

(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2007-506075

(P2007-506075A)

(43) 公表日 平成19年3月15日(2007.3.15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 W	4 C 0 8 4
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 E	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	GO 1 N 30/88 I O 1 N	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/22	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-526553 (P2006-526553)
 (86) (22) 出願日 平成16年9月7日(2004.9.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年5月19日(2006.5.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2004/009965
 (87) 国際公開番号 W02005/038461
 (87) 国際公開日 平成17年4月28日(2005.4.28)
 (31) 優先権主張番号 10343815.7
 (32) 優先日 平成15年9月22日(2003.9.22)
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

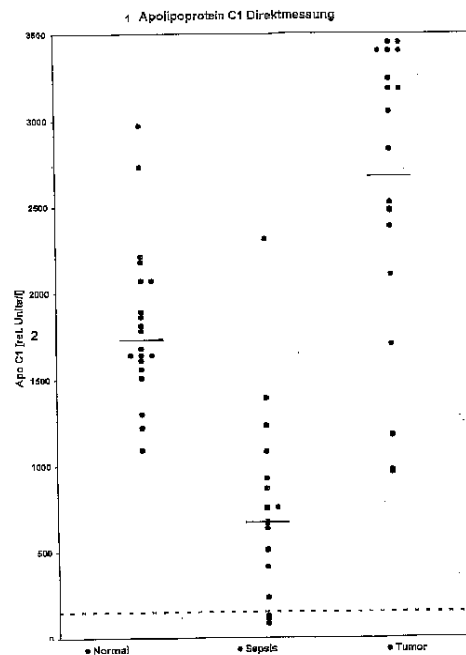
(71) 出願人 501154389
 ベー・エル・アー・ハー・エム・エス・アクティエンゲゼルシャフト
 ドイツ・D-16761・ヘーニッヒストルフ・ノイエンドルフシュトラッセ・25
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アポリポ蛋白質C-1の測定による疾患の診断方法

(57) 【要約】

ヒト患者の血清または血漿試料中のアポリポ蛋白質C-1および/またはその誘導体の量を測定し、正常な健康人で測定された値の範囲から有意に変動している結果に基づいて、疾患、特に腫瘍疾患または敗血症の存在に関して判断を下すことを可能にする疾患の診断、早期検出、危険性評価および疾患経過の管理のための方法。本発明はまた、病人の血液中のアポリポ蛋白質C-1の量または結合能力が正常人と有意に異なる疾患の治療および予防におけるアポリポ蛋白質C-1の使用に関する。



1. ALIPOPOTEIN C1 DIREKTMESSUNG
 2. ALIPOPOTEIN C1 DIRECT MEASUREMENT

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

ヒト患者の血清または血漿試料中のアポリポ蛋白質C-1および/またはその誘導体の含量を測定し、正常な健康人で測定された値の範囲と有意に異なる測定結果に基づいて疾患の存在の判断を下す疾患の診断、早期検出、危険性評価および疾患経過のモニターのための方法。

【請求項2】

疎水性分子構造に結合する能力を有する、試料中に存在する全アポリポ蛋白質C-1の画分(「遊離アポリポ蛋白質C-1」)を測定する請求項1に記載の方法。

【請求項3】

サンドイッチ型の免疫測定法を使用して試料中で直接測定することによって測定可能な、試料中に存在する全アポリポ蛋白質C-1の画分(「アポリポ蛋白質C-1免疫反応」)を測定する請求項1に記載の方法。

【請求項4】

癌疾患、敗血症、急性心疾患、糖尿病、グレイブス病およびクローン病からなる群から選択された疾患の診断、早期検出、危険性評価および疾患経過のモニターのために実施する請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

敗血症の診断、早期検出、危険性評価および疾患経過のモニターのために実施され、敗血症状態の患者の血清または血漿試料中における、正常な健康人と比較して有意に減少しており且つ疎水性分子構造と結合するアポリポ蛋白質C-1(「遊離アポリポ蛋白質C-1」)の割合、および/または低下したアポリポ蛋白質C-1免疫反応性と関連づけられる、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

癌疾患の診断、早期検出、危険性評価および疾患経過のモニターのために実施され、癌疾患の患者の血清または血漿試料中における、正常な健康人と比較して有意に減少しており且つ疎水性分子構造と結合するアポリポ蛋白質C-1(「遊離アポリポ蛋白質C-1」)の割合、および/または増加したアポリポ蛋白質C-1免疫反応性と関連づけられる、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

患者の血清または血漿試料中でリポ蛋白質C-1免疫反応性の増加が認められた場合に、測定値を追加の対照測定によって検査し、前記検査は試料中の測定可能な免疫反応性の値が疎水性表面を備えた吸着剤で試料を処理することによって有意に変化するかどうかを測定するために実施され、前記値が元の測定値から変動しないか、または有意に変動しないとき、癌疾患の存在が高い確率で結論される、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

血清または血漿試料を疎水性相互作用クロマトグラフィーにかけること(ここで、アポリポ蛋白質C-1はクロマトグラフィー物質に結合される)、および次に、溶出された蛋白質画分中のアポリポ蛋白質C-1を測定することによって、疎水性分子構造に結合するアポリポ蛋白質C-1(「遊離アポリポ蛋白質C-1」)が測定される請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

クロマトグラフィー物質としてオクチルセファロースが使用され、試料の非結合成分がクロマトグラフィー物質を洗浄することによって除去され、前記結合蛋白質が希釈酸、特に酢酸によって溶出され、溶出液中のアポリポ蛋白質C-1の量が次にHPLCおよび/または免疫診断法によって測定される請求項8に記載の方法。

【請求項10】

注射によって投与され、敗血症または癌疾患を治療することを目的とする医薬を調製するためのアポリポ蛋白質C-1の使用。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛋白質、アポリポ蛋白質C-Iをヒト患者の血清または血漿試料中のバイオマーカーとして測定する、疾患の診断、早期検出、危険性評価および経過モニターのための方法、ならびに治療上活性のある物質としてのアポリポ蛋白質C-Iの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

「診断法」という用語を一般的に以下の説明で使用するとき、この用語は、個々の点で特定の限定された目標を有する測定値のみが意味されることが具体的な状況から明らかでない限り、通例として、簡単のために、疾患の診断、早期検出、危険性評価および、治療の経過モニターを含めた経過モニターのための方法を表現するためのものであることに最初に注意されたい。

【0003】

さらに、本明細書の文脈では、「疾患」という用語は、通例、重篤で慢性な、特に急性の疾患のために使用され、アテローム性動脈硬化発症の危険因子として見なすことができるような脂肪代謝障害に関するものではないことに留意されたい。特に、癌疾患および敗血症は、「疾患」として指摘されるべきものである。しかし、本発明による測定はまた、その他の疾患、特に、心筋梗塞、狭心症および動脈閉塞性疾患などの急性心疾患または糖尿病、グレーブス病およびクローン病に罹患した患者の状態についてのより詳細な情報を提供することを企図した診断方法に関連して使用することができる。

