

(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2013-501229

(P2013-501229A)

(43) 公表日 平成25年1月10日(2013.1.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D
<b>GO 1 N 37/00 (2006.01)</b>	GO 1 N 37/00	1 O 2
<b>GO 1 N 30/88 (2006.01)</b>	GO 1 N 30/88	J
<b>GO 1 N 27/447 (2006.01)</b>	GO 1 N 27/26	3 O 1 A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁)

(21) 出願番号 特願2012-523270 (P2012-523270)  
 (86) (22) 出願日 平成22年7月19日 (2010. 7. 19)  
 (85) 翻訳文提出日 平成24年4月3日 (2012. 4. 3)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2010/060410  
 (87) 国際公開番号 W02011/015446  
 (87) 国際公開日 平成23年2月10日 (2011. 2. 10)  
 (31) 優先権主張番号 P200930559  
 (32) 優先日 平成21年8月4日 (2009. 8. 4)  
 (33) 優先権主張国 スペイン (ES)

(71) 出願人 512029157  
 ウニヴェルシダッド デ サラマンカ  
 UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
 MANCA  
 スペイン, エー37008 サラマンカ,  
 パティオ デ エスクエラス 1  
 Patio de Escuelas, 1  
 E-37008 Salamanca,  
 Spain  
 (74) 代理人 110000338  
 特許業務法人原謙三国際特許事務所  
 (72) 発明者 キロス ルイス, ジャレミ  
 スペイン, エー37008 サラマンカ,  
 パティオ デ エスクエラス 1, ウニヴェルシダッド デ サラマンカ  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腎損傷の検出のための方法

(57) 【要約】

本発明は、個体における腎損傷の存在を決定するための方法に関し、本発明はまた、Reg 3 B、フェツイン B、Ras 関連GTP結合タンパク質A、セリンプロテアーゼインヒビタA3L、COP9のサブユニット1、ATPシンターゼのサブユニット、ゲルゾリン、リボヌクレアーゼUK114、アミノアシラーゼ1A、エノラーゼ、ケラチン5、パルプアルブミン、リボヌクレアーゼ4、またはセリンプロテアーゼインヒビタA3Kを含むリストから選択された1個または数個のタンパク質を検出するための方法に関する。腎損傷は、急性の腎不全であり得る。この腎臓の病理学は、腎毒性因子の投与によって引き起こされ得、ここで、腎毒性因子は、アミノグリコシド系抗生物質（例えば、ゲンタマイシンまたはシスプラチン）であり得る。本発明はまた、Reg 3 Bおよび/またはゲルゾリン、あるいはこれらのフラグメントの尿中レベルの生化学的分析を介して、ゲンタマイシンによって引き起こされる腎損傷または腎不全を、シスプラチンによって引き起こされるものと差別化する方法を提供する。

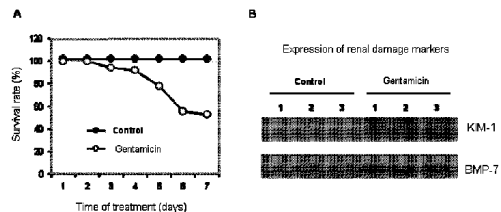


FIG. 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

腎損傷を決定するために有用なデータを提供する方法であって、

- a . 単離された生物学的サンプルを個体から取得する工程；および
- b . 得られたサンプル中に、

- ・ 配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列に少なくとも 60% 同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント；

- ・ 配列番号 3 ~ 11 のアミノ酸配列に少なくとも 80% 同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント；あるいは

- ・ 配列番号 12 ~ 14 のアミノ酸配列に少なくとも 90% 同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント

を含むリストより選択されるタンパク質の少なくとも 1 つまたはその任意の組合せを、検出する工程、および / または定量する工程を包含する、方法。

## 【請求項 2】

配列番号 1 ~ 14 を含むリストより選択される少なくとも 1 つのタンパク質またはその任意のフラグメント、あるいはその任意の組合せが検出および / または定量される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

配列番号 1 に少なくとも 60% 同一なタンパク質またはその任意のフラグメントが検出および / または定量される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

配列番号 1 のタンパク質またはその任意のフラグメントが検出および / または定量される、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

配列番号 5 に少なくとも 80% 同一なタンパク質またはその任意のフラグメントが検出および / または定量される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

配列番号 5 のタンパク質またはその任意のフラグメントが検出および / または定量される、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

配列番号 1 のタンパク質および配列番号 5 のタンパク質、またはこれらの任意のフラグメントが検出および / または定量される、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 8】

任意の有意差を見出すために、上記 b) において得られたデータを少なくとも 1 つのコントロールサンプルと比較する工程をさらに包含する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記有意差が、前記個体における前記腎損傷の発達に由来することを含む、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記腎損傷が急性腎不全である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記腎損傷または腎不全が少なくとも 1 つの腎毒性因子の投与または該因子への曝露に起因する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記腎毒性因子がアミノグリコシド系抗生物質である、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記アミノグリコシド系抗生物質がゲンタマイシンである、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記タンパク質が、前記腎毒性因子の投与または該因子への曝露の12時間後に検出される、請求項5～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記タンパク質が24時間後に検出される、請求項5～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記腎毒性因子がシスプラチンである、請求項5～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記腎損傷または腎不全の要因を決定するため、あるいは、ゲンタマイシンによって引き起こされる腎損傷または腎不全をシスプラチンによって引き起こされる腎損傷または腎不全と差別化するための、請求項3～16のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項18】

請求項17に記載の方法であって、

a. 配列番号1および/または配列番号5が検出および/または定量される場合に、腎損傷または腎不全の要因がゲンタマイシンの投与またはゲンタマイシンへの曝露であり、

b. 配列番号1および/または配列番号5が検出および/または定量されなかった場合に、腎損傷または腎不全の要因がシスプラチンの投与および/またはシスプラチンへの曝露である、方法。

【請求項19】

前記工程aからの前記生物学的サンプルが体液である、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項20】

前記体液が尿である、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記体液が血清である、請求項19に記載の方法。

【請求項22】

前記タンパク質またはそのフラグメントが、電気泳動、免疫アッセイ、クロマトグラフィおよび/またはマイクロアレイ技術によって検出および/または定量される、請求項1～21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

少なくとも1つの腎毒性因子の投与に起因する腎損傷の進行を防止する方法であって、

30

a. 腎毒性因子に曝露された個体または曝露されていない個体から単離された体液中に、

・配列番号1または2のアミノ酸配列に少なくとも60%同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント；

・配列番号3～11のアミノ酸配列に少なくとも80%同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント；あるいは

・配列番号12～14のアミノ酸配列に少なくとも90%同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント

を含むリストより選択されるタンパク質の少なくとも1つまたはその任意の組合せの第一の濃度を決定する工程、

40

b. 上記タンパク質またはその任意の組合せの第二の濃度を決定する工程であって、第二の濃度は、上記曝露された個体の体液中に第一の濃度を決定した後に、あるいは、上記曝露されていない個体における上記腎毒性因子の投与または該因子への曝露の後に、個体からの体液中に工程aにおいて決定される、工程、ならびに

c. 任意の有意差を見出すために、第二の濃度を、工程aにて得られた第一の濃度と比較する工程

を包含する、方法。

【請求項24】

配列番号1～14を含むリストより選択される少なくとも1つのタンパク質またはその

50

任意のフラグメント、あるいはその任意の組合せが、工程 a および b にて検出および / または定量される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

配列番号 1 に少なくとも 6 0 % 同一なタンパク質またはその任意のフラグメントが検出および / または定量される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

配列番号 1 のタンパク質またはその任意のフラグメントが検出および / または定量される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

配列番号 5 に少なくとも 8 0 % 同一なタンパク質またはその任意のフラグメントが検出および / または定量される、請求項 2 3 に記載の方法。

10

【請求項 2 8】

配列番号 5 のタンパク質またはその任意のフラグメントが検出および / または定量される、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

配列番号 1 のタンパク質および配列番号 5 のタンパク質、またはこれらの任意のフラグメントが検出および / または定量される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記腎損傷が急性腎不全である、請求項 2 3 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記腎毒性因子がアミノグリコシド系抗生物質である、請求項 2 3 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 3 2】

前記アミノグリコシド系抗生物質がゲンタマイシンである、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記腎毒性因子がシスプラチンである、請求項 2 3 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記体液が尿である、請求項 2 3 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記体液が血清である、請求項 2 3 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 3 6】

前記個体がヒトである、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 7】

腎損傷を決定するため、または腎損傷の進行を予測するためのバイオマーカーとしての

・ 配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列に少なくとも 6 0 % 同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント；

・ 配列番号 3 ~ 1 1 のアミノ酸配列に少なくとも 8 0 % 同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント；あるいは

・ 配列番号 1 2 ~ 1 4 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % 同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント

を含むリストより選択されるタンパク質の、使用。

40

【請求項 3 8】

前記タンパク質が、配列番号 1 ~ 1 4 を含むリストより選択される少なくとも 1 つのタンパク質またはその任意のフラグメントより選択される、請求項 3 7 に記載の使用。

【請求項 3 9】

前記タンパク質が、配列番号 1 に少なくとも 6 0 % 同一なタンパク質またはその任意のフラグメントより選択される、請求項 3 7 に記載の使用。

【請求項 4 0】

50

前記タンパク質が、配列番号 1 のタンパク質またはその任意のフラグメントより選択される、請求項 39 に記載の使用。

【請求項 41】

請求項 37 に記載の使用であって、前記腎損傷が発達する危険性を決定するため、該腎損傷を決定するため、または腎損傷の進行を予測するためのバイオマーカーとして、配列番号 5 に少なくとも 80% 同一なタンパク質またはその任意のフラグメントが選択される、使用。

【請求項 42】

配列番号 5 のタンパク質またはその任意のフラグメントが選択される、請求項 41 に記載の使用。

10

【請求項 43】

前記腎損傷が急性腎不全である、請求項 37 ~ 42 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 44】

前記腎損傷または腎損傷の進行が少なくとも 1 つの腎毒性因子の投与に起因する、請求項 37 ~ 43 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 45】

前記腎毒性因子がアミノグリコシド系抗生物質である、請求項 44 に記載の使用。

【請求項 46】

前記腎毒性因子がシスプラチンである、請求項 44 に記載の使用。

【請求項 47】

少なくとも 1 つ以上のプローブを備えているキットであって、該プローブは、  
・配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列に少なくとも 60% 同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント；  
・配列番号 3 ~ 11 のアミノ酸配列に少なくとも 80% 同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント；あるいは  
・配列番号 12 ~ 14 のアミノ酸配列に少なくとも 90% 同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント  
を含むリストより選択されるタンパク質の少なくとも 1 つまたはその任意の組合せを認識する、キット。

20

【請求項 48】

前記プローブが、配列番号 1 ~ 14 を含むリストより選択される少なくとも 1 つのタンパク質またはその任意のフラグメント、あるいはこれらの組合せを認識する、請求項 47 に記載のキット。

30

【請求項 49】

前記プローブが、配列番号 1 に少なくとも 60% 同一なタンパク質またはその任意のフラグメントを認識する、請求項 47 に記載のキット。

【請求項 50】

前記プローブが、配列番号 1 またはその任意のフラグメントを認識する、請求項 49 に記載のキット。

【請求項 51】

前記プローブが、配列番号 5 に少なくとも 80% 同一なタンパク質またはその任意のフラグメントを認識する、請求項 47 に記載のキット。

40

【請求項 52】

前記プローブが、配列番号 5 またはその任意のフラグメントを認識する、請求項 51 に記載のキット。

【請求項 53】

前記プローブが、固相支持体に連結されている、請求項 47 ~ 52 に記載のキット。

【請求項 54】

前記プローブが、前記タンパク質またはその任意のフラグメントを認識する抗体である、請求項 47 ~ 53 に記載のキット。

50

## 【請求項 5 5】

個体からの単離されたサンプルにおいて、腎損傷を決定するため、または腎損傷の進行を予測するための、請求項 4 7 ~ 5 0、5 3 および 5 4 のいずれか一項に記載のキットの使用。

## 【請求項 5 6】

個体からの単離されたサンプルにおいて、腎損傷が発達する危険性を決定するため、腎損傷を決定するため、または腎損傷の進行を予測するための、請求項 5 1 ~ 5 4 のいずれか一項に記載のキットの使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の詳細な説明】

10

## 【0 0 0 1】

本発明は、個体における腎損傷の存在を決定するための方法に関し、本発明はまた、Reg 3 B、フェツイン (fetuin) B、Ras 関連 GTP 結合タンパク質 A、セリンプロテアーゼインヒビタ A 3 L、COP 9 のサブユニット 1、ATP シンターゼのサブユニット、ゲルゾリン、リボヌクレアーゼ UK 1 1 4、アミノアシラーゼ 1 A、エノラーゼ、ケラチン 5、パルプアルブミン、リボヌクレアーゼ 4、またはセリンプロテアーゼインヒビタ A 3 K を含むリストから選択された 1 個または数個のタンパク質を検出するための方法に関する。腎損傷は、急性の腎不全であり得る。この腎臓の病理学は、腎毒性因子の投与によって引き起こされ得、ここで、腎毒性因子は、アミノグリコシド系抗生物質 (例えば、ゲンタマイシンまたはシスプラチン) であり得る。本発明はまた、Reg 3 B および / またはゲルゾリン、あるいはこれらのフラグメントの尿中レベルの生化学的分析を介して、ゲンタマイシンによって引き起こされる腎損傷または腎不全を、シスプラチンによって引き起こされるものと差別化する手段を提供する。

20

## 【0 0 0 2】

## 〔背景技術〕

アミノグリコシド系抗生物質は、細菌性の感染症に対して広範に用いられている。特に、ゲンタマイシンは、グラム陰性の感染症に対して用いられている。その治療用途および効力は、その毒性によってかなり妨げられており、腎および聴覚レベルにおいて主に生じる (Martinez-Salgado C, Lopez-Hernandez FJ and Lopez-Novoa JM. 2007, Toxicol Appl Pharmacol., 223: 86-98)。ゲンタマイシン誘導性の腎毒性は、処置の 1 0 ~ 2 5 % において見られる (Leehey DJ et al., 1993, J. Am. Soc. Nephrol., 4: 81-90)。これは尿細管の損傷によって主に特徴付けられる (Nakakuki M et al., 1996, Can J Physiol Pharmacol., 74: 104-111)。しかし、糸球体 (Martinez-Salgado C, Lopez-Hernandez FJ and Lopez-Novoa JM. 2007, Toxicol Appl Pharmacol., 223: 86-98) および脈管 (Goto T et al., 2004, Virchows Arch., 444: 362-74; Secilmis MA, et al., 2005, Nephron Physiol., 100: 13-20) における変化もまた、用量依存的な様式にて現われ得る (Hishida A et al., 1994, Ren Fail., 16: 109-116)。尿細管の損傷は主に、近位尿細管に影響し、攻撃の強度に依存して、その病変は、軽度の上皮脱落 (scaling) からより重篤な尿細管ネクロシスにまでわたり得る (Nakakuki et al., 1996, Can J Physiol Pharmacol., 74: 104-111)。尿細管の病変は、尿細管糸球体フィードバックを活性化させる再吸収のバランス不全を引き起こし、多量の流体の喪失を防ぐために糸球体濾過率 (GFR) を劇的に低減する。最終的に、ゲンタマイシンは、前糸球体動脈ならびに求心性細動脈および遠心性細動脈の収縮によって腎血流量 (RBF) を低減する (Klotman et al., 1983, Kidney Int., 24: 638-643)。RBF の低下の結果、GFR が悪化する。RBF の低下はまた、組織ネクロシスを、特に皮質部の内側に生じる (Cheung et al., 2008, Drugs Aging, 25: 455-476)。

30

40

## 【0 0 0 3】

年齢、性別、これまでの腎機能、処置器官、治療レジメン、水和レベル、および他の付随する状態 (例えば、妊娠または甲状腺機能低下) に依存して、ゲンタマイシン関連陣毒性は時折急性腎不全に至り得る。

50

## 【 0 0 0 4 】

急性腎不全は、腎臓の排泄機能の喪失によって特徴付けられるタイプの腎損傷であり、血液の老廃物および水の清浄化ならびに電解質バランスの維持を阻害する (Bellomo R, Kellum JA and Ronco C, 2007. *Intensive Care Med.*, 33: 409-413)。急性の腎傷害および急性腎不全は、広範な攻撃 (例えば、薬物、毒物 (chemical poisons)、低酸素症、腎尿路障害、感染症、その他) によって誘導され得る (Binswanger U, 1997. *Kidney Blood Press Res.*, 20: 163)。このタイプの腎損傷は、その高い発生率および死亡率のためにヒトおよび社会経済への膨大な負担を示す。受診している患者の約 1% が急性腎不全に関連し、入院患者の約 2 ~ 7% が最終的にこれを悪化させていることが見積もられる。より重要なことに、急性腎不全を有する患者の死亡率は、依然として顕著に高く、症例の約 50% である。

10

## 【 0 0 0 5 】

臨床の現場において、急性腎不全 (および、一般に、急性の腎傷害) は、腎機能不全が検出可能な症状を生成した場合に診断される。これらは、典型的には、クレアチニンレベルおよび尿素レベルを測定することに基づいている。最も一般的に、これらの血清中の濃度は、GFR が減少すると増加する。しかし、尿素およびクレアチニンの高い血清レベルがすでに観察されている場合、急性腎不全は処置が困難である。よって、診断における現在の流行は、損傷が限局的である初期段階にて生じている生理病理学事象の発生を検出することを目的としている (Vaidya VS, Ferguson MA and Bonventre JV, 2008. *Rev Pharmacol Toxicol.*, 48:463-493)。これらの中で、尿細管細胞の崩壊の結果として尿中に存在する特定の細胞性酵素を測定することが、尿細管損傷とともに生じる急性の腎傷害を早期に検出するための現在最も洗練された手順である。これらの酵素としては、N - アセチル - D - グルコサミニダーゼ (NAG) が挙げられるが、例えば、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)、アルカリホスファターゼ (ALP)、グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) もまた挙げられる。これらの酵素のほとんどが、他の尿成分による安定性および阻害の問題に起因して、急性腎傷害の早期かつ高感度な尿マーカーとして中程度の価値を有している (Vaidya VS, Ferguson MA and Bonventre JV, 2008. *Rev Pharmacol Toxicol.*, 48: 463-493)。初期マーカーの最新世代としては、上記のほかに、腎傷害分子 1 (KIM-1) または好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (lipocalin) (NGAL) の尿測定が挙げられる (Vaidya et al., 2008)。

20

30

## 【 0 0 0 6 】

しかし、急性の腎損傷および急性腎不全の診断において改善され得る局面がなお存在する。これらの局面の 1 つは、損傷の病因論的な診断であり、換言すれば、損傷を早期に検出するだけでなくその原因を検出することも行う診断である。この局面は、例えば、腎臓に対して潜在的に有害な種々の薬物のような潜在的な異なる腎毒性因子が同時に同一の個体に集中する際の臨床的状況において特に重要になる。これらの状況下で、腎毒性の第一の症状が出現した時に、現在の診断技術を用いて、その薬物の何が損傷を引き起こしたのかを知ることは不可能であり、結果的に、その薬物みの治療レジメンを、それ以外の薬物の治療レジメンを変更することなく置換するまたは変えることを妨げる。このタイプの薬物の中で、アミノグリコシド系抗生物質が注目されている。この様式において特定のマーカーまたはマーカーの集合を同定し得ることは、日々の臨床状況における、2 つ以上の潜在的な腎毒性薬物を含む同時処置のような、より合理的な、個別のかつ特定の処置を提供することを可能にする。これは、有害な薬物の治療レジメンを置換するまたは変えることによって、正しく指向されるべき治療を可能にする。

