

(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2008-533471**(P2008-533471A)**(43) 公表日 **平成20年8月21日 (2008. 8. 21)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 D	2 GO 4 1
GO 1 N 33/574 (2006. 01)	GO 1 N 33/574 A	
GO 1 N 27/62 (2006. 01)	GO 1 N 27/62 V	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁)

(21) 出願番号	特願2008-500963 (P2008-500963)	(71) 出願人	501497253
(86) (22) 出願日	平成18年3月10日 (2006. 3. 10)		ヴァーミリオン インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成19年11月12日 (2007. 11. 12)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 945
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/008578		5, フレモント, ダンバートン サークル, 6611
(87) 国際公開番号	W02006/099126	(71) 出願人	505045908
(87) 国際公開日	平成18年9月21日 (2006. 9. 21)		ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシテイ
(31) 優先権主張番号	60/662, 090		イ
(32) 優先日	平成17年3月11日 (2005. 3. 11)		アメリカ合衆国 メリーランド州 212
(33) 優先権主張国	米国 (US)		18 バルティモアー ノース・チャールズ・ストリート 3400
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 卵巣癌及び子宮内膜癌のバイオマーカー：ヘプシジン

(57) 【要約】

本発明は、患者における卵巣癌の症例、更に子宮内膜癌の症例を認定するのに有用な、タンパク質ベースのバイオマーカー及びそれらバイオマーカーの組み合わせを提供する。特に、ヘプシジンは、卵巣癌及び子宮内膜癌の両方のバイオマーカーであり、そしてヘプシジン、トランスサイレチン及び他の任意のマーカーを含むバイオマーカーのパネルが、対象のサンプルを卵巣癌又は非卵巣癌として分類するのに有用であることを見いだした。バイオマーカーは、S E L D I 質量分析により検出することができる。

【 0 0 3 6 】

このようにして見いだされた特定のバイオマーカーを、表 1 に示した。「プロテインチップアッセイ」の欄は、実施例のようにバイオマーカーが見い出されたクロマトグラフィーの分画、バイオマーカーが結合するバイオチップの種類及び洗浄条件を示すものである。各々の例において、種々の代替のプロテインチップアッセイを用いて、バイオマーカーの各々を見いだすことができる。

「理論上の質量」は、アミノ酸配列及びジスルフィド結合等による修飾をベースに予測質量を与える。

【 0 0 3 7 】

【表 1】

マーカー	P-値	卵巣癌において 調節された上昇 又は降下	プロテインチップ (登録商標) アッセイ
ヘプシジン-25 M2789 (理論質量 = 2789.41D)	0.002	上昇	尿、CM10、100mM の酢酸ナトリウム、pH4 で洗浄
	0.0011	上昇	尿、IMAC30- Cu ⁺⁺ 、100mM のリン 酸ナトリウム、0.5M のNaCl、pH7で洗浄
	0.0000069	上昇	血清、IMAC30- Cu ⁺⁺ 、50mMのリン酸 ナトリウム緩衝液、205 mMのNaCl、pH6で 洗浄
	試料セット1 卵巣癌対対照： 0.001040 卵巣癌対その他の 癌： 0.000002	上昇	血清、免疫沈降ITIH4 (3272m/zフラグメン ト)、PBS/0.1%のT ritonで洗浄、有機緩 衝液で溶出。 IMAC-Cu ⁺⁺ 、有機緩 衝液で洗浄
	試料セット2 バリデーション 0.000007	上昇	血清、免疫沈降ITIH4 (3272m/zフラグメン ト)、PBS/0.1%のT ritonで洗浄、有機緩 衝液で溶出。 IMAC-Cu ⁺⁺ 、有機緩 衝液で洗浄
	試料セット3 バリデーション 0.000000	上昇	血清、免疫沈降ITIH4 (3272m/zフラグメン ト)、PBS/0.1%のT ritonで洗浄、有機緩 衝液で溶出。 IMAC-Cu ⁺⁺ 、有機緩 衝液で洗浄

