

(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2008-536098

(P2008-536098A)

(43) 公表日 平成20年9月4日(2008.9.4)

(51) Int.Cl.

G 0 1 N 33/574 (2006.01)

F I

G O 1 N 33/574

A

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2007-556224 (P2007-556224)  
 (86) (22) 出願日 平成18年2月13日 (2006.2.13)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年10月4日 (2007.10.4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/004985  
 (87) 国際公開番号 W02006/091412  
 (87) 国際公開日 平成18年8月31日 (2006.8.31)  
 (31) 優先権主張番号 60/653,818  
 (32) 優先日 平成17年2月17日 (2005.2.17)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591044027  
 チルドレンズ メディカル センター コ  
 ーポレーション  
 CHILDREN'S MEDICAL  
 CENTER CORPORATION  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O  
 2 1 1 5 ポストン シャタックストリー  
 ト 5 5  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

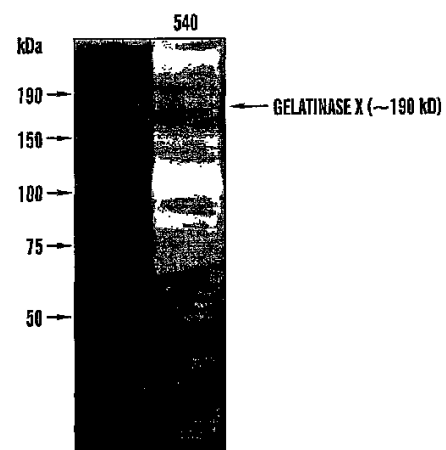
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 上皮由来の癌のためのバイオマーカーとしてのADAMTS-7

## (57) 【要約】

上皮由来の癌を有する患者において、ADAMTS-7の発現および活性は上方に調節される。従って、本発明は、上皮由来の癌（例えば乳癌、前立腺癌、膀胱癌、脳腫瘍および肝癌）の診断方法を対象とする。詳細には、生物学的サンプルにおけるADAMTS-7の存在は、上皮由来の癌が存在していることを指示する。それ故、生物学的サンプル（例えば尿または血液）におけるADAMTS-7のレベルを測定することにより、患者の癌を診断するために使用することが可能な、迅速且つ簡単に安全なスクリーニング方法を提供する。

~190 kDa HIGH MOLECULAR WEIGHT GELATINASE COMPLEX  
 IN URINE FROM CANCER PATIENTS



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

上皮由来の癌について患者の診断を容易化するための方法であって：

a . 該患者から生物学的サンプルを得るステップ；および

b . 該生物学的サンプルにおいて A D A M T S - 7 の存在または不在を検出するステップ；

を含み、A D A M T S - 7 の存在が上皮由来の癌の存在を示す方法。

**【請求項 2】**

前記生物学的サンプルが、血液、組織、血清、尿、大便、痰、脳脊髄液、乳頭吸引液、および細胞溶解物から得られる上層液からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

10

**【請求項 3】**

前記生物学的サンプルが尿である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

患者における上皮由来の癌を診断するための方法であって：

a . 該患者から得られる試験サンプルに存在する A D A M T S - 7 のレベルを測定するステップ；

b . 該試験サンプルにおける A D A M T S - 7 のレベルを対照サンプルに存在する A D A M T S - 7 のレベルと比較するステップ；

を含み、該対照サンプルにおける A D A M T S - 7 のレベルに比べ、該試験サンプルにおける相対的に高いレベルの A D A M T S - 7 が上皮由来の癌を示す方法。

20

**【請求項 5】**

前記試験サンプルおよび前記対照サンプルが、血液、組織、血清、尿、大便、痰、脳脊髄液、乳頭吸引液、および細胞溶解物から得られる上層液からなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記試験サンプルおよび前記対照サンプルが尿である、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記上皮由来の癌が、乳癌、基底細胞癌、腺癌、消化管癌、口唇癌、口腔癌、食道癌、小腸癌、胃癌、結腸癌、肝癌、脳腫瘍、膀胱癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮頸癌、肺癌、皮膚癌、前立腺癌および腎細胞癌からなる群から選択される、請求項 1 または 4 に記載の方法。

30

**【請求項 8】**

A D A M T S - 7 の存在または不在を、A D A M T S - 7 タンパク質に特異的に結合する抗体ベースの結合部分を用いて検出する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記 A D A M T S - 7 のレベルを、A D A M T S - 7 タンパク質のレベルを測定することにより測定する、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記 A D A M T S - 7 のレベルを、A D A M T S - 7 の活性を測定することにより測定する、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記 A D A M T S - 7 タンパク質のレベルを：

a . 前記試験サンプルまたはその調製物と、A D A M T S - 7 に特異的に結合する抗体ベースの結合部分とを接触させて、抗体 - A D A M T S - 7 複合体を形成するステップ；および

b . 該複合体の存在を検出し、これにより、存在している A D A M T S - 7 のレベルを測定するステップ；

を含む方法により測定する、請求項 9 に記載の方法。

40

**【請求項 12】**

前記抗体ベースの結合部分を、検出可能な標識で標識付けする、請求項 8 または 9 に記載の方法。

50

**【請求項 13】**

前記標識が、放射性標識、ハプテン標識、蛍光標識および酵素標識からなる群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記抗体ベースの結合部分が抗体である、請求項 8 または 9 に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 14 に記載の方法。

**【請求項 16】**

尿サンプル中の ADAMTS - 7 を検出するためのキットであって、尿サンプルを保持するための容器、および ADAMTS - 7 を特異的に結合する少なくとも一つの抗体を含むキット。

10

**【請求項 17】**

前記キットが、ADAMTS - 7 に特異的に結合する二つの抗体を含み、一方の抗体が固相に固定化されており、他方の抗体が検出可能に標識されている、請求項 16 に記載のキット。

**【請求項 18】**

更に、使用説明書を含む、請求項 16 に記載のキット。

**【請求項 19】**

被験体の治療を指示する方法であって、該方法は、被験体から得られる生物学的サンプルにおける ADAMTS - 7 の存在について試験される該被験体を得るステップを含み、ここで、臨床医が試験結果を精査し、もし該生物学的サンプルが ADAMTS - 7 の存在に関して陽性であるとき、該臨床医が、該被験体に対し、上皮由来の癌に対する治療を受けるように指示する方法。

20

**【請求項 20】**

前記生物学的サンプルが尿である、請求項 19 に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本出願は、米国仮特許出願第 60 / 653 , 818 号 (2005 年 2 月 17 日出願) についての米国特許法第 119 条 (e) の下の優先権を主張する。

30

**【0002】****( 発明の分野 )**

本発明は、患者から得られた生物学的サンプルにおいて ADAMTS - 7 のレベルを評価することにより、上皮由来の癌を診断および予後診断するための方法に関する。

**【背景技術】****【0003】****( 発明の背景 )**

癌の生存率における最も重要なファクターの一つは、早い段階での検出である。癌の初期事象を検出する臨床分析は、癌の進行を干渉および阻止する機会を提供する。遺伝子プロファイリングおよびプロテオミクスの発展に伴い、特定の癌を診断および予後診断するために使用することができる分子マーカーまたは「バイオマーカー」の同定がかなり進んできている。例えば、前立腺癌の場合には、抗原 PSA (前立腺特異抗原) が血液中において検出され得、そして、前立腺癌が存在することを示している。従って、前立腺癌のリスクを負った男性の血液は、PSA レベルの上昇により、迅速に、容易に、且つ安全にスクリーニングすることができる。

40

**【0004】**

癌の検出分野でかなりの進展があったとは言え、当技術分野には、尚も、臨床的応用において容易に使用することができる、様々な癌に対する新たなバイオマーカーを同定する必要性が依然として存在する。例えば、これまでのところ、容易に検出可能なバイオマーカーを用いて乳癌の診断に利用できる方法は比較的僅かな選択肢しかなかった。EGFR

50

の過剰発現は、特にエストロゲン受容体の下方調節と相まって、乳癌患者における予後不良のマーカーである。乳癌に対する他の公知のマーカーは、血液中における高レベルのM2ピルビン酸キナーゼ(M2PK)(特許文献1)、血液中における高レベルのZNF217タンパク質(特許文献2)、および乳癌において新たに同定されたタンパク質であるPDEBCの差次的発現を含み、このPDEBCの差次的発現は、診断に有用である(特許文献3)。これらのバイオマーカーは代替的な診断方法を提供しているが、広範には使用されていない。更に、多くの組織化学的マーカー、遺伝子マーカーおよび免疫学的マーカーが使用されているにもかかわらず、臨床医にとっては、依然として、どの腫瘍が他の器官に転移するのかを予測するのが困難である。

【特許文献1】米国特許第6,358,683号明細書

【特許文献2】国際公開第98/02539号パンフレット

【特許文献3】米国特許出願公開第2003/0124543号明細書

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

バイオマーカーの同定は、疾患の診断、予後診断および治療を改善することと深く関わっている。それ故、当技術分野においては、迅速に、容易に、且つ安全に検出することができる代替的なバイオマーカーを同定する必要性が存在する。そのようなバイオマーカーは、癌を有する被験体の進行または治療、特に、その疾患における浸潤性の潜在的な転移段階を診断し、病期を決定し、モニタリングするために使用することができる。

【課題を解決するための手段】

【0006】

(発明の概要)

