

(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2011-501176

(P2011-501176A)

(43) 公表日 平成23年1月6日(2011.1.6)

(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 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50	U
GO 1 N 30/90 (2006.01)	GO 1 N 30/90	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2010-530497 (P2010-530497)	(71) 出願人	504459559
(86) (22) 出願日	平成20年10月15日 (2008.10.15)		ファロン ファーマシューティカルズ オ
(85) 翻訳文提出日	平成22年4月20日 (2010.4.20)		サケ ユキチュア
(86) 国際出願番号	PCT/FI2008/050576		フィンランド共和国、エフイー-2052
(87) 国際公開番号	W02009/053523		0 ツルク、テキステカツ 6ペー
(87) 国際公開日	平成21年4月30日 (2009.4.30)	(74) 代理人	100098464
(31) 優先権主張番号	20070795		弁理士 河村 洸
(32) 優先日	平成19年10月24日 (2007.10.24)	(74) 代理人	100149630
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)		弁理士 藤森 洋介
		(74) 代理人	100154449
			弁理士 谷 征史
		(72) 発明者	ヤルカネン、シルパ
			フィンランド共和国、エフイー-2076
			0 ピースパンリスチ、ラウボランチェ
			79

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疾患の進展をモニターするための、および治療法の有効性を評価するための新規なバイオマーカー

(57) 【要約】

本発明は、患者において疾患の進展をモニターする方法、または患者におけるサイトカイン療法またはスタチン療法の有効性を評価する方法であって、該患者から得られた組織液中のCD73をバイオマーカーとして用いる方法に関する。本発明はまた、個体の組織液から得られた試料中のCD73タンパク質の測定方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者において疾患の進展をモニターする方法であって、該疾患が、

- a) 組織損傷、
- b) 心筋梗塞もしくは脳卒中に起因する再灌流障害、臓器移植または他の外科手術、
- c) 癌または癌転移、および
- d) 炎症性症状

からなる群より選択され、

かつ、該患者から得られた組織液中の CD73 を、バイオマーカーとして用いる方法。

【請求項 2】

前記方法が 2 以上の時点で繰返され、かつ先の分析結果と比較した、試料中の CD73 レベルの変化が、疾患の進行を示すために用いられる請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記疾患が炎症性疾患である請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記炎症性疾患が、全身性炎症反応症候群 (SIRS)、急性肺損傷 (ALI)、多臓器不全 (MOF)、虚血再灌流障害 (IRI) または薬物有害反応 (ADRS) である請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記方法が 2 以上の時点で繰返され、かつ先の分析結果と比較した、試料中の CD73 レベルの変化を、疾患のリグレッションを示すために用いる請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

疾患を患っている患者におけるサイトカイン療法またはスタチン療法の有効性を評価する方法であって、該患者から得られた組織液中の CD73 をバイオマーカーとして用いる方法。

【請求項 7】

前記方法が 2 以上の時点で繰返され、かつ先の分析結果と比較した、試料中の CD73 レベルの変化が、前記療法の有効性を評価するために用いられる請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

前記サイトカイン療法が、

- a) 組織損傷、
- b) 心筋梗塞もしくは脳卒中に起因する再灌流障害、臓器移植または他の外科手術、
- c) 癌または癌転移、および
- d) 炎症性症状

からなる群より選択される疾患を治療するために用いられる請求項 6 または 7 記載の方法。

【請求項 9】

前記スタチン療法が、心血管疾患、炎症性症状、痴呆、癌、核白内障および肺高血圧症からなる群より選択される疾患を治療するために用いられる請求項 6 または 7 記載方法。

【請求項 10】

以下の i) または ii) による、個体の組織液から得られた試料中の CD73 タンパク質の測定方法：

- i) CD73 タンパク質を認識する結合剤に該試料をさらし、該結合剤を定量することにより、該試料中の CD73 タンパク質のレベルを定量する、または
- ii) 薄層クロマトグラフィーを用いることにより、もしくは該試料を CD73 基質にさらし、該基質の変化をモニターすることにより、該試料中の CD73 タンパク質の活性を検出する。

【請求項 11】

前記結合剤が、抗体または抗体フラグメントである請求項 9 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、疾患の進展をモニターするための、または治療法の有効性を評価するための、組織液におけるバイオマーカーとしてのCD73の使用に関する。また、本発明は、組織液中のCD73タンパク質の測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

本明細書において本発明の背景を説明するために用いられる刊行物および他の資料、特に、実施に関する詳細を提供する事例は、参照することにより組み込まれる。

【0003】

CD73は、5'-エクトヌクレオチダーゼ活性を有する細胞表面酵素である。したがって、CD73は、一リン酸化プリンヌクレオチドから対応するヌクレオシドへの変換を媒介する。例えば、AMPからアデノシンへの脱リン酸化は、CD73が触媒する。CD73は、血漿中で可溶性としても存在し、可溶性酵素は、膜結合型と同じ酵素活性を有する。

【0004】

アデノシンは、内皮細胞透過性の生理的調節因子の1つであり[1、2]、したがって、急性肺損傷、全身性炎症反応症候群、呼吸促進症候群、高山病のような、多くの障害の病因に関与できる。内皮透過性の変化は、炎症、損傷および癌においても起こる。CD73は、正常な状態、低酸素および人工呼吸器により引き起こされる肺損傷において、アデノシン介在機序を介して内皮透過性を制御する[3~7]。

【0005】

CD73は、特定のサイトカインにより誘導される。最も重要なことに、インターフェロナルファおよびベータは、ヒトにおいてCD73の発現および活性を増加させることが報告されている(8、国際公開第2004/084933号パンフレット、11)。これらのサイトカインは、種々の疾患の治療にも臨床的に使用されている。例えば、インターフェロナルファは、ある種の感染や、肝炎や有毛細胞白血病のような悪性疾患の治療に使用されている。一方、インターフェロンベータは、多発性硬化症における炎症の抑制に広く用いられている。しかし、多くの場合、インターフェロン治療に対する有益な反応は、患者の亜集団で見られるのみであり、初期に反応した患者も、その後治療に反応を示さなくなることがある。したがって、治療に対する体の生物学的反応性を反映する、容易に測定可能なバイオマーカーの開発が必要とされている。

