

(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2009-505039

(P2009-505039A)

(43) 公表日 平成21年2月5日(2009.2.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/92 (2006.01)	GO 1 N 33/92 Z	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 W	
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2008-525331 (P2008-525331)	(71) 出願人	302013623 ヴィタテク・バイオテクノロジー・ゲーエムベーハー
(86) (22) 出願日	平成18年8月8日 (2006.8.8)		
(85) 翻訳文提出日	平成20年4月8日 (2008.4.8)		
(86) 国際出願番号	PCT/AT2006/000336		オーストリア国アーヘン 6020 インスブルック, インライン 66
(87) 国際公開番号	W02007/016716	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
(87) 国際公開日	平成19年2月15日 (2007.2.15)	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(31) 優先権主張番号	A1333/2005	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(32) 優先日	平成17年8月8日 (2005.8.8)	(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
(33) 優先権主張国	オーストリア (AT)	(74) 代理人	100096013 弁理士 富田 博行
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 アポリポタンパク質A-I Vレベルを測定することにより腫瘍を診断する方法

(57) 【要約】

個体における腫瘍の診断方法であって、以下の工程：－ 個体の体液サンプル又は組織サンプル中のアポリポタンパク質A-I V（アポA-I V）量を測定し；－ サンプル中のアポA-I Vの測定量を基準値と比較し（ここで、基準値は、腫瘍のない個体に由来するサンプル中のアポA-I V含量である）；そして、－ サンプル中のアポA-I V含量が基準値と比較して減少している場合に腫瘍を診断する、ことを含む方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

個体における腫瘍の診断方法であって、以下の工程：

- ー 個体の体液サンプル又は組織サンプル中のアポリポタンパク質 A-I V（アポ A-I V）の量を測定し；
 - ー サンプル中のアポ A-I V の測定量を基準値と比較し（ここで、基準値は、腫瘍のない個体に由来するサンプル中のアポ A-I V 含量である）；そして
 - ー サンプル中のアポ A-I V 含量が基準値と比較して減少している場合に腫瘍を診断する、
- ことを含む、前記方法。

10

【請求項 2】

個体がヒトであることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

腫瘍が、腎腫瘍、並びに生殖器腫瘍、特に卵巣癌、子宮頸癌、及び精巣癌から成る群より選択されることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

体液サンプルが、血液サンプル、血漿サンプル、又は血漿画分のサンプルであることを特徴とする、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

基準値が 10～18 mg、好ましくは 13～15 mg アポ A-I V / d L 血清であることを特徴とする、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 6】

アポ A-I V レベルが 10 mg アポ A-I V / d L 血清より低い場合、好ましくは 8 mg アポ A-I V / d L 血清より低い場合に腫瘍が診断されることを特徴とする、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

腫瘍のない個体に由来するサンプル中のアポ A-I V 含量よりも少なくとも 10 %、好ましくは少なくとも 30 %、特に少なくとも 50 % 低い場合に、サンプル中のアポ A-I V 含量が減少していることを特徴とする、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

サンプル中のアポ A-I V 量が、アポ A-I V に対する抗体を用いた免疫化学的方法によって測定されることを特徴とする、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 9】

抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

抗体が、検出マーカー、好ましくは発色マーカー、蛍光マーカー、又は放射性マーカーを含むことを特徴とする、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 11】

免疫化学的方法が、ウェスタンブロット、酵素結合免疫吸着測定法（E L I S A）、及び放射性免疫測定法（R I A）から成る群より選択されることを特徴とする、請求項 8～10 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 12】

腫瘍治療効率をモニターするための、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の方法の使用。

【請求項 13】

腫瘍が、腎腫瘍、並びに生殖器腫瘍、特に卵巣癌、子宮頸癌、及び精巣癌から成る群より選択されることを特徴とする、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】

患者の腫瘍を診断するため又は腫瘍治療効率をモニターするためのキットであって、1以上の以下の成分：

50

- － 腫瘍に罹患する個体に由来する正の対照；
- － 体液サンプル又は組織サンプル中のアポA－I V量の測定手段；及び
- － 基準値手段として、腫瘍に罹患していない個体に由来するサンプル、を含む、前記キット。

【請求項 15】

正の対照及び腫瘍に罹患していない個体に由来するサンプルが安定化されている、好ましくは凍結乾燥によって安定化されていることを特徴とする、請求項 14 に記載のキット

【請求項 16】

アポA－I V量測定手段が、抗アポA－I V抗体、特にポリクローナル抗体、2次抗体、特に酵素的に又は化学的に標識された2次抗体、アポA－I V－RNA特異的核酸、アポA－I V特異的酵素試験、アポA－I V特異的ELISA、又はこれらの組み合わせから選択されることを特徴とする、請求項 15 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、個体における腫瘍の診断方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

ヒトアポリポタンパク質A－I V（アポA－I V；スイスプロット番号P06727）は、小腸及び非常に少量ではあるが肝臓によって合成される46 kDの血漿糖タンパク質である。ヒトにおけるアポA－I Vの平均血漿濃度は約15 mg/dl（10～18 mg/dlの範囲）である。ラットにおける研究により、アポA－I Vが小腸によって腸間膜リンパ液へ放出され、カイロミクロン、超低密度リポタンパク質（VLDL）、高密度リポタンパク質（HDL）の構造タンパク質として、又はリポタンパク質に結合しないで血漿区画へ入ることが示された。大部分の糖タンパク質は比較的血漿半減期が長い、ヒトアポA－I Vは、最もターンオーバー速度が速いアポリポタンパク質に含まれる。ヒト血漿中のアポA－I V分布に関する報告は相反するものである。使用した技術によって、アポA－I Vの分布は、アポA－I Vはほとんど完全にHDLに結合しているというものから、ほとんど主要リポタンパク質画分に結合していないというものまで記載されている。

