【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】令和5年4月24日(2023.4.24)

【国際公開番号】WO2020/218121
【出願番号】特願2021-516037(P2021-516037)
【国際特許分類】
Ｇ０１Ｎ 33/574(2006.01)
Ｃ０７Ｋ 14/47(2006.01)
Ｃ０７Ｋ 16/32(2006.01)
【ＦＩ】
Ｇ０１Ｎ 33/574 ＡＺＮＡ
Ｃ０７Ｋ 14/47
Ｃ０７Ｋ 16/32

【手続補正書】
【提出日】令和5年4月14日(2023.4.14)
【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】
癌（ただし腎細胞癌を除く）を検出する方法であって、
検体において、アズロシディン（ＡＺＵ１）量を測定することを含み、
測定値があらかじめ設定された基準値を超えた場合に癌が検出されたとする、方法。
【請求項２】
前記癌が、胃癌、乳癌、大腸癌及び肺癌からなる群から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
ＡＺＵ１量の測定が、ＡＺＵ１を特異的に認識する抗体を用いて行われる、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記検体において、ＡＺＵ１が存在する細胞分泌微粒子と同一の細胞分泌微粒子上に存在する第二のマーカーを、さらに検出することを含み、
前記第二のマーカーは表２に記載されたいずれか少なくとも１つである、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。

【表１－１】

（表２）

タンパク質（78種類）（ページ 1/2）

	（遺伝子名）	（遺伝子シンボル）	(UniProtKB)
1	actin gamma 1	ACTG1	P63261
2	actin, beta	ACTB	P60709
3	albumin	ALB	P02768
4	aldolase A, fructose-bisphosphate	ALDOA	P04075
5	annexin A2	ANXA2	P07355
6	annexin A5	ANXA5	P08758
7	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	CAV1	Q03135
8	caveolin 2	CAV2	P51636
9	CD151 antigen	CD151	P48509
10	CD24 molecule	CD24	P25063
11	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	CD40	P25942
12	CD44 molecule (Indian blood group)	CD44	P16070
13	CD58 molecule	CD58	P19256
14	CD63 molecule	CD63	P08962
15	CD81 molecule	CD81	P60033
16	CD82 molecule	CD82	P27701
17	CD9 molecule	CD9	P21926
18	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	CXCR4	P61073
19	cofilin 1 (non-muscle)	CFL1	P23528
20	enolase 1, (alpha)	ENO1	P06733
21	epithelial cell adhesion molecule	EPCAM	P16422
22	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	EEF1A1	P68104
23	eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	P13639
24	flotillin 1	FLOT1	O75955
25	flotillin 2	FLOT2	Q14254
26	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	P04406
27	heat shock 70kDa protein 1A	HSPA1A	P08107
28	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	HSPA5	P11021
29	heat shock 70kDa protein 8	HSPA8	P11142
30	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	HSP90AA1	P07900
31	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	HSP90AB1	P08238
32	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)	ITGA2B	P08514
33	intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	P05362
34	lactate dehydrogenase A	LDHA	P00338
35	leukocyte antigen CD37	CD37	P11049
36	leukocyte surface antigen CD53	CD53	P19397
37	milk fat globule-EGF factor 8 protein	MFGE8	Q08431
38	moesin	MSN	P26038
39	peripherin-2	PRPH2	P23942
40	phosphoglycerate kinase 1	PGK1	P00558

