

(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2010-540921

(P2010-540921A)

(43) 公表日 平成22年12月24日(2010.12.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A N	4 B O 2 4
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/545 A	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 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2010-526328 (P2010-526328)	(71) 出願人	510086420
(86) (22) 出願日	平成20年9月1日 (2008.9.1)		フンダシオン レイナ メルセデス パラ
(85) 翻訳文提出日	平成22年4月28日 (2010.4.28)		ラ インベスティガシオン サニタリア
(86) 国際出願番号	PCT/ES2008/000572		スペイン王国 41013 セビリア ア
(87) 国際公開番号	W02009/040451		ベニダ マヌエル シウロット 番地なし
(87) 国際公開日	平成21年4月2日 (2009.4.2)		オスピタル ウニベルシタリオ ビルヘ
(31) 優先権主張番号	P200702641		ン デル ロシオ 6階 エディフィシオ
(32) 優先日	平成19年9月27日 (2007.9.27)		ラボラトリオ
(33) 優先権主張国	スペイン (ES)	(74) 代理人	100079049
			弁理士 中島 淳
		(74) 代理人	100084995
			弁理士 加藤 和詳
		(74) 代理人	100085279
			弁理士 西元 勝一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトGSTT1に対する抗体 (抗-HGSTT1) の検出のための免疫学的分析方法

(57) 【要約】

本発明の目的は、ヒトGSTT1に対する抗体 (抗hGSTT1) を生体液中で検出するための免疫学的分析方法である。本発明はまた、生体液中における抗GSTT1の存在に関連した病理学的状態の診断、予後、経過観察、およびモニタリングのための前記免疫学的分析方法の使用に関し、前記方法を実施するためのツールキットにも関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒト GSTT1 に対する抗体（抗 h GSTT1）を生体液中で検出するための免疫学的分析方法であって、

a) 抗原特性に対するマーカーである h GSTT1 組換えタンパク質を異種生物中で発現および精製する段階；

b) 抗原特性に対するマーカーである前記 h GSTT1 組換えタンパク質を支持体中に固定化する段階；

c) 生体液中に存在し、前記 h GSTT1 組換えタンパク質に対する特異性を有する抗体が、該物質と結合して抗原 - 抗体複合体を形成する条件下において、抗原特性に対するマーカーである前記 h GSTT1 組換えタンパク質を前記試験生体液と接触させる段階；

d) 前記抗原 - 抗体複合体から、非結合抗体および前記生体液のその他の成分を分離する段階；

e) ポジティブコントロールによって定められた抗 GSTT1 抗体の量と正に相関する、前記生体液中で検出された抗原 - 抗体複合体の量を測定する段階を含む、免疫学的分析の方法。

10

【請求項 2】

前記 h GSTT1 組換えマーカータンパク質が、発現され、少なくとも 5 個のヒスチジンアミノ酸を有するポリペプチド配列と融合されて、イオン交換アフィニティクロマトグラフィにより精製が可能であることを特徴とする、請求項 1 に記載のヒト GSTT1 に対する抗体を生体液中で検出するための免疫学的分析方法。

20

【請求項 3】

前記 h GSTT1 組換えマーカータンパク質が、微生物中、特に、p C A S B - G S T T 1 プラスミドを有する大腸菌株中で発現され、精製されることを特徴とする、請求項 1 および請求項 2 に記載のヒト GSTT1 に対する抗体を生体液中で検出するための免疫学的分析方法。

【請求項 4】

前記 h GSTT1 組換えマーカータンパク質が固定化される前記支持体が、前記固定化およびそれに続く前記抗 GSTT1 抗体の結合の分析を可能とする任意の表面であり、好ましくは、マルチウェル培養プレートのウェル、ナイロン膜、セルロースフィルター、ニトロセルロース膜、着色マイクロ粒子、蛍光マイクロ粒子、ガラス表面、または金属支持体であることを特徴とする、請求項 1 から 3 に記載のヒト GSTT1 に対する抗体を生体液中で検出するための免疫学的分析方法。

30

【請求項 5】

前記 h GSTT1 組換えマーカータンパク質および前記抗 h GSTT1 抗体の固定化のための前記支持体が、平坦な表面上のポリペプチドマイクロマトリックスであることを特徴とする、請求項 4 に記載のヒト GSTT1 に対する抗体を生体液中で検出するための免疫学的分析方法。

【請求項 6】

前記抗原 - 抗体複合体の検出段階が、ウェスタンブロットを用いて行われることを特徴とする、請求項 1 から 5 に記載のヒト GSTT1 に対する抗体を生体液中で検出するための免疫学的分析方法。

40

【請求項 7】

前記抗原 - 抗体複合体の検出段階が、E L I S A 法を用いて行われることを特徴とする、請求項 1 から 5 に記載のヒト GSTT1 に対する抗体を生体液中で検出するための免疫学的分析方法。

【請求項 8】

前記抗原 - 抗体複合体の検出段階が、h GSTT1 組換えマーカータンパク質でコーティングしたコード化マイクロ粒子を用いて行われることを特徴とする、請求項 1 から 5 に記載のヒト GSTT1 に対する抗体を生体液中で検出するための免疫学的分析方法。

50

【請求項 9】

生体液中における抗 G S T T 1 抗体の存在に関連する病理学的状態の診断、生体液中における抗 G S T T 1 抗体の存在に関連する病理学的状態の発症の予後、または生体液中における抗 G S T T 1 の存在に関連する状態の経過観察およびモニタリングのための、G S T T 1 に対する抗体を生体液中にて検出するための免疫学的分析方法の使用。

【請求項 10】

抗 G S T T 1 の存在が検出される前記生体液が、血液派生物であることを特徴とする、請求項 9 に記載の免疫学的分析方法の使用

【請求項 11】

前記病理学的状態が、移植されたもの (t r a n s p l a n t)、移植片 (g r a f t i n g)、または輸液由来の、細胞、組織、または臓器の拒絶反応であることを特徴とする、請求項 9 および 10 に記載の免疫学的分析方法の使用。

10

【請求項 12】

前記移植された臓器が、肝臓、腎臓、心臓、骨髄、または前記 h G S T T 1 配列を発現するその他の任意の臓器であることを特徴とする、請求項 11 に記載の免疫学的分析方法の使用。

【請求項 13】

前記移植された臓器が、肝臓であることを特徴とする、請求項 12 に記載の免疫学的分析方法の使用。

【請求項 14】

前記移植された臓器が、腎臓であることを特徴とする、請求項 12 に記載の免疫学的分析方法の使用。

20

【請求項 15】

前記病理学的状態が、h G S T T 1 配列を発現するドナーから輸血または任意の血液派生物の移植を受けた患者の拒絶反応であることを特徴とする、請求項 11 に記載の免疫学的分析方法の使用。

