

(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2005-527813

(P2005-527813A)

(43) 公表日 平成17年9月15日(2005.9.15)

(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 D	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09	GO 1 N 33/566	4 H O 4 5
GO 1 N 33/566	GO 1 N 37/00 1 O 2	
GO 1 N 37/00	C 1 2 N 15/00 A	
// CO 7 K 14/705	CO 7 K 14/705	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2003-586617 (P2003-586617)
 (86) (22) 出願日 平成14年10月22日 (2002.10.22)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年12月17日 (2004.12.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2002/001975
 (87) 国際公開番号 W02003/089935
 (87) 国際公開日 平成15年10月30日 (2003.10.30)
 (31) 優先権主張番号 2002/21488
 (32) 優先日 平成14年4月19日 (2002.4.19)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

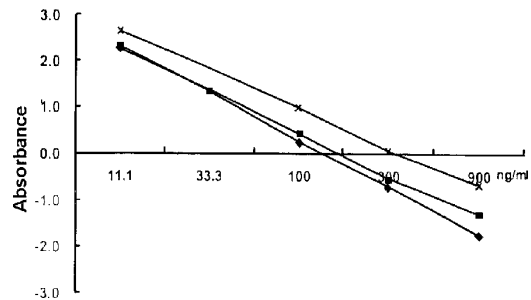
(71) 出願人 502411159
 リージェン バイオテック インコーポレ
 ーテッド
 大韓民国 ソウル サングブクーク ハウ
 オルゴクードン 39-1 キスト シー
 9231
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100108774
 弁理士 橋本 一憲
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 β ig-h3蛋白質の定量方法及びこれを利用した診断キット

(57) 【要約】

本発明は、 ig-h3蛋白質の定量方法及びそれを利用した診断キットに関するものである。詳細には、 ig-h3蛋白質または ig-h3蛋白質のfas-1ドメインに対する組換え蛋白質（その断片や誘導体を含む）とそのリガンドの特異的な結合反応を使用し、被検試料体液中に含まれた ig-h3蛋白質の量を測定する方法及び ig-h3蛋白質または ig-h3蛋白質のfas-1ドメインに対する組換え蛋白質（その断片や誘導体を含む）とそのリガンドを含む腎臓疾患、肝疾患、リュウマチ疾患または心臓血管疾患の診断キットに関するものである。本発明の定量方法及びキットは、腎臓疾患、肝臓疾患、慢性関節リュウマチまたは心臓血管疾患による損傷程度や経過を早期に鋭敏に診断する方法として効果的に使用できる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】

- 1) ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1 ドメインに対する組換え蛋白質、その断片または誘導体を製造する工程；
- 2) 前記工程1の蛋白質、その断片または誘導体に対する特異リガンドを製造する工程；及び
- 3) 前記工程1の蛋白質、その断片または誘導体と工程2のリガンドとの特異的結合反応を利用した定量方法を使用して被検試料中に含まれた ig-h3蛋白質の量を測定する工程を含む ig-h3の定量方法。

【請求項2】

前記工程2のリガンドが、抗体、RNA、DNA、脂質、蛋白質、有機化合物及び無機化合物からなる群から選択されることを特徴とする、請求項1に記載の定量方法。

【請求項3】

前記工程3のリガンドとの特異的結合反応が、抗原抗体反応であることを特徴とする、請求項1に記載の定量方法。

【請求項4】

前記抗原抗体反応が、免疫プロット、免疫沈澱法、ELISA方法、RIA、蛋白質チップ、ラピッド・アッセイ及びマイクロアレイからなる群から選択されることを特徴とする、請求項3に記載の定量方法。

【請求項5】

前記工程3の抗原抗体反応が、

- 1) ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1 ドメインに対する組換え蛋白質、その断片または誘導体を基質(matrix)にコーティングする工程；
- 2) 前記工程1の蛋白質、その断片または誘導体に対する抗体を被検試料と反応させる工程；
- 3) 工程1の吸着された蛋白質、その断片または誘導体に工程2の反応物を添加して反応させた後、洗浄する工程；及び
- 4) 工程3の反応物に2次抗体を添加して反応させ吸光度を測定する工程(工程4)を含むことを特徴とする、請求項3に記載の定量方法。

【請求項6】

前記 ig-h3蛋白質が、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を有するヒト ig-h3蛋白質、または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を有するマウス ig-h3蛋白質であることを特徴とする、請求項1乃至請求項5のいずれか1項に記載の定量方法。

【請求項7】

前記 ig-h3の fas-1 ドメインが、 ig-h3蛋白質の4番目 fas-1 ドメインを1個または2個乃至10個を反復して連結したことを特徴とする、請求項1乃至請求項5のいずれか1項に記載の定量方法。

【請求項8】

前記 ig-h3の fas-1 ドメインが、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9及び配列番号：10からなる群から選択されることを特徴とする、請求項7に記載の定量方法。

【請求項9】

前記被検試料が、尿、血液または滑膜液を含む人体のすべての体液であることを特徴とする、請求項1に記載の定量方法。

【請求項10】

ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1 ドメインに対する組換え蛋白質、その断片または誘導体及び ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1 ドメイン、その断片または誘導体に対する特異リガンドを含む腎臓疾患、肝臓疾患、リュウマチ疾患または血管疾患に対する診断キット。

【請求項11】

前記リガンドが、 ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1 ドメイン、その断片または誘導

10

20

30

40

50

体に特異的に結合する抗体、RNA、DNA、脂質、蛋白質、有機化合物及び無機化合物からなる群から選択されることを特徴とする請求項10に記載の診断キット。

【請求項12】

前記リガンドが、抗体であることを特徴とする請求項11に記載の診断キット。

【請求項13】

緩衝溶液、2次抗体、洗浄液、反応停止液または発色基質をさらに含むことを特徴とする請求項12に記載の診断キット。

【請求項14】

前記 ig-h3蛋白質が、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を有するヒト ig-h3蛋白質または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を有するマウス ig-h3蛋白質であることを特徴とする請求項10に記載の診断キット。

10

【請求項15】

前記 ig-h3の fas-1 ドメインが、 ig-h3蛋白質の4番目 fas-1 ドメインを1個または2個乃至10個を反復して連結したことを特徴とする請求項10に記載の診断キット。

【請求項16】

前記 ig-h3の fas-1 ドメインが、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9及び配列番号：10からなる群から選択されることを特徴とする請求項15に記載の診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

発明の分野

本発明は、 ig-h3蛋白質の定量方法及びこれを利用した診断キットに関するものである。詳細には、 ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1ドメインに対する組換え蛋白質(その断片または誘導体を含む)及びそのリガンドの特異的結合反応を使用して被検試料液体中に含まれた ig-h3蛋白質の量を測定する方法及び ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1ドメインに対する組換え蛋白質(その断片または誘導体を含む)及びその特異リガンドを含む腎臓疾患、肝臓疾患、リュウマチ疾患または血管疾患等の診断キットに関するものである。

【背景技術】

【0002】

30

発明の背景

ig-h3は、ヒトの黒色腫細胞(human melanoma cells)、哺乳動物の上皮細胞(mammary epithelial cells)、角質形成細胞(keratinocytes)及び肺繊維芽細胞(lung fibroblasts)等を含む様々な種類の細胞から、TGF- β により誘導される細胞外基質蛋白質(extracellular matrix protein)である。前記TGF- β (transforming growth factor- β)は、様々な種類の細胞の成長と分化に関与する物質で、哺乳類ではTGF- β 1、TGF- β 2及びTGF- β 3の3種類が存在し、成長調節、免疫反応の調節、骨生成の刺激、軟骨特異的分子(cartilage specific macromolecule)の誘導、創傷治癒促進等の色々な複雑な機能をすることが知られている(Bennett, N.T.等, Am. J. Surg. 1993年, 第165巻, P.728)。このようなTGF- β は、創傷治癒時期の上皮細胞で発現される。これは、再上皮化の間、角質形成細胞(keratinocyte)内のインテグリン(integrin)分子の発現を刺激するためのものであると見られる。TGF- β 発現に関する最近の研究では、TGF- β 3 mRNAが正常皮膚の上皮や急性及び慢性創傷で再生される上皮層で発現され、TGF- β 1 mRNAは、正常皮膚と慢性創傷では発現されないが、急性創傷で再生される上皮層で発現され、TGF- β 2 mRNAは発現されないことが明らかにされた(Schmid, P. 等, J. Pathol., 1993年, 第171巻, P.191)。現在、前記機序に対する定説が確立されたものではないけれどTGF- β が再上皮化に大きな役割をするものと予測されている。

40

【0003】

前記したTGF- β の関連遺伝子として知られる ig-h3は、ストニア(Stonier)等により始めて同定された遺伝子で、TGF- β 1を処理したヒトの肺腺癌(lung adenocarcinoma)細胞

50

株のA549細胞株からcDNAライブラリ差等スクリーニング(differential screening)資料の選別中に同定された。TGF- β 1で処理した後2日で20倍以上の増加を示すと報告された(Sto n i e r, J. 等, DNA cell Biol., 1992年、第11巻、P.511)。DNA配列分析によって ig-h3蛋白質は、アミノ末端分泌配列(amino-terminal secretory sequence)と幾つかのインテグリンに対するリガンド 識別(ligand recognition)が可能なカルボキシ末端(carboxy-terminal) Arg-Gly-Asp(RGD)配列を持った配列番号:1で表わされる683個のアミノ酸で構成されていることが明らかにされた。

【0004】

ig-h3は、RGDモチーフと共に相同性を持った4個の内部反復ドメイン(internal repeated domain)を含んでいる。これらは、哺乳類、昆虫、ウニ(sea urchin)、植物、酵母及び細菌を含む色々な種の分泌蛋白質または膜蛋白質から非常に保存的な配列として発見される。前記保存的な配列を含む蛋白質には、ペリオスチン(perioestin)、ファシクリンI(fasciclin I)、ウニHLC-2、アルガル-CAM(algal-CAM)及びミコバクテリウムMPB70(myco bacterium MPB70)等が含まれる(Kawamoto, T. 等, Biochem. Biophys. Acta., 1998年、第1395巻、P.288)。このような蛋白質で保存的に発見される相同性ドメイン(以下「fas-1ドメイン」と略称する)は、110乃至140個のアミノ酸で構成され、約10個のアミノ酸で構成された非常に保存的な二個の側鎖(H1及びH2)を含んでいる。前記蛋白質中で ig-h3、ペリオスチン及びファシクリンIは、4個のfas-1ドメインを持ち、HLC-2は2個、MPB70はただ1個のfas-1ドメインを持っている。前記蛋白質の生物学的機能が正確に明されたものではないけれど、これらの中の幾つかが細胞付着分子(cell adhesion molecule)として細胞付着(attachment)と脱着(detachment)を媒介するものと知られている。例えば、ig-h3、ペリオスチン及びファシクリンIは、各々繊維芽細胞、骨芽細胞及び神経細胞の付着を媒介するものとして報告された。アルガル-CAMは、鳥類ボボルクス(Vovolx)の胚(embryos)に存在する細胞付着分子であることが明らかにされた(LeBaron, R. G. 等, J. Invest. Dermatol., 1995年、第104巻、P.844 ; Horiuchi, K. 等, J. Bone Miner. Res., 1999年、第14巻、P.1239 ; Huber, O. 等, EMBO J., 1994年、第13巻、P.4212)。

