

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-506307

(P2009-506307A)

(43) 公表日 平成21年2月12日(2009.2.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/573	A
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

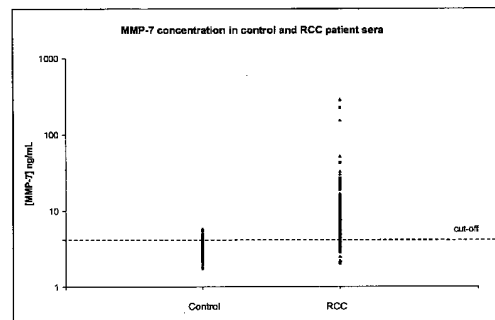
(21) 出願番号	特願2008-527374 (P2008-527374)	(71) 出願人	508058192 セザンヌ・エス・アー・エス フランス・F-30035・ニーム・セデ クス・1・パルク・シヤンティフィック・ ジョルジュ・ベス・アレ・グラアム・ベル ・280
(86) (22) 出願日	平成18年8月21日 (2006.8.21)	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(85) 翻訳文提出日	平成20年4月16日 (2008.4.16)	(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
(86) 国際出願番号	PCT/EP2006/008212	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(87) 国際公開番号	W02007/022940	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(87) 国際公開日	平成19年3月1日 (2007.3.1)		
(31) 優先権主張番号	05291783.8		
(32) 優先日	平成17年8月26日 (2005.8.26)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腎細胞癌 (RCC) に対する体液性バイオマーカーとしてMMP-7を使用する、RCCを診断及びモニターするための *in vitro* 方法

(57) 【要約】

ヒト患者における腎細胞癌 (RCC) の検出、早期発見、モニタリング、及び/または予後診断のための診断的 *in vitro* 方法における体液性バイオマーカーとしての、マトリックスメタロプロテアーゼ7 (MMP-7) 及び/または MMP-7の免疫反応性を備えたその前駆体と断片、あるいは循環している抗MMP-7抗体の使用。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ヒト患者における腎細胞癌（RCC）の検出、早期発見、モニタリング、及び/または予後診断のための体液性バイオマーカーとしての、マトリックスメタロプロテアーゼ7（MMP-7）及び/またはMMP-7の免疫反応性を備えたその前駆体と断片、あるいは循環している抗MMP-7抗体の使用。

**【請求項 2】**

ヒト患者の体液サンプル中において、その存在及び/またはレベルがRCCの存在及び/または重篤度を示すバイオマーカーを検出することによる、並びに前記測定されたバイオマーカーの存在及び/またはレベルをRCCの存在または重篤度と関連づけることによる、ヒト患者におけるRCCを診断またはモニタリングするための診断的in vitro方法であって、前記測定されたバイオマーカーが、測定可能なMMP-7免疫反応として直接的に測定される、またはMMP-7に対して生成された循環している抗体の形態で間接的に測定されるMMP-7である、診断的in vitro方法。

10

**【請求項 3】**

RCC患者の体液中のMMP-7の免疫反応レベルまたは抗MMP-7抗体レベルを、選択された連続的時間間隔で測定する工程を含む、RCC患者におけるRCCの進行をモニタリングするための方法として実施される方法であって、MMP-7の測定レベルの経時的な変化がRCCの進行を示す、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

RCC患者の体液中のMMP-7の免疫反応レベルまたは抗MMP-7抗体レベルを、選択された連続的時間間隔で測定する工程を含む、RCCの治療の有効性を評価するための方法として実施される方法であって、測定結果間のMMP-7の測定レベルの低下が治療の有効性を示す、請求項 2 に記載の方法。

20

**【請求項 5】**

前記体液が血清、血漿、及び血液から選択される、請求項 2 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

MMP-7の免疫反応性または抗MMP-7抗体が、特異的リガンドアッセイ技術を用いることによって測定される、請求項 2 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

**【請求項 7】**

MMP-7の免疫反応性が、MMP-7に特異的に結合する少なくとも1つの特異的リガンドを用いたアッセイで測定される、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

抗MMP-7抗体が、抗MMP-7抗体に特異的に結合する少なくとも1つの特異的リガンドを用いたアッセイで測定される、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 9】**

測定されたMMP-7の免疫反応性が、MMP-7自体、並びに/あるいはMMP-7の免疫反応性を示すそのプロ酵素型（プロMMP-7）及び/またはMMP-7断片の存在に起因し得る、請求項 2 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

40

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、厳選されたメタロプロテアーゼ、すなわちMMP-7及び/またはその生理的前駆体のプロMMP-7が腎細胞癌（RCC）患者の体液、特に血清または血漿中で上昇しているという新しい発見に基づいた、RCCの診断のための高感度且つ特異的なin vitro方法に関する。本発明はまた、体液サンプル中におけるMMP-7の検出のための特異的リガンドアッセイ、すなわちRCCに対する体液性バイオマーカーとしてのMMP-7の使用に関する。

**【0002】**

本出願の関連において、用語「診断」または「診断用の」は、その他の点でより詳細に

50

またはより狭い意味で定義されていなければ、通常、疾患または症状の検出及び同定の狭い意味での診断だけでなく、治療方法の評価にともなう治療、並びに疾患の予測される経過及び患者の生存のための予後診断を含んだ、すでに診断された疾患の経過をモニターすることも網羅することを意図する総称として用いられる。

【0003】

用語「体液性バイオマーカー」は、バイオマーカーまたは前記バイオマーカーに関連する免疫反応性を表すのに用いられ、組織バイオマーカーが、通常、それらの測定のために、生検または穿刺によってのみ獲得可能な組織物質を必要とするのとは対照的に、それは、体液中、特に血行中で測定され得る。

【背景技術】

【0004】

腎細胞癌(RCC)は、前立腺及び膀胱癌に続いて、三番目に多く見られる尿路の悪性腫瘍である。それは、診断するのが特に難しい癌である。実際、RCC患者はしばしば、比較的進行した状態に達するまで、非特異的な症候を有するかあるいは全く無症状である。その結果として、診断の時点で、腎臓癌患者の15~25%がすでに転移性RCCを罹患している。いったん転移性疾患が生じると、長期生存の予後は良くない。

