

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5456056号
(P5456056)

(45) 発行日 平成26年3月26日 (2014.3.26)

(24) 登録日 平成26年1月17日 (2014.1.17)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 D

請求項の数 15 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2011-540139 (P2011-540139)	(73) 特許権者	511143221
(86) (22) 出願日	平成21年12月14日 (2009.12.14)		ノトファーム ソチエタ・レスポンサビリ
(65) 公表番号	特表2012-511708 (P2012-511708A)		タ・リミタータ
(43) 公表日	平成24年5月24日 (2012.5.24)		NoToPharm s. r. l.
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/067128		イタリア国 ノヴェアラ ヴィア ソラロリ
(87) 国際公開番号	W02010/066913		17
(87) 国際公開日	平成22年6月17日 (2010.6.17)		Via Solaroli 17, I-
審査請求日	平成24年12月13日 (2012.12.13)		28100 Novara, Italy
(31) 優先権主張番号	61/122,091	(74) 代理人	100099483
(32) 優先日	平成20年12月12日 (2008.12.12)		弁理士 久野 琢也
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100061815
			弁理士 矢野 敏雄
		(74) 代理人	100112793
			弁理士 高橋 佳大

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 体液中の I F I 1 6 の検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血液、血漿又は血清、又は組織試料の上清又は細胞培養試料の上清から選択された試料中の細胞外インターフェロン誘導性タンパク質 16 (I F I 1 6) を決定するための *in vitro* 方法。

【請求項 2】

前記決定が

(a) 前記試料を、 I F I 1 6 に特異的に結合する少なくとも 1 のレセプターと結合させ、そして

(b) I F I 1 6 に対する前記レセプターの特異的結合を検出することを含む、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

前記試料を、 I F I 1 6 に特異的に結合する少なくとも 2 つのレセプターと接触させ、その際、前記レセプターの 1 つが検出可能なレセプターであり、この他のレセプターが固相に固定化されているか又は固相結合基を有する、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

少なくとも 1 つのレセプターが、抗体又はその抗原結合断片である請求項 2 又は 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記検出可能なレセプターが、検出可能なラベル化基を有する請求項 3 又は 4 記載の方

20

法。

【請求項 6】

前記検出可能なラベル化基が、酵素の、蛍光の、放射性の、又は核酸ラベル化基である請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

前記試料が、ヒト試料である請求項 1 から 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

細胞外 I F I 1 6 の存在及び / 又は増加した量が、病理学的状態の指標である請求項 1 から 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】

細胞外 I F I 1 6 の存在及び / 又は増加した量が、自己免疫及び / 又は炎症性疾患の指標である請求項 1 から 7 のいずれか 1 項記載の方法。

10

【請求項 10】

前記自己免疫疾患が、全身性硬化症 (S S c)、全身性エリトマトーデス (S L E) 及びシェーグレン症候群 (S j S) から選択される請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

前記疾患が関節リウマチから選択される請求項 9 記載の方法。

【請求項 12】

細胞外 I F I 6 の存在及び / 又は増加した量が、感染性疾患の指標である請求項 1 から 7 のいずれか 1 項記載の方法。

20

【請求項 13】

前記感染性疾患が H C V 感染である請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

さらに、少なくとも 1 つの付加的な診断マーカーの決定を含む請求項 1 から 13 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 15】

前記少なくとも 1 つの付加的な診断マーカーが抗 - I F I 1 6 - 自己抗体である請求項 14 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

発明の詳細な説明

本発明は、細胞外形態にあるインターフェロン誘導性タンパク質 1 6 (I F I 1 6) の定性的及び / 又は定量的決定のための方法に関する。

【0002】

インターフェロン誘導性タンパク質 I F I 1 6 は、インターフェロン (I F N) - 活性化可能な遺伝子のファミリーに属し、ヒトにおいて H I N 2 0 0 と、そしてマウス種において I f i 2 0 0 と命名される。I F I 1 6 は、細胞周期進行の阻害、及び炎症性プロセスの関与に参加する、核リントタンパク質であることが実証された。

【0003】

40

正常ヒト組織における I F I 1 6 発現の免疫組織化学的分析は、これが特定の器官内の選択された細胞において高度に制限されたパターンにおいて発現していることを明らかにした。I F I 1 6 は、C D 3 4 + 脊髄前駆体細胞において発現し、モノサイト前駆体、末梢血液モノサイト内で、そしてリンパ球発達を通じて、強力に発現されたままである。I F I 1 6 は、皮膚の上皮細胞、消化管、尿生殖路及び胸部組織の腺及び導管において見出された。さらに、血管及びリンパ管両方からの全ての血管内皮細胞は、強力に I F I 1 6 を発現した。

【0004】

I F I 1 6 発現はインターフェロンにより、同様に、多くのサイトカイン及び分化剤によっても誘導されることができる。H L - 6 0 細胞において、I F I 1 6 はジメチルスル

50

ホキシド、レチノイン酸及び1,25ジヒドロキシビタミンD3により誘導された。IFI16はHUVEC内皮細胞において酸化ストレスにより、そして、炎症促進性分子、例えばTNF- α 及びインターロイキン-1(IL-1)により刺激される。

【0005】

幾つかの一連の証拠が、インターフェロン(IFNs)を自己免疫疾患、特にSSc及び全身性エリトマトーデス(SLE)へとリンク付けている。多くの観察は、慢性炎症が関連する全身性自己免疫疾病におけるIFI16についての役割を示唆する。IFI16発現は、極めて増加し、SSc及びSLEの患者両方からの損傷性皮膚中の表皮の全ての層において遍在的に検出された。さらに、皮膚炎症性浸潤物はIFI16ポジティブ染色を示し、これが高レベルでリンパ球、繊維芽細胞及びEC中で発現することを示唆する。

10

【0006】

さらに、IFI16に対する自己抗体が、全身性硬化症(SSc)、全身性エリトマトーデス(SLE)及びシェーグレン症候群(SjS)を患う患者の血清中で見出された。

【0007】

分子マーカーとしてのIFI16の可能性のある使用は、しかし、固形組織試料に限定されるように見え、というのも、以前に説明された結果は、タンパク質IFI16が細胞内局在化を有することを示すからである。したがって、以前の検出手順は、患者からの固形組織試料を用いて実施された。しかし、損傷性組織から固形組織試料を取り出すことは、患者にとって不利な作用を有し、かつ困難である。さらに、健康な被験体から固形組織試料を獲得することは困難であるため、IFI16の分子マーカーとしての使用は、損傷性vs.健康な試料中のIFI16発現を比較するための困難性により制限されている。

20

【0008】

現在まで、病理学的状態における可能性のあるIFI16調節不全を評価するための実験が、固形組織試料又は培養した細胞で、そして組織、循環するか又は培養した細胞からの抽出物に対して実施され、というのも、先行技術においてはIFI16が、この細胞内で活性があり、かつ、ヒト細胞の核小体及び核質中に局在するタンパク質であることが想定されていたからである(核タンパク質の共焦点顕微鏡及びイムノプロットング両方により示されるとおり)。

