

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5069214号
(P5069214)

(45) 発行日 平成24年11月7日 (2012. 11. 7)

(24) 登録日 平成24年8月24日 (2012. 8. 24)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/574 (2006. 01)

GO 1 N 33/574

A

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53

D

GO 1 N 27/62 (2006. 01)

GO 1 N 27/62

V

請求項の数 35 (全 53 頁)

(21) 出願番号 特願2008-500963 (P2008-500963)
 (86) (22) 出願日 平成18年3月10日 (2006. 3. 10)
 (65) 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)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/008578
 (87) 国際公開番号 W02006/099126
 (87) 国際公開日 平成18年9月21日 (2006. 9. 21)
 審査請求日 平成21年2月23日 (2009. 2. 23)
 (31) 優先権主張番号 60/662, 090
 (32) 優先日 平成17年3月11日 (2005. 3. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501497253
 ヴァーミリオン インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 945
 55, フレモント, ダンバートン サーク
 ル, 6611
 (73) 特許権者 505045908
 ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシテ
 イ
 アメリカ合衆国 メリーランド州 212
 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) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 対象からの生体サンプル中の、ヘプシジンを含む1つ又はそれ以上のバイオマーカーを測定すること；そして

(b) ヘプシジンレベルの増加と卵巣癌の状態を相関させること；
 を含んでなる、対象における卵巣癌の状態を判定するためのデータを収集する方法。

【請求項 2】

バイオマーカーがトランスサイレチンを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

バイオマーカーが、ApoA1、トランスフェリン、CTAP-III及びITIH4フラグメントよりなる群から選ばれる少なくとも1つのバイオマーカーを更に含んでなる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

バイオマーカーが、ApoA1、トランスフェリン、CTAP-III及びITIH4フラグメントよりなる群から選ばれる少なくとも2つのバイオマーカーを更に含んでなる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

バイオマーカーが、ApoA1、トランスフェリン、CTAP-III及びITIH4フラグメントよりなる群から選ばれる少なくとも3つのバイオマーカーを更に含んでなる、請求項 3 に記載の方法。

10

20

【請求項 6】

バイオマーカーが、ApoA1、トランスフェリン、CTAP-III及びITH4フラグメントを更に含んでなる、請求項3に記載の方法。

【請求項 7】

ヘプシジンが、ヘプシジン-25であり、トランスサイレチンがシステイン化トランスサイレチンであり、そしてITH4フラグメントがITH4フラグメント1である、請求項3に記載の方法。

【請求項 8】

バイオマーカーが、β-2ミクログロブリンを更に含んでなる、請求項3に記載の方法。

10

【請求項 9】

1つ又はそれ以上のバイオマーカーを、質量分析で測定する、請求項1～8の何れか一項に記載の方法。

【請求項 10】

質量分析が、DELTA-MSである、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

少なくとも1つのバイオマーカーを、免疫学的測定法で測定する、請求項1～8の何れか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記サンプルが、血液又は血液製剤である、請求項1～11の何れか一項に記載の方法。

20

【請求項 13】

前記サンプルが、卵巣嚢胞液、腹水又は尿である、請求項1～11の何れか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記相関が、ソフトウェア分類アルゴリズムの実行によって実施される、請求項1～13の何れか一項に記載の方法。

【請求項 15】

卵巣癌の状態が、非卵巣癌に対する卵巣癌の状態である、請求項1～14の何れか一項に記載の方法。

30

【請求項 16】

非卵巣癌が、良性卵巣疾患である、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

非卵巣癌が、良性卵巣嚢胞、子宮内膜症、子宮線維腫、乳癌及び子宮頸癌から選ばれる婦人科疾患である、請求項15に記載の方法。

【請求項 18】

卵巣癌が、ステージI又はIIの卵巣癌である、請求項15～17の何れか一項に記載の方法。

【請求項 19】

対象が、卵巣癌の治療を受けており、そして卵巣癌が再発癌である、請求項1～18の何れか一項に記載の方法。

40

【請求項 20】

(c)対象に前記状態を報告すること；
を更に含んでなる、請求項1～19の何れか一項に記載の方法。

【請求項 21】

具体的な媒体に状態を記録すること、を更に含んでなる、請求項1～20の何れか一項に記載の方法。

【請求項 22】

(a)1回目に、対象からの生体サンプル中の、ヘプシジンを含む1つ又はそれ以上のバイオマーカーを測定すること；

50

(b) 2 回目に、対象からの生体サンプル中の 1 つ又はそれ以上のバイオマーカーを測定すること；

(c) 1 回目の測定値と 2 回目の測定値を比較すること；及び

(d) ヘプシジンレベルの経時的増大を卵巣癌の悪化と関連付け、経時的減少を卵巣癌の改善と関連付けること；

を含んでなる、卵巣癌の状態の経時的变化を判定するためのデータを収集する方法。

【請求項 2 3】

ヘプシジンの捕捉が可能な固体担体であって、ヘプシジンに結合する少なくとも 1 つの捕捉剤を付着している固体担体を含んでなる、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法のためのキット。

10

【請求項 2 4】

前記固体担体が、SELDI プローブを包含する、請求項 2 3 に記載のキット。

【請求項 2 5】

ヘプシジンの標準的基準を含んでなる、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のキット。

【請求項 2 6】

ヘプシジン及びトランスサイレチンの捕捉が可能な固体担体であって、固体担体は 1 又は複数からなり、それぞれの固体担体には少なくとも 1 つの捕捉剤が付着しており、ここにおいて、1 又は複数の捕捉剤がヘプシジン及びトランスサイレチンに結合する固体担体を含んでなる、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法のためのキット。

【請求項 2 7】

20

前記固体担体が、SELDI プローブを包含する、請求項 2 6 に記載のキット。

【請求項 2 8】

ヘプシジン及びトランスサイレチンの標準的基準を更に含んでなる、請求項 2 6 又は 2 7 に記載のキット。

【請求項 2 9】

ApoA1、トランスフェリン、CTAP - III 及び ITH4 フラグメントのうちの少なくとも 1 つ、ヘプシジン、並びにトランスサイレチンの捕捉が可能な固体担体であって、固体担体は 1 又は複数からなり、それぞれの固体担体には少なくとも 1 つの捕捉剤が付着しており、ここにおいて、1 又は複数の捕捉剤が ApoA1、トランスフェリン、CTAP - III 及び ITH4 フラグメントのうちの少なくとも 1 つ、ヘプシジン、並びにトランスサイレチンに結合する固体担体を含んでなる、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法のためのキット。

30

【請求項 3 0】

前記固体担体が、SELDI プローブを包含する、請求項 2 9 に記載のキット。

【請求項 3 1】

ヘプシジン、トランスサイレチン、並びに ApoA1、トランスフェリン、CTAP - III 及び ITH4 フラグメントのうちの少なくとも 1 つの標準的基準を更に含んでなる、請求項 2 9 又は 3 0 に記載のキット。

【請求項 3 2】

コンピュータに、

40

a. サンプル中のヘプシジンを含む少なくとも 1 つのバイオマーカーの測定値を包含する、サンプルに起因するデータへのアクセスを実行させ、

b. サンプルの卵巣癌の状態を、測定値の関数として分類する分類アルゴリズムを実行させるためのソフトウェア。

【請求項 3 3】

少なくとも 1 つのバイオマーカーが、トランスサイレチンを更に含んでなる、請求項 3 2 に記載のソフトウェア。

【請求項 3 4】

少なくとも 1 つのバイオマーカーが、ApoA1、トランスフェリン、CTAP - III 及び ITH4 フラグメントより選ばれる少なくとも 1 つのバイオマーカーを更に含ん

50

でなる、請求項 3 2 又は 3 3 に記載のソフトウェア。

【請求項 3 5】

少なくとも 1 つのバイオマーカーが、 β 2 - ミクログロブリンを更に含んでなる、請求項 3 2 ~ 3 4 の何れか一項に記載のソフトウェア。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2005年3月11日出願の米国特許仮出願第60/662,090号の便益を主張するもので、その全てを参照して本明細書に組み込まれている。

(発明の分野)

10

発明は一般的に、臨床診断に関連したものである。

【背景技術】

【0002】

卵巣癌は、先進国において最も死亡率の高い婦人科の悪性腫瘍の一つである。アメリカ合衆国だけでも年間に、約23,000名の女性が本疾病であると診断され、ほぼ14,000名が本疾病により死亡している(Jamal, A., et al., CA Cancer J. Clin, 2002; 52:23-47)。癌治療法の進歩に拘らず、卵巣癌の死亡率は、過去20年間実質的には変化がないままである(同上の文献)。疾病が診断された段階に応じた生存率の急勾配を考慮するならば、早期検出は、引き続き卵巣癌患者の長期生存率の改善に最も重要な要素であり続けている。

20

【0003】

後期段階に診断された卵巣癌の予後不良、確証的診断手段に関連した費用とリスク並びに一般の母集団における比較的少ない患者数が相俟って、一般母集団における卵巣癌患者のスクリーニングに適用する検査の感度及び特異性に極めて厳しい要件が求められている。

【0004】

癌の初期検出及び診断に適した腫瘍マーカーの識別により、患者の臨床成績の改善が大きく期待できる。曖昧な症状を示す患者、全く症状を示さない患者又は検診において比較的判断しにくい癌を有する患者にとって、腫瘍マーカーは特に重要である。初期段階における検出を目指して大きな努力が払われているにも拘らず、対費用効果の高い検査は開発されておらず(Paley PJ., Curr Opin Oncol, 2001;13(5):399-402)、女性は一般に、診断時に播種性の疾患の症状を示す(「婦人科腫瘍の本質と実際(Hoskins WJ, Perez CA, Young RC, editors., 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2000, p.981-1057)」の「上皮性卵巣癌(Ozol RF, et al.)」)。

30

【0005】

最も良く特徴が知られている腫瘍マーカーであるCA125は、ステージIの卵巣癌のおよそ30%から40%では陰性であり、多くの良性の疾患ではその割合は上昇する(Meyer T, et al., Br J Cancer, 2000; 82(9):1535-8; Buamah P., J Surg Oncol, 2000;75(4):264-5; Tuxen MK, et al., Cancer Treat Rev, 1995;21(3):215-45)。卵巣癌の初期段階での検出の集団ベースのスクリーニングの手段として並びに診断としてのその使用は、感度及び特異性が低いため無理である(「MacDonald ND, et al., Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1999;82(2):155-7」;「Jacobs I, et al., Hum Reprod, 1989;4(1):1-12」;「腫瘍マーカー、生理学的、病理生物学的、技術工学的並びに臨床適用(Diamandis EP, Fritsche, H., Lilja, H., Chan, D.W., and Schwartz, M., editor., Philadelphia: AACC)」における「卵巣癌における腫瘍マーカー(Shih I-M, et al.)」。骨盤及び更に近年では膣の超音波検査が、リスクの高い患者をスクリーニングするために使用されているが、いずれも一般集団に適用するためには技術的に感度及び選択性が十分ではなかった。(MacDonald ND, et al., supra)。癌モデルの長期リスク(Skates SJ, et al., Cancer, 1995;76(10 Suppl);2004-10)において、別の腫瘍マーカーとCA125との併用(「Woolas RP XF, et al., J Natl Cancer Inst, 1993;85(21):1748-51」;「Woola

40

50

s RP et al., Gynecol Oncol, 1995;59(1):111-6」;「Zhang Z, et al., Gynecol Oncol, 1999;73(1):56-61」;「ステージⅠの上皮卵巣癌を検出するための複数マーカーの利用:ニューラル・ネットワーク解析による性能の向上(Zhang Z, et al., American Society of Clinical Oncology 2001);年会の要旨」、並びに2次検査として超音波検査と並行してのCA125の使用(「Jacobs I DA, et al., Br Med J, 1993;306(6884):1030-34」及び「Menson U TA, et al., British Journal of Obstetrics and Gynecology, 2000;107(2):165-69」)での近年の試みでは、比較的低い有病率を示す卵巣癌のような疾病にとって極めて重要な、検査全体の特異性の改善に繋がる有望な結果が得られている。「Menon et al., J. Clin. Oncology (2005)23(31):7919-26」も参照されたい。

【0006】

10

後期卵巣癌の悲惨な予後のために、最小の陽性予測値が10%の検査でさえも臨床医は受け入れるであろうということは、一般的なコンセンサスである。(Bast, R.C., et al., Cancer Treatment and Research, 2002; 107:61-97)。これを一般の集団に拡張するには、一般スクリーニング検査の感度は70%を超え、選択性は99.6%を超える必要がある。近年、CA125、CA72-4又はM-CSF等の現存の血清マーカーは、何れも一つ一つではそのような性能を有していない(Bast, R.C., et al., Int J Biol Markers, 1998; 13:179-87)。

【0007】

従って、それ自体で又は他のマーカー若しくは診断モダリティーとの併用で卵巣癌の初期検出において必要な感度及び特異性を示す、新しい血清マーカーが切実に求められている(「卵巣癌:卵巣癌の初期検出、展望と実現性」(Bast RC, et al., : ISIS Medical Media Ltd., Oxford, UK))。

20

【0008】

卵巣癌の発現頻度が低いことを考慮するならば、適切な陽性予測を有する無症候性女性のためのスクリーニング検査の確立は、依然として困難である。しかしながら、例えば一般スクリーニング検査がないとしても、卵巣癌患者の長期生存率を改善させる要因の一つは、婦人科癌専門医に対して適切に優先順位を与えることである(「卵巣癌患者における治療プロセス及び転帰に対する外科専門医の影響」(Craig, CC et al., J Natl Canc Inst, 2006: 98, 172-80))。このことは、骨盤内腫瘍を示唆する症状を有する女性が、医師を訪れた場合には特に真実性がある。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

従って、患者の卵巣癌の状態を判定するための信頼の置ける且つ高い正確性を有する方法の確保が、希求されており、その様な方法の結果を用いて対象の治療が管理可能となる。

【課題を解決するための手段】

【0010】

(発明の概要)

ヘプシジン(hepcidin)は、卵巣癌(浸潤性上皮癌)に対するバイオマーカーであることが見出されている。更に、ヘプシジンは、子宮内膜癌を患っている対象に異なった形で存在しているバイオマーカーであることも明らかとなっている。とりわけ生体サンプル中のヘプシジンレベルは、非卵巣癌に比較して卵巣癌において、また非子宮内膜癌に比較して子宮内膜癌において増加することが見出されている。言い換えれば、ヘプシジンレベルの増加は、卵巣癌及び子宮内膜癌と相関している。

40

【0011】

ある態様において、識別される病状としては、良性卵巣疾患に対する卵巣癌; 良性女性生殖器疾患に対する卵巣癌; 子宮内膜症、子宮線維腫、乳癌及び子宮頸癌から選ばれる婦人科疾患に対する卵巣癌; その他の悪性腫瘍(例: 乳癌或いは大腸癌)に対する卵巣癌; 非卵巣癌に対するステージⅠの卵巣癌; 非卵巣癌に対する再発の卵巣癌がある。判定され

50

た状態から見て、別の診断検査又は治療法若しくは治療計画を含む更に進んだ方法が考えられる。

【0012】

その他のバイオマーカーのレベルとヘプシジンのレベルを併用した場合には、診断検査の予測力が改善することが認められている。具体的には、ヘプシジンレベルの上昇とトランスサイレチン濃度の低下は、卵巣癌と関連していた。ヘプシジンレベルの上昇とトランスサイレチン濃度の低下はまた、ApoA1（濃度減少）、トランスフェリン（濃度減少）、CTAP-III（濃度上昇）及びITH4の内部フラグメント（濃度上昇）と相俟って、卵巣癌と関連していた。これらのバイオマーカーは更に、診断検査におけるβ-2ミクログロブリン（濃度上昇）、CA125（濃度上昇）及び/又はその他の既知卵巣癌バイオマーカーとの併用が可能である。

10

【0013】

一態様として、本発明は、対象からの生体サンプル中の1つ又はそれ以上のバイオマーカー（バイオマーカーの少なくとも一つは、ヘプシジンである）を測定すること、そしてその測定結果（複数を含む）を卵巣癌及び非卵巣癌から選ばれる卵巣癌の状態と関連付けること、からなる方法であり、対象の卵巣癌の状態を認定する方法を提供するものである。その様な方法の一態様として、生体サンプル中の複数のバイオマーカーが測定され、その際測定されるバイオマーカーには、ヘプシジンに加えてトランスサイレチンが含まれる。その様な方法の別な態様では、生体サンプル中の複数のバイオマーカーが測定され、その際測定されるバイオマーカーには、ヘプシジンに加えてApoA1、トランスフェリン、CTAP-III及びITH4フラグメントからなるグループから、選定されるバイオマーカーの内の少なくとも1つが含まれる。その様な方法の更なる態様形では、生体サンプル中の複数のバイオマーカーが測定され、その際測定されるバイオマーカーには、ヘプシジンに加えてApoA1、トランスフェリン、CTAP-III及びITH4フラグメントからなるグループから、選定されるバイオマーカーの内の少なくとも2つが含まれている。その様な方法のもう更なる態様では、生体サンプル中の複数のバイオマーカーが測定され、その際測定されるバイオマーカーには、ヘプシジンに加えてApoA1、トランスフェリン、CTAP-III及びITH4フラグメントからなるグループから、選定されるバイオマーカーの内の少なくとも3つが含まれている。更なる態様では、複数のバイオマーカーが測定され、そして測定されるバイオマーカーにβ-2ミクログロブリンが含まれる。

20

30

【0014】

一態様として、ヘプシジンは、ヘプシジン-25であってもよく、トランスサイレチンは、システイン化トランスサイレチンであってもよく、及び/又はITH4フラグメントは、ITH4フラグメント1であってもよい。

【0015】

別の態様では、1つ又はそれ以上のバイオマーカーを質量分析で測定する。質量分析計は、適切な場合にはSELDI-MSであってもよい。更なる態様として、1つ又はそれ以上のバイオマーカーを免疫学的測定法で測定する。

【0016】

40

種々の生体サンプルが、本発明の方法に使用可能であり、例えば血液若しくは血液製剤からなる生体サンプル、又は卵巣嚢胞液、腹水若しくは尿からなる生体サンプルが含まれる。

【0017】

本発明の方法の一態様として、非卵巣癌とは、良性の卵巣疾患のことである。別の態様では、非卵巣癌とは、良性の卵巣嚢胞、子宮内膜症、子宮線維腫、乳癌及び子宮頸癌のような婦人科の疾患である。更なる態様では、卵巣癌はステージI及びIIの卵巣癌である。ある態様では、対象は卵巣癌の治療を受けており、その卵巣癌は再発癌である。

【0018】

別の態様では、方法は、(a)対象からの生体サンプル中の1つ又はそれ以上のバイオ

50

マーカー（バイオマーカーの少なくとも一つは、ヘプシジンである）を測定すること、そして（b）子宮内膜癌の状態とその測定結果（複数を含む）を関連付けること、からなる対象の子宮内膜癌の状態を認定する方法を提供するものである。一態様では、その状態は、非癌に対する子宮内膜癌を意味する。

【0019】

本発明の方法には、状態を対象に報告すること、有形の表現媒体に状態を記録すること及び／又は状態に基づいて対象の治療を管理することが更に包含できる。1つ又はそれ以上の複数のバイオマーカーは、対象の管理及び疾病の進行と関連する測定値を追跡することができる。

【0020】

好ましい態様としては、（a）1回目に、対象からの生体サンプル中の1つ又はそれ以上のバイオマーカー（少なくともバイオマーカーの一つは、ヘプシジンである）を測定し、（b）2回目に、対象からの生体サンプル中のバイオマーカーの少なくとも1つを測定し、（c）1回目の測定値と2回目の測定値を比較し、その測定値の比較から卵巣癌の過程を判定することからなる、卵巣癌の過程を判定するための方法が、提供される。

【0021】

更なる好ましい態様としては、対象からのサンプル中のヘプシジン及びトランスサイレチンを測定することからなる、方法が提供される。或る態様において、その様な方法は、サンプル中のApoA1、トランスフェリン、CTAP-IIII及びITH4フラグメントのうちの少なくとも1つを測定することを包含できる。

【0022】

別の態様では、本発明は、（a）少なくとも1つの捕捉剤（ここにおいて、捕捉剤はヘプシジンに結合する）を付着している固体担体、及び（b）この固体担体を、ヘプシジンを検出するために使用する説明書、からなるキットを提供する。この固体担体は、例えば、SELDIプローブを包含することができる。当該キットはまた、ヘプシジンの標準的基準を含んでいてもよい。

【0023】

更なる態様では、本発明は、（a）少なくとも1つの捕捉剤（ここにおいて、捕捉剤（複数を含む）は、ヘプシジン及びトランスサイレチンと結合する）を付着している少なくとも1つの固体担体、及び（b）この固体担体（複数を含む）を、ヘプシジン及びトランスサイレチンを検出するために使用する説明書、からなるキットを提供する。この固体担体は、例えば、SELDIプローブを包含することができる。当該キットはまた、ヘプシジン及びトランスサイレチンの標準的基準を含んでいてもよい。