【0005】

今日、RCCは、通常、腹部超音波検査(US)及びコンピュータ断層撮影(CT)によって付随的に検出される。それは、時には、放射性同位体による骨または腎臓の血流スキャンによって示唆される。しかし、これらの技術は時間がかかり且つ高価である。

【0006】

現在、分子生物学的、細胞遺伝学的、免疫組織化学的、並びにプロテオームに基づく技術を用いてRCCを特徴づけするための多大な努力がなされている。このような状況において、多くのマーカーが、診断または予後因子としてのそれらの潜在的な使用について評価されている。しかし、今のところ、それらのうちで積極的な試行において承認されているものはない。前記事項の現況を、以下のように概説することができる。

【0007】

インターロイキン6及びその受容体は、腫瘍増殖及び転移性腎臓癌にともなうある症候において役割を担っている可能性がある(Blay JYら, Cancer Res. (1992) 52, 3317-22)。

【0008】

血管新生因子であるFGF(線維芽細胞増殖因子)は、疾患の進行の潜在的な予後マーカーとして機能する可能性がある(Rak JMら, Anticancer Drugs (1995) 6, 3-18)。

【0009】

ウロキナーゼの特異的阻害剤であるプラスミノゲン活性化因子阻害剤-1は、腎細胞癌の早期再発を予測する予後因子として報告された。無病生存率に対して高リスク及び低リスクの群を、腫瘍組織中のプラスミノゲン活性化因子阻害剤-1抗原含量によって区別することができる(Hofmann Rら, J Urol. (1996) 155, 858-62)。

【0010】

最近の研究では、正常上皮の細胞-細胞接着に重要な役割を担うE-カドヘリンの発現が、腎臓細胞において減少していることが記載されている(Shimazui T, Cancer Res. (1996) 56, 3234-7)。

【0011】

WO 02/082076は、RCC患者において免疫原性である腫瘍マーカーの同定に関する。当該著者らは、これらのタンパク質が腫瘍細胞の表面に提示され、そのために循環していないことを報告した。当該著者らは、個体の血清中におけるこれらの腫瘍マーカータンパク質に特異的な循環している抗体の存在を検出するための免疫アッセイを記載している。従って、当該免疫アッセイは、循環中のRCCマーカーの直接的検出にではなく、患者の組織中に存在するRCC腫瘍マーカータンパク質に対して生じた(循環している)自己抗体の間接的検出に基づいている。マトリックスメタロプロテアーゼまたはマトリックスメタロプロ

10

20

30

40

50

テアーゼに対する抗体については言及されていない。

【特許文献 1】WO 02/082076

【特許文献 2】US 2004/0029200

【非特許文献 1】Blay JYら, *Cancer Res.* (1992) 52, 3317-22

【非特許文献 2】Rak JMら, *Anticancer Drugs* (1995) 6, 3-18

【非特許文献 3】Hofmann Rら, *J Urol.* (1996) 155, 858-62

【非特許文献 4】Shimazui T, *Cancer Res.* (1996) 56, 3234-7

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

10

腎細胞癌の検出及び追跡のためのさらなる腫瘍マーカー、特に血液サンプル及び血清または血漿サンプルのそれぞれにおいて検出することができ、ゆえに、患者の日常的検診で測定されるバイオマーカーの一覧に含めることができる体液性腫瘍マーカーに対する必要性が依然としてある。腎臓腫瘍を早期に診断することが可能であれば、これはRCCの結果を改善することに非常に強い衝撃を有するであろう。有効な診断用アッセイの利用可能性により、特に高リスクな集団（すなわちフォン・ヒッペル・リンドウ病患者、血液透析患者、移植患者、または免疫抑制患者）を日常的に選別することが可能となり（N.J. Vogelzang (1998) *The Lancet*, 352, 1691-1696）、無症状の腫瘍を検出することが可能となるであろう。高感度の体液性腎細胞癌マーカー試験は、腎全摘出または腎部分摘出後に腎細胞癌を有する患者において、腫瘍再発を検出するための高い有用性も有するであろう。そのようなマーカーにより、当該疾患の拡大の評価を完了することが可能となるであろう。それは、侵襲的検査の使用を制限し、より早期に治療法を用いるのに役立つ可能性がある。そのような体液性マーカーにより、治療の間の腫瘍のモニタリングが容易となり、治療反応及び予後のより優れた予測が可能となるであろう。

20

【課題を解決するための手段】

【0013】

これらの目的等のために、本発明の目的は、患者の体液、とりわけ血液、血清、及び血漿中で直接的に測定可能な体液性バイオマーカーに基づいた、RCCの診断のための *in vitro* 方法を提供することである。

【0014】

30

本発明によれば、並びに臨床的判断及び本明細書に記載の試験に基づき、腎細胞癌（RCC）の診断、予後診断、及びモニタリングは、請求項 1 による、ヒト患者における腎細胞癌の検出、早期発見、モニタリング、及び/または予後診断のための体液性バイオマーカーとしての、マトリックスメタロプロテアーゼ 7（MMP-7）及び/または MMP-7 の免疫反応性を備えたその前駆体と断片の使用、あるいは循環している抗 MMP-7 抗体の使用によって可能となる。

【0015】

体液性 RCC バイオマーカーとしての MMP-7 の前記使用に基づく診断方法は、請求項 2 から 9 に記載されている。

【0016】

40

前記請求項における、用語「レベル」は、容量あたりの質量について正確な数値で、並びに測定に用いられるアッセイの較正によって定義される任意の単位として提供され得る量または濃度を意味する。

【0017】

MMP-7 及びプロ MMP-7 は、ペプチド性で、既知の構造及びアミノ酸配列の金属含有生体分子である。MMP-7 は、酵素活性を示し、機能的且つ構造的に関連する「マトリックスメタロプロテアーゼ」（慣用名に加えて、MMP という文字と数字（すなわち、MMP-xx）からなる体系的な略称を特徴とする）と称される分子のグループに属する。ヒトにおいて、このファミリーの 16 個のメンバーが同定されており（Kleinerら, *Cancer Chemother Pharmacol.*, 1999; 43 Suppl: S42-15）、ヒト以外の種を同じように考慮した場合、MMP の数はさ

50

らに多い (Hideaki Nagaseらによるミニレビュー (1999) *J. Biol. Chem.* 274, pp. 21491-21494には、20種のファミリーのメンバーが列挙されている)。概してMMP、特にMMP-7について、以下で議論する。

