

(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2005-531754
(P2005-531754A)

(43) 公表日 平成17年10月20日(2005.10.20)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	Z N A N	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00	H	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 P 11/02		4 C O 8 5
A 6 1 P 11/02	A 6 1 P 11/06		4 H O 4 5
A 6 1 P 11/06	GO 1 N 33/15	Z	
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 28 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2004-505686 (P2004-505686)
 (86) (22) 出願日 平成15年5月12日 (2003. 5. 12)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年1月12日 (2005. 1. 12)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2003/000933
 (87) 国際公開番号 W02003/098211
 (87) 国際公開日 平成15年11月27日 (2003.11.27)
 (31) 優先権主張番号 10-2002-0026765
 (32) 優先日 平成14年5月15日 (2002. 5. 15)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

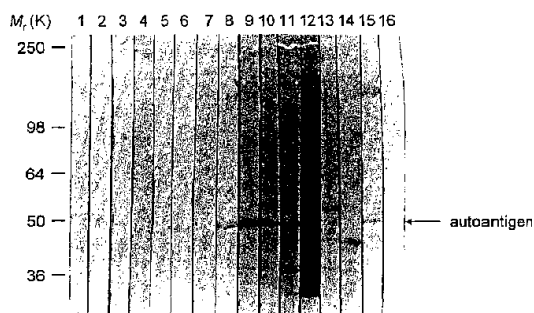
(71) 出願人 504420216
 ナン、ドン-ホ
 NAHM, Dong-Ho
 大韓民国 キョンギード 449-843
 ヨンイン-シ スジ-ウップ サンヒョ
 ン-リ 831 サンヨン アパートメン
 ト 217-1702
 (71) 出願人 504420238
 チョン、スク-ヨン
 JEON, Sook-Yeong
 大韓民国 キョンギード 449-843
 ヨンイン-シ スジ-ウップ サンヒョ
 ン-リ 831 サンヨン アパートメン
 ト 217-1702

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 気管支喘息及び慢性鼻炎患者におけるサイトケラチン18蛋白質に対する自己抗体の検出、及び哺乳動物のサイトケラチン18蛋白質を含む気管支喘息及び慢性鼻炎診断用キットを含む用途

(57) 【要約】

本発明は気管支喘息及び慢性鼻炎患者、特に非アレルギー患者の血清試料におけるサイトケラチン18蛋白質に対する自己抗体の存在についての驚くべき発見に基づいたものである。本発明はサイトケラチン18に対する自己抗体と関連がある気管支喘息及び慢性鼻炎患者を検出するための診断方法及び診断キットを含む。また、本発明は、サイトケラチン18に対する自己抗体を検出することにより気管支喘息及び慢性鼻炎患者の治療法を処方及び観察するための方法及びキットも含む。さらに、本発明は、サイトケラチン18に対する自己抗体と関連がある気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護するための、サイトケラチン18蛋白質を含む薬学的製剤に関するものである。また、本発明はこのような自己抗体とサイトケラチン18蛋白質の間の相互作用を抑制する化合物を利用して、サイトケラチン18蛋白質に対する自己抗体と関連がある気管支喘息及び慢性鼻炎の患者を治療するための方法に関するものでもある。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

気管支喘息及び慢性鼻炎を診断するための方法であって、被検者の体液からサイトケラチン 18 蛋白質に対する自己抗体を検出することを含む方法。

【請求項 2】

非アレルギー性気管支喘息及び慢性鼻炎患者を検出するための方法であって、被検者の体液からサイトケラチン 18 蛋白質に対する自己抗体を検出することを含む方法。

【請求項 3】

サイトケラチン 18 蛋白質に対する自己抗体と関連のある気管支喘息及び慢性鼻炎患者を検出するための方法であって、被検者の体液からサイトケラチン 18 蛋白質に対する自己抗体を検出することを含む方法。

10

【請求項 4】

気管支喘息及び慢性鼻炎治療法を処方するための方法であって、
(a) 被検者の体液中のサイトケラチン 18 蛋白質に対する自己抗体を検出する段階と、
(b) 上記段階 (a) で確認された気管支喘息及び慢性鼻炎に対する治療法を処方する段階とを含む方法。

【請求項 5】

気管支喘息及び慢性鼻炎に対する治療の効果を観察するための方法であって、被検者の体液からサイトケラチン 18 蛋白質に対する自己抗体を検出することを含む方法。

【請求項 6】

(a) 被検者から体液を得る段階と、(b) サイトケラチン 18 蛋白質とサイトケラチン 18 に対する自己抗体の間の免疫複合体を形成するのに適当な条件下で上記体液をサイトケラチン 18 蛋白質と接触させる段階と、(c) 前記免疫複合体を検出することにより、サイトケラチン 18 に対する自己抗体の存在を決定する段階とを含み、前記免疫複合体の存在が被検者においてサイトケラチン 18 に対する自己抗体が存在することを表すことを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記サイトケラチン 18 蛋白質が哺乳動物由来であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記サイトケラチン 18 蛋白質が配列番号 1 のアミノ酸配列、またはサイトケラチン 18 に対する自己抗体との免疫学的反応性を有する前記配列の変形物もしくは断片を有することを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記サイトケラチン 18 蛋白質が配列番号 2 のアミノ酸配列、またはサイトケラチン 18 に対する自己抗体との免疫学的反応性を有する前記配列の変形物もしくは断片を有することを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記サイトケラチン 18 蛋白質はサイトケラチン 18 に対する自己抗体と相互作用する能力を維持しているサイトケラチン 18 蛋白質断片であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 11】

気管支喘息及び慢性鼻炎を診断するためのキットであって、サイトケラチン 18 蛋白質と、被検者の体液からサイトケラチン 18 蛋白質に対する自己抗体を検出するための手段とを含むキット。

【請求項 12】

非アレルギー性気管支喘息及び慢性鼻炎患者を検出するためのキットであって、サイトケラチン 18 蛋白質と、被検者の体液からサイトケラチン 18 蛋白質に対する自己抗体を検出するための手段とを含むキット。

【請求項 13】

50

サイトケラチン 18 蛋白質に対する自己抗体と関連がある気管支喘息及び慢性鼻炎患者を検出するためのキットであって、サイトケラチン 18 蛋白質と、被検者の体液からサイトケラチン 18 蛋白質に対する自己抗体を検出するための手段とを含むキット。

【請求項 14】

気管支喘息及び慢性鼻炎治療法を処方するためのキットであって、サイトケラチン 18 蛋白質と、被検者の体液からサイトケラチン 18 蛋白質に対する自己抗体を検出するための手段とを含むキット。

【請求項 15】

気管支喘息及び慢性鼻炎に対する治療の効果を観察するためのキットであって、サイトケラチン 18 蛋白質と、被検者の体液からサイトケラチン 18 蛋白質に対する自己抗体を検出するための手段とを含むキット。

10

【請求項 16】

(a) サイトケラチン 18 蛋白質と、(b) 免疫学的反応のための培地を製造するための試薬と、(c) サイトケラチン 18 蛋白質とサイトケラチン 18 蛋白質に対する自己抗体の間の免疫複合体を検出することができる試薬とを含むことを特徴とする請求項 11 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 17】

前記サイトケラチン 18 蛋白質が哺乳動物由来であることを特徴とする請求項 11 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 18】

前記サイトケラチン 18 蛋白質が配列番号 1 のアミノ酸配列、またはサイトケラチン 18 に対する自己抗体との免疫学的反応性を有する前記配列の変形物もしくは断片を有することを特徴とする請求項 11 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のキット。

20

【請求項 19】

前記サイトケラチン 18 蛋白質が配列番号 2 のアミノ酸配列、またはサイトケラチン 18 に対する自己抗体との免疫学的反応性を有する前記配列の変形物もしくは断片を有することを特徴とする請求項 11 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 20】

前記サイトケラチン 18 蛋白質はサイトケラチン 18 に対する自己抗体と相互作用する能力を維持しているサイトケラチン 18 蛋白質断片であることを特徴とする請求項 11 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のキット。

30

【請求項 21】

気管支喘息及び慢性鼻炎患者のための、サイトケラチン 18 蛋白質を含む薬学的製剤。

【請求項 22】

非アレルギー性気管支喘息及び慢性鼻炎患者のための、サイトケラチン 18 蛋白質を含む薬学的製剤。

【請求項 23】

サイトケラチン 18 蛋白質に対する自己抗体と関連がある気管支喘息及び慢性鼻炎患者のための、サイトケラチン 18 蛋白質を含む薬学的製剤。

【請求項 24】

気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護または治療するための、サイトケラチン 18 蛋白質を含む薬学的製剤。

40

【請求項 25】

非アレルギー性気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護または治療するための、サイトケラチン 18 蛋白質を含む薬学的製剤。

【請求項 26】

サイトケラチン 18 蛋白質に対する自己抗体と関連がある気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護または治療するための、サイトケラチン 18 蛋白質を含む薬学的製剤。

【請求項 27】

前記サイトケラチン 18 蛋白質が哺乳動物由来であることを特徴とする請求項 21 ~ 2

50

6のいずれか1項に記載の製剤。

【請求項28】

前記サイトケラチン18蛋白質が配列番号1のアミノ酸配列、または、サイトケラチン18に対する自己抗体と免疫学的反応性を有する前記配列の変形物もしくは断片を有することを特徴とする請求項21～26のいずれか1項に記載の製剤。

【請求項29】

前記サイトケラチン18蛋白質が配列番号2のアミノ酸配列、または、サイトケラチン18に対する自己抗体と免疫学的反応性を有する前記配列の変形物もしくは断片を有することを特徴とする請求項21～26のいずれか1項に記載の製剤。

【請求項30】

前記サイトケラチン18蛋白質は、サイトケラチン18に対する自己抗体と相互作用する能力を維持しているサイトケラチン18蛋白質断片であることを特徴とする請求項21～26のいずれか1項に記載の製剤。

【請求項31】

気管支喘息及び慢性鼻炎患者のサイトケラチン18に対する自己抗体とサイトケラチン18蛋白質との間の結合を抑制可能な化合物を含む薬学的製剤。

【請求項32】

サイトケラチン18発現細胞に対する気管支喘息及び慢性鼻炎患者の自己抗体の細胞毒性作用を抑制可能な化合物を含む薬学的製剤。

【請求項33】

気管支喘息及び慢性鼻炎患者のサイトケラチン18に対する自己抗体とサイトケラチン18蛋白質との間の結合を抑制可能な薬学的化合物を同定するための方法。

【請求項34】

サイトケラチン18発現細胞に対する気管支喘息及び慢性鼻炎患者の自己抗体の細胞毒性作用を抑制可能な薬学的化合物を同定するための方法。

【請求項35】

前記薬学的化合物は気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護または治療するように製剤化されることを特徴とする請求項31～34のいずれか1項に記載の方法。