【0004】

脂質(トリグリセリド、コレステロール、リン脂質)と一緒にリポ蛋白質を形成する蛋白質は、「アポリポ蛋白質」と称される。アポリポ蛋白質の重要な機能は、血清および血漿中において水に不溶性脂質の輸送を可能にすることである。超遠心の密度勾配での移動性に基づいて、リポ蛋白質は密度の異なる4つの種類、カイロミクロン、VLDL(超低密度リポ蛋白質)、LDL(低密度リポ蛋白質)およびHDL(高密度リポ蛋白質)に振り分けられる。さらに、リポ蛋白質(a)と称する群が区別される。リポ蛋白質の脂質画分は、それらの密度が高くなるにつれて小さくなる。密度の異なるリポ蛋白質種は、一緒に存在する脂質画分の量に基づいてだけでなく、それらの組成に関して異なる。さらに、一般的なアポリポ蛋白質の特性を、それぞれの密度の種類に割り当てることが可能である。

【0005】

アポリポ蛋白質は、長さおよびアミノ酸組成が異なる蛋白質で、A~Hと称する群に振り分けられ、個々の群内では次に、それぞれの蛋白質は書き添えた数字によって特徴付けられ、区別される。例えば、アポリポ蛋白質A-Iと完全に示す代わりに、アポA-Iとしてののみ示すこともまた慣例である。様々なアポリポ蛋白質の1次構造(アミノ酸配列)が知られているが、多くの様々なアポリポ蛋白質について、3次元構造に関するデータまたは具体的な概念が、特に脂質に関連してさらに存在している。より詳細な情報は、関連する科学論文中に存在する。

【0006】

アポリポ蛋白質はまた、特に、アテローム性動脈硬化の危険性を早期に発見したり、脂質を低下させる薬物で患者を処置するときに、治療をモニターしたりするために、患者の脂肪代謝に関する測定データの入手と関連して明確に測定できることが知られている。前述したものの中で、個々のリポ蛋白質密度種のリポ蛋白質において、ある種のアポリポ蛋白質が排他的に生じるか、または少なくとも優先的に生じ、その特異性を測定する環境を使用して、リポ蛋白質のアポリポ蛋白質画分を測定することによって、患者の血清または血漿中におけるリポ蛋白質の割合を決定することもまた可能である。

【0007】

アポリポ蛋白質形成またはアポリポ蛋白質切断酵素または受容体欠如時のアポリポ蛋白質出現に及ぼされる影響が多大なために、正常な場合とは異なるリポ蛋白質およびアポリポ蛋白質プロフィールがまた、それぞれの患者で見いだされることが知られている。脂肪

10

20

30

40

50

代謝の障害(二次的異リポ蛋白血症)はまた、一時的な症状で、疾患が治癒すると再び消失してしまうが、その他の疾患の結果として生じる可能性がある(参考(20)、186~189ページ、括弧内の数字の参照文献は、参照文献の添付リストと関連している)。脂質代謝の変化がまた、アポリポ蛋白組成の変化として表れる場合については、この科学文献は主に、アポリポ蛋白A-IおよびA-IIに関連し、通例、HDLの異常な形態および濃度をもたらすような変化について報告している。しかし、アポリポ蛋白は、脂肪代謝の障害が伴うことがまた知られている疾患を診断するためのバイオマーカーとして、顕著で実用的ないかなる役割も演じていない。

【0008】

本明細書は、診断を目的としたアポリポ蛋白C-Iの測定に関する。アポリポ蛋白C-Iは、アポリポ蛋白アポC-I、アポC-IIおよびアポC-IIIと称する、分子量が比較的低いアポリポ蛋白の群に属する。これら3種類の蛋白の1次構造は公知である(参考、アポリポ蛋白C-Iに関しては、(1)、(2)および、特に(3))。アポリポ蛋白C-IおよびC-IIIの機能について分かっていることは比較的少なく、ある種の病理状態に応じて、ヒト血清中または血漿中におけるアポリポ蛋白C-Iの量または形態および会合形態の変化について報告された知見は得られていない。(1)から(18)の報告は、C群のアポリポ蛋白またはアポリポ蛋白C-Iに関する科学文献の中でも代表的な報告で、特に(11)の研究は、リポ蛋白代謝におけるアポリポ蛋白Cの役割について知られていることに関する優れた概説を提供している。アポリポ蛋白C-Iについて記載された生物学的効果には主に、コレステロールエステル転送蛋白(CETP)の阻害、LDL受容体(LDLR)に関連した蛋白(LRP)の阻害およびLDLR自体の阻害およびVLDL受容体(VLDLR)の阻害、ならびにレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)の活性化が含まれる。

【0009】

例えば、敗血症もしくは癌などの疾患を診断するためのバイオマーカーとしてのアポリポ蛋白C-Iの測定を可能にする、または前記診断の流れにおいてアポリポ蛋白C-Iの測定を示唆する知見は、前記の出版物の内容からは得ることはできない。

【特許文献1】EP656121B1

【特許文献2】EP1121600A2

【特許文献3】W002/085937

【特許文献4】W003/005035

【特許文献5】W003/002600

【特許文献6】EP1355158A1

【特許文献7】EP1318406A1

【特許文献8】EP1318407A1

【特許文献9】EP1355159A1

【特許文献10】EP1318402A1

【特許文献11】EP1318403A1

【特許文献12】EP1318404A1

【特許文献13】EP1318405A1

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、敗血症患者の蛋白組成の変化を調査すること、および得られた結果を敗血症および炎症の診断に具体的に使用できるようにすることを目的とする本出願人による系統だった研究の結果である。

【0011】

これらの研究の出発点は、敗血症の場合、プロホルモンであるプロカルシトニンが劇的に増加すること、および敗血症のバイオマーカーとしてプロカルシトニンを測定することは、診断および治療に伴うモニタリングのために非常に実用的な意義があるという発見であった(参考、例えば、EP656121B1)。さらに、出願人が研究に対して様々な取り組みを始

10

20

30

40

50

めてから得られた、敗血症患者の血清または血漿における蛋白質組成の変化に関する発見は、例えば、公開された特許出願EP1121600A2およびさらに最近の日付の公開特許出願、例えば、W002/085937、W003/005035、W003/002600、EP1355158A1、EP1318406A1、EP1318407A1およびEP1355159A1、およびさらに関連のあるまだ公開されていない出願人の特許出願に見いだされる。特に、敗血症という用語の最近の理解の説明、および敗血症の場合のバイオマーカーの測定の重要性に関して、前記特許出願の内容を参照する。

【0012】

いくつかの研究によって、伝統的に典型的な癌マーカーとしてのみ考えられてきたいくつかのバイオマーカー(参考、EP1318402A1、EP1318403A1、EP1318404A1およびEP1318405A1)は敗血症の場合でも有意に増加していることが示されたので、敗血症患者の試料の研究と共に様々な悪性腫瘍疾患に罹患した患者の血漿および血清試料について一層検討を行った。多くの研究例において、敗血症の症例で濃度の上昇が認められた個々のバイオマーカーは、癌患者の症例においても有意に上昇していることがわかった。しかし、多くの症例はまた、敗血症疾患と悪性腫瘍疾患を簡略化するために概して基本的に同様に扱うことを妨げるかなりの差異を示した。

