

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4368110号
(P4368110)

(45) 発行日 平成21年11月18日(2009.11.18)

(24) 登録日 平成21年9月4日(2009.9.4)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/574 (2006.01)		GO 1 N 33/574	A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68	Z N A A
GO 1 N 21/78 (2006.01)		GO 1 N 21/78	C
GO 1 N 33/53 (2006.01)		GO 1 N 33/53	D

請求項の数 34 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2002-558017 (P2002-558017)	(73) 特許権者	399122424
(86) (22) 出願日	平成14年1月11日(2002.1.11)		エール ユニヴァーシティ
(65) 公表番号	特表2004-533602 (P2004-533602A)		アメリカ合衆国 コネチカット州 ニュー
(43) 公表日	平成16年11月4日(2004.11.4)		ヘヴン カレッジ ストリート 451
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/000574	(74) 代理人	100094318
(87) 国際公開番号	W02002/057787		弁理士 山田 行一
(87) 国際公開日	平成14年7月25日(2002.7.25)	(74) 代理人	100126653
審査請求日	平成17年1月7日(2005.1.7)		弁理士 木元 克輔
(31) 優先権主張番号	60/260,898	(74) 代理人	100104282
(32) 優先日	平成13年1月12日(2001.1.12)		弁理士 鈴木 康仁
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	アルティエリ, ダリオ, シー.
			アメリカ合衆国, コネチカット州, ニ
			ュー ヘヴン, カレッジ ストリート
			451, エール ユニヴァーシティ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌患者の生物学的流体中のサバイビンの検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サバイビンの存在又は不在について患者からの生物学的サンプルをアッセイするステップを含む、患者の膀胱癌を検出する方法であって、サンプル中のサバイビンの存在により患者が膀胱癌を有することが示され、前記生物学的サンプルが尿濾液、尿細胞破片、尿上澄み液及び尿細胞ペレットから成る群より選択される、前記方法。

【請求項 2】

膀胱癌が、CISとグレード付けられている、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

膀胱癌が、いかなるグレード又はステージでもある、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 4】

サバイビンが、サバイビンに結合する抗体、サバイビン結合パートナー、及びサバイビンをコードする核酸にハイブリダイズする核酸から成る群より選択される作用物質を使って検出される、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

作用物質がラベルで標識されている、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

ラベルが、放射性ラベル、蛍光ラベル、酵素又は化学発光標識である、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

20

サバイピンが、免疫アッセイによって検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

免疫アッセイが、酵素連結免疫ソルベントアッセイ又は放射性免疫アッセイである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

免疫アッセイが、免疫プロットティング、免疫拡散、免疫電気泳動又は免疫沈降反応を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

サバイピンが、ドットプロットティングによって検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

ドットプロットティングが、バイオドット S F モジュールを使用することを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

サバイピンが、核酸ハイブリダイゼーションによって検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

核酸ハイブリダイゼーションが、RT-PCR 又はノーザンブロット分析である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

膀胱癌を診断、予測又はモニタリングするためのキットであって、患者から生物学的サンプルを集める容器と、生物学的サンプル中のサバイピンの存在を検出する作用物質とを備え、前記生物学的サンプルが尿濾液、尿細胞破片、尿上澄み液及び尿細胞ペレットから成る群より選択される、前記キット。

【請求項 15】

作用物質が、サバイピンに結合する抗体、サバイピン結合パートナー、及びサバイピンをコードする核酸にハイブリダイズする核酸から成る群より選択される、請求項 14 に記載のキット。

【請求項 16】

作用物質がラベルで標識されている、請求項 15 に記載のキット。

【請求項 17】

ラベルが、放射性ラベル、蛍光ラベル、酵素又は化学発光標識である、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 18】

作用物質が、水溶媒質中にパックされているか、又は、凍結乾燥された様式でパックされている、請求項 14 に記載のキット。

【請求項 19】

サバイピンの存在を分析する手段を更に備える、請求項 14 に記載のキット。

【請求項 20】

患者の膀胱癌のグレードを決定する方法であって、患者からの生物学的サンプル中のサバイピンの量を数量化するステップと、膀胱癌のグレードを決定するために、サンプル中のサバイピンの量を、コントロールサンプル中のサバイピンの量と比較するステップと、を含み、前記生物学的サンプルが尿濾液、尿細胞破片、尿上澄み液及び尿細胞ペレットから成る群より選択される、前記方法。

【請求項 21】

患者の膀胱癌のステージを決定する方法であって、患者からの生物学的サンプル中のサバイピンの量を数量化するステップと、膀胱癌のステージを決定するために、サンプル中のサバイピンの量を、コントロールサンプル中のサバイピンの量と比較するステップと、を含み、前記生物学的サンプルが尿濾液、尿細胞破片、尿上澄み液及び尿細胞ペレット

10

20

30

40

50

から成る群より選択される、前記方法。

【請求項 2 2】

患者の膀胱癌をモニタリングする方法であって、患者からの生物学的サンプル中のサバイビンの量を数量化するステップを含み、前記生物学的サンプルが尿濾液、尿細胞破片、尿上澄み液及び尿細胞ペレットから成る群より選択され、膀胱癌のグレードを決定するために、サンプル中のサバイビンの量を、コントロールサンプル中のサバイビンの量と比較し、患者の膀胱癌をモニタリングする、前記方法。

【請求項 2 3】

膀胱癌が、新発症癌又は再発癌である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

サバイビンの量が、サバイビン RNA を検出することによって数量化される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 5】

サバイビン RNA が、核酸ハイブリダイゼーションによって検出される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

核酸ハイブリダイゼーションが、RT-PCR 又はノーザンブロット分析である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

サバイビンの量が、サバイビン RNA を検出することによって数量化される、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 8】

サバイビン RNA が、核酸ハイブリダイゼーションによって検出される、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

核酸ハイブリダイゼーションが、RT-PCR 又はノーザンブロット分析である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

サバイビンの量が、サバイビン RNA を検出することによって数量化される、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 3 1】

サバイビン RNA が、核酸ハイブリダイゼーションによって検出される、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

核酸ハイブリダイゼーションが、RT-PCR 又はノーザンブロット分析である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

サバイビンの存否が、サバイビン RNA の存否を検出することにより検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

サバイビンの存在が、サバイビン RNA を検出することにより検出される、請求項 1 4 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、患者の生物学的流体中のサバイビンの存在を検出するステップを含む、癌の診断方法に関する。特に、この方法は、患者の尿サンプル中のサバイビンの存在を検出するステップを含む、膀胱癌の診断に関する。更に、本発明は、患者の生物学的流体中のサバイビンを検出する作用物質と、生物学的流体を集めるための容器と、を備える癌を診断するためのキットに関する。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

癌は、周囲の組織に侵入し新たな身体部位に転移する傾向にある悪性腫瘍を指す。癌は、除去が試みられた後でも再発し、十分な処置がされなければ患者を死に追いやる。癌の正確な原因は知られていない。しかし、喫煙又は発癌物質への暴露等の所定の活動と、癌及び腫瘍の所定のタイプの癌の発病率との間にはリンクがあることが数々の研究者によって示されてきた。

【0003】

原発部位から遠隔臓器への癌の広がり（つまり、転移）は、今なお、ほとんどの癌患者の死の主な原因である。数年にわたって研究がされているにもかかわらず、そのプロセス 10
に関する遺伝的メカニズムは、主として特徴化されていないままである。このような情報は、疾患の不確実な経過を与えられた場合に、癌予測に特に重要である。癌予測は、現在の腫瘍グレード付け手法では常に正確には断定されないので、癌患者の処置に成功することの最大の障害の一つは、堅実な予測マーカーの欠如であり続ける。

【0004】

膀胱癌

膀胱癌は、悪性腫瘍の成長であり、膀胱に沿って並ぶ尿路上皮細胞（urothelial cells）（移行性細胞）から一般には起こる。膀胱の尿路上皮癌（つまり、膀胱癌）は、毎年54000ケースを超える新症例があり11200人の死亡があることから、米国では、男性において4番目に一般的な癌であり、女性において8番目に一般的な癌である。膀胱癌 20
の再発は、患者の80%にまで起こり、長期にわたる緩解に対する手ごわい障害を構成する。このような再発は、頻繁には、筋侵襲と播種性疾患を含んでいる（Dawson et al., A BC of Urology: Urological Malignancies-II: Urothelial Tumors. BMJ, 1996, 312: 1090-1094）。

【0005】

数々の因子が膀胱癌の成長には寄与するらしい。タバコ喫煙及び芳香1族アミン（ナフチルアミン、キセニルアミン、4-ニトロピフェニル、ベンジジン）と呼ばれる特定種類 30
の有機化学剤への職業被曝は、確立した危険因子である。幾つかの研究は、人工甘味剤サッカリンの高用量と移行性細胞膀胱癌との間にはリンクがあるだろうと示唆する。他の研究は、子宮頸癌の処置のための放射線療法を受けた女性では、移行性細胞膀胱癌が成長する危険が増大すると示す。更に、化学療法剤であるシクロホスファミド（Cytosine）を受けた人々は、膀胱癌の成長についてより大きな危険を示してきた。

【0006】

膀胱癌の最も一般的な臨床学的な現れは、血尿症である。しかし、膀胱癌の診断は、間欠性であるか他の原因（尿路感染症又は抗凝血物質の使用等）に帰するため、たびたび遅れる。膀胱癌の診断をするために、排泄された移行性細胞の尿細胞診断学が従来使われている。尿細胞診断学が陽性である場合には、尿路上皮の移行性細胞癌がほぼ確実に存在する。しかし、移行性細胞の細胞学検査は、膀胱癌を持つ患者の半数までにわたって陰性であろう。このように、陰性の細胞学的結果により膀胱癌の存在は規定されない（Badalament et al., Cancer, 1987, 59(12): 2078; Cohen et al., Urologic Clinics of North A 40
merica, 1992, 19(3): 421）。

【0007】

追加的診断の複雑性は、膀胱癌の初期診断がいったんされたら、全ての尿路を移行性細胞癌について評価しなければならないことである。これは、移行性細胞が、腎盂、輸尿管、膀胱及び大部分の尿道を含む、腎臓レベルで始まる尿路に沿って並ぶからである。腎臓及び輸尿管の腎盂は、経静脈腎盂X線像（IVP）又は回帰性の腎盂X線像によって最も評価されている。IVPは、コントラスト物質の静脈注射を必要とし、これは、その後、血液から腎臓によって尿中へと濾過される。このプロセスにおいて取られたプレーンなX線は、尿路を示す。一般的に、回帰性腎盂X線像は、静脈内のコントラスト・アレルギー又は不良なIVP可視化を有する患者のために確保される。回帰性腎盂X線像は、膀胱鏡 50

