

(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2017-525971

(P2017-525971A)

(43) 公表日 平成29年9月7日(2017.9.7)

(51) Int.Cl.		F I			テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 27/62</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 27/62		V	2 GO 4 1
<b>GO 1 N 33/49</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/49		A	2 GO 4 5
<b>GO 1 N 33/72</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/72		A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2017-511663 (P2017-511663)	(71) 出願人	516162870
(86) (22) 出願日	平成27年8月27日 (2015.8.27)		マップ アイピー ホールディング リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成29年4月25日 (2017.4.25)		英国, C B 6 3 F Q, イーリー, モーリー ドライブ 28
(86) 国際出願番号	PCT/GB2015/052491	(74) 代理人	110000671
(87) 国際公開番号	W02016/030688		八田国際特許業務法人
(87) 国際公開日	平成28年3月3日 (2016.3.3)	(72) 発明者	アイルズ, レイモンド クルーゼ
(31) 優先権主張番号	1415367.0		英国, シービー6 3エフピー, ケンブリッジシャー, イーリー, モーリー ドライブ 28
(32) 優先日	平成26年8月29日 (2014.8.29)	(72) 発明者	アイルズ, ジェイソン クルーゼ
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		英国, シービー6 3エフピー, ケンブリッジシャー, イーリー, モーリー ドライブ 28

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘモグロビンにおける異常を検出する方法

## (57) 【要約】

本方法は、MALDI-TOF質量分析法に供される、全血サンプル、ピンブリックおよび血液スポットカードの迅速なスクリーニングを特徴とする。スペクトルを生成し、健常な対照からのスペクトルと比較する。特徴的なスペクトルを異常ヘモグロビン症の存在の指標とし、本方法は、全ての鎌状赤血球病、アルファおよびベータサラセミアをスクリーニング/診断するために使用することができる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

患者から得られた血液サンプルを直接質量スペクトル解析にかけることを含む、異常ヘモグロビン症を検出する方法。

## 【請求項 2】

前記血液サンプルを直接質量スペクトル解析の前に溶解剤と混合する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記溶解剤がホルマリンを含む、請求項 2 に記載の方法

## 【請求項 4】

前記サンプルを直接質量スペクトル解析の前に希釈する、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記異常ヘモグロビン症が、鎌状赤血球性貧血、 $\alpha$ -サラセミア、 $\beta$ -サラセミア、Hb A G、Hb A / エンフィールド、Hb H、Hb A F、Hb S、Hb C、Hb E、Hb D - パンジャブ、Hb O - アラブ、Hb G - フィラデルフィア、Hb コンスタントスプリング、Hb ハシャロン、Hb コルレ - ブ、Hb レポール、Hb M、および Hb カンザスから選択される、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記直接質量スペクトル解析から得られたスペクトルを正規化する、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記直接質量スペクトル解析から得られたスペクトルを  $7,000 \sim 700,000 \text{ m/z}$  の範囲で分析する、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記サンプルの前記直接質量スペクトル解析から得られたパターンと健常な対照からの血液サンプルの直接質量スペクトル解析から得られた質量スペクトルパターンとを比較して、前記サンプルからの前記パターンが異常ヘモグロビン症を示すかどうかを決定することを含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記サンプルの前記直接質量スペクトル解析から得られたスペクトルを健常な対照からの採血サンプルの統計分析から決定された約  $6,000 \sim 300,000 \text{ m/z}$  の間の期待質量の参照スペクトルモデルと比較する、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記サンプルの前記直接質量スペクトル解析から得られたスペクトルを異常ヘモグロビン症の患者からの採血サンプルの統計分析から決定された約  $6,000 \sim 300,000 \text{ m/z}$  の間の期待質量の疾患モデルと比較する、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 11】

実施された前記質量スペクトル解析がマトリックス支援レーザー脱離 / イオン化分析法 (MALDI) である、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記 MALDI 分析法が飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF MS) である、請求項 11 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本方法は、以下：

1) 脱イオン蒸留水への溶解 (または凍結) および脱イオン蒸留水または  $0.1\% \text{ TFA}$  脱イオン蒸留水のいずれかでの  $1/10$  から  $1/8000$  の範囲での大量の希釈。結果と

10

20

30

40

50

して得られるスペクトルは、 $15000\text{ m/z}$  から  $16,200\text{ m/z}$  の質量/荷電範囲で単一荷電イオンとして、好ましくは  $7500$  から  $8200\text{ m/z}$  で二重荷電イオンとして分析される。

2) クエン酸塩緩衝ホルマリンでのインキュベーション、その後脱イオン蒸留水への溶解(または凍結)および脱イオン蒸留水または  $0.1\%$  TFA 脱イオン蒸留水のいずれかでの  $1/10$  から  $1/8000$  の範囲での大量の希釈。結果として得られるスペクトルは、 $15000\text{ m/z}$  から  $100,000\text{ m/z}$  の質量/荷電範囲で単一荷電イオンとして分析される。

の MALDI-TOF 質量分析法に供される、全血サンプル、ピンブリック (pin prick) および血液スポットカード (blood spot cards) の迅速なスクリーニングを特徴とする。

10

#### 【0002】

前記スペクトルは、好ましくはマトリクスとしてシナピン酸を用いて生成され、特徴的なスペクトルは、異常ヘモグロビンの存在の指標であり、すべての鎌状赤血球病、アルファおよびベータサラセミアをスクリーニング/診断できる。

#### 【背景技術】

#### 【0003】

異常ヘモグロビン症は、世界的に遺伝性のヒト単一遺伝子病の最も大きなグループであり、赤血球において酸素に結合する  $2 \times 2$  ヘテロ四量体コンプレックス、ヘモグロビンを形成するグロビントタンパク質をコードする 1 以上の遺伝子における変異によるものである。患者において結果として起こる構造変化 (Hb) は、軽症で、潜在的であるが、重篤な慢性の病的状態および新生児死亡の原因でありうる。

20

#### 【0004】

アラビア諸国では、異常ヘモグロビン症が最も一般的な遺伝病である；報告されたキャリア率は、 $1 \sim 11\%$  の  $\beta$ -サラセミア、 $1 \sim 58\%$  の  $\delta$ -サラセミアおよび  $0.3 \sim 30\%$  の鎌状赤血球形質である。

#### 【0005】

インドでは、最も一般的な異常ヘモグロビン症は、鎌状赤血球形質、Hb D および Hb E である。 $2000$  年において、 $10$  億の人口および  $1000$  人あたり  $25$  の出生率で、インドでは毎年異常ヘモグロビン症である約  $4500$  万人のキャリアおよび約  $15,000$  の新生児がいるであろうと推定された。

30

#### 【0006】

ヘモグロビン自体は、2つのベータ遺伝子グロビントタンパク質を伴う2つのアルファ遺伝子グロビントタンパク質産物を含むヘテロ四量体コンプレックスである。構成グロビントタンパク質の遺伝的特徴およびタンパク質生化学は、複雑である：ヒト  $\beta$ -グロビン遺伝子座は、第 11 染色体の小領域に位置する 5 つの遺伝子で構成され、ヘモグロビンのベータ部分の形成に関与している。この遺伝子は、ベータ ( ) グロビン遺伝子を発現するクラシックの遺伝子だけではなく、デルタ ( )、ガンマ-A (A )、ガンマ-G (G )、およびイブシロングロビン ( ) も含む。ヒト  $\beta$ -グロビン遺伝子クラスターは、第 16 染色体に見つかっており、グロビン発現遺伝子アルファ 1 (  $\alpha 1$  ) およびアルファ 2 (  $\alpha 2$  ) ならびにゼータ (  $\zeta$  ) (図 1 参照) を含むが、新たな  $\beta$ -グロビン遺伝子が最近同定され、Hb Mu (  $\mu$  ) と呼ばれる。ヒトの生命が初期の胎児から後期の妊娠、誕生および幼児/成人期へ移動するにつれて、ペアであるアルファおよびベータ遺伝子は、in utero および extra utero 生活の環境に適応するように変化する。