【0009】

抗IFI16自己抗体の作成のための機構として、IFI16が死細胞(dying cell)から放出されることができることが文献中で仮定されていた(Mondini M. et al., 2006)。細胞死のプロセスは、幾つかの自己抗原の可能性のある供給源として認識され、この最も認められている放出機構は、アポトーシスプロセス中の核抗原の再局在化(このようにしてこの膜バリアー内に制限される)及び/又は細胞膜レベルでの免疫エフェクターに対するその曝露である。この現象は、幾つかの自己抗原、例えばRo/SSA、La/SSB及び酸化された核抗原について実証されている(すなわち、LeFeber et al., 1984; Casciola-Rosen L. et al., 1994; Saegusa et al. 2002参考のこと)。細胞外IFI16タンパク質と病理学的状態との関係は、発表されていない。

30

【0010】

しかしながら、この知識状況に基づいて、検出可能な量の細胞外形態のIFI16が細胞外環境中で存在する可能性があること、及び、このような量の細胞外IFI16が病理学的状態と関係していることは予期できないはずである。

40

【0011】

しかし、意外なことに、本発明者らは、細胞外IFI16が、簡易かつ直接的な分析法により適した試料中で決定されてよいことを見出された。

【0012】

このようにして、第1の観点において、本発明は、試料中の細胞外インターフェロン誘導可能なタンパク質16(IFI16)を決定するためのin vitro法に関する。

【0013】

特に、本発明者らは、細胞外IFI16の存在及び/又は増加した量が、病理学的状態

50

の指標であることを見出した。このようにして、本発明は、正常、すなわち、健康なコントロールに比較して、I F I 1 6 の増加した存在と関連する任意の病理学的状態のための診断方法として適している。

【 0 0 1 4 】

本願で使用される場合に「試料」との用語は、*in vitro* 評価の目的から獲得された生物学的試料を指す。本発明の方法において、細胞外 I F I 1 6 について試験される試料は、好ましくは体液試料、例えば、血液、血漿、血清、尿、唾液その他である。代わりに、組織試料の上清又は細胞培養試料の上清が試験されてよい。好ましくは、この試料調製は、細胞のいかなる溶解も伴わず、特に、I F I 1 6 を発現することが知られている細胞、例えば上皮又は内皮細胞の溶解は伴わない。この試料は哺乳類生物、例えばヒト生物又は哺乳類、例えば既知の方法によるヒト細胞培養物由来であってよい。

10

【 0 0 1 5 】

本発明の文脈において、「体液」との用語は、全ての種類の体液を含み、これは任意に希釈又は濃縮されている。例は、血液、血清、血漿、羊水、脳脊髄液、髄液 (liquor)、脳脊髄液、喀痰、喉及び咽頭分泌物及び他の粘膜分泌物、滑液、腹水、涙液、リンパ液及び尿である。好ましくは、前記体液は血液、血漿又は血清である。

【 0 0 1 6 】

本発明によれば、I F I 1 6 の検出は、完全長 I F I 1 6、又はその断片、特に、I F I 1 6 の免疫学的活性を有する断片の検出を含んでよく、例えばこれは免疫学的に検出可能であり、かつ、開裂、例えば酵素開裂により生産されてよく、かつ、病理学的状態、例えば炎症性疾患の指標となつてよい。

20

【 0 0 1 7 】

「決定」及び/又は「検出」との用語は、試料中の細胞外 I F I 1 6 の定性的又は定量的な決定を含む。好ましい一実施態様において、この決定は定性又は半定量的な決定であり、すなわち、I F I 1 6 が存在するか存在しないかが決定されるか、又は、I F I 1 6 の濃度がカットオフ値の上又は下であるかが決定される。当業者が理解するように、イエス - (存在) 又はノー (非存在) アッセイにおいて、このアッセイ感受性がこのカットオフ値に適合するよう通常は設定される。カットオフ値は、例えば、一群の健康な個人の試験から決定されることができ、好ましくは、このカットオフは、90%の特異性を生じるように設定され、このカットオフが95%の特異性を生じるように決定されることも好ましく、又はこのカットオフが98%の特異性を生じるように設定されることも好ましい。カットオフ値の上の値の存在は、例えば、病理学的状態の存在について指標となつてよく、特に例えば自己免疫及び/又は炎症性疾患の存在について指標となつてよい。更なる好ましい一実施態様において、この決定は定量的決定である。この実施態様において、細胞外 I F I 1 6 の濃度は、根底をなす診断的質問、例えば、疾病段階、疾病進行又は療法に対する応答に相関している。

30

【 0 0 1 8 】

好ましくは、細胞外 I F I 1 6 の前記決定が

(a) 前記試料を、I F I 1 6 に特異的に結合する少なくとも1のレセプターと結合させ、そして

40

(b) I F I 1 6 に対するこのレセプター特異的結合を検出することを含む。

【 0 0 1 9 】

本発明によれば、「特異的結合」との用語は、レセプター及び I F I 1 6 又はその断片の特異的相互作用を説明する。この特異的相互作用は、「鍵 - 鍵穴 - 原理」でもって特徴付けられることができる。前記レセプター及び I F I 1 6 は、相互に特異的にフィットする構造又はモチーフを有し、例えば、抗体の抗原結合部位と相互作用する抗原決定基 (エピトープ) である。

【 0 0 2 0 】

I F I 1 6 に特異的に結合するレセプターは、少なくとも 10^6 l / m o l の親和性を

50

I F I 1 6 に対して有し、好ましくは I F I 1 6 に対して少なくとも 10^7 l / m o l、より好ましくは I F I 1 6 に対して少なくとも 10^8 l / m o l の親和性を有し、少なくとも 10^9 l / m o l も好ましい。当業者であれば、特異的との用語は特に、この試料中に存在する他の生体分子が、I F I 1 6 について特異的なレセプターに有意に結合しないことを示すために使用されることを理解するだろう。好ましくは、標的 I F I 1 6 の他の生体分子への結合レベルは、それぞれ、多くともたった 10 % 以下、たった 5 % 以下又はたった 2 % 以下又はたった 1 % 以下の、標的 I F I 1 6 への親和性である結合親和性を生じる。I F I 1 6 に特異的に結合する好ましいレセプターは、親和性また同様に特異性についての上述の最小基準の両方を満たすものである。

【 0 0 2 1 】

10

本発明による方法の更に好ましい一実施態様において、工程 (a) における I F I 1 6 と第 1 のレセプターとの特異的結合の検出は、前記試料は I F I 1 6 についての第 2 のレセプター (これは、I F I 1 6 のエピトープと結合し、かつ、第 1 のレセプターと I F I 1 6 の結合後に到達可能である) と接触させる。

【 0 0 2 2 】

特に好ましい一実施態様において、本発明の方法は、I F I 1 6 に特異的に結合する少なくとも 2 のレセプターの使用を伴い、その際、1 つのレセプターは検出可能なレセプターであり、この他のレセプターは固相に固定化されているか、又は固相への固定化を可能にする基を有し、例えばこれは、この表面上の結合対の相補的メンバーへの特異的結合を介してである。

