

(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2013-513101  
(P2013-513101A)

(43) 公表日 平成25年4月18日(2013.4.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 A	4 H O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577 B	
CO 7 K 14/46 (2006.01)	CO 7 K 14/46 Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2012-541519 (P2012-541519)  
 (86) (22) 出願日 平成22年12月3日 (2010.12.3)  
 (85) 翻訳文提出日 平成24年6月1日 (2012.6.1)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2010/068836  
 (87) 国際公開番号 WO2011/067377  
 (87) 国際公開日 平成23年6月9日 (2011.6.9)  
 (31) 優先権主張番号 MI2009A002154  
 (32) 優先日 平成21年12月4日 (2009.12.4)  
 (33) 優先権主張国 イタリア (IT)

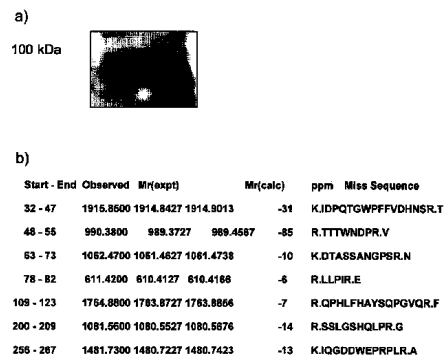
(71) 出願人 512144689  
 バイオユニヴァーサ ソシエタ ア レス  
 ポンサピリタ リミタータ  
 イタリア国、84084 ファスチアノ、  
 ディパーティメント ディ サイエンス  
 ファルマチェウティチェ、ユニヴァーシタ  
 デグリ ステュディ ディ サレルノ内  
 、ヴィア ポンテ ドン メリッロ  
 (74) 代理人 100130029  
 弁理士 永井 道雄  
 (72) 発明者 ツルコ・マリア・カテリナ  
 イタリア国、83100 アヴェッリノ、  
 ヴィア ブリガタ アヴェッリノ、33  
 Fターム(参考) 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40  
 EA20 EA50 FA71  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生化学的な血清マーカー

(57) 【要約】

本発明は、未知の生体サンプル中における可溶性 B A G 3 タンパク質の存在及び/又は濃度を決定するための方法に関するものであり、その分析は、抗体、好ましくはモノクローナル抗体による E L I S A 分析によって行われるのが好ましい。前述のタンパク質の可溶性形態での存在は、心臓疾患又は膵臓腫瘍の存在と関係がある。

Figure 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

未知の生体サンプル中における可溶性 B A G 3 タンパク質の存在及び / 又は濃度を検出する方法であって、

- a . 血清又は血漿からなる生体サンプルを得る工程と、
- b . 前記生体サンプル中における可溶性 B A G 3 の存在又は濃度値を決定する工程と、
- c . 前記サンプルから得られた値を基準値又は生体基準サンプルから得られた値と比較する工程と、
- d . 任意には、類似の値の更なるグループ分け又は統計的に異なる平均値を持つグループへの分割を決定する工程と、
- e . 可溶性 B A G 3 の存在及び / 又はレベルを、心臓疾患又は膵臓癌の病状からなる群から好ましくは選択される病的状態と結び付ける工程とを含む方法。

10

## 【請求項 2】

決定工程 b ) が、可溶性 B A G 3 に対して特異的なリガンドを用いて行われる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記生体サンプルがヒト由来のものである、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

抗凝固物質を前記生体サンプルに加える、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

20

## 【請求項 5】

前記特異的なリガンドが抗体である、請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 6】

決定工程 b ) が、モノクローナル、ポリクローナル若しくは組み換えの抗 B A G 3 抗体又はそれらの断片 ( s c F v 、二重特異性抗体、ミニ抗体 ) を用いて行われる、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記抗体が、モノクローナルであり、B A G 3 一次配列のアミノ酸配列 1 8 ~ 3 3 、 3 8 5 ~ 3 9 9 若しくは 5 3 3 ~ 5 4 7 からなる群から選択される少なくとも 1 種の B A G 3 エピトープを認識するか、又はヒト化された若しくは組み換えにより修飾されたその組み換え誘導体である、請求項 6 に記載の方法。

30

## 【請求項 8】

前記抗体又はリガンドが、フルオロフォア、発色団又は基質を発色団に変換できる酵素で標識されている、請求項 2 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 9】

決定工程 b ) が、B A G 3 捕獲リガンド及び検出リガンドによるサンドイッチ E L I S A を用いて行われ、ここで、一番目及び二番目がモノクローナル抗体であり、第二抗体が、使用した捕獲抗体によって認識されるものと異なるエピトープを認識するか又は複数のモノクローナル抗体の混合物である、請求項 2 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

40

## 【請求項 10】

前記病的状態が心臓疾患である、請求項 5 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 11】

前記心臓疾患 ( 工程 ( e ) ) が、狭心症、梗塞前狭心症、心筋梗塞、心不全、急性冠動脈疾患、急性心不全、慢性心不全又は医原性心臓疾患からなる群から選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 12】

酸化ストレスに関連した病的状態の血清マーカーとしての、ヒト可溶性 B A G 3 タンパク質の使用。

## 【請求項 13】

前記病的状態が心臓疾患又は膵臓癌である、請求項 1 2 に記載の使用。

50

## 【請求項 14】

前記心臓疾患が、狭心症、梗塞前狭心症、心筋梗塞、心不全、急性冠動脈疾患、急性心不全、慢性心不全及び医原性心臓疾患からなる群から選択される、請求項 13 に記載の使用。

## 【請求項 15】

血清からなる生体サンプル中における可溶性 BAG3 を検出し及び該可溶性 BAG3 に投薬するための、並びに癌又は心臓病患者の病的状態を特定するためのキットであって、(BAG3 一次配列についての)アミノ酸配列 18 ~ 33、385 ~ 399 若しくは 533 ~ 547 からなる群から選択される BAG-3 エピトープを認識する少なくとも 1 種の抗体又はそのヒト化された若しくは組み換えにより修飾された組み換え誘導体と、前記サンプルに投薬するための標準 BAG3 タンパク質、好ましくは組み換え体とを備えるキット。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、診断的血清マーカーの技術分野に関連するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

BAG3 (RefSeq: NP\_004272; 遺伝子 ID 9531) は、粗面小胞体中で特に濃縮されている 74 kDa 細胞質タンパク質である。近年、40 kD 細胞質型は、シナプトソームと関係があることが記載されている (Brown et al., 2008)。更に、組み換え型及び一部の欠失変異体は、大腸菌内で発現された (Rose et al. 2007 (a))。

20

## 【0003】

ヒトでは、bag3 の遺伝子発現が、ミオサイト内で、わずかの他の正常細胞タイプ内で、並びに一部の癌 (白血病及びリンパ腫、骨髄腫、膵臓癌及び甲状腺癌、黒色種、骨肉腫等) 内で恒常的であり (Romano et al., 2003; Homma et al., 2006; Chiappetta et al., 2007, Rosati et al., 2007)、種々のストレス要因に応答して各種細胞タイプにおいて誘発される: 高温にさらされた膵臓癌株 (Liao et al., 2001)、重金属と共にインキュベートされた又は高温にさらされた HeLa 細胞 (Pagliuca et al., 2003)、ジエチルマレアート、酸化ストレス誘発剤により処理された白血球 (Bonelli et al., 2004)、光によって損傷を受けたマウス網膜細胞 (Chen et al., 2004)、低強度超音波によって処理された Molt-4 細胞 (ヒト白血病 T 細胞) (Tabuchi et al., 2006)、HIV-1 ウイルスにさらされたヒトミクログリア細胞 (Rosati et al., 2007a)。これらの発見は、BAG3 発現の調節が、ストレスに対する細胞応答において重要な要素であり、bag3 遺伝子のプロモーターにおける、細胞ストレスの様々な形態で活性化された、転写因子 HSF (熱ショック因子) 1 に応答性がある要素の存在と一致していることを示す。HSF 1 活性の調節は、BAG3 タンパク質の細胞レベルの有意な減少につながり、この制御因子が bag3 の発現において重要な役割を果たすことが示されている (Franceschelli et al., 2008)。EGR1 は、bag3 発現の調節にかかわるもう一つの転写因子である (Gentilella et al., 2008)。