【0018】

[マトリックスメタロプロテアーゼ]

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) (マトリキシン (matrixin) と呼ばれる) は、細胞外マトリックス (ECM) の分解に作用する亜鉛及びカルシウム依存性エンドペプチダーゼファミリーを構成する。

【0019】

MMPは、骨及び組織の再形成、子宮の再吸収 (uterine resorption)、栄養膜移植、血管新生、胚発生、及び正常な創傷治癒を含む多種多様な正常な生理的過程に参与している (Kleiner及びStetler-Stevenson, *Cancer Chemother Pharmacol.* (1999) 43 Suppl: S42-51; Nagase, Hら, *J. Biol. Chem.* (1999) 274, 2191)。過剰に存在する場合、それらはまた、歯周炎 (Reynolds及びMeikle, *J R Coll Surg Edinb.* (1997) 42 (3): 154-60)、関節炎、アテローム性動脈硬化、組織の潰瘍、腫瘍細胞の浸潤、及び転移 (Birkedal-Hansenら, *Crit Rev Oral Biol Med.* (1993) 4 (2): 197-250) を含む多くの疾患に関連するECMの加速された分解に参与していると考えられている。

10

【0020】

マトリックスメタロプロテアーゼは、細胞外マトリックスの分解を介在することによって腫瘍の浸潤に重要な役割を果たしていることが知られている (Shiomi Tら, *Cancer Metastasis Rev.* (2003) 22 (2-3), 145-152)。

20

【0021】

MMP-2及びMMP-9タイプのメタロプロテアーゼは、RCC腫瘍組織において上昇していることが報告されており、それらの発現レベルは腫瘍の悪性度に相関していることが示唆された (Kyglarら, *J Urol.* 1998 Nov; 160 (5): 1914-8)。

【0022】

Lein Mらは、MMP-9がRCCに罹患した患者の腫瘍組織において上昇しており、一方でMMP-2が腫瘍組織と正常同等物との間で差がないことを見出した (*Int J Cancer.* 2000 Mar 15; 85 (6): 801-4)。

【0023】

Sheriefらは、腎細胞癌の患者からの尿中でマトリックスメタロプロテアーゼの上昇した酵素活性 (このことは、正常に分泌された細胞外マトリックス (ECM) タンパク質の分解を引き起こす) を検出することが可能であることを記載した。低下した尿中ECMタンパク質をSDS-PAGEによって、次いで3種のECMタンパク質に対する抗体を用いた免疫ブロッティングによって分析した。マトリックスメタロプロテアーゼの酵素活性を、フルオレセイン接合コラーゲンIV基質を用いて測定した (Sherief MH, *J Urol.* (2003) 169 (4), 1530-4)。

30

【0024】

酵素測定では、MMPは直接的に測定されない。そのような測定法においては、酵素活性のみが測定されるため、それによって観察された酵素活性に参与するMMPのタイプに関して信頼性のある結論を導くことはできない。

40

【0025】

同様に、US 2004/0029200において、患者の尿中において、メタロプロテアーゼの酵素活性によるタンパク質分解により生じた細胞外マトリックスタンパク質を検出することによって、RCCを診断するための方法が報告された。MMPは、MMP-2、MMP-3、及びMMP-9を含むことが言及されている。興味深いことに、当該著者らは、メタロプロテアーゼの上昇した活性が、メタロプロテアーゼの量が上昇したに違いないことを必ずしも意味しないことを明記している。従って、MMP-2及びMMP-9の量が、コントロールと比較してRCC患者の尿中で常に上昇しているわけではないことを示している。

【0026】

50

## [ MMP-7 ]

MMP-7 (本発明の方法において測定されたメタロプロテアーゼ)は、すべてのMMPのうち最も小さなものの一つであり、プロドメインと触媒ドメインの2つのドメインからなる。

## 【 0 0 2 7 】

MMP-7はまた、マトリライシン、Pump-1、プロテアーゼ子宮メタロプロテアーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ-7、及びマトリン (Matrin) としても知られている (Swiss-Prot登録番号: P09237, EC 3.4.24.2)。

## 【 0 0 2 8 】

MMP-7は、4-アミノフェニル酢酸第二水銀 (APMA) 及びトリプシンによって段階的に活性化される (Imai Kら, J Biol Chem (1995) 270, 6691-6697)。プロ酵素の活性化は、MMPにおいて保存されているシステイン・スイッチ・モチーフを含むN末のプロ領域のタンパク質分解による除去を必要とする (Van Wart, H. E.及びH. Birkedal-Hansen (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 5578)。

## 【 0 0 2 9 】

MMP-7は、広範囲の細胞外マトリックス高分子、例えばフィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカン、エラスチン、ゼラチン、及びIV型コラーゲン、並びに<sub>1</sub>-アンチトリプシンを切断することができる (Murphy Gら, Biochem J (1991) 277, 277-279; Sires Uら, Biochem Biophys Res Commun (1994) 204, 613-620)。

## 【 0 0 3 0 】

MMP-7は、正常及び病変組織の上皮細胞において発現している (Wilson, C. L.及びL. M. Matrisian (1996) Int. J. Biochem. Cell Biol. 28, 123)。

## 【 0 0 3 1 】

MMP-7は、しばしば、種々の癌、例えば胃腸系 (McDonnell Sら, Mol Carcinog. (1991), 4 (6), 527-33; Senota A, Clin Exp Metastasis. (1998) 16 (4), 313-21)、結腸直腸系 (Yoshimoto Mら, Int J Cancer. (1993) 54 (4), 614-8; Adachi Y, Int J Cancer. (2001) 95 (5), 290-4)、卵巣系 (Tanimoto H, Tumor Biol. (1999) 20 (2), 88-98)、膵臓系 (Yamamoto Hら, Journal of Clinical Oncology, (2001) 19 (4), 1118-1127)の癌において過剰発現している。

## 【 0 0 3 2 】

MMP-7の上昇した発現はまた、高悪性度のRCC腫瘍においても観察された (Sumi Tら, Oncol Rep. (2003) 10 (3), 567-70)。

## 【 0 0 3 3 】

しかし、組織抽出物、例えば腫瘍組織抽出物において、mRNAの過剰発現が確認され、多くの場合で、mRNAの過剰発現は、例えば癌患者の血清中の対応するタンパク質の上昇した血清レベルと相関しないことが立証されている。