40

#### 【0007】

例えば、最初期の胚は、Hb 組み合わせ  $\alpha_2\beta_2$  (ガウアー)； $\alpha_2\gamma_2$  (ガウアー I) および  $\alpha_2\delta_2$  (ポートランド) を妊娠初期の間、卵黄嚢において形成された赤血球幹細胞 (red blood stem cell) により生成する。これは急速に  $\alpha_2\beta_2$  (Hb F) に取って代われ、妊娠中期および妊娠後期の間、胎児肝臓の赤血球幹細胞により生成される。誕生後これは、大部分  $\alpha_2\beta_2$  (Hb A)、少しの  $\alpha_2\gamma_2$  (Hb

50

A 2) および微量の H b F に変化する ( 図 1 参照 )。

#### 【 0 0 0 8 】

驚くことではないが、同定された様々な異常ヘモグロビン症は、単離されたグロビンタンパク質の特徴よりむしろヘテロ四量体ヘモグロビンコンプレックスの特徴として命名された。鎌状赤血球病において、ヘモグロビン H b S では、グロビン遺伝子がグロビンタンパク質の 6 位で特定のアミノ酸変化突然変異 6 G l u - V a l を有し、S と名付けられる；およびヘテロ四量体 H b が  $\alpha_2 S \beta_2$  である。赤血球での通常の  $\alpha_2 \beta_2$  のコンプレックスである鎌状赤血球形質は、ヘテロ接合性の結果としてヘモグロビン分子を構成し、多くの場合気づかれない。ヘモグロビン C ( H b C ) は、 $\alpha$ -グロビン鎖の 6 位でアミノ酸置換 ( 6 G l u - L y s ) により生じる通常ヘモグロビン ( H b A ) の構造変異体である。それは、同じ位置 ( H b S ; 6 G l u - V a l ) で起こる、ヘモグロビン S、およびヘモグロビン E ( H b E , 2 6 G l u - L y s ) と一緒に世界的に最も広がった異常ヘモグロビン変異の一つである。H b C ヘテロ接合体個体 ( A C ) において、この形質は、無症状である。同型接合性 ( C C ) は、結晶形成につながるであろう赤血球の溶解性低下によって軽症の溶血性貧血を引き起こす。H b C は、H b S との組み合わせで遺伝する場合、臨床的に重要である。サラセミアは、 $\alpha$ -グロビン遺伝子 (  $\alpha$ -サラセミア ) または  $\beta$ -グロビン遺伝子 (  $\beta$ -サラセミア ) のいずれかの発現を阻害する変異のために生じる。結果として、異常なヘテロおよびホモ四量体の H b の組み合わせが生じる。

10

#### 【 0 0 0 9 】

20

$\alpha$ -サラセミアにおいて、 $\alpha$ -グロビンの合成の減少 (  $\alpha^+$ -サラセミア ) または  $\alpha$ -グロビンの合成の欠如 (  $\alpha^0$ -サラセミア ) がある。 $\alpha$ -サラセミアの軽症形態は、中間型サラセミアと呼ばれる。遺伝子融合から生じる  $\alpha$ -サラセミアもあり、 $\alpha$ -鎖および  $\beta$ -鎖両方の生成が消失する。ベータ鎖よりも  $\alpha$ -グロビンでのグロビン鎖合成におけるアンバランスは、赤血球における  $\alpha$ -グロビンの沈降を引き起こし、骨髓または末梢血での細胞の早期破壊を引き起こす。過剰な  $\alpha$ -グロビンは、細胞に大きなダメージを与える；赤血球前駆体において細胞タンパク質、脂肪および核酸を破壊する活性酸素種 ( R O S ) を生成する。また、四量体  $\alpha_2 \beta_2$  ヘモグロビンは、酸化で変性する傾向により、構造的に不安定であり、R O S 生成をさらに増やす、沈降した  $\alpha$ -グロビン鎖、遊離ヘム、ポルフィリンおよび鉄で細胞質および細胞膜を満たす。赤血球系細胞は、過剰な遊離  $\alpha$ -グロビンを分解するためにタンパク質分解経路を有するが、これらの経路は、圧倒されるであろう。

30

#### 【 0 0 1 0 】

$\alpha$ -サラセミアでは、 $\alpha$ -グロビン遺伝子の発現が欠失している；しかし、ヒトは、4 つの遺伝子コピーを有するため ( 各親染色体に 2 つ、図 1 参照 )、より大きな耐性がある。しかし、このことは、その一方で大きなキャリア能力およびこれが起こった際の結果として限定された集団での  $\alpha$ -サラセミアのより高い発生率を意味する。したがって、この状況は、インドから中国、東南アジアを含む、アジアでたびたび発生し、また中東およびアフリカでも発生する。

#### 【 0 0 1 1 】

3 つの機能的なアルファ遺伝子 - 患者は、症状または兆候のないサイレントキャリアである (  $\alpha$ -サラセミア ミニマ  $\alpha$ - /  $\alpha$  )。

40

#### 【 0 0 1 2 】

2 つだけの機能的なアルファ遺伝子 - 患者は、サイレントキャリア、 $\alpha$ -サラセミアマイナーまたはサラセミア形質であるが、しばしば小赤血球症である。2 つの遺伝子は、同じ染色体 ( シス型 ) またはペアのそれぞれ ( トランス型 ) のいずれかに存在しうる。

$\alpha$ - /  $\alpha$ - (  $\alpha^0$  サラセミア ) または  $\alpha$ - /  $\alpha$ - (  $\alpha^+$  サラセミア )。シス型の  $\alpha^0$  サラセミア形質は、アジア系の個体で発見される傾向があり、一方トランス型の  $\alpha^+$  サラセミアは、アフリカ系の個体で伝わる傾向にある。母親が  $\alpha^0$  サラセミアのキャリアである場合、妊娠は、パート胎児水腫症候群のリスクがあり、一方  $\alpha^+$  サラセミアである母親の妊娠での最悪の結果は、もっと穏やかな状態、H b - H 病である。

50

## 【0013】

1つだけの機能的なアルファ遺伝子（ $\alpha$ - $\alpha$ ）。過剰な $\alpha$ -グロビンを生じさせ、過剰 $\alpha$ -グロビンが四量体を形成し、 $\alpha_4$ （HbH）として蓄積される。HbHは、安定ではなく、熱で変化しやすく、患者は、貧血となり、脾腫がある。

## 【0014】

機能的な遺伝子がないと、早期の胎児死亡を引き起こす：過剰の $\alpha$ -グロビン鎖は、4つのガンマ鎖： $\gamma_4$ （Hbパート）からなる四量体の蓄積の原因となる。 $\alpha$ -グロビン鎖なしでは、HbFまたは成人ヘモグロビン（HbA、HbA<sub>2</sub>）が存在し得ず、死産を伴う胎児水腫という結果になる。<sup>0</sup>サラセミアのキャリアの母親において妊娠中毒症および分娩後出血のリスクが増加する。

10

## 【0015】

ヘモグロビンコンスタントスプリング変異（Hemoglobin Constant Spring mutation）。サイレントキャリア状態の珍しいケースは、ヘモグロビンコンスタントスプリング変異を持っている個体である。これは、終止コドン突然変異による異常に伸長した $\alpha$ -グロビンである。この突然変異を有する個体は、正常な赤血球指数を示すが、もう一方の親が $\alpha$ -サラセミア形質を有する場合、HbH-コンスタントスプリング病を有する子供ができる。