20

【 0 0 2 3 】

この好ましい実施態様は、例えば、サンドイッチ E L I S A の機構的原理の利点を伴う方法に関する。この原理は当業者に一般的に知られている。さらに、相応する方法は実施例 1 及び 3 に説明されている。

【 0 0 2 4 】

この検出可能なレセプターは、検出可能なラベル化基を有してよい。レセプターのラベル化を可能にする方法はこの分野において知られている。代わりに、検出可能な基は、他の、第 3 のレセプターであって検出可能なラベル化基を含むものを利用して特異的に認識されてよい。

【 0 0 2 5 】

30

このようなラベル化基の好ましい例は、放射性又は蛍光のラベル化基である。

【 0 0 2 6 】

更なる好ましいラベル化基は、酵素ラベル化基、例えばアルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、[ベータ] ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、ウレアーゼ及びクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼを含む。酵素反応を利用した検出のために適した例及び必要な基質の使用は当業者に知られており、特に、市販されている検出キットのパッケージ冊子から知られている。このような市販のキットはしばしば抗体を含み、これは特異的な種の抗体、例えば抗マウスを認識し、かつ、これにシグナルを放出する酵素が連結している。このようにして、相応する抗体は第 3 のレセプターの例であり、これはその F c 部分である、第 2 のレセプターの特異的ラベル化を認識する。

40

【 0 0 2 7 】

このレセプターは、ペプチド、ポリペプチド、低分子物質、抗体又はその断片又は誘導体及びアプタマーからなる群から選択されてよい。好ましい一実施態様において、前記レセプターは抗体又はその抗原結合断片である。

【 0 0 2 8 】

「ペプチド」との用語は通常は、30 個までのアミノ酸を有するアミノ酸鎖を指す。

【 0 0 2 9 】

「ポリペプチド」との用語は、通常 30 個を超えるアミノ酸を含むペプチドを指し、タンパク質を含む。

【 0 0 3 0 】

50

「低分子物質」又は小分子との用語は、上で定義した通りのマクロ分子に比較してより低い分子複雑性の分子を指す。文献においては、「低分子物質」との用語は一樣には使用されない。WO 89/03041及びWO 89/03042には、7000 g/molまでの分子量を有する分子が小分子と説明されている。しかし、通常は、50～3000 g/mol、しかししばしば75～2000 g/mol、大抵は100～1000 g/molの範囲内にある分子量が言及される。例が文献(WO86/02736, WO97/31269, U.S. Pat.No. 5,928,868, U.S. Pat. No. 5,242,902, U.S. Pat. No. 5,468,651, U.S. Pat.No. 5,547,853, U.S. Pat. No. 5,616,562, U.S. Pat. No. 5,641,690, U.S. Pat.No. 4,956,303及びU.S. Pat. No. 5,928,643)から当業者に知られている。低分子物質は、有機又は無機の性質を有してよい。

10

【0031】

本発明によれば、「抗体」との用語は、ポリクローナル血清また同様にモノクローナル抗体を含む。

【0032】

モノクローナル抗体及びこの生産方法は当業者に知られている。これらはKoehler and Milstein (1975) により最初に説明された方法を基礎とする。この方法は、特に、Harlow and Lane (Antibodies, A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory; (1988); Chapter 6) による実験室マニュアルにおいて詳細に説明されている。この定義によれば、二重特異性抗体、合成抗体及びこれら抗体の断片又は誘導体も含まれる。これらは断片、例えばFab、Fv又はscFv及びこれら抗体又は抗体断片の化学的に改変された誘導体を含む。

20

【0033】

アプタマーは、原則的に、先行技術から当業者に知られている。

【0034】

好ましくは、本発明の方法は、ELISA、EIA又はRIAである。適当な方法は、原則的に、Harlow and Lane, loc. cit.及びRehm, loc. citから当業者に知られている。

【0035】

これまでは細胞内タンパク質として知られていたIFI16が、細胞外環境で見出されるというこの意外な結果により、IFI16を、組織試料の培養上清、体液試料又は細胞培養上清の試料中で分析することが可能になる。本発明の方法により、IFI16は、単純かつ迅速に検出されることができ、このようにして、診断的パラメーターとして機能する。

30

【0036】

細胞外IFI16と病理学的状態との関係は、いまだ発表されていない。したがって、体液中の細胞外IFI16の決定により病理学的状態の評価が可能になることについて示唆はない。意外なことに、本発明においては、体液試料中の細胞外IFI16の存在及び/又は量の決定が、病理学的状態、特に自己免疫及び/又は炎症性疾患の評価を可能にすることが見出された。特に、本発明者らは、これら病理学的状態の信頼性のある評価が、個人からの細胞外液体試料内のIFI16を測定することにより可能であることを見出し、すなわち、組織又はバイオプシー試料は、細胞外IFI16タンパク質をマーカーとして使用する場合に、この疾病の診断において必要とされない。さらにいっそう予期できないことに、個人の体液から測定した場合に増加したレベルの細胞外IFI16が、自己免疫又は炎症性疾患に関連していることが見出された。

40

【0037】

IFI16が、SSc、SLE、SjS及び関節リウマチ(RA)患者からの体液中に有意に(significantly)存在するが、その一方で、健康な被験体からの体液中ではこれはほとんど検出できない、というこの意外な結果を基礎として、自己免疫疾患のための診断ツールとしての特定の有用性が、本発明による方法に割り当てられる。

【0038】

炎症の開始における特定の役割がIFI16に割り当てられており、これは、内皮細胞

50

中で過剰発現する場合に、幾つかの炎症促進性サイトカインの発現を上方調節し、かつ TNF- α 及び IFNシグナリングに関連しているというものである。

【0039】

このようにして、本発明の方法を利用した患者体液中の IFI16 の検出は、自己免疫疾患を含めた炎症性疾患に関して、そしてことによると細菌及びウイルス感染性疾患（AIDS、髄膜炎、HCV感染）、アレルギー、移植反応、循環器及び腫瘍疾病などに関して、特に重要でもある。さらに、これらは、炎症性サイトカイン（例えば、インターフェロン- γ ）を用いた処置下の患者を用いた応答反応の決定のために重要である。

【0040】

患者の体液の試料中の IFI16 の検出又は定量化は、患者のいくつかの臨床的特徴に関し結論付けることを可能にする。

10

【0041】

言及した試料獲得方法は当業者に知られている。任意に、本発明による方法は、さらに、1又は複数の洗浄工程を、各方法工程前又は後に含んでいる。これら洗浄工程は、非特異的反応（誤ったポジティブ検出又は誤ったネガティブ検出）を最小限にすることに役立つ、かつ、この方法の感受性を改善できる。適した洗浄緩衝液及びその組成は、原則的に、当業者に知られている。生理学的緩衝溶液が好ましい。

【0042】

本発明による好ましい一実施態様は、さらに、第1のレセプターとの接触前に工程（a）又は（a'）を含む：（a）前記試料中に含まれるタンパク質のラベル化；又は（a'）第1のレセプターのラベル化。

