

(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2010-507093  
(P2010-507093A)

(43) 公表日 平成22年3月4日(2010.3.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 GO 4 1
GO 1 N 27/64 (2006.01)	GO 1 N 27/64 B	2 GO 4 5
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 K	
	GO 1 N 27/62 V	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2009-532885 (P2009-532885)  
 (86) (22) 出願日 平成19年10月15日 (2007.10.15)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年6月15日 (2009.6.15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2007/003913  
 (87) 国際公開番号 W02008/047086  
 (87) 国際公開日 平成20年4月24日 (2008.4.24)  
 (31) 優先権主張番号 0620467.1  
 (32) 優先日 平成18年10月16日 (2006.10.16)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)  
 (31) 優先権主張番号 0708064.1  
 (32) 優先日 平成19年4月26日 (2007.4.26)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 500342709  
 ザ ユニバーシティ オブ ノッティンガム  
 イギリス国エヌジー7 2アールディー  
 ノッティンガム、ユニバーシティ パーク  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100106518  
 弁理士 松谷 道子  
 (74) 代理人 100127638  
 弁理士 志賀 美苗  
 (74) 代理人 100138911  
 弁理士 櫻井 陽子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオマーカー

(57) 【要約】

下記工程；

(i) 対象から得た材料のサンプルを提供すること、

(ii) サンプル中の1以上の後記タンパク質：

補体C4前駆体タンパク質補体、

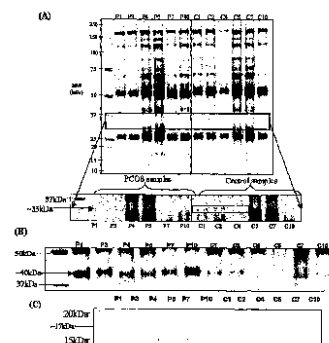
C4前駆体タンパク質の開裂フラグメント、および

ハプトグロビン、

のレベルを決定すること、ならびに

(iii) 決定した該レベルを、1以上の参照値と比較すること、

を含んでなる、対象の多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)状態を決定する方法。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象の多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)状態を決定する方法であって、  
下記工程：

- (a) 対象から得た材料のサンプルを提供すること、
- (b) 該サンプル中の1以上の後記タンパク質；  
補体C4前駆体タンパク質、  
補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメント、および  
ハプトグロビン

のレベルを決定すること、

(c) 決定した該レベルを、1以上の参照値と比較すること、  
を含む、方法。

10

## 【請求項 2】

補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントが、下記の

- a) C4
- b) C4
- c) C4
- d) C4aアナフィラトキシン
- e) C4b
- f) C4<sub>3</sub>cフラグメント
- g) C4<sub>4</sub>d
- j) h) C4<sub>4</sub>cフラグメント、および

20

i) a)~h)のいずれかのアミノ酸配列に対して、少なくとも75%アミノ酸配列同一性を有するポリペプチド、

を含む群から選択される、請求項1の方法。

## 【請求項 3】

1以上のハプトグロビンタンパク質が、ハプトグロビン およびハプトグロビン を含む群から選択される、請求項1または2の方法。

## 【請求項 4】

サンプル材料は、全血液、血清、血漿、尿、脂肪組織(脂肪)、子宮内膜組織、卵巣組織  
またはその他の体液または組織である、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

30

## 【請求項 5】

補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンの1以上のレベルが、イムノアッセイ、分光分析、質量分光分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化時間飛行型(MALDI-TOF)質量分光分析、顕微鏡、ノーザンブロット、ウェスタンブロット、サザンブロット、等電点電気泳動、SDS-PAGE、PCR、RT-PCR、ゲル電気泳動、タンパク質マイクロアレイ、DNAマイクロアレイ、抗体マイクロアレイおよびその組合せを含む群から選択されるアッセイを用いて決定される、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

40

## 【請求項 6】

1以上の参照値は、PCOSのいずれの臨床的兆候も持たない1以上の対象において観察された、1以上の補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンのレベルである、請求項1~5のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 7】

1以上の参照値は、サンプルを提供した同一対象において決定された、1以上の補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンの早期のレベルである、請求項1~5のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 8】

1以上の補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンの1以上のレベルにおける増加または低下が、対象のPCOS状態の指標であ

50

る、請求項1~7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

参照値と比較した、サンプル中のC4<sub>3c</sub>のレベルおよび/またはC4<sub>4c</sub>のレベルおよび/またはハプトグロビン<sub>1</sub>および/またはハプトグロビン<sub>2</sub>のレベルの増加が、PCOSの指標であるかまたは診断に用いる特徴である、請求項8の方法。

【請求項10】

C4前駆体タンパク質および/またはC4<sub>1</sub>および/またはC4<sub>2</sub>および/またはC4<sub>3</sub>および/またはC4aアナフィラトキシンのレベルの低下が、PCOSの指標または診断に用いる特徴である、請求項8の方法。

【請求項11】

方法がイン・ビトロで行われる、請求項1~10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

対象が哺乳動物である、請求項1~11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

哺乳動物がヒトである、請求項12の方法。

【請求項14】

下記工程；

(a) 対象から得た材料のサンプルを提供すること、

(b) MALDI-MSを用いてサンプルから得たタンパク質またはトリプシンペプチドを分析すること、

(c) タンパク質サンプル中の6つのイオン m/z 8674、8668、1351、8727、8673 および6871の存在および/またはトリプシンペプチドサンプル中の3つのイオンm/z 2924、3025および1977の存在が、対象におけるPCOSの診断に用いる特徴であることを判定すること、を含んでなる、対象におけるPCOS状態を決定する方法。

【請求項15】

1以上の補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンのレベルを決定するための少なくとも1つの試薬を含む、対象のPCOS状態を決定するために使用するためのキット。

【請求項16】

補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントが、下記の

a) C4

b) C4

c) C4

d) C4a アナフィラトキシン

e) C4b

f) C4<sub>3c</sub> フラグメント

g) C4<sub>1</sub> d

k) h) C4<sub>4c</sub> フラグメント、および

i) a)~h)のいずれかに記載のアミノ酸配列と少なくとも75%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチド、を含む群から選択される、請求項15のキット。

【請求項17】

1以上のハプトグロビタンパク質が、ハプトグロビン<sub>1</sub>およびハプトグロビン<sub>2</sub>を含む群から選択される、請求項15または16のキット。

【請求項18】

試薬が、酵素、抗体、核酸、タンパク質プローブおよびその他の好適な組成物を含む群から選択される、請求項15、16または17のキット。

【請求項19】

試薬が標識される、請求項15~18のいずれか1項に記載のキット。

【請求項20】

10

20

30

40

50

標識を検出するための手段をさらに含む、請求項19のキット。

【請求項 2 1】

標識または別の挿入物の形態にある、好適な操作上のパラメーターのための指示書をさらに含んでいる、請求項15～20のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 2 2】

較正および比較のための標準物として使用されるべき、1以上の補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよび/またはハプトグロビンのサンプルをさらに含む、請求項15～21のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 2 3】

1以上の補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンのレベルを調節できる試薬を対象に投与することを含む、対象におけるPCOSを処置する方法。 10

【請求項 2 4】

試薬が、補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンの発現を阻害するかまたは低下させるように作られたアンチセンスまたは干渉性RNA分子である、請求項23の方法。

【請求項 2 5】

試薬がC4前駆体タンパク質プロセッシングの阻害剤である、請求項23の方法。

【請求項 2 6】

試薬が補体活性を低下させる組成物である、請求項23の方法。 20

【請求項 2 7】

(a) 第一の時点で対象から得たサンプル中の、  
1以上の後記タンパク質:

補体C4前駆体タンパク質、  
補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメント、および  
ハプトグロビン、  
のレベルを決定すること、

(b) 後の第二の時点で対象から採取したサンプル中の、1以上の後記タンパク質:

補体C4前駆体タンパク質、  
補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメント、および  
ハプトグロビン  
のレベルを決定すること、ならびに

(c) 第一の測定値および第二の測定値を比較すること、ここで比較測定値によりPCOSの経過を決定すること、  
を含んでなる、対象におけるPCOSの進行を決定するか、またはPCOS罹患対象に与えた処置の効果を決定する、方法。 30

【請求項 2 8】

イン・ビトロまたはイン・ビボで、1以上の補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンのレベルを調節する1以上の化合物をスクリーニングすることを含む、PCOSを処置するための化合物を同定する方法。 40

【請求項 2 9】

PCOSの処置/緩和のための治療標的としての、C4 前駆体タンパク質、C4<sub>3c</sub>、C4<sub>4c</sub>、C4<sub>3a</sub> アナフィラトキシン、C4<sub>3b</sub>、C4<sub>3c</sub> フラグメント、C4<sub>3d</sub>、C4<sub>4c</sub> フラグメント、ハプトグロビン および/またはハプトグロビンの使用。

【請求項 3 0】

1以上の補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンを検出することが出来る1以上のプローブを含む、プローブ対。

【請求項 3 1】

プローブが、抗体、核酸またはペプチドを含む群から選択される、請求項30記載のプローブ対。 50

## 【請求項 3 2】

プローブが標識される、請求項30または31のプローブ対。

## 【請求項 3 3】

補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンを含む群から選択される2つの異なるタンパク質に関する2つのプローブを含む、請求項30、31または32のプローブ対。

## 【請求項 3 4】

タンパク質サンプル中の6つのイオンm/z 8674、8668、1351、8727、8673および6871の存在および/またはトリプシンペプチドサンプル中の3つのイオンm/z 2924、3025および1977の存在について、サンプルを分析するための指示書を含む、対象のPCOS状態を決定する際に使用するためのキット。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)のための新規バイオマーカー、およびこれらの新規バイオマーカーを用いて対象のPCOS状態を決定する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)に罹患している女性は、広範な兆候を臨床医に示すことが多く、その最も一般的な症状は、月経不順ならびに/またはニキビ、多毛症およびアンドロゲン性脱毛症を含む高アンドロゲン症に関連のある問題を伴った妊娠困難症/不妊症である。これらの女性の多くは、肥満になっており、後年に糖尿病、心疾患および子宮内膜癌のリスクが増加する可能性がある。PCOSは、U.Kにおいて再生産年齢の5-10%の女性が罹患していると考えられている。Stein および Leventhal らは、1935年にPCOSの発現の表現型を最初に特徴付け、それ以後の著しい進歩により、病態生理、診断、臨床提示および処置に関する理解がなされてきた。これらの進歩にも関わらず、依然として、一貫して利用できる診断上のマーカーは存在せず、この多面的な症候群に対する有効な処置を開発することは依然として難題である。

20

## 【0003】

現在、PCOSの病因に関与する3つの共通した最新の仮説があり、この仮説は次のものに関する：(i) 視床下部-下垂体-副腎皮質系、(ii) インスリン抵抗性および(iii) アンドロゲンレベル。例えば、PCOSに関する内分泌学的根拠は、ゴナドトロピン放出ホルモンの増加した放出により下垂体から放出される黄体形成ホルモン(LH)のパルス頻度を増加させる視床下部に起因すると考えられる。上昇したLHレベルは、卵巣莢膜細胞によるアンドロゲンの産生を増加させる、即ち罹患女性において遊離テストステロンの循環レベルを増加させると考えられる。しかし、LH分泌過多は、PCOSと診断された全ての対象において共通していない。他の症例においては、インスリン抵抗性は、性ホルモン結合グロブリン(SHBG)の合成を阻害して、莢膜細胞のアンドロゲン産生を直接的に刺激するようLHと相乗的に作用することにより、アンドロゲン産生を増加させると理解されている。しかし、PCOSにおいてインスリン抵抗性についての正確な原因論がなく、また末梢インスリン抵抗性の存在において選択的な卵巣感受性が存在することは、PCOSに関する課題をさらに示すものである。高アンドロゲン血症は、PCOSに関する全ての他の徴候の基礎となることが判っており、また高アンドロゲン血症に関する一次的原因および分子機構は全く明らかではない。