## 【 0 0 3 4 】

実際、プロMMP-7は結腸腺癌細胞において過剰発現しているが、結腸直腸癌の患者からの血清中のプロMMP-7レベルは、正常な血清のものとの有意な差を示さないことが報告されている (Ohuchi Eら, Clin Chim Acta. (1996) 244 (2), 181-98)。

## 【 0 0 3 5 】

MMP-7及びプロMMP-7の上昇した血清レベルは、直腸癌及び前立腺癌患者において報告されている (JP10287700及びJP8217800)。

## 【 0 0 3 6 】

現在まで、以上に記載した研究のいずれも、MMP-7またはプロMMP-7を、RCCの早期発見または検出のための体液性マーカーとして使用することができることを示唆していない。

## 【 0 0 3 7 】

同様に、前記研究のいずれも、体液中のMMP-7及び/またはプロMMP-7レベルを、RCC治療の有効性及びRCCの進行をモニタリングするために使用することができることを示唆していない。

## 【 0 0 3 8 】

10

20

30

40

50

実際に、本発明者らは、相当数のRCC患者において、循環しているMMP-7及び/またはプロMMP-7の免疫反応レベルが上昇していることを初めて示した。このように、MMP-7及び/またはプロMMP-7を、RCC検出用の陽性の予測パラメータとして使用することができ、統計的に有意なRCCの確率が、上昇したMMP-7及び/またはプロMMP-7レベルを有する患者に対して見出される。

【0039】

従って、MMP-7及び/またはプロMMP-7は、高リスク集団のRCC診断のための、RCC患者の管理の追跡のための、RCCの進行のモニタリングのための、並びに癌治療の有効性の評価のための有用なマーカーである。

【0040】

本発明は、癌患者からの体液サンプルをMMP-7及び/またはプロMMP-7について定期的に分析する工程；前記体液中のMMP-7及び/またはプロMMP-7のレベルを、健常なヒトコントロールの好ましくは同じ種類の体液中のMMP-7及び/またはプロMMP-7のレベルと比較する工程（ここで、前記健常なヒトコントロールに対して、前記患者におけるMMP-7及び/またはプロMMP-7の上昇は、RCCに関連している）を含む、癌患者におけるRCCを診断または検出する方法を提供する。

【0041】

本発明者らは、RCCにおける免疫原性成分の同定を可能にする血清学的スクリーニングを用いた従来のプロテオーム解析を組み合わせた技術を用いることによって、MMP-7及びプロMMP-7を同定した（Unwinら，Electrophoresis（1999）20，3629）。

【0042】

本発明のMMP-7及びプロMMP-7は、まず、RCC細胞株由来のタンパク質抽出物の二次元ゲル電気泳動によって、さらにそれに続くRCC患者の血清を用いた免疫プロットングによる検出によって同定された。免疫染色されたタンパク質スポットを二重のゲルから切り出し、ゲル消化し、マススペクトロメトリーによって分析した。健常な志願者に対する患者からの血清の差異分析を用いて、前記タンパク質がRCC患者における腫瘍マーカーとして同定された（Flickinger Cら，J Reprod. Immunol.（1999）43，35-53）。

【0043】

MMP-7及び/またはプロMMP-7を、下記に例示されるように、種々の診断用途における体液性バイオマーカーとして使用できる。

【0044】

免疫応答の性質が理由で、ごくわずかな量の循環している腫瘍マーカータンパク質によって自己抗体が誘発され得る可能性があり、それゆえ、腫瘍マーカーに対する免疫応答を検出することに依存する間接的な方法はそれらの直接的測定に代わる方法となり得、体液中の腫瘍マーカーの直接的測定用の方法よりもより高感度でさえあり得る。従って、MMP-7に対する自己抗体の検出に基づくアッセイ法は、当該疾患過程の初期において、特に有益であり得る。

【0045】

しかし、免疫応答及び自己抗体の存在は、患者依存적である（Koteraら，（1994）Cancer Res.，54，2856-2860；Korneevaら，（2000）Am. J. Obs. Gynecol.，183，18-21）。

【0046】

従って、本発明はまた、患者から得られた体液サンプル中のMMP-7、プロMMP-7、及び/またはMMP-7自己抗体を特異的に検出する工程、並びに前記測定された量を任意の既知の統計方法によって定義されたカットオフと比較する工程（95%信頼水準（CI）のコントロール集団またはROC曲線の傾き）を含む、高リスク集団におけるRCCの診断を補助するための方法を提供する。

【0047】

患者の体液中のMMP-7、プロMMP-7、及び/またはMMP-7自己抗体の有意に増大した量の存在は、RCCの兆候である。

【0048】

10

20

30

40

50

本発明の方法はまた、原発性RCCと診断された患者における、癌の経過または進行をモニタリングするための方法として実施され得る。

【0049】

部分的または全体的腎摘出の場合、当該方法を用いて外科治療(chirurgical treatment)の有効性を評価し、当該方法は、RCC患者からの体液サンプル中のMMP-7、プロMMP-7、及び/またはMMP-7自己抗体の濃度を測定することによって周期的検査を実施する工程を含む(ここで、基底レベルに戻るMMP-7、プロMMP-7、及び/またはMMP-7自己抗体の血清濃度は、治療の有効性を示す)。

【0050】

また、当該方法を用いて、初期診断の時点で転移を有するRCC患者に対する免疫療法による治療の有効性を評価することができ、当該方法は、RCC患者からの体液サンプル中のMMP-7、プロMMP-7、及び/またはMMP-7自己抗体の濃度を測定することによって周期的検査を実施する工程を含む(ここで、MMP-7、プロMMP-7、及び/またはMMP-7自己抗体の低下したレベルは、治療の感度または成功を示す)。

【0051】

また、当該方法を用いて、完全寛解後のRCC患者における腫瘍の再発を検出することができ、当該方法は、患者由来の体液中のMMP-7、プロMMP-7、及び/またはMMP-7自己抗体のレベルを周期的に測定する工程を含む(ここで、MMP-7、プロMMP-7、及び/またはMMP-7自己抗体の上昇した濃度は、疾患の再発を示す)。

