量と、胃癌で枯渇する細菌由来の DNA の相対存在量との比の \log_{10} の算出に基づく、胃癌を検出するための本方法の識別能力の実証を示す図である。この図では、ROC 分析を使用して、胃癌で富む細菌由来の DNA の相対存在量と、胃癌で枯渇する細菌由来の DNA の相対存在量との比の \log_{10} を使用する胃癌の検出での本方法の識別能力を測定し、いずれの細菌属単独と比べても感度及び特異度が高い0.91 (95% CI 0.87 ~ 0.97) の AUC を得た。 X 軸 - 100 - 特異度 (%) Y 軸 - 感度 (%)

20

【発明を実施するための形態】

【0031】

本発明の説明

本発明は、新生物発生前の良性状態から胃癌を識別する方法に関する。言及した反応方法は、増幅及び定量のためのプライマーを含む組成物を使用し、このプライマーの配列 (配列番号1 ~ 配列番号18) は、新生物発生前の良性状態からの胃癌の識別において高度に敏感であり且つ特異的であるアクロモバクター (Achromobacter) 種及び / 又はシトロバクター (Citrobacter) 種及び / 又はクロストリジウム (Clostridium) 種及び / 又はロドコッカス (Rhodococcus) 種及び / 又はラクトパチルス (Lactobacillus) 種及び / 又はフィロバクテリウム (Phyllobacterium) 種及び / 又はヘリコバクター (Helicobacter) 種及び / 又はナイセリア (Neisseria) 種を含む細菌に由来する核酸を検出して定量するように特に設計されている。

30

【0032】

そのため、プライマー配列は、前記増幅反応 (例えば、PCR アッセイ、リアルタイム (RT-PCR) アッセイ又はデジタル PCR アッセイ) の基盤を構築するために、増幅及び定量用に作られている。配列表で説明されているように、これらのプライマー用に18種の配列を設計した。これには、下記の目的のための配列が含まれる:

- a. アクロモバクター (Achromobacter) 種の検出及び定量
 - ・ 配列番号1: イニシエータ F
 - ・ 配列番号2: イニシエータ R
- b. シトロバクター (Citrobacter) 種の検出及び定量
 - ・ 配列番号3: イニシエータ F
 - ・ 配列番号4: イニシエータ R
- c. クロストリジウム (Clostridium) 種の検出及び定量
 - ・ 配列番号5: イニシエータ F
 - ・ 配列番号6: イニシエータ R
- d. ロドコッカス (Rhodococcus) 種の検出及び定量
 - ・ 配列番号7: イニシエータ F
 - ・ 配列番号8: イニシエータ R

40

50

- e . ラクトバチルス (Lactobacillus) 種の検出及び定量
 - ・ 配列番号 9 : イニシエータ F
 - ・ 配列番号 10 : イニシエータ R
- f . フィロバクテリウム (Phyllobacterium) 種の検出及び定量
 - ・ 配列番号 11 : イニシエータ F
 - ・ 配列番号 12 : イニシエータ R
- g . ヘリコバクター (Helicobacter) 種の検出及び定量
 - ・ 配列番号 13 : イニシエータ F
 - ・ 配列番号 14 : イニシエータ R
- h . ナイセリア (Neisseria) 種の検出及び定量
 - ・ 配列番号 15 : イニシエータ F
 - ・ 配列番号 16 : イニシエータ R
- i . 細菌全体の検出及び定量
 - ・ 配列番号 17 : イニシエータ F
 - ・ 配列番号 18 : イニシエータ R。

10

【0033】

上記配列を、刊行物 : Beaucage, SL; Iyer, RP (1992). "Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach". Tetrahedron 48 (12) : 2223 で説明されている固相ホスホロアミダイトヌクレオチドを使用するヌクレオチド合成法により調製し得る。この合成を、各オリゴヌクレオチドの 3' 末端の最初の塩基で官能化された固体支持体 (制御された細孔ガラス又はポリスチレン) を備えたカラムで実施し得る。各オリゴヌクレオチドの調製は多数の合成サイクルの後に起き、それぞれは複数種の化学反応 (典型的には下記の 4 種の化学反応) からなる : i) 放出 (脱トリチル化)、ii) カップリング、iii) 保護、及び iv) 酸化。各サイクルでは、成長中の鎖の 5' 末端に、所望される配列に対応するヌクレオチド残基が付加される。

20

【0034】

ヌクレオチドは、相補的ヌクレオチドとの塩基対形成によるハイブリダイゼーション能力を有する天然の又は合成の起源のヌクレオチドを指し、このヌクレオチドとして下記が挙げられ得るがこれらに限定されない : DNA、RNA 及びヌクレオチド類似体 (例えば、閉じたコンフォメーションの核酸、「ロックド核酸 (locked nucleic acid)」(LNA) として既知である)、ヌクレオチド間ホスホジエステル型結合を有しないヌクレオチド (例えば、ペプチド核酸 (PNA))、及びチオジエステル結合を有する核酸、又は同一の目的のための同種のもの。

30

【0035】

プローブの濃度は、溶液の体積当たりの各プローブのモル数に対応する溶液のモル濃度を指し、マイクロモル (μM) は 1 リットル当たり 1×10^{-6} モルに対応する。

【0036】

増幅及び DNA ハイブリダイゼーション用の組成物 (PCR 組成物) を、市販されている PCR に、様々な組み合わせで配列番号 1 ~ 配列番号 18 を含む様々なヌクレオチド配列、及び微生物 DNA フリー水 (分子生物学グレード、DNA 汚染を除去するためにフィルタ滅菌されて UV 処理されているヌクレアーゼフリー水) と共に反応物溶液を添加することにより調製した。

40

【0037】

PCR 用の反応溶液は、増幅反応の所望されるタイプにより異なる。本発明の実施形態に関する PCR に適した反応物溶液の例は、例えば、リアルタイム PCR による DNA 増幅及び定量の目的のための溶液「PowerUp SYBR Green Master Mix」(Applied Biosystems 社)、又は類似の溶液である。

【0038】

既に述べたように、プライマー配列は、新生物発生前の良性状態からの胃癌の識別において高度に敏感であり且つ特異的であるアクロモバクター (Achromobacter) 種及び / 又

50

はシトロバクター (Citrobacter) 種及び / 又はクロストリジウム (Clostridium) 種及び / 又はロドコッカス (Rhodococcus) 種及び / 又はラクトバチルス (Lactobacillus) 種及び / 又はフィロバクテリウム (Phyllobacterium) 種及び / 又はヘリコバクター (Helicobacter) 種及び / 又はナイセリア (Neisseria) 種を含む細菌由来の核酸を特異的に検出して定量するように定義される。