40

## 【 0 0 0 7 】

## 〔 発明の要旨 〕

本発明は、個体における腎損傷を決定するための方法、ならびに、Reg 3 B、フェツイン B、Ras 関連 GTP 結合タンパク質 A、セリンプロテアーゼインヒビタ A 3 L、COP 9 のサブユニット 1、ATP シンターゼのサブユニット、ゲルゾリン、リボヌクレアーゼ UK 114、アミノアシラーゼ 1 A、エノラーゼ、ケラチン 5、バルブアルブミ

50

ン、リボヌクレアーゼ4、またはセリンプロテアーゼインヒビタA3Kを含むリストから選択された1個または数個のタンパク質を検出することによってジン損傷の進行を予測するための方法に関する。腎損傷は、急性の腎不全であり得る。この腎臓の病理学は、腎毒性因子の投与によって引き起こされ得、ここで、腎毒性因子は、アミノグリコシド系抗生物質（例えば、ゲンタマイシンまたはシスプラチン）であり得る。

【0008】

本発明は、非限定的な例示としてのゲンタマイシンによって誘導された腎損傷または急性腎不全が上述したリストより選択される任意のタンパク質またはその任意の組合せの排泄の増加に関連する証拠を提供する。

【0009】

よって、本発明は、腎損傷または急性腎不全を検出するためのツールを提供する。これらのツールは、腎損傷または急性腎不全の進行が予測されることを可能にし、換言すれば、ヒトが非限定的な例示としての治療物質で処置されるとき、あるいはヒトが任意の腎毒性因子もしくは非腎毒性因子または状況に曝露されるときに、その病理学の進行を監視する。

【0010】

また、本発明は、Reg3B、フェツインB、Ras関連GTP結合タンパク質A、セリンプロテアーゼインヒビタA3L、COP9のサブユニット1、ATPシンターゼのサブユニット、ゲルゾリン、リボヌクレアーゼUK114、アミノアシラーゼ1A、エノラーゼ、ケラチン5、パルプアルブミン、リボヌクレアーゼ4、またはセリンプロテアーゼインヒビタA3Kを含むリストから選択されるタンパク質またはその任意のフラグメントを尿サンプル中にて検出するという顕著な利点を提供し、その体液の排出は天然の存在する病理学的な必要性であるので、患者に対してさらなる利点を必然的に伴わせる。これは、個体からのサンプリングが攻撃的でないことを意味する。

【0011】

最終的に、本発明は、腎損傷または腎不全がゲンタマイシンまたはシスプラチンによって引き起こされたかどうかを検出しそして差別化する方法を提供する。これは、多くの薬剤を処方されている患者においてその治療を適切に再構築するために腎損傷または腎不全の要因を区別する、診断的に顕著な別の利点である。

【0012】

本発明の方法において検出および/または定量されるタンパク質の簡単な説明は以下のとおりである。

【0013】

Regenerating islet-derived protein 3 beta (REG3、REG-IIIまたはRegIII)はまた、pancreatic stone protein 2、pancreatitis-associated protein (Pap)、Pancreatitis-associated protein 1 (Pap1)、HIPまたはINGAPとして知られており、これらは同義である。このタンパク質はレクチンに関連する。Reg3Bは、正常な膵臓に少量存在するが、膵炎の急性期に過剰発現される。これは、急性膵炎の間の細菌増殖を制御するための応答に関連し得る。これをクローン化することは可能である。

【0014】

フェツインB（他に16G2、フェツインB前駆体、Gugu、IRL685としても知られている。）は、腎臓において合成されるタンパク質であり、血流中に分泌される。これは、血流中における広範な種々の物質の輸送およびアベイラビリティを容易にするタンパク質の大きな群に属する。このタンパク質は、成人個体の血流よりも胎児の血液においてより普遍的であり、よって「フェツイン(fetuin)」と名付けられた。

【0015】

Ras関連GTP結合タンパク質A（他にRagA、FIP1、FIP-1、RagA、RAGA、RRAGA、RagA、またはアデノウイルスE3 14.7kDa-

10

20

30

40

50

相互作用タンパク質1としても知られている。)は、ホモダイマーの形態であり得る。これは、Rcc1/Ran-GTPaseシグナル伝達経路に関連し、細胞死の誘導をもたらすTNF 媒介シグナル伝達における直接的な機能を発揮し得る。これは、骨格筋、心臓および脳において遍在的に発現される。

【0016】

serpin A3Lタンパク質(このタンパク質をいう呼称としては、セリンプロテアーゼインヒビタA3L、セリンプロテアーゼインヒビタ1、またはコントラトリプシン様プロテアーゼインヒビタ3が挙げられる。)は、プロテアーゼ群のほかの酵素を阻害し得るタンパク質の群に属する。このSerpinという名称は、その機能的特性の観点でセリンプロテアーゼの組合せからきている。Seprin A3Lは、成長ホルモンによって誘導され、ラットにおける急性炎症の間のその発現レベルの低減が記載されている。この遺伝子の発現産物はRattus norvegicus(ラット)の肝臓に局在している。このseprin A3Kタンパク質(他にコントラトリプシン様プロテアーゼインヒビタ1、カリクレイン結合タンパク質、セリンプロテアーゼインヒビタ2、または成長ホルモン調節性プロテアーゼインヒビタともいわれる。)は、細胞外seprinタンパク質であり、糖尿病に罹患したラットの網膜に低レベルで示されており、網膜症に寄与し得る。

10

【0017】

シグナルソーム(signalosome)COP9は、真核生物細胞において保存されているタンパク質複合体であり、8つのサブユニット(CSN1~CSN8)から構成される。COP9はユビキチン化調節因子である。ユビキチン化は、タンパク質分解のためのユビキチンタンパク質を用いてタンパク質をマーキングするプロセスからなる。ユビキチンは、除去されるべきタンパク質にアンカリングし、この様式にて、マーキングされたタンパク質は、タンパク質分解プロセスが行われる構造物であるプロテオソームへ移動する。

20

【0018】

ATPシンターゼのサブユニット(FタイプATPaseのサブユニットとしても知られている。)は、この複合体のF0ロータリードメインをF1触媒ドメインに連結する中心軸を形成する。ATPシンターゼタンパク質は、細胞内外の間でのプロトン勾配の存在下でADPを用いてATPを生成する。FタイプATPaseは2つの成分を有している。F1成分は触媒機能を有しており、F0成分は、膜に埋め込まれたプロトンチャネルである。F1は5つのサブユニット(、 、 および )を有している。F0は、3つの主要なサブユニット(a、bおよびc)を有している。サブユニットは、複合体の活性およびプロトン流れを調節するに重要である。

30

【0019】

ゲルゾリンは、S1-S6と称される6つのサブユニットを有する、82kDaの球状のタンパク質である。このタンパク質はアクチンフィラメントのアセンブリに関連している。

【0020】

リボヌクレアーゼ(RNase)は、RNAからより小さな成分への加水分解を触媒する酵素(ヌクレアーゼ)である。リボヌクレアーゼUK114は、翻訳阻害、mRNA加水分解を担う。リボヌクレアーゼ4(RNase4)はリボ核酸ポリマーの加水分解を嗜好する約16kDaのタンパク質である。

40

【0021】

酵素アミノシラーゼ1(Acy1)は、細胞質に局在し、その亜鉛結合に依存したホモダイマーであり、アシル化されたLアミノ酸の加水分解を触媒する。

【0022】

エノラーゼ(解糖系の酵素としてよく知られている。)は、ハシモト脳症における自己抗原として同定され、重篤な喘息に関連している。この酵素の発現の低下は、角皮症(keratoconus)に罹患しているヒトの角膜に見出される。

50

## 【 0 0 2 3 】

ケラチン 5 は、しばしばケラチン 1 4 に関連するサイトケラチンである。タイプ I I サイトケラチンは、塩基性タンパク質または中性タンパク質から構成され、一對の鎖に編成され、単純かつ層状の上皮系組織が分化する間に同時発現されるケラチンと異なる。

## 【 0 0 2 4 】

パルプアルブミンタンパク質は、低分子量のアルブミン（通常 9 ~ 1 1 k D a ）であり、その機能を発揮するためにカルシウムに結合することが必要である。これは、構造的にカルモジュリンおよびトロポニン C に関連する。パルプアルブミンは、速く収縮する筋肉、脳およびいくつかの分泌性組織に局在する。

## 【 0 0 2 5 】

本発明の 1 つの局面は、腎損傷を決定するために有用なデータを提供する方法に関し、本方法は、

- a . 単離された生物学的サンプルを個体から取得する工程 ; および
  - b . 得られたサンプル中に、
    - ・ 配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列に少なくとも 6 0 % 同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント ;
    - ・ 配列番号 3 ~ 1 1 のアミノ酸配列に少なくとも 8 0 % 同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント ; あるいは
    - ・ 配列番号 1 2 ~ 1 4 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % 同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント
- を含むリストより選択されるタンパク質の少なくとも 1 つまたはその任意の組合せを、検出する工程、および / または定量する工程を包含する。

## 【 0 0 2 6 】

本明細書中にて使用される場合、用語「腎損傷」は、腎尿路系における任意の損傷に関し、これは、個体において、腎臓の病気に帰結する状態を引き起こしても引き起こさなくてもよい。腎損傷の由来としては、遺伝的、免疫系、虚血、あるいは任意の薬物を用いる処置が挙げられるがこれらに限定されない。腎損傷または上述した疾患はまた、非限定的な例示としての腎臓、前立腺、膀胱、尿管または尿道の外科的手順によって生成され得る。

## 【 0 0 2 7 】

以下には、言及した配列と記載したタンパク質との対応を記載し、各々のアクセッション番号および由来する生物を記載する :

- ・ 配列番号 1 ; R e g 3 B ( A49616 ; Homo sapiens に対応する。 )
- ・ 配列番号 2 ; フェツイン B ( NP\_055190.2 ; Homo sapiens に対応する。 )
- ・ 配列番号 3 ; セリンプロテアーゼインヒビタ A 3 K ( P05545.3 ; Rattus norvegicus に対応する。 )
- ・ 配列番号 4 ; A T P シンターゼの サブユニット ( NP\_001001973.1 ; Homo sapiens に対応する。 )
- ・ 配列番号 5 ; ゲルゾリン ( NP\_000168.1 ; Homo sapiens に対応する。 )
- ・ 配列番号 6 ; リボヌクレアーゼ U K 1 1 4 ( P52758.1 ; Homo sapiens に対応する。 )
- ・ 配列番号 7 ; アミノアシラーゼ 1 A ( NP\_000657.1 ; Homo sapiens に対応する。 )
- ・ 配列番号 8 ; エノラーゼ ( AAB88178.1 ; Homo sapiens に対応する。 )
- ・ 配列番号 9 ; ケラチン 5 ( NP\_000415.2 ; Homo sapiens に対応する。 )
- ・ 配列番号 1 0 ; パルプアルブミン ( P20472.2 ; Homo sapiens に対応する。 )
- ・ 配列番号 1 1 ; リボヌクレアーゼ 4 ( AAA96750.1 ; Homo sapiens に対応する。 )
- ・ 配列番号 1 2 ; セリンプロテアーゼインヒビタ A 3 L ( P05544.3 ; Rattus norvegicus に対応する。 )
- ・ 配列番号 1 3 ; C O P 9 のサブユニット 1 ( Q13098.4 ; Homo sapiens に対応する。 )
- ・ 配列番号 1 4 ; R a s 関連 G T P 結合タンパク質 A ( NP\_006561.1 ; Homo sapiens に対

10

20

30

40

50

応する。 )。

【 0 0 2 8 】

同一性%は、Homo sapiensに対応するタンパク質のアミノ酸配列の、Rattus norvegicusに対応するタンパク質のアミノ酸配列に関する同一性の%を決定したことに基づいて確立された。

【 0 0 2 9 】

【 表 1 】

表1.Rattus norvegicus およびHomo sapiensに対応する本発明のタンパク質の同一性%

タンパク質	配列番号	Rattus norvegicus アクセッション番号	Homo sapiens アクセッション番号	同一性%
Reg3B	1	P25031	A49616	69
フェツイン(Fetuin) B	2	Q9QX79	NP_055190.2	62
セリンプロテアーゼインヒビター A3K(Serpin A3K)	3	P05545.3	CAD83829.1	88.2
ATPシンターゼのγサブユニット	4	P35435	NP_001001973. 1	91.2
ケルゾリン	5	Q68FP1	NP_000168.1	93.1
リボヌクレアーゼ UK114 (RNase UK114)	6	P52759.3	P52758.1	87.6
アミリアンターゼ 1A(Acy 1A)	7	Q6AYS7.1	NP_000657.1	87.7
αエノラーゼ	8	P04764	AAB88178.1	94.6
ケタチン 5	9	Q6P6Q2	NP_000415.2	88.3
パルプアルブミンα	10	P02625.2	P20472.2	91.8
リボヌクレアーゼ 4 (RNase 4)	11	O55004	AAA96750.1	80.5
セリンプロテアーゼインヒビター A3L (Serpin A3L)	12	P05544.3	CAD83829.1	99.3
COP9 のサブユニット 1	13	P97834.1	Q13098.4	96.8
Ras 関連 GTP 結合タン パク質 A	14	Q63486	NP_006561.1	100

10

20

30

40

50

【 0 0 3 0 】

本発明において理解される場合、用語「同一性%」は、比較した配列全長にわたるアミノ酸位の数を行い、ここで、その位置におけるアミノ酸の全てが同一である。

【 0 0 3 1 】

より好ましくは、本発明の工程 b)において、少なくとも1つのタンパク質またはその任意の組合せが検出および/または定量され、上記タンパク質は、

- ・ 配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列に少なくとも 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または 95% 同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント；
- ・ 配列番号 3 ~ 11 のアミノ酸配列に少なくとも 80%、85%、90%、または 95% 同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント；あるいは
- ・ 配列番号 12 ~ 14 のアミノ酸配列に少なくとも 90% または 95% 同一性を有するタ

ンパク質、またはその任意のフラグメントである。

【0032】

本明細書中の以下において、本発明のタンパク質のいずれかに対して参照がなされる場合、上述した同一性を有する任意のタンパク質もまた検出され得ることが考慮されるべきである。よって、本明細書中の以下において、本は爪印タンパク質のいずれかが、「本発明のタンパク質 (protein of the invention)」または「本発明のタンパク質 (protein of the present invention)」として言及され得る。

【0033】

本発明のタンパク質を検出および/または定量するために、上記タンパク質の1つ以上のフラグメントを検出することが十分である。なぜなら、このフラグメントは、上記タンパク質のアミノ酸配列および構造の構成要素だからである。

【0034】

本発明の方法の工程bは、タンパク質またはその任意のフラグメントの検出および定量に関し、その検出またはその定量に関する。上記検出および/または定量は、当該分野において公知の任意の技術によって行われてもよい。

【0035】

同時に、すでに上述したように、本発明は、上述したリストのタンパク質のいずれかまたは上記タンパク質のフラグメントのいずれかの組合せを介して行われ得る。さらに、用語「その任意の組合せ」はまた、本発明のタンパク質の1つ以上が、本発明のタンパク質のいずれかと異なる任意の他のタンパク質の検出と組み合わせて検出されてもよいという事実をいう。

【0036】

本発明のタンパク質のいずれかは、ヌクレオチド配列の発現産物である。このヌクレオチド配列は、非限定的な例示として、任意のRNA (例えばmRNA) またはその任意のフラグメントであり得る。ヌクレオチド配列はまた、相補的DNA (cDNA) またはその任意のフラグメントであり得る。cDNAはmRNAに相補的なDNAであり、ゲノムヌクレオチド配列のエキソンを含みイントロンを含まないヌクレオチド配列でもある。すなわち、cDNAはコーディング配列である。タンパク質をコードする遺伝子のゲノムヌクレオチド配列の転写物およびタンパク質のcDNAの転写物は同一のmRNA、よって、同一のタンパク質をコードする。本発明において、任意のRNAまたは任意のDNAあるいはその任意のフラグメントもまた、タンパク質の検出の代わりに、あるいは同時に検出され得る。

【0037】

好ましい実施形態は、腎損傷を決定するために有用なデータを提供する方法に関し、ここで、配列番号1~14を含むリストより選択される少なくとも1つのタンパク質またはその任意の組合せが検出および/または定量される。

【0038】

別の好ましい実施形態は、腎損傷を決定するに有用なデータを提供する方法に関し、ここで、配列番号1に少なくとも60%同一性を有するタンパク質および/または配列番号2に少なくとも60%同一性を有するタンパク質あるいはこれらの任意のフラグメントが、検出および/または定量される。より好ましい実施形態に従って、配列番号1のタンパク質および/または配列番号2のタンパク質あるいはその任意のフラグメントが検出および/または定量される。

【0039】

本発明の別の好ましい実施形態は、腎損傷を決定するに有用なデータを提供する方法をいい、ここで、配列番号1に少なくとも60%同一性を有するタンパク質またはその任意のフラグメントが検出および/または定量される。より好ましい実施形態に従って、配列番号1のタンパク質またはその任意のフラグメントが検出および/または定量される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 0 】

本発明の別の好ましい実施形態は、腎損傷を決定するに有用なデータを提供する方法をいい、ここで、配列番号5に少なくとも80%同一性を有するタンパク質またはその任意のフラグメントが検出および/または定量される。より好ましい実施形態に従って、配列番号5のタンパク質またはその任意のフラグメントが検出および/または定量される。

## 【 0 0 4 1 】

本発明の別の好ましい実施形態は、腎損傷を決定するに有用なデータを提供する方法をいい、ここで、配列番号1のタンパク質および配列番号5のタンパク質またはこれらの任意のフラグメントが検出および/または定量される。

## 【 0 0 4 2 】

別の好ましい実施形態は、腎損傷を決定するに有用なデータを提供する方法に関し、ここで、任意の有意差を見出すために、工程bにて得られたデータをコントロールサンプルより得られたデータと比較する工程をさらに包含する。

## 【 0 0 4 3 】

本発明において理解される場合、用語「コントロールサンプル」は、非限定的な例示として、腎損傷に罹患していない個体（健常な個体）から得られたサンプルをいう。このタイプのコントロールサンプルは、腎損傷についてのネガティブコントロールサンプルまたはネガティブコントロールである。

## 【 0 0 4 4 】

本発明において理解される場合、用語「顕著な有意差」は、単離されたサンプル中に本発明のタンパク質が存在することをいい、あるいは、健常な個体から単離されたサンプルと比較して単離されたサンプル中での本発明のタンパク質の濃度がより高いことをいう。健常な個体は、腎損傷の共通マーカーの少なくとも1つ以上のレベルを測定することによって選択される。共通マーカーは、非限定的に、クレアチニン、血液尿窒素（BUN）または尿タンパク質を含むリストより選択される。

## 【 0 0 4 5 】

生物より単離された生物学的サンプル（例えば、非限定的にヒトまたは他の動物）は、上記生物からの体液または任意の細胞性組織であり得る。

## 【 0 0 4 6 】

本発明の別の好ましい実施形態は、腎損傷を決定するための方法に関し、本方法は、上述したようなデータを得るための方法の工程を包含し、上記有意差が個体における腎損傷の発達に由来することをさらに含む。したがって、この好ましい実施形態は、腎損傷を診断するための方法である。

