

(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2008-533454
(P2008-533454A)

(43) 公表日 平成20年8月21日(2008.8.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 E	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 A	
	GO 1 N 33/543 5 2 1	
	GO 1 N 33/543 Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2008-500106 (P2008-500106)
 (86) (22) 出願日 平成18年3月6日 (2006.3.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年10月22日 (2007.10.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2006/002043
 (87) 国際公開番号 W02006/094747
 (87) 国際公開日 平成18年9月14日 (2006.9.14)
 (31) 優先権主張番号 102005011421.0
 (32) 優先日 平成17年3月11日 (2005.3.11)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

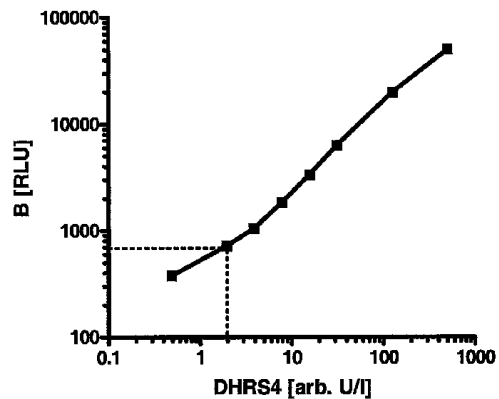
(71) 出願人 501154389
 ベー・エル・アー・ハー・エム・エス・ア
 クティエンゲゼルシャフト
 ドイツ・D-16761・ヘーニッヒスト
 ルフ・ノイエンドルフシュトラッセ・25
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症及び感染症のためのバイオマーカーとしての短鎖SRLアルコールデヒドロゲナーゼ (DHRS4) の測定

(57) 【要約】

敗血症性炎症及び感染症のex vivoにおける診断的検出、経過の予測、並びに経過及び治療のモニタリングのための液性バイオマーカーとしての、短鎖SRLアルコールデヒドロゲナーゼ (DHRS4 ; 配列番号 : 1) の使用。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

炎症及び感染症の診断的検出のための、並びに経過及び治療の予測及びモニタリングのための液性バイオマーカーとしての、短鎖SRLアルコールデヒドロゲナーゼ（DHRS4；配列番号：1）の使用。

【請求項 2】

患者の生物学的流体、特に血清または血漿において、DHRS4の、並びに／あるいはDHRS4免疫活性を有する病態生理学的に生じる断片、スプライシングバリエーション、及びDHRS4の翻訳後修飾型の発現及び／または量のex vivoにおける測定による、敗血症及び重い感染症の重篤度の測定のための、並びに経過及び治療をモニタリングするための、差別的な診断的早期検出及び検出における、請求項 1 に記載の使用。

10

【請求項 3】

敗血症及び重い感染症、特に敗血症様全身性感染症の重篤度の予測及び評価のための、並びに経過及び治療をモニタリングするための、差別的な診断的早期検出及び検出のためのex vivoにおける方法であって、短鎖SRLアルコールデヒドロゲナーゼ（DHRS4）の、並びに／あるいはDHRS4免疫活性を有する病態生理学的に生じる断片、スプライシングバリエーション、及びDHRS4の翻訳後修飾型の存在及び／または量を、患者の生物学的流体において測定すること、並びに敗血症または感染症の存在、予測される経過、重篤度、または治療の成果についての結論が、DHRS4免疫活性の検出及び／または量から得られることを特徴とする方法。

20

【請求項 4】

免疫診断的アッセイ方法であることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

サンドイッチアッセイの形態をとる、ヘテロジニアスなまたはホモジニアスな免疫診断的アッセイ方法であることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

同時に少なくとも1つのさらなる敗血症パラメーターが測定され、且つ少なくとも2つの測定変数のセットの形態をとる測定結果が得られ、優れた敗血症診断のためにまたは患者の層別化のために評価される、複数パラメーター測定の一部として実施されることを特徴とする、請求項 3 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記複数パラメーター測定の一部として、DHRS4免疫活性に加えて、プロカルシトニン、CA19-9、CA125、S100B、S100Aタンパク質、可溶性サイトケラチン断片、特にCYFRA21、TPS、及び／または可溶性サイトケラチン-1断片（sCY1F）、酵素アルドース-1-エピメラーゼ、グリシンN-アシルトランスフェラーゼ（GNAT）、Ce/Zn-SOD、カルバモイルリン酸シンターゼ（CPS）、及び前記酵素の断片、ペプチドinflammin、CHP、LASP-1、gastrophilin 1、並びに血管作動性ペプチドの前駆体、特にプロAMP、プロエンドセリン、4-バソプレシン、及びプロアドレノメジュリン、並びにサイトカイン、インターロイキン、TNF、及びC-反応性タンパク質（CRP）に由来する免疫活性からなる群から選択される少なくとも1つのさらなるパラメーターを測定することを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

40

【請求項 8】

前記複数パラメーター測定を、チップ技術測定装置または免疫クロマトグラフィー測定装置を用いることによる同時測定として実施することを特徴とする、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記測定装置で得られた複雑な測定結果の評価を、コンピュータープログラムの助けによって実施することを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

加速試験またはPOC（ポイント・オブ・ケア）試験として評価されることを特徴とする、請求項 3 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 11】

視覚的に検出可能な直接的標識付けを用いた免疫クロマトグラフィー法であることを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、炎症並びに感染症の、診断的検出のための、並びに経過及び治療の予測及びモニタリングのための方法に関するものであって、規定された指標に対して新規であるバイオマーカーを測定する。特に、本発明は、当該診断された炎症及び感染症が、敗血症の病理学的過程の複雑な経過の一部である前記タイプの方法に関する。

10

【0002】

以下の記載において、「診断」または「診断的」等の用語は、原則として、当該文脈から明らかでない場合には、議論される当該疾患の経過及び治療の予測 / 初期予測及びモニタリングのための、より特異的な差異診断及び適用を含むことも意図する単純化した総括的用語として用いられる。

【0003】

本発明は、敗血症の診断及び治療のさらなる改善に関して、本出願人による徹底的な研究にその出発点を有する。

【背景技術】

【0004】

敗血症と炎症との間の重要な用語において、及び定義によって科学的関係がある。ごく一般的に、種々の外部影響、例えば、損傷、火傷、アレルゲン、微生物（細菌、真菌、及びウイルス等）による感染症に対する、拒絶反応を誘発する外来性の組織に対する、あるいは、例えば、自己免疫疾患及びガンにおける身体の炎症を誘発する特定の内在的状态に対する器官の生理的防御反応を炎症と称する。

20

【0005】

炎症が、例えば、自己免疫疾患等におけるある内在的過程に対する身体の誤った反応の一部及び / または慢性的性質のものである場合、あるいはそれらが全身性炎症反応症候群（SIRS）の場合または感染症によって引き起こされた重い敗血症の場合におけるような全身の割合に達した場合、当該炎症は、炎症反応の特有の生理的過程がSIRS及び敗血症におけるような制御できなくなった場合に、生命にとって急性の脅威とさえなるかもしれない現実的な病理学的過程となる可能性がある。

30

【0006】

敗血症または敗血症性ショックの場合におけるような、全身性の炎症において、当該炎症特異的反応カスケードは、全身中にわたって無制御に広がり、過剰な免疫反応という意味において生命を脅かすものとなる。内在性の炎症特異的物質の個々の群の発現及び可能な役割についての現在の知識に関して、例えば、A. Beishuizenら、「Endogenous Mediators in Sepsis and Septic shock」, *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 33, 1999, 55-131; C. Gabayら、「Acute Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation」, *The New Journal of Medicine*, vol. 340, no. 6, 1999, 448-454を参照する。敗血症の理解、それによって、認定される定義もまた近年変化し改良されているため、用語・敗血症の最新の定義が付与されたK. Reinhartら、「Sepsis und septischer Schock [Sepsis and septic shock]」, *Intensivmedizin*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2001, 756-760、特に、Mitchell M. Levyら、「2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definition Conference」, *Crit Care Med* 2003, vol. 31, no. 4, 1250-1256を参照する。「重い敗血症」の臨床的画像の重要性に関して、Niels C. Riedemannら、「The Enigma of Sepsis」, *J. Clin. Invest.* 112: 460-467, 2003をさらに参照する。敗血症についての基準及び定義のより最近の概要、並びに密接に関連した臨床画像を、<http://www.talessin.de/scripte/medizin/sepsis1.html>で見るとも可能である。