【0024】

更に別の態様では、本発明は、（a）少なくとも1つの捕捉剤（ここにおいて、捕捉剤（複数を含む）は、ヘプシジン、トランスサイレチン、並びにApoA1、トランスフェリン、CTAP-IIII及びITH4フラグメントの内の少なくとも1つに結合する）が付着している少なくとも1つの固体担体、及び（b）固体担体（複数を含む）を、ヘプシジン、トランスサイレチン、並びにApoA1、トランスフェリン、CTAP-IIII及びITH4フラグメントの少なくとも1つを検出するために使用する説明書、からなるキットを提供する。この固体担体は、例えば、SELDIプローブを包含することができる。当該キットはまた、ヘプシジン、トランスサイレチン並びにApoA1、トランスフェリン、CTAP-IIII及びITH4フラグメントの内の少なくとも1つの、標準的基準を含んでいてもよい。

【0025】

本発明は、（a）サンプル中の少なくとも1つのバイオマーカー（ここにおいて、バイオマーカーの少なくとも1つは、ヘプシジンである）の測定値を包含する、サンプルに起因するデータにアクセスするコード、及び（b）サンプルの卵巣癌の状態を、測定値の関数として、類別する分類アルゴリズムを実行するコード、からなるソフトウェア製品が更に含まれる。一態様として、バイオマーカーの少なくとも一つは、トランスサイレチンを

10

20

30

40

50

更に包含する。別の態様として、バイオマーカーの少なくとも一つは、A p o A 1、トランスフェリン、C T A P - I I I 及び I T I H 4 フラグメントから選択される少なくとも一つのバイオマーカーを更に包含する。更に別の態様として、バイオマーカーの少なくとも一つは、 β 2 ミクログロブリンを更に包含する。

【 0 0 2 6 】

本発明はまた、対象からのサンプル中の少なくとも一つのバイオマーカー（ここにおいて、バイオマーカーの少なくとも一つはヘプシジンである）の相関性から判定された卵巣癌の状態に係る診断を、対象に連絡する方法も提供する。一態様として、バイオマーカーの少なくとも一つは、トランスサイレチンを更に包含する。診断は、例えば、コンピューター処理の媒体を経て適切に対象に連絡され得る。

10

【 0 0 2 7 】

本発明は更に、ヘプシジンと相互作用する化合物を同定する方法を提供する。尚、当該方法は、a) ヘプシジンを検査化合物と接触させること、及び b) 検査化合物がヘプシジンと相互作用するか否かを判定することを包含する。

【 0 0 2 8 】

本発明の他の態様に関しては、以下で考察した。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 2 9 】

(発明の詳細な説明)

1. 緒言

20

バイオマーカーは、別の表現型状態（例：疾病なし）と比較して、或る表現型状態（例：疾病あり）の対象から採取したサンプルに特異的に存在する有機生体分子である。異なったグループにおけるバイオマーカーの発現の平均又は中央値が、統計学的に有意であると算出された場合には、バイオマーカーは異なった表現型状態に対して特異的に存在している。統計学的有意に対する一般的な検定は多くあるが、特に、t 検定、A N O V A、クラスカル・ウォリス検定 (Kruskal-Wallis)、ウィルコクソン検定 (Wilcoxon)、マン・ホイットニー検定 (Mann-Whitney) 及びオッズ比 (odds ratio) が挙げられる。バイオマーカーは、それ自体又は他との併用で、対象がある表現型又は別の表現型の状態に属していることを示す相対危険率の指標を提供する。バイオマーカーはそれ自体、疾病（診断）、医薬品の治療効果（治療的診断法）及び薬剤の毒性のためのマーカーとして有用である。

30

【 0 0 3 0 】

本発明のバイオマーカーは、S E L D I を用いて見いだされた。従って、バイオマーカーは、部分的には質量対電荷比、質量分析におけるピークの形及びそれらの結合特性により特徴付けられる。これらの特徴は、生体分子の固有の特徴を示しており、生体分子を識別する方法におけるプロセスの限界を示すものではない。

【 0 0 3 1 】

本発明のバイオマーカーは、部分的には質量対電荷比により特徴付けられている。本明細書に、各バイオマーカーの質量対電荷比を示す。例えば「M 2 7 8 9」と示される特別な分子マーカーは、2 7 8 9 D の測定質量対電荷比を有する。質量対電荷比は、C i p h e r g e n B i o s y s t e m s、I n c . の P B S I I 質量分析計又は C i p h e r g e n P C S 4 0 0 0 質量分析計を用いて作成した質量分析スペクトルを用いて決定した。P B S I I は、約 $\pm 0.15\%$ の質量精度を有する機器である。更に、本機器は、約 $400 \sim 1000 \text{ m/dm}$ （ここで、m は質量を、dm は質量分析ピークの半値幅を示す）の質量分解能を有している。P C S 4 0 0 0 機器は、約 $\pm 0.12\%$ の生データの質量精度を有し、予測外部補正の質量精度は 0.1% 、内部補正の質量精度は 0.01% である。更に、本機器の質量分解能は、約 $1000 \sim 2000 \text{ m/dm}$ である（ここで、m は質量を、dm は質量分析ピークの半値幅を示す）。バイオマーカーの質量対電荷比は、B i o m a r k e r W i z a r d（登録商標）ソフトウェア (CIPHERGEN Biosystems, Inc.) を用いて決定した。B i o m a r k e r W i z a r d では、P B S I I 及び P C S

40

50

4000で決定したように、すべての解析スペクトルにおける同一ピークの質量対電荷比をクラスター化すること、クラスターにおける質量対電荷比の最大値及び最小値を選ぶこと、そして2で割ること、により質量対電荷比がバイオマーカーに割り付けられる。従って、質量は、これらの特徴を反映している。

【0032】

本発明のバイオマーカーは更に、飛行時間型質量分析におけるスペクトルのピークの形状によっても特徴付けられる。バイオマーカーを示すピークが認められる、マススペクトルを図に示した。

【0033】

本発明のバイオマーカーはまた、それらの吸着表面への結合特徴によっても特徴付けられる。各バイオマーカーの結合特徴もまた、本明細書に記述した。

【0034】

2. 卵巣癌のバイオマーカー

2.1 Hepcdin

ヘプシジンは、当初ヒト血漿及び尿において25個のアミノ酸からなるペプチド(ヘプシジン-25)として同定され、抗菌作用を有している。ヘプシジン前駆体の全長は、84個のアミノ酸からなるタンパク質(SwissProt Accession No. P81172)であり、シグナル配列及びプロ領域(pro-region)から構成されている(Kulaksiz, H. et al., (2004) Gut 53:735-743)。本発明のヘプシジンバイオマーカーは、完全な長さのヘプシジタンパク質のC-末端に由来する。ヘプシジンは、例えば、U.S. Biological (カタログH2008-51)(www.usbio.net, Swampscott, MA)より入手可能な抗体により認識される。本発明のバイオマーカーとして有用な4種の異なった変異型は、2789、2673、2436及び2191の算出された質量対電荷比により特徴付けられる。

【0035】

ヘプシジンは、Ciphergen Biosystems, Inc. (Fremont, CA)製のプロテインチップ(ProteinChip)アレイ(「Ciphergen」)を用いたSELDI技術により、卵巣及び子宮内膜癌に対するバイオマーカーであることが見いだされた。更に具体的に言うならば、ヘプシジンのレベルにより卵巣癌を、非癌、子宮頸癌及び良性の卵巣疾病から識別できる。それはまた、子宮内膜癌と非癌を識別できる。卵巣癌、子宮内膜癌、子宮頸癌と診断された対象、及び正常又は良性疾病と診断された対象から尿及び血清を採取した。ITIH4フラグメント1(詳細は、以下に記載)に対して惹起する抗体を用いて、ITIH4 3272m/zフラグメント(国際公開番号WO第2004/099432号)による共免疫沈降の存在下又は非存在下、サンプルをSELDIバイオチップに添加し、サンプル中のポリペプチドのスペクトルを、Ciphergen PBSIICの飛行時間型質量分析計又はPCS4000質量分析計を用いて作成した。このようにして得たスペクトルは、Ciphergen Biosystems, Inc.製のBiomarker Wizard付きCiphergen Express(登録商標)Data Managerソフトウェア及びBiomarker Patternソフトウェアを用いて解析した。各群のマススペクトルは、散布図(scatterplot)により解析した。散布図における各タンパク質クラスターに関して、卵巣癌群と対照群を比較するためにマン・ホイットニー検定解析を実施し、両群間で有意に($P < 0.01$)異なるタンパク質を選定した。本方法は、実施例の項で詳細に記載されている。

【0036】

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

10

20

30

40

50

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	
	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	
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	10
	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 riton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 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	30

10

20

30

40

【0038】

ヘプシジン-25、-24、-22及び-20のアミノ酸配列は、

ヘプシジン-25 (SEQ ID NO: 13): DTHFPICIFCCGCCCHR
SKCGMCKT

ヘプシジン-24 (SEQ ID NO: 14): THFPICIFCCGCCCHR

50

S K C G M C C K T

ヘプシジン - 22 (SEQ ID NO: 16): F P I C I F C C G C C H R

S K C G M C C K T

ヘプシジン - 20 (SEQ ID NO: 18): I C I F C C G C C H R

S K C G M C C K T

【0039】

本発明のバイオマーカーは更に、クロマトグラフィーの表面におけるそれらの結合特性により特徴付けられる。ヘプシジンは、pH 4 にて 100 mM の酢酸ナトリウムで洗浄した後、陽イオン交換吸着剤（例えば、C i p h e r g e n（登録商標）CM 10 のプロテインチップ（登録商標）アレイ）に結合する。ヘプシジンはまた、100 mM のリン酸ナトリウム、0.5 M の NaCl、pH 7 又は有機緩衝液で洗浄した後、金属キレート吸着剤（例えば、C i p h e r g e n（登録商標）IMAC - Cu⁺⁺ のプロテインチップ（登録商標）アレイ）に結合する。ヘプシジンは、下記のように I T I H 4 を視覚化するために使用される同様のアッセイで、視覚化することができる。

【0040】

ヘプシジンを検出するための好ましい生体サンプルは、尿及び血清である。ヘプシジンはまた、腹水及び嚢胞液、組織及び肝臓等の器官、並びにマクロファージ等の特異細胞においても検出される。

【0041】

2.2 トランスサイレチン

トランスサイレチンは、「プレ - アルブミン」とも称されるが、本発明の方法において有用な別のバイオマーカーである。トランスサイレチン及びその変異体は、US 特許公開第 2005 - 0059013 A 1 号公報及び国際特許公開第 WO 2005 / 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。未修飾のトランスサイレチンは、147 個のアミノ酸前駆体由来する 127 アミノ酸からなるタンパク質である (S w i s s P r o t A c c e s s i o n N o . P 0 2 7 6 6)。本発明のトランスサイレチンバイオマーカーには、未修飾のトランスサイレチン及び種々の修飾型の何れか又はその全てが含まれる。トランスサイレチンは、例えば D a k o（カタログ A 0 0 0 2）(www.dako.com, Glostrup, Denmark) から入手可能な抗体により認識される。

【0042】

血清の質量分析において、トランスサイレチンは、13.9 kD（ダルトン）付近にピークのクラスターとして認められる。このクラスターには、未修飾のトランスサイレチン、S - スルホン化トランスサイレチン、S - システイン化トランスサイレチン、S - G l y - C y s トランスサイレチン及び S - グルタチオン化トランスサイレチンが含まれる。これらの何れか及び / 又はすべてが、卵巣癌のバイオマーカーとして有用である。しかしながら、S - システイン化変異体は、スペクトルにおいて主要な形態を示すものであり、質量分析を用いる場合の好ましいバイオマーカーである。バイオマーカーとして有用な別のトランスサイレチン変異体は、トランスサイレチン Δ N 10 である。このようにして見いだされた特異的なトランスサイレチンのバイオマーカーを、表 2 に示した。

【0043】

【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

【0044】

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 2005-0059013 A1 号

50

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に由来する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】

10

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)

20

【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に由来する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】

30

40

【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 100 mM の Na_2HPO_4 pH 6.0 IMAC-Cu 50 mM のリン酸ナトリウム、 0.25 M の NaCl 、 pH 6.0

10

20

【0049】

2.5 CTAP-III:

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-III (結合組織の活性化ペプチドIII) である。CTAP-III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-IIIは、85個のアミノ酸からなるタンパク質である (SwissProt P02775)。CTAP-III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-III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-III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】

【表 6】

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
ITIH4フラグメント1 (M3272) (推定質量: 3273.72D)	<0.01	上昇	IMAC-Cu ⁺⁺ 100 mM のリン酸ナトリウム、pH 7.0
ITIH4フラグメント2 (M2725) (推定質量: 2725.06D)	<0.02	上昇	IMAC-Cu ⁺⁺ 100 mM のリン酸ナトリウム、pH 7.0
ITIH4フラグメント3 (M2627) (推定質量: 2627.94D)	<0.0057	上昇	IMAC-Cu ⁺⁺ 100 mM のリン酸ナトリウム、pH 7.0

10

20

【0053】

ITIH4フラグメントのアミノ酸配列を、以下に示す。

ITIH4フラグメント1 (SEQ ID NO: 23): MNFRPGVLS SRQLGLPGPPDVPDHAAYHPF

ITIH4フラグメント2 (SEQ ID NO: 24): PGVLS SRQLGLPGPPDVPDHAAYHPF

ITIH4フラグメント3 (SEQ ID NO: 25): GVLSS RQLGLPGPPDVPDHAAYHPF

30

【0054】

ITIH4前駆体は、930個のアミノ酸タンパク質 (SwissProt Q14624) である。ITIH4フラグメント1は、ヒトITIH4前駆体のアミノ酸658~687から成る。ITIH4フラグメント2は、ヒトITIH4前駆体のアミノ酸662~687から成る。ITIH4フラグメント3は、ヒトITIH4前駆体のアミノ酸663~687から成る。

【0055】

更に、本発明における好ましい方法には、ITIH4フラグメントの修飾型の利用が含まれる。ITIH4フラグメントの修飾には、例えばグリコシル化、脂質化、システイン化及びグルタチオン化等の種々の化学基の転写後付加を含むことができる。

40

【0056】

2.7 β-2ミクログロブリン

本発明の方法において有効な別のバイオマーカーは、β-2ミクログロブリンである。β-2ミクログロブリンは、2005年6月24日出願のUS仮特許出願第60/693,679号に、卵巣癌のバイオマーカーとして記載されている (Fungら)。β-2ミクログロブリンは、119個のアミノ酸前駆体から誘導される99個のアミノ酸からなるタンパク質である (GI: 179318; SwissProt Accession N

50

o . P 6 1 7 6 9) 。 β - 2 ミクログロブリンは、例えば A b c a m (カタログ A B 7 5 9) (www.abcam.com, Cambridge, MA.) から入手可能な抗体により認識される。特異的な β - 2 ミクログロブリンバイオマーカーを、表 7 に示した。

【 0 0 5 7 】

【表 7】

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
β - 2 ミクログロブリン (M11.7K) (推定質量 : 11729.17D)	<0.0001	上昇	I M A C - C u ⁺⁺

10

20

【 0 0 5 8 】

3 . バイオマーカー及びタンパク質の異なった形態

タンパク質は、しばしば複数の異なった形態でサンプル中に存在する。これらの形態は、転写前及び転写後修飾の何れか又は両方の結果によるものである。転写前修飾形態には、対立遺伝子多型、スプライス変異体及び R N A 編集形態等がある。転写後修飾形態には、タンパク質分解的切断 (例えば、親タンパク質のフラグメント)、グリコシル化、リン酸化、リピド化、酸化、メチル化、システイン化、スルホン化及びアセチル化等がある。サンプル中のタンパク質を検出又は測定する場合に、タンパク質の異なる形態間を区別する能力は、形態の異なる性質及び検出又は測定に用いる方法に依存する。例えば、モノクローナル抗体を用いる免疫学的測定は、抗原決定基を含有するすべてのタンパク質形態を検出し、それら識別しない。しかしながら、タンパク質上の異なる抗原決定基を指向した 2 種類の抗体を使用するサンドイッチ免疫学的測定では、両抗原決定基を含有するタンパク質のすべての形態を検出するが、抗原決定基の一方のみを含有する形態は検出しない。診断アッセイでは、特別な方法を用いて検出された形態が、特別な形態として同等の良好なバイオマーカーであるならば、タンパク質の形態の識別ができなくとも殆ど問題にはならない。しかしながら、タンパク質の特別な形態 (又は特別な形態のサブセット) が、特別な方法で同時に検出される異なった形態の集合体よりもバイオマーカーとして良好である場合には、アッセイの検出力は劣る可能性がある。この場合には、タンパク質の形態を相互に識別し、且つタンパク質の形態 (複数を含む) を特異的に検出し、測定するアッセイを採用することが有効である。分析対象物の異なった形態を識別すること、又は分析対象物の特殊な形態を特異的に検出することを、「分離すること (resolving)」と称する。

30

40

【 0 0 5 9 】

質量分析は、異なった形態のタンパク質が、一般的には質量分析計で分割可能な異なる質量を有しているため、異なった形態を分離するためには特に強力な方法である。従って、タンパク質の一つの形態が、他の形態のバイオマーカーよりもある疾病に対して優れた

50

バイオマーカーでありながら、従来の免疫学的測定がその形態を識別できず且つその有用なバイオマーカーを特異的に検出できない場合にも、質量分析では有用な形態を特異的に検出し測定できる可能性がある。

【 0 0 6 0 】

有用な方法の一つは、質量分析と免疫学的測定を組み合わせたものである。まず、生体特異的捕捉剤（例：バイオマーカーとそのバイオマーカーの他の形態を認識する抗体、アプタマー又は A f f i b o d y ）を、対象のバイオマーカーの捕捉のために使用する。好ましくは、生体特異的捕捉剤は、ビーズ、プレート、膜又はチップのような固相に結合させる。非結合のものを洗い去った後、捕捉された分析対象物を、質量分析にて検出及び／又は測定する。（この方法では、タンパク質と結合する又は場合によっては抗体により認識される、及びそれ自体がバイオマーカーとなり得る、タンパク質相互作用物が、捕捉されることになる。）従来の M A L D I 又は S E L D I のようなレーザー脱離法及びエレクトロスプレーイオン化法を含めた種々の形の質量分析が、タンパク質の形態を検出するために有用である。

【 0 0 6 1 】

従って、特定のタンパク質の検出又は特定のタンパク質の定量について述べる時、それは種々の形態のタンパク質を分離して或いは分離せずに、そのタンパク質を検出及び測定することを意味する。例えば、「ヘプシジンを測定すること」という段階には、種々の形態のタンパク質を区別しない方法（例えば免疫学的測定）、更にある形態を他の形態から区別する方法又はタンパク質の特定の形態（例えば、ヘプシジン - 2 5、ヘプシジン - 2 4、ヘプシジン - 2 2 及びヘプシジン - 2 0 の何れか及び／又はすべての、個別に又はその組み合わせで）を測定する方法、によるヘプシジンの測定も含まれる。対照的に、タンパク質の特定の形態（複数を含む）（例えば、ヘプシジンの特定の形態）を測定することが望まれる場合には、その特定の形態（又は複数の形態）が特定される。例えば、「ヘプシジン - 2 5 を測定すること」ということは、例えばヘプシジン - 2 4、ヘプシジン - 2 2 及びヘプシジン - 2 0 等の他の形態のヘプシジンから、ヘプシジン - 2 5 を識別する方法でのヘプシジン - 2 5 の測定を意味する。同様に、「トランスサイレチンを測定すること」とは、対象の検査サンプルに認められるトランスサイレチンの形態の何れか及び／又はすべてを、個別に又は組み合わせで測定することが含まれる。一方、「システイン化トランスサイレチンを測定すること」とは、患者のサンプル中に認められるトランスサイレチンの他の形態（例えば、トランスサイレチン Δ N 1 0、未修飾トランスサイレチン、グルタチオン化トランスサイレチン、スルホン化トランスサイレチン等）から、システイン化トランスサイレチンを識別できる方法でトランスサイレチンを測定することを意味する。「開裂していないトランスサイレチンを測定すること」とは、未修飾トランスサイレチン、スルホン化トランスサイレチン、システイン化トランスサイレチン、C y s G l y 修飾トランスサイレチン及びグルタチオン化トランスサイレチンの、何れかの個別又は組み合わせでの測定を意味する。

