

(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2015-503922
(P2015-503922A)

(43) 公表日 平成27年2月5日(2015.2.5)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-----------------------|------------------|-------------|
| C12N 15/09 (2006.01) | C12N 15/00 A | 4B024 |
| GO1N 33/543 (2006.01) | GO1N 33/543 545A | 4B029 |
| GO1N 33/574 (2006.01) | GO1N 33/574 A | 4B063 |
| GO1N 33/53 (2006.01) | GO1N 33/53 U | 4B064 |
| C12Q 1/04 (2006.01) | C12Q 1/04 ZNA | 4H045 |

審査請求有 予備審査請求有 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-550608 (P2014-550608)
 (86) (22) 出願日 平成24年1月9日 (2012.1.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年9月5日 (2014.9.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2012/070151
 (87) 国際公開番号 WO2013/104104
 (87) 国際公開日 平成25年7月18日 (2013.7.18)

(71) 出願人 514173825
 スージョウ マイクロダイアグ バイオメ
 ディスン カンパニー リミテッド
 中華人民共和国 ジアンサー 21512
 3 スージョウ インダストリアル パー
 ク ディストリクト バイオベイ 218
 シンファー ロード シー4 ビルディン
 グ スイート 201
 (74) 代理人 100116872
 弁理士 藤田 和子
 (74) 代理人 100107560
 弁理士 佐野 惣一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳癌の予測および診断のためのバイオマーカー

(57) 【要約】

乳癌診断および支持マーカーの調製における、CST4 遺伝子、CST4 遺伝子の mRNA、CST4 遺伝子の スプライスの cDNA、CST4 特異的プライマーに 対応する増幅産物、CST4 遺伝子によってコードされる シスタチンSタンパク質およびシスタチンSのエピトー タンパク質の利用を提供する。同じものが、乳癌の診断、 動的モニタリングおよび予後診断において利用可能で ある。

【選択図】 図 10

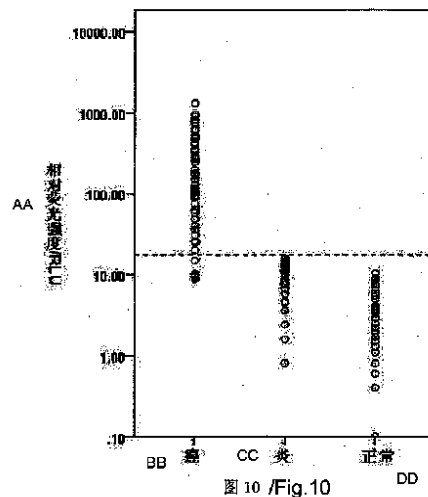


図 10 /Fig.10

AA RELATIVE FLUORESCENCE INTENSITY/RLU
 BB CANCER
 CC INFLAMMATION
 DD NORMAL

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

乳癌の予想および診断における、CST4 遺伝子、CST4 の mRNA、CST4 のスプライスの cDNA、シスタチン S (CST4 によってコードされるタンパク質) およびシスタチン S のエピトープの利用方法であって、前記シスタチン S の配列が配列番号 42 に示されている、利用方法。

【請求項 2】

CST4、CST4 の mRNA および CST4 のスプライスの cDNA のプローブ配列が配列番号 3 に示されている、請求項 1 に記載の利用方法。

【請求項 3】

増幅産物の 3) に述べられるプライマーが、配列番号 1、4、6、8、10、12、14、16、18、20 (プライマー 1) および配列番号 2、5、7、9、11、13、15、17、19、21 (プライマー 2) に示される配列を有する利用方法であって、配列番号 1 における配列は配列番号 2 における配列と対になり、配列番号 4 における配列は配列番号 5 における配列と対になり、配列番号 6 における配列は配列番号 7 における配列と対になり、配列番号 8 における配列は配列番号 9 における配列と対になり、配列番号 10 における配列は配列番号 11 における配列と対になり、配列番号 12 における配列は配列番号 13 における配列と対になり、配列番号 14 における配列は配列番号 15 における配列と対になり、配列番号 16 における配列は配列番号 17 における配列と対になり、配列番号 18 における配列は配列番号 19 における配列と対になり、配列番号 20 における配列は配列番号 21 における配列と対にされる、請求項 1 に記載の利用方法。

【請求項 4】

シスタチン S のエピトープペプチドの配列が配列番号 50 に示されている、請求項 1 に記載の利用方法。

【請求項 5】

乳癌の転移、微小転移巣、pTNM ステージ判定、癌治療の間の腫瘍のリアルタイムモニタリングおよび予後予測を含む、請求項 1 に記載の利用方法。

【請求項 6】

乳癌予測および乳癌診断用のマーカー用である乳癌バイオマーカー用キャプチャーであって、乳癌用マーカーが CST4 遺伝子、CST4 の mRNA、CST4 のスプライスの cDNA、CST4 - 特異的プライマーの増幅産物、CST4 によってコードされるシスタチン S およびシスタチン S のエピトープペプチドである、乳癌バイオマーカー用キャプチャー。

【請求項 7】

CST4 用プライマー用配列が配列番号 1 ~ 2 に示される、請求項 6 に記載の乳癌バイオマーカー用キャプチャー。

【請求項 8】

CST4 用プローブ用の 2) に述べられている配列が配列番号 3 に示される、請求項 6 に記載の乳癌バイオマーカー用キャプチャー。

【請求項 9】

3) において述べられている増幅産物の配列が、配列番号 43 に示される、請求項 6 に記載の乳癌バイオマーカー用キャプチャー。

【請求項 10】

シスタチン S 用キャプチャーが、シスタチン S またはそのエピトープペプチド用特異的抗体を包含する、請求項 6 に記載の乳癌バイオマーカー用キャプチャー。

【請求項 11】

シスタチン S のエピトープペプチドの配列が配列番号 50 内に存在する、請求項 6 に記載の乳癌バイオマーカー用キャプチャー。

【請求項 12】

乳癌検出用の検査試薬および検査キットの製造において上述されているこれらのキャプ

10

20

30

40

50

チャーの利用方法。

【請求項 13】

キャプチャーが包含されている、請求項 6 に記載の検査キット。

【請求項 14】

以下に詳細に説明されている、請求項 13 に記載の検査キット；

1) 上記のように TaqMan プロブを用いる CST 4 の mRNA 用リアルタイムかつ定量的検査キットであり、プライマー配列が配列番号 1 ~ 2 に示され、プロブの配列が配列番号 3 に示され、

2) プロブとして蛍光色素を用いる CST 4 の mRNA 用リアルタイムかつ定量的検査キットであり、プライマー配列が配列番号 1 ~ 2 に示され、内部参照用プライマーの配列が配列番号 30 ~ 31 に示され、または、

3) 核酸ベース増幅 (NASBA) または転写媒介増幅 (TMA) に基づく CST 4 の mRNA 用定量的検査キットであり、両方のキットが、配列は配列番号 2、32 (プライマー用) および 3 (プロブ用) において示される CST 4 用プライマーおよびプロブを包含し、または

4) リガーゼ連鎖反応 (LCR) に基づく CST 4 の mRNA 用定量的検査キットであり、配列が配列番号 33 ~ 36 に示される 4 つのプロブが包含され、または、

5) 好熱性鎖置換増幅 (tSDA) に基づく CST 4 の mRNA 用定量的検査キットであり、プライマー (配列番号 37 ~ 40 に示される配列) およびプロブ (配列番号 41) が包含される。

【請求項 15】

詳細な説明が以下のとおりである、請求項 13 に記載の検査キット；

1. 固体基質、固体基質に固定されたキャプチャー、ビオチン化キャプチャーおよび酵素基質 (比色分析) を包含している二重抗体サンドイッチ ELISA キット法であり、固定されたキャプチャーがモノクローナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である、または

2. 固体基質、キャプチャー、酵素による標識第二抗体および比色検出用酵素基質を包含しているプロットングキットであり、キャプチャーが、モノクローナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーがポリクローナル抗体である。または

3. 固体基質、固定された抗原、ビオチン化キャプチャー、比色検出用酵素基質および特異的なモノクローナル抗体を包含している競合 ELISA キットであり、ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である。

【請求項 16】

陽性対照サンプルおよび陰性対照サンプルならびにブランクサンプルが包含されている、請求項 14 に記載の検査キット。

【請求項 17】

モノクローナル抗体がラット抗シスタチン S 抗体であり、固体基質が ELISA プレートであり、ビオチン化ポリクローナル抗体がビオチン化ウサギ抗シスタチン S ポリクローナル抗体である、請求項 14 に記載のダブル抗体 ELISA 検査キット。

【請求項 18】

詳細が以下のように記載されている請求項 18 に記載の検査キットのプロトコルであって、ラット抗シスタチン S 抗体により ELISA プレートをコーティングし、その後 3% BSA でバックフィルされ、8 倍に希釈したサンプルを前記プレートにアブライし、それを 37 でインキュベートし、TBS によってサンプルを含む前記穴を洗浄し、ビオチン化ウサギ抗シスタチン S ポリクローナル抗体を加え、37 で前記プレートをインキュベートし、TBS によってサンプルを含む穴を洗浄し、ストレプトアビジン - ビオチン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 複合体を加え、37 で前記プレートをインキュベートし、続いて、TBS でプレートを洗浄し、最後に検体をアルカリホスファターゼ (ALP) を添加し、マイクロプレートリーダーにおける OD (405 nm) で読んで定量化される、検査キットのプロトコル。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

乳癌診断検査キットを用いるまたは乳癌予測用のための利用方法であって、ここで、発現レベルまたは検査キットを介して測定される乳癌マーカーの定量的含有量が健常者の発現レベルまたは検査キットを介して測定される乳癌マーカーの定量的含有量と比較され、その結果が陽性か否かを決定し、またはその結果がカットオフ値より高ければ陽性と解析され、カットオフ値が乳癌患者および健常者の体液または組織サンプル中の乳癌マーカー発現/レベルの比較を通して得られ、カットオフ値が統計的に有意であり、サンプルが以下：血液、尿、骨髄、乳癌細胞株、乳癌腫瘍および腫瘍隣接組織ならびにリンパ節組織の1以上を包含する、請求項14に記載の利用方法。

【請求項 20】

乳癌の診断用およびキット用の指針であって、固相に固定された固体相担体を包含しているシスタチンSタンパク質レベルの検出用のキットがキャプチャー試薬、ビオチン化キャプチャー試薬発色基質を支持し、キャプチャー試薬として固相担体-特異的モノクローナル抗体に固定され、ポリクローナル抗体を特異的にビオチン化するキャプチャー試薬、または

シスタチンSタンパク質レベルの検出用のキットであって、前記キットは、固相担体シスタチンSタンパク質、シスタチンS特異的マウスモノクローナル抗体、HRP二次抗体および発色基質であり、それらの固相担体バッグを包含し、

固相サポート、前記キャプチャー試薬およびHRP-発色基質を包含する検出用キットまたはシスタチンSタンパク質レベルであり、前記キャプチャー試薬が特異的モノクローナル抗体を含むキャプチャー試薬、特にビオチン化多耐性である、癌の診断用およびキット用の指針。

【請求項 21】

二重抗体サンドイッチELISAに基づく請求項14に記載の検査キットであって、ここで、ELISAプレートが固体基質であり、固定されたキャプチャーがラット抗シスタチンSモノクローナル抗体であり、前記ビオチン化キャプチャーがウサギ抗シスタチンSポリクローナル抗体(価数1:1000である)でありおよび前記比色検出用基質がアルカリホスファターゼであり、または

前記検査キットが競合ELISAに基づき、ここで、ELISAプレートが前記固体基質であり、シスタチンSの濃度が5 μ g/mLであり、前記特異的モノクローナル抗体がラット抗シスタチンS抗体(価数1:2000である)であり、酵素標識第二抗体がALP標識ヤギ抗マウスIgG(価数1:2000であり)であり、および前記比色検出用基質がALP基質であり、シスタチンS、酵素標識第二抗体およびALP基質の体積比が1:2であり、または

キットが免疫プロット法に基づき、前記固体基質はニトロセルロース膜であり、前記キャプチャーはモノクローナルシスタチンS抗体(価数1:1000である)であり、前記酵素標識第二抗体はペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgGであり、および前記酵素基質はTMB溶液である、検査キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は生物医療技術についてである。乳癌用のバイオマーカーおよびそれらの乳癌の診断への利用、動的検出および進行決定は本発明において述べられる。検査試薬および検査キットならびにそれらの個々のプロトコルも本発明に含まれる。

【背景技術】

【0002】

WHOによる癌についての報告によると、約1200万件の乳癌の発生が毎年報告されている。40万件超の乳癌が中国において毎年報告されており、その発生率は増加している。北京や上海などの都市部での乳癌発生率は他の癌よりも高い。上海での乳癌の発生率

10

20

30

40

50

は過去三十年で17.7/100000~70/100000に増加している。すべての悪性腫瘍の中で乳癌の発生率の順位は2番から1番に増加した。5年後の生存率は60%未満である。

【0003】

早期発見と5年生存率は、近年かなり改善されているが、乳癌による54万の死亡がWorld Cancer Report 2008(WHO)において報告された。乳癌の国内死亡率は、毎年3%増加している。乳癌の予防および治療における多くの問題は、乳癌の早期発見および早期介入、乳癌治療評価、腫瘍診断モニタリングおよび治療後の患者の乳癌の再発および転移の正確な予測を包含する解決を必要とする。

【0004】

高感度および特異性を有する乳癌の診断方法は乳癌の早期スクリーニングおよび患者の診断の改善に重要である。シスタチンスーパーファミリーは、カテプシン阻害作用を有するタンパク質の配列である。それらタンパク質は癌の発生および成長において重要な役割を演ずる。シスタチンスーパーファミリーに属するタンパク質は、組織および体液中のシステインプロテアーゼと可逆的に結合し、カテプシンの過剰活性化を抑制する。シスタチンCは、カテプシンBに最も高い親和性を有するリガンドである。卵巣癌および頭頸部癌の腫瘍における発現レベルは増加している。ステフィンA(シスタチンスーパーファミリーのメンバー)は非小細胞性肺癌(NSCLC)腫瘍における発現を増加している。ステフィンBのmRNAの発現は髄膜腫変化において阻害されている。シスタチンF(またはLeukocystatin, CMAP)は種々の腫瘍において発現する可能性が高い。調査は、増加したシスタチンの発現が、カテプシン発現が上昇し、シスタチンの発現の増加をもたらし、フィードバック機構を通してカテプシンの過剰活性化を阻害する間に腫瘍の発生およびつきぬきにおいてカテプシンの関与に起因する可能性が高いことを示す。しかしながら、シスタチンの発現は必ずしも腫瘍増殖と積極的に関連しているわけではないことに注意されたい。例えば、シスタチンCの低発現は、神経膠腫患者の後期、予後不良および高転移の可能性を示す。mRNAおよびタンパク質の発現の両方は調査され、その結論は両方の研究において確認されている。

