

(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2005-523452

(P2005-523452A)

(43) 公表日 平成17年8月4日(2005.8.4)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D 4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 H O 4 5
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-586616 (P2003-586616)
 (86) (22) 出願日 平成15年4月15日 (2003.4.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年12月15日 (2004.12.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/003940
 (87) 国際公開番号 W02003/089934
 (87) 国際公開日 平成15年10月30日 (2003.10.30)
 (31) 優先権主張番号 02008840.7
 (32) 優先日 平成14年4月19日 (2002.4.19)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (81) 指定国 EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), JP, US

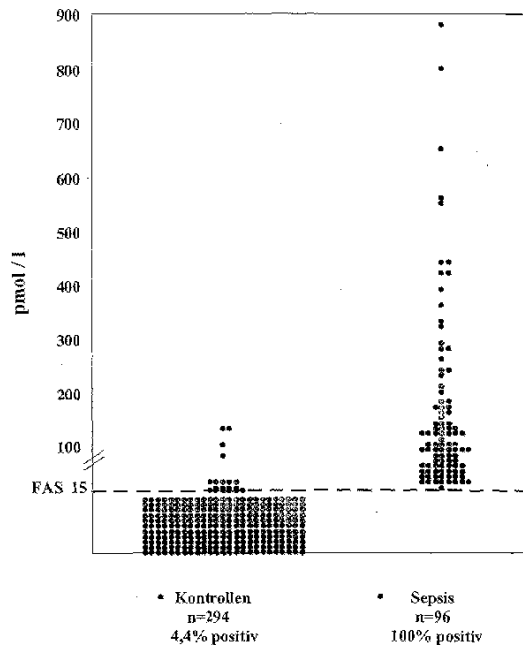
(71) 出願人 501154389
 ベー・エル・アー・ハー・エム・エス・アクティエンゲゼルシャフト
 ドイツ・D-16761・ヘーニッヒストルフ・ノイエンドルフシュトラッセ・25
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 L A S P - 1 免疫反応性の決定によって炎症性疾患および感染を診断するための方法

(57) 【要約】

本発明は、炎症性疾患および感染症、特に敗血症およびアルツハイマー病と同様の全身性感染症の、早期検出および同定、経過の予後診断、重症度の評価、および治療過程での評価するための方法に関する。前記方法によれば、患者の生体液、または任意選択で組織サンプルからの、遊離した形および/または結合した形にあるタンパク質LASP-1(配列番号1)またはタンパク質LAP-1(配列番号16)、あるいは前記タンパク質のうち一方の免疫反応性断片の存在および/または量を、好ましくは免疫反応性として決定し、炎症性疾患または感染症の存在、予想される経過、重症度、または治療の成功に関し、特異的タンパク質の存在および/または量から結論を引き出す。



【特許請求の範囲】**【請求項1】**

医学的診断の目的で、患者の生体液中に遊離した形態および/またはタンパク質に結合した形態あるいは翻訳後修飾した形態にある、タンパク質LASP-1(配列番号1)、またはこれに対して少なくとも最初の200アミノ酸の範囲内で配列が少なくとも実質的に同一なタンパク質、またはそのようなタンパク質の免疫反応性断片の、存在および/または量を決定するための方法。

【請求項2】

炎症性疾患および感染症、特に敗血症様全身性感染症の、早期診断および診断のため、重症度の予後および評価のため、および治療に伴うモニタリングのために実施し、決定されたLASP-1免疫反応性の存在および/または量から、炎症性疾患または感染症の存在、予測される経過、重症度、または治療の成功に関して結論を引き出すことを特徴とする、請求項1に記載の方法。 10

【請求項3】

炎症性疾患および感染症、特に敗血症様全身性感染症の、早期診断および診断のため、重症度の予後および評価のため、および治療に伴うモニタリングのための方法であって、患者の組織サンプル中に遊離した形態および/またはタンパク質に結合した形態にある、タンパク質LASP-1(配列番号1)、またはこれに対して少なくとも最初の200アミノ酸の範囲内で配列が少なくとも実質的に同一なタンパク質、またはそのようなタンパク質の免疫反応性断片の、存在および/または量を決定し、決定されたタンパク質の存在および/または量から、炎症性疾患または感染症の存在、予測される経過、重症度、または治療の成功に関して結論を引き出すことを特徴とする方法。 20

【請求項4】

LASP-1と呼ばれかつ配列番号16によるアミノ酸配列を有するタンパク質またはその断片の免疫反応性を、前記アッセイで決定しまたは共同決定することを特徴とする、請求項1、2、または3に記載の方法。

【請求項5】

LASP-1(配列番号1)の位置147から187に割り当てることができる免疫反応性を、前記アッセイで決定することを特徴とする、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

翻訳後に形成された可溶性形態のLASP-1および/またはLASP-1の免疫反応性を決定することを特徴とする、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項7】

前記生体液が、血液、血液画分、またはリカーであることを特徴とする、請求項1、2、または4から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

サンドイッチタイプの免疫診断アッセイ法(イムノアッセイ)であることを特徴とする、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

担体タンパク質に結合させかつ配列番号13、配列番号14、または配列番号17によるアミノ酸配列を有するペプチドから選択されたペプチドでの免疫化によって生成した抗体試薬を用いる免疫診断アッセイ法を使用することを特徴とする、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項10】

前記炎症性疾患が、脳の炎症性疾患、特にアルツハイマー病であることを特徴とする、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記疾患が、心疾患、特に心筋梗塞、中枢神経系の疾患、または癌であることを特徴とする、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

マルチパラメーター決定の一部として実施する方法であって、少なくとも1つの別の疾患関連パラメーターを同時に決定し、少なくとも2つの測定された量の組の形で測定された結果が得られ、かつ炎症または感染症の緻密な診断について評価することを特徴とする、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

敗血症診断のための方法であって、マルチパラメーター決定の一部として、LASP-1の他に、プロカルシトニン、CA125、CA19-9、S100B、S100Aタンパク質、可溶性サイトケラチン断片、特にCYFRA21、TPSおよび/または可溶性サイトケラチン-1断片(sCY1F)、ペプチドインフラミンおよびCHP、ペプチドプロホルモン、グリシンN-アシルトランスフェラーゼ(GNAT)、カルバモイルリン酸シンテターゼ1(CPS1)、およびC-反応性タンパク質(CRP)、またはこれらの断片からなる群から選択された少なくとも1つの別のパラメーターを決定することを特徴とする、請求項12に記載の方法。