【0005】

精製された ig-h3蛋白質は、皮膚繊維芽細胞の付着と拡散を促進させる一方、無血清培地でA549、HeLa及びWI-38細胞の付着を阻害する。特に、ig-h3は、腫瘍細胞の成長、コロニー形成及び出現を阻害するものとして知られていて、実例としてチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(Chinese hamster ovary cells)に ig-h3発現ベクターを転移(transfection)させたヌードマウスで前記細胞の腫瘍形成能が顕著に減少することが、米国特許第5,599,788号及び第5,714,588号に開示されていた。また、早くて効果的な傷の治癒のために有効な量の ig-h3を傷と接触させることより細胞、特に繊維芽細胞が傷部位に拡がり粘着することを促進させられる方法が、前記特許に開示されている。したがって、ig-h3は種々の細胞でTGF- β 1により高度に誘導される細胞付着分子として細胞成長(cell growth)、細胞分化(cell differentiation)、創傷治癒(wound healing)、形態形成(morphogenesis)及び細胞付着(cell adhesion)において非常に重要な役割を担っている。

【0006】

前記のように、ig-h3は医学的に様々な有用性が期待される物質でありながら、生体内で極少量しか採取できないので安定的な供給が困難な問題点がある。このような問題点を解決するために遺伝子組換えにより真核生物細胞系で発現させ、製造する方法が開発されたけれど、真核生物細胞系で発現させる場合、ig-h3を作り出す細胞は ig-h3を作らない細胞より細胞の成長がずっと遅いため、十分な量の細胞数を確保することが難しい。したがって、本発明者らは、大腸菌を宿主にして ig-h3蛋白質の全体及びその一部ドメインを含む組換え蛋白質を大量発現させる精製方法を確立し、組換え蛋白質が細胞付着及び拡散を支持することを確認して出願したことがある(大韓民国特許出願第2000-25664号)。

【0007】

一方、細胞付着分子として ig-h3の細胞付着活性は、ヒトの皮膚繊維芽細胞(dermal f 50

ibroblasts)で最初に報告された後、軟骨芽細胞(chondrocytes)、腹膜繊維芽細胞(peritoneal fibroblasts)及びヒトのMRC5繊維芽細胞等でも報告された。このような ig-h3の細胞付着活性は、初期には ig-h3のカルボキシル-末端に存在するRGDモチーフにより媒介されるものと考えられたが、RGDモチーフが軟骨芽細胞の分散を促進するのに必要ではなく、カルボキシル末端プロセッシング(carboxyl-terminus processing)によりRGDモチーフが欠失した成熟した形態の ig-h3が細胞付着を抑制できることが報告されて、RGDモチーフが ig-h3の細胞付着活性を媒介するのに必須不可欠な要素ではないことが確認された。また、最近の研究結果から、 ig-h3はインテグリン $\alpha 1$ を通じて繊維芽細胞の分散を増加させる反面、 ig-h3のRGDモチーフは ig-h3-媒介性細胞分散に要求されず、 ig-h3が独自のインテグリン $\alpha 1$ と作用して細胞の癒着と拡張を促進させることが明らかにされた(Ohno, S., 等, Biochim. Biophys. Acta, 1999年、第1451巻、P.196)。また、 ig-h3内保存的H1及びH2ペプチドもまた ig-h3-媒介性細胞付着に効果的な影響を及ぼし得ないことが確認された。このような結果は、 ig-h3の細胞付着活性のために必須的なアミノ酸がH1及びH2地域ではない他の場所に存在することを意味し、 ig-h3の反復 fas-1ドメインだけではなく他の蛋白質の fas-1ドメインとの相同性を比較したコンピュータ分析の結果、やはりH1及びH2以外にも幾つかの非常に保存的なアミノ酸が存在し、これらが細胞付着活性に関与できることを提示した。

10

20

30

40

50

【0008】

したがって、本発明者らは、細胞付着及び脱着活性に関与する保存的モチーフを明らかにし、これを含むペプチドを製造しようとして研究した結果、細胞付着分子として知られた ig-h3の第2及び第4ドメインを利用して機能的細胞受容体として $\alpha 3$ インテグリンと結合して細胞付着及び脱着活性を媒介するペプチド NKDIL及びEPDIM及びその誘導体を製造し、 ig-h3の第2及び第4ドメイン内H2 地域近くに位置する2個の非常に保存的なアミノ酸であるアスパラギン酸(aspartic acid, Asp)及びイソロイシン(isoleucine, Ile)が細胞付着及び脱着活性のための必須的なアミノ酸として作用することを明らかにして特許出願したことがある(大韓民国特許出願第2000-25665号)。

【0009】

一方、今まで ig-h3は、ヒトにおいて種々の腫瘍との関連性の他には、 ig-h3が直接的に他の疾患と関連あるという報告はなされていないのが実情で、特に ig-h3 蛋白質の発現と腎臓疾患、肝臓疾患、リュウマチ疾患または血管疾患の発病との直接的な関係に対してはまったく報告されておらず、体液で ig-h3蛋白質の量を測定して疾患と連結できる可能性に対してはまったく報告されることがない。

【0010】

それで、本発明者らは、 ig-h3または ig-h3の4番目 fas-1ドメインを幾つか連結して組換えした蛋白質を ig-h3測定時の標準蛋白質として使用する ig-h3の定量方法及びこれを利用して ig-h3を定量する診断キットを開発した。前記方法を利用して腎臓疾患、肝臓疾患、リュウマチ疾患または血管疾患を始めとする様々な疾患を早期に鋭敏に診断して治療に対する反応程度、予後の判定をできることを明らかにして本発明を完成した。

【発明の開示】**【0011】**

発明の要約

本発明の目的は、 ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1ドメインに対する組換え蛋白質を使用した ig-h3蛋白質の定量方法及び前記定量方法を利用した診断キットを提供することである。

【0012】

発明の詳細な説明

前記目的を達成するために本発明は、 ig-h3蛋白質を定量する方法を提供する。

【0013】

また、本発明は、前記 ig-h3蛋白質の定量方法を利用した腎臓疾患、肝疾患、リュウ

マチ疾患または血管疾患の診断キットを提供する。

【0014】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の ig-h3の定量方法は、

- 1) ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1ドメインに対する組換え蛋白質、その断片または誘導体を製造する工程、
- 2) 前記工程1の蛋白質、その断片または誘導体に対する特異リガンドを製造する工程、及び
- 3) 前記工程1の蛋白質、その断片または誘導体と工程2のリガンドとの特異的結合反応を利用した定量方法を使用して被検試料中に含まれた ig-h3蛋白質の量を測定する工程で構成される。

10

【0015】

前記工程1において、 ig-h3蛋白質は配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を持ったヒト ig-h3蛋白質または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を持ったマウス ig-h3蛋白質である。ヒトとマウスの ig-h3蛋白質構成要素は、図1に示した。図1の斜線及び格子の部分は、反復する fas-1ドメインの I、II、III、IVの非常に保存された配列を示し、白抜きの部分はRGDモチーフを示す。

【0016】

ig-h3蛋白質は、4個の fas-1ドメインを持っているが、前記工程1の ig-h3の fas-1ドメインは、 ig-h3蛋白質の1番目乃至4番目 fas-1ドメインの中から選ばれた一つまたは二つ以上のドメインを使用でき、4番目 fas-1ドメインを使用することが好ましい。また、前記4番目 fas-1ドメインは、単独で、または多く反復連結した組換え蛋白質で使用でき、1~10個連結したものが好ましい。1~4個連結した組換え蛋白質を使用することがさらに好ましい。本発明では、好ましい実施様態として ig-h3の4番目ドメインを1個、2個、3個または4個連結して組換えた蛋白質を使用した場合を例示した。

20

【0017】

本発明では、 ig-h3のアミノ酸配列中502から632までの第4fas-1ドメインを各々1個乃至4個含む各々配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9及び配列番号：10で表わされるアミノ酸配列を持った蛋白質を製造した。これを各々「 ig-h3D-IV(1x)」、「 ig-h3D-IV(2x)」、「 ig-h3D-IV(3x)」及び「 ig-h3D-IV(4x)」と命名した(図4参照)。

30

【0018】

本発明で前記 ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1ドメインに対する組換え蛋白質の断片には、下記のリガンドと特異的結合反応を起こすことができる前記蛋白質のエピトープ(epitope)部位またはプロテアーゼによる加水分解されたペプチドを含むすべての前記蛋白質の一部が可能である。また本発明で ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1ドメインに対する組換え蛋白質の誘導体は、前記蛋白質のリン酸化(phosphorylation)またはグリコシル化(glycosylation)等を含む共有結合反応及びイオン結合、配位結合、水素結合、疎水性結合またはファンデルワールス結合を含む非共有結合反応による前記蛋白質の誘導体であることが可能である。合わせて、前記蛋白質誘導体の断片も下記のリガンドと特異的結合反応が起きるなら、本発明の蛋白質範囲に含まれる。

40

【0019】

本発明の標準蛋白質を製造するにあたり発現ベクターと形質転換は、通常の方法で行なうことができる。

【0020】

前記工程2において、 ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1ドメイン、その断片または誘導体に対する特異リガンドは、工程1の蛋白質または組換え蛋白質(その断片または誘導体を含む)との結合反応により確認され、リガンドの種類としては、抗体、RNA、DNAのような核酸、脂質、蛋白質または有機塩を含んだ有機化合物または金属イオンまたは無機塩を含む無機化合物が可能であるが、好ましくは、工程2の ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1ドメインに対する抗体として前記工程1の蛋白質または組換え蛋白質(その断片または誘

50

導体を含む)を抗原に使用した場合の一次抗体である。前記一次抗体の製造は、通常的な方法で行なうことができ、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を使用できる。