## 【 0 0 4 7 】

別の好ましい実施形態は、腎損傷を決定するに有用なデータを提供するための方法に関し、ここで、上記腎損傷は急性腎不全である。本発明において理解される場合、用語「急性腎不全」は、腎臓の機能不全の任意のステージ（重篤度）における急性の腎不全をいう。急性腎不全の由来としては、遺伝的、免疫系、虚血、あるいは任意の薬物を用いる処置が挙げられるがこれらに限定されない。急性腎不全は、非限定的な例示としての腎臓、前立腺、膀胱、尿管または尿道の外科的手順によって生成され得る。本発明において理解される場合、用語「急性の腎傷害」および「腎損傷」は、任意の強度の、急性の腎臓の損傷をいい、これは、急性腎不全を導いても導かなくてもよい。

## 【 0 0 4 8 】

腎損傷または急性腎不全を決定するに有用なデータを提供するための方法の、別の好ましい実施形態において、工程aの生物学的サンプルは体液である。体液は、動物の身体から排出または分泌された液体を含み得る。体液は、非限定的な例示としての、胎児を取り囲む羊水、房水、血液、血清、乾湿液、リンパ、乳、粘液（鼻汁、痰を含む。）、唾液、皮脂、血清、汗、涙または尿を含むリストより選択される。より好ましい実施形態において、体液は血清である。本発明のタンパク質は、上述した体液中に存在する任意の生物学的成分（例えば細胞またはベジクルが挙げられるがこれらに限定されない。）に見出され

10

20

30

40

50

得る。より好ましい実施形態において、体液は尿である。

【0049】

別の好ましい実施形態は、腎損傷または急性腎不全を決定するに有用なデータを提供するための方法に関し、ここで、タンパク質が、電気泳動、免疫アッセイ、クロマトグラフィおよび/またはマイクロアレイ技術によって検出および/または定量される。

【0050】

本発明のタンパク質の検出および/または定量は、上述した技術のいずれか、またはその任意の組合せによって行われ得る。タンパク質は、その存在または非存在を評価することによって検出され得る。検出は、任意のプロブおよび/または任意の抗体による、タンパク質の任意のフラグメントの特定の認識によって行われ得る。本発明のタンパク質またはその任意のフラグメントは、コントロールサンプルより得られたデータとの比較のための参照、および任意の有意差を見出すための参照として働くデータを用いて定量され得る。この有意差は、問題のサンプルを提供した個体における腎損傷の診断に役立ち得る。好ましい実施形態において、本発明のタンパク質またはその任意のフラグメントは、電気泳動および/または免疫アッセイによって検出および/または定量され得る。

10

【0051】

電気泳動は、電場の作用の結果として、マトリクスまたは固体支持体を通る媒体（電気泳動用緩衝液）に溶解した巨大分子の移動（movement or migration）に基づく分離の分析技術である。分子の挙動は、その電気泳動の移動度に依存し、この移動度はロード、サイズおよび形状に依存する。タンパク質分離を行うために使用される装置、支持体および条件に基づいてこの技術の種々のバリエーションが存在する。電気泳動は、非限定的な例示としてのキャピラリー電気泳動、紙面上の電気泳動、アガロース中での電気泳動、ポリアクリルアミドゲル中での電気泳動、等電点電気泳動または二次元電気泳動を含むリストより選択される。

20

【0052】

免疫アッセイは、生物学的流体中の物質の濃度を測定する、生物学的な試験であり、抗体のその抗原のいずれかに対する反応を用いる。このアッセイは、抗体のその抗原に対する特異性を用いてなされる。抗体または抗原の量は、当該分野において公知の方法によって検出され得る。最も一般的な方法の1つが、抗原または抗体のマーキングに基づくものである。このマーキングは、非限定的な例示としての酵素、放射性同位元素（放射免疫アッセイ）、磁気ラベル（磁気免疫アッセイ）または免疫蛍光によって行われ得、また、凝集、比濁法（nephelometry）、比濁法（turbidimetry）、またはウエスタンブロットイングを含む他の技術によって行われ得る。異種性の免疫アッセイは、競合的であってもなくてもよい。免疫アッセイが競合的である場合、反応はサンプル中の抗原の濃度に反比例する。免疫アッセイが非競合的である場合、結果は抗原の濃度に正比例する。本発明において使用され得る免疫アッセイ技術はELISAアッセイ（酵素免疫測定法）である。

30

【0053】

クロマトグラフィ技術を用いて、分子は、ロード、サイズ、分子量、極性または酸化還元能（これらに限定されない。）に従って分離され得る。クロマトグラフィ技術は、液体クロマトグラフィ（分画クロマトグラフィ、吸収クロマトグラフィ、排除クロマトグラフィ、またはイオン交換クロマトグラフィ）、ガスクロマトグラフィまたは超臨界流体クロマトグラフィより選択されるが、これらに限定されない。

40

【0054】

本発明のマイクロアレイ技術は、例えば、本発明のタンパク質を認識する分子を固体支持体上に固定化することに基づいている。抗体ベースのマイクロアレイは最も一般的なタイプのタンパク質マイクロアレイである。この場合、抗体は固体支持体（用語チップもまたマイクロアレイを参照して用いられ得る。）上に固定化される。この抗体を用いて、関連タンパク質の検出を可能にする分子（生物学的サンプル、細胞溶解物、血清または尿が挙げられるがこれらに限定されない。）を捕捉する。本発明において用いられる場合、用語「固体支持体」は、広範な種々の材料をいい、例えば、イオン交換樹脂、吸着樹脂、ガ

50

ラス、プラスチック、ラテックス、ナイロン、ゲル、セルロースエステル、パラ磁気スフェアまたはこれらのいずれかの組合せが挙げられるがこれらに限定されない。

【0055】

腎損傷または腎不全を決定するに有用なデータを提供する方法の別の好ましい実施形態に従って、腎損傷または急性腎不全は、少なくとも1つの腎毒性因子の投与または該因子への個体の曝露によって生成される。より好ましい実施形態は、上記腎毒性因子がアミノグリコシド系抗生物質である方法に関する。

【0056】

腎毒性因子は、投与または曝露に起因して1つ以上の腎臓の病理学を引き起こし得る。この投与または曝露が、一定期間を超えて行われても、単一の事象に限定されてもよく、1つ以上の化合物に起因してもよい。曝露の環境は、無意識、偶発的、故意の、過用量の結果、または治療の必要性（投与）の結果であり得る。腎臓は重要な排出器官である。なぜなら、腎臓は水溶性分子のホメオスタシスを維持し、特定の物質を能動的に濃縮し得るからである。一般に、近位尿細管、遠位尿細管または尿細管は修復され得るが、糸球体および髄質は修復する傾向が極めて低い。

10

【0057】

腎毒性因子は、投与される場合、薬学的組成物（治療剤）であっても、ハロゲン麻酔剤、または機能性食品もしくはビタミンサプリメントもしくは栄養性サプリメントに含まれる化合物であってもよいが、これらに限定されない。腎毒性因子は、曝露される場合、例えば、重金属、抗生物剤（plaguicide）または抗微生物剤であり得るがこれらに限定されない。抗生物剤としては、防カビ剤、除草剤、殺虫剤、抗藻剤（algaecide）、軟体動物駆除剤、ダニ駆除剤または殺そ剤が挙げられるがこれらに限定されない。抗微生物剤としては、殺菌剤、抗生物質、抗微生物剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗原虫薬または抗寄生虫剤が挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0058】

アミノグリコシド系抗生物質（アミノグリコシド）は、細菌リボソームのサブユニット30Sおよび50Sへの結合によって作用し、ペプチジルtRNAの移動を阻害し、mRNAの読み間違いを引き起こし、細菌がその増殖のためにウイルスタンパク質を合成することを不能にしたままにする。アミノグリコシド系抗生物質は、アミカシン、アルベカシン、ゲンタマイシン、ケタマイシン、ネオマイシン、ネチルミシン、パロモマイシン、ロードストレプトマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン、アブラマイシン、スペクチノマイシン、ハイグロマイシンB、ベルだマイシン、アストロマイシンまたはピューロマイシンであり得るが、これらに限定されない。さらにより好ましい実施形態にしたがって、アミノグリコシド系抗生物質はゲンタマイシンである。

30

【0059】

ゲンタマイシンは、グラム陰性好気性細菌の感染を処置するために一般的に使用される、広いスペクトルを有する抗生物質である。アミノグリコシドは、経口投与された場合ほとんど吸収されないが、腎臓によって迅速に濃縮される。さらには、アミノグリコシドは、外膜に位置されるチャネルを介して細菌細胞内へ広がり、細胞質へ移動する。その結果、ゲンタマイシンは細菌タンパク質の合成を阻害することによって作用するが、近位尿細管（特にセグメントS1またはS2）に腎損傷を引き起こし得、これは急性の腎傷害を誘導し得、急性腎不全の発生を引き起こし得る。さらに、急性腎不全は、第二の腎毒性因子の、同時または連続的な投与に起因し得る。この第2の化合物は、例えば、硝酸ウラニルまたはシスプラチンであり得るがこれらに限定されない。硝酸ウラニルは、腎臓の重篤な機能不全および急性の尿細管ネクロシスを引き起こす腎毒性因子である。他の標的器官としては、肝臓、肺または脳が挙げられる。シスプラチンは、広いスペクトルを有する抗腫瘍薬であり、精巣、卵巣、膀胱、皮膚、頸部または肺の腫瘍を処置するために一般的に用いられている。シスプラチンは、細胞内に広がり、DNA鎖の内部または間に侵入することによって機能して、細胞死を引き起こす。

40

【0060】

50

本発明の別の実施形態は、腎損傷または急性腎不全を決定に有用なデータを提供するための方法に関し、ここで、タンパク質は、腎毒性因子の投与または曝露の開始から12時間後より検出される。より好ましい実施形態に従って、タンパク質は、腎毒性因子の投与または曝露の開始から24時間後から検出される。

【0061】

本発明の別の実施形態は、腎損傷または急性腎不全を決定するため、腎損傷または腎不全要因を決定するため、ゲンタマイシンによって引き起こされた腎損傷または腎不全をシスプラチンによって引き起こされたものと差別化するために、有用なデータを提供する方法に関し、本方法は、配列番号1および/または配列番号5またはこれらの任意のフラグメントを検出および/または定量することによって行われる。本発明の別のより好ましい実施形態は、ゲンタマイシンによって引き起こされた腎損傷または腎不全をシスプラチンによって引き起こされたものと差別化するまたは見分けるための方法に関し、ここで：

- a. 配列番号1および/または配列番号5が検出または定量される場合、腎損傷または腎不全の原因がゲンタマイシンの投与または曝露である；
- b. 配列番号1および/または配列番号5が検出または定量されない場合、腎損傷または腎不全の原因がシスプラチンの投与または曝露である。

【0062】

したがって、本発明の方法は、腎損傷または腎不全の原因を差示的に決定するに有用である。本方法は、腎損傷または腎不全がゲンタマイシンの投与または曝露に起因するか、あるいはシスプラチンの投与または曝露に起因するかを見分け得る。この場合、いくつかの可能性がある：

(i) 配列番号1および配列番号5が検出または定量される場合、あるいは配列番号1が検出または定量される場合、あるいは配列番号5が検出または定量される場合、腎損傷または腎不全の原因はゲンタマイシンの投与または曝露である；

(ii) 配列番号1および配列番号5が検出または定量されない場合、あるいは配列番号1が検出または定量されない場合、あるいは配列番号5が検出または定量されない場合、腎損傷または腎不全の原因はシスプラチンの投与または曝露である。

【0063】

本発明の別の局面は、少なくとも1つの腎毒性因子の投与に起因する腎損傷の進行を予測するための方法であり、本方法は、第一に、

(a) 腎毒性因子が曝露された個体または曝露されていない個体から単離された体液中での、タンパク質またはその任意のフラグメントの第1の濃度を決定する工程を包含し、上記タンパク質は以下を含むリストより選択される：

- ・配列番号1または2のアミノ酸配列に少なくとも60%の同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント；
  - ・配列番号3～11のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント；あるいは
  - ・配列番号12～14のアミノ酸配列に少なくとも90%の同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント。
- 第二に、曝露された個体における上記タンパク質の第1の濃度が決定された後、あるいは曝露されていない個体において腎毒性因子の投与または該因子への曝露が開始した後、工程aにおいて濃度が決定されたタンパク質の、個体の体液中での第2の濃度が決定される。そして、

(c) 任意の有意差を見出すために、工程bにおいて得られた第2の濃度を、工程aに含まれた第1の濃度と比較する工程、を包含する。すなわち、腎毒性因子に曝露された個体のサンプルから第1の濃度が決定される場合、第2の濃度は、第1の濃度が決定された後に測定される。腎毒性因子に曝露されなかった個体のサンプルから第1の濃度が決定される場合、第2の濃度は、腎毒性因子の個体への投与または該因子への個体の曝露が開始した後に測定される。第2の濃度は、任意の有意差を求めるために、第1の濃度と比較される。第2の濃度が第1の濃度と比較される場合、あるいは任意の有意差が予め決定された濃度と比較される場合、有意差は、より高い値またはより低い値であり得る。

10

20

30

40

50

## 【0064】

本発明において、用語「進行を予測する」は、腎損傷の進行をモニタリングまたは管理することをまとめていい、換言すれば、少なくとも1つの腎毒性因子の投与に起因する腎損傷の進行を見分けることをいう。

## 【0065】

好ましい実施形態は、少なくとも1つの腎毒性因子の投与に起因する腎損傷の進行を予測するための方法に関し、ここで、工程aおよびbにおいて、配列番号1～14またはその任意のフラグメントを含むリストより選択されるタンパク質の少なくとも1つ、あるいはその任意の組合せが検出および/または定量される。

## 【0066】

別の好ましい実施形態は、少なくとも1つの腎毒性因子の投与に起因する腎損傷の進行を予測するための方法に関し、ここで、配列番号1に少なくとも60%の同一性を有するタンパク質、および/または配列番号2に少なくとも60%の同一性を有するタンパク質、あるいはこれらの任意のフラグメント、の濃度が決定される。より好ましい実施形態に従って、配列番号1のタンパク質および/または配列番号2のタンパク質あるいはこれらの任意のフラグメントが検出および/または定量される。

10

## 【0067】

本発明の別の好ましい実施形態は、少なくとも1つの腎毒性因子の投与に起因する腎損傷の進行を予測するための方法に関し、ここで、配列番号1に少なくとも60%同一なタンパク質またはその任意のフラグメントが決定される。より好ましい実施形態に従って、配列番号1のタンパク質またはその任意のフラグメントが検出および/または定量される。

20

## 【0068】

本発明の別の好ましい実施形態は、少なくとも1つの腎毒性因子の投与に起因する腎損傷の進行を予測するための方法に関し、ここで、配列番号5に少なくとも80%同一なタンパク質またはその任意のフラグメントの濃度が決定される。より好ましい実施形態に従って、配列番号5のタンパク質またはその任意のフラグメントが検出および/または定量される。

## 【0069】

本発明の別の好ましい実施形態は、少なくとも1つの腎毒性因子の投与に起因する腎損傷の進行を予測するための方法に関し、ここで、配列番号1のタンパク質および配列番号5のタンパク質、あるいはこれらの任意のフラグメントが検出および/または定量される。

30

## 【0070】

別の好ましい実施形態は、少なくとも1つの腎毒性因子の投与に起因する腎損傷の進行を予測するための方法に関し、ここで、上記腎損傷は急性腎不全である。

## 【0071】

腎損傷または急性腎不全の進行を予測するための方法の別の好ましい実施形態に従えば、腎毒性因子はアミノグリコシド系抗生物質である。より好ましい実施形態は、アミノグリコシド系抗生物質がゲンタマイシンである方法に関する。

40

## 【0072】

腎損傷または急性腎不全の進行を予測するための方法の別の好ましい実施形態に従えば、腎毒性因子はシスプラチンである。

## 【0073】

腎損傷または急性腎不全の進行を予測するための方法の別の好ましい実施形態に従えば、体液は尿または血清である。

## 【0074】

腎損傷または急性腎不全を決定するに有用なデータを得るための本発明の方法のいずれか、あるいは上述した腎損傷または上述した急性腎不全の進行を予測するための方法のいずれかを参照するために、用語「本発明の方法」が用いられ得る。

50

## 【 0 0 7 5 】

本発明の方法の好ましい実施形態に従えば、個体はヒトである。本発明の方法の個体は動物であってもよい。なぜなら、問題の方法は、獣医学も汽笛に有用だからである。

## 【 0 0 7 6 】

本発明の別の局面は、少なくとも1つのタンパク質またはその任意の組合せの使用であり、上記タンパク質は、腎損傷を決定するため、あるいは、腎損傷の進行を予測するためのバイオマーカーとして

- ・ 配列番号1または2のアミノ酸配列に少なくとも60%の同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント；
  - ・ 配列番号3～11のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント；あるいは
  - ・ 配列番号12～14のアミノ酸配列に少なくとも90%の同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント
- を含むリストより選択される。

10

## 【 0 0 7 7 】

好ましい実施形態は使用に関し、ここで、配列番号1～14を含むリストより選択されるタンパク質またはその任意のフラグメントが検出および/または定量される。

## 【 0 0 7 8 】

別の好ましい実施形態は使用に関し、ここで、配列番号1に少なくとも60%同一性を有するタンパク質および/または配列番号2に少なくとも60%同一性を有するタンパク質、あるいはこれらの任意のフラグメントの濃度が決定される。より好ましい実施形態に従って、配列番号1のタンパク質および/または配列番号2のタンパク質あるいはその任意のフラグメントが決定および/または定量される。

20

## 【 0 0 7 9 】

別の好ましい実施形態は、タンパク質が配列番号1～14を含むリストより選択されるかまたはそのフラグメントである、使用である。

## 【 0 0 8 0 】

本発明の使用の別の好ましい実施形態に従えば、タンパク質は、配列番号1に少なくとも60%同一性を有するタンパク質またはそのフラグメントより選択される。好ましくは、タンパク質は、配列番号1のタンパク質またはそのフラグメントである。

30

## 【 0 0 8 1 】

本発明の別の好ましい実施形態は、使用に関し、タンパク質は、腎損傷の発達の危険性を決定するため、あるいは腎損傷の進行を予測するためのバイオマーカーとして、配列番号5に少なくとも80%同一性を有するタンパク質またはそのフラグメントより選択される。好ましくは、配列番号5またはそのフラグメントが選択される。

## 【 0 0 8 2 】

本発明の別の好ましい実施形態は、使用に関し、腎損傷は急性腎不全である。

## 【 0 0 8 3 】

このバイオマーカーは、腎損傷または腎損傷の進行に関連するタンパク質の発現または状態における変化を示す。一旦バイオマーカーが確認されると、これを用いて腎損傷または腎損傷の進行が診断されるか、そのような腎損傷に個体の処置（例えば、種々の薬物または投与レジメンを用いる処置）を適合させる。

40

## 【 0 0 8 4 】

処置が、腎損傷を罹患する危険性に直接的に関連する、検出されたバイオマーカーの存在または濃度を変更させる場合、その生物学的指示薬は、任意の処置、または任意の腎毒性剤の曝露を改変することを示すものとして働く。

## 【 0 0 8 5 】

タンパク質またはその任意のフラグメントの使用の好ましい実施形態は、腎損傷または腎損傷の進行が少なくとも1つの腎毒性因子の投与に起因する場合の使用である。タンパク質またはその任意のフラグメントの使用のより好ましい実施形態に従えば、腎毒性因子

50

はアミノグリコシド系抗生物質である。別の皿により好ましい実施形態は、アミノグリコシド系抗生物質がゲンタマイシンである場合の使用である。

【0086】

タンパク質またはその任意のフラグメントの使用のより好ましい実施形態に従えば、腎毒性因子はシスプラチンである。

【0087】

本発明の別の局面は、少なくとも1つのタンパク質またはその任意の組合せを認識し得る少なくとも1つ以上のプローブを備えているキットに関し、上記タンパク質は、

・配列番号1または2のアミノ酸配列に少なくとも60%の同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント；