20

【0043】

前記試料中に含まれるタンパク質及び/又は第1のレセプターは、例えば、化学的にラベル化されていてよく、これは例えば、ラベル化した化学基又はマーカーを、このタンパク質中に含まれるシステインの遊離アミノ基へと連結させることにより行われる。このようなマーキングされた化学基は、特殊な、検出可能なラジオアイソトープを含む基である。例えば、蛍光染料は、マーカーとしても機能する。適当なマーカーの更なる例は、核酸である。このようにしてラベル化された試料中のタンパク質又はレセプターの存在は、次いで、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）において適したプライマーを用いて検出されることができ。

30

【0044】

さらに、タンパク質を生理学的にラベル化することが可能であり、すなわち、ラベル化した分子の代謝による組み込みによる。この目的のため、細胞は、例えば、放射性ラベル化された代謝産物でインキュベーションされる。このインキュベーション期間の間にこれら細胞の生合成から生じ、ラベル化された代謝産物が組み込まれたタンパク質はマーク付けされる。この方法は、例えば、抗体を生産する細胞により分泌される抗体をラベル化するのに適している。

【0045】

本発明による方法の更に好ましい一実施態様において、このレセプターは、IFI16を含むことが疑われる試料と接触させる前に表面上に固定化される。

40

【0046】

本発明による方法の別の一実施態様によれば、このレセプターは、IFI16を含むことが疑われる試料と接触させた後に表面上に固定化される。

【0047】

レセプターは様々な様式で固定化されることができ。適した方法は、様々な因子、例えば、レセプター又はこの表面の材料の種類に依存する。固定化は、共有により又は吸着により行われることができる。本発明による方法の好ましい一実施態様によれば、このレセプターはタンパク質、特に好ましくは抗体である。同様に好ましいのは、ペプチド又は有機分子のレセプターとしての使用である。

【0048】

50

タンパク質であるレセプターの固定化のために、レセプターが受動吸着の手段により表面上に直接的に固定化される方法が説明される。通常は、適当な表面がポリマープラスチック材料（例えば、ポリスチレン、ポリビニル、ラテックス）からなり、かつ、例えばマイクロタイタープレート又はマルチウェルプレートの形に存在し、膜又は球状「ビーズ」（粒子の形にある架橋したポリマー）がこの目的のために使用される（Lowman, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26 (1997), 401-24）。

【0049】

本発明による方法の更に好ましい一実施態様において、この表面の材料は、セファロース、ラテックス、ガラス、ポリスチレン、ポリビニル、ニトロセルロース及びシリコンからなる群から選択される。さらに好ましいのは、本発明による方法における表面が膜、ビーズ、チップ又はプレートであることである。

10

【0050】

ビーズの例はセファロースビーズ又はラテックスビーズであり、これには任意にリガンドが結合され、これは、この表面に対するレセプターの固定化を促進する。このようなりガンドは、例えば、抗体のFc部分を介してこの抗体を表面に結合させることを促進するタンパク質A又はタンパク質Gである。キャリアー材料へのこのレセプターの結合は、共有的化学カップリング反応（例えば、ヒドラジンカップリング）により達成されることもできる。リガンドを用いたこの表面へのレセプターの固定化の別の例は、ビオチン及びアビジン又はストレプトアビジンの使用である。

【0051】

20

チップの例は、シリコンプレートであり、この上には複数の異なる又は同じレセプターが規則正しく固定化されていることができる。これにより、試料中の複数の異なるパラメーターの分析又は1又は複数のパラメーターに対する複数の異なる試料の分析が可能になり、例えば、異なる組織試料、体液の試料又は細胞培養上清の試料中のIFI16又はこのタンパク質の断片の同定及び/又は定量化である。

【0052】

言及されたプレートの例は、マイクロタイタープレート又はマルチウェルプレートである。好ましくは、これらは6、12、24、48、96、128、356、1024又はそれ以上のウェルを有する。実施例1において、96ウェルプレートが使用される方法が説明される。

30

【0053】

この方法の更に好ましい一実施態様によれば、これは更に、工程(b)を、特異的結合の検出工程前に含む：(b)第1のレセプター及びIFI16の複合体と一緒に前記ビーズの沈殿。

【0054】

ビーズは、例えば重量的に、試料から沈殿されることができる。これは、例えば遠心分離により、加速されることができる。適した方法は、当業者に知られており、特にRehm, *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, Spektrum Akademischer Verlag, 2002から知られている。

【0055】

40

本発明による方法の更に好ましい一実施態様において、レセプター及びIFI16の間の特異的結合の検出は、試料のゲル電気泳動による分離、及び任意に、さらにウェスタンブロット分析を含む。適した方法は、当業者に知られており、特に、Rehm, *loc. cit*から知られている。さらに、相応する方法が実施例2及び4に説明されている。

【0056】

本発明による方法は好ましくは自動的に実施される。これは、特に、ピペッティングロボットの使用により、かつ、最適化プロセスの自動化分析のために可能である。

【0057】

さらに、本発明は、体液又は細胞培養上清の試料（上で定義したとおり）の、細胞外IFI16の検出のための使用に関する。好ましくは、このポジティブ検出は、病理学的状

50

態、特に炎症性及び/又は自己免疫疾病の存在についての指標である。

【0058】

さらに、本発明の方法は、少なくとも1の付加的な診断マーカーの決定も含み、例えば、診断マーカーは、自己免疫及び/又は炎症性疾患の指標である。好ましい実施態様において、この少なくとも1の付加的な診断マーカーは、抗IFI16-自己抗体である。

【0059】

幾つかの診断マーカーの決定は、単独の試料又は単独の試料の異なるアリコート又は異なる試料に対して、並行して実施されてよい。診断マーカーの濃度は次いで、例えば、各マーカーのための個々のカットオフ値を使用して独立して解釈されるか、又はこれらは解釈のために組み合わせられる。

10

【0060】

最後に、本発明は、

(i) IFI16に特異的に結合する少なくとも1つのレセプター、及び

(ii) 更なるキット成分、例えば、緩衝液、塩、試薬及び/又は使用説明書を含む、診断用途のための試薬キットに関する。

【0061】

試薬キットの好ましい実施態様は、2つのレセプターを含み、その際、1のレセプターは、検出可能なレセプターであり、他方のレセプターは固定化したか又は固定化可能なレセプターである。

