

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-523398

(P2008-523398A)

(43) 公表日 平成20年7月3日(2008.7.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 G O 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 C O 8 4
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 5/50 (2006.01)	A 6 1 P 5/50	
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-545903 (P2007-545903)
 (86) (22) 出願日 平成17年12月9日 (2005.12.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年7月23日 (2007.7.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2005/013195
 (87) 国際公開番号 W02006/063733
 (87) 国際公開日 平成18年6月22日 (2006.6.22)
 (31) 優先権主張番号 04106548.3
 (32) 優先日 平成16年12月14日 (2004.12.14)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCH
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツアーヘルストラッセ124
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 ベルント ピーター
 スイス連邦 バーゼル ミットレール ス
 トラッセ 138

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリン抵抗性の標的/マーカーとしてのCD99

(57) 【要約】

本発明は、液体試料中のCD99のレベルを測定することによる糖尿病における疾患進行のモニタリングおよびインスリン抵抗性の診断、ならびに糖尿病の予防および/または治療のための新規化合物のスクリーニングに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

糖尿病の進行をモニタリングするための方法であって、以下の段階を含む方法：

- (a) 個体から得られる液体試料を提供する段階；
- (b) 結合剤およびCD99の間の複合体の形成に適切な条件下で、該試料をCD99に対して特異的な結合剤と接触させる段階；ならびに
- (c) (b)で形成された複合体の量を、インスリン抵抗性で形成される複合体の量と関連付ける段階。

【請求項 2】

糖尿病の治療の効果をモニタリングするための方法であって、以下の段階を含む方法：

- (a) 糖尿病に対する治療を受けた患者から得られる液体試料を提供する段階；
- (b) 結合剤およびCD99の間の複合体の形成に適切な条件下で、該試料をCD99に対して特異的な結合剤と接触させる段階；ならびに
- (c) (b)で形成された複合体の量を、治療を欠く場合に形成される複合体の量と関連付ける段階。

10

【請求項 3】

インスリン抵抗性の診断のための方法であって、以下の段階を含む方法：

- (a) 個体から得られる液体試料を提供する段階；
- (b) 結合剤およびCD99の間の複合体の形成に適切な条件下で、該試料をCD99に対して特異的な結合剤と接触させる段階；ならびに
- (c) (b)で形成された複合体の量を、インスリン抵抗性の診断と関連付ける段階。

20

【請求項 4】

試料が血清であることでさらに特徴付けられる、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

試料が血漿であることでさらに特徴付けられる、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

試料が全血であることでさらに特徴付けられる、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 7】

個体から得られる液体試料からのインスリン抵抗性の診断におけるマーカー分子としてのタンパク質CD99の使用。

【請求項 8】

個体から得られる液体試料からのII型糖尿病の早期診断におけるマーカー分子としてのタンパク質エンドグリンの使用。

【請求項 9】

早期診断がグルコース不耐性を患っている患者由来の試料で行われる、請求項8記載の使用。

【請求項 10】

糖尿病の進行をモニタリングするための、タンパク質CD99の使用。

40

【請求項 11】

糖尿病の治療の効果をモニタリングするための、タンパク質CD99の使用。

【請求項 12】

個体から得られる液体試料からのインスリン抵抗性の診断において、インスリン抵抗性に対する少なくとも一つの他のマーカー分子と組み合わせる、インスリン抵抗性に対するマーカー分子としてのタンパク質CD99の使用。

【請求項 13】

CD99に対する少なくとも一つの特異的な結合剤、およびCD99の測定に対する補助試薬を含む、免疫学的キット。

50

【請求項14】

CD99と相互作用する化合物をスクリーニングする方法であって、以下の段階を含む方法

(a)1つの化合物または複数の化合物とCD99との相互作用を可能にする条件下で、タンパク質CD99を該1つの化合物または複数の化合物と接触させる段階；および

(b)該1つの化合物または複数の化合物と該ポリペプチドとの間の相互作用を検出する段階。

【請求項15】

インスリン抵抗性を予防する、および/または抑制する、および/または和らげる可能性がある化合物をスクリーニングする方法であって、以下の段階

(a)化合物をタンパク質CD99と接触させる段階；

(b)タンパク質CD99の活性を測定する段階

を含む方法であり、

ここで、タンパク質CD99の活性を抑制する化合物がインスリン抵抗性を予防するおよび/または抑制する可能性がある化合物である、方法。

【請求項16】

段階(a)の前、または段階(a)と(b)との間にタンパク質CD99を固定化する段階を追加的に含む、請求項14および15のいずれか一項記載の方法。

【請求項17】

インスリン抵抗性を予防するおよび/または抑制するおよび/または遅らせる化合物の存在下または非存在下で宿主から分泌される可溶性CD99を検出する段階を含む、前記化合物をスクリーニングする方法であって、インスリン抵抗性を予防するおよび/または抑制するおよび/または遅らせる化合物が、宿主から分泌されるCD99のレベルを変化させる化合物である、方法。

【請求項18】

インスリン抵抗性を予防するおよび/または抑制する化合物をスクリーニングするための標的および/またはマーカーとしてのタンパク質CD99の使用。

【請求項19】

実質的に上記、特に実施例に関して記載されるような、方法、使用、およびキット。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

2型糖尿病は、世界中で急速に重要性を増している疾患であり、かつ細胞のインスリン分泌の増大によって末梢のインスリン抵抗性を代償する膵細胞の不全(細胞不全)といえる。

【0002】

インスリン抵抗性は、2型糖尿病の発生における第一段階と考えることができ、かつ糖尿病が診断される数年前から発生する。この第一段階の間、患者はインスリン分泌の増大により、血糖正常(normoglycaemic)のままであり、かつ筋肉および肝臓のインスリン応答性の低下を補う。2型糖尿病の発生における後期の段階で、細胞機能が低下し、耐糖能異常を招き、最終的に糖尿病に至る。体重減量、運動、または薬学的治療のいずれかによる早期の介入が、耐糖能異常の患者における糖尿病の発生を遅らせるまたは予防することが示された(Diabetes Prevention Program Research Group, N. Engl. J. Med. 346 (2002) 393-403) (非特許文献1)。従って、インスリン抵抗性の早期診断が、抗糖尿病治療または糖尿病の進行を予防する他の方法による早期の介入を可能にする。今日まで、インスリン抵抗性を検出するために唯一信頼できる可能性は、正常血糖高インスリンクランプ法(euglycemic-hyperinsulinemic clamp) (EHC)によるものである。HOMAモデリングが、インスリン抵抗性を評価するためにしばしば用いられるが、一般に容認された診断方法ではない(Wallace et al., Diabetes Care 27(2004) 1487ff) (非特許文献2)。時間がかりかつ多大な労働力を要するため、これらの方法は広範な患者スクリーニングプログラ

10

20

30

40

50

ムには適さない。インスリン抵抗性に対する分子マーカーは、従って、この状態の検出に極めて有用である。

【0003】

最近用いられる2型糖尿病の治療は、インスリン抵抗性を直接的には扱わない。安全性の懸念が、末梢のグルコース取り込みのレベルで主に作用するもの（例えば、インスリン増感剤）に対して存在する。従って、治療のためのさらなるより優れた標的を同定すること、およびEHCまたはHOMA法のような一般的に用いられるマーカーよりもさらに感受性の高いもしくはより信頼性のある、インスリン抵抗性もしくは有効性を検出するためのマーカーを同定することもまた、有用である。