【 0 0 6 2 】

4 . 卵巣癌に関するバイオマーカーの検出

本発明のバイオマーカーは、すべての適切な方法により検出可能である。検出法の例として、光学的方法、電気化学的方法（ボルタンメトリー及び電流測定法）、原子間力顕微鏡及び例えば多極共鳴スペクトロスコーピー等の高周波法がある。共焦点及び非共焦点の顕微鏡検査に加えて、光学的方法の実例としては、蛍光、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、及び複屈折又は屈折率（例えば、表面プラズモン共鳴、偏光解析法、共振ミラー法、グレーティングカプラ導波管法（grating coupler waveguide method）又は干渉分光法）による検出がある。

【 0 0 6 3 】

一態様では、サンプルは、バイオチップを用いて分析される。バイオチップは一般に、捕捉剤（吸着試薬又は親和性試薬とも称される）が付着する、実質的に平らな表面を有する固定基質を包含する。しばしばバイオチップの表面は、それぞれが捕捉剤と結合する複

数のアドレス可能領域を包含する。

【0064】

タンパク質バイオチップは、ポリペプチドの捕捉に適応したバイオチップである。多くのタンパク質バイオチップが、当該技術分野で記載されている。これらには、例えば、C i p h e r g e n B i o s y s t e m s、I n c . (Fremont, CA)、Z y o m y x (Hayward, CA)、I n v i t r o g e n (Carlsbad, CA)、B i a c o r e (Uppsala, Sweden) 及び P r o c o g n i a (Berkshire, UK) により製造されているタンパク質バイオチップがある。その様なタンパク質バイオチップの例が、以下の特許又は公開特許出願に記載されている：U S 特許第 6 , 2 2 5 , 0 4 7 号 (Hutchens & Yip)、U S 特許第 6 , 5 3 7 , 7 4 9 号 (Kuimelis & Wagner)、U S 特許第 6 , 3 2 9 , 2 0 9 号 (Wagner et al.)、P C T 国際公開第 W O 0 0 / 5 6 9 3 4 号公報 (Englert et al.)、P C T 国際公開第 W O 0 3 / 0 4 8 7 6 8 号公報 (Boutell et al.) 並びに U S 特許第 5 , 2 4 2 , 8 2 8 号 (Bergstrom et al.)。

10

【0065】

4 . 1 質量分析による検出

好ましい態様では、本発明のバイオマーカーは、気相イオンを検出するための質量分析計を用いる方法である、質量分析により検出される。質量分析計の例としては、飛行時間型、磁場型、四重極フィルター型、イオン・トラップ型、イオンサイクロトロン共鳴、静電場型 (electrostatic sector) 分析計及びこれらの複合型がある。

【0066】

20

更なる好ましい方法では、質量分析計は、レーザー脱離 / イオン化質量分析計である。レーザー脱離 / イオン化質量分析計では、分析対象物を、質量分析計のプロープ・インターフェイス作動のために適合させ、且つイオン化及び質量分析計への導入のために分析対象物をイオン化エネルギーに暴露する器具である、質量分析プローブの表面に置く。レーザー脱離質量分析計では、表面から分析対象物を離脱、揮発、イオン化させて、質量分析計のイオン光学系にそれらを曝露させるために、赤外線レーザーも用いられるが主として紫外線レーザー由来のレーザー・エネルギーが用いられる。L D I によるタンパク質の分析では、M A L D I 又は S E L D I の形式を取ることができる。

【0067】

4 . 1 . 1 . S E L D I

30

本発明において使用される好ましい質量分析技術は、例えば、U S 特許第 5 , 7 1 9 , 0 6 0 号及び同第 6 , 2 2 5 , 0 4 7 号 (Hutchens & Yip) に記載されているように「表面エンハンス型レーザー脱離イオン化質量分析法」又は「S E L D I」である。これは、分析対象物（ここでは、1つ又はそれ以上のバイオマーカー）が S E L D I 質量分析計プローブの表面に捕捉されている、脱離 / イオン化気相イオン分析計（例えば、質量分析計）の方法を意味する。

【0068】

S E L D I はまた、「アフィニティ捕捉質量分析計」又は「表面エンハンス型アフィニティ捕捉」(S E A C) とも称される。当該バージョンには、物質と分析対象物間の非共有結合の親和性相互作用（吸着）を介して、分析対象物を捕捉する物質をプローブ表面に有しているプローブの使用が含まれる。この物質は、「吸着剤」、「捕捉剤」、「親和剤」又は「結合部」とさまざまに称されている。その様なプローブは、「アフィニティ捕捉プローブ」として、及び「吸着表面」を有しているものとして意味することができる。捕捉剤には、分析対象物と結合可能なすべての物質がなり得る。捕捉剤は、物理吸着又は化学吸着によりプローブ表面に付着する。ある態様では、プローブは、表面に既に付着されている捕捉剤を有するものである。他の態様では、プローブは、予め活性化され、例えば、共有結合又は配位結合を形成する反応を介して、捕捉剤を結合できる反応部を有している。エポキシド及びアシル - イミダゾールが、抗体又は細胞受容体等のポリペプチド捕捉剤と共有結合する有用な反応部である。ニトリロ三酢酸及びイミノ二酢酸は、ヒスチジン含有ペプチドと非共有結合的に相互作用する金属イオンと結合する、キレート剤として機

40

50

能する有用な反応部である。吸着剤は一般に、クロマトグラフ用吸着剤と生体特異的吸着剤に類別される。

【 0 0 6 9 】

「クロマトグラフ用吸着剤」は、クロマトグラフで一般的に使用される吸着剤を指す。クロマトグラフ吸着剤としては、例えば、イオン交換物質、金属キレート剤（例えば、ニトリロ三酢酸及びイミノ二酢酸）、固定化金属キレート剤、疎水性相互作用吸着剤、親水性相互作用吸着剤、色素、単純生体分子（例えば、核酸、アミノ酸、単糖及び脂肪酸）及び混合モード吸着剤（例えば、疎水性吸引/静電反発力吸着剤）がある。

【 0 0 7 0 】

「生体特異的吸着剤」とは、例えば核酸分子（例：アプタマー）、ポリペプチド、多糖、脂質、ステロイド又はこれら物質の抱合体（例：糖タンパク質、リポタンパク質、糖脂質、核酸（例えば、DNA）-タンパク質抱合体）を指す。ある例においては、生体特異的吸着剤は、多タンパク質複合体、生体膜、或いはウイルス等の巨大分子構造である場合もある。生体特異的吸着剤の例としては、抗体、受容体タンパク質及び核酸がある。一般に生体特異的吸着剤は、クロマトグラフ吸着剤に比較して高い特異性を有している。SELDIに使用される吸着剤の更なる例は、US特許第6,225,047号に見出すことができる。「生体選択的吸着剤」とは、少なくとも 10^{-8} Mの親和性で分析対象物に結合する吸着剤を指す。

【 0 0 7 1 】

Ciphergen Biosystems, Inc. が製造したタンパク質バイオチップは、アドレス可能な部位に付着されるクロマトグラフ吸着剤又は生体特異的吸着剤を有する表面を包含する。Ciphergen プロテインチップ（登録商標）アレイには、NP20（親水性）；H4及びH50（疎水性）；SAX-2、Q-10及び（陰イオン交換）；WCX-2及びCM-10（陽イオン交換）；IMAC-3、IMAC-30及びIMAC-50（金属キレート）；並びにPS-10、PS-20（アシル-イミダゾール、エポキシドを有する反応性表面）及びPG-20（アシルイミダゾールを介して結合したプロテインG）が含まれる。疎水性プロテインチップアレイは、イソプロピル又はノニルフェノキシ-ポリ（エチレングリコール）メタクリル樹脂官能基を有している。陰イオン交換プロテインチップアレイは、四級アンモニウム官能基を有する。陽イオン交換プロテインチップアレイは、カルボン酸官能基を有する。固定化金属キレートプロテインチップアレイは、キレートを作ることにより銅、ニッケル、亜鉛及びガリウム等の遷移金属イオンを吸着するニトリロ三酢酸官能基（IMAC3及びIMAC30）或いはO-メタクリロイル-N,N-ビス-カルボキシメチルチロシン官能基（IMAC50）を有する。予め活性化されたプロテインチップアレイは、タンパク質上の基と反応し共有結合できる、アシル-イミダゾール又はエポキシド官能基を有する。

【 0 0 7 2 】

このようなバイオチップに関しては更に、US特許第6,579,719号（HutchensとYip、「Retentate Chromatography」、2003年6月17日）、US特許第6,897,072号（Richら、「気相イオン分光計のプロープ」、2005年5月24日）、US特許第6,555,813号（Beecheretら、「気相質量分析計における疎水性被覆含有サンプルホルダー」、2003年4月29日）、US特許公開第US2003-0032043号公報（Pohl and Papanu、「ラテックスをベースとする吸着剤チップ」、2002年7月16日）、PCT国際特許公開第WO03/040700号公報（Umら、「疎水性表面チップ」、2003年5月15日）、US特許公開第US2003-0218130A1号公報（Boschettiら、「多糖をベースとするヒドロゲルで被覆された表面を有するバイオチップ」、2003年4月14日）及びUS特許公開第US2005-059086A1号公報（Huangら、「光架橋ヒドロゲル・ブレンド表面被覆」、2005年3月17日）に記載されている。

【 0 0 7 3 】

10

20

30

40

50

一般に、吸着剤表面を有するプローブは、サンプル中に存在しているバイオマーカー（複数を含む）が吸着剤に結合するに十分な時間でサンプルと接触させる。インキュベーション後、非結合の物質を除去するために基質を洗浄する。適切な洗浄溶液は、すべて使用可能であるが、水溶性溶液を用いることが好ましい。分子が結合して残存する割合は、洗浄の程度を調整することにより操作可能である。洗浄溶液の溶離特性は、例えばpH、イオン強度、疎水性、カオトロピズムの程度、洗浄の強度、及び温度に依存し得る。プローブがSEAC及びSENDの特性の何れも有していない場合には（ここに記載されているように）、分子を吸収するエネルギーが、結合バイオマーカーを有する基質に適應される。

【0074】

10

別の方法においては、バイオマーカーに結合する抗体を有している固相結合の免疫吸着剤によりバイオマーカーが捕捉され得る。非結合物質を除去するために吸着剤を洗浄した後、バイオマーカーを固相から溶出し、バイオマーカーに結合するSELDIチップに添加し、SELDIにて分析する。

【0075】

基質に結合したバイオマーカーは、例えば飛行時間型質量分析計等の気相イオン分光計にて検出される。バイオマーカーは、例えばレーザー等のイオン化源によりイオン化され、生成したイオンはイオン光学アセンブリにて集束させ、続いて質量分析計にて通過イオンを分散させて、通過イオンを分析する。続いて検出器により検出イオンの情報を質量対電荷比に変換する。一般に、バイオマーカーの検出には、シグナル強度の検出が含まれる。すなわち、バイオマーカーの量及び質量が、共に決定され得る。

20

【0076】

4.1.2 SEND

レーザー脱離質量分析計を用いた別の方法は、表面エンハンス型Neat脱離法(SEND)と称される。SENDには、プローブの表面に化学的に結合するエネルギー吸収分子から成るプローブ(SENDプローブ)の使用が含まれる。「エネルギー吸収分子」(EAM)という語句は、レーザー脱離/イオン化源からエネルギーを吸収でき、続いてその後直ちに接触して分析対象物の分子の脱離及びイオン化に寄与できる分子を意味する。EAMカテゴリーには、しばしば「マトリックス」と称されるMALDIに使用される分子が含まれ、実例として桂皮酸誘導体、シナピン酸(SPA)、シアノ水酸化桂皮酸(CHCA)及び二水酸化安息香酸、フェルラ酸及び水酸化アセトフェノン誘導体がある。ある態様においては、エネルギー吸収分子は、例えばポリメタクリレート等の直鎖又は架橋ポリマーに組み込まれている。例えば、その組成が、 α -シアノ-4-メタクリロキシオキシ桂皮酸及びアクリレートである場合もある。別の態様では、その組成は、 α -シアノ-4-メタクリロキシオキシ桂皮酸、アクリレート及び3-(トリエトキシ)シリルプロピルメタクリレートの共重合体である。また、別の態様では、その組成は、 α -シアノ-4-メタクリロキシオキシ桂皮酸及びオクタデシルメタクリレート(C18SEND)の共重合体である。SENDは更に、US特許第6,124,137号及びPCT国際特許公開第WO03/64594号(Kitagawa、「分析対象物の脱離/イオン化に使用するエネルギー吸収部位を有するモノマー及びポリマー」2003年8月7日)に記載されている。

30

40

【0077】

SEAC/SENDは、捕捉剤及びエネルギー吸収分子の両方が、サンプルの存在する表面に付着している、レーザー脱離質量分析計のバージョンである。従って、外部マトリックスを適用する必要なしに、親和性捕捉及びイオン化/脱離を介してSEAC/SENDプローブに分析対象物を捕捉することが可能となる。C18のSENDバイオチップは、捕捉剤として機能するC18、及びエネルギー吸収部位として機能するCHCA部分からなるSEAC/SENDのバージョンである。

【0078】

4.1.3 SEPAR

50

L D I の別のバージョンは、表面エンハンス型感光付加及び脱離 (Surface-Enhanced Photolabile Attachment and Release) (S E P A R) と称される。S E P A R には、分析対象物と共有結合でき、続いて光 (例えば、レーザー光 (U S 特許第 5, 719, 060 号を参照されたい)) に曝露された後その部分の光に不安定な結合が開裂することにより分析対象物を脱離する、表面に付着する部分を有するプローブの使用が含まれる。S E P A R 及びその他の S E L D I の形態は、本発明に従ってバイオマーカー或いはバイオマーカー・プロフィールを検出するのに容易に適応する。

【0079】

4.1.4. M A L D I

M A L D I は、タンパク質及び核酸等の生体分子を分析するために使用されるレーザー脱離/イオン化の従来からの方法である。M A L D I の一方法においては、サンプルをマトリックスと混合し、直接 M A L D I チップ上に置く。しかしながら、血清又は尿等の生体サンプルの複雑性により、サンプルを予め分画しない場合にはこの方法は最適とはならない。従って、ある態様では、生体特異的物質 (例えば抗体) 又は樹脂のような固体担体に結合したクロマトグラフ材料 (例えば、スピン・カラムで) で、バイオマーカーを先ず捕捉させる。本発明のバイオマーカーに結合する特異的親和性物質に関しては上述の通りである。親和性物質上で精製後、バイオマーカーを溶出し、続いて M A L D I において検出する。

【0080】

4.1.5 質量分析計におけるイオン化のその他の形態

別の方法では、バイオマーカーを、L C - M S 又は L C - L C - M S にて検出する。この方法には、液体クロマトグラフィーを 1 回又は 2 回通過させてサンプル中のタンパク質を分離し、次いで一般的にはエレクトロスプレーイオン化にて質量分析する過程が含まれる。

【0081】

4.1.6 データ解析

飛行時間型質量分析法による分析対象物の分析では、飛行時間スペクトルが得られる。最終的に解析された飛行時間スペクトルは一般的に、サンプルに対するイオン化エネルギーの単一パルスからのシグナルを示すのではなく、複数のパルスからのシグナルの総計を示している。これによりノイズが減少し、ダイナミックレンジが高くなる。次にこの飛行時間型データを、データ処理にかける。C i p h e r g e n のプロテインチップ (登録商標) ソフトウェアでは、データ処理にはマススペクトル作成のための T O F - t o - M / Z 変換処理、機器オフセットを除外するためのベースラインの減算処理及び高周波数雑音を減少させるための高周波数雑音フィルター処理が含まれる。

【0082】

バイオマーカーの脱離及び検出により作成されるデータは、プログラムを組むことができるデジタル・コンピュータを使用して解析可能である。コンピュータプログラムを用いて、検出されたバイオマーカーの数を示すデータ、並びに場合に応じてシグナル強度及び検出された各バイオマーカーに関する分子質量を決定する。データ解析には、バイオマーカーのシグナル強度を決定する段階、及び予め定めておいた統計的分布から外れたデータを除外する段階を組み込むことができる。例えば、幾つかの標準に対する各ピークの高さを計算することにより、観察されるピークを正規化することができる。

【0083】

コンピュータは、得られた結果を表示のために種々のフォーマットに変換することができる。標準的なスペクトルが表示可能であるが、一つの有用なフォーマットではピークの高さ及び質量の情報のみがスペクトル図に保持され、その結果見やすい画像が得られ、ほぼ同等の分子量を有するバイオマーカーがより容易に認識できる。別の有用なフォーマットでは、2 つ又はそれ以上のスペクトルを比較し、固有のバイオマーカー及びサンプル間で上昇又は減少の調整を受けたバイオマーカーが都合良く強調表示されている。これらのフォーマットの何れかを用いることにより、特定のバイオマーカーがサンプル中に存在して

いるか否かを、容易に判定できる。

【0084】

一般に分析には、分析対象物からのシグナルを示すスペクトルのピークの同定も含まれる。ピークの選択は目視で行うが、ピークの検出を自動で行えるC i p h e r g e nのプロテインチップ（登録商標）ソフトウェア・パッケージの一部としてソフトウェアを入手できる。一般に、このソフトウェアは、選択した閾値を越えるシグナル対ノイズ比を示すシグナルを同定し、そしてピークシグナルの質量中心にあるピークの質量を標識する機能がある。有用な適用の一つでは、多くのスペクトルを比較して、マススペクトルにおいて或る選択された割合で存在している同一ピークを同定する。このソフトウェアのバージョンの一つでは、種々のスペクトルに出現するすべてのピークを規定された範囲内にクラスター化し、質量（M/Z）クラスターの中心点に近いすべてのピークの質量（M/Z）を決定する。

10

【0085】

データを解析するために用いられるソフトウェアには、本発明に従ったバイオマーカーのシグナルがその対応するシグナルのピークを示しているか否かを判定するために、シグナルの分析にアルゴリズムを適用するコードを含めることができる。またそのソフトウェアにより、検査中の特定の臨床パラメータの状態を示す、バイオマーカーピーク又はバイオマーカーピークの組み合わせが存在しているか否かを判定するために、観察されたバイオマーカーのピークに関するデータを分類ツリー解析又はANN解析することができる。データの解析には、直接的又は間接的の何れかでサンプルの質量分析から得られる種々のパラメータが重要となる可能性がある。これらのパラメータには、1つ又はそれ以上のピークが存在するか否か、1つのピーク又は1群のピークの型、1つ又はそれ以上のピークの高さ、1つ又はそれ以上のピークの高さの対数、及びその他のピークの高さに関するデータの算術乗算が含まれるが、これらに限定されるものではない。

20

【0086】

4.1.7 卵巣癌に対するバイオマーカーのSELDI検出のための一般的なプロトコール

本発明のバイオマーカーの検出に関する好ましいプロトコールは、以下の通りである。例えば、血清等の検査される生体サンプルは、SELDI分析の前にできれば予め分別する。このことがサンプルを簡素化し、感度が改善される。予備分別における好ましい方法には、Q HyperD (BioSeptra, SA) のような陰イオン交換クロマトグラフ材料にサンプルを接触させることが含まれる。続いて結合物質を、pH 9、pH 7、pH 5 及び pH 4 の緩衝液を用いて pH 段階の溶出を実施する。（バイオマーカーが溶出される分画も、表 1 に示した。） バイオマーカーを含有している種々の分画を採取する。

30

【0087】

表 1 に示されているように、検査されるサンプル（好ましくは、予め分別する）を、次いで陽イオン交換吸着剤（好ましくは、CM10のプロテインチップアレイ（Cipergen Biosystems, Inc.））又はIMAC吸着剤（好ましくは、IMAC30プロテインチップアレイ（Cipergen Biosystems, Inc.））からなる親和性捕捉プローブに接触させる。プローブは、バイオマーカーを保持するが、非結合分子を洗い流す緩衝液で洗浄する。各バイオマーカーに対する適切な洗浄には、表 1 に分類されている緩衝液を用いる。バイオマーカーは、レーザー脱離/イオン化質量分析計にて検出する。

40

【0088】

もう一つの方法として、変性させた或いは変性させていないサンプルを、各分析対象物を検出するための至適条件下、適切なアレイ結合緩衝液に希釈し、結合させ、そして洗浄する。

【0089】

Tecan Aquarius - 96 上で実施される Apo A1 のクロマトグラフアッセイ

1. 変性血清：7.5 μ l (9 M の尿素、2 % の CHAPS、50 mM の Tris HCl

50

1、pH 9)を、5 μ lのヒト血清に加え、室温にて20分間攪拌する。H50緩衝液(10%のアセトニトリル、0.1%のTFA)及び0.12 mg/mlのE. coli溶解物を含有する溶液で1:400に希釈する。

2. H50アレイの事前活性化: BioProcessorの各ウェルを、ウェル当たり50%のアセトニトリルにて洗浄する。室温にて5分間インキュベートして、溶液を除去する。150 μ lのH50洗浄緩衝液にて、2回各5分間平衡化して、緩衝液を除去する。