10

20

30

40

ヘプシジン-24 M2673 (理論質量 = 2674.32D)	0.001	上昇	尿、CM10、100mM の酢酸ナトリウム、pH4 で洗浄	10
	0.01	上昇	尿、IMAC30- Cu ⁺⁺ 、100mM のリ ン酸ナトリウム、0.5M のNaClp、H7で洗浄	
	試料セット1 卵巣癌対照： 0.000009 卵巣癌対その他の 癌： 0.000002	上昇	血清、免疫沈降ITIH4 (3272m/zフラグメン ト)、PBS/0.1%のT r i t o nで洗浄、有機緩 衝液で溶出。 IMAC-Cu ⁺⁺ 、有機緩 衝液で洗浄	
	試料セット2 バリデーション 0.000097	上昇	血清、免疫沈降ITIH4 (3272m/zフラグメン ト)、PBS/0.1%のT r i t o nで洗浄、有機緩 衝液で溶出。 IMAC-Cu ⁺⁺ 、有機緩 衝液で洗浄	20
	試料セット3 バリデーション 0.000001	上昇	血清、免疫沈降ITIH4 (3272m/zフラグメン ト)、PBS/0.1%のT r i t o nで洗浄、有機緩 衝液で溶出。 IMAC-Cu ⁺⁺ 、有機緩 衝液で洗浄	30
ヘプシジン-22 M2436 (理論質量 = 2436.07)	0.0002	上昇	尿、CM10、100mM の酢酸ナトリウム、pH4 で洗浄	40
	0.0619	上昇	尿、IMAC30- Cu ⁺⁺ 、100mM のリ ン酸ナトリウム、0.5M のNaCl、pH7で洗浄	

	試料セット 1 卵巣癌対対照： 0.000030 卵巣癌対その他の 癌： 0.000015	上昇	血清、免疫沈降 I T I H 4 P B S / 0 . 1 % の T r i t o n で洗浄、有機緩衝液 で溶出。 I M A C - C u ⁺⁺ 、有機緩 衝液で洗浄
	試料セット 2 バリデーション 0.002027	上昇	血清、免疫沈降 I T I H 4 (3 2 7 2 m / z フラグメン ト)、P B S / 0 . 1 % の T r i t o n で洗浄、有機緩 衝液で溶出。 I M A C - C u ⁺⁺ 、有機緩 衝液で洗浄
	試料セット 3 バリデーション 0.000000	上昇	血清、免疫沈降 I T I H 4 (3 2 7 2 m / z フラグメン ト)、P B S / 0 . 1 % の T r i t o n で洗浄、有機緩 衝液で溶出。 I M A C - C u ⁺⁺ 、有機緩 衝液で洗浄

10

20

30

40

ヘプシジン-20 M2191 (理論質量 = 2191.78)	0.0061	上昇	尿、CM10、100mM の酢酸ナトリウム、pH4 で洗浄
	0.0023	上昇	尿、IMAC30- Cu ⁺⁺ 、100mM のリ ン酸ナトリウム、0.5M のNaCl、pH7で洗浄
	試料セット1 卵巣癌対照： 0.000009 卵巣癌対その他の 癌： 0.000007	上昇	血清、免疫沈降ITIH4 (3272m/zフラグメン ト)、PBS/0.1%のT r i t o nで洗浄、有機緩 衝液で溶出。 IMAC-Cu ⁺⁺ 、有機緩 衝液で洗浄
	試料セット2 バリデーション 0.020419	上昇	血清、免疫沈降ITIH4 (3272m/zフラグメン ト)、PBS/0.1%のT r i t o nで洗浄、有機緩 衝液で溶出。 IMAC-Cu ⁺⁺ 、有機緩 衝液で洗浄
	試料セット3 バリデーション 0.000000	上昇	血清、免疫沈降ITIH4 (3272m/zフラグメン ト)、PBS/0.1%のT r i t o nで洗浄、有機緩 衝液で溶出。 IMAC-Cu ⁺⁺ 、有機緩 衝液で洗浄

