

(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2006-524794

(P2006-524794A)

(43) 公表日 平成18年11月2日(2006.11.2)

(51) Int. Cl.

G O 1 N 33/574 (2006.01)

F I

G O 1 N 33/574

A

テーマコード (参考)

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2006-500105 (P2006-500105) | (71) 出願人 | 591003013 エフ・ホフマン-ラ ロシュ アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCH E AKTIENGESELLSCHAFT |
| (86) (22) 出願日 | 平成16年5月25日 (2004. 5. 25) | (74) 代理人 | 100095832 弁理士 細田 芳徳 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成17年10月26日 (2005.10.26) | (72) 発明者 | ベルンツ, ベーター スイス国 バーゼル シーエイチ-405 6 ミトレーレ シュトラーセ 138 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/EP2004/005598 | (72) 発明者 | ハグマン, マリー-ルイゼ ドイツ連邦共和国 ペンツベルク 823 77 ザーランガーシュトラーセ 42 |
| (87) 国際公開番号 | W02004/104593 | | 最終頁に続く |
| (87) 国際公開日 | 平成16年12月2日 (2004. 12. 2) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 03011158.7 | | |
| (32) 優先日 | 平成15年5月26日 (2003. 5. 26) | | |
| (33) 優先権主張国 | 欧州特許庁 (EP) | | |

(54) 【発明の名称】 結腸直腸癌に対するマーカーとしてのタンパク質MASPの使用

(57) 【要約】

本発明は、結腸直腸癌の診断に関する。本発明は、結腸直腸癌の診断におけるタンパク質MASPの使用を開示する。本発明は、個体由来の液体試料からの、該試料中のMASPを測定することによる結腸直腸癌の診断方法に関する。MASPの測定は、例えば結腸直腸癌の早期の検出または診断に用いられ得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) 個体から得られた液体試料を提供する工程、
 b) 該試料と、マスピン前駆体(MASP)に対して特異的に結合する試薬とを、該結合試薬とMASPとの間での複合体形成に適切な条件下で接触させる工程、及び
 c) (b)で形成した複合体の量を、結腸直腸癌の診断に対して相関させる工程を含む、結腸直腸癌の診断方法。

【請求項 2】

前記試料が血清であることをさらに特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記試料が血漿であることをさらに特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記試料が全血であることをさらに特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

個体から得られた液体試料からの結腸直腸癌の診断における、マーカー分子としてのタンパク質MASPの使用。

【請求項 6】

個体から得られた液体試料からの結腸直腸癌の早期診断における、マーカー分子としてのタンパク質MASPの使用。

【請求項 7】

腺腫期のCRC患者由来の試料で早期診断が行われる、請求項 6 記載の使用。

【請求項 8】

T_{is} ~ 3; NO; MO期のCRC患者由来の試料を用いて早期診断が行われる、請求項 6 記載の使用。

【請求項 9】

個体から得られた液体試料からの結腸直腸癌の診断における、結腸直腸癌に対するマーカー分子としてのタンパク質MASPの、結腸直腸癌に対する別のマーカー分子と組み合わせた使用。

【請求項 10】

MASPに対する少なくとも1つの特異的に結合する試薬及びMASPの測定のための補助試薬を含む免疫学的キット

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、結腸直腸癌の診断に関する。本発明は、結腸直腸癌の診断におけるMASP(マスピン前駆体)タンパク質の使用を開示する。更に、本発明は特に個体由来の液体試料からの、該試料中のMASPを測定することによる結腸直腸癌の診断方法に関する。MASPの測定は、例えば結腸直腸癌の早期の検出または診断に用いられ得る。

【0002】

検出および治療が発達しても、癌は、依然として主な公衆の健康の課題である。様々な癌の中で、結腸直腸癌(=CRC)は、西洋において最も頻度の高い癌のうちの1つである。

【0003】

癌は早期に検出/診断できればできるほど、全体的な生存率はより良くなる。これはCRCに特に当てはまる。癌の進行段階での予後は不良である。診断後5年以内に、3分の1を超える患者が進行性の疾患で死亡し、これは5年間で約40%の生存率に相当する。現在の治療は僅かな患者を治療するのみであり、明らかに疾患の初期段階で診断された患者に最も効果がある。

【0004】

公衆の健康問題としてのCRCについては、結腸直腸癌のより効果的なスクリーニングお

10

20

30

40

50

よび予防手段が開発されることが必須である。

【0005】

現在、結腸直腸癌に有用で最も早期な検出手順は、便の血液に対する検査または内視鏡法を使用することを含む。しかし、便の血液が検出される以前に、重大な腫瘍サイズが典型的に存在することが必要である。癒瘍木脂ベースの便潜血検査での感度は26%以下であり、これは悪性病変を持つ患者の74%が検出されずにいることを意味する(Ahlfquist, D.A., Gastroenterol. Clin. North Am. 26 (1997) 41-55)。前癌または癌病変の視覚化は早期の検出には最も良いアプローチであるが、結腸鏡検査は高い費用、リスク、および複雑性を含み、侵襲性である(Silvis, S.E.ら, JAMA 235 (1976) 928-930; Geenen, J.E.ら, Am. J. Dig. Dis. 20 (1975) 231-235; Anderson, W.F.ら, J. Natl. Cancer Institute 10 94 (2002) 1126-1133)。

【0006】

近年、非常に多数の、いわゆる結腸特異的あるいはいわゆる結腸直腸癌特異的な遺伝子が、報告されている。対応する研究論文あるいは特許出願の大多数は、異なる組織あるいは近接する正常組織それぞれに対する結腸(癌)組織でのRNAの発現パターン解析で得たデータを基にしている。係るアプローチはディファレンシャルmRNAディスプレイ技術として要約され得る。

【0007】

mRNAディスプレイ技術から得られるデータの例として、WO 第01/96390号が言及され、審議されるはずである。200を超える単離したポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチドそれ自体、ならびにCRCの検出におけるそれらの使用を、本出願は記載および特許請求をしている。しかし、mRNAのレベルの差異が対応するタンパク質のレベルに反映されないのが一般的な知識である。希少なmRNAにコードされたタンパク質は非常に多く発見され、豊富なmRNAにコードされたタンパク質は検出され、発見されるのがそれでもなお困難であることが在り得る。係るmRNAのレベルとタンパク質のレベルとの間の相関性の欠如は、mRNAの安定性、翻訳の効率、タンパクの安定性などの様な理由による。 20

【0008】

CRCの診断で使用され得る候補マーカー分子を同定するために、異なる組織間あるいは健常組織と病理組織との間でのタンパクのパターンの差を研究している近年のアプローチもある。Brunagel, G.ら, Cancer Research 62 (2002) 2437-2442が、近接する正常組織と比較して、CRC組織においてより豊富に存在する7個の核基質タンパク質を同定した。 30
個体から得られた液体試料からのデータは、報告されていない。

【0009】

WO 第02/078636号は、表面増強レーザによる脱離およびイオン化(SELDI)で発見した9個の結腸直腸癌関連スポットについて、報告している。健常な対照から得た血清と比較すると、これらのスポットはCRCを保有する患者から得られた血清により高い頻度で発見されている。しかし、係るスポットにある分子の同定、例えばその(それらの配列)は知られていない。

【0010】

CRCの分野で、候補タンパク質マーカーのリストが多く、また拡大する傾向にあるにも関わらず、今日までこれらの分子の臨床/診断の有用性は知られていない。臨床上有用であるには、単一のマーカーとしての新規の診断マーカーは少なくとも、当該分野で公知の最良である単一のマーカーと同様に優れているべきである。または新規のマーカーを単独で使用するかあるいは1つ以上の他のマーカーとの組み合わせで使用するかのいずれかの場合、新規のマーカーは診断の感度および/または特異性の進展をもたらすべきである。検査の感度および/または特異性は、以下で詳細に記載するその受信者動作特性で評価するのが最良である。 40