【0004】

さらに、血漿中で検出され得るマーカーを同定することは、有利な点となり得る。

【0005】

【非特許文献1】Diabetes Prevention Program Research Group, N. Engl. J. Med. 346 (2002) 393-403

【非特許文献2】Wallace et al., Diabetes Care 27(2004) 1487ff

【発明の開示】

【0006】

本発明の目的は、インスリン抵抗性を予防する、和らげる、または抑制する化合物をスクリーニングするための、ならびにII型糖尿病のより早い段階でインスリン抵抗性のモニタリングおよび/または診断を可能にし、かつ現在実施され得るものよりもさらに信頼性のあるマーカーをスクリーニングするための新規の標的を同定および提供することである。

【0007】

驚くべきことに、タンパク質CD99の使用が、当技術分野の状況から公知である課題の少なくとも一部分を克服し得ることが見出された。

【0008】

CD99は、単球の移動ならびにT細胞と胸腺細胞の分化およびアポトーシスに関係した32kDaの膜貫通タンパク質である。CD99の生物学的機能は不明なところが多い。

【0009】

驚くべきことに、分泌されるCD99のレベルの変化がインスリン抵抗性において見出されることが分かった。従って、本発明はインスリン抵抗性治療および/または予防のための標的、ならびに糖尿病におけるインスリン抵抗性の早期診断のための新規マーカーを提供する。好ましくは、前記変化とは分泌されるCD99のレベルの増大である。

【0010】

エンドグリンが膜貫通タンパク質であるという事実は、血漿中に分泌型が現れるために、配列番号：1の配列の断片が生じなければならないことを意味する。それゆえ、本発明の方法のために用いられる標的、または本発明の方法により検出可能なマーカーもまた配列番号：1の可溶性断片を含む。このような可溶性断片は、成熟配列のN末端から膜貫通ドメインの前のアミノ酸まで、または細胞質ドメイン（膜貫通ドメインの後の最初のアミノ酸から配列のC末端まで）の、タンパク質の部分または任意のその断片のいずれかを含んでもよい。従って、用語「CD99」および「タンパク質CD99」は、本明細書において用いられるように、配列番号：1のタンパク質、または配列番号：1と少なくとも90%同一性であるその突然変異体のタンパク質と同様に、配列番号：1の可溶性断片を含むと理解される。2つのアミノ酸配列の同一性または同一性の割合を決定するために、配列は、最適な比較を目的に整列される（例えば、ギャップは、他のポリペプチドまたは核酸分子との最適なアライメントのため一つのポリペプチドの配列中に導入され得る）。次いで、対応するアミノ酸位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。一つの配列における位置がもう一方の配列における対応する位置と同じアミノ酸残基により占有されている場合、分子はその位置で相同である。本明細書で用いられるように、アミノ酸「同一性」は、アミノ酸「同一性」と同意義である。2つの配列間の相同率は、配列が共有する同一な位置

10

20

30

40

50

の数の関数である（すなわち、相同率 = 同一な位置の数 / 位置の総数 × 100）。

【 0 0 1 1 】

好ましい態様では、マーカーCD99は、実施例4に記載されているELISAにより検出され得る配列番号：1の、任意の断片または突然変異体または天然型からなる。

【 0 0 1 2 】

好ましい態様において、新規の標的および/またはマーカーCD99は、診断、モニタリングのために、ならびにスクリーニング目的のために用いられる可能性がある。

【 0 0 1 3 】

患者のモニタリングで用いられる場合、本発明に従う診断方法は、治療の効果、および患者の経過観察におけるインスリン抵抗性の再発を評価するのに役立つ可能性がある。したがって、本発明は、糖尿病の治療の効果モニタリングするための、タンパク質CD99の使用を提供する。

【 0 0 1 4 】

好ましい態様において、本発明に従う診断方法は、患者のスクリーニング目的のために用いられる。すなわち、これは、CD99のレベルを測定し、かつCD99のレベルをインスリン抵抗性の有無と関連付けることにより、糖尿病の事前の診断なしに対象を評価するために用いられる。

【 0 0 1 5 】

本発明の方法は、糖尿病をもたらす異なる段階、すなわちインスリン抵抗性、耐糖能異常、および糖尿病を経る疾患の進行をモニタリングするのに有用である。

【 0 0 1 6 】

したがって、本発明は、(a) 個体から得られる液体試料を提供する段階、(b) 結合剤およびCD99間の複合体の形成に適切な条件下で、該試料をCD99に対して特異的な結合剤と接触させる段階、および(c) (b) で形成された複合体の量をインスリン抵抗性で形成される複合体の量と関連付ける段階を含む、糖尿病の進行をモニタリングするための方法を提供する。

【 0 0 1 7 】

本発明はまた、(a) 糖尿病に対する治療を受けた患者から得られる液体試料を提供する段階、(b) 結合剤およびCD99間の複合体の形成に適切な条件下で、該試料をCD99に対して特異的な結合剤と接触させる段階、および(c) (b) で形成された複合体の量を治療を欠く場合に形成される複合体の量と関連付ける段階を含む、糖尿病の治療の効果モニタリングするための方法も提供する。

【 0 0 1 8 】

本発明は、CD99と相互作用する化合物をスクリーニングする方法であって、(a) 該1つの化合物または複数の化合物とCD99との相互作用を可能にする組成物の下で、タンパク質CD99を該1つの化合物または複数の化合物と接触させる段階；および(b) 該1つの化合物または複数の化合物と該ポリペプチドとの間の相互作用を検出する段階を含む方法を提供する。

【 0 0 1 9 】

本発明は、インスリン抵抗性を予防する、および/または抑制する、および/または和らげる化合物をスクリーニングする方法であって、(a) 化合物をタンパク質CD99と接触させる段階；および(b) タンパク質CD99の活性を測定する段階を含む方法であり、ここでタンパク質CD99の活性を阻害または刺激する化合物が、インスリン抵抗性を予防する、および/または抑制する、および/または和らげる可能性がある化合物である方法を提供する。好ましくは、該方法は段階(a)の前、または段階(a)と(b)の間にタンパク質CD99を固定化する段階を追加的に含む。

【 0 0 2 0 】

本明細書において用いられる「活性」という用語は、例えばCD99の、細胞の移動を媒介する、アポトーシスを誘導する、またはシクロフィリンAに結合する能力に関する（例えば、Cerisano et al., 2004, Oncogene 23, 5664-5674; Kim et al., Immunol. Lett. 95

10

20

30

40

50

, 155-159参照)。

【0021】

本発明はまた、無細胞アッセイも含む。このようなアッセイは、CD99のある形態(例えば、全長ポリペプチド、該ポリペプチドの生物学的に活性な断片、または該ポリペプチドの全てまたは一部を含む融合タンパク質)を試験化合物と接触させる段階、およびこの試験化合物の該ポリペプチドへの結合能を決定する段階を含む。該ポリペプチドへのこの試験化合物の結合は、上記のように直接的にまたは間接的にいずれかで決定され得る。1つの態様において、アッセイは該ポリペプチドを、該ポリペプチドと結合してアッセイ混合物を形成する公知の化合物と接触させる段階、このアッセイ混合物を試験化合物と接触させる段階、およびこの試験化合物の該ポリペプチドと相互作用する能力を決定する段階を含み、ここでこの試験化合物の該ポリペプチドと相互作用する能力を決定する段階は、公知の化合物と比較してこの試験化合物が該ポリペプチドに優先的に結合する能力を決定する段階を含む。

