



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113287013 A

(43) 申请公布日 2021.08.20

(21) 申请号 201980087854.9

(22) 申请日 2019.12.27

(30) 优先权数据

2019-000060 2019.01.04 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.07.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2019/051592 2019.12.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/141608 JA 2020.07.09

(71) 申请人 国立大学法人京都大学

地址 日本京都

(72) 发明人 塩川雅広 桑田威 児玉裕三

妹尾浩 千叶勉

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 赵曦

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

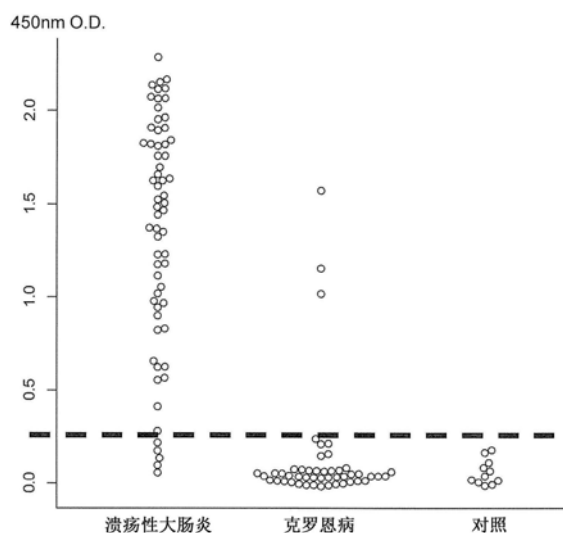
权利要求书1页 说明书28页
序列表10页 附图27页

(54) 发明名称

溃疡性大肠炎以及原发性硬化性胆管炎的检查方法

(57) 摘要

本发明以提供一种溃疡性大肠炎以及原发性硬化性胆管炎的特异性的检查方法等为目的。本发明第一提供一种溃疡性大肠炎的检查方法,提供一种检测样本中的与整合素 $\alpha V\beta$ 发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 发生免疫反应的抗体作为溃疡性大肠炎的指标的检测工序。本发明第二提供一种原发性硬化性胆管炎的检查方法,提供一种检测样本中的与整合素 $\alpha V\beta 6$ 发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 发生免疫反应的抗体作为原发性硬化性胆管炎的指标的检测工序。



1. 一种溃疡性大肠炎的检查方法，
包括检测工序，所述检测工序检测样本中的与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体作为溃疡性大肠炎的指标。
2. 根据权利要求1所述的方法，其中，
所述检测工序包括将整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体用作抗原来检测与其发生免疫反应的抗体和/或将整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体用作抗原来检测与其发生免疫反应的抗体。
3. 根据权利要求1或2所述的方法，其中，
所述样本是血液试样。
4. 一种用于检查溃疡性大肠炎的检查试剂盒，
包含整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体。
5. 根据权利要求4所述的检查试剂盒，其中，
进而包含检测用抗体。
6. 根据权利要求4或5所述的检查试剂盒，其中，
进而包含阳性标准液和/或阴性标准液。
7. 根据权利要求4至6中任一项所述的检查试剂盒，其中，
以固定于固相的形态包含所述整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或所述整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体。
8. 一种原发性硬化性胆管炎的检查方法，
包括检测工序，所述检测工序检测样本中的与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体作为原发性硬化性胆管炎的指标。
9. 根据权利要求8所述的方法，其中，
所述检测工序包括将整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体用作抗原来检测与其发生免疫反应的抗体和/或将整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体用作抗原来检测与其发生免疫反应的抗体。
10. 根据权利要求8或9所述的方法，其中，
所述样本是血液试样。
11. 一种用于检查原发性硬化性胆管炎的检查试剂盒，
包含整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体。
12. 根据权利要求11所述的检查试剂盒，其中，
进而包含检测用抗体。
13. 根据权利要求11或12所述的检查试剂盒，其中，
进而包含阳性标准液和/或阴性标准液。
14. 根据权利要求11至13中任一项所述的检查试剂盒，其中，
以固定于固相的形态包含所述整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或所述整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体。

溃疡性大肠炎以及原发性硬化性胆管炎的检查方法

技术领域

[0001] 本发明的一个方式涉及溃疡性大肠炎 (UC) 的检查方法以及用于检查 UC 的检查试剂盒。

[0002] 本发明的另一个方式涉及原发性硬化性胆管炎 (PSC) 的检查方法以及用于检查 PSC 的检查试剂盒。

背景技术

[0003] 在溃疡性大肠炎中,从直肠开始连续发生大肠粘膜的糜烂或炎症性溃疡,伴随腹泻、血便、腹痛等症状。溃疡性大肠炎主要发生在年轻人甚至老年人中,由于其活动期和缓解期反复,因此有必要长期治疗。近年来,溃疡性大肠炎在全世界呈增加趋势。

[0004] 原发性硬化性胆管炎 (PSC) 是在肝内外的胆管发生的多发性、弥漫性狭窄的进行性慢性肝病。原发性硬化性胆管炎被认为是包括免疫异常的多因素疾病,但原因尚不明确。原发性硬化性胆管炎多与炎症性肠病 (特别是溃疡性大肠炎) 并发。

[0005] 在专利文献1中记载了作为用于溃疡性大肠炎的诊断和/或预后预测的映射方法,包括将受检对象的肠道菌丛分类为10种肠道菌群,对各肠道菌群通过自组织化映射解析而进行数据处理的方法。

[0006] 在专利文献2中记载了测定来自哺乳动物的来自血液的试样中的可溶性LR11的浓度,该浓度作为原发性硬化性胆管炎、病毒性肝炎等肝病的严重程度以及预后预测的评价指标。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:日本特开2017-122603号公报

[0010] 专利文献2:日本特开2014-167446号公报

发明内容

[0011] 发明要解决的技术问题

[0012] 现有的溃疡性大肠炎的诊断是基于临床症状、内窥镜的观察结果、灌肠X射线检查、活检组织学检查的综合判断而进行。然而,尚未找到使用对溃疡性大肠具有特异性的生物标记物的分子生物学诊断基准。虽然在专利文献1中记载了用于溃疡性大肠炎的诊断的映射方法,但是由于有必要采集肠道菌丛并进行基因解析,因此不容易实施。

[0013] 同样的,关于原发性硬化性胆管炎,现有的诊断是基于临床症状等非特异性的基准的诊断,尚未找到使用对原发性硬化性胆管炎具有特异性的生物标记物的分子生物学诊断基准。专利文献2中记载的方法虽然是诊断包括原发性硬化性胆管炎、病毒性肝炎等的肝疾病的方法,但不是将原发性硬化性胆管炎与其他肝疾病区分而进行特异性诊断的方法。

[0014] 所以本发明以提供与溃疡性大肠炎以及原发性硬化性胆管炎的分子生物学诊断相关的技术为目的。

[0015] 用于解决技术问题的技术方案

[0016] 本发明人等令人惊讶地发现,在溃疡性大肠炎的患者以及原发性硬化性胆管炎的患者中,对于整合素 $\alpha V\beta 6$ 的自身抗体以及对于整合素 $\alpha V\beta 3$ 的自身抗体的血中浓度显著升高,并基于该发现完成了以下的发明。

[0017] (1) 一种溃疡性大肠炎的检查方法,

[0018] 包括检测工序,所述检测工序检测样本中的与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体作为溃疡性大肠炎的指标。

[0019] (2) 根据(1)所述的方法,所述检测工序包括将整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体用作抗原来检测与其发生免疫反应的抗体和/或将整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体用作抗原来检测与其发生免疫反应的抗体。

[0020] (3) 根据(1)或(2)所述的方法,所述样本是血液试样。

[0021] (4) 一种用于检查溃疡性大肠炎的检查试剂盒或检查试剂,包含整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体。

[0022] (5) 根据(4)所述的检查试剂盒或检查试剂,进而包含检测用抗体。

[0023] (6) 根据(4)或(5)所述的检查试剂盒或检查试剂,进而包含阳性标准液和/或阴性标准液。

[0024] (7) 根据(4)至(6)中任一项所述的检查试剂盒或检查试剂,以固定于固相的形态包含所述整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或所述整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体。

[0025] (8) 一种原发性硬化性胆管炎的检查方法,

[0026] 包括检测工序,所述检测工序检测样本中的与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体作为原发性硬化性胆管炎的指标。

[0027] (9) 根据(8)所述的方法,所述检测工序包括将整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体用作抗原来检测与其发生免疫反应的抗体和/或将整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体用作抗原来检测与其发生免疫反应的抗体。

[0028] (10) 根据(8)或(9)所述的方法,所述样本是血液试样。

[0029] (11) 一种用于检查原发性硬化性胆管炎的检查试剂盒或检查试剂,包含整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体。

[0030] (12) 根据(11)所述的检查试剂盒或检查试剂,进而包含检测用抗体。

[0031] (13) 根据(11)或(12)所述的检查试剂盒或检查试剂,进而包含阳性标准液和/或阴性标准液。

[0032] (14) 根据(11)至(13)中任一项所述的检查试剂盒或检查试剂,以固定于固相的形态包含所述整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或所述整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体。

[0033] (15) 一种评价溃疡性大肠炎的治疗效果的方法,

[0034] 包括检测工序,所述检测工序检测从实施了溃疡性大肠炎治疗的受试动物得到的样本中的与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体。

[0035] (16) 一种评价原发性硬化性胆管炎的治疗效果的方法,

[0036] 包括检测从实施了原发性硬化性胆管炎治疗的受试动物得到样本中的与整合素 α V β 6的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 α V β 3的片段或整体发生免疫反应的抗体的检测工序。

[0037] (17) 一种溃疡性大肠炎的诊断方法, 包括:

[0038] 检测来自受检动物的样本中的与整合素 α V β 6的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 α V β 3的片段或整体发生免疫反应的抗体, 以及

[0039] 在检测到所述抗体的情况下, 判断所述受检动物罹患溃疡性大肠炎。

[0040] 在此所述受检动物是人或非人动物, 优选是人。

[0041] (18) 根据(17)所述的方法, 所述检测包括将整合素 α V β 6的片段或整体用作抗原来检测与其发生免疫反应的抗体和/或将整合素 α V β 3的片段或整体用作抗原来检测与其发生免疫反应的抗体。

[0042] (19) 根据(17)或(18)所述的方法, 所述样本是血液试样, 优选是从所述受检动物分离的血液试样。

[0043] (20) 一种用于溃疡性大肠炎的诊断的生物标记物, 包含与整合素 α V β 6的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 α V β 3的片段或整体发生免疫反应的抗体。

[0044] (21) 一种筛选溃疡性大肠炎的治疗药的候补物质的方法, 包括:

[0045] 抗体检测工序, 检测从施用了试验物质的动物得到的样本中的与整合素 α V β 6的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 α V β 3的片段或整体发生免疫反应的抗体, 和

[0046] 选拔工序, 在所述样本中的所述抗体由于施用了所述试验物质而减少的情况下, 选拔所述试验物质作为溃疡性大肠炎的治疗药的候补物质。

[0047] (22) 一种制作溃疡性大肠炎的非人模型动物的方法, 至少包括抗体给药工序以及免疫工序中的至少一方,

[0048] 所述抗体给药工序向非人动物给药与整合素 α V β 6的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 α V β 3的片段或整体发生免疫反应的抗体,

[0049] 所述免疫工序将整合素 α V β 6的片段或整体和/或整合素 α V β 3的片段或整体作为抗原免疫非人动物。

[0050] (23) 一种取得溃疡性大肠炎的指标的方法, 包括

[0051] 检测样本中的与整合素 α V β 6的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 α V β 3的片段或整体发生免疫反应的抗体的检测工序。

[0052] (24) 根据(23)所述的方法, 所述检测工序包括将整合素 α V β 6的片段或整体用作抗原来检测与其发生免疫反应的抗体和/或将整合素 α V β 3的片段或整体用作抗原来检测与其发生免疫反应的抗体。

[0053] (25) 根据(23)或(24)所述的方法, 所述样本是血液试样。

[0054] (26) 整合素 α V β 6的片段或整体和/或整合素 α V β 3的片段或整体在制造用于检查溃疡性大肠炎的检查试剂盒或检查试剂中的使用。

[0055] (27) 根据(26)所述的使用, 所述整合素 α V β 6的片段或整体和/或所述整合素 α V β 3的片段或整体是固定于固相的形态。

[0056] (28) 一种整合素 α V β 6的片段或整体和/或整合素 α V β 3的片段或整体, 用于在溃疡性大肠炎的检查中使用。

[0057] (29) 根据 (25) 所述的整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体,是固定于固相的形态。

[0058] (30) 一种与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体,用于在制作溃疡性大肠炎的非人模型动物的方法中使用。

[0059] (31) 一种整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体,用于在制作溃疡性大肠炎的非人模型动物的方法中使用。

[0060] (32) 与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体在制造用于制作溃疡性大肠炎的非人模型动物的试剂中的使用。

[0061] (33) 整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体在制造用于制作溃疡性大肠炎的非人模型动物的试剂中的使用。

[0062] (34) 一种原发性硬化性胆管炎的诊断方法,包括

[0063] 检测来自受检动物的样本中的与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体,以及

[0064] 在检测到所述抗体的情况下,判断所述受检动物罹患原发性硬化性胆管炎。

[0065] 在此所述受检动物是人或非人动物,优选是人。

[0066] (35) 根据 (34) 所述的方法,所述检测包括将整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体用作抗原来检测与其发生免疫反应的抗体和/或将整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体用作抗原来检测与其发生免疫反应的抗体。

[0067] (36) 根据 (34) 或 (35) 所述的方法,所述样本是血液试样,优选是从所述受检动物分离的血液试样。

[0068] (37) 一种用于原发性硬化性胆管炎的诊断的生物标记物,包含与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体。

[0069] (38) 一种筛选原发性硬化性胆管炎的治疗药的候补物质的方法,包括:

[0070] 抗体检测工序,检测从施用了试验物质的动物得到的样本中的与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体,和

[0071] 选拔工序,在所述样本中的所述抗体由于施用了所述试验物质而减少的情况下,选拔所述试验物质作为原发性硬化性胆管炎的治疗药的候补物质。

[0072] (39) 一种制作原发性硬化性胆管炎的非人模型动物的方法,至少包括抗体给药工序以及免疫工序中的至少一方,

[0073] 所述抗体给药工序向非人动物给药与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体,

[0074] 所述免疫工序将整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体作为抗原免疫非人动物。

[0075] (40) 一种取得原发性硬化性胆管炎的指标的方法,包括

[0076] 检测样本中的与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体的检测工序。

[0077] (41) 根据 (40) 所述的方法,所述检测工序包括将整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体用作抗

原来检测与其发生免疫反应的抗体和/或将整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体用作抗原来检测与其发生免疫反应的抗体。

[0078] (42) 根据 (40) 或 (41) 所述的方法, 所述样本是血液试样。

[0079] (43) 整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体在制造用于检查原发性硬化性胆管炎的检查试剂盒或检查试剂中的使用。

[0080] (44) 根据 (43) 所述的使用, 所述整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或所述整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体是固定于固相的形态。

[0081] (45) 一种整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体, 用于在原发性硬化性胆管炎的检查中使用。

[0082] (46) 根据 (45) 所述的整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体是固定于固相的形态。

[0083] (47) 一种与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体, 用于在制作原发性硬化性胆管炎的非人模型动物的方法中使用。

[0084] (48) 一种整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体, 用于在制作原发性硬化性胆管炎的非人模型动物的方法中使用。

[0085] (49) 与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体在制造用于制作原发性硬化性胆管炎的非人模型动物的试剂中的使用。

[0086] (50) 整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体在制造用于制作原发性硬化性胆管炎的非人模型动物的试剂中的使用。

[0087] (51) 一种检测受检动物中与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体的方法,

[0088] 包括检测来自受检动物的样本中是否存在所述抗体。

[0089] 在此所述受检动物是人或非人动物, 优选是人。所述人可以是溃疡性大肠炎患者或疑似罹患溃疡性大肠炎的人。所述人可以是原发性硬化性胆管炎患者或疑似罹患原发性硬化性胆管炎的人。所述人可以是并发溃疡性大肠炎的原发性硬化性胆管炎患者或疑似罹患并发溃疡性大肠炎的原发性硬化性胆管炎的人。

[0090] (52) 根据 (51) 所述的方法, 所述检测使所述样本与作为整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体的抗原接触, 通过检测所述抗原与所述抗体的结合来检测所述样本中是否存在所述抗体。

[0091] (53) 根据 (51) 所述的方法, 所述检测使所述样本与作为整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体的抗原接触, 进而与抗人IgG抗体、抗人IgA抗体、抗人IgM抗体和/或抗人IgE抗体接触, 通过检测所述抗体与所述抗人IgG抗体、抗人IgA抗体、抗人IgM抗体和/或抗人IgE抗体的结合来检测所述样本中是否存在所述抗体。

[0092] 在此, 所述抗原优选固定于固相。

[0093] (54) 根据 (51) 至 (53) 中任一项所述的方法, 所述样本是从所述受检动物分离的血液试样。在此, 所述血液试样优选是血清试样、血浆试样或全血。

[0094] (55) 一种诊断受检动物的溃疡性大肠炎的方法, 包括

[0095] 使来自受检动物的样本与固定有作为整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体的抗原的固相载体接触,通过检测所述抗原与同所述抗原发生免疫反应的抗体的结合来检测所述样本中是否存在所述抗体,以及

[0096] 在所述样本中检测到所述抗体的存在的情况下,将所述受检动物诊断为罹患溃疡性大肠炎。

[0097] 在此所述受检动物是人或非人动物,优选是人。所述人可以是溃疡性大肠炎患者或疑似罹患溃疡性大肠炎的人。

[0098] (56) 根据 (55) 所述的方法,所述检测使所述样本与作为整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体的抗原接触,进而与抗人IgG抗体、抗人IgA抗体、抗人IgM抗体和/或抗人IgE抗体接触,通过检测所述抗体与所述抗人IgG抗体、抗人IgA抗体、抗人IgM抗体和/或抗人IgE抗体的结合来检测所述样本中是否存在所述抗体。

[0099] (57) 根据 (55) 或 (56) 所述的方法,所述样本是从所述受检动物分离的血液试样。在此,所述血液试样优选血清试样、血浆试样或全血。

[0100] (58) 一种诊断以及治疗受检动物的溃疡性大肠炎的方法,包括

[0101] 检测来自受检动物的样本中是否存在与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体,

[0102] 在所述样本中检测到所述抗体的存在的情况下,将所述受检动物诊断为罹患溃疡性大肠炎,以及

[0103] 向被诊断为罹患溃疡性大肠炎的所述受检动物给药有效量的溃疡性大肠炎的治疗药和/或实施用于治疗溃疡性大肠炎的血细胞成分除去疗法或者手术。

[0104] 在此所述受检动物是人或非人动物,优选是人。所述人可以是溃疡性大肠炎患者或疑似罹患溃疡性大肠炎的人。

[0105] (59) 根据 (58) 所述的方法,所述治疗药从类固醇药、5-氨基水杨酸 (5ASA) 制剂、免疫调节药 (例如硫唑嘌呤、巯基嘌呤)、生物制剂 (例如英夫利昔单抗、阿达木单抗、戈利木单抗、托法替尼、维多珠单抗)、抗TNF α 药以及免疫抑制药 (例如他克莫司、环孢素) 选择一者以上。

[0106] (60) 根据 (58) 或 (59) 所述的方法,所述样本是从所述受检动物分离的血液试样。在此,所述血液试样优选是血清试样、血浆试样或全血。

[0107] (61) 一种诊断受检动物的原发性硬化性胆管炎的方法,包括

[0108] 使来自受检动物的样本与固定有作为整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体的抗原的固相载体接触,通过检测所述抗原与同所述抗原发生免疫反应的抗体的结合来检测所述样本中是否存在所述抗体,以及

[0109] 在所述样本中检测到所述抗体的存在的情况下,将所述受检动物诊断为罹患原发性硬化性胆管炎。

[0110] 在此所述受检动物是人或非人动物,优选是人。所述人可以是原发性硬化性胆管炎患者或疑似罹患原发性硬化性胆管炎的人。

[0111] (62) 根据 (61) 所述的方法,所述检测使所述样本与作为整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体的抗原接触,进而与抗人IgG抗体、抗人IgA抗体、抗人IgM抗体和/或抗人IgE抗体接触,通过检测所述抗体与所述抗人IgG抗体、抗人IgA抗体、抗人IgM

抗体和/或抗人IgE抗体的结合来检测所述样本中是否存在所述抗体。

[0112] (63) 根据 (61) 或 (62) 所述的方法,所述样本是从所述受检动物分离的血液试样。

[0113] (64) 一种诊断以及治疗受检动物的原发性硬化性胆管炎的方法,包括

[0114] 检测来自受检动物的样本中是否存在与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体,

[0115] 在所述样本中检测到所述抗体的存在的情况下,将所述受检动物诊断为罹患原发性硬化性胆管炎,以及

[0116] 向被诊断为罹患原发性硬化性胆管炎的所述受检动物给药有效量的原发性硬化性胆管炎的治疗药。

[0117] 在此所述受检动物是人或非人动物,优选是人。所述人可以是原发性硬化性胆管炎患者或疑似罹患原发性硬化性胆管炎的人。

[0118] (65) 根据 (64) 所述的方法,所述样本是从所述受检动物分离的血液试样。在此,所述血液试样优选血清试样、血浆试样或全血。

[0119] (66) 根据 (54)、(57)、(60) 或 (63) 所述的方法,进而包括从所述受检动物分离所述血液试样。

[0120] (67) 一种诊断以及治疗受检动物的并发溃疡性大肠炎的原发性硬化性胆管炎的方法,包括

[0121] 检测来自受检动物的样本中是否存在与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体,

[0122] 在所述样本中检测到所述抗体的存在的情况下,将所述受检动物诊断为罹患并发溃疡性大肠炎的原发性硬化性胆管炎,以及

[0123] 向被诊断为罹患并发溃疡性大肠炎的原发性硬化性胆管炎的所述受检动物给药有效量的并发溃疡性大肠炎的原发性硬化性胆管炎的治疗药和/或实施用于治疗并发溃疡性大肠炎的原发性硬化性胆管炎的血细胞成分除去疗法或手术。

[0124] 在此所述受检动物是人或非人动物,优选是人。所述人可以是并发溃疡性大肠炎的原发性硬化性胆管炎患者或疑似罹患并发溃疡性大肠炎的原发性硬化性胆管炎的人。

[0125] (68) 根据 (67) 所述的方法,所述治疗药从类固醇药、5-氨基水杨酸 (5ASA) 制剂、免疫调节药 (例如硫唑嘌呤、巯基嘌呤)、生物制剂 (例如英夫利昔单抗、阿达木单抗、戈利木单抗、托法替尼、维多珠单抗)、抗TNF α 药以及免疫抑制药 (例如他克莫司、环孢素) 选择一者以上。

[0126] 本说明书包括作为本申请的优先权基础的日本专利申请号2019-000060的公开内容。

[0127] 发明效果

[0128] 根据本发明的溃疡性大肠炎的检查方法以及用于该检查方法的检查试剂盒,能够高灵敏度及高特异性地检测溃疡性大肠炎,能够与克罗恩病、其他炎症性肠病区分而进行特异性检测。

[0129] 根据本发明的原发性硬化性胆管炎的检查方法以及用于该检查方法的检查试剂盒,能够高灵敏度及高特异性地检测原发性硬化性胆管炎,能够与IgG4相关性硬化性胆管炎、其他肝胆管系疾病区分而进行特异性检测。

附图说明

[0130] 图1-1示出了在溃疡性大肠炎患者血清 (UC) 以及对照血清 (对照) 中,相对于亚基 α 链和 β 链的组合不同的多个人整合素的抗体的浓度。

[0131] 图1-2示出了在溃疡性大肠炎患者血清 (UC) 以及对照血清 (对照) 中,相对于亚基 α 链和 β 链的组合不同的多个人整合素的抗体的浓度。

[0132] 图1-3示出了在溃疡性大肠炎患者血清 (UC) 以及对照血清 (对照) 中,相对于亚基 α 链和 β 链的组合不同的多个人整合素的抗体的浓度。

[0133] 图1-4示出了在溃疡性大肠炎患者血清 (UC) 以及对照血清 (对照) 中,相对于亚基 α 链和 β 链的组合不同的多个人整合素的抗体的浓度。

[0134] 图2示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、对照血清中的抗人整合素 $\alpha\beta6$ 抗体的浓度。

[0135] 图3示出了原发性硬化性胆管炎患者血清、IgG4相关性硬化性胆管炎患者血清、对照血清中的抗人整合素 $\alpha\beta6$ 抗体的浓度。

[0136] 图4示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、对照血清中的抗人整合素 $\alpha\beta3$ 抗体的浓度。

[0137] 图5示出了原发性硬化性胆管炎患者血清、IgG4相关性硬化性胆管炎患者血清、对照血清中的抗人整合素 $\alpha\beta3$ 抗体的浓度。

[0138] 图6示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、其他肠病患者血清中的抗人整合素 $\alpha\beta6$ 抗体的浓度。

[0139] 图7示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、其他肠病患者血清、胶原病患者血清以及正常人血清中的抗人整合素 $\alpha\beta6$ 抗体的浓度。

[0140] 图8A示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、其他肠病患者血清中的抗人整合素 $\alpha\beta6$ 抗体IgG1的浓度。

[0141] 图8B示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、其他肠病患者血清中的抗人整合素 $\alpha\beta6$ 抗体IgG2的浓度。

[0142] 图8C示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、其他肠病患者血清中的抗人整合素 $\alpha\beta6$ 抗体IgG3的浓度。