【請求項36】

前記薬学的化合物は非アレルギー性気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護または治療するように製剤化されることを特徴とする請求項31～34のいずれか1項に記載の方法。

【請求項37】

前記薬学的化合物はサイトケラチン18に対する自己抗体と関連がある気管支喘息及び慢性鼻炎患者用に製剤化されることを特徴とする請求項31～34のいずれか1項に記載の方法。

【請求項38】

サイトケラチン18蛋白質を含む薬学的製剤を投与することにより、気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護または治療するための方法。

【請求項39】

サイトケラチン18蛋白質を含む薬学的製剤を投与することにより、非アレルギー性気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護または治療するための方法。

【請求項40】

サイトケラチン18蛋白質を含む薬学的製剤を投与することにより、サイトケラチン18に対する自己抗体と関連がある気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護または治療するための方法。

【請求項41】

前記サイトケラチン18蛋白質が哺乳動物由来であることを特徴とする請求項38～40のいずれか1項に記載の方法。

【請求項42】

前記サイトケラチン18蛋白質が配列番号1のアミノ酸配列、または、サイトケラチン

10

20

30

40

50

18に対する自己抗体との免疫学的反応性を有する前記配列の変形物もしくは断片を有することを特徴とする請求項38～40のいずれか1項に記載の方法。

【請求項43】

前記サイトケラチン18蛋白質が配列番号2のアミノ酸配列、または、サイトケラチン18に対する自己抗体との免疫学的反応性を有する前記配列の変形物もしくは断片を有することを特徴とする請求項38～40のいずれか1項に記載の方法。

【請求項44】

前記サイトケラチン18蛋白質は、サイトケラチン18に対する自己抗体と相互作用する能力を維持しているサイトケラチン18蛋白質断片であることを特徴とする請求項38～40のいずれか1項に記載の方法。

【請求項45】

気管支喘息及び慢性鼻炎患者のサイトケラチン18に対する自己抗体とサイトケラチン18との間の結合を抑制可能な薬学的化合物を投与することにより、気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護または治療するための方法。

【請求項46】

気管支喘息及び慢性鼻炎患者のサイトケラチン18に対する自己抗体とサイトケラチン18との間の結合を抑制可能な薬学的化合物を投与することにより、非アレルギー性気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護または治療するための方法。

【請求項47】

気管支喘息及び慢性鼻炎患者のサイトケラチン18に対する自己抗体とサイトケラチン18との間の結合を抑制可能な薬学的化合物を投与することにより、サイトケラチン18に対する自己抗体と関連がある気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護または治療するための方法。

【請求項48】

気管支喘息及び慢性鼻炎を診断するためのサイトケラチン18蛋白質の用途。

【請求項49】

気管支喘息及び慢性鼻炎を分類するためのサイトケラチン18蛋白質の用途。

【請求項50】

気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護または治療するための薬学的製剤用のサイトケラチン18蛋白質の用途。

【請求項51】

気管支喘息及び慢性鼻炎治療用薬物の製造における薬物標的としてのサイトケラチン18蛋白質の用途。

【請求項52】

気管支喘息及び慢性鼻炎患者の治療のためのサイトケラチン18蛋白質の用途。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はサイトケラチン18に対する自己抗体と関連のある気管支喘息及び慢性鼻炎患者を検出するための診断方法及び診断キットに関するものである。

さらに、本発明は、サイトケラチン18に対する自己抗体と関連のある気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護または治療するための、サイトケラチン18蛋白質を含む薬学的製剤に関するものである。さらに、本発明は、サイトケラチン18に対する自己抗体とサイトケラチン18蛋白質との間の相互作用を抑制する化合物を利用して、サイトケラチン18に対する自己抗体と関連のある気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護または治療するための方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

(気管支喘息及び慢性鼻炎の定義及び有病率)

気管支喘息とは、普通は症状が可逆的であるが、ひどくなり得るし、時折、致命的にな

り得る咳、喘鳴及び呼吸困難の悪化を特徴とする気道の慢性炎症性疾病を言う（非特許文献1）。このような気管支喘息は先進国人口の約5 - 10%がこの疾病を病んでいるものと報告されるほどに非常にありふれた疾病である。また、気管支喘息の有病率は、環境的な要因に因り最近数十年に亘って増加している（非特許文献2）。

【0003】

慢性鼻炎は鼻汁、くしゃみ、鼻づまりの代表的な慢性症状を特徴とする鼻気道の炎症性疾病である（非特許文献3）。さらに、慢性鼻炎は先進国人口の約10 - 20%が病んでいるありふれた疾病に属する（非特許文献4）。

【0004】

気管支喘息及び慢性鼻炎は疫学的及び免疫病理学的特性ならびに一般的治療方法によって互いに関連付けられている。気管支喘息患者らの大多数（約80 - 99%）は慢性鼻炎でもあり、慢性鼻炎を訴える患者らの約30 - 40%は気管支喘息でもあると知られている（非特許文献5、非特許文献6）。上部気道及び下部気道は同一な組織学的形態の呼吸器系上皮に覆われている。病理学的観点では、慢性鼻炎患者の上部気道（鼻粘膜組織）は気管支喘息患者の下部気道（気管支粘膜組織）と類似の炎症特性を表す。最近、上部気道（鼻炎）及び下部気道（喘息）にわたる共通の炎症過程の適切な認識及び治療を容易にするために「気管支炎（rhinobronchitis）」という新たな用語が提案された（非特許文献6）。

【0005】

「アスピリン増悪呼吸器疾患」は慢性鼻炎、鼻ポリープ及び喘息の存在と、アスピリン摂取後に喘息及び鼻炎の発作が促進されることを特徴とする臨床症候群である。（非特許文献7）。このような症候群が存在することは、気管支喘息及び慢性鼻炎の両方において共通の発病メカニズムが作用するという証拠となる（非特許文献8）。

【0006】

（気管支喘息及び慢性鼻炎の原因及び発生メカニズム）

気管支喘息及び慢性鼻炎を発生させる主要原因及びメカニズムは未だ完全には理解されていない（非特許文献1、非特許文献3）。従来、一般的な環境物質（イエダニ類及び花粉等のアレルゲン）に対するアレルギー免疫反応が気管支喘息及び慢性鼻炎患者の気道炎症を発生させる重要なメカニズムとされてきた（非特許文献9、非特許文献3）。しかし、一般的な環境物質に対するアレルギー反応は気管支喘息及び慢性鼻炎患者のかなりの割合（約40 - 50%）では検出できない（非特許文献10、非特許文献11）。このような患者らは非アレルギー性喘息及び鼻炎を有するものとして分類されている。非アレルギー性喘息及び鼻炎は比較的高い年齢で発症することが多く、アレルギー性喘息及び鼻炎より臨床学的に一層深刻である（非特許文献12、非特許文献11）。しかし、非アレルギー性喘息及び鼻炎患者において気道炎症を発生させるメカニズムは未だ説明されていない。

【0007】

（気管支喘息及び慢性鼻炎の診断、分類及び治療）

気管支喘息と慢性鼻炎の診断は病歴聴取及び客観的な検査等を通じて達成することができる（非特許文献1、非特許文献3）。

【0008】

間欠的な咳、呼吸困難、または喘鳴等の典型的な臨床症状歴があり、気管支拡張剤吸入前後の肺機能検査によって気道閉塞の可逆性が証明されうる場合、気管支喘息と診断され得る。また、非特異的刺激性物質（メタコリン、ヒスタミン等）に対する気道過敏も気管支喘息の診断のための客観的証拠となり得る。

【0009】

慢性鼻炎の場合、客観的な検査よりは鼻汁、くしゃみ、鼻づまり等の典型的な臨床症状によって主に診断される。顕微鏡検査を通じて鼻分泌物または鼻粘膜組織中の好酸球の有無を確認することも慢性鼻炎の診断の助けとなり得ることがある。

【0010】

10

20

30

40

50

気管支喘息及び慢性鼻炎患者では、一般的な環境物質の吸入抗原（イエダニ類及び花粉などのアレルゲン）に対するアレルギー反応の存在をアレルギー皮膚検査または血清試料中のアレルゲン特異的なIgE抗体に対する生体外試験によって検査し得る。環境物質に対するアレルギー反応の検査は、気管支喘息及び慢性鼻炎を増悪させうる危険因子等を究明し、アレルギー性喘息及び慢性鼻炎患者を非アレルギー性喘息及び慢性鼻炎患者から分類するために臨床的に有用である。しかし、環境内のアレルゲンに対するアレルギー反応の検査は、気管支喘息及び慢性鼻炎の診断には利用できない。というのも、健康と思われる人の約20 - 30%及びアトピー性皮膚炎やアレルギー性結膜炎等のその他の疾病を有する患者の50%以上においても陽性反応が見られるからである（非特許文献10）。

【0011】

気管支喘息及び慢性鼻炎を有するアレルギー患者の場合、過敏なアレルゲンに対する曝露を減少させるかまたは免疫治療を通じてアレルゲンに対する患者の過敏性を減少させることにより、臨床症状が好転され得る。免疫治療では、アレルゲンに対するアレルギー反応を減少させるために、アレルゲンが定期的に皮下投与される（非特許文献1、非特許文献3）。

【0012】

薬物治療として、コルチコステロイドは、気管支喘息及び慢性鼻炎の治療に最も効果的な薬物であるものと知られてきた。鼻腔用スプレーまたは吸入装置を利用して標的組織にコルチコステロイドを直接投与するのが全身に薬物を投与することより全身性の副作用を回避するのに好ましく方法である。気管支喘息の症状を一層抑制するために、吸入気管支拡張剤を利用した治療を追加することが有用であり得る。また、抗ヒスタミン剤を経口投与することも慢性鼻炎症状を減少させるのに有用であり得る（非特許文献1、非特許文献3）。

【0013】

気管支喘息及び慢性鼻炎患者の治療効果は、臨床症状の変化の過程によって探知され得る。また、一連の客観的な肺機能検査も気管支喘息患者の治療効果を観察するのに有用であり得る。

【非特許文献1】米国喘息教育・管理プログラム（National Asthma Education and Prevention Program）、米国NIH発行番号97-4051、1997年

【非特許文献2】シアース エム・アール。（Sears MR.）ランセット誌（Lancet）、1997年、第350巻（Suppl 2）、p. 1-4

【非特許文献3】ディケヴィクツ エム・エス。（Dykewicz MS.）ら、アナルズ・オブ・アレルギー・アズマ・アンド・イムノロジー誌（Ann Allergy Asthma Immunol）、1998年、第81巻、p. 463-468

【非特許文献4】スライ アール・エム。（Sly RM.）ら、アナルズ・オブ・アレルギー・アズマ・アンド・イムノロジー誌、1999年、第82巻、p. 233-48

【非特許文献5】ビグノラ エイ・エム。（Vignola AM）ら、クリニカル・アンド・エクスペリメンタル・イムノロジー誌（Clin Exp Immunol）、2001年、第31巻、p. 674-677

