

(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2014-526682

(P2014-526682A)

(43) 公表日 平成26年10月6日(2014.10.6)

(51) Int.Cl.

**G01N 33/68** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**A61B 1/00** (2006.01)

F 1

G01N 33/68  
G01N 33/50 S  
A61B 1/00 300A

テーマコード(参考)

2 G045  
4 C161

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁)

(21) 出願番号 特願2014-529665 (P2014-529665)  
(86) (22) 出願日 平成23年9月12日 (2011.9.12)  
(85) 翻訳文提出日 平成26年4月22日 (2014.4.22)  
(86) 国際出願番号 PCT/US2011/051269  
(87) 国際公開番号 WO2013/039477  
(87) 国際公開日 平成25年3月21日 (2013.3.21)

(71) 出願人 514060422  
クリエイティクス エルエルシー  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ O2  
185, ブレーンツリー, コロンビア  
ンストリート ウエスト 60  
(74) 代理人 100078282  
弁理士 山本 秀策  
(74) 代理人 100113413  
弁理士 森下 夏樹  
(74) 代理人 100181674  
弁理士 飯田 貴敏  
(74) 代理人 100181641  
弁理士 石川 大輔  
(74) 代理人 230113332  
弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】標的分子を検出する非侵襲的方法

## (57) 【要約】

本発明の実施形態は、標的分子を収集、検出、測定および同定するための非侵襲的方法および組成物に関する。いくつかの実施形態では、方法および組成物は、胃腸洗浄液または糞便中の標的分子に関する。一局面において、被験体の生理学的状況を評価するための方法が提供され、この方法は、被験体から胃腸洗浄液を得ることと、胃腸洗浄液中の胃腸系の外側に由来する標的分子を検出することとを含む。別の局面では、被験体の生理学的状況を評価するための方法が提供され、この方法は、被験体から糞便試料を得ることと、糞便試料中の胃腸系の外側に由来する標的分子を検出することとを含む。

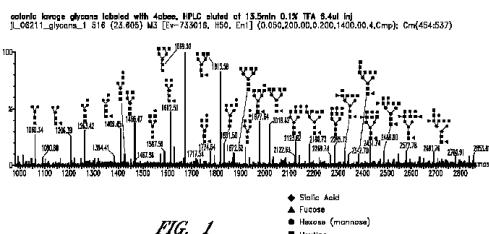


FIG. 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被験体の生理学的状況を評価するための方法であって、  
前記被験体から胃腸洗浄液を得ることと、  
前記胃腸洗浄液中の胃腸系の外側に由来する標的分子を検出することと  
を含む方法。

**【請求項 2】**

被験体の生理学的状況を評価するための方法であって、  
前記被験体から糞便試料を得ることと、  
前記糞便試料中の胃腸系の外側に由来する標的分子を検出することと  
を含む方法。

**【請求項 3】**

前記胃腸洗浄液が、前記被験体の胃腸系を部分的に浄化することによって前記被験体から得られる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記胃腸洗浄液が、糞便物質を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記糞便試料が、胃腸洗浄液を含む、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記標的分子が、ポリペプチド、抗体、胆汁酸、代謝産物またはグリカンを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。 20

**【請求項 7】**

前記標的分子が、バイオマーカーを含む、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。  
。

**【請求項 8】**

前記バイオマーカーが、疾患、治療に対する正の応答、治療に対する部分的応答、治療に対する負の応答または治療に対する応答がないことと関連している、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記標的分子が、癌または癌の素因の存在と関連している、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。 30

**【請求項 10】**

前記癌が、膵臓癌、結腸直腸癌、肝臓癌または胃癌である、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記標的分子が、付属消化腺に由来する、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記付属消化腺が、唾液腺、膵臓、胆嚢または肝臓である、請求項 11 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記被験体に洗浄液を投与することをさらに含む、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の方法。 40

**【請求項 14】**

前記洗浄液が、経口投与される、請求項 13 に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記洗浄液が、ポリエチレングリコール、硫酸マグネシウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、クエン酸マグネシウム、アスコルビン酸、ピコスルファートナトリウムおよびビサコジルからなる群より選択される成分を含む、請求項 13 に記載の方法。

**【請求項 16】**

前記洗浄液が、GOLYTELY、HALFLYTELY、NULLYTELY、SUPREP、FLEETのPHOSPHO-SODA、クエン酸マグネシウムおよびそれらの

50

一般的な同等物からなる群より選択される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記被験体に対して大腸内視鏡検査を実施することをさらに含む、請求項 1 から 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記被験体が、哺乳類である、請求項 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記被験体が、ヒトである、請求項 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

バイオマーカーを同定するための方法であって、

目的の状態または生理学的状況を有する複数の試験被験体から試験胃腸洗浄液、および前記状態も前記生理学的状況も有さない複数の対照被験体から対照胃腸洗浄液を得ることと、

前記試験胃腸洗浄液および前記対照胃腸洗浄液中の少なくとも 5 種の標的分子のレベルを決定することと、

前記対照胃腸洗浄液中のレベルに対して前記試験胃腸洗浄液中で有意に異なるレベルで存在する標的分子を同定し、それによってバイオマーカーを同定することとを含む方法。

【請求項 2 1】

前記胃腸洗浄液が、糞便物質を含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記標的分子が、ポリペプチド、胆汁酸、抗体、代謝産物、グリカンおよびそれらの組合せからなる群より選択される、請求項 2 0 から 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記試験胃腸洗浄液および前記対照胃腸洗浄液中の少なくとも 10 種の標的分子のレベルを決定することを含む、請求項 2 0 から 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記試験胃腸洗浄液および前記対照胃腸洗浄液中の少なくとも 20 種の標的分子のレベルを決定することを含む、請求項 2 0 から 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記試験胃腸洗浄液および前記対照胃腸洗浄液中の少なくとも 30 種の標的分子のレベルを決定することを含む、請求項 2 0 から 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記試験胃腸洗浄液および前記対照胃腸洗浄液中の少なくとも 50 種の標的分子のレベルを決定することを含む、請求項 2 0 から 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記試験胃腸洗浄液および前記対照胃腸洗浄液中の少なくとも 100 種の標的分子のレベルを決定することを含む、請求項 2 0 から 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記バイオマーカーが、疾患、治療に対する正の応答、治療に対する部分的応答、治療に対する負の応答または治療に対する応答がないことと関連している、請求項 2 0 から 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記バイオマーカーが、癌または癌の素因の存在と関連している、請求項 2 0 から 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記癌が、膵臓癌、肝臓癌または胃癌である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 1】

少なくとも 1 種の標的分子が、付属消化腺に由来する、請求項 2 0 から 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 3 2】**

前記付属消化腺が、唾液腺、胰臓、胆嚢または肝臓である、請求項 3 1 に記載の方法。

**【請求項 3 3】**

前記試験被験体および前記対照被験体に洗浄液を投与することをさらに含む、請求項 2 0 から 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 3 4】**

前記洗浄液が、経口投与される、請求項 3 3 に記載の方法。

**【請求項 3 5】**

前記洗浄液が、ポリエチレングリコール、硫酸マグネシウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、クエン酸マグネシウム、アスコルビン酸、ピコスルファートナトリウムおよびビサコジルからなる群より選択される成分を含む、請求項 3 3 に記載の方法。10

**【請求項 3 6】**

前記洗浄液が、GOLYTELY、HALFLYTETE、NULLYTELY、SUPREPE、FLEETのPHOSPHO-SODA、クエン酸マグネシウムおよびそれらの一般的な同等物からなる群より選択される、請求項 3 3 に記載の方法。

**【請求項 3 7】**

前記試験被験体および前記対照被験体に対して大腸内視鏡検査を実施することをさらに含む、請求項 2 0 から 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 3 8】**

前記試験被験体および前記対照被験体が、哺乳類である、請求項 2 0 から 3 7 のいずれか一項に記載の方法。20

**【請求項 3 9】**

前記試験被験体および前記対照被験体が、ヒトである、請求項 2 0 から 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 4 0】**

バイオマーカーを同定するための方法であって、

目的の状態を有する複数の試験被験体から試験糞便試料および複数の対照被験体から対照糞便試料を得ることと、30

前記試験糞便試料および前記対照糞便試料中の少なくとも 5 種の標的分子のレベルを決定することと、前記対照糞便試料中のレベルに対して前記試験糞便試料中で有意に異なるレベルで存在する標的分子を同定し、それによってバイオマーカーを同定することとを含む方法。

**【請求項 4 1】**

前記糞便試料が、胃腸洗浄液を含む、請求項 4 0 に記載の方法。

**【請求項 4 2】**

前記標的分子が、ポリペプチド、核酸、胆汁酸、抗体、代謝産物、グリカンおよびそれらの組合せからなる群より選択される、請求項 4 0 から 4 1 のいずれか一項に記載の方法。40

**【請求項 4 3】**

前記試験糞便試料および前記対照糞便試料中の少なくとも 10 種の標的分子のレベルを決定することを含む、請求項 4 0 から 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 4 4】**

前記糞便試料および前記対照糞便試料中の少なくとも 20 種の標的分子のレベルを決定することを含む、請求項 4 0 から 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 4 5】**

前記糞便試料および前記対照糞便試料中の少なくとも 30 種の標的分子のレベルを決定することを含む、請求項 4 0 から 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 4 6】**

前記糞便試料および前記対照糞便試料中の少なくとも 50 種の標的分子のレベルを決定することを含む、請求項 4 0 から 4 2 のいずれか一項に記載の方法。50

**【請求項 4 7】**

前記糞便試料および前記対照糞便試料中の少なくとも 100 種の標的分子のレベルを決定することを含む、請求項 4 0 から 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 4 8】**

前記バイオマーカーが、疾患、治療に対する正の応答または治療に対する負の応答と関連している、請求項 4 0 から 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 4 9】**

前記バイオマーカーが、癌または癌の素因の存在と関連している、請求項 4 0 から 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5 0】**

前記癌が、膵臓癌、結腸直腸癌、肝臓癌または胃癌である、請求項 4 9 に記載の方法。

**【請求項 5 1】**

少なくとも 1 種の標的分子が、付属消化腺に由来する、請求項 4 0 から 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5 2】**

前記付属消化腺が、唾液腺、膵臓、胆嚢または肝臓である、請求項 5 1 に記載の方法。

**【請求項 5 3】**

前記試験被験体および前記対照被験体が、哺乳類である、請求項 4 0 から 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5 4】**

前記試験被験体および前記対照被験体が、ヒトである、請求項 4 0 から 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5 5】**

胃腸洗浄液中の標的分子を検出するためのキットであって、  
被験体へ経口投与するための洗浄液と、  
前記被験体から前記胃腸洗浄液を収集するための容器と、  
胃腸系の外側に由来する標的分子を検出するための薬剤と  
を含むキット。

**【請求項 5 6】**

糞便試料中の標的分子を検出するためのキットであって、  
被験体へ経口投与するための洗浄液と、  
前記被験体から前記糞便試料を収集するための容器と、  
胃腸系の外側に由来する標的分子を検出するための薬剤と  
を含むキット。

**【請求項 5 7】**

プロテアーゼ阻害剤をさらに含む、請求項 5 5 から 5 6 のいずれか一項に記載のキット  
。

**【請求項 5 8】**

前記標的分子が、ポリペプチド、抗体、胆汁酸、代謝産物またはグリカンを含む、請求項 5 5 から 5 7 のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項 5 9】**

前記標的分子が、バイオマーカーを含む、請求項 5 5 から 5 8 のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項 6 0】**

前記バイオマーカーが、疾患、治療に対する正の応答または治療に対する負の応答と関連している、請求項 5 9 に記載のキット。

**【請求項 6 1】**

前記標的分子が、癌または癌の素因の存在と関連している、請求項 5 5 から 6 0 のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項 6 2】**

10

20

30

40

50

前記癌が、膵臓癌、肝臓癌、結腸直腸癌または胃癌である、請求項 6 1 に記載のキット。

**【請求項 6 3】**

前記標的分子が、付属消化腺に由来する、請求項 5 5 から 6 2 のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項 6 4】**

前記付属消化腺が、唾液腺、膵臓、胆嚢または肝臓である、請求項 6 3 に記載のキット。

**【請求項 6 5】**

前記洗浄液が、ポリエチレングリコール、硫酸マグネシウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、クエン酸マグネシウム、アスコルビン酸、ピコスルファートナトリウムおよびビサコジルからなる群より選択される成分を含む、請求項 5 5 から 6 4 のいずれか一項に記載のキット。

10

**【請求項 6 6】**

前記洗浄液が、GOLYTELY、HALFLYTELY、NULYTELY、SUPREP、FLEETのPHOSPHO-SODA、クエン酸マグネシウムおよびそれらの一般的な同等物からなる群より選択される、請求項 5 5 から 6 4 のいずれか一項に記載のキット。

20

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0001】**

本発明の実施形態は、標的分子を収集、検出、測定および同定するための非侵襲的方法および組成物に関する。いくつかの実施形態では、方法および組成物は、胃腸洗浄液 (GELF) または糞便中の標的分子に関する。

**【0002】**

配列表への言及

本願は、電子形式で配列表とともに提出されている。配列表は、およそ 231KB の大きさである、2011年9月7日に作成された USA\_007WO.TXT と題されたファイルとして提供されている。配列表の電子形式での情報は、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる。

30

**【背景技術】**

**【0003】**

胃腸 (GI) 管および肝胆道ならびに GI 管と関連する器官 / 組織と関連する障害として、胃癌、食道癌、肝臓癌および膵臓癌などの癌が挙げられる。膵臓癌（例えば、膵臓腺癌）は、特に、膵管の細胞に主に生じる膵臓の悪性増殖である。この疾患は、癌のうち 9 番目に多い形であるが、男性および女性においてそれぞれ癌による死亡の 4 番目および 5 番目の原因である。膵臓の癌は、ほとんどの場合致死性であり、3%未満の 5 年生存率である。

**【0004】**

膵臓癌の最も一般的な症状として、黄疸、腹痛および体重減少が挙げられ、これらは、他の提示因子と一緒にになって、実際は非特異的であることが多い。したがって、膵臓癌を、腫瘍増殖の初期の段階で診断することは、困難であることが多く、大規模な精密診断を必要とし、試験開腹の際に偶発的に発見されることも多い。内視鏡的超音波検査は、膵臓癌の診断に利用可能である 1 つの例示的非外科的技術である。しかし、小さい腫瘍ならびに限局性膵炎からの膵臓癌の分化の信頼できる検出は困難である。膵臓癌の患者の大部分は、現在、腫瘍がすでに膵臓を越えて広がり、周囲の器官に浸潤してしまった、および / または大規模に転移してしまった後期で診断される。参照によりその全文が本明細書に組み込まれる非特許文献 1。死亡につながることが多い進行した疾患と診断されている患者の大部分で、疾患の遅い検出が一般的であり、少数の患者しか初期疾患で検出されない。

40

50

**【0005】**

G I 管と関連する障害および疾患を診断するための侵襲的技術は、不都合なものであり、被験体を重大な危険に曝す。したがって、G I 管または関連する器官 / 組織から標的分子を検出および同定するための非侵襲的方法および組成物が必要である。いくつかの実施形態では、疾患、疾患素因、治療計画に対する正の応答または治療計画に対する応答がないこともしくは負の応答などの特定の特徴と関連しているバイオマーカーとして有用であるかどうかを決定するために、標的分子が評価され得る。さらに、G I 管または関連する器官 / 組織に由来するバイオマーカーは、個体が、上記で列挙した特定の特徴のいずれかを有するかどうかを決定するために使用され得る。

**【先行技術文献】**

10

**【非特許文献】****【0006】**

【非特許文献1】Goldら、Crit. Rev. Oncology/Hematology (2001年) 39巻：147～54頁

**【発明の概要】****【課題を解決するための手段】****【0007】**

本発明の実施形態は、標的分子を収集、検出、測定および同定するための非侵襲的方法および組成物に関する。いくつかの実施形態では、方法および組成物は、胃腸洗浄液 (G LF) または糞便中の標的分子に関する。

20

**【0008】**

いくつかの実施形態は、被験体の生理学的状況を評価するための方法であって、被験体から胃腸洗浄液を得ることと、胃腸洗浄液中の胃腸系の外側に由来する標的分子を検出することとを含む方法を含む。

**【0009】**

いくつかの実施形態は、被験体の生理学的状況を評価するための方法であって、被験体から糞便試料を得ることと、糞便試料中の胃腸系の外側に由来する標的分子を検出することとを含む方法を含む。

**【0010】**

いくつかの実施形態では、胃腸洗浄液は、被験体の胃腸系を部分的に浄化することによって被験体から得られる。

30

**【0011】**

いくつかの実施形態では、胃腸洗浄液は、糞便物質を含む。いくつかの実施形態では、糞便試料は、胃腸洗浄液を含む。

**【0012】**

いくつかの実施形態では、標的分子は、ポリペプチド、抗体、胆汁酸、代謝産物またはグリカンを含む。いくつかの実施形態では、標的分子は、バイオマーカーを含む。いくつかの実施形態では、バイオマーカーは、疾患、治療に対する正の応答、治療に対する部分的応答、治療に対する負の応答または治療に対する応答がないことと関連している。いくつかの実施形態では、標的分子は、癌または癌の素因の存在と関連している。いくつかの実施形態では、癌は、膵臓癌、結腸直腸癌、肝臓癌または胃癌である。いくつかの実施形態では、標的分子は、付属消化腺に由来する。いくつかの実施形態では、付属消化腺は、唾液腺、膵臓、胆嚢または肝臓である。

40

**【0013】**

いくつかの実施形態は、被験体に洗浄液を投与することを含む。いくつかの実施形態では、洗浄液は、経口投与される。いくつかの実施形態では、洗浄液は、ポリエチレングリコール、硫酸マグネシウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、クエン酸マグネシウム、アスコルビン酸、ピコスルファートナトリウムおよびビサコジルからなる群より選択される成分を含む。いくつかの実施形態では、洗浄液は、GOLYTELY、HALFLYTE LY、NULYTELY、SUPREP、FLEETのPHOSPHO-SODA、クエ

50

ン酸マグネシウムおよびそれらの一般的な同等物からなる群より選択される。

【0014】

いくつかの実施形態は、被験体に対して大腸内視鏡検査を実施することを含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、被験体は、哺乳類である。いくつかの実施形態では、被験体は、ヒトである。

【0016】

いくつかの実施形態は、バイオマーカーを同定するための方法であって、目的の状態または生理学的状況を有する複数の試験被験体から試験胃腸洗浄液、および前記状態も前記生理学的状況も有さない複数の対照被験体から対照胃腸洗浄液を得ることと、試験胃腸洗浄液および対照胃腸洗浄液中の少なくとも5種の標的分子のレベルを決定することと、対照胃腸洗浄液中のレベルに対して試験胃腸洗浄液中で有意に異なるレベルで存在する標的分子を同定し、それによってバイオマーカーを同定することとを含む方法を含む。10

【0017】

いくつかの実施形態では、胃腸洗浄液は、糞便物質を含む。

【0018】

いくつかの実施形態では、標的分子は、ポリペプチド、胆汁酸、抗体、代謝産物、グリカンおよびそれらの組合せからなる群より選択される。

【0019】

いくつかの実施形態は、試験胃腸洗浄液および対照胃腸洗浄液中の少なくとも10種の標的分子のレベルを決定することを含む。いくつかの実施形態は、試験胃腸洗浄液および対照胃腸洗浄液中の少なくとも20種の標的分子のレベルを決定することを含む。いくつかの実施形態は、試験胃腸洗浄液および対照胃腸洗浄液中の少なくとも30種の標的分子のレベルを決定することを含む。いくつかの実施形態は、試験胃腸洗浄液および対照胃腸洗浄液中の少なくとも50種の標的分子のレベルを決定することを含む。いくつかの実施形態は、試験胃腸洗浄液および対照胃腸洗浄液中の少なくとも100種の標的分子のレベルを決定することを含む。20

