

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2009 年 7 月 16 日 (16.07.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/088022 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 33/574 (2006.01) C07K 7/08 (2006.01)
G01N 27/62 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)東京都中央区八重洲二丁目 1 1 番 6 号 八重洲 KN
ビル 8 階 株式会社プロトセラ内 Tokyo (JP). 李 良子
(LEE, Lyang-ja) [KR/JP]; 〒1040028 東京都中央区八
重洲二丁目 1 1 番 6 号 八重洲 KN ビル 8 階 株式会
社プロトセラ内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2009/050088

(22) 国際出願日: 2009 年 1 月 7 日 (07.01.2009)

(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044
大阪府大阪市中央区伏見町四丁目 1 番 1 号 明治安
田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願2008-000776 2008 年 1 月 7 日 (07.01.2008) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AO, 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, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国
立大学法人 鹿児島大学 (KAGOSHIMA UNIVER-
SITY) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一
丁目 2 1 番 2 4 号 Kagoshima (JP). 株式会社プロトセ
ラ (PROTOSERA INC.) [JP/JP]; 〒1040028 東京都中
央区八重洲二丁目 1 1 番 6 号 八重洲 KN ビル 8 階
Tokyo (JP).(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 丸山 征郎
(MARUYAMA, Ikuro) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿
児島市郡元一丁目 2 1 番 2 4 号 国立大学法人鹿児島
大学内 Kagoshima (JP). 橋口 照人 (HASHIGUCHI,
Teruto) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元
一丁目 2 1 番 2 4 号 国立大学法人鹿児島大学内
Kagoshima (JP). 夏越 ▲祥▼次 (NATSUGOE, Shoji)
[JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目
2 1 番 2 4 号 国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima
(JP). 田中 憲次 (TANAKA, Kenji) [JP/JP]; 〒1040028

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: NOVEL CANCER MARKER, AND DIAGNOSIS USING THE SAME

(54) 発明の名称: 新規癌マーカーおよびそれをを用いた診断

(57) Abstract: Disclosed is a test method for diagnosing pancreatic cancer in a subject, which is characterized by measuring the quantity of at least one peptide selected from the group consisting of peptides comprising the amino acid sequences depicted in SEQ ID NOs:1, 2 and 3, respectively, in a biological sample (preferably a body fluid, more preferably a serum, a plasma or the like) collected from the subject (preferably by mass spectrometry or by using an antibody capable of specifically recognizing the peptide).

(57) 要約: 本発明は、被験者より採取した生体試料 (好ましくは体液、より好ましくは血清、血漿等) 中の、配列番号 1、2 および 3 に示される各アミノ酸配列からなるペプチド群より選ばれる 1 以上のペプチドの量を測定する (好ましくは質量分析もしくは該ペプチドを特異的に認識する抗体を用いて測定する) ことを特徴とする、該被験者における膵臓癌の診断のための検査方法を提供する。

WO 2009/088022 A1

明 細 書

新規癌マーカーおよびそれを用いた診断

技術分野

[0001] 本発明は、膵臓癌をはじめとする各種癌の新規診断マーカー、並びにそれを利用した当該疾患の診断方法等に関する。

背景技術

[0002] 膵臓癌は一般的な固形癌の中では5年生存率が最も低く、日本および米国でそれぞれ年間約2万人および約3万人が膵臓癌により死亡している。膵臓癌は大規模な局所浸潤と肝臓やリンパ節への早期転移を特徴とし、外科的切除が唯一頼りになる根治療法であるため、早期発見が不可欠である。しかしながら、「沈黙の臓器」としばしば形容されるように、閉塞性黄疸を除けば、膵臓癌の臨床症状はステージが進行するまで顕著とならない場合が多く、また、膵臓は腹部の奥に位置するため、エコーなどの簡便で安価な検査手段では膵臓癌を発見することは難しい。その結果、手術適応の膵臓癌患者は全体の20-40%程度にすぎない。

したがって、膵臓癌を早期発見を可能とする、安価・簡便かつ高感度・高特異性の新規検査手法の開発が切望されている。

[0003] 生体内のタンパク質発現を網羅的に解析するプロテオミクス研究の進展に伴い、プロテオミクスを利用した新規バイオマーカーの探索が精力的に行われている。例えば、Hondaら(非特許文献1)は、膵臓癌患者の血漿サンプルをSELDI-TOFMS技術を用いて分析し、健常者と比較してピーク強度が有意に異なる4つの質量ピーク(m/z 8,766、17,272、28,080、14,779)を同定し、膵臓癌マーカーとして報告している。しかし、これらの質量ピークがいかなるタンパク質に由来するかについては不明である。

[0004] トロンビンがフィブリノーゲンに働くときには、まずA α 鎖のN末端から16番目のArgと17番目のGlyの間を加水分解し、フィブリノペプチドA(FPA)を切りだす。次にB β 鎖のN末端から14番目のArgと15番目のGlyの間を切ってフィブリノペプチドB(FPB)を切りだす。これらの切り出されたフィブリノペプチドの機能はよく判っていない。最近、質量分析を用いて、いくつかの癌患者の血清中の蛋白質分解産物パターンが調

べられ、FPAもしくはそのフラグメントが、前立腺癌、膀胱癌、乳癌で変動することが報告されている(非特許文献2)。しかしながら、FPAもしくはそのフラグメントと膵臓癌との関連については何ら報告されていない。

[0005] 一方、FPAおよびFPBが切り出されて生じるフィブリンモノマーは、重合して不溶化することで血液凝固における主たる役割を果たしている。フィブリン α のC末端フラグメント(フィブリノーゲンA α 鎖前駆体ポリペプチドの496-629位)の存在が報告されているが、その生理学的意義などは全く解明されていない。

[0006] アポリポタンパク質E (apoE) は、家族性III型高脂血症の原因遺伝子(E2)やアルツハイマー病のリスクファクター(E4)等として知られているが、apoEもしくはそのフラグメントと膵臓癌との関連については何ら報告されていない。

非特許文献1: ホンダ(Honda)ら, 「キャンサー・リサーチ(Cancer Res.)」, 第65巻(第22号), pp. 10613-10622 (2005年)

非特許文献2: ヴィラヌエヴァ(Villanueva)ら, 「ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インヴェスティゲーション(The Journal of Clinical Investigation)」, 第116巻(第1号), pp. 271-284 (2006年)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の目的は、膵臓癌の新規診断マーカー、並びにそれを利用した癌の有効な診断方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記の目的を達成すべく、各種癌患者から採取した血清を質量分析により調べた結果、膵臓癌患者において、健常者および他の臓器における癌患者と比較して顕著に上昇している分子量約1616、約2410および約2930のペプチドを見出した。アミノ酸配列を分析した結果、これらのペプチドはそれぞれFPAの3位のSer残基がリン酸化したペプチド、apoEタンパク質の170-192位の部分アミノ酸配列からなるペプチド、およびフィブリン α 鎖C末端フラグメントの一部(フィブリノーゲンA α 鎖前駆体ポリペプチドの571-601位に相当する)のアミノ酸配列からなるペプチドであることが判明した。また、膵臓癌患者について、組織型ごとにこれらのペプチドのピーク