【非特許文献6】シモンズ エフ・イー。（Simons FE.）ら、ジャーナル・オブ・アレルギー・アンド・クリニカル・イムノロジー誌（J. Allergy Clin. Immunol.）、1999年、第104巻、p. 534-540

【非特許文献7】ベルゲス ギメーネ エム・ピー。（Berges-Gimene MP.）ら、アナルズ・オブ・アレルギー・アズマ・アンド・イムノロジー誌、2002年、第89巻、p. 474-478

【非特許文献8】ピカド シー。（Picado C.）ら、カレント・アレルギー・アンド・アズマ・リポート誌（Curr Allergy Asthma Rep）、2002年、第2巻p. 488-493

【非特許文献9】レマンスク アール・エフ・ジュニア（Lemanske RF Jr）ら、ザ・ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・メディカル・アソシエーション誌（JAMA）、1997年、第278巻、p. 1855-1873

10

20

30

40

50

【非特許文献10】ピアース エヌ．(Pearce N)ら、ソラックス誌(Thorax)、1999年、第54巻、p.268-272

【非特許文献11】セッティペイン アール．エイ．(Settipane RA)ら、アナルズ・オブ・アレルギー・アズマ・アンド・イムノロジー誌、2001年、第86巻、p.494-508

【非特許文献12】ヴィルチョウ ジェイ．シー．ジュニア(Virchow JC Jr.)ら、ジャーナル・オブ・アレルギー・アンド・クリニカル・イムノロジー誌、1996年、第98巻、p.S27-S33

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0014】

(気管支喘息及び慢性鼻炎の既存の定義及び分類方法の問題点)

気管支喘息及び慢性鼻炎は、疾病でなく、病因、病理学的メカニズム及び自然経過が多様で互いに異なる疾病を包含する症候群である(Rackemann FM. J Allergy 1940;11:147-162; 非特許文献12; Dykewicz MS, et al., Ann Allergy Asthma Immunol 1998;81:478-518; Sobol SE et al., Curr Allergy Asthma Rep 2001;1:193-201)。気管支喘息及び慢性鼻炎の病因論による分類は難しいが、これは気管支喘息及び慢性鼻炎の主要な発病原因が未だ完全には理解されていないからである(非特許文献1、Dykewicz MS et al., Ann Allergy Asthma Immunol 1998;81:478-518)。気管支喘息及び慢性鼻炎の分類のための今日の基準は、一般的な環境アレルゲンに対するアレルギー反応の有無に対する検査に主に依存している。さらに、一般的なアレルゲン(約10-30種のアレルゲン)に対しアレルギー反応がないことを立証することを除き、非アレルギー性気管支喘息及び慢性鼻炎患者を直接検出するための検査方法はない実情である。

20

【0015】

(現在の気管支喘息及び慢性鼻炎の診断方法の問題点)

一次診療に従事する医師らの場合、気管支喘息患者及び慢性鼻炎患者の診断のために、主に臨床症状と診察所見に依存する場合が多い。客観的な臨床検査は次に記述した理由等で広範囲には使用されておらず、その結果、これらの疾患の誤診や診断の遅延が生じることもある。肺機能検査は特殊な装備及び熟練した技術者を必要とする。アレルギー皮膚検査の場合、専門化された検査技師が必要であり、検査時皮膚に針を刺すので、患者に軽い身体的不快感を与える。一般的なアレルゲンに対する特異的IgE抗体の生体外試験も特別な実験設備と技能者を必要とし、通常は多数のアレルゲンについて試験する必要がある。鼻腔内好酸球の検査は、この検査の診断的価値に対する意見の一致がないため日常的には使用されていない(非特許文献3)。そして、診断的価値に対する意見の一致を見せる慢性鼻炎の診断に利用できる臨床検査法はない状態である。

30

【0016】

(他の慢性炎症性疾患の発病メカニズムと診断方法)

慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、慢性萎縮性胃炎、甲状腺炎等の種々の慢性炎症性疾患では、自身の抗原(自己抗原)に対する自己免疫反応が疾患の発生に重要な役割をするものと知られている。これらの疾患の場合、各々の疾患を診断し、疾患の活動度を追跡観察し、予後を予測し、治療方法を選ぶ目的で様々な自己抗原に対する自己抗体を検出する検査法が広く利用されている(Davidson A, et al., N Engl J Med 2001;345:340-350)。

40

【0017】

(気管支喘息及び慢性鼻炎の診断及び分類のための自己抗体検査法の利用における問題点)

気管支粘膜、鼻粘膜、副鼻腔、肺及び内皮細胞に存在する抗原に対する種々の自己抗体が、気管支喘息及び慢性鼻炎患者、特に、非アレルギー患者において健常対照群に比べて高頻度で検出されることが報告されている(Girard JP, et al., Poumon Coeur 1973;29:267-270.; Quintero JM, et al., J Allergy 1966;37:84-89.; Dinu IV, et al., Rum Med

50

Rev 1965;19:26-29.;Lassalle P, et al., Eur J Immunol 1993;23:796-803)。これらの研究に基づいて、過去の研究者らは自己免疫メカニズムが気管支喘息及び慢性鼻炎の発生に關与している可能性について提案してきた。しかし、過去の研究では、自己抗原を究明できなかった点や自己抗体と気道炎症との間の論理的關連がない点から自己免疫と喘息との間の因果關係を確立することができなかった。自己抗体検査法は、気管支喘息及び慢性鼻炎の診断または分類目的では未だ利用されていない。

【0018】

(現在の気管支喘息及び慢性鼻炎治療方法の問題点)

気管支喘息及び慢性鼻炎を発生させる主要な原因及びメカニズムが未だ完全には究明されていないので、気管支喘息及び慢性鼻炎を寛解させ得る治療方法は未だ開発されていない。現在の薬物治療法は薬物の連続的な投与の間だけ臨床症状及び生理機能を好転させ得るが、気管支喘息及び慢性鼻炎の長期的な自然経過を变化させるとは立証されていない(非特許文献1、Dykewicz MS et al., Ann Allergy Asthma Immunol 1998; 81:478-518)

10

【課題を解決するための手段】

【0019】

本発明は気管支喘息及び慢性鼻炎患者、特に非アレルギー患者の血清試料中にサイトケラチン18蛋白質に対する自己抗体が存在するという驚くべき発見に基づいたものである。本発明者らは、これが気管支喘息及び慢性鼻炎患者との關連を有する上記自己抗体の第一番目の報告であると判断している。

20

【0020】

本発明者らは気管支喘息及び慢性鼻炎を有する患者らの体液内に気道上皮細胞蛋白質に対する自己抗体が存在することを確認し、当該自己抗体と反応する自己抗原を究明するために多くの努力を傾けた。自己抗原を選別及び精製するための多くの実験を行なった後、本発明者らはサイトケラチン18蛋白質が気管支喘息及び慢性鼻炎、特に非アレルギー患者と關連のある気道上皮細胞自己抗原であるということを最終的に究明した。本発明は気管支喘息及び慢性鼻炎患者の診断及び分類のためのサイトケラチン18蛋白質の用途に関するものである。また、本発明はサイトケラチン18蛋白質を含む薬学的製剤、ならびに自己抗体とサイトケラチン18蛋白質との間の相互作用を抑制する化合物を利用して気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護または治療するための方法に関するものである。

30

【0021】

本発明者らは、気道上皮細胞蛋白質に対する自己免疫反応が下記の理由に基づいてある割合の気管支喘息及び慢性鼻炎患者、特に非アレルギー患者において気道炎症を発生させるものと判断している。

【0022】

(1) 病理学的研究に基づいて気道上皮は、気管支喘息及び慢性鼻炎における炎症反応の標的として提案されてきた(Montefort S et al., Clin Exp Allergy 1992 22:511-520.; Vignola AM et al., Clin Exp Immunol 2001;31:674-677.; Wladislavosky-Waserman P et al., Clin Allergy 1984 14:241-247)。

【0023】

(2) 気管支喘息患者の場合、気管支粘膜組織に対する自己抗体の存在が報告されており(Girard JP et al., Poumon Coeru 1973 29:267-270.; Wagner V et al., Acta Allergol 1965;20:1-9)慢性鼻炎患者の場合、鼻粘膜組織に対する自己抗体の存在が報告されてきた(Yassin A et al., J Laryngol Otol 1974;88:39-46)。気管支および鼻粘膜組織はいずれも同じ種類の呼吸器系上皮細胞で覆われている。

40

【0024】

(3) 成人で発病した喘息患者および喘息発作により死亡した喘息患者の気管支組織試料を分析した結果、気管支上皮及び気管支上皮細胞の細胞質にIgG抗体の沈着が確認された(Molina C et al., Clin Allergy 1977; 7: 137-45; Callerame ML et al., N Eng J Med 1971; 284: 459-64)。

50

【 0 0 2 5 】

(4) 気管支喘息及び慢性鼻炎患者体液のサイトケラチン 1 8 に対する自己抗体は、本明細書で記述する如く、自己抗体依存性の補体を介する細胞毒性を通じて気道上皮細胞を損傷させ得る。

【 0 0 2 6 】

(5) 重症喘息患者から自己抗体を含む血漿を除去した結果、臨床学的改善が得られた (Lassalle P et al., Clin Exp Allergy 1990; 20:707-712)。健康な提供者の免疫グロブリンを静脈内に投与した結果、重症喘息患者の全身性コルチコステロイド治療の必要性が低下した (Salmun LM et al., J Allergy Clin Immunol 1999;103:810-815)。

【 0 0 2 7 】

本発明者らは、気管支喘息及び慢性鼻炎患者の体液内の自己抗体が上部及び下部気道 (鼻粘膜及び気管支粘膜) の気道上皮細胞蛋白質と反応し得るものと判断している。そして、このような自己抗体 - 自己抗原免疫複合体は補体を介した細胞毒性及び炎症性細胞の活性化を通じて上部及び下部気道の慢性炎症を誘発し得る。そして、このような気道の慢性炎症は気管支喘息及び慢性鼻炎の臨床的特徴を誘発することができる。