40

本出願において、用語・敗血症は、特に敗血症、重い敗血症及び敗血症性ショックを含

50

む包括的な意味において、集中治療室にいる重篤な疾患の患者の敗血症の臨床画像に対して前記文献中にそれらがあるような定義に基づいて用いられる。

【0007】

少なくともヨーロッパ地域において、陽性の血液培養によって検出可能な全身性の細菌性感染症が、長い間、用語・敗血症を特徴づけしていたが、現在、敗血症は、感染によって引き起こされるが、病理学的過程として他の原因を有する全身性の炎症をとまなう非常に類似性のある全身性の炎症として主に理解されている。

【0008】

敗血症の理解の前記変化は、診断手法の変化に基づく。従って、細菌性の病原体の直接検出は、コンピューターの助けを借りたいわゆるスコアシステムの使用で実験室のパラメーター及び血行力学的パラメーターの複雑なモニタリング（例えば、APACHE II SCORE：「Acute Physiology and Chronic Health Evaluation」に対するAPACHEスタンダード；参照G. Pilzら, *Krankenpflege Journal* 29, 1981, 483-492、または特許DE-42 27 454 C1の序文）、及びより最近では、特に敗血症の過程または炎症過程に関わる特定の内在性の物質、例えば、特異的「バイオマーカー」の検出によって置き換えられ、または補足されている。

10

【0009】

多数の媒介物質及び急性期タンパク質としては、特にその発現が敗血症または敗血症のある段階に非常に特異的であり、その濃度が劇的且つ診断上有意に変化し、日常的測定に必要とされる安定性を特にex vivoにおいてさらに備え、且つ高い濃度値に達するものが、診断の目的に適している。病理学的過程（敗血症）のそれぞれのバイオマーカーとの信頼できる相互関係は、それが敗血症の過程に関わる、常に特異的に知られるべき内在性の物質の複雑なカスケードにおけるその役割に必要でなくても、診断の目的に根本的に重要なものである。しかし、敗血症患者を当該疾患の関連する原因を有する群、または当該疾患の類似した期待される過程を有する群へ、「層別化」の形式で、割り当てることができる（も）する、新規な特定のバイオマーカーの測定に関心が増大しており、それゆえ、可能な治療的手段の範囲から、最も適切なものを適用できる。この文脈において、John C. Marshallら, *Crit Care Med.*, 2003, vol. 31, no. 5, 1560-1567をさらに参照することができる。

20

【0010】

敗血症バイオマーカーとして特に適した確立された内在性の物質は、プロカルシトニン（PCT）である。プロカルシトニンは、健常者では実質的に検出できないが、感染性の病因（敗血症）の全身性炎症の状況下で、その濃度が非常に高い値に達するプロホルモンである。プロカルシトニンの高値は、敗血症の比較的早期の段階でさらに到達し、それゆえ、プロカルシトニンの測定は、敗血症の早期診断、及び他の原因を有する重篤な炎症からの感染症によって引き起こされた敗血症の早期の区別にも適している。敗血症マーカーとしてのプロカルシトニンの測定は、M. Assicotら, 「High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection」, *The Lancet*, vol. 341, no. 8844, 1993, 515-518、特許DE-42 27 454 C2、EP-0 656 121 B1、及びUS-5,639,617の文献の主題である。本記載を補足するために、前記特許、及び前記文献中で言及される初期の参考文献を特に参照する。

30

40

【0011】

敗血症診断における、バイオマーカーPCTを含むバイオマーカーの使用についての最新の議論を、Shawn D. Carriganらの総説「Toward Resolving the Challenges of Sepsis Diagnosis」, *Clinical Chemistry*, 50: 8, August 2004, 1301-1314にも見ることができる。

【0012】

敗血症マーカー・プロカルシトニンの可能性は敗血症研究に相当な刺激を与えており、プロカルシトニンの測定を補足し得る、並びに/あるいは正確な診断、差異診断、または層別化の目的のための付加的な情報を提供し得るさらなるバイオマーカーを見つけるため

50

の徹底的な努力が現在なされている。

【0013】

しかし、敗血症の過程に関わるある内在性の物質の正確な機能、または発現の正確な原因についてほとんどまたは何も知られていないという事実により、潜在的な新規な敗血症バイオマーカーに対する研究は複雑になっている。

【0014】

さらなる潜在的な敗血症マーカーの測定への、有益な、完全に仮説上のアプローチについての実験的調査の最初の結果は、本出願人による、DE-198 47 690 A1またはWO 00/22439に見ることができる。敗血症において、プロホルモン・カルシトニンの濃度が増加するだけでなく、ペプチドプロホルモンに数えられ、またはそのようなプロホルモンの断片であり、且つそのようなプロホルモンに特有の免疫活性を有するその他の物質に対する有意な濃度の増加を観察することができる。

10

【0015】

本出願は、さらなる敗血症特異的バイオマーカーの探索における、別の有益な、完全に実験的アプローチの結果である。これは、人工的敗血症として称され得る病理学的状態を、エンドトキシンの投与または細菌を用いた感染によって、霊長類（ヒヒ）において誘発するという事実に基づき、次いで、「敗血症性の」ヒヒにおいてのみ見られ、従って、潜在的な敗血症特異的バイオマーカーを表すペプチド性またはタンパク性の内在性物質を、エンドトキシン処理した及び未処理のヒヒについての、ゲル電気泳動タンパク質スポットサンプルの比較によって測定する。当該霊長類モデルは、霊長類及びヒトの生理機能の非常に高い類似性、並びに多くの治療上及び診断上のヒト試薬との高い交差反応性に基づいて選択された。

20

【0016】

本出願人の先行する特許出願の実験の章により正確に記載されているように、処理された動物においてのみ同定可能な多数のタンパク質スポットが、ヒヒにおける、エンドトキシン投与（サルモネラ菌由来のLPS）による人工的敗血症の実験的誘導、並びに処理された動物の組織の2Dゲル電気泳動による徹底的な調査の後に発見された。当該スポットに対応するタンパク質産物を電気泳動ゲルから単離し、マススペクトロメトリー法によって調査する（特に、タンデムマススペクトロメトリー法によって）。

【0017】

前記文献中ですでに議論されている敗血症マーカーに加え、本出願人の先行するドイツ及びヨーロッパ特許出願において初めて記載されているように、とりわけ、タンパク質「inflammin」（WO 02/085937）、CHP（WO/ 03/005035）、可溶性サイトケラチン-1断片（sCY1F；WO 03/002600）、タンパク質LASP-1（WO 03/089934）、及び酵素、例えば、アルドース-1-エピメラーゼ（ムタロターゼ；WO 03/048780）、グリシンN-アシルトランスフェラーゼ（GNAT；WO 03/04871）、及び可溶性カルバモイルリン酸シンターゼ1（CPS 1；WO 03/08993）が、前記方法によって新規な敗血症マーカーとして同定された。ホルモンANP（atrial-natriuretic peptide：心房性ナトリウム利尿ペプチド）の前駆体の中央領域断片の形態で測定され得る、プロテオーム解析の関連する方法、及び当該方法を用いることによって確立された敗血症マーカーに対して得られた結果についての議論が、J. Struckら、Immuno-analyse & biologie specialisee, 19, 2004, 131-137中に公示されている。

30

40

【0018】

本出願人の前記先行出願及び前記関連文献についての内容は、これらの出願及び文献の明白な参照によって、本出願の開示内容の補足部分として見なされるべきである。

【0019】

本発明の基礎は、ヒヒの肝臓抽出物を用いることによって記載されるタイプの調査において、LPSで処理したヒヒの抽出物中のみ発現し、健常なヒヒには存在しない物質を単離し、実験の章でより詳細に説明されるように、その物質が短鎖SRLアルコールデヒドロゲナーゼ（SCAD-SRLまたはDHRS4）として同定され得たことである。

50

【0020】

従って、本発明は、請求項1で請求されるように、最も広い意味において、炎症及び感染症、特に、敗血症性の病理学的過程の複雑な経過の一部であるものの、診断的検出のための、並びに経過及び治療の予測及びモニタリングのための液性バイオマーカーとしての、短鎖SRLアルコールデヒドロゲナーゼ (DHRS4) の使用に関する。