30

40

## 【0004】

BAG3 が一次癌細胞の生存に影響を及ぼすという第一の証拠は、B-細胞慢性リンパ性白血病 (B-CLL) を患う 24 人の患者及び急性リンパ性白血病 (ALL) を患う 11 人の子供からの一次白血球細胞に対する研究によってもたらされた: 特異的なアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドの使用による BAG3 レベルの減少は、EP1465927A1 及び U.S. 7,537,760B2 にも記載されるように、アポトーシス小体

50

の100%を超える増加 ( $p < 0.001$ ) を生じさせた。それ故、これら細胞中におけるアポトーシスの割合は、未処置細胞及び同一の化学療法薬を用いて処置した細胞の両方と比べて有意に増加していた (Leone and Turco, 2001, Romano et al., 2003a, 2003b)。正常な白血球では、遺伝子の過剰発現が、アポトーシス応答を有意に減少させることを証明した (Bonelli et al., 2004)。

【0005】

次に、ヒト甲状腺組織の分析は、正常な組織及び甲状腺腫サンプルがBAG3発現のテストにおいて陰性であり、一方、テストした癌サンプルが明らかな陽性であり、未分化腫瘍においてより高いBAG3の発現が観察されたことを示した。

10

【0006】

骨肉腫及びメラノーマ細胞等の他の腫瘍では、bag3特異的siRNAsが、基底細胞の生存の低減を引き起こし、化学療法薬を用いた著しい相乗効果を示す；マウスに埋め込んだヒトメラノーマ細胞におけるBAG3ノックダウンは、腫瘍増殖を有意に低減し、動物の生存を向上させた (Ammirante et al., in press)。一方、bag3の過剰発現は、化学療法薬を用いて処置された又は他のアポトーシス促進刺激にさらされた癌細胞のアポトーシスの減少をもたらす (Rose et al., 2007 (b))。

【0007】

細胞質BAG-3の存在は、異なる細胞系において検出され、腫瘍、例えば白血病又は甲状腺癌と、より一般的には細胞の生存と関係があることが見出されたものの、今までBAG3の可溶性形態については一切記載されておらず、その血清中での存在は、心臓病の状態と関係があるはずがなかった。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】EP1465927A1

【特許文献2】U.S.7,537,760B2

【発明の概要】

【0009】

そこで、本発明は、BAG-3タンパク質の分泌した新規の可溶性形態の同定の課題と、そのヒト及び他の哺乳動物中での産生の課題とを解決するものであり、驚くほど特異的で感受性のあるように特異的な病状と関係がある。

30

【0010】

本発明は、未知の生体サンプル中における可溶性BAG3タンパク質の存在及び/又は濃度を検出する方法であって、

- a. 血清又は血漿からなる生体サンプルを得る工程と、
  - b. 上記生体サンプル中における可溶性BAG3の存在又は濃度を決定する工程と、
  - c. 得られた値を基準値又は生体基準サンプルから得られた値と比較する工程と、
  - d. 任意には、類似の値の更なるグループ分け(場合により、それらの統計的に異なる  
平均値を持つグループへの更なる分割)を決定する工程と、
  - e. 可溶性BAG3の存在及び/又はレベルを病的状態に結び付ける工程であって、該  
状態が心臓疾患又は膵臓癌である工程と
- を含む方法に関する。

40

【0011】

好ましくは、投与工程(b)が、抗体、好ましくはモノクローナルによるELISAによって行われる。或いは、患者の血清から上記可溶性タンパク質を単離することができる。

【0012】

提案した分析方法は、好ましくは同年代のグループにおける、健常者のグループから心

50

臓病患者のグループの統計的に有意な分離を可能にする。また、それは、心臓疾患を患うそのような患者を、リスクの増加した患者のサブグループにおいて、階層化することができる(心不全、HF)。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】正常な心臓組織中の及びネズミにおける梗塞の誘発後でのBAG3タンパク質の発現を示す免疫組織化学的セクションである。

【図2】心筋細胞からの溶解物及び上澄み上で行われた抗BAG3抗体によるウエスタン・プロットである。

【図3】慢性虚血性心疾患を患う患者の血清から精製された可溶性タンパク質の、抗BAG3抗体による、ウエスタン・プロット解析である。

【図4】BAG3の検出のためのELISAの校正曲線である。

【図5】年齢層に従った健康なドナーにおけるBAG3血清濃度のグラフ表示である。

【図6】年齢層で分けられた健康なドナーと患者におけるBAG3血清濃度のグラフ表示である。

【図7】心不全を患う患者におけるBAG3タンパク質を検出するためのELISA試験のROC曲線である。

【図8】心不全の診断を受けた患者におけるBAG3血清濃度を非代償性でない心臓疾患を患う患者と比較したグラフ表示である。

【図9a】LPSの存在又は不在において増加する投与量の可溶性組み換えBAG-3で刺激された、マウスマクロファージ(J774)におけるiNOS(誘導型一酸化窒素合成酵素)タンパク質及び比較用のコントロールタンパク質(GAPDH)の生成である。

【図9b】同一の細胞タイプにおけるグリース試薬を用いた亜硝酸塩の決定である。

【図10】J774細胞の表面に結合するrBAG3タンパク質の共焦点顕微鏡分析である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は、細胞内の形態について以前に記載された機能(細胞周期及びアポトーシスの制御)と比べて予期しない生物学的活性を備えるBAG3タンパク質の可溶性形態の発現に基づくものである:例えば、かかる形態は、細胞によって活発に分泌され、単球/マクロファージを活性化することができる。

【0015】

また、上記可溶性形態は、ある種の病的状態、特に心臓疾患及び膵臓癌に対して非常に特異的である血清生化学的マーカーであることが見出された。それ故、本発明の目的は、BAG3の可溶性形態と、上述の病的状況の存在を決定するため、血清からなる生体サンプル中のそのレベルを確認する方法である。

【0016】

可溶性BAG3は、例えば、膵臓癌細胞(Panc-1)中のエキソソームとの関係によって、また、HepG2細胞(ヒト肝細胞癌)、C6細胞(ラットグリア芽腫)、ASPC-1細胞(ヒト膵臓腺癌)、ARO細胞(未分化甲状腺癌)、HT-29細胞(結腸直腸腺癌)及び全く同じPanc-1細胞等の生存腫瘍細胞株の(トリパンブルー排除アッセイによる)上澄み中での存在によって示されるように、活発に分泌されるBAG3の一形態を意味しており、それ故に、可溶性BAG3は、細胞死での培地中における細胞内容物の放出によって生じないことが示される。

【0017】

更に、可溶性BAG3は、心筋細胞中での酸化ストレスの誘発を受けて放出(又は分泌)され、心臓疾患を患う患者の血清から、例えばSDS-PAGEにより、およそ75kDの分子量を持つ形態として定量的に精製できる。

【0018】

従って、生体サンプルにおいて、可溶性BAG3は、その存在が細胞の存在から独立し

10

20

30

40

50

ているため、細胞質の形態と区別できる。実際、例えば、BAG3タンパク質は、甲状腺腫瘍生検において正常組織の場合より高いものの、免疫組織学的染色法は、細胞質のみで該タンパク質を検出することが見出される。

【0019】

病的状態用の血清マーカーとしての可溶性BAG3の使用によれば、本発明は、好ましい捕獲剤及び/又は検出剤としてのモノクローナル又はポリクローナル抗体の使用によるかかる形態の存在及び量の検出方法に関する。

【0020】

モノクローナル及びポリクローナル抗BAG3抗体は、EP1465927A1及びU.S. 7,537,760B2において記載されている。

10

【0021】

好ましい具現化によれば、本発明は、以下に示す工程を含む：

- a. 血清又は血漿からなる生体サンプルを得る工程
- b. かかる生体サンプル中の可溶性BAG3の濃度を決定する工程
- c. 上記サンプルから得られた結果を、基準値又は基準の血清サンプルから得られた値と比較する工程
- d. 任意に、統計的に違わない可溶性BAG-3平均値を持つ患者のサブグループ（例えば、21～43歳の患者のグループと44～65歳のグループ）を決定する工程
- e. 可溶性BAG3のレベル又は存在を、心臓疾患又は膵臓癌の中から選択される病的状態と結び付ける工程