10

20

30

40

【0038】

ヘプシジン-25、-24、-22及び-20のアミノ酸配列は、

50

【表 2】

マーカー	P 値	卵巣癌において調節された上昇又は減少	プロテインチップ (登録商標) アッセイ
トランスサイレチン ΔN10(M12,870.9) (推定質量: 12,887 ダルトン)	p<0.001	減少 (卵巣癌対非卵巣癌)	100 mM のリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0 (PB 緩衝液) を用いる Q10 アレー
非修飾トランスサイレチン (M13900) (推定質量: 13,761 ダルトン)	p<0.001	減少 (卵巣癌対非卵巣癌)	100 mM のリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0 (PB 緩衝液) を用いる Q10 アレー
スルホン化トランスサイレチン (M13850) (推定質量: 13,841 ダルトン)	p<0.001	減少 (卵巣癌対非卵巣癌)	100 mM のリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0 (PB 緩衝液) を用いる Q10 アレー
システイン化トランスサイレチン (M13,890.8) (推定質量: 13,880 ダルトン)	p<0.001	減少 (卵巣癌対非卵巣癌)	100 mM のリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0 (PB 緩衝液) を用いる Q10 アレー
Cys-Gly-修飾トランスサイレチン (M13944) (推定質量: 13,937 ダルトン)	p<0.001	減少 (卵巣癌対非卵巣癌)	100 mM のリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0 (PB 緩衝液) を用いる Q10 アレー
グルタチオン化トランスサイレチン (M14,086.9) (推定質量: 14,066 ダルトン)	p<0.001	減少 (卵巣癌対非卵巣癌)	100 mM のリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0 (PB 緩衝液) を用いる Q10 アレー

10

20

30

40

2.3 ApoA1

本発明の方法において有効な別のバイオマーカーは、アポリポタンパク質A1であり、ApoA1と称される。ApoA1は、US特許公開第2005-0059013A1号公報及び国際特許公開第WO2005/098447号公報において、卵巣癌のバイオマーカーとして記載されている。ApoA1は、267個のアミノ酸前駆体由来する243個のアミノ酸からなるタンパク質である(SwissProt Accession No. P02647)。ApoA1は、例えば、EMD Biosciences, Inc. (カタログ178474) (www.emdbiosciences.com/home.asp, San Diego, CA) から入手可能な抗体により認識される。特異的なApoA1バイオマーカーを、表3に示した。ApoA1は、H50アレイ又はIMAC30若しくはIMAC50アレイで視覚化可能であるが、H50アレイによる視覚化が好ましい。

【0045】

【表3】

マーカー	P-値	卵巣癌において 調節された上昇 又は減少	プロテインチップ (登録商標) アッセイ
ApoA1 (M28043) (推定質量: 28,078.62D)	p<0.000001	減少	H50緩衝液(10%アセ トニトリル、 0.1%TFA) IMAC-Cu ⁺⁺
ApoA1変異体 (M29977.4) (28,043D ピーク のショルダー(shoulder) に認められる。)		減少	H50緩衝液(10%アセ トニトリル、 0.1%TFA)

【0046】

本発明の好ましい方法には、ApoA1の修飾形態の使用が含まれる。ApoA1の修飾には、例えば、グリコシル化及び脂質化等の種々の化学基の転写後付加を含むことができる。

【0047】

2.4 トランスフェリン

本発明の方法において有効な別のバイオマーカーは、トランスフェリンである。トランスフェリンは、US特許公開第2005-0214760A1号公報において、卵巣癌のバイオマーカーとして記載されている。トランスフェリンは、698個のアミノ酸前駆体由来する679個のアミノ酸からなるタンパク質である(GenBank Accession No. NP_001054 GI: 4557871; SwissProt Accession No. P02787)。トランスフェリンは、例えばDako (カタログA006) (www.dako.com, Glostrup, Denmark) から入手可能な抗体により認識される。トランスフェリンは、グリコシル化される。従って、測定分子量は、グリコシル化が考慮されていない場合には理論値よりも高くなる。表4に、特異的なトランスフェリンバイオマーカーを示した。

【0048】

【表 4】

マーカー	P-値	卵巣癌において 調節された上昇 又は減少	プロテインチップ (登録商標) アッセイ
トランスフェリン (M79K) (推定質量：75,181D)	p<0.0001	減少	IMAC-Ni 100mMのNa ₂ HPO ₄ pH6.0 IMAC-Cu 50mMのリン酸ナトリウム、 0.25MのNaCl、 pH6.0

10

20

【0049】

2.5 CTAP-IIII:

本発明の方法において有用な別のバイオマーカーは、血小板塩基性タンパク質に由来するCTAP-IIII（結合組織の活性化ペプチドIIII）である。CTAP-IIIIは、2005年6月22日出願のUS仮特許出願第60/693,324号に、卵巣癌のバイオマーカーとして記載されている（Zhangら）。CTAP-IIIIは、85個のアミノ酸からなるタンパク質である（SwissProt P02775）。CTAP-IIIIは、例えばChemicon International（カタログ1484P）（www.chemicon.com, Temecula, CA.）から入手可能な抗体により認識される。CTAP-IIIIは、血小板塩基性タンパク質のフラグメントであり、血小板塩基性タンパク質の44～128個のアミノ酸を含有する。特異的なCTAP-IIIIバイオマーカーを、表5に示した。