【0062】

さらに、本発明は、以下の図面及び実施例により、これに限定されることなく、より詳細に説明される。

20

【0063】

図面

図1：IFI16サンドイッチELISAの図示

【0064】

図2：IFI16サンドイッチELISAの感受性及び線形性

ELISAマイクロタイタープレートを、ポリクローナルウサギ抗-IFI16抗体を用いてコーティングした。引き続き、このプレートをPBS-Triton (PBS-T; 0.25% Triton X100, PBS中) で洗浄し、30分間にわたり、自由結合部 (free binding site) をPBS-T/BSA 3% (PBS-TB) で37で飽和させた。PBS-Tでの洗浄後に、精製したHis-IFI16タンパク質を用いたインキュベーションが引き続き(1h)、これはPBS-T中に5% FCSに希釈され、標準として使用された。BSAはネガティブコントロールとして働く。この試料をPBS-Tを用いて3回洗浄し、それぞれの場合にモノクローナルマウス抗IFI16抗体を添加し、1時間室温でインキュベーションした。PBS-Tを用いた4回の洗浄後に、それぞれの場合に、PBS-TB中に希釈したHRP-コンジュゲートした抗マウス抗体100µlを用いてインキュベーションが引き続いた(1h、室温)。3回の洗浄工程後に、このIFI16タンパク質/抗体複合体を、テトラメチルベンジジン(TMB)を用いたインキュベーションにより可視化し、ストップ溶液(Stop Solution)でもって停止した。この吸収を、マイクロプレートリーダー中で450nmで測定した。この濃度の決定を、図2の標準曲線を使用して実施し、これについては、精製したHis-IFI16の増加する濃度を使用した。この測定の線形性を、1~15.6ng/mlの範囲内で示す。

30

40

【0065】

図3：自己免疫患者及び健康な被験体中の循環するIFI16の測定

血清中を循環するIFI16の濃度を、ELISAを利用して、SSc(99)、SLE(30)、SjS(20)、RA(30)を患う患者及びC型肝炎ウイルス感染(HCV)を有する患者中で、健康な被験体(CTRLS, 54)中で決定した。

【0066】

50

E L I S Aマイクロタイタープレートを、ポリクローナルウサギ抗 - I F I 1 6抗体を用いてコーティングした。引き続き、このプレートをP B S - T r i t o n (P B S - T ; 0 . 2 5 % T r i t o n X 1 0 0、P B S中)で洗浄し、30分間にわたり、自由結合部をP B S - T / B S A 3 % (P B S - T B)で37 で飽和させた。P B S - Tを用いた洗浄後に、終容積100 μ lにおいて5 μ lの異なる血清試料を用いたインキュベーションが引き続いた(1 h)。精製した6 H i s - I F I 1 6タンパク質(P B S - T中に5 % F C Sに希釈)を標準として使用した。B S Aはネガティブコントロールとして働いた。この試料をP B S - Tを用いて3回洗浄し、それぞれの場合にモノクローナルマウス抗I F I 1 6抗体を添加し、1時間室温でインキュベーションした。P B S - Tを用いた4回の洗浄後に、それぞれの場合に、P B S - T B中に希釈したH R P - コンジュゲートした抗マウス抗体100 μ lを用いたインキュベーションが引き続いた(1 h、室温)。3回の洗浄工程後に、このI F I 1 6タンパク質/抗体複合体を、テトラメチルベンジジン(T M B)を用いたインキュベーションにより可視化し、ストップ溶液でもって停止した。この吸収を、マイクロプレートリーダー中で450 nmで測定した。この濃度の決定を、図2の標準曲線を使用して実施し、これについては、精製した6 H i s - I F I 1 6の増加する濃度を使用した。測定の線形性は血清中の20 ~ 400 ng / ml I F I 1 6にわたった。線形性の範囲外の濃度(< 20 ng / ml又は> 400 ng / ml)を有する血清を、0 ng / ml又は400 ng / mlそれぞれを有するものとしてプロットする。

10

【0067】

20

I F I 1 6血清タンパク質が患者血清の分画(54% ~ 84%にわたる)中で検出可能であり、その一方で、I F I 1 6血清濃度は、全ての健康な被験体中でアッセイの検出限度より下であった。

【0068】

図4：細胞上清中の細胞外I F I 1 6の同定

ヒトのケラチノサイトを、200、400又は800 J / m^2 の線量(それぞれUV200、UV400又はUV800)でもってUVB照射に曝露するか、又は偽照射(N T)し、次いで16又24時間(それぞれ16 h又は24 h)インキュベーションした。上清を回収し、実施例2に説明したとおりにT C Aにより細胞外タンパク質を沈殿させた。抗I F I 1 6ポリクローナル抗体を使用したイムノプロット分析は、細胞外I F I 1 6の存在を、400及び800 J / m^2 のUVB照射線量に曝露した細胞の上清中に明らかにした。細胞内I F I 1 6を発現するヒトケラチノサイト(T E)から抽出された全細胞タンパク質を、I F I 1 6イムノプロットについてポジティブコントロールとして使用した。

30

【0069】

図5：改善された線形性を有するI F I 1 6サンドイッチE L I S Aの感受性及び線形性

E L I S Aマイクロタイタープレートを、ポリクローナルウサギ抗 - I F I 1 6抗体を用いてコーティングした。引き続き、このプレートを洗浄し、自由結合部をP B S / 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 / 3 % B S A (P B S - T B)で室温で1時間飽和させた。洗浄後に、標準として使用された、P B S / 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 / 1 % B S A (P B S - T D)中の5 % F B S中に希釈した、精製した6 H i s - I F I 1 6タンパク質を用いたインキュベーションが引き続いた(1 h、室温)。B S Aはネガティブコントロールとして働いた。この試料を洗浄し、それぞれの場合にモノクローナルマウス抗I F I 1 6抗体を添加し、1時間室温でインキュベーションした。洗浄後に、H R P - コンジュゲートした抗マウス抗体を用いてインキュベーションが引き続いた(1 h、室温)。洗浄後に、このI F I 1 6タンパク質/抗体複合体を、テトラメチルベンジジン(T M B)を用いたインキュベーションにより可視化し、ストップ溶液でもって停止した。この吸収を、マイクロプレートリーダー中で450 nmで測定した。この濃度の決定を、図5の標準曲線を使用して実施し、これについては精製した6 H i s - I F I 1 6の増加する濃度

40

50

を使用した。この測定の線形性を、 $1 \sim 32 \text{ ng/ml}$ の範囲内で示す。

【0070】

図6：改善した線形性を有するIFI16 ELISAを使用する自己免疫患者及び健康な被験体中の循環するIFI16の測定

血清中を循環するIFI16の濃度を、ELISAを利用して、SSc(50)、SLE(50)、SjS(51)、RA(50)、抗リン脂質症候群(pAPS、80)を患う患者及びC型肝炎ウイルス感染(HCV、82)を有する患者中で、健康な被験体(CTRL、50)中で決定した。この試験したコホートは、図3で試験されるものとは異なる患者を表す。

【0071】

ELISAマイクロタイプレートを、ポリクローマルウサギ抗-IFI16抗体を用いてコーティングした。引き続き、このプレートを洗浄し、自由結合部をPBS/0.05% Tween-20/3% BSA(PBS-TB)で室温で1時間飽和させた。洗浄後に、終容積100 μl のPBS/0.05% Tween-20/1% BSA(PBS-TD)中で異なる血清試料5 μl を用いてインキュベーションが引き続いた(1h、室温)。精製したHis-IFI16タンパク質(PBS-TD中に5% FBSに希釈)を標準として使用した。BSAはネガティブコントロールとして働いた。この試料を洗浄し、それぞれの場合にモノクローナルマウス抗IFI16抗体を添加し、1時間室温でインキュベーションした。洗浄後に、PBS-TD中に希釈したHRP-コンジュゲートした抗マウス抗体を用いてインキュベーションが引き続いた(1h、室温)。洗浄後に、このIFI16タンパク質/抗体複合体を、テトラメチルベンジジン(TMB)を用いたインキュベーションにより可視化し、ストップ溶液でもって停止した。この吸収を、マイクロプレートリーダー中で450nmで測定した。この濃度の決定を、図5の標準曲線を使用して実施し、これについては精製したHis-IFI16の増加する濃度を使用した。測定の線形性は血清中の20~640 ng/ml IFI16にわたった。線形性の範囲外の濃度($< 20 \text{ ng/ml}$ 又は $> 640 \text{ ng/ml}$)を有する血清を、0.1 ng/ml 又は640 ng/ml それぞれを有するものとしてプロットする。この一本の灰色水平線は、各群についての平均IFI16濃度を示す。

