(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2019-508694
(P2019-508694A)
(43)公表日　平成31年3月28日(2019.3.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/53	***(2006.01)***	G01N	33/53	D	4H045
C07K 16/18	***(2006.01)***	C07K	16/18	ZNA	
C07K 17/00	***(2006.01)***	C07K	17/00		
C07K 14/81	***(2006.01)***	C07K	14/81		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 53 頁）

(21)出願番号　特願2018-545645 (P2018-545645)
(86)(22)出願日　平成29年3月2日(2017.3.2)
(85)翻訳文提出日　平成30年9月13日(2018.9.13)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/020377
(87)国際公開番号　WO2017/151871
(87)国際公開日　平成29年9月8日(2017.9.8)
(31)優先権主張番号　62/302,299
(32)優先日　平成28年3月2日(2016.3.2)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　300004500
アイデックス　ラボラトリーズ　インコーポレイテッド
ＩＤＥＸＸ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国　メイン州　ウエストブルック　アイデックス　ドライブ　ワン
Ｏｎｅ　ＩＤＥＸＸ　Ｄｒｉｖｅ，Ｗｅｓｔｂｒｏｏｋ，Ｍａｉｎｅ　０４０９２，Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　ｏｆ　Ａｍｅｒｉｃａ
(74)代理人　230104019
弁護士　大野　聖二
(74)代理人　100119183
弁理士　松任谷　優子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】腎疾患及び歯周疾患を検出及び診断するための方法及び組成物

(57)【要約】
本開示は、哺乳類における腎疾患及び歯周疾患を検出するための組成物及び方法を提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
試料中のシスタチンＢポリペプチドを検出する方法であって、前記試料と、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体とを、前記シスタチンＢポリペプチドと配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する前記１つ以上の抗体との複合体の形成に適した条件下で接触させること、及びシスタチンＢポリペプチドと、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する前記１つ以上の抗体との前記複合体を検出すること、を含む方法。
【請求項２】
対象における腎疾患を診断する方法であって、
（ａ）　前記対象からの試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を決定することであって、シスタチンＢポリペプチドの量が配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体を用いて決定される、決定すること、及び
（ｂ）　前記試料中の前記シスタチンＢポリペプチドの量を対照試料または対照基準と比較することであって、前記試料中のシスタチンＢポリペプチドレベルが前記対照試料または対照基準に比べて高いことが腎疾患の徴候となる、比較すること、によって診断する方法。
【請求項３】
対象における腎疾患を治療する方法であって、前記対象からの試料中の前記シスタチンＢポリペプチドの量を、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体を用いて決定するための分析の結果を提供する試験を要求すること、及び前記試料が含有するシスタチンＢポリペプチドの量が前記腎疾患に対する対照試料または対照基準に比べて高い場合に、前記対象に腎機能低下に対する治療を投与すること、を含む方法。
【請求項４】
対象における歯周疾患を診断する方法であって、
（ａ）　前記対象からの試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を決定することであって、シスタチンＢポリペプチドの量が配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体を用いて決定される、決定すること、及び
（ｂ）　前記試料中の前記シスタチンＢポリペプチドの量を対照試料または対照基準と比較することであって、前記試料中のシスタチンＢポリペプチドレベルが前記対照試料または対照基準に比べて高いことが前記対象における歯周疾患の徴候となる、比較すること、によって診断する方法。
【請求項５】
上部尿路感染症と下部尿路感染症とを識別する方法であって、
（ａ）　前記対象からの試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を決定することであって、前記シスタチンＢポリペプチドの量が配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体を用いて決定される、決定すること、及び

（ｂ）　前記試料中の前記シスタチンＢポリペプチドの量を対照試料または対照基準と比較することであって、前記試料中のシスタチンＢポリペプチドレベルが前記対照試料または対照基準に比べて高いことが前記対象における上部尿路感染症の徴候となる、比較すること、によって識別する方法。

【請求項６】

急性腎障害と下部尿路感染症とを識別する方法であって、

（ａ）　前記対象からの試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を決定することであって、前記シスタチンＢポリペプチドの量が配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体を用いて決定される、決定すること、及び

（ｂ）　前記試料中の前記シスタチンＢポリペプチドの量を対照試料または対照基準と比較することであって、前記試料中のシスタチンＢポリペプチドレベルが前記対照試料または対照基準に比べて高いことが前記対象における急性腎障害の徴候となる、比較すること、によって識別する方法。

【請求項７】

前記腎疾患の原因が、慢性腎疾患患者における急性腎障害もしくは活動性腎障害、進行性慢性腎疾患、急性腎障害、活動性腎障害、または細菌感染である、請求項２または３に記載の方法。

【請求項８】

前記腎疾患の原因ががんではない、請求項２または３に記載の方法。

【請求項９】

前記細菌感染の原因が、アナプラズマ種、エーリキア種、レプトスピラ種、エシェリキア種、またはボレリア種である、請求項７に記載の方法。

【請求項１０】

前記シスタチンＢポリペプチドの量が、シスタチンＢポリペプチドと、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなるまたはより多くのポリペプチドに特異的に結合する前記１つ以上の抗体との複合体を検出することによって決定される、請求項１、２、３、４、５、または６に記載の方法。

【請求項１１】

前記抗体が固体担体に固定されている、請求項１、２、３、４、５、または６のいずれかに記載の方法。

【請求項１２】

前記抗体が１つ以上の標識に結合している、請求項１、２、３、４、５、または６のいずれかに記載の方法。

【請求項１３】

シスタチンＢポリペプチドと、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７の１つ以上のポリペプチドに対し特異的な１つ以上の抗体との前記複合体を、指示薬に接触させることをさらに含む、請求項１０に記載の方法。

【請求項１４】

前記１つ以上の抗体が、配列番号５、６、７、１１、または１３からなる１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する、請求項１、２、３、４、５、または６のいずれかに記載の方法。

【請求項１５】

前記対象が非ヒト動物である、請求項１、２、３、４、５、または６のいずれかに記載の方法。

【請求項１６】

前記試料が血液、血清、血漿、または尿である、請求項１、２、３、５、または６のい

ずれかに記載の方法。
【請求項１７】
前記試料が唾液、プラーク、歯肉溝液、歯肉生検、または舌スワブである、請求項４に記載の方法。
【請求項１８】
前記シスタチンＢポリペプチドまたはシスタチンＢポリペプチドの量が、免疫測定法、競合的免疫測定法、サンドイッチ免疫測定法、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、免疫比濁法、粒子増強免疫比濁法、放射免疫測定法（ＲＩＡ）、またはウェスタンブロットアッセイによって決定または検出される、請求項１、２、３、４、５、または６のいずれかに記載の方法。
【請求項１９】
配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する、単離抗体。
【請求項２０】
配列番号４、５、６、７、８、９、１１、または１３からなる１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する、請求項１９に記載の単離抗体。
【請求項２１】
前記単離抗体が、
（ａ）　凍結乾燥、粉末化、もしくは乾燥されている、
（ｂ）　標識に結合している、
（ｃ）　固体担体に固定されている、
（ｄ）　配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、もしくは２７からなるポリペプチドに特異的に結合している、または、
（ｅ）　固体担体に固定され、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、もしくは２７に示されるポリペプチドに特異的に結合している、請求項１９に記載の単離抗体。
【請求項２２】
腎疾患、慢性腎疾患患者における急性腎障害もしくは活動性腎障害、急性腎障害、活動性腎障害、進行性慢性腎疾患、上部尿路感染症、または歯周疾患を診断するためのキットであって、
（ａ）　配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体、及び
（ｂ）　前記１つ以上の抗体が対象の試料中に存在するシスタチンＢポリペプチドに結合するのを促進する１つ以上の試薬を含む、キット。
【請求項２３】
配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる、１つ以上の単離ポリペプチド。
【請求項２４】
前記ポリペプチドが、
（ａ）　凍結乾燥、粉末化、もしくは乾燥されている、
（ｂ）　標識に結合している、
（ｃ）　固体担体に固定されている、
（ｄ）　配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７に示される１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体に特異的に結合す

る、請求項２３に記載の１つ以上の単離ポリペプチド。
【請求項２５】
哺乳類対象における腎疾患を診断する方法であって、
（ａ）　前記対象からの試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を決定すること、及び
（ｂ）　前記試料中の前記シスタチンＢポリペプチドの量を対照試料または対照基準と比較することであって、前記試料中のシスタチンＢポリペプチドレベルが前記対照試料または対照基準に比べて高いことが腎疾患の徴候となる、比較すること、によって診断する方法。
【請求項２６】
免疫複合体であって、（ｉ）配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の単離抗体、及び（ｉｉ）前記１つ以上の単離抗体に特異的に結合している１つ以上のポリペプチドを含む、免疫複合体。
【請求項２７】
固体担体に固定されている、請求項２６に記載の免疫複合体。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
優先権
本出願は、参照により全体が本明細書に援用される２０１６年３月２日に出願された米国出願番号第６２／３０２，２９９号の利益を主張する。
【０００２】
配列表
本文書は、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介して電子形式で提出された配列表の電子テキストファイルを参照により援用する。本テキストファイルは「１６－１７９－ＷＯ＿ＳＴ２５．ｆｉｎａｌ．ｔｘｔ」という名称で７．１０ＫＢであり、２０１７年３月２日に作成された。
【背景技術】
【０００３】
腎疾患は、水分消費の増加、頻尿、食欲減退、体重損失、及び筋萎縮を伴う。概して、腎疾患の臨床症状が発生する頃には回復不能な腎臓損傷が生じている。早期検出は早期治療を可能にし、ひいては疾患の進行を遅らせる。現状の治療には、透析や、リン及びタンパク質を抑えた食事が含まれる。寿命及びクオリティーオブライフを向上させるためには、早期検出が極めて重要である。
【０００４】
哺乳類における腎疾患進行は５つのレベルに分類される。哺乳類、例えばイヌの腎疾患を検出するための現状の方法としては、腎臓超音波生検や、尿タンパク／クレアチニンレベルの測定が挙げられる。生検は侵襲的であり、クレアチニン測定は、顕著な組織損傷が生じた後の腎不全のステージ３に至って初めて正確さを有する。当技術分野では、疾患進行を停止できるよう、早期ステージの腎疾患を検出する方法が必要とされている。
【発明の概要】
【０００５】
一実施形態では、試料中のシスタチンＢ（「Ｃｙｓ　Ｂ」）ポリペプチドを検出する方法が提供される。当該方法は、試料と、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体とを、シスタチンＢポリペプチドと配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる（またはそれを含む）１つ以上の

ポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体との複合体の形成に適した条件下で接触させることを含む。シスタチンＢポリペプチドと、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる（またはそれを含む）１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体との複合体が、検出される。

【０００６】

別の実施形態では、対象における腎疾患を診断する方法が提供される。当該方法は、対象からの試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を決定することであって、シスタチンＢポリペプチドの量が配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる（またはそれを含む）１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体を用いて決定される、決定することを含む。試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を対照試料または対照基準と比較し、試料中のシスタチンＢポリペプチドレベルが対照試料または対照基準に比べて高いことが腎疾患の徴候となる。

【０００７】

また別の実施形態では、対象における疾患状態を治療する方法が提供される。当該方法は、対象からの試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる（またはそれを含む）１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体を用いて決定するための分析の結果を提供する試験を要求することを含む。試料が含有するシスタチンＢポリペプチドの量が疾患状態に対する対照試料または対照基準に比べて高い場合に、対象に腎機能低下に対する治療が投与される。当該疾患状態は、慢性腎疾患患者における急性腎障害もしくは活動性腎障害、急性腎障害、活動性腎障害、進行性慢性腎疾患、歯周疾患、上部尿路感染症、またはその組合せであり得る。

【０００８】

さらに別の実施形態では、対象における歯周疾患を診断する方法が提供される。当該方法は、対象からの試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を決定することであって、シスタチンＢポリペプチドの量が配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる（またはそれを含む）１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体を用いて決定される、決定することを含む。試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を対照試料または対照基準と比較し、試料中のシスタチンＢポリペプチドレベルが対照試料または対照基準に比べて高いことが対象における歯周疾患の徴候となる。

【０００９】

別の実施形態では、上部尿路感染症と下部尿路感染症とを識別する方法が提供される。当該方法は、対象からの試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を決定することであって、シスタチンＢポリペプチドの量が配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる（またはそれを含む）１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体を用いて決定される、決定することを含む。試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を対照試料または対照基準と比較し、試料中のシスタチンＢポリペプチドレベルが対照試料または対照基準に比べて高いことが対象における上部尿路感染症の徴候となる。

【００１０】

別の実施形態では、急性腎障害と下部尿路感染症とを識別する方法が提供される。当該方法は、（ａ）対象からの試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を決定することであって、シスタチンＢポリペプチドの量が配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３

、２４、２５、２６、または２７からなる１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体を用いて決定される、決定すること、及び（ｂ）試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を対照試料または対照基準と比較することであって、試料中のシスタチンＢポリペプチドレベルが対照試料または対照基準に比べて高いことが対象における急性腎障害の徴候である、比較すること、を含む。

【００１１】

一実施形態では、腎疾患の原因は、慢性腎疾患、急性腎障害、または細菌感染であり得る。一実施形態では、腎疾患、慢性腎疾患、または急性腎障害の原因はがんではない。細菌感染の原因は、アナプラズマ種、エーリキア種、レプトスピラ種、エシェリキア種、またはボレリア種であり得る。シスタチンＢポリペプチドの量は、シスタチンＢポリペプチドと、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる（またはそれを含む）１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体との複合体を検出することによって決定することができる。

【００１２】

一実施形態では、シスタチンＢポリペプチドと、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる（またはそれを含む）１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体との複合体は、検出の前に指示薬と接触させることができる。当該１つ以上の抗体は、配列番号５、６、７、１１、または１３からなる（またはそれを含む）１つ以上のポリペプチドに特異的に結合することができる。

【００１３】

一実施形態では、対象は非ヒト動物とすることができ、試料は血清、血漿、尿、唾液、プラーク、歯肉溝液、歯肉生検、または舌スワブとすることができる。

【００１４】

一実施形態では、シスタチンＢポリペプチドまたはシスタチンＢポリペプチドの量は、免疫測定法、競合的免疫測定法、サンドイッチ免疫測定法、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫測定法（ＲＩＡ）、免疫比濁法、粒子増強免疫比濁法、またはウェスタンブロットアッセイによって決定することができる。

【００１５】

また別の実施形態では、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる（またはそれを含む）１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する単離抗体が提供される。単離抗体は、凍結乾燥させてもよく、標識に結合していてもよく、固体担体に固定されていてもよく、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる（またはそれを含む）１つ以上のポリペプチドに特異的に結合していてもよく、あるいは固体担体に固定され、かつ配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる（またはそれを含む）１つ以上のポリペプチドに特異的に結合していてもよい。

【００１６】

一実施形態では、当該抗体は固体担体に固定されていてもよく、また１つ以上の標識に結合していてもよい。

【００１７】

さらに別の実施形態では、腎疾患、慢性腎疾患患者における急性腎障害もしくは活動性腎障害、活動性腎障害、進行性慢性腎疾患、急性腎障害、上部尿路感染症、または歯周疾患を診断するためのキットが提供される。当該キットは、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる（またはそれを含む）１つ

以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体、及び当該１つ以上の抗体が対象の試料中に存在するシスタチンＢポリペプチドに結合するのを促進する１つ以上の試薬を含むことができる。

【００１８】

別の実施形態では、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる（またはそれを含む）１つ以上の単離ポリペプチドが提供される。当該ポリペプチドは、凍結乾燥されてもよく、標識に結合していてもよく、固体担体に固定されていてもよく、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる（またはそれを含む）１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体に特異的に結合していてもよい。

【００１９】

また別の実施形態では、哺乳類対象、例えばヒト、イヌ、またはネコ対象における腎疾患を診断する方法が提供される。当該方法は、（ａ）試料（例えば、尿、血液、血漿、血清、細胞、組織）中のシスタチンＢポリペプチドの量を決定すること、及び（ｂ）試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を対照試料または対照基準と比較することであって、試料中のシスタチンＢポリペプチドレベルが対照試料または対照基準に比べて高いことが腎疾患の徴候である、比較すること、を含む。シスタチンＢポリペプチドの量は、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる（またはそれを含む）１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する単離抗体を用いて決定することができる。哺乳類における腎疾患とは、例えば、慢性腎疾患患者における急性腎障害もしくは活動性腎障害、慢性腎疾患、進行性慢性腎疾患、急性腎障害、活動性腎障害、上部尿路感染症、または腎臓の細菌感染であり得る。一実施形態では、腎疾患は、がんでも腎臓がんでもない。

【００２０】

一実施形態では、免疫複合体であって、（ｉ）配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の単離抗体、及び（ｉｉ）当該１つ以上の単離抗体に特異的に結合している１つ以上のポリペプチドを含む、免疫複合体が提供される。当該１つ以上のポリペプチドとは、例えば、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、またはその組合せであり得る。免疫複合体とは、抗原（例えば、ポリペプチド）と抗体との間で形成された複合体である。免疫複合体は、固体担体に固定されていてもよい。

【００２１】

以下のある特定の好ましい実施形態についてのより詳細な説明及び請求項から、具体的な実施形態が明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【００２２】