【0006】

国際公開第2004/084933号パンフレットには、内皮CD73発現を誘導し、続いてアデノシン濃度を上昇させるためのサイトカインの個体における使用が開示されている。ラットでの多臓器不全の治療における、アデノシン一リン酸(AMP)と組み合わせたインターフェロンベータの使用が記載されている。

【0007】

国際公開第2007/042602号パンフレットには、虚血再灌流障害または多臓器不全の治療または予防のためのそのままの(plain)インターフェロンベータの使用が記載されている。

【0008】

スタチンは、コレステロール濃度を低下させるために用いられる抗高脂血症剤であり、患者においてCD73発現を誘導することが知られている。

【0009】

しかし、先行技術には、疾患の進展をモニターするための、または治療法の有効性を評価するためのバイオマーカーとして使用するための、血清や他のいかなる組織液中でもCD73タンパク質を測定することに関する記載はない。

【発明の概要】

【0010】

10

20

30

40

50

本発明者らは、可溶性CD73活性の測定が、疾患の重症度および治療に対する反応性をモニターするために使用できることを示している。したがって、本発明者らは、任意の技術によりCD73の発現レベルまたは活性を解析することで、疾患の経過または治療反応について重要な情報を提供できるものと確信する。

【0011】

したがって、ある態様において、本発明は、患者における疾患の進展をモニターする方法であって、該疾患が、

- a) 組織損傷、
- b) 心筋梗塞もしくは脳卒中に起因する再灌流障害、臓器移植または他の外科手術、
- c) 癌または癌転移、および
- d) 炎症性症状

からなる群より選択され、

かつ、該患者から得られた組織液中のCD73を、バイオマーカーとして用いる方法に関する。

【0012】

別の態様において、本発明は、疾患を患っている患者におけるサイトカイン療法またはスタチン療法の有効性を評価する方法であって、該患者から得られた組織液中のCD73をバイオマーカーとして用いる方法に関する。

【0013】

別の態様において、本発明は、以下のi)またはii)による、個体の組織液から得られた試料中のCD73タンパク質の測定方法に関する：

- i) CD73タンパク質を認識する結合剤に該試料を晒し、該結合剤を定量することにより、該試料中のCD73タンパク質のレベルを定量する、または
- ii) 薄層クロマトグラフィーを用いることにより、もしくは該試料をCD73基質に晒し、該基質の変化をモニターすることにより、該試料中のCD73タンパク質の活性を検出する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】腸の虚血 - 再灌流障害は、一次的および二次的組織損傷を誘発する。腸間膜動脈を30分間閉塞したのち、4時間再灌流した。偽手術（開腹術のみ）後および虚血再灌流（IR）障害の誘発後の野生型マウスにおける（A）腸および（B）肺の代表的な顕微鏡写真。

【図2】肺CD73 / 5'NT活性は、疾患の活動性と逆相関する。CD73 / 5'NTマウスおよびこの野生型（WT）同腹子に、偽手術（偽）または30分間の腸管虚血とそれに続く240分間の再灌流（ALI）を施した。別の群では、ALIに曝した動物を、IFN- γ で前処置した。（A）肺CD73 / 5'NT活性（平均値 \pm SEM、1時間に1mgのタンパク質で加水分解されたAMP（nmol））は、TLCにより組織ライセートから測定した。（B）画像解析を用いて組織切片から測定した、肺における血管漏出（FITC結合デキストランの滲出）の半定量的解析（任意に選択したバックグラウンド値を超える蛍光値を示す切片領域（%）、平均値 \pm SEM）。表示した群の代表的な顕微鏡写真も示す。棒線は、50 μ m。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 。

【図3】膵炎を患っているSIRS患者におけるCD73 / 5'NT活性。図は、膵炎の重症度に対するCD73 / 5'NT活性を示す：0 = 軽症膵炎；1 = 臓器不全を伴わない重症膵炎；2 = 臓器不全を伴う重症膵炎；3 = 健常対照群。

【図4】あらゆる重症度の膵炎を有する患者の、集中治療室（ITU）総滞在時間に対するCD73 / 5'NT活性。

【発明を実施するための形態】

【0015】

定義と好ましい実施形態：

「患者」または「個体」との用語は、ヒトまたは動物の対象を示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 6 】

「疾患の進展をモニターする」との用語は、疾患の進行（例えば、疾患の悪化）または疾患のリグレッション（例えば、患者の回復）が、バイオマーカーの測定レベルを対照または同一の患者におけるバイオマーカーレベルの（異なる時点で行なわれた）1以上の先の測定値と比較することでなされることを意味する。例えば、先の測定結果または対照と比較したバイオマーカーレベルの減少は、疾患の進行を示すのに使用してもよく、一方、先の測定結果または対照と比較したバイオマーカーレベルの増加は、疾患のリグレッションを示すのに使用される。しかし、反対の方向でバイオマーカーレベルに影響を与える特定の疾患があり得る。

【 0 0 1 7 】

「組織液」との用語は、細胞を浸して取り囲んでいるあらゆる液体を含むものと理解されるべきである。この用語には、例えば、血液血漿、血清、リンパ、尿、滲出液（胸膜、腹膜）および脳脊髄液が含まれる。

【 0 0 1 8 】

「炎症性症状」との用語は、個体組織におけるあらゆる有害で望ましくない炎症反応を含むことを意味し、該炎症性症状は、組織損傷、心筋梗塞もしくは脳卒中に起因する再灌流障害、臓器移植または他の外科手術のような急性症状、あるいはアレルギー症状、自己免疫疾患、および炎症性疾患を含む慢性症状に起因してもよい。

【 0 0 1 9 】

その進展を、組織液中のCD73タンパク質を用いてモニターすることができる疾患は、典型的には

- a) 組織損傷、
 - b) 心筋梗塞もしくは脳卒中に起因する再灌流障害、臓器移植または他の外科手術、
 - c) 癌または癌転移、および
 - d) 炎症性症状
- からなる群より選択される。