【請求項 16】

G S T T 1 に対する抗体を生体液中で検出するための免疫学的分析方法を実施するためのツールキットであって、

- a) h G S T T 1 組換え抗原特性マーカートンパク質が固定化された支持体、
- b) 前記 h G S T T 1 組換え抗原特性マーカートンパク質が固定化された支持体と接触させた場合に、血清サンプル中の抗 h G S T T 1 抗体の結合を可能とする指示分子、好ましくは、酵素、フルオロフォア、着色マイクロ粒子、または蛍光マイクロ粒子と結合したヒト抗 I g G 二次抗体、
- c) 前記ヒト I g G 二次抗体と結合した前記指示分子の活性を検出するための手段、
- d) 抗 h G S T T 1 抗体を含むヒトコントロール血清、
- e) ヒト抗 h G S T T 1 抗体を含まないヒトコントロール血清を含むことを特徴とする、ツールキット。

30

【請求項 17】

- a) E L I S A 法を用いた抗原 - 抗体複合体の検出に適し、各ウェル中に前記 h G S T T 1 組換え抗原特性マーカートンパク質が固定化されているマルチウェルプレート；
- b) ペルオキシダーゼと結合したヒト抗 I g G 二次抗体のバイアル
- c) ペルオキシダーゼ酵素活性指示基質、好ましくは 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン、を有するバイアル；
- d) 抗 h G S T T 1 抗体で不活性化されたヒト血清の希釈サンプルからなるポジティブコントロール；
- e) 抗 h G S T T 1 抗体を含まないヒト血清の希釈サンプルからなるネガティブコントロール；
- f) 分析サンプル、前記結合二次抗体、前記コントロール、および前記対応する酵素指示基質の希釈を行うための緩衝溶液

40

50

からなることを特徴とする、請求項 16 に記載のツールキット。

【請求項 18】

a) ELISA 法を用いた抗原 - 抗体複合体の検出に適し、各ウェル中に前記 hGSTT1 組換え抗原特性マーカータンパク質が固定化されているマルチウェルプレート；

b) アルカリホスファターゼと結合したヒト抗 IgG 二次抗体のバイアル；

c) ペルオキシダーゼ酵素活性指示基質、好ましくは p - ニトロフェニルリン酸二ナトリウム、を有するバイアル；

d) 抗 GSTT1 抗体で不活性化されたヒト血清の希釈サンプルからなるポジティブコントロール；

e) 抗 hGSTT1 抗体を含まないヒト血清の希釈サンプルからなるネガティブコントロール；

f) 分析サンプル、前記結合二次抗体、前記コントロール、および前記対応する酵素指示基質の希釈を行うための緩衝溶液

からなることを特徴とする、請求項 16 に記載のツールキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医療および健康技術の一部であり、本出願の範囲は、自己免疫プロセスの診断、および移植拒絶反応の阻止のための分析システムの範囲にある。これは、生物医学的研究および臨床研究の分野の研究者にとって興味深いものでもあり得る。

【0002】

発明の目的

本発明の目的は、ヒト GSTT1 に対する抗体（抗 hGSTT1）を生体液中で検出するための免疫学的分析方法である。さらに、本発明の目的は、生体液中における抗 GSTT1 の存在に関連する病理学的状態の診断、発症の予後、経過観察、およびモニタリングのための前記免疫学的分析方法の使用、ならびに前記方法を実施するためのツールキットである。

【背景技術】

【0003】

自己免疫現象の範囲内において、移植患者における細胞もしくは組織の寛容または拒絶反応に関する研究により、この両プロセスの多因子性の性質が明らかとなった。したがって、例えば、非自己認識および同種免疫反応の現象が確認されており、それにより、移植された物質中で発現された遺伝子が、レシピエント内で抗体（同種抗体）の出現を誘発し、特定の移植片の拒絶反応を引き起こすことになる（Aguilera, I., et al (2001). Clin Exp Immunol, 126, 535 - 539）。最近、新しい形態の肝臓移植片拒絶反応の存在が初めて報告され、これは主として小児に影響を及ぼすものである。これは、慢性肝炎に典型的な組織学的変化、高濃度の IgG、臓器非特異的抗体の出現、および免疫抑制治療に対する反応の存在を特徴とする疾患を引き起こす。したがって、移植後 de novo 肝炎と命名される（Kerkar, N. et al (1998). Lancet, 351, 409 - 413; Jones, D. E., et al (1999). Hepatology, 30, 53 - 57）。臨床的に他の種類の肝炎と区別することができないことから、移植後 de novo 肝炎の鑑別診断は困難であり、患者に不快感をもたらすこととなる生検を必要とする場合が多い。生検により、架橋壊死（門脈 - 門脈 (porto - portal) および門脈 - 中心静脈 (porto - central)）、小葉中心性損傷 (centrilobular damage)、および門脈周囲遮断 (periportal interruptions) などの、稀な組織学的変化が明らかとなり、その他の血清学的、放射線学的、および分子生物学的データと合わせて、診断を確認する手助けとなる（Salcedo, M, et al (2002). Hepatology, 35, 349 - 356）。その発生を制御するメカニズムは未知であるが、種々の研究により、移植後 de novo 肝炎が、ドナーの臓器中

10

20

30

40

50

で発現される抗原に対する同種免疫タイプの反応によって引き起こされるとする仮説が支持されている (Aguilera, I., et al (2001). Clin Exp Immunol, 126, 535 - 539; Aguilera, I., et al (2004). Liver Transpl, 10, 1166 - 1172; Rodriguez - Mahou, M., et al (2007). Transplantation, 83, 1126 - 1129)。このように、この新しい病態の発症において重要な役割を担っていると考えられ、アロゲン (allogene) として作用するタンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ T1 (GSTT1) が同定された。GSTT1 は細胞解毒作用に関与する酵素であり、赤血球、肝臓、腎臓、およびその他の組織中での発現レベルが高い。このタンパク質は、ポジティブ対立遺伝子またはヌル対立遺伝子の 2 つの対立遺伝子を有する単純な多型遺伝子によってコードされ、コーカサス集団の 20%、およびその他の人種の個人の 11 ~ 58% に存在しないことが説明される (Sprenger, R., et al (2000). Pharmacogenetics, 10, 557 - 565; Landi, S., (2000). Mutat Res, 463, 247 - 283)。肝臓移植を受けた患者のうち、移植後 de novo 肝炎に典型的な臨床的症状および分析による徴候が見られる患者の研究により、GSTT1 に対する抗体 (抗 GSTT1) が高いレベルで存在することが明らかとなっている。このようなケースの遺伝子分析により、ドナーは GSTT1 陽性であり、その結果として、移植された肝臓がこの酵素を発現することが示された。対照的に、レシピエント患者は GSTT1 遺伝子を欠いていた (Aguilera, I., et al (2001). Clin Exp Immunol, 126, 535 - 539; Aguilera, I., et al (2004). Liver Transpl, 10, 1166 - 1172; Rodriguez - Mahou, M., et al (2007). Transplantation, 83, 1126 - 1129)。この研究は、移植後 de novo 肝炎の同種免疫の仮説を強固にするものであり; GSTT1 の不適合性がその発症の基本的要素として示されており、移植拒絶反応マーカーとして抗 GSTT1 抗体が示唆されている。さらに、実質臓器の移植を受けたことはないが、かつて輸血が必要であったか、または妊娠をした患者において、抗 GSTT1 抗体の存在が実証された (Aguilera, I., et al (2005). Transplantation Proceedings, 37, 1457 - 1458; Aguilera, I., et al (2005). Am J Kidney Dis, 46, 345 - 350; Wichmann, I., et al (2006). Transfusion, 46, 1505 - 1509)。このような患者のうちの何人かの場合には、GSTT1 に対する抗体の出現と同種免疫反応の発生との間に、有害な臨床的症状との相関があることが確認された (Aguilera, I., et al (2007). Tissue Antigens, 69, 396)。

