

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-503921
(P2015-503921A)

(43) 公表日 平成27年2月5日(2015.2.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B024
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 545A	4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 U	4H045
GO1N 33/574 (2006.01)	GO1N 33/574 A	
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-550607 (P2014-550607)
 (86) (22) 出願日 平成24年1月9日 (2012.1.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年9月2日 (2014.9.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2012/070149
 (87) 国際公開番号 WO2013/104103
 (87) 国際公開日 平成25年7月18日 (2013.7.18)

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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結腸直腸癌診断および予測のためのバイオマーカー

(57) 【要約】

本発明において、我々は、CST4 遺伝子、CST4 の mRNA、CST4 スプライスの cDNA、CST4 特異的プライマーの対応増幅産物、CST4 遺伝子および結腸直腸癌の診断および予測におけるCST4 によってコードされるシスタチンSタンパク質、ならびに上記の検出方法および検査キットの利用を開示し、実証した。本発明は、診断、動的モニタリングおよび結腸直腸癌の進行予測において用いられうる。本発明において述べられる方法は、高感度かつ信頼性を特徴とし、大量合成によって実証された。

【選択図】 図 1 0

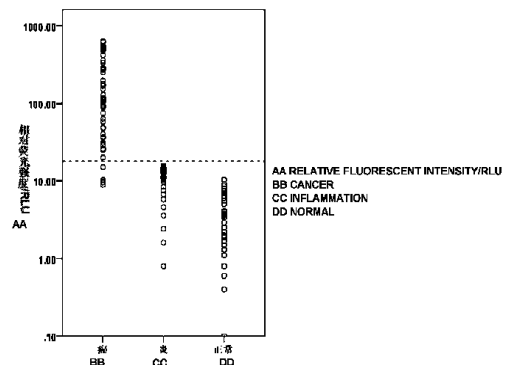


图 10 / Fig.10

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

結腸直腸癌の診断および予測における C S T 4 遺伝子、C S T 4 の m R N A、C S T 4 スプライスの c D N A、C S T 4 特異的プライマーの対応増幅産物、C S T 4 遺伝子によってコードされるシスタチン S タンパク質およびシスタチン S のエピトープペプチドの利用であって、前記 C S T 4 遺伝子の配列は配列番号 4 2 に示される、利用。

【請求項 2】

C S T 4 遺伝子、C S T 4 の m R N A、C S T 4 スプライスの c D N A の検出用のプローブの配列が、配列番号 3 に示されている、請求項 1 に記載の利用。

【請求項 3】

前記増幅産物の特異的プライマーが、配列番号 1、4、6、8、10、12、14、16、18、20（プライマー 1）に示される配列および配列番号 2、5、7、9、11、13、15、17、19、21（プライマー 2）に示される配列を有し、配列番号 1 における配列は配列番号 2 における配列と対になり、配列番号 4 における配列は配列番号 5 における配列と対になり、配列番号 6 における配列は配列番号 7 における配列と対になり、配列番号 8 における配列は配列番号 9 における配列と対になり、配列番号 10 における配列は配列番号 11 における配列と対になり、配列番号 12 における配列は配列番号 13 における配列と対になり、配列番号 14 における配列は配列番号 15 における配列と対になり、配列番号 16 における配列は配列番号 17 における配列と対になり、配列番号 18 における配列は配列番号 19 における配列と対になり、配列番号 20 における配列は配列番号 21 における配列と対になる、請求項 1 に記載の利用。

【請求項 4】

シスタチン S タンパク質のエピトープペプチドの配列が配列番号 5 0 の中に存在する、請求項 1 に記載の利用。

【請求項 5】

診断および予測が治療および腫瘍進行予測の間に結腸直腸癌の転移、微小転移巣、p T N M ステージ判定、動的モニタリングを言及する、請求項 1 に記載の利用。

【請求項 6】

結腸直腸癌診断および予測のためのバイオマーカーのための結腸直腸癌マーカー用キャプチャーであり、これらのバイオマーカーは、C S T 4 遺伝子、C S T 4 の m R N A、C S T 4 スプライスの c D N A、C S T 4 特異的プライマーの対応増幅産物、C S T 4 遺伝子によってコードされるシスタチン S タンパク質およびシスタチン S のエピトープペプチドである、結腸直腸癌マーカー用キャプチャー。

【請求項 7】

前記プライマー（請求項 3）の配列が配列番号 1 ~ 2 中に存在する、請求項 6 に記載のキャプチャー。

【請求項 8】

前記プローブ（請求項 2）の配列が配列番号 3 に示される、請求項 6 に記載のキャプチャー。

【請求項 9】

前記増幅産物の配列（請求項 3）が配列番号 4 3 中に存在する、請求項 6 に記載のキャプチャー。

【請求項 10】

これらのキャプチャーが、シスタチン S またはそのエピトープを特異的に認識する抗体である、請求項 6 に記載のキャプチャー。

【請求項 11】

前記シスタチン S のエピトープペプチドの配列が配列番号 5 0 中に示される、請求項 6 に記載のキャプチャー。

【請求項 12】

結腸直腸癌検出用の検査試薬の調製およびキットにおける請求項 6 ~ 11 のいずれか 1

10

20

30

40

50

項に記載のキャプチャーの利用。

【請求項 13】

請求項 6 に記載のキャプチャーを包含する診断キット。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の診断キットであって、1) 加水分解性 Taqman プローブに基づく CST 4 の mRNA の定量的かつリアルタイム検出用の検査キットであり、前記プライマーの配列が配列番号 1 ~ 2 中に存在し、前述プローブの配列が配列番号 3 中に存在し、2) 蛍光色素に基づく CST 4 の mRNA の定量的かつリアルタイム検出用の検査キットであり、前記プライマー配列が配列番号 1 ~ 2 中に存在し、内部校正プライマー用の配列は、配列番号 30 ~ 31 中に示され、3) 核酸ベース増幅 (NASBA) または転写媒介増幅 (TMA) に基づく CST 4 の mRNA の定量的かつリアルタイム検出用の検査キットであり、両方のキットは CST 4 のために配列が配列番号 2、配列番号 32 (プライマー用) および配列番号 3 (プローブ用) に見られるプライマーおよびプローブを包含し、4) リガーゼ連鎖反応 (LCR) に基づく前記 CST 4 の mRNA の定量的かつリアルタイム検出用の検査キットであり、配列が配列番号 33 ~ 36 中に示されて包含されている 4 つのプローブであり、5) 好熱性鎖置換増幅 (tSDA) に基づく CST 4 の mRNA の定量的かつリアルタイム検出用の検査キットであり、プライマー (配列番号 37 ~ 40 中に示される配列) およびプローブ (配列番号 41) は包含される診断キット。

10

【請求項 15】

詳細な記載は以下のとおりである請求項 13 に記載の検査キットであって、

20

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

2) 固体基質、キャプチャー、酵素標識化二次抗体および比色検出用酵素基質を包含しているプロットングキットであり、前記キャプチャーはモノクローナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である、または

3) 固体基質、固定されたアンチゲン、ビオチン化キャプチャー、前記比色検出用酵素基質および特異的モノクローナル抗体を包含する競合 ELISA キットであり、前記ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である、検査キット。

30

【請求項 16】

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

【請求項 17】

前記モノクローナル抗体がラット抗シスタチン S 抗体であり、前記固体基板が ELISA プレートであり、上述のビオチン化ポリクローナル抗体がビオチン化ウサギ抗シスタチン S ポリクローナル抗体である、請求項 15 に記載の二重抗体 ELISA 検査キット。

【請求項 18】

前記詳細が以下のように記載されている請求項 17 に記載の検査キットのプロトコルであって、

40

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

【請求項 19】

50

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

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

固相サポート、前記キャプチャー試薬およびHRP - 発色基質、特異的モノクローナル抗体を含むキャプチャー試薬、特異的にビオチン化された多耐性であるキャプチャー試薬を包含するシスタチンSタンパク質レベルの検出用キットである、癌の診断用およびキット用の指針。

【請求項20】

結腸直腸癌診断用または予測用の請求項13に記載の診断キットの使用方法であって、検査キットを介して測定される発現レベルまたは結腸直腸癌マーカーの定量含有量が健常者の発現レベルまたは結腸直腸癌マーカーの定量含有量と比較して、結果が陽性であるか否かを決定し、または結果がカットオフ値より高ければ陽性と解釈し、カットオフ値は、結腸直腸癌患者および健常者の体液または組織 サンプル中の結腸直腸癌マーカー発現 / レベルの比較を通して得られ、カットオフ値は統計的に有意であり、サンプルが以下：血液、尿、骨髄、結腸直腸癌細胞株、結腸直腸癌腫瘍および腫瘍隣接組織ならびにリンパ節組織の1以上を包含する、診断キットの使用方法。

【請求項21】

請求項15に記載の二重抗体ELISA検査キットであって、

前記固体基質がELISA プレートであり、前記固定されたキャプチャー がラット抗シスタチンS抗体であり、前記ビオチン化キャプチャーがウサギ抗シスタチンSポリクローナル 抗体（価数1：1000である）でありおよび前記比色検出用基質がアルカリホスファターゼ（ALP）であり、または

前記二重抗体サンドイッチELISAキットが競合ELISAに基づき、ELISA プレートは前記固体基質であり、シスタチンS の濃度は5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、前記特異的モノクローナル抗体はラット抗シスタチンS 抗体（価数1：2000である）であり、酵素標識化二次抗体はALP標識ヤギ抗マウスIgG（価数1：2000であり）であり、および前記比色検出用基質がALP基質であり、前記シスタチンS、酵素標識化二次抗体およびALP基質の体積比が1：2であり、または

キットが免疫プロット法に基づき、前記固体基質はニトロセルロース膜であり、前記キャプチャーはモノクローナル シスタチンS抗体（価数1：1000である）であり、前記酵素標識化二次抗体はペルオキシダーゼ標識化ヤギ抗ウサギ IgGであり、 および前記酵素基質はTMB溶液である、二重抗体ELISA検査キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、バイオテクノロジーおよび生物医学の発明である。特に、本発明は、結腸直腸癌用のバイオマーカーならびに結腸直腸癌の診断、動的モニタリングおよび進行予測などへの利用、検査試薬および検査キットならびにそれらの試験プロトコルを開示する。

【背景技術】

【0002】

結腸直腸癌の早期発見および治療は最近かなり改善されている。しかしながら、2008年に、結腸直腸癌を原因として約540000人が亡くなったことが報告された。結腸直腸癌の国内の死亡率は、毎年3%増加している。結腸直腸癌の予防への多くの問題は、早期発見、タイムリーな医療介入、ならびに処置後の患者への高精度に癌の再発をリアル

10

20

30

40

50

タイムに警告する治療有効性評価およびモニタリングなど、未解決のままで残っている。

【0003】

高感度および特異性を有する結腸直腸癌の診断ツールを開発することは、結腸直腸癌の早期発見割合および進行予測精度を向上するのに重要である。シスタチンスーパーファミリーは、カテプシン阻害剤として腫瘍の発生および成長において重要な役割を果たす。シスタチンスーパーファミリーに属しているタンパク質は、組織および体液中のシステインプロテアーゼと可逆的に結合し、カテプシンの過剰活性化を防止する。シスタチンCは、今まで、カテプシンBに対して最も強い阻害剤である。シスタチンCの発現は、卵巣癌および頭頸部癌の患者において増加する。シスタチンスーパーファミリーの別のメンバーであるステフィンAの発現は、非小細胞性肺癌（NSCLC）の発生とともに増加する。しかしながら、ステフィンBのmRNA発現は、通常の髄膜腫患者より低い。シスタチンFの発現の増加（またはレコシスタチン（leucostatin）およびCMPA）は癌患者にも観測される。腫瘍の発生および成長は、腫瘍の発現が増加するが、カテプシンの関与を必要とするということが、仮定されまたは報告されている。したがって、シスタチンの発現は、フィードバックメカニズムがプロテアーゼの過剰活性化を阻害するように活性化されることに起因する結果を増加する。シスタチンの発現は必ずしも腫瘍の進行と関連するものではないことに留意されたい。例えば、神経膠腫の患者にとって、より低いシスタチンCの発現（タンパク質およびmRNAの両方）は、より短い生存期間および再発のより高い可能性と関連している。

10

【0004】

本発明において、我々は、CST4、シスタチンスーパーファミリーのメンバーおよびスプライスとその結腸直腸癌との強い関連性を実証した。CST4、またはシスタチンSは、141個のアミノ酸残基を有するシステインプロテアーゼ阻害剤である。それは、涙、唾液、血漿および血清などの複数の体液および分泌物に見いだされる。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的の1つは、結腸直腸癌診断用の新しいツールとして、CST4遺伝子、CST4のmRNA、CST4スプライスのcDNA、CST4特異的プライマーの増幅産物、シスタチンSタンパク質およびそのエピトープの新規な利用方法を提供することである。

30

【課題を解決するための手段】

【0006】

1. 上記目的を達成するために、本発明の技術は以下に記載されている。CST4遺伝子、CST4のmRNA、CST4スプライスのcDNA、CST4特異的プライマーの増幅産物、シスタチンSタンパク質およびそのエピトープは、結腸直腸癌診断および予測のためのバイオマーカーとして利用される。CST4遺伝子の配列は配列番号42中に示されている。

【0007】

CST4遺伝子、CST4のmRNA、およびCST4スプライスのcDNAの検出用のプローブのために好ましい配列は、配列番号3中に存在している。

40

【0008】

好ましくは、増幅産物の特異的プライマーは、配列番号1、4、6、8、10、12、14、16、18、20（プライマー1）および配列番号2、5、7、9、11、13、15、17、19、21（プライマー2）において示される配列を有する。配列番号1における配列は配列番号2における配列と対になる。配列番号4における配列は配列番号5における配列と対になる。配列番号6における配列は配列番号7における配列と対になる。配列番号8における配列は配列番号9における配列と対になる。配列番号10における配列は配列番号11における配列と対になる。配列番号12における配列は配列番号13における配列と対になる。配列番号14における配列は配列番号15における配列と対に

50

なる。配列番号 16 における配列は配列番号 17 における配列と対になる。配列番号 18 における配列は配列番号 19 における配列と対になる。配列番号 20 における配列は配列番号 21 における配列と対になる。

【0009】

シスタチン S エピトープペプチド用の好ましい配列は、配列番号 50 中に存在する。

【0010】

診断および予測は、結腸直腸癌の治療および進行予測の間に転移、微小転移巣、pTNM ステージ判定、動的モニタリングとして好ましく定義される。

【0011】

本発明の第二目的は、結腸直腸癌バイオマーカーへの特異親和性を有するいくつかのキャプチャーを提供することである。

10

【0012】

上述の目的の実現のための技術的な詳細は以下に記載されている。

【0013】

結腸直腸癌バイオマーカー用キャプチャーは、結腸直腸癌の診断用および予測用である。結腸直腸癌バイオマーカーは、CST4 遺伝子、CST4 の mRNA、CST4 スプライスの cDNA、CST4 特異的プライマーの増幅産物、CST4 によってコードされるシスタチン S およびそのエピトープペプチドである。

【0014】

CST4 プライマーの配列 (3 に述べられている) は、配列番号 1 ~ 2 に示されている。

20

【0015】

上記プローブの配列は、配列番号 3 中に存在している。

【0016】

上記増幅産物の配列 (3 に述べられている) は、配列番号 43 に示されている。

【0017】

述べられているキャプチャーは、シスタチン S またはそのエピトープを特異的に認識する抗体である。

【0018】

シスタチン S エピトープペプチドの配列は、配列番号 50 中に示されている。

30

【0019】

別の目的は、キャプチャーの新規な用途を提供することである。これらの用途に基づく検査キットおよびプロトコルも提供されるだろう。当該用途および検査キットは、高い精度での結腸直腸癌の検出、シンプルな操作および適した高度な診療のため、新しい。

【0020】

上記目的を実現するための技術的な詳細は以下に記載されている。

【0021】

このセクションは、結腸直腸癌検出用の検査試薬および検査キットにおけるキャプチャーおよび上述のキャプチャーを包含する診断キットの利用を包含する。

【0022】

検査キットは、以下に記載されている。

40

【0023】

1) 加水分解性 Taqman プローブに基づく CST4 の mRNA の定量的かつリアルタイムの検出のための検査キット。プライマー配列は配列番号 1 ~ 2 中に存在し、プローブの配列は、配列番号 3 中に存在する。

【0024】

2) 蛍光色素に基づく CST4 の mRNA の定量的かつリアルタイム検出用の検査キット。プライマー配列は配列番号 1 ~ 2 中に存在する。内部校正プライマー用の配列は、配列番号 30 ~ 31 中に示される。

【0025】

50

3) 核酸ベース増幅 (NASBA) または転写媒介増幅 (transcription-mediated amplification: TMA) に基づく CST4 の mRNA の定量的かつリアルタイム検出用の検査キット。両方のキットは、CST4 用のプライマーおよびプローブを包含し、その配列は、配列番号 2、32 (プライマー用) および 3 (プローブ用) 中に示されている。

【0026】

4) リガーゼ連鎖反応 (LCR) に基づく CST4 の mRNA の定量的かつリアルタイム検出用の検査キット。4つのプローブは、その配列が配列番号 33 ~ 36 中に示されて包含されている。

【0027】

5) 好熱性鎖置換増幅 (tSDA) に基づく CST4 の mRNA の定量的かつリアルタイム検出用の検査キット。プライマー (配列番号 37 ~ 40 中に示される配列) およびプローブ (配列番号 41) は包含される。

【0028】

診断キットは以下のように好ましい。

【0029】

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

【0030】

2) 固体基質、キャプチャー、酵素標識化二次抗体および比色検出用酵素基質を包含しているプロットングキット。キャプチャーはモノクローナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である。