【0072】

IFI16ポジティブ性についてのカットオフ値を、コントロール集団の95°のパーセンタイル(117 ng/ml)に設定し、薄い灰色の連続的水平線により示す。X軸より下の数は各群中のカットオフ値よりも高いIFI16血清濃度を有する患者のパーセンテージを示す。IFI16血清タンパク質は、SSc、SLE、SjS、RA及びHCV患者血清の分画中でカットオフよりも高いレベルで検出可能であり、20~80%にわたっていたが、その一方で健康な被験体中ではたった6%であった。pAPSを患うたった1%の患者が、循環するIFI16についてポジティブであった。

【0073】

図7：細胞死を経る細胞の上清中の細胞外IFI16の同定

ヒトのケラチノサイト単層を、異なる線量(200、400及び800 J/m^2 、それぞれ)でUVB照射し、2 μM のドキソルピシン(Doxo)及び80 μM のエトポシド(VP-16)で処置したか、または未処置のままにした。処置16時間後に、細胞外IFI16の決定のためにこの上清を回収し、分離し、その一方で、この残りの細胞を、PARPの細胞内開裂形態の決定(細胞死の経過の決定)のために溶解した。回収した上清を、実施例4に説明したとおりにTCA 25%を用いて濃縮した。試料につき等しい量の全細胞タンパク質を、そして、等しい容積の濃縮した上清を、SDS-PAGE(NEXT GEL Amresco, OH, USA、7.5%)で分画化し、ニトロセルロース膜(Biorad, CA, USA)に移した。抗IFI16ポリクローマル抗体を使用するイムノプロット分析は、UVB照射線量400及び800 J/m^2 に曝露された細胞の上清中の細胞外IFI16の存在を明らかにした。この現象は、細胞損傷に一般的に関連せず、というのも、ドキソルピシン及びエトポシドのような薬理的に細胞毒性の薬物への曝露の場合に化学的に誘導された細胞死

10

20

30

40

50

をけるケラチノサイト中ではこれは観察されなかったからである（P A R P 開裂により実証されるとおり、ネクローシス及びアポトーシスの細胞死の認識されたマーカー（Cepeda V. et al., Recent Pat Anticancer Drug Discov. 2006 Jan;1(1):39-53））。

【図面の簡単な説明】

【0074】

【図1】図1は、IFI16サンドイッチELISAの図示を示す図である。

【図2】図2は、IFI16サンドイッチELISAの感受性及び線形性を示す図である。

【図3】図3は、自己免疫患者及び健康な被験体中の循環するIFI16の測定を示す図である。

10

【図4】図4は、細胞上清中の細胞外IFI16の同定を示す図である。

【図5】図5は、改善された線形性を有するIFI16サンドイッチELISAの感受性及び線形性を示す図である。

【図6】図6は、改善した線形性を有するIFI16 ELISAを使用する自己免疫患者及び健康な被験体中の循環するIFI16の測定を示す図である。

【図7】図7は、細胞死をける細胞の上清中の細胞外IFI16の同定を示す図である。

【0075】

実施例1

IFI16 ELISA

発達したIFI16 ELISAのために以下の緩衝液を使用した：PBS-T（0.25% Triton X100、PBS中）；及びPBS-TB（0.25% Triton X100及び3% BSA、PBS中）。

20

【0076】

96ウェルELISAプレート（Nunc-Maxisorb Plates）を、100 μ l/ウェルの抗IFI16ポリクローナル抗体を用いてコーティングした（インキュベーション、4で16h）。このプレートを、PBS-Tで洗浄し、少なくとも30分間室温でPBS-TBでブロッキングした。このウェルを吸引し、デュプリケート（duplicate）として1時間37の温度で100 μ lの標準（6His-IFI16）（PBS-TB中で5% FBSに希釈）を用いて、又は100 μ lの試料を用いて適した希釈（PBS-TBで希釈）で、それぞれインキュベーションした。このウェルを4回PBS-Tで洗浄し、PBS-TB中に希釈した、IFI16に対するモノクローナルマウス抗体100 μ lで1h37でインキュベーションした。引き続き、このウェルを3回PBS-Tで洗浄し、100 μ lのペルオキシダーゼ（HRP）で1h37でインキュベーションし、これは、ウサギ抗マウス抗体（GE HealthCare, USA）にコンジュゲートされ、1:500にPBS-TB中で希釈されている。引き続き、このウェルを3回PBS-Tで洗浄し、100 μ lのテトラ-メチルベンジジン（SureBlue-TMB, KPL, USA）でインキュベーションし、次にストップ溶液（TMB StopSolution, KPL, USA）100 μ lで停止させた。この吸収を、マイクロプレートリーダー（Tecan）中で450nmで決定し、この場合に620nmを参照として使用した。この試料中のIFI16の濃度を、この標準曲線を用いて計算した。この方法は、1~15.6ng/mlのIFI16/ウェルの線形性を示した。異なるアッセイにおけるこの結果の変動性は9.7%であった（インターアッセイCV%=9.7%）。

30

40

【0077】

実施例2

細胞上清中のIFI16のウェスタンブロット分析

血清不含培地（Epilife, Cascade Biologies, USA）中で培養したヒト初代ケラチノサイトの上清を、トリクロロ酢酸（TCA）での沈殿にかけた。沈殿したタンパク質をイムノブロットにより分析した。

【0078】

細胞を血清不含培地（Epilife, Cascade Biologies, USA）中で培養し、次いで、異な

50

る線量(200~800 J/m²)の紫外線B照射(UVB)に曝露したか又は偽照射した。照射16及び24時間後に、上清を回収し、細胞デブリを取り除くために5000gで10分間遠心分離した。TCAを次いで、終濃度25% v/vでこの上清に添加し、試料を10分間氷上でインキュベーションし、4℃で14000gで10分間遠心分離した。このタンパク質ペレットを3回100%アセトンで洗浄し、空気乾燥し、Laemli Sample緩衝液中に再懸濁した。95℃での5分間の変性に続き、この試料を7.5%のポリアクリルアミドゲル上に負荷し、ゲル電気泳動にかけた。

