

(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2008-523114

(P2008-523114A)

(43) 公表日 平成20年7月3日(2008.7.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 6 4
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574	A 4 C 0 7 6
G O 1 N 33/577 (2006.01)	G O 1 N 33/577	B 4 C 0 8 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D 4 H 0 4 5
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-545833 (P2007-545833)	(71) 出願人	507195519 メルテンス、ペーター・ルネ
(86) (22) 出願日	平成17年12月13日 (2005.12.13)		ドイツ国、52072・アーヘン、ラウレンスベルガー・シユトラーセ・130
(85) 翻訳文提出日	平成19年7月30日 (2007.7.30)	(74) 代理人	100062007 弁理士 川口 義雄
(86) 国際出願番号	PCT/DE2005/002238	(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(87) 国際公開番号	W02006/063567	(74) 代理人	100140523 弁理士 渡邊 千尋
(87) 国際公開日	平成18年6月22日 (2006.6.22)	(74) 代理人	100119253 弁理士 金山 賢教
(31) 優先権主張番号	102004060385.5	(74) 代理人	100103920 弁理士 大崎 勝真
(32) 優先日	平成16年12月14日 (2004.12.14)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症過程を決定するための方法およびこの治療のための医薬組成物

(57) 【要約】

本発明は、哺乳動物における炎症過程および悪性疾患を決定するために、細胞によって分泌される Y ボックスタンパク質 Y B - 1 およびこのフラグメントの存在に関して細胞外体液を分析するための方法に関する。本発明はさらに、マーカーとしての Y B - 1 の使用、ならびに Y B - 1、Y B - 1 のポリペプチドフラグメント、およびこの組み合わせを検出するためのキットに関する。炎症過程および悪性疾患を治療するために使用され、Y B - 1 タンパク質、タンパク質 Y B - 1 のフラグメント、ならびに Y B - 1 タンパク質に対する抗体および / またはタンパク質 Y B - 1 のフラグメントに対する抗体を含む医薬組成物もまた開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Y B - 1 タンパク質、Y B - 1 タンパク質のフラグメント、Y B - 1 タンパク質に対する抗体、および/または Y B - 1 タンパク質のフラグメントに対する抗体からなる群より選択される薬剤を含む、炎症過程または悪性疾患の治療のための医薬組成物。

【請求項 2】

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記ポリクローナル抗体が表 1 に列挙されるポリクローナル抗体の群より選択される、請求項 2 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 4】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記モノクローナル抗体がヒト化されている、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記モノクローナル抗体が、表 1 に列挙されるようなハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体の群より選択される、請求項 4 または 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記モノクローナル抗体が受入番号 D S M A C C 2703 を有するハイブリドーマ細胞株によって産生される、請求項 6 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 8】

前記抗体、前記 Y B - 1 タンパク質、前記 Y B - 1 タンパク質のフラグメント、またはこの組み合わせが生物学的に適合可能な移植体中に固定化される、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記炎症過程が移植または炎症性疾患の後の哺乳動物の拒絶反応である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記炎症性疾患が、腎臓疾患、喘息、慢性閉塞性肺疾患、内膜過形成、関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症、脈管炎、糖尿病、敗血症、膵炎、多発性硬化症、乾癬、大腸炎、および皮膚炎からなる群より選択される、請求項 9 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 11】

前記腎臓疾患が、糸球体腎炎、間質性腎炎、腎盂腎炎、狼瘡様腎炎、放射能による腎炎、血管性腎症、および嚢胞腎からなる群より選択される、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記悪性疾患が、膵癌、直腸癌、胃癌、結腸癌、乳癌、悪性黒色腫、腎細胞癌、喉頭癌、卵巣癌、前立腺癌、気管支癌などの固形腫瘍からなる群より選択される、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の医薬組成物。

40

【請求項 13】

前記悪性疾患が、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、および慢性リンパ性白血病などの白血病からなる群より選択される、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 14】

ゲル、軟膏、または溶解型の形態である、請求項 1 から 13 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 15】

哺乳動物における炎症過程または悪性疾患の決定のためのインビトロ処理方法であって、前記炎症過程または悪性疾患の決定が、

50

前記哺乳動物からの細胞外液の試料中における Y B - 1 タンパク質および / またはこのフラグメントの少なくとも 1 つの存在について調べる前記サンプルの検査を含む、処理方法。

【請求項 16】

Y B - 1 タンパク質および / またはこのフラグメントの少なくとも 1 つが前期試料中に存在する場合、

前記試料中における前記 Y B - 1 タンパク質および / またはこのフラグメントの分泌パターンの決定をさらに含む、請求項 15 に記載の処理方法。

【請求項 17】

前記分泌パターンの決定が H P L C またはウェスタンブロッティングを使用することによって行われる、請求項 16 に記載の処理方法。

【請求項 18】

炎症過程または悪性疾患についての一連の検定から確立された分泌パターンと決定された分泌パターンとを相関させることをさらに含む、請求項 15 から 17 のいずれか 1 項に記載の処理方法。

【請求項 19】

前記試料が、抗体を用いて Y B - 1 タンパク質および / またはこのフラグメントの少なくとも 1 つの存在を調べるために検査される、請求項 15 から 18 のいずれか 1 項に記載の処理方法。

【請求項 20】

ポリクローナル抗体が前記抗体として使用される、請求項 19 に記載の処理方法。

【請求項 21】

モノクローナル抗体が前記抗体として使用される、請求項 19 に記載の処理方法。

【請求項 22】

ヒトが前記哺乳動物として選択される、請求項 15 から 21 のいずれか 1 項に記載の処理方法。

【請求項 23】

前記試料として用いられる体液が、血液、尿、リンパ液、血漿、血清、汗、鼻分泌物、腔分泌物、創傷滲出物、唾液、膿、精液、糞便、および脳脊髄液からなる群より選択される、請求項 15 から 22 のいずれかに記載の処理方法。

【請求項 24】

尿が前記体液として使用される、請求項 23 に記載の処理方法。

【請求項 25】

前記炎症過程が移植または炎症性疾患の後の哺乳動物の拒絶反応である、請求項 15 から 24 のいずれか 1 項に記載の処理方法。

【請求項 26】

前記悪性疾患が、膵癌、直腸癌、胃癌、結腸癌、乳癌、悪性黒色腫、腎細胞癌、喉頭癌、卵巣癌、前立腺癌、気管支癌などの固形腫瘍からなる群より選択される、請求項 15 から 24 のいずれか 1 項に記載の処理方法。

【請求項 27】

前記悪性疾患が、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、および慢性リンパ性白血病などの白血病からなる群より選択される、請求項 15 から 24 のいずれか 1 項に記載の処理方法。

【請求項 28】

前記炎症性疾患が、腎臓疾患、喘息、慢性閉塞性肺疾患、内膜過形成、関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症、脈管炎、糖尿病、敗血症、膵炎、多発性硬化症、乾癬、大腸炎、および皮膚炎からなる群より選択される、請求項 25 に記載の処理方法。

【請求項 29】

前記腎臓疾患が、糸球体腎炎、間質性腎炎、腎盂腎炎、狼瘡様腎炎、放射能による腎炎

10

20

30

40

50

、血管性腎症、および嚢胞腎からなる群より選択される、請求項 28 に記載の処理方法。

【請求項 30】

哺乳動物における炎症過程または悪性疾患の決定のための Y B - 1 またはこの少なくとも 1 つのフラグメントまたはこの組み合わせの使用。

【請求項 31】

Y B - 1 タンパク質および / またはこの少なくとも 1 つのフラグメントの検出のための少なくとも 1 種の抗体を含む、哺乳動物における炎症過程または悪性疾患の決定のための検出キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、哺乳動物における炎症過程および腫瘍疾患の検出のための、細胞によって分泌される Y ボックスタンパク質 Y B - 1 およびこのフラグメントの存在を調べるための細胞外体液の検査方法に関する。本発明はさらに、マーカーとしての Y B - 1 の使用、ならびに Y B - 1、Y B - 1 のポリペプチドフラグメント、およびこれらの組み合わせの検出のためのキットを含む。加えて、本発明は、炎症性プロセスおよび悪性疾患を治療するためであり、Y B - 1 タンパク質、Y B - 1 タンパク質のフラグメント、Y B - 1 タンパク質に対する抗体および / または Y B - 1 タンパク質のフラグメントに対する抗体を含む医薬組成物を含む。

【背景技術】

20

【0002】

先行技術の説明

炎症は、哺乳動物の結合組織および血管によって生じる外部または内因性の炎症刺激に対する生物の反応であり、この目的は、このような刺激を取り除きまたは不活性化すること、および一般的には創傷治癒とも呼ばれる刺激に起因する組織への損傷を修復することである。このような炎症のトリガーは、機械的刺激、例えば、圧力、または異物、他の物理的要因、例えば、電離放射線、UV 光、温度の影響であるが、化学物質、例えば、酸、苛性アルカリ溶液、細菌毒素、アレルゲン、ならびに病原体、例えば、微生物、虫 (worm)、および昆虫もまたトリガーである。それは、炎症過程および関連する疾患を制御するための適切な治療を可能にするための、このような炎症過程およびこれらの原因の正確の診断を必要とする生物における、このような炎症刺激の変動性のみならず、関連する炎症過程の変動性でもある。

30

【0003】

広範な種々の手段が、それぞれの炎症過程に属する疾患を診断するために使用される。例えば、大部分は外部から観察可能である炎症性徴候、例えば、明白な、目に見える、またはさもなくば外部から識別可能な皮膚の発赤、熱、痛み、および膨張の発生に加えて、体液、例えば、血液および尿における種々のマーカーの検査の結果もまた、診断のために使用される。このようなマーカーには、例えば、低分子量無機または有機物質、タンパク質または細胞が含まれてもよい。このような検査の間、血液または尿の中に含まれるマーカー物質は、例えば、血液または尿の中のこれらの正常な分布と比較した不規則性について調べられる。これらの結果は、疾患の種類および原因に関する結論を出すことが可能であり得る。血液写真によって認識することができる疾患の例として、白血病またはブライファール病、ウイルス感染に言及してもよい。

40

【0004】

しかし、外的に認識可能な炎症性徴候および / または血液写真または尿の状態の測定を用いる診断が、疾患の種類または原因に関する正確な診断を確立するために十分ではない炎症性疾患もまた存在する。1 つの例としては、炎症性メサンギウム増殖性糸球体腎炎の型である Ig A 腎症に言及してもよい (Ig AN は Ig A 腎炎とも呼ばれる)。この疾患は、患者にとって定期的な透析を必要とする腎不全の最も頻度の高い原因である。明白な診断のために必要とされる指標となる臨床的徴候は、この疾患においては非常に異なって

50

いる可能性がある。例えば、指標となる臨床的徴候として働く可能性がある徴候は、持続する顕微鏡的な血尿または肉眼的な血尿の発生である。加えて、血尿にはしばしば、タンパク尿、すなわち、アルブミン、 α_1 グロブリン、および α_2 グロブリンなどのタンパク質の実質的な量の排出が付随する。指標となる臨床的徴候は、このようなIgA腎炎の存在を非常に可能性が高いものとするが、診断の最終的な確認は腎生検を必要とし、ここでは、腎臓の組織試料が実験室での検査のために取り出される。このかなり複雑な過程はまた、疾患のさらなる経過に関する情報を提供する可能性があり、および医師が適切な治療についての基礎を作ること補助する予後パラメーターの決定のために働く(Friedrich Thaiss and Rolf A. K. Stahl, Deutsches Arzteblatt, Volume 1997, Issue 41, p. A2708 - A2711, October 13, 2000)。組織生検を必要とする他の炎症性疾患には、例えば、狼瘡様腎炎、脈管炎、または膜性糸球体腎炎が含まれる。したがって、侵襲的方法、例えば、生検の使用を不必要にする炎症過程または炎症性疾患の経過のより良好な診断および評価のための方法についての強い必要性がなお存在する。

10

【0005】

同様の試みが、腫瘍疾患のためになされている。この場合においてもまた、腫瘍負荷の程度および腫瘍の転移の挙動について、部分的にマーカーに基づく検出方法が確立されており、これは、肝細胞癌についてのフェトプロテイン、または気管支癌についての癌胎児性抗原(CEA)およびニューロン特異的エノラーゼ(NSE)を検出する。腫瘍の再発は、部分的には、腫瘍マーカーの増加から早期に確立し、その後に腫瘍の程度およびこの局在に関する診断的検査を実施することができる。

20

【0006】

したがって、先行技術において、集中的な研究は、上記に述べたような疾患の迅速および明白な診断を可能にする細胞外と細胞内の両方のマーカーについて実行される。例えば、DE 100 31 122 A1は、悪性疾患の診断のために、細胞中における腫瘍の進行のために重要であるタンパク質YB-1の使用を記載している。本発明は、特に、タンパク質YB-1が核の中でのみこの機能を発揮することができるという認識をもとにしている。