20

【0022】

心臓疾患の定義は、狭心症、不安定狭心症、心筋梗塞、心不全、急性冠動脈疾患、急性心不全、慢性心不全、及び医原性心臓疾患を指す。

【0023】

好ましい具現化によれば、生体サンプルは、血清又は血漿であり、ヒト由来のものである。また、それは、任意には、例えば抗凝固活性を備える物質が補充された、血液全体から得ることができる。

【0024】

生体サンプル中のBAG3の存在は、免疫学的方法によって決定されるのが好ましく、抗BAG3モノクローナル、ポリクローナル又は組み換え抗体（例えば、ScFv断片、二重特異性抗体等）を用いるのがより一層好ましい。好ましい具現化によれば、上記抗体は、モノクローナルであり、断片18～33、385～399又は533～547を含むBAG3配列（RefSeq：NP\_004272；遺伝子ID9531）中のエピトープを認識する。上記抗体は、U.S. 7,537,760において同定されたもの、又はここに記載される2002年12月17日にジェノア先進バイオテクノロジーセンターにて預けられた親ハイブリドーマPD02009のサブクローンがより一層好ましい；或いは、それらは、組み換え型及び/又はヒト化型等のかかる抗体の誘導体であってもよい。

30

【0025】

更なる具現化によれば、市販の抗BAG3抗体を用いることもでき（例えば、ヤギ抗Bag3ポリクローナル抗体，Abcam；ウサギ抗Bag3ポリクローナル抗体，Abcam；マウス抗Bag3モノクローナル抗体，Abcam；ウサギ抗ヒトBag3ポリクローナル抗体，Abcam；マウス抗ヒトBag3モノクローナル抗体，クローン5A8，Abgent；抗Bag3ポリクローナル抗体，Abnova社；ヤギ抗Bag3ポリクローナル抗体，Abnova社；マウス抗Bag3ポリクローナル抗体，Abnova社；ウサギ抗ヒトBag3ポリクローナル抗体，アトラスアンチボディーズ；ヤギ抗Bag3/BIS/CAIR1ポリクローナル抗体，エベレストバイオテック；ヤギ抗Bag3ポリクローナル抗体，ジーンテックス；ウサギ抗ヒトBag3ポリクローナル抗体，ジーンテックス；ヤギ抗ヒトBcl-2-バインディングタンパク質BIS（BAG3）ポリクローナル抗体，ライフスパンバイオサイエンス；ウサギ抗ヒトBcl-2-バインディングタンパク質BIS（BAG3）ポリクローナル抗体，ライフスパンバイオサイエンス

40

50

ーズ；ヤギ抗 B a g 3 ポリクローナル抗体，ノーバスバイオロジカルズ；マウス抗ヒト B a g 3 ポリクローナル抗体，ノーバスバイオロジカルズ；ウサギ抗 B a g 3 ポリクローナル抗体，ノーバスバイオロジカルズ；ウサギ抗ヒト B a g 3 ポリクローナル抗体，ノーバスバイオロジカルズ；ヤギ抗ヒト B A G 3 / B I S / C A I R 1 ポリクローナル抗体，レイバイオテック社；ウサギ抗ヒト B a g 3 ポリクローナル抗体，プロテインテックグループ社；アトラスアンチボディーズの抗体を備えたウサギ抗ヒト B A G 3 プレステージ抗体，シグマ・アルドリッチ等）、好ましくはそれらがモノクローナルの場合である。

#### 【0026】

免疫学的分析は、E L I S A が好ましく、ここでは、第一の捕獲リガンドが、抗体、より一層好ましくは a a 1 8 ~ 3 3、3 8 5 ~ 3 9 9 又は 5 3 3 ~ 5 4 7 に対応する B A G 3 の配列におけるエピトープを認識するモノクローナル抗体から選択されたものであり；検出用の第二抗体は、上記捕捉抗体によって認識されるものと異なるエピトープを認識するものであり、モノクローナル、少なくとも 2 種のモノクローナル抗体の混合物又はポリクローナル抗体とすることができる。

10

#### 【0027】

上記分析の好ましい具現化は、抗 B A G 3 抗体の使用を含むものの、抗体以外の B A G 3 結合分子、例えば可溶性受容体又は天然若しくは合成リガンドを用いても同一の結果を達成することができる。

#### 【0028】

検出に用いたリガンドは、抗体、例えばフルオロフォア、発色団又は基質を発色団に変換できる酵素で標識された抗体によって順に認識でき、それ故に、生体サンプル中の B A G 3 の存在を視覚化するのに有用である；或いは、それは、かかる発色団基に直接結合できる。

20

#### 【0029】

可溶性 B A G 3 のレベルを検出及び / 又は測定するのに等しく有効な種々の反応スキームを確認することができる。例えば、捕獲のため、第一抗体、例えば抗 B A G 3 モノクローナル、好ましくは親クローン P D 2 0 0 9 によって生産されるモノクローナル抗体から選択されるもの（B A G 3 配列、特にそれぞれがアミノ酸 1 8 ~ 3 3、3 8 5 ~ 3 9 9 又は 5 3 3 ~ 5 4 7 からのアミノ酸配列の単一エピトープを認識する A C - 1、A C - 2 又は A C - 3）を用いることが可能である。検出のためには、モノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体（ポリクローナルの場合、その抗体は、R o s a t i e t a l . , 2 0 0 7 ( a ) に記載されるように、免疫原として使用される全組み換えタンパク質に対して産生される、T O S - 2 という名前のものが好ましい）又は親クローン P D 2 0 0 9 から得られるが捕獲用に用いた抗体と異なるモノクローナル抗体、例えば A C - 1 によって認識されるエピトープと異なるエピトープを認識する A C - 2 若しくは A C - 3 若しくはその 2 つの混合物（それぞれが B A G タンパク質のアミノ酸配列 3 8 5 ~ 3 9 9 及び 5 3 3 ~ 5 4 7 に対応する）等とすることができる第二抗体を用いることが可能である。

30

#### 【0030】

当業者は、上述の B A G 3 の捕獲及び / 又は検出スキームのバリエーションを決定できるが、それらは、上記分析の好ましい具現化について記載されたものと異なるモノクローナル又はポリクローナル抗体が使用されても、本発明に含まれる。例えば、上記方法は、上述のモノクローナル抗体に由来する抗体、組み換え形態で発現したもの（例えば S c F v 断片、ミニ抗体、二重特異性抗体等）又は例えばヒト化等によって修飾されたもの等の使用を含む。

40

#### 【0031】

一般に、可溶性 B A G 3 の検出は、サンドイッチスキームに従って行われており、ここでは、血清中の可溶性タンパク質が、固相上に固定化された第一分子（捕獲工程中における B A G リガンド）と相互作用し、次いで、既に捕獲リガンドに結合している可溶性 B A G 3 タンパク質を異なる部位のレベルにて結合することにより直接又は間接の比色又は蛍

50

光検出を可能にする第二分子と相互作用する。その第二リガンドは、検出リガンドと称される。また、上記方法は、第一捕獲剤又は第二検出剤をマトリックス（固相とも呼ばれる）、例えばマイクロタイタープレート又はビーズ又はチューブの壁に吸着、接着又は共有結合させる分析の具現化を含む。

【0032】

或いは、可溶性BAG3は、分子分離（例えばSDS-PAGEによる）と、例えばウエスタン・ブロット又は分子量に基づいて分離したタンパク質の配列決定による、その後の抗体認識の後でも血清中で検出できる。

【0033】

提案した分析方法は、好ましくは同年代のグループにおける、健康な患者のグループから心臓病患者のグループを分離することを可能にする。更に、それは、予後がより好ましくないリスクのより高い患者（心不全）の亜集団を特定して、同一の心臓病患者を階層化する。

10

【0034】

心臓疾患については、選択された心臓の病状、例えば狭心症、不安定狭心症、心筋梗塞、心不全、急性冠動脈疾患、急性心不全、慢性心不全、薬物からの心臓障害等からなる群から選択されるものが対象とされる。

【0035】

正常又は病的状態の特性を示す血清BAG3の値は、それらが分析に用いたスキームによって変化し得るので、一例のみであるが、以下に報告される。可溶性BAG3の濃度は、平均で $2.38 \text{ ng/ml} \pm 0.32$ であるが、21~43歳のグループでは、BAG3の平均血清濃度は、 $3.13 \text{ ng/ml} (\pm 0.50)$ であり、44~65歳のドナーでは $1.80 \text{ ng/ml} (\pm 0.40)$ である。

