

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第 6 部門第 1 区分  
 【発行日】平成29年9月21日 (2017.9.21)

【公表番号】特表2017-520763(P2017-520763A)  
 【公表日】平成29年7月27日 (2017.7.27)  
 【年通号数】公開・登録公報2017-028  
 【出願番号】特願2016-571689(P2016-571689)  
 【国際特許分類】

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/574 (2006.01)

G 0 1 N 33/543 (2006.01)

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

【 F I 】

G 0 1 N 33/53 N

G 0 1 N 33/574 A

G 0 1 N 33/543 5 4 1 Z

C 1 2 M 1/34 Z N A F

【手続補正書】  
 【提出日】平成29年8月9日 (2017.8.9)  
 【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】

患者の血清サンプル中に存在する、肝臓癌の存在を示す複数の腫瘍バイオマーカーに対する自己抗体を検出及び定量する方法であって、

腫瘍細胞を正常細胞と比較して、前記癌に特異的な複数のバイオマーカーとして腫瘍細胞に固有であるが正常細胞では固有ではないタンパク質セットを評価する工程；

対になる患者生検サンプルの当該タンパク質セットを、二次元又は質量分析系技術を用いることによって識別する工程；

肝臓癌の存在を示すタンパク質セットを検証する工程、  
 を含み、

当該タンパク質セットは、cDNAクローンから発現され、精製され、さらに種々の放射波長を有する蛍光微小球ビーズに結合させてタンパク質-ビーズ結合物が形成されており、

患者の血清に存在する当該タンパク質セットに対する自己抗体が当該タンパク質-ビーズ結合物と免疫学的に結合する、  
 前記方法。

【請求項 2】

自己抗体を続いてPE-結合二次抗体と相互反応させ、微小球ビーズに特異的な蛍光シグナルが当該タンパク質-ビーズ結合物のための識別因子として機能する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

複合体のPE-結合二次抗体によって提供される蛍光強度を測定して、自己抗体の検出及び定量を可能にする、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

患者と健康な対象者との間で血清を比較して、該当するバイオマーカーに対する自己抗体のレベルを決定する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

種々の病期の種々の患者から入手した種々の血清を比較して、シグネチャーパターンを作製する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

タンパク質セットが配列番号:1から15のアミノ酸配列の少なくとも1つを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

複数の腫瘍マーカーが、Bmi1、VCC1、SUMO-4、RhoA、TXN、ET-1、UBE2C、HDGF2、FGF21、LECT2、SOD1、STMN4、ミッドカイン、IL-17A及びIL26の少なくとも1つを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

腫瘍細胞が肝細胞癌（HCC）腫に由来する細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

蛍光微小球ビーズの各々が、ある特異的腫瘍バイオマーカーの存在と対応するタンパク質の各々に特異的な固有の蛍光放射波長を有し、一方、当該特異的腫瘍バイオマーカーのためのタンパク質の各々のタンパク質-ビーズ結合物と結合したPE-結合二次抗体から発生するPEシグナルが患者血清中に産生された自己抗体の存在の指標であり、さらにPEシグナルの蛍光強度が当該特異的腫瘍マーカーの豊富さと比例する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

自己抗体に存在する当該腫瘍バイオマーカーの各々が約0.15ng/mLの低さで存在する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

複数の腫瘍バイオマーカーに対する患者の自己抗体を検出及び定量することによって肝臓癌を診断及び病期決定するためのキットであって、cDNAクローンから発現され、精製され、さらに種々の放射波長を有する蛍光微小球ビーズと結合されてタンパク質-ビーズ結合物を形成したタンパク質セットを含み、当該タンパク質-ビーズ結合体が当該自己抗体と免疫学的に結合し、続いてPE-結合二次抗体の標的になって蛍光シグナル及び強度が測定され、正常対象者と比較した患者の自己抗体レベルが決定される、前記キット。

【請求項 12】

タンパク質セットが配列番号:1から15のアミノ酸配列の少なくとも1つを含む、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 13】

腫瘍バイオマーカーが、Bmi1、VCC1、SUMO-4、RhoA、TXN、ET-1、UBE2C、HDGF2、FGF21、LECT2、SOD1、STMN4、ミッドカイン、IL-17A及びIL26の少なくとも1つを含む、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 14】

cDNAクローンの各々が、自己抗体と免疫学的に結合して続いてPE-結合二次抗体の標的になるタンパク質-ビーズ結合体を形成するために、種々の放射波長を有する蛍光微小球ビーズと結合させるための、コンピテント細胞で発現されるタンパク質に対応するcDNA挿入物を含むHisタグ付きプラスミドを含む、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 15】

個々に固有の蛍光を提供する種々の蛍光微小球ビーズの多重混合物をすでに述べたように発現させ精製したタンパク質セットと結合させて、タンパク質-ビーズ結合体を形成し、さらに前記タンパク質-ビーズ結合体を容器のウェルに予めロードし、各ウェルに自己抗体を含む患者の血清をロードし、当該タンパク質-ビーズ結合体と相互作用させ、続いてPE-結合二次抗体を添加して当該自己抗体と結合させ、続いて一切の過剰な二次抗体を洗い流し、タンパク質-ビーズ結合体及び連なった抗体を含む複合体が個々に測定され、当該タンパク質-ビーズ結合体の固有の蛍光シグナルにより特異的な腫瘍バイオマーカー

の存在が明らかにされ、一方、当該複合体の二次抗体由来のPEシグナルにより自己抗体の存在及び患者血清中の前記腫瘍バイオマーカの相対的濃度が示される、請求項 1 1 に記載のキット。

【請求項 1 6】

自己抗体に存在する腫瘍バイオマーカの各々が約0.15ng/mLの低さで存在する、請求項 1 1 に記載のキット。