【0052】

MMP-7、プロMMP-7、及び/またはMMP-7自己抗体は、単独で、または他の日常的診断方法と組み合わせて測定され得る。

【0053】

血清MMP-7、プロMMP-7、及び/またはMMP-7自己抗体、並びに他の腫瘍マーカーまたは診断ツールの併用アッセイは、RCCの診断、進行のモニタリング、及び追跡調査に有益であろう。

【0054】

MMP-7及びプロMMP-7は、ヒトMMP-7及びプロMMP-7にそれぞれ特異的に結合する抗体または任意の特異的リガンドを用いて測定される。

【0055】

特異的リガンドは、ヒトMMP-7、プロMMP-7、ヒトMMP-7、プロMMP-7に特有のこれらの酵素のバリエーションまたは分解産物であり、他のMMPとの交差反応を実質的に示さない。

【0056】

これらのリガンドは、ヒトアルブミン、 $\alpha_2$ -グロブリン、及びヘモグロビンとの交差反応を有さないことは明らかである。

【0057】

MMP-7及び/またはプロMMP-7の存在は、それ自体既知である特異的リガンドアッセイ技術を用いることによって、体液サンプル(例えば血漿、血清)中で比較的容易に測定され得る。特異的リガンドとして、すなわち、抗体、アダプター、オリゴマーがある。特異的リガンドアッセイ技術として、標準的な抗体ベースの検出系、例えばサンドイッチアッセイまたは競合アッセイ等の免疫アッセイ、及び免疫プロットング技術等がある。

【0058】

本発明は、RCCマーカーとしてのMMP-7及び/またはプロMMP-7を特異的に検出及び測定する方法に関するものであって、当該方法は、MMP-7及び/またはプロMMP-7の存在について試験されるサンプルをリガンドアッセイ試薬と接触させる工程、並びに前記サンプル中に存在する任意のMMP-7及び/またはプロMMP-7への前記リガンドアッセイ試薬の特異的結合によって形成された複合体の存在を検出する工程を含む特異的リガンドアッセイ技術である。

【0059】

本発明はまた、RCCマーカーとしてのMMP-7及び/またはプロMMP-7に対する自己抗体を

10

20

30

40

50

特異的に検出及び測定する方法に関するものであって、当該方法は、MMP-7及び/またはプロMMP-7に対する自己抗体の存在について試験されるサンプルをリグンドアッセイ試薬と接触させる工程、並びに前記サンプル中のMMP-7及び/またはプロMMP-7に対する任意の自己抗体への前記リグンドアッセイ試薬の特異的結合によって形成された複合体の存在を検出する工程を含む特異的リグンドアッセイ技術である。

【0060】

既知の免疫アッセイ技術は当業者にとって公知であるため、それらについての詳細な議論は本明細書では必要ない。典型的な適切な免疫アッセイ技術は、サンドイッチ酵素連結免疫アッセイ(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)、競合結合アッセイ、ホモジニアスアッセイ、ヘテロジニアスアッセイ等を含む。種々の既知の免疫アッセイ法が、Methods in Enzymology (1980) 70, pp. 30-70及び166-198に概説されている。免疫アッセイでは、直接的及び間接的標識を使用することができる。

10

【0061】

本発明の一実施態様において、免疫学的反応検出方法は、いわゆるTRACE技術に基づいている(Mathis, Clin Chem. (1993) 39(9), 1953-9)。

【0062】

本発明の方法は、RCC個体からの血清を、MMP-7、プロMMP-7、抗MMP-7抗体、及び/または抗プロMMP-7抗体と反応する1つまたはいくつかのリグンドと接触させる工程を含む。

【0063】

好ましくは、ヒトMMP-7、プロMMP-7、またはバリエーションに対するリグンドは、MMP-7またはプロMMP-7に特異的であり、且つMMP-7及びプロMMP-7以外のMMPとの交差反応を実質的に示さない。

20

【0064】

好ましくは、ヒト抗MMP-7抗体及び抗プロMMP-7抗体に対するリグンドは、抗MMP-7及び抗プロMMP-7抗体に特異的であり、且つ他の抗MMP抗体との交差反応を実質的に示さない。

【0065】

MMP-7及びプロMMP-7は、それぞれ抗MMP-7抗体及び抗プロMMP-7抗体に対するリグンドとして使用され得る。

しかし、MMP-7及び/またはプロMMP-7の特異的測定結果をもたらす2つまたはいくつかのリグンドを用いて当該アッセイを実施する場合、少なくとも1つのリグンドは特異的であるべきである。

30

【0066】

一実施態様において、特異的リグンドは、ヒトMMP-7及び/またはプロMMP-7に対するポリクローナル及び/またはモノクローナル抗体である。

【0067】

現在までのところ、MMP-7及びプロMMP-7の代謝に関する情報はない。従って、多くのタンパク質に関して、我々は、MMP-7及びプロMMP-7は種々の修飾(すなわち、翻訳後修飾、変異、分解)形態で存在し得ると推測できる。

【0068】

このように、MMP-7及びプロMMP-7の評価は、種々の形態のMMP-7及びプロMMP-7を検出する測定方法を網羅することを意図する。

40

【0069】

本発明はまた、体液中のMMP-7及び/またはプロMMP-7を検出するための手段を含む前記方法を実施するためのキットを提供する。

【0070】

前記キットは、前述のアッセイを実施するのに必要な成分をすべて含むことができる。

【実施例】

【0071】

[材料と方法]

<血清サンプル>

50

すべての血清サンプルは、腎細胞癌と診断された患者 (n=177) または健常な志願者ドナー (n=116) から採取した (各個人からインフォームドコンセントを得た後に) ヒト静脈血サンプルから単離された。

【 0 0 7 2 】

< 免疫アッセイ >

下記に記載の測定方法用に、市販で入手可能な免疫アッセイキットであるヒトMMP-7 Qu antikine ELISAキット (DMP700) (R&D Systems Europe社, Abingdon UK) 及びTRACE技術に基づいたホモジニアスMMP-7免疫アッセイ (Mathis, Clin Chem. 39 (9), 1953-9 (1993)) を用いた。