【表１－２】

（表２つづき）

タンパク質（78種類）（ページ 2/2）

（遺伝子名）	（遺伝子シンボル）	(UniProtKB)
41 programmed cell death 6 interacting protein	PDCD6IP	Q8WUM4
42 putative tetraspanin-19	TSPAN19	P0C672
43 pyruvate kinase, muscle	PKM	P14618
44 RAB5A, member RAS oncogene family	RAB5A	P20339
45 RAB7A, member RAS oncogene family	RAB7A	P51149
46 rod outer segment membrane protein 1	ROM1	Q03395
47 selectin L	SELL	P14151
48 selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)	SELP	P16109
49 syndecan binding protein (syntenin)	SDCBP	O00560
50 tetraspanin-1	TSPAN1	O60635
51 tetraspanin-10	TSPAN10	Q9H1Z9
52 tetraspanin-11	TSPAN11	A1L157
53 tetraspanin-12	TSPAN12	O95859
54 tetraspanin-13	TSPAN13	O95857
55 tetraspanin-14	TSPAN14	Q8NG11
56 tetraspanin-15	TSPAN15	O95858
57 tetraspanin-16	TSPAN16	Q9UKR8
58 tetraspanin-17	TSPAN17	Q96FV3
59 tetraspanin-18	TSPAN18	Q96SJ8
60 tetraspanin-2	TSPAN2	O60636
61 tetraspanin-3	TSPAN3	O60637
62 tetraspanin-31	TSPAN31	Q12999
63 tetraspanin-32	TSPAN32	Q96QS1
64 tetraspanin-33	TSPAN33	Q86UF1
65 tetraspanin-4	TSPAN4	O14817
66 tetraspanin-5	TSPAN5	P62079
67 tetraspanin-6	TSPAN6	O43657
68 tetraspanin-7	TSPAN7	P41732
69 tetraspanin-8	TSPAN8	P19075
70 tetraspanin-9	TSPAN9	O75954
71 tissue specific transplantation antigen P35B	TSTA3	Q13630
72 transmembrane 9 superfamily protein member 4	TM9SF4	Q92544
73 tumor susceptibility 101	TSG101	Q99816
74 tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon	YWHAE	P62258
75 tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta	YWHAZ	P63104
76 uroplakin-1a	UPK1A	O00322
77 uroplakin-1b	UPK1B	O75841
78 vimentin	VIM	P08670

脂質（1種類）

Phosphatidylserine

【請求項５】

前記第二のマーカーがＣＤ８１、ＣＤ６３、ＣＤ９およびホスファチジルセリンのうち少なくとも１つを含む、請求項４に記載の方法。

【請求項６】

第二のマーカーの検出が、第二のマーカーを特異的に認識する抗体または受容体を用いて行われる、請求項４または５に記載の方法。

【請求項７】

ＡＺＵ１を特異的に認識する抗体を含む、癌（ただし腎細胞癌を除く）の検出に使用するための試薬。

【請求項８】

前記癌が、胃癌、乳癌、大腸癌及び肺癌からなる群から選択される、請求項７に記載の試薬。

【請求項９】

前記表２に記載されたいずれかの第二のマーカーを特異的に認識する抗体または受容体をさらに含む、請求項７又は８に記載の試薬。

【請求項１０】

前記第二のマーカーが、ＣＤ８１、ＣＤ６３、ＣＤ９およびホスファチジルセリンの少なくとも１つを含む、請求項９に記載の試薬。

【手続補正２】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１８】
本発明において測定対象であるＡＺＵ１は、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢのアクセッション番号Ｐ２０１６０において開示されているヒトＡＺＵ１タンパク質のアミノ酸配列のうち、２７残基目のイソロイシンから２４８残基目のプロリンまでの配列を少なくとも含むペプチド、または、前記配列と８０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチドである。前記同一性は、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上である。また、このペプチドは、前記配列において１または数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸からなるペプチドであってもよい。なお、数個とは、好ましくは２～２０個、より好ましくは２～１０個、さらに好ましくは２～５個をいう。また、前記配列の片側又は両側に他のペプチドフラグメントを有していてもよい。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２１】

【表２－１】

（表２）

タンパク質（78種類）（ページ 1/2）

	（遺伝子名）	（遺伝子シンボル）	(UniProtKB)
1	actin gamma 1	ACTG1	P63261
2	actin, beta	ACTB	P60709
3	albumin	ALB	P02768
4	aldolase A, fructose-bisphosphate	ALDOA	P04075
5	annexin A2	ANXA2	P07355
6	annexin A5	ANXA5	P08758
7	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	CAV1	Q03135
8	caveolin 2	CAV2	P51636
9	CD151 antigen	CD151	P48509
10	CD24 molecule	CD24	P25063
11	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	CD40	P25942
12	CD44 molecule (Indian blood group)	CD44	P16070
13	CD58 molecule	CD58	P19256
14	CD63 molecule	CD63	P08962
15	CD81 molecule	CD81	P60033
16	CD82 molecule	CD82	P27701
17	CD9 molecule	CD9	P21926
18	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	CXCR4	P61073
19	cofilin 1 (non-muscle)	CFL1	P23528
20	enolase 1, (alpha)	ENO1	P06733
21	epithelial cell adhesion molecule	EPCAM	P16422
22	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	EEF1A1	P68104
23	eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	P13639
24	flotillin 1	FLOT1	O75955
25	flotillin 2	FLOT2	Q14254
26	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	P04406
27	heat shock 70kDa protein 1A	HSPA1A	P08107
28	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	HSPA5	P11021
29	heat shock 70kDa protein 8	HSPA8	P11142
30	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	HSP90AA1	P07900
31	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	HSP90AB1	P08238
32	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)	ITGA2B	P08514
33	intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	P05362
34	lactate dehydrogenase A	LDHA	P00338
35	leukocyte antigen CD37	CD37	P11049
36	leukocyte surface antigen CD53	CD53	P19397
37	milk fat globule-EGF factor 8 protein	MFGE8	Q08431
38	moesin	MSN	P26038
39	peripherin-2	PRPH2	P23942
40	phosphoglycerate kinase 1	PGK1	P00558