【0004】

現存の抗 GSTT1 抗体の検出方法には、間接免疫蛍光試験およびウェスタンブロット試験で構成されている (Rodriguez - Diaz, Y., et al (2006). Transplantation Proceedings, 38, 1467 - 1470; Aguilera, I., et al (2005). Transplantation Proceedings, 37, 3968 - 3969)。間接免疫蛍光試験では、分析サンプルの種々の希釈物を、特異的抗原を有する細胞または組織と接触させ、スライド上に固定する。このように、サンプル中に存在する抗体は、スライド上に曝露された抗原と結合し、抗原 - 抗体複合体を形成する。このような複合体の検出は、フルオレセインで標識した他のヒト抗免疫グロブリン抗体との結合、および得られた蛍光の顕微鏡による観察によって行われる。顕微鏡により肉眼で視認可能である蛍光を発生させることができるサンプルの最大希釈を、抗体数 (antibody count) とする (Wheatley, S. P., et al (1998). Methods Cell Biol, 57, 313 - 332)。ウェスタンブロット試験では、分析サンプルを、特異的抗原を十分なレベルで発現することができる GSTT1 の cDNA を持つクローニングベクターで遺伝

10

20

30

40

50

子組換えされた細菌からの細胞抽出物を含有するニトロセルロース膜またはポリフッ化ビニリデン膜に接触させる。この場合、形成された抗原 - 抗体複合体の検出は、酵素、アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼと融合したその他の抗体との結合によって行われ、これにより特異的な基質の存在下にて、比色反応または化学発光反応が起こる。結果は、膜中にて反応の有無に応じて、抗体に対する陽性または陰性として解釈される (Simons, B., et al (2006). J. Immunol. Methods, 315, 88 - 98)。間接免疫蛍光およびウェスタンブロットの技術はともに、抗体の検出に有効である。しかし、これらは半定量的であり、複雑であり、自動化が容易ではなく、労力を要する分析方法である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の第一の目的は、ヒトGSTT1に対する抗体(抗GSTT1)を生体液中で検出するための免疫学的分析方法であって、

(a) 抗原特性マーカーであるhGSTT1組換えタンパク質を異種生物中で発現および精製する段階；

(b) 抗原特性マーカーである前記hGSTT1組換えタンパク質を支持体の中に固定化する段階；

(c) 生体液中に存在し、前記hGSTT1組換えタンパク質に対する特異性を有する抗体が、該物質と結合して抗原 - 抗体複合体を形成する条件下において、抗原特性に対するマーカーである前記hGSTT1組換えタンパク質を前記試験生体液と接触させる段階；

(d) 前記抗原 - 抗体複合体から、非結合抗体および前記生体液のその他の成分を分離する段階；

(e) ポジティブコントロールによって定められた抗GSTT1抗体の量と正に相関する、生体液中で検出された抗原 - 抗体複合体の量を測定する段階を含む方法。

【0006】

hGSTT1組換えマーカータンパク質は、少なくとも5個のヒスチジンアミノ酸を有するポリペプチド配列と融合されて、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)による精製が可能となり、微生物中、特に、pcASB-GSTT1プラスミドを有する大腸菌株の中で自身を発現する。

【0007】

前記hGSTT1組換えマーカータンパク質が固定化される支持体は、前記固定化およびそれに続く抗GSTT1抗体の結合分析を可能とする任意の表面であり、好ましくは、マルチウェル培養プレートのウェル、ナイロン膜、セルロースフィルター、ニトロセルロース膜、着色マイクロ粒子、蛍光マイクロ粒子、ガラス表面、または金属支持体である。hGSTT1組換えマーカータンパク質および抗GSTT1抗体の固定化のための支持体は、平坦な表面上のポリペプチドマイクロマトリックスである。

【0008】

抗原 - 抗体複合体の検出段階は、ELISA法によるウェスタンブロットを用いて、またはhGSTT1組換えマーカータンパク質でコーティングしたコード化マイクロ粒子によって行うことができる。

【0009】

さらに、本発明の目的は、生体液中における抗GSTT1抗体の存在に関連する病理学的状態の診断、生体液中における抗GSTT1抗体の存在に関連する病理学的状態の発症の予後、または生体液中における抗GSTT1の存在に関連する状態の経過観察およびモニタリングのための、GSTT1に対する抗体を生体液中にて検出するための免疫学的分析方法の使用である。

【0010】

10

20

30

40

50

抗GSTT1の存在が検出される生体液は、血液派生物であり、病理学的状態は、移植されたもの(transplant)、移植片(grafting)、または輸液由来の細胞、組織、または臓器の拒絶反応であり、移植された臓器が肝臓、腎臓、心臓、骨髄、またはhGSTT1配列が発現されるその他の任意の臓器である場合に特に適しており、移植された臓器が肝臓もしくは腎臓であり、hGSTT1タンパク質を発現するドナーから輸血または任意の血液派生物の移植を受けた患者の場合により適している。

【0011】

最後に、本発明の目的はまた、hGSTT1に対する抗体を生体液中で検出するための免疫学的分析方法を実施するためのツールキットである。キットには以下のものが含まれる：

- a) hGSTT1組換え抗原特性マーカータンパク質が固定化された支持体、
- b) 前記hGSTT1組換え抗原特性マーカータンパク質が固定化された支持体と接触させた場合に、血清サンプル中の抗hGSTT1抗体の結合を可能とする指示分子、好ましくは、酵素、フルオロフォア、着色マイクロ粒子、または蛍光マイクロ粒子と結合したヒト抗IgG二次抗体、
- c) 前記ヒトIgG二次抗体と結合した前記指示分子の活性を検出するための手段、
- d) 抗hGSTT1抗体を含むヒトコントロール血清、
- e) ヒト抗hGSTT1抗体を含まないヒトコントロール血清。