【0005】

本発明において、CST4(シスタチンスーパーファミリーのメンバー)とそのスプライスと乳癌腫瘍との強い関係は確認されている。CST4、またはシスタチンSは、141個のアミノ酸残基を含むシステインプロテアーゼ阻害剤の一つである。シスタチンSは、涙、唾液、血漿および血清などの種々の体液ならびに分泌物に見られる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の第一の目的は、CST4遺伝子、CST4のmRNA、CST4のスプライスのcDNA、CST4特異的プライマー用増幅産物、シスタチンSのCST4遺伝子およびエピトープペプチドによってコードされるシスタチンSタンパク質の新規な用途を提供することである。これらの用途は、乳癌の新たな診断方法を開発する点でかなり重要である。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明に包含される技術を以下に記載する。

1. 乳癌の診断および予防におけるCST4遺伝子、CST4のmRNA、CST4のスプライスのcDNA、CST4特異的プライマー用増幅産物、シスタチンSのCST4遺伝子およびエピトープペプチドによってコードされるシスタチンSタンパク質の利用。CST4遺伝子の配列は配列番号42に存在する。CST4遺伝子、CST4のmRNAおよびCST4のスプライスのcDNAのプロンプは配列番号3に示されるような配列を有する。増幅産物の特異的プライマーは配列番号1、4、6、8、10、12、14、16、18、20(プライマー1)および配列番号2、5、7、9、11、13、15、17、

10

20

30

40

50

19、21(プライマー2)に示される配列を有する。配列番号1における配列は、配列番号2における配列と対にされる。配列番号4における配列は、配列番号5における配列と対にされる。配列番号6における配列は、配列番号7における配列と対にされる。配列番号8における配列は、配列番号9における配列と対にされる。配列番号10における配列は、配列番号11における配列と対にされる。配列番号12における配列は、配列番号13における配列と対にされる。配列番号14における配列は、配列番号15における配列と対にされる。配列番号16における配列は、配列番号17における配列と対にされる。配列番号18における配列は、配列番号19における配列と対にされる。配列番号20における配列は、配列番号21における配列と対にされる。シスタチンSのエピトープペプチドの配列は配列番号50に示される。本願の診断およびスクリーニングは乳癌の転移および微小転移巣、pTNMステージ判定、癌治療および予後予測の間の腫瘍のリアルタイムモニタリングを意味する。これらの配列は本発明の範囲を限定しないということに留意されたい。それらの機能の全配列は本発明に含まれる。

10

【0008】

本発明の第二の目的は乳癌マーカーと特異的に相互作用する種々のキャプチャーを提供することである。

【0009】

上記目的を実現するために、技術を以下に記載する：

乳癌マーカー用のキャプチャーであり、キャプチャーは乳癌予測用および診断用の乳癌マーカー用キャプチャーである。乳癌マーカーは、CST4遺伝子、CST4のmRNA、CST4のスプライスのcDNA、CST4-特異的プライマー用の増幅産物シスタチンSのCST4遺伝子およびエピトープペプチドによってコードされるシスタチンSタンパク質である。

20

【0010】

3)で述べられているプライマーの配列は、配列番号1~2に存在する。

【0011】

2)で述べられたプローブの配列は、配列番号3に存在する。

【0012】

3)で述べられた増幅産物の配列は、配列番号43に存在する。

【0013】

本願明細書で述べられるキャプチャーは、シスタチンSまたはそのエピトープペプチドを具体的に実現する分子である。

30

【0014】

シスタチンSのエピトープペプチドの配列は、配列番号50に示される。

【0015】

本発明の第3の目的は、キャプチャーの新規な用途を提供することである。検査キットおよびそれらの個々のプロトコルはキャプチャーに基づく。新規な方法論として、これらの用途および乳癌検出用の検査キットは高い精度、簡易操作および大スケール診療の実現可能性を有する。

【0016】

上述の目的の実現のために、技術は以下に記載されている。

乳癌検出用の検査試薬および検査キットの製造におけるキャプチャーの利用
これらのキャプチャーを含むすべての診断キット。

40

【0017】

診断キットの詳細は以下のとおりである。

【0018】

1) TaqManプローブを用いるCST4のmRNA用のリアルタイムかつ定量的検査キット。プライマー配列は配列番号1~2に示される。プローブの配列は配列番号3に示される。

2) プローブとして蛍光色素を用いるCST4のmRNA用のリアルタイムかつ定量的検査

50

査キット。プライマー配列は配列番号 1 ~ 2 に示される。内部基準用のプライマーの配列は配列番号 30 ~ 31 に示される。または

3) 核酸ベースの C S T 4 の m R N A 用定量的検査キットは増幅 (N A S B A) または転写メジアン増幅 (T M A) 。両方のキットは、C S T 4 用のプライマーおよびプローブを包含し、その配列は、配列番号 2、32 (プライマー用) および 3 (プローブ用) に示される。または

4) リガーゼ連鎖反応 (L C R) に基づく C S T 4 の m R N A 用の定量的検査キット。4 つのプローブは、その配列が配列番号 33 ~ 36 に示されるように包含される。または

5) 好熱性鎖置換増幅 (t S D A) に基づく C S T 4 の m R N A 用の定量的検査キット。プライマー (配列番号 37 ~ 40 に示される配列) およびプローブ (配列番号 41) は包含されている。

10

【 0 0 1 9 】

診断キットは以下であり得る：

1) 固体基質、固体基質に固定されたキャプチャー、ビオチン化キャプチャーおよび酵素基質 (比色分析) を包含している二重抗体サンドイッチ E L I S A キット。固定されたキャプチャーはモノクローナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である。または、

2) 固体基質、キャプチャー、酵素標識第二抗体および比色検出用酵素基質を包含しているプロットングキット。キャプチャーはモノクローナル抗体およびビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である。または

20

3) 固体基質、固定された抗原、ビオチン化キャプチャー、比色検出用酵素基質および特異的モノクローナル抗体を包含している競合 E L I S A キット。ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である。

【 0 0 2 0 】

陽性対照および陰性対照ならびにブランクサンプルは診断キットに包含される。

【 0 0 2 1 】

ダブル抗体 E L I S A キットの成分として、モノクローナル抗体はラット抗シスタチン S 抗体であり、固体基質は E L I S A プレートであり、およびビオチン化ポリクローナル抗体はビオチン化ウサギ抗シスタチン S ポリクローナル抗体である。

30

【 0 0 2 2 】

または、彼は、検査キットはダブル抗体 E L I S A キットに基づくと述べ、ここで、固体基質は E L I S A プレートであり、固体基質上に固定されたキャプチャーはラット抗シスタチン S モノクローナル抗体 (R & D、M A B 1 9 2 6、5 μ g / m L) であり、ビオチン標識ポリクローナル抗体は、ビオチン化ウサギ抗シスタチン S ポリクローナル抗体である。

【 0 0 2 3 】

または、検査キットは競合 E L I S A キットに基づき、ここで、アッセイの固体基質は、E L I S A プレートであり、シスタチン S の濃度は 5 μ g / m L であり、モノクローナル抗体は、価数 1 : 2 0 0 0 であるラット抗シスタチン S 抗体であり、酵素標識二次抗体は、価数 1 : 2 0 0 0 である A L P 標識ヤギ抗マウス I g G である。酵素基質は A L P であり、シスタチン S および酵素標識第二抗体の基質に対する体積比は 1 : 2 である。

40

【 0 0 2 4 】

または、検査キットは免疫プロット法に基づき、ここで、固体基質はニトロセルロース膜であり、キャプチャーは価数 1 : 1 0 0 0 であるラット抗シスタチン S モノクローナル抗体であり、酵素標識第二抗体は H R P 標識ヤギ抗ウサギ I g G (J a c k s o n I m m u n o R e s a r c h) であり、比色検出用酵素基質は T M B 溶液 (K i r k e g a a r d a n d P e r r y L a b o r a t o r i e s I n c (ゲイザースバーグ、メリーランド)、 「 T M B ペルオキシダーゼ基質 (T M B P e r o x i d a s e S u b s t r a t e) 」 溶液カタログ番号 5 0 - 7 6 - 0 1) である。

【 0 0 2 5 】

50

検査キットの述べられたプロトコルの詳細は以下に記載されている。

【0026】

ELISAプレート(Corning)をシスタチンS(Abnova、カタログ番号H00001472-P01、5 μ g/mL)で被覆し、BSA3%でバックフィル(裏込め)をする。ラット抗シスタチンSモノクローナル抗体(R&D、カタログ番号MAB1296、価数1:2000)をサンプリングし、血清(8倍希釈)を調製し、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートする。サンプルを前処理したELISAプレート上にアプライ(付与)しおよび1時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。サンプルを含む穴をTBS緩衝液(10mM Tris-HCl、154mM NaCl、pH7.5)で洗浄する。0.3%BSAを含むTBSに溶解させたALP標識ヤギ抗マウスIgG(Jackson Immuno Research、価数1:2000)を穴にアプライし、1時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。ALPの基質(KPL、Blue Phos溶液、Kirkegaard and Perry Laboratories Inc(ゲイザースバーグ、メリーランド)、カタログ番号508805)をアプライし、OD(405nm)をマイクロプレートリーダーで測定した。

10

【0027】

本発明の第4の目的は、簡単操作、高感度および優れた特異性の乳癌診断用のインビトロ方法およびインビトロ診断用の検査キットを提供することである。

【0028】

上記目的の実現のため、本発明の技術は以下に詳細に記載されている。

20

【0029】

検査キットを用いて測定された乳癌マーカーの発現レベルまたは定量的成分は健常者の乳癌マーカーの発現レベルまたは定量的成分と比較され、その結果が陽性であるか否かを決定し、またはその結果は、カットオフ値より高い場合に陽性であると考えられるかどうか決定する。カットオフ値は、乳癌患者および健常者の体液または組織サンプルにおける乳癌マーカー発現/レベルの比較を通して得られる。カットオフ値は統計的有意性を有する。サンプルは以下の1以上を包含する:血液、尿、骨髄、乳癌細胞株、乳癌腫瘍および腫瘍隣接組織ならびにリンパ節組織。例えば、この場合において、カットオフ値は3.434ng/mLである。

【0030】

乳癌予測用および診断用検査キットは、シスタチンSタンパク質発現の測定用キットである。キットは、固体基質、固体基質上に固定されたキャプチャー、ビオチン化キャプチャーおよび比色検出用酵素基質を包含する。固定されたキャプチャーは、モノクローナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である。

30

【0031】

または、シスタチンSタンパク質発現測定用検査キットは、固体基質、プレートに被覆されたシスタチンSタンパク質、ラット抗シスタチンSモノクローナル抗体、酵素標識第二抗体および比色検出用酵素基質を包含する。

【0032】

または、シスタチンSタンパク質発現測定用検査キットは、固体基質、キャプチャー、酵素標識第二抗体および比色検出用酵素基質を包含する。キャプチャーは、モノクローナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である。

40

【0033】

検査キットは、二重抗体サンドイッチELISAに基づき、ここで、アッセイの固体基質はELISAプレートであり、固定されたキャプチャーはラット抗シスタチンSモノクローナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーは、価数1:1000であるウサギ抗シスタチンSポリクローナル抗体である。酵素基質はALPである。

【0034】

または、キットは競合ELISAに基づき、ここで、アッセイの固体基質は、ELISAプレートであり、シスタチンSの濃度は5 μ g/mLであり、モノクローナル抗体は、

50

価数 1 : 2 0 0 0 であるラット抗シスタチン S 抗体であり、酵素標識二次抗体は、価数 1 : 2 0 0 0 である A L P 標識ヤギ抗マウス I g G である。酵素基質は A L P であり、シスタチン S および酵素標識第二抗体の基質に対する体積比は 1 : 2 である。

【 0 0 3 5 】

または、検査キットは免疫プロット法に基づき、ここで、固体基質はニトロセルロース膜であり、キャプチャーは価数 1 : 1 0 0 0 であるラット抗シスタチン S モノクローナル抗体であり、酵素標識第二抗体は、H R P 標識ヤギ抗ウサギ I g G であり、比色検出用酵素基質は T M B 溶液である。

【 0 0 3 6 】

本発明の利点は、1) 乳癌の診断における発現 C S T 4 の m R N A およびシスタチン S タンパク質の利用、癌の成長および乳癌予後予測のリアルタイムモニタリングは、大量スケールのサンプルの場合本発明において変動する。当該結果はかなり正確であり、本発明は、乳癌診断およびリアルタイムモニタリングならびに乳癌予後予測用の新規な方法の開発において用いられ得、2) 乳癌診断およびリアルタイムモニタリングならびに乳癌予後予測用の検査試薬および高感度のキットは本発明に包含される。

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 7 】

【 図 1 】 C S T 4 を含む組み換えプラスミド P m d 1 8 - T を示す図である。

【 図 2 】 扁桃腺、下垂体後葉、甲状腺、唾液腺、骨格筋、骨髄、赤血球および血小板を含まない末梢血、肺、胃、肝臓、心臓、腎臓、副腎、腸管、結腸、膵臓、脾臓、膀胱、前立腺、卵巣、子宮、胎盤および精巣、ヒト乳癌細胞株 (H C C 1 9 3 7 、 S K - B R - 3 、 および M C F - 7) ならびに正常な乳房組織細胞株 (H s 5 7 8 B s t) を包含している、正常組織における C S T 4 遺伝子の発現を示す図である。

20

【 図 3 】 プローブとして蛍光色素を含むリアルタイム q P C を用いる乳癌腫瘍およびそれらの個々の腫瘍隣接組織の 2 0 個の場合における C S T 1 2 4 、 C S T 1 、 C S T 2 、 C S T 4 の発現比較を示す図である。

【 図 4 】 乳癌腫瘍およびそれぞれの腫瘍隣接組織の 1 0 0 個の場合におけるリアルタイム P C R により定量化される C S T 4 の発現を示す図である。

【 図 5 】 乳癌腫瘍の 4 0 個の場合と 4 0 個の生検サンプルにおけるリアルタイム P C R により定量化される C S T 4 の発現を示す図である。

30

【 図 6 】 乳房癌転移を有する 3 0 個のリンパ節サンプルおよび乳房癌転移を有しない 3 0 個のリンパ節サンプル中のリアルタイム P C R により定量化された C S T 4 の発現を示す図である。

【 図 7 】 細胞学的研究およびリアルタイム P C R により定量化された末梢血における C S T 4 発現を用いる乳癌診断の正確さの比較を示す図である。

【 図 8 】 細胞学的研究およびリアルタイム P C R により定量化された C S T 4 発現を用いる乳癌骨髄転移予想の正確さの比較を示す図である。

【 図 9 】 リアルタイム P C R (A) および受信者動作特性 (R O C) 曲線 (B) により定量化された 5 0 人の乳癌患者、3 0 人の健常者および 3 0 人の乳腺炎患者の無細胞 R N A における C S T 4 発現を示す図である。R O C 曲線は、乳腺炎および通常から乳癌を区別

