

(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2009-500597  
(P2009-500597A)

(43) 公表日 平成21年1月8日(2009.1.8)

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)  
 GO 1 N 33/68 (2006.01) GO 1 N 33/68 2 GO 4 5  
 GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2008-518876 (P2008-518876)  
 (86) (22) 出願日 平成18年6月22日 (2006. 6. 22)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年2月28日 (2008. 2. 28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/ES2006/000367  
 (87) 国際公開番号 W02007/003670  
 (87) 国際公開日 平成19年1月11日 (2007. 1. 11)  
 (31) 優先権主張番号 P200501611  
 (32) 優先日 平成17年7月1日 (2005. 7. 1)  
 (33) 優先権主張国 スペイン (ES)

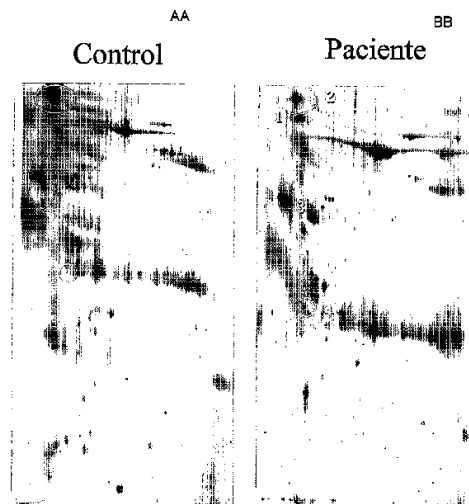
(71) 出願人 506061716  
 プロイェクト、デ、ピオメディシナ、シー  
 マ、ソシエダッド、リミターダ  
 PROYECTO DE BIOMEDI  
 CINA CIMA, S. L.  
 スペイン国ナバーラ、シスール、マヨール  
 、カリエ、エトセサカン、28、オフィシ  
 ナ、5、プランタ、バハ  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100106518  
 弁理士 松谷 道子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 線維症のマーカー

(57) 【要約】

本発明は、線維化変性のインビトロ検出のための、ウロモジュリン、MAC2BP、AGP1およびカテプシン A の中から選択される少なくとも2つのマーカーの組合せの使用に関する。さらに、本発明は、生物試料中の該マーカーのレベルの測定のためのキットに関する。



AA CONTROL  
 BB PATIENT

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

線維化変性のインビトロ検出のための、ウロモジュリン、MAC2BP、AGP1およびカテプシン A から選ばれる少なくとも 2 つのマーカの組み合わせの使用。

**【請求項 2】**

a) 生物試料を得ること；および

b) 試料中の該マーカの濃度を測定すること

を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の使用。

**【請求項 3】**

該生物試料が、血液、血漿、血清および尿から選択されることを特徴とする、請求項 2 に記載の使用。

10

**【請求項 4】**

該生物試料が、哺乳動物由来であることを特徴とする、請求項 2 または 3 に記載の使用。

**【請求項 5】**

該生物試料が、男性または女性のヒト由来であることを特徴とする、請求項 2 - 4 のいずれかに記載の使用。

**【請求項 6】**

さらに、マーカのレベルを参照値と比較することを含むことを特徴とする、請求項 1 - 5 のいずれかに記載の使用。

20

**【請求項 7】**

参照値の少なくとも 2 倍のレベルが、線維化変性の存在に関連づけられることを特徴とする、請求項 6 に記載の使用。

**【請求項 8】**

該線維化変性が、肺、延髄、肝臓、膵臓、腎臓、心臓または多臓器の線維症から選択されることを特徴とする、請求項 1 - 7 のいずれかに記載の使用。

**【請求項 9】**

該線維化変性が、肝線維症であることを特徴とする、請求項 1 - 8 のいずれかに記載の使用。

**【請求項 10】**

該マーカの濃度が、比色分析、分光光度、NMR、クロマトグラフィー、電気泳動、イムノアッセイまたは該方法の組み合わせから選択される方法により測定されることを特徴とする、請求項 1 - 9 のいずれかに記載の使用。

30

**【請求項 11】**

請求項 1 で特定されたマーカの 3 つの組み合わせを含むことを特徴とする、請求項 1 - 10 のいずれかに記載の使用。

**【請求項 12】**

ウロモジュリン、MAC2BP、AGP1およびカテプシン A の 4 つのマーカの組み合わせを含むことを特徴とする、請求項 1 - 11 のいずれかに記載の使用。

**【請求項 13】**

該マーカの濃度が、少なくとも 2 つのマーカに対する特異的なプローブを使用して測定されることを特徴とする、請求項 2 - 12 のいずれかに記載の使用。

40

**【請求項 14】**

プローブの少なくとも 1 つが特異的な抗体であることを特徴とする、請求項 12 に記載の使用。

**【請求項 15】**

ウロモジュリン、MAC2BP、AGP1およびカテプシン A の 2、3 または 4 のいずれかの組み合わせに対し特異的なプローブを含むことを特徴とする、ウロモジュリン、MAC2BP、AGP1 およびカテプシン A から選択される少なくとも 2 つのマーカのレベルを測定するためのキット。

50

**【請求項 16】**

少なくとも1つのプローブが、特異的抗体であることを特徴とする、請求項15に記載のキット。

**【請求項 17】**

イムノアッセイ用のキットであることを特徴とする、請求項15または16のいずれかに記載のキット。

**【請求項 18】**

イムノクロマトグラフィー用のキットであることを特徴とする、請求項15 - 17のいずれかに記載のキット。

**【請求項 19】**

E L I S A用のキットであることを特徴とする、請求項15 - 17のいずれかに記載のキット。

**【請求項 20】**

さらに、二次抗体、トレーサー、緩衝液、希釈剤、標準、キャリブレーションコントロール、テストカートリッジ、バイアル、クロマトグラフィーストリップ、マイクロプレートおよび使用説明書から選択される他の成分を含むことを特徴とする、請求項15 - 19のいずれかに記載のキット。

**【請求項 21】**

線維症の存在および重篤度の評価用の適応または同等の適応でラベルされたパッケージングを含むことを特徴とする、請求項15 - 20のいずれかに記載のキット。

**【請求項 22】**

肝線維症の存在および重篤度の評価用の適応を有する、請求項21に記載のキット。

**【請求項 23】**

ラベルが、尿中の測定用の適応も含む、請求項21に記載のキット。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】****要約**

本発明は、線維化変性のインビトロ検出のための、ウロモジュリン (uromodulin)、MA C2BP、AGP1およびカテプシン A から選択される少なくとも2つのマーカーの組合せの使用に関する。さらに、本発明は、また、生物試料中の該マーカーのレベルの測定のためのキットに関する。