・配列番号3～11のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント；あるいは

・配列番号12～14のアミノ酸配列に少なくとも90%の同一性を有するタンパク質、またはその任意のフラグメント

を含むリストより選択される。

【0088】

好ましい実施形態は、配列番号1～14を含むリストより選択される少なくとも1つのタンパク質またはその任意のフラグメントあるいはその任意の組み合わせをプローブが認識する場合のキットに関する。

【0089】

別の好ましい実施形態はキットに関し、ここで、プローブは、配列番号1に少なくとも60%同一性を有するタンパク質および/または配列番号2に少なくとも60%同一性を有するタンパク質、あるいはこれらの任意のフラグメントの濃度を認識する。より好ましい実施形態に従って、プローブは、配列番号1のタンパク質および/または配列番号2のタンパク質あるいはその任意のフラグメントを認識する。

【0090】

本発明の別の好ましい実施形態はキットに関し、プローブは、配列番号1に少なくとも60%同一性を有するタンパク質またはそのフラグメントを認識する。好ましくは、プローブは、配列番号1のタンパク質またはそのフラグメントを認識する。

【0091】

本発明の別の好ましい実施形態はキットに関し、プローブは、配列番号5に少なくとも80%同一性を有するタンパク質またはそのフラグメントを認識する。好ましくは、プローブは、配列番号5のタンパク質またはそのフラグメントを認識する。

【0092】

本発明の別の好ましい実施形態は、プローブが固体支持体に連結されている、キットに関する。

【0093】

プローブは、一般に（必要ではないが）マーキングされている物質であり、本発明の任意のタンパク質またはそのフラグメントを検出、同定、および/または定量するために使用される。プローブは、チオール基、アビジン、ストレプトアビジンまたはペプチン基と反応するプローブであってもよいが、これらに限定されない。固体支持体は、好ましくは、ゲル（非限定的な例示としてのアガロースゲルまたはアクリルアミドゲル）である。

【0094】

好ましい実施形態はキットに関し、ここで、プローブは、タンパク質またはその任意のフラグメントを認識する抗体である。上記抗体は、ポリクローナルであってもモノクローナルであってもよい。

【0095】

本発明の別の実施形態は、腎損傷を決定するため、あるいは腎損傷の進行を予測するための、個体からの単離されたサンプルにおける上述したキットの使用である。

【0096】

10

20

30

40

50

本発明の別の局面は、腎損傷が発達する危険性を決定するため、腎損傷を決定するため、あるいは腎損傷の進行を予測するための、個体からの単離されたサンプルにおける上述したキットの使用である。

【0097】

本明細書および特許請求の範囲を通じて、用語「含む（含んでいる）」およびそのバリエーションは、他の技術的な特性、添加物、成分または工程を排除することを意図していない。当業者にとって、本発明の他の目的、利益および特徴は、本明細書の記載から部分的に推察され、本発明の実行から部分的に推察される。添付の図面および以下の実施例は、例証の目的で提供され、本発明をその様式に限定することを意図していない。

【0098】

〔図面の簡単な説明〕

図1は、ゲンタマイシンで処理したラットにおける、生存率、および腎損傷マーカーの出現を示す。A：生存率は、7日間の処置の後の、各群において生存する動物の割合を示す。B：7日間の処置の後のコントロールおよび3匹のゲンタマイシンラットからの腎臓のホモジネートにおける、腎臓傷害1分子（KIM-1）および骨形成タンパク質7（BMP-7）の発現レベルの、ウエスタンブロッティング解析の代表的なイメージ。

【0099】

図2は、ゲンタマイシンで処理したラットからの、腎組織切片の皮質および乳頭の代表的なイメージを示す。無作為に選択した、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した、コントロールラット（n=3）およびゲンタマイシン処理ラット（n=3）からの腎組織切片の皮質（A-D）および乳頭（E-H）の代表的なイメージ。イメージA、B、EおよびFは、400倍の倍率にて撮影し、イメージC、D、GおよびHは1000倍の倍率にて撮影した。

【0100】

図3は、コントロールラットおよびゲンタマイシンで処理したラットからの尿タンパク質のSDS-PAGE分離を示す。タンパク質を、ポリアクリルアミドゲル（6%（A）および15%（B））でのSDS-PAGEによって分離し、次いで、クーマシーブリリアントブルーで染色した。バンド（1-24）に存在するタンパク質を、LC-ESI-Q-TOFによって決定し、表3に挙げた。レーン1：分子量パターン、レーン2：コントロール尿、レーン3：ゲンタマイシン群の尿。

【0101】

図4は、差示的に発現されるタンパク質の二次元（2D）電気泳動イメージを示す。Image Master 2D Platinum software (GE Healthcare)を用いた強度の定量的分析は、正常尿サンプルとゲンタマイシン尿サンプルとの間に差示的に発現される129個のタンパク質を示した。スポットを、表4に対応する数字でマーキングし、LC-ESI-Q-TOFおよびMALDI-TOFによって同定した。図中に示されるいずれのゲルも、各群より無作為に選択された動物からの尿を用いて得られた代表的な8個のゲルである。各群を二連で分析した。

【0102】

図5は、差示的に発現されるregIII（A）およびゲルゾリン（B）の2Dゲルイメージによる、尿プロテオミクスを示す。表に対応する数字でラベルしたスポットを、強度の定量的分析に供し、LC-ESI-Q-TOF質量分析機によって同定した。図中に示される各ゲルは、各群において無作為に選択された4匹の動物からの尿を用いて得られた代表的な8個のゲルである。各群を二連で分析した。regIIIbタンパク質はスポット1であり、アクセッション番号がP25031、MW 20kDa、PI 7.56である。ゲルゾリンはスポット2, 3, 4であり、アクセッション番号がQ68FP1、MW 86.1kDa、PI 5.75である。

【0103】

図6は、regIIIb（A）およびゲルゾリン（B）のウエスタンブロッティング解析を示す。A：ピヒクル（コントロール）、ゲンタマイシンまたはシスプラチンで処理し

10

20

30

40

50

た、無作為に選択した6匹のラットの尿のウエスタンブロッティング。矢印は、全長およびt-ゲルゾリンフラグメントを示す。B:Aに示したラットの血清クレアチニンおよびBUN濃度。\*,コントロールに対して $p < 0.05$ ; ,ゲンタマイシンに対して $p < 0.05$ 。

#### 【0104】

図7は、尿中のregIIIb(A)およびゲルゾリン(B)の経時的变化を示す。尿中のregIIIb(A)およびゲルゾリン(B)のウエスタンブロッティング分析の代表的なイメージ、ならびに、ゲンタマイシンで処理したラットのNAG排出および尿タンパク質;血清クレアチニン濃度;KIM-1、NGALおよびLAI-1のウエスタンブロッティング分析;3日間ゲンタマイシンで処理したラットからの、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した腎切片の代表的なイメージ。全ての実験において $n = 3$ 。\*,0時点に対して $p < 0.05$ 。

10

#### 【0105】

図8は、regIIIb(A)およびゲルゾリン(B)の血清レベルのウエスタンブロッティング分析、腎灌流実験およびRT-PCR分析を示す。ビヒクル(コントロール)またはゲンタマイシンで6日間処理した、無作為に選択したラットからの、regIIIb(A.1)およびゲルゾリン(B.1)のウエスタンブロッティング分析の代表的なイメージ。腎灌流実験:ゲンタマイシンで6日間処理したラットからの、regIIIb(A.2)およびゲルゾリン(B.2)の尿中レベルのウエスタンブロッティング分析の代表的なイメージ。次いで、Krebs溶液での腎灌流に供した。灌流の開始直前、灌流中の1時間後および2時間後; $n = 3$ 。A3.ビヒクル(コントロール)またはゲンタマイシンで3日間または6日間処理した、無作為に選択した3匹のラットからのRT-PCRによる、腎組織のregIIIb(A.3)、ゲルゾリン(B.3)およびGAPDHの遺伝子発現。

20

#### 【0106】

〔実施例〕

〔実施例1.実験材料および実験手順〕

##### 1.1 動物および実験手順

メスのウィスターラットは、重量200-250gのものを用いられた。動物は24時間毎のそれぞれの尿サンプル収集のために、調節された環境条件下で個別の代謝ケージの中に配置された。通常の餌および水が適宜投与された。ラットは無作為に2つの群に分割された:(i)コントロール群(C)、6日間毎日プラシーボ腹腔内投与を受けるもの、および(ii)ゲンタマイシン群(G)、6日間ゲンタマイシン腹腔内投与(150mg/kgの体重)を受けるもの。7日目に動物は、ペントバルビタールナトリウムで麻酔され、腎臓は生理食塩水(0.9%NaCl)を用いた解剖によって灌流された。腎臓はただちに解剖された。1つは液体窒素で凍結され、続いてウエスタンブロットの研究のために-80に保持され、もう一つは、組織学的な研究のために3.7%のpホルムアルデヒドに浸された。血液サンプルも、尾の先端の小さい切開によって、異なる時点の、ヘパリン化した毛細血管において得られた。血液は遠心され、血清は、使用まで-80に保持された。尿は、10,000gおよび4で10分間遠心されることによって除去され、使用まで-80に保持された。

30

40

#### 【0107】

##### 1.2 組織学的な研究

腎臓はpホルムアルデヒド中に4で一晩保持された。次にパラフィン固定がなされ、5 $\mu$ mの組織切片が切断され、ヘマトキシリンおよびエオシンを用いて染色された。写真はOlympus DP70カラーデジタルカメラに接続されたOlympus BX51顕微鏡下で撮影された。

#### 【0108】

##### 1.3 生化学的な測定

血清および尿クレアチニンおよび尿素窒素の濃度は市販の試験紙(Roche Diagnostics

50

) およびReflotron (登録商標) 自動解析装置 (Roche Diagnostics) を用いて測定された。クレアチニン濃度測定は、 $0.5 \text{ mg/dL}$  の検出下限を有していた。尿タンパク質濃度は、ブラッドフォード法 (Bradford, 1976. Anal Biochem, 72: 248-254) によって測定された。尿NAG含有量はNAG活性のレベルによって間接的に測定された。NAG酵素的な活性は、プレート光度計 (Thermo) を用いて  $580 \text{ nm}$  において3 クレゾールスルホンフタレイニル N アセチル D グルコサミンの、紫色の3 クレゾール クレゾールスルホンフタレイニルへの置換に基づいた比色分析法によって測定された。NAG活性を測定するために、市販のキットが製造会社の使用説明書にしたがって用いられた (Roche Diagnostics)。

#### 【0109】

10

##### 1.4 ウェスタンブロット

ウェスタンブロットは、(i) 尿サンプル (サンプル毎に  $21 \mu\text{L}$ )、(ii) 均質化バッファー ( $140 \text{ mM NaCl}$ 、 $20 \text{ mM}$  トリス  $\text{HCl}$   $\text{pH} = 7.5$ 、 $0.5 \text{ M}$  エチレンジアミン四酢酸 EDTA、 $10\%$  グリセロール、 $1\%$  Igepal CA 630、 $1 \text{ mg/mL}$  アポロチニン、 $1 \text{ mg/mL}$  ロイペプチン、 $1 \text{ mg/mL}$  ペプスタチンA、 $1 \text{ mM}$  フェニルメチルスルホニルフルオリド - PMSF) 中において4 で組織攪拌器 (Ultra-Turrax T8、IKA (登録商標) -Werwe) を用いて腎臓を均質化することによって調製された組織抽出物 (サンプル毎に  $100 \mu\text{g}$  総タンパク質) または、(iii) アルブミンフリーの血液の血清を用いて実行された。アルブミンはカラムベースの、ラットのアルブミンの免疫学的な保持に基づいた市販のキットを用いて血清から除去された (Qproteome Murine Albumin Depletion Kit、Quiagen)。サンプルは、 $10 \sim 15\%$  アクリルアミドゲル中で電気泳動によって分離された。ただちに、タンパク質は電氣的にImmobilon-P膜 (Millipore) に転写された。膜はKIM 1 (R&D Systems) 骨形態形成タンパク質7 (BMP 7、Santa Cruz Biotechnology)、NGAL (MBL)、PAI 1 (BD Biosciences)、レグIIIb (R&D Systems)、およびゲルゾリン (Santa Cruz Biotechnology) に対する抗体を用いて調査された。

20

#### 【0110】

##### 1.5 一次元および二次元 (1Dおよび2D) 電気泳動的なタンパク質の分離

尿は濃縮され、 $5 \text{ K}$  遮断のAmicon Ultraカラム中で遠心することによる強制濾過によって脱塩された。タンパク質濃度は、ブラッドフォード法によって測定された。1Dの電気泳動的な分離のために  $100 \text{ mg}$  の総タンパク質が、 $6$  および  $15\%$  アクリルアミドゲル (Mini Protean II system、BioRad、マドリッド、スペイン) に泳動するために作製され、クマシーブリリアントブルー G 250を用いて染色された。二次元電気泳動 (2D) のために、尿タンパク質は、製造会社の使用説明書にしたがい、除去キット (GE Healthcare) を用いて沈降された。それぞれのサンプルの  $100 \text{ mg}$  のタンパク質は、 $7 \text{ M}$  尿素、 $2 \text{ M}$  チオ尿素、 $4\%$  チャップス、 $0.5\%$  両性電解質、 $\text{pH} 4 \sim 7$  または  $4.5 \sim 5.5$ 、 $50 \text{ mM}$  ジチオスレート (DTT) およびプロモフェノールブルー中で再水合され、IPGphor装置 (GE Healthcare) を用いて、 $18 \text{ cm}$  長固定化  $\text{pH}$  勾配 (IPG) 試験紙、 $\text{pH} 4 \sim 7$  または  $4.5 \sim 5.5$  (GE Healthcare、マドリッド、スペイン) を通して等電点電気泳動 ( $500 \sim 8,000 \text{ V}$ ) された。IPG試験紙は、 $1\%$  (w/v) DTTを含んでいる、平衡バッファー [ $50 \text{ mM}$  チス (Tris)  $\text{HCl}$ 、 $\text{pH} = 8.8$ 、 $6 \text{ M}$  尿素、 $30\%$  (v/v) グリセロール、 $2\%$  (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、 $0.01\%$  (w/v) プロモフェノールブルー、中で15分間事前に平衡化され、さらに15分間  $2.5\%$  (w/v) ヨードアセトアミドを含んでいる平衡バッファー中で事前に平衡化された。その後、IPG試験紙は  $18 \text{ cm}$  長の  $12\%$  アクリルアミドゲルに移され、SE 600 Ruby装置 (GE Healthcare) を用いた電気泳動によって分離された。ゲルは、 $30\%$  エタノールおよび  $10\%$  酢酸中で一晚固定され、市販のキットを用いて (GE Healthcare) 銀染色された。他に示されていないならば、全ての試薬はSigmaのものである。

30

40

#### 【0111】

50

可視化および解析のために、染色されたゲルは、スキャンされ (Image Scanner、GE Healthcare、マドリード、スペイン)、Image Master 2D Platinum 6.0ソフトウェア (GE Healthcare、マドリード、スペイン) によって処理され、統計学的に解析された。スポットの識別は下記のパラメータにしたがって行われた: (i) スムース係数: 2; (ii) 最小面積: 5 ピクセル; (iii) 突極性: 100。解析は、アーチファクトの排除のために視覚的に収集された。それぞれの個別のスポットのためにバックグラウンドが引かれ、個別の強度量は全体の強度量 (全てのスポット強度) によって標準化された。ゲル間の同じスポットの比較として、最小2倍差が特異な発現を考慮するために確立された。

#### 【0112】

1.6 二次元液体クロマトグラフィー (クロマトフォーカス+逆相) (2D LC) ProteomeLab PF2D system (Beckman Coulter) が用いられた。濃縮および脱塩された尿は、室温で30分間、最適化バッファー (7.5 M尿素、2.5 Mチオ尿素、12.5%グリセロール、62.5 mMトリス HCl、pH = 7.8-8.2、2.5% (w/v) n-オクチルグルコシド、6.25 mMトリス (カルボキシエチル) ホスフィン塩化水素) 中で希釈された。このバッファーは続いてPD-10カラム (GE Healthcare) を用いて開始バッファー (pH 8.5 ± 0.1、Beckman Coulter) によって置換された。最初の分画の3.5 mlが回収され、タンパク濃度が定量された。次に、1 mgのそれぞれのサンプルが、クロマトフォーカスイオン交換カラムに置かれ、線形下行性pH勾配 (8.5 ~ 4) の手法により等電点に基づいてpH 0.3の分画に溶出された。それぞれのpH分画は続いて、アセトニトリル中に0.08% TFAが0.75 mL/minで存在し、上記Aは水中の0.1% TFAである5-100%の直線性勾配で実行されるC18非多孔質カラム (RP HPLC) を用いた、逆相高性能液体クロマトグラフィーによってタンパク質の疎水性に基づき50で分離された。0.6 minの逆相の分画は回収され、-80に保持された。吸光度は、二次元において214 nmで測定され、データは32 Karat and Delta Viewソフトウェア (Beckman Coulter) を用いて解析された。

#### 【0113】

1.7 1Dの分離、2Dの分離、および2D LC分離からのタンパク質の同定  
1Dおよび2Dの分離 (それぞれ) からの対象のバンドおよびスポットはゲルから切り取られた。それぞれのゲルの切り取ったものは、アセトニトリル中で脱水され、真空乾燥され、残渣はNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>中に再懸濁された。したがって、1D、2D、および2D LC由来のサンプルは同一に処理された。サンプルは、続いて56において50 mM NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>中の10 mM DTTを用いて還元された。続いて、タンパク質は、4において30分間ブタトリプシン (Promega) を用いてゲル内で消化された。ペプチドは続いて、0.5% トリフルオロ酢酸 (TFA) を用いて抽出された。溶液は真空乾燥され、ペプチドは、破碎下で0.1% 蟻酸に溶解された。ペプチド含有溶液は、1100マイクロHPLC (Agilent) を用いてLC9 ESI QUAD TOF質量分光光度計QSTAR XL (Applied Biosystems) に注入された。細孔径150 × 0.32 mm (5 μm) Supelcoカラム (Discovery BIO) は、7 L/minの流速で用いられた。MS/MSスペクトルが得られた。タンパク質の同定は、非重複のタンパク配列データベース (SwissProtおよびNCBI) に対し、MASCOTソフトウェア (www.matrixscience.com) を用いて行われた。質量の許容差は、50 ppmに設定され、MS/MS許容差は0.5 Daであり、分類学的な状態はRattusであった。MASCOT可能性解析によって同定されるとき、重要な該当するもののみが考慮され、20以上のイオンスコアを観測する少なくとも1つのペプチドが、許容性の閾値として設定された。いくつかの場合では、LC ESI QUAD TOFの手順では不明確ではないタンパク質の同定が行われず、または無作為に選択されたスポットにおいて、確認のために、タンパク質は、サラマンカ大学CSIC癌研究センター (サラマンカ、スペイン) のプロテオミクスサービスでUltraflex I MALDI TOF質量分光光度計 (Bruker Daltonics) を用いて同定された。