【 0 0 3 9 】

同様に、全細菌の検出のためのプライマー (配列番号 1 7 及び配列番号 1 8) の添加により、比較目的のための組成物を調製する。

【 0 0 4 0 】

配列番号 1 ~ 配列番号 1 8 の配列を有する様々なプライマーを含む P C R 用の組成物を調製し、個々の反応は、少なくとも配列番号 1 及び配列番号 2、又は配列番号 3 及び配列番号 4、又は配列番号 5 及び配列番号 6、又は配列番号 7 及び配列番号 8、又は配列番号 9 及び配列番号 1 0、又は配列番号 1 1 及び配列番号 1 2、又は配列番号 1 3 及び配列番号 1 4、又は配列番号 1 5 及び配列番号 1 6、又は配列番号 1 7 及び配列番号 1 8 を含む。そのため、P C R 用の本発明の組成物は、上述したプライマーのうちの 1 つ又は複数のセットのみを含み得る。

【 0 0 4 1 】

新生物発生前の良性状態から胃癌を識別するための反応混合物の組成物を、P C R に関して上述した組成物に、試験する生体サンプル由来の D N A を添加することにより調製した。

【 0 0 4 2 】

試験 D N A を、Qiagen社のQIAamp (登録商標) DNA Microbiome Kitで市販されているもの等の当分野で既知の標準的な方法又は類似の方法を使用して、ヒト又は他の生物学的起源の組織、胃洗浄液、呼気凝縮液又は呼気から得ることができる。

【 0 0 4 3 】

P C R 増幅の条件は下記のとおりであった：

- ・ 第 1 ステージ：5 0 で 2 分及び続いて 9 5 で 1 0 分を 1 サイクル、
- ・ 第 2 ステージ：シグナルの取得を伴う、9 5 で 1 5 秒及び 6 0 で 1 分を含む 4 0 サイクル、
- ・ 第 3 ステージ：1 5 秒にわたり 9 5 、 1 分 にわたり 6 0 、 3 0 秒 にわたり 9 5 及び 1 5 秒 にわたり 6 0 を 1 サイクル。

【 0 0 4 4 】

各細菌に関するプライマーセットの核酸濃度 (検量線上で、得られた蛍光レベルを交差させることにより算出される) を、全細菌の検出に関するプライマーセットの核酸濃度 (同一の方法で算出される) で割る定量により実施される、各細菌属に由来する D N A の相対存在量の分析により、胃癌と新生物発生前の良性病変との間の有意差が示される (図 1)。

【 0 0 4 5 】

アクロモバクター (Achromobacter) 種、シトロバクター (Citrobacter) 種、クロストリジウム (Clostridium) 種、ロドコッカス (Rhodococcus) 種、ラクトバチルス (Lactobacillus) 種、フィロバクテリウム (Phyllobacterium) 種の属の D N A の相対存在量のみが、胃癌の検出において高い識別能力を示す (図 2)。アクロモバクター (Achromobacter) 種及び / 又はシトロバクター (Citrobacter) 種及び / 又はクロストリジウム (Clostridium) 種及び / 又はロドコッカス (Rhodococcus) 種及び / 又はラクトバチルス (Lactobacillus) 種及び / 又はフィロバクテリウム (Phyllobacterium) 種の相対存在量と、ヘリコバクター (Helicobacter) 種及び / 又はナイセリア (Neisseria) 種の存在量との比を算出し、 \log_{10} 変換を実施し、且つ胃癌の存在に関するカットオフとして正の値を考慮することにより、胃癌と慢性胃炎等の新生物発生前の病変との間で、高度に敏感であり且つ特異的な識別が達成される (図 3)。

【 0 0 4 6 】

そのため、生体サンプルが添加される、プライマーの様々な組み合わせ（PCR組成物で使用される）により、新生物発生前の良性状態からの胃癌の識別において高度に敏感であり且つ特異的である計算が得られる方法を開発することが可能であった。

【0047】

そのため、本発明の方法は、

a) 配列番号1～配列番号18を含むか、又は少なくとも配列番号1～配列番号2及び/又は配列番号3～配列番号4及び/又は配列番号5～配列番号6及び/又は配列番号7～配列番号8及び/又は配列番号9～配列番号10及び/又は配列番号11～配列番号12及び/又は配列番号13～配列番号14及び/又は配列番号15～配列番号16及び/又は配列番号17～配列番号18を含む少なくとも1種の反応組成物の調製、並びに試験するインビトロの生体サンプルから抽出したDNAと、前記反応組成物との接触の促進の工程、

b) リアルタイムPCR反応による増幅の工程、

c) 蛍光シグナルの定量、並びに陽性結果を得た場合には胃癌の存在に関する陽性に対応する、アクロモバクター（*Achromobacter*）種及び/又はシトロバクター（*Citrobacter*）種及び/又はクロストリジウム（*Clostridium*）種及び/又はロドコッカス（*Rhodococcus*）種及び/又はラクトバチルス（*Lactobacillus*）種及び/又はフィロバクテリウム（*Phyllobacterium*）種に由来する核酸の相対存在量と、ヘリコバクター（*Helicobacter*）種及び/又はナイセリア（*Neisseria*）種由来の核酸の相対存在量との比の \log_{10} の算出による、b)で得られた増幅の分析の工程を含む。

【0048】

本発明の別の実施形態では、新生物発生前の良性状態から胃癌を識別する方法を、硝酸塩及び/又は亜硝酸塩及び/又は酸化窒素及び/又はp-クレゾール及び/又はインドール及び/又は3-ヒドロキシアントラニル酸及び/又はデオキシコール酸及び/又はフェノールを含む、硝酸レダクターゼ細菌機能又は亜硝酸レダクターゼ細菌機能に由来する代謝産物の定量のための発色反応、発光反応、蛍光反応又は免疫反応に基づいて達成し得る。

【0049】

この実施形態では、この反応方法は、前記代謝産物のうちの少なくとも1つに対する少なくとも1種の反応物（例えば、前記代謝産物の存在下で発色反応、発光反応又は発光反応を生じることが知られている他の既知の化学反応物を除外することなく、硫酸鉄、水酸化ナトリウム、ジフェニルアミン、硫酸、オゾン、又は他のもの）を含む組成物を使用する。

【0050】

前記代謝産物のうちの少なくとも1つに対して親和性を有する少なくとも1種の抗体を含む、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）用の反応組成物も、本発明を達成する形態のうちの1つである。

