

(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2013-543124

(P2013-543124A)

(43) 公表日 平成25年11月28日(2013.11.28)

(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	V
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 5 D
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531	A
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	B

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2013-534382 (P2013-534382)	(71) 出願人	513080254 シーターム ダイアグノスティックス リミテッド
(86) (22) 出願日	平成23年10月19日 (2011.10.19)		
(85) 翻訳文提出日	平成25年5月9日 (2013.5.9)		
(86) 国際出願番号	PCT/GB2011/052026		イギリス国 スットン コールドフィール ド ビー74 2 ユージー, フォー オー クス, 282 リッチフィールド ロード , アスター ハウス, スーツ ディー
(87) 国際公開番号	W02012/052762		
(87) 国際公開日	平成24年4月26日 (2012.4.26)		
(31) 優先権主張番号	1017615.4	(74) 代理人	100091683 弁理士 ▲吉▼川 俊雄
(32) 優先日	平成22年10月19日 (2010.10.19)	(74) 代理人	100179316 弁理士 市川 寛奈
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(72) 発明者	ハード, トーマス モール イギリス国 ハンプシャー エスオー50 8 キューエー イーストレイ, 91 オ リンピック ウェイ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌診断及びスクリーニングに適した尿組織因子の定量

(57) 【要約】

本出願人は癌の定量、診断および集団検診を目的とした尿組織因子C末端断片の新技術的な定量手法を提供し、C末端断片測定論の論理的根拠、一般に認められた試料調整法と共に、定量法、モノクローナルおよびポリクローナル抗体の作製方法を提供する。要するに、これらの提案および発想は癌患者の尿を利用した癌の診断および集団検診に適した新規手法に相当するものであり、さらには他の病態診断にも有用でありうる手法であるとする。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の尿組織因子 C 末端領域（すなわち、細胞内領域）を検出するための方法であって、（ a ）尿組織因子 C 末端領域に対する抗尿組織因子抗体の固相への結合、（ b ）試料中に抗体が結合する尿組織因子が存在する、固相への試料添加、（ c ）尿組織因子抗体が尿組織因子の C 末端領域に結合する、固相の捕捉抗体より C 末端領域の異なる抗原決定基に対する抗尿組織因子抗体の添加、および（ d ）第 2 の抗尿組織因子抗体の直接および間接的な免疫標識による尿組織因子の検出を含み、捕捉抗体はヒト組織因子 C 末端領域アミノ酸配列 275 ~ 285 に対するもの、および検出抗体はヒト組織因子 C 末端領域アミノ酸配列 286 ~ 295 に対するものでありうる方法。

10

【請求項 2】

試料は生物学的流動体、尿、唾液、全血、血漿、多血小板血漿（ P R P ）、乏血小板血漿（ P P P ）、プール正常血漿（ P N P ）および細胞培養上清から構成される群から選択される、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

固相は膜、プレート、マイクロウェル又はビーズである、請求項 1 の方法。

【請求項 4】

尿組織因子 C 末端領域の検出が第 2 の C 末端領域抗尿組織因子抗体の直接的な免疫標識による、請求項 1 の方法。

20

【請求項 5】

抗尿組織因子抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されている、請求項 4 の方法。

【請求項 6】

尿組織因子 C 末端領域の検出が C 末端領域抗尿組織因子抗体の間接的な免疫標識による、請求項 1 の方法。

【請求項 7】

抗尿組織因子抗体が第 1 の生物種で作製され、第 1 の生物種由来の抗体に対する標識抗体が第 2 の生物種で作製されて固相に加えて検出される、請求項 6 の方法。

【請求項 8】

抗尿組織因子捕捉抗体が第 1 の生物種で作製され、尿組織因子標識抗体が同一生物種である第 1 の生物種で作製されて固相に加えて検出される、請求項 6 の方法。

30

【請求項 9】

請求項 6 の方法を含み、さらに（ e ） 検出された抗尿組織因子抗体の定量、それによる試料中の尿組織因子 C 末端領域量の測定を含む、試料中の尿組織因子 C 末端領域量の測定方法。

【請求項 10】

被験者の癌診断方法であって、（ a ）請求項 8 の方法による被験者からの試験試料中尿組織因子量の測定、および（ b ）尿組織因子 C 末端領域に正常 C 末端領域を含有する標準試料中の尿組織因子 C 末端領域量に対し、試験試料中の尿組織因子 C 末端領域量の比較を含み、標準試料と比較して試験試料中の尿組織因子の C 末端領域増量により癌と診断され得

40

、ここで、癌は多種の固形癌、白血病および多種のリンパ腫であってよく、固形癌は、これらに限定するものではないが、乳房、卵巣、大腸、中枢神経系、腎臓、前立腺、腎臓、膀胱、乳房、結腸直腸、肝臓、肺（非小細胞および小細胞）、脳、膵臓、胃、食道および頭頸部であってよく、悪性リンパ腫は、これらに限定するものではないが、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病であってよい、被験者の癌診断方法。

【請求項 11】

50

試験試料が尿、唾液、全血、血漿、多血小板血漿（PRP）、乏血小板血漿（PPP）、プール正常血漿（PNP）より構成される群から選択される、請求項10の方法。

【請求項12】

固相が膜、プレート、マイクロウェル又はビーズである、請求項10の方法。

【請求項13】

尿組織因子C末端領域の検出が抗尿組織因子抗体の直接的な免疫標識による、請求項10の方法。

【請求項14】

C末端領域抗尿組織因子抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されている、請求項11の方法。

【請求項15】

尿組織因子C末端領域の検出が抗尿組織因子抗体C末端領域の間接的な免疫標識による、請求項14の方法。

【請求項16】

抗尿組織因子抗体C末端領域は第1の生物種で作製され、第1の生物種由来の抗体に対する標識抗体が第2の生物種で作製されて固相に加えて検出される、請求項9の方法。

【請求項17】

(1) C末端領域抗尿組織因子抗体でコートされた固相及び(2)第2のC末端領域抗尿組織因子抗体を含む、試料中の尿組織因子C末端領域を検出するためのキット。

【請求項18】

第2のC末端領域抗尿組織因子抗体が標識されている、請求項17のキット。

【請求項19】

第2のC末端領域抗尿組織因子抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されている、請求項18のキット。