【0021】

前記工程3において、被検試料中に含まれた ig-h3蛋白質量の測定は、前記蛋白質、その断片または誘導体とリガンド間の特異的結合で測定し、前記結合が起きる部分は蛋白質自体だけではなく、その分解された一部分、蛋白質の誘導体またはその一部分を含む。好ましくは、前記蛋白質とリガンドの特異的結合は ig-h3蛋白質を抗原にしてその抗体との反応を利用した抗原抗体結合を原理とする定量分析方法が使用でき、免疫プロット(Current Protocols in Molecular Biology, 第2巻、10.8章; David 等, Cells(a Laboratory manual), 第1巻、73章)、免疫沈殿法(Current Protocols in Molecular Biology, 第2巻、10.16章; Cells(a Laboratory manual), 第1巻、72章)、ELISA方法(Current Protocols in Molecular Biology, 第2巻、11.2章; ELISA Theory and Practice, John R. Crowther; The ELISA Guidebook, John R. Crowther)、RIA(Radioimmuno assay)(Nuklearmedizin 1986年 8月;25(4):125-127, Tumor markers as target substances in the radioimmunologic detection of malignancies. von Kleist S; Mariani G. Ann Oncol 1999年 ;10 Suppl 4:37-40)、蛋白質チップ(Daniel Figeys 等, Electrophoresis 2001年、第22巻、P.208-216; Albala JS. Expert Rev Mol Diagn 2001年 7月;1(2):145-152)、ラピッド・アッセイ(rapid assay)(Kasahara Y and Ashihara Y, Clinica Chimica Acta、1997年、第267巻、P.87-102; 大韓民国特許出願第2000-46639号)またはマイクロアレイ(microarray)(Vivian G. cheung 等, Nature genetics 1999年、第21巻、P.15-19; Robert J. Lipschutz 等, Nature genetics 1999年、第21巻、P.20-24; Christine Debouck and Peter N. Goodfellow, Nature genetics 1999年、第21巻、P.48-50; DNA Microarrays, M. Schena)からなる群から選択される方法を使用することがさらに好ましく、この中でELISA方法を使用することが最も好ましい。また、ELISA方法と合わせて公知の生物学的マイクロチップ(biological microchip)及び自動化された微細配列システム(microarray system)を利用して大量に試料を分析することができ、尿では、簡便な形態の自己診断法として開発できる。

10

20

【0022】

本発明の実施例によると、前記に列挙した多くの方法中でELISAを利用して競争法(competition assay)で前記 ig-h3蛋白質の量を測定することが好ましく、

30

1) ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1ドメインに対する組換え蛋白質、その断片または誘導体を基質(matrix)にコーティングさせる工程、

2) 前記工程1の蛋白質、その断片または誘導体に対する抗体を被検試料と反応させる工程、

3) 工程1のコーティングされた蛋白質に工程2の反応物を添加して反応させた後、洗浄する工程、及び

4) 工程3の反応物に2次抗体を添加して反応させ吸光度を測定する工程を含む。

【0023】

前記工程1の基質は、通常的に使用されるすべての基質を使用でき、ニトロセルロース膜、ポリビニール樹脂で合成されたプレート(例:96ウェルプレート)、ポリスチレン樹脂で合成されたウェルプレート及びガラス製のスライドガラス等が使用できる。

40

【0024】

また、前記工程4の2次抗体には、発色酵素、蛍光物質、発光物質、放射線物質または金属キレート標識して使用する。標識物質は、通常的に使用されるすべてのものを使用でき、発色酵素は過酸化酵素(peroxidase)、アルカリ性ホスファターゼ(Alkaline Phosphatase)、-D-ガラクトシダーゼ、マレート脱水素酵素、スタフィロコッカスヌクレアーゼ、西洋カラシ過酸化酵素、カタラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等を使用することが好ましく、蛍光物質は、イソチオシアネート(fluorescein isothiocyanate)、フィコビルリン(phycobilin)蛋白質、ローダミン(rhodamine)、フィコエリスリン(phycoerythrin)、フィコシアニン(phycoocyanin)、オルトフタル酸アルデヒド(orthophthalic aldehyde)等を

50

使用することが好ましい。

【0025】

また、発色酵素または蛍光物質の他に二次抗体を標識する物質として、イソルミノール(isolumino)、ルシゲニン(lucigenin)、ルミノール(luminol)、芳香族 アクリジニウムエステル(acridiniumester)、イミダゾール、アクリジニウム塩、ルシフェリン(luciferin)、ルシフェラーゼ(luciferase)、アクオリン(aequorin)等の発光物質または¹²⁵I、¹²⁷I、¹³¹I、¹⁴C、³H、³²P、³⁵S等の放射線物質だけではなく、免疫学的測定法に使用できるものなら特に限定されない。また抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドクシルまたはプロオレザミンのような低分子ヘプテンを使用できる。

【0026】

また、工程4で発色酵素を使用する場合、その活性を測定するために発色基質を使用し、発色基質は、二次抗体に結合された発色酵素に対して発色可能なすべての物質を使用でき、4CN(4-chloro-1-naphtol)、DAB(Diaminobenzidine)、AEC(Aminoethyl carbazole)、A BTS[2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]、OPD(o-Phenylenediamine)及びTMB(Tetramethyl Benzidine)等を使用できる。

【0027】

前記工程2の被検試料は、 ig-h3と関連した疾患を病む患者のすべての種類の体液が被検試料になり得るが、腎臓疾患、肝臓疾患、リュウマチ疾患または血管疾患患者の尿、血液または滑膜液であることが好ましい。

【0028】

本発明では、前記 ig-h3蛋白質の定量方法が正確に ig-h3蛋白質を定量するかどうかを確認するために、マウス ig-h3または ig-h3の4番目fas-1ドメインを一つ以上含む組換え蛋白質を標準蛋白質に使用して測定し、これをヒト ig-h3を標準蛋白質に使用した場合と比較した。

【0029】

本発明の ig-h3の定量方法において、ヒト ig-h3蛋白質の最適コーティング濃度及び抗体の定量的比率を決定した結果、一次抗ヒト ig-h3抗体の定量的比率は、1:1600と1:2000の時、グラフが直線をなすので前記比率が最も適当であることを確認した(図7参照)。二次抗体の定量的比率は、1:2000の比率の時、グラフが直線をなすので前記比率が最も適当な比率であることを確認した(図8参照)。ヒト ig-h3蛋白質は、1.0µg/mlと0.5µg/mlの二つの場合すべてグラフが直線を示し定量的範囲として適当であったが、1.0µg/mlより0.5µg/mlがピアソンの積率相関係数(R²)値が1に近い形態で現れ、コーティング濃度は0.5µg/mlの時が最も適当であることを確認した(図9参照)。

【0030】

前記結果から、本発明者らは、ヒト ig-h3標準蛋白質のコーティング濃度を0.5µg/mlとして一次抗ヒト ig-h3抗体及び二次抗体の稀釈比率は、各々1:2000にすることが最適の条件であることを確認した。

【0031】

本発明者らは、ヒト ig-h3の場合と同様な方法で、マウス ig-h3、組換え ig-h3D-1V(1x)、ig-h3D-1V(2x)、ig-h3D-1V(3x)及び ig-h3D-1V(4x)を使用して蛋白質の濃度、一次抗体及び二次抗体の定量的比率を決定した。詳細には、各蛋白質のコーティング濃度を0.5µg/mlにし、一次抗ヒト ig-h3抗体及び二次抗体は1:2000にして定量的実験をした。また一次抗マウス ig-h3抗体及び二次抗体は1:2000にして定量的実験をした。

【0032】

その結果、すべての場合において、グラフが直線を形成し、測定範囲もまた11ng/mlから900ng/mlとお互いに類似していることを確認した(図11及び図12参照)。

【0033】

前記の結果から、標準蛋白質はヒト ig-h3、マウス ig-h3、組換え ig-h3D-1V(1x)、ig-h3D-1V(2x)、ig-h3D-1V(3x)及び ig-h3D-1V(4x)のどれを使用しても問題なく、一次抗体の場合も交差作用があるので抗ヒト ig-h3抗体や抗マウス ig-h3抗体のいずれを

10

20

30

40

50

使用しても問題ないことを確認した。

【0034】

本発明において、標準蛋白質のコーティング濃度は、0.1乃至2.0 μ g/mlの範囲であることが好ましく、0.5乃至1.0 μ g/mlであることがさらに好ましい。また、一次抗体及び二次抗体の比率は、1:400乃至1:3200であることが好ましく、1:2000であることがさらに好ましい。

【0035】

本発明は、腎臓疾患、肝臓疾患、リュウマチ疾患または血管疾患を病んでいる検体の体液で ig-h3蛋白質量の測定を通じた種々の疾患の診断キットを提供する。

【0036】

本発明の診断キットには、ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1ドメインに対する組換え蛋白質(その断片または誘導体を含む)と ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1ドメイン(その断片または誘導体を含む)に対する特異リガンドを含む。ここで、特異リガンドとしては、ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1ドメイン(その断片または誘導体を含む)に対する抗体を使用することが好ましい。また、前記に追加的に緩衝溶液、2次抗体、洗浄液、反応停止液または発色基質を含むことができる。

【0037】

本発明の診断キットは、腎臓疾患、肝臓疾患、リュウマチ疾患または血管疾患をはじめとするすべての体液で ig-h3蛋白質の測定を通じて種々の疾患を診断できる。

【0038】

腎臓疾患の病理機序に重要な役割をするTGF- β により ig-h3の発現が強力に誘導される点に着眼して、腎臓疾患と ig-h3発現との相関関係を原理として ig-h3を定量して腎臓疾患を診断する。これを確認するために腎臓疾患を起こす代表的な疾患である糖尿病患者を対象に尿での ig-h3を測定してみると、マイクロアルブミン尿(microalbuminuria)を含む糖尿病性腎臓疾患患者の尿 ig-h3の濃度は、正常人に比べて5倍以上の高い数値を示し、臨床的に糖尿病性腎臓疾患を示さない患者でも ig-h3の濃度が増加した。糖尿病性腎臓疾患を持った患者の尿 ig-h3は大部分の患者で正常より高い数値を示し、臨床的に腎臓疾患がない患者の一部も高い数値を示した。前記の結果から、尿 ig-h3は腎臓の損傷程度を良く反映すると言え、特に臨床的に腎臓疾患を示さない糖尿病患者の一部でも高い数値を示すことは、これ等の患者が臨床的に現れる明瞭な腎臓機能障害はないけれども、ある程度腎臓の損傷を受けていることを意味する。したがって、尿の ig-h3測定は、腎臓の損傷を早期に反映する感度が高い診断的意義を持ち、既存の腎臓機能を反映するいかなる検査より早期に腎臓の損傷を反映できることを確認した。

【0039】

また、尿での ig-h3濃度が糖尿病患者の腎臓損傷を早期に反映するかどうかを確認するために、糖尿病誘発動物モデルで ig-h3濃度を測定してみると、糖尿病誘発前から5日が経過後に ig-h3濃度が約4倍程度増加した(図13参照)。糖尿病が誘発された後、各個体での ig-h3濃度変化を詳しく見てみると、すべての個体が糖尿病誘発後に尿 ig-h3濃度が顕著に増加することが分かった(図14参照)。糖尿病誘発5日には血中要素(urea)とクレアチン数値は正常で腎臓の組織所見も明瞭な異常を示さなかった。したがって、5日目尿で ig-h3数値が顕著に増加するということは、既存の検査法では見つけ出せない腎臓の微細な損傷を早期に反映できるということを示唆している。

【0040】

また、本発明では腎臓移植手術前と手術後の患者の尿から ig-h3の濃度を測定して腎臓損傷と ig-h3濃度との相関関係を確認してみると、腎臓移植手術前、高い数値の ig-h3濃度が手術が成功的に終わった患者の場合において、徐々に下がることを示し、手術後に腎臓機能が回復しない5番患者の場合には継続して高い数値を維持した(表2参照)。前記結果から本発明の ig-h3の濃度が腎臓の損傷を鋭敏に反映することが分かった。