【0031】

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

【0032】

上述の全診断キットは、陽性対照サンプルおよび陰性対照サンプルならびに対照サンプルを包含する。

【0033】

二重抗体サンドイッチ ELISA キットに基づく検査キットは、特異的抗体としてラット抗シスタチン S モノクローナル抗体を用いる。固体基質は ELISA プレートである。ビオチン化特異的ポリクローナル抗体は、ビオチン化ウサギ抗シスタチン S ポリクローナル抗体である。

【0034】

二重抗体サンドイッチ ELISA キットに基づく検査キットの固体基質は、ELISA プレートである。固体基質に固定されたキャプチャーはラット抗シスタチン S モノクローナル抗体 (R & D、MAB 1296、5 μ g / mL) である。ビオチン化キャプチャーは、ウサギ抗シスタチン S ポリクローナル抗体 (価数 1 : 1000) である。比色検出の基質はアルカリホスファターゼである。

【0035】

競合 ELISA に基づく検査キットの固体基質は、ELISA プレートである。シスタチン S の濃度は 5 μ g / mL である。特異的モノクローナル抗体は、ラット抗シスタチン S モノクローナル抗体 (価数 1 : 2000、MAB 1296 (R & D)) である。酵素標識化二次抗体は ALP 標識化ヤギ抗マウス IgG (3% の BSA を含む TBS に溶解され、価数 1 : 2000 (Jackson)) である。酵素基質は ALP 基質である。シスタチン S、酵素標識化二次抗体および酵素基質の体積比は 1 : 2 である。

【0036】

10

20

30

40

50

免疫プロットに基づく検査キットの固体基質はニトロセルロース膜である。キャプチャーはラット抗シスタチンS（価数1：1000）抗体である。酵素標識化二次抗体はペルオキシダーゼ標識化ヤギ抗ウサギIgG（Jackson）である。酵素基質は市販のTMB溶液である（Kirkegaard and Perry Laboratories Inc.（ゲイザースバーグ、メリーランド）、「TMB peroxidase substrate solution（TMBペルオキシダーゼ基質溶液）」、カタログ番号50-76-01）。

【0037】

検査キットのプロトコルは以下に詳細に記載されている。

【0038】

ELISAプレート（Corning）は、シスタチンS（Abnova、カタログ番号H00001472-P01）溶液（5 μ g/mL）で被覆され、3%BSA溶液でバックフィル（裏込め）される。ラット抗シスタチンSモノクローナル抗体（R&D、カタログ番号MAB1296、（価数1：2000）および血清（8倍希釈）は、混合され、4 $^{\circ}$ Cで一晩、プレートとともにインキュベートされ、その後、37 $^{\circ}$ Cで1時間、プレート中の混合物からインキュベートされる。プレートの穴は、その後、TBS緩衝液（10mMのTris-HCl、154mMNaCl、pH7.5）で洗浄される。ALP標識ヤギ抗マウスIgG（Jackson、価数1：2000、0.3%のBSAを有するTBS緩衝液に溶解）は、プレートに添加され、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートされる。ALP基質（Kirkegaard and Perry Laboratories Inc.（ゲイザースバーグ、メリーランド）、blue Phos Solution、カタログ番号508805、穴ごとに100 μ L）、OD値は最後にマイクロプレートリーダーを用いて読まれる。

【0039】

第4目的は、インビトロ診断ツールならびに簡易操作、高感度および特異性を有するキットを提供することである。

【0040】

本発明の目的を実現するための技術の詳細な説明は以下のとおりである。

【0041】

結腸直腸癌は、上記の診断キットによって検出され得または予測され得る。より詳細な語において、検査キットを介して測定された結腸直腸癌マーカーの発現レベルまたは定量的な含有量は、健常者の発現レベルと比較して、その結果が陽性であるか否かを決定する。または当該結果は、含有量（カットオフ値）より高い場合に陽性と解釈される。カットオフ値は結腸直腸癌患者および健常者の体液または組織サンプルにおける結腸直腸癌マーカー発現/レベルの比較を通して得られる。カットオフ値は統計的に有意である。サンプルは以下を1以上包含する：血液、尿、骨髄、結腸直腸癌細胞株、結腸直腸癌細（colorectal cancer）腫瘍および腫瘍に隣接する組織およびリンパ節組織。例えば、シスタチンSのカットオフ値は、この場合3.434ng/mLである。

【0042】

結腸直腸癌の予測および診断のための検査キットは、シスタチンSタンパク質発現の測定用のキットである。当該キットは、固体基質、固体基質に固定されたキャプチャー、ビオチン化キャプチャーおよび比色検出用酵素基質を包含する。固定化キャプチャーは、モノクローナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である。

【0043】

または、シスタチンSタンパク質発現測定用の検査キットは、固体基質、プレートに被覆されたシスタチンSタンパク質、ラット抗シスタチンSモノクローナル抗体、酵素標識化二次抗体および比色検出用酵素基質を包含する。

【0044】

または、シスタチンSタンパク質発現測定用の検査キットは、固体基質、キャプチャー、酵素標識化二次抗体および比色検出用酵素基質を包含する。キャプチャーはモノクロー

10

20

30

40

50

ナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である。

【0045】

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

【0046】

または、キットは競合ELISAに基づき、アッセイの固体基質はELISAプレートであり、シスタチンSの濃度は5 μ g/mLであり、モノクローナル抗体は価数1：2000を有するラット抗シスタチンS抗体であり、酵素標識化二次抗体は価数1：2000を有するALP標識化ヤギ抗マウスIgGである。酵素基質はALPである。シスタチンS、酵素標識化二次抗体およびその基質の体積比は1：2である。

10

【0047】

または、検査キットは免疫プロット法に基づき、固体基質はニトロセルロース膜であり、キャプチャーは価数1：1000を有するラット抗シスタチンSモノクローナル抗体であり、酵素標識化二次抗体はHRP標識ヤギ抗ウサギIgGであり、比色検出用酵素基質はTMB溶液である。

【0048】

本発明の利点は、1)結腸直腸癌の診断における発現CST4遺伝子およびシスタチンSタンパク質の利用であり、癌の成長および結腸直腸癌の進行予測のリアルタイムモニタリングは、本発明の大規模試験で変動する。当該結果は、かなりの精度であり、本発明は、結腸直腸癌の予後予測だけでなく結腸直腸癌診断およびリアルタイムモニタリングの新規な方法の開発において用いられ、2)結腸直腸癌診断およびリアルタイムモニタリングに高い感度を有する検査試薬と検査キットは結腸直腸癌進行予測と同様、本発明に含まれ得る。

20

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】CST4を含む組み換えプラスミドPmd18-Tを示す図である。

【図2】扁桃腺、後側下垂体、甲状腺、唾液腺、骨格筋、骨髄、赤血球および血小板を含まない末梢血、肺、胃、肝臓、心臓、腎臓、副腎、腸管、結腸、膵臓、脾臓、膀胱、前立腺、卵巣、子宮、胎盤、ヒト結腸直腸癌細胞株SW480およびcaco2ならびにヒト腸内上皮細胞株HNECを包含している正常な組織中のCST4遺伝子の発現(生体素子により測定)に関する図である。

30

【図3】プローブとして蛍光色素を含むリアルタイムqPCRを用いる結腸直腸癌腫瘍および個々の腫瘍隣接組織の20個の場合におけるCST124、CST1、CST2、CST4の発現比較の図である。

【図4】結腸直腸癌腫瘍およびそれらの個々の腫瘍隣接組織の100個の場合におけるリアルタイムPCRにより定量化されたCST4の発現に関する図である。

【図5】36個の結腸直腸癌サンプルおよび29個の腸炎を含む結腸鏡検査試料におけるリアルタイムPCRにより定量化されたCST4の発現に関する図である。

40

【図6】20個の結腸直腸の癌転移を含むリンパ節サンプルおよび15個の結腸直腸の癌転移を有さないリンパ節サンプルにおけるリアルタイムPCRにより定量化されたCST4の発現に関する図である。転移は病理学的研究において変動した。

【図7】リアルタイムPCRにより定量化された末梢血における細胞学的研究およびCST4発現を用いた結腸直腸癌診断の正確さの比較に関する図である。

【図8】リアルタイムPCRにより定量化された細胞学的研究およびCST4発現を用いた結腸直腸癌骨髄転移予測の正確さの比較に関する図である。

【図9】リアルタイムPCR(A)および受信者動作特性(ROC)曲線(B)により定量化された50人の結腸直腸癌患者、30人の健常者および30人の腸炎患者の血清無細胞RNAのCST4発現に関する図である。ROC曲線は、結腸直腸癌患者を腸炎患者お

50

よび健常者と区別する方法の感度および特異性の評価に用いられうる。

【図10】リガーゼ連鎖反応(LCR)により定量化される50人の結腸直腸癌患者、30人の健常者および30人の腸炎患者の血清無細胞RNAのCST4発現に関する図である。

【図11】逆転写ストランド変位増幅(rtsDA)により定量化される50人の結腸直腸癌患者、30人の健常者および30人の腸炎患者の血清における無細胞RNAのCST4発現に関する図である。

【図12】核酸ベース増幅(NASBA)によって定量化される20人の結腸直腸癌患者、10人の健常者および10人の腸炎患者の尿サンプル中のCST4発現に関する図である。

【図13】種々のpTNMステージ(30人のI+IIの例および50人のIII+IVの例)にある80人の結腸直腸癌患者の転写増幅法(TMA)によるCST4発現に関する図である。

【図14】結腸直腸癌細胞株の培養上清と健常者の血清中のシスタチンS発現に関する図である。

【図15】結腸直腸癌および健常者の血清中のシスタチンS発現に関する図である。

【図16】30人の結腸直腸癌患者および20人の健常者の血清サンプル中の競合ELISAによるシスタチンS発現に関する図である。

【図17】結腸直腸癌発見のためシスタチンSおよびCEA(ELISAにより測定)の特異性および感度比較に関する図である。

【図18】中央値より高いまたは中央値より低いシスタチンS発現を有する処置後の結腸直腸癌患者の無増悪生存期間(PFS)曲線に関する図である。

【発明を実施するための形態】

【0050】

(パートI)分子検出

上記されている分子生物学的技術は、以下の実施例に記載されている。これらの実施例は本発明の利用を限定する代わりに本発明を明確にしていることに留意されたい。Molecular Cloning: A Laboratory Manual(分子クローニング:実習マニュアル)(J. Sambrookら編)におけるプロトコルは、もし示されていない場合は、実験手順に厳密に従った。または取扱説明書を以下に示した。記載されていない場合、百分率および割合は、重量に基づく。

【0051】

物質および方法

全臨床サンプルを、Beijing Friendship Hospital(北京友情医院)から得、病院の厳しい検査法規と患者の同意書を有した。

【0052】

腫瘍またはその隣接組織と疑われていた生検サンプルを比較した。リンパ節サンプルと同様これらのサンプル中のRNAをサンプルの必要な時にすぐに抽出し、液体窒素中に貯蔵し、またはRNAlater(Ambion社)に保管している。

【0053】

末梢血、骨髄または尿サンプルを20分間(4000rpm、4)遠心分離した。その上清を、別に10分間(13000rpm、4)遠心分離した。上清および沈殿を分離する。RNA抽出をすぐに続いて行い、またはそのサンプルを-20 未満または-80 未満で貯蔵する。

【0054】

TaqManプローブを用いるリアルタイムPCR:

サンプルから市販キットを用いて核酸を抽出した。限定を意図しない例は、フェノール-クロロホルム抽出である。サンプル中のRNAを、Invitrogenにより製造したトリゾールキット(Trizol kit)を続けて用いて得られた。抽出したRNAの品質を、Molecular Biology Experiments(分子生物学

10

20

30

40

50

実験) (J. Liによる)などの参考文献中のプロトコルに従って分析した。mRNAの逆転写を市販キットにより行い、その指針は以下に従った。cDNA溶液を適切な濃度勾配で調製した。生化学反作用のプライマーを最適化した。CST4用のプライマーをエクソン1に基づき設計した。CST4増幅産物を含む組み換えプラスミドは、Pegm-T (Promega (図1に示されている))から市販されている。プライマーをエクソン1および3に基づき設計した。PCRプロセスをTaqManプローブの加水分解により観測した。

【0055】

CST4のプライマー用に最適化された配列は、
【化1】

10

gctctcaccctcctctctg (配列番号1) および tctctattctcctcttgg (配列番号2)

である。プローブの配列は、

【化2】

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

である。増幅産物の部分は142bpである。

【0056】

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

20

【化3】

tgctcgggctctcaccctcctct (配列番号22) および tgggtgggtggctgtgactggc (配列番号23)

である。

【0057】

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

30

【0058】

プローブとして蛍光色素を用いるリアルタイムPCR:

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

【化4】

agtcccagcccaacttggg (配列番号24) および gggaacttcgtagatctggaaga (配列番号25)

である。CST4増幅用のプライマーの配列は

40

【化5】

agtacaacaaggccaccgaagat (配列番号 4) および agaagcaagaaggaaggaggag (配列番号 5)、
 または tacaacaaggccaccgaagatga (配列番号 6) および agaagcaagaaggaaggagg gag (配列
 番号 7)、または tgctactctgatggctaccctg (配列番号 8) および gtggccttggtgactcgcgat (配
 列番号 9)、または agtacaacaaggccaccgaagat (配列番号 10) および
 taccaggtctattagaagcaagaagga (配列番号 11)、または tgctactctgatggctaccctg (配列番号
 12) および catcttcgggtggccttggtgtac (配列番号 13)、または tgctactctgatggctaccctg (配列
 番号 14) および tactcatctt cgggtggccttggt (配列番号 15)、または tgggattatcctattctcctcctg
 (配列番号 16) および ctccagcttt gtgctctgcctct (配列番号 17)、または
 tgctactctgatggctaccctg (配列番号 18) および ctcatcttcg gtggccttgt tgt (配列番号 19)、ま
 たは tacagtgggtgggagtgggtgt (配列番号 20) および gagtgggtac agcgtgcct tca (配列番号
 21)

10

である。C S T 2 増幅用のプライマーの配列は、

【化6】

cagaagaaacagttgtgctc (配列番号 26) および ggagtaggaggtggctag (配列番号 27)

20

である。C S T 1 増幅用のプライマーの配列は、

【化7】

tctaccctctctcctg (配列番号 28) および ttatctatctctccttgg (配列番号 29)

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

【化8】

aagatcattgctcctcctg (配列番号 30) および cgtcactctctgcttc (配列番号 31)

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

30

【0059】

【数1】

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

40

【0060】

核酸ベース増幅 (N A S B A) によるインビトロでの R N A 増幅 : キットは、T 7 R
 N A ポリメラーゼ、リボヌクレアーゼ H、鳥骨髄性白血病ウイルス (A M V) 逆転写酵素
 、リボヌクレオチド三リン酸 (N T P)、デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (d N T P
)、「T a q M a n プローブを用いるリアルタイム P C R」の区分に述べられていた C S
 T 4 増幅用プライマー、(R i b o - G r e e n 蛍光色素) を観測する R N A 増幅用蛍光
 色素を包含する。R N A テンプレートは、4 2 で 2 時間のインキュベートした後、2⁹
 ~ 2¹² 倍に増幅される。増幅された製品の蛍光を増幅前のテンプレート濃度の定量化の
 ために測定した。

【0061】

50

実施例 1 . C S T 4 および C S T スーパーファミリーの他のメンバーの発現

1 . 種々のヒト組織中の C S T 4

全組織サンプルを、Beijing Friendship Hospital (BFH) から得られる結腸組織を除いて購入した。種々のヒト組織サンプル中の C S T 4 の mRNA 発現を HG - U 9 5 A V Human Gene Chip Array (Affymetrix) 上で測定し、比較した (使用マニュアルからのプロトコルは以下の通りであった)。C S T 1 mRNA 発現の定量化を、 β -アクチン蛍光校正曲線により実現した。

【 0 0 6 2 】

図 2 に示されているように、C S T 4 発現は、唾液腺中のものを除いて、全サンプルにおいて低い。C S T 4 発現は、試験されている他の組織において全く観察されなかった。当該結果は、C S T 4 発現の低いバックグラウンドシグナルのせいで、C S T 4 は有望な病理診断であることを示す。C S T 4 は、SW 4 8 0 および C a c o 2 (結腸直腸癌細胞株である) 中に過剰発現であり、H N I E C (普通の結腸組織細胞株である) において発現しない。C S T 4 は結腸直腸癌診断用の有望なマーカーであると結論付けられている。

10

【 0 0 6 3 】

結腸直腸癌腫瘍とそれらの個々の隣接組織の 2 0 の組み合わせ (C 1、C 2 . . . C 2 0 と番号づけられた) における C S T 4、C S T 1 2 4、C S T 1 および C S T 2 の mRNA の発現を比較した。腫瘍およびそれらの隣接組織における C S T 4 の mRNA 発現差異は、C S T 1 を除いて全遺伝子より大きい (図 3)。全サンプルを結腸直腸癌について病理学的に診断した。プローブとして蛍光色素を用いるリアルタイム PCR を、遺伝子発現を定量化するために用い、そのリアルタイム PCR は陽性対照サンプルおよび陰性対照サンプルの同時に生じる増幅により変動した。当該対照の結果は予測と合致していた。

20

【 0 0 6 4 】

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

【 0 0 6 5 】

1) C S T 4 増幅用プライマー (その配列は以下に示される) :

【化 9】

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

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

または

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

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

または

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

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

または

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

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

または

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

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

または

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

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

または

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

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

または

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

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

または

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

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

10

20

30

40

50

内部基準としての - アクチンの増幅用プライマー

【化 10】

上流プライマー: aagatcattgctcctcctg (配列番号 30)