【請求項20】

西洋ワサビペルオキシダーゼの基質をさらに含む、請求項17のキット。

【請求項21】

標準試料、陽性対照および洗浄緩衝液から構成される群から選択される一つ以上の構成要素をさらに含む、請求項17のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

組織因子

体内で血液が凝固した場合には必ず一連の協調した反応が生じる。この反応の生理学的な主要開始因子は、組織因子として知られる膜結合型糖タンパク質である。通常、組織因子は血管内皮により血管から隔てられており、外傷または組織損傷による出血により複雑な酵素カスケードが活性化し血流にさらされる。

【0002】

しかしながら病態においては、血管内血液凝固を引き起こす白血球または血管内皮細胞の異常発現が起こりうる。血液凝固カスケードは、血友病のような罹患すると正常な血液凝固に要する血液タンパク質が欠乏する疾患と関係があり、心臓発作や脳卒中のような血液凝固が血管閉塞を導きうる血管疾患につながる。

【0003】

血液凝固は炎症疾患および癌でも活性化される。本書類では組織因子のこれらの過程での役割、並びに血管新生、癌、転移、炎症、薬物耐性、生殖能力および創傷治癒での非常に重要な役割を論じる。図1を参照されたい。

【0004】

組織因子の形態

遊離組織因子（可溶化、選択的スプライシング及び血液由来組織因子を含む）および膜結合組織因子の2つの形態が記述されている。可溶化組織因子は、組織因子分子の膜貫通

10

20

30

40

50

領域および細胞外領域の連結部あるいはその近くでのタンパク質切断の結果生じてタンパク質断片を形成するのに対して、他の遊離組織因子変異体は一次RNA転写物の選択的スプライシングの結果生じる(Bogdanov等, 2003; Bogdanov等, 2006; Guo等, 2001)。これら遊離組織因子は血漿中を循環し、生物学的活性を有する。血漿組織因子は、細胞由来の膜微粒子と結合して循環するのが発見され得る。これは主に単球マクロファージ膜の脂質ラフト又はラフト含有量の高い領域から生じる組織因子発現微粒子であり、この場合血液由来組織因子と称される。循環する組織因子微粒子だけでは効率的に血液凝固が開始されないと思われるが、微粒子上のP-セクレチン糖タンパク質リガンド1及び血小板上のP-セクレチンの関わる機構を通して活性化血小板と結合及び融合した場合には血液凝固が開始される(Dele Conde, Shrimpon, Thiagarajan及びLopez, 2005)。

【0005】

膜結合組織因子は細胞組織因子(単球、マクロファージ、内皮細胞及び癌細胞上に発見される)及び尿(微粒子、エキソソーム)または精液(プロスタソーム)中の脂質小胞結合組織因子の両方を含む。細胞組織因子は表面、暗号化された状態、細胞内の3つの形で見つかる。細胞膜上では、組織因子は暗号化された形態で多く存在し、たびたび脱暗号化と称されるその放出は同時に細胞表面のホスファチジルセリンを上昇させ、結果としてアポトーシス及びネクローシスを生じる。

【0006】

組織因子の発現

組織因子は血管壁の内皮下層及び血管外組織の両方の構成成分である。したがって血管周囲に保護層を形成し、血管の健全性が傷ついた場合に血液凝固を活性化する用意ができている(Ryan等, 1992)。内皮細胞および血液単球(血流に接する)は恒常的に組織因子を発現せず、貯蔵もしない。

【0007】

通常、組織因子は細胞によって血流中に発現されることはないが、他の生理学及び病理学的メディエーター同様、インターロイキン1及び6、腫瘍壊死因子アルファ(TNF-)、血管透過因子(VPF)、補体C5a、ホルボールエステル、血漿リポタンパク質、血漿タンパク質、コラーゲン、免疫複合体といった内因性炎症メディエーター、トロンビン及び微生物により遺伝子転写及びそれに続くタンパク質発現は単球、マクロファージ及び内皮細胞内で誘導されうる(Amirkhosravi等, 1996; Osterud, Olsen及びWillsgard, 1990; Roth, 1994)。

【0008】

単球及びナチュラルキラー細胞が内皮細胞内で組織因子発現を増加させるのと同様に、血小板及びリンパ球は単球及び内皮細胞内で組織因子の新規合成を誘導しうる(Napoleone, Di Santo及びLorenzetti, 1997)。この細胞間協力は炎症疾患及び細胞性免疫反応での組織因子の誘導に不可欠である。ずり応力及び低酸素症も多くの細胞で組織因子を誘導し、血液凝固を引き起こす。組織因子活性は細胞のリン脂質組成変化にも依存する。

【背景技術】

【0009】

尿組織因子 - 歴史的背景

尿が強力な「凝固促進活性」(PCA)を有することは知られ(Grünke等, 1935)、それは血友病患者生体内での凝固時間を標準化する(von Kaula等, 1954)。von Kaulaはヒト尿を硫酸バリウムに吸収させて調製すると、試験管内で血友病血漿凝固を標準化する物質に多数結合することに気づいた(von Kaula等, 1965)。これらの微量調整が、現在組織因子経路阻害因子(TFP1)として知られる循環「抗トロンボプラスチン」高力価の患者に対する凝固補正能力を有することが実証された(von Kaula等, 1963)。当初凝固促進活性は組織トロンボプラスチン関連物質と考えられていた。後に血小板第3因子、第V因子及びカルシウムイオ