## 【0016】

したがって、特定のグロビタンパク質/遺伝子の物理化学的特徴および分子遺伝学は、異常ヘモグロビン症の分子検査の基礎となる。

20

## 【0017】

分子量は、 $\alpha$ -グロビンが15,128であり、 $\beta$ -グロビンが15,868である：約740Daの差。したがって、Hbのホモ四量体コンプレックスおよびそれらのヘム（60,000から68,000Da）ならびに $\alpha_2\beta_2$ または $\alpha_2\gamma_2$ の誘導三量体（約47,500Da）および二量体（30,000から35,000Da）は、それぞれ2960、2200および1480Daで質量が変化する。これらの質量分解能は、MALDI-TOF質量分析の範囲内である。通常、MALDI-TOF質量分析のプロセスは、このようなヘモグロビンコンプレックスを遊離モノマーに解離させる。ホルマリン処理は、通常、隣接するアミド結合の自由水素とメチル架橋を形成するリジン残基側鎖を介して内部架橋を形成することによってタンパク質を「固定」する。しかし、ホルマリンは、タンパク質が当然互いに非常に接近しており、正しいアミノ酸側基が近くに整列する場合、タンパク質を架橋するであろう。これは、ヘモグロビンの四量体コンプレックスの場合である。したがって、クエン酸緩衝ホルマリン生理食塩水（citrate buffered formal saline）のような、ホルマリン溶液での全血の前処理は、もはや解離されず、四、三および二量体コンプレックスの特徴的なm/zとしてMALDI-TOF MSにより決定されるようにHbコンプレックスを「固定」するであろう。したがって、特定のサラセミアの質量パターン特性は、その結果、マップ化でき、本明細書で記載するようにサラセミアの診断/スクリーニングツールとして使用できる。

30

## 【0018】

本出願は、患者から得られた血液サンプルを直接質量スペクトル解析にかけることを含む異常ヘモグロビン症を検出する方法を提供する。

40

## 【0019】

「直接質量スペクトル解析」とは、質量スペクトル解析から生成されたデータが前記方法で用いられること、およびサンプルに存在する成分の推定質量ではないことを意味する。本明細書において、異常ヘモグロビン症とは、ヘモグロビン分子におけるグロビン分子の一つの異常発現または構造をもたらす遺伝子突然変異により生じたいかなる状態をいう。異常ヘモグロビン症の例は、特に制限されないが、鎌状赤血球性貧血、 $\alpha$ -サラセミア、 $\beta$ -サラセミア、HbAG、HbA/エンフィールド、HbH、HbAF、HbS、HbC、HbE、HbD-パンジャブ、HbO-アラブ、HbG-フィラデルフィア、Hbコンスタントスプリング、Hbハシャロン、Hbコルレ-ブ、Hbレポール、H

50

b M、および H b カンザスを含む。好ましい異常ヘモグロビン症は、鎌状赤血球性貧血、 $\alpha$ -サラセミア、 $\beta$ -サラセミア、H b C、H b E、H b A G、H b A /エンフィールド、H b H、および H b A Fである。

【0020】

血液サンプルは、従来の瀉血法を用いて収集された全血サンプルでありうる。例えば、前記サンプルは、静脈穿刺によりまたはフィンガースティックもしくはヒールプリックなどのピンプリックサンプルとして得ることができる。血液サンプルは、ろ紙上またはその他の適切なブラッドスポット捕捉材料に留めた乾燥したブラッドスポットであってもよい。

【0021】

血液サンプルは、被処理サンプルでありうる。または、血液サンプルは、希釈または処理（濃縮、ろ過など）されてもよい。

【0022】

血液サンプルは、好ましくは赤血球を溶解する溶解剤、または溶解の前に24時間までにクエン酸ホルマリン (citrated formalin) のような架橋剤のいずれかと最初に混合される。その他の適切な溶解剤は、当業者に知られている。溶解剤は、例えば1/1（すなわち1部の溶解剤に対して1部の血液）、1/5、1/10もしくは1/20またはそれ以上の適切な濃度でサンプルと混合することができる。血液サンプルが乾燥したブラッドスポットである場合、サンプルを乾燥したブラッドサンプル捕捉材料は、サンプルを再構成するために溶解剤またはクエン酸ホルマリンのいずれかの中に置くことができる。または、ブラッドスポットは、ホルマリン固定の前に適切なバッファー中で再構成して、その後溶解または直接溶解することができる。適切なバッファーおよびその他のタンパク質架橋剤は、当業者に知られている。好ましい溶解剤は、脱イオン蒸留水である。または、サンプルは、細胞を溶解するために凍結することができる。

【0023】

好ましい架橋剤は、クエン酸緩衝ホルマリン生理食塩水である。サンプルは、好ましくは1/5の濃度（すなわち、5部のクエン酸ホルマリン生理食塩水に対して1部の血液）でホルマリン含有剤と混合される。サンプルは、赤血球のグロビン分子が固定されるように適切な期間反応させることができる。例えば、混合は、4、5、6、7、8、10、12、16、20、24時間以上そのままにすることができる。サンプルは、好ましくは最低6時間そのままにされる。

【0024】

好ましくは、血液サンプルは、好ましくは溶解後、希釈される。希釈工程は、H b が最も豊富なタンパク質であるように質量スペクトル解析のために血液の他の成分からH b を効果的に精製する。血液サンプルは、1/10（すなわち、10部の希釈剤中に1部のサンプル）、1/166、1/333、1/500、1/1000、1/2000、1/2500、1/8000またはそれ以上希釈されてもよい。最も好ましくは、サンプルは、1/2000希釈され、すなわち2000部の希釈剤中に1部の血液サンプルである。好ましくは、希釈剤は、0.1%トリフルオロ酢酸を含む脱イオン蒸留水、または脱イオン蒸留水である。

【0025】

好ましくは、血液サンプルは、固定、溶解および希釈の相互間で処理されない。言い換えると、血液サンプルは、溶解および希釈されるのみ；または固定、溶解および希釈されるのみである。かかる処理は、興味のあるタンパク質、例えばH b を濃縮すること；例えばHPLCによりH b を単離することもしくは分子内結合を引き裂くまたは破壊するために化学薬品で処理することを含む。特に、サンプルは、好ましくは還元剤で処理されない。より好ましくは、サンプルは、ジチオスレイトール (DTT) で処理されない。

【0026】

好ましくは、本方法は、サンプルの前記直接質量スペクトル解析によるスペクトルパターンと健常な対照からの血液サンプルの直接質量スペクトル解析から得られた質量スペク

10

20

30

40

50

トルパターンとを比較して前記サンプルからの前記パターンが異常ヘモグロビン症を示すかどうかを決定することを含むことができる。本明細書中、「健常な対照」とは、異常ヘモグロビン症ではない患者である。

【0027】

好ましくは、質量スペクトルのパターンにおける違いは、健常な対照からの血液サンプルの質量スペクトルと異常ヘモグロビン症である患者からの血液サンプルの質量スペクトルパターンとを区別できる自動化された定量的な方法により決定される。

