

(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2004-524522  
(P2004-524522A)

(43) 公表日 平成16年8月12日(2004.8.12)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/573	GO 1 N 33/573	Z
GO 1 N 33/577	GO 1 N 33/577	B

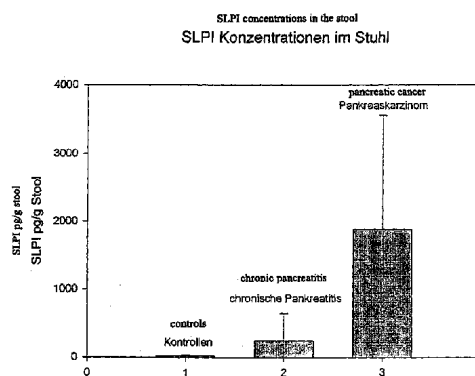
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 44 頁)

(21) 出願番号	特願2002-558015 (P2002-558015)	(71) 出願人	503252681
(86) (22) 出願日	平成13年12月11日 (2001.12.11)		ヴィヴォテック バイオメディカル テク
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月14日 (2003.7.14)		ノロジーズ ゲーエムペーハー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/014511		ドイツ連邦共和国 39114 マグデブルク, ブライツシャイドシュトラッセ 51
(87) 国際公開番号	W02002/057785	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成14年7月25日 (2002.7.25)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	101 01 792.8	(74) 代理人	100118773
(32) 優先日	平成13年1月17日 (2001.1.17)		弁理士 藤田 節
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100111741
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), JP, US		弁理士 田中 夏夫
		(72) 発明者	ニリウス, マンフレッド
			ドイツ連邦共和国 マクドブルク 39114, ブライツシャイドシュトラッセ 51

(54) 【発明の名称】 膵臓及び胃腸疾患の検出方法

(57) 【要約】

本発明は抗体を使用して血清及び糞便で胃及び膵臓疾患を検出する方法に関する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

膵癌、慢性膵炎、胃病及び炎症性腸疾患からなるグループから選ばれたヒト又は動物の身体の疾病の検出方法において、身体の血清又は糞便から得られ、この中に存在する S L P I (分泌性白血球プロテアーゼ阻害剤)、その断片又は複合体を免疫学的手段と接触させることによって検出する方法。

## 【請求項 2】

免疫学的手段と接触させる前に、糞便を均質化する請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

免疫学的手段が抗 S L P I 抗体、特に標識抗体、その断片又は複合体である請求項 1 又は 2 に記載の方法。 10

## 【請求項 4】

S L P I - 抗体反応を E L I S A 検定によって検出する請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

胃病が胃炎又は潰瘍に起因する請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6】

炎症性腸疾患がクローン病又は潰瘍性大腸炎である請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7】

身体の子清又は糞便中の S L P I - 抗体反応のほかにエラスターゼ 1 濃度も検出する請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

## 【請求項 8】

抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 9】

複合体が S L P I - エラスターゼ 1 複合体である請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

S L P I の断片がアミノ酸残基 1 から 54 を有する S L P I の N 末端領域である請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 11】

S L P I の断片がアミノ酸残基 55 から 107 を有する S L P I の C 末端領域である請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

## 【請求項 12】

膵癌、慢性膵炎、胃病及び炎症性腸疾患からなるグループから選ばれたヒト又は動物の身体の疾病をヒト又は動物の身体の子清又は血清で検出するための抗 S L P I 断片又は抗 S L P I 複合体抗体の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は膵臓及び胃腸疾患の検出方法、特に膵癌、慢性膵炎、胃病及び炎症性腸疾患の検出方法に関する。 40

## 【背景技術】

## 【0002】

膵臓疾患、例えば膵癌又は慢性膵炎は胃腸疾患、例えば胃病又は炎症性腸疾患と同じくヒト及び動物の身体の子重大な脅威である。この種の疾病の早期のなるべく特異的な診断は、効果的な治療のために不可欠である。これまで胃腸管のほとんどすべての疾患は、標準的方法として試料採取による侵襲的方法(内視鏡法、大腸鏡法、E R C P [内視鏡的膵胆管造影法]等)に造影法(ソノグラフ法、X線撮影、コンピュータ断層撮影等)を援用して診断した。この診察の前段階で幾つかの実験室的方法が、特定の内臓例えば膵臓の不全について解明することができる日常的方法として確立されている。ところがこれら実験室的 50

方法はたいてい費用がかかり、多くの場合新鮮な材料（胃液、膵液、十二指腸液等）で短時間の内に実施しなければならない。さもなければ試料の酵素組成により特異的因子の検出がもはやできないことが多いからである（このことはとりわけ酵素基質反応に当てはまる）。患者の血清で特定のパラメータを決定する場合、この値はしばしば希望通りに確実なものではなく（大きな個人内及び個人間変動）、極めて低い感受性を示す。

【0003】

また幾つかの少数の疾患（慢性膵炎、胃のヘリコバクターピロリ感染症、腸内細菌異常等）で最近、呼吸試験（例えば<sup>13</sup>C-尿素呼吸試験、H<sub>2</sub>-グルコース呼吸試験、<sup>13</sup>C-トリグリセリド呼吸試験等）を確立することができたが、かなり高価な設備（例えば質量分析計）を備えねばならず、例えば高価な<sup>13</sup>C-標識に制約されて費用をこれ以上引き下げるできないので、その実施はこれまで少数のセンターでしかできない。従ってこれらの方法は適当な予備スクリーニング・プログラムへの採用に適さないことが多い。

10

【0004】

患者の糞便で特定の疾患を検出することができる診断テストは、これまでごく少数しかない。例えば腸癌のスクリーニング法としての糞便中の潜血の検出のための潜血試験、慢性膵炎の診断のための糞便中の膵臓エラスターゼの検出及び胃のヘリコバクターピロリ感染の検出のために最近開発されたヘリコバクターピロリ糞便試験がこれに数えられる。最後の2つの試験では抗体技術により検出が行われる。

【0005】

膵臓エラスターゼの試験に関しては、この試験は重い膵臓外分泌不全の診断のための有用な方法であるが、しかし中度ないし軽度の機能障害は検出が比較的不良であることが認められる。

20

【0006】

悪性の疑いのある膵臓病変の確実な非侵襲的鑑別方法は依然として存在しない。膵癌の非侵襲的診断のための候補として、とりわけ特定の遺伝子突然変異を検出するマーカーが検討されている（K-Ras、p16、p53）。個々の遺伝子は癌発生の時間的経過の中で様々に活動するから、異なる確率で癌腫の発生に関連する。

【0007】

例えばK-Ras突然変異はすでに前癌段階、即ち癌種の「発生」の段階で検出されるが、腫瘍抑制遺伝子p16及びp53は癌種が存在すると不活性化される。ところが癌種の発生に早期に関与する遺伝子は、腫瘍発生の前段階即ち「前癌」状態や腫瘍のない慢性膵炎患者でも検出されることがあり、それが予測力を制限するという欠点がある。このためこれらの種々の腫瘍マーカー又は膵癌に対するその他の特異的マーカーの組み合わせを得ようとする。

30

【0008】

CA19-9、即ち患者の血清で経過マーカー及び再発指標として決定される腫瘍マーカーの、経過パラメータとして利用される検出にも同じことが当てはまる。研究が示すところによれば、7人中ちょうど5人の慢性膵炎患者でCA19-9の血清値が増加しており、膵癌の手術を行った後、血清のCA19-9レベルの正常化が現われたのは10-29%の場合に過ぎない。

40

【0009】

これまでPCR法による市販のK-Ras検出キットが提供されているが（Elucigene K-Ras7; Zeneca Diagnostics）、この技術は時間がかかり、高価であり、検出に偽陰性の又は偽陽性の影響を及ぼす恐れのある環境からのDNA汚染を回避するために、すべての分子生物学的方法のように研究材料及び試験方法の実施を極めて入念に（無菌で）取扱うことが必要である。

【0010】

膵癌の診断のための別のマーカーとして、カルボキシペプチダーゼA（CPA）の検出が有効である。この酵素はもっぱら膵臓で前駆体（「プロ酵素」）プロカルボキシペプチダ

50

ーゼ A (PCPA) として形成される。プロペプチドの分解によって、酵素は活性カルボキシペプチダーゼに変えられる。

【0011】

膵臓腫瘍患者の血清で PCPA の増加が検出される。また健全な膵臓のカルボキシペプチダーゼ A は他の膵臓酵素 (エラスターゼ、アミラーゼ等) と比較して分泌が少ない (酵素分泌の割合は約 5%)。従って膵臓の病的変異 (膵炎、膵癌) は検出限界以下の酵素の低下及び / 又は「未成熟」プロ酵素 (PCPA) の増加をもたらすと予想される。もう一つの利点は、カルボキシペプチダーゼ A が無傷で腸通過に耐え、糞便中で定量されることである。

【0012】

体液又は糞便中の CPA 又は PCPA の決定のための市販の検出キットはまだない。

10

【0013】

全体として、多くの胃腸疾患の慢性的異変の確実な非侵襲的診断は依然として存在しないことが確認される。

【0014】

慢性炎症性腸疾患、例えばクローン病又は潰瘍性大腸炎では最初の症状の発現から診断に至るまでに一般に大変長い期間が経過し、それが多くの場合治療の実施を非常に難しくし、不可能にさえする。クローン病と潰瘍性大腸炎は、現在十分な診断法も治療法もない病因不明な慢性炎症性腸疾患 (CED) である。クローン病又は潰瘍性大腸炎の診断のために現在行われる方法は、炎症パラメータの確定並びに体液及び糞便の微生物学的及び血清学的検査である。場合によってはソノグラフ的及び内視鏡的検査法がこれに加わる。さらに放射性同位元素、例えば<sup>111</sup>インジウム、<sup>99</sup>テクネチウムを使用し、それに関連して白血球をこれらの同位元素で標識して検出する方法が開発された。この方法はクローン病及び潰瘍性大腸炎に対して高い感受性と特異性を有するが、技術的に複雑であり、高価であり、患者にとって厄介である。特定の患者群、例えば幼児や妊婦にはこの診断法を行うことができない。