【 0 0 2 0 】

患者の組織液中、特に血清中のCD73レベルに変化をもたらす典型的な疾患には、組織損傷；心筋梗塞もしくは脳卒中に起因する再灌流傷害、臓器移植もしくは他の外科手術；癌もしくは癌転移；あるいは前述の損傷もしくは再灌流傷害に起因する炎症性症状、またはアレルギー症状、自己免疫疾患および炎症性疾患を含む慢性症状に起因する炎症性症状が含まれる。このような慢性症状の例には、関節炎、喘息などのアレルギー症状、炎症性腸疾患もしくは皮膚の炎症性症状などの炎症性症状、乾癬、パーキンソン病、アルツハイマー病、自己免疫疾患、I型もしくはII型の糖尿病、アテローム性動脈硬化症、多発性硬化症、クローン病、または臓器移植による拒絶反応が挙げられる。特に、炎症性疾患である患全身性炎症反応症候群（SIRS）、急性肺損傷（ALI）、多臓器不全（MOF）、虚血再灌流障害（IRI）および薬物有害反応（ADRS）は、組織液CD73タンパク質の変化を誘導するはずである。

【 0 0 2 1 】

「サイトカイン」との用語には、生物においてシグナル伝達化合物として用いられるあらゆるタンパク質またはペプチドが含まれる。特に、この用語は、インターフェロンまたはインターロイキンを示すが、これらに限定されるものではない。サイトカインがインターフェロンの場合には、インターフェロンは、アルファ、ベータ、ガンマ、オメガまたはその他の任意のインターフェロンであってよく、前述のインターフェロンのいずれのサブタイプであってよい。インターフェロンは、前述の疾患の治療に用いられる。インターロイキンの例としては、IL-4、IL-10、IL-13およびIL-20が挙げられる。

【 0 0 2 2 】

「スタチン」は、個体においてコレステロールレベルを低下させるため、とりわけ心血管疾患のリスクを低下させるために用いられる抗高脂血症剤の1分類を形成する。また、

10

20

30

40

50

炎症性症状、痴呆、癌、核白内障および肺高血圧症も、スタチンによる治療に対して反応することができる。

【0023】

個体の組織液から得られた試料中のCD73タンパク質の測定は、該試料をCD73タンパク質を認識する結合剤にさらして、該結合剤を定量することによる該試料中のCD73タンパク質のレベルを定量する免疫検出により行うことができる。

【0024】

あるいは、検出は、薄層クロマトグラフィーを用いて該試料中のCD73タンパク質の活性を検出することにより、または該試料をCD73の基質にさらして、該基質の変化をモニターすることにより行うことができる。

10

【0025】

「結合剤」との用語には、抗体が含まれるものと理解され、これは、モノクローナルまたはポリクローナルまたは遺伝子工学的に合成されたもの；あらゆる抗体フラグメント；アプタマーおよびアフィボディ (affibodies)、およびCD73タンパク質上のエピトープと結合することができるあらゆる他の結合剤であってもよい。CD73抗体は、当該分野では公知であり、例えば、<http://www.biocompare.com/matrixsc/3194/6/67151/CD73.html>を参照。アフィボディとは、アフィボディA b社により開発された、新しい種類の結合剤、小さく、そして特に安定なタンパク質を示す。

【0026】

結合アッセイは、競合的または非競合的であってよい。好ましいアッセイの1つは、サンドイッチアッセイであり、この方法では、固体支持体に固定された捕捉抗体（または他の種類の結合剤）が、第1のエピトープでその捕捉に結合する抗原を含む試料にさらされ、そして抗原の別のエピトープに対する標識抗体（または他の種類の結合剤）が添加される。標識抗体は、直接（ホモジニアスアッセイ）または非固定化標識抗体の分離後に定量される。標識は、放射性同位元素、蛍光色素、酵素または他のあらゆる検出可能な標識であってよい。

20

【0027】

例えば、免疫検出の目的には、あらゆる適当な抗CD73特異抗体を試料から可溶性CD73を捕捉するために用いることができ、次に結合したタンパク質の量が、各種技術により定量される。例えば、サンドイッチELISA法を用いることができ、この方法では、一の抗CD73抗体が多穴プレートの底に固定化され、試料が添加されて、結合したCD73が別の抗CD73抗体を用いて検出される。次に、抗CD73抗体が、標識した二次抗体などの、抗体検出に適当な多数の技術のいずれかにより検出される。反応のCD73特異性は、無関係な抗体を捕捉抗体または検出抗体として採り入れ、これらの負の対照と抗CD73抗体とのシグナルを比較することで制御された。

30

【0028】

CD73活性の測定：

CD73活性は、公表されたプロトコールにしたがい、薄層クロマトグラフィーを用いて測定することができる。CD73活性は、AMP、またはCD73の基質として用いることができる他のプリンモノヌクレオチドから対応するヌクレオシドへの変換を測定するあらゆる酵素アッセイを用いて、測定することもできる。例えば、アッセイは、放射標識または蛍光標識した基質の変換に基づくことができる。検出方法は、基質濃度の減少、または生成物濃度もしくはリン酸基の放出の増加の定量によるものであってもよい。反応のCD73依存性は、AMP CPなどの公知のCD73阻害剤の存在下および非存在下でアッセイを行うことにより決定することができる。

40

【0029】

CD73の適当な基質は、例えば、アデノシン-5'-リン酸 (AMP)、イノシン-5'-リン酸塩 (IMP) などを含むヌクレオシド-5'-リン酸である。

【0030】

本発明は、次の非限定的な実験の項により説明される。

50

【0031】

実験の項

材料および方法

A L Iモデルおよび血管漏出

8世代C57BL/6バックグラウンド系統に戻し交配したCD73^{-/-}マウス、およびC57BL/6野生型(WT)マウスを用いた。これらのマウスは、CD73のmRNA、タンパク質および酵素活性を欠損する[3]。これらの動物は、体重、性別および年齢を一致させた。全てのマウスは、実験まで標準的なマウス固形飼料と水とを摂取できる状態であった。