【図１】図１は、近位尿細管の上皮細胞における正常な尿細管上皮、細胞破壊、及び細胞死を示す図である。

【図２】図２は、シスタチンＣタンパク質の存在下におけるシスタチンＢのウェスタンブロット分析を示す図である。

【図３】図３は、ネイティブなイヌのシスタチンＢ（ＭＤＣＫライセート）を用いて、Ｃｙｓ　Ｂ　ＥＬＩＳＡアッセイで得られた標準曲線を示す図である。

【図４】図４は、イヌゲンタマイシンモデルからの血清及び尿のＣｙｓ　Ｂ　ＥＬＩＳＡ分析を示す図である。

【図５】図５は、炎症または虚血誘発性活動性腎障害で診療所に受診したイヌからの尿の

Ｃｙｓ　Ｂ　ＥＬＩＳＡ分析を示す図である。
【図６】図６は、パネルＡ及びＢにおいて、イヌ及びネコの参照範囲を示す図である。
【図７】図７は、パネルＡ及びＢにおいて、ＡＫＩと診断された患畜における尿中及び血清シスタチンＢレベルが健康なイヌ及びＣＫＤ患畜に比べて顕著に増加したことを示す図である。
【図８】図８は、健康な患畜及び下部尿路感染症患畜におけるシスタチンＢレベルを示す図である。
【図９】図９は、イヌＡＫＩ試料、ヒトＣＫＤ試料、及びイヌ陰性対照試料におけるＣｙｓ　Ｂポリペプチドの検出を示す図である。
【図１０】図１０は、健康なイヌからの血清におけるＣｙｓ　Ｂ値を示す図である。これら及び他の対象物及び特徴については、図面と併せてなされる以下の詳細な説明から十分に理解されることになる。
【発明を実施するための形態】
【００２３】
以下で本発明をより詳細に説明するが、本明細書で示す実施例は、例示的なものとして意図されているに過ぎない。というのも、当業者には多くの改変及び変形が明らかなものとなるためである。本明細書での説明及び後続の請求項全体において使用する「ａ（１つの、１種の）」、「ａｎ（１つの、１種の）」、及び「ｔｈｅ（その、当該）」は、文脈による別段の明確な定めがない限り、複数の指示対象を含む。数値を伴った「約」という用語は、その値が上下５％変動することを意味する。例えば、約１００という値は９５－１０５（すなわち、９５から１０５の間の任意の値）を意味する。
【００２４】
概して、本明細書で使用する用語は、本明細書に記載の組成物及び方法の文脈内で、また各用語が使用される特定の文脈において、当技術分野における通常の意味を有する。一部の用語は、組成物及び方法の説明に関して追加的な教示を実施者に提供するために、以下でより具体的に定義されている。
【００２５】
本明細書に記載の組成物及び方法は、いくつかの疾患及び状態（例えば、腎疾患、慢性腎疾患患者における急性腎障害または活動性腎障害、進行性慢性腎疾患、急性腎障害、活動性腎障害、活動性腎障害、上部尿路感染症、及び歯周疾患を含む）の予測、診断、及び進行の監視に使用することができる。腎疾患には、（１）健康な対象と比較しての腎機能低下、もしくは（２）腎臓への物理的損傷、または（３）この両方、をもたらす任意の疾患状態が含まれる。一実施形態では、腎疾患にはがんが含まれず、腎臓がんも含まれない。腎臓がんを含めたがんのマーカーは、慢性腎疾患患者における急性腎障害もしくは活動性腎障害、慢性腎疾患、進行性慢性腎疾患、活動性腎障害、急性腎障害、上部尿路感染症、または歯周疾患のマーカーとは異なる。一実施形態では、慢性腎疾患患者における急性腎障害、進行性慢性腎疾患、活動性腎障害、急性腎障害、上部尿路感染症、または歯周疾患にはがんが含まれず、腎臓がんも含まれない。
【００２６】
慢性腎疾患（ＣＫＤ）とは、経時的な腎機能の漸進的喪失によって特徴づけられる状態である。ＣＫＤは、慢性腎疾患（ｃｈｒｏｎｉｃ　ｒｅｎａｌ　ｄｉｓｅａｓｅ）としても知られる。ＣＤＫには、腎臓がんも、腎細胞がんも、膀胱がんも、そしてその他のがんも含まれない。ＣＫＤが悪化するにつれ、老廃物が血液中で高レベルに集積し、高血圧、貧血、骨の弱体化、低栄養状態、及び神経損傷が生じ得る。ＣＫＤは心疾患及び血管疾患のリスクを高め、最終的には腎不全に至る恐れがある。ＣＫＤの原因は、糖尿病、高血圧、及びその他の異常であり得る。早期の検出及び治療がしばしば疾患の悪化を防ぎ得る。
【００２７】
Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｒｅｎａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ　Ｓｏｃｉｅｔｙによって確立されたイヌにおけるＣＫＤのステージを表１に示す。
【００２８】

【表１】

表１

血清クレアチニン濃度	ステージI 非窒素血 CKD	ステージII 軽度腎性窒素血症	ステージIII 中等度腎性窒素血症	ステージIV 重度腎性窒素血症
mg/dL	<1.4	1.4-2.0	2.1-5.0	>5.0
Mmol/L	<125	125-179	180-439	>440

Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｒｅｎａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ　Ｓｏｃｉｅｔｙによって確立されたネコにおけるＣＫＤのステージを表２に示す。

【００２９】

【表２】

表２

血清クレアチニン濃度	ステージI 非窒素血 CKD	ステージII 軽度腎性窒素血症	ステージIII 中等度腎性窒素血症	ステージIV 重度腎性窒素血症
mg/dL	<1.6	1.6-2.8	2.9-5.0	>5.0
Mmol/L	<140	140-250	251-440	>440

本明細書に記載の方法は、ステージ１、２、３、または４のＣＫＤにおける急性腎障害または活動性腎障害を検出することができる。一実施形態では、当該方法は、クレアチニンアッセイがステージ１、２、３、または４のＣＫＤにおける急性腎障害または活動性腎障害を検出し得る前に、ステージ１、２、３、または４のＣＫＤにおける急性腎障害または活動性腎障害を検出することができる。

【００３０】

ヒトにおける腎疾患は、糸球体濾過率（ＧＦＲ）に従ってステージ分類される。個人の年齢、人種、性別、及び血清クレアチニンを用いた式を使用してＧＦＲを計算する。以下に、５ステージのＣＫＤ及び各ステージのＧＦＲを示す。

【００３１】

・　ステージ１　正常または高いＧＦＲ（ＧＦＲ＞９０ｍＬ／分）
・　ステージ２　軽度ＣＫＤ（ＧＦＲ＝６０－８９ｍＬ／分）
・　ステージ３Ａ　中程度ＣＫＤ（ＧＦＲ＝４５－５９ｍＬ／分）
・　ステージ３Ｂ　中程度ＣＫＤ（ＧＦＲ＝３０－４４ｍＬ／分）
・　ステージ４　重度ＣＫＤ（ＧＦＲ＝１５－２９ｍＬ／分）
・　ステージ５　末期ＣＫＤ（ＧＦＲ＜１５ｍＬ／分）

本明細書に記載の方法は、ヒトのステージ１、２、３Ａ、３Ｂ、４、または５のＣＫＤにおける急性腎障害または活動性腎障害を検出することができる。一実施形態では、当該方法は、クレアチニンアッセイまたはＧＦＲ値がステージ１、２、３Ａ、３Ｂ、４、または５のＣＫＤにおける急性腎障害または活動性腎障害を検出し得る前に、ヒトにおけるステージ１、２、３Ａ、３Ｂ、４、または５のＣＫＤにおける急性腎障害または活動性腎障害を検出することができる。

【００３２】

慢性の腎疾患（ｋｉｄｎｅｙ　ｄｉｓｅａｓｅ）または腎疾患（ｒｅｎａｌ　ｄｉｓｅａｓｅ）は、糸球体疾患である場合も尿細管疾患である場合もある。

【００３３】

急性腎障害（ＡＫＩ）は、突然のまたは急速な腎臓の濾過機能の低下として定義される。ＡＫＩは、慢性腎疾患（ＣＫＤ）、透析が必要となる腎不全（末期の腎疾患）、腎疾患、または死に至る恐れがある。軽度ＡＫＩまたはＡＫＩからの完全回復であっても、何らかの短時間及び長時間持続する健康問題を有し得る。ＡＫＩは、何らかの原因（例えば、低血圧、脱水）による腎臓の血流減少に由来する腎臓組織への損傷、腎臓に有害な物質への曝露、腎臓内の抗炎症プロセス、全身疾患、圧挫傷、抗生物質、敗血症、または尿管の閉塞によって起こり得る。ＡＫＩは、代謝性アシドーシス、高カリウムレベル、尿毒症、体液バランスの変化、及び他の臓器系への影響に至る恐れがある。一実施形態では、ＡＫＩにはがんが含まれず、腎臓がんも含まれない。Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｒｅｎａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ　Ｓｏｃｉｅｔｙによって確立されたネコ及びイヌにおけるＡＫＩのグレードを表３に示す。

【００３４】

【表３】

表３

AKI グレード	血中クレアチニン	臨床的説明
グレードI	<1.6mg/dl(<140μmol/l)	非窒素血 AKI 実証された AKI(病歴、臨床、実験、または画像による AKI の証拠)、臨床的な乏尿/無尿、体積応答性；及び/または 48 時間以内の血中クレアチニンにおける漸進的非窒素的増加≧0.3mg/dl(≧26.4μmol)；及び/または 測定された乏尿(<1ml/kg/時間)または 6 時間にわたる無尿
グレードII	1.7-2.5mg/dl (141-220μmol/l)	軽度 AKI： 実証された AKI 及び静的または漸進的窒素血 血中クレアチニンにおける漸進的窒素的増加； 48 時間以内の≧0.3mg/dl(≧26.4μmol/l)または体積応答性 測定された乏尿(<1ml/kg/時間)または 6 時間にわたる無尿
グレードIII	2.6-5.0mg/dl (221-439μmol/l)	中程度-重度 AKI： 実証された AKI、及び窒素血の重症度増大、及び機能的腎不全
グレードIV	5.1-10.0mg/dl (440-880μmol/l)	
グレードV	>10mg/dl (>880μmol/l)	

【００３５】

一実施形態では、本明細書に記載の方法は、グレード１、２、３、４、または５のＡＫＩを検出することができる。一実施形態では、本明細書に記載の方法は、クレアチニンアッセイがグレード１、２、３、４、または５のＡＫＩを検出し得る前に、グレード１、２、３、４、または５のＡＫＩを検出することができる。

【００３６】

ヒトにおけるＡＫＩは、以下のようにステージ分類することができる。

【表４】

表３Ａ

ステージ	クレアチニン	尿量
1	ベースラインの 1.5-1.9 倍 または ≧0.3mg/dl(≧26.5μmol/l)増加	6-12 時間の<0.5ml/kg/時間
2	ベースラインの 2.0-2.9 倍	12 時間以上の<0.5ml/kg/時間
3	ベースラインの 3.0 倍 または 血清クレアチニンの増加 (≧4.0mg/dl(≧353.6μmol/l)) または腎置換療法の開始 または患者が<18 歳、1.73m^2 当たり <35ml/分の eGFR 減少	24 時間以上の<0.3ml/kg/時間 または 12 時間以上の無尿

【００３７】

一実施形態では、方法はヒトにおけるステージ１、２、または３のＡＫＩを検出することができる。一実施形態では、当該方法は、クレアチニンアッセイがヒトにおけるグレード１、２、または３のＡＫＩを検出し得る前に、ヒトにおけるグレード１、２、または３のＡＫＩを検出することができる。

【００３８】

一実施形態では、腎疾患、ＣＫＤ、またはＡＫＩの原因は細菌感染である。一実施形態では、細菌感染の原因は、アナプラズマ種、エーリキア種、レプトスピラ種、エシェリキア種、またはボレリア種である。

【００３９】

活動性腎障害は、進行中または進行性の腎障害、腎臓異常、または腎臓病態として定義されている。活動性腎障害は、腎臓に累積的損傷をもたらす。

【００４０】

ポリペプチド

シスタチンＡ及びＢは、シスタチンスーパーファミリーのファミリー１のメンバーであり、サイズが１１ｋＤａと比較的低分子のタンパク質である。ヒトにおいては、これらのタンパク質は単量体であり、サイズは約１１ｋＤａである。これらはグリコシル化されず、他のシスタチンスーパーファミリーに見られるジスルフィド架橋を有しない。また、シグナル配列も欠如しているため、概してある細胞に限定された細胞内タンパク質である。Ｏｃｈｉｅｎｇ及びＣｈａｕｄｈｕｒｉ、Ｊ Ｈｅａｌｔｈ Ｃａｒｅ Ｐｏｏｒ Ｕｎｄｅｒｓｅｒｖｅｄ ２０１０、２１（１補遺）：５１を参照。いくらかの量のシスタチンＢは細胞外液に存在し、これはヒトの尿から精製されたものである。Ａｂｒａｈａｍｓｏｎ他、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ １９８６、２６１：１１２８２－１１２８９を参照。シスタチンＢは、リソソームシステインプロテイナーゼ、カテプシンファミリーのメンバー、具体的にはカテプシンＢ、Ｈ、及びＬを阻害することが示されている。Ｇｒｅｅｎ他、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ １９８４ ２１８：９３９；Ｄ’Ａｍｉｃｏ他、Ｊ Ｔｒａｎｓｌ Ｍｅｄ ２０１４、１２：３５０；Ｊａｒｖｉｎｅｎ及びＲｉｎｎｅ、Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ １９８２、７０８：２１０－２１７を参照。

【００４１】

シスタチンＢポリペプチドについては実施例１で詳細に説明されており、以下のものが含まれる：

ＱＶＫＡＱＬＥＥＲＥＮＫＫＹＴＴＦＫＡＶＴＦＲＳＱＶＶＡＧＴＰＹＦＩＫＶＱＶＤＤＤＥＦＶＨＬＲＶＦＱＳＬＰＨＥＮＫＰＬＡＬＳＳＹＱＴＮＫＡＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号１）
ＭＭＣＧＡＰＳＡＳＱＰＡＴＡＤＴＱＡＩＡＤ（配列番号２）
ＭＭＣＧＡＰＳＡＳＱＰＡＴＡＤＴＱＡＩＡＤＱＶＫＡＱＬＥＥＲＥＮＫＫＹＴＴＦＫＡＶＴＦＲＳＱＶＶＡＧＴＸＹＦＩＫＶＱＶＤＤＤＥＦＶＨＬＲＶＦＱＳＬＰＨＥＮＫＰＬＡＬＳＳＹＱＴＮＫＡＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号３）（Ｘは任意のアミノ酸とすることができる、またはＸはＰもしくはＮとすることができる）
ＱＴＮＫＡＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号４）シスタチンＢ　Ｃ末端「ペプチド９」
ＣＧＡＰＳＡＳＱＰＡＴＡＤＴＱＡＩＡ（配列番号５）シスタチンＢ　Ｎ末端「ペプチド３－２０」
ＣＧＡＰＳＡＳＱ（配列番号６）シスタチンＢ　Ｎ末端「ペプチド３－１０」
ＣＡＩＡＤＱＶＫＡ（配列番号７）シスタチンＢ　Ｎ末端「ペプチド１８－２５」
ＦＱＳＬＰＨＥＮＫＰＬＡＬＳＳ（配列番号８）シスタチンＢ「ペプチド２」
ＳＱＶＶＡＧＴＰＹＦＩＫＶＱＶＤＤＤ（配列番号９）シスタチンＢ「ペプチド１」
ＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号１０）
ＭＭＣＧＡＰＳＡＳＱＰＡＴＡＤＴＱＡＩＡＤＱＶＫＡＱＬＥＥ（配列番号１１）
ＡＩＡＤＱＶＫＡ（配列番号１２）
ＳＱＶＶＡＧＴＮＹＦＩＫＶＱＶＤＤＤ（配列番号１３）

【００４２】

一実施形態では、配列番号１－２７またはその断片を含む精製されたポリペプチドが提供される。配列番号１－２７のポリペプチド断片は、約９５、９０、８０、７０、６０、５０、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１０（または約１０から約９５の間の任意の範囲）未満の連続したアミノ酸からなり得る。一実施形態では、ポリペプチド断片は、配列番号１－２７の約１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または９５を超える連続したアミノ酸からなる。一実施形態では、ポリペプチドまたはその断片は非天然のものである。

【００４３】

配列番号１－２、４－１３、及び１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７のポリペプチドが全長Ｃｙｓ　Ｂポリペプチドよりも低分子であるという事実は重要である。というのは、低分子ポリペプチドは、全長ポリペプチドのアッセイよりも高い特異性及び／または感受性を有し得るためである。これらの低分子ポリペプチドは製造にかかる費用が少ない可能性があり、また全長ポリペプチドよりも高い純度で得られ得る。さらに、試料中に存在する低分子断片及び低分子断片のレベルは、疾患状態を示すことができる。断片化したポリペプチド（すなわち、全長未満）のレベル増加は、疾患のマーカーとすることができる。

【００４４】

ポリペプチドとは、アミド結合によって共有結合した３つ以上のアミノ酸の多量体である。ポリペプチドは翻訳後に修飾され得る。精製されたポリペプチドとは、細胞材料、他のタイプのポリペプチド、化学的前駆物質、ポリペプチド合成に用いる化学物質、またはその組合せを実質的に含まないポリペプチド調製物である。細胞材料、培地、化学的前駆物質、ポリペプチド合成に用いる化学物質を実質的に含まないポリペプチド調製物は、約３０％、２０％、１０％、５％、１％未満またはそれ以上の他のポリペプチド、培地、化学的前駆物質、及び／または合成に用いる他の化学物質を有する。そのため、精製されたポリペプチドの純度は、約７０％、８０％、９０％、９５％、９９％またはそれ以上である。

【００４５】

「ポリペプチド」という用語は、あるタイプのポリペプチド（例えば、ポリペプチドのセット）のうちの１つ以上を指すことができる。また「ポリペプチド」は、２つ以上の異なるタイプのポリペプチドの混合物（すなわち、以下に限定するものではないが、全長タンパク質、切断ポリペプチド、またはポリペプチド断片を含むポリペプチドの混合物）を指すこともできる。「ポリペプチド（単数）」または「ポリペプチド（複数）」という用語は、それぞれが「１つ以上のポリペプチド」も意味し得る。

【００４６】

ポリペプチドバリアントまたは、配列番号１－２７に示されるポリペプチドまたはその断片に対し、例えば約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上のアミノ酸残基が異なる（例えば、アミノ酸の付加、置換、または欠失）。この比較に整列が必要な場合、最大の相同性を有するよう配列を整列させる。バリエーション部位はポリペプチドの任意の位置で生じ得る。

【００４７】

概して、バリアントポリペプチドは、本明細書に記載のポリペプチド配列の１つを修飾し、修飾したポリペプチドを評価して生物学的等価物であるかを決定することによって、同定することができる。バリアントが生物学的等価物であるのは、免疫組織化学アッセイ、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、免疫比濁法、粒子増強免疫比濁法、放射免疫測定法（ＲＩＡ）、またはウェスタンブロットアッセイなどのアッセイにおいて、本明細書に記載のポリペプチドと実質的に同じ反応する場合、例えば元来のポリペプチドの９０－１１０％の活性を有する場合である。一実施形態では、当該アッセイは、生物学的に等価なポリペプチドが、本明細書に記載のポリペプチドと対応反応抗原または抗体との結合を約８０、９５、９９、または１００％低減することができる、競合アッセイである。対応ポリペプチドに特異的に結合する抗体は、バリアントポリペプチドとも特異的に結合する。

