

(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2015-529633

(P2015-529633A)

(43) 公表日 平成27年10月8日 (2015. 10. 8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18 Z N A	4 B O 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 H O 4 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

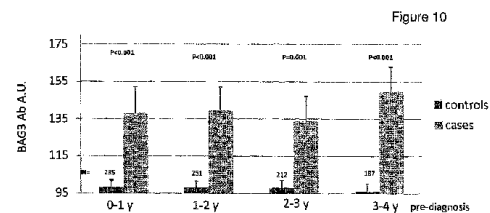
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 54 頁)

(21) 出願番号	特願2015-517672 (P2015-517672)	(71) 出願人	514324829
(86) (22) 出願日	平成25年6月11日 (2013. 6. 11)		ビオユニヴェルサ ソシエタ ア レスポ
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月18日 (2015. 2. 18)		ンサビリタ リミタータ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/061976		イタリア アイー84084 (サレルノ
(87) 国際公開番号	W02013/189778		) フィシャーノ ヴィア ジョバンニ
(87) 国際公開日	平成25年12月27日 (2013. 12. 27)		パオロ セコンド 132 アット ディ
(31) 優先権主張番号	12172531.1		ファルマ ユニヴェルシタ ディ サレル
(32) 優先日	平成24年6月19日 (2012. 6. 19)		ノ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	110001243
			特許業務法人 谷・阿部特許事務所
		(72) 発明者	マリア カテリナ タルコ
			イタリア アイー83100 (アヴェリー
			ーノ) アベリノ ヴィア ブリガータ
			アヴェリーノ 33
		Fターム (参考)	4B024 AA11 AA12 CA12 HA12
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生化学的血清マーカーおよび組織マーカーとしてのBAG3

(57) 【要約】

本開示は、診断用生物学的マーカーの分野に関する。具体的には、開示は、病理学的状態の診断の生物学的マーカーとしての使用のための抗BAG3抗体に関する。さらに、開示は、生物学的試料中の抗BAG3抗体またはBAG3 / 抗体複合体を検出および評価するための特定のELISA法およびキットを伴う。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

病理学的状態の診断における使用のための抗 B A G 3 抗体。

【請求項 2】

前記抗 B A G 3 抗体は、可溶性 B A G 3 と結合して免疫複合体を形成することを特徴とする請求項 1 に記載の使用のための抗 B A G 3 抗体。

【請求項 3】

前記診断は、インビトロまたはエキソビボであることを特徴とする請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載の使用のための抗 B A G 3 抗体。

【請求項 4】

前記診断の受容個体は、哺乳類、好ましくはヒトであることを特徴とする請求項 1 または 3 のいずれか一項に記載の使用のための抗 B A G 3 抗体。

【請求項 5】

前記病理学的状態は、心臓疾患、癌、糖尿病、炎症および炎症性関連疾患であって、皮膚、神経、骨、血管および結合組織の炎症および炎症性関連疾患から選択されることを特徴とする請求項 1 または 4 のいずれか一項に記載の使用のための抗 B A G 3 抗体。

【請求項 6】

前記心臓疾患は、狭心症、梗塞前狭心症、心筋梗塞、心不全、虚血、急性冠疾患、急性心不全、慢性心不全、および医原性心疾患から選択されることを特徴とする請求項 5 に記載の使用のための抗 B A G 3 抗体。

【請求項 7】

前記癌は、膀胱癌、膀胱癌、および前立腺癌から選択されることを特徴とする請求項 5 に記載の使用のための抗 B A G 3 抗体。

【請求項 8】

生物学的試料における、抗 B A G 3 抗体または抗 B A G 3 抗体が可溶性 B A G 3 に結合して形成された免疫複合体の存在を検出する方法であって、

a . 血清、血漿、尿、または唾液からなる生物学的試料を得るステップと、

b . 生物学的試料における抗 B A G 3 または B A G 3 関連抗体の存在を決定するステップと

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 9】

c . 生物学的試料から得た値を、基準値または健康な提供者から得た値と比較するステップ

をさらに含むことを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記決定ステップ b は、E L I S A 検査により実施されることを特徴とする請求項 6 または 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記血清、血漿、尿、または唾液は、哺乳類、好ましくはヒト由来であることを特徴とする請求項 6 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗 B A G 3 抗体または前記免疫複合体の存在は、病態と関連することを特徴とする請求項 6 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記病理学的状態は、心臓疾患、癌、炎症および炎症性関連疾患であって、皮膚、神経、骨、血管、および結合組織の炎症および炎症性関連疾患から選択されることを特徴とする請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記心臓疾患は、狭心症、梗塞前狭心症、心筋梗塞、心不全、急性冠疾患、虚血、急性心不全、慢性心不全、または医原性心疾患から選択されることを特徴とする請求項 13 に

10

20

30

40

50

記載の方法。

【請求項 15】

前記癌は、膀胱癌、膀胱癌、および前立腺癌から選択されることを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

生物学的試料における抗 B A G 3 抗体または抗 B A G 3 抗体が可溶性 B A G 3 に結合して形成された免疫複合体の検出のための E L I S A キットの使用であって、B A G 3 組換えタンパク質または可溶性 B A G 3 を捕捉する B A G 3 特異的マウスモノクローナル抗体 A C - 1、A C - 2、A C - 3、A C - 4 および A C - 5、ならびにヒト免疫グロブリンを認識することができる抗体を含むことを特徴とする E L I S A キットの使用。

10

【請求項 17】

前記生物学的試料は、血清、血漿、尿、または唾液試料であることを特徴とする請求項 16 に記載の使用。

【請求項 18】

前記血清、血漿、尿、または唾液試料は、哺乳類、好ましくはヒト由来であることを特徴とする請求項 17 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、病理学的状態の診断における生化学的マーカーとしての使用のための抗 B A G 3 抗体に関する。

20

【背景技術】

【0002】

B A G 3 (基準配列 : N P _ 0 0 4 2 7 2 ; 遺伝子 I D 9 5 3 1) は、粗面小胞体に特に集中している 7 4 k D a の細胞質タンパク質である。B A G 3 タンパク質は、B A G ドメイン (1 1 0 ~ 1 2 4 アミノ酸) として知られている構造ドメインを介して熱ショックタンパク質 H S P 7 0 の A T P アーゼドメインと相互作用する、コシャペロンのファミリーに属する。B A G ドメインに加えて、B A G 3 は、W W ドメインおよびプロリン豊富反復 (P X X P) を含有し、これらは他のタンパク質への結合を仲介することができる。さらに、2 つの保存 I P V (I l e - P r o - V a l) モチーフが、W W 領域と P X X P 領域の間に配置されており、分子シャペロンの H s p B ファミリーのメンバーである、H s p B 8 への B A G 3 の結合を仲介する。したがって、B A G 3 は、そのマルチドメイン構造のアダプター性質に起因して、異なるパートナータンパク質と相互作用することができる。b a g 3 遺伝子発現は、筋細胞を含む少数の正常な細胞型および幾つかの原発性腫瘍または腫瘍細胞系から構成される。さらに、b a g 3 遺伝子発現は、多様なストレスにより誘発される。事実、ストレス性の刺激は、b a g 3 を含むストレス活性化遺伝子の発現の原因である、熱ショック転写因子 (H S F) 1 を活性化する (非特許文献 1 参照) 。証拠は、B A G 3 が、細胞状況に応じて I K K γ 、B a x または B R A F などのアポトーシス調節タンパク質のレベルまたは局在化を、H s p 7 0 依存または非依存様式のいずれかにより調節することによって、細胞生存の維持において役割を有することを示している。

30

40

【0003】

B A G 3 タンパク質は、心筋芽細胞 (c a r d i o m y o b l a s t) 分化の際に発現し、ミオゲニン発現を維持すると思われる。これらの知見は、後期心臓発生における B A G 3 の関与を示している (非特許文献 2 参照) 。さらに、心筋細胞における B A G 3 は、Z 板に局在化して、アクチンキャッピングタンパク質 C a p Z β 1 と相互作用すること、筋原線維構造を安定化すること、および機械的ストレスの間、筋原線維の完全性をおそらく保存することを示している。B A G 3 突然変異は、Z 板会合を損ない、ストレス誘発性アポトーシスに対する感受性を増加する可能性がある。心筋細胞における、一般には筋肉細胞における生存および筋原線維完全性についての B A G 3 の役割を踏まえると、b a g

50

3 遺伝子の突然変異は、筋原線維性ミオパチーおよび拡張型心筋症の幾つかの形態と関連している。現在まで、細胞質 BAG3 および BAG3 の可溶性セリカル (s e r i c a l) 形態の両方が、検出されており、異なる病状はもとより、より一般的には細胞生存に関連することが見出されている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Rosati A, Graziano V, De Laurenzi V, Pascale M, Turco MC. BAG3: a multifaceted protein that regulates major cell pathways. Cell Death Dis. 2011; 2: e141 10

【非特許文献2】De Marco M, Turco MC, Rosati A. BAG3 protein is induced during cardiomyoblast differentiation and modulates myogenin expression. Cell Cycle. 2011; 10: 850 - 852

【非特許文献3】Menon et al., BMJ, 337: a2079, 2008

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

驚くほど特異的であり繊細な方法による侵襲的な診断に関連する欠点を有することなく、そのような病状の迅速な同定を可能にする、および/または病状の早期検出、療法の効果のモニター、合併症の危険性の予測、情報提供性追跡の実施を可能にすることができる、生物学的マーカーの同定についての必要性および重要性が、ますます感じられている。 20

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、病理学的状態の診断における生化学的マーカーとしての使用のための抗 BAG3 抗体に関する。

【0007】

好ましくは、前記抗 BAG3 抗体は、可溶性 BAG3 に結合して、免疫複合体を形成する。 30

【0008】

本発明の好ましい実施形態によると、前記診断は、インビトロまたはエキソビボである。

【0009】

本発明のさらなる態様は、前記診断の受容個体が、哺乳類、好ましくはヒトであるということである。

【0010】

発明を実施するための形態においてさらに記載されているように、本発明の抗 BAG3 抗体の使用は、心臓疾患、癌、糖尿病、皮膚、神経、骨、血管および結合組織の炎症および炎症性関連疾患からなる群から選択される病理学的状態に特異的であるという利点を有する。 40

【0011】

本発明の実施形態によると、前記心臓疾患は、狭心症、梗塞前狭心症、心筋梗塞、心不全、虚血、急性冠疾患、急性心不全、慢性心不全および医原性心疾患から選択される。

【0012】

本発明の別の実施形態によると、前記癌は、膵癌、膀胱癌および前立腺癌から選択される。

【0013】

本発明のさらなる実施形態は、生物学的試料における、抗 BAG3 抗体または抗 BAG3 抗体が可溶性 BAG3 に結合して形成された免疫複合体の存在を検出する方法であって 50

、

a . 血清、血漿、尿または唾液からなる生物学的試料を得るステップと、

b . 生物学的試料における抗 B A G 3 または B A G 3 関連抗体の存在を決定するステップと

を含む方法である。

【 0 0 1 4 】

好ましい実施形態によると、本発明の方法は、

c . 生物学的試料から得た値を、基準値または健康な提供者から得た値と比較する追加のステップをさらに含む。

【 0 0 1 5 】

好ましい実施形態において、前記決定ステップ b は、E L I S A 検査により実施される。

【 0 0 1 6 】

本発明の好ましい実施形態によると、前記血清、血漿、尿または唾液は、哺乳類、好ましくはヒト由来である。

【 0 0 1 7 】

本発明の方法における好ましい実施形態によると、前記抗 B A G 3 抗体または前記免疫複合体の存在は、病態に関連する。

【 0 0 1 8 】

好ましくは、前記病態は、心臓疾患、癌、糖尿病、皮膚、神経、骨、血管および結合組織の炎症および炎症性関連疾患からなる群から選択される。

【 0 0 1 9 】

好ましくは、前記心臓疾患は、狭心症、梗塞前狭心症、心筋梗塞、心不全、虚血、急性冠疾患、急性心不全、慢性心不全および医原性心疾患から選択される。

【 0 0 2 0 】

本発明の好ましい実施形態によると、前記癌は、膵癌、膀胱癌および前立腺癌から選択される。

【 0 0 2 1 】

本発明のさらなる実施形態は、B A G 3 組換えタンパク質または可溶性 B A G 3 を捕捉する B A G 3 特異的マウスモノクローナル抗体 A C - 1、A C - 2、A C - 3、A C - 4、A C - 5、A C - r b 1 a、A C - r b 1 b、A C - r b 2 a、A C - r b 2 b、A C - r b 3 a、A C - r b 3 b、A C - r b 4 a および A C - r b 4 b と、ヒト免疫グロブリンを認識することができる抗体とを含む E L I S A キット、ならびに生物学的試料における抗 B A G 3 抗体または抗 B A G 3 抗体が可溶性 B A G 3 に結合して形成された免疫複合体の検出のためのその使用である。

【 0 0 2 2 】

好ましくは、前記生物学的試料は、血清、血漿、尿または唾液試料である。

【 0 0 2 3 】

本発明の好ましい実施形態において、前記血清、血漿、尿または唾液試料は、哺乳類、好ましくはヒト由来である。

【 0 0 2 4 】

本発明は、生物学的試料中の B A G 3 タンパク質の検出のための免疫組織化学 (I H C) キットになおさらに関し、ここで前記生物学的試料は、好ましくは、B A G 3 特異的抗体および染色に必要なプローブを含む試薬を含む組織試料である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 5 】

本発明の特徴および利点は、下記に報告されている発明を実施するための形態、例示および非限定目的のために提示されている実施例、ならびに添付した図 1 ~ 1 0 によって明らかとなる。

【図 1 A】培養した心筋細胞の上清における B A G 3 タンパク質の検出を示す図である。

10

20

30

40

50

80%集密度のヒト(HCMa)およびラット(H9c2)心筋細胞を、10%のFABと共に、または伴わず、5%のCO₂分雰囲気により37℃で16時間インキュベートした。上清を、50mMのNaClおよび0.05%のIGEPALを含有する緩衝液で透析し、凍結乾燥し、1mlのRIPA緩衝液(50mLのTrisHCl pH7.6、150mMの塩化ナトリウム、2mMのオルトバナジウム酸ナトリウム、4mMのEDTA、10mMのピロリン酸ナトリウム、1%のNP-40、0.1%のデオキシコロール酸ナトリウム)に再懸濁し、ウエスタンブロットにより抗BAG3または抗GAPDH抗体を用いて分析した。

【図1B】開口放出小胞におけるBAG3タンパク質の検出を示す図である。H9c2細胞から得た上清を、連続遠心分離：(i)細胞除去のために2,000×gで15分間、(ii)細胞片の除去のために10,000×gで30分間、(iii)開口放出小胞のペレット化のために150,000×gで90分間、に付した。ペレットをPBS中に150,000×gにより90分間で1回洗浄し、ウエスタンブロットにより、抗BAG3 TOS-2ポリクローナル抗体を用いて総細胞溶解産物と比較して分析した。Rab-4を開口放出小胞のマーカーとして分析した。細胞質タンパク質であるGAPDHを、対照として分析した。

【図1C】2人の健康な提供者および2人の慢性心不全を罹患している患者由来の血清を、ウエスタンブロットにより抗BAG3抗体TOS-2ポリクローナル抗体を用いて分析したことを示す図である。

【図1D】2人の慢性心不全を罹患している患者から得たバンドをゲルから切り取り、その同一性を、プログラムMASCOTを使用して質量分析により分析したことを示す図である。

【図2A】CHF患者の血清におけるBAG3タンパク質の検出を示す図である。HCMa細胞のBAG3組換えタンパク質および総細胞溶解産物を、心不全の患者から得た血清(1:40)を用いて、ウエスタンブロットにより分析した。健康な提供者由来の血清での分析は、陰性対照として実施した。

【図2B】ELISA検査による抗BAG3抗体の検出を示す図である。50人のCHF患者(駆出率<60%)の血清を、特異的ELISA検査により抗BAG3抗体の存在について50人の健康な提供者由来の血清と比較した。結果を任意単位としてプロットする。

【図2C】ELISA検査結果のROC分析を示す図である。任意単位0.083でのカットオフは、74%の感受性および68%の特異性をもたらす。

【図3A】HCMa細胞(a、b、c)およびJ774A1細胞(d、e、f、g、h、i)へのrBAG3-FITC結合の検出のために実施された直接蛍光の共焦点顕微鏡法分析を示す図である。BAG3組換えタンパク質および精製BSA(SIGMAから購入したウシ血清のアルブミン)を、製造会社の説明書に従って、SIGMAから購入したFluorotag FITC Conjugation Kitを使用してFITCにコンジュゲートした。製造会社の説明書に従って計算した等量のrBAG3-FITC(b、e)およびBSA-FITC(h)タンパク質を、0.1%のNaN₃を有するHCMaおよびJ774A1培養培地に1時間加えた。β-インテグリンを対照として分析した(a、d、g)。細胞をZeiss LSM共焦点顕微鏡により分析した。統合画像をc、fおよびiに示す。

【図3B】BAG3はマクロファージに結合することを示す図である。J774A1マクロファージ(1×10⁶個の細胞/ml)を、異なる濃度のFITC-BAG3タンパク質(7、14および70nM)と共にインキュベートした。FITC-BSA(70nM)を陰性対照(灰色)として使用した。細胞の蛍光を、フローサイトメトリーにより分析した。

【図3Ca】BAG3と共にインキュベートしたJ774A1マクロファージのcox-2およびiNOSレベルの分析を示す図である。集密度80%のJ774A1細胞を、対照培地、BSA、LPSまたはrBAG3と共に20時間インキュベートした。ポリミキ

10

20

30

40

50

シンを、示された場所に添加して、大腸菌 (*E. coli*) に由来する r B A G 3 の効果が、汚染内毒素の存在と無関係であることを確認した。C o x - 2 および i N O S 発現を、ウエスタンブロットにより細胞溶解産物において分析した。

【図 3 C b】B A G 3 と共にインキュベートした J 7 7 4 A 1 マクロファージの亜硝酸塩放出の分析を示す図である。集密度 80% の J 7 7 4 A 1 細胞を、対照培地、B S A、L P S または r B A G 3 と共に 24 時間インキュベートした。各試料の 100 μ l の上清を、100 μ l のグリース試薬と共にインキュベートし、550 nm での光学密度 (O D 550) を B e c k m a n D U 6 2 分光光度計により測定した。亜硝酸塩濃度は、試料の O D 550 を亜硝酸ナトリウムの標準曲線と比較することによって評価した。