【 0 0 2 8 】

本発明は、気管支喘息と慢性鼻炎の診断方法であって、(a) 気管支喘息及び慢性鼻炎を有するものと疑われる被検者から体液を得る段階と、(b) 前記体液を、サイトケラチン 1 8 蛋白質とこれに対する自己抗体との間に免疫複合体を形成するのに適当な条件下でサイトケラチン 1 8 蛋白質と接触させる段階と、(c) 前記免疫複合体を検出することにより、サイトケラチン 1 8 に対する自己抗体の存在を確認する段階とを含み、前記免疫複合体の存在は前記被検者が気管支喘息及び慢性鼻炎を有することを表すことを特徴とする方法に関する。自己抗原と自己抗体との間の前記免疫複合体の存在を確認するための技術は当業者に知られており、このような技術の例が本明細書において説明されている。このような技術等は例えば、次の文献 (Rose et al., Manual of Clinical Laboratory Immunology, American Society for Microbiology Press, 1997) から確認され得る。体液としては、血液、血清、血漿、尿、涙、唾液、鼻分泌物、気管支分泌物、肺分泌物及びその他任意の分泌物等があるがこれらに限定はされない、人体から採取できるすべての液体が含まれる。

【 0 0 2 9 】

本明細書で使用される用語「サイトケラチン 1 8 蛋白質」は、哺乳類のサイトケラチン 1 8 蛋白質またはその断片を表すものであり、該断片は気管支喘息及び慢性鼻炎患者の体液内に存在するサイトケラチン 1 8 に対する自己抗体に結合する能力を維持しているものである。サイトケラチン 1 8 蛋白質は、細胞、組織または微生物から分離または発現可能であり、組換え DNA 技術等を含む当業界の標準的な方法を利用して製造することができる。ヒトのサイトケラチン 1 8 蛋白質は、4 3 0 個のアミノ酸から構成され、その配列は次の文献 (Oshima RG, Millan JL, Cecena G. Comparison of mouse and human keratin 18:a component of intermediate filaments expressed prior to implantation. Differentiation 1986; 33: 61-68) に報告されている。配列番号 1 (SEQ ID NO : 1) は、ヒトのサイトケラチン 1 8 蛋白質のアミノ酸配列である。マウスのサイトケラチン 1 8 蛋白質は 4 2 3 個のアミノ酸から構成され、その配列は次の文献 (Ichinose Y, Morita T, Zhang FY, Srimahasongcram S, Tondella ML, Matsumoto M, Nozaki M, Matsushiro A. Nucleotide sequence and structure of the mouse cytokeratin endoB gene. Gene 1988; 70:85-95) に報告されている。配列番号 2 (SEQ ID NO : 2) はマウスサイトケラチン 1 8 蛋白質のアミノ酸配列である。サイトケラチン 1 8 は、気管支上皮細胞及び肺 (肺胞) 上皮細胞を含む、気道及び胃腸管の表面を覆っている上皮細胞に主に見出される細胞骨格蛋白質である (Moll R et al., Cell 1982; 31:11-24)。サイトケラチン 1 8 は、主に細胞内にある蛋白質であるが、上皮細胞では細胞表面上で強く発現されることもまた観察されている (Moll R et al., Cell 1982; 31:11-24; Saarloos MN et al., Curr Eye Res 1999; 19:439-449)。

10

20

30

40

50

【0030】

本発明は非アレルギー性の気管支喘息及び慢性鼻炎患者を検出する方法であって、(a)気管支喘息及び慢性鼻炎を有するものと疑われる被検者から体液を得る段階と、(b)前記体液を、サイトケラチン18蛋白質とこれに対する自己抗体との間の免疫複合体を形成するのに適当な条件下でサイトケラチン18蛋白質と接触させる段階と、(c)前記免疫複合体を検出することにより、サイトケラチン18に対する自己抗体の存在を確認する段階とを含み、前記免疫複合体の存在は前記被検者が非アレルギー性の喘息及び鼻炎を有することを表すことを特徴とする方法に関する。

【0031】

さらに、本発明はサイトケラチン18に対する自己抗体と関連のある気管支喘息及び慢性鼻炎患者を検出または分類するための方法であって、(a)気管支喘息及び慢性鼻炎を有するものと疑われる被検者から体液を得る段階と、(b)前記体液を、サイトケラチン18蛋白質とこれに対する自己抗体との間の免疫複合体を形成するのに適当な条件下でサイトケラチン18蛋白質と接触させる段階と、(c)前記免疫複合体を検出することにより、サイトケラチン18に対する自己抗体の存在を確認する段階とを含み、前記免疫複合体の存在は前記被検者がサイトケラチン18に対する自己抗体と関連のある非アレルギー性の喘息及び鼻炎を有することを表すことを特徴とする方法に関する。

【0032】

さらに、本発明は気管支喘息及び慢性鼻炎の患者を検出及び分類するための、哺乳動物のサイトケラチン18蛋白質を含む診断キットに関するものである。前記キットは哺乳動物のサイトケラチン18蛋白質またはその断片とヒト被検者の体液からサイトケラチン18蛋白質に対する自己抗体を検出するための手段を含む。前記キットに適用される検定(assay)方法は、当業者に良く知られているが、このような方法の例が本明細書において開示されている。前記キットに使用される検定方法としては、凝集免疫法、光散乱免疫測定法、酵素結合免疫測定法、放射線免疫測定法、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法、免疫固定法及び免疫プロットングなど(これらに限定はされない)の抗原抗体反応を検出可能な方法がある。

【0033】

さらに、本発明はサイトケラチン18に対する自己抗体と関連のある気管支喘息及び慢性鼻炎を同定するための方法を教示するという点で、気管支喘息及び慢性鼻炎の治療法を処方する方法に関するものである。また、本発明は、気管支喘息及び慢性鼻炎患者の体液からサイトケラチン18に対する自己抗体を検出することにより、前記患者に対する治療の効果を観察する方法に関するものである。さらに、本発明は気管支喘息及び慢性鼻炎患者からサイトケラチン18に対する自己抗体を検出して治療法を処方し治療の効果を観察するための、哺乳動物のサイトケラチン18を含むキットに関するものである。

【0034】

本発明は体液内にサイトケラチン18に対する自己抗体を有する気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護または治療するための、哺乳動物のサイトケラチン18またはその断片を含む薬学的製剤に関するものである。このような製剤は気管支喘息及び慢性鼻炎患者の体液中の自己抗体による細胞毒性作用からサイトケラチン18発現細胞を保護するようにデザインされる。また、本発明はサイトケラチン18に対する自己抗体とサイトケラチン18蛋白質との間の結合を抑制する化合物を含む薬学的製剤に関するものである。このような抑制化合物は、哺乳動物のサイトケラチン18蛋白質全体、またはサイトケラチン18に対する自己抗体に結合する能力を維持しているサイトケラチン18蛋白質断片を含む。

【0035】

本発明は、体液内にサイトケラチン18蛋白質に対する自己抗体を有する気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護または治療する方法に関するものである。このような方法は、哺乳動物のサイトケラチン18を含む抑制化合物を投与することにより、サイトケラチン18に対する自己抗体とサイトケラチン18発現細胞との間の結合を抑制する段階を含む。このような抑制化合物は、哺乳動物のサイトケラチン18蛋白質全体、またはサイトケラチ

ン18に対する自己抗体に結合する能力を維持しているサイトケラチン18蛋白質断片を含む。

【0036】

また、本発明は気管支喘息及び慢性鼻炎患者の自己抗体がサイトケラチン18蛋白質またはサイトケラチン18発現細胞に結合することを抑制できる薬学的化合物を同定する方法に関するものである。このような抑制化合物は(a)気管支喘息及び慢性鼻炎患者の体液から分離した自己抗体を抑制化合物候補と接触させる段階と、(b)該化合物がサイトケラチン18蛋白質に対する前記自己抗体の結合を抑制できるかまたはサイトケラチン18発現細胞に対する自己抗体の細胞毒性作用を抑制できるかを決定する段階によって同定され得る。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0037】

以下に気管支喘息また慢性鼻炎患者と関連のある気道上皮細胞自己抗原としてサイトケラチン18を同定した具体的実験について記載する。

1. 対象及び方法

(1) 対象者

本発明者らは27名のアレルギー性喘息及び鼻炎患者、23名の非アレルギー性喘息及び鼻炎患者、34名の年齢を合わせた健康な対照群、及び20名の全身性エリテマトーデス患者の血清試料を検査した。すべての気管支喘息及び慢性鼻炎患者らは気管支喘息及び慢性鼻炎に対応する典型的な臨床病歴を有し、気管支拡張剤の吸入後に15%を超える努力肺活量1秒量(FEV₁)の改善を表し、または1ml当り8mg未満のメタコリン吸入後にFEV₁が20%減少した。すべての気管支喘息及び慢性鼻炎患者は50種の一般的吸入性アレルゲン(英国ブレントフォード(Brentford)所在のベンカード社(Bencard Co.))を利用した皮膚反応検査を受けた。或る一種のアレルゲンの膨疹(wheal)の直径が陰性対照群(一般の生理食塩水)より3mmを超えて大きく、アレルゲン曝露による臨床的増悪について明確な履歴または客観的証拠がある場合の患者らはアレルギー性喘息及び鼻炎患者に分類された。非アレルギー性の喘息及び鼻炎患者らは50種の一般的吸入性アレルゲンのいずれに対しても陽性皮膚反応を表さず、血清中総IgE濃度は正常範囲内(180 IU/ml未満)にあった。米国リウマチ協会の1982年改正基準によって分類された全身性エリテマトーデス患者20名を、疾病を有する対照群として含めた。すべての対象者の血清試料等は-20℃で保管した。

20

30

【0038】

(2) 気道上皮細胞の培養

米国微生物系統保存機関(ATCC; American Type Culture Collection; 米国バージニア州マナッサス所在)から、BEAS-2B細胞(ATCC CRL-9609; Ke Y et al., Differentiation 1988; 38:60-6)及びA549細胞(ATCC CCL-185; Giard et al., J Natl Cancer Inst 1973; 51:1417-23)を含むヒト気道上皮細胞株を購入した。

【0039】

(3) 細胞溶解及び蛋白質抽出

培養された細胞を、10mM Tris/HCl, pH 7.2, 1%トリトン(Triton) X-100, 1%ソジウム・デオキシコレート, 0.1%ドデシル硫酸ナトリウム, 158mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM Na₃VO₄, 250µg/mlロイペプチン及び1mMフェニルメチルスルフォニルフルオリドを含有する溶解緩衝液の添加によって溶解させた。

40

【0040】

(4) 免疫プロット分析

細胞溶解物中の蛋白質を8%分離ゲル(pH 8.8)及び4%スタッキングゲル(pH 6.8)を利用して不連続的なドデシル硫酸ナトリウム/ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)で分離した。電気泳動後、蛋白質をポリビニリデンジフルオリド膜(PVDF; 米国カリフォルニア州ハーキュリーズ所在のバイオ・ラッド・ラボラトリー