【００４８】

バリアントポリペプチドは、配列番号１－２７に示されるポリペプチドに対し、少なくとも約８０％、または約８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％同一である。例えば、配列番号１－２７のバリアントポリペプチドは、配列番号１－２７に対し、少なくとも約９９．５％、９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９０％、８７％、８４％、または８１％同一であり得る。バリアントポリペプチドは、１つ以上の保存的アミノ酸バリエーションまたは他の軽微な修飾を有しながら生物学的活性を保持し、すなわち配列番号１－２７に対し生物学的に機能的な等価物である。生物学的に活性のある等価物は、対応ポリペプチドに対し実質的に等価な機能を有する。

【００４９】

アミノ酸配列に突然変異を導入する方法は当業者に周知である。例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ（編）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ.（１９９４）；Ｍａｎｉａｔｉｓ他、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ.Ｙ.（１９８９））を参照。突然変異は、「ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ（商標）部位特異的変異誘発キット」（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）などの市販のキットを用いて導入することもできる。当業者は、機能的に活性のあるバリアントポリペプチドを、ポリペプチドの機能に影響を及ぼさないアミノ酸を置き換えることによって生成することができる。

【００５０】

バリアントポリペプチドは、１つ以上の予測された非必須のアミノ酸残基において保存的アミノ酸置換を有することができる。保存的置換とは、ペプチド化学分野の当業者が二次構造及びポリペプチドのヒドロパシー性質が実質的に不変であると予測するであろう形で、あるアミノ酸を特性が類似した別のアミノ酸に置換することである。概して、以下の

アミノ酸のグループが保存的変化に相当する：（１）ａｌａ、ｐｒｏ、ｇｌｙ、ｇｌｕ、ａｓｐ、ｇｌｎ、ａｓｎ、ｓｅｒ、ｔｈｒ；（２）ｃｙｓ、ｓｅｒ、ｔｙｒ、ｔｈｒ；（３）ｖａｌ、ｉｌｅ、ｌｅｕ、ｍｅｔ、ａｌａ、ｐｈｅ；（４）ｌｙｓ、ａｒｇ、ｈｉｓ；及び（５）ｐｈｅ、ｔｙｒ、ｔｒｐ、ｈｉｓ。一実施形態では、ポリペプチドは、約１、２、３、４、５、１０、２０、またはそれ以下の保存的アミノ酸置換を有する。

【００５１】

本明細書において、２つのアミノ酸配列（または２つの核酸配列）のパーセント同一性は、Ｋａｒｌｉｎ及びＡｌｔｓｃｈｕｌのアルゴリズム（ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　８７：２２６４－２２６８、１９９０）のＫａｒｌｉｎ及びＡｌｔｓｃｈｕｌにおける修正版（ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　９０：５８７３－５８７７、１９９３）を用いて決定する。このようなアルゴリズムは、Ａｌｔｓｃｈｕｌ他（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０、１９９０）のＮＢＬＡＳＴ及びＸＢＬＡＳＴプログラムに組み込まれている。ＢＬＡＳＴのヌクレオチド検索は、ＮＢＬＡＳＴプログラムによってｓｃｏｒｅ＝１００、ｗｏｒｄｌｅｎｇｔｈ＝１２で実施する。ＢＬＡＳＴのタンパク質検索は、ＸＢＬＡＳＴプログラムによってｓｃｏｒｅ＝５０、ｗｏｒｄｌｅｎｇｔｈ＝３で実施する。比較目的でギャップありの整列を取得するには、Ａｌｔｓｃｈｕｌ他（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２、１９９７）に記載のようにＧａｐｐｅｄＢＬＡＳＴを利用する。ＢＬＡＳＴ及びＧａｐｐｅｄＢＬＡＳＴを利用する場合は、それぞれのプログラム（例えば、ＸＢＬＡＳＴ及びＮＢＬＡＳＴ）のデフォルトパラメーターは、本明細書に記載の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を取得するために使用する。

【００５２】

同一性または同一であるとはアミノ酸配列の類似性を意味し、これらの語は当技術分野で認識されている意味を有する。同一性を有する配列は、同一または類似のアミノ酸を共有する。配列同一性とは、抗体の元来のアミノ酸配列に対し同一であるアミノ酸のパーセンテージであり、必要に応じて配列同一性を最大化するように配列を整列しギャップを適切に導入した後に決定する。したがって、基準配列に対し８５％アミノ酸配列同一性を共有する候補配列は、候補配列の基準配列との整列後に、候補配列の８５％のアミノ酸が、基準配列における対応アミノ酸と同一でありかつ／または保存的アミノ酸変化を構成する必要がある。

【００５３】

ポリペプチドまたは抗体は、通常は全く関連付けられていないアミノ酸配列に共有結合または非共有結合していてもよい。さらに、ポリペプチドまたは抗体は、アミノ酸以外の化合物または分子に共有結合または非共有結合していてもよい。例えば、ポリペプチドまたは抗体は、指示試薬、アミノ酸スペーサー、アミノ酸リンカー、シグナル配列、輸送停止配列、膜貫通ドメイン、タンパク質精製リガンド、またはその組合せに結合していてもよい。一実施形態では、タンパク質精製リガンドは、例えばポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端における１つ以上のＣアミノ酸残基であり得る。アミノ酸スペーサーとは、ポリペプチドまたは抗体に通常は全く関連付けられていないアミノ酸の配列である。アミノ酸スペーサーは、約１、５、１０、２０、１００、または１，０００アミノ酸を含むことができる。

【００５４】

ポリペプチドはさらに、翻訳と同時にまたは翻訳後にタンパク質の輸送を指示するシグナル（またはリーダー）配列を含むことができる。また、ポリペプチドは、ポリペプチドの合成、精製、または識別を容易にするために（例えば、ｐｏｌｙ－Ｈｉｓ）、あるいは固体担体へのポリペプチドの結合を強化するために、リンカーまたは他の配列を含むこともできる。例えば、ポリペプチドは、免疫グロブリンのＦｃ領域またはウシ血清アルブミンに結合してもよい。

【００５５】

ポリペプチドは、通常は全く関連付けられていないアミノ酸配列、すなわち異種アミノ酸配列に共有結合または非共有結合していてもよい。異種アミノ酸配列は、異なる生物か

らのものであってもよく、合成配列であっても、通常はポリペプチドのカルボキシ末端またはアミノ末端に位置しない配列であってもよい。さらに、ポリペプチドは、アミノ酸以外の化合物または分子、例えば指示試薬に共有結合または非共有結合していてもよい。ポリペプチドは、アミノ酸スペーサー、アミノ酸リンカー、シグナル配列、輸送停止配列、膜貫通ドメイン、タンパク質精製リガンド、またはその組合せに共有結合または非共有結合していてもよい。また、ポリペプチドは、免疫応答を強化する部分（すなわち、ポリペプチドまたは他の化合物であり得る官能基）（例えば、ＩＬ－２などのサイトカイン）、精製を促進する部分（例えば、６－ヒスチジンタグ、ｔｒｐＥ、グルタチオンマルトース結合タンパク質などのアフィニティータグ）、またはポリペプチドの安定性を促進する部分（例えば、ポリエチレングリコール；アセチル、プロピル、スクシニル、ベンジル、ベンジルオキシカルボニル、またはｔ－ブチルオキシカルボニルなどのアミノ末端保護基；アミド、メチルアミド、及びエチルアミドなどのカルボニル末端保護基）に結合していてもよい。一実施形態では、タンパク質精製リガンドは、例えばポリペプチドのアミノ末端もしくはカルボキシ末端または両末端における１つ以上のＣアミノ酸残基であり得る。アミノ酸スペーサーとは、ポリペプチドに全く関連付けられていないアミノ酸の配列である。アミノ酸スペーサーは、約１、５、１０、２０、１００、または１，０００アミノ酸を含むことができる。

【００５６】

所望の場合、ポリペプチドは、他のアミノ酸配列、例えばアミノ酸リンカー、アミノ酸スペーサー、シグナル配列、ＴＭＲ輸送停止配列、膜貫通ドメイン、さらにタンパク質精製に有用なリガンド、例えば、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ、ヒスチジンタグ、及びブドウ球菌プロテインＡ、またはその組合せも含有し得る融合タンパク質であってもよい。融合タンパク質とは、作用可能に互いに結合した２つ以上の異なるアミノ酸配列である。融合タンパク質コンストラクトは、有機化合物の合成技法を用いて、個々のポリペプチド断片を固定した配列に共に連結させることによって化学的に合成することができる。また、融合タンパク質コンストラクトは、適正な配列でアミノ酸残基をコードする指定された組換えＤＮＡ配列を有する導入発現ベクターを保有する、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養した遺伝子修飾宿主細胞（例えば、大腸菌）によって発現させることもできる。異種ポリペプチドは、例えばポリペプチドのＮ末端またはＣ末端に融合していてもよい。融合タンパク質内に２つ以上のポリペプチドが存在してもよい。融合タンパク質内にポリペプチドの断片が存在してもよい。融合タンパク質は、例えば配列番号１－２７、その断片、またはその組合せのうちの１つ以上を含むことができる。ポリペプチドは、多量体形態をとることができる。すなわち、ポリペプチドは配列番号１－２７の２つ以上のコピーまたはその組合せを含むことができる。

【００５７】

一実施形態では、ポリペプチドは、ヒト、ウサギ、マウス、イヌ、ネコ、他の哺乳類、またはその組合せに由来する。ポリペプチドは、標準的なタンパク質精製技法を用いて、細胞または組織供給源から単離することができる。また、ポリペプチドは、組換えＤＮＡ技法によって化学的に合成または生成することもできる。例えば、ポリペプチドは、従来型のペプチドシンセサイザーを用いて合成することができる。

【００５８】

一実施形態では、ポリペプチドを、固相または基質に対し、共有結合的にまたは非共有結合的に固定する。

【００５９】

ポリペプチドは、組換えで生成してもよい。ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、当技術分野で周知の技法を用いて好適な発現宿主系で発現させることができる組換え発現ベクターに導入してもよい。様々な細菌、酵母、哺乳類、及び昆虫の発現系が当技術分野で利用可能であり、任意のこのような発現系を使用することができる。任意選択により、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、セルフリー翻訳系に翻訳することができる。ポリペプチドは、凍結乾燥、粉末化、または乾燥させてもよく、例えばフリー

ズドライにしてもよい。
【００６０】
ポリヌクレオチド
一実施形態には、本明細書で開示されるポリペプチドのうちの１つ以上をコードする単離ポリヌクレオチドが含まれる。本発明のポリヌクレオチドは全ゲノム未満を含有し、１本鎖または２本鎖の核酸であり得る。ポリヌクレオチドは、ＲＮＡ、ＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、化学合成ＲＮＡもしくはＤＮＡ、またはその組合せとすることができる。ポリヌクレオチドは、他の構成要素、例えばタンパク質、脂質、及び他のポリヌクレオチドを含まずに精製することができる。例えば、ポリヌクレオチドは、５０％、７５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％精製することができる。本発明の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号１－２７に示されるポリペプチドまたはその断片をコードする。
【００６１】
本発明のポリヌクレオチドは、他のヌクレオチド配列、例えばリンカーをコードする配列、シグナル配列、ＴＭＲ輸送停止配列、膜貫通ドメイン、またはタンパク質精製に有用なリガンド、例えばグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ、ヒスチジンタグ、及びブドウ球菌プロテインＡを含むことができる。
【００６２】
本発明のポリヌクレオチドは単離することができる。単離ポリヌクレオチドは、天然に関連付けられた５’及び３’の隣接ゲノム配列の一方または両方にすぐ隣接していない、天然に存在するポリヌクレオチドである。単離ポリヌクレオチドは、例えば、任意の長さの組換えＤＮＡ分子とすることができるが、天然に存在するゲノムにおいて当該組換えＤＮＡ分子に直接隣接して天然に見いだされる核酸配列が除去されているか不在であることを条件とする。単離ポリヌクレオチドは、天然に存在しない核酸分子も含む。
【００６３】
本発明のポリペプチドをコードする縮重ヌクレオチド配列も、本発明のポリヌクレオチドである。縮重ヌクレオチド配列は、本発明のポリペプチドまたはその断片をコードするポリヌクレオチドであるが、遺伝コードの縮重のため、野生型のポリヌクレオチド配列とは核酸配列が異なる。生理学的に機能的なポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドの相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）分子、種相同体、及びバリアントも、本発明のポリヌクレオチドである。
【００６４】
本発明のポリヌクレオチドは、天然に存在するポリペプチドのコード配列を含むことができ、あるいは天然に存在しない改変配列をコードすることができる。所望の場合、ポリヌクレオチドは、発現調節要素（例えば、複製開始点、プロモーター、エンハンサー、または宿主細胞において本発明のポリヌクレオチドの発現を駆動する他の制御要素を含む）を含む発現ベクターにクローニングすることができる。発現ベクターは、例えば、ｐＢＲ３２２、ｐＵＣ、もしくはＣｏｌＥ１などのプラスミド、またはアデノウイルス２型ベクターもしくは５型ベクターなどのアデノウイルスベクターとすることができる。任意選択により他のベクターも使用することができ、これには以下に限定するものではないが、シンドビスウイルス、シミアンウイルス４０、アルファウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ならびにサイトメガロウイルス及びレトロウイルスベクター（例えば、マウス肉腫ウイルス、マウス乳房腫瘍ウイルス、モロニーマウス白血病ウイルス、及びラウス肉腫ウイルス）が含まれる。また、ミニ染色体（例えば、ＭＣ及びＭＣ１）、バクテリオファージ、ファージミド、酵母人工染色体、バクテリア人工染色体、ウイルス粒子、ウイルス様粒子、コスミド（ファージラムダのｃｏｓ部位が挿入されたプラスミド）、及びレプリコン（細胞内で自らの制御下で複製が可能な遺伝子要素）も使用することができる。
【００６５】
発現調節配列に作用可能に結合したポリヌクレオチドを調製し宿主細胞内で発現させる方法は、当技術分野において周知である。例えば、米国特許第４，３６６，２４６号を参

照。本発明のポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの転写及び／または翻訳を指示する１つ以上の発現調節要素に隣接した位置または近い位置にある場合、作用可能に結合している。

【００６６】

本発明のポリヌクレオチドは、例えば、プローブまたはプライマー（例えば、ＰＣＲプライマー）として使用して、試験試料（例えば、生物学的試料）中のポリヌクレオチドの存在を検出することができる。プローブとは、典型的には配列特異的な様式で、例えばハイブリダイゼーションを通じて、標的核酸との相互作用が可能な分子である。プライマーとは、酵素的操作を支持することができ、かつ酵素的操作が生じるように標的核酸とハイブリダイズすることができる、プローブのサブセットである。プライマーは、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体、または酵素的操作を妨げない当技術分野で利用可能な類似体のうちの任意の組合せから作製することができる。

【００６７】

プローブまたはプライマーは、本発明のポリペプチドをコードする約６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２５、１５０、１７５、２００、またはそれ以上の連続したヌクレオチドであり得る。

【００６８】

抗体

抗体には、本明細書に記載のシスタチンＢポリペプチド、本明細書に記載のバリアントシスタチンＢポリペプチド、またはその断片に特異的に結合する抗体分子が含まれる。抗体は、複数のポリペプチドに特異的に結合することができる。「抗体」という用語は、インタクトな抗体、または抗原結合においてインタクトな抗体と競合するその抗原結合部分もしくは断片を指す。また、「抗体」という用語は、１つ以上のシスタチンＢポリペプチド（例えば、配列番号１－２７）に特異的に結合する、任意のタイプの抗体分子または特定の結合分子も含む。抗体は、天然に存在するものであっても、天然に存在しない、合成の、または遺伝子操作されたものであってもよい。本明細書において、抗体の「抗原結合部分」、抗体の「抗原結合断片」などという用語は、シスタチンＢポリペプチド（例えば、配列番号１－２７）に特異的に結合して複合体を形成する、天然に存在する、酵素的に取得可能な、合成の、または遺伝子操作された任意のポリペプチド、糖タンパク質、または免疫グロブリンを含む。

【００６９】

抗体またはその断片は、本明細書に記載のポリペプチドのエピトープに結合する。抗体は、好適な実験動物においてｉｎ　ｖｉｖｏで作製することも、組換えＤＮＡ技法を用いてｉｎ　ｖｉｔｒｏで作製することもできる。抗体を調製しその特性を決定する手段は、当技術分野で周知である。例えば、Ｄｅａｎ、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．８０：２３－３７（１９９８）；Ｄｅａｎ、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３２：３６１－７９（１９９４）；Ｂａｉｌｅｇ、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３２：３８１－８８（１９９４）；Ｇｕｌｌｉｃｋ、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３２：３８９－９９（１９９４）；Ｄｒｅｎｃｋｈａｈｎ他　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３７：７－５６（１９９３）；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０：２３９－６５（１９９２）；Ｗｒｉｇｈｔ他　Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２：１２５－６８（１９９２）を参照。例えば、ポリクローナル抗体は、本明細書に記載のポリペプチドを動物（例えば、ヒトもしくは他の霊長類、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヤギ、ブタ、イヌ、ウシ、ヒツジ、ロバ、またはウマ）に投与することによって生成することができる。免疫化した動物から血清を採取し、抗体は、例えば、硫酸アンモニウムを用いて沈殿させ、次にアフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを行うことによって、血漿から精製する。ポリクローナル抗体を生成及び処理する技法は、当技術分野において公知である。

【００７０】

抗体は、ＩｇＧ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ２ａ、Ｉｇ２ｂ、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）、ＩｇＭ、ＩｇＡ（ＩｇＡ１及びＩｇＡ２）、ＩｇＤ、及びＩｇＥを含めた任意のアイソタイプとすることができる。

【００７１】

抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、またはその抗原結合断片とすることができる。モノクローナル抗体とは、実質的に同質の抗体群から得られる抗体である。実質的に同質の抗体群は、少量の変異体またはバリアントを含有し得る。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位と相互作用する。それぞれのモノクローナル抗体は、典型的には単一のエピトープを標的とするが、ポリクローナル抗体の個体群は、典型的には多様なエピトープの群を標的とする様々な抗体を含有する。モノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ法（Ｋｏｈｌｅｒ及びＭｉｌｓｔｅｉｎ、Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５、１９７５）、組換え法（米国特許第４，８１６，５６７号）、及びファージ抗体ライブラリーからの単離（Ｃｌａｃｋｓｏｎ他、Ｎａｔｕｒｅ ３５２：６２４－６２８、１９９１；Ｍａｒｋｓ他、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１－５９７、１９９１）を含めた多数の方法によって生成することができる。