10

【請求項14】

マルチパラメーター決定を、チップ技術測定装置または免疫クロマトグラフィー測定装置を用いることにより同時決定として実施することを特徴とする、請求項12または13に記載の方法。

【請求項15】

前記測定装置を使用して得られた複雑な測定結果の評価を、コンピュータプログラムの助けを借りて評価することを特徴とする、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

LASP-1とLAP-1の決定を、どちらも一緒に決定されるような方法で実施することを特徴とする、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項17】

前記LASP-1および/またはLAP-1の決定を、LASP-1のみおよび/またはLAP-1のみの存在および/または量の特徴である測定値が得られるような方法で実施することを特徴とする、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

治療上の影響が及ぶ炎症および感染症、特に敗血症、アルツハイマー病、および心臓血管疾患に対する薬剤を調製するための、LASP-1、LAP-1、および/またはその部分ペプチド、あるいはこれらペプチドの特異的結合パートナーまたは作動薬または拮抗薬の使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質LASP-1と、任意の密接に関係しているタンパク質であって少なくともその最初の200アミノ酸についてはLASP-1と実質的に同じ配列を有し、したがって同等の免疫反応性を有するタンパク質と、その断片とを、炎症性疾患および感染、特に敗血症および敗血症様全身感染と、脳に局限されまたは脳に拡がる炎症性疾患の医学的診断のために、新規に使用することに関する。これは、毒素投与によって敗血症または全身性炎症を実験的に誘発させた霊長類の脳組織内で、大幅に増大したタンパク質LASP-1の濃度を検出すること、およびその後に行われる、敗血症罹患患者およびアルツハイマー病患者の循環系内で大幅に増大したLASP-1免疫反応性の検出と、やはり心筋梗塞に罹患した患者に見られる同様の免疫反応性の増大の検出に、初めて基づくものである。

40

【背景技術】

【0002】

以下の記述でLASP-1という用語を使用する場合、この用語は、配列番号1で定められる特定のアミノ酸配列を有する既知のタンパク質LASP-1だけではなく、広範囲にわたってこのLASP-1と同一の配列を有する任意の関連するタンパク質も示すものとし、例えばタンパク質LAP-1は、本願の実験の節の終わりに示すようなタンパク質の説明的な記述である。この定義は、当業者に向けた特定の文脈から他に明示されない限り、LASP-1に関する全ての表現に当てはまる。LASP-1という用語を使用する場合、この用語は、LASP-1免疫反応性

50

を有する断片も意味し、これは、全ての記載されている生成物に関し、遊離した形態でも、また任意選択で結合タンパク質に結合した形態でかつ/または翻訳後修飾形態でも存在することが可能なものであり、例えばグリコシル化および/またはリン酸化した形態で存在することが可能なものである。

【0003】

本発明は、その原点が、炎症および感染の診断および療法のさらなる改善に関連した本出願人による徹底した研究にある。

【0004】

炎症は、非常に概略的に、例えば外傷や熱傷、アレルゲン、細菌や真菌、ウイルスなどの微生物による感染などの異なるタイプの外部作用、または拒絶反応を引き起こす外来組織、または炎症を引き起こす身体のある特定の肉因的状态、例えば自己免疫疾患や癌に対する、生体のある特定の生理反応と定義される。炎症は、身体の無害な限局的反応として生ずる場合があるが、個体の組織、器官、器官の部分、および組織部分の、非常に数多くの重篤な慢性および急性疾患の典型的な特徴でもある。

【0005】

限局的炎症は、一般に、有害な作用に対する身体の健全な免疫応答の一部であり、したがって、生体の生命を保護する防御メカニズムの一部である。しかし炎症が、例えば自己免疫疾患などにおけるある特定の肉因的過程に対する身体の誤った応答の一部でありかつ/または慢性的な生来のものである場合、あるいは炎症が、全身性炎症応答症候群(SIRS)または感染によって引き起こされた重篤な敗血症の場合などに全身に広がった場合、炎症反応に典型的な生理的過程は収拾がつかないものになり、実際に頻繁に生命を脅かす病理的過程になる。本特許出願の文脈では、概して人生の50代から60代で引き起こされる止めることのできない進行性大脳皮質萎縮症を特徴とし、かつその頻度が原因で主に経済上重要視されるアルツハイマー病は、特に脳において、炎症の典型的な症状を伴う疾患とも見なされる。

【0006】

現在では、炎症過程の起点および推移が、主としてタンパク質またはペプチドの性質を持つ相当数の物質によって制御され、あるいは、若干制限された時間内である特定の生体分子の出現を伴うことがわかっている。炎症反応に関与する肉因性物質には、特に、サイトカイン、媒介物質、血管作動性物質、急性期タンパク質および/またはホルモン調節剤に割り当てることができるものが含まれる。炎症反応は、炎症過程を活性化する肉因性物質(例えばTNF- α 、インターロイキン1)と不活性化物質(例えばインターロイキン10)との両方が関与する複雑な生理反応である。

【0007】

敗血症または敗血症性ショックの場合のような全身性炎症では、炎症特異的な反応カスケードが、制御されない状態で全身に広がり、過剰免疫反応という面において生命を脅かすようになる。肉因性炎症特異的物質の個々の群の出現および可能な役割についての現行の知識に関しては、例えばA.Beishuizen他の「Endogenous Mediators in Sepsis and Septic Shock」、Advances in Clinical Chemistry、Vol.33、1999、55~131と、C.Gabay他の「Acute Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation」、The New England Journal of Medicine、Vol.340、No.6、1999、448~454を参照されたい。敗血症および関連する全身炎症性疾患に対する理解、したがって認識されている定義も、近年は変化しているので、敗血症の最新の定義が記載されているK.Reinhart他の「Sepsis und septischer Schock」、[Sepsis and Septic Shock]、Intensiv-medizin、Georg Thieme Verlag、Stuttgart、New York、2001、756~760も参照されたい。本願の文脈において、使用される敗血症および炎症性疾患という用語は、これら3つの参考文献に記載されている定義に基づく。