40

【 図 1 0 】 L C R により定量化された 5 0 人の乳癌患者、3 0 人の健常者および 3 0 人の乳腺炎患者の無細胞 R N A における C S T 4 発現を示す図である。

【 図 1 1 】 逆転写ストランド置換増幅 (r t S D A) により定量化された 5 0 人の乳癌患者、3 0 人の健常者および 3 0 人の乳腺炎患者の無細胞 R N A における C S T 4 発現を示す図である。

【 図 1 2 】 核酸ベース増幅 (N A S B A) により定量化される 3 0 人の乳癌患者、2 0 人の健常者および 2 0 人の乳腺炎患者の尿サンプルにおける C S T 4 発現を示す図である。

【 図 1 3 】 種々の p T N M ステージ (3 0 人の I + I I の例および 5 0 人の I I I + I V の例) にある 8 0 人の乳癌患者の転写増幅法 (T M A) による C S T 4 発現を示す図であ

50

る。

【図14】乳癌細胞株の培養上清 (culturer supernatant) および健常者の血清におけるシスタチンS発現を示す図である。

【図15】乳癌細胞株および健常者の血清におけるシスタチンS発現を示す図である。

【図16】30人の乳癌患者および20人の健常者の血清サンプルにおける競合ELISAによるシスタチンS発現を示す図である。

【図17】乳癌予測のためのシスタチンSおよびCEAの特異性および感度比較 (ELISAにより測定) を示す図である。

【図18】中央値より高いまたは低いシスタチンS発現を有する処置後の乳癌患者の無増悪生存期間 (PFS) を示す図である。

10

【発明を実施するための形態】

【0038】

1. 分子検出

上述されている分子生物学的技術は以下の実施例に例証されている。これらの実施例は、本発明の用途を限定する代わりに本発明を明確にするためのものであることに留意されたい。Molecular Cloning: A Laboratory Manual (J. Sambrookら編)におけるプロトコルは、実験手順が記載されていない場合、厳密に従った。または、製造業者の取扱説明書は以下の通りであった。もし述べられていない場合、百分率および割合は重量に基づく。

【0039】

20

材料および方法

全ての臨床サンプルはBeijing Friendship Hospitalから、病院の厳密な観察および患者に署名された同意書の基準と共に得られる。

【0040】

腫瘍の可能性のある生検サンプルまたはそれらの隣接組織を比較する。これらのサンプルとリンパ節サンプル中のRNAは、サンプル取得の後すぐ抽出され、または液体窒素またはRNA later (Ambion) 中に保存されるだろう。

【0041】

末梢血、骨髄または尿サンプルは20分間 (4000 rpm、4) で遠心分離される。上清は別の10分間 (13000 rpm、4) 遠心分離される。上清および沈殿を分離する。RNA抽出をすぐに続けて行い、またはサンプルを - 20 または - 80 で貯蔵する。

30

【0042】

TaqManプローブを用いるリアルタイムPCR:

サンプルから市販キットを用いて核酸を抽出した。限定を意図しない例は、フェノール-クロロホルム抽出である。サンプル中のRNAは、Invitrogen (インビトロゲン) により製造されたトリゾールキット (Trizol kit) を続けて用いて得られた。抽出されたRNAの品質は、Molecular Biology Experiments (分子生物学実験) (J. Liによる) などの参考文献中のプロトコルに従って分析された。mRNAの逆転写は市販キットにより行われ、その指針は以下の通りであった。cDNA溶液を適切な濃度勾配で調製した。生化学反作用のプライマーを最適化した。CST4用のプライマーをエクソン1に基づき設計した。CST4増幅産物を含む組み換えプラスミドは、Pegm-T (Promega (図1に示されているように)) から市販されている。プライマーをエクソン1および3に基づき設計した。PCRプロセスをTaqManプローブの加水分解により観測した。

40

【0043】

CST4のプライマー用に最適化された配列は、

【化 1】

gctctcaccctctctctctg (配列番号 1) および tctctattctctctcttgg (配列番号 2)

である。プローブの配列は、

【化 2】

5'-fam-ctccagctttgtgctctgcctctg-tamra-3' (配列番号 3)

である。増幅産物の部分は 142 bp である。

【0044】

CST4 増幅産物を含有する組み換えプラスミドのプライマー用に最適化された配列は、

10

【化 3】

tgctcgggctctcaccctctct (配列番号 22) および tgggtgggtggctgggtgactggc (配列番号 23)

である。

【0045】

典型的に試験において、サンプル、陽性対照および陰性対照ならびに組み換えプラスミド標準は同時に増幅される。組み換えプラスミド標準と濃度に対する適当な濃度勾配との交差点 (C_P) をプロットし、校正曲線を得る。サンプルおよび対照サンプル中の遺伝子発現のコピーを、当該校正曲線を用いて定量化する。

20

【0046】

プローブとして蛍光色素を用いるリアルタイム PCR :

サンプルの前処理は、TaqMan プローブを用いるリアルタイム PCR のセクションに記載されているものと同じである。同時に増幅される CST1、CST2 および CST4 の増幅用のプライマーの配列は、

【化 4】

agtcaccagcccaacttgga (配列番号 24) および gggaacttcgtagatctggaaaga (配列番号 25)

30

である。CST4 増幅用のプライマーの配列は

【化 5】

agtacaacaaggccaccgaagat (配列番号 4) および agaagcaagaaggaaggaggag (配列番号 5)、

または tacaacaaggccaccgaagatga (配列番号 6) および agaagcaagaaggaaggagg gag (配列

番号 7)、または tgctactctgatggetaccctg (配列番号 8) および gtggccttgtgtactcgetgat (配

列番号 9)、または agtacaacaaggccaccgaagat (配列番号 10) および

taccaggtctattagaagcaagaagga (配列番号 11)、または tgctactctgatggctaccctg (配列番号

12) および catcttcgggtggccttgtgtac (配列番号 13)、または tgctactctgatggctaccctg (配列

40

番号 14) および tactcatctt cggtggccttgtt (配列番号 15)、または tgggattatcctattctctctctg

(配列番号 16) および ctccagcttt gtgctctgcctct (配列番号 17)、または

tgctactctgatggctaccctg (配列番号 18) および ctcatcttcg gtggccttgt tgt (配列番号 19)、ま

たは tacagtgggtgggagtgggtgt (配列番号 20) および gagtgggtac agcgtgcct tca (配列番号

21)

である。CST2 増幅用のプライマーの配列は、

【化6】

cagaagaaacagttgtctc (配列番号 26) および ggagtaggaggtggctcag (配列番号 27)

である。CST1増幅用のプライマーの配列は、

【化7】

tctaccctctctctctg (配列番号 28) および ttatcctatcctctctcttgg (配列番号 29)

である。 - アクチンは内部基準として用いられる。 - アクチン増幅用のプライマーの配列は、

【化8】

aagatcattgctctctctg (配列番号 30) および cgtcatactctctgcttgc (配列番号 31)

である。癌性腫瘍、腫瘍隣接組織 (TAT) および内部基準遺伝子中の遺伝子を同時に増幅する。遺伝子のコピーは以下の等式によって定量化され、ここで、蛍光シグナルがバックグラウンドを超える時、ctはサイクル数である。SYBR Green k、Eve Green、LC Greenなどはアプライする蛍光色素に含まれる。

【0047】

【数1】

$$\text{発現}_{\text{相対}} = \frac{2^{ct_{\text{腫瘍}} - ct_{\text{標準}}}}{2^{ct_{\text{TAT}} - ct_{\text{標準}}}}$$

10

20

【0048】

核酸ベース増幅 (NASBA) によるインビトロでのRNA増幅: キットは、T7 RNAポリメラーゼ、リボヌクレアーゼH、鳥骨髄性白血病ウイルス (AMV) 逆転写酵素、リボヌクレオチド三リン酸 (NTP)、デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTP)、TaqManプローブを用いるリアルタイムPCRの区分に述べられていたCST4増幅用プライマー、(Ribo-Green蛍光色素)を観測するRNA増幅用蛍光色素を包含する。RNAテンプレートは、42℃で2時間のインキュベートした後、2⁹ ~ 2¹² 倍に増幅される。増幅された製品の蛍光を増幅前のテンプレート濃度の定量化のために測定した。

30

【0049】

実施例1. CST4およびCSTスーパーファミリーの他のメンバーの発現

1. 種々のヒト組織中のCST4

全組織サンプルを、Beijing Friendship Hospital (BFH) から得られる乳房組織を除いて購入した。種々のヒト組織サンプル中のCST4のmRNA発現をHG-U95AV Human Gene Chip Array (Affymetrix) 上で測定した (使用マニュアルからのプロトコルは以下の通りであった)。CST1 mRNA発現の定量化を、 - アクチン蛍光校正曲線により実現した。

40

【0050】

図2に示されているように、CST4発現は、唾液腺中でだけ高い。CST4発現は、試験されている他の組織において全く観察されなかった。当該結果は、その低いバックグラウンドシグナルのため、CST4は、病理診断の良好な候補であることを示す。CST4は、HCC1937、SK-BR-3およびMCF-7 (乳癌細胞株である) 中に過剰発現し、およびHs578Bst (正常な乳房組織細胞株である) 中に発現しない。CST4は乳癌診断用のマーカーとして使用され得ることが結論付けられた。

【0051】

2. 乳房癌性腫瘍および腫瘍隣接組織におけるCST4、CST124、CST1およびCST2のmRNA発現

50

乳癌腫瘍とそれらの個々の隣接組織の20の組み合わせ(C1、C2...C20と番号づけられた)におけるCST4、CST124、CST1およびCST2のmRNAの発現を比較した。腫瘍およびそれらの隣接組織におけるCST4のmRNA発現差異は有意であり、CST1を除いて全遺伝子より大きい(図3)。全サンプルを乳癌について病理学的に診断した。プローブとして蛍光色素を用いるリアルタイムPCRを、遺伝子発現を定量化するために用い、そのリアルタイムPCRは陽性対照サンプルおよび陰性対照サンプルの同時に生じる増幅により変動した。当該対照の結果は予測と合致していた。

【0052】

mRNA発現の定量化用のプローブとして蛍光色素を有するリアルタイムPCRに基づく検査キットは、以下を含有する。

10

1) CST4増幅用プライマー(その配列は以下に示される) :

【化9】

上流プライマー: agtacaaca ggccaccgaa gat (配列番号4)

下流プライマー: agaagcaaga aggaaggagg gag (配列番号5)

または

上流プライマー: tacaacaagg ccaccgaaga tga (配列番号6)

下流プライマー: agaagcaaga aggaaggagg gag (配列番号7)

または

上流プライマー: tgctactcct gatggctacc ctg (配列番号8)

下流プライマー: gtggccttgt tgtactcgt gat (配列番号9)

または

上流プライマー: agtacaaca ggccaccgaa gat (配列番号10)

下流プライマー: taccaggtct attagaagca agaagga (配列番号11)

または

上流プライマー: tgctactcct gatggctacc ctg (配列番号12)

下流プライマー: catcttcggt ggcccttgtg tac (配列番号13)

または

上流プライマー: tgctactcct gatggctacc ctg (配列番号14)

下流プライマー: tactcatctt cggcctt gtt (配列番号15)

または

上流プライマー: tgggattatc ctattctcct ccttg (配列番号16)

下流プライマー: ctccagcttt gtgctctgcc tct (配列番号17)

または

上流プライマー: tgctactcct gatggctacc ctg (配列番号18)

下流プライマー: ctcatcttcg gtggccttgt tgt (配列番号19)

または

上流プライマー: tacagtgggt gggagtgggt ggt (配列番号20)

下流プライマー: gagtgggtac agcgtgcct tca (配列番号21)

20

30

40

【化10】

上流プライマー: aagatcattgctcctctg (配列番号 30)

下流プライマー: cgtcatactcctgcttgc (配列番号 31)

【0053】

2) 核酸抽出用試料および逆転写用試料、SYBR Green 蛍光色素、dNTP、Taq ポリメラーゼ、リボヌクレアーゼを含まない水、標準溶液、陽性対照サンプルおよび陰性対照サンプル、10倍緩衝液および塩化マグネシウム溶液。

【0054】

実施例2種々の組織および位置におけるCST4発現

1. 乳癌腫瘍および腫瘍隣接組織におけるCST4発現

TaqManプローブを有するリアルタイムPCRに基づくCST4のmRNA発現用検査キット。当該キットは以下を含有する。

【0055】

1) プライマーおよびプローブ:

【化11】

上流プライマー: gctctcaccctcctctctg (配列番号 1)

下流プライマー: tctctattctcctccttgg (配列番号 2)

プローブ: 5'-fam-ctccagctttgtgctctgctctg-tamra-3' (配列番号 3)

【0056】

2) 核酸抽出用試料および逆転写用試料、SYBR Green 蛍光色素、dNTP、Taq ポリメラーゼ、リボヌクレアーゼを含まない水、標準溶液、陽性対照サンプルおよび陰性対照サンプル、CST4遺伝子を含む組み換えプラスミドサンプル、10倍緩衝液および塩化マグネシウム溶液。

【0057】

全サンプルは、cDNAが得られることで、RNA抽出および逆転写の前に乳癌と診断された。リアルタイムPCRは、乳癌腫瘍およびそれらの個々の隣接組織におけるCST4の発現の定量化に用いられた。100のサンプルがこの試験において検査された。校正曲線および増幅収率の直線性は個々の必須要件を満たした。陽性対照および陰性対照サンプルの増幅のための結果は予想したものだ。鑄型のないサンプルの増幅は観測されなかった。

【0058】

図4において示されるように、CST4のmRNA発現は、病理学上診断される悪性乳癌腫瘍において高く、個々の隣接組織において低い。腫瘍中のCST4発現の中央値は、隣接組織中のものより7.08倍高く、CST4のmRNAは乳癌の優れたマーカーであることを示す。乳癌組織は264.92のコピーがカットオフ値である場合、正常組織から区別され得、乳癌の臨床診断用の参照として提案される。

【0059】

2. 乳癌患者および乳腺炎患者の生検サンプル中のCST4発現

生検サンプルは、腫瘍細胞の百分率変動する外科サンプルと大きく異なる。腫瘍組織はときどき、全生検サンプルの非常に小さな一部であり、または腫瘍組織は生検サンプル中に含まれない。発明者らは試験し、乳腺炎患者からの40個の生検サンプルおよび乳癌患者からの40個の乳癌生検サンプル中のCST4発現と比較した。癌性サンプルにおけるCST4発現の中央値は、腸炎サンプル中におけるより9.15倍大きいことがわかった。もし113.795がカットオフ値である場合、癌性腫瘍は炎症から区別されえ、生検サンプルを用いる乳癌診断用の参照文献を提供する。当該結果は、図5でまとめている。