10

20

30

40

50

ン存在下にも、尿凝固促進活性はプロトロンビンからトロンビンへの変換を触媒することが発見された。これはプロトロンビナーゼ型活性であり、従って組織因子よりもむしろ「血小板補助因子」として分類された (Matsumura 等, 1970; Caldwell 等, 1963)。Aoki 及び von Kaula はさらに血小板第3因子、第V因子、プロトロンビン及び尿凝固促進活性の間の相互作用を調査した。プロトロンビン活性化の下、脂質が最適条件下で使用されて供給されるリン脂質により血小板第3因子が部分的に精製された尿凝固促進因子 (uPC) に置換され得ると彼らは結論づけた。Joist 及び Alkiaersig は同様の観察を行い、リン脂質又は血小板は血漿凝固において尿凝固促進活性を単に増強することに気付いた (Joist 等, 1967)。続いて尿中の組織因子特性を有する因子が記述された。Kurosawa 等はフェニルセファロスクロマトグラフィーで尿凝固促進因子を精製し、第VII因子依存的様式で凝血形成を促進することを示した (Kurosawa 等, 1984)。Aoki 及び von Kaula は尿凝固促進活性が微粒子として存在することを示唆し、「プロトロンビナーゼ」特性を有する因子を報告した。続いて、尿凝固促進活性が脂質に結合した小胞に存在し、主に第VII因子に依存することが実証された (Wiggins 等, 1987)。尿凝固促進因子は、第VII因子及びカルシウム存在下第X因子を活性化可能であり、コンカナバリンAにより阻害される (Zacharascki 等, 1974)。活性は -メチル-グルコシドの添加により回復した (Kurosawa 等, 1984)。後にヒト組織因子特異抗体の存在下、該活性がほぼ完全に阻害されることが実証され、凝固促進因子は組織因子であることが確認された (Carty 等, 1990)。該活性は、細孔100nMを通過せず、220nM濾過器を通過する膜小胞に結合していると思われた。

【0010】

精製及び汚染物質タム-ホースフォールムコ蛋白の除去後、凝固促進因子は微小凝集体に存在することが発見された。この微小凝集体はジスルフィド結合で互いに結ばれた68kDと76kDの2つの小単位からなる151kDの基本機能単位で構成されていた (Kurosawa 等, 1984)。これはヒト組織因子の確立された分子量43kDとは対照的である。組織因子成熟mRNA転写産物は腎臓を含む様々なヒト組織で同様であることから、この相違はおそらく前準備段階での相対的不純性を反映している。確かに続くウエスタンブロッティングでの尿組織因子の評価は、尿組織因子が他のヒト組織由来組織因子と同様の分子量であることを明らかにした (Carty 等, 1990)。該小胞は超遠心分離機で沈殿することが可能であり (Carty 等, 1990)、組織因子活性は組織因子含有沈殿物を界面活性剤 - オクチル-グルコピラノシドに溶解することにより回復可能である (Lwaleed 等, 1999)。試験管内でフィブリン繊維を産生した場合、該小胞はフィブリン繊維と親密に結合しているらしく (Carty 等, 1990)、金標識マウス抗組織因子抗体に対する特異的な結合が示された (Lwaleed 等, 1998)。金標識したアネキシンV (胎盤抗凝固タンパク質-I) でのこれら小胞の標識により、小胞が組織因子だけでなく、尿組織因子活性の脂質供給源になり得る陰イオン性リン脂質 (Lwaleed 等, 1998) も含むことが示された。確かに異なる濃度の組換えアネキシンVと恒温放置した場合、尿組織因子活性は濃度依存的様式で阻害された。この結果は単球組織因子活性に関して得られた結果と一致する (Satta 等, 1994; Carvalho 等, 1995)。

【0011】

尿組織因子の供給源

正確な供給源及び病態での尿組織因子増加の基になる生物学的機序にはかなり不明な点が多い。この問題について様々な研究が行われ、異なる結果が報告されてきた。腎盂尿の正常な凝固促進能が実証され、下部尿路は可能な供給源から排除された (Matsumura 等, 1968)。他に2つ尿凝固促進因子の可能な供給源が暗示されており、それは尿凝固促進因子が糸球体濾過器を通過する組織 (排泄性) 産物又は腎実質組織に由来する腎臓の分泌物であるというものである。尿組織因子は分子量43kDであり、尿組織因子値、尿タンパク排泄及び糸球体濾過率マーカーとの間には弱い相関関係のみ観察されて

きた (Lwaleed 等, 1998)。従って尿組織因子は血液由来ではないかもしれない。さらに尿組織因子活性は血友病、ヘパリン治療及び循環抗トロンボプラスチンを有する患者のような臨床状態に影響しない。よって腎臓は尿凝固促進因子の可能な供給源のままである。尿組織因子の供給源としての腎細胞に関して、いくつかの組織化学的及び免疫学的研究が実行されてきた。いくつかの群は糸球体に位置すると報告し (Bukovskiy 等, 1992)、他の群は尿細管内のシグナルを報告した (Lwaleed 等, 1998)。凝固促進因子が尿細管で産生されるという主張は臨床観察及び実験モデルにより支持される (Matsuda 及び von Kaula, 1968; Matsuda 等, 1968; Matuda 等, 1979; Lwaleed 等, 2007)。出願人は、ヒト組織因子に対するマウスモノクローナル抗体を使用して尿細管細胞に陽性シグナルを発見した (Lwaleed 等, 1999)。尿細管細胞はアネキシン V 陽性でもあった (Lwaleed 等, 1999)。特に悪性腫瘍及びある種の炎症状態のような病態で、腎マクロファージ及び/又は尿細管細胞が活性化され、増量した組織因子を分泌する可能性もある (Carty 等, 1990)。尿組織因子の増加は単球組織因子に関して説明された重要性と同様であることから、尿組織因子が病態における単球/マクロファージ「活性化」状態を反映し得ると提案することは妥当である。特にリポ多糖に刺激された細胞では尿組織因子と組織因子の間に中程度の関連が実証されている (Lwaleed 等, 1998)、しかし尿組織因子産生のための刺激及びその制御はまだ確立されていない。