【0028】

本明細書中、「自動化された定量的な方法」とは、サンプルがコンピュータソフトウェアプログラムにより処理された質量分析計からの直接出力データの処理をいう。

10

【0029】

MALDI-TOF MSなどの質量スペクトルを生成する方法は、通常、定量的な技術ではない。例えば、これらのスペクトルのY軸は、スペクトル内の質量ピークの「相対強度」の指標であるが、一つのサンプルともう一つのサンプルとの質量ピーク間のものではない。これを克服するために、正規化は、Y軸の値をサンプルスペクトル間で比較可能にする必要がある。したがって、直接質量スペクトル解析から得られたスペクトルは、好ましくは正規化される。スペクトルは、データ処理をされ、質量スペクトルの相対的比率の正規化された統計的に決定された指標 (normalised statistically determined index) となる。これは、定性的な質量スペクトルを定量的な値に変換する。正規化は、データの繰り返しおよび不一致を減少するためのデータ構造を生成する処理である。いくつかの正規化技術が可能である。典型的な正規化方法は、与点での総面積のパーセンテージ、二乗差および差の比を含む。パーセンテージ差は、以下のように計算される。

20

【0030】

【数1】

パーセンテージ差 =  $(Y1 - Y_{ref} / Y_{ref} \times 100\%)$

【0031】

この際、 $Y_{ref}$  は、スペクトルの最小のY値であり、Y1は、各点のY値である。

【0032】

二乗差は、以下のように計算される。

30

【0033】

【数2】

二乗差 =  $(Y1 - Y_{ref})^2$

【0034】

比の差は、以下のように計算される。

【0035】

【数3】

比の差 =  $(比1 - 比2)$

【0036】

したがって、質量スペクトルからのデータは、スペクトルに示される定性的変化の定量的尺度を提供するために操作される。

40

【0037】

好ましくは、スペクトルモデルは、データ処理の方法により作製され、設定された範囲内の質量スペクトルの相対的割合の正規化された統計的に決定された指標となる。このことは、任意の与えられた質量値での中央値および百分率の変動がモデル化されうるように、全てのスペクトルを比較可能にする。好ましくは、前記範囲は、約6,000~700,000 m/zの間である。

【0038】

一価の形態のグロビンのために、分析された範囲は、6,000~17000 m/zであり、より好ましくは7,500~16,200 m/zである。赤血球グロビンの単一荷

50

電および／または二重荷電分子を測定できる。単一荷電イオンのために、 $15000\text{ m/z}$  から  $16200\text{ m/z}$  の質量／荷電範囲でのスペクトルを分析する。二重荷電イオンのために、 $5000\text{ m/z} \sim 8200\text{ m/z}$ 、好ましくは  $6000$  から  $8100\text{ m/z}$ 、より好ましくは  $7500\text{ m/z}$  から  $8200\text{ m/z}$  または  $7550\text{ m/z}$  から  $8100\text{ m/z}$  の質量／荷電範囲でのスペクトルを分析する。下記表は、二重荷電イオンに対応する様々なグロビンに対応するピークの位置を示す。

【0039】

【表1】

グロビン鎖	$[M=2H]^{2+}$ の $M/Z$ 公表された配列および既知の翻訳後開裂に基づく
A	7564 $m/z$
$\mu$	7743 $m/z$
$\xi$	7753 $m/z$
$\theta$	7754 $m/z$
B	7934 $m/z$
$\Delta$	7963 $m/z$
$^G\gamma$	7999 $m/z$
$^A\gamma$	8005 $m/z$
$\epsilon$	8102 $m/z$

10

20

【0040】

グロビンの多価の形態のために、分析された範囲は、 $30,000 \sim 700,000\text{ m/z}$  である。

【0041】

所与の範囲での質量スペクトルの相対的割合の正規化された統計的に決定された指標は、質量スペクトルの曲線下の総面積を用いて計算できる。その結果、これを相対強度を計算するために使用できる。

【0042】

質量スペクトルの曲線下の面積は、質量スペクトルを  $m/z$  の所与の値の多くの瓶に分割することにより計算される。本明細書中、「瓶」は、通常の統計的意味を有し、例えば統計分析においてデータがソートされた一連の数値範囲の一つである。例えば、瓶は、 $100\text{ m/z}$ 、 $50\text{ m/z}$ 、 $25\text{ m/z}$ 、 $10\text{ m/z}$  または  $5\text{ m/z}$  のサイズでありうる。使用される瓶のサイズが小さいほど、方法がより洗練される。

30

【0043】

相対強度（Y軸値）は、「二乗差（square of difference）」法により計算することができ、よって比較可能なY値が全ての瓶に与えられる。この方法において、スペクトルの最小のY値（Yref）をすべての瓶でのY値から減算して、差を二乗した。二乗差を計算するのに使用される式  $= (y_1 - y_{ref})^2$  および計算された二乗差を「相対強度」と名付けた。

40

【0044】

サンプルにおける各質量瓶での相対強度は、MATLAB（登録商標）、Stats Direct（登録商標）およびOrigin 8（登録商標）などの市販の統計的検定を用いて捕捉できる。

【0045】

スペクトルがデータ処理の方法を経て質量スペクトルの相対的比率の正規化された統計的に決定された指標になると、存在するグロビンのレベルは、様々なグロビンに対応するピークの相対的な高さを測定することによって決定できる。好ましくは、範囲は約  $6,000 \sim 700,000\text{ m/z}$  の間である。一価の形態のグロビンのために、分析された範囲は、 $5,000 \sim 8,200\text{ m/z}$  であり、好ましくは  $6,000 \sim 17000\text{ m/z}$

50



であり、より好ましくは7, 500 ~ 16, 200 m/zである。二重荷電イオンのために、5, 000 ~ 8, 200 m/zまたは6000から8100 m/z、より好ましくは7550から8100 m/zまたは7, 550から8, 200 m/zの質量/荷電範囲でのスペクトルを分析する。

#### 【0046】

好ましくは、サンプルの直接質量スペクトル解析から得られたスペクトルは、健常な対照からの血液サンプルのコレクションの統計分析から決定された約6, 000 ~ 700, 000 m/zまたは6, 000 ~ 100, 000 m/zの間で期待質量の標準スペクトルモデルと比較される。「標準スペクトルモデル (reference spectral model)」は、健常な対照からの血液サンプルの回収物の統計分析から決定された設定範囲内での期待質量である。好ましくは、範囲は、約6, 000 ~ 700, 000 m/zの間である。一価の形態のグロビンのために、分析される範囲は、6, 000 ~ 17000 m/zであり、好ましくは7, 500 ~ 16, 200 m/zであり、より好ましくは5, 000 ~ 8, 200 m/zである。二重荷電イオンのために、5, 000 ~ 8, 200 m/zまたは6000から8100 m/z、より好ましくは7550から8100 m/zまたは7, 550から8, 200 m/zの質量/荷電範囲でのスペクトルを分析する。好ましくは、約5, 000 ~ 8, 200 m/zまたは6, 000 ~ 8, 100 m/zの間での期待質量のスペクトルモデルを健常な対照からの血液サンプルの収集物の統計分析から決定する。

10

#### 【0047】

好ましくは、スペクトルモデルは、データ処理の方法により作製され、設定範囲内での質量スペクトルの相対的比率の正規化された統計的に決定された指標となる。このことは、任意の与えられた質量値での中央値および百分率の変動がモデル化されうるように、全てのスペクトルを比較可能にする。好ましくは、前記範囲は、約6, 000 ~ 700, 000 m/zの間である。より好ましくは、前記範囲は、5, 000 ~ 8, 200 m/zまたは6000から8100 m/zであり、より好ましくは7550から8100 m/zまたは7, 550から8, 200 m/zである。

20

#### 【0048】

好ましくは、サンプルの直接質量スペクトル解析から得られたスペクトルは、異常ヘモグロビン症である患者からの血液サンプル収集物の統計分析から決定された約6, 000 ~ 300, 000 m/zの間での期待質量の疾患のモデルと比較される。パラレルの「疾患」モデルは、設定範囲内での質量スペクトルの相対的比率の正規化された統計的に決定された指標から作り出され、異常ヘモグロビン症を有すると分かっている患者から得られた血液サンプルから作製される。好ましくは、前記範囲は、約6, 000 ~ 700, 000 m/zの間である。より好ましくは、前記範囲は、5, 000 ~ 8, 200 m/zまたは6000から8100 m/zであり、より好ましくは7550から8100 m/zまたは7, 550から8, 200 m/zである。