【0011】

現在、癌胎児抗原(CAE)、腫瘍関連糖タンパク質の検出に基づいた診断性血液検査だけが、CRCの分野で診断を助けるのに利用可能である。CEAは結腸直腸癌、胃癌、および膵臓 50

癌を保有する患者から得られる組織試料のうち95%において、あるいは乳癌、肺癌、および頭部または頸部の癌の大半で、増えている(Goldenberg, D.M.ら, J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 57 (1976) 11-22)。上昇したCEAのレベルは悪性でない疾患の患者でも報告され、結腸直腸癌を保有する多くの患者は、特に疾病の早期の段階の間に、血清中で正常なCEAレベルを有している(Carriquiry, L.A.およびPineyro, A., Dis. Colon Rectum 42 (1999) 921-929; Herrera, M.A.ら, Ann. Surg. 183 (1976) 5-9; Wanebo, H.J.ら, N. Engl. J. Med. 299 (1978) 488-451)。再発の検出時に血清または血漿から測定されるようなCEAの有用性は、議論の的になっているといわれており、未だに広く受け入れられていない(Martell, R.E.ら, Int. J. Biol. Markers 13 (1998) 145-149; Moertel, C. G.ら, JAMA 270 (1993) 943-947)。

10

【0012】

有用なデータを考慮して、血清のCEA測定法は、無症候性の集団における結腸直腸癌に対するスクリーニング検査としての使用を可能にする感度も特異性も持たない(Reynoso, G.ら, JAMA 220 (1972) 361-365; Sturgeon, C., Clinical Chemistry 48 (2002) 1151-1159)。

【0013】

全血、血清、または血漿は、臨床上の試料のうち、最も広く用いられる供給源である。信頼できる癌の検出を可能にするか、あるいは早期の予後の情報を提供する早期のCRC腫瘍マーカーの同定は、この疾患の診断および管理で大変役立つ診断アッセイをもたらした。それゆえに、緊急な臨床上の必要性があり、血液からのCRCの診断に改良がなされている。疾患の進行した段階で診断される患者と比較して、早期に診断された患者にとって生存の機会は遥かに高いので、CRCの早期診断を改良することが特に重要である。

20

【0014】

CRC診断の助けとなり得る新規のマーカーが同定できるかどうか調査するのが本発明の課題であった。

【0015】

驚くべきことに、タンパク質MASPの利用は、当該分野の現状から既知の問題を少なくとも部分的に克服し得るといえることが見出されている。

【0016】

本発明はそれゆえに、a) 個体から得られた液体試料を提供する工程、b) 該試料と、MASPに対して特異的に結合する試薬とを、該結合試薬とMASPとの間での複合体形成に適切な条件下で接触させる工程、およびc) (b) で形成した複合体の量を、結腸直腸癌の診断に対して相関させる工程を含む結腸直腸癌の診断方法に関する。好ましい方法は、個体から得た液体試料を使用する。

30

【0017】

別の好ましい本発明の態様は、a) 個体から得た液体試料と、MASPに対して特異的に結合する試薬とを、該結合試薬とMASP間での複合体の形成に適切な条件下で接触させる工程、およびb) (a) で形成した複合体の量を、結腸直腸癌の診断に対して相関させる工程を含む結腸直腸癌の診断方法である。

【0018】

当業者が認めるように、任意の係る診断は、インビトロで行う。患者試料は以後廃棄する。患者試料は本発明のインビトロでの診断方法に対して単独で使用され、患者試料の物質は患者の体内に戻されない。典型的には、試料は液体試料である。

40

【0019】

タンパク質MASP(マスピン前駆体; Swiss-PROT: P36952)は配列番号:1にある配列で特徴付けられる。クローン化したヒトマスピンcDNAはプロテアーゼインヒビターのセルピンスーパーファミリーとホモロジーを有する、42kDaのタンパク質をコードしている。抗体染色の研究によって、マスピンは細胞外マトリックス中および細胞膜に存在することが示されている(Zou, Z.ら, Science 263 (1994) 526-529)。

【0020】

50

ヒトMASP遺伝子(P15のうちSERPINB5)は本来、mRNAのレベルでの発現を基にサブトラクティブハイブリダイゼーションによって正常乳房上皮から単離された(Zouら,上掲)。マスピンは正常乳房上皮細胞で発現しているが、大半の乳癌細胞系では発現していない。Zouら(上掲)はその発現によって、形質転換した細胞が腫瘍形成または転移を誘導する能力が減ずるということを示し、つまりマスピン遺伝子は腫瘍サプレッサーをコードしていることを示唆している。

【0021】

Bass, R.ら(J. Biol. Chem. 277 (2002) 46845-46848)は、真核生物のマスピンの特徴を述べ、測定したタンパク分解系のいかなるものに対してもプロテアーゼ阻害効果を持たないということを見出した。しかし、腫瘍と血管平滑筋細胞の両方の移動は阻害した。

10

【0022】

腺腫、腺癌および転移性腺癌の組織切片の免疫組織化学染色によって、Song, S.Y.ら(Digestive Diseases and Sciences 47 (2002) 1831-1835)は、結腸癌でのマスピンの発現を研究した。Songら(上掲)が発見したマスピンの免疫反応は、細胞質に存在し、いくらか核染色された。腺腫の90%、腺癌の75%および転移性癌の47%より多くの組織切片がマスピンに対して陽性に染色した。この研究ではウエスタンブロット解析のような定量的アッセイ系は使用されていないという限定を持っていた。近接する正常な結腸組織と比較した発現のレベルは、評価されていない。

【0023】

当業者に明白なように、本発明は配列番号:1の全長タンパク質MASPに限定されると解釈されるべきではない。MASPの生理的および人工断片、MASPの二次的な修飾、ならびにMASPの対立形質変異体もまた同様に本発明で包括している。人工断片は合成的に、あるいは組換え体技術によって生産されたペプチドを好ましくは含んでおり、ペプチドは少なくとも1つの診断目的のエピトープを含み、配列番号:1に開示される配列由来の少なくとも6つの連続したアミノ酸を含む。係る断片は抗体の産出に、あるいはイムノアッセイでの基準として、有利に使用され得る。人工断片はさらに好ましく、サンドイッチイムノアッセイを準備するのに適切で重要な少なくとも2つのエピトープを含む。

20

【0024】

好ましい態様において、新規のマーカーMASPはモニタリングと同様にスクリーニングの目的に使用され得る。

30

【0025】

患者のモニタリングで使用される際、本発明の診断方法は、患者の追跡における腫瘍の負荷、治療の効能および腫瘍の再発を評価するのに役立つ。上昇したMASPのレベルは直接的に腫瘍の負荷と相関する。化学療法の後、MASPの短期間(数時間~14日)の増加は、腫瘍細胞の死の指標として役立つ。患者の追跡(3ヶ月~10年)で、MASPの増加は腫瘍の再発の指標として用いられ得る。

【0026】

好ましい態様において、本発明の診断方法はスクリーニング目的に用いられる。つまり、MASPのレベルを測定し、測定したレベルをCRCの有無に相関させることでCRCの事前の診断なしに被験体を評価するのに用いられる。