【 0 0 7 3 】

a) ヒトMMP-7酵素連結免疫アッセイ

当該アッセイは、定量的サンドイッチ酵素免疫アッセイ技術を利用している。MMP-7に特異的なモノクローナル抗体が、マイクロプレート上にあらかじめコーティングされている。標準物質及びサンプルをウェル中にピペットで入れ、固定化した抗体にMMP-7を結合させる。結合していない物質を洗浄除去した後、MMP-7に特異的な酵素連結ポリクローナル抗体を前記ウェルに加える。結合していない抗体 - 酵素試薬を除去するために洗浄した後、基質溶液を前記ウェルに加え、第1工程で結合している総MMP-7 (プロ型及び/または活性型) の量に比例して発色させる。発色を停止させ、色の強度をFLUOstarマイクロプレートリーダー (BMG Labtechnologies社, GmbH, Offenburg, Germany) によって450nmの吸収波長で測定する。

【 0 0 7 4 】

前記アッセイは、製造業者のR&D Systemsが指示したアッセイプロトコールに従って実施された。

【 0 0 7 5 】

b) TRACE技術に基づいたヒトMMP-7ホモジニアス免疫アッセイ (Mathis, Clin Chem. 39 (9), 1953-9 (1993))

当該アッセイは、非放射性のエネルギー移動に基づいたTRACE (Time Resolved Amplified Cryptate Emission: 時間分解増幅クリプテート放射) 技術を利用している。この移動は、2つの蛍光トレーサー (ドナー: ユーロピウム・クリプテート、アクセプター: AF647) の間で生じる。

【 0 0 7 6 】

前記アッセイでは、それらはヒトMMP-7に特異的なモノクローナル抗体にそれぞれ結合している。励起後、クリプテートは620nmで長寿命の蛍光シグナルを発する。AF647は、クリプテートからのエネルギー移動によって励起される場合以外は、665nmで短寿命のシグナルを発する。この移動は、免疫複合体中のアクセプターに対するドナーの接近度、並びにドナーの発光スペクトル及びアクセプターの吸収スペクトルの回復に依存する。抗原 - 抗体複合体の形成の間に測定されるシグナルは増幅をとまなう。抗原濃度に比例する特異的蛍光 (RFU) は、2つの選択: スペクトル選択 (波長に応じた分離) 及び時間的選択 (時間分解測定) によって得られる。このアッセイは、分離または洗浄のないホモジニアスなものである。アッセイサンプル中に存在するMMP-7の分子は、ヒトMMP-7に特異的な2つのモノクローナル抗体 (Cezanne SAS, France) の間に挟まれる。当該シグナルの強度 (RFU) は、MMP-7の量に比例する。

【 0 0 7 7 】

前記アッセイでは、2つのモノクローナル抗ヒトMMP-7抗体が、AF647フルオロフォア (Molecular Probes社, Eugene, OR) 及びユーロピウム・クリプテートTBP - モノ - MP (Schering AG GmbH, Germany) にそれぞれカップリングしている。当該カップリング反応は、製造業者が指示したカップリングプロトコールに従って実施された。

【 0 0 7 8 】

AF647接合抗体及びクリプテート接合抗体のストック溶液を、アッセイ用緩衝液 (0.1M リン酸ナトリウム (pH 7.1)、0.1% BSA (プロテアーゼフリー)、0.6M KF、0.2mg/mLマ

10

20

30

40

50

ウスIgG)で、使用前にそれぞれ5 µg/mL及び0.35 µg/mLに希釈した。

【0079】

[測定結果及び結果]

a) 酵素連結免疫アッセイ技術を用いた、検量線及び腎細胞癌(RCC)の患者の血清中のMMP-7レベルの測定結果

検量線は、リコンビナント・ヒトMMP-7(Quantikineキット標準物質)を用いることによって得られた。前記リコンビナント・ヒトMMP-7を、校正用希釈液RD6-28(Quantikineキット)で希釈し、0.156、0.312、0.625、1.25、2.5、5、及び10ng/mLのMMP-7標準値を得た。

【0080】

>10ng/mLのMMP-7濃度を有する血清サンプルを、校正用希釈液RD6-28(Quantikineキット)で希釈し、当該アッセイのダイナミック・レンジ内の値を有するサンプルを作製した。

【0081】

標準物質または血清サンプル(50 µL)、及びアッセイ用希釈液(100 µL)を、マイクロタイタープレートのウェルへ加えた。水平方向環状型シェーカー上で室温にて2時間インキュベーション後、各ウェルを洗浄用緩衝液(400 µL)で4回洗浄した。200 µLのMMP-7接合体を各ウェルへ加え、次いでシェーカー上で室温にて2時間、マイクロタイタープレートをインキュベーションした。4回の洗浄工程及び各ウェルへの基質溶液(200 µL)の添加後、マイクロプレートを室温にて30分間インキュベーションした。当該反応を停止溶液(50 µL)で停止させ、各ウェルの吸光度を、FLUOstarマイクロプレートリーダーを用いて450nmに対して測定した。

【0082】

健常なヒト血清(n=116)を、コントロールサンプルとして用いた。検量線を図1に示す。

【0083】

RCC患者は、コントロール被験者と比較して、上昇した血清MMP-7レベルを有した(表1及び図2)。

【0084】

【表1】

表1

群	n	平均値±SD	感度 (カットオフ 4.78ng/mL)	特異性 (カットオフ 4.78ng/mL)
RCC	177	12.59±29.13 ng/mL	79.7%	95%
コントロール	116	3.27±0.83 ng/mL		

【0085】

表1において、

感度 = 真陽性 / 真陽性 + 偽陰性 ;

特異性 = 真陰性 / 真陰性 + 偽陽性

【0086】

b) TRACE技術を用いた、検量線及び腎細胞癌(RCC)の患者の血清中のMMP-7レベルの測定結果

検量線は、ヒト腎臓癌から確立されたCal-54細胞株(DSMZ, GmbH, Germany)の細胞培養上清を用いることによって得られた(Gioanniら, Bull Cancer 83: 553 (1996))。天然型のMMP-7を含む培養上清を新生仔ウシ血清(NBCS)で希釈し、1、2、4、6.1、9、9.9

10

20

30

40

50

、16.3、及び42.8ng/mLのMMP-7標準値を得た。当該標準物質を、高純度リコンビナント・ヒトMMP-7（R&D Systems Europe社，Abingdon UK）に対して校正した。NBCSをゼロ基準として用いた。健全なヒト血清（n=61）を、コントロールサンプルとして用いた。