10

【0013】

本明細書で説明した本発明は、診断目的のバイオマーカーとして潜在的に適した蛋白質は、敗血症患者およびその他の重篤な疾患、特に、炎症性疾患または癌疾患に罹患している可能性のある患者では健康人と比べてその測定値が有意に変化しているため、それらを決定するためにさらに取り組んだ研究の結果である。この目的のために、敗血症患者の血清または血漿画分のHPLCプロフィールを見かけ上正常な健康人のHPLCプロフィールと比較し、HPLCクロマトグラフィープロフィールの有意な変化をさらに綿密に調べた。これらの研究によって、本発明の基礎となる結果が得られた。すなわち、試料の疎水性または親油性構成要素と相互作用でき、このような構成要素を選択的に結合できるクロマトグラフィー物質を含有するカラム(「疎水性相互作用クロマトグラフィー」)でこれらの試料を予め分離したとき、患者の血清または血漿試料のHPLC溶出プロフィールの有意な変化が検出可能である。クロマトグラフィー物質に結合して分離された試料の構成要素が適切な方法でその後溶出されるならば、疎水性表面と相互作用できる構成要素、特に蛋白質特性の構成要素が選択的に濃縮された、元の血清または血漿試料の垂画分が得られる。リポ蛋白質に適用したこのような方法の変形は(19)に記載されている。

20

30

【0014】

敗血症およびその他の疾患の患者の血漿または血清のこのような画分の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分離によって、本発明の基礎となる驚くべき発見、すなわち、正常な健康人の血清および血漿中で十分な濃度で見いだされるべき構成要素が敗血症患者およびある種のその他の患者の血清では非常に減少しているか、見かけ上完全になくなっているという発見が導かれた。以下にさらに詳細に説明するが、このような構成要素の特性をさらに研究すると、著しく減少した構成要素はアポリポ蛋白質C-Iであることが示された。同様に、以下にさらに詳細に説明したその後の研究によって次に、最初の暫定評価では敗血症および癌患者において変化の類似性を示した結果が、実際には互いに明確に区別され、ヒト患者の血清または血漿中において、それ自体診断目的のために利用できる発見を構成するアポリポ蛋白質C-Iを測定することによって、癌疾患からの敗血症疾患の明確な区別することを可能にできるというさらに驚くべき結果が導かれた。

40

【0015】

本発明の目的は、診断測定に適した新規蛋白質バイオマーカーを発見すること、およびそれを診断目的に利用できるようにすることで、ヒト血清または血漿中のこのバイオマーカーの定量的な出現頻度は、見かけ上正常な健康人で見いだされる値とは有意に異なり、したがって、その測定値は診断手段として価値がある。

【課題を解決するための手段】

【0016】

この目的は、請求項1で請求したとおりの方法によって実現される。

50

【0017】

特に、敗血症患者、癌患者およびその他の疾患の患者の場合における診断適用に関して、好ましい応用は下位請求項に記載されている。

【0018】

本明細書または請求項において、アポリポ蛋白質C-Iに加えて、「それらの誘導体」がまた測定すべき種として述べられる場合は、これらは特に断片および集合体、特に、それぞれの選択した測定法において遊離蛋白質であるアポリポ蛋白質C-Iと同様の挙動を示すものを意味すると理解すべきである。「誘導体」は、例えば、個々のアミノ酸もしくはアミノ酸配列の分、短くなったアポリポ蛋白質C-I分子、または、例えば、凝集によって立体的に、もしくは構造的に改変された完全なアポリポ蛋白質C-I分子であってよい。

10

【0019】

バイオマーカーとしてのアポリポ蛋白質C-Iの使用を可能にする今回の新規な発見によって、関連する疾患に罹患している患者において、アポリポ蛋白質C-Iの検出量は見かけ上正常な健康人と比較して非常に減少していることが示唆される。このことから、アポリポ蛋白質C-Iは、上記疾患の場合、不十分な量で形成され、消費され、かつ/または異常に結合していると結論づけることが可能であり、健康人と比較してのアポリポ蛋白質C-Iの欠乏として解釈することができる。

【0020】

したがって、他の態様では、本発明はまた、疾患に関連したアポリポ蛋白質C-I欠乏状態を治療するため、および診断レベルで測定可能な量のアポリポ蛋白質C-Iの著しい減少として表れる疾患を治療するための医薬を調製するため、治療剤としてのアポリポ蛋白質C-Iの使用に関する。

20

【0021】

本発明のこれらの態様は、請求項10の主題となる。

【0022】

記載した導入部分および特許請求の範囲において再現された保護すべきすべての事実および教示では、実験データおよび関連図を参考にして以下に詳細に説明し、本発明の記述で使用した個々の用語の意味をさらに説明する。したがって、特許請求の範囲を解釈するため、および今までに記載された一般的な記述のより正確な解釈のために、以下の記述を明示する。

30

【0023】

実施した実験の説明および得られた結果

A. クロマトグラフィーによる調査

1. 疎水性表面に結合し、そこから溶出することができるヒト血清/血漿の構成要素を含む血清または血漿画分の取得

見かけ上正常な健康人および独立して医学的に診断されたいくつかの疾患に罹患した患者の血清/血漿の試料それぞれ0.5mlをPBSに溶かしたオクチルセファロースクロマトグラフィー物質(販売元:ファルマシア、充填材料0.25ml、PBSで洗浄)0.5mlと混合し、ゆっくり振盪しながら室温で10分間インキュベートした。その後、混合物をポリプロピレンカラム(直径5mm)に入れ、PBS 20mlで洗浄することによって、オクチルセファロース物質に結合した物質から結合しなかった物質を分離した。

40

【0024】

オクチルセファロース物質に結合した物質(蛋白質)の脱離は、酢酸(pH 2.5)50mMによる溶出によって実施した。

【0025】

2. 逆相C18 HPLC

オクチルセファロースカラムから得られた酢酸溶出物はそれぞれの場合に、 μ Bondapak C18カラム(3.9×300mm、Millipore、Waters)の逆相C18 HPLCによって直接分析した。

【0026】

移動相A(水の体積95部、アセトニトリルの体積5部、トリフルオロ酢酸の体積0.1部の混

50

合物)および移動相B(水の体積10部、アセトニトリルの体積90部、トリフルオロ酢酸の体積0.1部)の勾配をHPLCクロマトグラフィーに使用した。

【0027】

HPLCカラムに酢酸溶出物をチャージした後、以下の移動相A/移動相Bの勾配で分析を実施した。

t=0~5分100/0(A/B)から65/35(A/B)

t=5~20分65/35(A/B)から40/60(A/B)

t=20~22分40/60(A/B)から0/100(A/B)

【0028】

流速は1ml/分であった。カラムからの流出物は、214nmでの吸光度を継続的に測定した

10

【0029】

図1は、見かけ上正常で健康な患者(a)、様々な腫瘍疾患の患者(b)および敗血症患者(c)からの試料の画分の一般的な3種類の溶出プロフィールを示す。

【0030】

驚くべきことに、上記グループの人のHPLC溶出プロフィールは、実質的かつ系統的に互いに異なることが発見された。本明細書にとって重要なバンドは、17.05分に溶出するバンドである。

【0031】

このバンドは、調査した血清および血漿の全試料のピークを集積することによって、相対的に定量され、この方法で測定された物質の相対的な量は、多数の対照および患者試料について、図2にグラフで示してある。具体的に、以下の試料を調査した。