10

【0012】

尿組織因子及び癌

20

癌患者の尿中バイオマーカー物質用簡易検査は魅力的な案である (Wajsmann 等, 1975)。尿組織因子はある状況でそのようなバイオマーカーであり得る (例: Carty, 1990; Adamson, 1992 及び 1993; Lwaleed, 1996 及び 1997; Colluci, 1991)。癌患者での尿組織因子増加機序についてかなり不明な点が多いが、その値は臨床的重要性を持ち得る。Carty 等は大腸癌、炎症性腸疾患及び乳癌での尿組織因子活性の上昇を報告した。良性の大腸及び乳房疾患患者でも正常対照または関節リウマチ患者よりも高い値が得られるが、悪性腫瘍対照群よりも低い。膀胱鏡検査値が異常な患者の 88% が異常な尿組織因子値を示したのに対し、膀胱鏡検査値が正常な患者では 24% が異常な尿組織因子値を示した。Adamson 等は正常対照及び良性前立腺肥大の患者に比較して、膀胱及び前立腺の悪性腫瘍患者での高い尿組織因子値を示した。Lwaleed 等は正常対照、外科的対照及び良性 (非炎症性) 状態患者に有意な差がないことを示した。しかし正常対照は、悪性腫瘍又は良性 (炎症性) 状態の患者と比較して有意に低い尿組織因子値を示した。Spillert 及び Lazaro、Osterud 等、及び Edwards 等は、これらの状態での尿組織因子増加を同様に説明する機序であり、炎症性状態が単球組織因子発現増加を導く宿主免疫反応を妨げると示唆している。しかし、Carty 等は関節リウマチ患者、全ての活動性疾患を有する患者で一般的に正常な尿組織因子値を示すことを発見した。これは尿組織因子が単に急性相反応物質として挙動しないことを示唆する。

30

【0013】

尿組織因子活性は組織学的腫瘍悪性度及び/又は腫瘍進行度 (乳癌、膀胱癌、前立腺癌及び大腸癌)、骨スキャン値 (前立腺癌) 及び血清前立腺特異抗原値 (前立腺癌) といくらか相関関係が示されてきた (Lwaleed, 1997)。再発膀胱癌の患者も膀胱鏡検査値が正常な患者より高い尿組織因子値を示し、後に死亡する患者ではさらに高い値が見られた (Adamson, 1992; Lwaleed, 1998)。

40

【0014】

尿組織因子の構造

尿組織因子を含む全ての完全長膜結合組織因子は 43 ~ 45 kD の分子量の 263 アミノ酸残基からなる一本鎖糖タンパク質であり、1) 細胞外領域、2) 膜貫通領域、及び 3) 細胞質の C 末端細胞内領域の 3 つの領域からなる。

【0015】

50

それぞれの領域が尿組織因子の生物学に不可欠で重要な機能を有する。細胞外領域 (a a 3 3 ~ 2 5 1) は第 V I I 因子、T F P I 及び第 X 因子のような血液凝固系の様々なタンパク質との結合で責任を果たす。膜貫通領域 (a a 2 5 2 ~ 2 7 4) は極めて疎水性で、組織因子を細胞の細胞膜に固定する。細胞内領域 (a a 2 7 5 ~ 2 9 5) は様々な遺伝子の活性化及び不活性化を引き起こすシグナル伝達活動に影響を与える。組織のシグナル伝達機能は発癌において極めて重要である。癌細胞での組織発現は V E G F 及びインテグリンの発現を仲介することが知られている。これらのメディエーターは血管新生、細胞運動性及び転移に重要である。組織因子は増殖及び拡散を含む腫瘍生物学で役割を担う。悪性腫瘍及びある種の炎症性病態における組織因子の活性化は様々な体液中組織因子レベルに影響を与え得る。尿組織因子レベルは年齢、性別又は喫煙 (L w a l e e d 等 , 1 9 9 9) により大きく影響を受けない。これは大集団を検査する際、偽陽性数が少ないことを意味する。従って尿組織因子は腎疾患及び癌患者を検査するのに潜在的に有用でありうる。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 6 】

尿組織因子測定法 活性測定法

組織因子の生化学及び分子構造理解の進歩は、組織因子の様々な構造的要素を測定する測定法の開発をもたらした。相当な臨床的可能性を持ちながら、細胞、血漿レベル及び他の体液での組織因子の評価に異なる方法が用いられてきた。尿組織因子凝固促進活性の測定に依存した測定法がかなりの研究で用いられてきた。これらの測定法も完全に機能的な尿組織因子のみ測定し、尿組織因子の細胞外領域に焦点を合わせる。1段階及び2段階カイネティック比色法 (K C A) は病態 (C a r t y 等 , 1 9 9 0 ; L w a l e e d 等 , 1 9 9 9)、糸球体腎炎 (L w a l e e d 等 , 1 9 9 7 b a)、固形癌 (L w a l e e d 等 , 1 9 9 7 b) での尿組織因子凝固促進活性の測定に用いられてきた。尿組織因子測定における腎機能の影響は L w a l e e d 等により研究された (1 9 9 8)。

【 0 0 1 7 】

いくつかの病態で尿組織因子活性の変化は実証されてきた。その一方、尿組織因子凝固促進活性は甲状腺機能亢進症の患者でやや上昇し、糸球体腎炎及び癌患者では著しく上昇する (例として C a r t y , 1 9 9 0 ; A d a m s o n , 1 9 9 2 及び 1 9 9 3 ; C o l l u c i , 1 9 9 1 ; L w a l e e d , 1 9 9 6 及び 1 9 9 7)。尿組織因子凝固促進活性は血栓塞栓性及び肝疾患では正常で、腎実質性疾患及び糖尿病患者で著しく低下する (Q I H 等 , 1 9 9 6)。