10

【0022】

本発明の無細胞アッセイは、ポリペプチドの膜結合型、またはその可溶性断片のいずれかの使用に適している。膜結合型のポリペプチドを含む無細胞アッセイの場合、膜結合型のポリペプチドが溶液中で維持されるような、可溶化剤を利用することが望ましい可能性がある。このような可溶化剤の例は、n-オクチルグルコシド、n-ドデシルグルコシド、n-ドデシルマルトシド、オクタノイル-N-メチルグルカミド、デカノイル-N-メチルグルカミド、Triton X-100、Triton X-114、Thesit、イソトリデシポリ(Isotridecypoly)(エチレングリコール エーテル)n、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンミノ(dimethylamminio)]-1-プロパンスルホネート(CHAPS)、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンミノ(dimethylamminio)]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート(CHAPSO)、またはN-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネートなどの非イオン性界面活性剤を含む。

20

【0023】

本発明の上記アッセイ方法の種々の態様において、結合分子を用いてポリペプチドの非複合型からの複合型の分離を容易するために、およびアッセイの自動化に適応させるために、ポリペプチドを固定化することが望ましい可能性がある。ポリペプチドへの試験化合物の結合、または候補化合物の存在下および非存在下における結合分子とポリペプチドの相互作用は、反応物を含むのに適した任意の容器で行われ得る。このような容器の例は、マイクロタイタープレート、試験管、および微量遠心管を含む。1つの態様において、1つまたは両方のタンパク質をマトリックスに結合させることを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が、提供され得る。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ(Sigma Chemical; St. Louis, Mo.)またはグルタチオン誘導体化されたマイクロタイタープレートの上で吸収されてもよく、その後それを試験化合物または試験化合物および吸収されなかった結合タンパク質またはポリペプチドのいずれかと混合し、混合物を複合体形成を促す条件下(例えば、塩およびpHの生理的な条件で)でインキュベートする。インキュベーションに続いて、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを任意の結合されなかった構成要素を取り除くために洗浄し、複合体形成を例えば上記のように直接的にまたは間接的に測定する。あるいは、複合体をマトリックスから分離してもよく、上記記載の結合のレベルまたはポリペプチドの活性を標準的な技術を用いて決定し得る。

30

40

【0024】

マトリックス上でタンパク質を固定化するための他の技術もまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて用いられ得る。例えば、上記記載のポリペプチド、またはその結合分子のいずれかは、ビオチンおよびストレプトアビジンの結合を利用して固定化され得る。ビオチン化された本発明のポリペプチドまたは標的分子は、当技術分野において周知の技術(例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals; Rockford, Ill.)を用いてビオチン-NHS(N-ヒドロキシ-スクシンイミド)から調製され、ストレプトアビジンでコーティングされた96ウェルプレート(Pierce Chemical)のウェル中に固定化され得る。あるいは、ポ

50

リペプチドまたは結合分子と反応するが、本発明のポリペプチドとその結合分子との結合を妨げない抗体を、プレートのウェルに誘導体化してもよい。結合されない本発明の結合タンパク質またはポリペプチドは、抗体結合によりウェル中で捕捉される。このような複合体を検出するための方法は、上記記載のGST-固定化複合体に対する方法に加え、上記記載のポリペプチドまたは結合分子に反応する抗体を用いる複合体の免疫検出、およびポリペプチドまたは結合分子に関連する酵素活性を検出することに依拠する酵素結合アッセイを含む。

【0025】

本発明はまた、該化合物の存在下または非存在下で宿主から分泌される可溶性CD99を検出する段階を含む、インスリン抵抗性を予防するおよび/または抑制するおよび/または遅らせる化合物をスクリーニングする方法も提供し、ここでインスリン抵抗性を予防するおよび/または抑制するおよび/または遅らせる化合物は、宿主から分泌されるCD99のレベルを変化させる化合物である。

10

【0026】

宿主は、培養下で細胞を表すモデル細胞、またはインスリン抵抗性に対するモデルとして用いられ得る動物であってもよい。

【0027】

本発明はまた、インスリン抵抗性を予防するおよび/または抑制する化合物をスクリーニングするための標的としておよび/またはマーカーとしての、タンパク質CD99の使用も提供する。

20

【0028】

本発明に従う診断、モニタリング、または患者のスクリーニングの方法は、個体に由来する液体試料に基づく。当技術分野において公知の方法とは異なり、特異的な結合剤の使用によりこの液体試料からCD99を特異的に測定する。

【0029】

特異的な結合剤は、例えば、CD99の受容体、またはCD99に対する抗体である。当業者は、特異的という用語が、試料中に存在する他の生体分子がCD99に対して特異的な結合剤に著しく結合しないことを指すのに使用されるということを理解していると考えられる。5%より少ない交差反応のレベルは、有意でないと思われる。

【0030】

特異的な結合剤は好ましくは、CD99に反応する抗体である。抗体という用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、このような抗体の断片、および抗体の結合ドメインを含む遺伝子構築物を指す。

30

【0031】

抗体は、例えば、Tijssen(Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays 11 (1990)全編、特に 43-78ページ; Elsevier, Amsterdam)に記載されているような、最先端の手法により産生される。本発明において開示されるような達成のために、ウサギで産生されるポリクローナル抗体が用いられている。しかしながら、異なる種、例えばラットまたはモルモットからのポリクローナル抗体、およびモノクローナル抗体もまた、明らかに用いられ得る。モノクローナル抗体は、一定の性質で必要とされる任意の量で生産され得るため、それらは臨床上のルーチンに対するアッセイの開発で理想的な道具であることを意味する。本発明に従う方法でのCD99に対するモノクローナル抗体の産生および使用は、さらにもう1つの好ましい態様である。

40

【0032】

CD99はインスリン抵抗性の診断で有用であるマーカーとして同定されていると当業者が現在理解しているように、本発明の達成に相当する結果に到達するために別の方法を用いてもよい。例えば、抗体を産生するための別の戦略を用いてもよい。このような戦略は、とりわけ、免疫化のためのCD99のエピトープを提示する、合成ペプチドの使用を含む。あるいは、DNAワクチン接種としても公知であるDNA免疫化を用いてもよい。

【0033】

50

測定のために、結合剤CD99複合体の形成に適切な条件下で、個体から得られる液体試料をCD99に対して特異的な結合剤と接触させる。このような条件は、当業者はいかなる発明の努力もなしにその適切なインキュベーション条件を容易に同定し得るので、特定される必要はない。

【0034】

本発明で開示された方法に従う最終段階として、上記記載のように、複合体の量を測定し、かつインスリン抵抗性の診断、またはそれぞれの対照と関連付ける。当業者が理解しているように、特異的な結合剤CD99複合体の量を測定するための非常に多くの方法が存在し、全て関連する教科書(例えば、上記のTijssen P., または Diamandis, et al., 編. (1996) Immunoassay, Academic Press, Bostonを参照のこと)に詳細に記載されている。