【0003】

このアポリポタンパク質に関してさまざまな生理機能が提唱されている。非常に多くの *in vitro* 研究は、胆汁酸又はホルモンへの最終変換のためにコレステロールを末梢細胞から除去し、肝臓又はステロイド産生臓器へ輸送する逆コレステロール輸送経路のいくつかの工程に関与することを示唆している。アポA－I Vは、酵素のレシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）を活性化することによって小さなHDL粒子の形成を促進させる。*in vitro* 研究では、リポタンパク質リパーゼの活性化、及びHDLからLDLへのコレステリルエステルのコレステリルエステル輸送タンパク質（CETP）介在輸送も調節する。これらの *in vitro* データと一致して、トランスジェニックマウスにおけるアポA－I Vの過剰発現は、大動脈病変の減少とアテローム性動脈硬化症に対する予防をもたらした。これらの結果は、3つの独立したヒト集団における症例対照研究によって近年確認された：冠動脈疾患患者の血漿アポA－I V濃度は対照群と比較して優位に低いことがわかった（KRONENBERG Fら、J Am Coll Cardiol 36：751－757、2000）；腎不全患者では血漿アポA－I V濃度とアテローム性動脈硬化症との相関も観察された（KRONENBERG Fら、J Am Soc Nephrol 13：461－469、2002）。

【0004】

US2002/068319A号は、アポA－I Vと相同性が高いいくつかのヒト分泌タンパク質の同定について開示している。

US2005/0059013A1号には、サンプル中のアポA－I量を測定すること

10

20

30

40

50

による卵巣癌の診断方法が記載されている。

【0005】

J P 2 0 0 4 - 3 3 3 2 7 4 A 号は、癌に罹患する個体の血清サンプル中のアポリポタンパク質 A 2 の測定方法に関するものである。

W O 9 7 / 1 0 5 0 3 号は、アポリポタンパク質 D の量を測定することによる前立腺癌の診断方法を開示する。

【0006】

E P 1 5 6 0 0 2 4 A 1 号は、個体の血清又は血漿中のアポ A - I V 量を測定することによる消化管疾患の診断方法に関するものである。

D E 1 0 3 4 3 8 1 5 A 1 号には、アポリポタンパク質 D 1 の腫瘍マーカーとしての使用が開示されている。

【0007】

いくつかの研究は、アポ A - I V 代謝における腎臓の役割について示唆している。慢性腎疾患患者は、顕著に上昇したアポ A - I V 濃度を示す (K R O N E N B E R G F ら、K i d n e y I n t (S u p p l) : S 1 1 3 - S 1 1 6、2 0 0 3)。アポ A - I V は、腎不全の初期において既に増加し始めるため、アポ A - I V を腎機能障害の初期マーカーとして同定されている (K R O N E N B E R G F ら、J A m S o c N e p h r o l 1 3 : 4 6 1 - 4 6 9、2 0 0 2)。肝臓は主要な分解部位であることがわかっているが、腎臓はアポ A - I V の異化に大いに寄与している。

【0008】

腎疾患に罹患する個体のアポ A - I V レベルはすでに集中的に研究されているが、このレベルが個体の腫瘍、特に固形腫瘍のような他の疾患の存在によってどのように影響されるかに関して利用可能なデータはない。個体における腫瘍の検出を、特に発症の初期段階において、迅速で正確な様式で可能にすることができる腫瘍マーカーを有することが医療診断では非常に重要であるため、本発明の目的は、個体において腫瘍を診断するため、並びに腫瘍治療効率 (例えば固形腫瘍切除術後) のモニタリング、特に腫瘍の再発をモニタリングするための方法及び手段を提供することである。

【0009】

【非特許文献 1】K R O N E N B E R G F ら、J A m C o l l C a r d i o l 3 6 : 7 5 1 - 7 5 7、2 0 0 0

【非特許文献 2】K R O N E N B E R G F ら、J A m S o c N e p h r o l 1 3 : 4 6 1 - 4 6 9、2 0 0 2

【非特許文献 3】K R O N E N B E R G F ら、K i d n e y I n t (S u p p l) : S 1 1 3 - S 1 1 6、2 0 0 3

【非特許文献 4】D I E P L I N G E R H ら、E u r J C l i n I n v e s t 2 2 : 1 6 6 - 1 7 4、1 9 9 2

【非特許文献 5】K R O N E N B E R G F ら、J A m S o c N e p h r o l 6 : 1 1 0 - 1 2 0、1 9 9 5

【非特許文献 6】K R O N E N B E R G F ら、J L i p i d R e s 3 5 : 1 3 1 8 - 1 3 2 8、1 9 9 4

【非特許文献 7】S T E I N M E T Z A ら、J C h r o m a t o g r 4 8 7 : 1 5 4 - 1 6 0、1 9 8 9

【非特許文献 8】E Z E H B ら、J L i p i d R e s 4 4 : 1 5 2 3 - 1 5 2 9、2 0 0 3

【発明の開示】

【0010】

したがって、本発明は、個体における腫瘍の診断方法を提供するものであり、以下の工程：

一 個体の体液サンプル又は組織サンプル中のアポリポタンパク質 A - I V (アポ A - I V) の量を測定し；

10

20

30

40

50

- ー サンプル中のアポA-I Vの測定量を基準値と比較し（ここで、基準値は、腫瘍のない個体に由来するサンプル中のアポA-I V含量である）；そして
 - ー サンプル中のアポA-I V含量が基準値と比較して減少している場合に腫瘍を診断する、
- ことを含む。

