

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4574619号
(P4574619)

(45) 発行日 平成22年11月4日(2010.11.4)

(24) 登録日 平成22年8月27日(2010.8.27)

(51) Int.Cl.

GO 1 N 33/574 (2006.01)
C 12 N 15/09 (2006.01)

F 1

GO 1 N 33/574 Z N A A
C 12 N 15/00 A

請求項の数 6 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2006-525478 (P2006-525478)
 (86) (22) 出願日 平成16年9月3日 (2004.9.3)
 (65) 公表番号 特表2007-506945 (P2007-506945A)
 (43) 公表日 平成19年3月22日 (2007.3.22)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2004/028766
 (87) 國際公開番号 WO2005/026687
 (87) 國際公開日 平成17年3月24日 (2005.3.24)
 審査請求日 平成19年8月31日 (2007.8.31)
 (31) 優先権主張番号 60/500,657
 (32) 優先日 平成15年9月5日 (2003.9.5)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 597177242
 トマス・ジェファーソン・ユニバーシティ
 Thomas Jefferson University
 アメリカ合衆国 19107-5587 ペン
 シルベニア州フィラデルフィア、ウォール
 ナット・ストリート 1020番
 (73) 特許権者 504402061
 セントルイス ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 ミズーリ州 63104
 , セントルイス, ルーム シー-110,
 キャロライン ストリート 3556

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】肝細胞癌の検査及び監視

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検体における HCC の検査方法において、
HCC に罹患している疑いのある被検体から得られた血清試料中における GP73 又は
 その断片のレベルを決定し、及び該血清試料中における GP73 又はその断片のレベルと、
 対照における GP73 の血清レベルとを比較することを含み、

該対照に対する該血清試料中 GP73 又はその断片レベルの上昇が、該被検体が HCC
 に罹患したことを示す。

被検体における HCC の検査方法。

【請求項 2】

血清試料中における GP73 又はその断片のレベルが、対照における GP73 のレベル
 に対して、少なくとも 2 倍上昇する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

血清試料中における GP73 又はその断片のレベルを生体分子相互作用検定法によって
 検出する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

血清試料中における GP73 又はその断片のレベルをアプタマーによって検出する、請
 求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

生体分子相互作用検定法が免疫学的検定法である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

免疫学的検定法が、ウエスタンプロット分析、放射免疫測定法（RIA）、免疫蛍光検定法、化学発光検定法又は酵素免疫測定法（ELISA）よりなる群から選択される、請求項5に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】****米国政府補助金への言及**

ここに記載される発明は、一部、N I H / N C I 補助金 5 U 0 1 C A 9 4 9 5 1 - 0 4
からの援助でなされた。米国政府は、本発明における一定の権利を有する。

10

【0002】**発明の分野**

本発明は、血清中で肝細胞癌（HCC）の生物学的マーカーを検出することによって、特に血清中でのG P 7 3蛋白質の検出によって、HCCを診断することに関する。また、本発明は、血清中のG P 7 3レベルの評価により、HCCの発症について患者を監視することに関するものもある。

【背景技術】**【0003】****発明の背景**

HCCは、世界中で5番目に多く蔓延している癌である。しかしながら、この病気は、多くの場合、治療が無効であるため、HCCは、世界中の癌死亡率の主原因の第3位であり、診断後の5年生存率は5パーセント未満である。

20

【0004】

HCCの主要な病因は、B型肝炎ウイルス（HBV）又はC型肝炎ウイルス（HCV）のいずれかによる慢性感染である。この高リスク集団におけるHBV又はHCV感染とHCCの発症との間の長い潜伏期間は、重大な病状の発症前に、早期発見のためのよい機会を与える。従って、HCCの危険性がある集団は、病気のバイオマーカーが利用できるようになると、これらについて監視できる。さらに、さらに多くの治療法の選択肢が利用できるようになるときに、患者の予後を改善させるにはHCCの早期発見が重要である。

【0005】

30

近年、HCCの疾病状態は、物理的評価である肝臓の超音波画像診断又はマーカーパネルについての血清分析によって典型的に監視されている。-胎児性蛋白質（AFP）レベルの上昇とHCCの出現との間には良好な相関があるため、 AFP レベルの決定が、しばしば病気の血清マーカーとして含まれる。しかしながら、HCCの唯一の指標としての AFP は効果が限られている。というのは、この蛋白質は、多くの場合、重大な病気が存在しないときに上昇するからである。HCV関連HCCの検出に際してのその値は、さらに明確さに乏しい。それにもかかわらず、 AFP と HCC との間の限られた相関でさえも、肝臓疾患のバイオマーカー源としての血清の可能性を明確に示している。

【0006】

HBV及びHCVキャリアの臨床的性質は、一般に、4つの臨床カテゴリー：不活性、活性、肝硬変及びHCCに分類できる。与えられるカテゴリーは、必ずしもその次の前駆状態であるわけではないが、HCCは、感染した被検体における肝臓疾患の進行の末期であるとみなされ得る。早期発見及び病気の予後を助成するために、血清分子マーカー（ポリペプチド、糖脂質及びプロテオグリカン）であってその数度がこれらの臨床カテゴリーと相關するものの同定が非常に望ましいであろう。

40

【0007】

G P 7 3は、ウイルス性肝炎患者の肝細胞内で高レベルに発現するゴルジII型膜貫通蛋白質である（K l a d n e y 外，2 0 0 0，Gene 2 4 9，5 3 - 6 5）。G P 7 3は、胆管上皮細胞内で構成的に発現し、そして正常の肝細胞内で最小に発現する。対照的に、巨細胞性肝炎患者の肝臓は、多核肝細胞内でG P 7 3に対する強い免疫反応性を示す

50

。G P 7 3 のm R N A 及び蛋白質は、アデノウイルスを含むウイルスの感染後に、高度に分化したH e p G 2 肝細胞癌細胞内で発現する。G P 7 3 はゴルジ膜貫通蛋白質であるため、損傷を受けた又は罹病した肝臓を有する患者でさえも、血清中に有意な量で存在することは予期されない。

【0008】

ウイルス性の原因 (H B V、H C V) 又は非ウイルス性の原因 (アルコール誘発肝臓病、自己免疫性肝炎) による肝臓病において、全器官レベルでのG P 7 3 の増加が認められた。K l a d n e y外, 2 0 0 2 , H e p a t o l o g y 3 5 (6) : 1 4 3 1 - 4 0 を参照されたい。G P 7 3 の肝細胞での発現は、病因にもかかわらず、罹病した肝臓では調節されないのに対し、胆管上皮細胞での発現はさほど変化しない。

10

【0009】

これらの報告は興味深いが、肝臓細胞内でのG P 7 3 の検出は、患者が苦痛を伴い且つ不都合な肝生検を受けることを必要とする。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