20

【0032】

腫瘍患者42試料(腸癌9試料、気管支癌7試料、乳癌13試料、卵巣癌8試料、膵臓癌5試料)、敗血症患者22試料、心筋梗塞患者(Ci)7試料、狭心症患者(APe)4試料、動脈閉塞性疾患(AOD)5試料、クローン病患者(CD)6試料、糖尿病患者11試料、自己免疫甲状腺炎(AIT)4試料、I型糖尿病患者(D-I型)10試料、II型糖尿病患者(D-II型)6試料、関節リウマチ患者(RA)3試料、アルツハイマー病患者(AD)2試料およびHIV陽性患者6試料。

【0033】

図2から直ちに明らかのように、17.05分で測定されたピークに対応する物質について、実質的に高い値は、正常な健康人の試料に認められる。疾患に罹患した患者の試料では、とりわけ敗血症患者、腫瘍患者、顕性/急性心疾患の患者(Ci、APe、AOD)およびクローン病の患者の試料では明らかに同物質の比率の極めて著しい減少が測定されている。I型糖尿病およびII型糖尿病の患者でも健康人と比較して有意に値が減少していたが、同様の程度までは減少していない。糖尿病、自己免疫甲状腺炎、関節リウマチ、アルツハイマー病の患者およびHIV陽性患者では、対応する濃度の変動は小さく、統計学的には有意ではない。

30

【0034】

個々の試料群について得られた相対量の平均値を以下の表にまとめて示す。

【0035】

40

【表 1】

試料の種類	平均値(相対的吸光度単位)
対照	640
敗血症	30
腫瘍	80
心筋梗塞	80
狭心症	140
動脈閉塞性疾患	80
クローン病	80
グレーブス病	320
自己免疫甲状腺炎	1130
I型糖尿病	180
II型糖尿病	200
関節リウマチ	1130
アルツハイマー病	440
HIV陽性	480

10

20

【0036】

3. 試料を特徴付けるためのバンドの同定(17.05分に溶出するバンド)

同定をするために、このバンドに対応する溶出物質を収集し、乾燥させ(speed vac)、ペプチド分析を行った。N末端の配列分析では、配列TPDVSが決定された。質量分析(ESIMS)によって測定された分子量は、 6630 ± 15 Dであった。これらの結果は、ヒトアポリポ蛋白質C-1の公知のデータと明らかに相関しており(参考、例えば(3))、配列番号1に記載されたペプチド配列を有し(SWISS PROT寄託番号3660227もまた参考のこと)、理論的な分子量は6627 Dである。

30

【0037】

上記物質のトリプシン消化、およびその後の質量分析(ESIMS、「トリプシンフィンガープリント」)の後で、行った同定が完全に確認された。

【0038】

説明したクロマトグラフィー法によって測定できるアポリポ蛋白質C-1はまた、本明細書の文脈では、「遊離アポリポ蛋白質C-1」のことである。それは、(PBSで希釈した)血清または血漿試料から疎水性分子構造、例えば、疎水性オクチルセファロースクロマトグラフィー物質のオクチル基に結合し、蛋白質の溶出に対する一般的条件の下で、特に希釈酢酸で溶出されることができる特性を有する。しかし、「遊離アポリポ蛋白質C-1」という用語を使用する場合、疎水性相互作用クロマトグラフィーによって分離できる物質が元の試料において完全に遊離の形態で存在しなくてはならないことを必ずしも意味するわけではない。実験条件下でオクチルセファロースと接触して切断される脂質も備えた、アポリポ蛋白質C-1をクロマトグラフィー物質に結合させる結合物または凝集物はまた、本明細書でこの用語を使用する文脈では、「遊離アポリポ蛋白質C-1」と考えられる。

40

【0039】

したがって、「疎水性分子構造」はまた、疎水性クロマトグラフィー物質の表面の一部であることができる。しかし、これらはまた、このような分子とアポリポ蛋白質C-1とを

50

結合させることができる疎水性構造領域を有する個々の分子、例えば、標識可能な疎水性構造を有する分子であってよく、例えば、試料液体中でアポリポ蛋白質C-Iを標識するための均一系測定法において使用できる。「疎水性分子構造」に結合する能力は、このような結合に使用できる試料中のアポリポ蛋白質C-Iの領域がその他の物質、例えば、リポ蛋白質の脂質によってブロックされていないとき、表れる。例えば、オクチルセファロースに結合するアポリポ蛋白質C-Iのそのような画分が測定されると記述されているときでも、その測定において実際にオクチルセファロースへの結合を利用する必要があることを意味しない。むしろ、このような記述は、まったく異なる方法によって測定される場合であっても、測定する物質の特性として理解されるべきである。例えば、対応するアポリポ蛋白質C-Iは、以下に説明するように、免疫測定法によっても測定されるものと同じであってよい。

10

【0040】

B. 血清/血漿中のアポリポ蛋白質C-Iの直接免疫診断測定法

1. アポリポ蛋白質C-Iの免疫測定法

血清中のアポリポ蛋白質C-Iの直接免疫診断測定法については、サンドイッチ型の免疫測定法を以下に説明した部分で提示する。

【0041】

a) コーティング試験管: ポリスチレン試験管(Greiner)は、アポリポ蛋白質C-Iに対する市販のポリクローナルアフィニティー精製抗体(販売元、Acris Antibody、Bad Neuheim、ドイツ)でコーティングした。製造者の情報によれば、抗体はヒトアポC-Iでウサギを免疫することによって得られ、ヒトアポリポ蛋白質C-Iを結合させたセファロースアフィニティーカラムで精製されている。コーティングでは、PBS 300 μ lに溶かした抗体0.2 μ gを、ヒツジ抗ウサギIgG抗体(Sigma)でコーティングしたポリスチレン試験管(Greiner、ドイツ)に結合させた。本結合は、室温で18時間後に完了した。次に、試験管を、PBSに溶かした0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)で3mlずつ2回洗浄した。真空中で乾燥させた後、試験管をアポリポ蛋白質C-I免疫測定法の固相として使用した。

20

【0042】

b) アクリジニウムエステルで標識した抗体: PBS 100 μ lに溶かしたヒトアポリポ蛋白質C-Iに対する別の抗体(ウサギ由来、販売元: Academie Bio-Medical Company、Texas、USA) 100 μ gを(アセトニトリル10 μ lに溶かした)アクリジニウムNHSエステル10 μ gと反応させた。室温で10分間インキュベートした後、標識した抗体は、SW 300(Waters)によるHPLCによって反応混合物の未変換構成成分を分離して精製した。これを免疫測定法で使用するためには、試験管壁を飽和させるために、0.5% BSAおよびウサギIgG 1mg/mlを含むPBSに溶かした上記標識抗体を約100万RLU/300 μ l(RLU=相対光ユニット)に調節した。

30

【0043】

2. 血清または血漿試料中のアポリポ蛋白質C-Iの免疫診断測定の実施

血清または血漿試料は、PBS、0.5% BSAで1:10000に希釈した。いずれの場合でも、それらの300 μ lを前述の固定した抗体でコーティングした試験管にピペットで入れ、次に室温で振盪しながら4時間インキュベートした(Heidolph回転式振盪機で300rpm)。次に、試験管の内容物をPBSで洗浄し(それぞれについてPBS 1mlの充填およびデカンテーションを4回行う)、試験管壁に結合したアポリポ蛋白質C-Iを試験管当たり300 μ lのアクリジンエステル標識抗アポリポ蛋白質C-I抗体と室温で300rpmで20時間かけて反応させた。その後、未結合の標識抗体はPBS 1mlで5回洗浄することによって除去し、残存する化学ルミネセンスを、Berthold 952 T照度計で公知の方法で測定した。