強度を測定・比較した結果、最も早期に位置づけられる上皮内癌でも、これらのペプチドは健常者と有意差をもって検出され、フィブリノーゲン由来の2つのペプチドは、病理組織学的な微小浸潤については画像検査(MRI、CT等)で診断不可能とされる病気分類のII期においてより明瞭に高値を示した。

本発明者らは、これらの知見に基づいて、該ペプチドを膵臓癌の早期診断マーカーとして同定し、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明は、

[1]被験者より採取した生体試料中の、配列番号1、2および3に示される各アミノ酸配列からなるペプチド群より選ばれる1以上のペプチドの量を測定することを特徴とする、該被験者における膵臓癌の診断のための検査方法；

[2]配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるペプチドがリン酸化されている、上記[1]記載の方法；

[3]生体試料が体液である、上記[1]または[2]記載の方法；

[4]体液が血液、血漿、血清、唾液、尿、髄液、骨髄液、胸水、腹水、関節液、涙液、眼房水、硝子体液およびリンパ液からなる群より選択される、上記[3]記載の方法；

[5]生体試料を質量分析にかけることを含む、上記[1]～[4]のいずれかに記載の方法；

[6]配列番号1、2および3に示される各アミノ酸配列からなる各ペプチドを特異的に認識する抗体群より選ばれる1以上の抗体を用いることを特徴とする、上記[1]～[4]のいずれかに記載の方法；

[7]患者から時系列で生体試料を採取し、該試料における、配列番号1、2および3に示される各アミノ酸配列からなるペプチド群より選ばれる1以上のペプチドの量の経時変化を調べることを特徴とする、上記[1]～[6]のいずれかに記載の方法；

[8]膵臓癌患者における治療効果の評価方法であって、治療が施される前後に該患者から採取した生体試料における、配列番号1、2および3に示される各アミノ酸配列からなるペプチド群より選ばれる1以上のペプチドの量の変化を調べることを特徴とする方法；

[9]配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるペプチドがリン酸化されている、上記[

8]記載の方法;

[10]配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるペプチド;および

[11]配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるペプチド;

などを提供する。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、膵臓癌を迅速・的確に判定できるので、該疾患の早期発見、早期治療が可能となる。また、本発明のマーカーペプチドを適宜組み合わせることにより、他の臓器における癌の診断も可能となる。

発明を実施するための最良の形態

[0011] 本発明は、3種の新規かつ有用な膵臓癌の診断マーカーペプチド(以下、3種のペプチドを包括して「本発明のペプチド」という場合もある)を提供する。

[0012] 本発明の第1のペプチド(「ペプチド1」ともいう)は、配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる。該アミノ酸配列は、成熟フィブリノーゲンA α 鎖のN末端のAla残基から16番目のArg残基までのフラグメントに相当する。また、ペプチド1は、該アミノ酸配列中の第3番目のSer残基がリン酸化されていることを特徴とする。

前述の通り、フィブリノーゲンA α 鎖のN末端から16番目のArg残基と17番目のGly残基との間がトロンビンにより切断されてフィブリノペプチドA(FPA)が生成することは周知である。また、該ペプチドの血清レベルは前立腺癌、膀胱癌および乳癌患者の血清中で有意に低下することは、既に報告されている(上記非特許文献2)。しかしながら、リン酸化されたFPAであるペプチド1が、膵臓癌患者の血清中で、上記の癌とは正反対に、非常に高値を示すことはこれまで全く知られていなかった。

また、ペプチド1の血清レベルは、膵臓癌患者ほど際立った変化ではないが、肺癌、造血器腫瘍および胆嚢・胆管癌の患者においても、健常者と比較して有意に増加する。一方、このペプチドは、FPA(リン酸化されていない)と同様に、前立腺癌および乳癌患者において、血清レベルが健常者と比較して有意に低下する他、子宮体癌、大腸・直腸癌、食道癌、子宮頸癌および胃癌患者においても有意に低下している。従って、ペプチド1は、これらの癌の診断マーカーとしても使用することができる。

[0013] 本発明の第2のペプチド(「ペプチド2」ともいう)は、配列番号2に示されるアミノ酸

配列からなる。該アミノ酸配列は、アポリポタンパク質E (apoE) のN末端から170番目のAla残基から192番目のLeu残基までのフラグメントに相当する。

ペプチド2の血清レベルは、膵臓癌患者の他、胆嚢・胆管癌患者においても、健常者および他臓器における癌患者と比較して顕著に高値を示す。また、膵臓癌および胆嚢・胆管癌患者ほど際立った変化ではないが、卵巣癌、食道癌および造血器腫瘍患者においても、血清レベルが健常者と比較して有意に増加する。従って、ペプチド2は、これらの癌の診断マーカーとしても使用することができる。

[0014] 本発明の第3のペプチド(「ペプチド3」ともいう)は、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなる。該アミノ酸配列は、フィブリノーゲンA α 鎖前駆体ポリペプチドのN末端から571番目のSer残基から601番目のTyr残基までのフラグメントに相当する。

ペプチド3の血清レベルは、膵臓癌患者ほど際立った変化ではないが、子宮頸癌、大腸・直腸癌、卵巣癌、食道癌、胆嚢・胆管癌、前立腺癌、子宮体癌、胃癌、乳癌および肺癌患者において、健常者と比較して有意に低下している。従って、ペプチド3は、これらの癌の診断マーカーとしても使用することができる。

[0015] 上述の通り、ペプチド1および3はフィブリノーゲンA α 鎖のフラグメント(分解産物)であり、ペプチド2はapoEタンパク質のフラグメントである。したがって、被験対象となる患者が、フィブリノーゲンA α またはapoEタンパク質のこれらのペプチドに対応する部分アミノ酸配列内に1もしくは2以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加またはそれらの組合せを含む多型もしくはアレル変異を有する場合、検出すべきペプチドのアミノ酸配列は、「配列番号1、2および3に示される各アミノ酸配列において、当該多型もしくはアレル変異を有するアミノ酸配列」と解すべきであることは、当業者にとって自明であろう。

[0016] 本発明はまた、膵臓癌に罹患していると疑われる患者由来の生体試料中の、1種以上の本発明のペプチドの量を測定することによる、該患者における膵臓癌の診断のための検査方法を提供する。ここで「診断のための検査」とは、該ペプチド量の測定および必要に応じて対照サンプルにおける測定値との比較を意味する。「膵臓癌に罹患していると疑われる患者」は、患者本人が主観的に疑いを抱くものであっても、何らかの客観的な根拠に基づくものであってもよいが、好ましくは、従来公知の臨

床検査および／または診察の結果、それら疾患への合理的な罹患可能性があると医師が判断した患者、あるいはそれと同等の病態を有するヒトである。

膵臓癌の治療においては、早期発見、早期治療が大原則とされるが、本発明のペプチドは、病気分類(1997年、UICC)全6期の最も早期である0期に位置づけられる上皮内癌(Tis)でも、健常者と有意差をもって検出されることから、本発明のペプチドを指標とする定期診断を採用することにより、膵臓癌の早期発見・早期治療に寄与し得る可能性がある。