【0032】

マウスは、塩酸ケタミン(100mg/kg体重、腹腔内)およびキシラジン(10mg/kg体重、腹腔内)で麻酔した。麻酔の間、マウスは通中の空気を自発換気した。手術中の体液喪失を代償するために、動物は手術前に1mlの滅菌生理食塩水を皮下に投与された。上腸間膜動脈を正中線開腹術(midline laparotomy)により切開し、微小血管鉗子により30分間閉塞した。偽動物は、血管閉塞なしで上腸間膜動脈切開を受けた。傷を一層縫合した。動物の体温は、虚血段階の間加熱灯により維持した。虚血後、微小血管鉗子を放し、傷を縫合し、動物は、皮下にさらに1mlの生理食塩水を投与された。235分間の再灌流後、マウスはFITC結合デキストラン(0.2ml滅菌生理食塩水中25mg/kg体重;分子量70,000D、モレキュラープローブ社(Molecular Probes))を投与された。マウスを、240分間の再灌流後に犠牲死させ、組織試料を採取した。虚血30分-再灌流240分のプロトコールは、実証されかつ再現可能なALIモデルである[9]。このプロトコールは、トゥルク(Turku)大学の動物倫理委員会(Sirpa Jalakanenに対する承認番号1597/05)により承認された。

【0033】

CD73活性および透過性に対するIFN- γ の効果は、前処理および後処理プロトコールを用いて検討した。マウスの垂群を、組換えマウスIFN- γ により前処理した(6000IU、皮下、虚血前3日間、1日1回、)。後処理群では、動物は、虚血段階後再灌流期間の開始時に、IFN- γ の単回ボラス(20,000IU)を静脈内に投与された。

【0034】

全てのマウスに、安楽死5分前にFITC結合デキストラン(70kDa)を静脈内に注射した。血管漏出は、コンピューター画像解析(イメージJ)を用い、凍結切片化された肺から無作為に選択したフィールドからの3色画像により測定した。

【0035】

CD73活性の解析

エクト-5'-ヌクレオチダーゼ活性は、前述のようにTLCにより分析した[10]。簡潔には、標準的な酵素アッセイには、最終容量120 μ lのRPMI1640、肺ライセート、5mmol/Lの β -グリセロリン酸、およびトレサ[2-³H]AMPを有する表示濃度のAMP(sp.act., 18.6Ci/mmol;アマシャム社(Amersham)、リトルチャルフォント、英国)が含まれた。インキュベーション時間は、反応と時間との直線性が確保されるように選択し、変換されたAMPの量が、初期に投入した基質の7~10%を超えないようにした。混合物のアリコートにAlugram SIL G/UV₂₅₄TLCシート(マッハライ・ノーゲル(Macherey-Nagel)、デュレン、独国)に適用し、イソブタノール/イソアミルアルコール/2-エトキシエタノール/アンモニア/H₂O(9:6:18:9:15)を溶媒として用いて分離した。³H-標識AMPおよびその脱リン酸化ヌクレオシド誘導体を紫外光で可視化し、Wallac 1409分光計を用いて定量した。CD73活性は、時間当たり1mgのタンパク質により加水分解されたAMPのnMで表した。ライセート中のタン

10

20

30

40

50

パク質濃度は、製造業者の使用説明書に従い、BCA Protein Assay Kit (ピアス (Pierce) 社、ロックフォード、イリノイ州) により測定した。

【0036】

統計分析

ノンパラメトリック一元配置分散分析 (ANOVA) (クラスカル・ウォーリスおよびマン・ホイットニーのU検定) を用いた。

【0037】

結果

CD73 活性は、疾患の活動性と相関する。

腸管虚血・再灌流 (IR) は、腸と肺との両方で著しい組織損傷を引き起こした (図 1)。偽手術をした野生型マウスの肺では、CD73 活性は低かった (図 2 A)。肺における FITC デキストランの顕微鏡分析により、偽手術を受けた WT マウスでは、漏出は辺縁部のみであったことが示された (図 2 B)。

【0038】

ALI が WT 動物で誘導された場合、CD73 活性は 25% 減少した。同時に、血管漏出は顕著に増加した。血管内液の肺実質への漏出、さらには肺胞への漏出は、肺機能悪化とガス交換障害との主な原因であるため、血管透過性の変化は、疾患の重症度と直接相関する。

【0039】

予想どおり、CD73 活性は、CD73 欠損マウスでは、偽手術後と腸内 IR 後との両方において検出不能、または非常に低いレベルであった。CD73 欠損マウスでは、偽手術した動物での漏出は、偽手術した野生型マウスと比較して穏やかに増加した。特に、ALI を誘導した場合、CD73 欠損マウスは、肺において WT 同腹子よりも漏出が約 80% 多いことが示された ($p = 0.03$)。

【0040】

これらのデータは、CD73 活性と血管透過性すなわち疾患の重症度の度合いとの間に逆相関があることを示す。

CD73 活性は治療反応と相関する。

【0041】

3 日間の IFN- γ 前処置 (多発性硬化症の治療において臨床的に用いられる用量で) により、ALI の間 WT 肺において、230% の CD73 活性の増加がもたらされた ($p = 0.002$ 、図 2 A)。最も顕著なことに、ALI 誘導後の WT マウスにおける漏出領域は、非処理の同腹子と比較した場合、IFN- γ 前処置後に 90% を上回って減少した ($p = 0.0001$ 、図 2 B)。実際に、偽手術のみを受けた動物との差はなかった。顕著なことに、IFN- γ は、CD73 欠損マウスでの ALI に対しても、保護作用はなかった。これらのデータは、インターフェロンベータ治療が、厳密に CD73 に依存して血管漏出を減少させることを示す。さらに、野生型マウスにおける CD73 活性の増加は、IFN- γ 治療に対する反応の有益な結果を予測するために使用することができる。