【００７２】

キメラ抗体またはその抗原結合部分は、特定の種または特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに由来する重鎖及び／または軽鎖の一部を有し、鎖の残りの部分は別の種、または別の抗体のクラスもしくはサブクラスに由来するものである。例えば、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２９：１２０２（１９８５）；Ｏｉ他、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ４：２１４（１９８６）；Ｇｉｌｌｉｅｓ他、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １２５：１９１－２０２（１９８９）；米国特許第５，８０７，７１５号；同第４，８１６，５６７号；同第４，８１６，３９７号を参照。

【００７３】

キメラ抗体は、例えば、ＣＤＲグラフティング（ＥＰ２３９，４００；ＰＣＴ公開ＷＯ９１／０９９６７；米国特許第５，２２５，５３９号；同第５，５３０，１０１号；及び同第５，５８５，０８９号）、ベニアリング（ｖｅｎｅｅｒｉｎｇ）またはリサーフェイシング（ｒｅｓｕｆａｃｉｎｇ）（ＥＰ５９２，１０６；ＥＰ５１９，５９６；Ｐａｄｌａｎ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２８：４８９－４９８（１９９１）；Ｓｔｕｄｎｉｃｋａ他、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ７（６）：８０５－８１４（１９９４）；Ｒｏｇｕｓｋａ他、ＰＮＡＳ ９６：９６９－９７３（１９９４））、及び鎖シャッフリング（米国特許第５，５６５，３３２号）を含めた様々な技法を用いて生成することができる。

【００７４】

一実施形態では、キメラ抗体は、互いに異なる種の可変領域及び定常領域を含むことができ、例えば、抗体は、ある哺乳類の重鎖及び軽鎖の可変領域と、異なる動物（例えば、マウス、ウサギ、イヌ、ネコ、またはヒト）の重鎖及び軽鎖の定常領域を含むことができる。キメラ抗体は、受容抗体に導入されるＣＤＲにもフレームワーク配列にも含まれていない、追加のアミノ酸（ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ａｃｉｄｓ）を含むことができる。このようなアミノ酸は、抗体が抗原を認識し結合する能力をより的確に最適化するために導入され得る。例えば、必要に応じて、抗体の可変領域のフレームワーク領域内のアミノ酸を置換して、再整形した抗体のＣＤＲが適切な抗原結合部位を形成するようにさせることができる。Ｓａｔｏ他、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．（１９９３）５３：８５１－８５６を参照。

【００７５】

抗体の抗原結合部分または断片における非限定的な例としては、以下のものが挙げられる：Ｆａｂ断片；Ｆａｂ’断片；Ｆａｂ’－ＳＨ断片；Ｆ（ａｂ’）$_2$断片；Ｆｄ断片；Ｆｖ断片；１本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）分子；ｓｄＡｂ断片（ナノボディ）；Ｆａｂ様抗体（パパイン消化によって得られるＦａｂ断片に同等な、重鎖及び軽鎖の可変領域を含有する抗原結合断片）；Ｆ（ａｂ’）$_2$様抗体（ペプシン消化によって得られるＦ（ａｂ’）$_2$

断片に同等な、２つの抗原結合ドメインを含有する抗原結合断片）、抗原断片から調製される多特異性抗体、ダイアボディ、二重特異性抗体、多機能性抗体、ヒト化抗体、イヌ化抗体、ヒト抗体、イヌ抗体、ネコ抗体、マウス抗体、ウサギ抗体、合成抗体、ＣＤＲグラフト抗体、及び抗体の超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位（例えば、ＣＤＲ３ペプチドなどの単離相補性決定領域（ＣＤＲ））、または制限ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４ペプチド。また、他の遺伝子操作された分子、例えば、ドメイン特異性抗体、単一ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、ＣＤＲグラフト抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、ナノボディ（例えば、一価のナノボディ、二価のナノボディ）、１本鎖（ＦＶ）$_2$（ｓｃ（Ｆｖ）$_2$）；二価（ｓｃＦｖ）$_2$）；四価（［ｓｃ（Ｆｖ）$_2$］$_2$）のｓｃＦＶ抗体、及びスモールモジュラー免疫医薬（ＳＭＩＰ）、及びサメ可変ＩｇＮＡＲドメインも、本明細書における「抗原結合断片または部分」とみなされる。

「特異的に結合する（ｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙ　ｂｉｎｄｓ）」、「特異的に結合する（ｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙ　ｂｉｎｄ）」、または「～に特異的な」とは、第１の抗原、例えば配列番号１－２７のポリペプチドが、他の非特異的な分子よりも高いアフィニティーで本明細書に記載の抗体を認識し結合することを意味する。また、「特異的に結合する（ｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙ　ｂｉｎｄｓ）」、「特異的に結合する（ｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙ　ｂｉｎｄ）」、または「～に特異的な」は、第１の抗体、例えば配列番号１－２７に対し産生した抗体が、他の非特異的な分子よりも高いアフィニティーで配列番号１－２７を認識し結合することも意味する。非特異的分子とは、第１の抗原と共通のエピトープを共有しない抗原である。特異的結合は、例えば、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫測定法（ＲＩＡ）、免疫比濁法、粒子増強免疫比濁法、またはウェスタンブロットアッセイを用いて、当技術分野で周知の方法論を用いて試験することができる。

【００７６】

一実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、または２７に示されるポリペプチド上のエピトープに特異的に結合する。一実施形態では、エピトープは、ＡＹＦＬＡＹＦ（配列番号２０）、ＥＬＡＹＦ（配列番号２１）、ＤＥＬＡＹＦ（配列番号２２）、ＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号２３）、ＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号１０）、ＡＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号２４）、ＫＡＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号２５）、ＮＫＡＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号２６）、ＴＮＫＡＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号２７）、またはＱＴＮＫＡＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号４）である。

【００７７】

一実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号１－２７またはその断片との結合において、第２の抗体または参照抗体と競合する。任意の競合的結合アッセイを使用して、同じ抗原に対する２つの抗体間の競合を測定することができる。例えば、サンドイッチＥＬＩＳＡアッセイをこの目的に使用することができる。交差反応性をアッセイする手段は当業者に周知である（例えば、Ｄｏｗｂｅｎｋｏ他（１９８８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６２：４７０３－４７１１を参照）。

【００７８】

競合的結合の評価に使用するいずれかのアッセイを用いて、第１の抗体の存在下で、第２の抗体の抗原に対する結合が少なくとも約３０％、４０％、５０％、６０％、７５％、９０％またはそれ以上低減された場合、第１の抗体は第２の抗体の結合を競合的に阻害すると考えられる。

【００７９】

競合的結合は、固体担体に付着した配列番号１－２７に示される１つ以上の単離ポリペプチドを準備し、抗体の、当該ポリペプチドに結合する能力、または当該ポリペプチドとの結合において本明細書に記載の抗体と競合する能力をアッセイすることによって、確認

することができる。

【００８０】

抗体には、（ａ）配列番号１－２７またはその抗原結合断片との結合において、参照抗体と競合する抗体及びその抗原結合断片；（ｂ）参照抗体と同じ配列番号１－２７またはその抗原結合断片のエピトープに結合する抗体及びその抗原結合断片；（ｃ）参照抗体と実質的に同じK_dで配列番号１－２７またはその抗原結合断片に結合する抗体及びその抗原結合断片；ならびに／または（ｄ）参照抗体と実質的に同じオフレートで配列番号１－２７またはその抗原結合断片に結合する抗体及びその抗原結合断片が含まれ、ここで、参照抗体とは、10^7ｌ／ｍｏｌまたはそれ以上の結合アフィニティーK_aで配列番号１－２７のポリペプチドまたはその抗原結合断片に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片である。

【００８１】

抗体またはその抗原結合断片におけるポリペプチドパートナーに対するアフィニティーは、解離定数（Ｋｄ）によって表すことができる。平衡解離定数（Ｋｄ）は、k_{off}／k_{on}の定量で計算される。Ｃｈｅｎ，Ｙ．他、１９９９、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９３：８６５－８８１を参照。アフィニティー定数を測定する様々な方法は当技術分野において公知である。特定の実施形態では、参照抗体は、特定のK_{on}レート／会合レートまたはK_{off}レートで配列番号１－２７のポリペプチドに対する結合アフィニティーを有する抗体またはその抗原結合断片である。一実施形態では、抗体は$6\times10^{5}M^{-1}s^{-1}$またはそれより良好な$K_{on}$で特異的に結合し、抗体は$5\times10^{-6}s^{-1}$またはそれより良好な$K_{off}$レートで特異的に結合し、あるいは抗体は５００ｐＭ、４００ｐＭ、３００ｐＭ、２００ｐＭ、１００ｐＭ、５０ｐＭ、４０ｐＭ、３０ｐＭ、２０ｐＭ、またはそれより良好な結合アフィニティーで特異的に結合する。

【００８２】

配列番号１－２７に特異的に結合する抗体は、試料（例えば、動物からの血清、血液、血漿、細胞、組織、唾液、プラーク、歯肉溝液、歯肉生検、舌スワブ、または尿試料）中に存在するシスタチンＢポリペプチド及びその断片の存在を検出するのにとりわけ有用である。免疫測定法は、１つの抗体またはいくつかの抗体を利用することができる。免疫測定法は、例えば、１つのエピトープに特異的なモノクローナル抗体、１つのポリペプチドの複数のエピトープに特異的なモノクローナル抗体の組合せ、異なるポリペプチドのエピトープに特異的なモノクローナル抗体、同じ抗原に特異的なポリクローナル抗体、異なる抗原に特異的なポリクローナル抗体、またはモノクローナル抗体とポリクローナル抗体との組合せを使用することができる。免疫測定法プロトコルは、例えば、競合型、直接反応型、またはサンドイッチ型の、例えば標識抗体を使用したアッセイに基づくことができる。抗体は、当技術分野で公知の任意のタイプの標識で標識することができ、このような標識には、例えば、蛍光、化学発光、放射性、酵素、コロイド金属、ラジオアイソトープ、及び生物発光の標識が含まれる。

【００８３】

抗体またはその抗原結合断片は支持体に結合させ、ある特定の疾患及び状態の試料中に存在するポリペプチドの存在または量の検出に使用することができる。支持体としては、例えば、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然及び修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、及びマグネタイト（ｍａｇｌｅｔｉｔｅ）が挙げられる。抗体またはその抗原結合断片は、凍結乾燥、粉末化、または乾燥させてもよく、例えばフリーズドライにしてもよい。

【００８４】

抗体はさらに、イムノアフィニティーカラムによるポリペプチドの単離に使用することもできる。抗体は、免疫選択活性を保持するように、例えば吸収または共有結合によって、固体担体に固定することができる。任意選択により、抗体の抗原結合部位のアクセス性が保たれるようにスペーサー群を含めることができる。次に、固定された抗体を使用して、生物学的試料（以下に限定するものではないが、唾液、プラーク、歯肉溝液、歯肉生検

、舌スワブ、血清、血液、及び尿を含む）からの配列番号１－２７またはその断片に特異的に結合させることができる。

【００８５】

また、抗体を免疫局在性の研究に使用して、様々な細胞事象または生理学的状態における本明細書に記載のポリペプチドの存在及び分布を分析することもできる。また、抗体を使用して、受動免疫に関与する分子を同定したり、非タンパク質抗原の生合成に関与する分子を同定したりすることもできる。このような分子の同定は、ワクチン開発に有用であり得る。抗体（例えば、モノクローナル抗体及び１本鎖抗体を含む）を使用して、ある特定の疾患または状態の経過を監視することができる。ある動物からの試験試料中の配列番号１－２７またはその断片の量の増加または減少を測定することにより、障害の改善を目的とする特定の治療レジメンが有効であるかどうかを判定することができる。抗体は、例えば、ＲＩＡ、ＥＬＩＳＡ、またはウェスタンブロットアッセイなどの直接結合アッセイを用いて、検出及び／または定量化することができる。

【００８６】

検出の方法

一実施形態では、試料中のシスタチンＢポリペプチドを検出する方法であって、試料と、配列番号１－２７に特異的な１つ以上の抗体とを、シスタチンＢポリペプチドと配列番号１－２７に特異的な１つ以上の抗体との複合体の形成に適した条件下で接触させることを含む方法が提供される。シスタチンＢポリペプチドと配列番号１－２７に特異的な１つ以上の抗体との複合体が検出される。

【００８７】

一実施形態では、配列番号１－２７を含むポリペプチド及びその断片を検出する方法が提供される。任意選択により、試料中の配列番号１－２７を含むポリペプチドの量を検出することができる。ポリペプチドの相対的レベルは、いくつかの疾患または状態の診断または検出に使用することができる。当技術分野で公知の任意のポリペプチド検出方法を本明細書に記載の方法で使用することができる。

【００８８】

本明細書に記載の抗体と共に使用するアッセイ方法としては、直接及び間接の標識技法、イムノアフィニティーカラム、免疫磁気ビーズ、蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ）、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫測定法（ＲＩＡ）、凝集アッセイ、ネフェロメトリックアッセイ、定量的ネフェロメトリックアッセイ、さらに一次抗体を検出する標識二次抗体が挙げられ得る。

【００８９】

抗体は、例えば、検出に適合した励起及び発光波長を有する蛍光標識によって、蛍光活性化セルソーターなどの市販の装置を用いて、検出可能に標識することができる。蛍光標識の例としては、フィコエリトリン（ＰＥ）、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、ローダミン（ＲＨ）、Ｔｅｘａｓ　Ｒｅｄ（ＴＸ）、Ｃｙ３、Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３２５８、及び４’６－ジアミノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ）が挙げられる。このような標識は、標準的技法を用いて抗体に結合させることができる（Ｍａｉｎｏ他、１９９５、Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ　２０：１２７－１３３）。

【００９０】

本明細書に記載の方法は、配列番号１－２７またはその断片の検出に使用することができ、このとき抗体または抗原結合抗体断片は配列番号１－２７に特異的に結合する。生物学的試料としては、例えば、動物（例えば、イヌ、ネコ、またはヒト）からの血清、血液、細胞、血漿、唾液、プラーク、歯肉溝液、歯肉生検、舌スワブ、または尿が挙げられ得る。試験試料は、未処理であっても、沈殿、分画、分離、希釈、濃縮、精製を行ってもよい。

【００９１】

本明細書において、「患者（患畜）（ｐａｔｉｅｎｔ）」または「対象」とは、ヒト、またはネコ、ウシ、ブタ、ウマ、もしくはイヌを含めた非ヒト動物を意味し得る。

【００９２】
本明細書において、「試料」、「試験試料」、「患者試料」、または「対象試料」という用語には、以下に限定するものではないが、対象から得られた血液、血清、血漿、唾液、プラーク、歯肉溝液、歯肉生検、舌スワブ、または尿の試料が含まれる。
【００９３】
アッセイには、以下に限定するものではないが、競合型、直接反応型、またはサンドイッチ型アッセイに基づいたものが含まれ、以下に限定するものではないが、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、ウェスタンブロット、ＩＦＡ、放射免疫測定法（ＲＩＡ）、血液凝集（ＨＡ）、免疫比濁法、粒子増強免疫比濁法、蛍光偏光免疫測定法（ＦＰＩＡ）、及びマイクロタイタープレートアッセイ（マイクロタイタープレートの１つ以上のウェルで行われる任意のアッセイ）が含まれる。あるアッセイは、リバーシブルフロークロマトグラフィー結合アッセイ（ｒｅｖｅｒｓｉｂｌｅ　ｆｌｏｗ　ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｉｃ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ａｓｓａｙ）、例えばＳＮＡＰ（登録商標）アッセイを含む。例えば、米国特許第５，７２６，０１０号を参照。
【００９４】
アッセイでは、固相または基質を使用することができ、あるいは免疫沈殿法または固相を利用しない他の任意の方法によって実施することができる。固相または基質が使用される場合、１つ以上のポリペプチドまたは抗体は、固体担体または基質（例えば、マイクロタイターウェル、磁気ビーズ、非磁気ビーズ、カラム、マトリックス、膜、合成もしくは天然の繊維（例えば、ガラスもしくはセルロースベースの材料、またはポリエチレン、ポリプロピレン、もしくはポリエステルなどの熱可塑性ポリマー）で構成された繊維マット、粒子材料（例えば、ガラスまたは様々な熱可塑性ポリマー）で構成された焼結構造、またはニトロセルロース、ナイロン、ポリスルホンなど（概して本来的に合成のもの）で構成された鋳造膜フィルム）に直接的または間接的に付着する。一実施形態では、基質は、多孔質ポリエチレンとして一般的に知られる焼結ポリエチレン粒子であり、例えば、Ｃｈｒｏｍｅｘ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ａｌｂｕｑｕｅｒｑｕｅ，ＮＭ）製の１０－１５ミクロンの多孔質ポリエチレンである。これらの基質材料は全て、フィルム、シート、またはプレートなどの好適な形状で使用することができ、あるいは、紙、ガラス、プラスチックフィルム、またはファブリックなどの適切な不活性担体にコーティングまたは結合または積層することができる。抗体を固相に固定する好適な方法としては、イオン的、疎水的、共有結合的な相互作用などが挙げられる。
【００９５】
一実施形態では、方法は、試験試料と、配列番号１－２７に特異的に結合する１つまたは複数の抗体とを、ポリペプチド／抗体複合体、すなわち免疫複合体の形成を可能にする条件下で接触させることを含む。すなわち、抗体は、試料中に位置する配列番号１－２７の１つまたは複数のポリペプチドに特異的に結合する。当業者は、抗体／ポリペプチド複合体の結合の検出に使用されるアッセイ及び条件に精通している。試料中のポリペプチド及び抗体間複合体の形成が検出される。抗体／ポリペプチド複合体の形成は、ポリペプチドが患者試料中に存在することを示すものである。
【００９６】
一実施形態では、抗体に結合した酵素結合体などの指示試薬が検出可能な反応を触媒した場合に、ポリペプチド／抗体複合体が検出される。任意選択により、シグナル生成化合物を含む指示試薬を、ポリペプチド／抗体／指示薬複合体の形成を可能にする条件下で、ポリペプチド／抗体複合体に適用してもよい。ポリペプチド／抗体／指示薬複合体が検出される。任意選択により、ポリペプチド／抗体複合体の形成の前にポリペプチドまたは抗体を指示試薬で標識してもよい。当該方法は、任意選択により陽性または陰性の対象を含むことができる。陽性対照は、Ｃｙｓ　Ｂに特異的な抗体に特異的に結合し陽性の結果をもたらすと考えられる１つ以上のポリペプチドを含有することができる。陰性対照は、いかなるＣｙｓ　Ｂポリペプチドも、Ｃｙｓ　Ｂに特異的な抗体に特異的に結合または交差反応し得るいかなるポリペプチドも他の構成要素も含有しない。