30

【0050】

【表 5】

マーカー	P-値	卵巣癌において 調節された上昇 又は減少	プロテインチップ (登録商標) アッセイ
CTAP-III (M9290) (推定質量: 9287.74D)	p<0.0001	上昇	IMAC-Cu ⁺⁺ 100 mM のリン酸ナト リウム、pH 7.0

10

20

【0051】

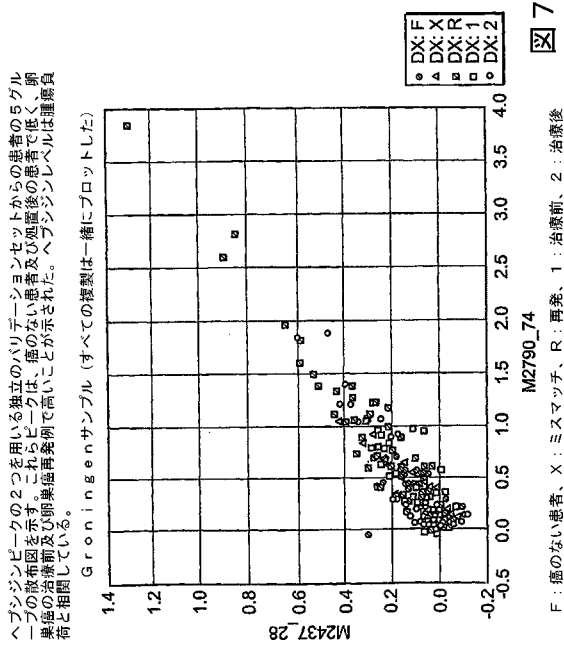
2.6 ITH4フラグメント

本発明の方法において有用なその他のバイオマーカーは、inter- α -トリプシン阻害剤の重鎖H4前駆体の開裂フラグメントの密接に関連する1つ又はそれ以上のセットであり、ここでは「ITH4フラグメント」とも称する。ITH4フラグメントは、US特許公開第2005-0059013A1号公報、国際特許公開第WO2005/098447号公報及び「Fung et al., Int. J. Cancer 115:783-789 (2005)」に、卵巣癌のバイオマーカーとして記載されている。ITH4フラグメントは、ITH4フラグメントno. 1、ITH4フラグメントno. 2及びITH4フラグメントno. 3よりなる群から選択可能である。特異的なITH4内部フラグメントバイオマーカーを、表6に示した。