本発明は、乳癌、前立腺癌、膀胱癌、脳腫瘍および肝癌を有する患者においては、ADAMTS-7タンパク質が尿中に存在し、ADAMTS-7の発現および活性が上方に調節されている、という発見に基づくものである。従って、本発明は、上皮由来の癌の予後を評価するための方法、上皮由来の癌の診断を容易化するための方法、および上皮由来の癌の治療効力に対するマーカーを対象とする。詳細には、生物学的サンプル、例えば尿などで検出されるADAMTS-7タンパク質の存在は、健常個体においてはADAMTS-7タンパク質が有意なレベルでは検出されないため、癌の存在を予測する。従って、生物学的サンプル(例えば尿または血液)におけるADAMTS-7の存在または不在を測定することにより、患者における上皮由来の癌、例えば前立腺癌、乳癌、肝癌、脳腫瘍または膀胱癌などの診断および予後診断の両方に使用可能な、迅速で簡単で安全なスクリーニング方法を提供する。

【0007】

一つの実施形態においては、患者における上皮由来の癌の診断を容易化するための方法が提供される。その方法は、患者から生物学的サンプルを得るステップ、およびその生物学的サンプルにおけるADAMTS-7(またはそのフラグメント)の存在または不在を検出するステップを含み、ここで、ADAMTS-7の存在は、上皮由来の癌が存在していることを示している。

【0008】

別の実施形態においては、本方法は、患者から得た生物学的試験サンプルに存在するADAMTS-7のレベルを測定するステップ、およびその観測されたADAMTS-7のレベルを同じタイプの対照サンプルに存在するADAMTS-7のレベルと比較するステップを含む。対照サンプルと比べるときに、試験サンプルに存在する比較的高いレベルのADAMTS-7は、癌が存在していることを示している。好適には、本発明の方法は、上皮由来の癌を早期に検出するために用いられる。例えば、医師により、年に一度行われる健康診断の際に患者をスクリーニングすることができる。

【0009】

「対照サンプル」という用語は、癌を有していないものと確信される一人もしくは複数

10

20

30

40

50

の「正常」または「健常」な個体から得られた生物学的サンプルを表す。対照は、当該技術分野において広く知られている方法を用いて選択されてよい。一旦、対照集団でのあるレベルが明確になると、生物学的試験サンプルから得られた一連の結果をその既知のレベルと直接的に比較することができる。

【0010】

「試験サンプル」という用語は、上皮由来の癌について試験される患者から得られた生物学的サンプルを表す。

【0011】

生物学的サンプルは、例えば血液、組織（例えば腫瘍または乳房）、血清、大便、尿、痰、脳脊髄液、乳頭吸引液および細胞溶解物からもたらされる上層液から得ることができる。一つの好適な生物学的サンプルは尿である。

10

【0012】

一つの態様においては、診断されるべき上皮由来の癌は、乳癌、基底細胞癌、腺癌、消化管癌（例えば口唇癌、口腔癌、食道癌、小腸癌および胃癌）、結腸癌、肝癌、膀胱癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮頸癌、肺癌、および皮膚癌（例えば扁平上皮細胞癌および基底細胞癌）、前立腺癌、腎細胞癌、ならびに身体の至る所で上皮細胞に影響を及ぼす他の公知の癌である。

【0013】

本発明は、更に、上皮由来の癌を有する患者を治療すべく設計された治療計画の治療効力をモニタリングするためのADAMTS-7のレベルの評価も想定している。

20

【0014】

一つの好適な実施形態においては、生物学的サンプルは尿サンプルである。しかし、血液、組織、血清、大便、痰、脳脊髄液、乳頭吸引液および細胞溶解物からもたらされる上層液の生物学的サンプルを使用することもできる。

【0015】

本発明の一つの態様においては、生物学的試験サンプル中に存在するADAMTS-7のレベルは、試験サンプルまたはその調製物を、ADAMTS-7タンパク質またはその一部に特異的に結合する抗体ベースの結合部分と接触させることにより測定される。この抗体ベースの結合部分は、検出することができるADAMTS-7との複合体を形成し、これにより、ADAMTS-7のレベルを測定することが可能になる。

30

【0016】

抗体をベースとしたイムノアッセイは、ADAMTS-7タンパク質のレベルを測定するための好適な手段である。しかし、当業者にとって公知のあらゆる手段を用いてADAMTS-7のレベルを評価することができる。例えば、幾つかの実施形態においては、ADAMTS-7の発現レベルは、ADAMTS-7のmRNA転写物のレベルを測定することにより検定される。代替的に、ADAMTS-7のレベルは、SELDI質量分析法を含め、質量分析法により評価することができる。また、ADAMTS-7のレベルは、限定されないが、基質ゲル電気泳動（ザイモグラフィ）を含め、生物学的活性分析により評価することもできる。

【0017】

一つの更なる実施形態においては、本発明は、生物学的サンプルにおけるADAMTS-7を測定するための手段を含むキットを提供する。

40

【0018】

別の実施形態においては、被験体の治療を指示するための方法が提供される。その方法は、被験体から得られた生物学的サンプルにおけるADAMTS-7の存在について試験される被験体を得るステップを含み、臨床医がそれらの結果を精査し、もしその生物学的サンプルがADAMTS-7の存在に関して陽性であるとき、それに応じて、臨床医は、その被験体に対し、治療を受けるように指示する。その試験は、被験体が居住している場所と同じ地域で行われてもよいし、別の地域で行われてもよく、試験結果は、例えばウェブサイトを通じて利用可能に為され、またはその臨床医に送信される。

50

## 【 0 0 1 9 】

本発明の別の態様は以下で開示されている。

## 【 発明を実施するための最良の形態 】

## 【 0 0 2 0 】

( 発明の詳細な説明 )

本発明者らは、患者の生物学的サンプルに存在する A D A M T S - 7 のレベルが上皮由来の癌の存在または不在と相関関係があることを発見した。

## 【 0 0 2 1 】

本明細書で使用する場合、「上皮由来の癌」という用語は、上皮細胞から生じる癌を表し、これらに限定されないが、乳癌、基底細胞癌、腺癌、消化管癌、口唇癌、口腔癌、食道癌、小腸癌および胃癌、結腸癌、肝癌、膀胱癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮頸癌、肺癌、乳癌および皮膚癌（例えば扁平上皮細胞癌および基底細胞癌）、前立腺癌、腎細胞癌、ならびに身体の至る所で上皮細胞に影響を及ぼす他の公知の癌を含む。

## 【 0 0 2 2 】

癌に関する「侵襲性の強い」または「浸潤性の」という用語は、腫瘍がその境界を越えて隣接する組織に広がる性質的傾向を表す ( D a r n e l l , J . ( 1 9 9 0 ) , M o l e c u l a r C e l l B i o l o g y , 第三版, W . H . F r e e m a n , N Y ) 。浸潤性の癌は、腫瘍が特定の器官に限定される器官限局性の癌と対照をなすことができる。腫瘍の浸潤特性は、しばしば、タンパク質分解酵素、例えばコラゲナーゼなどの産生を伴い、これらのタンパク質分解酵素は、マトリックス物質および基底膜物質を分解し、腫瘍が、その被膜の境界を越えて広がることを可能にし、また、腫瘍が位置している特定の組織の境界を越えて広がることを可能にする。

## 【 0 0 2 3 】

本明細書で使用する場合、「転移」という用語は、癌が発生元の器官から患者の付加的な遠位方向の部位へ拡散する状態を表す。腫瘍が転移するプロセスは多段階事象であり、細胞間マトリックスの局所的な侵害および破壊、血管、リンパ管または他の輸送チャンネル内への侵入、その循環内における生存、それらの脈管から二次的な部位への管外遊出、および新たな場所での増殖を含む ( F i d l e r ら、A d v . C a n c e r R e s . 2 8 , 1 4 9 - 2 5 0 ( 1 9 7 8 ) , L i o t t a ら、C a n c e r T r e a t m e n t R e s . 4 0 , 2 2 3 - 2 3 8 ( 1 9 8 8 ) , N i c o l s o n , B i o c h i m . B i o p h y . A c t a 9 4 8 , 1 7 5 - 2 2 4 ( 1 9 8 8 ) および Z e t t e r , N . E n g . J . M e d . 3 2 2 , 6 0 5 - 6 1 2 ( 1 9 9 0 ) ) 。悪性細胞の運動性の増大は、動物およびヒトの腫瘍の転移能の増強と関連している ( H o s a k a ら、G a n n 6 9 , 2 7 3 - 2 7 6 ( 1 9 7 8 ) および H a e m m e r l i n ら、I n t . J . C a n c e r 2 7 , 6 0 3 - 6 1 0 ( 1 9 8 1 ) ) 。

## 【 0 0 2 4 】

本明細書で使用する場合、「生物学的サンプル」は、患者、好適にはヒト患者から得られた生物学的物質のサンプルを表し、組織、組織サンプル、細胞サンプル（例えば組織生検、例えば吸引生検、ブラシ生検、表面生検、針生検、パンチ生検、切除生検、直視下生検、切開生検または内視鏡生検など）および腫瘍サンプルを含む。また、生物学的サンプルは生体液サンプルであってもよい。一つの好適な実施形態においては、生物学的サンプルは尿である。しかし、血液、血清、唾液、脳脊髄液、乳頭吸引液、および細胞溶解物から得られる上層液を使用することもできる。