【0007】

YB-1は、このメンバーが、Y-ボックスとも呼ばれる特定の一本鎖または二本鎖核酸セグメントに結合するタンパク質のファミリーに属する。このタンパク質ファミリーのメンバーは、原核生物と真核生物の両方において存在する。これらのタンパク質は、低温ショックに応答して誘導されることが原核生物に対する最初の試験において確立されたので(Goldstein, J., et al., Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1990, Vol. 87, p. 283 - 287)、これらは「低温ショックタンパク質」と名付けられた。真核生物YBタンパク質は、平均で35 kDaの計算分子量を有し、アルギニンおよびアラニンが豊富な可変性のN末端、約70アミノ酸の高度に保存性のドメイン、ならびにC末端領域においてそれぞれ塩基性/芳香族性アミノ酸および酸性アミノ酸を各々有する4個のクラスターの交互の配置からなる。これらのより少ない35 kDaの計算平均分子量にも関わらず、これらのタンパク質は、SDS-PAGEにおいては50,000から60,000の分子量(MW)で存在する。C末端クラスターにおけるこの高度な電荷の違いは、おそらく、SDS-PAGEにおける異常な泳動の挙動の理由である(Dissertation by Karsten Juerchott Humboldt, Universitaet zu Berlin, November 1999, 表題:「Untersuchungen zur subzellulaeren Lokalisation und zu den Funktionen von YB-1, einem Y-Box-Protein in Saeugerzellen」)。すべてのYBタンパク質に特徴的である高度に保存性のドメインは、「低温ショックドメイン」CSDの命名を得たDNA結合ドメインである。YB-1タンパク質のアミノ酸配列お

30

40

50

よび核酸配列は、例えば、Didierらによる論文(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, Vol. 85, p. 7322 - 7326)の中に記載されている。

【0008】

YB-1タンパク質のクラスは、これらのタンパク質のどれが関係のある標的であるかに起因して、種々の機能を発揮する。S. K. Swamyathanらによる概説(The FASEB Journal, May 1998, Vol. 12, p. 515 - 522)において、今日までに知られているこれらのタンパク質の細胞内での種々の機能が記載されている。従って、多くの細胞型において、YBタンパク質は、転写の調節において、クロマチンの修飾において、翻訳の間のRNAのマスキングにおいて、真核生物の酸化還元シグナル経路において、細胞のストレス応答の調節において、および種々の遺伝子の活性化において役割を果たしている。しかし、細胞外プロセスにおけるYB-1タンパク質の関与、または細胞外でのYB-1タンパク質の存在は今日まで知られていなかった。

10

【0009】

(発明の詳細な説明)

本発明は、炎症過程および悪性疾患の細胞において、今日まで細胞内因子としてのみ知られていたタンパク質YB-1が発現されるのみならず、細胞によって分泌される、すなわち、細胞によって生物の細胞外液に分泌されるという本発明者らの驚くべき結果に基づく。このことは、炎症過程および悪性疾患の診断のためのマーカーとしてこのタンパク質を使用することの可能性を提供する。

20

【0010】

したがって、本発明は、哺乳動物における炎症過程または悪性疾患の決定のためのインビトロ処理方法を含み、ここで、この炎症過程または悪性疾患の決定は、哺乳動物からの細胞外液のサンプル中におけるYB-1タンパク質および/またはこの少なくとも1つのフラグメントの存在を調べるための、このサンプルの試験を含む。

【0011】

炎症過程または悪性疾患の「決定」という用語は、炎症過程または悪性疾患が生物に存在するか否かを確立する操作を含む。炎症過程に関しては、この用語は、特に、何らかの外部または内因性の炎症刺激に対する生物の応答が存在するか否かを確立することである。加えて、炎症性疾患については、この定義はまた、対応する細胞によって体液にそれぞれ分泌されたYB-1全長タンパク質、YB-1タンパク質のフラグメント、または両方の検出からの炎症過程の種類決定を含む。さらに、本発明に従う処理方法はまた、この哺乳動物の身体がある炎症の段階を決定するために使用されてもよい。中でも、悪性疾患に関して、転移している腫瘍が存在するか否かを予測することができる。潜在的な腫瘍組織から組織試料を取り出すことの代わりに、本発明に従うインビトロ処理方法は、悪性の転移している腫瘍の疑いを有する患者における迅速および単純な診断を可能にする。

30

【0012】

本発明の処理方法は、哺乳動物における炎症過程および悪性疾患の決定のために特に適している。このことは、すべての哺乳動物の身体細胞が、炎症過程または転移している腫瘍疾患においてYB-1およびYB-1のフラグメントを分泌することを意味する。ヒトは、この細胞が炎症過程または悪性疾患においてYB-1およびYB-1のフラグメントを分泌している哺乳動物の例である。このことは、単離された原発性マクロファージによるYB-1タンパク質の分泌について、実施例6において図示的に実証される。YB-1を分泌する他の細胞型には、メサンギウム細胞、BおよびTリンパ球、腫瘍細胞、例えば、HepG2細胞、または急性骨髄症におけるMonoMac-6細胞が含まれる。

40

【0013】

本発明において説明されるYB-1タンパク質およびYB-1タンパク質のフラグメントは細胞によって分泌され、従って、分泌型YB-1として存在しているという事実に起因して、細胞外体液中でのYB-1、YB-1のタンパク質フラグメント、またはこの組

50

み合わせの検出は可能である。体液の取り出しは、例えば、I g A 腎炎における診断を最終的に確認するために必要とされる、例えば、組織試料の取り出しよりもより簡単である。同時に、本発明のプロセスは、組織試料を取り出すことなく、および事前の腫瘍疾患の位置診断の必要性なしで、疾患の早期診断を可能にする。

【 0 0 1 4 】

本発明に従う「細胞外体液」とは、血液、尿、リンパ液、血漿、血清、汗、鼻分泌物、腔分泌物、創傷滲出物、唾液、膿、精液、糞便、または脳脊髄液をいう。これらの中で、尿、汗、鼻分泌物、腔分泌物、創傷滲出物、唾液、膿、精液、および糞便が単に身体からの分泌の間に収集することができ、またはスミアを調製することによって得ることができる。血液、血漿、血清、リンパ液、および脳脊髄液は、針吸引によって被験体の血管系から得ることができ、ここで、血液は、血液小体を含まない血漿を得るために、取り出し後に遠心分離されなくてはならない。ユーザーのために、尿からの Y B - 1 タンパク質、Y B - 1 タンパク質のフラグメント、またはこの組み合わせの検出は、炎症過程または悪性疾患を決定するための最も単純および最も迅速な可能性である。次いで、尿は、Y B - 1 タンパク質、Y B - 1 タンパク質のタンパク質フラグメント、またはこの組み合わせについて、継続して試験することができる。

10

【 0 0 1 5 】

図 3 (実施例 2) から見るように、細胞外 Y B - 1 (図 3 の「 L P S / 上清」列) は、ポリアクリルアミドゲル中でのこのわずかに高い移動度により、核 Y B - 1 (図 3 の「 N E 」列) と区別される (Y B - 1 の異なるエピトープに対して指向される異なる抗 Y B - 1 抗体を用いる) 。この違いは、タンパク質は修飾され、ここで、代替的な分泌経路が検出され、すなわち、Y B - 1 は細胞の E R またはゴルジ装置によって修飾されないという事実から生じる。加えて、疾患の活性に依存して変化するタンパク質のフラグメントが検出され、これは例えば、活動的なメサングウム増殖性 I g A 腎炎における 2 8 k D a 、 2 3 k D a 、 1 6 k D a 、 および 8 k D a のフラグメントの検出 (図 6 を参照のこと) 、ならびに腫瘍疾患における血清中でのおよそ 1 6 k D a フラグメントの検出の増強を伴う (図 1 1 を参照のこと) 。

20

【 0 0 1 6 】

細胞によって分泌される Y B - 1 タンパク質が検出される場合、本発明は、細胞からのこの分泌の後またはこの間に、Y B - 1 タンパク質がより小さなフラグメントに切断されるという事実を利用する。I g A 腎炎などの炎症性腎疾患において、または腎臓移植拒絶において、より小さなフラグメントが比較的特異的な方法で形成されるので、疾患の活動性は、尿などの体液中でのフラグメントの特異的検出から結論付けることができる。

30

【 0 0 1 7 】

「分泌パターン」は、Y B - 1、このフラグメントおよびこれらの組み合わせの異なる存在から生じる。ウェスタンブロットにおいて 5 2 k D a に存在する全長 Y B - 1 に加えて、8 k D a 、 1 6 k D a 、 2 3 k D a 、 2 8 k D a 、 3 0 k D a 、 3 2 k D a 、 および 3 5 k D a のサイズを有するより小さなフラグメントが存在する。炎症過程または悪性疾患の経過に依存して、存在するフラグメントの分布および量は変化する可能性がある。さらに、まだ完全には試験されていない炎症または悪性疾患において存在する可能性がある他の Y B - 1 フラグメントを確立することができる。フラグメントのサイズは、利用される検出方法がどのように実施されるかに依存して、上方または下方にわずかに逸脱することがあり得る。したがって、本発明はまた、本発明の実施例において決定されたような分子量から ± 5 k D a まで逸脱する分子量を有するフラグメントを含む。Y B - 1 および Y B - 1 のフラグメントは、特に、表 1 に言及される抗体を用いて検出することができる。

40

【 0 0 1 8 】

実施例 1 に記載されるようなウェスタンブロットを用いる全長 Y B - 1 および Y B - 1 のフラグメントの検出の代替として、分泌パターンの決定もまた、H P L C によって行われてもよい。ウェスタンブロットングに対して比較した場合、H P L C は、検出されたフラグメントのより良好な定量を可能にする。H P L C および他のタンパク質分析の方法

50

に関する詳細は、F. LottspeichおよびH. Zorbachによる書籍「Bioanalytik」(Spektrum Akademischer Verlag, May 1998, 1st Edition. ISBN 3-8274-0041-4)において見い出すことができる。タンパク質分析において使用される他の方法は当業者に公知である。例えば、ピウレットアッセイ、ローリーアッセイ、ピシンコニン酸アッセイ(BCAアッセイ)、ブラッドフォードアッセイなどの染色試験; UVおよび蛍光測定に加えて、放射活性標識、タンパク質のヨウ素化および質量分析を含む分光法; 酵素試験; および免疫学的検出技術; クロマトグラフィー分離法; 電気泳動法; キャピラリー電気泳動; 配列分析; ならびにX線構造分析にを挙げることができる。

【0019】

例えば、今日までに尿中での8kDa、16kDa、および23kDaのサイズのフラグメントの存在を伴うYB-1分泌パターンは、腎小体におけるメサンギウム細胞の炎症に付随する疾患において独占的に観察されてきた。腎臓移植の範囲内では、単球およびリンパ球の特徴的な細胞浸潤物が顕著な量のYB-1を発現することが、免疫組織学によって検出されてきた。尿における分泌パターンおよびATPおよびLPS刺激の際のMM-6細胞を用いる結果に起因して、炎症性細胞は、拒絶反応の間にYB-1およびこのフラグメントを分泌し、したがって、これらは尿中で検出可能であることを、考慮することができる。

【0020】

全長YB-1および30kDa YB-1フラグメントは、健全な被験体の血清中で顕著な量で検出することができる。異なる転移している腫瘍疾患を有する患者の血清は、全長YB-1タンパク質に対して指向されるポリクローナル抗体を用いて、およびモノクローナル抗体を用いてウェスタンブロットによって検査される場合、16kDaのYB-1フラグメントのバンドが、試験されるすべての腫瘍患者においてさらに検出可能である(n=15; 図11)。この16kDaフラグメントは、試験された3名の健全被験体および敗血症患者S2においては検出することができなかった。同様の結果は、全長YB-1に対する異なるポリクローナル抗体を用いても得られた。

【0021】

したがって、本発明の処理方法は、サンプル中のYB-1タンパク質およびこのフラグメントの分泌パターンを決定するために上記の検査において得られる検査結果の評価を含む。炎症過程の型およびこのような炎症過程が存在する段階に依存して、切断によって得られた細胞外YB-1の個々のタンパク質フラグメントの量およびサイズは、他の炎症過程において形成されるYB-1の個々のタンパク質フラグメントのサイズ分布と明確に区別される。従って、図9(実施例5)において見ることができるよう、腎臓移植の際の拒絶反応におけるYB-1およびこのタンパク質フラグメントの「分泌パターン」は、図6および7(実施例4)に表されるようなIgA腎炎におけるYB-1分泌パターンと明確に区別される。このことは、本発明に従うプロセスのユーザーが、YB-1およびYB-1タンパク質フラグメントの分布から、炎症性疾患の種類、この原因、およびこの段階を決定可能であることを意味する。したがって、本発明のプロセスは、炎症過程についての一連の検定から確立された分泌パターンと、以前に決定された分泌パターンを比較する工程をさらに含む。これによって決定された分泌パターンは、常に、全長YB-1タンパク質それ自体を含む。一連の検定は、実施例4、5および7において例示的な様式で例示されるように、異なる患者に対する複数の測定から確立することができる。

【0022】

図8において、IgA腎炎を有する患者において、YB-1尿診断から、低分子量バンドの消失後の期間にわたって、腎機能が正常に戻ることを見ることができる。例えば、低分子量バンドの検出に基づいて、免疫抑制についての処理の決定を導き出すことができる。加えて、血清中の16kDaフラグメントの検出は、腫瘍疾患の経過の診断または評価を可能にする(図11、実施例7)。

