

(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2006-527983

(P2006-527983A)

(43) 公表日 平成18年12月14日(2006.12.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	C12N 15/00 A	4H045
GO1N 33/574 (2006.01)	GO1N 33/53 D	
CO7K 16/18 (2006.01)	GO1N 33/574 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-517202 (P2006-517202)
 (86) (22) 出願日 平成16年6月10日 (2004.6.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年2月17日 (2006.2.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/018187
 (87) 国際公開番号 W02004/112570
 (87) 国際公開日 平成16年12月29日 (2004.12.29)
 (31) 優先権主張番号 10/463,867
 (32) 優先日 平成15年6月18日 (2003.6.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502224951
 エール ユニヴァーシティ
 アメリカ合衆国, コネチカット州,
 ニュー ヘヴン, トゥー ホイット
 ニー アヴェニュー (番地なし)
 (74) 代理人 100094318
 弁理士 山田 行一
 (74) 代理人 100123995
 弁理士 野田 雅一
 (72) 発明者 アルティエリ, ダリオ, シー,
 アメリカ合衆国, コネチカット州, ニ
 ユー ヘヴン, トゥー ウィットニー ア
 ベニュー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌患者の生体液中のサバイピンの検出

(57) 【要約】

本発明は、患者の生体液中のサバイピンの存在を検出することを含む、癌の診断および再発癌の予測のための方法を包含する。本発明は、またサバイピンポリペプチドまたはサバイピン核酸を検出する1つまたは複数の試薬と、検査のために生体液を採集するための容器とを備えるキットをも提供する。

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
サバイピンの有無について患者からの生体液試料をアッセイすることを含む、患者における癌の再発を予測する方法であって、前記患者が癌の治療によって寛解期にあって、前記試料中のサバイピンの存在が前記患者に癌が再発することを示す、方法。
- 【請求項 2】
前記患者が 1 カ月未満前に前記癌の治療を完了した、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 3】
前記癌の治療が、化学療法、放射線療法、免疫療法、免疫毒素療法および外科療法からなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。 10
- 【請求項 4】
前記癌の治療が、BCG を膀胱内に投与することを含む免疫療法である、請求項 3 に記載の方法。
- 【請求項 5】
前記癌の治療が、マイトマイシン C を膀胱内に投与することを含む化学療法である、請求項 4 に記載の方法。
- 【請求項 6】
前記生体液が尿または血清である、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 7】
前記癌が泌尿生殖器に浸潤する任意の癌である、請求項 1 に記載の方法。 20
- 【請求項 8】
前記泌尿生殖器癌が膀胱癌または前立腺癌である、請求項 7 に記載の方法。
- 【請求項 9】
前記膀胱癌が移行上皮癌である、請求項 8 に記載の方法。
- 【請求項 10】
サバイピンが、サバイピンと結合する抗体、サバイピン結合パートナー、およびサバイピンをコードする核酸にハイブリダイズする核酸からなる群から選択される試薬を用いて検出される、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 11】
前記試薬が標識でタグ付けされている、請求項 10 に記載の方法。 30
- 【請求項 12】
前記標識が、放射性標識、蛍光標識、酵素、または化学発光タグである、請求項 11 に記載の方法。
- 【請求項 13】
サバイピンがイムノアッセイにより検出される、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 14】
前記イムノアッセイが酵素免疫吸着測定法またはラジオイムノアッセイである、請求項 13 に記載の方法。
- 【請求項 15】
前記イムノアッセイが、イムノプロット法、免疫拡散法、免疫電気泳動法、または免疫沈降法を含む、請求項 13 に記載の方法。 40
- 【請求項 16】
サバイピンがドットプロット法により検出される、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 17】
ドットプロット法が Bio-Dot SF モジュールを使用することを含む、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 18】
サバイピンが核酸ハイブリダイゼーションにより検出される、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 19】
前記核酸ハイブリダイゼーションが RT-PCR またはノーザンプロット分析である、 50

請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

患者から生体液を採集するための容器と、前記生体液中のサバイピンの存在を検出する試薬とを備える、癌の再発を予測するためのキットであって、前記患者が癌の治療によって寛解期にある、キット。

【請求項 21】

前記試薬がサバイピンと結合する抗体、サバイピン結合パートナー、およびサバイピンをコードする核酸にハイブリダイズする核酸からなる群から選択される、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 22】

前記試薬が標識でタグ付けされている、請求項 21 に記載のキット。

10

【請求項 23】

前記標識が、放射性標識、蛍光標識、酵素、または化学発光タグである、請求項 21 に記載のキット。

【請求項 24】

前記試薬が水性媒体中に、または凍結乾燥の形態でパッケージされている、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 25】

サバイピンの存在を分析するための手段をさらに備える、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 26】

前記癌が膀胱癌または前立腺癌である、請求項 20 に記載のキット。

20

【請求項 27】

前記生体液が尿または血清である、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 28】

患者からの生体液試料中のサバイピンの量を定量することを含む、患者における再発癌のステージまたはグレードを決定する方法であって、前記患者が癌の治療によって寛解期にある、方法。

【請求項 29】

前記癌のグレードを決定するために前記試料中のサバイピンの量と対照試料中のサバイピンの量とを比較することをさらに含む、請求項 28 に記載の方法。

30

【請求項 30】

CISステージの癌を有する患者からの生体液試料中のサバイピンの量が、非浸潤癌ステージの癌を有する患者からの生体液試料中のサバイピンの量よりも多い、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

癌のグレードを決定するために患者からの生体液試料中のサバイピンの量を定量することを含む、患者における再発癌をモニタリングする方法。

【請求項 32】

CISステージの癌を有する患者からの生体液試料中のサバイピンの量が、非浸潤癌ステージの癌を有する患者からの生体液試料中のサバイピンの量よりも多い、請求項 31 に記載の方法。

40

【請求項 33】

前記生体液が前立腺液、精液、全血、血清、尿、乳房生検液、胃腸液および腔液からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 34】

前記癌がサバイピンを発現する任意の癌である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 35】

前記癌が、神経芽細胞腫、乳癌、肺癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、泌尿生殖器癌、前立腺癌、腎臓癌および膀胱癌からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 36】

50

前記癌が前記患者において1年以内に再発する、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0001】

[0001]本出願は、2003年6月18日に出願した米国出願第10/463867号の優先権を主張する。本出願は、2002年1月11日に出願した米国出願第10/042302号および2001年1月12日に出願した米国仮出願第60/260898号に関連し、これら出願の両方は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれている。

【0002】

[0002]本出願は、またその全体が参照により本明細書に組み込まれている1997年1月20日に出願した米国出願第08/975080号、現在の米国特許第6245523号にも関連する。

【技術分野】

【0003】

[0003]本発明は、患者の生体液中のサバイピンの存在を検出することを含む、癌を診断およびモニタリングし、癌の再発を予測する方法に関する。特に、本方法は、患者の尿試料中のサバイピンの存在を検出することを含む、膀胱癌の診断に関する。さらに、本発明は、患者の生体液中のサバイピンを検出する試薬と生体液を採集するための容器とを含む、癌を診断するためのキットに関する。

【背景技術】

【0004】

[0004]癌は、周囲の組織に浸潤する傾向があり新しい身体部位に転移する悪性新生物を指す。癌は、除去を試みた後も再発するおそれがあり、適切に治療を行った場合を除き、患者の死亡を引き起こすおそれがある。癌の正確な原因は未知であるが、喫煙または発癌物質への曝露のようなある種の行動とある種の癌および腫瘍の罹患率との関連が、多くの研究者によって明らかにされている。

【0005】

[0005]原発部位から遠隔器官への癌の蔓延、すなわち転移は、依然として大部分の癌患者の主な死亡原因である。長年の研究にもかかわらず、その過程に関与する遺伝メカニズムの大部分は、依然と特定されていない。この疾患の進行が不確定であることを考慮すれば、そのような情報は癌の予後に特に重要である。現行の腫瘍グレーディング法を用いて癌の予後を常に正確に評価できるわけではないことから、癌患者の治療の成功を阻む最大の障害の1つは、相変わらず、信頼できる予後マーカーの欠如である。

【0006】

(膀胱癌)

[0006]膀胱癌は、通常膀胱の内表面を覆う尿路上皮細胞(移行細胞)から生じる悪性腫瘍増殖である。米国において膀胱の尿路上皮癌、すなわち膀胱癌は、男性で4番目に多く、女性で8番目に多い癌であり、毎年54000例を超える新しい症例と11200例の死亡の原因となっている。膀胱癌の再発は最大80%の患者で起こり、そのような再発は筋肉への浸潤および播種性疾患を伴うことが多く、寛解の長期継続への手強い障害となっている(Dawsonら、ABC of Urology: Urological Malignancies - II: Urothelial Tumors. BMJ、1996、312:1090~94)。

【0007】

[0007]膀胱癌の発現には多数のファクターが寄与している可能性がある。喫煙および芳香族アミン(-ナフチルアミン、キセニルアミン、4-ニトロピフェニル、ベンジジン)と呼ばれるある種類の有機化学物質への職業曝露は、十分に確立したリスクファクターである。高用量の人工甘味料サッカリンと膀胱移行上皮癌との間に関連がありうることを示唆する研究もある。子宮頸癌の治療のために放射線療法を受けた女性では膀胱移行上皮

10

20

30

40

50

癌を発生するリスクが増加していると示した研究もある。さらに、化学療法薬であるシクロホスファミド (C y t o x a n) を投与された者は、高い膀胱癌発現リスクを示した。

【0008】

[0008]膀胱癌で最もよくみられる臨床症状は、血尿である。しかし、血尿が間欠性であるためか、または尿路感染もしくは抗凝固剤の使用のような他の原因によるものとされるため、膀胱癌の診断が遅れることが多い。排尿中の移行細胞の細胞診が膀胱癌を診断するために従来から使用されている。尿細胞診が陽性であれば、尿路上皮の移行上皮癌がほぼ確実に存在する。しかし、移行細胞の細胞学的観察では、膀胱癌を有する患者の最大半数は陰性のおそれがある。したがって、細胞学的結果が陰性であっても膀胱癌の存在は排除されない (B a d a l a m e n t ら、C a n c e r、1987、59(12): 2078; C o h e n ら、U r o l o g i c C l i n i c s o f N o r t h A m e r i c a、1992、19(3): 421)。

10

【0009】

[0009]さらなる診断の煩雑さとして、一旦膀胱癌の最初の診断がされれば移行上皮癌について尿路全体を評価しなければならない。それは、移行細胞が腎臓レベルに始まり、腎盂、尿管、膀胱および尿道の大部分を含む尿路の内表面を覆っているからである。腎臓の腎盂および尿管は経静脈性腎盂造影 (I V P) または逆行性腎盂造影で最もうまく評価される。I V P は、造影剤の静脈内注射を必要とし、その造影剤はその後腎臓によつて過されて血液から尿に入る。この過程で撮影された単純X線像は尿路を示す。通常、逆行性腎盂造影は経静脈造影剤にアレルギーを有するか、またはI V Pでの造影が悪い患者のために確保されている。逆行性腎盂造影は膀胱鏡検査の時点で実施される。

20

【0010】

[0010]膀胱内部を調べるためにライト付き器具の使用を必要とする膀胱鏡検査は、膀胱癌と確実に診断するために利用される苦痛のある処置である。膀胱鏡による逆行性腎盂造影の実施にあたっては、尿管に小さなプラスチック製チューブを挿入し、造影剤を尿管および腎臓に注入する。膀胱鏡検査は、超音波、コンピューター断層撮影法、または磁気共鳴画像法のような他の診断モダリティによって見落とされるおそれのある小さな微妙な異常を同定できる。このように、診察室で行う膀胱鏡検査は初期評価に欠かせない部分であり、この時点で他の検査に置き換えることはできない。今日、診療室で行う大部分の膀胱鏡検査は軟性鏡で実施される。硬性膀胱鏡検査に比べて、軟性内視鏡検査の方は苦痛が少

30

【0011】

[0011]膀胱癌を診断するために生検も実施できる。生検は、診断を確認または確立するか、予後を予測するか、または疾患の経過を追うために、膀胱のような器官から生組織の小さな試料を切り取り、顕微鏡で観察するものである。しかし、生検は侵襲性の処置であるため望ましくなく、また時々人体に麻酔を施す必要がある。また、任意の侵襲性処置と同様に、生検を受ける個体は感染のリスクを冒す。さらに、膀胱癌が存在するかどうかを決定するために膀胱全体を生検することはできない。

【0012】

(膀胱癌のステージング)

[0012]膀胱癌は、その侵襲性および周囲の膀胱組織とどの程度異なるか(分化)に基づいて分類される。医師は膀胱癌を診断するときに膀胱癌のステージングおよびグレーディングを行う。

40

【0013】

[0013]腫瘍のステージングにはいくつかの異なる方法がある。膀胱癌のための最も一般に使用される2つのステージング方式は、A B C D方式 (J e w e t t - S t r o n g - M a r s h a l l 方式) およびT N M方式である。A B C D方式は、より古く、膀胱癌の別個の相または期を分類するためにA - B - C - D分類を使用している。この方式は、以下の尺度を基本的に使用している。0: 上皮内癌(腫瘍は膀胱粘膜(内表面)に限定される)、A: 腫瘍は粘膜を通過して伸展しているが粘膜下組織を超えては伸展していない、

50

B：腫瘍は筋肉に浸潤している、C：腫瘍は脂肪内に浸潤している、D：癌は所属リンパ節または遠隔部位に蔓延している。各アルファベットの後に、例えばA1、B2などのように数字が続く。TNM方式では、膀胱をT、リンパ節をN、遠隔への蔓延をMで記述する。各アルファベットの後に記述数字、T2aN0M0が続く。例えば、Taは非浸潤性乳頭状癌を、Tisは上皮内癌を、T1は上皮結合組織に浸潤している腫瘍を表す。

【0014】

[0014]膀胱癌は、前立腺、子宮、膣、尿管および直腸を含む近隣の器官に伸展することによって残りの身体に蔓延する。転移は骨盤リンパ節を介して起こり、次に腫瘍は肝臓、肺および骨に蔓延する。

【0015】

(膀胱癌のグレーディング)

[0015]膀胱癌は、病理学者によって生検からグレーディングされる。癌のグレードは、癌がどれほど速く増殖し、どれほど侵襲性でありうるかに関する情報を提供する。高グレードの癌は、低グレードの癌よりも速く増殖し、早期に蔓延する。現行のグレーディング方式は、3つの異なるグレード、すなわち高分化型、中分化型および低分化型(またはグレードI、II、もしくはIII)のみを使用している。病理学者の中にはI、II、IIIおよびIVの4段階のグレーディング方式を使用する者もいる。どちらの方式も許容でき、病理学者はII/IIIまたはII/IVと癌を表すことによって何段階を使用しているかを常に書き留めるものである。分母または2番目の数は、使用した方式を述べている。高分化型の腫瘍は、癌が正常な膀胱組織に類似しており、よって普通は迅速に増殖または蔓延しないことを意味する。低分化型腫瘍は、癌が正常な膀胱に類似しておらず、普通は迅速に増殖して他の組織に早期に蔓延することを意味する。中分化型腫瘍はこれら