従って、必要なのは、肝炎ウイルス感染が原因の肝臓病及び損傷の程度を決定するための単純且つ迅速な検定法である。H C C のバイオマーカー用の血清検定法がその速さ及び単純さを与えるであろう。

【課題を解決するための手段】

20

【0011】

発明の概要

被検体の血清中における高レベルのG P 7 3 又はその断片の存在は、該被検体がH C C に罹っているのか又はそれを発症しているのかどうかを示す。非癌性又は前癌性肝臓疾患は、G P 7 3 の血清レベルの上昇を生じさせるようには見えない。

【0012】

従って、本発明は、被検体におけるG P 7 3 、G P 7 3 の断片又はその両方の血清レベルを、対照におけるG P 7 3 又はG P 7 3 の断片の血清レベルに対して決定することを含む、被検体におけるH C C の検査方法を提供する。被検体における血清G P 7 3 、G P 7 3 断片又はその両方のレベルの上昇は、該被検体がH C C に罹患していることを示す。

30

【0013】

また、本発明は、H C C を発症する危険性のある被検体を監視する方法において、該被検体におけるG P 7 3 、G P 7 3 の断片又はその両方の血清レベルを少なくとも2つの時点にわたって決定することを含む被検体の監視方法も提供する。より早い時点に対する、被検体における血清G P 7 3 、G P 7 3 断片又はその両方の増加は、該被検体がH C C を発症したことを見示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

略語

本明細書においては、次の略語を使用している：

40

A F P : - 胎児性蛋白質

A L T : アラニンアミノトランスフェラーゼ

A N O V A : 分散分析

A S T : アスパラギントランスアミナーゼ

A U R O C : R O C 曲線下面積

E C L : 向上した化学発光

E L I S A : 酵素免疫測定法

G S T : グルタチオン - S - トランスフェラーゼ

H B V : B 型肝炎ウイルス

H B s A g : H B V 表面抗原

50

HCC：肝細胞癌

HCV：C型肝炎ウイルス

HIV：ヒト免疫不全ウイルス

MELD：末期肝臓病評点用のモデル

RIA：放射免疫測定法

ROC：受信者動作特性

SDS-PAGE：ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法

【0015】

図1は、HCVに感染した患者におけるGP73の免疫プロット分析である。「GP73」の印のある上のパネルは、次のものに対する抗GP73ウサギポリクローナル抗体による免疫プロット分析を示している：HCC組織溶解物（レーン1及び2；25μg/レーン）、肝硬変組織溶解物（レーン3及び4；25μg/レーン）及び2名のHCV感染したHCC患者からの血清（レーン5及び6；1μL/レーン）。「アクチン」の印のある下のパネルは、上のパネルにおいて示された同一のプロットであるが、ただし、これは、取り除かれ、次いで蛋白質ローディング用の対照としてアクチンを再プローブとした後のものを表している。

【0016】

図2A及び図2Bは、次のヒト被験者：HBV陰性（A群）、不活性感染のHBVキャリア（B群）、活性感染のHBVキャリア（C群）、HBV関連HCC（D群）、HCV陰性（1群）、慢性HCV感染（2群）、HCV関連肝硬変（3群）、HCV関連HCC（4群）から得られたヒト血清（0.5μL）に対する抗GP73特異的抗体による免疫プロット分析の結果を示している。同定の目的のためにそれぞれの研究被験者に割り当てられた番号がそれぞれのレーンの上に示されている。HCV陰性、HIV陰性及びHBV陰性の被験者（S）からの市販のプール血清を正常の対照のために使用した。

【0017】

図3A及び3Bは、図2A及び2Bの免疫プロット像のデンシトメトリー分析の結果を示している。

【0018】

図4A及び図4Bは、HCV関連肝臓疾患の患者及び対照の患者におけるGP73（図4A）血清レベル及び-胎児性蛋白質（AFP）（図4B）血清レベルを測定する研究の結果を示している。示されたGP73レベルは、対照の血清（シグマ社）で測定されたGP73レベルにまで正常化される。 AFPレベルは、ng/mLの血清として報告されている。誤差バーは、標準誤差を表している。

【0019】

図5A及び5Bは、図4A及び4Bのデータに基づいて作成された受信者動作特性（ROC）曲線を表している。GP73及びAFPについてのROC下面積（AUROC）曲線は、挿入で示されている。

【0020】

発明の詳細な説明

GP73は、機能が知られていない400個のアミノ酸のゴルジII型膜蛋白質であり、およそ73kDaの見掛けの分子量を有する（Kladney外，2000，Gene 249，53-65）。GP73のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列は、Kladney外，2000（前出）及びGenBank登録Accession No. AF236056に開示されている。これらの開示の全体は、引用によってここに加入するものとする。3042塩基対を含み且つ1200塩基対の単一のオープンリードィングフレームを含有する全長GP73cDNAは、ここでは、配列番号1と表す。GP73のアミノ酸配列は、ここでは、配列番号2と表す。

【0021】

現在、GP73及びおよそ25kDa±5kDaの分子量を有するポリペプチド（これはGP73特異的抗体と交差反応する）のかなりの量がHCCの個体の血清中に存在する

ことが分かっている。当業者であれば、G P 7 3 特異的抗体と交差反応するほぼ 25 kD a ± 5 kD の分子量を有するポリペプチドが G P 7 3 の断片であることを合理的に予期するであろう。肝臓疾患若しくは肝臓感染症を有しない個体又は非癌性若しくは前癌性肝臓疾患を有する個体は、それらの血清中に G P 7 3 又は G P 7 3 断片をほとんど又は全く有しない。予め非癌性又は前癌性肝臓疾患であると診断された個体の血清中に G P 7 3 又は G P 7 3 断片が出現することは、該肝臓疾患が癌状態に進行したことを示している。内在ゴルジ膜貫通蛋白質としての G P 7 3 の初期の特徴に基づけば、G P 7 3 が、罹病した又は損傷を受けた肝臓を有する患者においてさえも、循環において見出されるうることは予期されなかった。この開示全体を通して、検出可能な分子的実体としての G P 7 3 に対する任意の言及は、全長 G P 7 3 蛋白質並びに任意の及び全ての G P 7 3 ポリペプチド断片を包含することを意味する。

【 0 0 2 2 】

従って、本発明は、H C C に罹患している疑いのある被検体の H C C を診断する方法を提供する。この診断方法は、該被検体から血清試料を得、そして該血清試料の G P 7 3 レベルと対照の血清 G P 7 3 レベルとを比較することを含む。対照と比較して、該被検体からの血清試料中における P 7 3 レベルの上昇は、該被検体が H C C に罹患していることを示す。