- [0017] 被験試料となる患者由来の生体試料は特に限定されないが、患者への侵襲が少ないものであることが好ましく、例えば、血液、血漿、血清、唾液、尿、涙液など生体から容易に採取できるものや、髄液、骨髄液、胸水、腹水、関節液、眼房水、硝子体液など比較的容易に採取されるものが挙げられる。

血清や血漿を用いる場合、常法に従って患者から採血し、液性成分を分離することにより調製することができる。検出対象である本発明のペプチドは必要に応じて、スピンカラムなどを用いて、予め高分子量の蛋白質画分などを分離除去しておくこともできる。

- [0018] 生体試料中の、本発明のペプチドの検出は、例えば、生体試料を各種の分子量測定法、例えば、ゲル電気泳動や、各種の分離精製法(例:イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなど)、イオン化法(例:電子衝撃イオン化法、フィールドディソープション法、二次イオン化法、高速原子衝突法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)法、エレクトロスプレーイオン化法など)、質量分析計(例:二重収束質量分析計、四重極型分析計、飛行時間型質量分析計、フーリエ変換質量分析計、イオンサイクロトロン質量分析計など)を組み合わせる方法等に従い、該ペプチドの分子量と一致するバンドもしくはスポット、あるいはピークを検出することにより行うことができるが、これらに限定されない。本発明のペプチドはアミノ酸配列が既知であるので、該アミノ酸配列を認識する抗体を作製して、ウェスタンブロッティングや各種イムノアッセイにより該ペプチドを検出する方法が、より好ましく用いられ得る。さらに上記方法のハイブリッド型検出法も有効である。

[0019] 本発明のペプチド1、2および3は、それぞれ1615.65、2409.69および2930.28の分子量(計算値)を有するが、用いられる測定方法・測定機器に応じて、実測値は若干変動し得ることはいうまでもない。例えば、質量分析計を用いる方法による場合は、計算値 $\pm 0.5\%$ (好ましくは $\pm 0.3\%$ 、より好ましくは $\pm 0.1\%$)の位置に出現するピーク強度を測定することが好ましい。

[0020] 本発明の検査方法における特に好ましい測定法の1つは、飛行時間型質量分析に使用するプレートの表面に被験試料を接触させ、該プレート表面に捕捉された成分の質量を飛行時間型質量分析計で測定する方法が挙げられる。

飛行時間型質量分析計に適合可能なプレートは、検出対象である本発明のペプチドを効率よく吸着し得る表面構造を有している限り、いかなるものであってもよい。そのような表面構造としては、例えば、官能基付加ガラス、Si、Ge、GaAs、GaP、SiO₂、SiN₄、改質シリコン、広範囲のゲル又はポリマー(例えば、(ポリ)テトラフルオロエチレン、(ポリ)ビニリデンジフロリド、ポリスチレン、ポリカーボネート、又はこれらの組合せなど)によるコーティングが挙げられる。複数のモノマー又はポリマー配列を有する表面構造としては、例えば、核酸の直鎖状及び環状ポリマー、ポリサッカライド、脂質、 α -、 β -又は ω -アミノ酸を有するペプチド、クロマトグラフィーで使用されるゲル表面の担体(陰イオン性/陽イオン性化合物、炭素鎖1~18からなる疎水性化合物、親水性化合物(例えば、シリカ、ニトロセルロース、セルロースアセテート、アガロース等)と架橋した担体など)、人工ホモポリマー(例えば、ポリウレタン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリウレア、ポリアミド、ポリエチレンイミン、ポリアリーレンスルフィド、ポリシロキサン、ポリイミド、ポリアセテート等)、上記化合物のいずれかに既知の薬物又は天然化合物が結合(共有及び非共有結合)したヘテロポリマー等によるコーティングが挙げられる。

[0021] 好ましい実施態様においては、質量分析用プレートとして用いられる支持体は、ポリビニリデンジフロリド(PVDF)、ニトロセルロースまたはシリカゲル、特に好ましくはPVDFで薄層コーティングされた基材[通常、質量分析用プレートにおいて使用されているものであれば、特に限定されず、例えば、絶縁体(ガラス、セラミクス、プラスチック・樹脂等)、金属(アルミニウム、ステンレス・スチール等)、導電性ポリマー、それらの複

合体などが挙げられるが、好ましくはアルミニウムプレートが用いられる]である(WO 2004/031759を参照)。支持体の形状は、使用する質量分析装置の、特に試料導入口に適合するような形状に適宜考案され得るが、それらに限定されない。かかるPVDFで薄層コーティングされた質量分析用プレートとして、好ましくはプロトセラ社のプロットチップ(登録商標)などが挙げられる。

[0022] 好ましくは、コーティングは、メンブレンのように予め成型された構造体を支持体上に重層するのではなく、コーティング分子が分散した状態で支持体上に堆積されて形成される薄層をいう。コーティング分子が堆積される態様は特に制限されないが、後述の質量分析用プレートの調製方法において例示される手段が好ましく用いられる。

薄層の厚さは、組織もしくは細胞に含まれる分子の転写効率および質量分析の測定感度等に好ましくない影響を与えない範囲で適宜選択することができるが、例えば、約0.001～約100 μm 、好ましくは約0.01～約30 μm である。

[0023] 質量分析用プレート(支持体)は自体公知の方法により調製することができるが、例えば、上記の好ましい質量分析用プレートは、PVDF等のコーティング分子で支持体表面を薄層コーティングすることにより調製される。コーティングの手段としては、塗布、噴霧、蒸着、浸漬、印刷(プリント)、スパッタリングなどが好ましく例示される。

「塗布」する場合、コーティング分子を、適当な溶媒、例えば、ジメチルホルムアミド(dimethyl formamide; DMF)などの有機溶媒に適当な濃度(例えば、約1～約100 mg/mL程度)で溶解したもの(コーティング分子含有溶液)を、刷毛などの適当な道具を用いて基材に塗布することができる。

「噴霧」する場合、上記と同様にして調製したコーティング分子含有溶液を噴霧器に入れ、基材上に均一にPVDFが堆積されるように噴霧すればよい。

「蒸着」する場合、通常の有機薄膜作製用真空蒸着装置を用い、基材を入れた真空槽中でコーティング分子(固体でも溶液でもよい)を加熱・気化させることにより、基材表面上に該分子の薄層を形成させることができる。

「浸漬」させる場合、上記と同様にして調製したコーティング分子含有溶液中に基材を浸漬させればよい。

「印刷(プリント)」する場合は、基材の材質に応じて通常使用され得る各種印刷技術を適宜選択して利用することができ、例えば、スクリーン印刷などが好ましく用いられる。

「スパッタリング」する場合は、例えば、真空中に不活性ガス(例、Arガス等)を導入しながら基材とコーティング分子間に直流高電圧を印加し、イオン化したガスを該分子に衝突させて、はじき飛ばされたコーティング分子を基材上に堆積させて薄層を形成させることができる。

コーティングは基材全面に施してもよいし、質量分析に供される面(画分)のみに施してもよい。

[0024] コーティング分子は、コーティング手段に応じて適宜好ましい形態で 사용할 ことができ、例えば、コーティング分子含有溶液、コーティング分子含有蒸気、固体コーティング分子などの形態で基材にアプライされ得るが、コーティング分子含有溶液の形態でアプライすることが好ましい。「アプライする」とは、接触後にコーティング分子が支持体上に残留・堆積されるように支持体に接触させることをいう。アプライ量は特に制限はないが、コーティング分子量として、例えば、約10～約100,000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、好ましくは約50～約5,000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ が挙げられる。アプライ後に溶媒は自然乾燥、真空乾燥などにより除去する。