40

【0027】

結腸直腸癌は腺腫(ポリープ)から悪性癌腫に最も高い頻度で進行する。CRCの種々の段階はDukeの病期AからDに従って分類化して用いる。

【0028】

癌の病期分類は程度、進行、および重篤度の観点における疾患の分類である。一般化が予後および治療の選択についてなされ得ることで、癌患者を分類している。

【0029】

今日では、TNM系が、最も広く使用されている解剖学的な癌の程度の分類である。それは、国際的に承認された、一様な病期分類系の代表である。3つの基本的な変数:T(原発腫瘍の程度)、N(限局性リンパ節の状態)およびM(遠隔転移の有無)がある。TNMの基準

50

は、UICC (国際対癌連合), Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (編): TNM Classification of Malignant Tumours, 第五版, 1997)によって公表されている。

【0030】

特に重要なことは、CRCの早期の診断は遥かにより良い予後につながることである。結腸直腸の悪性腫瘍は良性腫瘍つまり、腺腫から生ずる。それゆえ、一番の予後は腺腫期で診断される患者にある。遠隔転移が既に存在するときに診断された患者ではたったの10%の5年生存率と比較して、 T_{is} 、NO、MOまたは $T1\sim 3$; NO; MO期ほどの早期に診断された患者は、適切に治療された場合には診断後5年の生存率が90%を超える。

【0031】

本発明の意味において、CRCの早期診断は前悪性状態(腺腫)または少しも転移がない(近位または遠位でもない)腫瘍期での診断に関する。つまり、 T_{is} 、NO、MOまたは $T1\sim 4$; NO; MOの腺腫が存在する。 T_{is} はインシチュの癌腫を示す。

10

【0032】

好ましい態様において、MASPの検出は、腺腫期ほどの早期にCRCを診断するのに用いられる。

【0033】

腸壁中にまだ十分に成長しておらず、そのため臓側腹膜が穿孔されておらず、また、他の器官または構造が侵されてもいないときに、CRCが診断されるのがより好ましい。つまり、診断は T_{is} ; NO; MOから $T3$; NO; MO(= $T_{is}\sim 3$; NO; MO)の任意の病期でなされるのがより好ましい。

20

【0034】

本発明の診断方法は、個体由来の液体試料を基にしている。当該分野の公知の方法と違い、MASPは特異的に結合する試薬の使用によってこの液体試料から特異的に測定される。

【0035】

特異的に結合する試薬は、例えばMASPのレセプター、MASPに結合するレクチンまたはMASPに対する抗体である。特異的に結合する試薬は相当する標的分子に対して少なくとも 10^7 l/molの親和性を持つ。特異的に結合する試薬は、好ましくはその標的分子に対して 10^8 l/molの親和性あるいは、さらにより好ましくは 10^9 l/molの親和性を持つ。当業者が認めるように、用語特異的は、試料中に存在する他の生体分子がMASPに対して特異的に結合する試薬と実質的に結合をしないということを示すのに用いられる。好ましくは標的分子以外の生体分子に結合するレベルが標的分子の親和性のわずか10%、より好ましくはわずか5%またはそれより低い結合親和性になる。最も好ましい特異的に結合する試薬は親和性と同様に特異性に対する前記の最小の基準の両方を満たす。

30

【0036】

特異的に結合する試薬は好ましくは、MASPと反応する抗体である。用語抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、係る抗体の断片、ならびに抗体の結合ドメインを含む遺伝子構築物のことを指す。

【0037】

用語抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、係る抗体の断片、ならびに抗体の結合ドメインを含む遺伝子構築物のことを指す。特異的に結合する試薬の上記の基準を保持する任意の抗体断片が用いられ得る。例えば、Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays 11 (1990)の本全体、特に43~78ページ; Elsevier, Amsterdam)に記載されているように、抗体は最先端技術の手順で産生される。加えて、当業者は、抗体の特異的な単離に使用され得る免疫吸着剤を基にした方法を充分承知している。これらの手段によって、ポリクローナル抗体の質およびそのため、イムノアッセイでそれらの性能が増強され得る (Tijssen, P., 前掲, 108~115ページ)。

40

【0038】

本発明に開示したような達成のために、ウサギで惹起したポリクローナル抗体が用いられている。しかし明らかに、種々の種、例えばラットまたはモルモット由来のポリクローナル抗体、ならびにモノクローナル抗体も用いられる。モノクローナル抗体は、一定の特性

50

を持ち、任意の必要量で産生され得るので、それらは臨床的慣例のための分析の開発に理想的なツールとなる。本発明の方法におけるMASPに対するモノクローナル抗体の産生および使用もまた、別の好ましい態様である。

【0039】

MASPがCRCの診断に有用なマーカーとして同定されたということを当業者が今や認めているので、代替方法が本発明の達成に匹敵する結果に到達するように使用され得る。例えば、抗体を産生する代替戦略が用いられ得る。係る戦略は、特に、免疫化のためのMASPのエピトープである合成ペプチドの使用を含む。あるいは、DNAワクチン接種としても公知のDNA免疫化が用いられ得る。

【0040】

測定のために、個体から得られた液体試料は、結合試薬MASP複合体の形成に適切な条件下で、MASPに特異的に結合する試薬とインキュベートする。発明の努力なしに当業者は係る適切なインキュベーション条件を容易に同定し得るので、係る条件は明記される必要はない。

【0041】

本発明に開示した方法の最終の工程として、複合体の量はCRCの診断に対して測定され相関される。当業者が認めるように特異的に結合する試薬MASP複合体の量を測定する多数の方法があり、全ては関連する教科書に詳細に記載されている（例えば、Tijssen P., 前掲, またはDiamandisら編(1996) Immunoassay, Academic Press, Boston参照）。

【0042】

好ましくは、MASPはサンドイッチ型のアッセイ形式で検出する。係るアッセイにおいて、一方で第一の特異的に結合する試薬はMASPを捕捉するのに用いられ、他方で直接的または間接的に検出できるように標識される第二の特異的に結合する試薬が用いられる。

【0043】

上記のように、MASPは個体試料から得られた液体試料から測定され得るということが驚くべきことに見出されている。CRCの診断において、組織または生検試料にマーカーMASPを適用する必要はない。

【0044】

好ましい態様において、本発明の方法は、液体試料材料として血清を用いて実施される。

【0045】

さらに好ましい態様において、本発明の方法は、液体試料材料として血漿を用いて実施される。

【0046】

さらに好ましい態様において、本発明の方法は、液体試料材料として全血を用いて実施される。

【0047】

さらに当業者に公知の様々な方法で便が調製され、液体試料をもたらしこともできる。便由来の係る液体試料もまた本発明の好ましい態様である。

【0048】

組織試料に対する慣例的なプロテオミクス方法の適用は、選択した組織に対する多くの潜在的なマーカー候補の同定をもたらす一方で、本発明の発明者らは驚くべきことに、体液試料中のタンパク質MASPを検出できている。より驚いたことに、個体から得られた係る液体試料中のMASPの存在が結腸直腸癌の診断に相関され得るということを本発明者らは示すことができた。

【0049】

卓越した利点を持つMASPに対する抗体は確立した手法、例えばインシチュ、生体組織検査、または免疫組織学的手法で結腸直腸癌細胞を検出する手法に用いられ得る。

【0050】

好ましくは、MASPに対する抗体は、定性的（MASPの有無）または定量的（MASP量が測定

10

20

30

40

50

される)イムノアッセイに用いられる。

【0051】

タンパク質MASPのレベルを測定することは、CRCの分野で大変有利であると判明した。それゆえに、より好ましい態様において、本発明は個体から得られた液体試料からの結腸直腸癌の診断におけるマーカー分子としてのタンパク質MASPの使用に関する。