【 0 0 1 8 】

K C A 測定法は研究応用に一段と適した手作業の測定法であり、大規模な臨床利用及び機械に基づく応用にはあまり適さない。尿組織因子が構造的に不活性又はタンパク質分解切断されていると、尿組織因子の「活性」を測定する測定法では試料中に存在する全尿組織因子量を反映しないかもしれない。機能測定法ではこれらの形状は測定されない。機能測定法はまた細胞外領域を優先的に測定する。

【 0 0 1 9 】

免疫学的測定法

免疫学的測定法は臨床検査室に一段と適しており、尿組織因子特異的免疫学的測定法は集団検診に最も望ましい。組織因子は E L I S A 形式のような免疫学的測定法で尿及び他の体液から測定されてきた (F a r e e d 等 , 1 9 9 5)。免疫学的測定法は組織因子抗原又は組織因子の生物学的活性よりもむしろタンパク質レベルを測定するために組織因子タンパク質に対する抗体を使用する。過去の多くの組織因子 E L I S A には直接的に細胞外領域に対する抗体が使用されてきた (例 : アメリカン・ダイアグノスティカ製 I m u b i n d T i s s u e F a c t o r E L I S A (引用文献 8 4 5))。細胞外領域は主に組織因子の凝固促進活性を有する。そのような E L I S A は、完全長組織因子、組織因子細胞外領域のタンパク質切断により形成される「可溶性組織因子」及び組織因子のさらなるタンパク質分解によって産生される多彩な他の断片を含む多様な形状の組織因子を

測定する。タンパク質分解断片は抗体全長に抗体が結合するのを阻害するので、試料中の組織因子タンパク質分解断片の存在は完全長組織因子（すなわち尿組織因子）の測定を妨げる。未変性の細胞外領域を有する他の組織因子の形状（すなわち選択的スプライシング変異体）もまた同様の理由で尿組織因子の測定を妨げる。

【 0 0 2 0 】

従って、組織因子の異なる形状及びタンパク質分解断片の存在下で正確に尿組織因子抗原を測定するためには、免疫学的測定法に異なる手法が必要とされる。より具体的には、他の組織因子から尿組織因子を識別する新規抗体一式を必要とする。

【 0 0 2 1 】

尿組織因子測定のための新規手法

全てのタンパク質同様、尿組織因子はN末端からC末端まで細胞内で合成される。従って尿組織因子のC末端の存在はN末端からC末端まで全タンパク質が合成されたことを示す。このように全尿組織因子分子が完全な状態で存在するのか、又はタンパク質分解の断片として存在するのかどうかという場合、尿組織因子のC末端領域は全尿組織因子が合成されたことを示す良い指標である。またC末端は未変性の尿組織因子分子にだけ見られ、選択的スプライシング変異体にはない。尿組織因子C末端領域の測定はスプライシング変異体ではなく、全尿組織因子分子の濃度を特異的に反映すべきである。

【 0 0 2 2 】

出願人は、尿及び他の生物学的流動体中の尿組織因子濃度を正確且つ特異的に測定する新規手法である、尿組織因子のC末端断片の測定法を提案する。組織因子C末端領域の測定はE L I S A、ラテックス凝集反応、側方流動技術等を含む様々な定量及び定性的な免疫学的測定法技術で成し遂げ得る。これらの測定法に共通した重要な特徴はポリクローナル及びモノクローナル抗体、抗体断片、遺伝子組換え抗体、及び/又はC末端ペプチドを特異的に標的とした他の結合タンパク質の開発である。出願人は、抗体及び尿組織因子C末端ペプチドに対する特異的な結合分子を利用した特異的免疫学的測定法/測定法が生物学的流動体中の尿組織因子の特異的且つ正確な定量に有用であると提案する。

【 0 0 2 3 】

Carson及びYoder (Blood Coagul Fibrinolysis (1992) 3: 779 - 787) は組織因子のC末端断片に対してモノクローナル抗体を開発し得ることを教示する。彼らはC末端ペプチドがタンパク質分解で組織因子から切断されるのを示すためモノクローナル抗体を使用した。また、彼らは組織因子を含む小胞の分布及び小胞内での組織因子の向きを特定するためにも抗体を利用した。C末端抗体が生物学的流動体で組織因子レベルの定量測定又は半定量測定に利用し得ることを彼らは教示していない。また2部位E L I S A又は組織因子測定用免疫学的測定法の開発に使用し得る、他の免疫学的測定形式で使用するための組織因子C末端ペプチドに対する抗体の作製方法も彼らは教示していない。

【 0 0 2 4 】

出願人は、尿組織因子測定用の2部位E L I S Aを開発するのに使用し得る下記抗C末端抗体作製方法を提案する。

【 0 0 2 5 】

モノクローナル抗体

尿組織因子のC末端ペプチドは細胞膜の下にあり、細胞膜から細胞の細胞質部分へ突き出た尿組織因子タンパク質の20アミノ酸部分である。C末端ペプチドの重要な役割は上記で論じたようなシグナル伝達への影響である。出願人はC末端領域の2つの断片（例えばaa275~285及び286~295）を標準方法で合成することを提案する。それぞれのペプチドに対するポリクローナル及びモノクローナル抗体は標準的方法論を利用して作製する。2部位免疫学的測定法はペプチドに対する一組の抗体を利用して開発する。出願人は生物学的流動体中に完全長尿組織因子分子が存在する場合、又はC末端20アミノ酸断片が尿組織因子分子の残りの部分なしで存在する場合に、それぞれのペプチドに対する抗体が相互に阻害しないことを要する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 6 】