20

【0015】

そこで抗体検定に基づき特定の病像の特異的検出をすでに早期に行うことができる比較的温和な方法が開発された。例えば米国特許公報第 5,455,160 号は胃腸管の腫瘍疾患並びにクローン病及び潰瘍性大腸炎の診断方法を記載する。この刊行物は抗カルプロテクチン抗体の使用、特に患者の糞便中のカルプロテクチンの定量のための酵素免疫検定の使用を開示する。その場合カルプロテクチン量の増加は前記の疾病を示唆する。

30

【0016】

ドイツ国特許第 4107765 号明細書は体液及び糞便のいずれとも反応する高特異的膵臓エラスターゼ 1 - 抗体を得る方法を記載する。この方法により得られる抗体は糞便による慢性及び急性膵炎の診断に適している。

【0017】

Si - Tahar (Gastroenterology 118 (2000), 1061 - 1071) により、SLPI (分泌性白血球プロテイナーゼ阻害剤) 即ちプロテアーゼ阻害機能を有する 11.7 kDa の大きさのタンパク質は腸への有害な影響、例えば微生物感染に対する有力な治療薬であることが知られている。

40

【0018】

国際公開公報 WO94/06454 により HIV 感染に対する予防薬としての SLPI の使用が知られている。国際特許出願 WO99/17800 には粉末状 SLPI の薬剤としての使用が記載されている。そこで特に説明されている粉末状の投薬形態は、吸入療法による SLPI の使用に利用される。米国特許第 5,633,227 号により喘息又はアレルギー性鼻炎の治療のための SLPI の使用が明らかである。日本国特許第 07103977 号明細書により SLPI 又は SLPI - エラスターゼ複合体のための免疫学的サンドイッチ型検定が明らかである。その場合アミノ酸残基 1 から 54 及び 55 から 107 を有する SLPI 断片が認識される。上記の系により呼吸道の疾患を検出できることが説明さ

50

れる。また日本国特許第03279862号明細書により抗体に基づくSLPI検定法が明らかである。

【0019】

SLPIについては、このタンパク質がキモトリプシン形プロテアーゼ（例えば膵臓エラスターゼ）及びトリプシン形プロテアーゼに対して阻害活性を有することが知られている。前者の活性については、これがSLPIのC末端領域に、後者の活性はN末端領域に属することが知られている。米国特許第5,851,983号明細書はこの認識に基づき調製された短縮及び融合タンパク質並びにこのタンパク質の製薬上の応用の可能性を記載する。最後に国際公開公報WO96/08275は別のSLPI断片及びトリプターゼの阻害のためのこの断片の使用を開示する。

10

【発明の開示】

【0020】

そこで本発明の根底にある技術問題は、膵臓及び胃腸疾患、特に膵癌、慢性膵炎、胃病及び炎症性腸疾患に対する、簡単に実施され、温和で安価な、かつ迅速に実施される検出方法を提供することである。

【0021】

本発明はヒト又は動物の身体の血清又は糞便を採取し、免疫学的手段と接触させることによってSLPI（分泌性白血球プロテアーゼ阻害剤）、その断片又は複合体を検出し、特に血清又は糞便中のSLPI、その断片又は複合体の濃度を決定して行う、膵癌、慢性膵炎、胃病及び炎症性腸疾患からなるグループから選ばれるヒト又は動物の身体の疾病の検出方法を提供することによってこの問題を解決する。本発明に基づき意外なことに免疫学的手段、特にモノクローナル又はポリクローナル抗体を使用して、SLPI、その断片又は複合体の有無、特に現存するSLPIの濃度を、健康な対象者と比較して決定することにより、ヒト又は動物の身体の血清又は糞便で上記の疾病の検出が可能であることを示すことができた。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

慢性膵炎又は膵癌を罹患する患者は、本発明に基づき糞便にSLPIが健康な者に比して特に高い濃度で現われることによって診断される。健康なヒト又は動物の身体の糞便はSLPIが極めて少ないか又はまったくない。本発明に基づき患者の糞便で慢性膵炎又は膵癌を決定できるだけでなく、さらに疾患の度合もSLPI濃度決定によって定量することができる。糞便中のSLPI濃度は糞便中に存在するエラスターゼ1濃度と相関することを示すことができた。特に慢性膵炎患者の糞便中のSLPI濃度はエラスターゼ1濃度と、また健康な対照者のSLPI濃度はこの対照者のエラスターゼ1濃度と相関することを示すことができた。同じことが膵癌患者のSLPI濃度にも当てはまる。従ってこのSLPI濃度は同じくこの患者のエラスターゼ1濃度と相関する。

30

【0023】

本発明はとりわけSLPIが腸内で決して直ちに分解されないことを示すことができたという点で、意外である。むしろ慢性膵炎及び膵癌患者では糞便中のSLPIを検出することができる。

40

【0024】

そこで本発明は特にヒト又は動物の身体の糞便中のSLPIの検出による膵臓疾患の免疫学的検出方法に関する。

【0025】

さらに本発明に基づき胃病、例えば胃炎又は潰瘍のない健康な対照者の血清中のSLPI濃度は、このような疾病を持つ患者より小さいことを示すことができた。そこで本発明に基づき膵臓及び胃腸疾患の免疫学的検出のための本方法を胃病の診断にも利用することができる。その場合正常な健康な対照者に比して高い血清中SLPI濃度が検出される。そこで本発明はまた特にヒト又は動物の身体の血清中のSLPIの検出による胃腸疾患の免疫学的検出方法に関する。

50

## 【0026】

本発明に関連して「免疫学的手段」の概念は、抗原、特にSLPI、SLPI含有複合体、例えば異価又は同価の組成のタンパク質-タンパク質複合体もしくはSLPI断片の検出のための抗体の使用を意味する。以下で本発明に関連してSLPIの概念は、例えばSLPI-エラスターゼ1複合体のような他のタンパク質との複合体又はSLPIの断片、例えばC又はN末端断片をも意味する。このような断片は例えばアミノ酸残基1から54(N末端断片)又は55から107(C末端断片)を有する。上記の位置データについては、米国特許第5,851,983号及びそこに配列番号4で示された番号表示を参照されたい。米国特許第5,851,983号及び国際公開公報WO96/08275に開示されたSLPI断片に関する開示内容は、ここに本発明の開示内容に完全に包含されており、そこに挙げられた断片と本発明方法の組合わせに対して保護が請求されることを明確にしている。

10

## 【0027】

本発明に関連して抗体の概念は、特異的にSLPI、SLPI含有複合体例えばSLPI-エラスターゼ1複合体又はSLPI断片を認識し、結合する限り、モノクローナル抗体もポリクローナル抗体も意味する。好ましい実施形態では抗体又はその断片は他の抗原を結合しない。もちろん抗体又は断片は修飾することができ、例えば他の分子又はその部分例えば色素標識、放射性標識、測定可能な反応を開始する酵素、例えばホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、酵素基質、蛍光物質、化学発光物質、細胞毒素、スパーサー、支持物質等とコンジュゲート、会合もしくは共有又は非共有結合することができる。標識、コン

20

## 【0028】

本発明の好ましい実施形態では免疫学的手段の使用とは、試料即ち血清又は糞便、特に均質化した糞便を、特異的に抗原即ちSLPIを認識する少なくとも1つの抗体を含む免疫学的試薬と接触させることを意味する。

## 【0029】

そこで発明はヒト又は動物の身体の糞便又は血清中のSLPIの定性的及び/又は定量的決定のための抗SLPI抗体の使用に関する。こうして本発明に基づき抗SLPI抗体を使用して血清で胃腸疾患を、また糞便で膵癌又は慢性膵炎を特異的に検出することが可能である。

30

## 【0030】

免疫学的手段を使用する本発明方法はサンドイッチ型ELISA、間接的又は競合的ELISAとして実施することが好ましい。その場合HTP法(high throughput)を使用することが特に好ましい。

## 【0031】

本発明に基づくサンドイッチ型ELISAに関連して、異なるSLPIエピトープに、また代替として同じSLPIエピトープに向けられた少なくとも2つの異なるモノクローナル抗体が必要である。少なくとも2つの抗体は均質又は不均質系に溶解し及び/又は支持体に固定されている。

40

## 【0032】

本発明に基づき免疫学的手段を3つの異なる抗体の系として構成することももちろん可能であり、その場合抗体の1つは不均質相にあり、他の2つの抗体は可溶である。2つの可溶の抗体の1つは標識を有し、他の抗体は標識なしである。この実施形態では可溶の抗体は標識無しの抗体に向けられている。

## 【0033】

本発明に基づき免疫学的手段を使用して行われる方法は、特に好ましい実施形態では血清又は好ましくは均質化し、場合によっては希釈した糞便を、SLPIに対して特異的な少なくとも2つの抗体とともにインキュベートすることが必要である。好ましい実施形態で

50

は2つの抗体の1つは固相に結合されている。これは常法で行われる。別の抗体は可溶の形であることが好ましく、好ましい実施形態では標識を有する。本発明に基づき別の抗体を使用する場合は、好ましい実施形態ではそのうちの1つだけが標識を有する。

**【0034】**

本発明の一実施形態では非特異的にSLPIと結合し得る抗体、又は特に好ましくは特異的にSLPIと結合し得る抗体が固相に結合される。固相に結合されたこの抗体は続いて血清又は糞便とともに、場合によっては洗浄処理の後に第2の抗体とともにインキュベートする。第2の抗体は特異的にSLPIと結合することができ、可溶の形であって標識を有する。固相に結合された抗体が非特異的にSLPIと結合し得る抗体であるならば、固相にはSLPIだけでなく他の抗原も結合する。ところが特異的にSLPIと結合する第2の抗体は、特異的にSLPI又はSLPIと第1の抗体の複合体とだけ反応するから、SLPI分子だけが特異的に標識付き抗体を有し、こうして固相と液相の分離の後に定量することができる。