10

20

【0016】

[0016]グレードは重要であるが、ステージよりも治療法の決定に関係しない。グレードおよびステージが分かった後で、今後の治療について任意の決定を下す前に他の要因も働き始める。

【0017】

(前立腺癌)

[0017]前立腺癌は、前立腺内の悪性腫瘍増殖である。前立腺癌は、全ての年齢の男性で癌による死亡原因のうち3番目多い原因であり、75歳を超える男性では癌による死亡の最大の原因である。前立腺癌は、年齢40歳未満の男性にはまれにしかみられない。

30

【0018】

[0018]原因は未知であるが、一部の研究は前立腺癌と食事からの高い脂肪摂取およびテストステロンレベルの増加との間の関係を示した。良性前立腺肥大症(BPH)との関連性は知られていない。

【0019】

[0019]前立腺癌は、膀胱癌のようにその侵襲性および周囲の前立腺組織と異なる程度に基づいて分類またはステージングされる。大部分の前立腺癌は、A-B-C-Dステージング方式またはTNM方式を用いてステージングされる。前立腺癌についてA-B-C-D方式は、以下の尺度を用いて腫瘍を基本的に類別する。A：触知可能(感触可能)ではないが生検の顕微鏡観察で検出できる腫瘍、B：前立腺に限定して触知可能な腫瘍、C：遠隔転移を有さない、前立腺を超えた腫瘍の伸展、およびD：癌が所属リンパ節に蔓延。一方TNM方式は、前立腺(T)、リンパ節(N)、および転移性疾患(遠隔蔓延)の証拠(M)を別々に記述する。前立腺癌は、精囊、膀胱および腹腔に伸展することによって蔓延する。前立腺癌は、一般的にリンパ節、骨、肺、肝臓および腎臓に転移する。

40

【0020】

[0020]今日、前立腺癌は、通常ミネソタ大学の病理学者に因んで命名されたグリーソングレード体系を用いて悪性分類される。この体系は、前立腺内での異なるパターンの侵襲性を探し、次に1~5の2つのスコアを付けることを含む。これら2つのスコアを足して

50

2 ~ 10の範囲となる総グリーソンスコアを得る。スコアが高いほど腫瘍の侵襲性は大きいであろう。例えば、典型的なグリーソングレードされた癌は、グリーソン4 + 3 = 7、またはグリーソン2 + 2 = 4のように記載されうる。

【0021】

(サバイピン)

[0021]アポトーシス(プログラム細胞死)阻害因子の脱調節された発現は、細胞の生存を異常に伸ばし、突然変異の蓄積に有利に働き、治療に対する耐性を促進することによって癌に寄与すると考えられる(Reed、J. Clin. Oncol.、1999、17 : 2941 ~ 53)。最近、サバイピンは癌における細胞の死/生存バランスの新規な調節因子として同定された(Ambrosiniら、Nat. Med.、1997、3 : 917 ~ 21)。サバイピンは、アポトーシス阻害因子(IAP)遺伝子ファミリーの一員である(Deverauxら、Genes Dev.、1999、13 : 239 ~ 52)。

10

【0022】

[0022]サバイピンは、1つの部分的に保存されたBIR(バキュロウイルスIAPリピーター)ドメインと、RINGフィンガーの代わりに高度に荷電したカルボキシ末端のコイルドコイル領域とを含む16.5kDaの細胞質タンパク質であり、B細胞前駆細胞に形質転換と、増殖因子(IL-3)の除去によって誘導されるアポトーシスを阻害する(Ambrosiniら、Nat. Med. 1997、3 : 917 ~ 921)。配列が一般的に保存されていること、カルボキシ末端のRINGフィンガーが存在しないこと、および1つの部分的に保存されたBIRDドメインが存在することに基づけば、サバイピンはIAPファミリーの最も遠縁の一員であり、NAIP(神経細胞アポトーシス抑制タンパク; Royら、Cell, 1995, 80 : 167 ~ 178)と最大の類似性を共有している。さらに、他のIAPタンパク質とは異なり、サバイピンは正常な成体組織で検出できないが、*in vivo*で肺癌、結腸癌、乳癌、膵臓癌および前立腺癌のようなよくみられるヒトの癌(Ambrosiniら、Nat. Med.、1997、3 : 917 ~ 21; Velculescuら、Nat. Genet.、1999、23 : 387 ~ 88)、ならびに高悪性度非ホジキンリンパ腫の~50%において発現する上位から4番目の転写産物となる。尿路上皮癌におけるアポトーシスの脱調節という予想された役割(Gazzanigaら、Int. J. Cancer、1996、69 : 100 ~ 04; Laraら、Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.、1999、43 : 1015 ~ 19)に一致して、サバイピンは膀胱癌の78%にみられるが、正常尿路上皮にはみられず、その発現は再発の促進と関連した(Swanaら、N. Engl. J. Med.、1999、341 : 452 ~ 53)。サバイピンが正常組織ではなく癌に過剰発現すること(Ambrosiniら、Nat. Med.、1997、3 : 917 ~ 21; Velculescuら、Nat. Genet.、1999、23 : 387 ~ 88)、およびサバイピンが多様な悪性疾患において好ましくない予測/予後の意味をもつことから(Adidaら、Lancet、1998、351 : 882 ~ 83; Islamら、Oncogene、2000、19 : 617 ~ 23; Tanakaら、Clin. Cancer Res.、2000、6 : 127 ~ 34; Monzoら、J. Clin. Oncol.、1999、17 : 2100 ~ 04; Kawasakiら、Cancer Res.、1998、58 : 5071 ~ 74)、サバイピンは癌における有用な分子マーカーとなりうる。これは、治療に対する応答をモニタリングし追跡プロトコルを単純化するための簡単で非侵襲的な診断手段が必要に迫られている膀胱癌に特に該当する(Steinら、J. Urol.、1998、160 : 645 ~ 59; Ozen、Curr. Opin. Oncol.、1998、10 : 273 ~ 78)。尿細胞診は「ゴールドスタンダード」(Brown FM、Urol. Clin. North Am.、2000、27 : 25 ~ 37)とされているものの、膀胱癌では低い感度(30 ~ 40%)しか有さず、表在性の低グレードの病変を検出できない。したがって、本出願の発明者らは、膀胱癌の診断および膀胱癌の再発の予測のための癌の検出、特に尿サバイピンの検出のための新しい分子マーカーと

20

30

40

50

して体液中サバイピンの潜在的適切性について研究した。

【発明の開示】

【0023】

[0023]本発明は、患者における癌を診断し癌の再発を予測する方法を提供し、その方法は、サバイピンの有無について患者からの生体液試料をアッセイすることを含む。ここで、試料中にサバイピンが存在することは患者が癌を有することを示す。好ましい実施形態において、生体液は前立腺液、精液、全血、血清、尿、乳房生検液、胃腸液および膣液からなる群から選択され、癌は肺癌、結腸癌、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、泌尿生殖器癌、非ホジキンリンパ腫および神経芽細胞腫からなる群から選択される初発癌または再発癌である。より好ましくは、生体液は尿または血清であり、癌は膀胱癌または前立腺癌である。最も好ましくは、生体液は尿であり、癌は膀胱癌である。

10

【0024】

[0024]本発明の一実施形態において、本発明は、癌の治療により寛解期にある患者における癌の再発を予測する方法を提供する。癌の治療は、化学療法、放射線療法、免疫療法、免疫毒素療法および外科療法を含むが、それらに限定されない。好ましくは、治療はBCGを投与することを含む免疫療法またはマイトマイシンCを投与することを含む化学療法である。より好ましくは、癌は膀胱癌である。

【0025】

[0025]別の実施形態において、本発明は、1カ月未満前に癌の治療を完了した患者における癌の再発を予測する方法を提供する。さらに、その患者において癌は1年以内に再発するであろう。

20

【0026】

[0026]一態様において、本発明は、患者の生体液中のサバイピン量を定量することによって癌のグレードを決定する方法を含み、ここで、高レベルのサバイピンは癌が高グレードであることを示す。さらに、本発明は癌のステージを決定するため本方法の使用を含み、ここで、CISステージの癌は非浸潤性乳頭状癌ステージの癌よりも高レベルのサバイピンを有する。

【0027】

[0027]別の態様において、本発明は、患者における癌をモニタリングする、好ましくは癌の再発をモニタリングする方法を含み、その方法は、患者の生体液中のサバイピン量を定量することを含む。さらに、本発明は、患者の生体液中のサバイピン量を検出または定量することによって患者の予後を決定することを意図している。場合によっては、サバイピンの存在は予後不良を示す。サバイピンの定量は、試料中のサバイピンの相対レベルを測定することを含む。それは、サバイピンの有無の検出をも含む。

30

【0028】

[0028]好ましくは、サバイピンは、サバイピンに結合するかまたはサバイピンをコードする核酸にハイブリダイズする試薬を用いて検出される。最も好ましくは、試薬はサバイピンと結合する抗体、サバイピン結合断片、およびサバイピンをコードする核酸にハイブリダイズする核酸からなる群から選択され、試薬は標識でタグ付けされている。標識は放射性標識、蛍光標識、酵素、化学発光タグ、または比色タグでありうる。

40

【0029】

[0029]本発明の一態様において、サバイピンはイムノアッセイによって検出される。好ましくは、イムノアッセイは酵素免疫吸着測定法またはラジオイムノアッセイであり、イムノアッセイは免疫プロット法、免疫拡散法、免疫電気泳動法、または免疫沈降法を含む。より好ましくは、サバイピンはドットプロット法により検出され、最も好ましくはBio-Dot法およびBio-Dot SFモジュールを使用することによって検出される。

【0030】

[0030]本発明の別の態様において、サバイピンは核酸ハイブリダイゼーションによって検出される。

50

【0031】

【0031】好ましい実施形態において、核酸ハイブリダイゼーションはRT-PCRまたはノーザンブロット分析である。核酸ハイブリダイゼーションに使用される試薬は、放射性標識、蛍光標識、酵素、化学発光タグ、または比色タグで標識されている。

【0032】

【0032】本発明は、患者における癌もしくは再発癌を診断のための、予後のための、またはモニタリングするためのキットをも提供し、そのキットは、患者から生体液を採集するための容器と、生体液中のサバイピンの存在を検出する1つまたは複数の試薬とを備える。キット中の試薬は標識でタグ付けできる。あるいは、試薬をタグ付けするために他の構成要素をキットに含めることができる。本発明は、患者における癌を診断およびモニタリングし、癌の予後を決定するための他の構成要素を備えるキットをも意図している。一実施形態において、キットの構成要素は水性媒体中に、または凍結乾燥の形態でパッケージされる。

10

【0033】

(発明の詳細な説明)

I. 概説

【0038】本発明は、癌、特に膀胱癌を検出するための、または癌の再発を予測するための安全で、信頼でき、非侵襲性のスクリーニング戦略を開発する必要性に基づく。疾患の単一の予測/予後マーカーが依然として同定しにくい(Steinら、J. Urol. 1998、160:645~59)。癌、特に膀胱移行上皮癌の診断およびスクリーニングのための、および癌の活性をモニタリングし膀胱癌を有する個体の予後を決定するためのマーカーの同定および方法の開発は、癌の治療に有用であろう。

20

【0034】

【0039】本発明は、癌を有する患者の尿または他の体液中のアポトーシス阻害因子サバイピンを同定するための、抗体または他のプローブに基づく簡単な検査を提供する。

【0035】

【0040】本発明は部分的に、新たに診断されたか、または再発性膀胱癌を有する全ての患者の尿中に尿サバイピンがみられるが、正常志願者または他の泌尿器癌を有する患者にはみられず、非腫瘍性泌尿生殖器障害を有する患者ではまれにしかみられないという発見に基づく。本発明はまた部分的に、尿サバイピンについて検査で陽性となった血尿を有する患者3人のうち1人は膀胱癌についての細胞診で陽性となり、もう1人はサバイピン検出から6カ月以内に膀胱癌と診断されたという発見に基づく。さらに本発明は、膀胱癌を治療され膀胱鏡検査上の寛解を達成している患者が尿サバイピン陰性であるという発見に基づく。

30

【0036】

【0041】本発明はまた部分的に、膀胱癌および前立腺癌を有する患者の血清からサバイピンが検出されるという発見に基づく。

【0037】

【0042】さらに本発明は部分的に、サバイピンに対するポリクローナル抗体を利用したドットブロット法を用いて、腫瘍のステージまたはグレードにかかわらず初発または再発の移行上皮癌(TCC)を有する被験者の尿からサバイピタンパク質が検出されたという発見に基づく。サバイピンの検出は、対照に比べて初発または再発TCCの診断を有する被験者に対して感度100%および特異性95%を有した。TCCを有する被験者からの尿中細胞は、サバイピンmRNAおよびサバイピタンパク質を示した。カルメットゲラン菌(BCG)またはマイトマイシンCの膀胱内注入を受けたTCC被験者における尿サバイピンの存在は、再発と関連する。したがって、体液中のサバイピンの存在は癌の再発の予測に有用である。尿サバイピンの検出は、TCCの治療転帰を評価するための迅速で非侵襲性の検査を提供する。

40

【0038】

II. 具体的な実施形態

50

1. 移行上皮癌 (TCC) と治療

[0043]腎盂および尿管のTCCは、尿を採集する腎臓における組織(腎盂)および/または腎臓と膀胱をつなぐ管(尿管)に悪性細胞がみられる疾患である。腎盂および尿管の内側を覆う細胞は移行細胞と呼ばれる。TCCで侵されるのはこれらの細胞である。

【0039】

[0044]表在性膀胱癌は、膀胱内表面または粘膜に限られる。浸潤癌は粘膜を通過して筋肉に伸展する癌として定義される。表在性腫瘍は、最初の発現時に大部分のTCC症例に存在する。

【0040】

[0045]TCCは、最も一般的な膀胱癌であり、西半球で診断される膀胱癌の95%に相当する。膀胱癌の70~80%は尿路上皮に限定される低グレードの非侵襲性腫瘍であるが、被験者の最大70%に再発が起こる。この高い再発率は適切な追跡診断および治療に課題をつきつける。転移または再発性移行上皮癌を有するどの患者の予後も不良である。再発の妥当な管理は、再発部位、以前の治療の程度、および個別の患者の留意事項に依存する。