3. 50 μ lの1:400希釈血清を各ウェルに添加し、室温で120分間インキュベートする。

4. アレイを150 μ lのH50緩衝液にて洗浄し、150 μ lの水で1回洗浄する。 10

5. BioProcessorのトップを除去し、10分間風乾する。

6. BioDotを用いて、スポット当たり0.75 μ lのシナピン酸マトリックス(SPA、Ciphergen、50%のアセトニトリル/0.5%のTFA/0.1%のTX100中の12.5 mg/ml)を添加する。BioDotチャンバー中で10分間風乾する。更に、スポット当たり0.75 μ lのSPAを添加する。PCS4000上でアレイを読み取る前にチャンバー中で30分間風乾する。

7. 28,000 Daの質量に照準を合わせてPCS4000にて読み取り、1区画当たり10ショット、1スポット当たりトータル530ショットを採取する。

【0090】

Tecan Aquarius - 96で実施したトランスサイレチンのクロマトグラフ 20
アッセイ

1. サンプル希釈: 血清サンプルを、0.05 mg/ml E. coli溶解液を加えた100 mMのリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 (PB緩衝液)を含有する溶液中で1:250に希釈し、十分に攪拌する。

2. Q10アレイをPB緩衝液で前処理し、5分間インキュベートする。緩衝液を除去し、もう一度繰り返す。

3. 50 μ lの1:250希釈血清サンプルを各ウェルに添加し、120分間室温にてインキュベートする。サンプルを除去する。

4. アレイを150 μ lのPB緩衝液で4回洗浄する。各洗浄後、緩衝液を除去する。

5. アレイを150 μ lの水で1回洗浄し、水相を除去する。 30

6. BioProcessorを除去し、アレイを30分間風乾する。

7. BioDotを用いて、スポット当たり0.75 μ lのシナピン酸マトリックス(SPA、Ciphergen、50%のアセトニトリル/0.5%のTFA中の12.5 mg/ml)を添加する。BioDotチャンバー中で10分間風乾する。更に、スポット当たり0.75 μ lのSPA溶液を添加する。PCS4000にてアレイを読み取る前にチャンバー中で30分間風乾する。

8. 14,000 Daの質量に照準を合わせてPCS4000にて読み取り、1区画当たり10ショット、1スポット当たりトータル530ショットを採取する。

【0091】

Tecan Aquarius - 96で実施したITH4のクロマトグラフアッセイ 40

1. サンプル希釈: 血清サンプルをIMAC結合/洗浄緩衝液(50 mMのリン酸ナトリウム、0.25 MのNaCl、pH 6.0)で1:50に希釈し、十分に希釈する。

2. IMAC50アレイの事前活性化: BioProcessorにおけるウェル1個当たり50 mMのCuSO₄を添加し、室温にて10分間インキュベートする。銅溶液を除去し、4回洗浄する。IMAC50アレイを結合緩衝液にて2回平衡化する。

3. 50 μ lの1:50希釈血清サンプルを各ウェルに添加し、120分間室温にてインキュベートする。サンプルを除去する。

4. アレイを150 μ lのIMAC結合/洗浄緩衝液で3回洗浄する。各洗浄後、緩衝液を除去する。

5. アレイを150 μ lの水で2回洗浄し、水相を除去する。 50

6. BioProcessorを除去し、アレイを30分間風乾する。

7. BioDotを用いて、スポット当たり0.75 µlのシナピン酸マトリックス(SPA、Ciphergen、50%のアセトニトリル/0.5%のTFA中の12.5 mg/ml)を添加する。BioDotチャンパー中で10分間風乾する。更に、スポット当たり0.75 µlのSPA溶液を添加する。PC54000にてアレイを読み取る前にチャンパー中で30分間風乾する。

8. 3, 273 Daの質量に照準を合わせてPC54000にて読み取り、1区画当たり10ショット、1スポット当たりトータル530ショットを採取する。

【0092】

もう一つの方法として、例えばDako、U.S. Biological、Chemicon、Abcam及びGenway等からバイオマーカーを認識する抗体が入手可能な場合には、これらを例えば予め活性化したPS10又はPS20プロテインチップアレイ(Ciphergen Biosystems, Inc.)等のプローブの表面に結合させることができる。これらの抗体は、サンプル中のバイオマーカーをその表面に捕捉することができる。続いてバイオマーカーは、例えばレーザー脱離/イオン化質量分析等にて検出できる。

【0093】

例えば、Hewlett Packard及びHamilton等から入手可能な流体工学的操作を行うすべてのロボットが、これらのアッセイには使用可能である。

【0094】

4. 2 免疫学的測定による検出

本発明の別な態様において、質量分析以外の方法又はバイオマーカーの質量測定に基づく方法以外によって、本発明のバイオマーカーが測定される。質量に基づかない態様では、本発明のバイオマーカーを免疫学的測定により測定する。免疫学的測定では、バイオマーカーを捕捉するために、抗体等の生体特異的捕捉剤が必要である。抗体は、例えば動物をバイオマーカーで免疫化する等の、当該技術分野において広く知られた方法により作成可能である。バイオマーカーは、それらの結合特性に基づいてサンプルから単離可能である。もう一つの方法として、ポリペプチド・バイオマーカーのアミノ酸配列が既知の場合には、その様なポリペプチドは合成可能であり、当該技術分野で良く知られている方法により抗体産生に利用できる。

【0095】

本発明では、例えばELISA又は蛍光を基礎とした免疫学的測定等を含むサンドイッチ免疫学的測定、更に他の酵素免疫学的測定を含めた従来の免疫学的測定も考慮に入れている。比濁分析は、液層で行われるアッセイであり、その場合には抗体は溶液に存在している。抗原が抗体に結合すると吸着能が変化するが、それを測定する。SELDIを基礎とした免疫学的測定では、バイオマーカーに対する生体特異的捕捉剤は、予め活性化されたプロテインチップアレイ等のMSプローブの表面に付着している。従って、バイオマーカーは、この試薬を介してバイオチップに捕捉され、捕捉されたバイオマーカーが質量分析計にて検出される。

【0096】

5. 対象の卵巣癌状態の判定

本発明のバイオマーカーは、例えば卵巣癌を診断するために対象における卵巣癌の状態を評価するための診断検査に使用できる。「卵巣癌の状態」という語句は、病気ではないことを含め疾病に関するすべての識別可能な徴候が含まれる。例えば、卵巣癌の状態には、疾病の有無(例えば、卵巣癌対非卵巣癌)、疾病発現のリスク、疾病の段階、疾病の経過(例えば、経時的な疾病の悪化又は疾病の緩解)及び疾病治療に対する反応又は有効性が含まれるが、これらに制限されるものではない。

【0097】

検査結果と卵巣癌の状態との相関には、幾つかの分類アルゴリズムをその状態を惹起する結果に適用することが含まれる。分類アルゴリズムは、ヘプシジンの測定量が特定のカットオフ番号より大きいのか又は小さいかを判定するだけという単純な場合もある。複数の

10

20

30

40

50

バイオマーカーを利用する場合には、分類アルゴリズムは線形回帰式である場合もある。別法として、分類アルゴリズムは本明細書に記載されている多くの学習アルゴリズムの内の何れかの産物であってもよい。

【0098】

複雑な分類アルゴリズムの場合には、データに関してアルゴリズムを実施することが必要となる場合もあり、これにより、コンピュータ、例えばプログラム可能なデジタル・コンピュータ等を用いて分類を決定する。何れの場合においても、メモリー・ドライブ、ディスク又は紙に印刷されている等のコンピュータの読み取り可能なフォーマットにおいて有形の表現媒体上にその状態を記録できる。結果はまた、コンピュータのスクリーン上に報告することも可能であろう。

10

【0099】

5.1 単一のマーカー

状態を正しく予測する診断検査の検出力は、アッセイの感度、アッセイの特異性又は受信者動作特性（ROC）分析曲線下面積として通常測定される。感度は、陽性であると検査で予測される真陽性の割合であるが、特異性は、陰性であると検査で予測される真陰性の割合である。ROC曲線は、（1 - 特異性）の関数として検査の感度を与える。ROC曲線下面積が大きければ大きいほど、検査の予測値はより正確となる。検査の効用に関する他の有用な尺度は、陽性予測値及び陰性予測値である。陽性予測値は検査で陽性であり、実際に陽性であった人の割合である。陰性予測値は検査で陰性であり、実際に陰性であった人の割合である。

20

【0100】

本発明のバイオマーカーは、異なった卵巢癌の状態において統計学的な差異を示す。これらのバイオマーカーを単独又は組み合わせて使用する診断検査は、感度及び特異性を少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%及びおよそ100%である。

【0101】

表1に示した各バイオマーカーは、卵巢癌に異なって存在し、従ってそれぞれが固有に卵巢癌の状態を判定する際の補助として有用である。その方法には、第一に例えば、SELDIバイオチップに捕捉し次いで質量分析計にて検出する等の、本明細書に記載されている方法を用いて対象のサンプル中の選択されたバイオマーカーを測定すること、第二に陽性の卵巢癌の状態を陰性の卵巢癌の状態と識別する診断量又はカットオフ値と測定値を比較することが含まれる。診断量は、バイオマーカーの測定量がその診断量より大きい又は小さいかで、対象が特定の卵巢癌状態にあるとして識別される量を表す。例えば、正常に比較して、卵巢癌ではヘプシジンは上方に調整されることから、ヘプシジン測定値が診断カットオフ値より大きい場合には卵巢癌と診断される。当該技術分野で良く理解されているように、アッセイにおいて用いられる特定の診断カットオフ値を調整することにより、診断者の選択に基づいて診断アッセイの感度及び特異性を良くすることは可能である。特定の診断カットオフ値は、例えば本明細書で実施した様に異なった卵巢癌の状態にある対象からの統計学的に有意な数のサンプルにおけるバイオマーカーの量を測定し、そして診断者の望むレベルの特異性及び感度に合ったカットオフを描くことにより決定できる。

30

40

【0102】

5.2 マーカーの組み合わせ

個々のバイオマーカーは有用な診断バイオマーカーであるが、バイオマーカーの組み合わせは、一つのバイオマーカーを単独で使用するよりも特定の状態に対してより大きな予測値を与えることが見出されている。具体的には、サンプル中の複数のバイオマーカーの検出により、検査の感度及び/又は特異性が上昇し得る。少なくとも2つのバイオマーカーの組み合わせは、場合によっては「バイオマーカー・プロフィール」又は「バイオマーカー・フィンガープリント」と称される。従って、ヘプシジンは、診断検査の感度及び/又は特異性を改善するために、卵巢癌又は子宮内膜癌に対する他のバイオマーカーと組み合わせることができる。

50

【0103】

特に、ヘプシジン及びトランスサイレチンの両方の測定を含む卵巣癌状態の診断検査は、ヘプシジンのみの測定よりも大きな予想検出力を有する。示されるように、卵巣癌ではヘプシジンレベルが増大し、トランスサイレチンレベルは減少する。更に、少なくとも3つのバイオマーカー又は場合によっては、7つのバイオマーカーを合わせた診断検査は、ヘプシジン及びトランスサイレチン両方の測定よりも大きな予想検出力を提供することが見出されている。更に具体的には、卵巣癌状態の診断検査に、ヘプシジン、トランスサイレチン、並びにApoA1、トランスフェリン、CTAP-III及びITIH4フラグメントの少なくとも1つを測定すること、そしてこれら測定値と卵巣癌状態を相関付けることを、含めることが考慮されている。更にβ2ミクログロブリンを、上記の4つのバイオマーカーの何れかと共に、ヘプシジン及びトランスサイレチンと組み合わせることが考慮されている。

10

【0104】

日本人集団のサンプルの検討で、ヘプシジン、ApoA1、β2ミクログロブリン及びCTAP-IIIの組み合わせは、特に有効な診断組み合わせであることが見出された。

【0105】

卵巣癌の診断には、通常CA125の測定がなされ、このマーカーのレベルの増大は卵巣癌と相関を有する。従って、卵巣癌の状態を判定するために、CA125のレベルが上記マーカーの何れかの組み合わせと相関付けられる。

【0106】

20

ヘプシジンを組み合わせることのできる他のバイオマーカーとしては、以下のものがあるが、これらに限られるものではない；CA125、CA125II、CA15-3、CA19-9、CA72-4、CA195、腫瘍関連トリプシン抑制剤(TATI)、CEA、胎盤アルカリフォスファターゼ(LAP)、シアリルTN、ガラクトシルトランスフェラーゼ、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF、CSF-1)、リゾホスファチジン酸(LPA)、表皮性成長因子受容体の細胞外領域の110kDコンポーネント(p110EGFR)、組織カリクレイン(例えば、カリクレイン6及びカリクレイン10(NES-1))、プロスタシン、HE4、クレアチンキナーゼB(CKB)、LASA、HER-2/neu、尿ゴナドトロピンペプチド、ディアノンNB70/K、組織ペプチド抗原(TPA)、オステオポンチン、ハプトグロビン、レプチン、プロラクチン、インシュリン様成長因子I又はII。卵巣癌の検査を受ける女性は、通常その一部としてCA125の検査を受けるのでCA125は特に有用である。

30

【0107】

5.3 卵巣癌状態

卵巣癌状態を判定するには、診断検査結果に基づき2又はそれ以上のグループ(状態)に個人を通常分類する。本明細書に記述した診断検査は、幾つかの異なった状態に分類するのに用いることができる。

【0108】

5.3.1 疾病の存在

一態様では、本発明は、対象における卵巣癌の存在又は非存在(状態：卵巣癌対非卵巣癌)を判定する方法を提供する。卵巣癌の存在又は非存在は、関連のバイオマーカー(複数を含む)を測定し、次いで分類アルゴリズムを適用するか又は特定のリスクレベルと関連するバイオマーカーの参考量及び/又はパターンと比較することにより判定される。

40

【0109】

5.3.2 発病リスクの判定

一態様では、本発明は、対象に於ける卵巣癌発病リスク(状態：低リスク対高リスク)を判定する方法を提供する。バイオマーカー量又はパターンは、種々なリスク状態(例えば、高い、中程度又は低い)の特性である。発病のリスクは、関連のバイオマーカー(複数を含む)を測定し、次いで分類アルゴリズムを適用するか又は特定のリスクレベルと関連するバイオマーカーの参考量及び/又はパターンと比較することにより判定される。

50

【 0 1 1 0 】

5 . 3 . 3 疾病の段階の判定

一態様では、本発明は、対象に於ける疾病の段階を判定する方法を提供する。疾病の各段階において、バイオマーカーの特性的な量又はバイオマーカーのセット（パターン）の相対量が存在する。疾病の段階は、関連バイオマーカー（複数を含む）を測定し、次いで分類アルゴリズムを適用するか又は特定の段階と関連するバイオマーカーの参考量及び／又はパターンと比較することにより判定される。例えば、初期卵巣癌、非卵巣癌、又はステージⅠの卵巣癌、ステージⅡの卵巣癌又はステージⅢの卵巣癌の区別をすることができる。

【 0 1 1 1 】

5 . 3 . 4 疾病の経過（進行／緩解）の判定

一態様では、本発明は、対象での疾病の経過を判定する方法を提供する。疾病の経過とは、疾病の進行（悪化）、緩解（改善）を含む疾病の状態の経時的変化を言う。時間の経過と共に、バイオマーカーの量又は相対的な量（例えば、パターン）が変化する。例えば、ヘプシジンは疾病と共に増大し、トランスサイレチンは低下する。そこで、疾病又は無疾病に対しこれらバイオマーカーの傾向（経時的増大又は減少）は、疾病の経過を示すことになる。従って、この方法では、対象での１つ又はそれ以上のバイオマーカーを少なくとも２つの異なる時点（例えば、１回目、２回目）で測定し、変化が存在すればそれを比較する。疾病の経過は、これら比較に基づいて判定される。

【 0 1 1 2 】

5 . 4 状態の報告

本発明の追加の態様は、アッセイ結果若しくは診断結果の何れか又はそれらの両方を、例えば技師、医者又は患者に伝えることに関する。ある態様では、アッセイ結果又は診断結果の何れか又はそれらの両方を、関心を有する者、例えば医者とその患者に伝えるのにコンピュータが用いられる。幾つかの態様では、結果又は診断が報告される国又は法域とは異なった国又は法域で、アッセイ又はアッセイ結果の分析が行われる。

【 0 1 1 3 】

本発明の好ましい態様では、表１のバイオマーカーの何れかの検査の対象に於ける差別的な存在に基づいた診断を、その診断後できるだけ早くその対象に伝える。診断はその対象を治療している医者から伝えるか、あるいは検査の対象に電子メール又は電話で伝えてもよい。電子メール又は電話で診断を伝えるのにコンピュータを用いてもよい。ある態様では、診断検査の結果を含むメッセージを作成し、電気通信業界の当業者にはよく知られたコンピュータソフト及びハードの組み合わせを用い、対象に自動的に送られる。ヘルスケア指向のコミュニケーションシステムの一例が、米国特許第 6 , 2 8 3 , 7 6 1 号に記述されているが、本発明はこの特定のコミュニケーションシステムを用いる方法に限られるものではない。本発明の方法のある態様では、サンプルのアッセイ、疾病の診断、及びアッセイ結果又は診断の伝達を含む方法の全てのステップ又は一部が、種々な法域（例えば、外国）で実施される。

【 0 1 1 4 】

5 . 5 対象の管理

卵巣癌状態を認定する方法のある態様では、状態に応じて対象の治療を管理することが方法に含まれる。そのような管理には、卵巣癌状態の判定に続いて取られる医師又は臨床医の行動が含まれる。例えば、医者が卵巣癌の診断をすれば、例えば、処方又はケモセラピー等のある特定の治療が実施される。あるいは、非卵巣癌の診断又は非卵巣癌とわかった場合、患者が罹っている疾病を判定するために更に検査が行われる。また、診断検査で卵巣癌であるとの結論が得られない際は、更なる検査が必要となる。

【 0 1 1 5 】

6 . 卵巣癌状態の認定のための分類アルゴリズムの作成

ある態様では、「公知のサンプル」のようなサンプルを用いて得られたスペクトル（例えば、マスペクトル又は飛行時間型スペクトル）から得られたデータは、分類モデルを

10

20

30

40

50

「トレーニングする (train)」ために利用できる。「公知のサンプル」とは、前もって分類されたサンプルである。スペクトルから得られ、そして分類モデルを作るために用いられるデータは、「トレーニングデータセット」と称する。一旦トレーニングされると、分類モデルは、未知のサンプルから得られたスペクトルから導出したデータのパターンを認識できる。そこで、分類モデルは、未知のサンプルをクラスに分類するのに用いられる。これは、例えば、ある特別な生体サンプルをある特定の生体の状態に関連しているか又はそうでないのか (病気対病気でない) を、予想するに有用である。

【 0 1 1 6 】

分類モデルを作成するのに用いるトレーニングデータは、生のデータ又は前もって処理したデータで構成される。幾つかの態様では、生のデータは飛行時間型スペクトル又はマ

10

【 0 1 1 7 】

分類モデルは、データ中に存在する客観的パラメータに基づくクラスに、データ集団を分離することを試みる適切な統計的分類 (又は「ラーニング (learning)」) 法を用い作成できる。分類方法は、監督又は不監督 (監督されていない) のどちらでもよい。監督又は不監督分類過程の例は、J a i n の「統計的パターン認識: 概説」(IEEE Transaction s on Pattern Analysis and Machine Intelligence, Vol. 22, No.1, January 2000) に記述されており、その教えるところは、参照することにより取り込まれている。

【 0 1 1 8 】

20

監督下分類では、公知のカテゴリの例を含むトレーニングデータが、ラーニング機構に提供され、それが公知のクラスの各々を定義する 1 つ又はそれ以上のセットの関係を学ぶ。その後、新しいデータをラーニング機構に適用し、それは学んだ関係を用いて新しいデータを分類する。監督下分類過程の例としては、線形回帰過程 (例えば、多重線形回帰 (M L R)、部分最小二乗 (P L S) 回帰及び主構成要素回帰 (P C R))、二分決定木 (例えば、C A R T - 分類、回帰ツリーのような再帰形分割過程)、バック・プロパゲーションネットワークのような人工ニューラルネットワーク、判別分析 (例えば、ベイジアン分類子又はフィッシャー分析)、ロジスティック分類子、及びサポートベクター分類子 (サポートベクターマシン) が挙げられる。

【 0 1 1 9 】

30

より好ましい監督下分類法は、再帰形分割過程である。再帰形分割過程では、未知のサンプルから誘導されるスペクトルを分類するために再帰形分割ツリーを利用する。再帰形分割過程の更なる詳細は、米国特許第 6 , 6 7 5 , 1 0 4 号 (P a u l e s らの「マスペクトルの分析法」) に記されている。