30

40

## 【0004】

PCOSの現在の診断は、他のアンドロゲン血症に基づく疾患を除くものであり、後記の3つの基準のうち少なくとも2つの臨床的識別に従う：(i) 慢性の過少排卵/無排卵(ii) 高アンドロゲン血症の臨床的および/または生物化学的徴候および(iii) 多嚢胞性卵巣の超音波エビデンス。しかしながら、各基準の相対比重は、臨床医の医学のバックグラウンドによって、さらにPCOSの臨床課題を強調することによって変化する傾向がある。処置方法もまた、対象の提示する特徴および所望の結果によって変化し、婦人科または外見的

50

改善または単なる体重管理およびライフスタイルの変更に対して症状を基にした方法へと変化する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

従って、PCOSを診断するための単純で、迅速で、信頼のおける、再現可能な方法に対する必要性および該疾患の処置/緩和のための好適な新規治療標的に対する必要性が依然として存在する。

【0006】

本発明は、PCOSの診断において有用な新規バイオマーカー、ならびにPCOSを診断するおよび対象のPCOS状態を決定するために該バイオマーカーを使用するための方法およびキットを提供する。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

第一の態様に従って、本発明は、下記工程：

(a) 対象から得た材料のサンプルを提供すること

(b) 該サンプル中の1以上の後記タンパク質；

補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンのレベルを決定すること、ならびに

(c) 該決定したレベルを、1以上の参照値と比較すること、

20

を含んでなる、対象の多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)状態を決定する方法を提供する。

【0008】

好ましくは、該方法は、対象により提供されたサンプル中のタンパク質の分析から対象のPCOSを診断出来る。

【0009】

補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンは、PCOSについてのバイオマーカーとして同定され、本明細書において該バイオマーカーまたは該バイオマーカータンパク質として見なされる。

【0010】

これらのバイオマーカーは、対象のPCOS状態を決定するために、例えばPCOSを診断するために使用され得る。用語 "PCOS状態" には、疾患および非疾患を含むPCOS疾患のあらゆる識別し得る症状が含まれる。例えば、PCOS状態には、疾患の存在または非存在、疾患が進行するリスク、疾患の段階、疾患の進行(例えば、経時的な疾患の進行または疾患の緩和)および疾患の処置に対する対象の効果または応答が含まれるが、これらに限定するものではない。

30

【0011】

通常、本発明の方法は、臨床的な兆候の評価と組合せて使用される。

【0012】

C4前駆体タンパク質は、補体経路の一成分であり、免疫応答システムに対する重要な関与因子である。C4は、補体システムの古典的経路において中心的役割を担う。C4のDNA配列は、GenBankデータベースにおいて2つのアイソフォームとして見出され得る、これらはアイソフォームA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=67190747>) についてはアクセス番号NM007293およびアイソフォームB (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=50345295>) についてはアクセス番号NM001002029により利用可能である。対応するタンパク質は、アクセス番号POCOL4 およびPOCOL5 (C4前駆体としてタンパク質配列は<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=67190747>にて見出され、対応するDNA配列は<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/expasyfetch?K02403>で見出され得る)を持つ。各アイソフォームのタンパク質配列は図8および9に示される。

40

【0013】

50

用語"C4 タンパク質"および"C4 前駆体タンパク質"は、同一タンパク質を示しており、本明細書では互換的に使用される。

【0014】

補体C4前駆体タンパク質の1以上の開裂フラグメントは、下記ポリペプチド：

- a) C4
- b) C4
- c) C4
- d) C4a アナフィラトキシン
- e) C4b
- f) C4<sub>3c</sub> フラグメント
- g) C4<sub>d</sub>
- h) C4<sub>4c</sub> フラグメントおよび
- i) a) ~ h)のいずれかのアミノ酸配列に対して、少なくとも75%アミノ酸配列同一

性、より好ましくは少なくとも80%、85%、90%または95%または95%以上の配列相同性を有するポリペプチド、を含む群のいずれかから選択され得る。

10

【0015】

好ましくは、少なくとも1つのまたは該フラグメントa) ~ i)が、本発明の方法において検出され、より好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、または9のフラグメントa) ~ i)が検出される。

20

【0016】

開裂フラグメントa) ~ h)のアミノ酸配列は、図8および9を参照して見出され得る。

【0017】

1以上のハプトグロビンタンパク質は、ハプトグロビン およびハプトグロビン を含む群から選択され得る。両方のハプトグロビンのアミノ酸配列を図10に示した。

【0018】

タンパク質は、複数の異なる形態にて、体内に、および体内から得られるサンプル中に高頻度にて存在する。これらの形態は、翻訳前および翻訳後修飾のいずれかまたは両方から得られ得る。サンプル中の該タンパク質のレベルを検出するかまたは決定する場合に、タンパク質の異なる形態の間を区別する能力は、該差違の性質および該タンパク質レベルを検出または測定するために使用した方法に依存する。例えば、モノクローナル抗体を用いるイムノアッセイは、エピトープを含有するタンパク質の全ての形態を検出するが、それらの間を区別しない。しかし、タンパク質上の異なるエピトープに対する2つの抗体を使用するサンドイッチイムノアッセイは、両方のエピトープを含有するタンパク質の全ての形態を検出するが、エピトープの一つのみを含有するそれらの形態を検出しない。

30

【0019】

本発明の方法において、1以上のバイオマーカータンパク質のレベルを決定するために使用されるアッセイ方法は、特異的バイオマーカータンパク質の全ての形態を検出するのが好ましい。好ましくは、少なくとも特異的バイオマーカータンパク質の全ての生物学的に活性な形態が検出される。好ましくは、図8、9および10に示したバイオマーカーのアミノ酸配列と、少なくとも75%以上、好ましくは少なくとも80%、85%、90%、95%以上の同一性を有するあらゆるバイオマーカータンパク質の全ての形態が、本発明の方法において検出される。

40

【0020】

ポリペプチド/タンパク質の同一性を測定する方法は、当業者にはよく知られている。例えば、UWGCG Packageは、同一性を計算するために使用され得る(例えば、そのデフォルト設定で使用した)BESTFITプログラムを提供する(Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395)。

【0021】

また、PILEUPおよびBLASTアルゴリズムは、ホモロジーを計算するか、または配列を並

50

べるために使用され得る(通常、そのデフォルト設定に対して)、例えば、Altschul S.F. (1993) J Mol Evol 36:290-300 Altschul, S, F et al (1990) J Mol Biol 215:403-10において説明されているとおりである。

【0022】

BLAST分析を行うためのSoftwareは、National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を介して公的に利用できる。

【0023】

本発明の方法は、一般的な集団に共通する多型性を有するバイオマーカータンパク質のレベルを検出できるようにするのが好ましい。タンパク質の機能に影響しない多型性が生じる可能性があり、本発明の方法はこれらを検出できるようにすることを意図するものである。

10

【0024】

対象から得られるサンプル材料は、全血液、血清、血漿、尿、脂肪組織(脂肪)、子宮内膜組織、卵巣組織または他の体液または組織を含み得る。

【0025】

1以上の補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンのレベルは、イムノアッセイ、分光分析、質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)質量分光分析、顕微鏡、ノーザンブロット、ウェスタンブロット、サザンブロット、等電点電気泳動、SDS-PAGE、PCR、RT-PCR、電気泳動、タンパク質マイクロアレイ、DNAマイクロアレイおよび抗体マイクロアレイ、またはその組合せを含む群のいずれかの使用を含み得るあらゆる好適なアッセイにより決定され得る。好ましくは、1以上のバイオマーカーのレベルは、イムノアッセイを用いて決定される。イムノアッセイは、特異的抗原に対する一つの抗体または複数の抗体を使用して、該抗原の該レベルを決定する。この場合には、1以上のC4前駆体タンパク質、C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントまたはハプトグロビンに特異的な一つの抗体または複数の抗体を使用できる。該イムノアッセイは、酵素結合イムノアッセイ(ELISA)、サンドイッチアッセイ、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロット、バイオセンサーを用いるイムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、凝集アッセイ、濁度アッセイまたは散乱光アッセイであってもよい。

20

【0026】

1以上の抗体は、合成のモノクローナル、ポリクローナル、二重特異性、キメラまたはヒト化抗体であってもよい。キメラ抗体には、様々な動物から得られた部分を包含し得る。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の1以上の相補性決定領域およびヒトイムノグロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する非ヒト種由来の抗体である。キメラおよびヒト化抗体は、当業者には既知の組換え技術によって生成され得る。

30

【0027】

1以上の抗体は、放射活性、蛍光、化学ルミネセンス、染料、酵素またはヒスチジンタグまたは標識、または当業者には既知のその他の好適な標識またはタグを含む群から選択されるタグまたは標識を含み得る。

【0028】

サンプル中の特定のタンパク質の該存在および場合により該レベルは、質量分析技術を用いることによっても決定され得る。質量分析技術は、特異的なタンパク質またはタンパク質の一部、例えばトリプシンペプチドと相関するガス相のイオンを検出するために使用され得る。質量分析計の例示には、飛行時間型、磁性セクター、四重フィルター、イオントラップ、イオンサイクロトロン共鳴、静電場分析器(electrostatic sector analyser)およびこれらの複合型が含まれる。

40

【0029】

質量分光計はレーザー脱離/イオン化を使用してもよい。

【0030】

MALDI(マトリックス支援レーザー脱離イオン化)ペプチド質量フィンガープリントを使

50

用して、2Dゲル分析およびRPE/SDS PAGE分析から特定のバイオマーカータンパク質の存在を同定し得る。

【0031】

MALDI-MSおよびANN分析を用いて、PCOSについて同定されたタンパク質およびトリプシンのバイオマーカーの特徴をプロフィールできる。

【0032】

好ましくは、1以上の補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンの決定したレベルを比較する参照値とは、PCOSのあらゆる臨床的症候を持たない対象において観察されたレベル、いわゆる“正常値”である。

【0033】

あるいは、該参照値は、特定対象について得られた早期の値であってもよい。この方法が疾患の進行をモニターまたは特定処置に対する対象の反応をモニターすることであれば、この種の参照値を使用することが出来る。

【0034】

1以上の補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンの決定したレベルを参照値と比較する場合に、1以上のバイオマーカータンパク質のレベルの増加または低下は対象のPCOS状態の指標であり得る。

【0035】

より具体的には、C4<sub>3c</sub>のレベルおよび/またはC4<sub>4c</sub>のレベルおよび/またはハプトグロビン および/またはハプトグロビンのレベルの増加は、PCOSの指標であるかまたは診断に用いる特徴であり得る。

【0036】

C4前駆体タンパク質および/またはC4 および/またはC4 および/またはC4 および/またはC4aアナフィラトキシンのレベルの低下は、PCOSの指標であるかまたは診断に用いる特徴であり得る。

【0037】

本発明の方法もまた、疾患の進行をモニターおよび/または対象に与えた処置の有効性をモニターするために使用できる。これは、最初の診断の後に様々な時点で対象から採取したサンプルを分析すること、バイオマーカーのレベルにおける変化をモニターすること、そしてこれらのレベルを参照値と比較することによって達成され得る。

【0038】

この場合において、参照レベルは、対象におけるバイオマーカーの最初のレベル、または最後に試験した時の対象におけるバイオマーカーのレベル、または両方を包含し得る。

【0039】

好ましくは、本発明の方法はイン・ビトロで実施される。

【0040】

対象は、哺乳動物であってよく、好ましくはヒトであるが、サル、類人猿、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、ウサギまたは齧歯類であってもよい。