**記載**

本発明は、線維症同定のための生物学的マーカーに関する。

**【背景技術】****【0002】**

線維化変性または疾患は、罹患 / 死亡の主な原因の一つを構成し、それらの慢性的な性質は、患者および社会にかなりの経済的負担を及ぼす。肝臓、肺、腎臓、心臓、血管および皮膚を含む器官および組織の進行性の線維化は、さまざまなメカニズムに関連した変性を含む。これらの変性のそれぞれは、共通して、細胞外マトリックス、主にコラーゲンの過剰な、変化した蓄積を有し、それは、正常な組織構造の無秩序化、そして、結果的に、機能喪失を伴う。

**【0003】**

とりわけ、肝臓の線維化は、慢性肝臓損傷の主な合併症であり、その進行は、長期間で肝硬変を導く。最も頻繁な肝臓の線維化の原因は、アルコールの摂取、C型肝炎ウイルスによる感染および非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) である。さらに、それは、肝不全および門脈高血圧の進行に大きく寄与する。

**【0004】**

結果的に、肝臓の線維化の存在および重篤度の評価は、臨床診療における重要なパラメーターであり、肝硬変進行の危険性の有益な指標を構成する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 5 】

さらに、線維化の存在および重篤度を評価する適切な方法の利用性は、潜在的抗線維化分子の探索における、測定ツールである。

## 【 0 0 0 6 】

肝臓生検およびそれに続く組織学的検討は、今日においてもなお、肝線維症を評価する参照技術である。それにもかかわらず、それは、適用の制限された費用のかかる技術であり、侵襲的で、痛みを伴い、そして、個人の健康に対し合併症の原因ともなり得る。この方法の正確性および再現性は、組織標本の抽出および観察者間および観察者内での変動による問題のために、かなり疑問である。

## 【 0 0 0 7 】

化学および血液学の通常の分析、生理学的試験および血清線維症マーカー等のあらゆるアプローチが、その進行を測定するために提案されてきた。

## 【 0 0 0 8 】

細胞外マトリックス蛋白質または血清中のその合成および分解産物の測定が、例えば、示唆されてきた (US-5,316,914, EP-0283779)。

## 【 0 0 0 9 】

US6,631,330は、一連の臨床血清学パラメーター(マーカー)に基づく、2元記号論理学回帰モデルを用いた方法を提案する。このスキームは、ファイブロテスト(Fibrotest)(Biopredictive、パリ、フランス)、5つの間接的な血清線維症マーカーの評価を組み合わせた線維症インデックスを発達させるために使用された。ファイブロスキャン(FibroScan)(Echosens、パリ、フランス)(Sandrin L. et al. 2003. "Transient elastography: a new non-invasive method for assessment of hepatic fibrosis"; Ultrasound Med. Biol. 29: 1705-1713)と組み合わせられて適用されるこの試験は、C型肝炎ウイルス感染における線維症の進行を評価するために好適に機能するようである。

## 【 0 0 1 0 】

WO2004/063753は、血清N-グリカン蛋白質のプロフィールの分析に基づく評価法を提案する。

## 【 0 0 1 1 】

それにもかかわらず、実施が簡便で、非侵襲的であり、肝線維症の程度を適切に評価できる、新しい簡潔な方法が、とりわけ、線維症の比較的軽篤でないステージにおいて、なお必要である。

## 【 0 0 1 2 】

多くの病的進行が、体液の分子構成の定量的および機能的変化に関連するという証拠が存在する。尿は容易に入手できる体液なので、線維症インジケータ分析物、例えば、尿中に検出可能な蛋白質の測定および定量に基づく肝線維症の評価方法の発展が、大変好ましく、有利である。

## 【 0 0 1 3 】

したがって、本発明の目的は、生物試料、好ましくは尿において、検出可能である相違するインジケータ分析物の測定および定量により、肝線維症の、そして、また、他の重要な臓器の線維症の存在および重篤度を評価する方法の発展である。このために、健常人および肝線維症を有する個人の尿中における、相違する蛋白質発現パターン(プロテオーム)を解析し、それによりバイオマーカーの候補として種々の蛋白質の選別を可能にする。

## 【 0 0 1 4 】

図面の簡単な説明

図1 肝線維症の患者における尿サンプル中の、ウロモジュリン(uromodulin)、MAC2BP、AGP1およびカテプシンAの増加および出現の同定。患者および対照個人からの代表的なゲルが示される。ことなるスポットは、1:ウロモジュリン、2:MAC2BP、3:AGP1および4:カテプシンAとして同定される。

## 【 発明の開示 】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 5 】

第一の態様において、本発明は、線維変化のインピトロ検出のための、ウロモジュリン (uromodulin)、MAC2BP、AGP1およびカテプシン A から選択される少なくとも2つのマーカーの組合せの使用に関する。この使用は、それが、生物学的サンプルを得ること、およびサンプル中の該マーカーの濃度を測定することを含むことを特徴とする。

## 【 0 0 1 6 】

さらに、本発明は、線維変化の存在（または非存在）および重篤度（進行のステージまたは程度）を評価する方法に関する。

## 【 0 0 1 7 】

該方法は、それが、

- a) 生物試料を得ること；
- b) -ウロモジュリン
  - MAC2BP
  - AGP1、および
  - カテプシン A

から選択される、該サンプル中の少なくとも2つのマーカーのレベルを決定すること、を特徴とする。

## 【 0 0 1 8 】

用語「マーカー」は、量が評価される分子または化合物に関する。本発明の方法において、レベルが測定される4つのマーカーは、蛋白質である。生物試料における該マーカーの存在 - 非存在または増加 - 減少は、線維化変性の存在または重篤度の指標である。

## 【 0 0 1 9 】

用語「ウロモジュリン」は、シンボルUMOD(LOCUSLINK: 7369 ホモサピエンス; UNIGENE : Hs. 164470)によりヒトにおいて同定される遺伝子により、そのアイソフォームのいずれかで、およびいずれかの動物種において、コードされる蛋白質に関する。該蛋白質は、ウロムコイド (Uromucoid) またはタム・ホースフォール (Tamm - Horsfall) 糖蛋白質 (T HP) としても知られる。特定の実施態様において、蛋白質はヒト蛋白質 (Swiss-Prot Accession number P07911, Last update: Release 47 10-May-2005) である。