10

**【0035】**

このようにして本発明に基づき例えばサンドイッチ型ELISAに関連して、標識なしのSLPI特異的な第1の抗体を例えば担体に結合し、試験溶液又は懸濁液を加えることができる。その際試験溶液又は懸濁液中にあるSLPIは第1の抗体に結合される。続いて第2の標識付き抗SLPI抗体を加える。この抗体はSLPI又はSLPIと第1の抗体の複合体と特異的に反応する。第2の抗体に標識することによって、標準液を使用してSLPI量を決定することができる。

20

**【0036】**

SLPIに特異的に結合する第1の抗体を固相に固定すれば、固相にSLPIだけが特異的に結合される。第2の可溶の抗体とともにインキュベートすると、この第2の抗体もSLPIと反応する。固相と液相を分離した後、第2の抗体に標識することによってSLPIの正確な定量を行うことができる。

**【0037】**

発明の特に好ましい実施形態ではSLPIに特異的又は非特異的に結合する第1の抗体でマイクロタイタープレートを被覆し、続いて血清又は糞便を被覆されたマイクロタイタープレートと接触させ、未結合の成分を洗い流した後、標識付きの、例えばビオチン標識付きの第2の抗SLPI抗体をマイクロタイタープレートに加え、第2の抗体がSLPIに結合し得る条件でマイクロタイタープレートをインキュベートする。続いて固相と液相を分離し、標識を直接検出するか、又は酵素で標識した第2の抗体を使用して基質を加え、基質の変化を定量的に決定する。そこでビオチンで標識した第2の抗体を次のインキュベーションでペルオキシダーゼ(POD)とストレプトアビジンのコンジュゲートと反応させることができる。ペルオキシダーゼは基質ABTS(2,2'-アジノ-ビス-(3-エチルベンゾチオアゾリン-6-スルホン酸)ジアンモニウム塩)を酸化することができる。酸化したABTSを続いて測光法で決定することができる。

30

**【0038】**

本発明の特に好ましい実施形態では第1の抗体が常法のようにELISAイムノプレートのかぼみの底をなすのではなく、支持体マトリクス例えば不織構造、織構造又は膜構造に直接組み込むことによってマトリクスに結合される。好ましいマトリクスは中空線維膜又は細孔を有する平面膜である。発明の有利な実施形態ではこの平面膜にイオン交換基を設けることもできる。

40

**【0039】**

ポリクローナル抗体は、分離し完全に精製したSLPI又はその断片で動物を免疫感作し、周知のようにポリクローナル抗体を含む抗血清を得ることによって作られる。モノクローナル抗体は周知の方法で作られる。本発明に基づき使用される抗SLPI抗体は市販の抗体であってもよい。

**【0040】**

本発明に基づき検出可能な胃病は胃炎又は潰瘍症状である。本発明に基づき検出可能な炎

50

症性疾患は例えばヘリコバクターピロリ感染に原因し、もしくはクローン病又は潰瘍性大腸炎症状である。

【0041】

本発明の特に好ましい実施形態では患者の血清又は糞便でSLPIを検出するときに、同時にエラスターゼ1濃度も検出する。ヒトの膵臓エラスターゼ1は腸通過に無傷で耐え、糞便でタンパク質として定量することができる。糞便中のエラスターゼ1濃度は膵臓外分泌機能を反映する。糞便グラム当リエラスターゼ200 $\mu$ g以上の値は正常な膵臓外分泌機能を指示し、糞便グラム当リエラスターゼ200 $\mu$ g以下の値は膵臓外分泌不全を指示する。急性膵炎の場合、急性炎症段階でエラスターゼ1が血清に放出されるから、血清中のエラスターゼの定量によってこの疾病の診断又は説明が可能である。従って血清中の高いエラスターゼ1濃度は膵炎を示唆する。

10

【0042】

発明のその他の有利な実施形態は従属請求項で明らかである。

【0043】

以下の実施例と当該の図に基づき発明を詳述する。

【実施例】

【0044】

実施例1

慢性膵炎患者の糞便中のSLPIの検出

慢性膵炎のない患者42人、膵癌患者6人及び慢性膵炎患者19人からそれぞれ100mgの糞便を採取し、秤量し、抽出用緩衝液(リン酸塩緩衝食塩溶液、pH7.2、洗浄剤及びアジ化トリウム)で抽出し、希釈した。

20

【0045】

糞便試料懸濁液を室温で試験管振とう装置により何回も激しく混合することによって抽出を行う。完全な抽出を保証するために、糞便をよく均質化しなければならない。少なくとも5分間の抽出の後に最後にもう1回混合する。粒子の沈降の後に糞便試料抽出物を次のように希釈する。

【0046】

SLPIの測定のために1:100の希釈率で、またエラスターゼ1の比較測定のために1:500の希釈率で試料抽出物の希釈を行った。

30

【0047】

R&D System社(R&D System GmbH、ドイツ国ヴィースバーデン)のSLPI-ELISA(Quantikline<sup>(R)</sup>、カタログ番号DP100,6/99)でSLPI濃度を決定した。

【0048】

このELISAは96個のくぼみを具備し、マウスの抗ヒトSLPIモノクローナル抗体で被覆したポリスチレン・マイクロタイタープレートを使用する。抽出物をピペットでくぼみに移した後、SLPIは固定化したモノクローナル抗体により結合される。未結合の物質を洗い流した後、酵素と結合された、ヒトSLPIに対して特異的なポリクローナル抗体(ホースラディッシュペルオキシダーゼと結合した抗ヒトSLPIポリクローナル抗体)をくぼみに入れる。未結合の抗体-酵素試薬を洗い流した後、基質溶液をくぼみに入れ、結合したSLPIの尺度として発色を測定する。

40

膵臓エラスターゼ1の濃度をSCHeBo-Tech<sup>(R)</sup>社のエラスターゼ1-ELISA(ドイツ国ギーセン、カタログ番号07、2000年4月、EP0547059B1)により決定した。

【0049】

図1及び2に示す下記の結果が生じた。

【0050】

図1は慢性膵炎のない患者群、膵癌患者群及び慢性膵炎患者群について作図した患者の糞便中のSLPI濃度(糞便グラム当りピコグラムSLPI)を示す。対照群の成員は糞便

50

中に S L P I がまったく又は僅かしかないが、慢性膵炎及び膵癌の 2 つの患者群は糞便中の S L P I 濃度をはるかに高いことがはっきり示される。

【 0 0 5 1 】

図 2 は同じ患者群で行ったエラスターゼ 1 の濃度測定を示す。健康な対照群は明らかに 2 0 0  $\mu$  g / 糞便 g を超えるエラスターゼ含量を有するが、慢性膵炎及び膵癌の 2 つの患者群は糞便中のエラスターゼ 1 濃度が著しく減少している。

【 0 0 5 2 】

実施例 2

実施例 2 a

胃病がある又はない患者の血清中の S L P I の検出

10

胃の所見が正常な患者 ( o B ) 1 7 人と胃又は小腸の潰瘍 ( 胃潰瘍及び十二指腸潰瘍 ) の患者 3 3 人からそれぞれ 5 m l の血液を採取し、室温で 3 0 0 0 r p m により 1 0 分間遠心分離して血清を得た。

S L P I の測定のために希釈率 1 : 1 0 0 で血清試料の希釈を行なった。

【 0 0 5 3 】

血清中の S L P I 濃度を R & D 社 ( R & D S y s t e m G m b H、ドイツ国ウィースバーデン ) の S L P I - E L I S A ( Q u a n t i k i n e <sup>(R)</sup>、カタログ番号 D P 1 0 0 , 6 / 9 9 ) により決定した。E L I S A は実施例 1 で説明したように行った。

【 0 0 5 4 】

図 3 は対照群と患者の S L P I 濃度 ( n g / m l ) を示す。

20

【 0 0 5 5 】

結果 :

患者群は対照群と比較して著しく高い S L P I 濃度を示した。

【 0 0 5 6 】

実施例 2 b

胃の所見が正常な患者 ( 対照 ) 1 7 人、慢性胃炎患者 1 6 人及び潰瘍病患者 1 8 人からそれぞれ 5 m l の血液を採取し、室温で 3 0 0 0 r p m により 1 0 分間遠心分離して血清を得た。

【 0 0 5 7 】

S L P I の測定のために希釈率 1 : 1 0 0 で血清試料の希釈を行った。

30

【 0 0 5 8 】

血清中の S L P I 濃度を R & D 社 ( R & D S y s t e m G m b H、ドイツ国ウィースバーデン ) の S L P I - E L I S A ( Q u a n t i k i n e (R)、カタログ番号 D P 1 0 0 , 6 / 9 9 ) により決定した。

【 0 0 5 9 】

E L I S A は実施例 1 で説明したように行った。

【 0 0 6 0 】

慢性胃炎患者も潰瘍病 ( 胃潰瘍又は十二指腸潰瘍 ) の患者も血清中の S L P I 濃度が著しく高かった。

【 0 0 6 1 】

40

図 4 は胃の所見が正常な患者、慢性胃炎患者及び潰瘍病 ( U l c u s ) 患者の血清中の S L P I 濃度 ( n g / m l ) を示す。図がはっきり示すように、健康な対照群は慢性胃炎及び潰瘍病の患者群よりはるかに小さな S L P I 濃度を有する。

結果 :

S L P I 血清濃度は胃腸病のマーカーとしても適している。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 6 2 】

