

(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2010-526995

(P2010-526995A)

(43) 公表日 平成22年8月5日 (2010. 8. 5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/574 (2006. 01)</b>	GO 1 N 33/574 A	2 G O 4 5
<b>GO 1 N 33/48 (2006. 01)</b>	GO 1 N 33/48 G	
<b>GO 1 N 33/72 (2006. 01)</b>	GO 1 N 33/72 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2010-506846 (P2010-506846)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成20年5月7日 (2008. 5. 7)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成21年10月19日 (2009. 10. 19)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/003642		E AKTIENGESELLSCHAFT
(87) 国際公開番号	W02008/138522		スイス・シーエイチー4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成20年11月20日 (2008. 11. 20)		グレンツァーヘルストラッセ124
(31) 優先権主張番号	07009396.8	(74) 代理人	100095832
(32) 優先日	平成19年5月10日 (2007. 5. 10)		弁理士 細田 芳徳
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	ロリンガー, ウォルフガング
			ドイツ連邦共和国 ボリング 82398
			カイザー-ハインリッヒ-シュトラッセ
			10

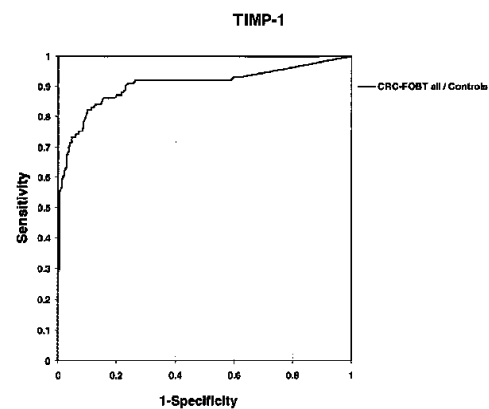
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結腸直腸癌のマーカーとしてのTIMP-1の使用

## (57) 【要約】

本発明は、結腸直腸癌の診断に関する。本発明は、結腸直腸癌の診断におけるマーカー分子としてのタンパク質TIMP-1 (=メタロプロテイナーゼ組織インヒビター1) の使用を開示する。本発明は、個体由来の便試料中のTIMP-1を測定することによる、前記試料からの結腸直腸癌の診断方法に関する。TIMP-1の測定は、例えば結腸直腸癌の早期検出または診断に使用することができる。

Fig. 1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

- a) 個体から得られた便試料を提供する工程、
- b) 前記試料とTIMP-1に特異的な結合剤を、前記結合剤とTIMP-1の間の複合体の形成に適した条件下で接触させる工程、
- c) 工程(b)で形成された複合体の量を測定する工程、および
- d) 形成された複合体の量と結腸直腸癌の診断を相関する工程を含む、結腸直腸癌の診断方法。

**【請求項 2】**

- a) 個体から得られた便試料を提供する工程、
- b) 前記試料とTIMP-1に特異的な結合剤を、前記結合剤とTIMP-1の間の複合体の形成に適した条件下で接触させる工程、
- c) 前記試料と、ヘモグロビン/ハプトグロビン複合体、ヘモグロビン、カルプロテクチン、および腫瘍M2ピルビン酸キナーゼ(M2-PK)からなる群より選択される第2のマーカースに特異的な結合剤を、前記結合剤と第2のマーカースの間の複合体の形成に適した条件下で接触させる工程、
- d) 工程(b)および(c)で形成された複合体の量を検出する工程、ならびに
- e) 工程(b)および(c)で形成された複合体の量と結腸直腸癌の診断を相関する工程を含む、結腸直腸癌の診断方法。

**【請求項 3】**

前記第2のマーカースがヘモグロビンである請求項2記載の方法。

**【請求項 4】**

前記第2のマーカースがヘモグロビン/ハプトグロビン複合体である請求項2記載の方法。

**【請求項 5】**

抽出バッファを使用して便試料を処理し、前記処理された便試料からTIMP-1を特異的に測定する、請求項1~4いずれか記載の方法。

**【請求項 6】**

便試料を提供する工程において、抽出バッファを含む便回収デバイスを使用する、請求項1~5いずれか記載の方法。

**【請求項 7】**

特異的な結合剤が抗体である、請求項1~6いずれか記載の方法。

**【請求項 8】**

個体から得られた便試料からの結腸直腸癌の診断における、マーカース分子としてのタンパク質TIMP-1の使用。

**【請求項 9】**

個体から得られた便試料からの結腸直腸癌の早期診断における、マーカース分子としてのタンパク質TIMP-1の使用。

**【請求項 10】**

個体から得られた便試料からの結腸直腸癌の診断における、ヘモグロビン/ハプトグロビン複合体、ヘモグロビン、カルプロテクチン、および腫瘍M2ピルビン酸キナーゼ(M2-PK)からなる群より選択される結腸直腸癌のための1つ以上の他のマーカース分子と組み合わせた、結腸直腸癌のためのマーカース分子としてのタンパク質TIMP-1の使用。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は結腸直腸癌の診断に関する。本発明は、結腸直腸癌の診断におけるマーカース分子としてのタンパク質TIMP-1(=メタロプロテイナーゼ組織インヒビター1)の使用を開示する。さらに、本発明は特に、便試料中のTIMP-1を測定することによる個体由来の便試料からの結腸直腸癌の診断方法に関する。TIMP-1の測定は、例えば結腸直腸癌の早期検出または診断に使用することができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 2 】

検出および治療は進歩しているが、癌は主要な公衆衛生の課題であり続けている。西洋諸国において、多くの種類の癌の中で、結腸直腸癌 (=CRC) は最も頻繁な癌の1つである。

## 【 0 0 0 3 】

癌を早く検出/診断できればできるほど、全体的な生存率はよくなる。このことは特にCRCにおいて真実である。進行した病期の腫瘍の予後は乏しい。患者の1/3より多くは、進行性の疾患により、診断後5年以内に死亡し、これは5年間で約40%の生存率に相当する。現在の治療はわずかに患者の一部を治療するのみであり、疾患の早期に診断された患者において明らかに最良の効果を有する。

10

## 【 0 0 0 4 】

公衆衛生課題としてのCRCに関して、結腸直腸癌についてより効果的なスクリーニングおよび予防的な方法を開発することが必要不可欠である。

## 【 0 0 0 5 】

現在利用可能な結腸直腸癌についての最も早い検出法は、糞便の血液についての試験または内視鏡法を使用することを含む。しかし、通常、糞便の血液が検出される前には有意な腫瘍サイズが存在しているはずである。便試料からのCRCの検出に関して、現在最も頻繁に使用されているアッセイはグアヤクベース便潜血試験である。

## 【 0 0 0 6 】

近年では、非常に多くのいわゆる結腸特異的またはさらに言えば結腸直腸癌特異的遺伝子が報告されている。それに対応する大部分の研究論文または特許出願は、結腸(癌)組織に対する異なる組織または隣接する正常組織のそれぞれにおけるRNA発現パターンの解析により得られたデータに基づいている。このようなアプローチはディファレンシャルmRNAディスプレイ技術としてまとめられている。

20

## 【 0 0 0 7 】

mRNAディスプレイ技術から得られるデータの例として、WO 01/96390が言及および議論されている。この出願には、200より多くの単離されたポリヌクレオチドおよびそれに対応するポリペプチド、ならびにCRCの検出におけるそれらの使用が記載され、特許請求されている。しかし、mRNAのレベルの差は対応するタンパク質のレベルに反映されないことは一般常識である。希少なmRNAにコードされるタンパク質が非常に高い量で見られることがあり、それにもかかわらず豊富なmRNAにコードされるタンパク質がほとんど検出されないかまたは全く検出されないことがある。mRNAレベルとタンパク質レベルのこの相関の欠如はmRNAの安定性、翻訳効率、タンパク質安定性などのためである。

30

## 【 0 0 0 8 】

CRCの診断に使用し得る候補マーカー分子を同定するために、異なる組織間または健常組織と疾患組織間のタンパク質パターンの差を検査する最近のアプローチもある。Bruenagel, G. et al., Cancer Research 62 (2002)2437-2442では、隣接する正常組織と比較した際にCRC組織においてより豊富であると思われる7種類の核マトリックスタンパク質が同定されている。個体から得られた液体および便試料由来のデータは報告されていない。

## 【 0 0 0 9 】

WO 02/078636には、表面増強レーザー離脱イオン化 (surface-enhanced laser desorption and ionization) (SELDI) によって見られるような約9個の結腸直腸癌関連スポットが報告されている。これらのスポットは、健常対照から得られた血清と比較して、CRCを有する患者から得られた血清においてより頻繁に見られる。しかし、かかるスポットに含まれる分子(1つまたは複数)の同一性、例えばその(それらの配列)はわかっていない。

40

## 【 0 0 1 0 】

CRCの分野における候補タンパク質マーカーのリストは大きくかつ依然として増大しているが、これらの分子の臨床的/診断的有用性は今日までわかっていない。臨床的に有用であるために、単一マーカーとしての新規の診断マーカーは、当該技術分野において公知