10

【0035】

好ましくは、CD99をサンドイッチ型のアッセイ形式で検出する。このようなアッセイにおいて、第1の特異的な結合剤を片側でCD99を捕捉するために用い、および直接的にまたは間接的に検出可能なように、標識された第2の特異的な結合剤を、反対側で用いる。

【0036】

上記のように、驚くべきことにCD99を個体試料から得られる液体試料から測定し得ることが見出された。インスリン抵抗性の診断においてマーカーCD99を適用するために、組織および生検試料を必要としない。

【0037】

好ましい態様において、本発明に従う方法は液体試料材料として血清を用いて実施される。

20

【0038】

さらに好ましい態様において、本発明に従う方法は液体試料材料として血漿を用いて実施される。

【0039】

さらに好ましい態様において、本発明に従う方法は液体試料材料として全血を用いて実施される。

【0040】

通常のプロテオミクス法の組織試料への適用は、選択された組織のための多くの可能性あるマーカー候補の同定をもたらすのに対し、本発明の発明者らは驚くべきことに、体液試料でタンパク質CD99の検出が可能であった。さらに驚くべきことに、本発明者らは、個体から得られるこのような液体試料中のCD99の存在をインスリン抵抗性の診断と関連付け得ることを実証している。

30

【0041】

多大な利点を伴うCD99に対する抗体は、確立された手法、例えばインスリン抵抗性に対する、インサイチュー、生検、または免疫組織学的な手法において用いられ得る。

【0042】

好ましくは、CD99に対する抗体は、定性的な(CD99が存在するまたは存在しない)イムノアッセイ、または定量的な(CD99量が決定される)イムノアッセイにおいて用いられる。

【0043】

タンパク質CD99のレベルを測定することは、インスリン抵抗性および糖尿病の領域における多大な利点を証明している。したがって、さらなる好ましい態様において、本発明は、個体から得られる液体試料からのインスリン抵抗性の診断におけるマーカー分子としての、タンパク質CD99の使用に関する。

40

【0044】

マーカー分子という用語は、個体の体液から測定されるような分析物CD99のレベルの変化がインスリン抵抗性の存在を示すことを指すよう用いられる。

【0045】

II型糖尿病の早期診断において新規マーカーCD99を使用することは好ましい。

【0046】

50

グルコース不耐性の早期診断において新規マーカーCD99を使用することは特に好ましい。

【0047】

糖尿病における疾患進行のモニタリングにおいて新規マーカーCD99を使用することも特に好ましい。

【0048】

タンパク質CD99それ自体の使用は、インスリン抵抗性診断の難しい領域への重要な進歩を意味する。インスリンのような糖尿病の他の公知のマーカー、またはまだ発見されていないインスリン抵抗性の他のマーカーとCD99の測定を組み合わせることは、さらなる改良をもたらす。したがってさらなる好ましい態様において、本発明は、個体から得られる液体試料からの糖尿病、好ましくはインスリン抵抗性の診断において、糖尿病、好ましくはインスリン抵抗性に対するもう1つのマーカー分子との組み合わせにおける、糖尿病、好ましくはインスリン抵抗性に対するマーカー分子としてのCD99の使用に関する。インスリン抵抗性の測定を組み合わせてもよい、好ましい選択される他の糖尿病マーカーはインスリン、プレインスリン、および/またはC-ペプチドである。

10

【0049】

イムノアッセイのような特異的結合アッセイの領域における診断試薬は通常、キットの形態で最も良く提供され、それはアッセイを実行するのに必要とされる特異的な結合剤および補助試薬を含む。したがって、本発明はまた、少なくとも1つのCD99に特異的な結合剤およびCD99の測定のための補助試薬を含む免疫学的なキットにも関する。

20

【0050】

新規マーカーCD99の臨床上的利用を評価する1つの方法は、EHC法を用いた糖消失率 (glucose disposal rate) の測定によりインスリン抵抗性であると診断された17人の患者におけるそのレベルを測定し、同一の手法により決定した正常の糖消失率を有すると立証された17人の患者で測定されたものとレベルを比較することによる。統計的分析のために、標準的なスチューデントの t-検定評価を有意として見なされる0.05より小さい値で行う。

【0051】

試験の精度をその受信者動作特性(ROC)により描写することができる(特にZweig, M. H., and Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577を参照のこと)。ROCグラフは、観察されたデータの全範囲にわたって識別閾値(decision threshold)を連続的に変更することに起因する全ての感度/特異度の対のプロットである。

30

【0052】

実験室試験の臨床上的成績は、その診断の精度、または対象を臨床的に関連性のあるサブグループに正確に分類する能力に依存する。診断の精度は、調査される対象の2つの異なる状態を正確に識別する試験の能力を測定する。このような状態は、例えば健康および疾患である。

【0053】

それぞれの場合において、ROCプロットは、識別閾値の全範囲について1 - 特異度に対する感度をプロットすることにより、2つの分布間の重なり合う部分を描写する。y軸上は感度、すなわち真の陽性率[(真の陽性試験結果の数)/(真の陽性試験結果の数 + 偽陰性試験結果の数)]として定義される]である。これはまた、疾患または状態の存在における陽性としても言及されている。それは、影響を受けたサブグループから単独に計算される。x軸上は偽陽性率、すなわち1 - 特異度[(偽陽性結果の数)/(真の陰性結果の数 + 偽陽性結果の数)]として定義される]である。それは、特異度の指標であり、影響を受けていないサブグループから全体的に計算される。真の陽性率および偽陽性率は2つの異なるサブグループからの試験結果を用いることにより全く別々に計算されるので、ROCプロットは、試料における疾患の有病率と無関係である。ROCプロット上の各点は、特定の識別閾値に対応する感度/特異度対を表す。完全な区別(結果の2つの分布において重なり合う部分が存在しない)を伴う試験は、左上隅を通過するROCプロットを有し、そこで真の陽性率は1.

40

50

0、または100% (完全な感度)であり、偽陽性率は0(完全な特異度)である。区別を有さない(2群の結果が全く同じ分布)試験に対する理論的なプロットは、左下隅から右上隅への45°対角線である。多くのプロットは、これら2つの両極値の間に入る。(もしROCプロットが45°対角の下に完全に入った場合、これは、「陽性」に対する基準を「より大きい」から「より小さい」に、またはその反対に逆向きにすることにより容易に矯正される。)定性的には、プロットが左上隅に近いほど、試験の全般的な精度が高い。

【0054】

実験室試験の診断の精度を定量化するための1つの簡便な目標は、単一の数によりその成績を表現することである。最も一般的な世界的な基準は、ROCプロット下の面積である。慣例により、この面積は常に0.5以上である(そうでない場合、そうなるように決定基準を逆にできる)。値は、1.0(2群の試験値の完全な分離)と0.5(試験値の2群間で明らかな分布の差異が見られない)の間で変化する。面積は、対角線または90%特異度での感度に最も近いポイントなどのプロットの特定の部分だけではなく、全体のプロットに依存する。これは、ROCプロットが完全なもの(面積=1.0)に対してどれくらい近いかの量的記述的な表現である。

【0055】

また、本特許請求の範囲は、実質的に上記記載のような方法、使用、およびキットであり、特に以下の実施例に関連する。

【0056】

以下の実施例、参照、配列表、および図は、本発明の理解を助けるために提供され、その正当な範囲は添付の特許請求の範囲に説明されている。説明された手法において本発明の精神から逸脱しない範囲で変更され得ることが理解される。