【0011】

驚くべきことに、個体のサンプル中のアポA-I V量を測定することにより、個体における固形腫瘍の存在の診断を可能にすることが示されるであろう。例えば、個体の血清中のアポA-I Vレベルが腫瘍のない個体の平均アポA-I V量よりも低い場合、腫瘍の存在を診断することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

「基準値」は、腫瘍に罹患していない健常個体における平均アポA-I V量を表す。基準値は、好ましくはさまざまな個体の、少なくとも1サンプル、好ましくは少なくとも5サンプル、より好ましくは少なくとも10サンプル、更により好ましくは少なくとも50サンプルから計算することが好ましい。血清アポA-I Vレベルは、腎機能障害（腎機能障害に罹患していない健常個体と比較してアポA-I Vレベルが上昇）、冠動脈疾患及びアテローム性動脈硬化の合併症（冠動脈疾患及びアテローム性動脈硬化の合併症に罹患していない健常個体と比較してアポA-I Vレベルが低下）のような他の疾患の存在にも依存することに注目されたい（EP 1 410 039 A号を参照されたい）。したがって、基準値は、腫瘍、腎機能障害、冠動脈疾患、及びアテローム性動脈硬化の合併症に罹患していない個体から計算することが好ましい。

【0013】

本発明の好ましい態様によれば、個体はヒトである。

当然、本発明による方法は、哺乳動物、特にペット（例えばイヌ、ネコ）及び家畜（例えばウマ、ウシ、ヒツジ）に適用することもできる。アポA-I Vレベルをヒト以外の他の哺乳動物で測定する場合、本発明による方法を用いて腫瘍を診断する前に、健常哺乳動物のアポA-I Vレベルを測定する必要がある。

【0014】

診断すべき腫瘍は、腎腫瘍、並びに生殖器官（即ち生殖系）の腫瘍、特に卵巣癌、子宮頸癌、及び精巣癌から成る群より選択されることが好ましい。

結局、特に腎腫瘍及び生殖器腫瘍（例えば卵巣癌、子宮頸癌、及び精巣癌）（又は1種より多い腫瘍）に罹患する患者において、血清アポA-I Vレベルは、それらの疾患に罹患していない個体の血清レベルと比較して低下していることがわかり、臨床診療において信頼できる診断マーカーとしてすでに証明されている。しかしながら、本発明は、腫瘍、特に固形腫瘍、例えば上皮細胞に関与する腫瘍に適用することもできる。

【0015】

生殖器腫瘍、特に卵巣腫瘍及び精巣腫瘍は、特に若い人々（30～50歳の人々の大きな群も同様）を侵す。これらの腫瘍の多くは、初期診断が生存に最も重要である。生殖系には、性腺、即ち男性の精巣及び女性の卵巣、並びに他の付随する管及び腺が含まれる（gonos=種子）。これらは、生殖手段、種の存続、及び次世代への遺伝物質の伝達を提供する。

【0016】

本発明による方法は、子宮頸癌、特に既にこの種の癌の初期にあるもの（例えば前第0期、第0期、第I期、第IA期、又は第IB期）の診断に有効であることも証明されている。

【0017】

子宮頸癌の病期分類が癌の増殖の程度を記述するために開発されている。子宮頸癌の病期は、腫瘍の大きさ、頸部浸潤の深さ、並びに頸部内及びそれを越えた広がりについて記述している。子宮頸癌の病期分類は、通常、国際産科婦人科連合によって開発された病期

10

20

30

40

50

分類案であるFIGOシステムで記載されている。FIGO分類は、第0期～第IV期（0～4）と表示される基本的な病期にグループ分けされる：

- * 第0期又は上皮内癌は非常に初期の癌である。異常細胞は頸部裏打ち層細胞の第1層に見られるのみであり、頸部の更に深い組織へは浸潤していない。
- * 第I期癌は頸部を侵すが近隣には広がっていない。
- * 第IA期は、顕微鏡下でのみ目に見え、頸部組織の更に深部に見られる、非常に少量の癌を示す。
- * 第IB期は、頸部組織に見られる更に多量の癌を示す。
- * 第II期癌は近隣領域まで広がっているが、依然として骨盤領域内である。
- * 第IIA期癌は頸部を越えて膣の上部2／3まで広がっている。
- * 第IIB期癌は頸部周辺組織まで広がっている。
- * 第III期癌は骨盤領域全体に広がっている。癌細胞は膣の下部まで広がり得る。細胞は更に広がって腎臓と膀胱をつなぐ管をブロックし得る。
- * 第IV期癌は身体の他の部分まで広がっている。
- * 第IVA期癌は膀胱又は直腸（頸部に近接した臓器）まで広がっている。
- * 第IVB期癌は肺などの他の臓器まで広がっている。

【0018】

初期検出（特に第0期の前（前第0期））によって子宮頸癌の発生率を顕著に低下させる能力があるにもかかわらず、この疾患のスクリーニング法には現在のところ依然として限界がある。最も優勢なのは、多くの患者が近年利用可能なスクリーニング方法を知らないという事実である。日常的に実施されている血清解析において血清サンプルで子宮頸癌を検出することによりこの問題は解決されるであろう。現在のスクリーニング法は血清サンプルでCIN及び／又は子宮頸癌を検出することができず、頸部細胞の解析用にデザインされたものである。これまでに確立されたスクリーニング法には全て特定の限界があり、これらの方法で、頸部形質転換領域由来のもの以外のサンプルにおいてCIN又は子宮頸癌の検出を可能にするものはない。更に、これらのスクリーニングプログラムはいずれも、特に発展途上国において、集団検診に用いられる可能性をはるかに越えている。この状況は正確で迅速で安価なCIN及び／又は子宮頸癌の診断ツールの開発により劇的に変化するであろう。