50

である最良の単一マーカーと少なくとも同程度に良好であるべきである。または、新規のマーカーは、単独もしくは1つ以上の他のマーカーのそれぞれと合わせて使用した場合のいずれかにおいて、診断感度および/または特異性の進歩をもたらすべきである。試験の診断感度および/または特異性はしばしば、以下に詳細に説明される受信者動作特性によって評価される。

#### 【0011】

現在では、例えば癌胎児抗原 (CEA)、腫瘍関連糖タンパク質の検出に基づいた診断的血液試験がCRCの分野における診断の補助に利用可能である。CEAは、結腸直腸、胃および膵臓の癌ならびに胸、肺および頭部頸部癌の大部分を有する患者から得られた組織試料の95%で増加している (Goldenberg, D.M. et al., J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 57 (1976) 11-22)。高いCEAレベルは非悪性疾患を有する患者でも報告されており、結腸直腸癌を有する多くの患者は、特に疾患の初期の病期において正常な血清CEAレベルを有する (Carriquiry, L.A. and Pineyro, A., Dis. Colon Rectum 42 (1999) 921-929; Herrera, M.A. et al., Ann. Surg. 183 (1976) 5-9; Wanebo, H.J. et al., N. Engl. J. Med. 299 (1978) 448-451)。再発の検出において血清または血漿から測定されるようなCEAの有用性は、報告されているように問題が多く、まだ広く適用されていない (Martell, R.E. et al., Int. J. Biol. Markers 13 (1998) 145-149; Moertel, C.G. et al., JAMA 270 (1993) 943-947)。

#### 【0012】

利用可能なデータを考慮すると、血清CEAの測定は、無症候性の集団における結腸直腸癌のスクリーニング試験としてその使用を可能にするような感度も特異性も有していない (Reynoso, G. et al., JAMA 220 (1972) 361-365; Sturgeon, C., Clin. Chem. 48 (2002) 1151-1159)。

#### 【0013】

転移性の疾患が癌患者の病的状態および死亡率の主な原因となっているので、腫瘍の侵入および転移の制御に関連する分子は潜在的な診断/予後の標的として魅力的である。癌細胞または腫瘍ストロマ中の細胞によって産生されるタンパク質溶解性酵素が細胞外組織の分解に関連し、癌細胞の侵入および転移を引き起こすことがよく確立されている。多くの酵素がこの過程に関連しており、コラゲナーゼおよびストロメリシンなどのメタロプロテイナーゼならびにプラスミンなどのセリンプロテアーゼが最も詳細に研究されている。

#### 【0014】

マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) は癌の増殖および拡散に中心的な役割を果たしており、細胞外マトリックスの酵素分解に寄与している。天然に存在するMMPのインヒビターはMMP組織インヒビター、またはTIMPと呼ばれている。TIMPはMMPの活性形態と1:1の密な化学量論的複合体を形成して、これらの酵素の触媒活性を阻害する。MMPのマトリックス分解能とTIMPの阻害効果のバランスは正常な生理学的条件下では厳密に制御されているが (Matrisian, L.M., Bioessays 14 (1992) 455-463; Birkedal-Hansen, H., et al., Crit. Rev. Oral Biol. Med. 4 (1993) 197-250)、このバランスは悪性組織中では乱れることがある。

#### 【0015】

TIMP-1の検出のための多くの酵素結合免疫アッセイ (Kodama, S., et al., Matrix 9 (1989) 1-6; Cooksley, S., et al., Matrix 10 (1990) 285-291; Clark, I.M., et al., Matrix 11 (1991) 76-85) およびTIMP-2 (Fujimoto, N., et al., Clin. Chim. Acta 220 (1993) 31-45) が記載されている。これらのアッセイは体液、例えば血清、血漿、羊水、脳脊髄液、尿に適用されているが、試験される試料の数は健常個体におけるTIMPレベルの正常範囲を確立するには充分ではない (Kodama, S., et al., Matrix 9 (1989) 1-6; Clark, I.M., et al., Matrix 11 (1991) 76-85)。さらに、技術的性能または臨床的使用についてこれらのアッセイの中で十分に検証されているものはない。

#### 【0016】

胃癌を有する患者においてTIMP-1 mRNAの腫瘍組織レベルが研究されたMimoriら (Mimori 50

i, K., et al., Br. J. Cancer 76 (1997) 531-536) の研究において、TIMP-1 mRNAの高い腫瘍/正常組織比が侵入の増加および乏しい予後に関連することが見出された。しかし、前立腺癌患者および健常ドナー由来の血清中のTIMP-1タンパク質レベル (Baker, T., et al., Br. J. Cancer 70 (1994) 506-512) は、高い程度の重複を示した。同様に、前立腺癌患者および健常ドナー由来の血漿の別の試験では、2集団間でTIMP-1レベルの差は示されなかった (Jung, K., et al., Int. J. Cancer 74 (1997) 220-223)。

【0017】

進行した胃腸癌および婦人科癌を有する患者の血漿中のMMP-9と複合体化したTIMP-1の研究 (Zucker, S., et al., Cancer 76 (1995) 700-708) では、健常対照個体と比較して転移性の疾患を有する癌患者由来の血液試料において有意に高いレベルが示され、循環中に高レベルのTIMP-1:MMP-9複合体を有する患者は生存が短いことが示された (Zucker, S., et al., Cancer 76 (1995) 700-708およびUS 5,324,634)。

10

【0018】

Holten-Anderson M. N. (US 2003/082652) には、体液試料から測定された場合にTIMP-1を癌の評価に使用できることが記載されている。便を含むいくつかの試料供給源が言及されており、血漿由来のデータが示されている。当業者に明らかなように、血漿中で検出されたタンパク質の濃度と便試料中のかかるタンパク質の濃度には全く相関はないか、またはかなり低い。当該技術分野において便試料中のTIMP-1の存在を示すデータを見出すことはできない。当該技術分野において、便試料中のTIMP-1の存在が臨床的に有用であり得るという事実を示す利用可能なデータはない。

20

【0019】

便から得られた試料は、サンプリングが非侵襲性手段によって容易に可能であるという利点を有する。

【0020】

上述のように、現在、便からのCRCのスクリーニングアッセイとしてグアヤク試験が最も広く使用されている。しかし、グアヤク試験は、乏しい感度および乏しい特異性の両方を有する。グアヤクベース便潜血試験の感度は約26%であり、これはグアヤクアッセイに基づいたスクリーニング法において悪性病変を有する患者の74%が検出されずにいることを意味する (Ahlquist, D.A., Gastroenterol. Clin. North Am. 26 (1997) 41-55)。

【0021】

30

結腸内視術による前癌性および癌性病変の視覚化により、早期検出への最良のアプローチが示される。しかし、結腸内視術は侵襲性であり、高いコスト、リスク、および合併症を伴う (Silvis, S.E. et al., JAMA 235 (1976) 928-930; Geenen, J.E. et al., Am. J. Dig. Dis. 20 (1975) 231-235; Anderson, W.F. et al., J. Natl. Cancer Institute 94 (2002) 1126-1133)。

【0022】

グアヤク試験に代わる診断方法の感度および特異性は最近では、Sieg, A. et al., Int. J. Colorectal Dis. 14 (1999) 267-271により調査されている。特に、便検体でヘモグロビンおよびヘモグロビン-ハプトグロビン複合体の測定が比較されている。ヘモグロビンアッセイは結腸直腸新形成の検出について満足のいく感度を有さないことに注意されたい。進行した癌の病期では癌は約87%の感度で検出されるが、さらに早期の腫瘍病期では十分な感度で検出されない。早期病期のCRCの検出においてヘモグロビン-ハプトグロビン複合体アッセイはより感受性であった。より感受性なこの検出は乏しい特異性を伴った。しかし、乏しい特異性は結腸内視術などの多くの不要な二次検査へとつながるために、特異性の乏しいアッセイも一般的に許容されるスクリーニングアッセイの要件を満たさない。

40

【0023】

便試料由来のCRCの検出のために代替的バイオマーカーとして、カルプロテクチンがUS 5,455,160および対応するRoseth, A.G., らによる科学論文 (Scand J Gastroenterol 27 (1992) 793-798; Scand. J. Gastroenterol. 28 (1993) 1073-1076) に記載されている。

50

カルプロテクチンは炎症性疾患のマーカーであるが、便からのCRCの検出についてのマーカーとしてのその潜在性はいくつかの文献に記載されている (Johne, B., et al., Scand. J. Gastroenterol. 36 (2001) 291-296; Limburg, P.J., et al., Am. J. Gastroenterol. 98 (2003) 2299-2305; Hoff, G., et al., Gut 53 (2004) 1329-1333)。カルプロテクチンの感度および特異性は免疫学的ヘモグロビンアッセイと同等であるが、カルプロテクチンはヘモグロビンと比較すると、診断バイオマーカーに好ましいいくつかの特徴を有するように思われる。カルプロテクチンは便に均一に分布し、試料を研究所に郵送できるように室温で安定であり、食物成分または医薬化合物により何ら障害を示さない (Ton, H., et al., Clin. Chim. Acta 292 (2000) 41-54)。しかしながら、CRC、クローン病または炎症性腸疾患に罹患した患者由来の便試料中で、高濃度のカルプロテクチン、S100A8 およびS100A9のヘテロダイマーが検出された。これらの結果は炎症におけるカルプロテクチンのより一般的な機能と一致する (Ryckman, C., et al., J. Immunol. 170 (2003) 3233-3242)。そのため、胃腸病学におけるカルプロテクチンの使用は、CRCの検出に限定されず、Poullis, A., ら (J. Gastroenterol. Hepatol. 18 (2003) 756-762) により概説されるように他の疾患、特に炎症性腸疾患にまで広がる。