検査のときに実行される。

【 0 0 0 8 】

膀胱の内部を見るために照明機器を必要とする膀胱鏡検査は、膀胱癌の明確な診断のために利用される不快な手法である。膀胱鏡を通して回帰性腎盂像を実行するにあたって、小さなプラスチックのチューブが尿管に挿入され、コントラスト物質が尿管及び腎臓に注入される。膀胱鏡検査は、他の診断モダリティ（例えば超音波、コンピューテッドトモグラフィまたは磁気共鳴画像）では見逃すかもしれない小さな微妙な異常状態の同定を可能にする。従って、診察室膀胱鏡検査は、初期評価において本質的部分であり、この時期では他の検査で代理され得ない。今日、ほとんどの診察室膀胱鏡検査が、柔軟スコープを用いて実行されている。柔軟内視鏡検査は、硬直膀胱鏡検査法に比べて安楽で、医師に拡大された前立腺の屈曲部辺りの観察も許容する。

10

【 0 0 0 9 】

また、膀胱癌の診断のために生検を行うことができる。生検は、診断の確認又は確立、予後の推定、又は疾患の経過の追従のために、膀胱等の臓器から生組織の小さなサンプルを除去して顕微鏡検査をすることである。しかし、生検は、侵襲的な手法であり、故に望ましくなく、たびたび麻酔を人が受けることを必要とする。加えて、いかなるものでも侵襲的な手法を用いると、生検を受けた人は感染の危険性を受ける。更に、膀胱癌が存在するか否かを決定するために、膀胱全体を生検することはできない。

【 0 0 1 0 】

膀胱癌のステージ付け

膀胱癌は、その侵襲性と周りの膀胱組織と異なるといかに異なるか（分化）とによって分類される。膀胱癌は、診断のときに医師によってステージ付け及びグレード付けがされる。

20

【 0 0 1 1 】

腫瘍をステージ付けるには幾つかの方法がある。ステージ付けシステムのうちで最も一般に使用されているものの2つは、A B C Dシステム（the Jewett-Strong-Marshall system）及びT N Mシステムである。A D C Dシステムのほうが古く、膀胱癌の異なったフェーズまたは過程を分類するために、A - B - C - Dのステージ付けをする。このシステムでは、基本的には次のスケールが使われる：0、上皮内癌（膀胱粘膜に制限された腫瘍（ライニング））；A、粘膜を通して伸張するが、粘膜下組織を超えない；B、筋肉に侵入する腫瘍；C、脂肪組織に侵入する腫瘍；D、所属リンパ節又は遠隔部位に広がった腫瘍。各英文字には番号が続く。例えば、A 1、B 2等である。T N Mシステムでは、膀胱はTで、リンパ節はNで、遠隔部位はMで記述される。各英文字には記述番号が続くT 2 a N 0 M 0。例えば、T a は、非侵襲性乳頭癌を示し、T i s は、上皮内癌を示し、T 1 は、上皮結合組織に侵入している腫瘍を示す。

30

【 0 0 1 2 】

膀胱癌は、近くの臓器（前立腺、子宮、膣、輸尿管、直腸を含む）に伸張することによって、身体に残部に広がる。転移は、骨盤リンパ節を通して起こる。腫瘍は、次には腎臓、肺、骨に広がる。

【 0 0 1 3 】

膀胱癌のグレード付け

膀胱癌は、生検材料から病理学者によってグレード付けされる。癌のグレードは、癌がどのくらい速く成長しているのか又はいかに侵襲的であるかに関する情報を提供する。高いグレードの癌は、グレードの低い癌に比べて速く成長し、より早期に広がる。現在のグレード付けシステムは、3つの異なるグレードのみを使っている：十分に分化している、適度に分化している、及び不十分に分化している（又はグレードI、II又はIII）。幾人かの病理学者は、4レベル（I、II、III及びIV）のグレード付けシステムを使う。どちらのシステムも許容され、病理学者は、II / III又はII / IVと癌を明言することによって彼らが幾つのレベルを使うのかについて常に言及する。分母又は二番目の番号は、彼らがどのシステムを使っているのかを示す。十分に分化した腫瘍は、癌が正常な膀胱組織に似ていて、故に迅速には成長又は広がらないことを一般に意味する。

40

50

不十分に分化した腫瘍は、癌が正常な膀胱には似ていず迅速に成長して他の組織に早期に広がることを一般に意味する。適度に分化した腫瘍は、その中間である。

【 0 0 1 4 】

グレードは重要ではあるが、ステージに比べて処置決定との関係が少ない。グレード及びステージがわかると、将来の処置について決定する前に、他の因子も活用される。

【 0 0 1 5 】

前立腺癌

前立腺癌は、前立腺内での悪性腫瘍の成長である。前立腺癌は、全年齢の男性における癌に起因する死としては3番目に一般的な原因であり、75歳を超えた男性における癌に起因する死としては一番目に一般的な原因である。前立腺癌は、40歳未満の男性ではめったに見られない。

10

【 0 0 1 6 】

原因は未知であるが、幾つかの研究によって、前立腺癌と高食物脂肪摂取量及びテストステロンレベルの増加との関係が示されてきた。良性の前立腺過形成症 (B P H) に関連しては知られていない。

【 0 0 1 7 】

膀胱癌と同様に、前立腺癌は、その侵襲性と周りの前立腺組織といかに異なるかによって分類又はステージ付けされる。ほとんどの前立腺癌は、A B C Dシステム又はT N Mシステムによってステージ付けされる。前立腺癌については、A B C Dシステムにより、基本的には以下のスケールを使って腫瘍が分類される：A、触知可能（感じられる）ではないが、顕微鏡生検によって検出可能な腫瘍；B、触知可能で前立腺に限られた腫瘍；C、遠隔転移を伴わない前立腺を超えて伸張した腫瘍；D、所属リンパ節に広がった癌。一方、T N Mシステムでは、前立腺を (T) で示し、リンパ節を (N) で示し、転移疾患（遠隔への広がり）の証拠を (M) で別々に示す。前立腺癌は、精囊、膀胱及び腹腔腔の中へ伸張することによって広がる。前立腺癌は、リンパ節、骨、肺、肝臓及び腎臓に転移する。

20

【 0 0 1 8 】

今日では、前立腺癌は、ミネソタ大学の病理学者の名前をとったグリーソングレード付けシステム (Gleason grading system) を使ってグレード付けされる。このシステムには、前立腺内での異なる侵襲性パターンを観察し、1 - 5の2つのスコアを付けることが含まれる。これらの2つのスコアは加算されて、全グリーソンスコアを与える。このスコアは、2から10の範囲である。スコアが高いほど、腫瘍の侵襲性が高いと思われる。例えば、グリーソンによりグレード付けされた癌は、グリーソン $4 + 3 = 7$ 又はグリーソン $2 + 2 = 4$ などと書かれる。

30

【 0 0 1 9 】

サバイピン

アポトーシス（プログラム化された細胞死）阻害剤の制限されない発現は、細胞生存度を異常に延長させることによって、突然変異の蓄積を支持することによって、且つ、治療に対する抵抗度を上げるため、癌に寄与すると考えられている (Reed, J. Clin. Oncol., 1999, 17:2941-53)。癌における細胞死 / 生存度バランスについての新規なモジュレーターは、最近、アポトーシス阻害剤 (I A P) 遺伝子ファミリー (Deveraux et al., Genes Dev., 1999, 13: 239-52) のメンバーであるサバイピン (Ambrosini et al., Nat. Med., 1997, 3: 917-21) と同定された。

40

【 0 0 2 0 】

サバイピンは、単一の部分的に保存された B I R (baculovirus IAP repeats) ドメインと、R N G フィンガーの代わりに非常に荷電された C 末端コイル - コイル領域とを含む 16.5 k D a の細胞質タンパク質である。この領域は、B細胞前駆体に移された場合、成長因子 (I L - 3) 撤退によって誘導されるアポトーシスを阻害する (Ambrosini et al., Nat. Med 1997, 3:917-921)。全体的配列保存、C末端 R I N G フィンガーの不在及び単一の部分的に保存された B I R ドメインの存在に基づくと、サバイピンは、最もか

50

すかに関連した I A P ファミリーメンバーであり、N A I P (neuronal apoptosis inhibitory protein; Roy et al., Cell, 1995, 80:167-178) と高度の類似の程度を共有している。更に、他の I A P タンパク質と異なり、サバイピンは、大人の正常組織では検出可能でないが、一般的なヒトの癌(肺癌、大腸癌、乳癌、膵臓癌及び前立腺癌)及び ~ 50% ハイグレード非ホジキンリンパ腫においては、インピボで、トップから 4 番目に発現された翻訳物である (Ambrosini et al., Nat. Med., 1997, 3:917-21; Velculescu et al., Nat. Genet., 1999, 23:387-88)。尿路上皮癌における制限されないアポトーシスの提案された役割と一致して (Gazzaniga et al., Int. J. Cancer, 1996, 69:100-04; Lara et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1999, 43:1015-19)、サバイピンは、78% の膀胱癌において発見されたが、正常な尿路上皮では発見されなかった。また、サバイピンの発現は、促進再発と関係していた (Swana et al., N. Engl. J. Med., 1999, 341:452-53)。正常組織でなく癌組織での過度発現 (Ambrosini et al., Nat. Med., 1997, 3:917-21; Velculescu et al., Nat. Genet., 1999, 23:387-88)、及び種々の悪性腫瘍 (Adida et al., Lancet, 1998, 351: 882-83; Islam et al., Oncogene, 2000, 19:617-23; Tanaka et al., Clin. Cancer Res., 2000, 6: 127-34; Monzo et al., J. Clin. Oncol., 1999, 17:2100-04; Kawasaki et al., Cancer Res., 1998, 58: 5071-74) における予測 / 予後の好ましくない意義のため、サバイピンは、癌の有効な分子マーカーを構成し得る。このことは、治療に対する反応をモニターする簡単で非侵襲的な診断手段及び簡単にフォローアップするプロトコールが緊急に必要とされている膀胱癌 (Stein et al., J. Urol., 1998, 160: 645-59; Ozen, Curr. Opin. Oncol., 1998, 10: 273-78) において特に重要である。「ゴールドスタンダード」とみなされている (Brwon, Urol. Clin. North Am., 2000, 27:25-37) もかかわらず、膀胱癌において尿細胞診断学は低い感応性 (30 - 40%) を持ち、表在性で低いグレードの病変を検出することができない。従って、本出願の発明者等は、身体流体のサバイピンについて癌検出 (特に、膀胱癌の診断のための尿サバイピンの検出) のための新規な分子マーカーとしての可能性ある適性について調査した。