【0057】

実施例

実施例1

臍静脈内皮細胞におけるmRNA発現の分析によるインスリン抵抗性に対する候補内皮マーカータンパク質の同定

内皮細胞の培養、mRNA抽出、逆転写、標識化、およびDNAマイクロアレイへのハイブリダイゼーション

対照からの血漿と比較したインスリン抵抗性の患者由来の血漿におけるタンパク質レベルの分析に基づいて、内皮活性化のマーカーがインスリン抵抗性の個体において増大したレベルで検出され得ることが明白になった。最近の文献は、これらの知見を支持する(例えば、Meigs et al., JAMA 291 (2004) 1978 ff)。従って、単一の膜貫通配列により膜につながり留められた大きな細胞外ドメインを有する1型膜タンパク質の排出のために内皮タンパク質を標的にするシグナル配列を持つ高発現した内皮タンパク質が、内皮活性化に対する潜在的な新規マーカータンパク質である。候補タンパク質を同定するため、細胞外タンパク質についてmRNA発現データセットをインシリコで分析した。

【0058】

ヒト血管内皮細胞(HUVEC)を標準的な手法に従って調製した。簡単に言うと、静脈を洗浄して血液を除き、その後静脈をディスパーゼ溶液 (Roche, Cat.No 295 825、DMEMで1:10に希釈)で満たした。血管の両端を閉じて、37°Cで30分間インキュベートした。次いで分離した内皮細胞を回収し、臍静脈をPBSで一度洗浄した。細胞は、320 x gで10分間遠心分離し、P0培養培地: M199 (Sigma Cat. No. M7528 + 20% ウシ胎児血清 + 1% Pen/Strep + 1% グルタミン + 100 µg/ml ECGS (Sigma Cat. No E2759) + 100 µg/ml ヘパリン (Sigma Cat. No. H3149) + 1/500 Vol. ゲンタマイシン (Roche Cat. No. 1 059 467)に再懸濁した。24時間後、赤血球を洗い落とし、培地を新鮮なP0培地と入れ替えた。さらに24時間インキュベーションした後、培地をp1培地: M199 (Sigma Cat. No. M7528 + 20% ウシ胎児血清 + 1% Pen/Strep + 1% グルタミン + 50 µg/ml ECGS (Sigma Cat. No E2759) + 100 µg/ml ヘパリン (Sigma Cat. No. H3149)と入れ替えた。

【0059】

HUVECを、p1培地で48時間培養した。48時間後に細胞を擦過により採取し、全ての細胞RNAをRNA-Bee (商標)を用いて抽出した。各試料からの10 µgの全ての細胞RNAを、逆転写し (Invitrogen、U.S.)、標識し (Ambion、U.S.)、供給元の使用説明書に従って市販キットを用いて処理した。アルカリ熱断片化(alkaline heat fragmentation)法および次に続くcDNAとU133 A および B GeneChip アレイとのハイブリダイゼーションは、マイクロチップ製造業者(Affymetrix、U.S.)により提供された標準的な手法であった。

【0060】

アレイの細胞強度値を共焦点レーザーキャナ (Hewlett Packard、U.S.)で記録し、データをGeneChip v3.1ソフトウェア (Affymetrix、U.S.)を用いて分析した。各遺伝子の発現レベルは、平均差(A.D.)として表現される、ミスマッチのオリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションと比較した、正規化された蛍光強度の平均差として計算した。本実験は、生物学的変動のため三連で行った。

10

【0061】

mRNA発現データセットのインシリコでの分析による高発現細胞外タンパク質の同定

上記記載のデータセットにおける最も高いmRNAレベル (最も高いA.D.値)を示す200個の遺伝子を選択した。対応するタンパク質配列を、確率的手法でシグナル配列および膜アンカー配列を予測するカスタムソフトウェアツールにより分析した。簡単に言うと、本ソフトウェアツールは、SwissProtからのタンパク質または真核生物ゲノムにおいて予測されるタンパク質について、シグナルペプチドまたは膜アンカーの予測を示す。専用の、手動で調製された一連の隠れマルコフモデル(HMM)に基づいて、シグナルペプチドまたはアンカーに共通の配列特徴をそれぞれ認識することを試みる(Sean R. Eddy, HMMER 2.3.2, <http://hmmer.wustl.edu>)。これらの配列シグナルが確実に予測出来ない場合、任意の入力配列が割り当てられた「シグナル」および「アンカー」スコアが、第二の分析段階においてサポートベクターマシン(SVM)に送られる(Cristianini N, Shawe-Taylor J. An Introduction to Support Vector Machines and other Kernel-based Learning Methods. Cambridge University Press, Cambridge, England, 2000)。SVMは、両方のクラスに関する一連の正しい例に対して調整した。この調整セットに関して、SVMから3つの調整セット(シグナル - アンカー - どちらでもない)に関する次の結果を得た。細胞外性(「シグナル」または「アンカー」)として予測されたタンパク質を、さらに器官特異性について評価した。候補タンパク質をコードする、パブリックドメインの発現配列タグに対する検索を行い、組織源に従って分類した。血管において発現し、かつ他の分泌器官(例えば、肝臓、膵臓)においては強い発現を示さなかったタンパク質のみが保持されていた。

20

30

【0062】

実施例2

インスリン抵抗性マーカーCD99に対する抗体の産生

インスリン抵抗性マーカーCD99に対するポリクローナル抗体は、免疫検出アッセイ、例えばウェスタンブロットングおよびELISAによる、CD99の、血清、および血漿、および血液レベルの測定における抗体のさらなる使用のために産生される。

【0063】

大腸菌(E. coli)における組換えタンパク質の発現

CD99に対する抗体を産生するため、タンパク質の組換え発現を免疫源を得るために行う。発現をRTS100発現システムおよび大腸菌の組合せを利用して行う。第一段階として、DNA配列を分析し、高収率cDNA沈黙突然変異変異体およびそれぞれのPCRプライマー配列に対する推奨を「ProteoExpert RTS E.coli HY」システムを用いて得る。これは市販のウェブベースのサービスである(www.proteoexpert.com)。推奨されたプライマー対を用いて、cDNAから直線的なPCR鋳型を産生し、かつCD99タンパク質をコードするヌクレオチド配列のインビトロの転写および発現のために「RTS 100 E. coli Linear Template Generation Set, His-tag」(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Cat.No. 3186237)システムを使用する。ウェスタンブロット検出および後の精製のために、発現タンパク質はHis-tagを含む。最も良く発現する変異体を同定する。PCRから発現および検出への全ての段階

40

50

を製造者の取扱説明書に従って実行する。全ての必要なT7制御領域(プロモーター、リボソーム結合部位、およびT7ターミネーター)を含む各PCR産物を、pBAD TOPO(登録商標)ベクター(Invitrogen, Karlsruhe, Germany, Cat. No. K 4300/01)内に製造者の取扱説明書に従ってクローニングする。T7制御配列を用いる発現のために、構築物を大腸菌BL 21(DE 3)(Studier, F.W., et al., Methods Enzymol. 185 (1990) 60-89)に形質転換し、形質転換された細菌をタンパク質発現のために1lバッチで培養する。