【0052】

用語マーカー分子は個体の体液から測定するような、被検体MASPのレベルの上昇がCRCの存在を示すということを示すのに用いられる。

【0053】

結腸直腸癌の早期診断に新規のマーカーMASPを使用することが特に好ましい。

10

【0054】

タンパク質MASP自体の使用は、CRC診断の難題である分野への重大な進展を意味する。MASPの測定を、CEAのような他の公知のマーカー、または未だ発見されていないCRCの他のマーカーと組み合わせることは、さらなる改良をもたらす。それゆえに、より好ましい態様において、個体から得られた液体試料からの結腸直腸癌の診断における、結腸直腸癌のマーカー分子としてのMASPの、結腸直腸癌に対する一つ以上のマーカー分子と組み合わせた使用に本発明は関する。この点において、語句「一つ以上」は、1~10、好ましくは1~5、より好ましくは3を表わす。好ましく選択される、MASPの測定が組み合わせられ得る他のCRCマーカーはCEA、CA 19-9、CA 72-4、および/またはCA 242である。このように、本発明の大変好ましい態様は個体から得られた液体試料からの結腸直腸癌の診断にお

20

【0055】

イムノアッセイのような、特異的な結合アッセイの分野での診断試薬は、通常、キットの形態で最もよく提供される。そのキットは特異的に結合する試薬とアッセイを行なうのに必要な補助試薬を含む。それゆえに、本発明はまたMASPに対して特異的に結合する少なくとも一つの試薬とMASPの測定の補助試薬を含む免疫学的キットに関する。

【0056】

検査の正確度は、その受信者動作特性(ROC)によって記載するのが最善である(特に Zweig, M. H. および Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577参照)。ROCグラフは、観察したデータの全体の範囲に対して判定基準を継続的に変化させることで生じる感度/特異性対の全てのプロットである。

30

【0057】

実験室検査の臨床的な性能は、その診断の正確度または被検体を臨床的に関連したサブグループに正しく分類する能力に依存している。診断の正確度が、調べられた被検体の2つの異なる状態を正しく区別する検査能力を測る。係る状態は例えば健康および疾患、または良性の疾患対悪性の疾患である。

【0058】

それぞれの場合で、ROCプロットは感度対1-特異性をプロットすることで、判定基準の全範囲に対する2つの分布間の重複を描写している。y軸には感度、つまり真陽性分数[(真陽性検査結果の数)/(真陽性の数+偽陰性検査結果の数)]として定義する]がある。これは疾患あるいは状態の存在における確実性としても呼ばれる。これは、罹患のサブグループからのみ計算される。x軸には偽陽性分数、つまり1-特異性[(偽陽性結果の数)/(真陰性の数+偽陽性結果の数)]として定義する]がある。これは、特異性の指標であり、非罹患のサブグループから完全に計算される。真陽性および偽陽性分数は2つの異なるサブグループから生じる検査結果を使用して完全に別々に計算されるので、ROCプロットは試料での疾患の有病率とは独立している。ROCプロット上の各点は特定の判定基準に対応する感度/特異性対を表している。完全に差別化された検査(2つの結果の分布で重複がない)は、左上角を通るROCプロットをもち、そこで真陽性分数は1.0、つまり10

40

50

0% (完全な感度) であり、および偽陽性分数は0 (完全な特異性) である。差別化のない検査に対する理論プロット (2つの集団に対する結果の同一な分布) は左下角から右上角にかけての45°対角線である。ほとんどのプロットはこれら2つの端との間に入る。(ROCプロットが45°対角線より完全に下に入る場合、これは「确实性」に対する判定基準を「より大きい」から「より小さい」に逆転させることで容易に修正される。その逆も同じ。) 定性的に、プロットが左上角に近くなればなるほど、検査の全体的な正確度は高くなる。

【0059】

実験室検査の診断の正確度を定量するためのある好都合な目標は単一の数字によってその性能を表すことである。最も普遍的で世界的な測定はROCプロット下の面積である。慣例によって、この面積は常に0.5以上である (そうでない場合、そうするために決定規則を逆にし得る)。値は1.0 (2つの群の検査値の完全な分離) と0.5 (2つの群の検査値の間での明白な分布の差がない) の間で変化する。面積は、対角線に最も近い点または90%の特異性の感度のようなある特定の部分のプロットに依存するだけでなく、プロット全体に依存している。これは、ROCプロットが完全なもの (面積 = 1.0) にどれくらい近いのかについての、定量的で記述的な表現である。

10

【0060】

新規のマーカーマSPの臨床的な有用性は、受信者動作特性曲線分析 (ROC; Zweig, M. H. および Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577) を用いた確立したマーカークEAとの比較および組み合わせで評価される。この分析は、T1~3; N0; M0、更に進行した腫瘍、つまり、T4 および / または様々な重篤度の転移 (N+ および / またはM+)、および健全な対照のそれぞれの患者からの各50サンプルからなる明確な患者のコホートを基にしている。

20

【0061】

確立されたマーカークEAのみと比較して、MASPのみの測定を基にした診断方法は、曲線下の面積で示されるのと少なくとも同程度良い診断の正確度 (感度 / 特異性プロファイル) を有することが見出された。

【0062】

以下の実施例、参考文献、配列表および図面は、本発明の理解を補助するために提供され、本発明の真の範囲は、添付の特許請求の範囲に示される。本発明の意図から逸脱すること無く、示した手順において変更がなされ得ることが理解されよう。

30

【0063】

略語

ABTS 2,2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸(6)]ニアンモニウム塩

BSA ウシ血清アルブミン

cDNA 相補DNA

CHAPS (3-[(3-コールアミドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-1-プロパン-スルホン酸)

DMSO ジメチルスルホキシド

DTT ジチオスレイトール

EDTA エチレンジアミン四酢酸

40

ELISA 酵素結合免疫吸着定量法

HRP ホースラディッシュペルオキシダーゼ

IAA ヨードアセタミド

IgG 免疫グロブリンG

IEF 等電点電気泳動法

IPG 固定化pH勾配

LDS ドデシル硫酸リチウム

MALDI-TOF マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析

MES メシチル、2,4,6-トリメチルフェニル

OD 光学密度

50

PAGE ポリアクリルアミドゲル電気泳動

PBS リン酸緩衝生理食塩水

PI 等電点

RTS 迅速翻訳装置

SDS ドデシル硫酸ナトリウム

【0064】

実施例1

潜在的な結腸直腸癌マーカーとしてのMASPの同定

組織の供給源

結腸直腸癌の潜在的な診断マーカーとして腫瘍特異的なタンパク質を同定するために、プロテオミクス方法を用いて3つの異なる種類の組織の分析を行なう。 10

【0065】

結腸直腸癌を患う全部で10人の患者に由来する組織標本を分析する。各患者から、3つの異なる組織型を治療的切除から収集する：腫瘍組織 (>80%腫瘍) (T)、隣接する健康な組織 (N) および隣接する健康な粘膜から細片化した粘膜 (M)。後者2つの組織型は、適合した健康な対照試料として働く。組織を切除後すぐにスナップ凍結し、処理前に-80 で保存する。腫瘍を組織病理学的基準により診断する。

【0066】

組織調製

0.8~1.2gの凍結組織をモルタルに入れ、液体窒素で完全に凍結させる。組織をモルタル中で粉碎し、10倍容積 (w/v) の溶解バッファー (40mM クエン酸Na、5mM MgCl₂、1% Genapol X-080、0.02%アジドNa、Complete (登録商標) EDTAフリー [Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, カタログ番号 1 873 580]) 中に溶解させ、続いてWheaton (登録商標) グラスホモジナイザー (20×ルーズフィッティング、20×タイトフィッティング) でホモジナイズする。3 mlのホモジェネートを1時間4500xgでスクロース密度遠心分離 (10~60%スクロース) に供する。この遠心分離工程後、3画分を得る。グラジェントの上部の画分は、可溶性タンパク質を含み、更なる解析に用いる。 20