【0087】

>42.8ng/mLのMMP-7濃度を有する血清サンプルをNBCSで希釈し、当該アッセイのダイナミック・レンジ内の値を有するサンプルを作製した。

【0088】

標準物質及びサンプル（50 $\mu$ L）を、BRAHMS Kryptor自動装置での使用に適したチューブ（12-13mm径）の中に入れ、次いで〔材料と方法〕（b）で記載したように調製されたA F647接合抗体（50 $\mu$ L）及びクリプテート接合抗体（50 $\mu$ L）を加えた。37 $^{\circ}$ Cにて1時間インキュベーションした後、BRAHMS Kryptor自動装置（BRAHMS Aktiengesellschaft, Hennigsdorf, Germany）を用いて、665及び620nmでの2波長同時測定法によって、特異的蛍光（RFU）を測定した。

10

【0089】

検量線を図4に示す。

【0090】

RCC患者は、コントロール被験者と比較して、上昇した血清MMP-7レベルを有した（表2及び図5）。

【0091】

【表2】

20

表2

群	n	平均値 $\pm$ SD	感度 (カットオフ 3.37ng/mL)	特異性 (カットオフ 3.37ng/mL)
RCC	100	13.51 $\pm$ 42.32 ng/mL	79%	95%
コントロール	61	1.58 $\pm$ 0.97 ng/mL		

30

【0092】

表2において、

感度 = 真陽性 / 真陽性 + 偽陰性；

特異性 = 真陰性 / 真陰性 + 偽陽性

【0093】

b) 統計分析及びROC曲線

臨床的特異性に対する臨床的感度の線図を、ROC (Receiver-Operating Characteristics: 受信者操作特性) 曲線によって表す。

【0094】

40

臨床的感度及び臨床的特異性の計算のために、二項分布に基づいて95%信頼区間を決定した (Besnard et Morin, In: Immunostat, Paris, Edition Nucleon, 227-251 (1997))。

【0095】

我々が、当該実験に用いられたアッセイのカットオフは、ROC曲線と斜線の間の最大直交距離によって規定される4.78ng/mL (MMP-7 Quantikine ELISAキット) 及び3.37ng/mL (TRACE技術に基づいたMMP-7免疫アッセイ) の位置であるとみなした場合、RCCにおける当該MMP-7測定法の臨床的感度は79%である (表1及び表2を参照)。

【0096】

ROC曲線を図3及び図6に示す。

50

【 0 0 9 7 】

以下に、試験及び図面を参照して、本発明をより詳細に記載する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 9 8 】

【 図 1 】 実験の章に記載される酵素連結免疫アッセイを用いた、腎細胞癌（RCC）の患者の血清中のMMP-7の測定用の検量線。

【 図 2 】 実験の章に記載される酵素連結免疫アッセイを用いた、RCC患者及び健常コントロールの血清中のMMP-7の測定結果の図表示。

【 図 3 】 MMP-7 Quantikine ELISAキットを用いた、RCC患者の血清中の上昇したMMP-7レベルの測定結果の臨床診断上の有効性（感度vs特異性）を表すROC（受信者操作特性）曲線。

【 図 4 】 実験の章に記載されるTRACE技術に基づいたホモジニアス免疫アッセイを用いた、腎細胞癌（RCC）の患者の血清中のMMP-7レベルの測定用の検量線。

【 図 5 】 実験の章に記載されるTRACE技術に基づいたホモジニアス免疫アッセイを用いた、RCC患者及び健常コントロールの血清中のMMP-7の測定結果の図表示。

【 図 6 】 TRACE技術に基づいたホモジニアス免疫アッセイを用いた、RCC患者の血清中の上昇したMMP-7レベルの測定結果の臨床診断上の有効性（感度vs特異性）を表すROC（受信者操作特性）曲線。