30

#### 【0049】

正規化技術の適用後、健常な対照から得られたサンプルおよび異常ヘモグロビン症を患う患者からのサンプルのスペクトル値を比較する。異常ヘモグロビン症の存在は、グロビンタンパク質内での突然変異によって引き起こされた質量のシフトにより、正規化されたスペクトルのピークのパターンにおける変化を引き起こす。

40

#### 【0050】

鎌状赤血球症の患者は、7934 m/zの - グロビンおよび約7933 m/zのCからはっきりと分解された7920 m/zにS のピークを有する。したがって、7920 m/zのS のピークの存在は、鎌状赤血球症の指標である。

#### 【0051】

遺伝性高胎児ヘモグロビン症 (Hereditary Persistent fetal hemoglobin) 血液サンプル、Hb A Fを有する患者において、7934 m/zの - グロビンの強度は、著しく減少し、A に対応する8005 m/zのピーク

50

は、著しく上昇した。7965および7996 m/zでの およびG グロビンのベースラインの上昇もまた見ることができる。したがって、A に対応する8005 m/zのピークの存在は、Hb A Fの指標である。

【0052】

Hb A Gにおいて、68 A s n - L y sでの突然変異がある。これは、胎児のアルファ - グロビン および新たに発見された $\mu$ を示すであろう7612および7645 m/zでの追加のピークを生じる。7993 m/zでのG の上昇もまたありうる。したがって、7993 m/zでのG の上昇を伴ってもよい、7612および7645 m/zでのピークの存在は、Hb A Gの指標でありうる。

【0053】

Hb A /エンフィールドは、89 H i s - G l uの突然変異である。この状態の患者は、胎児のアルファ - グロビン および新たに発見された $\mu$  - グロビンを示すであろう7612および7645 m/zでの追加のピークを有する。7963 m/zでの および7993 m/zでのG の上昇もまたありうる。したがって、7963 m/zでの および7993 m/zでのG の上昇を伴ってもよい、7612および7645 m/zでのピークの存在は、Hb A /エンフィールドの指標でありうる。

【0054】

特に、健常な対照から得られたサンプルの正規化されたスペクトル値と異常ヘモグロビン症を患う患者からのスペクトル値との比率を比較することができ、様々な測定、例えば平均、標準偏差、歪度、上位および下位の四分位数、中央値、尖度、ならびに95および5パーセンタイル値を算出できるように、統計分析を行うことができる。

【0055】

健常な対照から得られたサンプルと異常ヘモグロビン症を患う患者からのサンプルとの間の各質量瓶での相対強度の差は、M A T L A B (登録商標)、S t a t s D i r e c t (登録商標)およびO r i g i n 8 (登録商標)などの市販の統計的検定を用いて捕捉できる。

【0056】

参照スペクトルモデルおよび疾患モデルは、その後「ホットスポット」、すなわち2つのモデルの相違点を確認するためにプロットすることにより比較される。これは、ピークのサイズにおける減少もしくは増加、またはピークの出現でありうる。そして相違点は、異常ヘモグロビン症の存在を決定するために用いることができる。好ましくは、これは、適切なアルゴリズムを用いて行われる。

【0057】

質量スペクトルの解析は、適切なコンピュータプログラムソフトウェアを用いて簡単に算出できる。コンピュータはまた、異常ヘモグロビン症の存在の指標を提供するために、適切なアルゴリズムでプログラムすることができる。

【0058】

好ましくは、実行される質量スペクトル解析は、マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (M A L D I - T o F M S) である。

【0059】

架橋剤が使用される場合、二量体と比較して、存在する四量体、五量体および三量体の相対的割合量 (r e l a t i v e p e r c e n t a g e a b u n d a n c e) は、異常ヘモグロビン症の存在を診断するために利用することができる。存在する四量体の二つの形態 - グロビタンパク質のみを含むS - 四量体およびグロビンとヘムとを含むL - 四量体がある。固定された二量体と比較して固定されたS - 四量体の平均相対量が 10、好ましくは 15および/または固定された二量体と比較して固定されたL - 四量体の平均相対量が 6、好ましくは 10であることは、異常ヘモグロビン症の存在の指標である。この結果が得られた時点で、患者は、存在する特定の異常ヘモグロビン症を特定するためにさらなる調査を受けることができる。

【0060】

10

20

30

40

50

また、

- a) 患者から血液サンプルを得ること
  - b) 前記サンプルの希釈および溶解；または固定、希釈および溶解
  - c) 前記サンプルを直接質量スペクトル解析にかけること
  - d) 患者からの前記サンプルからのパターンが異常ヘモグロビン症の指標であるかどうかを決定するために前記分析によるパターンを分析すること
- を含む、異常ヘモグロビン症を検出する方法を示す。

【0061】

好ましくは、分析によるスペクトルパターンは、健常な対照からの血液サンプルから得られた質量スペクトルパターンと比較される。

【0062】

本明細書中、動詞「含む」は、通常の辞書の意味であり、非排他的な包含を意味する。すなわち、1以上の特徴を含むための「含む」（または派生語のいずれか）の使用は、さらなる特徴をも含むことの可能性を排除しない。「望ましい」（または派生語のいずれか）は、好ましいが必須ではない1つ以上の特徴を示す。

【0063】

本明細書（添付しているあらゆる請求項、要約および図面）で開示された特徴のすべてまたは特徴のいずれか、および／または開示されたあらゆる方法またはプロセスの工程のすべてまたはいずれかは、少なくとも特徴および／または工程のいくつかが互いに排反する組み合わせを除き、任意の組み合わせで組み合わせることができる。

【0064】

本明細書（添付しているあらゆる請求項、要約および図面）で開示された各特徴は、特に明記しない限り、同じ、同等または同様の目的を果たす別の特徴により、置換することができる。したがって、特に明記しない限り、開示された各特徴は、同等または同様の特徴の一般的な系の単なる一例である。

【0065】

本発明は、前述の実施形態の詳細に限定されない。本発明は、本明細書（添付しているあらゆる請求項、要約および図面）で開示された特徴からなる、いかなる新規の発明、またはいかなる新規の組み合わせ、またはそのように開示されたいかなる方法またはプロセスからなる、いかなる新規の発明、またはいかなる新規の組み合わせにまで及ぶ。

【0066】

本願は、以下の図面を参照する下記実施例で説明される。

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1】図1は、ヒトにみられる機能的に発現したベータおよびアルファ - グロビン遺伝子（遺伝子クラスター内での公知の偽遺伝子を省略した）簡略化された図表示を示す。

【図2】図2は、Hb A 全血のスペクトルを示す。

【図3】図3は、Hb A S のスペクトルを示す。

【図4】図4は、Hb A C のスペクトルを示す。

【図5】図5は、Hb A C のスペクトルを示す。

【図6】図6は、Hb A E のスペクトルを示す。

【図7】図7は、Hb F のスペクトルを示す。

【図8】図8は、Hb H のスペクトルを示す。

【図9】図9は、Hb A G のスペクトルを示す。

【図10】図10は、Hb A / ケニヤのスペクトルを示す。

【図11A】図11Aは、表現型正常サンプルでのスペクトルの表形式の比較を示す。

【図11B】図11Bは、表現型異常サンプルでのスペクトルの表形式の比較を示す。

【図12】図12は、ホルマリン固定精製Hb A およびホルマリン固定全血Hb A の30,000から700,000 m/z の間での質量スペクトルパターンを示す。