10

#### 【0024】

近年、ビルビン酸キナーゼM2アイソエンザイム (M2-PK) の検出についてのアッセイが市場に導入されている (Schebo Biotech, Giesen, Germany)。ヘモグロビンおよびM2-PKについてのグアヤク試験と免疫アッセイとの比較は、例えば、Vogel, T. et. al., Dtsch. Med. Wochenschr. 130 (2005) 872-877によりなされている。彼らは、免疫学的アッセイがグアヤク試験よりも優れていること、およびCRCの検出においてヘモグロビンアッセイと比較するとM2-PKアッセイは同等の特異性でより低い感度であることを示している。しかし、著者は、これらの両方の便ベースアッセイの有用性は依然として疑わしいと結論づけている。

20

#### 【0025】

便におけるCRCの検出について、グアヤク試験のさらなる代替的な方法が最近公開されており、それは便中に隠れた結腸細胞中の免疫組織化学による結腸直腸癌特異的抗原「ミニ染色体維持タンパク質2」(MCM2)の検出からなる。小規模な研究のために、結腸直腸癌の検出についての診断の価値についての結論は仮のものである。しかしながら、この試験は右側結腸癌を検出する限定された感度のみを有するように思われる (Davies, R.J. et al., Lancet 359 (2002) 1917-1919)。

30

#### 【0026】

Osborn, N.K. and Ahlquist, D.A. (Gastroenterology 128 (1995) 192-206) では、マーカーヘモグロビンの不利な点、およびCRCのスクリーニングにおいて便試料から回収されたDNAの使用の非常に好ましい点が議論されている。

#### 【0027】

信頼性の高い癌検出を可能にするかまたは非侵襲性的手段により便検体から早期予後情報を提供する早期CRC腫瘍マーカーの同定により、疾患の診断および管理を大きく補助する診断アッセイがもたらされ得る。従って、特に便からのCRCの診断を改善する緊急の臨床的な必要性がある。早期に診断された患者は疾患の進行した病期で診断された患者と比較して生存の見込みがかなり高いため、CRCの早期診断を改善することが特に重要である。

40

#### 【0028】

CRC診断を補助し得る新規のマーカーを同定することができるかどうか調べることが本発明の課題であった。好ましくは、かかるマーカーは便中に存在し、非侵襲性診断を可能にする。

#### 【0029】

驚くべきことに、タンパク質TIMP-1をCRCのマーカーポリペプチドとして使用することは、当該技術分野の状態から知られていた課題を少なくとも部分的に克服し得ることが見出された。

50

## 【 0 0 3 0 】

したがって、本発明は、

- a) 個体から得られた便試料を提供する工程、
- b) 前記試料とTIMP-1に特異的な結合剤を、前記結合剤とTIMP-1との間の複合体の形成に適した条件下で接触させる工程、
- c) 工程(b)で形成された複合体の量を測定する工程、および
- d) (c)で測定された複合体の量と結腸直腸癌の診断を相関する工程を含む、結腸直腸癌の診断方法に関する。

## 【 0 0 3 1 】

さらに好ましい態様として、本発明は、個体から得られた便試料を提供する工程、前記試料とTIMP-1に特異的な結合剤を前記結合剤とTIMP-1の間の複合体の形成に適した条件下で接触させる工程、前記試料とヘモグロビン/ハプトグロビン複合体、ヘモグロビン、カルプロテクチン、および腫瘍M2ピルビン酸キナーゼ(M2-PK)からなる群より選択される少なくとも1つの第2のマーカ-に特異的な結合剤を前記結合剤と第2のマーカ-の間の複合体の形成に適した条件下で接触させる工程、TIMP-1について形成された複合体の量および少なくとも1つの第2のマーカ-について形成された複合体の量を検出する工程、ならびに工程で形成された複合体の量と結腸直腸癌の診断を相関する工程を含む、結腸直腸癌の診断方法を開示する。さらに好ましい態様において、本発明の方法は、TIMP-1および第2のマーカ-としてヘモグロビンの測定、TIMP-1および第2のマーカ-としてヘモグロビン/ハプトグロビン複合体の測定、TIMP-1および第2のマーカ-としてカルプロテクチンの測定、およびTIMP-1および第2のマーカ-としてM2-PKの測定のそれぞれに基づく。

## 【 0 0 3 2 】

当業者に明確なように、TIMP-1の測定および任意に1つ以上の他のマーカ-の測定は便試料のアリコートからなされる。かかる測定または複数の測定は、便試料もしくは処理された便試料の同一のアリコートのそれぞれから、または患者の便試料の異なるアリコートもしくは患者の処理された便試料の異なるアリコートのそれぞれからなされ得る。

## 【 0 0 3 3 】

当業者が理解するように、便試料由来のTIMP-1の任意のかかる測定はインビトロでなされる。患者試料はその後廃棄される。患者試料は本発明のインビトロ法のみで使用される。TIMP-1の測定またはCRCの評価のいずれもヒトまたは動物の身体において実施されることはない。

## 【 0 0 3 4 】

本発明のインビトロ診断法を使用して、便試料中のTIMP-1の非存在、存在または相対的濃度を評価する。TIMP-1について測定された値は、臨床医によるCRCの評価、例えば臨床医による臨床診断の確立および/または臨床医による適切な治療の決定を補助する。TIMP-1の相対的濃度をCRCの評価に使用する場合、かかるTIMP-1の相対的濃度は、最も容易かつ好適に便の量当たりのTIMP-1の量の割合に基づいている。

## 【 0 0 3 5 】

好ましい態様において、便試料を処理して、便検体よりも扱い易い処理された試料液を得る。次いで、かかる処理された試料をTIMP-1に特異的な結合剤とインキュベートする。したがって、本発明はまた、

- a) 個体から得られた便試料を提供する工程、
- b) 前記試料を処理して処理された液体試料を得る工程、
- c) 前記処理された液体試料とTIMP-1に特異的な結合剤を、前記結合剤とTIMP-1の間の複合体の形成に適した条件下で接触させる工程、および
- d) (c)で形成された複合体の量と結腸直腸癌の診断を相関する工程を含む、結腸直腸癌の診断方法に関する。

## 【 0 0 3 6 】

本発明の別の好ましい態様は、

- a) 個体から得られた便試料を処理して処理された液体試料を得る工程、

- b) 前記処理された液体試料とTIMP-1に特異的な結合剤を、前記結合剤とTIMP-1の間の複合体の形成に適した条件下で接触させる工程、  
c) 工程(b)で形成された複合体の量を測定する工程、および  
d) (c)で測定された複合体の量と結腸直腸癌の診断を相関する工程を含む、結腸直腸癌の診断方法である。

【0037】

タンパク質TIMP-1(=メタロプロテイナーゼ組織インヒビター1)は、配列番号:1に示される配列を特徴とする。

【0038】

好ましい態様において、新規マーカーTIMP-1は個体のCRCのスクリーニングに使用される。

10

【0039】

好ましい態様において、本発明の診断方法は、スクリーニング目的に使用される。つまり、本発明の診断方法を使用して、便試料中のTIMP-1レベルの測定および測定されたレベルとCRCの有無の相関により、以前にCRCの診断をされていない被験体を評価する。

【0040】

かかるスクリーニングにおいて当業者が容易に理解するように、適切な量の便試料が使用されるように注意する必要がある。好ましくは、便試料に含まれるTIMP-1の測定には規定量の便試料が使用される。好ましくは、TIMP-1の量は便の量当たりのTIMP-1の量として表され、つまりTIMP-1の相対的濃度が与えられる。

20

【0041】

当業者が良好に理解するように、TIMP-1のカットオフ値は健常正常集団中の個体由来の便試料中で測定されたTIMP-1値に基づいて確立される。好ましくは、スクリーニングセット中の臨床的に関連のある正常集団は、55~65歳の臨床的に健常な個体からなる。確立されたカットオフ値より高い便試料中のTIMP-1値はCRCを示すと考えてもよい、またはそれぞれの個体のさらなる診断検査の少なくとも正当な理由とを考えてもよい。