【0051】

代謝産物の定量用の反応組成物は、所望される代謝産物及び反応タイプにより異なる。

【0052】

この実施形態における反応組成物を、インビトロで硝酸レダクターゼ機能及び/又は亜硝酸レダクターゼ機能から得られた化合物を含む生体サンプルの添加により調製する。

【0053】

別の実施形態では、新生物発生前の良性状態からの胃癌の識別のための反応組成物を、インビボで硝酸レダクターゼ機能及び/又は亜硝酸レダクターゼ機能から得られた化合物を含むインビトロの生体サンプルの添加により調製する。

【0054】

この試験生体サンプルを、当分野で既知の標準的な方法を使用して、ヒト又は他の生物学的起源の組織、胃洗浄液、血清、血漿、尿、呼気凝縮液又は呼気から得ることができる

10

20

30

40

50

。

【0055】

発色反応、発光反応、蛍光反応又はELISA反応により、生体サンプル中の代謝産物の量に比例するシグナルが生じ、このシグナルは、正常範囲（新生物発生前の良性状態を有する個体での対応する代謝産物のレベルの平均により算出される）と比べて高い場合には胃癌の存在を示す。

【0056】

そのため、代謝産物（例えば、硝酸塩及び／又は亜硝酸塩及び／又は酸化窒素及び／又はp-クレゾール及び／又はインドール及び／又は3-ヒドロキシアントラニル酸及び／又はデオキシコール酸及び／又はフェノール）との反応用の組成物に、インビトロで生体

10

サンプルを添加し、新生物発生前の良性状態からの胃癌の識別において特異的である定量をもたらす、方法を開発することが可能である。そのため、本実施形態の方法は、

a) 上記で説明した少なくとも1種の反応組成物の調製、並びに言及した識別のために試験するインビトロの生体サンプル由来の硝酸レダクターゼ機能及び／又は亜硝酸レダクターゼ機能からの代謝産物と、反応組成物との接触の促進の工程、

b) 発色反応、発光反応、蛍光反応又はELISA反応のインキュベーションの工程、

c) 正常範囲と比べて値が高い場合には胃癌の存在に関して陽性に対応する吸光度又は発光シグナル若しくは蛍光シグナルの定量による、b) で得られた反応の結果の分析の工程

20

を含む。

【0057】

この方法の代替実施形態では、前記代謝産物を質量分析により定量する。そのため、この代替実施形態では、本発明の方法は、

a) 言及した識別のために試験するインビトロの生体サンプル由来の硝酸レダクターゼ機能及び／又は亜硝酸レダクターゼ機能からの代謝産物を得る工程、

b) このサンプルを質量分析に供する工程、

c) 正常範囲と比べて値が高い場合には胃癌の存在に関して陽性に対応する硝酸塩及び／又は亜硝酸塩及び／又は酸化窒素及び／又はp-クレゾール及び／又はインドール及び／又は3-ヒドロキシアントラニル酸及び／又はデオキシコール酸及び／又はフェノールの存在量を定量することにより、b) で得られた結果を分析する工程

30

を含む。

【0058】

結論として、本発明の方法は、生体サンプルにおける新生物発生前の良性状態からの胃癌の識別で有用であり、このことは、この目的のために設計された、遺伝子配列、反応組成物、及び識別のために使用される計算により付与されるこの方法の高い感度及び特異性に起因する。この方法の利点は、新生物発生前の状態／病変を有する患者が胃癌へと既に進行しているかどうかを高い識別能力で確認することが可能であるということである。この方法は、胃癌の発生を検出するために又は予測するために、新生物発生前の良性状態（例えば、慢性胃炎、腸上皮化生及び異形成）を有する患者のモニタリングで適用され得、最終的には、抗生物質の組成物を使用して適切な予防処置の基盤を提供する。

40

【実施例】

【0059】

実施例

実施例1 - プライマーの配列の調製

プライマー配列 配列番号1～配列番号18を下記のとおり調製した：

上記で示した配列を、固相ホスホロアミダイトヌクレオシドを使用するヌクレオチド合成法により調製した。この合成を、各オリゴヌクレオチドの3'末端の最初の塩基で官能化された固体支持体を備えた充填カラムで実施した。各オリゴヌクレオチドの調製は多数の合成サイクルの後に起き、それぞれは下記の4種の化学反応からなった：アンロック（脱トリチル化）；カップリング；保護及び酸化。各サイクルでは、成長中の鎖の5'末端

50

に、所望される配列に対応するヌクレオチド残基が段階的に付加された。

【0060】

プローブの濃度を、微生物DNAフリー水（分子生物学グレード、ゲノムDNA汚染を除去するためにフィルタ滅菌されてUV処理されているヌクレアーゼフリー水）による凍結乾燥調製物の希釈により、20 μMの値に調整した。

【0061】

実施例2 - PCR反応用の組成物の調製

様々な可能な組み合わせで配列番号1～配列番号18のヌクレオチドを含むいくつかのPCR反応組成物を調製した。

【0062】

2.1. 新生物発生前の病変からの胃癌の識別のためのPCR反応用の本発明の組成物の一例は、

- ・ 濃度1×でのリアルタイムPCR用の溶液試薬「PowerUp SYBR Green Master Mix」；
- ・ 1 μMの濃度での配列：配列番号1を有するオリゴヌクレオチド；
- ・ 1 μMの濃度での配列：配列番号2を有するオリゴヌクレオチド；
- ・ 微生物DNAフリー水

である。

【0063】

2.2. 新生物発生前の病変からの胃癌の識別のためのPCR反応用の本発明の組成物の別の例は、

- ・ 濃度1×でのリアルタイムPCR用の溶液試薬「PowerUp SYBR Green Master Mix」；
- ・ 1 μMの濃度での配列：配列番号3を有するオリゴヌクレオチド；
- ・ 1 μMの濃度での配列：配列番号4を有するオリゴヌクレオチド；
- ・ 微生物DNAフリー水

である。

【0064】

2.3. 新生物発生前の病変からの胃癌の識別のためのPCR反応用の本発明の組成物の別の例は、

- ・ 濃度1×でのリアルタイムPCR用の溶液試薬「PowerUp SYBR Green Master Mix」；
- ・ 1 μMの濃度での配列：配列番号5を有するオリゴヌクレオチド；
- ・ 1 μMの濃度での配列：配列番号6を有するオリゴヌクレオチド；
- ・ 微生物DNAフリー水

である。

【0065】

2.4. 新生物発生前の病変からの胃癌の識別のためのPCR反応用の本発明の組成物の別の例は、

- ・ 濃度1×でのリアルタイムPCR用の溶液試薬「PowerUp SYBR Green Master Mix」；
- ・ 1 μMの濃度での配列：配列番号7を有するオリゴヌクレオチド；
- ・ 1 μMの濃度での配列：配列番号8を有するオリゴヌクレオチド；
- ・ 微生物DNAフリー水