[0143] 图8D示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、其他肠病患者血清中的抗人整合素 $\alpha\beta6$ 抗体IgG4的浓度。

[0144] 图9A示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、其他肠病患者血清中的抗人整合素 $\alpha\beta6$ 抗体IgA的浓度。

[0145] 图9B示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、其他肠病患者血清中的抗人整合素 $\alpha\beta6$ 抗体IgM的浓度。

[0146] 图9C示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、其他肠病患者血清中的抗人整合素 $\alpha\beta6$ 抗体IgE的浓度。

[0147] 图10A示出了溃疡性大肠炎患者从2017年11月至2018年11月期间在各时间点的部分Mayo评分 (partial Mayoscore) (左纵轴) 以及抗人整合素 $\alpha\beta6$ 自身抗体 (IgG) 的抗体效价 (右纵轴)。

[0148] 图10B示出了其他溃疡性大肠炎患者从2017年11月至2018年11月期间在各时间点

的部分Mayo评分(左纵轴)以及抗人整合素 $\alpha V\beta 6$ 自身抗体(IgG)的抗体效价(右纵轴)。

[0149] 图11示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、其他肠病患者血清中的抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体的浓度。

[0150] 图12示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、其他肠病患者血清、胶原病患者血清以及正常人血清中的抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体的浓度。

[0151] 图13A示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、其他肠病患者血清中的抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体IgG1的浓度。

[0152] 图13B示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、其他肠病患者血清中的抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体IgG2的浓度。

[0153] 图13C示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、其他肠病患者血清中的抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体IgG3的浓度。

[0154] 图13D示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、其他肠病患者血清中的抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体IgG4的浓度。

[0155] 图14A示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、其他肠病患者血清中的抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体IgA的浓度。

[0156] 图14B示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、其他肠病患者血清中的抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体IgM的浓度。

[0157] 图14C示出了溃疡性大肠炎患者血清、克罗恩病患者血清、其他肠病患者血清中的抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体IgE的浓度。

具体实施方式

[0158] <1. 样本>

[0159] 本发明的检查方法对作为对象的受检动物没有特别限定,可以是人,也可以是其他非人哺乳动物,但优选是人。

[0160] 作为用于本发明的检查方法的样本,能够列举从受检动物采集的体液。具体而言,除血清、血浆、全血等血液试样之外,也可以是唾液、脊髓液、尿等血液以外的体液试样。另外,不限于体液,从受检动物采集的组织,例如从需要检查的溃疡性大肠炎的病灶部位(例如大肠、直肠)、原发性硬化性胆管炎的病灶部位(例如肝脏)采集的组织也能够作为样本使用。样本以从受检动物分离的方式而用于本发明的检查方法。

[0161] <2. 整合素 $\alpha V\beta 6$ >

[0162] 整合素是天然型为由异二聚体分子形成的蛋白质,所述异二聚体分子由2根亚基链,即 α 链以及 β 链形成。已知 $\alpha 1 \sim \alpha 11$ 、 αV 、 αX 、 αM 、 αL 、 αD 、 αE 、 αIIb 作为 α 链, $\beta 1 \sim \beta 8$ 作为 β 链,存在二者组合不同的多个同种型。

[0163] 整合素存在于上皮细胞表面,与结缔组织表面的作为细胞外基质蛋白的层粘连蛋白、纤连蛋白等结合。

[0164] 整合素 $\alpha V\beta 6$ 由包含 αV 作为 α 链、 $\beta 6$ 作为 β 链的异二聚体分子形成。整合素 $\alpha V\beta 6$ 在正常组织中几乎不表达,但在炎症刺激时等在上皮细胞表面表达。

[0165] 在本发明中,与需要检测的自身抗体发生免疫结合的整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体的起源没有特别限定,但优选与受检动物是同种,特别优选是人。编码人等哺乳动物的种的整

合素的 α V链、 β 6链的基因的碱基序列信息以及各链的氨基酸序列信息能够从公知的数据库 (GenBank等) 取得。特别是, 人整合素 α V链同种型1的前蛋白原的氨基酸序列被登记为 GenBank Accession Number NP_002201.2, 示于序列号1。人整合素 β 6链的前体的氨基酸序列被登记为 GenBank Accession Number NP_000879.2, 示于序列号2。人以外的各种哺乳动物的整合素 α V链以及 β 6链的氨基酸序列信息也同样能够从公知的数据库 (GenBank等) 取得。也可以是包含登记于数据库的 α V链以及 β 6链的一方或双方的氨基酸序列进而受到翻译后修饰而形成的氨基酸序列的 α V链以及 β 6链构成整合素 α V β 6。例如, 序列号1的氨基酸序列的第1位~第30位的部分序列是信号肽序列, 人整合素 α V链的成熟多肽的氨基酸序列包含序列号1的氨基酸序列的第31位~第1048位的序列。同样地, 序列号2的氨基酸序列的第1位~第21位的部分序列是信号肽序列, 人整合素 β 6链的成熟多肽的氨基酸序列包含序列号2的氨基酸序列的第22位~第788位的序列。

[0166] 进而, 在没有特别明示的情况下, 在本发明中的整合素 α V β 6不限于包含成熟或未成熟的氨基酸序列的天然型, 也可以是与天然型整合素 α V β 6等效价形态的变异体。

[0167] 另外, 整合素 α V β 6不限于包含成熟或未成熟的氨基酸序列的天然型或变异体的 α 链以及 β 链均包含其全长的形态 (即整合素 α V β 6的整体), 也可以是整合素 α V β 6的片段的形态。

[0168] 另外, 需要检测的自身抗体不限于与仅由整合素 α V β 6的片段或整体的氨基酸序列形成的物质发生免疫结合的抗体, 也可以是与向整合素 α V β 6的片段或整体的各链加合其他肽的物质 (特别是在C末端侧进行了加合的物质) 发生免疫结合的抗体。

[0169] 作为整合素 α V β 6的片段, 可以列举构成整合素的二聚体的 α V链、 β 6链中至少一者比成熟或未成熟的天然型或其变异体短的物质。具体的, 能够示例包含下述 α V链和/或 β 6链的二聚体作为整合素 α V β 6的片段: 作为 α V链, 包含序列号1所示的 α V链的氨基酸序列中从第31位的Phe至第992位的Val的部分序列的 α V链; 作为 β 6链, 包含序列号2所示的 β 6链的氨基酸序列中从第22位的Gly至第707位的Asn的部分序列的 β 6链。整合素 α V β 6的片段优选形成二聚体, 优选具有与层粘连蛋白、纤连蛋白等细胞外基质蛋白的结合活性。整合素 α V β 6的片段具有与细胞外基质蛋白的结合活性能够通过ELISA (酶联免疫吸附试验) 法等确认。

[0170] 能够通过下述方式确认整合素 α V β 6的整体或其片段形成二聚体: 将整合素 α V β 6的整体或其片段在不存在2-巯基乙醇的条件下供给至SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳) 时, 能够检测到与二聚体的分子量相当的条带, 且在存在2-巯基乙醇的条件下将其供给至SDS-PAGE时, 与二聚体的分子量相当的条带消失。

[0171] 作为市售的整合素 α V β 6, 能够示例重组人整合素 α V β 6 (R&D Systems, 美国明尼苏达州, 产品号3817-AV)。该重组人整合素 α V β 6是下述 α V链和 β 6链的二聚体: 所述 α V链由序列号1所示的 α V链的氨基酸序列中从第31位的Phe至第992位的Val的部分序列与在其C末端加合的连接子序列以及酸性尾端序列形成, 所述 β 6链由序列号2所示的 β 6链的氨基酸序列中从第22位的Gly至第707位的Asn的部分序列与在其C末端加合的连接子序列以及碱性尾端序列形成。

[0172] 作为构成整合素 α V β 6的片段或整体的 α V链的更具体的实施方式, 可以列举从由

[0173] (I) 包含序列号1所示的氨基酸序列或序列号1所示的氨基酸序列中从第31位的Phe至第1048位的Thr的部分序列的多肽、

[0174] (II) 包含序列号1所示的氨基酸序列的部分序列且与(I)的多肽功能性等效价的多肽、

[0175] (III) 包含与序列号1所示的氨基酸序列或其部分序列具有85%以上的序列同源性的氨基酸序列且与(I)的多肽功能性等效价的多肽、以及

[0176] (IV) 包含序列号1所示的氨基酸序列或其部分序列中一个或多个氨基酸置换、缺失和/或加合的氨基酸序列且与(I)的多肽功能性等效价的多肽

[0177] 组成的组中选择的多肽。

[0178] 所述(I)~(IV)的多肽也可以是包含进而将其他氨基酸序列加合至由所述(I)~(IV)定义的氨基酸序列或部分序列的N末端侧以及C末端侧的至少一方、优选是C末端侧的氨基酸序列的多肽。

[0179] 所述(II)、(III)以及(IV)中,与(I)的多肽功能性等效价的多肽能够示例下述多肽:能够与整合素 $\beta 6$ 链(特别优选由序列号2所示的氨基酸序列形成的多肽链、由序列号2所示的氨基酸序列中从第22位的Gly至第788位的Cys的部分序列形成的多肽链或由序列号2所示的氨基酸序列中从第22位的Gly至第707位的Asn的部分序列形成的多肽链)形成二聚体,且形成的二聚体具有与层粘连蛋白、纤连蛋白等细胞外基质蛋白结合的能力,所述细胞外基质蛋白能够结合天然型整合素 $\alpha V\beta 6$ 或市售的整合素 $\alpha V\beta 6$ 。

[0180] 作为所述(II)的部分序列,能够列举序列号1所示的氨基酸序列中从第31位的Phe至第992位的Val的部分序列。作为所述(III)以及(IV)的部分序列,能够列举序列号1所示的氨基酸序列中从第31位的Phe至第1048位的Thr的部分序列或序列号1所示的氨基酸序列中从第31位的Phe至第992位的Val的部分序列。

[0181] 所述(III)的序列同源性优选是90%以上,更优选是95%以上,进而更优选是96%以上,特别优选是97%以上,最优选是98%以上或99%以上。

[0182] 所述(IV)中“一个或多个”例如是1~100个,优选是1~50个,优选是1~30个,优选是1~20个,优选是1~15个,优选是1~10个,优选是1~5个,优选是1~4个,优选是1~3个,优选是1~2个,优选是1个。

[0183] 作为构成整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体的 $\beta 6$ 链的更具体的实施方式,可以列举从由

[0184] (V) 包含序列号2所示的氨基酸序列或序列号2所示的氨基酸序列中从第22位的Gly至第788位的Cys的部分序列的多肽、

[0185] (VI) 包含序列号2所示的氨基酸序列的部分序列且与(V)的多肽功能性等效价的多肽、

[0186] (VII) 包含与序列号2所示的氨基酸序列或其部分序列具有85%以上的序列同源性的氨基酸序列且与(V)的多肽功能性等效价的多肽、以及

[0187] (VIII) 序列号2所示的氨基酸序列或其部分序列中一个或多个氨基酸置换、缺失和/或加合的氨基酸序列且与(V)的多肽功能性等效价的多肽

[0188] 组成的组中选择的多肽。

[0189] 所述(V)~(VIII)的多肽也可以是包含进而将其他氨基酸序列加合至由所述(V)~(VIII)定义的氨基酸序列或部分序列的N末端侧以及C末端侧的至少一方、优选是C末端侧的氨基酸序列的多肽。

[0190] 所述(VI)、(VII)以及(VIII)中与(V)的多肽功能性等效价的多肽能够示例下述多

肽:能够与整合素 α V链(特别优选由序列号1所示的氨基酸序列形成的多肽链、由序列号1所示的氨基酸序列中从第31位的Phe至第1048位的Thr的部分序列形成的多肽链或由序列号1所示的氨基酸序列中从第31位的Phe至第992位的Val的部分序列形成的多肽链)形成二聚体,且形成的二聚体具有与层粘连蛋白、纤连蛋白等细胞外基质蛋白结合的能力,所述细胞外基质蛋白能够结合天然型整合素 α V β 6或市售的整合素 α V β 6。

[0191] 作为所述(VI)的部分序列,能够列举序列号2所示的氨基酸序列中从第22位的Gly至第707位的Asn的部分序列。作为所述(VII)以及(VIII)的部分序列,能够列举序列号2所示的氨基酸序列中从第22位的Gly至第788位的Cys的部分序列或序列号2所示的氨基酸序列中从第22位的Gly至第707位的Asn部分序列。

[0192] 所述(VII)的序列同源性优选是90%以上,更优选是95%以上,进而优选是96%以上,特别优选是97%以上,最优选是98%以上或99%以上。

[0193] 所述(VIII)中“一个或多个”例如是1~100个,优选是1~50个,优选是1~30个,优选是1~20个,优选是1~15个,优选是1~10个,优选是1~5个,优选是1~4个,优选是1~3个,优选是1~2个,优选是1个。

[0194] 所述(III)、所述(VII)以及后述的(XI)中,氨基酸序列的序列同源性能够使用本领域技术人员周知的方法、序列解析软件等而求得。作为序列解析软件,例如可以列举BLAST算法的blastp程序、FASTA算法的fasta程序。

[0195] <3. 整合素 α V β 3>

[0196] 整合素 α V β 3由包含 α V作为 α 链、 β 3作为 β 链的异二聚体分子形成。

[0197] 在本发明中,与需要检测的自身抗体发生免疫结合的整合素 α V β 3的片段或整体的起源没有特别限定,但优选与受检动物是同种,特别优选是人。编码人等哺乳动物的种的整合素的 α V链、 β 3链的基因的碱基序列信息以及各链的氨基酸序列信息能够从公知的数据库(GenBank等)取得。

[0198] 关于 α V链如上所述,因此省略说明。

[0199] 人整合素 β 3链的前体的氨基酸序列被登记为GenBank Accession Number AAA52589.1,示于序列号3。人以外的各种哺乳动物的整合素 β 3链的氨基酸序列信息也同样能够从公知的数据库(GenBank等)取得。

[0200] 也可以是包含登记于数据库的 α V链以及 β 3链的一方或双方的氨基酸序列进而受到翻译后修饰而形成的氨基酸序列的 α V链以及 β 3链构成整合素 α V β 3。例如,人整合素 α V链的成熟多肽的氨基酸序列包含序列号1的氨基酸序列的第31位~第1048位的序列。同样地,序列号3的氨基酸序列的第1位~第26位的部分序列是信号肽序列,人整合素 β 3链的成熟多肽的氨基酸序列包含序列号3的氨基酸序列的第27位~第788位的序列。

[0201] 进而,在没有特别明示的情况下,在本发明中的整合素 α V β 3不限于包含成熟或未成熟的氨基酸序列的天然型,也可以是与天然型整合素 α V β 3等效价形态的变异体。

[0202] 另外,整合素 α V β 3不限于包含成熟或未成熟的氨基酸序列的天然型或变异体的 α 链以及 β 链均包含其全长的形态(即整合素 α V β 3的整体),也可以是整合素 α V β 3的片段的形态。

[0203] 另外,需要检测的自身抗体不限于与仅由整合素 α V β 3的片段或整体的氨基酸序列形成的物质发生免疫结合的抗体,也可以是与向整合素 α V β 3的片段或整体的各链加合其他

的肽的物质(特别是在C末端侧进行了加合的物质)发生免疫结合的抗体。

[0204] 作为整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段,可以列举构成整合素的二聚体的 αV 链、 $\beta 3$ 链中至少一者比成熟或未成熟的天然型或其变异体短的物质。具体的,能够示例包含下述 αV 链和/或 $\beta 3$ 链的二聚体作为整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段:作为 αV 链,包含序列号1所示的 αV 链的氨基酸序列中从第31位的Phe至第992位的Val的部分序列的 αV 链;作为 $\beta 3$ 链,包含序列号3所示的 $\beta 3$ 链的氨基酸序列中从第27位的Gly至第718位的Asp的部分序列的 $\beta 3$ 链。整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段优选形成二聚体,更优选具有与层粘连蛋白、纤连蛋白等细胞外基质蛋白的结合活性。整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段具有与细胞外基质蛋白的结合活性能够通过ELISA法等确认。

[0205] 能够通过下述方式确认整合素 $\alpha V\beta 3$ 的整体或其片段形成二聚体:将整合素 $\alpha V\beta 3$ 的整体或其片段在不存在2-巯基乙醇的条件下供给至SDS-PAGE时,能够检测到与二聚体的分子量相当的条带,且在存在2-巯基乙醇的条件下将其供给至SDS-PAGE时,与二聚体的分子量相当的条带消失。

[0206] 作为市售的整合素 $\alpha V\beta 3$,能够示例重组人整合素 $\alpha V\beta 3$ (R&D Systems,美国明尼苏达州,产品号3050-AV)。该重组人整合素 $\alpha V\beta 3$ 是下述 αV 链和 $\beta 3$ 链的二聚体:所述 αV 链由序列号1所示的 αV 链的氨基酸序列中从第31位的Phe至第992位的Val的部分序列与在其C末端加合的连接子序列以及酸性尾端序列形成,所述 $\beta 3$ 链由序列号3所示的 $\beta 3$ 链的氨基酸序列中从第27位的Gly至第718位的Asp的部分序列与在其C末端加合连接子序列以及碱性尾端序列形成。

[0207] 作为构成整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体的 αV 链的更具体的实施方式,可以列举从所述(I)~(IV)选择的多肽。

[0208] 作为构成整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体的 $\beta 3$ 链的更具体的实施方式,可以列举从由

[0209] (IX)包含序列号3所示的氨基酸序列或序列号3所示的氨基酸序列中从第27位的Gly至第718位的Asp的部分序列或序列号3所示的氨基酸序列中从第27位的Gly至第788位的Thr的部分序列的多肽、

[0210] (X)包含序列号3所示的氨基酸序列的部分序列且与(IX)的多肽功能性等效价的多肽、

[0211] (XI)包含与序列号3所示的氨基酸序列或其部分序列具有85%以上的序列同源性的氨基酸序列且与(IX)的多肽功能性等效价的多肽、以及

[0212] (XII)包含序列号3所示的氨基酸序列或其部分序列中一个或多个氨基酸置换、缺失和/或加合的氨基酸序列且与(IX)的多肽功能性等效价的多肽

[0213] 组成的组中选择的多肽。

[0214] 所述(IX)~(XII)的多肽也可以是包含进而将其他氨基酸序列加合至由所述(IX)~(XII)定义的氨基酸序列或部分序列的N末端侧以及C末端侧的至少一方、优选是C末端侧的氨基酸序列的多肽。

[0215] 所述(X)~(XII)中,与(IX)的多肽功能性等效价的多肽能够示例下述多肽:能够与整合素 αV 链(特别优选由序列号1所示的氨基酸序列形成的多肽链、由序列号1所示的氨基酸序列中从第31位的Phe至第1048位的Thr的部分序列形成的多肽链或由序列号1所示的氨基酸序列中从第31位的Phe至第992位的Val的部分序列形成的多肽链)形成二聚体,且形成的二聚体具有与层粘连蛋白、纤连蛋白等细胞外基质蛋白结合的能力,所述细胞外基质

蛋白能够结合天然型整合素 $\alpha V\beta 3$ 或市售的整合素 $\alpha V\beta 3$ 。

[0216] 作为所述 (X) 的部分序列,能够列举序列号3所示的氨基酸序列中从第27位的Gly至第718位的Asp的部分序列。作为所述 (XI) 以及 (XII) 的部分序列,能够列举序列号3所示的氨基酸序列中从第27位的Gly至第718位的Asp的部分序列或序列号3所示的氨基酸序列中从第27位的Gly至第788位的Thr的部分序列。

[0217] 所述 (XI) 的序列同源性优选是90%以上,更优选是95%以上,进而优选是96%以上,特别优选是97%以上,最优选是98%以上或99%以上。

[0218] 所述 (XII) 中“一个或多个”例如是1~100个,优选是1~50个,优选是1~30个,优选是1~20个,优选是1~15个,优选是1~10个,优选是1~5个,优选是1~4个,优选是1~3个,优选是1~2个,优选是1个。

[0219] <4. 溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的检查方法>

[0220] 本发明的检查方法第一涉及

[0221] 一种溃疡性大肠炎的检查方法,

[0222] 包括检测样本中的与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体作为溃疡性大肠炎的指标的检测工序。

[0223] 本发明的检查方法第二涉及

[0224] 一种原发性硬化性胆管炎的检查方法,

[0225] 包括检测样本中的与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体作为原发性硬化性胆管炎的指标的检测工序。

[0226] 在以下的说明中将“整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体”总称为“整合素 $\alpha V\beta 6$ ”,将“整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体”总称为“整合素 $\alpha V\beta 3$ ”。

[0227] 本发明的第一检查方法是基于以下令人惊讶的发现而完成的:从受检动物取得的样本中的整合素 $\alpha V\beta 6$ 的抗体(自身抗体)以及整合素 $\alpha V\beta 3$ 的抗体(自身抗体)成为罹患溃疡性大肠炎的指标。

[0228] 本发明的第二检查方法是基于以下令人惊讶的发现而完成的:从受检动物取得的样本中的整合素 $\alpha V\beta 6$ 的抗体(自身抗体)以及整合素 $\alpha V\beta 3$ 的抗体(自身抗体)成为罹患原发性硬化性胆管炎的指标。

[0229] 本发明的检查方法中的检测工序是检测样本中的与整合素 $\alpha V\beta 6$ 发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 发生免疫反应的抗体的工序。本发明中的“检测”是除了包括确认样本中是否存在与整合素 $\alpha V\beta 6$ 发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 发生免疫反应的抗体之外,还包括测定样本中的该抗体的含量、即“定量”的概念。

[0230] 本发明的检查方法中的检测工序只要是能够定量或定性检测样本中的所述抗体的方法即可,具体的方式没有特别限定。例如,能够使用免疫学手法,例如能够列举抗体酶法(ELISA法)、免疫沉降法(IPP法)、免疫墨点法(IB法)、胶乳凝集法、免疫色谱法、间接荧光抗体法(IF法)、放射免疫分析法(RIA法)等手法。特别优选能够处理很多样本的ELISA法。在ELISA法中,具体而言,将作为所述抗体的抗原的在上述进行详述的整合素 $\alpha V\beta 6$ 和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 固定于固相,使样本接触该固定于固相的抗原,通过使用酶标识的检测用抗体等检测抗原与样本中可能含有的所述抗体的免疫复合物,能够检测所述抗体。ELISA法的实施所伴随的非特异性反应的抑制方法、检测时可以使用的标识物质、测定仪器等没有特别限定。

作为用于固定抗原的固相能够使用板、珠、管等任意形状的固相。

[0231] 在ELISA法等免疫学手法中,能够在适当的缓冲液中进行使可能含有所述抗体的样本接触所述抗原的工序、必要的清洗工序、必要的标识工序、必要的检测工序,但优选在包含从钙离子、镁离子、锰离子、钠、锂等选择一种以上金属离子的缓冲液中进行。所述金属离子优选是钙离子、镁离子、锰离子等二价金属离子,特别优选钙离子、镁离子以及锰离子中的一种或两种。所述金属离子的缓冲液中的浓度没有特别限定,能够示例合计是0.02mM~200mM,优选是0.2mM~20mM,特别优选是0.4mM~10mM。在包含这些金属离子的缓冲液中检测灵敏度升高,因此优选。

[0232] 在检测工序中,与整合素 α V β 6发生免疫反应的抗体的量和/或与整合素 α V β 3发生免疫反应的抗体的量能够作为与所述抗体与所述抗原的免疫复合物结合的检测用抗体的标识量的测定值而求得。也能够利用包含已知浓度的所述抗体的阳性标准液建立校准曲线,使用校准曲线从标识量的测定值算出受检试样中的所述抗体的量。

[0233] 在检测工序中,是否存在与整合素 α V β 6发生免疫反应的抗体和/或与整合素 α V β 3发生免疫反应的抗体的判定(阳性/阴性的判定)能够通过将从受检动物个体(例如,疑似罹患溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的人)得到的样本中的所述抗体的测定值与从未罹患溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的动物个体(例如正常人)得到的样本中的所述抗体的测定值比较而进行。在此,从未罹患溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的个体得到的样本中的所述抗体的测定值可以是同时测定得到的值,也可以是预先测定得到的值。在从受检动物个体得到的样本中的所述抗体的测定值显著比从未罹患溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的动物个体得到的样本中的所述抗体的测定值大的情况下,能够判断为阳性。

[0234] 在检测工序检测的与整合素 α V β 6发生免疫反应的抗体和/或与整合素 α V β 3发生免疫反应的抗体的同种型没有特别限定,可以是IgG抗体、IgA抗体、IgM抗体、IgE抗体等的同种型,特别优选是IgG抗体或IgA抗体。作为与整合素 α V β 6发生免疫反应的抗体,特别优选检测IgG或IgA。作为与整合素 α V β 3发生免疫反应的抗体,特别优选检测IgG抗体。IgG抗体中的亚型没有特别限定,例如能够检测IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体或IgG4抗体。作为与整合素 α V β 6发生免疫反应的IgG抗体,更优选检测IgG1抗体、IgG2抗体或IgG4抗体,最优选检测IgG1抗体。作为与整合素 α V β 3发生免疫反应的IgG抗体,更优选检测IgG1抗体、IgG2抗体或IgG3抗体,最优选检测IgG1抗体。

[0235] <5. 溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的检查试剂盒或检查试剂>

[0236] 本发明的检查试剂盒或检查试剂第一涉及包含整合素 α V β 6的片段或整体和/或整合素 α V β 3的片段或整体的用于检查溃疡性大肠炎的检查试剂盒或检查试剂。

[0237] 本发明的检查试剂盒或检查试剂第二涉及包含整合素 α V β 6的片段或整体和/或整合素 α V β 3的片段或整体的用于检查原发性硬化性胆管炎的检查试剂盒或检查试剂。