【 0 0 2 3 】

対照と比較して、被検体からの血清試料中における G P 7 3 の「レベルの上昇」とは、単位容量又は単位質量当たりの G P 7 3 蛋白質の量が、対照よりも被検体の血清試料中の方が多いことを意味する。この G P 7 3 レベルは、単位容量又は単位質量当たりの蛋白質の質量の絶対単位で、例えば、ピコグラム / μL として表され得る。また、G P 7 3 レベルは、対照の試料に対して決定されるような任意の単位、例えば蛍光単位又はデンシトメトリー単位でも表され得る。以下の実施例では、G P 7 3 レベルは、任意のデンシトメトリー単位で表されている。

【 0 0 2 4 】

G P 7 3 のいかなるレベルの上昇も本発明の実行において病気の前兆となり得るが、好ましくは、被検体の血清試料中における G P 7 3 蛋白質レベルは、対照における G P 7 3 レベルよりも少なくとも 2 倍、例えば、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、又は少なくとも 8 倍大きい。

【 0 0 2 5 】

本明細書において使用するときに、「被検体」とは、H C C に罹患していることが疑われる任意の動物である。好ましくは、この被検体は、ほ乳類、例えば、ヒツジ、ウシ、ブタ、ウマ、イヌ科、ネコ科、齧歯類又は靈長類である。より好ましくは、被検体は、齧歯類、例えば、マウス又はラットである。さらに好ましくは、被検体は、靈長類、例えば、ヒトである。特に好ましい具体例では、被検体はヒトである。

【 0 0 2 6 】

本明細書において使用するときに、「血清試料」とは、血清を含む任意の生物学的試料である。本方法において使用するための血清試料は、その他の成分、特に血液成分を含有し得るものとする。従って、本発明の目的上、全血液試料、又は部分的にしか分画若しくは分離されていないが、なお血清を含有する血液試料は、「血清試料」であるとみなされる。当業者であれば、例えば、慣用の採血技術を使用することによって容易に血清試料を得ることができる。さらに、血清試料中の防腐剤、抗凝血剤又はその他の化学剤の存在は、G P 7 3 の検出を妨げてはならない。また、ここで使用するときに、「血清試料」は、対照試料をも包含する。

【 0 0 2 7 】

ここで使用するときに、「対照」又は「対照試料」とは、少なくとも 1 の個体であって任意の肝炎感染について検査で陰性との結果がでたもの又は H C C 若しくは任意のその他の肝臓疾患に罹っていないものから得られた 1 種以上の血清試料をいう。好ましくは、該対照又は対照血清試料は、少なくとも 1 の個体であって任意の肝炎感染について検査で陰

10

20

30

40

50

性の結果がでたもの及びHCC又は任意のその他の肝臓疾患に罹っていないものから得られる。特に好ましい具体例では、対照は、個体の集団であって任意の肝炎感染について検査で陰性がでたもの及びHCC又は任意の他の肝臓疾患に罹っていないものから得られた血清試料を含む。該対照が複数の血清試料を含むとき、血清GP73レベルは、それぞれの血清試料中で測定されるGP73レベルの相加平均、中央値、最頻値又はその他の好適な統計的尺度として表され得る。また、複数の対照血清試料はプールすることもでき、そしてこのプールされた試料のGP73レベルを決定し、被検体の血清試料と比較できる。

【0028】

当業者であれば、例えば、慣用の採血技術によって又はHCC若しく任意の肝臓疾患に罹っていない個体由来の市販の血清試料を得ることによって容易に対照血清試料を得ることができる。本方法において対照として使用するのに好適な市販血清試料は、例えば、シグマ・ケミカル社（ミズーリ州セントルイス）から得られる。

【0029】

例えば、GP73特異的生体分子相互作用のような、血清GP73レベルを検出するために好適な任意の技術を本方法と共に使用することができる。その例としては、抗体ベースの検定法、アプタマーベースの検定法、受容体及びリガンド検定法、酵素活性検定法及びアロステリック調節結合検定法が挙げられるが、これらに限定されない。血清試料中の蛋白質濃度を検出するための技術は当業者の技術内にある。好ましくは、GP73レベルは、ウエスタンプロット分析、放射免疫測定法（RIA）、免疫蛍光検定法、化学発光検定法又は酵素免疫測定法（ELISA）のような免疫学的検定法によって検出される。本方法に使用するのに好適な免疫学的検定法は、例えば、米国特許第5976809号、同5965379号、同5571680号、同5279956号及び同6579684号に記載されている。これらの開示の全体は、引用によってここに加入するものとする。

【0030】

ウエスタンプロット分析による血清GP73レベルの検出は、例えば、Kladney外，2002，Hepatology 35：1431-1440（この開示の全体は、引用によってここに加入するものとする。）及び以下の実施例に記載されている。

【0031】

血清試料中のGP73レベルを検出ために使用される抗体は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を含むことができる。この抗体は、そのままの抗体又はGP73蛋白質に特異的に結合し得る抗体断片を含むことができる。このような断片としては、Fab及びF(ab')₂断片が挙げられるが、これらに限定されない。しかし、ここで使用されるときに、用語「抗体」には、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方が含まれる。用語「抗体」は、そのままの抗体分子を意味するだけでなく、抗原結合能を保持するそれらの断片をも包含する。

【0032】

適切なポリクローナル抗体は、適切な宿主動物をGP73蛋白質で免疫化し、そしてその抗血清を当業者に周知の慣用技術に従って集め、そして精製することによって調製できる。ポリクローナル抗GP73抗体の調製法は、例えば、Kladney外，2000（前出）に記載されている。

【0033】

モノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature 254: 493-497 (1975) の古典的な技術に従い、Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis, R.H. Kennet外著, Plenum Press, ニューヨーク及びロンドン (1980) のような後期の研究でさらに詳しく述べられているように調製できる。これらの開示の全体は、引用によってここに加入するものとする。

【0034】

10

20

30

40

50

血清 G P 7 3 レベルは、抗体ベースの検定法に非常に類似するが、ただし、抗体の代わりにアプタマーを使用するアプタマーベースの検定法によって検出できる。さらに、アプタマーベースの検定法は、核酸の増幅（例えば、P C R）及び検出検定法（例えば、ハイブリダイゼーションプロット法）が G P 7 3 の検出にも使用できるという点で、より幅広い。アプタマーは、生化学的活性又は分子認識特性の点で有用な生物学的活性を有する任意のポリヌクレオチド、一般には R N A 又は D N A であることができる。通常、アプタマーは、酵素活性を有するような又はある種のポリペプチドに該ポリペプチドの特定の領域（即ち、抗体に対するエピトープに類似する）で結合するような分子活性を有する。一般的には、アプタマーは、インビトロセレクション法によって作製できることが知られている。