【図 3 C c】B A G 3 と共にインキュベートした J 7 7 4 A 1 マクロファージの I L - 6 放出の分析を示す図である。集密度 80% の J 7 7 4 A 1 細胞のマクロファージを、対照培地、B S A、L P S または組換え B A G 3 と共に 5 時間インキュベートした。B A G 3 ペプチド (ペプチド 1、ペプチド 2、ペプチド 3、ペプチド 4 またはスクランブルペプチド (s c r a m b l e d p e p t i d e)) の 625 nM を、示された場所に加えて、B A G 3 活性を遮断するこれらの能力を確認した。I L - 6 産生は、E L I S A 検査を使用して細胞培養培地において測定した。I L - 6 濃度は、試料の O D を組換え I L - 6 の標準曲線と比較することによって評価した。

【図 4 A】正常な膵臓組織におけるモノクローナル抗 B A G 3 抗体 A C - 1 の使用による B A G 3 染色の代表的な画像である。切片をヘマトキシリンで対比染色した。染色は、ランゲルハンス島の中程度の陽性を明らかにしたが、正常な膵管および膵腺房細胞は、B A G 3 発現を有さなかった。

【図 4 B】ビオチン化二次抗体により現れたモノクローナル抗 B A G 3 抗体の使用により染色した、B A G 3 低陽性および B A G 3 高陽性腫瘍試料の代表的な画像である。切片をヘマトキシリンで対比染色した。2 つの異なる倍率が示されている。100 $\times$ (左側パネル) および 400 $\times$ (右側パネル)。本発明者らは、400 $\times$ 倍率を使用して、10 個の非重複視野において総癌細胞に対する陽性細胞の数を計数することにより、試料中の陽性癌細胞の割合に基づいてスコアを指定した。記載されたように計算した B A G 3 陽性細胞の割合の中央値は、40% であり、この値を、低および高陽性試料を分けるカットオフとして使用した。

【図 4 C】低 B A G 3 染色 (陽性細胞 40%) を有する 39 人の患者および高 B A G 3 染色 (陽性細胞 > 40%) を有する 27 人の患者を比較して作製した生存曲線を示す図である。分析した全ての患者は、膵臓腺癌の R O 切除を受けた。生存中央値は、高陽性群の 12 か月から低陽性群の 23 か月に増加した。ログランク検定 p 値 = 0.0013。

【図 5】数人の関節リウマチ由来の滑膜組織における B A G 3 染色の代表的な画像である。B A G 3 陽性は、滑膜線維芽細胞および炎症性浸潤において観察される。切片をヘマトキシリンで対比染色した。

【図 6】腫瘍細胞の細胞質における B A G 3 に陰性をもたらした正常な膀胱および高い陽性をもたらした移行細胞膀胱癌による B A G 3 染色の代表的な画像である。切片をヘマトキシリンで対比染色した。

【図 7 A】q R T - P C R により評価される b a g 3 m R N A 相対的発現を示すグラフであり、値は、平均 $\pm$ S D で報告されている。青色線は、計算された中央値を表す。

【図 7 B】q R T - P C R により分析された全ての患者において行った生存分析を示す図である。高い b a g 3 発現を有する 13 人の患者は、低い b a g 3 発現を有する 12 人の患者 (生存中央値 = 32.0 か月) と比較して、短い生存 (生存中央値 = 19.0 か月) を有した。ログランク検定 p 値 = 0.0198。

【図 8 A】膵癌細胞系 (P S N 1、C a p a n - 1、A s P C - 1、P A N C - 1 および M I A P a C a - 2) を、グラフにより示されているように異なる濃度のゲムシタピンで処理したことを示す図である。48 時間後、アポトーシス細胞死を分析した。グラフは、サブ G 0 / G 1 細胞 ($\pm$ S . D .) の割合の平均値を描いている。データは、3 つの独立した実験の代表値である。

10

20

30

40

50

【図 8 B】膵癌細胞系における B A G 3 のウエスタンブロット分析を示す図であり、G A P D H ハウスキーピングタンパク質含有量を、等しい負荷状態をモニターするために使用した。

【図 8 C】M I A P a C a - 2 および P A N C - 1 細胞系を、2 μ M のゲムシタピン (G E M) により指定された時間にわたって処理したことを示す図である。B A G 3 タンパク質発現レベルを、ウエスタンブロットによりモニターした。

【図 8 D】b a g 3 m R N A レベルを R T - P C R により分析したことを示す図であり、グラフは、相対的な b a g 3 m R N A レベル ($\pm$ S . D .) を描き、データは、3 つの独立した実験の代表値である。

【図 8 E】M I A P a C a - 2 および P A N C - 1 細胞系を、B A G 3 s i R N A または非標的化 s i R N A (N T s i R N A) により 7 2 時間かけて形質移入し、次に 2 μ M のゲムシタピン (G E M) により 2 4 時間処理したことを示す図である。B A G 3 レベルをウエスタンブロットにより分析し、G A P D H レベルを、等しい負荷状態をモニターするために検出した。

【図 8 F】M I A P a C a - 2 および P A N C - 1 細胞を上記に記載されたように形質移入し、2 μ M のゲムシタピン (G E M) により 2 4 時間または 4 8 時間処理したことを示す図である。アポトーシス細胞死を記載されたように分析した。グラフは、サブ G 0 / G 1 細胞 ($\pm$ S . D .) の割合の平均値を描いている。データは、3 つの独立した実験の代表値である。

【図 9 A】E L I S A 検査による B A G 3 特異的免疫複合体の検出である。5 5 人の膵臓腺癌患者由来の血清を、特異的 E L I S A 検査により B A G 3 特異的免疫複合体の存在について、5 1 人の健康な提供者由来の血清と比較したことを示す図である。結果を任意単位 $\pm$ S . E . としてプロットする。

【図 9 B】E L I S A 検査結果の R O C 分析を示す図である。任意単位 0 . 1 8 3 でのカットオフは、6 5 % の感受性および 7 8 % の特異性をもたらす。

【図 1 0】膵臓腺癌の 0 ~ 1 年の前診断を有する 4 9 人の女性対象由来の患者血清における B A G 3 特異的抗体の検出を、特異的 E L I S A 検査により、B A G 3 特異的抗体の存在について 2 3 5 人の女性対照対象由来の血清と比較した図である。対照血清は、各症例対象に対して約 5 つあり、年齢を対応する症例と適合させた。他の時点には、2 5 1 人の対照と比較した、P D A C の 1 ~ 2 年の前診断を有する 5 3 人の対象、2 1 2 人の対照と比較した、P D A C の 2 ~ 3 年の前診断を有する 4 4 人の対象、1 8 7 人の対照と比較した、P D A C の 3 ~ 4 年の前診断を有する 4 2 人の対象が含まれた。

【 0 0 2 6 】

結果を任意単位としてプロットする。 $\pm$ S . P . 値は、スチューデント t 検定により計算した。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 7 】

本発明は、病理学的状態の診断における生化学的マーカーとしての使用のための抗 B A G 3 抗体に関する。

【 0 0 2 8 】

本発明における用語「診断」では、本発明者らは、ありうる疾患または障害を決定または同定することを試みる過程を意味する医療診断 (多くの場合に単に診断と呼ばれる) を意味する。本発明の診断は、早期診断も包含する。

【 0 0 2 9 】

用語「早期診断」では、本発明者らは、特異的または非特異的症状の前に病理学的状態を決定する検査能力を意味する。

【 0 0 3 0 】

抗 B A G 3 抗体は、現在、好都合なことに血清、血漿、尿または唾液において検出されている。現在まで、そのような抗体は、生理学的状態または病態のいずれにおいても血清中に見出されていない。血清における抗 B A G 3 抗体の検出は、診断、早期診断および予

10

20

30

40

50

後の目的で利用される迅速な非侵襲的技術、危険性層別化、同定のため、および療法のモニタリングのためのツールとしての利点を有する。

【0031】

抗体の検出のさらなる利点は、検出のために非常に少量の血清が必要であることである。事実、可溶性BAG3タンパク質も、幾つかの病状に罹患している患者の血清において検出されうるが、可溶性タンパク質の検出に必要な血清の量は、抗体の検出に必要な量よりはるかに多い。さらに、可溶性BAG3タンパク質レベルは、抗体のレベルよりはるかに低いことがありうる、ならびに／または可溶性BAG3タンパク質に関して、抗体は、特異的病状の初期相において検出可能でありうる、および／もしくは合併症の危険性をより効率的に予測しうる、もしくは療法の効果をモニターしうるということが可能である。

10

【0032】

本発明のさらなる実施形態は、抗BAG3抗体が、血清、血漿、尿または唾液から選択される異なる生物学的試料において都合よく検出されうることである。

【0033】

本発明において、血清とは、血球でもなく凝固因子でもない血液の成分が意図され、線維素原が除去された血漿である。血清は、凝血（凝固）に使用されない全てのタンパク質、全ての電解質、抗体、抗原、ホルモンおよび任意の外来性物質を含む。

【0034】

本発明において、血漿とは、通常は全血中に血球を懸濁して保持する血液のわら色／淡黄色液体成分が意図される。線維素原などの凝固因子を含有する。

20

【0035】

さらなる実施形態において、本発明は、生化学的マーカーとしての抗BAG3抗体の使用を提供し、抗BAG3抗体は、可溶性BAG3と結合して、免疫複合体を形成する。

【0036】

遊離している、または可溶性BAG3と結合して免疫複合体を形成する抗BAG3抗体は、現在、生物学的条件下で都合よく検出されており、病態の診断にマーカーとして使用することができる。生物学的試料におけるそのような抗体および／または免疫複合体の検出も、診断および／または予後の目的の迅速な非侵襲的技術としての利点を有する。

【0037】

本発明の好ましい実施形態によると、診断は、インビボまたはエキソビボである。

30

【0038】

本発明のさらなる実施形態は、診断の受容個体が、哺乳類、好ましくはヒトであるということである。

【0039】

本発明において、免疫複合体またはタンパク質／抗体複合体は、可溶性抗原への抗体の一体型結合が意図され、結合した抗原は、特異的エピトープとして作用し、抗体と結合したものは、単一免疫複合体と呼ばれる。

【0040】

そのような免疫複合体は、同様に非常に少量の血清が免疫複合体の検出のために必要であるので、抗体の検出において見られる同じ利点を有する。可溶性BAG3の検出に必要な血清の量も、タンパク質／抗体（免疫）複合体の検出に必要な量よりもはるかに多い。免疫複合体、ならびに遊離抗体は、特異的病状の初期相において検出可能であり、合併症の危険性をより効率的に予測する、または療法の効果をモニターすることができる。

40

【0041】

本発明のなおさらなる実施形態は、病理学的状態の生物学的マーカーとしての抗BAG3抗体または免疫複合体（可溶性BAG3と結合した抗BAG3抗体により形成される）の使用であり、病理学的状態は、心臓疾患、癌、糖尿病、皮膚、神経、骨、血管および結合組織の炎症および炎症性関連疾患である。

【0042】

好ましくは、心臓疾患は、狭心症、梗塞前狭心症、虚血、心筋梗塞、心不全、急性冠

50

患、急性心不全、慢性心不全および医原性心疾患からなる群から選択される。

【0043】

本発明の好ましい実施形態によると、癌は、膵癌、膀胱癌および前立腺癌から選択される。

【0044】

本発明のさらなる実施形態は、生物学的試料における、抗BAG3抗体または抗BAG3抗体が可溶性BAG3に結合して形成された免疫複合体の存在を検出する方法であって、

a. 血清、血漿、尿または唾液からなる生物学的試料を得るステップと、

b. 生物学的試料における抗BAG3またはBAG3関連抗体の存在を決定するステップとを含む方法である。

10

【0045】

本発明による方法は、健康な個人とBAG3関連病状に罹患している患者との間の抗BAG3抗体および/またはBAG3/抗体複合体の有意な差を検出できるという利点を有する。提案されたアッセイ方法は、心臓病患者の群と健康な人の群との統計的に有意な分離を可能にする。危険性が増加した患者の下位集団において、心臓疾患を有するような患者(心不全、HF)を層別化することもできる。

【0046】

なおさらなる態様において、本発明は、生物学的試料における抗BAG3抗体または抗BAG3抗体が可溶性BAG3に結合して形成された免疫複合体の存在を検出する方法であって、

20

c. 生物学的試料から得た値を、基準値または健康な提供者から得た値と比較するステップをさらに含む。

【0047】

好ましい態様において、本発明による方法は、決定ステップbがELISA検査により実施される方法である。

【0048】

本発明の方法の好ましい実施形態によると、血清、血漿、尿または唾液試料は、哺乳類、好ましくはヒト由来である。

30

【0049】

本発明による方法は、病状、疾患および/またはこれらの合併症の危険性、ならびに療法のモニタリングの評価を可能にする生物学的マーカーの、迅速な非侵襲的検出を可能にする利点を有する。

【0050】

さらなる態様によると、本発明は、抗BAG3抗体または抗BAG3抗体が可溶性BAG3に結合して形成された免疫複合体の存在が病態と関連する、検出方法に関する。

【0051】

好ましい実施形態において、病態は、心臓疾患、癌、糖尿病、ならびに、炎症および炎症性関連疾患であって、皮膚、神経、骨、血管および結合組織の炎症および炎症性関連疾患からなる群から選択される。特に、心臓疾患は、狭心症、梗塞前狭心症、心筋梗塞、虚血、心不全、急性冠疾患、急性心不全、慢性心不全または医原性心疾患からなる群から選択される。

40

【0052】

本発明の好ましい実施形態によると、癌は、膵癌、膀胱癌および前立腺癌から選択される。

【0053】

本発明は、さらに、生物学的試料における、抗BAG3抗体または抗BAG3抗体が可溶性BAG3に結合して形成された免疫複合体を検出するELISAキットに関する。

50

【 0 0 5 4 】

本発明による E L I S A キットは、抗 B A G 3 抗体を捕捉する B A G 3 組換えタンパク質または可溶性 B A G 3 を捕捉する B A G 3 特異的マウスモノクローナル抗体 A C - 1、A C - 2、A C - 3、A C - 4、A C - 5、A C - r b 1 a、A C - r b 1 b、A C - r b 2 a、A C - r b 2 b、A C - r b 3 a、A C - r b 3 b、A C - r b 4 a および A C - r b 4 b ならびにヒト免疫グロブリンを認識することができる抗体を含む。

【 0 0 5 5 】

そのような抗体は、ヒト免疫グロブリンを認識することができる酵素結合抗体でありうる。

【 0 0 5 6 】

本発明は、また、生物学的試料における B A G 3 関連抗体を検出するためのキットに関し、可溶性 B A G 3 を捕捉する B A G 3 特異的マウスモノクローナル抗体 A C - 1、A C - 2、A C - 3、A C - 4、A C - 5、A C - r b 1 a、A C - r b 1 b、A C - r b 2 a、A C - r b 2 b、A C - r b 3 a、A C - r b 3 b、A C - r b 4 および A C - r b 4 b ならびにヒト免疫グロブリンを認識することができる検出用の酵素結合抗体を用いる E L I S A により実施される。

10

【 0 0 5 7 】

好ましくは、生物学的試料は、血清、血漿、尿または唾液試料である。

【 0 0 5 8 】

本発明の好ましい実施形態において、血清、血漿、尿または唾液試料は、哺乳類、好ましくはヒト由来である。

20

【 0 0 5 9 】

本発明は、さらに生物学的試料中の B A G 3 タンパク質の検出のための免疫組織化学 (I H C) キットに関連し、前記生物学的試料は、好ましくは組織試料である。組織試料は、生検、凍結組織、パラフィン埋め込み組織でありうる。

【 0 0 6 0 】

本発明による I H C キットは、B A G 3 特異的抗体および染色に必要なプローブを含む試薬を含む。

【 0 0 6 1 】

B A G 3 特異的抗体は、マウス免疫グロブリンを認識することができる検出用のマウスモノクローナル抗体 A C - 1、A C - 2 および A C - 3、ならびに / または酵素結合抗体でありうる。

30

【 0 0 6 2 】

特に、I H C キットは、有利には、膵臓切除を受けた患者の膵癌組織試料の 1 0 0 % にあり、かつ大部分の膀胱癌試料に発現している B A G 3 タンパク質を明らかにすることができる。さらに、B A G 3 タンパク質を、ランゲルハンス島の正常な膵臓組織における I H C による B A G 3 検出用キットによっても明らかにすることができ、一方、他の正常組織は、陰性である (例えば、正常な膀胱)。B A G 3 陽性は、関節リウマチ組織試料の滑膜線維芽細胞および炎症性浸潤においても観察されうる。

40

【 0 0 6 3 】

P D A C により影響を受ける患者の長期生存は、非常に不十分であり、約 4 % の患者のみが、診断の 5 年後に生存している。事実、外科的切除が、現在、治癒の唯一の機会であるが、およそ 2 0 % の患者のみが切除可能な疾患を診断され、さらに、そのような患者の下位集団の大きな割合 (約 8 0 %) において、転移過程がすでに診断時に生じており、事実、遠位転移が外科的切除後に現れる。したがって、本発明者らは、膵癌の発生の初期段階をより良く理解し、これらの検出を可能にする分子を同定する必要性がある。また、より良好な予後を可能にすること、および療法の選択を助けることができるマーカーが、大いに求められている。

【 0 0 6 4 】

有利なことに、B A G 3 I H C キットは、P D A C 患者の予後の同定を可能にする。

50

I H C により同定された B A G 3 発現の強度は、患者の生存と相関することが分かった。したがって、これを予後のため、および療法の選択を行うことのための両方に使用することができる。

【 0 0 6 5 】

本発明のさらなる態様は、増幅プライマーのセットを含む、生物学的試料における B A G 3 遺伝子発現を検出するためのキットである。好ましくは、増幅プライマーは、定量的リアルタイム R T - P C R による検出に適している。

【 0 0 6 6 】

下記に記載され、配列番号 1 から配列番号 10 により同定されているプライマーセット 1 から 5 の特異的プライマー b a g 3 プライマーは、定量的リアルタイム P C R による B A G 3 発現の検出および定量化を可能にする。

10

【 0 0 6 7 】

プライマーセット 1

順方向：配列番号 1：A A C G G T G A C C G C G A C C C T T T

逆方向：配列番号 2：C C T T C C C T A G C A G G C G G C A G

プライマーセット 2

順方向：配列番号 3：C C G G C T G G C C C T T C T T C G T G

逆方向：配列番号 4：C A G C C T A G A G C C C T C C C G G G

プライマーセット 3

順方向：配列番号 5：G T C A C C T C T G C G G G G C A T G C

逆方向：配列番号 6：G G T G A C T G C C C A G G C T G C T C

プライマーセット 4

順方向：配列番号 7：C C A G C C T C C C A C G G A C C T G A

逆方向：配列番号 8：C T G G T G A C T G C C C A G G C T G C

プライマーセット 5

順方向：配列番号 9：C A G G A G C A G C A C G C C A C T C C

逆方向：配列番号 10：T G G T C C A A C T G G G C C T G G C T

20

生物学的試料における b a g 3 m R N A 検出用の R T - P C R キットは、b a g 3 遺伝子発現のレベルを、患者の生存と相関させることができ、予後および療法の選択に使用することができる。好ましくは、生物学的試料は、組織試料である。