【0041】

[0046]外科療法は腎盂および尿管のTCCで最もよくみられる治療である。腎尿管切除術と呼ばれる手術で腎臓、尿管および膀胱上部が除去されうる。切除によって尿管および腎臓の一部が除去されうる。膀胱内療法が利用できるようになる前は、根治的膀胱全摘術(膀胱全体の摘出)が再発表在性膀胱癌、特に上皮内癌(CIS)の治療に最も通常の治療であった。

【0042】

[0047]腫瘍が腎盂または尿管の表面に存在するならば、電流を用いた電気外科療法で腫瘍を焼いて除去できるし、また強い光のナロービームを用いたレーザー療法でそれを除去できる。

【0043】

[0048]化学療法を用いてもTCCを治療できる。「化学療法」は、化学物質を用いた疾患の治療を指す。本明細書において使用するように、化学療法は癌を有する個体への抗腫瘍化学物質の適用を指す。薬物が血流に入り、体内を移動して体内くまなく癌細胞を殺滅するため、化学療法は全身治療である。化学療法を尿管または腎盂に直接投入することもできる(尿管内または腎盂内化学療法)。

【0044】

[0049]膀胱の転移性移行上皮癌または再発性移行上皮癌を有する患者において、併用化学療法は、高い反応率、ときには完全な反応性を実現した(Stembergら、1989、Cancer 64:2448~2458; Harkerら、1985、Journal of Clinical Oncology 3:1463~1470)。ランダム化試験で、進行膀胱癌の治療へのメトトレキサート、ピンブラスチン、ドキシソルピシンおよびシスプラチンの組み合わせ(MVAC)をシスプラチンの単剤と比較した結果は、反応率および生存期間の中央値の両方でMVACが有意な利点を示した。この組み合わせ群の試験におけるMVACの全体反応率は39%であった(Loehrerら、1992、Journal of Clinical Oncology、10:1066~1073)。

【0045】

[0050]転移性移行上皮癌に活性を示した他の化学療法剤には、パクリタキセル、イホスファミド、硝酸ガリウムおよびゲムシタピンがある(Rothら、1995、Seminars in Oncology 22(3) Suppl. 6:1~5; Witteら、1997、Journal of Clinical Oncology 15:589~593; Einhornら、1994、Journal of Clinical Oncology 12(11):2271~2276; Polleraら、1994、Annals of Oncology 5(2):182~184、1994)。マイト

10

20

30

40

50

マイシンC (Mutamycin (登録商標))も膀胱癌を治療するために使用されている。他の組み合わせ剤には、パクリタキセルとシスプラチン、ゲムシタピンとシスプラチン、シスプラチンと組み合わせるか、または組み合わせないゲムシタピンとパクリタキセルがある (H. Von der Mause, 2002, Seminars in Oncology, 29 (1, Suppl. 3): 3~14)。

【0046】

[0051]放射線療法もTCCを有する患者を治療するために使用される。放射線療法は、癌細胞を殺滅し腫瘍を萎縮させるために高エネルギーX線の使用を伴う。体外の機械(体外光線照射療法)、または癌細胞が見出された領域に細いプラスチックチューブによって放射線を発生する物質(放射性同位体)を置くこと(内部照射療法)によって放射線が発生しうる。体外光線照射療法は、任意の異常細胞を破壊し腫瘍の増殖または再増殖を防止するために、癌が見出された部位の端に高焦点放射線光線を照射するために使用される。近接照射療法は、腫瘍または腫瘍近辺のどちらかに放射線源を配置することを伴う放射線療法の1種である。近接照射療法では、放射線源から放射線が外部に放射され、短距離に限られる。このように、腫瘍に達するために放射線が正常組織を通過する必要のある体外光線照射療法とは異なり、近接照射療法はずっと局所的であるため、正常組織への被曝が少ない一方で、体外光線照射療法に比べて高い線量が可能である。

10

【0047】

[0052]一般に、癌患者を放射線のみで治療しうる。例えば、前立腺癌はこのように治療されることが多い。しかし、上部尿路TCCを有する患者では、放射線療法は大抵患者の治療の単なる一部である。放射線療法および/または化学療法、ならびに外科療法でTCC患者を治療しうる。実際に、手術前に患者を放射線療法および/または化学療法で治療することが、そうでない場合に必要である手術よりも、過激でない手術を患者に施すことを可能にする。例えば膀胱癌患者の中には、単一の治療よりも、放射線療法、化学療法および外科療法で治療される場合、膀胱を保存することができる。

20

【0048】

[0053]TCCの他の治療法には、免疫療法(生物学的療法)および免疫毒素療法がある。免疫療法は、癌と闘うために患者の免疫系を採用する。免疫療法は、疾患に対する患者の自然防御をブースト(boost)し、方向付けし(direct)、または回復させる(restore)ために、患者自身の体によって作られたか、または実験室で作られた物質を使用する。免疫療法に使用される薬物は、体を刺激して癌に生物学的または自然に応答させるため、ときに「生物応答調節剤」(BRM)と呼ばれる。免疫療法は局所または全身性でありうるし、標的をもつか、または非特異性でありうる。

30

【0049】

[0054]局所免疫療法は体の一部分を治療することを伴う。TCCを治療するための局所免疫療法の例は、カルメットゲラン菌(BCG)の膀胱内注入である。

【0050】

[0055]全身免疫療法は全身の治療を指す。全身免疫療法は局所免疫療法よりも一般的であり、蔓延した可能性のある癌を治療するために使用できる。非特異的免疫治療手段は、癌細胞と闘うのにより有効となるように一般的に免疫系をブーストするために与えられる治療を指す。標的免疫療法は、癌細胞に狙いを定め、可能ならば正常細胞をそのままに保つ免疫療法を指す。標的免疫療法の例には癌ワクチンおよびモノクローナル抗体があるが、それに限定されない。

40

【0051】

[0056]癌ワクチンは研究室で抗体を作りそれを患者に与えるよりも、むしろ患者の体を刺激して患者自身の免疫応答を発生させることを伴う。体内のT細胞が癌細胞と反応し、癌細胞を殺滅することが発見された。T細胞ワクチンの接種は、進行癌の治療に有用でありうる。

【0052】

[0057]モノクローナル抗体は、癌細胞が体の免疫防御によって殺滅されるように癌細胞

50

をマークするために使われるか、または癌細胞を殺滅する抗癌薬または放射性物質を連結させるために使用される。例えば免疫毒素は、モノクローナル抗体に連結したタンパク質毒素を含むハイブリッド分子である。これを、化学カップリング剤または組換え手段を用いて実施できる。組換えDNA法の手法を用いて毒素の結合ドメインをモノクローナル抗体のFc部分と交換することによって免疫毒素を製造できる。組換え免疫毒素は化学カップリングによって作製された免疫毒素よりも均質である。

【0053】

[0058]上に解説したように、TCCおよび膀胱癌の再発率は高い。したがって、定期的に患者をモニタリングする必要がある。現行のモニタリングは侵襲的な方法である膀胱鏡検査および尿細胞診によって行われる。したがって、膀胱癌の再発を検出するための非侵襲的で高感度の方法を開発する関心が存在する。 10

【0054】

[0059]本発明は、寛解期にあるまたは治療を完了した患者における腫瘍の再発を予測、検出およびモニタリングする簡単、非侵襲性および高感度の方法を提供する。好ましくは、本発明は膀胱癌または前立腺癌の再発を予測、検出および/またはモニタリングするために使用される。より好ましくは、本発明はTCCの再発を検出するために使用される。

【0055】

2. BCGおよびマイトマイシンを用いた膀胱内治療

[0060]BCGは、結核に対するワクチンとして使われてきたウシ型結核菌の弱毒株である。BCGは、1976年にはじめて膀胱癌を治療するために使用された。BCGは宿主防御メカニズムの強力な刺激因子であり、免疫適応能をもつ宿主に腫瘍の退縮を誘導できる。BCGの反復注入は、膀胱内で非特異的免疫反応を生じ、その反応は内表面の細胞、特に速やかに分裂中の癌細胞を剥落させることができる。BCGは、普通は手術において表在性膀胱腫瘍が除去された後で与えられる。BCGは膀胱に留置したカテーテルチューブを介して膀胱内に投与され、一定期間にわたり反復投与される。BCGは、表在性膀胱癌および上皮内癌(CIS)の有効な膀胱内治療として浮上した(Alexandroffら、Lancet、1999、353:1689)。膀胱癌におけるBCGの効果は単に局所性であり、BCGと接触しない領域の腫瘍の発現には防止効果がない。 20

【0056】

[0061]マイトマイシンCは、ストレプトミセスケスピトス(*Streptomyces caespitosus*)から単離された抗腫瘍抗生物質である。マイトマイシンCの臨床試験は1960年代後半に米国で始まる。In vivoでマイトマイシンCは活性化してDNAに結合する二官能性および三官能性アルキル化剤になる。DNAとマイトマイシンCとの結合によってDNAが架橋し、DNAの合成および機能の阻害に至る。膀胱癌の治療に膀胱内投与した場合、マイトマイシンCは膀胱癌の治療に、特に生存率に関してBCGと同等である。 30

【0057】

[0062]本研究において、治療前のサバイビンレベルは、寛解に達した被験者に比べ治療後にTCCが再発した被験者の方が高い。サバイビンレベルは治療中に数倍に増加し、再発する被験者で最高のサバイビンレベルが測定される。治療後のサバイビンの中央値は寛解に達する被験者ではゼロであり、TCCが再発する被験者では尿1ml当たりサバイビン約1.0ngである。 40

【0058】

[0063]治療完了の1カ月後に尿サバイビンが存在することは、感度約100%、特異性約78%でTCCの再発を予測する。1年後ではTCCの再発を予測する特異性は約92%に増加する。治療後のサバイビンレベルが尿1ml当たりサバイビン0.1ngであった被験者14人中12人において約1年間にTCCは再発しなかった。治療完了の1カ月後にサバイビン陽性であるが寛解期の患者4人中3人は、1年以内にTCCが再発した。膀胱内注入の完了後に尿サバイビンを有する被験者は、TCCが再発する高い可能性を有する。 50

【 0 0 5 9 】

3 . 生体液

【0064】本明細書に使用する「患者の生体液」という用語は、生きた生物からの液体を指す。この用語は、生きた生物の体内にみられる「体液」を包含する。

【 0 0 6 0 】

【0065】本発明は、サバイピンの存在についての生体液のスクリーニングに試薬を使用することを含む。これによって患者から回収された生体液の *in vitro* 血清学的評価は、癌の非侵襲的診断を可能にする。例えば、前立腺液、精液、全血、血清、尿、乳房生検液、胃腸液および腔液のようなヒト体液を患者から採取し、ラジオイムノアッセイもしくは酵素免疫吸着測定法、競合的酵素免疫吸着測定法、ドットプロット、ウエスタンプロット、ノーザンプロット、PCR、または当技術分野で公知の他のアッセイによってサバイピンを検出できる試薬を用いてサバイピンの存在についてアッセイできる。

10

【 0 0 6 1 】

【0066】一実施形態において、患者からの血清を採集して膀胱癌または前立腺癌の診断のためにサバイピンの存在を検出する。

【 0 0 6 2 】

【0067】別の実施形態において、患者からの尿試料を採集して膀胱癌の診断のためにサバイピンの存在を検出する。被験尿試料を検査のかなり前に採集して処理まで凍結してもよい。尿試料を分析まで凍結する予定であれば、試料を採集して氷冷することが好ましい。好ましくは、氷冷した試料を約2時間の時間以内に遠心分離して細胞の破片を沈殿させてからろ過し、次にろ液を -20°C 、より好ましくは -80°C で急速凍結する。分析直前に 37°C の温水浴に入れて凍結試料を迅速に溶かすべきである。新鮮尿試料も、採集して最適な遠心分離およびろ過の直後に使用できる。より好ましくは、 -80°C で凍らせるまで全尿を氷冷する。4 で解凍後、尿を4 で遠心分離し、サバイピンについてアッセイする。

20

【 0 0 6 3 】

4 . サバイピンを検出する試薬

【0068】患者の生体液中のサバイピンを検出できる試薬は、サバイピンと、またはサバイピンをコードする核酸と相互作用する試薬である。そのような試薬の例には、サバイピンと結合するサバイピン抗体またはその断片、p34^{cdc2}-サイクリンB1キナーゼのようなサバイピン結合パートナー、およびサバイピンをコードする核酸にハイブリダイズする核酸があるが、それに限定されない。

30

【 0 0 6 4 】

サバイピン抗体

【0069】サバイピン抗体は、当業者によって調製され使用されてきた。Luら (Cancer Res.、1998、58(9)：1808~12) は、胃癌の免疫組織化学分析のために、組換え製造されたサバイピン/グルタチオンS-トランスフェラーゼ融合タンパク質からのマウスモノクローナルサバイピン抗体の調製について教示している。Grossmanら (J. Invest. Dermatol.、1999、113：1076~81) は、ヒト転移性悪性黒色腫細胞系におけるサバイピンを検出するためのウサギポリクローナル抗体の使用を開示している。(その全体が参照により本明細書に組み込まれているWO98/22589も参照のこと)。

40

【 0 0 6 5 】

【0070】当技術分野で周知であり記載されている標準的な免疫学的方法を用いて抗体を作製するために、サバイピンまたはサバイピンペプチドを使用できる (Practical Immunology、Butt編、Marchel Dekker、ニューヨーク、1984)。簡潔には、例えば宿主細胞における組換えDNAの発現によって生成された、単離したサバイピンまたはサバイピンペプチドが、異種宿主において抗体を作製するために使用される。好ましい抗体は、サバイピタンパク質のエピトープに特異的に結合する抗体であり、好ましくはそのエピトープに対して約 10^5 M^{-1} を超える結合親和性を

50

有し、最も好ましくは約 10^7 M^{-1} を超える親和性を有する。例えば、ヒトサバイピンタンパク質に対する抗体が望ましい場合、適当な抗体発生宿主は、マウス、ヤギ、ウサギ、モルモット、または抗体の発生に有用な他の哺乳動物である。サバイピンタンパク質またはペプチドを、宿主における抗体産生を増強できる適当なアジュバントと組み合わせ、例えば腹腔内投与により宿主に注射する。宿主の免疫応答の刺激に適した任意のアジュバントを使用できる。一般に好ましいアジュバントはフロイントの完全アジュバント（例えば Calbiochem Corp.、サンディエゴ、または Gibco、グランドアイランド、ニューヨーク州からの乾燥死菌細胞を含むエマルジョン）である。多数回の抗原注射が望ましい場合、その後の注射は不完全アジュバントと組み合わせた抗原（例えば無細胞エマルジョン）を含む。