【0021】

ex vivoにおける敗血症診断のための好ましい診断的使用は、請求項2に記載される。

【0022】

請求項3から11は、敗血症診断のための好ましい方法、及びその好ましい開発に関する。

【0023】

実験の章でより詳細に記載されるように、短鎖SRLアルコールデヒドロゲナーゼ (DHRS4) として同定されたペプチド物質は、本出願人による調査中に同定された。

【0024】

DHRS4 (「デヒドロゲナーゼ/リダクターゼ (SDRファミリー) メンバー4」、別名: SCA D-SRL (C末配列SRLを有する「短鎖アルコールデヒドロゲナーゼ」)、ペルオキシソーム短鎖アルコールデヒドロゲナーゼ等) は、NAD-またはNADP-依存性酸化還元酵素の大きなファミリー (短鎖デヒドロゲナーゼ/リダクターゼファミリー (SDR)) (1) (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF00106>) に属する。これらの酵素は、約250-300個のアミノ酸を含み、通常、ホモ二量体またはホモ四量体として存在する。典型的に、前記SDRは2つのドメインを含み、一方は補酵素 (NADまたはNADP) に結合し、もう一方は基質に結合し、基質特異性を決定し、且つ触媒に関与している。ここで注目するDHRS4の基質特異性は、実験的に示されていない。しかし、配列類似性に基づき、DHRS4は、オールトランス-レチナール及び9-シス-レチナールを還元すると推定されている。さらに、基質は、芳香環を有するアルキルフェニルケトン及びアルファ-ジカルボニル化合物 (例えば、ピリミジン-4-アルデヒド、3-ベンゾイルピリジン、4-ベンゾイルピリジン、メナジオン、及び4-ヘキサノイルピリジン等) (<http://us.expasy.org/cgi-bin/niceprot.p1?q9nv08>) であるかもしれない。

DHRS4は、第14染色体上の遺伝子によってコードされている (<http://genecards.bcgsc.bc.ca/cgi-bin/carddisp?DHRS4&search=dhrs4&suff=txt>)。DHRS4のアミノ酸配列は、関連したcDNA配列に由来している。文献は、当該タンパク質のN末領域に関する種々の解釈を含む。従って、例えば、Clarkらは配列番号: 1に係る278アミノ酸を含む配列を提供している(2)。他の著者は、配列番号: 1に係る配列の位置18のメチオニンにおいてのみ、当該タンパク質の開始と考える(3)。

【0025】

より長いバリエーションが基礎として得られた場合、当該タンパク質の分泌を示し得るシグナル配列はN末端で同定され得る(2)。Fransenらの結果は、C末トリペプチドSRLによって示されるペルオキシソームの局在を示唆する傾向がある。そのようなC末構造は、PTS (peroxisomal targeting sequence: ペルオキシソーム標的配列) として知られる(4)。

【0026】

DHRS4は、明らかに種々の組織/器官で発現している (<http://genecards.bcgsc.bc.ca/cgi-bin/carddisp?DHRS4&search=dhrs4&suff=txt>)。

【0027】

さらに、種々の選択的スプライシングバリエーションがDHRS4に対して記載されている。現在、30の差別的にスプライシングされた転写物、及び従って30の異なる翻訳産物がNCBIによって予測されている (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&c=locusid&1=10901>)。しかし、さらなる2つのバリエーションのみがSWISSPROTデータベースに記載されている。

【0028】

WO 0153486は、DHRS4における可能なグリコシル化及びミリスチル化部位を予測して

10

20

30

40

50

いるが、しかし、実験的には証明されていない。

【 0 0 2 9 】

本出願において、名称DHRS4は、配列番号：1に係る単量体または多量体のタンパク質だけでなく、スプライシングバリエーション、断片、及び他の翻訳後修飾されたバリエーション、特に後記のアッセイにおいてDHRS4に相当する免疫活性を示すものを含む。

【特許文献1】WO 02/085937

【特許文献2】WO/ 03/005035

【特許文献3】WO 03/002600

【特許文献4】WO 03/089934

【特許文献5】WO 03/048780

【特許文献6】WO 03/08993

【特許文献7】WO 0153486

【特許文献8】DE-198 47 690 A1

【特許文献9】WO 00/22439

【非特許文献1】John C. Marshallら, Crit Care Med., 2003, vol. 31, no. 5, 1560-1567

【非特許文献2】Shawn D. Carriganら, 「Toward Resolving the Challenges of Sepsis Diagnosis」, Clinical Chemistry, 50: 8, August 2004, 1301-1314

【非特許文献3】J. Struckら, Immuno-analyse & biologie specialisee, 19, 2004, 131-137

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 3 0 】

病態生理学的な文脈において、WO 0153486は、とりわけ、DHRS4があるガン細胞で過剰発現し、それによって、ガンの治療のための攻撃部位及び組織サンプルからの診断として役立つことを開示している。しかし、感染症と敗血症の病理学的過程との関係は示されていない。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 3 1 】

これは、特にin vitro (ex vivo) における診断のための新しい発見物の使用に関する本出願において、初めてなされている。

【 0 0 3 2 】

診断目的のための生物学的流体のDHRS4の測定は、好ましくはex vivoにおいて免疫診断的アッセイ方法(リガンド結合アッセイ;免疫アッセイ)の助けで実施される。

【 0 0 3 3 】

当然、必要とされる特異性及び感度を仮定すると、既知の原理に従った任意のリガンド結合アッセイ/免疫アッセイ操作を、生物学的流体の、特に血清または血漿等の血液循環からのDHRS4の定量的または半定量的測定のために用いることができる。

【 0 0 3 4 】

好ましい実施態様において、当該方法はヘテロジニアス(heterogeneous)サンドイッチ免疫アッセイとして実施され、第一のDHRS4結合抗体は、任意の固相、例えばコーティングされた試験管の壁(例えばポリスチレンの;「コーティングされた試験管(coated tube; CT)」)、マイクロタイタープレート、例えばポリスチレンの、または粒子、例えば磁気粒子上に固定化され、さらなるDHRS4に特異的な抗体は、直接的に検出可能な標識を表す、または標識への選択的な連結を可能にする、且つ形成されたサンドイッチ構造の検出に役立つ残基を有する。適切な固相を使用した、遅延したまたは引き続く固定化もまた可能である。

【 0 0 3 5 】

放射性同位体、酵素、蛍光、化学発光、または生物発光標識を用いた標識付け、並びに、例えば、特にいわゆるポイント・オブ・ケア(POC)または加速試験に用いられるよう

10

20

30

40

50

な金原子及び着色粒子等の直接的な光学的に検出可能な色の標識付けを含む、記載されるタイプのアッセイに用いることができるすべての標識付け技術を使用することが原則として可能である。従って、本発明に係る方法を加速試験としても設計することは、本発明の範囲内である。

【0036】

DHRS4を測定する方法を、2つの抗体及び検出されるべきDHRS4から形成されるサンドイッチ複合体が液相中で懸濁されたままの状態であるホモジニアスな (homogeneous) 検出方法を用いることによっても実施することができる。そのような場合において、両抗体が1つのサンドイッチ中で一体化された際に、シグナルの発生またはシグナルの点火を可能にする検出系の一部で、両抗体を標識付けすることが好ましい。そのような技術を、特に 10
蛍光増幅または蛍光減衰検出方法として設計することができる。このタイプの特に好ましい方法は、例えば、US-A-4 822 733、EP-B1-180 492、またはEP-B1-539 477、及びそれらの中に引用される先行技術に記載されているような、対で用いられるべき検出試薬の使用に関する。それらは、1つの免疫複合体中に両方の標識付け成分を含む反応産物のみを、反応混合物中で選択的に直接検出する測定を可能にする。例として、TRACE (登録商標) (Time Resolved Amplified Cryptate Emission: 時間分解増幅クリプテート発光) 及びK RYPTOR (登録商標) の商標で提供され、前記出願の教示を満たす技術を参照することができる。

【0037】

しかし、ヘテロジニアスサンドイッチ免疫アッセイの場合においてもまた、DHRS4に特異的な2つの抗体は、ホモジニアスアッセイに関連してちょうど記載されたタイプの検出系の一部を有することができる。 20

【0038】

下記に示すように、検出可能な発現の状況において、ヒヒ肝臓抽出物中のDHRS4の発現は、エンドトキシン刺激及び前記感染症を誘導する前記「敗血症」と結びつけられる。未処理コントロールでは、最初に引用された文献と一致して、DHRS4の検出はできなかった。従って、DHRS4は潜在的な敗血症マーカーである。

【0039】

下記に、本発明を7個の図に関連してより詳細に説明する。

【0040】

図1は、健常なヒヒの可溶性の肝臓タンパク質 (A) のスポットサンプルの、LPSの注射によって敗血症を誘発された5時間後のヒヒの肝臓タンパク質 (B) との比較を可能にする2Dゲルの拡大断面図を示す。丸は、本発明に係る敗血症特異的産物DHRS4の位置を示す。 30