30

【 0 0 6 8 】

本発明のさらなる態様は、マクロファージ活性を遮断することができ、したがってマクロファージ活性化を伴う炎症性、腫瘍学的または他の疾患の療法に使用されうる、B A G 3 タンパク質に特異的なアミノ酸配列に対応する抗 B A G 3 モノクローナル抗体、これらのフラグメントおよびペプチドによって表される。特に図 3 および表 1 を参照されたい。本発明は、B A G 3 特異的マウスモノクローナル抗体 A C - 1、A C - 2 および A C - 3、もしくは F (a b)、F (a b ') 2、F (a b) として修飾されたもの、もしくはヒト化されたもの、または可溶性 B A G 3 の作用に結合することができる、および / もしくは可溶性 B A G 3 の作用を遮断することができる分子としての、以下の配列を含むペプチド：

40

ペプチド 1：D R D P L P P G W E I K I D P Q (配列番号 1 1)

ペプチド 2：S S P K S V A T E E R A A P S (配列番号 1 2)

ペプチド 3：D K G K K N A G N A E D P H T (配列番号 1 3)

ペプチド 4：N P S S M T D T P G N P A A P (配列番号 1 4)

の使用に関する。

【 0 0 6 9 】

[実施例]

(実施例 1)

培養ヒト一次心筋細胞およびラット心筋細胞細胞系 H 9 c 2 における血清枯渇誘発性ストレス

50

心筋細胞は、ストレス性作用物質に対する応答を開始する保護因子を放出することが知られている。H s p 7 0、H p 2 7、H s p 9 0 および他などのストレス誘発性タンパク質は、細胞内活性を発揮するが、ストレスに応答して分泌もされうるので、心筋細胞による B A G 3 放出を、ストレス条件下で分析した。この目的のため、培養ヒト一次心筋細胞またはラット心筋細胞細胞系 H 9 c 2 における血清枯渇誘発性ストレスの作用を分析した。図 1 に示されているように、本発明者らは、血清枯渇に 1 6 時間曝露された心筋細胞の上清に B A G 3 タンパク質を検出することができた (図 1 A)。この時点で、細胞生存は、血清枯渇により影響を受けなかった (結果は示されず)、B A G 3 放出が細胞壊死に起因するという仮説を放棄した。したがって本発明者らは、B A G 3 が開口放出小胞に存在するかを確認した。事実、分画遠心分離手順 (1 6) を介して細胞外小胞を単離することによって、これらが B A G 3 タンパク質を含有することを見出した (図 1 B)。

10

【 0 0 7 0 】

B A G 3 の可溶形態の存在をさらに確認するため、慢性心疾患 (C H F) に罹患している患者由来の 2 つの血清におけるその存在を調査した。ウエスタンブロット分析を介して、抗 B A G 3 抗体により認識されたバンドを同定することができた。バンドを切り取り、質量分析に付し、その同一性を確認した (図 1 C)。この証拠は、タンパク質が細胞外形態で検出されうることを確認した。健康な提供者由来の血清では、タンパク質を検出することができなかった (図 1 C)。

【 0 0 7 1 】

全 B A G タンパク質配列に対する質量分析により認識され、適合されたペプチドを太字で示す。

20

【 0 0 7 2 】

MSAATHSPMM QVASGNNGDRD PLPPGWEIKI DPQTGWPFV
DHNSRTTTWN DPRVPSEGP K ETPSSANGPS REGSRLPPAR
EGHPVYPQLR PGYIPIPV LH EGAENRQVHP FHVYPQPGMQ
RFRTEAAAAA PQRSQSPLRG MPETTQPD KQ CGQVAAAAA
QPPASHGPER SQSPAASDCS SSSSSASLPS SGRSSLGSHQ
LPRGYISIPV IHEQNVTRPA AQPSFHQAQK **THYPAQQGEY**
QTHQPVYHKI QGDDWEPRPL RAASPFRSSV QGASSREGSP
ARSSTPLHSP SPIRVHTVVD RPQQPMTHRE TAPVSQPENK
PESKPGPVGP ELPPGHIPIQ VIRKEVDSKP VSQKPPPPSE
KVEVKVPAP VPCPPSPGP SAVPSSPKSV ATEERAAPST
APAEATPPKP GEAEAPPKHP GVLKVEAILE KVQGLEQAVD
NFEGKKTDDK YLMIEEYLTK ELLALDSVDP EGRADVQRAR
RDGVRKVQTI **LEKLEQKAID VPGQVQVYEL QPSNLEADQP**
LQAIMEMGAV AADKGGKNAG NAEDPHTETQ QPEATAAATS
NPSSMTDTPG NPAAP

30

40

【 0 0 7 3 】

(配列番号15)。

【 0 0 7 4 】

ヒト B A G 3 タンパク質は、配列番号 1 5 のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 7 5 】

(実施例 2)

C H F 患者の血清における抗 B A G 3 抗体

本発明者らは、C H F 患者の血清が、二次抗体として抗ヒト g G を使用したウエスタンブロットにより B A G 3 タンパク質を認識したことを見出した (3 つの異なる患者由来の

50

血清を用いた実験の代表的な結果を図 2 A に示す)。この結果は、CHF 患者の血清に抗 BAG3 抗体の存在を示した。この知見を確認するため、特異的 ELISA 検査により抗 BAG3 抗体の存在について 50 人の健康な提供者由来の血清と比較した、50 人の CHF 患者（駆出率 < 60 %）由来の血清を分析した。図 2 B に示されているように、対照血清と比較して有意に高い値の抗 BAG3 抗体を患者のものにおいて検出した。ELISA 検査の ROC 分析は、任意単位 0.083 のカットオフを使用して、74 % の感受性および 68 % の特異性をもたらす（図 2 C）。

【0076】

（実施例 3）

マクロファージへの BAG3 結合

本発明者らは、心筋細胞による BAG3 放出の機能的有意性について検討した。タンパク質がオートクリン経路に関与しうることを除外し、それは、イソチオシアン酸フルオレセイン（FITC）コンジュゲート BAG3 を使用した実験で評価したように、心筋細胞表面に結合しないと思われたからである（図 3 A）。したがって、本発明者らは、BAG3 が血球と相互作用しうるか調査した。事実、FITC-BAG3 が細胞系 J774 のマクロファージに結合したことを見出した（図 3 B）。マクロファージへの BAG3 結合は、競合性 BAG3 ペプチドにより、または抗 BAG3 モノクローナル抗体の BAG3 配列決定 F(ab')₂ フラグメントにより特異的に阻害された（表 I）。特に、J774 細胞を、14 nM の FITC-BAG3 タンパク質および 625 nM の BAG3 ペプチド（ペプチド 1、ペプチド 2、ペプチド 3、ペプチド 4 もしくはスクランブルペプチド）と共に、または抗 BAG3 モノクローナルおよびポリクローナル抗体（マウスモノクローナル AC1、AC2 およびウサギポリクローナル TOS2）の 420 nM の F(ab')₂ フラグメントと共にインキュベートした。マウス IgG の F(ab')₂ フラグメントまたはウサギ IgG の F(ab')₂ フラグメントを陰性対照として使用した。

【0077】

【表 1】

表 I

	FITC-rBAG3	FITC-BSA	競合アッセイ	
	陽性細胞% (±S.D.)	陽性細胞% (±S.D.)	陽性細胞% (±S.D.)	阻害%
FITC-rBAG3	15.7 (±0.45)			
FITC-BSA		4.04 (±0.06)		
(FITC-rBAG3)-(FITC-BSA)	11.06 (±0.45)			
FITC-rBAG3 + Pep1			0.18 (±0.05)	98.4
FITC-rBAG3 + Pep2			1.21 (±0.63)	89.1
FITC-rBAG3 + Pep3			5.86 (±0.43)	47.2
FITC-rBAG3 + Pep4			0.68 (±0.20)	93.8
FITC-rBAG3 + Pep Scr			12.1 (±0.21)	0.0
FITC-rBAG3 + マウス IgG F(ab') ₂			12.3 (±0.40)	0.0
FITC-rBAG3 + ウサギ IgG F(ab') ₂			14.7 (±0.20)	0.0
FITC-rBAG3 + AC1 IgG F(ab') ₂			4.11 (±0.26)	62.8
FITC-rBAG3 + AC2 IgG F(ab') ₂			3.76 (±0.43)	66.0
FITC-rBAG3 + TOS2 IgG F(ab') ₂			3.19 (±0.21)	71.1

【0078】

マクロファージへのBAG3結合の機能的意義を探究するため、細胞における誘発性一酸化窒素シンターゼ(iNOS)およびシクロオキシゲナーゼ(Cox)-2に発現に対する組換えBAG3の効果を試験した。図3Caに示されているように、これらの酵素のレベルは、BAG3処理マクロファージにおいて増強された。さらに、BAG3は、亜硝酸塩およびインターロイキン(IL)-6の放出を誘発し(図3Cbおよびc)、マクロファージが、タンパク質へのこれらの結合に応答して活性化されたことが確認された。

【0079】

CHF患者の血清において、有意な量の抗BAG3抗体を検出することができた(図2A、B)自己抗体産生は、例えば、抗トロポニン自己抗体を産生する慢性虚血患者において生じるように、正常な細胞内タンパク質の細胞外放出に関係する可能性がある。CHF患者の血清における抗BAG3抗体のELISA値は、健康な対照の血清において検出されるものより有意に高い。

10

【0080】

したがって、ELISAにより検出される抗BAG3抗体の産生は、慢性心不全のバイオマーカーであると思われる。危険性層別化および療法のモニタリングにおける有用性は、調査する価値がある。ストレスを受けた心筋細胞によるBAG3放出、続くマクロファージの活性化は、NOの局所放出をもたらし、心臓虚血の保護回路を構成しうる。事実、血管拡張、血管新生および再構築が標的になりうる。BAG3放出およびその一過性または慢性的効果は調査に値し、虚血および他の心臓ストレス状態の理解に寄与しうる。

20

【0081】

さらに、BAG3特異的マウスモノクローナル抗体AC-1、AC-2およびAC-3、および/もしくは他、またはF(ab)、F(ab')₂、F(ab)として修飾されたもの、またはヒト化されたもの、または配列ペプチド1から4および/もしくは他を含むペプチドは、マクロファージ活性化を伴う炎症性、腫瘍学的または他の疾患の療法に使用される可溶性BAG3の作用に結合することができる、および/または可溶性BAGの作用を遮断することができる分子である。

【0082】

(実施例4)

免疫組織化学によるPDACにおけるBAG3発現

本発明者らは、抗BAG3モノクローナル抗体を含み、かつ免疫組織化学(IHC)によりBAG3タンパク質を検出することができる、免疫組織化学キット(IHC)を開発した。このキットは、分析した346全て(100%)のPDAC生検において、BAG3発現を明らかにした。BAG3染色は、ランゲルハンス島の中程度の陽性を明らかにしたが、正常な膵管および膵腺房細胞は、BAG3発現を有さなかった。このことは、正常な膵臓および腫瘍塊に隣接した非新生物膵臓組織のどちらにもあてはまった。BAG3染色は、腫瘍細胞の細胞質において主に観察された。BAG3染色の強度は、陽性癌細胞の数と同様に様々であった。さらに、ランゲルハンス島は、陽性であり、IHCの良好な内部対照を構成した(図4A)。したがって、キットはIHCによるPDACにおけるBAG3タンパク質の検出を可能にする。さらに、他の腫瘍または正常な組織においても、IHCによるBAG3タンパク質の検出を可能にする。

30

40

【0083】

本発明者らは、患者の生存および療法への応答と相関するBAG3の発現についても調査した。免疫組織化学により分析された全ての腫瘍試料のデータおよび生存データにより分析されたR0患者の下位集団のデータを記載する、同じ数の患者由来の346のPDAC試料のコホートを分析した(表II);本発明者らは、400×倍率を使用して、10個の非重複視野において総癌細胞に対する陽性細胞の数を計数することにより、試料中の陽性癌細胞の割合に基づいてスコアを指定した。

【0084】

【表 2】

表II

	合計 数	平均 年齢 ±S. D.	性別		局所腫瘍病期T (%)				Nodal 期N (%)		腫瘍悪性度G (%)		
			男性	女性	T1	T2	T3	T4	N0	N1	G1	G2	G3
PDAC患者データ	346	63.0±10.5	181	165	5 (1.4)	59 (17.1)	264 (76.3)	18 (5.2)	130 (37.6)	216 (62.4)	16 (4.6)	177 (51.2)	153 (44.2)
生存データを有するPDAC患者	66	61.9±11.3	36	30	0 (0.0)	1 (1.5)	65 (98.5)	0 (0.0)	13 (19.7)	53 (80.3)	3 (4.5)	37 (56.1)	26 (39.4)

10

【0085】

記載されたように計算したBAG3陽性細胞の割合の中央値は、40%であり、この値を、低および高陽性試料を分けるカットオフとして使用した。この分類に基づいて、190の患者試料(55%)を低陽性(陽性細胞40%)と分類し、156(45%)を高陽性(陽性細胞>40%)と分類した(図4パネルB)。生存分析は、検査した全ての病変が腫瘍細胞のない切除周縁部を有し(R0)、3.7%のみが遠位臓器に転移の存在を示した、66人の患者のコホートで実施した(表II)。得られたデータは、高BAG3発現を有する患者が、低BAG3発現を有する患者(生存中央値=23.0か月)よりも有意に短い生存(生存中央値=12.0か月)を有したことを示した(p=0.0013)(図4、パネルC)。Cox割合分析に基づく、高BAG3発現は、2倍を超える高さの死亡危険性と関連した(表III)。

20

【0086】

【表 3】

表III

パラメーター	HR	95% CI	p値
年齢(年齢)	0.99	0.97~1.02	0.601
性別(男性対女性)	0.86	0.48~1.55	0.617
腫瘍悪性度(G2対G1)	0.84	0.24~2.98	0.789
腫瘍悪性度(G3対G1)	1.55	0.45~5.37	0.486
局所腫瘍状態(T3対T2)	2.5	0.30~21.17	0.400
Nodal 期(N1対N0)	1.17	0.58~2.37	0.668
BAG3陽性(高対低)	2.7	1.53~4.78	<0.001
事象=66 n=66			

30

40

【0087】

(実施例5)

療法に应答するBAG3タンパク質

膵癌の治療のための第一次化学療法は、ゲムシタピンである。療法への応答におけるB

50

BA G 3 タンパク質の役割を調査するため、本発明者らは、ヒトPDAC細胞におけるBA G 3 の下方調節の効果を分析した。細胞に、特異的 siRNA 標的 bag 3 mRNA または非特異的 (NT) siRNA を形質移入し、細胞をゲムシタピンにより、指示された時間にわたって処理した。BA G 3 のサイレンシングは、薬剤に応答した細胞アポトーシスを増強した (図 8)。

【0088】

これらの結果は、膵臓腺癌におけるBA G 3 タンパク質およびmRNAの過剰発現、ならびに高い発現レベルと、高い死亡の危険性との関係性を実証し、予後および療法の選択に有用なマーカーの役割がBA G 3 に与えられる。さらに、BA G 3 の下方調節がPDAC細胞のアポトーシスを増強することを示している。試験された全ての病変における広範囲の発現および膵癌細胞生存の維持における関与に起因して、BA G 3 は、PDACにおける革新的な療法のための重要な標的を表す。

【0089】

(実施例 6)

膵癌患者の血清におけるBA G 3 タンパク質

膵癌患者における広範囲の発現のため、BA G 3 が膵癌患者の血清に存在するかを調査した。事実、BA G 3 は検出可能であることが見出された。抗BA G 3 抗体も検出可能であったが、BA G 3 と複合して広がっていた。したがって、BA G 3 / 抗体複合体を検出するELISA検査を開発した。51人の健康な提供者および55人のPDACに罹患している患者の血清を分析した (表IV)。

【0090】

【表 4】

表IV

	合計数 (TOT)	年齢 (中央値+ s. e.)	男性	女性
健康な提供者	51	58.7 + 1.6	35	16
PDAC患者	55	64.0 + 1.3	30	25

【0091】

図9Aに示されているように、免疫複合体 (任意単位で測定) は、健康な提供者よりも患者の血清において有意に高かった。さらに、ELISA検査のROC分析は、任意単位0.183のカットオフを使用して65%の感受性および78%の特異性をもたらす (図9B)。

【0092】

(実施例 7)

定量的リアルタイムPCRによるBA G 3 発現

BA G 3 発現の免疫組織化学データも、25個のPDAC組織試料におけるbag 3 mRNAレベルの測定を確認した (表V)。

【0093】

【表 5】

表V

合計数	平均年齢 + S. D.	性別		局所腫瘍病期T (%)			Nodal期N (%)			腫瘍悪性度G (%)		
		男性	女性	T1	T2	T3	T4	N0	N1	G1	G2	G3
25*	65.4 ± 11.9	21	4	2 (8.0)	3 (12.0)	20 (80.0)	-	6 (24.0)	19 (76.0)	3 (12.5)	13 (54.2)	8 (33.3)

【0094】

10

20

30

40

50

特に、分析時には、25人の患者のうち16人が生存し、一方、9人の患者が膵癌進行のために死亡した。分析した腫瘍におけるbag3 mRNAの発現の中央値を、0.0068 (Q1 = 0.004、Q3 = 0.010) に設定した (図7パネルA)。PDAC患者の考慮された人口統計学および臨床的特徴は、全て、bag3 mRNAレベルと無関係であった。したがって、生存との相関関係を評価し、PDAC試料におけるbag3発現レベルの中央値を、高bag3発現を有する患者から低い患者を分けるカットオフとして使用した。このようにして、13個の試料 (52%) を高bag3陽性と分類し、12個の試料 (48%) を低bag3陽性と分類した。高BAG3発現を有する患者が、低bag3発現を有する患者 (生存中央値 = 32.0 か月) よりも短い生存 (生存中央値 = 19.0 か月) を有した。p 値 = 0.0198 (図7パネルB)。Cox 割合分析に基づく、高bag3発現は、6倍を超える高さの死亡危険性と関連した (単変量: HR = 6.094, 95% CI = 1.105 ~ 33.597、p = 0.038)。

10

【0095】

定量的リアルタイムRT-PCRによりBAG3発現を検出するbag3プライマー。本発明者らは、bag3 mRNA検出および定量化のために特異的プライマーを含有するRT-PCRキットを開発した。

【0096】

(実施例8)