40

【0044】

測定法の較正に合成アポリポ蛋白質C-Iを使用した。上記方法で得られた一般的な標準曲線を図3に示す。

【0045】

3. 結果

説明したサンドイッチ型免疫測定法を使用して、クロマトグラフィーによる検討で使用

50

したようにまた、見かけ上正常な健康人の対照血清および敗血症および腫瘍の試料を測定した。敗血症患者の試料を測定することによって、アポリポ蛋白質C-Iでは、正常人と比較して有意な測定値の減少が得られたというHPLC検討の結果が実質的に確認された。腫瘍患者の試料を測定したところ、クロマトグラフィーによる検討では同様に濃度の減少が測定されたが、得られた測定値には増加の傾向があった。その結果を図4に図示する。

【0046】

腫瘍患者の結果が一方のクロマトグラフィーの測定と他方の免疫診断測定で異なるのは、疎水性相互作用クロマトグラフィーによる前述の選択段階によるのかどうかという疑問を調べるために、アポリポ蛋白質C-Iの「遊離」画分の結合をさらに測定する前に、免疫測定法で測定した試料をオクチルセファロースで処理した。

10

【0047】

4. オクチルセファロースによる試料の処理

免疫測定法で説明したように測定した同じ血清または血漿試料150 μ lをオクチルセファロース(ファルマシア、PBSにゲル50 μ lを溶かしたもの)200 μ lと混合し、室温でゆっくり振盪しながら1時間インキュベートし、その後、オクチルセファロースとそこに結合したアポリポ蛋白質C-I画分を遠心(2000Gで15分)によって分離した。得られた上清をPBS/0.5% BSAで1:5000に希釈し、次に前述のように免疫測定法で測定した。

【0048】

得られた結果を図5(fig.5)に示す。オクチルセファロース処理の結果として、記載したサンドイッチ型免疫測定法による測定で検出可能な「遊離」のアポリポ蛋白質C-Iはすべて、オクチルセファロースに結合し、したがって、アポリポ蛋白質C-Iはもはや上清では検出されなかったのは明らかである。同様の所見が処理した敗血症試料でも認められ、正常試料と比較して既に非常に減少していた測定可能なアポリポ蛋白質C-Iの量の大部分がオクチルセファロース処理によって試料から取り除かれた。

20

【0049】

しかし、驚くべきことに、記載した型の免疫測定法で測定可能なアポリポ蛋白質C-Iは、オクチルセファロース処理によっても腫瘍患者の試料からは除去されなかった。

【0050】

C. 考察

説明した発見によって示されることは、腫瘍患者の血清または血漿中のアポリポ蛋白質C-Iの少なくとも大部分は、疎水性表面に結合する能力は失われているが、免疫測定法において免疫反応性としてまだ測定できる形態で存在するということである。これらの観察の可能性ある説明は、腫瘍患者の血清に生じるアポリポ蛋白質C-Iの場合、疎水性相互作用で利用される分子領域は、特にオクチルセファロースによって置換できない結合相手によって、飽和またはブロックされるということであろう。これらの結合相手の特性については現在のところ分かっていない。しかし、それ自体として、または疎水性結合相手、例えば、アポリポ蛋白質C-Iなどの不活性化に基づいて、例えば、本来の免疫応答に悪影響を及ぼしたり、腫瘍増殖を活発に促進したりすることによって、腫瘍の発症に重要な役割を果たす腫瘍特異的物質であるということを除くことはできない。免疫診断法によって調べた試料ではアポリポ蛋白質C-I画分の有意な減少は検出できなかったが、並行して調べたクロマトグラフィーでは、これは前述の意味では「遊離」ではないが、疎水性結合相手に結合する能力が減少した別の形態で存在することを示している。「遊離」のアポリポ蛋白質C-I、すなわち、疎水性結合相手に結合するアポリポ蛋白質C-Iは、他方で、腫瘍患者の血清では、その他の疾患、例えば、敗血症の場合のように、減少している。

30

40

【0051】

説明した発見に基づいて、腫瘍患者に対しては、アポリポ蛋白質C-Iを外部から供給することによって「遊離」アポリポ蛋白質C-Iの減少した割合について攪乱された平衡を補い、したがって、例えば、外部のアポリポ蛋白質C-Iによって腫瘍に一般的な結合相手を飽和し、遊離アポリポ蛋白質C-Iを追加供給することによって、病理過程に良い影響をもたらすことは有益であるものと考えられる。

50

【 0 0 5 2 】

同様の考え方、すなわち、「遊離」のアポリポ蛋白質C-Iの攪乱された濃度を補うために外部からアポリポ蛋白質C-Iを供給することは有益であるという考え方はまた、他の疾患、例えば、敗血症の場合にも適用される。敗血症の場合、アポリポ蛋白質C-Iの産生が攪乱されるならば、外部からの供給によってそれによって生じた欠乏を補うことができる。敗血症の場合、患者の血清/血漿中の「遊離」のアポリポ蛋白質C-Iの減少が、病理組織構造または存在する可能性のある不溶性細菌構造に結合することによってアポリポ蛋白質C-Iが循環から取り除かれることに起因すると考えられるならば、外部からのアポリポ蛋白質C-Iの供給によって、生じた欠乏を補うか、または病理組織内または細菌構造上の結合部位の飽和を実施することができる。外部供給によって増加した遊離のアポリポ蛋白質

10

【 0 0 5 3 】

したがって、本発明はまた、癌、敗血症、および健康人と比較して検出可能な遊離のアポリポ蛋白質C-Iが減少していることに関連したその他の疾患を治療するために、アポリポ蛋白質C-I、または適切な誘導体、またはその生理学的作用を模倣する化合物の新たな治療的使用を可能にする。

[参考文献]

List of references:

1. Erika Polz et al., Human Apolipoprotein C-I: Concentration in Blood Serum and Lipoproteins, *Biochemical Medicine* 24, 229-237 (1980)
2. Kane, J.P., in "Lipid Metabolism in Mammals" (F.Snyder, Ed.), Vol.1, S. 209, Plenum, New York, 1977 10
3. Shulman, RS et al., The complete amino acid sequence of C-I (apoLP-Ser), an apolipoprotein from human very low density lipoproteins, *J Biol Chem.* 250, 182-190 (1975)
4. Xiao-Ren Pan et al., Abnormal Composition of Apolipoproteins C-I, C-II, and C-III in Plasma and Very-Low-Density Lipoproteins of Non-Insulin-Dependent Diabetic Chinese, *Clin. Chem.* 32, No.10, 1914-1920 (1986) 20
5. Jutta Poensgen, Apolipoprotein C-I inhibits the hydrolysis by phospholipase A₂ of phospholipids in liposomes and cell membranes, *Biochim.Biophys.Acta*, 1042 (1990), 188-192
6. Ming Liu et al., Activation of plasma lysolecithin acyl-transferase reaction by apolipoproteins A-I, C-I and E, *Biochim.Biophys.Acta*, 1168 (1993), 144-152 30
7. Nina D. Bren et al., Quantification of Human Plasma Apolipoproteins C-I, C-II, and C-III by Radioimmunoassays, *Mayo Clin Proc*, July 1993, Vol.68, 657-664
8. Rampratap S. Kushwaha et al., Characterization of cholesteryl ester transfer protein inhibitor from plasma of baboons (*Papio sp.*), *J.Lipid Res.* 1993, 34:1285-1297 40
9. N. Savion et al., Role of apolipoproteins A-I, A-II and C-I in cholesterol efflux from endothelial and smooth muscle cells, *Eur Heart J* (1993) 14, 930-935