[0238] 在以下的说明中将“整合素 α V β 6的片段或整体”总称为“整合素 α V β 6”,将“整合素 α V β 3的片段或整体”总称为“整合素 α V β 3”。

[0239] 本发明的检查试剂盒或检查试剂能够用于上述的本发明的检查方法。

[0240] 本发明的检查试剂盒可以根据需要而包含免疫测定所必要的试剂类,例如可以从缓冲液、钙盐、镁盐、锰盐、钠盐、锂盐等选择一种以上的金属盐等。

[0241] 本发明的检查试剂能够是含有整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 和/或整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 以及溶剂、赋形剂等出于制剂化的目的而被接受的载体的液状或固态状的组合物。

[0242] 在本发明的检查试剂盒或检查试剂中,整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 和/或整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 的形态没有特别限定,可以是溶液状态,也可以是干燥状态,也可以是固定于固相的形态。在整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 和/或整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 是干燥状态的情况下,本发明的检查试剂盒或检查试剂可以包含用于在使用前使其成为溶液状态的缓冲液、溶剂。

[0243] 含有固定于固相的形态的整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 和/或整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 的检查试剂盒或检查试剂能够用于通过ELISA法检查溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎。作为固相的形态,可以是板、珠、管等任意的形态。用于通过ELISA法检查溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的试剂盒除所述固相以外,能够包含阳性标准液、阴性标准液、封闭液、清洗液、样本稀释液、检测用抗体、基质液等。检测用抗体可以通过酶等能够检测的标识而标识。阳性标准液除包含整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 和/或整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 的自身抗体的溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎患者的血清稀释液以外,还使用添加了整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 和/或整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 的抗体的溶液。作为添加至该溶液的抗体,IgG抗体、IgA抗体、IgM抗体、IgE抗体等优选是与作为测定对象的自身抗体的同种型是相同的同种型。阴性标准液使用未罹患溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的人的血清稀释液、医学上区别于溃疡性大肠炎的其他肠病患者的血清、医学上区别于原发性硬化性胆管炎的其他肝胆道系疾病患者的血清、正常人的血清(对照血清)以及其稀释液等。

[0244] <6.评价溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的治疗的效果的方法>

[0245] 本发明的治疗效果的评价方法第一涉及

[0246] 一种评价溃疡性大肠炎的治疗的效果的方法,

[0247] 包括检测从实施了溃疡性大肠炎的治疗的受试动物得到的样本中的与整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体的检测工序。

[0248] 本发明的治疗效果的评价方法第二涉及

[0249] 评价原发性硬化性胆管炎的治疗的效果的方法,

[0250] 包括检测从实施了原发性硬化性胆管炎的治疗的受试动物得到的样本中的与整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体的检测工序。

[0251] 在以下的说明中将“整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 的片段或整体”总称为“整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ ”,将“整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 的片段或整体”总称为“整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ ”。

[0252] 关于本发明的检查方法正如已经说明的,样本中的与整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 发生免疫反应的抗体以及与整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 发生免疫反应的抗体分别作为溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的指标是有用的。因此,从实施了溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的治疗的受检动物得到的样本中的所述抗体的量在治疗有效并治愈的情况下降低,在治疗未充分发挥效果的情况下与治疗开始前无变化或上升。所以,通过检测从实施了溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的治疗的受检动物得到的样本中的所述抗体,能够评价治疗的效果。

[0253] 作为受检动物,能够示例接受了溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的治疗的人、非人动物。

[0254] 本发明的治疗效果的评价方法中的样本、整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 、整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 、抗体、检测工

序等的具体的方式与关于本发明的检查方法所说明的内容是同样的。

[0255] 将通过本发明的治疗效果的评价方法中的检测工序得到的从实施了溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的治疗的受检动物得到的样本中的所述抗体的定量结果,与例如从开始所述治疗前的同一动物个体得到的样本中的所述抗体的定量结果比较,在前者比后者小的情况下,能够评价为治疗有效。另一方面,在前者与后者为相同程度或比后者大的情况下,能够评价为评价治疗无效或不充分。基于该评价结果,能够判断进而继续治疗、变更治疗方针、中止治疗等。

[0256] 另外,将通过本发明的治疗效果的评价方法中的检测工序得到的从实施了溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的治疗的受检动物得到的样本中的所述抗体的定量结果,与例如从同一动物种的正常个体得到的样本中的所述抗体的定量结果比较,在前者与后者为相同程度或比后者小的情况下,能够评价为治疗有效。另一方面,在前者比后者大的情况下,能够评价为评价治疗无效或不充分。基于该评价结果,能够判断进而继续治疗、变更治疗方针、中止治疗等。

[0257] <筛选溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的治疗药的候补物质的方法>

[0258] 本发明的筛选方法第一涉及

[0259] 一种筛选溃疡性大肠炎的治疗药的候补物质的方法,包括

[0260] 检测从施用了试验物质的动物得到的样本中的与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体的抗体检测工序,和

[0261] 在所述样本中的所述抗体由于施用了所述试验物质而减少的情况下,选拔所述试验物质作为溃疡性大肠炎的治疗药的候补物质的选拔工序。

[0262] 本发明的筛选方法第二涉及

[0263] 一种筛选原发性硬化性胆管炎的治疗药的候补物质的方法,包括

[0264] 检测从施用了试验物质的动物得到的样本中的与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体的抗体检测工序,和

[0265] 在所述样本中的所述抗体由于施用了所述试验物质而减少的情况下,选拔所述试验物质作为原发性硬化性胆管炎的治疗药的候补物质的选拔工序。

[0266] 正如已经说明的,样本中的与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体作为溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的指标是有用的。因此在所述样本中的所述抗体由于施用了所述试验物质而减少的情况下,能够选拔所述试验物质作为溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的治疗药的候补物质。

[0267] 包括本发明的筛选方法的抗体检测工序的实施方式中的样本、整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体、整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体、抗体、抗体检测工序等的具体的方式与关于本发明的检查方法所说明的内容是同样的。

[0268] 在本发明的筛选方法中,作为试验物质,只要可能成为新药候补的试验物质就没有特别限定。就施用了试验物质的动物而言,典型的是溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的非人模型动物等与正常个体相比与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段

或整体发生免疫反应的抗体在样本中的量大的动物。

[0269] 在本发明的筛选方法的选拔工序中,将通过抗体检测工序得到的从施用了试验物质的动物得到的样本中的所述抗体的定量结果,与例如从施用所述试验物质前的同一动物个体得到的样本中的所述抗体的定量结果比较,在前者比后者小的情况下,判断所述样本中的所述抗体由于施用了所述试验物质而减少,能够选拔所述试验物质作为溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的治疗药的候补物质。

[0270] 在本发明的筛选方法的选拔工序中,将通过抗体检测工序得到的从施用了试验物质的动物得到的样本中的所述抗体的定量结果,与例如从同一动物种的正常个体得到的样本中的所述抗体的定量结果比较,在前者与后者为相同程度或比后者小的情况下,判断所述样本中的所述抗体由于施用了所述试验物质而减少,能够选拔所述试验物质作为溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的治疗药的候补物质。

[0271] <制作溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的非人模型动物的方法>

[0272] 制作本发明的非人模型动物的方法第一涉及

[0273] 一种制作溃疡性大肠炎的非人模型动物的方法,至少包括

[0274] 向非人动物给药与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体的抗体给药工序,以及

[0275] 将整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体作为抗原免疫非人动物的免疫工序

[0276] 中的至少一方。

[0277] 制作本发明的非人模型动物的方法第二涉及

[0278] 一种制作原发性硬化性胆管炎的非人模型动物的方法,至少包括

[0279] 向非人动物给药与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体的抗体给药工序,以及

[0280] 将整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体作为抗原免疫非人动物的免疫工序

[0281] 中的至少一方。

[0282] 本发明的非人模型动物的制作方法中的整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体、整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体、抗体等具体的方式与本发明的检查方法中的内容是同样的。

[0283] 通过向非人动物给药与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体的抗体给药工序,能够制作溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的非人模型动物。

[0284] 作为给药抗体的非人动物,例如能够示例BALB/c小鼠、B6小鼠等小鼠、其他的非人动物。

[0285] 抗体给药工序中的与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体和/或与整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体发生免疫反应的抗体的给药途径没有特别限定,例如能够示例皮下给药、腹腔给药、静脉给药等。所述抗体不必是作为纯化的抗体而给药至非人动物,例如也可以作为包含抗体的血清而给药至非人动物。

[0286] 在抗体给药工序中给药的抗体选择能够与接受给药的非人动物所具有的整合素 $\alpha V\beta 6$ 和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 发生免疫反应的抗体。

[0287] 另一方面,通过将整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体作为抗原免疫非人动物的免疫工序,能够制作溃疡性大肠炎或原发性硬化性胆管炎的非人模型动物。

[0288] 作为给药抗原的非人动物,例如能够示例BALB/c小鼠、B6小鼠等小鼠、其他的非人动物。

[0289] 免疫工序中的方法没有特别限定。能够通过将整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体与弗氏完全佐剂等适当的佐剂一同通过皮下给药、静脉给药、或腹腔给药等途径给药至非人动物,免疫非人动物。

[0290] 在免疫工序中,作为抗原给药的整合素 $\alpha V\beta 6$ 的片段或整体和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 的片段或整体以其抗体能够通过自身免疫与待免疫的非人动物具有的整合素 $\alpha V\beta 6$ 和/或整合素 $\alpha V\beta 3$ 发生免疫反应的方式进行选择。

[0291] 实施例

[0292] <实验1:溃疡性大肠炎患者特异性自身抗体的鉴定>

[0293] 本发明人等为了鉴定溃疡性大肠炎患者特异性自身抗体的抗原,将文献中已知的细胞外基质蛋白作为抗原候补分别固定于固相,通过ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)法确认在溃疡性大肠炎患者的血清中是否包含结合于所述细胞外基质蛋白的抗体。

[0294] 在ELISA法中,将能够包含于溃疡性大肠炎患者的血清中的与固定于固相的抗原候补结合的人IgG作为检测对象的自身抗体,将由HRP (辣根过氧化物酶)标识的兔抗人IgG多克隆抗体作为检测用抗体。

[0295] 1. 抗原的候补

[0296] 作为抗原候补,使用已知的以下蛋白质作为细胞外基质蛋白。

[0297] 人整合素 $\alpha 2\beta 3$ (7148-A2、R&Dsystem)

[0298] 人整合素 $\alpha 1\beta 1$ (7064-AB、R&Dsystem)

[0299] 人整合素 $\alpha 2\beta 1$ (5698-A2、R&Dsystem)

[0300] 人整合素 $\alpha 3\beta 1$ (2840-A3、R&Dsystem)

[0301] 人整合素 $\alpha 4\beta 1$ (5668-A4、R&Dsystem)

[0302] 人整合素 $\alpha 4\beta 7$ (5397-A3、R&Dsystem)

[0303] 人整合素 $\alpha 5\beta 1$ (3230-A5、R&Dsystem)

[0304] 人整合素 $\alpha 6\beta 1$ (7809-A6、R&Dsystem)

[0305] 人整合素 $\alpha 6\beta 4$ (5497-A6、R&Dsystem)

[0306] 人整合素 $\alpha 9\beta 1$ (5438-A9、R&Dsystem)

[0307] 人整合素 $\alpha 10\beta 1$ (5895-AB、R&Dsystem)

[0308] 人整合素 $\alpha 11\beta 1$ (6357-AB、R&Dsystem)

[0309] 人整合素 $\alpha E\beta 7$ (5850-A3、R&Dsystem)

[0310] 人整合素 $\alpha L\beta 2$ (3868-AV、R&Dsystem)

[0311] 人整合素 $\alpha M\beta 2$ (4047-AM、R&Dsystem)

[0312] 人整合素 $\alpha V\beta 1$ (6579-AVB、R&Dsystem)

[0313] 人整合素 $\alpha V\beta 3$ (3050-AV、R&Dsystem)

- [0314] 人整合素 α V β 5 (2528-AV、R&Dsystem)
- [0315] 人整合素 α V β 6 (3817-AV、R&Dsystem)
- [0316] 人整合素 α V β 8 (4135-AV、R&Dsystem)
- [0317] 人整合素 α X β 2 (5755-AX、R&Dsystem)
- [0318] 2. 血清试样
- [0319] 从被诊断为溃疡性大肠炎的8名患者取得血清试样。
- [0320] 作为溃疡性大肠炎患者,选择未并发原发性硬化性胆管炎的患者。
- [0321] 作为对照血清试样,从3名正常人取得血清试样。
- [0322] 3. 流程
- [0323] 在以下的试验中,在没有特别明示的情况下,使用ELISA Starter Accessory Kit (E101, Bethyl Laboratories)。
- [0324] ELISA用包被缓冲剂 (ELISA Coating Buffer)、ELISA用清洗溶液 (ELISA Wash Solution)、ELISA用封闭缓冲剂 (ELISA Blocking Buffer)、共轭稀释剂 (Conjugate Diluent) 均按照所述试剂盒的用法说明配制。
- [0325] 所有工序若无明示则在室温进行。
- [0326] 3.1. 抗原候补的包被
- [0327] (1) 将上述抗原候补中的一者用所述试剂盒的ELISA用包被缓冲剂稀释为2 μ g/ml浓度的溶液。将该溶液100 μ l添加至所述试剂盒的微孔板的各孔。
- [0328] (2) 将上述微孔板在4 $^{\circ}$ C温育60分钟。
- [0329] (3) 在温育后,将各孔内的溶液吸除。
- [0330] (4) 通过所述试剂盒的ELISA用清洗溶液清洗各孔。具体的,重复三次下述清洗操作:向各孔注满所述ELISA用清洗溶液,接着吸除所述ELISA用清洗溶液。
- [0331] 3.2. 封闭
- [0332] (1) 将所述试剂盒的ELISA用封闭缓冲剂200 μ l添加至各孔。
- [0333] (2) 温育30分钟。
- [0334] (3) 温育后,除去所述ELISA用封闭缓冲剂,将各孔清洗三次。
- [0335] 3.3. 受检试样
- [0336] (1) 将所述溃疡性大肠炎患者血清试样 (n=8) 或所述对照血清试样 (n=3) 通过所述试剂盒的共轭稀释剂 (Conjugate Diluent) 以1:100的比例稀释。
- [0337] (2) 将通过所述稀释而得到的血清稀释液100 μ l添加至封闭后的微孔板的各孔。
- [0338] (3) 温育60分钟。
- [0339] (4) 温育后,将所述血清稀释液除去,将各孔清洗五次。
- [0340] 3.4. HRP共轭检测用抗体
- [0341] (1) 将与HRP(辣根过氧化物酶)共轭的检测用抗体 (abcam6759, 兔抗人IgG H&L (HRP)) 通过所述试剂盒的共轭稀释剂 (Conjugate Diluent) 以1:50000的比例稀释。
- [0342] (2) 将通过所述稀释得到的检测用抗体稀释液100 μ l添加至接触过血清的微孔板的各孔。
- [0343] (3) 温育60分钟。
- [0344] (4) 温育后,将所述检测用抗体稀释液除去,将各孔清洗五次。

[0345] 3.5.酶基质反应

[0346] (1) 按照制造商的推荐条件配制TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 溶液。

[0347] (2) 将所述TMB溶液100 μ l添加至接触过检测用抗体的微孔板的各孔。

[0348] (3) 温育7分钟~8分钟。

[0349] (4) 为了停止TMB的氧化,将100 μ l的0.18M H₂SO₄添加至各孔。

[0350] (5) 使用酶标仪在450nm的波长测定所述氧化反应的生成物的显色。

[0351] 4.结果与讨论

[0352] 将结果示于图1-1~图1-4。将抗原候补的整合素的 α 亚基与 β 亚基的型号的组合示于各图表的标题部分。

[0353] 图1-1~图1-4中纵轴表示与固相上的检测用抗体量成比例的在450nm处的吸光度的相对值。UC表示溃疡性大肠炎患者血清试样 (n=8), 对照表示对照血清试样 (n=3)。

[0354] 将人整合素 α V β 6以及人整合素 α V β 3用作抗原时, 确认到其抗体浓度在溃疡性大肠炎患者血清的四个试样中比对照血清试样高 (图1-3、图1-4)。这表明人整合素 α V β 6的自身抗体在血清中的浓度的增加以及人整合素 α V β 3的自身抗体在血清中的浓度的增加能够成为溃疡性大肠炎的诊断指标。将其他人整合素用作抗原时, 未确认到其抗体浓度在溃疡性大肠炎患者血清试样与对照血清试样中有显著差异。

[0355] <实验2: 基于抗人整合素 α V β 6抗体的溃疡性大肠炎的诊断>

[0356] 在实验1中, 确认到在溃疡性大肠炎患者血清中抗人整合素 α V β 6抗体的浓度高。

[0357] 所以, 为了探讨基于抗人整合素 α V β 6抗体在血清中的浓度能够诊断溃疡性大肠炎的可能性, 增加本实验中的试样的样本数, 将溃疡性大肠炎患者血清试样以n=63、来自被诊断为克罗恩病的患者的血清试样以n=48、来自正常人或被诊断为白塞氏病、嗜酸性胃肠炎、感染性肠炎、缺血性肠炎、息肉-色素沉着-脱发-爪甲营养不良 (Cronkhite-Canada) 综合征、IBDU (未分类型炎症性肠病, inflammatory bowel disease unclassified) 的患者的对照血清试样以n=11的样本数使用。

[0358] 在该实验中, 作为溃疡性大肠炎患者, 也选择未并发原发性硬化性胆管炎的患者。

[0359] 将各血清试样中的抗人整合素 α V β 6抗体浓度以与实验中1所述的同样的流程通过ELISA法测定。其中, 分别将CaCl₂以及MgCl₂添加至ELISA用清洗溶液、ELISA用封闭缓冲剂以及共轭稀释剂使其终浓度为1mM。

[0360] 将结果示于图2。图2中纵轴表示与固相上的检测用抗体量成比例的在450nm处的吸光度的相对值。“溃疡性大肠炎”表示溃疡性大肠炎患者血清试样 (n=63), “克罗恩病”表示克罗恩病患者血清试样 (n=48), “对照”表示对照血清试样 (n=11)。用虚线表示的截断值是在对照血清试样的吸光度相对值的平均值加上标准偏差 (SD) 的3倍的值所得的值。

[0361] 由图2可知, 就抗人整合素 α V β 6抗体而言, 溃疡性大肠炎患者血清试样的63例中有58例是阳性, 灵敏度是92%。另一方面, 就抗人整合素 α V β 6抗体而言, 克罗恩病患者血清试样的48例中有45例是阴性, 对照血清试样的11例中有11例是阴性, 特异性是95%。该结果支持能够基于人整合素 α V β 6的自身抗体的血中浓度诊断溃疡性大肠炎。

[0362] <实验3: 基于抗人整合素 α V β 6抗体的原发性硬化性胆管炎的诊断>

[0363] 在本实验中探讨了基于抗人整合素 α V β 6抗体在血清中的浓度能够诊断原发性硬化性胆管炎 (PSC) 的可能性。将PSC患者血清试样以n=24、来自被诊断为IgG4相关性硬化性

胆管炎的患者血清试样以 $n=5$ 、来自正常人的对照血清试样以 $n=6$ 的样本数使用。

[0364] 原发性硬化性胆管炎的24症例中有18症例并发溃疡性大肠炎。

[0365] 将各血清试样中的抗人整合素 $\alpha V\beta 6$ 抗体浓度以与实验1中所述的同样的流程通过ELISA法测定。其中,分别将 $CaCl_2$ 以及 $MgCl_2$ 添加至ELISA用清洗溶液、ELISA用封闭缓冲剂以及共轭稀释剂使其终浓度为1mM。

[0366] 将结果示于图3。图3中纵轴表示与固相上的检测用抗体量成比例的在450nm处的吸光度的相对值。“原发性硬化性胆管炎”表示PSC患者血清试样($n=24$),“IgG4相关性硬化性胆管炎”表示IgG4相关性硬化性胆管炎患者血清试样($n=5$),“对照”表示对照血清试样($n=6$)。用虚线表示的截断值是在对照血清试样的吸光度相对值的平均值加上标准偏差(SD)的3倍的值所得的值。

[0367] 由图3可知,就抗人整合素 $\alpha V\beta 6$ 抗体而言,PSC患者血清试样的24例中有23例是阳性,灵敏度是96%。另一方面,就抗人整合素 $\alpha V\beta 6$ 抗体而言,IgG4相关性硬化性胆管炎患者血清试样的5例中有4例是阴性,对照血清试样的6例中有6例是阴性,特异性是91%。该结果支持能够基于人整合素 $\alpha V\beta 6$ 的自身抗体的血中浓度诊断原发性硬化性胆管炎(PSC)。

[0368] <实验4:基于抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体的溃疡性大肠炎的诊断>

[0369] 在实验1中,确认到溃疡性大肠炎患者血清中抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体的浓度高。

[0370] 所以,为了探讨基于抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体在血清中的浓度能够诊断溃疡性大肠炎的可能性,增加本实验中的试样的样本数,将溃疡性大肠炎患者血清试样以 $n=15$ 、来自被诊断为克罗恩病的患者的血清试样以 $n=4$ 、来自正常人的对照血清试样以 $n=9$ 的样本数使用。

[0371] 在该实验中,作为溃疡性大肠炎患者,也选择未并发原发性硬化性胆管炎的患者。

[0372] 将各血清试样中的抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体浓度以与实验1所述的同样的流程通过ELISA法测定。其中,分别将 $CaCl_2$ 以及 $MgCl_2$ 添加至ELISA用清洗溶液、ELISA用封闭缓冲剂以及共轭稀释剂使其终浓度为1mM。

[0373] 将结果示于图4。图4中纵轴表示与固相上的检测用抗体量成比例的在450nm处的吸光度的相对值。“溃疡性大肠炎”表示溃疡性大肠炎患者血清试样($n=15$),“克罗恩病”表示克罗恩病患者血清试样($n=4$),“对照”表示对照血清试样($n=9$)。用虚线表示的截断值是在对照血清试样的吸光度相对值的平均值加上标准偏差(SD)的3倍的值所得的值。

[0374] 由图4可知,就抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体而言,溃疡性大肠炎患者血清试样的63例中有58例是阳性,灵敏度是93%。另一方面,就抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体而言,克罗恩病患者血清试样的4例中有4例是阴性,对照血清试样的9例中有9例是阴性,特异性是100%。该结果支持能够基于人整合素 $\alpha V\beta 3$ 的自身抗体的血中浓度诊断溃疡性大肠炎。

[0375] <实验5:基于抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体的原发性硬化性胆管炎的诊断>

[0376] 在本实验中探讨了基于抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体在血清中的浓度能够诊断原发性硬化性胆管炎(PSC)的可能性。将PSC患者血清试样以 $n=24$ 、来自被诊断为IgG4相关性硬化性胆管炎的患者血清试样以 $n=5$ 、来自正常人或被诊断为胆管癌、原发性胆汁性胆管炎、肝硬化、肝细胞癌的患者对照血清试样以 $n=6$ 的样本数使用。

[0377] 原发性硬化性胆管炎的24症例中有18症例并发溃疡性大肠炎。

[0378] 将各血清试样中的抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体浓度以与实验1中所述的同样的流程通过

ELISA法测定。其中,分别将 CaCl_2 以及 MgCl_2 添加至ELISA用清洗溶液、ELISA用封闭缓冲剂以及共轭稀释剂使其终浓度为1mM。

[0379] 将结果示于图5。图5中纵轴表示与固相上的检测用抗体量成比例的在450nm处的吸光度的相对值。“原发性硬化性胆管炎”表示PSC患者血清试样(n=24)，“IgG4相关性硬化性胆管炎”表示IgG4相关性硬化性胆管炎患者血清试样(n=5)，“对照”表示对照血清试样(n=6)。用虚线表示的截断值是在对照血清试样的吸光度相对值的平均值加上标准偏差(SD)的3倍的值所得的值。

[0380] 由图5可知,就抗人整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 抗体而言,PSC患者血清试样的24例中有15例是阳性,灵敏度是63%。另一方面,就抗人整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 抗体而言,IgG4相关性硬化性胆管炎患者血清试样的5例中有5例是阴性,对照血清试样的6例中有6例是阴性,特异性是100%。该结果支持能够基于人整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 的自身抗体的血中浓度诊断原发性硬化性胆管炎(PSC)。

[0381] <实验6:基于抗人整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 抗体的溃疡性大肠炎的诊断>

[0382] 在本实验中确认了基于抗人整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 抗体在血清中的浓度诊断溃疡性大肠炎的方法能够将溃疡性大肠炎特异性地诊断为阳性。在本实验中,将溃疡性大肠炎患者血清试样以n=66、克罗恩病患者血清试样以n=47、其他肠病(感染性肠炎、缺血性肠炎、白塞氏病、嗜酸性胃肠炎、息肉-色素沉着-脱发-爪甲营养不良综合征或IBDU)患者血清试样以n=9的样本数使用。

[0383] 在该实验中,作为溃疡性大肠炎患者,也选择未并发原发性硬化性胆管炎的患者。

[0384] 将各血清试样中的抗人整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 抗体浓度以与实验2所述的同样的流程通过ELISA法测定。

[0385] 将结果示于图6。图6中纵轴表示与固相上的检测用抗体量成比例的在450nm处的吸光度的相对值。“溃疡性大肠炎”表示溃疡性大肠炎患者血清试样,“克罗恩病”表示克罗恩病患者血清试样,“其他肠病”表示所述其他肠病患者血清试样。用虚线表示的截断值是在所述其他肠病患者血清试样的吸光度相对值的平均值加上标准偏差(SD)的3倍的值所得的值。