## 【 0 0 2 5 】

また、本発明は、該発明の方法における生物学的サンプルの単離物の使用も包含する。本明細書で使用する場合、生物学的サンプルの「単離物」（例えば組織または腫瘍サンプルの単離物）は、サンプルから分離、誘導、抽出、精製または単離された物質または組成物（例えば生物学的な物質または組成物）を表し、好適には、その生物学的サンプルに関わる不所望の組成物及び / 又は不純物もしくは汚染物質を実質的に含まない。

## 【 0 0 2 6 】

一つの好適な実施形態においては、生物学的サンプルは、A D A M T S - 7 タンパク質または A D A M T S - 7 の m R N A の分解を防ぐべく処理される。分解を抑制または防止するための方法は、これらに限定されないが、生物学的サンプルをプロテアーゼ阻害剤または R N A アーゼ阻害剤を用いて処理する方法、生物学的サンプルを凍結させる方法、または生物学的サンプルを氷の上に置く方法を含む。好適には、分析する前には、生物学的サンプルまたは単離物は、A D A M T S - 7 タンパク質または A D A M T S - 7 の R N A の分解を防ぐことができるような条件下で恒常的に保持される。

【 0 0 2 7 】

本明細書で使用する場合、「組織サンプル」は、被験体、好適にはヒト被験体の手つかずの組織から入手または除去された組織の小部分、断片、一部、セグメントまたはフラクションを表す。

10

【 0 0 2 8 】

本明細書で使用する場合、「腫瘍サンプル」は、腫瘍、例えば被験体から入手または除去された（例えば被験体の組織から除去または抽出された）腫瘍、好適にはヒト被験体から入手または除去された腫瘍の小部分、断片、一部、セグメントまたはフラクションを表す。

【 0 0 2 9 】

本明細書で使用する場合、「原発腫瘍」は、被験体内における最初の部位において出現する腫瘍であり、原発腫瘍から離れた部位においてその被験体の身体に出現する「転移性腫瘍」と区別することができる。

20

【 0 0 3 0 】

本明細書で使用する場合、「L C I S」は、インサイチュでの小葉癌を表す。L C I S は、小葉性新生物とも呼ばれており、時には、非浸潤性の乳癌として分類されることがある。L C I S は小葉の壁部を貫通しない。L C I S は、通常、それ自体は浸潤性の癌にならないが、この状態を有する女性は、同じ側または反対側の乳房で浸潤性の乳癌が発現する高いリスクを負っている。

【 0 0 3 1 】

本明細書で使用する場合、「D C I S」は、乳管内癌を表す。乳管内癌は、最も一般的なタイプの非浸潤性乳癌である。D C I S の場合、悪性細胞は、乳管の壁部を通じてその乳房の脂肪組織に転移していない。コメド癌は、局所部分切除術後、他のタイプの D C I S よりも同じ領域で再発しやすいタイプの D C I S であり、他の形態の D C I S よりも、最終的な浸潤性乳管癌の発現と深いつながりを有している。

30

【 0 0 3 2 】

本明細書で使用する場合、「A D A M T S - 7」は、Genebank登録、タンパク質、NP\_\_055087.2 (Homo sapiens) (配列番号1) (図4)のA D A M T S - 7 タンパク質を表す。A D A M T S - 7 は、トロンボスポンジンタイプ1モチーフ、7を伴うジスインテグリン様のメタロプロテアーゼ(レプロリシンタイプ)である。「A D A M T S - 7」という用語は、改変体、ホモログ、対立形質型、突然変異型およびそれらの同等物などの種も包含する。

【 0 0 3 3 】

本発明は、患者における上皮由来の癌の診断を容易化するための方法を対象としている。一つの実施形態においては、本方法は、患者から生物学的サンプルを得るステップ、およびその生物学的サンプルにおけるA D A M T S - 7 (またはA D A M T S - 7 のフラグメント)の存在または不在を検出するステップを含み、ここで、A D A M T S - 7 の存在は、上皮由来の癌が存在していることを示している。

40

【 0 0 3 4 】

別の実施形態においては、本方法は、癌を有している疑いのある患者から得られた試験サンプルにおけるA D A M T S - 7 のレベルを測定するステップ、およびその観測されたレベルを、対照サンプル、例えば癌を有していないことが確信される個人の患者または個人の集団から得られたサンプル中において見出されるA D A M T S - 7 のレベルと比較す

50

るステップを含む。正常な対照サンプルにおいて観測されるレベルよりも高いレベルの A D A M T S - 7 は、癌が存在することを示している。A D A M T S - 7 のレベルはあらゆる任意の単位で表されてよく、例えばデンスitomーター、照度計、活性分析または E l i s a プレートリーダーから得られる単位として表すことができる。

【 0 0 3 5 】

本明細書で使用する場合、「対照サンプルにおけるレベルと比べ、試験サンプルにおける相対的に高いレベルの A D A M T S - 7 」は、対照サンプル中に存在する A D A M T S - 7 の量よりも大きな A D A M T S - 7 の量を表す。「相対的に高いレベル」という用語は、統計学的に有意なレベル、または対照サンプル中において見出されるレベルを有意に上回るレベルを表す。好適には、「相対的に高いレベル」は、少なくとも 2 倍大きい。

10

【 0 0 3 6 】

「統計学的に有意な」または「有意に」という用語は、統計学的な有意性を表し、一般的には、正常なマーカーの濃度を 2 標準偏差 ( 2 S D ) 上回るか、またはそれより高いことを意味する。

【 0 0 3 7 】

比較の目的上、試験サンプルおよび対照サンプルは同じタイプのものであり、即ち、同じ生物学的なソースから得られる。この対照サンプルは、同じタイプの生物学的サンプルにおいて通常見られる濃度であって、健常個体から得られる濃度と同じ濃度の A D A M T S - 7 を含有する標準サンプルであってもよい。例えば、生物学的サンプル、例えば尿、血液、脳脊髄液または組織などにおいて通常見られる量の A D A M T S - 7 に対する標準的な正常対照サンプルが存在してよい。

20

【 0 0 3 8 】

本発明の一つの態様においては、二次的診断ステップが実施されてよい。例えば、もし A D A M T S - 7 のレベルが癌の存在を示すものであることが判明した場合、その後に、癌の存在を確認するため、癌を検出する付加的な方法を実施することができる。種々のあらゆる付加的診断ステップを用いることができ、例えばマンモグラフィー（乳癌）、超音波、P E T スキャニング、M R I もしくは他のあらゆるイメージング技術、生検、臨床検査、ダクトグラム ( d u c t o g r a m ) 、またはあらゆる他の方法などを用いることができる。

【 0 0 3 9 】

30

また、本発明の方法は、癌を有する患者に対する適切な治療コースを決定するのにも有用である。治療コースは、癌の診断後または癌の治療後、患者に対して取られる治療的処置を表す。例えば、癌の再発、拡散または患者の生存に関する可能性の決定は、治療に保存的な方法を採用すべきか、もしくは根治的な方法を採用すべきか、または種々の治療法を組み合わせるべきかどうかを決定する上での助けとなり得る。例えば、癌が再発する可能性が高いときには、外科治療に前後して、化学療法、放射線療法、免疫療法、生物学的改変剤療法、遺伝子療法およびワクチンなどを施すことが有利であり得、または患者が治療されるタイムスパンを調節することが有利であり得る。

【 0 0 4 0 】

A D A M T S - 7 のレベルの測定

40

A D A M T S - 7 のレベルは、当業者にとって公知のあらゆる手段により測定されてよい。本発明においては、一般的に、抗体または抗体同等物を用いてバイオマーカータンパク質のレベルを検出することが好適である。しかし、バイオマーカーの発現を検出するための他の方法を使用することもできる。例えば、A D A M T S - 7 の発現レベルは、m R N A 転写物の分析によりモニタリングされてよい。A D A M T S - 7 の m R N A を測定することは、例えば生物学的サンプルが腫瘍サンプルまたは組織サンプルである場合に好適であり得る。

【 0 0 4 1 】

m R N A のレベルを評価するための方法は当業者に広く知られている。例えば、R N A 転写物の検出は、ノーザンブロット法により達成されてよく、そこでは、R N A の調製物

50



が変性アガロースゲル上で走らされ、適切な支持体、例えば活性セルロース、ニトロセルロース、またはガラスもしくはナイロン膜などに移される。その後、標識された（例えば放射標識された）cDNAまたはRNAがその調製物にハイブリダイズされ、洗浄され、オートラジオグラフィーなどの方法により分析される。

#### 【0042】

RNA転写物の検出は、更に、公知の増幅法を用いて実施することができる。例えば、mRNAをcDNAに逆転写し、続いて、ポリメラーゼ連鎖反応を実施する方法（RT-PCR）；または、米国特許第5,322,770号に記載されている如く、両方のステップで単一の酵素を使用する方法、または、R. L. MarshallらによるPCR Methods and Applications 4:80-84（1994）に記載されている如く、mRNAをcDNAに逆転写し、続いて、対称ギャップ（symmetric gap）リパーゼ連鎖反応を実施する方法（RT-AGLCR）；は本発明の範囲内である。ADAMTS-7のmRNA転写物を検出するための一つの適切な方法がPablicらによる参考文献Hepatology、37（5）：1056-1066（2003年）に記載されており、この参考文献は、参照により、その内容全体が本明細書に組み入れられる。