10

20

30

40

50

リアルタイムPCRを遺伝子発現の定量化に用いた。校正曲線および増幅収率の直線性は個々の需要を満たした。陽性対照および陰性対照サンプルの増幅の結果は予想通りであった。鋳型のないサンプルの増幅は観測されなかった。

【0060】

3. 乳癌転移を伴うまたは伴わないリンパ節サンプル中のCST4発現

異なるサイズの薬理的診断された乳房転移を含むリンパ節の30個の外科サンプルおよび初期段階の非転移性乳癌を伴う患者からの30のリンパ節サンプルを得た。初期段階の癌患者は、検出できないリンパ節転移および得られたアーチファクトを避けるために選択された。リアルタイムPCRはCST4の発現の定量化に用いられ、詳細な実験手順は実施例2（乳癌腫瘍および腫瘍隣接組織におけるCST4発現）に記載しているものと同じである。校正曲線および増幅収率の直線性は個々の要求を満たした。陽性対照および陰性対照サンプルの増幅のための結果は予想通りであった。鋳型のないサンプルの増幅は観測されなかった。

10

【0061】

図6に示されているように、CST4発現は、乳癌転移を伴うサンプルにおいて高く、癌転移を伴わないサンプルにおいて比較的低い。転移を伴うサンプル中のCST4発現の中央値は、乳癌転移を伴わないサンプル中に中央値より8.458倍高い。120.66のコピーのカットオフ値は転移を区別するのは可能である。CST4発現の2つの陽性の場合を非転移グループにおいて報告した。これらのサンプルは、注意深く研究され、そして微小転移巣は両方において発見された。これらの2つの場合が転移性のサンプルとして考えられる場合、CST4のmRNA発現試験は、検査においてすべての転移の場合を区別することができる。伝統的な病理学的研究の可能性を超えている微小転移巣は発見され、より高い感度を示す。

20

【0062】

4. リアルタイムPCRおよび末梢血中に循環している乳癌細胞の発見のための細胞学的研究によるCST4発現測定精度比較

【0063】

RNAは、赤血球および血小板を含まない末梢血から抽出され、CST4のmRNA発現をリアルタイムPCRで定量化し、乳腺炎患者および健常者からのサンプルと比較して、循環する乳癌細胞の存在を決定した。得られた結果を細胞学的研究と比較した。

30

【0064】

図7にまとめるように、CST4発現方法は、細胞学的研究により診断される全ての癌のケースを検出することができる。癌転移は細胞学的陰性な患者において発見され、本発明で述べられるその方法は細胞学的な方法より感度がよく、細胞学的な方法がし得るものを超えている微小転移巣も検出され得ることを証明する。

【0065】

5. リアルタイムPCRおよび細胞学的研究により検出される骨髄転移

乳癌患者からの生検骨髄サンプルのCST4のmRNAをリアルタイムPCRにより定量化した。得られた結果を転移または微小転移巣の発見用の通常の骨髄サンプルと比較した。これらの検査結果を細胞学的研究と比較した。

40

【0066】

図8に示されるように、骨髄転移を伴う95%のサンプル（細胞学的研究に基づく）はCST4のmRNA検査により検出され得る。細胞学的研究よりより高い陽性の割合はより高い感度を示す。

【0067】

実施例3. 乳癌患者、乳腺炎患者および健常者におけるCST4発現

1. 乳癌患者、乳腺炎患者および健常者の血清無細胞RNAにおけるCST4発現

乳癌患者（50例）、乳腺炎患者（30例）および健常者（30例）からの血漿サンプルを集めた。無細胞RNAを市販キットを通して抽出し、リアルタイムPCRをCST4発現の定量化に用いた。

50

【 0 0 6 8 】

癌性のグループのCST4発現の中央値は、炎症グループおよび正常グループのそれぞれおよそ8.87倍および25.62倍高い(図9A)。71.218のカットオフ値は、非癌性サンプルから癌性サンプルを区別することができる。乳癌診断のための方法としてCST4発現検査の受信者動作特性(ROC)曲線は図9Bに存在する。高感度および特異性を0.987の曲線の積分により結論付ける。CST4は、血漿サンプルによる非浸潤性の乳癌診断用の特異的なマーカーである。

【 0 0 6 9 】

2. リガーゼ連鎖反応(LCR)により検査された乳癌患者、乳腺炎患者および健常者の血清無細胞RNAにおけるCST4発現

10

CST4のmRNA発現用の検査キットは以下を含有する。

【 0 0 7 0 】

1) ハプテン標識化した4つのプローブ:

【 化 1 2 】

gggctctggcctcgagctccaagga (配列番号 33)、ataggataatcccaggtggcatctatgatg (配列番号 34)、
tctcctccttggagctcgaggccagagccc(配列番号 35)、catcatagatgccacctgggattatcctat(配列番号 36)

【 0 0 7 1 】

2) 市販の核酸抽出用試料および逆転写用試料。他の試薬は、LCxキット(Abbott Laboratories)と同一である。

20

無細胞RNAを乳癌患者(50例)、乳腺炎患者(30例)および健常者(30例)の血漿サンプルから抽出した。CST4のmRNAの発現をLCR方法により検査した。図10に示すように、癌性サンプルの相対発光量(RLU)の中央値は、炎症を伴うサンプルや正常サンプルのそれぞれの10.881倍および35.286倍高い。乳癌サンプルは17.458RLUのカットオフ値と区別し得る。

【 0 0 7 2 】

3. 逆転写ストランド置換増幅(rtSDA)により検査された乳癌患者、乳腺炎患者および健康者の血清無細胞RNAにおけるCST4発現

rtSDAに基づくCST4のmRNA発現の定量化用の検査キットは以下を含有する:

30

【 化 1 3 】

CST4 B1 プライマー: cccggcctctgtgtaccctgcta (配列番号 37)

CST4 S1 プライマー: gaa-ctcgagctaccctggctggggctctgg (配列番号 38)

CST4 B2 プライマー: ggtggccttgttactcgcctgat (配列番号 39)

CST4 S2 プライマー: gct-ctcgag agtgaagggcacgctgtac (配列番号 40)

検査プローブ: 5' -³²P-ttactcag ctccaaggaggagaatagga-3' (配列番号 41)

40

【 0 0 7 3 】

2) 核酸抽出および逆転写用試料、dCTP S、dATP、dGTP、dTTP、BsoBIおよびexo-BcaI。

【 0 0 7 4 】

無細胞RNAを、乳癌患者(50例)、乳腺炎患者(30例)および健常者(30例)の血漿サンプルから抽出した。CST4のmRNAの発現を好熱性鎖置換増幅(tSDA)により検査した。図11に示すように、癌性サンプルの相対発光量(RLU)の中央値は、炎症および正常サンプルをそれぞれ伴うサンプルより、34.58倍および35.89倍高い。乳癌サンプルは、24.095RLUのカットオフ値と区別され得る。

【 0 0 7 5 】

50

4. 乳癌患者、乳腺炎患者および健常者の尿無細胞RNAにおけるCST4発現
核酸ベース増幅(NASBA)に基づくCST4のmRNA発現定量化用の検査キット
は、以下を含有する。

【0076】

1) CST4用のプライマーおよびプローブ:

【化14】

上流プライマー: aattctaatacgactcactataggg-gctctcacccctcctcctg (配列番号32)

下流プライマー: tatcctattctcctcctgg (配列番号2)

分子指標プローブ: 5'-fam-gcggcctccagctttgtgctctgctctggccgc-dabsyl-3' (配列番号3)

10

【0077】

2) RNA抽出用および逆転写用試薬、T7RNAポリメラーゼ、リボヌクレアーゼH、
鳥骨髄性白血病ウイルス(AMV)逆転写酵素、リボヌクレオチド三リン酸(NTP)、
デオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)およびRNA蛍光色素(リボグリーン蛍
光色素)

【0078】

無細胞RNAを乳癌患者(30例)、乳腺炎患者(20例)および健常者(20例)の
尿サンプルから抽出した。CST4のmRNAの発現をNASBAにより検査した。図1
2に示されているように、癌性サンプルの相対発光量(RLU)の中央値は、炎症および
正常サンプルを伴うサンプルよりそれぞれ15.86および38.35倍高い。乳癌サン
プルは、30.92RLUのカットオフ値と区別され得る。それゆえ、CST4は、乳癌
診断用の非浸潤性の尿検査における優れたマーカーである。

20

【0079】

実施例4 乳癌pTNMステージ判定、治療中の腫瘍成長のリアルタイムモニタリング
および乳癌予後診断予測用のマーカーとしてのCST4

CST4のmRNA発現定量化用診断キットは、以下を含有する転写増幅法(TMA)
に基づく。

【0080】

1) 増幅用のプライマーおよびプローブ:

【化15】

上流プライマー: aattctaatacgactcactataggg-gctctcacccctcctcctg (配列番号32)

下流プライマー: tatcctattctcctcctgg (配列番号2)

分子指標プローブ: 5'-fam-gcggcctccagctttgtgctctgctctggccgc-dabsyl-3' (配列番号3)

30

【0081】

2) プライマーおよびプローブ以外のGen-probeのTMAアッセイに包含されて
いる任意の試薬

【0082】

40

1. CST4発現および乳癌pTNMステージ判定

80人の乳癌患者(I+IIステージの30例およびIII+IVステージの50例)
からの血漿サンプルにおける無細胞RNAを市販キットによって抽出した。CST4発現
を、TMA(転写増幅)方法を用いて測定した。図13に示すように、末期患者のRLU
中央値(ステージIII+IV)は、初期患者(ステージI+II)より7.2倍高い。
当該結果は、CST4は乳癌ステージの良好な指標であり、癌ステージ決定のために用い
られうる。

【0083】

2. 乳癌治療におけるリアルタイムモニタリングにおけるCST4発現の利用

治療を受ける乳癌患者の血清CST4発現(化学療法での6人の患者および放射線療法

50

での4人の患者)は、リアルタイムPCRにより観測された。腫瘍レベル成長を血液中のCST4発現レベルと比較し対応させた。

【0084】

表1にまとめるように、CST4発現は効果的な治療をする患者で減少し、これは、腫瘍の減少した大きさから明らかであった。CST4発現は、効果的でない治療をする患者の治療の継続とともに増加し、これは腫瘍の増加した大きさからも明らかであった。したがって、CST4を治療の有効性のリアルタイムモニタリング用のマーカーとして提案する。

【0085】

【表1】

10

リアルタイムPCRによる治療の間、乳癌患者の血液中のリアルタイムCST4発現

| | | CST4発現(コピー) | | | 腫瘍サイズ(cm) | | |
|----|--------|-------------|---------|---------|-----------|-------|-------|
| | | サイクル1 | サイクル2 | サイクル3 | サイクル1 | サイクル2 | サイクル3 |
| 有効 | 化学療法1 | 781.32 | 521.78 | 80.64 | 2.5 | 1.5 | <1 |
| | 化学療法3 | 1533.6 | 1314.6 | 125.25 | 3.5 | 2.5 | <1 |
| | 化学療法5 | 1213.5 | 439.89 | 66.64 | 3 | 2 | <1 |
| | 放射線療法2 | 1434.58 | 1160.33 | 116.83 | 3 | 1.5 | 1 |
| | 放射線療法3 | 2062.66 | 1689.44 | 189.65 | 3 | 2.5 | 1.5 |
| 無効 | 化学療法2 | 1466.14 | 1984.62 | 2433.57 | 3 | 3 | 3.5 |
| | 化学療法4 | 956.92 | 1156.34 | 1846.21 | 2 | 2 | 2.5 |
| | 化学療法6 | 646.2 | 826.7 | 1032.55 | 1 | 1 | 1.5 |
| | 放射線療法1 | 1032.4 | 1246.8 | 1989.61 | 2 | 2.5 | 3 |
| | 放射線療法4 | 936.4 | 1048 | 1678 | 1 | 1.5 | 2 |

20

【0086】

30

3. 乳癌の予後予測用CST4発現

5人の処置後の乳癌患者の血液CST4発現を定量的リアルタイムPCRによる治療後1月後、3月後および1年後に観測した。表2に示されているように、2人の患者は癌が再発した。CST4発現の増加はこれらの2人の患者で観測された。癌の再発は、CST4発現がおよそ1000のコピーに達するまで検出されなかった。他の3人の患者はがんが再発せず、あまりCST4発現の増加は彼らに観測されなかった。したがって、CST4は癌の予後予測に良好なマーカーである。

【0087】

【表 2】

定量的なリアルタイムPCRにより処置後の乳癌患者のCST4発現モニタリング

| | | CST4(コピー) | | | 腫瘍サイズ(cm) | | |
|--------|-----|-----------|--------|---------|-----------|----|----|
| | | 1月 | 3月 | 1年 | 1月 | 3月 | 1年 |
| 癌の再発 | 患者1 | 56.84 | 198.87 | 1135.24 | ND | ND | 1 |
| | 患者5 | 15.25 | 64.34 | 786.59 | ND | ND | <1 |
| 癌の再発なし | 患者2 | 23.6 | 40.5 | 36.3 | ND | ND | ND |
| | 患者3 | 52.43 | 39.8 | 48.65 | ND | ND | ND |
| | 患者4 | 67.9 | 79.6 | 86.79 | ND | ND | ND |

10

【0088】

(パートII) マーカーとしてのタンパク質

非浸潤性のタンパク質プローブ、検査キット、乳房疾患診断の方法およびプロトコル、観測および治療評価を本発明の以下の部分において議論されている。

【0089】

組み換えシスタチンSタンパク質をAbnovaから購入した(0.06 μg/μL、カタログ番号H00001472-P01)。価数1:2000であるラット抗シスタチンSモノクローナル抗体をR&Dから購入した(カタログ番号MAB1296)。価数1:1800であるウサギ抗シスタチンSポリクローナル抗体をAbcamから購入した(カタログ番号ab58515)。

20

【0090】

本発明は、乳癌の再発および転移の乳房組織状態の決定および予測のための方法を提供する。治療の評価は本発明に記載されている方法により理解され得る。この方法は、患者に与えられるサンプル中の少なくとも1つのタンパク質の濃度を測定する。サンプル中のシスタチンSタンパク質およびその定量的なまたは半定量的な測定は非常に好ましい。様々な分子は、タンパク質検出のために繰り返されたが、シスタチンの特定の抗体またはそれらのフラグメントは、本発明において好ましい。方法検出プロトコルおよび検査キットは、癌の兆候のないヒトの乳癌検診に用いられうる。

30

【0091】

少なくとも1つの(好ましい)抗体またはシスタチンSの少なくとも1つのエピトープに特異的に結合するフラグメントは本願明細書に述べられている検出において利用される。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであり得る。好ましいモノクローナル抗体は、シスタチンSを配列番号50に示される配列と結合する。抗体はシスタチンSを免疫原として獲得される。免疫原濃度は好ましい成分である。それゆえ、本発明は、シスタチンSの存在に対する抗体の免疫応答によるシスタチンSの定量化方法を提供する。