【0019】

言うまでもなく、本発明による方法は、当該技術分野に熟練した者が、個体において1種の腫瘍だけでなく複数の腫瘍の存在を診断することを可能にする。したがって、1種より多い腫瘍に罹患する個体において腫瘍を診断することも可能であるが、この場合、最終診断はこれらの状況を注意深く考慮する必要がある、全ての最終的な診断の決定に関しては信頼できる医者によってのみなされ得る。

【0020】

アポA-I V量は、いくつかの体液サンプル及び組織サンプルにおいて測定することができるが、体液は、血液、血清、又はそれらの画分であることが好ましい。

腫瘍診断方法は、例えば外科的介入（例えば生検）ほど侵襲的でない、比較的簡便で迅速な方法で得ることができるサンプルを使用することが有益である。したがって、腫瘍マーカーは、血液、血清、又はそれらの画分中で検出することが好ましい。又、本発明の方法を用いて腫瘍処置の進展をモニターする場合、例えば侵襲的な方法は処置の進展をモニターするために必要な十分量の組織サンプルを得ることができないため、好ましくは侵襲的でない方法によって得たサンプルを得る必要がある。

【0021】

本発明の好ましい態様によれば、基準値は10～18mgアポA-I V／dL血清、好ましくは13～15mgアポA-I V／dL血清である。

本発明を用いて診断した個体における測定値と基準値との比較は、値を採取若しくは測定した体液又は組織にも依存する。言うまでもなく、血清を試験することが好ましく、アポA-I V ELISAで試験した場合、（健常）基準値は通常10～18mgアポA-

I V / d L 血清である。しかしながら、上記のように、これらの絶対値は、非常に特異的なアポ A - I V 量測定方法、及びアポ A - I V 量を測定する体液／組織に常に依存する。本発明による試験材料の体液に由来する血液以外の他の好ましい供給源には、腫瘍組織、特に腫瘍組織に由来する生検材料が含まれる。

【0022】

腫瘍は、アポ A - I V レベルが 10 mg アポ A - I V / d L 血清、好ましくは 8 mg アポ A - I V / d L 血清よりも低い場合に診断される。

本発明の好ましい態様によれば、サンプル中のアポ A - I V 含量は、腫瘍のない個体由来するサンプル中のアポ A - I V 含量よりも少なくとも 10 %、好ましくは少なくとも 30 %、特に少なくとも 50 % 少ない場合に減少していると判断される。

10

【0023】

低下したアポ A - I V レベルは、腫瘍のない健常対照個体よりも低いレベルであるとみなされる。

サンプル中のアポ A - I V 量は、アポ A - I V に対する抗体を用いた免疫化学的方法で検出することが好ましい。

【0024】

サンプル中のタンパク質量の測定は、例えば免疫化学的方法によって行うことができる。この方法は、測定すべきタンパク質又はその断片に対する抗体を使用する。

抗体はモノクローナル抗体であることが好ましい。

【0025】

本発明の方法に使用できる抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。しかしながら、この方法にモノクローナル抗体を使用することが好ましい。アポ A - I V 抗原に対するモノクローナル抗体は、当該技術分野に公知の方法によって得ることができる（例えば Kohler G 及び Milstein C.、Nature (1975) 256: 495-457）。当該技術分野に熟練した者にはポリクローナル抗体の産生方法も周知である。そのような抗体は、抗原を、場合により少なくとも 1 種のアジュバントと組み合わせて、哺乳動物、好ましくはウサギ、マウス、又はヒツジへ投与し、得られた血清から抗体を含む画分を単離することによって得ることができる。

20

【0026】

アポ A - I V 又はその断片に対する抗体は、検出マーカー、好ましくは発色マーカー、蛍光マーカー、又は放射性マーカーを含むことが好ましい。

30

アッセイで抗体を検出するには、例えば検出手段（例えば光電子増倍管）によって容易に検出できる適当なマーカーを有するアポ A - I V 抗体のように標識が必要である。言うまでもなく、アポ A - I V 抗体は直接標識しないことも可能である。そのような抗体を包含するアッセイでは、アポ A 特異的抗体に対する抗体を標識する必要がある。どの抗体を標識すべきかは、血清中のアポ A - I V を測定するために用いるアッセイに主に依存する。

【0027】

本発明の好ましい態様によれば、免疫化学的方法は、ウエスタンブロット、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、及び放射性免疫測定法（RIA）から成る群より選択される。使用した、抗原アポリポタンパク質 A - I V に対するモノクローナル抗体及び／又はポリクローナル抗体の特異性をモニターするために、ウエスタンブロットが用いられる。

40

【0028】

当該技術分野において公知の免疫化学的方法の中で、ウエスタンブロット、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、又は放射性免疫測定法（RIA）を用いることが好ましい。ELISA 及び RIA は競合アッセイに、ELISA はサンドイッチアッセイにも用いることができる（例えば Rosseneu M ら、Clin Chem (1988) 34: 739-743）。

【0029】

本発明の他の側面は、腫瘍治療効率をモニターするための、本発明による方法の使用に

50

関するものである。

腫瘍に罹患する個体、特に個体の血清におけるアポA-I V量の減少は、腫瘍処置中のアポA-I Vレベルのモニタリングを可能にする。血清アポA-I Vレベルは個体における腫瘍の存在に顕著に依存するため、血清アポA-I Vレベルが基準値まで増加することは、癌患者の処置が成功したことを示す。処置のあいだ血清アポA-I Vレベルの変化をモニターするには、個体のサンプルを、処置前（例えば腫瘍切除前）、及び処置（例えば化学療法）中の規定の期間に採取する。言うまでもなく、この方法を長期試験に用いて、個体における腫瘍再発をモニターすることもできる。