本発明者らは、UKCTOCSから派生したプロスペクティブバイオバンク内の症例対照研究セットによるPDACの診断の前に、BAG3抗体レベルを評価した (非特許文献3)。試験コホートの202,000人の閉経後の女性が募集時に一回血清を提供し、50,000人の女性が毎年継続的に血清試料を提供した。任意化後に膵癌を診断された女性を、癌登録データおよび郵送追跡質問表により同定した。

20

【0097】

PDACが診断された女性では、PDACの診断前の異なる時点で血清試料を得た。対照血清を健康な対象から得て、BAG3抗体力価を、各PDAC症例に対して約5人の対照対象で測定する。さらに対照血清を、対応するPDAC症例と年齢を適合させた対象から得た。この対照血清適合を、各時点で使用した。

【0098】

膵臓腺癌の0~1年の前診断を有する49人の女性対象由来の患者血清におけるBAG3特異的抗体の検出を、特異的ELISA検査により、BAG3特異的抗体の存在について235人の女性対照対象由来の血清と比較した。

30

【0099】

BAG3抗体濃度を、特異的ELISAアッセイにより検出した。

【0100】

図10に示されているように、BAG3抗体は、対照対象と比べて3~4年の前診断の症例において有意に高かった。

【0101】

他の時点には、251人の対照と比較した、PDACの1~2年の前診断を有する53人の対象、212人の対照と比較した、PDACの2~3年の前診断を有する44人の対象、187人の対照と比較した、PDACの3~4年の前診断を有する42人の対象が含まれた。

40

【0102】

図10に示されているように、BAG3抗体は、対照対象に関して少なくとも3~4年の前診断の症例において有意に高かった。

【0103】

方法

細胞培養

HCMa (ヒト心筋細胞 - 成人) を、Sciencell Research Laboratories (San Diego, CA) から購入し、Cardiac Myo

50

cyte Medium (CMM、FBS 5%、Cardiac Myocyte Growth Supplement 1%、ペニシリン/ストレプトマイシン溶液1%) (Sciencell Research Laboratories, San Diego, CA) で増殖させた。全ての実験は、低継代細胞培養物により実施した。胎児ラット心筋芽細胞 (H9c2系) を American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) から購入し、10%のウシ胎仔血清 (FBS)、100 U/mL のペニシリンおよび100 μ g/mL のストレプトマイシンを補充したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) で増殖させた。ネズミ単球マクロファージ細胞系の J774A.1 (ATCC, Manassas, VA, USA) を、10%のウシ胎仔血清 (FBS)、25 mM の HEPES、2 mM のグルタミン、100 U/mL のペニシリンおよび100 μ g/mL のストレプトマイシンを補充した DMEM で増殖させた。

10

【0104】

膵癌細胞系 (MIA PaCa-2、AsPC-1、PSNI、Capan-1 および PANC-1) を、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA,) 細胞バンクから受け取った。MIA PaCa-2 細胞を、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) において、10% FBS および 2.5% のウマ血清を補充して、培養した。AsPC-1 および PSNI 細胞を、10% の FBS を補充した RPMI-1640 培地で増殖させた。Capan-1 を、20% の FBS を含有する RPMI-1640 で培養し、一方、PANC-1 を、10% の FBS を補充した DMEM で培養した。上記の細胞系のための全ての培地は、BioWhittaker-Lonza (Bergamo, Italy) Media Tech (Manassas, VA) から購入し、100 単位のペニシリン/mL および 2 μ g のストレプトマイシン/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を補充した。細胞を、5% CO₂ の雰囲気において 37 ° でインキュベートした。細胞を、Eli Lilly (Sesto Fiorentino, Italy) から提供されたゲムシタピン (2', 2'-ジフルオロデオキシシチジン、GEM、Gemzar (登録商標)) により示された濃度で処理した。

20

【0105】

ヒト血清における BAG3 抗体の解離

30

血清を、解離緩衝液 (1.5% の BSA および 0.2 M のグリシンアセテートを有する PBS、pH 2.5) により 1:40 に希釈して、500 μ l の最終容量にし、室温で 20 分間インキュベートした。次に血清を Microcon 遠心分離フィルター装置 YM-100 (100,000 MW カットオフ; Millipore, Billerica, MA, USA) の試料レザパーにピペットで移し、14,100 rpm により室温で 20 分間遠心分離した。次に試料レザパーをフロースルーから取り外し、第2の管に逆向きで配置し、5,000 rpm により室温で 3 分間遠心分離した。解離した抗体を含有する収集溶液を、1 M Tris 緩衝液、pH 9.0 により pH 7.0 に調整した。濃縮水量を、希釈緩衝液 (1.5% の BSA および 0.1% の Tween 20 を有する PBS) により初期量 (500 μ l) に再構築した。14 免疫プロットによる BAG3 タンパク質の検出では、解離抗体を、5% のウシ血清アルブミンを含有する TBST において、4 ° で一晩かけて 1:200 に希釈した。

40

【0106】

ウェスタンブロット分析

細胞を採取し、プロテアーゼインヒビターカクテル (1 mM のフッ化フェニルメチルスルホニル、1 mg/mL のペプスタチン A、2 mg/mL のアプロチニン) を補充した、20 mM の HEPES (pH 7.5)、150 mM の NaCl、0.1% の Triton (TNN 緩衝液) を含有する緩衝液において、3 サイクルの凍結解凍により溶解した。可溶性タンパク質を 10,000 g により 15 分間遠心分離した後に収集し、これらの量を Bradford アッセイ (Bio-Rad, Hercules, CA) により決定した

50

。25 μ g の総タンパク質および血清試料 (PBS-T 0.05% 中 1:2) を、8% または 10% の SDS-PAGE ゲルに流し、電気泳動的にニトロセルロース膜に移動させた。ニトロセルロースブロットを、TBS-T 緩衝液 (20 mM の Tris-HCl、pH 7.4、500 mM の NaCl および 0.1% の Tween 20) 中 10% の脱脂粉乳によりブロッキングし、5% のウシ血清アルブミンまたは 5% の脱脂粉乳を含有する TBS-T 中の一次抗体と共に、4 で一晩かけてインキュベートした。免疫反応性を、Pierce (Rockford, IL) から購入したホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体および Amersham Life Sciences Inc. (Arlington Heights, IL USA) から購入した ECL 検出試薬を伴う連続インキュベーションにより検出した。

10

【0107】

バンドの走査濃度測定を、Image Scan (SnapScan 1212; Agfa-Gevaert NV) により実施した。各バンドに関連する曲線下の面積を、Gimp 2 ソフトウェアの使用により決定した。バックグラウンドを、計算した値から差し引いた。

【0108】

質量分析

タンパク質バンドを切り取り、続いてゲル片を Milli Q 水およびアセトニトリルで洗浄し、タンパク質を Shevchenko プロトコールに記載されているように *in situ* で消化した。簡潔には、ゲル片を 1, 4-ジチオトレイトール (10 mM) で還元し、ヨードアセトアミド (50 mM) でアルキル化し、次に洗浄し、トリプシン溶液 (12 ng/ μ L) により氷上で 1 時間かけて再水和した。30 μ L の重炭酸アンモニウム (10 mM、pH 7.5) を加えた後、試料を 25 で一晩かけて消化した。5 μ L の得られたペプチド混合物を、NanoAcquity LC system (Waters Corp. Manchester, United Kingdom) に注入した。ペプチドを 1.7 μ m の BEH C-18 カラム (Waters Corp. Manchester, United Kingdom) により 200 nL/分の流速で分離した。勾配 (溶液 A: 0.1% のギ酸、溶液 B: 0.1% のギ酸、100% の ACN) は、5% で出発し、55 分後に 50% の B で終了した。MS および MS/MS データは、Q-TOF Premier 質量分析計 (Waters Corp., Micromass, Manchester, United Kingdom) を使用して得た。二重および三重に投入したペプチドイオンを、MassLynx ソフトウェアにより自動的に選択し、フラグメント化した。MS データを自動的に処理し、データベース検索によるタンパク質同定のピークリストを、ProteinLynx ソフトウェアにより作製した。データベース検索は、SwissProt タンパク質データベースを使用する MASCOT サーバーにより実施した。SwissProt ヒトデータベース (405506 配列; 146166984 残基) を検索し、固定修飾として 1 つの欠損切断、カルバミドメチル (C) が許容された。ペプチド耐性を 60 ppm に設定し、MS/MS 耐性を 0.8 Da に設定した。

20

30

【0109】

分画超遠心分離による開口放出小胞の精製

H9c2 の無血清培地から、4 での連続遠心分離 (2000 $\times$ g で 15 分間、10,000 $\times$ g で 30 分間) により細胞および大型の壊死組織片を排除した。最初の 2 つの遠心分離のそれぞれの終了時に、ペレットを廃棄し、上清を次のステップのために保持する。次に最終上清を 150,000 $\times$ g により 4 で 90 分間超遠心分離して (SW50.1 ローターおよび Optima L-90K Ultracentrifuge, Beckman Coulter により)、エキソソームをペレット化する。ペレットを PBS で洗浄して、汚染タンパク質を排除し、最後に 150,000 $\times$ g により 4 で 90 分間遠心分離した。16 洗浄した後、ペレット (エキソソーム) を 20 μ L の PBS に再懸濁し、ウェスタンブロットにより、抗 BAG3 TOS-2 ポリクローナル抗体を用いて総細胞溶解産物と比較して分析した。Rab-4 を開口放出小胞のマーカーとして分析した

40

50

。

【0110】

FACS分析

rBAG3結合-J774A.1細胞を、PBS中の2%のFBS+0.1%のNaN₃により氷上で15分間ブロッキングし、異なる濃度のFITC-rBAG3タンパク質(7、14および70nm)または2%のFBS+0.1%のNaN₃を含有するPBS中のFITC-BSA(70nM)と共に、暗黒中において4℃で30分間インキュベートした(2.5%、10⁵/100μl)。PBSにより洗浄した後、細胞をPBS+2%のFBS+0.1%のNaN₃に再懸濁し、FACSscan(BD Biosciences)フローサイトメーターにより分析した。

10

【0111】

競合-J774A.1細胞(2.5×10⁵/100μl)を、2%のFBS+0.1%のNaN₃を含有するPBS中、625nMのBAG3ペプチド(ペプチド1、ペプチド2、ペプチド3、ペプチド4またはスクランブルペプチド)と共に、または420nMの抗BAG3モノクローナルおよびポリクローナル抗体(マウスモノクローナルAC1、AC2およびウサギポリクローナルTOS2)のF(ab')₂フラグメントもしくはマウスIgGのF(ab')₂フラグメントもしくはウサギIgGのF(ab')₂フラグメントと共に氷上で30分間インキュベートした。インキュベートした後、細胞をPBSで洗浄し、次に2%のFBS+0.1%のNaN₃を含有するPBS中、FITC-rBAG3タンパク質(14nM)と共に暗黒中において4℃で30分間インキュベートした。PBSにより洗浄した後、細胞をPBS+2%のFBS+0.1%のNaN₃に再懸濁し、フローサイトメーター(BD Biosciences)により分析した。

20

【0112】

ELISAによるIL6検出

ポリミキシンBスルフェート(5μg/ml)の不在下または存在下でLPS(10ng/ml)により、またはrBAG3(14nM)もしくはBSA(14nM)により10または20時間処理したJ774A.1細胞(5×10⁴/96ウエルマイクロプレート中)の上清において、IL6を測定した。処理した後、50μLの細胞培養培地を収集し、マウスIL6 Kit(eBioscience)により三重に分析した。

30

【0113】

蛍光

細胞を6ウエルプレートにおいてカバーガラス上で60~70%の集密度に培養し、等量のrBAG3-FITCおよびBSA-FITCタンパク質をHCMAに加え、0.1%のNaN₃を有するJ774A.1培養培地に1時間加えた。カバーガラスを1×PBSで洗浄し、1×PBS中3.7%のホルムアルデヒドにより室温で30分間固定し、次に1×PBS 0.1Mグリシンと共に5分間インキュベートした。1:100希釈の抗β-インテグリンモノクローナル抗体と共に4℃でインキュベートした後、カバーガラスを1×PBSにより3回洗浄した。1:500希釈のヤギ抗マウスIgG DyLight 594コンジュゲート抗体(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)と共に室温で45分間インキュベートした後、カバーガラスを再び1×PBSにより3回洗浄した。Hoechst 33342(Sigma Aldrich, 2g/ml)と共に室温で10分間インキュベートした後、カバーガラスを再びPBSにより3回、次に蒸留水で洗浄した。次にカバーガラスを、間に47%(v/v)のグリセロールを含有するスライドに載せた。試料を共焦点レーザー走査顕微鏡(Zeiss LSM共焦点顕微鏡, Germany)の使用により分析した。画像は、実験および対照材料を比較するとき、同じ取得パラメーター(レーザー強度、光電子増倍管、ピンホール口径、対物レンズ63×、ズーム2)を使用して連続走査モードにより取得した。図の生成では、最低蛍光強度の特徴の視感のために明るい細胞蛍光バックグラウンドを残すこと、および異なる実験群間の比較を助けることに注意しながら、画像の明度およびコントラストを調整した。最終的な図は、Adobe Photoshop 7およ

40

50

び Adobe Illustrator 10 を使用して組み立てた。Leica Q9 Confocal Software および Image J をデータ分析に使用した。

【0114】

E L I S A による抗体力価の測定

NUNC Maxisorp 96 ウエル E L I S A プレート を、組換え B A G 3 タンパク質の、P B S、p H 7 中の $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($50 \mu\text{l}/\text{ウエル}$) により被覆し、4 で一晩インキュベートした。プレートを、洗浄緩衝液 (P B S + 0.05 % の Tween 20) により 2 回洗浄し、次に P B S 中 0.5 % の魚肉ゼラチンにより室温で 1 時間ブロッキング ($150 \mu\text{l}/\text{ウエル}$) した。ブロッキングした後、プレートを洗浄緩衝液により 2 回洗浄し、血清を洗浄緩衝液中 0.5 % の魚肉ゼラチンにより 1 : 70 に希釈し、次に三重に適用し ($50 \mu\text{l}/\text{ウエル}$)、室温で 2 時間インキュベートした。次にプレートを洗浄緩衝液により 6 回洗浄した。抗ヒト I g G (H + L) 抗体 (Sigma Aldrich) を、洗浄緩衝液中 0.5 % の魚肉ゼラチンにより 1 : 20, 000 に希釈し、 $50 \mu\text{l}/\text{ウエル}$ で加え、4 で 30 分間インキュベートした。インキュベートした後、プレートを 6 回洗浄し、T M B ($50 \mu\text{l}/\text{ウエル}$) (e B i o s c i e n c e) により現像し、反応を 4.5 M の硫酸 ($25 \mu\text{l}/\text{ウエル}$) により停止させ、プレートを 450 nm で分光光度的に分析した。

10

【0115】

N O₂⁻ アッセイ

培養上清中の細胞から放出された N O の安定した代謝産物である亜硝酸塩含有量 (N O₂⁻) を、ポリキシシン B スルフェート (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA) $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の不在下または存在下で L P S ($10 \text{ ng}/\text{ml}$) により、または r B A G 3 (7、14 および 28 nM) もしくは B S A (25 nM) により 24 時間処理した、J 774 A.1 細胞 ($5 \times 10^4 / 96$ ウエルマイクロプレート) において測定した。N O₂⁻ の量をグリース反応により測定した。簡潔には、100 μL の細胞培養培地を、100 μL のグリース試薬、等量の、5 % (v : v) のリン酸中 1 % (w : v) のスルファニルアミドおよび 0.1 % (w : v) のナフチルエチレンジアミン - H C l と混合し、室温で 10 分間インキュベートし、次に吸光度をマイクロプレート読み取り機 T i t e r t e k (D a s i t, C o r n a r e d o, M i l a n, I t a l y) により 550 nm で測定した。試料中の N O₂⁻ の量 (μM) を、亜硝酸ナトリウム標準曲線から計算した。

20

30

【0116】

E L I S A による B A G 3 / 抗体免疫複合体の測定

NUNC Maxisorp 96 ウエル E L I S A プレート を、P B S、p H 7 中の抗 B A G 3 モノクローナル抗体 A C - 1、A C - 2 または A C - 3 により被覆し、4 で一晩インキュベートした。プレートを、洗浄緩衝液 (P B S + 0.05 % の Tween 20) により 2 回洗浄し、次に P B S 中 0.5 % の魚肉ゼラチンにより室温で 1 時間ブロッキング ($150 \mu\text{l}/\text{ウエル}$) した。ブロッキングした後、プレートを洗浄緩衝液により 2 回洗浄し、血清を洗浄緩衝液中 0.5 % の魚肉ゼラチンにより 1 : 70 に希釈し、次に三重に適用し ($50 \mu\text{l}/\text{ウエル}$)、室温で 2 時間インキュベートした。次にプレートを洗浄緩衝液により 6 回洗浄した。抗ヒト I g G (H + L) 抗体 (Sigma Aldrich) を、洗浄緩衝液中 0.5 % の魚肉ゼラチンにより 1 : 20, 000 に希釈し、 $50 \mu\text{l}/\text{ウエル}$ で加え、4 で 30 分間インキュベートした。インキュベートした後、プレートを 6 回洗浄し、T M B ($50 \mu\text{l}/\text{ウエル}$) (e B i o s c i e n c e) により現像し、反応を 4.5 M の硫酸 ($25 \mu\text{l}/\text{ウエル}$) により停止させ、プレートを 450 nm で分光光度的に分析した。

40

【0117】

免疫組織化学

免疫組織化学プロトコールには、キシレンによる脱パラフィン化 (d e p a r a f f i n a t i o n)、純水までアルコールの濃度を下降させることによる再水和、クエン酸緩

50

衝液、pH 6.0 による 95 °C での 30 分間の非酵素的抗原回復およびメタノール中の H₂O₂ による 20 分間の内在性ペルオキシダーゼ消光が含まれる。PBS によりすすいだ後、試料を、0.1% の PBS / BSA 中 5% の正常なウマ血清によりブロッキングした。BAG3 を検出するため、試料を、3 マイクログラム / ml の濃度の BAG3 モノクローナル抗体 AC-1、AC-2 または AC-3 と共に室温で 1 時間インキュベートした。PBS により十分に洗浄した後、切片をビオチン化二次抗マウス IgG と共に 20 分間インキュベートし、次にすすぎ、アビジン-ビオチン複合体ペルオキシダーゼ (Novocastbra-Leica Microsystems, Milano, IT から購入した) と共にインキュベートし、ジアミノベンジジン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) により現像した。最後に、切片をヘマトキシリンで対比染色し、アルコールで脱水し、キシレンで清浄化し、Permount (Fisher Scientific, Milan, IT) により装填した。