【0079】

移動したタンパク質をニトロセルロースに移した。この膜をTBS-5% BSA中でブロッキングし、細胞外IFI16を、抗IFI16ウサギポリクローナル抗体を用いて4℃で一晩の膜インキュベーションにより検出した。TBS-0.05%-Tween20(TBS-T)での3回の洗浄後に、この膜を、1時間室温でHRP-コンジュゲートした抗ウサギ二次抗体(GE Healthcare, USA)でインキュベーションした。TBS-Tでの洗浄後に、この膜をECL(GE Healthcare)を用いてインキュベーションし、GelDoc image analyzer(BioRad, USA)によりこの化学発光シグナルを獲得した。

10

【0080】

実施例3

改善した線形性を有するIFI16 ELISA

発達したIFI16 ELISAのために以下の緩衝液を使用した：PBS-TB(0.05% Tween20及び3% BSA、PBS中)及びPBS-TD(0.05% Tween20及び1% BSA、PBS中)。

20

【0081】

96ウェルELISAプレート(Nunc-Maxisorb Plates)を、100µl/ウェルの抗体IFI16ポリクローナル抗体を用いてコーティングした(インキュベーション、4℃で16h)。このプレートを洗浄緩衝液(Wash Solution Concentrate, KPL, USA)で洗浄し、少なくとも1時間室温でPBS-TBでブロッキングした。このウェルを洗浄し、デュプリケートとして1時間室温で100µlの標準(6His-IFI16)(PBS-TD中で5% FBSに希釈)を用いて、又は100µlの試料を用いて適した希釈(PBS-TDで希釈)で、それぞれインキュベーションした。このウェルを洗浄し、1時間室温で、PBS-TD中に希釈した、IFI16に対するモノクローナルマウス抗体100µlでインキュベーションした。引き続き、このウェルを洗浄し、100µlのペルオキシダーゼ(HRP)で1時間室温でインキュベーションし、これはウサギ抗マウス抗体(GE HealthCare, USA)にコンジュゲートされており、PBS-TD中で1:500に希釈されている。引き続き、このウェルを洗浄し、100µlのテトラメチルベンジジン(SureBlue-TMB, KPL, USA)でインキュベーションし、次いで、100µlのストップ溶液(0.6N H₂SO₄)で停止させた。この吸収を、マイクロプレートリーダー(Tecan)中で450nmで決定し、この場合に620nmを参照として使用した。この試料中のIFI16の濃度を、この標準曲線を用いて計算した。この方法は、1~32ng/mlのIFI16/ウェルの線形性を示した。カットオフ値をこのコントロール集団の95%パーセンタイルに設定した。このカットオフ値よりも高いIFI16濃度を示す被験体は、循環するIFI16の存在についてポジティブであると考慮された。

30

40

【0082】

実施例4

細胞死を経る細胞の上清中のIFI16のウェスタンブロット分析

血清不含培地(Epilife, Cascade Biologies, USA)中で培養したヒト初代ケラチノサイトの上清を、トリクロロ酢酸(TCA)での沈殿にかけた。沈殿したタンパク質をイムノブロットにより分析した。

【0083】

細胞を血清不含培地(Epilife, Cascade Biologies, USA)中で培養し、次いで、異なる線量(200~800 J/m²)の紫外線B照射(UVB)に曝露したか、又は2µM

50

ドキソルピシン (Doxo) 又は 80 μ M エトポシド (VP-16) で処置したか、又は偽照射した。処置 16 時間後に、上清を回収し、細胞デブリを取り除くために 5000 g で 10 分間遠心分離した。TCA を次いで、終濃度 25% v/v でこの上清に添加し、試料を 10 分間氷上でインキュベーションし、4 で 14000 g で 10 分間遠心分離した。このタンパク質ペレットを 3 回 100% アセトンで洗浄し、空気乾燥し、Laemlli Sample 緩衝液中に再懸濁した。

【0084】

UVB 照射及び Doxo 又は VP-16 を用いた処置により誘導された経過する細胞死のコントロールとして、細胞内 PARP 開裂もまたこの曝露されたケラチノサイト中に決定した。このために提案されたのはこの付着細胞を RIPA 緩衝液 (50 mM Tris - cl 10
pH 7.4、150 mM NaCl、1% NP40、0.25% Na - デオキシコール、1 mM PMSF、1 X コンプリートミニプロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche)、1 X ホスファターゼ阻害剤 (Pierce)) 中で溶解した。

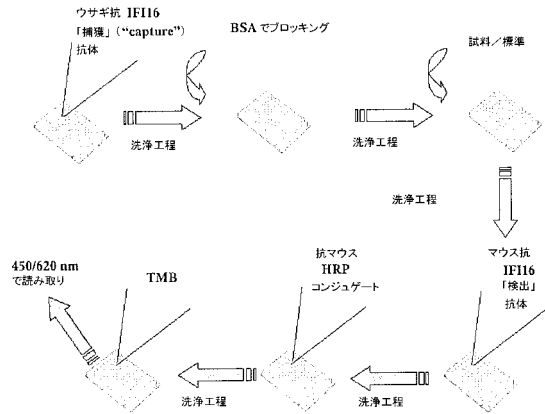
【0085】

95 での 5 分間の変性に続き、この試料を 7.5% のポリアクリルアミドゲル上に負荷し、ゲル電気泳動にかけた。

【0086】

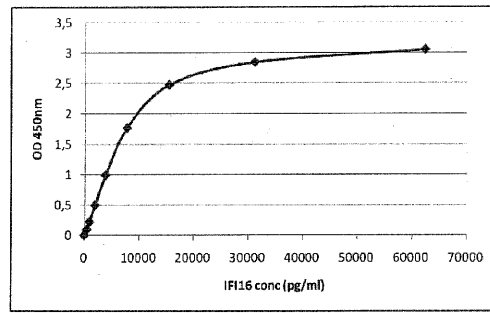
移動したタンパク質をニトロセルロースに移した。この膜を TBS / 0.05% Tween 20 / 5% BSA 中でブロッキングし、細胞外 IFI16 を抗 IFI16 マウスモノクローナル抗体 (clone 1G7, Santa Cruz, CA, USA) を用いた上清試料を有するこの膜の 20
インキュベーションにより検出した。PARP の細胞内開裂した形態を、ウサギ抗 PARP 開裂した抗体 (GTX24830, GeneTex, CA, USA) により細胞抽出物試料を有する膜のインキュベーションにより検出した。TBS / 0.05% Tween 20 (TBS - T) での 3 回の洗浄後に、この膜を、HRP - コンジュゲートした抗マウス又は抗ウサギ二次抗体 (GE Healthcare, USA) でもってそれぞれ 1 時間室温でインキュベーションした。TBS - T での洗浄後に、この膜を ECL (GE HealthCare) を用いてインキュベーションし、Ge IDoc image analyzer (BioRad, USA) によりこの化学発光シグナルを獲得した。