【0042】

次に、IFN- γ 治療が、すでに確立された毛細血管の損傷を回復させることができるかどうかを試験した。そのために、虚血期間後のみに再灌流時点で、マウスを IFN- γ で処置した。とりわけ、IFN- γ の単回投与により、次の 4 時間の再灌流期間の間、血管バリア機能が極めて有意に改善された。FITC デキストランの漏出は、後処置群において、対照群と比較した場合、 $90 \pm 9\%$ 減少した ($n = 8 \sim 13$ マウス/群、 $p < 0.001$)。同時に、血清試料からの CD73 活性の測定は、30% を上回って増加した (427 ± 22 (処理なし ALI 群) $\sim 561 \pm 48$ (IFN- γ で処理した ALI 群); $p = 0.04$ 、 $n = 4$ / 群)。したがって、CD73 活性の誘導は、治療反応と正に相関する。さらに、血液試料中での CD73 活性の測定により、IFN- γ の反応性についての有益な情報がもたらされる。

【0043】

10

20

30

40

50

当然のことながら、本発明の方法は、様々な実施態様の形で取り入れることができ、本明細書には、そのうちのいくつかのみが記載されている。当該分野における高度な技術者には、他の実施態様が存在し、本発明の精神から逸脱しないことは明らかであろう。したがって、記載された実施態様は例示である、制限的なものとして解釈されるべきではない。

【 0 0 4 4 】

参考文献

- 1 **Hasko, G. and Cronstein, B. N.**, Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* 2004. **25**: 33-39.
- 2 **Ohta, A. and Sitkovsky, M.**, Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001. **414**: 916-920. 10
- 3 **Thompson, L. F., Eltzschig, H. K., Ibla, J. C., Van De Wiele, C. J., Resta, R., Morote-Garcia, J. C. and Colgan, S. P.**, Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J. Exp. Med.* 2004. **200**: 1395-1405.
- 4 **Lennon, P. F., Taylor, C. T., Stahl, G. L. and Colgan, S. P.**, Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J. Exp. Med.* 1998. **188**: 1433-1443. 20
- 5 **Synnestvedt, K., Furuta, G. T., Comerford, K. M., Louis, N., Karhausen, J., Eltzschig, H. K., Hansen, K. R., Thompson, L. F. and Colgan, S. P.**, Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.* 2002. **110**: 993-1002.
- 6 **Henttinen, T., Jalkanen, S. and Yegutkin, G. G.**, Adherent leukocytes prevent adenosine formation and impair endothelial barrier function by Ecto-5'-nucleotidase/CD73-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 2003. **278**: 24888-24895. 30
- 7 **Eckle, T., Fullbier, L., Wehrmann, M., Khoury, J., Mittelbronn, M., Ibla, J., Rosenberger, P. and Eltzschig, H. K.**, Identification of Ectonucleotidases CD39 and CD73 in Innate Protection during Acute Lung Injury. *J. Immunol.* 2007. **178**: 8127-8137. 40
- 8 **Niemela, J., Henttinen, T., Yegutkin, G. G., Airas, L., Kujari, A. M., Rajala, P. and Jalkanen, S.**, IFN-alpha induced adenosine production on the endothelium: a mechanism mediated by CD73 (ecto-5'-nucleotidase) up-regulation. *J. Immunol.* 2004. **172**: 1646-1653.

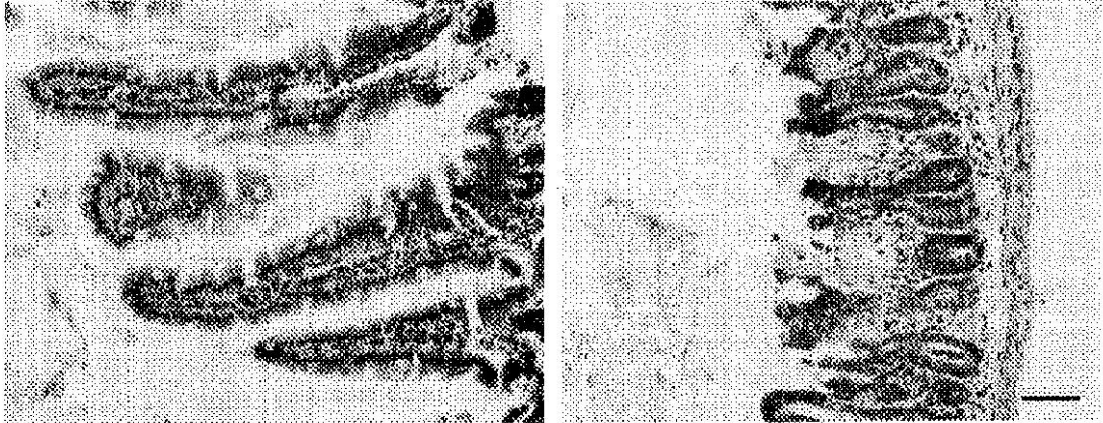
- 9 **Ohara, M., Unno, N., Mitsuoka, H., Kaneko, H. and Nakamura, S.,** Peritoneal lavage with oxygenated perfluorochemical preserves intestinal mucosal barrier function after ischemia-reperfusion and ameliorates lung injury. *Crit. Care Med.* 2001. **29**: 782-788.
- 10 **Yegutkin, G. G., Henttinen, T. and Jalkanen, S.,** Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions. *Faseb J.* 2001. **15**: 251-260. 10
- 11 **Airas, L., Niemelä, J., Yegutkin, G. and Jalkanen, S.,** Mechanism of Action of IFN- β in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 1110:641-648 (2007).