【 0 1 2 0 】

他の態様例では、作成される分類モデルは、不監督のラーニング法を用い作成される。不監督の分類では、トレーニングデータセットを得たスペクトルを前もって分類すること無しに、トレーニングデータセットの類似性に基づき分類を学ぶことを試みるものである。不監督のラーニング法には、クラスター分析が含まれる。クラスター分析では、理想的には互いに非常に類似し、そして他のクラスターのメンバーとは相違した「クラスター」又はグループに、データを分割することが試みられる。類似性は、次にデータ項目間の距離を測定するある距離関数を用いて測定し、そして互いに近いデータ項目を一緒にしてクラスター化する。クラスター化技術としては、M a c Q u e e n の K 平均アルゴリズム及び K o h o n e n の自己組織化マップアルゴリズムがある。

40

【 0 1 2 1 】

生物情報を分類するに用いるよう主張されるラーニングアルゴリズムは、例えば、P C T 国際公開第 W O 0 1 / 3 1 5 8 0 号公報 (B a r n h i l l らの「生体システムのパターン認定法及びその装置並びにその使用法」)、米国特許出願第 2 0 0 2 0 1 9 3 9 5 0 A 1 号 (G a v i n らの「マスペクトル法及び分析」)、米国特許出願第 2 0 0 3 0 0 0 4 4 0 2 A 1 号 (H i t t らの「生体データからの隠れたパターンに基づき生体の状態

50

間を区別する工程」)、米国特許出願第20030055615A1号(ZhangとZhangの「生体発現データの処理システム及び方法」)が挙げられる。

【0122】

分類モデルは、適切なデジタルコンピュータで作成、また使用できる。適切なデジタルコンピュータとしては、Unix(登録商標)、Windows(登録商標)又はLinux(登録商標)ベースのオペレーティングシステムのような、標準又は特殊オペレーティングシステムの何れかを利用するマイクロ、ミニ、又は大型コンピュータが含まれる。用いるデジタルコンピュータは、目的のスペクトルを得るに用いる質量分析計から、物理的に分離しているか、又は質量分析計と結合していてもよい。

【0123】

本発明の態様によるトレーニングデータセット及び分類モデルは、デジタルコンピュータで実施又は使用できるコンピュータコード化できる。コンピュータコードは、オプティカル、又は磁気ディスク、スティック、テープ、その他のコンピュータで読める適切な媒体に保存でき、またC、C++、ビジュアルベーシック等適切なコンピュータ言語で書ける。

【0124】

上記のラーニングアルゴリズムは、既に見いだされたバイオマーカーの分類アルゴリズムの開発、及び卵巣癌の新しいバイオマーカーの発見の両方に有用である。また分類アルゴリズムは、単独又は組み合わせで用いられたバイオマーカーの診断値(例えば、カットオフポイント)を提供し、診断検査の基礎を形成する。

【0125】

ロジスティック回帰分析は、以下の実施例4(より小さいサンプルセット)に記される実験から得られたデータに対し実施された。この分析では、7つのバイオマーカー:ヘプシジン、ITIH4フラグメント1、CTAP-IIII, トランスサイレチン、トランスフェリン、 β 2ミクログロブリン及びApo-A1、に基づき卵巣癌を非卵巣癌から区別する分類アルゴリズムが作成された。そのアルゴリズムでは、2つのステップが存在した。第一のステップでは、以下の式に基づき検査サンプルから数値が得られた。

$$\text{Logit} = -1.673 + 0.7349 \times \text{hepc} - 0.6252 \times \text{ITIH4 conc} + 0.1458 \times \text{CTAP-IIII} - 0.4923 \times \text{Ttconc} - 0.5023 \times \text{TFR} - 0.1595 \times \text{M2B} + 0.0265 \times \text{ApoA1 conc}$$

この測定では、正規化したピーク強度又は分析対象物濃度(「conc」と示す)が得られる。第二のステップでは、卵巣癌の対象からサンプルが得られた確率が、式: $e^{\text{Logit}} / (1 + e^{\text{Logit}})$ で決定される。次に所望の感度又は検査の特異性に基づきカットオフを適用する。カットオフ値が高いほど、アッセイの感度が良い。このアッセイで用いられる特定の値は、アッセイの条件及び使用装置に依存するもので、アッセイをセットアップするたびに再校正する必要がある。

【0126】

7. 物質の組成

他の態様として、本発明は、本発明のバイオマーカーをベースにした物質の組成物を提供する。

【0127】

一態様では、本発明は純粋な形で本発明のバイオマーカーを提供する。純化バイオマーカーは、抗体を増大させる抗原として有用である。純化バイオマーカーは、アッセイ方法での標準としても有用である。本明細書で用いられる「純化バイオマーカー」とは、バイオマーカーが見出される生体サンプルからの、他のタンパク質、ペプチド及び/又は他の物質から単離されたバイオマーカーである。バイオマーカーは、尿又は血清のような生体の液体から単離される。バイオマーカーは、機械的分離(例えば、遠心分離)、硫酸アンモニウム沈殿、透析(サイズ排除の透析を含む)、電気泳動(例えば、アクリルアミドゲル電気泳動)、サイズ排除のクロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、及び金属キレートクロマト

10

20

30

40

50

グラフィーを含む、当該技術分野で公知の方法で純化されるが、これらに限られるものではない。これら方法は例えば、クロマトグラフィーカラム又はバイオチップ等の何れか適当なスケールで実施できる。

【0128】

別な態様では、本発明は、本発明のバイオマーカーに特異的に結合する生体特異的捕捉剤（純化した形態であってもよい）を提供する。或る態様では、生体特異的捕捉剤は、抗体である。そのような組成物は、検出アッセイ、例えば、診断でバイオマーカーを検出するのに有効である。

【0129】

別な態様では、本発明は、固体相に結合する、本発明のバイオマーカーを結合する生体特異的捕捉剤を提供する。例えば、本発明では、生体特異的捕捉剤で被覆されるビーズ、チップ、膜、モノリス又はマイクロタイタープレートからなる装置が考えられる。そのような物体は、バイオマーカー検出アッセイで有用である。

【0130】

別の態様では、本発明は、本発明のバイオマーカーに結合する抗体のような生体特異的試薬からなる組成物（純化した形態であってもよい）を提供する。そのような組成物は、バイオマーカーの純化又はバイオマーカーを検出するアッセイで有用である。

【0131】

別な態様では、本発明は、本発明のバイオマーカーが更に結合した吸着剤、例えば、クロマトグラフィー吸着剤又は生体特異的捕捉剤、が付着した固体基質からなる物体を提供する。一態様では、その物体は、バイオチップ又は質量分析プローブ、例えば、SELDIプローブである。そのような物体は、バイオマーカーの純化又は検出に有用である。

【0132】

8. 卵巣癌のバイオマーカーの検出キット

別な態様として、本発明は、卵巣癌の状態を認定するためのキットを提供し、そのキットは本発明に基づきバイオマーカーの検出に用いられる。一態様では、キットは、捕捉剤が付着したチップ、マイクロタイタープレート、ビーズ又は樹脂のような固体担体からなり、ここにおいて、捕捉剤は本発明のバイオマーカーを結合する。従って、例えば、本発明のキットは、プロテインチップ（登録商標）アレイのようなSELDI用の質量分析プローブを包含できる。生体特異的捕捉剤の場合、キットは、反応性表面を有する固体担体及び生体特異的捕捉剤を包含するからなる容器を含んでなる。

【0133】

そのキットは、洗浄液又は洗浄液を作るための指示書も包含し、捕捉剤と洗浄液の組み合わせは、例えば質量分析計で、その後の検出のための固体担体上にバイオマーカー（複数を含む）の捕捉を可能にする。このキットでは、異なった固体担体上に、それぞれ存在する、より多くのタイプの吸着剤を含むことができる。

【0134】

更なる態様では、このようなキットは、ラベル又は別個の挿入物の形態で、適切な操作パラメータの指示書を包含できる。例えば、その指示書で使用者にサンプルの採取法、プローブの洗浄法、又は検出すべき特定のバイオマーカーについての情報を提供しうる。

【0135】

更なる別な態様では、キットは、校正用の標準として用いられるバイオマーカーのサンプルを有している1つ又はそれ以上の容器を包含できる。

【0136】

9. 製薬の治療効果の判定

別な態様では、本発明は、製薬の治療効果を判定する方法を提供する。これらの方法は、薬剤の臨床試験の実施、更にその薬剤の投与を受けている患者の進行をモニターするのに有用である。治療又は臨床試験では、薬剤を特定の投薬計画に基づき投与する。投薬計画としては、薬剤の単回投与量、又はある期間にわたる反復投与量が含まれうる。医者又は臨床研究者が、投与期間中の患者又は対象に対する薬の効果モニターする。薬剤が、

10

20

30

40

50

症状に薬理効果を有するならば、本発明のバイオマーカーの量又は相対量（例えば、パターン、又はプロフィール）は、疾病ではないプロフィールへと変化する。例えば、ヘプシジンは疾病と共に増大し、トランスサイレチンは疾病と共に減少する。そこで、治療期間中に対象でのこれらバイオマーカー量の経過をフォローできる。従って、この方法では、薬剤治療を受けている対象での1つ又はそれ以上のバイオマーカーを測定し、対象の病状とバイオマーカー量を相関させることが含まれる。本方法の一態様では、薬剤治療期間中の少なくとも2つの異なる時点（例えば、1回目及び2回目）でのバイオマーカーのレベルを判定し、バイオマーカー量の変化（もしあるとすれば）を比較する。例えば、バイオマーカーを、薬剤投与の前後で、又は薬剤投与の2つの異なる時点で測定する。治療の効果は、これら比較に基づき判定する。もし治療が効果をあげているならば、バイオマーカーは正常に向かい、もし治療効果がなければ、バイオマーカーは疾病を示す方向に変化する。もし治療が効果をあげているならば、バイオマーカーは正常に向かい、もし治療効果がなければ、バイオマーカーは疾病を示す方向に変化する。

10

【0137】

10. スクリーニングアッセイでの卵巣癌用バイオマーカーの使用及び卵巣癌の治療法
本発明の方法には、更に他の応用もある。例えば、バイオマーカーは、生体内、生体外でのバイオマーカーの発現を調節する化合物のスクリーニングに用いられ、この化合物は、患者の卵巣癌の治療又は防止に有用である。別の例では、バイオマーカーは、卵巣癌に対する治療の応答をモニターするために使用できる。他の実施例では、バイオマーカーは、対象が卵巣癌を発症するリスクがあるかを判定する遺伝検討に用いることができる。

20

【0138】

治療試験に適した化合物は、ヘプシジン及び本明細書にリストアップした1つ又はそれ以上のバイオマーカーと反応する化合物を同定することで、まずスクリーニングされる。例示として、スクリーニングには、バイオマーカーを組み換え発現させること、バイオマーカーを純化すること、バイオマーカーを基質に接着させることが含まれる。次に、テスト化合物を基質に接触させ（通常、水性条件下で）、テスト化合物とそのバイオマーカー間の相互作用を、例えば、塩濃度の関数として流出率を測定することで、測定する。ある特定のタンパク質は、表1のバイオマーカーの1つ又はそれ以上を認知し、開裂しうるが、そのような場合には、そのタンパク質は、標準アッセイ、例えばタンパク質のゲル電気泳動によって、1つ又はそれ以上のバイオマーカーの消化をモニターすることにより検出できる。

30

【0139】

関連した態様では、1つ又はそれ以上のバイオマーカーの活動を抑制するテスト化合物の能力が測定される。当業者は、特定のバイオマーカーの活動を測定する技術がバイオマーカーの機能及び特性に依存して変動することを認めている。例えば、バイオマーカーの酵素活動は、適切な基質が利用でき、また基質の濃度又は反応生成物が容易に測定できるならば、アッセイできる。所与のバイオマーカーの活動を抑制する又は強化する潜在的に治療効果のあるテスト化合物の能力は、テスト化合物の存在下又は不在下で触媒の率を測定し判定できる。ヘプシジン又は本明細書の別な1つ又はそれ以上のバイオマーカーの、非酵素（例えば、構造的）機能又は活動に干渉するテスト化合物の能力が測定できる。例えば、ヘプシジンを含む多タンパク質複合体の自己集合は、テスト化合物の存在下又は不在下で分光法でモニターできる。又は、バイオマーカーが転写の非酵素的なエンハンサーであるなら、転写を強化するバイオマーカーの能力に干渉するテスト化合物を、テスト化合物の存在下又は不在下での生体内又は生体外で、バイオマーカー依存の転写レベルを測定することによって同定することができる。

40

【0140】

表1のバイオマーカーの何れかの活動を調整できるテスト化合物は、卵巣癌又は他の癌を患っている又はそのリスクのある患者に投与できる。例えば、特定のバイオマーカーの活動を増大させるテスト化合物の投与は、もしその特定のバイオマーカーの活動が卵巣癌のタンパク質の蓄積を生体内で防止するならば、患者での卵巣癌のリスクを低減するであ

50

ろう。また特定のバイオマーカーの活動を低減させるテスト化合物の投与は、そのバイオマーカーの活動の増大が、少なくとも一部、卵巢癌の発症に責任があれば、患者での卵巢癌のリスクを減少させることができる。

【0141】

更に追加の態様では、本発明は、ヘプシジンの変性した形態のレベルの増大と関連する卵巢癌のような疾患の治療に有用な化合物を同定するための方法を提供する。例えば、一態様では、細胞抽出物又は発現ライブラリーが、全長のヘプシジンの開裂で先を切断した形のヘプシジンを形成する触媒となる化合物のスクリーニングに利用できる。そのようなスクリーニングアッセイの一態様として、ヘプシジンの開裂は、ヘプシジンが開裂されていないときは抑制された状態で、そのタンパク質が開裂したときは蛍光を発する蛍光プローブをヘプシジンに結合して、検出できる。又は、アミノ酸xとyの間に開裂できないアミノ結合を提供するように変性した全長ヘプシジンが、生体内でそのサイトで全長ヘプシジンを開裂する細胞プロテアーゼを選択的に結合又は「トラップ」するのに用いられる。プロテアーゼ及びそのターゲットをスクリーニングし、同定する方法は、科学文献に詳しく記述されている。例えば、L o p e z - O t t i nらの「Nature Reviews, 3:509-519(2002)」を参照されたい。

10

【0142】

更に、別な態様では、本発明は、疾病、例えば、卵巢癌（これは、先を切断したヘプシジンのレベル増大と関連している）の進行若しくは可能性を治療又は低減する方法を提供する。例えば、全長のヘプシジンを開裂する1つ又はそれ以上のタンパク質を同定した後、同定したタンパク質の開裂活動を抑制する化合物について組み合わせライブラリーをスクリーニングする。その様な化合物の化学ライブラリーをスクリーニングする方法は、当該技術分野で公知である。例えば、L o p e z - O t t i n(2002)らの文献を参照されたい。又は、抑制化合物は、ヘプシジンの構造に基づいて理知的に設計できるであろう。

20

【0143】

全長のヘプシジンは、体内の鉄分の蓄積の制御、更に遺伝性ヘモクロマトーテストシス、慢性腎不全、腎性貧血に関与していると信じられている。ヘプシジン発現はまた、インターロイキンカスケードにより体内の免疫応答の一部として誘導される。ヘプシジンは、予備処理及び処理形態から高度に処理されているので、それを目標とし、開裂するプロテアーゼが存在するようである。従って、更なる態様では、本発明は、その標的のプロテアーゼに対して、先を切断したヘプシジンの親和性を増大させる化合物を同定するための方法を提供する。例えば、化合物が、ヘプシジンを開裂する能力についてスクリーニングされる。次に、ヘプシジンの開裂又はヘプシジンと相互作用する分子の活動を、調整する能力を有するテスト化合物を、対象における卵巢癌又はノ及び子宮内膜癌を遅延又は停止させる能力について、生体内でテストする。

30

【0144】

臨床レベルでは、テスト化合物のスクリーニングは、テスト化合物に対象を曝露する前後に、検査対象からサンプルを得ることが含まれる。表1にリストアップしたバイオマーカーの1つ又はそれ以上のサンプルのレベルを測定し、テスト化合物に曝露後のバイオマーカーのレベルが変化するかどうかを判定するために、分析する。本明細書に記したように、質量分析でサンプルを分析してもよいし、又は当業者に公知の他の方法の何れかで分析しても良い。例えば、表1に記したバイオマーカーの1つ又はそれ以上のレベルは、それらバイオマーカーに特定の結合する放射性標識又は蛍光標識の抗体を用いる、ウエスタンブロットで直接測定できる。あるいは、バイオマーカーの1つ又はそれ以上をエンコードするmRNAのレベルの変化を測定し、対象に投与したテスト化合物の投与と相関付けられる。更なる態様では、バイオマーカーの1つ又はそれ以上の発現レベルの変化を、生体外での方法及び材料を用いて測定する。例えば、表1のバイオマーカーの1つ又はそれ以上を発現する又は発現できるヒト組織培養の細胞に、テスト化合物を接触しても良い。テスト化合物で処置された対象は、その治療による生理的效果につき定期的に検査を受ける。特に、対象での疾病可能性を低減する能力について、テスト化合物を評価する。又

40

50

は、卵巣癌と先に診断された対象にテスト化合物を投与する際は、その疾病の進行を遅延する又は停止する能力について、テスト化合物をスクリーニングする。

(1 1 . 実施例)

【実施例 1】

【 0 1 4 5 】

卵巣癌に対するバイオマーカーの発見

本明細書に記載される実施例及び態様は例示のためのみであり、またそれらの種々な変更又は修正は、当業者にとっては当然示唆されるものであり、それらは本出願及び特許請求の範囲の精神及び範囲に含まれることは理解されるであろう。

【 0 1 4 6 】

10

サンプル：

血清及び尿サンプルは、MDACC 卵巣癌サンプルバンク (MD Anderson) から入手した。サンプルは、癌患者から 2000 年 ~ 2004 年に手術前に採取し、- 80 で保存した。サンプルの分布は、以下の通りである；卵巣癌 (OvCa)：200 症例、子宮内膜癌：50 症例、子宮頸癌：50 症例及び良性：50 症例であった。全てではないが、多くの OvCa、良性の血清及び尿は、同一患者からであった。サンプルは、2 セットで操作された。第 1 のセットは、卵巣癌サンプル (200 症例) 及び良性サンプル (50 症例) から構成される。これはバイオマーカー候補の最初のリストを提供した。これらバイオマーカー候補の腫瘍タイプの特異性を検査するために、良性サンプル (50 症例)、子宮内膜 (50 症例) 及び子宮頸癌 (50 症例) と共に、卵巣癌サンプルのサブセット (50 症例) が分析された。

20

【 0 1 4 7 】

血清プロファイリング：

血清プロファイリングは、卵巣癌と良性サンプルのみで実施した。プロファイリングするサンプルを含むランダム化テンプレートが、Ciphergen Express ソフトプログラムを用い作成された。腫瘍バンクからのサンプルを氷上で解凍し、96 個のウェルプレートに加えて (アレンジメント用テンプレートに従い)、4000 rpm で 20 分間遠心分離した。血清のアリコートをし、新しい 96 個のウェルプレートに入れ、使用まで - 80 で保存した。血清サンプルは、IMAC - Cu⁺⁺ 及び Q10 (以下のプロトコルを参照されたい) よりトリプリケート (3 組) のタンパク質チップアレイでプロファイリングした。同一日に全ての複製を調製し、PBSSIC (調製の翌日の朝から開始) 及び / 又は PCS4000 (調製の数日後に開始) で読み込んだ。アレイは、Biomex 2000 ロボットを用いサンプルで処理した。

30

【 0 1 4 8 】

IMAC - Cu 血清プロファイリングプロトコル：

血清は、まず尿素処理で変性した。5 µl の血清を、96 個のウェルプレート中の 7 . 5 µl (9 M の尿素、2 % の CHAPS、50 mM の TrisHCl、pH 9) に加えた。プレートはテープでカバーし、20 分間室温で振とうした。237 . 5 µl の結合緩衝液 (50 mM のリン酸ナトリウム緩衝液、250 mM の NaCl、pH 6 . 0) を各ウェルに加え (= 1 : 50 希釈)、良く混合した。希釈した血清 50 µl を、別の 96 個のウェルプレートに加え、150 µl の結合緩衝液 (= 1 : 200 希釈) を加えた。IMAC アレイは、各ウェル当たり 50 mM の CuSO₄ (50 µl) を加え前もって活性化し、振とうせずに 10 分間室温でインキュベートした。アレイをスポット当たり水 150 µl で上下に一度混合し、次いで、スポット当たり 50 mM の NaAc (50 µl、pH 4) で洗浄し、振とうせずに室温で 5 分間インキュベートした。次に、スポット当たり 150 µl の水で上下に 1 回混合する洗浄を 2 回実施した。