【 0 0 6 4 】

HisCD99融合タンパク質の精製を標準的な手法に従ってNi-キレートカラム上で行う。簡単に言うと、His-CD99融合タンパク質に対する発現ベクターを含む1lの細菌培養液を遠心分離によりペレット状にする。細胞ペレットを、リン酸pH 8.0、7 Mの塩化グアニジウム、イミダゾール、およびチオグリセロールを含む溶解緩衝剤中で再懸濁し、続いてUltra-Turrax(登録商標)を用いて均質化する。不溶性の物質を高速遠心分離によりペレット状にし、上清をNi-キレートクロマトグラフィカラムにアプライする。カラムを総容積の数倍量の溶解緩衝剤で洗浄し、続いてリン酸pH 8.0および尿素を含む緩衝剤で洗浄する。最後に、結合抗原を酸性条件下でSDSを含むリン酸緩衝剤を用いて溶出する。

10

【 0 0 6 5 】

タンパク質CD99に対するモノクローナル抗体の産生

(a)マウスの免疫化

最初に12週齢のA/Jマウスを100 µgのCD99で腹腔内に免疫化する。6週間後、さらに2回の腹腔内の免疫化が1ヶ月間隔で続く。この工程において、各マウスに、水酸化アルミニウムに吸収させた100 µgのCD99、および 10^9 微生物の百日咳菌(*Bordetella pertussis*)を投与する。続いて、100 µgのCD99を含むPBS緩衝剤を用いて、融合のそれぞれ2日前および3日前において、最後2回の免疫化を静脈内に行う。

20

【 0 0 6 6 】

(b)融合およびクローニング

(a)に従って免疫化されたマウスの脾臓細胞を、Galfré, G., and Milstein, C., Methods in Enzymology 73 (1981) 3-46に従って骨髓腫細胞と融合する。この工程において、免疫化されたマウスの約 1×10^8 脾臓細胞を 2×10^7 の骨髓腫細胞(P3X63-Ag8-653, ATCC CRL1580)と混合し、遠心分離する(300 gおよび4 で10分)。その後、細胞をウシ胎児血清(FCS)を含まないRPMI 1640培地で一度洗浄し、50 mlのコニカルチューブで400 gで再び遠心分離する。上清を廃棄し、細胞沈降物を軽くたたいて徐々に緩め、1 mlのPEG(分子量4000, Merck, Darmstadt)を添加し、そしてピペティングにより混合する。37 のウォーターバス中で1分後、FCSを含まない5 mlのRPMI 1640を室温で4~5分の時間内に液滴添加する。その後、10%のFCSを含む5 mlのRPMI 1640を約1分以内に液滴添加し、完全に混合し、培地(RPMI 1640+10% FCS)で50 mlまで満たし、続いて400 gおよび4 で10分間遠心分離する。沈降細胞を10%のFCSを含むRPMI 1640培地中で取り上げ、ヒポキサンチン-アザセリン選択培地(100 mmol/lヒポキサンチン、1 µg/mlアザセリンを含むRPMI 1640+10%のFCS)に播種する。インターロイキン6を100 U/mlで増殖因子として培地に添加する。約10日後、初代培養物を特異的抗体に対して試験する。CD99陽性の初代培養物を96ウェル細胞培養プレート中に蛍光標示式細胞分取器の手段によりクローニングする。この工程において、再びインターロイキン6を100 U/mlで増殖因子として培地に添加する。

30

40

【 0 0 6 7 】

(c)細胞培養上清液からのイムノグロブリン単離

得られたハイブリドーマ細胞をml当たり 1×10^5 細胞の密度で10%のFCSを含むRPMI 1640培地に播種し、発酵槽(Thermodux Co., Wertheim/Main, Model MCS-104XL, Order No.144-050)中で7日間増殖させる。平均して、培養上清中にml当たり100 µgのモノクローナル抗体の濃度が得られる。培養上清からのこの抗体の精製をタンパク質化学における通常の方法(例えば、Bruck, C., et al., Methods in Enzymology 121 (1986) 587-695に従う)により行う。

【 0 0 6 8 】

50

ポリクローナル抗体の産生

(a)免疫化

免疫化のために、1:1の比でタンパク質溶液(100 μ g/mlタンパク質CD99)および完全フロイントアジュバントの新鮮なエマルジョンを調製する。それぞれのウサギを1 mlのエマルジョンで1、7、14、および30、60、および90日目に免疫化する。血液を採り、結果として生じる抗CD99血清を実施例3および4に記載されているようなさらなる実験に対して用いた。

【0069】

(b)カプリル酸および硫酸アンモニウムを用いる連続した沈殿によるウサギ血清からのIgG(イムノグロブリンG)の精製

1倍量のウサギ血清を4倍量のアセテート緩衝剤(60 mM、pH 4.0)で希釈する。pHを2 MのTris塩基で4.5に調整する。カプリル酸(25 μ l/mlの希釈試料)を活発な攪拌下で液滴添加する。30分後、試料を遠心分離し(13,000 \times g、30分、4)、ペレットを廃棄し、上清を回収する。上清のpHを2 MのTris塩基の添加により7.5に調整し、ろ過する(0.2 μ m)。

【0070】

上清中のイムノグロブリンを活発な攪拌下で2 Mの最終濃度までの4 Mの硫酸アンモニウム溶液の液滴添加により沈殿させる。沈殿したイムノグロブリンを遠心分離(8000 \times g、15分、4)により回収する。

【0071】

上清を廃棄する。ペレットを10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 、pH 7.5、30 mM NaCl中で溶解し、徹底的に透析する。透析物を遠心分離し(13,000 \times g、15分、4)、ろ過する(0.2 μ m)。

【0072】

ポリクローナルウサギIgGのビオチン化

ポリクローナルウサギIgGを10 mMの $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 、pH 7.5、30 mMのNaCl中で10 mg/mlにする。IgG溶液ml当たり50 μ lのビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミド(DMSO中に3.6 mg/ml)を添加する。室温で30分後、試料をSuperdex200上で色層分析する(10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 、pH 7.5、30 mM NaCl)。ビオチン化されたIgGを含む画分を回収する。同じ手法に従って、モノクローナル抗体をビオチン化している。

【0073】

ポリクローナルウサギIgGのジゴキシゲニン化(digoxygenylation)

ポリクローナルウサギIgGを10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 、30 mM NaCl、pH 7.5中で10 mg/mlにする。IgG溶液ml当たり50 μ lのジゴキシゲニン-3-O-メチルカルボニル- -アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, Cat. No. 1 333 054)(DMSO中に3.8 mg/ml)を添加する。室温で30分後、試料をSuperdex(登録商標)200上で色層分析する(10 mMの $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 、pH 7.5、30 mMのNaCl)。ジゴキシゲニン化IgGを含む画分を回収する。同じ手法に従ってモノクローナル抗体をジゴキシゲニンで標識化する。