10

【 0 0 3 5 】

インビトロセレクション法としては、指數関数的富化によるリガンドの系統的進化 (systematic evolution of ligand by exponential enrichment : a . k . a . S E L E X) と呼ばれる周知の方法が挙げられる。簡単に言えば、インビトロセレクション法は、ポリペプチドのような生体分子に結合し又は検出可能な特定の活性を有する特定のポリヌクレオチドについてランダムポリヌクレオチドのプールをスクリーニングすることを伴う。一般に、この特定のポリヌクレオチドは、該プールの非常に小さな画分に相当するため、通常ポリメラーゼ連鎖反応を介した増幅ラウンドを使用して有用かもしれないアプタマーの発現量を増大させる。選択(セレクション)及び増幅の連続ラウンドを使用して特定のアプタマーの存在量を指數関数的に増加させる。インビトロセレクション法は、Famulok , M . ; Szostak , J . W . , In Vitro Selection of Specific Ligand Binding Nucleic Acids , Angew . Chem . 1992 , 104 , 1001 (Angew . Chem . Int . Ed . Engl . 1992 , 31 , 979 - 988) ; Famulok , M . ; Szostak , J . W . , Selection of Functional RNA and DNA Molecules from Randomized Sequences , Nucleic Acids and Molecular Biology , 第 7 卷 , F . Eckstein , D . M . J . Lilley 著 , Springer Verlag , ベルリン , 1993 , pp . 271 ; Klug , S . ; Famulok , M . , All you want to know about SELEX ; Mol . Biol . Reports 1994 , 20 , 97 - 107 ; 及び Burgstaller , P . ; Famulok , M . Synthetic ribozymes and the first deoxyribozyme ; Angew . Chem . 1995 , 107 , 1303 - 1306 (Angew . Chem . Int . Ed . Engl . 1995 , 34 , 1189 - 1192) 、米国特許第 6287765 号、同 6180348 号、同 6001570 号、同 5861588 号、同 5567588 号、同 5475096 号及び同 5270163 号に記載されている。これらの開示の全体は、引用によってここに加入するものとする。

20

【 0 0 3 6 】

ポリクローナル抗体若しくはモノクローナル抗体を生じさせるための免疫原として、又はアプタマーを選択するための基質として使用できる実質的に純粋な G P 7 3 は、例えば、組換え D N A 方法によって調製できる。例えば、配列番号 1 の c D N A を、当該技術分野の範囲内にある技術によって発現ベクターにクローン化できる。次いで、 G P 7 3 をコードする配列を含む発現ベクターを、適切な、例えば細菌の宿主に導入する。そうすると、 G P 7 3 が発現する。次いで、この発現した G P 7 3 を任意の好適な技術によって単離できる。

30

【 0 0 3 7 】

例えば、 G P 7 3 蛋白質は、細菌で発現するグルタチオン S - トランスフェラーゼ (G S T) 融合蛋白質として調製できる。このような融合蛋白質は、市販の発現系を使用し、標準的な発現プロトコール、例えば、 Current Protocols in Mo

40

50

Molecular Biology (1990) の「Expression and Purification of Glutathione-S-Transferase Fusion Proteins」, 補遺 10, 単元 16.7 並びに Smith 及び Johnson, *Gene* 67: 34 - 40 (1988); Frangioni 及び Neel, *Anal. Biochem.* 210: 179 - 187 (1993) に従って調製できる。これらの開示の全体は、引用によってここに加入するものとする。

【0038】

簡単に言えば、GP73をコードするDNA(例えば、配列番号1)を、pGEX2Tベクターに正確なリーディングフレームでサブクローニングし、そしてE.coli細胞に導入する。37で12~15時間のインキュベーション後にLB/アンピシリンプレート上で形質転換体を選択する。次いで、選択された形質転換体を、イソプロピル-D-チオガラクトシドを含有する液体培地中で増殖させてGP73融合蛋白質の発現を誘導する。これらの細胞を遠心分離によって該液体培地から集め、該細菌ペレットを再懸濁し、そして超音波処理して細胞を溶解させる。

【0039】

GST-GP73融合蛋白質を単離するために、次いで該溶解液をグルタチオン-アガロースビーズと接触させる。GST-GP73融合蛋白質を結合させるビーズを遠心分離によって集め、そしてGST-GP73融合蛋白質を溶離させる。GSTアガロースビーズを、該融合蛋白質をトロンビン開裂用緩衝液で処理することによって除去する。解放されたGP73蛋白質を回収し、そしてこれを使用して上記のように抗体を生じさせる。

【0040】

また、GP73に対する抗体を、全GP73蛋白質の免疫原性断片、特に、該分子のカルボキシ末端に相当するペプチドで適切な宿主を免疫化することによって生じさせることもできる。GP73蛋白質の断片は、単離されたGP73蛋白質の化学的開裂又は酵素的開裂によって得られ得る。別法として、GP73蛋白質断片は、配列番号2の小さな(例えば、7~10個のアミノ酸)配列の化学合成によって得られ得る。

【0041】

好ましくは、本方法で使用するための抗GP73抗体は、検出可能な標識を含む。この検出可能な標識は、一次抗GP73抗体に直接結合できる。また、検出可能標識は、抗GP73抗体と、検出可能標識を保有する二次抗体、例えば、ヤギ抗ウサギIgGとを反応させることによって該抗GP73抗体に間接的に結合することもできる。

【0042】

検出可能標識は、例えば、放射免疫測定法の場合には放射性核種、免疫蛍光検定法の場合には蛍光部分、化学発光検定法の場合には化学発光部分又は酵素免疫測定法の場合には発色基質を開裂させる酵素を含むことができる。

【0043】

血清GP73レベルを検出するための生体分子相互作用検定法は、典型的には、非常に少量、例えば、ほぼ0.5μLの血清試料しか必要としない。しかしながら、任意の好適な容量の血清試料を本方法で使用できることが理解される。また、血清試料は液体である必要はないが、乾燥された(凍結乾燥された)生物学的試料であって血清を含むものを含むことができることも理解される。乾燥血清試料の任意の量を本方法で使用できる。

【0044】

肝硬変の被検体を含め、慢性HCV及びHCV感染症の被検体の検査から、GP73レベルは、対照と比較して統計上有意な程度にまでは上昇しなかったことが示された。しかしながら、HCCを有する被検体におけるGP73レベルは、有意に上昇した。従って、HCCの危険性がある被検体の血清中におけるGP73レベルの上昇は、該被検体がHCCを発症したことを示す。

【0045】

従って、本発明は、HCCの危険性がある被検体を監視する方法において、該被検体の血清中におけるGP73レベルを経時的に検査する、該監視方法を提供する。ここで使用

10

20

30

40

50

するときに、「HCCの危険性がある」被検体には、正式にはHCCであるとは診断されていないが、家族性のHCCの病歴があり、HBV若しくはHCVに感染し又はHCCへと進行し得る任意の病因の肝臓障害を有する被検体が含まれる。