## 【 0 0 2 0 】

用語「MAC2BP」は、シンボル「LGALS3BP」(LOCUSLINK: 3949 ホモサピエンス; UNIGENE : Hs. 514535)によりヒトにおいて同定される遺伝子により、そのアイソフォームのいずれかで、およびいずれかの動物種において、コードされる蛋白質に関する。該蛋白質は、「ガレクチン - 3 結合蛋白質 (Galectin-3 binding protein)」、「Mac - 2 結合蛋白質 (MAC2BP)」または「腫瘍関連抗原 90 K (Tumor associated antigen 90K)」としても知られる。特定の実施態様において、蛋白質はヒト蛋白質 (Swiss-Prot Accession number Q08380, Last update: Release 47 10-May-2005) である。これは、細胞接着を促進する糖タンパク質であり、そして、ウイルスおよび腫瘍細胞に対する防御を刺激し得る。

## 【 0 0 2 1 】

用語「AGP1」は、シンボルORM1(LOCUSLINK: 5004 ホモサピエンス; UNIGENE: Hs. 494984)によりヒトにおいて同定される遺伝子により、そのアイソフォームのいずれかで、およびいずれかの動物種において、コードされる蛋白質に関する。該蛋白質は、「アルファ - 1 - 酸 糖蛋白質 (AGP1)」またはオロソムコイド 1 (orosomuroid 1) (OMD1) としても知られる。特定の実施態様において、蛋白質はヒト蛋白質 (Swiss-Prot Accession number P02763, Last update: Release 47 10-May-2005) である。その急性期の間の免疫系活性化の調節における介入が記載されてきた。肝硬変の患者ではそのグリコシレーションパターンに変化を受け、肝線維症の促進機能もまた示唆されている。この蛋白質に対する特異的抗原を用いた肝臓疾患 (肝炎、肝硬変、肝細胞癌) の診断法が提案されている (W 02004058823)。

## 【 0 0 2 2 】

表現「カテプシン A」は、シンボルPPGB(LOCUSLINK: 5476 ホモサピエンス; UNIGENE:

10

20

30

40

50

Hs. 517076)にヒトにおいて同定される遺伝子により、そのアイソフォームのいずれかで、およびいずれかの動物種において、コードされる蛋白質に関する。該蛋白質は、また、「リソソーム保護蛋白質前駆体 (Lysosomal protective protein precursor)」、カルボキシペプチダーゼC、「ベータガラクトシダーゼのための保護蛋白質 (Protective protein for beta-galactosidase)」として、またはコードE.C. 3.4.16.5によっても知られている。特定の実施態様において、蛋白質はヒト蛋白質 (Swiss-Prot Accession number P10619, Last update: Release 47 10-May-2005)である。

【0023】

マーカの濃度を測定する生物試料は、組織ホモジネートまたは生物学的液体、例えば、血液、血漿、血清、尿、唾液、脳脊髄液、涙、羊水 (amniotic liquid) およびミルク等であり得る。特定の実施態様において、該生物試料は、血液、血漿、血清または尿である。好ましい実施態様において、該生物試料は、尿試料である。

10

【0024】

本発明による評価のための生物試料の調製は、分析実験技術により知られる常法により、基本的には、生物試料のタイプおよび評価のために選択される発明の方法の設定に依存して実施される。簡単な実施例、例えば、イムノクロマトグラフィーストリップ (immuno chromatographic strip) («イムノストリップ」または「ディップストリップ»)を用いた尿のサンプル評価において、試料は、調製の必要がなく、直接的に適用される。異なるマーカの測定または以前の結果の確認を目的として、さらなる測定が必要とされるとき、評価は、同じ試料または同一被験者由来の異なる試料で実施される。

20

【0025】

本発明において、生物試料は、いずれかの動物、とりわけいずれかの哺乳動物、例えば、実験動物 (齧歯類、ウサギ、霊長類、イヌ)、ペットまたは家畜 (イヌ、ネコ、ウマ、ウシまたはブタ動物)、または野生動物由来であり得る。本発明の特定の実施態様において、該生物試料は、男性または女性のヒト由来である。

【0026】

本発明による化合物のレベルの測定は、試料中の参照化合物の量が評価されること (一般的に濃度として表現される) を意味する。該評価は、単に、存在 - 非存在の決定、準定量的評価、またはより好ましくは定量的評価であり得る。

【0027】

本発明の特定の実施態様は、さらに、参照標準または値に関して測定されるマーカのレベルの比較を含む。本発明の特定の実施態様において、標準レベルの約1.5倍のレベルは、線維化変性の存在に関する。好ましい実施態様において、参照値の少なくとも2倍のレベルは、線維化変性の存在に係する。

30

【0028】

線維化に関わる分子メカニズムは、それが進行する組織にかかわりなく、少なくとも部分的に共通しているので、評価される線維化に罹患した器官はいずれの器官であり得る。例えば、評価される線維化は、肺、延髄、肝臓、脾臓、腎臓、心臓または多臓器の線維症であり得る。

【0029】

好ましい実施態様において、本発明のマーカの組み合わせられた使用は、肝線維症の存在および重篤度を評価することである。

40

【0030】

特定の実施態様において、本発明は、ウロモジュリン、MAC2BP、AGP1、およびカテプシンAから選択される3つのマーカの組み合わせ使用を含む。好ましくは、4つの特定されたマーカのレベルが測定される。

【0031】

場合により、本発明は、他の付加的なマーカの使用を含み得る。該付加的なマーカは、蛋白質またはいずれかの他のタイプの化合物 (糖タンパク質、ペプチド、小分子、ポリサッカライド、核酸、抗体等) であり得る。

50

## 【0032】

本発明の目的物である、マーカーのレベルの測定は、いずれの公知の分析法により実施され得、その選択は、基本的に、当業者が得ることを欲する、評価に渡り主要な、要求および必要：スピード - 簡潔性、感受性および特異性、予測値等に依存する。

## 【0033】

本発明の異なる機器構成により、測定は、他の中で、比色分析の、分光光度の、蛍光光度の、化学発光の方法によって、放射性同位元素、分光光度、NMR、クロマトグラフィー、電気泳動および化学的方法、イムノアッセイ（抗原 - 抗体反応に基づく）を用いて、または該方法の組み合わせにより、実施され得る。

## 【0034】

特定の実施態様において、測定は、質量分析、例えば、液体クロマトグラフィーに関連したタンデム質量分析計（LC-MS-MS）またはMALDI-TOF-MS（マトリックス - 関連レーザー脱離 / イオン化質量分析飛行時間形MS）により実施される。