【 図 1 】 糞便中の S L P I 濃度のヒストグラムを示す。

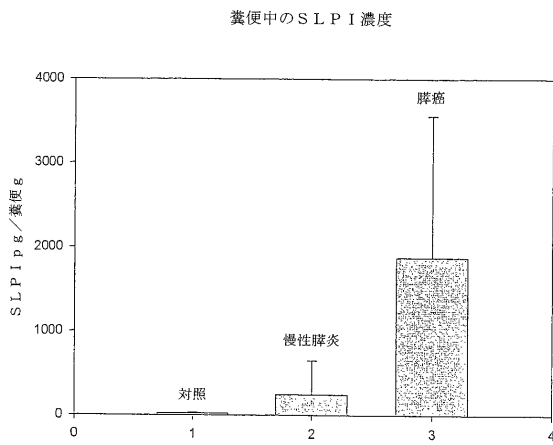
【 図 2 】 糞便中のエラスターゼ 1 濃度のヒストグラムを示す。

【 図 3 】 血清中の S L P I 濃度のヒストグラムを示す。

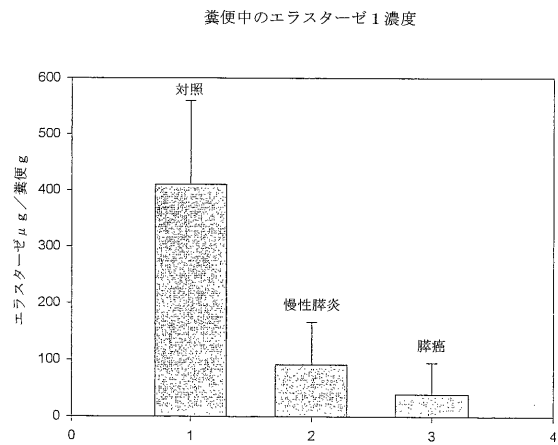
50

【図4】血清中のSLPI濃度のヒストグラムを示す。

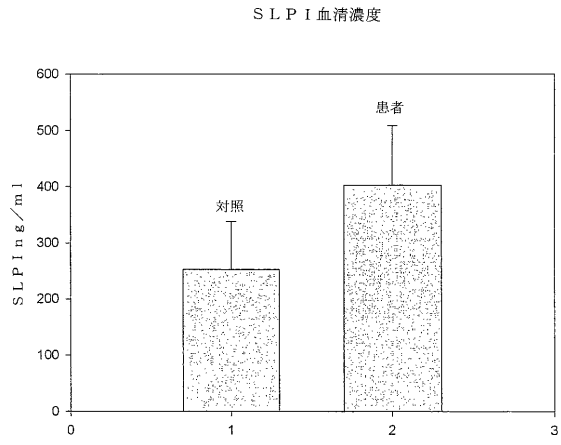
【図1】



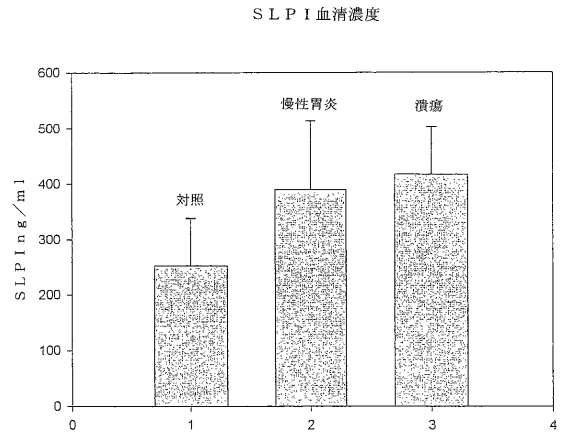
【図2】



【 图 3 】



【 图 4 】



## 【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
25. Juli 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/057785 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: G01N 33/574 (74) Anwälte: SCHRELL, Andreas usw.; Maybachstrasse 6A, 70469 Stuttgart (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/14511 (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

(22) Internationales Anmeldedatum: 11. Dezember 2001 (11.12.2001) (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(25) Erfindungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 101 01 792.8 17. Januar 2001 (17.01.2001) DE

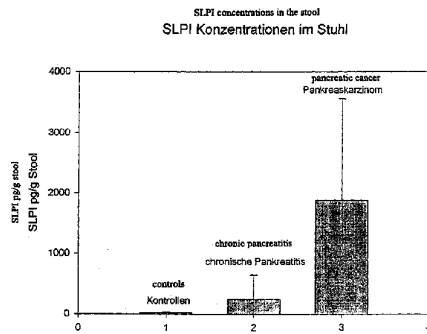
(71) Anmelder und (72) Erfinder: NILIUS, Manfred (DE/DE); Breischeidstrasse 51, 39114 Magdeburg (DE).

**Veröffentlicht:**  
— mit internationalem Recherchenbericht vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING PANCREATIC AND GASTRO-INTESTINAL ILLNESSES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS PANKREATITISCHER UND GASTROINTESTINALER ERKRANKUNGEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting gastric and pancreatic illnesses, using antibodies in serum and in stools.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis gastraler und pankreatischer Erkrankungen unter Einsatz von Antikörpern in Serum und Stuhl.



WO 02/057785 A1

Verfahren zum Nachweis pankreatitischer und gastro-  
intestinaler Erkrankungen

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweis pankreatischer und gastrointestinaler Erkrankungen, insbesondere Verfahren zum Nachweis von Pankreaskarzinomen, chronischer Pankreatitis, gastrischer Läsionen und entzündlicher Darmerkrankungen.

Pankreatische Erkrankungen, wie Pankreaskarzinom oder chronische Pankreatitis, stellen ebenso wie gastrointestinale Erkrankungen, also zum Beispiel gastrische Läsionen oder entzündliche Darmerkrankungen, ernsthafte Gefährdungen des menschlichen und tierischen Körpers dar. Eine frühzeitige und möglichst spezifische Diagnose derartiger Krankheiten ist für eine erfolgversprechende Therapie unerlässlich. Bisher werden fast alle Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes mit invasiven Methoden (Endoskopie, Koloskopie, ERCP, etc.) mit Gewebeprobe-entnahme, unterstützt durch bildgebende Verfahren (Sonografie, Röntgenologie, Computertomografie, etc.) als Standardmethoden diagnostiziert. In der Vorphase dieser Untersuchungen haben sich einige Labormethoden als Routinemethoden etabliert, die Aufschluss über eine Insuffizienz bestimmter innerer Organe wie zum Beispiel des Pankreas geben können. Diese Labormethoden sind jedoch meist aufwendig und müssen oft an frischem Material (Magensaft, Pankreassaft, Duodenalsaft, etc.) innerhalb einer

WO 02/057785

PCT/EP01/14511

-2-

kurzen Zeit durchgeführt werden, da durch die enzymatische Zusammensetzung des Probenmaterials sonst ein Nachweis spezifischer Faktoren oft nicht mehr gelingt (dies gilt vor allem für Enzym-Substrat-Reaktionen). Werden bestimmte Parameter im Serum der Patienten bestimmt, sind diese Werte oft nicht in gewünschtem Maße zuverlässig (große intra- und interindividuelle Schwankungen) und zeigen eine extrem geringere Sensitivität.

- 10 Bei einigen wenigen Erkrankungen (chronische Pankreatitis, Helicobacter pylori-Infektion des Magens, bakterielle Darmfahbesiedlung, etc.) haben sich in jüngster Zeit auch Atemteste (zum Beispiel <sup>13</sup>C-Harnstoffatemtest, H<sub>2</sub>-Glucoseatemtest, <sup>13</sup>C-Triglycerid-Atemtest, etc.) etablieren können, deren Durchführung aber bisher nur an wenigen Zentren möglich ist, da entsprechend teures Equipment (zum Beispiel Massenspektrometer) zur Verfügung muss, und deren Kosten, bedingt durch zum Beispiel teure <sup>13</sup>C-Markierung, nicht mehr weiter gesenkt werden können.

Daher eignen sich diese Methoden meist auch nicht zur Aufnahme in entsprechende Vorsorge-Screening-Programme.

- 25 Bisher gibt es nur ganz wenige diagnostische Tests, mit denen bestimmte Erkrankungen im Stuhl der Patienten nachgewiesen werden können. Dazu zählt zum Beispiel der Hämoccult-Test zum Nachweis okulten Blutes im Stuhl als Screening-Methode für das Darmkarzinom, der Nachweis von Pankreas-Elastase im Stuhl zur Diagnose der chronischen Pankreatitis und

WO 02/057785

PCT/EP01/14511

- 3 -

der jüngst entwickelte *Helicobacter pylori*-Stuhl-  
Test zum Nachweis der *Helicobacter pylori*-Infektion  
im Magen. Bei den letzten beiden Tests wird der  
Nachweis mittels Antikörpertechnologie durchge-  
führt.

Bezüglich des Tests für die Pankreaselastase lässt  
sich feststellen, dass der Test zwar ein brauchba-  
res Verfahren zur Diagnose der schweren exokrinen  
Pankreasinsuffizienz ist, milde bis mäßige Funkti-  
onseinschränkungen jedoch relativ schlecht nach-  
weist.

Eine sichere Methode zur nicht-invasiven Differenz-  
zierung malignomverdächtiger Pankreasveränderungen  
steht nach wie vor nicht zur Verfügung. Als Kandi-  
daten für die nicht-invasive Diagnostik des Pankre-  
askarzinoms sind vor allem Marker in der Diskussi-  
on, die bestimmte Genmutationen nachweisen (K-Ras,  
p16, p53). Da die einzelnen Gene im zeitlichen Ver-  
lauf der Entstehung eines Karzinoms unterschiedlich  
in Aktion treten, sind sie auch mit einer unter-  
schiedlichen Wahrscheinlichkeit mit dem Entstehen  
eines Karzinoms assoziiert.