2つの抗体のどちらでもE L I S Aの捕捉抗体又はE L I S Aの検出抗体として利用し得る。図3を参照されたい。

【 0 0 2 7 】

ポリクローナル抗体

1種類のポリクローナル抗体を使用して2部位抗C末端E L I S Aを行うことも可能である。必要なのは、相互に阻害しない20アミノ酸断片の異なる領域に対する抗体を含むポリクローナル抗体である。ポリクローナル抗体は、動物（ウサギ、ヒツジ、ヤギ）を全20アミノ酸C末端断片で免疫することで産生し得る。抗体は20アミノ酸断片の異なる領域に対して作られるはずである。ポリクローナル血清又は免疫グロブリンGはE L I S Aの捕捉及び検出部分で使用可能である。

10

【 0 0 2 8 】

試料調整

可溶化

図4に示すように尿組織因子はリポソーム様微粒子内に存在する。そのような構造では、尿組織因子のC末端部位は小胞内にある（L w a l e e d等，1992）。尿組織因子が小胞内にあれば、抗体が尿組織因子C末端部位に結合するのは難しい。出願人が提供する尿組織因子C末端断片測定法では、T r i t o n X - 1 0 0、N P - 4 0、デオキシコール酸又はT w e e n 2 0といった界面活性剤を添加することで、尿組織因子を含む微小胞又はリポソーム様膜組織を可溶化する手順の組み込みを提供する。界面活性剤による微粒子の可溶化は微粒子構造を溶解し、C末端断片に抗体が結合できるようC末端断片をあらわにする。

20

【 0 0 2 9 】

遠心分離

免疫学的測定法の前に尿組織因子微粒子を濃縮するのに使用しうる別の試料調整技術を実行した。微粒子は高速遠心分離で溶液から分離できる。これを成し遂げる代表的なG力は標準的な実験室微量遠心機で実行できる10～20,000×gである。従って、例えば1mlの尿試料を12,000×gで遠心分離し、尿溶液から微粒子を取り出し、微粒子を濃縮することが可能である。そして尿組織因子を含む沈殿した微粒子は少量の界面活性剤を含む緩衝液（50μl）に可溶化され得る。この方法は微粒子を尿中の20倍にまで濃縮する。

30

【 0 0 3 0 】

原理研究の予備的証拠

出願人は尿中の組織因子値の測定に市販のアメリカン・ダイアグノスティカ製組織因子用E L I S A（引用文献845）を試した。このE L I S Aは捕捉および検出の両方に組織因子の細胞外部位に対する抗体を使用する。出願人はこの市販の測定法を使用して尿中の組織因子を測定することはできなかった。この結果は尿中の組織因子の検出に異なる抗体の組み合わせが必要であることを示唆している。

【 0 0 3 1 】

出願人は尿組織因子C末端ペプチドに対する抗体が癌患者尿での尿組織因子の定量に有用である原理的証拠を実証するためにE L I S A技術を使用して予備実験を実行した。この研究で、出願人はE L I S Aでの捕捉抗体として組織因子のC末端断片に対するポリクローナル抗体を、検出抗体として細胞外領域に対するモノクローナル抗体を使用した。出願人はE L I S A法が悪性腫瘍および炎症性状態の違いを検出する以上に高感度であると考えている。市販の以前多種の癌と診断された患者からの尿を購入した。1.5mlの尿試料は微量遠心機で遠心分離し、沈殿した微粒子は界面活性剤を含む緩衝液に再懸濁し、その微粒子溶液でE L I S Aを行った。図5は肺癌、膀胱癌、前立腺癌、腎癌、リンパ腫及び皮膚癌からの尿中に高濃度の尿組織因子を含むC末端ペプチドが存在することを示す。正常（非癌）患者及び前立腺炎（前立腺の炎症状態）患者は尿組織因子が低かった。

40

【 0 0 3 2 】

50

尿組織因子定量の潜在的最適化方法

尿組織因子の定量はさらに高感度の E L I S A で最適化される。これは図 5 で示す異なる 1 組の抗体を使用することで成し遂げうる。さらに優れた E L I S A は尿組織因子 C 末端断片の異なる領域に対して高い特異性を有する二つの高親和性モノクローナルおよび / またはポリクローナル抗体により構築されうる。

【 0 0 3 3 】

尿組織因子の測定においては、尿中の「正規化」因子を利用することで別の改良をなし得る。例えば、尿試料中のタンパク質量によって尿組織因子量を正規化することは有用でありうる。試料中のタンパク質は標準測定法 (B C A , クマシーブルー試薬) で測定できる。E L I S A で決定された尿組織因子量をタンパク質量で割ると癌患者又は非癌患者から得られた尿を選別するのにさらに良い計量を提供し得る。尿組織因子量を「正規化」するのに適した別の方法は尿組織因子活性を尿組織因子タンパク質容量で割った量を決定することである。活性 / タンパク質の割合は癌患者と非癌患者のさらに良い選別を供給し得る。尿組織因子に対する活性は上記のどの方法を使用しても測定できる。

10

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 3 4 】

出願人は癌の定量、診断および集団検診を目的とした尿組織因子 C 末端断片の新技術的な定量手法を提供し、C 末端断片測定の論理的根拠、一般に認められた試料調整法と共に、定量法、モノクローナルおよびポリクローナル抗体の作製方法を提供する。要するに、これらの提案および発想は癌患者の尿を利用した癌の診断および集団検診に適した新規手法に相当するものであり、さらには他の病態診断にも有用でありうる手法であると考え

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 5 】

【 図 1 】 細胞組織因子により開始された血液凝固を表す。

【 0 0 3 6 】

第 V I I 因子は組織因子発現細胞上の組織因子に結合し、自己活性化して第 V I I a 因子となる。その結果生じた複合体は第 X 因子、第 I X 因子及び少量のトロンビン I I a を活性化する。フィードバック機構 (T F P I) は組織因子と第 V I I a 因子の複合体を阻害するが、産生された少量のトロンピンは第 X I 因子を活性化、さらに第 V I I I 因子をフォン・ウィルブランド因子 (V W F) から遊離及び活性化することで血小板および第 V 因子を活性化する。活性型第 I X 因子は活性型血小板と結合し第 X 因子を活性化する。そして第 X 因子を産生した血小板は凝血形成に必要な大量のトロンピンを産生する。