## 【0035】

本発明の好ましい実施態様において、測定は、イムノアッセイを用いて実施される。本発明の方法により適用されるイムノアッセイは、均一アッセイ（homogeneous assay）、不均一アッセイ（heterogeneous assay）、酵素免疫アッセイ（EIA、ELISA）、競合アッセイ、イムノメトリックアッセイ（immunometric assay）（サンドウィッチ）、比濁アッセイ、ネフェロアッセイ（nephelometric assay）およびそれらの組み合わせを含む。これらイムノアッセイで適用される原理およびプロトコールは良く知られ、引用文献として含められる「The immunoassay handbook」（デイビッド ワイルド編集、第2版、2001、Nature Publishing group）等の手引き書に十分に記載されている。

## 【0036】

特定の実施態様において、該イムノアッセイはELISAまたはストリップイムノクロマトグラフィーアッセイ（「ディップストリップ」、「イムノクロマトグラフィックストリップ」または「イムノストリップ」）である。他の特定の実施態様において、該イムノアッセイは抗体チップ上で実施される。

## 【0037】

特許文献US5,753,517において、サンドウィッチタイプ試験および阻害アッセイの両方のため、適用できる可能性のある、定量的なイムノクロマトグラフィーストリップアッセイの機器構成および実施例について、我々は、詳細な情報を見出すことができるが、それは、本発明を制限するものとして取り上げるべきではない。イムノクロマトグラフィックアッセイ（immunochromatographic assay）は、また、例えば、特許文献US6,316,205に開示されているもの等の、多くの他の機器構成を採用し得るが、そのうちのいくつかは、同じアッセイおよび同じサンプルで幾つかの異なるマーカーの解析を可能にする。

## 【0038】

生物試料における、線維化変性、好ましくは肝線維症の存在（または非存在）または重篤度の最終的な評価のために、試験試料（我々が評価したい線維症の患者の生物学的サンプル）中で測定されたマーカーのレベルは、予め確立された参照値と比較される。定量的（陽性 - 陰性）または準定量的評価が十分であるとき、測定されるそれぞれの化合物に対し、カットオフ値を確立することが、ただ必要である。最適化された感受性および特異性を有する定量的評価が必要とされるとき、参照値またはインデックスは、例えば、測定されるマーカーのそれぞれ1つの差別的な値の記号論理学回帰分析、およびそれに続く、それぞれの化合物のために得られた測定値を結びつける記号論理的関数の構築により規定され得る。記号論理的関数の質は、ROCカーブを用いて解析される。記号論理的関数を構築する方法は、良く知られており、線維的变化の評価においてもまた使用されてきており、それらの中で、肝線維症は、血清学的マーカーを使用する。これらの方法は、例えば、文献US6,631,330（引用により組み込まれる）で開示される。

## 【0039】

本発明の好ましい実施態様において、マーカーは尿試料における肝線維症の存在および重

10

20

30

40

50

篤度を評価するために使用され、ウロモジュリン、MAC2BP、AGP1、およびカテプシン A から選択される少なくとも2つのマーカーのレベルを測定することにより実施される。特定の実施態様において、該マーカーのために得られた測定は、記号論理学関数によって結びつけられる。

【0040】

本発明の目的は、例えば、潜在的に抗線維化活性を有する薬剤を選択し、スクリーニングするための方法への使用である。この方法は、a) 被検体(好ましくは動物)に試験する薬剤を投与すること; b) 試験の異なる時点で(投与の前、間および/または後)、動物から生物試料を摘出し、本発明の方法にしたがって、マーカーレベルを測定すること; および c) 異なる処置段階で得られた試料で実施された測定を比較し、例えば、処置されていない対照動物と比較することを含む。

10

【0041】

他の適用において、本発明は、動物または患者の器官、好ましくは肝臓の線維化状態の進行を制御することを可能にし、その結果、動物または患者は、定義されたマーカーの異なるサンプリングおよび評価にかけられる。更なる特定の適用において、本発明は、時間と共に抗線維化処置に対する応答を評価することを可能にする。

【0042】

本発明の他の態様は、少なくとも2つの以下のマーカー: ウロモジュリン、MAC2BP、AGP1、およびカテプシン A のための特定のプローブを用いて、該マーカーの濃度を測定することを特徴とする。

20

【0043】

用語「プローブ」は、4つの示されたマーカー(ウロモジュリン、MAC2BP、AGP1、およびカテプシン A)の一つと特異的に反応する分子で、その反応が、着色、蛍光、発光生成物またはマーカー、または他の検出可能なマーカーであり得る、反応強度を示すマーカー-トレーサーにより、直接的にまたは間接的に検出され得る分子に関する。特定の実施態様において、プローブは、ウロモジュリン、MAC2BP、AGP1、およびカテプシン A の特異的なリガンドであり、例えば、レクチンまたは抗体(抗体(複数))である。好ましい実施態様において、該プローブは、特異的な抗体、ポリクローナルまたはモノクローナルのいずれかであり得る。

【0044】

他の更なる実施態様において、本発明は、ウロモジュリン、MAC2BP、AGP1、およびカテプシン A から選択される少なくとも2つのレベルを測定するキットに関し、それは、該マーカーの2、3または4のいずれかの組み合わせのための特異的なプローブを含むことを特徴とする。特定の実施態様において、キットは、該マーカーの2つのための2つの特異的なプローブを含む(例えば、カテプシン A に対する1つのプローブおよびウロモジュリンに対する他のプローブ; またはMAC2BPに対する1つのプローブ、AGP1に対する他のプローブおよびウロモジュリンに対する他のプローブ; 等)。他の実施態様において、キットは、該マーカー3つに対する3つのプローブのいずれかの組み合わせを含む。他の実施態様において、キットは少なくとも4つのプローブを含み、その1つは、それぞれ、4つのマーカー、ウロモジュリン、MAC2BP、AGP1、およびカテプシン A の1つに対する。好ましい実施態様において、プローブの少なくとも1つは、検出し定量化することを欲するマーカーに対する特異的な抗体である。他の特定の実施態様において、全てのキットのプローブは、特異的な抗体である。

30

40

【0045】

本発明のキットのプローブは、同じ組成物または分離された組成物に含まれ得、同じキット内の、固体基盤(例えば、ELISAのためのマイクロプレート上、またはイムノクロマトグラフィーのためのストリップ上)に、またはいくつかの組成基盤(composition substrate)上に付着されている。特定の実施態様において、キットはイムノアッセイキットである。好ましい実施態様において、本発明のキットは、イムノクロマトグラフィー用のキットである。