10

#### 【0043】

ここで利用することができる他の公知の増幅法は、これらに限定されないが、PNAS USA 87:1874-1878（1990）に記載されており、また、Nature 350（No. 6313）：91-92（1991）にも記載されている、いわゆる「NASBA」法または「3SR」法；公開欧州特許出願（EPA）第4544610号に記載されている如きQ-ベータ増幅法；（G. T. WalkerらによるClin. Chem. 42:9-13（1996）および欧州特許出願第684315号に記載されている如きストランド置換増幅法；ならびにPCT公開公報WO第9322461号に記載されている如き、標的媒介（target mediated）増幅法；を含む。

20

#### 【0044】

インサイチュでのハイブリッド形成法による視覚化を使用することもでき、そこでは、放射活性物質で標識されたアンチセンスRNAプローブが生検サンプルの薄い切片にハイブリダイズされ、洗浄され、RNaseで切断され、オートラジオグラフィー用の感光乳剤にさらされる。それらのサンプルは、サンプルの組織学的組成物を示すべく、ヘマトキシリンで染色されてよく、適切な光フィルターを用いる暗視野イメージングにより顕色（developed）エマルジョンが示される。ジゴキシゲニンなどの非放射性標識を使用することもできる。

30

#### 【0045】

代替的に、mRNAの発現は、DNAアレイ、チップまたはマイクロアレイで検出することができる。ADAMTS-7に対応するオリゴヌクレオチドがチップに固定化され、この後、そのチップが、患者から得られた試験サンプルの標識核酸と共にハイブリダイズされる。ADAMTS-7の転写物を含有するサンプルの場合には、陽性のハイブリダイゼーション信号が得られる。DNAアレイを調製する方法およびそれらのアレイの使用方法は、当技術分野において広く知られている（例えば米国特許第6,618,679号；第6,379,897号；第6,664,377号；第6,451,536号；第5,488,257号；U.S.第2,003,015,748号、ならびにSchenarらによる1995年のScience 20:467-470；Gerholdらによる1999年のTrends in Biochem. Sci. 24:168-173；およびLennonらによる2000年のDrug discovery Today 5:59-65（これらの参考文献は、参照により、それらの内容全体が本明細書に組み入れられる）；を参照のこと）。Serial Analysis of Gene Expression（SAGE）を実施することもできる（例えば米国特許出願第2,003,021,585号を参照のこと）。

40

#### 【0046】

50

mRNAのレベルをモニタリングする場合には、例えば、試験されるべき生物学的サンプルからmRNAが抽出され、逆転写され、蛍光標識cDNAプローブが作製される。この後、ADAMTS-7のcDNAにハイブリダイズすることができるマイクロアレイが、標識cDNAプローブを用いてプロービングされ、スライドがスキャニングされ、蛍光強度が測定される。この強度は、ハイブリッド形成の強さおよび発現レベルと相関関係がある。

#### 【0047】

特に、生物学的サンプルが流体サンプルの場合、例えば血液または尿などであるときには、ADAMTS-7タンパク質のレベルまたはADAMTS-7の活性を測定することもできる。一つの実施形態においては、ADAMTS-7タンパク質のレベルは、生物学的サンプルをADAMTS-7またはADAMTS-7のフラグメントに特異的に結合する抗体ベースの結合部分と接触させることにより測定される。この後、抗体-ADAMTS-7複合体の形成がADAMTS-7のレベルの測定値として検出される。

10

#### 【0048】

「抗体ベースの結合部分」または「抗体」という用語は、イムノグロブリン分子およびイムノグロブリン分子の免疫学的に活性な決定基、例えばADAMTS-7に特異的に結合する（免疫反応する）抗原結合部位を含有している分子を含む。この「抗体ベースの結合部分」という用語は、全抗体、例えばあらゆるアイソタイプ（IgG、IgA、IgM、IgEなど）の抗体全体を含めるべく意図されており、また、ADAMTS-7タンパク質と特異的に反応する抗体のフラグメントも含む。抗体は、従来技術を用いてフラグメント化することができる。従って、この用語は、特定のタンパク質と選択的に反応することができる、抗体分子のタンパク質分解作用により切断された部分または組換え技術によって調製された部分のセグメントを含む。そのようなタンパク質分解作用によるフラグメント及び/又は組換え技術によるフラグメントの非限定的な例は、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fv、dAb、およびペプチドリンカーによって接合されたVLおよびVHドメインを含有する一本鎖抗体（scFv）を含む。scFvは、二つもしくはそれ以上の結合部位を有する抗体を形成するために、共有結合または非共有結合により連結されていてよい。従って、「抗体ベースの結合部分」は、抗体および組換え抗体のポリクローナル、モノクローナルまたは他の精製調製物を含む。更に、「抗体ベースの結合部分」という用語は、ヒト化抗体、二重特異性抗体、および抗体分子から誘導される少なくとも一つの抗原結合決定基を有するキメラ分子を含めるべく意図されている。一つの好適な実施形態においては、抗体ベースの結合部分が検出可能に標識される。

20

30

#### 【0049】

本明細書で使用する場合、「標識抗体」は、検出可能な手段によって標識された抗体を含み、これらに限定されないが、酵素で標識された抗体、放射活性物質で標識された抗体、蛍光物質で標識された抗体、および化学発光物質で標識された抗体を含む。また、抗体を検出可能なタグで標識することもでき、例えばc-Myc、HA、VSV-G、HSV、FLAG、V5またはHISなどで標識することができる。

#### 【0050】

バイオマーカー（例えばADAMTS-7または図5のバイオマーカー）のレベルを検出するために抗体ベースの結合部分を使用する本発明の診断法および予後診断法において、生物学的サンプルに存在するバイオマーカーのレベルは、検出可能に標識された抗体から発せられる信号の強度と相関関係を有している。

40

#### 【0051】

一つの好適な実施形態においては、抗体ベースの結合部分は、抗体を酵素に連結することにより検出可能に標識される。次いで、酵素は、その酵素の基質に供されたときに、例えば分光光度計により、蛍光光度計により、または視覚的な手段により検出することができる化学的な部分を生成するような仕方で、その基質と反応するであろう。本発明の抗体を検出可能に標識するために使用することができる酵素は、これらに限定されないが、リソゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-V-ステロイドイソメラー

50

ゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファ - グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース - V I - リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼを含む。化学発光は、抗体ベースの結合部分を検出するために使用することができる別の方法である。

#### 【0052】

また、検出は、あらゆる他の様々なイムノアッセイを用いて達成することもできる。例えば、抗体を放射活性物質で標識することにより、ラジオイムノアッセイを用いてその抗体を検出することができる。放射性同位体は、ガンマ線カウンタまたはシンチレーションカウンタを使用する方法などにより、またはオートラジオグラフィーにより検出することができる。本発明の目的にとって特に有用な同位体は、 $^3\text{H}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ などであり、好適には $^{125}\text{I}$ である。

10

#### 【0053】

抗体を蛍光化合物で標識することも可能である。蛍光物質で標識された抗体が適切な波長の光に曝露されるときには、蛍光により、その蛍光標識抗体の存在を検出することができる。数ある中で最も一般的に使用されている蛍光標識化合物は、CYE染料、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、フィコエリトリン (phycoerythrin)、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o - フタルアルデヒド (o - phthalaldehyde) およびフルオレサミンである。

20

#### 【0054】

また、抗体は、蛍光発光金属、例えば $^{152}\text{Eu}$ またはランタニド系列の他の金属などで検出可能に標識することもできる。これらの金属は、金属キレート基、例えばジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) またはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) などを用いて抗体に付着させることができる。

#### 【0055】

また、抗体は、抗体を化学発光化合物にカップリングさせることにより検出可能に標識することもできる。この後、その化学発光 - 抗体の存在は、化学反応の過程で生じる発光の存在を検出することにより決定される。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、ルシフェリン、イソルミノール、セロマティック (theromatic) アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルである。

30

#### 【0056】

上述の如く、ADAMTS - 7のレベルは、イムノアッセイ、例えば酵素結合免疫吸着 (immunoabsorbant) 検定法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、免疫放射性測定検定法 (IRMA)、ウェスタンブロット法または免疫組織化学的検定法などにより検出することができ、それぞれの分析法については以下でより詳しく説明されている。極めて迅速であり得るELISAまたはRIAなどのイムノアッセイが、一般的にはより好適である。抗体アレイまたはタンパク質チップを使用することもでき、例えば米国特許出願第20030013208A1号；第20020155493A1号；第20030017515号、および米国特許第6,329,209号；第6,365,418号を参照のこと（これらの特許文献は、参照により、それらの内容全体が本明細書に組み入れられる）。

40

#### 【0057】

##### イムノアッセイ

「ラジオイムノアッセイ」は、標識された（例えば放射活性物質で標識された）形態の抗原を用いて抗原の濃度を検出および測定するための技術である。抗原に対する放射活性標識の例は、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ および $^{125}\text{I}$ を含む。生物学的サンプルにおける抗原ADAMTS - 7の濃度は、生物学的サンプルにおける抗原を、その抗原に対する抗体への結合に関して、標識（例えば放射活性標識）抗原と競合させることにより測定される。標識抗原と非標識抗原との間の競合結合を確実化するため、標識抗原は、抗体の結合部位を飽和