【0041】

また、本発明では腎不全症患者の尿を採取して ig-h3の濃度を測定した結果、すべて

10

20

30

40

50

の患者で正常より顕著に高い ig-h3濃度数値を示すことを確認したことから、尿での ig-h3濃度は腎臓の損傷を早期に鋭敏に反映して腎臓の損傷を与える様々な場合において、診断的に非常に重要な意味を持つことを確認した(表3参照)。

【0042】

慢性肝炎患者が肝硬化に進行しているかどうかを判定することは、臨床的にとても重要であるけれど、現在までそのような診断法がないのが実情である。肝硬化の進行に最も重要な因子は、TGF- β 1でありTGF- β 1によって発現が誘導される ig-h3が肝硬化が進行するにつれて血中でその濃度が増加する可能性があり、これは肝硬化の進行程度を反映できる。実際に肝炎患者の肝組織の免疫組織検査で ig-h3が肝硬化の程度がひどいほど多く発現することを確認した。それで、本発明では慢性肝炎患者を組織検査結果を基準に等級(grade)と工程(stage)に分けて血中 ig-h3濃度との相関関係を確認してみると、慢性肝炎患者は正常より血中 ig-h3濃度が高いことを確認した。低い等級と工程での ig-h3濃度が、高い等級と工程での ig-h3濃度より高いことを確認した(表5参照)。等級3と工程3は、肝硬化に相当に進行した状態で、すでに肝硬化の活動性が頂点を過ぎた状態であると見ることができ、反面、工程1と2及び等級1と2は現在炎症反応が活発に進行している活動性状態であるといえる。したがって、血中 ig-h3の濃度は肝硬化の活動性状態を反映し、同一な患者で定期的に血中 ig-h3濃度を測定することにより患者の肝硬化への進行状況を観察できることが分かった。

【0043】

また、退行性関節炎(osteoarthritis)とリュウマチ性関節炎(rheumatoid arthritis)患者の滑膜液で ig-h3の濃度を測定してみると、リュウマチ性関節炎患者の滑膜液で約2倍程度の高い ig-h3濃度を示した。前記結果から滑膜液での ig-h3濃度が退行性関節炎とリュウマチ性関節炎の診断に有用に使用できることを確認した(表6参照)。

【0044】

合わせて、血管疾患と ig-h3発現との相関関係を確認するために、血管に損傷を起こす代表的な疾患の糖尿病が誘発されたマウスを対象に、正常血管と損傷した血管での ig-h3の発現様相を免疫組織化学方法で確認した結果、正常組織より糖尿病が誘発され損傷したマウスの血管で ig-h3蛋白質がずっと強烈に発現していることを確認した(図18参照)。また、血管疾患の病理機序に重要な役割をするTGF- β 1により ig-h3の発現が強力に誘導される点に着眼して血管を構成する細胞である血管平滑筋細胞でTGF- β 1により誘導される ig-h3の発現様相を調査した結果、TGF- β 1の量が増加するほど ig-h3の発現が増加することを確認した(図19参照)。

【0045】

前記結果から、血液及び組織での ig-h3の発現程度は血管疾患の損傷を鋭敏に反映する。したがって、本発明の ig-h3蛋白質の定量方法が血管疾患の診断に有用に使用できることを確認した。

【0046】

したがって、本発明の ig-h3蛋白質を定量する診断キットは腎臓疾患、肝臓疾患、リュウマチ疾患または血管疾患を早期に鋭敏に診断でき、前記疾患の診断、損傷程度及び進行程度を反映するので効果的な検査方法として有用に使用できる。

【0047】

実施例

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。

但し、下記の実施例は本発明を例示するだけのものであり、本発明の内容が下記実施例に限定されるものではない。

【0048】

実施例1：標準蛋白質及び1次抗体の製造

<1-1> ヒト ig-h3及びマウス ig-h3の分離

本発明者らは、ヒトとマウスの ig-h3蛋白質を製造した。各蛋白質構成要素の概略図を図1に示した。図1の斜線の部分及び格子の部分は、反復するドメインであるI、II、III

10

20

30

40

50

、IVの非常に保存された配列を示し、RGDモチーフは、白抜き部分で示した。

【0049】

本発明者らは、pBluescript SK(-)ベクターにクローニングされた配列番号：2で表わされる塩基配列を持つ ig-h3cDNA(pBS ig-h3)(ヒト皮膚の乳頭腫細胞cDNAからクローニングして得る)をNde IとBgl II制限酵素で切断してプラント末端(blunt end)を持つDNA断片を製造した。前記断片をpET-29 ベクター(Novagen社から購入)のEcoR VとEcoR I部位にサブクローニングした。 ig-h3の69アミノ酸から653アミノ酸に該当する配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を持つ蛋白質を分離して、これをヒト ig-h3と命名した。

【0050】

次に本発明者らは、 ig-h3cDNAにBamH IとXho I部位を作り前記と同様な方法でPCR(polymerase chain reaction)を遂行して、23アミノ酸から641アミノ酸に該当する塩基配列を持った配列番号：4で表わされるDNA断片を製造した。前記断片をpET-29 ベクターのBamH IとXho I部位に挿入して発現させた配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を持った蛋白質を分離して、これをマウス ig-h3と命名した。

【0051】

本発明者らは、前記ヒト ig-h3蛋白質及びマウス ig-h3蛋白質を発現させるために、E.coli BL21(DE3)を宿主に使用して形質転換させた。形質転換菌株を595nmでの光学濃度(OD)が0.5乃至0.6になるまで37、50µg/mlのカナマイシン(kanamycin)を含むLB培地で培養した。培養過程で1mM IPTG(isopropyl-β-D-(-)-thiogalactopyranoside)で37で3時間の間 ig-h3蛋白質を誘導して発現させた。

【0052】

ig-h3を発現させた後、大腸菌沈殿物(pellet)を50mMトリス塩酸(Tris-HCl, pH 8.0)、100mM塩化ナトリウム、1mM EDTA、1%トリトン(Triton)X-100、1mMフェニルメタン スルホニルフルオライド(phenylmethane sulfonyl fluoride、以下“PMSF”とする)及び0.5mM DTTで構成された細胞溶解緩衝溶液(cell lysis buffer)に再び懸濁させた後、超音波処理をして細胞を破碎した。この過程を5回反復した。

【0053】

前記の溶液を遠心分離して ig-h3が含まれた不溶性含有体(inclusion bodies)を0.5M塩化ナトリウム、5mMイミダゾール及び8M要素(urea)を含む20 mMトリス塩酸(Tris-HCl)緩衝溶液に溶解させた後、Ni-NTAレジン(Qiagen)を使用して蛋白質を精製した。50mM塩化ナトリウムを含む20mMトリス塩酸緩衝溶液で高濃度から低濃度までの要素(urea)で蛋白質を順に透析して精製し、SDS-PAGEで確認した。

【0054】

その結果、本発明のヒト ig-h3及びマウス ig-h3蛋白質が分離されることを確認した(図2)。

【0055】

<1-2> ig-h3 D-IV(1x)及び ig-h3 D-IV(4x)の製造及び分離

本発明者らは、配列番号：1で表わされるヒト ig-h3の498から637までの第4ドメインをコーティングする配列番号：6で表わされるDNA断片をPCRを遂行して増幅した後、pET-29 ベクターにクローニングした第4ドメインの発現ベクターを製造し、これを「 ig-h3 D-IV」と命名した。

【0056】

次に、第4ドメインに該当する塩基配列をPCRで合成してクレナウ(Klenow)断片で3'末端部分を平滑化させた後、前記で製造した4番目ドメインを含む発現ベクター p ig-h3 D-IVのEcoR V部位に挿入し、これをp ig-h3 D-IV(2x)と命名した。p ig-h3 D-IV(2x)の挿入断片をEcoR VとXho Iで切り出した後、前記と同様にクレナウ断片で3'末端部分を平滑化させた後、p ig-h3 D-IV及びp ig-h3 D-IV(2x)のEcoR V部位で各々挿入し、これをp ig-h3 D-IV(3x)及びp ig-h3 D-IV(4x)と命名した(図3)。Ni-NTAレジン(Qiagen)を使用して発現される蛋白質を精製するために前記DNA断片のカルボキシル末端に6個のヒスチジン(histidine)残基を連結させHis-標識(His-tag)を作った。

【0057】

前記発現ベクターを大腸菌BS21(DE3)に形質転換させた後、大腸菌形質転換体を50 μ g/ml濃度のカナマイシン(kanamycin)が添加された培地で培養した。前記大腸菌形質転換体を1mM Tris-HCL(pH 8.0)、100 mM EDTA、1% Triton X-100、1 mM PMSF及び0.5 mM DTTを含む細胞溶解緩衝溶液に懸濁させた後、超音波処理をして細胞を破碎した。前記過程を5回反復した後、遠心分離で上澄液を分離し、その上澄液をNi-NTAレジンが充填されたカラムを使用して精製した後、SDS-PAGEを使用して確認した。

【0058】

その結果、本発明の第4ドメインを含む各々配列番号：7乃至配列番号：10で表わされるアミノ酸配列を持つ ig-h3 D-IV(1x)、 ig-h3 D-IV(2x)、 ig-h3 D-IV(3x)及び ig-h3 D-IV(4x) 蛋白質が発現されたことを確認した(図4)。 10

【0059】

<1-3> 一次抗体の製造及び分離

前記実施例<1-1>で分離したヒト ig-h3及びマウス ig-h3蛋白質を抗原に使用してウサギの背中に皮下注射して抗体を製造した。始め、注射は200 μ gの蛋白質を完全フレウンド免疫増強剤(complete Freund's adjuvant)と混合して注射し、その次の4回にわたる注射は100 μ gの蛋白質を不完全フレウンド免疫増強剤(incomplete Freund's adjuvant)と混合して3週間隔で注射した。血清は採血後、室温で2時間程度放置した後、10,000 \times gで10分間遠心分離して一次抗体を含む上澄液を採取して、-20 $^{\circ}$ C 冷凍庫に保管して使用した(図5)。 20

【0060】

実施例2：ヒト ig-h3蛋白質のコーティング濃度及び抗体の定量的比率決定

<2-1> 1次抗体の定量的比率決定

ヒト ig-h3蛋白質に対する一次抗体の定量的比率を求めるために、ヒト ig-h3を0.5 μ g/mlのコーティング緩衝溶液(20mM carbonate-bicarbonate 溶液、pH9.6、0.02% sodium azide)に希釈した後、96ウェルプレートに200 μ lずつ入れ、4 $^{\circ}$ Cで一晩中コーティングした。コーティングされたプレートに一次抗ヒト ig-h3抗体の濃度を1：200、1：400、1：800、1：1600、1：2000及び1：3200に希釈緩衝溶液(サリン(saline)-リン酸緩衝溶液/Tween 80)に希釈した後、1：5000に固定させた二次抗体を添加して常温で1時間の間反応させた。反応後、基質溶液(o-フェニレンジアミンをメタノールに10mg/mlで溶解し蒸留水に1：100で希釈して30%過酸化水素 10 μ lを添加して混合)を添加して、常温で1時間の間反応させた。50 μ lの8N硫酸溶液で反応を中止させてすぐにELISA分析(O.D 492 nm)を実施した。 30