10

【0066】

[0071]好ましい実施形態において、生体液中のサバイピンの存在を検出する開示された方法は、サバイピンに特異的に結合する抗体を用いて実施される。当技術分野で公知の方法によってサバイピンに特異的に結合するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を調製できる。抗体には、Huseら (Science, 1989, 246: 1275 ~ 1281; Campbell, 「Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas」Burdon.ら編、Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 1985, 第13巻、Elsevier Science Publishers、アムステルダムも参照のこと)の方法により調製された組換えポリクローナルまたはモノクローナルFab断片がある。

20

【0067】

[0072]上述のように、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を調製するための方法は、当業者に周知である。簡潔には、ウサギ、マウス、ラット、またはヤギのような宿主哺乳動物に、サバイピンタンパク質またはサバイピンペプチドもしくは断片を注射することによってポリクローナル抗体を製造できる。哺乳動物からの血清を抽出しスクリーニングして、ペプチドまたはペプチド断片に特異的なポリクローナル抗体を得る。

【0068】

[0073]抗体を発生させるためのサバイピンのタンパク質、ペプチド、または断片は、天然供給源からのサバイピンの単離によって、組換え手段によって、または合成手段によって、得ることができる。

30

【0069】

[0074]モノクローナル抗体を製造するために、宿主哺乳動物にサバイピンタンパク質またはペプチドを接種し、次にブーストする。接種を受けた哺乳動物から、最終ブーストの数日後に脾臓を採集する。KohlerおよびMilstein (Nature, 1975, 256: 495 ~ 497)によって記載された一般法に従って、脾臓の細胞懸濁液を腫瘍細胞と融合させる。有用であるためには、ペプチド断片は検出されるサバイピン分子のエピトープを規定するのに十分なアミノ酸残基を含まなければならない。

【0070】

[0075]断片が免疫原性であるには短すぎる場合、断片を担体分子とコンジュゲートさせてもよい。適当な担体分子の中にはキーホールリンペットヘモシアニンおよびウシ血清アルブミンがある。当技術分野で公知である方法によってコンジュゲーションを実施できる。そのような1つの方法は、断片のシステイン残基を担体分子のシステイン残基と結合させることである。当技術分野で公知の方法によってペプチド断片を合成できる。適当な方法のいくつかはStuartおよびYoung「Solid Phase Peptide Synthesis」、第2版、Pierce Chemical Company (1984)に記載されている。

40

【0071】

[0076]抗体または断片の精製は、硫酸アンモニウムもしくは硫酸ナトリウムによる沈殿

50

後に生理食塩水による透析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティもしくはイムノアフィニティクロマトグラフィー、およびゲルろ過、ゾーン電気泳動法などを含む当業者に公知の多様な方法によって達成できる (Goding 「Monoclonal Antibodies: Principles and Practice」第2版、104~126頁、オランダ、フロリダ州、Academic Press)。癌患者の液体中、好ましくは膀胱癌患者の尿中のサバイピンの検出のために、精製された抗体、または抗体の、例えばFv、F(ab')₂、Fab断片 (HarlowおよびLane、1988、Antibody Cold Spring Harbor)を含むサバイピン結合領域の少なくとも一部を有する精製された断片を使用することが好ましい。

【0072】

[0077]癌の検出および/またはモニタリングに使用するために、ならびに癌の再発を予測するために、精製抗体をレポーターグループとして働く化合物に直接またはリンカーを介して共有結合させ、サバイピンの存在を検出可能にできる。酵素、色素、放射性の金属および非金属同位体、蛍光発生化合物、蛍光化合物などを含むがそれに限定されない多様な異なる種類の物質がレポーターグループとして働くことができる。検出、モニタリングに有用な本発明の抗体(またはその断片)の抗体コンジュゲートを調製するための方法は、米国特許第4671958号、第4741900号および第4867973号に記載されている。

【0073】

[0078]本発明の一態様において、好ましい結合エピトープを公知のサバイピン遺伝子配列およびそれがコードするアミノ酸配列から同定して、高結合親和性を有するサバイピン抗体を発生させるのに使用できる。また、サバイピンの結合エピトープの同定を好ましい抗体の設計および構築に使用できる。例えば、サバイピンの好ましいエピトープをコードするDNAを組換え発現させ、そのエピトープに選択的に結合する抗体を選択するのに使用できる。次に、サバイピンの特異的結合エピトープに対する抗体の特異的結合を可能にするのに十分な条件で、選択された抗体を試料に曝露し、形成した複合体の量を検出する。特異的抗体による方法論は十分に理解され、文献に記載されている。これら抗体の調製のさらに詳細な記載は、例えばPractical Immunology、Butt W. R編、Marcel Dekker、ニューヨーク、1984から見出すことができる。

【0074】

[0079]本発明は、サバイピン抗体の検出をも意図している。サバイピンは癌特異的マーカーである。このように、患者の生体液中のサバイピン抗体の検出は癌の診断を可能にする。

【0075】

サバイピンの結合パートナー

[0080]生体液中のサバイピンの存在を検出するためにサバイピンと結合する他の分子も使用できる。サバイピン抗体以外のサバイピンの結合パートナーの例には、p34^{cdc}²-サイクリンB1キナーゼおよびカスパーゼ9があるが、それに限定されない。(その全体が参照により本明細書に組み込まれているWO01/64741を参照のこと)。

【0076】

核酸

[0081]サバイピンをコードする核酸にハイブリダイズする、天然核酸、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび合成オリゴヌクレオチドを含む核酸は、癌患者の生体液中の、好ましくは膀胱癌患者の尿中のサバイピンの存在を検出するための試薬として有用である。Ambrosiniら (Nat Med、1997、3:917~921)は、サバイピン遺伝子のクローニングについて開示している。本発明に有用な試薬である核酸およびオリゴヌクレオチドには、Ambrosiniら (Nat Med、1997、3:917~921)によって単離されたサバイピン遺伝子に対応するものがあるが、それに限定されない。本発明は、癌患者の生体液中の、好ましくは膀胱癌患者の

10

20

30

40

50

尿中のサバイピン発現を検出するための試薬として使用するための、サバイピンのコード配列およびその相補的配列に対応する核酸配列と、コード配列からさらに上流または下流に存在するサバイピン転写配列（例えば5'および3'非翻訳領域に含まれるか、5'および3'非翻訳領域にまで延伸する配列）に相補的な配列との使用を含む。

【0077】

[0082]生体液中のサバイピンの存在を検出するための好ましいオリゴヌクレオチドは、サバイピンをコードするcDNA配列の少なくとも一部に相補的なオリゴヌクレオチドである。これらの相補的配列は、「アンチセンス」配列としても当該技術分野で知られている。これらのオリゴヌクレオチドは、オリゴリボヌクレオチドまたはオリゴデオキシリボヌクレオチドでありうる。さらに、オリゴヌクレオチドは生物学的に重要なヌクレオチド、すなわちA（アデニン）、dA（デオキシアデニン）、G（グアニン）、dG（デオキシグアニン）、C（シトシン）、dC（デオキシシトシン）、T（チミン）およびU（ウラシル）からなる天然オリゴマー、またはヌクレオチド間ホスホジエステル結合におけるリン酸性酸素を例えばメチル基もしくは硫黄原子によって置換した修飾オリゴヌクレオチド種でありうる。さらに、これらのヌクレオチド自体および/またはリボース部分は修飾されうる。

10

【0078】

[0083]当該技術分野で十分に記載された任意の公知のオリゴヌクレオチド化学合成法を用いてオリゴヌクレオチドを化学合成できる。例えば、市販の任意の核酸自動合成装置を使用することによってオリゴヌクレオチドを調製する。あるいは、例えば非コード鎖の転写を誘導することのような標準的な組換えDNA法によってオリゴヌクレオチドを創作できる。サバイピンをコードするDNA配列は、組換えDNA系において逆方向となってもよく、例えば非コード鎖が転写されるように適当なプロモーター下流に逆方向に挿入できる。

20

【0079】

[0084]サバイピンをコードする核酸にハイブリダイズさせるために、任意の長さのオリゴヌクレオチドを利用できるが、一般的に8~100ヌクレオチドの範囲のオリゴヌクレオチドが好ましい。尿試料中のサバイピンの検出に使用するための好ましいオリゴヌクレオチドの大部分は、15~50ヌクレオチドの範囲のオリゴヌクレオチドである。

【0080】

[0085]化学合成されたものであれ組換えDNA法によって合成されたものであれ、サバイピン核酸にハイブリダイズさせるために選択されたオリゴヌクレオチドを、次に標準法を用いて単離および精製し、それから好ましくは標準標識プロトコルを用いて（例えば³ Sまたは³² Pで）標識する。

30

【0081】

[0086]本発明は、生体液中のサバイピンの発現を検出するための、定性、半定量または非定量的であるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）へのオリゴヌクレオチド対の使用も含む。オリゴヌクレオチド対は、サバイピンプライマーおよびサバイピン逆プライマーからなる。好ましいオリゴヌクレオチド対は、配列番号1および配列番号2である。より好ましくは、オリゴヌクレオチド対は配列番号3および配列番号4である。

40

【0082】

5. 検出法

タンパク質結合アッセイ

[0087]当業者に認識されているであろうように、癌患者の生体液中のサバイピンタンパク質を特異的に同定および/または定量するための任意の手段が意図される。試料中のサバイピンタンパク質を検出するための現行の好ましい手段は、マーカータンパク質と特異的に相互作用できる結合タンパク質による。好ましくは、標識抗体、標識抗体の結合部分、または他のサバイピン結合パートナーを使用できる。抗体は、起源がモノクローナルまたはポリクローナルでありえ、また生物合成的に製造されうる。サバイピン結合パートナーも、天然分子または合成製造されたものでありうる。複合サバイピンタンパク質の量、

50

例えば結合タンパク質と会合したサバイピンタンパク質の量を、当技術分野で記載された標準的なタンパク質検出法を用いて決定する。他のアッセイでは、量を定量することなくサバイピンの存在を検出する。免疫学的アッセイの設計、理論およびプロトコルの詳細な総説を、Practical Immunology、Butt, W. R編、Marcel Dekker、ニューヨーク、1984を含む当技術分野の多数の出典から見出すことができる。

【0083】

[0088]標識抗体でタンパク質を検出するために多様なアッセイを利用できる。一段階アッセイでは、サバイピン分子が(もしも存在するならば)、それを固定化し標識抗体と共にインキュベートする。標識抗体は固定化標的分子と結合する。洗浄して未結合の分子を除いた後で標識の存在について試料をアッセイする。

10

【0084】

[0089]二段階アッセイでは、固定化サバイピン分子を未標識抗体と共にインキュベートする。サバイピン-未標識抗体複合体が(存在するならば)、次に未標識抗体に特異的な標識した二次抗体に結合させる。試料を洗浄して標識の存在についてアッセイする。

【0085】

[0090]抗体の標識に使用するマーカーの選択は、アプリケーションにより様々であろう。しかし、マーカーの選択は当業者によって容易に決定できる。腫瘍の存在を検出するため、イムノアッセイおよび組織学的アプリケーションにこれらの標識抗体を使用できる。標識抗体はポリクローナルまたはモノクローナルでありうる。好ましい実施形態において、抗体はウサギポリクローナル抗体である。

20

【0086】

[0091]放射性原子、酵素、発色もしくは蛍光部分(moiety)、または比色タグで抗体を標識できる。タグ付け用の標識の選択は、所望の検出限界にも依存するであろう。酵素アッセイ(ELISA)は、一般的に酵素タグを付けた複合体と酵素基質との相互作用によって形成した呈色生成物の検出を可能にする。放射性原子のいくつかの例には³²P、¹²⁵I、³Hおよび¹⁴Pがある。酵素のいくつかの例にはホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼおよびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼがある。発色部分のいくつかの例には、フルオレセインおよびロダミンがある。当技術分野で公知の方法によって抗体をこれらの標識にコンジュゲートできる。例えば、ジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミドなどのようなカップリング剤によって酵素および発色分子を抗体にコンジュゲートできる。あるいは、コンジュゲーションはリガンド-受容体対を介して生じうる。適当なリガンド-受容体対の中には、例えばビオチン-アビジンまたはビオチン-ストレプトアビジンおよび抗体-抗原がある。

30

【0087】

[0092]今日知られている最も高感度の標識は、タグと反応物質との相互作用が光の発生を招く化学発光タグである。有用な標識には、アクリジニウムエステルのような化学発光分子または反応物質が酵素の基質である化学発光酵素がある。例えばアクリジニウムエステル(Acridium Ester)がアルカリ性ペルオキシド溶液と反応すると、強い閃光が発生し、検出限界が他の標識によりもたらされる検出限界の100から10000倍に増加する。さらに、この反応は迅速である。化学発光およびイムノアッセイの詳細な総説をWeeksら(Methods in Enzymology、1983、133:366~387)、Kawaguchiら(Stabilized Phenyl Acridinium Esters For Chemiluminescent Immunoassay - Bioluminescence and Chemiluminescence、第9回国際シンポジウム要旨集1996、Hastings、KrickaおよびStanley編、John Wiley & Sons、1997、480~484頁)、および米国特許第5468646号から見出すことができる。液体アッセイのための他の選択肢には、マイクロタイターウェルまたはカラムイムノアッセイの

40

50

使用がある。カラムアッセイは、化学発光標識のような迅速反応標識を使用する場合に特に有利でありうる。反応物質または酵素の基質も含有するポストカラム検出器までタグ付き複合体を溶出させて、その後形成した生成物を直ちに検出することができる。

【0088】

[0093]一態様において、本発明は、血清および他の生体液中のサバイピンタンパク質を検出するためのサンドイッチ法の使用を意図している。1993年5月13日に公開されたPCT公報WO93/09437に記載されているように、この方法は、対象タンパク質と結合できる2つの抗体、例えば1つは固体支持体に固定化され、もう1つは溶液中に遊離状態であるが容易に検出される化学化合物で標識された抗体を必要とする。二次抗体に使用できる化学標識の例には、放射性同位元素、蛍光化合物、および酵素、または反応物質もしくは酵素の基質に曝露された場合に、呈色した生成物もしくは電気化学的に活性な生成物を発生する他の分子があるが、それに限定されない。サバイピンタンパク質を含有する試料をこの系に置く場合、サバイピンタンパク質は固定化抗体および標識抗体の両方に結合する。その結果、支持体表面に「サンドイッチ」免疫複合体が生成される。結合していない試料構成要素および過剰の標識抗体を洗浄し、支持体表面のタンパク質と複合体を形成した標識抗体の量を測定することによって、複合体を形成したタンパク質を検出する。検出限界の良好な標識を使用するならば、サンドイッチイムノアッセイは特異性が高く非常に高感度である。

10

【0089】

[0094]本発明は、多数の生体液試料を同時にスクリーニングすることをも意図している。これは、広く使用され容易に自動化できる通常の96穴マイクロタイター形式を用いて実施できる。96穴プレートを熱量分析するための市販のスペクトロメーター(プレートリーダー)もいくつかある。