【0041】

他の態様に従って、本発明は、対象のPCOS状態を決定するために、バイオマーカーとして使用するための、またはバイオマーカーのパネルの一部として使用するための1以上の補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンを提供する。好ましくは、バイオマーカーのパネルは、C4前駆体タンパク質、C4<sub>3c</sub>、C4<sub>4c</sub>、C4aアナフィラトキシン、C4b、C4<sub>3c</sub>フラグメント、C4<sub>4c</sub>フラグメント、ハプトグロビン およびハプトグロビンを含む群から選択された少なくとも2、3、4、5または5以上のバイオマーカーを含む。

【0042】

本発明の別の態様に従って、下記工程；

(a) 対象から得た材料のサンプルを提供すること、

(b) サンプルから得たタンパク質またはトリプシンペプチドをMALDI-MSを用いて分析す

10

20

30

40

50

ること、

(c) タンパク質サンプル中の6つのイオン  $m/z$  8674、8668、1351、8727、8673および6871の存在および/またはトリプシンペプチドサンプル中の3つのイオン  $m/z$  2924、3025および1977の存在が、対象におけるPCOSの診断に用いる特徴であることを判定すること、を含んでなる、対象におけるPCOS状態を決定する方法を提供する。

【0043】

6つのイオン $m/z$  8674、8668、1351、8727、8673 および6871、ならびに3つのイオン $m/z$  2924、3025 および1977は、PCOSについてのバイオマーカーである。

【0044】

本発明の別の態様に従って、タンパク質サンプル中の6つのイオン $m/z$  8674、8668、1351、8727、8673 および6871の存在および/またはトリプシンペプチドサンプル中の3つのイオン $m/z$  2924、3025 および1977の存在について、サンプルを分析するための指示書を含む、対象のPCOS状態を決定するために使用するためのキットを提供する。

【0045】

本発明の別の態様に従って、1以上の補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンのレベルを決定するための少なくとも1つの試薬を含む、対象のPCOS状態を決定する場合に使用するためのキットを提供する。

【0046】

試薬は、酵素、抗体、核酸、タンパク質プローブまたは他の好適な組成物であり得る。

【0047】

好ましくは、1以上のPCOSバイオマーカーのレベルを決定するための試薬は標識される。また、該キットは該標識を検出する手段を含み得る。

【0048】

キットは、決定されるべき1以上のバイオマーカータンパク質レベルを捕捉するための1以上の捕捉試薬を含み得る。捕捉試薬は1以上の抗体であってよい。

【0049】

1以上のPCOSバイオマーカーのレベルを決定するための捕捉試薬または試薬を、固体支持体に結合してもよい。該固体支持体は、チップ、マイクロタイタープレート、ビーズまたは樹脂であり得る。

【0050】

また、キットは、洗浄溶液または洗浄溶液を作成するための指示書を含み得る。該洗浄溶液により、単独で、または捕捉試薬と組み合わせて、例えば質量分析またはイムノアッセイ方法により、連続検出のために固体支持体上で一つのバイオマーカーまたは複数のバイオマーカーの効果的な捕捉が可能となる。

【0051】

キットは、ラベル形態または別の挿入物の形態において、好適な操作上のパラメーターについての使用説明書を含み得る。該説明書により、購入者はサンプルの回収方法および/または捕捉試薬の洗浄方法について、および/または検出されるべき特定のバイオマーカーの詳細についての情報が提供され得る。

【0052】

キットは、計算および比較のための標準物として使用されるべき1以上のバイオマーカーサンプルを含み得る。

【0053】

さらに別の態様に従って、本発明は、個人のPCOS状態を評価する手段として、その他のPCOSバイオマーカーの検出を用いるかまたは用いずに、C4前駆体タンパク質および/またはC4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよび/またはハプトグロビン鎖のレベル判定の使用を提供する。

【0054】

さらなる態様に従って、本発明は、1以上の前記PCOSバイオマーカーを検出することが出来るプローブ対を提供する。当業者は、好適なプローブ(例えば、合成分子、抗体、核

酸または天然のタンパク質類似物であり得る)を設計する方法を十分理解しているであろう。該プローブは、その検出を促進するように1以上の標識を担持していてもよい；該標識は、例えば放射活性、化学ルミネセンスまたは蛍光標識であり得るが、これらの例示に限定するものではない。好ましくは、プローブ対は、異なるバイオマーカータンパク質に対して少なくとも2つのプローブを含む。

【0055】

別の態様に従って、本発明はPCOS対象を処置する方法を提供するものであって、細胞中の1以上のPCOSバイオマーカーのレベルを調節することが出来る試薬を対象に投与することを含んでおり、ここで該1以上のバイオマーカーは、補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンを含む群から選択される。該試薬は、細胞内でのバイオマーカータンパク質の発現を阻害または低下させるように設計された、アンチセンスまたは干渉性RNA分子であり得る。

10

【0056】

あるいは、該試薬は、C4前駆体タンパク質プロセッシングの阻害剤または補体活性を低下させる組成物であり得る。

【0057】

さらなる態様に従って、本発明は下記工程：

(a) 第一の時点で対象から得たサンプル中の、1以上の後記タンパク質：補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンのレベルを決定すること、

20

(b) 後の第二の時点で対象から採取したサンプル中の、1以上の後記タンパク質：補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンのレベルを決定すること、ならびに

(c) 第一の測定値および第二の測定値を比較すること、ここで比較測定はPCOSの経過を示す、

を含んでなる、

対象におけるPCOSの進行を決定するか、またはPCOS対象に与えた処置の効果を決定する方法を提供する。

【0058】

この方法を用いて、2以上の時点で採取したサンプルを比較することが出来る。

30

【0059】

さらなる態様に従って、本発明は、イン・ビトロまたはイン・ビボでの1以上の補体C4前駆体タンパク質、補体C4前駆体タンパク質の開裂フラグメントおよびハプトグロビンのレベルを変化させる1以上の化合物をスクリーニングすることを含む、PCOSを処置するための化合物を同定する方法を提供する。

【0060】

治療試験に好適な化合物は、最初に、本明細書に列挙した1以上のPCOSバイオマーカーと相互作用する化合物を同定することによりスクリーニングされ得る。一例として、スクリーニングは、バイオマーカーを組換え的に発現させること、バイオマーカーを精製すること、およびバイオマーカーを基質に取付けることを含み得る。通常、試験化合物を、次いで水性条件下で基質と接触させ、試験化合物およびバイオマーカーの相互作用を、例えば塩濃度の関数として溶出速度を測定することにより測定できる。特定のタンパク質は、1以上のバイオマーカーを認識および開裂することができる、この場合には該タンパク質は、1以上のバイオマーカーの消化を、標準的アッセイ(例えば、タンパク質の電気泳動)によりモニターすることにより検出され得る。

40

【0061】

関連のある実施態様において、試験化合物が1以上のバイオマーカーの活性を阻害する能力を測定できる。当業者には認識するであろうが、特定のバイオマーカーの活性を測定するために使用したこの技術は、バイオマーカーの機能および特性によって変化させる。例えば、バイオマーカーの酵素活性は、適切な基質が利用できるという条件下および基質

50

の濃度または反応生成物の発生が容易に測定できるという条件下でアッセイされ得る。所与のバイオマーカーの活性を阻害するかまたは増強させる可能性のある治療試験化合物の能力は、試験化合物の存在または非存在において、触媒の速度を測定することにより決定され得る。

#### 【 0 0 6 2 】

あらゆるPCOSバイオマーカーの活性を変更出来る試験化合物を、PCOSに罹患しているか、または発症リスクのある対象に投与できる。例えば、イン・ビボで特定のバイオマーカーの活性がPCOSの原因となるタンパク質の蓄積を阻害するなら、特定のバイオマーカーの活性を増加させる試験化合物の投与により、対象におけるPCOSのリスクを低下させることができる。逆に、該バイオマーカーの増加した活性がPCOSの発病に、少なくとも部分的に

10

#### 【 0 0 6 3 】

またさらなる態様は、PCOSの処置/緩和のための治療標的として、C4前駆体タンパク質、C4<sub>3c</sub>、C4<sub>4c</sub>、C4<sub>2b</sub>、C4<sub>2a</sub>アナフィラトキシン、C4<sub>2b</sub>、C4<sub>3c</sub>フラグメント、C4<sub>2d</sub>、C4<sub>4c</sub>フラグメント、ハプトグロビン およびハプトグロビン および / または他のPCOSバイオマーカーの使用を提供する。

#### 【 0 0 6 4 】

当業者であれば、本発明の実施態様および / または態様のいずれかに一つの好ましい特徴が、本発明の全ての他の実施態様および / または態様に適用され得ることは認識されよう。

20

#### 【 0 0 6 5 】

本発明は、単なる一例として、下記の図を参照してより詳細にさらに記載される。

#### 【 0 0 6 6 】

図1は、PCOS対象と対応コントロール対象との間のタンパク質レベルの変化を示す2次元ゲル電気泳動の結果を示す。上部10個のイメージは、銀染色した2Dゲルであって、ゲル中の目的とするタンパク質スポットが丸く印付けられており、PCOS対象とコントロールの年齢/BMIが対応した対象との間のタンパク質のレベルにおける差違が判り得る。下部の5つのイメージは、DELTA 2D image Analysis softwareを用いて作成したもので、比色分析表示にて同一タンパク質スポットを示している対応するゲルの対のイメージを重ね合わせた

30

#### 【 0 0 6 7 】

図2は、年齢 - 体重が対応したPCOS対象 - コントロール対象のゲルの対のC4<sub>3c</sub>スポットの強度の定量分析を示す。データを、DELTA 2D image analysis softwareを用いて計算した。

#### 【 0 0 6 8 】

図3は、未知C4<sub>4c</sub>ペプチド配列に対して生じた抗体を用いて10個の血清枯濁サンプルのウェスタンブロット分析を示す。図3Aは、前記2DE試験で使用した同一サンプル対からの全血清のウェスタンブロット分析を示す。このブロットを、C4<sub>2</sub>鎖内のエピトープに対して生じたポリクローナル抗C4<sub>2</sub>抗体によりプローブした。示された ~24kDaバンドは、C4<sub>4c</sub>フラグメントを示す。図3Bは、SynGene Gene Tools densitometry softwareを用いて決定した図3Aのバンド強度の定量分析を示す。\* P= 0.03。

40

#### 【 0 0 6 9 】

図4は、補体成分C4タンパク質に関する一次構造の図表示を示す。C4前駆体および多くのその開裂フラグメントが示されている。C4タンパク質は3つの鎖から構成されることが示され、これは1つのC4前駆体から全て開裂され得、タンパク質の機能的構造を形成するようにフォールディングされ得る。開裂したC4aフラグメントが放出され、アナフィラトキシンとして作用する場合、この鎖は活性な要素である。C4bフラグメントは、C2と共

50

に複合体を形成して、古典的な補体経路の酵素的カスケードを継続させ、オプソニンとしても作用し得る。C4bは、後にC4<sub>3</sub>c、C4<sub>d</sub>およびC4<sub>4</sub>cフラグメントへと開裂され、これが補体カスケードを不活性化させる(Nagasawa et al., (1980) J Immunol 125(2): 578-82 およびHessing, (1991) Biochem J 277:581-92に基づく)。注：† PCOSサンプルにおいて上方調節されているものとして2DE分析で同定したC4<sub>3</sub>cフラグメント。‡ PCOSにおいて上方調節されることがウェスタンブロットにより示されたC4<sub>4</sub>cフラグメント。\* PCOSにおいて下方調節されているものとしてRP-SPE 画分のSDS PAGE分析で同定されたC4鎖。