#### 【0114】

1.8 質量分析によるタンパク質同定

2 D の分離由来の対象ののスポットはゲルから切り取られ、アセトニトリルで脱水され、真空乾燥され、 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ で残渣を再懸濁された。サンプルは続いて56において50 mM  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ 中の10 mM DTTを用いて還元され、50 mM  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ 中のヨロアセトアミドを用いてアルキル化された。タンパク質は、ブタトリプシン (Promega) を用いてゲル内で消化され、ペプチドが0.5%トリフルオロ酢酸 (TFA) を用いて抽出され、真空乾燥され、0.1% (v/v) 蟻酸に再溶解された。ペプチド含有溶液は、1100マイクロHPLC (Agilent) を用いてLC9 ESI QUAD TOF質量分光光度計 QSTAR XL (Applied Biosystems) に注入された。細孔径150 x 0.32 mm (5  $\mu\text{m}$ ) Supelcoカラム (Discovery BIO) が用いられた。MS/MSスペクトルが得られた。タンパク質の同定は、非重複のタンパク配列データベース (Swiss Prot および NCBI) に対し、MASCOTソフトウェア (www.matrixscience.com) を用いて行われた。質量の許容差は、50 ppmに設定され、MS/MS許容差は0.5 Daであり、分類学的な条件はRattusであった。MASCOT可能性解析によって同定されるとき、重要な該当するもののみが考慮され、20以上のイオンスコアを観測する少なくとも1つのペプチドが、許容性の閾値として設定された。確認のために、いくつかのタンパク質がUltraflex I MALDI TOF分光光度計 (Bruker Daltonics) を用いて同定された。

10

#### 【0115】

##### 1.9 遺伝子発現解析

レグIIb、ゲルゾリン、およびGAPDHのRT-PCR増幅が、次のプライマー：ラットのレグIIbに対しては、配列番号15および配列番号16；ラットのゲルゾリンに対しては配列番号17および配列番号18；ラットのグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) に対しては、配列番号19および配列番号20を用いて行われた。PCR条件は：1x (95 x 4分)；30x (95 x 1分 + Tm x 1分)；1x (72 x 10分)；ここで、レグIIbに対しTmは55.5、ゲルゾリンに対し55.0、およびGAPDHに対し55.9であった。

20

#### 【0116】

##### 1.10 腎臓の排出の研究

処理の最後に、いくつかの変更を加えつつ、他の文献 (69) に記載されてように、6日間ゲンタマイシンで処理されたラットは麻酔がかけられ、腎臓の灌流のための体外循環回路が設置された。簡潔には、右の腎臓の動脈、静脈および尿管が結合された。左の腎臓の動脈、静脈および膀胱はカニューレ処理された。酸素を加えられ、あたたかい (37)、クレブスデキストラン溶液 [クレブス溶液 (118.3 mM NaCl、4.7 mM KCl、1.8 mM CaCl<sub>2</sub>、1.2 mM MgSO<sub>4</sub>、1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、25 mM NaHCO<sub>3</sub>、0.026 mM EDTA、11.1 グルコース、pH = 7.4) 中において40 g/Lのデキストラン (分子量64K - 76K)] が3 mL/minで腎臓の動脈を通じて灌流され、腎臓の静脈を通じて廃棄された。尿の分画は、クレブス溶液を用いた灌流を開始する前 (血液がまだ腎臓を通過しているとき)、およびクレブス溶液を用いた灌流の開始された後の2時間の間、膀胱に設置されたカテーテルから回収され、全ての尿サンプルは、レグIIbおよびゲルゾリンの存在のためのウェスタンブロットによって解析されるまで、-80に保持された。

30

40

#### 【0117】

##### 1.11 統計学的な解析

データは、それぞれの場合で示されているように、n回行われた実験の平均値 ± 標準誤差で表されている。(上記に示されているように)、プロテオミクスの結果の研究を除いて、統計学的な比較は、1つの方法、ANOVA解析によって評価された。正規分布が (少なくとも3回の、以下の試験を受けて) 評価された：非対称性による残渣の正常性、尖度による残渣の正常性、包括による残渣の正常性、および改変されたリーベンによる分散の均一性。シェッフェ試験が統計学的な重要性を決定するために用いられた。p < 0.05の値が重要であると見なされた。

50

## 【 0 1 1 8 】

〔実施例 2 . ゲンタマイシン誘導性の腎臓の損傷の特性〕

7日間の処理後、ゲンタマイシンは、関連する死亡率の約50%となる著しい腎臓の損傷（急性の腎臓傷害または急性の腎臓不全）の要因となった（図1および図2）。生存している動物は、少ないが重要な体重減少および多尿症の経過をたどった。急性の腎臓不全は、さらにGFRの還元を示している血清クレアチニンおよびBUN濃度の劇的な増加によって特徴づけられた。広範囲の尿細管の損傷を示している、NAGの排出も広範囲で増加した。タンパク尿もゲンタマイシンで処理された動物の尿に明白であった（表2）。

## 【 0 1 1 9 】

【表2】

表2.コントロール群に対し $p < 0.05$ における7日間の処理後のコントロールおよびゲンタマイシンラットの（初期重量のパーセントとして示されている）体重、血漿クレアチニン濃度、血中尿素窒素（BUN）、タンパク尿、NAG排出、および尿流。両方の群の実験開始時において $n=12$ である。

	$\Delta$ 重量 (%)	クレアチニン (mg/dL)	BUN (mg/dL)	尿タンパク質 (mg/日)	NAG (UA/日)	尿流 (mL/日)
コントロール	105±4	<0,5	45.9±1.9	7.3±0.9	54±11	10±1
ゲンタマイシン	95±3 <sup>a</sup>	3.3±0.4 <sup>a</sup>	435,8±47.9 <sup>a</sup>	40±7.4 <sup>a</sup>	744±212 <sup>a</sup>	18±3 <sup>a</sup>

a.コントロール群について $p \leq 0.05$ である。両方の群の実験開始時において $n=12$ である。

## 【 0 1 2 0 】

〔実施例 3 . 腎臓の組織学的な研究〕

ヘマトキシリン - エオシンを用いて染色された腎臓の切片（図2）はゲンタマイシンラットの明確な尿細管の壊死を示し、ここで、大規模な上皮の破壊が観察され得る。糸球体の重要な変化は明らかではない。毛乳頭レベルで、ヒアリン物質による回収管の妨害は、ゲンタマイシンを用いて処理された動物に一般的である。これらの研究は、観察された広範囲の腎臓の機能不全の少なくとも一部に対して、形態学的な裏付けを提供する。

## 【 0 1 2 1 】

〔実施例 4 . 尿の特異なプロテオミクスの解析〕

本研究では、3つの異なるプロテオミクスの手法（1D SDS-PAGE、2D、ならびに2D-LC）および、2つの質量分析技術（LC ESI QUAD TOFならびにMALDI TOF）がタンパク質同定に用いられた。この組合せは、部分的に重複しており、部分的に非重複性であることを証明した。1Dの典型的な結果は、図に示されている。図3は、コントロールおよびゲンタマイシンラット由来の尿の典型的なSDS-PAGEのプロファイリングを表しており、上記SDS-PAGEから24個の特異に豊富なバンドが抽出および解析され、上記バンドの一つ一つはいくつかのタンパク質を含んでいた。バンド13~16はコントロール群において最も豊富であり、一方でバンド1~12および17~24はゲンタマイシン群において最も豊富であった。この手法によって同定されたタンパク質は表5に挙げられている。

## 【 0 1 2 2 】

予備の研究ではコントロールおよびゲンタマイシンの尿のタンパク質分布プロファイルは等電点によって決定された。ほとんどのタンパク質は、4~7の間のpHに含まれていた。予備の研究では、著者らは幅広いpHの範囲（2~10）をカバーしているIPG試験紙を用いた。pH7を超える範囲に欠陥があるため、および、比較的少ないタンパク質がpH7~10の範囲で失われたため、著者らは2Dの分離の1次元目のために、4~7のpH範囲で実験を行うことを決定した。図4の上のパネルは、ゲンタマイシンで処理したコントロールラット由来の尿サンプルの2Dのゲル（pHの範囲4~7）の典型的な画

10

20

30

40

50

像を示している。非常な類似性が、同じ群の動物由来のサンプル間で観察されており、2Dの分離が同じサンプルを用いて繰り返されたとき、高い再現性が得られた。多くのタンパク質が、4.5～5.5のpHの範囲に集中した。この理由のため、同じ尿サンプルの同じ2Dの分離は、このpHの範囲でも行われた。このことの顕著な画像が図4の下のパネルに示されている。両方の場合で、特異に存在し、統計学的に重要なスポットが認識され、コントロールとゲンタマイシンの群との間の化学的な同定のために番号を付けられた。(図4は、特異的なタンパク質がより豊富に現れる群に対するスポットに関連する番号を示している)。

#### 【0123】

両方の群の尿のプロテオームは、統計学的に異なっている。最初の段階で、コントロールのラットの尿よりもゲンタマイシン処理をされたラットの尿中で顕著により多くのスポットが同定された。4～7のpHの範囲では、コントロールの群から、606個のスポットが同定され、ゲンタマイシンの群から933個のスポットが同定された。4.5～5.5のpHの範囲では、スポットの数はそれぞれ358個および724個であった。これらのうち、両方の群の間で、129個の特異に発現されているスポットが見出された(ゲンタマイシンの群において37個の過剰発現されたスポット、およびコントロールの群において92個のスポット)。これらの129個のスポットの質量分析のデータは、それらのうち98個をタンパク質データベースにおいて、34個のタンパク質のイソ型または転写後に修飾されたバリエーションに相当しているものとして同定した(ゲンタマイシンの群において23個が増加し、コントロールの群において11個が増加した;表4を参照)。

#### 【0124】

2種類のコントロールの動物および2種類のゲンタマイシンで処理された動物の尿の特異なプロテオームの相補的な研究が、2D-LCの手法にしたがって行われた。同じ群のサンプル間の類似性は良好であり、同じサンプルを用いた異なる実験の結果の再現性も非常に高かった。特異に豊富な分画のMS解析は、22個のタンパク質を同定した(表5参照)。これらのタンパク質の多くは、2HS糖タンパク質、ヘモペキシン、血清アルブミン、T1キニノーゲン、トランスフェリン、ビタミンD結合タンパク質、および尿タンパク質1、2、3のような、2Dの手法にしたがって見出されたものと一致していた。これらのタンパク質の多くも、バリエーションまたはイソ型の存在を確認する、いくつかの反応において同定された。興味深いことに、この手法は1Dおよび2Dによって検出されなかったいくつかのタンパク質を同定した。これは、例えば2ミクログロブリンおよびシスタチンCの場合である。1つ気をつけなければならないことは、液体の分画の結果として、2Dの手法にしたがっても同定されたタンパク質のほとんどにとって、より良好な範囲の配列が得られたということである。

#### 【0125】

特異に1D、2Dおよび2D-LCを用いたタンパク質の分離の手法は、部分的に重複しているのみでなく、非重複性であって、それらの相補的な値を明白にしていることも証明した。

#### 【0126】

〔実施例1～4の結果の解析〕

本発明では、尿は、個体群の規模における日常的な解析にとって好適な個体のサンプルとして選択された。腎臓の疾患の場合では、このことは、単純な非外傷性の入手可能性によって便利であるだけでなく、当該組織から重要な診断材料を集めることが容易である、病理学的な活動が起こっている組織に直接接触するためでもある。

#### 【0127】

尿のサンプリングは、無作為の尿のサンプルに対しアミノグリコシドの抗体の処理または投与の開始の24時間後に実行され得る。24時間のサンプリングは、本発明の任意のタンパク質の一日の排出の計算を通じてより精密なおよびより正確な標準化を可能にする(マーカー)。しかしながら、臨床的な背景におけるその使用は、患者の部分集合に限定される。一方で、無作為のサンプルは、一般に個体群の解析により良いものを提供する。

しかしながら、潜在的なマーカーの存在のレベルは、尿の濃度に強く依存し得、結果および結論を変更し得る。尿の濃度を標準化する試み（すなわち、尿のクレアチニン濃度による）は、標準化のパラメータは病理学的な条件でしばしば変化するため、誤った結果も導き得る。

#### 【0128】

これらの不便性を解決する1つの試みは、尿中の存在が攻撃（例えば、薬剤）の結果として排出されるタンパク質全ての分画として、関連する期間に（増加または減少のどちらであっても）変化する本発明の任意のタンパク質の尿のプロファイルを作成することによって行われることである。臨床的な実習における応用のために、特定の診断におけるマーカータンパク質の大きさは、解析された尿サンプル中のタンパク質の総量に対する標準化の結果でなければならない。したがって、この目的のために、本研究において著者らは、サンプル毎に同じ量のタンパク質を用いたタンパク質含量によって、尿サンプルを標準化し、次に、特異なプロテオミクス技術によって同定される、本発明の任意のタンパク質の相対的な存在量を調査した。

#### 【0129】

理論的な観点から、尿中の本発明の任意のタンパク質の、絶対的なまたは相対的な存在量の増加または減少はいくつかの因子の結果であり得る：（i）糸球体の濾過における変化および血液または細胞外の腎臓部の空間からの、タンパク質の尿細管組織の分泌における変化；（ii）マーカーは、損傷した、または修復中の腎臓の組織由来であり得、；（iii）変化する存在量は、一般的に、妨害された再吸収能力の結果であり、または特異的には尿細管組織のレベルでもあり得；（iv）最後に、非常に重要なことに、マーカーは、存在している腎臓の組織において変化した、または変化していない合成、シグナリング経路、膜貫通型の輸送または開口分泌由来、または細胞外区画由来であり得る。

#### 【0130】

本発明では、プロテオミクスの技術の利用を通じて健康体の（コントロール）ラットに対してゲンタマイシンでネフロイントキシケートド（nephrointoxicated）ラットの尿中に増加されて現れる多数の腎臓の損傷のマーカータンパク質が見出された（表6）。ゲンタマイシン群の14個体のラットは、明白なタンパク尿を示したため、これらのマーカータンパク質の排出は、少なく見積もられていることを考慮しなければならない。これは、これらの動物において増加しているものとして同定されたマーカータンパク質の日単位の分泌が、それらの尿中の相対的な存在量より数倍高いということの意味している（ゲンタマイシン群におけるタンパク質の排出はコントロール群におけるものより5倍高い、表2）。両方の群由来の尿中のタンパク質の、1Dおよび2Dの電気泳動的なプロファイルの解析（図3および図4）は、低分子量のタンパク質（<35KDa）の相対的な存在度がコントロールのラットにおいて高いことを明確に示している。しかしながら、中程度の分子量（MW）（35~65KDa）のタンパク質は、ゲンタマイシン処理されたラットにおいて相対的により豊富である。後者において、1Dの実験から、コントロール群由来のラットには存在しない、高分子量のタンパク質（HMW）（65KDa）が、ゲンタマイシンを用いた処理の結果として現れることは、特に明白である。これらの大きなタンパク質はほぼ200KDa以上で見出され得る（図3、バンド17~22）。尿中のHMWタンパク質の存在からは、通常は限外濾過から排除される、より大きいタンパク質に対する許容性を上昇させる、糸球体濾過障壁（GFB）の傷害の症状を通常は考えられる。しかしながら、濾過障壁、異なる尿細管組織の部分、尿管または膀胱を形成している構造のような、尿への直接の接触における腎臓の構造の剥脱の結果として高分子量のタンパク質が現れ得る。糸球体濾過障壁の明らかな機能障害の結果として起こる、腎炎型のタンパク尿は、尿中に非特異的な範囲の分子量のタンパク質の出現を生み出すことが予測される。しかしながら、より特異的、および微妙な損傷は、尿中のいくつかの高分子量のタンパク質の出現の要因となるのみであろうということも考えられ得る。本発明のゲンタマイシンを用いて処理された動物の場合、ほとんどのタンパク質が、閾値より大きい関連するいくつかのタンパク質とともに、通常は濾過されるタンパク質（例えば、

10

20

30

40

50

およそアルブミンの大きさ)の大きさの上限の周辺またはそれより小さい大きさに集中して出現した。

【0131】

しかしながら、これらのHMWタンパク質と共に、多くの低分子量(LMW)のタンパク質の排出もゲンタマイシンを用いた処理後の増加する(表6参照)。

【0132】

これらのデータは、全体として、非常に腎毒性がある、および腎臓を損傷する、このゲンタマイシンレジームは、50%の死亡率に関連する、著しい腎臓の機能不全を生み出していることにも関わらず、糸球体濾過障壁の濾過機能を穏やかに変化させたのみであることを示している(図1および2)。

10

【0133】

尿の最終的な組成物への尿細管の再吸収および分泌過程の影響は、尿細管のレベルにおけるゲンタマイシンの影響の結果であるだけではない。限外濾過の組成物は、おそらく競合の過程によって特異的にタンパク質の再吸収も変化させる。したがって、この事実の結果として限外濾過において特異的に変化したタンパク質の内容は、攻撃の特異的な尿のマーカーを提供することに加えて、それ自身の尿細管の過程も改変する。

【0134】

図1および2にみられる結果は、尿細管のレベルにおいて濾過されるタンパク質の回復を深刻に減少させる、ゲンタマイシンによって引き起こされる明白な尿細管の機能不全を指摘している(表2)。

20

【0135】

表6は主にMMWおよびLMWタンパク質を挙げている。多くの他の腎臓疾患におけるように、これらのタンパク質のほとんどは、血液由来であって、ゲンタマイシンを用いた処理後、それらの尿の排出は増加を示しており、このことは、低下した尿細管の再吸収の一般的なモデルを証明している。

【0136】

他の腎臓疾患と共通して、特異に検出されたタンパク質(表6)は、カテプシンB、いくつかのタンパク質分解酵素(アルファ1抗トリプシン、シスタチンC、インター-アルファ-トリプシン阻害因子、セルピンA3L、および種々の急性期および免疫応答のタンパク質(アルファ1ミクログロブリン、アルファ2HS糖タンパク質、セルロプラスミン、補体C3ならびにC9、ハプトグロビン、ヘモペキシン、イムノグロブリン、リゾチームC、Tキニノーゲン)を含んでいる。それらの増加した排出は、不均衡化した尿細管組織の再吸収と組合せられ、(過剰濾過の結果としてだけでなく、血液中のそれらの高レベルのため)限外濾過において増加した存在量によって説明され得る。

30

【0137】

特異に検出されたタンパク質全てにおいて(表6)、下記のタンパク質の尿の値の増加は、腎臓損傷の診断値と共にバイオマーカー値を有している:タンパク質レグ3B、フェチュインB、Ras関連GTP結合タンパク質A、セルピンA3L、COP9のサブユニット1、ATP合成酵素のガンマサブユニット、ゲルゾリン、リボヌクレアーゼUK114、アミノアシラーゼ1A、アルファ-エノラーゼ、ケラチン5、バルブアルブミンアルファ、リボヌクレアーゼ4、セルピンA3K。これらのタンパク質は今までに、腎臓疾患を診断するための有効なデータを得ることに関係したことがなく、または、診断そのものに用いられたことはなかった。ゲルゾリンおよびセルピンA3Kを除き、これらのタンパク質は、通常は、血液には存在していない。血液中の任意の上記タンパク質の増加は、ゲンタマイシンによって引き起こされる腎臓中で起こる現象の結果である。腎臓損傷および/またはゲンタマイシンのようなアミノグリコシドの抗生物質によって引き起こされる急性の腎臓不全の予後におけるそれらの使用をさらに模索するための重要な候補も存在する。

40

【0138】

さらに、腎臓の皮層の特異なプロテオミクスの解析は、ゲンタマイシンが、(i)糖新

50

生および解糖（例えば、フルクトース 1, 6-ビスホスファターゼおよびアルファ エノラーゼ）；(ii) 脂肪酸の輸送および代謝（例えば、脂肪酸輸送タンパク質、アセチル CoAカルボキシラーゼ、メチルアシル CoAラセマーゼ）；(iii) クエン酸回路（例えば、ATP特異的スクシニルCoA合成酵素、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ）；および(iv) ストレス応答（例えば、モエシン、SPI1、dnaK型分子シャペロン）に主に関連するタンパク質の過剰制御の要因となることを明らかにした。1つの例外は、ゲンタマイシンを用いて処理された試験ラットの尿中においても増加する、アルファ エノラーゼである（表4および6）。腎臓の組織と尿との間のタンパク質のモデルの改変におけるこの逸脱は、おそらく、腎臓に由来する本発明のバイオマーカータンパク質のほとんどは、増加した生産物の結果ではなく、むしろおそらく(i) 腎臓の細胞からの変化した分泌、または(ii) 尿中に排出された、剥がれ落ちた、もしくは損傷した組織および細胞の残渣を反映している。