【発明の概要】

【0021】

本発明は、患者の癌を診断する方法を提供する。該方法は、患者からの生物学的流体サンプルを、サバイピンの存在又は不在についてアッセイするステップを含むものである。ここで、サンプル中にサバイピンが存在することにより患者が癌を有することが示される。好ましい実施形態では、生物学的流体は、前立腺液、精液、全血、血清、尿、胸部生検流体、胃腸流体及び腔液から成る群より選択され、癌は、肺癌、大腸癌、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、膀胱癌、腎癌、尿生殖路癌、非ホジキンリンパ腫及び神経芽細胞腫から成る群より選択される新発症癌又は再発癌である。より好ましくは、生物学的流体は尿又は血清であり、癌は膀胱又は前立腺癌である。最も好ましくは、生物学的流体は尿であり、癌は膀胱癌である。

【0022】

一つの態様において、本発明は、患者の生物学的流体中のサバイピンの量を数量化することによって、癌のグレードを決定する方法を企図する。ここで、サバイピンが高レベルであることは、癌のグレードが高いことを示す。更に、本発明は、癌のステージを決定する方法の使用を企図する。ここで、CIS ステージにある癌は、非侵襲性乳頭状癌ステージの癌よりも高いレベルのサバイピンを有する。

【0023】

もう一つの態様において、本発明は、患者の癌をモニタリングする方法を企図する。該方法は、患者の生物学的流体中のサバイピンの量を数量化するステップを含むものである。更に、本発明は、患者の生物学的流体中のサバイピン量を検出又は数量化することによって、患者の予後を決定することを企図する。例えば、サバイピンの存在は、予後不良を示す。サバイピンの数量化には、サンプル中のサバイピンの比較的なレベルを測定することが含まれる。また、サバイピンの存在又は不在を検出することも含まれる。

【0024】

好ましくは、サバイピンは、サバイピンに結合する作用物質又はサバイピンをコードする核酸にハイブリダイズする作用物質を使って検出される。最も好ましくは、作用物質は、サバイピンに結合する抗体、サバイピン結合断片、及びサバイピンをコードする核酸にハイブリダイズする核酸から成る群より選択され、作用物質はラベルで標識されている。ラベルは、放射性ラベル、蛍光ラベル、酵素、化学発光標識又は比色標識であってよい。

【0025】

発明の一つの態様では、免疫アッセイによってサバイピンが検出される。好ましくは、免疫アッセイは、酵素連結免疫ソルベントアッセイ又は放射性免疫アッセイであり、免疫アッセイは、免疫プロットティング、免疫拡散、免疫電気泳動又は免疫沈降反応を含む。より好ましくは、ドットプロットティングによってサバイピンが検出され、最も好ましくは、バイオドット法 (Bio-Dot method) 及びバイオドット S F モジュール (Bio-Dot SF module) によってサバイピンが検出される。

10

【0026】

本発明のもう一つの態様では、核酸ハイブリダイゼーションによってサバイピンが検出される。

【0027】

好ましい実施形態では、核酸ハイブリダイゼーションは、RT-PCR又はノーザンブロット分析である。核酸ハイブリダイゼーションに使われる作用物質は、放射性ラベル、蛍光ラベル、酵素、化学発光標識又は比色標識でラベル化されている。

20

【0028】

また、本発明は、患者の癌を診断、予測又はモニタリングするためのキットを提供する。該キットは、患者からの生物学的流体を集める容器と、生物学的流体中のサバイピンの存在を検出する一つ以上の作用物質とを備えるものである。

【発明の詳細な説明】

【0029】

1. 一般的説明

本発明は、癌、特に膀胱癌を検出するために、安全で信頼性のある非侵襲性のスクリーニングストラテジーを開発する必要性に基づくものである。疾患についての単一の予言/予測マーカーの同定は、確認されていない (Stein et al., J. Urol., 1998, 160: 645-59)。マーカーの同定及び癌、特に膀胱の移行上皮癌の診断及びスクリーニング、並びに癌活性のモニタリング及び膀胱癌を持つ個人の予測の決定は、癌の処置に有効である。

30

【0030】

本発明は、癌を持つ患者の尿又は他の身体流体中のアポトーシス阻害剤であるサバイピンを同定するための、抗体又は他のプローブに基づく単純な検査を開示する。

【0031】

本発明は、尿サバイピンが、新たに膀胱癌と診断された患者又は再発性の膀胱癌と診断された患者の全てに見つかるが (46 / 46)、正常なボランティアでは見つからず (0 / 17)、他の泌尿器学的癌を持つ患者でも見つからず (0 / 30)、非新生物尿生殖器障害を持つ患者では、ほんの 4 / 30 という発見に部分的に基づくものである。また、本発明は、尿サバイピン検査が陽性であるヘルマチュリア (hematuria) を持つ 3 人の患者で見られる知見に基づく。このうち 1 人は、膀胱癌について陽性と細胞診断されており、他の 1 人は、サバイピン検出の 6 月以内に膀胱癌を有すると診断された。更に、本発明は、膀胱癌の処置を受けていて膀胱鏡検査による緩解を達成している患者は尿サバイピンについて陰性 (32 / 35) であるという知見に基づく。

40

【0032】

また、本発明は、膀胱癌及び前立腺癌を持つ患者の血清においてサバイピンが検出されるという知見に部分的に基づく。

【0033】

II. 特定の実施形態

50

1. 生物学的流体

本明細書において、用語「患者の生物学的流体」は、生体系からの流体を指す。この用語は、生体系の身体に見出される「身体流体」を含む。

【0034】

本発明は、サバイピンの存在について、生物学的流体のスクリーニングに作用物質を使用することを含む。患者からの生物学的流体のインビトロ血清学的評価により、癌の非侵襲性診断が許容される。例えば、前立腺液、精液、全血、血清、尿、胸部生検流体、胃腸流体及び腔液等のヒト身体流体を患者から取り、放射性免疫アッセイ又は酵素連結免疫アッセイ、競合結合による酵素連結免疫アッセイ、ドットプロット、ウエスタンプロット、ノーザンプロット、PCR又は本技術分野で知られる他のアッセイによって、サバイピン

10

【0035】

好ましい実施形態では、膀胱癌又は前立腺癌の診断をするために、患者から血清を集めてサバイピンの存在を検出する。

【0036】

より好ましくは、膀胱癌の診断をするために、患者から尿サンプルを集めてサバイピンの存在を検出する。検査される尿サンプルは、検査のかなり前に集めることができ、処置の前に凍結できる。分析の前に尿サンプルが凍結される場合には、サンプルが集められて氷の上に置かれることが好ましい。約2時間以内に、冷やされたサンプルは遠心分離されて細胞破片にペレットされ、そして濾過された後、即座に -20 （さらに好ましくは -80 ）で凍結されることが好ましい。分析の直前に、 37 の水槽で凍結サンプルを迅速に解凍すべきである。また、採尿し、最適遠心分離し、そして濾過した後の新鮮な尿サンプルも使うことができる。より好ましくは、尿全部は、 -80 で凍結されるまで氷の上に保たれる。 4 で解かした後、尿は 4 で遠心分離され、サバイピンのアッセイが行われる。

20

【0037】

2. サバイピンを検出する作用物質

患者の生物学的流体中のサバイピンを検出することができる作用物質は、サバイピン又はサバイピンコード核酸と相互作用することができるものである。このような作用物質の例として、サバイピン抗体又はサバイピンに結合するその断片、 $P34^{cd}c^2$ サイクリンB1キナーゼ等のサバイピン結合パートナー、及びサバイピンをコードする核酸にハイブリダイズする核酸が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0038】

サバイピン抗体

サバイピン抗体は、当業者によって調製され使用されてきた。Lu等は、胃癌の免疫組織化学分析のために、組み換えにより製造されたサバイピン/グルタチオンSトランスフェラーゼ融合タンパク質からのマウスモノクローナルサバイピン抗体の調製について教示する(Cancer Res., 1998, 58(9): 1808-12)。Grossman等は、ヒト転移性悪性黒色腫細胞株においてサバイピンを検出するためのウサギポリクローナル抗体の使用について教示する(J. Invest. Dermatol., 1999, 113: 1076-81)。

40

【0039】

本技術分野において周知であり且つ説明されている標準的な免疫学的手法を使って抗体を作るためにサバイピン又はサバイピンペプチドを使うことができる(Practical Immunology, Butt, ed., Marchel Dekker, New York, 1984)。簡潔に述べると、例えば宿主細胞内で組み換えDNA発現によって製造された、単離されたサバイピン又はサバイピンペプチドを使用して、外因性宿主(xenogenic host)の中で抗体を作る。好ましい抗体は、サバイピタンパク質のエピトープに特異的に結合する抗体であり、好ましくは、エピトープに対して約 $10^5 M^{-1}$ よりも大きな結合アフィニティーを持つものであり、最も好ましくは、エピトープに対して約 $10^7 M^{-1}$ よりも大きなアフィニティーを持つものである。例えば、ヒトサバイピタンパク質についての抗体が望まれる場合には、適切な

50

抗体を産生する宿主は、マウス、ヤギ、ウサギ、モルモット、又は抗体産生に適した他の動物である。サバイピンタンパク質又はペプチドを、宿主内で抗体産生を向上させることができる適切なアジュバントと組み合わせ、宿主の中に、例えば腹腔内注射によって注入させる。宿主の免疫反応を刺激するのに適当であればいかなるアジュバントを使ってもよい。現在好ましいアジュバントは、フロイントの完全アジュバント（殺されて乾燥した微生物細胞を含んでいるエマルジョン、例えば、Calbiochem Corp., San Diego 又は Gibco, Grand Island, N.Y. からのもの）である。多数の抗原注入が望ましい場合には、以降の注入には、不完全アジュバント（例えば、細胞が含まれないエマルジョン）と一緒に抗原が含まれる。

【0040】

10

好ましい実施形態では、生物学的流体中でサバイピンの存在を検出する開示方法は、サバイピンに特異的に結合する抗体を使って実行される。サバイピンに特異的に結合するポリクローナル及びモノクローナル抗体は、本技術分野で知られる方法によって調製することができる。抗体には、Huse等の方法（Science, 1989, 246: 1275-1281; Campbell, “Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas” in Burdon et. al. Eds, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 1985 Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam についても参照）に従って調製される組み換えポリクローナル又はモノクローナル Fab 断片が含まれる。