50

させるのに十分な濃度で存在する。サンプル中の抗原の濃度が高いほど、抗体に結合する標識抗原の濃度は低くなる。

【0058】

ラジオイムノアッセイの場合、抗体に結合した標識抗原の濃度を決定するためには、抗原-抗体複合体を遊離抗原から分離しなければならない。抗原-抗体複合体を遊離抗原から分離するための一つの方法は、抗-アイソタイプの抗血清を用いて抗原-抗体複合体を沈降させることによるものである。抗原-抗体複合体を遊離抗原から分離するための別の方法は、ホルマリンで殺した (formalin-killed) *S. aureus* を用いて抗原-抗体複合体を沈降させることによるものである。抗原-抗体複合体を遊離抗原から分離するための更に別の方法は、「固相ラジオイムノアッセイ」を実施することによるものであり、抗体が Sepharose ビーズ、ポリスチレンウェル、ポリ塩化ビニルウェルまたはマイクロタイターウェルに (例えば共有結合により) 連結されている。抗体に結合した標識抗原の濃度を、既知濃度の抗原を有するサンプルに基づいて作成された標準曲線と比較することにより、生物学的サンプルにおける抗原の濃度を決定することができる。

10

【0059】

「免疫放射性測定検定法」(IRMA)は、抗体試薬が放射活性物質で標識されているイムノアッセイである。IRMAは、タンパク質、例えばウサギ血清アルブミン(RSA)への結合体化などの技術により、多価抗原コンジュゲートを生成する必要がある。この多価抗原コンジュゲートは、一分子当たり少なくとも2個の抗原残基を有していなければならない。また、それらの抗原残基は、少なくとも2個の抗体がその抗原に結合することができるようにするのに十分な距離だけ離間していなければならない。例えば、IRMAの場合、その多価抗原コンジュゲートを、固体表面、例えばプラスチック球などに付着させることができる。非標識の「サンプル」抗原および放射活性物質で標識された抗原に対する抗体が、上述の多価抗原コンジュゲートで被覆された球を含有する試験管に加えられる。サンプル中の抗原は、抗原抗体結合部位に関して、その多価抗原コンジュゲートと競合する。適切なインキュベーション時間の後、洗浄により非結合反応物が取り除かれ、その固相での放射能の量が決定される。結合した放射性抗体の量は、サンプル中の抗原の濃度に反比例する。

20

【0060】

最も一般的な酵素免疫測定法は、「酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)」である。ELISAは、標識された(例えば酵素が連結された)形態の抗体を用いて抗原の濃度を検出および測定するための技術である。種々の異なる形態のELISAが存在し、それらのELISAは当業者に広く知られている。ELISAの技術分野において知られた標準的な技術は、「Methods in Immunodiagnosis」(第2版、RoseおよびBigazzi編集、John Wiley & Sons、1980); Campbellらによる「Methods and Immunology」(W. A. Benjamin, Inc., 1964); および Oellerich, M. による 1984、J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 22: 895-904 に記載されている。

30

40

【0061】

「サンドイッチELISA」の場合、抗体(例えば、抗-ADAMTS-7)が固相(即ち、マイクロタイタープレート)に結合され、抗原(例えば、ADAMTS-7)を含有する生物学的サンプルに供される。この後、非結合抗原を取り除くべく、その固相が洗われる。次いで、標識抗体(例えば、酵素が連結された標識抗体)が、結合している状態の抗原(存在する場合)に結合され、抗体-抗原-抗体のサンドイッチを形成する。抗体に連結され得る酵素の例は、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、ウレアーゼおよびB-ガラクトシダーゼである。酵素が連結された抗体は、基質と反応し、測定され得る呈色反応生成物を発生させる。

【0062】

50

「競合 E L I S A」の場合には、抗体が、抗原（例えば、A D A M T S - 7）を含有するサンプルと共にインキュベートされる。この後、その抗原 - 抗体混合物は、抗原（即ち、A D A M T S - 7）で被覆された固相（例えば、マイクロタイタープレート）と接触する。サンプルに存在する抗原の量が多いほど、固相への結合に利用できる遊離抗体の量が少なくなる。この後、固相に結合されたその一次抗体の量を決定すべく、標識された（例えば、酵素が連結された）二次抗体がその固相に加えられる。

#### 【 0 0 6 3 】

「免疫組織化学的検定法」の場合には、組織の切片が特異タンパク質に関して試験され、この試験は、組織を、検定対象のタンパク質に特異的な抗体に供することにより行われる。この後、タンパク質の存在および量を決定するための数多くの方法のうちのいずれかの方法により、抗体が視覚化される。抗体を視覚化するために使用される方法の例は、例えば、抗体に連結された酵素（例えば、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼもしくはベータ - ガラクトシダーゼ）を介する方法、または化学的な方法（例えば、D A B / 基質クロモゲン（c h r o m a g e n））である。

10

#### 【 0 0 6 4 】

診療医の好みにより、また、本開示に基づき、他の技術を用いて本発明のバイオマーカーを検出することができる。一つのそのような技法はウェスタンブロット法（T o w b i n ら、P r o c . N a t . A c a d . S c i . 7 6 : 4 3 5 0 ( 1 9 7 9 )）であり、適切に処理されたサンプルが S D S - P A G E ゲル上を走らされ、その後、固体の支持体、例えばニトロセルロースフィルターなどに移される。次いで、A D A M T S - 7 に特異的に結合する検出可能に標識された抗体を用いて、バイオマーカーのレベルを評価することができ、そこでは、その検出可能な標識から得られる信号の強度が、存在しているバイオマーカーの量に対応する。それらのレベルは、例えばデンストメトリーにより定量化することができる。

20

#### 【 0 0 6 5 】

##### 質量分析法

更に、本発明のバイオマーカーは、質量分析法を用いて検出されてよく、例えば M A L D I / T O F（飛行時間計測式（t i m e - o f - f l i g h t））、S E L D I / T O F、液体クロマトグラフィー - 質量分析法（L C - M S）、ガスクロマトグラフィー - 質量分析法（G C - M S）、高速液体クロマトグラフィー - 質量分析法（H P L C - M S）、キャピラリー電気泳動 - 質量分析法、核磁気共鳴分光分析法またはタンデム質量分析法（例えば、M S / M S、M S / M S / M S、E S I - M S / M S など）を用いて検出することができる。例えば、米国特許出願第 2 0 0 3 0 1 9 9 0 0 1 号、第 2 0 0 3 0 1 3 4 3 0 4 号、第 2 0 0 3 0 0 7 7 6 1 6 号を参照のこと（これらの特許文献は、参照により本明細書に組み入れられる）。

30

#### 【 0 0 6 6 】

質量分析法は、当技術分野において広く知られており、生体分子、例えばタンパク質などを定量及び / 又は同定するために使用されている（例えば、L i らによる（2 0 0 0）T i b t e c h 1 8 : 1 5 1 - 1 6 0 ; R o w l e y らによる（2 0 0 0）M e t h o d s 2 0 : 3 8 3 - 3 9 7 ; ならびに K u s t e r および M a n n による（1 9 9 8）C u r r . O p i n . S t r a c t u r a l B i o l . 8 : 3 9 3 - 4 0 0 を参照のこと）。更に、単離されたタンパク質の少なくとも部分的なデノボ配列決定を可能にする質量分析技術が開発されている。C h a i t らによる S c i e n c e 2 6 2 : 8 9 - 9 2（1 9 9 3）; K e o u g h らによる P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A . 9 6 : 7 1 3 1 - 6（1 9 9 9）; B e r g m a n による E X S 8 8 : 1 3 3 - 4 4（2 0 0 0）において論評されている文献（r e v i e w e d）。

40

#### 【 0 0 6 7 】

特定の実施形態においては、気相イオン分光光度計が使用される。別の実施形態においては、レーザー - 脱離 / イオン化質量分析法を用いてサンプルが分析される。最近のレーザー脱離 / イオン化質量分析法（「L D I - M S」）は、二つの主な変形様式で実践する

50

ことができる：マトリックス支援レーザー脱離/イオン化（「MALDI」）質量分析法および表面増強レーザー脱離/イオン化（「SELDI」）質量分析法。MALDIの場合、被分析物がマトリックスを含有する溶液と混合され、一滴の液体が基体の表面に置かれる。この後、そのマトリックス溶液は、それらの生物学的分子と共に共結晶化する。基体が質量分析計に挿入される。レーザーエネルギーが基体表面に向けられ、生物学的分子を有意にフラグメント化することなく、生物学的分子を脱離およびイオン化する。しかし、MALDIは、分析用ツールとして限界を有している。MALDIは、サンプルを分画化するための手段を備えておらず、また、マトリックス材料は、特に低分子量の被分析物の場合、検出と干渉することができる。例えば、米国特許第5,118,937号（Hillenkampら）および米国特許第5,045,694号（Beavis & Chait）を参照のこと。

#### 【0068】

SELDIの場合には、脱離プロセスにおいて基体表面が積極的に関与するように、基体表面が改変されている。一つの変形様式においては、表面は、対象のタンパク質を選択的に結合する吸着剤及び/又は捕獲剤で誘導体化される。別の変形様式においては、表面は、レーザーが当たったときに脱離されないエネルギー吸収分子で誘導体化される。別の変形様式においては、表面は、対象のタンパク質を結合し、且つ、レーザーの適用時に壊される光分解性の結合を含有した分子で誘導体化される。これらのそれぞれの方法において、誘導体化剤は、一般的に、サンプルが適用される基体表面の特定の場所に局在化される。例えば、米国特許第5,719,060号およびWO第98/59361号を参照のこと。これら二つの方法は、例えば、被分析物を捕獲するためにSELDI親和性表面を使用し、且つ、エネルギー吸収材料をもたらし、マトリックス含有液体を、捕獲された被分析物に加えることにより組み合わせることができる。