【0042】

結腸直腸癌は最も頻繁に、腺腫(ポリープ)から悪性癌へと進行する。

【0043】

癌の病期は程度、進行度および重症度に関する疾患の分類である。病期は、予後および治療の選択を一般化することができるように癌患者を分類する。

30

【0044】

CRCの異なる病期を使用して、デュークス病期A~Dに従って分類する。今日では、TNMシステムが最も広く使用されている解剖学的な癌の程度の分類である。TNMシステムは国際的に受け容れられた、一定の病期分類システムである。3種類の基本的な変数:T(原発性腫瘍の程度)、N(局所的なリンパ節の状態)およびM(遠位の転移の有無)がある。TNM基準は、UICC(国際対ガン協会)Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (編), TNM Classification of Malignant Tumours, 第6版, 2002)により公表されている。一旦TNM状態が決定されると、患者はIVが最も進行した病期であるI~IVのローマ数字によって表される病期に分類される。TNM病期決定およびUICC病期は、Sobin L.H. and Wittekind (編) 上記から得られる以下の表に示されるように互に対応する。

40

【0045】

## TNM 病期分類と UICC 疾患病期の相互関係：

UICC 疾患病期	T 病期分類	N 病期分類	M 病期分類
病期 0	Tis	N0	M0
病期 I	T1, T2	N0	M0
病期 IIA	T3	N0	M0
病期 IIB	T4	N0	M0
病期 IIIA	T1, T2	N1	M0
病期 IIIB	T3, T4	N1	M0
病期 IIIC	任意 T	N2	M0
病期 IV	任意 T	任意 N	M1

10

## 【 0 0 4 6 】

特に重要なことは、CRCの早期診断がかなり良好な予後につながるということである。結腸直腸の悪性腫瘍は良性腫瘍つまり腺腫から生じる。したがって、腺腫の病期で診断された患者は最良の予後を有する。病期 $T_{is}$ 、N0、M0または $T1 \sim 3$ ；N0；M0ほどの早期に診断された患者は、適切に治療された場合、遠位の転移がすでに存在する時期に診断された患者についてわずか10%の5年生存率と比較して、90%より高い診断後5年間生存する見込みを有する。

20

## 【 0 0 4 7 】

本発明の意味において、CRCの早期診断とは、転移が全く存在しない（近位=N0、または遠位=M0のいずれも）腫瘍病期、つまり $T_{is}$ 、N0、M0または $T1 \sim 4$ ；N0；M0の病期での診断のことをいう。 $T_{is}$ はインサイチュの癌を表す。

## 【 0 0 4 8 】

CRCが腸壁中で完全には成長しておらず、内臓腹膜が貫通されていないかまたは他の臓器もしくは構造が侵入されていない時期にCRCが診断されること、つまり診断が $T_{is}$ ；N0；M0～ $T3$ ；N0；M0（= $T_{is} \sim 3$ ；N0；M0）の任意の病期になされることが好ましい。

## 【 0 0 4 9 】

本発明の診断方法は個体由来の便試料に基づく。便試料が抽出され、特異的な結合剤を使用して、この処理された便試料からTIMP-1が特異的に測定される。

30

## 【 0 0 5 0 】

特異的な結合剤は、例えばTIMP-1のレセプター、TIMP-1に結合するレクチン、TIMP-1に対するアプタマー、またはTIMP-1に対する抗体である。特異的な結合剤は、その対応する標的分子に対して少なくとも $10^7$  l/molの親和性を有する。特異的な結合剤は、その標的分子に対して好ましくは $10^8$  l/molまたはさらに好ましくは $10^9$  l/molの親和性を有する。当業者が理解するように、用語、特異的は、試料中に存在する他の生物分子がTIMP-1に特異的な結合剤と有意に結合しないことを示すために使用される。好ましくは、標的分子以外の生物分子への結合レベルは、標的分子のわずか10%、より好ましくは5%以下の親和性である結合親和性を生じる。最も好ましい特異的結合剤は、親和性および特異性について上記の最小基準の両方を満たす。

40

## 【 0 0 5 1 】

好ましくは、特異的結合剤は、TIMP-1に反応性を有する抗体である。用語、抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、かかる抗体の断片、および抗体の結合ドメインを含む遺伝子構築物のことをいう。特異的結合剤の上記の基準を保持する抗体断片を使用することができる。抗体は、当該技術分野の手法の記載、例えばTijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays, Elsevier, Amsterdam (1990), 書籍全体、特に43-78頁)に記載されるように作製される。また、当業者は、抗体の特異的単離に使用可能な免疫吸着剤に基づく方法に精通している。これらの手段により、ポリクローナ

50

ル抗体の質、および免疫アッセイにおけるその性能を高めることができる (Tijssen, P., 上記, p 108-115)。

【0052】

本発明に開示されるような達成のために、ウサギ内で生じたポリクローナル抗体を使用することができる。しかし、明確には、異なる種、例えばラットまたはモルモット由来のポリクローナル抗体、およびモノクローナル抗体も使用することができる。モノクローナル抗体は一定の性質で任意の必要量で産生することができるので、臨床的常套手段のためのアッセイの開発に理想的なツールである。本発明の方法におけるTIMP-1に対するモノクローナル抗体の作製および使用も別の好ましい態様である。

【0053】

ここで、CRCの診断に有用なマーカーとして免疫アッセイ法によりTIMP-1が同定されたことを当業者が理解するように、本発明の達成と同等な結果をもたらすために代替的な手段を使用してもよい。マーカータンパク質TIMP-1は、任意の適切な手段により検出され得、CRCのマーカーとして使用され得る。かかる好ましい適切な手段は、免疫アッセイ法、液体クロマトグラフィー、特に高速液体クロマトグラフィー、電気泳動、特にウェスタンブロットと組み合わせたSDS-PAGEおよび質量分析によるTIMP-1ポリペプチドの検出を含む。

【0054】

測定のために便試料を個体から得る。便試料のアリコートを直接使用してもよい。好ましくは、便試料のアリコートを処理して液体試料を得る。処理された便試料は、抽出バッファを用いた便試料の抽出の際に得られる液体試料である。

【0055】

任意の適切な抽出バッファが使用され得る。適切な抽出バッファは、少なくとも3個の基本的な要件を満たすはずである。適切な抽出バッファは便マトリックスから目的の解析物を遊離させるはずである。適切な抽出バッファは遊離解析物を安定化させるはずである。適切な抽出バッファは解析物のその後の検出において便マトリックスの干渉を最小にするはずである。一態様において、便試料の処理は課題に最適化された抽出バッファにより達成される。マーカー組合せは、付加的な診断能力を保持し得るので、最適化されたバッファは1つの特異的生物マーカーに適用可能なだけでなく、全ての目的の解析物に適用可能なはずである。抽出バッファは、便試料の均質化および抽出を改善するために尿素を含み得る。 $\text{Ca}^{2+}$ 結合タンパク質の安定化のために $\text{Ca}^{2+}$ が含まれることがある。一方では、 $\text{Ca}^{2+}$ 結合タンパク質と便マトリックス間のイオン結合を切断し得る弱キレート剤が使用されるはずである。最適化された好ましい抽出バッファは尿素、 $\text{Ca}^{2+}$ イオンおよびキレート剤を含む。好ましくは、キレート剤はニトリロ三酢酸またはクエン酸からなる群より選択される。

【0056】

最適化された抽出バッファを注文どおりに作製された便サンプリングデバイスと併用することが最も都合がよい。最も都合がよい方法では、個体は規定量の便試料を回収し、安定化抽出バッファを予め満たされた回収物に直接移す。このサンプリングおよび抽出の都合のよい様式により、解析物が分解することなく検体を診断実験室に運ぶことが可能になる。便試料の抽出はサンプリングデバイス中で直接達成することができるので、必要な取り扱いおよび移動手順が減少する。

【0057】

いくつかの最近の開発は、便試料のサンプリングおよび取り扱いを容易にするデバイスに焦点が当てられている。EP 1 366 715には、便試料の回収のための特殊な回収チューブが開示されている。この抽出チューブは本質的に、(a)内部が中空になり、上部が開放され、バッファ液を受けることが可能なコンテナ体、(b)便試料の回収のためのねじ式小さなロッドが備えられた上部キャップ、前記小さなねじ式ロッドは、コンテナ体の上部端に上部キャップが付されている場合に、コンテナ体の内部で軸に沿って突出している、および(c)前記コンテナ体の上部チャンバと底部チャンバを分離するように前記コンテナ体の

10

20

30

40

50

内部の中間位置にもうけられた分割しきり、前記分割しきりは、前記上部チャンバ内で過剰な便を保持し、小さなロッドのねじ部分を前記底部チャンバに通すことを可能にするように、前記小さいねじ式ロッドを通すことを可能にするのに適した軸に沿った孔を有する、を備える。この抽出チューブはさらに、底部が開放し、コンテナ体の底部端に移動可能に付され得る底部キャップが備えられたコンテナ体を有するので、前記抽出チューブは自動解析器の試料ホルダープレートに挿入される一次サンプリングチューブとして直接使用することができ、前記底部キャップが外されて前記コンテナ体が上下逆さまになる。EP 1 366 715に開示されるデバイスにより規定量の便試料の都合のよい取り扱いが可能になり、適切な抽出後、チューブを自動解析器の試料ホルダーに直接設置し得るという利点を有する。