【0139】

【表 3】

表3.コントロールラットについてゲンタマイシンで処理されたラット由来の尿サンプルのSDS-PAGE(一次元電気泳動;1D)のバンド中に同定されたタンパク質であり、ここで、ゲンタマイシンコントロール群に存在するタンパク質はそれらのタンパク質が不在のコントロール由来のタンパク質と同様に留意され、また、逆もまた同様である。二次元電気泳動(2D)においても同定されたタンパク質は太字で強調されている。

バンド	タンパク質	登録番号	スコア	ペプチド	被度(%)
1	ビタミンD結合タンパク質	P04276	340	12	19
	アルファ抗タンパク分解酵素前駆体	P17475	216	13	19
	血清アルブミン前駆体	P02770	156	7	9
2	血清アルブミン前駆体	P02770	154	11	17
	Igガンマ-2AC鎖	P20760	69	2	6
	アルファ-1-抗タンパク分解酵素前駆体	P17475	37	1	1
	ゲルリン前駆体	Q68FP1	21	2	2
3	血清アルブミン前駆体	P02770	134	10	14
4	血清アルブミン前駆体	P02770	27	1	2
5	ハプトグロビン前駆体	P06866	52	5	13
6	ハプトグロビン前駆体	P06866	165	9	23
7	血清アルブミン前駆体	P02770	34	1	1
	インター-アルファ-トリプシン阻害因子重鎖前 H3 鎖前駆体	Q63416	25	1	0
8	血清アルブミン前駆体	P02770	428	19	25
	C3補体前駆体	P01026	119	7	2
	ヘパキシン前駆体	P20059	71	4	7
	AMBPタンパク質前駆体	Q64240	41	2	3
	セルビリンA3L前駆体	P05544	40	3	6
9	C3補体前駆体	P01026	226	9	3
	血清アルブミン前駆体	P02770	83	8	10
	セロトランフェリン前駆体	P12346	43	1	1
	AMBPタンパク質前駆体	Q64240	36	1	2
10	血清アルブミン前駆体	P02770	139	8	11
	対立遺伝子A Igカプ C鎖	P01836	36	1	7
11	血漿レチノール結合タンパク質前駆体	P04916	23	1	4
12	リボヌクレアーゼ UK114	P52759	31	1	7
13	対立遺伝子B Igカプ C鎖	P01835	313	6	41
14	尿タンパク質2前駆体	P81828	117	2	13
	対立遺伝子A Igカプ C鎖	P01836	77	1	13
	エプリンA型受容体7前駆体	P54759	39	1	12
	腺性カクイン7前駆体	P36373	23	1	3
15	尿タンパク質1前駆体	P81827	298	7	28
	プロラクチン誘導性前駆体	O70417	82	3	21
	主要尿タンパク質前駆体	P02761	48	1	4
	尿タンパク質2前駆体	P81828	37	1	13
16	未決定				
17	未決定				
18	セルロプラスミン前駆体	P13635	74	4	3
19	未決定				
20	未決定				
21	未決定				
22	セロトランフェリン前駆体	P12346	786	29	35
	Ras-関連GTP結合タンパク質A	Q63486	32	1	1
	COP9シグナソームサブユニット1	P97834	32	1	1
23	血清アルブミン前駆体	P02770	97	5	7
24	血清アルブミン前駆体	P02770	806	28	41
	T-キナーゼン1前駆体	P01048	57	1	2
	ヘパキシン前駆体	P20059	41	1	1

【表 4】

表4.2次元ゲノムタンパク質(2D)によって同定された、コントロール群に対してゲンタマイシン群の増加または減少している尿レベルにおけるタンパク質

タンパク質	登録番号	MW サイズ (kDa)/pI	スポット 番号	スコア	p <sup>+</sup> 値	被度(%)
<b>I.コントロールに対して発現レベルの増加したタンパク質</b>						
アルファ-1-抗タンパク質分解酵素前駆体	P17475	46.1 / 5.7	292	259	7	14
			299	334	11	22
			320	45	3	6
			332	363	11	26
			866	240	12	19
アルファ-2-HS-糖タンパク質前駆体	P24090	38 / 6.05	216	154	4	11
			225	125	6	23
			229	148	4	11
			241	106	4	11
			248	109	4	11
			268	25	1	1
血清アルブミン前駆体	P02770	68.7 / 6.09	385	212	6	12
			650	106	3	4
			658	119	4	7
			659*	318	23	40
			662	91	4	7
アンギオテンシノーゲン前駆体	P01015	52 / 5.37	310	146	4	8
			321	51	2	3
			322	260	7	16
			341	63	2	3
			352	135	4	9
ハプトグロビン前駆体	P06866	38.6 / 6.1	497	220	12	26
			502	279	10	20
			508	230	10	26
			511	457	15	30
			517	266	11	26
			653	290	12	24
			668	226	11	23
669	513	18	33			
カプシリン B 前駆体	P00787	37.5 / 5.36	459	35	2	5
補体 C3 前駆体	P01026	186.5 /	447	132	6	4
			556	80	5	1
			557	145	7	3
			560	98	5	2
ケルソリン前駆体	Q68FP1	86.1 / 5.75	400	100	3	3
			403	85	3	3
			409	77	3	3
ケラチン	Q6P6Q2	62 / 7.61	621	64	1	2
T-キノーゲン 1 前駆体	P01048	48 / 6.08	184	253	8	17
			191	319	8	16
			198	442	11	30
セルビオン A3L	gi 29293811	46.5 / 6.04	379	337	9	22
ビタミン D 結合タンパク質	P04276	53.5 / 5.65	307	55	2	3
			316	555	16	31
			349	378	12	15
ベータ-2-糖タンパク質前駆体	P26644	33.2 / 8.59	254	108	4	11
			268	178	3	11
アルファ-エノラーゼ	P04764	47.1 / 6.16	436	79	5	10
フェチン B 前駆体	Q9QX79	41.5 / 6.71	315	61	3	5
			328	247	7	7
			339	272	9	15
			348	288	9	30
ヘモキシリン前駆体	P20059	51.4 / 7.58	152	329	14	30
			153	375	14	29
			154	311	14	22
インター-アルファ-トリプシン阻害因子重鎖 H3 前駆体	Q63416	99.1 / 5.85	655	107	2	1
			666	97	2	1
血漿リチン結合タンパク質前駆体	P04916	23.2 / 5.69	963	184	6	19
トランスチリン前駆体	P02767	15.7 / 5.77	1.066	38	3	19
ミトコンドリア ATP 合成酵素のガンマサブユニット	P35435	30.2 / 8.9	951*	94	7	26
レグ 3B	P25031	20.0 / 7.56	1054*	107	7	46
アミノシラーゼ 1A	Q6AYS7	46.0 / 6.03	528*	433	26	75

【表 5】

## II.コントロールに対して発現レベルの減少しているタンパク質

ケルチリン前駆体	Q68FP1	186.5 / 6.12	190	186	9	9
対立遺伝子 B Ig カップ C 鎖	P01835	11.6 / 4.97	311	126	5	49
			352	86	1	12
			387	107	2	13
			504	66	1	12
			518	36	1	12
			670	164	4	33
			391	113	2	13
			403	108	2	27
			413	127	4	41
436	68	1	12			
腺性カリクレイン 7 前駆体	P36373	28 / 5.63	376	54	3	9
			378	53	2	6
			494	59	1	3
ケラチン I 型細胞骨格 15	Q61FV3		675	80	3	5
			192	108	3	5
			187	109	3	5
尿タンパク質 1 前駆体	P81827	11 / 6.67	597	60	1	10
			617	74	1	10
			619	72	1	10
			629	148	3	28
			835	65	1	10
尿タンパク質 3 前駆体	P83121	11 / 6.85	597	67	1	13
すい臓のアルファ-アミラーゼ 前駆体	P00689	57.2 / 8.34	239	57	3	2
			244	27	2	2
カロキナーゼ型トランスミン活性因子受容体	P29598	47 / 8.07	421	132	6	14
主要尿タンパク質前駆体	P02761	20.7 / 5.85	515	40	1	4
			570	136	5	18
			793	100	6	20

10

20

30

【 0 1 4 2 】

【表 6】

表5.二次元液体クロマトグラフィー(2D-LC)によって同定されたコントロール群に対するゲンタマイシン群の増加または減少している尿レベルにおけるタンパク質

タンパク質	登録番号	分画番号
<b>I.コントロールに対して発現レベルの増加したタンパク質</b>		
ベータ-2-ミクログロブリン前駆体 - Rattus norvegicus(ラット)	P07151	1
アルファ-HS-糖タンパク質前駆体 - Rattus norvegicus(ラット)	P24090	4
AMBPタンパク質前駆体 - Rattus norvegicus(ラット)	Q64240	1
補体成分 C9 前駆体 - Rattus norvegicus(ラット)	Q62930	1
シスタチン - C 前駆体 - Rattus norvegicus(ラット)	P14841	3
ハエモグロビンサブユニットベータ-1 - Rattus norvegicus(ラット)	P02091	1
ヘモキシン前駆体 - Rattus norvegicus(ラット)	P20059	5
対立遺伝子 A Ig カップ C 鎖 - Rattus norvegicus(ラット)	P01836	2
リゾチーム C1 型前駆体 - Rattus norvegicus(ラット)	P00697	3
パルプアルブミン - アルファ - Rattus norvegicus(ラット)	P02625	1
リボヌクレアーゼ 4 前駆体 - Rattus norvegicus(ラット)	O55004	1
セルピン A3K 前駆体 - Rattus norvegicus(ラット)	P05545	4
セロトランスフェリン前駆体 - Rattus norvegicus(ラット)	P12346	6
血清アルブミン前駆体 Rattus norvegicus(ラット)	P02770	18
T-キナーゼン 1 前駆体 - Rattus norvegicus(ラット)	P01048	2
T-キナーゼン 2 前駆体 - Rattus norvegicus(ラット)	P08932	1
トランスレチン前駆体 - Rattus norvegicus(ラット)	P02767	2
ビタミン D 結合タンパク質前駆体 - Rattus norvegicus(ラット)	P04276	3

<b>II.コントロールに対し発現レベルの減少したタンパク質</b>		
タンパク質 - アルギニンテイミンナーゼ 2 型 - Rattus norvegicus(ラット)	P20717	2
尿タンパク質 1 前駆体 - Rattus norvegicus(ラット)	P81827	10
尿タンパク質 2 前駆体 - Rattus norvegicus(ラット)	P81828	14
尿タンパク質 3 前駆体 - Rattus norvegicus(ラット)	P83121	2

【 0 1 4 3 】

【表 7】

表6.1D、2D、および/または2D-LCの電気泳動的な分離を通じて、コントロールのラットに対し、ゲンタマイシンで処理をしたラットの排出の増加した尿中において検出されたタンパク質のまとめ。太字で強調されたタンパク質は事前に腎臓の損傷に関連していないものである。タンパク質はアルファベット順に挙げられている。

タンパク質	検出技術
<b>アミノアシラーゼ 1</b>	2D
アルブミン	1D, 2D, 2D-LC
<b>アルファ - エノラーゼ</b>	1D, 2D
アルファ - 1 - ミクログロブリン	1D, 2D-LC
アルファ - 2 - HS - 糖タンパク質	1D, 2D-LC
アンギオテンシノーゲン	2D
<b>ATP 合成酵素、ガンマサブユニット</b>	2D
ベータ - 2 - 糖タンパク質 1	2D
ベータ - 2 - ミクログロブリン	2D-LC
カテプシン B	2D
セルロプラスミン	1D
補体 C3	1D, 2D
補体 C9	2D-LC
<b>GOP9 シグナローム、サブユニット 1</b>	1D
シスタチン C	2D-LC
<b>フェチイン B</b>	2D
<b>ゲルゾリン</b>	1D, 2D
ハプトグロビン	1D, 2D
ハエモグロビン、サブユニットベータ 1	2D-LC
ヘモキシリン	1D, 2D, 2D-LC
Ig ガンマ - 2A, C 鎖	1D
Ig カッパ 鎖, C 領域	1D, 2D-LC
インター - アルファ - トリプシン阻害因子、重鎖 H3	1D, 2D
インター - アルファ - トリプシン阻害因子、軽鎖	1D, 2D-LC
<b>ケラチン 5</b>	2D
リゾチーム C 1 型	2D-LC
<b>パルプアルブミンアルファ</b>	2D-LC
<b>Ras - 関連 GTP 結合タンパク質 A</b>	1D
<b>レグ 3B</b>	2D
レチナル結合タンパク	1D, 2D
<b>リボヌクレアーゼ 4</b>	2D-LC
<b>リボヌクレアーゼ UK114</b>	1D
セリン(またはシステイン)タンパク分解酵素(阻害因子)、クレート F、メンバー 1	2D
<b>セルピオン A3K</b>	2D-LC
<b>セルピオン A3L</b>	1D
セロトランスフェリン	1D, 2D-LC
T - キナーゼ 1	1D, 2D, 2D-LC
T - キナーゼ 2	2D-LC
トランスレチン	2D, 2D-LC
ビタミン D 結合タンパク質	1D, 2D, 2D-LC

## 【 0 1 4 4 】

〔実施例 5 . 尿の特異なプロテオミクスの解析。レグ I I I b およびゲルゾリン。〕  
コントロールおよびゲンタマイシン処理されたラット由来の尿の 2 D ゲル ( pH 範囲 4  
7 ) の典型的な画像は図 5 の上のパネルに示されている。多くのタンパク質が pH 4 .  
5 5 . 5 の範囲に集中している。そのため、この pH の範囲における 2 D の分離も、同  
じ尿を用いて行われた。これらの後者の典型的な画像は、図 5 の下のパネルに示されてい

10

20

30

40

50

る。非常な類似性が、同じ群の動物由来のサンプル間で観察され、品質の確認のための同じサンプルを用いた2Dの分離を繰り返したときに、高い再現性が得られた。しかしながら、両方の群の尿のプロテオームは、統計学的に異なっている。コントロールとゲンタマイシンの群との間の、統計学的に重要な、特異に存在するスポットが認知され、化学的な同定のための番号が振られた。質量分析の解析は、通常は異なるタンパク尿の条件で見出される、他のタンパク質のほとんどを除いた後に潜在性の興味を示した、ゲンタマイシン処理されたラットの尿中において増加した3つのタンパク質の同定を明らかにした。それらは再生する島由来のタンパク質3ベータ(レグIIIB)およびゲルゾリンとして同定された(図5)。

#### 【0145】

〔実施例6．レグIIIBおよびゲルゾリンはゲンタマイシン処理されたラットの尿中に特異に排出される。〕

ゲンタマイシン処理されたラットの尿中における増加した尿レベルのこれらのタンパク質は、ウェスタンブロット解析によって確認された。さらに、シスプラチンの腎毒性のレジームを用いて処理されたラット由来の尿も解析された。図6 Bは、6個体のコントロールラット、ゲンタマイシンを用いて処理された6個体のラットおよび、シスプラチンを用いて処理された6個体のラット由来の血清クレアチニン濃度およびBUNのデータを示している。そのデータは、処理された動物は、明白な腎臓損傷を示したことを証明している。それらの尿は、レグIIIBおよびゲルゾリンの含量も解析された。図6 Aは、シスプラチン処理されたラットにおいて同程度の腎臓損傷を受けているにも関わらず、尿レベルのレグIIIBは、ゲンタマイシン処理された動物においてのみ顕著に増加していることを明確に示している。ゲルゾリンのウェスタンブロットは、2本の反応性のバンドを示した。高い方の物は全長のタンパク質と一致し、一方で低い方のものはその断片と一致している。反応性のバンド内のゲルゾリンの存在はMS/MS質量分析によってさらに再確認された。ゲンタマイシンを用いた処理は、全長のゲルゾリンと43kDaの断片との両方の、尿中の出現を誘導する。しかしながら、シスプラチンを用いて処理された全てのラット由来の尿には、それらのうちの1個体を除き、全長のバンドは存在しなかった。他のシスプラチン処理されたラット由来の尿の広範囲の解析は、全長のバンドの不在を示している。

#### 【0146】

〔実施例7．レグIIIBおよびゲルゾリンの尿の排出の経時的な進化〕

我々は、さらに、ゲンタマイシンで処理されたラットのこれらのタンパク質の尿の排出の経時的な進化を解析した。図7は、ゲンタマイシンによって与えられる腎臓の損傷の時間的なプロファイルを示している。血清クレアチニン、NAG排出、タンパク尿、およびKIM-1、NGAL, ならびにプラスミノゲン活性因子阻害因子1(PAI-1)のような、腎臓の損傷の、尿レベルの3つの感受性のマーカーの進化によって示されているように、著しい損傷が4日間の処理の後のみ起こっている。蓄積された知見(44)と一致して、血清クレアチニンは少なくとも試験された全てのマーカーの中でもっとも感受性が弱く、処理の3日後の腎臓の切片の組織学的な解析は、尿細管の損傷は見られないことを示している。この時点で、エンドソームの区画のゲンタマイシンの蓄積(45、46)、および開口分泌経路および、エンドソームの輸送の変化(47、48)を報告しているその他の文献の結果から、尿細管の上皮細胞の細胞質の空胞化が顕著である。この筋書きでは、ウェスタンブロット解析は、レグIIIBが、第4日目を開始する、最も多くの他の腎臓の損傷の感受性のマーカーとともに、尿中に出現することを示した。興味深いことに、KIM-1、PAI-1、NGAL、およびNAGを含んでいる、全ての他のマーカーが出現するかなり前に、尿のゲルゾリン(~43kDaの断片)は早くも第1日目には出現し、処理の間高い出現を保っている。

#### 【0147】

〔実施例8．尿のレグIIIBおよびゲルゾリンの起源〕

コントロールおよびゲンタマイシン処理されたラット由来のアルブミン欠乏の血清のウ

10

20

30

40

50

エストンブロット解析は、血液の区画で（この技法の検出限界に対し）レグ I I I b は存在しないが、一方で、ゲルゾリンは見出されることを示した。その上、ゲンタマイシンは、血清レベルの、この後者をわずかに増加している（図 8 B）。RT PCR によって腎臓の組織において実行された遺伝子発現解析は、これらの 2 つのタンパク質は、通常は腎臓で発現されていることを示した。ゲンタマイシンを用いたラットの処理は、ゲルゾリンの腎臓の発現パターンを改変しないが、まだ、検出可能な腎臓の損傷が起こっていないときである（図 7）、早くも第 3 日目にはレグ I I I b 遺伝子の発現の増加を誘導し（図 8 A）、第 6 日目には、レグ I I I b の発現は最も高い。

#### 【 0 1 4 8 】

糸球体濾過障壁を通じてを尿へ流すはずの、これらの尿タンパク質の起源が血液であるかどうか調べるため、我々は、（膨張圧を補うためにデキストランを含んでいる）クレブス溶液に添加したゲンタマイシンを用いて 6 日間のあいだ処理されたラットの腎臓を灌流した。我々は、腎臓の血流をクレブス溶液で置換する直前に、尿中にまだレグ I I I b およびゲルゾリンが検出され得ることを見出した（図 8）。しかしながら、いったん腎臓の血流がクレブス溶液流に置換されると、ゲルゾリンは尿から消失し、レグ I I I b の上の方のバンドはまだ検出されたが、一方で下の方のバンドは消失した。