【0020】

いくつかの実施形態では、バイオマーカーは、疾患、治療に対する正の応答、治療に対する部分的応答、治療に対する負の応答または治療に対する応答がないことと関連している。30

【0021】

いくつかの実施形態では、バイオマーカーは、癌または癌の素因の存在と関連している。いくつかの実施形態では、癌は、膵臓癌、肝臓癌または胃癌である。

【0022】

いくつかの実施形態では、少なくとも1種の標的分子は、付属消化腺に由来する。いくつかの実施形態では、付属消化腺は、唾液腺、膵臓、胆嚢または肝臓である。

【0023】

いくつかの実施形態は、試験被験体および対照被験体に洗浄液を投与することを含む。いくつかの実施形態では、洗浄液は、経口投与される。いくつかの実施形態では、洗浄液は、ポリエチレングリコール、硫酸マグネシウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、クエン酸マグネシウム、アスコルビン酸、ピコスルファートナトリウムおよびビサコジルからなる群より選択される成分を含む。いくつかの実施形態では、洗浄液は、GOLYTELY、HALFLYTELY、NULYTELY、SUPREPおよびFLEETのPHOSPHO-SODA、クエン酸マグネシウムおよびそれらの一般的な同等物からなる群より選択される。40

【0024】

いくつかの実施形態は、試験被験体および対照被験体に対して大腸内視鏡検査を実施することを含む。

【0025】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、試験被験体および対照被験体は、哺乳類である。いくつかの実施形態では、試験被験体および対照被験体は、ヒトである。

【0026】

いくつかの実施形態は、バイオマーカーを同定するための方法であって、目的の状態を有する複数の試験被験体から試験糞便試料および複数の対照被験体から対照糞便試料を得ることと、試験糞便試料および対照糞便試料中の少なくとも5種の標的分子のレベルを決定することと、対照糞便試料中のレベルに対して試験糞便試料中で有意に異なるレベルで存在する標的分子を同定し、それによってバイオマーカーを同定することとを含む方法を含む。

【0027】

いくつかの実施形態では、糞便試料は、胃腸洗浄液を含む。

【0028】

いくつかの実施形態では、標的分子は、ポリペプチド、胆汁酸、抗体、代謝産物、グリカンおよびそれらの組合せからなる群より選択される。

【0029】

いくつかの実施形態は、試験糞便試料および対照糞便試料中の少なくとも10種の標的分子のレベルを決定することを含む。いくつかの実施形態は、糞便試料および対照糞便試料中の少なくとも20種の標的分子のレベルを決定することを含む。いくつかの実施形態は、糞便試料および対照糞便試料中の少なくとも30種の標的分子のレベルを決定することを含む。いくつかの実施形態は、糞便試料および対照糞便試料中の少なくとも50種の標的分子のレベルを決定することを含む。いくつかの実施形態は、糞便試料および対照糞便試料中の少なくとも100種の標的分子のレベルを決定することを含む。

【0030】

いくつかの実施形態では、バイオマーカーは、疾患、治療に対する正の応答または治療に対する負の応答と関連している。

【0031】

いくつかの実施形態では、バイオマーカーは、癌または癌の素因の存在と関連している。いくつかの実施形態では、癌は、膵臓癌、結腸直腸癌、肝臓癌または胃癌である。

【0032】

いくつかの実施形態では、少なくとも1種の標的分子は、付属消化腺に由来する。いくつかの実施形態では、付属消化腺は、唾液腺、膵臓、胆嚢または肝臓である。

【0033】

いくつかの実施形態では、試験被験体および対照被験体は、哺乳類である。いくつかの実施形態では、試験被験体および対照被験体は、ヒトである。

【0034】

いくつかの実施形態は、胃腸洗浄液中の標的分子を検出するためのキットであって、被験体へ経口投与するための洗浄液と、被験体から胃腸洗浄液を収集するための容器と、胃腸系の外側に由来する標的分子を検出するための薬剤とを含むキットを含む。

【0035】

いくつかの実施形態は、糞便試料中の標的分子を検出するためのキットであって、被験体へ経口投与するための洗浄液と、被験体から糞便試料を収集するための容器と、胃腸系の外側に由来する標的分子を検出するための薬剤とを含むキットを含む。

【0036】

いくつかの実施形態は、プロテアーゼ阻害剤を含む。

【0037】

いくつかの実施形態では、標的分子は、ポリペプチド、抗体、胆汁酸、代謝産物またはグリカンを含む。いくつかの実施形態では、標的分子は、バイオマーカーを含む。いくつかの実施形態では、バイオマーカーは、疾患、治療に対する正の応答または治療に対する負の応答と関連している。

【0038】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、標的分子は、癌または癌の素因の存在と関連している。いくつかの実施形態では、癌は、膵臓癌、肝臓癌、結腸直腸癌または胃癌である。

#### 【0039】

いくつかの実施形態では、標的分子は、付属消化腺に由来する。いくつかの実施形態では、付属消化腺は、唾液腺、膵臓、胆嚢または肝臓である。

#### 【0040】

いくつかの実施形態では、洗浄液は、ポリエチレングリコール、硫酸マグネシウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、クエン酸マグネシウム、アスコルビン酸、ピコスルファートナトリウムおよびビサコジルからなる群より選択される成分を含む。いくつかの実施形態では、洗浄液は、GOLYTELY、HALFLYTELY、NULYTELY、SUPREP、FLEETのPHOSPHO-SODA、クエン酸マグネシウムおよびそれらの一般的な同等物からなる群より選択される。10

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0041】

【図1】図1は、胃腸洗浄液の画分中に存在する種々の糖タンパク質に由来するグリカン構造の相対的存在量のグラフを表す図である。誘導体化されたグリカンを、0.2%ギ酸中の約20~25%アセトニトリルでQ-TOF MSでのC18逆相カラムから溶出した。質量分析計は、MSのみの様式で毎秒m/z 150~2000でスキャンし、誘導体化グリカンプロファイルデータを獲得した。

【図2】図2は、胃腸洗浄液の画分中に存在するコール酸などの代謝産物を含めた化合物の相対的存在量のグラフを表す図である。データは、LCシステムからの入力を使用し、Mass Lynxソフトウェアを使用して Waters Q-TOF質量分析計で獲得した。MSは、毎秒m/z 100~m/z 2000の質量範囲にわたってスキャンした。20

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0042】

本発明の実施形態は、標的分子を収集、検出、測定および同定するための非侵襲的方法および組成物に関する。いくつかの実施形態では、方法および組成物は、胃腸洗浄液(GLF)または糞便中の標的分子に関する。

#### 【0043】

胃腸洗浄は、大腸内視鏡検査または結腸直腸手術のための下部胃腸(GI)管準備として広く使用されている(例えば、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる、Dipalma JAら、(1984年) Gastroenterology 86巻:856~60頁参照のこと)。腸管の疾患の特定の病態生理学は、GLF中のタンパク質を測定することによって調査されている(各々、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる、Evgenikos Nら(2000年) Br J Surg 87巻:808~13頁、Brydon WG、Ferguson A.(1992年) Lancet 340巻:1381~2頁、Choudari CPら(1993年) Gastroenterology 104巻:1064~71頁、Ferguson Aら(1996年) Gut 38巻:120~4頁、Handy LMら(1996年) Scand J Gastroenterol 31巻:700~5頁、およびStanley AJら(1996年) Gastroenterology 111巻:1679~82頁)。3040

#### 【0044】

糞便のタンパク質の測定は、タンパク質喪失性腸症および粘膜炎症などの種々の病態生理学を調査するために有用であり得る。しかし、本明細書に記載されたいいくつかの実施形態では、糞便が使用され得るが、GLFは、アッセイに干渉する物質をより少量しか含有せず、GLFでは、GI管を迅速に通過するために消化酵素および細菌プロテアーゼによるタンパク質の破壊が糞便試料よりも少ないので、GLFは、バイオマーカーを検出および同定するための試料として糞便を上回って好ましい。さらに、腸に沿った流体通過の速度が推定され得るので、粘膜からのタンパク質放出速度を推定することが可能である。

#### 【0045】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、G L Fは、被験体に洗浄液を経口投与して、大容量の流体を腸管に通過させることによって製造され得、洗浄液は、塩の混合物ならびにポリエチレンリコールおよびビサコジルなどのその他の物質を含有し得る。洗浄液は、結腸への液体の流入を引き起こし、これによって固体が流し出される。洗浄液は、大腸内視鏡検査およびG I 管を検査するために使用されるその他の方法のための準備において一般的に使用されるように、G I 管の清浄化を引き起こすために一般的に使用される。大部分が清浄化されたG I 管から流し出されたか、またはその中に留まるこれらの液体は、G I 管に沿った口から肛門までの連続性のためにさまざまな疾患を評価するのに有用である。結果として、流体をG I 管中に入れるG I 管を含めたありとあらゆる器官が、本明細書において提供される方法および組成物の候補である。

10

#### 【0046】

##### G I 管および関連する器官 / 組織

本明細書において提供される方法および組成物の一部は、G I 管および付属消化腺を含めたG I 管と関連する器官 / 組織に関する。当技術分野では周知であるが、G I 管は、上部G I 管および下部G I 管を含む。上部G I 管は、口腔または頬側口腔、食道、胃および十二指腸を含む。下部G I 管は、空腸、回腸および大腸および肛門を含む。大腸は、虫垂、盲腸、結腸および直腸を含む。

#### 【0047】

G I 管と関連する器官および組織は、G I 管の外側の構造を含む。このような構造の例として、唾液腺、例えば、耳下唾液腺、顎下唾液腺および舌下唾液腺、脾臓、例えば、外分泌脾臓、胆嚢、胆管および肝臓などの付属消化器官が挙げられる。G I 管およびG I 管の外側と関連する構造のさらなる例として、胰管、胆樹および胆管が挙げられる。

20

#### 【0048】

##### 胃腸洗浄液 ( G L F )

一般に、洗浄液は、被験体に経口投与され得、経口洗浄液は、被験体のG I 管を通過し、得られるG L Fが被験体から収集される。本明細書において、用語「被験体」とは、哺乳動物、例えば、ヒトなどの動物を含み得る。上記のように、G L Fは、糞便 / 便試料の検査よりも清潔なG I 管のサンプリングを提供する。G L Fは、食物の摂取、種類および消化状態と関連する可変性を軽減すると思われる。

30

#### 【0049】

本明細書に記載されたいいくつかの実施形態は、標的分子を検出するための、または胃腸管または関連する器官 / 組織の疾患および病状についてのスクリーニング、トリアージ、疾患検出、診断、予後、治療に対する応答、治療の選択および個別化医薬のためのG L Fの分析を含む。いくつかの実施形態は、被験体が患っている可能性がある、あり得る疾患または状態から、特定の疾患および病状を排除するためのG L F試料の分析を含む。いくつかの実施形態は、診断のためにさらに試験する必要性を示すためのG L Fの分析を含む。さらなる実施形態は、新規疾患診断を確立し、これまでの診断をさらに分類し、有望な治療計画に対する感受性を決定し、および / またはこれまでのもしくは進行中の治療計画に対する応答を評価するためのG L Fの分析を含む。

#### 【0050】

##### G L Fを得るための方法

本明細書において提供される方法および組成物のいくつかの実施形態は、被験体からG L Fを得ることを含む。G L Fを得る方法は、当技術分野で周知である。例えば、S字結腸鏡検査、大腸内視鏡検査、X線検査、腸の手術を受ける患者のための準備などの医療手順およびまたは診断手順の際に、腸および結腸が、完全に浄化され、清浄化されることが重要である。特に、腸管粘膜の適切な可視化を可能にするよう、結腸からできるだけ多くの糞便物質が除去されることが必須である。これは、例えば、軟性S字結腸鏡検査または大腸内視鏡検査などの診断手順、結腸の疾患について患者をスクリーニングするために広く実施される診断検査の前には重要である。さらに、結腸の満足のいくX線写真を得るために、腸管が完全に洗浄されることが重要である。同一状態はまた、結腸が手術のため

40

50

に術前準備される場合、糞便老廃物の除去が、患者の安全にとって非常に重要である場合にも当てはまる。内視鏡的検査のために結腸を準備するには、現在の清浄化手順は、直立歩行結腸洗浄を含む。直立歩行洗浄は、被験体に、4 Lのポリエチレンジリコール／電解質溶液（参照によりその全文が組み込まれる米国特許出願公開第20070298008号）を含む洗浄組成物を経口投与することを含み得る。いくつかの実施形態は、順行性洗浄および逆行性洗浄を含む。

#### 【0051】

一般に、経口洗浄組成物は、硫酸、炭酸水素、塩化物、リン酸またはクエン酸のナトリウム、カリウムおよびマグネシウム塩などの電解質の溶液を含む。いくつかのこのような組成物はまた、非吸収性の浸透圧性薬剤として作用し得るポリエチレンジリコールも含み得る。一般的な組成物は、電解質溶液とともにポリエチレンジリコールを含み、場合により、ビサコジルまたはアスコルビン酸および硫酸ナトリウム、硫酸マグネシウムまたは硫酸カリウムなどの硫酸塩を含めた組成物も含む。いくつかの実施形態では、経口洗浄液は、クエン酸マグネシウムを含み得る。いくつかの実施形態では、経口洗浄液は、ピコスルファートナトリウムを含み得る。電解質溶液とともにポリエチレンジリコールを含む経口洗浄溶液の1種の例示的組成物として、GOLYTELY (Braintree Labs. Inc.) がある。GOLYTELYは、以下：ポリエチレンジリコール59 g、硫酸ナトリウム5.68 g、炭酸水素ナトリウム1.69 g、塩化ナトリウム1.46 g、塩化カリウム0.745 gおよび1リットルを構成するための水に従って製剤される（参照によりその全文が組み込まれる、Davisら（1980年）Gastroenterology 78巻：991～995頁）。GOLYTELYの摂取は、被験体の水および電解質バランスにおいて最小の変化しか伴わずに多量の液状便をもたらす。電解質溶液とともにポリエチレンジリコールを含む経口洗浄組成物の別の例として、NULLYTELYがある（Braintree Labs. Inc.）。電解質溶液およびビサコジルとともにポリエチレンジリコールを含む1種の例示的経口洗浄組成物として、HALFLYTELYがある（Braintree Labs. Inc.）。硫酸ナトリウム、硫酸マグネシウムまたは硫酸カリウムなどの硫酸塩を含む1種の例示的経口洗浄組成物として、SUPREPがある（Braintree Labs. Inc.）。電解質溶液およびアスコルビン酸とともにポリエチレンジリコールを含む経口洗浄溶液の1種の例示的組成物として、MOVIPREPがある（Salix Pharmaceuticals, Inc.）。

10

20

30

40

50

#### 【0052】

多量のポリエチレンジリコールが、大容量の希釈塩溶液中で投与される場合に、ポリエチレンジリコールは、経口洗浄組成物として有効である。普通、約250～400 gのポリエチレンジリコールが、約4 Lの電解質水溶液中で被験体に投与される。ポリエチレンジリコールの経口投与は、一定期間、例えば、一晩にわたって便通を生じさせるために使用され得る。必要な用量は変わるが、8オンスの水中、約10～100 gのポリエチレンジリコールが有効であり得る。重篤な下痢を伴わずに一晩の便通を生じさせるには、約68～85 gのポリエチレンジリコールの用量が有効であり得る。等張性流体中のポリエチレンジリコールの溶液の容量は、浸透圧性緩下薬の有効量であり得る。約0.5 L～約4 Lの容量が有効であり得る。好ましくは、有効容量は、約1.5 Lから約2.5 Lの間である。2 Lの等張性溶液の経口投与は、有効である。

#### 【0053】

経口洗浄組成物のさらなる例として、ポリエチレンジリコールなどの浸透圧性緩下剤と組み合わせた非リン酸塩の高張液が挙げられる（参照によりその全文が組み込まれる米国特許出願公開第20090258090号）。リン酸塩を除く硫酸塩の混合物、例えば、以下の硫酸塩 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ および $\text{K}_2\text{SO}_4$ のうち1種または複数の有効量が有効であり得る（例えば、SUPREP）。いくつかの実施形態は、約0.1 g～約20.0 gの $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を含み、約1.0 g～10.0 gの $\text{Na}_2\text{SO}_4$ が有用であり得る。約0.01 g～約40.0 gの $\text{MgSO}_4$ の投与量が有効であり得る。約0.1 g～

約 20.0 g の  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  の用量ならびに、1.0 ~ 10.0 g の投与量も有利に使用され得る。約 0.01 g ~ 約 20.0 g の  $\text{K}_2\text{SO}_4$  の投与量が、浄化をもたらすのに有效であり得、約 0.1 g ~ 約 10.0 g および約 0.5 g ~ 約 5.0 g の  $\text{K}_2\text{SO}_4$  の用量も有用であり得る。ポリエチレングリコール (PEG) などの浸透圧性緩下剤の添加は、上記の塩混合物の有効性を改善し得る。約 1.0 g ~ 約 100 g の PEG の用量が有効である。約 34 g の用量のように、約 10.0 g ~ 約 50 g の PEG の用量も有効である。投与の容易さのためには、上記の塩の混合物は、好都合な容量の水に溶解され得る。1 リットル未満の容量の水は、ほとんどの被験体によって十分に許容され得る。混合物は、任意の小容量の水に溶解されてもよく、100 から 500 ml の間の容量が有用である。有効用量をわけて、適当な期間にわたる 2 回以上の投与で患者に投与してもよい。一般に、6 ~ 24 時間隔てられた有効用量の同等部分の 2 用量の投与は、満足のいく浄化をもたらす。いくつかの実施形態は、経口洗浄組成物の投与の前およびその間の規定の期間の間の正常な経口摂取の中止を含む。

10

## 【0054】

いくつかの洗浄組成物は、ビサコジルなどの緩下薬を含む。いくつかの実施形態では、緩下薬は、洗浄組成物とともに被験体に同時投与され得る。理解されるであろうが、このような同時投与は、例えば、被験体への洗浄組成物の投与の最大数時間前の緩下薬の投与、被験体への洗浄組成物の投与と組み合わせた緩下薬の投与または被験体への洗浄組成物の投与の最大数時間後の緩下薬の投与を含み得る。緩下薬およびその有効用量の例として、アロエ、250 ~ 1000 mg ; ビサコジル、約 5 ~ 80 mg ; カサンスラノール、30 ~ 360 mg ; カスカラ芳香族流体抽出物、2 ~ 24 ml ; カスカラサグラダ樹皮、300 ~ 4000 mg ; カスカラ (Cascada) サグラダ抽出物、300 ~ 2000 mg ; カスカラサグラダ流体抽出物、0.5 ~ 5.0 ml ; ヒマシ油、15 ~ 240 ml ; ダンスロン、75 ~ 300 mg ; デヒドロコール酸、250 ~ 2000 mg ; フェノールフタレン、30 ~ 1000 mg ; センノシド A および B、12 ~ 200 mg ; およびピコスルファート、1 ~ 100 mg が挙げられる。

20

## 【0055】

洗浄組成物のさらなる例として、濃縮リン酸塩の水溶液が挙げられる。水性リン酸塩濃縮物は、G I 管の管腔内内容物に対して浸透圧性効果をもたらし、身体から結腸への水および電解質の大流入で腸の排泄が起こる。1種の例示的組成物は、安定化された緩衝水溶液中に 480 g / L のリン酸二水素ナトリウムおよび 180 g / L のリン酸水素二ナトリウムを含む (FLEET の PHOSPHO-SODA、C.S.Fleet Co., Inc.)。被験体は、通常、合計 6 オンス (180 ml) について、3 ~ 12 時間の間隔で隔てられた、この組成物の 2 ~ 3 オンスの用量を摂取することを必要とする。