【００９７】
一実施形態では、１つ以上の抗体を、固相または基質に対し、共有結合的にまたは非共有結合的に固定する。Ｃｙｓ　Ｂポリペプチドを含む可能性のある試料を基質に添加する。Ｃｙｓ　Ｂに特異的な１つ以上の抗体を基質に添加する。抗体は、固相で使用されるものと同じ抗体であってもよく、あるいは異なる供給源または種からのものであってもよく、酵素結合体などの指示試薬に結合していてもよい。各添加の前に洗浄ステップを実施してもよい。発色団または酵素基質を添加し、発色を展開させる。発色反応を停止させ、例えば分光光度計を用いて、発色を定量化することができる。
【００９８】
別の実施形態では、１つ以上の抗体を、固相または基質に固定する。Ｃｙｓ　Ｂポリペプチドを含有する可能性のある試験試料を基質に添加する。Ｃｙｓ　Ｂポリペプチドに特異的に結合する第２の抗種抗体（ａｎｔｉ－ｓｐｅｃｉｅｓ　ａｎｔｉｂｏｄｙ）を添加する。この第２の抗種抗体は、固相に固定した抗体とは異なる種からのものである。第２の抗種抗体に特異的に結合し、かつ固相に固定した抗体には特異的に結合しない第３の抗種抗体を添加する。第３の抗種抗体は、酵素結合体などの指示試薬を含むことができる。各添加の前に洗浄ステップを実施してもよい。発色団または酵素基質を添加し、発色を展開させる。発色反応を停止させ、例えば分光光度計を用いて、発色を定量化することができる。
【００９９】
一実施形態では、１つ以上の捕捉抗体は、本明細書に記載のポリペプチドの１つ以上のエピトープに特異的に結合することができる。１つ以上の捕捉抗体は、配列番号１－２７の１つまたは複数のポリペプチドを、例えば固体担体に固定するのに使用することができる。１つ以上の検出抗体は、ポリペプチドの同じ１つ以上のエピトープまたは異なる１つ以上のエピトープに特異的に結合することができる。検出抗体は、ポリペプチドの固体担体への固定を検出または視覚化するのに使用することができる。この実施形態は、ただ１つの抗体を捕捉機能及び検出機能の両方に使用するアッセイよりも特異的でありかつ感受性が高いため、有利である。
【０１００】
あるタイプのアッセイ形式では、１つ以上の抗体を固相または基質にコーティングすることができる。配列番号１－２７を含むポリペプチドまたはその断片を含有する疑いのある試験試料を、前述のポリペプチドに特異的な抗体または抗体断片に結合したシグナル生成化合物を含む指示試薬と共に、試験試料ポリペプチドに対する固相の抗体またはポリペプチドに特異的な抗体に結合した指示試薬化合物の抗原／抗体複合体の形成に十分な条件下で、一定時間インキュベートする。抗ポリペプチド抗体に結合した指示試薬と固相との結合を、定量的に測定することができる。対照試料または対照基準から生成されたシグナルと比較しての、シグナルの測定可能な変化は、配列番号１－２７を含むポリペプチドまたはその断片の存在を示すものである。このタイプのアッセイは、試験試料中のポリペプチドの量を定量化することができる。
【０１０１】
別のタイプのアッセイ形式では、１つ以上の抗体を担体または基質にコーティングする。抗体を指示試薬に結合し、試験試料に添加する。この混合物を担体または基質に適用する。試験試料中にＣｙｓ　Ｂポリペプチドが存在する場合、Ｃｙｓ　Ｂポリペプチドは指示試薬に結合した１つ以上の抗体にも、担体に固定した１つ以上の抗体にも結合することになる。そして、ポリペプチド／抗体／指示薬複合体を検出することができる。このタイプのアッセイは、試験試料中のポリペプチドの量を定量化することができる。
【０１０２】
別のタイプのアッセイ形式では、１つ以上の抗体を担体または基質にコーティングする。試験試料を担体または基質に適用し、インキュベートする。固体担体を洗浄液で洗浄することにより、結合していない試料からの構成要素を洗い落とす。配列番号１－２７を含むポリペプチドまたはその断片が試験試料中に存在する場合、固相にコーティングされた

抗体に結合することになる。このポリペプチド／抗体複合体は、指示試薬に結合した第２の抗種特異性抗体を用いて検出することができる。そして、ポリペプチド／抗体／抗種抗体指示薬複合体を検出することができる。このタイプのアッセイは、試験試料中のポリペプチドの量を定量化することができる。

【０１０３】

ポリペプチド／抗体複合体またはポリペプチド／抗体／指示薬複合体の形成は、例えば放射分析法、比色分析法、蛍光分析法、サイズ分離法、または沈殿法によって検出することができる。任意選択により、ポリペプチド／抗体複合体の検出は、シグナル生成化合物を含む指示試薬に結合した二次抗体を添加することによって行われる。ポリペプチド／抗体複合体に会合したシグナル生成化合物（標識）を含む指示試薬は、上述の方法を用いて検出することができ、これには発色剤、酵素結合体などの触媒、フルオレセイン及びローダミンなどの蛍光化合物、ジオキセタン、アクリジニウム、フェナンスリジニウム、ルテニウム、及びルミノールなどの化学発光化合物、放射性元素、直接的な視覚標識、さらに補因子、阻害物質、磁気粒子などが含まれる。酵素結合対の例としては、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ベーターガラクトシダーゼなどが挙げられる。特定の標識の選択はクリティカルなことではないが、特定の標識を選択することで、それ自身によってまたは１つ以上のさらなる物質と共にシグナルを生成することができると考えられる。

【０１０４】

本明細書において「量を決定する」という表現は、試料中の１つ以上のポリペプチドのレベルを測定または識別することを指す。これは、当技術分野で周知のポリペプチドを検出するための方法論によって行うことができ、例えば、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫測定法（ＲＩＡ）、免疫比濁法、粒子増強免疫比濁法、またはウェスタンブロットアッセイ、または免疫組織化学が挙げられる。代替方法として、配列番号１－２７のポリペプチドは、質量分析法または当業者に公知の類似方法によって決定することができる。試料中に存在するポリペプチドの量の決定は、このようなｉｎ　ｖｉｔｒｏ分析及び実験操作によって行われる。

【０１０５】

診断の方法

一実施形態では、対象における腎疾患を診断する方法が提供される。当該方法は、対象からの試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を決定することであって、シスタチンＢポリペプチドの量が配列番号１－２７に特異的に結合する１つ以上の抗体を用いて決定される、決定することを含む。試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を対照試料または対照基準と比較し、試料中のシスタチンＢポリペプチドレベルが対照試料または対照基準に比べて高いことが腎疾患の徴候となる。

【０１０６】

他の方法では、ＣＫＤ患者におけるＡＫＩまたはＡＫＩを診断することができる。一実施形態では、当該方法は、がんまたは腎臓がんが原因の腎機能低下または腎臓への物理的損傷を診断することができる。別の実施形態では、当該方法は、細菌感染が原因の腎疾患、腎機能低下または腎臓への物理的損傷を診断することができる。細菌感染の原因は、例えば、アナプラズマ種、エーリキア種、レプトスピラ種、エシェリキア種、またはボレリア種であり得る。

【０１０７】

本発明の一実施形態では、細菌感染が原因の腎疾患、腎機能低下または腎臓への物理的損傷を診断または検出する方法が提供される。当該方法は、対象からの試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を決定することであって、シスタチンＢポリペプチドの量が配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、または２７からなる１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体を用いて決定される、決定することを含む。試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を対照試料または対照基準と比較し、試料

中のシスタチンＢポリペプチドレベルが対照試料または対照基準に比べて高いことが、細菌感染が原因の腎疾患、腎機能低下、または腎臓への物理的損傷の徴候となる。

【０１０８】

本明細書で開示するポリペプチドは、疾患を有する対象試料において、疾患を有しない対象からの対照対象試料よりも多い量または高いレベルで見いだされる。本明細書に記載のポリペプチドの対象試料における相対的レベルは、疾患及び疾患重症度の進行を示すことができる。すなわち、ある場合において、より多い量または高いレベルのシスタチンＢポリペプチドは、より重症の疾患状態を意味する。

【０１０９】

シスタチンＢポリペプチドの高いレベルとは、対照試料または対照基準よりも約１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００％またはそれ以上高いレベルである。シスタチンＢポリペプチドの高いレベルとは、対照試料または対照基準よりも約１０－５００％またはそれ以上、約２０－５００％またはそれ以上、約３０－５００％またはそれ以上、約４０－５００％またはそれ以上、約５０－５００％またはそれ以上、約６０－５００％またはそれ以上、約１００－５００％またはそれ以上のレベルである。

【０１１０】

また、シスタチンＢポリペプチドの高いレベルとは、対照試料または対照基準に比べて量が統計的有意に増加したレベルでもあり得る。

【０１１１】

また、シスタチンＢポリペプチドの高いレベルとは、約１０、２０、５０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、１，５００、２，０００、３，０００、４，０００、５，０００、６，０００、７，０００、８，０００、９，０００、１０，０００ｎｇ／ｍｌ、またはそれ以上であり得る。シスタチンＢポリペプチドの対照レベルまたは対照基準とは、約４００、３５０、３００、２５０、２００、１５０、１００、５０、２０、１０ｎｇ／ｍｌまたはそれ以下であり得る。

【０１１２】

シスタチンＢポリペプチドの高いレベルは、いかなるタイプの腎臓の疾患もしくは状態、細菌感染、または歯周疾患も有しない正常な対照対象を用いて決定される対照試料または対照基準と比較することができる。

【０１１３】

一部の実施形態では、試験試料中のシスタチンＢポリペプチドのレベルを、１個体以上の正常な対照対象からの対照試料中のシスタチンＢのレベルと比較する。典型的には、次に対照試料中で測定した対照レベルを試験試料中で測定したシスタチンＢポリペプチドレベルと比較する。代替方法として、試験試料中のシスタチンＢポリペプチドのレベルを、予め決定または事前定義した対照レベル（「対照基準」）と比較する。例えば、シスタチンＢポリペプチドの対照基準は、データから、例えば、複数の正常または健康な対照対象からの対照試料中のシスタチンＢポリペプチドのレベルを含めたデータから計算することができる。評価を受ける正常または健康な対照対象及び試験対象は、同じ種であり得る。

【０１１４】

特定の実施形態では、哺乳類における、より詳細にはイヌ、ネコ、及びヒトにおける、ある特定の疾患または状態を識別するための試薬及び方法が提供される。ある特定の実施形態では、患者の診断及び予測を提供する方法が提供される。対象試料中のＣｙｓ　Ｂポリペプチドの識別は、腎疾患の独立予測因子、または慢性腎疾患ステージ（例えば、ステージ１－４）における急性腎障害または活動性腎障害の識別子であり得る。当該方法は、慢性腎疾患における急性腎障害または活動性腎障害の診断及び識別を有利に可能にし、患者の年齢または体重による影響または交絡を受けない。したがって、さらなる実施形態は、ポリペプチドを用いて決定される前述の腎臓の患者予測を使用して、適切な腎臓療法を選択することに向けられる。

【０１１５】

対象試料におけるＣｙｓ　Ｂポリペプチドの識別は、ＡＫＩグレード（例えば、グレード１－５）の独立予測因子であり得る。本明細書に記載の方法及び組成物は、グレード３より前のＡＫＩステージの診断及び識別を有利に可能にし、患者の年齢または体重による影響または交絡を受けない。

【０１１６】

抗体は、腎疾患にかかっている疑いのある動物、例えば、ヒト、ネコ、またはイヌから試験試料を得ることにより、腎疾患の診断方法に使用することができる。試験試料と抗体とを、抗体－抗原複合体（すなわち、免疫複合体）の形成を可能にする条件下で接触させる。当業者は、抗原／抗体複合体の形成を可能にし、それに適切である条件を認識している。抗体－抗原複合体の存在または量は、当技術分野で公知の方法論によって決定することができる。

【０１１７】

実施形態にはさらに、患者試料中の特定のポリペプチドのレベルを識別することにより、患者の健康状態を予測する、疾患進行を監視する、及び／または治療有効性を評価／監視する方法が含まれる。一態様では、当該方法は、疾患進行または治療有効性を評価するために複数の時点で実施することができる。特定の実施形態では、当該方法は、診断で実施し、次に、特定の療法が疾患進行の低減または改善をもたらすはずである治療後の特定の時点で実施することができる。

【０１１８】

また、本明細書に記載の方法は、配列番号１－２７を含むポリペプチドの量（ａｍｏｕｎｔ）または分量（ｑｕａｎｔｉｔｙ）も示すことができる。特定の実施形態では、ある特定のポリペプチドの量または分量は、疾患ステージの指標（すなわち、ステージ１－４）、疾患進行、及び／または予後指標をもたらす。酵素結合体などの多くの指示試薬を用いると、存在するポリペプチドの量は生成シグナルに比例している。試験試料のタイプに応じて、好適な緩衝試薬で希釈し、濃縮し、またはいかなる操作もすることなく固相と接触させることができる。例えば、予め希釈した血清または血漿の試料、または尿などの濃縮された検体は、ポリペプチドの存在または存在するポリペプチドの量の決定に使用することができる。

【０１１９】

本明細書に記載のポリペプチド及びアッセイは、他のポリペプチドまたはアッセイと組み合わせて腎疾患の存在を検出することができる。例えば、ポリペプチド及びアッセイは、クレアチニンまたは一般的なタンパク質レベルの検出または測定に適した試薬と組み合わせることができる。

【０１２０】

一実施形態では、上部尿路感染症と下部尿路感染症とを識別する方法も提供される。上部尿路感染症とは、腎臓の感染症（腎盂腎炎）である。下部尿路感染症とは、膀胱の感染症（膀胱炎）である。これらの状態は、区別が困難であり得る。これらの治療は異なり得るため、医療従事者にとって上部尿路感染症と下部尿路感染症との違いが分かるのは有利なことである。これらの感染症を識別するための方法が当技術分野で必要とされている。

【０１２１】

当該方法は、対象からの試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を、配列番号１－２７に特異的に結合する１つ以上の抗体を用いて決定することを含む。試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を対照試料または対照基準と比較し、試料中のシスタチンＢポリペプチドレベルが対照試料または対照基準に比べて高いことが対象における上部尿路感染症の徴候となる。

【０１２２】

一実施形態では、急性腎障害と下部尿路感染症とを識別する方法が提供される。これらの状態は、区別が困難であり得る。これらの治療は異なり得るため、医療従事者にとって急性腎障害と下部尿路感染症との違いが分かるのは有利なことである。当該方法は、対象からの試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を決定することであって、シスタチンＢポ

リペプチドの量が配列番号１－２７からなる１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つ以上の抗体を用いて決定される、決定することを含む。試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を対照試料または対照基準と比較し、試料中のシスタチンＢポリペプチドレベルが対照試料または対照基準に比べて高いことが対象における急性腎障害の徴候となる。

【０１２３】

一実施形態では、対象における歯周病を診断する方法が提供される。歯周疾患には、歯肉炎（歯肉の炎症）及び歯周病が含まれる。歯周病は、アタッチメントロス及び歯槽骨の破壊をもたらす歯周組織の疾患である。歯周疾患の臨床的診断は、疾患を示す歯周組織における様々なサイン及び症状の認識によって行われる。サイン及び症状の出現は、通常は疾患の発症からしばらく経ち、支持する骨及び組織にかなりの損傷が生じてからのことである。さらに歯周疾患は、獣医学患畜において、全身麻酔なしでは適正に評価または治療することができない場合が多い。歯周疾患を早期に検出する方法が当技術分野で必要とされている。当該方法は、対象からの試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を決定することを含む。シスタチンＢポリペプチドの量は、配列番号１－２７に特異的な１つ以上の抗体を用いて決定される。試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を対照試料または対照基準と比較し、試料中のシスタチンＢポリペプチドレベルが対照試料または対照基準に比べて高いことが対象における歯周疾患の徴候となる。

【０１２４】

治療方法

ある特定の実施形態では、対象における疾患状態を治療する方法が提供される。当該方法は、対象からの試料中のシスタチンＢポリペプチドの量を、番号１－１３に特異的な１つ以上の抗体を用いて決定するための分析の結果を提供する試験を要求することを含む。試料が含有するシスタチンＢポリペプチドの量が疾患状態に対する対照試料または対照基準に比べて高い場合に、対象に疾患状態に対する治療が投与される。

【０１２５】

疾患状態には、ＡＫＩ、歯周疾患、上部尿路感染症、及び腎疾患が含まれる。一実施形態では、疾患状態は、がんでも腎臓がんでもない。

【０１２６】

ＣＫＤ、ＡＫＩ、及び腎疾患の治療としては、例えば、閉塞性ネフロン／尿管結石の手術、腎臓新形成に対する化学療法、食事管理、腸のリン吸着剤、抗タンパク尿薬（例えば、アンジオテンシン変換酵素阻害薬（ＡＣＥＩ）、オメガ３脂肪酸）、降圧薬（例えば、ＡＣＥＩ、カルシウムチャネル拮抗薬（ＣＣＡ））、脱水を矯正するための輸液療法、アシドーシスの管理、利尿薬の投与、透析、電解質異常の矯正、制吐薬及び制酸薬、組換えエリスロポエチンが挙げられる。上部尿路感染症は、抗生物質で治療することができる。歯周疾患は、十分な洗浄、スケーリング、及びルートプランニング（ｒｏｏｔ　ｐｌａｎｎｉｎｇ）、歯肉グラフト手術、レーザー治療、再生手順（ポケットにおける膜（フィルター）、骨グラフト、または組織刺激タンパク質の使用）、歯科インプラント、ポケット低減手順（歯肉組織の折り返し、及び組織を元の位置に固定する前の疾患原因細菌の除去）で治療することができる。

【０１２７】

代替的な実施形態では、本明細書に記載の方法を使用して、組成物または治療レジーム（組成物または食事）の疾患進行の改善に対する有効性を評価することができる。同様に、本明細書に記載の方法を使用して、配列番号１－２７を含むポリペプチドの患者レベルに対する組成物または治療レジメンの活性を評価することができる。