#### 【 0 1 4 9 】

##### 〔 実施例 5 ~ 8 の結果の解析 〕

腎毒性は、世界的に相当な健康および経済的な問題を引き起こしている。それは、臨床的に興味深い分子でなければ廃棄することにつながる、医薬発見の過程に伴う失敗の重要な理由である。最も重要なことには、100 種類の、集中治療室において最も使用される医薬の約 25% は潜在的に腎毒性である。その上、腎毒性は、急性の腎臓不全の場合の 10 ~ 20% を占めていると見積もられている。AKI の最適な臨床的な取り扱いの重大な局面は、早期の診断である。新しく、より感受性の強い尿のマーカーに基づき、徐々により早期となる検出について、この 10 年で重要な進歩がなされた。（Vaidya VS, Ferguson MA and Bonventre JV, 2008. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 48: 463-493）。しかしながら、AKI 診断は、促進されたセラノスティクスおよびより個別化した医薬のための個別の医薬において未だ改良され得る。この論文では、我々は、ゲンタマイシンの腎毒性とシスプラチンによって起こるものとを潜在的に差別化するための新規の尿マーカーのいくつかの証拠を提供する。それらは、ゲンタマイシンの薬学的なプロファイルをより明確にし、同様に、臨床的な有用性を改良する助けとなるであろう。

#### 【 0 1 5 0 】

レグ I I I b および全長のゲルゾリンは、ゲンタマイシンの腎毒性の、特異な、または病因学的な診断に対する潜在能力を有する。それらは、ゲンタマイシンによって誘導される顕在的な腎臓の損傷を有するラットの尿中に出現するが、シスプラチンによって与えられる、類似の程度の腎臓損傷を有するラットの尿中には存在しない。レグ I I I b は、4 つの遺伝子（レグ I、I I、I I I、および I V）のいくつかの分泌タンパク質産物を含んでいる、カルシウム依存性レクチン（C 型レクチン）スーパーファミリーの 17 k D a のメンバーである（Zhang YW, Ding LS and Lai MD, 2003. *World J Gastroenterol*, 9: 2635-2641）。レグ遺伝子は、ヒト、ラット、およびマウスを包含する、異なる哺乳類の種において見出された。ラットのレグ遺伝子は、4 p 3 3 q 3 4 の染色体領域に位置している。ヒトにおいては、レグ I V 以外の全てのレグ遺伝子は、2 p 1 2 の領域に位置している。一般論として、レグファミリータンパク質は、もっとも顕著には膵炎だけでなく、肝臓の損傷、糖尿病および癌を含んでいる、多くの生物学的および病理学的な状況における組織の再生に関与している（Zhang YW, Ding LS and Lai MD, 2003. *World J Gastroenterol*, 9: 2635-2641）。我々の実験は、レグ I I I b が、ゲンタマイシン処理の間の腎臓の損傷および修復に関係し得、重要なことには、それが、特異な尿のマーカーとして用いられ得ることを示唆している。我々はこのタンパクを血清中に検出できなかったため、尿のレグ I I I b は腎臓の組織中で発生し得ると考えた。確かに、我々のデータは、腎毒性の、尿ならびに血清のマーカー、および組織学的な発見にも先立って、腎臓において

10

20

30

40

50

ゲンタマイシンによって、レグ I I I b の発現が強く誘導されることを示している（処理の第 3 日目、図 8 A）。ゲンタマイシンを用いた処理に対するレグ I I I b の腎臓の発生は、腎臓の灌流における我々の実験によってさらに支持されている。我々は、事前にゲンタマイシンを用いて処理されたラットの腎臓の血流を、灌流されたクレブス溶液に急激に置換したときにおいても、尿中にレグ I I I b を観察した（図 8 A . 2）。尿のレグ I I I b は、2 D のゲルの 2 つのスポットと一致している、ウェスタンブロット解析における 2 重のバンドとして現れる。しかしながら、ゲンタマイシン処理されたラットの腎臓の回路において血液がクレブス溶液に置換される時、尿中において上の方のバンドのみが検出される。我々は、下の方のバンドが、血清のタンパク分解酵素、または血清成分によって活性化された腎臓のタンパク分解酵素によって生じたタンパク分解性の断片に一致しているということ推測のみし得る。

10

## 【 0 1 5 1 】

ゲルゾリンは、ゲルゾリンスーパーファミリーの、高度に保存された 8 2 k D a のタンパク質である。細胞骨格組織および運動性、シグナリング、アポトーシスを包含する多くの正常な細胞の工程における再構築 (Kwiatkowski DJ, 1999. *Curr Opin Cell Biol*, 11: 103-108) ; および、炎症、癌、アミロイドーシスのような病態生理学的な条件 (Spinardi L and Witke W, 2007. *Subcell Biochem*, 45: 55-69) に関与している。ゲルゾリンは、多くの細胞の種類において発現し、分泌もされ、脊椎動物の血液中に通常見出される。ゲルゾリンは、排出およびアポトーシスの制御に関与している、4 2 k D a のタンパク質分解性の断片を得る、作動因子カスパーゼ 3 の基質として知られている (t ゲルゾリン ; Sakurai N and Utsumi T, 2006. *J Biol Chem*, 281: 14288-14295) 。我々の結果は、尿のゲルゾリンも、ゲンタマイシンの腎毒性の特異な診断のマーカーとして改良され得ることを示している。実際に、ウェスタンブロットの研究における、全長のタンパク質に一致するバンドは、ゲンタマイシン処理されたラットの尿中出现するが、シスプラチン処理されたラットにおいてはほとんど存在しない。対照的に、t ゲルゾリンのような、我々のゲルにおける ~ 4 3 k D a のバンドは、ゲンタマイシン群およびシスプラチン群の両方に共通している。図 8 に示されている結果は、ゲルゾリン遺伝子の発現は、(コントロールに対して) ゲンタマイシンを用いて処理されたラットの腎臓において変更されないということを示している。それらはさらに、腎臓の血流がクレブス溶液に置換される時、ゲルゾリンは尿中から消失することを示しており、このことは、尿のゲルゾリンは、おそらく糸球体濾過障壁を通じて血液から濾過されているということを示唆している。これは、なぜ全長のゲルゾリンが、ゲンタマイシンを用いて処理されたラットの尿中に検出され、シスプラチンを用いて処理されたものでは検出されないが、t ゲルゾリンは両方の処理の後出現するのかということ説明し得る。ゲンタマイシンは、特異的なタンパク質の濾過の促進を導く、G F B の機能の変更をする。ゲンタマイシンのポリカチオンの電荷は G F B の静電的な機能を変化させ、(ゲルゾリン、p I = 5 . 7 5 のような) 負に帯電したタンパク質の透過性を促進し、正に帯電したもののふるい係数を低下させる (Cojocel et al., 1983. *Toxicol Appl Pharmacol*, 68: 96-109) 。G F B のふるい分け機能がシスプラチンに対しては変化しないことが報告されている。この場合、全長のゲルゾリンが大きさの制限のため、G F B を通過するものから排除されるはずである。しかしながら、より低分子量であるため、G F B を通じてより容易に濾過できるので、t ゲルゾリンは、任意の場合において、血液中で補足されない。尿細管の壊死の場合は、より大量のタンパク質が、尿中で検出され得る、障害のある尿細管の再吸収能をスケープする。図 7 に示されているように、t ゲルゾリンは、従来および新規の A K I マーカーであって後者は、K I M 1、N G A L、N A G および P A L 1 を含んでいるものよりも著しく早くゲンタマイシン処理されたラットの尿中出现する。これは、ゲンタマイシンの腎毒性の初期の監視にも利用され得る。

20

30

40

## 【 0 1 5 2 】

本研究は、より良いセラノスティックな利用およびこの薬剤の効果のために、前臨床的および臨床的な設定においてさらに改良される必要がある、ゲンタマイシンの腎毒性の特

50

異なる診断のための2つの新規な尿のバイオマーカーの候補を提供する。その上、多剤投与を包含する腎臓の保全性に、潜在的に影響している複合的な状態に進行する、臨床患者に対し、AKIの病因学的な診断の、潜在的な応用の原理の証明を主張している。病因学的な診断は、臨床的な実習において、およびAKIの腎臓以前、ならびに腎臓以降の要因に広く用いられる多くの他の潜在的に腎毒性のある薬剤に応用されるべきである。このことは、危険にさらされている患者の臨床的な処置および最適治療計画を適切に、および選択的に作り変えるために、望ましくない腎臓の効果の発生を特異に区別するマーカーの傾向の概略を示すことを可能にするであろう。

【図面の簡単な説明】

【0153】

【図1】ゲンタマイシンで処理したラットにおける、生存率、および腎損傷マーカーの出現を示す図である。

【図2】ゲンタマイシンで処理したラットからの、腎組織切片の皮質および乳頭の代表的なイメージを示す図である。

【図3】コントロールラットおよびゲンタマイシンで処理したラットからの尿タンパク質の、SDS-PAGE分離を示す図である。

【図4】差示的に発現されるタンパク質の二次元(2D)電気泳動イメージを示す図である。

【図5】差示的に発現されるregIII(A)およびゲルゾリン(B)の2Dゲルイメージによる、尿プロテオミクスを示す図である。

【図6】regIII(A)およびゲルゾリン(B)のウエスタンブロッティング分析を示す図である。

【図7】尿中のregIIIb(A)およびゲルゾリン(B)の経時的変化を示す図である。

【図8】regIIIb(A)およびゲルゾリン(B)の血清レベルのウエスタンブロッティング分析、腎灌流実験およびRT-PCR分析を示す図である。

10

20

【 図 3 】

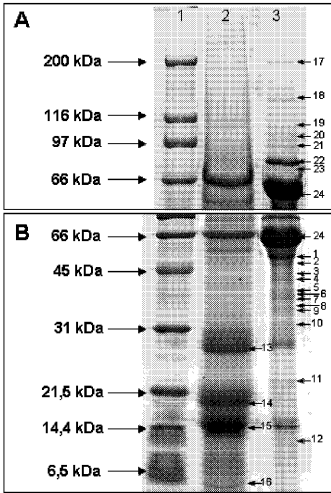
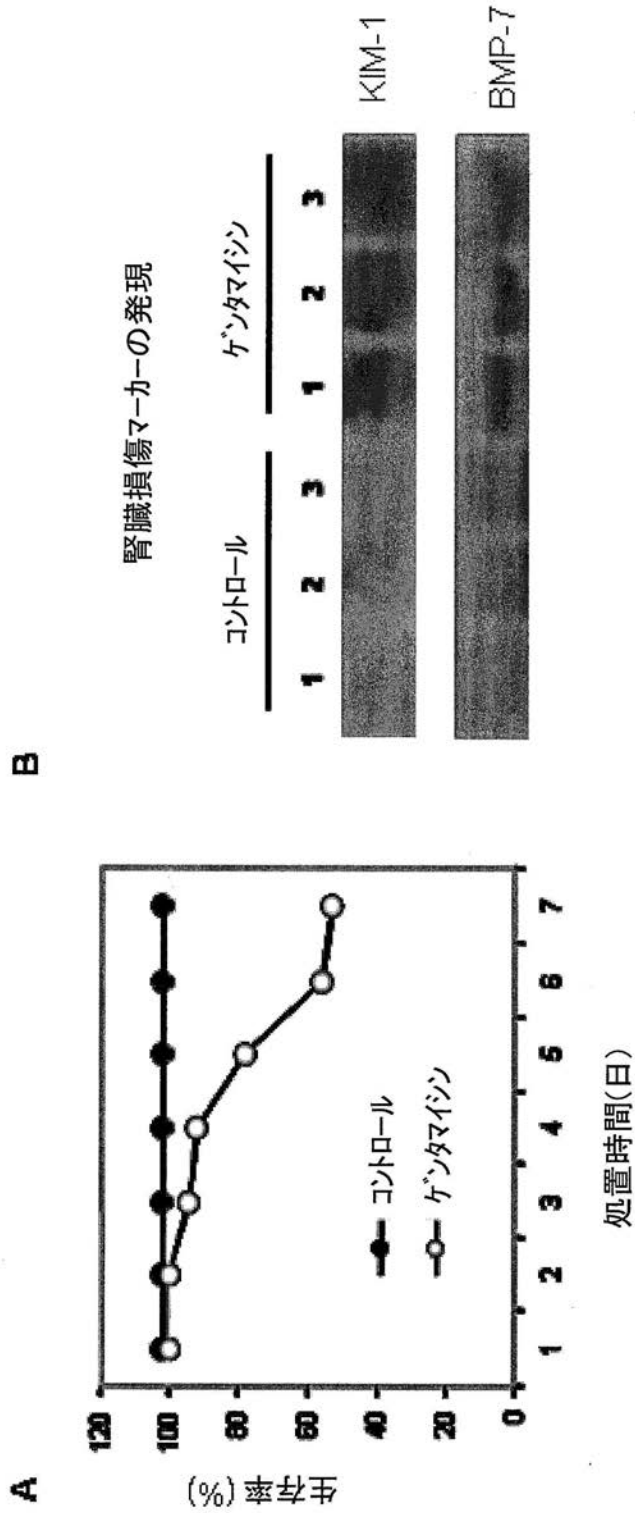
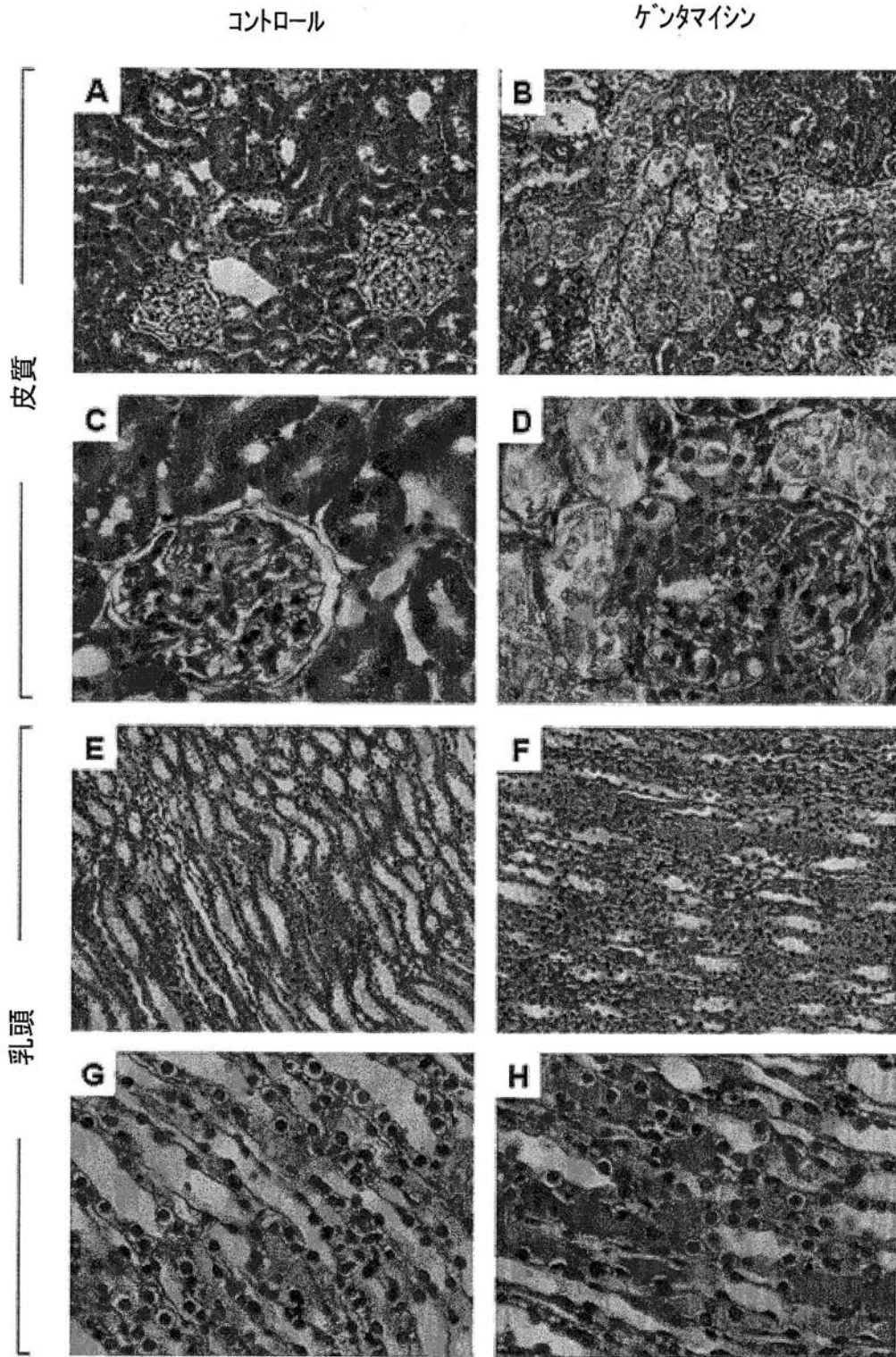


FIG. 3

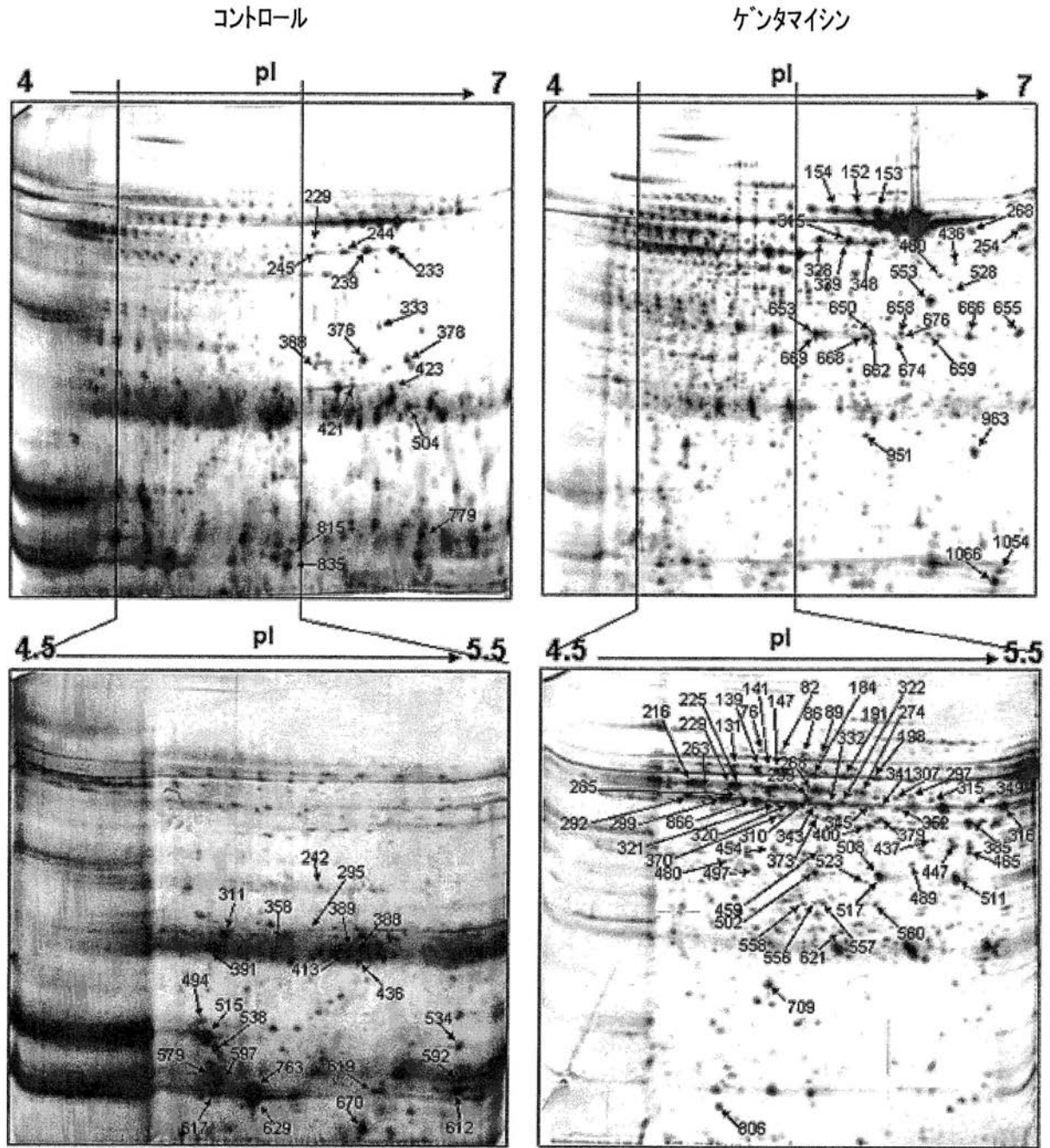
【 図 1 】



【 図 2 】



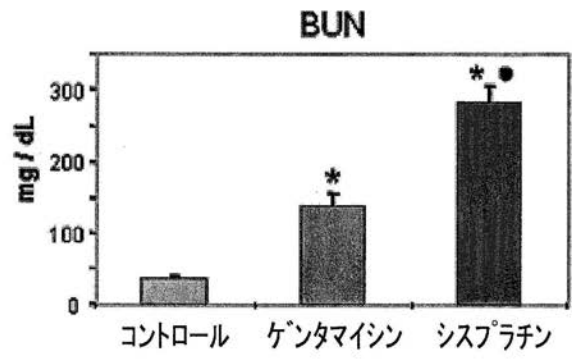
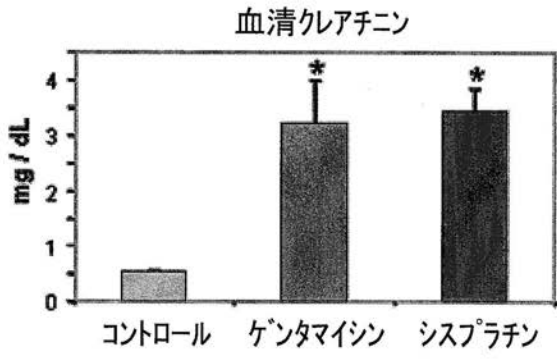
【 図 4 】