40

【0092】

本発明における被検体はヒトであり、ここで、試験特徴的な抗体およびヒトペプチド中の免疫応答である。免疫反応は任意の好ましい方法によって測定されてよく、これらに限定されないが、ELISA、免疫プロット法または両方の組み合わせ、競合ELISAおよび二重抗体のサンドイッチELISAキットを包含する。

【0093】

乳癌組織状態のモニタリングおよび診断、乳房疾患の治療の有効性のモニタリングは、シスタチンS発現の定量化を介する免疫反応により定量化され得る。

【0094】

我々は、サンプル中のマーカー(シスタチンSおよびその本願明細書におけるエピトープ)の検出のための全ての検査キットを本願明細書において主張する。乳房組織および乳

50

房疾患の状況は上記キットを介して診断され得る。乳房疾患の治療のモニタリングならびに癌の再発および転移の予測はキットの利用の範囲内でもある。抗シスタチンS抗体またはそれらのフラグメントはキットに含まれる。これらの抗体またはそれらのフラグメントは、血清のような流体サンプル中のシスタチンSと結合する。抗体またはそのフラグメントおよびシスタチンSの結合事象はモニタリングされ、報告単位によって検出される。

【0095】

好ましいまたは最適化されたキットの報告単位は抗体またはそれらの機能を標識化したフラグメントであり得る。ここで、報告単位は、適切なIgGまたはIgM抗体として好ましい。当該標識は、ペルオキシダーゼによるなど基質の色の変化を伴う反応を触媒する酵素としてあり得、好ましい。当該標識は二次抗体に共有結合しているのが好ましい。または、当該標識は蛍光色素であり得る。

10

【0096】

ELISAに基づく検査キットは本発明において好ましい。

【0097】

述べられるELISA検査キットは、競合ELISAキットまたは二重抗体のサンドイッチELISAキットであり、その詳細は次に記載されている。抗体またはそのフラグメントは、検体をインキュベートされている。抗体はモノクローナル抗体である。抗体はモノクローナル抗体である。抗シスタチンS抗体の製造用の免疫源であるシスタチンSタンパク質を、マイクロプレート（本願明細書の固体基質）とコンジュゲートさせている。事前にインキュベートした混合物をELISAプレート上で利用し、その後結合されていない抗体をプレート上に固定されているタンパク質に結合している。報告単位は、免疫グロブリン、とりわけIgGおよびIgMであり、プレート上で抗体を検出することができる。抗体は、酵素または検出用の蛍光標識とコンジュゲートされているということに留意されたい。

20

【0098】

本発明の別の方法論は免疫ブロット法、またはウエスタンブロット法であり、ここで、サンプル中のタンパク質を、PAGEなどのゲル電気泳動によって分離し、次いでニトロセルロース膜などの固体基質に移す。当該移す方法の1つは電気移動である。当該検体は、特定の抗体（モノクローナル抗体が好ましい）と関係する。免疫反応は、酵素/フルオロフォア標識抗体などによる適切な方法で観測され得る。

30

【0099】

本発明における別の好ましい方法論は親和性カラムに基づく検査キットである。典型的なプロセスにおいて、抗体またはそのフラグメントはカラム上で固定され、サンプル溶液はカラムをゆっくり通過する。本願明細書において、抗体はモノクローナルまたはポリクローナルである。上述されている抗体は好ましい。

【0100】

サンプル溶液はカラムを通過する。検体のタンパク質が固定された抗体と接触するとき、そのタンパク質はカラム中に残る。その後、検体のタンパク質は、抗体用の競合抗原を利用することにより、またはランニングバッファー条件を変更することにより溶出される。複数のタンパク質を分析する場合、異なるときにタンパク質を溶出するのが好ましい。タンパク質は、UV吸光度検出など、周知の種々の補法により定量化され得る。

40

【0101】

シスタチンS検査キットは本発明において提供される。2つのチャンネルシスタチンS指標は、シスタチンSレベルが通常より高いかどうかを正確に示す。流体サンプルは前記試験に好ましい。キットはサンプル、抗体およびそれらのフラグメントならびに指示薬のための容器を包含する。モノクローナル抗体、とりわけ、上述した抗体は好ましい。試験および操作やデータ解釈に必要な全溶液および緩衝液は、キットに含まれるだろう。キットは病院、診療所および家などの任意の場所において専門家により行われるだろう。

【0102】

本発明の受験者は、乳房の心地悪いヒトであり得る。当該検査はその受験者の乳癌の早

50

期スクリーニングを包含する。

【0103】

本発明の受験者は乳腺炎であるヒトであり得る。その試験は、受験者の乳癌の早期スクリーニングを包含する。

【0104】

本発明の受験者は乳癌の家族歴を有するヒトであり得る。その試験は受験者の乳癌の早期スクリーニングを包含する。

【0105】

本発明に用いるサンプルは、これらに限定されないが、全血液またはその画分を包含する血清、血漿、尿および血液を包含する。

【0106】

上記のように、本発明における抗体は、乳癌の診断ならびに乳癌の再発および転移の予測のために用いられうる。この出願において周知の方法は、キットと組み合わされ得る。例えば、蛍光方法は、血漿、血清または尿、次いで、特定の疾患の存在におけるシスタチンSの量を試験するためのキットと組み合わされ得る。

【0107】

本発明の目的、利点および特徴部は、以下の実施例において明らかとなる。その上、請求項および上記になされる結論を支持する実験の詳細も、以下の実施例に包含される。

【0108】

材料および方法

組み換えシスタチンSタンパク質をAbnovaから購入した(0.06 μg / μL、カタログ番号H00001472-P01)。

【0109】

抗体：価数1：2000であるラット抗シスタチンSモノクローナル抗体をR&Dから購入した(カタログ番号MAB1296)。価数1：1800であるウサギ抗シスタチンSポリクローナル抗体をAbcamから購入した(カタログ番号ab58515)。

【0110】

免疫沈殿：2 mMフッ化フェニルメタンスルホニル(PMSF)、ブドウ球菌タンパク質Aの固定されたアガロースゲルおよびシスタチンS抗体を、サンプル中に添加する。混合物を、4 で一晩穏やかに攪拌する。ジメチルピメルイミドエステルを、アガロースゲルに抗シスタチンS抗体をコンジュゲートするために用いる。その沈殿を、N-グリコシダーゼFで洗浄かつ処理し、タンパク質をSDS-PAGEによって精製する。

【0111】

N-グリコシダーゼFの塗布前に、沈殿物は10 μLのクエン酸塩緩衝液(50 mM、pH 6.0、0.5%のSDS)中で沸騰させられる。10 μLのリン酸塩緩衝液(200 mM、pH 8.0(40 mMのEDTAを含む))およびN-オクチルグルコシド(3%)およびN-キシラナーゼは混合物(40 mU)に添加され、一晩(37)培養される。添加液は、その後添加され、SDS-PAGE精製のために沸騰させられる。他に示されない限り、15%ポリアクリルアミドゲルはPAGEに用いられる。ゲルは20%の2,5-ジフェニルオキサゾール溶液によりイメージ化する。

【0112】

タンパク質の電子移動および免疫プロット法：タンパク質を、5%の脱脂粉乳および0.1%のPBS緩衝液を含むBrij-35を含むPBS緩衝液に2時間(常温)であるニトロセルロース膜に転移する。当該幕をPBS緩衝液(0.1%のBrij-35を含む)で3倍洗浄する。それをペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG溶液(0.27 μL)で1時間(37)インキュベートし、続いて、緩衝液(0.1% Brij-35)で4回、PBSの洗浄を1回行った。膜は、市販のTMB溶液(TMBペルオキシターゼ基板、Kirkegaard and Perry Laboratories Inc. (ゲイザースバーグ、メリーランド)カタログ番号50-76-01)により撮像される。または、膜が5.4 mMの過酸化水素溶液、2.5 nMのluminolおよび40

10

20

30

40

50

0 mM p - クマル酸 (100 mM の T r i s - H C l に溶解され、p H 8 . 5) に浸され
れ間、E L C 方法によって試験され、A g f a C P - B U - f o i l 上にイメージ化さ
れる。

【0113】

競合 E L I S A :

E L I S A プレート (コーニング) をシスタチン S 溶液 (5 μ g / m L) で被覆し、3
% の B S A 溶液によってバックフィルする。8 つの血清サンプル (2 倍希釈物) およびポ
リクローナルラット抗シスタチン S 抗体 (価数 1 : 1000 である) を一晚 (4) でイ
ンキュベートし、および前処理した E L I S A プレート上にアプライされた。プレートは
37 で 1 時間 37 でインキュベートする。サンプルの穴を T B S 緩衝液 (10 mM の
T r i s - H C l 、 154 mM の N a C l 、 p H 7 . 5) によって洗浄洗浄する。添加し
たアルカリのホスファターゼ (A L P) 標識ヤギ抗マウス I g G (価数 1 : 2000 の
ある J a c k s o n w i I m m u n o R e s e a r c h) 溶液を添加し、1 時間 (37
) の間インキュベートした。T M B 溶液 (T M B ペルオキシダーゼ基質、K i r k e g
a a r d a n d P e r r y L a b o r a t o r i e s I n c . (ゲイザーズパー
グ、メリーランド) カタログ番号 50 - 76 - 01) を添加し、405 nm における O D
をマイクロプレートリーダーにより定量化する。

10

【0114】

二重抗体サンドイッチ E L I S A :

E L I S A プレート (コーニング) をモノクローナルラット抗シスタチン S 溶液 (5 μ
g / m L) により被覆し、3 % B S A 溶液によりバックフィルした。8 個の血清サンプル
(2 倍希釈) を 1 時間 (37) プレートの穴にインキュベートした。プレートを T B S
緩衝液 (10 mM の T r i s - H C l 、 154 mM の N a C l 、 p H 7 . 5) で洗浄する
。ビオチン化ウサギ - 抗シスタチン S ポリクローナル抗体 (価数 : 1 : 1000) を穴に
アプライし、1 時間 (37) インキュベートする。当該穴を T B S 緩衝液で洗浄し、ス
トレプトアビジン - ペルオキシダーゼ複合体 (A B C コМПレックス) を添加する。プレ
ートを 1 時間 37 でインキュベートし、穴を T B S 緩衝液で洗浄する。T M B 溶液 (T
M B ペルオキシダーゼ基質、K i r k e g a a r d a n d P e r r y L a b o r a
t o r i e s I n c . (ゲイザーズパーグ、メリーランド) カタログ番号 50 - 76 -
01) を添加し、405 nm における O D をマイクロプレートリーダーにより定量化する
。

20

30

【0115】

実施例 1

1 . 乳癌細胞株培養上清におけるシスタチン S 検出

C S T 4 の m R N A を上で論じたように乳癌腫瘍中で過剰発現する。分泌タンパク質と
して、シスタチン S は種々の体液および分泌物中に見られうる。乳癌のマーカールとしてシ
スタチン S を樹立するため、C S T 4 の m R N A の高発現を伴う H C C 1973 (乳癌細胞
株) の上清を 15 % ポリアクリルアミドゲル (レーン 1 ~ 2、図 14) に充填し、対照
試料 (健常者の血清) をゲル (レーン 3 ~ 4、図 14) に充填した。電気泳動の後、タン
パク質をニトロセルロース膜に移し、ペルオキシダーゼ標識抗シスタチン S 抗体およびヤ
ギ抗ウサギ I g G と反応させた。T M B をタンパク質のイメージ化に用いた。上記方法に
従った。

40

【0116】

図 14 に示されているように、 - アクチン (内部基準) はゲルのボトムにある。16
k D a タンパク質を伴うバンドをレーン 1 ~ 2 で観測し、レーン 3 ~ 4 は、バンドが非常
に薄かった。

【0117】

2 . 乳癌患者の血清におけるシスタチン S 検出

セクション「1」に記載されているプロトコルは以下の通りであった。図 15 に示され
ているように、 - アクチン (内部基準) は、ゲルのボトムにある。16 k D a タンパク

50

質を有するバンドはレーン 1 ~ 2 (癌性サンプル) に観測され、レーン 3 ~ 4 (対照試料) のバンドは極めてかすかであった。

【0118】

3. モノクローナル抗体を用いた E L I S A による血清シスタチン S レベルの測定

実験: シスタチン S (5 μ g / mL) を E L I S A プレートにアプライし、一晚 (4) インキュベートした。50 個の血清サンプル (結直腸癌患者から 30 個および健常者から 20 個) を抗シスタチン S モノクローナル抗体 (価数 1 : 2000、3% の B S A を T B S に溶解させた) と混合し、当該サンプル混合物を前処理した E L I S A プレートにアプライし、1 時間 (常温) インキュベートした。当該 E L I S A プレートを T B S 緩衝液で洗浄し、ヤギ抗ウサギ抗体 (0.08 μ g / mL、T B S に溶解させた) でインキュベートした。プレートを p - ニトロフェニルホスフェート (p - N P P) と反応させた。マイクロプレートリーダーを定量化のために用いた。

【0119】

図 16 に示されているように、正常な血清中のシスタチン S レベルの中央値は 1.35 ng / mL であり、結腸直腸ガン血清中で 2.95 ng / mL である。3.105 ng / mL のカットオフ値は、癌性サンプルおよび健常サンプルを区別するのが可能である。

【0120】

4. 乳癌診断および予測のためにシスタチン S および C E A の感度および特異性の比較

シスタチン S をセクション「3」に記載されている方法に従って測定した。C E A を市販キット (D R G、ドイツ、カタログ番号 E I A 5071) を用いて測定し、取扱説明書に従っている。

【0121】

図 17 および表 3 に示されているように、受信動作特性 (R O C) 曲線 (A U C) の積分値は、シスタチン S が 0.832 および C E A が 0.776 であり、前者はより感度と選択性が良いことを意味する。

【0122】

【表 3】

ROC曲線の積分値

| 変数 | 積分値 | 標準偏差 | P:積分値と0.5の比較 | 信頼区間(cI95%) | |
|--------|-------|-------|--------------|-------------|-------|
| | | | | 下限 | 上限 |
| シスタチンS | 0.832 | 0.052 | 0.000 | 0.730 | 0.935 |
| CEA | 0.776 | 0.061 | 0.000 | 0.657 | 0.894 |

【0123】

5. 方法、検査キットおよびプロトコル

限定を意図せず、例証的な方法、検査キットおよびプロトコル

【0124】

乳癌の検出方法は以下を包含する。シスタチン S アンチゲンを基板上に固定する。R & D 抗体 (M A B 1296) を前処理した基板にアプライする。当該基板を洗浄し、A L P 標識ヤギ抗ウサギ I g G (B e y o t i m e I n c .、カタログ番号 A 239) などの二次抗体をアプライする。当該基板を洗浄し、直接的または間接的に標識 (例における A L P) からの応答からタンパク質の量を測定および検出する。