30

## 【0056】

G L F は、医療手順または診断手順の前、その間またはその後に被験体から収集され得る。いくつかの実施形態では、被験体は、例えば、流体を捕獲するトイレ挿入物 (toilet insert) などの容器を使用して G L F を収集し得る。G L F の品質を保つために酵素阻害剤および変性剤が使用され得る。いくつかの実施形態では、試料の安定化に役立つよう、試料の pH が調整され得る。いくつかの実施形態では、G L F 試料は、遠心分離などによって、一部またはすべての固体および / または細菌を除去するようさらに処理され得る。いくつかの実施形態では、G I 管は、経口洗浄組成物の投与によって完全には浄化されない場合もある。例えば、被験体の G I 管を完全に浄化するのに必要な経口洗浄組成物の完全用量の一部が、被験体に投与される場合がある。いくつかの実施形態では、G L F は、糞便物質を含み得る。さらなる実施形態では、糞便物質は、G L F を含み得る。

40

## 【0057】

## 標的分子

本明細書に記載されたいいくつかの実施形態は、G I 管から得られた試料中の標的分子を検出する方法またはこのような検出にとって有用な組成物に関する。本明細書において、

50

「標的分子」は、G I 管から得られた試料中で検出または測定または同定され得る任意の分子を含む。このような試料として、被験体から得られた G L F および被験体から得られた糞便試料が挙げられる。標的分子の例として、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、突然変異体タンパク質、選択的スプライシングから生じたタンパク質、翻訳後修飾されたタンパク質、例えば、グリコシリ化タンパク質、リン酸化タンパク質などの修飾されたタンパク質、抗体（例えば、自己抗体、IgG、IgA および IgM）、抗体断片、糖、例えば、单糖、二糖、オリゴ糖およびグリカン、脂質、小分子、例えば、代謝産物、医薬組成物、代謝された医薬組成物およびプロドラッグなどの分子が挙げられる。標的分子のさらなる例として、胆汁酸塩および胆汁酸、例えば、コレステロールが挙げられる。さらなる例として、ケノデオキシコール酸、グリココール酸、タウロコール酸、デオキシコール酸およびリトコール酸が挙げられる。標的分子は、G I 管および G I 管の外側に由来し得る、例えば、付属消化腺などの G I 管と関連している器官および / または組織に由来し得る。いくつかの実施形態では、細胞の断片およびその他の副生成物 (bi product)、例えば、赤血球、白血球および内皮細胞を含めた細胞、生物、例えば、細菌、原虫ならびにウイルスおよびウイルス粒子が、G L F または糞便試料中で検出され得る。いくつかの実施形態では、標的分子は、本明細書における表 1 ~ 10 またはその一部のいずれかに列挙されるタンパク質またはその一部のいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、表 1 ~ 10 のいずれかに列挙されるタンパク質の一部は、表 1 ~ 10 中に列挙されるタンパク質のいずれかの少なくとも 10 個、少なくとも 15 個、少なくとも 20 個、少なくとも 25 個、少なくとも 50 個または 50 個を超える連続するアミノ酸を含み得る。いくつかの実施形態では、標的分子は、配列番号 01 ~ 804 のうち 1 種のポリペプチドを含み得る、から本質的になり得る、またはからなり得る。配列番号 01 ~ 804 のうち 1 種から本質的になるポリペプチドは、配列番号 01 ~ 804 中のものに対してさらなるアミノ酸または置換アミノ酸を、このようなさらなるアミノ酸または置換アミノ酸が、ポリペプチドが検出可能であることを妨げない場合に含み得る。

#### 【0058】

標的分子はまた、バイオマーカーを含む。本明細書において、用語「バイオマーカー」は、疾患、疾患素因、特定の治療計画に対する正の応答、特定の治療計画に対する応答がないことまたは特定の治療計画に対する負の応答と関連している、G L F または糞便試料中に存在する任意の標的分子を含む。いくつかの実施形態では、バイオマーカーが、同定、測定および / または疾患の診断もしくは予後と相互に関連付けられ得る。

#### 【0059】

いくつかの実施形態では、標的分子は、血液、唾液、胃液、肝臓分泌物、胆汁、十二指腸液および胰液からなる群より選択される被験体の流体の構成成分である。いくつかの実施形態では、標的分子は、被験体の上部胃腸管または被験体の下部胃腸管において発現される。いくつかの実施形態では、標的分子は、頸側口腔、食道、胃、胆嚢、胆囊、十二指腸、空腸、回腸、虫垂、盲腸、結腸、直腸および肛門管からなる群より選択される被験体中の位置で発現される。

#### 【0060】

いくつかの実施形態では、標的分子は、G L F 中に見られるタンパク質またはその他の化合物、例えば、ラクトフェリン、好酸球由来神経毒、好酸球カチオン性タンパク質、ビリルビン (Bil)、アルカリホスファターゼ (ALP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ヘモグロビンまたは好酸球ペルオキシダーゼを含まない。いくつかの実施形態では、標的分子は、糞便中に見られるタンパク質、例えば、ヘプタグロブリン (hepatoglobin)、ヘモペキシン、-2-マクログロブリン、カドヘリン-17、カルプロテクチン、癌胚形成 (carcinoembryogenic) 抗原、メタロプロテイナーゼ-1 (TIMP-1)、S100A12、K-ras または p53 を含まない。いくつかの実施形態では、標的分子は、胰液中に見られるタンパク質、例えば、前勾配 (anterior gradient)-2 (AGR2)、インスリン様増殖因子結合タンパク質-2、CEACAM6、MUC1、CA19-9、セリンプロテイナー

10

20

30

40

50

ゼ - 2 ( P R S S 2 ) プレプロタンパク質、膵臓リバーゼ関連タンパク質 - 1 ( P L R P 1 ) 、キモトリプシノーゲン B ( C T R B ) 、エラスターーゼ 3 B ( E L A 3 B ) 、腫瘍拒絶抗原 ( p g 9 6 ) 、アズロシジン、肝細胞癌 - 腸 - 膵臓 / 膵炎関連タンパク質 I ( H I P / P A P - I ) 、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 9 ( M M P - 9 ) 、癌遺伝子 D J 1 ( D J - 1 ) または - 1 B - 糖タンパク質前駆体 ( A 1 B G ) を含まない。

#### 【 0 0 6 1 】

##### 標的分子を特性決定する方法

本明細書において提供される方法および組成物のいくつかの実施形態は、 G L F または糞便試料中の標的分子を特性決定することを含む。標的分子を特性決定することは、例えば、標的分子を同定すること、標的分子を検出することおよび / または標的分子を定量することを含み得る。標的分子を同定、検出および定量する方法は、当技術分野で周知である。

10

#### 【 0 0 6 2 】

いくつかの実施形態は、ペプチド、ポリペプチドおよび / もしくはタンパク質を含む標的分子を同定すること、その有無を決定すること、ならびに / または標的分子を定量することを含む。このような標的分子は、本明細書に記載されるようなラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫測定法および 2 抗体サンドイッチアッセイを含めたイムノアッセイなどのさまざまな方法によって特性決定され得る。競合および非競合イムノアッセイ形式、抗原捕獲アッセイおよび 2 抗体サンドイッチアッセイを含めたさまざまなイムノアッセイ形式も有用である（参照によりその全文が組み込まれる、 S e l f および C o o k 、（ 1 9 9 6 年） C u r r . O p i n . B i o t e c h n o l . 7 卷： 6 0 ~ 6 5 頁）。いくつかの実施形態は、 1 種または複数の抗原捕獲アッセイを含む。抗原捕獲アッセイでは、抗体が、固相と結合しており、抗原、例えば、 G L F または糞便試料中の標的分子が、抗体によって結合されるように試料が添加される。結合していないタンパク質が、洗浄によって除去された後、必要に応じて、例えば、ラジオアッセイを使用して、結合している抗原の量が定量化され得る（参照によりその全文が組み込まれる、 H a r l o w および L a n e 、（ 1 9 8 8 年） A n t i b o d i e s A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory : New York ）。イムノアッセイは、抗原の量を定量化し、ひいては、 G L F または糞便試料中の標的分子のレベルを決定するために、抗体過剰または抗原競合のような状態下で実施され得る。

20

#### 【 0 0 6 3 】

酵素結合免疫吸着法 ( E L I S A ) は、本明細書において提供されるある特定の実施形態において有用であり得る。西洋ワサビペルオキシダーゼ ( H R P ) 、アルカリホスファターゼ ( A P ) 、 - ガラクトシダーゼまたはウレアーゼなどの酵素は、本発明の方法において使用するために、例えば、抗 H M G B 1 抗体と、または二次抗体と連結され得る。西洋ワサビ - ペルオキシダーゼ検出システムは、例えば、過酸化水素の存在下で、 4 5 0 n m で検出可能である可溶性生成物を生じる発色基質テトラメチルベンジシン ( T M B ) とともに使用され得る。その他の好都合な酵素結合型システムとして、例えば、 4 0 5 n m で容易に検出可能な可溶性生成物を生じる発色基質 p - ニトロフェニルリン酸とともに使用され得るアルカリホスファターゼ検出システムが挙げられる。同様に、 - ガラクトシダーゼ検出システムは、 4 1 0 n m で検出可能な可溶性生成物を生じる発色基質 o - ニトロフェニル - - D - ガラクトピラノシド ( O N P G ) とともに使用され得、またはウレアーゼ検出システムは、尿素 - プロモクレゾールパープル ( S i g m a I m m u n o c h e m i c a l s ) などの基質とともに使用され得る。有用な酵素結合型一次および二次抗体は、本明細書においてさらに記載されるような J a c k s o n I m m u n o - R e s e a r c h ( W e s t G r o v e , P a . ) などのいくつかの市販の供給源から得ることができる。

30

#### 【 0 0 6 4 】

ある特定の実施形態では、 G L F または糞便試料中の標的分子は、化学発光検出を使用

40

50

して検出および／または測定され得る。例えば、ある特定の実施形態では、生体試料、例えば、G L F または糞便試料中に存在する標的分子を捕獲するために特定の標的分子に対する特異的抗体が使用され、試料中に存在する標的分子を検出するために、標的分子特異的抗体に対して特異的であり、化学発光標識で標識される抗体が使用される。本方法において、任意の化学発光標識および検出システムが使用され得る。化学発光二次抗体は、A m e r s h a mなどの種々の供給源から商業的に入手できる。化学発光二次抗体を検出する方法は、当技術分野で公知である。

#### 【0065】

蛍光検出はまた、本明細書において提供されるある特定の方法において標的分子を検出するために有用であり得る。有用な蛍光色素として、D A P I 、フルオレセイン、H o e c h s t 3 3 2 5 8 、R - フィコシアニン、B - フィコエリトリン、R - フィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッドおよびリサミンが挙げられる。本発明において、フルオレセインもしくはローダミン標識された抗体またはフルオレセイン - もしくはローダミン - 標識された二次抗体は、有用であり得る。

10

#### 【0066】

ラジオイムノアッセイ( R I A )もまた、本明細書において提供されるある特定の方法において有用であり得る。このようなアッセイは、当技術分野で周知である。ラジオイムノアッセイは、例えば、<sup>1 2 5</sup>I - 標識された一次または二次抗体( H a r l o w およびLane 、前掲、1 9 8 8 年)を用いて実施され得る。

20

#### 【0067】

検出可能な試薬からのシグナルは、例えば、発色基質からの色を検出するための分光光度計；<sup>1 2 5</sup>I の検出のためのカウンターなどの、放射線を検出するための放射線カウンター；またはある特定の波長の光の存在下で蛍光を検出するための蛍光光度計を使用して分析され得る。酵素結合型アッセイが使用される場合には、標的分子の量の定量的分析が、E M A X M i c r o p l a t e R e a d e r ( M o l e c u l a r D e v i c e s ; M e n l o P a r k , C a l i f . ) などの分光光度計を製造業者の使用説明書に従って使用して実施され得る。本発明のアッセイは、必要に応じて、自動化またはロボット制御で実施することができ、さらに複数の試料からのシグナルを同時に検出することができる。

30

#### 【0068】

いくつかの実施形態では、標的分子を検出および／または測定するために、必要に応じて自動化され得るキャピラリー電気泳動をベースとするイムノアッセイ( C E I A )が使用され得る。イムノアッセイはまた、例えば、各々、参照によりその全文が組み込まれるS c h m a l z i n g およびN a s h a b e h , E l e c t r o p h o r e s i s 1 8 卷：2 1 8 4 ~ 9 3 頁( 1 9 9 7 年) およびB a o , J . C h r o m a t o g r .

40

B . B i o m e d . S c i . 6 9 9 卷：4 6 3 ~ 8 0 頁( 1 9 9 7 年) に記載されるようなレーザー誘導性蛍光とともに使用され得る。本明細書において提供されるある特定の方法に従って、標的分子を検出するために、または標的分子のレベルを決定するために、フローインジェクションリポソームイムノアッセイおよびリポソームイムノセンサーなどのリポソームイムノアッセイもまた使用され得る( 参照によりその全文が組み込まれる、R o n g e n l a 、( 1 9 9 7 年) J . I m m u n o l . M e t h o d s 2 0 4 卷：1 0 5 ~ 1 3 3 頁)。

#### 【0069】

ある特定の実施形態では、サンドイッチ酵素イムノアッセイも有用であり得る。2 抗体サンドイッチアッセイでは、一次抗体が固相支持体と結合され、抗原が、一次抗体と結合することが許可される。それと結合する二次抗体の量を測定することによって、標的分子の量が定量化される。

#### 【0070】

本明細書において提供される方法において、標的分子を検出するために、または標的分子のレベルを決定するために、定量的ウエスタンブロッティングも使用され得る。ウエス

50

タンプロットは、走査デンシトメトリーなどの周知の方法によって定量化され得る。一例として、タンパク質試料が、10% SDS-PAGE Laemmli ゲルで電気泳動される。例えば、標的分子に対する一次マウスモノクローナル抗体がプロットと反応させられ、予備的スロットプロット実験を使用して、抗体結合が直線的であることが確認される。二次抗体としてヤギ抗マウス西洋ワサビペルオキシダーゼ結合型抗体 (Biorad) が使用され、シグナル検出は、化学発光、例えば、Renais sance 化学発光キット (New England Nuclear; Boston, Mass.) を、製造業者の使用説明書に従って使用して実施される。プロットのオートラジオグラフが、走査デンシトメーター (Molecular Dynamics; Sunnyvale, Calif.) を使用して分析され、陽性対照に対して正規化される。値は、例えば、実測値対陽性対照の間の比 (濃度測定指數) として報告される。このような方法は、例えば、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる、Parral, J. Vasc. Surg. 28巻: 669~675頁 (1998年) に記載されるように、当技術分野で周知である。

10

## 【0071】

本明細書に記載されるように、標的分子を検出するためまたは標的分子のレベルを決定するためのいくつかの実施形態では、例えば、酵素結合免疫吸着法、ラジオイムノアッセイおよび定量的ウエスタン分析を含めたイムノアッセイは有用であり得る。このようなアッセイは、通常、1種または複数の抗体に依存する。当業者には理解されるであろうが、本明細書に記載された方法を使用して、翻訳後修飾の代替形態を有するタンパク質、例えば、リン酸化タンパク質およびグリコシリ化タンパク質を容易に区別できる。

20

## 【0072】

タンパク質標的分子などの標的分子は、さまざまな方法によって特性決定され得る。タンパク質、ポリペプチドおよびペプチドは、タンパク質沈殿、クロマトグラフィー (例えば、逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー)、親和性捕獲および分画抽出 (differentia l extractions) などの当技術分野で周知のさまざまな方法によって単離され得る。

20

## 【0073】

単離タンパク質は、酵素消化または化学的切断を受けて、ポリペプチド断片およびペプチドを生じ得る。このような断片は、同定および定量され得る。ポリペプチド/ペプチド断片およびその他の標的分子の分析にとって特に有用な方法は、質量分析である (参照によりその全文が組み込まれる、米国特許出願第20100279382号)。各試料中に含有されるタンパク質を同定し、試料にわたって同定されたタンパク質各々の相対的存在量を決定する、いくつかの質量分析ベースの定量的プロテオミクス法が開発されている (各々、参照によりその全文が組み込まれる、Floryら、Trends Biotechnol. 20巻: S23~29頁 (2002年)、Aebersold、J. Am. Soc. Mass Spectrom. 14巻: 685~695頁 (2003年)、Aebersold、J. Infect. Dis. 187巻付録2: S315~320頁 (2003年)、Patterson および Aebersold、Nat. Genet. 33巻付録、311~323頁 (2003年)、Aebersold および Mann、Nature 422巻: 198~207頁 (2003年)、Aebersold, R. および Cravatt、Trends Biotechnol. 20巻: S1~2頁 (2002年)、Aebersold および Goodlett、Chem. Rev. 101巻、269~295頁 (2001年)、Tao および Aebersold、Curr. Opin. Biotechnol. 14巻: 110~118頁 (2003年))。一般に、各試料中のタンパク質は、その起源の試料を同定し、正確な質量分析的定量の基礎を提供する同位体識別特性を獲得するよう標識される。次いで、異なる同位体識別特性を有する試料が組み合わされ、通常、多次元的クロマトグラフィータンデム質量分析によって分析される。次いで、得られた衝突誘起解離 (CID) スペク

30

40

および Mann、Nature 422巻: 198~207頁 (2003年)、Aebersold, R. および Cravatt、Trends Biotechnol. 20巻: S1~2頁 (2002年)、Aebersold および Goodlett、Chem. Rev. 101巻、269~295頁 (2001年)、Tao および Aebersold、Curr. Opin. Biotechnol. 14巻: 110~118頁 (2003年))。一般に、各試料中のタンパク質は、その起源の試料を同定し、正確な質量分析的定量の基礎を提供する同位体識別特性を獲得するよう標識される。次いで、異なる同位体識別特性を有する試料が組み合わされ、通常、多次元的クロマトグラフィータンデム質量分析によって分析される。次いで、得られた衝突誘起解離 (CID) スペク

50

トルが、ペプチド配列に割り当てられ、同一配列の異なって同位体標識されたペプチドの相対シグナル強度に基づいて、各試料中の検出されたタンパク質各々の相対的存在量が算出される。

#### 【0074】

標的分子を同定および定量するためのさらなる技術、標識を含まない定量的プロテオミクス法。このような方法は、(i)タンパク質抽出、還元、アルキル化および消化を含めた試料調製、(ii)液体クロマトグラフィー(LCまたはLC/LC)およびMS/MSによる分析による試料分離、(iii)ペプチド/タンパク質同定、定量および統計分析を含めたデータ分析を含む。各試料は、別個に調製され、次いで、個別のLC-MS/MSまたはLC/LC-MS/MS実施に付され得る(参照によりその全文が組み込まれる、Zhu W.ら、J. of Biomedicine and Biotech. (2010年) Article ID 840518、6頁)。1種の例示的技術として、ペプチドの質量に、ペプチド配列を独特に規定するペプチド特性としてのその対応するクロマトグラフ溶出時間が加味される、LC-MS、精密質量および時間(AMT)タグアプローチと呼ばれる方法が挙げられる。クロマトグラフおよび高質量精度情報を得るためにフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴を加えたLC(LC-FTICR)MSを使用して、AMTタグを、データベースに保存されたこれまでに獲得されたLC-MS/MS配列情報と対応させることによって、ペプチド配列が同定され得る。測定されたペプチドのピーク面積とその存在量の間で観察される線形相関を利用することによって、これらのペプチドは、MS実施間で比較されるその対応するピークのシグナル強度比によって相対的に定量され得る(参照によりその全文が組み込まれる、Tang, K.ら、(2004年) J. Am. Soc. Mass Spectrom. 15巻: 1416~1423頁、およびChelius, D.およびBondarenko, P. V. (2002年) J. Proteome Res. 1巻: 317~323頁)。スチュードントのt検定などの統計ツールを使用して、各試料の複数のLC-MS実施から得られるデータが分析され得る(参照によりその全文が組み込まれる、Wiener, M. C.ら、(2004年) Anal. Chem. 76巻: 6085~6096頁)。試料間の存在量の統計的に有意な差を有するペプチドを検出するために、獲得時間およびm/zの各点で、複数のLC-MS実施から得られたシグナル強度の振幅が、2種の試料間で比較され得る。