[0386] 就抗人整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 抗体而言,溃疡性大肠炎患者血清试样的66例中有62例是阳性,灵敏度是94%。另一方面,就抗人整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 抗体而言,克罗恩病患者血清试样47例中有44例是阴性,其他肠病患者血清试样的9例中有9例是阴性,特异性是95%。该结果显示在溃疡性大肠炎患者中人整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 的自身抗体的血中浓度特异的高。

[0387] <实验7:基于抗人整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 抗体的溃疡性大肠炎的诊断>

[0388] 在本实验中确认了基于抗人整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 抗体在血清中的浓度诊断溃疡性大肠炎的方法能够将溃疡性大肠炎特异性地诊断为阳性。在本实验中,将溃疡性大肠炎患者血清试样以n=51、克罗恩病患者血清试样以n=26、其他肠病(感染性肠炎、缺血性肠炎、白塞氏病、嗜酸性胃肠炎、息肉-色素沉着-脱发-爪甲营养不良综合征或IBDU)患者血清试样以n=24、胶原病患者血清试样以n=27、正常人的血清试样以n=22的样本数使用。

[0389] 在该实验中,作为溃疡性大肠炎患者,也选择未并发原发性硬化性胆管炎的患者。

[0390] 将各血清试样中的抗人整合素 $\alpha\text{V}\beta 6$ 抗体浓度以与实验2所述的同样的流程通过ELISA法测定。

[0391] 将结果示于图7。图7中纵轴表示与固相上的检测用抗体量成比例的在450nm处的

吸光度的相对值。“溃疡性大肠炎”表示溃疡性大肠炎患者血清试样，“克罗恩病”表示克罗恩病患者血清试样，“其他肠病”表示所述其他肠病患者血清试样，“胶原病”表示胶原病患者血清试样，“正常人”表示正常人血清试样。用虚线表示的截断值是在正常人血清试样的吸光度相对值的平均值加上标准偏差(SD)的3倍的值所得的值。

[0392] 就抗人整合素 $\alpha V\beta 6$ 抗体而言,溃疡性大肠炎患者血清试样的51例中有43例是阳性,灵敏度是84%。另一方面,就抗人整合素 $\alpha V\beta 6$ 抗体而言,克罗恩病患者血清试样的26例中有24例是阴性,其他肠病患者血清试样的24例中有23例是阴性,胶原病患者血清试样的27例中有26例是阴性,正常人血清试样的22例中有22例是阴性,特异性是96%。该结果还与实验6同样地显示在溃疡性大肠炎患者中人整合素 $\alpha V\beta 6$ 的自身抗体的血中浓度特异的高。

[0393] <实验8:溃疡性大肠炎患者的抗人整合素 $\alpha V\beta 6$ 自身抗体的IgG亚型>

[0394] 在本实验中确认了溃疡性大肠炎患者的血清中的抗人整合素 $\alpha V\beta 6$ 自身抗体的IgG亚型。

[0395] 在本实验中,将溃疡性大肠炎患者血清试样以 $n=47$ 、克罗恩病患者血清试样以 $n=8$ 、其他肠病(感染性肠炎、缺血性肠炎、白塞氏病、嗜酸性胃肠炎、息肉-色素沉着-脱发-爪甲营养不良综合征或IBDU)患者血清试样以 $n=8$ 的样本数使用。

[0396] 在该实验中,作为溃疡性大肠炎患者,也选择未并发原发性硬化性胆管炎的患者。

[0397] 为了将与人整合素 $\alpha V\beta 6$ 特异性结合的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4进行区分而检测,在将人整合素 $\alpha V\beta 6$ 用作抗原的实验1中所述的ELISA法中,除了使用与HRP共轭的抗人IgG1抗体(Anti-IgG1-HRP,AP006,Binding Site)、与HRP共轭的抗人IgG2抗体(Anti-IgG2-HRP,AP007,Binding Site)、与HRP共轭的抗人IgG3抗体(Anti-IgG3-HRP,AP008,Binding Site)或与HRP共轭的抗人IgG4抗体(Anti-IgG4-HRP,AP009,Binding Site)作为检测用抗体,并分别将 $CaCl_2$ 以及 $MgCl_2$ 添加至ELISA用清洗溶液、ELISA用封闭缓冲剂以及共轭稀释剂使其终浓度为1mM以外,以与实验1同样的流程进行ELISA法。

[0398] 分别将IgG1的检测结果显示于图8A、将IgG2的检测结果显示于图8B、将IgG3的检测结果显示于图8C、将IgG4的检测结果显示于图8D。在图8A~图8D中,纵轴表示与固相上的检测用抗体量成比例的在450nm处的吸光度的相对值。“溃疡性大肠炎”表示溃疡性大肠炎患者血清试样($n=47$),“克罗恩病”表示克罗恩病患者血清试样($n=8$),“其他肠病”表示所述其他肠病患者血清试样($n=8$)。在图8A~图8D中,用虚线表示的截断值是在所述其他肠病患者血清试样的吸光度相对值的平均值加上标准偏差(SD)的3倍的值所得的值。

[0399] 图8A示出了以下结果。就与人整合素 $\alpha V\beta 6$ 结合的IgG1而言,溃疡性大肠炎患者血清试样的47例中有45例是阳性(灵敏度96%),克罗恩病患者血清试样的8例中有8例是阴性,所述其他肠病患者血清试样的8例中有8例是阴性。

[0400] 图8B示出了以下结果。就与人整合素 $\alpha V\beta 6$ 结合的IgG2而言,溃疡性大肠炎患者血清试样的47例中有29例是阳性(灵敏度62%),克罗恩病患者血清试样的8例中有7例是阴性,所述其他肠病患者血清试样的8例中有8例是阴性。

[0401] 图8C示出了以下结果。就与人整合素 $\alpha V\beta 6$ 结合的IgG3而言,溃疡性大肠炎患者血清试样的47例中有10例是阳性(灵敏度21%),克罗恩病患者血清试样的8例中有6例是阴性,所述其他肠病患者血清试样的8例中有8例是阴性。

[0402] 图8D示出了以下结果。就与人整合素 $\alpha V\beta 6$ 结合的IgG4而言,溃疡性大肠炎患者血

清试样的47例中有19例是阳性(灵敏度40%),克罗恩病患者血清试样的8例中有8例是阴性,所述其他肠病患者血清试样的8例中有8例是阴性。

[0403] 由这些实验结果能够确认,溃疡性大肠炎患者的抗人整合素 $\alpha V\beta 6$ 自身抗体的IgG亚型中IgG1占优势。

[0404] <实验9:溃疡性大肠炎患者的抗人整合素 $\alpha V\beta 6$ 自身抗体的同种型>

[0405] 在本实验中检测了作为溃疡性大肠炎患者的血清中的抗人整合素 $\alpha V\beta 6$ 自身抗体的IgG以外的同种型IgA、IgM、IgE。

[0406] 在本实验中,将溃疡性大肠炎患者血清试样以 $n=47$ 、克罗恩病患者血清试样以 $n=8$ 、其他肠病(感染性肠炎、缺血性肠炎、白塞氏病、嗜酸性胃肠炎、息肉-色素沉着-脱发-爪甲营养不良综合征或IBDU)患者血清试样以 $n=8$ 的样本数使用。

[0407] 在该实验中,作为溃疡性大肠炎患者,也选择未并发原发性硬化性胆管炎的患者。

[0408] 为了检测与人整合素 $\alpha V\beta 6$ 特异性结合的IgA、IgM、IgE,在将人整合素 $\alpha V\beta 6$ 用作抗原的实验1中所述的ELISA法中,除了使用与HRP共轭的抗人IgA抗体(Goat anti-Human IgA Antibody HRP Conjugated,A80-102P,BETHYL)、与HRP共轭的抗人IgM抗体(Goat anti-Human IgM Antibody HRP Conjugated,A80-100P,BETHYL)或与HRP共轭的抗人IgE抗体(Goat anti-Human IgE Cross-Adsorbed Secondary Antibody,HRP,A18799,Invitrogen)作为检测用抗体,并分别将 CaCl_2 以及 MgCl_2 添加至ELISA用清洗溶液、ELISA用封闭缓冲剂以及共轭稀释剂使其终浓度为1mM以外,以与实验1同样的流程进行ELISA法。

[0409] 分别将IgA的检测结果显示于图9A、将IgM的检测结果显示于图9B、将IgE的检测结果显示于图9C。图9A~图9C中,纵轴表示与固相上的检测用抗体量成比例的在450nm处的吸光度的相对值。“溃疡性大肠炎”表示溃疡性大肠炎患者血清试样($n=47$),“克罗恩病”表示克罗恩病患者血清试样($n=8$),“其他肠病”表示所述其他肠病患者血清试样($n=8$)。在图9A~图9C中,用虚线表示的截断值是在所述其他肠病患者血清试样的吸光度相对值的平均值加上标准偏差(SD)的3倍的值所得的值。

[0410] 图9A示出了以下结果。就与人整合素 $\alpha V\beta 6$ 结合的IgA而言,溃疡性大肠炎患者血清试样的47例中有35例是阳性(灵敏度74%),克罗恩病患者血清试样的8例中有8例是阴性,所述其他肠病患者血清试样的8例中有8例是阴性。

[0411] 图9B示出了以下结果。就与人整合素 $\alpha V\beta 6$ 结合的IgM而言,溃疡性大肠炎患者血清试样的47例中有11例是阳性(灵敏度23%),克罗恩病患者血清试样的8例中有8例是阴性,所述其他肠病患者血清试样的8例中有8例是阴性。

[0412] 图9C示出了以下结果。就与人整合素 $\alpha V\beta 6$ 结合的IgE而言,溃疡性大肠炎患者血清试样的47例中有10例是阳性(灵敏度21%),克罗恩病患者血清试样的8例中有7例是阴性,所述其他肠病患者血清试样的8例中有8例是阴性。

[0413] 由这些实验结果能够确认,作为溃疡性大肠炎患者的抗人整合素 $\alpha V\beta 6$ 自身抗体,除了IgG以外还包含IgA、IgM、IgE,IgA占优势。

[0414] <实验10:溃疡性大肠炎的病情与抗人整合素 $\alpha V\beta 6$ 自身抗体的抗体效价的相关性>

[0415] 验证了溃疡性大肠炎的病情与抗人整合素 $\alpha V\beta 6$ 自身抗体(IgG)的抗体效价的相关性。

[0416] 病情的评价中使用了从Mayo评分中去除粘膜观察结果(内窥镜观察结果)的部分Mayo评分。

[0417] 抗人整合素 $\alpha V\beta 6$ 自身抗体(IgG)的抗体效价以与上述的实验2同样的流程测定。

[0418] 图10A和图10B分别示出了代表性的2名溃疡性大肠炎患者的从2017年11月至2018年11月期间的各时间点的部分Mayo评分(左纵轴)以及抗人整合素 $\alpha V\beta 6$ 自身抗体(IgG)的抗体效价(右纵轴)。

[0419] 在2名患者中,抗体效价均伴随部分Mayo评分的变化而同样地变化。

[0420] <实验11:基于抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体的溃疡性大肠炎的诊断>

[0421] 在本实验中确认了基于抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体的血清中浓度诊断溃疡性大肠炎的方法能够将溃疡性大肠炎特异性地诊断为阳性。在本实验中,将溃疡性大肠炎患者血清试样以 $n=66$ 、克罗恩病患者血清试样以 $n=47$ 、其他肠病(感染性肠炎、缺血性肠炎、白塞氏病、嗜酸性胃肠炎、息肉-色素沉着-脱发-爪甲营养不良综合征或IBDU)患者血清试样以 $n=9$ 的样本数使用。

[0422] 在该实验中,作为溃疡性大肠炎患者,也选择未并发原发性硬化性胆管炎的患者。

[0423] 将各血清试样中的抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体浓度以与实验4中所述的同样的流程通过ELISA法测定。

[0424] 将结果示于图11。图11中纵轴表示与固相上的检测用抗体量成比例的在450nm处的吸光度的相对值。“溃疡性大肠炎”表示溃疡性大肠炎患者血清试样,“克罗恩病”表示克罗恩病患者血清试样,“其他肠病”表示所述其他肠病患者血清试样。用虚线表示的截断值是在所述其他肠病患者血清试样的吸光度相对值的平均值加上标准偏差(SD)的3倍的值所得的值。

[0425] 就抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体而言,溃疡性大肠炎患者血清试样的66例中有60例是阳性,灵敏度是91%。另一方面,就抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体而言,克罗恩病患者血清试样的47例中有38例是阴性,其他肠病患者血清试样的9例中有9例是阴性,特异性是84%。该结果显示在溃疡性大肠炎患者中整合素 $\alpha V\beta 3$ 的自身抗体的血中浓度特异的高。

[0426] <实验12:基于抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体的溃疡性大肠炎的诊断>

[0427] 在本实验中确认了基于抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体在血清中的浓度诊断溃疡性大肠炎的方法能够将溃疡性大肠炎特异性地诊断为阳性。在本实验中,将溃疡性大肠炎患者血清试样以 $n=51$ 、克罗恩病患者血清试样以 $n=26$ 、其他肠病(感染性肠炎、缺血性肠炎、白塞氏病、嗜酸性胃肠炎、息肉-色素沉着-脱发-爪甲营养不良综合征或IBDU)患者血清试样以 $n=24$ 、胶原病患者血清试样以 $n=27$ 、正常人的血清试样以 $n=22$ 的样本数使用。

[0428] 在该实验中,作为溃疡性大肠炎患者,也选择未并发原发性硬化性胆管炎的患者。

[0429] 将各血清试样中的抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体浓度以与实验4中所述的同样的流程通过ELISA法测定。

[0430] 将结果示于图12。图12中纵轴表示与固相上的检测用抗体量成比例的在450nm处的吸光度的相对值。“UC”表示溃疡性大肠炎患者血清试样,“CD”表示克罗恩病患者血清试样,“其他肠病”表示所述其他肠病患者血清试样,“胶原病”表示胶原病患者血清试样,“正常人”表示正常人血清试样。用虚线表示的截断值是在正常人血清试样的吸光度相对值的平均值加上标准偏差(SD)的3倍的值所得的值。

[0431] 就抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体而言,溃疡性大肠炎患者血清试样的51例中有42例是阳性,灵敏度是82%。另一方面,就抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 抗体而言,克罗恩病患者血清试样的26例中有21例是阴性,其他肠病患者血清试样的24例中有21例是阴性,胶原病患者血清试样的27例中有27例是阴性,正常人血清试样的22例中有22例是阴性,特异性是92%。该结果还与实验11同样地显示在溃疡性大肠炎患者中人整合素 $\alpha V\beta 3$ 的自身抗体的血中浓度特异的高。

[0432] <实验13:溃疡性大肠炎患者的抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 自身抗体的IgG亚型>

[0433] 在本实验中确认了溃疡性大肠炎患者的血清中抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 自身抗体的IgG亚型。

[0434] 在本实验中,将溃疡性大肠炎患者血清试样以 $n=47$ 、克罗恩病患者血清试样以 $n=8$ 、其他肠病(感染性肠炎、缺血性肠炎、白塞氏病、嗜酸性胃肠炎、息肉-色素沉着-脱发-爪甲营养不良综合征或IBDU)患者血清试样以 $n=8$ 的样本数使用。

[0435] 在该实验中,作为溃疡性大肠炎患者,也选择未并发原发性硬化性胆管炎的患者。

[0436] 为了将与人整合素 $\alpha V\beta 3$ 特异性结合的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4区分而检测,在将人整合素 $\alpha V\beta 3$ 用作抗原的实验1中所述的ELISA法中,除了使用与HRP共轭的抗人IgG1抗体(Anti-IgG1-HRP, AP006, Binding Site)、与HRP共轭的抗人IgG2抗体(Anti-IgG2-HRP, AP007, Binding Site)、与HRP共轭的抗人IgG3抗体(Anti-IgG3-HRP, AP008, Binding Site)或与HRP共轭的抗人IgG4抗体(Anti-IgG4-HRP, AP009, Binding Site)作为检测用抗体,并分别将 CaCl_2 以及 MgCl_2 添加至ELISA用清洗溶液、ELISA用封闭缓冲剂以及共轭稀释剂使其终浓度为1mM以外,以与实验1同样的流程进行ELISA法。

[0437] 分别将IgG1的检测结果显示于图13A、IgG2的检测结果显示于图13B、IgG3的检测结果显示于图13C、IgG4的检测结果显示于图13D。在图13A~图13D中,纵轴表示与固相上的检测用抗体量成比例的在450nm处的吸光度的相对值。“溃疡性大肠炎”表示溃疡性大肠炎患者血清试样($n=47$),“克罗恩病”表示克罗恩病患者血清试样($n=8$),“其他肠病”表示所述其他肠病患者血清试样($n=8$)。在图13A~图13D中,用虚线表示的截断值是在所述其他肠病患者血清试样的吸光度相对值的平均值加上标准偏差(SD)的3倍的值所得的值。

[0438] 图13A示出了以下结果。就与人整合素 $\alpha V\beta 3$ 结合的IgG1而言,溃疡性大肠炎患者血清试样的47例中有39例是阳性(灵敏度83%),克罗恩病患者血清试样的8例中有8例是阴性,所述其他肠病患者血清试样的8例中有8例是阴性。

[0439] 图13B示出了以下结果。就与人整合素 $\alpha V\beta 3$ 结合的IgG2而言,溃疡性大肠炎患者血清试样的47例中有14例是阳性(灵敏度30%),克罗恩病患者血清试样中8例中有8例是阴性,所述其他肠病患者血清试样的8例中有8例是阴性。

[0440] 图13C示出了以下结果。就与人整合素 $\alpha V\beta 3$ 结合的IgG3而言,溃疡性大肠炎患者血清试样的47例中有16例是阳性(灵敏度34%),克罗恩病患者血清试样的8例中有8例是阴性,所述其他肠病患者血清试样的8例中有8例是阴性。

[0441] 图13D示出了以下结果。就与人整合素 $\alpha V\beta 3$ 结合的IgG4而言,溃疡性大肠炎患者血清试样的47例中有3例是阳性(灵敏度6%),克罗恩病患者血清试样的8例中有8例是阴性,所述其他肠病患者血清试样的8例中有8例是阴性。

[0442] 由这些实验结果能够确认,溃疡性大肠炎患者的抗人整合素 $\alpha V\beta 3$ 自身抗体的IgG亚型中IgG1占优势。

[0443] <实验14:溃疡性大肠炎患者的抗人整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 自身抗体的同种型>

[0444] 在本实验中检测了作为溃疡性大肠炎患者的血清中的抗人整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 自身抗体的IgG以外的同种型IgA、IgM、IgE。

[0445] 在本实验中,将溃疡性大肠炎患者血清试样以 $n=47$ 、克罗恩病患者血清试样以 $n=8$ 、其他肠病(感染性肠炎、缺血性肠炎、白塞氏病、嗜酸性胃肠炎、息肉-色素沉着-脱发-爪甲营养不良综合征或IBDU)患者血清试样以 $n=8$ 的样本数使用。

[0446] 在该实验中,作为溃疡性大肠炎患者,也选择未并发原发性硬化性胆管炎的患者。

[0447] 为了检测与人整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 特异性结合的IgA、IgM、IgE,在将人整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 用作抗原的实验1中所述的ELISA法中,除了使用与HRP共轭的抗人IgA抗体(Goat anti-Human IgA Antibody HRP Conjugated,A80-102P,BETHYL)、与HRP共轭的抗人IgM抗体(Goat anti-Human IgM Antibody HRP Conjugated,A80-100P,BETHYL)或与HRP共轭的抗人IgE抗体(Goat anti-Human IgE Cross-Adsorbed Secondary Antibody,HRP,A18799,Invitrogen)作为检测用抗体,并分别将 CaCl_2 以及 MgCl_2 添加至ELISA用清洗溶液、ELISA用封闭缓冲剂以及共轭稀释剂使其终浓度为1mM以外,以与实验1同样的流程进行ELISA法。

[0448] 分别将IgA的检测结果显示于图14A、将IgM的检测结果显示于图14B、将IgE的检测结果显示于图14C。在图14A~图14C中,纵轴表示与固相上的检测用抗体量成比例的在450nm处的吸光度的相对值。“溃疡性大肠炎”表示溃疡性大肠炎患者血清试样($n=47$),“克罗恩病”表示克罗恩病患者血清试样($n=8$),“其他肠病”表示所述其他肠病患者血清试样($n=8$)。在图14A~图14C中,用虚线表示的截断值是在所述其他肠病患者血清试样的吸光度相对值的平均值加上标准偏差(SD)的3倍的值所得的值。

[0449] 图14A示出了以下结果。就与人整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 结合的IgA而言,溃疡性大肠炎患者血清试样的47例中有5例是阳性(灵敏度11%),克罗恩病患者血清试样的8例中有8例是阴性,所述其他肠病患者血清试样的8例中有8例是阴性。

[0450] 图14B示出了以下结果。就与人整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 结合的IgM而言,溃疡性大肠炎患者血清试样的47例中有10例是阳性(灵敏度21%),克罗恩病患者血清试样的8例中有8例是阴性,所述其他肠病患者血清试样的8例中有8例是阴性。

[0451] 图14C示出了以下结果。就与人整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 结合IgE而言,溃疡性大肠炎患者血清试样的47例中有0例是阳性(灵敏度0%),克罗恩病患者血清试样的8例中有8例是阴性,所述其他肠病患者血清试样的8例中有8例是阴性。

[0452] 由这些实验结果能够确认,作为溃疡性大肠炎患者的抗人整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 自身抗体的同种型,IgA、IgM、IgE均少。