#### 【0069】

質量分析計に関する更なる情報については、例えば、Principles of Instrumental Analysis、第3版、Skoog、Saunders College Publishing、Philadelphia、1985；およびKirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology、第4増補版、Vol. 15（John Wiley & Sons、New York 1995）、1071-1094頁を参照のこと。

#### 【0070】

マーカーまたは他の物質の存在の検出は、典型的には、信号強度の検出を含むであろう。これは、次に、基体に結合されたポリペプチドの量および特性を反映することができる。例えば、特定の実施形態においては、第一サンプルおよび第二サンプルのスペクトルから得られた信号強度のピーク値を（例えば視覚的に、またはコンピューター分析により）比較することにより、特定の生体分子の相対的な量を決定することができる。ソフトウェアプログラム、例えばBiomarker Wizardプログラム（Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, Calif.）などを使用して、質量スペクトルの分析に役立てることができる。そのような質量分析計およびそれらの技術は当業者に広く知られている。

#### 【0071】

当業者であれば、質量分析計のいずれかの構成要素（例えば、脱離ソース、質量分析器、検出など）および様々なサンプル調製物は、本明細書で説明されている他の適切な構成要素もしくは調製物と、または当技術分野において公知のそれらと組合せ得ることが理解されよう。例えば、幾つかの実施形態においては、対照サンプルは重原子（例えば $^{13}\text{C}$ ）を含んでいてよく、これにより、試験サンプルを、同一の質量分析実行において、その既知の対照サンプルと混ぜ合わせることが可能になる。

#### 【0072】

一つの好適な実施形態においては、レーザー脱離飛行時間計測式（TOF）質量分析計が使用される。レーザー脱離質量分析法においては、結合されたマーカーを伴う基体がイ

ンレットシステムに導入される。そのマーカーは、イオン化ソースからのレーザーにより脱離され、イオン化されて気相になる。発生したイオンはイオン光学アセンブリにより収集され、その後、飛行時間計測式質量分析器内において、イオンは、短い高電圧場を通じて加速され、高真空チャンバー内に送り込まれる。高真空チャンバーの遠端において、加速されたイオンは、様々に異なる時間を掛けて、高感度検出器の表面にぶつかる。飛行時間は、イオンの質量の関数であるため、イオンが形成されてからイオンが検出器に衝突するまでの間に要した時間を利用して、特定の質量対電荷比を有する分子の存在または不在を同定することができる。

#### 【0073】

幾つかの実施形態においては、第一サンプルまたは第二サンプルに存在する一つもしくはそれ以上の生体分子の相対的な量が、一部では、プログラマブルデジタルコンピューターを用いてアルゴリズムを実行することにより決定される。アルゴリズムは、第一質量スペクトルおよび第二質量スペクトルにおける少なくとも一つのピーク値を同定する。この後、アルゴリズムは、質量スペクトルのうち、第一質量スペクトルのピーク値の信号強度を第二質量スペクトルのピーク値の信号強度と比較する。相対的な信号強度は、第一サンプルおよび第二サンプルに存在している生体分子の量を表している。既知量の生体分子を含有する標準サンプルを第二サンプルとして分析することにより、第一サンプルに存在している生体分子の量を一層良好に定量化することができる。特定の実施形態においては、第一サンプルおよび第二サンプルに存在する生体分子の性質 ( i d e n t i t y ) を決定することもできる。

10

20

#### 【0074】

一つの好適な実施形態においては、MALDI - TOF 質量分析法によりバイオマーカーのレベルが測定される。

#### 【0075】

他のアッセイ

また、ADAMTS - 7のレベルは、例えば、これに限定されないが、ザイモグラフィを含め、活性を測定する他の生物学的分析法により測定することもできる。ザイモグラフィは、当業者に広く知られた分析法であり、HeusenらによるAnal. Biochem.、(1980)102:196-202; WilsonらによるJournal of Urology、(1993)149:653-658; HernonらによるJ. Biol. Chem. (1986)261:2814-2828、BraunhutらによるJ. Biol. Chem. (1994)269:13472-13479; および MosesらによるCancer Research 58、1395-1399、1998年4月1日で説明されている(これらの参考文献は、参照により、それらの内容全体が本明細書に組み入れられる)。

30

#### 【0076】

抗体

本発明において使用するための抗体は商業的なソースから入手することができる。代替的に、ADAMTS - 7またはバイオマーカーポリペプチドの一部に対する抗体を惹起することもできる。ADAMTS - 7抗体を製造するのに有用な方法が米国出願第2002/0182702号; 第2003/0212256号; 第20020110894号およびWO第01/11074号に開示されており、これらの特許文献は、参照により本明細書に組み入れられる。

40

#### 【0077】

本発明において使用する抗体は、抗体を生成するための標準的な方法により製造することができ、例えばモノクローナル抗体の生成により製造することができる(Cambell, A.M.によるMonoclonal Antibodies Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology、Elsevier Science Publishers、Amsterdam、the Netherlands (1984

50

); St. Grothらによる J. Immunology、(1990) 35: 1-21; および Kozborらによる Immunology Today (1983) 4: 72)。また、抗体は、当技術分野において広く知られている方法により、ファージ提示ライブラリーのような抗体ライブラリーをスクリーニングすべく、タンパク質の抗原性部分を使用することにより容易に得ることもできる。例えば、米国特許第 5,702,892 号 (U.S.A. Health & Human Services) および WO 01/18058 号 (Novopharm Biotech Inc.) は、バクテリオファージ提示ライブラリーおよび抗体結合ドメインフラグメントを製造するための選択方法を開示している。

#### 【0078】

10

##### ADAMTS - 7 検出キット

本発明は、上皮由来の癌の検出および予後診断的な評価を行うための商業的なキットも対象としている。このキットは、当業者に広く知られているどのような構成であってもよく、また、ADAMTS - 7を検出するための本明細書で説明されている一つまたはそれ以上の方法を実施するのに有用などのような構成であってもよい。キットは、すべてではないにしても、生物学的サンプルに存在する ADAMTS - 7を検出するためのアッセイを実施する上で絶対に必要な試薬のうちの多くを提供している点で都合がよい。更に、このアッセイは、好適には、予め定められた量の ADAMTS - 7タンパク質または核酸などの、キットに含まれている一つの標準サンプルまたは複数の標準サンプルと同時に実施され、従って、試験の結果を定量化することができ、または試験結果の正当性を確認することができる。

20

#### 【0079】

キットは、ADAMTS - 7のレベルを検出するための手段を含み、例えば、ADAMTS - 7タンパク質に選択的に結合する抗体もしくは抗体フラグメント、またはタンパク質をエンコードする cDNA の合成を可能にする一組の DNA オリゴヌクレオチドプライマー、または例えば ADAMTS - 7の mRNA 発現を検出する DNA プローブなどを含んでいる。診断アッセイキットは、好適には、標準的な二抗体結合フォーマットで構築され、一つの ADAMTS - 7 - 特異抗体が患者のサンプルに存在する ADAMTS - 7を捕獲し、そして、捕獲された ADAMTS - 7を検出するために別の ADAM - 特異抗体が使用される。例えば、捕獲用の抗体は、固相、例えばアッセイプレート、アッセイウェル、ニトロセルロース膜、ビーズ、ディップスティック、または溶離カラムの構成要素などに固定化される。第二抗体、即ち、検出抗体は、典型的には、検出可能な標識、例えば比色分析用物質 (calorimetric agent) または放射性同位体などでタグ付けされる。

30

#### 【0080】

一つの好適な実施形態においては、キットは、尿サンプルに存在する ADAMTS - 7のレベルを検出するための手段を含む。特定の実施形態においては、キットは、ADAMTS - 7タンパク質を特異的に結合する、その上に固定化された抗 - ADAMTS - 7抗体またはフラグメントを有する「ディップスティック」を含む。この後、特異的に結合された ADAMTS - 7タンパク質は、例えば、比色分析用物質 (calorimetric agent) または放射性同位体で検出可能に標識された二次抗体を用いて検出することができる。

40

#### 【0081】

別の実施形態においては、アッセイキットは、(これらに限定されないが) 以下の技術を用いてよい：競合および非競合アッセイ、ラジオイムノアッセイ (RIA)、生物発光および化学発光アッセイ、蛍光分析によるアッセイ、サンドイッチアッセイ、免疫放射性測定アッセイ、ドットプロット、ELISA を含む酵素結合アッセイ、マイクロタイタープレートおよび免疫組織化学。それぞれのキットでのアッセイの範囲、感度、精度、信頼性、特異性および再現性は、当業者に広く知られた手段により定められる。

#### 【0082】

50



上で説明されているアッセイキットは、更に、使用説明書を提供するであろう。

【0083】

以上または以下で引用されているすべての参考文献は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0084】

本発明は、以下の実施例により更に例証される。

【0085】

これらの実施例は、本発明の理解を促進させるために与えられたものであり、本発明を限定するものとして解釈すべきではない。

【実施例】

【0086】

実施例 1 癌患者から得られた尿に存在する高分子量ゼラチナーゼとしての A D A M T S - 7 の同定

尿中 A D A M T S - 7 の同定

本発明者らは、膀胱癌患者から得た尿サンプルにおいて見られる約 190 k D a の高分子量ゼラチナーゼ ( 図 1 ) を A D A M T S - 7 として同定した。