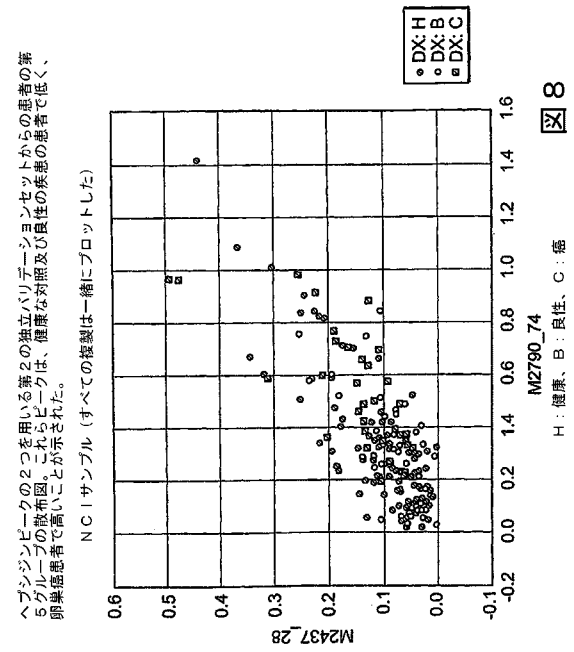
30

【0052】

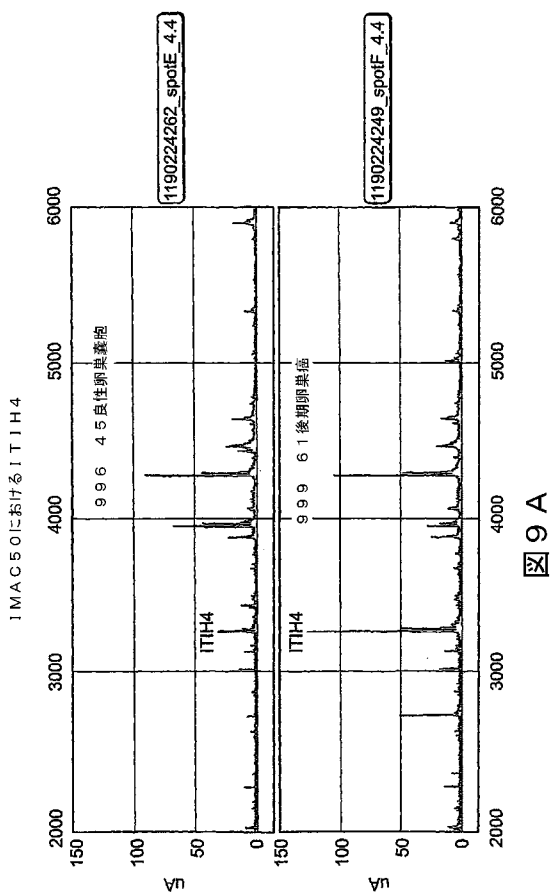
【 図 7 】



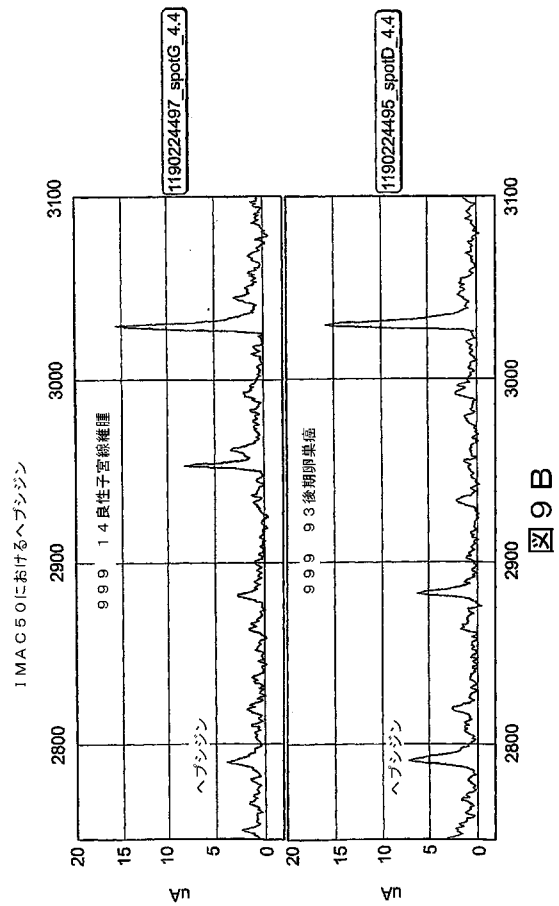
【 図 8 】



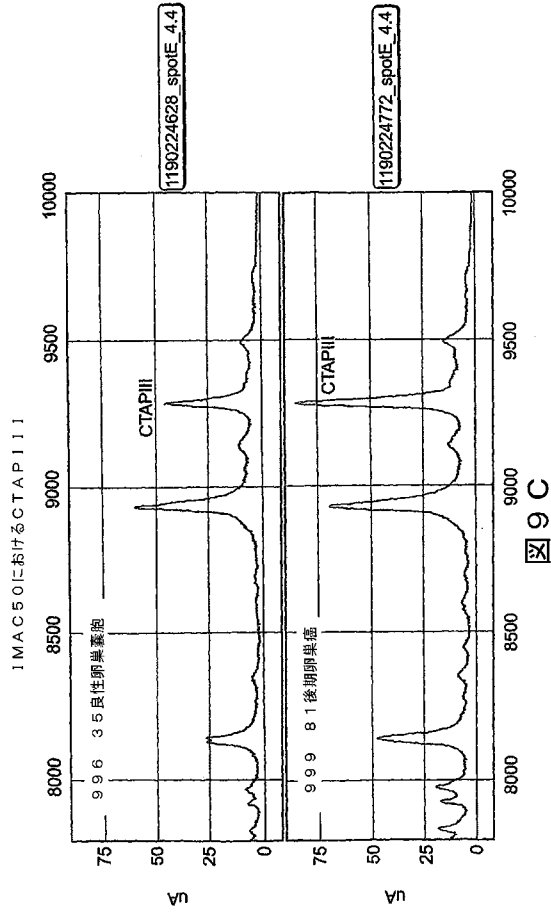
【 図 9 A 】