50

ズ (Bio-Rad Laboratories)) へ転写した。転写後、P V D F 膜を先ず、10% ウシ血清及び0.1 % Tween 20が含まれたトリス緩衝生理食塩水(TBS) でブロッキングした。次に、P V D F 膜ストリップを1 : 100 希釈した血清試料と室温で2時間反応させた。洗浄後、上記膜をアルカリホスフェートが結合された抗ヒト I g G ヤギ抗体 (米国ミズーリ州セントルイス所在のシグマ・ケミカル社 (Sigma Chemical Co.)) とともに室温で2時間インキュベートした。最終洗浄後、上記膜を5 ブロモ 4 クロロ 3 インドイルホスフェート/ニトロブルーテトラゾリウム (BCIP/NBT; シグマ) 溶液で染色した。アミノ酸配列分析後、49 k D a 自己抗原を確認するために、ヒトのサイトケラチン18に対するマウスモノクローナル抗体 (クローン番号CY-90 ; シグマ) 及び同一 I g G 1 アイソタイプを有する陰性対照のマウスモノクローナル抗体 (シグマ・ケミカル社) を利用して免疫ブロット分析を行なった。アルカリホスファターゼ結合抗マウス I g G ヤギ抗体 (シグマ・ケミカル社) を二次結合物として使用して、上記のように発色させた。ヒトのサイトケラチン18に対するマウスモノクローナル抗体を利用した実験では市販の精製されたウシサイトケラチン18蛋白質 (米国ニュージャージー州プレザント・ヒル・ロード・フランダース (Pleasant Hill Road Flanders) 所在のリサーチ・ダイアグノスティクス・インコーポレイテッド (Research Diagnostics INC.)) を陽性対照抗原として利用した。

10

【0041】

(5) 自己抗原の精製及び同定

自己抗原の精製のために、気道上皮細胞であるBEAS-2B 溶解物をDEAE (ジエチルアミノエチル) セファロース (Sephacrose ; 登録商標) ビーズ (シグマ・ケミカル社) を利用したイオン交換クロマトグラフィを行なって分画した。重要な分画等をSDS-PAGE及び免疫ブロット分析を利用して分析し、Centriprep (登録商標) 50 (ドイツ連邦共和国ヴィッテン所在のアミコン (Amicon) 社) を利用して濃縮した後、Vydac (登録商標) C18 カラム (米国カリフォルニア州ヘスペリア所在のザ・セパレーション・グループ・インコーポレイテッド (The Separation Group, Inc.)) を利用した逆相HPLCを実施した。分画を得て凍結乾燥させた。前記分画をSDS PAGE及び免疫ブロット分析を通じて検査した。PVDF上の精製蛋白質の分析の結果、N-末端アミノ酸配列がブロックされていることが判明したため、同蛋白質をゲル内トリプシン消化した。トリプシン消化されたペプチド断片等を Sephasil (登録商標) C18 逆相カラム (スウェーデン国ウプサラ所在のアマシャム・ファルマシア・バイオテック (Amersham Pharmacia Biotech)) を利用したマイクロ-HPLC システムを通じて分離した。ペプチド断片2分画をProcise (登録商標) c LC 492 蛋白質配列分析システム (米国カリフォルニア州フォスター所在のアプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems)) を利用してアミノ酸配列分析した。ペプチド断片のアミノ酸配列を公知の蛋白質の配列と比較するために、SWISS-PROTデータベース (スイス国ジュネーブ所在のスイスパイオインフォマティクス研究所 (Swiss Institute of Bioinformatics))、英国ケンブリッジ所在の欧州バイオインフォマティクス研究所 (The European Bioinformatics Institute) を利用した。

20

30

【0042】

(6) その他の自己抗体の検出

すべての血清試料に対して、I g G 抗核抗体 (ANA)、及びチログロブリン及び甲状腺ペルオキシターゼに対する I g G 自己抗体を検査した。I g G 抗核抗体はHEp-2 細胞株を利用した間接免疫蛍光染色 (米国メリーランド州所在のヘマゲン・ダイアグノスティクス・インコーポレイテッド (Hemagen Diagnostics Inc.)) を使用して評価した。チログロブリンと甲状腺ペルオキシターゼに対する I g G 自己抗体は放射線免疫測定法 (ドイツ連邦共和国ベルリン所在のブラームス・ディアグノスティカ・ゲーエムベーハー (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH)) を利用して測定した。

40

【0043】

(7) 自己抗体による気道上皮細胞に対する補体を介した細胞毒性

3 (4, 5ジメチルチアゾール 2 イル) 2, 5 ジフェニルテトラゾリウムブロマイド (MTT) を利用して、自己抗体による気道上皮細胞に対する補体を介した細胞毒性

50

を測定した。上記実験は、サイトケラチン18に対するIgG自己抗体を有する非アレルギー性喘息及び鼻炎患者8名、サイトケラチン18に対する検出可能なIgG自己抗体がない非アレルギー性喘息及び鼻炎患者6名、サイトケラチン18に対する検出可能なIgG自己抗体がないアレルギー性喘息及び鼻炎患者8名、及び健康人対照群8名の血清試料を利用して実施した。上記気道上皮細胞(BEAS-2B)を96ウエル培養用プレート上で培養した。上記細胞が各ウエル表面の50%を被覆した時点で、細胞毒性を測定した。細胞毒性の測定前に、血清試料を56で30分間処理して補体を不活性化した。各ウエルから培地を除去した後、DMEM/F12培地で1:20に希釈した100 μ lの血清試料を3連でウエルに添加するか若しくはDMEM/F12培地だけを対照として各ウエルに添加した。上記プレートをCO₂インキュベータで37で90分間インキュベートした。そして、10 μ lのウサギ補体を各ウエルに添加した後に、CO₂インキュベータで37で90分間インキュベートした。血清試料及び補体を含む培地を各ウエルから除去し、10%ウシ胎児血清を含む200 μ lの新たなDMEM/F12培地及び50 μ lのMTT溶液を各ウエルに添加し、プレートをCO₂インキュベータで37で3時間インキュベートした。次に、各ウエルから上澄液を除去し、200 μ lのジメチルスルホキシドを各ウエルに添加した。次に、25 μ lの0.1Mグリシン、0.1M NaCl緩衝液(pH10.5)を各ウエルに添加した。570nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーを利用して測定した。血清試料を含む試験群ウエル及び培地だけを含む対照群ウエルの吸光度値を利用して下記式に基づいて補体を介した細胞毒性を細胞溶解率(%)で表した。

10

【0044】

細胞毒性(細胞溶解率(%)) = [(対照群ウエルの吸光度 - 試験ウエルの吸光度) / 対照群ウエルの吸光度] × 100

20

(8) 気道上皮細胞に対する補体を介した細胞毒性の抑制

サイトケラチン18に対するIgG自己抗体を有する非アレルギー性喘息及び鼻炎患者8名から得た同一体積の血清試料を混合してプール血清試料を作った。このようなプール血清を56で30分間処理し、DMEM/F12培地で1:20に希釈した後、補体を介した気道上皮細胞毒性を測定した。上記プール血清において気道上皮細胞に対する補体を介した細胞毒性を抑制するために、精製されたヒトサイトケラチン18蛋白質またはヒト血清アルブミンを、これら抑制剤が最終濃度100 μ g/mlとなるように上記希釈プール血清に添加した。上記混合物を37で2時間インキュベートした後、補体を介した細胞毒性を測定した。8回の独立の実験を通じて結果を得、平均及び標準偏差で表した。

30

【0045】

2. 結果

(1) 気管支上皮細胞抗原に対するIgG自己抗体の検出

49kDa気管支上皮細胞抗原に対するIgG自己抗体が非アレルギー性喘息及び鼻炎患者23名中10名(43%)、アレルギー性喘息及び鼻炎患者27名中3名(11%)、全身性エリテマトーデス患者20名中2名(10%)、そして、年齢を合わせた健康な対照群34名中3名(9%)から検出された(図1、表1;カイ二乗検定、p<0.005)。49kDa気管支上皮細胞抗原に対するIgG自己抗体の陽性率は、アレルギー性喘息及び鼻炎患者、全身性エリテマトーデス患者及び健康な対照群と比較して非アレルギー性喘息及び鼻炎患者において有意に高かった(表1;フィッシャーの正確確率検定、p<0.05)。

40

【0046】

表1は、アレルギー性喘息及び鼻炎患者、非アレルギー性喘息及び鼻炎患者、全身性エリテマトーデス患者、および健康な対照群における49kDa気管支上皮細胞抗原に対するIgG自己抗体の検出率を示したものである。

【0047】

【表 1】

表 1

グループ	人数	自己抗体陽性(%)	P値*
健常な対照者	34	3(9%)	0.002
アレルギー性喘息及び鼻炎	27	3(11%)	0.009
全身性エリテマトーデス	20	2(10%)	0.015
非アレルギー性喘息及び鼻炎	23	10(43%)	

* 二つのグループ(他のグループに対する非アレルギー性喘息及び鼻炎グループ)の間の差異の統計学的有意性はフィッシャーの正確確率検定で算出した。

10

【0048】

(2) その他の I g G 自己抗体の検出

I g G 抗核抗体及び甲状腺自己抗原に対する I g G 自己抗体の陽性率は、非アレルギー性喘息及び鼻炎患者、アレルギー性喘息及び鼻炎患者及び健康な対照群の間に有意な差がなかった(表 2、 $p > 0.05$)。

【0049】

表 2 は、アレルギー性気管支喘息及び鼻炎患者、非アレルギー性喘息及び鼻炎患者、全身性エリテマトーデス患者及び健康な対照群における I g G 抗核抗体、チログロブリンに対する I g G 自己抗体、及び甲状腺ペルオキシターゼに対する I g G 自己抗体の検出率を示したものである。

20

【0050】

【表 2】

表 2

グループ	人数	自己抗体陽性(%)		
		ANA	抗TG	抗TPO
健常な対照者	34	1(3%)	1(3%)	2(6%)
アレルギー性喘息及び鼻炎	27	0(0%)	1(4%)	2(7%)
非アレルギー性喘息及び鼻炎	23	3(13%)	2(9%)	0(0%)
全身性エリテマトーデス	20	19(95%)*	3(15%)	3(15%)

ANA: 抗核抗体(antinuclear antibody)、抗TG: 抗チログロブリン抗体、
抗TPO: 抗甲状腺ペルオキシターゼ抗体。

* 他の 3 グループに比べて統計的有意差あり ($p < 0.05$)。

30

40

【0051】

(3) 49kDa 気道上皮細胞自己抗原の精製及び同定

49kDa 気道上皮細胞自己抗原の特性を解析するために、同蛋白質をイオン交換クロマトグラフィと逆相HPLC法で精製した。精製された蛋白質を 8% トリス グリシングルで分離した(図 2)。次に、精製された蛋白質をゲル内トリプシン消化し、ペプチド断片を逆相HPLCで分離した(図 3)。二つのペプチド断片分画(ピーク A 及びピーク B)をアミノ酸配列分析した。二つのペプチド断片のアミノ酸配列をデータベース分析した結果、ヒトのサイトケラチン 18 蛋白質と完全に一致するものと確認された(表 3)。