#### 【0075】

理解されるであろうが、ポリペプチド/ペプチド断片を同定および/または定量するための方法では、さまざまな質量分析システムが使用され得る。高質量精度、高感度および高解像度を有する質量分析器として、イオントラップ、トリプル四重極および飛行時間型、四重極飛行時間型質量分析計およびフーリエ変換イオンサイクロトロン質量分析器(FT-ICR-MS)が挙げられる。質量分析計は、通常、マトリックス支援レーザー脱離(MALDI)またはエレクトロスプレーイオン化(ESI)イオン源を備えているが、ペプチドイオン化のその他の方法も使用され得る。イオントラップMSでは、分析物は、ESIまたはMALDIによってイオン化され、次いで、イオントラップ中に入れられる。次いで、トラップされたイオンは、イオントラップからの選択的放出の際にMSによって別個に分析され得る。また、断片が、イオントラップ中で作製され、分析され得る。放出されたポリペプチド/ペプチド断片などの試料分子が、例えば、MALDI-TOFまたはESI-TOFシステムを備えたシングルステージ型質量分析によって分析され得る。質量分析の分析方法は、当業者には周知である(例えば、各々、参照によりその全文が組み込まれる、Yates, J. (1998年) Mass Spect. 33巻: 1~19頁、KinterおよびSherman、(2000年) Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry、John Wiley & Sons、New York、ならびにAebersoldおよびGoodlett、(2001年) Chem. Rev. 101巻: 269~295頁参照のこと)。

10

20

30

40

50

高解像度ポリペプチド断片分離のために、液体クロマトグラフィー E S I - M S / M S または分離方法としてキャピラリー逆相クロマトグラフィーを利用する自動化 L C - M S / M S が使用され得る（参照によりその全文が組み込まれる、Y a t e s ら、M e t h o d s M o l . B i o l . 1 1 2 卷：5 5 3 ~ 5 6 9 頁（1 9 9 9 年））。質量分析法として、動的排除を用いるデータ依存性衝突誘起解離（C I D）も使用され得る（参照によりその全文が組み込まれる、G o o d l e t t ら、A n a l . C h e m . 7 2 卷：1 1 1 2 ~ 1 1 1 8 頁（2 0 0 0 年））。

#### 【0 0 7 6】

ペプチドが M S / M S によって分析されると、得られた C I D スペクトルを、単離ペプチドの同一性の決定のためにデータベースに対して比較できる。単一ペプチドを使用するタンパク質同定のための方法は、これまでに記載されている（各々、参照によりその全文が組み込まれる、A e b e r s o l d および G o o d l e t t 、C h e m . R e v . 1 0 1 卷：2 6 9 ~ 2 9 5 頁（2 0 0 1 年）、Y a t e s , J . M a s s S p e c . 3 3 卷：1 ~ 1 9 頁（1 9 9 8 年）、D a v i d N . ら、E l e c t r o p h o r e s i s 、2 0 卷 3 5 5 1 ~ 6 7 頁（1 9 9 9 年））。特に、ペプチドが親ポリペプチドの独特の識別特性を提供する場合には、1 種または 2 、3 種のペプチド断片を使用して、断片が由来した親ポリペプチドを同定できるということがあり得る。さらに、単独またはグリコシル化の部位についての知識と組み合わせた、単一ペプチドの同定を使用して、グリコペプチド断片が由来した親のグリコポリペプチドを同定できる。理解されるであろうが、M S を含む方法を使用して、タンパク質、その断片ならびにその他の種類の本明細書に記載された標的分子を特性決定できる。

10

20

30

#### 【0 0 7 7】

いくつかの実施形態は、タンパク質および／または G L F のタンパク質画分を濃縮することを含み得る。例示的方法は、タンパク質沈殿、逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーならびに親和性捕獲、分画抽出法および遠心分離を含み得る。トップダウンプロテオミクスなどの無処理タンパク質法または S D S - P A G E などのゲルクロマトグラフィーを使用して、タンパク質および／またはタンパク質画分をさらに検査することができる。

#### 【0 0 7 8】

いくつかの実施形態は、グリコシル化タンパク質および／もしくはグリカンを含む標的分子を同定すること、その有無を決定すること、ならびに／または標的分子を定量することを含む。グリコシル化タンパク質およびグリカンは、当技術分野で周知の種々の方法によって分析され得る。グリコシル化の変化は、疾患または疾患状況を示し得る。したがって、特定の標的分子は、特定のグリコシル化タンパク質および／またはグリカンを含み得る。理解されるであろうが、グリカンは、糖タンパク質、プロテオグリカンまたは他のグリカン含有化合物の構成成分であり得る。

40

#### 【0 0 7 9】

いくつかの実施形態は、代謝産物を含む標的分子を同定すること、その有無を決定すること、および／または標的分子を定量することを含む。代謝産物は、G L F または糞便試料中で、さまざまな方法を使用して分析され得る。例えば、G L F または糞便試料は、クロマトグラフィーなどの方法を使用して代謝産物について分析され得る。メタボロームのいくつかの構成成分は、胆汁酸および他の小さい有機化合物を含む。代謝産物は、G L F または糞便試料中に存在するペプチドを含み得る。

50

#### 【0 0 8 0】

##### バイオマーカーを同定するための方法

いくつかの実施形態では、G L F または糞便試料中で検出される標的分子を、評価して、それらが、疾患または生理学的状況などの特定の状態と関連しているバイオマーカーであるかどうかを決定できる。このようなバイオマーカーは、特定の疾患、疾患素因、予後、特定の治療計画に対する正の応答または特定の治療計画に対する負の応答を示し得る。

50

いくつかの実施形態では、バイオマーカーの有無またはそのレベルが、疾患または生理学的状況などの特定の状態と関連している場合がある。いくつかの実施形態では、バイオマーカーの有無またはそのレベルを、疾患または生理学的状況などの特定の状態と統計的に相互に関連付けることができる。いくつかの実施形態では、生理学的状況は、疾患を含み得る。いくつかの実施形態では、疾患または生理学的状況などの状態を有する被験体におけるバイオマーカーの発現のレベルを、状態または生理学的状況を有さない被験体におけるバイオマーカーの発現のレベルと比較することによって、バイオマーカーを疾患または生理学的状況などの特定の状態と相互に関連付けることができる。

#### 【0081】

いくつかの実施形態では、状態を有さない被験体におけるバイオマーカーの発現と比較した、状態を有する被験体におけるバイオマーカーの差次的発現は、状態または生理学的状況を示す。本明細書において、「差次的発現」とは、疾患または生理学的状況などの状態を有する被験体と疾患または生理学的状況などの状態を有さない被験体におけるバイオマーカーの発現レベルの差を指す。例えば、用語「差次的発現」は、状態または生理学的状況を有さない被験体と比較した、疾患または生理学的状況などの状態を有する被験体におけるバイオマーカーの有無を指し得る。いくつかの実施形態では、差次的発現は、疾患または生理学的状況などの状態を有さない被験体におけるバイオマーカーの発現のレベルと比較した、疾患または生理学的状況などの状態を有する被験体におけるバイオマーカーの発現レベルの差を指し得る。

#### 【0082】

バイオマーカーのレベルの差は、本明細書において提供された方法を使用して、バイオマーカーの発現の量またはレベルを測定することによって決定できる。いくつかの実施形態では、差次的発現は、状態または生理学的状況を有するか、または有さない参照被験体／集団間の、1種または複数のバイオマーカー生成物のレベルの比として決定でき、ここで、比は、統計的に有意である。集団間の差次的発現は、p値の閾値として統計的に有意であると決定できる。統計的有意性を決定するためにp値を使用する場合には、バイオマーカー、p値は、0.2未満であることが好ましい。別の実施形態では、p値が、0.15、0.1、0.05、0.01、0.005、0.0001など未満である場合に、バイオマーカーは差次的に発現されると同定される。比に基づいて差次的発現を決定する場合には、バイオマーカー生成物は、第2の試料と比較した、第1の試料における発現のレベルの比が、1.0より大きいか、1.0未満である場合に差次的に発現される。例えば、1.0より大きい比として、例えば、1.1、1.2、1.5、1.7、2、3、4、10、20などより大きい比が挙げられる。1.0未満の比として、例えば、0.9、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05など未満の比が挙げられる。別の実施形態では、バイオマーカーは、第2の集団の発現の平均レベルと比較した、第1の集団の発現のレベルの平均の比が、1.0より大きいか、1.0未満である場合に差次的に発現され得る。例えば、1.0より大きい比として、1.1、1.2、1.5、1.7、2、3、4、10、20などより大きい比が挙げられ、1.0未満の比として、例えば、0.9、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05など未満の比が挙げられる。別の実施形態では、バイオマーカーは、第2の集団の平均と比較した、第1の試料における発現のレベルの比が、1.0より大きいか、1.0未満である場合に、差次的に発現され、例えば、1.1、1.2、1.5、1.7、2、3、4、10、20より大きい比または1未満、例えば、0.9、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05の比が挙げられる。

#### 【0083】

いくつかの実施形態では、バイオマーカーは、状態または生理学的状況を有する少なくとも1種の試験被験体から得られた試験G L Fまたは試験糞便試料および状態または生理学的状況を有さない少なくとも1種の対照被験体から得られた対照G L Fまたは対照糞便試料中の少なくとも1種の標的分子のレベルを測定することと、試験G L Fまたは試験糞便試料中の少なくとも1種の標的分子のレベルを、対照G L Fまたは対照糞便試料中の少

10

20

30

40

50

なくとも 1 種の標的分子のレベルと比較することによって同定され得、ここで、少なくとも 1 種の標的のレベルにおける有意差が、バイオマーカーを同定する。いくつかの実施形態は、状態または生理学的状況を有する複数の試験被験体から得られた試験 G L F または試験糞便試料および状態または生理学的状況を有さない複数の対照被験体から得られた対照 G L F または対照糞便試料中の複数の標的分子を測定および比較することを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 または 100 種の標的分子が測定および比較され得る。いくつかの実施形態では、G L F または糞便試料は、少なくとも 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 または 100 種の試験被験体から得られる場合がある。いくつかの実施形態では、G L F または糞便試料は、少なくとも 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 または 100 種の対照被験体から得られる場合がある。いくつかの実施形態では、対照 G L F または対照糞便試料と比較した、試験 G L F または試験糞便試料における標的分子のレベルにおける有意差は、統計的に有意であり得る。

10

#### 【0084】

##### キット

本明細書において提供された方法および組成物のいくつかの実施形態は、G L F または糞便試料中の標的分子を検出するため、G L F または糞便試料中の標的分子の有無を決定するため、G L F または糞便試料中の標的分子を定量するため、または G L F または糞便試料中の標的分子を同定するためのキットに関する。いくつかのこのようなキットは、被験体に経口投与するための洗浄組成物を含み得る。いくつかの実施形態では、洗浄液は、ポリエチレングリコール、硫酸マグネシウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、クエン酸マグネシウムおよびビサコジルなどの成分を含み得る。いくつかの実施形態では、洗浄液は、場合により、ビサコジルまたはアスコルビン酸も含めた電解質溶液とともにポリエチレングリコールを含み得る（例えば、GOLYTELY、HALFLYTELY、NULLYTELY、MOVIPREP）。いくつかの実施形態では、洗浄液は、リン酸塩（例えば、FLEET の PHOSPHO-SODA）を含み得る。いくつかの実施形態では、洗浄液は、硫酸ナトリウム、硫酸マグネシウムまたは硫酸カリウムなどの硫酸塩を含み得る（例えば、SUPREP）。いくつかの実施形態では、洗浄液は、クエン酸マグネシウムを含み得る。いくつかの実施形態では、洗浄液は、ピコスルファートナトリウムを含み得る。

20

#### 【0085】

いくつかの実施形態では、キットはまた、被験体から G L F および / または糞便試料を収集するための容器を含み得る。G L F を収集するための容器は、G L F または糞便試料などを捕獲するトイレ用挿入物を含み得る。いくつかの実施形態では、容器は、1 種または複数の単離プロテアーゼ阻害剤などの標的分子を安定化および / または保存するための材料を含み得る。いくつかの実施形態では、容器は、標的分子を検出するため、標的分子の有無を決定するため、標的分子を定量するため、または標的分子を同定するための薬剤を含み得る。

30

#### 【0086】

##### 疾患

本明細書において提供される方法および組成物のいくつかの実施形態は、特定の疾患の診断、予後に関する。いくつかの実施形態は、G I 管およびそれと関連している器官と関連している疾患および障害を含む。例示的疾患として、G I 管およびそれと関連している器官の癌、例えば、胃癌、肝臓癌、脾臓癌が挙げられる。疾患のさらなる例として、脾炎、脾臓腺癌、胃腸神経内分泌腫瘍、胃腺癌、結腸腺癌、肝細胞癌腫、胆管癌、胆囊腺癌（adenocarcinoma）、潰瘍性大腸炎およびクローニング病が挙げられる。いくつかの疾患は、炎症性腸疾患（IBD）に関する。本明細書において、用語「炎症性腸疾患」とは、胃腸管の少なくとも一部の炎症を特徴とする広範なクラスの疾患を指し得る。

40

50

I B D 症状は、腸管の炎症を含み、腹部の筋痙攣および持続性の下痢をもたらし得る。炎症性腸疾患として、潰瘍性大腸炎（U C）、クローン病（C D）、不確定大腸炎、慢性大腸炎、不連続または斑状疾患、回腸炎症、結腸外炎症、破裂した陰窩に応じた肉芽腫性炎症、アフタ性潰瘍、貫壁性炎症、顕微鏡的大腸炎、憩室炎および空置性大腸炎が挙げられる。疾患のさらなる例として、セリアックスプルー、吸収不良障害ならびに消化管、肝臓、胰臓および胆樹のその他の状態が挙げられる。

#### 【0087】

本明細書において提供された方法および組成物のいくつかの実施形態は、治療（個別化医薬と呼ばれることが多い）の選択、治療に対する被験体の正の応答、治療に対する負の応答または治療に対する応答がないことを決定することに関する。いくつかのこのような実施形態は、治療計画に対する患者の部分的応答を決定することを含む。例えば、最初の時点で、被験体から得られた G L F または糞便試料において、バイオマーカーの存在、バイオマーカーの不在またはバイオマーカーのレベルが決定され得る。治療が始まったおよび／または治療が完了した後の第2の時点で、被験体から得られた G L F または糞便試料においてバイオマーカーの存在、バイオマーカーの不在またはバイオマーカーのレベルが決定され得る。第1の時点から得られた G L F または糞便試料におけるバイオマーカーの存在、バイオマーカーの不在またはバイオマーカーのレベルと比較した、第2の時点での G L F または糞便試料におけるバイオマーカーの存在、バイオマーカーの不在またはバイオマーカーのレベルの差が、治療に対する被験体の正の応答、治療に対する負の応答、治療に対する部分的応答または治療に対する応答がないことを示し得る。あるいは、被験体は、治療計画を与えられ、正の応答、負の応答、部分的応答を有するか、または応答を有さないと分類され得る。各被験体群の標的分子の存在、不在またはレベルが決定され得、応答の各カテゴリーと統計的に有意な関連を有する標的分子が同定され得る。いくつかの実施形態はまた、以前のまたは現在の治療計画に対する被験体の正の応答、負の応答、部分的応答または応答がないことの決定を考慮して、被験体に提供される将来の治療計画を決定することも含む。したがって、以前のまたは現在の治療計画は、本明細書において提供された方法によって行われた決定に基づいて改変され得る。

10

20

30

40

#### 【0088】

さらなる実施形態は、複数のバイオマーカーを評価することによって、被験体の生理学的状況を決定するための方法を含む。いくつかのこのような方法は、複数のバイオマーカーの存在、不在および／またはレベルを決定することを含む。複数のバイオマーカーの存在、不在および／またはレベルは、被験体の疾患を発症する尤度および／または特定の疾患を治療するための治療計画に対する被験体の起こり得る応答などの被験体の生理学的状況の尤度と相互に関連付けられ得る。いくつかのこのような方法では、複数のバイオマーカーの存在、不在および／またはレベルを相互に関連付けて、被験体が疾患有するか、疾患を発症する尤度を決定することによって、被験体の「臨床的リスクスコア」が決定され得る（例えば、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる、S o o n m y u n g P . ら、（2004年）N e w E n g . J . o f M e d i c i n e 3 5 1 卷：2 8 1 7 ~ 2 8 2 6 頁、およびC h o C . S . ら、（2008年）J . A m . C o l l . S u r g . 2 0 6 卷：2 8 1 ~ 2 9 1 頁参照のこと）。

#### 【0089】

本発明は、明確さおよび理解を目的として、幾分か詳細に記載されたが、当業者ならば、形態および詳細の種々の変更は、本発明の真の範囲から逸脱することなく行われ得ると理解するであろう。

#### 【実施例】

#### 【0090】

##### （実施例1）

###### 硫酸塩ベースの G L F のプロテオミクス解析

この解析では、硫酸塩ベースの G L F の、プロテオミクス解析を支援する能力を評価した。硫酸塩ベースの洗浄組成物を使用して得ている G L F において標的分子を同定するた

50

めに、S U P R E P を 3 人のヒト被験体に投与し、得られた G L F 中のタンパク質を、質量分析によって解析した。この実施例では、G L F は、大腸内視鏡検査手順の一部として被験体から収集した。

#### 【 0 0 9 1 】

収集の際に、完全プロテアーゼ阻害剤錠 (R O C H E ) を添加し、試料を 1 0 0 0 r p m 、 4 で 3 0 分間回転させた。上清を、 1 4 , 0 0 0 × g で 3 0 分間再度回転させて、細菌および細片をペレットにした。 1 . 8 m l の上清を、 6 容量のアセトンを用いて沈殿させ、続いて、等容量のクロロホルムを用いて抽出し、続いて、 C - 2 逆相 S P E カラム (S e p - P a k 、 W a t e r s ) で分離した。 0 . 1 % T r i f u r o l i c 酸 (T F A ) 、 0 . 1 % T F A 中、 1 0 % 、 2 0 % および 3 0 % A c e t o n i t r i l e (A C N ) の各々、 3 カラム容量を用いてカラムを洗浄し、 0 . 1 % T F A 中の、 6 0 % A C N の 3 カラム容量を用いて溶出した。試料を遠心分離凍結乾燥によって乾燥させ、 1 0 0 μ l の 5 0 m M 重炭酸アンモニウム / 1 0 m M トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィンに再懸濁し、 1 0 m M の配列決定等級トリプシン (P r o m e g a 、 M a d i s o n 、 W I ) 2 μ l を用いて消化した。