10

【0118】

定量的リアルタイム RT-PCR

切除腫瘍の組織試験片を取り出し、直ぐに液体窒素により凍結し、RNA 抽出まで -80 °C で保存した。全 RNA をフェノール抽出により凍結組織および腫瘍細胞系から単離した (TRIzol Reagent, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)。組織試料において、癌細胞充実性は、大部分の細胞領域のクリオスタット切片作製および切開により濃縮された。RNA 濃度および純度 (A₂₆₀:A₂₈₀>2.0、A₂₆₀/A₂₃₀>1.8) は、NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) により確認した。1.0 μg の全 RNA を、製造会社 (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) の説明書に従って、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit の使用により逆転写した。定量的リアルタイム PCR アッセイを使用して、腫瘍組織試料における BAG3 の発現差異を評価した。ヒト bag3 遺伝子のプライマーを、Primm srl (Milano, Italy) (順方向プライマー: (配列番号 16) CCTGTTAGCTGTGGTTG、逆方向プライマー: (配列番号 17) AACATACAGATATTCCTATGGC) により合成した。全ての qPCR は、25 μl の最終容量において、以下の条件: 95 °C で 5 分間、40 サイクルの 95 °C で 10 秒間および 60 °C で 30 秒間に従って、QuantiFast SYBR Green PCR キット (QIAGEN, Hamburg, Germany) を使用し、ABI PRISM (登録商標) 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を稼働して、試料あたり 3 回繰り返して実施した。データは、S.D.S ソフトウェア v2.1 を使用して、閾サイクル (Ct) 値として取得した。それぞれの試料において、bag3 mRNA の相対的発現レベルを、内在性 GAPDH の発現に正規化した後、比較法の使用により得た。

20

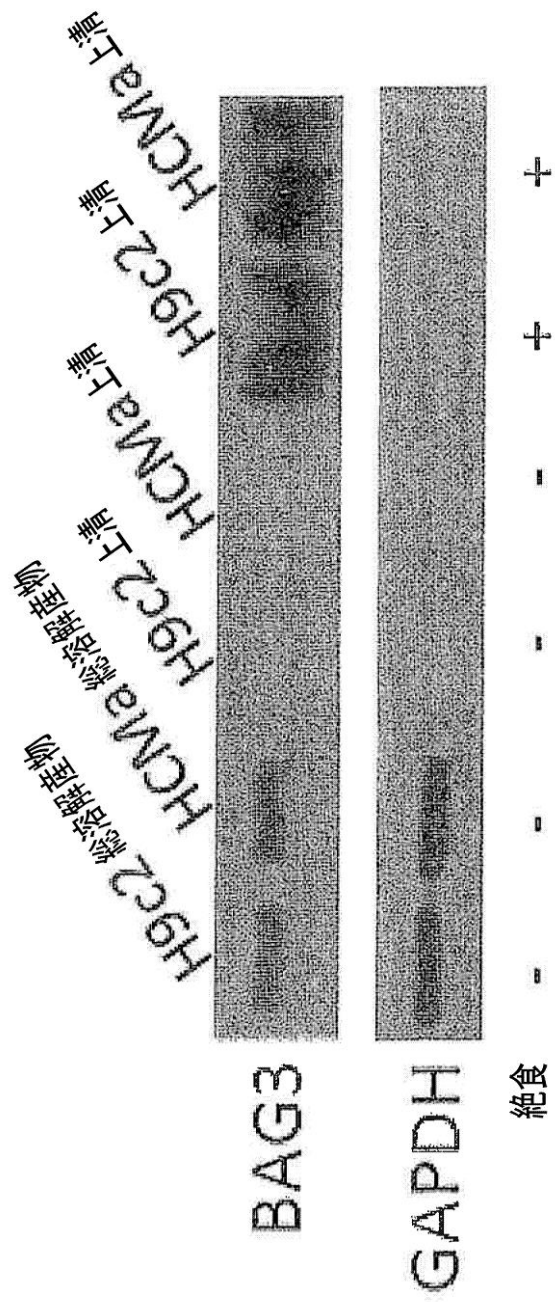
30

【0119】

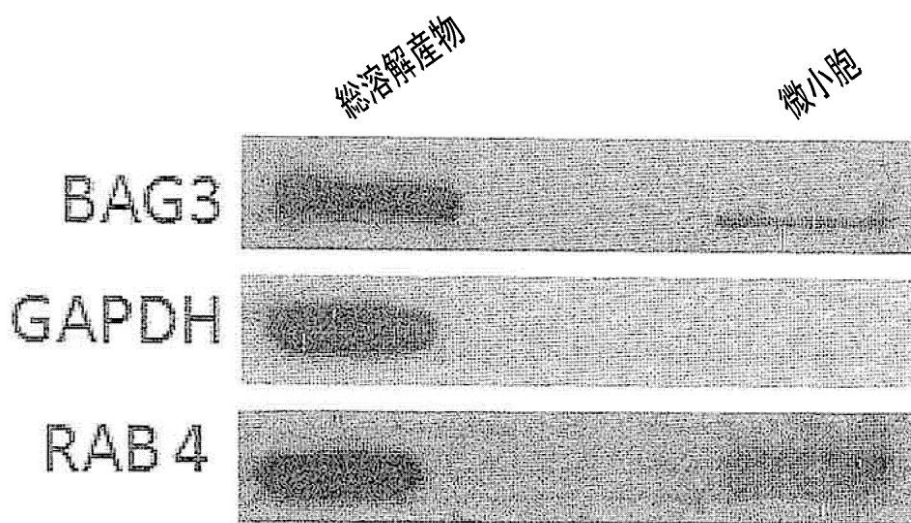
上記の記載および上記に示された実施例から、本発明により記載され、得られる生物学的マーカーによって得られる利点が、明らかである。

40

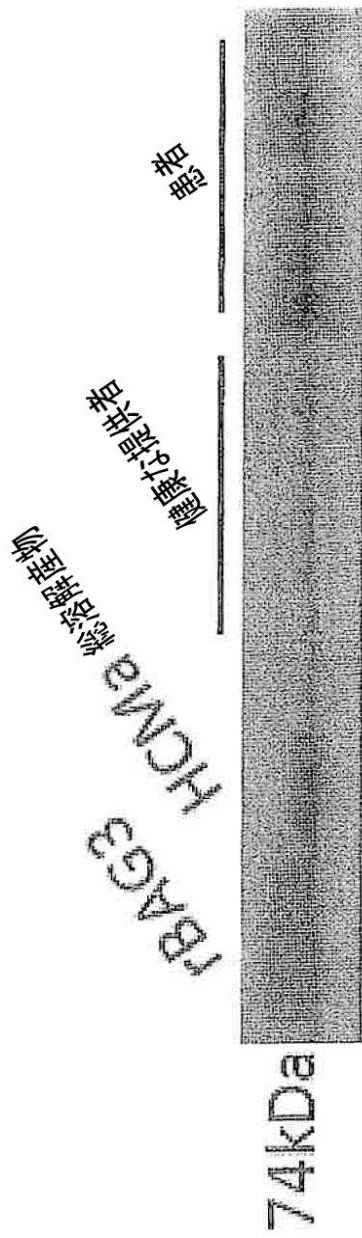
【図 1 A】



【図 1 B】



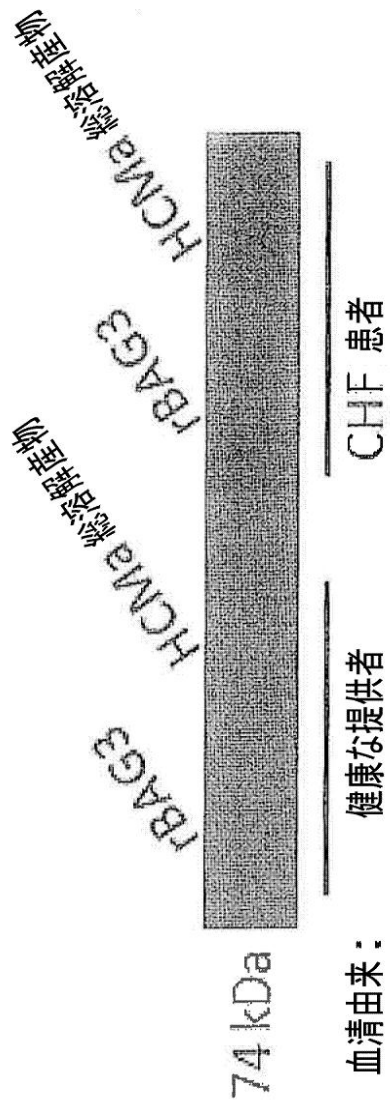
【図 1 C】



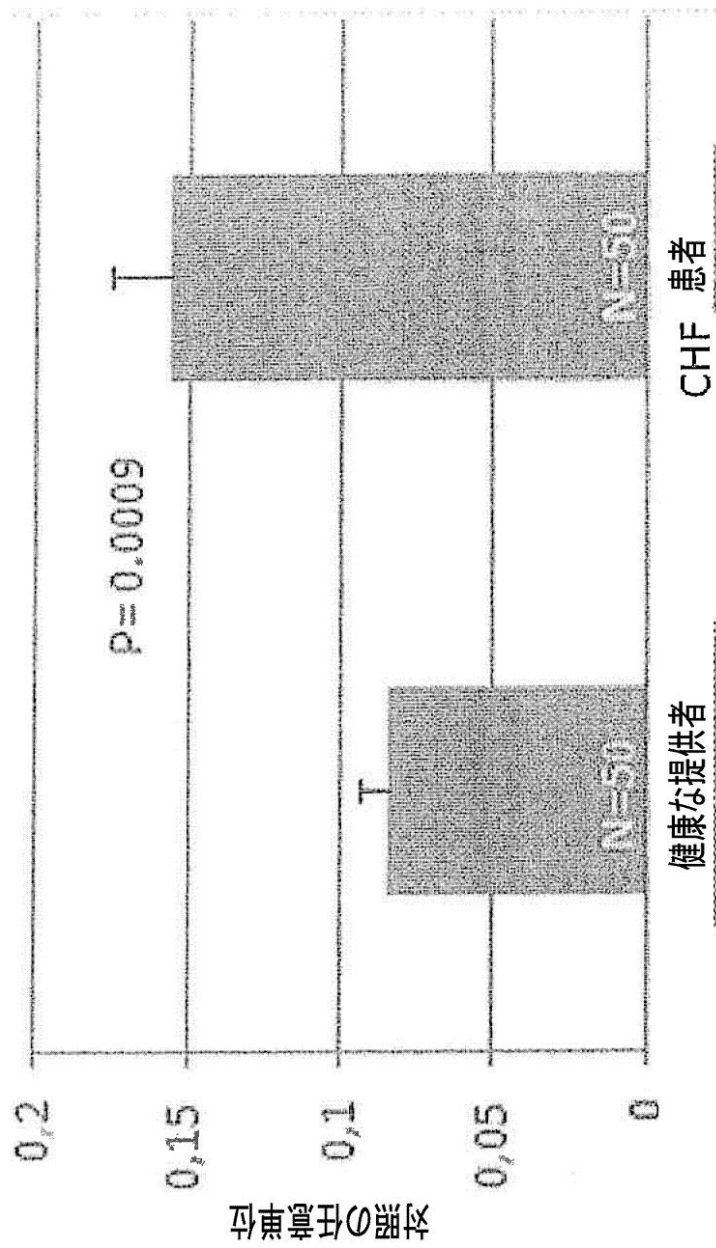
【 図 1 D 】

Pept:BAG3 aa	MW
81-106	2937.56
107-121	1819.92
140-149	1102.51
231-249	2311.12
494-536	4621.39
538-575	3747.66