【図13】図13は、ホルマリン固定鎌状赤血球病（SSD）血液サンプルのスペクトル

10

20

30

40

50

を示す。

【図 1 4】図 1 4 は、表現型正常および異常サンプルでのホルマリン固定スペクトルの表形式の比較を示す。

【実施例】

【0068】

実施例 1

方法

サンプル処理

全血の最適希釈は、 $ddH_2O$  (1 : 1 v / v) でのサンプルの最初の溶解後、 $ddH_2O$  または 0 . 1 % TFA  $ddH_2O$  のいずれかにおける 1 / 1000 および 1 / 2000 の間である。この希釈工程は、Hb が最も豊富なタンパク質であるように、質量スペクトル解析のために血液の他の成分から Hb を効果的に精製する。また、 $ddH_2O$  (または 0 . 1 % TFA /  $ddH_2O$ ) での希釈は、MALDI - TOF 質量分析による分離分析のために構成グロビンタンパク質を解離する。1 / 8000 よりも高い希釈では、質量スペクトルシグナルが次第に弱くなる。

10

【0069】

MALDI TOF 質量スペクトル解析

最適なマトリックスは、シナピン酸 (SA)、フェルラ酸 (FA) およびアルファ 4 - シアノヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) である。好ましいマトリックスである、シナピン酸は、1 / 1000 から 1 / 8000 希釈サンプル (最適 1 / 2000) の混合液滴へのプレコーティング層として混合または使用される。銅 MALDI プレート (384 ウェル) は、0 . 5  $\mu$ l のマトリックス溶液 (50 / 50 v / v アセトニトリル (ACN) /  $ddH_2O$  および 0 . 1 % トリフルオロ酢酸 (TFA) に溶解したシナピン酸 - 20 mg / ml) をピペッティングすることにより調製し、乾燥させた。0 . 5  $\mu$ l のサンプルを SA と混合し、乾燥マトリックス上にスポットした。これを MALDI TOF MS 分析の前に室温で 1 時間乾燥させた。

20

【0070】

質量スペクトル解析は、島津 Axima plus MALDI 質量分析計を用いて行われた；パルス窒素レーザー ( $m_{ax} = 337$  nm) を 75 から 80 % の任意の単位パワーで発射した。イオンは、1 . 2 m 線形管の下の 20 kV の電場により加速され、500 MHz のサンプリングレートでマイクロチャンネルプレート検出器により検出された。スペクトルは 20 ~ 30 回のレーザーショットを積算することにより生成された。ディレイドエクストラクションでの正の線形モードは、スペクトルを得るために使用された。

30

【0071】

装置は、内部でキャリブレーションされ、それにより 1 / 1000 希釈の血液サンプルを 10 pモル /  $\mu$ l シトクロム C (1 : 2、v / v) でスパイクした。生成された 2 つのポイントのキャリブレーションは、 $[M + H]^+ = 12361$  m / z および  $[M + 2H]^{2+} = 6181$  m / z であった。

【0072】

6 , 000 から 17 , 000 m / z の間の質量スペクトル領域を収集して分析し、特に 6000 から 8100 m / z または 6000 から 8200 m / z の範囲を二重荷電グロビンタンパク質のために分析した。

40

【0073】

分析されたスペクトルレンジにおいて、比較の正規化ピーク高さまたは正規化ピーク面積のいずれかとして、重心質量割当 (centroid mass assignment) および相対ピーク強度の両方に関して特徴づけられる。

【0074】

結果

グロビンの同定

最良の分解能は、 $[M + 2H]^{2+}$  イオンに対応する 6000 ~ 8200 m / z の範囲

50

で得られた。

【 0 0 7 5 】

【 表 2 】

グロビン鎖へのピーク割当	[M=2H] <sup>2+</sup> のM/Z
A	7564 m/z, ± 5m/z
α-グロビンのアセチル およびカルボニル付加物	7594 m/z, ± 5m/z
糖化された α	7645 m/z, ± 5m/z
α-グロビンのマトリックス(SA)付加物	7671 m/z, ± 5m/z
<sup>s</sup> β	7921 m/z
B	7936 m/z, ± 5m/z
Δ	7965 m/z, ± 5m/z
G γ	7996 m/z, ± 5m/z
A γ	8005 m/z, ± 5m/z
糖化された β	8017 m/z, ± 5m/z
β-グロビンのマトリックス(SA)付加物	8039 m/z ± 5m/z
マーカー 8088m/z ε-グロビンと思われる	8088 m/z ± 5m/z

10

【 0 0 7 6 】

20

病理学的サンプルスペクトルパターン

異常ヘモグロビン症が存在するすべてのサンプルにおける一般的な知見として、突然変異のまたは胎児のグロビン遺伝子のいずれかに対応するピークが見られる。これは、発症していない血液サンプルの場合にはなかった。

【 0 0 7 7 】

通常成人Hbサンプルは、Hb A2およびHb F ( 、 G および A )で見られる他のグロビンと - グロビンおよび グロビンのピークがほとんど検出されなかったことを明らかにする ( 図 2 )。

【 0 0 7 8 】

Hb S - 鎌状赤血球病 ( 図 3 および 4 )

30

鎌状赤血球形質 ( Hb A S ) を有する患者からの血液サンプルは、通常およびSA付加 - グロビンのピークならびに7934 m/zでの - グロビンおよび約7933 m/zでのC から明確に分解された7920 m/zでのS のピークを明らかにした。7965および7996 m/zでの およびG グロビンのベースライン上昇は、8023 m/zでの新たなピークと同様に、明らかであった。

【 0 0 7 9 】

Hb A C ( 図 5 )

Hb C 形質を有する患者からの血液サンプルは、通常およびSA付加 - グロビンピークを示した。7965および7996 m/zでの およびG グロビンのベースライン上昇は、明らかであったが、7934 m/zでの - グロビンは、約7933 m/zでのC から分解されなかった。

40

【 0 0 8 0 】

Hb A E ( 図 6 )

Hb E 形質を有する患者からの血液サンプルは、単独の通常およびSA付加 - グロビンピークを示した。7965および7996 m/zでの およびG グロビンのベースライン上昇は、明らかであったが、7934 m/zでの - グロビンは、約7933 m/zでの<sup>E</sup>から分解されなかった。

【 0 0 8 1 】

Hb A F ( 図 7 )

遺伝性高胎児ヘモグロビン症血液サンプル、Hb A F は、単独の通常およびSA付加

50

- グロビンピークを示した。7934 m/zでの - グロビンの強度は、著しく減少し、8005 m/zでのA は、著しく上昇した。7965および7996 m/zでの およびG グロビンのベースライン上昇も見られた。

#### 【0082】

HbH病 ( - / - ) - サラセミア (図8)

HbHからの血液サンプルは、ピークが7564および7667 m/zでの単独の通常およびSA付加グロビンピークを示したことを明らかにした。 - グロビンは、7934 m/zで明らかであり、7965および7996 m/zでの およびG グロビンのベースライン上昇は、明らかであった。

#### 【0083】

発現した - および グロビン突然変異 (図9および10)

HbAGは、68Asn - Lysでの グロビンにおける突然変異により引き起こされる。 - グロビンは、7564 m/z、SA付加 は、7667 m/zで見られるが、7612 (不明) および7645 m/z (糖化された - グロビン)での追加のピークが見られた。7933 m/zでの グロビンは、7993 m/zでのG の上昇を伴った。HbA/ケニヤ表現型は、同様に示されたG および の融合である。 グロビンは、7564 m/zであり、SA付加 は、7667 m/zであるが、7963 m/zでの のピークと一致する、7961 m/zでの追加のピークが、おそらく融合 グロビンを示す。7933 m/zでの グロビンは、7993 m/zでのG の上昇を伴った。