10. Janine H. van Ree et al., Inactivation of Apoe and Apoc1 by two consecutive rounds of gene targeting: effects on mRNA expression levels of gene cluster members, Human Molecular Genetics, 1995, Vol.4, No.8, 1403-1409
11. Miek C. Jong et al., Role of ApoCs in Lipoprotein Metabolism - Functional differences Between ApoC1, ApoC2, and ApoC3, Arterioscler Thromb Vasc Biol.1999; 19:472-484 10
12. Thomas Gautier et al., Human Apolipoprotein C-I Accounts for the Ability of Plasma High Density Lipoproteins to Inhibit the Cholesteryl Ester Transfer Protein Activity, J. Biol. Chem. 275, No.48, 37504-37509, (2000)
13. Jong M.C. et al., Insights into Apolipoprotein C Metabolism from Transgenic and Gene-Targeted Mice, Int.J.Tissue React. XXII (2/3) 59-66 (2000) 20
14. Neil S. Shachter, Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism, Current Opinion in Lipidology 2001, 12:297-304
15. Benjamin W. Atcliffe et al., The interaction of human apolipoprotein C-I with sub-micellar phospholipid, Eur. J. Biochem. 268, 2838-2846 (2001) 30
16. Thomas Gautier et al., Apolipoprotein CI Deficiency Markedly Augments Plasma Lipoprotein Changes Mediated by Human Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) in CETP Transgenic/ApoCI-knocked Out Mice, J. Biol. Chem. 277, No.35, 31354-31363 (2002)
17. Puiying A. Mak et al., Regulated Expression of the Apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II Gene Cluster in Murine and Human Macrophages, J. Biol. Chem. 277, No.35, 31900-31908 (2002) 40
18. Johan Björkegren et al., Postprandial Enrichment of Remnant Lipoproteins With ApoC-I in Healthy Normolipidemic Men With

Early Asymptomatic Atherosclerosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:1470-1474

19. John G. Raynes et al., Purification of Serum Amyloid A and Other High Density Apolipoproteins by Hydrophobic Interaction Chromatography, *Analytical Biochemistry* 173, 116-124 (1988)
20. Lothar Thomas (Editor): *Labor und Diagnose*, 5. erweiterte Auflage, Frankfurt 200, Kapitel 4 Fettstoffwechsel, S.177-190
21. Cesare R. Sitori, Evaluation of Lipoproteins/Apolipoproteins as Therapeutic Agents for the Treatment of Vascular and Nonvascular Disease, *Am J Cardiol.*, Vol 81, 36F-39F (1998)

10

【図面の簡単な説明】

20

【0054】

【図1】(a)見かけ上正常な健康人、(b)様々な悪性腫瘍疾患の患者および(c)敗血症患者の血清または血漿をチャージしたオクチルセファロースクロマトグラフィーカラムから、リン酸緩衝生理食塩水溶液(PBS)で前記チャージしたカラムを中間洗浄した後で、酢酸(50 mM)で溶出可能な血清および血漿画分の逆相C18 HPLCの溶出プロフィールを示した図である。

【図2A】見かけ上正常な健康人および様々な種類の疾患(敗血症、腫瘍、それぞれの場合について、独立して、臨床的に診断を確認した)に罹患した患者の試料中の溶出可能なアポリポ蛋白質C-Iの図1で示した種類のHPLC溶出プロフィールのピーク集積によって得られた相対量を示した図である。

30

【図2B】見かけ上正常な健康人および様々な種類の疾患(心筋梗塞、狭心症、動脈閉塞性疾患、クローン病、それぞれの場合について、独立して、臨床的に診断を確認した)に罹患した患者の試料中の溶出可能なアポリポ蛋白質C-Iの図1で示した種類のHPLC溶出プロフィールのピーク集積によって得られた相対量を示した図である。

【図2C】見かけ上正常な健康人および様々な種類の疾患(グレーブス病、自己免疫甲状腺炎、I型糖尿病、II型糖尿病、関節リウマチ、アルツハイマー病、HIV陽性血清、それぞれの場合について、独立して、臨床的に診断を確認した)に罹患した患者の試料中の溶出可能なアポリポ蛋白質C-Iの図1で示した種類のHPLC溶出プロフィールのピーク集積によって得られた相対量を示した図である。

【図3】標準として合成アポリポ蛋白質C-Iを使用して得られた、2種類のアフィニティー精製ポリクローナルアポリポ蛋白質C-I抗体で行ったサンドイッチ免疫測定法の標準曲線を示した図である。

40

【図4】典型的な校正曲線を図3で示したアポリポ蛋白質C-Iサンドイッチ免疫測定を使用して、見かけ上正常な健康人、敗血症患者および腫瘍患者の血清および血漿におけるアポリポ蛋白質C-Iを直接測定した結果を示した図である。