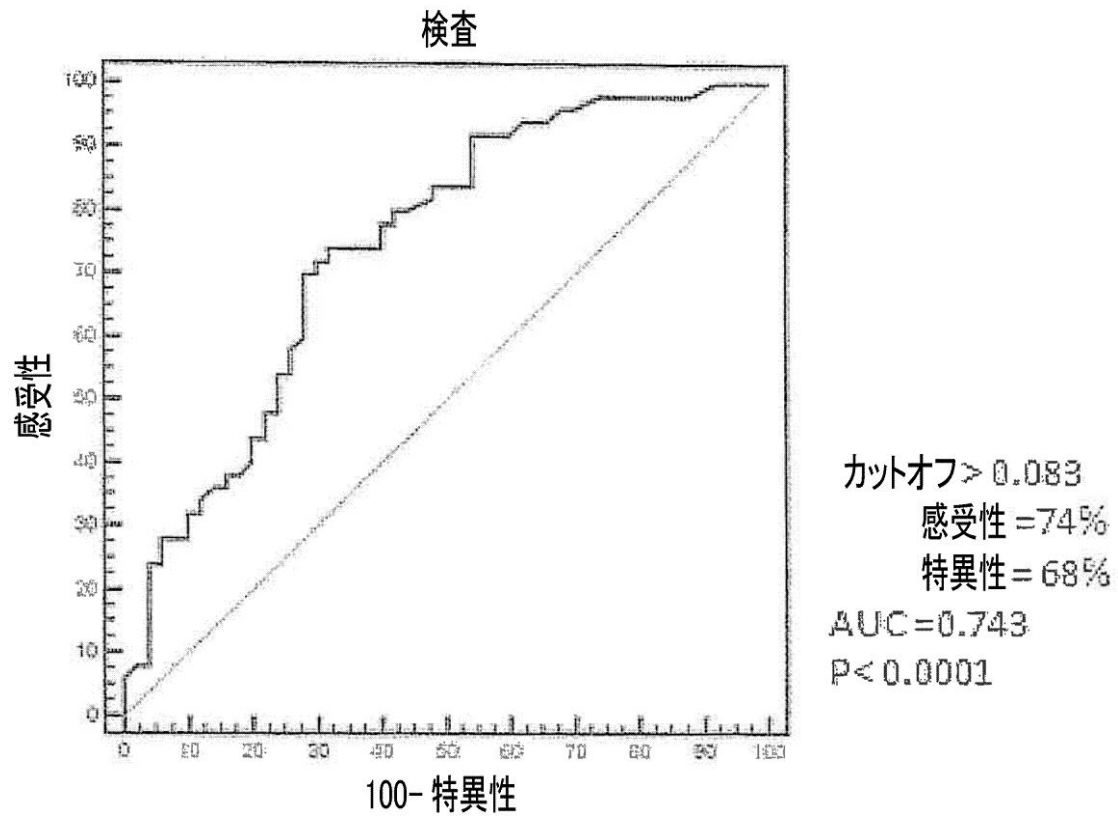
【図 2 A】



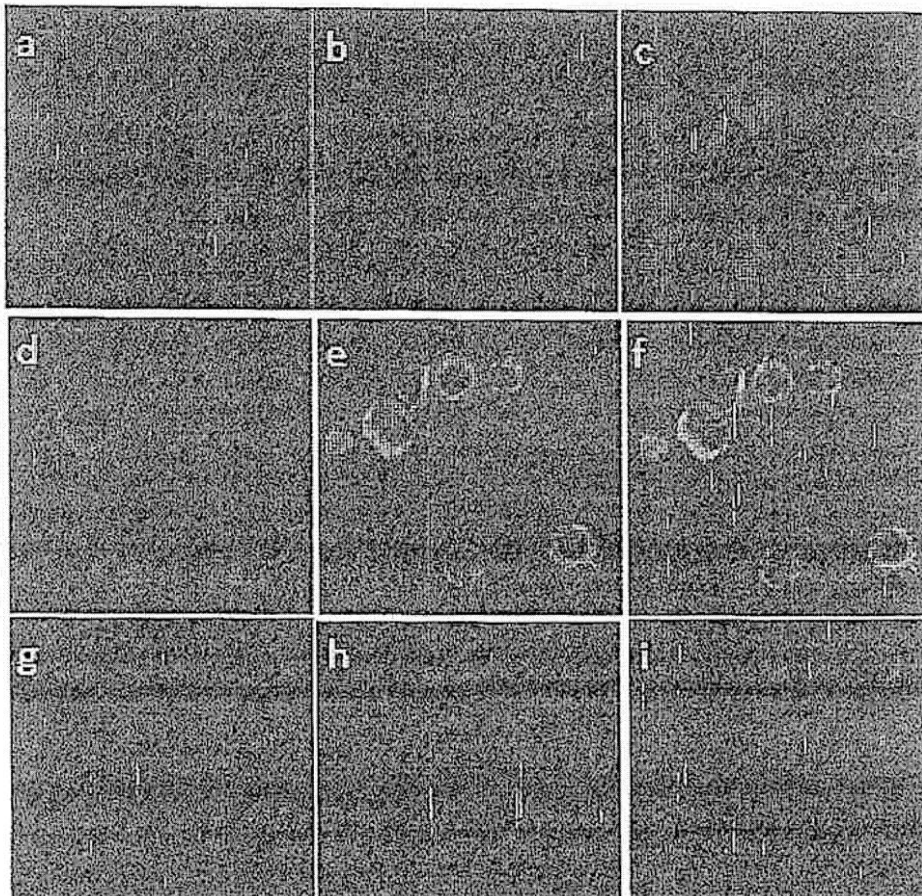
【図 2 B】



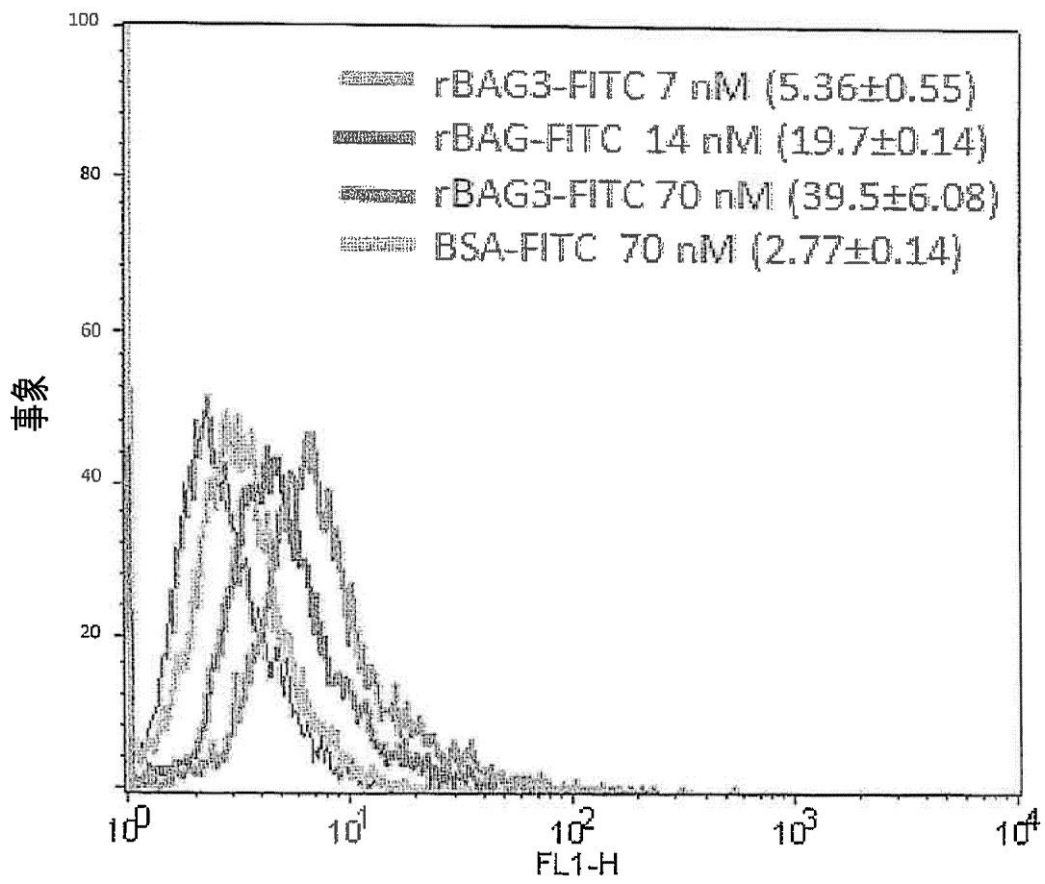
【図 2 C】



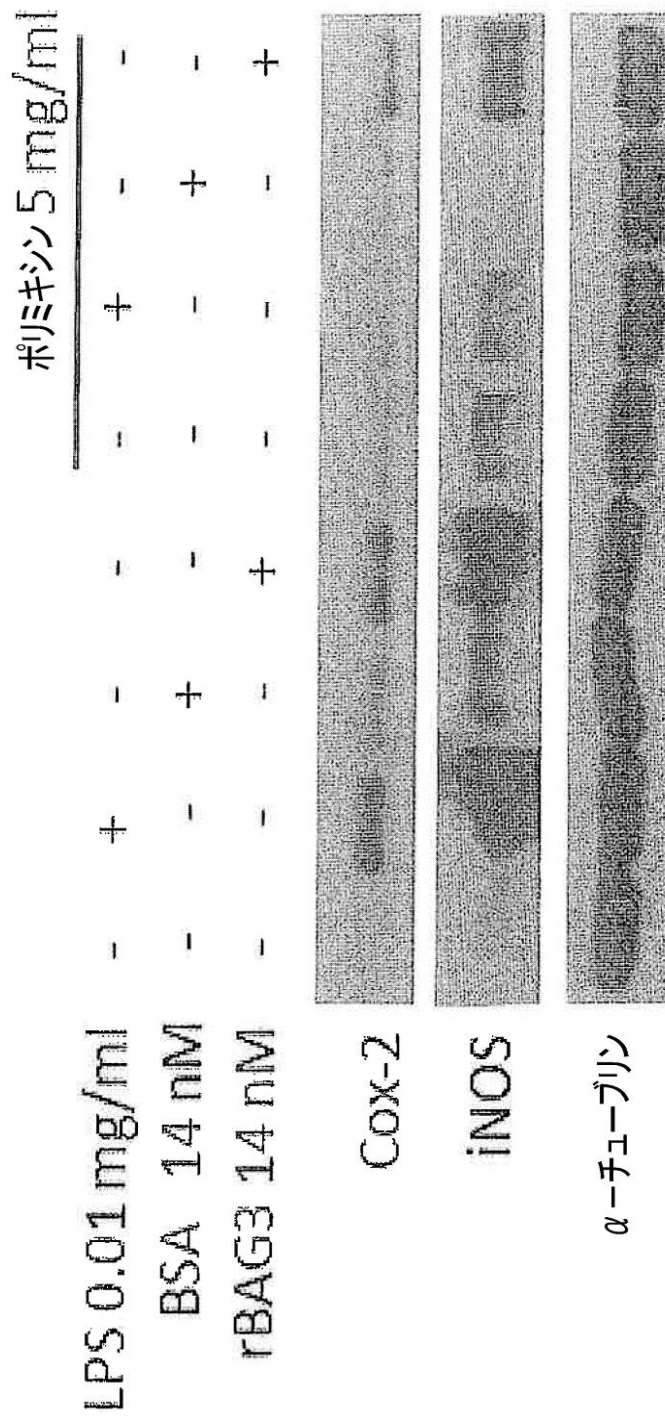
【図 3 A】



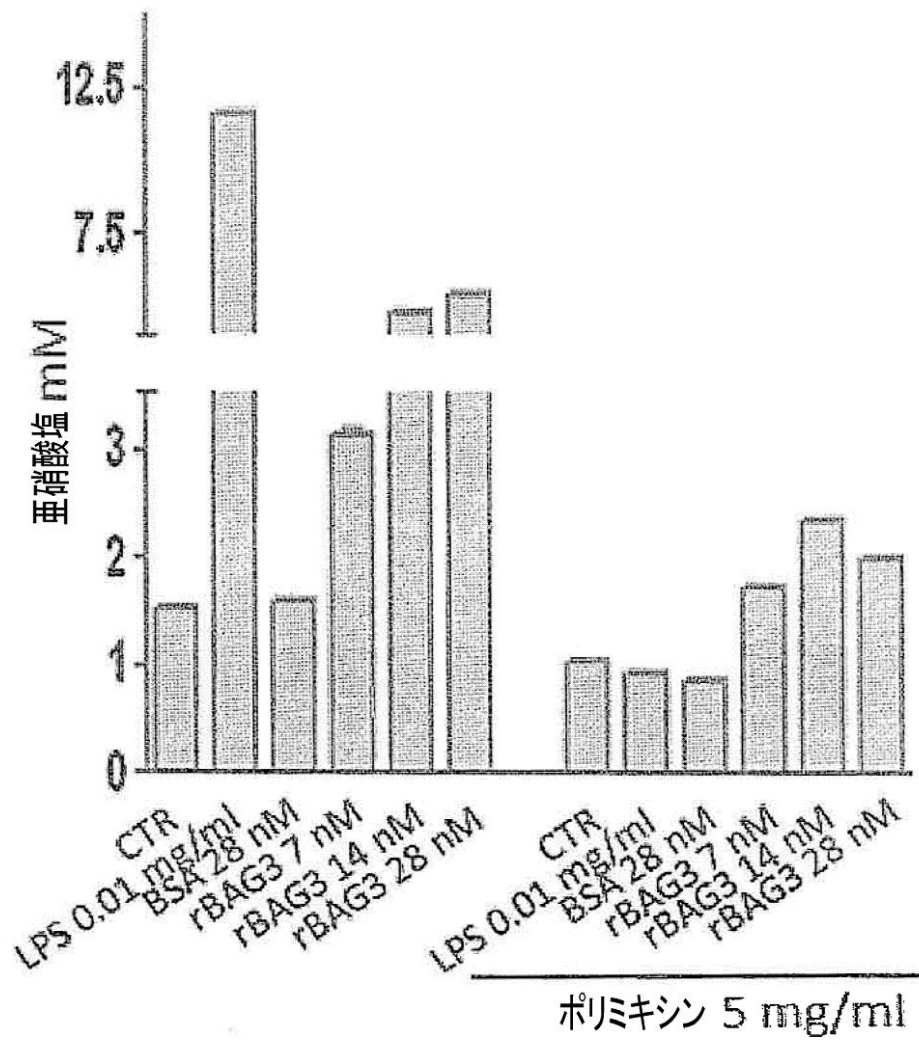
【図 3 B】



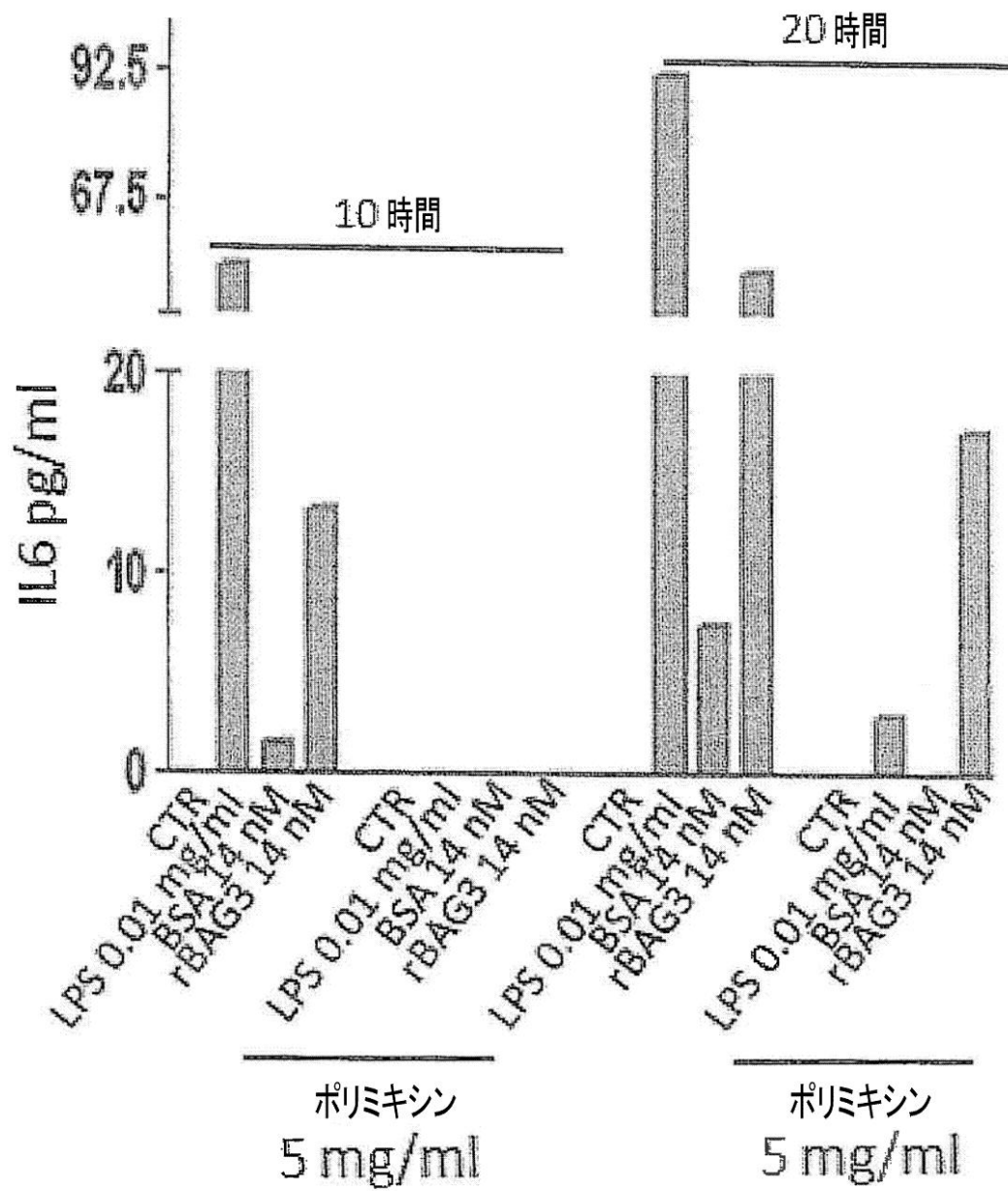
【図 3 C a】



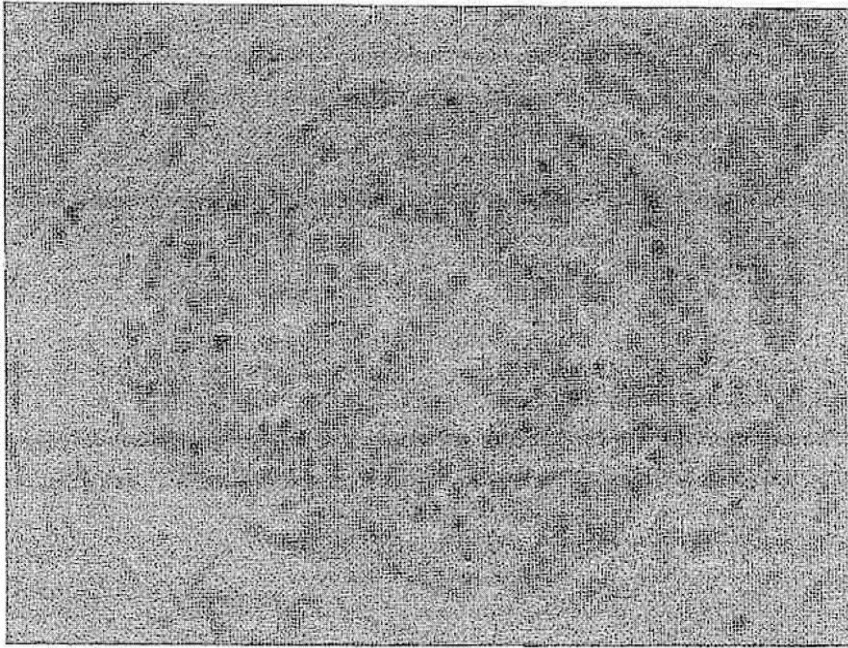
【図 3 C b】



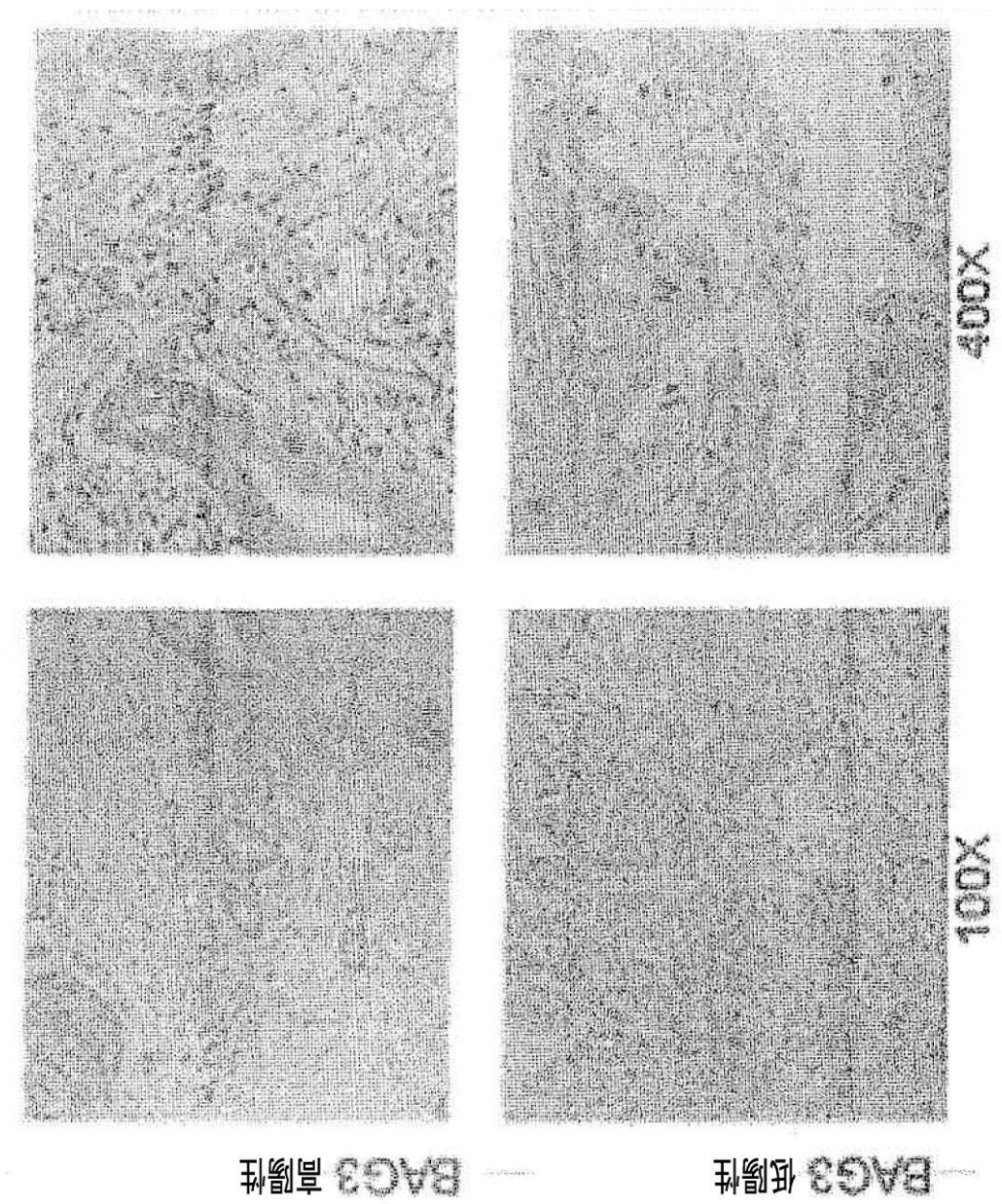
【図 3 C c】



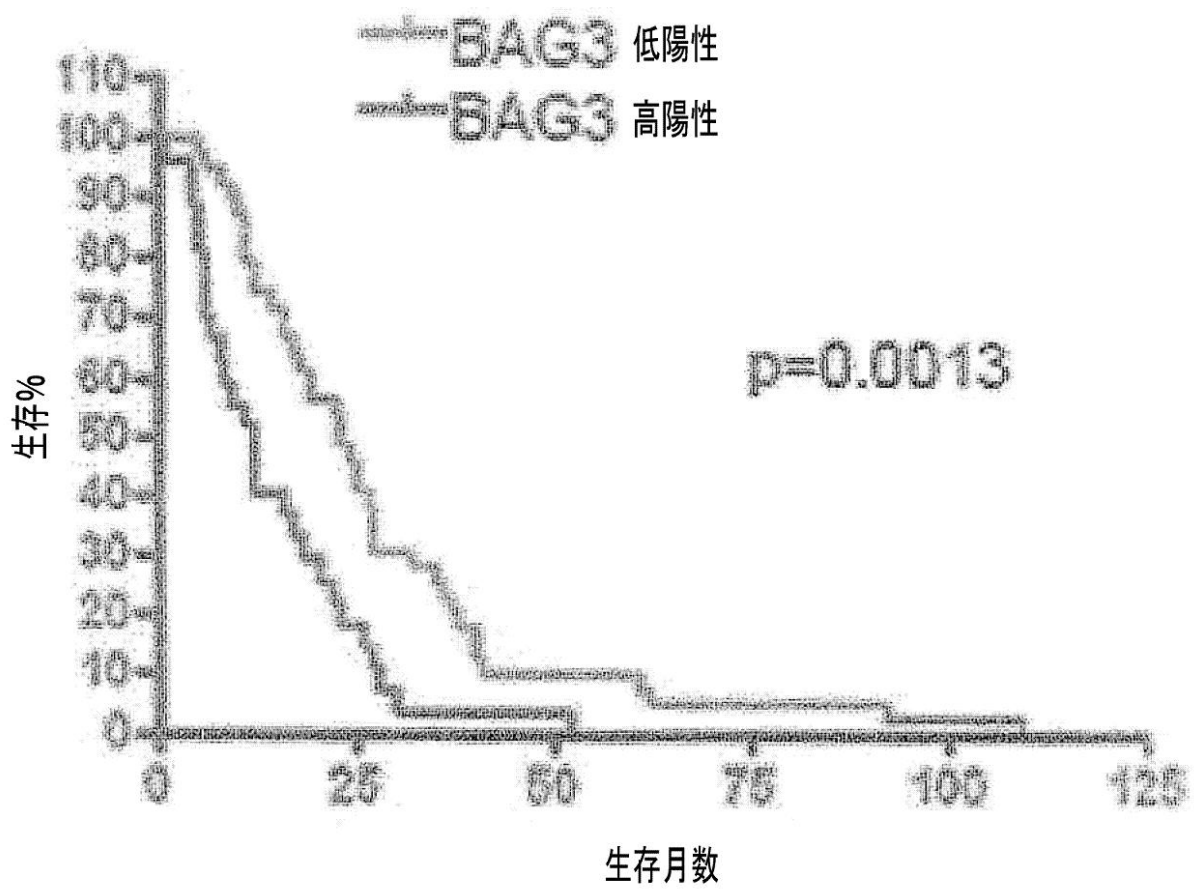
【図 4 A】



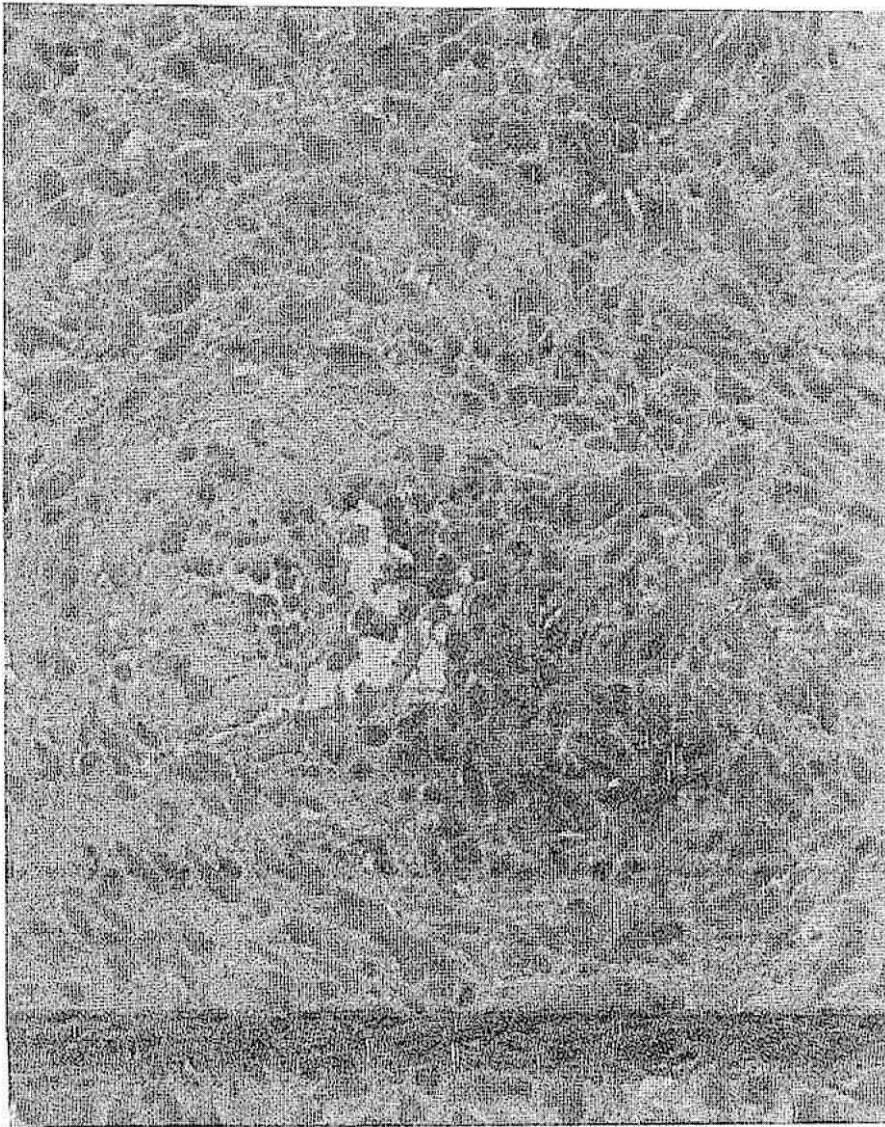
【図 4 B】



【図 4 C】



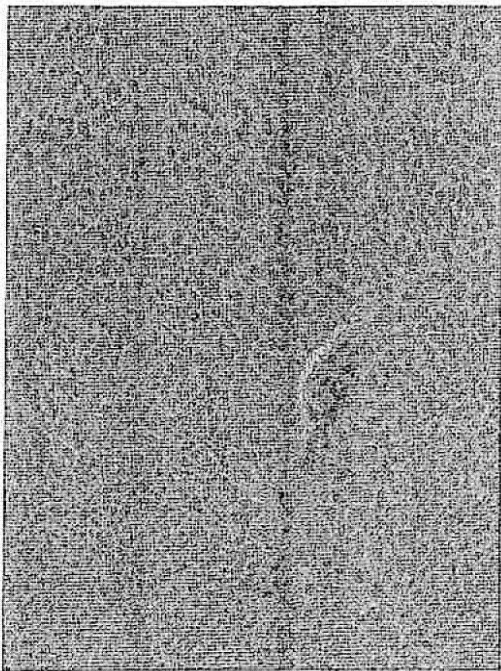
【図 5】



【図 6】

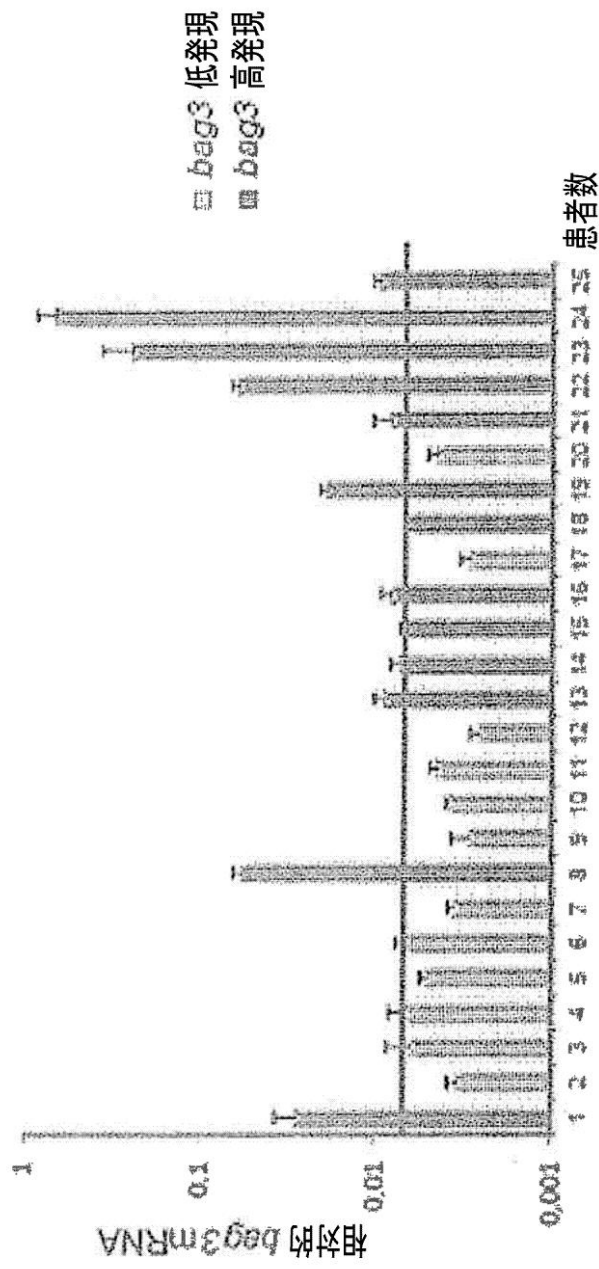


移行細胞膀胱癌

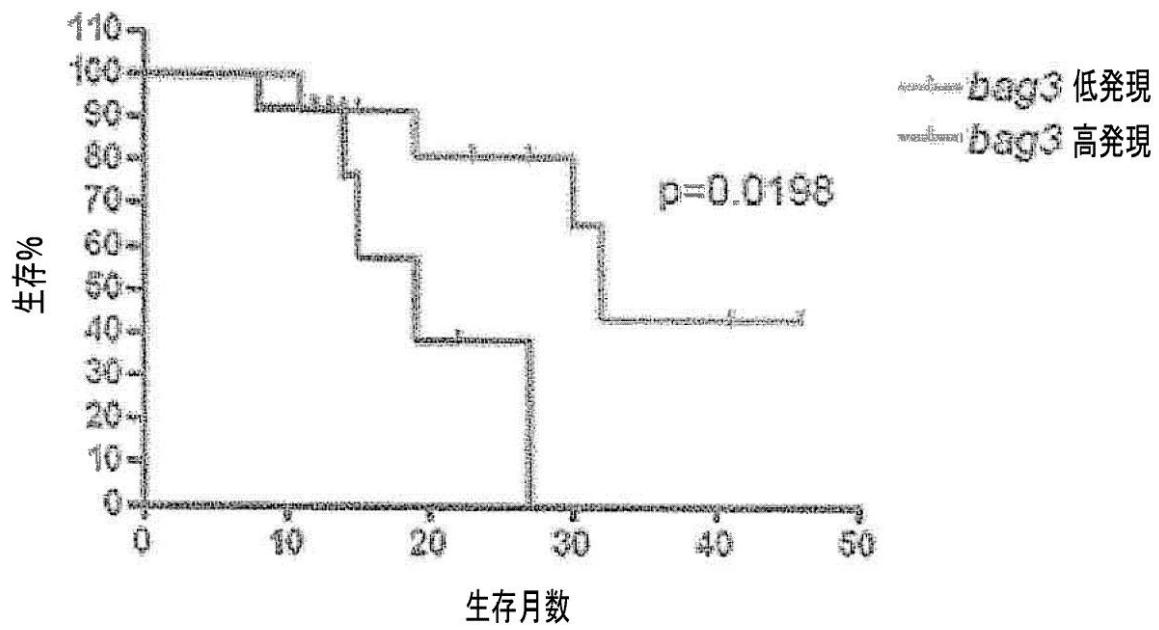


正常な膀胱

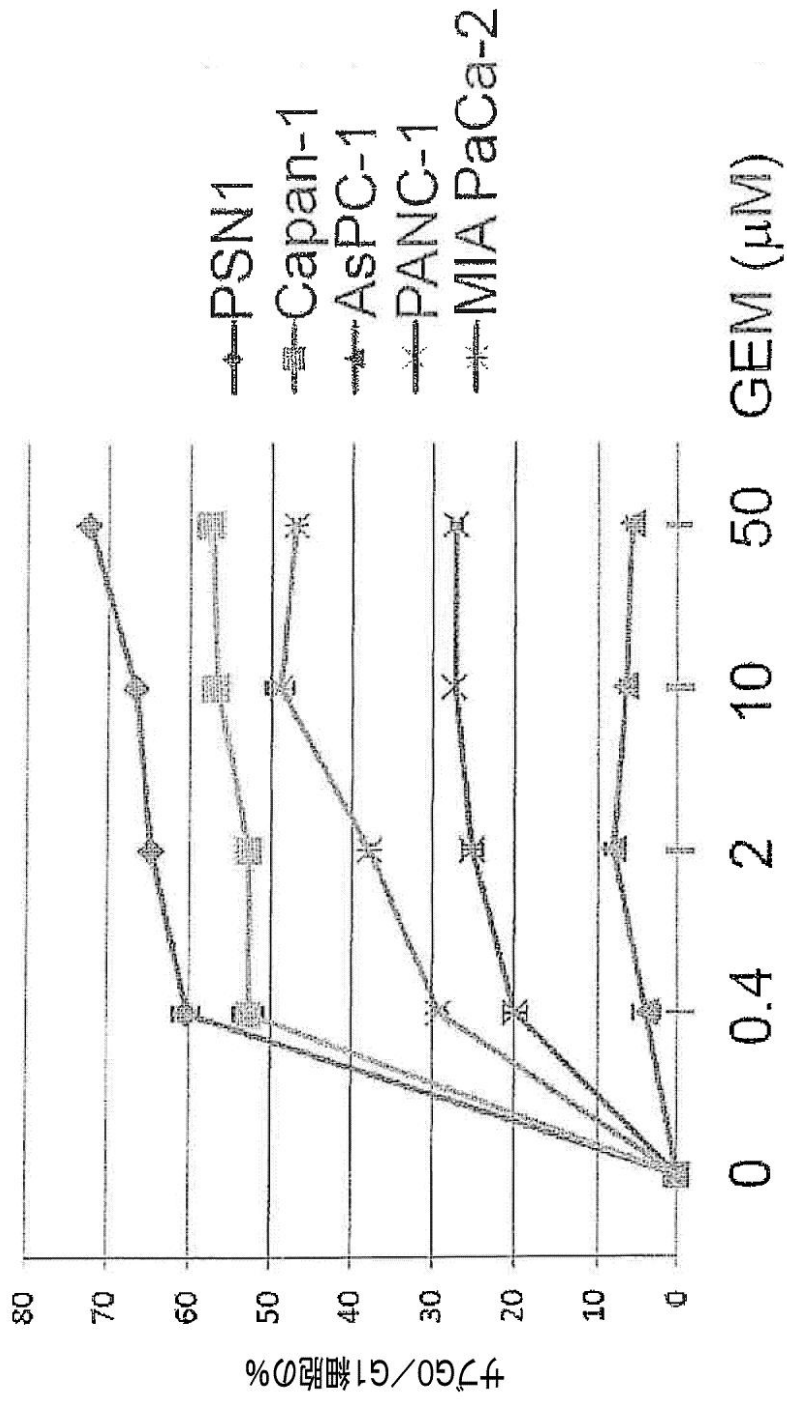
【図 7 A】



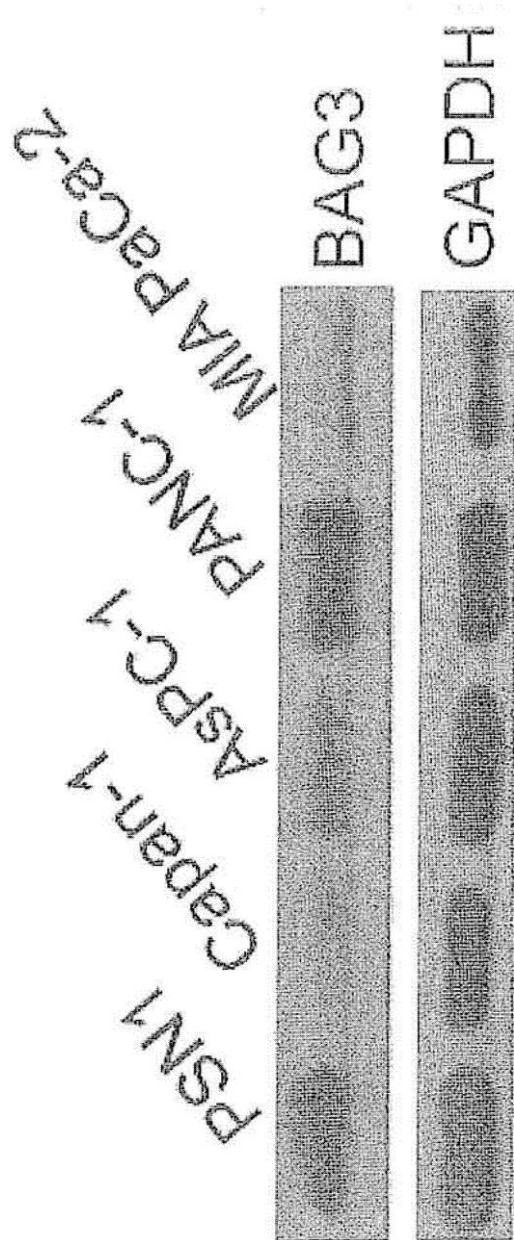
【図 7 B】

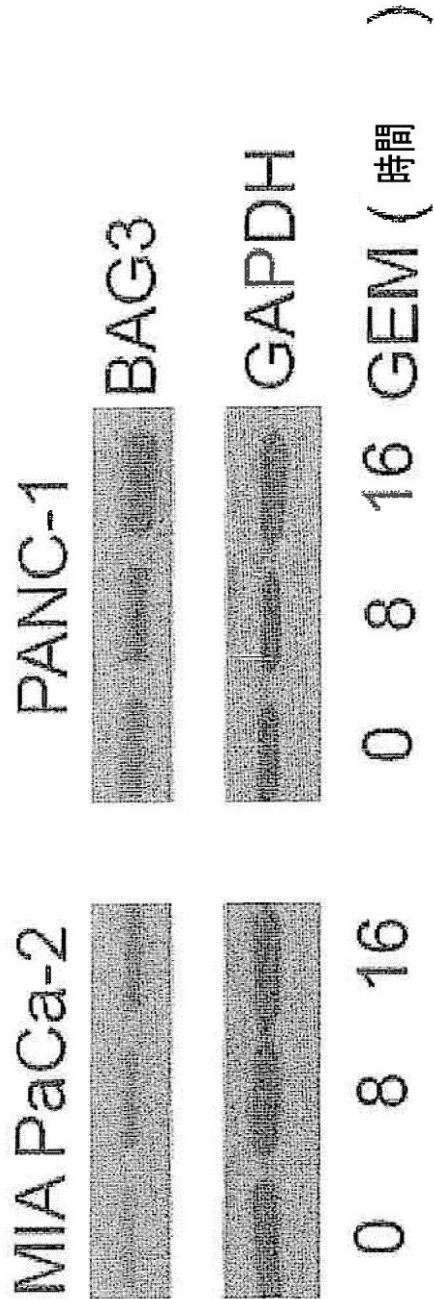


【図 8 A】

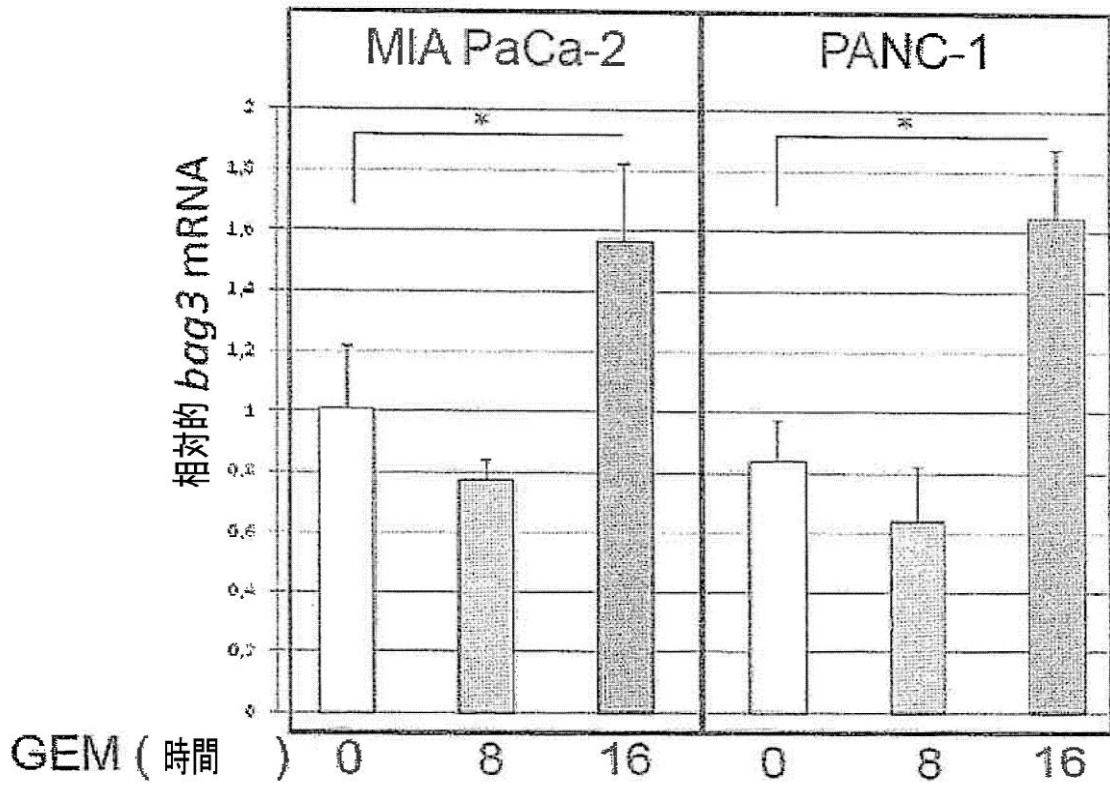


【図 8 B】



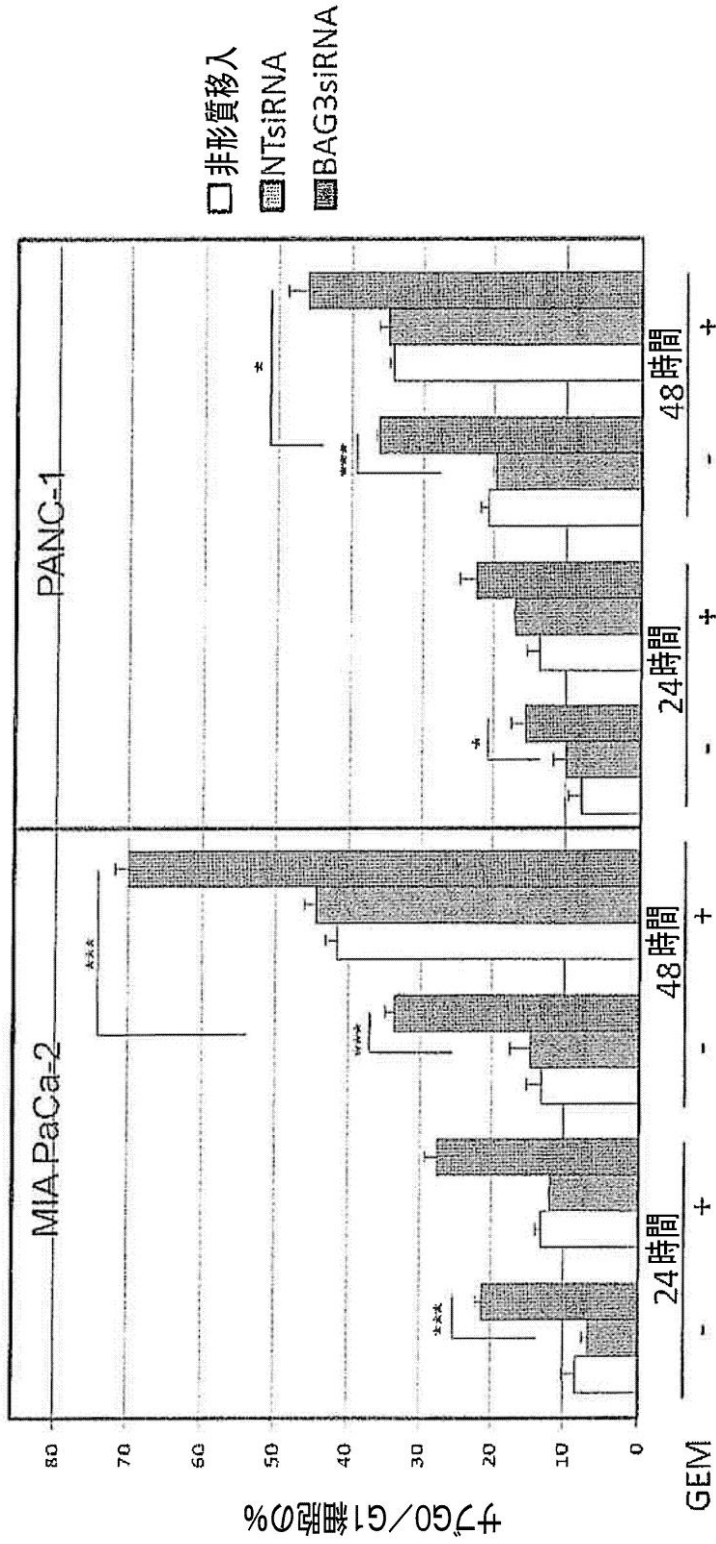


【図 8 D】

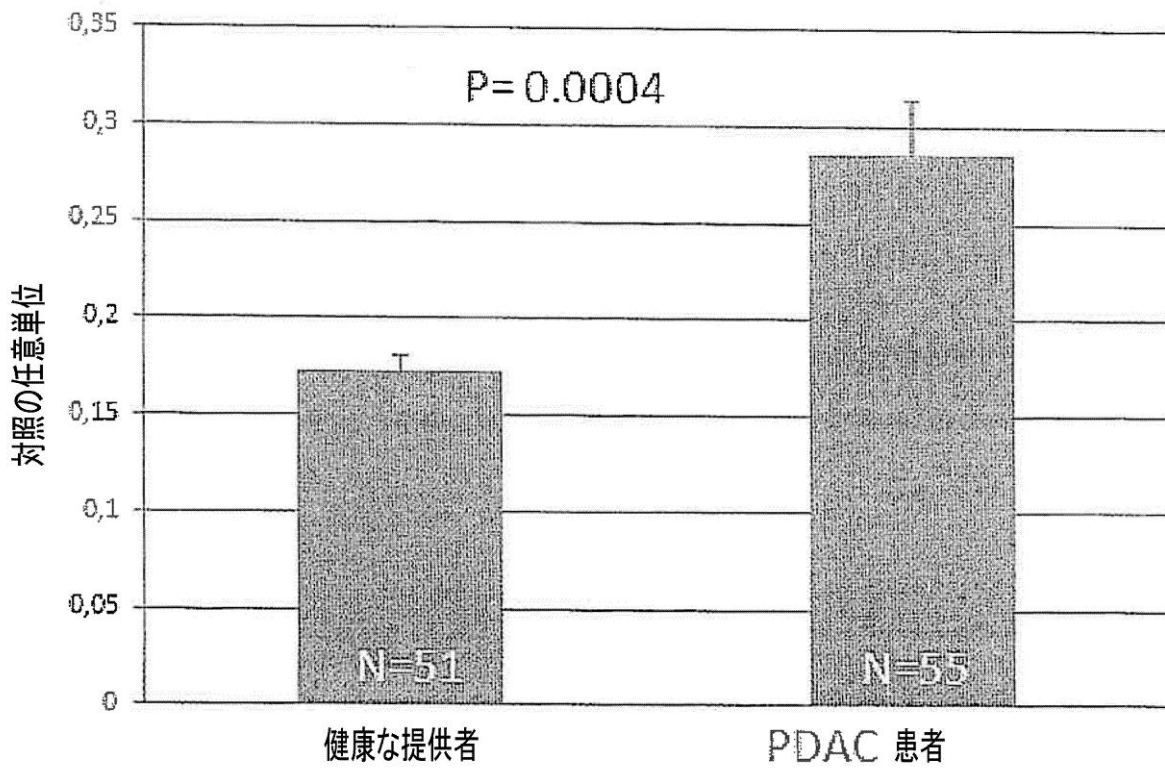


MIA PaCa-2		PANC-1				NTsiRNA BAG3siRNA GEM
BAG3		PANC-1				
GAPDH		PANC-1				
		PANC-1				
-	+	-	+	-	+	-
-	-	-	-	+	-	+
-	-	-	-	-	+	+

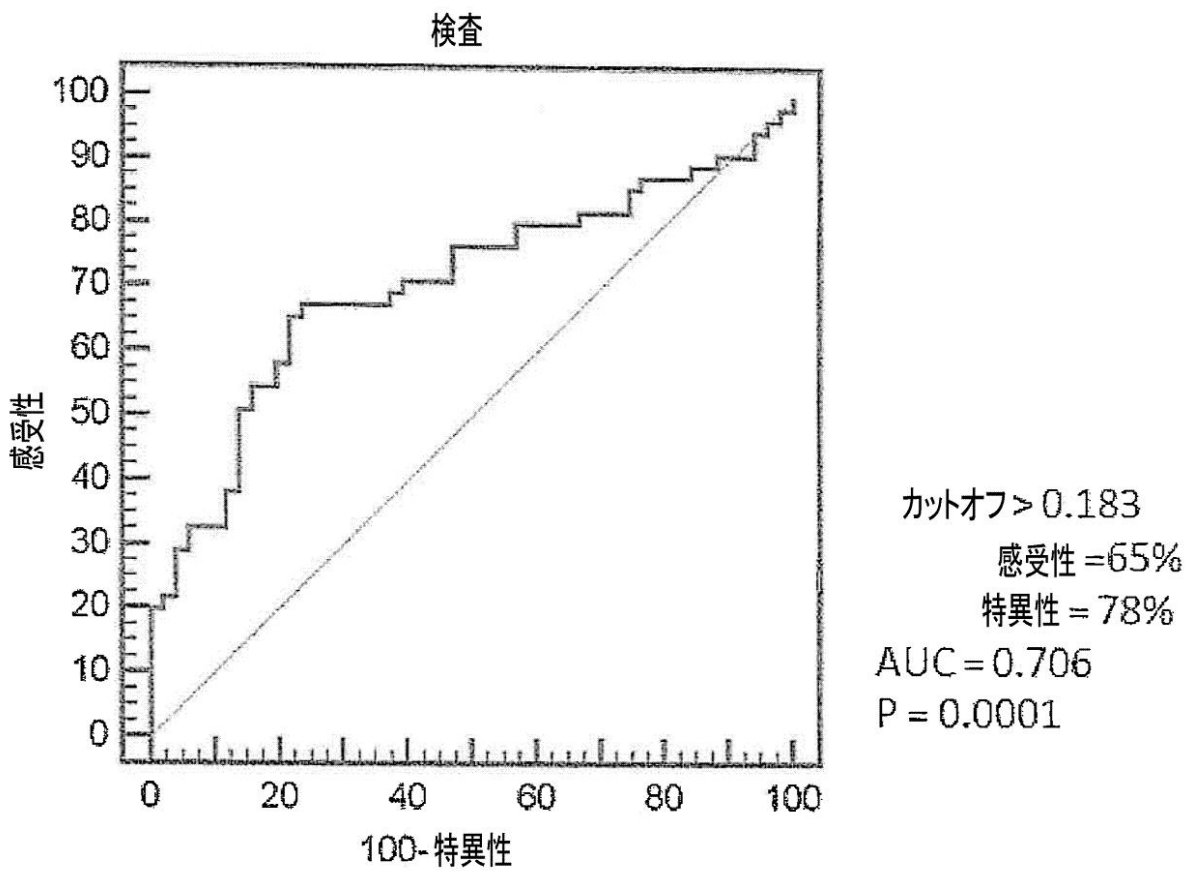
【図 8 F】



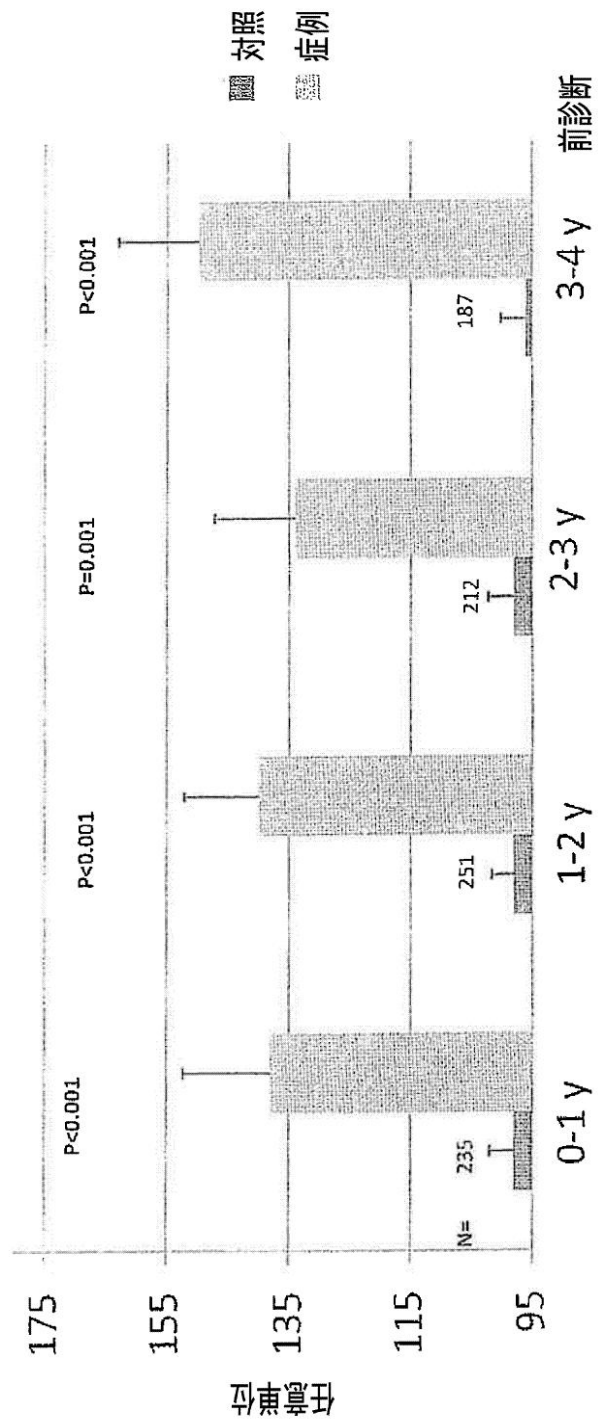
【図 9 A】



【図 9 B】



【図 10】



【配列表】

[2015529633000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/061976

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K15/18 C12Q1/68 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPO		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K G01N C12Q		