【0030】

腫瘍は、腎腫瘍及び生殖器腫瘍、特に卵巣癌、子宮頸癌、及び精巣癌から成る群より選択されることが好ましい。

本発明の他の側面は、患者の腫瘍を診断するため及び腫瘍治療効率をモニターするためのキットに関するものであり、1以上の以下の成分を含む：

- － 腫瘍に罹患する個体に由来する正の対照；
- － 体液サンプル又は組織サンプル中のアポA-I V量の測定手段；及び
- － 基準値手段として、腫瘍に罹患していない個体に由来するサンプル。

【0031】

腫瘍に罹患する個体に由来する正の対照、及び腫瘍に罹患していない個体に由来するサンプルは安定化させることが好ましく、凍結乾燥によって安定化させることが好ましい。

生体物質を含むサンプルは不安定な傾向にある。したがって、そのようなサンプル及び正の対照をキットに提供する場合、キットを6℃以下又は室温で長期間保存させるには、サンプル及び正の対照を安定化させる必要がある。キットを室温保存することを意図する場合、キットに含まれる生体物質は例えば凍結乾燥される必要がある。凍結乾燥は、広く普及しているタンパク質サンプルの保存方法である。キットを6℃以下、好ましくは0℃以下で保存することを意図する場合、生体物質を、生体物質中に含有されるタンパク質の劣化を妨げる溶液中で提供する必要がある。溶液は、例えばグリセロール、メルカプトエタノール、及び防腐剤を含むことができる。

【0032】

アポA-I V量の測定手段は、抗アポA-I V抗体、特にポリクローナル抗体、2次抗体、特に酵素的に若しくは化学的に標識された2次抗体、アポA-I V-RNA特異的核酸、アポA-I V特異的酵素試験、アポA-I V特異的ELISA、又はそれらの組み合わせから選択されることが好ましい。

【0033】

サンプル中のアポA-I V量はいくつかの方法で測定することができ、量を測定する手段として抗体を使用する方法を用いることが好ましい。

本発明を以下の図面及び実施例によって更に説明するが、それらに限定されるものではない。

【実施例1】

【0034】

腎腫瘍マーカーとしてのアポA-I V

方法：

被験者

この実施例には、30人の患者（男性18人、女性12人）から採取したヒト血液サンプルが含まれた。全ての患者は腎癌のため片側腎全摘出術を受けている。重篤なタンパク尿の患者はいなかった（タンパク尿に関する尿検査は最高でも1+であった）。

【0035】

一晚絶食後、術前に血液サンプルを採取した。4℃で低速遠心分離後、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）血漿を得、使用前、-80℃で凍結させた。患者は、献血前1週間以内に、腎機能に影響を及ぼし得る造影剤を用いた試験を受けていないことを確かめた。

【0036】

10

20

30

40

50

血漿アポA-I V濃度の測定

親和性精製したポリクローナル抗ヒトアポA-I V抗体をコーティングに用い、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合させた同一抗体を検出に用いる2重抗体酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)にて血漿アポA-I V濃度を測定した。既知含量のアポA-I Vを有する血漿を校正基準とした。この測定法の検出下限は 0.002 mg/dl である(KRONENBERG Fら、J Lipid Res 35:1318-1328、1994)。各サンプルは2重に解析した。CNBrで活性化したセファロースQ2-4B(アマシャム・ファルマシア・バイオテクAB、スウェーデン)に結合させた精製血漿アポA-I Vを用いて、ウサギ抗ヒトアポA-I V抗血清の免疫吸着クロマトグラフィによって親和性精製した抗体を調製した。ウサギを精製血漿アポA-I Vで免疫することによって抗アポA-I V血清を得た(DIEPLINGER Hら、Eur J Clin Invest 22:166-174、1992)。

10

【0037】

イムノブロット解析

ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS PAGE)で分離し、ニトロセルロース膜に転写したサンプルについてアポA-I Vのイムノブロット解析を行った。精製アポA-I Vを標準として用いた。アポA-I Vは、リボタンパク質を枯渇させた後、トリグリセリドリン脂質エマルジョンとともにインキュベーションし、脂質に結合した疎水性タンパク質を陰イオン交換クロマトグラフィで分離することによってヒト血漿から単離した(STEINMETZ Aら、J Chromatogr 487:154-160、1989)。同様に親和性精製した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ヒトアポA-I VもELISAプロトコールに含まれており、イムノブロットに使用した。

20

【0038】

統計的評価

試験群間の平均アポA-I V濃度をマンホイットニーU検定で比較した。対応のあるサンプルはウィルコクソン検定で比較した。

【0039】

結果：

アポA-I V抗体の特異性

免疫組織化学に用いるポリクローナルウサギ抗ヒトアポA-I V抗体の特異性を検証するために、2人の異なる患者に由来する組織から単離したヒト腎タンパク質及び対応の血漿サンプルのイムノブロット解析によって抗体を解析した。アポA-I V抗体は組織サンプル及び血漿サンプルにおいてタンパク質のバンドを1本だけ検出できたが、標準として用いたアポA-I V調製物では2本のバンドを検出した。ペプチドの配列決定により、標準のタンパク質バンドはいずれもアポA-I Vを表すことを確認した。したがって、2本目の小さなアポA-I Vアイソフォームは、脱グリコシル化又はタンパク質分解により生じたのであろう。

30

【0040】

血清アポA-I Vレベル

血漿サンプルの解析により、血漿アポA-I V濃度は、通常、健常個体($11.9 \pm 2.8\text{ mg/dl}$ 、 $n=52$)と比較して、腎臓病患者($6.8 \pm 4.4\text{ mg/dl}$)で低いことが示された(EZEH Bら、J Lipid Res 44:1523-1529、2003; KRONENBERG Fら、J Am Coll Cardiol 36:751-757、2000)。