20

【0090】

[0095]好ましくは、ラジオイムノアッセイもしくは酵素免疫吸着測定法、競合的酵素免疫吸着測定法、ドットプロット、ウエスタンプロット、クロマトグラフィー、好ましくは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、または当技術分野で公知の他のアッセイにより体液試料中のサバイピンの存在を検出する。

【0091】

[0096]ドットプロット法は、プローブとして抗体を用いて所望のタンパク質を検出するために当業者によってルーチンで実施される(Promega Protocols and Applications Guide、第2版、1991、263頁、Promega Corporation)。ドットプロット装置を用いて膜に試料をアプライする。膜と共に標識プローブをインキュベートし、そのタンパク質の存在を検出する。

30

【0092】

[0097]ウエスタンプロット分析は、当業者に周知である(Sambrookら、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、1989、第3巻、18章、Cold Spring Harbor Laboratory)。ウエスタンプロットでは、SDS-PAGEで試料を分離する。ゲルを膜に転写させる。所望のタンパク質を検出するために標識抗体と共に膜をインキュベートする。

40

【0093】

[0098]上記のアッセイは、イムノプロット法、免疫拡散法、免疫電気泳動法、または免疫沈降法のようなステップを伴うが、それに限定されない。

【0094】

[0099]好ましくは、サバイピンはドットプロット法またはウエスタンプロット法により検出される。より好ましくは、癌患者の生体液中のサバイピンは、Bio-Dot法およびBio-Dot SFモジュールを用いたドットプロット法により検出される。

【0095】

核酸の検出

[00100]患者の生体液試料中のサバイピンの存在は、ノーザンプロット分析、ドットブ

50

ロット法、マイクロアレイハイブリダイゼーション、サザンプロット分析、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH)、および PCR を例とするがそれに限定されない核酸ハイブリダイゼーションによっても決定されうる。クロマトグラフィー、好ましくは、HPLC および他の公知のアッセイも、試料中のサバイピンのメッセンジャー RNA レベルを決定するために使用できる。

【0096】

[00101] 被検液体に流れ出しているまたは放出されているサバイピン DNA は、多分、サバイピン陽性癌細胞内部の生体液から見出しうる。

【0097】

[00102] 一態様において、本発明は、患者の生体液中のサバイピンを検出するための試薬として核酸の使用を意図しており、その核酸は標識されている。放射性標識、蛍光標識、酵素、化学発光タグ、比色タグか、あるいは上記もしくは当技術分野で公知の他の標識またはタグで核試薬を標識できる。

10

【0098】

[00103] 別の態様において、本発明は体液試料中のサバイピン mRNA の存在を検出するためのノーザンプロット分析の使用を意図している。分析の第 1 段階は、ゲル電気泳動でサバイピン核酸含有試料を分離することを伴う。次に分散した核酸をニトロセルロースフィルターまたは別のフィルターに転写する。その後、適当なハイブリダイゼーション条件、例えば *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*、*Maniatis* ら (1982、*CSH Laboratory*) に記載しているように 42 で 50% ホルムアミド、5xSSPE、2xDenhardt's 溶液、0.1% SDS の条件で標識オリゴヌクレオチドをフィルターに曝露させる。当技術分野で公知である他の有用な方法には、溶液ハイブリダイゼーション、ドットおよびスロット RNA ハイブリダイゼーション、ならびにプローブに基づくマイクロアレイがある。当技術分野で公知の標準法を用いてハイブリダイゼーション後の断片の放射能を測定することは、患者の生体液中に存在するサバイピン核酸の量を定量する。

20

【0099】

[00104] ドットプロット法は、対象核酸を含有する試料を膜にアプライすることを伴う。膜にアプライする前または後に核酸を変性できる。膜を標識プローブと共にインキュベートする。ドットプロット法は当業者に周知であり、米国特許第 4582789 号および第 4617261 号にさらに十分に記載されている。これらの特許の開示は参照により本明細書に組み込まれている。

30

【0100】

[00105] ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は、ポリマー化のためにプライマーおよび試薬を用いて核酸試料中に存在する 1 つまたは複数の特異的核酸配列を増幅させ、増幅した配列を次に検出するための方法である。あるプライマーがもう一方のプライマーにハイブリダイズした場合のそのプライマーの伸長産物は、所望の特異的核酸配列の産生のためのテンプレートおよびその逆となり、所望の量の配列を産生させるのに必要な回数だけこの方法を繰り返す。所望の配列の存在を検出する当業者 (米国特許第 4683195 号) は、ルーチンでポリメラーゼ連鎖反応を使用する。

40

【0101】

[00106] 所望の配列を検出する当業者によってルーチンで実施される PCR の具体的な例は、逆転写 PCR (RT-PCR; *Saiki* ら、*Science*、1985、230:1350; *Scharf* ら、*Science*、1986、233:1076) である。RT-PCR は、生体液から全 RNA を単離すること、所望の核酸配列を認識するプライマーの存在下でその RNA を変性させること、そのプライマーを用いて逆転写により RNA の cDNA コピーを発生させること、特異的プライマーを用いて PCR により cDNA を増幅させること、および増幅した cDNA を電気泳動または当業者に公知である他の方法によって検出することを伴う。

【0102】

50

[00107]好ましい実施形態において、癌患者の生体液中の、好ましくは膀胱癌患者の尿中のサバイピン核酸を検出する方法には、ノーザンブロット分析、ドットブロット法、サザンブロット分析、FISHおよびPCRがある。より好ましくは、検出方法は以下の2つのプライマーセットを用いたRT-PCRである：配列番号1および2、ならびに配列番号3および4。

【0103】

6. 癌を診断するためのキット

[00108]一態様において、本発明には癌を診断するために必要な要素を含むキットがある。好ましくはキットは、患者から生体液を採集するための容器と、その液中のサバイピンまたはそれをコードする核酸の存在を検出するための試薬とを備える。水性媒体中に、または凍結乾燥の形態でキットの構成要素をパッケージできる。

10

【0104】

[00109]サバイピン抗体、その断片、またはサバイピン結合パートナーを例とするがそれに限定されない、サバイピントタンパク質を検出する1つまたは複数の試薬を含有する、癌を診断もしくはモニタリングし、癌の再発を予測するためのキットを製造できる。患者から生体液を採集するための容器と共に試薬をパッケージできる。抗体または結合パートナーを、放射性金属イオンまたは部分(moiety)のような標識が連結したコンジュゲートの形でキットに使用する場合に、完全にコンジュゲートした形態、中間体の形態、またはキットの使用者によりコンジュゲートされる別々の部分(moiety)としてそのようなコンジュゲートの構成要素を供給できる。

20

【0105】

[00110]完全長サバイピン核酸、サバイピンオリゴヌクレオチド、およびサバイピンのプライマー対を例とするがそれに限定されない、サバイピン核酸を検出する1つまたは複数の試薬を含むキットをも製造できる。患者から生体液を採集するための容器と共に試薬をパッケージできる。核酸は標識された形態または後で標識される形態でありうる。

【0106】

[00111]キットの他の構成要素には、生体液を採集するための手段、試薬を標識するための手段、生体液中のサバイピンまたはサバイピン核酸を固定化するための膜、膜に生体液をアプライするための手段、患者の生体液中のサバイピンに試薬を結合させるための手段、二次抗体、患者の生体液から全RNAを単離するための手段、ゲル電気泳動を実施するための手段、単離された全RNAからcDNAを発生させるための手段、ハイブリダイゼーションアッセイを実施するための手段、およびPCRを実施するための手段などがありうるが、それに限定されない。

30

【0107】

7. 本発明のアッセイおよびキットの用途

[00112]本発明のアッセイまたは方法およびキットは、診断、予後、および/または患者における癌のモニタリング、ならびに患者における癌再発の予測に有用である。本発明の一態様において、患者の生体液中のサバイピンの存在は、患者が癌を有することを示す。癌は初発癌または再発癌でありうる。本明細書に使用する「再発癌」という用語は、癌が治療された後に復帰(再発)したことを意味する。本明細書に使用する「初発癌」という用語は、新たに発現した癌を指す。

40

【0108】

[00113]サバイピンが発現し、体液中に分泌、放出または発見される任意の癌からの生体液からサバイピンを検出できる。サバイピンは、肺癌、結腸癌、膵臓癌、乳癌、前立腺癌(Ambrosiniら、Nat. Med.、1997、3:917~21)、膀胱癌(Swanaら、N. Engl. J. Med.、1999、341:452~53)、および非ホジキンリンパ腫に発現する。神経芽細胞腫、乳癌、肺癌、膀胱癌および結腸直腸癌におけるサバイピンの発現は、予後不良の疾患および生存の短縮と関連した(Adidaら、Lancet、1998、351:882~83;Islamら、Oncogene、2000、19:617~23;Tanakaら、Clin. Cancer Res

50

、2000、6:127~34; Monzoら、J. Clin. Oncol.、1999、17:2100~04; Kawasakiら、Cancer Res.、1998、58:5071~74; Swanaら、N. Engl. J. Med.、1999、341:452~53)。

【0109】

[00114]サバイピンは、腫瘍の進行中に剥離した癌細胞によって細胞外環境に放出される。したがって、サバイピンの存在について患者からの任意の生体液をアッセイできる。好ましくは前立腺液、精液、全血、血清、尿、乳房生検液、胃腸液および膣液のようなヒト体液を患者から採取してサバイピンの存在についてスクリーニングできる。

【0110】

[00115]好ましい実施形態において、本発明の方法およびキットを使用して、患者の生体液中のサバイピンを検出することによって膀胱癌、前立腺癌および腎臓癌を含む初発泌尿生殖器癌を診断し、その癌の再発を予測する。より好ましくは、本発明の方法およびキットを使用して、患者の尿試料中のサバイピンの存在を検出することによって膀胱癌を診断する。患者の尿試料中のサバイピンの存在は、患者が膀胱癌を有することを示す。

【0111】

[00116]別の態様において、本発明の方法およびキットを使用して患者の生体液中のサバイピンの量を定量できる。患者の生体液中のサバイピンの量は、癌のグレーディングに有用でありうる。患者の生体液中に高レベルのサバイピンが存在することは、その癌が高グレードであることを示しうる。あるいは、本発明の方法およびキットを使用して患者における癌のステージを決定できる。CISステージの癌は非浸潤性乳頭状癌ステージの癌よりも高レベルのサバイピンを有する。寛解期の患者の生体液中に、あるレベルのサバイピンが存在することは、癌の再発を予測しうる。

【0112】

[00117]本明細書に使用する「乳頭状癌」という用語は、腫瘍上皮細胞の表層で覆われた線維性ストロマの多数の、不規則な、指様の突起の形成を特徴とする悪性新生物を指す。

【0113】

[00118]本明細書に使用する「上皮内癌(CIS)」という用語は、上皮内癌腫(intraepithelial carcinoma)と同義である。膀胱癌を指すのに使用する場合、この用語は膀胱内表面(移行細胞)における扁平腫瘍を意味する。

【0114】

[00119]さらに、患者における癌の進行をモニタリングするために、および癌患者の予後を決定するために、患者の生体液から定量されたサバイピンの量を使用できる。例えば、一定期間に渡って測定されたサバイピンの量は、癌がどの程度の速度で増殖しているかについての情報を提供する。

【0115】

[00120]患者をモニタリングするための、および寛解期の患者における癌の再発を予測するための迅速で安価な方法として尿サバイピンを使用できる。尿サバイピン検査を一連の尿マーカーに組み込んで再発を早期に検出する感度および特異性を改善できる。

【0116】

[00121]患者が検査で生体液中のサバイピンが陽性となった後で、膀胱鏡検査のような、より侵襲性で高価な取り組みを用いて患者をさらに検査することが意図している。

【0117】

[00122]上記の概説を考慮に入れると、以下に発表する具体的な実施例は単に例示であり、本発明の範囲を限定することを意図しない。他の一般的小および具体的形態は当業者に明白であろう。

【実施例】

【0118】

材料と方法

10

20

30

40

50

[00123]尿検体：エールニューヘブン病院および復員軍人局（New England Health Care Systems、ウェストヘブン、コネティカット部）の泌尿器科診療所で158個の尿検体を採集した。5つの異なる群に分類した個体からランダムに無菌採取または直線状のカテーテルで採取した尿試料を得た。第1群は、薬剤の投与を受けていない平均年齢47.6 ± 20.8歳の健常志願者である（n = 17）。第2群は、非腫瘍性尿路疾患または血尿の診断を有する平均年齢60.0 ± 18.1歳の患者である（n = 30）。第3群は、膀胱癌を除外した泌尿生殖器癌の診断を有する平均年齢71.5 ± 9.9歳の患者である（n = 30）。第4群は、初発または再発膀胱癌の診断を有する平均年齢69.7 ± 8.7歳の患者である（n = 46）。第5群は、膀胱癌のための治療を受けている途中か、すでに治療を受けた患者であって、採尿日に細胞診による評価で陰性であった平均年齢76.1 ± 8.9歳の患者である（n = 35）。第5群における治療手段には、膀胱内カルメットゲラン菌（BCG）投与、チオテパ、経尿道的切除、部分膀胱切除および放射線照射がある。第4群は、採尿後に同様の治療手段および/またはサルベージ膀胱切除もしくは根治的膀胱全摘術を受けた患者を含む。

10

【0119】

[00124]統計解析：尿サバイピンと患者の診断との間の関係をカイ二乗検定で解析した。補正された（weighted）尿サバイピンスコアとエールニューヘブン病院で実施したグレーディング方式とを比較するためにノンパラメトリック統計解析を使用した。

【0120】

実施例1 Bio-Dot SFモジュールを用いた尿サバイピンの検出

20

[00125]48穴スロット形式をもたらすモジュールにおける精密ろ過装置を用いてニトロセルロース膜上で尿検体をろ過した。ポリクローナル抗体を用いてサバイピンの存在についてプロットを分析した。プロトコルを以下のとおりとした。尿を採集し、分析まで-80℃で保存した。分析を行う日に尿試料を20000 × gで20分間遠心分離した。その間に、Bio-Dot精密ろ過装置を0.2 μmのニトロセルロース膜（Bio-Rad Laboratories、ハーキュリーズ、カリフォルニア州）と共に組み立て、20 mM トリス緩衝生理食塩水（pH 7.5）に入れて湿らせた。次に、尿上清（300 μl）と同様に、大腸菌に発現させた段階濃度の組換えサバイピン（Lira, Nature, 1998, 396: 580~84）をTBS 300 μlに溶かしたものを標準（0.001 ~ 1.0 μg/ml）としてこの膜上でろ過した。ろ過後に、膜を乾燥させPBS（pH 7.4）に溶かした5% Biottoおよび0.01% アジ化ナトリウム中で4で12時間ブロッキングした。PBS-Tween 20（0.25%）に入れて洗浄後に、サバイピンに対する2 μg/ml ウサギ抗体（Grossmanら、J. Invest. Dermatol., 1999, 113: 1076~81）と共に22℃で3時間膜をインキュベートし、PBS-Tweenに入れて洗い、ホースラディッシュペルオキシダーゼがコンジュゲートしたロバ抗ウサギIgG（Amersham Biotech、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）を1:1000に希釈したものと共に22℃で1時間インキュベートした。PBSで2回、10分間、PBS-Tweenで2回、5分間、PBSで2回、5分間洗った後で、電気化学発光（Amersham）およびオートラジオグラフィによって一次抗体の結合を検出した。デンストメトリーによってバンドを定量し、以下のようにして段階濃度の組換えサバイピンとの抗体の反応性に基づいて補正されたサバイピンスコアを計算した：0 = 検出不能、1 = 0.001 ~ 0.25 μg/ml、2 = 0.25 ~ 1 μg/ml、および3 = > 1 μg/ml。各尿検体を少なくとも2つの異なる状況において2回分析し、共通する結果を得た。