10

#### 【 0 0 9 2 】

データは、 L C システムからの入力を使用して L T Q - O r b i t r a p 質量分析計で獲得した。 A 溶媒は、 3 % の B および水中、 0 . 2 % のギ酸を含有していた。 B 溶媒は、 3 % の A およびアセトニトリル中、 0 . 2 % のギ酸を含有していた。溶媒は、 F i s h e r 製の H P L C 等級とした。 1 2 0 分の実施のために、出発溶媒は、 5 % B とし、 7 分間そのままである。勾配は、 1 3 分までに 1 0 % に、 8 3 分までに 4 0 % に、 1 0 3 分までに 9 0 % に変更し、次いで、 1 1 1 分で 9 0 % から 5 % に低下させた。次いで、それを次の注入のために再平衡化させた。再現性決定のために各試料について 3 回の注入を実施した。

20

#### 【 0 0 9 3 】

M S は、毎秒 4 0 0 m / z ~ 2 0 0 0 m / z の質量範囲にわたってスキャンし (O r b i t r a p ) 、 L T Q ( T r a p ) は、最大 5 M S M S (ペプチド配列) スペクトルを並行して獲得した。データは、標準 T h e r m o X c a l i b u r ソフトウェアを使用して獲得した。 M S データ (O r b i t r a p ) は、 2 ~ 3 p p m まで安定であり、バックグラウンドイオンは、質量ドリフト評価のために使用された。 M S M S データ (L T Q ) は、およそ 0 . 6 D a まで測定したが、親の質量は、低 p p m O r b i t r a p データから獲得した。ペプチドは、 C 1 8 L C カラムから、データの信頼性および再現性を確実にするために 3 連の注入を使用して溶出した。検索ファイルは、各洗浄調製物 (患者試料) からの 3 連の注入から作成し、 X c a l i b u r および M a s c o t ソフトウェアパッケージの組合せを使用して M G F (M a s c o t G e n e r i c F o r m a t ) ファイルに変換した。

30

#### 【 0 0 9 4 】

データベース検索は、ヒト (h o m o s a p i e n s ) として特定された生物分類学、親イオンについて (M S ) 1 0 p p m および断片イオンについて (M S / M S ) 0 . 6 D a の質量精度を用い、 R e f S e q データベース (h t t p : / / w w w . n c b i . n l m . n i h . g o v / R e f S e q / ) に対して M a s c o t 検索エンジン (M a t r i x S c i e n c e 、 U K ) を使用して行い、「酵素ではない」が選択された。試料における、検査されているペプチドを修飾または末端切断し得る消化酵素の存在のために、酵素特異性を用いない検索を実施した。 R e f S e q データベースは、 S w i s s P r o t タンパク質データベース中に含まれる抗体配列の付加によって補完したが、その理由は、これらの抗体配列が、標準 R e f S e q リストの一部ではないからである。

40

#### 【 0 0 9 5 】

高い M a s c o t スコアほど、良好なタンパク質ヒットを示し、相対タンパク質レベルと相互に関連付けられ得る。「 > 4 0 」というスコア閾値は、酵素特異性を用いないこのデータベースの検索に基づいて M a s c o t スコアリングシステムによって決定されるよ

50

うな  $p < 0.05$  という  $p$  値有意性を示し； $40$  というスコアは、 $p < 0.01$  と一致する。M S / M S 複数回の間にサンプリングされたとしても、検出される各ペプチドの最高スコアのみが付加される標準 M a s c o t スコアリングを使用した。含まれるすべてのデータについて、スコアは、タンパク質系統あたり少なくとも 1 種の試料において、すべて  $> 40$  であった。さらなる信頼のために、有意なペプチドの数も報告し、少なくとも 2 種のペプチドという最低基準が選択された。極めて少ないものが 3 未満のペプチドを有していた。カウントされたすべての有意なペプチドが、そのそれぞれのタンパク質に由来する異なる配列（個々のペプチド）に相当していた。スコアおよび有意なペプチドの数は、形式  $x / y$  で報告される（式中、 $x$  は、スコアであり、 $y$  は、有意なペプチドの数である）。特定の試料においてタンパク質が検出されなかった場合には、「N D」として列挙されている。タンパク質は、タンパク質名として報告され、N C B I のタンパク質データベースによって定義される「g i」番号が提供された。本願を通じて列挙された N C B I データベースにおいて「g i」番号の各々の中に含有される配列は、参照により本明細書に組み込まれる。タンパク質が、ブレタンパク質またはその他の非成熟形態で名付けられる場合には、シグナル配列の除去および翻訳後修飾の付加などの変更を含めてタンパク質の成熟形態も等しく暗示される。すべての場合において、タンパク質は、一貫性を提供するためにその遺伝子由来配列によって名付けられた。

10

20

## 【0096】

表 1 は、上記の形式で示される、患者 3、4 および 6 として定義される 3 人の別個の患者から得られた G L F において同定された最も豊富なタンパク質の例を列挙する。表 1 からわかるように、多数のタンパク質が、G L F から同定され得、これらのうち多数が、膵臓と関連している可能性がある。その他のタンパク質は、結腸癌およびその他の癌と関連している可能性がある D M B T 1 ( g i 番号 1 4 8 5 3 9 8 4 0 ) を含む。抗体および推定グリコシル化タンパク質も同定された。

## 【0097】

【表 1 - 1】

表 1

NCBI gi 番号	タンパク質	Mascot スコア/ 有意なペプチドの数		
		サンプル 3	サンプル 4	サンプル 6
10835000	膵臓リバーゼ前駆体	2224 / 24	1238 / 13	2926 / 34
4506147	プロテアーゼセリン 2 プレプロタンパク質	665 / 7	46 / 0	1189 / 11
4506145	プロテアーゼセリン 1 プレプロタンパク質	239 / 2	64 / 0	1002 / 11
29725633	再生島由来 1 $\alpha$ 前駆体	231 / 2	132 / 1	802 / 6
6679625	エラスターーゼ 3B 脇臓プレプロタンパク質	852 / 12	1144 / 11	772 / 8
236460050	エラスターーゼ 3A 脇臓プレプロタンパク質	1291 / 17	1306 / 14	769 / 7
118498350	キモトリプシン B2	945 / 10	244 / 2	724 / 6
15559207	エラスターーゼ 2A プレプロタンパク質	752 / 10	952 / 8	593 / 6
54607080	膵臓カルボキシペプチダーゼ B1 プレプロタンパク質	702 / 9	84 / 1	499 / 4
50363217	セリンプロテイナーゼ阻害剤クレード A メンバー-1	655 / 9	406 / 3	490 / 2
10280622	アミラーゼ膵臓 $\alpha$ -2B 前駆体	ND	ND	388 / 2
4505847	ホスホリバーゼ A2 群 IB	258 / 3	639 / 8	384 / 5
4502085	膵臓アミラーゼ $\alpha$ 2A 前駆体	95 / 1	193 / 3	365 / 2
4502997	カルボキシペプチダーゼ A1 前駆体	454 / 4	88 / 1	349 / 5
62526043	キモトリプシン C プレプロタンパク質	696 / 9	440 / 3	343 / 4
148539840	悪性脳腫瘍で欠失 1 アイソフォーム a 前駆体 (DMBT1)	88 / 1	101 / 1	280 / 3
31377806	ポリマー免疫グロブリン受容体前駆体	566 / 7	ND	279 / 3

10

20

30

40

【0098】

【表1-2】

NCBI gi 番号	タンパク質	Mascot スコア/ 有意なペプチドの数		
		サンプル 3	サンプル 4	サンプル 6
41152086	セリン(またはシステイン)プロテイナーゼ阻害剤クレード B(オボアルブミン)メンバー6	ND	269 / 3	276 / 2
148539842	悪性脳腫瘍で欠失 1 アイソフォーム b 前駆体	ND	ND	275 / 3
4507149	スーパーオキシドジスムターゼ 1 可溶性	ND	87 / 1	253 / 3
113584	RecName:Full=Ig $\alpha$ -1鎖 C 領域	940 / 10	53 / 1	204 / 2
125145	RecName:Full=Ig $\kappa$ 鎖 C 領域	659 / 9	106 / 1	180 / 1
98986445	癌胎児性抗原関連細胞接着分子 5 プレプロタンパク質	ND	219 / 3	135 / 0
218512088	RecName:Full=Ig $\alpha$ -2鎖 C 領域	886 / 9	ND	ND
119395750	ケラチン 1	ND	499 / 7	ND
55956899	ケラチン 9	ND	395 / 3	ND

## 【0099】

別の実験では、被験体に SUPREP を、製造業者のガイドラインに従って投与し、得られた GLF は、被験体によって、大腸内視鏡検査の直前にトイレの中に入れられた収集容器中に自己収集された。GLF のプロテオームは上記のように MS によって解析された。存在する最も豊富な種の Mascot スコアを示す結果が表 2 にまとめられている。結果は、幾つかの尿の混入を示した。大腸内視鏡検査の際に続いて収集された試料について、同様のプロテオミクスプロファイルが観察された。表 2 は、被験体によって収集された GLF において多数の異なるタンパク質が同定されたことを示す。同定されたタンパク質は、表 1 中のデータと一致して、DMBT1、臍臍タンパク質および抗体を含んでいた。

## 【0100】

10

20

30

## 【表2-1】

表2

NCBI gi番号	タンパク質	Mascotスコア/有意なペプチドの数
		サンプル25
148539842	悪性脳腫瘍で欠失1アイソフォームb前駆体	1184 / 13
119395750	ケラチン1	742 / 9
10835000	膵臓リバーゼ前駆体	538 / 8
113584	RecName:Full=Ig α-1鎖C領域	506 / 6
31377806	ポリマー免疫グロブリン受容体前駆体	474 / 5
98986445	癌胎児性抗原関連細胞接着分子5プレプロタンパク質	424 / 5
125817	RecName:Full=Ig κ鎖V-III領域HAH;Flags:前駆体	382 / 5
125797	RecName:Full=Ig κ鎖V-III領域SIE	341 / 5
54607080	膵臓カルボキシペプチダーゼB1プレプロタンパク質	340 / 5
236460050	エラスターーゼ3A膵臓プレプロタンパク質	328 / 4
125145	RecName:Full=Ig κ鎖C領域	327 / 5
4502027	アルブミンプレプロタンパク質	319 / 3
33456	免疫グロブリンM鎖	239 / 3
118498350	キモトリプシンB2	238 / 3
125811	RecName:Full=Ig κ鎖V-III領域VG;Flags:前駆体	237 / 3
123843	RecName:Full=Ig 重鎖V-III領域VH26;Flags:前駆体	219 / 3
157266300	膜アラニンアミノペプチダーゼ前駆体	213 / 3

【0101】

【表2-2】

NCBI gi 番号	タンパク質	Mascot スコア/有意なペプチドの数
		サンプル 25
563454	Ig 重鎖(VH4)V 領域(VDJ)	206 / 3
125788	RecName:Full=Ig κ 鎖 V-II 領域 TEW	202 / 3
4506147	プロテアーゼセリン 2 プレプロタンパク質	177 / 3
125809	RecName:Full=Ig κ 鎖 V-III 領域 CLL; AltName:Full=リウマチ因子;Flags:前駆体	149 / 3

## 【0102】

前述の解析は、硫酸塩ベースの G L F を使用して得られた試料では、多数の標的分子が検出され得るということを実証する。

## 【0103】

## (実施例2)

## ポリエチレングリコールベースの G L F のプロテオミクス解析

この解析では、ポリエチレングリコールベースの G L F の、プロテオミクス解析を支援する能力を評価した。ポリエチレンベースの洗浄組成物を使用して得ている G L F において標的分子を同定するために、ポリエチレングリコールベースの洗浄組成物を 2人のヒト被験体に投与し、得られた G L F 中のタンパク質を、実施例 1 に記載されるように質量分析によって解析した。ポリエチレングリコールの除去は、洗浄液のクロロホルム抽出によって大部分が達成された。ポリエチレングリコールベースの洗浄組成物を投与されたこれらの被験体から得られた G L F において、多数の異なるタンパク質が同定された。これまでの表において観察されたものと一致している、同定された最も豊富な同定されたタンパク質の例が、表 3 に示されている。

## 【0104】

10

20

30

## 【表3】

表3

NCBI gi 番号	タンパク質	Mascot スコア/有意なペプチドの数	
		サンプル 1	サンプル 5
98986445	癌胎児性抗原関連細胞接着分子 5 プレプロタンパク質	767 / 10	127 / 1
4502085	膵臓アミラーゼ $\alpha$ 2A 前駆体	619 / 8	ND
1684927	免疫グロブリン軽鎖	586 / 6	152 / 1
50363217	セリンプロテイナーゼ阻害剤クレード A メンバー1	550 / 4	268 / 2
40254482	唾液アミラーゼ $\alpha$ 1A 前駆体	548 / 6	ND
298351713	RecName:Full=Ig $\lambda$ -1鎖 C 領域	501 / 6	139 / 1
4507725	トランスサイレチン前駆体	477 / 5	ND
236460050	エラスターーゼ 3A 脇臓プレプロタンパク質	432 / 5	84 / 0
4502997	カルボキシペプチダーゼ A1 前駆体	412 / 5	106 / 1
113584	RecName:Full=Ig $\alpha$ -1鎖 C 領域	404 / 4	214 / 3
4885165	シスタチン A	352 / 4	66 / 1
40255013	癌胎児性抗原関連細胞接着分子 6(非特異的交差反応性抗原)	349 / 3	ND
4506147	プロテアーゼセリン 2 プレプロタンパク質	326 / 5	434 / 6
125145	RecName:Full=Ig $\kappa$ 鎖 C 領域	291 / 4	265 / 5
218512088	RecName:Full=Ig $\alpha$ -2鎖 C 領域	272 / 3	ND
121039	RecName:Full=Ig $\gamma$ -1鎖 C 領域	265 / 3	ND
54607080	膵臓カルボキシペプチダーゼ B1 プレプロタンパク質	263 / 2	ND

## 【0105】

別の実験では、被験体にPEGベースの洗浄組成物を投与し、被験体が、得られたGLFを大腸内視鏡検査の直前にトイレの中に入れられた収集容器中に自己収集した。GLFのプロテオームは本明細書に記載されるようにMSによって解析された。自己収集されたGLF試料において多数の異なるタンパク質が同定された。最も豊富な同定されたタンパク質の例ならびに対応するMascotスコアおよび各タンパク質の有意なペプチドの数が、表4に列挙されている。より大規模なタンパク質リストが、尿の混入の証拠を示した。大腸内視鏡検査の際に続いて収集された試料について、同様のプロテオミクスプロファイルが観察された。

## 【0106】

10

20

30

40

## 【表4】

表4

NCBI gi 番号	タンパク質	Mascot スコア/ 有意なペプチドの数
		サンプル 26
50363217	セリンプロテイナーゼ阻害剤クレード A メンバー1	406 / 3
4885165	シスタチン A	294 / 3
4502027	アルブミンプレプロタンパク質	287 / 3
55956899	ケラチン 9	287 / 4
4506147	プロテアーゼセリン 2 プレプロタンパク質	227 / 3
4502085	臍臓アミラーゼ $\alpha$ 2A 前駆体	217 / 3

## 【0107】

硫酸塩ベースの洗浄組成物の投与から得られた、大腸内視鏡検査手順の一部としてその際に収集されたか、または被験体によって自己収集された G L F のプロテオームを比較した。最も豊富なタンパク質の M a s c o t スコアおよび有意なペプチドの数が、表 5 にまとめられている。観察された 2 種のプロテオームの間に密接な相関があったが、少なくとも 2 種のタンパク質について異なるアイソフォームが同定された。異なるアイソフォームの選択は、M S / M S の際の配列データの収集および検索エンジンの結果であり得る。大腸内視鏡検査の際に収集されたものよりも希薄であった自己収集された試料では、より少ないタンパク質が検出された。

## 【0108】

## 【表5-1】

表5

NCBI gi番号	タンパク質	Mascot スコア/ 有意なペプチドの数		
		大腸内視鏡検査に よって収集された サンプル	被験体によって 収集されたサン プル	
148539842	悪性脳腫瘍で欠失 1 アイソフォーム b 前駆体	アイソフォーム a を参照のこと	1184 / 13	10
148539840	悪性脳腫瘍で欠失 1 アイソフォーム a 前駆体	417 / 4	アイソフォーム b を参照のこと	
119395750	ケラチン 1	159 / 2	742 / 9	
10835000	膵臓リパーゼ前駆体	3719 / 37	538 / 8	
113584	RecName:Full=Ig α-1鎖 C 領域	958 / 9	506 / 6	20
31377806	ポリマー免疫グロブリン受容体前駆 体	469 / 4	474 / 5	
98986445	癌胎児性抗原関連細胞接着分子 5 プ レプロタンパク質	74 / 1	424 / 5	
125817	RecName:Full=Ig κ鎖 V-III 領域 HAH;Flags:前駆体	ND	382 / 5	
125797	RecName:Full=Ig κ鎖 V-III 領域 SIE	ND	341 / 5	30
54607080	膵臓カルボキシペプチダーゼ B1 プ レプロタンパク質	1389 / 17	340 / 5	
236460050	エラスターーゼ 3A 膵臓プレプロタン パク質	2268 / 27	328 / 4	
125145	RecName:Full=Ig κ鎖 C 領域	734 / 7	327 / 5	
118498350	キモトリプシン B2	キモトリプシン B1 を参照のこと	238 / 3	
118498341	キモトリプシン B1	881 / 7	キモトリプシン B2 を参照のこ と	40
62526043	キモトリプシン C プレタンパク質	1002 / 10	ND	
125811	RecName:Full=Ig κ鎖 V-III 領域 VG;Flags:前駆体	ND	237 / 3	

【0109】

【表5-2】

NCBI gi 番号	タンパク質	Mascot スコア/ 有意なペプチドの数	
		大腸内視鏡検査に よって収集された サンプル	被験体によって 収集されたサン プル
1684927	免疫グロブリン軽鎖	371 / 4	221 / 2
123843	RecName:Full=Ig 重鎖 V-III 領域 VH26;Flags:前駆体	181 / 2	219 / 3
157266300	膜アラニンアミノペプチダーゼ前駆 体	544 / 5	213 / 3
125788	RecName:Full=Ig κ鎖 V-II 領域 TEW	ND	202 / 3
4502085	臍臍アミラーゼ α 2A 前駆体	4258 / 49	ND
10280622	アミラーゼ臍臍 α -2B 前駆体	3916 / 45	ND
6679625	エラスターーゼ 3B 脾臍プレプロタン パク質	1955 / 22	ND
4506147	プロテアーゼセリン 2 プレプロタン パク質	1442 / 14	ND
4502997	カルボキシペプチダーゼ A1 前駆体	1168 / 14	ND
15559207	エラスターーゼ 2A プレプロタンパク 質	959 / 5	ND
217416390	カルボキシペプチダーゼ A2(脾臍)前 駆体	811 / 10	ND
29725633	再生島由来 1 α 前駆体	714 / 8	ND
218512088	RecName:Full=Ig α -2 鎖 C 領域	663 / 6	ND
7669492	グリセルアルデヒド-3-ホスフェート デヒドロゲナーゼ	593 / 5	ND
4506145	プロテアーゼセリン 1 プレプロタン パク質	551 / 6	ND
157266300	膜アラニンアミノペプチダーゼ前駆 体	544 / 5	ND
298351713	RecName:Full=Ig λ -1 鎖 C 領域	322 / 4	ND
119220569	チモーゲン顆粒膜糖タンパク質 2 ア イソフォーム 1	304 / 3	ND

【表5-3】

NCBI gi番号	タンパク質	Mascotスコア/有意なペプチドの数	
		大腸内視鏡検査によって収集されたサンプル	被験体によって収集されたサンプル
51593090	ムチン 13 上皮膜貫通	293 / 3	ND
125807	RecName:Full=Ig κ 鎮 V-III 領域 GOL;AltName:Full=リウマチ因子	288 / 3	ND
10334859	クレアチンキナーゼミトコンドリア 1B 前駆体	265 / 3	ND