【0074】

実施例3

ウエスタンブロット

ヘパリンカラム(上記)により培地から濃縮および単離されたタンパク質試料を、10 mM Tris-HCl(pH 7.5)、150 mM NaCl、0.05 % Tween 20、1 % SDSからなる試料緩衝剤で溶解し、4 で10分間、12,000 gで遠心分離する。上清のタンパク質濃度を、公知のウシ血清アルブミン標準の範囲から作成される検量線を用いるブラッドフォード法により測定する。試料を試料緩衝剤(60 mM Tris-HCl、2 % SDS、0.1% ブロモフェノールブルー(bromphenol blue)、25 % グリセロール、および14.4 mM 2-メルカプトエタノール、pH 6.8)と混合、および70 で5分間インキュベーションした後、試料を12.5% homogenous ExcelGel SDS ゲル(Amersham Bioscience)により分離し、そしてニトロセルロース膜の上に電氣的に転写する。膜を、ブロッキング溶液(10 mM Tris-HCl、pH 7.5、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、および5% 脱脂粉乳)中でインキュベーションの後、抗ラットウサギ抗体で、それぞれ

10

20

30

40

50

室温で2時間インキュベートする。洗浄溶液(0.3% Tween 20を含むTris緩衝生理食塩水)で10分間3回洗浄した後、膜をホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgG(H+L)、抗マウスIgG₁および抗マウスIgG_{2a}(Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)と共にそれぞれ1時間室温でインキュベートする。膜を10分間3回洗浄し、抗原-抗体複合体を、増強された化学発光の試薬(Western Lightning(商標), PerkinElmer Life Sciences, Inc., Boston, MA)により製造者のプロトコルに従ってX線フィルム上で可視化する。

【0075】

実施例4

ヒト血清およびヒト血漿試料中のCD99の測定のためのELISA

ヒト血清またはヒト血漿中のCD99の検出のために、サンドイッチELISA法が開発された。抗原の捕捉および検出のために、抗CD99ポリクローナル抗体(実施例2を参照のこと)の一定分量がそれぞれビオチンおよびジゴキシゲニンと結合する。

【0076】

ストレプトアビジンでコーティングした96ウェルマイクロタイタープレートに100 μlのビオチン化抗CD99ポリクローナル抗体と共に、10 mMのリン酸、pH 7.4、1%のBSA、0.9%のNaCl、および0.1%のTween 20中10 μg/mlで60分間インキュベートする。インキュベーション後、プレートを0.9% NaCl、0.1% Tween 20で3回洗浄する。その後、ウェルを、標準抗原として組換えタンパク質(実施例2を参照のこと)の段階希釈、または患者からの希釈血漿試料のいずれかと共に2時間インキュベートする。CD99の結合後、プレートを0.9% NaCl、0.1% Tween 20で3回洗浄する。結合CD99の特異的な検出のために、ウェルを100 μlのジゴキシゲニン化抗CD99ポリクローナル抗体と共に、10 mM リン酸、pH 7.4、1% BSA、0.9% NaCl、および0.1% Tween 20中10 μg/mlで60分間インキュベートする。その後、プレートを結合していない抗体を取り除くために3回洗浄する。次の段階において、ウェルを20 mU/mlの抗ジゴキシゲニン-POD複合体(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Catalog No. 1633716)と共に10 mM リン酸、pH 7.4、1% BSA、0.9% NaCl、および0.1% Tween 20中で60分間インキュベートする。続いてプレートを同じ緩衝剤で3回洗浄する。抗原抗体複合体の検出のために、ウェルを100 μlのABTS溶液(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Catalog No. 11685767)と共にインキュベートし、ODを30~60分後ELISAリーダーを用いて405 nmで測定する。

【0077】

実施例5

患者データの統計分析

新規マーカーCD99の臨床上的有用性を、外因性インスリンの注射に依存している10人の糖尿病患者におけるそのレベルを測定し、かつ正常な細胞機能を有すると立証された10人の患者において測定されたレベルと比較することにより評価した。統計分析は有意と考えられる0.05より小さい値で標準的な学生t検定評価により行う。

【配列表】

[2008523398000001.app](#)

【手続補正書】

【提出日】平成19年7月24日(2007.7.24)

【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】

糖尿病の進行をモニタリングするための方法であって、以下の段階を含む方法：

(a) 個体から得られる液体試料を提供する段階；

10

20

30

(b) 結合剤およびCD99の間の複合体の形成に適切な条件下で、該試料をCD99に対して特異的な結合剤と接触させる段階；ならびに

(c) (b)で形成された複合体の量を、インスリン抵抗性で形成される複合体の量と関連付ける段階。

【請求項2】

糖尿病の治療の効果をモニタリングするための方法であって、以下の段階を含む方法：

(a) 糖尿病に対する治療を受けた患者から得られる液体試料を提供する段階；

(b) 結合剤およびCD99の間の複合体の形成に適切な条件下で、該試料をCD99に対して特異的な結合剤と接触させる段階；ならびに

(c) (b)で形成された複合体の量を、治療を欠く場合に形成される複合体の量と関連付ける段階。

【請求項3】

インスリン抵抗性の診断のための方法であって、以下の段階を含む方法：

(a) 個体から得られる液体試料を提供する段階；

(b) 結合剤およびCD99の間の複合体の形成に適切な条件下で、該試料をCD99に対して特異的な結合剤と接触させる段階；ならびに

(c) (b)で形成された複合体の量を、インスリン抵抗性の診断と関連付ける段階。

【請求項4】

試料が血清であることでさらに特徴付けられる、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項5】

試料が血漿であることでさらに特徴付けられる、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】

試料が全血であることでさらに特徴付けられる、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項7】

個体から得られる液体試料からのインスリン抵抗性の診断におけるマーカー分子としてのタンパク質CD99の使用。

【請求項8】

個体から得られる液体試料からのII型糖尿病の早期診断におけるマーカー分子としてのタンパク質CD99の使用。

【請求項9】

早期診断がグルコース不耐性を患っている患者由来の試料で行われる、請求項8記載の使用。

【請求項10】

糖尿病の進行をモニタリングするための、タンパク質CD99の使用。

【請求項11】

糖尿病の治療の効果をモニタリングするための、タンパク質CD99の使用。

【請求項12】

個体から得られる液体試料からのインスリン抵抗性の診断において、インスリン抵抗性に対する少なくとも一つの他のマーカー分子と組み合わせる、インスリン抵抗性に対するマーカー分子としてのタンパク質CD99の使用。

【請求項13】

CD99に対する少なくとも一つの特異的な結合剤、およびCD99の測定に対する補助試薬を含む、免疫学的キット。

【請求項14】

CD99と相互作用する化合物をスクリーニングする方法であって、以下の段階を含む方法：

(a) 一つの化合物または複数の化合物とCD99との相互作用を可能にする条件下で、タンパク

質CD99を該1つの化合物または複数の化合物と接触させる段階；および
(b)該1つの化合物または複数の化合物と該ポリペプチドとの間の相互作用を検出する段階。

【請求項15】

インスリン抵抗性を予防する、および/または抑制する、および/または和らげる可能性がある化合物をスクリーニングする方法であって、以下の段階

(a)化合物をタンパク質CD99と接触させる段階；

(b)タンパク質CD99の活性を測定する段階

を含む方法であり、

ここで、タンパク質CD99の活性を抑制する化合物がインスリン抵抗性を予防するおよび/または抑制する可能性がある化合物である、方法。

【請求項16】

段階(a)の前、または段階(a)と(b)との間にタンパク質CD99を固定化する段階を追加的に含む、請求項14および15のいずれか一項記載の方法。

【請求項17】

インスリン抵抗性を予防するおよび/または抑制するおよび/または遅らせる化合物の存在下または非存在下で宿主から分泌される可溶性CD99を検出する段階を含む、前記化合物をスクリーニングする方法であって、インスリン抵抗性を予防するおよび/または抑制するおよび/または遅らせる化合物が、宿主から分泌されるCD99のレベルを変化させる化合物である、方法。