So können zum Beispiel K-Ras Mutationen schon in  
einem prämaligen Stadium, also in einem Stadium  
des „Entstehens“ eines Karzinoms, nachgewiesen wer-  
den, während die Tumor-Supressor-Gene p16 und p53  
bei vorhandenem Karzinom inaktiviert sind. Gene,  
die früh an der Entstehung des Karzinoms beteiligt  
sind, haben allerdings den Nachteil, dass sie auch  
in Vorstufen der Tumorentstehung, sogenannten „prä-  
malignen“ Zuständen und bei Patienten mit chroni-

WO 02/057785

PCT/EP01/14511

-4-

5 scher Pankreatitis ohne Tumor nachgewiesen werden können, was ihre Vorhersagekraft wiederum eingeschränkt. Deshalb ist eine Kombination verschiedener dieser Tumormarker beziehungsweise anderer spezifischer Marker für das Pankreaskarzinom anzustreben.

10 Dasselbe gilt für den als Verlaufsparemeter genutzten Nachweis von CA 19-9, einem Tumormarker der in Patientenserum als Verlaufs-Marker und Rezidiv-Indikator bestimmt wird. Studien zeigen, dass eben  
15 auch 5/7 Patienten mit einer chronischen Pankreatitis erhöhte CA 19-9 Serumwerte haben, und nach einer erfolgten Operation eines Pankreaskarzinoms eine Normalisierung der Serum CA 19-9 Spiegel nur in 10-29% der Fälle eintritt.

20 Bisher steht ein kommerzieller Kit zum Nachweis von K-Ras mittels PCR-Technik zur Verfügung (Elucigene K-Ras7; Zeneca Diagnostics), doch ist diese Technik zeitaufwendig und teuer und erfordert wie alle molekularbiologischen Methoden einen sehr sorgfältigen (sterilen) Umgang mit dem Untersuchungsmaterial und der Durchführung des Testverfahrens, um DNA-Kontaminationen aus der Umwelt zu vermeiden, die den Nachweis falsch negativ oder falsch positiv be-  
25 einflussen können.

30 Als ein weiterer Marker zur Diagnose des Pankreaskarzinoms bietet sich die Bestimmung von Carboxypeptidase A (CPA) an. Dieses Enzym wird ausschließlich im Pankreas als Vorläufer („Proenzym“) Procarboxypeptidase A (PCPA) gebildet. Durch Abspaltung

WO 02/057785

PCT/EP01/14511

-5-

des Propeptids wird das Enzym in aktive Carboxypeptidase überführt.

PCPA wird im Serum von Pankreastumorpatienten erhöht nachgewiesen. Außerdem wird Carboxypeptidase A vom gesunden Pankreas im Vergleich mit anderen Pankreasenzymen (Elastase, Amylase, etc.) nur in geringem Maße sezerniert (ca. 5% Anteil an der Enzymsekretion). Es ist deshalb zu erwarten, dass eine krankhafte Veränderung des Pankreas (Pankreatitis, Pankreaskarzinom) zum Abfall des Enzyms unter die Nachweisgrenze und/oder zu einem Anstieg des „unreifen“ Proenzym (PCPA) führt. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass Carboxypeptidase A die Darmpassage unbeschadet übersteht und im Stuhl zu quantifizieren ist.

Es gibt bisher keinen kommerziellen Nachweiskit zur Bestimmung von CPA beziehungsweise PCPA in Körperflüssigkeiten oder Stuhl.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass eine sichere, nicht-invasive Diagnostik chronischer Veränderungen bei den meisten gastrointestinalen Erkrankungen nach wie vor nicht zur Verfügung steht.

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa vergeht zwischen dem Auftreten erster Symptome bis zur Diagnosestellung im Allgemeinen ein sehr langer Zeitraum, der die Durchführung einer Heilbehandlung in vielen Fällen sehr erschwert oder sogar unmöglich macht. Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) unklarer Ätio-

WO 02/057785

PCT/EP01/14511

- 6 -

logie für die gegenwärtig weder befriedigende Diagnose- noch Therapiemöglichkeiten zur Verfügung stehen. Die gegenwärtig zur Diagnose von Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa durchgeführten Verfahren umfassen das Feststellen von Entzündungsparametern sowie mikrobiologische und serologische Untersuchungen von Körperflüssigkeiten und Stuhl. Hinzu kommen in einigen Fällen sonografische und endoskopische Untersuchungsverfahren. Überdies wurden Verfahren unter Einsatz radioaktiver Isotopen wie <sup>111</sup>Indium oder <sup>99</sup>Technezium entwickelt, im Rahmen derer mit diesen Isotopen Leukozyten markiert und nachgewiesen wurden. Obgleich diese Verfahren eine hohe Sensitivität und Spezifität für den Nachweis von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa aufweisen, erweisen sie sich als technisch kompliziert, teuer und für den Patienten als belastend. Bestimmte Patientengruppen wie Kinder oder schwangere Frauen können diesen Diagnoseverfahren nicht ausgesetzt werden.

Es wurden daher schonendere Verfahren entwickelt, die auf der Basis von Antikörpertests einen spezifischen Nachweis bestimmter Krankheitsbilder schon frühzeitig ermöglichen. So beschreibt die US-PS 5,455,160 Verfahren zur Diagnose onkologischer Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes sowie von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Die Druckschrift offenbart den Einsatz von Antikörpern, die gegen Calprotectin gerichtet sind, insbesondere den Einsatz eines Enzym-Immuntests zur Quantifikation von Calprotectin im Stuhl von Patienten, wobei eine erhöhte Menge von Calprotectin einen Hinweis auf eine der vorgenannten Krankheiten gibt.

WO 02/057785

PCT/EP01/14511

-7-

Die DE 41 07 765 A1 beschreibt ein Verfahren zur Gewinnung von einem hochspezifischen Pankreas-Elastase 1-Antikörper, der sowohl mit Körperflüssigkeiten als auch mit Stuhl reagiert. Ein gemäß  
5 dieses Verfahrens gewonnener Antikörper eignet sich zur Diagnose der chronischen und akuten Pankreatitis im Stuhl.

SLPI (Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor), ein 11,7 kDa großes Protein mit Protease-inhibitorischer Funktion ist aus Si-Tahar  
10 (Gastroenterology 118 (2000), 1061-1071) als mögliches therapeutisches Agens gegen intestinale schädigende Einflüsse wie mikrobielle Infektionen, bekannt.

15 Aus der WO 94/06454 ist die Verwendung von SLPI als prophylaktisches Agens gegenüber einer HIV-Infektion bekannt. In der WO 99/17800 ist die Verwendung von SLPI in pulverisierter Form als pharmazeutisches Agens beschrieben. Die dort speziell  
20 beschriebene pulverisierte Darreichungsform dient dem Einsatz von SLPI im Rahmen einer Inhalationstherapie. Aus der US 5,633,227 geht die Verwendung von SLPI zur Behandlung von Asthma oder allergischer Rhinitis hervor. Aus der JP 07103977 gehen immuno-  
25 logische Sandwich-Tests für SLPI oder SLPI-Elastase-Komplexe hervor, wobei SLPI Fragmente mit den Aminosäureresten 1 bis 54 und 55 bis 107 erkannt werden. Es wird beschrieben, dass mittels des beschriebenen Systems Erkrankungen der Atemwege  
30 nachgewiesen werden können. Aus der JP 03279862 gehen ebenfalls Antikörper-basierte Testverfahren für SLPI hervor.

WO 02/057785

PCT/EP01/14511

- 8 -

Für SLPI ist bekannt, dass dieses Protein inhibitorische Aktivität gegenüber Chymotrypsintyp-Proteasen (wie pankreatische Elastase) und Trypsintyp-Proteasen aufweist. Für die erstgenannte Aktivität ist bekannt, dass diese dem C-terminalen Bereich und die zweitgenannte Aktivität dem N-terminalen Bereich von SLPI zuzuordnen ist. Die US 5,851,983 beschreibt auf der Basis dieser Erkenntnisse hergestellte verkürzte und Fusionsproteine sowie pharmazeutische Anwendungsmöglichkeiten derselben. Schließlich offenbart die WO 96/08275 weitere Fragmente von SLPI und deren Einsatz zur Inhibierung von Tryptasen.

Das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende technische Problem liegt also darin, einfach durchzuführende, schonende, kostengünstige sowie schnell durchzuführende Nachweisverfahren für pankreatische und gastrointestinale Erkrankungen, insbesondere Pankreaskarzinom, chronische Pankreatitis, gastrische Läsionen und entzündliche Darmerkrankungen bereitzustellen.

Die Erfindung löst dieses Problem durch die Bereitstellung eines Verfahrens zum Nachweis einer Krankheit eines menschlichen oder tierischen Körpers, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Pankreaskarzinom, chronischer Pankreatitis, gastrischer Läsion und entzündlicher Darmerkrankung, wobei Serum oder Stuhl des menschlichen oder tierischen Körpers gewonnen und SLPI (Sekretorischer Leukozyten-Protease-Inhibitor), Fragmente oder Komplexe davon durch Inkontaktbringen mit immunologischen Mitteln nachgewiesen wird, insbesondere, wobei die Konzent-

ration an SLPI, Fragmenten oder Komplexen davon im Serum oder Stuhl bestimmt wird. Erfindungsgemäß konnte überraschenderweise gezeigt werden, dass unter Einsatz immunologischer Mittel, insbesondere monoclonaler oder polyclonaler Antikörper, ein Nachweis der genannten Krankheiten im Serum oder im Stuhl des menschlichen oder tierischen Körpers möglich ist, indem die Anwesenheit beziehungsweise Abwesenheit von SLPI, Komplexen oder Fragmenten davon, insbesondere die Konzentration an vorhandenem SLPI, im Vergleich zu nicht erkrankten Kontrollpersonen bestimmt wird.