【0041】

20

上述のように、ポリクローナル及びモノクローナル抗体を調製するための方法は、当業者に周知である。簡単に述べると、ウサギ、マウス、ラット又はヤギ等の宿主哺乳動物に、サバイピンタンパク質又はサバイピンペプチド又は断片を注入することによって、ポリクローナル抗体を製造することができる。動物から血清を抽出してスクリーニングし、ペプチド又はペプチド断片に特異的なポリクローナル抗体を得る。

【0042】

抗体を産生するためのサバイピンタンパク質、ペプチド又は断片は、その天然源からの単離によって、組み換え手段によって、又は合成手段によって得ることができる。

【0043】

モノクローナル抗体を製造するためには、宿主哺乳動物を、サバイピンタンパク質又はペプチドで接種した後、ブースト（boost）させる。最終的なブーストの数日後に接種された哺乳動物から脾臓を集める。脾臓からの細胞懸濁液を、Kohler及びMilstein（Nature, 1975, 256: 495-497）によって説明された一般的方法に従い、腫瘍細胞と融合させる。有効であるためには、ペプチド断片は、検出されるサバイピン分子のエピトープを定義するために十分なアミノ酸残基を含んでいなければならない。

30

【0044】

免疫原として断片が短すぎる場合には、フラグメントをキャリアー分子に複合化することができる。幾つかの適切なキャリアー分子として、キーホールリンペットヘモシニアンとウシ血清アルブミンが含まれる。複合化は、本技術分野で知られている方法によって実施される。このような方法の一つは、断片のシステイン残基を、キャリアー分子のシステイン残基と複合させることである。ペプチド断片は、本技術分野で知られる方法によって合成することができる。幾つかの適切な方法が、Stuart及びYoungによって “Solid Phase Peptide Synthesis”, Second Edition, Pierce Chemical Company (1984) に説明されている。

40

【0045】

抗体又は断片の精製は、当業者に知られる種々の方法によって達成することができる。これらの方法には、硫酸アンモニウム又は硫酸ナトリウムにより析出した後に塩類溶液に対しての透析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティー又は免疫アフィニティークロマトグラフィー並びにゲル濾過、ゾーン電気泳動等がある（Goding in, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., pp. 104-126, Orland, Fla., Academic

50

Press)。癌患者の流体（好ましくは、膀胱癌患者の尿）中のサバイピンを検出するためには、Fv、F(ab')₂、Fab断片（Harlow and Lane, 1998, Antibody Cold Spring Harbor）等のサバイピン結合領域部分を少なくとも有する、精製された抗体の断片又は抗体を使うことが好ましい。

【0046】

癌の診断及び/又はモニタリングに使用する際に、精製された抗体を、サバイピンの存在の検出を許容するレポーターグループとして用いられる化合物に、直接又はリンカーを介して共有結合させることができる。種々の異なるタイプの物質がレポーターグループとして用いられ、酵素、色素、放射性金属又は非金属アイソトープ、発光性化合物（fluorogenic compound）、蛍光化合物等が含まれるが、これらに限定されない。検出、モニタリングに有効な本発明の抗体（又はその断片）の抗体コンジュゲートの調製については、米国特許第4671958号、第4741900号及び第4867973号に記載されている。

10

【0047】

本発明の一つの態様では、好ましい結合エピトープを、既知のサバイピン遺伝子配列及びそのコードされたアミノ酸配列から同定して、高い結合アフィニティを有するサバイピン抗体を産生するために使うことができる。また、サバイピンへの結合エピトープの同定は、好ましい抗体の考案及び構築において使うことができる。例えば、サバイピン上の好ましいエピトープをコードするDNAを、そのエピトープに選択的に結合する抗体を選択するために、組み換えにより表現させ使用することができる。その後、選択された抗体は、サバイピン上の特異的結合エピトープに、その抗体が選択的に結合できるように十分な条件下でサンプルに晒され、そして、形成された複合体が検出される。特異的な抗体方法論は、文献においてよく理解されており記述されている。抗体調製のより詳細な記述は、例えば、Practical Immunology, Butt, W.R., ed., Marcel Dekker, New York, 1984に見出すことができる。

20

【0048】

また、本発明は、サバイピン抗体の検出についても企図する。サバイピンは、癌の特異的マーカーである。従って、患者の生物学的流体中でのサバイピン抗体の検出により、癌の診断が可能となる。

【0049】

サバイピン結合パートナー

生物学的流体中のサバイピンの存在を検出するために、サバイピンに結合する他の分子もまた使うことができる。サバイピン抗体以外のサバイピン結合パートナーの例としては、P34^{cd}c²サイクリンB1キナーゼ及びカスパーゼ9（caspase-9）があるが、これらに限定されない。

30

【0050】

核酸

サバイピンをコードする核酸にハイブリダイズする核酸（天然に生じている核酸、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び合成オリゴヌクレオチド等）は、癌患者の生物学的流体（好ましくは、膀胱癌患者の尿）中でサバイピンを検出するための作用物質として有効である。Ambrosini等は、サバイピン遺伝子のクローニングについて開示している（Nat. Med, 1997, 3: 917-921）。本発明にとって有効な作用物質である核酸及びオリゴヌクレオチドとしては、Ambrosini等（Nat. Med, 1997, 3: 917-921）によって単離されたサバイピン遺伝子に相当するものがあるが、これらに限定されない。本発明は、サバイピンのコード配列、その相補配列並びにコード配列からアップストリーム又はダウンストリームで生じているサバイピン転写配列（例えば、5'及び3'非翻訳領域に含まれる配列、又は、5'及び3'非翻訳領域中に伸張する配列）に相補的な配列、に相当する核酸配列を、癌患者の生物学的流体（好ましくは、膀胱癌患者の尿）中のサバイピン発現を検出するために、作用物質として使用することを企図する。

40

【0051】

50

生物学的流体中のサバイピンの存在を検出するための好ましいオリゴヌクレオチドは、サバイピンをコードするcDNA配列の少なくとも部分に相補的なものである。これらの相補配列は、「アンチセンス」配列としても本技術分野では知られている。これらのオリゴヌクレオチドは、オリゴリボヌクレオチド又はオリゴデオキシリボヌクレオチドであってよい。更に、オリゴヌクレオチドは、生物学的に意義のあるヌクレオチド（つまり、A（アデニン）、dA（デオキシアデニン）、G（グアニン）、dG（デオキシグアニン）、C（シトシン）、dC（デオキシシトシン）、T（チミジン）及びU（ウラシル））から構成される天然のオリゴマーであってもよく、又は、修飾されたオリゴヌクレオチド種（例えば、インター・ヌクレオチドホスホジエステル結合において、メチル基又は硫黄原子がリン酸塩酸素と置換されている）でもよい。更に、これらのヌクレオチド自身及びノ

10

【0052】

オリゴヌクレオチドは、本技術分野で詳述されている既知の化学オリゴヌクレオチド合成法を使って、化学的に合成することができる。例えば、いかなる市販の自動核酸シンセサイザーを使っても、オリゴヌクレオチドを調製することができる。代替的に、標準的な組み換えDNA手法（例えば、非コードストランドの転写を含む）によって、オリゴヌクレオチドを作出することができる。サバイピンをコードするDNA配列は、組み換えDNAシステムにおいて逆転されてもよい。すなわち、非コードストランドが転写されるように適切なプロモーターの逆方向ダウンストリームに挿入されてもよい。

【0053】

サバイピンをコードする核酸にハイブリダイズするものとしては、いかなる長さのオリゴヌクレオチドも利用可能であるが、典型的には8 - 100ヌクレオチド範囲にあるオリゴヌクレオチドが好ましい。尿サンプル中のサバイピン検出に使用するために最も好ましいオリゴヌクレオチドは、15 - 50ヌクレオチドの範囲にあるものである。

20

【0054】

サバイピン核酸にハイブリダイズするように選択されたオリゴヌクレオチド（化学的に合成され又は組み換えDNA手法によるかにかかわらない）は、その後、標準的手法を使って単離され精製された後、標準的ラベル化プロトコールを使って（例えば、³²S又は³²Pで）ラベル化されることが好ましい。

【0055】

また、本発明は、生物学的流体中のサバイピン発現を検出するために、ポリメライズ連鎖反応（PCR）においてオリゴヌクレオチドペアを使用することを企図する。オリゴヌクレオチドペアは、サバイピンプライマー及び逆サバイピンプライマーから成る。好ましいオリゴヌクレオチドペアは、配列番号1及び配列番号2のものである。より好ましくは、オリゴヌクレオチドペアは、配列番号3及び配列番号4のものである。

30

【0056】

3. サバイピンを検出する作用物質

タンパク質結合アッセイ

当業者には認識されるように、癌患者の生物学的流体中のサバイピンタンパク質を特異的に同定し且つ定量化するためのいかなる手段も企図される。サンプル中のサバイピンタンパク質を検出するために現在好ましい手段は、マーカータンパク質と特異的に相互作用することができる結合タンパク質の手段によってである。好ましくは、ラベル化された抗体、その結合タンパク質、又は他のサバイピン結合パートナーが使われる。抗体は、起源としてモノクローナルでもポリクローナルでもよいし、生物合成的に製造されてもよい。サバイピン結合パートナーもまた、天然に生じた分子でも合成されたものでもよい。複合化サバイピンタンパク質の量（例えば、結合タンパク質と連結したサバイピンタンパク質の量）は、本技術分野で説明されている標準的なタンパク質検出法を使って決定される。免疫アッセイの考案、理論及びプロトコールの詳細なレビューについては、本技術分野の数々のテキスト（例えば、Practical Immunology, Butt, ed., Marcel Dekker, New York, 1984）に見出すことができる。

40

50

【 0 0 5 7 】

ラベル化された抗体を用いてタンパク質を検出するためには、様々なアッセイが利用可能である。ワンステップアッセイでは、サバイピン分子が（もしも存在する場合には）、固定されて、ラベル化された抗体と一緒にインキュベートされる。ラベル化された抗体は、固定化された標的分子に結合する。結合していない分子を除去するために洗浄した後、サンプルは、ラベルの存在についてアッセイされる。