【0008】

少なくとも欧州では、陽性血液培養によって検出可能な全身性細菌感染が敗血症であると長い間定義してきたが、現在では、主として敗血症は感染によって引き起こされるもの

10

20

30

40

50

であるが、病理学的過程として、他の原因によって引き起こされる全身性炎症にかなり類似している全身性炎症であると主に理解されている。敗血症に対する理解が前述のように変化している結果、診断手法も変化している。したがって、細菌性病原体の直接的な検出は、生理学的パラメーターの複雑なモニタリングに取って代わられまたは補われ、より最近では特に、敗血症の過程または炎症過程に関与するある特定の内因性物質、すなわち特異的「生物マーカー」の検出に取って代わられている。

【0009】

炎症過程に関与することが知られておりまたは推定される多数の媒介物質および急性期タンパク質において、診断目的に適するものは、特に、その出現が炎症性疾患あるいは炎症性疾患のある特定の局面または重症度に対して非常に特異的であるもの、およびその濃度が劇的にかつ診断上著しく変化するもの、およびさらに、日常的な決定に必要とされる安定性を有しかつ高濃度の値に達するものである。診断目的の場合、病理学的過程(炎症、敗血症)とそれぞれの生物マーカーとの信頼性ある相関関係は、最も重要なものである(良好な特異性および選択性、炎症過程に関与する内因性物質の複雑なカスケードにおけるその役割を知る必要性は、そこには全く存在しない)。

10

【0010】

敗血症生物マーカーとして特に適している既知の内因性物質は、プロカルシトニンである。プロカルシトニンは、その血清濃度が、感染に起因した全身性炎症(敗血症)の条件下で非常に高い値に達するプロホルモンであるが、これは事実上、健康な人では検出不可能である。プロカルシトニンの高い値は、比較的早期においても得られ、その結果プロカルシトニンを決定することは、敗血症の早期診断にできしており、または感染によって引き起こされた敗血症とその他の原因による重篤な炎症とを早期に区別するのに適している。敗血症マーカーとしてのプロカルシトニンの決定は、M.Assicot他の「High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection」、The Lancet、Vol. 341、No.8844、1993、515~518による文献と、特許DE 4227454 C2およびEP 0656121 B1およびUS 5,639,617の主題である。これにより本発明の記述を補うために、前記特許および前記文献に記載された当初の参考文献を参照されたい。近年、プロカルシトニンを対象とする文献の数が大幅に増えつつある。したがって最近公表された報告書の典型的なものとして、W.Karzai他の「Procalcitonin-A New Indicator of the Systemic Response to Severe Infection」、Infection、Vol.25、1997、329~334;およびM.Oczenski他の「Procalcitonin: a new parameter for the diagnosis of bacterial infection in the peri-operative period」、European Journal of Anaesthesiology 1998、15、202~209;さらにH.Redl他の「Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin」、Crit Care Med 2000、Vol.28、No.11、3659~3663;およびH.Redl他の「Non-Human Primate Models of Sepsis」: Sepsis 1998; 2:243~253;およびその内部に引用されているほかの参考文献も参照されたい。

20

30

【0011】

敗血症マーカーとしてプロカルシトニンを利用できることは、敗血症の研究に大きなはずみを与え、現在では、プロカルシトニン決定を補うことができかつ/あるいは緻密な診断または差別的な診断を目的とした追加の情報を提供することができる別の生物マーカーを見出すために、鋭意努力がなされている。しかし、可能性ある新規な敗血症生物マーカーに関する調査は、しばしば、炎症または敗血症の過程に関与するある特定の内因性物質の出現についての厳密な機能または厳密な理由がほとんどまたは全くわかっていないため、複雑になっている。

40

【0012】

別の可能性のある敗血症マーカーを決定するための、実りある純粋に仮定的な手法を試験する実験の結果は、DE 19847690 A1およびWO 00/22439に見られる。そこには、敗血症の場合、プロホルモンであるプロカルシトニンの濃度が増加するだけでなく、プロホルモン免疫反応性を有するその他のペプチド物質についてもその濃度に著しい増加が観察されることが示されている。記述した現象については十分に記されているが、敗血症におけ

50

るプロホルモン免疫反応性の増大の原因は、依然として十分に説明されていない。

【0013】

本願では、他の炎症または敗血症に特異的な生体分子に関する調査での、別の実りある純粋に実験的な手法の結果を報告する。これらの実験的調査も、感染が原因の全身性炎症反応に関連したプロカルシトニンの決定に基づく。したがって敗血症の場合、プロカルシトニンは、早い段階で、ホルモンであるカルシトニンの前駆体である場合と同じ方法では明らかに形成されないことが観察されていた。このため、甲状腺が除去された患者では、プロカルシトニンが高レベルであることも観察された。したがって甲状腺は、敗血症である間、プロカルシトニンが形成されまたは分泌される器官になることができない。H.Redl 10
他の「Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin」、Crit Care Med 2000、Vol.28、No.11、3659 ~ 3663;およびH.Redl他の「Non-Human Primate Models of Sepsis」、Sepsis 1990;2:243 ~ 253による文献には、敗血症でのプロカルシトニンの形成を明らかにすることを目的とした実験的調査の結果が報告されている。前記論文では、霊長類(ヒヒ)にエンドトキシンを投与することによって人為的な敗血症を誘発し、プロカルシトニンの血中濃度が最高に達した実験的誘発状態が決定されている。本願の文脈において、前記論文に記載した実験動物モデルのさらなる開発は、ペプチドまたはタンパク質の性質を持つ新規な内因性の炎症および/または敗血症特異的生物マーカーを決定するのに役立ち、その出現は、敗血症 20
あるいはある特定の形態の炎症および/または敗血症の特徴であり、したがって、特定の任意選択で器官特異的な敗血症または炎症の診断が可能になる。霊長類モデルは、霊長類とヒトの生理機能の非常に大きな類似性と、多くの治療用および診断用のヒト試薬との高い交差反応性に基いて選択した。