【0046】

本方法を実施するにあたり、血清試料は、少なくとも2つの時点にわたり被検体から得られる。該血清試料中におけるGP73レベルを決定し、そして互いに比較する。早い時点からの試料に対する、遅い時点で得られた試料中の血清GP73レベルの上昇は、該被検体がHCCを発症したことを示す。

【0047】

好ましくは、複数の血清試料は、数ヶ月から数年の期間にわたって被検体から採取される。例えば、血清試料は、被検体がHBV又はHCV感染と診断された時から3ヶ月毎に、該ウイルス感染の期間中3年まで、5年まで又は10年までにわたって採取できる。血清試料は、さらに長い又は短い時間にわたりてさらに短い間隔又は長い間隔で採取できることが理解される。10

【0048】

早い時点で採取された被検体の血清試料中における血清GP73と比較して、遅い時点で採取された被検体の血清試料中におけるGP73の「レベルの上昇」とは、単位容量又は単位質量当たりのGP73蛋白質の量が、早い血清試料中よりも遅い血清試料中の方が多いことを意味する。GP73のレベルは、単位容量若しくは単位質量当たりの蛋白質質量の絶対単位で、又は上記のような任意の単位として表現できる。20

【0049】

好ましくは、遅い時点で採取された血清試料中におけるGP73蛋白質のレベルは、早い時点で採取された血清試料中におけるGP73レベルよりも少なくとも2倍、例えば、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍大きい。

【0050】

血清試料を得るための技術及びGP73レベルを検出するための技術は上記の通りである。

【0051】

本発明の実施を次の実施例で例示するが、これに限定されない。30

【実施例】

【0052】

例1：肝細胞癌患者の血清中におけるGP73の検出

血清試料及び患者の病歴

血清試料は、患者の同意を得、及び、該当する場合には、フォックス・チエース癌センター、トマス・ジェファーソン大学及びミシガン大学の施設内倫理委員会の承認を受けた手順に従って集めた。これらの試料をその後の実施例でも同様に使用した。患者の2つ群が含まれた。HBV感染患者及び対照患者の群は、最少年齢35歳の中華民族的背景をもつ38名の女性被験者であって試料収集の時点で米国に居住していたものから構成された。これらの患者は、HBVが高度に風土病性であるところの集団に由来し、恐らく、全員が幼年期又は幼児期に感染したものと思われる。HBV感染は、HBV表面抗原(HBsAg)陽性及び血清中におけるHBV-DNAの検出に基づき立証された。HBVのDNAは、「ドットプロット」法によって検出されたが、これは、1mL当たりおよそ 3×10^5 ゲノム当量の敏感度の検出限界を有する(Evans外, 1998, Cancer Epidemiology, Biomarkers, and Prevention, 7: 559-565)。HCV感染した患者及び対照の患者の群は、2001年9月から2002年5月の間にミシガン大学メディカルセンターにある肝臓及び肝臓移植診療所から選ばれた。HCV感染の診断は、血清におけるHCV抗体の陽性及びHCV-RNAの存在によって立証された。肝臓病の非ウイルス性の原因を有する患者及び複数の病気の病因を有する患者は除外した。慢性肝炎、肝硬変又はHCCは、肝生検又は外移植試料の組織40

学的試験によって立証した。HCCの診断は、超音波画像診断及び生検によって確認された。肝機能検査（ALT又はAST）を免疫学的検定法によって決定し、そしてその上限値を50IU/mLであるとみなした。血清を血液から収集後直ちに単離し、そして血清アリコートを検査まで-80で保存した。HCC被験者からの血液試料をHCC治療の開始前に抜き出した。

次いで、GP73の発現を、HCV感染した個体の大きな群から連続して集めた血清試料で評価した。診断及び組織学的分類を上記の通りに行った。

【0053】

- 胎児性蛋白質（AFP）の測定

AFPは、ミシガン大学ホスピタル・クリニカル・ダイアグノスティック・ラボラトリ－において、増強された化学発光を使用して市販の免疫学的検定法によって上記血清試料中で測定した。正常の上限値は、8ng/mLのAFPであった。この人口統計学的データ及び実験室データを全ての患者について得た。HCC患者を、UNOS TNM病期分類システムに従って病期分類した。

【0054】

免疫プロット分析及び試薬

等容量の患者血清（0.5又は1.0μL/レーン）を4~20%のポリアクリルアミド勾配ゲル上でSDS-PAGEによって分離させた。正規化のために、いくつかのゲルは、HCV及びHBV陰性源のプール由来の0.5μLの血清を含有するレーンも含んでいた（シグマ社、ミズーリ州セントルイス）。電気泳動による分離の後に、それらの蛋白質を免疫プロット法によってPVDF膜に移行させた。これらの膜をインキュベーションブロック用緩衝液（1×TBSは、50mMのTris-HCl、pH7.6、150mMの塩化ナトリウム、5%の脱脂粉乳及び0.1%のTween20である）によって室温で1時間にわたってブロックした。これらのプロットを、ブロック用緩衝液で1:100に希釈した抗GP73ウサギポリクローナル抗体と共に4で一晩穏やかに振盪せながらインキュベートした（Kladney, 2000, Gene, 前出）。これらのプロットをブロック用緩衝液中で室温で2回洗浄し、そしてホースラディッシュペルオキシダーゼ結合マウス抗ウサギ二次抗体（1:4000v/v）と共に室温で2時間インキュベートした。これらのプロットを1×TBS-T（0.1%のTween20を含有するTBS）中で室温で2回洗浄し、そしてECLプラス化学発光検出システム（アマーシャム・ファルマシアバイオテック社、イリノイ州アーリントンハイツ）を使用して発現させた。

HCV感染HCC試料の肝臓組織及びHCV感染肝硬変組織からの全細胞蛋白質溶解物を先に記載した通りに調製した（Kladney外, 2002, Hepatology 35: 1431-1440）。蛋白質濃度をブラッドフォードアッセイ法（バイオラド社）によって決定した。肝硬変又はHCCを有するHCV感染患者の肝臓組織からの全細胞蛋白質溶解物の25μgを4~20%のポリアクリルアミド勾配ゲル上でSDS-PAGEによって分画し、そして上記のような抗GP73ウサギポリクローナル抗体による免疫プロット分析に付した。これらの技術をその後の例でも同様に使用した。

【0055】

結果

GP73レベルを、肝硬変又はHCCをも有するHCV感染患者で比較した。結果を図1に示している。レーン1及び2はHCC組織の溶解物である。レーン3及び4は肝硬変組織溶解物である。レーン5及び6は、HCCを有する2名のHCV感染患者からの血清である。

GP73は、この2名のHCV感染患者の血清中で明らかに検出できた（図1のレーン5及び6）。さらに、HCCを有するHCV患者の肝臓生検材料から得られた細胞溶解物中において、肝硬変を有するHCV患者と比較して、より高レベルのGP73が検出された（図1のレーン1~4）。