30

40

【0121】

実施例2 ウエスタンプロット法

[00126]尿検体（100 ml）を1200 × gで22℃で10分間遠心分離し、細胞のペレットをTBSで2回洗浄し、プロテアーゼ阻害剤の存在下で4℃で30分間0.5% トリトンX-100に溶解させた。SDSゲル電気泳動で試料を分離し、ナイロン膜（Millipore, Corp.）に転写させ、さらにサバイピンに対する1 μg/mlの

50

抗体 (Grossmanら、J. Invest. Dermatol.、1999、113 : 1076 ~ 81) の後にホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) がコンジュゲートしたヤギ抗ウサギ IgG と共にインキュベートし、化学発光を行った。

【0122】

実施例3 RT-PCR

[00127] 初発または再発尿路上皮癌を有する患者15人、膀胱癌を治療された患者2人、前立腺癌患者1人、非腫瘍性尿路疾患の患者1人および健康志願者1人から無菌採取した尿50mlを得た。トリゾール試薬 (Life Technologies, Inc.、ゲーサーズバーグ、メリーランド州、米国) を用いて尿ペレットから全RNAを単離した。Superscript逆転写酵素 (Gibco BRL、Life Technologies, Inc.、ゲーサーズバーグ、メリーランド州、米国) 1μlを用いて43 で1時間、全RNA 1~5μgをランダムプライミングすることによって一本鎖cDNAを合成した。70 で15分間加熱後、サバイピンプライマー5'-CTGCCCTGGCAGCCCTTTCTCA A-3' (正方向; 配列番号1) および5' AATAAACCCCTGGAAGTGGTGC A-3' (逆方向; 配列番号2) を用いて94 で15秒間の変性、53 で15秒間のアニーリング、および72 で1分間の伸長を20サイクル行い、その後72 で5分間インキュベートすることで初回増幅反応を実施した。サバイピン内側プライマー (nested surviving primer) 5'-CCGCATCTCTACATTC AAGA AC-3' (正方向; 配列番号3) および5'-CTTG GCTCTTTCTCTGTCC-3' (逆方向; 配列番号4) を用いて94 で30秒間の変性、60 で30秒間のアニーリング、および72 で45秒間の伸長を30サイクル行い、その後72 で5分間インキュベートすることでサバイピンcDNAの463塩基対 (bp) 断片を第2ラウンドの増幅にかけた。増幅した279bpのサバイピンcDNAを2.0%アガロースゲルで分離し、臭化エチジウム染色によって可視化した。 - アクチン特異的プライマー5'-AGCGGGA AATCGTGCGTG-3' (正方向; 配列番号5) および5'-CAGGGTACATGGTGGTGC C-3' (逆方向; 配列番号6) を用いて対照反応物を増幅させ、309bpの断片が発生した。

10

20

【0123】

(結果)

[00128] Bio-Dot検査を用いて尿サバイピンを検出する代表的な実験を図1に示す。本研究のために採集した158検体のうち138検体についてBio-Dot法による尿サバイピンの決定を行った (表1)。RT-PCRによってサバイピン発現について追加の尿試料20個を分析し、Bio-Dot法の特異性を独立して評価した。サバイピンは、正常志願者 (0/16)、ならびに良性前立腺肥大症 (0/6)、間質性膀胱炎 (0/2)、腎結石 (0/3)、尿路感染症 (0/6)、および他の非腫瘍性尿路疾患 (0/6) を有する患者の尿からは検出されなかった (表1)。経尿道的前立腺切除術後に残尿および排尿困難の既往を有して来院し膀胱鏡検査で不規則に肥厚した肉柱膀胱が明らかとなった潜伏性血尿の患者5人中3人から尿サバイピンが検出された (補正されたサバイピンスコア2)。PSAレベルが増加しているが前立腺癌の診断を有さない患者1人は、尿サバイピンが陽性であった (表1)。膀胱鏡検査でこの患者も肥厚した肉柱膀胱が明らかとなった。サバイピンは前立腺癌 (0/19)、腎臓癌 (0/8)、膣癌 (0/1)、および子宮頸癌 (0/1) を有する患者の尿検体からは検出されなかった (表1)。対照的に、尿サバイピンは初発または再発膀胱癌を有する全ての患者から検出された (31/31) (表1)。Bio-Dot SFにより尿サバイピンについて分析された第4群の患者31人の組織病理学的グレーディング (グレードI~IV) には、グレードII腫瘍を有する患者が13人、グレードIII腫瘍を有する患者が7人、およびグレードIV腫瘍を有する患者が5人存在した。患者5人の乳頭状浸潤癌に付随して、および患者1人の尿管の高グレード尿路上皮癌に付随して上皮内癌 (CIS) が発見された。

30

40

【0124】

50

【表 1】

表 1. Bio-Dot SFモジュールによる尿検体 138 個からのサバイビンの検出

尿検体	(n)	サバイビン陰性	サバイビン陽性
第 1 群 (対照健康志願者)	16	16	0
第 2 群 (非腫瘍性尿路疾患)	29		
血尿	5	2	3
UTI	6	6	0
BPH	6	6	0
PSA 上昇	1	0	1
間質性膀胱炎	2	2	0
腎結石	3	3	0
その他 †	6	6	0
第 3 群 (膀胱以外の泌尿生殖器癌)	29		
前立腺	19	19	0
腎	8	8	0
膣	1	1	0
子宮頸	1	1	0
第 4 群 (初発または再発膀胱癌)	31 §	0	31
第 5 群 (治療後の膀胱癌 ¶)	33	30	3 †

10

20

UTI: 尿路感染症、BPH: 良性前立腺肥大症、PSA: 前立腺特異抗原。† 乳頭壊死 (n=1)、前立腺炎 (n=2)、膀胱尿管逆流 (n=1)、およびクレアチニン上昇を伴う腎移植 (n=2) の患者を含む。§ 尿管の尿路上皮癌を有する患者 1 人を含む。¶ 膀胱鏡検査正常。† これらの患者のうち 2 人は膀胱腫瘍の経尿道的切除で、1 人は高周波療法で治療された。これらの患者のうち 1 人は尿細胞診で膀胱癌陽性の結果となった。

【0125】

[00129] Bio-Dot SF で分析された第 5 群の患者 33 人中 30 人は、検出できる尿サバイビンを有さなかった (表 1)。これらの患者 30 人中 5 人は BCG 投与を受けている最中で、3~5 回の治療を完了していた。残りの 25 人は膀胱鏡検査陰性の治療後状態であった。最初の診断が GII 非浸潤膀胱癌であった第 5 群の患者 3 人は、膀胱鏡検査を受けて結果が陰性であった後に尿サバイビンの検査結果が陽性であった。この患者 3 人のうち 1 人は膀胱癌についての尿細胞診が陽性であった。患者 3 人のうち 2 人は膀胱腫瘍の経尿道的切除で治療され、1 人は高周波療法で治療された。

30

【0126】

[00130] 補正されたサバイビンスコアについて基準化した場合、CIS を有する患者 (2.5 ± 0.5、n = 6) は、グレード II 膀胱癌を有する患者 (1.3 ± 0.6、n = 13) よりもかなり高いサバイビンスコアを有した。補正されたサバイビンスコアと多様な膀胱癌症例の組織病理学またはグレーディングとの間の相関をそれぞれ表 2 および表 3 に示す。

【0127】

40

【表 2】

表 2. 補正された尿サバイビンスコアと膀胱癌組織病理学との間の相関

組織病理学	被験例数	平均サバイビンスコア
ND	3	1.7 ± 1.2
非浸潤性乳頭状癌	4	1 ± 0
排尿筋への浸潤なし	12	1.6 ± 0.8
筋に浸潤	6	1.7 ± 0.8
CIS	6	2.5 ± 0.5 †

50

【 0 1 2 8 】

【 表 3 】

表 3. 補正された尿サバイビンスコアと膀胱癌グレーディングとの間の相関

グレード	被験例数	平均サバイビンスコア
グレード I I	13	1.3±0.6
グレード I I I	7	1.5±0.8
グレード I V	5	2±1
グレード I V	1	3*

以下のように段階濃度の組換えサバイビンによる標準曲線を用いて補正されたサバイビンスコアを計算した。0：検出不能、1：0.001～0.25 μg/ml、2：0.25～1 μg/ml、3：>1 μg/ml。

* C I S が付随する患者 6 人中 1 人は尿管の尿路上皮癌を有した（グレード IV、サバイビンスコア 3）。移行上皮乳頭腫の分類のための B r o a d e r の細胞学的グレーディング方式、グレード I～IV を用いて組織病理分析を実施した。ND：測定せず。C I S：上皮内癌。†グレード II または非浸潤性乳頭状癌のどちらかよりも有意に大きい（ $p < 0.02$ ）。

10

【 0 1 2 9 】

[00131]ウエスタンブロット法により、膀胱癌を有する患者からの尿細胞ペレットから 16.5 k D a のサバイビンの単一バンドが検出されたが、健康志願者からは検出されなかった（図 2）。

20

【 0 1 3 0 】

[00132] B i o - D o t 法で得られた結果を独立して評価するために、R T - P C R により尿サバイビンについて初発または再発膀胱癌を有する追加的な患者 15 人を分析した。膀胱癌を有する新しい患者 15 人全ての尿細胞ペレットから 279 b p のサバイビン c D N A を増幅した（15 / 15）（図 3 およびデータ示さず）。これに対して、尿路感染症を有する 1 人、膀胱癌の治療後で膀胱鏡検査陰性の 2 人、前立腺癌を有する 1 人、および正常志願者からの 1 人である追加の個体 5 人からの尿細胞ペレットは、サバイビン c D N A を有さなかった（図 3）。対照実験において、対照および膀胱癌患者の尿から 309 b p の - アクチン c D N A 断片を増幅したが、両者に区別はつかなかった（図 3）。R T - P C R により分析された膀胱癌の組織病理学例には、グレード I I 腫瘍を有する患者 5 人、グレード I I I を有する患者 1 人、グレード I V を有する患者 6 人、および C I S を有する患者 3 人が含まれた。剥離した癌細胞は腫瘍が進行する間に細胞外環境すなわち尿に受動的にサバイビンを放出することを、これらの実験は示唆している。

30

【 0 1 3 1 】

[00133]ここで実験した一連の患者において、初発または再発膀胱癌に対する尿サバイビン検査の感度は 100% であり、他の腫瘍性および非腫瘍性泌尿生殖器疾患に対する特異性は 95%（ $p < 0.02$ ）であった。本検査が高特異性であることから、尿サバイビン検査は細胞診および / または他の診断マーカーを補完して（R a m a k u m a r ら、J . U r o l . 1999、161：388～94；L o k e s h w a r ら、J . U r o l . 2000、163：348～56）膀胱癌患者をよりよくモニタリングし、初期再発または d e n o v o 新生物を同定するために有用でありうる。尿サバイビン検査の他の潜在的な利点には、今や商業的に入手可能となったサバイビンに対する単一の抗体を用いたワンステップ検出を使用する簡易性、サービス時点管理（p o i n t - o f - s e r v i c e）法としての適合性、および費用対効果がある。

40

【 0 1 3 2 】

実施例 4 患者の血清中のサバイビンの検出

[00134]膀胱癌および前立腺癌患者から血液を採集した。血清を単離し、実施例 1 に記載したドットブロット法によりサバイビンの存在について検査した。膀胱癌および前立腺癌患者の血清からサバイビンを検出した。μg/ml 単位で段階濃度の組換えサバイビン（左右の列）、尿試料または血清試料をスロットブロット装置にアプライした。サバイビ

50

ンに対する抗体と共に膜をインキュベートした後で、HRPとコンジュゲートしたヤギ抗ウサギIgGと共にインキュベートした。化学発光によりバンドを可視化した。

【0133】

【00135】癌患者の血清中のサバイピンの検出は、サバイピンが他の癌を検出するためのマーカーとして有用であることを示す。サバイピンの存在について血清を検査することは、スクリーニングに、および癌の再発および回帰の検出に有用である。

【0134】

実施例5 尿サバイピンレベルおよび転帰に対するカルメットゲラン菌およびマイトマイシンCを用いた移行上皮癌の膀胱内治療の効果

【00136】本発明において、TCCのために27回のBCGの膀胱内治療またはマイトマイシンCを受けている被験者25人からの尿を治療前、治療中および治療後に採集する。治療完了の1カ月後および12カ月後に、尿サバイピンレベルと、細胞診および膀胱鏡検査(±生検)によって評価した転帰とを比較する。

【0135】

(材料と方法)

【00137】被験者：エールニューヘブン病院、復員軍人局(New England Health Care Systems、ウェストヘブン、コネティカット部)、およびニューヘブンのいくつかの地域泌尿器科医の診療所から全ての採尿を得た。エール大学医学部ヒト治験委員会およびVA研究委員会は試料の採集および実験計画を承認した。膀胱鏡検査および生検の後に、表在性TCCを有する被験者25人(平均年齢70歳、範囲48~89歳、女性12%)についてBCG(n=23)で治療するかマイトマイシンC(n=4)で治療するかの決定を行った。被験者2人はそれぞれ2クルの治療を受け、合計27回の治療となった。被験者25人についての最初のグレードおよびステージは以下のとおりであった。グレードI:1.4%、グレードII:48%およびグレードIII、IV:48%;Tastage:48%、Tisstage:20%、およびTistage:32%)。被験者の20パーセントは上皮内癌(CIS)陽性の領域を有した。