【0067】

等電点電気泳動 (IEF) およびSDS-PAGE

IEFのために、3 mlの懸濁液を12 mlの試料バッファー (7M 尿素、2M チオ尿素、2% CHAPS、0.4% IPGバッファー pH4~7、0.5% DTT) と混合し、1時間インキュベートする。試料をAmicon (登録商標) Ultra-15装置 (Millipore GmbH, Schwalbach, Germany) で濃縮し、Bio-Rad (登録商標) タンパク質アッセイ (カタログ番号 500-0006; Bio-Rad Laboratories GmbH, Muenchen, Germany) を用いて製造業者のマニュアルの指示に従ってタンパク質濃度を測定する。1.5 mgのタンパク質試料に相当する容積に、最終体積350 µlまでバッファーを加える。この溶液を用いてIPG条片pH4~7 (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) を一晩再水和させた。以下の勾配プロトコルを用いてIEFを行なう：1.) 500 Vまで1分；2.) 3500Vまで2時間；3.) 3500Vの一定で22時間、82 kVhを生じさせる。IEF後、条片を-80 で保存するか、またはSDS-PAGEで直接使用する。 30

【0068】

SDS-PAGEの前に、条片は平衡バッファー (6M 尿素、50 mM Tris/HCl、pH8.8、30% グリセロール、2%SDS) でインキュベートし、還元のためにDTT (15分、+ 50 mg DTT/10 ml)、およびアルキル化のためにIAA (15分、+ 235 mg ヨードアセトアミド/10 ml) を加える。条片を12.5%ポリアクリルアミドゲル上に置き、1W/ゲルで1時間、その後17W/ゲルで電気泳動に供する。続いて、ゲルを固定し (50%メタノール、10%酢酸塩)、NovexTM Colloidal Blue Stainingキット (Invitrogen, Karlsruhe, Germany, カタログ番号 LC6025, 45-7101) で一晩染色する。 40

【0069】

結腸直腸癌の潜在的なマーカーとしてのMASPの検出

各患者を、ProteomeWeaver (登録商標) ソフトウェア (Definiens AG, Germany, Muenc 50

hen) を用いてイメージ分析により別々に分析する。さらに、ゲルの全てのスポットを、ピッキングロボットにより切り出し、スポットに存在するタンパク質をMALDI-TOFマスマスペクトロメトリー (UltraflexTM Tof/Tof, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) により同定する。各患者について、腫瘍試料由来の4つのゲルを、隣接する正常なおよび細片化した粘膜組織由来の4つのゲルと比較し、差次的に発現したタンパク質に対応する独自のスポットについて分析する。この手段により、タンパク質MASPは腫瘍組織中に特異的に発現するか、強く過剰発現するが、健康な対照組織中では検出されないか、それ程強くは発現しないことが見出される。それゆえ、多くのタンパク質の中でもとりわけ、結腸直腸癌の診断に使用するための候補マーカーとして適切である。

【0070】

10

実施例2

結腸直腸癌マーカータンパク質MASPに対する抗体の産生

結腸直腸癌マーカータンパク質MASPに対するポリクローナル抗体を、免疫検出アッセイ、例えば、ウエスタンブロッティングおよびELISAによりMASPの血清および血漿および血液レベルの測定における抗体のさらなる使用のために産生する。

【0071】

大腸菌における組換えタンパク質発現

MASPに対する抗体を産生するために、免疫原を得るためにタンパク質の組換え発現を行なう。発現は、RTS100発現系および大腸菌の組み合わせを適用して行なう。第一の工程において、DNA配列を分析し、高収率cDNAサイレント変異バリエーションおよび個々のPCRプライマー配列の推奨を「ProteoExpert RTS E.coli HY」系を用いて得る。これは商業用のウェブベースサービスである (www.proteoexpert.com)。推奨されたプライマー対を用いて、cDNAから直鎖PCRテンプレートを産生するため、およびMASPタンパク質をコードするヌクレオチド配列のインビトロ転写および発現のために「RTS 100 E.coli Linear Template Generation Set, His-tag」 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, カタログ番号 3186237) 系を使用する。ウエスタンブロット検出およびその後の精製のために、発現タンパク質はHis-tagを含む。最良の発現バリエーションを同定する。PCRから発現および検出までの全ての工程を製造業者の指示に従って行なう。全ての必要なT7調節領域 (プロモーター、リボソーム結合部位およびT7ターミネーター) を含む各々のPCR産物を、製造業者の指示に従ってpBAD TOPO (登録商標) ベクター (Invitrogen, Karlsruhe, Germany, カタログ番号 K 4300/01) にクローニングする。T7調節配列を用いる発現のために、構築物を大腸菌BL 21 (DE 3) (Studier, F.W.ら、Methods Enzymol. 185 (1990) 60-89) に形質転換し、形質転換細菌をタンパク質発現のために11バッチ中で培養する。

20

30

【0072】

His-MASP融合タンパク質の精製は、以下の標準的な手順に従いNiキレートカラムにおいて行なう。手短かにいえば、His-MASP融合タンパク質の発現ベクターを含む1lの細菌培養物を遠心分離によりペレット化する。細胞ペレットをリン酸塩、pH8.0、7M 塩酸グアニジン、イミダゾールおよびチオグリセロールを含む溶解バッファーに再懸濁し、続いてUltra-Turrax (登録商標) を用いてホモジナイズする。不溶性物質を高速遠心分離によってペレット化し、上清をNiキレートクロマトグラフィーカラムにアプライする。カラムを数ベッド容積の溶解バッファーで洗浄し、続いてリン酸塩、pH8.0、および尿素を含むバッファーで洗浄する。最後に、結合した抗原を酸性条件下でSDSを含むリン酸塩バッファーを用いて溶出する。

40

【0073】

MASPに対するモノクローナル抗体の産生

a) マウスの免疫化

12週齢のA/Jマウスを100 μgのMASPで腹腔内に初回免疫する。6週間後、一月間隔で2回のさらなる腹腔内免疫を行なう。この過程において、各マウスに水酸化アルミニウムに吸着した100 μgのMASPおよび10⁹個の細菌の百日咳菌を投与する。続いて、最後の2回の免疫を、PBSバッファー中の100 μgのMASPを用いて融合の3日前および2日前におの

50

静脈内に行う。

【0074】

b) 融合およびクローニング

a) に従って免疫化したマウスの脾臓細胞を Galfre, G. および Milstein, C., *Methods in Enzymology* 73 (1981) 3-46 に従ってミエローマ細胞と融合する。この過程において、免疫化マウスの約 1×10^8 個の脾臓細胞を 2×10^7 個のミエローマ細胞 (P3X63-Ag8-653, ATCC CRL1580) と混合し、遠心分離 (300 g および 4 で 10 分間) する。次いで、細胞をウシ胎仔血清 (FCS) を含まない RPMI 1640 培地で一度洗浄し、50 ml コニカルチューブ中にて 400 g で再び遠心分離する。上清を廃棄し、細胞沈殿物をタッピングにより穏やかに解し、1 ml の PEG (分子量 4000、Merck、Darmstadt) を加え、ピペティングにより混合する。37 °C の温浴中で 1 分間の後、4~5 分以内に室温で FCS を含まない 5 ml の RPMI 1640 を滴下する。その後、10% FCS を含む 5 ml の RPMI 1640 を約 1 分以内に滴下し、十分に混合し、培地 (RPMI 1640+10% FCS) で 50 ml にし、続いて 400 xg および 4 で 10 分間遠心分離する。沈殿した細胞を、10% FCS を含む RPMI 1640 培地中にとり、ヒポキサンチン-アザセリン選択培地 (RPMI 1640+10% FCS 中に 100 mmol/l ヒポキサンチン、1 µg/ml アザセリン) 中に播種する。100 U/ml のインターロイキン 6 を成長因子として培地に添加する。