【0052】

50

表 3 は、精製された 49 kDa 自己抗原の二つのペプチド断片のアミノ酸配列と、データベース中的一致するアミノ酸配列を示したものである。

【 0 0 5 3 】

【表 3】

表 3

ペプチド断片 1	Trp Ser His Tyr Phe Lys
ヒトサイトケラチン18蛋白質	126' Trp Ser His Tyr Phe Lys
ペプチド断片 2	Leu Glu Ala Glu Ile Ala Thr Tyr Arg
ヒトサイトケラチン18蛋白質	373' Leu Glu Ala Glu Ile Ala Thr Tyr Arg
マウスサイトケラチン18蛋白質	366' Leu Glu Ala Glu Ile Ala Thr Tyr Arg

【 0 0 5 4 】

49 kDa 気道上皮細胞抗原がヒトのサイトケラチン18であるということ、ヒトのサイトケラチン18に対するモノクローナル抗体を利用した免疫ブロッティング分析を実施し、ウシの精製されたサイトケラチン18蛋白質と比較することにより、さらに一層確認した(図 4)。

【 0 0 5 5 】

(4) 自己抗体による気道上皮細胞に対する補体を介した細胞毒性

気道上皮細胞に対する補体を介した細胞毒性は、サイトケラチン18に対する IgG 自己抗体を有する非アレルギー性喘息及び鼻炎患者の血清試料(平均±標準偏差; 30.9±10.2%)が、サイトケラチン18に対する検出可能な IgG 自己抗体がない非アレルギー性喘息及び鼻炎患者(19.1±3.1%)、サイトケラチン18に対する検出可能な IgG 自己抗体がないアレルギー性喘息及び鼻炎患者(16.5±2.7%)及び健康な対照群(15.8±3.8%)より有意に高かった(図 8、 $p < 0.005$)。加熱によって不活性化された血清試料だけが補体なしに添加された場合には気道上皮細胞に対する補体を介した細胞毒性は検出されなかった。さらに、プール血清試料における気道上皮細胞に対する補体を介した細胞毒性(29.1±4.3%)は、精製されたヒトサイトケラチン18蛋白質の添加によって有意に抑制されたが(11.3±2.6%)、ヒト血清アルブミンの添加によっては抑制されなかった(27.3±2.7%)(図 9、 $p < 0.005$)。このような結果から、気道上皮細胞は非アレルギー性喘息及び鼻炎患者の血清試料に存在するサイトケラチン18に対する自己抗体によって補体を介した細胞毒性を通じて損傷されることが分かる。また、気道上皮細胞に対する補体を介した細胞毒性が精製されたヒトサイトケラチン18蛋白質によって有意に抑制されるという事実から、ヒトのサイトケラチン18蛋白質がサイトケラチン18蛋白質に対する自己抗体を有する気管支喘息及び鼻炎患者の体液中の自己抗体による損傷から気道上皮細胞を保護し得るとということが明らかである。さらに、このような結果から、ヒトのサイトケラチン18蛋白質を投与すると、サイトケラチン18に対する自己抗体を有する気管支喘息及び慢性鼻炎患者を血液中の自己抗体による気道上皮細胞の損傷から保護し得ることも分かる。

【 0 0 5 6 】

下記の実施例等は例示の目的で提供されるものであって、本発明の範囲を制限するものとは解釈されない。

【実施例 1】

【 0 0 5 7 】

(気管支喘息及び慢性鼻炎患者の血清試料におけるサイトケラチン18に対する IgG 及び IgA 自己抗体の免疫ブロット分析による検出)

ヒトの気道上皮細胞(A549細胞)の全細胞抽出物またはヒトの精製されたサイトケラチン18蛋白質を SDS-PAGE(4%スタッキングゲルおよび8%分離ゲル)を利用して分離した後、PVDF膜に蛋白質を転写した。このPVDF膜を5%脱脂粉乳と0.05% Tween 20を含むTBS

10

20

30

40

50

(ブロッキング緩衝液)とともに1時間インキュベートしてPVDFに対する非特異的蛋白質結合を遮断した後、膜を4mm幅のストリップに切断した。該PVDFストリップをブロッキング緩衝液で1:100に希釈した血清試料とともに室温で2時間インキュベートした。洗浄後、PVDFストリップをアルカリホスファターゼが結合したヤギの抗ヒトIgGまたは抗ヒトIgA抗体とともに2時間インキュベートした。洗浄後、PVDFストリップをBCIP/NBT基質溶液を利用して5分間染色した。陽性対照として、一個のPVDFストリップをヒトの血清試料の代わりにサイトケラチン18に対するマウスモノクローナル抗体とともにインキュベートし、アルカリホスファターゼが結合したヤギの抗マウスIgG抗体を2次結合物として利用し、BCIP/NBTで染色した。また、陰性対照として、1個のPVDFストリップをヒトの血清試料の代わりにブロッキング緩衝液とのみインキュベートした。

10

【0058】

ヒトの気道上皮細胞(A549)の全細胞抽出物を利用した血清試料中のサイトケラチン18に対するIgG自己抗体の免疫プロット分析の結果、サイトケラチン18に対するIgG自己抗体は2名の健常な対照者及び1名のアレルギー性喘息及び鼻炎患者では陰性であり、3名の非アレルギー性喘息及び鼻炎患者では陽性であった(図5)。

【0059】

ヒトの気道上皮細胞(A549)の全細胞抽出物を利用した血清試料中のサイトケラチン18に対するIgA自己抗体の免疫プロット分析の結果、サイトケラチン18に対するIgA自己抗体は1名の健常な対照者及び3名のアレルギー性喘息及び鼻炎患者では陰性であり、6名の非アレルギー性喘息及び鼻炎患者では陽性であった(図7)。

20

【0060】

ヒトの精製されたサイトケラチン18蛋白質を利用して血清試料中のサイトケラチン18に対するIgG自己抗体を免疫プロット分析した結果、サイトケラチン18に対するIgG自己抗体は慢性鼻炎の臨床症状がない3名のアレルギー性喘息患者では陰性であり、慢性鼻炎の臨床症状がない4名の非アレルギー性喘息患者では陽性であった(図10)。

【0061】

ヒトの気道上皮細胞(A549)の全細胞抽出物を利用して血清試料中のサイトケラチン18に対するIgG自己抗体を免疫プロット分析した結果、サイトケラチン18に対するIgG自己抗体は2名の健常な対照者及び気管支喘息でない3名のアレルギー性鼻炎患者では陰性であり、気管支喘息でない4名の非アレルギー性鼻炎患者では陽性であった(図11)。

30

【実施例2】**【0062】**

(気管支喘息及び慢性鼻炎患者の血清試料中のサイトケラチン18に対するIgG自己抗体のELISAによる検出)

マイクロタイタープレートにヒトの精製されたサイトケラチン18蛋白質を0.1M炭酸緩衝液(pH9.6)中ウエル当り0.5µgの濃度として4で16時間反応させた。0.05% Tween 20を含んだリン酸緩衝生理食塩水(PBST)で3回洗浄した後、3%ウシ胎児血清を含んだPBSTをウエル当り350µlずつ入れて室温で1時間インキュベートした。PBSTで3回洗浄した後、ウエルに3%ウシ胎児血清を含んだPBSTで希釈した血清試料を4連で100µl入れて2時間インキュベートした。3回洗浄した後、ウエルをペルオキシターゼが結合したヤギの抗ヒトIgG抗体(シグマ社)とともに2時間インキュベートした。3回洗浄後、各ウエルに100µlのTMB基質溶液(シグマ・ケミカル社)を添加した。10分後、100µlの2.5N H₂SO₄を各ウエルに添加して反応を停止させた。ELISAリーダーで450nmで吸光度を測定した。非アレルギー性喘息及び鼻炎患者2名の血清試料の吸光度値は、健常対照者10名のプール血清試料の吸光度値に比べて、有意に高かった(図6)。

40

【実施例3】**【0063】**

(血清試料中のサイトケラチン18に対するIgG自己抗体の検出を通じた気管支喘息治療法の処方方法)

50

静脈用免疫グロブリン、シクロスポリン、金、メトトレキセート、及びヒドロキシクロロキン等のいくつかの非ステロイド系免疫調節剤が重症喘息患者に有益なものと報告されてきたが、個々の患者ごとに治療効果が非常に多様であり、このような治療に対する反応を予測できるマーカーがないために、喘息治療におけるこれらの薬物の使用は複雑なままである。

【0064】

本発明は血清試料中のサイトケラチン18に対するIgG自己抗体の検出に基づいて重症喘息患者に対する静脈用免疫グロブリンを処方する方法を提供する。

非アレルギー性喘息及び鼻炎を有する2名の成人患者が喘息症状の悪化に因り病院に入院した。上記2名の患者に、高容量静脈コルチコステロイド投与(6時間当り62.5mgのメチルプレドニソロン)及び5日間の鼻内酸素供給を伴う最大用量の気管支拡張剤(サルブタモール)噴霧を含む喘息増悪に対する標準的治療を施した。しかしながら、これらの喘息症状及び肺機能は好転しなかった。患者らの同意を得た後、上記の標準的治療を継続しながら高用量の静脈用免疫グロブリン(0.4g/kg/日)を上記2名の患者に2日間(入院後6,7日)投与した。静脈用免疫グロブリン治療後、患者1は臨床的な喘息症状および客観的な肺機能パラメータが劇的に好転したが、患者2は有意な好転を表さなかった(表4)。

10

【0065】

表4は喘息の増悪に因って病院に入院した2名の非アレルギー性喘息及び鼻炎患者における喘息重症度の変化を示している。喘息重症度は吸入気管支拡張剤の使用前の午前7時に3回測定したピークフロー値(PEFR)の平均値で表した。

20

【0066】

【表4】

表4

患者1										
入院日	1	2	3	4	5	6*	7*	8	9	10
PEFR(L/分)	155	143	162	144	155	135	352	384	411	405

患者2										
入院日	1	2	3	4	5	6*	7*	8	9	10
PEFR(L/分)	191	213	181	193	187	205	220	183	208	228

30

* 静脈注射用免疫グロブリン(0.4g/kg/日)を入院第6日及び第7日に患者に投与した。

【0067】

入院1日目に採取した血清試料中のサイトケラチン18に対するIgG自己抗体の免疫ブロット検出の結果、患者1では陽性結果が表れ(図4、レーン1-3)、患者2では陰性結果が表れた。このような結果から、気管支喘息及び慢性鼻炎患者の血清試料中のサイトケラチン18に対するIgG自己抗体の検出を、静脈注射用免疫グロブリン治療を含む免疫調節治療に対する反応を予測するマーカーとして利用できることが分かる。