40

【実施例2】

【0041】

卵巣癌マーカーとしてのアポA-I V

a) 第1の患者群は19人の卵巣癌患者で構成した。卵巣癌の再発は、患者における血漿アポA-I Vレベルの定量によって決定した。初期血漿アポA-I Vレベルは外科的

50

介入後およそ30日に測定し、患者の血漿アポA-I Vレベルは健常個体の基準値に近いことを示した。卵巣癌の再発後、血漿アポA-I Vレベルは初期値と比較して顕著に低下した(図1)。

【0042】

b) 第2の臨床試験では、外科的介入前後に10人の癌患者の血漿アポA-I Vレベルを長期間にわたって測定し、周知の腫瘍マーカーであるCA125の血漿レベルと比較した。卵巣癌患者において術前(時点0)及び術後少なくとも30週間、CA125及びアポA-I Vの血漿レベルを測定した。図2Aに、2つの腫瘍マーカー間の相関を示す。卵巣癌の存在を示す高CA125量は、低血清アポA-I Vレベルと相関する。卵巣癌の再発は術後50~55週に認められる。これらの結果は、組織学的試験によって確認した。しかしながら、CA125レベルは卵巣癌の再発を示さなかったが、血清アポA-I Vレベルは術後65~70週に2人の他の患者において卵巣癌の存在を明らかに示している(図2B、図2Cを参照されたい)。これらの結果も組織学的試験によって確認した。したがって、血漿アポA-I Vレベルは、この症例の非検出が偽陰性診断をもたらすCA125よりも、腫瘍、特に卵巣癌の確実に良好なマーカーであることを明らかに証明する。図2Dでは、卵巣癌患者の成功した治療におけるCA125及びアポA-I Vの測定結果を示す。図2E及び図2Fでは、卵巣癌患者におけるCA125レベルとアポA-I Vレベルとの相関が確認されるであろう。

10

【実施例3】

【0043】

20

精巣癌マーカーとしてのアポA-I V

18人の精巣癌患者群を試験した。血漿アポA-I Vレベルの結果を以下の表に表す。

【0044】

【表 1】

精巣癌腫瘍マーカーとしての血漿アポA-I V (mg/d l)

患者	診断	手術時	4週間後
1	S	18.42	27.07
2	S	11.90	9.07
3	S	6.19	10.50
4	NS	7.69	14.42
5	S	12.70	23.98
6	MT	3.59	8.56
7	MT	8.51	15.38
8	S	6.34	8.42
9	S	11.70	31.34
10	NS	3.37	14.38
11	NS	7.68	13.26
12	MT	18.34	17.55
13	S	11.73	13.68
14	S	12.30	19.60
15	S	11.70	15.41
16	MT	4.93	10.76
17	NS	8.20	14.12
18	NS	7.60	10.60
平均		9.61	15.45
SD		4.36	6.42

S=精上皮腫

NS=非精上皮腫

MT=混合型腫瘍

【実施例 4】

【0045】

子宮頸癌マーカーとしてのアポA-I V

最後に、他の生殖器腫瘍である子宮頸癌（女性では2番目に頻度の高いがん）の患者群についても調査した。この頻度の高い癌を同定するための特異的血清腫瘍マーカーは全く存在しない。慣用的に使用される血漿マーカーSCC（扁平上皮癌抗原）も、子宮頸癌に対して十分に特異的ではない。

【0046】

本発明によって、16人の子宮頸癌患者において血漿アポA-I V濃度が顕著に低下したことを示した（図4）だけでなく、縦断的研究（n=16）においてアポA-I Vのモニタリング腫瘍マーカーとしての好適性を再度立証することができた。調査した全てのがんのFIGO病期においてアポA-I Vは減少し、腫瘍除去後に健常対照の正常値まで増加し、腫瘍再発時に再度減少した（図5及び図6）。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】図1は、腫瘍を外科切除された腫瘍患者の血漿アポA-I Vレベルの変化を示す。外科的介入後、アポA-I Vレベルは、健常個体（卵巣癌なし；OCなし）で通常測定されるレベルを示す。卵巣癌が再発した患者では、アポA-I Vレベルが、健常個体のア

ポA-I Vレベル（「基準値」）以下に顕著に低下した（OCの再発）。これは、本発明による方法を用いて腫瘍の再発をモニターできることを示す。

【図2-1】図2A～図2Cは、血漿アポA-I Vレベルと、卵巣癌患者の血液に見られ、周知の腫瘍マーカーであるCA125のレベルとの比較結果を示す。

【図2-2】図2D～図2Fは、血漿アポA-I Vレベルと、卵巣癌患者の血液に見られ、周知の腫瘍マーカーであるCA125のレベルとの比較結果を示す。

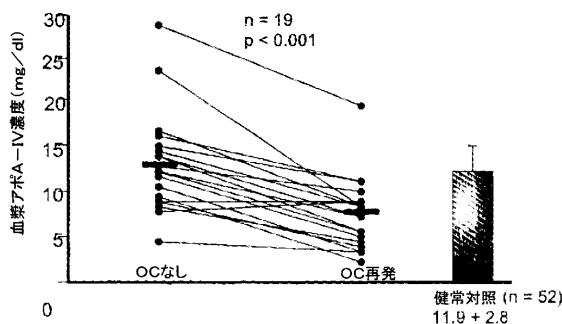
【図3】図3は、精巣癌患者のアポA-I Vを示す。

【図4】図4は、集団ベースの対照群（ $n = 52$ ）、及びさまざまなFIGO病期の子宮頸癌患者（ $n = 16$ ）の腫瘍外科切除日（術前）の血漿アポA-I V濃度を示す（ mg/dl 、平均±標準偏差）。