ウエスタンプロットで、GP73蛋白質を表すおよそ73kDa（ダルトン×10³）

10

20

30

40

50

のバンドのほかに、恐らく G P 7 3 の断片であるおよそ 2 5 k D a ± 5 k D のバンドが H C C 患者及び H C V 患者からの血清で検出されたが、正常の対照個体からの血清では検出されなかった。

【 0 0 5 6 】

例 2 : 肝細胞癌患者の血清中における G P 7 3 の検出

方法

上記のように、血清試料を得、そして免疫プロット分析を実行した。免疫プロットのデンシトメトリー分析を実行して、患者の血清中の G P 7 3 蛋白質量をシグマ社製対照血清中に存在するシグナルに対して定量した。

7 3 k D a 種からの G P 7 3 特異的シグナルを、アルファイノテック社製 F l u o r C h e m C C D カメラを A l p h a E a s e スポットデンシトメトリー・ソフトウェアと共に使用して X 線フィルムから定量し、そしてこれをシグマ社製対照血清（それぞれのプロット上のレーン S ）で検出された G P 7 3 シグナルに対する積分強度単位として表した。それぞれの血清試料及び結果についての二重又は三重決定の平均として値を算出した。

ヒト血清のアリコート（ 0 . 5 μ L ）を次の H B V 研究被験者から得た： H B V 陰性（ A 群）、不活性感染の H B V キャリア（ B 群）、活性感染の H B V キャリア（ C 群）、 H B V 関連 H C C （ D 群）。ヒト血清のアリコート（ 0 . 5 μ L ）を次の H C V 研究被験者から得た： H C V 陰性（ 1 群）、慢性 H C V 感染（ 2 群）、 H C V 関連肝硬変（ 3 群）、 H C V 関連 H C C （ 4 群）。試料を 4 ~ 2 0 % のポリアクリルアミド勾配ゲル上で S D S - P A G E によって分離し、そして抗 G P 7 3 特異的抗体による免疫プロット分析に付した。商業的に得られる、 H C V 陰性、 H I V 陰性及び H B V 陰性被験者からのプール血清（ S ）を正常の対照のために使用した。対照の被験者及び患者の人口統計及び血清学的プロファイルを以下の表 1 (H B V 患者) 及び 2 (H C V 患者) にまとめている。

【 0 0 5 7 】

結果

H C C を有する又は H C C を有しない H B V 感染患者の血清中における G P 7 3 レベルと、 H C C を有する又は H C C を有しない H C V 感染患者の血清中における G P 7 3 レベル及び対照被験者における G P 7 3 レベルとを比較した。それらの結果を図 2 A 及び 2 B に示している。識別する目的でそれぞれの研究被験者に割り当てられている番号は、それぞれのレーンの上に示されている。

【 0 0 5 8 】

高レベルの G P 7 3 が慢性 H B V 又は H C V 関連 H C C を有する 2 4 名の患者のうち 2 3 名の血清中に存在していたが、ウイルス性肝炎を有しない健康な個体には存在しなかった。また、 H C C を有しない肝硬変患者の一部にも上昇した血清レベルが存在した（図 2 A 及び 2 B ）。対照血清（ S ）で見られるレベルと同様の低レベルの G P 7 3 が、感染していない個体の循環において検出された。

【 0 0 5 9 】

図 2 A 及び 2 B の免疫プロットのデンシトメトリー分析を上記のように実行して、患者の血清中の G P 7 3 蛋白質量をシグマ社製対照血清中に存在するシグナルに対して定量した。デンシトメトリー分析の結果を図 3 A 及び 3 B に図示している。

【 0 0 6 0 】

図 3 A の統計学的分析は、唯一の有意な差が D 群（ H C C 患者）対 A 、 B 及び C 群の間に存在することを示している（ $p < 0 . 0 0 1$ ）。図 3 B に示すように、 H C V 患者及び対照の統計学的分析は、唯一の有意な差が 4 群（ H C C 患者）対 1 、 2 及び 3 群の間に存在することを示している（ $p < 0 . 0 0 1$ ）。

【 0 0 6 1 】

H B V 又は H C V 関連非悪性肝臓疾患を有する数名は、幾分上昇した血清中 G P 7 3 レベルを有していたが、最も高いレベルは、 H C C と診断された患者で見出された（図 3 A 及び 3 B ）。 H B V 関連 H C C を有する 8 名のうち 7 名は、その他の 3 つの群内の任意の患者よりも大きな増加を示した（図 2 A の D 群及び図 3 A ）。 H C V 関連 H C C を有する

10

20

30

40

50

16名のうち11名は、この実験セットのその他の群内の任意の患者よりも高いG P 73 レベルを示した（図2Bの4群及び図3B）。

【0062】

統計学的分析から、他の全ての診断群と比較して、HCC患者における血清G P 73 レベルの統計学的に有意な全体的な増加が明らかになった（ $p < 0.001$ ）（図3）。HBV又はHCV感染に従う分散分析（ANOVA）は、この差がウイルス物質にかかわらず存在したことを示している。それぞれの群について、4つの被験者群間では差がないという帰無仮説は却下された（HBV群について、 $F = 49.47$ 、 $p < 0.0001$ 、HCV群について、 $F = 17.51$ 、 $p < 0.0001$ ）。複数の比較のために調節されたペアワイズ試験において、群のそれぞれについての平均を比較した。HBV及びHCVデータセットの個別分析では、HCC群は、その他3つの群のそれとは有意に相違した（ $p < 0.0001$ ）。しかしながら、3つの非HCC群は、互いにさほど相違しなかった。いかなる特定の理論に拘泥されることを望まないが、これらの結果は、高レベルの循環性G P 73 の出現が、ウイルスが原因の肝炎（HBV又はHCV）にも関わらず、ウイルス誘発肝細胞癌の特徴であり得ることを示している。
10

【0063】

【表1】

表1. A～D群被験者のHBV患者人口統計及び血清学的プロファイル

群	診断	血清学的 プロファイル ¹	患者の数及び性 ²	年齢(平均±S. D.)
A	HBV陰性	HBsAg— HBV DNA— 正常LFT	7(7M)	60.1±5.3
B	HBVキャリア、 不活性	HBsAg+ HBV DNA— 正常LFT	11(11M)	52.6±11.4
C	HBVキャリア、 活性	HBsAg+ HBV DNA+ 異常LFT	12(12M)	55.1±9.0
D	HBV-HCC	HBsAg+	8(8M)	57.1±8.8