## 【0111】

前述の解析は、ポリエチレングリコールベースのG L Fを使用して得られた試料では、多数の標的分子が検出され得るということを実証する。

## 【0112】

(実施例3)

## クエン酸マグネシウムベースのG L Fのプロテオミクス解析

この解析では、クエン酸マグネシウムベースのG L Fの、プロテオミクス解析を支援する能力を評価した。クエン酸マグネシウムベースの洗浄組成物を投与されたヒト被験体から得られたG L Fにおいて標的分子を同定するために、クエン酸マグネシウムベースの洗浄組成物を被験体に投与し、G L Fを、大腸内視鏡検査手順の一部として被験体から収集した。G L Fのプロテオームを、実施例1に記載されるように質量分析によって解析した。G L Fにおいて多数の異なるタンパク質が同定された。最も豊富な同定されたタンパク質の例が、表6に列挙されている。同定されたタンパク質の多くは、異なる大腸内視鏡検査調製物を用いて検出され、このことは、プロテオームが、使用された腸調製物に依存していないことを示唆する。

## 【0113】

10

20

30

【表 6 - 1】

表 6

NCBI gi 番号	タンパク質	Mascot スコア/有意なペプチドの数	サンプル 27
4502085	膵臓アミラーゼ $\alpha$ 2A 前駆体	2977 / 31	10
10280622	アミラーゼ膵臓 $\alpha$ -2B 前駆体	2891 / 30	
40254482	唾液アミラーゼ $\alpha$ 1A 前駆体	2472 / 26	
50363217	セリンプロテイナーゼ阻害剤クレード A メンバー1	1316 / 12	
236460050	エラスターーゼ 3A 脇臓プレプロタンパク質	1299 / 13	20
15559207	エラスターーゼ 2A プレプロタンパク質	1109 / 11	
6679625	エラスターーゼ 3B 脇臓プレプロタンパク質	987 / 10	
29725633	再生島由来 1 $\alpha$ 前駆体	577 / 6	
4507725	トランスサイレチン前駆体	570 / 7	
4506147	プロテアーゼセリン 2 プレプロタンパク質	521 / 6	30
58331211	エラスターーゼ 2B プレプロタンパク質	498 / 4	
157266292	腸アルカリホスファターゼ前駆体	491 / 7	
113584	RecName:Full=Ig $\alpha$ -1 鎖 C 領域	338 / 3	
125145	RecName:Full=Ig $\kappa$ 鎖 C 領域	337 / 4	40
98986445	癌胎児性抗原関連細胞接着分子 5 プレプロタンパク質	329 / 3	
218512088	RecName:Full=Ig $\alpha$ -2 鎖 C 領域	293 / 3	
41152086	セリン(またはシステイン)プロテイナーゼ阻害剤クレード B(オボアルブミン)メンバー6	293 / 4	

【0 1 1 4】

【表 6 - 2】

NCBI gi 番号	タンパク質	Mascot スコア/有意なペプチドの数
		サンプル 27
4506145	プロテアーゼセリン 1 プレプロタンパク質	267 / 3
4502997	カルボキシペプチダーゼ A1 前駆体	146 / 3

10

## 【0115】

前述の解析は、クエン酸マグネシウムベースの G L F を使用して得られた試料では、多数の標的分子が検出され得るということを実証する。

## 【0116】

## (実施例 4)

G L F を S S L - 7 濃縮と組み合わせて使用して得られた試料における、I g A - 1 および I g A - 2 抗体の検出

この解析では、G L F を S S L - 7 濃縮と組み合わせて使用して得られた試料の、I g A - 1 および I g A - 2 抗体を検出する能力を評価した。S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s 超抗原様タンパク質 7 ( S S L - 7 ) に対する親和性を用いて、G L F において標的分子を同定するために、ヒト被験体に硫酸塩ベースの洗浄組成物 ( S U P R E P ) を投与し、S S L - 7 親和性ビーズを使用して各 G L F においてタンパク質を濃縮した。G L F は、大腸内視鏡検査手順の一部として被験体から収集した。

20

## 【0117】

S S L - 7 親和性ビーズを使用して、I g A - 1 および I g A - 2 を特異的に単離した。1 m l の試料に、20  $\mu$  l の S S L - 7 アガロース ( I n v i t r o g e n 、 S a n D i e g o 、 C A ) を添加し、4 °C 、ローラー上で一晩インキュベートした。試験管を、1,000  $\times$  g で 2 分間回転させて、ビーズをペレットにし、上清を廃棄した。ビーズを、1  $\times$  リン酸緩衝生理食塩水を用いて 4 回洗浄し、シェーカー中の 100 mM グリシン、pH 2.7 の 20  $\mu$  l を用いて、37 °C 、600 rpm で 1 時間溶出した。溶出された抗体を、100 mM 重炭酸アンモニウム / 10 mM トリス ( 2 - カルボキシエチル ) ホスフリンの 60  $\mu$  l を用いて希釈し、2  $\mu$  l の配列決定等級トリプシン ( P r o m e g a 、 M a d i s o n 、 W I ) を用いて消化した。質量分析およびデータベース検索を、上記のように実施した。S S L - 7 に対する親和性を有する G L F 中に存在する最も豊富な同定されたタンパク質およびその対応する M a s c o t スコアが表 7 にまとめられている。先の実施例において観察されたように、抗体は、G L F 中に存在しており、これらの濃縮および解析は、アフィニティー試薬を使用して可能であり、したがって、G L F におけるこのサブプロテオームの特異的解析を可能にする。最も豊富な抗体は、I g A であった。I g A は、腸管中に存在すると一貫して報告されている。

30

## 【0118】

40

## 【表7】

表7

NCBI gi 番号	タンパク質	Mascot スコア/ 有意なペプチドの数	
		サンプル 12	サンプル 13
113584	RecName:Full=Ig α -1鎖 C 領域	3084 / 29	2477 / 24
31377806	ポリマー免疫グロブリン受容体前駆体	3065 / 36	898 / 13
218512088	RecName:Full=Ig α -2鎖 C 領域	2736 / 24	2225 / 18
125145	RecName:Full=Ig κ鎖 C 領域	477 / 4	542 / 6
21489959	免疫グロブリン J 鎖	403 / 4	308 / 2
298351715	RecName:Full=Ig λ -3鎖 C 領域	352 / 3	ND
298351713	RecName:Full=Ig λ -1鎖 C 領域	317 / 3	581 / 6
1684927	免疫グロブリン軽鎖	ND	636 / 6

## 【0119】

前述の解析は、GLFをSSL-7濃縮と組み合わせて使用して得られた試料において、IgA抗体が検出され得るということを実証する。

## 【0120】

(実施例5)

GLFをプロテインL濃縮と組み合わせて使用して得られた試料における、IgAおよびIgMの検出

この解析では、GLFをプロテインL濃縮と組み合わせて使用して得られた試料の、IgAおよびIgM抗体を検出する能力を評価した。プロテインLに対する親和性を用いてGLFにおいて標的分子を同定するために、ヒト被験体に硫酸塩ベースの洗浄組成物(SUPEREP)を投与し、プロテインL親和性ビーズを使用して各GLFにおいてタンパク質を濃縮した。GLFは、大腸内視鏡検査手順の一部として被験体から収集した。

## 【0121】

プロテインL親和性ビーズは、軽鎖を含有する抗体を単離するために使用した。1mlの試料に20μlのプロテインLアガロース(Santa Cruz Biotech nology、Santa Cruz、CA)を添加し、4℃、ローラー上で一晩インキュベートした。試験管を、1,000×gで2分間回転させて、ビーズをペレットにし、上清を廃棄した。ビーズを、1×リン酸緩衝生理食塩水を用いて4回洗浄し、シェーカー中の100mMグリシン、pH 2.7の20μlを用いて、37℃、600rpmで1時間溶出した。溶出された抗体を、100mM重炭酸アンモニウム/10mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンの60μlを用いて希釈し、2μlの配列決定等級トリプシン(Promega、Madison、WI)を用いて消化した。プロテインLに対する親和性を有するGLF中に存在する最も豊富な同定されたタンパク質ならびにその対応

10

20

30

40

50

するMascotスコアおよび有意なペプチドの数が表8にまとめられている。予測されたように、抗体に由来するIgAおよび関連する鎖を再度検出した。プロテインLは、IgA抗体に対して完全に特異的ではないので、IgM抗体(gi番号193806374)も検出された。

【0122】

【表8】

表8

NCBI gi番号	タンパク質	Mascotスコア/ 有意なペプチドの数	10
		サンプル9	
113584	RecName:Full=Ig α-1鎖C領域	1183 / 14	
31377806	ポリマー免疫グロブリン受容体前駆体	1149 / 14	
218512088	RecName:Full=Ig α-2鎖C領域	985 / 11	
125145	RecName:Full=Ig κ鎖C領域	654 / 8	20
193806374	RecName:Full=Ig μ鎖C領域	407 / 5	
187950123	免疫グロブリン重鎖可変領域	289 / 3	
21489959	免疫グロブリンJ鎖	249 / 2	

【0123】

30

前述の解析は、GLFをプロテインL濃縮と組み合わせて使用して得られた試料において、IgAおよびIgM抗体が検出され得るということを実証する。

【0124】

(実施例6)

40

GLFを使用して得られた試料における、細菌起源のタンパク質の検出

この解析では、GLFの細菌起源のタンパク質の検出を容易にする能力を評価した。GLFにおいて細菌と関連している標的分子を同定するために、2人のヒト被験体に硫酸塩ベースの洗浄組成物(SUPERE)を投与し、得られたGLFを、大腸内視鏡検査手順の一部として被験体から収集した。各GLFから100μlを用いて、SuperOptimal Broth(SOB)培地に播種し、37、220rpm振盪で一晩インキュベートした。ペレットを、8M尿素中でビーズビーターにおいて溶解し、溶解物を、50mM重炭酸アンモニウム/10mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンで2M尿素に希釈し、配列決定等級のトリプシン(Promega、Madison、WI)を用いて消化した。データは、先に記載されるように、Orbitrap MSシステムで120分の実施を使用して獲得した。MGF検索ファイルを作成し、真正細菌として特定された生物分類学、親イオンについて(MS)10ppmおよび断片イオンについて(MS/MS)0.6Daの質量精度を用い、RefSeqデータベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>)に対してMascot検索エンジン(Matrix Science、UK)を使用して検索した。細菌と関連しているGLF中に存在する最も豊富な同定されたタンパク質ならびにその対応するMas

50

c o t スコアおよび有意なペプチドの数が、表 9 にまとめられている。示された試料では、培養された細菌は、Escherichia coli であった。その他の試料は、洗浄液が依然として腸細菌の一部を保持していることを示す異なる細菌を示す。

## 【0125】

## 【表 9】

表 9

NCBI gi 番号	タンパク質	Mascot スコア/ 有意なペプチドの数
		細菌単離物
15834378	シャペロニン GroEL[Escherichia coli]	1294 / 3
15803852	延長因子 Tu[Escherichia coli]	1244 / 7
157159481	分子シャペロン DnaK[Escherichia coli]	683 / 3
123444102	延長因子 Tu[Yersinia enterocolitica 亜種 enterocolitica 8081]	518 / 3

10

20

30

40

## 【0126】

前述の解析は、G L F を使用して得られた試料において細菌起源のタンパク質が検出され得るということを実証する。

## 【0127】

## (実施例 7)

いくつかの被験体から得られた組み合わされた試料のプロテオミクス解析 G L F を使用して得られた試料において検出可能である多数の標的タンパク質の同定をさらに容易にするために、12人の被験体から個別に獲得したデータから作製した検索ファイルを、単一の検索ファイルに連結させ、Orbitrap データについてこれまでに特定したパラメータを使用して検索した。種々の G L F 試料において多数のタンパク質を分析し、p < 0.05 (Mascot スコアおよそ 41) の閾値で検出された少なくとも 3 種の独特的有意なペプチドを(主に)有するタンパク質を選択した。3 種のみの列挙されたタンパク質(gi の 5031863、6466801 および 115430223)が 3 種未満の有意なペプチドを有していたが、これらは、タンパク質同定のための 95% 信頼レベルを十分に上回るおよそ 400 の Mascot スコアを有していた。この組み合わされた解析において同定されたタンパク質は、特定のタンパク質の報告された起源および報告された関連する癌とともに表 10 に列挙されている。表 10 はまた、独特の同定されたタンパク質各々について 40 以上の Mascot スコアを有していた同定されたペプチドの配列番号を列挙する。多数の同定されたタンパク質が、脾液中に存在すると報告されている。表 10 中に列挙される参考文献は、本願において提供される。

## 【0128】

【表 10 - 1】

表 10

NCBI gi 番号	検出されたタンパク質	Mascot スコア>40 を有するペプチドの配列番号	検出されたタンパク質の起源	脾液中の存在	関連する癌	参考文献
10835000	脾臓リパーゼ前駆体	6919/75	1-77	脾臓	有	Friess (2003)
4502085	脾臓アミラーゼ $\alpha$ 2A 前駆体	5766/60	78-137	脾臓	有	Kang (2010)
10280622	アミラーゼ、脾臓、 $\alpha$ -2B 前駆体	5332/55	78-83, 85-100, 102, 103, 105-108, 110-130, 133, 136-141	脾臓	有	Koyama (2001)
40254482	唾液アミラーゼ $\alpha$ 1A 前駆体	4712/50	78-83, 86-90, 93-99, 102, 105-107, 110-116, 118-126, 128, 129, 131, 133-135, 139, 140, 142, 143	脾臓/唾液腺	有	Tomita (1989)
236460050	エラスターーゼ 3A、脾臓プロタノバク質	4267/49	144-193	脾臓	有	Shimada (2002)
6679625	エラスターーゼ 3B、脾臓プロタノバク質	4123/44	145-147, 151-153, 155, 157, 161-163, 165, 166, 168, 170, 172-176, 178, 179, 181, 183, 185, 186, 188, 191, 194-211	脾臓	有	Gao (2010)
4506147	プロテアーゼ、セリン、2 プレプロタンパク質	3427/33	212-247	脾臓	有	Gao (2010)

【0 1 2 9】

## 【表 10 - 2】

NCBI gi番号	検出されたタンパク質	Mascot スコア>40 ア/有意なペ プチドの数	Mascot スコア>40 を有するペプチド の配列番号	検出されたタン パク質の起源	脾液中の存 在	関連する癌	参考文献
118498350	キモトリプロシン B2	2621/27	248-274	脾臓	有	脾臓	Miao (2008)
118498341	キモトリプロシン B1	2527/26	248-256, 258-274	脾臓	有	全身	Miao (2008)
50363217	セリソンプロテイナード ゼ阻害剤、クレード A、メンバー1	2443/27	275-304	脾臓/肝臓	有	全身	Normandin (2010), Sato (2004), Zhou (2000)
15559207	エラスター 2A プレ プロタシナム質	2351/25	305-331	脾臓	有	脾臓	Akakura (2001) Yamamura (1989)
54607080	脾臓カルボキシペプ チダーゼ B1 プレプロ タンパク質	2143/24	332-355	脾臓	有	肝臓	Matsugi (2007)
4506145	プロテアーゼ、セリ ン、1 プレプロタンパ ク質	2135/21	215, 217, 219, 221, 222, 225, 228, 229, 231, 232, 236, 238- 240, 242, 245, 356- 361	脾臓	有	脾臓	
148539844	悪性脳腫瘍で欠失 1 アイソフォーム c 前 駆体	2129/23	362-385	上皮、脾臓	有	脾臓、脳、 肺、結腸、 胃	Sasaki (2002), Kuramitsu (2006)
113584	RecName:Full=Ig α -1 鎖 C 領域	2065/19	386-405	抗体-重鎖 IgA	有		
4502997	カルボキシペプチダ ーゼ A1 前駆体	2026/25	334, 406-429	脾臓	有	脾臓	Matsugi (2007)

## 【0 1 3 0】

## 【表 10 - 3】

NCBI gi番号	検出されたタンパク質	Mascot スコアア>40 を有するペプチドの数	Mascot スコアア>40 を有するペプチド の配列番号	検出されたタンパク質の起源	脛液中の存在	関連する糖	参考文献
29725633	再生島由来 1α 前駆体	1799/17	430-444	脾臓	有	肝臓	Cavard (2006)
31377806	ポリマー免疫グロブリン受容体前駆体	1783/19	445-465	上皮	有	子宮内膜	DeSouza (2005)
218512088	RecName:Full=Ig α -2 鎖 C 領域	1779/16	386-388, 390-392, 397, 399-404, 466-469	抗体-重鎖	有		
157266300	膜アラニンアミノペプチダーゼ前駆体	1581/16	470-486	小腸	有	乳房	Liang (2006)
119395750	ケラチン 1	1491/15	487-501	上皮			
62526043	キモトリプシン C プレプロタンパク質	1407/16	502-517	脾臓	有	肝臓	Wang (2011)
98986445	癌胎児性抗原関連細胞接着分子 5 プレプロタンパク質	1140/11	518-528	上皮	有	脾臓、結腸	Sato (2004), Van Gisbergen (2005)
217416390	カルボキシペプチダーゼ A2(脾臓)前駆体	1129/11	529-539	脾臓	有	脾臓	Matsugi (2007)
4505847	ホスホリノベーゼ A2 群 IB	1124/13	540-552	脾臓	有	結腸、前立腺	Belinsky (2007), Sved (2004)
125145	RecName:Full=Ig κ 鎮 C 領域	1121/14	553-566	抗体-軽鎖	有		

## 【0 1 3 1】

【表 10 - 4】

NCBI gi番号	検出されたタンパク質	Mascot スコア/有意なペプチドの数	Mascot スコアア>40 を有するペプチド の配列番号	検出されたタン パク質の起源	脾液中の存 在	関連する癌	参考文献
7669492	グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ	1106/11	567-578	上皮/細菌		結腸	Egea (2007), Shin (2009)
58331211	エラスターーゼ 2B プレ プロタンパク質	1083/11	305, 307-310, 312-314, 318, 324, 328, 331	肺臓			
105990514	フィラミン B、 $\beta$ (ア クチン結合タンパク 質 278)	1041/7	579-586	複数の細胞種		前立腺	Harding (2006)
4507725	トランスサイレチン 前駆体	952/11	587-597	肝臓/血清タンパク 質	有	結腸	Fentz (2007)
55956899	ケラチン 9	945/9	598-607	上皮			
170296790	メソトリプシンアイ ソフオーム 1 プレプロタンパク質	907/8	214, 215, 218, 219, 221, 224, 226, 233, 608	肺臓		乳房	Hockla (2010)
10835248	再生島由来 1 $\beta$ 前駆体	903/9	430, 431, 433-437, 441	肺臓	有	肺臓	Cui (2010)
41152086	セリン(またはシステ イン)プロテイナーゼ 阻害剤、クレード B(オボアルブミン)、 メンバー6	902/9	609-617	ケラチノサイ ト、筋肉、肺、 肝臓、肺臓	有	結腸	Krasnov (2009)

【0 1 3 2】

【表 10 - 5】

NCBI gi番号	検出されたタンパク質	Mascot スコア/有意なペチドの数	Mascot スコア>40を有するペチドの配列番号	検出されたタンパク質の起源	膝液中の存在	関連する糖	参考文献
1684927	免疫グロブリン軽鎖	889/8	618-625				
4505605	膝炎関連タンパク質前駆体	848/9	626-634	膝臓	有	膝臓	Rosty(2002)
13489087	セリン(またはシスティン)プロテイナーゼ阻害剤、クレードB(オボアルブミン)、メンバーハー1	842/8	635-642	ケラチノサイト、筋肉、肺、肝臓、膝臓	有	膝臓	Sato(2004)
226529917	トリオースリシン酸イソメラーゼ 1 アイソフォーム 2	760/7	643-649	複数の細胞種	有	乳房	Tamesa(2009)
298351713	RecName:Full=Ig λ -1鎖 C 領域	760/8	618-623, 625, 650	抗体-軽鎖			
47132620	ケラチン2	713/7	487, 495, 651-655	上皮			
5080756	ヒト Fc γ BP[AA1-2843]	706/4	656-659				
195972866	ケラチン10	676/5	660-664	上皮		肝臓、脾臓	Yang(2008), Xiao(2010)
4502027	アルブミンプレプロタンパク質	642/4	665-668				