[0025] 質量分析用プレートにおける基材は、コーティング分子でコーティングする前に予め適当な物理的、化学的手法により、その表面を修飾(加工)しておいてもよい。具体的には、プレート表面を磨く、傷を付ける、酸処理、アルカリ処理、ガラス処理(テトラメトキシシランなど)等の手法が例示される。

[0026] 被験試料の質量分析用プレート(支持体)への移行は、被験試料となる患者由来の生体試料を未処理のままで、あるいは抗体カラムその他の方法で高分子タンパク質を除去、濃縮した後に、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動もしくは等電点電気泳動に付し、泳動後ゲルをプレートと接触させて転写(ブロッティング)することにより行われる。転写装置としては公知のものをを用いることができる。転写の方法自体は公知である。好ましくは電気転写が用いられる。泳動後ゲルに展開された試料は、種々の方法(拡散、電気力その他)によって質量分析用プレートに移行される。電気転写時

に使用する緩衝液としては、pH 7～9、低塩濃度のものを用いることが好ましい。具体的には、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酢酸緩衝液などが例示される。トリス緩衝液としては、トリス／グリシン／メタノール緩衝液、SDS-トリスートリシン緩衝液など、リン酸緩衝液としては、ACN／NaCl／等張リン酸緩衝液、リン酸ナトリウム／ACNなど、ホウ酸緩衝液としては、ホウ酸ナトリウム－塩酸緩衝液、トリス－ホウ酸塩／EDTA、ホウ酸塩／ACNなど、酢酸緩衝液としては、トリス－酢酸塩／EDTAなどが挙げられる。好ましくは、トリス／グリシン／メタノール緩衝液、ホウ酸ナトリウム－塩酸緩衝液である。トリス／グリシン／メタノール緩衝液の組成としては、トリス10～15 mM、グリシン70～120 mM、メタノール7～13%程度が例示される。ホウ酸ナトリウム－塩酸緩衝液の組成としては、ホウ酸ナトリウム5～20 mM程度が例示される。

[0027] これにより、標的分子を含めて、被験試料中に存在する分子は支持体表面上に効率よく捕捉される。プレートを乾燥させた後、後の質量分析(MALDI法による場合)に有利なように、レーザー光を吸収し、エネルギー移動を通じて分析対象物分子のイオン化を促進するためにマトリックスと呼ばれる試薬を添加することもできる。当該マトリックスとしては、質量分析において公知のものを用いることができる。例えば、シナピン酸(sinapinic acid; SPA (=3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid))、インドールアクリル酸(Indoleacrylic acid; IAA)、2,5-ジヒドロキシ安息香酸(2,5-dihydroxybenzoic acid; DHB)、 α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; CHCA)等が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、DHBまたはCHCAである。

[0028] 上記の方法により支持体表面上に捕捉された被験試料中の分子を質量分析することにより、分子量に関する情報から、標的分子である本発明のペプチドの存在および量を同定することができる。

質量分析装置は、ガス状の試料をイオン化した後、その分子や分子断片を電磁場に投入し、その移動状況から質量数／電荷数によって分離、物質のスペクトルを求めることにより、物質の分子量を測定・検出する装置である。試料とレーザー光を吸収するマトリックスを混合、乾燥させて結晶化し、マトリックスからのエネルギー移動によるイオン化とレーザー照射による瞬間加熱により、イオン化した分析対象物を真空

中に導くマトリックス支援レーザー脱イオン化(MALDI)と、初期加速による試料分子イオンの飛行時間差で質量数を分析する飛行時間型質量分析(TOFMS)とをあわせて用いるMALDI-TOFMS法、1分析対象物を1液滴にのせて液体から直接電氣的にイオン化する方法、試料溶液を電氣的に大氣中にスプレーして、個々の分析対象物多価イオンをunfoldの状態で氣相に導くナノエレクトロスプレー質量分析(nano-ESMS)法等の原理に基づく質量分析装置を使用することができる。

質量分析用プレート上の分子を質量分析する方法自体は公知である。例えば、WO 2004/031759に記載の方法を、必要に応じて適宜改変して使用することができる。

[0029] 質量分析の結果から、標的分子の分子量情報に基づいて、被験試料中の標的分子の有無およびその量が同定され得る。この工程において、質量分析装置からの情報を、任意のプログラムを用いて、健常者由来の生体試料における質量分析データと比較して、示差的な(differential)情報として出力させることも可能である。そのようなプログラムは周知であり、また、当業者は、公知の情報処理技術を用いて、容易にそのようなプログラムを構築もしくは改変することができることが理解されよう。

[0030] 特に好ましい態様においては、質量分析用プレートとしてプロトセラ社のプロットチップを用いて、上記の各工程を実施し、MALDI型質量分析装置で本発明のペプチドを定量比較(ディファレンシャル解析)する。さらに、必要に応じて、同一チップに残存する該ペプチドを同定することもできる。あるいは、被験試料の定量比較(ディファレンシャル解析)までをプロトセラ社のプロットチップシステムを用いて実施し、該ペプチドの同定を、高速液体クロマトグラフィーとイオンスプレー型質量分析装置の組み合わせ装置(LC-MS/MS)で実施することも可能である。

[0031] 本発明の検査方法における本発明のペプチドの測定は、それに対する抗体を用いて行うこともできる。かかる方法は、最適化されたイムノアッセイ系を構築してこれをキット化すれば、上記質量分析装置のような特殊な装置を使用することなく、高感度かつ高精度に該ペプチドを検出することができる点で、特に有用である。

[0032] 本発明のペプチドに対する抗体は、例えば、本発明のペプチドを、これを発現する患者由来の生体試料から単離・精製し、該ペプチドを抗原として動物を免疫することにより調製することができる。あるいは、得られるペプチド量が少量である場合等は、

該ペプチドをペプチダーゼ等によって部分消化し、得られる断片のアミノ酸配列をエドマン法などにより決定し、その配列を基に該ペプチドをコードする核酸とハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドを合成、これをプローブとして該患者由来のcDNAライブラリーを鋳型にハイブリダイゼーション法により該ペプチドを含む蛋白質をコードするcDNAを得るか、あるいは該オリゴヌクレオチドをプライマーとして該患者由来のRNAを鋳型にしてRT-PCRを行うことにより、該ペプチドをコードするcDNA断片を得て、該cDNA断片を適当な発現ベクターに組み込んで適当な宿主細胞に導入し、得られる形質転換体を培養して組換えペプチドを採取することによって、本発明のペプチドを大量に調製することができる。あるいは上記のようにして得られるcDNAを鋳型として、無細胞転写・翻訳系を用いて本発明のペプチドを取得することもできる。さらに有機合成法により大量に調製することも可能である。