#### 【0084】

表現型の正常および異常サンプルの比較 (図11)

さらに9つの表現型の通常な血液サンプルと9つの表現型の異常な血液サンプル (ホモ接合体HBS鎌状赤血球症、ヘテロ接合体HBC鎌状赤血球症、2つの表現型のアルファサラセミア形質、ベータ - サラセミアおよびベータ - サラセミア形質、ならびにHbE病)とが分析された。

#### 【0085】

全てのヘモグロビン異常症およびキャリアの特徴は、発症していない個体と比較して、 - グロビン、 - (GおよびA)グロビンならびにマーカー8088 m/z ( - グロビンと思われる)の上昇した割合である。加えて、 - グロビンの - グロビンに対する比は、発症していないものである表現型通常血液サンプル (表3参照)と比較して発症およびキャリアにおいてより低い。これは、実証したように、 および胎児グロビンをさらに発現するためにベータ - グロビン遺伝子クラスターから生じる転写における変化をおそらく反映している。

#### 【0086】

典型的な<sup>S</sup> <sup>S</sup> ホモ接合体は、一般的なベータ - グロビンピークにおける7921 m/zへの質量シフトにより検出でき、一方<sup>S</sup> <sup>C</sup> 鎌状赤血球症は、7921 m/zピークの顕著な低下を示すが、鎌状キャリアと同じく ( <sup>C</sup> )グロビンの7936 m/zでの一般的なピークを示す。しかし、<sup>S</sup> <sup>C</sup> 鎌状赤血球症は、上昇した および - グロビンならびにマーカー質量 (すなわち、 - グロビンと思われる8088 m/z)を有する。

#### 【0087】

表現型ベータ - サラセミアおよびベータ - サラセミア形質両方のサンプルは、8088 m/z ( - グロビンと思われる)での上昇した異常なピーク、わずかに上昇した - グロビンおよび減少した / グロビン比率により特徴づけられた。このパターンは、HbE病と類似していたが、 - グロビンのより著しい上昇が見られた。

#### 【0088】

アルファサラセミア形質の表現型サンプルの両方は、8088 m/z ( - グロビンと思われる)での上昇した異常なピーク、上昇した 及び グロビンを明らかにした。

#### 【0089】

実施例2 - ホルマリン固定サンプル

10

20

30

40

50

## 方法

## サンプル処理

全血サンプルを1部から5部、クエン酸緩衝ホルマリン生理食塩水で最低6時間混合する。その後これを $\text{ddH}_2\text{O}$ または0.1% $\text{TFA}$   $\text{ddH}_2\text{O}$ のいずれかに1/166および1/333の間で希釈する。この希釈工程は、Hbが最も豊富なタンパク質であるように質量スペクトル解析のために血液の他の成分からHbを効果的に精製する。

【0090】

1/8000よりも高い希釈では、質量スペクトルシグナルが次第に弱くなる。

【0091】

MALDI TOF 質量スペクトル解析

最適なマトリックスは、シナピン酸(SA)、フェルラ酸(FA)およびアルファ4-シアノヒドロキシケイ皮酸(CHCA)である。好ましいマトリックスである、シナピン酸は、1/1000から1/8000希釈サンプル(最適1/2000)の混合液滴へのプレコーティング層として混合または使用される。鋼MALDIプレート(384ウェル)は、0.5  $\mu\text{l}$ のマトリックス溶液(50/50 v/v アセトニトリル(ACN)/ $\text{ddH}_2\text{O}$ および0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)に溶解したシナピン酸-20 mg/ml)をピペッティングすることにより調製し、乾燥させた。0.5  $\mu\text{l}$ のサンプルをSAと混合し、乾燥マトリックス上にスポットした。これをMALDI TOF MS分析の前に室温で1時間乾燥させた。質量スペクトル解析は、島津Axima plus

MALDI 質量分析計を用いて行われた; パルス窒素レーザー( $m_{\text{ax}} = 337 \text{ nm}$ )を75から80%の任意の単位パワーで発射した。イオンは、1.2 m線形管の下の20 kVの電場により加速され、500 MHzのサンプリングレートでマイクロチャンネルプレート検出器により検出された。スペクトルは20~30回のレーザーショットを積算することにより生成された。ディレイドエクストラクションでの正の線形モードは、スペクトルを得るために使用された。

【0092】

30,000から70,000  $m/z$ の間の質量スペクトル領域を収集して分析した。

【0093】

分析されたスペクトルレンジにおいて、比較の正規化ピーク高さまたは正規化ピーク面積のいずれかとして、重心質量割当(centroid mass assignment)および相対ピーク強度の両方に関して特徴づけられる。

【0094】

サンプルスペクトルパターン

一般的な成果として、分離された単量体のグロビン、二量体、三量体および四量体ならびに五量体などの複合体に対応するピークがある。個々のピークまたは合成の二量体、三量体、四量体およびより大きい複合体に対応する幅広いピークの質量分布は、様々なグロビンペア(globin pairing)の相対質量代表物、すなわち二量体、  
、  
、  
、  
A、  
Gなどに対応する。同様に、幅広いピークでの大きな複合体質量分布は、個々のグロビンの三量体、四量体、五量体およびその他の複合体の組み合わせの相対組成を表す。

【0095】

ホルマリン固定HbAおよび全血サンプル(図12)

通常の前製成人HbAサンプルは、検出されていないHbA2およびHbF(、GおよびA)で見られる他のグロビンと共に $\alpha$ -グロビンおよび $\beta$ -グロビンのピークを明らかにする。グロビンの特定のオリゴマーペアを検出した。 $\alpha$ -グロビンに対応する二量体、中央の最大値31396  $m/z$ ; 三量体、 $\alpha\alpha\alpha$  および  $\alpha\alpha\beta$  に対応する47308  $m/z$ の中央の最大値; 四量体、 $\alpha\alpha\alpha\alpha$  に対応する中央の最大値62858  $m/z$ ; ならびに  $\alpha\alpha\alpha\beta$  に対応する77732  $m/z$ での中心を外れた質量最大値を含む五量体の複合体。

【0096】

10

20

30

40

50

ホルマリンで固定後溶解された全血は、単量体のグロビン ( 1 5 0 0 0 から 1 7 0 0 0 m / z )、H b 二量体 ( 3 1 0 0 0 ~ 3 3 0 0 0 m / z )、H b 三量体 ( 4 5 , 0 0 0 ~ 4 5 8 0 0 m / z )、H b 四量体 ( 6 1 0 0 0 ~ 6 4 0 0 0 m / z ) および五量体プラス 4 つのヘム人工ユニット ( p r o s t h e t i c u n i t s ) ( 6 6 , 0 0 0 ~ 6 8 0 0 0 m / z ) を同様に明らかにした。

#### 【 0 0 9 7 】

表現型通常および異常サンプルの比較 ( 図 1 3 および 1 4 )

さらに 9 つの表現型通常血液サンプルおよび 9 つの表現型異常血液サンプル ( ホモ接合体 H B S 鎌状赤血球症、ヘテロ接合体 H B S C 鎌状赤血球症、2 つの表現型 サラセミア形質、 - サラセミアおよび - サラセミア形質ならびに H b E 病 ) を分析した。

10

#### 【 0 0 9 8 】

全ての異常ヘモグロビン症の特徴は、ホルマリン固定二量体グロビンから四量体 / オリゴマーの相対強度比における変化したプロファイルである ( 図 1 3 )。これが鎌状赤血球症で最も劇的である ( 図 1 4 参照 ) が、発症していないものと比べて四量体 / オリゴマーの割合が二倍である形質を含むベータ - およびアルファ - サラセミアでも見られる。