【 図 1 】



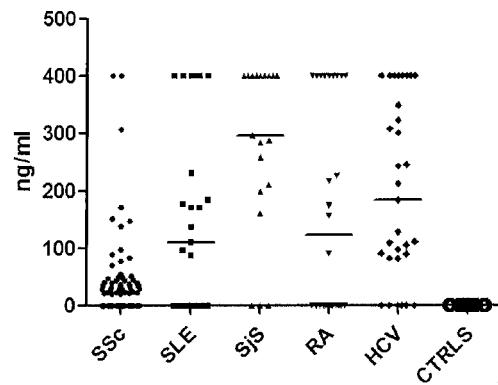
【 図 2 】

Figure 2



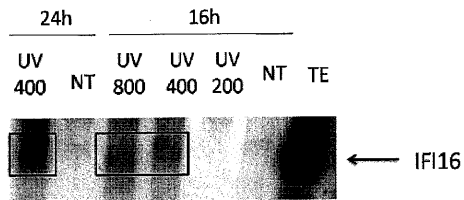
【 図 3 】

血清中の IFI16 レベル

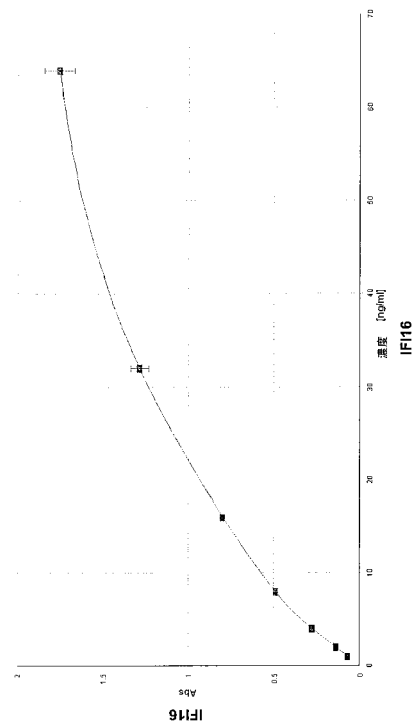


【 図 4 】

Figure 4

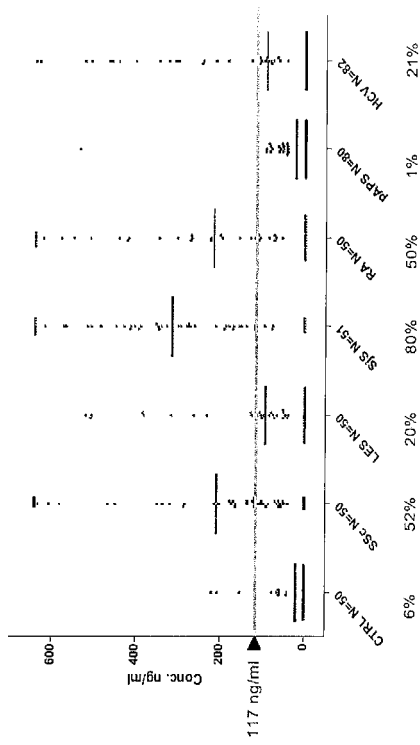


【 図 5 】

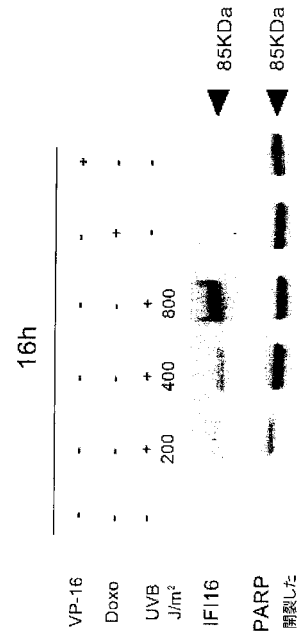


【 図 6 】

血清中のIFI16レベル



【 図 7 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100114292
弁理士 来間 清志
- (74)代理人 100128679
弁理士 星 公弘
- (74)代理人 100135633
弁理士 二宮 浩康
- (74)代理人 100156812
弁理士 篠 良一
- (74)代理人 100114890
弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト
- (72)発明者 ミチエレ モンディーニ
イタリア国 イヴレア ヴィア エッレ . ガルダ 4
- (72)発明者 サント ランドルフォ
イタリア国 トリノ ヴィア ミッレフォンティ 39 / 4
- (72)発明者 マリーザ ガリグリオ
イタリア国 ポイリーノ カシーナ ルピナ 30
- (72)発明者 シルヴィア コスタ
イタリア国 トッレーニョ ヴィア マルティリ デッラ リベルタ 48
- (72)発明者 エリカ ミラグリア
イタリア国 トリノ ヴィア ソスペッコ 115 / ビ
- (72)発明者 フランチェスカ ググリエージ
イタリア国 トリノ ヴィア カプリエ ヌメロ 31

審査官 加々美 一恵

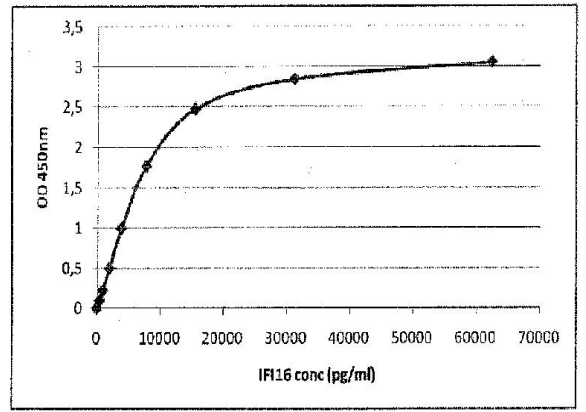
- (56)参考文献 MONDINI M , A NOVEL AUTOANTIGEN TO DIFFERENTIATE LIMITED CUTANEOUS SYSTEMIC SCLEROSIS
以下備考 , ARTHRITIS & RHEUMATISM , 2006年12月 1日 , V54 N12 , P3939-3944 , FROM DI
FFUSE CUTANEOUS SYSTEMIC SCLEROSIS - THE INTERFERON-INDUCIBLE GENE IF116

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
G01N 33 / 48 - 33 / 98

专利名称(译)	检测体液中的IFI 16		
公开(公告)号	JP5456056B2	公开(公告)日	2014-03-26
申请号	JP2011540139	申请日	2009-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	NOTOPHARM		
申请(专利权)人(译)	Notofamu Sochieta-Resuponsabirita-Rimitata		
当前申请(专利权)人(译)	Notofamu Sochieta-Resuponsabirita-Rimitata		
[标]发明人	ミチエレモンディーニ サントランドルフォ マリーザガリグリオ シルヴィアコスタ エリカミラグリア フランチェスカグリエージ		
发明人	ミチエレ モンディーニ サント ランドルフォ マリーザ ガリグリオ シルヴィア コスタ エリカ ミラグリア フランチェスカ グリエージ		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/564 A61K39/3955 A61K2039/505 C07K16/24 G01N2333/186 G01N2800/101 G01N2800/102 G01N2800/104		
FI分类号	G01N33/53.D		
代理人(译)	矢野俊夫 克利马清 星 公弘 二宫和也HiroshiYasushi 四野良一		
优先权	61/122091 2008-12-12 US		
其他公开文献	JP2012511708A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及定量和/或定量测定细胞外形式的干扰素诱导蛋白16 (IFI16) 的方法。



【 3 】