【0041】

図2Aは、前記敗血症特異的タンパク質スポットのトリプシン消化の選択されたペプチド断片についての、ESI-MS/MSタンデムマススペクトロメトリー法の結果を示す。前駆体イオンのタンデムマススペクトル = 669.76。当該スペクトルの解釈は、アミノ酸配列A (K / Q) DGAHVVになる。

【0042】

図2Bは、前記敗血症特異的タンパク質スポットのトリプシン消化の選択されたペプチド断片についての、ESI-MS/MSタンデムマススペクトロメトリー法の結果を示す。前駆体イオンのタンデムマススペクトル = 814.44。当該スペクトルの解釈は、アミノ酸配列TAST DG (I/L) GSになる。 40

【0043】

図3は、DHRS4のアミノ酸配列を示す (配列番号: 1も参照)。注目の構造成分を強調する。推定される - 折りたたみシート構造及び - ヘリックスは、Kalberg Yら, 2002 (15) 及びJorvall Hら, 1995 (1) に明記される配列と同定され、輪郭線を描いた。同様の比較によって保存的アミノ酸が同定され、これらは影つきの背景を有する。SDRファミリーの他のメンバーについて、多量体化の場合における接触部位は、4 (E) 及び 5 (F) 領域であることが明記されていた。Jornvall Hら, 1995 (1)。DHS2 (SWISSPROT登録Q1 50

3268) との配列比較によれば、NAD/NADPに対する結合部位は位置36-59の領域である。

【0044】

免疫化用のペプチドとして用いられた配列領域を、太字及びイタリックで示す(位置19-30、209-228、230-247、256-278)。

【0045】

図4は、本出願において測定のために章5.1で用いられた、DHRS4サンドイッチ免疫アッセイの典型的スタンダード曲線を示す(コーティングされた試験管における化学発光アッセイ; 位置209-228(ペプチドPLE20; 固相)及び位置256-278(ペプチドPSL23; トレーサー)の領域に対する抗体)。スタンダードとして働き、任意のユニットがそれに基づく、ウマ正常血清中の組換えDHRS4含有大腸菌抽出物の希釈。2 V/Lという機能的アッセイ感度が示されている。

10

【0046】

図5は、試験健常者及び敗血症患者の50の血漿サンプル中のそれぞれの場合において測定された、図4に従うアッセイで測定されたDHRS4免疫活性を示す。2 U/lという機能的アッセイ感度が示されている。

【0047】

図6は、DHRS4に対する異なるサンドイッチアッセイ用の方法の比較を示す。血漿サンプルを異なるアッセイで測定した。当該アッセイで用いられた抗体のペプチドエピトープを軸上に示す。相関係数は、 $r = 0.97$ (A)、 $r = 0.95$ (B)、 $r = 0.94$ (C)である。

【0048】

図7Aは、DHRS4 (DHS4_HUMAN) と配列DHS2_HUMANとの配列比較を示す(ClustalWプログラム)。同一のアミノ酸を星印で特徴づけし、構造的に関連するアミノ酸を点で特徴づける。ペプチドとして合成され、抗体の作製に用いられた、DHRS4のそれらの配列領域に印をつける。

20

【0049】

図7Bは、DHRS4 (DHS4_HUMAN) とSWISSPROTデータベース(ClustalWプログラム)において同定された2つのスプライシングバリエーションとの配列比較を示す。同一のアミノ酸を星印で特徴づける。ペプチドとして合成され、抗体の作製に用いられた、DHRS4のそれらの配列領域に印をつける。

【実施例】

30

【0050】

[実験結果]

< 1. 動物モデル(ヒヒ)におけるエンドトキシン投与による感染刺激 >

エンドトキシン注射によってプロカルシトニン分泌を刺激するためにヒヒを用いて実施された試験に関して(5, 6)、約2歳、体重27-29kgのオスのヒヒ(Papio ursinus)にそれぞれ、体重kgあたり100 µgのLPS(サルモネラ菌由来のリポポリサッカライド; 供給元: Sigma社)を静脈内投与した。投与の5-5.5時間後に、当該動物を10mLのdoletalの静脈内投与によって殺した。それらの死の直後に、肝臓を調製し、液体窒素中で凍結させることによって安定化させた。

【0051】

40

さらなる処理において、前記凍結させた肝臓のサンプル(1g)を、窒素で冷却する間、1.5mLのバッファ-A(50mM Tris-HCl、pH 7.1、100mM KCl、20%グリセロール、1mM Pefabloc、プロテアーゼインヒビターカクテル「Complete」(Roche社): 1.5mLのバッファ-Aあたり、2mL中に1錠の溶液0.2 µL)と混合し、磁器乳鉢中で粉碎し、粗挽き粉にした(7)。ホモジネートを水浴中で6×10秒間、超音波で処理し、4 で40分間、100,000gで遠心分離し、得られた上清を単離した。残った細胞沈殿物を、前記のように、再び窒素下で粉碎し、超音波で処理し、遠心分離した。それから生じる第二の上清を、第一の上清と合わせ、さらなる処理に必要となるまで-80 で保存した。

【0052】

< 2. ヒヒの肝臓抽出物を用いたプロテオーム比較解析 >

50

一方で(コントロール)健常なヒヒ、もう一方でLPSを注射されたヒヒの肝臓タンパク質抽出物を、プロテオーム解析に用いた。分析用の2Dゲル電気泳動において、150 µgのタンパク質を含む肝臓抽出物、9M尿素、70mM DTT、2%両性電解質pH 2-5に調整し、次いで、分析用2Dゲル電気泳動を用いて分離した(8)。当該2D電気泳動ゲル中のタンパク質の可視化は、銀染色によって実施された(9)。

【0053】

評価のために、未処理の動物のサンプルのタンパク質スポットパターンを、処理された動物の肝臓組織サンプル由来のタンパク質スポットパターンと比較した。図1は、コントロールサンプル(A)とLPSで処理された動物のサンプル(B)に対する2D電気泳動ゲルの比較を示す。分析用2Dゲル電気泳動のタンパク質スポットパターンにおいて同定された差異的に発現するタンパク質を、引き続いてさらに350 µgのタンパク質を用いた調製用2Dゲル電気泳動によって調製した後、見かけ上約29,000ダルトンの分子量及び見かけ上約8.0-8.2の等電点を有する(B)中のさらなるタンパク質スポットを、マスペクトロメトリー法によって分析した。

10

【0054】

調製用2Dゲル電気泳動において、染色はクーマシーブリリアントブルーG250を用いて実施された(10)。

【0055】

さらなる分析のためにあらかじめ選択されたタンパク質スポットを、前記ゲルから切り出し、公知の方法(11)を用いてトリプシン消化にさらし、次いで、生じたトリプシン断片をエレクトロスプレー・マスペクトロメトリー(ESI-MS)によって分析した(12-14)。

Micromass社製(UK)のナノフローのZ-スプレーイオン供給を備える、Q-TOFマスペクトロメーターを用いた。前記装置のメーカーの操作指示書に従った。

20

【0056】

< 3 . 短鎖SRLアルコールデヒドロゲナーゼ(DHRS4)の同定 >

それぞれの場合において、前記選択されたスポットのトリプシン消化されたタンパク質の親スペクトル由来の個々のペプチド(「タグ」)を、ESI-MS/MSによって同定した。これらの断片に対して得られたマスペクトルを、それ自体既知の方法で計算的に評価できた。当該ESI-MS/MS配列タグに関するデータベース検索を、カリフォルニア大学サンフランシスコ・マスペクトロメトリー施設のタンパク質探索サーバー(Server Protein Prospector)上にある、MS-Edman(<http://falcons.ludwig.ucl.ac.uk/ucshtml3.2/msedman.htm>)の助けによって実施した。

30

【0057】

図2Aは、例として、質量669.76及び当該スペクトルから読み取られた配列A(K/Q) DGAHV V(KとQはマスペクトロメトリーによって区別できない)を有するペプチドに対するMS/MS結果を示す。図2Bは、質量814.44、結果のスペクトル、TASTDG(I/L)GS(IとLはマスペクトロメトリーによって区別できない)を有するさらなるペプチドを示す。

【0058】

両アミノ酸配列を、NCBI nr.18.09.00またはNCBI nr.6.17.2000データベースの哺乳類タンパク質の全配列と比較した。両ペプチド(A(K/Q) DGAHV V及びTASTDG(I/L)GS)に対する最高的一致が、ヒトタンパク質DHRS4(peroxisomal short chain alcohol dehydrogenase:ペルオキシソーム短鎖アルコールデヒドロゲナーゼ):AQDGAHV V及びTASTDGIGFの一部に関して見つかった。この同定は、明白であると見なされるべきである。ヒトDHRS4(配列番号:1)に対して、分子量29.5kDa及び等電点8.8が算出される。これらの値は、実験的に観察された値(前記参照)に非常に近く、当該同定結果を裏付ける。