下流プライマー: cgtcatactcctgcttgc (配列番号 31)

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

【0066】

3. 結腸直腸癌腫瘍および腫瘍隣接組織におけるCST4発現

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

【 0 0 6 7 】

1) プライマーおよびプローブ:

【 化 1 1 】

上流プライマー: gctctcaccctcctctctctg (配列番号 1)

下流プライマー: tatcctattctcctccttgg (配列番号 2)

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

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

【 0 0 6 8 】

全サンプルは、cDNAが得られることで、RNA抽出および逆転写の前に結腸直腸癌と診断された。リアルタイムPCRは、結腸直腸癌腫瘍およびそれらの個々の隣接組織におけるCST4の発現の定量化に用いた。100個のサンプルがこの試験において試験された。

【 0 0 6 9 】

図4において示されるように、CST4のmRNA発現は、病理学上診断される悪性結腸直腸癌腫瘍において特に高く、それらは個々の隣接組織において低い。腫瘍におけるCST4発現は、隣接組織におけるCST4発現よりおよそ100倍高く、このことは、CST4のmRNAが結腸直腸癌のために優れたマーカーであるということを示す。13.89がCST4コピーのためのカットオフ値である場合、癌性組織は正常組織と区別され得る。したがって、13.89は結腸直腸癌の臨床診断用の参照として提案される。 20

【 0 0 7 0 】

4. 結腸直腸癌患者および腸炎患者からの結腸鏡検査サンプルにおけるCST4発現
結腸鏡検査サンプルは、腫瘍細胞の百分率が変動する外科サンプルと大きく異なる。癌性組織はときどき、結腸鏡検査サンプル全体の非常に小さな一部であり、または癌性組織は結腸鏡検査サンプル中に含まれない。発明者らは試験し、結腸直腸癌患者からの36個の結腸鏡検査サンプルと腸炎患者からの36個の結腸鏡検査サンプルにおけるCST4発現を比較した。癌性サンプルにおけるCST4発現の中央値は、腸炎サンプル中でのカットオフ値より14.3倍大きい。もし60.5がカットオフ値である場合、癌性腫瘍は炎症と区別され得、結腸鏡検査サンプルを用いる結腸直腸癌診断用のレファレンスを提供する。 30

【 0 0 7 1 】

当該結果を、図5にまとめている。リアルタイムPCRを遺伝子発現の定量化に用いた。

【 0 0 7 2 】

5. 結腸直腸癌転移を伴うまたは伴わないリンパ節サンプル中のCST4発現
異なるサイズの薬理的診断された結腸直腸癌転移を含むリンパ節の20個の外科サンプルおよび初期段階の非転移性結腸直腸癌を伴う患者からの15個のリンパ節サンプルを得た。初期段階の癌患者を、検出できないリンパ節転移および得られたアーチファクトを避けるために選択した。リアルタイムPCRをCST4の発現の定量化に用い、詳細な実験手順は実施例2に記載しているようなものと同じである。図6に示されているように、CST4発現は、結腸直腸癌転移を伴うサンプルにおいて高く、癌転移を伴わないサンプルにおいて比較的ひくい。転移を伴うサンプル中のCST4発現の中央値は、乳癌の転移を伴わないサンプル中のCST4発現の中央値より23.6倍高い。もしカットオフ値が23.9のコピーである場合、癌転移を区別するのは可能である。CST4発現の2つの陽性の場合を非転移グループにおいて報告した。これらのサンプルを、注意深く研究し、そして微小転移巣を両方において発見した。これらの2つの例を転移サンプルとして考え 40 50

る場合、C S T 4 の m R N A 発現試験は、検査においてすべての転移性の場合を区別することができる。伝統的な薬理学的研究の可能性を超えている微小転移巣は発見され、より高い感度を示すとわかった。

【 0 0 7 3 】

6 . リアルタイム P C R と末梢血中に循環している結腸直腸癌細胞の発見のための細胞学的研究による C S T 4 発現測定精度比較

【 0 0 7 4 】

R N A は、赤血球および血小板を含まない末梢血から抽出され、C S T 4 の m R N A 発現をリアルタイム P C R で定量化し、腸炎患者および健常者からのサンプルと比較して、循環する結腸直腸癌細胞の存在を決定した。得られた結果を細胞学的研究と比較した。

10

【 0 0 7 5 】

図 7 にまとめるように、C S T 4 発現方法は、細胞学的研究により診断される全ての癌の例を検出することができる。癌転移は薬理的に転移していないと診断された結腸直腸癌患者において発見され、本発明で述べられる方法は細胞学的方法よりも感度が高く、細胞学的方法がし得るものを超えている微小転移巣も検出され得る。

【 0 0 7 6 】

7 . リアルタイム P C R および細胞学的研究により検出される骨髄転移

結腸直腸癌患者からの生検骨髄サンプルの C S T 4 の m R N A をリアルタイム P C R により定量化した。得られた結果を検出用の健常な骨髄サンプルと比較した。これらの試験の結論を細胞学的研究と比較した。

20

【 0 0 7 7 】

図 8 に示されるように、骨髄転移、転移または微小転移を伴う 9 5 % のサンプル (細胞学的研究に基づく) は C S T 4 の m R N A 検査により検出され得る。細胞学的研究より高い陽性の割合はより高い感度を示す。

【 0 0 7 8 】

8 . 結晶中の C S T 4 発現

【 0 0 7 9 】

9 . 結腸直腸癌患者、腸炎患者および健常者の無細胞 R N A

結腸直腸癌患者 (5 0 例) 、腸炎患者 (3 0 例) および健常者 (3 0 例) の血漿サンプルを集めた。無細胞 R N A を市販キットを通して抽出した : リアルタイム P C R を C S T 4 発現の定量化のために用いた。

30

【 0 0 8 0 】

癌性のグループの C S T 4 発現の中央値は、炎症グループおよび正常グループのおよそ 6 倍 (図 9 A) である。5 9 . 4 8 のカットオフ値により、非癌性サンプルから癌性サンプルを分離することができる。乳癌診断のための方法として C S T 4 発現検査の受信者動作特性 (R O C) 曲線は図 9 B に示す。高感度および特異性をその曲線から結論付けた。C S T 4 は、血漿サンプルによる非浸潤性の結腸直腸癌診断用の特異的なマーカーである。

【 0 0 8 1 】

1 0 . リガーゼ連鎖反応 (L C R) により検査された結腸直腸癌患者、腸炎患者および健常者の血漿の無細胞 R N A における C S T 4 発現

40

C S T 4 の m R N A 発現用の検査キットは以下を含有する。

【 0 0 8 2 】

1) ハプテン標識化したプローブ :

【 化 1 2 】

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

2) 市販の核酸抽出用試料および逆転写用試料。他の試薬は、L C x キット (A b b o t

50

t Laboratories) と同一である。

【0083】

無細胞RNAを結腸直腸癌患者(50例)、腸炎患者(30例)および健常者(30例)の血漿から抽出した。CST4のmRNAの発現をLCR方法により検査した。

【0084】

図10に示されるように、癌性サンプルの相対発光量(RLU)の中央値は、炎症を伴うサンプルや正常サンプルのそれぞれとの9.96倍および32.29倍高い。結腸直腸癌サンプルを17.85 RLUのカットオフ値と区別し得る。

【0085】

10. 逆転写ストランド変位増幅(rtsDA)により検査された結腸直腸癌患者、腸炎患者および健常者の血清無細胞RNAにおけるCST4発現

rtsDAに基づくCST4 mRNA発現の定量化用の検査キットは以下を含有する：
1)

【化13】

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

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

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

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

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

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

【0086】

無細胞RNAを、結腸直腸癌患者(50例)、乳腺炎患者(30例)および健常者(30例)の血漿サンプルから抽出した。CST4のmRNAからの発現を好熱性鎖置換増幅(tSDA)により検査した。図11に示されているように、癌性サンプルの相対発光量(RLU)の中央値は、炎症および正常サンプルをそれぞれを含むサンプルより、20.73倍および21.51倍高い。結腸直腸癌サンプルは、23.09 RLUのカットオフ値と区別され得る。

【0087】

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

【0088】

1) CST4用のプライマーおよびプローブ：

【化14】

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

下流プライマー: tatectattctcctctg (配列番号 2)

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

2) RNA抽出用および逆転写用試薬、T7 RNAポリメラーゼ、リボヌクレアーゼH、鳥骨髄性白血病ウイルス(AMV)逆転写酵素、リボヌクレオチド三リン酸(NTP)、デオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)およびRNA蛍光色素(リボグリーン蛍光色素)。

【0089】

無細胞RNAを結腸直腸癌患者(30例)、腸炎患者(20例)および健常者(20例)の尿サンプルから抽出した。CST4のmRNAの発現をNASBAにより検査した。

10

20

30

40

50

図 1 2 に示されているように、癌性サンプルの相対発光量 (R L U) の中央値は、炎症および正常サンプルを伴うサンプルより約 1 3 . 2 倍高い。結腸直腸癌サンプルは、1 5 . 0 2 R L U のカットオフ値と区別され得る。それゆえ、C S T 4 は、結腸直腸癌診断用の非浸潤性の尿検査において優れたマーカーである。

【 0 0 9 0 】

実施例 2 結腸直腸癌の予測および診断のための C S T 4 の利用

転写増幅法 (T M A) に基づく C S T 4 の m R N A 発現の定量化用検査キットは以下を含有する。

【 0 0 9 1 】

1) 増幅用のプライマーおよびプローブ :

【 化 1 5 】

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

下流プライマー: tctctattctcctccttgg (配列番号 2)

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

2) プライマーおよびプローブ以外の G e n - プローブ T M A アッセイに包含されている任意の試薬。

【 0 0 9 2 】

1 . C S T 4 発現および結腸直腸癌 p T N M ステージ判定

8 0 人の結腸直腸癌患者 (I + I I ステージの 3 0 例および I I I + I V ステージの 5 0 例) からの血漿サンプル中の無細胞 R N A を市販キットによって抽出した。C S T 4 発現を、T M A (転写増幅) 方法を用いて測定した。

【 0 0 9 3 】

図 1 3 に示すように、末期患者 (ステージ I I I + I V) の R L U の中央値は、初期患者 (ステージ I + I I) より 8 . 9 倍高い。当該結果は、C S T 4 は結腸直腸癌ステージの良好な指標であり、ステージの決定のために用いられる。

【 0 0 9 4 】

2 . 結腸直腸癌治療におけるリアルタイムモニタリングにおける C S T 4 発現の利用

治療を受ける結腸直腸癌患者の血清 C S T 4 発現 (化学療法での 6 人の患者および放射線療法での 4 人の患者) は、リアルタイム P C R により観測された。腫瘍成長を血液中の C S T 4 発現レベルと比較および対応させた。

【 0 0 9 5 】

表 1 にまとめるように、C S T 4 発現は効果的な治療をする患者で減少し、これは、腫瘍の減少した大きさからも明らかであった。C S T 4 発現は、効果的でない治療をする患者の治療の継続を増加し、腫瘍の増加した大きさからも明らかであった。したがって、C S T 4 を治療の有効性のリアルタイムモニタリング用のマーカーとして提案する。

【 0 0 9 6 】

10

20

30

【表 1】

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

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

10

20

【0097】

3. 結腸直腸癌の予後予測用CST4発現

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

30

【0098】

【表 2】

定量的なリアルタイムPCRにより処置後の結直腸癌患者のCST4発現

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

40

【0099】

実施例 3 結腸直腸癌の予測用および診断用キット

50

1. CST4 の mRNA 発現のリアルタイム定量化のための Taqman プローブに基づく検査キット

【0100】

1) プライマーおよびプローブ

【化16】

上流プライマー: gctctcaccctcctctcctg (配列番号 1)

下流プライマー: tctctattctcctcctgg (配列番号 2)

プローブ: 5'-FAM-CTCCAGCTTTGTGCTCTGCCTCTG-TAMRA-3' (配列番号 3)

10

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

【0101】

2. CST4 の mRNA 発現のリアルタイム定量化のための蛍光色素に基づく検査キット

1) CST4 用プライマー

【化17】

上流プライマー: gctctcaccctcctctcctg (配列番号 1)

下流プライマー: tctctattctcctcctgg (配列番号 2)

20

- アクチン用プライマー

【化18】

上流プライマー: aagatcattgctcctcctg (配列番号 30)

下流プライマー: cgtcatactcctgcttgc (配列番号 31)

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

【0102】

30

3. CST4 の mRNA 発現のリアルタイム定量化のための核酸配列ベース増幅 (NASBA) に基づく検査キット

当該キットは以下を含有する。

1) プライマーおよびプローブ

【化19】

上流プライマー: aattctaatacagactcaactataggg-gctctcaccctcctctcctg (配列番号 1)

下流プライマー: tctctattctcctcctgg (配列番号 2)

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

40

2) RNA 抽出用および逆転写用試薬、T7 RNA ポリメラーゼ、リボヌクレアーゼ H、鳥骨髄性白血病ウイルス (AMV) 逆転写酵素、リボヌクレオチド三リン酸 (NTP)、デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTP) および RNA 蛍光色素 (リボグリーン蛍光色素)。

【0103】

4. CST4 の mRNA 発現のリアルタイム定量化のための転写増幅法 (TMA) に基づく検査キット

キットは以下を含有する。

1) プライマーおよびプローブ

50

【化20】

上流プライマー: aattctaatacgaactcactataggg-gctctcaccctcctctctg (配列番号 1)

下流プライマー: tatectattctcctccttgg (配列番号 2)

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

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

【0104】

10

5. CST4 の mRNA 発現のリアルタイム定量化のためのリガーゼ連鎖反応 (LCR) に基づく検査キット

当該キットは、以下を含有する。

1) ハプテン標識化した4つのプローブ:

【化21】

gggctctggcctcgagctccaagga (配列番号 33)、ataggataatcccaggtggcatctatgatg (配列番号 34)、

tctcctccttggagctcgaggccagagccc (配列番号 35)、catcatagatgccacctgggattatcctat (配列番号 36)

2) 核酸抽出用および逆転写用の市販の試料。他の試薬は LCx キット (Abbott Laboratories) と全く同一である。

20

【0105】

6. CST4 の mRNA 発現のリアルタイム定量化のための好熱性鎖置換増幅 (tSDA) に基づく検査キット

当該キットは、以下を含有する。

1)

【化22】

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

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

30

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

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

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

3) 核酸抽出用試料および逆転写用試料、dCTP、S、dATP、dGTP、dTTP、BsoBI および exo-Bca。

【0106】

(パートII) タンパク検出

本発明を以下の実施例に示す。これらの実施例は、本発明の利用を制限する代わりに本発明を明確にすることに留意されたい。Molecular Cloning: A Laboratory Manual (J. Sambrook 編) は、記載されていない場合、実験工程に厳密に続けられた。または、取扱説明書に従った。言及されない場合、百分率および割合は重量に基づく。

40

【0107】

このセクションにおいて、結腸直腸疾患検出用のタンパク質バイオマーカーの検出を述べる。抗体、検査キットおよびプロトコルを詳細に述べる。結腸直腸疾患診断の利用およびモニタリング、ならびに有効性評価も記載する。

【0108】

組み換えシスタチン S タンパク質を Abnova から購入した (0.06 μg / μL、

50

カタログ番号 H 0 0 0 0 1 4 7 2 - P 0 1)。価数 1 : 2 0 0 0 であるラット抗シスタチン S モノクローナル抗体を R & D から購入した (カタログ番号 M A B 1 2 9 6)。価数 1 : 1 8 0 0 であるウサギ抗シスタチン S ポリクローナル抗体を A b c a m から購入した (カタログ番号 a b 5 8 5 1 5)。

【 0 1 0 9 】

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

10

【 0 1 1 0 】

少なくとも 1 つの (好ましい) 抗体またはシスタチン S の少なくとも 1 つのエピトープに特異的に結合するフラグメントは本願明細書に述べられている検出において利用される。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであり得る。好ましいモノクローナル抗体は、シスタチン S を配列番号 5 0 に示される配列と結合する。抗体はシスタチン S を免疫原とともに得られる。免疫原濃度は好ましい成分である。それゆえ、本発明は、シスタチン S の存在に対する抗体の免疫応答によるシスタチン S の定量化方法を提供する。

20

【 0 1 1 1 】

本発明における検体はヒトであり、ここで、試験における免疫応答は抗体およびヒトペプチドを特徴づける。免疫反応は任意の好ましい方法によって測定されてよく、これらに限定されないが、E L I S A、免疫プロット法または両方の組み合わせ、競合 E L I S A および二重抗体サンドイッチ E L I S A キットを包含する。

30

【 0 1 1 2 】

結腸直腸組織状態のモニタリングおよび診断ならびに結腸直腸疾患用の治療の有効性のモニタリングは、シスタチン S 発現の定量化を介する免疫反応により定量化され得る。

【 0 1 1 3 】

我々は、サンプル中のマーカー (シスタチン S およびその本願明細書におけるエピトープ) の検出のための全ての検査キットを本願において主張する。結腸直腸組織および結腸直腸疾患の状況は上記キットを介して診断され得る。結腸直腸疾患の治療のモニタリングならびに癌の再発および転移の予測もキットの利用の範囲内である。抗シスタチン S 抗体またはそれらのフラグメントはキットに包含される。これらの抗体またはそれらのフラグメントは、血清のような流体サンプル中のシスタチン S と結合する。抗体またはそのフラグメントとシスタチン S との結合事象はモニタリングされ、報告単位によって検出される。