#### 【 0 0 7 0 】

図5はPCOSと対応するコントロールとの間の差を示すRP-SPE分析を示す。図5Aは、5/6コントロールサンプル中に存在する～33kDaバンド、および画分12のみに対して3/6のPCOSサンプル中で非常に低いレベルを示している。画分4および5にて類似した大きさのバンドが存在する可能性があるが、これは異なるタンパク質の種類であると考えられる。図5Bは、コントロールサンプル中に存在するよりも増加したレベルにて、全PCOSサンプル中に存在する～40kDaバンドを示す。この差は、画分8-12中で最も顕著であった。図5Cは、5/6PCOSサンプルおよび唯一2/6コントロールサンプル中に存在する～17kDaバンドを示す。

#### 【 0 0 7 1 】

図6は、PCOSおよび対応コントロールとの間の差を示す定量的なRP-SPE分析を示す。図6Aは、RP-SPEで見られた～40kDaバンドのデンストリーによる定量的結果を示す(図5B)。P=0.001。図6Bは、RP-SPE(図5C)で見られた～17kDaバンドのデンストリーによる定量的結果を示す。

#### 【 0 0 7 2 】

図7は、代表的なMALDI-TOF質量スペクトルを示す：

図7Aは、トリプシンの消化後の血清ペプチドであり、図7BはPCOS対象およびコントロールの血清由来のC<sub>18</sub>ZipTipクリーン・アップ後のタンパク質である。このスペクトルはPCOS血清およびコントロール血清との間に観察された差を示す。図7Cは、3つのイオンモデルに基づいたトリプシンペプチドプロファイルの評価するためのANNの予測能力を示し、図7Dは、6つのイオンANNモデルに基づいたタンパク質プロファイルを示す。灰色の棒線はコントロールサンプルを示し、黒色の棒線はPCOSサンプルを示す。1.5以下の予測値はコントロールサンプルを示すが、1.5以上の予測値はPCOSサンプルを示す。

#### 【 0 0 7 3 】

図8(配列番号:1)は、アイソフォームAのC4前駆体タンパク質のタンパク質配列である。より具体的には、アミノ酸20～675は、C4<sub>3</sub>c開裂フラグメントであり、アミノ酸680～1446はC4<sub>d</sub>開裂フラグメントであり、アミノ酸680～756はC4aアナフィラトキシン開裂フラグメントであり、アミノ酸757～1446はC4b開裂フラグメントであり、アミノ酸757～956はC4<sub>3</sub>c開裂フラグメントであり、アミノ酸957～1333はC4<sub>d</sub>開裂フラグメントであり、アミノ酸1334～1446はC4<sub>4</sub>c開裂フラグメントであり、アミノ酸1454～1744はC4<sub>4</sub>c開裂フラグメントである。

#### 【 0 0 7 4 】

図9(配列番号:2)は、アイソフォームBのC4前駆体タンパク質のタンパク質配列である。アイソフォームAとのアミノ酸の差に下線を引いた。

#### 【 0 0 7 5 】

図10(配列番号:3)は、ハプトグロビンのタンパク質配列である。アミノ酸19～161はハプトグロビン<sub>1</sub>であり、アミノ酸162～406はハプトグロビン<sub>2</sub>である。

#### 【 発明を実施するための形態 】

#### 【 0 0 7 6 】

材料および方法

対象

この試験は、PCOSと診断された11人の女性(18-40年齢)およびその年齢-BMIが対応した10人のコントロールから構成した。the Queen's Medical Centre, Nottinghamにて運営

10

20

30

40

50

する不妊症、婦人科またはPCOSの診療所にて、PCOS罹患女性をまず同定し、その後口頭でこの試験への参加をもちかけた。PCOSに罹患していないコントロールの女性を、ポスター広告にてPCOS罹患女性と同じ婦人科の医院からおよびまた女性スタッフから募った。この試験の倫理的承認が、Nottingham Local Research Ethics Committeeにより許可され、インフォームドコンセントを各対象から得た。

#### 【0077】

##### 臨床評価

月経、婦人科医学、産科および他の病歴に加えて対象者群形成層の詳細を、臨床問診中に各対象について集めた。規則的な月経周期を、21~35日の間であると規定した。ニキビおよび多毛症の存在を評価し、多毛症を、Ferriman Gallwey Scoreの $>7$ として規定した(Ferriman およびGallwey, (1961) J Clin Endocrinol Metab 21: 1440-7)。甲状腺疾患の病歴、高プロラクチン血症、最近の出産、流産または手術、心筋梗塞の病歴、血栓もしくは血液疾患、または性ステロイド治療の現在の使用がある場合には、該対象をこの試験から除外した。様々な身体計測もこの問診で行った。身長および体重測定を行い、ボディマス指数(BMI)を計算し、ウエストおよびヒップのcmを測定し、座位で対象に適切なサイズの血圧計バンドを用いて血圧を計った。

10

#### 【0078】

臨床問診の後に、絶食血液サンプルを各女性毎に集めた。全てのコントロール女性について、可能な場合、PCOS罹患女性において、サンプルを、その月経周期の卵胞期中に採取した。経膈骨盤超音波も行った。超音波スキャンを行う超音波検査および臨床化学部門には各対象の臨床診断を知らせていない。血液サンプルを、生化学試験のためにはBDバキュティナーのSSTチューブ中に収集し、グルコース決定のためにはBDバキュティナーのフッ化チューブに収集した(両方BD Biosciences, Oxford, U.K.から)。該サンプルを、エンドクリンについてアッセイして、血液グルコース、インスリン、脂質プロファイル(トリグリセリド、総コレステロールおよびHDLコレステロール)、ならびに血清ホルモンプロファイル(テストステロン、SHBG、黄体形成ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、17-ヒドロキシプロゲステロンおよびプロラクチン)を測定した。

20

#### 【0079】

Rotterdam 基準(Rotterdam ESHRE/ASRM Sponsored PCOS Consensus Workshop (2004) Fertil Steril 81(1):19-25)を用いて、2以上の、過少排卵/無排卵、多嚢胞性卵巣および高アンドロゲン血症の臨床的および/または生化学的兆候が提示された場合に、対象をPCOSと診断する。高アンドロゲン血症は、臨床的には多毛症(Ferriman Gallweyのスコア $>7$ )により規定され、生化学的には上昇したテストステロン( $>2\text{nmol/L}$ )および/または上昇した遊離アンドロゲン指数( $>10$ )(テストステロン/SHBG  $\times 100$ )により規定される。コントロールの対象は、規則的な21-35日の月経周期を持ち、多嚢胞性卵巣の超音波エビデンスまたは高アンドロゲン血症のエビデンスがない。

30

#### 【0080】

##### サンプル調製

血清サンプルを、21人の対象から12カ月の期間にわたり同時に回収した。該サンプルを、回収1時間以内に、4,000 rpm、10分間、4 で遠心分離によりSSTチューブ中で凝固した全血液から分離し(生化学試験のためのサンプルと平行して得た)、必要になるまで $-80$ で貯蔵した。サンプルを、匿名で保持するために、各群内で連続番号を付してPCOSサンプルについてはP-およびコントロールについてはC-と適宜標識した。年齢およびBMIが高度に類似するPCOSおよびコントロール女性をサンプル対にて対応させた。

40

#### 【0081】

##### 血清枯濁およびサンプルの精製

最初の試験のために、5つの年齢-BMIが対応したPCOS-コントロール対由来の血清サンプル( $15 \mu\text{l}$ )を、製造者プロトコール(Alubumin & IgG Removal Kit Amersham Biosciences, Little Chalfont, Bucks, U.K.)に従って抗体を基にしたカラムを用いてアルブミンおよびイムノグロブリンG(IgG)を同時に枯濁させた。得られたサンプル( $\sim 500 \mu\text{l}$ )を、製

50

造者プロトコール(2D clean-up kit Amersham Biosciences)に従って、タンパク質沈殿に供した。次いで、該タンパク質沈渣を、改変したブラッドフォードアッセイ(Quick Start Protein Assay BioRad)により定めたように、5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の終濃度に、室温で可溶化緩衝液[7M 尿素 (Sigma, Poole, U.K.)、2M チオ尿素(Sigma)、4% w/v 3-(シクロヘキシルアミノ)-1-プロパンスルホン酸(CHAPS Amersham Biosciences)、10mM ジチオスレイトル(DT T Fisher Scientific, Loughborough, Leics, U.K.)、1% v/v BioLyte carrier ampholytes 3-10 (BioRad, Hercules, CA, U.S.A.)]に再懸濁した。

#### 【 0 0 8 2 】

##### 等電点電気泳動(IEF)

IEFを、PROTEAN IEF 細胞 (BioRad)を用いて行った。ReadyStrip (登録商標) (11 cm)の固定化pH勾配(IPG)ストリップ pH 3-10 NL (BioRad)を、IEF緩衝液(188  $\mu\text{l}$ ) [7M 尿素、2M チオウレア、4% w/v CHAPS、100mM ビス(2-ヒドロキシエチル)ジスルフィド(HED De Streak reagent, Amersham Biosciences)、0.5% v/v BioLyte carrier ampholytes 3-10]を用いて16時間20 で再水和させた。ストリップの再水和後に、サンプル(60  $\mu\text{g}$  全タンパク質)(12  $\mu\text{l}$ )を、各ストリップの陽極末端に投入した。次いで、至適化したIEFプログラムを、20 で15分間250Vの電圧で印加し、直線的に2.5時間かけて8,000Vまで上げて、50 kVhとして8,000 Vで集束させて行った。全て10の血清枯渴サンプルおよび精製サンプルを同時に分画して、該ストリップを必要になるまで個別に - 20 で貯蔵した。

10

#### 【 0 0 8 3 】

##### 二次元SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)

IEFにより生成した各年齢およびBMIが一致したPCOS-コントロール対のサンプルストリップを溶かし、室温で、最初に15分間、2% w/v DTTを含む平衡化緩衝液 [0.37M Tris.HCl (pH 8.8 Invitrogen, Paisley, U.K.)、6M尿素、2% w/v 硫酸ドデシルナトリウム (SDS Fisher Scientific)、30% v/v グリセロール(Sigma)]中で平衡化し、その後15分間 2.5% w/v ヨードアセトアミド(Sigma)を含む平衡化緩衝液中で平衡化した。SDS-PAGEを、1xゲル泳動緩衝液[0.25M Tris、1.86M グリシン(Fisher Scientific)、0.1% w/v SDS]で作成した1% w/v 低融解アガロース(BioRad)を用いてゲルの上部を密封した平衡化ストリップと共に均一な13%アクリルアミドゲルまたは8-20%アクリルアミド勾配ゲルで行った。2つのストリップの電気泳動分離を平衡して行い、ゲルあたり22 mAにて3.5時間室温で行った。ゲル中のタンパク質を、スポット解析を改良するために4 で行う発色工程を伴う質量分析(Yan et al., 2000)に適合する改変した銀染色法(Plus One Silver Stain Kit Amersham Biosciences)を用いて染色した。染色ゲルのイメージングを、Agfa Fotolook v3.0 および Duoscan T1200 flatbed scannerを用いて行い、その後DELTA 2D イメージ分析ソフトウェア(v3.3 Decodon, Greifswald, Germany)を用いて定性および定量分析を行った。染色したゲルを室温でdH<sub>2</sub>Oに保存した。