10

【0058】

便試料の都合のよいサンプリングおよび取り扱いに適した、精巧な便サンプリングデバイスの第2の例がWO 03/068398に記載される。

【0059】

好ましくは、便試料はサンプリング後に直接使用もしくは処理され、または冷却保存もしくはより好都合に凍結保存される。凍結便試料を融解し、その後適切なバッファに希釈して、混合し遠心分離を行うことにより処理することができる。マーカーTIMP-1のその後の測定のために、液体試料として上清を使用する。

【0060】

処理された便試料のアリコートは、結合剤TIMP-1複合体の形成に適切な条件下でTIMP-1に特異的な結合剤とインキュベートされる。当業者は、いかなる発明の努力をすることもなく、このような適切なインキュベーション条件を容易に同定することができるために、このような条件は特定される必要はない。

20

【0061】

本発明に開示される方法による最終工程として、複合体の量を測定し、CRCの診断と相関させる。当業者が理解するように特異的結合剤TIMP-1複合体の量を測定する多くの方法があり、全ては関連する教科書に詳細に記載されている(例えば、Tijssen P., 上掲またはDiamandis, E.P., およびChristopoulos, T.K. (編), Immunoassay, Academic Press, Boston (1996)参照)。

【0062】

好ましくはTIMP-1は、サンドイッチ型アッセイ形式で検出される。このようなアッセイにおいて、第一の特異的結合剤が一方の面でTIMP-1を捕捉するために使用され、他方の面で直接または間接的に検出可能なように標識された第二の特異的結合剤が使用される。好ましくは、遊離TIMP-1および複合体化TIMP-1の合計が測定されることを確実にするアッセイ設定が選択される。

30

【0063】

CRCの評価において、TIMP-1に対する抗体は、他の方法で、例えばインサイチュ、生検または免疫組織学染色法で結腸直腸癌細胞を検出するためにも使用することができる。

【0064】

好ましくは、TIMP-1に対する抗体は、定性的(TIMP-1の存在もしくは非存在)または定量的(TIMP-1量が測定される)イムノアッセイで使用される。

40

【0065】

上記のように、驚くべきことにTIMP-1が個体試料から得られた便試料から測定できることを見出した。CRCの診断にマーカーTIMP-1を適用するために組織および生検試料を必要としない。

【0066】

例えば健常組織および癌組織を比較することによって通例のプロテオミクス法を組織試料に適用して、選択された組織/疾患について多くの可能なマーカー候補を同定するが、これらのマーカー候補は偶然および稀な場合のみに血液循環中に見出される。驚くべきことに、本発明の発明者らは、便試料中のタンパク質TIMP-1を検出することができた。発明

50

者らは、個体から得られたこのような便試料中のTIMP-1の存在を結腸直腸癌の診断に相関させることができることを示すことができた。

【0067】

個体から得られたこのような便試料中のTIMP-1の存在または非存在を患者における結腸直腸癌の存在または非存在に相関させることができることも見出された。また、本発明は、a)個体から得られた便試料を提供する工程、b)該試料を処理して処理された液体試料を得る工程、c)TIMP-1に特異的な結合剤とTIMP-1との間の複合体の形成に適切な条件下で、該処理された液体試料と該結合剤とを接触させる工程、およびd)結腸直腸癌が存在しない指標として工程(c)における複合体の非存在を用いる工程を含む、結腸直腸癌の排除方法に関する。

10

【0068】

当業者が理解するように、便試料中のTIMP-1の陽性結果は、必ずしも患者がCRCを有することを意味するとは限らない。しかし、便試料中のTIMP-1の陽性値は、さらにより洗練された診断を保証する明確な指標とみなされるべきである。好ましい態様において、便試料から測定されるTIMP-1の陽性値は、さらなる検査、特にPETスキャンまたは結腸内視術が患者に与えられるべきであるという指標として使用される。好ましくは、便試料中の陽性値は、患者の(診断)検査における次の工程としての結腸内視術が正当であるという指標として使用される。

【0069】

好ましい態様において、新規マーカーTIMP-1は、CRC患者のモニタリングのために使用される。

20

【0070】

本発明による診断方法は、患者のモニタリングに使用する場合、腫瘍負荷量、治療の効能、および患者の追跡における腫瘍再発の評価に役立つことがある。高いレベルのTIMP-1は腫瘍負荷量に直接相関する。化学療法後に、TIMP-1の短期間(数時間~14日間)の増加は、腫瘍細胞死の指標として使用されることがある。手術および/または化学療法後の患者の長期間追跡(3ヶ月~10年)において、TIMP-1の増加は、結腸直腸における腫瘍再発の指標として使用することができる。

【0071】

タンパク質TIMP-1のレベルの測定は、CRCの分野で非常に有利であることが認められている。従って、さらに好ましい態様において、本発明は、個体から得られた便試料からの結腸直腸癌の診断におけるマーカー分子としてのタンパク質TIMP-1の使用に関する。

30

【0072】

用語マーカー分子は、個体から得られた処理された便試料から測定される分析物TIMP-1の高いレベルがCRCの存在を特徴付けることを示すために使用される。マーカー分子TIMP-1は、便中に、遊離形態およびTIMP-1/MMP複合体の形態で存在する。本発明による診断方法において、遊離TIMP-1、TIMP-1/MMP複合体または全TIMP-1(遊離TIMP-1およびTIMP-1/MMP複合体中のTIMP-1の合計)は、マーカー分子として使用することができる。好ましくは、全TIMP-1を測定して、測定された量をCRCを評価するために使用する。

【0073】

当業者に明らかなように、本発明は、配列番号:1の完全長タンパク質TIMP-1の測定に限定されると解釈されない。また、本発明を実施しながら、TIMP-1の生理学的断片を測定して、CRCのマーカーとして使用できる。免疫学的に検出可能な断片は、好ましくは該マーカーポリペプチドの少なくとも6個、7個、8個、10個、12個、15個または20個の連続アミノ酸を含む。当業者は、細胞によって放出されるタンパク質、または細胞外マトリックスに存在するタンパク質が例えば炎症中にダメージを受ける場合があり、このような断片に分解または切断される場合があることを理解する。また、あるいは代替的に、TIMP-1ポリペプチドは翻訳後修飾を有してもよく、このような修飾TIMP-1もCRCのマーカーとして使用してもよい。

40

【0074】

50

TIMP-1のアッセイは、総量のTIMP-1、即ちマトリックスメタロプロテアーゼに結合したTIMP-1および遊離TIMP-1の量を測定するように設定できる。この好ましい態様において、それぞれ遊離TIMP-1およびMMPに結合したTIMP-1の両方に結合する少なくとも1つの特異的結合剤が使用される。例えば、遊離TIMP-1およびTIMP-1/MMP複合体中のTIMP-1にも結合する抗体を使用することができる。サンドイッチアッセイ形式を使用する場合、同じ要件を満たす第二抗体が使用される。好ましい態様において、本発明による方法は、便試料中の全TIMP-1を測定することによって行われる。

【0075】

また、TIMP-1のアッセイは、遊離TIMP-1、即ちマトリックスメタロプロテアーゼに結合していないTIMP-1だけを測定するように設定できる。好ましい態様において、遊離TIMP-1は、CRCのマーカーとして使用される。遊離TIMP-1の測定のアッセイにおいて、遊離TIMP-1のみに結合する少なくとも1つの特異的結合剤が使用される。例えば、遊離TIMP-1に結合するがTIMP-1/MMP複合体中のTIMP-1には結合しない抗体を使用することができる。

【0076】

上記のように、TIMP-1は、マトリックスメタロプロテアーゼと1:1の複合体を形成する。本発明による好ましい態様において、TIMP-1/MMP複合体がCRCのマーカーとして使用される。このようなアッセイにおいて、TIMP-1に特異的な結合剤が捕捉試薬として使用でき、MMPに特異的な結合剤が検出剤として使用でき、またはその逆である。あるいは、全TIMP-1および遊離TIMP-1を測定し、TIMP-1/MMP複合体中のTIMP-1の量をこれらの2つの測定の差として計算することができる。

【0077】

TIMP-1の人工断片は、例えば、イムノアッセイでの陽性対照または免疫原として使用されてもよい。人工断片は、好ましくは配列番号:1に開示される配列に由来する少なくとも6個、7個、8個、9個、10個、12個または少なくとも15個の連続アミノ酸からなる合成または組み換え技術で作製されたペプチドを含む。好ましくは、このような人工断片は、診断目的の少なくとも1つのエピトープを含む。また、好ましい人工断片は、目的の少なくとも2つのエピトープを含み、サンドイッチイムノアッセイにおける陽性対照としての使用に適切である。

【0078】

結腸直腸癌の早期検出において新規マーカーTIMP-1を使用することが好ましい。しかし、当業者が理解するように、他のマーカーとは異なって、TIMP-1はまた、より進行した病期の腫瘍進行でのCRCにすでに罹患している患者の診断および追跡に非常に有利である。