である。

【0066】

2.5. 新生物発生前の病変からの胃癌の識別のためのPCR反応用の本発明の組成物の別の例は、

- ・ 濃度1×でのリアルタイムPCR用の溶液試薬「PowerUp SYBR Green Master Mix」；

；

10

20

30

40

50

- ・ 1 μ M の濃度での配列：配列番号 9 を有するオリゴヌクレオチド；
- ・ 1 μ M の濃度での配列：配列番号 10 を有するオリゴヌクレオチド；
- ・ 微生物 DNA フリー水

である。

【0067】

2.6. 新生物発生前の病変からの胃癌の識別のための PCR 反応用の本発明の組成物の別の例は、

- ・ 濃度 1 x でのリアルタイム PCR 用の溶液試薬「PowerUp SYBR Green Master Mix」；
- ・ 1 μ M の濃度での配列：配列番号 11 を有するオリゴヌクレオチド；
- ・ 1 μ M の濃度での配列：配列番号 12 を有するオリゴヌクレオチド；
- ・ 微生物 DNA フリー水

10

である。

【0068】

2.7. 新生物発生前の病変からの胃癌の識別のための PCR 反応用の本発明の組成物の別の例は、

- ・ 濃度 1 x でのリアルタイム PCR 用の溶液試薬「PowerUp SYBR Green Master Mix」；
- ・ 1 μ M の濃度での配列：配列番号 13 を有するオリゴヌクレオチド；
- ・ 1 μ M の濃度での配列：配列番号 14 を有するオリゴヌクレオチド；
- ・ 微生物 DNA フリー水

20

である。

【0069】

2.8. 新生物発生前の病変からの胃癌の識別のための PCR 反応用の本発明の組成物の別の例は、

- ・ 濃度 1 x でのリアルタイム PCR 用の溶液試薬「PowerUp SYBR Green Master Mix」；
- ・ 1 μ M の濃度での配列：配列番号 15 を有するオリゴヌクレオチド；
- ・ 1 μ M の濃度での配列：配列番号 16 を有するオリゴヌクレオチド；
- ・ 微生物 DNA フリー水

30

である。

【0070】

2.9. 新生物発生前の病変からの胃癌の識別のための PCR 反応用の本発明の組成物の別の例は、

- ・ 濃度 1 x でのリアルタイム PCR 用の溶液試薬「PowerUp SYBR Green Master Mix」；
- ・ 1 μ M の濃度での配列：配列番号 17 を有するオリゴヌクレオチド；
- ・ 1 μ M の濃度での配列：配列番号 18 を有するオリゴヌクレオチド；
- ・ 微生物 DNA フリー水

40

である。

【0071】

実施例 3 - 細菌の DNA 又は cDNA の定量用の組成物の調製

新生物発生前の良性状態からの胃癌の識別のための PCR 反応混合物の組成物を、上述した PCR 組成物に、インビトロで得た生体サンプル由来の DNA を添加することにより、新生物発生前の良性状態からの胃癌の識別のための PCR 反応混合物の組成物を調製した。例えば RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用して抽出した RNA を、前記リアルタイム PCR 反応に使用し得る cDNA へと変換する逆転写酵素キット (例えば、Superscript IV (Invitrogen)) を使用するインビトロでの方法によって、細菌に由来する RNA から得た相補 DNA (cDNA) も使用した。

50

【0072】

実施例 4 - 組織中の細菌 DNA の定量の方法

本発明の方法を実行するために、細菌 DNA の定量用の様々な組成物を、先の実施例で説明したように調製した。この実施例では、新鮮な又はホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) のいずれかの組織生検由来の DNA を使用した。

【0073】

先の実施例からの定量用の組成物を、リアルタイム PCR での増幅に供した。

【0074】

この増幅を実行するために、Scientific ThermoFischer から販売されている ABI PRISM (登録商標) 7500 Fast Real Time PCR 装置を使用した。

【0075】

この PCR 増幅の条件は下記のとおりであった：

- ・ 第 1 ステージ：50 で 2 分及び続いて 95 で 10 分を 1 サイクル、
- ・ 第 2 ステージ：シグナルの取得を伴う、95 で 15 秒及び 60 で 1 分を含む 40 サイクル、
- ・ 第 3 ステージ：15 秒にわたり 95、1 分にわたり 60、30 秒にわたり 95 及び 15 秒にわたり 60 を 1 サイクル。

【0076】

得られた蛍光シグナルの分析と、全細菌濃度により除算された各細菌の DNA 濃度の定量とから、各細菌の相対存在量を得た。アクロモバクター (Achromobacter) 種及び / 又はシトロバクター (Citrobacter) 種及び / 又はクロストリジウム (Clostridium) 種及び / 又はロドコッカス (Rhodococcus) 種及び / 又はラクトバチルス (Lactobacillus) 種及び / 又はフィロバクテリウム (Phyllobacterium) 種の相対存在量と、ヘリコバクター (Helicobacter) 種及び / 又はナイセリア (Neisseria) 種の存在量との比を算出し、 \log_{10} 変換を実施し、且つ胃癌の存在に関するカットオフとして正の値を考慮することにより、胃癌と慢性胃炎等の新生物発生前の病変との間で、高度に敏感であり且つ特異的な識別が達成される。

【0077】

この実施例では、利点は、試験の結果を同一サンプルで観測した解剖学的な且つ病理学的な特徴と相関させることが可能であるということである。FFPE 組織を使用することも有利であり、なぜならば、長期の臨床経過観察によりアーカイブサンプル (archival sample) から遡及的に試験し得るからである。

【0078】

実施例 5 - 胃洗浄液中における細菌 DNA の定量の方法

本発明の方法を実行するために、細菌 DNA の定量用の PCR 反応のための様々な組成物を、先の実施例で説明したように調製した。

【0079】

この実施例では、内視鏡検査により及び Qiagen 社の QIAamp (登録商標) DNA Microbiome Kit を使用してインビトロでの DNA 抽出を実施することにより得られた胃洗浄液由来の DNA を使用した。

【0080】

増幅反応及び分析を、先の実施例で述べたように実施した。

【0081】

この実施例での利点は、特定の解剖学的位置に限定されている生検と比較して、胃細菌内容物のより包括的なサンプリングを表す生体サンプルで決定を行ない得ることである。

【0082】

実施例 6 - 呼気凝縮液中における細菌 DNA の定量の方法

本発明の方法を実行するために、細菌 DNA の定量用の PCR 反応のための様々な組成物を、先の実施例で説明したように調製した。

【0083】

この実施例では、QIAamp (登録商標) DNA Microbiome Kit を使用することによりインビ

10

20

30

40

50

ト口で得られた呼気凝縮液由来のDNAを使用して、Respiratory Research Inc.のRTube 息凝縮液採取器等の採取用の装置又は類似の市販の装置（例えば、EcoScreen（Erich Jaeger GmbH）、ANACON凝縮器（Biostec）、TURBO-DECCS（ItaChill Pharma）及びOncosopro（Infogene,lda））により得られた呼気凝縮液からのDNA抽出を実施した。