【0061】

その結果、一次抗ヒト ig-h3抗体の定量的比率は、1：1600と1：2000の時にグラフが直線をなすため、前記比率が最も適当であることを確認した(図7)。

【0062】

<2-2> 2次抗体の定量的比率決定

二次抗体の定量的比率を求めるために、ヒト ig-h3蛋白質を0.5 μ g/ml濃度でコーティングし、一次抗ヒト ig-h3抗体を1：1600と1：2000に希釈して固定させた後、二次抗体の濃度を各々1：1000、1：2000及び1：3000に希釈してELISA分析を実施した。 40

【0063】

その結果、1：2000の比率の時にグラフが直線をなすため、前記比率が最も適当な比率であることを確認した(図8)。

【0064】

<2-3> ヒト ig-h3蛋白質のコーティング濃度決定

本発明者らは、ヒト ig-h3蛋白質のコーティング濃度を決定するために一次抗ヒト ig-h3抗体を1：2000、二次抗体を1：2000に希釈し、ヒト ig-h3蛋白質のコーティング濃度を0.5 μ g/ml及び1.0 μ g/mlにしてELISA分析を実施した。

【0065】

その結果、 $1.0\mu\text{g/ml}$ と $0.5\mu\text{g/ml}$ 二つの場合すべてグラフが直線を示し、定量的範囲に相当だったけれど $1.0\mu\text{g/ml}$ より $0.5\mu\text{g/ml}$ がピアソンの積率相関係数(R^2)値が1に近い形態で現れ、コーティング濃度は $0.5\mu\text{g/ml}$ の 때가最も適当であることを確認した(図9)。

【0066】

前記結果から、本発明者らは、ヒト ig-h3 標準蛋白質のコーティング濃度を $0.5\mu\text{g/ml}$ にして一次抗ヒト ig-h3 抗体及び二次抗体の稀釈比率は、各々 1:2000にして定量的実験を遂行した。

【0067】

前記結果を基に下記数式1で表示されるロバード(Robard, 1971)の公式によりログ変換(log transformation)させた結果、 11ng/ml から 900ng/ml まで直線を形成して前記範囲が測定可能範囲であることを確認し、前記反応条件が 10ng/ml まで測定できる感度を持っていることを確認した(図10)。

10

<数式1>

$$\log b = \log e^{b/(100-b)}$$

式中、bは抗原が入っていないウェルの吸光度に対する各濃度でのパーセント値を示す。

【0068】

実施例3: 交差実験を通じたマウス ig-h3 、組換え $\text{ig-h3 D-IV}(1x)$ 及び $\text{ig-h3 D-IV}(4x)$ 蛋白質の定量的範囲測定

前記実施例2と同様な方法で、マウス ig-h3 、組換え $\text{ig-h3 D-IV}(1x)$ 及び $\text{ig-h3 D-IV}(4x)$ を使用して蛋白質の濃度、一次抗体及び二次抗体の定量的比率を決定した。詳細には、各蛋白質のコーティング濃度を $0.5\mu\text{g/ml}$ にし、一次抗ヒト ig-h3 抗体及び二次抗体は1:2000にして定量的実験をした。また一次抗マウス ig-h3 抗体及び二次抗体は1:2000にして定量的実験をした。

20

【0069】

その結果、すべての場合においてグラフが直線を形成し、測定範囲もまた 11ng/ml から 900ng/ml とお互いに類似していることを確認した(図11及び図12)。

【0070】

前記の結果から、標準蛋白質は、ヒト ig-h3 、マウス ig-h3 、組換え $\text{ig-h3 D-IV}(1x)$ 及び $\text{ig-h3 D-IV}(4x)$ 中のいずれのものを使用しても問題なく、一次抗体の場合も交差作用があるので抗ヒト ig-h3 抗体や抗マウス ig-h3 抗体中のどれを使用しても良いことを確認した。

30

【0071】

実施例4: 腎臓疾患と ig-h3 発現との相関関係

<4-1> 糖尿病患者での ig-h3 測定

本発明者らは、腎臓疾患の病理機序に重要な役割をするTGF- β により ig-h3 の発現が強力に誘導されることに着眼して腎臓疾患と ig-h3 発現との相関関係を確認しようとした。そのために本発明者らは、まず腎臓疾患を起こす代表的な疾患である糖尿病患者を対象に尿での ig-h3 を測定した。詳細には、糖尿病患者の尿 $110\mu\text{l}$ と一次抗体(1:1000) $110\mu\text{l}$ を丸プレートに添加して 37°C で1時間半の間培養した後、その中の $200\mu\text{l}$ を再び ig-h3 で前もってコーティングされたプレートに添加して常温で30分間反応させる。反応後、二次抗体-基質反応中止液で反応を中止させELISA分析(O.D 492nm)を遂行した。

40

【0072】

【表 1】

腎臓疾患患者の尿 β ig-h3 濃度

対象群	β ig-h3 (ng/ml)
正常	31.0 (n=93, \pm 8.6)
Type II DM	101.9 (n=51, \pm 17.1)
Type II DM + microalbuminuria	127.4 (n=30, \pm 27.7)
Type II DM + overt proteinuria	105.4 (n=19, \pm 14.9)
Type II DM + CRF	153.6 (n=93, \pm 28.1)

【0073】

10

その結果、マイクロアルブミンリア (microalbuminuria) を含む糖尿病性腎臓疾患患者の尿 ig-h3 の濃度は正常人に比べて5倍程度の高い数値を示し、臨床的に糖尿病性腎臓疾患を示さない患者にも ig-h3 の濃度が増加した。糖尿病性腎臓疾患を持った患者の尿 ig-h3 は大部分の患者で正常より高い数値を示し、臨床的に腎臓疾患が無い患者の一部も高い数値を示した。前記の結果からして、尿 ig-h3 は腎臓の損傷程度をよく反映すると言うことができ、特に臨床的に腎臓疾患を示さない糖尿病患者の一部にも高い数値を示すことは、これらの患者が臨床的に示す明確な腎臓機能障害はないけれど、ある程度腎臓の損傷を負っていることを意味する。したがって、尿の ig-h3 測定は腎臓の損傷を早期に反映する感度が高い診断的意義を持ち、既存の腎臓機能を反映するどんな検査よりも早期に腎臓の損傷を反映できることを確認した。

20

【0074】

<4-2> 糖尿病誘発動物モデルでの ig-h3 測定

本発明者らは、尿での ig-h3 濃度が糖尿病患者の腎臓損傷を早期に反映するかどうかを確認するために、糖尿病誘発動物モデルで ig-h3 濃度を測定した。

【0075】

SDラット (Sprague-Dawley rat) に糖尿病誘発薬物であるストレプトゾトシン (streptozotocin) を 60mg/kg 濃度で腹腔内に注射して糖尿病を誘発させた。血糖を測定して糖尿病が誘発されたことを確認して、5日目の尿を24時間の間採取して前記実施例<4-1>と同様な方法で ig-h3 濃度を測定した。

【0076】

30

その結果、糖尿病誘発前の ig-h3 濃度は、 56.9 ± 6.4 ng/クレアチン mg だったが、糖尿病誘発後5日目の平均値は、 230.4 ± 131.8 ng/クレアチン mg で、ig-h3 濃度が約4倍程度増加した (図13)。糖尿病が誘発された後、各個体での ig-h3 濃度変化を詳しく見るとすべての個体が糖尿病誘発後に尿 ig-h3 濃度が顕著に増加することが分かった (図14)。糖尿病誘発5日目は血中要素 (urea) とクレアチン数値は正常で、腎臓の組織所見も目立った異常を示さなかった。したがって、5日目の尿で ig-h3 数値が顕著に増加するということは既存の検査法では見つけ出せない腎臓の微細な損傷を早期に反映できることを示唆する。

【0077】

40

<4-3> 腎臓移植 (kidney transplantation) 手術患者での ig-h3 測定

本発明者らは、腎臓移植手術前と後の患者の尿から ig-h3 の濃度を測定して、腎臓損傷と ig-h3 濃度との相関関係を確認しようとした。そのために前記実施例<4-1>と同様な方法で腎臓移植手術前と後の患者で ig-h3 濃度を測定し、その結果を表2に示した。

【0078】

【表 2】

腎臓移植前後の β ig-h3 濃度変化

日	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	手術成功
患者														
1				376.9	199.2	105.6	59.1	67.6	84.5	63.1	61.2	39.7	9.9	○
2		149.2	147.3	133.5	159.5	148.3	147.3	96.0	74.0	40.7	20.3	27.9	26.4	○
3	107.8	95.8	101.4	102.3	102.2	106.1	106.6	125.5	83.5	49.4	36.5	33.3	23.2	○
4							298.8	208.1	140.5	169.9	188.4	76.3	24.4	○
5							188.6	160.7	469.3	290.9	494.7	324.4	-	X

10

【0079】

その結果、腎臓移植手術前に高い数値の β ig-h3濃度が手術が成功的に終わった患者の場合において、徐々に下がることを示し、手術後に腎臓機能が回復しない5番の患者の場合には継続して高い数値を維持した。前記結果から本発明の β ig-h3の濃度が腎臓の損傷を鋭敏に反映することが分かる。

【0080】

20

<4-4> 腎不全症患者での β ig-h3測定

本発明者らは、腎不全症患者の尿を採取して前記実施例<4-1>と同様な方法で β ig-h3の濃度を測定した結果、すべての患者で正常より顕著に高い β ig-h3濃度数値を示すことを確認した(表3)。

【0081】

【表 3】

腎不全症患者の尿 β ig-h3 濃度

対象群	β ig-h3 (ng/mg)
正常	31.0 (n=93, \pm 8.6)
慢性腎不全症	335.4 (n=9, \pm 56.0)

30

【0082】

<4-5> 腎臓疾患関連患者での β ig-h3測定

本発明者らは、腎臓と関連した疾患を病む患者において、 β ig-h3が正常と異なって発現されるかどうかを調べるために、腎臓移植後正常な人の場合、移植を受けた腎臓の大きさが小さい場合、慢性拒否、腎盂炎の再発及びシクロスポリン毒性が現れた場合に分類して前記患者の尿から β ig-h3の濃度を前記実施例<4-1>と同様な方法で測定した。

【0083】

その結果、腎臓移植後、正常的な腎臓機能を見せる患者の平均値は39.4 ng/クレアチンmgであるのに対して慢性拒否、腎盂炎の再発及びシクロスポリン毒性がある患者では、 β ig-h3の濃度が顕著に増加して各々140.8、175.4及び90.9 ng/クレアチンmgを示した(図15、表4)。