【0023】

10

20

30

40

50

図6および7に示される結果は、分泌パターンが異なる患者においてほぼ同一に見られることを明確にする。図6は、2名の患者の検査の結果を示し、この両方がIgA腎炎の進行する経過を示す。これらの患者についてのYB-1分泌パターンはまた、52kDaの全長YB-1に加えて、ゲル中で28kDa、23kDa、16kDa、および8kDaのフラグメントによって特徴付けられる。本発明の説明の範囲内で述べられるkDa値は、ゲル中のバンドの位置に合致することが言及されてもよい。図7において、生検で確認されたIgA腎症を有する12名の患者からの自然発生的な尿を用いたYB-1についての尿検査の結果を示した。患者のデータは、ゲルに適用されるときに血清クレアチンのレベルによって分類し、2年後のクレアチン濃度の経過を提示する。23kDa、16kDa、および8kDaのサイズを有するより小さなフラグメントが全長YB-1タンパク質および28kDaフラグメント(レーン10および11)に加えて存在する分泌パターンは、義務的な透析を伴う末期腎不全までの疾患の進行に付随する。したがって、疾患の既知の経過を有する患者に対するこのような測定によって確立されたYB-1についての分泌パターンは、他の患者におけるこのような炎症過程の決定のための一連の検定として使用することができる。

10

20

30

40

50

【0024】

図9(実施例6)における結果からさらに見るように、炎症過程、本実施例においては臓器拒絶の検出のためのマーカー物質としてのYB-1タンパク質およびこのフラグメントの検出は、おそらく、従来的に使用されているマーカーを用いる検出よりも明らかに初期の症状に適用可能である。図9から見るように、26kDaにおけるより小さなYB-1タンパク質フラグメントは、拒絶反応の初期のマーカーとして利用されているグランザイムBまたはMIGの濃度の上昇の前に、すでに患者Aにおいて見ることができる。ここで使用したモノクローナル抗体(AB 4)は言及したフラグメントを認識する。

【0025】

実施した実験の結果はまた、IgA腎炎におけるような、腎臓における炎症過程における本発明の方法の適用が、炎症過程のより正確な診断のために、腎臓疾患において通常再発されるタンパク尿の程度とは独立しているという結論を可能にする。従って、本発明は、哺乳動物生物における炎症過程および悪性疾患の診断のために有効な早期警戒システムを表す。

【0026】

細胞外に存在するYB-1タンパク質、YB-1タンパク質の少なくとも1つのフラグメント、またはこの組み合わせの検出は、当分野において公知の方法によってもたらされる。これらには、例えば、染色試験、酵素活性試験、免疫学的方法および分光法を用いるタンパク質検出が含まれる。これらの技術の概観は、例えば、F. LottspeichおよびH. Zorbachによる書籍「Bioanalytik」(Spektrum Akademischer Verlag, May 1998, 1st Edition, ISBN 3-8274-0041-4)において見いだされる。例えば、抗体を用いる免疫学的検出は、YBタンパク質を検出するために適切である。含まれるタンパク質のウェスタンブロットティングによる分離後、例えば、尿中で、全長YB-1タンパク質の異なるセグメントに対して指向されるポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体が使用され、したがってこれはまた、YB-1のタンパク質フラグメントの検出のために使用されてもよい。抗体を用いるYB-1およびこのフラグメントの検出は、この免疫学的検出が非常に特異的および非常に高感度であるため有利である。先行技術においては、例えば、DE 100 31 122 A1においては、細胞内YB-1タンパク質に対して指向される抗体が記載され、これは、組織試料からの細胞の溶解後においてのみ、免疫学的検査に利用可能になる。

【0027】

本発明の処理方法は、特に、哺乳動物生物における炎症過程の決定のために適している。このような炎症過程は、移植または炎症性疾患の後の拒絶反応であり得る。炎症性疾患

は、腎臓疾患、喘息、慢性閉塞性肺疾患、関節リウマチ、脈管炎、糖尿病、癌、白血病、敗血症、膵炎、多発性硬化症、乾癬、および皮膚炎からなる群より選択される。この段階に依存して、各々の疾患は、Y B - 1、Y B - 1タンパク質フラグメントまたはこの組み合わせについての特異的分泌パターンに起因する。このプロセスは、特に、腎臓疾患の決定のために適切である。

【0028】

腎臓疾患は、糸球体腎炎、特に、I g A腎炎、間質性腎炎、腎盂腎炎、狼瘡様腎炎、放射能による腎炎、血管性腎症、および嚢胞腎からなる群より選択される。以下の実施例において例示的な様式で議論されるはずである、異なる疾患（例えば、I g A腎炎および臓器拒絶）、I g A腎炎などの疾患の異なる段階における異なる分泌パターンの例は、実施例から明らかになる。

10

【0029】

実施例に示されるように、本発明の処理方法はまた、悪性疾患の決定のために適切である。このような悪性疾患には、膵癌、直腸癌、胃癌、結腸癌、乳癌、悪性黒色腫、腎細胞癌、喉頭癌、卵巣癌、前立腺癌、気管支癌などの固形腫瘍からなる群より選択される腫瘍、ならびに急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、および慢性リンパ性白血病などの白血病が含まれる。

【0030】

本発明はさらに、哺乳動物における炎症過程を決定するためのY B - 1または少なくとも1つのこのフラグメントまたはこの組み合わせの使用を含む。Y B - 1の分泌がすべての種類の炎症過程および悪性疾患において観察することができるという事実に起因して、Y B - 1または少なくとも1つのこのフラグメントまたはこの組み合わせは、哺乳動物の身体中における炎症および悪性疾患のためのマーカーとして特に適切である。特に、特異的抗体/抗原結合を利用する免疫学的技術が、Y B - 1タンパク質または少なくとも1つのこのフラグメントまたはこの組み合わせの検出のために適切である。

20

【0031】

Y B - 1タンパク質、少なくとも1つのこのフラグメントまたはこの組み合わせの検出のために、本発明はまた、哺乳動物における炎症過程の決定のために働く検出キットを提供する。この検出キットは、Y B - 1タンパク質および/またはこの少なくとも1つのフラグメントの検出のために適切な少なくとも1種の抗体を含む。この検出キットを用いて、Y B - 1の分泌パターンが確立され、炎症過程または悪性疾患については既存の一連の検定と比較される。この炎症過程または悪性疾患の早期診断および決定は、患者のための適切な治療が早期に開発されることを可能にする。

30

【0032】

タンパク質Y B - 1の検出のための手段は抗体を含み、ここで、この抗体は、Y B - 1タンパク質またはこのフラグメントの少なくとも1つの抗原決定基に特異的に結合することができるモノクローナル抗体とポリクローナル抗体の両方であり得る。本発明のプロセスのために適切な抗体は表1に示される。これらの抗体には、I g G、I g A、I g E、I g M、およびI g D抗体が含まれるがこれらに限定されない。このようなキットは、これらの抗体の保存のための緩衝剤およびタンパク質分解性分解から抗体を保護する試薬両方を含んでもよい。

40

【0033】

Y B - 1タンパク質およびY B - 1タンパク質のフラグメントが細胞によって分泌されるという驚くべき結果に起因して、他の細胞因子または受容体との、分泌型のY B - 1タンパク質またはこのフラグメントの相互作用に基づく、可能性のある医学的応用が生じる。したがって、本発明はさらに、Y B - 1タンパク質、Y B - 1タンパク質のフラグメント、Y B - 1タンパク質に対する抗体、および/またはY B - 1タンパク質のフラグメントに対する抗体を含む群から選択される薬剤を含む、炎症過程または悪性疾患の治療のための医薬組成物を含む。

【0034】

50

本発明者らは、分泌型 Y B - 1 が、パラクリン効果およびオートクリン効果によって炎症過程および細胞増殖に影響を与えることを見出した。従って、本発明者らは、いくつかの実験において、Y B - 1 が N O T C H ファミリーの受容体に結合することを示すことができた。N O T C H 受容体は、細胞中の多くの分化プロセス、例えば、筋発生または造血の間の幹細胞集団の分化などの調節に關与する膜貫通受容体のファミリーである。加えて、T細胞中の N O T C H - 1 受容体の活性化ヒトバリアントの抗アポトーシス効果が知られており、これによって、特定の細胞集団の発生が調節される。炎症誘発性刺激 (T N F - α / 細菌リポポリサッカリド) の影響下での免疫担当細胞の活性化における N O T C H 依存性シグナル経路と N F - κ B 依存性シグナル経路の間のいくつかの関連性が確立された。組換え Y B - 1 を適用することによって、Y B - 1 の活性は増強することができ、例えば、神経皮膚炎 (*neurodermitis*) などの増殖性疾患において重要である細胞分化を開始することができる。細胞の増殖およびこれによって達成される分化を阻害することができる。対照的に、分泌型 Y B - 1 を結合する抗体の適用は、炎症性細胞の補充 (単球 / マクロファージの移動) を阻害することができる。このことは、例えば、移植における拒絶反応を回避するために、しかしまた、冠状動脈介入およびステント挿入の際に、アテローム性動脈硬化症または内膜過形成の予防において所望される。他の応用は、細胞の分化が増殖の阻害をもたらす腫瘍疾患の治療に關連する。

10

【 0 0 3 5 】

従って、本発明者らは、ケラチノサイト培養を用いる実験において、Y B - 1 および Y B - 1 に対する抗体が細胞の分化に影響を与えることを示すことができた (実施例 8) 。さらに、Y B - 1 が T G F - β 結合タンパク質 (L T B P) に結合し、これによって、T G F - β などのさらなる炎症性メディエーターの放出を引き起こすことを示すことができた。

20

【 0 0 3 6 】

したがって、本発明はまた、好ましくはモノクローナル抗体を含む医薬組成物に關し、モノクローナル抗体がキメラ化またはヒト化される場合に、医学的応用のために特に利点がある。ヒト化抗体は、対応する非ヒト化抗体よりも低い免疫原性効果を有する。ヒト化において、抗原結合部位を伴う可変ドメインのみまたは超可変ドメインのみのいずれかが非ヒト起源であり、他のヒト抗体骨格に導入される。キメラ化抗体またはヒト化抗体の調製のための広範な種々の実験が先行技術において公知である (Morrison et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 1985 , Vol. 81 , p . 6851 ; Takeda et al. , Nature , 1985 , Vol. 314 , p . 452 ; Cabilly et al. , U.S. Pat. No. 4,816,567 ; Teng et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 1983 , Vol. 80 , p . 7308 - 7312 ; Kozbor et al. , Immunology Today , 1983 , Vol. 4 , p . 7279 ; Green , L. L. Journal of Immunological Methods , 1999 , Vol. 231 (1 - 2) , p . 11 - 23) 。

30

【 0 0 3 7 】

本発明において使用されるモノクローナル抗体は、表 1 に表されるハイブリドーマ細胞株から調製されるモノクローナル抗体の群から選択される。受入番号 D S M A C C 2 7 0 3 を有するハイブリドーマ細胞株のモノクローナル抗体が好ましい。

40

【 0 0 3 8 】

医薬組成物の特に好ましい実施形態において、抗体、Y B - 1 タンパク質、Y B - 1 タンパク質のフラグメント、またはこの組み合わせは、生物学的に適合可能な移植体上に固定化される。例えば、腸吻合またはヘルニア修復による創傷治癒は、可能な限り高いコラーゲン発現が付随する。移動細胞、例えば、マクロファージの分化、および常在のおよび移動している線維芽細胞とのこの相互作用は、細胞の表現型およびコラーゲンの発現パターンに影響を与える。本発明の抗体または組換え Y B - 1 で生物学的に適合可能な材料をコーティングすることによって、創傷治癒は、直接的に影響を受けることができる。この

50

ような生物学的に適合可能な移植物は、ほんの少し例を挙げるだけでも、プラスチックネット、創傷プラスター、ヒドロキシアパタイトまたはポリカプロラク톤の骨格を含む群から選択することができる。

【0039】

本発明の医薬組成物は、炎症過程および悪性疾患の治療のために特に適切であり、ここで、この炎症過程は、移植または炎症性疾患の際の哺乳動物の拒絶反応であり得る。

【0040】

この炎症性疾患は、腎臓疾患、喘息、慢性閉塞性肺疾患、内膜過形成、関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症、脈管炎、糖尿病、敗血症、膵炎、多発性硬化症、乾癬、大腸炎、および皮膚炎であり得る。

【0041】

この悪性疾患は、膵癌、直腸癌、胃癌、結腸癌、乳癌、悪性黒色腫、腎細胞癌、喉頭癌、卵巣癌、前立腺癌、気管支癌などの固形腫瘍、ならびに急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、および慢性リンパ性白血病などの白血病であり得る。

【0042】

この腎臓疾患は、糸球体腎炎、特にIgA腎炎、間質性腎炎、腎盂腎炎、狼瘡様腎炎、放射能による腎炎、血管性腎症、および嚢胞腎であり得る。

【0043】

本発明の医薬組成物は、経口使用のために適切な型、例えば、錠剤、カプセル、水性もしくは油性溶液、懸濁液、またはエマルジョンで投与されてもよく；経粘膜的および経皮的使用を含む局所的使用のために、これは、例えば、クリーム、軟膏、ゲル、水性もしくは油性溶液または懸濁液、軟膏、またはプラスターの型で投与されてもよい。これはまた、吸入によって、例えば、エアロゾルとして投与されてもよい。これは、同様に、非経口的使用（静脈内、皮下、筋肉内、血管内、または注入を含む）のために、例えば、水性もしくは油性溶液または懸濁液として適切である。炎症過程または悪性疾患の部位が正確に位置決めできる場合、投与の適切な方法は、この部位におけるこの医薬組成物を含む溶液の直接的注射であり得る。