20

【0036】

（様々なタイプ及びグレードの）心臓疾患の臨床診断を受けた患者の血清には、49~81歳に含まれる年齢範囲（平均年齢 $68.04 \pm 6.9$ ）で可溶性BAG3タンパク質が存在し、検出されたBAG3の濃度は平均で $8.30 \text{ ng/ml} \pm 0.58$ である。

【0037】

膵臓腺癌によって影響される患者では、一般に、可溶性BAG-3の濃度が $10 \text{ ng/ml}$ より高く、平均が $130.8 \text{ ng/ml} (\pm 59.4)$ である。

30

【0038】

更なる態様によれば、本発明は、病的状態のマーカーとしての可溶性ヒトBAG3タンパク質の使用に係る。特に、上記病的状態は、心臓疾患であり、狭心症、不安定狭心症、心筋梗塞、心不全、急性冠動脈疾患、急性心不全、慢性心不全、心臓の医原性損傷等から選択され、又は膵臓腫瘍、好ましくは腺癌である。

【0039】

特定の理論に縛られるものではないが、膵臓細胞及び心筋細胞によるBAG3の分泌は、心臓の場合には病原性発作から生じる又は膵臓腺癌の場合には酸素及び/又は他の栄養素の欠乏から生じるストレスに対する「生理的」細胞応答を表すこともあり得る。

【0040】

加えて、本発明は、BAG3が高度に保存されるタンパク質であるので、免疫系の標的細胞、好ましくは哺乳動物のマクロファージを活性化するための可溶性ヒトBAG3タンパク質の使用に関する。

40

【実施例】

【0041】

実験パート

例1. 親のハイブリドーマからのAC-1、AC-2、AC-3クローンの単離

モノクローナル抗体AC-1、2及び3を親のハイブリドーマ（2002年12月17日にジェノア先進バイオテクノロジーセンターにてNo. PD02009として預けられ、U.S. 7,537,760に記載されている）からのサブクローニングにより単離し

50

、培地上での E L I S A 分析によって選択した。

【 0 0 4 2 】

例 2 . 心臓疾患を患う患者の血清から可溶性 B A G 3 タンパク質を精製する。

慢性虚血性心疾患にかかる患者の血清をウエスタン・プロットングによって分析した。75 k D に対応するバンドをゲル溶出し ( 図 1 a 参照 )、トリプシン消化によって得られた断片を質量スペクトル ( M A L D I / M S ) によって分析し、「M A S C O T」ソフトウェアを介して同定した。一部のペプチド配列 ( 図 1 b ) の分析は、B A G 3 様のタンパク質の同定を可能にした。

【 0 0 4 3 】

例 3 . ラットにおける心筋ストレスモデルの開発

およそ 2 2 0 ~ 2 5 0 グラムの重さのあるスプラッグ・ドーリー雄ラット ( C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s , I t a l y ) を、ペントバルビタール ( 6 0 m g / k g ) の経口での腹腔内注射により麻酔した。前開胸後、心臓を露出させ、下行冠動脈の近位前方管の縫合を受けた。対照動物は、該動脈の結紮を除き、同一の手順を受けた。その手順の翌日、少なくとも 3 5 % の左心室を取り込む大きな梗塞の存在についての経胸壁心エコー検査によって全生存者を選択した ( I M グループ )。次に、標準的な手順によってラットを犠牲にし、免疫組織化学的手順のため、左心室をホルマリンで処置した。その図は、コントロール及び I M グループを代表する B A G 3 タンパク質の発現データを示す。

10

【 0 0 4 4 】

図 2 は、例 1 に記載される B A G 3 特異的モノクローナル抗体を用いて得た免疫組織化学の結果を示す：大動脈の一時的な閉塞による梗塞の誘発後、ラットからの心臓組織中に、B A G 3 タンパク質レベルの有意な増加が観察された。

20

【 0 0 4 5 】

次いで、ウエスタンプロット分析は、P E I T C ( フェニルイソチオシアネート ) によって誘発された酸化ストレスにさらされた心筋細胞の上澄み中に、B A G 3 タンパク質が放出されることを示した ( 図 3 )。

【 0 0 4 6 】

この実験では、ラット心筋細胞を、集蜜 8 0 % でプレートに蒔き、5 % C O <sub>2</sub> 雰囲気中 3 7 °C の血清がない培地中でインキュベートし、それを 1 0 μ M の P E I T C によって図中に示す時間処置した。

30

【 0 0 4 7 】

実験の終わりで、細胞を収集し、加工した。タンパク質溶解物を、細胞内 B A G 3 の発現レベルを評価するために抗 B A G 3 抗体 ( T O S - 2 及び A C - 1 ) と、負荷コントロールとして用いた抗 G A P D H 抗体とによるウエスタン・プロットによって分析した ( 図 3 A ) ; 図 3 B では、上澄みを集め、アセトン ( 1 : 9 体積 ) を用いて沈殿させ、ウエスタンプロットングによって分析した。

【 0 0 4 8 】

また、B A G 3 の存在は、H e p G 2 ( ヒト肝細胞癌 )、C 6 ( ラットグリア芽腫 )、P a n c - 1 ( ヒト膵臓腺癌 )、A R O ( 未分化甲状腺癌 ) 及び H T - 2 9 ( 結腸直腸腺癌 ) 細胞株の上澄み中でも検出された。試験された各種腫瘍細胞株によって B A G 3 は放出されるが、H U V E C ( ヒト臍帯内皮細胞 ) 等の正常な一次細胞の培地中では放出されない。

40

【 0 0 4 9 】

例 4 . 血清中における B A G - 3 の測定のための E L I S A 試験の開発

B A G 3 タンパク質が心臓疾患を患う患者の血液中で検出できるか否かを試験するため、標準物質として以下に記載されるように調製された B A G 3 組み換えタンパク質を用いる E L I S A 試験を開発した。

【 0 0 5 0 】

試験された B A G - 3 特異的抗体の種々の組み合わせは以下の通りである：

50

a) :

- ・ B A G 3 タンパク質の a a 1 8 ~ 3 3 の配列 ( D R D P L P P G Y E I K I D P Q ) を認識するように設計された第一モノクローナル抗体クローン A C - 1 ;
- ・ 免疫原として全組換えタンパク質 ( R e f S e q : N P \_ 0 0 4 2 7 2 ) を用いることにより開発され、代わりに A C - 1 抗体によって捕捉された B A G 3 タンパク質の検出物質として使用された T O S - 2 という名の第二ポリクローナル抗体 ;

b) :

- ・ 第一モノクローナル抗体クローン A C - 1 ;
- ・ B A G 3 タンパク質の a a 3 8 5 ~ 3 9 9 の配列 ( S S P K S V A T E E R A A P S ) を認識するように設計され、検出物質として使用された A C - 2 という名の第二モノクローナル抗体 ;

c) :

- ・ 第一モノクローナル抗体クローン A C - 1 ;
- ・ B A G 3 タンパク質の a a 5 3 3 ~ 5 4 7 の配列 ( D K G K K N A G N A E D P H T ) を認識するように設計され、検出物質として使用された A C - 3 という名の第二モノクローナル抗体 ;

d) :

- ・ 第一モノクローナル抗体クローン A C - 1 ;
- ・ 検出物質として使用された A C - 2 及び A C - 3 の混合物 ;

e) :

- ・ 第一モノクローナル抗体クローン A C - 2 ;
- ・ 検出物質としての、A C - 1、又は A C - 3、又は A C - 1 及び A C - 3 抗体の混合物 ;

f) :

- ・ 第一モノクローナル抗体クローン A C - 3 ;
- ・ 検出物質としての、A C - 1、又は A C - 2、又は A C - 1 及び A C - 2 抗体の混合物 ;

#### 【 0 0 5 1 】

試験した全ての組み合わせは、定量的に、E L I S A 試験によって、患者の血清中における可溶性 B A G - 3 の存在を確認することができる。図 4 中の説明に役立つ例は、3 % ウシ血清アルブミン ( B S A ) が加えられた食塩水中に再構成された組み換え B A G 3 タンパク質のスカラー濃度による校正曲線の展開を示す。