【0012】

好ましくは、キットは、以下のものを含む：

- a) ELISA法を用いた抗原-抗体複合体の検出に適し、各ウェル中にhGSTT1組換え抗原特性マーカータンパク質が固定化されたマルチウェルプレート、
- b) ペルオキシダーゼと結合したヒト抗IgG二次抗体のバイアル、
- c) ペルオキシダーゼ酵素活性指示基質、好ましくは3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、を有するバイアル、
- d) 抗hGSTT1抗体を含むヒト血清の希釈サンプルからなるポジティブコントロール、
- e) 抗hGSTT1抗体を含まないヒト血清の希釈サンプルからなるネガティブコントロール、
- f) 分析サンプル、結合二次抗体、コントロール、および対応する酵素指示基質の希釈を行うための緩衝溶液。

【0013】

もしくは、キットは、以下のものを含む：

- a) ELISA法を用いた抗原-抗体複合体の検出に適し、各ウェル中にhGSTT1組換え抗原特性マーカータンパク質が固定化されたマルチウェルプレート、
- b) アルカリホスファターゼと結合したヒト抗IgG二次抗体のバイアル、
- c) アルカリホスファターゼ酵素活性指示基質、好ましくはp-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム、を有するバイアル、
- d) 抗hGSTT1抗体を含むヒト血清の希釈サンプルからなるポジティブコントロール、
- e) 抗hGSTT1抗体を含まないヒト血清の希釈サンプルからなるネガティブコントロール、
- f) 分析サンプル、結合二次抗体、コントロール、および対応する酵素指示基質の希釈を行うための緩衝溶液。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】ヒトGSTT1組換えタンパク質の精製の分析を示す図である。M、分子量マーカー(BioRad)；1、培地の不溶性タンパク質；2、培地の可溶性タンパク質；3、カラムに保持されなかったタンパク質；4、5、および6、それぞれ、1回目、2回目、および3回目の洗浄で排出されたタンパク質；7~18、イミダゾール勾配での連続溶

10

20

30

40

50

出。

【図2】ウェスタンブロット試験による抗GSTT1抗体の検出を示す図である。M、分子量マーカー(BioRad)；1~6、種々の量のヒトGSTT1組換え体：それぞれ、500ng、1000ng、200ng、40ng、8ng、および1.6ng。

【図3】間接ELISAタイプの試験による抗GSTT1抗体の検出を示す図である。1および2、抗GSTT1抗体(GSTT1)を含むサンプル；3および4、GSTT1抗体を含まないサンプル(コントロール)；5、核抗原に対する抗体(ANA)を含むサンプル；6、抗HLAクラスI抗体(HLA-I)を含むサンプル；7、抗HLAクラスII抗体(HLA-II)を含むサンプル；8、抗HLAクラスIおよびII抗体(HLA-I/HLA-II)を含むサンプル。示したデータは、分析した各サンプルあたり、3つの値の平均値に相当する。

【図4】肝臓移植を受けた患者における拒絶反応に対するマーカーの検出を示す図である。1~8、表1に示す、分析サンプル；9、+コントロール；10、-コントロール。示したデータは、分析した各サンプルあたり、3つの値の平均値に相当する。

【図5】腎臓移植を受けた患者における拒絶反応に対するマーカーの検出を示す図である。1~8、表2に示す、分析サンプル；9、+コントロール；10、-コントロール。示したデータは、分析した各サンプルあたり、3つの値の平均値に相当する。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、ヒトGSTT1配列を発現するドナーから前記配列を持たない移植患者へ移植された異種細胞群の拒絶反応を診断するための、微生物、好ましくは大腸菌で発現され単離されたヒトGSTT1の使用に関する。前記細胞群は、組織であっても臓器であってもよく、好ましくは肝臓もしくは腎臓に関連するものであり、または血液のような生体液の一部であってもよい。拒絶反応は、移植を受けた個体の血清中におけるhGSTT1ポリペプチド配列と結合する抗体の存在によって検出されることがある。hGSTT1に対する抗体の存在を決定する診断メカニズムは、マルチウェルプレートのウェル、膜、蛍光、着色、および/もしくは磁気マイクロ粒子によってよい表面へ単離された前記ポリペプチド配列を固定化すること、または、移植を受けた個体の血清抗体の結合の検出を可能とする免疫学的試験において通常実施されるその他のいずれかのタイプの固定化であろう。好ましくは、前記試験は、希釈されたヒト血清のサンプルが配置され、結果的に酵素、および比色基質または蛍光基質と結合したヒト抗IgG抗体となる、ウェルへ接着されたGSTT1タンパク質を有するマルチウェルプレートを含むELISAキットを用いて行われるべきである。

【0016】

本発明の目的は、移植片の拒絶反応に対するマーカーであるヒトGSTT1に対する抗体もしくは抗GSTT1の検出のための組換えポリペプチド物質の使用、および前記拒絶反応の診断およびモニタリングにおけるこれらの適用を含む。本発明の目的である前記方法は、ヒトGSTT1組換え体の使用が、表面に固定化された抗原として特徴付けられていることから、いくつかの科学刊行物に記載されている現存の方法(Rodriguez-Diaz, Y., et al (2006). *Transplantation Proceedings*, 38, 1467-1470)を改良するものであり、免疫学的試験および市販のシステムにおける使用の可能性の範囲を広げるものである。

【0017】

具体的には、本発明は、ヒスチジンタグ(Histag)を有する組換えポリペプチド物質であるヒトGSTT1タンパク質の使用について記載するものであり、該タンパク質は、微生物、好ましくは大腸菌中にて大量に産生され、これまでの最新技術で用いられるものについて改変され、固定化金属アフィニティクロマトグラフィ(IMAC)法により精製される。

【0018】

本発明の目的の最も新規な特徴は、以下の点にまとめることができる：

10

20

30

40

50

1. 移植片の拒絶反応に対するマーカーとしての抗GSTT1抗体の検出を、患者からの生物学的サンプル中で、好ましくは血清の形態で行うことができる。

2. ヒト抗GSTT1抗体の検出のための抗原として単離ヒトGSTT1組換え体（高純度）を使用することにより、細菌に由来するその他のタンパク質に対するその他の抗体との非特異的反応のリスクが最小限に抑えられ、したがって、分析されたサンプルの解釈において偽陽性および誤差の出現が回避される。