40

【0084】

【表 4】

β ig-h3	腎臓移植後 正常 (n=47)	移植受けた腎臓大 き小さい場合 (n=16)	慢性拒否 (n=15)	腎盂炎再発 (n=6)	シクロスポリン 毒性(n=6)
平均	39.4±18.2	54.7±23.0	140.8±81.1	175.4±65.8	90.9±22.4
最低	9.4	17.9	48.8	83.2	64.6
最大	84.7	100.0	374.4	249.8	119.4

【0085】

また、本発明者らは、腎臓移植後再発により ig-h3濃度が増加したことが治療に反応するにつれて再び減少するかどうか調べてみた。腎臓移植後腎盂炎(局所分節糸球体硬化症)が再発して血漿交換術を受けた患者の尿 ig-h3濃度は漸次減少するものと現れたが、これは治療に反応するにつれて尿の ig-h3の濃度が減少することが分かるもので治療反応の指標としての可能性を示すものである(図16)。

10

【0086】

<4-6> 腎臓移植後 ig-h3濃度に及ぼす影響分析

本発明者らは、腎臓移植手術後に尿 ig-h3の濃度がどのように変化するかを調べるために、腎臓手術直後毎日、尿で ig-h3の濃度を測定した。

【0087】

その結果、生きていたヒトの腎臓や脳死したヒトの腎臓移植を受け成功的に移植された場合、尿 ig-h3の濃度が手術後徐々に減少して、生きていたヒトの腎臓移植を受けた場合は4~5日の間に正常値に戻り、脳死のヒトの腎臓移植の場合は6~7日の間に正常値になった(図17)。

20

【0088】

また、移植した腎臓の大きさが小さく移植された腎臓は正常であるが腎機能が充分でない場合は、血中クレアチン値が相変わらず高い反面、尿 ig-h3の濃度は正常に戻った。これは移植された腎臓が小さくて患者の老廃物を十分に排泄できないけれど腎臓自体は正常であることを意味している。したがって、腎臓の損傷を反映する ig-h3の濃度は正常に戻ったことを意味する(図17)。反面、腎臓移植が失敗した場合、尿 ig-h3濃度の変動が激しく現れる傾向を示した。

30

【0089】

以上の結果から見て、尿 ig-h3濃度の測定は腎臓の損傷程度を良く反映して腎臓疾患異常の早期診断と腎臓疾患の進行と治療効果判定の良い指標として使用できる。

【0090】

上記の結果から、尿での ig-h3濃度は腎臓の損傷を早期に鋭敏に反映するため、腎臓に損傷を与える様々な場合において診断的にとても重要な意味を持っていることを確認した。

【0091】

実施例5：肝臓疾患と ig-h3発現との相関関係

慢性肝炎患者が肝硬化に進行しているかどうかを判定することは、臨床的に非常に重要なことであるが、現在、そのような診断法がないのが実情である。肝硬化の進行に最も重要な因子は、TGF- β により発現が誘導される ig-h3が肝硬化が進行するにつれて血中でその濃度が増加する可能性があり、これは肝硬化の進行程度を反映できる。実際に肝炎患者の肝組織の免疫組織検査で ig-h3が肝硬化の程度がひどいほど多く発現されると報告されている。それで、本発明者らは、慢性肝炎患者を組織検査結果を基準に等級(grade)と段階(stage)に分けて血中 ig-h3濃度との相関関係を確認した。慢性肝炎患者の血液を採血して前記実施例<4-1>と同じ方法で ig-h3の濃度を測定した。その結果を下記の表5に示した。

40

【0092】

【表 5】

慢性肝炎患者の血中 β ig-h3 濃度

等級	β ig-h3 (ng/mg)	段階	β ig-h3 (ng/mg)
0(正常)	146.2 (n=172, \pm 28.5)	0(正常)	146.2 (n=172, \pm 28.5)
1	196.6 (n=16, \pm 30.6)	1	193.4 (n=20, \pm 30.2)
2	190.0 (n=43, \pm 72.8)	2	192.2 (n=36, \pm 79.1)
3	167.5 (n=7, \pm 21.9)	3	172.5 (n=10, \pm 21.9)

【0093】

その結果、慢性肝炎患者は正常より血中 ig-h3濃度が高いことを確認した。低い等級と段階(1及び2)での ig-h3濃度が高い等級と段階(3)での ig-h3濃度より高いことを確認した。等級3と段階3は肝硬化に相当に進行した状態でありすでに肝硬化の活動が頂点を過ぎた状態であるといえ、一方、段階1と2及び等級1と2は、現在炎症反応が活潑に進行している活動状態であるといえる。したがって、血中 ig-h3の濃度は肝硬化の活動状態を反映し、同一な患者で定期的に血中 ig-h3濃度を測定することにより患者の肝硬化への進行状況を観察できることが分かる。

10

【0094】

実施例6：リュウマチ関節炎患者と ig-h3発現との相関関係

本発明者らは、退行性関節炎(osteoarthritis)とリュウマチ性関節炎(rheumatoid arthritis)患者の滑膜液で、前記実施例<4-1>と同じ方法で ig-h3の濃度を測定した(表6)。

20

【0095】

【表 6】

滑膜液での β ig-h3 濃度

	β ig-h3 (ng/mg)
退行性関節炎	11.0 (n=29, \pm 0.3)
リュウマチ性関節炎	21.0 (n=20, \pm 2.5)

【0096】

その結果、リュウマチ性関節炎患者の滑膜液で約2倍程度の高い ig-h3濃度を示した。前記結果から滑膜液での ig-h3濃度が退行性関節炎とリュウマチ性関節炎の診断に有用に使用できることを確認した。

30

【0097】

実施例7：血管疾患と ig-h3発現との相関関係

<7-1> 糖尿病誘発マウスの損傷された血管での ig-h3発現様相測定

本発明者らは、血管に損傷をおこす代表的な疾患である糖尿病が誘発されたマウスを対象に正常血管と損傷血管での ig-h3の発現様相を免疫組織化学方法で確認した。

【0098】

その結果、正常組織(血管)より糖尿病が誘発され損傷されたマウスの血管で ig-h3蛋白質がずっと強烈に発現されていることを確認した(図18)。

【0099】

<7-2> 血管平滑筋細胞でTGF- β により誘導される ig-h3の発現様相測定

本発明者らは、血管疾患の病理機序に重要な役割をするTGF- β により ig-h3の発現が強力に誘導される点に着眼して、血管疾患と ig-h3発現との相関関係を確認した。そのために本発明者らは、血管を構成する細胞である血管平滑筋細胞でTGF- β 1により誘導される ig-h3の発現様相を前記実施例<4-1>と同じ方法で測定した。

40

【0100】

その結果、TGF- β 1の量が増加するほど、 ig-h3の発現が増加することを確認した(図19)。

【0101】

前記結果から、血液及び組織での ig-h3の発現程度は血管疾患の損傷を鋭敏に反映す

50

る。したがって、本発明の ig-h3蛋白質の定量方法が血管疾患の診断に有用に使用できることを確認した。

【0102】

産業上の利用可能性

上記で詳しく見たように、本発明の ig-h3測定法は、ヒト ig-h3、マウス ig-h3、ig-h3 D-IV(1x)または ig-h3 D-IV(4x)を標準蛋白質に使用することにより、費用が手頃で多様な体液から ig-h3の濃度を正確に診断できる。検体での ig-h3濃度はTGF-と関連する医学的症状である種々の腎臓疾患、肝疾患、リュウマチ疾患及び血管疾患を早期に鋭敏に反映するため、前記疾患の診断、損傷程度及び進行程度を反映する効果的な検査方法として有用に使用できる。

【図面の簡単な説明】

【0103】

【図1】 ig-h3組換え蛋白質の構造を示した模式図である。I、II、III及びIV：各ドメイン(domain)。斜線部分及び格子部分：塩基配列が保存された領域。A：ig-h3、B：ヒト ig-h3、C：マウス ig-h3

【図2】 ig-h3のIVドメイン(domain)の反復により組換えられた ig-h3 D-IV蛋白質の幾何学的構造を示した概略図である。A：ig-h3、B：ig-h3 D-IV(1x)、C：ig-h3 D-IV(2x)、D：ig-h3 D-IV(3x)、E：ig-h3 D-IV(4x)

【図3】分離された ig-h3組換え蛋白質の電気泳動(electrophoresis)写真である。1：ヒト ig-h3、2：マウス ig-h3

【図4】 ig-h3D-IV(1x、2x、3x、4x)蛋白質を電気泳動法で確認した写真である。1：ig-h3 D-IV(1x)、2：ig-h3 D-IV(2x)、3：ig-h3 D-IV(3x)、4：ig-h3 D-IV(4x)

【図5】一次抗体を利用してウエスタンブロット(western blot)でヒト ig-h3とマウス ig-h3を確認した結果を示した電気泳動写真である。1：ヒト ig-h3、2：マウス ig-h3

3

【図6】ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)の原理を示した概略図である。

【図7】一次抗体の定量的比率を示したグラフである。黒菱形；1：200、長四角；1：400、黒三角；1：800、×；1：1600、*；1：2000、楕円；1：3200

【図8】二次抗体の定量的比率を示したグラフである。A；1：1600で一次抗体固定、B；1：2000で一次抗体固定、黒菱形；1：1000で二次抗体稀釈、長四角；1：2000で二次抗体稀釈、楕円；1：3000で二次抗体稀釈

【図9】ヒト ig-h3蛋白質のコーティング濃度を示したグラフである。黒菱形；0.5 µg/ml、長四角；1.0 µg/ml

【図10】交差実験を通じて、ヒト ig-h3蛋白質とマウス ig-h3蛋白質を標準蛋白質に使用できることを示したグラフである。黒菱形；ヒト ig-h3蛋白質コーティング濃度0.5 µg/ml、一次抗ヒト ig-h3抗体 1：2000、二次抗体 1：2000、長四角；ヒト ig-h3蛋白質コーティング濃度0.5 µg/ml、一次抗マウス ig-h3抗体 1：2000、二次抗体 1：2000、黒三角；マウス ig-h3蛋白質コーティング濃度0.5 µg/ml、一次抗ヒト ig-h3抗体 1：2000、二次抗体 1：2000、×；マウス ig-h3蛋白質コーティング濃度0.5 µg/ml、一次抗マウス ig-h3抗体 1：2000、二次抗体 1：2000

【図11】交差実験を通して組換え ig-h3 D-IV(1x)蛋白質と組換え ig-h3 D-IV(4x)蛋白質を標準蛋白質に使用できることを示したグラフである。Aの黒菱形；ig-h3 D-IV(1x)コーティング濃度0.5 µg/ml、一次抗ヒト ig-h3抗体 1：2000、二次抗体 1：2000、Aの長四角；ig-h3 D-IV(4x)コーティング濃度0.5 µg/ml、一次抗ヒト ig-h3抗体 1：2000、二次抗体 1：2000、Bの黒菱形；ig-h3 D-IV(1x)コーティング濃度0.5 µg/ml、一次抗マウス ig-h3抗体 1：2000、二次抗体 1：2000、Bの長四角；ig-h3 D-IV(4x)コーティング濃度0.5 µg/ml、一次抗マウス ig-h3抗体 1：2000、二次抗体 1：2000