#### 【 0 0 5 2 】

上記組み換えタンパク質は、N C B I P u b M e d 配列 : N M \_ 0 0 4 2 8 1 . 3 ヒトのヌクレオチド 1 ~ 2 6 0 8 に対応する B A G 3 タンパク質をコードする c D N A から作られ、乳癌細胞株 M C F - 7 から得られた R N A 全体からの P C R によって増幅され、次いで、制限酵素 N c o I / X h o I を用いて発現ベクター p E T 3 0 a ( + ) ( N o v a g e n ) 中でクローン化された。

#### 【 0 0 5 3 】

得られた組み換えタンパク質を 6 つのヒスチジン残基に融合したものを大腸菌内で発現させ、H i s T r a p H P カラム ( G E ヘルスケア ) を用いた親和性クロマトグラフィーによって精製した。

#### 【 0 0 5 4 】

次いで、9 6 ウェルマイクロプレートを、A C - 1 抗体を含有する溶液を加えることにより、機能化し、その後、非特異的な相互作用を防ぐため、遮断溶液を用いて処置した。その後、組み換えタンパク質を図中に示す濃度で加え、ポリクローナル抗体 T O S - 2 によって示された。その信号は、ヒドロペルオキシダーゼ ( H R P ) に結合した抗ウサギ二次抗体の使用と、その後の T M B 試薬 ( e B i o s c i e n c e , U K ) の添加とによって得られた。

#### 【 0 0 5 5 】

10

20

30

40

50

上記分析は、心不全を患う患者の血清中における可溶性BAG3タンパク質を分析するのに有用であることが証明された。

【0056】

例5．心臓疾患及び膵臓癌を患う患者の血清上でのELISA分析の検証

どんな種類の顕在的な疾患をも患っていない対象におけるBAG3の血清濃度を調べるため、健康なドナーから血清を集めた。ドナーの年齢の範囲は21～65歳であった。検出したBAG3の濃度は平均で $2.38 \text{ ng/ml} \pm 0.32$ であった。

【0057】

年齢に関係した濃度の差異がわずかにあった。具体的に、21～43歳の年齢グループでは、BAG3の平均血清濃度が $3.13 \text{ ng/ml} (\pm 0.50)$ であり、44～65歳のドナーでは、それが $1.80 \text{ ng/ml} (\pm 0.40)$ である(図5)。

10

【0058】

次いで、可溶性BAG3タンパク質の存在を分析するため、(様々なタイプ及びグレードの)心臓疾患の臨床診断を受けた38人の患者から血清を集めた。試験した患者の年齢範囲は、49～81歳(平均年齢 $68.04 \pm 6.9$ )であった。検出したBAG3の濃度は平均で $8.30 \text{ ng/ml} \pm 0.58$ である。

【0059】

心臓疾患を患う患者と健康なドナー間の差異は、全体と同年代の患者の双方で、非常に有意なものである(図6)。

【0060】

更に、心不全にかかっている対象とかかかっていない対象からなる心臓疾患を患う患者の中から、2つの集団を認識し、図8に記載されるように、BAG3タンパク質の異なる血清レベルによって特徴付けられた。なお、図8は、非代償性でない心臓疾患を患う患者と比較した心不全の診断を受けた患者におけるBAG3の血清濃度を図示する。

20

【0061】

更に、膵臓癌、結腸癌又は肺癌を患う幾人かの患者においても可溶性BAG3の血清レベルを測定した。以下の表1に示されるように、膵臓癌を患う患者のみに於いて、 $70 \text{ ng/ml}$ を超える血清レベルが測定された。

【0062】

【表1】

30

表1. 癌患者の血清中における可溶性BAG-3のレベル

膵臓腺癌	BAG-3の血清濃度(ng/ml)
患者1膵臓	222.5
患者2膵臓	157.6
患者3膵臓	102.7
患者4膵臓	77.4
患者5膵臓	94
結腸癌	
患者1結腸	0
患者2結腸	0
患者3結腸	0
肺癌	
患者1肺	0
患者2肺	0

40

【0063】

例6．ELISA分析の感度及び特異性の決定

次いで、心不全を患う患者におけるBAG3タンパク質の検出のためのELISA分析

50

の感度及び特異性の値を明確にするため、得られたデータを統計分析のプログラムを介して分析した。

【0064】

カットオフ値として2.76 ng/mlを用い、感度及び特異性の値はそれぞれ83.3%及び77.08%であり、陽性及び陰性予測値はそれぞれ75%及び88.1%である。図7は、示されたカットオフで得たROC曲線を示す。

【0065】

例7. 可溶性BAG3タンパク質の機能活性の特徴付け

血清中に放出されたタンパク質の血球上での役割の可能性を決定するため、組み換えBAG3タンパク質をマクロファージ活性化分析に用いた。このため、マウス単球J774細胞株を、陽性コントロールとしてリポ多糖(LPS)等の炎症促進剤を用い、異なる濃度の組み換えBAG3タンパク質によって処置した。J774細胞を集蜜60%にてプレート上に蒔き、濃度が250、500 ng/ml及び1 mg/mlの組み換えBAG3タンパク質と共に又はそれを濃度が10 ng/mlのLPSと組み合わせたものと共に24時間インキュベートした。

【0066】

実験の終わりで、細胞を収集し、加工した。タンパク質溶解物を、酵素の発現レベルを評価するために抗iNOS抗体(iNOS:誘導型一酸化窒素合成酵素)を用い、また、負荷コントロールとして使用されるGAPDHに対する抗体を用いたウエスタン・ブロットによって分析した。そのデータを図9a)に示す。

【0067】

更に、培地中の亜硝酸塩の生成は、単球活性化と相関しており、Griess試薬(1%スルファニルアミド、0.1%ナフチルエチレンジアミン、5%リン酸)を用いて検証され、ベックマンDU-62分光光度計において550 nMにて測定した(図9b)。

【0068】

図9b)は、組み換えタンパク質が、500 ng/mlの濃度にて、コントロール(未処置細胞からなる)と比べて亜硝酸塩の生成を3倍に増大させることを示す( $p < 0.001$ );更に、その活性は用量依存的である(図9a及びb)。

【0069】

次いで、BAG3組み換えタンパク質を、フルオロタグFITC結合キット(Sigma)を用い、FITCに結合させた。等しい量のBSA-FITC(陰性コントロール)及びrBAG3-FITCを培地に1時間加えた。次に、細胞を3.7%ホルムアルデヒド溶液によって固定し、Zeiss LSM共焦点顕微鏡によって分析した。

【0070】

J774細胞表面へのBAG3タンパク質の結合は、フルオロフォアと結合した組み換えタンパク質の使用により確認された(図10)。BAG3結合は、他のタンパク質、例えばBSAがBAG3の代わりに使用された場合に観察されないため、特異的である。

【0071】

参考文献

1. Bonelli, P., Petrella A., Rosati, A., Romano, M.F., Lerose, R., Pagliuca, M. G., Amelio, T., Festa, M., Martire, G., Venuta, S., Turco, M.C., and Leone, A. (2004). BAG3 protein regulates stress-induced apoptosis in normal and neoplastic leukocytes. *Leukemia* 18, 358-360.
2. Bruno, A.P., Festa, M., Dal Piaz, F., Rosati, A., Turco, M.C., Giuditta, A., Marzullo, L. (2008). Identification of a synaptosome-associated form of BAG3 protein. *Cell Cycle* 7(19), 3104-3105.
3. Carra, S., Seguin, S.J., Landry, J. (2008a). HspB8 and Bag3: a new chaperone complex targeting misfolded proteins to macroautophagy. *Autophagy* 4(2), 237-239.
4. Carra, S., Seguin, S.J., Lambert, H., Landry, J. (2008b). HspB8 chaperone ac

10

20

30

40

50

tivity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy. *J Biol Chem* 18, 283(3), 1437-1444.

5 .Chen, L., Wu, W., Dentchev, T., Zeng, Y., Wang, J., Tsui, I., Tobias, J.W., Bennett, J., Baldwin, D., Dunaief, J.L. (2004). Light damage induced changes in mouse retinal gene expression. *Exp Eye Res* 79(2), 239-247.