【０１２８】

キット

一実施形態では、本明細書に記載の方法を実施するためのキットが提供される。ある特定の実施形態では、当該キットは、配列番号１－２７を含む１つまたは複数のポリペプチドに特異的な１つまたは複数の抗体を含む。任意選択により、ある特定の実施形態では、使用説明書に加えて、例えばサンドイッチアッセイで有用な二次抗体を含むことができる。

特徴的な標識抗体、さらに抗体の標識用の試薬もキットに存在し得る。

【０１２９】

さらなる実施形態では、キットは、それぞれが配列番号１－２７を含む１つ以上のポリペプチドに特異的に結合する１つまたは複数の抗体を含む。ある特定の実施形態では、抗体は、チップ、マイクロアレイ、ビーズなどを含むがこれに限定されない固体担体または基質上で提供される。

【０１３０】

当該キット（例えば、製造品）は、患者試料中の本明細書に記載のポリペプチドまたはそのタンパク質断片を検出するためのものであり得る。キットは、１つ以上の抗体及び、当該抗体の、本明細書に記載の全長タンパク質またはタンパク質断片に対する結合を判定する組成物を含む。また、キットまたは製造品は、１つ以上の抗体または抗体断片及び、当該抗体または抗体断片の、試料中のポリペプチドに対する結合を判定する組成物も含むことができる。キットは、１つ以上のポリペプチドまたは抗体を含有するデバイス及び、当該１つ以上のポリペプチドまたは抗体の使用説明書を、例えば哺乳類における腎疾患の識別のために含むことができる。また、当該キットは、キットの１つ以上のポリペプチドまたは抗体が腎臓の機能不全の識別のために使用され得るものであることを示すラベルを含むパッケージング材料も含むことができる。緩衝液、対照などの当業者に公知の他の構成要素は、このような試験キットに含まれ得る。本明細書に記載のポリペプチド、抗体、アッセイ、及びキットは、例えば患者における個々のケースの腎疾患診断に有用である。

【０１３１】

当該キットは、腎疾患、特にイヌ、ネコ、及びヒトの腎疾患の治療を診断、予測、または監視するのに有用である。

【０１３２】

本明細書で例示的に記載される実施形態は、本明細書で具体的に開示されていない任意の１つまたは複数の要素、１つまたは複数の限定の不在下で好適に実施され得る。したがって、例えば、本明細書の各場合において、「～を含む」、「～から本質的になる」、及び「～からなる」という用語のいずれかは、その通常の意味を保持しながら他の２つの用語のいずれかに置き換えることができる。用いられた用語及び表現は、説明のための用語として限定なしで使用され、このような用語及び表現の使用が、示され記載されている当該特徴の等価物またはその一部を除外するようには意図されておらず、請求される実施形態の範囲内で様々な改変が可能であることが認識されている。したがって、本明細書は実施形態によって具体的に開示されているが、本明細書で開示される概念における任意選択による特徴、改変、及びバリエーションが当業者によって用いられ得ること、またこのような改変及びバリエーションが、本明細書及び付属の請求項によって定義されるこれらの実施形態の範囲内とみなされることを理解するべきである。

【０１３３】

上述の特徴を含む方法の実施形態は、本開示の範囲内に入るように意図されている。

【実施例】

【０１３４】

以下の実施例は、本開示における特定の実施形態及びその様々な用途を例示するものである。これらの実施例は説明の目的で示すものに過ぎず、限定として解釈すべきではない。

【０１３５】

実施例１：イヌＣｙｓ　Ｂのタンパク質配列

かつて、イヌＣｙｓ　Ｂは配列番号１に示すような７７ａａのタンパク質配列を有すると考えられていた。

ＱＶＫＡＱＬＥＥＲＥＮＫＫＹＴＴＦＫＡＶＴＦＲＳＱＶＶＡＧＴＰＹＦＩＫＶＱＶＤＤＤＥＦＶＨＬＲＶＦＱＳＬＰＨＥＮＫＰＬＡＬＳＳＹＱＴＮＫＡＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号１）

しかし、この考えは正しくない。ＭＤＣＫ細胞株をコンフルエントに増殖させ、付着した細胞を採取し、界面活性剤を含有する生理学的緩衝液に溶解した。溶解後、細胞を１００００ｒｐｍで３０分間スピンして、細胞細片をペレット状にした。上清を尿特異性イヌシスタチンＢの供給源に使用した。上清を使用して、イヌＣｙｓ　Ｂの欠損した２１ａａＮ末端をトリプシン消化及びＬＣ－ＭＳ同定を用いて配列決定した。

ＭＭＣＧＡＰＳＡＳＱＰＡＴＡＤＴＱＡＩＡＤ（配列番号２）

したがって、イヌＣｙｓ　Ｂ（ＦＬ－Ｃｙｓ　Ｂ）の完全なアミノ酸配列を以下のように決定した。

ＭＭＣＧＡＰＳＡＳＱＰＡＴＡＤＴＱＡＩＡＤＱＶＫＡＱＬＥＥＲＥＮＫＫＹＴＴＦＫＡＶＴＦＲＳＱＶＶＡＧＴＮＹＦＩＫＶＱＶＤＤＤＥＦＶＨＬＲＶＦＱＳＬＰＨＥＮＫＰＬＡＬＳＳＹＱＴＮＫＡＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号３）

【０１３６】

実施例２：イヌシスタチンＢに対する抗体

Ａ．　組み換えタンパク質に対する抗体産生

ウサギにおける標準的な方法論に従って、免疫原として配列番号１及び配列番号３の組換えタンパク質を使用することにより、ポリクローナル抗体を生成した。したがって、各抗体は、ＥＬＩＳＡアッセイでそれぞれの組換え免疫原に特異的に結合するように産生した。

【０１３７】

マウスにおける標準的な方法論に従って、免疫原として配列番号３を有する組換えタンパク質をアジュバントのＣＰＧと共に使用することにより、モノクローナル抗体を産生した。７つの抗体は、ＥＬＩＳＡアッセイでそれぞれの組換え免疫原に特異的に結合するように生成した。ＨＲＰ－ヤギ抗マウスＩｇＧ　Ｈ及びＬ鎖二次抗体を使用してモノクローナル結合を検出した。試験した全てのクローンは、５ｕｇ／ｍｌの組換えＦＬシスタチンＢ（配列番号３）でコーティングしたプレートに結合した。表４は、クローンのうちの３つにおける例示的な結合データを示している。

【０１３８】

【表５】

表４：モノクローナル抗体のｒＦＬ－Ｃｙｓ　Ｂに対するスクリーニング。３つのクローンからの代表的な段階希釈データ

	Cys Bモノクローナル(10ug/ml)		
FL-Cys B (ug/ml)	9A3	5E1	3H4
10	2.79	2.77	2.74
1	2.38	2.32	2.36
0.5	1.94	1.87	1.79
0.25	1.54	1.46	1.43
0.125	1.12	1.04	0.97
0.0625	0.69	0.62	0.64
0.03125	0.44	0.42	0.43
0	0.11	0.11	0.13

【０１３９】

Ｂ：　合成ペプチドに対する抗体産生

イヌシスタチンＢに由来する以下のペプチドをＫＬＨに結合した。結合体を、ウサギの抗体生成用の免疫原として使用した。

【０１４０】

シスタチンＢ　Ｃ末端「ペプチド９」　ＱＴＮＫＡＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号４）
シスタチンＢ　Ｎ末端「ペプチド３－２０」　ＣＧＡＰＳＡＳＱＰＡＴＡＤＴＱＡＩＡ（配列番号５）
シスタチンＢ　Ｎ末端「ペプチド３－１０」　ＣＧＡＰＳＡＳＱ（配列番号６）
シスタチンＢ　Ｎ末端「ペプチド１８－２５」　ＣＡＩＡＤＱＶＫＡ（配列番号７）
シスタチンＢ「ペプチド２」ＦＱＳＬＰＨＥＮＫＰＬＡＬＳＳ（配列番号８）
シスタチンＢ「ペプチド１」ＳＱＶＶＡＧＴＰＹＦＩＫＶＱＶＤＤＤ（配列番号９）

【０１４１】

さらに、マウスにおける標準的な方法論に従って、免疫原として配列番号２（Ｎ末端）及び配列番号５（ペプチド３－２０）のペプチドをフロイントアジュバントと共に使用することにより、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を産生した。したがって、各抗体は、ＥＬＩＳＡアッセイでそれぞれの組換え免疫原に特異的に結合するように産生した。

【０１４２】

したがって、各抗体は、それぞれのペプチド免疫原に特異的に結合するように産生した。例えば、下の表５は、ウサギ抗ペプチドポリクローナル抗体におけるペプチド１、２、及び９とそれぞれの免疫原との典型的な結合曲線を示している。３つのポリクローナル抗体全てが標的に対し高いアフィニティーで結合したので、これらをシスタチンＢ　ＥＬＩＳＡでサンドイッチの形成に使用することができる。

【０１４３】

【表６】

表５：ウサギ抗シスタチンＢペプチドとそれぞれの免疫原との結合

抗体力価	ペプチド1	ペプチド2	ペプチド9
10	2.55	4.00	4.00
1	1.00	3.79	4.00
0.5	0.31	2.15	3.95
0.25	0.08	0.50	2.41
0.125	0.05	0.11	0.57
0.0625	0.04	0.06	0.12
0	0.04	0.04	0.05

【０１４４】

さらに、抗ペプチド９抗体及び抗ペプチド１抗体は、ＥＬＩＳＡアッセイにおいて、刺激を与えたＭＤＣＫ細胞のライセート中で組換えＦＬ－Ｃｙｓ　Ｂ（配列番号３）及びネイティブな細胞内タンパク質に特異的に結合した。抗ペプチド９抗体は、競合ＥＬＩＳＡアッセイにおいて、ペプチドＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号１０）に特異的に結合することが示された。

【０１４５】

配列番号１１、１２、及び１３を使用して、標準的な方法論に従ってウサギを免疫化した。各抗体は、ＥＬＩＳＡアッセイにおいて、それぞれの抗原に特異的に結合した。

【０１４６】
実施例３：イヌシスタチンＢ検出のための免疫測定法
シスタチンＢ　ＥＬＩＳＡを以下のように開発した。
固相及び捕捉抗体：
９６ウェル４ＢＸマイクロタイタープレートを、１０ｕｇ／ｍｌのアフィニティー精製ウサギ抗ペプチド９で終夜４℃にてコーティングする。プレートを、０．０５％のＴＷＥＥＮ（登録商標）（ポリソルベート）２０を含有する１×ＰＢＳ、ｐＨ７．４で３回洗浄する。次にプレートを、１％のＢＳＡを含有する１×ＰＢＳ、ｐＨ７．４で２時間ブロックする。上述のように洗浄した後、プレートを３７℃、真空下で４時間乾燥させる。次にプレートを乾燥状態で４℃にて保管する。
【０１４７】
検出抗体の調製：
全長組換えシスタチンＢ（ｒＦＬ－Ｃｙｓ　Ｂ）（配列番号３）で免疫化したマウスから、７つのモノクローナル抗体を生成した。ｒＦＬ　Ｃｙｓ　Ｂに対する結合パフォーマンスに基づいて１つのクローン（３Ｈ４）を選択し、プロテインＧを用いて精製し、１．０ｍｇの精製された抗体をＳＭＣＣ法を用いてホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）で標識し、脱塩して過剰なＨＲＰを除去した。標識抗体を滴定し、０．２５－２．０ｕｇ／ｍｌをＥＬＩＳＡアッセイで使用した。
【０１４８】
シスタチンＢサンドイッチＥＬＩＳＡプロトコル：血清及び尿
シスタチンＢは細胞内タンパク質であり、概して高濃度で自由に循環することはない。このことは、負荷のかかったイヌ腎臓細胞から採集した上清中にタンパク質が見いだされなかったという事実によってさらに確認された。ただし、シスタチンＢは破壊されたイヌ腎臓細胞から精製された。そのため、血清中で検出される任意のシスタチンＢは、この破壊や細胞死に起因する可能性がある。活動性腎障害において、近位尿細管内の上皮細胞のアポトーシス及びネクローシスは、血清及び尿中のシスタチンＢ増加をもたらす可能性がある（図１）。
【０１４９】
シスタチンＢは、愛玩動物における腎疾患とは関連付けられていない。上述のように組換えシスタチンＢに対するモノクローナル抗体を産生し、その特異性を、シスタチンＣタンパク質の存在下、ウェスタンブロット分析を用いて確認した（図２）。これらの抗体を用いてサンドイッチＥＬＩＳＡも開発した。
【０１５０】
サンドイッチＥＬＩＳＡ用の基準は、ｒＦＬ－Ｃｙｓ　ＢまたはＭＤＣＫ細胞ペレットからの界面活性剤ライセートとした。両方の基準調製物を、ＬＣＭＳ法によって定量化した。尿試料を緩衝液Ａ（０．１ＭのＰＯ４；ｐＨ７．４、少なくとも０．１％のサルコシルを含有）を用いて少なくとも１：１０に希釈した。血清試料を緩衝液Ａにおいて少なくとも１：１００に希釈し、１００ｕｌを上記のように二重反復でウェルに添加した。１００マイクロリットル（１００ｕｌ）を二重反復でポリクローナル抗体捕捉ウェルに添加し、室温で振とうしながら１時間インキュベートした。次にプレートをＰＥＴＣＨＥＫ（登録商標）洗浄剤（ＩＤＥＸＸ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｍａｉｎｅ，ＵＳＡ）で６回洗浄し、１００ｕｌの０．２５－２ｕｇ／ｍｌのＨＲＰモノクローナル検出抗体を添加した。検出抗体を振とうしながら３０分間インキュベートし、次に６回洗浄し、１００ｕｌの基質ＴＭＢをウェルに添加した。発色を５分間展開し、次に１００ｕｌの停止溶液（１ＮのＨＣＬ）を加えた。プレートをＶＭＡＸ（登録商標）マイクロプレートリーダーで読み取った。Ｓｉｇｍａ　ｐｌｏｔで４ＰＬパラメーター適合を使用し、未知数を定量化した。
【０１５１】
ネイティブなイヌのシスタチンＢ（ＭＤＣＫライセート）を用いて、上述のようにＣｙｓ　Ｂ　ＥＬＩＳＡアッセイで標準曲線を得た（図３）。

【０１５２】
患畜試料中のイヌシスタチンＢの検出
上述のようにシスタチンＢ　ＥＬＩＳＡアッセイを用いてイヌの尿におけるシスタチンＢレベルを決定した。これを表６に示す。
【０１５３】
【表７】

表６　腎疾患を有するイヌにおけるシスタチンＢレベル

試料	状態	シスタチンB(ng/ml)
1	健康	356
2	健康	382
3	健康	292
4	AKI	6022
5	AKI	7920
6	AKI	9559
7	CKD	453
8	CKD	1595
9	CKD	3372

【０１５４】
表６に示すように、健康なイヌは、急性（活動性）腎障害（ＡＫＩ）及び慢性腎疾患（ＣＫＤ）に比較して尿中のシスタチンＢレベルが低かった。ＡＫＩ試料は、ＣＫＤ試料よりも高いシスタチンＢレベルを示した。
【０１５５】
ＥＬＩＳＡを用いて、イヌゲンタマイシンモデルからの血清及び尿中のシスタチンＢ（図４）、ならびに炎症または虚血誘発性活動性腎障害で診療所を受診したイヌの尿のシスタチンＢ（図５）を測定した。モデル系では、イヌに対し、血清クレアチニンが１．５ｍｇ／ｄＬに達するまで、８時間ごとに１０ｍｇ／ｋｇのゲンタマイシンを投与した。このイヌでは、８日目にそのポイントに到達し、一方血清シスタチンＢは１日目にベースラインを上回って増加した。これらの暫定結果から、シスタチンＢは、活動性腎障害に関しクレアチニンよりも早期のマーカーとなることが示唆される。患畜試料では、健康な患畜と活動性腎障害と診断された患畜との間に明確な分離がみられた。
【０１５６】
実施例４：経口スワブによるシスタチンＢ検出
コットンスワブを使用して、歯科検査を受けたイヌの歯肉の試料採取を行った。このイヌは、歯肉炎、歯肉疾患、さらに重度のう歯を示した。スワブをプラスチック試験管の中に入れ、使用時まで４度で保管した。スワブを３０分間室温に平衡化し、次に界面活性剤を含有するシスタチンＢアッセイ緩衝液０．５ｍｌに３０分間入れた。スワブを取り出し、上述のシスタチンＢアッセイで使用した。試料なしの対照スワブをバックグラウンドシグナルの決定に使用した。対照スワブは、検出限界（ＬＯＤ）を下回り平均ＯＤが０．０４であった。一方、広範な歯科手順を受けたイヌからのスワブのＯＤは１．０４であった。これにより、シグナル対ノイズＳ／Ｎ比は２６となる。下の表７を参照。
【０１５７】

【表８】

表７　経口スワブにおけるシスタチンＢの検出

シスタチンＢ（４５０ｎｍにおけるＯ．Ｄ）　Ｓ／Ｎ

対照スワブ	0.04	--
イヌスワブ	1.04	26

【０１５８】

２匹の歯周疾患を有するイヌの歯をコットンスワブで拭き取り、シスタチンＢ　ＥＬＩＳＡ緩衝液中でシスタチンＢを抽出し、試料としてシスタチンＢアッセイにかけた。１０００ｎｇ／ｍｌの組換え全長イヌシスタチンＢタンパク質を添加した基準物質を陽性対照として実行した。シグナル（４５０ｎＭにおけるＯ．Ｄ．）　は、組換え全長イヌシスタチンＢタンパク質陽性対照については０．３２２、イヌ１については１．８４８５、イヌ２については１．４４４であった。２匹の歯周疾患を有するイヌの値は、１０００ｎｇ／ｍｌのイヌＦＬ－Ｃｙｓ　Ｂ基準物質よりも５倍超高かった。そのため、Ｃｙｓ　Ｂは、イヌなどの哺乳類における歯周疾患のマーカーとなる。

【０１５９】

実施例５：改変ＥＬＩＳＡ

９６ウェル４ＢＸマイクロタイタープレートを５μｇ／ｍｌのアフィニティー精製ウサギ抗ペプチド９で、終夜４℃にてコーティングした。プレートを、ｐＨ７．４、０．０５％のＴＷＥＥＮ（登録商標）（ポリソルベート）２０を含有する１×ＰＢＳで３回洗浄する。次にプレートを、１％のＢＳＡを含有する１×ＰＢＳ、ｐＨ７．４で２時間ブロックした。上述のように洗浄した後、プレートを３７℃、真空下で４時間乾燥させる。次にプレートを乾燥状態で４℃にて保管する。