40

【0059】

前述の本出願人の多くの調査において特に何度も繰り返して見られ、且つヒヒにおいて人工的に誘発させた敗血症の結果に基づく、ヒヒ及びヒトの病態生理学的反応の高い類似性に基づき、感染したまたは敗血症のヒト患者において生じる状態は、記載されるヒヒ動物モデルにおけるものと実質的に同一であると推測されてよい。この基本的推測は、健常

50

者と敗血症患者のヒト血漿中のDHRS4の免疫診断的測定によって立証された。

【0060】

この目的のために、DHRS4に対するサンドイッチ免疫アッセイを開発し、それをもって種々の患者群の血液循環中のDHRS4の発現を調べた。

【0061】

< 4 . DHRS4免疫アッセイのためのアッセイ成分の調製 >

4 . 1 ペプチド合成

DHRS4に対する抗体の作製のために、DHRS4のアミノ酸配列由来の部分的ペプチドを合成し、それをもってヒツジを免疫化した(図3)。当該ペプチドを選択する際、天然DHRS4に結合するのに適した抗体を作製する目的で、前記タンパク質の二次、三次、及び四次構造についての情報を考慮した。

10

【0062】

DHRS4の既知のアミノ酸配列に由来した、4つの領域が選択された(位置19-30、209-228、230-247、256-278)。当該領域(位置19-30及び230-247のそれぞれの場合において、N末のシステイン残基によって補足された)を標準的な方法によって可溶性ペプチドとして化学的に合成し、精製し、マススペクトロメトリー及び逆相HPLCによって品質管理し、且つ分取して凍結乾燥した(JERINI AG社, Berlin, Germany)。

【0063】

前記ペプチドのアミノ酸配列は以下のとおりである。

PML CMASSGMTRRDPL (配列番号: 2)
 PLE20 CLAPGLIKTSFSRMLWMDKE (配列番号: 3)
 PED19 CEESMKETLRIRRLGEPED (配列番号: 4)
 PSL23 CSEDASYITGETVVVGGGTPSRL (配列番号: 5)

20

【0064】

4 . 2 接合及び免疫化

前記ペプチドPML13、PLE20、PED19、及びPSL23を、MBS(m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)によって、キャリアタンパク質KLH(キーホール・リンペット・ヘモシアニン)と接合させた(PIERCE社, Rockford, IL, USAからの操作指示書「NHS-エステル-マレイミド架橋剤」を参照)。以下の計画に従って、ヒツジをこれらの接合体で免疫化した。まず、各ヒツジは100µgの接合体(当該接合体のペプチド画分に基づいて定められた質量)を受け、次いで、それぞれの場合において4週間ごとに50µgの接合体(当該接合体のペプチド画分に基づいて定められた質量)を受けた。当該免疫化の開始後4ヶ月目から、ヒツジあたり700mLの血液を採取し、遠心分離によってそれから血清を得た。接合、免疫化、及び抗血清の単離は、MicroPharm社(Carmarthenshire, UK)によって実施された。

30

【0065】

4 . 3 抗体の精製

ペプチド特異的抗体を、免疫化後4ヶ月目から得られていた抗血清から、1-ステップ法で調製した。

【0066】

この目的のために、まず、前記ペプチドPML13、PLE20、PED19、及びPSL23をSulfoLinkゲルにカップリングさせた(PIERCE社, Rockford, IL, USAからの操作指示書「SulfoLinkキット」を参照)。それぞれの場合において、カップリング用ゲル5mLあたり、5mgのペプチドを提供した。

40

【0067】

前記ペプチドに対するヒツジ抗血清からのペプチド特異的抗体のアフィニティー精製を、以下のように実施した。

【0068】

まず、ペプチドカラムを、それぞれ10mLの溶出バッファー(50mMクエン酸、pH 2.2)及び結合バッファー(100mMリン酸ナトリウム、0.1% Tween、pH 6.8)で交互に3回洗浄した

50

。100mLの抗血清を0.2 μ mのフィルターに通し、現存するカラム物質をそれらに添加した。この目的のために、ゲルを10mLの結合バッファーでカラムから定量的に洗い出した。室温で回転させながら、インキュベーションをオーバーナイトで実施した。バッチを空カラムに定量的に移した（NAP25、Pharmacia社、空にした）。流出物を捨てた。次いで、カラムを250mLの結合バッファーで洗浄し、タンパク質を含まない状態にした（洗浄溶出液のタンパク質含有量は <0.02 A 280nm）。洗浄されたカラムに溶出バッファーを添加し、1mL画分を回収した。各画分のタンパク質含有量を、BCA法によって測定した（PIERCE社、Rockford, IL, USAの操作指示書を参照）。タンパク質濃度 >0.8 mg/mLを有する画分をプールした。BCA法による前記プールのタンパク質測定後、抗PML13抗体に対しては57mgの収量、抗PLE20抗体に対しては56mg、抗PED19抗体に対しては12mg、及び抗PSL23抗体に対しては99mgの収量が得られた。

10

【0069】

4.4 抗体の標識付け

NAP-5ゲルろ過カラム（Pharmacia社）を用いて、それぞれ500 μ Lの前記精製された抗PLE20、抗PED19、及び抗PSL23抗体（前記参照）を、それぞれの場合において、1mLの100mMリン酸カリウムバッファー（pH 8.0）で再バッファー処理した。当該抗体溶液のタンパク質濃度を、100mMリン酸カリウムバッファー（pH 8.0）で1.5mg/mLに調整した。

【0070】

化学発光標識付けのために、すべての抗体を以下のようにさらに処理した。10 μ LのMA70アクリジニウムNHSエステル（1mg/mL；HOECHST Behring社製）を、67 μ Lの前記抗体溶液に添加し、室温で15分間インキュベーションを行った。その後、423 μ Lの1Mグリシンを添加し、さらに10分間インキュベーションを行った。その後、操作指示書に従って、標識付けバッチを、NAP-5ゲルろ過カラム（Pharmacia社）を用いて、1mLの可動相A（50mMリン酸カリウム、100mM NaCl、pH 7.4）中で再バッファー処理し、それにより、低分子量成分がなくなった。抗体に結合していない標識の最終的残渣を分離除去するために、ゲルろ過HPLCを実施した（カラム：Walters Protein Pak SW300）。当該サンプルをアプライし、可動相Aを用いて1mL/minの流速でクロマトグラフィーによって分離した。流動（flow-through）光度計を用いることによって、280nmと368nmの波長を測定した。前記抗体の標識付けの程度の量としての吸収率368nm/280nmは、最大で 0.10 ± 0.01 であった。単量体の抗体を含有する画分（保持時間8-10分間）を集め、3mLの100mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl、5%ウシ血清アルブミン、0.1%アジ化ナトリウム、pH 7.4中に回収した。

20

30

【0071】

4.5 抗体の固定化

照射した5mLのポリスチレン試験管（Greiner社製）を、精製した抗PML13抗体または抗PLE20抗体で以下のようにコーティングした。前記抗体を、50mM Tris、100mM NaCl、pH 7.8で、6.6 μ g/mLの濃度に希釈した。前記溶液の300 μ Lを、それぞれの試験管の中にピペットで移した。前記試験管を22 $^{\circ}$ Cで20時間インキュベートした。前記溶液を吸引した。次いで、各試験管を4.2mLの10mMリン酸ナトリウム、2% Karion FP、0.3%ウシ血清アルブミン、pH 6.5で充填した。20時間後、当該溶液を吸引した。最後に、当該試験管を真空乾燥機中で乾燥させた。

40

【0072】

< 5. DHRS4免疫アッセイの手順及び評価 >

5.1 ヒト血漿中のDHRS4の測定

約2 U/Iの機能的アッセイ感度を有するDHRS4（位置209-228の領域またはペプチドPLE20、及び256-278またはペプチドPSL23に対する抗体）に対するサンドイッチ免疫アッセイを開発した（典型的なスタンダード曲線：図4を参照）。

【0073】

健常者と敗血症患者の血漿サンプルをこのアッセイを用いることによって測定した（図5）。健常者のすべてのサンプルは、機能的アッセイ感度より下の測定値を示し、敗血症患者の50サンプルのうちの38は、機能的アッセイ感度より上の測定値を示した。100%の特