40

【 0 1 1 4 】

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

50

【 0 1 1 5 】

E L I S A に基づく検査キットは本発明において好ましい。

【 0 1 1 6 】

述べられる E L I S A 検査キットは、競合 E L I S A キットまたは二重抗体サンドイッチ E L I S A キットであり、その詳細は以下に記載されている。少なくとも 1 つの抗体またはそのフラグメントは、検体とインキュベートされる。抗体はモノクローナル抗体であり、上述したモノクローナル抗体として好ましい。抗シスタチン S 抗体の製造用の免疫源であるシスタチン S タンパク質を、マイクロプレート (本願明細書の固体基質) とコンジ

60

ュゲイトさせている。事前にインキュベートした混合物をE L I S Aプレート上でアプライし、その後コンジュゲイトされていない抗体をプレート上に固定されているタンパク質にコンジュゲイトさせる。報告単位は、免疫グロブリン、とりわけI g GおよびI g Mであり、プレート上で抗体を検出することができる。抗体は、酵素または検出用の蛍光標識とコンジュゲイトされている。

【0117】

本発明の別の方法論は免疫プロット法またはウエスタンプロット法であり、ここで、サンプル中のタンパク質を、P A G Eなどのゲル電気泳動によって分離し、次いでニトロセルロース膜などの固体基質に移す。当該移す方法の1つは電気移動である。当該検体は、特定の抗体（モノクローナル抗体または好ましくはそのフラグメント）と関係する。免疫反応は、酵素/フルオロフォア標識化抗体などの適切な方法で観測され得る。

10

【0118】

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

【0119】

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

20

【0120】

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

【0121】

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

30

【0122】

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

【0123】

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

40

【0124】

材料および方法

組み換えシスタチンSタンパク質をA b n o v aから購入した(0.06 μg / μL、カタログ番号H 0 0 0 0 1 4 7 2 - P 0 1)。

【0125】

抗体：価数1：2000であるラット抗シスタチンSモノクローナル抗体をR & Dから購入した(カタログ番号M A B 1 2 9 6)。価数1：1800であるウサギ抗シスタチンSポリクローナル抗体をA b c a mから購入した(カタログ番号a b 5 8 5 1 5)。

【0126】

50

免疫沈殿：2 mMフッ化フェニルメタンスルホニル (P M S F)、ブドウ球菌タンパク質 A の固定されたアガロースゲルおよびシスタチン S 抗体を、サンプル中に添加する。混合物を、4 で一晚穏やかに攪拌する。ジメチルピメルイミドエステルを、アガロースゲルに抗シスタチン S 抗体をコンジュゲイトするために用いる。その沈殿を、N - グリコシダーゼ F で洗浄かつ処理し、タンパク質を S D S - P A G E によって精製する。

【 0 1 2 7 】

要するに、N - グリコシダーゼ F の利用前に、沈殿物を 1 0 μ L のクエン酸塩緩衝液 (5 0 m M 、 p H 6 . 0 、 0 . 5 % の S D S) 中で沸騰する。1 0 μ L のリン酸塩緩衝液 (2 0 0 m M 、 p H 8 . 0 (4 0 m M の E D T A を含む)) および N - オクチルグルコシド (3 %) および N - キシラナーゼを混合物 (4 0 m U) に添加し、一晚 (3 7) 培養する。加える緩衝液を、その後添加し、S D S - P A G E 精製のために沸騰させる。他に示されない限り、1 5 % ポリアクリルアミドゲルは P A G E に用いられる。ゲルは 2 0 % の 2 , 5 - ジフェニルオキサゾール溶液にイメージ化する。

10

【 0 1 2 8 】

タンパク質の電気移動および免疫プロット法：タンパク質を、5 % の脱脂粉乳および 0 . 1 % B r i j - 3 5 を含む P B S 緩衝液中に 2 時間 (常温) インキュベートしたニトロセルロース膜に移す。その後、当該膜をウサギ抗シスタチン S 抗シスタチン S ポリクローナル抗体溶液中で一晚 (4) インキュベートする。当該膜を P B S 緩衝液 (0 . 1 % の B r i j - 3 5 を含む) で 3 回洗浄する。それをペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ I g G 溶液 (0 . 2 7 μ L 、 J a c k s o n) で 1 時間 (3 7) インキュベートし、続いて、P B S 緩衝液 (0 . 1 % B r i j - 3 5) で 4 回、P B S の洗浄を 1 回行った。膜は、市販の T M B 溶液 (T M B P e r o x i d a s e S u b s t r a t e 、 K i r k e g a a r d a n d P e r r y L a b o r a t o r i e s I n c . (ゲイザースバーグ、メリーランド) カタログ番号 5 0 - 7 6 - 0 1) によりイメージ化される。または、膜が 5 . 4 m M の過酸化水素溶液、2 . 5 n M の l u m i n o l および 4 0 0 m M p - クマル酸 (1 0 0 m M の T r i s - H C l に溶解され、p H 8 . 5) 溶液に浸されている間、E L C 方法によって試験し、A g f a C P - B U - f o i l 上にイメージ化される。

20

【 0 1 2 9 】

競合 E L I S A :

E L I S A プレート (コーニング) をシスタチン S 溶液 (5 μ g / m L) で被覆し、3 % の B S A 溶液によってバックフィルする。8 つの血清サンプル (2 倍希釈物) およびポリクローナルラット抗シスタチン S 抗体 (価数 1 : 1 0 0 0 である) を一晚 (4) でインキュベートし、および前処理した E L I S A プレート上にアプライする。プレートは 1 時間 3 7 でインキュベートする。サンプルの穴を T B S 緩衝液 (1 0 m M の T r i s - H C l 、 1 5 4 m M の N a C l 、 p H 7 . 5) によって洗浄する。添加したアルカリのホスファターゼ (A L P) 標識ヤギ抗マウス I g G (価数 1 : 2 0 0 0 である J a c k s o n w i I m m u n o R e s e a r c h) 溶液を添加し、1 時間 (3 7) の間インキュベートした。T M B 溶液 (T M B P e r o x i d a s e S u b s t r a t e 、 K i r k e g a a r d a n d P e r r y L a b o r a t o r i e s I n c . (ゲイザースバーグ、メリーランド) カタログ番号 5 0 - 7 6 - 0 1) を添加し、4 0 5 n m における O D をマイクロプレートリーダーにより定量化する。

30

40

【 0 1 3 0 】

二重抗体サンドイッチ E L I S A :

E L I S A プレート (コーニング) をモノクローナルラット抗シスタチン S 溶液 (5 μ g / m L) により被覆し、3 % B S A 溶液によりバックフィルした。8 個の血清サンプル (2 倍希釈) を 1 時間 (3 7) プレートの穴にインキュベートした。プレートを T B S 緩衝液 (1 0 m M の T r i s - H C l 、 1 5 4 m M の N a C l 、 p H 7 . 5) で洗浄する。ビオチン化ウサギ抗シスタチン S ポリクローナル抗体 (価数 : 1 : 1 0 0 0) を穴にアプライし、1 時間 (3 7) インキュベートする。当該穴を T B S 緩衝液で洗浄し、ストレプトアビジン - ペルオキシダーゼ複合体 (A B C コンプレックス) を加える。プレート

50

を1時間37℃でインキュベートし、穴をTBS緩衝液で洗浄する。TMB溶液(TMB Peroxidase Substrate, Kirkegaard and Perry Laboratories Inc. (ゲイザースバーグ、メリーランド)カタログ番号50-76-01)を添加し、405nmにおけるODをマイクロプレートリーダーにより定量化する。

【0131】

実施例1 シスタチンSの検出

1. 結腸直腸癌細胞株培養上清におけるシスタチンS検出

CST4のmRNAを上で論じたように結腸直腸癌腫瘍において過剰発現する。分泌タンパク質として、シスタチンSは種々の体液および分泌物中に見られる。結腸直腸癌の10
マーカーとしてシスタチンSを樹立するため、CST4のmRNAの高発現を伴うSW480およびCaCO2の上清を15%ポリアクリルアミドゲル(レーン5~6、レーン7~8のそれぞれ、図14)に充填し、対照サンプル(健常者の血清)をゲル(レーン1~2、レーン3~4のそれぞれ、図14)に充填した。電気泳動の後、タンパク質をニトロセルロース膜に移し、ペルオキシダーゼ標識抗シスタチンS抗体およびヤギ抗ウサギIgGと反応させた。TMBをタンパク質イメージ化に用いた。上記方法に従った。

【0132】

図14に示されているように、 α -アクチン(内部基準)はゲルのボトムにある。16kDaタンパク質を伴うバンドをレーン5~8で観測し、レーン1~4では、バンドが非常に薄かった。20

【0133】

2. 結腸直腸癌患者の血清におけるシスタチンS検出

セクション「1」に記載されているプロトコルは以下の通りであった。図15に示されているように、 α -アクチン(内部基準)は、ゲルのボトムにある。16kDaタンパク質を有するバンドはレーン3~6(癌性サンプル)に観測され、レーン1~2(対照サンプル)のバンドは極めてかすかであった。

【0134】

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

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

【0135】

図16に示されているように、健常な血清中のシスタチンSレベルの中央値は1.55ng/mLであり、結腸直腸ガン血清中で3.75ng/mLである。3.179ng/mLのカットオフ値は、癌性サンプルおよび健常サンプルを区別するのが可能である。40

【0136】

4. 結腸直腸癌診断および予測のためにシスタチンSおよびCEAの感度および特異性の比較

シスタチンSをセクション「3」に記載されている方法に従って測定した。CEAを市販キット(DRG、ドイツ,カタログ番号EIA5071)を用いて測定し、取扱説明書に従っている。

【0137】

図17および表3に示されているように、受信動作特性(ROC)曲線(AUC)の値の下の面積は、シスタチンSが0.698およびCEAが0.573であり、前者はより50

感度と選択性が良いことを意味する。

【0138】

【表3】

ROC曲線のAUC

タンパク質	AUC	標準偏差	P:AUCと0.5の 比較	信頼区間(cI95%)	
				下限	上限
シスタチンS	0.698	0.073	0.018	0.555	0.842
CEA	0.573	0.087	0.384	0.404	0.743

10

【0139】

5. 方法、検査キットおよびプロトコル

限定を意図せず、例証的な方法、検査キットおよびプロトコル

【0140】

結腸直腸癌の検出方法は以下を包含する。シスタチンSアンチゲンを基板上に固定する。R&D抗体(MAB1296)を前処理した基板にアプライする。当該基板を洗浄し、ALP標識ヤギ抗ウサギIgG(Beyotime Inc.、カタログ番号A239)などの二次抗体をアプライする。当該基板を洗浄し、直接的または間接的に標識(例におけるALP)からの応答からタンパク質の量を測定および検出する。

20

【0141】

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

【0142】

アンチゲンを共有結合でまたは非共有結合で固定し得る。試験用サンプルはヒト血清である。選択されまたは好ましい基板は、血清および基板中の他の成分間の非特異的相互作用を最小化するために、サンプルの添加前にBSAによってバックフィルすべきである。その後、当該基板を界面活性剤を含むリン酸緩衝液などの適切な緩衝液によって洗浄する。

30

【0143】

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

【0144】

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

40

【0145】

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

【0146】

例えば、検査キットは、特異的抗体またはそのフラグメントとなる。また、検査キットは、サンプル中のターゲットタンパク質の検出のため任意にまたは好ましくは報告単位と

50

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

【0147】

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

10

【0148】

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

20

【0149】

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

【0150】

6. 実証的検査キットおよびそのプロトコル

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

30

【0151】

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

【0152】

検査キットは以下を包含するだろう：1）プラスチック箱で閉じたELISAプレート、2）シスタチンS標準溶液。シスタチンS溶液を1%BSAを含むPBS緩衝液を用いて10ng/mLの濃度で調製する。当該原液を薄めて、5ng/mL、2.5ng/mL、1ng/mLおよび0.5ng/mLの濃度の一連の溶液を調製する。1%BSAを含むPBS緩衝液を0ng/mLシスタチンSを含む溶液として用いる。得られた溶液を試験前に15分以内に調製すべきである。例えば、4ng/mLシスタチンSの調製を、エッペンドルフチューブ中、0.5mL（0.5mLも）シスタチンS溶液（8ng/mL）および0.5mLの希釈緩衝液を混合して行うことができる。他の濃度を同様にして実現し得る。3）バックフィル用の3%BSAを含むPBST緩衝液。4）コーティング用抗体：5μg/mLのラット抗シスタチンSモノクローナル抗体および希釈用緩衝液（

40

50

0.05 M NaHCO₃ 溶液、pH 9.0)。5) ビオチン化ウサギ抗シスタチン S (価数 1 : 200) および希釈緩衝液 (1% BSA を含む P B S T)。6) A B C (ストレプトアビジン - ビオチン - ペルオキシダーゼ複合体)。7) 比色検出用 T M B 溶液。8) B S T 緩衝液 (P B S 中、0.05% トウイーン - 20)。9) 停止液 : 2 N H₂ S O₄。

【0153】

詳細な操作プロトコルを以下に記載する。

【0154】

1) コーティング . ラット抗シスタチン S 溶液を炭酸水素ナトリウム緩衝液 (0.05 M、pH 9.0) を用いて 5 μg / mL に希釈する。得られた溶液をポリスチレンプレート上の穴 (0.1 mL / 1つの穴) にアプライする。当該プレートを一晩インキュベートする。穴の中の溶液を廃棄し、その穴を各3分間かけて3回洗浄する。

10

【0155】

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

【0156】

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

20

【0157】

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

【0158】

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

30

【0159】

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

【0160】

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

【0161】

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

40

【0162】

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

【0163】

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

【0164】

50

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

【0165】

7. 結腸直腸癌 pTNMステージ判定用のシスタチンS発現

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

【0166】

【表4】

種々のpTNMステージにある結直腸癌患者のシスタチンS発現

シスタチンS発現の中央値(ng/mL)	
ステージT(20例)	0.96
ステージN(30例)	1.89
ステージM(30例)	4.04

10

20

【0167】

8. 乳房癌転移診断用のシスタチンS発現

実験の詳細は、セクション6と同一である。結腸直腸癌患者50人のサンプルを細胞的に診断し、そのうち30人の患者は癌転移している。表5にまとめるように、シスタチンS発現は、癌転移をしていない患者より転移する患者において高く、シスタチンS発現が結腸直腸癌転移診断用のマーカーであることを示している。

【0168】

【表5】

転移している結直腸癌患者と転移していない結直腸癌患者のシスタチンS発現

シスタチンS発現の中央値(ng/mL)	
転移なし(20例)	2.43
転移性癌(30例)	3.89

30

40

【0169】

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

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

【0170】

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

【0171】

50

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

【 図 3 】

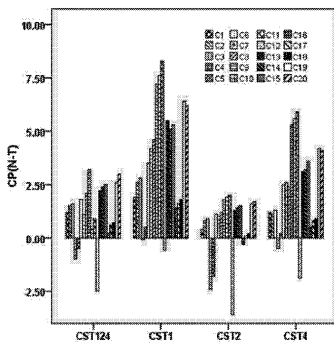
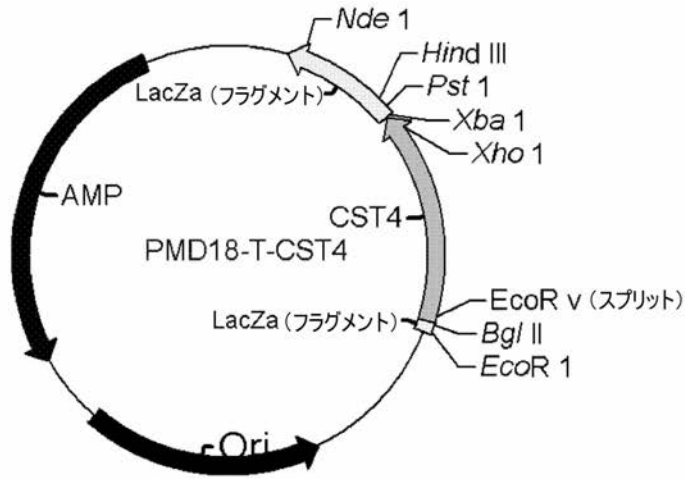
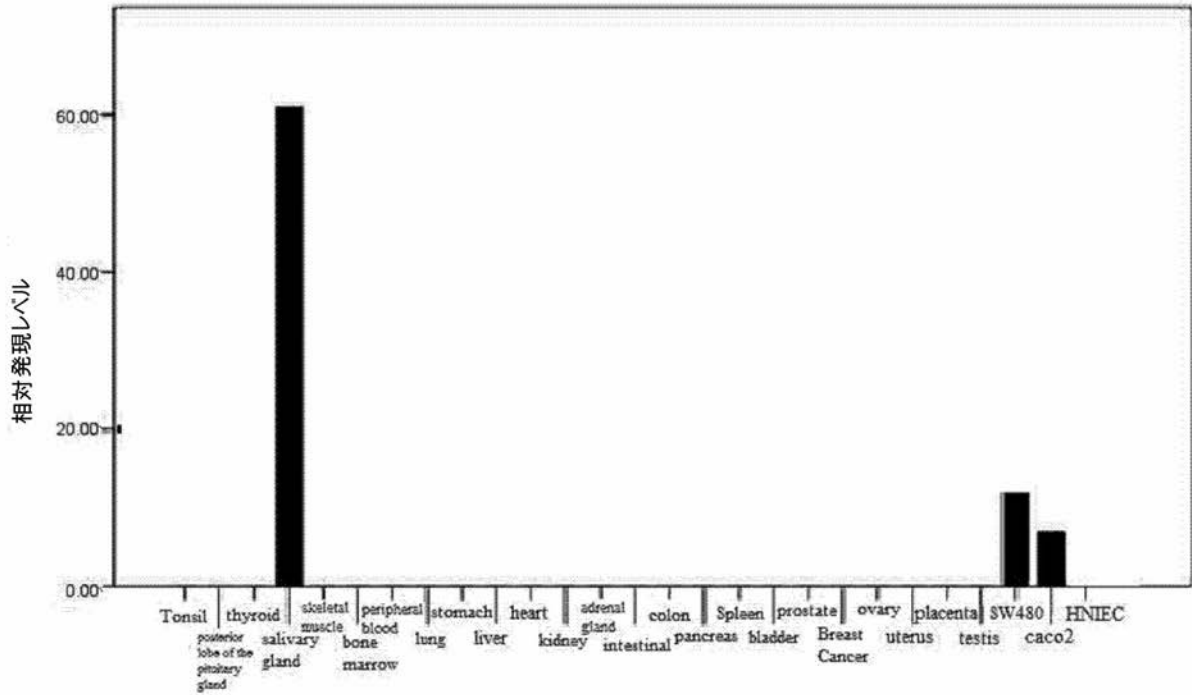