【0125】

基板は、これに限定されないが、セルロースシート、プラスチックプレートおよび粒子などのセルロースベース材料である樹脂粒子を包含する。

【0126】

抗原を共有結合でまたは非共有結合で固定し得る。試験用サンプルはヒト血清である。選択されまたは好ましい基板は、血清および基板中の他の成分間の非特異的相互作用を最

10

20

30

40

50

小化するために、サンプルの添加前にBSAによってバックフィルすべきである。その後、当該基板を界面活性剤を含むリン酸緩衝液などの適切な緩衝液によって洗浄する。

【0127】

標識二次抗体の限定を意図しない例は標識抗マウスポリクローナル抗体である。当該標識は、ALP、ルシフェラーゼ、ペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼおよび蛍光色素（フルオロセイン（fluorocsein）など）などの酵素を包含するが、これらに限定されない。ビオチン、アビジン、ストレプトアビジンおよびジギタリス配糖体などの分子は、抗体およびその標識の結合のために用いられてよい。

【0128】

酵素が標識である場合、その定性的検出および/または定量的検出は、酵素基質の添加および酵素による比色反応および/または発光反応により実現され得る。蛍光色素が標識である場合、その定性的検出および/または定量的検出は、UV露光および蛍光測定/検出により実現され得る。感光薬が必要に応じて用いられる。

10

【0129】

本発明の応用として、シスタチンSまたはそのエピトープ（配列番号50）に結合する分子は、必要に応じて、抗シスタチンS抗体またはそれらのフラグメント、二次抗体および固体基質、および1つまたは複数の補助供給品である。これらの必要な試薬または任意の試薬は検査キット内に供給される。上述した試薬は乳癌診断、pTNMステージ判定、転移検出および治療の有効性の評価に用いられてよい。

【0130】

例えば、検査キットは、特異的抗体またはそのフラグメントとなる。また、検査キットは、サンプル中のターゲットタンパク質の検出のため任意にまたは好ましくは報告単位となる。報告単位は好ましくは適切な二次抗体であり、任意にまたは好ましくは（必要に応じて）検出のための標識化を含む。キットは任意にまたは好ましくは、タンパク質の基板インキュベート用およびサンプル中のタンパク質の非特異的相互作用の除去用のタンパク質のバックフィル用ならびに基板に固定されたタンパク質用の緩衝液などの1以上の緩衝液やサンプル、二次抗体および/または上述された試薬をインキュベートした後の基板の洗浄用緩衝液を包含する。

20

【0131】

任意に、キットは、競合方法用のコントロールタンパク質の固定化のための固体基質を提供する。この場合、抗体およびサンプルは事前にインキュベートされ、その後、その混合物は、基板にアプライされる。報告単位は抗体および基板の検出に用いられる。専門家は、抗体が血清サンプルからエピトープと結合するかどうかを決定し、血清エピトープと結合する抗体の量を定量的に測定するかもしれない。したがって、当該ターゲットタンパク質の量は決定され得る。

30

【0132】

任意に、キットは、二重抗体サンドイッチ法において用い得、抗シスタチンS抗体を基板上に固定する。シスタチンS標準溶液および前処理したサンプル血清を基板にアプライする。報告単位標識（reporting-unit-labeling）を有する抗シスタチンSポリクローナル抗体を基板にアプライする。専門家は、抗体が血清サンプルからのエピトープと結合しているかどうか確かめ、血清エピトープに結合する抗体の量を定量的に測定できる。このようにして、ターゲットタンパク質の量は決定され得る。

40

【0133】

検査試薬および/または検査キット、ならびに/または測定器具および/またはキットおよび器具の組み合わせの必要条件の選択は検出に用いる方法に依存する。上述のように、これらの方法はタンパク質プロットングおよびフローサイトメトリを包含するが、これに限定されない。ELISA方法は上述されており、プロットングはより正しいが、さらなる設備および/または操作時間を必要とする。

【0134】

6. 実証的検査キットおよびそのプロトコル

50

取得物をサンプルし貯蔵する。血清について、血液サンプルを2時間室温で保存しまたは一晩4℃で保存する。当該サンプルを20分間(1000g)遠心分離し、上清を血清として収集する。得られた血清サンプルを-20℃または-80℃で保存かつ繰り返して解凍し、凍結しないようにすべきである。血漿について、抗凝固薬としてEDTAまたはヘパリンを用いる。当該サンプルを、血液の収集後30分未満の、15分間(2~8、1000g)遠心分離する。得られた血漿サンプルを-20℃または-80℃で保存し、解凍を繰り返して、凍結しないようにすべきである。

【0135】

前処理物をサンプリングする。血清または血漿サンプルを10倍に薄めることを勧める。例えば、100μL血清または血漿サンプルを900μLのPBS緩衝液と混ぜる。得られたサンプルを0.1MのPBS緩衝液(pH7.0~7.2)で希薄する。

10

【0136】

検査キットは以下を包含するだろう：1)プラスチック箱で閉じたELISAプレート、2)シスタチンS標準溶液。シスタチンS溶液を1%BSAを含むPBS緩衝液を用いて10ng/mLの濃度で調製する。当該原液を薄めて、5ng/mL、2.5ng/mL、1ng/mLおよび0.5ng/mLの濃度の一連の溶液を調製する。1%BSAを含むPBS緩衝液を0ng/mLシスタチンSを含む溶液として用いる。得られた溶液を試験前に15分以内に調製すべきである。例えば、4ng/mLシスタチンSの調製を、エペンドルフチューブ中、0.5mL(0.5mLも)シスタチンS溶液(8ng/mL)および0.5mLの希釈緩衝液を混合して行うことができる。他の濃度を同様にして実現し得る。3)バックフィル用の3%BSAを含むPBST緩衝液。4)コーティング用抗体：5μg/mLのラット抗シスタチンSモノクローナル抗体および希釈用緩衝液(0.05M NaHCO₃溶液、pH9.0)。5)ビオチン化ウサギ抗シスタチンS(価数1:200)および希釈緩衝液(1%BSAを含むPBST)。6)ABC(ストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体)。7)比色検出用TMB溶液。8)PBST緩衝液(PBS中、0.05%トゥイーン-20)。9)停止液：2N H₂SO₄。

20

【0137】

詳細な操作プロトコルを以下に記載する。

【0138】

1)コーティング．ラット抗シスタチンS溶液を炭酸水素ナトリウム緩衝液(0.05M、pH9.0)を用いて5μg/mLに希釈する。得られた溶液をポリスチレンプレート上の穴(0.1mL/1つの穴)にアプライする。当該プレートを一晩インキュベートする。穴の中の溶液を廃棄し、その穴を各3分間かけて3回洗浄する。

30

【0139】

2)バックフィル．上記穴に3%BSAを含む200μLPBST緩衝液を加える。当該プレート1時間(37℃)または一晩(4℃)でインキュベートする。その穴の中の溶液を廃棄し、当該穴を洗浄緩衝液を用いて3回、各回3分間洗浄する。

【0140】

3)サンプル充填．穴にブランク、標準溶液およびサンプル溶液を割り当てる。希釈緩衝液100μL、標準溶液およびサンプル溶液をブランクの穴、標準穴およびサンプル穴のそれぞれに添加する。気泡をできないようにする。上記溶液を当該穴のボトムで充填し、溶液が穴の壁と接しないようにする。プレートを緩やかに振り、蓋またはプラスチック箔によって穴を閉じる。プレートを120分間(37℃)インキュベートする。標準溶液を新たに調製し、結果物の精度を確かめる。

40

【0141】

4)穴の残留溶液を廃棄し、プレートを乾燥する。プレートを洗浄しない。ビオチン化ウサギ抗シスタチンSポリクローナル抗体溶液(1%BSAを含むPBSTで200倍に希釈する)を加える。蓋またはプラスチック箔によって穴を閉じる。60分間(37℃)、プレートをインキュベートする。

50

【0142】

5) 60分間、プレートをインキュベートし、穴の中の残留液体を廃棄する。当該プレートを乾燥した後に、プレートを3回、各回1~2分間、300 μ L洗浄緩衝液に浸して洗浄する。プレートを乾燥し、プレートをシェイクして、穴の中の残留液体を除去する。

【0143】

6) 100 μ LのABC溶液を穴に加える。箔によって穴を閉じ、60分間(37)、プレートをインキュベートする。

【0144】

7) 60分間、プレートをインキュベートし、穴の中の液体を廃棄し、プレートを乾燥する。プレートを5回、各回1~2分間、300 μ L洗浄緩衝液を浸して洗浄する。プレートを乾燥し、プレートを振盪して、穴の中の残留液体を除去する。

10

【0145】

8) 続けて、穴の中に50 μ L酵素基質溶液を加え、プレートを箔で閉じ、プレートを15分未満、暗闇(37)でインキュベートする。標準穴の中の溶液が濃度に応じて青色であり、ブランクの穴において無色であるときに反応を止める。

【0146】

9) 反応を50 μ L停止溶液を加えて止める。溶液は青から黄に変化する。停止溶液の添加の順番は、酵素基質の添加の順番と同一である。停止溶液を、反応が、終了しかけているときに、すぐに添加し、試験の精度を確認する。

20

【0147】

10) 酵素反応の停止後すぐに生じる穴の中の溶液のOD値の測定(405nm)

【0148】

計算: OD値に対して個々の溶液の濃度をプロットする。校正方程式を、データ調整を通して得、 R^2 を計算し、それは効果的試験用の0.95より高いはずである。検体を、サンプルおよび校正方程式のOD値を用いて計算する。

【0149】

7. 乳癌pTNMステージ判定用のシスタチンS発現

実験の詳細は、セクション6と同一である。乳癌患者(20個のTステージの例、30個のNステージの例および30個のMステージの例)サンプルを細胞的に80人診断する。癌の成長を表4にまとめるように、シスタチンS発現は増加し、シスタチンSタンパク質発現はpTNMステージ判定のために用いられうることを示す。

30

【0150】

【表4】

種々のpTNMステージにある乳癌患者のシスタチンS発現

| シスタチンS発現の中央値(ng/mL) | |
|---------------------|------|
| ステージT(20例) | 1.16 |
| ステージN(30例) | 2.89 |
| ステージM(30例) | 4.34 |

40

【0151】

8. 乳房癌転移診断用のシスタチンS発現

実験の詳細は、セクション7と同一である。乳癌患者50人のサンプルを細胞的に診断し、そのうち30人の患者は癌転移している。表5にまとめるように、シスタチンS発現は、癌転移をしていない患者より転移する患者において高く、シスタチンS発現が乳癌転移診断用のマーカーであることを示している。

50

【 0 1 5 2 】

【 表 5 】

転移している乳癌患者と転移していない乳癌患者のシスタチンS発現

| | シスタチンS発現の中央値 (ng/mL) |
|-----------|----------------------|
| 転移なし(20例) | 1.43 |
| 転移性癌(30例) | 4.19 |

10

【 0 1 5 3 】

9. 結直腸癌の治療のために化学療法と組み合わせられる内分泌セラピーの評価用シスタチンS発現

実験の詳細は、セクション6と同一である。1000人の胃癌(N0-1ステージ)を研究した。患者を5-FU/LV(レバミゾール)レジメで4回治療した。全患者は24月続けた。シスタチンS発現を上記セラピーの最終サイクルの後測定した。当該研究において364人の場合に有効であり、シスタチンS発現1.中央値は2.56ng/mLだった。図18に示されているように、中央値より高いシスタチンS発現を有する患者の疾患を有しない生存率(DFS)は30%であり、中央値より低いシスタチンS発現を有する群の生存率(50%)より低かった。

20

【 0 1 5 4 】

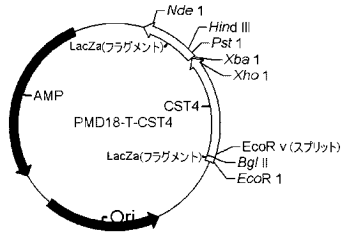
全実施例は本発明のいくつかの特徴部をよりよくかつより明らかに説明することに留意されたい。それは、一つの特徴部と組み合わせられうる。全特徴部またはそれに隣接する特徴部を必要に応じて組み合わせ得る。

【 0 1 5 5 】

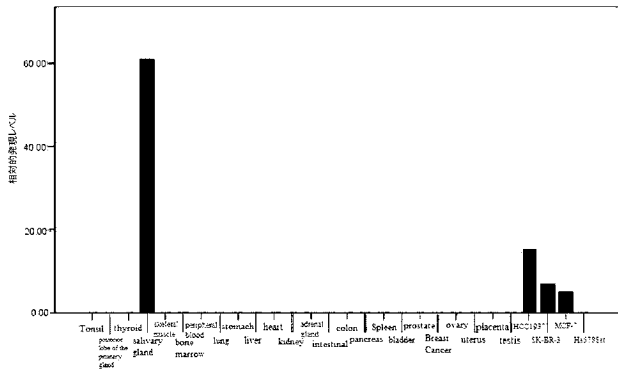
本発明における方法は実施例により例示され提供された。多くの置換、改良および変更がこの分野での専門家に進められている。これらの置換、改良および変更の任意の効果は請求項およびそれらの妥当な拡張の部分である。本特許において参照されている任意の出版物、特許および特許出願は、実施工程および本発明に包含されていないプロトコルの詳細を説明するために用いられるべきである。本発明に述べられている任意の参照は本発明の技術の代替として認知されていない。