50

## 【0046】

好ましい実施態様において、本発明のキットは、イムノクロマトグラフィー用のキットであり、本発明の方法の4つのマーカーの1つに対する少なくとも1つの特異的な抗体（プローブ）、および少なくとも1つのイムノクロマトグラフィーのストリップまたは膜を含む。好ましい実施態様において、該マーカーまたはそれらの部分に特異的な抗体は、それらをコーティングして、標識された粒子に結合され得る。特定の実施態様において、該特異的な抗体は、クロマトグラフィーストリップ（chromatographic strip）または膜に埋め込まれる。さらに、他の物質または試薬、例えば、標識された粒子に結合されるか、結合されていない、内部対照のための抗体が、クロマトグラフィーストリップに結合され得る。

10

## 【0047】

特定の実施態様において、本発明のキットは、イムノクロマトグラフィー用のキットであり、以下を含む：本発明の方法のマーカーの少なくとも2つまたはそれ以上に対し、より好ましくは特異的な、2つまたはそれ以上のプローブ、抗体；それらに結合する特異的な抗体に合致した特定のマーカーに特異的な2つまたはそれ以上のイムノクロマトグラフィーストリップ；並びに、イムノクロマトグラフィーストリップを完了させるための分析物および特異的な抗体の間の反応を検出するために必要な他の試薬および物質。

## 【0048】

本発明のキットは、また、他の任意の物質および試薬、例えば、二次抗体、緩衝液、希釈剤、着色剤またはトレーサー（蛍光、発光、等）、標準、キャリブレーションコントロール、テストカートリッジ、バイアル、ボトル、チューブ、針、クロマトグラフィーストリップ、マイクロプレートおよび使用説明書を含み得る。

20

## 【0049】

特定の実施態様において、本発明のキットは、適応「線維症の存在および重篤度の評価用」および、より好ましくは、「肝線維症の存在および重篤度の評価用」でラベルされたパッケージングを含む。特定の実施態様において、それは、「尿における測定用」の適応を含む。該適応は、その同等な適応が、中間段階として、または最終結果として、線維症、好ましくは肝臓の線維症の存在および/または重篤度を評価することを含む方法において、および/または尿中で測定することによって、キットを適用または使用することを默示的に意味する限りにおいて、同等と考えられる他の適応によって置き換えられることができる。

30

## 【0050】

本発明の実施態様

以下の実施例は、本特許（出願）の発明の目的の態様を非限定的に説明することを目的とする。

## 【実施例】

## 【0051】

この試験において、異なる程度および起源の肝線維症を有する11人の患者より得られた尿試料を、6人の対照の個人より得られた尿試料と比較した。肝線維症の臨床学的な決定は、尿を得た日と同日に採取された肝臓生検試料の解剖病理学的試験を用いて実施された。KNODELL(Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. Hepatology 1981 Sep-Oct; 1: 431- 435)に基づき評価された、第4の態様に一致する線維症インデックスまたはスコアを、このために用いた。

40

## 【0052】

尿の試料を収集するために、出所病院の慣習的な臨床プロトコルを用いた。対照個人の尿試料を、同様に、その病院からの健常人から収集した。

## 【0053】

線維症の患者および健常人からの尿試料の分析を、2次元電気泳動および質量分析を用

50

いて実施した。このために、患者および対照個人からの約50mlの試料を分析した。試料を、カットサイズ5000 D aのAmicon Ultra (Millipore) concentratorを用いて濃縮し、その尿を、7M尿素、2Mチオウレア、(4% vol/vol)の3-[コールアミドプロピル)ジメチルアンモニウム]-1-プロパンスルホネート、1% (col/col) DRRおよび0.5% バイオライト (BioLytes) 3/10を含む溶解緩衝液に再懸濁した。蛋白質の量を、Bradford analysisキット (Bio-rad) を使用し、溶解緩衝液に希釈したアルブミンを標準として測定した。2次元電気泳動 (2 D E) を100  $\mu$  gの全蛋白質を用いて測定した。第1次元をBioRadよりのProtean IEF Cell上で、BioRadよりの17cmIPGストリップを用いて実施し、そして、それを積極的に再水和し、つまり、20 の温度で、50 Vの電圧を12時間与えた。ゲルを60,000 V hで、製造者により設計されたランプ電圧を用いて泳動した。ストリップを、50mM TRIS、pH7、6M尿素、30%グリセロール、2% SDSおよび少量のプロモフェノールブルー中で平衡化した。還元方法は、2%DTTを用いて実施し、他のアルキル化は2%ヨードアセトアミドを用いた。ストリップは、12.5%ポリアクリルアミドゲル (18cmX20cmX1cm) 上に直接載せ、それらを1%アガロースでシールする。SDS-PAGE中の第2次元を15時間実施する。ゲルをBioRadよりのSpyro-Ruby蛍光色素を用いて染色した。イメージをBioRadよりのMolecular Imager FXを用いてデジタル化し、BioRadからのPGQUEST 7.1プログラムを用いて解析した。この方法で、300個の蛋白質の平均解析が得られ、比較をPDQUESTを用いに行い、ここで、少なくとも2倍の増加または減少が、相違として受け入れられた。この基準で、4つの蛋白質バンドが、線維症の患者からの尿試料中で検出され、その増加または出現が全ての試験で一致した。

10

20

#### 【0054】

選択された試料は、以下に記載するプロトコルに従って、異なる蛋白質のトリプシン消化、それに続く、電子スプレイイオン源を用いたQ TOFマイクロ質量分析計に結合した液体ナノクロマトグラフィー (ESI/MS/MS) を用いて解析した。ゲル内消化を、50mM炭酸アンモニウム中に懸濁した6 ng/ $\mu$  lのトリプシンで、37 ー晩実施した。トリプシン消化したペプチドを1% ギ酸および2% アセトニトリルで抽出した。最後に、トリプシン消化したペプチドの分離を、5%アセトニトリルおよび0.2%ギ酸で平衡化された、Watersからの逆相Atlantis, C18 , 3  $\mu$ m, 75  $\mu$ m x 10 cm Nano Ease<sup>TM</sup> キャピラリーカラム上で実施した。6  $\mu$  lの試料の注入後、カラムを5分間同じ緩衝液で洗浄し、ペプチドを30分間、0.2  $\mu$  l/minの定常流速で5-50%アセトニトリルの線形グラジエントを用いて溶出した。カラムを、Watersからのナノスプレイ型イオン源PicoTipを用いて、WatersからのQ-TOF Microにオンラインで接続した。キャピラリーの温度は80 であり、スプレイの電源は1.8-2-2kVであった。MS/MSスペクトルをデータに依存して自動的に収集した。3つの最も強いイオンを、2.5単離ウィンドーおよび35%の相対的衝突エネルギーを用いて、衝突惹起解離 (CID) により連続的にフラグメント化した。データプロセッシングを、Watersからの解析プログラムMassLynx4.0およびProteinLynx Global Server 2を用いて実施した。