An chronischer Pankreatitis oder Pankreaskarzinom erkrankte Patienten lassen sich erfindungsgemäß dadurch diagnostizieren, dass in ihrem Stuhl SLPI auftritt, insbesondere in erhöhter Konzentration gegenüber Gesunden. Der Stuhl von gesunden menschlichen oder tierischen Körpern weist sehr wenig oder kein SLPI auf. Erfindungsgemäß kann mittels der vorliegenden Erfindung im Stuhl von Patienten nicht nur chronische Pankreatitis oder Pankreaskarzinom bestimmt, sondern überdies auch der Erkrankungsgrad mittels einer SLPI-Konzentrationsbestimmung quantifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die SLPI-Konzentrationen im Stuhl mit den dort vorhandenen Konzentrationen an Elastase-1 korrelieren. Es konnte insbesondere gezeigt werden, dass bei Patienten mit chronischer Pankreatitis die SLPI-Konzentrationen im Stuhl mit den Elastase-1-Konzentrationen und dass auch die SLPI-Konzentration bei gesunden Kontrollpersonen mit den Elastase-1-Konzentrationen dieser Personen korreliert. Gleiches gilt für die SLPI-Konzentration von

WO 02/057785

PCT/EP01/14511

- 10 -

Patienten mit Pankreaskarzinom, die demgemäß ebenfalls mit den Elastase-1-Konzentrationen dieser Patienten korreliert.

5 Die Erfindung ist unter anderem deswegen überraschend, als dass gezeigt werden konnte, dass SLPI im Darmtrakt nicht in jedem Fall sofort abgebaut wird. Vielmehr kann bei Patienten mit chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinom SLPI im Stuhl nachgewiesen werden.

10 Die Erfindung betrifft also insbesondere Verfahren zum immunologischen Nachweis von pankreatischen Erkrankungen durch Detektion von SLPI im Stuhl von menschlichen oder tierischen Körpern.

Erfindungsgemäß konnte überdies gezeigt werden, dass bei gesunden Kontrollpersonen, die keine gastrischen Läsionen wie Gastritis oder Ulkus aufweisen, die SLPI-Konzentration im Serum geringer als bei Patienten mit solchen Läsionen ist. Erfindungsgemäß kann das vorliegende Verfahren zum immunologischen Nachweis von pankreatischen und gastrointestinalen Erkrankungen also auch zur Diagnose von gastralen Läsionen dienen, wobei eine gegenüber normalen, gesunden Vergleichspersonen erhöhte SLPI-Konzentrationen im Serum nachgewiesen wird. Die Erfindung betrifft daher insbesondere auch Verfahren zum immunologischen Nachweis von gastrointestinalen Erkrankungen durch Detektion von SLPI im Serum von menschlichen oder tierischen Körpern.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff "immunologische Mittel" insbeson-

30

WO 02/057785

PCT/EP01/14511

- 11 -

dere der Einsatz von Antikörpern zum Nachweis von Antigenen, insbesondere SLPI, SLPI-haltigen Komplexen, zum Beispiel Protein-Protein-Komplexen homo- oder heteromerer Zusammensetzung oder SLPI-Fragmenten verstanden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter dem Begriff SLPI im Folgenden auch dessen Komplexe zum Beispiel mit anderen Proteinen, wie ein SLPI-Elastase-1-Komplex, oder Fragmente von SLPI, zum Beispiel C- oder N-terminale Fragmente, verstanden. Solche Fragmente können zum Beispiel Aminosäurereste 1 bis 54 (N-terminales Fragment) oder 55 bis 107 (C-terminales Fragment) aufweisen. Hinsichtlich der vorgenannten Positionsangaben wird auf die US 5,851,983 und die dort in SEQ ID Nr. 4 angegebene Nummerierung verwiesen. Der Offenbarungsgehalt der US 5,851,983 sowie der WO 96/08275 hinsichtlich der dort offenbarten Fragmente von SLPI wird hiermit vollständig in den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Erfindung mit einbezogen und verdeutlicht, dass für die dort genannten Fragmente in Kombination mit dem vorliegenden erfindungsgemäßen Verfahren Schutz begehrt wird.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter dem Begriff Antikörper sowohl monoclonale als auch polyclonale Antikörper sowie Fragmente davon verstanden, solange diese spezifisch SLPI, SLPI-haltige Komplexe, zum Beispiel SLPI-Elastase-1-Komplexe, oder SLPI-Fragmente erkennen und binden. In bevorzugter Ausführung binden die Antikörper oder Fragmente davon keine anderen Antigene. Selbstverständlich können die Antikörper oder Fragmente modifiziert sein, zum Beispiel mit anderen

WO 02/057785

PCT/EP01/14511

- 12 -

Molekülen oder Teilen davon konjugiert, assoziiert oder kovalent oder nicht-kovalent gebunden sein, zum Beispiel mit Farbmarkierungen, radioaktiven Markierungen, messbare Reaktionen auslösenden Enzymen, wie Phosphatasen, Peroxidasen, Enzymsubstraten, fluoreszierenden Substanzen, chemiluminiszenten Substanzen, cytotoxischen Agentien, Spacern, Trägerstoffen oder ähnliches. Die markierten, konjugierten oder nicht-modifizierten Antikörper können in löslicher oder immobilisierter Form, zum Beispiel auf Trägermatrices oder Kügelchen, vorliegen. Zum Beispiel können die enzymmarkierten Antikörper in einem zweiten Enzymamplifikationssystem eingesetzt werden.

15 Erfindungsgemäß wird in bevorzugter Ausführung unter dem Einsatz immunologischer Mittel das Inkontaktbringen einer Probe, das heißt von Serum oder Stuhl, insbesondere homogenisierten Stuhls, mit einem immunologischen Agens verstanden, umfassend wenigstens einen Antikörper, der spezifisch das Antigen, also SLPI, erkennt.

Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung von Antikörpern gegen SLPI zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung von SLPI im Stuhl oder Serum eines menschlichen oder tierischen Körpers. Erfindungsgemäß ist es so möglich, unter Verwendung des Antikörpers gegen SLPI gastrointestinale Erkrankungen spezifisch in Serum und Pankreas-  
25 karzinom oder chronische Pankreatitis im Stuhl  
30 nachzuweisen.

WO 02/057785

PCT/EP01/14511

- 13 -

Die erfindungsgemäßen Verfahren unter Einsatz immunologischer Mittel können bevorzugt als Sandwich-ELISA, indirekter oder kompetitiver ELISA ausgeführt sein, wobei besonders bevorzugt HTP-Verfahren (high through put) eingesetzt werden.

Im Rahmen eines erfindungsgemäßen Sandwich-ELISAs ist die Bereitstellung mindestens zwei verschiedener monoclonaler Antikörper nötig, die vorzugsweise gegen unterschiedliche Epitope, alternativ aber auch gleiche Epitope, von SLPI gerichtet sind. Die mindestens zwei Antikörper können in homogenen oder heterogenen System zum Beispiel löslich und/oder geträgert vorliegen.

Erfindungsgemäß ist es selbstverständlich auch möglich, die immunologischen Mittel als System aus drei unterschiedlichen Antikörpern auszuführen, wobei einer der Antikörper in heterogener Phase vorliegt und die beiden anderen Antikörper löslich sind. Einer der beiden löslichen Antikörper ist markiert, während der andere unmarkiert ist. Der lösliche Antikörper ist in dieser Ausführungsform gegen den nicht markierten Antikörper gerichtet.

Erfindungsgemäß durchgeführte Verfahren unter Einsatz immunologischer Mittel erfordern in besonders bevorzugter Ausführungsform also die Inkubation des Serums oder, bevorzugt homogenisierten und gegebenenfalls verdünnten, Stuhls mit mindestens zwei verschiedenen Antikörpern, die spezifisch für SLPI sind. In bevorzugter Ausführungsform ist einer der beiden Antikörper an eine Festphase gebunden, wobei dies in üblicher Weise geschieht. Der weitere Anti-

WO 02/057785

PCT/EP01/14511

- 14 -

körper liegt vorteilhafterweise in löslicher Form vor und trägt in bevorzugter Ausführungsform eine Markierung. Werden erfindungsgemäß weitere Antikörper verwendet, so trägt in bevorzugter Ausführungsform nur einer von diesen eine Markierung.

5  
10  
15  
20  
25

Erfindungsgemäß ist in einer Ausführungsform vorgesehen, dass entweder ein unspezifisch mit SLPI bindefähiger Antikörper oder besonders bevorzugt ein spezifisch mit SLPI bindefähiger Antikörper an eine feste Phase gebunden wird. Dieser an die Festphase gebundene Antikörper wird anschließend mit dem Serum oder dem Stuhl und, gegebenenfalls nach einem Waschschritt, einem zweiten Antikörper inkubiert, der spezifisch mit SLPI bindefähig ist, in einer löslichen Form vorliegt und eine Markierung trägt. Sofern der an die Festphase gebundene Antikörper ein unspezifisch mit SLPI bindefähiger Antikörper ist, binden an der Festphase nicht nur SLPI, sondern auch andere Antigene. Der zweite Antikörper, der jedoch spezifisch mit SLPI bindet, reagiert nun spezifisch nur mit SLPI beziehungsweise dem Komplex aus SLPI und erstem Antikörper, so dass nur SLPI-Moleküle spezifisch einen markierten Antikörper tragen und so nach Trennung der festen von der flüssigen Phase quantifiziert werden können.

30

Erfindungsgemäß kann also beispielsweise auch vorgesehen sein, im Rahmen eines Sandwich-ELISAs einen nicht markierten SLPI-spezifischen ersten Antikörper zum Beispiel an einen Träger zu binden, die Testlösung beziehungsweise -suspension hinzuzugeben, wobei das in der Testlösung oder -suspension vorhandene SLPI von dem ersten Antikörper gebunden

wird. Anschließend wird eine zweiter markierter Antikörper gegen SLPI hinzugegeben, der spezifisch mit SLPI oder dem Komplex aus SLPI und erstem Antikörper reagiert. Mittels der Markierung des zweiten Antikörpers kann unter Einsatz einer Eichlösung die Menge an SLPI bestimmt werden.