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) EP0-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/067377 A1 (BIOUNIVERSA S.R.L.) 9 June 2011 (2011-06-09)	1-15
Y	the whole document	1-18
X	----- M. FESTA ET AL.: "BAG3 protein is overexpressed in human glioblastoma and is a potential target for therapy.", THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 178, no. 6, 10 May 2011 (2011-05-10), pages 2504-2512, XP002685427, USA	1,3-5
Y	abstract figures page 2505, left-hand column, paragraph 3 ----- -/--	1-18
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
8 July 2013		18/07/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Nooij, Frans

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/061976

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/049664 A2 (SENSE PROTEOMIC LIMITED) 19 April 2012 (2012-04-19) claims table 1	1-18
Y	----- EP 1 323 733 A1 (A. LEONE & M. TURCO) 2 July 2003 (2003-07-02) paragraph [0025] figure 1 -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2013/061976

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☒ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/061976

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011067377 A1	09-06-2011	AU 2010326600 A1 CA 2782544 A1 CN 102725638 A EP 2507635 A1 JP 2013513101 A KR 20120121391 A US 2012244561 A1 WO 2011067377 A1	19-07-2012 09-06-2011 10-10-2012 10-10-2012 18-04-2013 05-11-2012 27-09-2012 09-06-2011
WO 2012049664 A2	19-04-2012	NONE	