图 3

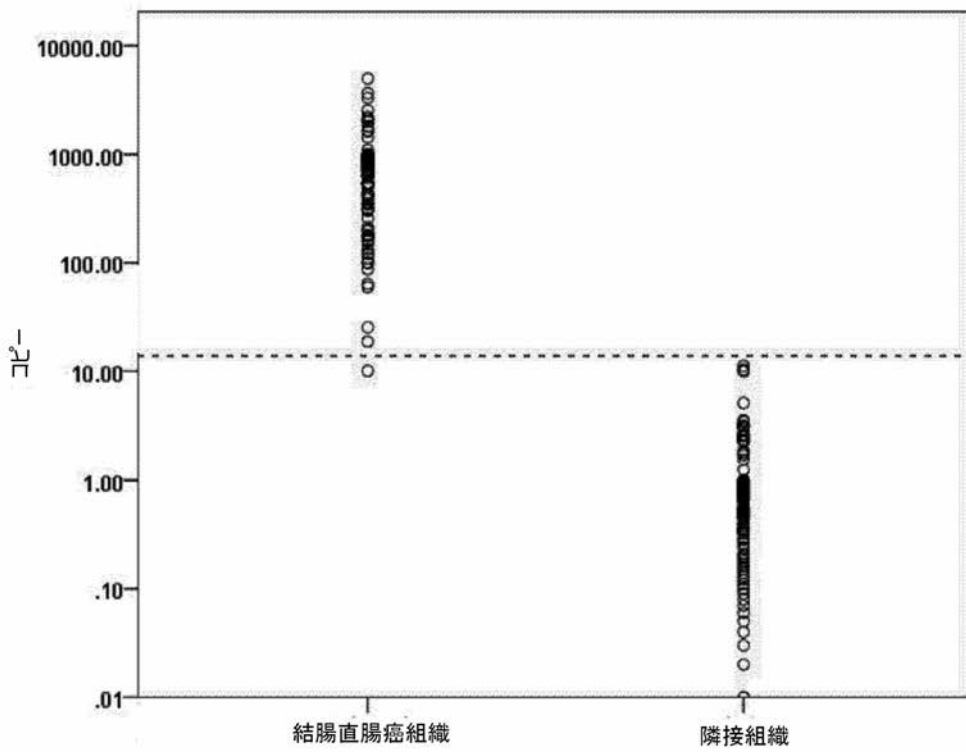
【 図 1 】



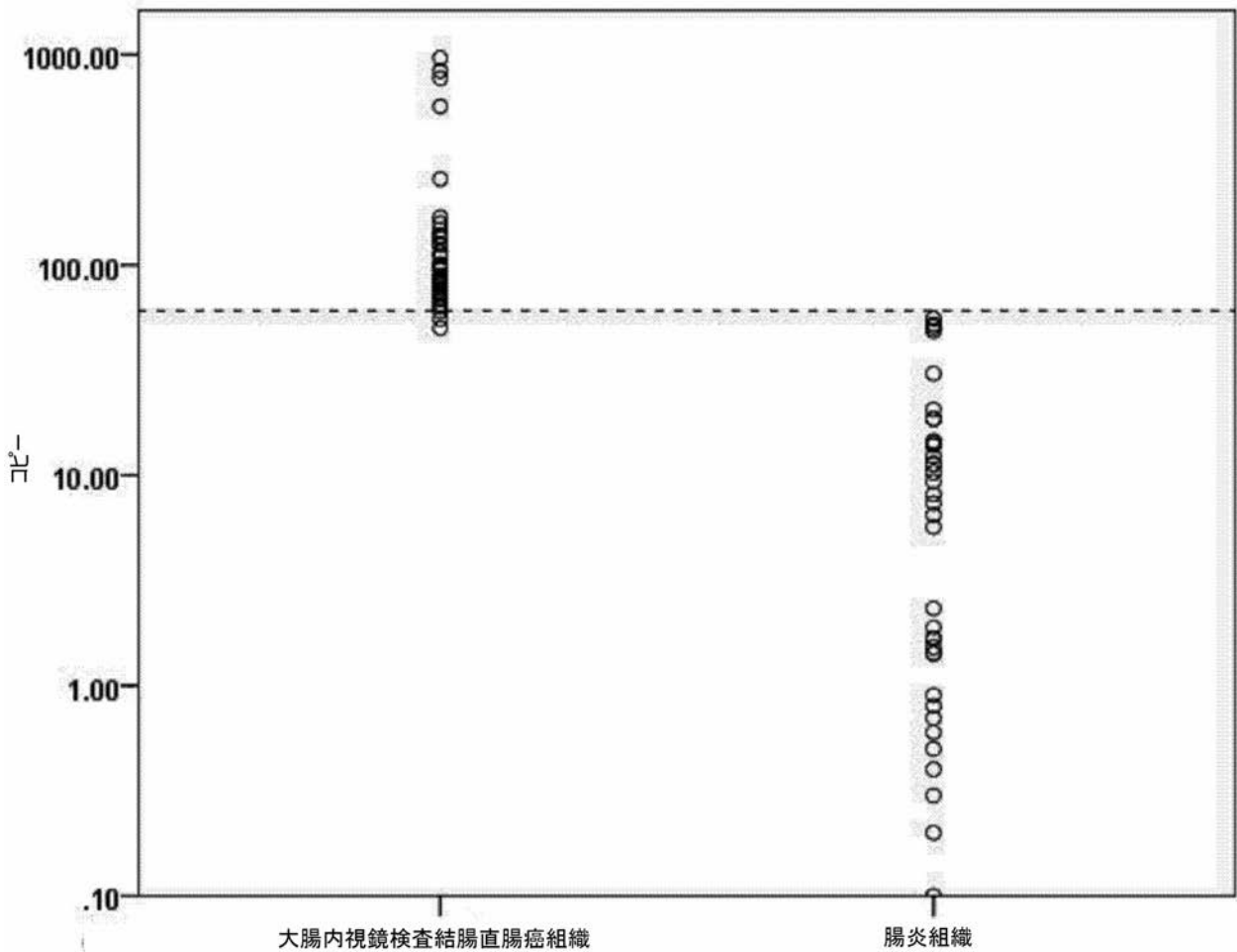
【 図 2 】



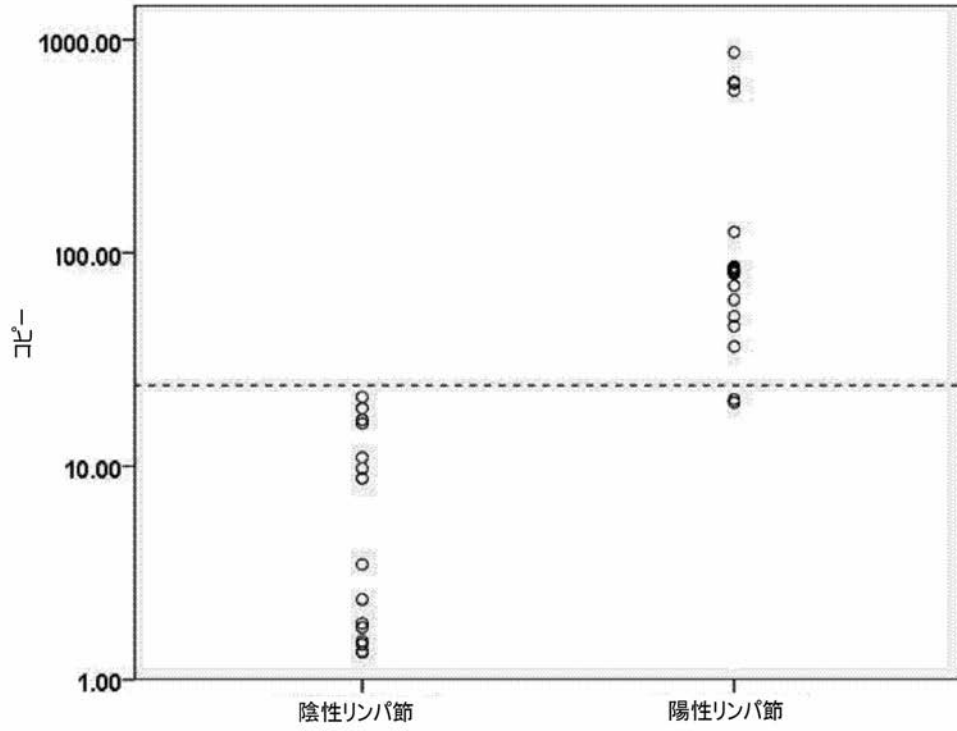
【 図 4 】



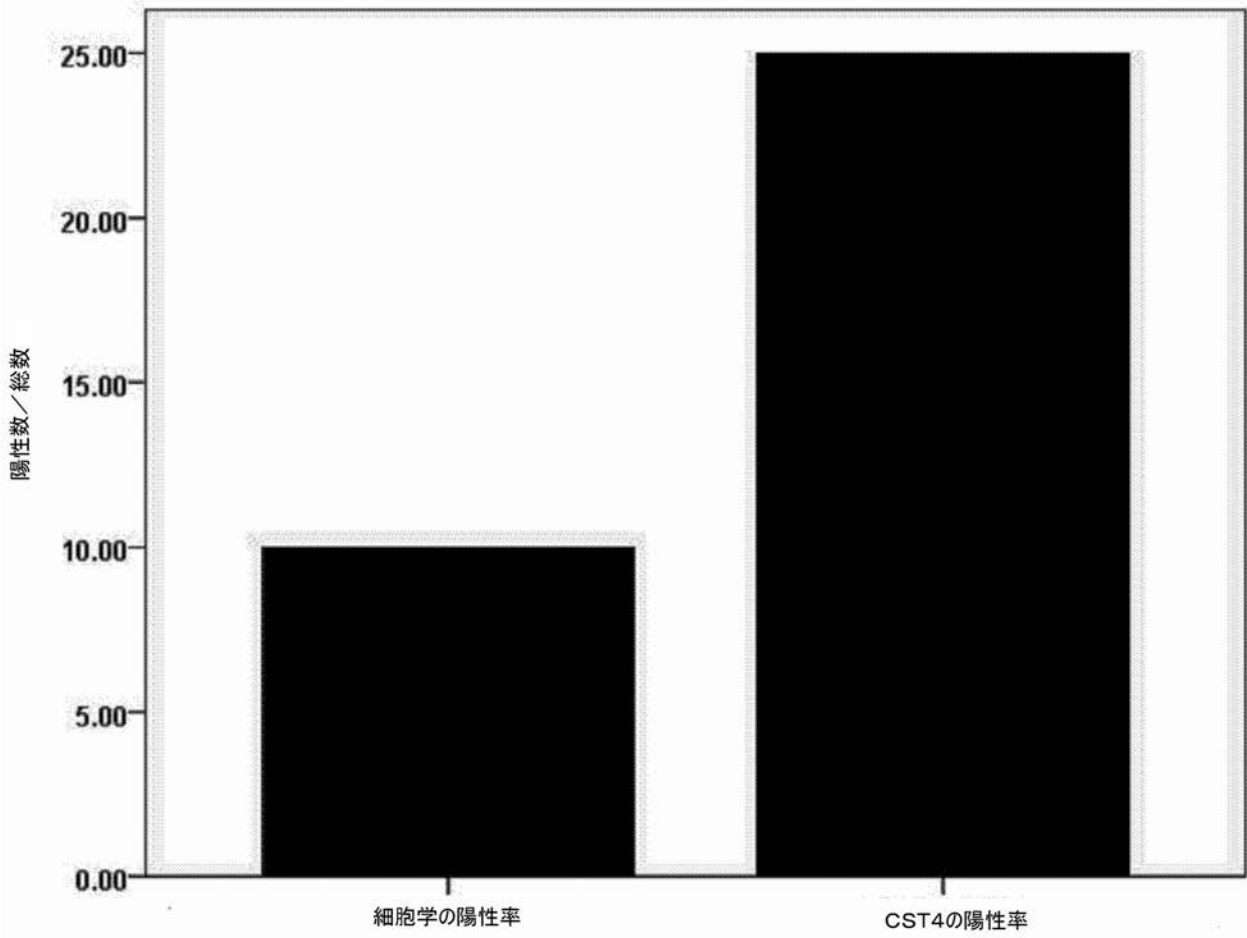
【 図 5 】



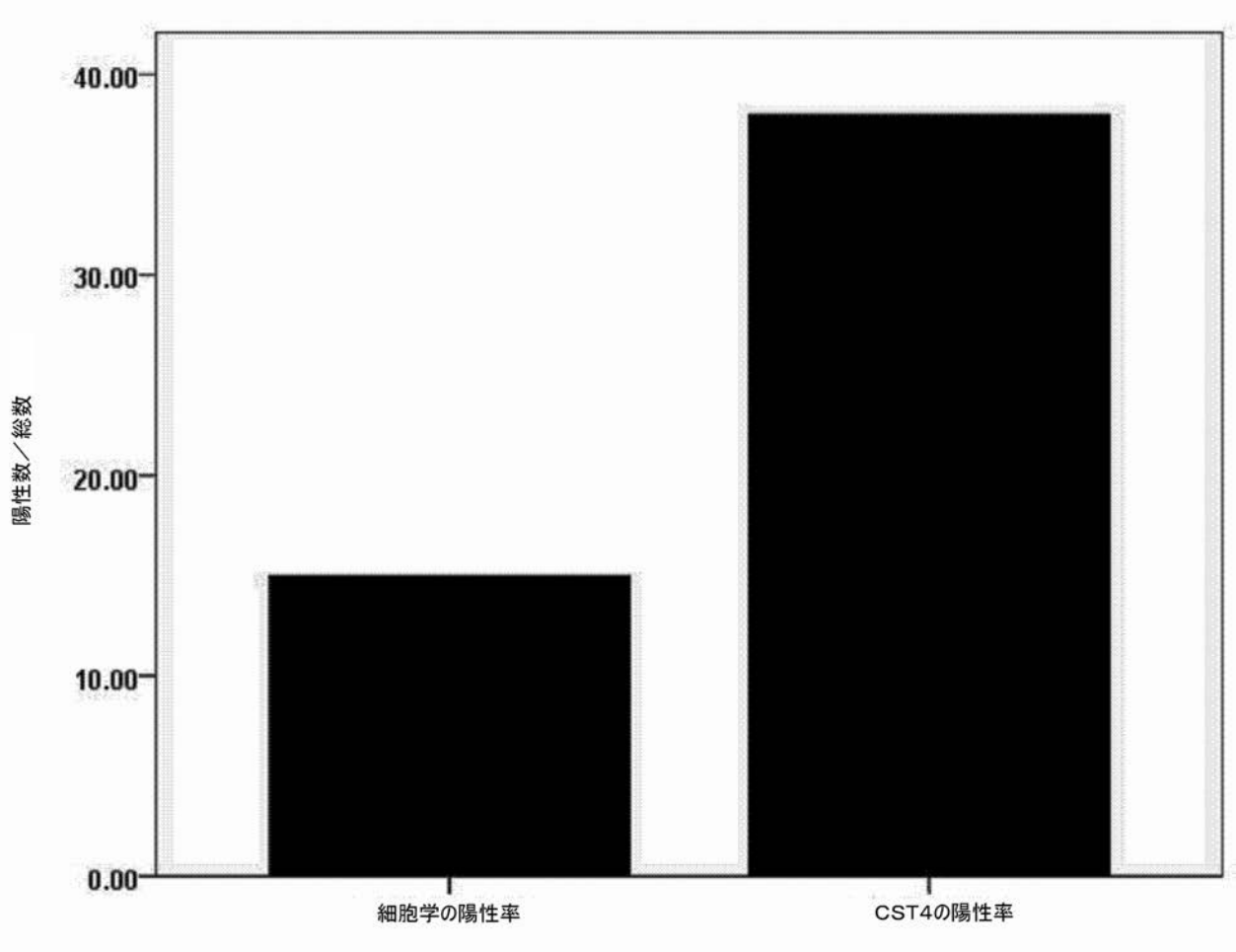
【 図 6 】



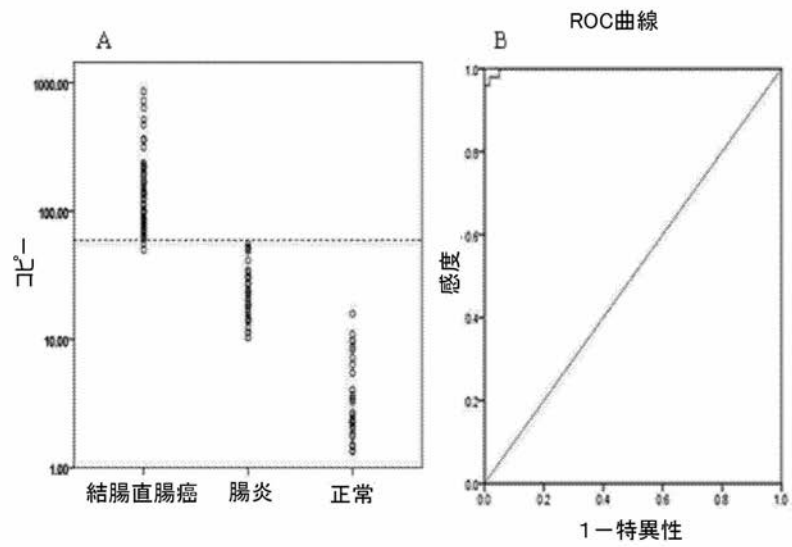
【 図 7 】



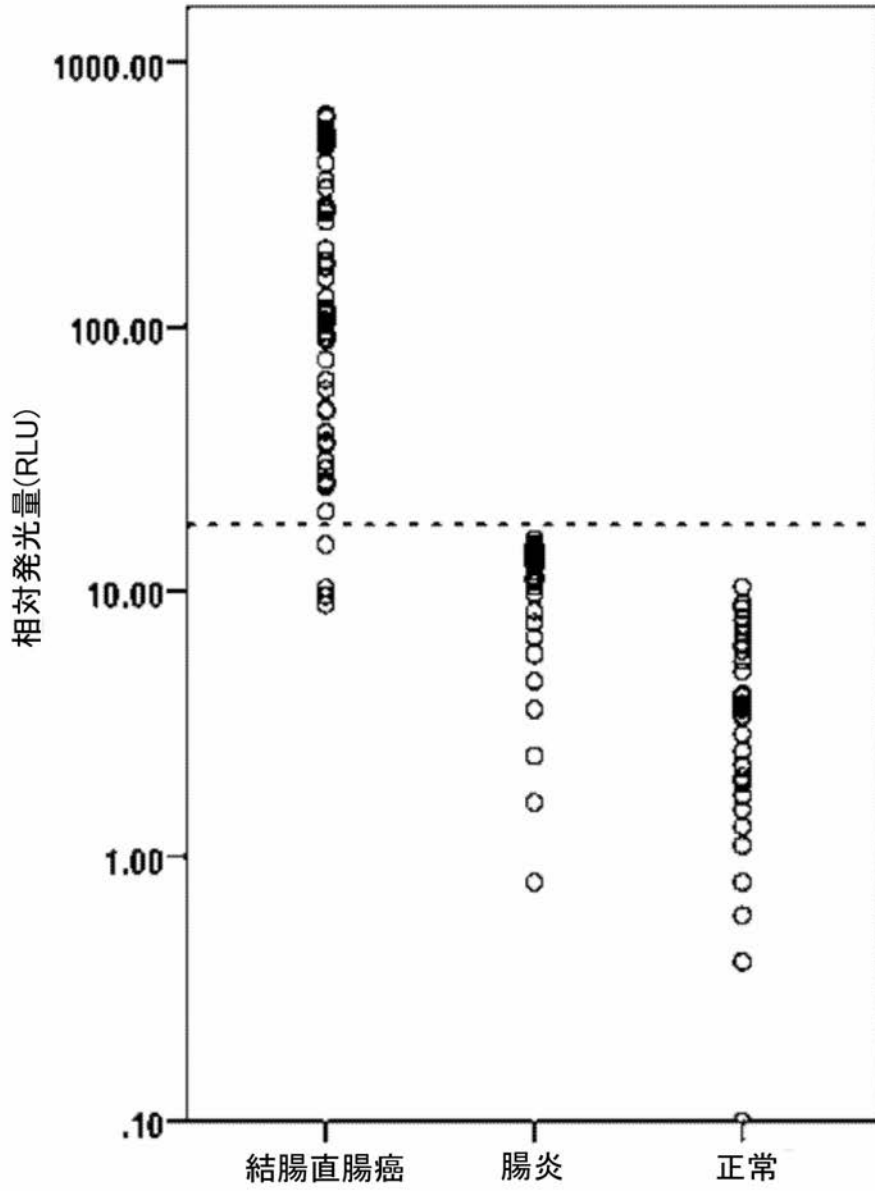
【 図 8 】



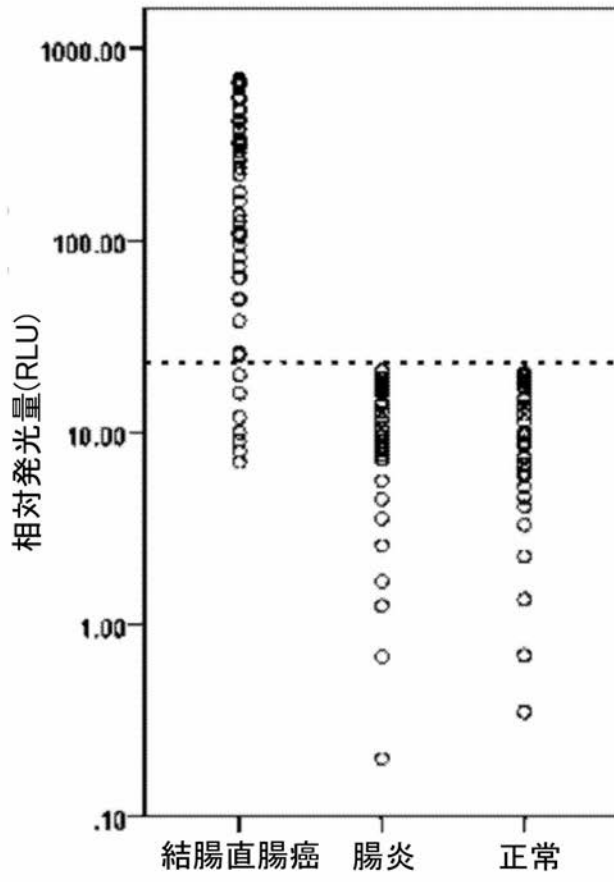
【 図 9 】



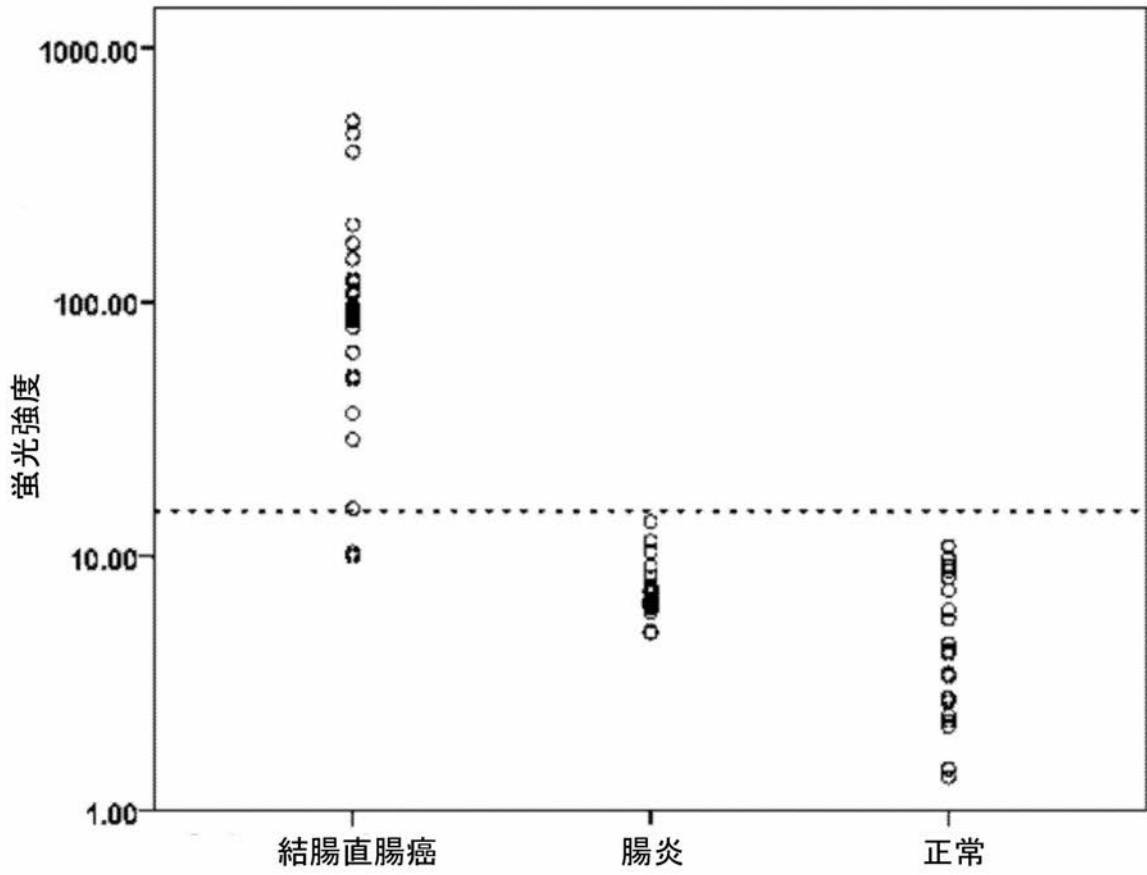
【 図 1 0 】



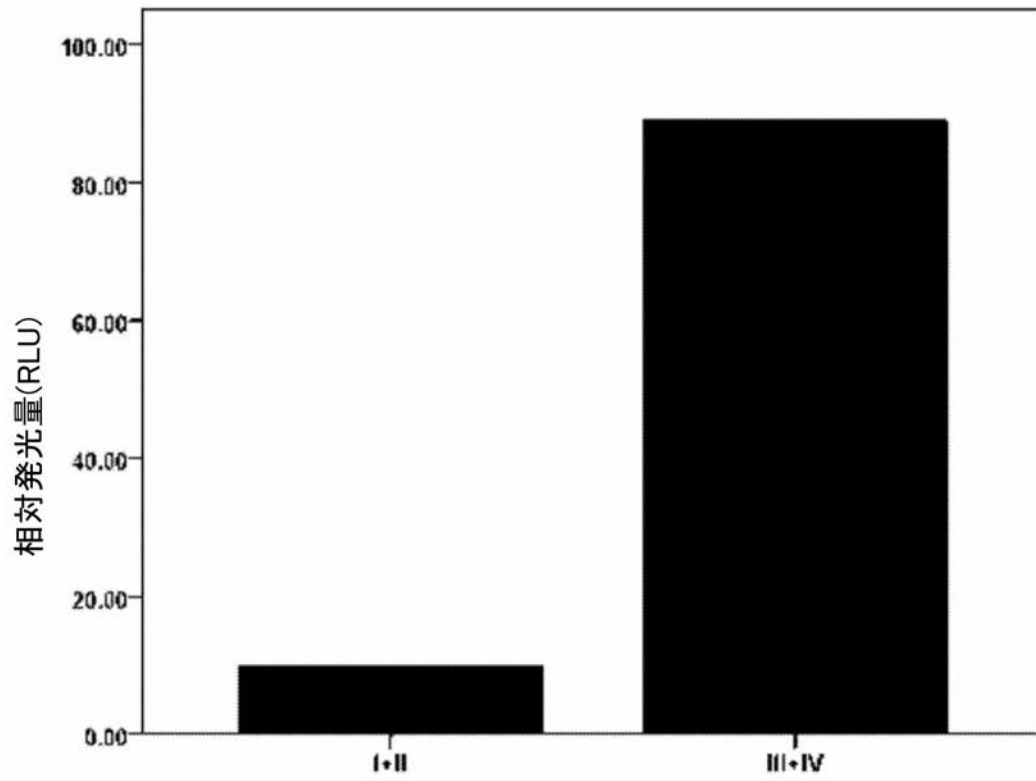
【 図 1 1 】



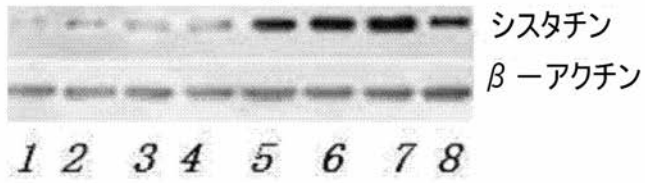
【 図 1 2 】



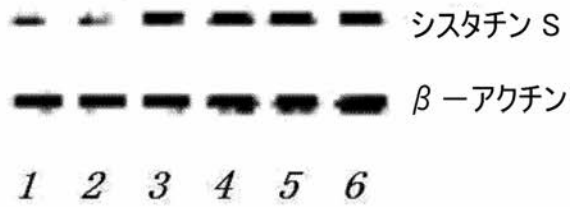
【 図 1 3 】



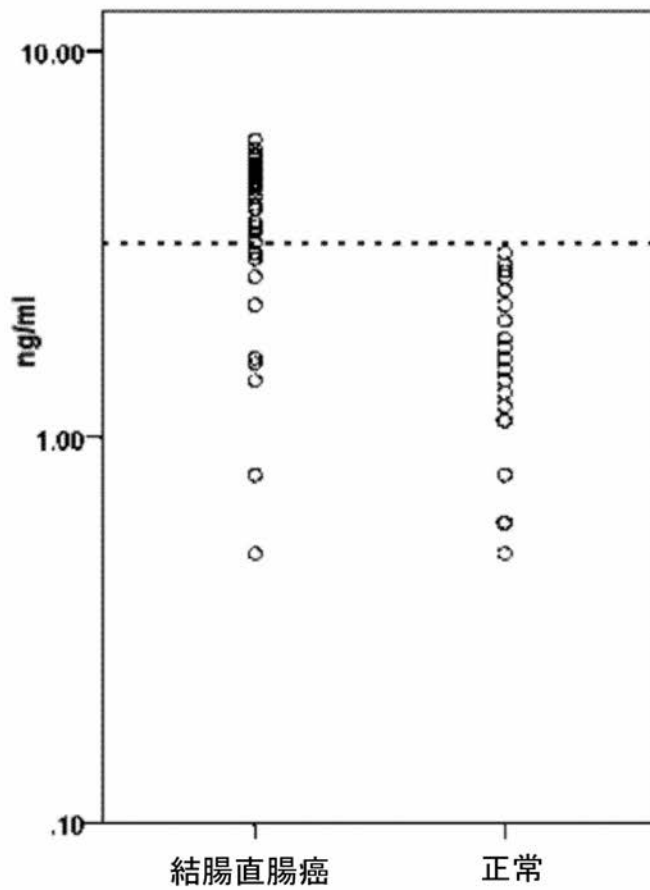
【 図 1 4 】



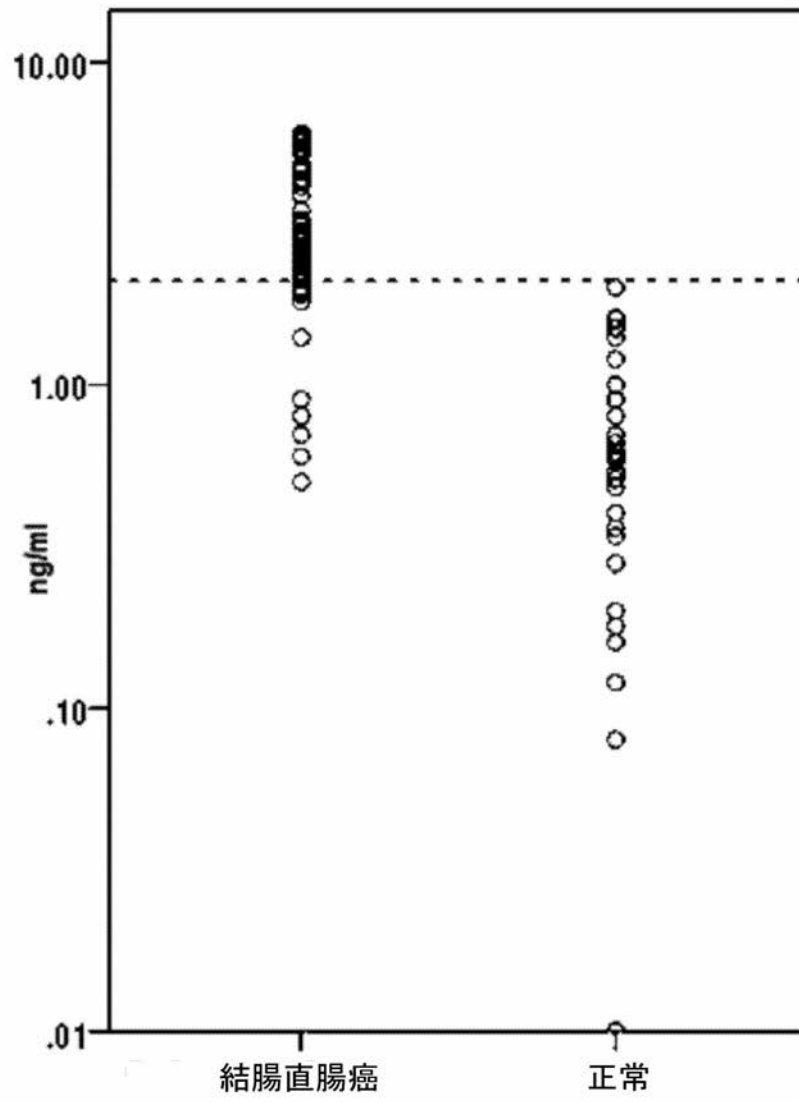
【 図 1 5 】



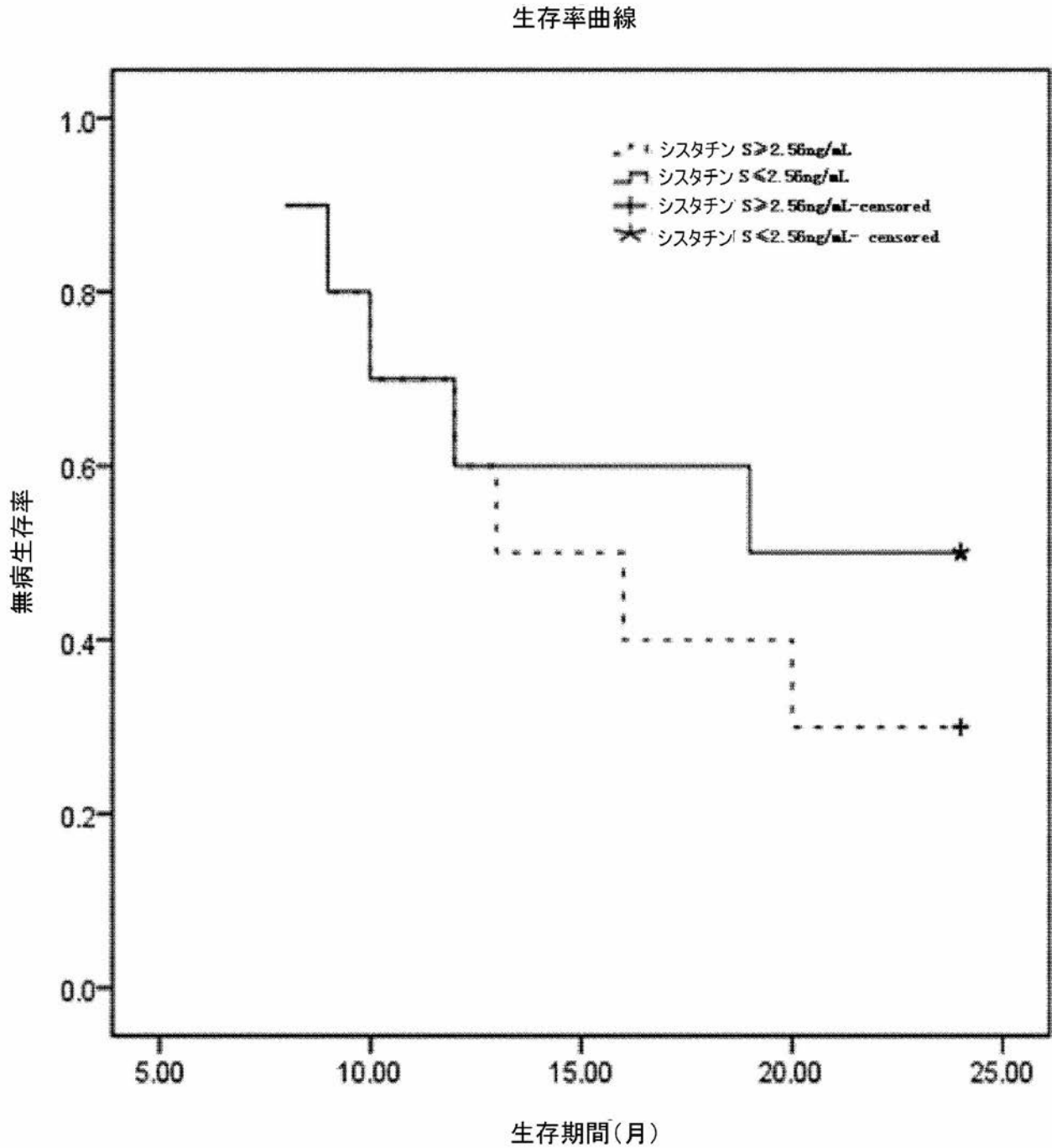
【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【 配列表 】

2015503921000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成25年11月5日 (2013.11.5)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

結腸直腸癌の診断および予測におけるCST4遺伝子、CST4のmRNA、CST4

スプライスの cDNA、CST4 特異的プライマーの対応増幅産物、CST4 遺伝子によってコードされるシスタチンSタンパク質およびシスタチンSのエピトープペプチドの利用であって、前記CST4 遺伝子の配列は配列番号42に示される、利用。

【請求項2】

CST4 遺伝子、CST4 の mRNA、CST4 スプライスの cDNA の検出用のプローブの配列が、配列番号3に示されている、請求項1に記載の利用。

【請求項3】

前記増幅産物の特異的プライマーが、配列番号1、4、6、8、10、12、14、16、18、20（プライマー1）に示される配列および配列番号2、5、7、9、11、13、15、17、19、21（プライマー2）に示される配列を有し、配列番号1における配列は配列番号2における配列と対になり、配列番号4における配列は配列番号5における配列と組み合わせられ、配列番号6における配列は配列番号7における配列と対になり、配列番号8における配列は配列番号9における配列と対になり、配列番号10における配列は配列番号11における配列と対になり、配列番号12における配列は配列番号13における配列と対になり、配列番号14における配列は配列番号15における配列と対になり、配列番号16における配列は配列番号17における配列と対になり、配列番号18における配列は配列番号19における配列と対になり、配列番号20における配列は配列番号21における配列と対になる、請求項1に記載の利用。

【請求項4】

シスタチンSタンパク質のエピトープペプチドの配列が配列番号50の中に存在する、請求項1に記載の利用。

【請求項5】

診断および予測が治療および腫瘍進行予測の間に結腸直腸癌の転移、微小転移巣、pTNMステージ判定、動的モニタリングを言及する、請求項1に記載の利用。

【請求項6】

結腸直腸癌診断および予測のためのバイオマーカーのための結腸直腸癌マーカー用キャプチャーであり、これらのバイオマーカーが、CST4 遺伝子、CST4 の mRNA、CST4 スプライスの cDNA、CST4 特異的プライマーの対応増幅産物、CST4 遺伝子によってコードされるシスタチンSタンパク質およびシスタチンSのエピトープペプチドである、結腸直腸癌マーカー用キャプチャー。

【請求項7】

前記特異的プライマーの配列が配列番号1～2中に存在する、請求項6に記載のキャプチャー。

【請求項8】

CST4 遺伝子、CST4 の mRNA、CST4 スプライスの cDNA の検出用プローブの配列が配列番号3に示される、請求項6に記載のキャプチャー。

【請求項9】

前記増幅産物の配列が配列番号43中に存在する、請求項6に記載のキャプチャー。

【請求項10】

これらのキャプチャーが、シスタチンSまたはそのエピトープを特異的に認識する抗体である、請求項6に記載のキャプチャー。

【請求項11】

前記シスタチンSのエピトープペプチドの配列が配列番号50中に示される、請求項6に記載のキャプチャー。

【請求項12】

結腸直腸癌検出用の検査試薬の調製およびキットにおける請求項6～11のいずれか1項に記載のキャプチャーの利用。

【請求項13】

請求項6に記載のキャプチャーを包含する診断キット。

【請求項14】

請求項 13 に記載の診断キットであって、1) 加水分解性 Taqman プローブに基づく CST4 の mRNA の定量的かつリアルタイム検出用の検査キットであり、前記プライマーの配列が配列番号 1 ~ 2 中に存在し、前記プローブの配列が配列番号 3 中に存在し、2) 蛍光色素に基づく CST4 の mRNA の定量的かつリアルタイム検出用の検査キットであり、前記プライマー配列が配列番号 1 ~ 2 中に存在し、内部校正プライマー用の配列は、配列番号 30 ~ 31 中に示され、3) 核酸ベース増幅 (NASBA) または転写媒介増幅 (TMA) に基づく CST4 の mRNA の定量的かつリアルタイム検出用の検査キットであり、両方のキットは CST4 のために配列が配列番号 2、配列番号 32 (プライマー用) および配列番号 3 (プローブ用) に見られるプライマーおよびプローブを包含し、4) リガーゼ連鎖反応 (LCR) に基づく前記 CST4 の mRNA の定量的かつリアルタイム検出用の検査キットであり、配列が配列番号 33 ~ 36 中に示されて包含されている 4 つのプローブであり、5) 好熱性鎖置換増幅 (tSDA) に基づく CST4 の mRNA の定量的かつリアルタイム検出用の検査キットであり、プライマー (配列番号 37 ~ 40 中に示される配列) およびプローブ (配列番号 41) は包含される診断キット。

【請求項 15】

詳細な記載は以下のとおりである請求項 13 に記載の検査キットであって、

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

2) 固体基質、キャプチャー、酵素ラベル化二次抗体および比色検出用酵素基質を包含しているプロットングキットであり、前記キャプチャーはモノクローナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である、または

3) 固体基質、固定されたアンチゲン、ビオチン化キャプチャー、前記比色検出用酵素基質および特異的モノクローナル抗体を包含する競合 ELISA キットであり、前記ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である、検査キット。

【請求項 16】

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

【請求項 17】

前記モノクローナル抗体がラット抗シスタチン S 抗体であり、前記固体基板が ELISA プレートであり、ビオチン化ポリクローナル抗体がビオチン化ウサギ抗シスタチン S ポリクローナル抗体である、請求項 15 に記載の二重抗体 ELISA 検査キット。

【請求項 18】

前記詳細が以下のように記載されている請求項 17 に記載の検査キットのプロトコルであって、

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

【請求項 19】

請求項 15 に記載の二重抗体 ELISA 検査キットであって、

前記固体基質が ELISA プレートであり、前記固定されたキャプチャー がラット抗シスタチン S 抗体であり、前記ビオチン化キャプチャーがウサギ抗シスタチン S ポリクローナル抗体 (価数 1 : 1000 である) でありおよび前記比色検出用基質がアルカリ

ホスファターゼ (ALP) であり、または

前記二重抗体サンドイッチ ELISA キットが競合 ELISA に基づき、ELISA プレートは前記固体基質であり、シスタチン S の濃度は $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ であり、前記特異的モノクローナル抗体はラット抗シスタチン S 抗体 (価数 1 : 2000 である) であり、酵素ラベル化二次抗体は ALP ラベルしたヤギ抗マウス IgG (価数 1 : 2000 であり) であり、および前記比色検出用基質が ALP 基質であり、前記シスタチン S、酵素ラベル化二次抗体および ALP 基質の体積比が 1 : 2 であり、または