40

【 0 1 4 9 】

IMAC30 チップは、結合緩衝液で 2 回平衡化した。チップは、振とうせずに各 5 分間インキュベートした。1 : 200 に希釈した血清サンプル 50 µl を各ウェルに加え、振とうせずに 120 分間室温でインキュベートした。チップはウェル当たり 150 µl の

50

結合緩衝液で3回洗浄し、次いで振とうせずに3回「シップ/スピット (sip and spit)」混合した。チップは3回の混合サイクルで150 μ lの水で2回洗浄し、バイオプロセッサリザーバーを取り外した。水は吸引除去し、チップは10分間風乾した。50%のアセトニトリル/0.5%のTFA水のSPAマトリックス(12.5 mg/ml)をスポット当たり1 μ l加え、チップは10分間風乾した。このアプリケーションを繰り返し、チップは一晩風乾した。

【0150】

Q-10 血清プロファイリングプロトコール:

サンプルは、結合緩衝液に希釈した。

サンプル希釈:

100 mMのリン酸塩緩衝液(PB)(pH 7.0)に患者の血清サンプルを、1:250で希釈する。Q10チップは、100 mMのPB(150 μ l、pH 7.0)で2回前処理し、振とうせずに5分間インキュベートした。1:250希釈の患者血清(50 μ l)を各ウェルに加えた。チップは900 rpmで45秒間遠心分離し、振とうせずに120分間インキュベートした。チップをウェル当たり100 mMのPB(150 μ l、pH 7)で4回洗浄し、次いで振とうせずに3回「シップ/スピット」混合し、洗浄した。チップは3回の混合サイクルで150 μ lの水で1回洗浄した。バイオプロセッサリザーバーを取り外し、水は吸引除去し、チップは10分間風乾した。50%のアセトニトリル/0.5%のTFA水のSPAマトリックス(12.5 mg/ml)をスポット当たり1 μ l加え、チップは10分間風乾した。このアプリケーションを繰り返し、チップは一晩風乾した。

【0151】

尿プロファイリング:

尿プロファイリングは、初期セット(200症例の卵巣癌サンプル及び50症例の良性サンプル)、更に2番目のセット(各50症例の卵巣癌、良性、子宮内膜癌及び子宮頸癌)を対象として実施した。癌バンクから得たサンプルを、氷上で解凍し、96個のウェルプレート(順序は上述のテンプレートに従った)に添加し、4000 rpmで20分間遠心した(但し、尿は、初回の凍結及びサンプルバンクでの貯蔵の前に、遠心分離は実施していない)。続いて、尿のアリコート新しい96個のウェルプレートに移し、使用まで-80で保管した。尿のプロファイリングは、2回実施した。最初の実施では、OvCa及び良性サンプルのみを使用した。サンプルは、CM10とIMAC-Cu⁺⁺でプロファイリングした。血清プロファイリングで作成したと同様のランダム化テンプレートを使用した。患者の尿サンプルにマッチしない一部のサンプルがあり、これらの場合には別の患者のサンプルで置き換えた。尿サンプルは、複製プロテインチップアレイでプロファイリングした(以下のプロトコールを参照されたい)。全ての複製を同一日に調製し、PBS IIC(調製の翌日の朝から開始)及び/又はPC54000(調製の数日後に開始)で読み込んだ。アレイは、BioMek 2000ロボットを用いサンプルで処理した。第二の操作では、子宮内膜、子宮頸癌、良性、及び(最初の操作からの)最初のOvCaサンプルのサブグループのプロファイリングを実施した。サンプルは、CM10とIMAC-Cu⁺⁺でプロファイリングした。最初のランダム化テンプレートを再び用いたが、OvCaサンプルの内の100症例は、子宮内膜又は子宮頸癌尿サンプルで置き換え、OvCaサンプルの最初のセットの内の50症例のみを含めた。

【0152】

CM10尿プロファイリングプロトコール:

15 μ lの尿サンプルを、23 μ lの変性緩衝液(9Mの尿素/2%のCHAPS)に加え、4で30分間インキュベートした。263 μ lの結合緩衝液(BB)、100 mMの酢酸ナトリウム(pH 4)を、各々の変性サンプルに加え、良く混合した。チップの表面を、5分間のBB洗浄を2回行い調製した。緩衝液を取り除き、150 μ lの希釈した尿サンプルを各ウェルに加え、30分間振りながら室温でインキュベートした。サンプルを除き、適切なスポットで新しい同様な希釈サンプル125 μ lで置き換え、30分間

振りながら室温でインキュベートした。サンプルを取り除き、チップの5分間のBB洗浄を3回実施した。緩衝液を除き、チップは迅速に水で2回洗浄した（インキュベート無し）。バイオプロセッサリザーバーを除き、チップは風乾した。50%のアセトニトリル/0.5%のTFA水のSPAマトリックス（12.5 mg/ml）をスポットあたり1 µl 加え、チップは10分間風乾した。このアプリケーションを繰り返し、チップは一晩風乾した。

【0153】

IMAC - Cu⁺⁺ 尿プロファイリングプロトコール：

15 µl の尿サンプルを、23 µl の変性緩衝液（9 M の尿素 / 2 % の CHAPS）に加え、4 で30分間インキュベートした。263 µl の結合緩衝液（BB）、100 mM の酢酸ナトリウム + 0.5 M の NaCl（pH 7）を、各々の変性サンプルに加え、良く混合した。IMACチップを、ウェルあたり50 mM の CuSO₄（50 µl）を加えることにより、銅で調製し、そして室温で10分間インキュベートした。チップは、スポットあたり150 µl の水で2分間1回洗浄し、スポットあたり50 mM の NaAc（50 µl、pH 4）でインキュベートし、続いてスポットあたり150 µl の水で2分間1回洗浄した。水を除き、IMAC30チップは、結合緩衝液BBで5分間に2回平衡化した。緩衝液を除き、150 µl の希釈した尿サンプルを加えた。チップは、30分間振りながら室温でインキュベートした。サンプルを除き、適切なスポットで新しい同じ希釈したサンプル125 µl で置き換え、30分間振りながら室温でインキュベートした。サンプルを取り除き、チップの5分間のBB洗浄を3回実施した。緩衝液を除き、チップは2回迅速に水で洗浄した（インキュベート無し）。バイオプロセッサリザーバーを除き、チップは風乾した。50%のアセトニトリル/0.5%のTFA水のSPAマトリックス（12.5 mg/ml）をスポットあたり1 µl 加え、チップは10分間風乾した。このアプリケーションを繰り返し、チップは一晩風乾した。

【0154】

データ分析：

データは、Ciphergen Express ソフトを用いて得た。質量較正は、外部較正試薬を用いて実施し、強度の正規化は、外部の正規化要因を用いて、総イオン電流に基づき実施し、またベースラインを差し引くことを行った。ピーク検出は、ピークがシグナル/ノイズ比3：1を有し、スペクトルの20%に存在することを基準として用い、Ciphergen Express ソフトで実施した。統計解析は、マン・ホイットニー検定（2グループ、例えば、良性対卵巣癌に対して）又はクラスカル・ウォリス検定（多重グループ、良性対卵巣癌対子宮内膜癌に対して）を用い、Ciphergen Express ソフトで実施した。

【0155】

結果：

尿サンプル（200症例の卵巣癌及び50症例の良性疾病）分析からのデータをまず解析した。

表2：良性対卵巣癌を比較する場合のマン・ホイットニー検定を用いる $p < 0.05$ からのピーク

アレイ	p 値	AUC	m/z
IMAC30	2.52E-04	0.664118	2785.654
IMAC30	8.01E-04	0.642618	2187.061
IMAC30	0.002658	0.642618	2431.063

【0156】

$AUC > 0.5$ は、ピークが良性グループより卵巣癌で大きく、 $AUC < 0.5$ は、ピークが良性グループより卵巣癌で小さいことを示す。

表3：それぞれの比較に対するピーク（ $p < 0.05$ ）

（卵巣及び子宮内膜癌の特定のマーカーは、良性疾病及び子宮頸癌に対する比較で、 $p < 0.05$ を有するピークで定義される。）

【 0 1 5 7 】

【 化 0 0 1 】

条件	ベースライン	質量	p値：卵巣 対			中央値強度			卵巣癌
			良性疾病	子宮頸癌	子宮内膜癌	良性疾病	子宮頸癌	子宮内膜癌	
卵巣及び子宮内膜のマーカー									
IMAC low	5	2193.623	0.0023	0.0211	0.5997	10.83	15.54	23.58	28.63
CM10 low	5	2194.852	0.0061	0.0012	0.0855	21.61	20.34	29.83	47.21
CM10 low	5	2434.871	0.002	0.0936	0.5628	5.459	13.16	16.13	22.21
IMAC low	5	2437.971	0.0619						
IMAC low	5	2664.621	0.01	0.0045	0.1311	1.468	1.437	1.755	2.076
CM10 low	5	2664.983	0.0001	0.0001	0.0132	4.211	3.612	7.373	10.98
IMAC low	5	2792.399	0.0011	0.0311	0.9721	2.37	5.568	10.73	13.55
CM10 low	5	2793.231	0.002	0.0004	0.0578	7.158	5.549	14.51	40.42

10

【 0 1 5 8 】

卵巣癌に対するこれらピークの特異性を判定するために、種々の婦人科癌（卵巣癌：50症例、子宮内膜癌：50症例及び子宮頸癌：50症例）及び良性骨盤疾病（ $n = 50$ ）からの尿サンプルのプロファイリングを実施した。プロファイリング及びデータ解析は、第一のセットに対し実施したが、多重グループ間の有意性の検定にはクラスカル・ウォリス検定を用いた。

【 0 1 5 9 】

20

血清サンプルから得られたデータの解析を、尿サンプルに対し実施した。表3は、IMACプロテインチップアレイを用いた血清分析から得られた有意なピーク（ $p < .05$ 、良性対卵巣癌を比較するマン・ホイットニー検定を用いた）を示す。上記のように、 $AUC < 0.5$ は、ピークが良性グループより卵巣癌で下方に制御され、 $AUC > 0.5$ は、ピークが良性グループより卵巣癌で上方制御されていることを示す。これらピークは、上記で示したヘプシジンの形態を代表することが確認された。2789.4でのピークは、ヘプシジン - 25である。

表 4

マス	p 値	AUC	IDコメント
2789.4	0.00000069	0.70	ヘプシジン

30

【 0 1 6 0 】

11.2 MD Andersonの尿サンプルからの2789の精製及び確認

尿サンプルは、MDACC卵巣癌サンプルバンクから入手した。サンプルは、2000年～2004年の手術前の癌患者から採取し、-80で保存した。サンプルの分布は、以下の通りである；卵巣癌（OvCa）：200症例、子宮内膜癌：50症例、子宮頸癌：50症例及び良性：50症例であった。サンプルは、2セットで操作された。

実験1：第1のセットは、卵巣癌サンプル（200症例）及び良性サンプル（50症例）から構成される。これはバイオマーカー候補の最初のリストを提供した。サンプルはCM10及びIMAC-Cuでプロファイリングした。

実験2：これらバイオマーカー候補の腫瘍タイプ特異性を検査するために、良性サンプル（50症例）、子宮内膜癌（50症例）及び子宮頸癌（50症例）と共に、卵巣癌サンプルのサブセット（50症例）が分析された。サンプルはCM10及びIMAC-Cu双方でプロファイリングした。

40

【 0 1 6 1 】

尿（1.0ml）を、銅で前負荷したIMAC HyperCell（Biosepra）のビーズ375 μ lに加え、4で1時間インキュベートした。ビーズは、100mMの $NaPO_4$ （350 μ l、pH7）で一度、100mMの $NaAc$ （pH5）で2回、有機溶剤（33.3%のアセトニトリル、16.7%のイソプロパノール及び0.1%のTFA）で2回洗浄した。2789Daマーカーの殆どは、有機洗浄液に含まれた。5 μ lを、NP20チップ（CiphaGen C553-0043）に適用した。278

50

9 Daを付与したNP20は、SPA (Ciphergen C300-0002)で処理し、プロテインチップインターフェース (Ciphergen Z200-0003)を備えたMicroMass Q-TOFに負荷した。イオンは、1秒に30パルスの割合で操作し、130 mJ/mm²の平均パルス・フルエンスを提供するパルス窒素レーザー (Laser Science Inc., VSL337NDS, Franklin, MA)を用いて生成した。10ミリの圧力の窒素ガスは、生成したイオンの衝突冷却に用い、またアルゴンガスは、全ての低エネルギー衝突誘発分解実験の衝突ガスとして用いた。前記のCHCAマトリックスシステムは、酸加水分解生成物のタンデム分析に用いた。適用した衝突のエネルギーは、一般に50 eV/kDルールに従い、また各々のデータ収集は、通常5分間のスペクトルの和であった。MS及びMS/MSモードに対しては、既知のペプチドの混合を用いてシステムを、外部から校正した。CIDスペクトルを平滑化し、重心化し、リクエストファイルとして出力した。タンパク質の同定は、Matrix Science Mascot Program (オンラインで入手できる: <http://www.matrixscience.com>)を用いて実施した。

10

【0162】

11.3 JHU血清サンプルからの2789の精製及び同定

合計178のアーカイブ保管された血清サンプルは、制度的承認を得て、Johns Hopkins Medical Institutionsで採取した。サンプルセットは、40名の健康な女性 (年齢: 平均±SD、42±7歳)、40名のIII/IV段階 (23/17症例)の卵巣癌患者 (年齢: 平均±SD、56±14歳)、19名の0/I/II/III段階 (3/5/8/3症例)の乳癌患者 (年齢: 平均±SD、54±15歳)又は19名のI/II/III段階 (1/10/8症例)の結腸癌 (年齢: 平均±SD、69±16歳)のグループ、そして20名のI/II/III段階 (1/12/7症例)の前立腺癌 (年齢: 平均±SD、58±8歳)、20名のII/III段階 (4/16症例)の膵臓癌 (年齢: 平均±SD、66±8歳)又は20名の糖尿病 (年齢: 平均±SD、52±18歳)のグループを含む。乳癌、結腸癌、膵臓癌及び糖尿病の患者は、全て女性であった。上記の全ての血清サンプルは、採取後迅速に処理し、使用まで-70で保存した。更に、III/IV段階の卵巣癌の3患者 (年齢: 平均±SD、57±13歳)からの血漿及び血清の3対のサンプル及び健康な対照からの血清1サンプルを新しく採取し、直ちに処理した。血漿調製には、BDプラスプラスチックK2 EDTAチューブを用いた。全てのサンプルは、治療前及び手術前に得た。

20

30

【0163】

7.5 mgのウサギ抗ITH4抗体 (MNF R P G V L S S R Q L G L P G P P D V P D H A A Y H P F (SEQ ID NO. 26)に対して特異的な特注の抗体)は、12.5 mlのAminoLink (登録商標)カップリングビーズ (Pierce P/N20501B)に結合させた。70 µlの血清サンプルは、0.05%のTweenを含む630 µlのPBS (pH 7.2)で希釈し、抗ITH4ビーズ70 µlに負荷した。4で1晩インキュベート後、ビーズは、1 mlのPBS+0.1%のTween緩衝液で3回洗浄し、続いて、1 mlの水で1回洗浄した。ビーズは、次いで50 µlの有機溶出剤 (33.3%のイソプロパノール/16.7%のアセトニトリル/0.1%のトリフルオロ酢酸)で3回溶出した。有機溶出物での流出及び3回のPBS洗浄液は、IMAC30-銅プロテインチップアレイ (Ciphergen C553-0078)でPBS IIプロテインチップ・リーダを用いてプロファイリングした。2789 Daのタンパク質は、有機溶出物、更に3回の全てのPBS及び有機溶出物に存在した。IPからの溶出フラクションを、YM10膜 (Millipore 42407)で処理し、そしてYM10からの溶出フラクション50 µlは、IMAC30銅 (Ciphergen C553-0078)アレイでプロファイリングした。IMAC30銅アレイは、SPA (Ciphergen C300-0002)で処理し、タンデム質量分析用のCiphergenインターフェース (Ciphergen Z200-0003)を備えたQ-TOFで処理した。更に、IPからの800 µlの溶出液を、YM10膜 (Millipore 42407)で処理した。YM10からの

40

50

溶出フラクションを乾燥し、50%のアセトニトリル(50 μ l)で再水和した。この濃縮溶出液1 μ lは、SPAをマトリックスとしてNP20チップに適用した。このNP20チップは、タンデム質量分析用のCIPHERGENインターフェースを備えたQ-TOFで処理した。MS/MS実験には、CIPHERGEN(Fremont, CA)プロテインチップアレイ・インターフェース(プロテインチップ Qq-TOF)を備えたMICROMASS QTOF IIタンデム質量分析でスペクトルが得られた。イオンは、1秒に30パルスの割合で操作し、130 mJ/mm²の平均パルスフルエンスを提供するパルス窒素レーザー(Laser Science Inc., VSL337NDS, Franklin, MA)を用いて生成した。10ミリトールの圧力の窒素ガスは、生成したイオンの衝突冷却に用い、またアルゴンガスは、全ての低エネルギー衝突誘発分解実験の衝突ガスとして用いた。前記のCHCAマトリックスシステムは、酸加水分解生成物のタンデム分析に用いた。適用した衝突のエネルギーは、一般に50 eV/kDルールに従い、また各々のデータ収集は、通常5分間のスペクトルの和であった。MS及びMS/MSモードに対しては、既知のペプチドの混合を用いてシステムを、外部から校正した。CIDスペクトルを平滑化し、重心化し、リクエストファイルとして出力した。タンパク質の同定は、Matrix Science Mascot Program(オンラインで入手できる：<http://www.matrixscience.com>)を用いて実施した。

【0164】

11.4 MD Anderson血清サンプルからの2789の精製及び確定

160 μ lの血清サンプルは、240 μ l(9Mの尿素、50 mMのTris、pH 9、2%のCHAPS)で4 にて20分間変性した。変性血清は、720 μ lのQ-hyper-DFビーズ(Biosepra 20078)で処理し、40分間4 でインキュベートした。12のフラクションを、pHの減少順に採取した。フラクションは、CM10プロテインチップアレイ(CIPHERGEN C553-007)でPBS IIプロテインチップリーダーを用いてプロファイリングし、2789 Daのタンパク質は、有機溶出物中に存在した。溶出物のpHは、1MのHOAcでpH 4に調整し、50 μ lをCM10チップで処理した。このCM10チップを、SPA(CIPHERGEN C300-0002)で処理し、タンデム質量分析用のCIPHERGENインターフェース(CIPHERGEN Z200-0003)を備えたQ-TOFで処理した。MS/MS実験には、CIPHERGEN(Fremont, CA)プロテインチップアレイ・インターフェース(プロテインチップ Qq-TOF)を備えたMICROMASS QTOF IIタンデム質量分析でスペクトルが得られた。イオンは、1秒に30パルスの割合で操作し、130 mJ/mm²の平均パルスフルエンスを提供するパルス窒素レーザー(Laser Science Inc., VSL337NDS, Franklin, Massachusetts)を用いて生成した。10ミリトールの圧力の窒素ガスは、生成したイオンの衝突冷却に用い、またアルゴンガスは、全ての低エネルギー衝突誘発分解実験の衝突ガスとして用いた。前記のCHCAマトリックスシステムは、酸加水分解生成物のタンデム分析に用いた。適用した衝突のエネルギーは、一般に50 eV/kDルールに従い、また各々のデータ収集は、通常5分間のスペクトルの和であった。MS及びMS/MSモードに対しては、既知のペプチドの混合を用いてシステムを、外部から校正した。CIDスペクトルを平滑化し、重心化し、リクエストファイルとして出力した。タンパク質の同定は、Matrix Science Mascot Program(オンラインで入手できる：<http://www.matrixscience.com>)を用いて実施した。

【実施例2】

【0165】

卵巣癌のバイオマーカーの発見

以前の検討で、インターアルファトリプシン抑制剤の重鎖4(ITIH4、また時にはITIH4と称される)のフラグメントは、卵巣癌を検出する差別能力を有するバイオマーカーとして同定された。この例では、ITIH4フラグメントと共に共沈降する、臨床血清サンプル中のタンパク質の発現データを用いて構築した相関ネットワークが分析された。

【0166】

最初の分析は、142症例の血清サンプル（卵巣癌の41症例、健康な対照の41症例、並びに乳癌、結腸直腸癌及び前立腺癌のそれぞれ20症例）のパネルを用い実施した。発現データは、I T I H 4の3272 m/zフラグメントに対して作成した、多クローン性の抗体を用いた免疫沈降/ブルダウン、そしてそれに続く表面エンハンス型レーザー脱着/イオン化質量分析によりトリプリケート（3組）作成した。バリデーションのために、2つの追加場所からのサンプルを、同様に処理した。第1のセットは、114症例の卵巣癌（処置前の16症例、処置後の17症例、癌に罹っていないモニターリングの37症例、再発の30症例）で構成された。第2のセットには、11症例の卵巣癌、16症例の良性例、30症例の健康な対照が含まれた。