【0084】

増幅反応及び分析を、先の実施例で述べたように実施した。

【0085】

この実施例では、利点は、内視鏡検査、生検又は手術に頼る必要なしに、患者にとってより便利であり侵襲性がより低い種類のサンプルから決定を行い得ることである。

【0086】

実施例7 - 代謝産物との反応用の組成物の調製

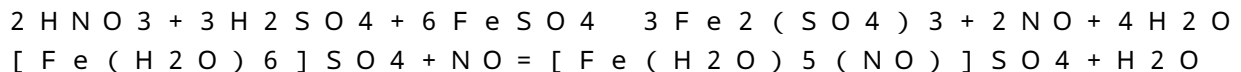
硝酸塩及び/又は亜硝酸塩及び/又は酸化窒素及び/又はp-クレゾール及び/又はインドール及び/又は3-ヒドロキシアントラニル酸及び/又はデオキシコール酸及び/又はフェノールとの反応物を含む、硝酸レダクターゼ細菌機能及び/又は亜硝酸レダクターゼ細菌機能に由来する代謝産物との反応用の組成物を調製した。

【0087】

代謝産物の定量用の反応組成物は、所望される代謝産物及び反応タイプにより異なる。

【0088】

7.1. 硝酸塩の検出及び定量による新生物発生前の状態からの胃癌の識別用の本発明の組成物は、下記の化学反応に従って、反応物として例えば硫酸鉄及び硫酸を含む前記組成物である。



【0089】

7.2. 硝酸塩の検出及び定量による新生物発生前の状態からの胃癌の識別用の本発明の組成物の別の例は、下記の化学反応に従って、反応物として例えば水酸化ナトリウム、アルミニウム、及び赤リトマス紙を含む前記組成物である。



【0090】

7.3. 硝酸塩の検出及び定量による新生物発生前の状態からの胃癌の識別用の本発明の組成物の別の例は、反応物として例えばジフェニルアミンを含む前記組成物である。

【0091】

7.4. 硝酸塩の検出及び定量による新生物発生前の状態からの胃癌の識別用の本発明の組成物の別の例は、反応物として例えば硫酸及び硫酸中の塩化アンモニウムを含む前記組成物である。

【0092】

7.5. 硝酸塩の検出及び定量による新生物発生前の状態からの胃癌の識別用の本発明の組成物の別の例は、下記の化学反応に従って、反応物として例えば硫酸及び銅を含む前記組成物である。



【0093】

7.6. 亜硝酸塩の検出及び定量による新生物発生前の状態からの胃癌の識別用の本発明の組成物の別の例は、反応物として例えば4モル濃度の硫酸及び0.1モル濃度の硫酸鉄(II)を含む前記組成物である。

【0094】

7.7. 酸化窒素の検出及び定量による新生物発生前の状態からの胃癌の識別用の本発明の組成物の別の例は、化学発光化合物である二酸化窒素を形成するための反応物として例えばオゾンを含む前記組成物である。

【0095】

7.8. 代謝産物の検出及び定量による新生物発生前の状態からの胃癌の識別用の本発

10

20

30

40

50

明の組成物の別の例は、例えば前記代謝産物に対する親和性を有する抗体を含む前記組成物である。

【0096】

実施例8 - インビトロでの細菌代謝機能に由来する代謝産物の定量用の組成物の調製

新生物発生前の良性状態からの胃癌の識別用の反応組成物を、先の実施例で述べた反応組成物の、硝酸レダクターゼ細菌代謝機能及び/又は亜硝酸レダクターゼ細菌代謝機能に由来する前記代謝産物を含む、インビトロで得られた生体サンプルへの添加により調製する。インビトロで硝酸レダクターゼ機能由来の及び/又は亜硝酸レダクターゼ機能由来の代謝産物を得るために、基質(例えば硝酸塩)をインビトロで生体サンプルに添加し得る。

10

【0097】

試験生体サンプルを、当分野で既知の標準的な方法を使用して、ヒト又は他の生物学的起源の組織、胃洗浄液、血清、血漿、尿、呼気凝縮液又は呼気から得ることができる。

【0098】

実施例9 - インビボでの細菌代謝機能に由来する代謝産物の定量用の組成物の調製

新生物発生前の良性状態からの胃癌の識別用の反応組成物を、先の実施例で述べた反応組成物の、インビボで実施された硝酸レダクターゼ細菌代謝機能及び/又は亜硝酸レダクターゼ細菌代謝機能に由来する前記代謝産物を含む、インビトロで得られた生体サンプルへの添加により調製する。この実施例では、硝酸レダクターゼ機能由来の及び/又は亜硝酸レダクターゼ機能由来の代謝産物を含むインビトロのサンプルを得るために、基質(例えば硝酸塩若しくは亜硝酸塩又は硝酸レダクターゼ代謝機能及び/又は亜硝酸レダクターゼ代謝機能の他の既知の基質)を患者に投与した後に生体サンプルを得る。

20

【0099】

試験生体サンプルを、当分野で既知の標準的な方法を使用して、ヒト又は他の生物学的起源の組織、胃洗浄液、血清、血漿、尿、呼気凝縮液又は呼気から得ることができる。

【0100】

実施例10 - 発色反応、発光反応、蛍光反応又は免疫反応を使用する細菌代謝産物の定量の方法

本発明において新生物発生前の良性状態から胃癌を識別する方法を実行するために、先の実施例に従って、インビトロの生体サンプルを添加する、代謝産物との反応用の組成物を調製した。

30

【0101】

発色反応、発光反応、蛍光反応又はELISA反応をインキュベートして、この生体サンプル中の代謝産物の量に比例するシグナルを得た。

【0102】

正常範囲(新生物発生前の良性状態を有する個体における対応する代謝産物のレベルの平均により算出される)と比べて高い場合には、結果は、サンプルが胃癌に関して陽性であることを示す。

【0103】

この実施例では、利点は、実験室で一般的であり且つ重くて高価な機器を必要としないアッセイにより決定を行ない得ることである。

40

【0104】

実施例11 - 質量分析を使用する細菌代謝産物の定量の方法

本発明において新生物発生前の良性状態から胃癌を識別する方法を実行するために、インビトロの生体サンプルを先の実施例で述べたように得て、質量分析に直接供した。固体、液体又は気体であり得る生体サンプルはイオン化され、次いで、このイオンは、このイオンを加速させて電場又は磁場に供することにより、このイオンの質量対電荷比に従って分離される。次いで、このイオンは、電子増倍管等の荷電粒子を検出し得るメカニズムにより検出される。結果は、質量対電荷比の関数として、検出されたイオンの相対存在量のスペクトルとして表示される。このようにして、サンプル中の前記代謝産物は、同定した