【0087】

アフィニティークロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーの組合せを用いて、ゼラチナーゼを部分的に精製した。高分子量ゼラチナーゼ種が富化された ( 膀胱癌患者からの ) サンプルを S D S - P A G E により分離し、S y p r o R u b y 染色液で染色した ( 図 3 ) 。約 190 k D a のこのタンパク質バンドを切り取り、ゲル内トリプシン消化に供し、続いて、タンデム ( T a n d e m ) ( M S - M S ) 質量分析に供した。約 190 k D a のゼラチナーゼ種の質量分析は、1 % のペプチドカバー率で、A D A M T S - 7 ( トロンボスポンジンタイプ 1 モチーフ、7 を伴うジスインテグリンおよびメタロプロテアーゼ ( レプロリシンタイプ ) ; トロンボスポンジンモチーフ、7 プレプロプロテインを伴うジスインテグリンおよびメタロプロテアーゼ ) の存在を示した。ブラスト ( B l a s t ) 分析および文献調査は、質量分析法で同定されたペプチドが A D A M T S - 7 ( N P \_ 0 5 5 0 8 7 . 2 ) と一致することを確認した。

【0088】

実施例 I I 乳癌、前立腺癌、膀胱癌、脳腫瘍および肝癌を有する患者では、A D A M T S - 7 の発現および活性が上方に調節される。

【0089】

本発明者らは、癌に罹患した患者と罹患していない患者における A D A M T S - 7 の活性および発現について試験した。乳癌、脳腫瘍、前立腺癌、膀胱癌および肝癌を有する患者から尿サンプルを採取した。A D A M T S - 7 の活性を検出すべく、50  $\mu$  l の非濃縮尿サンプルをゼラチンザイモグラフィーにより分析した。

【0090】

A D A M T S - 7 のウェスタンブロット分析において、尿サンプルを、10 k D a のカットオフ膜を伴う微小遠心スピニングカラム ( V i v a s p i n 、 V i v a s c i e n c e ) を用いて濃縮した。分析したすべてのサンプルは、20  $\mu$  g の総タンパク質に対して正規化した。イムノブロットは、ザイモグラムからではなく、通常の B i s T r i s 4 - 1 2 % 勾配ゲルから作製した。使用した A D A M T S - 7 抗体は、T r i p l e P o i n t B i o l o g i c s から入手したウサギポリクローナル抗体 - R P 1 - A D A M T S - 7 であり、このタンパク質のカルボキシ末端に向けられる。

【0091】

図 5 A に示されているように、乳癌、脳腫瘍、前立腺癌、脳腫瘍、膀胱癌および肝癌を有する患者では、A D A M T S - 7 の活性が上方に調節された。A D A M T S - 7 活性は、年齢 / 性別がマッチングされた正常な対照 ( 癌を伴わない患者 ) から得られた濃縮尿サンプルのザイモグラフィーによる平行分析では検出されなかった ( 図 5 B ) 。

【0092】

10

20

30

40

50

図 6 A および 6 B は、癌を有する患者および癌を伴わない患者から得られた尿サンプルにおける A D A M T S - 7 タンパク質に対する代表的なイムノプロット染色を示している。図 6 B に示されているように、乳癌、膀胱癌および前立腺癌を有する患者から得られた尿サンプルにおいては、A D A M T S - 7 タンパク質が検出された。年齢 / 性別がマッチングされた正常な対照（癌を伴わない患者）から得られた濃縮尿サンプルのイムノプロット法による平行分析は、何ら A D A M T S - 7 を検出しなかった（図 6 A）。

【 0 0 9 3 】

本明細書全体を通じ、引用されている参考文献は、参照により本明細書に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

10

【 0 0 9 4 】

本明細書に組み込まれており、また、本明細書の一部を構成している添付図面は、本発明の種々の実施形態を明らかにするものであり、また、その解説と相まって、本発明の目的、利点および原理を説明する役割を果たしている。

【図 1】図 1 は、ザイモグラフィーによる、膀胱癌患者から得られた尿における約 1 9 0 k D a の高分子量ゼラチナーゼ種の存在を示している。

【図 2】図 2 A および 2 B は、膀胱癌患者の尿から得られた約 1 9 0 k D a の高分子量ゼラチナーゼ種の部分的な精製を示している。図 2 A はザイモグラムである。図 2 B は銀染色ゲルである。

【図 3】図 3 は、H M Wゼラチナーゼ種が富化されたサンプルの、S y p r o R u b y S t a i n で染色された S D S - P A G E を示している。

20

【図 4】図 4 は、A D A M T S - 7（配列番号：1）のアミノ酸配列を示している。

【図 5】図 5 A および 5 B は、癌患者から得られた尿サンプルにおけるザイモグラフィーによる A D A M T S - 7 の検出、および健常個体から得られた尿サンプルにおける A D A M T S - 7 の不在を示している。図 5 A は、癌患者から得られた尿サンプルにおける高 M Wゼラチナーゼ種のゼラチンザイモグラムである；最初のレーンは分子量マーカー（M W）を表しており、1 - 9 で示されているレーンは、5 0 μ l の非濃縮尿を使用した、個々の患者から得られた尿サンプルを表しており、レーン 1 は前立腺癌を有する患者から得られた尿サンプルであり、レーン 2 は脳腫瘍を有する患者から得られた尿サンプルであり、レーン 3 は膀胱癌を有する患者から得られた尿サンプルであり、レーン 4 は乳癌を有する患者から得られた尿サンプルであり、レーン 5 は乳癌を有する患者から得られた尿サンプルであり、レーン 6 は肝癌を有する患者から得られた尿サンプルであり、レーン 7 は肝癌を有する患者から得られた尿サンプルであり、レーン 8 は乳癌を有する患者から得られた尿サンプルであり、そしてレーン 9 は乳癌を有する患者から得られた尿サンプルである。矢印は、約 1 9 0 k D a で走る A D A M T S - 7 を指し示している。図 5 B は、年齢 / 性別がマッチングされた正常な対照（癌を伴わない患者）から得られた尿サンプルのザイモグラフィーによる平行分析の結果を示している。すべてのケースにおいて、A D A M T S - 7 は検出することができなかった。

30

【図 6】図 6 A および 6 B は、癌を有する患者および癌を伴わない患者から得られた尿サンプルにおける A D A M T S - 7 タンパク質に対する代表的なイムノプロット染色を示している。図 6 B は、4 - 1 2 % の勾配の S D S - P A G E ゲル上で走らせた、癌患者から得られた尿の分析結果である：レーン 1 は前立腺癌を有する患者から得られた濃縮尿サンプルであり、レーン 2 は前立腺癌を有する患者から得られた濃縮尿サンプルであり、レーン 3 は乳癌を有する患者から得られた濃縮尿サンプルであり、レーン 4 は乳癌を有する患者から得られた濃縮尿サンプルであり、レーン 5 は膀胱癌を有する患者から得られた濃縮尿サンプルであり、レーン 6 は乳癌を有する患者から得られた濃縮尿サンプルであり、レーン 7 は乳癌を有する患者から得られた濃縮尿サンプルであり、レーン 8 は乳癌を有する患者から得られた濃縮尿サンプルである。図 6 A は、年齢 / 性別がマッチングされた正常な対照（癌を伴わない患者）から得られた濃縮尿サンプルのイムノプロット法による平行分析の結果を示している。乳癌、膀胱癌および前立腺癌を有する患者から得られた尿サン