【0014】

炎症中に形成された内因性物質は身体の複雑な反応カスケードの一部であるので、そのような物質は診断上興味あるだけではなく、例えば敗血症で観察される炎症の全身への広がりができる限り早い段階で止めるために、現在ではかなりの努力によって、このタイプの個々の物質の出所および/または濃度に影響を与えることにより、炎症過程に治療上介入しようとする試みもなされている。この文脈において、炎症過程に関与することが示される内因性物質は、潜在的な治療標的であるとも見なされる。前記過程に治療上積極的に影響を及ぼそうとする、炎症過程のある媒介物質から始めた試みは、例えば、E.A.Panacek 30
の「Anti-TNF strategies」、Journal fur Anasthesie und Intensivbehandlung; No.2、2001、4~5; T.Calandra他、「Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor」、Nature Medicine、Vol.6、No.2、2000、164~170;またはK.Garber、「Protein C may be sepsis solution」、Nature Biotechnology、Vol.18、2000、917~918に記載されている。今日まで全く期待はずれの治療手法であったので、できる限り炎症又は敗血症に特異的でありかつ治療標的として炎症の治療による制御を成功させるための新たな期待ももたらす内因性生体分子を同定することに、大きな関心が持たれている。

【非特許文献1】A.Beishuizen他、「Endogenous Mediators in Sepsis and Septic Shock」、Advances in Clinical Chemistry、Vol.33、1999、55~131 40

【非特許文献2】C.Gabay他、「Acute Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation」、The New England Journal of Medicine、Vol.340、No.6、1999、448~454

【非特許文献3】K.Reinhart他、「Sepsis und septischer Schock」、[Sepsis and Septic Shock]、Intensiv-medicin、Georg Thieme Verlag、Stuttgart、New York、2001、756~760

【非特許文献4】M.Assicot他、「High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection」、The Lancet、Vol.341、No.8844、1993、515~518

【特許文献1】DE 4227454 C2

【特許文献2】EP 0656121 B1

- 【特許文献3】US 5,639,617
- 【非特許文献5】W.Karzai他、「Procalcitonin-A New Indicator of the Systemic Response to Severe Infection」、*Infection*、Vol.25、1997、329~334
- 【非特許文献6】M.Oczenski他、「Procalcitonin: a new parameter for the diagnosis of bacterial infection in the peri-operative period」、*European Journal of Anaesthesiology* 1998、15、202~209
- 【非特許文献7】H.Redl他、「Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin」、*Crit Care Med* 2000、Vol.28、No.11、3659~3663
- 【非特許文献8】H.Redl他、「Non-Human Primate Models of Sepsis」: *Sepsis* 1998; 2 :243~253 10
- 【特許文献4】DE 19847690 A1
- 【特許文献5】WO 00/22439
- 【非特許文献9】E.A.Panacek、「Anti-TNF strategies」、*Journal fur Anesthesie und Intensivbehandlung*; No.2、2001、4~5
- 【非特許文献10】T.Calandra他、「Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor」、*Nature Medicine*、Vol.6、No.2、2000、164~170
- 【非特許文献11】K.Garber、「Protein C may be sepsis solution」、*Nature Biotechnology*、Vol.18、2000、917~918 20
- 【非特許文献12】C.S.Chew他、*Journal of Cell Science* 113、2035~2045(2000)
- 【非特許文献13】C.S.Chew他、*Am.J.Physiol.* 275(Cell Physiol.44): C56~C67、(1998)
- 【非特許文献14】C.Tomasetto他、*FEBS Letters* 373 (1995): 245~249
- 【非特許文献15】C.Tomasetto他、*Genomics* 28: 367~376 (1995)
- 【非特許文献16】I.Bieche他、*Cancer Res.* 56: 3886~3890 (1996)
- 【非特許文献17】A.Hammarstorm他、*Biochemistry* 1996; 35、12723~12732
- 【非特許文献18】Brian K. Kay他、*FASEB J.* 14、231~241 (2000)
- 【非特許文献19】G.A.Jicha他、*Journal of Neurochemistry*、69、2087~2095 (1997)
- 【特許文献6】EP 637418 30
- 【特許文献7】EP 737208
- 【特許文献8】EP 772634
- 【特許文献9】EP 610330
- 【特許文献10】EP 618968
- 【非特許文献20】Lih-Fen Lue他、*GLIA* 35: 72~79、2001
- 【非特許文献21】Michael Hull他、*DDT* Vol.4、No.6: 275~282;(1999年6月)
- 【非特許文献22】F.Licastro他、*Journal of Neuroimmunology* 103 (2000)、97~102
- 【非特許文献23】Neuroinflammation Working Group: Haruhiko Akiyama他、*Neurobiology of Aging* 21 (2000) 383~421
- 【非特許文献24】Michael Hull他、*Exp. Opin. Invest. Drugs* (2000) 9(4): 671~683 40
- 【非特許文献25】M.Hull他、*Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* (1996) 246: 124~128
- 【非特許文献26】J.Rhodin他、*Annals New York Academy of Sciences*、199x、345~352
- 【非特許文献27】V.Schreiber他、*Molecular Medicine* 4: 675~687、1988
- 【非特許文献28】P.P.Ghillani他、「Monoclonal antipeptide antibodies as tools to dissect closely related gene products」、*The Journal of Immunology*、Vol.141、No.9、1988、3156~3163
- 【非特許文献29】P.P.Ghillani他、「Identification and Measurement of Calcitonin Precursors in Serum of Patients with Malignant Diseases」、*Cancer Research*、Vol 50

.49、No.23、1989、6845～6851

【特許文献11】US-A-4822733

【特許文献12】EP-B1-180492

【特許文献13】EP-B1-539477

【非特許文献30】J.Klose、「Fractionated Extraction of Total Tissue Proteins from Mouse and Human for 2-D Electrophoresis」、Methods in Molecular Biology、Vol. 112: 2-D Proteome Analysis Protocols、Humana Press Inc.、Totowa、NJ

【非特許文献31】J.Klose他、「Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome」、Electrophoresis 1995、16、1034～1059

【非特許文献32】J.Heukeshoven他、「Improved silver staining procedure for fast staining in Phast-System Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl gels」、Electrophoresis 1988、9、28～32