【0079】

TIMP-1濃度はCRCにおける腫瘍負荷量と密接に相関する。従って、該マーカーはまた、治療後のCRC患者の追跡に適切である。好ましい態様において、新規マーカーTIMP-1が、CRCに罹患している患者の追跡に使用される。規則的に例えば3ヶ月、6ヶ月または1年の間隔でCRCを測定することによって、腫瘍進行および/または場合によっては腫瘍再発を評価することができる。正常カットオフ値よりも高いTIMP-1の増加または再出現は、腫瘍進行または腫瘍再発のそれぞれを示すとみなされる。従って、さらに好ましい態様は、a) 患者から得られた便試料を提供する工程、b) TIMP-1に特異的な結合剤とTIMP-1との間の複合体の形成に適切な条件下で、該試料と該結合剤とを接触させる工程、c) 工程(b)で形成された複合体の量を測定する工程、ならびにd) 工程(c)で測定された複合体の量を結腸直腸癌の再発または進行に相関させる工程を含む、癌病変の除去手術後に結腸直腸癌に罹患する患者をインビトロ評価によって評価する方法に関する。治療後のTIMP-1の増加は、各患者におけるCRCの再発を示す。便試料からのTIMP-1の測定は、特に有用であり、好ましい態様において胃腸管内のCRC腫瘍再発の早期検出に使用される。

【0080】

結腸および直腸の両方は胃腸管の一部である。これまでにTIMP-1が結腸直腸癌の患者のスクリーニングに有用である可能性が最も高いことが示されたので、便試料におけるTIMP-1の存在はまた、胃腸癌の他の種類の評価における診断補助として使用されてもよい可能

性が非常に高い。さらに好ましい態様において、本発明は、胃腸腫瘍の評価における便試料から測定されるTIMP-1の使用に関する。好ましくは便試料から測定されるTIMP-1はまた、胃腸腫瘍の評価に使用される。

【0081】

タンパク質TIMP-1自体の使用は、感度および特異性の両方の点で驚くべき良好な性能を示す。TIMP-1の測定を、ヘモグロビンまたはヘモグロビン-ハプトグロビン複合体のような他の公知のマーカーあるいはまだ発見されていないCRCの他のマーカーと組み合わせることによって、CRCの評価におけるさらなる改善をもたらし、もたらしてもよい。従って、さらに好ましい態様において、本発明は、個体から得られた便試料からの結腸直腸癌の診断における、結腸直腸癌の1つ以上の他のマーカー分子と組み合わせた結腸直腸癌のマーカー分子としてのTIMP-1の使用に関する。TIMP-1の測定と組み合わせてもよい好ましい選択された他のCRCマーカーは、カルプロテクチン、腫瘍M2ピルビン酸キナーゼ(M2-PK)、ヘモグロビンおよび/またはヘモグロビン-ハプトグロビン複合体である。

10

【0082】

さらに好ましい態様として、本発明は、ヘモグロビン/ハプトグロビン複合体、ヘモグロビン、カルプロテクチン、および腫瘍M2ピルビン酸キナーゼ(M2-PK)からなる群より選択される結腸直腸癌の1つ以上の他のマーカー分子と組み合わせた、結腸直腸癌のマーカー分子としてのタンパク質TIMP-1の使用を開示する。

【0083】

好ましい態様において、本発明は、CRCの評価におけるマーカーTIMP-1およびヘモグロビンを含むマーカー組み合わせの使用であって、両方のマーカーが便試料から測定される使用に関する。

20

【0084】

好ましい態様において、本発明は、CRCの評価におけるマーカーTIMP-1およびヘモグロビン/ハプトグロビン複合体を含むマーカー組み合わせの使用であって、両方のマーカーが便試料から測定される使用に関する。

【0085】

イムノアッセイのような特異的結合アッセイの分野における診断試薬は、通常、キットの形態で最もよく提供され、キットには特異的結合剤およびアッセイを行うために必要な補助試薬が含まれる。従って、本発明はまた、少なくとも1つのTIMP-1に特異的な結合剤およびTIMP-1測定用補助試薬を含む免疫学的キットに関する。

30

【0086】

診断試験の精度は、しばしば受信者動作特性(ROC)によって説明される(特にZweig, M.H. およびCampbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577を参照)。ROCグラフは、観察されたデータの範囲全体に対して判定閾値を連続して変化させることでもたらされる感度/特異性対の全てのプロットである。

【0087】

研究室試験の臨床性能は、その診断精度、または被験体を臨床的に関連する亜群に正確に分類する能力に依存する。診断精度は、調査される被験体の2つの異なる状態を正確に区別する試験の能力を評価する。このような状態は、例えば、健康と疾患または良性疾患対悪性疾患である。

40

【0088】

それぞれの場合において、ROCプロットは、識別閾値の完全範囲に対する感度対1-特異性のプロットによる2つの分布間の重複を示す。y軸は感度、即ち真陽性部分[(真陽性試験結果の数)/(真陽性の数+偽陰性試験結果の数)]として定義される]である。これは、疾患または状態の存在下の陽性度とも呼ばれる。これは、罹患亜群のみから計算される。x軸は、偽陽性部分、即ち1-特異性[(偽陽性結果の数)/(真陰性の数+偽陽性結果の数)]として定義される]である。これは、特異性の指標であり、罹患していない亜群全体から計算される。2つの異なる亜群の試験結果を使用することで、真陽性部分および偽陽性部分が完全に別々に計算されるために、ROCプロットは、試料中の疾患の有病率とは独立している。R

50

ROCプロット上の各点は、特定の識別閾値に対応する感度/1-特異性対を表す。完全識別を有する試験(2つの結果の分布に重複はない)は、左上隅を通過するROCプロットを有し、この場合真陽性部分は1.0、即ち100%(完全感度)であり、偽陽性部分は0(完全特異性)である。識別のない試験の理論的プロット(2つの群の結果の同一分布)は、左下隅から右上隅の45°の対角線である。ほとんどのプロットは、これらの2つの極値の間に入る。(ROCプロットが45°対角線より下に完全に入る場合、これは「陽性度」の基準を「より大きい」から「より小さい」またはその逆に逆転することによって容易に直される。)定性的に、プロットが左上隅に近づくほど、試験の全体精度は高くなる。

#### 【0089】

研究室試験の診断精度を定量する1つの便利な目標は、1つの数によってその性能を表すことである。最も一般的で包括的な基準は、ROCプロットの曲線下面積である。慣例により、この面積は常に0.5である(そうでない場合、そうなるように判定規則を逆転することができる)。値は1.0(2つの群の試験値が完全に分離する)~0.5(2つの群の試験値間の明白な分布の差はない)の範囲である。面積は、対角線に最も近い点または90%特異性での感度などのプロットの特定の部分だけに依存せず、プロット全体にも依存する。これは、AUCが完全なもの(面積=1.0)にどれくらい近いかを定量的に説明した表現である。

#### 【0090】

新規マーカーTIMP-1の臨床有用性は、確立されたマーカーヘモグロビンと比較しておよびこれと組み合わせて受信者動作特性分析を用いて評価される(ROC; Zweig, M.H.およびCampbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577)。この分析は、実施例の項に示される十分に定義された患者コホートに由来する試料に基づいている。

#### 【0091】

驚くべきことに、TIMP-1およびヘモグロビンの値に基づいたマーカー組み合わせは、その両方が便試料から測定されるが、それぞれ単一マーカーとして使用される場合にこれらのマーカーのそれぞれと比較して、診断精度の改善を示すことを示すことができた。

#### 【0092】

以下の実施例、図面および配列表は、その真の範囲が添付の特許請求の範囲に示される本発明の理解を補助するために提供される。本発明の精神を逸脱することなく以下に示される手順で改変を行うことができることが理解される。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0093】

【図1】図1はTIMP-1のROCである。健常(=対照)個体のスクリーニングから得られた252個の試料と比較したCRCを有する患者から得られた101個の試料の評価のための受信者動作曲線(ROC)を示す。

#### 【実施例】

#### 【0094】

##### 実施例1

##### 試験集団

多数の臨床的に十分に特徴付けられた便試料を得るために、見込みのある多施設試験を開始した。参加者らは、便試料がどのように回収される必要があるかについて詳細な指示を受けた。各患者から、単一の便試料の異なる部位で2つの異なる部分を回収しなければならず、両方を一日以内に-20℃で凍結しなければならなかった。便試料は、結腸内視術が行われる(対照集団)前にまたは手術が行われる(癌集団)前に回収されなければならなかった。最大2週間-20℃で保存した後、便試料を、便抽出が行われるまで-70℃で保存した。対照集団の患者は、胃腸科での平均リスクスクリーニング集団で集められ、結腸内視術を受けた。炎症性大腸疾患および任意の種類の大腸腫瘍を有する患者を対照集団から排除した。予防スクリーニング集団内での結腸直腸癌患者の低い罹病率のために、癌患者を異なる外科で集めた。結腸直腸癌の診断を、各癌患者の病理段階によって確認した。免疫化学FOBTの陽性偏りを回避するために、全ての癌患者を排除し、そこから結腸内視術の前にグアヤク系FOBTを行うか、または視覚による直腸出血によって検出した。全部で252人の対