3. 抗GSTT1抗体検出のための、感度が良く、短時間であり、容易に再現可能であり、自動化も可能であり、多数のサンプルの同時分析さえ可能とするメカニズムの開発を容易にする目的で、本発明は、本技術分野の任意の技術に対する種々の通常の免疫学的試験で単離されたヒトGSTT1組換え体の使用を含む。分析のタイプに応じて：

i) 単離されたヒトGSTT1 (rhGSTT1) 組換え体が、以下のいずれかの表面上に固定化する：

(a) ELISA試験用には、既に様々な製造元から市販されている種々のポリマー製のマルチウェルプレート上に固定化される。

(b) ウェスタンブロット、ドットブロット試験、または免疫クロマトグラフィストリップ試験用には、紙、または、ニトロセルロースなどのセルロース誘導體、またはポリフッ化ビニリデンもしくはナイロンなどのその他のポリマー化合物から作られた膜の上に固定化される。

(c) ルミネックスタイプの試験、または流体マトリックス上の多重試験に基づくその他の技術用には、ポリスチレンもしくはシリコン、またはコポリマーなどの種々のポリマー化合物のマイクロ粒子またはナノ粒子上に固定化される。

(d) クロマトグラフィ支持体または電気泳動ゲル中での相互作用試験用には、セルロース、ポリアクリルアミド、またはアガロースなどのポリマー中に固定化される。

(e) バイオセンサー、スライドガラス上でのマイクロマトリックス、およびその他の種類の高度な免疫学的試験用には、タンパク質の固定化を可能とするその他の表面を用いることができる。

ii) 分析サンプルを前記表面と接触させ、それによって、サンプルの抗GSTT1抗体が、曝露されたヒトGSTT1組換え体と結合し、抗原-抗体複合体が形成される。

iii) 前記抗原-抗体複合体は、以下のような免疫学的試験における通常の技術を用いて検出される：

(a) 顕微鏡、スキャナー、フローサイトメーター、またはバイオテクノロジーにおいて通常用いられるその他の装置によって検出可能である、蛍光分子と、または蛍光産物、発光産物、もしくは燐光産物を生じる酵素と結合させたその他の抗体のヒト抗体定常領域に結合すること。

(b) 特異的基質の存在下で、比色反応、蛍光反応、または化学発光反応を起こすアルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼなどの酵素と結合したその他の抗体のヒト抗体定常領域に結合すること (Simons, B., et al (2006). J. Immunol Methods, 315, 88-89)。

iv) 抗原-抗体複合体の検出は、分析されたサンプル中の抗GSTT1抗体の存在を示すものである。

【実施例】

【0019】

実施例1. ヒトGSTT1組換え体の産生および精製

本実施例は、ヒトGSTT1組換えタンパク質を単離された形で得ることができる方法について述べる。プラスミドを構築して、6-Hisタグに結合したヒトGSTT1タンパク質を細菌中にて発現させる。これを用いて、固定化金属アフィニティクロマトグラフィ法 (IMAC) によるヒトGSTT1組換え体の産生および精製を行うことができる。

【0020】

細菌中における発現のプラスミドの構築は、以下のようにして行う。まず、Uni-Zap XRベクター発現ライブラリーのスクリーニングによって得られたクローンから (

10

20

30

40

50

Aguilera, I., et al (2001). Clin Exp Immunol, 126, 535-539)、GSTT1 酵素をコードする配列を、Pfu DNAポリメラーゼ (Bioneer)、ならびにプライマーとして、オリゴヌクレオチド、CLONT1-F (配列番号1) および CLONT1-R (配列番号2) を用い、PCR を用いて増幅する (GenBank 受託番号: NM000853)。得られた PCR 産物を、BanHI および HindIII 酵素で消化し、得られた断片を、同一の酵素で既に消化しておいた pcASb プラスミド (www.activemotif.com) 中へクローン化する。このようにして、His タグに結合したヒト GSTT-1 組換え体を発現する pcASB-GSTT1 プラスミドが得られる。

【0021】

続いて、ヒト GSTT1 組換え体を精製するために、pcASB-GSTT1 プラスミドを市販の細菌株 REG-1 (Biomedal、品番 BS-3262) へ形質転換する。この形質転換体を用いて、100 µg/ml のアンピシリンを含有する LB 液体培地中の培養物を作製し、600 nm での光学濃度 (O.D.) が 0.8 ~ 1.0 に達するまで 37 °C でインキュベートして振とうし、続いて、2 mM のサリチル酸塩の存在下にて、30 °C でさらに 4 時間インキュベートして振とうする。4 °C、5000 g での 10 分間の遠心分離によって細胞を回収し、0.25 mg/ml / リゾチームを添加した市販の溶解液 PROLYSE 1x (Biomedal、品番 RS-3406) の溶液中に再懸濁する。得られた懸濁液を環境温度にて 15 分間インキュベートし、定期的に振とうし; -80 °C で 1 時間凍結させ、これを 37 °C にて解凍した後、水中にて複数の超音波パルスにより超音波処理する。4 °C、9000 g での 10 分間の遠心分離によって細胞残留物を除去した後、培養物の可溶性タンパク質と共に上清を除去する。これを、50 mM pH 8.0 リン酸カリウムバッファー、1.5 M NaCl、0.1% Triton X-100、20 mM イミダゾールからなるカラム平衡バッファーの 6 カラム容量分で予備平衡化を行った IMAc 樹脂カラム (His-Select (商標) カートリッジ、Sigma-Aldrich) に 2 回通す。次に、20 カラム容量分のカラム平衡バッファーでカラムを 3 回洗浄する。最後に、50 mM pH 8.0 リン酸カリウムバッファー、1.5 M NaCl、0.1% Triton X-100 からなるバッファーの 1 カラム容量分を、イミダゾールの濃度を 20 mM から 300 mM まで次第に増加させながら繰り返しアプライすることにより、ヒト GSTT1 組換えタンパク質を溶出する。精製の結果は、クーマシーによって染色した 12% のアクリルアミドゲル中の SDS-PAGE によって分析し (図 1)、溶出物の純度を、Experion (商標) システム (Bio-Rad) を用いて測定する。作製された量 (培養物 1 リットルあたりの精製タンパク質 8.28 mg) および高い純度 (96% 超) の両方により、このヒト GSTT1 組換え体を種々のタイプの試験へ適用することが可能となり、細菌由来のその他のタンパク質との非特異的反応のリスクが最小限に抑えられる。

【0022】

実施例 2. ウェスタンブロットタイプの試験にて精製されたヒト GSTT1 組換え体を抗原として用いた抗 GSTT1 抗体の検出方法

以下の実施例は、抗 GSTT1 抗体の存在を検出することができる方法を示すものである。このために、実施例 1 に記載したヒト GSTT1 組換え体を抗原として用いたウェスタンブロットタイプの試験を行う。