【０１６０】

サンドイッチＥＬＩＳＡ用の基準は、ｒＦＬ－Ｃｙｓ　ＢまたはＭＤＣＫ細胞ペレットからの界面活性剤ライセートとした。両方の基準調製物を、ＬＣＭＳ法によって定量化した。尿試料を緩衝液Ａ（０．１Ｍリン酸、ｐＨ７．２、少なくとも１．０％のＮ－ドデカノイル－Ｎ－メチルグリシンナトリウム塩（Ｓａｒｋｏｓｙｌ，Ｓｉｇｍａ）を含有）で１：２０に希釈した。血清試料を緩衝液Ａにおいて少なくとも１：５０に希釈し、１００ｕｌを上記のように二重反復でウェルに添加した。１００マイクロリットル（１００ｕｌ）を二重反復でポリクローナル抗体捕捉ウェルに添加し、室温で振とうしながら１時間インキュベートした。次にプレートをＰＥＴＣＨＥＫ（登録商標）洗浄剤（ＩＤＥＸＸ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｗｅｓｔｂｏｏｋ，Ｍａｉｎｅ，ＵＳＡ）で６回洗浄し、１００ｕｌの０．２５－２ｕｇ／ｍｌのＨＲＰ標識モノクローナル検出抗体を添加した。検出抗体を振とうしながら３０分間インキュベートし、次に６回洗浄し、１００ｕｌの基質ＴＭＢをウェルに添加した。発色を５分間展開し、次に１００ｕｌの停止溶液（１ＮのＨＣＬ）を加えた。プレートをＶＭＡＸ（登録商標）マイクロプレートリーダーで読み取った。Ｓｉｇｍａ　ｐｌｏｔで４ＰＬパラメーター適合を使用し、未知数を定量化した。

【０１６１】

実施例６：ヒトＣｙｓ－Ｂの検出

この実施例では、抗イヌＣｙｓ　Ｂ抗体を用いてヒトＣｙｓ　Ｂを検出するためのＥＬＩＳＡの構築を実証する。組換えヒトシスタチンＢ（ｒＨ　ＦＬ　Ｃｙｓ　Ｂ）タンパク質（配列番号１４）をＧｅｎｓｃｒｉｐｔ，ＵＳＡから入手した。

＞ｓｐ｜Ｐ０４０８０｜ＣＹＴＢ＿ヒトＣｙｓｔａｔｉｎ－Ｂ　ＯＳ＝ホモサピエンス　ＧＮ＝ＣＳＴＢ　ＰＥ＝１　ＳＶ＝２

ＭＭＣＧＡＰＳＡＴＱＰＡＴＡＥＴＱＨＩＡＤＱＶＲＳＱＬＥＥＫＥＮＫＫＦＰＶＦＫＡ

ＶＳＦＫＳＱＶＶＡＧＴＮＹＦＩＫＶＨＶＧ
ＤＥＤＦＶＨＬＲＶＦＱＳＬＰＨＥＮＫＰＬＴＬＳＮＹＱＴＮＫＡＫＨＤＥＬＴＹＦ［配列番号：１４］

【０１６２】

ｒＨ　ＦＬ　Ｃｙｓ　Ｂタンパク質と、イヌシスタチンＢに対し産生した抗体との交差反応性を、サンドイッチＥＬＩＳＡによって評価した。簡潔に述べると、組換え全長イヌシスタチンＢ配列（ｒＣ　ＦＬシスタチンＢ）に対し産生したマウスモノクローナル抗体を捕捉試薬に使用し、ＥＬＩＳＡにおいて複数の組換えＦＬ　Ｃｙｓ　Ｂ抗原に結合する能力をスクリーニングした。スクリーニングした検出試薬は、ウサギポリクローナルＮ末端抗イヌシスタチンＢ抗体及びホースラディッシュペルオキシダーゼ抗種ＩｇＧ（Ｈ＆Ｌ）であった。ＥＬＩＳＡにおいて用量依存性曲線をもたらす一連の試薬ペアが見いだされた。下の表８に示すように、マウスにおいてイヌＣ末端「ペプチド９」（ＱＴＮＫＡＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号４）に対し産生した３つのモノクローナル抗体（ＩＦ１０、２Ｂ５、及び９Ａ１０）を、抗イヌＮ末端シスタチンＢポリクローナル抗体３２７（ウサギにおいてＣＡＩＡＤＱＶＫＡ（配列番号７）に対し産生）、３２８（ウサギにおいてＣＧＡＰＳＡＳＱＰＡＴＡＤＴＱＡＩＡ（配列番号５）に対し産生）、または３２９（ウサギにおいてＣＧＡＰＳＡＳＱ（配列番号６）に対し産生）とペアリングして、サンドイッチＥＬＩＳＡを形成した。さらに、これらのペアを、ラット及びマウスのｒＦｌシスタチンＢタンパク質と結合させた。

【０１６３】

【表９】

表８：ヒト、ラット、及びマウスの組換えシスタチンＢタンパク質とのサンドイッチ形成のためのイヌ試薬のペアリング

固相 モノクローナル	検出 ポリクローナル	イヌ rFL Cys B	ヒト rFL Cys BL	ラット rFL Cys B	マウス rFL Cys B
IF10	327	3.8	0.7	2.8	3.2
mAb	328	3.4	0.1	1.9	2.8
	329	0.0	0.1	0.1	0.1
2B5	327	3.8	1.0	3.2	3.5
mAb	328	3.5	0.3	2.3	3.4
	329	0.1	0.1	0.1	0.1
9A10	327	3.6	0.6	2.6	3.5
mAb	328	3.3	0.1	1.8	3.3
	329	0.1	0.2	0.1	0.2

【０１６４】

Ｎ末端ウサギポリクローナル抗体３２７を固相捕捉として使用して、イヌシスタチンＢＣ末端「ペプチド９」ＱＴＮＫＡＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号４）に対し産生したモノクローナルマウス抗体を、ｒＨ　ＦＬシスタチンＢとの結合について分析した。表９を参照。下の表１０に示すように、あるＣ末端モノクローナル抗体（９Ａ１０）がサンドイッチを形成したのに対し、別のＣ末端モノクローナル抗体（２Ｂ５）はサンドイッチを形成しなかった。これらのモノクローナル抗体の特異性をマッピングし、９Ａ１０モノクローナルはヒト及びイヌ両方のシスタチンＢの相同配列を認識した。ｒＦＬイヌシスタチンＢに対し産生し、固相結合ポリクローナル抗体３２７とペアリングした３Ｈ４モノクローナル抗体は、ヒト及びイヌのｒＦＬシスタチンＢ両方への結合を示した（表１１）。

【０１６５】

【表１０】

表９

シスタチンＢＣ末端配列		
イヌ	QTNKAKHDELAYF	配列番号４
ヒト	QTNKAKHDELTYF	配列番号15

【０１６６】

【表１１】

表１０：シスタチンＢウサギポリクローナル抗体及びマウスモノクローナル抗体のエピトープマッピング

	抗ペプチド抗体		
	ポリクローナル	モノクローナル	
ペプチド配列	抗ペプチド９	2B5	9A10
QTNKAKHDELAYF 配列番号４	3.4	2.5	2.8
QTNKAKHDELAY 配列番号16	3.4	0.2	2.8
QTNKAKHDELA 配列番号17	3.1	0.2	2.4
QTNKAKHDEL 配列番号18	2.3	0.1	0.1
QTNKAKHDE 配列番号19	2.3	0.2	0.1
エピトープに必須の残基		YF	AYF

【０１６７】

【表１２】

表１１：

		ｒFL-シスタチンＢ	
捕捉	結合	ヒト	イヌ
327	3H4	0.911	2.102
	9A10	0.829	1.584
	2B5	0.065	0.065
	327	0.077	1.211

【０１６８】

イヌＣｙｓ　Ｂに特異的な抗体は、ヒトＣｙｓ－Ｂの検出に使用することができる。と

りわけＡＹＦ、ＬＡＹＦ（配列番号２０）、ＥＬＡＹＦ（配列番号２１）、ＤＥＬＡＹＦ（配列番号２２）、ＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号２３）、ＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号１０）、ＡＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号２４）、ＫＡＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号２５）、ＮＫＡＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号２６）、ＴＮＫＡＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号２７）、及びＱＴＮＫＡＫＨＤＥＬＡＹＦ（配列番号４）を含むエピトープまたはその一部に結合する抗体またはその特異的結合断片は、ヒト及びイヌのＣｙｓ　Ｂの検出に使用することができる。

【０１６９】

実施例７：イヌ及びネコの尿における参照範囲の決定

イヌ及びネコからの尿試料を、地元の動物病院で２年のタイムフレームにわたり採取した。尿を分取し、使用時まで凍結した。実施例３に記載のＥＬＩＳＡアッセイを用いて、凍結した尿試料のシスタチンＢを測定した。獣医診察において、ＣＫＤを示唆する血清クレアチニンまたはＳＤＭＡレベル、尿路結石または尿路感染症の病歴または症状などの腎障害の徴候を有しない健康な動物から、参照範囲を確立した。したがって、合計２８０匹の健康なイヌ及び４２匹の健康なネコを使用し、各種について＋３標準偏差（Ｓｔｄ　Ｄｅｖ）を用いて２５７ｎｇ／ｍｌの参照範囲を決定した。図６を参照。そのため、正常で健康な範囲は、約０ｎｇ／ｍｌから約２５７ｎｇ／ｍｌ（例えば、約０、５、１０、２０、５０、７５、１００から約２００、２１０、２２５、２５０，または２５７ｎｇ／ｍｌ）とする。２５７ｎｇ／ｍｌを上回る値（例えば、約２５７、２６０、２７０、２８０、２９０、３００ｎｇ／ｍｌ及びそれ以上）は、腎疾患の徴候とする。

【０１７０】

実施例８：イヌＡＫＩ個体群におけるシスタチンＢ

臨床的に確認されたＡＫＩを有するイヌ及び健康なイヌからの２５のマッチした尿及び血清の試料をシスタチンＢ　ＥＬＩＳＡ（実施例５）にかけた。ＡＫＩ患畜の病因には、例えば腎毒性薬物、ヘビ咬傷、日射病、エチレングリコールの曝露、及び感染症が含まれた。図７Ａ－Ｂ及び表１２－１３に示すように、ＡＫＩと診断された患畜における尿中及び血清シスタチンＢレベルは、健康なイヌ及びＣＫＤ患畜に比べて顕著に増加した。

【０１７１】

【表１３】

表１２

sCysB ng/mL の変動性の概要

	平均	標準偏差	標準 誤差平均	下限 95%	上限 95%	最小値	最大値	範囲	中央値	観察数
sCysB ng/mL	1076.048	1225.574	267.4422	518.1729	1633.922	113	4175	4062	642	21
診断 [AKI]	2065.625	1509.591	533.7209	803.5756	3327.674	604	4175	3571	1763	8
診断 [CKD]	628	353.9148	125.1278	332.1198	923.8802	200	1348	1148	608	8
診断 [健康]	209.6	67.21086	30.05761	126.1467	293.0533	113	291	178	206	5

【０１７２】

【表１４】

表１３

uCysB ng/ml の変動性の概要										
	平均	標準偏差	標準 誤差平均	下限 95%	上限 95%	最小値	最大値	範囲	中央値	観察数
uCysB ng/ml	525.8	676.3851	151.2443	209.242	842.358	14	2803	2789	289.5	20
診断 [AKI]	928.2857	1001.605	378.5712	1.955283	1854.616	14	2803	2789	704	7
診断 [CKD]	449.25	264.6473	93.56696	227.9993	670.5007	87	862	775	461	8
診断 [健康]	84.8	86.8833	38.49987	-22.0928	191.6928	20	236	216	52	5

【０１７３】

実施例９：感染症におけるシスタチンＢ

動物の泌尿器系において最も感染性の高い疾患は、好気性細菌の感染症である。一般的な生物としては、大腸菌、ブドウ球菌、腸球菌、及び連鎖球菌が挙げられる。一般的ではないが感染症の原因となる生物としては、クレブシエラ、プロテウス、及びシュードモナスが挙げられる。マイコプラズマは尿路感染症の原因としてはまれであり、通常は細菌との同時感染として見いだされる。レプトスピラ症は世界中で見られる人畜共通感染症であり、その原因となるのは、腎臓や他の多くの臓器に感染する糸状のレプトスピラ細菌である。リケッチア症（リケッチア症（ｒｉｃｋｅｔｔｓｉｏｓｅｓ））及び関連疾患（アナプラズマ症、エーリキア症、Ｑ熱、ツツガムシ病）の原因は、グラム陰性の偏性細胞内球桿菌である。マダニ媒介疾患であるバベシアも腎疾患に関与している。

【０１７４】

ＥＬＩＳＡ、ＰＣＲ、及び顕微鏡下凝集試験（ＭＡＴ）力価＞１：８００（ＩＤＥＸＸ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．）によってレプトスピラ種陽性と確認された２０匹のイヌ患畜からの血清試料を、シスタチンＢ ＥＬＩＳＡにかけた。健康と確認されたイヌの血清試料もＥＬＩＳＡにかけて、血清中の平均シスタチンＢレベルを決定した。下の表１４に示すように、９つのレプトスピラ症陽性試料（４５％）は、健康なイヌからの血清の相対カットオフ（平均＋３ＳＤ）値（１４９．１ｎｇ／ｍｌ）を上回った（図１０）。このデータは、試験したレプトスピラ症患畜の４５％が腎障害を有したことを示すものである。そのため、シスタチンＢの血清レベルが高い場合、レプトスピラに感染した患畜における腎障害の存在を意味する。

【０１７５】

【表１５】

表１４：*レプトスピラ種*に対するシスタチンＢ　ＥＬＩＳＡの結果　陽性試料

試料ID	シスタチンB(ng/ml)
1304	99
2648	375
4282	241
4318	171
4558	411
4567	82
4628	133
4650	145
4873	767
4972	276
5242	65
5369	54
5529	292
5614	75
5646	65
5651	81
5659	203
5663	167
5664	111
5679	59
5694	141

【０１７６】

実施例１０：尿路感染症におけるシスタチンＢ

それぞれ尿路感染症（ＵＴＩ）と臨床的に確認された１０匹のイヌからの尿試料及び１０匹の健康なコホートをシスタチンＢアッセイにかけた。ＵＴＩは、陽性培養物及び臨床検査によって確認した。ＵＴＩからの干渉は、既知のＡＫＩマーカーの特異性に対し大きな問題となっている。図８は、シスタチンＢレベルが健康な患畜と尿路感染症患畜との間で顕著な差を示さなかったことを実証するものである。そのため、シスタチンＢマーカーは、ＡＫＩ及びＵＴＩの識別に使用することができる。

【０１７７】

実施例１１：ネコ腎疾患におけるシスタチンＢ

腎疾患と診断された４匹のネコ及び健康な３匹のネコからの尿試料を地元の動物病院から入手し、これらをシスタチンＢアッセイにかけた。尿疾患を有する４匹のネコそれぞれにおける尿中シスタチンＢ濃度は、参照範囲の２５７ｎｇ／ｍｌを上回った。健康な３匹のネコそれぞれにおける尿中シスタチンＢ濃度は、参照範囲内であった。表１５を参照。シスタチンＢは、ネコにおける腎疾患のマーカーとなる。

【０１７８】

【表１６】

表１５

尿中シスタチンB ng/mL	血清クレアチニン mg/dL	SDMA(ug/dL)、または他の指示された試験	診断
3062	3.0 (03/02/2016) 2.9 (04/01/2016) 2.6 (08/27/2016)	N/D (3/2/2016) 16 (4/1/2016) 26 (8/27/2016)	腎疾患
1513	2.0 (02/13/2013) 2.4 (03/20/2014) 3.1 (10/06/2015)	尿タンパク質 30mg/dL；尿 250 赤血球/uL	腎疾患
903	1.3 (7/17/2015) 3.6 (11/16/2015) 2.4 (11/23/2015) 2.0 (12/10/2015) 3.8 (02/01/2016)	N/D	腎疾患
329	2.0 (02/13/2013) 2.4 (03/20/2014) 3.1 (10/06/2015)	尿タンパク質 30mg/dL；尿 250 赤血球/uL	腎疾患
73	N/D	N/D	健康
50	N/D	N/D	健康
48	N/D	N/D	健康

N/D=測定されず

【０１７９】

実施例１２：ヒツジにおける抗シスタチンＢ抗体

２頭のヒツジを使用して、配列番号４に対するヒツジポリクローナル抗体を生成した。ペプチドをＫＬＨに結合し、フロイント完全アジュバントに乳化させた。標準的な２００日プロトコルを使用した。ヒツジ血清における抗体応答をウサギ血清のものと比較した。免疫化プロトコルの初期段階であったにもかかわらず、ヒツジに同様の力価が見られた。ヒツジ内で産生した抗体は、Ｃｙｓ　Ｂポリペプチドの検出に使用することができる。

【０１８０】

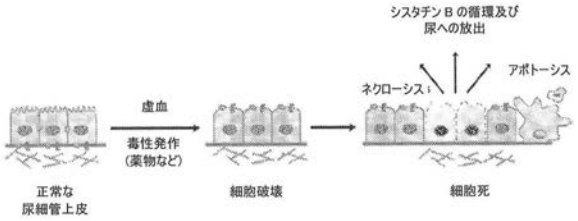
【表１７】
表１６

希釈	ウサギ	ヒツジ
100	2.832	2.804
1000	2.753	2.986
10000	1.56	0.797
100000	0.296	0.076
1000000	0.04	0.017
10000000	0.008	0.001