[0033] 上述のように、本発明のペプチド1、2および3は、それぞれ配列番号1、2および3に示されるアミノ酸配列からなるペプチドである。従って、本発明のペプチドに対する抗体は、例えば、該アミノ酸配列の全部もしくは一部を、上記アミノ酸配列情報に基づき、公知のペプチド合成法を用いて合成するか、あるいは常法により単離したフィブリノーゲンA α 鎖またはapoEタンパク質を適当なペプチダーゼ等で切断して、本発明のペプチドの配列の全部もしくは一部を含むペプチド断片を取得し、これを免疫原として調製することが望ましい。

[0034] 本発明のマーカーペプチドに対する抗体(以下、「本発明の抗体」と称する場合がある)は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれであってもよく、周知の免疫学的手法により作製することができる。また、該抗体は完全抗体分子だけでなくそのフラグメントをも包含し、例えば、Fab、F(ab')₂、ScFv、minibody等が挙げられる。

[0035] 例えば、ポリクローナル抗体は、上記のいずれかの方法または他の方法によって調製された本発明のペプチドもしくはその部分ペプチド(必要に応じて、ウシ血清アルブミン、KLH(Keyhole Limpet Hemocyanin)等のキャリアタンパク質に架橋した複合体とすることもできる)を抗原として、市販のアジュバント(例えば、完全または不完全フロイントアジュバント)とともに、動物の皮下あるいは腹腔内に2～3週間おきに2～4回程度投与し(部分採血した血清の抗体価を公知の抗原抗体反応により測定し、そ

の上昇を確認しておく)、最終免疫から約3～約10日後に全血を採取して抗血清を精製することにより取得できる。抗原を投与する動物としては、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ハムスターなどの哺乳動物が挙げられる。

[0036] また、モノクローナル抗体は、細胞融合法(例えば、渡邊武、細胞融合法の原理とモノクローナル抗体の作成、谷内昭、高橋利忠編、「モノクローナル抗体とがんー基礎と臨床ー」、第2-14頁、サイエンスフォーラム出版、1985年)により作成することができる。例えば、本発明のペプチドもしくはその部分ペプチドを市販のアジュバントと共にマウスに2～4回皮下あるいは腹腔内に投与し、最終投与の約3日後に脾臓あるいはリンパ節を採取し、白血球を採取する。この白血球と骨髓腫細胞(例えば、NS-1、P3X63Ag8など)を細胞融合して該ペプチドに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る。細胞融合はPEG法[J. Immunol. Methods, 81(2): 223-228 (1985)]でも電圧パルス法[Hybridoma, 7(6): 627-633 (1988)]であってもよい。所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、周知のEIAまたはRIA法等を用いて抗原と特異的に結合する抗体を、培養上清中から検出することにより選択できる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養は、インビトロ、またはマウスもしくはラット、このましくはマウス腹水中等のインビボで行うことができ、抗体はそれぞれハイブリドーマの培養上清および動物の腹水から取得することができる。

[0037] フィブリノーゲンA α 鎖のN末端フラグメントとしては、本発明のペプチド1の他に、非リン酸化FPAやそのフラグメントも、被験試料中に存在する可能性がある。これらのペプチド群は膵臓癌で有意な変動は認められないが、他の疾患においてこれらのいずれかが顕著に高値を示す可能性がある。本発明のペプチド1に対する抗体が、1以上のフィブリノーゲンA α 鎖の他のN末端フラグメントと交差反応性を有する場合、他の疾患を膵臓癌と誤診する(偽陽性)可能性が高くなる。従って、本発明の検査方法に用いられる、本発明のペプチド1に対する抗体は、該ペプチド以外のフィブリノーゲンA α 鎖のN末端フラグメントとは交差反応しない、特異性の高い抗体であることが望ましい。そのような抗体は、上記のようにして得られた複数のモノクローナル抗体を当該他のフラグメントと反応させ、それらと交差反応しない抗体を選択することにより得ることができる。特に、本発明のペプチド1はリン酸化したFPAであることから、ペ

プチド1に対する抗体としては、該リン酸化部位を特異的に認識し得るものであることが望ましい。

[0038] 本発明の抗体を用いる本発明の検査方法は、特に制限されるべきものではなく、被験試料中の抗原量に対応した抗体、抗原もしくは抗体－抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法等が好適に用いられる。

[0039] 標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン－アビジン系を用いることもできる。

[0040] 抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

[0041] サンドイッチ法においては、不溶化した本発明の抗体に被験試料を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明の抗体を反応させ（2次反応）た後、不溶化担体上の標識剤の量（活性）を測定することにより、被験試料中の本発明のペプチド量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。

[0042] 本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を、サンドイッチ法以外の測定

システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることもできる。

競合法では、被験試料中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させた後、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B, Fいずれかの標識量を測定し、被験試料中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものをを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被験試料の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被験試料中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させた後、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被験試料中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被験試料中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

[0043] これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常技術的配慮を加えて本発明のペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))

、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

[0044] 本発明のペプチドはタンパク質分解産物からなるため、通常の「サンドイッチELISAシステム」では、未分解のタンパク質や、切断部位が共通の類似ペプチド等様々な分子が測定値に影響を与える可能性がある。そこで、第1工程において、生体試料を抗体により免疫アフィニティ精製し、抗体に結合したフラクションを、第2工程において質量分析に付し、精緻な分子量を基準に同定、定量する、いわゆる免疫質量分析法を利用することができる(例えば、Rapid Commun. Mass Spectrom. 2007, 21: 352-358を参照)。例えば、生体試料として血液試料を用いる場合、該試料をそのままMALDI型質量分析計で測定しても、バイオマーカーのピークは観察されないが、免疫質量分析法によれば、未分解のタンパク質も類似ペプチドも、質量分析計で完全に分離され、バイオマーカーの正確な分子量を基準に高い特異性と感度で定量が可能となる。

[0045] あるいは、本発明の抗体を用いる別の本発明の検査方法として、該抗体を上記したような質量分析計に適合し得るプローブの表面上に固定化し、該プローブ上の該抗体に被検試料を接触させ、該抗体に捕捉された生体試料成分を質量分析にかけ、該抗体が認識するマーカーペプチドの分子量に相当するピークを検出する方法が挙げられる。

[0046] 上記のいずれかの方法により測定された被験者由来の試料中のペプチド1のレベルが、健常者由来の対照試料中のペプチド1レベルの約2倍以上、好ましくは約5倍以上である場合に、該被験者は膵臓癌に罹患している可能性が高いと診断することができる。さらに、例えば、肺癌などのペプチド1が比較的高値を示す癌患者由来の試料を対照として利用し得る場合は、該対照試料中のペプチドレベルと比較して統計学上有意に高値を示したときに、被験者は膵臓癌に罹患している可能性が高いと

診断することができる。

また、被験者由来の試料中のペプチド1のレベルが、健常者由来の対照試料中のペプチド1レベルと比較して統計学上有意に高値を示すが、約2倍未満である場合は、該被験者は、膵臓癌以外に肺癌、造血器腫瘍または胆嚢・胆管癌に罹患している可能性が高いと診断することができる。さらに、被験者由来の試料中のペプチド1のレベルが、健常者由来の対照試料中のペプチド1レベルと比較して統計学上有意に低値を示した場合には、該被験者は、前立腺癌、乳癌、子宮体癌、大腸・直腸癌、食道癌、子宮頸癌または胃癌に罹患している可能性が高いと診断することができる。