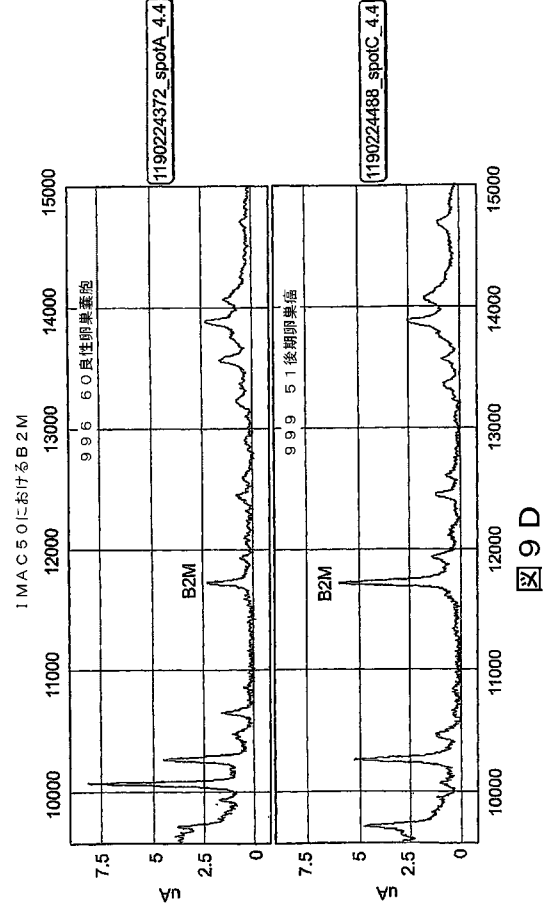
【 図 9 B 】



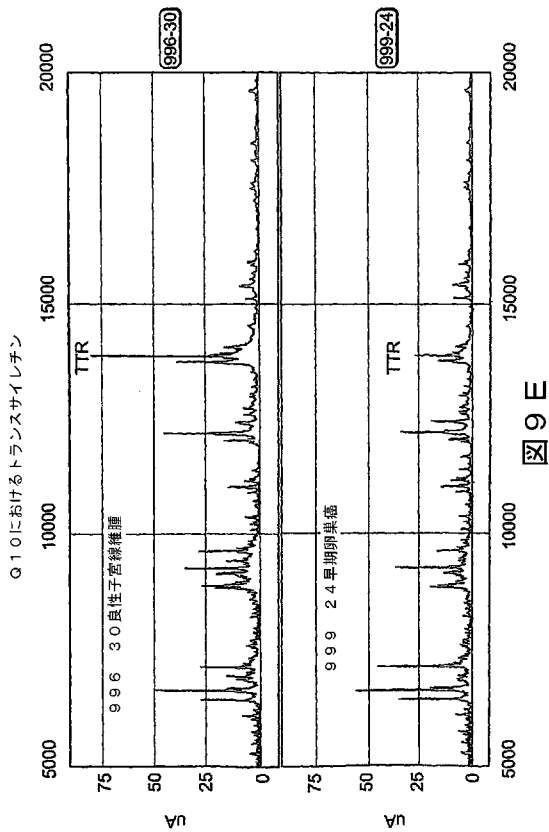
【図 9 C】



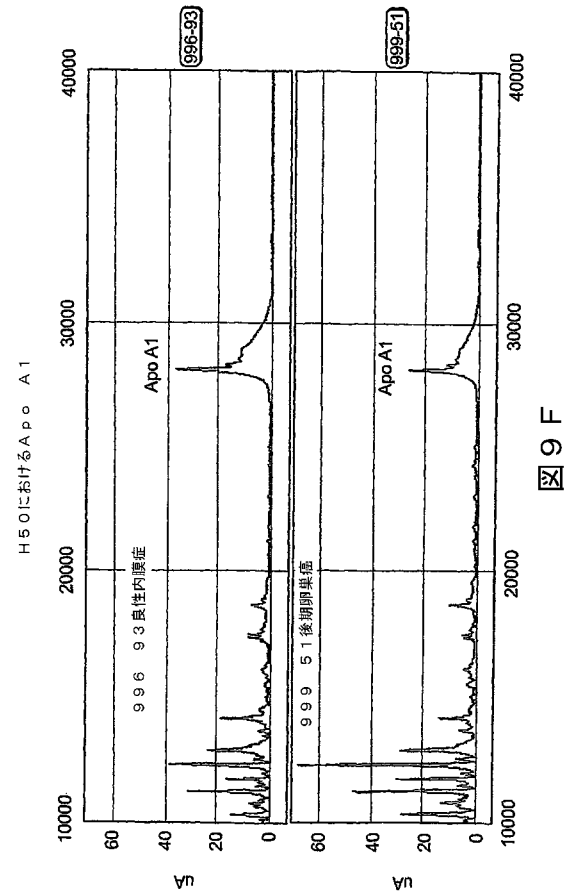
【図 9 D】



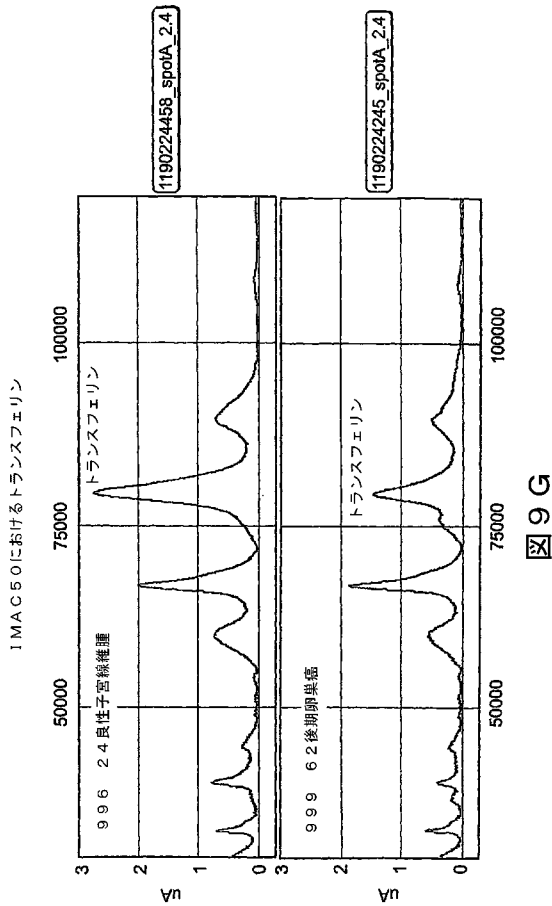
【図 9 E】



【図 9 F】



【図 9 G】