50

異性において、76%の診断感度という結果になった。

【0074】

5.2 ヒト血清におけるDHRS4の免疫診断的測定 - 方法の比較

方法の比較において、DHRS4の他のエピトープに対する抗体を使用するサンドイッチアッセイは、5.1で用いられた前記アッセイと比較可能な結果をもたらした(図6)。

【0075】

この目的のために、DHRS4に対する合計3つのサンドイッチ免疫アッセイを確立し、以下の抗体を用いて操作した。

a) 固相: 抗PLE20、トレーサー: 抗PSL23 (5.1参照)

b) 固相: 抗PLE20、トレーサー: 抗PED19

c) 固相: 抗PML13、トレーサー: 抗PLE20

10

【0076】

それぞれの場合において用いられたスタンダード物質は、形質転換された大腸菌 (InVi vo GmbH社、Hennigsdorf、Germany) 由来の抽出物の形態の組換えヒトDHRS4であった。DHRS4遺伝子のクローニング及び発現は、分子生物学の標準的な方法によって実施された。当該抽出物を、ウマ正常血清 (Sigma社製) で連続的に希釈した。任意のユニットにおける濃度は、それによって作製されたスタンダードに基づいた。

【0077】

測定されたサンプルは、外見上健常者及び敗血症に罹患した患者のEDTA血漿であった。

【0078】

前記3つのサンドイッチ免疫アッセイを、同様に以下のように調製した。100 µLのスタンダードまたはサンプル、及び100万RLU (relative light units: 相対的光ユニット) のそれぞれMA70標識された抗体を含有する100 µLのアッセイバッファー (100mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl、5%ウシ血清アルブミン、0.1%非特異的ヒツジIgG、0.1%アジ化ナトリウム、pH 7.4) を、抗体をコーティングしたそれぞれの試験管の中にピペットで移した。攪拌しながら、22 °Cで20時間インキュベーションを行った。その後、試験管あたりそれぞれ1mLの洗浄溶液 (0.1% Tween 20) で4回洗浄し、当該試験管を水切りさせ、当該試験管に結合した化学発光を、ルミノメーター中で測定した (BERTHOLD社製LB952T; BRAHMS AG社製の基本試薬)。

20

【0079】

MultiCalcソフトウェア (スプラインフィット) を用いることによって、前記サンプルのDHRS4濃度をスタンダード曲線から読み取った。

30

【0080】

5.3 免疫診断的DHRS4測定のための推定される干渉作用の評価

前記選択されたペプチドに対して作製された抗体が、DHRS4 (SCAD-SLR) 以外のヒトタンパク質/ペプチドとも交差反応し得るかどうかを評価するために、「Quickblast」を用いて、SWISSPROTデータベースに存在するすべてのヒト配列と比較した。DHRS4との類似性を有し、実施された前記3つのサンドイッチアッセイバリエーションで用いられたそれらの抗体に対するエピトープに相当する領域を含むことが分かったそれらの配列を、より詳細に分析した。DHRS4の2つのスプライシングバリエーション、及びDHRS2遺伝子の産物を発見した (図7A, 7B)。前記抗PLE20抗体が配列LWMDKEのみを認識する場合 (実験的に調べられていない) に、当該2つのスプライシングバリエーションとの交差反応性が予想された。しかし、配列相同性が低いため、DHRS2遺伝子の産物との交差反応性は、完全には除外できないものの、起こりそうにないと考えられる。

40

【0081】

DHRS4が血球中にも存在し、ただし、このことがサンプリング (溶血、血小板の不完全分離) に適しているかどうか知られていないため、試験健常者のEDTA血液を超音波によって完全に溶血し、次いでDHRS4に関して測定した。1-3 U/lの濃度が検出された (データは示さず)。このことは、DHRS4は、部分的な溶血または部分的な血小板の不完全分離が測定された結果に問題となる影響を及ぼさないような低い濃度で、血球中に存在することを

50

示している。

【 0 0 8 2 】

不明瞭なままのものは、敗血症の間、DHRS4が血液循環に入るメカニズムである。

【 0 0 8 3 】

(参考文献)

参考文献

1. Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J., and Ghosh, D. 1995. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* 34:6003-6013.
2. Clark, H.F., Gurney, A.L., Abaya, E., Baker, K., Baldwin, D., Brush, J., Chen, J., Chow, B., Chui, C., Crowley, C., et al. 2003. The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment. *Genome Res* 13:2265-2270. 10
3. Fransen, M., Van Veldhoven, P.P., and Subramani, S. 1999. Identification of peroxisomal proteins by using M13 phage protein VI phage display: molecular evidence that mammalian peroxisomes contain a 2,4-dienoyl-CoA reductase. *Biochem J* 340 (Pt 2):561-568. 20
4. Gould, S.J., Keller, G.A., Hosken, N., Wilkinson, J., and Subramani, S. 1989. A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* 108:1657-1664. 30
5. Redl, H., Schlag, G., Togel, E., Assicot, M., and Bohuon, C. 2000. Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: relationship to cytokines and neopterin. *Crit Care Med* 28:3659-3663.
6. Redl, H., and Schlag, G. 1998. Non-human primate models of sepsis. *Sepsis* 2:243-253.
7. Klose, J. 1999. Fractionated extraction of total tissue proteins from mouse and human for 2-D electrophoresis. *Methods Mol Biol* 112:67-85. 40
8. Klose, J., and Kobalz, U. 1995. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications

- for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 16:1034-1059.
9. Heukeshoven, J., and Dernick, R. 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9:28-32. 10
 10. Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9:255-262.
 11. Otto, A., Thiede, B., Muller, E.C., Scheler, C., Wittmann-Liebold, B., and Jungblut, P. 1996. Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis using an effective sample preparation for mass spectrometry. *Electrophoresis* 17:1643-1650. 20
 12. Neubauer, G., King, A., Rappsilber, J., Calvio, C., Watson, M., Ajuh, P., Sleeman, J., Lamond, A., and Mann, M. 1998. Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat Genet* 20:46-50. 30
 13. Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., and Cech, T.R. 1997. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276:561-567.
 14. Mann, M., and Pandey, A. 2001. Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleotide and protein sequence databases. *Trends Biochem Sci* 26:54-61. 40
 15. Kallberg, Y., Oppermann U., Jörnvall H. and Persson, B., *Eur. J. Biochem.* 269, 4409-4417 (2002)

【図面の簡単な説明】

【 0 0 8 4 】

【図 1 A】 健常なヒヒの可溶性の肝臓タンパク質 (A) のスポットサンプルの、LPSの注射によって敗血症を誘発された5時間後のヒヒの肝臓タンパク質 (B) との比較を可能にする 50

2Dゲルの拡大断面図を示す。丸は、本発明に係る敗血症特異的産物DHRS4の位置を示す。

【図1B】健常なヒヒの可溶性の肝臓タンパク質(A)のスポットサンプルの、LPSの注射によって敗血症を誘発された5時間後のヒヒの肝臓タンパク質(B)との比較を可能にする2Dゲルの拡大断面図を示す。丸は、本発明に係る敗血症特異的産物DHRS4の位置を示す。

【図2A】前記敗血症特異的タンパク質スポットのトリプシン消化の選択されたペプチド断片についての、ESI-MS/MSタンデムマススペクトロメトリー法の結果を示す。前駆体イオンのタンデムマススペクトル = 669.76。当該スペクトルの解釈は、アミノ酸配列A (K/Q) DGAHVVになる。

【図2B】前記敗血症特異的タンパク質スポットのトリプシン消化の選択されたペプチド断片についての、ESI-MS/MSタンデムマススペクトロメトリー法の結果を示す。前駆体イオンのタンデムマススペクトル = 814.44。当該スペクトルの解釈は、アミノ酸配列TASTDG (I/L) GSになる。

【図3】DHRS4のアミノ酸配列を示す。推定される α -折りたたみシート構造及び β -ヘリックスに輪郭線を描いた。保存的アミノ酸は影つきの背景を有する。免疫化用のペプチドとして用いられた配列領域を、太字及びイタリックで示す(位置19-30、209-228、230-247、256-278)。

【図4】本出願において測定のために章5.1で用いられた、DHRS4サンドイッチ免疫アッセイの典型的スタンダード曲線を示す(コーティングされた試験管における化学発光アッセイ; 位置209-228(ペプチドPLE20; 固相)及び位置256-278(ペプチドPSL23; トレーサー)の領域に対する抗体)。スタンダードとして働き、任意のユニットがそれに基づく、ウマ正常血清中の組換えDHRS4含有大腸菌抽出物の希釈。2 U/Lという機能的アッセイ感度が示されている。

【図5】試験健常者及び敗血症患者の50の血漿サンプル中のそれぞれの場合において測定された、図4に従うアッセイで測定されたDHRS4免疫活性を示す。2 U/lという機能的アッセイ感度が示されている。