【図12】腎臓組織内で ig-h3の発現様相を示した免疫組織化学的染色写真である。Aの黒三角；S3 近位細管細胞(proximal tubular cell)の基底膜での発現様相、Bの黒三角；糸球体ボウマン嚢(Bowman's capsule)の基底膜での発現様相 Bの黒矢印；皮質厚上肢

10

20

30

40

50

細胞(cortical thick ascending limb cell)の基底膜での発現様相

【図13】糖尿病誘発ラットの尿で ig-h3を測定した結果を示したグラフである。黒塗り；対照群、白抜き；ストレプトゾトシン(streptozotocin)を投与して糖尿病を誘発したラット

【図14】図13の糖尿病誘発ラットの尿で ig-h3を測定した結果を各個体別に示したグラフである。

【図15】腎臓移植後正常の場合(normal)、移植を受けた腎臓の大きさが小さい場合(Nephron underdose)、慢性拒否(chronic rejection)、腎盂炎の再発(Recurrent GN)及びシクロスポリン毒性(CyA toxicity)が現れた場合を分類して尿の ig-h3蛋白質の濃度を測定したグラフである。

【図16】腎臓移植手術後、局所性分節性糸球体硬化症(focal segmental glomerulosclerosis (FSGS))が再発して血漿交換術(plasmapheresis)治療を受けた患者の日数による ig-h3蛋白質の濃度を測定したグラフである。

【図17】生きているヒトの腎臓(Living donor)や死亡したヒトの腎臓(Cadaver donor)、移植した腎臓の大きさが小さくて腎機能が充分でない場合(Underdose)または拒否(Rejection)患者の尿で腎臓移植前後の ig-h3蛋白質の濃度を測定したグラフである。

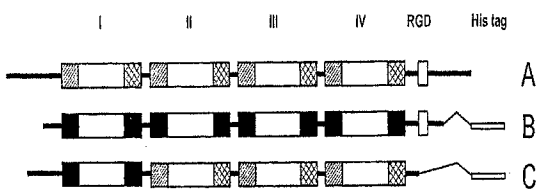
【図18】糖尿病誘発マウスの損傷した血管での ig-h3蛋白質の発現様相を示した免疫組織化学染色写真である。A；正常血管組織、B；損傷した血管組織、L；lumen