[0047] 上記のいずれかの方法により測定された被験者由来の試料中のペプチド2のレベルが、健常者由来の対照試料中のペプチド2レベルの約2倍以上、好ましくは約5倍以上である場合に、該被験者は膵臓癌または胆嚢・胆管癌に罹患している可能性が高いと診断することができる。さらに、例えば、卵巣癌などのペプチド2が比較的高値を示す癌患者由来の試料を対照として利用し得る場合は、該対照試料中のペプチドレベルと比較して統計学上有意に高値を示したときに、被験者は膵臓癌または胆嚢・胆管癌に罹患している可能性が高いと診断することができる。さらに、ペプチド1および／またはペプチド3をマーカーとして組み合わせることにより、膵臓癌と胆嚢・胆管癌とを鑑別することもできる。

一方、被験者由来の試料中のペプチド2のレベルが、健常者由来の対照試料中のペプチド2レベルと比較して統計学上有意に高値を示すが、約2倍未満である場合は、該被験者は、膵臓癌および胆嚢・胆管癌以外に卵巣癌、食道癌または造血器腫瘍に罹患している可能性が高いと診断することができる。

[0048] 上記のいずれかの方法により測定された被験者由来の試料中のペプチド3のレベルが、健常者由来の対照試料中のペプチド3レベルと比較して統計学上有意に高値を示した場合に、該被験者は膵臓癌に罹患している可能性が高いと診断することができる。

一方、被験者由来の試料中のペプチド3のレベルが、健常者由来の対照試料中のペプチド3レベルと比較して統計学上有意に低値を示した場合には、該被験者は、子宮頸癌、大腸・直腸癌、卵巣癌、食道癌、胆嚢・胆管癌、前立腺癌、子宮体癌、胃

癌、乳癌または肺癌に罹患している可能性が高いと診断することができる。

[0049] 本発明の検査方法は、患者から時系列で生体試料を採取し、各試料における本発明のペプチドの発現の経時変化を調べることにより行うことが好ましい。生体試料の採取間隔は特に限定されないが、患者のQOLを損なわない範囲でできるだけ頻繁にサンプリングすることが望ましく、例えば、血漿もしくは血清を試料として用いる場合、約1分～約12時間の間隔で採血を行うことが好ましい。本発明のペプチドのうち、ペプチド1および3は、少なくとも病気分類の0-II期においては、膵臓癌のステージが進行するに従って血清レベルが増加する傾向にある。一方、ペプチド2は、0期で顕著な高値を示し、ステージが進行しても健常者と比較して有意に高値を維持する。従って、本発明のペプチドのレベルが経時的に低下した場合には、該患者における膵臓癌の病態が改善されている可能性が高いと判定することができる。

[0050] さらに、上記時系列的なサンプリングによる膵臓癌の検査方法は、前回サンプリングと今回サンプリングとの間に、被験者である患者に対して該疾患の治療措置が講じられた場合に、当該措置による治療効果を評価するのに用いることができる。即ち、治療の前後にサンプリングした試料について、治療後の状態が治療前の状態と比較して病態の改善が認められると判定された場合に、当該治療の効果があったと評価することができる。一方、治療後の状態が治療前の状態と比較して病態の改善が認められない、あるいはさらに悪化していると判定された場合には、当該治療の効果がなかったと評価することができる。

[0051] さらに本発明のペプチドは、診断以外に積極的な膵臓癌の創薬ターゲットを提供することもできる。即ち、該ペプチドそれ自体が該疾患の治療(寛解)方向に生理機能を持つ(「治療ペプチド」という)場合、該ペプチドの量もしくは活性を増大させる物質を患者に投与することにより、また、該ペプチドそれ自体が該疾患の増悪方向に生理機能を持つ場合(「増悪ペプチド」という)、該ペプチドの量もしくは活性を低減させる物質を投与することにより、それぞれ該疾患を治療することができる。

[0052] 本発明はまた、本発明のペプチドが治療ペプチドとして作用する場合に、該ペプチドの量もしくは活性を増大させる、および/または、本発明のペプチドが増悪ペプチドとして作用する場合に、該ペプチドの量もしくは活性を低減させることによる、膵臓

癌の治療方法を提供する。該治療方法は、具体的には、治療ペプチドとしての本発明のペプチドの量もしくは活性を増大させる物質および／または増悪ペプチドとしての本発明のペプチドの量もしくは活性を低減させる物質の有効量を、膵臓癌患者に投与することを含む。従って、本発明はまた、治療ペプチドとしての本発明のペプチドの量もしくは活性を増大させる物質および／または増悪ペプチドとしての本発明のペプチドの量もしくは活性を低減させる物質を含有してなる、膵臓癌治療剤を提供する。

具体的には、治療ペプチドとしての本発明のペプチドの活性を増大させる物質としては、該ペプチド自体あるいはそれと同様のアゴニスト作用を有する分子が挙げられる。あるいは、治療ペプチドとしての本発明のペプチドの活性を増大させる物質として、該ペプチドの非中和抗体、好ましくはアゴニスト抗体なども挙げることができる。一方、増悪ペプチドとしての本発明のペプチドの活性を低減させる物質としては、該ペプチドのアンタゴニスト作用を有する分子、あるいは該ペプチドに対する中和抗体などが挙げられる。

また、治療ペプチドとしての本発明のペプチドの産生を増大させる物質としては、生体内に存在する親蛋白質(フィブリノーゲン、apoE)から該ペプチドを遊離する分解酵素、該ペプチドのN末側および／またはC末側に該分解酵素により認識・切断されるアミノ酸配列をさらに含む、該分解酵素の基質もしくは基質アナログ分子、該分解酵素の産生を促進する分子(類似化合物を含む)、該分解酵素の活性を促進する分子、該分解酵素のインヒビターの産生を抑制する分子などが挙げられる。該ペプチドのN末側および／またはC末側のアミノ酸配列から、該ペプチドを遊離させる分解酵素の存在が示唆され、該ペプチドのN末側および／またはC末側のアミノ酸配列をプローブにした分解酵素探索と同定が可能となる。こうして同定された分解酵素の基質もしくは基質アナログ分子、即ち、該ペプチドのN末側および／またはC末側に該分解酵素により認識・切断されるアミノ酸配列をさらに含むペプチド分子は、膵臓癌患者の体内で該分解酵素により切断されて治療ペプチドとしての本発明のペプチドもしくはそのアナログ分子を遊離するので、同様の治療効果を奏することができる。一方、同定された分解酵素の産生および／または活性を促進する物質も、間接的に治療

ペプチドとしての本発明のペプチドの産生を増大させることができる。これらの物質は、標的の分解酵素が同定されれば、自体公知の手法によりスクリーニングし、あるいは分子設計することができる。

一方、増悪ペプチドとしての本発明のペプチドの産生を低減させる物質としては、生体内に存在する蛋白質から該ペプチドを遊離する分解酵素の産生を抑制する分子、該分解酵素のインヒビター、該インヒビターの産生を促進する分子などが挙げられる。増悪ペプチドとしての本発明のペプチドを遊離する分解酵素は、上記治療ペプチドとしての本発明のペプチドと同様の手法により探索・同定することができる。こうして同定された分解酵素を用いて、自体公知の手法により、該分解酵素の産生もしくは活性を直接または間接的に抑制(阻害)する物質をスクリーニングし、あるいは分子設計することができる。