【0023】

種々の量のヒト GSTT1 組換えタンパク質について、12% アクリルアミドでの SDS-PAGE ゲルに掛ける。次に、ゲルのタンパク質を、セミドライ転写システム (SV20-SDB、Sigma-Aldrich) を用いてポリフッ化ビニリデン膜 (GE HealthCare) へ転写する。蒸留水で膜を 2 回、5 分間洗浄した後、1 時間または 2 時間環境温度にて乾燥させる。次に、膜を、50 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、0.02% Tween-20 から成り 0.5% スキムミルクを添加したバッファーにて 1:100 に希釈した抗 GSTT1 抗体を含有する血清サン

10

20

30

40

50

ブルと共に、4 で一晩インキュベートする。膜を、50 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl からなる洗浄バッファーで5分間、3回洗浄した後、50 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl から成り0.5%スキムミルクを添加したバッファーにて1:1000に希釈した抗ヒトIgG-AP結合抗体 (Promega) の溶液と共に、1時間環境温度にてインキュベートする。最後に、膜をさらに洗浄バッファーにより5分間、3回洗浄した後、膜上に形成された抗原-抗体複合体を、比色基質 (SIGMA-FAST-BCIP/NBTシステム、Sigma-Aldrich) によって出現させる。この試験の結果を図2に示す。理解することができるように、非常に少量 (40 ng) のヒトGSTT1組換え体から、サンプルは反応し、陽性シグナルを発生させることができる。

【0024】

実施例3. ヒトGSTT1組換え体を抗原としてELISAタイプの試験に用いた、抗GSTT1抗体検出のための装置の開発

本実施例は、ELISAタイプの試験 (酵素結合免疫吸着アッセイ) に基づいて、マルチウェルプレートの表面上に固定化された実施例1で記載したヒトGSTT1組換え体を用いることによって、抗GSTT1抗体の検出を可能とする装置の作製方法について述べる。

【0025】

まず、50 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl からなるバッファー中に溶解した1 µg/mlのヒトGSTT1組換え体の溶液を調製する。次に、100 µlのこのGSTT1溶液、および100 µlの100 mM pH 9.6 炭酸ナトリウムバッファーを、マルチウェルプレート (Marxisorp ELISAプレート、Nunc) の各ウェルへ添加する。次に、このプレートを37 で1時間、続いて4で一晩、最後に37 で30分間インキュベートする。内容物を除去した後、ウェルを、50 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、0.05% Tween-20 からなる洗浄バッファーの300 µlで2回洗浄し、各洗浄では、環境温度にて5分間のインキュベーションを行い、最後にはウェル内に液体が残留していないことを確認する必要がある。次に、洗浄バッファーに溶解した5%スキムミルクからなるブロッキング溶液の300 µlを各ウェルに添加し、プレートを環境温度にて1時間または2時間インキュベートする。その間に、以下の抗体を含有するヒト血清サンプルのブロッキング溶液中での1:500希釈物を調製する：

- ・抗GSTT1抗体 (GSTT1)
- ・核抗原に対する抗体 (ANA)
- ・抗HLAクラスI抗体 (HLA-I)
- ・抗HLAクラスII抗体 (HLA-II)
- ・抗HLAクラスIおよびクラスII抗体 (HLA-I/HLA-II)
- ・抗体を含まないサンプル (コントロール)

【0026】

内容物を除去した後、100 µlの希釈サンプルをウェルへ添加し、プレートを環境温度にて1時間インキュベートする。内容物を除去した後、ウェルを300 µlの洗浄バッファーで5回洗浄し、ウェル内に液体が残留していないことを確認する。次に、ブロッキング溶液で1:5000に希釈した抗ヒトIgG-AP抗体結合体 (Promega) を含む溶液の100 µlを各ウェルへ添加し、プレートを環境温度にて1時間インキュベートする。内容物を除去した後、ウェルを300 µlの洗浄バッファーで5回洗浄し、ウェル内に液体が残留していないことを確認する。次に、100 mM グリシン、1 mM MgCl₂、1 mM ZnCl₂ pH 10.4 からなるバッファーに溶解した1 µg/mlのp-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム (Aldrich) を含む溶液の100 µlを各ウェルに添加し、プレートを環境温度で1時間暗所にてインキュベートする。各ウェルへ25 µlの0.5 M NaOHを添加して反応を停止させた後、405 nmの波長での吸光度の読み取りを行う。この試験の結果を図3に示す。理解されるように、得られた吸

10

20

30

40

50

光度の値から、抗GSTT1抗体を含有するサンプル(GSTT1)と抗GSTT1抗体を含有しないサンプル(コントロール)との間に著しい差(最大5倍までの増加)があることが分かる。さらに、ELISA試験では、その他のタイプの非GSTT1抗体(ANA、HLA-I、HLA-II、およびHLA-I/HLA-II)を含むサンプルとの非特異的反応または交差反応が生じず、この方法の高い特異性を示している。

【0027】

実施例4．ELISAタイプの試験を用いた抗GSTT1抗体の検出による、肝臓移植片に対する拒絶反応の診断

本実施例は、マルチウェルプレートに固定化されたヒトGSTT1組換え体を用いるELISAタイプの装置が、肝臓移植片に対する拒絶反応を有する患者の診断および経過観察を、同種免疫反応マーカー、抗GSTT1抗体の検出によって可能とする方法を示すものである。

【0028】

表1に示す、間接免疫蛍光法および/またはウェスタンブロット法で測定された種々の抗GSTT1抗体数を有する肝臓の移植を受けた患者からの一連のヒト血清は、Immunology Service of University Hospital Virgen del Rocío(スペイン、セビリア)から提供され、実施例3に記載するようなELISAタイプの試験のサンプルとして用いる。抗GSTT1抗体を含有するサンプル(コントロール+)および抗体を含有しない別のサンプル(コントロール-)を基準として用いる。

【0029】

【表1】

表1．分析したサンプルの説明

サンプル番号	IIF	WB
1	>1/320	+
2	>1/320	+
3	>1/320	+
4	1/160	+
5	1/80	+
6	1/80	+
7	1/40	-
8	-	-

略語：IIF＝間接免疫蛍光法による抗GSTT1数；WB＝ウェスタンブロットにおける抗GSTT1の存在

【0030】

得られた結果を図4に示す。理解されるように、提案されたELISA試験は、非常に低い抗体数(1/40)から抗GSTT1抗体の存在を検出することが可能である。さらに、抗GSTT1抗体を含有し、ウェスタンブロット分析では陰性に見なされるサンプル(サンプル7)は、ポジティブコントロールと類似の値を示している。このことは、現在利用可能である抗GSTT1抗体の検出についてのその他のシステムに対して、ELISA試験の感度が向上していることを示しており、これは、特に、天然の決定因子のみを認識するために、ウェスタンブロットでの偽陰性血清においても陽性を検出するためである。