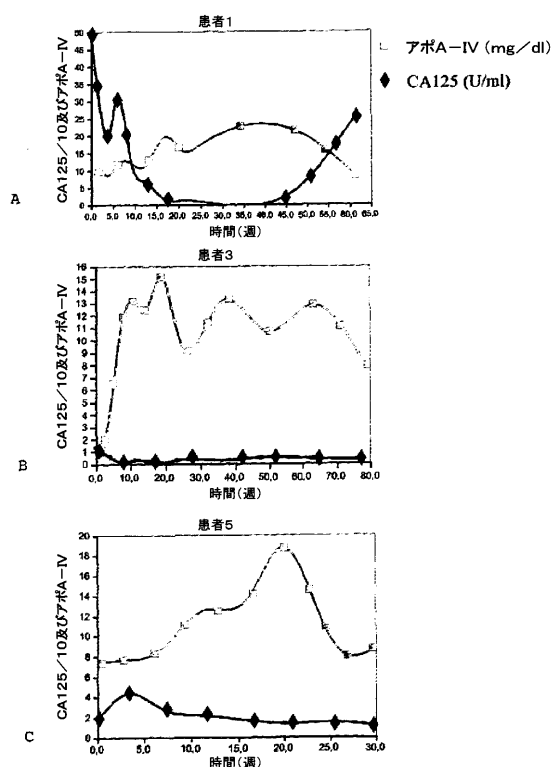
【図5】図5は、FIGO病期IIaの代表的子宮頸癌患者の、腫瘍外科切除日（第0日、術前）及び腫瘍再発（矢印）までの観察50週間後の血漿アポA-I V濃度（四角）並びに慣用の腫瘍マーカーSCC（丸）を示す。低下した血漿アポA-I V濃度は正常レベルまで増加し、腫瘍再発の場合再度低下する。

【図6】図6は、FIGO病期IVaの代表的子宮頸癌患者の、腫瘍外科切除日（第0日、術前）及び腫瘍再発（矢印）までの観察150週間後の血漿アポA-I V濃度（四角）並びに慣用の腫瘍マーカーSCC（四角）を示す。低下した血漿アポA-I V濃度は正常レベルまで増加し、腫瘍再発の場合再度低下する。

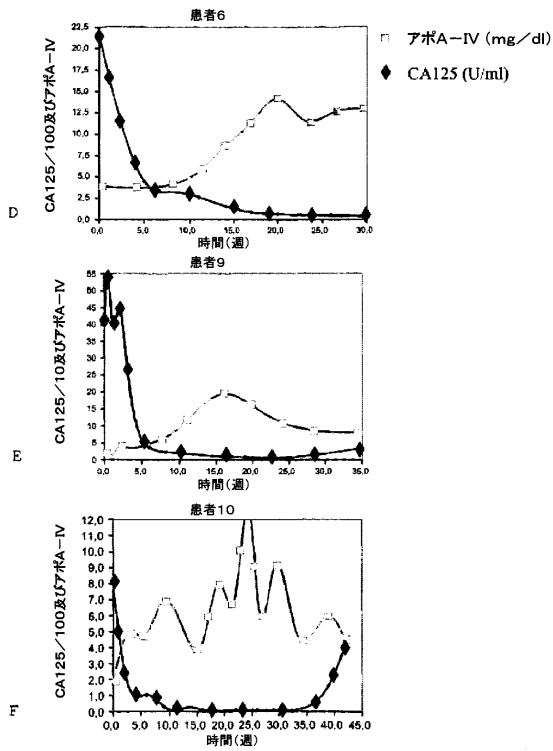
【図1】



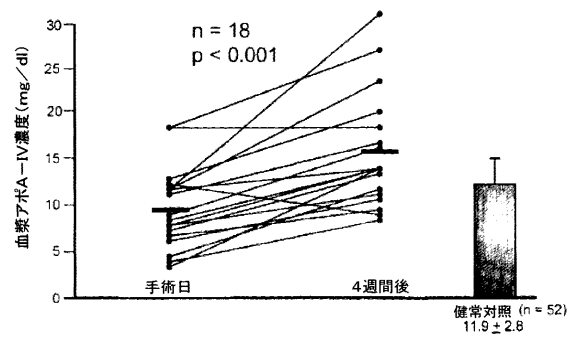
【図2-1】



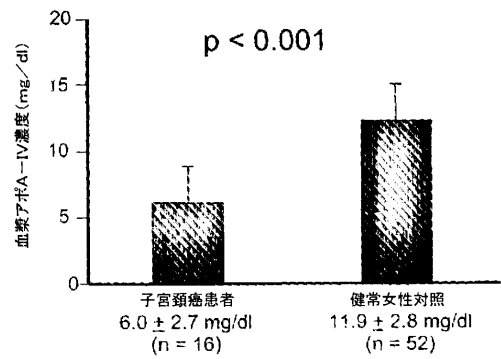
【図 2 - 2】



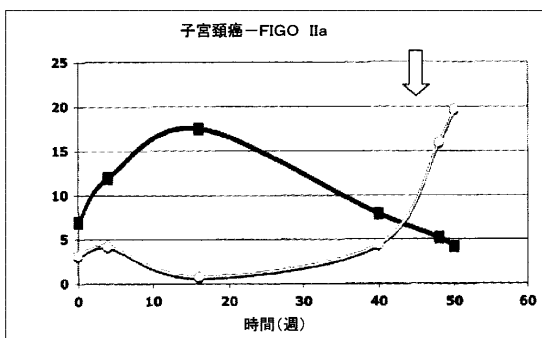
【図 3】



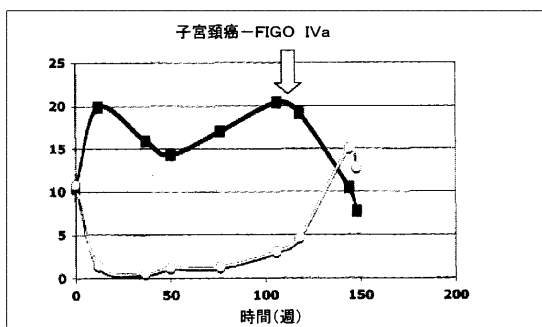
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/AT2006/000336