【請求項18】

インスリン抵抗性を予防するおよび/または抑制する化合物をスクリーニングするための標的および/またはマーカーとしてのタンパク質CD99の使用。

【請求項19】

実質的に上記、特に実施例に関して記載されるような、方法、使用、およびキット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/013195

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/566		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched .		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	US 2003/211099 A1 (MULLER WILLIAM A ET AL) 13 November 2003 (2003-11-13) paragraph [0101]; claims 1,11-14 paragraph [0034] - paragraph [0036] paragraph [0075] - paragraph [0078] paragraph [0111] - paragraph [0114] paragraph [0127] paragraph [0098] ----- -/--	1-7, 10-18
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 9 May 2006		Date of making of the international search report 24/05/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl. Fax. (+31-70) 340-2016		Authorized officer Rosin, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/013195

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	AZIZ W ET AL: "LEVELS OF SOLUBLE TGF-BETA RECEPTOR-CD105 AND VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN THE PLASMA AND VITREOUS OF DIABETIC PATIENTS WITH PROLIFERATIVE RETINOPATHY" DIABETOLOGIA, BERLIN, DE, no. SUPPL 1, August 1998 (1998-08), page A18, XP008061824 ISSN: 0012-186X abstract	8,9
A	PFÜTZNER ANDREAS ET AL: "Fasting intact proinsulin is a highly specific predictor of insulin resistance in type 2 diabetes." DIABETES CARE. MAR 2004, vol. 27, no. 3, March 2004 (2004-03), pages 682-687, XP002372164 ISSN: 0149-5992 abstract	1
A	MEIGS JAMES B ET AL: "Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus." JAMA : THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION. 28 APR 2004, vol. 291, no. 16, 28 April 2004 (2004-04-28), pages 1978-1986, XP002372165 ISSN: 1538-3598 abstract	1
A	LEINONEN EEVA ET AL: "Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes." ATHEROSCLEROSIS. FEB 2003, vol. 166, no. 2, February 2003 (2003-02), pages 387-394, XP002372166 ISSN: 0021-9150 abstract	1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/013195**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: **19**
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/EP2005/013195

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 19

Claim 19 is obsolete because neither the category nor the scope of the claim is clear (Art 6 PCT). The use of the relative term "substantially as hereinbefore" as well as the reference to the "foregoing examples" is on the one hand vague and unclear, on the other hand shall claims not rely on the description (Art 6 PCT). The lack of clarity is to such an extent that no meaningful search could be carried out at all (Article 17(2) PCT).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2005/013195

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003211099	A1	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/566 (2006.01)	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z

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

(72) 発明者 エバース ステファン
ドイツ連邦共和国 ミュールハイム ポーラ - ホーレンウェガー - ストラッセ 2 3

(72) 発明者 フォサー ステファン
スイス連邦 バーゼル ブールダーホルツライン 2 4

(72) 発明者 フォントウラキス マイケル
スイス連邦 ミュンヘンシュタイン グルスウェグ 2 7

(72) 発明者 マーティン ミッチェル リー
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 ベローナ マウンテン ロード 2 8

(72) 発明者 セボコヴァ エレーナ
スイス連邦 ポットミンゲン スターレンストラッセ 8

F ターム(参考) 2G045 AA40

4C084 AA17 NA14 ZC351 ZC411

专利名称(译)	CD99作为胰岛素抵抗的靶标/标记物		
公开(公告)号	JP2008523398A	公开(公告)日	2008-07-03
申请号	JP2007545903	申请日	2005-12-09
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ベルントピーター エバースステファン フォサーステファン フォウトウラキスマイケル マーティンミッチェルリー セボコヴァエレーナ		
发明人	ベルント ピーター エバース ステファン フォサー ステファン フォウトウラキス マイケル マーティン ミッチェル リー セボコヴァ エレーナ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K45/00 A61P3/10 A61P5/50 G01N33/50 G01N33/566 G01N33/15		
CPC分类号	G01N33/566 G01N2333/70596 G01N2500/04 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.D A61K45/00.ZNA A61P3/10 A61P5/50 G01N33/50.Z G01N33/566 G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA40 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZC351 4C084/ZC411		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2004106548 2004-12-14 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及通过测量液体样品中CD99的水平和诊断胰岛素抗性以及筛选用于预防和/或治疗糖尿病的新化合物来监测糖尿病中的疾病进展。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. 01/EP2005/013195
1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Inv. No.: 601N33/666		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
2. FIELD OF SEARCH G01N		
Documentation searched (classification system followed by classification symbol)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base, arch., where practical, search term used)		
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
E. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character or classification, where appropriate, of the relevant passages	Reference to claim No.
X	US 2002/21099 A1 (MULLER WILLIAM A ET AL) 13 November 2002 (2002-11-13) paragraph [010] - Claims [1]-14 paragraph [0034] - paragraph [0036] paragraph [0076] - paragraph [0078] paragraph [0111] - paragraph [0114] paragraph [0127] paragraph [0098]	1-7 10-18
<input checked="" type="checkbox"/>	Former documents are listed in the continuation of box C	<input checked="" type="checkbox"/> Also patent family entry.
* Special categories of cited documents:		
A Documents defining the general state of the art which do not constitute part of minimum documentation		
B Documents which are cited in order to support the invention		
C Documents which may have priority, claims or other legal effect		
D Documents cited for other specific reasons (see explanation)		
E Documents cited for an oral disclosure, use, exhibition or other non-written form		
F Documents cited prior to the international filing date but not in the minimum documentation		
G Documents published after the international filing date and/or published in a language other than the language of the application		
H Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report		
I Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report and/or published in a language other than the language of the international search report		
J Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report and/or published in a language other than the language of the international search report		
K Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report and/or published in a language other than the language of the international search report		
L Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report and/or published in a language other than the language of the international search report		
M Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report and/or published in a language other than the language of the international search report		
N Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report and/or published in a language other than the language of the international search report		
O Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report and/or published in a language other than the language of the international search report		
P Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report and/or published in a language other than the language of the international search report		
Q Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report and/or published in a language other than the language of the international search report		
R Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report and/or published in a language other than the language of the international search report		
S Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report and/or published in a language other than the language of the international search report		
T Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report and/or published in a language other than the language of the international search report		
U Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report and/or published in a language other than the language of the international search report		
V Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report and/or published in a language other than the language of the international search report		
W Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report and/or published in a language other than the language of the international search report		
X Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report and/or published in a language other than the language of the international search report		
Y Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report and/or published in a language other than the language of the international search report		
Z Documents published in a language other than the language of the application and/or published in a language other than the language of the international search report and/or published in a language other than the language of the international search report		
Date of the actual completion of the international search: 9 May 2006		
Date of mailing of the international search report: 24/05/2006		
Name and mailing address of the ISA/ International Patent Office, P. O. Box 16, Friesenheim 2 74471 Friesenheim, Germany, Fax: +49-7141-94-3111		
Authorized officer: Rosin, O		