40

【産業上の利用可能性】

【0068】

本発明は、臨床的評価及び臨床検査の複雑な段階の代わりに、サイトケラチン18に対する自己抗体を検出する簡単な血液検査により気管支喘息及び慢性鼻炎患者を選別するのに利用され得る。また、本発明はサイトケラチン18に対する自己抗体を検出することにより、自己免疫現象を示す非アレルギー性気管支喘息及び慢性鼻炎患者を検出するのにも利用され得る。また、本発明はサイトケラチン18に対する自己抗体を検出することにより、自己免疫現象を示す気管支喘息及び慢性鼻炎患者を分類するのに使用することができる。ま

50

た、本発明はサイトケラチン18に対する自己抗体を検出することにより、気管支喘息及び慢性鼻炎患者のための特殊な治療法を処方するのに使用することができる。

【0069】

本発明はサイトケラチン18に対する自己抗体と関連がある気管支喘息及び慢性鼻炎患者を保護するための、サイトケラチン18蛋白質またはその断片を含む薬学的製剤に利用され得る。また、本発明は気管支喘息及び慢性鼻炎患者のサイトケラチン18に対する自己抗体がサイトケラチン18蛋白質またはサイトケラチン18発現細胞に結合する能力を抑制することができる薬学的化合物を同定するのに使用することもできる。

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1】血清試料中の、ヒト気道上皮細胞(BEAS-2B)抗原に対するIgG自己抗体の免疫ブロット分析結果を示す図。レーン1-3は健常な対照者の血清、レーン4-7はアレルギー性喘息及び鼻炎患者の血清、レーン8-11は非アレルギー性喘息及び鼻炎患者の血清、レーン12-14は全身性エリテマトーデス患者の血清、レーン15は陽性対照であって非アレルギー性喘息及び鼻炎患者の血清、レーン16は陰性対照であって希釈緩衝液だけである。矢印は49kDa自己抗原を表す。

【図2】精製された49kDa自己抗原をSDS-PAGEで分離して蛋白質染色した結果を示す図。レーン1：分子量標準、レーン2：気道上皮細胞(BEAS-2B)の全細胞抽出物、レーン3：イオン交換クロマトグラフィと逆相HPLCを利用して精製した49kDa自己抗原、レーン4：精製されたウシのサイトケラチン18蛋白質。

【図3】精製された49kDa自己抗原をトリプシン消化した後に得たペプチド断片を逆相HPLCによって分離したクロマトグラフを示す図。2個のペプチド断片分画(ピークAとピークB)のアミノ酸配列が分析された。

【図4】非アレルギー性喘息及び鼻炎患者(2名)の血清試料中のIgG自己抗体とサイトケラチン18蛋白質に対するモノクローナル抗体の免疫ブロット分析の結果を示す図。レーン1、4及び7は気道上皮細胞(BEAS-2B)の全細胞抽出物であり、レーン2、5及び8は精製された49kDa自己抗原、そして、レーン3、6及び9は精製されたウシのサイトケラチン18蛋白質である。2名の非アレルギー性喘息及び鼻炎患者の血清試料中の自己抗体(レーン1-3、レーン7-9)とサイトケラチン18蛋白質に対するモノクローナル抗体(レーン4-6)は、精製された49kDa自己抗原及び精製されたウシのサイトケラチン18を認識した。

【図5】健常者対照群(レーン1、2)、アレルギー性喘息及び鼻炎患者(レーン3)、非アレルギー性喘息及び鼻炎患者(レーン4-6)の血清試料中のヒトサイトケラチン18蛋白質に対するIgG自己抗体の免疫ブロット分析結果を示す図。陽性対照としてサイトケラチン18に対するモノクローナル抗体(レーン7)、陰性対照として希釈緩衝液のみ(レーン8)を使用した。*矢印はサイトケラチン18蛋白質を表す。

【図6】健常な対照者10名のプール血清及び非アレルギー性喘息及び鼻炎患者2名の血清試料中の、精製されたヒトサイトケラチン18蛋白質に対するIgG自己抗体のELISAによる検出結果を示す図。

【図7】健常な対照者(レーン1)、アレルギー性喘息及び鼻炎患者(レーン2-4)、及び非アレルギー性喘息及び鼻炎患者(レーン5-10)の血清試料中の、サイトケラチン18蛋白質に対するIgA自己抗体の免疫ブロット分析結果を示す図。サイトケラチン18に対するモノクローナル抗体を陽性対照(レーン11)として利用した。*矢印はサイトケラチン18蛋白質を示す。

【図8】健常対照者群(グループ1)、サイトケラチン18に対する検出可能なIgG自己抗体がないアレルギー性喘息及び鼻炎患者(グループ2)、サイトケラチン18に対する検出可能なIgG自己抗体がない非アレルギー性喘息及び鼻炎患者(グループ3)、及びサイトケラチン18に対するIgG自己抗体を有する非アレルギー性喘息及び鼻炎患者(グループ4)の血清試料における、気道上皮細胞(BEAS-2B)に対する補体を介した細胞毒性を示す図。

10

20

30

40

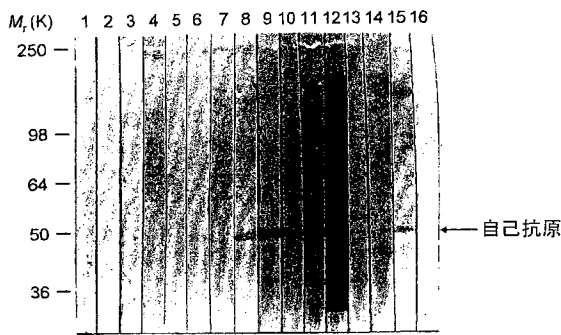
50

【図9】サイトケラチン18に対するIgG自己抗体を有する患者のプール血清試料（血清のみ）における気道上皮細胞（BESA 2B）に対する補体を介した細胞毒性、及び精製されたヒトサイトケラチン18蛋白質（血清+CK18）またはヒト血清アルブミン（血清+HSA）の添加による該細胞毒性の抑制を示す図。図示されたデータは、8回の独立の実験から得て平均値及び標準偏差で表されたものである。

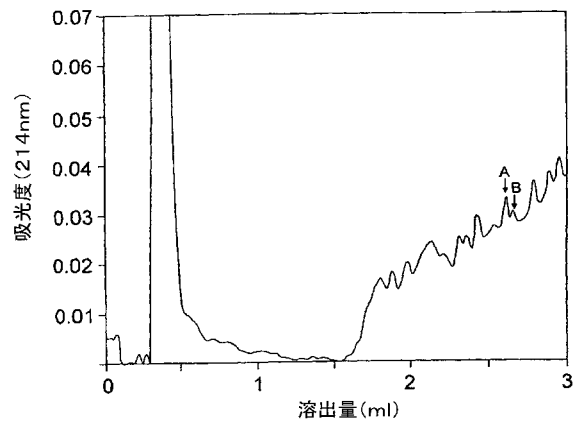
【図10】慢性鼻炎の臨床症状がないアレルギー性喘息患者（レーン1-3）及び慢性鼻炎の臨床症状がない非アレルギー性喘息患者（レーン4-7）の血清試料中の、精製されたヒトサイトケラチン18蛋白質に対するIgG自己抗体の免疫プロット分析結果を示す図。サイトケラチン18に対するモノクローナル抗体を陽性対照（レーン8）として使用した。*矢印はサイトケラチン18蛋白質を示す。

【図11】気管支喘息を伴わないアレルギー性鼻炎患者（レーン1-3）、気管支喘息を伴わない非アレルギー性鼻炎患者（レーン4-7）、及び健常者対照群（レーン9, 10）の血清試料中の、サイトケラチン18蛋白質に対するIgG自己抗体の免疫プロット分析結果を示す図。サイトケラチン18に対するモノクローナル抗体を陽性対照（レーン8）として使用した。*矢印はサイトケラチン18蛋白質を示す。