10

20

30

40

50

照患者および101人の結腸直腸癌患者が試験に含まれた(表1)。

【 0 0 9 5 】

表 1: 試料集団の標準特性

	総数	年齢(歳)	性別 (女性/男性)
対照	252	63,0 +/- 8,0	151/101
健常対照 (いかなる腸疾患の徴候なし)	132	62,3 +/- 6,8	81/51
痔	28	60,1 +/- 7,1	13/15
憩室症	73	64,7 +/- 9,5	46/27
過形成ポリープ (hyperplastic polyp)	14	67,9 +/- 9,9	8/6
他のGI疾患	5	59,2 +/- 6,7	3/2
CRC (全病期)	101	68,4 +/- 11,5	48/53
- UICC 0	1	-	0/1
- UICC I	22	65,9 +/- 9,3	8/14
- UICC II	27	73,1 +/- 10,9	14/13
- UICC III	12	70,9 +/- 12,3	8/4
- UICC IV	23	69,6 +/- 10,3	12/11
- 病期無し	16	61,9 +/- 12,6	6/10

10

20

【 0 0 9 6 】

#### 実施例2

ヘモグロビンおよびTIMP-1の測定のための便試料の抽出

各患者から、単一の便試料の異なる部位で2つのアリコート回収した。患者から試料あたり約1gの便を専用サンプリングデバイス(Sarstedt, Germany, 注文番号: 80 623 022)で回収し、1日以内に凍結し、抽出まで-70 で保存した。

30

【 0 0 9 7 】

便試料の処理のために、プロテアーゼインヒビターカクテル(Mini Complete EDTA無し, Roche, Germany, 注文番号: 11 873 580)を以下のバッファに添加することによって、抽出バッファを新たに調製した。

TRIS	0.10 mol/l, pH 8.0
クエン酸	0.10 mol/l
尿素	1.00 mol/l
CaCl <sub>2</sub>	0.01 mol/l
BSA	0.50 %

40

【 0 0 9 8 】

便試料を解凍し、デバイスの使い捨てスパチュラを使用して50~100mgの各試料を便試料調製キット(Roche, Germany, 注文番号: 10 745 804)に移した。抽出バッファを便試料の重量に従って添加し、50倍の希釈液を得た。試料を、楕円状シェイカーで30分間激しく混合して、10mlチューブ(Sarstedt, Germany, 注文番号: 62 551 201)に移し、1,200gで10分間遠心分離した。5µmカットオフフィルター(Ultrafree (登録商標)-CL, Millipore, Germany, 注文番号UFC40SV25)を用いて上清を濾過し、アリコートにし、-70 でさらなる分析のために保存した。これらの抽出物を、本試験における全ての目的の生体マーカー

50

を測定するために使用する。

#### 【 0 0 9 9 】

#### 実施例3

#### 便抽出物におけるTIMP-1の分析物安定性

基本的に、血清または血漿試料中のTIMP-1の測定について製造業者が示した説明書に従って、TIMP-1の測定を“Quantikine (登録商標) ヒトTIMP-1 イムノアッセイ(カタログ番号 DTM100; R&D Systems, Minneapolis)”で行う。しかし、便中のTIMP-1を測定できるようにするために、便抽出物(実施例2参照)を、キットの校正希釈剤RD5Pで1:2の比率に希釈する。次に、これらの予め希釈した便抽出物を、パッケージ挿入物に記載される試料として使用する(50  $\mu$ Lの予め希釈した便抽出物+100  $\mu$ Lのアッセイ希釈剤RD1X)。この市販TIMP-1アッセイは、捕捉試薬として抗TIMP-1モノクローナル抗体および検出試薬としてTIMP-1に対するポリクローナル抗体を使用し、試料中の全TIMP-1を検出する。

10

#### 【 0 1 0 0 】

ヘモグロビン測定を、製造業者が示した説明書に従って「RIDASCREEN (登録商標) ヘモグロビン」アッセイ(カタログ番号G09030, R-Biopharm AG, Darmstadt)で行う。10  $\mu$ Lの上記便抽出物を使用し、アッセイの90  $\mu$ Lの試料希釈剤で希釈する(1:10希釈比)。

#### 【 0 1 0 1 】

臨界範囲中または上記カットオフ値より上の分析物濃度を有する20個の便試料を、上記のように新たに抽出し、次に室温で1日間または3日間保存する。安定性を評価するために使用された20個の試料のうち、18個がヘモグロビンに陽性であり、7個がTIMP-1に陽性であり、分析物の安定性の計算に使用することができる。

20

#### 【 0 1 0 2 】

表 2:

温度ストレス後の便抽出物中の TIMP-1 およびヘモグロビンの回収

	数	試料の濃度範囲	室温で1日後の 回収 (平均 $\pm$ SD)	室温で3日後の 回収 (平均 $\pm$ SD)
TIMP-1	7	1.0ng/g~17.6ng/g	96.7 %	99.7 %
ヘモグロビン	18	0.32 $\mu$ g/g~10.4 $\mu$ g/g	79.1 %	58.6 %

30

#### 【 0 1 0 3 】

表2から明らかなように、TIMP-1は上記のように調製された便抽出物中で非常に安定であるように思われ、ヘモグロビンよりも有意に安定である。このことは、特に便抽出バッファが特注の便試料デバイスに組み込まれる場合に非常に有利である。このように、便試料を、抽出バッファを含むデバイスに直接回収することができ、便抽出物をデバイス内ですぐに調製し、分析される試料を含むチューブを室温で実験室に送ることができる。

#### 【 0 1 0 4 】

40

#### 実施例4

#### 結腸直腸癌の診断におけるTIMP-1の臨床有用性

TIMP-1の臨床有用性を、実施例1に記載される十分に特徴付けされた患者コホートから得られた便試料を分析することによって評価する。各患者について、同じ排便からの2つの便試料を測定し、濃度を分析する。両方の濃度の相関を、ピアソン相関係数によって評価する。この分析によって、2つの抽出物の間での密接な相関が明らかになる。アッセイの感度を改善するために、2つで一組の試料のうち1つで測定される最大濃度をさらなる分析に使用する。TIMP-1の診断値を、Zweigら(上掲)に従ってROC分析により評価する。曲線下面積によって測定されるようにCRC群の患者と健常個体を区別する識別力は、CRC対スクリーニング集団について91%であることが分かる(図1)。

50

## 【 0 1 0 5 】

CRCの早期検出におけるマーカーTIMP-1の感度を計算するために、陽性度のカットオフを、対照集団と比較して、95%または98%の特異性のいずれかをもちたすように設定した。

## 【 0 1 0 6 】

表 3: ROC 分析、TIMP-1 の感度および特異性

試料パネル	数	ROC 面積%
血液/FOBT 無し CRC 試料	101	91
UICC 病期 I	23	85
UICC 病期 II	27	95
UICC 病期 III	12	96
UICC 病期 IV	23	90
カットオフ:		
- 95% 特異性		23,8 ng/g 便
- 98% 特異性		44,7 ng/g 便
感度(%)	101	
- 95% 特異性		73
- 98% 特異性		62

10

20

## 【 0 1 0 7 】

表3から分かるように、95%の特異性で、高いTIMP-1の値がCRC患者の便試料の73%で検出される。98%の特異性レベルで、高いTIMP-1の値がCRC患者の便試料の62%でも検出される。

## 【 0 1 0 8 】

## 実施例5

## TIMP-1と他の便マーカーとの組み合わせ

30

TIMP-1と便抽出物の他の生体マーカーとの組み合わせを評価した。市販のELISAを使用して、マーカーヘモグロビン、ヘモグロビンとハプトグロビンのヘテロ複合体、カルプロテクチン、M2-PK、およびCEAを測定する。ヘモグロビン、ヘモグロビン/ハプトグロビンおよびカルプロテクチンの測定のためのアッセイはR-Biopharm, Germanyから得られる。Calpro カルプロテクチンELISAは、Calpro SA, Norwayによって製造されており、PhiCal<sup>TM</sup> Testとしてドイツ国外で販売されている。CEAの測定のためのアッセイは、Roche Diagnostics, Germanyから得られる。M2-PKのためのアッセイは、Schebo Biotech, Germanyによって販売されている。いくつかのアッセイは、便抽出物中の測定を目的としているが、CEA便は一般に使用される試料物質ではない。つまり、アッセイは、抽出された便検体を表す試料中の対応する分析物の測定に適合される必要がある。試料(便抽出物)を、CEA測定のために予め20倍に希釈するが、そうでない場合は製造業者の推奨に従ってアッセイを行う。

40

## 【 0 1 0 9 】

表 4: アッセイおよび 便抽出物の測定に使用される抽出物希釈の概要

アッセイ	供給元	正味の 便重量/ 抽出方法	アッセイするための 全抽出物希釈
Hb	R-Biopharm	実施例 2 参照	1:10
Hb-ハプトグロビン	R-Biopharm	実施例 2 参照	1:10
TIMP-1	R&D-Systems	実施例 2 参照	1:6
CEA	Roche-Elecsys	実施例 2 参照	1:400
カルプロテクチン	Calpro AS	実施例 2 参照	1:51
M2-PK	Schebo- Biotech	Schebo Biotech 製の オリジナル試料 デバイス	1:6