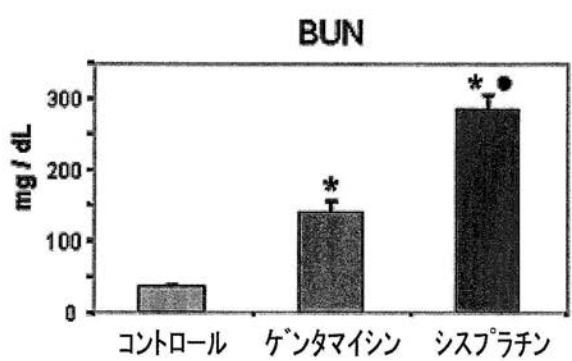
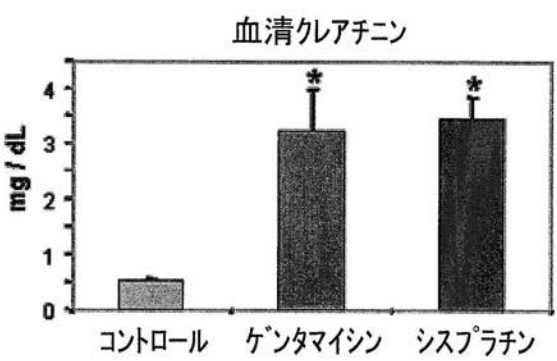
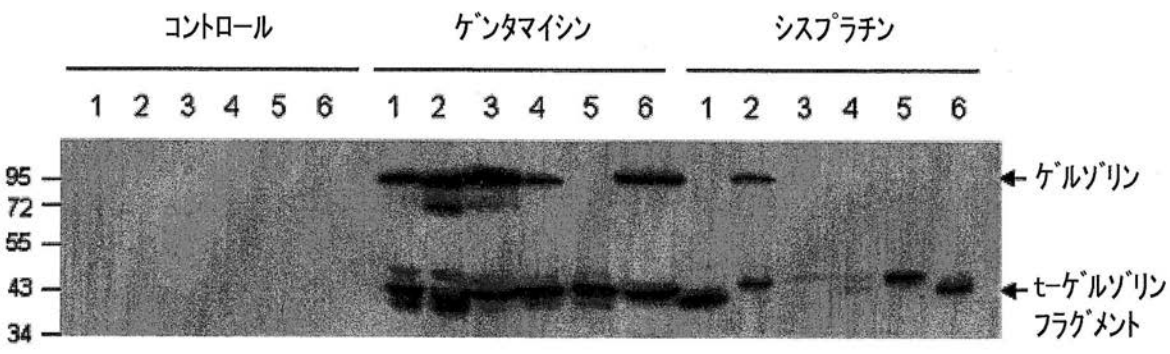


【 図 6 】

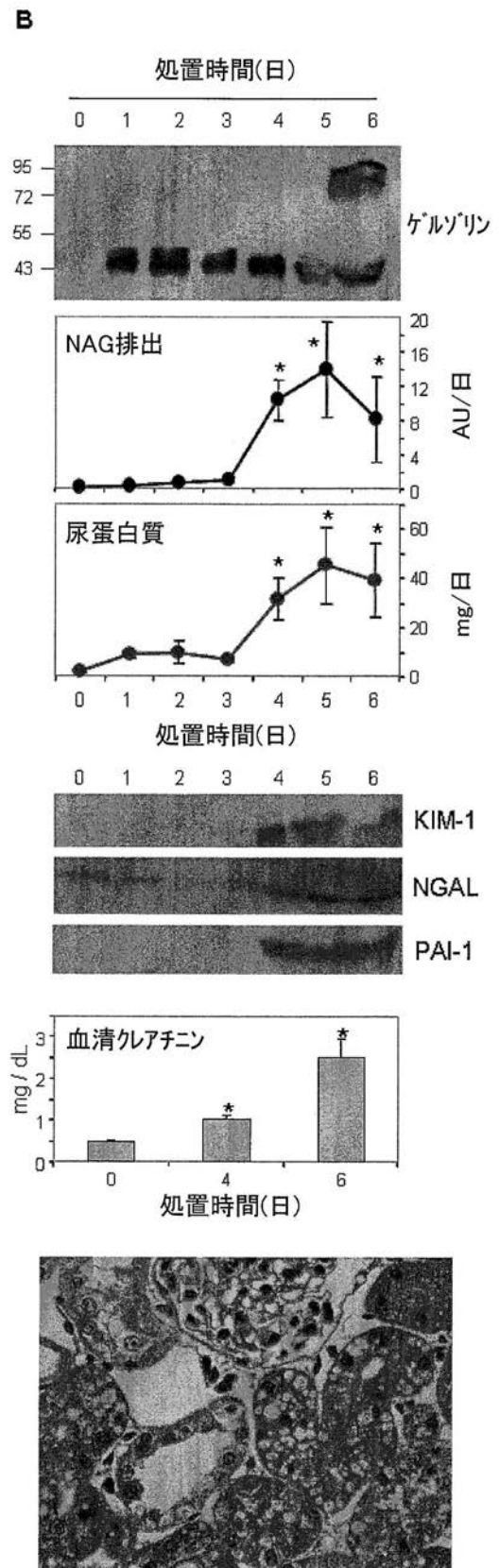
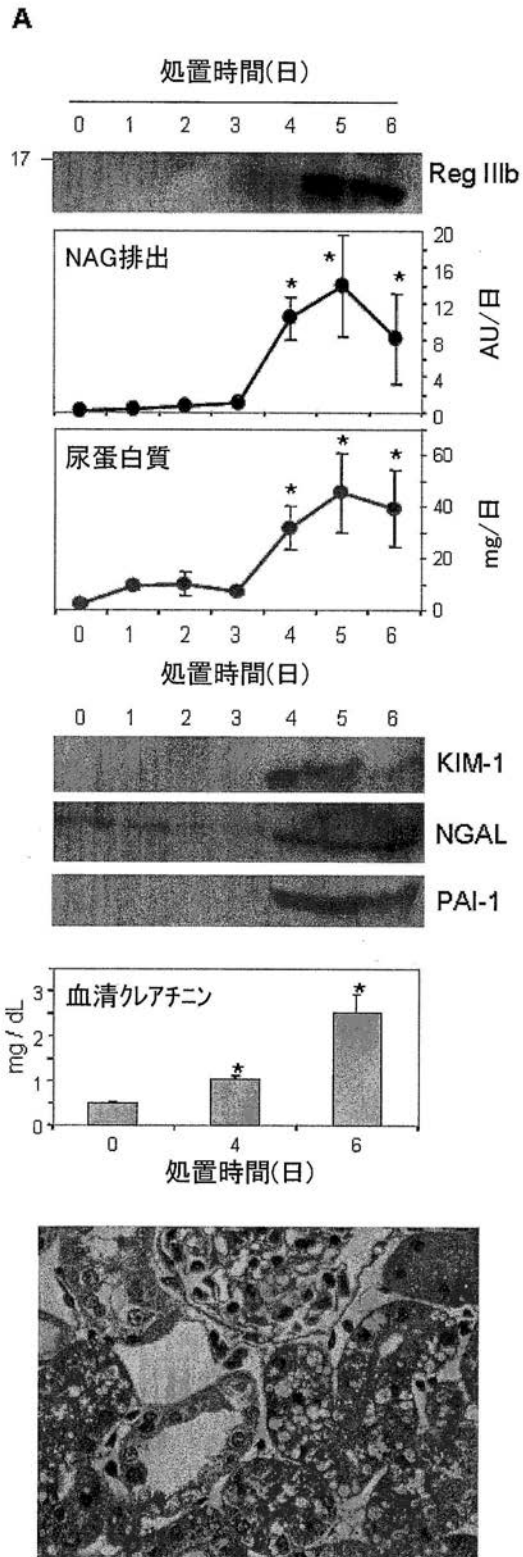
**A**



**B**



【 図 7 】



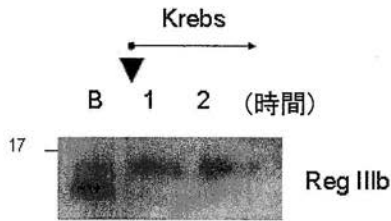
【 図 8 】

**A**

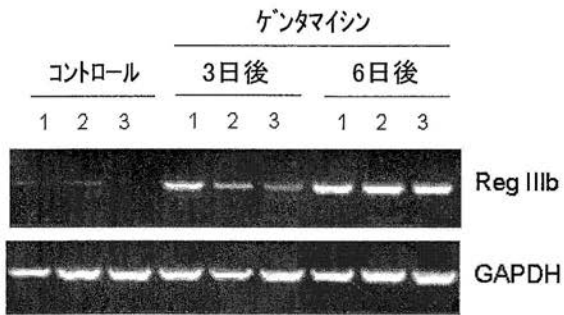
**A.1. 血清レベル**



**A.2. 腎灌流**



**A.3. 腎組織遺伝子発現(RT-PCR)**

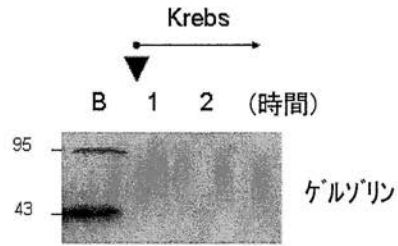


**B**

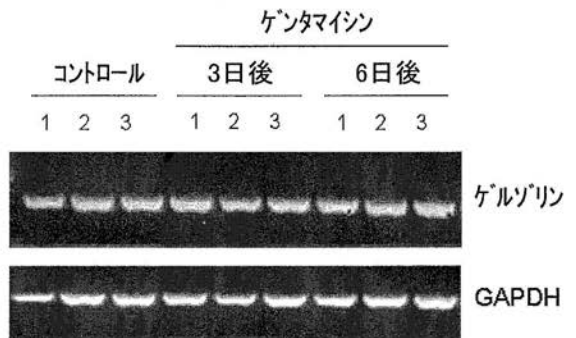
**B.1. 血清レベル**



**B.2. 腎灌流**



**B.3. 腎組織遺伝子発現(RT-PCR)**



【 配列表 】

[2013501229000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2010/060410
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/68		
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, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PERCO P ET AL: "Protein biomarkers associated with acute renal failure and chronic kidney disease" EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB LNKD- DOI:10.1111/J.1365-2362.2006.01729.X, vol. 36, no. 11, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 753-763, XP002495251 ISSN: 0014-2972 tables 1,2  ----- -/--	1
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  23 August 2010		Date of mailing of the international search report  12/11/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Rosin, Oliver

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2010/060410
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VAIDYA VISHAL S ET AL: "Biomarkers of acute kidney injury." ANNUAL REVIEW OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY 2008 LNKD- PUBMED:17937594, vol. 48, 2008, pages 463-493, XP002597062 ISSN: 0362-1642 table 2	1
A	----- Ferreira: "TOWARDS A URINARY FINGERPRINT OF GENTAMICIN-INDUCED ACUTE RENAL FAILURE"[Online] 22 May 2009 (2009-05-22), XP002597063 Retrieved from the Internet: URL:http://www.mindcu11.com/searchresults_full.php?doc=76a329d0414deab82554baf9f4335cd> [retrieved on 2010-08-17] abstract	1
X	----- CHRISTA L ET AL: "HIP/PAP IS AN ADHESIVE PROTEIN EXPRESSED IN HEPATOCARCINOMA, NORMAL PANETH, AND PANCREATIC CELLS" AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY, BETHESDA, MD, US, vol. 271, no. 6, PART 01, 1 January 1996 (1996-01-01), pages G993-G1002, XP009019999 ISSN: 0002-9513 abstract; figure 1 -----	47-54

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2010/060410**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-4, 7-26, 29-40; 43-50, 53-56(all partially)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2010 /060410

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention: 1; Claims: 1-4, 7-26, 29-40, 43-50, 53-56(all partially)

Methods, uses and kits for renal damage involving Reg3B.  
---

Inventions: 2-4; Claims: 1, 2, 8-17, 19-24, 30-38, 43-48, 53-56(all partially)

Methods, uses and kits for renal damage involving fetuin B (invention 2), serin protease inhibitor A3K (invention 3), gamma subunit of ATP synthase (invention 4).  
---

Invention: 5; Claims: 1, 2, 5-24, 27-38, 41-48, 51-56(all partially)

Methods, uses and kits for renal damage involving gelsolin.  
---

Inventions: 6-14; Claims: 1, 2, 8-17, 19-24, 30-38, 43-48, 53-56(all partially)

Methods, uses and kits for renal damage involving ribonuclease UK114 (invention 6), ..., up to Ras-related GTP-binding protein A (invention 14).  
---

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, 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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 フェレイラ レドンド, ラウラ  
 スペイン, エ - 3 7 0 0 8 サラマンカ, パティオ デ エスクエラス 1, ユニヴェルシダッド  
 デ サラマンカ
- (72) 発明者 サンチョ マルティネス, サンドラ, マリア  
 スペイン, エ - 3 7 0 0 8 サラマンカ, パティオ デ エスクエラス 1, ユニヴェルシダッド  
 デ サラマンカ
- (72) 発明者 ゴンサレス デ ビトゥラゴ アリエリョ, ホセ, マヌエル  
 スペイン, エ - 3 7 0 0 8 サラマンカ, パティオ デ エスクエラス 1, ユニヴェルシダッド  
 デ サラマンカ
- (72) 発明者 ロペス ヘルナンデス, フランシスコ, ホセ  
 スペイン, エ - 3 7 0 0 8 サラマンカ, パティオ デ エスクエラス 1, ユニヴェルシダッド  
 デ サラマンカ
- (72) 発明者 ロペス ノヴォア, ホセ, ミゲル  
 スペイン, エ - 3 7 0 0 8 サラマンカ, パティオ デ エスクエラス 1, ユニヴェルシダッド  
 デ サラマンカ
- (72) 発明者 ガルシア サンチェス, オマール  
 スペイン, エ - 3 7 0 0 8 サラマンカ, パティオ デ エスクエラス 1, ユニヴェルシダッド  
 デ サラマンカ

专利名称(译)	检测肾损伤的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013501229A</a>	公开(公告)日	2013-01-10
申请号	JP2012523270	申请日	2010-07-19
[标]申请(专利权)人(译)	ウニヴェルシダッドデサラマンカ 萨拉曼卡大学		
申请(专利权)人(译)	海胆威赛世爸爸萨拉曼卡		
[标]发明人	キロスルイスジャレミ フェレイラレドンドラウラ サンチヨマルティネスサンドラマリア ゴンサレスデビトゥラゴアリエリヨホセマヌエル ロペスヘルナンデスフランシスコホセ ロペスノヴォアホセミゲル ガルシアサンチェスオマール		
发明人	キロスルイス, ジャレミ フェレイラレドンド, ラウラ サンチヨマルティネス, サンドラ, マリア ゴンサレスデビトゥラゴアリエリヨ, ホセ, マヌエル ロペスヘルナンデス, フランシスコ, ホセ ロペスノヴォア, ホセ, ミゲル ガルシアサンチェス, オマール		
IPC分类号	G01N33/53 G01N37/00 G01N30/88 G01N27/447		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2800/347 G01N2800/50 G01N2800/60		
FI分类号	G01N33/53.D G01N37/00.102 G01N30/88.J G01N27/26.301.A		
优先权	2009030559 2009-08-04 ES		
其他公开文献	JP5745515B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及确定个体肾损伤存在的方法，还涉及检测选自Reg3B，胎球蛋白B，Ras相关GTP结合蛋白A丝氨酸蛋白酶抑制剂A3L的一种或多种蛋白质的方法，COP9的亚基1，ATP合酶的γ亚基，凝溶胶蛋白，核糖核酸酶UK114，氨基酰化酶1A，α-烯醇酶，角蛋白5，小白蛋白α，核糖核酸酶4或丝氨酸蛋白酶抑制剂A3K。肾损伤可能是急性肾功能衰竭。所述肾病理可以由肾毒性剂的给药引起，其中肾毒性剂可以是氨基糖苷类抗生素，例如庆大霉素或顺铂。本发明还提供了通过对Reg3B和/或凝溶胶蛋白或其片段的尿液水平进行生化分析来区分由庆大霉素诱导的肾损伤或肾衰竭与顺铂诱导的肾损伤或肾衰竭的方法。

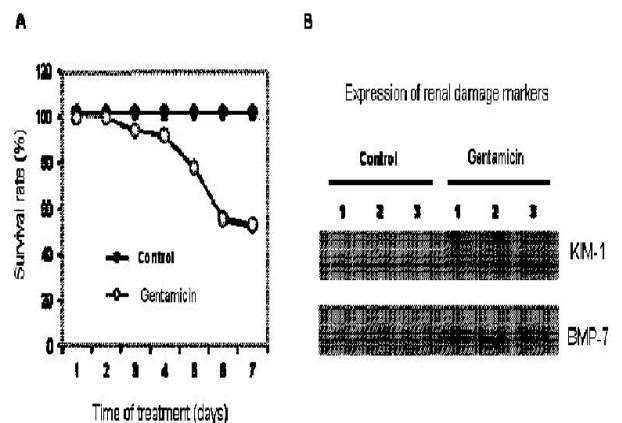


FIG. 1