#### 【 0 0 9 9 】

##### 考察

異常ヘモグロビン症の同定における臨床検査室が直面する主要な問題は、結果が多くの場合決定的であるよりむしろ推定的であり、そのためある試験からの陽性結果を別の試験で確認または区別のいずれかをする必要がある。集団を完全にスクリーニングするまたは特定の診断を確認するために、鎌状化試験、血液塗抹標本の顕微鏡検査、H b 電気泳動、キャピラリー電気泳動および高速液体クロマトグラフィーからのいくつかの方法の寄せ集めを使用する。これは、サンプル量、所要時間およびリソースにおいて、すべてで非常にコストがかかる。特にナショナルスクリーニングポリシーを導入する場合、より迅速で費用効果の高い試験が必要である。

20

#### 【 0 1 0 0 】

##### 結論

ピンブリックおよび血液スポットは、M A L D I - T o F 質量分析によって鎌状赤血球およびその他の潜在的な異常ヘモグロビン症を迅速にスクリーニングすることができる。サンプルを溶解し、水中で 1 0 0 0 倍以上希釈する。構成グロビンの二重荷電イオンは、S の特徴的な m / z を明らかにするために M A L D I - T o F M S により十分かつ再現性良く分解される。さらに、その他の異常ヘモグロビン症は、胎児グロビンからの上昇した m / z シグナルの検出により特徴づけられる。これらの胎児グロビンは、欠陥がある

30

および グロビン遺伝子発現を補おうとするためにストレス状態で発現されるであろうし、異常ヘモグロビン症のバイオマーカーとして作用できる。しかし、ホルマリンまたはその他の架橋剤により固定化され、その後溶解された場合、グロビンの構成四量体、二量体ペアおよびその他のオリゴマーグループ ( 例えば、三量体および五量体 ) は、明らかにされ、 および サラセミアの特徴である過剰および異常な または グロビンオリゴマーペアを示すことができる。

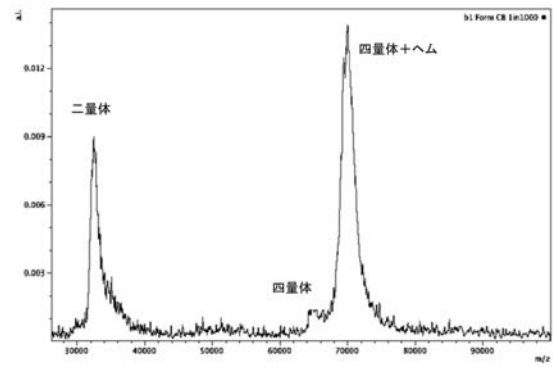






【 図 1 3 】

ホルマリン固定および溶解全血鎌状赤血球病のスペクトル



—ホルマリン固定血液(❖)の30,000から100,000m/zスペクトルピーク分析および相対割合存在量の集計表—

A)表現型通常血液サンプル												
群当ピーク	m/z	Cntrl-1	Cntrl-2	Cntrl-3	Cntrl-4	Cntrl-5	Cntrl-6	Cntrl-7	Cntrl-9	Cntrl-9	平均	SD
◆二重体との比較												
◆二重体	32480	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
◆三重体	49000	9.6	5.6	1	1	6.5	5	7	5.6	7.5	5.42	2.85
◆一四重体	64670	0.3	2.8	12	8.2	4.3	2	6	2.8	5	4.82	3.56
◆L一四重体	69550	0.6	7	6	4	1.3	1	0	1.3	1	2.47	2.55
B)一表現型異常血液サンプル												
群当ピーク	m/z	SCD HbS	SCD HbSC	ベーター サラセミア 形質	ベーター サラセミア 病	HbE	アルファアー サラセミア 形質	アルファアー サラセミア 形質	平均	SD		
◆二重体との比較												
◆二重体	32480	100	100	100	100	100	100	100	100			
◆三重体	49000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.0	2.85
◆一四重体	64670	13.3	16.8	20	23.3	10	18.5	15	16.7	15	16.7	3.56
◆L一四重体	69550	155.5	44.73	40	4.1	14.4	4.1	17.8	40.1	17.8	40.1	2.55

B) — 表現型異常血液サンプル

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2015/052491

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/68 G01N33/72  
ADD.

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)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>P. KLEINERT ET AL: "Mass Spectrometry: A Tool for Enhanced Detection of Hemoglobin Variants", CLINICAL CHEMISTRY., vol. 54, no. 1, 16 November 2007 (2007-11-16), pages 69-76, XP055222451, WASHINGTON, DC. ISSN: 0009-9147, DOI: 10.1373/clinchem.2007.089961 whole document, in particular Figure 2; table 1; materials and methods on page 70</p> <p>----- -/--</p>	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 October 2015

Date of mailing of the international search report

03/11/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vanmontfort, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2015/052491

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>JOHAN HACHANI ET AL: "MALDI-TOF MS profiling as the first-tier screen for sickle cell disease in neonates: Matching throughput to objectives", PROTEOMICS - CLINICAL APPLICATIONS, vol. 5, no. 7-8, 13 August 2011 (2011-08-13), pages 405-414, XP055222402, DE  ISSN: 1862-8346, DOI: 10.1002/prca.201000093  whole document, in particular abstract; page 406, right column, paragraphs 2 when 3; materials and methods; figure 1  -----</p>	1-12
X	<p>ZANELLA-CLEON I ET AL: "Phenotype determination of hemoglobinopathies by mass spectrometry", CLINICAL BIOCHEMISTRY, ELSEVIER INC, US, CA, vol. 42, no. 18, 1 December 2009 (2009-12-01), pages 1807-1817, XP026782100, ISSN: 0009-9120, DOI: 10.1016/J.CLINBIOCHEM.2009.04.010 [retrieved on 2009-05-03]  whole document, in particular abstract; page 1808, right column, last paragraph- page 1810, left column, paragraph 2, figure 1  -----</p>	1-12
X	<p>WO 2012/166055 A1 (SINGAPORE HEALTH SERV PTE LTD [SG]; UNIV MAHIDOL [TH]; UNIV NANYANG TE) 6 December 2012 (2012-12-06)  Claims; example 1; figure 1  -----</p>	1,4,5, 8-12
X	<p>TROXLER HEINZ ET AL: "Advances in hemoglobinopathy detection and identification.", ADVANCES IN CLINICAL CHEMISTRY 2012, vol. 57, 2012, pages 1-28, XP009186789, ISSN: 0065-2423  whole document, in particular paragraphs 5.1, 5.3 and 5.4; figures 3 and 4; table 1  -----</p>	1-12

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2015/052491

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012166055 A1	06-12-2012	SG 195180 A1	30-12-2013
		US 2015111238 A1	23-04-2015
		WO 2012166055 A1	06-12-2012
-----			

## フロントページの続き

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

(72)発明者 アバン, トーマス

英国, シービー 6 3 エフピー, ケンブリッジシャー, イーリー, モーリー ドライブ 2 8

(72)発明者 ドチャーティ, スザンヌ マーガレット エリザベス

英国, シービー 6 3 エフピー, ケンブリッジシャー, イーリー, モーリー ドライブ 2 8

(72)発明者 ナーゼ, マフムード

英国, シービー 6 3 エフピー, ケンブリッジシャー, イーリー, モーリー ドライブ 2 8

F ターム(参考) 2G041 CA01 DA04 EA03 EA12 FA12 GA06 JA07 LA07 LA08

2G045 AA02 AA25 BA13 BB02 CA02 CA07 CA25 DA36 DA45 DA46

DA49 DA51 FA34