[0453] 本说明书中引用的所有的刊行物、专利以及专利申请均以原文引用的方式并入本说明书。

序列表

<110> 国立大学法人京都大学

<120> 溃疡性大肠炎以及原发性硬化性胆管炎的检查方法

<130> PH-8191-PCT

<150> JP 2019-000060

<151> 2019-01-04

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1048

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Ala Phe Pro Pro Arg Arg Arg Leu Arg Leu Gly Pro Arg Gly Leu
1           5           10           15
Pro Leu Leu Leu Ser Gly Leu Leu Leu Pro Leu Cys Arg Ala Phe Asn
          20           25           30
Leu Asp Val Asp Ser Pro Ala Glu Tyr Ser Gly Pro Glu Gly Ser Tyr
          35           40           45
Phe Gly Phe Ala Val Asp Phe Phe Val Pro Ser Ala Ser Ser Arg Met
          50           55           60
Phe Leu Leu Val Gly Ala Pro Lys Ala Asn Thr Thr Gln Pro Gly Ile
65           70           75           80
Val Glu Gly Gly Gln Val Leu Lys Cys Asp Trp Ser Ser Thr Arg Arg
          85           90           95
Cys Gln Pro Ile Glu Phe Asp Ala Thr Gly Asn Arg Asp Tyr Ala Lys
          100          105          110
Asp Asp Pro Leu Glu Phe Lys Ser His Gln Trp Phe Gly Ala Ser Val
          115          120          125
Arg Ser Lys Gln Asp Lys Ile Leu Ala Cys Ala Pro Leu Tyr His Trp
          130          135          140
Arg Thr Glu Met Lys Gln Glu Arg Glu Pro Val Gly Thr Cys Phe Leu
145          150          155          160
Gln Asp Gly Thr Lys Thr Val Glu Tyr Ala Pro Cys Arg Ser Gln Asp
          165          170          175
Ile Asp Ala Asp Gly Gln Gly Phe Cys Gln Gly Gly Phe Ser Ile Asp
          180          185          190
Phe Thr Lys Ala Asp Arg Val Leu Leu Gly Gly Pro Gly Ser Phe Tyr

```

195	200	205
Trp Gln Gly Gln Leu Ile Ser Asp Gln Val Ala Glu Ile Val Ser Lys		
210	215	220
Tyr Asp Pro Asn Val Tyr Ser Ile Lys Tyr Asn Asn Gln Leu Ala Thr		
225	230	235
Arg Thr Ala Gln Ala Ile Phe Asp Asp Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Val		
245	250	255
Ala Val Gly Asp Phe Asn Gly Asp Gly Ile Asp Asp Phe Val Ser Gly		
260	265	270
Val Pro Arg Ala Ala Arg Thr Leu Gly Met Val Tyr Ile Tyr Asp Gly		
275	280	285
Lys Asn Met Ser Ser Leu Tyr Asn Phe Thr Gly Glu Gln Met Ala Ala		
290	295	300
Tyr Phe Gly Phe Ser Val Ala Ala Thr Asp Ile Asn Gly Asp Asp Tyr		
305	310	315
Ala Asp Val Phe Ile Gly Ala Pro Leu Phe Met Asp Arg Gly Ser Asp		
325	330	335
Gly Lys Leu Gln Glu Val Gly Gln Val Ser Val Ser Leu Gln Arg Ala		
340	345	350
Ser Gly Asp Phe Gln Thr Thr Lys Leu Asn Gly Phe Glu Val Phe Ala		
355	360	365
Arg Phe Gly Ser Ala Ile Ala Pro Leu Gly Asp Leu Asp Gln Asp Gly		
370	375	380
Phe Asn Asp Ile Ala Ile Ala Ala Pro Tyr Gly Gly Glu Asp Lys Lys		
385	390	395
Gly Ile Val Tyr Ile Phe Asn Gly Arg Ser Thr Gly Leu Asn Ala Val		
405	410	415
Pro Ser Gln Ile Leu Glu Gly Gln Trp Ala Ala Arg Ser Met Pro Pro		
420	425	430
Ser Phe Gly Tyr Ser Met Lys Gly Ala Thr Asp Ile Asp Lys Asn Gly		
435	440	445
Tyr Pro Asp Leu Ile Val Gly Ala Phe Gly Val Asp Arg Ala Ile Leu		
450	455	460
Tyr Arg Ala Arg Pro Val Ile Thr Val Asn Ala Gly Leu Glu Val Tyr		
465	470	475
Pro Ser Ile Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr Cys Ser Leu Pro Gly Thr		
485	490	495
Ala Leu Lys Val Ser Cys Phe Asn Val Arg Phe Cys Leu Lys Ala Asp		
500	505	510

Gly Lys Gly Val Leu Pro Arg Lys Leu Asn Phe Gln Val Glu Leu Leu		
515	520	525
Leu Asp Lys Leu Lys Gln Lys Gly Ala Ile Arg Arg Ala Leu Phe Leu		
530	535	540
Tyr Ser Arg Ser Pro Ser His Ser Lys Asn Met Thr Ile Ser Arg Gly		
545	550	555
Gly Leu Met Gln Cys Glu Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Arg Asp Glu Ser		
565	570	575
Glu Phe Arg Asp Lys Leu Thr Pro Ile Thr Ile Phe Met Glu Tyr Arg		
580	585	590
Leu Asp Tyr Arg Thr Ala Ala Asp Thr Thr Gly Leu Gln Pro Ile Leu		
595	600	605
Asn Gln Phe Thr Pro Ala Asn Ile Ser Arg Gln Ala His Ile Leu Leu		
610	615	620
Asp Cys Gly Glu Asp Asn Val Cys Lys Pro Lys Leu Glu Val Ser Val		
625	630	635