¹LFT=肝機能検査

²M=男性

【0064】

20

30

40

【表2】

表2. 1～4群被験者のHCV患者人口統計及び血清学的プロファイル

群	診断	血清学的 プロファイル	患者の数及び性 ¹	年齢 (平均±S. D)
1	HCV陰性	HCV Ab(−) HCV-RNA(−)	16(4M、12F)	41+/-13
2	HCV慢性	HCV Ab(+) HCV-RNA(+)	16(7M、9F)	45+/-6.5
3	HCV+肝硬変	HCV Ab(+) HCV-RNA(+)	16(10M、6F)	49+/-6.6
4	HCV+HCC	HCV Ab(+) HCV-RNA(+)	16(14M、2F)	56+/-12.4

¹M=男性、F=女性

【0065】

例3：HCC検出における血清GP73とAFPの比較

例2で得られた結果に基づき、よく特徴付けられたHCV感染コホートに重点を置いた、さらに大規模な二重盲検試験を実行した(n=142)。GP73及びAFPのレベルを、HCV関連肝臓疾患の患者及び対照の患者からの血清で測定した。患者群及び人口統計を表3に明示する。

【0066】

【表3】

表3. さらに大規模なC型肝炎患者コホートの人口統計

変数	正常 (n=40)	慢性肝炎 (n=35)	肝硬変 (n=35)	HCC (n=33)	P値
年齢	51±9.7	54±6	51±8	51±10	0.14
性(M:F)	30:10	20:14	16:9	28:5	0.32
AFP(ng/mL)	2.94±1.6	10.8±23	19.7±38	11788±60359	<0.001
%<20	100	88	77	55	
%20-200	0	12	23	24	
%>200	0	0	0	21	
ALT(IU/mL)	28.6±9	67±41	112±124	81±49	<0.001 [#]
AST(IU/mL)	22±5	53±36	94±85	109±59	0.003*
ビリルビン(mg/dL)	0.4±0.2	0.5±0.4	0.9±0.6	1.2±0.9	0.13
MELD得点	5±0.2	6.1±0.4	7.8±1.8	8.3±2.1	0.03*
TNM状態%(I/II/III/IV)	NA	NA	NA	9/12/6/6	

[#]3群対1及び2群。^{*}4群対1及び2群。NA=該当なし。

10

20

30

40

50

【0067】

方法

免疫プロット及びデンシトメトリー分析を上記の通りに実行した。

【0068】

統計学的分析

A F P 値について広範囲の値を説明するためにログ変換を使用した。A F P と G P 7 3 についての記述統計をボックスプロットで比較し、次いで A N O V A で比較した。平均での群の差異を、一般的な線形モデルを適合させるために最小二乗法を使用する分散分析用 S A S V 8 . 0 1 (S A S 研究所、ノースカロライナ州カリー) P R O C G L M を連続変数のために使用することによって試験した。2 値変数については、カイ二乗を利用して群を比較した。多重比較を説明するために、A N O V A 内での個体平均についての p 値を、テューキー・クレーマー検定を使用して調節した。H C C 診断における G P 7 3 及び A F P についての最適なカットオフ値を決定するために、受信者動作特性 (R O C) 曲線を、それぞれの検定法について全ての可能なカットオフを使用して作成した。R O C 下面積 (A U R O C) 曲線を算出し、そしてこれを前記の通りに比較した (Grinell 外, 1981, Ann. Intern. Med. 94 : 555 - 600; Metz, 1998, Semin. Nucl. Med. 8 : 283 - 298)。これらの開示の全体は、引用によってここに加入するものとする。)。この 2 つのマーカーについての二变量正規分布を推定した。<0.05 の両側 p 値を使用して統計的有意性を決定した。全ての分析は、S A S (米国ノースカロライナ州カリー) を使用して実行した。

【0069】

免疫プロット分析を使用して血清中の G P 7 3 レベルを検出し、そして定量した。統計学的分析について、被験者を前述のように 4 つのカテゴリーに分類した：正常の対照 (H B V 又は H C V に非感染)、肝硬変なしの慢性 H C V、肝硬変を有する慢性 H C V 並びに肝硬変及び H C C を有する慢性 H C V。これらの群は、年齢、性及び民族性について調和されている (表 3 参照)。

【0070】

結果

これらの結果 (図 4 A) は、H C C と診断された患者における血清 G P 7 3 が、悪性でない肝臓疾患又は対照群と比較して、統計学的に有意に上昇したことを示した (A N O V A、p < 0.001)。G P 7 3 の上昇頻度 (図 4 A) を、この集団からの患者における A F P の上昇と比較した (図 4 B)。A F P レベルは、上記のような標準的な臨床検定によって決定した。一般に、A F P レベルは、H C C 患者で増加したが、この分析において H C C 患者とその他の群との間での A F P レベルではいかなる統計学的に有意な差も立証できなかった (A N O V A、p = 0.292)。

【0071】

また、H C V に慢性的に感染した個体の集団内で肝硬変患者と肝硬変 + H C C 患者とを区別する際に、R O C 曲線分析も実行して G P 7 3 と A F P の敏感度及び特異度を比較した。図 4 において 3 及び 4 群について得られたデータを R O C 分析のためにプロットした。これを図 5 に与えている。この R O C 曲線は、G P 7 3 レベルが H C C の指標として A F P よりも予測に役立つことを示している。G P 7 3 は、0.85 の敏感度及び 0.65 の特異度を有するが、A F P は、敏感度 (0.70) と特異度 (0.60) の両方がそれよりも低い。使用した検定法に基づき、G P 7 3 についての最適カットオフ値を、対照試料からの G P 7 3 シグナル以上の 8.4 相対単位であると決定し、そして A F P についての最適カットオフ値は 9.9 n g / m L であった。A F P と G P 7 3 との間の差については p = 0.149 であった。

【0072】

いかなる特定の理論にも拘泥されることを望まないが、これらの研究は、血清 G P 7 3 レベルが、H C C と H B V 又は H C V 感染のいずれかに関連する悪性でない肝臓病との臨床診断を区別するために、A F P よりも予測に役立ち得ることを示している。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 3 】

ここに言及した全ての文献は、引用によって加入するものとする。本発明を好ましい具体例及び様々な図表と共に説明してきたが、本発明の同一の作用をそれから逸脱することなく実現させるためにその他の類似する具体例を使用し又はこの説明した具体例に改変及び付加をなし得ることを理解すべきである。従って、本発明は、任意の単一の具体例に限定されるべきではなく、むしろ、添付した請求の範囲の文言に従う範囲内で解釈されるべきである。

【 図面の簡単な説明 】**【 0 0 7 4 】**

【図1】HCVに感染した患者におけるGP73の免疫プロット分析図である。 10

【図2A】次のヒト被験者：HBV陰性（A群）、不活性感染のHBVキャリア（B群）、活性感染のHBVキャリア（C群）、HBV関連HCC（D群）、HCV陰性（1群）、慢性HCV感染（2群）、HCV関連肝硬変（3群）、HCV関連HCC（4群）から得られたヒト血清（0.5 μL）に対する抗GP73特異的抗体による免疫プロット分析の結果を示す図である。