キットが免疫プロット法に基づき、前記固体基質はニトロセルロース膜であり、前記キャプチャーはモノクローナルシスタチン S 抗体 (価数 1 : 1000 である) であり、前記酵素ラベル化二次抗体はペルオキシダーゼラベル化ヤギ抗ウサギ IgG であり、および前記酵素基質は TMB 溶液である、二重抗体 ELISA 検査キット。

【請求項 20】

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

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

固相サポート、前記キャプチャー試薬および HRP - 発色基質、特異的モノクローナル抗体を含むキャプチャー試薬、特異的にビオチン化された多耐性であるキャプチャー試薬を包含するシスタチン S タンパク質レベルの検出用キットである、癌の診断用およびキット用の指針。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0006】

上記目的を達成するために、本発明の技術は以下に記載されている。CST4 遺伝子、CST4 の mRNA、CST4 スプライスの cDNA、CST4 特異的プライマーの増幅産物、シスタチン S タンパク質およびそのエピトープは、結腸直腸癌診断および予測のためのバイオマーカーとして利用される。CST4 遺伝子の配列は配列番号 42 中に示されている。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

CST4 特異的プライマーの配列は、配列番号 1 ~ 2 に示されている。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

CST4、CST4 の mRNA、および CST4 スプライスの cDNA の検出用プローブの配列は、配列番号 3 中に存在している。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

上述の増幅産物の配列は、配列番号43に示されている。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0169

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0169】

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

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

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/070149**Box No. □ Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/070149**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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
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:

3. Claims Nos.:
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:

See the extra sheet

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:
1-3, 5, 14 and 16 (all parts of technical solutions)
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		International application No. PCT/CN2012/070149
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See the extra sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: C12N, C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CPRSABS, CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, BA, CA, PUBMED, Genbank, DDBJ, EMBL: CST4, cystatin, search for sequences SEQ ID NOs: 1-3 and 42, colon cancer, colon carcinoma, colorectal cancer, colorectal carcinoma		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE Genbank [Online], 20 November 2011 (20.11.2011), Genbank accession no. NM_001899, KOTTGEN, A. et al.: "Homo sapiens cystatin S (CST4), mRNA", see the whole document	1-3, 5, 14, 16 (all parts of technical solutions)
A	CN 102232113 A (GENENTECH, INC., et al.), 02 November 2011 (02.11.2011), see the whole document	1-3, 5, 14, 16 (all parts of technical solutions)
A	CN 1867679 A (PACIFIC EDGE BIOTECHNOLOGY LIMITED), 22 November 2006 (22.11.2006), see the whole document	1-3, 5, 14, 16 (all parts of technical solutions)
A	ISEMURA, S. et al., "Cystatin S: A cysteine proteinase inhibitor of human saliva", J. BIOCHEM., vol. 96, pages 1311-1314, 31 October 1984 (31.10.1984), see the whole document	1-3, 5, 14, 16 (all parts of technical solutions)
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 07 September 2012 (07.09.2012)	Date of mailing of the international search report 27 September 2012 (27.09.2012)	
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer SONG, Zhigang Telephone No.: (86-10) 62411078	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2012/070149

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102232113 A	2011-11-02	WO 2009124090 A1	2009-10-08
		AU 2009231733 A1	2009-10-08
		CA 2718120 A1	2009-10-08
		MXPA 10010746 A	2010-10-31
		KR 20100131003 A	2010-12-14
		EP 2271770 A1	2011-01-12
		US 2011123530 A1	2011-05-26
		JP 2011523350 A	2011-08-11
		INDELNP 201007657 E	2011-09-09
		CN 1867679 A	2006-11-22
AU 2004260083 A1	2005-02-03		
WO 2005010213 A3	2005-09-15		
EP 1649064 A2	2006-04-26		
BRPI 0412725 A	2006-09-26		
US 2007184439 A1	2007-08-09		
JP 2007531500 A	2007-11-08		
EP 2305833 A2	2011-04-06		
EP 2325338 A2	2011-05-25		
EP 1649064 B1	2011-06-01		
EP 2325338 A3	2011-10-12		
JP 2011250795 A	2011-12-15		
EP 2305833 A3	2012-02-01		
JP 4936887 B2	2012-05-23		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/070149**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C12N 15/15 (2006.01) i