20

30

#### 【 0 0 8 4 】

##### ウェスタンブロットティング

最初の10のサンプル由来の希釈した血清サンプル(dH<sub>2</sub>O中1:10)の等量(50  $\mu\text{g}$ )を、ゲル泳動緩衝液を用いて1:1に希釈し、95 で7分間加熱して変性させた。サンプルを、5-20%のアクリルアミドSDS-PAGEゲルで泳動させて、2.5時間ゲルあたり35 mAで電気泳動により分離した。次いで、ゲルのタンパク質を、40 mAで一晩ブロットティングしてニトロセロース膜に移した。該膜を、TBS-T(10mM Tris.HCl (pH 7.5)、150mM 塩化ナトリウム(Fisher Scientific)、0.05 % (v/v) Tween-20 (Sigma))中で5 % w/v スキムミルク(Marvel, Premier International Foods (UK) Ltd, Lincs, U.K.)を用いてブロッキングし、補体成分C4 鎖 (Santa Cruz, Heidelberg, Germany)に対して生じたポリクローナル一次抗体、続いてホースラディッシュ ペルオキシダーゼ結合二次抗体(Dako, Ely, Cambs, U.K.)でブローブした。抗体結合を、ECL検出キット(Amersham Biosciences)を用いて化学発光により検出した。

40

#### 【 0 0 8 5 】

RP-SPE およびSDS PAGE

50

### 血清画分

6つのPCOSおよび6つのコントロールサンプルの血清分画化を、逆相モード(RP)で大きな孔の(1000 )ポリスチレンジビニルベンゼン(PDVB)樹脂(International Sorbent Technologies, mid-Glamorgan, U.K.)(25 mg)を用いる固相抽出(SPE)を用いて行った。質量分析グレードの移動相(Riedel de Haean, Sigma)を、1mL/分程度の流速にて、適合真空を用いて、容積調節されている送出組成物(1mL)と共に流す。樹脂を、70% v/v アセトニトリル(MeCN, Sigma)、0.1% v/v トリフルオロ酢酸(TFA, Sigma)を用いて溶媒和させ、0.1% TFA水溶液を用いて平衡にした。年齢-BMIが対応するPCOS-コントロール対由来の血清サンプル(100  $\mu$ lは $\sim$ 7mg 全タンパク質に該当する)を固相カラムに重層した。サンプルタンパク質の結合は、分子の疎水性に依存する(Badock et al., 2001)。次いで、カラムを、0.1% v/v TFAで洗浄し、保持成分を、5~100% v/vにMeCN 組成物の段階的增加により複数の画分に溶出した。該溶出物は、電子スプレーまたはMALDI-TOF質量分析による分析に直接適用できるが、この例では電気泳動分析の後に遠心真空蒸発により乾燥させ(BETA-RVC, Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany)、室温で3時間、ゲル泳動緩衝液[0.15M Tris.HCl (pH 6.8), 8M 尿素, 2.5% w/v SDS, 20% v/v グリセロール, 10% v/v 2-メルカプトエタノール(Sigma), 3% w/v DTT, 0.1%w/v プロモフェノールブルー(Sigma)](100  $\mu$ l)に再懸濁させた。サンプルをゲル泳動用緩衝液中に-20 で貯蔵した。

10

### 【0086】

#### SDS-PAGE

ゲル泳動緩衝液中の各血清サンプル画分の等量(5  $\mu$ l)を、95 で7分間加熱して変性させた。サンプルを、予め成型された4-12%アクリルアミドビス-トリスSDS-PAGEゲル(Invitrogen)上に重層し、ゲルあたり200 mAにて2.5時間、3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS Invitrogen)における電気泳動により分離した。ゲル中のタンパク質を、2.5時間、濾過済コマジー・ブルー(50% v/v メタノール (Fisher Scientific)、20% v/v 酢酸 (Fisher Scientific)、0.12% w/v プリリアントブルーR250 (Sigma))を用いて染色し、次いで10% v/v 酢酸/10% v/v メタノール溶液中で所望の強度まで脱色した。染色したゲルのイメージングを、Agfa Fotolook v3.0 および a Duoscan T1200 flatbed scannerを用いて行い、続いて較正デンシトメトリー定量を行った(Gene Tools Quantification, SynGene)。染色したゲルを室温でdH<sub>2</sub>Oに保存した。

20

30

### 【0087】

#### ペプチドの質量フィンガープリントおよびデータベース探索

コントロールと比較した場合にPCOSサンプル中の有意に異なる発現プロファイルを有する個々のスポットを、染色したゲルから切出し、脱色した。タンパク質を、ゲル内でトリプシン消化し、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化時間飛行型質量分析(MALDI-TOF MS)に供し、ペプチドの質量フィンガープリントを得た。トリプシンペプチドイオンの単一同位体の m/z 値を、Aldente software (<http://www.expasy.org/tools/aldente/>)に提出し、the Human Swiss-Prot およびTrEMBLデータベースにて探索し、タンパク質を同定できた。

### 【0088】

#### 統計分析

コントロールおよびPCOS群間の差違を、対応のあるサンプルの学生t検定を用いて評価した。両側p値 $\leq$ 0.05を、統計学的に有意とみなした。

40

### 【0089】

#### MALDI 質量分光分析

##### サンプル調製

##### タンパク質およびペプチド分析

サンプル調製物のランダム化を、サンプルの取扱い前に行い、11個のPCOSおよび10個のコントロール血清サンプルの全セットの分析を行った。0.1% TFAを用いて10分の1希釈した血清の同一アリコートを用いて、タンパク質およびトリプシンペプチド分析に用いた。希釈し

50

た血清(25  $\mu$ l)は、the Xcise robotic system (Proteome Systems, Shimadzu, UK)を用いて製造者指示書に従って分画したC<sub>18</sub> ZipTipであって、該溶出タンパク質/ペプチドを、ロボット・システム(robotic system)によりMALDI-TOF MS 標的プレート上にSA (10 mg/ml)と共にスポットした。残留溶出物をトリプシン消化へとすすめた。要するに、分画した血清サンプルを、重炭酸アンモニウム(100mM 16.6  $\mu$ L)、水(7.6  $\mu$ L)およびトリプシン(0.5  $\mu$ g/ $\mu$ Lの1.3  $\mu$ L)と併せて、37 °Cで一晩インキュベートした。該反応を停止させ、該サンプルを製造者指示書に従ってC<sub>18</sub> ZipTipを用いて清浄にし、CHCA (50% ACN + 0.1% TFA, LaserBio Labs, Cedex, France中の10mg/ml 溶液)と共にドライドロップレット法を用いてMALDI標的上にスポットした。標的プレートを、タンパク質についてはラスターオプシオンを用いるリニアモードおよびトリプシンペプチドについてはリフレクトロンおよびオートクオリティモードにて、AXIMA-CFR+ MALDI-TOF MS (Shimadzu, Manchester, UK)を用いて分析した。牛血清アルブミン(BSA)コントロールを用いて、消化手順の効率を確かめ、0.1% TFA ブランクを用いて試薬およびプレート由来の汚染がないことを確かめた。近似外部較正(close external calibration)を、ペプチド(Laser Biolabs, Cedex, France)に対してタンパク質較正 Proteomix3 およびProteomix2を用いて行った。

10

## 【0090】

得られる質量スペクトルを、視覚的に全て試験し、拒絶された異常値(ノイズに対して弱いシグナルを有する)を、バイオインフォマティクス処理を行う前にデータセットから除いた。

20

## 【0091】

ANN(人工神経回路網)分析

データ処理：MALDI-MSから得られた粗質量スペクトルデータ(m/z, 強度)をASCIIファイルとして保存し、目的とする質量範囲(m/z 1000-25000)について平滑化し、端数処理した(rounded)質量および強度を得た。その後、これらの強度値を、ANNモデルに対する入力データとして用いて、Statistica 7.0 (Stat Soft Inc. Tulsa, USA)を用いて作成した。この作成したモデルを用いて、2つの出力クラス:コントロール(1)またはPCOS(2)のうちの1つに対する各サンプルの構成因子を予測した。

## 【0092】

モデル構築：モデル構築およびネットワークパラメーターはLancashire et al (2005) Bioinformatics 21(10):2191-9に記載されている。トレーニングの前に、サンプルをランダムに3つのサブセットに分けた：トレーニング(60%、n= 14)、試験(20%、n = 5)および検証(20%、n = 5)。トレーニングを、各時点でのブラインドデータに対してこのモデルを独立して評価するために使用した検証サブセットと共に、50のランダムに抽出したデータ分割を用いて行い、過剰適合が生じなかったことを保証した。感受性分析を行い、分類性能に関するモデルシステムに対して最大の影響を示すその入力値を同定した。次いで、これらの入力値をさらなるトレーニングに供した。これは、クラス鑑別のためのバイオマーカーの最適なサブセットの同定を可能にする段階的方法を用いることを包含する。データの独立した検証セットに対する3工程(至適サブセットに対するイオン付加)についてさらなる有意な改善がなかった場合に、この手順を中止した(p = <0.001)。

30

## 【0093】

結果

この試験で分析した21人の女性は同じ病院の診療所から募集されており、Rotterdam基準を用いてPCOSまたはコントロールとして定義された。コントロールおよびPCOS群の両方には違いがあるが、年齢およびBMI範囲は同じように対応した。PCOS罹患女性についての生体、臨床的および生化学的プロファイルは、文献にあるPCOS対象に対する現行のコンセンサスと一致していた。表1は、5人のコントロール対象と比較して、5人のPCOS罹患女性のサンプル対において、SHBGの低い平均レベルと共に、上昇した多毛症平均スコア、テストステロンレベル、遊離アンドロゲン指数(FAI)およびLH/FSH比率を示す。また、該コンセンサスと一致して、この試験におけるPCOS女性は、平均して、コントロール女性と比較して、卵胞数が高く、卵巣体積が増加していた。しかしながら、各群内で個体間の変動性

40

50

は大きく、これは正常女性およびPCOS女性の両方で表現型集団の変動性を反映する。唯一の有意差 ( $P < 0.05$ ) は、SHBGレベルで見られ、これはコントロールの女性よりもPCOS女性において有意に低く、またFAIレベルはPCOS女性において増加していたことが判った。しかし、同一診療所からのより大きな対象コホート(11人のPCOSおよび10人のコントロール)を調査した場合には(データ示していない)、増加した、テストステロンレベル、LH/FSH比率、多毛症スコア、卵胞数および卵巣体積について有意差が見られた。

【0094】

表 1

RP-SPE試験で使用した2つの試験群において、デモグラフィック、身体計測、生物化学的および生殖パラメーター

【表 1】

	PCOS (n=5)	コントロール (n=5)	群間の P 値
年齢(y)	25.2 ± 6.3=0	26.4 ± 5.9	0.75
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31.6 ± 7.34	26.4 ± 5.5	0.24
WHR	0.83 ± 0.07	0.89 ± 0.24	0.61
過小排卵/無排卵 (%)	100	0	-
多毛症(F-Gスコア)	9.8 ± 7	6.2 ± 5.2	0.39
全 T (nmol/L)	2.38 ± 0.63	1.76 ± 0.39	0.1
SHBG (nmol/L)	21.2 ± 9.28	66.2 ± 28.4	0.009*
FAI	13.1 ± 6	3.4 ± 2.28	0.009*
LH/FSH 比	1.77 ± 0.66	1.28 ± 0.50	0.23
卵胞右卵巣	22.75 ± 10.2	11.4 ± 6.14	0.07
右卵巣体積	9.4 ± 4.0	9.2 ± 2.8	0.95
卵胞左卵巣	18.75 ± 4.3	9.8 ± 3.96	0.01*
左卵巣体積	7.8 ± 1.6	3.62 ± 1.14	0.003*