【0031】

実施例5．ELISAタイプの試験を用いた抗GSTT1抗体の検出による腎臓移植に対

する拒絶反応の診断

本実施例は、固定化されたヒトGSTT1組換え体を有するマルチウェルプレートを用いるELISAタイプのキットにより、同種免疫反応マーカである抗GSTT1抗体の検出によって腎臓移植に対する拒絶反応を有する患者の診断および経過観察を可能とする方法を示すものである。

【0032】

表2に示す、間接免疫蛍光法および/またはウェスタンブロット法(Wichmann, I., et al (2006). Transfusion, 46, 1505-1509; Aguilera, I., et al (2005). Transplantation Proceedings, 37, 3968-3969)で測定された種々の抗GSTT1抗体数を有する腎臓の移植を受けた患者からの種々のヒト血清は、Immunology Service of University Hospital Virgen del Rocío (スペイン、セビリヤ)から提供され、実施例3に記載するようなELISAタイプの試験に用いる。抗GSTT1抗体を含有するサンプル(コントロール+)および抗体を含有しない別のサンプル(コントロール-)を参照として用いる。

【0033】

【表2】

表2. 分析したサンプルの説明

サンプル番号	IIF	WB
1	1/60	+
2	ND	+
3	ND	+
4	1/80	-
5	1/80	-
6	ND	-
7	-	-
8	-	-

略語：IIF＝間接免疫蛍光法による抗GSTT1数；WB＝ウェスタンブロットにおける抗GSTT1の存在、ND：試験を実施したが計数されなかった

【0034】

得られた結果を図5に示す。理解されるように、ELISA試験は、ウェスタンブロット分析では陰性に見なされる非常に低い抗体数(1/80)から抗GSTT1抗体の存在を検出することが可能である。このことは、現在利用可能である抗GSTT1抗体の検出についてのその他のシステムに対して、ELISA試験の感度が向上されていることを示している。観察されるように、記載したELISA試験は、非常に低い抗体数(1/80)から抗GSTT1抗体の存在を検出することができる。さらに、抗GSTT1抗体を含有し、ウェスタンブロット分析では陰性に見なされるサンプル(サンプル4、5、および6)は、ポジティブコントロールと類似の値を示している。このことは、現在利用可能である抗GSTT1抗体の検出についてのその他のシステムに対するELISA試験の感度の良さを示している。

【産業上の利用可能性】

【0035】

バイオテクノロジーの通常の技術を用いることで、本発明は以下のものに用いることができる：

1. 以下の技術に基づいて、抗GSTT1抗体の検出を可能とするキットまたは装置の

設計：

- a . E L I S A (酵素結合免疫吸着アッセイ)
- b . ウェスタンブロットまたはドットブロット
- c . 免疫クロマトグラフィストリップ
- d . タンパク質マイクロアレイまたはアレイ (マイクロマトリックスまたはマトリックス)
- e . フローサイトメーター
- f . 特異的磁気分離のための常磁性マイクロ粒子
- g . 抗原 - 抗体結合を定量的な方法で検出するバイオセンサー

2 . 例えば以下に起因するものなど、同種免疫タイプの反応の診断およびモニタリングのための、これらの装置の臨床レベルでの使用： 10

- a . ヒト G S T T 1 を発現しない患者における、異種細胞、組織、または臓器の移植片の拒絶反応
- b . 従来 of 反応によって説明されない、胎児もしくは新生児での溶血反応 (経胎盤経路)、R h 不適合、または赤血球群がより少ない
- c . G S T T 1 対立遺伝子陽性の胎児を妊娠中の G S T T 1 対立遺伝子陰性の母における不耐性のケース
- d . G S T T 1 対立遺伝子陰性の移植患者における G S T T 1 血液派生物の投与に対する不耐性

【 0 0 3 6 】

配列表

配列番号 1

長さ：26ヌクレオチド

種類：DNA

配列：

a t g g a t c c a t g g g t c t g g a g c t c t a c 2 6

配列番号 2

長さ：26ヌクレオチド

種類：DNA

配列：

g t a a g c t t t c a c c g g a t c a t g g c c a g 2 6

20

30

【 図 1 】

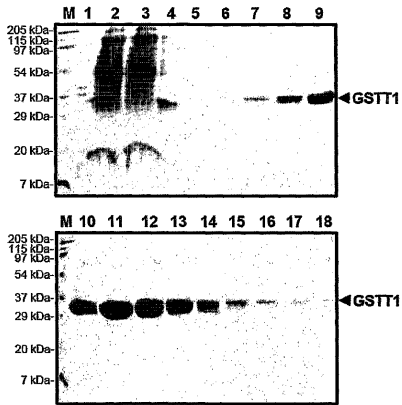


Figura 1

【 図 2 】

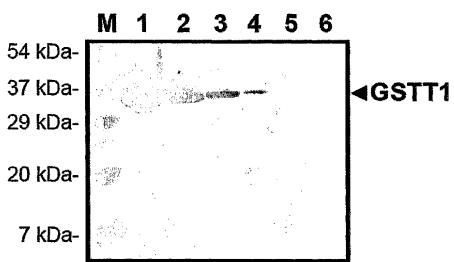
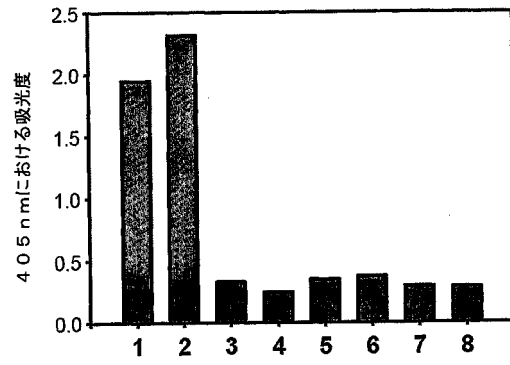
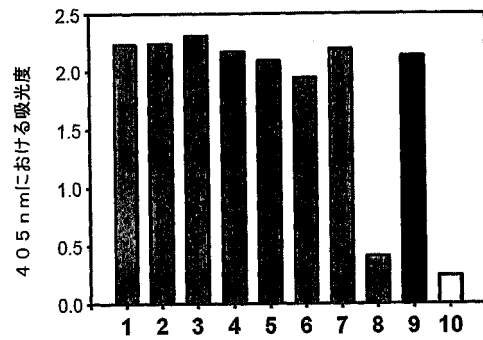