【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２２】

【表２－２】

（表２つづき）

タンパク質（78種類）（ページ 2/2）

	（遺伝子名）	（遺伝子シンボル）	(UniProtKB)
41	programmed cell death 6 interacting protein	PDCD6IP	Q8WUM4
42	putative tetraspanin-19	TSPAN19	P0C672
43	pyruvate kinase, muscle	PKM	P14618
44	RAB5A, member RAS oncogene family	RAB5A	P20339
45	RAB7A, member RAS oncogene family	RAB7A	P51149
46	rod outer segment membrane protein 1	ROM1	Q03395
47	selectin L	SELL	P14151
48	selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)	SELP	P16109
49	syndecan binding protein (syntenin)	SDCBP	O00560
50	tetraspanin-1	TSPAN1	O60635
51	tetraspanin-10	TSPAN10	Q9H1Z9
52	tetraspanin-11	TSPAN11	A1L157
53	tetraspanin-12	TSPAN12	O95859
54	tetraspanin-13	TSPAN13	O95857
55	tetraspanin-14	TSPAN14	Q8NG11
56	tetraspanin-15	TSPAN15	O95858
57	tetraspanin-16	TSPAN16	Q9UKR8
58	tetraspanin-17	TSPAN17	Q96FV3
59	tetraspanin-18	TSPAN18	Q96SJ8
60	tetraspanin-2	TSPAN2	O60636
61	tetraspanin-3	TSPAN3	O60637
62	tetraspanin-31	TSPAN31	Q12999
63	tetraspanin-32	TSPAN32	Q96QS1
64	tetraspanin-33	TSPAN33	Q86UF1
65	tetraspanin-4	TSPAN4	O14817
66	tetraspanin-5	TSPAN5	P62079
67	tetraspanin-6	TSPAN6	O43657
68	tetraspanin-7	TSPAN7	P41732
69	tetraspanin-8	TSPAN8	P19075
70	tetraspanin-9	TSPAN9	O75954
71	tissue specific transplantation antigen P35B	TSTA3	Q13630
72	transmembrane 9 superfamily protein member 4	TM9SF4	Q92544
73	tumor susceptibility 101	TSG101	Q99816
74	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon	YWHAE	P62258
75	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta	YWHAZ	P63104
76	uroplakin-1a	UPK1A	O00322
77	uroplakin-1b	UPK1B	O75841
78	vimentin	VIM	P08670

脂質（1種類）

Phosphatidylserine

【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００５５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５５】
次に、本方式で作製した試薬を用いてＡＺＵ１を検出し測定するには、以下の［１１］～［１３］に示す方法で行えばよい。

［１１］前述した［９］で作製したビオチン標識抗体等１、［１０］で作製したシグナル発生物質標識抗体等２、および検体を、一定時間、一定温度、遮光条件下のもと接触させ、サンドイッチ複合体を形成させる。反応条件は、温度４℃から４０℃の範囲で、５分間から１８０分間反応させればよい。

［１２］続いてストレプトアビジン被覆標識物質を添加して一定時間、一定温度、遮光条件下のもと接触させ、ビオチン標識抗体とストレプトアビジン被覆標識物質とを結合させる。反応条件は、温度４℃から４０℃の範囲で、５分間から１８０分間反応させればよい。

［１３］分析装置を用いて、励起光を照射したときにシグナル発生物質標識抗体等２から発せられるシグナルを定量し、既知濃度のＡＺＵ１を標準として作成した検量線により、検体中のＡＺＵ１濃度を定量する。分析装置としては、例えばＥｎＳｐｉｒｅ（Ｐｅ

ｒｋｉｎＥｌｍｅｒ製）を好適に使用できる。
【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１０３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１０３】
測定値のボックスプロットを図１３に示す。健常者群および胃癌患者群のＣＥＡ濃度の最小値、２５パーセンタイル、中央値、７５パーセンタイル、最大値、９５％信頼区間におけるＣＥＡ濃度の範囲、およびマン・ホイットニーのＵ検定のｐ値を表１０に示す。