【 0 0 5 8 】

ツーステップアッセイでは、固定されたサバイピン分子は、未ラベル化抗体と一緒にインキュベートされる。サバイピン - 未ラベル化抗体の複合体は、その後、未ラベル化抗体に特異的な第二のラベル化された抗体と結合される。サンプルは、洗浄されてラベルの存在についてアッセイされる。

10

【 0 0 5 9 】

抗体をラベル化するために使われるマーカーの選択は、適用ごとに異なる。しかし、マーカーの選択は、当業者であれば容易に決定することができる。これらのラベル化された抗体は、腫瘍の存在を検出するために、免疫アッセイ並びに組織学的適用において使うことができる。ラベル化された抗体は、ポリクローナルでもモノクローナルでもよい。好ましい実施形態では、抗体は、ポリクローナルウサギ抗体である。

【 0 0 6 0 】

抗体は、放射性原子、酵素、色素又は蛍光成分、又は比色標識でラベル化される。標識するラベルの選択は、望まれる検出限界による。酵素アッセイ (E L I S A s) は、一般的に、酵素標識された複合体と酵素基質との相互作用によって形成される有色産物の検出を許容する。放射性原子の数例として、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 及び ^{14}P が挙げられる。酵素の数例として、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、ガラクトシダーゼとグルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼが挙げられる。色素成分の数例として、フルオレセイン及びローダミンが挙げられる。抗体は、本技術分野で知られる方法によって、これらのラベルに接合 (conjugate) されていてよい。例えば、酵素及び色素分子は、ジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド等のカップリング剤の手段によって抗体に接合される。代替的に、リガンド - レセプターのペアを介して接合が起こってもよい。幾つかの適切なリガンド - レセプターのペアとして、例えば、ビオチン - アビジン又はストレプトアビジン、又は抗体 - 抗原がある。

20

30

【 0 0 6 1 】

今日までに知られるラベルで最も高感度のものは、化学発光標識である。この標識が、反応物と相互作用すると、光が産出される。有効なラベルとして、反応物が酵素基質である場合には化学発光酵素又はアクリジニウム・エステル等の化学発光分子を含む。アクリジニウムエステルがアルカリ性過氧化物水溶液と反応すると、例えば、強い光フラッシュが発せられ、検出限界は、他のラベルによって提供される場合に比べて100から1000倍に増大する。さらに、反応は迅速である。化学発光及び免疫アッセイについての詳細なレビューは、Wee k s等 (Methods in Enzymology, 1983, 133: 366-387)、K a w a g u i c h i 等 (Stabilized phenyl Acridinium Esters For Chemiluminescent Immun oassay-Bioluminescence and Chemiluminescence, Proceedings of 9th International S ymposium 1996, Edited by Hastings, Kricka and Stanley, Jon Wiley & Sons, 1997, p.480-484)、及び米国特許第5468646号に見出すことができる。流体アッセイについての他の考慮としては、マイクロタイターウエル又はカラム免疫アッセイが挙げられる。カラムアッセイは、迅速に反応するラベル (化学発光ラベル等) が使われる場合に特に利益的である。標識された複合体は、反応物又は酵素を含むポストカラム検出器に溶出されることから、その後形成される産物を直ぐに検出することができる。

40

【 0 0 6 2 】

一つの態様では、本発明は、血清及び他の生物学的流体中のサバイピンタンパク質を検出するためのサンドイッチ法の使用を企図する。1993年5月13日に発行されたPCT公表に記述されているように、この手法は、目的のタンパク質に結合することができる

50

2つの抗体を必要とする。例えば、1つは、固体支持体に固定されており、他の1つは溶液中でフリーの状態にあるが、容易に検出することができる化合物によってラベル化されている。第二の抗体として使える化学的なラベルの例としては、放射性アイソトープ、蛍光化合物、及び、反応物又は酵素基質に晒されると有色又は電気化学的に活性な産物を生ずる酵素又は他の分子が挙げられるが、これらに限定されない。このシステムにサバイピンタンパク質を含んでいるサンプルが配置されると、サバイピンタンパク質は、固定された抗体とラベル化された抗体の両方に結合する。その結果、支持体表面での「サンドイッチ」免疫複合体になる。複合化されたタンパク質は、結合していないサンプル成分及び過剰のラベル化抗体を洗浄して、支持体の表面にあるタンパク質と複合化したラベル化抗体の量を測定することによって検出される。このサンドイッチ免疫アッセイは、検出限界が良好なラベルが使われるという設定においては、非常に特異的でとても感度が高い。

10

【0063】

また、本発明は、数々の生物学的流体サンプルを同時にスクリーニングすることを企図する。これは、広く使用されており且つ容易に自動化が可能な従来の96ウエルマイクロタイター形式を使って実行することができる。また、96ウエルプレートカロリメトリ法により(calorimetrically)分析するためのスペクトロメーター(「プレートリーダー」)が幾つか市販されている。

【0064】

好ましくは、身体流体サンプル中のサバイピンの存在は、放射性免疫アッセイ又は酵素連結免疫アッセイ、競合結合酵素連結免疫アッセイ、ドットプロット、ウエスタンプロット、クロマトグラフィー、好ましくは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、又は本技術分野で知られる他のアッセイ、で検出される。

20

【0065】

ドットプロットは、抗体をプローブとして使うことによって所望のタンパク質を検出するために当業者によって日常的に実施されている(Promega Protocols and Applications Guide, Second Edition, 1991, Page 263, Promega Corporation)。サンプルは、ドットプロット装置を使って膜に適用される。ラベル化されたプローブを膜と一緒にインキュベートし、タンパク質の存在を検出する。

【0066】

ウエスタンプロット分析は、当業者には周知である(Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989, Vol., 3, Chapter 18, Cold Spring Harbor Laboratory)。ウエスタンプロットでは、サンプルはSDS-PAGEによって分離される。ゲルは、膜に移される。その膜は、所望のタンパク質を検出するためにラベル化された抗体でインキュベートされる。

30

【0067】

上述のアッセイは、免疫プロット、免疫拡散、免疫電気泳動、免疫沈降等のステップを含むが、これらに限定されるものではない。

【0068】

好ましくは、サバイピンは、ドットプロット又はウエスタン・プロットによって検出される。より好ましくは、サバイピンは、バイオドット法及びバイオドットSFモジュールを使うドットプロットにより、癌患者の生物学的流体中で検出される。

40

【0069】

核酸の検出

患者の生物学的流体サンプル中のサバイピンの存在は、核酸ハイブリダイゼーションによっても決定することができる。核酸ハイブリダイゼーションとしては、ノーザンプロット分析、ドットプロット、サザンプロット分析、蛍光インシットハイブリダイゼーション(FISH)及びPCRがあるが、これらに限定されない。クロマトグラフィー、好ましくはHPLC、及び他の既知のアッセイもまた、サンプル中のサバイピンのメッセンジャーRNAレベルを決定するために使うことができる。

50

【 0 0 7 0 】

サバイピンDNAは、おそらく、生物学的流体中、検査中の流体に注がれるか放出されるサバイピン陽性癌細胞内に見出される。

【 0 0 7 1 】

一つの態様では、本発明は、患者の生物学的流体中のサバイピンを検出するための作用物質としての核酸の使用を企図する。ここで、核酸はラベル化されているものである。核酸は、放射性活性ラベル、蛍光ラベル、酵素、化学発光標識、比色標識、又は先に議論され又は本技術分野で既知の他のラベル若しくは標識でラベル化されてよい。

【 0 0 7 2 】

もう一つの態様では、本発明は、身体流体のサンプル中のサバイピンmRNAの存在を検出するためにノーザンブロット分析を使用することを企図する。この分析の第一のステップには、ゲル電気泳動によって、サバイピン核酸を含むサンプルを分離することを含む。分散した核酸は、その後ニトロセルロースフィルター又はその他のフィルターに移される。引き続き、ラベル化されたオリゴヌクレオチドが、適切なハイブリダイゼーション条件（例えば、50%ホルムアルデヒド、5XSSPE、2X Denhardt's溶液、42℃にて0.1%SDS、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis等（1982, CSH Laboratory）に記載）下で、そのフィルターに晒される。本技術分野で知られる他の有効な手順としては、溶液ハイブリダイゼーション、ドット及びスロットRNAハイブリダイゼーション、及びプローブをベースにしたマイクロアレイが挙げられる。本技術分野で知られる標準的な手順を使って、ハイブリダイズされた断片の放射性活性を測定することにより、患者の生物学的流体中に存在するサバイピン核酸の量を数量化することができる。

【 0 0 7 3 】

ドットプロットティングには、対象の核酸を含むサンプルを膜に適用することを含む。膜への適用の前又は後に、核酸を変性させることができる。膜は、ラベル化されたプローブでインキュベートされる。ドットプロット手順は、当業者には周知であり、米国特許第4582789号及び第4617261号により完全に記載されている。これらの開示は、参考文献として本明細書に組み込まれている。

【 0 0 7 4 】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、ポリメリゼーションの作用剤及びプライマーを使って、核酸サンプル中に存在する一つ以上の特異的な核酸配列を増幅した後、増幅された配列を検出するプロセスである。ある一つのプライマーが他のプライマーにハイブリダイズしたときの伸張産物は、所望の特異的核酸配列を産出するためのテンプレートになり、又は、その逆も成り立つ。そして、そのプロセスは、所望の量の配列が産出されるのに必要な回数にわたって繰り返される。所望の配列（米国特許第4683195号）の存在を検出するために当業者は、ポリメラーゼ連鎖反応を日常的に使用する。

【 0 0 7 5 】

所望の配列を検出するために当業者によって日常的に実行されるPCRの特定例は、逆転写PCR（RT-PCR; Saiki et al., Science, 1985, 230: 1350; Scharf et al., Science, 1986, 223: 1076）である。RT-PCRには、生物学的流体から全RNAを単離すること、所望の核酸配列を認識するプライマーの存在下でRNAを変性させること、プライマーを使って逆転写によりRNAのcDNAコピーを生じること、特定のプライマーを使ってPCRによりcDNAを増幅すること、及び、電気泳動又は当業者に既知の他の方法によって増幅したcDNAを検出することを含む。

【 0 0 7 6 】

好ましい実施形態では、癌患者の生物学的流体（好ましくは、膀胱癌患者の尿）中のサバイピン核酸を検出する方法には、ノーザンブロット分析、ドットプロットティング、サザンブロット分析、FISH及びPCRが含まれる。より好ましくは、検出の方法は、以下の2つのプライマーセットを使ったRT-PCRである：配列番号1及び2、並びに、配列番号3及び4。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 7 】