Asp Ser Asp Gln Lys Lys Ile Tyr Ile Gly Asp Asp Asn Pro Leu Thr		
645	650	655
Leu Ile Val Lys Ala Gln Asn Gln Gly Glu Gly Ala Tyr Glu Ala Glu		
660	665	670
Leu Ile Val Ser Ile Pro Leu Gln Ala Asp Phe Ile Gly Val Val Arg		
675	680	685
Asn Asn Glu Ala Leu Ala Arg Leu Ser Cys Ala Phe Lys Thr Glu Asn		
690	695	700
Gln Thr Arg Gln Val Val Cys Asp Leu Gly Asn Pro Met Lys Ala Gly		
705	710	715
Thr Gln Leu Leu Ala Gly Leu Arg Phe Ser Val His Gln Gln Ser Glu		
725	730	735
Met Asp Thr Ser Val Lys Phe Asp Leu Gln Ile Gln Ser Ser Asn Leu		
740	745	750
Phe Asp Lys Val Ser Pro Val Val Ser His Lys Val Asp Leu Ala Val		
755	760	765
Leu Ala Ala Val Glu Ile Arg Gly Val Ser Ser Pro Asp His Val Phe		
770	775	780
Leu Pro Ile Pro Asn Trp Glu His Lys Glu Asn Pro Glu Thr Glu Glu		
785	790	795
Asp Val Gly Pro Val Val Gln His Ile Tyr Glu Leu Arg Asn Asn Gly		
805	810	815
Pro Ser Ser Phe Ser Lys Ala Met Leu His Leu Gln Trp Pro Tyr Lys		

820	825	830
Tyr Asn Asn Asn Thr Leu Leu Tyr	Ile Leu His Tyr Asp Ile Asp Gly	
835	840	845
Pro Met Asn Cys Thr Ser Asp Met	Glu Ile Asn Pro Leu Arg Ile Lys	
850	855	860
Ile Ser Ser Leu Gln Thr Thr Glu	Lys Asn Asp Thr Val Ala Gly Gln	
865	870	875
Gly Glu Arg Asp His Leu Ile Thr	Lys Arg Asp Leu Ala Leu Ser Glu	
885	890	895
Gly Asp Ile His Thr Leu Gly Cys	Gly Val Ala Gln Cys Leu Lys Ile	
900	905	910
Val Cys Gln Val Gly Arg Leu Asp	Arg Gly Lys Ser Ala Ile Leu Tyr	
915	920	925
Val Lys Ser Leu Leu Trp Thr Glu	Thr Phe Met Asn Lys Glu Asn Gln	
930	935	940
Asn His Ser Tyr Ser Leu Lys Ser	Ser Ala Ser Phe Asn Val Ile Glu	
945	950	955
Phe Pro Tyr Lys Asn Leu Pro Ile	Glu Asp Ile Thr Asn Ser Thr Leu	
965	970	975
Val Thr Thr Asn Val Thr Trp Gly	Ile Gln Pro Ala Pro Met Pro Val	
980	985	990
Pro Val Trp Val Ile Ile Leu Ala	Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Leu	
995	1000	1005
Ala Val Leu Val Phe Val Met Tyr	Arg Met Gly Phe Phe Lys Arg	
1010	1015	1020
Val Arg Pro Pro Gln Glu Glu Gln	Glu Arg Glu Gln Leu Gln Pro	
1025	1030	1035
His Glu Asn Gly Glu Gly Asn Ser	Glu Thr	
1040	1045	
<210> 2		
<211> 788		
<212> PRT		
<213> 人 (Homo sapiens)		
<400> 2		
Met Gly Ile Glu Leu Leu Cys Leu	Phe Phe Leu Phe Leu Gly Arg Asn	
1	5	10
Asp His Val Gln Gly Gly Cys Ala	Leu Gly Gly Ala Glu Thr Cys Glu	
20	25	30
Asp Cys Leu Leu Ile Gly Pro Gln	Cys Ala Trp Cys Ala Gln Glu Asn	

35	40	45
Phe Thr His Pro Ser Gly Val	Gly Glu Arg Cys Asp Thr Pro Ala Asn	
50	55	60
Leu Leu Ala Lys Gly Cys Gln Leu Asn Phe Ile Glu Asn Pro Val Ser		
65	70	75
Gln Val Glu Ile Leu Lys Asn Lys Pro Leu Ser Val Gly Arg Gln Lys		
85	90	95
Asn Ser Ser Asp Ile Val Gln Ile Ala Pro Gln Ser Leu Ile Leu Lys		
100	105	110
Leu Arg Pro Gly Gly Ala Gln Thr Leu Gln Val His Val Arg Gln Thr		
115	120	125
Glu Asp Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Ala Ser		
130	135	140
Met Asp Asp Asp Leu Asn Thr Ile Lys Glu Leu Gly Ser Arg Leu Ser		
145	150	155
Lys Glu Met Ser Lys Leu Thr Ser Asn Phe Arg Leu Gly Phe Gly Ser		
165	170	175
Phe Val Glu Lys Pro Val Ser Pro Phe Val Lys Thr Thr Pro Glu Glu		
180	185	190
Ile Ala Asn Pro Cys Ser Ser Ile Pro Tyr Phe Cys Leu Pro Thr Phe		
195	200	205
Gly Phe Lys His Ile Leu Pro Leu Thr Asn Asp Ala Glu Arg Phe Asn		
210	215	220
Glu Ile Val Lys Asn Gln Lys Ile Ser Ala Asn Ile Asp Thr Pro Glu		
225	230	235
Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met Gln Ala Ala Val Cys Lys Glu Lys Ile		
245	250	255
Gly Trp Arg Asn Asp Ser Leu His Leu Leu Val Phe Val Ser Asp Ala		
260	265	270
Asp Ser His Phe Gly Met Asp Ser Lys Leu Ala Gly Ile Val Ile Pro		
275	280	285
Asn Asp Gly Leu Cys His Leu Asp Ser Lys Asn Glu Tyr Ser Met Ser		
290	295	300
Thr Val Leu Glu Tyr Pro Thr Ile Gly Gln Leu Ile Asp Lys Leu Val		
305	310	315
Gln Asn Asn Val Leu Leu Ile Phe Ala Val Thr Gln Glu Gln Val His		
325	330	335
Leu Tyr Glu Asn Tyr Ala Lys Leu Ile Pro Gly Ala Thr Val Gly Leu		
340	345	350