6 .Chiappetta, G., Ammirante, M., Basile, A., Rosati, A., Festa, M., Monaco, M., Vuttariello, E., Pasquinelli, R., Arra, C., Zerilli, M., Todaro, M., Stassi, G., Pezzullo, L., Gentilella, A., Tosco, A., Pascale, M., Marzullo, L., Belisario, M.A., Turco, M.C. and Leone, A. (2007). The antiapoptotic protein BAG3 is expressed in thyroid carcinomas and modulates apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Clin Endocrinol Metab* 92(3), 1159-1163.

7 .Franceschelli, S., Rosati, A., Le Rose, R., Turco, M.C., Pascale, M. (2008). Bag3 gene expression is regulated by heat shock factor 1. *J Cell Physiol* 19, 215(3), 575-577.

8 .Gentilella, A., Passiatore, G., Deshmane, S., Turco, M.C., Khalili, K. (2008). Activation of BAG3 by Egr-1 in response to FGF-2 in neuroblastoma cells. *Oncogene* 28, 27(37), 5011-5018.

9 .Homma, S., Iwasaki, M., Shelton, G.D., Engvall, E., Reed, J.C., Takayama, S. (2006). BAG3 deficiency results in fulminant myopathy and early lethality. *Am J Pathol* 169(3), 761-773.

10 .Iwasaki, M., Homma, S., Hishiya, A., Dolezal, S.J., Reed, J.C., Takayama, S. (2007). BAG3 regulates motility and adhesion of epithelial cancer cells. *Cancer Res* 1, 67(21), 10252-10259.

11 .Kassis, J.N., Guancial, E.A., Doong, H., Virador, V., Kohn, E.C. (2006). C-AIR-1/BAG-3 modulates cell adhesion and migration by downregulating activity of focal adhesion proteins. *Exp Cell Res* 10, 312(15), 2962-2971.

12 .Liao, Q., Ozawa, F., Friess, H., Zimmermann, A., Takayama, S., Reed, J.C., Kleeff, J. & Buchler, M.W. (2001). The anti-apoptotic protein BAG-3 is overexpressed in pancreatic cancer and induced by heat stress in pancreatic cancer lines. *FEBS Lett* 503, 151-157.

13 .Pagliuca, M.G., Lerose, R., Cigliano, S. and Leone, A. (2003). Regulation by heavy metals and temperature of the human BAG-3 gene, a modulator of Hsp70 activity. *FEBS Lett* 541, 11-15.

14 .Romano, M.F., Festa, M., Putrella, A., Rosati, A., Pascale, M., Bisogni, R., Poggi, L., Kohn, E.C., Venuta, S., Turco, M.C. and Leone, A. (2003b). BAG3 protein regulates cell survival in childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Biol Ther* 2, 508-510.

15 .Romano, M.F., Festa, M., Pagliuca, G., Lerose, R., Bisogni, R., Chiurazzi, F., Storti, G., Volpe, S., Venuta, S., Turco, M.C. and Leone, A. (2003a). BAG3 protein controls B-chronic lymphocytic leukaemia cell apoptosis. *Cell Death Differ* 10, 383-385.

16 .Rosati, A., Leone, A., Del Valle, L., Amini, S., Khalili, K. and Turco, M.C. (2007a). Evidence for BAG3 modulation of HIV-1 gene transcription. *J Cell Physiol* 210(3), 676-683.

17 .Rosati, A., Ammirante, M., Gentilella, A., Basile, A., Festa, M., Pascale, M., Marzullo, L., Belisario, M.A., Tosco, A., Franceschelli, S., Moltedo, O., Pagliuca, G., Lerose, R. and Turco, M.C. (2007b). Apoptosis inhibition in cancer cells: a novel molecular pathway that involves BAG3 protein. *IJBCB* 39 7-8, 1337-1342.

10

20

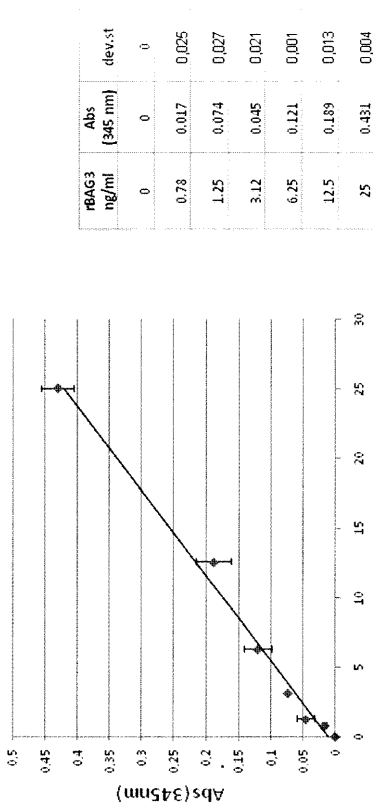
30

40

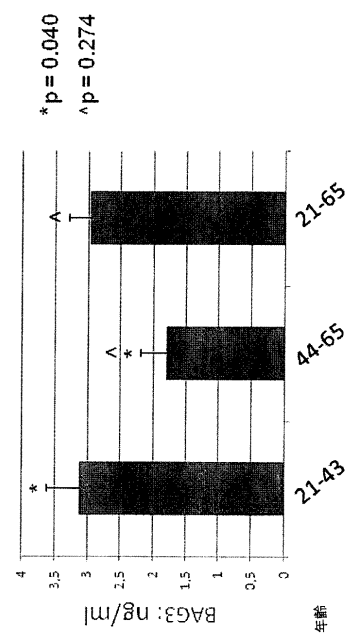
50

18 .Tabuchi, S., Asaeda, M., Kamitan, H., Watanabe, T. (2006). Surgical treatment of arteriovenous malformation in a patient with human immunodeficiency virus infection and hemophilia a: case report. J Stroke Cerebrovasc Dis 15(2), 66-8.

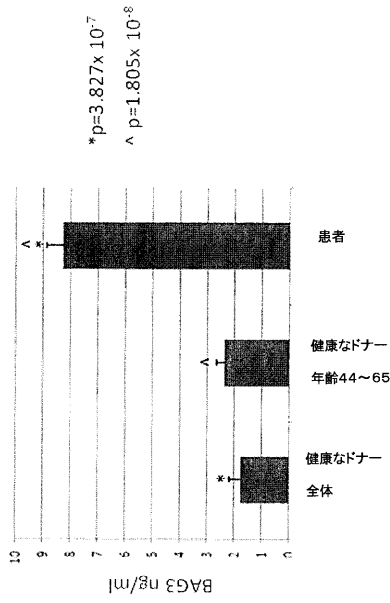
【 図 4 】



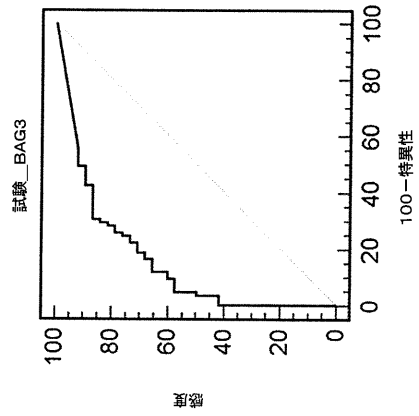
【 図 5 】



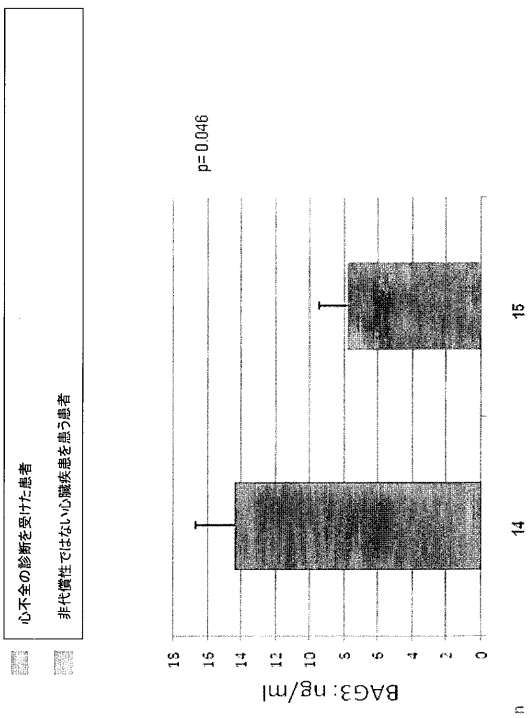
【 図 6 】



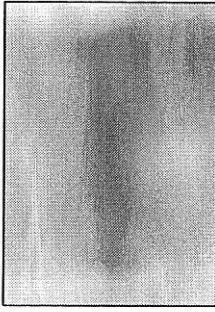
【 図 7 】



【 図 8 】



a)