4 . 癌診断用キット

一つの態様では、本発明には、癌の診断に必要なエレメントを備えたキットが含まれる。好ましくは、このキットは、患者から生物学的流体を集めるための容器と、流体中のサバイピン又はそれをコードする核酸の存在を検出するための作用物質とを備えている。キットの構成要素は、水溶媒体中に又は凍結乾燥の様式で包装される。

【 0 0 7 8 】

癌の診断又はモニタリングのためのキットは、サバイピンタンパク質を検出するための一つ以上の作用物質を含んでいる。これらとして、サバイピン抗体、その断片、又はサバイピン結合パートナーが調製され得るが、これらに限定されない。その作用物質（単数又は複数）は、患者から生物学的流体を集めるための容器と共に包装される。抗体又は抗体結合パートナーが、ラベル（放射性金属イオン又は成分）が付されたコンジュゲートの形態でキットの中で使用される場合には、このようなコンジュゲートの構成要素は、完全にコンジュゲートされた形態で供給されるか、又は、キットのユーザーによってコンジュゲートされる、分離した成分若しくは中間体の形態で供給される。

10

【 0 0 7 9 】

また、サバイピン核酸（例えば、完全長サバイピン核酸、サバイピンオリゴヌクレオチド）を検出する一つ以上の作用物質及びサバイピンプライマーの対を含むキットを調製することができる。作用物質（単数又は複数）は、患者からの生物学的流体を集めるための容器と一緒に包装することができる。核酸は、ラベル化された形態でも、ラベル化される形態でもあり得る。

20

【 0 0 8 0 】

キットの他の構成要素には、生物学的流体を集めるための手段、作用物質をラベル化するための手段、生物学的流体中のサバイピン又はサバイピン核酸を固定化するための膜、生物学的流体を膜に適用させる手段、患者の生物学的流体中のサバイピンに作用物質を結合させるために手段、第二の抗体、患者の生物学的流体から全RNAを単離するための手段、ゲル電気泳動を実行するための手段、単離された全RNAからcDNAを生じる手段、ハイブリダイゼーションアッセイを実行するための手段、及びPCRを実行するための手段等が含まれる。

【 0 0 8 1 】

5 . 本発明のアッセイ及びキットについての使用

本発明のアッセイ又は方法及びキットは、患者の癌を診断、予測及びモニタリングするために有効である。本発明の一つの態様では、患者の生物学的流体中にサバイピンが存在することは、その患者に癌があることを示す。癌は、新発症癌又は再発癌であり得る。本明細書において、用語「再発癌」は、癌が処置された後に戻ってきたこと（再発）を意味する。本明細書において、用語「新発症癌」は、新しく発生した癌を指す。

30

【 0 0 8 2 】

サバイピンは、サバイピンが発現され、身体流体中に分泌、放出又は見出される場合のいかなる癌からの生物学的流体においても検出することができる。サバイピンは、肺癌、大腸癌、膵臓癌、乳癌、前立腺癌（Ambrosini et al., Nat. Med., 1997, 3: 917-21）、膀胱癌（Swana et al., N. Engl. J. Med., 1999, 341: 452-53）、及び非ホジキンリンパ腫で発現される。神経芽細胞腫、胸部、肺、膀胱及び結直腸癌でのサバイピン発現は、好ましくない疾患及び短縮された生存と関連した（Adida et al., Lancet, 1998, 351: 82-83; Islam et al., Oncogene, 2000, 19:617-23; Tanaka et al., Clin. Cancer Res., 2000, 6: 127-34; Monzo et al., J. Clin. Oncol., 1999, 17: 2100-04; Kawasaki et al., Cancer Res., 1998, 58: 5071-74; Swana et al., N. Engl. J. Med., 1999, 341: 452-53）。

40

【 0 0 8 3 】

サバイピンは、腫瘍が進行する間に、はぎ落された癌細胞から細胞外環境に放出されるらしい。従って、患者からのいかなる生物学的流体であってもサバイピンの存在について

50

アッセイすることができる。好ましくは、前立腺液、精液、全血、血清、尿、胸部生検流体、胃腸流体及び膈液等のヒト身体流体を患者から取り除いて、サバイピンの存在についてスクリーニングすることができる。

【0084】

好ましい実施形態では、本発明の方法及びキットは、患者の生物学的流体中のサバイピンを検出することによって、膀胱癌、前立腺癌及び腎癌を含む尿生殖路癌の診断をするために使われる。より好ましくは、本発明の方法及びキットは、患者の尿サンプル中のサバイピンの存在を検出することによって、膀胱癌を診断するために使われる。患者の尿サンプル中のサバイピンの存在は、その患者が膀胱癌を持っていることを示す。

【0085】

もう一つの態様では、本発明の方法及びキットは、患者の生物学的流体中のサバイピンを数量化するために使うことができる。患者の生物学的流体中のサバイピンの量は、癌をグレード付けするために有効である。患者の生物学的流体中でサバイピンのレベルが高いことは、癌のグレードが高いことを示す。代替的に、本発明の方法及びキットは、患者の癌のステージを決定するために使うことができる。CISステージにある癌は、非侵襲性乳頭癌ステージにある癌に比べてサバイピンのレベルが高い。

【0086】

本明細書において、用語「乳頭癌」は、腫瘍性の上皮細胞の表面相で覆われている、繊維状基質の、多数の不規則な指状突起の形成によって特徴づけられる悪性腫瘍を指す。

【0087】

本明細書において、用語「上皮内癌(CIS)」は、上皮内癌と同義である。この用語は、膀胱癌を指すために使われる場合には、膀胱ライニング(移行性細胞)における扁平状腫瘍を意味する。

【0088】

更に、患者の生物学的流体から数量化されたサバイピンの量は、患者の癌の進行度をモニターし、癌患者の予後を決定するために使うことができる。例えば、ある期間にわたって測定されたサバイピンの量により、癌がどのくらい速く成長しているかについての情報が提供される。

【0089】

尿サバイピンは、患者をモニターするための迅速且つ安価な方法として使うことができる。尿サバイピン検査は、再発についての早期検出の感度及び特異性を改良するために、尿マーカーの総合テストに統合され得る。

【0090】

患者が、生物学的流体中のサバイピンについて陽性と検査された後に、その患者は、より侵襲性で高価なアプローチ(例えば膀胱鏡検査)を使って更に検査される。

【0091】

前述の一般的な議論を考慮して、以下に示される特定の実施例は、単に例示のためであり、本発明の範囲を制限するものとは意図されない。他の一般的で特定の形態は、当業者には明らかである。

【0092】

実施例

材料及び方法

(尿検体) エールニューヘーヴン病院の泌尿器科診療室及び復員軍人庁(ニューイングランドヘルスケアシステム、ウェストヘーヴン、コネティカット部局)において、158の尿検体を集めた。ランダムなクリーンキャッチ又はストレートカテーテルの尿サンプルを、5つの異なるグループに分類された個人から得た。グループ1は、薬剤投与をとっていない平均年齢が47.6 ± 20.8の正常な健康ボランティアである(n = 17)。グループ2は、非新生物尿路疾患又は血尿症と診断された平均年齢が60.0 ± 18.1の患者である(n = 30)。グループ3は、膀胱癌を除外する尿生殖器癌と診断された平均年齢が71.5 ± 9.9の患者である(n = 30)。グループ4は、新発症又は再発

10

20

30

40

50

膀胱癌と診断された平均年齢が 69.7 ± 8.7 の患者である ($n = 46$)。グループ 5 は、膀胱癌のための処置を受けている又は既に処置を受けた患者であって、採尿の日に陰性のサイトスコピック評価をされた、平均年齢が 76.1 ± 8.9 の患者ある ($n = 35$)。グループ 5 の処置手段には、膀胱内バチルスカルメット-ゲラン (BCG)、チオテパ、経尿道的切除、部分的膀胱切除及び照射が含まれる。グループ 4 には、採尿の後に同様の処置手段を受けた患者及び/又はサルベージ膀胱切除若しくはラジカル膀胱切除を受けた患者が含まれた。

【0093】

(統計的分析) カイ自乗検定 (Chi square test) によって、尿サバイピンと患者の診断との関係を分析した。エールニューヘーヴン病院で行われたグレード分類システムと、尿サバイピンの荷重スコア (weighted score) とを比較するために、ノンパラ統計的分析を使用した。

10

【0094】

実施例 1

バイオドット SF モジュールを用いた尿サバイピンの検出

48 ウエルスロットフォーマットを提供するモジュールの微量濾過装置を使って、ニトロセルロース膜上に、尿検体を濾過した。ポリクローナル抗体を使って、サバイピンの存在についてプロットを分析した。プロトコルは以下の通りである：採尿して、分析まで - 80 で保存した。分析の日に、 $20000 \times g$ で 20 分間にわたって尿サンプルを遠心分離にかけた。その間に、 $0.2 \mu m$ ニトロセルロース膜 (バイオラッド研究所、ヘラクレス、CA) を用いてバイオドット微量濾過装置を組み立て、 $20 mM$ トリス緩衝塩溶液 ($pH 7.5$) で湿らせた。その後、標準として ($0.001 - 1.0 \mu g / ml$) $300 \mu l$ の TBS 中の E. coli 発現組み換えサバイピンの増大する濃度とともに、尿上澄み液 ($300 \mu l$) を、ニトロセルロース膜上に濾過した。濾過の後、膜を乾燥させ、4 で 12 時間にわたって、5% プロット及び 0.01% アジ化ナトリウムの PBS ($pH 7.4$) 中でブロックした。PBS - Tween 20 (0.25%) で洗った後、22 で 3 時間にわたって、サバイピンに対するウサギ抗体 (Grossman et al., J. Invest. Dermatol., 1999, 113: 1076-81) $2 \mu g / ml$ で膜をインキュベートし、PBS - Tween で洗い、そして 22 で 1 時間にわたって、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合の口バの抗ウサギ IgG (Amersham Biotech, Piscataway, NJ) の 1:1000 稀釈でインキュベートした。10 分間にわたって PBS で 2 回、5 分間にわたって PBS - Tween で 2 回、そして 5 分間にわたって PBS で 2 回洗浄した後に、増強された化学発光 (Amersham) 及びオートラジオグラフィを用いて、第一抗体の結合を検出した。デンシトメトリーを用いてバンドを数量化し、サバイピンの荷重スコアを、組み換えサバイピンの増大する濃度とともに抗体反応度を基礎として以下のように計算した：0 = 検出不可；1 = $0.001 - 0.25 \mu g / ml$ ；2 = $0.25 - 1 \mu g / ml$ ；3 = $> 1 \mu g / ml$ 。各尿検体を、2 つの異なる場合で少なくとも 2 回分析して、結果を得た。