【0136】

【00138】膀胱腫瘍の経尿道的切除(TURBT)後で最初の膀胱内注入直前(治療前)、残りのBCGまたはマイトマイシンC治療それぞれの直前、および治療クルの完了の約1カ月後(治療後)に、無菌採取尿またはカテーテル尿を各患者から採集した。同じ患者から無菌採取尿またはカテーテル尿を採集した場合にサバイピンレベルの差はみられなかった。最も高い尿サバイピンは、膀胱内注入のクル中に測定された最高レベルのサバイピンであった。各被験者について2回目の注入前に得られた尿から最終の膀胱内注入前に得られた尿にわたる平均尿サバイピン値を計算する。尿試料を採集し、分析まで-80で小分けして保存した。

【0137】

【00139】尿サバイピンの検出：一次抗体とのさらに長いインキュベーション時間を使用し、化学発光生成物の検出にさらに長時間かけ、かつ凍結全尿試料を使用することを除いて、方法は、Smithら(JAMA、2001、285:324)に記載されている。本明細書によってこの文献はその全体が参照により組み込まれている。凍結全尿試料は、遠心分離してから上清を凍結した尿試料よりも多量のサバイピンを含有することが多い。サバイピン分析を行う日に、尿試料を解凍し、20000×gで20分間遠心分離した。その間、20mMトリス緩衝生理食塩水(pH7.5)中で湿らせた0.2μニトロセルロース膜(Bio-Rad Laboratories、ハーキュリーズ、カリフォルニア州)と共にBio-Dot精密ろ過装置を組み立てた。次に、尿上清(500μl)と同様に大腸菌に発現させた段階濃度(0.1~100ng/ml)の組換えサバイピン(Lira、Nature、1998、396:580)、サバイピン陰性タンパク質対照、ならびにサバイピン陽性対照尿試料およびサバイピン陰性対照尿試料を膜上でろ過した。ろ過後に、PBS(pH7.4)を溶媒とする5%脱脂粉乳および0.01%アジ化ナトリウム中で膜をインキュベートした(4、2時間)。PBS-トウィーン20(0.5

10

20

30

40

50

%) 中で洗浄した後で、サバイピンに対する $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ のウサギポリクローナル抗体 (Grossmanら、J. Invest. Dermatol. 1999、113:1076) と共にこの膜を4 で一晩インキュベートし、PBS-トウイン(0.05%)で洗浄し、ホースラディッシュペルオキシダーゼがコンジュゲートしたロバ抗ウサギIgG (Amersham Biotech、ピスタカウェイ、ニュージャージー州) を1:1000に希釈したものと共にインキュベートした(22、1時間)。PBS、PBS-トウイン(0.05%)および再度PBSでそれぞれ2回洗った後で、電気化学発光 (Amersham Biotech、ピスタカウェイ、ニュージャージー州) で一次抗体の結合を検出した。Kodak Digital Science 1D画像解析システム (Eastman Kodak Co.、ロチェスター、ニューヨーク州) を用いてプロットをスキャンし、サバイピン濃度を決定した。 10

【0138】

[00140]データ解析および統計：治療後膀胱鏡検査(±生検)および細胞診の結果により再発および寛解状態への帰属を決定する。分類不確定($n=3$)への帰属は、膀胱鏡検査で疑いがある、生検がTCCについて陰性であり、細胞診で異型細胞を有する被験者からなる。Statview (SAS Institute、ケアリー、ノースカロライナ州) を用いて群間差を決定した。研究結果を平均±標準誤差および中央値として表現した。符号つきt検定およびMann-WhitneyのU検定を含むノンパラメトリック解析を用いて治療の転帰を解析した。アッセイの検出限界は、非特異的バックグラウンドを有さないサバイピン $0.1 \text{ ng}/\text{ml}$ であった。 20

【0139】

(結果)

[00141]膀胱内治療の転帰：細胞診および膀胱鏡検査±生検の所見により測定されたように膀胱内注入完了の1カ月後に15/27回の治療がTCCの寛解を招き、9/27回の治療がTCCの再発を有した(表4)。3回の治療は不確定と分類された転帰を有した。これらは、1)最初の治療後生検が扁平上皮化生を示したが、11カ月以内にグレード2/4 TCCの再発の診断があった例；2)マイトマイシンCの膀胱内注入の1カ月後に治療後細胞診が異型性を示し膀胱鏡検査所見が目視的にCISを示唆したが、生検は腫瘍について陰性であった例(この被験者は11カ月後にCISの領域を有するグレード3/4/4 TCCと診断された)；および3)治療後膀胱鏡検査で目視的に新生物の疑い 30

【0140】

【表 4】

表 4. 膀胱内治療前、治療中および治療後の個別の TCC 患者におけるサバイビンレベルおよび転帰

被験者番号	治療	グレード	ステージ	治療前サバイビン (ng/ml尿)	サバイビン最高値 (ng/ml尿)	治療後サバイビン (ng/ml尿)	1ヵ月における転帰	6-12ヵ月における転帰
1A	BCG失敗	4	Tis	4.2	75.6	4.5	治療中止	
1B	マイトマイシンC			4.5	32.6	40.9	治療失敗	膀胱切除
2	BCG繰り返し	2	Ta	0.5	0.6	0.4	再発	前立腺癌
3	BCG繰り返し	4	T1	1.7	1.9	1.1	再発	グレード4/4 TCC
4	初回BCG	3	Ta	0.1	0.2	1.0	再発	グレード3/4 TCC
5	BCG	2	T1	1.9	2.0	1.1	再発	
6	BCG	3	Tis	0.7	2.2	1.0	再発、プロスタチン腺を含むCIS	グレード2-3/4 TCC
7	初回BCG	2	T1	0.3	0.8	0.6	追跡せず	12ヵ月後にグレード2/4 TCC再発
8A	初回BCG	3	Tis	0	7.8	0.8	再発	
8B	BCG繰り返し			0.2	0.2	0	寛解	再発、12ヵ月後にUVJの高グレードTCC
9	BCG繰り返し	2	Ta	1.4	6.9	2.2	膀胱鏡検査、扁平上皮化生、生検陰性	11ヵ月後にグレード2/4 TCC再発
10	初回BCG	3	Tis	2.8	7.8	0.8	膀胱鏡検査がCISを示唆、細胞診で異型性	11ヵ月後に再発、CISを有するグレード3-4/4 TCC
11	マイトマイシンC	3	Ta	0.2	0.5	0.4	膀胱鏡検査で疑い、生検陰性	膀胱鏡検査で疑い、生検陰性、直腸癌寛解
12	BCG	3	T1	0.2	0.5	0.1	寛解。細胞診陰性、PSA上昇、腎腫瘍	細胞診陰性、PSA上昇、腎細胞癌に一致する腎腫瘍
13	初回BCGおよび維持BCG	3	Tis	0.2	5.0	0	寛解	12ヵ月で再発なし
14	初回BCG	2	Ta	1.1	0.9	1.0	寛解	6ヵ月後にグレード1-2/4 TCC再発
15	マイトマイシンC	3	T1	1.3	1.4	0	寛解	寛解
16	初回BCG	1	Ta	0	0.5	0	寛解	寛解
17	マイトマイシンC	2	Ta	0	0.2	0	寛解	寛解
18	BCG繰り返し	2	Ta	0	0.7	0	寛解	寛解
19	初回BCG	2	Ta		0.9	0	寛解	寛解
20	初回BCG	2	Ta	0	0	0	寛解	寛解
21	初回BCG	2	T1	0.6	0.2	0	寛解	寛解
22	初回BCG	2	Ta	0	0.9	0	寛解	7ヵ月後にグレード1 TCC再発
23	初回BCG	2	Ta	0	0	0	寛解	寛解
24	初回BCG	4	T1	0	3.0	0	寛解	寛解
25	初回BCG	3	T1	0	0.2	0	寛解	寛解

2回の治療を受けた患者のうち、初回の治療にA、2回目にBの表示を付す。数字ゼロは、サバイビン < 0.1 ng/ml である。

【0141】

[00142]治療前のサバイビンレベル：TURBT後および膀胱内化学療法による治療前の全ての被験者について要約した尿サバイビンレベルの中央値は、サバイビン 0.2 ng/ml 尿であった(表5)。治療が再発(中央値：サバイビン 0.7 ng/ml 尿、n =

10

20

30

40

50

9) よりも寛解 (中央値: サバイピン 0 ng/ml 尿、 $n = 15$) を招いた場合の方が治療前サバイピンレベルは低かった (表 5)。寛解に達した被験者のうち 8 人は、切除後および BCG または マイトマイシン C による治療前に測定可能なサバイピンを有さなかった (表 4)。寛解に達した被験者および再発した被験者からの尿サバイピンレベルの代表的なプロットを図 5 に示す。不確定と分類された転帰を招いた治療は、寛解を招いた治療よりも高いサバイピンレベルを有した (中央値サバイピン 1.4 ng/ml 、 $n = 3$)。これら 3 例のうち 2 例は 1 年以内に膀胱腫瘍を有すると診断された。

【0142】

【表 5】

表 5. 膀胱内治療の完了後 1 カ月以内の転帰とサバイピンレベルの平均 (平均 \pm SEM) および中央値 (斜体字) との関係

10

診断	n	治療前 サバイピン (ng/ml 尿)	治療時最高 サバイピン (ng/ml 尿)	治療時平均 サバイピン (ng/ml 尿)	治療後 サバイピン (ng/ml 尿)
再発	9	$1.5 \pm 0.6^{*\dagger}$ <i>0.7</i>	$13.7 \pm 8.5^*$ <i>2.0</i>	$6.8 \pm 5.0^*$ <i>1.5</i>	$5.7 \pm 4.4^*$ <i>1.0</i>
不確定	3	$1.5 \pm 0.7^*$ <i>1.4</i>	5.1 ± 2.3 <i>6.9</i>	2.2 ± 0.9 <i>3.0</i>	$1.1 \pm 0.6^*$ <i>0.8</i>
寛解	15	0.3 ± 0.1 <i>0.0</i>	1.0 ± 0.3 <i>0.5</i>	0.4 ± 0.1 <i>0.2</i>	$0.1 \pm 0.1^\dagger$ <i>0</i>
全例	27	$0.8 \pm 0.2^\dagger$ <i>0.2</i>	5.7 ± 3.0 <i>0.9</i>	$2.7 \pm 1.7^\dagger$ <i>0.5</i>	$2.1 \pm 1.5^\dagger$ <i>0.1</i>

20

*寛解での値に比べて $p < 0.05$ 。†各群の最高サバイピンレベルに比べて $p < 0.05$ 。

どの群についても治療前後のサバイピンレベルに差は存在しない。被験者 7 番についてのサバイピン値は再発群に含めた。数字ゼロはサバイピン $< 0.1 \text{ ng/ml}$ である。

【0143】

[00143] 治療中のサバイピンレベル: 治療中に測定し全ての被験者について要約した最高サバイピンレベルは、治療前または治療後サバイピンレベルよりも高かった (表 5、図 5)。治療中の最高サバイピンレベルを転帰尺度と比較したとき、寛解を招いた治療中のレベル (中央値: サバイピン 0.5 ng/ml 尿) は、再発が生じた治療中のレベル (中央値: サバイピン 2.0 ng/ml 尿) よりも低かった (表 5)。

30

【0144】

[00144] 転帰尺度と比較した治療後サバイピンレベル: 寛解を招いた治療に対するサバイピンの治療後レベルの中央値はゼロであった ($n = 15$) (表 5)。治療 1 カ月後にサバイピン 0.1 ng/ml 尿のサバイピンレベルを有する被験者 14 人は全て寛解期にあった。これら 14 人中 12 人は 1 年後に腫瘍を有さなかったが、これら 12 人のうち 1 人は治療の 14 カ月後に再発した。この被験者 (被験者 13) は、治療中に高い尿サバイピンを有したが、治療 1 カ月後にサバイピンゼロおよび寛解の両方を達成した。その後の尿 2 つはサバイピンレベルがゼロであったが、BCG 治療完了の 8 カ月後かつ再発の診断前に尿サバイピンは陽性であった。

40

【0145】

[00145] 不確定な転帰を有すると分類された治療のうち、サバイピンに対する治療後レベルの中央値は、サバイピン 0.8 ng/ml 尿 ($n = 3$) であった。再発を招いた治療のうち、サバイピンについての治療後レベルの中央値は、サバイピン 1.0 ng/ml 尿 ($n = 9$) であった。治療直後に、サバイピンは再発した被験者全ての尿から検出された。治療後に最高のサバイピンレベルを有した被験者は TCC に対する膀胱切除を受けていた。尿サバイピンが陽性であった被験者 1 人は、1 カ月で再診を拒絶し、1 年以内に TC

50

Cの再発が検出された。

【0146】

[00146]治療後短期間でサバイピン陽性であったが、その時点で再発していなかった被験者4人中3は、1年以内にTCCの再発を発現した。治療後サバイピンレベル1.0 ng/ml尿を有し、治療後短期間のTCCに関する膀胱鏡検査および細胞診が陰性であった被験者1人は、治療後6カ月以内にTCCの再発を発現した。治療後サバイピンレベルがサバイピン2.2および0.8 ng/ml尿であり疑いのある膀胱鏡検査所見±細胞診で異型細胞を有するが生検ではTCCと診断できなかった他の被験者2人は、BCG注入の完了後1年以内に再発性TCCを発現した。治療後サバイピンレベルがサバイピン0.4 ng/ml尿である被験者1人は、直腸癌の既往を有した。この被験者は疑わしい膀胱鏡検査所見を有し続けているが、この被験者は臨床的に明らかな膀胱癌を発現していない。

10

【0147】

[00147]治療直後に測定した尿サバイピンレベルは、感度100%および特異性78%で治療の失敗(すなわち治療1カ月以内の再発)を予測する。1年後に、治療直後に測定した尿サバイピンレベルは、感度83%および特異性92%で依然としてTCCの再発を予測する(表6)。

【0148】

【表6】

表6. 尿サバイピン陽性は再発を予測する

20

サバイピンレベル (サバイピン ng/ml尿) ^c	細胞診/膀胱鏡検査の結果			
	1カ月 ^a		1年 ^b	
	(+)	(-)	(+)	(-)
>0.1 ng./ml.	8	4	10	1
≤0.1 ng./ml.	0	14	2	12

感度	100%	83%
特異性	78%	92%
PPA	67%	91%
NPA	100%	86%

30

^a治療26/27

^b患者25/25

^c最終治療後1カ月でサバイピンレベルを測定した。

【0149】

40

(考察)

[00148]TCCの治療後1カ月で寛解に達した被験者における治療後サバイピンレベルの中央値はゼロであるが、TCCが再発した被験者は、サバイピン1.0 ng/ml尿という治療後中央値レベルを有する。膀胱内治療クール完了の1カ月後に評価した場合、再発しなかった被験者4人は尿中にサバイピンを有した。もっとも、この4人中3人は不確定な分類となっていた。12カ月以内にこれら被験者4人中3人がTCCの再発を有した。4番目の被験者は、TCCに追加して第二の癌、すなわちリンパ浸潤を伴う直腸-S状結腸癌を診断され治療されていたが、いくつかの膀胱鏡検査で疑いがあったにもかかわらず、膀胱生検は陰性のままである。直腸-S状結腸癌は寛解を維持している。