【0044】

一般的に、本発明の医薬組成物は、当業者に公知の標準的な技術を使用して通常の賦形剤（媒体）を用いて慣用的に製剤化される。

【0045】

本発明の医薬組成物の経口投与のために、これは、錠剤、カプセルの型で、または水性溶液または懸濁液として提供される。

【0046】

経口使用のための錠剤は、医薬的に許容される賦形剤、例えば、不活性希釈剤、崩壊剤、結合剤、充填剤、流動促進剤、甘味料、香料、着色料、および保存剤とともに混合された活性成分を含んでもよい。適切な不活性希釈剤には、炭酸ナトリウムまたは炭酸カルシウム、リン酸ナトリウムまたはリン酸カルシウム、およびラクトースが含まれる。適切な崩壊剤には、例えば、デンプンおよびアルギン酸が含まれる。結合剤には、例えば、デンプンおよびゼラチンが含まれ、一方流動促進剤には、存在する場合、ステアリン酸マグネシウム、セバシン酸、または獣脂が含まれる。所望される場合、錠剤は、例えば、胃腸管における吸収を遅らせるために、モノステアリンまたはグリセロール1,3-ジステアリン酸のような物質でコーティングされてもよい。経口使用のためのカプセルには、活性薬学的成分が固体希釈剤と混合される固形ゼラチンカプセル、および本発明の薬学的成分が水または油、例えば、ピーナッツオイル、流動パラフィン、またはオリーブ油と混合されるソフトゼラチンカプセルが含まれる。本発明の医薬組成物の筋肉内、腹腔内、皮下、または静脈内使用のために、これは、適切なpHおよび等張性に調整された滅菌水溶液または懸濁液として一般的に提供される。適切な水溶性キャリアには、リンガー液および等張性塩化ナトリウムなどのアジュバントが含まれる。水性懸濁液には、セルロース誘導体、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン-2-オンおよびトラガカントなどの懸濁

10

20

30

40

50

剤、ならびにレシチンなどの湿潤剤が含まれてもよい。適切な保存剤には、例えば、エチルおよび n - プロピル p - ヒドロキシ安息香酸が含まれる。

【 0 0 4 7 】

(実施例)

下記において、実施例で使用される抗体を表に要約する。特に、抗体が、全長 Y B - 1 タンパク質のどの部分に対して作用するか、または Y B - 1 タンパク質のどのフラグメントに対して作用するかが示される。

【 0 0 4 8 】

【 表 1 】

抗体の表示	抗体(AB)型(モノクローナルまたはポリクローナル)	AB が何に対して作用するか(どのフラグメントかおよび/または全長 YB-1 か)	供給源
AB1	ポリクローナル	YB-1 タンパク質の C 末端	Martens P.R. et al., J. Am. Soc. Nephrology, 1999, Vol. 10, p. 2480-2487
AB2(抗ウサギ HRP-結合体化 F(ab') ₂ フラグメント)	ポリクローナル	二次抗体	Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, UK
AB3(ポリクローナルウサギ抗体)	ポリクローナル	全長 YB-1 タンパク質	Mertens P.R. et al., The Journal of Biological Chemistry, 1997, Vol. 272, No. 36, p. 22905-22912
AB4	モノクローナル	全長 YB-1	ハイブリドーマ細胞株「Deutschland」(受入番号 DSM ACC 2703 の下で DSMZ に寄託)
AB5(抗マウス抗体)(PI-2000)	ポリクローナル	二次抗体	Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, UK
AB6(HA タグに対するポリクローナルウサギ抗体)	ポリクローナル	HA-YB-1 融合タンパク質 (MW 54 kDa)	Y-11 Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA
AB7(ポリクローナルウサギ抗体)	ポリクローナル	YB-1 タンパク質の N 末端	A-16X, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA
AB8	モノクローナル	全長 YB-1	ハイブリドーマ細胞株「Italien」
AB9	モノクローナル	AB9 は血清中で全長 YB-1 タンパク質および 26kDa フラグメントについてより低い親和性を有する。16kDa または 23kDa などのより小さな YB-1 フラグメントの検出なし	ハイブリドーマ細胞株「Grossbritannien」

10

20

30

40

50

【実施例 1】

【0049】

リポポリサッカリド (LPS) を用いる単球細胞株 MM - 6 の刺激の際の分泌型 Y B - 1 およびこのフラグメントの検出

MM - 6 単球細胞からの微小胞の回収および Y B - 1 の検出

MM - 6 単球細胞を、10% (v/v) FCS (ウシ胎仔血清)、2 mM L - グルタミン、100 μg/ml ストレプトマイシンおよび 100 U/ml ペニシリン - G を含有する RPMI 1640 培地中の懸濁培養として増殖させる。リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) 中での洗浄操作後、細胞を、リプミン (Lipumine) (商標) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) を含有し、FCS 添加なしの RPMI 培地中に取り、および計数する。エッペンドルフ (Eppendorf) 容器中で、 2×10^6 MM - 6 細胞を、LPS および アデノシン三リン酸 (1 mM) (両方とも Sigma Aldrich, St. Louis, USA より) とともに、図 1 および 2 に述べた濃度にて、37 °C で 4 時間インキュベートする。続いて、細胞を含む培地を、細胞を沈殿させるために $330 \times g$ で 10 分間遠心分離し、次いで、上清を $2200 \times g$ で 15 分間再度遠心分離する。2 回目の遠心分離後の上清を、タンパク質 (微小胞を含む) の沈殿のために氷冷トリクロロ酢酸と混合し、-20 °C で一晩保存し、続いて $33,000 \times g$ で 30 分間の遠心分離および上清の廃棄を行う。ペレットを氷冷非変性エタノール (70%) で 1 回洗浄し、真空遠心分離で乾燥させる。

10

【0050】

続いて、乾燥した沈殿物を 25 μl の蒸留水中に取る。25 μl の変性緩衝液の添加後、これを SDS ポリアクリルアミド (SDS - PA) ゲル (12.5%) 中の電気泳動によって分離し、Y B - 1 および Y B - 1 のフラグメントを、「抗体検出」の項目 (Mertens P. R., et al., J. Am. Soc. Nephrology, 1999, Vol. 10, p. 2480 - 2487) において以下に言及される抗体を用いて、ウェスタンブロットングにおいて検出する (以下を参照のこと)。全長 Y B - 1 (52 kDa) に加えて、35 kDa、32 kDa、28 kDa、および 16 kDa のサイズを有する Y B - 1 のフラグメントもまた検出した。

20

【0051】

ウェスタンブロット分析

利用した溶液:

下部 (分離) ゲル緩衝液 (4x): 1.5 M Tris - HCl, pH 8.8

アクリル/ビスアクリル (30%): 29.2 g アクリルアミド、0.8 g ビスアクリルアミド、70 ml H₂O

上部 (濃縮) ゲル緩衝液 (4x): 0.5 M Tris - HCl, pH 6.8

SPS (10%): 90 ml の H₂O 中 10 g の SDS

APS (10%): 9 ml の H₂O 中 1 g のペルオキソ二硫酸アンモニウム

電気泳動緩衝液 (10x): 30 g の Tris - HCl、144 g のグリシン、10 g の SDS を、H₂O で 1000 ml にし、全体を pH 8.3 に調整

サンプル緩衝液 (4x): 2.4 ml の H₂O、2.4 ml の下部ゲル緩衝液、2.0 ml のグリセロール、2.0 ml の SDS (10%)、200 μl のプロモフェノールブルー溶液 (1%)、40 μl の EDTA 溶液 (0.5 M)、1 ml の β -メルカプトエタノール

転写緩衝液: 3.03 g のトリズマベース、14.4 g のグリシン、200 ml のメタノールを、H₂O で 2000 ml にする

TTBS 溶液: 1916 ml の H₂O、60 ml の NaCl 溶液 (5 M)、20 ml の Tris 溶液 (1 M, pH 8)、4 ml の Tween - 20 溶液 (25%)。

【0052】

タンパク質を電気泳動によって分離し、ニトロセルロース膜に転写し、および以下のよう抗 Y B - 1 抗体を用いて検出する (「抗体検出」の項目において以下に列挙されるリ

30

40

50

ストを参照のこと)。最初に、12.5% SDS PAゲルを、BioRadミニゲルシステム (Mini gel System) で成型した。4枚の下部ゲル (約25mlに対応) について、以下の溶液を連続的に混合した。H₂O 8ml、下部ゲル緩衝液 (4x) 6.25ml、アクリル/ビスアクリル (30%) 10.4ml、SDS (10%) 250 μ l、TEMED 12.5 μ l、APS (10%) 125 μ l。

【0053】

続いて、まだ液体である下部ゲルを、液体のレベルがガラスプレートの上端よりも1cm下まで、ミニゲルシステムのガラスプレート間に直にピペティングした。残りの空間は水で満たし、重合を室温で45分間行った。

【0054】

4枚の下部ゲルについて、以下の溶液を連続的に混合した。H₂O 6.1ml、下部ゲル緩衝液 (4x) 2.5ml、アクリル/ビスアクリル (30%) 1.3ml、SDS (10%) 100 μ l、TEMED 10 μ l、APS (10%) 50 μ l。

【0055】

ガラスプレート間の余分の水をデカントし、ガラスの間隙を液体下部ゲルで満たした。すぐにコームを挿入し、下部ゲルを室温で45分間重合した。この間に、細胞抽出液から、または上清の遠心分離後のサンプルを調製する。10 μ lのサンプルを10 μ lの変性サンプル緩衝液 (Laemmle) と混合し、ウォーターバス中で95℃にて3から5分間インキュベートした。コームを重合ゲルから取り出し、チャンバーを電気泳動緩衝液 (1x濃度) で満たした。続いて、各サンプルを手短に遠心分離し、サンプルウェルをピペットで前洗浄し、各サンプルをサンプルウェルに適用して、150ボルトで約1時間の電気泳動によって分離する。

【0056】

電気泳動の間、転写のための調製物を作製する。従って、転写緩衝液を調製し、4℃にあらかじめ冷却した。各ゲルについて、ニトロセルロース膜および倍の数のWhatman濾紙を適切なサイズに切断する。電気泳動後、ゲルをチャンバーから取り出し、ニトロセルロース膜およびWhatman濾紙を転写緩衝液で濡らし、以下の順番で、泡が入らないように重ねた。Whatman濾紙、ニトロセルロース膜、ゲル、Whatman濾紙。転写のために、ニトロセルロース膜は転写チャンバーの陽極に向け、チャンバーは転写緩衝液で満たし、氷の塊を冷却のために挿入し、およびプロットングを100ボルトで1時間実施する。

抗体検出

転写後、膜をTTBS溶液で3x10分間洗浄し、2% BSA溶液 (TTBSAに溶解) で室温で2時間ブロックし、および再度TTBS中で3x10分間洗浄する。続いて、膜を1:2000の希釈にて4℃で一晩、一次抗体とともにインキュベートする。異なる抗YB-1抗体を利用する (以下のリストを参照のこと)。さらなる洗浄操作後、膜を二次抗体とともにインキュベートする (以下のリストを参照のこと)。

【0057】

以下の抗体の組み合わせ ([一次抗体] : [二次抗体]) を、YB-1およびYB-1のフラグメントを検出するために利用する。

【0058】

YB-1 C末端に対するポリクローナルウサギ抗体 (AB1) (Mertens P. R. et al., J. Am. Soc. Nephrology, 1999, Vol. 10, p. 2480-2487) : 口バからの抗ウサギHRP-結合体化F(ab')₂フラグメント (AB2) (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, UK)、1:5,000の希釈にて室温で2時間インキュベートする。

【0059】

全長YB-1タンパク質に対するポリクローナルウサギ抗体 (AB3) (Mertens P. R. et al., The Journal of Biological C

10

20

30

40

50

hemistry, 1997, Vol. 272, No. 36, p. 22905 - 22912) : ロバからの抗ウサギHRP - 結合体化F(ab')₂フラグメント(AB2)(Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, UK)、1:5,000の希釈にて室温で2時間インキュベートする。

【0060】

モノクローナル抗YB-1抗体(AB4およびAB8) : ロバからの抗マウス抗体(AB5)(PI-2000, Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, UK)、1:20,000の希釈にて室温で2時間インキュベートする。細菌中で組換え的に調製した全長YB-1タンパク質に対するモノクローナル抗体「Deutschland」(AB4)および「Italien」(AB5)は、マウスを免疫すること、および以下のプロトコールに従って組換えタンパク質の2回のブースター注射後に脾臓リンパ球を単離すること、およびこれらをハイブリドーマ細胞と融合させることによって生成された。

10

【0061】

モノクローナル抗体の調製

免疫 : 8週齢のBALB/cマウスを、精製した抗原(rYB-1タンパク質、Mertens et al., The Journal of Biological Chemistry, 1997, Vol. 272, No. 36, p. 22905 - 22912を参照のこと)で免疫した。投薬量は150µg/マウスである。初回免疫のために、抗原を完全フロイントアジュバント(CFA; Sigma)(油中水エマルジョン、Hurn and Chantler, 1980)中で乳化し、300µlの量でマウスに皮下注射する。免疫前に、血液をマウスの尾静脈から取り出す(免疫前血清)。初回免疫の4週間後、血液をマウスから取り出す(免疫血清)。これらの血清中の抗体力価を、半定量的エンザイム免疫アッセイ(スロットプロット)で決定する。高い抗体力価を有するマウスを、初回免疫の6から8週間後免疫し、および2週間後に再度免疫する(ブースター免疫)。このようにして、PBS中の100µgのrYB-1を、動物に静脈内注射する。最終免疫の3から5日後に、融合がもたらされる。