Figura 2

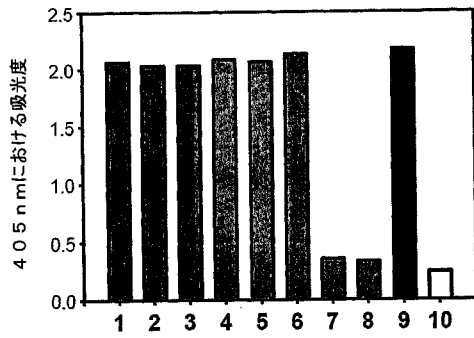
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【配列表】

2010540921000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 2008/000572

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
see extra sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K, G01N33		
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) INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Rodríguez-Díaz Y. et al. "De novo autoimmune hepatitis following liver transplantation for primary biliary cirrhosis". Jun 2006. Transplantation proceedings. Vol. 38, Nº. 5, pages 1467-1470; ISSN 0041-1345 (Print).	1,4,6,9,11, 13,16
X	Aguilera I. et al. "Antibodies against glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with of novo immune hepatitis following liver transplantation", Dic. 2001. Clinical and experimental immunology. Vol. 126, Nº. 3, pages 535-539; ISSN 0009-9104 (Print).	1-18
<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:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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 documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"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)	"&"	document member of the same patent family
"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		
Date of the actual completion of the international search 20 January 2009 (20.01.2009)	Date of mailing of the international search report (26/01/2009)	
Name and mailing address of the ISA/ O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Facsimile No. 34 91 3495304	Authorized officer J. Manso Tomico Telephone No. +34 91 349 55 83	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2008)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2008/000572

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Rodriguez-Mahou Margarita et al, "Antibodies against glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with GSTT1 null genotype as prognostic marker: long-term follow-up after lisee transplantation", Transplantation, 27.04.2007, Vol. 83, N° 8, pages 1126-1129; ISSN 0041-1337.	1-18
A	US 5427917 A (TEIJIN LTD) 27.06.1995. the whole document	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2008/000572

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5427917 A	27.06.1995	AU 2952489 A AU 608117 B EP 0328939 AB JP 2057977 A JP 7050115 B JP 2015335 C JP 2131595 A AT 99059 T DE 68911550 T ES 2060676 T	03.08.1989 21.03.1991 23.08.1989 27.02.1990 31.05.1995 02.02.1996 21.05.1990 15.01.1994 11.05.1994 01.12.1994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2008/000572

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONALSolicitud internacional Nº
PCT/ES 2008/000572

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD		
Ver hoja adicional De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.		
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA		
Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación) C07K, G01N33		
Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda		
Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones Nº
X	Rodríguez-Díaz Y, et al. "De novo autoimmune hepatitis following liver transplantation for primary biliary cirrhosis". Jun 2006. Transplantation proceedings. Vol. 38, Nº. 5, páginas 1467-1470; ISSN 0041-1345 (Print).	1,4,6,9,11, 13,16
X	Aguilera I. et al. "Antibodies against glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with de novo immune hepatitis following liver transplantation". Dic. 2001. Clinical and experimental immunology. Vol. 126, Nº. 3, páginas 535-539; ISSN 0009-9104 (Print).	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos <input checked="" type="checkbox"/> Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo		
* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional	
20 Enero 2009 (20.01.2009)	26 de Enero de 2009 (26/01/2009)	
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado J. Manso Tomico Nº de teléfono +34 91 349 55 83	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº PCT/ES 2008/000572
--

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones Nº
A	Rodriguez-Mahou Margarita et al, "Antibodies against glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with GSTT1 null genotype as prognostic marker: long-term follow-up after liver transplantation", Transplantation, 27.04.2007, Vol. 83, Nº. 8, páginas 1126-1129; ISSN 0041-1337.	1-18
A	US 5427917 A (TEIJIN LTD) 27.06.1995. Todo el documento	1-18

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2008/000572

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US 5427917 A	27.06.1995	AU 2952489 A AU 608117 B EP 0328939 AB JP 2057977 A JP 7050115 B JP 2015335 C JP 2131595 A AT 99059 T DE 68911550 T ES 2060676 T	03.08.1989 21.03.1991 23.08.1989 27.02.1990 31.05.1995 02.02.1996 21.05.1990 15.01.1994 11.05.1994 01.12.1994

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ES 2008/000572

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

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, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ヌニェス ロルダン、アントニオ
 スペイン王国 4 1 0 1 3 セビリア アベニダ エム・シウロット オスピタレス ウニベルシ
 タリオス ビルヘン デル ロシオ エディフィシオ ラボラトリオ 番地なし

(72)発明者 アギレラ ガルシア、イサベル
 スペイン王国 4 1 0 1 3 セビリア アベニダ エム・シウロット オスピタレス ウニベルシ
 タリオス ビルヘン デル ロシオ エディフィシオ ラボラトリオ 番地なし

(72)発明者 ウィヒマン シュリプフ、インゲボルグ
 スペイン王国 4 1 0 1 3 セビリア アベニダ エム・シウロット オスピタレス ウニベルシ
 タリオス ビルヘン デル ロシオ エディフィシオ ラボラトリオ 番地なし

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA31 CA01 DA06 EA04 GA11 HA08

专利名称(译)	检测抗人GSTT1抗体的免疫学分析方法 (抗hGSTT1)		
公开(公告)号	JP2010540921A	公开(公告)日	2010-12-24
申请号	JP2010526328	申请日	2008-09-01
[标]申请(专利权)人(译)	丰达锡安雷纳奔驰对线贝丝迪加卫生锡永一		
申请(专利权)人(译)	雷纳基金会奔驰对拉库存Sutiga锡安疗养		
[标]发明人	ヌニェスロルダンアントニオ アギレラガルシアイサベル ウィヒマンシュリプフインゲボルグ		
发明人	ヌニェス ロルダン、アントニオ アギレラ ガルシア、イサベル ウィヒマン シュリプフ、インゲボルグ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/545 C12N15/09		
CPC分类号	C07K16/42 C12N9/1088 C12Q1/48 G01N33/54366 G01N33/6854 G01N33/6893 G01N2800/08 G01N2800/245 G01N2800/368 C07K16/18 G01N33/57484		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.N G01N33/545.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA01 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA08		
代理人(译)	中岛敦		
优先权	2007002641 2007-09-27 ES		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的主题是用于检测抗人GSTT1 (抗hGSTT1) 的抗体的生物体液中的免疫学分析方法。本发明还涉及所述免疫学分析方法用于诊断，预后，随访和监测与生物体液中抗GSTT1的存在相关的病理状况的用途，并且还涉及用于将所述方法付诸实践的工具箱。。

サンプル番号	I I F	WB
1	>1/320	+
2	>1/320	+
3	>1/320	+
4	1/160	+
5	1/80	+
6	1/80	+
7	1/40	-
8	-	-