注：PCOS - 多嚢胞性卵巣症候群；BMI = ボディマス指数；WHR = ウエスト(cm)/ヒップ(cm)割合；F-G = Ferriman & Gallwey；T = テルトステロン；SHBG = 性ホルモン結合グロブリン；FAI = 遊離アンドロゲンインデックス；LH = 黄体形成ホルモン(IU/L)；FSH = 卵胞刺激ホルモン (IU/L)。

・ = PCOSおよびコントロール群間の統計学的有意差

・ 一人のコントロール女性は、14のFerriman Galweyスコアを示したが、コントロールと一致した規則的な月経周期および超音波の特徴を有した。相違するコントロールは、正常なアンドロゲンおよび規則的な月経周期を持つが、卵巣超音波にて増加した卵胞を抽出していた。

【0095】

この試験中、コントロール対象(C4)の一人が、Rotterdam(2004)基準のいくらかを用いてと、PCOSのボーダーラインにある状態を示したことに注目した。従って、このC4コントロールおよび対応するPCOSの対を、殆どの試験から排除した。2DE試験の後に行った逆相モード-固相抽出試験(RP-SPE)のために、排除した対を、一人のPCOS対象および一人の明確なコントロールから構成する新たな対に置き換えた。

【図面の簡単な説明】

【0096】

【図 1】図1は、PCOS対象と対応コントロール対象との間のタンパク質レベルの変化を示す2次元ゲル電気泳動の結果を示す。上部10個のイメージは、銀染色した2Dゲルであって、ゲル中の目的とするタンパク質スポットが丸く印付けられており、PCOS対象とコントロ

10

20

30

40

50

ールの年齢/BMIが対応した対象との間のタンパク質のレベルにおける差が判り得る。下部の5つのイメージは、DELTA 2D image Analysis softwareを用いて作成したもので、比色分析表示にて同一タンパク質スポットを示している対応するゲルの対のイメージを重ね合わせたものである。発色は見られないが、この観察したスポットが、PCOS対象にのみ生じることを示すオレンジに着色したイメージを重ね合わせた5つのうち4つゲルの対に現れたことをこの結果が示している。スポットをその後C4<sub>3c</sub>と同定した。

【図2】図2は、年齢・体重が対応したPCOS対象・コントロール対象のゲルの対のC4<sub>3c</sub>スポットの強度の定量分析を示す。データを、DELTA 2D image analysis softwareを用いて計算した。

【図3】図3は、未知C4<sub>4c</sub>ペプチド配列に対して生じた抗体を用いて10個の血清枯湯サンプルのウェスタンブロット分析を示す。図3Aは、前記2DE試験で使用した同一サンプル対からの全血清のウェスタンブロット分析を示す。このブロットを、C4鎖内のエピトープに対して生じたポリクローナル抗C4抗体によりプローブした。示された~24kDaバンドは、C4<sub>4c</sub>フラグメントを示す。図3Bは、SynGene Gene Tools densitometry softwareを用いて決定した図3Aのバンド強度の定量分析を示す。\* P= 0.03。

【図4】図4は、補体成分C4タンパク質に関する一次構造の図表示を示す。C4前駆体および多くのその開裂フラグメントが示されている。C4タンパク質は3つの鎖から構成されることが示され、これは1つのC4前駆体から全て開裂され得、タンパク質の機能的構造を形成するようにフォールディングされ得る。開裂したC4aフラグメントが放出され、アナフィラトキシンとして作用する場合、この鎖は活性な要素である。C4bフラグメントは、C2と共に複合体を形成して、古典的な補体経路の酵素的カスケードを継続させ、オプソニンとしても作用し得る。C4bは、後にC4<sub>3c</sub>、C4<sub>d</sub>およびC4<sub>4c</sub>フラグメントへと開裂され、これが補体カスケードを不活性化させる(Nagasawa et al., (1980) J Immunol 125(2): 578-82 およびHessing, (1991) Biochem J 277:581-92に基づく)。注：† PCOSサンプルにおいて上方調節されているものとして2DE分析で同定したC4<sub>3c</sub>フラグメント。‡ PCOSにおいて上方調節されることがウェスタンブロットにより示されたC4<sub>4c</sub>フラグメント。\* PCOSにおいて下方調節されているものとしてRP-SPE画分のSDS PAGE分析で同定されたC4鎖。

【図5】図5はPCOSと対応するコントロールとの間の差を示すRP-SPE分析を示す。図5Aは、5/6コントロールサンプル中に存在する~33kDaバンド、および画分12のみに対して3/6のPCOSサンプル中で非常に低いレベルを示している。画分4および5にて類似した大きさのバンドが存在する可能性があるが、これは異なるタンパク質の種類であると考えられる。図5Bは、コントロールサンプル中に存在するよりも増加したレベルにて、全PCOSサンプル中に存在する~40kDaバンドを示す。この差は、画分8-12中で最も顕著であった。図5Cは、5/6PCOSサンプルおよび唯一2/6コントロールサンプル中に存在する~17kDaバンドを示す。

【図6】図6は、PCOSおよび対応コントロールとの間の差を示す定量的なRP-SPE分析を示す。図6Aは、RP-SPEで見られた~40kDaバンドのデンシメトリーによる定量的結果を示す(図5B)。P=0.001。図6Bは、RP-SPE(図5C)で見られた~17kDaバンドのデンシメトリーによる定量的結果を示す。

【図7】図7は、代表的なMALDI-TOF質量スペクトルを示す：図7Aは、トリプシンの消化後の血清ペプチドであり、図7BはPCOS対象およびコントロールの血清由来のC<sub>18</sub>ZipTipクリーン・アップ後のタンパク質である。このスペクトルはPCOS血清およびコントロール血清との間に観察された差を示す。図7Cは、3つのイオンモデルに基づいたトリプシンペプチドプロファイルを評価するためのANNの予測能力を示し、図7Dは、6つのイオンANNモデルに基づいたタンパク質プロファイルを示す。灰色の棒線はコントロールサンプルを示し、黒色の棒線はPCOSサンプルを示す。1.5以下の予測値はコントロールサンプルを示すが、1.5以上の予測値はPCOSサンプルを示す。

【図8】図8(配列番号:1)は、アイソフォームAのC4前駆体タンパク質のタンパク質配列である。より具体的には、アミノ酸20~675は、C4開裂フラグメントであり、アミノ酸680

10

20

30

40

50

~1446はC4 開裂フラグメントであり、アミノ酸680~756はC4aアナフィラトキシン開裂フラグメントであり、アミノ酸757~1446はC4b開裂フラグメントであり、アミノ酸757~956はC4<sub>3c</sub>開裂フラグメントであり、アミノ酸957~1333はC4<sub>d</sub>開裂フラグメントであり、アミノ酸1334~1446はC4<sub>4c</sub>開裂フラグメントであり、アミノ酸1454~1744はC4 開裂フラグメントである。

【図9】図9(配列番号:2)は、アイソフォームBのC4前駆体タンパク質のタンパク質配列である。アイソフォームAとのアミノ酸の差違に下線を引いた。

【図10】図10(配列番号:3)は、ハプトグロビンのタンパク質配列である。アミノ酸19~161はハプトグロビン<sub>1</sub>であり、アミノ酸162~406はハプトグロビン<sub>2</sub>である。

#### 【実施例1】

##### 【0097】

実施例1 - PCOSに対するバイオマーカーとしてのC4<sub>3C</sub>

2D SDS PAGE 分離を、5人のPCOSおよび5人のコントロール血清枯渇サンプルの最初のコホートで行い、この結果を図1に示した。染色したゲルを比較した場合に、1つのタンパク質スポットが、C1コントロールサンプルゲルのみならず、全てのPCOSサンプルゲル中にも視覚的に存在していることに注目した(図1)。

##### 【0098】

このタンパク質の関連性を、重ね合わせたイメージにおいて均等に発現したスポットが黒色に見えるように、コントロールゲルスポットを青色として、およびPCOSゲルスポットをオレンジ色として擬似染色する対応するゲルの対の均等な重ね合わせたイメージを作成したDELTA 2D イメージ分析ソフトウェアを用いて確認した。分析した大部分のゲル面積において、スポットパターンは同一かつ黒色であった。しかし、図5において円で囲んだスポット(下部の5つのイメージ)は、複数のPCOSサンプルおよび1つのコントロールサンプル(C1)にのみ見出された。

##### 【0099】

次いで、イメージ分析ソフトウェアを使用して、分析したゲル面積についての全スポット量の%としてのスポット量を定量し、こうして全てのゲルを直接比較することが出来た。これは視覚評価で確認した。図2は、定量化をグラフ形態にて示した。最大の示差発現がC2-P3サンプル対で見られ、C2と比較して、P3ゲル中のスポット強度は~10倍まで増加していた。平均定量値により、4倍にコントロールサンプルよりもPCOSサンプルにおけるスポット強度の全体的な上方調節が明らかとなった。

##### 【0100】

タンパク質同定

上方調節されたタンパク質スポット(図1)を、P1、P3、P4およびP5サンプルゲルから切り出して、プールし、トリプシン消化し、この抽出ペプチドをMALDI-TOF MSにより分析した。

##### 【0101】

得られる13のペプチドイオンは、Human Swiss-Prot および TrEMBL データベースに対して探索した場合に、15.2%のC4<sub>3c</sub>ペプチド配列をカバーしている5つの対応するペプチドイオンと、補体成分-4(Swiss-Prot アクセション番号P01028)、鎖、cフラグメント(C4<sub>3c</sub>)に関して一定の対応があった。C4<sub>3c</sub>配列の予測MWおよびpIは、ExPASy 一次構造分析ソフトウェアを用いて計算したように、各々32.9 kDa および5.1 kDaであった。これは、ゲル(~35 kDa、pI ~7.0)においてスポット位置と適切に対応する。

#### 【実施例2】

##### 【0102】

実施例2-PCOSに対するバイオマーカーとしてのC4<sub>4C</sub>

PCOSおよびコントロール対象由来サンプルのウェスタンブロット分析は、C4派生タンパク質の示差発現を示す。PCOSおよびコントロールサンプル由来の全血清を、補体C4前駆体タンパク質の<sub>d</sub>および<sub>4c</sub>フラグメントに対して生じたポリクローナル抗体でプローブした(図3)。<sub>4c</sub>フラグメント、即ちC4b分解産物の一つ、を示す~24 kDaでの得られるバ

10

20

30

40

50

ンドは、全てのサンプル(図 3A)に存在したが、バンド強度(図 3B)のデンストメトリック分析から、コントロールと比較して、PCOSサンプル中では強度が有意に高い( $P = 0.03$ )ことが明らかとなった。年齢-BMIが対応する対において、バンドの強度は、5つの対の内の4つの対で高かった。コントロールサンプルバンドがPCOSサンプルバンド(C4-P1)よりもより高い強度であった対は、PCOSのボーダーラインにあったコントロールサンプルに関係すると考えられるため、これは例外として説明する。C4<sub>3c</sub>フラグメントに特異的な抗体を調達することは出来ないが、C4<sub>4c</sub>の増加は、C4<sub>3c</sub>およびC4<sub>4c</sub>を生成するC4bポリペプチド(図 4)のタンパク質分解の指標である。

### 【実施例 3】

#### 【0103】

10

実施例 3 - PCOSに対するバイオマーカーとしてのC4 およびハプトグロビン および鎖

6つのPCOSおよび6つのコントロール対象由来のサンプルを分析したものが、RP-SPE/SDS-PAGEである。サンプルは、5つの前記BMIおよび年齢の対応したPCOSおよびコントロール対象対および別のPCOSおよびコントロール対由来のものであった。対象由来の血清サンプルのアリコート、逆相固相カラムおよびMeCN濃度を増加させる段階的濃度勾配による連続溶出を用いて前分画した。次いで、各溶出画分に対して得られる12のサンプルを、特定のアセトニトリル濃度にて12の血清サンプル全てを提示しているゲルである、SDS PAGEゲル上に並べて泳動させ、コマジープルーにより染色した。これにより、比較されるべき各画分のタンパク質組成物を、年齢/BMIが一致する血清サンプルの全ての対にわたり比較出来る。上記に概説した理由から、PCOS-コントロール対(P1およびC4)から得たデータは、定量的データ分析には考慮に入れなかった。