【非特許文献33】V.Neuhoff他、「Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250」、Electrophoresis 1988、9、255～262

【非特許文献34】A.Otto他、「Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis using an effective sample preparation for mass spectrometry」、Electrophoresis 1996、17、1643～1650

【非特許文献35】G.Neubauer他、「Mass Spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex」、nature genetics、vol.20、1998、46～50

【非特許文献36】J.Lingner他、「Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase」、Science、Vol.276、1997、561～567

【非特許文献37】M.Mann他、「Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleotide and protein sequence databases」、TRENDS in Biochemical Sciences、Vol.26、1、2001、54～61

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明は、霊長類およびヒトにおいて、大幅に過発現したタンパク質LASP-1または大型のN末端配列セグメント全体についてはこれと同一なタンパク質が、細胞質脳組織の感染によって引き起こされた炎症では可溶性の形態で検出可能であることに基づくものであり、これは特に、上記タンパク質が見出されずまたは検出の分析限界でのみ見出される健常者または治療をしていない者とは対照的なことであり、また敗血症の霊長類実験動物のその他の体組織とも対照的なことであり、このタンパク質を、脳に關係する炎症の診断および感染または敗血症の診断に適するようになされたものである。

【0016】

本発明はさらに、実質的に増大したLASP-1免疫反応性を、ヒト敗血症患者だけではなくアルツハイマー病患者の循環系でも測定可能であることが見出されたことに基づくものであり、これは霊長類の脳抽出物の基づいて得られた知識の価値を強調しまたは大幅に高めるものである。

【0017】

敗血症の炎症の実験的シミュレーションで脳に特異的なLASP-1の出現を初めて検出し、かつ循環系内で実質的に増大したLASP-1免疫反応性を検出することによって生じた診断の使用について、以下により詳細に述べる。

【課題を解決するための手段】

【0018】

請求項1から17は、本発明およびその好ましい実施形態により得られた新規な方法を定

10

20

30

40

50

義する。

【0019】

請求項18は、治療目的で、LASP-1免疫反応性を有するタンパク質またはそのようなタンパク質の特異的結合パートナーを使用することに関する。

【0020】

以下の実験の節でより詳細に述べるように、本発明の出発点は、エンドトキシン投与(サルモネラチフィムリウム(*Salmonella Typhimurium*)からのLPS)によってヒヒに実験的に人為的敗血症を引き起こし、2Dゲル電気泳動によって治療した動物の脳組織の後処理をした後に、既知のタンパク質LASP-1に対して実質的に同一であり特に少なくとも1~200のアミノ酸セグメントについては同一であるタンパク質が治療した動物でのみ同定可能な生成物の1つであり、このタンパク質がさらに、脳組織でのみ著しく増大した濃度で観察されることを見出したことであった。その同定を行うため、治療した動物の脳組織でのみ見出されかつゲル電気泳動によれば約 36 ± 3 kDaの分子量および約6.6~7.0の等電点を有している新しいタンパク質スポットを、電気泳動ゲルから分離し、トリプシン消化によって複数の断片に切り離れたが、前記断片は、質量分析によってそれ自体が知られている手法で分析されるものである。トリプシン処理したタンパク質LASP-1の既知の質量スペクトルとの比較により、分離したスポットのタンパク質は、少なくとも広範囲にわたるセグメントがタンパク質LASP-1と同一なタンパク質であると同定した。

【0021】

タンパク質スポット中に見出された生成物の同定については実験の節でより詳細に記述するが、記述される同定は、認められた解釈の原理によれば、タンパク質LASP-1のアミノ酸配列を有する生成物の安全な同定と見なされる。

【0022】

理論上決定されるLASP-1のペプチド鎖(配列番号1; 261アミノ酸 参照)の分子量は、29,717ダルトンである。しかしLASP-1は、翻訳後に処理された形態(グリコシル化およびリン酸化)で生理学的に存在する。したがってその後LASP-1と定義された生成物は、当初、胃壁細胞内の40kDa cAMP依存性リンタンパク質(「pp40」)と定義されていた(C.S.Chew他、*Journal of Cell Science* 113、2035~2045(2000); C.S.Chew他、*Am.J.Physiol.* 275(*Cell Physiol.*44): C56~C67、(1998)参照)。

【0023】

LASP-1と定義されたリンタンパク質のアミノ酸配列は、当初、染色体17の範囲q11~q21.3からの遺伝子「MLN 50」のcDNAの推定上の発現生成物と決定されていたが、この遺伝子は、ヒト乳癌細胞系で過発現したものである(C.Tomasetto他、*FEBS Letters* 373 (1995): 245~249; C.Tomasetto他、*Genomics* 28: 367~376 (1995); I.Bieche他、*Cancer Res.* 56: 3886~3890 (1996))。LASP-1という名称は、このタンパク質において初めて、いわゆるLIMドメイン(様々なタンパク質から知られるZn結合ドメイン; A.Hammarstorm他、*Biochemistry* 1996; 35、12723~12732参照)を受容体依存性のいわゆるsrcキナーゼ、チロシンキナーゼから知られるドメイン(SH3)と組み合わせたことに起因し得る(LIMおよびSH3タンパク質(LIM and SH3 Protein))(Brian K. Kay他、*FASEB J.* 14、231~241 (2000)も参照)。

【0024】

LASP-1 mRNAは、正常な細胞のどこにおいても検出可能であり(例えば前立腺、肝臓、筋肉、脳、様々な細胞型)、乳癌の場合にはある特定のパーセンテージで過発現する。LASP-1は、細胞骨格に関連するタンパク質に属することが想定され、かつ細胞形状および細胞移動度に重要でありおそらくはシグナル伝達にも重要であることが想定される、アクチン結合タンパク質であることがわかった。これは神経終末においても検出可能である。LASP-1は、辛うじて清浄剤にのみ可溶化する。生体外で、LASP-1は、cAMP依存性セリン-トレオニンキナーゼPKAにより著しくリン酸化できる基質になることが証明されている。LASP-1は、種々の上皮細胞型で種々の発現パターンを有する(C.S.Chew他、*Journal of Cell Science* 113、2035~2045 (2000); C.S.Chew他、*Am. J.Physiol.* 275 (*Cell Physiol.* 44):