20

【0062】

脾細胞を得るための脾細胞懸濁液の調製 : 頸部転置後、滅菌条件下でマウスから脾臓を取り出し、HBSS(ハンクス緩衝化塩溶液)中でペトリ皿中で2対のピンセットを用いて注意深く引っ張って分ける。細胞塊および残りの結合組織は、微細なワイヤメッシュを通す濾過によって除去する。続いて、細胞をHBSSで3回洗浄する(室温にて200×g、10分間の遠心分離)。ハイブリドーマのクローニングのために、組換えIL-6(100U/ml, Roche)を利用する。

30

【0063】

細胞融合 : 細胞融合のために、KoehlerおよびMilstein(Koehler and Milstein, Biotechnology, 1992; Vol. 24, p. 524 - 526)によってもともと記載された方法の改変プロトコールを使用する。免疫したマウスからの10⁸個の洗浄した脾細胞および2から5×10⁷個の8-アザグアニン耐性ミエローマ細胞(X63-Ag8/653)を、50mlの遠心分離チューブ中で混合する。このミエローマ細胞を10日間増殖させ、大きな細胞培養フラスコ(225cm²)に移す。続いて、これらの細胞数をNeubauer計数チャンパー中で測定する。チューブをGKN培地(8g/l NaCl、0.4g/l KCl、1.77g/l Na₂HPO₄、0.69g/l NaH₂PO₄、2g/l グルコース)で満たし、室温にて、200×gで10分間遠心分離する。上清を吸引する。1分間の時間にわたって、0.5mlの50% PEG溶液(Sigma)を滴下して加える。ペレットを、注意深く、軽く叩くことによって再懸濁する。PEGを希釈するために、90秒後、5mlのGKN培地を、5分間の時間にわたって加える。10分間の休止期の後、大きな塊を、10mlピペットを用いて注意深くピペッティングすることによって溶解する。細胞懸濁液は、引き続いて、HAT培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン、および細胞

40

50

ハイブリッドの培養のためのチミジン、DMEM (Gibco)、2 mM L-グルタミン、 5×10^{-5} M β -メルカプトエタノール、2% (v/v) 50 \times HAT、1% (v/v) 非必須アミノ酸、10% (v/v) ウシ胎仔血清、100 μ g/ml ストレプトマイシン、および100 U/ml ペニシリンを有する培地) 中で希釈し、6枚のマイクロタイタープレート(96ウェル)に分配する。細胞密度は、100 μ lの体積でウェルあたり約 1×10^5 である。1週間の間隔で、ハイブリドーマは、HAT培地を供給する。約2週間後、ハイブリドーマの大部分は増大し、約 5×10^3 から 10^4 の細胞数を含む。この時点で、上清を、ドット-プロットエンザイムイムノアッセイを用いて、特異的抗体のこれらの含量について試験する。この目的のために、各々の上清の100 μ l/ウェルをマイクロタイタープレートから取り出し、利用する。試験でポジティブであったハイブリドーマを増殖させる。

10

【0064】

限界希釈の原理に従うクローニング：抗体産生クローンの単クローン性を保証するために、Coller and Collerによって記載された限界希釈法(Hybridoma, 1983; Vol. 2, p. 91-96)を用いる。Neubauer細胞チャンパーを用いて、クローンの細胞数を決定し、細胞培養物を培地で希釈し、その結果、統計学的には1つのみの細胞が96ウェルプレートの1つおきのウェルに分配される。培養は再度拡大され、約2週間後、これらの培養物からの上清は、特異的抗体の産生についてエンザイムイムノアッセイ(ウェスタンブロット、ELISA)において再度試験される。陽性クローンを拡大し、より詳細に特徴付けし、および保存のために液体窒素中で凍結する。凍結のために、ハイブリドーマ細胞は、収集され、遠心分離され、氷凍結媒体中に 1×10^6 細胞/mlの細胞密度で再懸濁し(10% (v/v) DMSO、20%から30%ウシ胎仔血清を有するDMEM)、および窒素中に保存する。

20

【0065】

「Deutschland」抗体(AB4)のアイソタイプ決定により、これがIgG 2bサブクラスに属するという結果が出た。「Italien」(AB8)および「Grossbritannien」(AB9)という表示の抗体は同様の様式で調製した。

【0066】

検出は、「増強化学発光(Enhanced Chemiluminescence)」反応(ECL(商標)、Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, UK)、その後X線フィルム曝露を用いて行った。

30

【0067】

結果：

図1Aにおいて、全長YB-1(52 kDa)の分泌の誘導は、1 ng/ml LPSを加えたときに明確になる(レーン4)。より低い濃度(10^{-2} から 10^{-1} ng/ml)およびより高い濃度(10から 10^4 ng/ml)は、例えば、 10^4 ng/mlのLPS濃度において見ることができるよう(レーン8)、分泌なしまたは低い分泌のみをもたらす。

【0068】

0.1から10 ng/mlのより限定された濃度範囲におけるさらなる試験列(図1B)は、全長YB-1が1.0から7.5 ng/mlのLPS濃度においてMM6細胞によって分泌されることを示す。ウェスタンブロッティングからの膜がより長く抗体とインキュベートされる場合、全長YB-1の構成的発現もまた、低いLPS濃度(0.25から0.75 ng/ml)で見ることができるよう(図2)。加えて、YB-1切断産物の分泌は、1.0 ng/mlから7.5 ng/mlのLPS濃度において明確になる。YB-1の切断産物は、35 kDa、32 kDa、28 kDa、および16 kDaのサイズを有する。

40

【0069】

図1において、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)およびアクチンが、1 ng/ml

50

1 (図1A) および1から7.5 ng/ml (図1B) のLPS濃度においてそれぞれ存在することもまた示される。このことは、分泌メカニズムの特異性、および検出されたYB-1が溶解した細胞に由来するのではないという事実を実証する。

【実施例2】

【0070】

細胞内発現されたYB-1と分泌型YB-1の分子量(MW)の比較

本実験において、E. coli中で組換え的に調製したYB-1(rYB-1)、核YB-1(NE)、およびMM-6細胞のLPS刺激に際して分泌されたYB-1(LPS/上清)の間の分子量の違いを調べる。

【0071】

MM-6細胞のLPS刺激および分泌型YB-1の測定についての実験設定の説明は実施例1に見い出される。組換えYB-1の調製および核YB-1の単離は、Mertens et al., J. Biol. Chem., 1997, Vol. 272, p. 22905-22912; Mertens P. R. et al., J. Biol. Chem., 1998, Vol. 273, p. 32957-32965による論文に記載されているような方法によって行う。核YB-1、組換えYB-1、およびLPS刺激に際して分泌されたYB-1のサンプルを用いて引き続いて実施するウェスタンブロッティングは、実施例1の説明に従って実施する。一方、ウェスタンブロッティングにおいて使用される抗体は、以下に対して指向される。

【0072】

C末端(抗C(AB1);上記を参照のこと、Mertens P. R. et al., J. Am. Soc. Nephrology, 1999, Vol. 10, p. 2480-2487);

N末端(抗N(AB7)、1:2000の希釈で利用されるSanta Cruzからの抗YB-1抗体);および

全長YB-1タンパク質(抗w(AB3;上記を参照のこと、Mertens P. R. et al., The Journal of Biological Chemistry, 1997, Vol. 272, Nr. 36, p. 22905-22912)(さらなる詳細については、実施例1を参照のこと)。核細胞抽出物の回収は、以下においてより詳細に記載される。

【0073】

核細胞抽出物(NE)の回収:

利用される溶液:

低張性緩衝液: 10 mM HEPES pH 7.9、1.5 mM MgCl₂、10 mM KCl、0.2 mM PMSF、0.5 mM DTT、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム。

【0074】

低塩濃度を有する緩衝液: 20 mM HEPES pH 7.9、25% (v/v) グリセロール、1.5 mM MgCl₂、20 mM KCl、0.2 mM EDTA、0.2 mM PMSF、0.5 mM DTT、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム。

【0075】

高塩濃度を有する緩衝液: 20 mM HEPES pH 7.9、25% (v/v) グリセロール、1.5 mM MgCl₂、1.0 M KCl、0.2 mM EDTA、0.2 mM PMSF、0.5 mM DTT、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム。

【0076】

透析緩衝液: 20 mM HEPES、20% (v/v) グリセロール、0.1 M NaCl、0.2 mM EDTA、0.2 mM PMSF、0.5 mM DTT。

【0077】

核抽出物の回収は、Dignam et al. (Methods Enzymol., 1983; Vol. 101, p. 582-598)によって記載される方法から適合さ

10

20

30

40

50

れる。細胞は、250 ml 細胞培養フラスコに播種され、10% FCS を有する完全 RPMI 培地中で、80% のコンフルエンスまで培養する。培地をデカントし、細胞を氷冷 PBS で1回洗浄し、続いて10 ml の氷冷 PBS 中で細胞スクレーパーを用いて注意深く脱離させる。以下の工程は常に氷上または4で行う。1分間あたり3,000回転 (rpm) で10分間の細胞懸濁液の遠心分離、上清のデカント、および5ペレット体積の低張性緩衝液 (上記を参照のこと) 中への細胞ペレットの取り込み。この懸濁液を、再度3,000 rpm で5分間遠心分離する。ペレットを、低張性緩衝液 (3ペレット体積) に再度取り込み、10分間氷上でインキュベートし、および4,000 rpm で15分間遠心分離する。上清を遠心分離後に廃棄し、沈殿物を低塩濃度を有する緩衝液 (1/2ペレット体積) 中に取り込み、高塩濃度を有する緩衝液 (総体積の1/3) を、ピペティングによって注意深く加える。その後、抽出物を各々30分間振盪し、14,000 rpm で遠心分離する。この間に、透析チューブを0.05 M EDTA 中で煮沸し、水中に浸漬する。遠心分離後、上清をこの透析チューブにピペットで移し、2リットルのあらかじめ冷却した透析緩衝液中で、定常的に攪拌しながら4で一晩透析する。翌朝、透析緩衝液を交換し、さらに2時間透析を行う。引き続き、サンプルをアリコートとし、液体窒素素で瞬間的に凍結し、および-80で保存する。

10

【0078】

結果：

図3において示されるウェスタンブロットのゲル中の最初の列は陰性対照として働く (すなわち、一次抗体を使用しなかった)。分泌型 YB-1 のより低い移動度 (レーン1、5、および8) が、核起源の YB-1 (レーン3、6、および9) と比較して見い出される。原核細胞によって調製された YB-1 (rYB-1) は、この46 kDa の分子量によってのみならず、これがより高分子量のバンド (88 kDa) として検出することができるという事実によってもまた、真核生物によって調製された YB-1 (LPS / 上清; 52 kDa) から区別され (レーン4、7、および10)、これは、最も可能性が高いこととしては、ホモマルチマー化によってである。加えて、38 kDa、36 kDa、35 kDa、33 kDa、および22 kDa のサイズを有するフラグメントを検出することができる。加えて、全長 YB-1 タンパク質に対して調製した抗体を用いて、25 kDa フラグメントが組換え YB-1 を用いて検出することができる (レーン7)。

20

【0079】

分泌型 YB-1 と細胞内 YB-1 の間の違いに関して、本発明者らは、現在のところ、分泌型 YB-1 が、古典的な経路の分泌産物について説明されるようなグリコシル化型ではないことのみを知っている。YB-1 の分泌経路に対して何らかのさらなる光を照らすデータが存在している (示さず)。現在の知見によると、分泌は、非常に可能性が高いこととして、代替的な分泌経路に寄与する可能性がある、ABC トランスポーターを通して活動的に行われる。加えて、図3が分析されるときに、分泌型 YB-1 が核 YB-1 (約57 kDa) よりも約5 kDa 大きく、全長タンパク質として存在するのみならず、フラグメントとしてもまた存在することが注目される。図3から見るように、細胞内 YB-1 は、50 kDa および52 kDa の二重バンドとして存在する (例えば、レーン9を参照のこと)。

30

40

【実施例3】

【0080】

血小板由来増殖因子 PDGF-B を用いる、条件的に HA-YB-1 を発現するメサングウム細胞株の刺激後の、微小胞中に分泌される YB-1 および YB-1 のフラグメントの検出

以下の実施例は、条件的に HA-YB-1 を発現するメサングウム細胞株の細胞が、PDGF-B を用いる刺激に際して、YB-1 および YB-1 のフラグメントを分泌することを示す。この実験は、分泌型の YB-1 タンパク質が、YB-1 が属する低温ショックタンパク質のファミリーの異なるメンバーではないことをさらに実証する。

【0081】

50

この目的のために、本実施例は、ラットからの原発性メサングウム細胞を使用する (Mertens et al., Hypertension, 1998, Vol. 32, p. 945-952)。これらは、10%ウシ胎仔血清、2 mM L-グルタミン、1 mM ピルビン酸 Na、非必須アミノ酸、5 mg/l インスリン、3.4 µg/l 亜セレン酸ナトリウム、2.8 mg/l トランスフェリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、および100 U/ml ペニシリンを加えた RPMI 1640 培地中で、5% CO₂ を含有する H₂O 飽和気中で、37℃ で増殖される。