Leu	Gln	Lys	Asp	Ser	Gly	Asn	Ile	Leu	Gln	Leu	Ile	Ile	Ser	Ala	Tyr
355								360						365	
Glu	Glu	Leu	Arg	Ser	Glu	Val	Glu	Leu	Glu	Val	Leu	Gly	Asp	Thr	Glu
370								375						380	
Gly	Leu	Asn	Leu	Ser	Phe	Thr	Ala	Ile	Cys	Asn	Asn	Gly	Thr	Leu	Phe
385								390						395	400
Gln	His	Gln	Lys	Lys	Cys	Ser	His	Met	Lys	Val	Gly	Asp	Thr	Ala	Ser
				405						410					415
Phe	Ser	Val	Thr	Val	Asn	Ile	Pro	His	Cys	Glu	Arg	Arg	Ser	Arg	His
			420							425				430	
Ile	Ile	Ile	Lys	Pro	Val	Gly	Leu	Gly	Asp	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Val
			435							440				445	
Ser	Pro	Glu	Cys	Asn	Cys	Asp	Cys	Gln	Lys	Glu	Val	Glu	Val	Asn	Ser
450										455				460	
Ser	Lys	Cys	His	His	Gly	Asn	Gly	Ser	Phe	Gln	Cys	Gly	Val	Cys	Ala
465										470				475	480
Cys	His	Pro	Gly	His	Met	Gly	Pro	Arg	Cys	Glu	Cys	Gly	Glu	Asp	Met
					485					490					495
Leu	Ser	Thr	Asp	Ser	Cys	Lys	Glu	Ala	Pro	Asp	His	Pro	Ser	Cys	Ser
			500							505					510
Gly	Arg	Gly	Asp	Cys	Tyr	Cys	Gly	Gln	Cys	Ile	Cys	His	Leu	Ser	Pro
			515							520					525
Tyr	Gly	Asn	Ile	Tyr	Gly	Pro	Tyr	Cys	Gln	Cys	Asp	Asn	Phe	Ser	Cys
530										535					540
Val	Arg	His	Lys	Gly	Leu	Leu	Cys	Gly	Gly	Asn	Gly	Asp	Cys	Asp	Cys
545										550					560
Gly	Glu	Cys	Val	Cys	Arg	Ser	Gly	Trp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Cys	Asn	Cys
										565					570
Thr	Thr	Ser	Thr	Asp	Ser	Cys	Val	Ser	Glu	Asp	Gly	Val	Leu	Cys	Ser
										575					580
Gly	Arg	Gly	Asp	Cys	Val	Cys	Gly	Lys	Cys	Val	Cys	Thr	Asn	Pro	Gly
										585					590
Gly	Arg	Gly	Asp	Cys	Val	Cys	Gly	Lys	Cys	Val	Cys	Thr	Asn	Pro	Gly
										595					600
Ala	Ser	Gly	Pro	Thr	Cys	Glu	Arg	Cys	Pro	Thr	Cys	Gly	Asp	Pro	Cys
610										615					620
Asn	Ser	Lys	Arg	Ser	Cys	Ile	Glu	Cys	His	Leu	Ser	Ala	Ala	Gly	Gln
625										630					635
Ala	Arg	Glu	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	Lys	Leu	Ala	Gly	Ala	Thr	Ile
										640					645
Ser	Glu	Glu	Glu	Asp	Phe	Ser	Lys	Asp	Gly	Ser	Val	Ser	Cys	Ser	Leu
										645					650
															655

660	665	670
Gln Gly Glu Asn Glu Cys Leu Ile Thr Phe Leu Ile Thr Thr Asp Asn		
675	680	685
Glu Gly Lys Thr Ile Ile His Ser Ile Asn Glu Lys Asp Cys Pro Lys		
690	695	700
Pro Pro Asn Ile Pro Met Ile Met Leu Gly Val Ser Leu Ala Ile Leu		
705	710	715
Leu Ile Gly Val Val Leu Leu Cys Ile Trp Lys Leu Leu Val Ser Phe		
725	730	735
His Asp Arg Lys Glu Val Ala Lys Phe Glu Ala Glu Arg Ser Lys Ala		
740	745	750
Lys Trp Gln Thr Gly Thr Asn Pro Leu Tyr Arg Gly Ser Thr Ser Thr		
755	760	765
Phe Lys Asn Val Thr Tyr Lys His Arg Glu Lys Gln Lys Val Asp Leu		
770	775	780
Ser Thr Asp Cys		
785		
<210> 3		
<211> 788		
<212> PRT		
<213> 人(Homo sapiens)		
<400> 3		
Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala		
1	5	10
Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr		
20	25	30
Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met		
35	40	45
Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys		
50	55	60
Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile		
65	70	75
Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser		
85	90	95
Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln		
100	105	110
Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile		
115	120	125
Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met		

130	135	140
Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Trp Ser Ile Gln Asn Leu		
145	150	155
Gly Thr Lys Leu Ala Thr Gln Met Arg Lys Leu Thr Ser Asn Leu Arg		
165	170	175
Ile Gly Phe Gly Ala Phe Val Asp Lys Pro Val Ser Pro Tyr Met Tyr		
180	185	190
Ile Ser Pro Pro Glu Ala Leu Glu Asn Pro Cys Tyr Asp Met Lys Thr		
195	200	205
Thr Cys Leu Pro Met Phe Gly Tyr Lys His Val Leu Thr Leu Thr Asp		
210	215	220
Gln Val Thr Arg Phe Asn Glu Glu Val Lys Lys Gln Ser Val Ser Arg		
225	230	235
Asn Arg Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met Gln Ala Thr		
245	250	255