【図6A】DHRS4に対する異なるサンドイッチアッセイ用の方法の比較を示す。血漿サンプルを異なるアッセイで測定した。当該アッセイで用いられた抗体のペプチドエピトープを軸上に示す。相関係数は、 $r = 0.97$ (A)である。

【図6B】DHRS4に対する異なるサンドイッチアッセイ用の方法の比較を示す。血漿サンプルを異なるアッセイで測定した。当該アッセイで用いられた抗体のペプチドエピトープを軸上に示す。相関係数は、 $r = 0.95$ (B)である。

【図6C】DHRS4に対する異なるサンドイッチアッセイ用の方法の比較を示す。血漿サンプルを異なるアッセイで測定した。当該アッセイで用いられた抗体のペプチドエピトープを軸上に示す。相関係数は、 $r = 0.94$ (C)である。

【図7A】DHRS4 (DHS4_HUMAN) と配列DHS2_HUMANとの配列比較を示す(ClustalWプログラム)。同一のアミノ酸を星印で特徴づけし、構造的に関連するアミノ酸を点で特徴づける。ペプチドとして合成され、抗体の作製に用いられた、DHRS4のそれらの配列領域に印をつける。

【図7B】DHRS4 (DHS4_HUMAN) とSWISSPROTデータベース(ClustalWプログラム)において同定された2つのスプライシングバリエーションとの配列比較を示す。同一のアミノ酸を星印で特徴づける。ペプチドとして合成され、抗体の作製に用いられた、DHRS4のそれらの配列領域に印をつける。

10

20

30

40

【 1 A 】

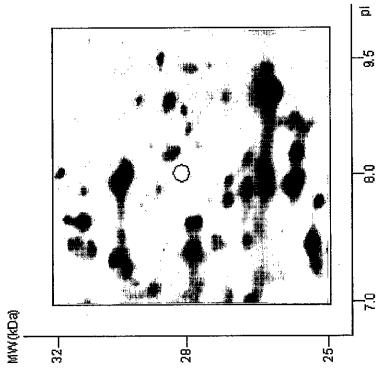


FIGURE 1A

【 1 B 】

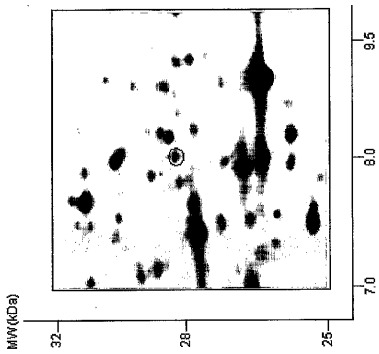


FIGURE 1B

【 2 A 】

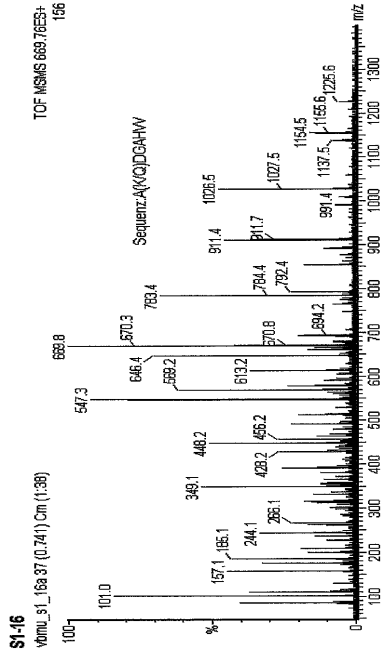


FIGURE 2A

【 2 B 】

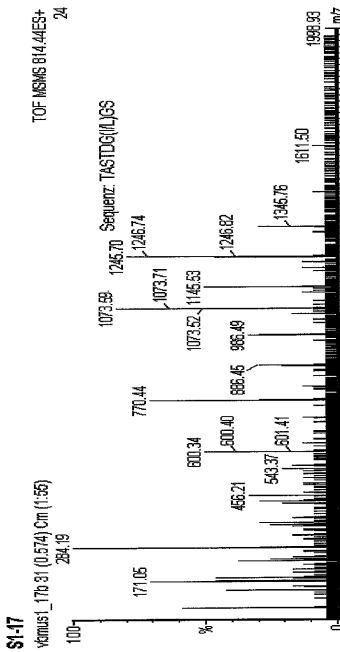


FIGURE 2B

【 3 】

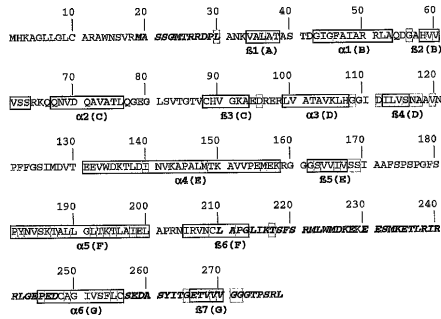


FIGURE 3

【 4 】

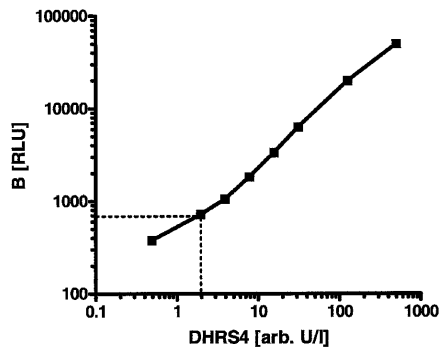
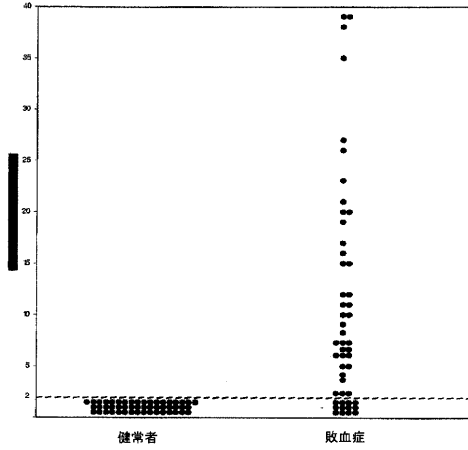