30

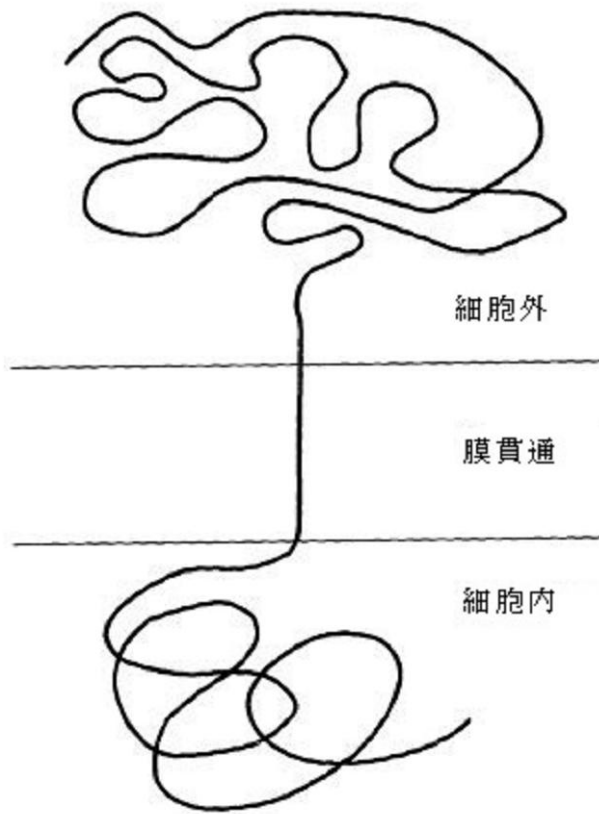
【 図 2 】 組織因子の 3 つの領域を表す模式図。

【 図 3 】 2 種類の抗体を示す。

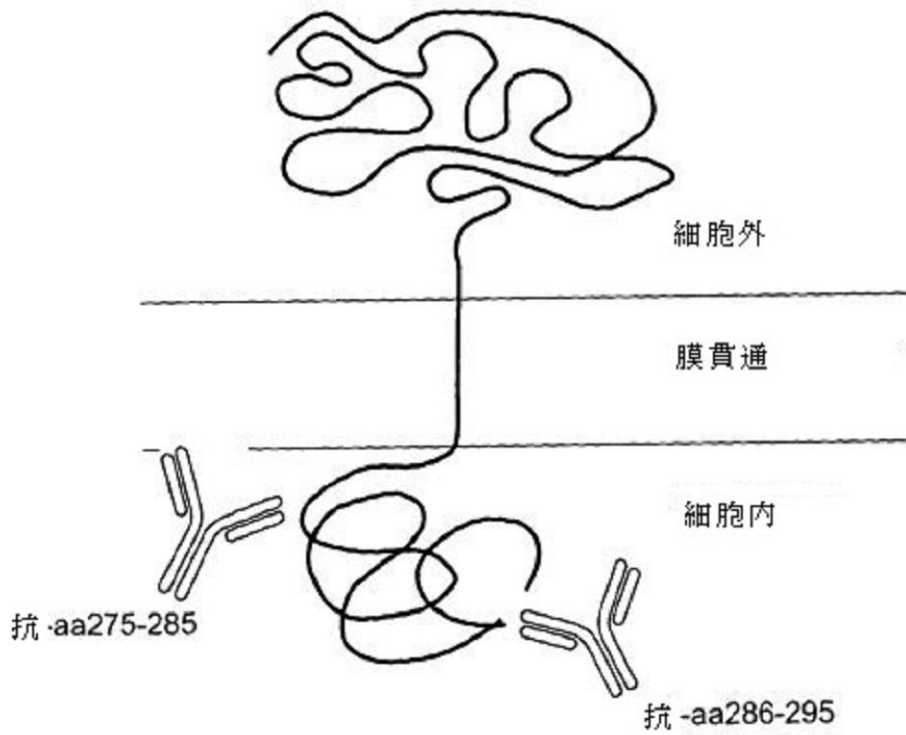
【 図 4 】 H u g e l ら P h i s i o l o g y (2 0 0 5) 2 0 : 2 2 - 2 7 からの引用図