20

30

【0095】

実施例 2

ウェスタンブロッティング

22 で 10 分間にわたって $1200 \times g$ で尿検体 ($100 ml$) を遠心分離にかけた。そして、TBS 中で細胞ペレットを 2 回洗浄して、プロテアーゼ阻害剤が存在する 0.5% Triton - X100 中で、4 で 30 分間にわたって可溶化した。SDS ゲル電気泳動を用いてサンプルを分離して、ナイロン膜 (Millipore, Corp.) に移し、サバイピンに対する抗体 (Grossman et al., J. Invest. Dermatol., 1999, 113: 1076-81) $1 \mu g / ml$ で更にインキュベートし、続けてホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合ヤギ抗ウサギ IgG でインキュベートし、そして化学発光法を行った。

40

【0096】

実施例 3

RT - PCR

50

50 mlのクリーンキャッチ尿を、新発症又は再発尿路上皮癌を持つ15人の患者から得た。このうち、2人は処置された膀胱癌を、1人は前立腺癌を、1人は非新生物尿路疾患を持っており、1人は健常ボランティアであった。Trizol試薬(Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA)を使って尿ペレットから全RNAを分離した。42で1時間にわたって、スーパースク립ト逆転写酵素(Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA) 1 µlを使って、1-5 µgの全RNAのランダムプライミングによって一本鎖cDNAを合成した。70で15分にわたって加熱した後、サバインプライマー5'CTGCCCTGGCAGCCCTTTCTCAA-3'(フォワード; 配列番号1)及び5'AATAAACCCCTGGAAAGTGGTGC-3'(リバーズ; 配列番号2)を用いて、94で15秒間にわたって変性させ、53で15秒間にわたってアニリングし、72で1分間の間20サイクルにわたって伸張させ、続けて72で5分間インキュベートすることによって、第一の増幅反応を実行した。サバインcDNAの463ベースペア(bp)断片を、サバインのネストプライマー5'CCGCATCTCTACATTCAGAAC-3'(フォワード; 配列番号3)及び5'CTTGGCTCTTTCTCTGTCC-3'(リバーズ; 配列番号4)を用いて、94で30秒間にわたって変性させ、60で30秒間にわたってアニリングし、72で45秒間の間30サイクルにわたって伸張させ、続けて72で5分間インキュベートすることによって、第二ラウンド目の増幅にかけた。279 bpの増幅されたサバインcDNAを2.0%アガロース上で分離し、臭化エチジウム染色によって可視化した。コントロール反応を、アクチン特異的プライマー5'AGCGGGAAATCGTGCGTG-3'(フォワード; 配列番号5)及び5'CAGGGTACATGGTGGTGCC-3'(リバーズ; 配列番号6)を使って、309 bp断片のジェネレーションで増幅させた。

【0097】

結果

バイオドット検査を使って尿サバインを検出する代表的な実験を図1に示す。バイオドット法を用いた尿サバインの決定は、この研究のために集めた158試料のうちの138で実施した(表1)。20の追加の尿サンプルについては、バイオドット法の特異性を独立して評価するために、RT-PCRによりサバイン発現を分析した。サバインは、正常のボランティアでは検出されず(0/16)、良性の前立腺過形成症を持つ患者でも検出されず(0/6)、間質性膀胱炎(0/2)、腎性結石(0/3)、尿路感染症(0/6)又は他の非腫瘍性尿路疾患(0/6)でも検出されなかった(表1)。尿サバインは、原因不明の血尿症(サバイン荷重スコアは2)を持つ5人の患者のうち3人で検出された。これらの患者は、貯留及び排尿困難のポスト経尿道の前立腺切除の病歴を呈する者であり、膀胱鏡検査法によると、肉柱形成された(trabeculated)不規則に厚い膀胱を現した。増大するレベルのPSAを持つが前立腺癌と診断されていない1人の患者は、尿サバインが陽性であった(表1)。この患者もまた、膀胱鏡検査法によると、trabeculatedされた不規則に厚い膀胱を現した。サバインは、前立腺癌(0/19)、腎癌(0/8)、膣癌(0/1)又は子宮頸癌(0/1)の患者の尿試料では検出されなかった(表1)。一方で、新発症又は再発膀胱癌の患者(31/31)全員で尿サバインが検出された(表1)。バイオドットSFにより尿サバインについて分析された31人の患者の組織病理学的なグレード付け(グレードI乃至IV)の4グループは、グレードII腫瘍が13人、グレードIII腫瘍が7人、グレードIV腫瘍が5人を含んだ。上皮内癌(carcinoma in situ, CIS)は、5人の患者の乳頭状で侵襲性の癌との関連では発見されず、1人の輸尿管の高いグレードの尿路上皮癌との関連でも発見されなかった。

【0098】

【表1】

尿試料	(n)	サバイピン陰性	サバイピン陽性
グループ1 (コントロール健常ボランティア)	16	16	0
グループ2 (非新生物尿路疾患)	29		
血尿症	5	2	3
UTI	6	6	0
BPH	6	6	0
上昇PSA	1	0	1
間質性膀胱炎	2	2	0
腎性結石	3	3	0
その他†	6	6	0
グループ3 (膀胱以外の尿生殖器癌)	29		
前立腺	19	19	0
腎性	8	8	0
陰	1	1	0
頸部	1	1	0
グループ4 (新発又は再発性の膀胱癌)	31§	0	31
グループ5 (処置膀胱癌¶)	33	30	3‡

10

UTI、尿路感染； BPH、良性の前立腺過形成症； PSA、前立腺特異的抗原。†乳頭状ネクローシス (n=1)、前立腺炎 (n=2)、膀胱尿管還流 (n=1) 及び上昇性クレアチニンを伴う腎性移植体 (n=2) が含まれる。§尿管の尿路上皮癌を持つ1人の患者が含まれる。¶通常の膀胱鏡検査。‡これらの患者うち、2人は膀胱腫瘍の経尿道的切除処置を受けており、1人は高周波療法を受けていた。これらの患者のうちの1人は、膀胱癌について、陽性の尿細胞診断を受けていた。

20

【0099】

バイオドットSFによって分析されたグループ5の33人の患者のうちの30人は、検出可能なサバイピンを有していなかった(表1)。これらの30人の患者のうちの5人は、BCGを受けており3-5回の処置を完了していた。他の25人は、膀胱鏡検査陰性のポスト-処置状態であった。非侵襲性膀胱癌と最初に診断されたグループ5の3人の患者は、陰性の膀胱鏡検査を受けた後に、尿サバイピンが陽性と検査された。3人のうちの1人は、膀胱癌についての尿細胞診断が陽性であった。3人の患者のうちの2人は、膀胱腫瘍の経尿道的切除の処置を受けており、1人は、高周波療法で処置されていた。

30

【0100】

サバイピン荷重スコアについて正規化した場合、CISを持つ患者のサバイピンスコア(1.5...0.5、n=6)は、グレードII膀胱癌患者のスコア(1.3...0.6、n=13)よりもかなり高かった。サバイピン荷重スコアと、種々の膀胱癌症例の組織病理学又はグレード付けとの関係が、表2と表3にそれぞれ示されている。

【0101】

【表2】

組織検査	検査された症例	平均サバイピンスコア
ND	3	1.7±1.2
非侵襲性乳頭癌	4	1±0
非排尿筋侵襲	12	1.6±0.8
筋侵襲	6	1.7±0.8
CIS	6	2.5±0.5†

40

【0102】

【表 3】

グレード	検査された症例	平均サバイピンスコア
グレード I I	13	1.3 ± 0.6
グレード I I I	7	1.5 ± 0.8
グレード I V	5	2 ± 1
グレード I V	1	3 *

サバイピン荷重スコアは、以下のようにして、増大する組み換えサバイピン濃度を有する標準曲線を使って計算した：0、検出不可能； 1、 $0.001-0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ； 2、 $0.25-1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ； 3、 $>1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。*関連CISを持つ6人の患者のうちの1人は、尿管の尿路上皮癌を持っていた（グレードIV；サバイピンスコア、3）。組織病理解析は、乳頭状移行性細胞腫瘍（階級I-IV）を分類するために、ブローダーの細胞学的グレード付けシステムを用いて実行された。ND、決定されていない。CIS、上皮内癌。†グレードI I又は非侵襲性乳頭癌のいずれかよりも有意義に大きい（ $p < 0.02$ ）。

10

【0103】

ウエスタンブロットにより、膀胱癌の患者からの尿細胞ペレット中で16.5 KDaの単一サバイピンバンドが検出されたが、健常ボランティアからは検出されなかった（図2）。

【0104】

バイオドット法を用いて得られた結果をそれぞれに評価するために、新発症又は再発膀胱癌を持つ追加の患者15人について、RT-PCRにより尿サバイピン分析をした。279bpサバイピンcDNAを、膀胱癌の新患者15人全員の尿細胞ペレットから増幅した（15/15）（図3及び図示されていないデータ）。一方で、追加の5人（1人は尿路感染症、2人は処置されて膀胱癌及び陰性膀胱鏡検査、1人は前立腺癌、1人は健常ボランティア）には、サバイピンcDNAは無かった（図3）。コントロール実験においては、309bpアクチンcDNA断片を、コントロール及び膀胱癌患者の尿から見分けがつかないように増幅した（図3）。RT-PCRによって分析された膀胱癌の組織病理学的症例には、グレードII腫瘍の患者が5人、グレードIIIの患者が1人、グレードIVの患者が6人及びCISの患者が3人含まれた。これらの実験により、腫瘍が進行する間、はぎ落された癌細胞が細胞外環境（つまり、尿）に受動的にサバイピンを放出することが示される。

20

30

【0105】

ここで調べられた一連の患者で、新発症又は再発膀胱癌についての尿サバイピン検査の感度は100%であり、他の新生物形成及び非新生物尿生殖器疾患についての尿サバイピン検査の感度は95%であった（ $p < 0.02$ ）。感度が高いため、尿サバイピン検査は、細胞診断学及び/又は他の診断マーカー（Ramakumar et al., J. Urol., 1999, 161:38-94; Lokeshwar et al., J. Urol., 2000, 163: 348-56）を補足して、膀胱癌患者のより良いモニタリング及び再発又はデノボ腫瘍（de novo neoplasms）のより良い同定に有効であろう。尿サバイピン検査の他の可能性のある利点としては、現在市販されているサバイピン単一抗体を用いたワンステップ検出を使うことによつての、単純性、ポイントオブサービスプロシージャ（point-of-service procedure）としての適切性、及び対費用効果が挙げられる。