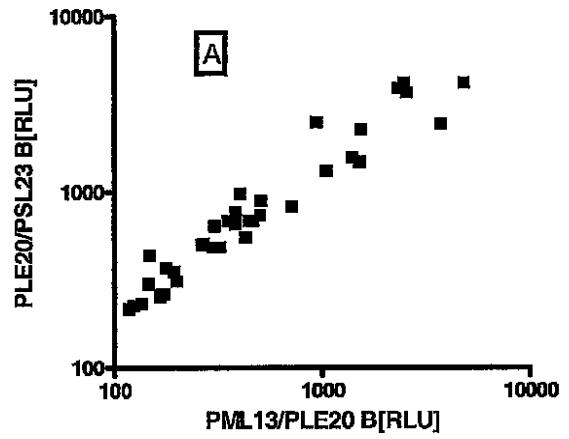
FIGURE 4

【 図 5 】



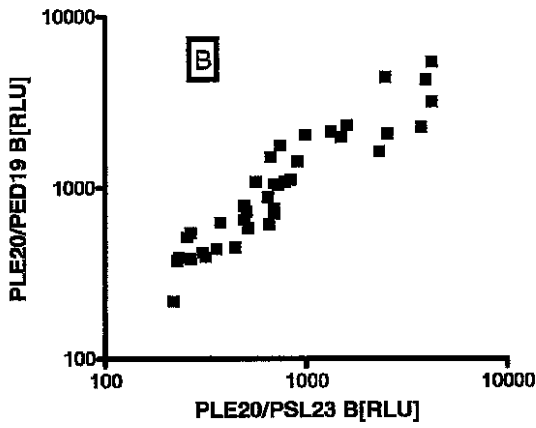
FIGUR 5

【 図 6 A 】



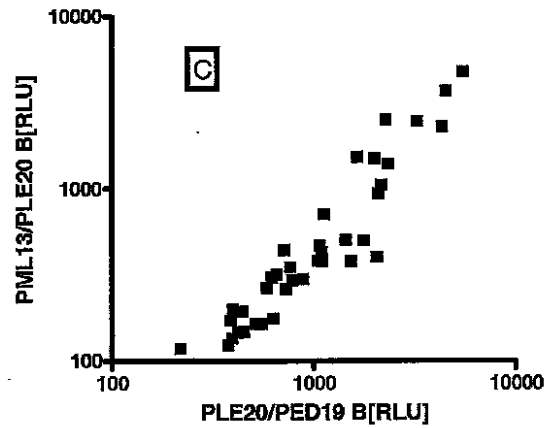
FIGUR 6A

【 図 6 B 】



FIGUR 6B

【 図 6 C 】



FIGUR 6C

【 図 7 A 】

```

sp | 099762 | DB84_HUMAN | RSRQVREEDDANKVALVDAPTDSIGFATARRLAQDAHVVSSRQKQWQDAVTLQ
sp | Q13268 | DB82_HUMAN | RSRQVREEDDANKVALVDAPTDSIGFATARRLAQDAHVVSSRQKQWQDAVTLQ
sp | 099762 | DB84_HUMAN | KGLSVFQVCHVEGAEISRLVAZAVLEGGIDILVSMANVFFQSLNDVREYVDRYL
sp | Q13268 | DB82_HUMAN | KGLSVFQVCHVEGAEISRLVAZAVLEGGIDILVSMANVFFQSLNDVREYVDRYL
sp | 099762 | DB84_HUMAN | DITVKAALATKAVVPEMUKKGGGVIVSIAAFQPSPOFPTVSKTLLGLLCTLA
sp | Q13268 | DB82_HUMAN | DITVKAALATKAVVPEMUKKGGGVIVSIAAFQPSPOFPTVSKTLLGLLCTLA
sp | 099762 | DB84_HUMAN | ELAPMILVWCAKGLIKISFERNLNDKSGSRKRTLRIRLGRPEKAGVDFECS
sp | Q13268 | DB82_HUMAN | ELAPMILVWCAKGLIKISFERNLNDKSGSRKRTLRIRLGRPEKAGVDFECS
sp | 099762 | DB84_HUMAN | DAITLIDKSTVYGGDFTRH
sp | Q13268 | DB82_HUMAN | DAITLIDKSTVYGGDFTRH

```

FIGUR 7A

【 図 7 B 】

```

ap | 099722 | MS4_HUMAN | MASRSTFSDHPLANKVALVTAFTDQIGFALARRLQDGMVVVSRKQQN
ap_v1 | 099722-1 | 099722 | MASRSTFSDHPLANKVALVTAFTDQIGFALARRLQDGMVVVSRKQQN
ap_v1 | 099722-3 | 099722 | MASRSTFSDHPLANKVALVTAFTDQIGFALARRLQDGMVVVSRKQQN
*****
ap | 099722 | MS4_HUMAN | VDGAVLQGRSLSPVPCVYVKAERRLVAVVLEGGIDIVSNGA
ap_v1 | 099722-1 | 099722 | VDGAVLQGRSLSPVPCVYVKAERRLVAVVLEGGIDIVSNGA
ap_v1 | 099722-3 | 099722 | VDGAVLQGRSLSPVPCVYVKAERRLVAVVLEGGIDIVSNGA
*****
ap | 099722 | MS4_HUMAN | VHPFQSTEDVPRVWQKLDINVEAALMFEAVVPMKKGSGGVIVS
ap_v1 | 099722-1 | 099722 | VHPFQSTEDVPRVWQKLDINVEAALMFEAVVPMKKGSGGVIVS
ap_v1 | 099722-3 | 099722 | VHPFQSTEDVPRVWQKLDINVEAALMFEAVVPMKKGSGGVIVS
*****
ap | 099722 | MS4_HUMAN | SIANFSGSFGSFPYVSKVLLGLTKTLAELAPMIRVWLAQGLTKS
ap_v1 | 099722-1 | 099722 | SIANFSGSFGSFPYVSKVLLGLTKTLAELAPMIRVWLAQGLTKS
ap_v1 | 099722-3 | 099722 | SIANFSGSFGSFPYVSKVLLGLTKTLAELAPMIRVWLAQGLTKS
*****
ap | 099722 | MS4_HUMAN | FSRRLNRDPLSRKSKFSLRLEGEFEEKAGTVSPFSDRSLVYFQKLV
ap_v1 | 099722-1 | 099722 | FSRRLNRDPLSRKSKFSLRLEGEFEEKAGTVSPFSDRSLVYFQKLV
ap_v1 | 099722-3 | 099722 | FSRRLNRDPLSRKSKFSLRLEGEFEEKAGTVSPFSDRSLVYFQKLV
-----
LAWDEKREEMKSTLRRLRLESDCAQIVSLCEDASTTPQSPV
*****
ap | 099722 | MS4_HUMAN | VVGGDFSRRL
ap_v1 | 099722-1 | 099722 | VVGGDFSRRL
ap_v1 | 099722-3 | 099722 | VVGGDFSRRL
*****

```

FIGUR 7B

【 配 列 表 】

2008533454000001 . app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/002043

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 G01N33/569		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
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, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/003162 A (INCYTE CORPORATION; ELLIOTT, VICKI, S; MASON, PATRICIA, M; RICHARDSON,) 8 January 2004 (2004-01-08) claims 1,11,30 sequence 5 page 1, line 4 - line 9	1-11
A	US 2002/160392 A1 (BOTSTEIN DAVID ET AL) 31 October 2002 (2002-10-31) paragraph [0041] - paragraph [0061]	1-11
<input 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 29 May 2006		Date of mailing of the international search report 06/06/2006
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, Fac (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gundlach, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/002043

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004003162 A	08-01-2004	AU 2003245747 A1	19-01-2004
US 2002160392 A1	31-10-2002	US 2003032060 A1	13-02-2003
		US 2003054447 A1	20-03-2003
		US 2002182618 A1	05-12-2002
		US 2002164646 A1	07-11-2002
		US 2002192668 A1	19-12-2002
		US 2002098505 A1	25-07-2002
		US 2002098506 A1	25-07-2002
		US 2002098507 A1	25-07-2002
		US 2003077657 A1	24-04-2003
		US 2003027256 A1	06-02-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/002043

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
INV. G01N33/68 G01N33/569		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RESEARCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)		
G01N		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff 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, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, Sequence Search		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2004/003162 A (INCYTE CORPORATION; ELLIOTT, VICKI, S; MASON, PATRICIA, M; RICHARDSON,) 8. Januar 2004 (2004-01-08) Ansprüche 1,11,30 Sequenz 5 Seite 1, Zeile 4 - Zeile 9	1-11
A	US 2002/160392 A1 (BOTSTEIN DAVID ET AL) 31. Oktober 2002 (2002-10-31) Absatz [0041] - Absatz [0061]	1-11
<input type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*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)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*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</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*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</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Abschließendes Datum des internationalen Recherchenberichts	
29. Mai 2006	06/06/2006	
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 661 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Gundiach, B	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/002043

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2004003162 A	08-01-2004	AU 2003245747 A1	19-01-2004
US 2002160392 A1	31-10-2002	US 2003032060 A1	13-02-2003
		US 2003054447 A1	20-03-2003
		US 2002182618 A1	05-12-2002
		US 2002164646 A1	07-11-2002
		US 2002192668 A1	19-12-2002
		US 2002098505 A1	25-07-2002
		US 2002098506 A1	25-07-2002
		US 2002098507 A1	25-07-2002
		US 2003077657 A1	24-04-2003
		US 2003027256 A1	06-02-2003

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, 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, DE, 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

(72)発明者 アンドレアス・ベルグマン

ドイツ・1 2 3 5 1・ベルリン・パウムロイファーヴェーク・4 7

(72)発明者 ヨアヒム・シュトルック

ドイツ・1 3 4 6 5・ベルリン・ツェルンドルファー・ヴェーク・5 2 A

(72)発明者 モニカ・ユーライン

ドイツ・1 0 4 0 7・ベルリン・フーフェラントシュトラッセ・1 5

专利名称(译)	测量短链SRL醇脱氢酶 (DHRS4) 作为炎症和感染的生物标志物		
公开(公告)号	JP2008533454A	公开(公告)日	2008-08-21
申请号	JP2008500106	申请日	2006-03-06
[标]申请(专利权)人(译)	布拉姆斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	裴埃尔啊她IMS股份公司		
[标]发明人	アンドレアスベルグマン ヨアヒムシュトルック モニカユーライン		
发明人	アンドレアス・ベルグマン ヨアヒム・シュトルック モニカ・ユーライン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/536 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N33/6893 G01N2800/26		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/536.E G01N33/543.501.A G01N33/543.521 G01N33/543.ZNA		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	102005011421 2005-03-11 DE		
其他公开文献	JP5090332B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

使用短链SRL醇脱氢酶 (DHRS 4; SEQ ID NO : 1) 作为体液生物标志物，用于离体诊断检测脓毒性炎症和感染，预测病程，以及监测病程和治疗。