【0082】

細胞に YB-1 の分泌を誘導させるために、細胞を、75 cm² 培養皿中で、ハイグロマイシン (200 µg/ml) および ジェネティシン (400 µg/ml) の存在下で、80% コンフルエンスまで増殖させる。PDGF-B を用いる刺激の前に、増殖を中断するために、細胞を MCDB 培地 (Sigma, St. Louis, MO, USA) で 24 時間処理する。PDGF-B を、RPMI 培地に、50 ng/ml の最終濃度まで加える。培養後、細胞を、カルシウムおよびマグネシウム/EDTA (1 mM) を含まない PBS を用いて、細胞培養フラスコの底から脱離させ、滅菌した 50 ml ファルコンチューブに移し、次に 1000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上清を除去する。細胞ペレットを 5 ml の PBS に再懸濁し、細胞数を Neubauer チャンバー中で計数し、細胞を再度 1000 rpm で 10 分間遠心分離する。細胞ペレットを、血清を加えていない RPMI 培地中に取り出し、その結果、細胞数は 5 × 10⁵ 細胞/100 µl 培地である。200 µl をエペンドルフ容器にピペットで移し、サーモブロックシャー中で、37℃ にて PDGF-B (20 ng/ml PDGF-B) とともにインキュベートする。

10

20

【0083】

4 時間のインキュベート時間後、エペンドルフ容器を 4℃ にて 330 × g で 15 分間遠心分離して、細胞を沈殿させる。50 µl の上清 (S1) を LDH 測定のために保存する。残りの上清は 0.2 µm フィルター (Qualilab, Merck, Bruchsal, Germany) を通し、100,000 × g で 210 分間遠心分離する。上清 (S2) および沈殿 (P2) を、別々に変性 Laemmli 緩衝液に取り、すべてのサンプルを 10% SDS-PAGE ゲル中で分離する (図 5 を参照のこと)。分泌された微小胞は沈殿 P2 に含有される。培地中の微小胞の回収に導く上記に言及した工程の模式図は図 4 に示される。引き続きウェスタンブロットングにおける YB-1 タンパク質の免疫学的検出は (ウェスタンブロットングの詳細については、実施例 1 を参照のこと)、抗 HA 抗体 (AB6) を用いてもたらされる。

30

【実施例 4】

【0084】

進行性の IgA 腎炎を有する患者の尿中での YB-1 およびこの切断産物の検出

実施例 4 から 5 および 7 から 8 は、試験した患者の臨床的画像を用いて細胞による YB-1 タンパク質および YB-1 タンパク質のフラグメントの分泌の補正を例証する。これらの実施例は、患者における炎症過程に対する明瞭な指摘について、細胞による YB-1 およびこのフラグメントの分泌のパターンを利用することの可能性を示す。従って、患者における炎症性疾患の起源および経過を、より良好に決定することができる。

40

【0085】

本実施例において、進行性の IgA 腎炎における YB-1 および YB-1 のフラグメントの分泌パターンを 2 例の患者について示す (図 6)。ウェスタンブロット (ウェスタンブロットのさらなる詳細は実施例 1 に見い出される) における YB-1 およびこのタンパク質分解フラグメントの検出は、完全な YB-1 タンパク質に対して調製されたポリクローナル抗体 (AB3) を用いてもたらされる (Mertens P. R. et al., The Journal of Biological Chemistry, 1997, Vol. 272, No. 36, p. 22905-22912)。

【0086】

すべての腎臓疾患に付随する効果である、1.5 g/d よりも上のタンパク尿を有する

50

2例の選択された患者において(図6においてAおよびBで示される)、YB-1についての特徴的な分泌パターンは、これらの免疫学的検査において見い出される。ポリクローナル抗体およびこのタンパク質分解フラグメントで標識されたYB-1タンパク質は、ゲル中で類似の特徴的なバンドパターンで、両方の患者において存在し、ここで、タンパク質バンドは、52kDa、28kDa、23kDa、26kDa、および8kDaの分子量で観察することができる(図6、レーン1および4)。52kDaにおけるバンドは全長タンパク質YB-1を表す。YB-1自体および他のより小さなYB-1のフラグメントとのYB-1のマルチマー化によって、52kDaよりも大きな分子量を有するバンドもまた存在する。

【0087】

疾患の経過は患者においては同じままであったが、これらの結果は、さらなる自然発生的な尿サンプルを検査することによって、約3ヶ月の間隔で連続的に確認した(図6、患者Aについてレーン2および3、ならびに患者Bについてレーン5および6)。すべての場合において、ほぼ常に、同じバンドパターンがゲル中に存在し、これは、YB-1およびこのタンパク質分解フラグメントの定常的な分泌を示す。

【0088】

図7は、IgA腎炎に罹患している患者から得られた12個の尿サンプルのゲルを示す。ゲルの個々のレーンの下に血清クレアチニンについての言及された濃度は現在の腎機能を示すのに対して、血清中のクレアチニン値は、いかにして腎機能が発生しているかを示す。クレアチニン濃度の濃度変化の経過は、患者において2年間にわたって観察し、患者についてのゲル上のサンプルの配置は、クレアチニン濃度の増加の範囲であった。全長YB-1タンパク質に対して指向される抗体(AB-3)を用いる免疫学的検出において(Mertens P. R. et al., 1997, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 36, p. 22905-22912)、52kDaの全長YB-1タンパク質に加えて、28kDa、23kDa、16kDa、および8kDaの分子量を有するフラグメントもまた検出できることが注目される。サンプルの保存後、患者は彼らの臨床的経過に関して評価され、血清クレアチニンの上昇が言及された。腎機能は大部分の患者において安定しているが、末期腎不全に向けた進行および義務的な透析が、23kDa、16kDa、および8kDaのYB-1フラグメントが検出された2例の患者において存在した。加えて、ゲルの画像の下のタンパク尿に関する比較データから見るように、YB-1の検出はタンパク尿の程度とは独立して得られることが注目された。対照として、進行性の腎不全を有する2例のうちの1例の患者の尿サンプルは(レーン10)、レーン13における二次抗体とともに独占的にインキュベートする。この場合、低分子量バンドは観察できない。

【0089】

図8は、尿中のYB-1パターンが数週間にわたって変化した、IgA腎炎が生検によって確認された患者における経過を例示的な様式で示す。低分子量バンドは消失し、腎機能の回復が起こることが注目される。急性腎不全の時点で(時間0)、患者は免疫抑制を用いて治療された。

【実施例5】

【0090】

急性腎臓移植拒絶の指標としてのYB-1タンパク質およびこのタンパク質フラグメントの検出

モノクローナル抗体「Deutschland」(AB4)を、ウェスタンブロッティングにおいてYB-1を検出するために使用した。このモノクローナル抗体は、8kDa、16kDa、および23kDaのより小さなフラグメントは認識しない。腎臓移植が行われた後で、尿サンプルを、検査した6例の患者(A-F)において連続的に収集する。患者AおよびBにおいては、図9のARとして示されるように、生検によって確認された移植拒絶(AR)が存在する。患者CおよびDにおいては、拒絶反応も、いかなる他の合併症も存在しない(ARなし)。患者EおよびFにおいては、拒絶反応は存在しなかった

10

20

30

40

50

が、他の合併症（合併症、AR）、例えば、腹膜炎およびカテーテル関連敗血症が存在した。YB-1およびこのフラグメントの存在の決定と並行して、サイトカインおよび拒絶反応についての他のマーカータンパク質もまた決定した。

【0091】

図9における結果は、移植後の身体の反応が、YB-1およびこのタンパク質フラグメントの分泌プロフィールに明確に反映されることを示す。図9の患者Aにおいて見ることができるよう、より小さなフラグメント（約27kDaのMW）は、拒絶反応の初期のマーカーとして評価されてきたグランザイムAが有意に上昇する前に、すでに検出可能である。この結果は、YB-1およびこのフラグメントの検出がタンパク尿の程度とは独立していることをさらに示す。

10

【0092】

先の実施例は、YB-1分泌パターンの分析が、担当の医師に、炎症過程およびこのような炎症過程の原因を迅速に決定する可能性を提供することを示す。

【実施例6】

【0093】

LPSを用いる刺激の際の単球細胞およびマクロファージによるYB-1の分泌

図10Aから見ることができるよう、標準的なプロトコールに従ってバフィーコートを用いて健常なドナーの血液から得られた原発性ヒト単球およびマクロファージもまた、LPSとのインキュベーションに際してYB-1を分泌し始める。このプロットにおいて、完全なYB-1タンパク質に対して調製されたポリクローナル抗体（AB3）を検出のために利用した。

20

【実施例7】

【0094】

悪性疾患と関連するYB-1およびYB-1のフラグメントの検出

図11は、健常被験体（レーン1から3）、劇症性敗血症を有する2例の患者について（レーン4および5）、ならびに異なる組織系および組織学の転移している腫瘍疾患を有する8例の患者について（レーン6から13）の血清中でのYB-1の免疫学的検出を示す。診断には、膵臓癌（Pa.-CA）、非小細胞気管支癌（NSC-BC）、直腸癌（Re.-CA）、乳癌（Ma.-CA）、喉頭癌（La.-CA）、および原発性腫瘍の検出を伴わない腺癌（Ad.-CA）が含まれる。レーン14および15において、膵臓癌を有する腫瘍患者からのサンプルを再度適用する。レーン14において、インキュベーションはYB-1に対する一次抗体を用いて行い、レーン15において、インキュベーションは、二次抗体に起因する非特異的バンドを検出するために二次抗体を用いて独占的に行った。50kDaおよび26kDaにおける2つの弱い非特異的バンドが見い出される。全長YB-1タンパク質に対して指向されるポリクローナル抗体（AB3）を使用することによって、全長YB-1（52kDa）および28kDaにおけるYB-1フラグメントの第2の主要なバンドを検出できる。すべてのサンプル中で見られるこれらのYB-1フラグメントに加えて、約14kDaのサイズを有する小さなYB-1フラグメントがすべての腫瘍患者において検出できるが、劇症性敗血症を有する患者においてはそれほど明確には検出されない（レーン4）。従って、より高い濃度でのこのフラグメントの検出は、腫瘍疾患の存在を結論付けることを可能にする。

30

40

【実施例8】

【0095】

ケラチノサイトの移動に対する、YB-1およびYB-1に対する抗体の影響

ヒトケラチノサイトは、ペニシリンおよびアムホテリシンBが加えられたPBS溶液で皮膚サンプルを3回洗浄することによって成体ドナーの皮膚生検から得られる。サンプルを70%エタノールで洗浄し、1cm²の薄片に切断する。表皮をカゼイン分解性ディスパーゼ（dispase）（50U/ml、Collaborative、Bedford, MA, USA）との37で2時間のインキュベーションによって分離する。0.25mg/mlトリプシン/EDTA（Cambrex, Walkersville, M

50

D, USA) 中での 37、30 分間のインキュベーション後、ケラチノサイトは、注意深いピペティングによって、単細胞懸濁物として遊離する。トリプシン中和溶液 (TNS, Cambrex, Walkersville, MD, USA) でトリプシンを中和した後、細胞を KGM 培地 (Cambrex, Walkersville, MD, USA) に取り、細胞培養フラスコに播種し、およびこの中で培養する。

【0096】

細胞のコンフルエンス後、「スクラッチ」を実施する。すなわち、細胞ローンに傷 (defect) を作製する (Draper B. K. et al., J Cell Biochem., 2003, Vol. 89, p. 1126-37)。細胞を KGM 培地で洗浄した後、組換え YB-1 または抗体を言及した濃度で加える。

10

【0097】

結果：

実験の結果を図 13 に示す。通常血清を含まない培地を加えるときには、ケラチノサイトは作製された創傷に移動するのに対して (行：培地)、組換え YB-1 で処理した細胞においては細胞の有意な移動は存在しない (行：r YB-1 (50 ng))。細菌中で発現された YB-1 サンプルが 10 分間にわたり 95 に加熱され、続いてケラチノサイト培養に加えられる場合、細胞の移動は観察することができ、このことは、阻害効果がリポポリサッカリドによって引き起こされることを意味しない (行：不活性化 R YB-1 (100 ng))。

20

【0098】

抗 YB-1 (行：抗 YB-1 AB4 (「Deutschland」) (2) (1 µg)) および抗 YB-1 (3) (5 µg) の添加は、ケラチノサイトの移動に対して同様の効果を有するのに対して、対照 IgG 抗体は、移動に影響を与えない (行：IgG 1 (1) (1 µg) および IgG 1 (2) (5 µg))。このことは、利用したモノクローナル抗体が YB-1 効果に対して中和効果を有さないが、むしろこれを増強することを示す。

【実施例 9】

【0099】

モノクローナル抗体を用いる YB-1 フラグメントの検出

本実験において、「特異的」YB-1 フラグメントは、モノクローナル抗体を用いて、腫瘍患者の血清および IgA 腎炎を有する患者の尿において検出した (図 10B)。生成したモノクローナル抗体「Italian」(AB8、表 1 を参照のこと) を用いて、転移している腎臓癌を有する腫瘍患者の血清 (TM20) および進行性 IgA 腎炎を有する患者からの尿 (K) を検査した。200 kDa 周辺の高分子量バンドに加えて、52 kDa および 28 kDa の相対分子量を有するバンドもまた、非変性サンプル緩衝液 (メルカプトエタノールおよび EDTA を含まない) 中で観察される。変性条件下では (メルカプトエタノールおよび EDTA を含む)、異なるポリクローナル抗 YB-1 抗体を用いて以前に観察され、16 kDa の相対サイズを有するバンドが腫瘍疾患についての血清中で、または 23 kDa の相対サイズを有するバンドが進行性の IgA 腎炎についての尿中で検出できる。特異的 YB-1 結合を有さない対照抗体を用いると (「Grossbritannien」, AB9、上記の表を参照のこと)、および抗マウス二次抗体 (AB5) 単独を用いると、16 kDa および 23 kDa のバンドは検出不可能である。