40

50

プルにおいて、上述の 190 kDa 種が検出された。

【図 1】

症患者から得られた尿に於ける約 190 kDa の  
高分子量ゼラチン-ゼン

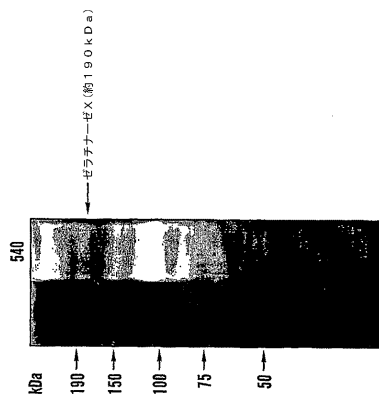


FIG. 1

【図 2】

症患者の尿から得られた約 190 kDa の高分子量ゼラチン-ゼン  
部分的分

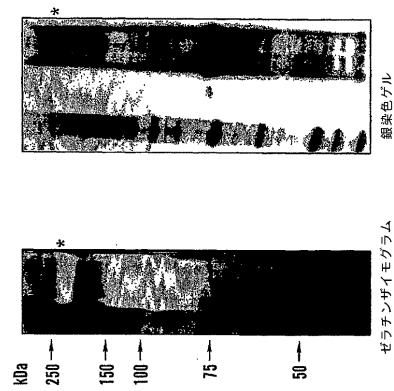


FIG. 2

【図 3】

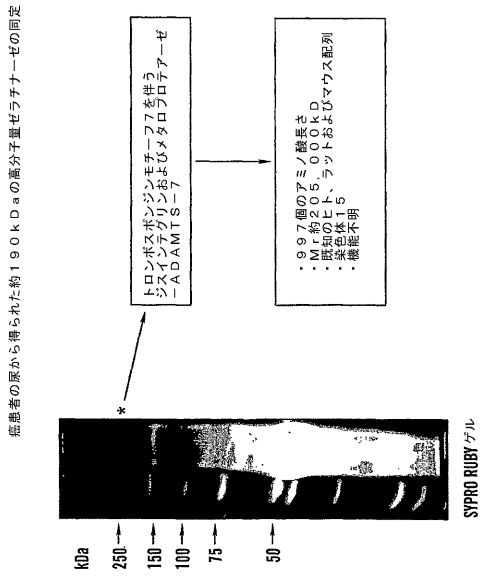


FIG. 3

【図 4】

タンデム (MS/MS) 質量分析による  
約 190 kDa の HMWゼラチナーゼの同定

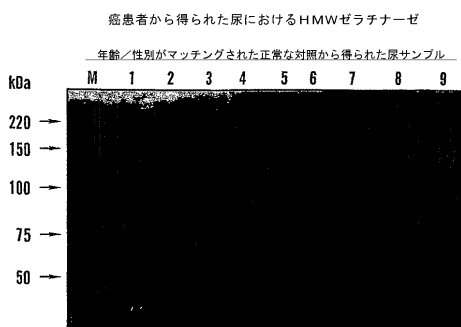
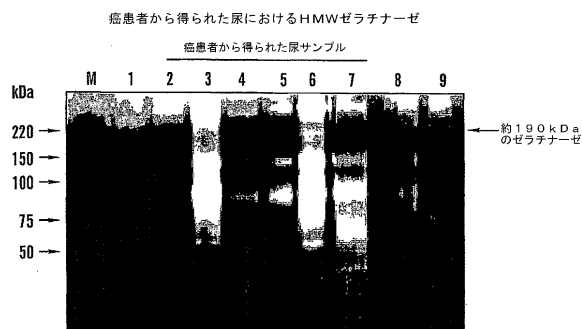
> [P13683827] [ref NP\_053087.2] トロンボスポンジゼラチナーゼ ADAMTS-7 (Homo sapiens)

ジスチンゲリンおよびマトロプロチン

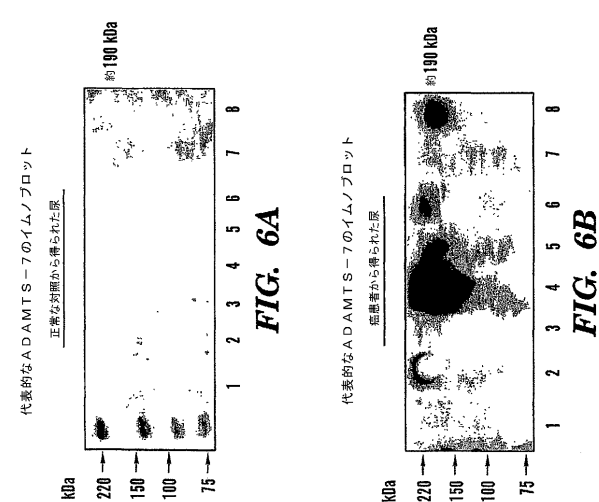
MPGSPSPAPLRLPILLLLCALPAGAPAPGAPGATEGRAALDHPVRLVWVAGGSLFSLVLPALRKDVSRDAPAFYELQVGRLELRLNLTANQ  
HLLAPGVSETRRRGGI GRAHRAHTPACHLGEVQDPEEGGLAASACQGLKGVFQLSNEDYFIEPLDSAPRGHAQPHVYKQAPERLAQRGDS  
SAPSTCGVQVYELSPREWEQRRPRLRLRHORSYSEKWNWETLWADAKMEYHGQVQESVYLTMMVAGLFDPSGNPHITVRLVLL  
EDEEDLKITHADNITKSCWQKSNMKGDAPLHDDTALLTRKLCANRRPCELTGLSHVAGMCQPHRSNSINEDTGLPFTVAHELGHSGFGL  
HDGSGDCPVGKPTFMSPLLQYDAAPLTWSCRQVITRELDGWLGLDPPAKIIDFSPVPGVLYVSHQCRLOYGAYSACEDMDVCHTL  
WCSVGTTHSKLDAAVDTGCGENKWLSCGCVPGPREAVDGGWGSWSWSCSCMGVQSAERQCTOPTPKYKGYCYGERKRLCLL  
QACAPGRSPRRVCCSFDAMLYKGLHTWVWVNDVNPCELHCRPANEYFAEKLDAVDGTPCYQRASRLCINGCKNKGCCPDESGAMEOR  
CYCHNGSTCHTVSGTTEAEGLGYDVGLPAGAREIQEVAEANFLARLSEDPEKFTLNGWTQVGVAGTFTYARRGNVETLSPGP  
TKEPVWQLFQESNPGVHYETHREAGGHDVPPVFSWHYGPWTKVTCGRGVRQWVYCLERQAGVDEEHCDPLGRPDQQRKCEQCP  
ARWAGVEQLCSSCGPGLSRRVLCIRSVGLDEGSALEPACHPRPETITPNRHVPCATWAGNWSQSVTCGEGTORNVLCNDTG  
PCDEAQCPSEVTLCSPLCRWPLGLTGFCGSGSSSHLFEADFPHLAPRSPSPKPTMGNAEEAPDLPGFVFDVYVYVNFHFE  
DLSTGPSEEPDLDACTGDRTPPHSPHAPSTGSPVATEPANKKEGVLGNWSPSPWSPSCAGSPSPSECTGPNLPEEDTPGAPDLGLPS  
LSNPRVSTGLQITATPESQNDPVKDGSQLPPWDRDINEVFQDEEPKGRAPLPPRSTLPLSPVGSHTSSPSVDVIELWTGTVAVNEP  
ALEGGLPVDSLELPTVYVAPLPSLAEGAPADPLVWNAQWAGNWSGCTCGLGAVWPRVRCSSGRCDECAPAGRPQARRCHLRPCAT  
SSRLSTPAWDSANSHRVPTQPLAPSLAEAGPAPDPLVWNAQWAGNWSGCTCGLGAVWPRVRCSSGRCDECAPAGRPQARRCHLRPCAT  
WHSNWSKCRSCGSGSVVDVOCVDTDLRLPLRFHQCPGAPPAHRCGQAQPLSWYTSWRECSAGGEGQRLVTCPEPLCEALRP  
NITRPNTHPCITQWVYGPVGGGSGGVRRLVKVNTQTGLPEEDSDCCGHEAWPESPSPGCTEDCEPVEPRPCRDRLSFGFGFCTLRLLGR  
CQLPTIRTCGRSCSPSPGAPSRGHQVARR

FIG. 4

【図 5】



【図 6】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US06/04985																		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC: C07K 16/00( 2006.01);A61K 39/395( 2006.01);C12Q 1/68( 2006.01);G01N 33/53( 2006.01)  USPC: 530/387.1;424/130.1;435/6,7.1 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) U.S. : 530/387.1; 424/130.1; 435/6,7.1  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) Please See Continuation Sheet																				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US PATENT 6,391,610 (APTE et al) 21 May 2002 (21.05.2002), columns 10-11.</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>LIU et al ADAMTS-7: A Metalloproteinase that Directly Binds to and Degrades Cartilage Oligomeric Matrix Protein. FAESB J May 2006, Vol. 20, No. 7, pages 988-990, see entire document.</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>ZENG et al Glycosaminoglycan-Binding Properties and Aggrecanase Activities of truncated ADAMTS: Comparative Analyses with ADAMTS-3, -9, -16 and -18. Biochimica et Biophysica Acta March 2006, Vol. 1760, No. 3, pages 517-524.</td> <td>1-20</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US PATENT 6,391,610 (APTE et al) 21 May 2002 (21.05.2002), columns 10-11.	1-20	A	LIU et al ADAMTS-7: A Metalloproteinase that Directly Binds to and Degrades Cartilage Oligomeric Matrix Protein. FAESB J May 2006, Vol. 20, No. 7, pages 988-990, see entire document.	1-20	A	ZENG et al Glycosaminoglycan-Binding Properties and Aggrecanase Activities of truncated ADAMTS: Comparative Analyses with ADAMTS-3, -9, -16 and -18. Biochimica et Biophysica Acta March 2006, Vol. 1760, No. 3, pages 517-524.	1-20						
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	US PATENT 6,391,610 (APTE et al) 21 May 2002 (21.05.2002), columns 10-11.	1-20																		
A	LIU et al ADAMTS-7: A Metalloproteinase that Directly Binds to and Degrades Cartilage Oligomeric Matrix Protein. FAESB J May 2006, Vol. 20, No. 7, pages 988-990, see entire document.	1-20																		
A	ZENG et al Glycosaminoglycan-Binding Properties and Aggrecanase Activities of truncated ADAMTS: Comparative Analyses with ADAMTS-3, -9, -16 and -18. Biochimica et Biophysica Acta March 2006, Vol. 1760, No. 3, pages 517-524.	1-20																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">* Special categories of cited documents:</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E"</td> <td>earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			* 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	
* 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 27 September 2006 (27.09.2006)		Date of mailing of the international search report 12 DEC 2006																		
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. (571) 273-3201		Authorized officer Christopher H. Yaen Telephone No. 571-272-0500																		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US06/04985

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:  
WEST, STN DATABASE (MEDLINE, CANCERLIT, BIOSIS, CONFSCI, SCISEARCH, EMBASE, USPATFULL, PCTFULL,  
DISSABS) PUBMED

## 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 モーゼス, マーシャ エー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02445, ブルックライン, ディーン ロード 64

(72)発明者 ロイ, ルーパリ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02703-5121, アトルバロ, オニール プール  
バード 300, アpartment 6