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/574 G01N33/92

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)
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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ROSSENEU M ET AL: "QUANTIFICATION OF HUMAN APOLIPOPROTEIN A-IV BY SANDWICH-TYPE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY" CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WASHINGTON, DC, US, vol. 34, no. 4, 1988, pages 739-743, XP009008741 ISSN: 0009-9147 the whole document ----- -/--	1,2,4, 9-11, 14-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier 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.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

9 November 2006

Date of mailing of the International search report

22/11/2006

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Döpfer, Klaus-Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/AT2006/000336

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KRONENBERG F ET AL: "LOW APOLIPOPROTEIN A-IV PLASMA CONCENTRATIONS IN MEN WITH CORONARY ARTERY DISEASE" JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, ELSEVIER, NEW YORK, NY, US, vol. 36, no. 3, September 2000 (2000-09), pages 751-757, XP001146847 ISSN: 0735-1097 the whole document	1
A	KRONENBERG FLORIAN ET AL: "Apolipoprotein A-IV serum concentrations are elevated in patients with mild and moderate renal failure" JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, vol. 13, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 461-469, XP002406439 ISSN: 1046-6673 cited in the application	1
A	US 2005/059013 A1 (CHAN DANIEL W [US] ET AL) 17 March 2005 (2005-03-17) cited in the application the whole document	1-16
A	WO 97/10503 A (SIGNET LAB INC [US]; TILLEY WAYNE [US]) 20 March 1997 (1997-03-20) cited in the application the whole document	1-16
A	WO 2005/038461 A (B R A H M S AG [DE]; BERGMANN ANDREAS [DE]) 28 April 2005 (2005-04-28) the whole document	1-16
A	NAVARRO M A ET AL: "Immune-regulation of the apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in experimental inflammation" CYTOKINE, ACADEMIC PRESS LTD, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 31, no. 1, 7 July 2005 (2005-07-07), pages 52-63, XP004936872 ISSN: 1043-4666 the whole document	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/AT2006/000336

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005059013	A1	17-03-2005	NONE
WO 9710503	A	20-03-1997	AT 229183 T 15-12-2002 AU 722666 B2 10-08-2000 AU 6977996 A 01-04-1997 CA 2232004 A1 20-03-1997 DE 69625236 D1 16-01-2003 DE 69625236 T2 21-08-2003 EP 0862739 A1 09-09-1998 JP 11512525 T 26-10-1999 JP 3564668 B2 15-09-2004
WO 2005038461	A	28-04-2005	CN 1856707 A 01-11-2006 DE 10343815 A1 14-04-2005 EP 1664789 A1 07-06-2006

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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 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, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100106080

弁理士 山口 晶子

(72)発明者 ディープリンガー, ハンス

オーストリア国 6020 インスブルック, グラウアー・シュタインヴェーク 5

(72)発明者 クロネンベルク, フロリアン

オーストリア国 6020 インスブルック, ムゼーウムシュトラッセ 27

Fターム(参考) 2G045 CA26 CB01 DA62 FB03

专利名称(译)	通过测量载脂蛋白A-IV水平诊断肿瘤的方法		
公开(公告)号	JP2009505039A	公开(公告)日	2009-02-05
申请号	JP2008525331	申请日	2006-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	Vita的高新生物技术门EM为主硬		
申请(专利权)人(译)	Vitateku生物技术有限公司		
[标]发明人	ディープリンガーハンス クロネンベルクフロリアン		
发明人	ディープリンガー,ハンス クロネンベルク,フロリアン		
IPC分类号	G01N33/92 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/92 G01N33/57411 G01N33/57438 G01N33/57449 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/92.Z G01N33/53.W G01N33/574.A		
F-TERM分类号	2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/DA62 2G045/FB03		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫 山口明子		
优先权	2005001333 2005-08-08 AT		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在个体中诊断肿瘤，步骤如下的方法： - 测量载脂蛋白A-IV (APO-IV) 体液样本或个人的组织样本的数量; - 样品中的载脂蛋白A-IV测量比较载脂蛋白的样品中的一个 - IV内容到一个参考值 - 和; (式中，参考值是载脂蛋白从一个无肿瘤的个体的样品中的一个 - IV含量) 量与基准值进行比较如何，如果你在诊断肿瘤缩小包括。技术领域

患者	診断	手術時	4週間後
1	S	18.42	27.07
2	S	11.90	9.07
3	S	6.19	10.50
4	NS	7.69	14.42
5	S	12.70	23.98
6	MT	3.59	8.56
7	MT	8.51	15.38
8	S	6.34	8.42
9	S	11.70	31.34
10	NS	3.37	14.38
11	NS	7.68	13.26
12	MT	18.34	17.55
13	S	11.73	13.68
14	S	12.30	19.60
15	S	11.70	15.41
16	MT	4.93	10.76
17	NS	8.20	14.12
18	NS	7.60	10.60
平均		9.61	15.45
SD		4.36	6.42