【図 10】

Q10アレイにおけるトランスサイレチンピーク

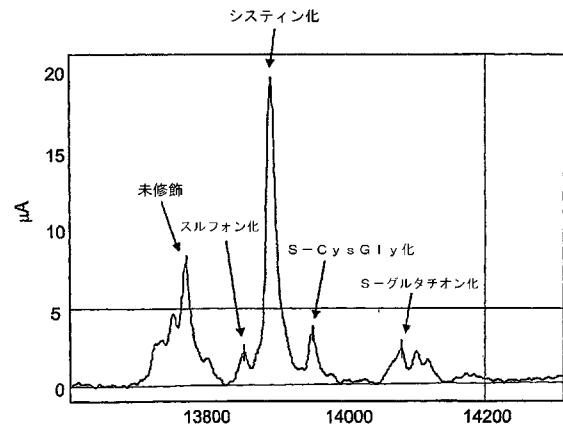


図 10

【図 11】

ミニアッセイ検討における7個の
マーカーに関するROC-曲線下
面積 (AUC) : 0.79

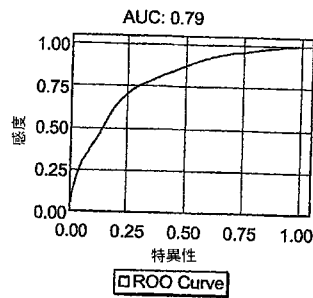


図 11

【配列表】

2008533471000001.app