Wird an die Festphase ein an SLPI spezifisch bindender erster Antikörper fixiert, so wird an der Festphase auch nur SLPI spezifisch gebunden. Bei der Inkubation mit dem zweiten löslichen Antikörper reagiert auch dieser ausschließlich mit SLPI. Nach Trennung der festen von der flüssigen Phase kann über die Markierung des zweiten Antikörpers eine genaue Quantifizierung von SLPI vorgenommen werden.

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sieht die Erfindung auch vor, dass eine Mikrotiterplatte mit einem ersten spezifisch oder unspezifisch an SLPI bindenden Antikörper überzogen wird, dass anschließend das Serum oder der Stuhl mit der beschichteten Mikrotiterplatte in Kontakt gebracht und, nach Abwaschen ungebundener Bestandteile, ein markierter, zum Beispiel Biotin-markierter, zweiter Antikörper gegen SLPI zu der Mikrotiterplatte gegeben wird, wobei die Mikrotiterplatte unter Bedingungen inkubiert wird, dass der zweite Antikörper an SLPI binden kann. Anschließend wird die feste von der flüssigen Phase getrennt und entweder die Markierung direkt nachgewiesen oder, bei Verwendung eines enzymmarkierten zweiten Antikörpers, ein Substrat hinzugegeben, und die Umsetzung des Substrates quantitativ bestimmt. So kann vorgesehen sein, dass der mit Biotin markierte zweite Antikörper in

WO 02/057785

PCT/EP01/14511

- 16 -

einer nächsten Inkubation mit einem Konjugat von Peroxidase (POD) und Streptavidin reagiert. Die Peroxidase ist in der Lage, das Substrat ABTS (2, 2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)Di-amoniumsalz) zu oxidieren. Oxidiertes ABTS kann anschließend photometrisch bestimmt werden.

In einer erfindungsgemäß besonders bevorzugten Ausführungsform wird der erste Antikörper an einer Trägermatrix, zum Beispiel einer Vlies-, Gewebs- oder Membranstruktur, derart gebunden, dass er nicht wie üblicherweise den Boden der Vertiefung einer ELISA-Immunplatte darstellt, sondern direkt in die Matrix eingebunden ist. Bevorzugte Matrixes sind Hohlfaser-Membranen oder mikroporöse Flachmembranen, die in einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung auch mit Ionenaustauschergruppen versehen sein können.

Polyclonale Antikörper lassen sich herstellen, indem Tiere mit isolierter und vollständig gereinigtem SLPI oder Fragmenten davon immunisiert werden und so Antiseren mit polyclonalen Antikörpern in an sich bekannter Weise erhalten werden. Monoclonale Antikörper werden nach an sich bekannten Methoden hergestellt. Die erfindungsgemäß eingesetzten Antikörper gegen SLPI können im Handel erhältliche Antikörper sein.

Die erfindungsgemäß nachweisbaren gastrischen Läsionen können Symptome einer Gastritis oder eines Ulcus darstellen. Die erfindungsgemäß nachweisbaren entzündlichen Erkrankungen können beispielsweise auf eine Helicobacter pylori-Infektion zurückzuführen

ren oder Symptome von Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa sein.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass bei dem Nachweis von SLPI im Serum oder Stuhl des Patienten gleichzeitig auch die Elastase 1-Konzentration nachgewiesen wird. Die menschliche pankreatische Elastase-1 übersteht die Passage durch den Darm unbeschadet und kann im Stuhl als Protein quantifiziert werden. Die Elastase-1-Konzentration im Stuhl spiegelt die exokrine Pankreasfunktion wieder. Werte größer 200 µg Elastase/pro Gramm Stuhl weisen auf eine normale exokrine Pankreasfunktion und Werte kleiner 200 µg Elastase/pro Gramm Stuhl weisen auf eine exokrine Pankreasinsuffizienz hin. Bei einer akuten Pankreatitis wird in der akuten Entzündungsphase Elastase-1 in das Serum abgegeben, so dass eine Quantifizierung der Elastase im Serum die Diagnose oder den Ausschluss dieser Krankheit erlaubt. Eine hohe Konzentration an Elastase-1 im Serum deutet daher auf eine Pankreatitis hin.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele und der dazugehörigen Figuren näher erläutert.

Die Figuren zeigen:

Figur 1 ein Histogramm zur SLPI-Konzentration im Stuhl,

WO 02/057785

PCT/EP01/14511

- 18 -

Figur 2 ein Histogramm zur Elastase-1-Konzentration im Stuhl und

Figur 3 und 4 jeweils ein Histogramm zur SLPI-Konzentration im Serum.

#### 5 Beispiel 1

Nachweis von SLPI im Stuhl von Patienten mit chronischer Pankreatitis

Von 42 Patienten ohne chronische Pankreatitis, 6 Patienten mit Pankreaskarzinom und 19 Patienten mit chronischer Pankreatitis wurden jeweils 100 mg Stuhl gewonnen, abgewogen und mit Extraktionspuffer (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2, mit Detergenz und Natriumazid) extrahiert und verdünnt.

15 Die Extraktion wird durchgeführt, indem die Stuhlprobensuspension bei Raumtemperatur mehrfach kräftig mit einem Reagenzglasschüttelgerät gemixt wird. Die Stühle müssen gut homogenisiert sein, um eine vollständige Extraktion zu gewährleisten. Nach mindestens fünf Minuten Extraktion wird noch einmal abschließend gemixt. Nach Absetzen der Partikel  
20 werden die Stuhlprobenextrakte wie folgt verdünnt.

Die Verdünnung der Probenextrakte erfolgte zur Messung von SLPI in einer Verdünnung von 1:100 und zur vergleichenden Messung von Elastase-1 mit einer  
25 Verdünnung von 1:500.

Die SLPI-Konzentrationen im Stuhl wurden mittels eines SLPI-ELISAs (Quantikine®, Kat. Nr. DP 100,

WO 02/057785

PCT/EP01/14511

- 19 -

6/99) der Firma R&D Systems (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland) bestimmt.

Dieser ELISA setzt eine 96 Vertiefungen umfassende Polystyrolmikrotiterplatte ein, die mit monoclonalen gegen menschliches SLPI gerichteten Antikörper aus der Maus beschichtet ist. Nach Pipettieren des Extraktes in die Vertiefungen wird SLPI durch den immobilisierten monoclonalen Antikörper gebunden. Nach Abwaschen ungebundener Substanzen wird ein mit einem Enzym verbundener polyclonaler Antikörper, der spezifisch für menschliches SLPI ist, in die Vertiefungen gegeben (polyclonaler Antikörper gegen menschliches SLPI, verbunden mit Meerrettich-Peroxidase). Nach Abwaschen ungebundener Antikörper-Enzymreagenzien wird eine Substratlösung in die Vertiefungen gegeben und die Farbentwicklung als Maß für gebundenes SLPI gemessen.

Die Konzentration an pankreatitischer Elastase-1 wurde mittels eines Elastase-1-ELISAs der Firma ScheBo-Tech® (Giessen, Deutschland, Kat. Nr. 07, April 2000, EP 0 547 059 B1) bestimmt.

Es ergaben sich folgende in den Figuren 1 und 2 dargestellte Resultate:

Die Figur 1 zeigt die SLPI-Konzentrationen im Stuhl der Patienten (SLPI in Picogramm pro Gramm Stuhl), aufgetragen für die Patientengruppe ohne chronische Pankreatitis, die Patientengruppe mit Pankreaskarzinom und die Patientengruppe mit chronischer Pankreatitis. Es zeigt sich deutlich, dass die Mitglieder der Kontrollgruppe kein beziehungsweise nur

WO 02/057785

PCT/EP01/14511

-20-

sehr wenig SLPI im Stuhl haben, während die beiden Patientengruppen mit chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinom erheblich erhöhte SLPI-Konzentrationen im Stuhl aufweisen.

- 5 Die Figur 2 zeigt die an den gleichen Patientengruppen durchgeführten Konzentrationsmessungen von Elastase-1. Die gesunde Kontrollgruppe weist einen deutlich über 200 µg/g Stuhl liegenden Elastasegehalt auf, während die beiden Patientengruppen mit  
10 chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinom signifikant reduzierte Elastase-1-Konzentrationen im Stuhl aufweisen.

Beispiel 2

Beispiel 2a

- 15 Nachweis von SLPI im Serum von Patienten mit beziehungsweise ohne eine Magenerkrankung.

Von 17 Patienten mit normalem Magenbefund (oB) und 33 Patienten mit einem Magen- oder Dünndarmgeschwür (Ulcus ventriculi oder Ulcus duodeni) wurde jeweils  
20 5 ml Blut gewonnen und durch Zentrifugieren bei 3000 rpm, RT, 10 Minuten Serum gewonnen.

Die Verdünnung der Serumproben erfolgte zur Messung von SLPI in einer Verdünnung von 1:100.

- 25 Die SLPI-Konzentrationen im Serum wurden mittels SLPI-ELISAs (Quantikine®, Kat. Nr. DP 100, 6/99) der Firma R&D Systems (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland) bestimmt. Der ELISA wurde wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

WO 02/057785

PCT/EP01/14511

-21-

Die Figur 3 zeigt die SLPI-Konzentration in ng/ml in der Kontrollgruppe und der Patienten.

Resultate:

Die Patientengruppe zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere SLPI-Serumkonzentrationen.

Beispiel 2b

Von 17 Patienten mit normalem Magenbefund (Kontrollen), 16 Patienten mit chronischer Gastritis und 18 Patienten mit Geschwürsleiden wurde jeweils 5 ml Blut gewonnen und durch Zentrifugieren bei 3000 rpm, RT, 10 Min. Serum gewonnen.

Die Verdünnung der Serumproben erfolgte zur Messung von SLPI in einer Verdünnung 1:100.

Die SLPI-Konzentrationen im Serum wurden mittels SLPI-ELISAs (Quantkine®, Kat. Nr. DP 100, 6/99) der Firma R&D Systems (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland) bestimmt.