10

【0167】

相関ネットワーク分析を用いて、I T I H 4フラグメント以外に、4つのピークのグループが発見され、それらは41の卵巣癌症例では上方に制御され、また高度に相関しているが、健康な対照及びその他の癌サンプルでは発現度が低く、相関が最低である。これらピークは、更にヘプシジンの変異体であると同定された。図2は、4つの相関するフラグメントである、ヘプシジン-25、ヘプシジン-24、ヘプシジン-22及びヘプシジン-20を含めた種々のヘプシジンフラグメントの配列を示す。

【0168】

142症例のサンプル中、レシーバーオペレーティング特性（ROC）曲線分析は、全長ヘプシジンに相当するピークが、健康な対照から卵巣癌を分離する上で曲線下面積（AUC）0.876（95%のCI：0.795～0.957）（図1を参照されたい）を、また卵巣癌を他の3種の癌から分離する上で、0.774（0.678～0.871）（図4を参照されたい）を有することを示した。第1のバリデーションセットでは、ヘプシジンは、処理後又は癌無しのモニターリンググループより前処理及び再発グループで高く（AUC = 0.756（0.702～0.811））、再発例ではヘプシジンレベルが最高であった（図5を参照されたい）。第2のバリデーションセットでは、卵巣癌を良性及び健康な対照から分離する上で、AUCは0.722（0.693～0.851）であった（両バリデーションセットで、全てのトリプリケート（3組）を分析に含めた；図5を参照されたい）。予備的な結果では、ヘプシジンとI T I H 4フラグメントは、結合パートナーであることが示された。

20

30

【0169】

第1のアプローチでは、血清10 µlを、0.05%のTritonを有する90 µlのPBS中のI T I H 4ビーズ10 µlに加えた。ビーズは、4で一晩インキュベートした。この段階で、溶出物（100 µl）を取り出し、5 µlをIMAC及びCM10チップで分析した。ビーズは、0.1%のTritonを有する150 µlのPBSで3回洗浄した。各洗浄後に、20 µlの洗浄緩衝液を取り出し、IMAC及びCM10チップで分析した。ビーズは、洗浄の後、50 µlの有機溶出緩衝液で溶出した。全溶出液の50 µlを、IMACとCM10チップで分析した。第2のアプローチでは、I T I H 4 IP溶出フラクションA13からのサンプルを濃縮し、IMACチップで分析した。

【0170】

40

図3は、I T I H 4フラグメントに対する抗体を用いた免疫沈降/ブルダウン後の、血清サンプルのSELDIスペクトルを示す。相関ネットワーク分析は、4つのピーク（m/z 2191、2436、2788）が互いに高度に相関し、卵巣癌患者からの血清サンプル中のI T I H 4フラグメントグループと逆相関していた。健康な対照では、相関はそれほど強くなかった。同様な相関ネットワーク分析を、卵巣癌と前立腺癌、乳癌、健康な対照間で実施した。4ピーク間の最も強い相関は、卵巣癌でのものであった。図6は、ヘプシジン変異体を示す4ピークの内の2ピークでの、サンプルの5グループの散布図を示す。図7は、ヘプシジンピークの2つを用いる、独立のバリデーションセットからの患者の5グループの散布図を示す。これらピークは、癌のない患者及び処置後の患者で低く、卵巣癌の治療前、更に卵巣癌再発例で高いことが示された。ヘプシジンレベルは、腫瘍負

50

荷と相関している。図 8 は、ヘプシジンピークの 2 つを用いる、第 2 の独立バリデーションセットからの患者の 5 グループの散布図を示す。これらピークは、健康な対照及び良性の疾患の患者で低く、卵巣癌患者で高いことが示された。

【実施例 3】

【0171】

大きなサンプルセットを用いたバイオマーカーアッセイ

卵巣癌マーカーとしてのヘプシジンの特性を更に評価するために、大きな多数施設の検討を実施した。7 つのバイオマーカー用に最適化した SELDI-TOF-MS を用いて、5 場所からの 607 個の血清サンプルが分析された。それらは、良性の婦人科疾病の 234 名の女性及び 373 名の浸潤性上皮卵巣癌患者（初期段階の 101 名、後期段階の 231 名及び段階不明の 40 名）のサンプルを含んだ。それらのうち、165 名の良性患者及び 228 名の癌患者のサンプルでは、分析時に CA125 が利用できた。CA125 の中央値及び四分位数は、良性、初期段階及び後期段階又は段階未知に対して、それぞれ 26 / 11 / 57 IU、80 / 22 / 434 IU 及び 234 / 40 / 1114 IU であった。バイオマーカーは、マン・ホイットニーの U 検定を用いて、個々に評価した。線形コンボジット・インデックスを、不監督（監督されていない）の形で、1 場所からのデータを用いて誘導し、次いで残りのデータに対して固定した式を用いて計算した。ROC 曲線分析は、個々の場所及び全場所を合わせて得たデータで実施した。

【0172】

5 場所からの 607 個の血清サンプル全体を、7 つのバイオマーカー用に最適化した SELDI-TOF-MS を用いて、分析した：ヘプシジン - 25 (M2789)、システイン化トランスシレチン、ApoA1 (M28043)、トランスフェリン (M79K)、CTAP-III (M9313.9)、ITH4 フラグメント 1 (M3272) 及び β 2 ミクログロブリン (M11.7K) (「7 マーカーパネル」)。それらは、良性の婦人科疾病の 234 名の女性及び 373 名の浸潤性上皮卵巣癌患者（初期段階の 101 名、後期段階の 231 名及び段階不明の 40 名）のサンプルを含んだ。それらのうち、165 名の良性患者及び 228 名の癌患者のサンプルでは、分析時に CA125 が利用できた。CA125 の中央値及び四分位数は、良性、初期段階及び後期段階又は段階未知に対して、それぞれ 26 / 11 / 57 IU、80 / 22 / 434 IU 及び 234 / 40 / 1114 IU であった。バイオマーカーは、マン・ホイットニーの U 検定を用いて、個々に評価した。線形コンボジット・インデックスは、不監督の形で、1 場所からのデータを用いて誘導し、次いで残りのデータに対して固定した式を用いて計算した。ROC 曲線分析は、個々の場所及び全場所を合わせて得たデータで実施した。7 つのバイオマーカー全ては、統計的に有意な識別の出力をそれぞれ示し、また大多数は、 p 値 < 0.00001 であった。6 場所の ROC 分析でのコンボジット・インデックスの AUC は、良性から全ての段階の癌を検出するうえで、0.602、0.566、0.821、0.813 及び 0.592 であった。合わせたデータでは、インデックスと CA125 との間の AUC の差は、全ての段階の癌 (AUC = 0.706 対 0.725) 又は初期段階のみ (AUC = 0.534 対 0.653) での検出に対して、統計的に有意で無かった。しかし、インデックスは、高感度域ではより良いものであった。86% の固定した感度では、インデックスの特異性は、CA125 の 26% (42 / 163) に比べて 34% (77 / 226) であった。初期段階例では、84% の固定した感度で、インデックスの特異性は、CA125 の 14% (22 / 163) に比べて 24% (55 / 226) であった。

【実施例 4】

【0173】

小さなサンプルセットを用いてのバイオマーカーアッセイ

卵巣病理につき評価した 202 名の連続的な患者からの手術前血清サンプルを分割し、採取の 6 時間以内に冷凍した。血清サンプルは、7 マーカーパネルに対する SELDI-TOF-MS プロテオミクスアッセイを用いて評価した。モデルのトレーニングには、126 個のサンプルが用いられ、残りのサンプルは盲検のテストに用いた。202 名の患者

中、132名は良性の疾患（子宮内膜症、良性骨盤内嚢胞、子宮線維腫を含む）を有し、11名はボーダーラインの腫瘍を有し、50名は浸潤性上皮卵巢癌患者で、3名は胚細胞腫瘍を有し、そして残りは転移性の非婦人科癌を有していた。良性疾患グループの平均年齢は、48.3歳（20～84歳）で、浸潤性上皮卵巢癌患者では、65.1歳（40～89歳）であった。

【0174】

卵巢病理につき評価した202名の連続的な患者からの手術前血清サンプルを分割し、採取の6時間以内に冷凍した。血清サンプルは、7マーカーパネルに対するSELDI-TOF-MSプロテオミクスアッセイを用いて評価した。モデルのトレーニングには、126個のサンプルが用いられ、残りのサンプルは盲検のテストに用いた。202名の患者中、132名は良性の疾患（子宮内膜症、良性骨盤内嚢胞、子宮線維腫を含む）を有し、11名はボーダーラインの腫瘍を有し、50名は浸潤性上皮卵巢癌患者で、3名は胚細胞腫瘍を有し、そして残りは転移性の非婦人科癌を有していた。良性疾患グループの平均年齢は、48.3歳（20～84歳）で、浸潤性上皮卵巢癌患者では、65.1歳（40～89歳）であった。トレーニングセットでは、CA125は、感度100%（95%のCI：88.1～100.0%）及び特異性63.3%（95%のCI：52.2～73.3%）を有し、一方、盲検テストセットでは、CA125は、感度95.0%（95%のCI：75.1～99.9%）及び特異性67.5%（95%のCI：50.9～81.4%）を有した。7つのマーカー及びCA125を統合した多変数アルゴリズムは、トレーニングセットでは、感度86.2%（95%のCI：68.3～96.1%）及び特異性94.4%（95%のCI：87.5～98.2%）を有し、他方、盲検テストセットでは、感度80.0%（95%のCI：68.3～96.1%）及び特異性90.0%（95%のCI：76.4～97.2%）を有していた。7マーカーパネルは、持続的な骨盤内腫瘍の評価を受けている患者の優先順位付けに有用であろう。このマーカーは、CA125の特異性を改善するが、感度を低減する。

【0175】

以下のパネルに対し、感度は85.2%（95%のCI：65.4%～95.1%）及び特異性は96.7%（95%のCI：89.9%～99.1%）である。

3マーカー：

Apo、トランスシレチン、ITIH4

Apo、トランスシレチン、トランスフェリン

4マーカー：

Apo、トランスシレチン、ITIH4、トランスフェリン

Apo、トランスシレチン、ITIH4、CTAP-II

5マーカー：

Apo、トランスシレチン、ITIH4、トランスフェリン、CTAP-II

Apo、トランスシレチン、ITIH4、トランスフェリン、β2ミクログロブリン

6マーカー：

Apo、トランスシレチン、ITIH4、トランスフェリン、CTAP-II、β2ミクログロブリン

【0176】

以下のパネルに対し、感度は81.5%（95%のCI：61.3%～93.0%）及び特異性は97.8%（95%のCI：91.4%～99.6%）である。

3マーカー：

Apo、トランスシレチン、ヘプシジン

4マーカー：

Apo、トランスシレチン、ヘプシジン、トランスフェリン

Apo、トランスシレチン、ヘプシジン、CTAP-II

5マーカー：

Apo、トランスシレチン、ヘプシジン、トランスフェリン、CTAP-II

A p o、トランスシレチン、ヘプシジン、トランスフェリン、 β 2 ミクログロブリン

6 マーカー：

A p o、トランスシレチン、ヘプシジン、トランスフェリン、C T A P - I I I、 β 2 ミクログロブリン

【 0 1 7 7 】

本明細書に記した実施例及び態様は、例示のためのみであり、それらに基づく種々の修正及び変更は当業者には示唆されるものであり、それらは本出願及び添付の特許請求の範囲の精神及び範疇に含められるものである。本明細書に参照した出版物、特許及び特許出願の全ては、全ての目的のためにそれらの全てを参照して本明細書に取り込む。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 1 7 8 】

【図 1】図 1 は、R O C 曲線分析を示すもので、健康な対照から卵巣癌を差別する、 m/z : 2 7 8 9 でのヘプシジンピークの出力を示すものである。A U C 値は、0 . 8 7 6 であり、この値は、 p 値 < 0 . 0 0 0 1 を有して、0 . 5 より有意に大きい。

【図 2】図 2 は、4 つの相関するフラグメントである、ヘプシジン - 2 5 (S E Q I D N O : 1 3)、ヘプシジン - 2 4 (S E Q I D N O : 1 4)、ヘプシジン - 2 2 (S E Q I D N O : 1 6) 及びヘプシジン - 2 0 (S E Q I D N O : 1 8) を含め種々なヘプシジンフラグメントのシーケンスを示す。2 1 のシーケンスは、上から下へ S E Q I D N O : 1 から S E Q I D N O : 2 2 の番号が付けられる。

20

【図 3】図 3 は、I T I H 4 フラグメント (m/z : 3 2 7 2) に対する抗体を用いた、免疫沈降 / プルダウン後の血清サンプルの S E L D I スペクトルを示す。矩形ラベルで示すピークは、I T I H 4 の既知のフラグメントである。4 つの発見されたヘプシジン変異体は、このスペクトルの m/z 位置、約 2 1 9 1、2 4 3 6、2 6 7 3 及び 2 7 8 8 (矢印で示されている) に存在する。

【図 4】図 4 は、R O C 曲線分析を示すもので、その他の癌から卵巣癌を差別する、 m/z : 2 7 8 9 でヘプシジンピークの出力を示すものである。A U C 値は、0 . 7 7 4 であり、この値は、 p 値 < 0 . 0 0 0 1 を有して、0 . 5 より有意に大きい。

【図 5】図 5 は、R O C 曲線分析を示すもので、2 つの独立のバリデーションセットに対するヘプシジンピークの出力を示すものである。A U C 値は、0 . 7 5 6 及び 0 . 7 7 2 であり、両方とも、 p 値 < 0 . 0 0 0 1 を有して、0 . 5 より有意に大きい。

30

【図 6】図 6 は、ヘプシジン変異体を表す 4 ピークの内の 2 ピークでのサンプルの 5 グループの散布図 (scatterplot) を示す。

【図 7】図 7 は、ヘプシジンピークの 2 つを用いる独立のバリデーションセットからの患者の 5 グループの散布図を示す。これらピークは、癌のない患者及び処置後の患者で低く、そして卵巣癌の治療前更に卵巣癌再発での患者で高いことが示された。ヘプシジンレベルは、腫瘍の負荷と相関している。

【図 8】図 8 は、ヘプシジンピークの 2 つを用いる第 2 の独立のバリデーションセットからの患者の 5 グループの散布図を示す。これらピークは、健康な対照及び良性の疾患の患者で低く、そして卵巣癌患者で高いことが示された。

40

【図 9 A】図 9 A ~ 9 G は、本明細書に記した種々のバイオマーカーが示す S E L D I マススペクトルを示す。図 9 A は、銅でチャージした I M A C - 5 0 バイオチップに捕捉された I T I H 4 フラグメント 1 を示す。

【図 9 B】図 9 B は、銅でチャージした I M A C - 5 0 バイオチップに捕捉されたヘプシジン - 2 5 を示す。

【図 9 C】図 9 C は、銅でチャージした I M A C - 5 0 バイオチップに捕捉された C T A P - I I I を示す。

【図 9 D】図 9 D は、銅でチャージされた I M A C - 5 0 バイオチップに捕捉された β 2 ミクログロブリンを示す。

【図 9 E】図 9 E は、Q 1 0 バイオチップに捕捉されたトランスサイレチンを示す。

50

【図 9 F】図 9 F は、H 5 0 バイオチップに捕捉された A p o A 1 を示す。

【図 9 G】図 9 G は、銅でチャージした I M A C 5 0 バイオチップに捕捉されたトランスフェリンを示す。

【図 1 0】図 1 0 は、血清中のトランスサイレチン型のマスペクトルの拡大図を示す。

【図 1 1】図 1 1 は、上記に示した実施例 4 のミニアッセイを示す R O C 曲線分析を示す。

【 図 1 】

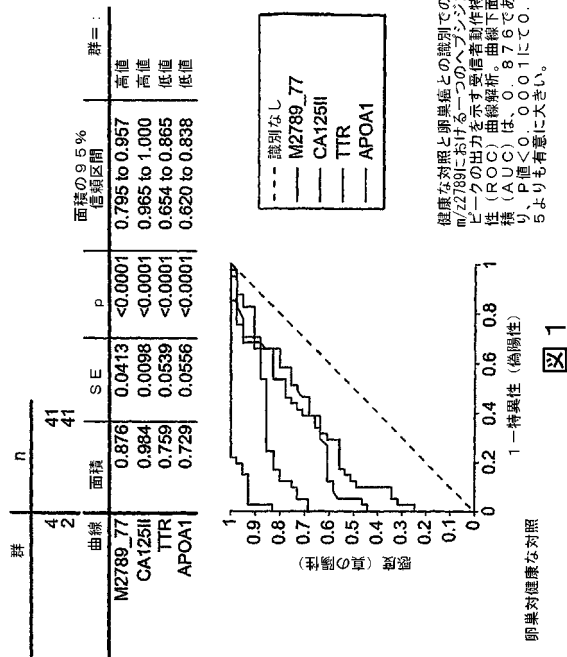


図 1

【 図 2 】

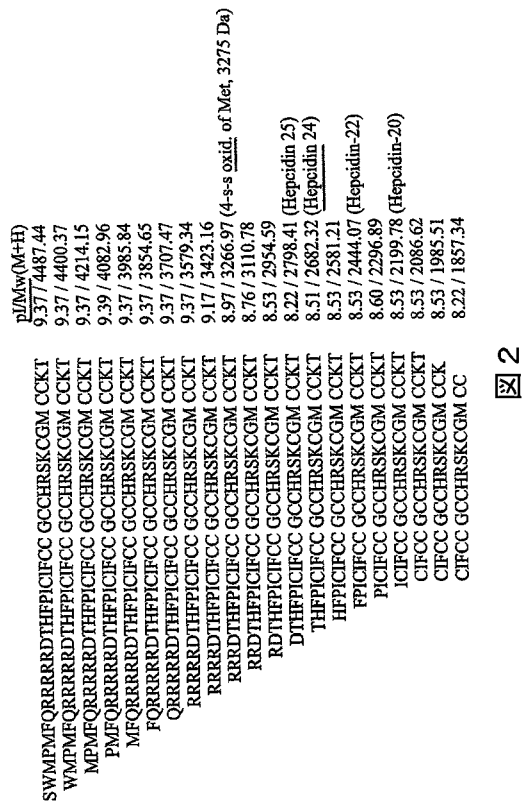
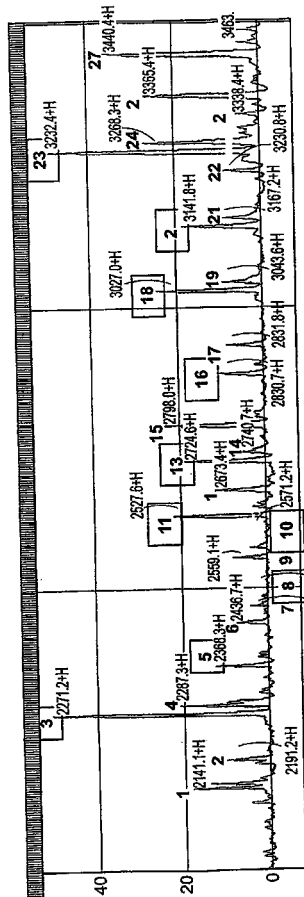


図 2

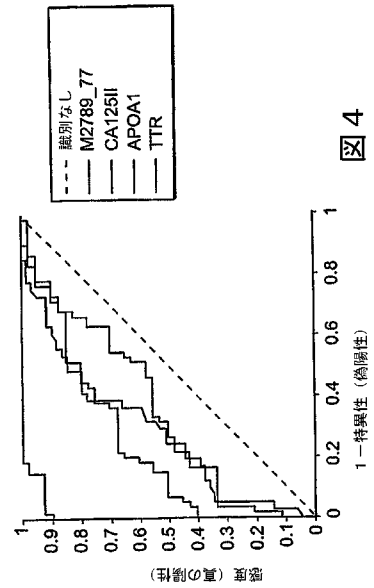
【 図 3 】



1TH4フラグメント(m/z3273)ピークに対する抗体を用いた免疫沈降/ブルダウ後の血清サンプリングのSELDIマススペクトル。長方形で囲ったピークは1TH4の既知のフラグメントである。このマススペクトルでは、m/zが2191、2436、2673及び2788(赤の矢印で示した)のところに4個の発見されたペプチジン変異体が認められる。