[0053] 治療ペプチドとしての本発明のペプチドの量もしくは活性を増大させる物質および増悪ペプチドとしての本発明のペプチドの量もしくは活性を低減させる物質は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤、関節内注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記化合物またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤[例、ポリソルベート80、HCO

—50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)]などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記化合物またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

[0054] 上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mgの上記化合物が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記治療ペプチドとしての本発明のペプチドの量もしくは活性を増大させる物質または増悪ペプチドとしての本発明のペプチドの量もしくは活性を低減させる物質との配合により、好ましくない相互作用を生じない限り、他の活性成分を含有してもよい。

[0055] このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトに対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

治療ペプチドとしての本発明のペプチドの量もしくは活性を増大させる物質および増悪ペプチドとしての本発明のペプチドの量もしくは活性を低減させる物質の投与量は、その作用、投与ルート、患者の重篤度、年齢、体重、薬物受容性などにより差異はあるが、例えば、成人1日あたり活性成分量として約0.0008～約25mg/kg、好ましくは約0.008～約2mg/kgの範囲であり、これを1回もしくは数回に分けて投与することができる。

[0056] 以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

実施例

[0057] 実施例1 BlotChipを用いたプロファイリング解析

各種癌患者の血清並びに健常者血清1.5 μ Lを電気泳動用サンプル処理液(NuPAGE(登録商標)LDS Sample Buffer 4x ;Invitrogen)4.5 μ Lと混合し70℃で10分間、加

熱処理した後、4-12%グラジエントポリアクリルアミドゲル(Invitrogen)にアプライし電気泳動を行った。電気泳動終了後、ゲルを切り出しBLOTCHIP(登録商標)(Protosera, Inc.)に積層し電気転写用バッファー(BLOTBufferTM;Protosera, Inc.)中で90mA, 120分間転写した。転写終了後、チップの表面を超純水でリンスし、チップ全体にマトリックス(α -Cyano-4-hydroxy cinamic acid)を塗布後、matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer (Bruker Daltonics社製 Ultra-FlexII)で質量分析を行った。測定パラメータは、Detector voltage 1685V, Suppression1000, Laser Intensity は28~35のFuzzyモードで、1チップあたり415点、1点あたり500回のレーザー照射で、総計207,500回レーザー照射を行った。得られたスペクトル中の各ピーク強度をM/z 毎に積算し、1個の積算スペクトルに変換した。積算スペクトルをClinProTools (Bruker Daltonik GmbH) を用いて、患者血清と健常者血清の間でディファレンシャルプロファイリング解析を行った。さらにこうして得られた解析結果を実際の積算スペクトル中のピークと照合した。

その結果、膵臓癌患者群において、ピーク強度が、健常者群と比較して顕著に高値を示す、分子量約1616、約2410および約2930の3種のペプチド(それぞれペプチド1~3と命名)が検出された(表1~3)。

[0058] [表1]

ペプチド 1			
疾患名	患者数	ピーク強度	T検定 p値
膵癌	8	14884	0.000005680
乳癌	9	1166	0.000000409
子宮体癌	6	0	0.000000080
卵巣癌	10	2109	0.000001423
前立腺癌	5	430	0.000000140
子宮頸癌	7	482	0.000000149
肺癌	9	6617	0.001093650
胆嚢・胆管癌	7	3707	0.000017537
食道癌	8	462	0.000000007
胃癌	9	944	0.000000276
大腸・直腸癌	8	84	0.000000003
造血器腫瘍	9	5271	0.000278305
健常者	10	1853	-

膵臓癌は健常者との検定

他の癌患者は膵臓癌患者との検定

[0059] [表2]

ペプチド 2

疾患名	患者数	ピーク強度	T検定 p値
膵癌	8	2501	0.000966180
乳癌	9	326	0.004619852
子宮体癌	6	98	0.001457365
卵巣癌	10	692	0.018067663
前立腺癌	5	0	0.000966180
子宮頸癌	7	152	0.001907947
肺癌	9	264	0.003148298
胆嚢・胆管癌	7	2339	0.841507643
食道癌	8	539	0.007247593
胃癌	9	77	0.001295909
大腸・直腸癌	8	142	0.000953755
造血器腫瘍	9	499	0.007689856
健常者	10	0	-

膵臓癌は健常者との検定

他の癌患者は膵臓癌患者との検定

[0060] [表3]

ペプチド 3

疾患名	患者数	ピーク強度	T検定 p値
膵癌	8	11708	0.0073241586405119
乳癌	9	3573	0.0000000004434938
子宮体癌	6	2594	0.0000000000382171
卵巣癌	10	1478	0.0000000000025276
前立腺癌	5	2515	0.0000000000807637
子宮頸癌	7	872	0.0000000000004272
肺癌	9	3930	0.0000000136752553
胆嚢・胆管癌	7	2498	0.0000000000221907
食道癌	8	2240	0.0000000000007784
胃癌	9	3277	0.0000000002254914
大腸・直腸癌	8	895	0.0000000000000001
造血器腫瘍	9	4685	0.0000000290580642
健常者	10	5447	-

膵臓癌は健常者との検定

他の癌患者は膵臓癌患者との検定

[0061] 次に、膵臓癌患者について、組織型ごとに該ペプチドのピーク強度を測定・比較した結果、病気分類(1997年、UICC)全6期の最も早期である0期に位置づけられる上皮内癌(Tis)でも、該ペプチドが明瞭に検出された(表4)。このことは、病気分類のII期(2cm以上、転移あり)でも病理組織学的な微小浸潤については画像検査(MRI、CT等)で診断不可能とされる、いわゆる「見えない癌」の早期診断が可能となり得ることを意味する。

[0062] [表4]

ペプチド 1

組織型	性別	患者数	ピーク強度 測定値
上皮内癌	男	1	11,014
浸潤性膵管癌 管状腺癌 高分化型	男	2	28,137
	女	1	20,140
不明	-	4	7,910
健常者	男	10	1,853

ペプチド 2

組織型	性別	患者数	ピーク強度 測定値
上皮内癌	男	1	4,062
浸潤性膵管癌 管状腺癌 高分化型	男	2	2,496
	女	1	1,255
不明	-	4	2,425
健常者	男	10	0

ペプチド 3

組織型	性別	患者数	ピーク強度 測定値
上皮内癌	男	1	8,083
浸潤性膵管癌 管状腺癌 高分化型	男	2	14,308
	女	1	10,655
不明	-	4	11,578
健常者	男	10	5,447

[0063] 実施例2 BlotChip上でのde novo MS/MS解析によるペプチドの同定

同定にはmatrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer (Bruker Daltonics社製Ultra-FlexII)を使用し、Bradykinin, AngiotensinII, AngiotensinI, SubstanceP, Bombesin, Renin Substrate, ACTH Clip{1-17}, ACTH Clip{18-39}, Somatostatinを用いて質量校正を行った。その後、リフレクトロン測定モードでプロファイリングをとり、選択したペプチドピークとそのフラグメントイオンからBiotools(Bruker Daltonik GmbH)に組み込まれているMASCOT検索エンジンを通して、NCBInr及び、SwissProtデータベースと合わせ、MS/MS解析による同定を行った。