【0 1 3 3】

【表 10 - 6】

NCBI gi 番号	検出されたタンパク質	Mascot スコア/有意なペプチドの数	Mascot スコア>40 を有するペプチド の配列番号	検出されたタンパク質の起源	膀胱中の存在	関連する癌	参考文献
40255013	癌胎児性抗原関連細胞接着分子 6(非特異的交差反応性抗原)	614/5	522, 524, 669-671	上皮	有	結腸	Van Gisbergen (2005)
125819	RecName:Full=Ig κ 鎮V-III 領域 HIC;Flags:前駆体	611/6	672-677	抗体-軽鎖		白血病	Kipps (1988)
154146262	IgG 組合タンパク質のFc 斷片	607/4	656-659			前立腺	Gazi (2008)
157266292	腸アルカリホスファターゼ前駆体	605/7	678-684	小腸		肝臓	Yamamoto (1984)
50845388	アネキシンA2 アイソフォーム 1	604/5	685-689	複数の細胞種		肝臓	Mohammad (2008)
50659080	セルビンペプチダーゼ阻害剤、クレードA、メンバーブー3 前駆体	599/4	690-693	肝臓		黒色腫	Wang (2010)
51593090	ムチン 13、上皮膜貫通	575/5	694-698	結腸		GI 癌	Maher (2011)
119220569	チモールゲン顆粒膜糖タンパク質 2 アイソフォーム 1	567/4	699-702	膀胱	有		

【0 1 3 4】

## 【表 10 - 7】

NCBI gi 番号	検出されたタンパク質	Mascot スコア ア/有意なペ プチドの数	Mascot スコア>40 を有するペプチド の配列番号	検出されたタン パク質の起源	脾液中の存 在	関連する癌	参考文献
125817	RecName:Full=Ig κ 鎮 V-III 領域 HAH;Flags: 前駆体	554/6	672-677	抗体-軽鎖		白血病	Kipps (1988)
151301154	ムチン6、胃の	544/3	703-705				
10334859	クレアチンキナーゼ、ミトコンドリア IB 前駆体	533/5	706-711	ミトコンドリア		組織損傷	Bark (1980)
223099	Ig α 1Bur	520/4	388, 391, 467-469				
4504919	ケラチン8	506/6	712-717	上皮		皮膚	Yamashiro (2010)
119703753	ケラチン6B	504/4	488, 653, 654, 718	上皮		乳房	Millar (2009)
121039	RecName:Full=Ig γ -1 鎖 C 領域	501/4	719-722	抗体-重鎖			
4507149	スーパーオキシドジ スムターゼ1、可溶性	498/5	723-727	上皮/ミトコンド リア	有	多発	Pham (2009)
223942069	エンテロキナーゼ前 駆体	497/3	728-731	小腸		多発	Vilen (2008)
153070262	メプリンAα	497/4	732-735	小腸		結腸	Lottaz (1999)
157364974	スクラーゼ-イソマル ターゼ	480/3	736-738	小腸		結腸	Gu (2006)

## 【0 1 3 5】

## 【表 10 - 8】

NCBI gi番号	検出されたタンパク質	Mascot スコア>40 ア/有意なペ プチドの数	Mascot スコア>40 を有するペプチド の配列番号	検出されたタン パク質の起源	脾液中の存 在	関連する癌	参考文献
125797	RecName:Full=Ig κ 鎮 V-III 領域 SIE	478/5	672-676, 739	抗体-軽鎖			
38455402	リボカリシン2	463/4	740-743	上皮、多數の細 胞種	有	膀胱、乳 房、子宮内 膜、前立腺	Sato (2004), Lin (2011), Mahadevan (2011)
167857790	オロソムコイド1 前 駆体	446/6	744-750	血清/急性期タン パク質			
5031839	ケラチン6A	441/3	653, 654, 718	上皮		乳房	Millar (2009)
32313593	オルファクトメジン4 前駆体	437/4	751-754	小腸、結腸、膀 胱		膀胱、結腸	Kobayashi (2007), Koshida (2007)
125803	RecName:Full=Ig κ 鎮 V-II 領域 WOL	432/5	672-676	抗体-軽鎖			
10835063	ヌクレオフオスマシン1 アイソフォーム1	414/5	755-759	複数の細胞種		肝臓、その 他	Kuramitsu (2006), Grisendi (2006)
75707587	免疫グロブリン軽鎖 可変領域	414/4	673, 674, 676, 760	抗体-軽鎖			
5031863	ガレクチン3 結合タ ンパク質	414/2	761, 762	複数の細胞種	有	結腸	Bresalier (2004), Kim (2011)

## 【0 1 3 6】

【表 10 - 9】

NCBI gi 番号	検出されたタンパク質	Mascot スコア $>40$ を有するペプチドの数	Mascot スコア $>40$ を有するペプチドの配列番号	検出されたタンパク質の起源	膝液中の存在	関連する癌	参考文献
187960098	中鎖アシル-CoA デヒドロゲナーゼアイソフォーム b 前駆体	407/3	763-765	ミトコンドリア/細菌			
4503143	カテブシン D プレプロタンパク質	407/4	766-769	複数の細胞種	乳房		Wolf (2003)
106507261	膝臓リバーゼ関連タンパク質 2	393/2	1,5,770	膝臓	有		
223718246	プラスチン 1	393/3	771-774	小腸、結腸、胃臓	膝臓		Terri (2002)
4885165	シスタチン A	384/4	775-778	マクロファージ	結腸		Kupio (1998), Kos (2000)
6466801	腸ムチン 3	379/1	779	上皮	膝臓		Park (2003)
115430223	ガレクトシン 3	377/2	780,781	複数の細胞種	膝臓		Jiang (2008)
19923195	癌胎児性抗原関連細胞接着分子 1 アイソフォーム 1 前駆体	375/4	518,670,782,783	上皮	有	多発	Gerstel (2011)
19923748	ジヒドロリポアミド S-スクシニルトランスフェラーゼ(2-オキソ-グルタルート複合体の E2 構成成分)	362/3	784-786	ミトコンドリア			

【0 1 3 7】

【表 10 - 10】

NCBI gi 番号	検出されたタンパク質	Mascot スコア/有意なペプチドの数	Mascot スコア>40 を有するペプチド の配列番号	検出されたタン パク質の起源	膀胱中の存 在	関連する癌	参考文献
193806374	RecName:Full=Ig C 鎮	361/4	787-790	抗体-重鎖			
16306550	セレン結合タンパク質 1	361/3	791-793			卵巢、子宮、胃、食道	Huang (2006), Zhang (2010), Zhang (2011), Silvers (2010)
33456	免疫グロブリン M 鎮	353/4	794-797	抗体-重鎖			
125811	RecName:Full=Ig κ 鎮 V-III 領域 VG;Flags:前駆体	319/3	760, 798, 799	抗体-軽鎖			
123843	RecName:Full=Ig 重鎮 V-III 領域 VH26;Flags:前駆体	219/3	796, 800, 801	抗体-重鎖			
563454	Ig 重鎮(VH4)V 領域 (VDJ)	206/3	802-804	抗体-重鎖			

【0138】

前述の解析は、G L F を使用して得られた試料において多数のタンパク質が検出され得るということを実証する。

## 【0139】

(実施例8)

## 糞便試料のプロテオミクス解析

この解析では、糞便試料の、プロテオミクス解析を支援する能力を評価した。糞便試料において標的分子を同定するために、ヒト被験体に洗浄組成物を投与しなかった。糞便試料は、正常な排便の際に、トイレの中に入れられた収集容器を使用して被験体から収集した。少量の糞便（便）試料を、0.1%TFA中でホモジナイズし、次いで、13000×gで遠心分離した。タンパク質を、実施例1に記載されるように、6容量のアセトンを用いて沈殿させ、0.1%TFAに再懸濁し、等容量のクロロホルムを用いて抽出し、次いで、SPEカラム中で処理した。最も豊富な同定されたタンパク質ならびにその対応するMascotスコアおよび有意なペプチドの数が、表11にまとめられている。試料において、大部分はおそらくは臍臍起源であるタンパク質が検出され、これは、GLFにおける発見後は、便が、これらのバイオマーカー-タンパク質の検出のための供給源であるということを示す。しかし、試料はまた、分析を、特に、バイオマーカーの発見についてはるかに制限されたものにする、いくつかのその他の非ヒト物質を含有していた。

10

20

30

40

## 【0140】

## 【表11】

表11

NCBI gi番号	タンパク質	Mascotスコア/有意なペプチドの数
		サンプル糞便1
119395750	ケラチン1	549/7
15559207	エラスターーゼ2A プレプロタンパク質	546/5
236460050	エラスターーゼ3A 脍臍プレプロタンパク質	532/4
55956899	ケラチン9	444/5
125145	RecName:Full=Ig κ鎖C領域	396/5
4506147	プロテアーゼセリン2 プレプロタンパク質	344/4
4506145	プロテアーゼセリン1 プレプロタンパク質	320/5
118498350	キモトリプシンB2	298/3
6679625	エラスターーゼ3B 脍臍プレプロタンパク質	286/3

## 【0141】

前述の解析は、糞便試料において多数の標的分子が検出され得るということを実証する。

## 【0142】

50

## (実施例9)

G L F を使用して得られた試料におけるグリカンの検出

この解析では、グリカンの、G L F を使用する試料において得られた試料において検出される能力を評価した。G L F においてグリカンを含めた標的分子を同定および分析するために、G L F をヒト被験体から収集した。12 mL の氷冷アセトンに 1.8 mL の G L F を添加し、1 時間インキュベートしてタンパク質をペレットにした。試料を 12,000 × g で 15 分間遠心分離し、アセトンを除去した。氷冷アセトンを用いて洗浄した後、ペレットを 0.1% TFA に再懸濁し、5 mL のシリングスタイルの SepPak C2 カラムに通した。60% アセトニトリル / 40% 0.1% TFA を用いてタンパク質を溶出した。真空下で溶媒を除去した後、タンパク質画分を 100 μL の 50 mM 重炭酸アンモニウムに再溶解し、2 μL の PNGase F を用い、37℃、シェーカー中で一晩脱グリコシル化した。1 mL の 0.1% TFA を用いてクエンチした後、グリカンを、真空マニフォールドを使用して、1 mL のシリングスタイルの SepPak C18 カラムからフロースルーパン分として収集した。乾燥グリカンを、4-ABEE（エチル4-アミノベンゾエート）を用い、乾燥グリカンに、25 μL の誘導体化溶液（35 mM ABEE および 100 mM 2-PB を含有する 90:10 MeOH:HAc）を添加することおよび 65℃ で 2 時間インキュベートすることによって還元的アミノ化によって標識した。1 mL のエチルエーテルを添加すること、ボルテックス処理することおよびエーテルを廃棄することによって過剰の ABEE を除去した。第 2 のエーテル抽出後、試料を、SpeedVac 中に短時間入れて、あらゆる残存するエーテルを除去した。次いで、標識されたグリカンを HPLC で実施し、Agilent C8 逆相カラムから 20~25% の間のアセトニトリルで溶出した。この画分を真空乾燥させ、50 μL の 0.1% TFA に再溶解し、グリカン解析のために Waters Q-TOF LC-ESI-MS で実施した。誘導体化したグリカンは、Q-TOF MS での C18 逆相カラムから 0.2% ギ酸中、約 20~25% アセトニトリルで溶出された。質量分析計は、MS のみの様式で毎秒 m/z 150~2000 でスキャンして、誘導体化グリカンプロファイルデータを獲得した。図 1 は、これらの結果をまとめており、胃腸洗浄液の画分中に存在する種々の糖タンパク質に由来するグリカン構造の相対的存在量のグラフを表す。図 1 に示されるように、いくつかの糖タンパク質に由来するグリカン構造は、鎖の末端切断と関連している特定の修飾を含む。これらの修飾は、細菌が、タンパク質からグリカンを消化し、消費し得ると知られるように、G L F 試料中に存在する細菌活性によるものであり得る。しかし、このような修飾はまた、疾患、特に、異常なグリコシル化が疾患と関係している癌と関連している可能性がある。

## 【0143】

前述の解析は、G L F を使用して得られた試料において多数のグリカンが検出され得ることを実証する。

## 【0144】

## (実施例10)

G L F を使用して得られた試料における代謝産物の検出

この解析では、代謝産物の、G L F を使用して得られた試料において検出される能力を評価した。G L F において代謝産物を含めた標的分子を同定および解析するために、ヒト被験体にクエン酸マグネシウムベースの洗浄組成物を投与し、コール酸およびその他の胆汁酸塩などの代謝産物について得られた G L F を解析した。得られた G L F は、大腸内視鏡検査手順の一部として被験体から収集した。

## 【0145】

3 mL の G L F を、最大速度で 20 分間遠心分離し、0.1% TFA を用いて上清を酸性化した。上清を C18 SPE カラム（Waters Sep-Pak）にアプライし、3 容量の 0.1% TFA を用いて洗浄し、0.1% TFA 中の、50% ACN を用いて溶出した。溶出物を、遠心凍結乾燥によって乾燥させ、500 μL の 0.1% TFA に再溶解した。

10

20

30

40

50

**【 0 1 4 6 】**

データは、Waters Q-TOF質量分析計でLCシステムからの入力を使用して獲得した。A溶媒は、3%のBおよび水中、0.2%のギ酸を含有していた。B溶媒は、3%のAおよびアセトニトリル中、0.2%のギ酸を含有していた。溶媒は、Fisher製のHPLC等級とした。出発溶媒は、5%Bとし、5分間そのままとし、次いで、25分までに40%、30分までに90%に変更し、次いで、36で5%に再設定した。MSは、毎秒m/z 100 m/z ~ 2000の質量範囲にわたってスキャンした。データは、標準MassLynxソフトウェアを使用して獲得した。コール酸ピークをマークした溶出化合物が、図2にまとめられている。Orbitrap機器で、コール酸ピークが標準およびMS/MSデータを使用して同定された同様のピークのプロファイルが観察された。コール酸を含めた代謝産物が同定された。

10

**【 0 1 4 7 】**

前述の解析は、GLFを使用して得られた試料において代謝産物が検出され得るということを実証する。

**【 0 1 4 8 】**

用語「含んでいる（comprising）」とは、本明細書において、「含んでいる（including）」、「含有している（containing）」または「を特徴とする（characterized by）」と同義であり、包括的なものであるか、または制約がなく、さらなる、列挙されていない要素または方法工程を排除しない。

20

**【 0 1 4 9 】**

本明細書において使用される成分の分量、反応条件などを表すすべての数は、用語「約」によって、すべての例において修飾されていると理解されるものとする。したがって、反対に示されない限り、本明細書に示される数的パラメータは、得られるよう搜し求められる所望の特性に応じて変わり得る近似値である。最低限でも、本願に優先権を主張する任意の出願における任意の請求項の範囲の同等物の原則の適用を制限しようとするものではなく、各数的パラメータは、有効桁の数字および普通の丸めのアプローチを考慮して解釈されなければならない。

**【 0 1 5 0 】**

上記の説明は、本発明のいくつかの方法および材料を開示する。本発明は、方法および材料における修飾ならびに製造方法および装置における変更を受けやすい。このような修飾は、本明細書に開示された本発明のこの開示内容を考慮することまたはその実施から当業者には明らかとなろう。結果として、本発明が本明細書において開示された具体的な実施形態に制限されることはない。本発明の真の範囲および趣旨内にあるすべての修飾および変更を網羅すると意図される。

30

**【 0 1 5 1 】****参考文献**

以下の参考文献の各々は、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる。

**【 0 1 5 2 】****【 化 1 】****隣液の参考文献**

40

Chen, R., S. Pan, et al. (2007). "Comparison of pancreas juice proteins from cancer versus pancreatitis using quantitative proteomic analysis." *Pancreas* 34(1): 70-9.

Chen, R., S. Pan, et al. (2010). "Elevated level of anterior gradient-2 in pancreatic juice from patients with pre-malignant pancreatic neoplasia." *Mol Cancer* 9: 149.

Chen, R., S. Pan, et al. (2006). "Quantitative proteomic profiling of pancreatic cancer juice." *Proteomics* 6(13): 3871-9.

**【 0 1 5 3 】**

## 【化2】

- Gao, J., F. Zhu, et al. (2010). "Identification of pancreatic juice proteins as biomarkers of pancreatic cancer." *Oncol Rep* 23(6): 1683-92.
- Gomez-Lazaro, M., C. Rinn, et al. (2010). "Proteomic analysis of zymogen granules." *Expert Rev Proteomics* 7(5): 735-47.
- Gronborg, M., J. Bunkenborg, et al. (2004). "Comprehensive proteomic analysis of human pancreatic juice." *J Proteome Res* 3(5): 1042-55.
- Paulo, J. A., L. S. Lee, et al. (2010). "Identification of pancreas-specific proteins in endoscopically (endoscopic pancreatic function test) collected pancreatic fluid with liquid chromatography--tandem mass spectrometry." *Pancreas* 39(6): 889-96.
- Zhou, L., Z. Lu, et al. (2007). "Comparative proteomic analysis of human pancreatic juice: methodological study." *Proteomics* 7(8): 1345-55.

癌の参考文献

- Akakura, N., M. Kobayashi, et al. (2001). "Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation." *Cancer Res* 61(17): 6548-54.
- Bark, C. J. (1980). "Mitochondrial Creatine Kinase." *Journal of the American Medical Association* 243(20): 2058-2060.
- Belinsky, G. S., T. V. Rajan, et al. (2007). "Expression of secretory phospholipase A2 in colon tumor cells potentiates tumor growth." *Mol Carcinog* 46(2): 106-16.
- Bresalier, R. S., J. C. Byrd, et al. (2004). "A circulating ligand for galectin-3 is a haptoglobin-related glycoprotein elevated in individuals with colon cancer." *Gastroenterology* 127(3): 741-8.
- Cavard, C., B. Terris, et al. (2006). "Overexpression of regenerating islet-derived 1 alpha and 3 alpha genes in human primary liver tumors with beta-catenin mutations." *Oncogene* 25(4): 599-608.
- Cui, L., F. Li, et al. (2010). "Screening and Verification of Differentially Expressed Proteins from Pancreatic Cancer Tissue." *Chinese Journal of Chemistry* 28(6): 884-890.
- DeSouza, L., G. Diehl, et al. (2005). "Search for cancer markers from endometrial tissues using differentially labeled tags iTRAQ and cICAT with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry." *J Proteome Res* 4(2): 377-86.
- Egea, L., L. Aguilera, et al. (2007). "Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen." *Int J Biochem Cell Biol* 39(6): 1190-203.
- Fentz, A. K., M. Sporl, et al. (2007). "Detection of colorectal adenoma and cancer based on transthyretin and C3a-desArg serum levels." *Proteomics Clin Appl* 1(6): 536-44.
- Friess, H., J. Ding, et al. (2003). "Microarray-based identification of differentially expressed growth- and metastasis-associated genes in pancreatic cancer." *Cell Mol Life Sci* 60(6): 1180-99.
- Gao, J., F. Zhu, et al. (2010). "Identification of pancreatic juice proteins as biomarkers of pancreatic cancer." *Oncol Rep* 23(6): 1683-92.
- Gazi, M. H., M. He, et al. (2008). "Downregulation of IgG Fc binding protein (Fc gammaBP) in prostate cancer." *Cancer Biol Ther* 7(1): 70-5.
- Gerstel, D., F. Wegwitz, et al. (2011). "CEACAM1 creates a pro-angiogenic tumor microenvironment that supports tumor vessel maturation." *Oncogene*.
- Grisendi, S., C. Mecucci, et al. (2006). "Nucleophosmin and cancer." *Nat Rev Cancer* 6(7): 493-505.