【 図 5 】 E L I S A 法による各種癌患者および正常者での組織因子の定量。

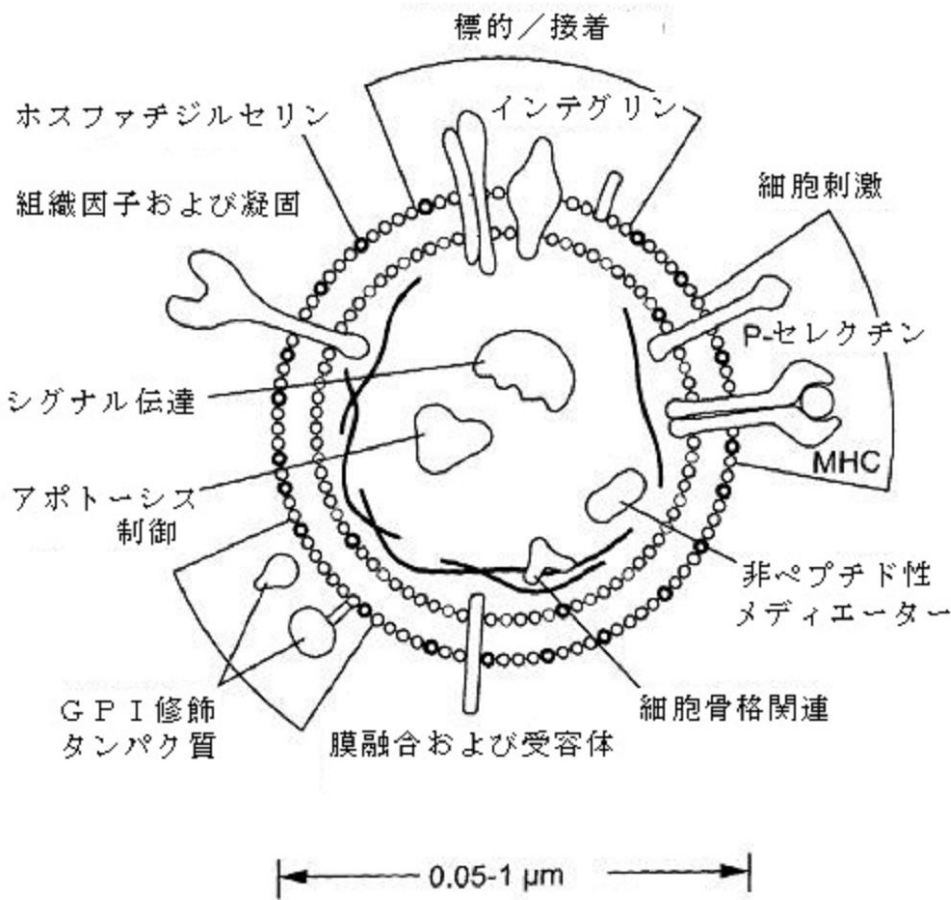
【 図 2 】



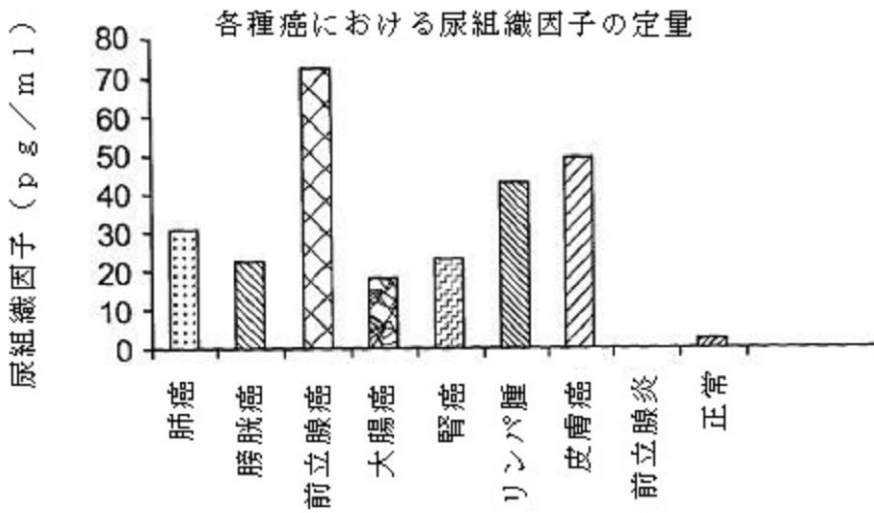
【 図 3 】



【図4】



【図5】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2011/052026

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/574 ADD.		
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, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CARSON; YODER: BLOOD COAGUL FIBRINOLYSIS, vol. 3, 1992, pages 779-787, XP9156520, abstract	1-21
Y	ADAMSON A S ET AL: "Urinary tissue factor levels in prostatic carcinoma: A potential marker of metastatic spread?", BRITISH JOURNAL OF UROLOGY, BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 71, no. 5, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 587-592, XP009156472, ISSN: 0007-1331 the whole document	1-16
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 15 February 2012		Date of mailing of the international search report 02/03/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moreno de Vega, C

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2011/052026

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>FAREED J ET AL: "Tissue factor antigen levels in various biological fluids", BLOOD COAGULATION & FIBRINOLYSIS, RAPID COMMUNICATIONS, OXFORD, OXFORD, GB, vol. 6, no. Suppl.1, 1 June 1995 (1995-06-01), pages S32-S36, XP009156474, ISSN: 0957-5235 the whole document -----</p>	1-21
Y	<p>LWALEED B A: "Increased urinary tissue factor levels in patients with advanced bladder cancer", UROONCOLOGY, TAYLOR & FRANCIS HEALTH SCIENCES, ABINGDON, GB, vol. 2, no. 2, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 103-104, XP009156468, ISSN: 1561-0950, DOI: 10.1080/1561095021000003133 the whole document -----</p>	1-16
Y	<p>US 2003/119075 A1 (KIRCHHOFER DANIEL K [US] ET AL) 26 June 2003 (2003-06-26) paragraph [0186]; claim 1 -----</p>	17-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2011/052026

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003119075 A1	26-06-2003	US 2003119075 A1	26-06-2003
		US 2003124117 A1	03-07-2003
		US 2004126816 A1	01-07-2004

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72)発明者 グリーンフィールド, ロバート
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10533, イルヴァントン, 280 バーチ レーン

专利名称(译)	确定适合癌症诊断和筛查的尿组织因子		
公开(公告)号	JP2013543124A	公开(公告)日	2013-11-28
申请号	JP2013534382	申请日	2011-10-19
[标]申请(专利权)人(译)	海词诊断有限公司		
申请(专利权)人(译)	海 - 长期诊断有限公司		
[标]发明人	ハードトーマスモール グリーンフィールドロバート		
发明人	ハード,トーマス モール グリーンフィールド,ロバート		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/531 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/574		
FI分类号	G01N33/53.V G01N33/543.545.D G01N33/531.A G01N33/574.B		
优先权	2010017615 2010-10-19 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本申请人提供了用于尿液组织因子C末端片段的新技术定量技术，用于癌症的定量测定，诊断和质量筛选，并提供了C末端片段测量的基本原理以及普遍接受的样品制备方法。 ，定量方法，制备单克隆和多克隆抗体的方法。简而言之，这些提议和想法对应于适用于使用癌症患者的癌症尿液诊断和大规模筛查癌症的新方法，并且进一步被认为是用于其他疾病诊断的有用方法。 。【选择图】无