その結果、ペプチド1～3は、それぞれ配列番号1～3に示される各アミノ酸配列からなるペプチドであると同定された。ホモロジー検索の結果、ペプチド1はフィブリノーゲンのトロンビン分解産物であるFPAがリン酸化されたもの、ペプチド2はapoEタンパク質の170-192位に相当するフラグメント、ペプチド3はフィブリノーゲンA α 鎖前駆体ポリペプチドの571-601位に相当するフラグメントであることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0064] 本発明の新規な膵臓癌診断マーカーを利用した臨床検査方法は、膵臓癌を迅速且つ的確に判断できるので、該疾患の早期発見、早期治療が可能となる点で有用である。また、本発明における測定対象たる本発明のペプチドは、それ自体、これらの疾患における創薬ターゲットとなり得るので、膵臓癌の新規治療薬のスクリーニング、並びにそれらを用いた該疾患の治療に利用し得る点で、極めて有用である。

本出願は、日本で出願された特願2008-000776を基礎としており、それらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

- [1] 被験者より採取した生体試料中の、配列番号1、2および3に示される各アミノ酸配列からなるペプチド群より選ばれる1以上のペプチドの量を測定することを特徴とする、該被験者における膵臓癌の診断のための検査方法。
- [2] 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるペプチドがリン酸化されている、請求項1記載の方法。
- [3] 生体試料が体液である、請求項1または2記載の方法。
- [4] 体液が血液、血漿、血清、唾液、尿、髄液、骨髄液、胸水、腹水、関節液、涙液、眼房水、硝子体液およびリンパ液からなる群より選択される、請求項3記載の方法。
- [5] 生体試料を質量分析にかけることを含む、請求項1～4のいずれかに記載の方法。
- [6] 配列番号1、2および3に示される各アミノ酸配列からなる各ペプチドを特異的に認識する抗体群より選ばれる1以上の抗体を用いることを特徴とする、請求項1～4のいずれかに記載の方法。
- [7] 患者から時系列で生体試料を採取し、該試料における、配列番号1、2および3に示される各アミノ酸配列からなるペプチド群より選ばれる1以上のペプチドの量の経時変化を調べることを特徴とする、請求項1～6のいずれかに記載の方法。
- [8] 膵臓癌患者における治療効果の評価方法であって、治療が施される前後に該患者から採取した生体試料における、配列番号1、2および3に示される各アミノ酸配列からなるペプチド群より選ばれる1以上のペプチドの量の変化を調べることを特徴とする方法。
- [9] 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるペプチドがリン酸化されている、請求項8記載の方法。
- [10] 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるペプチド。
- [11] 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるペプチド。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/050088

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/574(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i, C07K7/08(2006.01)n, C07K14/705(2006.01)n

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)

G01N33/574, G01N27/62, C07K7/08, C07K14/705

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009

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

CAPLUS (STN), JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A/X	Josep Villanueva et al., "Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns", The Journal of Clinical Investigation, 2006.01, Vol.116, No.1, Page271-284 (Fig 5, 6, 7, page 277, lines 7 to 53)	1-9/10,11
A	WO 2006/129717 A1 (National University Corporation Chiba University), 07 December, 2006 (07.12.06), Par. Nos. [0015] to [0018] (Family: none)	1-9,11
A	JP 2006-308533 A (Shimadzu Corp.), 09 November, 2006 (09.11.06), Claims 1 to 17; Par. Nos. [0060] to [0063] (Family: none)	1-9,11

☒ 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 February, 2009 (12.02.09)Date of mailing of the international search report
24 February, 2009 (24.02.09)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/050088

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/125021 A2 (DANA FARBER CANCER INSTITUTE), 23 November, 2006 (23.11.06), Page 10, lines 9 to 11; table A (Family: none)	1-9, 11
P, X	WO 2008/072676 A1 (Kagoshima University, Protosera Inc.), 19 June, 2008 (19.06.08), Par. Nos. [0010] to [0013] (Family: none)	1, 3-8
E, A	JP 2009-029731 A (Japan Health Sciences Foundation), 12 February, 2009 (12.02.09), Par. Nos. [0021] to [0030] (Family: none)	1, 3-8, 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/050088

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:

The amino acid sequences depicted in SEQ ID NOs:1-3 recited in claim 1 share no common amino acid sequence or function, and share only a common matter that they are peptides which can act as markers for detecting pancreatic cancer in a subject. However, a matter that Apo-C-1 protein is used as a marker for detecting pancreatic cancer is already known, as disclosed in a document WO 2006/129717 A1. Therefore, the matter cannot be regarded as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2, second sentence.

Thus, these inventions cannot be regarded as a group of inventions so linked to one another as to form a single general inventive concept, and these inventions include three groups of inventions relating to distinct three peptides.

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.:

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

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/574 (2006.01)i, G01N27/62 (2006.01)i, C07K7/08 (2006.01)n, C07K14/705 (2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/574, G01N27/62, C07K7/08, C07K14/705

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 9 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 9 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 9 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus (STN)、JSTPlus (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A/X	Josep Villanueva et al., "Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns", The Journal of Clinical Investigation, 2006.01, Vol.116, No.1, Page271-284 (Fig 5,6,7, 第 277 ページ第 7 行から第 53 行)	1-9/10, 11
A	WO 2006/129717 A1 (国立大学法人 千葉大学) 2006.12.07, 段落【0015】 - 【0018】 (ファミリーなし)	1-9, 11

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 2 . 0 2 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

2 4 . 0 2 . 2 0 0 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

2 J

4 0 7 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2006-308533 A (株式会社島津製作所) 2006. 11. 09, 特許請求の範囲 1-17, 段落【0060】－【0063】 (ファミリーなし)	1-9, 11
A	WO 2006/125021 A2 (DANA FARBER CANCER INSTITUTE) 2006. 11. 23, 第 10 ページ第 9 行から第 11 行, 表 A (ファミリーなし)	1-9, 11
P, X	WO 2008/072676 A1 (国立大学法人鹿児島大学、株式会社プロトセラ) 2008. 06. 19, 段落【0010】－【0013】 (ファミリーなし)	1, 3-8
E, A	JP 2009-029731 A (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 2009. 02. 12, 段落【0021】－【0030】 (ファミリーなし)	1, 3-8, 11

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1に記載された配列番号1-3に記されるアミノ酸配列は、共通のアミノ酸配列や機能を有するものでなく、被験者から膵臓癌を検出するためのマーカーとして機能するペプチドである点でのみ共通する。しかしながら、膵臓癌を検出するマーカーとして、ApoC-1蛋白質を使用することが文献 WO 2006/129717 A1 に記載されているように公知の事項であるから、当該事項は、PCT 規則 13.2 の第2文の意味において特別な技術的特徴ではない。

よってこれらの一群の発明は、単一の一般的発明概念を形成しているように関連している一群の発明であるとはいえず、異なった3つのペプチドに関する3つの発明からなる発明群であると認める。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。