EP 1323733 A1	02-07-2003	AT 495193 T AU 2002364302 A1 CA 2471924 A1 DK 1465927 T3 EP 1323733 A1 EP 1465927 A2 ES 2359396 T3 SI 1465927 T1 US 2005176660 A1 US 2009306192 A1 WO 03055908 A2	15-01-2011 15-07-2003 10-07-2003 18-04-2011 02-07-2003 13-10-2004 23-05-2011 31-05-2011 11-08-2005 10-12-2009 10-07-2003

フロントページの続き

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

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ53 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02
4B064 AG27 CA10 CE20 DA13 DA14
4H045 AA11 AA30 BA10 DA76 EA50 EA51 FA73 GA15

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015529633A5	公开(公告)日	2016-07-28
申请号	JP2015517672	申请日	2013-06-11
申请(专利权)人(译)	Biouniverusa Soshietta 一个 Resuonsabirita Rimitata		
[标]发明人	マリアカテリナタルコ		
发明人	マリア カテリナ タルコ		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68 C12P21/08		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N33/57407 G01N33/57434 G01N33/57438 G01N33/6887 G01N33/6893 G01N2333/47 G01N2800/324 G01N2800/325 G01N2800/7095 C07K14/47 C07K16/18 C07K2317/21 C12Q1/686 C12Q2527/101 G01N33/574 G01N33/68 C12Q2600/118 G01N33/57496		
FI分类号	C07K16/18.ZNA G01N33/53.D C12N15/00.A C12Q1/68.A C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/CA12 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CE20 4B064/DA13 4B064/DA14 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA73 4H045/GA15		
优先权	2012172531 2012-06-19 EP		
其他公开文献	JP6654432B2 JP2015529633A		

摘要(译)

本公开涉及诊断血清和组织标志物的领域。具体地，本公开涉及用作病理状态的血清标志物的抗BAG3抗体。此外，本公开涉及用于检测和评估生物样品中的抗BAG3抗体或BAG3 /抗体复合物的特异性ELISA方法和试剂盒。本公开进一步涉及用于检测和评估特定病理生理状态（心脏病，胰腺癌，膀胱癌）中的细胞内BAG3的免疫组织化学试剂盒。此外，本公开涉及BAG3特异性抗体，其修饰的衍生物和用于调节巨噬细胞活化的肽。