【図1】

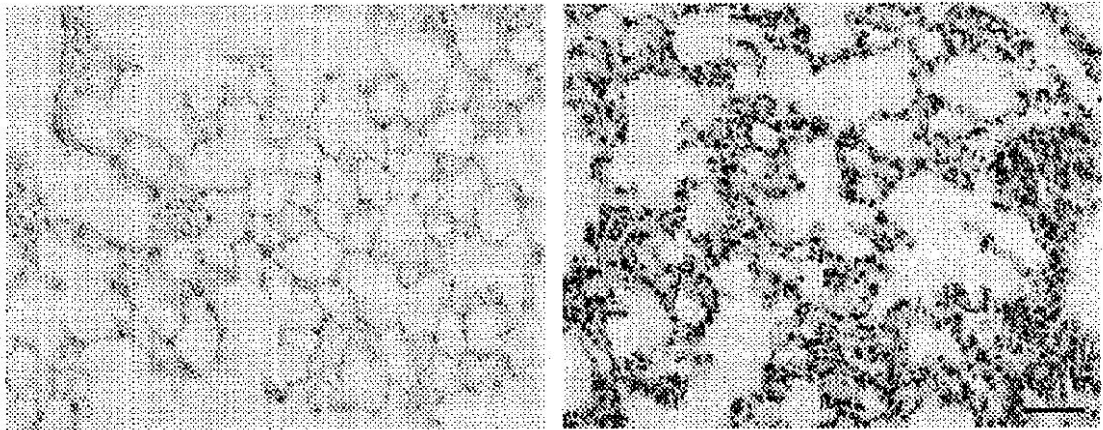
A

WT 偽

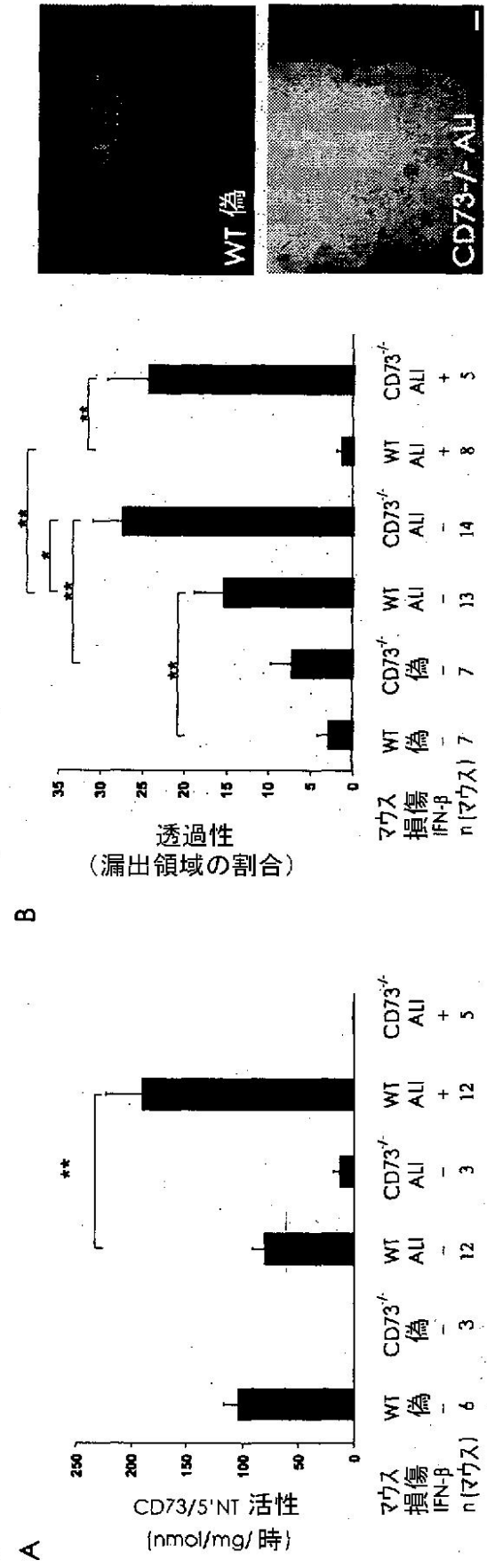
CD73^{-/-} ALI



B

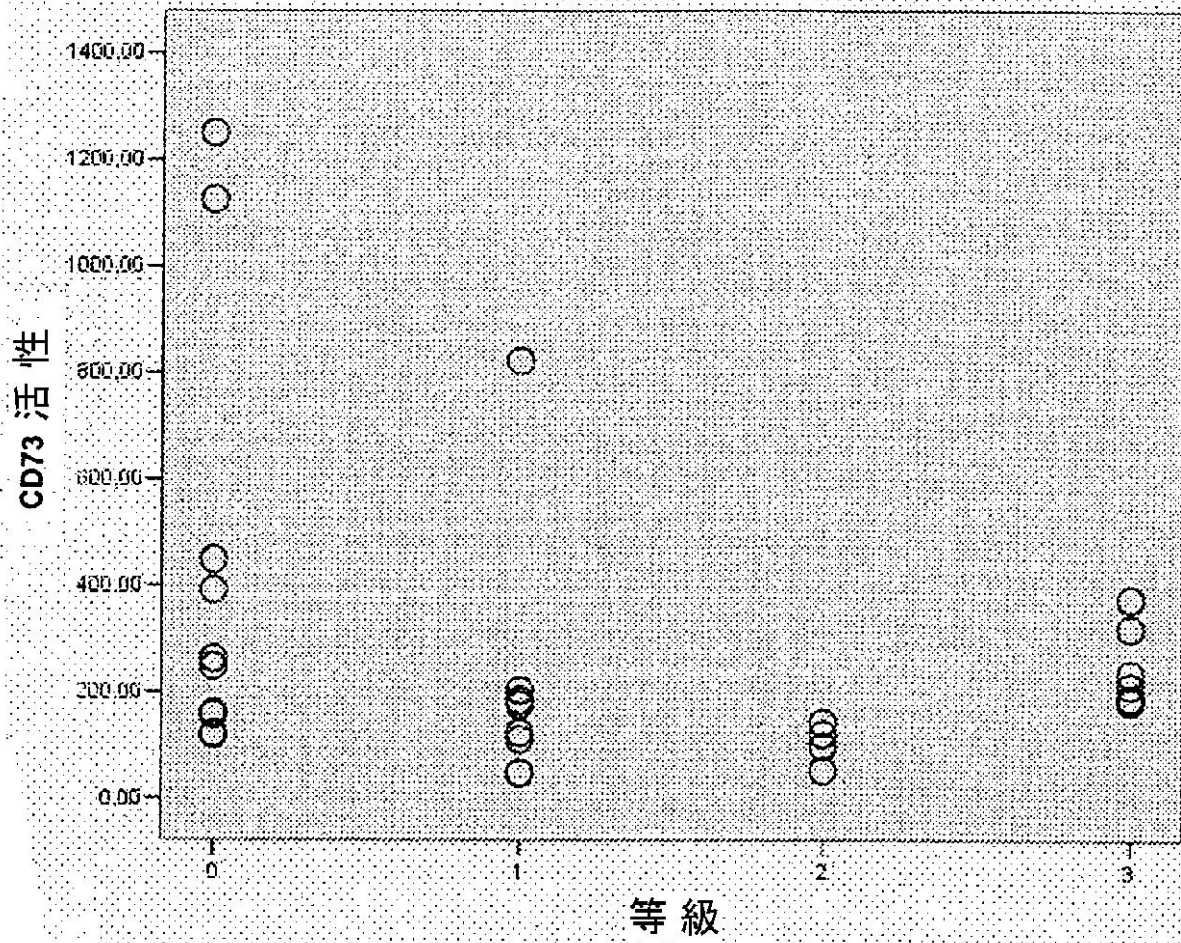