40

【0106】

実施例 4

患者の血清中でのサバイピン検出

膀胱及び前立腺癌の患者から血液を集めた。血清を分離して実施例1で述べたドットブロット法により、サバイピンの存在について検査した。膀胱及び前立腺癌の患者の血清にサバイピンが検出された。組み換えサバイピンの濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を増大させて（左及び右コラム）、スロットブロット装置に尿又は血清サンプルを適用した。膜を、サバイピンへの抗体でインキュベートした後、HRP-結合ヤギ抗ウサギIgGでインキュベ

50

ートした。化学発光法によりバンドを可視化させた。

【0107】

癌患者の血清中でのサバイピンの検出により、他の癌を検出するためのマーカーとしてサバイピンが有効であることが示される。サバイピンの存在について血清を検査することは、癌の再発及び回帰の検査及びスクリーニングに有効である。

【0108】

先行する議論及び例示は、特定の好ましい実施形態の詳細な説明を単に示すのみであることは理解されるべきである。従って、本発明の精神及び範囲を離れることなく、種々の修飾及び等価物が成され得ることは、当業者には明らかであろう。本出願において特定された全ての雑誌記事、他の参照文献、特許及び特許出願は、その全体が参照として本明細書に組み込まれている。

【図面の簡単な説明】

【0109】

【図1】バイオドットSFモジュールを使用したサバイピンの尿検出を示す。組み換えサバイピンの濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) を増大 (左のコラム) させるとともに、表示されている患者グループからの尿試料を、スロットプロット装置に適用した。膜を、サバイピンへの抗体でインキュベートし、続けてHRP-結合ヤギ抗ウサギIgGでインキュベートした。化学発光法によりバンドを可視化して、デンストメトリーを用いてバンドを数量化した。TCC、膀胱癌 (グループ4); TCC/R、緩解 (グループ5); TCC/T、処置中 (グループ5); RCC、腎細胞癌、PC、前立腺癌 (グループ3); PSA、前立腺癌の診断はないが上昇したPSAのある患者 (グループ2); BPH、良性前立腺過形成症 (グループ2); Ctrl、健常ボランティア (グループ1)。

【図2】尿サバイピンのウェスタンブロッティングを示す。正常な健常ボランティア (正常) 及び膀胱癌を持つグループ4の患者 (TCC) からの尿の細胞ペレットを、電気泳動にかけ、ナイロン膜に移し、サバイピンに対する抗体でインキュベートし、続けて化学発光法を行った。比較分子量マーカーが左に示されている。

【図3】尿中のサバイピンmRNAのRT-PCR増幅を示す。尿の細胞ペレットから全RNAを抽出し、ランダムプライミングによって逆転写した。サバイピン特異的ネストプライマー (279bp) 又はアクチン特異的プライマー (309bp) を用いて増幅反応を実施した。分子量マーカーが、bpで示されている (M)。TCC、新又は再発性膀胱癌を持つ代表的な5人の患者の分析。

【図4】バイオドットSFモジュールを使用したサバイピンの血清検出を示す。組み換えサバイピンの濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) を増大させるとともに、尿又は血清サンプルを、スロットプロット装置に適用した。膜を、サバイピンへの抗体でインキュベートし、続けてHRP-結合ヤギ抗ウサギIgGでインキュベートした。化学発光法によりバンドを可視化した。「血清BICA」が後続するナンバーは、TCCを持つ患者からの血清を示す。これらのサンプルのほとんどは、二重にプロットに適用された。膀胱癌を持つ患者の血清サンプルの7/8が陽性であった。1つのサンプル (8-血清BICA) については、検査された2つのサンプルのうちの1つが陰性であった。患者2BICAからの尿及び血清は陽性であった。「尿HxTCC」は、TCC前に診断された単一の患者からの尿を示す。この患者は、一部を切除されて、BCG処置を受けている。「3-血清PCA」は、前立腺癌を持つ患者からのサバイピン陽性血清を示す。「6-血清BPH」は、良性の前立腺肥大を持つ患者からの血清である。このサンプルは、検査されたものの1/2倍サバイピン陽性であった。この患者については、更なる情報が利用可能でない。「尿TCC」は、膀胱癌を持つ患者からの尿である。「Neg con」は、タンパク質コントロールである。「ブランク」はTBS緩衝液のみである。

10

20

30

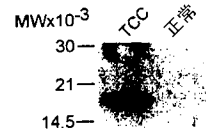
40

【 図 1 】

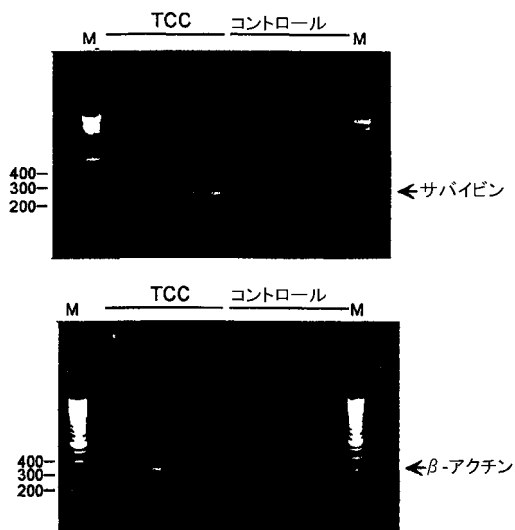
FIG. 1

0	RCC	TCC	TCC/R	TCC/R	Ctl
0.001	PC	TCC	TCC/R	TCC/R	Ctl
0.005	PC	TCC	TCC/R	TCC/R	Ctl
0.01	PC	TCC	TCC/R	TCC/R	Ctl
0.05	PC	TCC	TCC/R	TCC/R	Ctl
0.25	PSA	TCC/R	TCC/R	TCC/R	Ctl
1	BPH	TCC	TCC/R	TCC/R	Ctl

【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】

0.1 STD	1-血清 BICA	2-尿 BICA	2-血清 BICA	尿 Hx TCC	尿 Hx TCC	0.01 STD	ブランク
Neg Con	尿 Hx TCC	尿 Hx TCC	尿 Hx TCC	6-血清 BPH	6-血清 BICA	ブランク	0.001 STD
0.01 STD	3-血清 PCA?	4-血清 BICA	5-血清 BICA	10-血清 BICA	1-血清 BICA	0.005 STD	ブランク
0.005 STD	7-血清 BICA	8-血清 BICA	9-血清 BICA	尿 Hx TCC	尿 Hx TCC	Neg Con	尿 TCC
0.001 STD	尿 Hx TCC	尿 Hx TCC	2-尿 BICA	3-血清 PCA?	3-血清 BICA	7-血清 BICA	0.001 STD
0.0005 STD	尿 Hx TCC	尿 Hx TCC	4-血清 BICA	4-血清 BICA	7-血清 BICA	ブランク	ブランク
0.0001 STD	6-血清 BPH	ブランク	8-血清 BICA	8-血清 BICA	ブランク	ブランク	ブランク
ブランク	ブランク	9-血清 BICA	9-血清 BICA	ブランク	ブランク	ブランク	ブランク

フロントページの続き

- (72)発明者 ワイス, ロバート, エム.
アメリカ合衆国, コネチカット州, ニュー ヘヴン, カレッジ ストリート 451, エ
ール ユニヴァーシティ
- (72)発明者 スミス, シャンノン, ディー.
アメリカ合衆国, コネチカット州, ニュー ヘヴン, カレッジ ストリート 451, エ
ール ユニヴァーシティ
- (72)発明者 ホイラー, マルシア, エー.
アメリカ合衆国, コネチカット州, ニュー ヘヴン, カレッジ ストリート 451, エ
ール ユニヴァーシティ
- (72)発明者 プレシラ, ジャネット
アメリカ合衆国, コネチカット州, ニュー ヘヴン, カレッジ ストリート 451, エ
ール ユニヴァーシティ

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 国際公開第98/022589(WO, A1)
特開平09-275997(JP, A)
国際公開第00/018781(WO, A1)
国際公開第01/053535(WO, A1)
JAMA, 2001年 1月17日, Vol.285, No.3, Page.324-328
北里医学, 2002年, Vol.32, No.5, Page.385-390

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/574
C12Q 1/68
G01N 21/78
G01N 33/53
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	癌症患者生物体液中survivin的检测		
公开(公告)号	JP4368110B2	公开(公告)日	2009-11-18
申请号	JP2002558017	申请日	2002-01-11
[标]申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
申请(专利权)人(译)	耶鲁大学盐湖城		
当前申请(专利权)人(译)	耶鲁大学盐湖城		
[标]发明人	アルティエリダリオシー ワイスロバートエム スミスシャンノンディー ホイーラーマルシアエー プレシラジャネット		
发明人	アルティエリ, ダリオ, シー. ワイス, ロバート, エム. スミス, シャンノン, ディー. ホイーラー, マルシア, エー. プレシラ, ジャネット		
IPC分类号	G01N33/574 C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/53 C07K14/47		
CPC分类号	G01N33/57488 C07K14/4747 G01N33/57407 G01N33/57434 G01N2333/47 Y10S435/81		
FI分类号	G01N33/574.A C12Q1/68.ZNAA G01N21/78.C G01N33/53.D		
代理人(译)	鈴木康仁		
审查员(译)	三木隆		
优先权	60/260898 2001-01-12 US		
其他公开文献	JP2004533602A JP2004533602A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明包括用于诊断癌症的方法，包括检测患者生物体液中存活蛋白的存在。本发明还提供了试剂盒，其包含一种或多种检测存活蛋白多肽或存活蛋白核酸的试剂和用于收集生物流体用于测试的容器。

尿試料	(n)	サバイビン陰性	サバイビン陽性
グループ1 (コントロール健康ボランティア)	16	16	0
グループ2 (非新生物尿路疾患)	29		
血尿症	5	2	3
UTI	6	6	0
BPH	6	6	0
上昇PSA	1	0	1
間質性膀胱炎	2	2	0
腎性結石	3	3	0
その他†	6	6	0
グループ3 (膀胱以外の尿生殖器癌)	29		
前立腺	19	19	0
腎性	8	8	0
腫	1	1	0
頸部	1	1	0
グループ4 (新発又は再発性の膀胱癌)	31§	0	31
グループ5 (処置膀胱癌¶)	33	30	3‡