10

【0075】

約 10 日後、初代培養物を特異的抗体について試験する。MASP 陽性初代培養物を蛍光活性化細胞ソーターにより 96 ウェル細胞培養プレート中でクローニングする。この過程において、再び 100 U/ml のインターロイキン 6 を成長添加物として培地に添加する。

20

【0076】

c) 細胞培養上清からの免疫グロブリンの単離

得られたハイブリドーマ細胞を、10% FCS を含む RPMI 1640 培地中に 1 ml あたり 1×10^5 個の細胞の密度で播種し、発酵槽 (Thermodux Co., Wertheim/Main, Model MCS-104XL, 注文番号 144-050) 中で 7 日間増殖させる。1 ml あたり 100 µg の平均濃度のモノクローナル抗体が培養上清中に得られる。培養上清からのこの抗体の精製を、タンパク質化学における従来の方法 (例えば、Bruck, C.ら、*Methods in Enzymology* 121 (1986) 587-695 による) により行なう。

【0077】

ポリクローナル抗体の産生

30

a) 免疫

免疫のために、1:1 の比のタンパク質溶液 (100 µg/ml タンパク質 MASP) および完全なフロイントアジュバントの新鮮なエマルジョンを調製する。各ウサギを 1 ml のエマルジョンで 1、7、14 および 30、60 および 90 日に免疫する。血液を抜き取り、得られた抗 MASP 血清を実施例 3 および 4 に記載されるさらなる実験のために使用する。

【0078】

b) カプリル酸および硫酸アンモニウムを用いた連続沈殿によるウサギ血清からの IgG (免疫グロブリン G) の精製

1 容積のウサギ血清を 4 容積の酢酸バッファー (60 mM、pH 4.0) で希釈する。pH を 2 M Tris 塩基を用いて 4.5 に調整する。カプリル酸 (希釈試料の 25 µl/ml) を激しい攪拌下で滴下する。30 分後、試料を遠心分離 (13,000 xg、30 分、4) し、ペレットを廃棄し、上清を収集する。上清の pH を 2 M Tris 塩基を加えることによって 7.5 に調整し、濾過 (0.2 µm) する。

40

【0079】

上清の免疫グロブリンを最終濃度 2 M までの 4 M 硫酸アンモニウム溶液の滴下により激しい攪拌下で沈殿させる。沈殿した免疫グロブリンを遠心分離 (8,000 xg、15 分、4) により収集する。

【0080】

上清を廃棄する。ペレットを 10 mM NaH₂PO₄/NaOH、pH 7.5、30 mM NaCl 中に溶解し、完全に透析する。透析物を遠心分離 (13,000 xg、15 分、4) し、濾過 (0.2 µm) する。

50

【 0 0 8 1 】

ポリクローナルウサギIgGのビオチン化

ポリクローナルウサギIgGを10mM NaH₂PO₄/NaOH、pH7.5、30mM NaCl中に10 mg/mlにする。IgG溶液1 mlあたり、50 μlのビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミド (DMSO中に3.6 mg/ml)を加える。室温で30分後、試料をSuperdex 200 (10mM NaH₂PO₄/NaOH、pH7.5、30mM NaCl)においてクロマトグラフを行う。ビオチン化IgGを含む画分を収集する。モノクローナル抗体を同じ手順に従ってビオチン化する。

【 0 0 8 2 】

ポリクローナルウサギIgGのジゴキシゲニン化

ポリクローナルウサギIgGを10mM NaH₂PO₄/NaOH、30mM NaCl、pH7.5中に10 mg/mlにする。IgG溶液1 mlあたり、50 μlのジゴキシゲニン-3-0-メチルカルボニル--アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミド エステル (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, カタログ番号 1 333 054) (DMSO中に3.8 mg/ml)を加える。室温で30分後、試料をSuperdex (登録商標) 200 (10mM NaH₂PO₄/NaOH、pH7.5、30mM NaCl)においてクロマトグラフを行う。ジゴキシゲニン化IgGを含む画分を収集する。モノクローナル抗体を同じ手順に従ってジゴキシゲニンで標識する。

10

【 0 0 8 3 】

実施例3

実施例2で産生したポリクローナル抗体を使用したヒト結腸直腸癌組織におけるMASPの検出のためのウエスタンブロッティング

20

【 0 0 8 4 】

腫瘍試料および健康な対照試料由来の組織溶解物を実施例1「組織調製」に記載されたように調製する。

【 0 0 8 5 】

SDS-PAGEおよびウエスタンブロッティングをInvitrogen, Karlsruhe, Germanyの試薬および装置を使用して行なう。試験する各組織試料について、10 μgの組織溶解物を還元NuPAGE (登録商標) (Invitrogen) SDS試料バッファーに希釈し、95 °Cで10分間加熱する。試料をMESランニングバッファー系中の4~12% NuPAGE (登録商標) ゲル (Trisグリシン) において泳動する。ゲル分離したタンパク質混合物を、Invitrogen XCell II™ Blot Module (Invitrogen) およびNuPAGE (登録商標) トランスファーバッファー系を使用してニトロセルロース膜上にプロットする。膜をPBS/0.05% Tween-20で3回洗浄し、Roti (登録商標) -Block ブロッキングバッファー (A151.1; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) で2時間ブロッキングする。一次抗体、ポリクローナルウサギ抗MASP血清 (実施例2に記載したように産生) をRoti (登録商標) -Block ブロッキングバッファーに1:10000で希釈し、膜と1時間インキュベートする。膜をPBS/0.05% Tween-20で6回洗浄する。特異的に結合した一次ウサギ抗体をPODコンジュゲートポリクローナルヒツジ抗ウサギIgG抗体で標識し、0.5×Roti (登録商標) -Block ブロッキングバッファーに10 mU/mlに希釈する。1時間のインキュベーション後、膜をPBS/0.05% Tween-20で6回洗浄する。結合したPODコンジュゲート抗ウサギ抗体を検出するために、膜をLumi-Light^{PLUS} ウエスタンブロッティング基質 (注文番号 2015196, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) とインキュ

30

40

【 0 0 8 6 】

実施例4

ヒト血清および血漿試料中のMASPの測定のためのELISA

ヒト血清または血漿中のMASPの検出のために、サンドイッチELISAを開発する。抗原の捕捉および検出のために、抗MASPポリクローナル抗体 (実施例2参照) のアリコートにビオチンおよびジゴキシゲニンそれぞれとコンジュゲートする。

【 0 0 8 7 】

ストレプトアビジン被膜96ウェルマイクロウェルプレートに、10 mMリン酸塩、pH7.4、1% BSA、0.9% NaClおよび0.1% Tween-20中に10 μg/mlのビオチン化抗MASPポリクローナ