10

20

30

40

50

C56～C67、(1998)参照)。

【0025】

敗血症の脳組織に、LASP-1またはこれに実質的に相当するタンパク質が過発現形態で出現することは、著しく科学的で、診断において、およびおそらくは治療においても関心あるものである。LASP-1がキナーゼ基質およびリントタンパク質であるという事実によって、いわゆるタウタンパク質とのある類似性が与えられるが、これは特に診断目的で、アルツハイマー病において役割を果たす(例えば、G.A.Jicha他、Journal of Neurochemistry、69、2087～2095 (1997)およびそこに引用される文献;およびEP 637418; EP 737208; EP 772634; EP 610330; EP 618968参照)。

【0026】

現在では、アルツハイマー病を、その病気の原因またはその病気の結果に関して記述することを全く意図することなく、脳に特異的な炎症過程であると見なすことができることは周知である(Lih-Fen Lue他、GLIA 35: 72～79、2001; Michael Hull他、DDT Vol.4、No.6: 275～282;(1999年6月); F.Licastro他、Journal of Neuroimmunology 103 (2000)、97～102; Neuroinflammation Working Group: Haruhiko Akiyama他、Neurobiology of Aging 21 (2000) 383～421; Michael Hull他、Exp. Opin. Invest. Drugs (2000) 9(4): 671～683; M.Hull他、Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci (1996) 246: 124～128; J.Rhodin他、Annals New York Academy of Sciences、199x、345～352)。リントタンパク質LASP-1またはこれに実質的に相当するタンパク質は、敗血症または全身性炎症過程をシミュレートする実験条件下、特に脳内において過発現の形で検出可能であるので、LASP-1またはある特定の発現形態のLASP-1の過発現がアルツハイマー病においても観察可能であることが、ほぼ確実なものとされ、したがってLASP-1の決定は、アルツハイマー病の診断にも重要なものである。その後実施される、LASP-1の最初の200アミノ酸の配列に割り当てることが可能な、敗血症およびアルツハイマー病患者の血清の免疫反応性に関する免疫診断決定によって、この仮説が、確信ある見事な手法で実験的に確認された。

【0027】

LASP-1に関する今日までの文献は、そのような可能性を決して示すものではない。今日までの利用可能な知見に基づけば、敗血症および/またはアルツハイマー病などの脳特異的炎症の結果として、脳内および循環系内にもおけるLASP-1の生理学的な濃度が著しくかつ検出可能に変化したことは、予期されなかったことであり、したがって敗血症の過程または炎症性脳疾患の過程におけるLASP-1濃度を決定することは、診断上関心あるものと考えられる。

【0028】

本発明により、毒素投与によって人為的に敗血症を誘発させた霊長類の脳組織内で比較的高いLASP-1濃度が検出されるが、このとき、他の方法で完全同一に処置した対照動物サンプルまたは敗血症動物のその他の組織サンプルにおいてLASP-1を検出することは同時に不可能な状態であり、その後、ヒト循環系における免疫診断を行うことは、非常に有意なことである。この出現は、処置した動物でのみ、特に毒素投与によって敗血症が誘発されてから比較的短時間しか経過していないものでのみ観察可能であるので、この事実を、LASP-1免疫反応性を決定することによって敗血症、感染症、および炎症を診断する将来有望な診断法を提供するのに利用することが可能である。さらに、アルツハイマー病の診断マーカーおよび予後マーカーとしてLASP-1が適していることが証明されたことは、特に興味深いものである。

【0029】

LASP-1の決定は、あらゆる任意の適切なアッセイ法によって実施することができるが、適切な選択的抗体を使用する免疫診断経路によって(イムノアッセイを用いて)、患者のリカー(脳脊髄液)を含めた体液で決定することは、実用の観点から最も有利なものと考えられる。

【0030】

霊長類の脳に実験的に敗血症を誘発させ、その後、ヒト患者の循環系にも誘発させたと

10

20

30

40

50

きに、LASP-1またはこれと実質的に同一なタンパク質の出現の増大を初めて検出することができたので、特に脳内での発生が顕著である炎症および感染に関連した診断目的でLASP-1免疫反応性を使用する可能性が生み出される。このため、特に合成または遺伝子工学的の方法によって、また任意選択で現在では従来技術の一部であるプロセスによって、LASP-1またはその適切な部分ペプチドまたはエピトープまたはエピトープの組合せを調製することが可能である。任意選択でマークされた形のLASP-1部分ペプチドは、免疫診断決定のためのある特定のアクセイフォーマット用の校正物質、トレーサー、および競合物質として必要である場合もあり、このため、説明した手法で調製される。ある特定の、現在好ましい特定の実施形態について、以下の実験の節でより詳細に述べる。

【0031】

さらに、LASP-1断片またはその適切な部分配列は、患者の体液中のLASP-1を診断決定するための助剤としてかつ/または可能性ある治療薬としても適切な、特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体を生成するために、既知の最新の現況技術により使用することもできる。ある特定の現在好ましい特異的ポリクローナル親和性精製抗LASP-1抗体について、以下の実験の節でより詳細に述べる。既知のペプチド部分配列に対して適切なモノクローナル抗体の生成は、現在、一般的な従来技術の一部であり、特に説明する必要はない。さらに、対応するDNAと共に直接的遺伝免疫化の技法を使用する抗体の生成についても、明らかに述べるべきである。したがって、得られる抗体のスペクトルは、そのような免疫化技法を使用することによって広がるのがこれまでにわかったので、例えば免疫化のためにLASP-1またはLASP-1断片のcDNAを使用することは本発明の範囲内である。しかし、LASP-1に対する既知の抗体を使用することも可能である(例えば、V.Schreiber他、Molecular Medicine 4: 675~687、1988; C.S.Chew他、Am.J.Physiol. 275 (Cell Physiol. 44): C56-C67、(1998)参照)。