【図1】

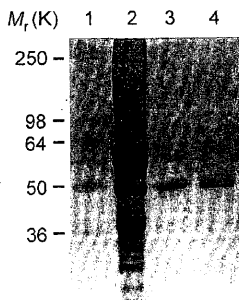


【図3】



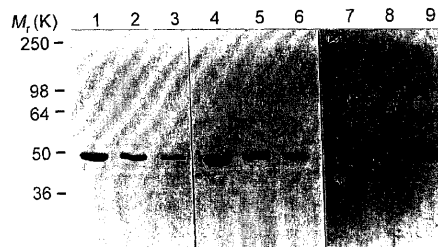
【図2】

FIG. 2



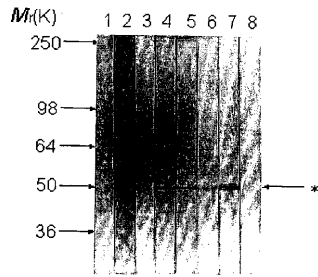
【図4】

FIG. 4



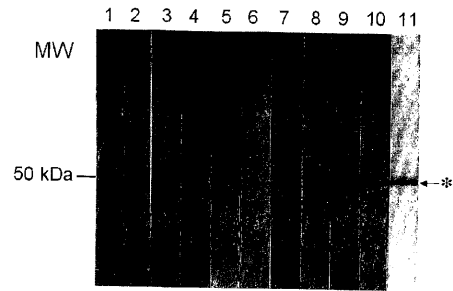
【 図 5 】

FIG. 5

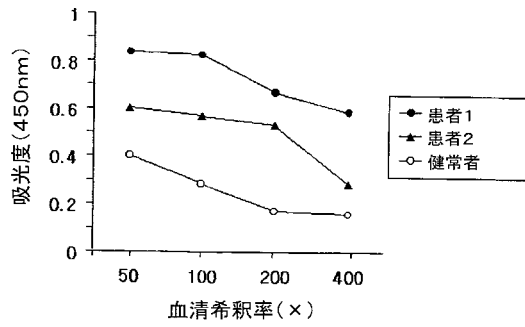


【 図 7 】

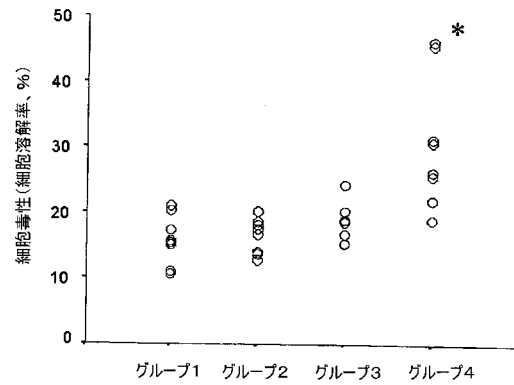
FIG. 7



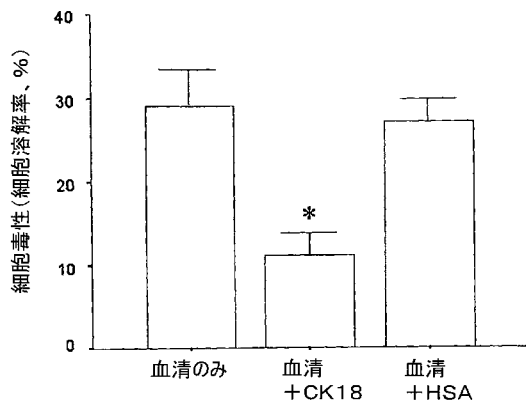
【 図 6 】



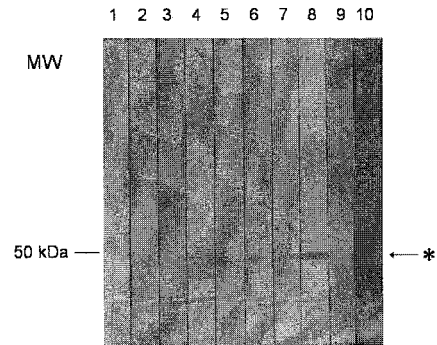
【 図 8 】



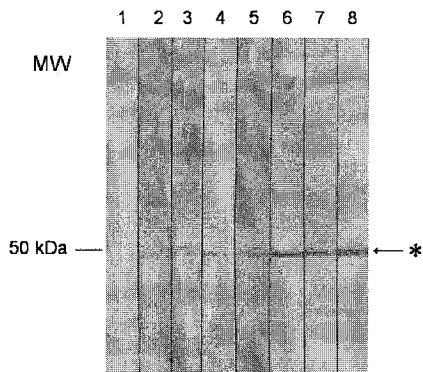
【 図 9 】



【 図 1 1 】



【 図 1 0 】



【配列表】

2005531754000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成17年1月12日(2005.1.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

患者における気管支喘息及び慢性鼻炎の疾患状態を検出するために、前記患者から得た体液中の、サイトケラチン18蛋白質に対する自己抗体を検出する方法であって、

サイトケラチン18蛋白質とサイトケラチン18に対する自己抗体との間の免疫複合体を形成するのに適当な条件下で前記体液をサイトケラチン18蛋白質と接触させる段階と

前記患者においてサイトケラチン18に対する自己抗体が存在することを表す前記免疫複合体の存在を検出する段階と

からなる方法。

【請求項2】

気管支喘息及び慢性鼻炎の疾患状態を検出することが、

気管支喘息及び慢性鼻炎を診断すること、

非アレルギー性の気管支喘息及び慢性鼻炎患者を検出すること、

サイトケラチン18に対する自己抗体に関連のある気管支喘息及び慢性鼻炎患者を検出すること、

気管支喘息及び慢性鼻炎に対して処方し治療すること、または

気管支喘息及び慢性鼻炎に対する治療の効果を観察すること

のいずれか1つである請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記サイトケラチン18蛋白質が、

哺乳類由来、

配列番号1のアミノ酸配列、またはサイトケラチン18に対する自己抗体との免疫学的反応性を有する前記配列の変形物もしくは断片、

配列番号2のアミノ酸配列、またはサイトケラチン18に対する自己抗体との免疫学的反応性を有する前記配列の変形物もしくは断片、または

サイトケラチン18に対する自己抗体と相互作用する能力を維持しているサイトケラチン18蛋白質断片

のいずれか1つである請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

患者の体液を用いて気管支喘息及び慢性鼻炎の疾患状態を検出するためのキットであって、

サイトケラチン18蛋白質と、

免疫学的反応のための培地を製造するための試薬と、

サイトケラチン18蛋白質とサイトケラチン18蛋白質に対する自己抗体の間の免疫複合体を検出することができる試薬と

を含むことを特徴とするキット。

【請求項5】

前記サイトケラチン18蛋白質が、

哺乳動物由来、

配列番号1のアミノ酸配列、またはサイトケラチン18に対する自己抗体との免疫学的

反応性を有する前記配列の変形物もしくは断片、

配列番号2のアミノ酸配列、またはサイトケラチン18に対する自己抗体との免疫学的反応性を有する前記配列の変形物もしくは断片、または

サイトケラチン18に対する自己抗体と相互作用する能力を維持しているサイトケラチン18蛋白質断片

のいずれか1つである請求項4に記載のキット。

【請求項6】

有効成分としてサイトケラチン18を含有する薬学的製剤。

【請求項7】

気管支喘息及び慢性鼻炎、

非アレルギー性の気管支喘息及び慢性鼻炎、または

サイトケラチン18に対する自己抗体に関連のある気管支喘息及び慢性鼻炎のいずれかである患者を治療し、保護するための、また該患者に投与するための、サイトケラチン18を含有する薬学的製剤。

【請求項8】

前記サイトケラチン18蛋白質が、

哺乳動物由来、

配列番号1のアミノ酸配列、またはサイトケラチン18に対する自己抗体との免疫学的反応性を有する前記配列の変形物もしくは断片、

配列番号2のアミノ酸配列、またはサイトケラチン18に対する自己抗体との免疫学的反応性を有する前記配列の変形物もしくは断片、または

サイトケラチン18に対する自己抗体と相互作用する能力を維持しているサイトケラチン18蛋白質断片

のいずれか1つである請求項6または7に記載の薬学的製剤。

【請求項9】

気管支喘息及び慢性鼻炎患者のサイトケラチン18に対する自己抗体とサイトケラチン18との間の結合を抑制可能な化合物をさらに含む請求項6または7に記載の薬学的製剤

【請求項10】

サイトケラチン18発現細胞に対する気管支喘息及び慢性鼻炎患者の自己抗体の細胞毒性作用を抑制可能な化合物をさらに含む請求項6または7に記載の薬学的製剤。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR 03/00933-0

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC ⁷ : G01N 33/48, A61K 39/00, A61P 11/00		
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)		
IPC ⁷ : G01N 33/48, A61K 39/00, A61P 11/00		
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)		
WPI, CAS, Medline, STN-registry		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	
	Relevant to claim No.	
A	DE 19716346 C1 (WAGNER, C.) 19 November 1998 (19.11.98) column 1, lines 1-5; claims.	1-20,48,49
A	DOBASHI, N. et al. Elevation of anti-cytokeratin 18 antibody and circulating cytokeratin 18: anti-cytokeratin 18 antibody immune complexes in sera of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. LUNG, 2000, Vol. 178, No. 3, pages 171-179, Medline-abstract [online], [retrieved on 13 June 2003 (13.06.03)]. Retrieved from: EPOQUE Medline Database, AN: NLM10871435 abstract.	1-52
A	NAKAMURA, H. et al. Elevated levels of cytokeratin 19 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with chronic airway inflammatory diseases--a specific marker for bronchial epithelial injury. American journal of respiratory and critical care medicine, 1997, Vol. 155, No. 4, pages 1217-1221, Medline-abstract [online], [retrieved on 13 June 2003 (13.06.03)]. Retrieved from: EPOQUE Medline Database, AN: NLM9105057 abstract.	1-20,48,49
<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	„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	
„E“ earlier application or patent but published on or after the international filing date	„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	
„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)	„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	
„O“ document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	„&“ document member of the same patent family	
„P“ document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
13 June 2003 (13.06.2003)	12 August 2003 (12.08.2003)	
Name and mailing address of the ISA/AT Austrian Patent Office Dresdner Straße 87, A-1200 Vienna Facsimile No. 1/53424/535	Authorized officer MOSSER R. Telephone No. 1/53424/437	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR 03/00933-0

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	NAHM, DH. al. Identification of Cytokeratin 18 as a Bronchial Epithelial Autoantigen Associated with Nonallergic Asthma. American journal of respiratory and critical care medicine, 1 June 2002, Vol. 165, pages 1536-1539. <i>the whole document.</i>	1-52

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR 03/00933-0**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.: 1-10, 38-50, 52
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claims 1-10, 38-50, 52 concern the treatment of the human or animal body by therapy or a method of diagnosis practised on the human or animal body (see PCT Rule 39.1 (iv)) the search was carried out and based on the alleged effects.
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR 03/00933-0

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE C1 19716346	19-11-1998	none	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	A 6 1 K 37/02	
// C 0 7 K 14/78	C 0 7 K 14/78	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IT,LU,MC,NL,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,M X,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100068755
弁理士 恩田 博宣

(74)代理人 100105957
弁理士 恩田 誠

(72)発明者 ナン、ドン - ホ
大韓民国 キョンギ - ド 4 4 9 - 8 4 3 ヨンイン - シ スジ - ウップ サンヒョン - リ 8 3
1 サンヨン アパートメント 2 1 7 - 1 7 0 2

(72)発明者 チョン、スク - ヨン
大韓民国 キョンギ - ド 4 4 9 - 8 4 3 ヨンイン - シ スジ - ウップ サンヒョン - リ 8 3
1 サンヨン アパートメント 2 1 7 - 1 7 0 2

Fターム(参考) 2G045 AA34 BB50 CB01 DA36 FB03 GC10
4C084 AA02 BA01 BA08 NA14 ZA341 ZA591
4C085 AA02 BB11
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA86 EA20 EA50

专利名称(译)	检测支气管哮喘和慢性鼻炎患者中抗细胞角蛋白18蛋白的自身抗体，以及含有哺乳动物细胞角蛋白18蛋白的试剂盒用于支气管哮喘和慢性鼻炎的用途		
公开(公告)号	JP2005531754A	公开(公告)日	2005-10-20
申请号	JP2004505686	申请日	2003-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	Nandonho NAHM东浩 Chonsukuyon JEON SOOK永		
申请(专利权)人(译)	南，唐 - 豪 钟，盘 - 延亨默		
[标]发明人	ナンドンホ チョンスクヨン		
发明人	ナン、ドン-ホ チョン、スク-ヨン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/00 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 C07K14/78 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/564 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/1709 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 G01N33/564 G01N2800/24 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.N A61K39/00.H A61P11/02 A61P11/06 G01N33/15.Z G01N33/50.Z A61K37/02 C07K14/78		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/GC10 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/NA14 4C084/ZA341 4C084/ZA591 4C085/AA02 4C085/BB11 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50		
代理人(译)	昂达诚		
优先权	1020020026765 2002-05-15 KR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明基于在患有支气管哮喘和慢性鼻炎的患者，特别是非过敏性患者的血清样品中对细胞角蛋白18蛋白自身抗体的令人惊讶的发现。本发明包括诊断方法和诊断试剂盒，以检测与细胞角蛋白18自身抗体有关的支气管哮喘和慢性鼻炎患者。细胞角蛋白18。本发明还包括包含细胞角蛋白18蛋白的药物制剂，以保护患有支气管哮喘和与自身抗体相关的慢性鼻炎的患者。本发明还包括治疗患有支气管哮喘和与自身抗体相关的慢性鼻炎的患者的方法。cytokeratin 18使用抑制此类自身抗体与cytokeratin 18蛋白相互作用的化合物。