30

#### 【0055】

図1に見られるゲルイメージに認められるように、2次元電気泳動を用いた尿試料の解析は、約700の異なる蛋白質の分離を可能にした。患者の試料のゲルのそれぞれは、対照個人のそれと比較され、4つのバンドをその後の解析に選択した。それら4つのみが患者の試料中で現れ、それらの1つが、それら個人の中で明らかに増加する。11人の患者および6人の対照個人から作成したゲルからのバンドを切り出し、前のセクションで示したプロトコルを用いてトリプシンで消化した。該バンドを研究することができるように、トリプシン消化物を、それから、MALDI-TOF質量分析計、ペプチドフィンガープリンティング、およびLC-ESI-QUAD-TOF質量分析計を用いて解析した。該蛋白質を、図1中にそれぞれ1、2、3および4として記されている、ウロモジュリン、MAC2BP、AGP1およびカテプシンAと同定した。これら蛋白質の存在または非存在の解析を、対照個人および患者から得られた2次元ゲルの両方で解析し、表1に示される分布が得られた。この表で観察することができるように、少なくとも2つのマーカーが、全ての線維症患者の試験で出現し、一方、それらは対照個人では観察されない。

40

50

## 【 0 0 5 6 】

## 【 表 1 】

表 1. 異なる蛋白質の増加（ウロモジュリン）または存在（AGP1、カテプシン A および MAC2BP）の比較。2次元電気泳動、イメージ解析およびMALDI-TOFまたはESI/MS/MS質量分析による解析。

	ウロモジュリン	AGP1	カテプシン A	Mac2bp
線維症患者				
1	イエス	ノー	イエス	イエス
2	イエス	ノー	イエス	イエス
3	イエス	ノー	イエス	イエス
4	イエス	イエス	イエス	イエス
5	イエス	イエス	イエス	イエス
6	イエス	ノー	イエス	イエス
7	イエス	イエス	イエス	イエス
8	イエス	イエス	イエス	イエス
9	イエス	イエス	イエス	イエス
10	イエス	イエス	ノー	イエス
11	イエス	イエス	イエス	イエス
対照				
C1	ノー	ノー	ノー	ノー
C2	ノー	ノー	ノー	ノー
C3	ノー	ノー	ノー	ノー
C4	ノー	ノー	ノー	ノー
C5	ノー	ノー	ノー	ノー
C6	ノー	ノー	ノー	ノー

10

20

## 【 図面の簡単な説明 】

30

## 【 0 0 5 7 】

【 図 1 】 肝線維症の患者における尿サンプル中の、ウロモジュリン (uromodulin)、MAC2BP、AGP1 および カテプシン A の増加および出現の同定。患者および対照個人からの代表的なゲルが示される。ことなるスポットは、1 : ウロモジュリン、2 : MAC2BP、3 : AGP1 および 4 : カテプシン A として同定される。

【图 1】

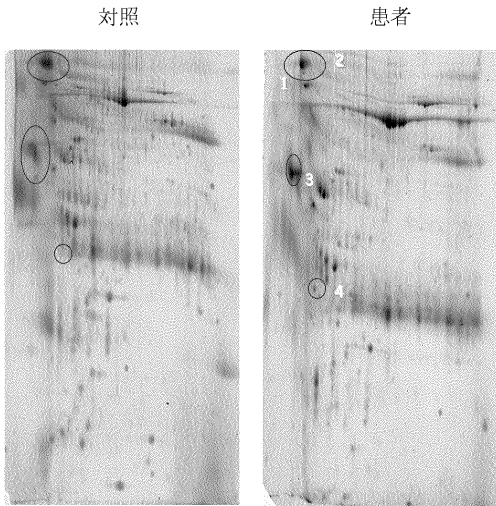


Figure 1

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2006/000367

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
GOIN 33/68 (2006.01)				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)				
GOIN				
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 practicable, search terms used)				
CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, XPESP, EMBASE, BIOSIS				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	BABA, Y., DOI, K. MHC class II-related genes expression in porcine-serum-induced rat hepatic fibrosis. <i>Experimental and Molecular Pathology</i> . 2004, Vol. 77, N° 3, pages 214-221. ISSN 0014-4800.	1-23		
A	FOURNIER, T., MEDJOUBI-N, N., PORQUET, D. Alpha-1-acid glycoprotein. <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> . October 2000, Vol. 1482, N°1-2, pages 157-171. ISSN 0167-4838.	1-23		
A	US 5310655 A (ZIMMERHALCKL, L., KINNE, R. FABRICIUS, T. et al) 10.05.1994.	1-23		
A	WO 1993/008215 A1 (CELTUS ONCOLOGY CORPORATION [US/US]) 29.04.1993.	1-23		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">           "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         </td> <td style="width: 50%;">           "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 documents, such combination being obvious to a person skilled in the art            "&amp;" document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			"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 documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"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 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		
30 November 2006 (30.11.2006)		(12-12-2006)		
Name and mailing address of the ISA/ O.E.P.M.		Authorized officer		
Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Facsimile No. 34 91 3495304		E. Relaño Reyes		
		Telephone No. +34 91 349 85 04		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/ES 2006/000367
---

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5747274 A (JACKOWSKI, G.) 05.05.1998, column 18, line 62 - column 19, line 6; column 24, line 50 - column 25, line 9.	1-23
A	US 4894442 A (TOYAMA, S., TANIHARA, M.) 16.01.1990.	1-23
A	RATZIU, V., LE CALVEZ, S., IMBERT-BISMUT, F. et al. Diagnostic value of biochemical markers (Fibrotest) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Hepatology. October 2003, Vol. 38, N° 4 suppl. 1, pages 510A-511A. ISSN 0270-9139.	1-23
A	WATTIEZ, R., FALMAGNE, P. Proteomics of bronchoalveolar lavage fluid. Journal of Chromatography B. February 2005, Vol. 815, N° 1-2, pages 169-178. Disponible in red el 05.11.2004. ISSN 1570-0232.	1-23

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2006/000367

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

**see additional sheet**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
  - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2006/000367

## Continuation of Box III

The technical subject matter of the inventions derived from claim 1 differs to such an extent that no technical relationship linking this group of inventions under a single general inventive concept can be determined within the meaning of PCT Rule 13.1. For all the claimed methods to share a common inventive concept, they would have to include a common marker. Since this is not the case, the possible inventions have been divided according to their common markers (uromodulin for invention 1, MAC2BP for invention 2, and AGP1 and catepsin A for invention 3).