30

40

【実施例 10】

【0100】

HA-タグ化 NOTCH との GFP-YB-1 の直接的相互作用の検出

ヘマグルチニン (HA) で標識した NOTCH3 (EGF) (すなわち、NOTCH-3 受容体の細胞外 EGF-含有ドメイン) および GFP または YB-1-GFP を、HEK293T 細胞で同時発現させる。細胞溶解物を、抗 HA-抗体を用いる免疫沈殿に供し、SDS-PAGE によって分離し、および抗 HA 抗体を用いて検出する (レーン 1 から 3)。発現したタンパク質 N3 (EGF) は、このようにして検出することができる (レーン 2 および 3)。さらに、細胞溶解物は、抗 GFP または抗 HA 抗体を用いる免疫沈殿

50

にそれぞれ供し、続いて、抗 GFP 抗体を用いて検出する。レーン 9 において、同時免疫沈殿した YB - 1 - GFP を見ることができる。2 つのタンパク質の内の 1 つのみがそれぞれ発現された、対応する対照実験は陰性である (レーン 5 および 7)。「I . P .」は、免疫沈殿を表し、「プロット」はタンパク質の分離後のウェスタンブロッティングによる検出を意味する。

【図面の簡単な説明】

【0101】

【図 1 A】異なる濃度のリポポリサッカリド (LPS) 溶液を用いる単球 MM - 6 細胞の誘導に際しての、タンパク質の C 末端に対して指向されるポリクローナル抗体 (Mertens P . R . , Alfonso - Jaume M . A . et al . , J . Am . Soc . Nephrology , 1999 , Vol . 10 , p . 2480 - 2487) を用いる YB - 1 およびこのフラグメントの検出を示す。図 1 B において、0 . 25 から 10 ng / ml の間の LPS 濃度範囲を MM - 6 細胞を用いて試験した。YB - 1 が 1 . 0 から 7 . 5 ng / ml の LPS 濃度において分泌され、タンパク質の C 末端に対して生成されたポリクローナルペプチド抗体を用いて検出できることが見い出される。

10

【図 1 B】異なる濃度のリポポリサッカリド (LPS) 溶液を用いる単球 MM - 6 細胞の誘導に際しての、タンパク質の C 末端に対して指向されるポリクローナル抗体 (Mertens P . R . , Alfonso - Jaume M . A . et al . , J . Am . Soc . Nephrology , 1999 , Vol . 10 , p . 2480 - 2487) を用いる YB - 1 およびこのフラグメントの検出を示す。図 1 B において、0 . 25 から 10 ng / ml の間の LPS 濃度範囲を MM - 6 細胞を用いて試験した。YB - 1 が 1 . 0 から 7 . 5 ng / ml の LPS 濃度において分泌され、タンパク質の C 末端に対して生成されたポリクローナルペプチド抗体を用いて検出できることが見い出される。

20

【図 2】図 1 と同様に、延長した抗体曝露を用いるウェスタンブロッティングの結果を示す。従って、YB - 1 の構成的分泌は、より低い LPS 濃度 (0 . 25 から 0 . 75 ng / ml) においてさえ検出することができる。加えて、1 から 7 . 5 ng / ml の LPS 濃度において、35 kDa、32 kDa、28 kDa、および 16 kDa の分子量を有する YB - 1 切断産物の分泌が観察される。

【図 3】E . coli 中で組換え的に調製した YB - 1 (rYB - 1)、核 YB - 1 (NE)、および MM - 6 細胞の LPS 刺激に際して分泌された YB - 1 (LPS / 上清) の間の分子量の違いをウェスタンブロットにおいて示す。一方、利用する抗体は、C 末端 (抗 C)、N 末端 (抗 N)、および全長 YB - 1 タンパク質 (抗 w) に対して作用する。ゲルにおける最初の列は陰性対照として働く (すなわち、一次抗体を使用していない)。この実験に関するさらなる詳細は実施例 2 に見い出すことができる。核起源の YB - 1 (レーン 3、6、および 9) と比較して、分泌型の YB - 1 (レーン 1、5、および 8) のより低い移動度が見い出される。原核生物によって調製された YB - 1 (rYB - 1) は、この 46 kDa の分子量によってのみならず、これがより高分子量のバンド (88 kDa) として検出することができるという事実によってもまた、真核生物によって調製された YB - 1 (LPS / 上清) から区別される。このより高分子量のバンドは、最も可能性が高いこととして、ホモマルチマー化によって説明できる。加えて、38 kDa、36 kDa、35 kDa、33 kDa、および 22 kDa のサイズを有するフラグメントを検出することができる。加えて、全長 YB - 1 タンパク質に対して調製した抗体を用いて、25 kDa フラグメントが組換え YB - 1 を用いて検出することができる (レーン 7)。

30

40

【図 4】YB - 1 を含有し、および PDGF - B によって誘導されたメサングウム細胞によって分泌された微小胞からの YB - 1 およびこのフラグメントの単離のためのプロセスの模式図を示す。実験に関するさらなる詳細は実施例 3 において見い出すことができる。P1 は沈殿物 1 を表し、これは、サイトカインインキュベーションの 1 時間から 4 時間後の細胞上清の最初の遠心分離後に得られ、主として細胞、高分子量成分、および細胞断片を含有する。S1 は、最初の遠心分離後に残っている細胞上清を表し、これは、引き続いて、微小胞を得るために遠心分離される。S2 はこれによって得られる上清を表し、P2

50

は第2の沈殿物を表し、これは、微小胞中にY B - 1タンパク質およびこのフラグメントを含む。

【図5】メサンギウム細胞によって分泌されたY B - 1の免疫学的検出の結果をウェスタンブロットにおいて表す。略号S 1、S 2、およびP 2の意味は、図4に関連する説明の中に見い出される。文字「A」によって印が付けられたドメインは、分泌されたY B - 1のN末端ドメインである。「B」はアルギニンおよびアラニンが多く存在する分泌型Y B - 1のドメインを表す。「C」は分泌型Y B - 1の低温ショックドメイン(C S D)を表し、および「D」は、分泌型Y B - 1のC末端における交互に正電荷および負電荷を有するセグメントを表す。この実験において、ラットメサンギウム細胞によって発現されたヘマグルチニタグを伴って提供されたY B - 1タンパク質は、抗H A抗体を用いてウェスタンブロットにおいて検出される。このアプローチは、分泌型タンパク質が、Y B - 1が属する低温ショックタンパク質のファミリーの異なるメンバーであることを除外する。実験に関するさらなる詳細については、実施例3を参照のこと。

【図6】患者の尿から回収し、完全なY B - 1タンパク質に対して作用するポリクローナル抗体を用いてもたらされる、タンパク質Y B - 1(52 k D aのバンド)ならびに28 k D a、23 k D a、16 k D a、および8 k D aのサイズを有するこのタンパク質分解フラグメントの免疫学的検出を示す。図6において、I g A腎炎に罹患しており、1.5 g / dより上のタンパク尿として数週間の間隔で回復した2例の患者(AおよびB)からの3つの試料を適用する。これらはすべて、Y B - 1およびY B - 1のタンパク質分解フラグメントのほぼ同一の分泌パターンを示す。結果に関するさらなる詳細は、実施例4において見い出される。

【図7】I g A腎炎に罹患している患者から得られ、クレアチニン値の増加順に分類した12個の尿サンプルを用いるゲルを示す。全長Y B - 1タンパク質に対して作用する抗体を用いる免疫学的検出において、注目すべきは、52 k D aの全長Y B - 1タンパク質に加えて、28 k D a、23 k D a、16 k D a、および8 k D aの分子量を有するフラグメントもまた検出できることである。サンプルの保存後、患者は彼らの臨床的経過に関して評価され、血清クレアチニンレベルの上昇が言及された。腎機能は大部分の患者において安定していたが、末期腎不全に向けた進行および義務的な透析が、23 k D a、16 k D a、および8 k D aのY B - 1フラグメントが検出された2例の患者において存在した。加えて、Y B - 1の検出は、タンパク尿の程度とは独立して得られることが注目された。

【図8】尿中のY B - 1分泌パターンが数週間の経過で変化した、生検によって確認されたI g A腎炎の患者における経過を例示的な様式で示す。低分子量バンドは消失し、腎機能の回復が起こることが注目された。急性腎不全の時点で(時間0)、患者は免疫抑制を用いて治療された。

【図9】Y B - 1に対して作用するモノクローナル抗体を用いる、6例の患者の尿からの急性腎臓移植拒絶反応における分泌型Y B - 1およびこのタンパク質フラグメントの免疫学的検出を示す。腎臓移植が実施された後、尿サンプルは検査された6例の患者(A - F)において連続的に収集された。患者AおよびBにおいて、図9においてA Rとして示されるように、生検によって確認された移植拒絶(A R)が存在する。患者CおよびDにおいて、拒絶反応も、いかなる他の合併症も存在しない(A Rなし)。患者EおよびFにおいて、拒絶反応は存在しなかったが、他の合併症、すなわち、感染性のものが存在した(合併症、A R)。Y B - 1およびこのフラグメントの存在の決定と並行して、サイトカイン、および拒絶反応についての他のマーカータンパク質もまた決定した(M I G p g / m l ; I P - 1 0 p g / m l ; M C P - I p g / m l ; I L - 1 8 p g / m l ; グランザイム B p g / m l ; タンパク尿 g / l)。

【図10A】原発性ヒト単球およびマクロファージが健常被験体の血液から単離され、L P Sとともにインキュベートされる実験の結果を示す。5 n g / m lの濃度のL P Sを用いる刺激後、全長Y B - 1ならびに16 k D aフラグメントは、血清を含まない上清中で検出することができた。

10

20

30

40

50

【図10B】モノクローナル抗体を使用する、腫瘍患者の血清およびIgA腎炎の尿における「特異的」YB-1フラグメントの検出を示す。さらなる詳細については、実施例9を参照のこと。生成したモノクローナル抗体「Italian」(AB8、表1を参照のこと)を使用して、転移している腎臓癌を有する腫瘍患者の血清(TM20)ならびに進行性IgA腎炎を有する患者からの尿(K)を検査した。200kDa周辺の高分子量バンドに加えて、52kDaおよび28kDaの相対分子量を有するバンドもまた、非変性サンプル緩衝液(メルカプトエタノールおよびEDTAを含まない)中で観察される。変性条件下では(メルカプトエタノールおよびEDTAを含む)、異なるポリクローナル抗YB-1抗体を用いて以前に観察され、16kDaの相対サイズを有するバンドが腫瘍疾患についての血清中で、または23kDaの相対サイズを有するバンドが進行性のIgA腎炎についての尿中で検出できる。特異的YB-1結合を有さない対照抗体を用いると(「Grossbritannien」、AB9、以下の表を参照のこと)、および抗マウス二次抗体単独を用いると、16kDaおよび23kDaのバンドは検出不可能である。

【図11】健常被験体について(レーン1から3)、劇症性敗血症を有する2例の患者について(レーン4および5)、および異なる組織系および組織学の転移している腫瘍疾患を有する8例の患者について(レーン6から13)、血清中でのYB-1の免疫学的検出を示す。レーン14において、一次抗体単独を用いる対照反応は、非特異的バンドを検出するために適用する。レーン15において、二次抗体単独を用いる対照反応は、二次抗体に起因して存在する非特異的バンドを検出するために適用する。全長YB-1タンパク質に対して指向されるポリクローナル抗体を使用することによって、全長YB-1(52kDa)および28kDaにおけるYB-1フラグメントの第2の主要なバンドを検出できる。すべてのサンプル中で見られるこれらのYB-1フラグメントに加えて、約14kDaのサイズを有する小さなYB-1フラグメントがすべての腫瘍患者において検出できるが、劇症性敗血症を有する患者においてはそれほど明確には検出されない(レーン4)。従って、より高い濃度でのこのフラグメントの検出は、この結果を腫瘍疾患の生成に起因することが可能であることを伴うことなく、腫瘍疾患の存在を結論付けることを可能にする。

【図12】免疫沈殿におけるHA-タグ化NOTCHとのGFP-YB-1の直接的相互作用の検出を示す。さらなる詳細については、実施例10を参照のこと。

【図13】スクラッチ実験後の、組換えYB-1ならびに抗YB-1抗体とのケラチノサイトのインキュベーションの結果を示す。「培地」の表示を伴うライン1は、培地あり、およびYB-1または抗YB-1抗体なしのケラチノサイトのローン(lawn)の対照インキュベーションを示す。ライン2は、組換えYB-1(rYB-1(50ng))との細胞ローンのインキュベーションを示し、ライン3は、熱により不活性化した組換えYB-1(rYB-1(100ng))とのインキュベーションを示し、ライン4および5は、対照IgG抗体(IgG1(1)(1μg)およびIgG1(2)(5μg))とのインキュベーションを示し、ならびにライン6および7は、抗YB-1抗体(抗YB-1(2)(1μg)および抗YB-1(3)(5μg))とのインキュベーションを示す。さらなる詳細については、実施例8を参照のこと。