【0150】

50

【00149】治療後のサバイピンレベルがゼロ（被験者13人）またはサバイピン0.1 ng/ml尿（被験者1人）である被験者14人は、BCGまたはマイトマイシンC治療直後に陰性の膀胱鏡検査/細胞診結果を有した。これら被験者14人中12人は治療の完了1年後にTCCの再発を有さなかった。いくつかの研究は、非浸潤性（pT aステージ）腫瘍または粘膜固有層浸潤性（pT 1ステージ）腫瘍を有し、膀胱腫瘍の初回経尿道的切除の3カ月後の膀胱鏡検査所見が陰性であった被験者が12カ月間は追跡膀胱鏡検査の義務から解放されうることを示唆していた（Holmangら、J Urol、2002、167:1634; Parmarら、J Urol、1989、142:284; Abel, P.D., Br J Urol、1993、72:135）。T aまたはT 1病変を有し治療後サバイピンがゼロであった被験者12人中1人だけが1年以内に再発したことから、尿サバイピンの不在は、あまり厳しくない膀胱鏡検査方式のための追加的な基準を提供する。T aまたはT 1病変を有し治療後尿サバイピンが陽性であった被験者8人中7人は1年以内に再発した。この研究において、当初T aまたはT 1ステージTCCを有すると診断された被験者の40%（8/20）が再発したが、これらの被験者の1人だけが治療後にサバイピン陰性であり、この再発はグレード1と分類された。最初の追跡膀胱鏡検査とサバイピン測定とを関連させることは、低TCCステージを有する被験者についての追跡間隔を決定するうえで有用でありうる。

10

【0151】

【00150】TURBT直後にサバイピンが不在であることは、必ずしもTURBT後の寛解を示さない。TURBT後に尿中にサバイピンを有さなかった（サバイピン0.1 ng/ml尿）被験者10人中8人が寛解に達した。しかし、被験者10人中8人は治療中にサバイピン陽性であった。

20

【0152】

【00151】まとめると、寛解に達する患者に比べて再発する患者の方が膀胱内治療前、治療中および治療後のサバイピンレベルが高い。BCGまたはマイトマイシンCの膀胱内注入直後の測定で尿サバイピンが存在することは、感度100%および特異性78%でTCCの再発を予測する。治療直後に測定した尿サバイピンレベルは1年後に依然として感度83%および特異性92%でTCCの再発を予測する。この本研究は、膀胱内注入の完了後に尿サバイピンを有する被験者は予後不良であり、尿サバイピンを有さない被験者に比べて集中した追跡を必要としうることを示す。したがって、膀胱内注入の完了後の患者に尿サバイピンが存在することは患者の予後のインジケータとして使用できる。

30

【0153】

【00152】前記の解説および実施例は単にある好ましい実施形態の詳細な説明を表すものである。したがって、種々の変更および等価物が本発明の精神および範囲から逸脱せず製成されることは当業者に明らかであろう。本特許出願において確認された全ての雑誌記事、他の参照、特許および特許出願はその全体が参照により組み込まれている。

【図面の簡単な説明】

【0154】

【図1】Bio-Dot SFモジュールを用いた尿サバイピンの検出を示す図である。μg/ml単位で表した段階濃度の組換えサバイピン（左列）、または表示した患者群からの尿検体をスロットプロット装置にアプライした。サバイピンに対する抗体の後で、HRPコンジュゲートヤギ抗ウサギIgGと共に膜をインキュベートした。化学発光によりバンドを可視化し、デンシトメトリーで定量した。TCC：膀胱癌（第4群）、TCC/R：寛解（第5群）、TCC/T：治療中（第5群）、RCC：腎細胞癌、PC：前立腺癌（第3群）、PSA：前立腺癌の診断を有さないPSAが上昇した患者（第2群）、BPH：良性前立腺肥大症（第2群）、Ctrl：健康な志願者（第1群）。

40

【図2】尿サバイピンのウエスタンプロット分析を示す図である。健康志願者（正常）および膀胱癌（TCC）を有する第4群の患者からの尿細胞ペレットを電気泳動させ、ナイロン膜に転写させ、サバイピンに対する抗体で免疫プロットを行ってから化学発光を行った。相対的分子量マーカーを左に示す。

50

【図3】RT-PCRによる尿中サバイピンmRNAの増幅を示す図である。尿細胞ペレットから全RNAを抽出し、ランダムプライミングにより逆転写した。サバイピンに特異的な内側のプライマー(279bp)または-アクチン特異的プライマー(309bp)を用いて増幅反応を実施した。分子量マーカーをbpで表したものを示す(M)。TCC:初発または再発膀胱癌を有する代表的な患者5人の分析(第4群)。

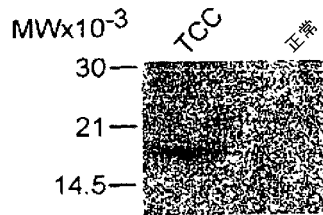
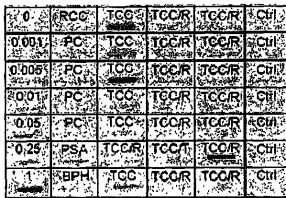
【図4】Bio-Dot SFモジュールを用いた血清サバイピンの検出を示す図である。μg/ml単位で表した段階濃度の組換えサバイピン(左右の列)、尿試料、または血清試料をスロットプロット装置にアプライした。サバイピンに対する抗体の後で、HRPコンジュゲートヤギ抗ウサギIgGと共に膜をインキュベートした。化学発光によりバンドを可視化した。数字が「血清(serum)BLCA」の前に来るときは、TCCを有する患者からの血清を示す。これらの試料の大部分を2回1組としてプロットにアプライした。膀胱癌を有する患者からの血清試料8個中7個が陽性であった。1つの試料(8-血清BLCA)は、検査した2つの試料の1つで陰性であった。患者2BLCAからの尿および血清は陽性であった。「尿(urine)HxTCC」は、以前にTCCを有すると診断されたただ1人の患者からの尿を示す。この患者は、切除を受け、BCG治療中である。「3-血清PCA」は、前立腺癌を有する患者からのサバイピン陽性血清を示す。「6-血清BPH」は、良性前立腺肥大症を有する患者からの血清である。この試料は、検査した2回中1回でサバイピン陽性であった。この患者について追加の情報は入手できない。「尿TCC」は、膀胱癌を有する患者からの尿である。「Neg con」は、タンパク質対照である。「blank」は、TBS緩衝液のみである。

【図5】TCC被験者の尿中の尿サバイピンレベルの代表的なプロットを示す図である。治療の結果が寛解期にある被験者および治療後にTCCが再発する被験者について尿試料中のサバイピンの相対強度を示す。治療前、治療中および治療後のサバイピンレベルを示す。強度はプロットの曝露時間に対するものである。

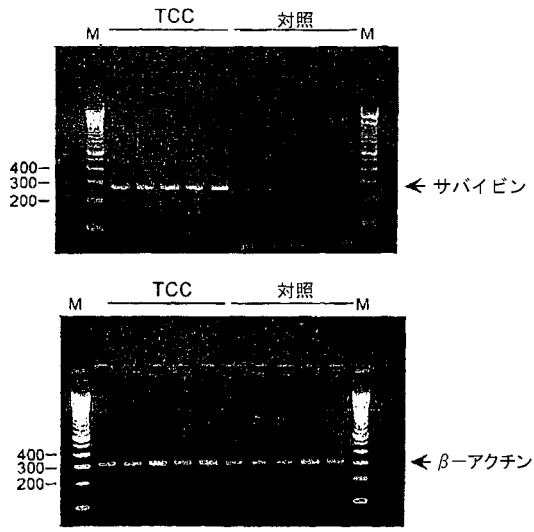
【図1】

【図2】

FIG.1

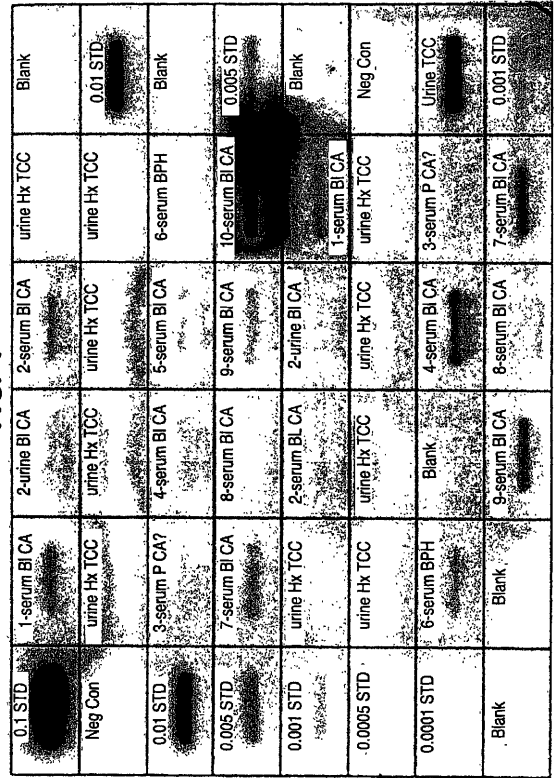


【 図 3 】

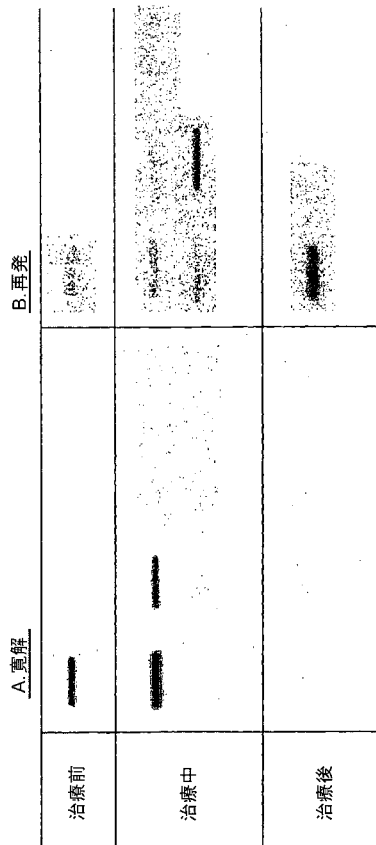


【 図 4 】

FIG. 4



【 図 5 】



【配列表】

2006527983000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/18187
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : CO7H 21/02, 21/04; C12Q 1/68; C12P 19/34		
US CL : 435/6, 91.1, 91.2, 183, 810; 536/23.1, 24.3, 24.31, 24.33		
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) U.S. : 435/6, 91.1, 91.2, 183, 810; 536/23.1, 24.3, 24.31, 24.33		
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 practicable, search terms used) MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, WPIDS, CONFSCI, SCISEARCH, JICST-EPLUS, JAPIO, CANCERLIT		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P --- Y,P	US 5,656,684 B1 (SANDLER) 02 December 2003, see column 2, lines 19-34, 43-54; column 5, line 44-column 6, line 67; column 8, lines 1-25; and column 9, lines 27-60.	1, 6-15, 30-35 ----- 2-5, 16-28, 36
X,P Y	US 6,673,914 B1 (HOON) 06 January 2004 (06.01.2004), see column 60, lines 49-65; column 61, lines 29-33; column 63, line 59-column 64, line 10. Bio-Rad Laboratories. Bio-Rad Catalog, 1998/99, pages 246 and 247.	1-5 16-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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	"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	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 05 November 2004 (05.11.2004)	Date of mailing of the international search report 27 JAN 2005	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer Alana M. Harris, Ph.D. Telephone No. 571-272-1600	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C O 7 K 16/18

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

(72)発明者 ウェイス, ロバート, エム.
アメリカ合衆国, コネチカット州, ニューヘヴン, トゥーウィットニーアベニュー
(72)発明者 スミス, シャノン, ディー.
アメリカ合衆国, コネチカット州, ニューヘヴン, トゥーウィットニーアベニュー,
エールユニヴァーシティー内
(72)発明者 ウェラー, マルシア, エー.
アメリカ合衆国, コネチカット州, ニューヘヴン, トゥーウィットニーアベニュー
(72)発明者 プレスシア, ジャネット
アメリカ合衆国, コネチカット州, ニューヘヴン, トゥーウィットニーアベニュー

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 CA11 HA14
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ52 QQ79 QR08 QR32 QR56 QR62
QS16 QS25 QS34 QX02
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA51 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	癌症患者生物体液中survivin的检测		
公开(公告)号	JP2006527983A	公开(公告)日	2006-12-14
申请号	JP2006517202	申请日	2004-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
申请(专利权)人(译)	耶鲁大学盐湖城		
[标]发明人	アルティエリダリオシー ウェイスロバートエム スミスシャノンディー ウェラーマルシアエー プレスシアジャネット		
发明人	アルティエリ, ダリオ, シー. ウェイス, ロバート, エム. スミス, シャノン, ディー. ウェラー, マルシア, エー. プレスシア, ジャネット		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/574 C07K16/18 A61B C07H21/02 C07H21/04 C07K14/47 C12P19/34		
CPC分类号	G01N33/574 C07K14/4747 G01N33/57407 G01N33/57434 G01N33/57484 G01N33/57488 G01N2333/47		
FI分类号	C12Q1/68.A C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.D G01N33/574.A C07K16/18		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/CA11 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	10/463867 2003-06-18 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

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

		(43) 公表日 平成18年12月14日(2006.12)	
(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)	
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B024	
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B063	
GO1N 33/53 (2006.01)	C12N 15/00 A	4H045	
GO1N 33/574 (2006.01)	GO1N 33/53 D		
CO7K 16/18 (2006.01)	GO1N 33/574 A		
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に	
(21) 出願番号	特願2006-517202 (P2006-517202)	(71) 出願人	502224851
(86) (22) 出願日	平成16年6月10日 (2004.6.10)		エール ユニヴァーシティ
(85) 翻訳文提出日	平成18年2月17日 (2006.2.17)		アメリカ合衆国、コネチカット州、
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/018187		ニューヘヴン、トラーホイス
(87) 国際公開番号	WO2004/112570		ニューアヴェニュー (番地なし)
(87) 国際公開日	平成16年12月28日 (2004.12.28)	(74) 代理人	100094318
(31) 優先権主張番号	10/463,867		弁理士 山田 行一
(32) 優先日	平成15年6月18日 (2003.6.18)	(74) 代理人	100123995
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 野田 雅一
		(72) 発明者	アルティエリ, ダリオ, シー. アメリカ合衆国、コネチカット州、 ニューヘヴン、トラーホイス ニューアヴェニュー