C12Q 1/28 (2006.01) i

C12Q 1/42 (2006.01) i

This International Searching Authority found 25 inventions in claims, as follows:

Invention 1: claims 1-2 and 5 (all parts of technical solutions);

relate to the application of the CST4 gene, the mRNA of the CST4 gene, and CYSTATIN S protein encoded by the CST4 gene in the preparation of makers for diagnosing and predicting colorectal cancer, wherein the nucleotide sequence of said CST4 gene is shown as SEQ ID NO: 42;

Invention 2: claims 1-2 and 5 (all parts of technical solutions);

relate to the application of the cDNA of spliceosome of the CST4 gene in the preparation of makers for diagnosing and predicting colorectal cancer;

Invention 3: claims 1-3 and 5 (all parts of technical solutions);

relate to the application of an amplicon corresponding to the CST4 specific primer in the preparation of makers for diagnosing and predicting colorectal cancer, wherein the amplicon is amplified by an upstream primer of SEQ ID NO: 1 and a downstream primer of SEQ ID NO: 2;

Invention 4: claims 1-3 and 5 (all parts of technical solutions);

relate to the application of an amplicon corresponding to the CST4 specific primer in the preparation of makers for diagnosing and predicting colorectal cancer, wherein the amplicon is amplified by an upstream primer of SEQ ID NO: 4 and a downstream primer of SEQ ID NO: 5;

Invention 5: claims 1-3 and 5 (all parts of technical solutions);

relate to the application of an amplicon corresponding to the CST4 specific primer in the preparation of makers for diagnosing and predicting colorectal cancer, wherein the amplicon is amplified by an upstream primer of SEQ ID NO: 6 and a downstream primer of SEQ ID NO: 7;

Invention 6: claims 1-3 and 5 (all parts of technical solutions);

relate to the application of an amplicon corresponding to the CST4 specific primer in the preparation of makers for diagnosing and predicting colorectal cancer, wherein the amplicon is amplified by an upstream primer of SEQ ID NO: 8 and a downstream primer of SEQ ID NO: 9;

Invention 7: claims 1-3 and 5 (all parts of technical solutions);

relate to the application of an amplicon corresponding to the CST4 specific primer in the preparation of makers for diagnosing and predicting colorectal cancer, wherein the amplicon is amplified by an upstream primer of SEQ ID NO: 10 and a downstream primer of SEQ ID NO: 11;

Invention 8: claims 1-3 and 5 (all parts of technical solutions);

relate to the application of an amplicon corresponding to the CST4 specific primer in the preparation of makers for diagnosing and predicting colorectal cancer, wherein the amplicon is amplified by an upstream primer of SEQ ID NO: 12 and a downstream primer of SEQ ID NO: 13;

Invention 9: claims 1-3 and 5 (all parts of technical solutions);

relate to the application of an amplicon corresponding to the CST4 specific primer in the preparation of makers for diagnosing and predicting colorectal cancer, wherein the amplicon is amplified by an upstream primer of SEQ ID NO: 14 and a downstream primer of SEQ ID NO: 15;

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/070149

Invention 10: claims 1-3 and 5 (all parts of technical solutions);
relate to the application of an amplicon corresponding to the CST4 specific primer in the preparation of makers for diagnosing and predicting colorectal cancer, wherein the amplicon is amplified by an upstream primer of SEQ ID NO: 16 and a downstream primer of SEQ ID NO: 17;

Invention 11: claims 1-3 and 5 (all parts of technical solutions);
relate to the application of an amplicon corresponding to the CST4 specific primer in the preparation of makers for diagnosing and predicting colorectal cancer, wherein the amplicon is amplified by an upstream primer of SEQ ID NO: 18 and a downstream primer of SEQ ID NO: 19;

Invention 12: claims 1-3 and 5 (all parts of technical solutions);
relate to the application of an amplicon corresponding to the CST4 specific primer in the preparation of makers for diagnosing and predicting colorectal cancer, wherein the amplicon is amplified by an upstream primer of SEQ ID NO: 20 and a downstream primer of SEQ ID NO: 21;