Der ELISA wurde wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

Sowohl Patienten mit einer chronischen Gastritis als auch Patienten mit Geschwürsleiden (Ulcus ventriculi oder Ulcus duodeni) hatten eine signifikant erhöhte SLPI-Konzentration im Serum.

Die Figur 4 zeigt die SLPI-Konzentrationen in ng/ml im Serum von Patienten mit normalem Magenbefund,

WO 02/057785

PCT/EP01/14511

-22-

Patienten mit chronischer Gastritis und Patienten mit Geschwürsleiden (Ulcus). Die Figur zeigt deutlich, dass die gesunde Kontrollgruppe eine erheblich geringere SLPI-Konzentration im Serum aufweist als sowohl die Patientengruppe mit chronischer Gastritis als auch die mit Ulcus-Leiden.

Resultate:

SLPI-Serumkonzentrationen sind auch als Marker für gastrointestinale Läsionen geeignet.

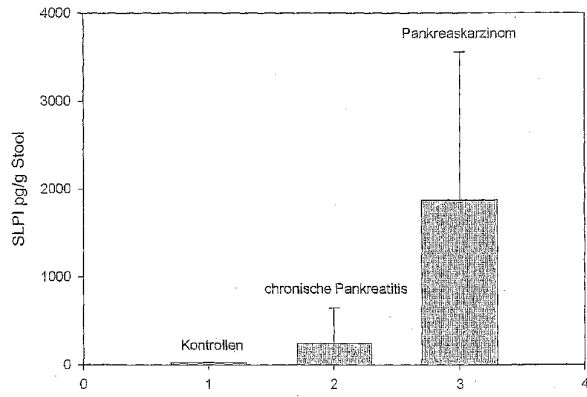
10

**Ansprüche**

1. Verfahren zum Nachweis einer Krankheit eines  
5 menschlichen oder tierischen Körpers ausgewählt aus  
der Gruppe bestehend aus Pankreaskarzinom, chroni-  
scher Pankreatitis, gastrischer Läsion und entzünd-  
licher Darmerkrankung, wobei Serum oder Stuhl des  
Körpers gewonnen und in diesem vorhandenes SLPI  
10 (sekretorischer Leukocyten-Protease-Inhibitor), ein  
Fragment oder ein Komplex davon durch Inkon-  
taktbringen mit immunologischen Mitteln nachgewie-  
sen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Stuhl vor  
15 Inkontaktbringen mit den immunologischen Mitteln  
homogenisiert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die im-  
munologischen Mittel Antikörper, insbesondere mar-  
kierte Antikörper, gegen SLPI, Fragmente oder Kom-  
20 plexe davon sind.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die SLPI-  
Antikörperreaktion mittels eines ELISA-Tests nach-  
gewiesen wird.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprü-  
25 che, wobei die gastrische Läsion auf eine Gastritis  
oder einen Ulcus zurückzuführen ist.

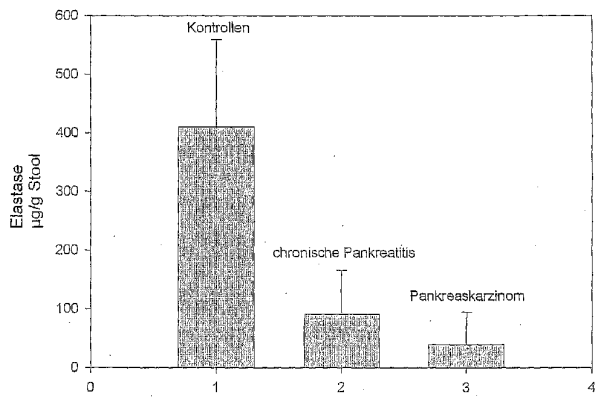
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die entzündliche Darmerkrankung Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa ist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei im Serum oder Stuhl des Körpers neben der SLPI-Antikörperreaktion auch die Elastase 1-Konzentration nachgewiesen wird.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Antikörper monoclonale Antikörper sind.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Komplex ein SLPI-Elastase-1-Komplex ist.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Fragment von SLPI der N-terminale Bereich von SLPI mit den Aminosäureresten 1 bis 54 ist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Fragment von SLPI der C-terminale Teil von SLPI mit den Aminosäureresten 55 bis 107 ist.
12. Verwendung von gegen SLPI-Fragmenten oder Komplexen davon gerichteten Antikörpern zum Nachweis einer Krankheit eines menschlichen oder tierischen Körpers in Stuhl oder Serum des menschlichen oder tierischen Körpers, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Pankreaskarzinom, chronischer Pankreatitis, gastrischer Läsion und entzündlicher Darmerkrankung.

SLPI Konzentrationen im Stuhl



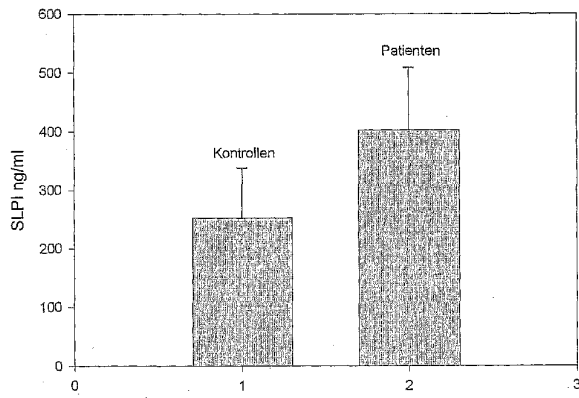
Figur 1

Elastase-1 Konzentrationen im Stuhl



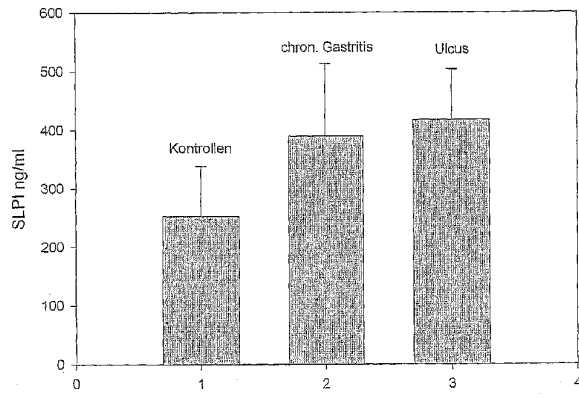
Figur 2

SLPI Serumkonzentrationen



Figur 3

SLPI Serumkonzentrationen



Figur 4.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/14511
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/574  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> 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) BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NYSTROM M ET AL: "The elimination of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) from the gastrointestinal tract in man." SCANDINAVIAN JOURNAL OF CLINICAL AND LABORATORY INVESTIGATION, vol. 57, no. 2, 1997, pages 119-125, XP002200455 ISSN: 0036-5513 page 124, left-hand column, paragraph 3 --- -/--	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input 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 *B* earlier document but published on or after the international filing date *C* 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) *D* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *E* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *F* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention *G* 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 *H* 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. *I* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 May 2002		Date of mailing of the international search report 19/06/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentean 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Cuendet, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 01/14511

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AMESHIMA SHINGO ET AL: "Increased secretory leukoprotease inhibitor in patients with nonsmall cell lung carcinoma." CANCER, vol. 89, no. 7, 1 October 2000 (2000-10-01), pages 1448-1456, XP002200456 ISSN: 0008-543X page 1448 page 1455, left-hand column	1-12
P,A	STOCKLEY R A ET AL: "Assessment of airway neutrophils by sputum colour: Correlation with airways inflammation." THORAX, vol. 56, no. 5, May 2001 (2001-05), pages 366-372, XP002200457 ISSN: 0040-6376 the whole document	1-12

<b>INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT</b>		Nr. .... Joneses Aktenzeichen PCT/EP 01/14511
<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 7 G01N33/574		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Fischerchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N		
Fischerchiete 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) BIOSIS		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Behr. Anspruchs Nr.
Y	NYSTROM M ET AL: "The elimination of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) from the gastrointestinal tract in man." SCANDINAVIAN JOURNAL OF CLINICAL AND LABORATORY INVESTIGATION, Bd. 57, Nr. 2, 1997, Seiten 119-125, XP002200455 ISSN: 0036-5513 Seite 124, linke Spalte, Absatz 3 --- -/-	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*B* Altens Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelsfrei erschließen 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)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahme bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindereischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindereischer 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</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 29. Mai 2002		Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts 19/06/2002
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2340, Tx. 31 051 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beamteter Cuendet, P

2

Formblatt PCT/ISA210 (Blatt 2) (Juli 1992)

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internationales Aktenzeichen  
 PCT/EP 01/14511

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bet. Anspruch Nr.
Y	AMESHIMA SHINGO ET AL: "Increased secretory leukoprotease inhibitor in patients with nonsmall cell lung carcinoma." CANCER, Bd. 89, Nr. 7, 1. Oktober 2000 (2000-10-01), Seiten 1448-1456, XP002200456 ISSN: 0008-543X Seite 1448 Seite 1455, linke Spalte	1-12
P,A	STOCKLEY R A ET AL: "Assessment of airway neutrophils by sputum colour: Correlation with airways inflammation." THORAX, Bd. 56, Nr. 5, Mai 2001 (2001-05), Seiten 366-372, XP002200457 ISSN: 0040-6376 das ganze Dokument	1-12

专利名称(译)	检测胰腺和胃肠疾病的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004524522A</a>	公开(公告)日	2004-08-12
申请号	JP2002558015	申请日	2001-12-11
[标]申请(专利权)人(译)	六VO-高科技生物医疗技术门EM为主硬		
申请(专利权)人(译)	Vivotekku生物医学技术有限公司		
[标]发明人	ニリウスマンフレッド		
发明人	ニリウス,マンフレッド		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/573 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/57438 G01N33/573 G01N33/6893 G01N2333/811 G01N2800/06 G01N2800/065 G01N2800/067		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/573.Z G01N33/577.B		
优先权	10101792 2001-01-17 DE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及使用抗体检测血清和粪便的胃和胰腺疾病的方法。