50

質量に対して既知の質量を相関させることにより同定され、生体サンプル中の代謝産物の量に比例する、対応するピークの強度により定量される。

【 0 1 0 5 】

正常範囲（新生物発生前の良性状態を有する個体における対応する代謝産物のレベルの平均により算出される）と比べて高い場合には、結果は、サンプルが胃癌に関して陽性であることを示す。

【 0 1 0 6 】

この実施例では、利点は、同一サンプル中で同時にいくつかの代謝産物の決定を行ない得ることである。

【 0 1 0 7 】

配列表

配列番号 1 :

5' -TCGGGCCTTGGTAGCG-3'

配列番号 2 :

5' -TTCCTTTGAGTTTTAATCTT -3'

配列番号 3 :

5' -GTAAAGTACTTTCAGCGAG-3'

配列番号 4 :

5' -GTTTCGGATGCAGTCCC-3'

配列番号 5 :

5' -GCTTAACACATGCAAGTCGAGCG-3'

配列番号 6 :

5' -CCTTTCGGGAGGCTATCC-3'

配列番号 7 :

5' -GGGTTCCCTCCACGGGAT-3'

配列番号 8 :

5' -CCTTTGAGTTTTAGCCTTG-3'

配列番号 9 :

5' - GGCAGCAGTAGGGAAT -3'

配列番号 10 :

5' - CTATCCTTCTCACCAAC -3'

配列番号 11 :

5' -CTGCCTTTGATACTGGTAGT-3'

配列番号 12 :

5' -CGGCTAGCTCTCATAGTTTA-3'

配列番号 13 :

5' -GAAGATAATGACGGTATCTAAC-3'

配列番号 14 :

5' -ATTTACACCTGACTGACTAT-3'

配列番号 15 :

5' -AACGATGTCAATTAGCTGTT-3'

配列番号 16 :

5' -CAATTCCTTTGAGTTTTAATC-3'

配列番号 17 :

5' -TAGATACCCTGGTAGTCC-3'

配列番号 18 :

5' -CTGACGACAGCCATGC-3'

【 0 1 0 8 】

参考文献 :

1. Ferlay J, Soerjomataram II, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality

10

20

30

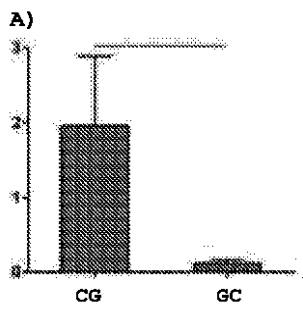
40

50

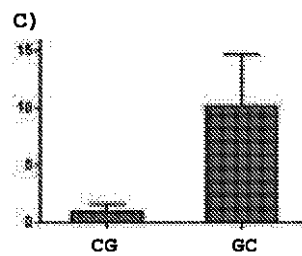
- worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2014;124:1-14.
2. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992;52:6735-40.
3. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, et al. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001;345:784-9.
4. Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, et al. Helicobacter pylori and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1680-7. 10
5. Ferreira RM, Machado JC, Figueiredo C. Clinical relevance of Helicobacter pylori vacA and cagA genotypes in gastric carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014;28:1003-1015.
6. Mimuro H, Suzuki T, Nagai S, et al. Helicobacter pylori dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. *Cell Host Microbe* 2007;2:250-63.
7. Machado AM, Figueiredo C, Touati E, et al. Helicobacter pylori infection induces genetic instability of nuclear and mitochondrial DNA in gastric cells. *Clin Cancer Res* 2009;15:2995-3002.
8. El-Omar EM, Oien K, El-Nujumi A, et al. Helicobacter pylori infection and chronic gastric acid hyposecretion. *Gastroenterology* 1997;113:15-24. 20
9. Fukase K, Kato M, Kikuchi S, et al. Effect of eradication of Helicobacter pylori on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2008;372:392-7.
10. Ma JL, Zhang L, Brown LM, et al. Fifteen-year effects of Helicobacter pylori, garlic, and vitamin treatments on gastric cancer incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst* 2012;104:488-92.
11. Wong BC, Lam SK, Wong WM, et al. Helicobacter pylori eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004;291:187-94. 30
12. Plottel CS, Blaser MJ. Microbiome and malignancy. *Cell Host Microbe* 2011;10:324-35.
13. Leach SA, Thompson M, Hill M. Bacterially catalysed N-nitrosation reactions and their relative importance in the human stomach. *Carcinogenesis* 1987;8:1907-12.
14. Stockbruegger RW. Bacterial overgrowth as a consequence of reduced gastric acidity. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1985;111:7-16.
15. Lertpiriyapong K, Whary MT, Muthupalani S, et al. Gastric colonisation with a restricted commensal microbiota replicates the promotion of neoplastic lesions by diverse intestinal microbiota in the Helicobacter pylori INS-GAS mouse model of gastric carcinogenesis. *Gut* 2014;63:54-63. 40
16. Lofgren JL, Whary MT, Ge Z, et al. Lack of commensal flora in Helicobacter pylori-infected INS-GAS mice reduces gastritis and delays intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* 2011;140:210-20.
17. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:732-7.
18. Maldonado-Contreras A, Goldfarb KC, Godoy-Vitorino F, et al. Structure of the human gastric bacterial community in relation to Helicobacter pylori status. *J SME J* 2011;5:574-9. 50

- 19. Delgado S, Cabrera-Rubio R, Mira A, et al. Microbiological Survey of the Human Gastric Ecosystem Using Culturing and Pyrosequencing Methods. *Microb Ecol* 2013.
- 20. Aviles-Jimenez F, Vazquez-Jimenez F, Medrano-Guzman R, et al. Stomach microbiota composition varies between patients with non-atrophic gastritis and patients with intestinal type of gastric cancer. *Sci Rep* 2014;4:4202.