Invention 13: claims 1 (part of technical solutions), 4 and 5 (part of technical solutions);
relate to the application of an epitope peptide of the CYSTATIN S protein in the preparation of makers for diagnosing and predicting colorectal cancer, wherein the nucleotide sequence of the epitope peptide of said CYSTATIN S protein is shown as SEQ ID NO: 50;

Invention 14: claims 6, 8, 12-13, 15 and 17-19 (all parts of technical solutions);
relate to a trapping agent for the CST4 gene or the mRNA of the CST4 gene; the application of the trapping agent in the preparation of colorectal cancer detection reagents or kits; a diagnostic kit containing the trapping agent; a method for using the kit; a method of detecting or predicting for colorectal cancer for using the diagnostic kit;

Invention 15: claims 6, 8, 12-13, 15 and 17-19 (all parts of technical solutions);
relate to a trapping agent of the cDNA of the CST4 gene spliceosome; the application of the trapping agent in the preparation of colorectal cancer detection reagents or kits; a diagnostic kit containing the trapping agent; a method for using the kit; a method of detection or prediction for colorectal cancer for using the diagnostic kit;

Invention 16: claims 6, 12-13, 15, 17-19 (all parts of technical solutions) and 7;
relate to a trapping agent of the amplicon corresponding to the CST4 specific primer; the application of the trapping agent in the preparation of colorectal cancer detection reagents or kits; a diagnostic kit containing the trapping agent, wherein the amplicon is amplified by the primers of SEQ ID NOs: 1-2; a method for using the kit; a method of detection or prediction for colorectal cancer for using the diagnostic kit;

Invention 17: claims 6, 12-13, 15, 17-19 (all parts of technical solutions) and 9;
relate to a trapping agent of the amplicon corresponding to the CST4 specific primer; the application of the trapping agent in the preparation of colorectal cancer detection reagents or kits; a diagnostic kit containing the trapping agent, wherein the nucleotide sequence of the amplicon, such as shown by SEQ ID NO: 43; a method for using the kit; a method of detection or prediction for colorectal cancer for using the diagnostic kit;

Invention 18: claims 6, 10, 12-13, 15 and 17-19 (all parts of technical solutions);
relate to a trapping agent of the CYSTATIN S protein; the application of the trapping agent in the preparation of colorectal cancer detection reagents or kits; a diagnostic kit containing the trapping agent; a method for using the kit; a method of detection or prediction for colorectal cancer for using the diagnostic kit;

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/070149

Invention 19: claims 6, 10, 12-13, 15, 17-19 (all parts of technical solutions) and 11;
relate to a trapping agent of the epitope peptide of the CYSTATIN S; the application of the trapping agent in the preparation of colorectal cancer detection reagents or kits; a diagnostic kit containing the trapping agent, wherein the nucleotide sequence of the epitope peptide of said CYSTATIN S protein, such as shown by SEQ ID NO: 50; a method for using the kit; a method of detection or prediction for colorectal cancer for using the diagnostic kit;

Invention 20: claims 14 and 16 (all parts of technical solutions);
relate to a diagnostic kit, comprising a primer pair, wherein the upstream primer is SEQ ID NO: 1 and the downstream primer is SEQ ID NO: 2, and a probe for the nucleotide sequence, such as SEQ ID NO: 3;

Invention 21: claims 14 and 16 (all parts of technical solutions);
relate to a diagnostic kit, comprising a primer pair, wherein the upstream primer is SEQ ID NO: 1 and the downstream primer is SEQ ID NO: 2, and an internal reference primer pair, wherein the upstream primer is SEQ ID NO: 30 and the downstream primer is SEQ ID NO: 31;

Invention 22: claims 14 and 16 (all parts of technical solutions);
relate to a diagnostic kit, comprising a primer pair, wherein the upstream primer is SEQ ID NO: 32 and the downstream primer is SEQ ID NO: 2, and a probe for the nucleotide sequence, such as SEQ ID NO: 3;

Invention 23: claims 14 and 16 (all parts of technical solutions);
relate to a diagnostic kit, comprising 4 probes having the nucleotide sequences of SEQ ID NOs: 33-36, respectively;

Invention 24: claims 14 and 16 (all parts of technical solutions);
relate to a diagnostic kit, comprising a primer having the nucleotide sequences of SEQ ID NOs: 37-40, and a probe having the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 41;

Invention 25: claims 20-21
relate to a diagnostic kit for diagnosing and predicting colorectal cancer by detecting the CYSTATIN S protein level;
reference document (Genbank accession number: NM_001899, 20 November 2011 (20.11.2011), "Homo sapiens cystatin S (CST4) mRNA") has disclosed the mRNA sequence of the CST4 gene, the amino acid sequence of the encoded CYSTATIN S protein thereof, and the structure of CYSTATIN S protein. Therefore, the inventions 1-25 do not share a same or corresponding special technical feature, are not so linked as to form a single general inventive concept, and therefore do not meet the requirements of PCT Rules 13.1, 13.2 and 13.3.

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2012/070149
A. 主题的分类		
参见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C12N, C12Q		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CPRSABS、CNABS、DWPI、SIPOABS、CNKI、BA、CA、PUBMED、Genbank、DDBJ、EMBL、CST4、cystatin、胱抑素、结肠癌、结肠直肠癌、对序列 SEQ ID NO: 1-3、42 的检索、colon cancer、colon carcinoma、colorectal cancer、colorectal carcinoma		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	DATABASE Genbank [Online], 20.11 月 2011 (20.11.2011), Genbank accession no. NM_001899, Kottgen, A., et al.: "Homo sapiens cystatin S (CST4), mRNA", 参见全文	1-3、5、14、16 (都是部分技术方案)
A	CN102232113A (健泰科生物技术公司, 等), 02.11 月 2011 (02.11.2011), 参见全文	1-3、5、14、16 (都是部分技术方案)
A	CN1867679A (环太平洋生物技术有限公司), 22.11 月 2006 (22.11.2006), 参见全文	1-3、5、14、16 (都是部分技术方案)
A	Isemura S., 等, "Cystatin S: A cysteine proteinase inhibitor of human saliva", J. Biochem., 第 96 卷, 第 1311-1314 页, 31.10 月 1984 (31.10.1984), 参见全文	1-3、5、14、16 (都是部分技术方案)
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件
国际检索实际完成的日期 07.9 月 2012 (07.09.2012)		国际检索报告邮寄日期 27.9 月 2012 (27.09.2012)
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		授权官员 宋智刚 电话号码: (86-10) 62411078

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2012/070149

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1、关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是在下列基础上进行的:

a. 序列表的提交或提供

 纸件形式 电子形式

b. 提交或提供时间

 包含在申请提交时的国际申请中 以电子形式与国际申请一起提交 为检索之用随后提交本单位

2、 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2012/070149

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，
具体地说：

3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

参见附加页

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。
3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说，是权利要求：1—3、5、14、16（都是部分技术方案）
4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明： 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/070149

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN102232113A	2011-11-02	WO2009124090A1	2009-10-08
		AU2009231733A1	2009-10-08
		CA2718120A1	2009-10-08
		MXPA10010746A	2010-10-31
		KR20100131003A	2010-12-14
		EP2271770A1	2011-01-12
		US2011123530A1	2011-05-26
		JP2011523350A	2011-08-11
		INDELNP201007657E	2011-09-09
		CN1867679A	2006-11-22
AU2004260083A1	2005-02-03		
WO2005010213A3	2005-09-15		
EP1649064A2	2006-04-26		
BRPI0412725A	2006-09-26		
US2007184439A1	2007-08-09		
JP2007531500A	2007-11-08		
EP2305833A2	2011-04-06		
EP2325338A2	2011-05-25		
EP1649064B1	2011-06-01		
EP2325338A3	2011-10-12		
JP2011250795A	2011-12-15		
EP2305833A3	2012-02-01		
JP4936887B2	2012-05-23		

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2012/070149

A. 主题的分类

C12N 15/15 (2006.01) i

C12Q 1/28 (2006.01) i

C12Q 1/42 (2006.01) i

本国际检索单位发现权利要求书中包括 25 项发明，如下所示：

发明 1：权利要求 1—2、5（都是部分技术方案）；

涉及 CST4 基因、CST4 基因的 mRNA、CST4 基因编码的 CYSTATIN S 蛋白在制备诊断和预示肠癌标志物中的应用，其中所述 CST4 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO：42 所示；

发明 2：权利要求 1—2、5（都是部分技术方案）；

涉及 CST4 基因剪切子的 cDNA 在制备诊断和预示肠癌标志物中的应用；

发明 3：权利要求 1—3、5（都是部分技术方案）；

涉及一种 CST4 特异性引物对应的扩增子在制备诊断和预示肠癌标志物中的应用，其中该扩增子是通过上游引物 SEQ ID NO：1 和下游引物 SEQ ID NO：2 扩增的；

发明 4：权利要求 1—3、5（都是部分技术方案）；

涉及一种 CST4 特异性引物对应的扩增子在制备诊断和预示肠癌标志物中的应用，其中该扩增子是通过上游引物 SEQ ID NO：4 和下游引物 SEQ ID NO：5 扩增的；

发明 5：权利要求 1—3、5（都是部分技术方案）；

涉及一种 CST4 特异性引物对应的扩增子在制备诊断和预示肠癌标志物中的应用，其中该扩增子是通过上游引物 SEQ ID NO：6 和下游引物 SEQ ID NO：7 扩增的；

发明 6：权利要求 1—3、5（都是部分技术方案）；

涉及一种 CST4 特异性引物对应的扩增子在制备诊断和预示肠癌标志物中的应用，其中该扩增子是通过上游引物 SEQ ID NO：8 和下游引物 SEQ ID NO：9 扩增的；

发明 7：权利要求 1—3、5（都是部分技术方案）；

涉及一种 CST4 特异性引物对应的扩增子在制备诊断和预示肠癌标志物中的应用，其中该扩增子是通过上游引物 SEQ ID NO：10 和下游引物 SEQ ID NO：11 扩增的；

发明 8：权利要求 1—3、5（都是部分技术方案）；

涉及一种 CST4 特异性引物对应的扩增子在制备诊断和预示肠癌标志物中的应用，其中该扩增子是通过上游引物 SEQ ID NO：12 和下游引物 SEQ ID NO：13 扩增的；

发明 9：权利要求 1—3、5（都是部分技术方案）；

涉及一种 CST4 特异性引物对应的扩增子在制备诊断和预示肠癌标志物中的应用，其中该扩增子是通过上游引物 SEQ ID NO：14 和下游引物 SEQ ID NO：15 扩增的；

发明 10：权利要求 1—3、5（都是部分技术方案）；

涉及一种 CST4 特异性引物对应的扩增子在制备诊断和预示肠癌标志物中的应用，其中该扩增子是通过上游引物 SEQ ID NO：16 和下游引物 SEQ ID NO：17 扩增的；

发明 11：权利要求 1—3、5（都是部分技术方案）；

涉及一种 CST4 特异性引物对应的扩增子在制备诊断和预示肠癌标志物中的应用，其中该扩增子是通过上游引物 SEQ ID NO：18 和下游引物 SEQ ID NO：19 扩增的；

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2012/070149

发明 12: 权利要求 1-3、5 (都是部分技术方案);
涉及一种 CST4 特异性引物对应的扩增子在制备诊断和预示肠癌标志物中的应用, 其中该扩增子是通过上游引物 SEQ ID NO: 20 和下游引物 SEQ ID NO: 21 扩增的;

发明 13: 权利要求 1 (部分技术方案)、4、5 (部分技术方案);
涉及一种 CYSTATIN S 蛋白的表位肽在制备诊断和预示肠癌标志物中的应用, 其中所述 CYSTATIN S 蛋白的表位肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 50 所示;

发明 14: 权利要求 6、8、12-13、15、17-19 (都是部分技术方案);
涉及一种 CST4 基因或 CST4 基因的 mRNA 的捕获剂; 该捕获剂在制备肠癌检测试剂或试剂盒中的应用; 含有该捕获剂的诊断试剂盒; 使用该试剂盒的方法; 用该诊断试剂盒检测或预示肠癌的方法;

发明 15: 权利要求 6、8、12-13、15、17-19 (都是部分技术方案);
涉及一种 CST4 基因剪切子 cDNA 的捕获剂; 该捕获剂在制备肠癌检测试剂或试剂盒中的应用; 含有该捕获剂的诊断试剂盒; 使用该试剂盒的方法; 用该诊断试剂盒检测或预示肠癌的方法;

发明 16: 权利要求 6、12-13、15、17-19 (都是部分技术方案)、7;
涉及一种 CST4 特异性引物对应的扩增子的捕获剂; 该捕获剂在制备肠癌检测试剂或试剂盒中的应用; 含有该捕获剂的诊断试剂盒, 其中该扩增子是通过引物 SEQ ID NO: 1-2 扩增的; 使用该试剂盒的方法; 用该诊断试剂盒检测或预示肠癌的方法;

发明 17: 权利要求 6、12-13、15、17-19 (都是部分技术方案)、9;
涉及一种 CST4 特异性引物对应的扩增子的捕获剂; 该捕获剂在制备肠癌检测试剂或试剂盒中的应用; 含有该捕获剂的诊断试剂盒, 其中该扩增子的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示; 使用该试剂盒的方法; 用该诊断试剂盒检测或预示肠癌的方法;

发明 18: 权利要求 6、10、12-13、15、17-19 (都是部分技术方案);
涉及一种 CYSTATIN S 蛋白的捕获剂; 该捕获剂在制备肠癌检测试剂或试剂盒中的应用; 含有该捕获剂的诊断试剂盒; 使用该试剂盒的方法; 用该诊断试剂盒检测或预示肠癌的方法;

发明 19: 权利要求 6、10、12-13、15、17-19 (都是部分技术方案)、11;
涉及一种 CYSTATIN S 表位肽的捕获剂; 该捕获剂在制备肠癌检测试剂或试剂盒中的应用; 含有该捕获剂的诊断试剂盒, 其中所述 CYSTATIN S 蛋白的表位肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 50 所示; 使用该试剂盒的方法; 用该诊断试剂盒检测或预示肠癌的方法;

发明 20: 权利要求 14、16 (都是部分技术方案);
涉及一种诊断试剂盒, 其中包含上游引物为 SEQ ID NO: 1 和下游引物为 SEQ ID NO: 2 的引物对, 以及核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 的探针;

发明 21: 权利要求 14、16 (都是部分技术方案);
涉及一种诊断试剂盒, 其中包含上游引物为 SEQ ID NO: 1 和下游引物为 SEQ ID NO: 2 的引物对, 以及上游引物为 SEQ ID NO: 30 和下游引物为 SEQ ID NO: 31 的内参引物对;

发明 22: 权利要求 14、16 (都是部分技术方案);
涉及一种诊断试剂盒, 其中包含上游引物为 SEQ ID NO: 32 和下游引物为 SEQ ID NO: 2 的引物对, 以及核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 的探针;

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2012/070149

发明 23: 权利要求 14、16 (都是部分技术方案);

涉及一种诊断试剂盒, 其中包含核苷酸序列分别为 SEQ ID NO: 33-36 的 4 条探针;

发明 24: 权利要求 14、16 (都是部分技术方案);

涉及一种诊断试剂盒, 其中包含核苷酸序列为 SEQ ID NO: 37-40 的引物, 以及核苷酸序列如 SEQ ID NO: 41 的探针;

发明 25: 权利要求 20-21

涉及一种通过检测 CYSTATIN S 蛋白水平来诊断和预示肠癌的试剂盒;

对比文件(Genbank 登录号: NM_001899, 20.11 月 2011 (20.11.2011), “Homo sapiens cystatin S (CST4) mRNA”) 已经公开了 CST4 基因的 mRNA 序列、其所编码的 CYSTATIN S 蛋白的氨基酸序列、以及 CYSTATIN S 蛋白的结构, 因而发明 1-25 之间没有相同或相应的特定技术特征, 这些发明不能相互关联, 从而不能形成一个总的发明构思。因此, 不符合 PCT 实施细则 13.1、13.2 和 13.3 的规定。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/00 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	Z N A	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)		C 0 7 K 16/18		

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

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

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

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

F ターム (参考) 4B024 AA12 CA04 CA09 CA12 HA12 HA15
 4B063 QA01 QA19 QQ43 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02
 4H045 AA30 BA10 DA76 EA51

专利名称(译)	生物标志物用于结直肠癌的诊断和预测		
公开(公告)号	JP2015503921A	公开(公告)日	2015-02-05
申请号	JP2014550607	申请日	2012-01-09
[标]申请(专利权)人(译)	苏周微诊断生物医药有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	苏州微诊断生物医药有限公司		
[标]发明人	ワンタオ チューシャンユン チェンフェイ		
发明人	ワン タオ チュー シャンユン チェン フェイ		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/543 G01N33/53 G01N33/574 C12N15/09 C12N15/00 C07K16/18		
CPC分类号	C07K14/8139 G01N33/57419 C12Q1/6886 C07K16/38 C12Q2600/158 G01N2333/8139		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/543.545.A G01N33/53.U G01N33/574.A C12N15/00.A C12N15/00.ZNA C07K16/18		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA51		
代理人(译)	藤田和子		
其他公开文献	JP6192122B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在本发明中，我们鉴定了CST4基因，CST4 mRNA，CST4剪接cDNA，CST4特异性引物，CST4基因和CST4胱抑素S蛋白的相应扩增产物在结直肠癌的诊断和预测中，并且公开并证明了测试试剂盒的使用。本发明可用于结肠直肠癌进展的诊断，动态监测和进展。本发明中描述的方法的特征在于高灵敏度和可靠性，并通过质量合成证明。The 10