【図19】血管平滑筋細胞培養でTGF-1による ig-h3蛋白質の発現様相を示すグラフである。*；p<0.05、**；p<0.01

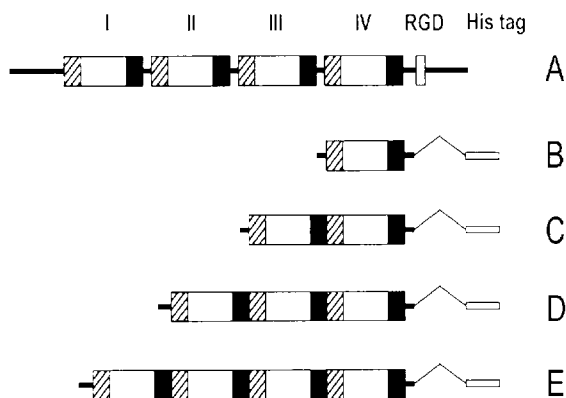
10

20

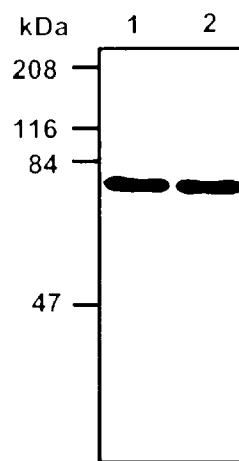
【図1】



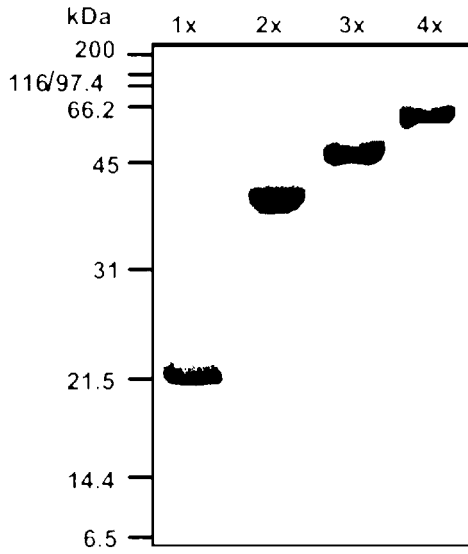
【図2】



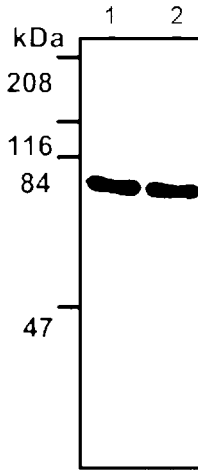
【図3】



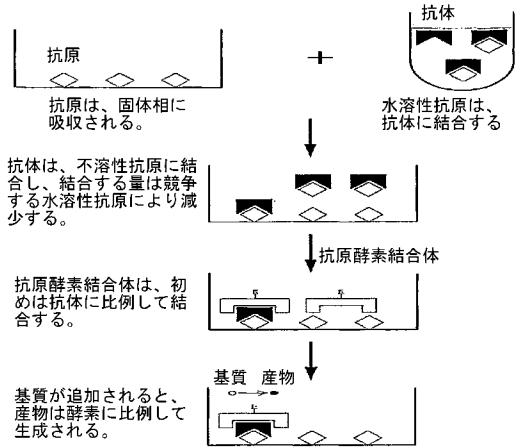
【 図 4 】



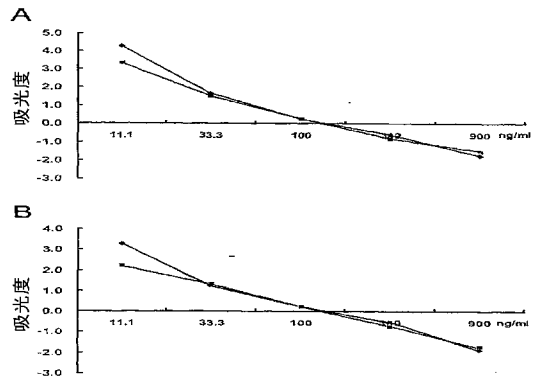
【 図 5 】



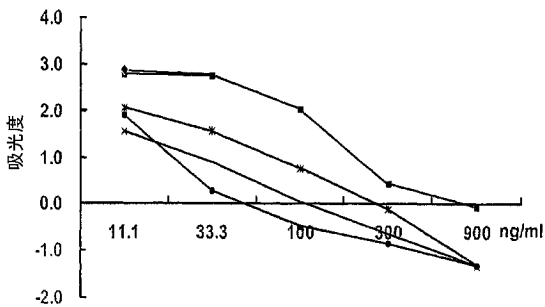
【 図 6 】



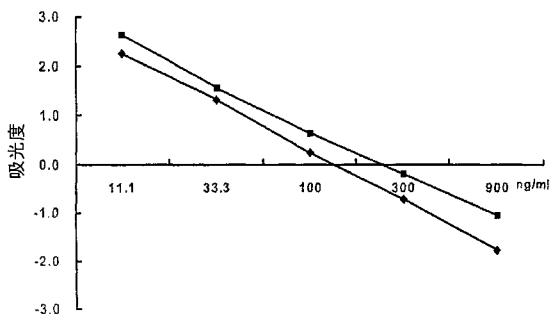
【 図 8 】



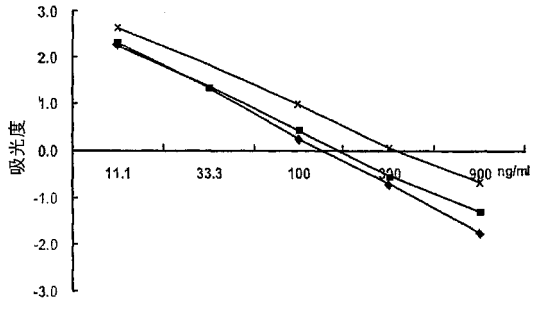
【 図 7 】



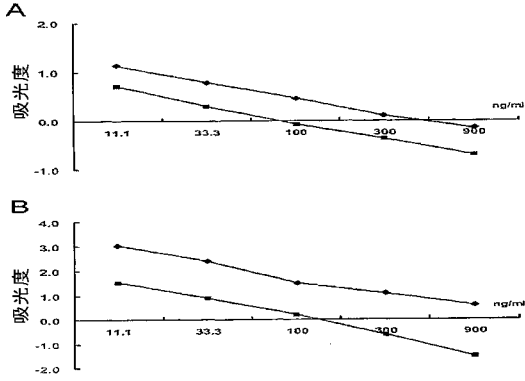
【 図 9 】



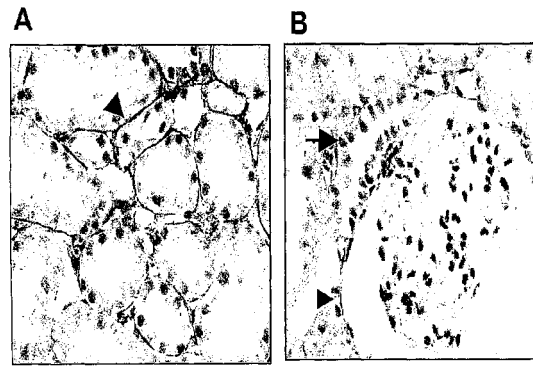
【 図 1 0 】



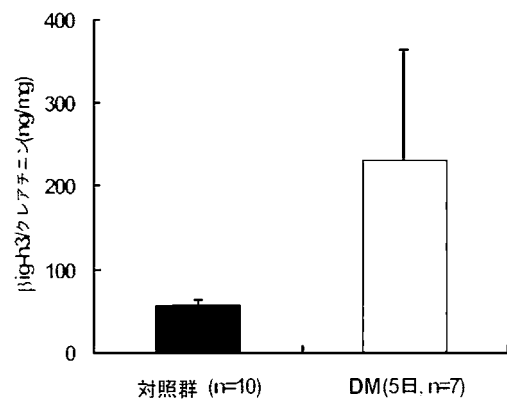
【 図 1 1 】



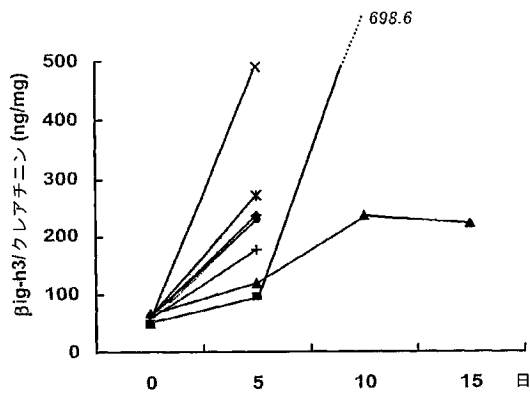
【 図 1 2 】



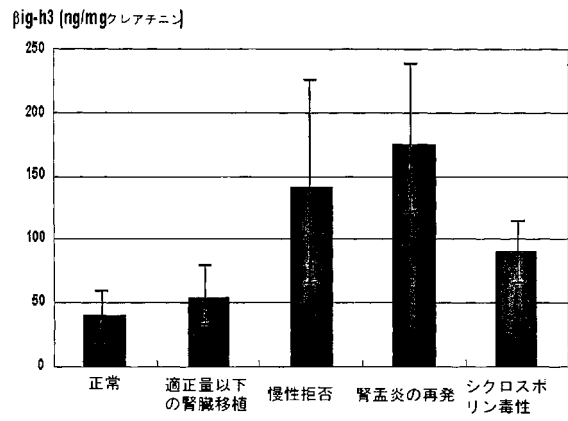
【 図 1 3 】



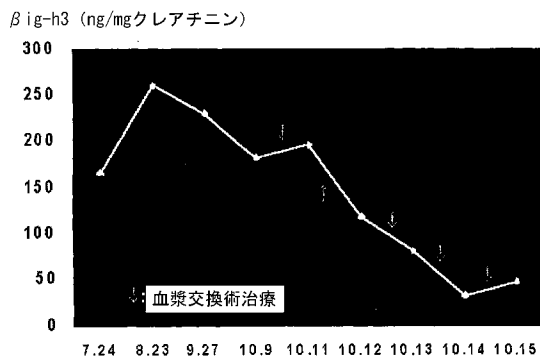
【 図 1 4 】



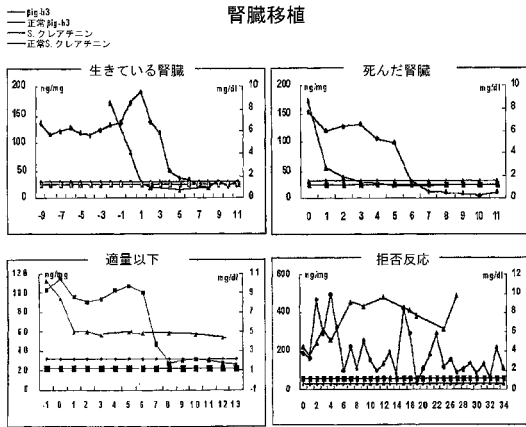
【 図 1 5 】



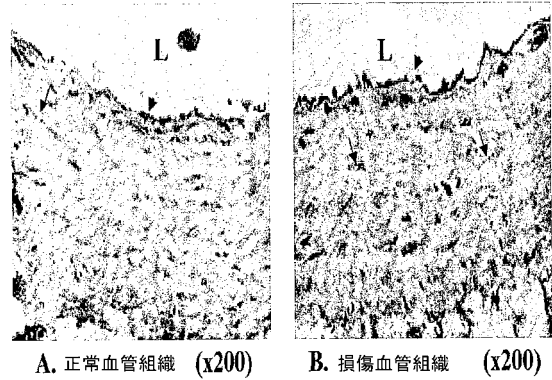
【 図 1 6 】



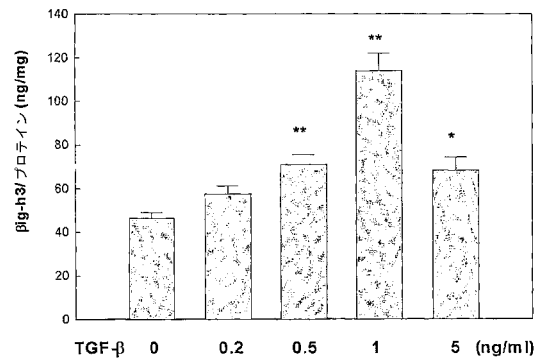
【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【 配 列 表 】

2005527813000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平成16年9月9日 (2004.9.9)

【 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 】

- 1) 標準タンパク質として ig-h3蛋白質の4番目fas-1ドメインを含む組換え蛋白質、その断片または誘導体を製造する工程；
- 2) 前記工程1の蛋白質、その断片または誘導体に対する特異リガンドを製造する工程；及び
- 3) 前記工程1の蛋白質、その断片または誘導体と工程2のリガンドとの特異的結合反応を利用した定量方法を使用して被検試料中に含まれた ig-h3蛋白質の量を測定する工程を含む ig-h3の定量方法。

【 請 求 項 2 】

前記工程2のリガンドが、抗体、RNA、DNA、脂質、蛋白質、有機化合物及び無機化合物からなる群から選択されることを特徴とする、請求項1に記載の定量方法。

【 請 求 項 3 】

前記工程3のリガンドとの特異的結合反応が、抗原抗体反応であることを特徴とする、請求項1に記載の定量方法。

【 請 求 項 4 】

前記抗原抗体反応が、免疫プロット、免疫沈澱法、ELISA方法、RIA、蛋白質チップ、ラビッド・アッセイ及びマイクロアレイからなる群から選択されることを特徴とする、請求項3に記載の定量方法。

【請求項5】

前記工程3の抗原抗体反応が、

- 1) ig-h3蛋白質の4番目fas-1ドメインを含む組換え蛋白質、その断片または誘導体を基質(matrix)にコーティングする工程；
- 2) 前記工程1の蛋白質、その断片または誘導体に対する抗体を被検試料と反応させる工程；
- 3) 工程1の吸着された蛋白質、その断片または誘導体に工程2の反応物を添加して反応させた後、洗浄する工程；及び
- 4) 工程3の反応物に2次抗体を添加して反応させ吸光度を測定する工程(工程4)を含むことを特徴とする、請求項3に記載の定量方法。

【請求項6】

前記 ig-h3蛋白質が、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を有するヒト ig-h3蛋白質、または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を有するマウス ig-h3蛋白質であることを特徴とする、請求項1乃至請求項5のいずれか1項に記載の定量方法。

【請求項7】

前記 ig-h3の fas-1 ドメインが、 ig-h3蛋白質の4番目 fas-1 ドメインを1個乃至10個を反復して連結したことを特徴とする、請求項1乃至請求項5のいずれか1項に記載の定量方法。

【請求項8】

前記 ig-h3の fas-1 ドメインが、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9及び配列番号：10からなる群から選択されることを特徴とする、請求項7に記載の定量方法。

【請求項9】

前記被検試料が、尿、血液または滑膜液を含む人体のすべての体液であることを特徴とする、請求項1に記載の定量方法。

【請求項10】

ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1 ドメインに対する組換え蛋白質、その断片または誘導体及び ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1 ドメイン、その断片または誘導体に対する特異リガンドを含む腎臓疾患、肝臓疾患、リュウマチ疾患または血管疾患に対する診断キット。

【請求項11】

前記リガンドが、 ig-h3蛋白質または ig-h3の fas-1 ドメイン、その断片または誘導体に特異的に結合する抗体、RNA、DNA、脂質、蛋白質、有機化合物及び無機化合物からなる群から選択されることを特徴とする請求項10に記載の診断キット。

【請求項12】

前記リガンドが、抗体であることを特徴とする請求項11に記載の診断キット。

【請求項13】

緩衝溶液、2次抗体、洗浄液、反応停止液または発色基質をさらに含むことを特徴とする請求項12に記載の診断キット。

【請求項14】

前記 ig-h3蛋白質が、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を有するヒト ig-h3蛋白質または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を有するマウス ig-h3蛋白質であることを特徴とする請求項10に記載の診断キット。

【請求項15】

前記 ig-h3の fas-1 ドメインが、 ig-h3蛋白質の4番目 fas-1 ドメインを1個または2個乃至10個を反復して連結したことを特徴とする請求項10に記載の診断キット。



【請求項16】

前記 ig-h3の fas-1 ドメインが、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9及び配列番

号：10からなる群から選択されることを特徴とする請求項15に記載の診断キット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No. PCT/KR02/01975
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7 G01N 33/68		
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) IPC7 G01N 33/53, C07K 15/00, C12N 15/09, A61K 9/06		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Patents and applications for inventions since 1975, Korean Utility models and application for Utility models since 1975. Japanese Utility models and applications for Utility models since 1975.		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) NCBI, MEDLINE, eKIPASS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96/01102 A (Advanced Tissue Sciences) 18. 01. 1996 - see the whole document -	1-16
Y	EP 555,989 A (Purchio, Anthony F) 18. 08.1993 - example 1, 2	1-16
Y	US 5,714,588 A (Advanced Tissue Sciences) 03. 02. 1998 - see the whole document -	1-16
Y	US 5,444,164 A (Bristol-Myers Squibb Company) 22.88. 1995 - see the abstract, example -	1-16
Y	US 5,599,788 A (Advanced Tissue Sciences) 04. 02. 1997 -see the whole document -	1-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 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 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 27 FEBRUARY 2003 (27.02.2003)		Date of mailing of the international search report 27 FEBRUARY 2003 (27.02.2003)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer JOO, Young Sik Telephone No. 82-42-481-5995 

フロントページの続き

(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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,MX,MZ,NO,N Z,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 キム イン - サン

大韓民国 タエグ スーサン - ク マエホー - ドン 1040 ドンス タウン #106-908

(72)発明者 バエ ジョン - サブ

大韓民国 タエグ ダルセオ - ク ソンヘヨン 1 - ドン #1940-2

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA15 BA63 CA02 DA03 HA15

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA41 DA50 DA75 EA20 EA54 FA74

专利名称(译)	定量测定βig-h3蛋白的方法和使用其的诊断试剂盒		
公开(公告)号	JP2005527813A	公开(公告)日	2005-09-15
申请号	JP2003586617	申请日	2002-10-22
申请(专利权)人(译)	Rijen生物技术公司		
[标]发明人	キムインサン バエジョンサブ		
发明人	キム イン-サン バエ ジョン-サブ		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/705 C12N15/09 G01N33/566 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/6887 G01N2333/78		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/566 G01N37/00.102 C12N15/00.A C07K14/705		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA15 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/DA03 4B024/HA15 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA54 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	1020020021488 2002-04-19 KR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

定量测定βig-h3蛋白质的方法和诊断试剂盒技术领域本发明涉及定量测定βig-h3蛋白质的方法和使用其的诊断试剂盒。具体地，使用重组蛋白（包括其片段或衍生物）与βig-h3蛋白或βig-h3蛋白及其配体的fas-1结构域的特异性结合反应，其包含在测试样品体液中。测定针对βig-h3蛋白或βig-h3蛋白的fas-1结构域的βig-h3蛋白质和重组蛋白质（包括其片段和衍生物）的量的方法肾病包括配体，肝病，风湿病或心血管疾病。本发明的定量方法和试剂盒可以有效地用作早期和急性诊断由肾病，肝病，类风湿性关节炎或心血管疾病引起的损伤的程度和过程的方法。