20

#### 【0104】

染色したゲルの視覚分析は、PCOSおよびコントロールサンプル(図 5A、5Bおよび5C)間のバンドパターンにおいて3つの明らかな差を示した。70% MeCN 画分中で検出された(図5A)第一の差は、全てのコントロールサンプル中に存在するが、5つのPCOSサンプル内の唯一つのサンプル中において少量の存在量にて観察された、~33kDaの成分に関するものである。低いシグナル強度のために、これらの成分のデンストメトリック定量は出来なかった。

#### 【0105】

30

2つのサンプル群間の第二の差は、42-70% MeCN 画分(図 5B)において全てのサンプル中に~40kDaにて存在する成分の一つの存在量の変化であり、これは6つの連続溶出画分中、コントロールサンプルと比べて全てのPCOSサンプルにて増加した。PCOS血清中の潜在的タンパク質の上方調節のさらなる例示は、10-20% MeCN 画分において最も顕著ではあるが、ゲル分析にわたって見出された。この場合において、~17kDaでの成分は、4つのPCOSサンプルおよび2つのコントロールサンプルのみに存在した(図 5C)。図5Bおよび5Cにおけるこれらの2つの変化についてのデンストメトリック定量を、0.001の有意値を有する~40kDaでの示差発現(図 6A)と共に、図6Aおよび6Bに図示する。

#### 【0106】

40

示差的に発現したタンパク質の同定

RP-SPE/SDS PAGE 分析で同定した示差バンドを切り出して、回収して、トリプシン処理し、MALDI-TOF MSを用いて分析した。測定したペプチドイオンおよび得られた配列を用いるスイス・プロットおよびTrEMBL データベースの調査から、全ての3つの観察された差違についての一致の可能性を同定した。70% MeCN 画分ゲルから抽出した~33 kDaバンド(図 5B)は、補体成分C4 鎖の6つのペプチドイオンの特徴をもたらし、タンデム MS/MS プロダクトイオン分析からこの一致を確認した。C4 鎖のこの予測MWは、ExPASy 一次構造分析ソフトウェアを用いて計算したように、~33.5 kDaであり、SDS PAGEの後に観察されたバンド位置と十分に一致している。

#### 【0107】

42% MeCN 分画ゲルから抽出した~40 kDaバンド(図5Bおよび6A)は、ハプトグロビン

50

鎖に特徴的な3つのペプチドイオンを与え、その後このうちの2つを、タンデムLC-MS/MSプロダクトイオン分析により分析して、この一致を確認した。さらなる3つのペプチドイオンは、ハプトグロビン前駆体タンパク質の領域と一致した。20% MeCN 画分ゲルから抽出した~17 kDaバンド(図5Cおよび6B)は、ハプトグロビン鎖に特徴的な6つのペプチドイオンを与えた。ハプトグロビン鎖配列について理論配列から得られた分子量は、15.9 kDaであり、これはSDS PAGE後に観察した分子量とかなり対応しており、また鎖配列については27.3 kDaであり、該前駆体は43.6kDaの分子量を持っており、これはRP-SPE分析において観察された~40 kDaバンドに良好に一致している。RP-SPEカラムからの複数画分中のこれらのバンドの存在から、タンパク質が示差修飾され(例えば、グリコシル化により)、そのためカラムマトリックスに対して様々な親和性を示し得ることが示唆される。

10

**【実施例4】****【0108】**

実施例4-PCOSについてのMALDI-MS血清タンパク質/ペプチドのバイオマーカーの特徴  
この分析を、11人のPCOS対象および10人のコントロール由来の、21人の血清サンプルに対して行った。

**【0109】**

罹患していない個人と比較して、PCOSにおける最も傑出したスペクトルの識別パターンを、図7Aおよび7B各々に例示した。しかし、両方のタンパク質およびトリプシンペプチドについて全データ対を調査するために、包括的なバイオインフォマティックANN分析を行った。

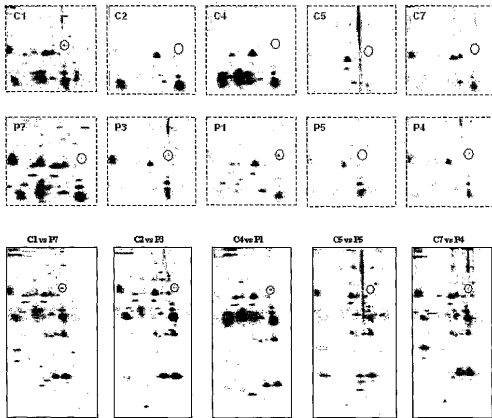
20

**【0110】**

ANN分析から、タンパク質およびペプチドデータ対各々について3つのおよび6つのバイオマーカーイオンの至適サブセットを同定した。6つのイオン(m/z 8674、8668、1351、8727、8673および6871)により、0.5の閾値にて、それらがコントロールまたはPCOSであるかどうかに基づいて、90.4%のサンプルの独立した検証セットを正しく分類した(図7C)。消化したペプチドデータから同定したこの3つのバイオマーカーイオン(2924、3025および1977)は、サンプルの独立検証サブセットを100%の精度に成功裏に分類した(図7D)