【図5】それぞれの試料をオクチルセファロースで処理した後に測定(測定結果を図4に示したものを)を繰り返した結果を示した図である。

【 図 1 】

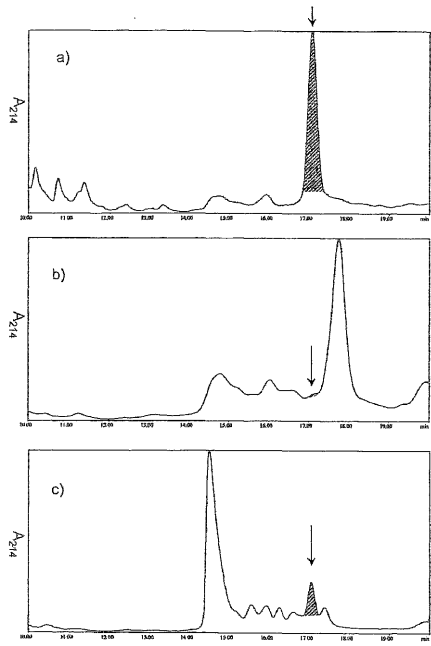


FIG. 1

【 図 2 A 】

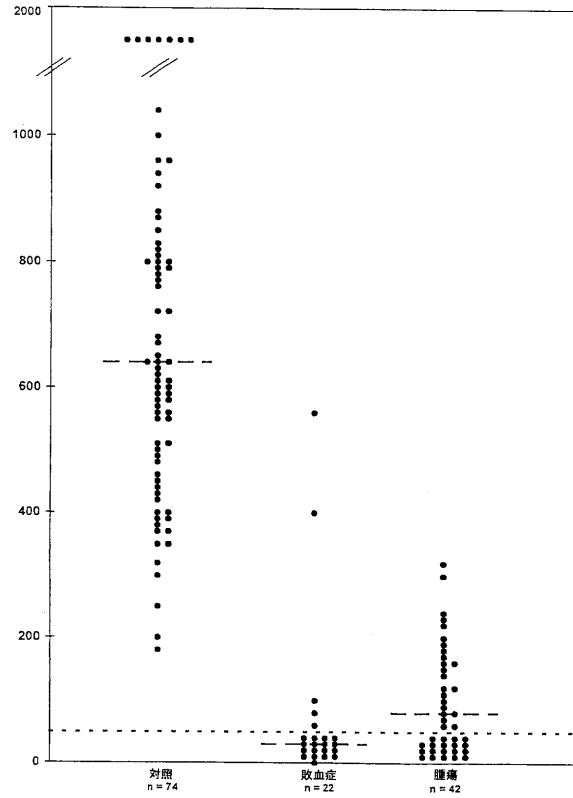


FIG. 2a

【 図 2 B 】

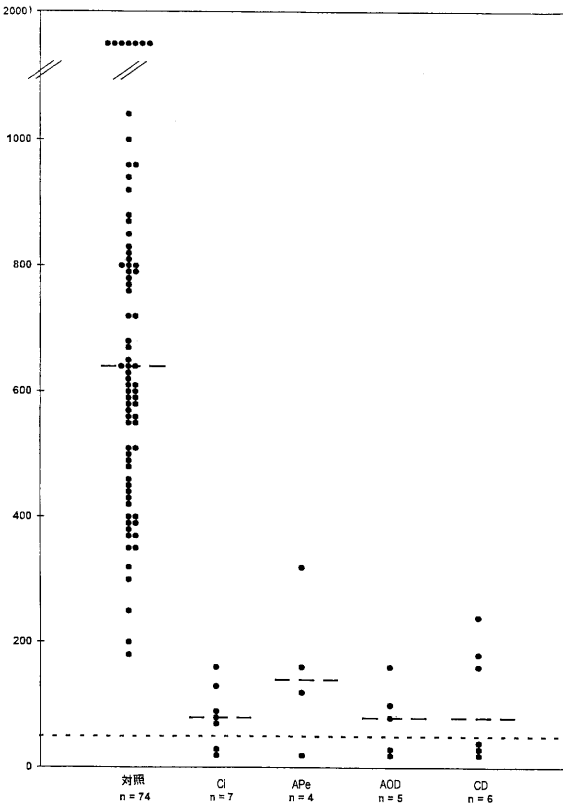


FIG. 2b

【 図 2 C 】

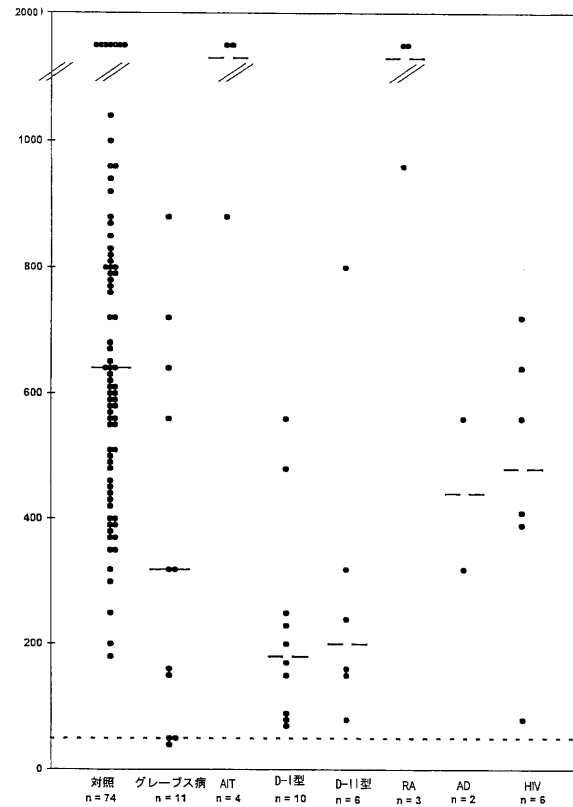


FIG. 2c

【 図 3 】

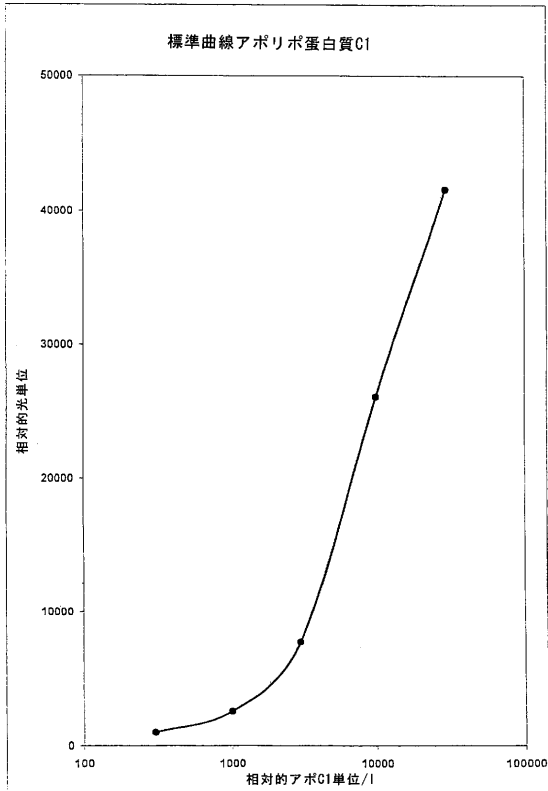


FIG. 3

【 図 4 】

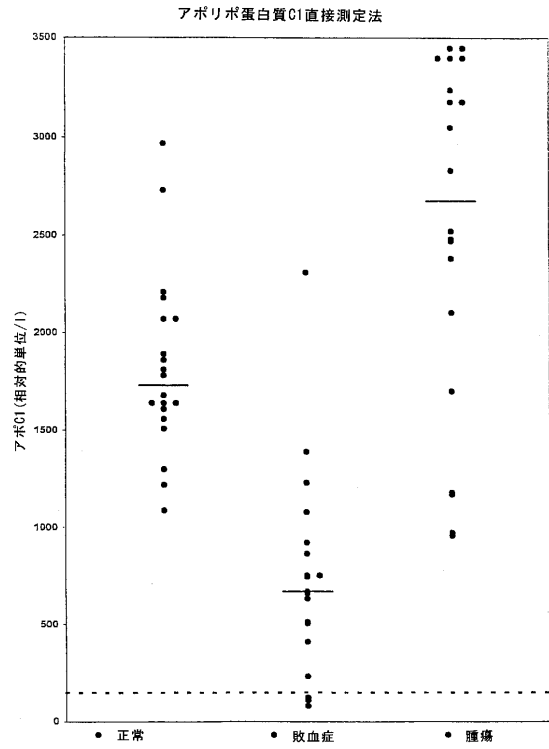


FIG. 4

【 図 5 】

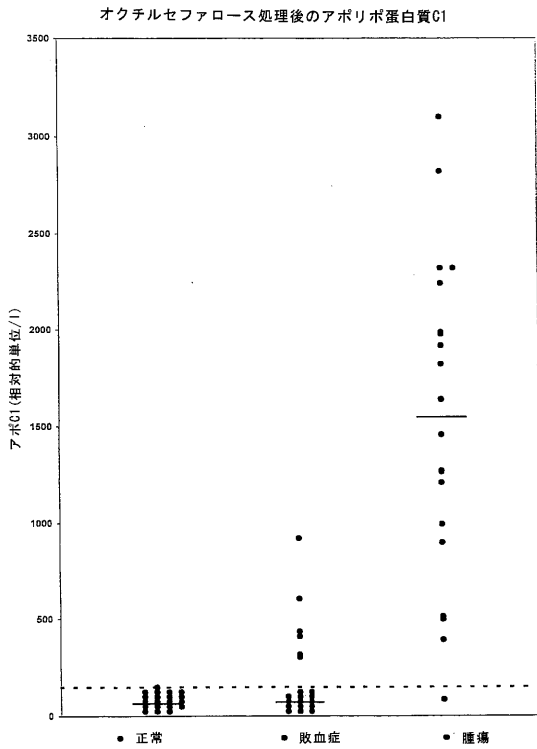


FIG. 5

【配列表】

2007506075000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/E0004/009965
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/574		
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 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARLAGE S ET AL: "ApoE-containing high density lipoproteins and phospholipid transfer protein activity increase in patients with a systemic inflammatory response." JOURNAL OF LIPID RESEARCH. FEB 2001, vol. 42, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 281-290, XP002309046 ISSN: 0022-2275 the whole document	1-10
X	WO 03/076594 A (SIDRANSKY DAVID ; UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 18 September 2003 (2003-09-18) paragraph [0055] - paragraph [0057]; claims 9,11,18,72,100; table 2 ----- -/--	1,3-5, 8-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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		Date of mailing of the international search report
6 December 2004		07 FEB 2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 840-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 840-3016		Authorized officer Schalich, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/E004/009965

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2001/005714 A1 (HAUSER HELMUT ET AL) 28 June 2001 (2001-06-28) paragraph [0071] - paragraph [0073] -----	1,3-5, 8-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP2004/009965

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental 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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:

6-7 in full**1-4, 8-10 in part****Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP2004/009965

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

1. Claims 6 and 7 (in full), 1-4, 8-10 (in part)

apoCI as diagnostic marker for cancerous diseases.

2. Claims 5 (in full), 1-4, 8-10 (in part)

apoCI as diagnostic marker for sepsis.

3. Claims 1-4, 8-10 (in part)

apoCI as diagnostic marker for acute cardiac diseases.

4. Claims 1-4, 8-10 (in part)

apoCI as diagnostic marker for diabetes.

5. Claims 1-4, 8-10 (in part)

apoCI as diagnostic marker for Graves' disease.

6. Claims 1-4, 8-10 (in part)

apoCI as diagnostic marker for Crohn's disease.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/E004/009965

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03076594 A	18-09-2003	CA 2478510 A1	18-09-2003
		WO 03076594 A2	18-09-2003
		US 2004081976 A1	29-04-2004

US 2001005714 A1	28-06-2001	AU 710061 B2	09-09-1999
		AU 2174197 A	22-10-1997
		CA 2249459 A1	09-10-1997
		CN 1216995 A , C	19-05-1999
		EP 0889906 A1	13-01-1999
		WO 9736927 A1	09-10-1997
		JP 2000509020 T	18-07-2000
		NO 984524 A	30-11-1998
		NZ 331980 A	29-09-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/E 004/009965
A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/574		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BARLAGE S ET AL: "ApoE-containing high density lipoproteins and phospholipid transfer protein activity increase in patients with a systemic inflammatory response." JOURNAL OF LIPID RESEARCH. FEB 2001, Bd. 42, Nr. 2, Februar 2001 (2001-02), Seiten 281-290, XP002309046 ISSN: 0022-2275 das ganze Dokument -----	1-10