【 図 1 】

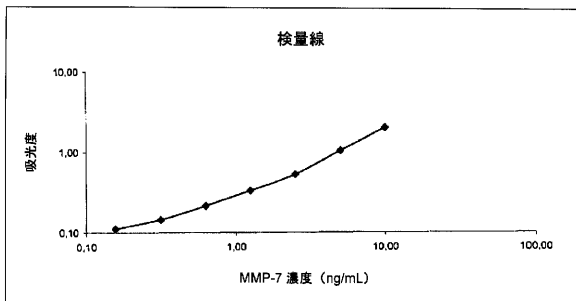


Figure 1

【 図 3 】

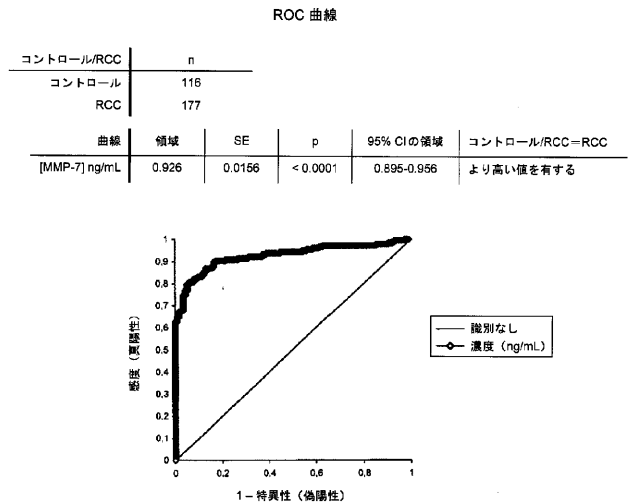


Figure 3

【 図 2 】

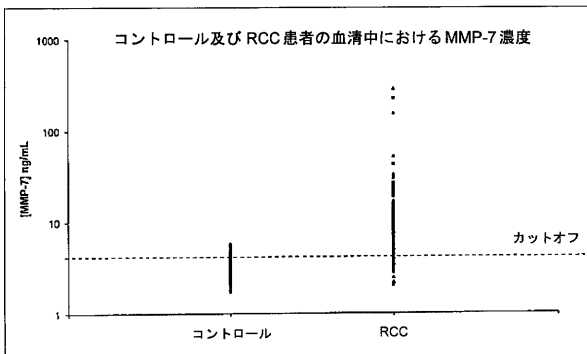


Figure 2

【 図 4 】

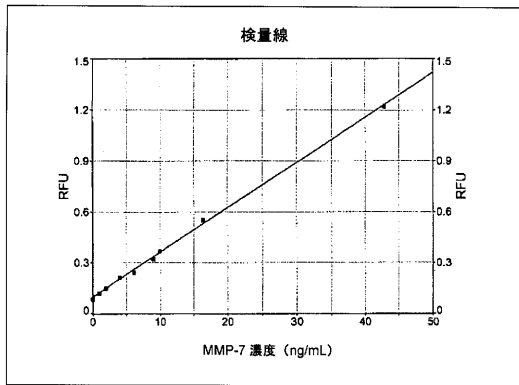


Figure 4

【 図 5 】

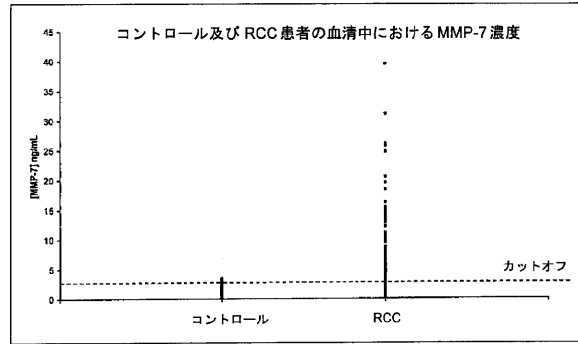


Figure 5

【 図 6 】

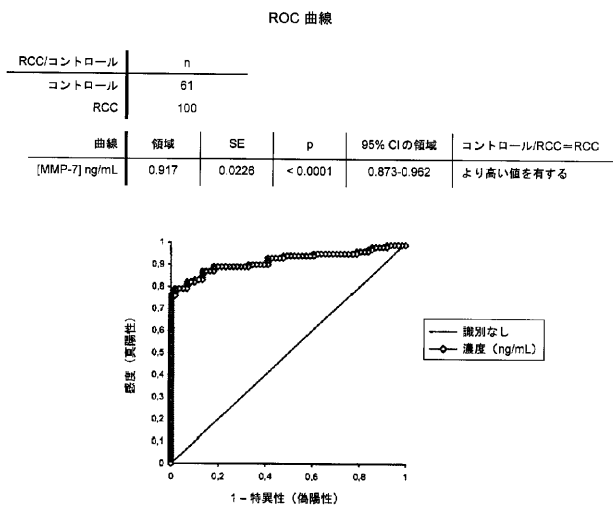


Figure 6

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2006/008212
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/574 G01N33/573		
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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data		
<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	KALLAKURY B V S ET AL: "Increased expression of matrilysin (MMP7) and stromelysin (MMP3, MMP10, MMP11) proteins as predictors of survival in RCCs." MODERN PATHOLOGY, vol. 16, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 155A-156A, XP008054954 & 92ND ANNUAL MEETING OF THE UNITED STATES AND CANADIAN ACADEMY OF PATHOLOGY; WASHINGTON, D.C., USA; MARCH 22-28, 2003 ISSN: 0893-3952 page 155A, paragraph 707	1-9
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
17 October 2006		03/11/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 661 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Schlegel, Birgit

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2006/008212

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1996, no. 12, 26 December 1996 (1996-12-26) & JP 08 217800 A (FUJI YAKUHIN KOGYO KK), 27 August 1996 (1996-08-27) cited in the application abstract	1-9
Y	LEIN M ET AL: "Matrix-metalloproteinases and their inhibitors in plasma and tumor tissue of patients with renal cell carcinoma." 15 March 2000 (2000-03-15), INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER. 15 MAR 2000, VOL. 85, NR. 6, PAGE(S) 801 - 804 , XP002352028 ISSN: 0020-7136 cited in the application page 803	1-9
Y	US 2004/253637 A1 (BUECHLER KENNETH F ET AL) 16 December 2004 (2004-12-16) paragraphs [0160] - [0164]	1-9
A	SUMI TOSHIYUKI ET AL: "Expression of matrix metalloproteinases 7 and 2 in human renal cell carcinoma." ONCOLOGY REPORTS. 2003 MAY-JUN, vol. 10, no. 3, May 2003 (2003-05), pages 567-570, XP002352032 ISSN: 1021-335X cited in the application page 570, column 1, paragraphs 2,3	1-9
Y	STRUCKMANN K, BURDET L, SIMON R, ELMENHORST K, SALVISBERG T, DIENER PA, SCHRAML P, MIHATSCH MJ, MOCH H: "MMP and TIMP expression are relevant for renal cancer progression." PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE, vol. 199, no. 4, 2003, page 256, XP002352109 87TH MEETING OF THE GERMAN SOCIETY OF PATHOLOGY AND 23RD MEETING OF THE GERMAN SOCIETY OF CYTOLOGY; BAMBERG, GERMANY; JUNE 11-14, 2003 ISSN: 0344-0338 paragraph [0297]	1-9

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/EP2006/008212

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 08217800	A	JP 2949467 B2	13-09-1999
US 2004253637	A1	NONE	

## フロントページの続き

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

(72)発明者 ブルーノ・ダルブール

フランス・30330・トレスク・リュ・ドゥ・ラ・カルミニャーヌ・(番地なし)

(72)発明者 ゲアネ・サーキシアン

フランス・30900・ニーム・モンテ・デュ・フェアウェイ・45

专利名称(译)	使用MMP-7作为肾细胞癌 ( RCC ) 的体液生物标志物诊断和监测RCC的invitro方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009506307A</a>	公开(公告)日	2009-02-12
申请号	JP2008527374	申请日	2006-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	塞尚ES ES啊		
申请(专利权)人(译)	塞尚ES啊-ES		
[标]发明人	ブルーノダルブール ゲアネサーキシアン		
发明人	ブルーノ・ダルブール ゲアネ・サーキシアン		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/573 G01N33/57438 G01N33/57484 G01N33/57488 G01N2333/96486		
FI分类号	G01N33/573.A G01N33/53.N		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	2005291783 2005-08-26 EP		
其他公开文献	JP5355086B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

基质金属蛋白酶7 ( MMP-7 ) 和/或作为体液生物标志物，用于人类患者肾细胞癌 ( RCC ) 的检测，早期检测，监测和/或预后的体外诊断方法使用其前体和片段，具有MMP-7的免疫反应性，或循环抗MMP-7抗体。