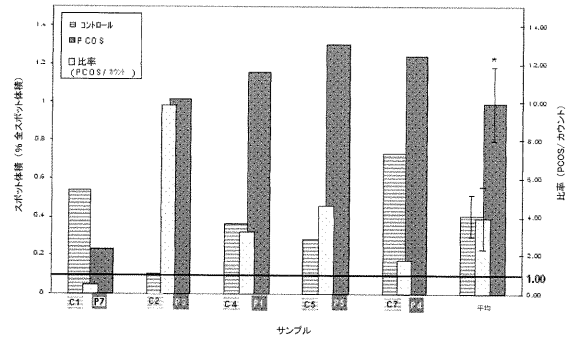
【 図 1 】

Figure 1



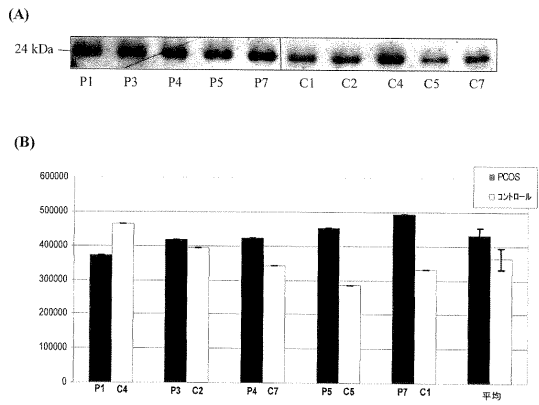
【 図 2 】

Figure 2



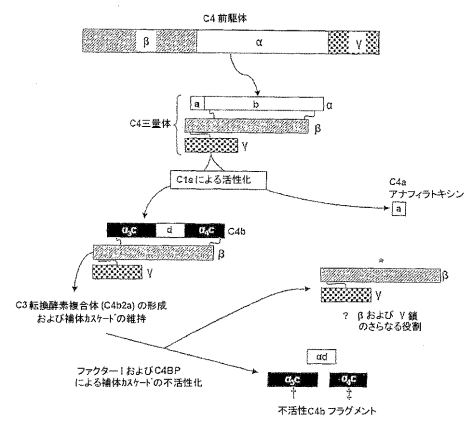
【 図 3 】

Figure 3



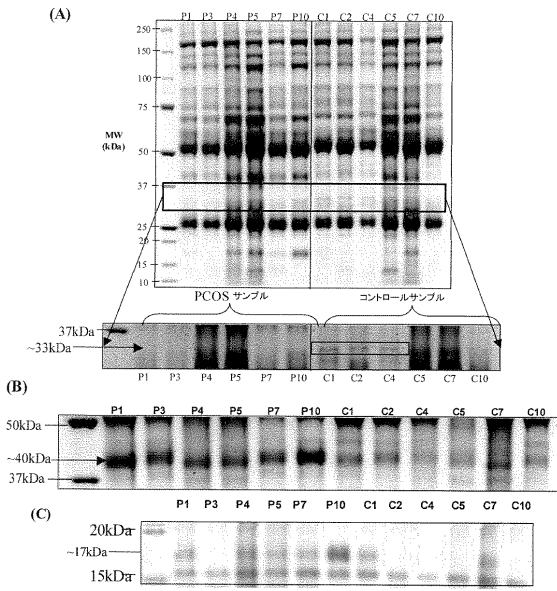
【 図 4 】

Figure 4



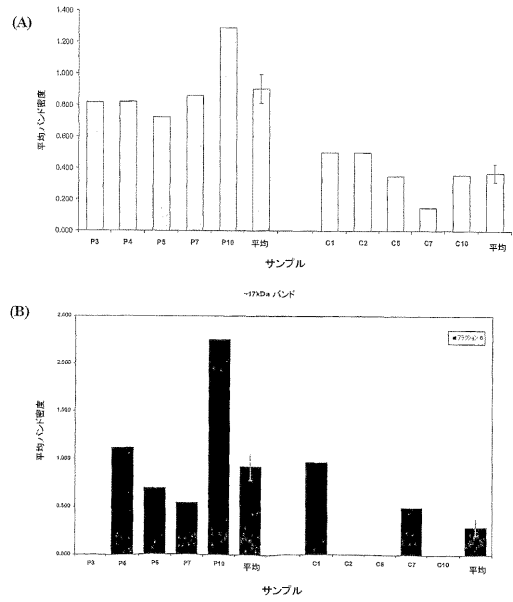
【 図 5 】

Figure 5



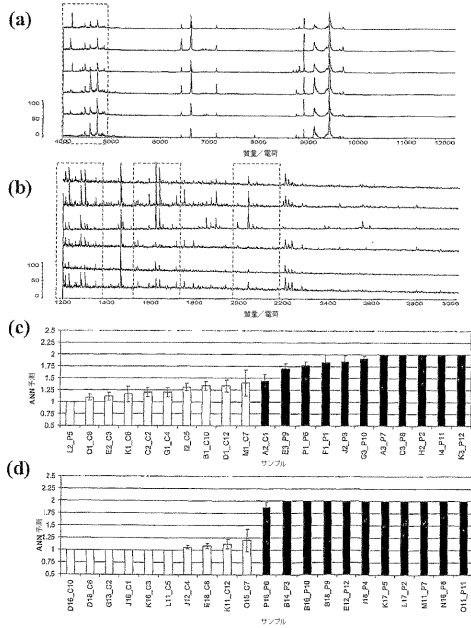
【 図 6 】

Figure 6



【 図 7 】

Figure 7



【 図 8 】

1 mxllwqlwa ssfttllsqk prlllfepov vhlgvplsvq vqlqdvprsq vvkgsvflrn  
61 psnrvpcsp kvdfllsser dfallalqvp lkdkakscglh qlirgpevql vanapwkds  
121 lerttniqgi nllfsszrgh lflgtqdqiy ngyqrvryrv faldkmpzs tdtitvmen  
181 shglrvrke vmpseifqd dfvipdisep gtwkisarfs dglesnstrq fevkiyvipa  
241 fevkitpqp ylltvgphld emqldiqary iyqkpvqva yzrfllled gkttffrgla  
301 sqtklvngq hislksaefq dsleklmgi tdlqgriyv aasiespgg emeaelstw  
361 yfsspsfld lsktknhlp qaplllqalv reasgspsaq spvkvestvs pgspspevdq  
421 lqntdqsqg vsplilpqt lseqlvsea gsphsaisrl tvaapsqgp gflslerpds  
481 rprvrgdin lnkravsga tshyymil arqvifmnr epkrtitavs vfvdhilaps  
541 fyrvfvybg dhpvanalrv dvqgsacagk lelsvdgagk yrngesvklh letdsalva  
601 lgaltdalya apakabkpln mpkvrsems yldgcpqppg dsalqvfgaa glafsdgqg  
661 tlerklsacp kektttkrn vnfkainek lqgyasptak rrcqgdvtrl ymrsecegra  
721 arvqpdrcr pflscqgfae slrktardq qeqlralei lqeedlidd dipvrefpfe  
781 nmlrvetrd rfglltlwlp dalttweihg lnlkktkalc vaipqrvf rafhhlrlp  
841 msvrfeqle lrvlynyld kltvsvhvs pveqlclagq gllagqvrv agsarvafe  
901 vprtsaavs lrvrarvafe frvgdvavk lqlekegaih zmlvylmp ldirgr lsei  
961 pmsdpmip dgdfnayrv taspldlq segalpgpvg aalllprqg qactmlylp  
1021 tlaaxyidk teqvslpse tkhdawdic kymiqqfr kedsyawl andsvbta  
1081 fvklvlsah eqvgspsakl qetsmlieq qqdgsfqdp qvldrsnag glvndvta  
1141 ltarvtiah bglavfdqg seplqvrea slskensrlg ekasagllga haasitayal  
1201 sltkapdlil gvahmlmam aqutgdnylv gvtvqegna vepvpaenp sdmpagpal  
1261 wiettayall hlllhagkaa madqasewlt rqsifgyfr stqdviald alsyvlash  
1321 tteerglntv lsozgrgfk shalqimrq lrgleeeiqf sigskinvk gmskgtklv  
1381 lrtvvlomk nttocdqle vtvkghvntf meanedeyf eydeipakd psdplqvpt  
1441 lqifegrrn rraepkvra eqesrvhvt ciwrngvqg sgmasdvil lsgfnalrad  
1501 lekltalsdr yvshfetsg hvlyfidsv tarecvqfae vqovqrvlp psatlydyd  
1561 nprrcavfy gepkrlle tlcesevcq ceqkcpqrz alerqlded gyzmkfacy  
1621 prveygfyk vlreksran flfektltq lhtkdvkaa angarnlrv asclrlsqg  
1681 keylingld atydlqhpq ylldenswie empserlcrs trqascaql ndflqeygtq  
1741 gcqv

Figure 8

【 図 9 】

```

1  mrlhwglwa asfftleslk prllfispav vhlqvpisav vqlqdvpcq vvkgevlrn
61  psrnnvpcap kvdfllsax dfallslqvp lkdkkacqgh qlrqppevql vahspwkde
121 lzsttniqgi nilfseazgh jflqddqpiy nngqzrvyrv faldqmrps tdtitvaven
181 shglrvrkkc vmpseifqd drvdpdaep gtwkksarfa dglseansq fevkkvypm
241 fevkitppkp ylltvpghld emqldiqay lygkpvqava yvrflided gkkfffgle
301 sqtklvngqs hialekaefq dalekinmji tdlqqlrlyv aaaiespqg emeaeltav
361 yfwspsfald lektkrlhvp gapfllqelv remsgaeag ipvksaatva spysvpevqd
421 lqntdsqgc vspilipqt iselqlsava gspkpaial twasppsgpp gflsierpda
481 rppvsgdtln lntvavsga tfsyymal scqqlvfmmr epkrtlsvs vfvdbhlaps
541 fyfvefyng dhpvanslr dvqgecegk leiswdgak yrngesvkih ledelalva
601 lgaltdalya agskshkpln mgkvfeams ydlcogppgg dsolqvfqae qlafsdqgw
661 tlaekrlapc kektrkrkn vnfkainek lqyasptak rccqgvtrl pmrscsqra
721 arwqgdrcr pflsccqfae alrkardkq csglqralci lqsedlided diprvsffe
781 mdkrvetvd ufqlltlwp dslltwehng lelektkqlc vatpvlrvf rafhhlrlp
841 msvrfeagle lrpvlynyld knltsvhvs pveglclogu gslagvlyv agsarpafe
901 vvpseasavs lkovergsrv fpvgdavekv lqlekegaih reelyelnp ldhrgtlee
961 pgsndpmmp dgdfnsyrv tasqldidig segalpvgv aslllpqg geqtstlyap
1021 tlaasryldk toqestlpe tkdhavdlq kymrqgfr kadgesawl rrdstelta
1081 rvlkvialag eqvgspskl qstemsllq qqsdgsqdl gpbhramq qlvmdetva
1141 ltafvialh hplavfdeg seplkqvra siskansflg okaseqllga hesaltayal
1201 sltkaprdll gvahnlmam eqetdmlvy gsvtsgsna vspbprrp rdpmpopal
1261 wietayall hllhbgkae madgsamlt rgsfgggfr stqvtiald alsayelash
1321 tteerslnvt lestrngfk shalclmrq ingleselqf slgskinvk ggnakqtkv
1381 lrtynldmk nttcqlgie vtvkghvvt meanedvedy eydeipakdd pdaplpvtp
1441 lqlferrnr rrcapkrve eqesrhyvt ciwmgkvl gmaladvtl lagchalrad
1501 leklteladr vshfetaq hvlyfdvvp tscecvfca vqevpqlv pesatlydy
1561 npekrvfy qpskarlla ltaawecq acgkpxrrr aleqlqded gysmkfacyy
1621 prvayqfuk vloedraaf rlfetkitcv lhfkdkvka anpamflvr ascrizlep
1681 keylimldg stydlehpq yildsawie ampaeclre trqaeacql ndflqeygtq
1741 gqgv

```

Figure 9

【 図 10 】

```

1  maalgvial llvqglfvd ognrvtdiad dgpkkpefa hgyvehvry cknnyklrt
61  egdyvylnd kqvwinkewg dhlpecsadd gpkkpeish gyvehvry cknnyklrt
121 gdyvylcne kwvinkewd kipeceavq gpmagvqy rllqghldak gspwqekwv
181 shmlttgat llineqlltt sknflnhse natkdiapt llyvgkql velskvlnp
241 nyagvdlgll kikkvonne xvmpclpex dyavevrvvy vsagvrsnaf kfdhllkym
301 lpsadqgqci rhyegatvpe kltppapgv qllsehtfc gmskyqadt cygdsgsfa
361 vhdloedwy atgillsfks cavaeyvvyv kvtsiqdhwv ktlaen

```

Figure 10

【 配 列 表 】

2010507093000001.xml

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 21 年 6 月 15 日 (2009.6.15)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 配 列 表

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 配 列 表 】

2010507093000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/GB2007/003913
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50		
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 practical, search terms used) EPO-Internal; BIOSIS; WPI Data; EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HUGHES CATHERINE ET AL: "Genomic and post-genomic approaches to polycystic ovary syndrome - progress so far: Mini Review" 26 August 2006 (2006-08-26), HUMAN REPRODUCTION (OXFORD), VOL. 21, NR. 11, PAGE(S) 2766-2775, XP002463462 ISSN: 0268-1161 page 2771, right-hand column, paragraph 1 page 2772, left-hand column, paragraph 2 page 2772, right-hand column page 2773, left-hand column, paragraph 2  -/-	1,2, 4-13,15, 16, 18-22, 27,29-33
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 document 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  17 January 2008		Date of mailing of the international search report  28/05/2008
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Hoff, Céline

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No  
 PCT/GB2007/003913

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; 18 August 2005 (2005-08-18), ZHAO SHU-YUN ET AL: "[Protein expression profilings of polycystic ovary syndrome]" XP002463463 Database accession no. NLM16086052 abstract & BEIJING DA XUE XUE BAO. YI XUE BAN = JOURNAL OF PEKING UNIVERSITY. HEALTH SCIENCES 18 AUG 2005, vol. 37, no. 4, 18 August 2005 (2005-08-18), pages 362-365, ISSN: 1671-167X	1,2, 4-13,15, 16, 18-22, 27,29-33
A	WOOD JENNIFER R ET AL: "The molecular phenotype of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells and new candidate PCOS genes defined by microarray analysis." 18 July 2003 (2003-07-18), THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 18 JUL 2003, VOL: 278, NR. 29, PAGE(S) 26380 - 26390 , XP002463464 ISSN: 0021-9258 the whole document	1,2, 4-13,15, 16, 18-22, 27,29-33
P,X	MATHAROO-BALL B ET AL: "Characterization of biomarkers in polycystic ovary syndrome (PCOS) using multiple distinct proteomic platforms" August 2007 (2007-08), JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, VOL. 6, NR. 8, PAGE(S) 3321-3328 , XP002463465 ISSN: 1535-3893 the whole document	1,2, 4-13,15, 16, 18-22, 27,29-33

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/GB2007/003913**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.: 15, 16, 18-22  
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:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 additional 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 an 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.:
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.:  
see additional sheet(s)

**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 Application No. PCT/GB2007/003913

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 15, 16, 18-22

The present claims 15, 16, 18-22 relates to an extremely large number of possible compounds. Support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT is to be found however for none of the compounds claimed.

Therefore the search of said claims is impossible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

International Application No. PCT/GB2007/003913

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1(part), 2, 4-9(part), 10, 11-13(part), 15(part), 16, 18-22(part), 27(part), 29(part), 30-33(part)

A method of determining the polycystic ovarian syndrome (PCOS) status of a subject by determining the level of complement C4 precursor protein.

2. claims: 1(part), 3, 4-9(part), 11-13(part), 15(part), 17, 18-22(part), 27(part), 29(part), 30-33(part)

A method of determining the polycystic ovarian syndrome (PCOS) status of a subject by determining the level of haptoglobin in a sample.

3. claims: 14, 34

A method of determining the PCOS status in a subject analysing proteins or tryptic peptides obtained from a sample using MALDI-MS.

4. claims: 23-26, 28

A method for treating PCOS in a subject using agents capable of modulating the level of complement C4 precursor protein, a cleavage fragment thereof and a haptoglobin and a method for identifying agents capable of modulating the level of C4 precursor protein, a cleavage fragment thereof and a haptoglobin

## フロントページの続き

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

(74)代理人 100146259

弁理士 橋本 諭志

(72)発明者 ウィリアム・エイティオモ

イギリス国エヌジー 7・2 ユーエイチ、ノッティンガム、クイーンズ、メディカル・センター、ユニバーシティ・オブ・ノッティンガム・メディカル・スクール、イースト・ブロック、ピー・フロアー、アカデミック・ディビジョン・オブ・オブステトリックス、アンド・ガイニコロジー、スクール・オブ・ヒューマン・ディベロップメント

(72)発明者 ロバート・レイフィールド

イギリス国エヌジー 7・2 ユーエイチ、ノッティンガム、クイーンズ・メディカル・センター、ユニバーシティ・オブ・ノッティンガム・メディカル・スクール、ルーム・ディ 46、スクール・オブ・バイオメディカル・サイエンス

(72)発明者 キャサリン・ヒューズ

イギリス国エヌジー 7・2 エヌアール、ノッティンガム、レントン・レイン、キングズ・メドウ・キャンパス、リサーチ・イノベーション・サービシーズ、ユニバーシティ・オブ・ノッティンガム

Fターム(参考) 2G041 CA01 DA04 GA06

2G045 AA25 DA36 DA44