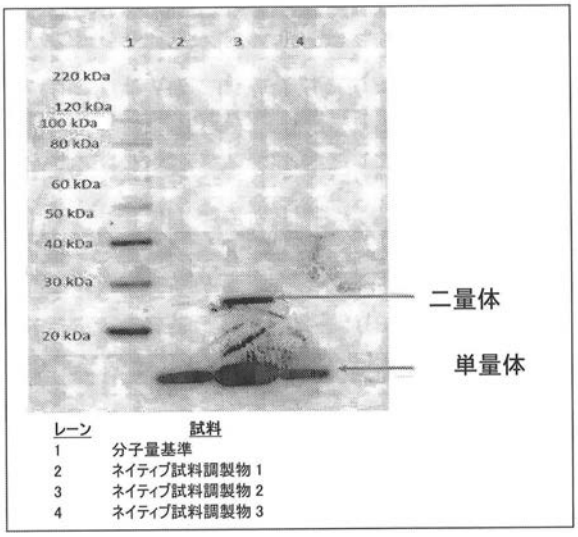
【０１８１】
実施例１３：ＣＫＤ患者におけるヒト尿シスタチンＢ検出

ステージ４のＣＫＤと診断されたヒト患者から尿を採取した。尿を段階希釈し、シスタチンＢ尿ＥＬＩＳＡにかけた。２つの抗シスタチンＢモノクローナル抗体（３Ｈ４（実施例２及び３参照）及び９Ａ１０（実施例６参照））を比較した。図９に示すように、ヒト尿試料は、イヌＡＫＩ試料よりも高レベルのシスタチンＢを生成し、またイヌ陰性対照よりも高レベルであった。さらに、異なる抗シスタチンＢモノクローナル抗体は、おそらくはエピトープの結合有効性に起因して、異なる応答を示した。そのため、ＣＫＤを含めた腎疾患は、ヒトにおいて、シスタチンＢに特異的な抗体を用いて診断することができる。

【図１】

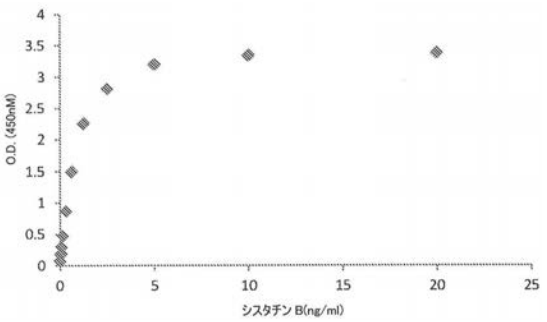


【図２】

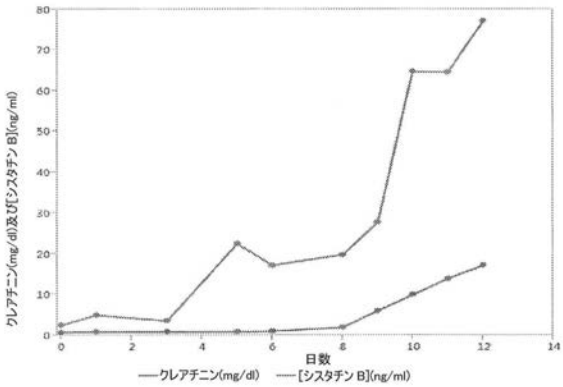


レーン	試料
1	分子量基準
2	ネイティブ試料調製物１
3	ネイティブ試料調製物２
4	ネイティブ試料調製物３

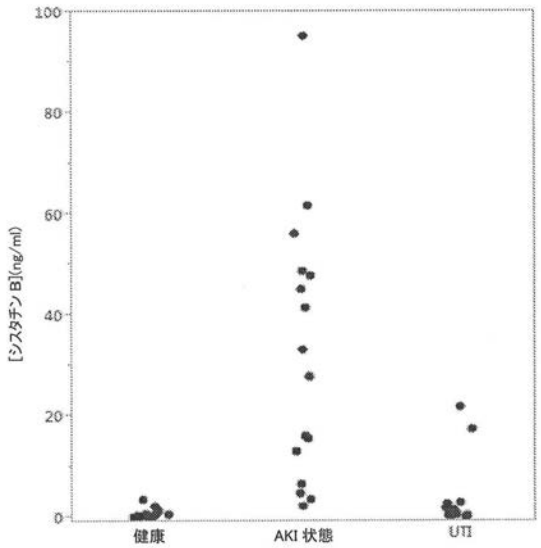
【図３】



【図４】

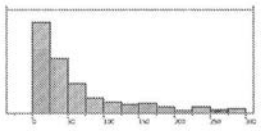


【図５】



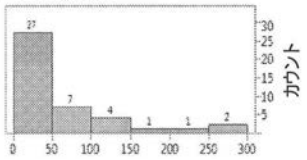
【図６】

A: イヌ参照範囲



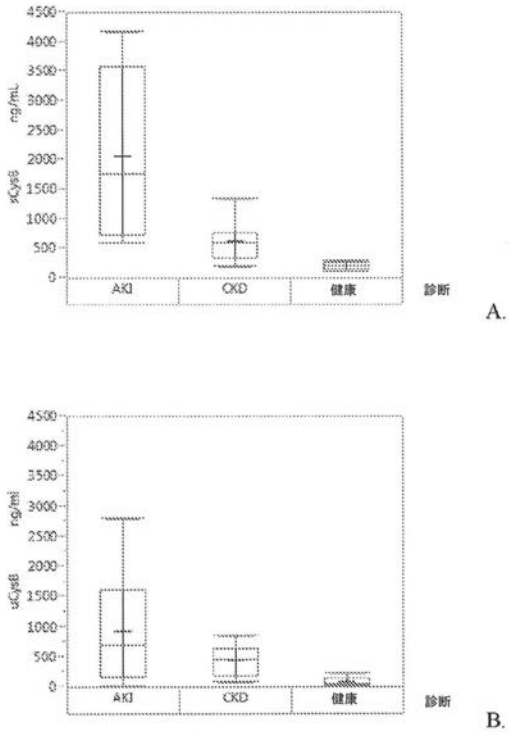
平均	59.757143
標準偏差	66.055464
標準誤差平均	3.947569
上限95%平均	67.527945
下限95%平均	51.986341
N	280

B. ネコ参照範囲

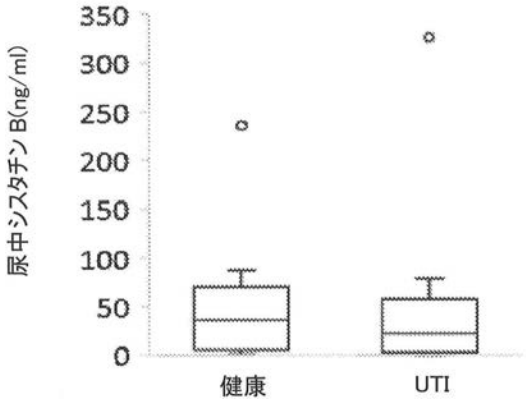


平均	56.642857
標準偏差	67.102696
標準誤差平均	10.354171
上限95%平均	77.553529
下限95%平均	35.732185
N	42

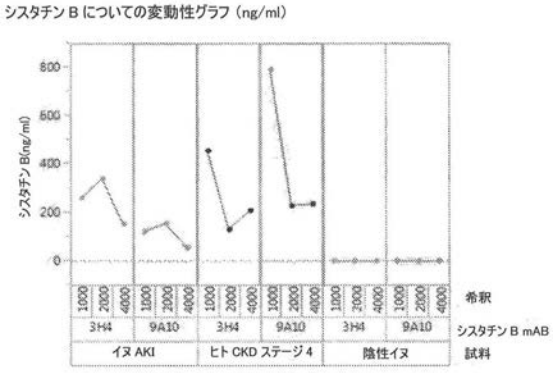
【図７】



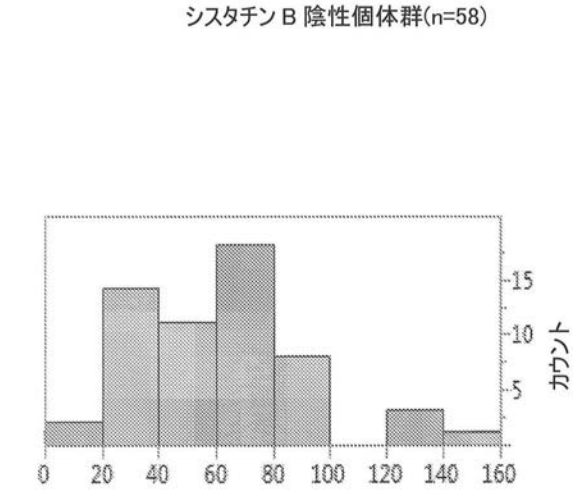
【図８】



【図９】



【図１０】



平均:60.927313

標準 偏差 29.473122

標準 誤差平均 3.8700105

上限 95%平均 68.676875

下限 95%平均 53.177751

N: 58

【配列表】
2019508694000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/020377

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/68 C07K14/81 C07K16/00
ADD.

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)
G01N C07K

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)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/153469 A1 (IDEXX LAB INC [US]; YERRAMILLI MAHALAKSHMI [US]; ATKINSON MICHAEL RAND) 8 December 2011 (2011-12-08) Whole document, in particular claims 1-11; table 1; SEQ ID:33; page 11, last paragraph- page 23, paragraph 2 ----- -/--	1-3, 5-16, 18-22, 25-27

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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 application or patent 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	Date of mailing of the international search report
20 July 2017	31/07/2017

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Vanmontfort, D

6

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/020377

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.:

1-3, 5-16, 18-27(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 SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/020377

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JORONEN I ET AL: "Detection of low molecular weight cysteine proteinase inhibitors by time-resolved fluoroimmunoassay", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 86, no. 2, 12 February 1986 (1986-02-12), pages 243-247, XP023987615, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/0022-1759(86)90460-6 [retrieved on 1986-02-12] whole document, particular abstract and paragraph "time resolved fluoroimmunoassay" on pages 244-245	1-3, 18-25
X	LEE M-J ET AL: "Identification of cystatin B as a potential serum marker in hepatocellular carcinoma", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 14, no. 4, 15 February 2008 (2008-02-15), pages 1080-1089, XP002547862, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1615 whole document, in particular abstract and paragraph "CSTB ELISA" on page 1083	1,18-24, 26,27
X	JI NA YOUNG ET AL: "Development of a fluorescent microsphere immunoassay for cystatin B (CSTB) in serum of patients with hepatocellular carcinoma", CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE, vol. 49, no. 1, January 2011 (2011-01), pages 151-155, XP009194541, ISSN: 1434-6621 Whole document, in particular abstract and Materials and methods on page 152	1,18-24, 26,27

-/--

6

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/020377

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOPITAR-JERALA N ET AL: "Monoclonal antibodies to human stefin B and determination of their epitopes", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. PROTEIN STRUCTURE AND MOLECULAR ENZYMOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM; NL, vol. 1164, no. 1, 24 June 1993 (1993-06-24), pages 75-80, XP023469414, ISSN: 0167-4838, DOI: 10.1016/0167-4838(93)90114-7 [retrieved on 1993-06-24] whole document, in particular paragraph bridging , pages 77 and 78; figures 2 and 3	1,18-24, 26,27
A	WO 2010/057184 A2 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]; BONVENTRE JOSEPH V [US]; VAIDYA VISHAL) 20 May 2010 (2010-05-20) the whole document	1-3, 5-16, 18-27
A	WO 2011/079280 A2 (HILLS PET NUTRITION INC [US]; AL-MURRANI SAMER [US]; MALLADI SUKHASWAM) 30 June 2011 (2011-06-30) the whole document	1-3, 5-16, 18-27
A	WK HAN1 ET AL: "Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury", KIDNEY INTERNATI, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 73, no. 7, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 863-869, XP008165765, ISSN: 0085-2538, DOI: 10.1038/SJ.KI.5002715 the whole document	1-3, 5-16, 18-27
X,P	YERRAMILLI MURTHY ET AL: "Kidney Disease and the Nexus of Chronic Kidney Disease and Acute Kidney Injury: The Role of Novel Biomarkers as Early and Accurate Diagnostics.", THE VETERINARY CLINICS OF NORTH AMERICA. SMALL ANIMAL PRACTICE NOV 2016, vol. 46, no. 6, November 2016 (2016-11), pages 961-993, XP009194537, ISSN: 1878-1306 Paragraph "Urinary and serum cystatin B" on pages 978-981 ; figures 18-21	1-3, 5-16, 18-27

-/--

6

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/020377

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UniParc [Online] 3 May 2011 (2011-05-03), "From CSTB gene of Canis lupus familiaris (Dog) (Canis familiaris)", XP002770680, retrieved from EBI accession no. UNIPARC:UPI0000EB0729 Database accession no. UPI0000EB0729 sequence -----	23,24

6

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2017/020377

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011153469 A1	08-12-2011	AU 2011261308 A1	06-12-2012
		CA 2799536 A1	08-12-2011
		EP 2577315 A1	10-04-2013
		EP 3054301 A1	10-08-2016
		JP 5855094 B2	09-02-2016
		JP 2013527478 A	27-06-2013
		JP 2016095312 A	26-05-2016
		US 2013130285 A1	23-05-2013
		WO 2011153469 A1	08-12-2011
WO 2010057184 A2	20-05-2010	US 2011287964 A1	24-11-2011
		WO 2010057184 A2	20-05-2010
WO 2011079280 A2	30-06-2011	AU 2010336392 A1	21-06-2012
		CA 2785406 A1	30-06-2011
		CN 102713632 A	03-10-2012
		EP 2517020 A2	31-10-2012
		JP 2013515489 A	09-05-2013
		JP 2017079763 A	18-05-2017
		RU 2012131367 A	27-01-2014
		US 2012283129 A1	08-11-2012
		WO 2011079280 A2	30-06-2011
		ZA 201407857 B	29-04-2015

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/US2017/020377

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-3, 5-16, 18-27(all partially)

Reagent (polypeptide SEQ ID:1 or antibody against said polypeptide or immunocomplexes formed by binding of said polypeptide and corresponding antibodies) and a method/kit for detecting cystatin B in a sample of a subject and use thereof to diagnose renal disease.

2-26. claims: 1-3, 5-16, 18-27(all partially)

Reagents (polypeptides SEQ ID:2-13 and 15-27, respectively, or antibodies against said polypeptides or immunocomplexes formed by binding of said polypeptide and corresponding antibody) and a method/kit for detecting cystatin B in a sample of a subject and use thereof to diagnose renal disease. Reagents and method based on each SEQ ID represent a separate invention.

---

27. claims: 4, 17(completely); 10-16, 18(partially)

Reagents (polypeptides or antibodies against said polypeptides or immunocomplexes formed by binding of said polypeptide and corresponding antibody) and a method/kit for detecting cystatin B in a sample of a subject and use thereof to diagnose periodontal disease.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,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,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

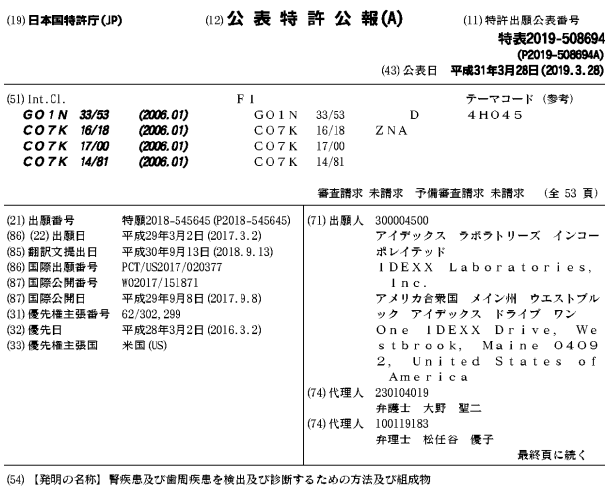
(74)代理人 100149076
弁理士 梅田 慎介
(74)代理人 100173185
弁理士 森田 裕
(74)代理人 100162503
弁理士 今野 智介
(74)代理人 100144794
弁理士 大木 信人
(72)発明者 イエラミッリ, マハーラクシュミー
アメリカ合衆国 ０４１０５ メイン州, ファルマス, オールド オーク ウェイ ７
(72)発明者 ファラス, ジョシ
アメリカ合衆国 ０４５４８ メイン州, ジョージタウン, ナブル ロード ９８
(72)発明者 クイン, ジョン, ジョセフ
アメリカ合衆国 ０４１０５ メイン州, ファルマス, ヘムロック レーン ９
(72)発明者 イエラミッリ, マーティ, ヴィー. エス. エヌ.
アメリカ合衆国 ０４１０５ メイン州, ファルマス, オールド オーク ウェイ ７

Ｆターム(参考) 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 BA21
CA40 DA55 DA75 EA50 FA70

专利名称(译)	用于检测和诊断肾病和牙周病的方法和组合物		
公开(公告)号	JP2019508694A	公开(公告)日	2019-03-28
申请号	JP2018545645	申请日	2017-03-02
[标]申请(专利权)人(译)	艾德克斯实验室公司		
申请(专利权)人(译)	IDEXX Laboratories，Inc.的		
[标]发明人	ファラスジョシ		
发明人	イエラミッリ,マハーラクシュミー ファラス,ジョシ クイン,ジョン,ジョセフ イエラミッリ,マーティ,ヴィー.エス.エヌ.		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C07K17/00 C07K14/81		
CPC分类号	G01N33/6893 C07K14/8139 C07K16/38 G01N2333/8139 G01N2800/18 G01N2800/347 G01N2800/348 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.D C07K16/18.ZNA C07K17/00 C07K14/81		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA21 4H045/CA40 4H045/DA55 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA70		
代理人(译)	松任谷裕子 森田 裕 Nobuto滤纸冲		
优先权	62/302299 2016-03-02 US		
其他公开文献	JP2019508694A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开提供了用于检测哺乳动物的肾脏和牙周疾病的组合物和方法。 [选择图]无



(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2019-508694 (P2019-508694A)

(43)公表日　平成31年3月28日(2019.3.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D	4H045
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18	ZNA	
C07K 17/00	(2006.01)	C07K	17/00		
C07K 14/81	(2006.01)	C07K	14/81		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 53 頁）

(21)出願番号　特願2018-545645 (P2018-545645)
(86)(22)出願日　平成29年3月2日(2017.3.2)
(85)翻訳文提出日　平成30年9月13日(2018.9.13)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/020377
(87)国際公開番号　WO2017/151871
(87)国際公開日　平成29年9月8日(2017.9.8)
(31)優先権主張番号　62/302,299
(32)優先日　平成28年3月2日(2016.3.2)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　300004500
アイデックス ラボラトリーズ インコーポレイテッド
ＩＤＥＸＸ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国 メイン州 ウエストブルック アイデックス ドライブ ワン
Ｏｎｅ ＩＤＥＸＸ Ｄｒｉｖｅ，Ｗｅｓｔｂｒｏｏｋ，Ｍａｉｎｅ ０４０９２，Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ
(74)代理人　230104019
弁護士 大野 聖二
(74)代理人　100119183
弁理士 松任谷 優子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】腎疾患及び歯周疾患を検出及び診断するための方法及び組成物