X	WO 03/076594 A (SIDRANSKY DAVID ; UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 18. September 2003 (2003-09-18) Absatz [0055] - Absatz [0057]; Ansprüche 9,11,18,72,100; Tabelle 2 ----- -/--	1, 3-5, 8-10
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipien oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 6. Dezember 2004		Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts 07 FEB 2005
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 840-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Schalich, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/E 004/009965

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 2001/005714 A1 (HAUSER HELMUT ET AL) 28. Juni 2001 (2001-06-28) Absatz [0071] - Absatz [0073] -----	1,3-5, 8-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
T/EP2004/009965

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2. Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____
3. Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
6-7 zur Gänze, 1-4, 8-10 teilweise

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

 Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt. Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

International application No.

PCT/ EP2004/ 009965

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: Ansprüche 6 und 7 (zur Gänze); 1-4, 8-10 (teilweise)

ApoCI als diagnostischer Marker für Krebserkrankungen

2. Ansprüche: Anspruch 5 (zur Gänze), 1-4, 8-10 (teilweise)

ApoCI als diagnostischer Marker für Sepsis

3. Ansprüche: Ansprüche 1-4, 8-10 (teilweise)

ApoCI als diagnostischer Marker für akute Herzerkrankungen

4. Ansprüche: Ansprüche 1-4, 8-10 (teilweise)

ApoCI als diagnostischer Marker für Diabetes

5. Ansprüche: Ansprüche 1-4, 8-10 (teilweise)

ApoCI als diagnostischer Marker für Morbus Basedow

6. Ansprüche: Ansprüche 1-4, 8-10 (teilweise)

ApoCI als diagnostischer Marker für Morbus Crohn

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Publizitätszeichen

PCT/EP2004/009965

In Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 03076594 A	18-09-2003	CA 2478510 A1	18-09-2003
		WO 03076594 A2	18-09-2003
		US 2004081976 A1	29-04-2004
US 2001005714 A1	28-06-2001	AU 710061 B2	09-09-1999
		AU 2174197 A	22-10-1997
		CA 2249459 A1	09-10-1997
		CN 1216995 A ,C	19-05-1999
		EP 0889906 A1	13-01-1999
		WO 9736927 A1	09-10-1997
		JP 2000509020 T	18-07-2000
		NO 984524 A	30-11-1998
		NZ 331980 A	29-09-2000

フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

A 6 1 P 31/04

(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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 アンドレアス・ベルクマン

ドイツ・1 2 3 5 1・ベルリン・バウムロイファーヴェーク・4 7

Fターム(参考) 4C084 AA02 BA46 CA62 NA14 ZB26 ZB35

专利名称(译)	通过测量载脂蛋白C1诊断疾病的方法		
公开(公告)号	JP2007506075A	公开(公告)日	2007-03-15
申请号	JP2006526553	申请日	2004-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	布拉姆斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	裴埃尔啊她IMS股份公司		
[标]发明人	アンドレアスベルクマン		
发明人	アンドレアス・ベルクマン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N30/88 A61K38/00 A61P35/00 A61P31/04 G01N33/92		
CPC分类号	A61P31/04 A61P35/00 G01N33/92 G01N2333/775		
FI分类号	G01N33/53.W G01N30/88.E G01N30/88.101.N A61K37/22 A61P35/00 A61P31/04		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/BA46 4C084/CA62 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C084/ZB35		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	10343815 2003-09-22 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

诊断，早期识别，风险评估和监测疾病的进展是新的，包括确定人血清或血浆样品中载脂蛋白C-1 (A) 和/或其衍生物的含量。如果测量值与健康受试者的值明显不同，则可以推断出疾病。还包括独立权利要求用于 (A) 制备用于治疗癌症和败血症的可注射组合物的用途。活性：抗菌；免疫抑制 抑制细胞生长。没有给出生物学数据。作用机理：未给出。