30

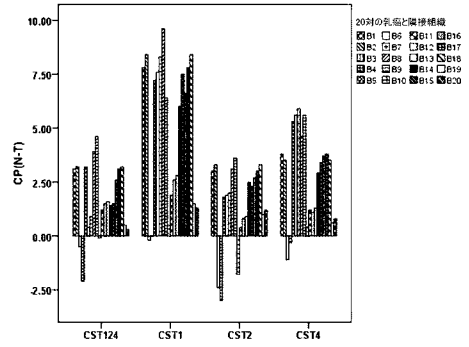
【 図 1 】



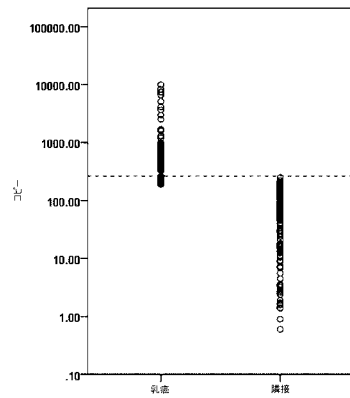
【 図 2 】



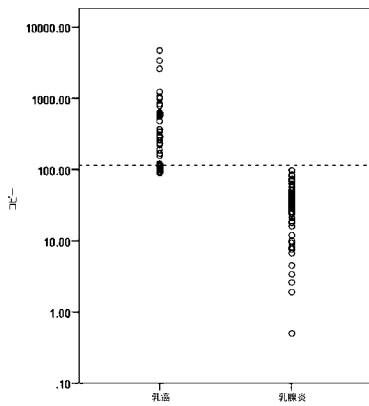
【 図 3 】



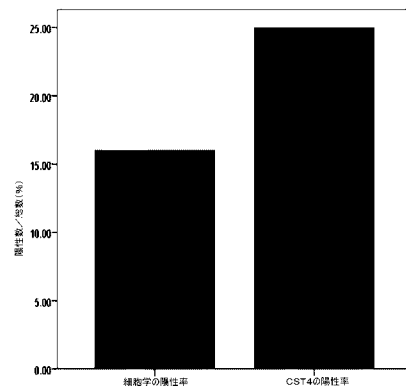
【 図 4 】



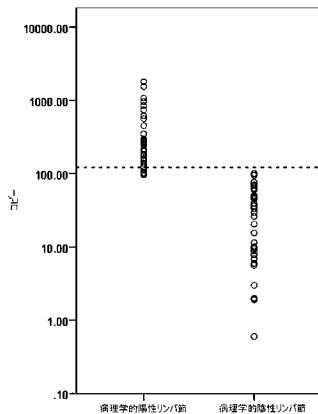
【 図 5 】



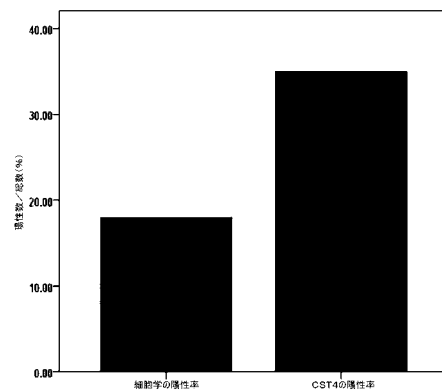
【 図 7 】



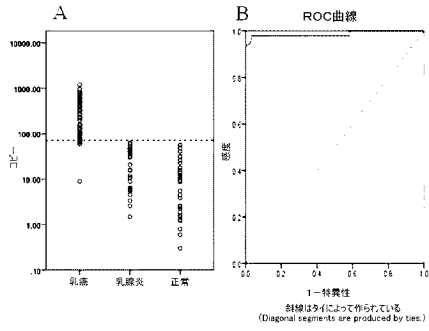
【 図 6 】



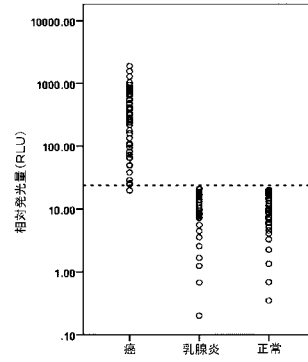
【 図 8 】



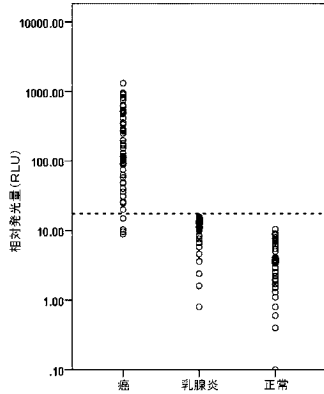
【 図 9 】



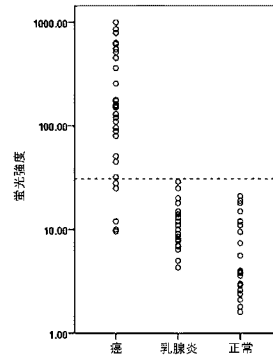
【 図 1 1 】



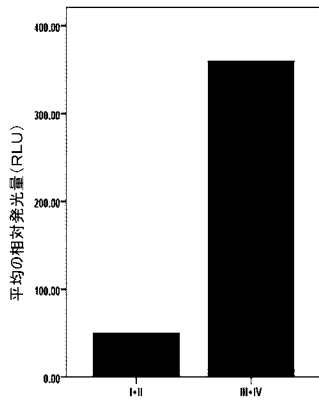
【 図 1 0 】



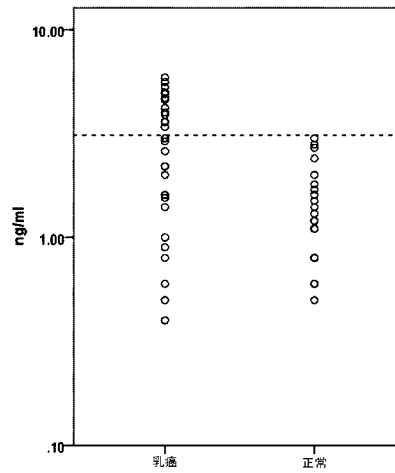
【 図 1 2 】



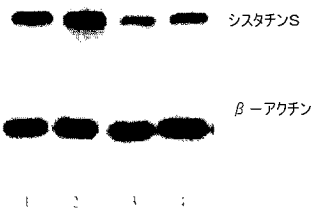
【 図 1 3 】



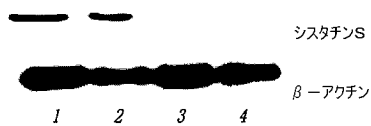
【 図 1 6 】



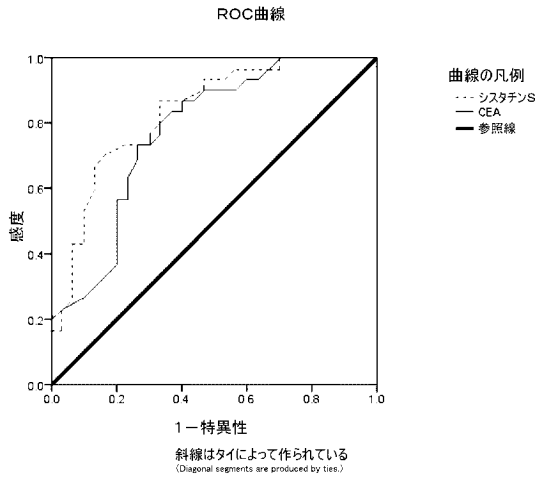
【 図 1 4 】



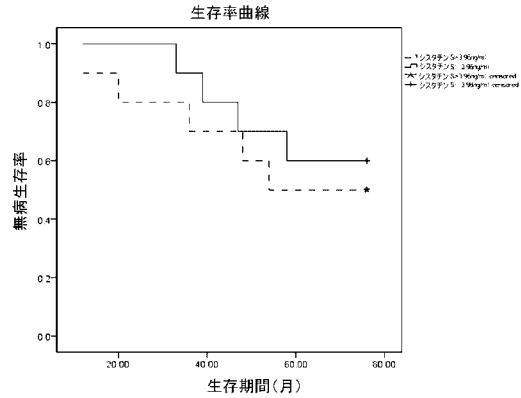
【 図 1 5 】



【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【 配列表 】

2015503922000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成25年11月5日(2013.11.5)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

乳癌の予想および診断における、CST4 遺伝子、CST4 の mRNA、CST4 のスプライスの cDNA、シスタチン S (CST4 によってコードされるタンパク質) およびシスタチン S のエピトープの利用方法であって、前記シスタチン S の配列が配列番号 4 2 に示されている、利用方法。

【 請求項 2 】

CST4、CST4 の mRNA および CST4 のスプライスの cDNA のプローブ配列が配列番号 3 に示されている、請求項 1 に記載の利用方法。

【 請求項 3 】

増幅産物の特異的プライマーが、配列番号 1、4、6、8、10、12、14、16、18、20 (プライマー 1) および配列番号 2、5、7、9、11、13、15、17、19、21 (プライマー 2) に示される配列を有する利用方法であって、配列番号 1 における配列は配列番号 2 における配列と対になり、配列番号 4 における配列は配列番号 5 における配列と対になり、配列番号 6 における配列は配列番号 7 における配列と対になり、配列番号 8 における配列は配列番号 9 における配列と対になり、配列番号 10 における配

列は配列番号 1 1 における配列と対になり、配列番号 1 2 における配列は配列番号 1 3 における配列と対になり、配列番号 1 4 における配列は配列番号 1 5 における配列と対になり、配列番号 1 6 における配列は配列番号 1 7 における配列と対になり、配列番号 1 8 における配列は配列番号 1 9 における配列と対になり、配列番号 2 0 における配列は配列番号 2 1 における配列と対になる、請求項 1 に記載の利用方法。

【請求項 4】

シスタチン S のエピトープペプチドの配列が配列番号 5 0 に示されている、請求項 1 に記載の利用方法。

【請求項 5】

乳癌の転移、微小転移巣、p T N M ステージ判定、癌治療の間の腫瘍のリアルタイムモニタリングおよび予後予測を含む、請求項 1 に記載の利用方法。

【請求項 6】

乳癌予測および乳癌診断用のマーカーのための乳癌バイオマーカー用キャプチャーであって、乳癌用マーカーが C S T 4 遺伝子、C S T 4 の m R N A、C S T 4 のスプライスの c D N A、C S T 4 - 特異的プライマーの増幅産物、C S T 4 によってコードされるシスタチン S およびシスタチン S のエピトープペプチドである、乳癌バイオマーカー用キャプチャー。

【請求項 7】

C S T 4 用プライマー用配列が配列番号 1 ~ 2 に示される、請求項 6 に記載の乳癌バイオマーカー用キャプチャー。

【請求項 8】

C S T 4、C S T 4 の m R N A および後者のスプライス用プローブのための配列が配列番号 3 に示される、請求項 6 に記載の乳癌バイオマーカー用キャプチャー。

【請求項 9】

増幅産物の配列が、配列番号 4 3 に示される、請求項 6 に記載の乳癌バイオマーカー用キャプチャー。

【請求項 1 0】

シスタチン S 用キャプチャーが、シスタチン S またはそのエピトープペプチド用特異的抗体を包含する、請求項 6 に記載の乳癌バイオマーカー用キャプチャー。

【請求項 1 1】

シスタチン S のエピトープペプチドの配列が配列番号 5 0 内に存在する、請求項 6 に記載の乳癌バイオマーカー用キャプチャー。

【請求項 1 2】

乳癌検出用の検査試薬および検査キットの製造において上述されているこれらのキャプチャーの利用方法。

【請求項 1 3】

キャプチャーが包含されている、請求項 6 に記載の検査キット。

【請求項 1 4】

以下に詳細に説明されている、請求項 1 3 に記載の検査キット；

1) T a q M a n プローブを用いる C S T 4 の m R N A 用リアルタイムかつ定量的検査キットであり、プライマー配列が配列番号 1 ~ 2 に示され、プローブの配列が配列番号 3 に示され、

2) プローブとして蛍光色素を用いる C S T 4 の m R N A 用リアルタイムかつ定量的検査キットであって、プライマー配列が配列番号 1 ~ 2 に示され、内部参照用プライマーの配列が配列番号 3 0 ~ 3 1 に示され、または、

3) 核酸ベース増幅 (N A S B A) または転写媒介増幅 (T M A) に基づく C S T 4 の m R N A 用定量的検査キットであって、両方のキットが、配列は配列番号 2、3 2 (プライマー用) および 3 (プローブ用) において示される C S T 4 用プライマーおよびプローブを包含し、または

4) リガーゼ連鎖反応 (L C R) に基づく C S T 4 の m R N A 用定量的検査キットであ

って、配列が配列番号 33 ~ 36 に示される 4 つのプロープが包含され、または、

5) 好熱性鎖置換増幅 (tSDA) に基づく CST4 の mRNA 用定量的検査キットであって、プライマー (配列番号 37 ~ 40 に示される配列) およびプロープ (配列番号 41) が包含される。

【請求項 15】

詳細な説明が以下のとおりである、請求項 13 に記載の検査キット；

1) 固体基質、固体基質に固定されたキャプチャー、ビオチン化キャプチャーおよび酵素基質 (比色分析) を包含している二重抗体サンドイッチ ELISA キットであって、固定されたキャプチャーがモノクローナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である、または

2) 固体基質、キャプチャー、酵素によりラベル化した第二抗体および比色検出用酵素基質を包含しているプロットイングキットであって、キャプチャーが、モノクローナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーがポリクローナル抗体である。または

3) 固体基質、固定された抗原、ビオチン化キャプチャー、比色検出用酵素基質および特異的なモノクローナル抗体を包含している競合 ELISA キットであって、ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である。

【請求項 16】

陽性対照サンプルおよび陰性対照サンプルならびにブランクサンプルが包含されている、請求項 14 に記載の検査キット。

【請求項 17】

モノクローナル抗体がラット抗シスタチン S 抗体であり、固体基質が ELISA プレートであり、ビオチン化ポリクローナル抗体がビオチン化ウサギ抗シスタチン S ポリクローナル抗体である、請求項 15 に記載のダブル抗体 ELISA 検査キット。

【請求項 18】

詳細が以下のように記載されている請求項 17 に記載の検査キットのプロトコルであって、ラット抗シスタチン S 抗体により ELISA プレートをコーティングし、その後 3% BSA でバックフィルされ、8 倍に希釈したサンプルを前記プレートにアプライし、それを 37 でインキュベートし、TBS によってサンプルを含む前記穴を洗浄し、ビオチン化ウサギ抗シスタチン S ポリクローナル抗体を加え、37 で前記プレートをインキュベートし、TBS によってサンプルを含む穴を洗浄し、ストレプトアビジン - ビオチン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 複合体を加え、37 で前記プレートをインキュベートし、続いて、TBS でプレートを洗浄し、最後に検体をアルカリホスファターゼ (ALP) を添加し、マイクロプレートリーダーにおける OD (405 nm) で読んで定量化される、検査キットのプロトコル。

【請求項 19】

乳癌診断検査キットを用いるまたは乳癌予測用のための利用方法であって、ここで、発現レベルまたは検査キットを介して測定される乳癌マーカーの定量的含有量が健常者の発現レベルまたは検査キットを介して測定される乳癌マーカーの定量的含有量と比較され、その結果が陽性か否かを決定し、またはその結果がカットオフ値より高ければ陽性と解析され、カットオフ値が乳癌患者および健常者の体液または組織サンプル中の乳癌マーカー発現 / レベルの比較を通して得られ、カットオフ値が統計的に有意であり、サンプルが以下：血液、尿、骨髄、乳癌細胞株、乳癌腫瘍および腫瘍隣接組織ならびにリンパ節組織の 1 以上を包含する、請求項 14 に記載の利用方法。

【請求項 20】

乳癌の予測および診断用の検査キットであって、ここで、前記検査キットが、血液のシスタチン S レベルを検出し、固体基質、前記基質上に固定されたキャプチャー、ならびにビオチン化キャプチャーおよび比色検出用の対応する基質を包含し、固定されたキャプチャーは特異的モノクローナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体であり、または