50

ル抗体100 μ lと60分間インキュベートする。インキュベーション後、プレートを0.9% NaCl、0.1% Tween-20で3回洗浄する。次いでウェルを標準抗原としての組換えタンパク質（実施例2参照）の連続希釈物または患者由来の希釈した血漿試料のいずれかと2時間インキュベートする。MASPの結合後、プレートを0.9% NaCl、0.1% Tween-20で3回洗浄する。結合MASPの特異的検出のために、ウェルを10 mMリン酸塩、pH7.4、1% BSA、0.9% NaClおよび0.1% Tween-20中に10 μ g/mlのジゴキシゲニン化抗MASPポリクローナル抗体100 μ lと60分間インキュベートする。その後、未結合抗体を除去するためにプレートを3回洗浄する。次の工程で、ウェルを10 mMリン酸塩、pH7.4、1% BSA、0.9% NaClおよび0.1% Tween-20中に20 mU/mlの抗ジゴキシゲニンPODコンジュゲート（Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, カタログ番号 1633716）と60分間インキュベートする。続いて、プレートを同じバッファーで3回洗浄する。抗原-抗体複合体の検出のために、ウェルを100 μ lのABTS溶液（Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, カタログ番号 11685767）とインキュベートし、ODをELISAリーダーで405 nmにて30～60分後に測定する。

10

【0088】

実施例5：

診断の正確度の点から臨床的有用性を評価するためのROC分析

正確度を、十分に特徴づけられた患者コホート、すなわち結腸内視術を受け、腺腫またはCRCを有しないと判明した50人の患者、診断されCRCのT_{is}-3、N0、M0に病期分類された50人の患者、および少なくとも一つの近傍リンパ節に少なくとも腫瘍浸潤を有するかまたはより重篤な形態の転移を有する進行したCRCと診断された50人の患者それぞれから得られた個々の液体試料を分析することにより評価する。市販のアッセイ（Elecsys（登録商標）Systemsイムノアッセイアナライザ用のRoche Diagnostics, CEA-アッセイ（カタログ番号 1 173 1629）により測定されるCEAおよび上記のように測定されるMASPは、これら個体の各々から得られた血清中で定量する。ROC分析をZweig, M. H.およびCampbell, 前出に従って行なう。T_{is}-3、N0、M0群の患者と健康な個体とを区別するための判別能力は、曲線下面積により測定されるように、確立されたマーカーCEAと比べて少なくともMASPについて良好であることが見出される。

20

【0089】

予備データは、MASPがまた手術後の患者の追跡に非常に有用であり得ることを示す。

【0090】

30

参考文献の表

- Ahlquist, D.A., Gastroenterol. Clin. North Am. 26 (1997) 41-55
- Anderson, W.F., ら, J. Natl. Cancer Institute 94 (2002) 1126-1133
- Bass, R., ら, J. Biol. Chem. 277 (2002) 46845-46848
- Bruck, C., ら, Methods Enzymol. 121 (1986) 587-695
- Brünagel, G., ら, Cancer Research 62 (2002) 2437-2442
- Carriquiry, L.A., および Pineyro, A., Dis. Colon Rectum 42 (1999) 921-929
- Diamandis, ら, 編. (1996) Immunoassay, Academic Press, Boston. 10
- Galfre, G., および Milstein, C., Methods Enzymol. 73 (1981) 3-46
- Geenen, J.E., ら, Am. J. Dig. Dis. 20 (1975) 231-235
- Goldenberg, D.M., ら, J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 57 (1976) 11-22
- Herrera, M.A., ら, Ann. Surg. 183 (1976) 5-9
- Martell, R.E., ら, Int. J. Biol. Markers 13 (1998) 145-149
- Moertel, C.G., ら, JAMA 270 (1993) 943-947
- Reynoso, G., ら, JAMA 220 (1972) 361-365
- Silvis, S.E., ら, JAMA 235 (1976) 928-930
- Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (編), TNM Classification of Malignant Tumours, 第5版, 1997 20
- Song, S.Y., ら, Digestive Diseases and Sciences 47 (2002) 1831-1835
- Studier, F.W., ら, Methods Enzymol. 185 (1990) 60-89
- Sturgeon, C., Clinical Chemistry 48 (2002) 1151-1159
- Tijssen, P., Practice および theory of enzyme immunoassays 11 (1990) 全文.
特にページ 43-78; Elsevier, Amsterdam
- UICC (International Union Against Cancer), Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (編),
TNM Classification of Malignant Tumours, 第5版, 1997
- Wanebo, H.J., ら, N. Engl. J. Med. 299 (1978) 448-451
- WO 01/96390
- WO 02/078636 30
- Zou, Z., ら, Science 263 (1994) 526-529
- Zweig, M. H., および Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1】図1は腫瘍試料を負荷した2Dゲル(左側)、および隣接する健康な粘膜から得た対照試料を負荷したゲル(右側)の典型的な例を示す。MASPの見かけの分子量および等電点は、それぞれ約40 kDおよび5.98の理論値に相当する。これらのゲルの拡大部分にある円は、タンパク質MASPの位置を示す。このタンパク質は、健康な粘膜には同じ方法で検出できなかった。

40

【図2】図2はウェスタンブロットの典型的な例を示す。ゲルは、4人の患者(被験体36:直腸癌(癌)、デュークスB;被験体37:直腸癌、デュークスA;被験体39:結腸癌、デュークスA;および被験体40:結腸癌、デュークスB)由来の結腸直腸腫瘍組織および隣接した健康な対照組織の組織溶解産物を負荷された。試料中のMASPの存在は、ウサギのポリクローナル抗MASP血清を用いて試験された。腫瘍溶解産物を含むレーンを「T」、正常対照組織を含むレーンを「N」で示す。標準分子量タンパク質を含むマーカーレーンは「Ma」と示す。異なる濃度で組み換えMASPを含むレーンは「300」、「1000」および「3000」と示す。矢印はゲル中のMASPバンドの位置を示す。全ての腫瘍試料はMASPの位置で強いシグナルがでており、一方、隣接した正常対照組織由来の溶解産物中には弱いシグナルしか検出できない。結腸直腸癌患者由来の腫瘍組織におけるMASPのこの強い過剰発現は、

50

試験された患者13人中13人で認められる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Use of protein MASP as a marker for colorectal cancer

<130> 21767

<150> EP 03011158.7
<151> 2003-05-26 10

<160> 1

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 375
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> maspin precursor; Swiss-PROT: P36952 20

<400> 1

Met Asp Ala Leu Gln Leu Ala Asn Ser Ala Phe Ala Val Asp Leu Phe
1 5 10 15

Lys Gln Leu Cys Glu Lys Glu Pro Leu Gly Asn Val Leu Phe Ser Pro
20 25 30

Ile Cys Leu Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ala Gln Val Gly Ala Lys Gly
35 40 45