Val Cys Asp Glu Lys Ile Gly Trp Arg Asn Asp Ala Ser His Leu Leu		
260	265	270
Val Phe Thr Thr Asp Ala Lys Thr His Ile Ala Leu Asp Gly Arg Leu		
275	280	285
Ala Gly Ile Val Gln Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Val Gly Ser Asp		
290	295	300
Asn His Tyr Ser Ala Ser Thr Thr Met Asp Tyr Pro Ser Leu Gly Leu		
305	310	315
Met Thr Glu Lys Leu Ser Gln Lys Asn Ile Asn Leu Ile Phe Ala Val		
325	330	335
Thr Glu Asn Val Val Asn Leu Tyr Gln Asn Tyr Ser Glu Leu Ile Pro		
340	345	350
Gly Thr Thr Val Gly Val Leu Ser Met Asp Ser Ser Asn Val Leu Gln		
355	360	365
Leu Ile Val Asp Ala Tyr Gly Lys Ile Arg Ser Lys Val Glu Leu Glu		
370	375	380
Val Arg Asp Leu Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Phe Asn Ala Thr Cys		
385	390	395
Leu Asn Asn Glu Val Ile Pro Gly Leu Lys Ser Cys Met Gly Leu Lys		
405	410	415
Ile Gly Asp Thr Val Ser Phe Ser Ile Glu Ala Lys Val Arg Gly Cys		
420	425	430
Pro Gln Glu Lys Glu Lys Ser Phe Thr Ile Lys Pro Val Gly Phe Lys		
435	440	445

Asp Ser Leu Ile Val Gln Val Thr Phe Asp Cys Asp Cys Ala Cys Gln		
450	455	460
Ala Gln Ala Glu Pro Asn Ser His Arg Cys Asn Asn Gly Asn Gly Thr		
465	470	475 480
Phe Glu Cys Gly Val Cys Arg Cys Gly Pro Gly Trp Leu Gly Ser Gln		
	485	490 495
Cys Glu Cys Ser Glu Glu Asp Tyr Arg Pro Ser Gln Gln Asp Glu Cys		
	500	505 510
Ser Pro Arg Glu Gly Gln Pro Val Cys Ser Gln Arg Gly Glu Cys Leu		
	515	520 525
Cys Gly Gln Cys Val Cys His Ser Ser Asp Phe Gly Lys Ile Thr Gly		
	530	535 540
Lys Tyr Cys Glu Cys Asp Asp Phe Ser Cys Val Arg Tyr Lys Gly Glu		
545	550	555 560
Met Cys Ser Gly His Gly Gln Cys Ser Cys Gly Asp Cys Leu Cys Asp		
	565	570 575
Ser Asp Trp Thr Gly Tyr Tyr Cys Asn Cys Thr Thr Arg Thr Asp Thr		
	580	585 590
Cys Met Ser Ser Asn Gly Leu Leu Cys Ser Gly Arg Gly Lys Cys Glu		
	595	600 605
Cys Gly Ser Cys Val Cys Ile Gln Pro Gly Ser Tyr Gly Asp Thr Cys		
610	615	620
Glu Lys Cys Pro Thr Cys Pro Asp Ala Cys Thr Phe Lys Lys Glu Cys		
625	630	635 640
Val Glu Cys Lys Lys Phe Asp Arg Glu Pro Tyr Met Thr Glu Asn Thr		
	645	650 655
Cys Asn Arg Tyr Cys Arg Asp Glu Ile Glu Ser Val Lys Glu Leu Lys		
	660	665 670
Asp Thr Gly Lys Asp Ala Val Asn Cys Thr Tyr Lys Asn Glu Asp Asp		
	675	680 685
Cys Val Val Arg Phe Gln Tyr Tyr Glu Asp Ser Ser Gly Lys Ser Ile		
690	695	700
Leu Tyr Val Val Glu Glu Pro Glu Cys Pro Lys Gly Pro Asp Ile Leu		
705	710	715 720
Val Val Leu Leu Ser Val Met Gly Ala Ile Leu Leu Ile Gly Leu Ala		
	725	730 735
Ala Leu Leu Ile Trp Lys Leu Leu Ile Thr Ile His Asp Arg Lys Glu		
	740	745 750
Phe Ala Lys Phe Glu Glu Glu Arg Ala Arg Ala Lys Trp Asp Thr Ala		

755	760	765
Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr		
770	775	780
Tyr Arg Gly Thr		
785		

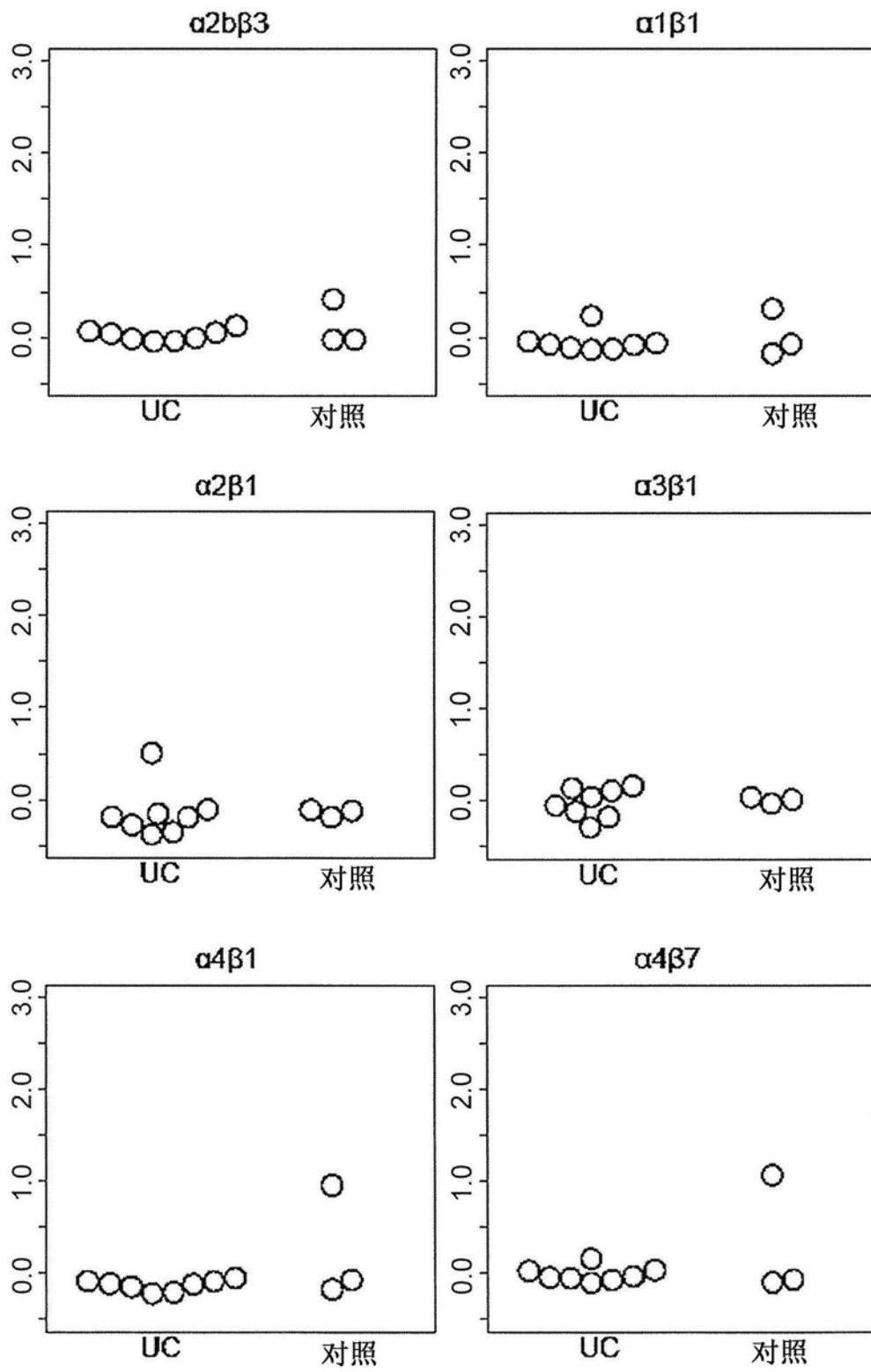


图1-1

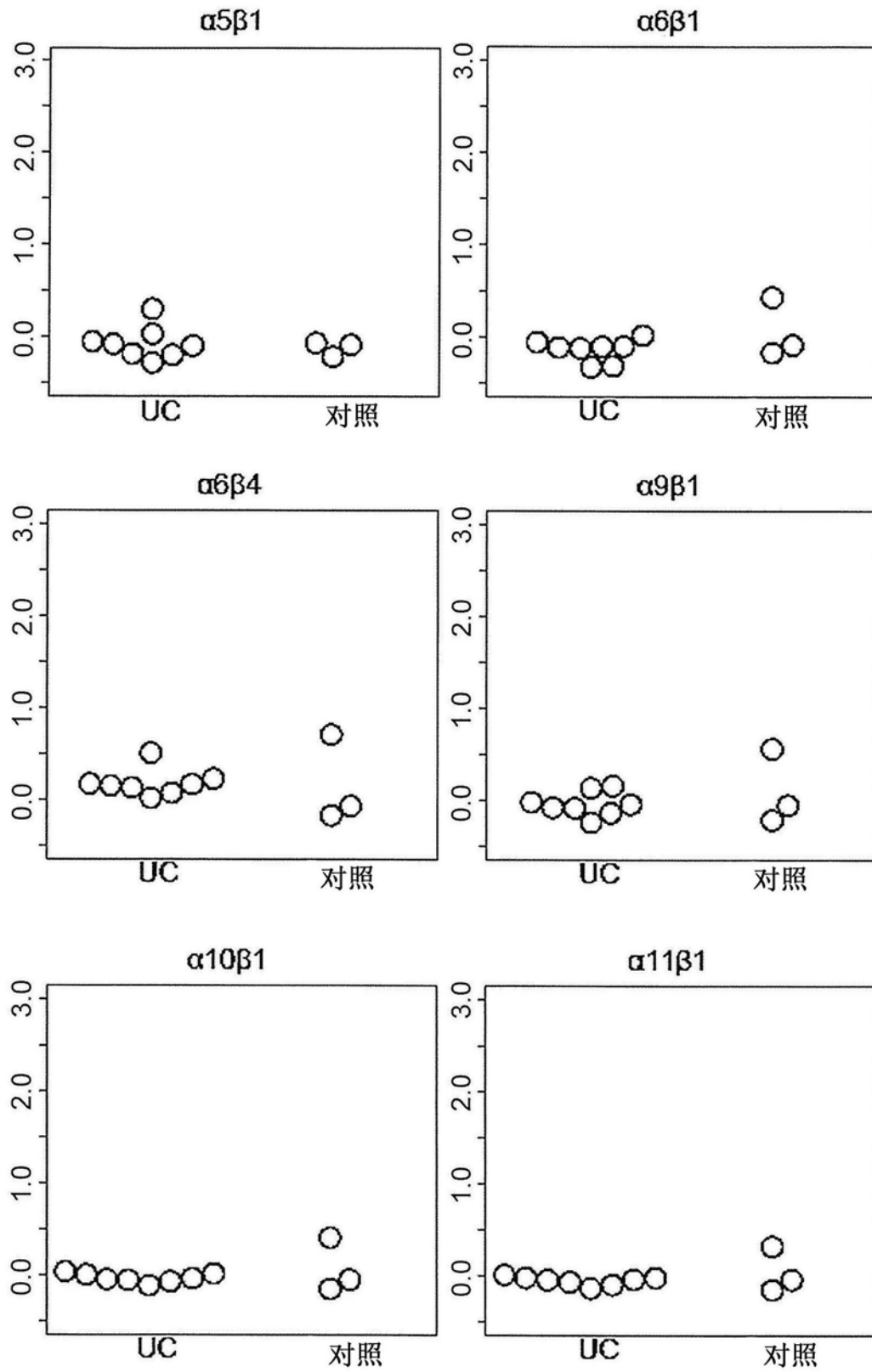


图1-2

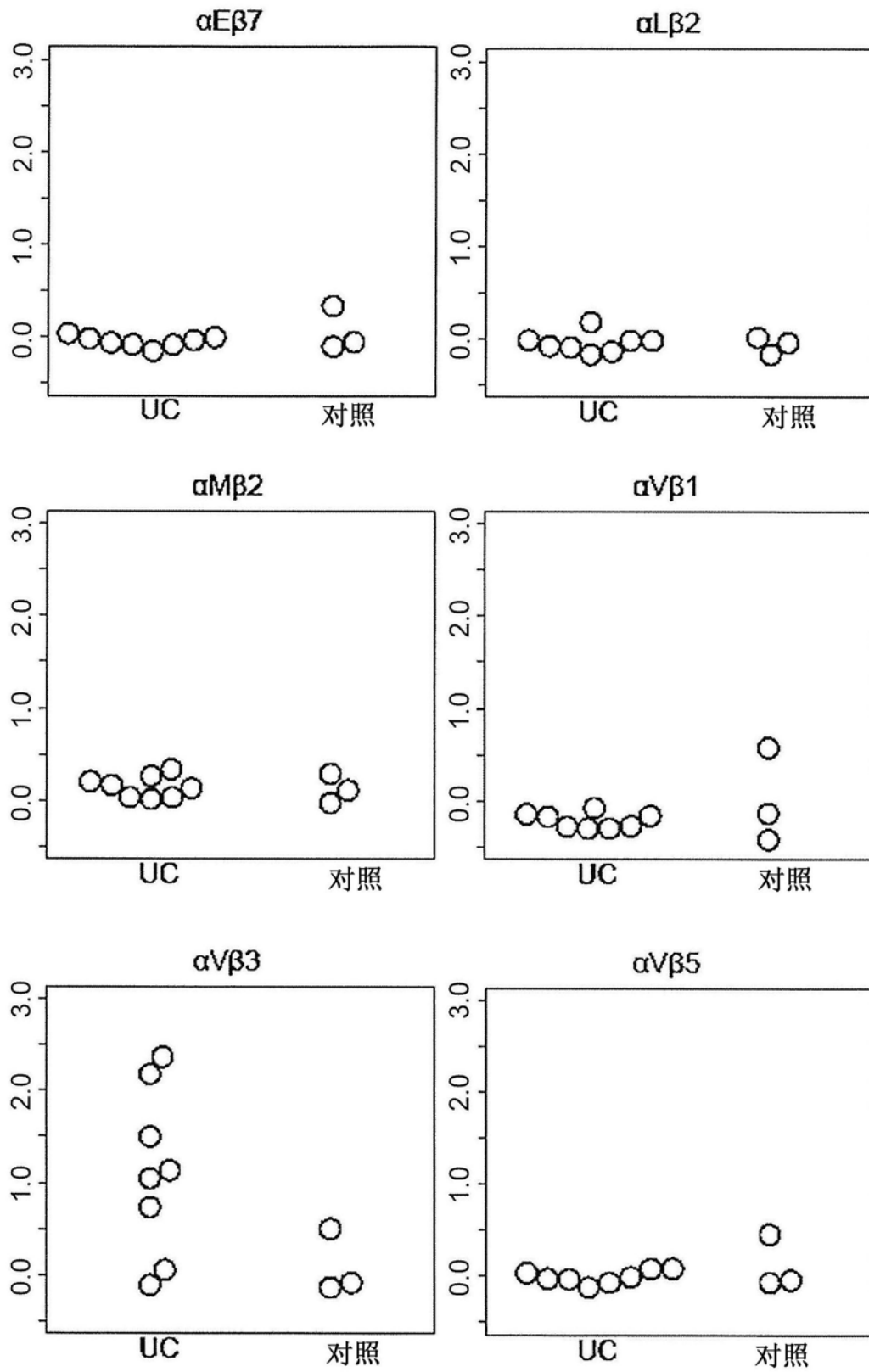


图1-3

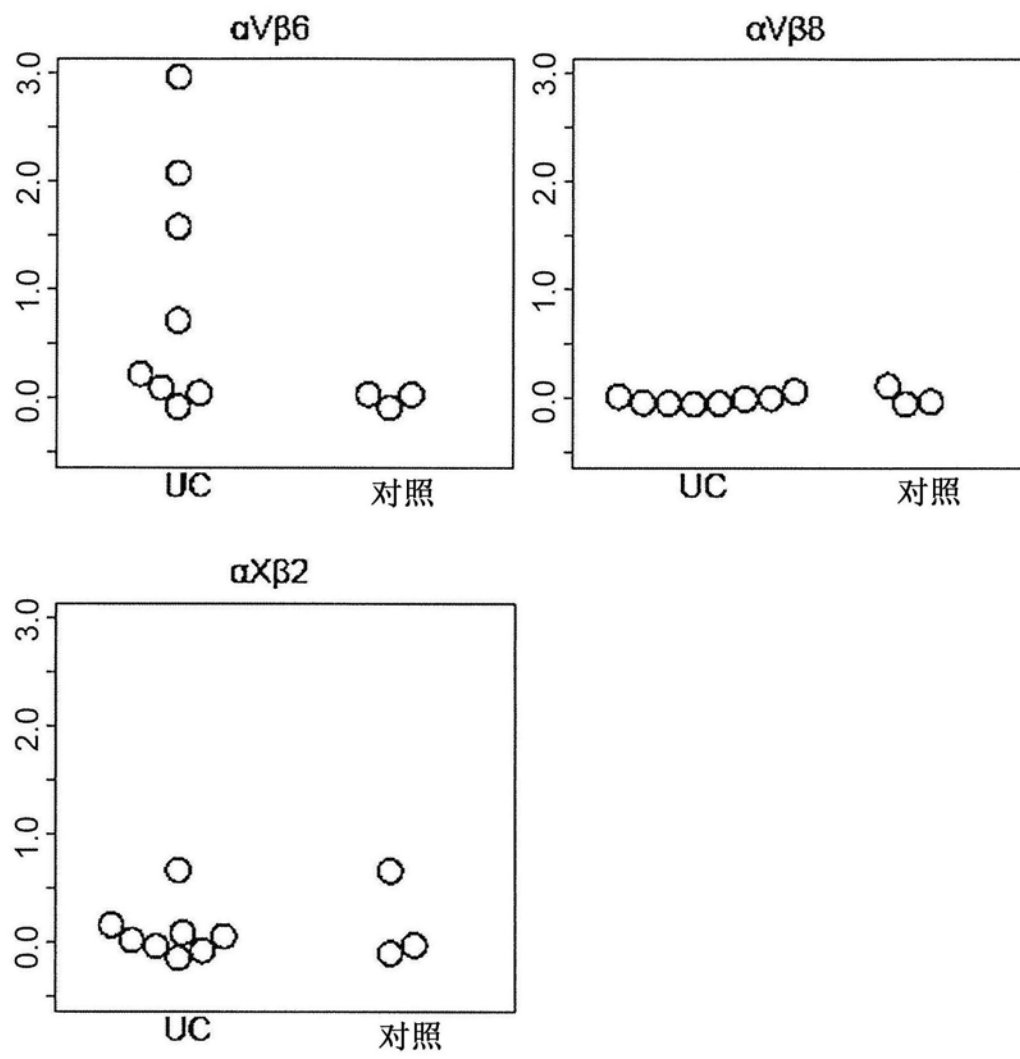


图1-4

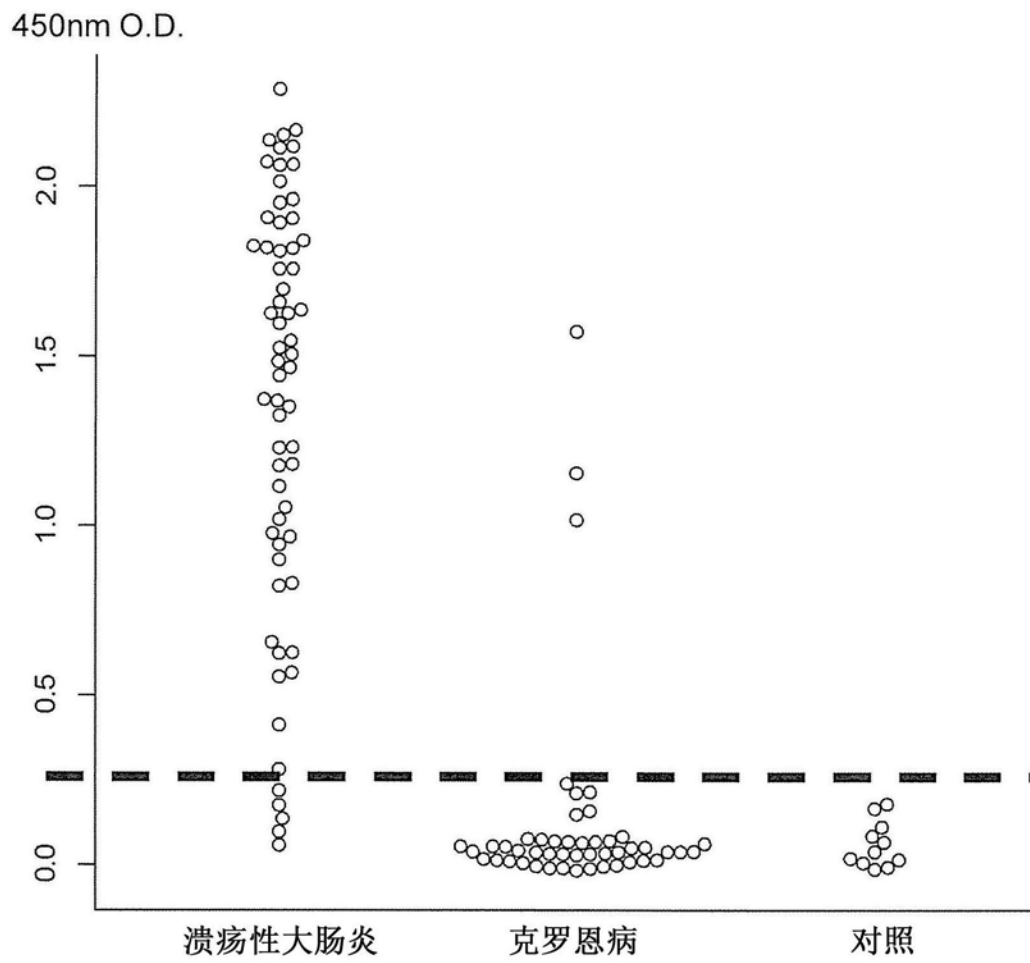


图2

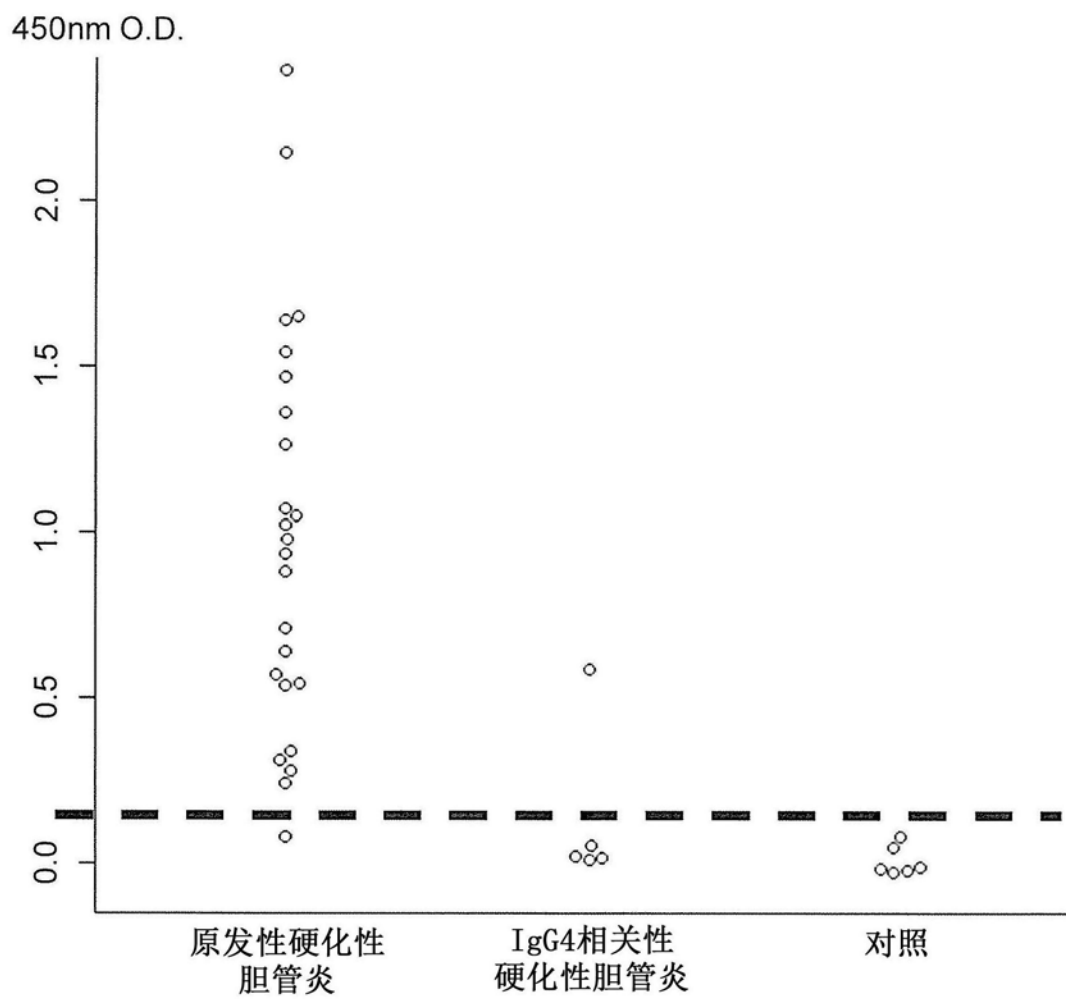


图3

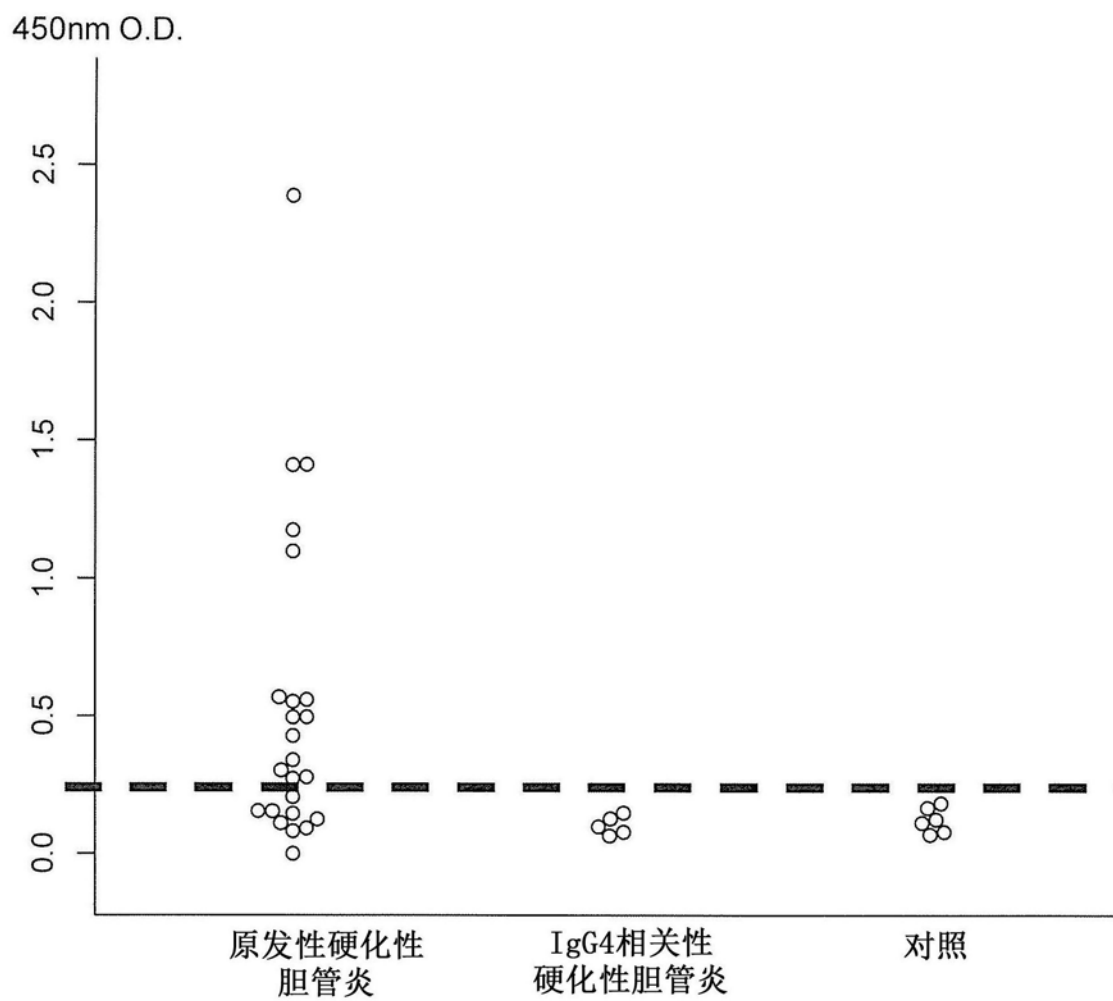


图5

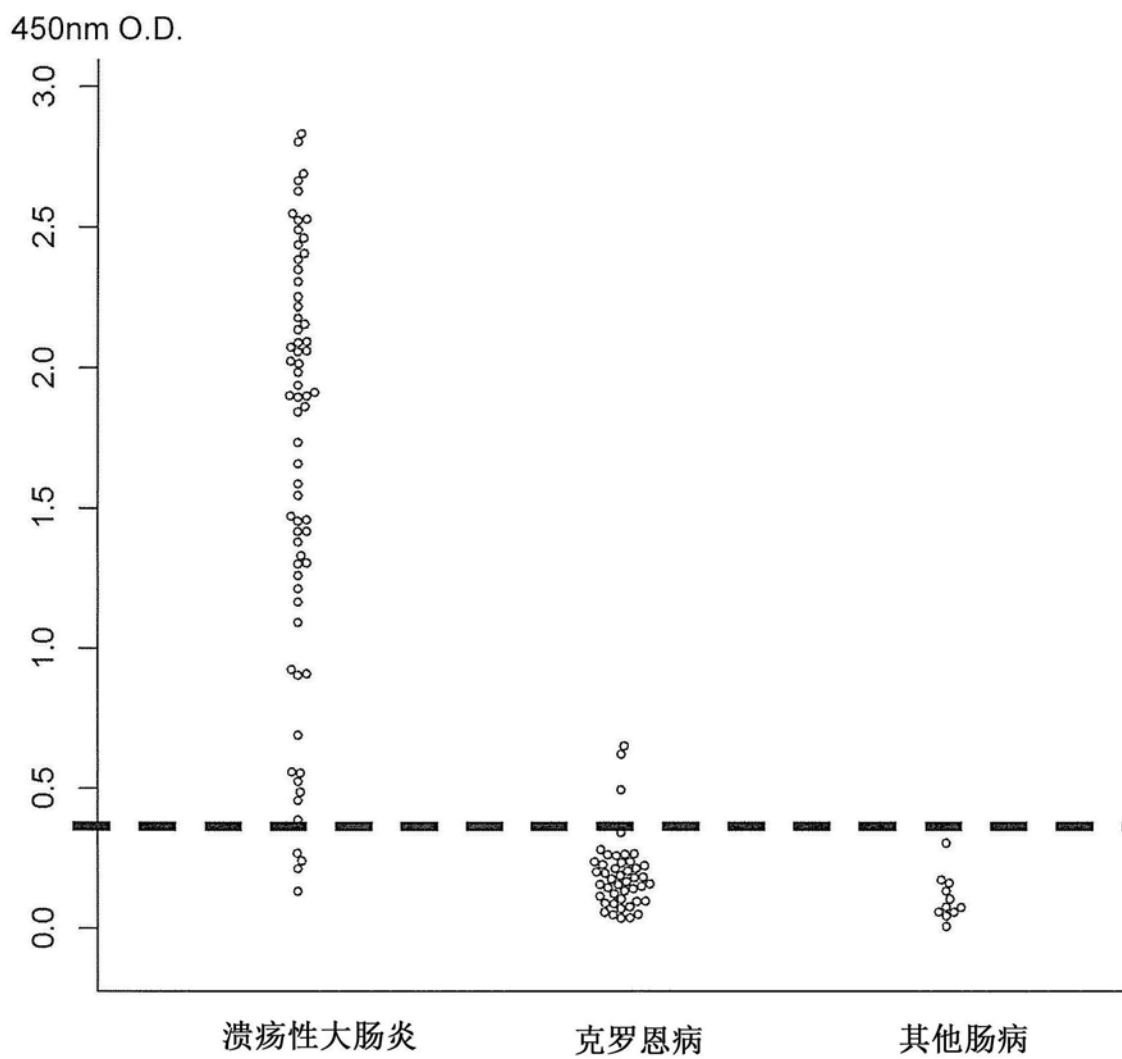


图6

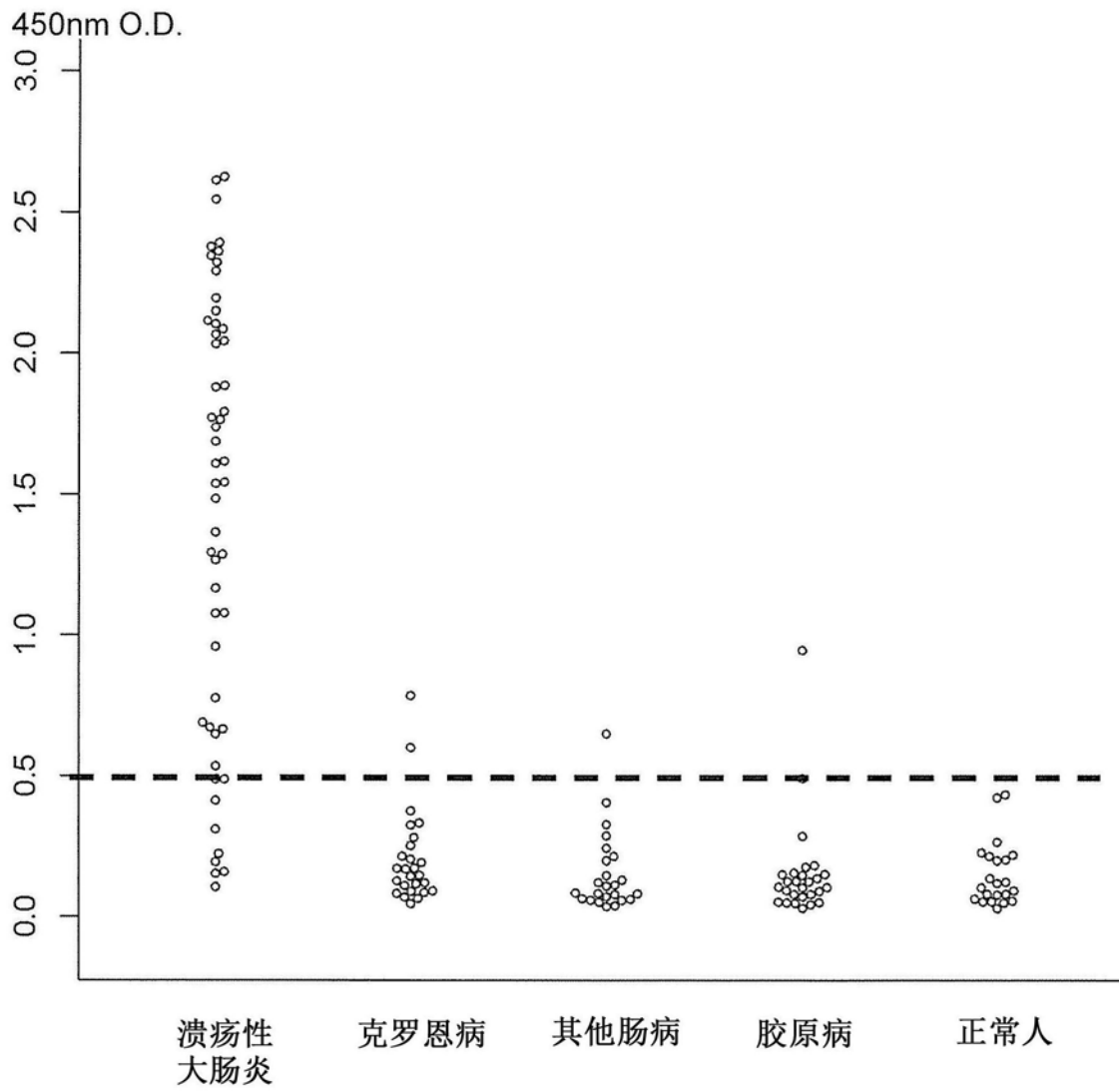


图7

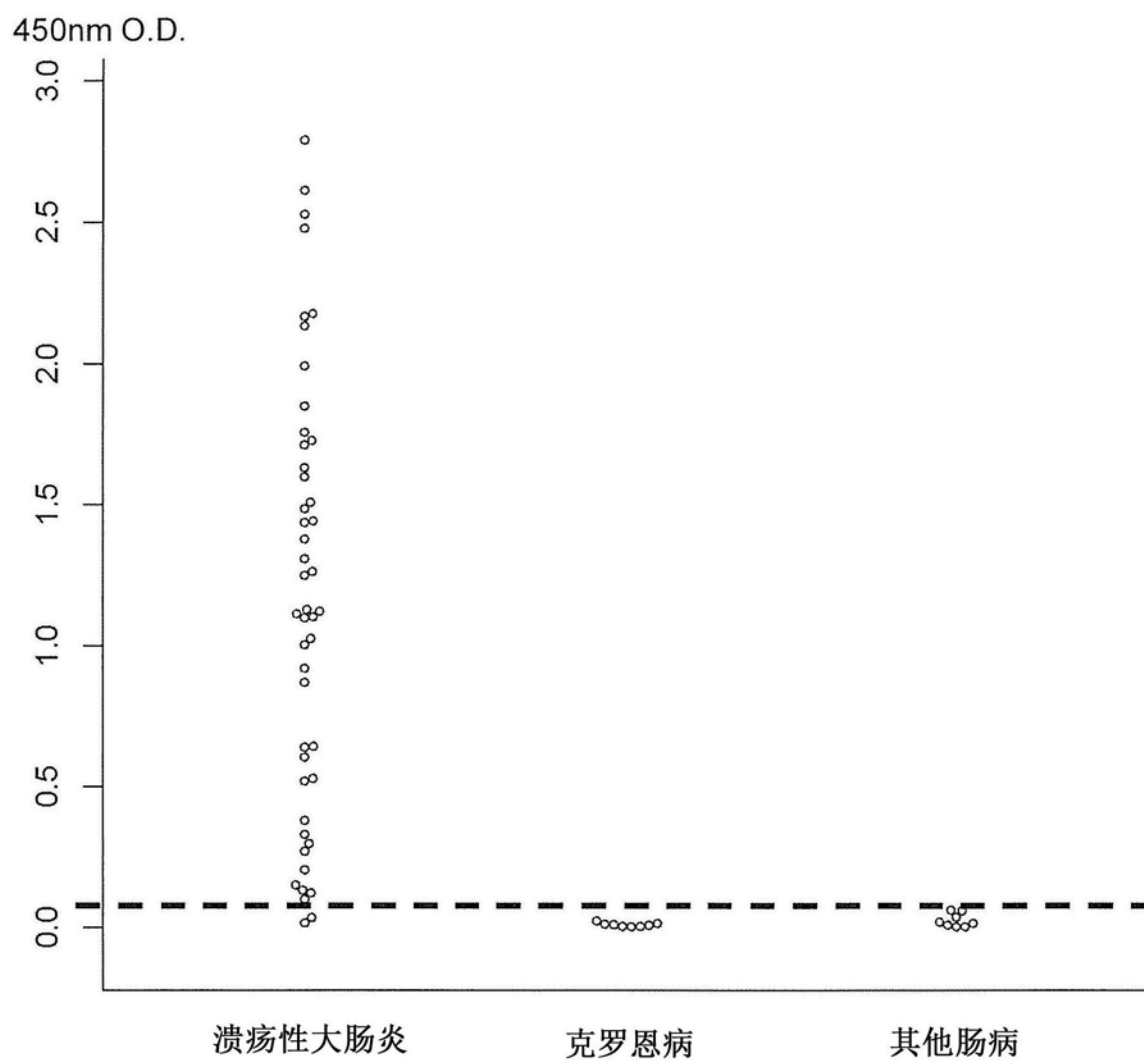


图8A

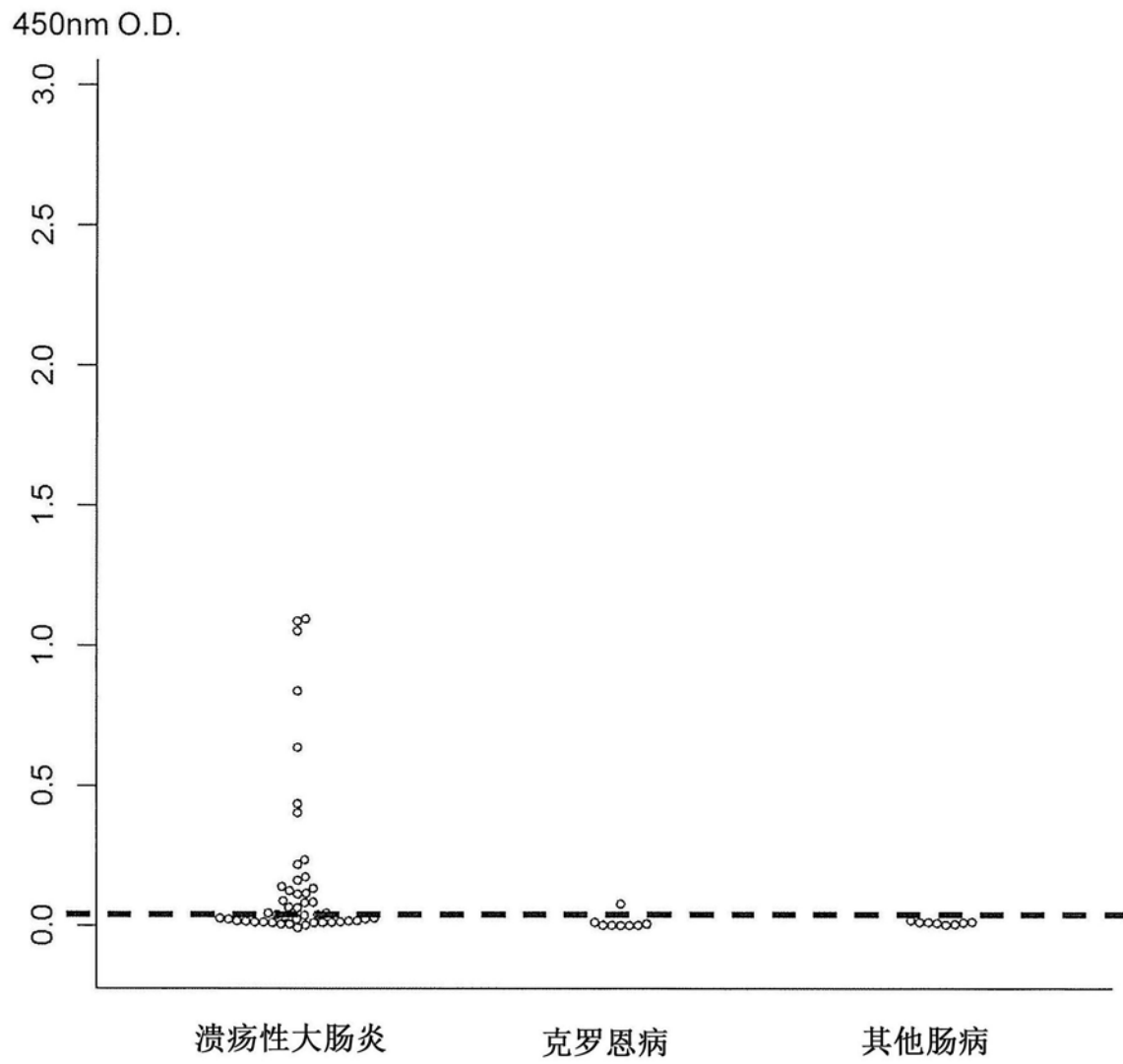


图8B

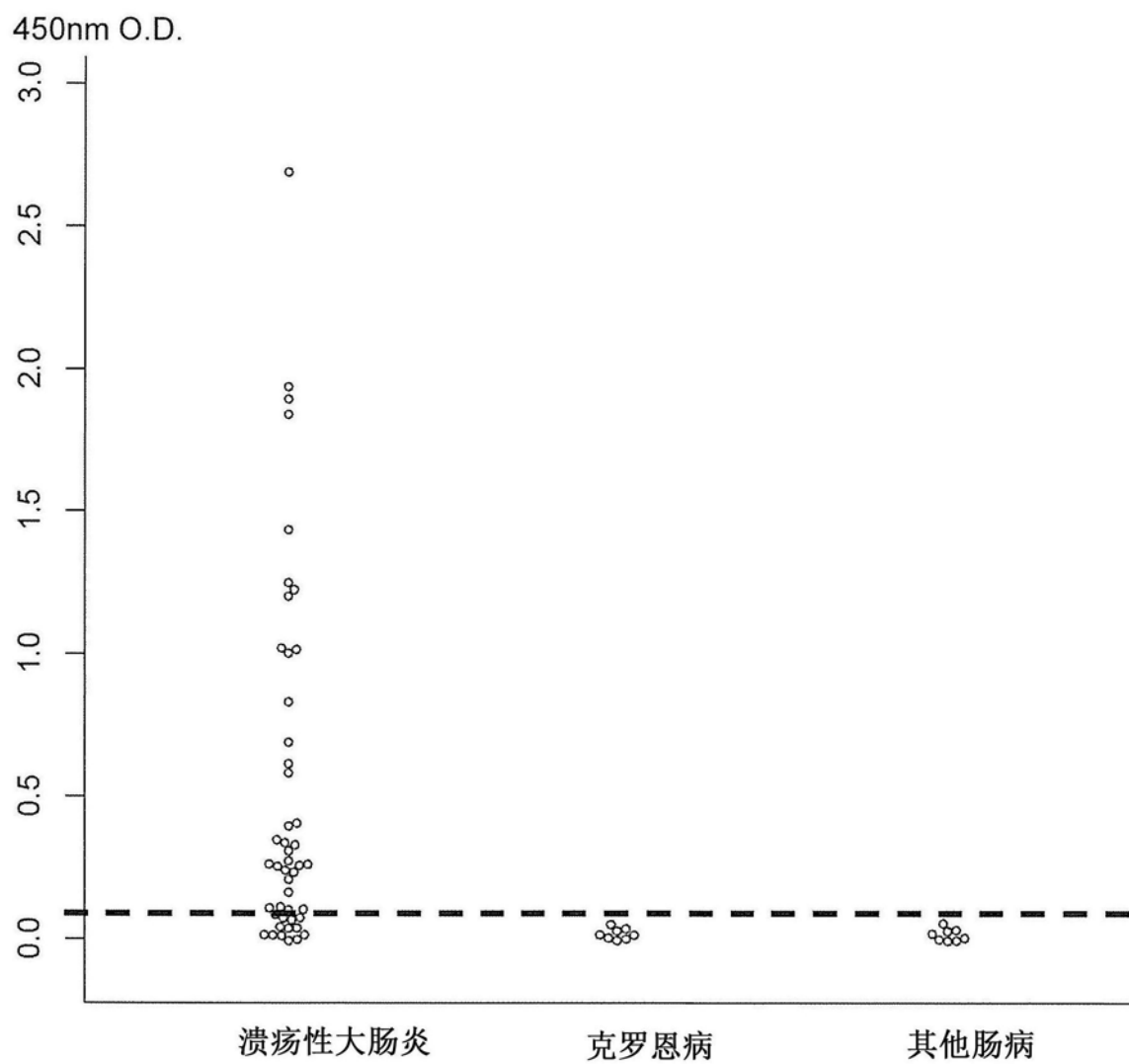


图9A

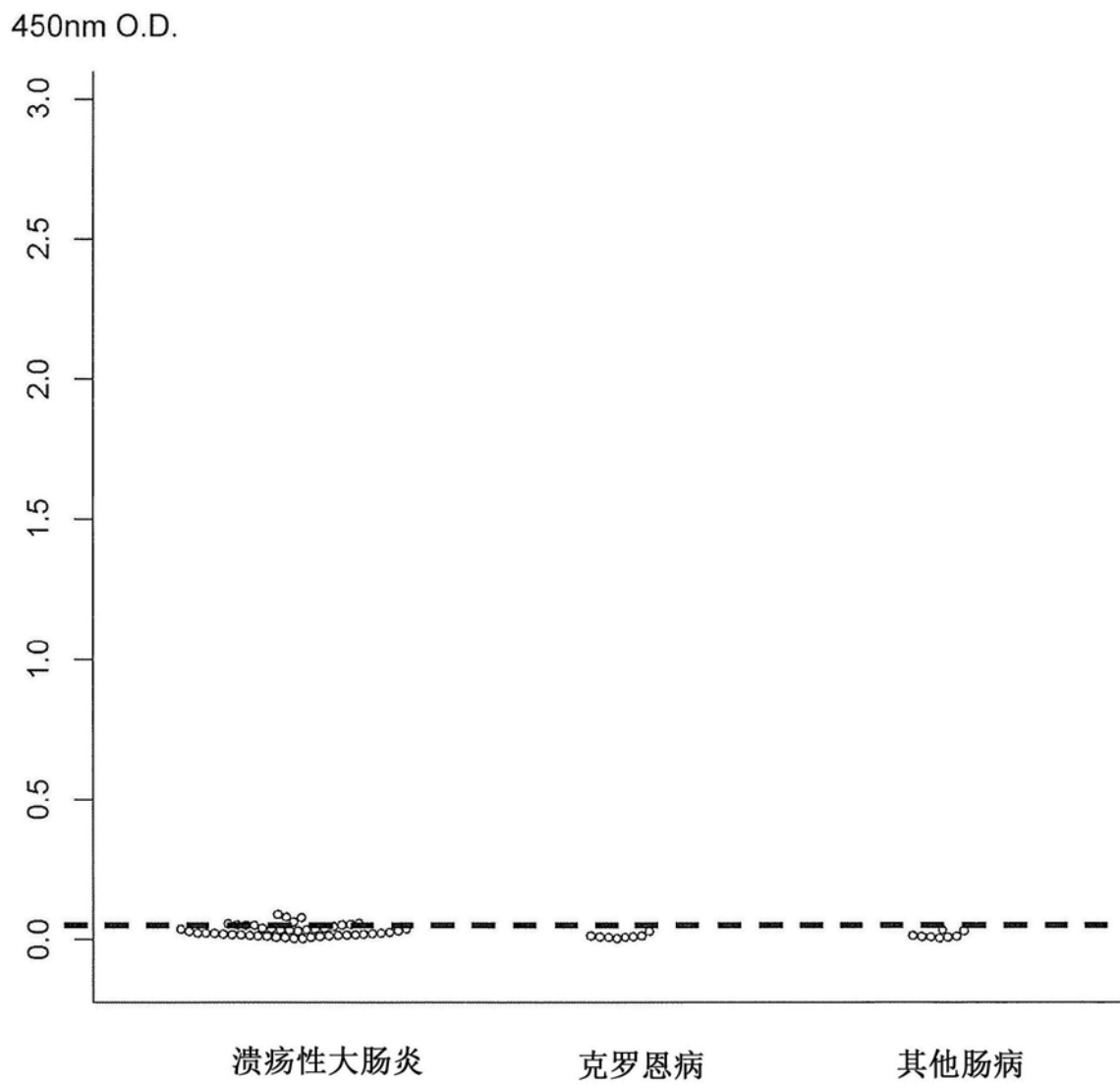


图9B

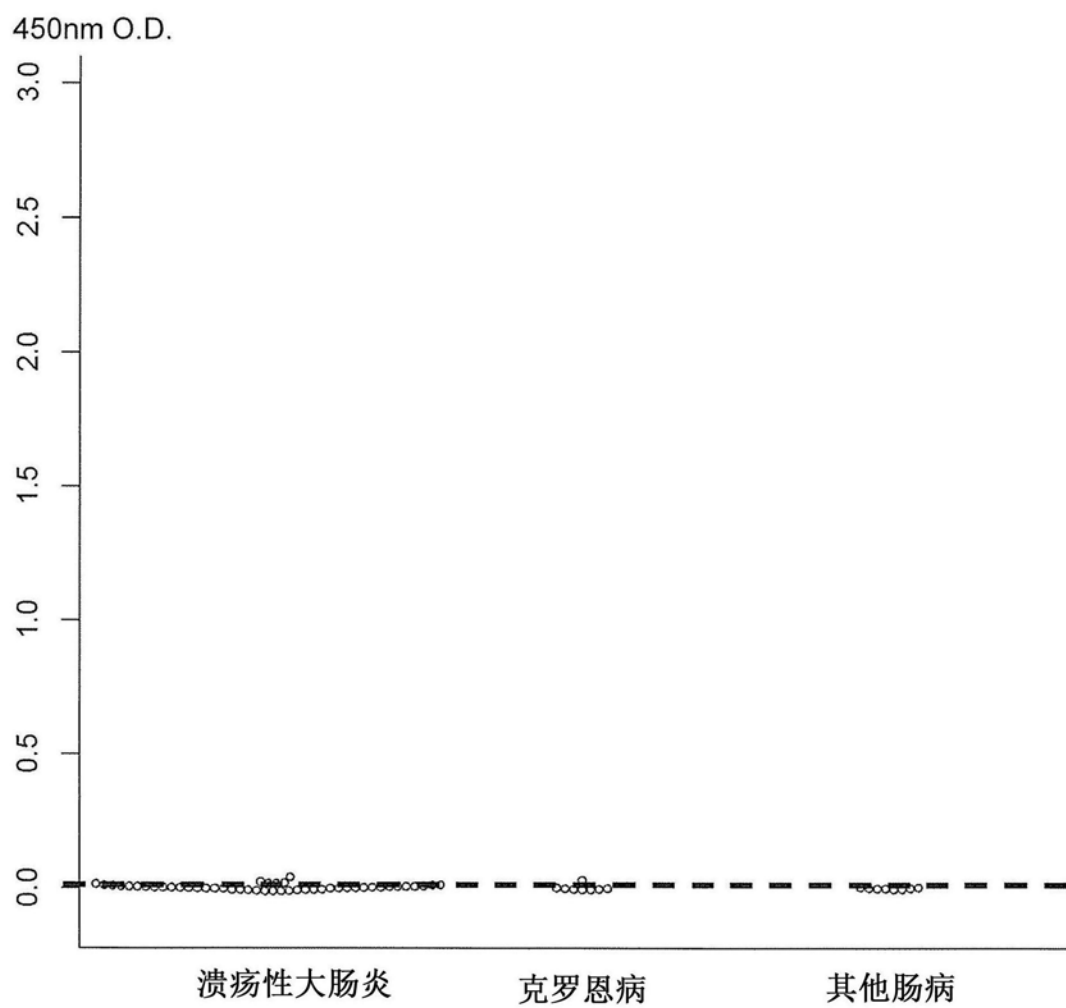


图9C

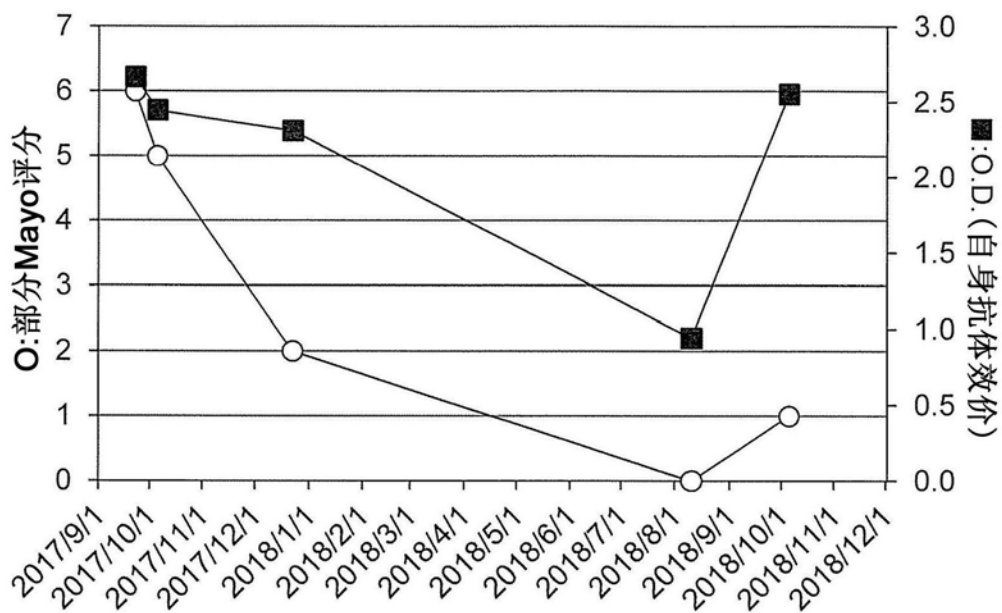


图10A

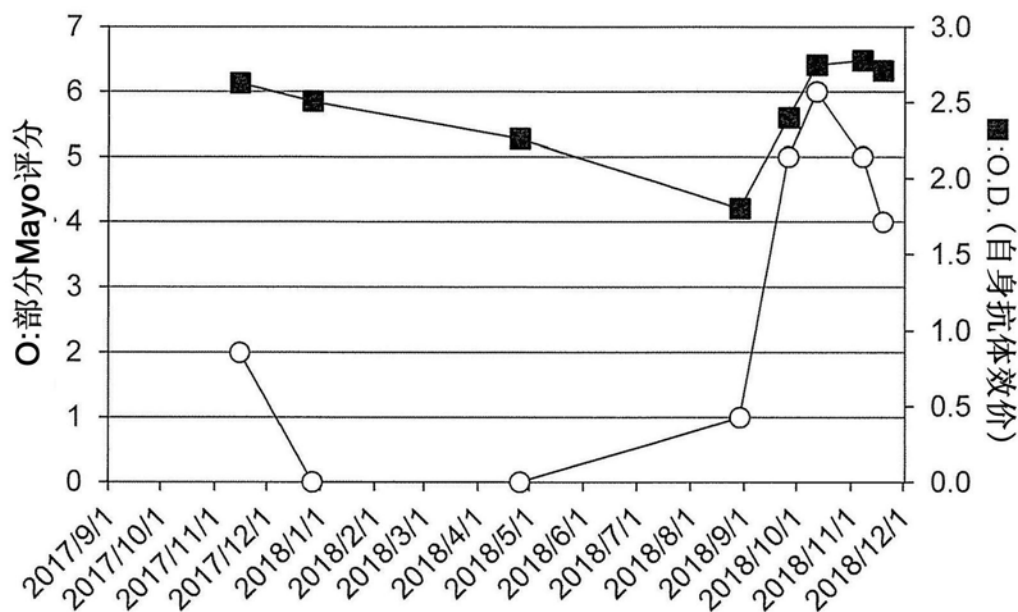


图10B

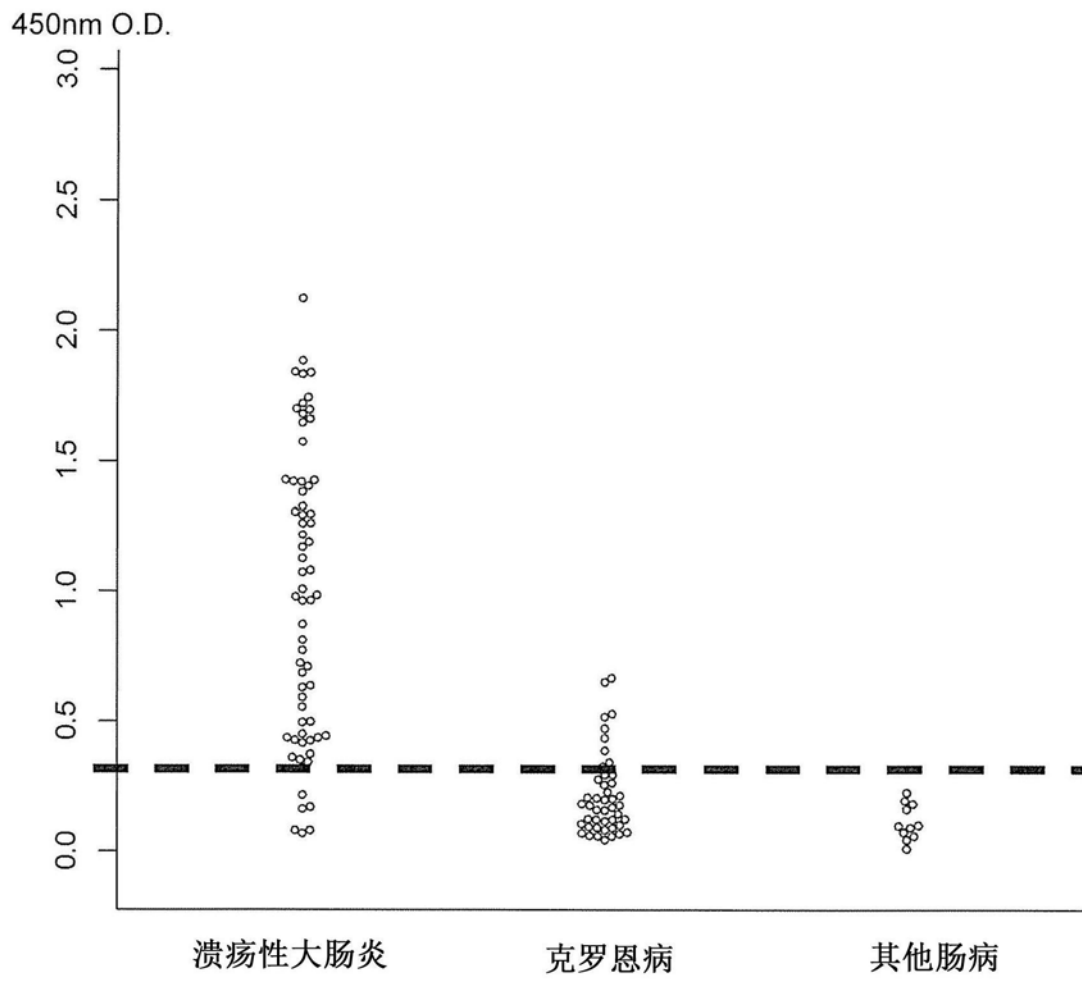


图11

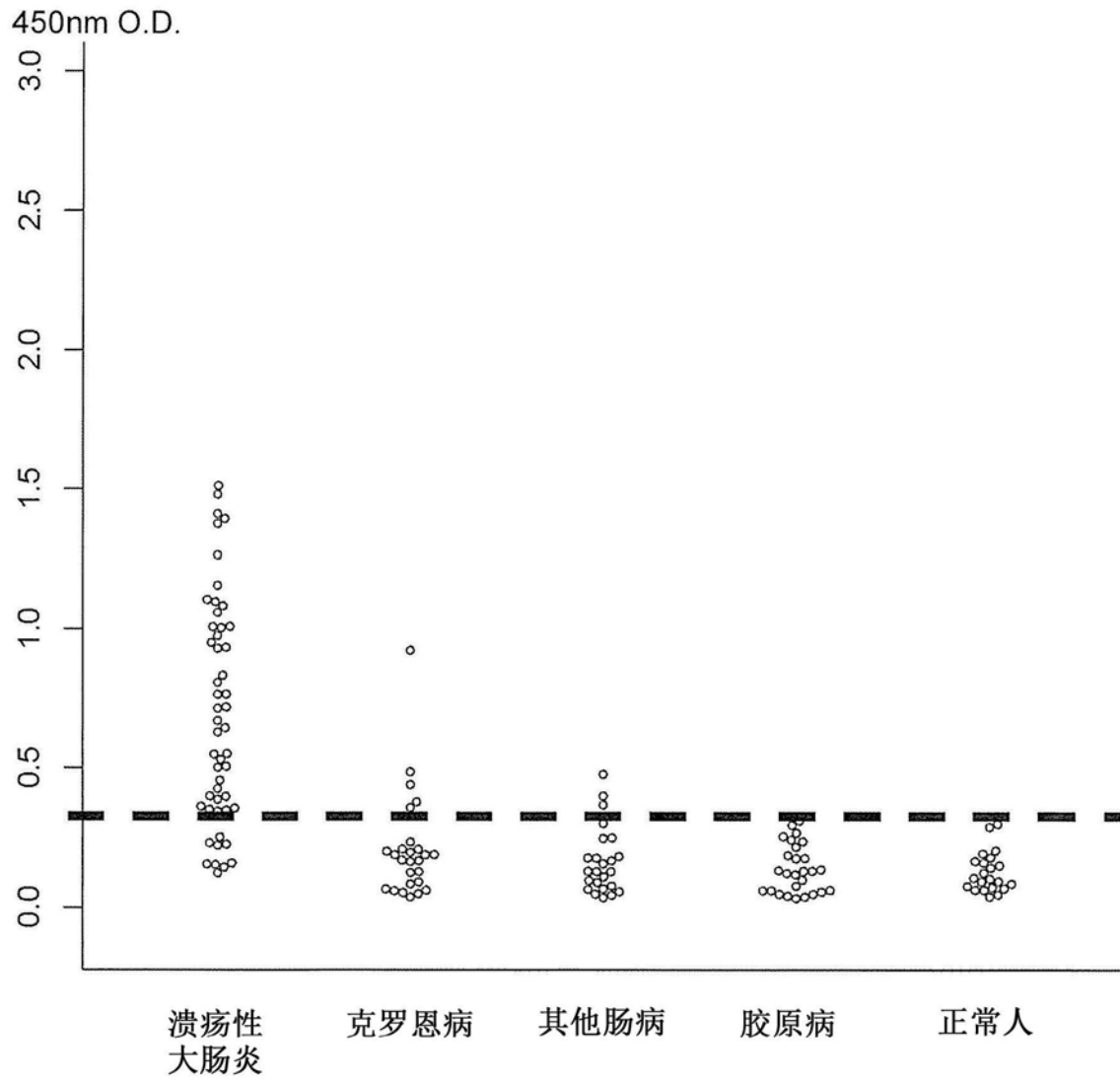


图12

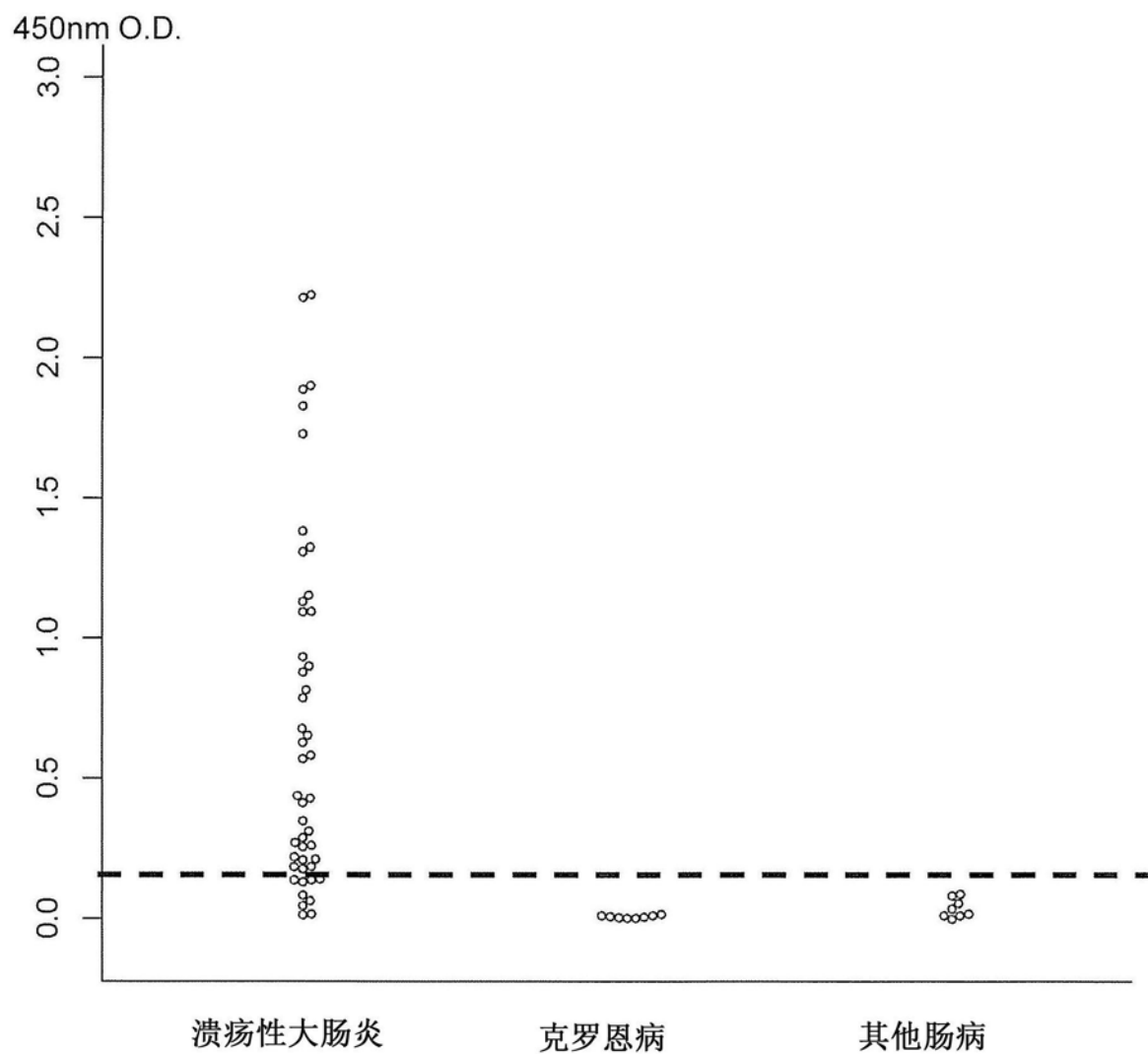


图13A

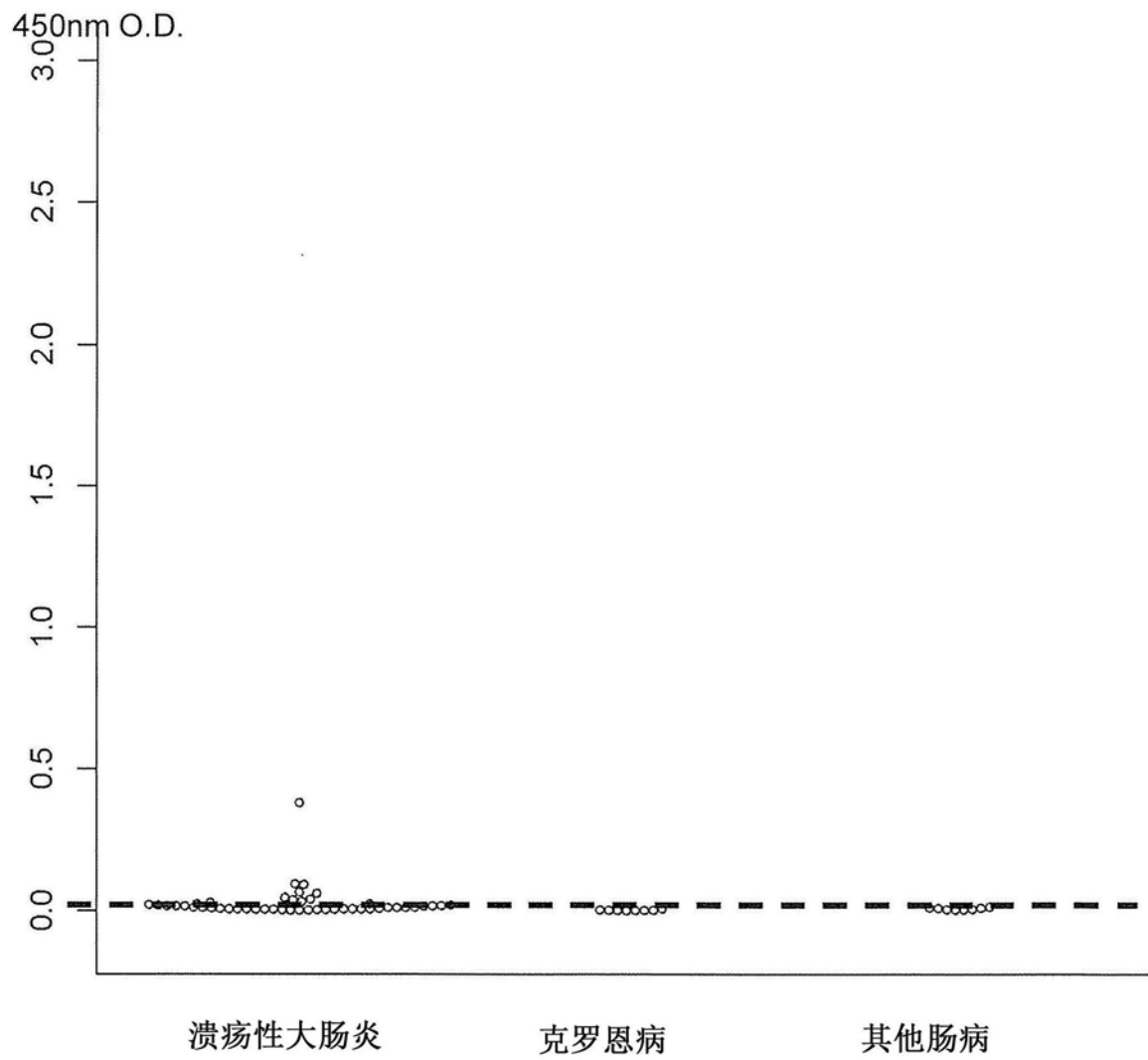


图13B

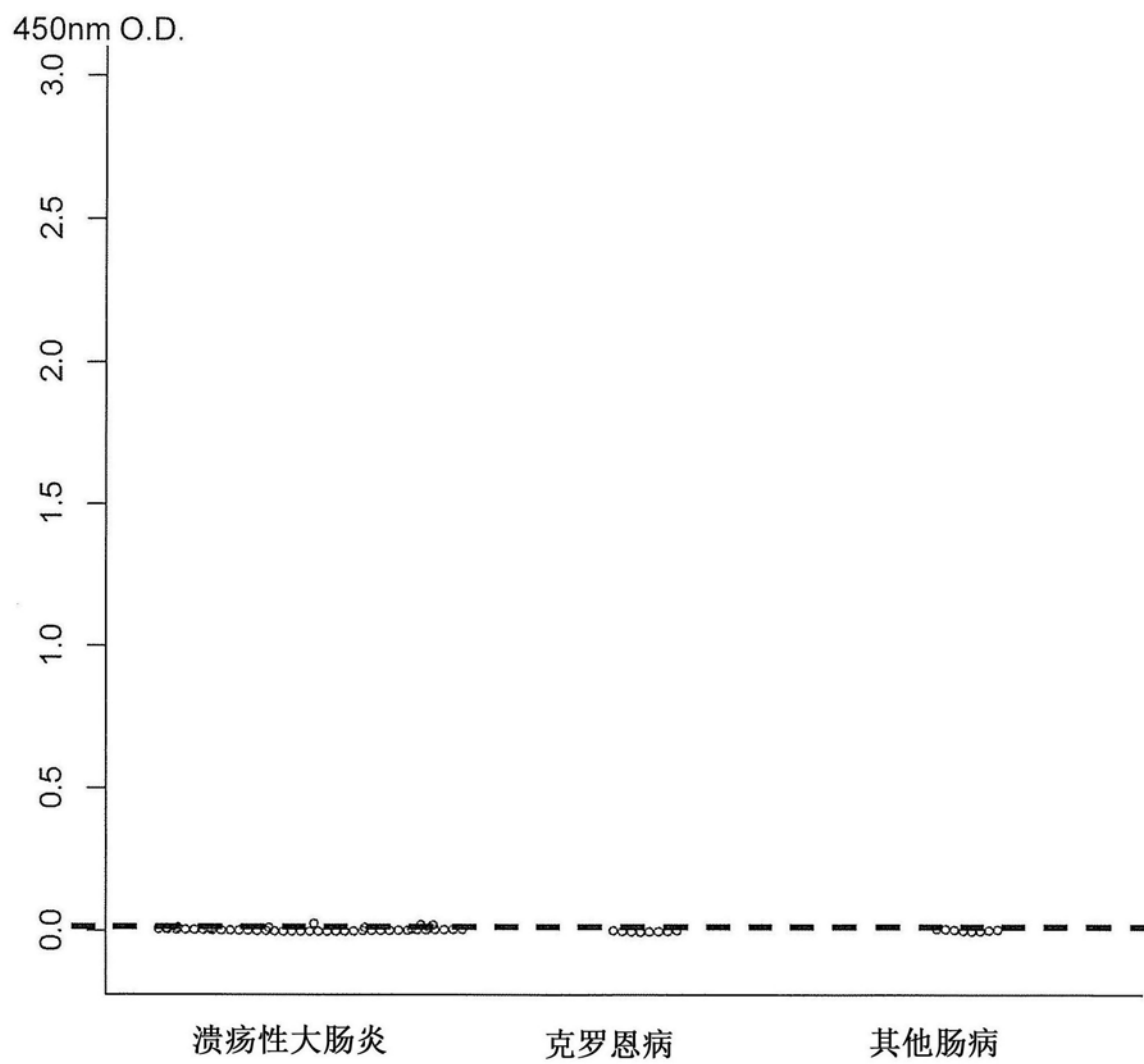


图13D

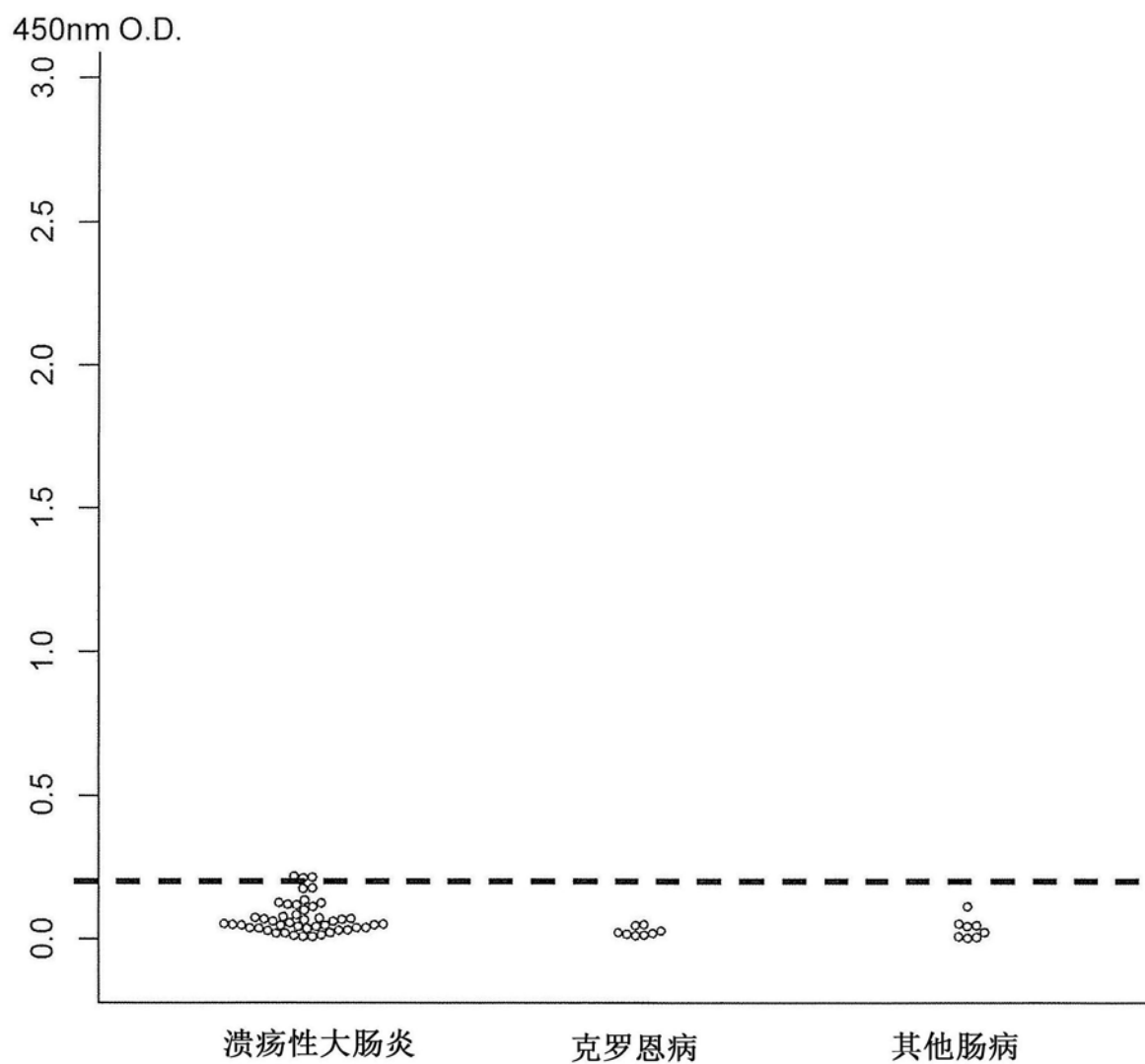


图14A

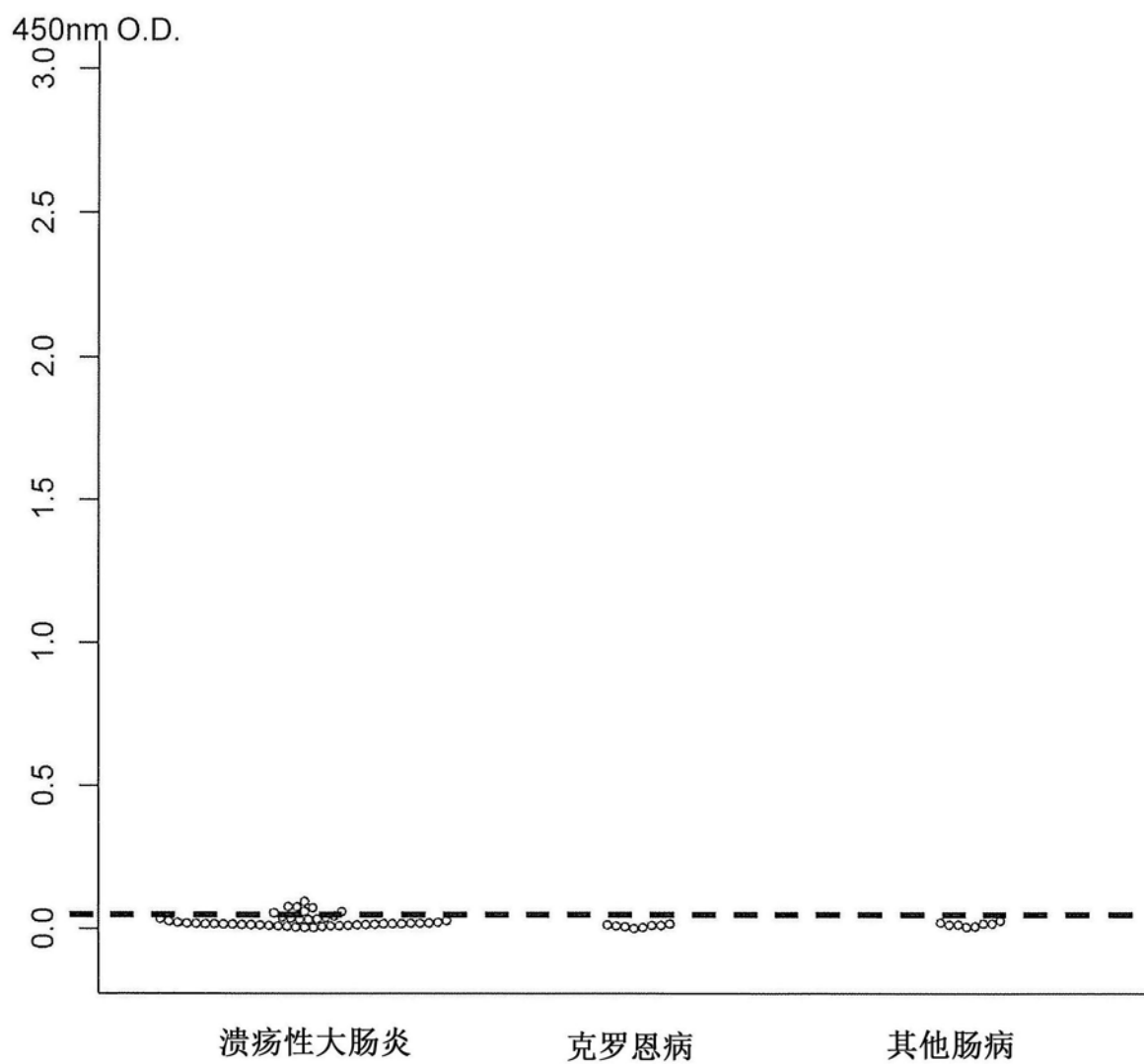


图14B

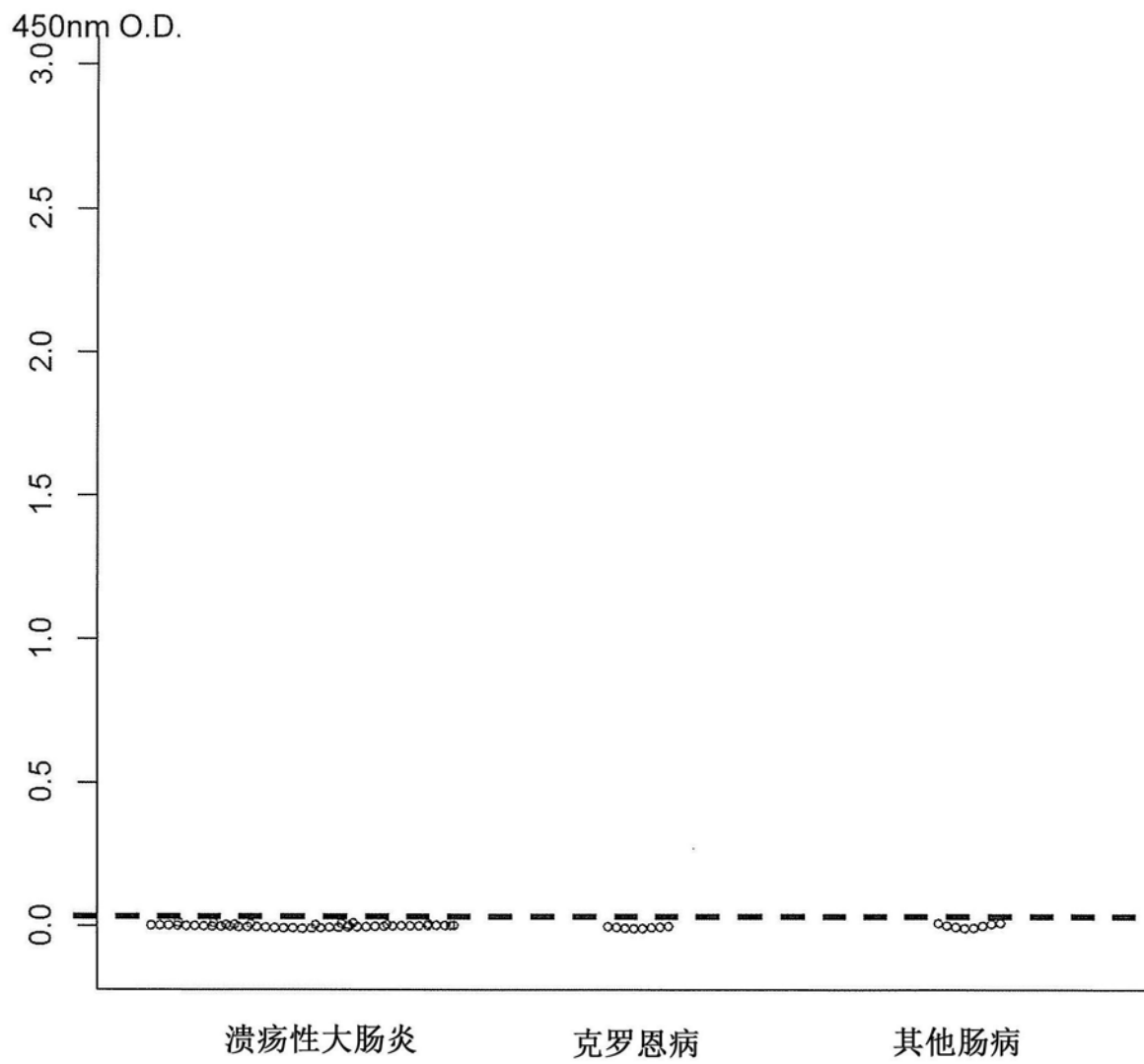


图14C