前記検出キットが、固体基質、前記固体基質上に固定されたシスタチン S、マウス抗シ

スタチンSモノクローナル抗体、酵素標識化二次抗体および比色検出用の対応する基質を包含する血液シスタチンSレベルを検出し、または

固体基質、キャプチャー、酵素標識化二次抗体および比色検出用の対応する基質を包含する血液シスタチンSレベルを検出するキットであって、キャプチャーが特異的モノクローナル抗体を包含し、ビオチン化キャプチャーがポリクローナル抗体である、検査キット

【請求項 2 1】

二重抗体サンドイッチ E L I S A に基づく請求項 1 5 に記載の検査キットであって、ここで、E L I S A プレートが固体基質であり、固定されたキャプチャーがラット抗シスタチンSモノクローナル抗体であり、前記ビオチン化キャプチャーがウサギ抗シスタチンSポリクローナル抗体（価数 1 : 1 0 0 0 である）でありおよび前記比色検出用基質がアルカリホスファターゼであり、または

前記検査キットが競合 E L I S A に基づき、ここで、E L I S A プレートが前記固体基質であり、シスタチンSの濃度が 5 μ g / m L であり、前記特異的モノクローナル抗体がラット抗シスタチンS抗体（価数 1 : 2 0 0 0 である）であり、酵素ラベル化二次抗体が A L P ラベル化ヤギ抗マウス I g G （価数 1 : 2 0 0 0 であり）であり、および前記比色検出用基質が A L P 基質であり、シスタチンS、酵素ラベル化二次抗体および A L P 基質の体積比が 1 : 2 であり、または

キットが免疫プロット法に基づき、前記固体基質はニトロセルロース膜であり、前記キャプチャーはモノクローナルシスタチンS抗体（価数 1 : 1 0 0 0 である）であり、前記酵素ラベル化二次抗体はペルオキシダーゼラベル化ヤギ抗ウサギ I g G であり、および前記酵素基質は T M B 溶液である、検査キット。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 7】

本発明に包含される技術を以下に記載する。

乳癌の診断および予防における C S T 4 遺伝子、C S T 4 の m R N A、C S T 4 のスプライスの c D N A、C S T 4 特異的プライマ用増幅産物、シスタチンSの C S T 4 遺伝子およびエピトープペプチドによってコードされるシスタチンSタンパク質の利用。C S T 4 遺伝子の配列は配列番号 4 2 に存在する。C S T 4 遺伝子、C S T 4 の m R N A および C S T 4 のスプライスの c D N A のプローブは配列番号 3 に示されるような配列を有する。増幅産物の特異的プライマは配列番号 1、4、6、8、10、12、14、16、18、20（プライマー 1）および配列番号 2、5、7、9、11、13、15、17、19、21（プライマー 2）に示される配列を有する。配列番号 1 における配列は、配列番号 2 における配列と対にされる。配列番号 4 における配列は、配列番号 5 における配列と対にされる。配列番号 6 における配列は、配列番号 7 における配列と対にされる。配列番号 8 における配列は、配列番号 9 における配列と対にされる。配列番号 10 における配列は、配列番号 11 における配列と対にされる。配列番号 12 における配列は、配列番号 13 における配列と対にされる。配列番号 14 における配列は、配列番号 15 における配列と対にされる。配列番号 16 における配列は、配列番号 17 における配列と対にされる。配列番号 18 における配列は、配列番号 19 における配列と対にされる。配列番号 20 における配列は、配列番号 21 における配列と対にされる。シスタチンSのエピトープペプチドの配列は配列番号 50 に示される。本願の診断およびスクリーニングは乳癌の転移および微小転移巣、p T N M ステージ判定、癌治療および予後予測の間の腫瘍のリアルタイムモニタリングを意味する。これらの配列は本発明の範囲を限定しないということに留意されたい。それらの機能の全配列は本発明に含まれる。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

特異的プライマーの配列は、配列番号1～2に存在する。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

CST4 遺伝子、CST4 の mRNA、CST4 のスプライスの cDNA 用プローブの配列は、配列番号3に存在する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

増幅産物の配列は、配列番号43に存在する。

【 国际调查报告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/CN2012/070151 |
|--|--|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| See the extra sheet | | |
| 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: C12Q, C07K, G01N | | |
| 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) | | |
| Database: DWPI, SIPOABS, CNTXT, CNABS, ISI WEB OF KNOWLEDGE (Biosis, medline, Embase), CNKI, GenBank; | | |
| Search terms: cst4, cystatin s, breast, cancer, tumor, mammary, adenocarcinoma?, gland, carcinoma?, sequence search on SEQ ID NOs: 1-21, 30-43 and 50 | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 2007070021 A1 (NANOBAC LIFE SCIENCE, INC.), 21 June 2007 (21.06.2007), see claims 59-102, description pages 30-33, 46-49 and 122, table 7 | 6, 10, 12-13, 15, 18-19, 21, 23 |
| Y | see claims 59-102, description pages 30-33, 46-49 and 122, table 7 | 1, 5 |
| A | see the whole document | 2-4, 7-9, 11, 14, 17, 20 |
| X | US 20070134814 A1 (E.Olavi Kajander et al), 14 June 2007 (14.06.2007), see the whole document | 6, 10, 12-13, 15, 18-19, 21, 23 |
| Y | see the whole document | 1, 5 |
| <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 10 September 2012 (10.09.2012) | Date of mailing of the international search report 18 October 2012 (18.10.2012) | |
| Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451 | Authorized officer PAN, Junyu Telephone No. (86-10) 62411086 | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2012/070151

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|--------------------------|
| A | See the whole document | 2-4, 7-9, 11, 14, 17, 20 |
| A | CN 101541977 A (NOVARTIS AG), 23 September 2009 (23.09.2009), see the whole document | 1-15, 17-21, 23 |
| Y | GenBank Accession Number: NM_001899, 02 April 2002 (02.04.2002), [on line], [search time: 10 September 2012 (10.09.2012)], From: GenBank database | 1, 5 |
| A | MARIO Campone et al, Prediction of metastatic relapse in node-positive breast cancer: Establishment of a clinicogenomic model after FEC100 adjuvant regimen, Breast Cancer Res Treat, 21 July 2007 (21.07.2007), vol.109, no.3, pages 491-501, ISSN: 0167-6806, see pages 497-498 | 1-15, 17-21, 23 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/070151

| Patent Documents referred in the Report | Publication Date | Patent Family | Publication Date |
|---|------------------|---------------------|------------------|
| WO 2007070021 A1 | 21.06.2007 | None | |
| US 20070134814 A1 | 14.06.2007 | None | |
| CN 101541977 A | 23.09.2009 | WO 2008082730 A2 | 10.07.2008 |
| | | WO 2008082730 A3 | 08.01.2009 |
| | | EP 2074226 A2 | 01.07.2009 |
| | | KR 20090071603 A | 01.07.2009 |
| | | AU 2007340265 A1 | 10.07.2008 |
| | | CA 2262508 A1 | 10.07.2008 |
| | | MXPA 09002936 A | 30.04.2009 |
| | | US 2010004253 A1 | 07.01.2010 |
| | | JP 2010504530 A | 12.02.2010 |
| | | INDELNP 200902493 E | 20.08.2010 |
| | | RU 2009114745 A | 27.10.2010 |
| | | SG 174826 A1 | 28.10.2011 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/070151

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

CI2Q 1/68 (2006.01) i

C07K 16/18 (2006.01) i

G01N 33/53 (2006.01) i

| 国际检索报告 | | 国际申请号 PCT/CN2012/070151 |
|--|--|---|
| A. 主题的分类 | | |
| 见附加页 | | |
| 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类 | | |
| B. 检索领域 | | |
| 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) | | |
| IPC: C12Q, C07K, G01N | | |
| 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 | | |
| 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) | | |
| 数据库: DWPI, SIPOABS, CNTXT, CNABS, ISI WEB OF KNOWLEDGE(Biosis, medline, Embase), CNKI, Genbank; 检索词: 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 S, 抑半胱氨酸蛋白酶蛋白 S,cst4,cystatin s,乳腺, 癌, 肿瘤, breast, cancer, tumor, mammary, adenocarcinoma?, gland, carcinoma?, SEQ ID NOs:1-21,30-43,50 等 | | |
| C. 相关文件 | | |
| 类 型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求 |
| X | WO2007070021A1 (NANOBAC LIFE SCIENCE, INC.), 21.6 月 2007 (21.06.2007), 参见权利要求 59-102, 说明书 30-33, 46-49 页, 122 页表 7 | 6,10,12-13,15,18-19,21,23 |
| Y | 参见权利要求 59-102, 说明书 30-33, 46-49 页, 122 页表 7 | 1,5 |
| A | 参见全文 | 2-4,7-9,11,14,17,20 |
| X | US2007013481A1 (E.Olavi Kajander 等人), 14.6 月 2007 (14.06.2007), 参见全文 | 6,10,12-13,15,18-19,21,23 |
| Y | 参见全文 | 1,5 |
| A | 参见全文 | 2-4,7-9,11,14,17,20 |
| A | CN101541977A (诺瓦提斯公司), 23.9 月 2009 (23.09.2009), 参见全文 | 1-15,17-21,23 |
| <input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。 | | |
| * 引用文件的具体类型: | | “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 |
| “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 | | “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 |
| “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 | | “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 |
| “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) | | “&” 同族专利的文件 |
| “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 | | |
| “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 | | |
| 国际检索实际完成的日期 10.9 月 2012 (10.09.2012) | | 国际检索报告邮寄日期 18.10 月 2012 (18.10.2012) |
| ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451 | | 受权官员 潘俊宇 电话号码: (86-10) 62411086 |

国际检索报告

| |
|-----------------------------------|
| 国际申请号 PCT/CN2012/070151 |
|-----------------------------------|

| C(续). 相关文件 | | |
|------------|---|---------------|
| 类 型 | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求 |
| Y | Genbank 登录号NM_001899, 02.4月 2002 (02.04.2002), [联机][检索日期10.9月2012 (10.09.2012)], 检索自: GenBank数据库 | 1,5 |
| A | Mario Campono等人, Prediction of metastatic relapse in node-positive breast cancer: establishment of a clinicogenomic model after FEC100 adjuvant regimen, Breast Cancer Res Treat, 21.7月2007 (21.07.2007), 第109卷, 第3期, 第491-501页, ISSN: 0167-6806, 参见第497-498页 | 1-15,17-21,23 |

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/070151

| 检索报告中引用的 专利文件 | 公布日期 | 同族专利 | 公布日期 |
|------------------|------------|-------------------|------------|
| WO2007070021A1 | 21.06.2007 | 无 | |
| US20070134814A1 | 14.06.2007 | 无 | |
| CN101541977A | 23.09.2009 | WO2008082730A2 | 10.07.2008 |
| | | WO2008082730A3 | 08.01.2009 |
| | | EP2074226A2 | 01.07.2009 |
| | | KR20090071603A | 01.07.2009 |
| | | AU2007340265A1 | 10.07.2008 |
| | | CA2662508A1 | 10.07.2008 |
| | | MXPA09002936A | 30.04.2009 |
| | | US2010004253A1 | 07.01.2010 |
| | | JP2010504530A | 12.02.2010 |
| | | INDELNP200902493E | 20.08.2010 |
| | | RU2009114745A | 27.10.2010 |
| | | SG174826A1 | 28.10.2011 |

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/070151

A. 主题的分类

C12Q1/68(2006.01)i
C07K16/18(2006.01) i
G01N33/53(2006.01)i

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I | | テーマコード(参考) |
|-------------|-----------------|---------|-------|------------|
| C 1 2 Q | 1/68 (2006.01) | C 1 2 Q | 1/68 | A |
| C 0 7 K | 16/18 (2006.01) | C 0 7 K | 16/18 | |
| C 1 2 M | 1/00 (2006.01) | C 1 2 M | 1/00 | A |
| C 1 2 M | 1/34 (2006.01) | C 1 2 M | 1/34 | F |
| C 1 2 N | 15/02 (2006.01) | C 1 2 M | 1/34 | Z |
| C 1 2 P | 21/08 (2006.01) | C 1 2 N | 15/00 | C |
| | | C 1 2 P | 21/08 | |

(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, MD, RU, T J, 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, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72)発明者 ワン タオ

中華人民共和国 ジアンスー 2 1 5 1 2 3 スージョウ インダストリアル パーク ディスト
リクト バイオベイ 2 1 8 シンファー ロード シー4 ビルディング スイート 2 0 1

(72)発明者 チュー シャンユン

中華人民共和国 ジアンスー 2 1 5 1 2 3 スージョウ インダストリアル パーク ディスト
リクト バイオベイ 2 1 8 シンファー ロード シー4 ビルディング スイート 2 0 1

(72)発明者 チェン フェイ

中華人民共和国 ジアンスー 2 1 5 1 2 3 スージョウ インダストリアル パーク ディスト
リクト バイオベイ 2 1 8 シンファー ロード シー4 ビルディング スイート 2 0 1

F ターム(参考) 4B024 AA12 BA45 CA09 DA02 GA05 HA14 HA15
4B029 AA07 BB11 BB17 BB20 CC02 CC08 FA12
4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ53 QQ79 QR32
QR36 QR48 QR62 QR72 QR77 QS02 QS07 QS33 QS34 QX01
4B064 AG27 CA20 DA14
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA51 FA71

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | <无法获取翻译> | | |
| 公开(公告)号 | JP2015503922A5 | 公开(公告)日 | 2016-05-12 |
| 申请号 | JP2014550608 | 申请日 | 2012-01-09 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 苏周微诊断生物医药有限责任公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 苏州微诊断生物医药有限公司 | | |
| [标]发明人 | ワンタオ チューシャンユン チェンフェイ | | |
| 发明人 | ワン タオ チュー シャンユン チェン フェイ | | |
| IPC分类号 | C12N15/09 G01N33/543 G01N33/574 G01N33/53 C12Q1/04 C12Q1/68 C07K16/18 C12M1/00 C12M1/34 C12N15/02 C12P21/08 | | |
| CPC分类号 | G01N33/57415 C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/158 C12Q2600/178 G01N2333/8139 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.A G01N33/543.545.A G01N33/574.A G01N33/53.U C12Q1/04.ZNA C12Q1/68.A C07K16/18 C12M1/00.A C12M1/34.F C12M1/34.Z C12N15/00.C C12P21/08 | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA12 4B024/BA45 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/GA05 4B024/HA14 4B024/HA15 4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/BB17 4B029/BB20 4B029/CC02 4B029/CC08 4B029/FA12 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS07 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/DA14 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA51 4H045/FA71 | | |
| 代理人(译) | 藤田和子 | | |
| 其他公开文献 | JP6192123B2 JP2015503922A | | |

摘要(译)

CST4基因, CST4基因mRNA, CST4基因剪接cDNA, CST4特异性引物扩增产物, CST4基因编码胱抑素S蛋白和胱抑素S表位蛋白在乳腺癌诊断和支持标志物制备中的应用提供使用。同样可用于乳腺癌的诊断, 动态监测和预后。 .The 10