Asp Thr Ala Asn Glu Ile Gly Gln Val Leu His Phe Glu Asn Val Lys 30
50 55 60

Asp Ile Pro Phe Gly Phe Gln Thr Val Thr Ser Asp Val Asn Lys Leu
65 70 75 80

Ser Ser Phe Tyr Ser Leu Lys Leu Ile Lys Arg Leu Tyr Val Asp Lys
85 90 95

Ser Leu Asn Leu Ser Thr Glu Phe Ile Ser Ser Thr Lys Arg Pro Tyr
100 105 110 40

Ala Lys Glu Leu Glu Thr Val Asp Phe Lys Asp Lys Leu Glu Glu Thr
 115 120 125

Lys Gly Gln Ile Asn Asn Ser Ile Lys Asp Leu Thr Asp Gly His Phe
 130 135 140

Glu Asn Ile Leu Ala Asp Asn Ser Val Asn Asp Gln Thr Lys Ile Leu
 145 150 155 160

Val Val Asn Ala Ala Tyr Phe Val Gly Lys Trp Met Lys Lys Phe Pro
 165 170 175

10

Glu Ser Glu Thr Lys Glu Cys Pro Phe Arg Leu Asn Lys Thr Asp Thr
 180 185 190

Lys Pro Val Gln Met Met Asn Met Glu Ala Thr Phe Cys Met Gly Asn
 195 200 205

Ile Asp Ser Ile Asn Cys Lys Ile Ile Glu Leu Pro Phe Gln Asn Lys
 210 215 220

20

His Leu Ser Met Phe Ile Leu Leu Pro Lys Asp Val Glu Asp Glu Ser
 225 230 235 240

Thr Gly Leu Glu Lys Ile Glu Lys Gln Leu Asn Ser Glu Ser Leu Ser
 245 250 255

Gln Trp Thr Asn Pro Ser Thr Met Ala Asn Ala Lys Val Lys Leu Ser
 260 265 270

Ile Pro Lys Phe Lys Val Glu Lys Met Ile Asp Pro Lys Ala Cys Leu
 275 280 285

30

Glu Asn Leu Gly Leu Lys His Ile Phe Ser Glu Asp Thr Ser Asp Phe
 290 295 300

Ser Gly Met Ser Glu Thr Lys Gly Val Ala Leu Ser Asn Val Ile His
 305 310 315 320

Lys Val Cys Leu Glu Ile Thr Glu Asp Gly Gly Asp Ser Ile Glu Val
 325 330 335

40

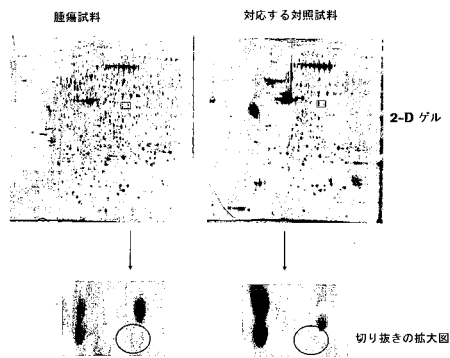
Pro Gly Ala Arg Ile Leu Gln His Lys Asp Glu Leu Asn Ala Asp His
 340 345 350

Pro Phe Ile Tyr Ile Ile Arg His Asn Lys Thr Arg Asn Ile Ile Phe
 355 360 365

Phe Gly Lys Phe Cys Ser Pro
 370 375

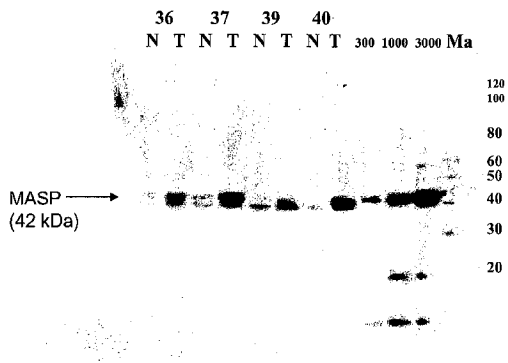
【 図 1 】

図 1



【 図 2 】

図 2



【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No. PCT/EP2004/005598 |
|---|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/574 G01N33/536 | | |
| 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 7 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 practical, search terms used) EPO-Internal, MEDLINE, WPI Data, CHEM ABS Data, PAJ | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | SONG SANG YONG ET AL: "Expression of maspin in colon cancers: its relationship with p53 expression and microvessel density." DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES. UNITED STATES AUG 2002, vol. 47, no. 8, August 2002 (2002-08), pages 1831-1835, XP009019409 ISSN: 0163-2116 the whole document | 1-10 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 | | *I* 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 6 August 2004 | | Date of mailing of the international search report 15/09/2004 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer G. Willière |

 フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ランゲン, ハンノ

ドイツ連邦共和国 シュタイネン 7 9 5 8 5 イム ヴォルフィシュビュール 2 7 / 4

(72) 発明者 パルメ, シュテファン

ドイツ連邦共和国 ベンツベルク 8 2 3 7 7 ホッフフェルトシュトラッセ 1 9

(72) 発明者 レスラー, マルクス

ドイツ連邦共和国 ゲルメリング 8 2 1 1 0 アイヒェンシュトラッセ 9 アー

(72) 発明者 ロリンガー, ウォルフガング

ドイツ連邦共和国 ポリング 8 2 3 9 8 カイザー - ハイブリッヒ - シュトラッセ 1 0

(72) 発明者 タッケ, ミヒアエル

ドイツ連邦共和国 ミュンヒェン 8 1 3 7 3 ハンザシュトラッセ 1 1 0

(72) 発明者 ツォルク, ヴェルナー

ドイツ連邦共和国 ヴァイルハイム 8 2 3 6 2 スポルトプラッツヴェーク 4 アー

(72) 発明者 カール, ヨハン

ドイツ連邦共和国 パイセンベルク デー - 8 2 3 8 0 ベルト - シュラッツルゼールシュトラッセ 7

| | | | |
|-------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 使用蛋白质MASP作为结直肠癌的标志物 | | |
| 公开(公告)号 | JP2006524794A | 公开(公告)日 | 2006-11-02 |
| 申请号 | JP2006500105 | 申请日 | 2004-05-25 |
| 申请(专利权)人(译) | F.霍夫曼 - 罗氏公司 | | |
| [标]发明人 | ベルンツペーター ハグマンマリールイゼ ランゲンハンノ パルメシュテファン レスラーマルクス ロリンガーウォルフガング タツケミヒアエル ツオルクヴェルナー カールヨハン | | |
| 发明人 | ベルンツ,ペーター ハグマン,マリー-ルイゼ ランゲン,ハンノ パルメ,シュテファン レスラー,マルクス ロリンガー,ウォルフガング タツケ,ミヒアエル ツオルク,ヴェルナー カール,ヨハン | | |
| IPC分类号 | G01N33/574 G01N33/536 | | |
| CPC分类号 | G01N33/57419 G01N2333/8107 G01N2800/52 | | |
| FI分类号 | G01N33/574.A | | |
| 优先权 | 2003011158 2003-05-26 EP | | |
| 其他公开文献 | JP4241822B2 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及结肠直肠癌的诊断。本发明公开了蛋白质MASP在结肠直肠癌诊断中的用途。本发明涉及通过测量来自个体的液体样品的样品中的MASP来诊断结肠直肠癌的方法。MASP的测量可用于例如结肠直肠癌的早期检测或诊断。

(43) 公表日 平成18年11月2日(2006)

Int. Cl. F I テーマコード (参考)
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/574 A

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全)

| | | | |
|-------------|------------------------------|----------|---------------------------------|
| 1) 出願番号 | 特願2006-500105 (P2006-500105) | (71) 出願人 | 591003013 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーノ |
| 2) (22) 出願日 | 平成16年5月25日 (2004. 5. 25) | | F. HOFFMANN-LA R C |
| 3) 翻訳文提出日 | 平成17年10月26日 (2005. 10. 26) | | E AKTIENGESELLSCHAFT |
| 4) 国際出願番号 | PCT/EP2004/005598 | | スイス・シーエイチー4070バー |
| 5) 国際公開番号 | W02004/104593 | | グレンツァーヘルストラッセ124 |
| 6) 国際公開日 | 平成16年12月2日 (2004. 12. 2) | (74) 代理人 | 100095832 |
| 7) 優先権主張番号 | 03011158. 7 | | 弁理士 細田 秀徳 |
| 8) 優先日 | 平成15年5月26日 (2003. 5. 26) | (72) 発明者 | ベルンツ, ペーター |
| 9) 優先権主張国 | 欧州特許庁 (EP) | | スイス国 バーゼル シーエイチー |
| | | | 6 ミトレーレ シュトラッセ 1: |
| | | (72) 発明者 | ハグマン, マリー-ルイゼ |
| | | | ドイツ連邦共和国 ベンツベルク |
| | | | 77 ザーランガーシュトラッセ |
| | | | 最終頁に於 |