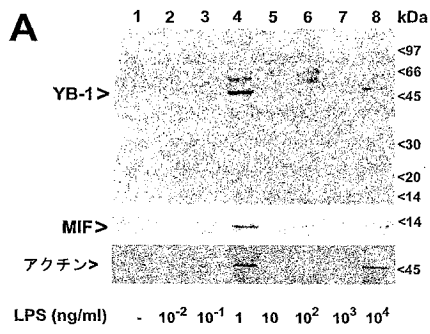
10

20

30

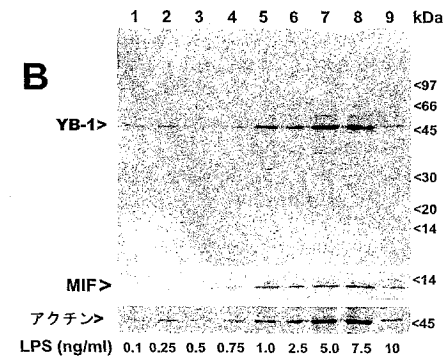
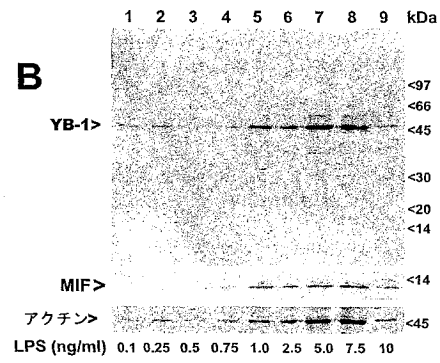
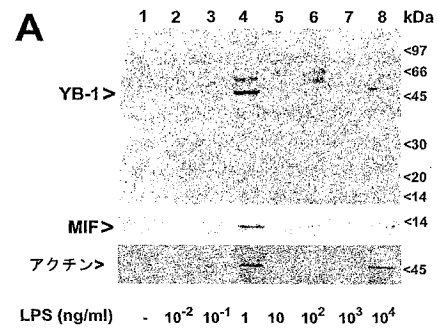
【 図 1 A 】

Fig. 1



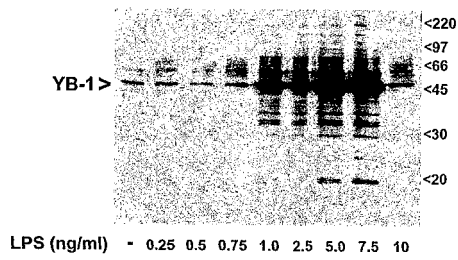
【 図 1 B 】

Fig. 1



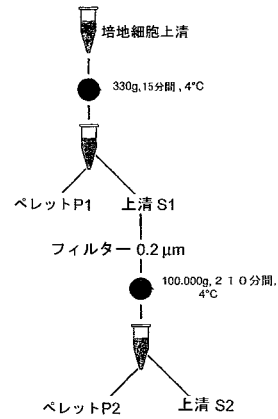
【 図 2 】

Fig. 2



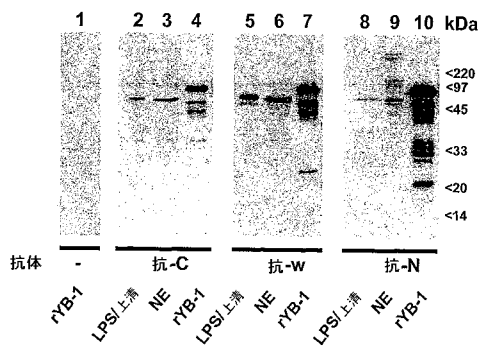
【 図 4 】

Fig. 4



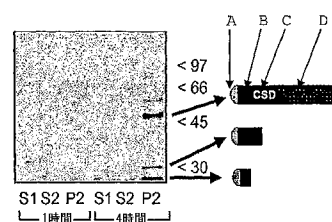
【 図 3 】

Fig. 3



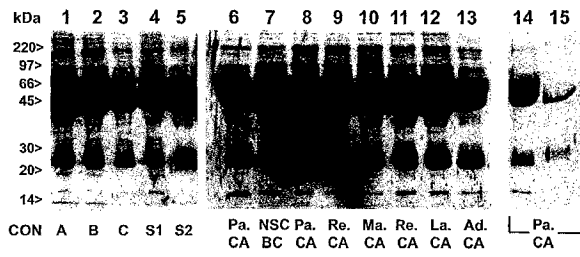
【 図 5 】

Fig. 5



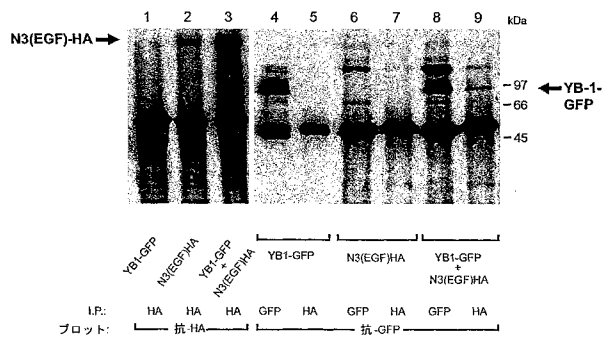
【 図 1 1 】

Fig. 11



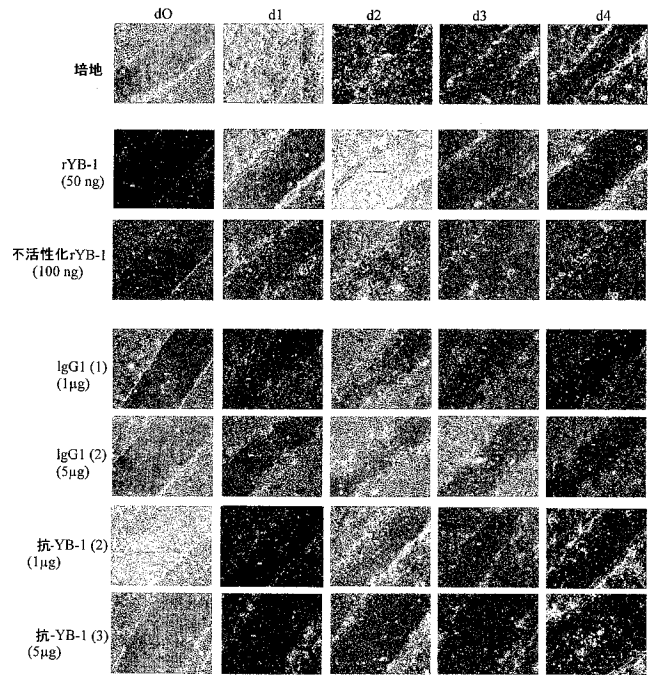
【 図 1 2 】

Fig. 12



【 図 1 3 】

Fig. 13



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/DE2005/002238
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/17 C07K14/47		
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) A61K 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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 100 31 122 A1 (MAX-DELBRUECK-CENTRUM FUER MOLEKULARE MEDIZIN) 22 March 2001 (2001-03-22) the whole document	31
X	BARGOU R C ET AL: "NUCLEAR LOCALIZATION AND INCREASED LEVELS OF TRANSCRIPTION FACTOR YB-1 IN PRIMARY HUMAN BREAST CANCERS ARE ASSOCIATED WITH INTRINSIC MDR1 GENE EXPRESSION" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 3, no. 4, April 1997 (1997-04), pages 447-450, XP001148855 ISSN: 1078-8956 the whole document	30
--/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
12 April 2006		21/04/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 661 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Kalsner, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/DE2005/002238

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	<p>VAN ROEYEN CLAUDIA R C ET AL: "Y-box protein 1 mediates PDGF-B effects in mesangioproliferative glomerular disease" JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, vol. 16, no. 10, October 2005 (2005-10), pages 2985-2996, XP009065141 ISSN: 1046-6673 the whole document</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DE2005/002238

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
DE 10031122	A1	22-03-2001	AU 6425800 A	22-01-2001
			WO 0102556 A2	11-01-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2005/002238

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. A61K38/17 C07K14/47		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfstoß (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) A61K C07K		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoß gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 100 31 122 A1 (MAX-DELBUECK-CENTRUM FUER MOLEKULARE MEDIZIN) 22. März 2001 (2001-03-22) das ganze Dokument	31
X	BARGOU R C ET AL: "NUCLEAR LOCALIZATION AND INCREASED LEVELS OF TRANSCRIPTION FACTOR YB-1 IN PRIMARY HUMAN BREAST CANCERS ARE ASSOCIATED WITH INTRINSIC MDR1 GENE EXPRESSION" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, Bd. 3, Nr. 4, April 1997 (1997-04), Seiten 447-450, XP001148855 ISSN: 1078-8956 das ganze Dokument	30
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche		Absenddatum des Internationalen Recherchenberichts
12. April 2006		21/04/2006
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentkanal 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Kalsner, I

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2005/002238

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,A	<p>VAN ROEYEN CLAUDIA R C ET AL: "Y-box protein 1 mediates PDGF-B effects in mesangio proliferative glomerular disease" JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, Bd. 16, Nr. 10, Oktober 2005 (2005-10), Seiten 2985-2996, XP009065141 ISSN: 1046-6673 das ganze Dokument</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2005/002238

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 10031122 A1	22-03-2001	AU 6425800 A WO 0102556 A2	22-01-2001 11-01-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	11/06
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00 1 0 1
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	17/06
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	1/18 (2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	1/18
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/00
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 K	9/06 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 P	35/02
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	A 6 1 K	9/06
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08
		C 0 7 K	16/18
		C 1 2 P	21/08

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 メルテンス, ペーター・ルネ

ドイツ国、5 2 0 7 2・アーヘン、ラウレンスベルガー・シユトラーセ・1 3 0

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA20 CC24 DA13 DA14

4C076 AA06 AA08 AA11 CC04 CC11 CC15 CC16 CC17 CC18 CC27

4C085 AA13 AA14 BB11 CC21

4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA50 EA51 FA72 FA74

专利名称(译)	用于确定炎症过程的方法和用于该治疗的药物组合物		
公开(公告)号	JP2008523114A	公开(公告)日	2008-07-03
申请号	JP2007545833	申请日	2005-12-13
[标]申请(专利权)人(译)	梅尔紧张彼得·刘若英		
申请(专利权)人(译)	梅尔滕斯, 彼得·勒内		
[标]发明人	メルテンスペータールネ		
发明人	メルテンス,ペータールネ		
IPC分类号	A61K39/395 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/53 A61P29/00 A61P11/06 A61P19/02 A61P11/00 A61P9/10 A61P9/00 A61P25/00 A61P17/06 A61P17/00 A61P31/04 A61P3/10 A61P1/18 A61P1/00 A61P13/12 A61P35/00 A61P35/02 A61K9/06 A61K9/08 C07K16/18 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/1709 A61P1/00 A61P1/18 A61P3/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 C07K14/4702 C07K16/18 C07K16/30 G01N33/574 G01N33/6875 G01N2500/00 G01N2800/24		
FI分类号	A61K39/395.D G01N33/574.A G01N33/577.B G01N33/53.D A61K39/395.N A61P29/00 A61P11/06 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P11/00 A61P9/10 A61P9/00 A61P25/00 A61P17/06 A61P17/00 A61P31/04 A61P3/10 A61P1/18 A61P1/00 A61P13/12 A61P35/00 A61P35/02 A61K9/06 A61K9/08 C07K16/18 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B064/DA14 4C076/AA06 4C076/AA08 4C076/AA11 4C076/CC04 4C076/CC11 4C076/CC15 4C076/CC16 4C076/CC17 4C076/CC18 4C076/CC27 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 Masarushin大崎		
优先权	102004060385 2004-12-14 DE		
其他公开文献	JP5466822B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种分析细胞外体液的方法，该方法涉及由细胞分泌的Y-盒蛋白YB-1及其片段的的存在，以确定哺乳动物的炎症过程和恶性疾病。此外，它涉及YB-1作为标记物和用于检测YB-1的试剂盒，YB-1的多肽片段及其组合的用途。还公开了一种药物组合物，其用于治疗炎症过程和恶性疾病，并且含有YB-1蛋白，蛋白质YB-1的片段和抗YB-1蛋白的抗体和/或蛋白质YB-1的片段。

抗体を表示	抗体(AB)型(モノクローナルまたはポリクローナル)	ABが何に対して作用するか(どのフラグメントか)または全長YB-1か)	供給源
AB1	ポリクローナル	YB-1タンパク質のC末端	Martens P.R. et al., J. Am. Soc. Nephrol., 1999, Vol. 10, p. 2480-2487
AB2 (抗YB-1 HRP-結合体化F(ab') ₂ フラグメント)	ポリクローナル	二次抗体	Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, UK
AB3 (ポリクローナル抗体)	ポリクローナル	全長YB-1タンパク質	Mortens P.R. et al., The Journal of Biological Chemistry, 1997, Vol. 272, No. 36, p. 22905-22912
AB4	モノクローナル	全長YB-1	ハイブリトマ細胞株「Deutschland」(受入番号DSM ACC 2703の下でDSMZに寄託)
AB5 (抗マウス抗体) (PI 2000)	ポリクローナル	二次抗体	Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, UK
AB6 (HAタグに對するポリクローナル抗体)	ポリクローナル	HA-YB-1融合タンパク質 (MW 54 kDa)	Y-11 Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA
AB7 (ポリクローナル抗体)	ポリクローナル	YB-1タンパク質のN末端	A-16X, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA
AB8	モノクローナル	全長YB-1	ハイブリトマ細胞株「Italian」
AB9	モノクローナル	AB9は血清中で全長YB-1タンパク質および26kDaフラグメントについてより低い親和性を有する。16kDaまたは23kDaなどのより小さなYB-1フラグメントの検出なし	ハイブリトマ細胞株「Grossbritannien」