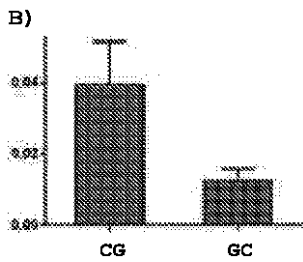
【 図 1 A) 】



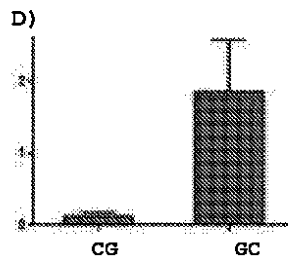
【 図 1 C) 】



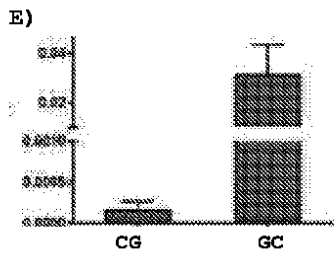
【 図 1 B) 】



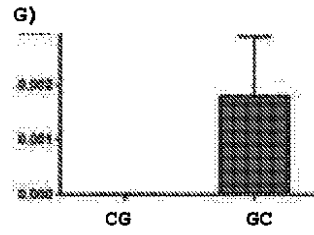
【 図 1 D) 】



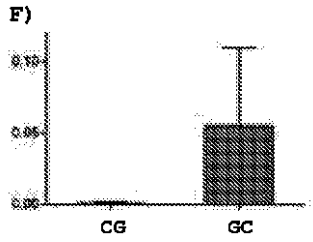
【 図 1 E) 】



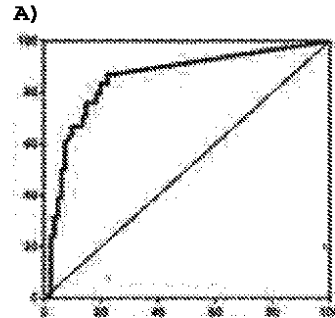
【 図 1 G) 】



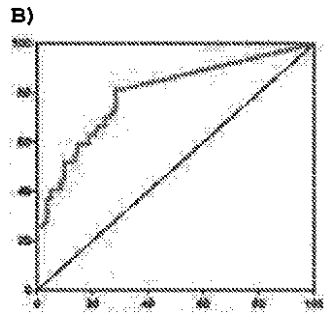
【 図 1 F) 】



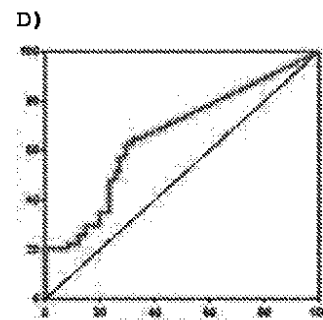
【 図 2 A) 】



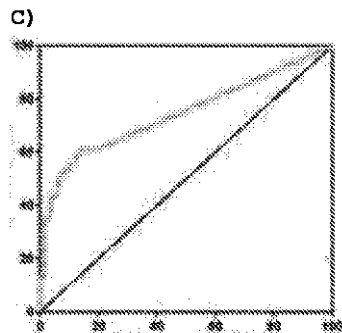
【 図 2 B) 】



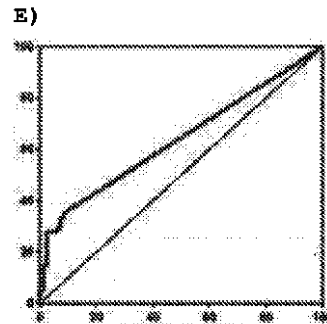
【 図 2 D) 】



【 図 2 C) 】

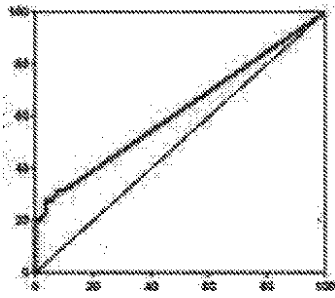


【 図 2 E) 】



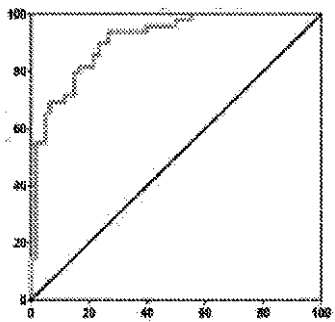
【 図 2 F) 】

F)



【 図 3 】

Figure 3



【 配 列 表 】

2020513852000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/PT2018/050007

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/6886 C12Q1/689 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 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) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LILI WANG ET AL: "Bacterial overgrowth and diversification of microbiota in gastric cancer :", EUROPEAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY, vol. 28, no. 3, 1 March 2016 (2016-03-01), pages 261-266, XP055471644, UK ISSN: 0954-691X, DOI: 10.1097/MEG.0000000000000542 abstract ----- -/--	1,2,5, 8-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of 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		Date of mailing of the international search report
3 May 2018		10/07/2018
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Aguilera, Miguel

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/PT2018/056007

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CHANG SOO EUN ET AL: "Differences in Gastric Mucosal Microbiota Profiling in Patients with Chronic Gastritis, Intestinal Metaplasia, and Gastric Cancer Using Pyrosequencing Methods", HELICOBACTER, vol. 19, no. 6, 1 December 2014 (2014-12-01), pages 407-416, XP055471655, US ISSN: 1083-4389, DOI: 10.1111/hel.12145 abstract</p> <p>-----</p>	1,2,5, 8-11
A	<p>FRANCISCO AVILES-JIMENEZ ET AL: "Stomach microbiota composition varies between patients with non-atrophic gastritis and patients with intestinal type of gastric cancer", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 4, no. 1, 26 February 2014 (2014-02-26), XP055471652, DOI: 10.1038/srep04202 Abstract and Methods section</p> <p>-----</p>	1,2,5, 8-11
A	<p>WO 2004/084705 A2 (UNIFORMED SERV UNIV HEALTH [US]; DOI SONIA [US]; DUBOIS ANDRE [US]; LI) 7 October 2004 (2004-10-07) pages 7-12; table 2</p> <p>-----</p>	1,2,5, 8-11
A	<p>CHAO ZHANG ET AL: "Identification of low abundance microbiome in clinical samples using whole genome sequencing", GENOME BIOLOGY, vol. 16, no. 1, 27 November 2015 (2015-11-27), XP055441714, DOI: 10.1186/s13059-015-0821-z pages 7-9; figures 6,7 page 10, column 1</p> <p>-----</p>	1,2,5, 8-11
A	<p>L. LIU ET AL: "Ribosomal DNA-Directed PCR for Identification of Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans Recovered from Sputum Samples from Cystic Fibrosis Patients", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 40, no. 4, 1 April 2002 (2002-04-01), pages 1210-1213, XP055472022, US ISSN: 0095-1137, DOI: 10.1128/JCM.40.4.1210-1213.2002 page 1211, column 1; table 1</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,2,5, 8-11

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/PT2018/050007

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	RUI M FERREIRA ET AL: "Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota", GUT, vol. 67, no. 2, 4 November 2017 (2017-11-04), pages 226-236, XP055471653, UK ISSN: 0017-5749, DOI: 10.1136/gutjnl-2017-314205 the whole document -----	1,2,5, 8-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/PT2018/050007**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:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional 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.:
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.:
- 1, 2, 5, 8-11(all partially)

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 Application No. PCT/ PT2018/ 050007

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 2, 5, 8-11(all partially)

Set of oligonucleotides for discrimination between gastric cancer and a pre-neoplastic benign condition comprising SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 2. Compositions and kits comprising said set. In vitro methods using said set.