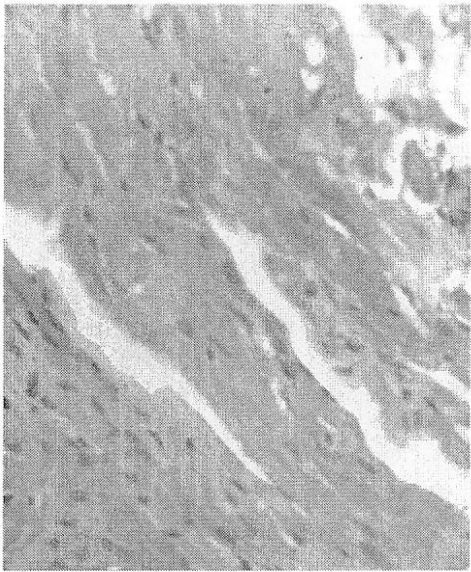


100 kDa

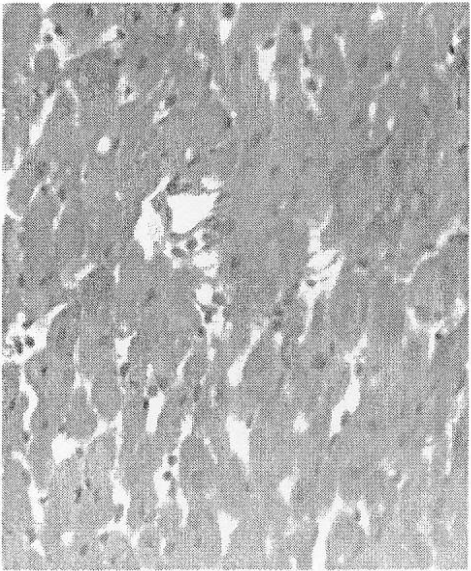
b)

開始一末端	観察された Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	ミス配列
32 - 47	1915.8500 1914.8427 1914.9013	-31	K.IDPQTGWPFVVDHNSR.T	
48 - 55	990.3800 989.3727 989.4567	-85	R.TTTWNDPR.V	
63 - 73	1062.4700 1061.4627 1061.4738	-10	K.DTASSANGPSR.N	
78 - 82	611.4200 610.4127 610.4166	-6	R.LLPIR.E	
109 - 123	1764.8800 1763.8727 1763.8856	-7	R.QPHILFHAYSQPGVQR.F	
200 - 209	1081.5600 1080.5527 1080.5676	-14	R.SSLGSHQLPR.G	
256 - 267	1481.7300 1480.7227 1480.7423	-13	K.IQGDDWEPRPLR.A	

【 図 2 】

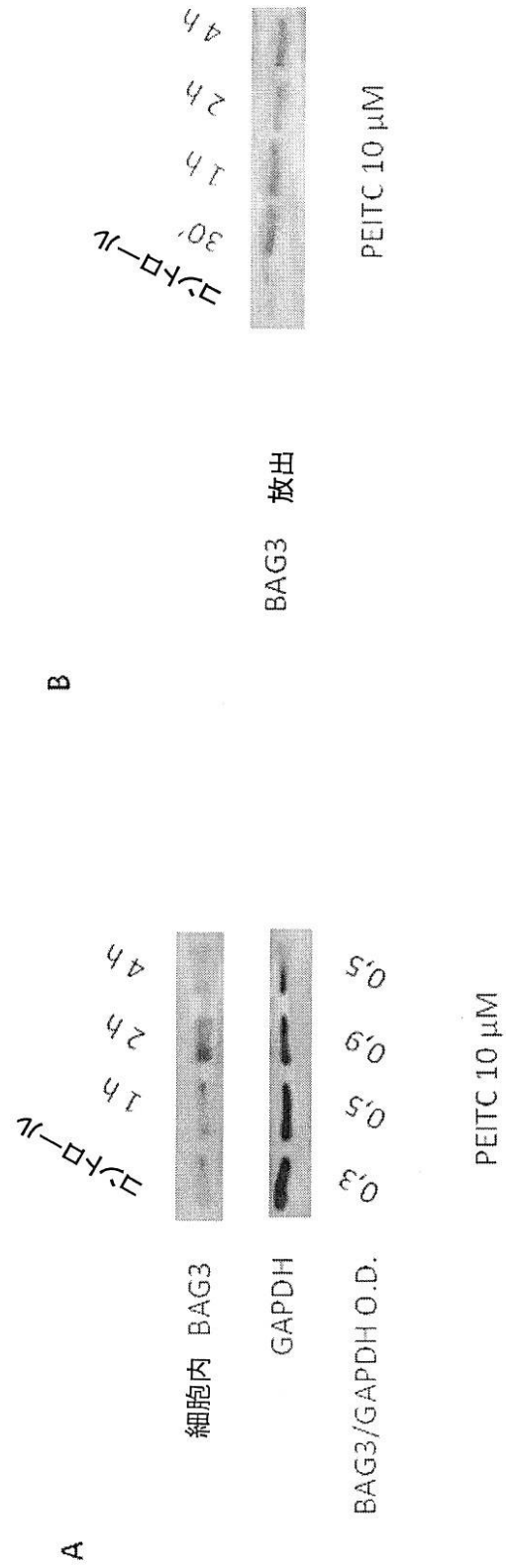


MI



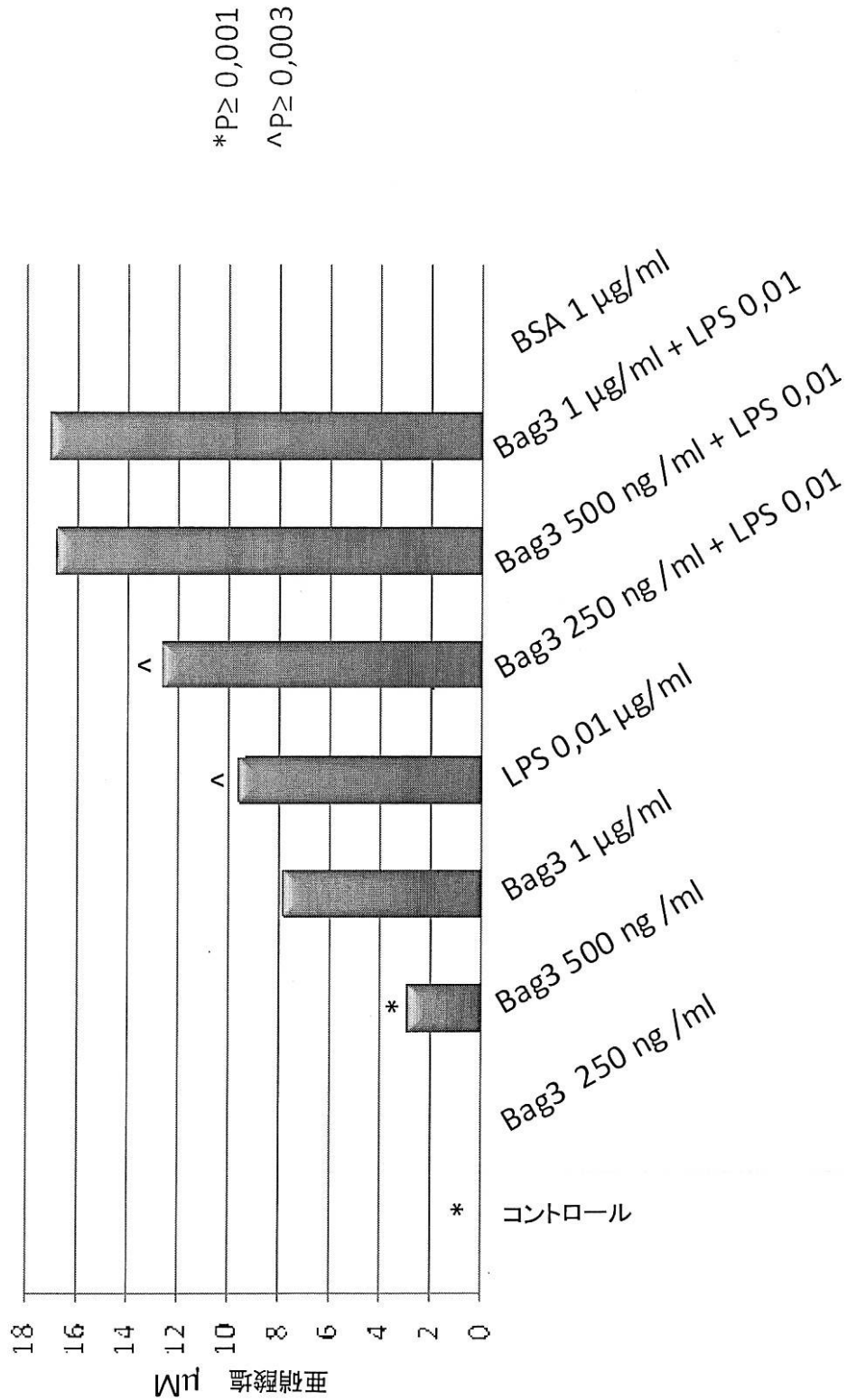
コントロール

【 図 3 】





【図9b】



【配列表】

2013513101000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成24年6月5日(2012.6.5)