【0032】

本明細書に記載する研究過程において、モル質量が約36kDaでありかつ記述した決定に十分な溶解性を有するLASP-1生成物が2D電気泳動のゲル内に見出されたので、見出されたLASP-1生成物は、文献に記載された実際のLASP-1とは異なる発現生成物、例えば選択的スプライシングの生成物であり、かつ/またはあるタイプのグリコシル化および/またはリン酸化を有し、それによって観察された溶解性を与えかつそれに基づいて胃壁から分離された40kDa生成物とは著しく異なることを、除外するものではない。したがって、特定の部分配列および/または任意選択でグリコシル化および/またはリン酸化パターンも検出される特定のアクセイの助けを借りてLASP-1の決定を実施することは、この調査の始めから本発明の範囲内にあるものとみなされていた。特定のグリコシル化および/またはリン酸化を認識する抗体の調製、特にモノクローナル抗体の調製については原則として知られており、例えばアルツハイマー病の診断の一部として、いわゆるタウタンパク質のある特定リン酸化形態を決定することに関して記述されている。

【0033】

LASP-1の免疫学的決定では、原則として、例えばP.P.Ghillani他、「Monoclonal antipeptide antibodies as tools to dissect closely related gene products」、The Journal of Immunology、Vol.141、No.9、1988、3156~3163;およびP.P.Ghillani他、「Identification and Measurement of Calcitonin Precursors in Serum of Patients with Malignant Diseases」、Cancer Research、Vol.49、No.23、1989、6845~6851で選択的プロカルシトニン決定に関して記述されるように進めることが可能である。記述される技法および/または別の免疫化技法の変形例は、関係する標準的な研究および文献で当業者により見出すことができ、これをその文脈内で適用することができる。

【0034】

LASP-1、あるいは任意選択でLAP-1などの一部同一の配列を有するLASP-1断片または生成物は、利用可能な結果に基づいて、免疫反応性、または炎症および感染(特に、敗血症タイプの全身感染症およびアルツハイマー病などの脳の炎症)を診断しモニタするための特異的マーカーペプチド(生物マーカー)としての役割を果たすことができる。プロカルシ

10

20

30

40

50

トニンの決定の場合と同様に、LASP-1の決定は、炎症および感染の早期識別診断、検出、予後診断の準備、重症度の評価、および経過の治療に伴う評価を目的として行うことができ、LASP-1の含量は、好ましくはいわゆるリカーも含めた生体液サンプルにおいてまたは任意選択で患者の組織のサンプルにおいてそのような方法で決定され、脳に関わる炎症の存在あるいは決定されたLASP-1の存在および/または量からの敗血症の存在に関する結論が引き出され、得られた結果は敗血症の重症度に相関するものであり、任意選択で治療の可能性および/または治療の見通しが評価される。

【0035】

少なくとも1つの別の炎症または感染パラメーターが同時に決定され、少なくとも2個の測定量が一組になった形で測定された結果が得られかつそのような結果が炎症または感染の緻密な診断のために評価される、マルチパラメーター決定の一部としてのLASP-1の決定は、特に興味あるものと考えられる。このタイプの別の炎症または感染パラメーターは、一部が知られておりあるいは従来技術または本出願人の並行特許出願に開示されているパラメーターからなる群から選択されたものと見なされ、そのような群は、プロカルシトニン、CA125、CA19-9、S100B、S100Aタンパク質、可溶性サイトケラチン断片、特にCYFRA21、TPS、および/または可溶性サイトケラチン-1断片(sCY1F)、ペプチドインフラミンおよびCHP、ペプチドホルモン、グリシンN-アシルトランスフェラーゼ(GNAT)、カルバモイルリン酸シンターゼ1(CPS1)およびその断片、C-反応性タンパク質(CRP)、または前記タンパク質の全ての断片からなるものである。チップ技術測定装置または免疫クロマトグラフィー測定装置を用い、同時決定としてマルチパラメーター決定を実施することが有利であるが、これらの装置を使用して得られた複合測定結果の評価は、コンピュータプログラムの支援により実施される。

10

20

【0036】

好ましい実施形態では、この方法は不均一サンドイッチイムノアッセイとして実施され、すなわち抗体の一方が、例えば被覆済み試験管壁(例えばポリスチレンからなる;「コーテッドチューブ(coated tube)」; CTからなる)などの任意の固相上に、または例えばポリスチレンからなるマイクロタイタープレート上に、または例えば磁性粒子などの粒子表面に固定化されており、他方の抗体は、直接検出可能な標識を表す残基を持ちまたは標識と選択的に結合することが可能であり、形成されたサンドイッチ構造の検出に役に立つものである。適切な固相を使用して、遅延させまたはその後に行う固定化も可能である。

30

【0037】

原則として、記述したタイプのアッセイで使用することができる全てのマーキング技法を使用することが可能であり、その技法には、放射性同位元素、酵素、あるいは蛍光、化学発光、または生物発光標識によるマーキングと、特にポイントオブケア(POC)または加速試験に使用されるような、例えば金原子および染色粒子などの直接光学的に検出可能なカラーマーキングが含まれる。不均一サンドイッチイムノアッセイの場合、2個の抗体は、均一アッセイに関連して以下に述べるタイプの検出系の一部を有してもよい。

【0038】

したがって、本発明による方法を加速試験としても設計することは、本発明の範囲内にある。

40

【0039】

本発明による方法はさらに、2個の抗体とLASP-1とから形成された検出されるべきサンドイッチ複合体が液相に懸濁されたままの、均一方法として設計することができる。そのような場合、検出系の一部でどちらの抗体もマークすることが好ましく、それによって、どちらの抗体も単一のサンドイッチに一体化したときに、シグナルを発生させまたはシグナルのきっかけをもたらすことが可能になる。このような技法は、特に、蛍光増幅または蛍光消去を検出する方法として設計することができる。このタイプの特に好ましい方法は、例えばUS-A-4822733、EP-B1-180492、またはEP-B1-539477、およびそこに引用されている従来技術に記載されるように、対になって用いられる検出試薬の使用に関する。これらの方法によれば、単一の免疫複合体中に2つのマーキング成分を含有する反応生成物のみ

50

選択的に測定されるような測定が、反応混合物中で直接可能になる。一例として、TRACE(登録商標)(時間分解増幅クリプテート放出(Time Resolved Amplified Cryptate Emission))またはKRYPTOR(登録商標)という商標で提供された、上記出願の教示を実現する技術を参照することができる。