10

## 【 0 1 1 0 】

マーカー組み合わせがCRCの診断を改善するかどうかを試験するために、マーカーをベイズロジスティック回帰(BLR)によって組み合わせる。マーカー組み合わせの評価のためのBLRアルゴリズムにおいて、ガウス事前確率 (prior) を使用し、Alexander Genkin, David D. Lewis, およびDavid MadiganのBBR-ソフトウェア(テキスト分類のための大規模ベイズロジスティック回帰: テクノ測定 (Technometrics))で行う。以下の設定: 非自動化特徴選択、0.05に固定された事前分散、閾値調整なし、および正規化による入力標準化を使用する。多くの処理のために、0.0005の収束閾値、1000回の反復および非正確モードを有する初期設定を保持し、変化させない。基本アルゴリズムを用いた結果を、モンテカルロクロス確認デザインで100回試行によって評価する。各試行で、全症例および対照のそれぞれの2/3を、初期ランダム数発生器のための開始値19022007を用いたMatlab (登録商標) R2006a内蔵ファンクションランドサンプル(randsample)を介した訓練集合として選択する。基本アルゴリズムを訓練集合に適用して、診断規則を作成する。推定された後の症例確率についての閾値を、95%または98%の特異性それぞれを達成するように訓練集合の対照で決定する。次に、診断規則を残りの1/3のデータに適用し、所定の閾値での感度および特異性を推定する。

20

## 【 0 1 1 1 】

スクリーニングアッセイのために、ROC値以外も関連する。スクリーニング設定の非常に重要な要件は、高い特異性で十分良好な感度である。低い特異性が多数の偽陽性結果を生じ、不必要な追跡手順および患者の苦痛を伴うために高い特異性が重要である。表5に、95%および98%のプリセット特異性のそれぞれでの感度と共に、表1に特定される101人のCRC患者対252人の対照の評価のROC値をまとめる。

30

## 【 0 1 1 2 】

表 5: CRC 検出用マーカー組み合わせ

マーカー組 み合わせ	TIMP-1	TIMP-1+ Hb-Hp	TIMP-1+ Hb	TIMP-1+ Calpro.	TIMP-1+ M2-PK	TIMP-1+ CEA
ROC 面積%)	91	95	94	92	92	91
95%特異性 での感度	73	88	85	79	79	73
98%特異性 での感度	62	79	73	64	70	61

40

## 【 0 1 1 3 】

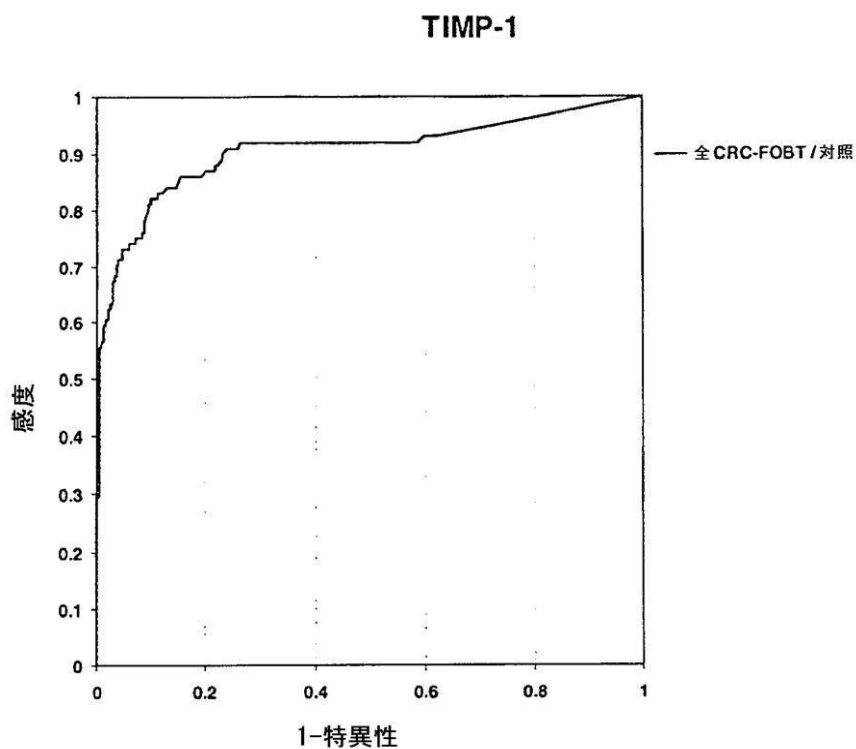
表5から導き出されるように、CRCの診断における個別のマーカーのAUC値は非常に類似している。一方で、CRCの検出における感度は、TIMP-1とCRCの他のマーカーとの組み合わせによって有意に改善することができる。これは、98%の特異性レベルで特に明白である

50

。TIMP-1単独で、98%の特異性レベルでの61%の感度を有するが、Hb、M2PKおよびHb/Hpのような他のCRCマーカーとの組み合わせによって感度が高くなる。特に、TIMP-1およびヘモグロビン-ハプトグロビン複合体からなるマーカー組み合わせは、62%から79%の感度の増加を示す。従って、TIMP-1を含むマーカー組み合わせは、早期段階でCRCを検出するために非常に重要であると考えられる。特に、このような組み合わせは、結腸直腸癌の病期IまたはIIのそれぞれの検出に重要であると思われる。

【図1】

Fig. 1



【配列表】

2010526995000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/003642

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/574		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) 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, 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.
X	US 2003/082652 A1 (HOLTEN-ANDERSEN MADSEN NIKOLAJ [DK] ET AL) 1 May 2003 (2003-05-01)	1, 5-9
Y	abstract; claims 23, 24, 28 page 5, column 2, paragraph 59 page 17, column 2, paragraph 1 page 1, column 1, paragraph 3 page 6, column 1, paragraph 63	2-4, 10
Y	"Metabolischer Tumormarker im Stuhl: Tumor M2-Pyruvatkinase (Tumor M2-PK)" INTERNET CITATION, [Online] May 2003 (2003-05), XP002365413 Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://www.laborzentrum-berlin.de/Labormedizin/Fachinformationen/M2PK.pdf">http://www.laborzentrum-berlin.de/Labormedizin/Fachinformationen/M2PK.pdf</a> [retrieved on 2006-01-31] abstract	2, 4, 10
-/-		
<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 "8" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
28 August 2008		10/09/2008
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. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Bigot-Maucher, Cora

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/003642

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OSBORN ET AL: "Stool screening for colorectal cancer: Molecular approaches" GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 128, no. 1, January 2005 (2005-01), pages 192-206, XP005313231 ISSN: 0016-5085 abstract; table 1 page 193, column 2, paragraph 2 page 197, column 1, paragraph 1	2,3,10
Y	SIEG A ET AL: "DETECTION OF COLORECTAL NEOPLASMS BY THE HIGHLY SENSITIVE HEMOGLOBIN-HAPTOGLOBIN COMPLEX IN FECES" INTERNATIONAL JOURNAL OF COLORECTAL DISEASE, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 14, no. 6, December 1999 (1999-12), pages 267-271, XP001182520 ISSN: 0179-1958 abstract page 268, column 1, paragraph 3	2-4,10
Y	WO 2005/095978 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; TACKE MICHAEL [DE]). 13 October 2005 (2005-10-13) page 3, paragraph 5	2-4,10

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/003642

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003082652 A1	01-05-2003	US 2007020707 A1	25-01-2007
WO 2005095978 A	13-10-2005	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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, 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 アンドレス, ヘルベルト

ドイツ連邦共和国 ペンツベルク 8 2 3 7 7 カペレンヴィーゼ 3 9

(72)発明者 ガルツアレック, ウルズラ

ドイツ連邦共和国 ドルトムント 4 4 3 0 9 ヴェストフェリッシェ シュトラーセ 2 0 5

(72)発明者 ガイスタンガー, アンドレア

ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 8 1 4 7 7 ツァイスメリンガーシュトラーセ 1 3

(72)発明者 ハイス, ペーター

ドイツ連邦共和国 ベーネディクトボイヤーン 8 3 6 7 1 ヴァルトラムシュトラーセ 1

(72)発明者 カール, ヨハン

ドイツ連邦共和国 パイセンベルク 8 2 3 8 0 ベルト - シュラッツルゼール - シュトラーセ 7

(72)発明者 クラウゼ, フリーデマン

ドイツ連邦共和国 ペンツベルク 8 2 3 7 7 アン デル フライハイト 1 5 0

(72)発明者 ヴィルト, ノルベルト

ドイツ連邦共和国 ゲレツリート/ゲルティング 8 2 5 3 8 ウンテルフェルトヴェーク 2

Fターム(参考) 2G045 AA26 CB04 DA36 DA51 FB03