2-9. claims: 1, 2, 5, 8-11(all partially)

Set of oligonucleotides for discrimination between gastric cancer and a pre-neoplastic benign condition comprising SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 4. Compositions and kits comprising said set. In vitro methods using said set.

-
[idem for each one of the oligonucleotide pairs listed in claim 1]

10-17. claims: 3, 4, 6-14(all partially)

Compositions comprising a reactant to metabolite nitrate. Kits comprising said composition. In vitro methods making use of said composition.

-
[idem for each one of the metabolites listed in claim 3]

18-23. claim: 15(partially)

Compositions for treatment comprising an antibiotic suitable for *Achromobacter* sp.

-
[idem for each one of the bacterial species listed in claim 15]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/PT2018/050007

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004084705 A2	07-10-2004	WO 2004084705 A2	07-10-2004
		WO 2004084815 A2	07-10-2004

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/536 (2006.01)	G 0 1 N 33/536	C
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	P
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	G 0 1 N 21/64	F

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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

(74) 代理人 100134120

弁理士 内藤 和彦

(72) 発明者 フォンテス ヘルデイロ フィゲイレド, マリア ド セウ
ポルトガル国, ポルト 4 2 0 0 - 1 3 5 - ルア ジュリオ アマラル デ カルヴァーリオ
4 5, アイピーエーティーアイエムユーピー

(72) 発明者 レモス マチャド, ジョセ カルロス
ポルトガル国, ポルト 4 2 0 0 - 1 3 5 - ルア ジュリオ アマラル デ カルヴァーリオ
4 5, アイピーエーティーアイエムユーピー

(72) 発明者 メンデス ダ シルヴァ フェツレイラ, ルイ マニユエル
ポルトガル国, ポルト 4 2 0 0 - 1 3 5 - ルア ジュリオ アマラル デ カルヴァーリオ
4 5, アイピーエーティーアイエムユーピー

(72) 発明者 ダ シルヴァ ボルゲス コスタ, ジョセ ルイス
ポルトガル国, ポルト 4 2 0 0 - 1 3 5 - ルア ジュリオ アマラル デ カルヴァーリオ
4 5, アイピーエーティーアイエムユーピー

F ターム(参考) 2G043 AA01 BA16 DA02 EA01
2G045 AA26 CB02 DA13 DA14
4B063 QA19 QQ03 QQ06 QQ42 QQ53 QQ79 QQ89 QR08 QR55 QR62
QS32 QS33 QS34 QX02
4C084 AA17 NA05 ZA661 ZA662 ZB261 ZB262

专利名称(译)	胃癌的微生物组标记		
公开(公告)号	JP2020513852A	公开(公告)日	2020-05-21
申请号	JP2019572339	申请日	2018-03-14
发明人	フオンテス ヘルデイロ フィゲイレド, マリア ド セウ レモス マチャド, ジョセ カルロス メンデス ダ シルヴァ フェレイラ, ルイ マニユエル ダ シルヴァ ポルゲス コスタ, ジョセルイス		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/6886 C12Q1/6851 A61K45/00 A61P35/00 A61P1/00 G01N33/53 G01N33/536 G01N33/50 G01N21/64		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q1/689		
FI分类号	C12N15/09.Z C12Q1/6886.ZNA.Z C12Q1/6851.Z A61K45/00 A61P35/00 A61P1/00 G01N33/53.Y G01N33/536.C G01N33/50.P G01N21/64.F		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/DA02 2G043/EA01 2G045/AA26 2G045/CB02 2G045/DA13 2G045 /DA14 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ06 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS32 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084 /AA17 4C084/NA05 4C084/ZA661 4C084/ZA662 4C084/ZB261 4C084/ZB262		
代理人(译)	江口明彦 内藤一彦		
优先权	2017109971 2017-03-14 PT		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

胃癌的微生物标志物。本发明涉及一种通过检测来源于特定细菌的核酸或代谢物来将胃癌与癌前良性疾区分开的方法。所述方法使用了包含引物的反应组合物,所述引物用于检测和扩增与所述特定细菌或源自代谢功能的代谢物的核酸的反应物。本发明的另一方面是用于实施上述方法的引物,其具有对所述特定细菌核酸显示高特异性的序列(鉴定为SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:18),和本发明涉及包含底漆的组合物。本发明进一步涉及一种试剂盒,其包含上述组合物,用于通过实施本发明的方法来检测来自特定细菌的核酸或代谢物。本发明的方法,基因序列,组合物和试剂盒可有利地用于区分生物学样品中的胃癌与肿瘤前良性疾病,所述生物样品包括方法,基因序列,由于此类组合物和试剂盒对此类歧视的高度敏感性和特异性。因此,本发明可用于监测患有肿瘤前良性疾病(例如,慢性胃炎,肠化生和异型增生)的患者,以检测或预测胃癌的发展,特别是,它可以为正确的治疗设置提供基础。因此,本发明被包括在医学,药学,分子生物学,生物化学和细菌相关遗传学的技术领域中。[选择图]无

(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2020-513852 (2020-513852A)
	(43) 公表日	令和2年5月21日(2020.5.21)
(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z 2 G 0 4 3
C 1 2 Q 1/6886 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6886	Z N A Z 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851	Z 4 B 0 6 3
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く
(2) 出願番号	特願2019-572339 (P2019-572339)	(71) 出願人
(8) (22) 出願日	平成30年3月14日(2018.3.14)	519331580
(85) 翻訳文提出日	令和1年11月1日(2019.11.1)	インスティテュート デ バトロジア エ
(86) 国際出願番号	PCT/PT2018/050007	イムノロジーア タ ユニバーシターテ
(87) 国際公開番号	W02018/169423	ド ホルト (アイビーエーティーアイ
(87) 国際公開日	平成30年9月20日(2018.9.20)	エムユービー)
(31) 優先権主張番号	109971	ポルトガル国、ポルト 4 2 0 0 - 1 3 5
(32) 優先日	平成29年3月14日(2017.3.14)	ールア ジュリオ アマラル デ カ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	ポルトガル(P)	ルヴァーリョ 4 5
		(74) 代理人
		100079108
		弁理士 稲葉 良幸
		(74) 代理人
		100109346
		弁理士 大貫 敏史
		(74) 代理人
		100117189
		弁理士 江口 昭彦
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】	胃癌用のマイクロバイオームマーカー	