【 図 2 】



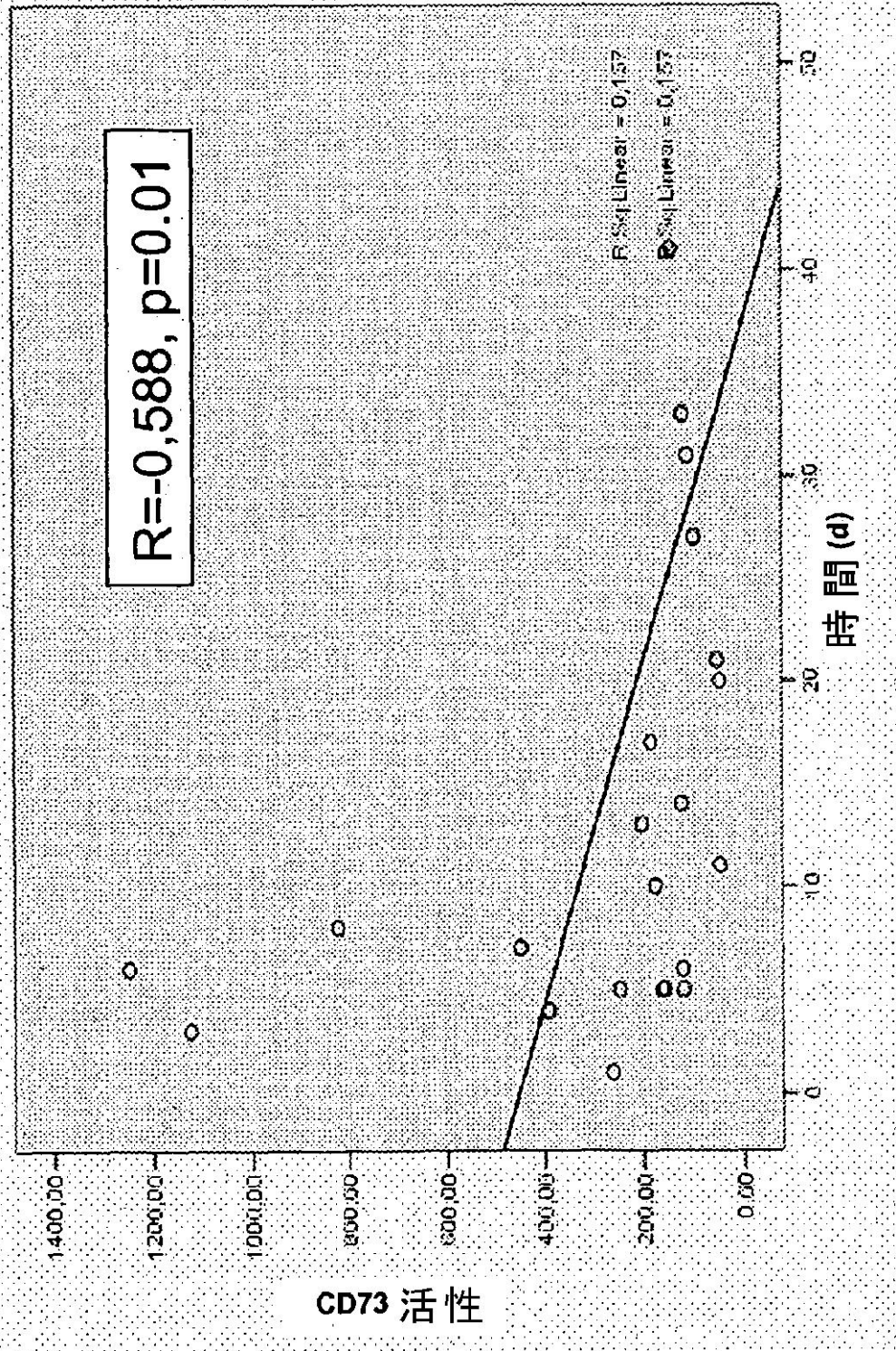
【 図 3 】

SIRS患者におけるCD73活性



【 図 4 】

CD73活性 対 ITUでの総滞在時間 (全等級)