【 図 4 】

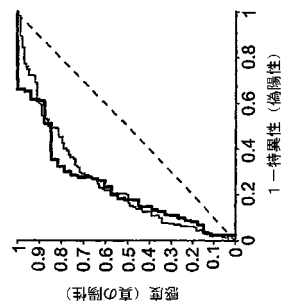
群	n	面積	S E	P	面積の95%信頼区間	群二：
0	60					高値
2	41					高値
M2789_77		0.774	0.0493	<0.0001	0.678 to 0.871	低値
CA125II		0.988	0.0077	<0.0001	0.973 to 1.000	低値
TTR		0.725	0.0515	<0.0001	0.625 to 0.826	低値
ADCA1		0.656	0.0565	0.0029	0.545 to 0.767	低値



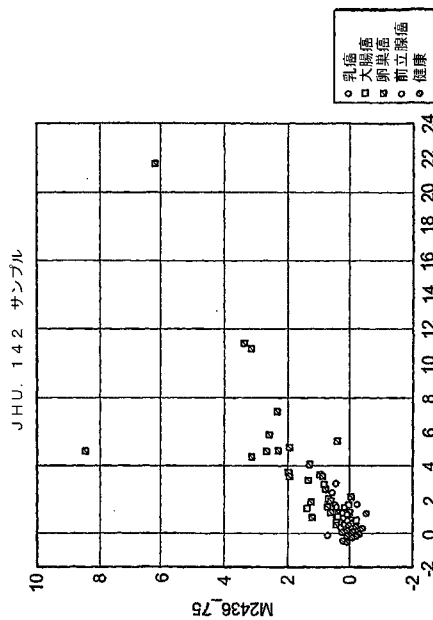
【 図 5 】

NCI n (トリブリンケートを含む)	DX		n	DX		n	i ₀ トリブリンケート	3.0.0 (除外症例: 欠番値のため「X」とラベルした4.2症例)
	0	1		0	1			
171	0	138	33	0	162	138		
	面積			面積の9.5%信頼区間				
	M2790_74 GRN Samples	0.768		p	<0.0001			高値
	M2790_74 NCI Samples	0.772		SE	0.0279			高値
					0.0403			
					0.693 to 0.851			
					0.702 to 0.811			
					DX = 1			

2つの独立のバリデーションセットに関するヘアジジニピークにおける識別出力を示すROC曲線解析。曲線下面積（AUC）は、0.756、0.772であり、両方共 p 値 <0.0001 にて0.5より有意に大きい。



【 図 6 】



へブジン変異体を示す4ピークの内2ピークにおける5グループのサンブルの散布図

【図 7】

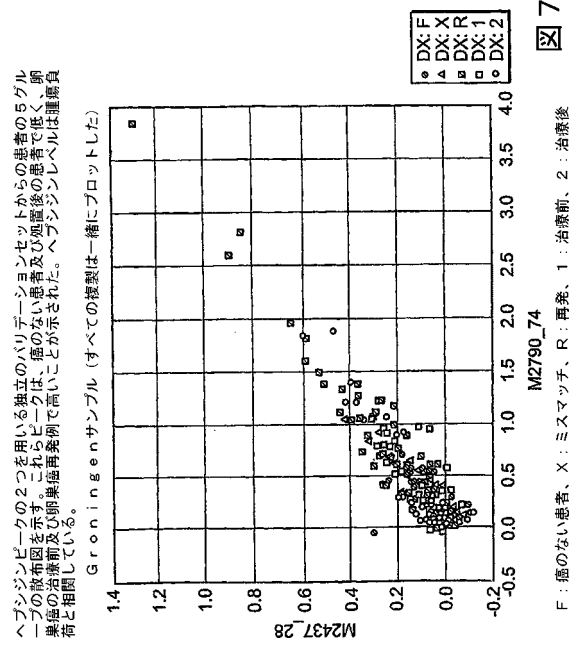


図 7

【図 8】

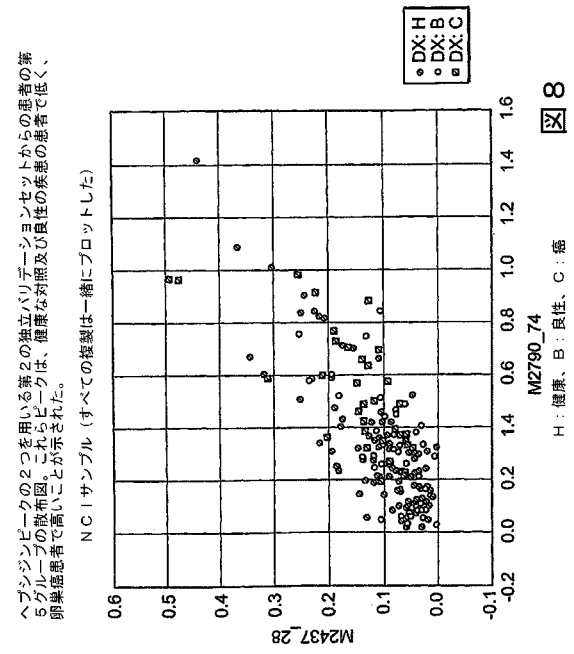
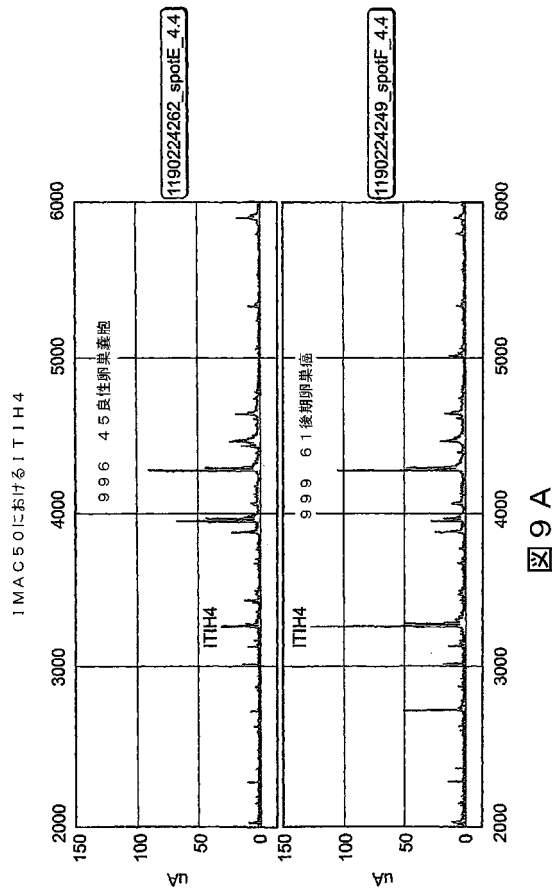
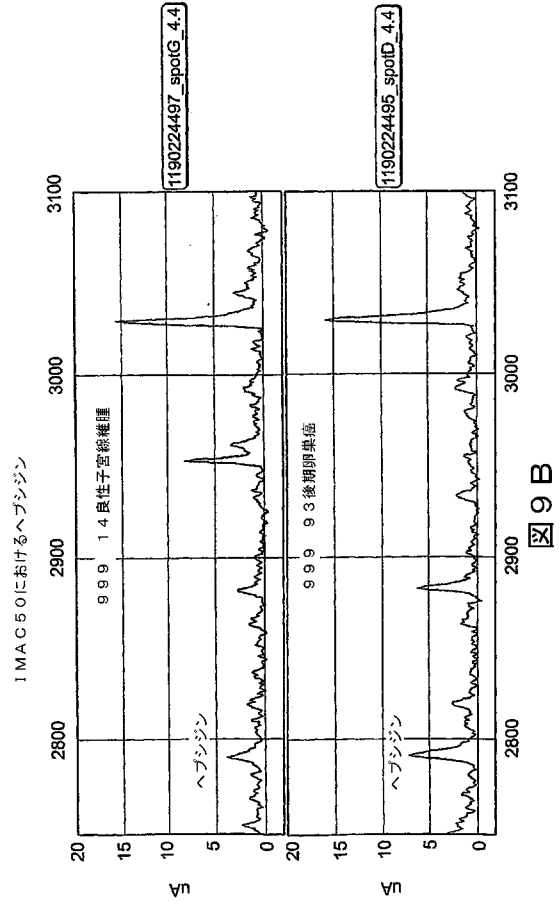


図 8

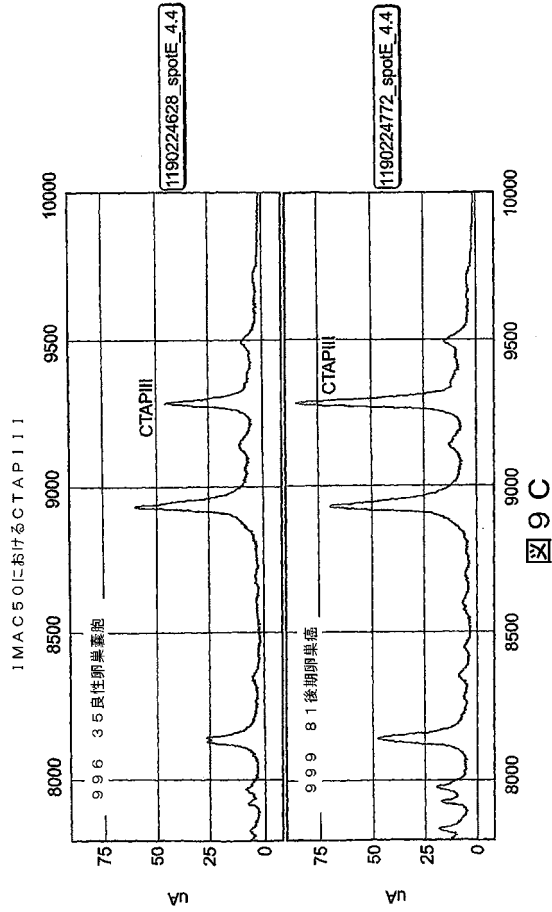
【図 9 A】



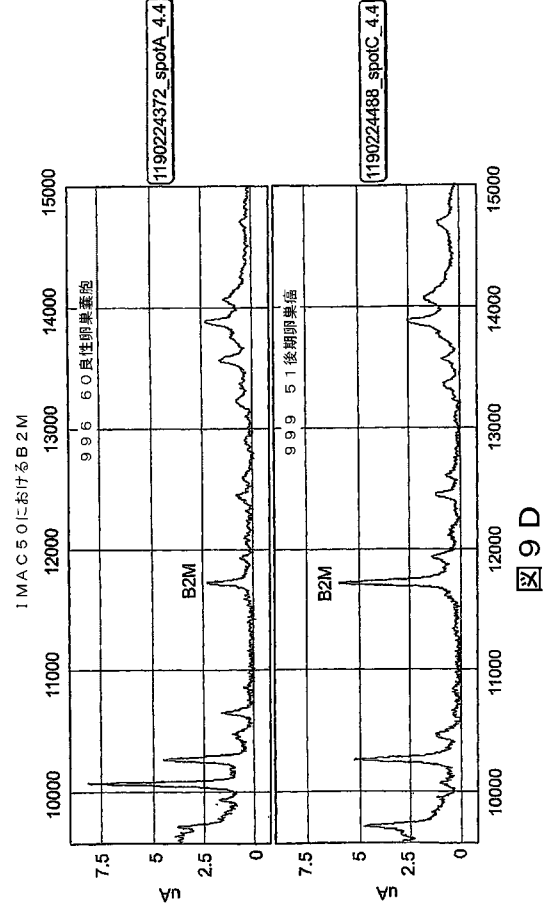
【図 9 B】



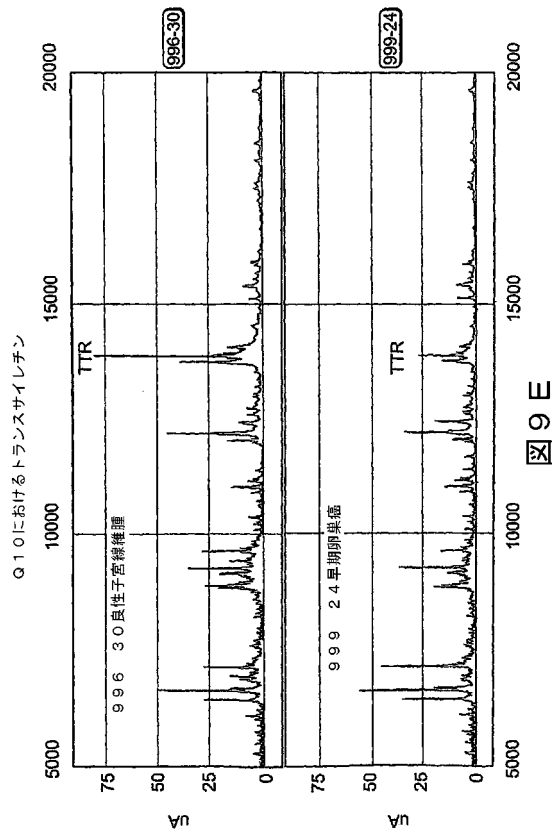
【図 9 C】



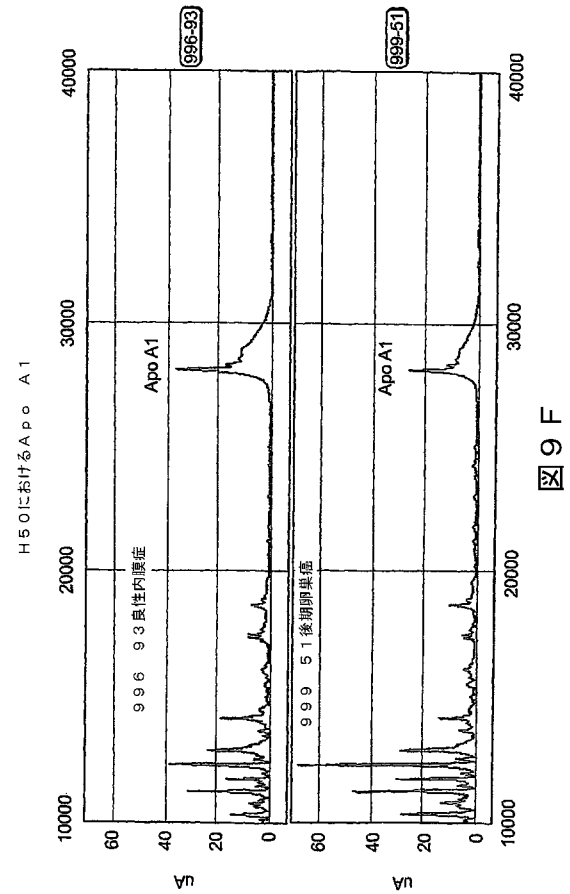
【図 9 D】



【図 9 E】



【図 9 F】



【図 9 G】

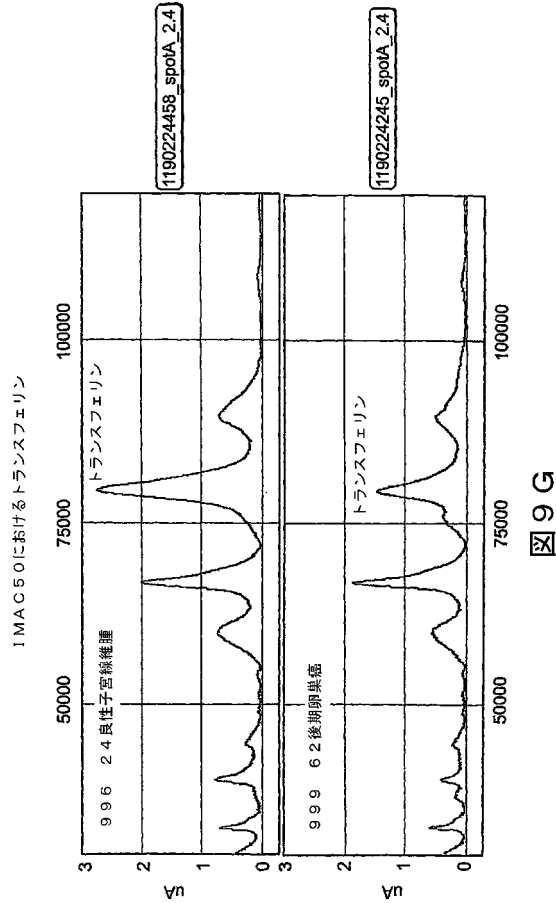


図 9 G

【図 10】

Q10アレイにおけるトランスサイレチンピーク

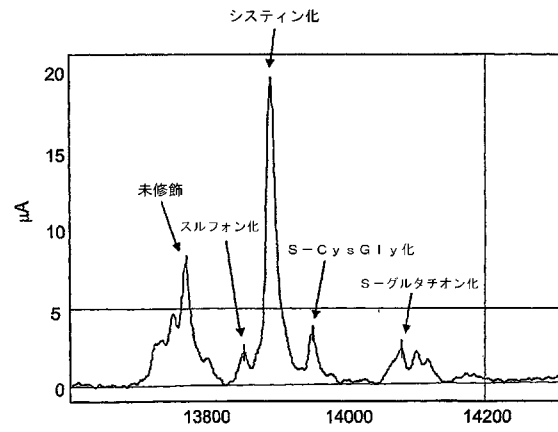


図 10

【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

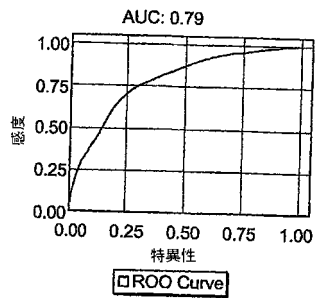


図 11

【配列表】

0005069214000001.app

フロントページの続き

(73)特許権者 500039463

ボード・オブ・リージエンツ, ザ・ユニバーシティ・オブ・テキサス・システム
アメリカ合衆国、テキサス・78701、オースティン、ウエスト・セブンス・ストリート・201

(74)代理人 100102668

弁理士 佐伯 憲生

(72)発明者 ファン, エリック トーマス

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94022 ロスアルトス, デ アンザ レーン 271

(72)発明者 ロバート バスト

アメリカ合衆国 テキサス州 77030 ヒューストン, ホロコム ブールヴァード 1515, ユニット 0355

(72)発明者 チェン, ダニエル ダブリュー

アメリカ合衆国 メリーランド州 21029 クラークスヴィル, ウェクスフォード パーク 12925

(72)発明者 ソン, ジン

アメリカ合衆国 メリーランド州 21212 バルティモア, ロジャース フォージ ロード 248 ディー

(72)発明者 ヴラヂミール ボジュスト

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94538 フレモント, ショパン テラス 1140, 202

(72)発明者 チャン, チェン

アメリカ合衆国 メリーランド州 21036 デイトン, ビッグ ブランチ ドライブ 14104

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 国際公開第2004/058044(WO, A1)

国際公開第2004/012588(WO, A1)

国際公開第2003/057014(WO, A1)

特表2002-512533(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

G01N 33/48-98

G01N 27/62

CAplus(STN)

专利名称(译)	卵巢癌和子宫内膜癌的生物标志物：铁调素		
公开(公告)号	JP5069214B2	公开(公告)日	2012-11-07
申请号	JP2008500963	申请日	2006-03-10
[标]申请(专利权)人(译)	朱红公司 约翰霍普金斯大学		
申请(专利权)人(译)	朱红公司 约翰·霍普金斯大学 得克萨斯系统摄政大学董事会		
当前申请(专利权)人(译)	朱红公司 约翰·霍普金斯大学 Rijientsu董事会，德州系统的通用名称		
[标]发明人	ファンエリックトーマス ロバートバスト チェンダニエルダブリュー ソンジン ヴラチミールポジュスト チャンチェン		
发明人	ファン, エリック トーマス ロバート バスト チェン, ダニエル ダブリュー ソン, ジン ヴラチミール ポジュスト チャン, チェン		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N27/62		
CPC分类号	G01N33/6851 G01N33/57442 G01N33/57449 G01N33/68 G01N33/74 G01N2500/00		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/53.D G01N27/62.V		
代理人(译)	佐伯 宪生		
优先权	60/662090 2005-03-11 US		
其他公开文献	JP2008533471A5 JP2008533471A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了基于蛋白质的生物标志物和这些生物标志物的组合，其可用于鉴定患者的卵巢癌病例，以及子宫内膜癌病例。特别是，hepcidin是卵巢癌和子宫内膜癌的生物标志物，包括hepcidin，运甲状腺素蛋白和任何其他标志物在内的一组生物标志物可用于治疗感兴趣的样本，如卵巢癌或非卵巢癌。它被发现对分类有用可以通过SELDI质谱检测生物标志物。

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
	0.000069	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 卵巣癌対照： 0.001040 卵巣癌対その他の 癌： 0.000002	上昇	血清、免疫沈降IT1H4 (3272m/zフラグメン ト)、PBS/O、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IT1H4 (3272m/zフラグメン ト)、PBS/O、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IT1H4 (3272m/zフラグメン ト)、PBS/O、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