【図2B】次のヒト被験者：HBV陰性（A群）、不活性感染のHBVキャリア（B群）、活性感染のHBVキャリア（C群）、HBV関連HCC（D群）、HCV陰性（1群）、慢性HCV感染（2群）、HCV関連肝硬変（3群）、HCV関連HCC（4群）から得られたヒト血清（0.5 μL）に対する抗GP73特異的抗体による免疫プロット分析の結果を示す図である。 20

【図3A】図2A及び2Bの免疫プロット像のデンシトメトリー分析の結果を示す図である。

【図3B】図2A及び2Bの免疫プロット像のデンシトメトリー分析の結果を示す図である。

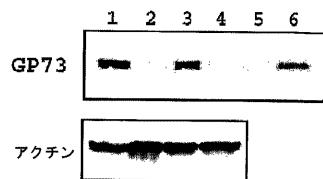
【図4A】HCV関連肝臓疾患の患者及び対照の患者におけるGP73血清レベルを測定する研究の結果を示す図である。

【図4B】HCV関連肝臓疾患の患者及び対照の患者における - 胎児性蛋白質（AFP）を測定する研究の結果を示す図である。

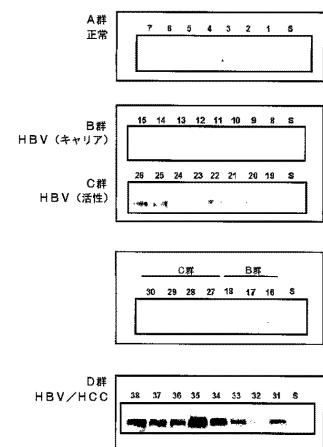
【図5A】図4A及び4Bのデータに基づいて作成された受信者動作特性（ROC）を表す図である。 30

【図5B】図4A及び4Bのデータに基づいて作成された受信者動作特性（ROC）を表す図である。

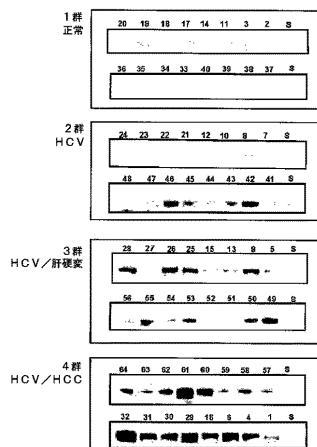
【図1】



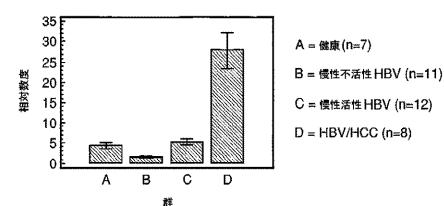
【図2 A】



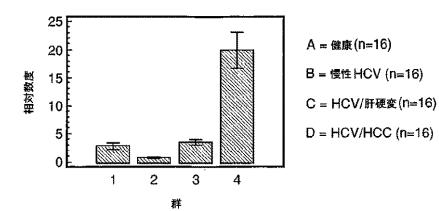
【図2 B】



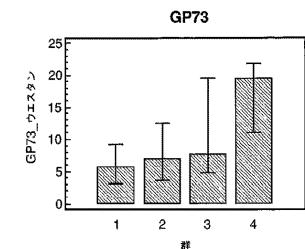
【図3 A】



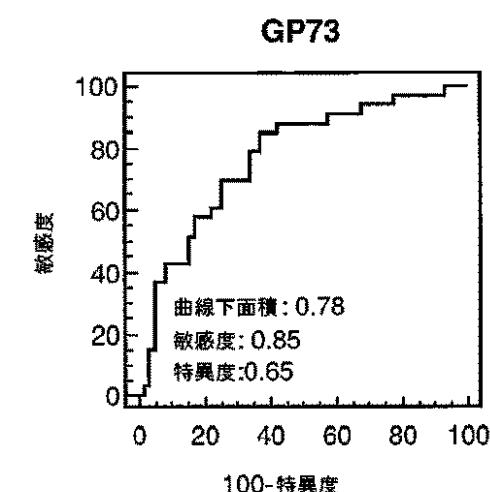
【図3 B】



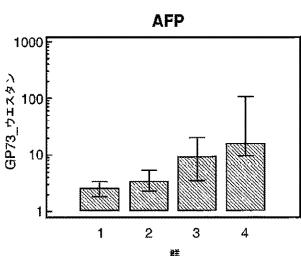
【図4 A】



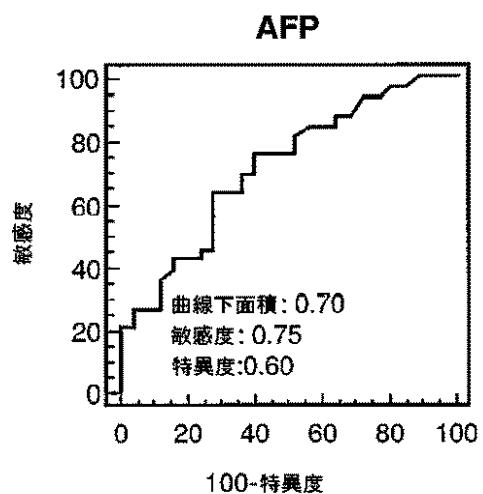
【図5 A】



【図4 B】



【図 5 B】



【配列表】

0004574619000001.xml

フロントページの続き

(73)特許権者 505082888

ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ アズ レプリゼンティッド バイ ザ デパート
メント オブ ベテランズ アフェアーズ
アメリカ合衆国 20420 ワシントン バーモント アベニュー ノースウェスト 810

(74)代理人 100067817

弁理士 倉内 基弘

(74)代理人 100126527

弁理士 遠藤 朱砂

(74)代理人 100130465

弁理士 吉田 匠

(74)代理人 100129333

弁理士 中島 拓

(72)発明者 パトリック アール ロマーノ

アメリカ合衆国 18901 ペンシルベニア、ドイルズタウン、パイン ミル サークル 66

(72)発明者 ティモシー エム. ブロック

アメリカ合衆国 18901 ペンシルベニア、ドイルズタウン、フォックスクロフト ドライブ
90

(72)発明者 クラウス ジェイ. フィンメル

アメリカ合衆国 63105 ミズーリ、クレイトン、ワリンカ テラス 7644

(72)発明者 オルガ ニコラエバ

アメリカ合衆国 18947 ペンシルベニア、パイパー・ズビル、ジャーマン ロード 6113

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特表2005-518522(JP,A)

Virology, 2002年, Vol.301, No.2, Page.236-246

Gene, 2000年, Vol.249, No.1/2, Page.53-65

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/574

C12N 15/09

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)