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2008/050576

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet 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) IPC: G01N, C07K, C12N, C12Q Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched FI, SE, NO, DK Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
X	JOHNSON, S.M. et al. 5'-Nucleotidase as a marker of both general and local inflammation in rheumatoid arthritis patients. <i>Rheumatology</i> , 1999, Vol. 38, Nr. 5, pages 391-396, (abstract; page 391, left column, line 1; page 392, left column, last paragraph; page 392, right column, paragraphs 1-3; page 393, right column, paragraph 4; page 394, right column paragraph 2; page 395, last paragraph)
X	ECKLE, T. et al. Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury. <i>Journal of Immunology</i> , June 2007, Vol. 178, Nr. 12, pages 8127-8137, (abstract; page 8130, figures 2a and 2c; page 8133, left column, paragraph 2; page 8133, left column, last paragraph - right column, first paragraph)
X	AIRAS, L. et al. Mechanism of action of IFN-beta in the treatment of multiple sclerosis: a special reference to CD73 and adenosine. <i>Annals of the New York Academy of Sciences</i> , September 2007, Vol. 1110, pages 641-648, (abstract; page 645, paragraph 2)
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 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 19 January 2009 (19.01.2009)	Date of mailing of the international search report 05 February 2009 (05.02.2009)
Name and mailing address of the ISA/FI National Board of Patents and Registration of Finland P. O. Box 1160, FI-00101 HELSINKI, Finland Facsimile No. +358 9 6939 5328	Authorized officer Jan-Jonas Filén Telephone No. +358 9 6939 500

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2008/050576

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THOMSON, L.F. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to the glycosyl phosphatidylinositol-anchored lymphocyte differentiation antigen ecto-5'-nucleotidase (CD73). Tissue antigens, 1990, Vol. 35, Nr. 1, pages 9-19, (abstract; page 10, right column, paragraph 2; page 12, right column, last paragraph - page 13, left column, first paragraph; page 12, figure 1; page 15, left column, paragraph 2 - right column, paragraph 1; page 15, table 2)	10, 11
A	UEDA, Y. et al. Pravastatin restored the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning blunted by hypercholesterolemia in the rabbit model of myocardial infarction. Journal of the American College of Cardiology, 1999, Vol. 34, Nr. 7, pages 2120 - 2125, (abstract)	
A	WO 2007107598 A1 (SCHRADER JUERGEN et al.) 27 September 2007 (27.09.2007), (page 8, line 24 - page 9, line 7)	
A	WO 2004079013 A1 (UNIV ARIZONA et al.) 16 September 2004 (16.09.2004), (page 2, paragraph 2; page 3, paragraph 1; claims 1 and 14)	
A	ZHOU, X. et al. Effects of ecto-5'-nucleotidase on human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. Oncology Reports, 2007, Vol. 17, Nr. 6, pages 1341-1346, (abstract)	
A	WO 2007025044 A2 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO et al.) 01 March 2007 (01.03.2007), (claim 7)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2008/050576

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:

See extra 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 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 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 SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2008/050576

Continuation of Box No. III

According to PCT Rules 13.1 and 13.2, an international application shall relate to one invention only or to a group of inventions linked by one or more of the same or corresponding technical features. The expression "special technical feature" means those technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art.

The special technical feature for the claimed inventions in claims 1-11 is a method for determining CD73 in a tissue fluid sample drawn from an individual.

In view of the prior art cited in the international search report the above mentioned method is known and thus, there would not be a special technical feature common to all the claims.

This authority found that there are at least 9 inventions within claims 1-11. The separate inventions are:

Invention I: Claims 1-5 (all partially)

A method for monitoring the development of a tissue trauma in a patient, wherein CD73 in a tissue fluid sample is used as a biomarker.

Invention II: Claims 1-5 (all partially)

As above, wherein the disease is a reperfusion injury resulting from myocardial infarction or stroke, organ transplantations or another surgical operation.

Invention III: Claims 1-5 (all partially)

As above, wherein the disease is a cancer or a cancer metastasis.

Invention IV: Claims 1-5 (all partially)

As above, wherein the disease is an inflammatory condition.

Invention V: Claims 6 (partially), 7, and 8

A method for assessing the efficacy of a cytokine therapy in a patient suffering from a disease, wherein CD73 in a tissue fluid sample is used as a biomarker.

Invention VI: Claims 6 (partially), 7, and 9

As invention V, wherein the therapy is a statin therapy.

Invention VII: Claims 10 (partially) and 11

A method for determining of CD73 protein in a tissue fluid sample by quantifying the level of CD73 by a specific binder.

Invention VIII: Claim 10 (partially)

As invention VII, wherein CD73 is determined by detecting the activity of CD73 by using thin layer chromatography.

Invention IX: Claim 10 (partially)

As invention VII, wherein CD73 is determined by detecting the activity of CD73 by a CD73 substrate.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI2008/050576

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.
G01N 33/573 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/FI2008/050576

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members(s)	Publication date
WO 2007107598 A1	27/09/2007	None	
.....			
WO 2004079013 A1	16/09/2004	None	
.....			
WO 2007025044 A2	01/03/2007	CA 2620195 A1 EP 1917528 A2	01/03/2007 07/05/2008
.....			

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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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, 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

(72)発明者 サルミ、マルコ

フィンランド共和国、エフィー - 2 0 9 0 0 ツルク、アンニーツンカツ 2 2

(72)発明者 ヤルカネン、マルック

フィンランド共和国、エフィー - 2 0 7 6 0 ピースパンリスチ、ラウボランチエ 7 9

Fターム(参考) 2G045 AA25 DA36 FB03 FB06

专利名称(译)	用于监测疾病进展和评估治疗效果的新型生物标志物		
公开(公告)号	JP2011501176A	公开(公告)日	2011-01-06
申请号	JP2010530497	申请日	2008-10-15
申请(专利权)人(译)	法伦制药Osake Yukichua		
[标]发明人	ヤルカネンシルパ サルミマルコ ヤルカネンマルック		
发明人	ヤルカネン、シルパ サルミ、マルコ ヤルカネン、マルック		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N33/50 G01N30/90		
CPC分类号	G01N33/57484 G01N2333/70596 G01N2800/245 G01N2800/324 G01N2800/56		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/50.U G01N30/90		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB06		
优先权	2007000795 2007-10-24 FI		
其他公开文献	JP4982610B2 JP2011501176A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种用于监测患者中疾病发展或评估患者中细胞因子疗法或其他汀类药物疗法的功效的方法，其中将所述患者的组织液中的CD73方法用作生物标记物。 。 本发明还涉及确定从个体的组织液中提取的样品中的CD73蛋白的方法。