## 【化3】

- Gu, N., T. Adachi, et al. (2006). "Sucrase-isomaltase gene expression is inhibited by mutant hepatocyte nuclear factor (HNF)-1alpha and mutant HNF-1beta in Caco-2 cells." *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 52(2): 105-12.
- Harding, T. C., M. Nguyen, et al. (2006). Humoral immune response induced to filamin B in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer (HRPC) treated with a GM-CSF-transduced allogeneic prostate cancer vaccine (GVAX(R)). AACR.
- Hockla, A., D. C. Radisky, et al. (2010). "Mesotrypsin promotes malignant growth of breast cancer cells through shedding of CD109." *Breast Cancer Res Treat* 124(1): 27-38.
- Huang, K. C., D. C. Park, et al. (2006). "Selenium binding protein 1 in ovarian cancer." *Int J Cancer* 118(10): 2433-40.
- Jiang, H. B., M. Xu, et al. (2008). "Pancreatic stellate cells promote proliferation and invasiveness of human pancreatic cancer cells via galectin-3." *World J Gastroenterol* 14(13): 2023-8.
- Kang, J. U., S. H. Koo, et al. (2010). "AMY2A: a possible tumor-suppressor gene of 1p21.1 loss in gastric carcinoma." *Int J Oncol* 36(6): 1429-35.
- Kim, G. E., H. I. Bae, et al. (2002). "Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucins and sialyl Tn antigen in intraepithelial neoplasms of the pancreas." *Gastroenterology* 123(4): 1052-60.
- Kim, Y. S., J. A. Jung, et al. (2011). "Galectin-3 binding protein promotes cell motility in colon cancer by stimulating the shedding of protein tyrosine phosphatase kappa by proprotein convertase 5." *Biochem Biophys Res Commun* 404(1): 96-102.
- Kipps, T. J., E. Tomhave, et al. (1988). "Autoantibody-associated kappa light chain variable region gene expressed in chronic lymphocytic leukemia with little or no somatic mutation. Implications for etiology and immunotherapy." *J Exp Med* 167(3): 840-52.
- Kobayashi, D., S. Koshida, et al. (2007). "Olfactomedin 4 promotes S-phase transition in proliferation of pancreatic cancer cells." *Cancer Sci* 98(3): 334-40.
- Kos, J., M. Krasovec, et al. (2000). "Cysteine proteinase inhibitors stefin A, stefin B, and cystatin C in sera from patients with colorectal cancer: relation to prognosis." *Clin Cancer Res* 6(2): 505-11.
- Koshida, S., D. Kobayashi, et al. (2007). "Specific overexpression of OLFM4(GW112/HGC-1) mRNA in colon, breast and lung cancer tissues detected using quantitative analysis." *Cancer Sci* 98(3): 315-20.
- Koyama, I., S. Komine, et al. (2001). "alpha-Amylase expressed in human liver is encoded by the AMY-2B gene identified in tumorous tissues." *Clin Chim Acta* 309(1): 73-83.
- Krasnov, G. S., N. Oparina, et al. (2009). "[Colorectal cancer 2D-proteomics: identification of altered protein expression]." *Mol Biol (Mosk)* 43(2): 348-56.
- Kuopio, T., A. Kankaanranta, et al. (1998). "Cysteine proteinase inhibitor cystatin A in breast cancer." *Cancer Res* 58(3): 432-6.
- Kuramitsu, Y. and K. Nakamura (2006). "Proteomic analysis of cancer tissues: shedding light on carcinogenesis and possible biomarkers." *Proteomics* 6(20): 5650-61.
- Liang, X., J. Zhao, et al. (2006). "Quantification of membrane and membrane-bound proteins in normal and malignant breast cancer cells isolated from the same patient with primary breast carcinoma." *J Proteome Res* 5(10): 2632-41.
- Lin, H. H., C. J. Liao, et al. (2011). "Lipocalin-2-induced cytokine production enhances endometrial carcinoma cell survival and migration." *Int J Biol Sci* 7(1): 74-86.
- Lottaz, D., C. A. Maurer, et al. (1999). "Nonpolarized secretion of human meprin alpha in colorectal cancer generates an increased proteolytic potential in the stroma." *Cancer Res* 59(5): 1127-33.

## 【化4】

- Mahadevan, N. R., J. Rodvold, et al. (2011). "ER stress drives Lipocalin 2 upregulation in prostate cancer cells in an NF-kappaB-dependent manner." *BMC Cancer* 11: 229.
- Maher, D. M., B. K. Gupta, et al. (2011). "Mucin 13: structure, function, and potential roles in cancer pathogenesis." *Mol Cancer Res* 9(5): 531-7.
- Matsugi, S., T. Hamada, et al. (2007). "Serum carboxypeptidase A activity as a biomarker for early-stage pancreatic carcinoma." *Clin Chim Acta* 378(1-2): 147-53.
- Miao, Q., Y. Sun, et al. (2008). "Chymotrypsin B cached in rat liver lysosomes and involved in apoptotic regulation through a mitochondrial pathway." *J Biol Chem* 283(13): 8218-28.
- Millar, E. K., P. H. Graham, et al. (2009). "Prediction of local recurrence, distant metastases, and death after breast-conserving therapy in early-stage invasive breast cancer using a five-biomarker panel." *J Clin Oncol* 27(28): 4701-8.
- Mohammad, H. S., K. Kurokohchi, et al. (2008). "Annexin A2 expression and phosphorylation are up-regulated in hepatocellular carcinoma." *Int J Oncol* 33(6): 1157-63.
- Normandin, K., B. Peant, et al. (2010). "Protease inhibitor SERPINA1 expression in epithelial ovarian cancer." *Clin Exp Metastasis* 27(1): 55-69.
- Park, H. U., J. W. Kim, et al. (2003). "Aberrant expression of MUC3 and MUC4 membrane-associated mucins and sialyl Le(x) antigen in pancreatic intraepithelial neoplasia." *Pancreas* 26(3): e48-54.
- Pham, T. M., Y. Fujino, et al. (2009). "Relationship between serum levels of superoxide dismutase activity and subsequent risk of cancer mortality: Findings from a nested case-control study within the Japan Collaborative Cohort Study." *Asian Pac J Cancer Prev* 10 Suppl: 69-73.
- Rosty, C., L. Christa, et al. (2002). "Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology." *Cancer Res* 62(6): 1868-75.
- Sasaki, K., K. Sato, et al. (2002). "Peptidomics-based approach reveals the secretion of the 29-residue COOH-terminal fragment of the putative tumor suppressor protein DMBT1 from pancreatic adenocarcinoma cell lines." *Cancer Res* 62(17): 4894-8.
- Sato, N., N. Fukushima, et al. (2004). "Gene expression profiling identifies genes associated with invasive intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas." *Am J Pathol* 164(3): 903-14.
- Shimada, S., K. Yamaguchi, et al. (2002). "Pancreatic elastase IIIA and its variants are expressed in pancreatic carcinoma cells." *Int J Mol Med* 10(5): 599-603.
- Shin, Y. K., B. C. Yoo, et al. (2009). "Upregulation of glycolytic enzymes in proteins secreted from human colon cancer cells with 5-fluorouracil resistance." *Electrophoresis* 30(12): 2182-92.
- Silvers, A. L., L. Lin, et al. (2010). "Decreased selenium-binding protein 1 in esophageal adenocarcinoma results from posttranscriptional and epigenetic regulation and affects chemosensitivity." *Clin Cancer Res* 16(7): 2009-21.
- Sved, P., K. F. Scott, et al. (2004). "Oncogenic action of secreted phospholipase A2 in prostate cancer." *Cancer Res* 64(19): 6934-40.
- Tamesa, M. S., Y. Kuramitsu, et al. (2009). "Detection of autoantibodies against cyclophilin A and triosephosphate isomerase in sera from breast cancer patients by proteomic analysis." *Electrophoresis* 30(12): 2168-81.
- Terris, B., E. Blaveri, et al. (2002). "Characterization of gene expression profiles in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas." *Am J Pathol* 160(5): 1745-54.

## 【化5】

Tomita, N., A. Horii, et al. (1989). "A novel type of human alpha-amylase produced in lung carcinoid tumor." *Gene* 76(1): 11-8.

van Gisbergen, K. P., C. A. Aarnoudse, et al. (2005). "Dendritic cells recognize tumor-specific glycosylation of carcinoembryonic antigen on colorectal cancer cells through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin." *Cancer Res* 65(13): 5935-44.

Vilen, S. T., P. Nyberg, et al. (2008). "Intracellular co-localization of trypsin-2 and matrix metalloprotease-9: possible proteolytic cascade of trypsin-2, MMP-9 and enterokinase in carcinoma." *Exp Cell Res* 314(4): 914-26.

Wang, H., W. Sha, et al. (2011). "Effect of chymotrypsin C and related proteins on pancreatic cancer cell migration." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 43(5): 362-71.

Wang, Y., H. Jiang, et al. (2010). "Alpha 1 antichymotrypsin is aberrantly expressed during melanoma progression and predicts poor survival for patients with metastatic melanoma." *Pigment Cell Melanoma Res* 23(4): 575-8.

Wolf, M., I. Clark-Lewis, et al. (2003). "Cathepsin D specifically cleaves the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha, macrophage inflammatory protein-1 beta, and SLC that are expressed in human breast cancer." *Am J Pathol* 162(4): 1183-90.

Xiao, J., W. N. Lee, et al. (2010). "Profiling pancreatic cancer-secreted proteome using <sup>15</sup>N amino acids and serum-free media." *Pancreas* 39(1): e17-23.

Yamamoto, H., M. Tanaka, et al. (1984). "Intestinal-type alkaline phosphatase produced by human hepatoblastoma cell line HUH-6 clone 5." *Cancer Res* 44(1): 339-44.

Yamamura, H., M. Tatsuta, et al. (1989). "Effectiveness of discriminant analysis of serum CA 19-9 and elastase 1 in diagnosis of pancreatic carcinoma." *Pancreas* 4(4): 401-5.

Yamashiro, Y., K. Takei, et al. (2010). "Ectopic coexpression of keratin 8 and 18 promotes invasion of transformed keratinocytes and is induced in patients with cutaneous squamous cell carcinoma." *Biochem Biophys Res Commun* 399(3): 365-72.

Yang, X. R., Y. Xu, et al. (2008). "Cytokeratin 10 and cytokeratin 19: predictive markers for poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients after curative resection." *Clin Cancer Res* 14(12): 3850-9.

Zhang, J., W. G. Dong, et al. (2011). "Reduced selenium-binding protein 1 is associated with poor survival rate in gastric carcinoma." *Med Oncol* 28(2): 481-7.

Zhang, P., C. Zhang, et al. (2010). "The expression of selenium-binding protein 1 is decreased in uterine leiomyoma." *Diagn Pathol* 5: 80.

Zheng, H., H. Takahashi, et al. (2006). "MUC6 down-regulation correlates with gastric carcinoma progression and a poor prognosis: an immunohistochemical study with tissue microarrays." *J Cancer Res Clin Oncol* 132(12): 817-23.

Zhou, H., M. E. Ortiz-Pallardo, et al. (2000). "Is heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency type PIZ a risk factor for primary liver carcinoma?" *Cancer* 88(12): 2668-76.

10

20

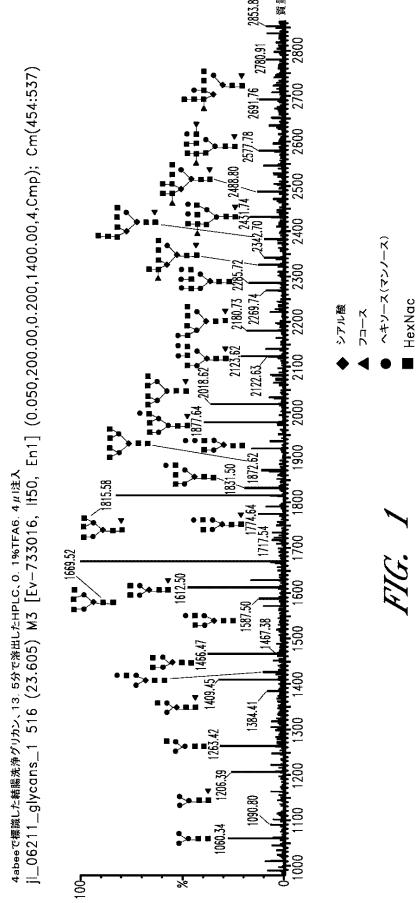
30

40

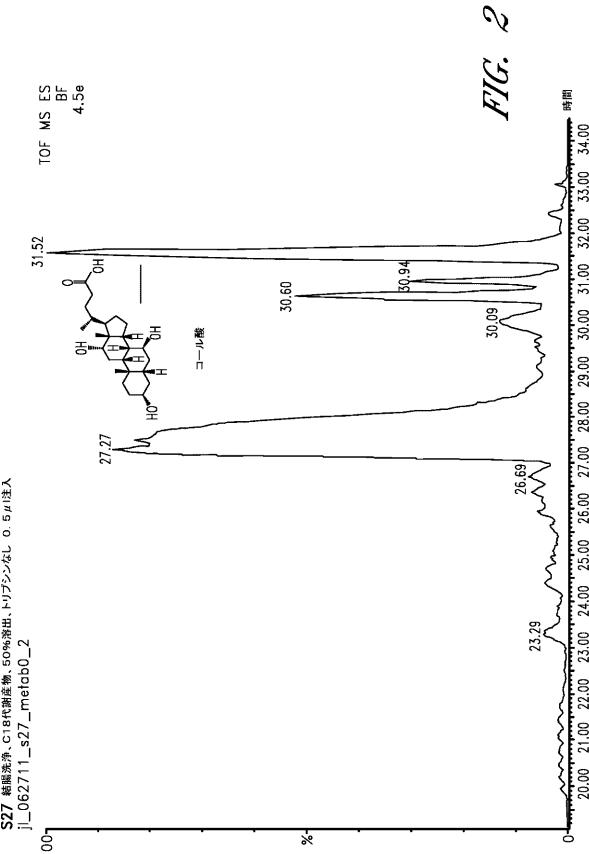
## 【0157】

それだけには限らないが、公開されたおよび公開されていない出願、特許および文献参考を含めた本明細書において引用されるすべての参考文献が、参照によりその全文が本明細書に組み込まれ、これによって本明細書の一部を成す。参照により組み込まれる刊行物および特許または特許出願が、本明細書に含有される開示内容と相反する限り、本明細書が、あらゆるこのような相反する材料を上回って優先するおよび／または上位にあるものとする。

【図1】



【図2】



【配列表】

[2014526682000001.app](#)

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/US2011/051269</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<b>G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/50; G01N 33/53; G01N 33/53; C12Q 1/68; G01N 33/68; C12M 1/34; A61B 5/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: assess, physiological, state, subject, gastrointestinal, lavage, fluid, fecal, sample, and target molecule		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	US 2009-0311707 A1 (XIA, LIJUN) 17 December 2009 See abstract; paragraphs 34-36, 138-151; claims 1-2; figs. 1-7.	2,5,55-57 40-42
Y A	US 05331973 A (FIEDLER, PAUL N. et al.) 26 July 1994 See abstract; col. 2, line 50 - col. 3, line 54; claim 1.	2,5,55-57 40-42
A	US 2008-0299555 A1 (NITTA, HIROAKI et al.) 04 December 2008 See abstract; paragraphs 84-96; claim 1.	2,5,40-42,55-57
A	US 06057166 A (CHILDS, MARY ANN et al.) 02 May 2000 See abstract; col. 3, line 61 - col. 5, line 57; claim 1; fig. 1.	2,5,40-42,55-57
A	US 2010-0304397 A1 (BURNS, MORGAN C. et al.) 02 December 2010 See abstract; paragraphs 63-69; claim 1; figs. 1-2.	2,5,40-42,55-57
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:      "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance      "B" 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 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</p> <p>"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      "&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search  23 APRIL 2012 (23.04.2012)	Date of mailing of the international search report  <b>24 APRIL 2012 (24.04.2012)</b>	
Name and mailing address of the ISA/KR   Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer  BYUN, SUNG CHEAL  Telephone No. 82-42-481-8262	



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No. <b>PCT/US2011/051269</b>
---

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 1,3-4,6-39  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 1, 3-4, and 6-39 pertain to diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search under Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv) PCT.
2.  Claims Nos.: 8,10,12,14-16,30,32,34-36,50,52,60,62,64  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
The claims refer to a multiple dependent claim that refers to other multiple dependent claims. Therefore, the meaning of the technical feature to which they refer is vague and unclear.
3.  Claims Nos.: 7,9,11,13,17-19,23-29,31,33,37-39,43-49,51,53-54,58-59,61,63,65-66  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2011/051269**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009-0311707 A1	17.12.2009	EP 2310852 A1 WO 2009-155355 A1	20.04.2011 23.12.2009
US 05331973 A	26.07.1994	EP 0693901 A1 WO 94-21104 A3	02.01.2003 29.09.1994
US 2008-0299555 A1	04.12.2008	JP 2008-298654 A	11.12.2008
US 06057166 A	02.05.2000	EP 0868665 A1 EP 0868665 A4 JP 2000-502452 A WO 97-23781 A1	12.06.2002 22.11.2000 29.02.2000 03.07.1997
US 2010-0304397 A1	02.12.2010	None	

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,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,HU,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,ZA

(72)発明者 パンネル, ルイス

アメリカ合衆国 アラバマ 36608, モービル, ユニバーシティ ブールバード 775  
, ビルディング 2, スイート 150 気付

(72)発明者 ロッカー, ジャナ

アメリカ合衆国 アラバマ 36608, モービル, ユニバーシティ ブールバード 775  
, ビルディング 2, スイート 150 気付

(72)発明者 コントレラス, カルロス

アメリカ合衆国 アラバマ 36608, モービル, ユニバーシティ ブールバード 775  
, ビルディング 2, スイート 150 気付

(72)発明者 ディ パルマ, ジャック

アメリカ合衆国 アラバマ 36608, モービル, ユニバーシティ ブールバード 775  
, ビルディング 2, スイート 150 気付

F ターム(参考) 2G045 AA26 CB04 DA36

4C161 AA04 JJ09

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014526682A5</a>	公开(公告)日	2014-11-13
申请号	JP2014529665	申请日	2011-09-12
申请(专利权)人(译)	クリエイティ库斯エルエル海洋		
[标]发明人	パンネルルイス ロッカージャナ コントレラスカルロス ディパルマジャック		
发明人	パンネル, ルイス ロッカー, ジャナ コントレラス, カルロス ディパルマ, ジャック		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/50 A61B1/00		
CPC分类号	A61B10/0045 A61B1/31 A61B5/425 A61B10/0038 A61B2010/0061 G01N33/68 G01N33/6803		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/50.S A61B1/00.300.A		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB04 2G045/DA36 4C161/AA04 4C161/JJ09		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
其他公开文献	JP2014526682A		

**摘要(译)**

本发明的实施方案涉及用于收集检测，测量和鉴定靶分子的非侵入性方法和组合物。在一些实施方案中，方法和组合物涉及胃肠灌洗液或粪便中的靶分子。