Consequently, the International Searching Authority considers that the following claims cover three inventions:

- Invention 1: use of uromodulin, together with MAC2BP and/or AGP1 and/or catepsin A, as markers for diagnosing fibrotic alterations in vitro, as well as corresponding kit (part of claims 1-11 and 13-23, as well as claim 12).
- Invention 2: use of MAC2BP, together with AGP1 and/or catepsin A, as markers for diagnosing fibrotic alterations in vitro, as well as diagnostic kit (part of claims 1-11 and 13-23).
- Invention 3: use of AGP1 and catepsin A as markers for diagnosing fibrotic alterations in vitro, and the corresponding kit (part of claims 1-10 and 13-23).

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ES 2006/000367

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5310655 A	10.05.1994	DE 3832432 A	29.03.1990
		WO1990/003578 A1	05.04.1990
		EP 0435890 B1	10.07.1991
		JP 4501006 T	20.02.1992
		AT 120010 T	15.04.1995
		DE 58909122 D	20.04.1995
WO 1993/008215 A1	29.04.1993	CA 2121256 A	29.04.1993
		AU 2896392 A	21.05.1993
		EP 0625990 A1	30.11.1994
		JP 6510790 T	01.12.1994
		AU 673810 B	28.11.1996
		US 5644035 A	01.07.1997
		AU 1497297 A	03.07.1997
		JP 2718827 B2	25.02.1998
		US 5736340 A	07.04.1998
		JP 10110000 A	28.04.1998
		AT 169028 T	15.08.1998
		DE 69226448 D	03.09.1998
		DE 69226448 T	08.04.1999
		AU 708987 B	19.08.1999
		US 5965382 A	12.10.1999
		US 6069127 A	30.05.2000
US 5747274 A	05.05.1998	CA 2027434 A	13.04.1992
		GB 2248688 A	15.04.1992
		AU 8475791 A	16.04.1992
		DE 4122886 A	16.04.1992
		FR 2667944 A1	17.04.1992
		CN 1060533 A	22.04.1992
		CN 1036155 C	15.10.1997
		BR 9104431 A	09.06.1992
		MX 9101550 A	08.07.1992
		JP 4258765 A	14.09.1992
		JP 2628421 B	09.07.1997
		BE 1004994 A5	16.03.1993
		US 5290678 A	01.03.1994
		NZ 239938 A	25.03.1994
		AU 654672 B	17.11.1994
		AR 247634 A	31.01.1995
		AU 4553993 A	13.02.1995
		ZA 9404547 A	17.02.1995
		IT 1251682 B	19.05.1995
		ES 2070658 A1	01.06.1995
		WO 1996/032648 A	17.10.1996
		CA 2215018 A	17.10.1996
AU 5117996 A	30.10.1996		
US 5604105 A	18.02.1997		
NO 974682 A	10.12.1997		
US 5710008 A	20.01.1998		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ES 2006/000367

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 0826151 A	04.03.1998
		US 5744358 A	28.04.1998
		JP 10511185 T	27.10.1998
		KR 0167564 B	30.03.1999
US 4894442 A	16.01.1990	EP 0199196 A2	29.10.1986
		JP 62044199 A	26.02.1987

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ES 2006/000367

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD <i>G01N 33/68 (2006.01)</i> De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.		
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación) G01N Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, XPESP, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	BABA, Y., DOI, K. MHC class II-related genes expression in porcine-serum-induced rat hepatic fibrosis. <i>Experimental and Molecular Pathology</i> . 2004, Vol. 77, Nº 3, páginas 214-221. ISSN 0014-4800.	1-23
A	FOURNIER, T., MEDJOUBI-N, N., PORQUET, D. Alpha-1-acid glycoprotein. <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> . Octubre 2000, Vol. 1482, Nº1-2, páginas 157-171. ISSN 0167-4838.	1-23
A	US 5310655 A (ZIMMERHALCKL, L., KINNE, R. FABRICIUS, T. et al) 10.05.1994.	1-23
A	WO 1993/008215 A1 (CELTUS ONCOLOGY CORPORATION [US/US]) 29.04.1993.	1-23
<input checked="" type="checkbox"/> En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos <input checked="" type="checkbox"/> Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo		
* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 30 Noviembre 2006 (30.11.2006)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 12 diciembre 2006 (12-12-2006)	
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado E. Relaño Reyes Nº de teléfono +34 91 349 85 04	

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº PCT/ES 2006/000367
--

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	US 5747274 A (JACKOWSKI, G.) 05.05.1998, columna 18, línea 62 - columna 19, línea 6; columna 24, línea 50 - columna 25, línea 9.	1-23
A	US 4894442 A (TOYAMA, S., TANIHARA, M.) 16.01.1990.	1-23
A	RATZIU, V., LE CALVEZ, S., IMBERT-BISMUT, F. et al. Diagnostic value of biochemical markers (Fibrotest) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Hepatology. Octubre 2003, Vol. 38, Nº 4 supl. 1, páginas 510A-511A. ISSN 0270-9139.	1-23
A	WATTIEZ, R., FALMAGNE, P. Proteomics of bronchoalveolar lavage fluid. Journal of Chromatography B. Febrero 2005, Vol. 815, Nº 1-2, páginas 169-178. Disponible en red el 05.11.2004. ISSN 1570-0232.	1-23

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2006/000367

<b>Recuadro II</b>	<b>Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)</b>
<p>Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones por los siguientes motivos:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Las reivindicaciones n°:</p> <p style="padding-left: 20px;">se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Las reivindicaciones n°:</p> <p style="padding-left: 20px;">se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Las reivindicaciones n°:</p> <p style="padding-left: 20px;">son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).</p>	
<b>Recuadro III</b>	<b>Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)</b>
<p>La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:</p> <p>(ver hoja adicional)</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°:</p> <p>Indicación en cuanto a la protesta</p> <p style="padding-left: 20px;"><input type="checkbox"/> Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.</p> <p style="padding-left: 20px;"><input type="checkbox"/> Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.</p> <p style="padding-left: 20px;"><input type="checkbox"/> El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.</p>	

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2006/000367

El objeto técnico de las invenciones derivadas de la primera reivindicación es tan diferente que no se puede apreciar ninguna relación técnica que integre este grupo de invenciones bajo un único concepto inventivo general según la regla 13.1 del PCT, ya que para que los métodos reivindicados tengan un concepto inventivo común, en todos ellos ha de incluirse un marcador común. Como esto no sucede, se han agrupado las posibles invenciones según si tienen un marcador común (uromodulina en el caso de la invención 1ª, MAC2BP en el caso de la invención 2ª, y AGP1 y catepsina A para la invención 3ª). En consecuencia, la Administración encargada de la búsqueda internacional considera que hay tres invenciones cubiertas por las siguientes reivindicaciones:

- Invención 1ª: Uso de la uromodulina junto con MAC2BP y/o AGP1 y/o catepsina A como marcadores en el diagnóstico in vitro de alteraciones fibróticas, así como el correspondiente kit (parte de las reivindicaciones de la 1 a la 11 y de la 13 a la 23, así como la reivindicación 12).
- Invención 2ª: Uso de MAC2BP junto con AGP1 y/o catepsina A como marcadores en el diagnóstico in vitro de alteraciones fibróticas, junto con el kit de diagnóstico (parte de las reivindicaciones de la 1 a la 11 y de la 13 a la 23).
- Invención 3ª: Uso de la AGP1 y la catepsina A como marcadores en el diagnóstico in vitro de alteraciones fibróticas, y el kit correspondiente (parte de las reivindicaciones de la 1 a la 10 y de la 13 a la 23).

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2006/000367

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 5310655 A	10.05.1994	DE 3832432 A	29.03.1990
		WO1990/003578 A1	05.04.1990
		EP 0435890 B1	10.07.1991
		JP 4501006 T	20.02.1992
		AT 120010 T	15.04.1995
		DE 58909122 D	20.04.1995
WO 1993/008215 A1	29.04.1993	CA 2121256 A	29.04.1993
		AU 2896392 A	21.05.1993
		EP 0625990 A1	30.11.1994
		JP 6510790 T	01.12.1994
		AU 673810 B	28.11.1996
		US 5644035 A	01.07.1997
		AU 1497297 A	03.07.1997
		JP 2718827 B2	25.02.1998
		US 5736340 A	07.04.1998
		JP 10110000 A	28.04.1998
		AT 169028 T	15.08.1998
		DE 69226448 D	03.09.1998
		DE 69226448 T	08.04.1999
		AU 708987 B	19.08.1999
		US 5965382 A	12.10.1999
		US 6069127 A	30.05.2000
US 5747274 A	05.05.1998	CA 2027434 A	13.04.1992
		GB 2248688 A	15.04.1992
		AU 8475791 A	16.04.1992
		DE 4122886 A	16.04.1992
		FR 2667944 A1	17.04.1992
		CN 1060533 A	22.04.1992
		CN 1036155 C	15.10.1997
		BR 9104431 A	09.06.1992
		MX 9101550 A	08.07.1992
		JP 4258765 A	14.09.1992
		JP 2628421 B	09.07.1997
		BE 1004994 A5	16.03.1993
		US 5290678 A	01.03.1994
		NZ 239938 A	25.03.1994
		AU 654672 B	17.11.1994
		AR 247634 A	31.01.1995
		AU 4553993 A	13.02.1995
		ZA 9404547 A	17.02.1995
		IT 1251682 B	19.05.1995
		ES 2070658 A1	01.06.1995
WO 1996/032648 A	17.10.1996		
CA 2215018 A	17.10.1996		
AU 5117996 A	30.10.1996		
US 5604105 A	18.02.1997		
NO 974682 A	10.12.1997		
US 5710008 A	20.01.1998		

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2006/000367

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
		EP 0826151 A	04.03.1998
		US 5744358 A	28.04.1998
		JP 10511185 T	27.10.1998
		KR 0167564 B	30.03.1999
US 4894442 A	16.01.1990	EP 0199196 A2	29.10.1986
		JP 62044199 A	26.02.1987

## フロントページの続き

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

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(74)代理人 100146259

弁理士 橋本 諭志

(72)発明者 フェルナンド・コラレス・イスキエルド

スペイン、エ - 3 1 0 0 8 パンプローナ、アベニダ・ピオ 1 2、5 5 番、フンダシオン・パラ・ラ  
・インベスティガシオン・メディカ・アプリカダ・フィマ

(72)発明者 ラウラ・セスマ・アギレ

スペイン、エ - 3 1 0 0 8 パンプローナ、アベニダ・ピオ 1 2、5 5 番、フンダシオン・パラ・ラ  
・インベスティガシオン・メディカ・アプリカダ・フィマ

(72)発明者 ホアキン・フェルナンデス・イリゴイエン

スペイン、エ - 3 1 0 0 8 パンプローナ、アベニダ・ピオ 1 2、5 5 番、フンダシオン・パラ・ラ  
・インベスティガシオン・メディカ・アプリカダ・フィマ

(72)発明者 ヘスス・プリエト・バルトゥエニャ

スペイン、エ - 3 1 0 0 8 パンプローナ、アベニダ・ピオ 1 2、5 5 番、フンダシオン・パラ・ラ  
・インベスティガシオン・メディカ・アプリカダ・フィマ

(72)発明者 マティアス・アピラ・サラゴサ

スペイン、エ - 3 1 0 0 8 パンプローナ、アベニダ・ピオ 1 2、5 5 番、フンダシオン・パラ・ラ  
・インベスティガシオン・メディカ・アプリカダ・フィマ

Fターム(参考) 2G045 AA25 BB51 CA25 CA26 CB03 CB07 CB11 CB26 DA20 DA36

DA77 FA36 FB03 FB06 FB07 FB08 FB12 FB13 FB17 GC12

GC15 JA01

专利名称(译)	纤维化的标志		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009500597A</a>	公开(公告)日	2009-01-08
申请号	JP2008518876	申请日	2006-06-22
申请(专利权)人(译)	Puroiekuto, 德, Biomedishina, 西玛, Soshiedaddo, LTDA		
[标]发明人	フェルナンドコラレスイスキエルド ラウラセスマアギレ ホアキンフェルナンデスイリゴイエ ヘスプリエトバルトゥエニャ マティアスアピラサラゴサ		
发明人	フェルナンド・コラレス・イスキエルド ラウラ・セスマ・アギレ ホアキン・フェルナンデス・イリゴイエ ヘス・プリエト・バルトゥエニャ マティアス・アピラ・サラゴサ		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/576 G01N2800/085		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB11 2G045/CB26 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FA36 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB07 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/FB17 2G045/GC12 2G045/GC15 2G045/JA01		
代理人(译)	田中, 三夫 山崎 宏 櫻井洋子		
优先权	2005001611 2005-07-01 ES		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

对于纤维化改变, 尿调节素, 在体外检测本发明涉及由中间MAC2BP, AGP1和组织蛋白酶A中选择的使用的至少两种标记的组合的此外, 本发明涉及用于所述标志物的水平的生物样品中确定的试剂盒。