【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】

未知の生体サンプル中における可溶性 B A G 3 タンパク質の存在及び / 又は濃度を検出する方法であって、

- a . 血清又は血漿からなる生体サンプルを得る工程と、
- b . 前記生体サンプル中における可溶性 B A G 3 の存在又は濃度値を決定する工程と、
- c . 前記サンプルから得られた値を基準値又は生体基準サンプルから得られた値と比較する工程と、
- d . 任意には、類似の値の更なるグループ分け又は統計的に異なる平均値を持つグループへの分割を決定する工程と、
- e . 可溶性 B A G 3 の存在及び / 又はレベルを病的状態と結び付ける工程とを含む方法。

## 【請求項 2】

前記病的状態が、心臓疾患又は膵臓癌の病状からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

決定工程 b ) が、可溶性 B A G 3 に対して特異的なリガンドを用いて行われる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記生体サンプルがヒト由来のものである、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 5】

抗凝固物質を前記生体サンプルに加える、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 6】

前記特異的なリガンドが抗体である、請求項 3 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 7】

決定工程 b ) が、モノクローナル、ポリクローナル若しくは組み換えの抗 B A G 3 抗体又はそれらの断片 ( s c F v 、二重特異性抗体、ミニ抗体 ) を用いて行われる、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記抗体が、モノクローナルであり、B A G 3 一次配列のアミノ酸配列 1 8 ~ 3 3 、 3 8 5 ~ 3 9 9 若しくは 5 3 3 ~ 5 4 7 からなる群から選択される少なくとも 1 種の B A G 3 エピトープを認識するか、又はヒト化された若しくは組み換えにより修飾されたその組み換え誘導体である、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記抗体又はリガンドが、フルオロフォア、発色団又は基質を発色団に変換できる酵素で標識されている、請求項 3 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 10】

決定工程 b ) が、B A G 3 捕獲リガンド及び検出リガンドによるサンドイッチ E L I S A を用いて行われ、ここで、一番目及び二番目がモノクローナル抗体であり、第二抗体が、使用した捕獲抗体によって認識されるものと異なるエピトープを認識するか又は複数のモノクローナル抗体の混合物である、請求項 3 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 11】

前記病的状態が心臓疾患である、請求項 6 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 12】

前記心臓疾患 ( 工程 ( e ) ) が、狭心症、梗塞前狭心症、心筋梗塞、心不全、急性冠動脈疾患、急性心不全、慢性心不全又は医原性心臓疾患からなる群から選択される、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 13】

酸化ストレスに関連した病的状態の血清マーカーとしての、ヒト可溶性 B A G 3 タンバ

ク質の使用。

【請求項 1 4】

前記病的状態が心臓疾患又は膵臓癌である、請求項 1 3に記載の使用。

【請求項 1 5】

前記心臓疾患が、狭心症、梗塞前狭心症、心筋梗塞、心不全、急性冠動脈疾患、急性心不全、慢性心不全及び医原性心臓疾患からなる群から選択される、請求項 1 4に記載の使用。

【請求項 1 6】

血清からなる生体サンプル中における可溶性 B A G 3 を検出し及び該可溶性 B A G 3 に投薬するための、並びに癌又は心臓病患者の病的状態を特定するためのキットであって、( B A G 3 一次配列についての ) アミノ酸配列 1 8 ~ 3 3、3 8 5 ~ 3 9 9 若しくは 5 3 3 ~ 5 4 7 からなる群から選択される B A G - 3 エピトープを認識する少なくとも 1 種の抗体又はそのヒト化された若しくは組み換えにより修飾された組み換え誘導体と、前記サンプルに投薬するための標準 B A G 3 タンパク質とを備えるキット。

【請求項 1 7】

前記標準 B A G 3 タンパク質が組み換え体である、請求項 1 6に記載のキット。

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/EP2010/068836
<b>Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)</b>		
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:	
a.	(means)	
	<input checked="" type="checkbox"/>	on paper
	<input checked="" type="checkbox"/>	in electronic form
b.	(time)	
	<input type="checkbox"/>	in the international application as filed
	<input type="checkbox"/>	together with the international application in electronic form
	<input checked="" type="checkbox"/>	subsequently to this Authority for the purpose of search
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3.	Additional comments:	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/068836

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/574 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> 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		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/055908 A2 (LEONE ARTURO [IT]; TURCO MARIA CATERINA [IT]) 10 July 2003 (2003-07-10) claims 9,23,29	15
X	EP 1 323 733 A1 (LEONE ARTURO [IT]; TURCO MARIA CATERINA [IT]) 2 July 2003 (2003-07-02) paragraph [0035]	15
<input 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. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 April 2011		26/04/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Rosin, Oliver

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/068836

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03055908	A2	10-07-2003	AT 495193 T 15-01-2011
			AU 2002364302 A1 15-07-2003
			CA 2471924 A1 10-07-2003
			EP 1323733 A1 02-07-2003
			EP 1465927 A2 13-10-2004
			US 2009306192 A1 10-12-2009
			US 2005176660 A1 11-08-2005
-----			
EP 1323733	A1	02-07-2003	AT 495193 T 15-01-2011
			AU 2002364302 A1 15-07-2003
			CA 2471924 A1 10-07-2003
			WO 03055908 A2 10-07-2003
			EP 1465927 A2 13-10-2004
			US 2009306192 A1 10-12-2009
			US 2005176660 A1 11-08-2005
-----			

---

フロントページの続き

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

专利名称(译)	生化血清标记物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013513101A</a>	公开(公告)日	2013-04-18
申请号	JP2012541519	申请日	2010-12-03
申请(专利权)人(译)	生物技术的Uni的Versa Soshietta一个Resuponsabirita Rimitata		
[标]发明人	ツルコマリアカテリナ		
发明人	ツルコ・マリア・カテリナ		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/577 C07K14/46		
CPC分类号	G01N33/57438 G01N33/6893 G01N2800/32		
FI分类号	G01N33/543.501.A G01N33/53.D G01N33/577.B C07K14/46.ZNA		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71		
代理人(译)	永井道雄		
优先权	102009901790236 2009-12-04 IT		
其他公开文献	JP5677450B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及测定未知生物样品中可溶性BAG3蛋白的存在和/或浓度的方法，该分析优选通过ELISA分析用抗体，优选单克隆抗体进行。可溶形式的上述蛋白质的存在与心脏病或胰腺肿瘤的存在有关。

a)

100 kDa



b)

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
32 - 47	1915.8600	1914.8427	1914.9013	-31	K.IDPQTGWPFVVDHNSRT
48 - 55	990.3800	989.3727	989.4567	-85	R.TTTWNDPR.V
63 - 73	1052.4700	1051.4627	1051.4738	-10	K.DTASSANGPSR.N
78 - 82	611.4200	610.4127	610.4166	-6	R.LLPIR.E
109 - 123	1764.8800	1763.8727	1763.8856	-7	R.QPHLFHAYSQPGVQR.F
200 - 209	1081.5600	1080.5527	1080.5676	-14	R.SSLGSHQLPR.G
256 - 267	1481.7300	1480.7227	1480.7423	-13	K.IGGDDWEPRPLR.A