【0040】

以下に、様々な疾患に罹っている患者の生体液(血清または血漿)におけるLASP-1の発見および同定とその決定について、より詳細に述べる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0041】

1.動物モデル(ヒヒ)へのエンドトキシン投与による感染シミュレーション

10

エンドトキシン注入によるプロカルシトニン分泌の刺激に関してヒヒで実施された実験に基づき(H.Redl他、「Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin」、Crit Care Med 2000、Vol.28、No.11、3659~3663; H.Redl他、「Non-Human Primate Models of Sepsis」、Sepsis 1998、2:243~253参照)、複数のヒヒ(約2才のオス、体重27~29kg)にそれぞれ、体重1kg当たりLPS(サルモネラチフィウムからのリポ多糖、Sigma提供)100 μ gを静脈内投与した。注射をした5~5.5時間後、これらの動物にドレタール10mlを静脈内投与して、犠牲にした。これら動物の死後60分以内に、全ての器官/組織を切り取り、液体窒素中で凍結させることにより安定化させた。

【0042】

20

さらに処理中、緩衝液A(50mM Tris/HCl、pH7.1、100mM KCl、20%のグリセロール)1.5mlを、窒素で冷却しながら個々の凍結組織サンプル(1g)に添加し、そのサンプルを陶製乳鉢で微粉碎して粉末を得た(J.Klose、「Fractionated Extraction of Total Tissue Proteins from Mouse and Human for 2-D Electrophoresis」、Methods in Molecular Biology、Vol.112: 2-D Proteome Analysis Protocols、Humana Press Inc.、Totowa、NJ参照)。その後100,000gで1時間、+4 で遠心分離した後、得られた上澄みを回収し、さらなる処理に必要とされるまで-80 で貯蔵した。

【0043】

2.ヒヒの細胞質脳タンパク質を使用したプロテオーム分析

一方では健康なヒヒ(対照)と、他方ではLPSを注射したヒヒとの細胞質脳細胞タンパク質抽出物を、プロテオーム分析で使用した。初期分析用2Dゲル電気泳動では、タンパク質100 μ gを含有する脳抽出物を安定化させて9M尿素、70mM DTT、2%両性電解質、pH2~4にし、次いでJ.Klose他、「Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome」、Electrophoresis 1995、16、1034~1059に記載されるように、分析用2Dゲル電気泳動によって分離した。2D電気泳動ゲルにおけるタンパク質の視覚化は、銀染色によって行った(J.Heukeshoven他、「Improved silver staining procedure for fast staining in Phast-System Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl gels」、Electrophoresis 1988、9、28~32参照)。

30

【0044】

40

評価のため、処置した動物のサンプルのタンパク質スポットパターンと、未処置の動物の脳組織サンプルから得られたタンパク質スポットパターンとを比較した。さらに、処置した動物の脳組織のタンパク質スポットパターンを、同じ処置動物のその他の組織サンプルとも比較した(その結果については個々に示していない)。対照サンプルでは出現しないが追加として全ての処置動物で出現した物質を選択して、さらなる分析調査に供した。図1は、対照サンプル(A)と処置動物サンプル(B)に関する2D電気泳動ゲルの比較を示し、(B)における追加のタンパク質スポットは新規なタンパク質に対応し、その位置は矢印および円により強調されている。

【0045】

次いで分析用2D電気泳動のタンパク質スポットパターンで同定された新規な特異的タン

50

パク質を、タンパク質350 μ gを使用する調製用2Dゲル電気泳動によって調製した(再び(10)参照)。調製用2Dゲル電気泳動では、染色を、クーマシーブリリアントブルーG250によって行った(V.Neuhoff他、「Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250」、Electrophoresis 1988、9、255~262参照)。

【0046】

さらなる分析のため事前選択されたタンパク質スポットを、A.Otto他、「Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis using an effective sample preparation for mass spectrometry」、Electrophoresis 1996、17、1643~1650に記載されている方法を使用してゲルから切り取り、トリプシン消化し、次いで質量分析を用いて、特に例えばG.Neubauer他、「Mass Spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex」、nature genetics、vol.20、1998、46~50; J.Lingner他、「Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase」、Science、Vol.276、1997、561~567; M.Mann他、「Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleotide and protein sequence databases」、TRENDS in Biochemical Sciences、Vol.26、1、2001、54~61に記載され論じられている質量分光分析調査を用いて分析した。トリプシン消化サンプルを、MALDI-TOF質量分析にかけた。

【0047】

3.LASP-1の同定

図1(A)および1(B)に示すように、LPS注射による投与がなされたヒヒの脳組織抽出物は、とりわけ、既知の分子量のマーカー物質との比較によるゲル電気泳動データに基づいて約36kDa \pm 3kDaの分子量であることが評価され、かつ一方で約6.6~7.0の等電点が第1の寸法からのタンパク質の相対的な位置から決定された、タンパク質のスポットを含有する。

【0048】

新規なタンパク質スポットのトリプシン消化の質量分析では、ペプチドに割り当てようとする試みが、データベース情報に基づき21の断片について着手された。その結果は、得られた割当のうち12が、リンタンパク質LASP-1のタンパク質鎖の断片(配列番号1)に対応していた。いわゆる「配列カバー率」は38%であり、これは当技術分野で一般に認められている基準によれば、LASP-1のタンパク質鎖としてスポットに含有されているタンパク質が明らかに確認されたと見なすべきである。

【0049】

したがって例えば、以下のマスマフラグメント、すなわち1202.714; 1254.615; 1291.745; 1360.813; 1418.898; 1443.959; 1489.826; 1551.943; 1604.040; 1608.960をLASP-1タンパク質鎖(配列番号1)に割り当てることが可能であり、特にMS-Fit 3.3.1. Protein Prospector 3.4.1.、データベースNCBI no.7.25.2002による割当ては、以下の通りであった。

【0050】

質量1202.714(MH⁺)は、配列QQSELQSQVR(配列番号2)に対応する。この断片の理論分子量は1201.604である。LASP-1のアミノ酸配列では、この配列が位置76~95に生ずる。

【0051】

質量1254.615は、配列ACFHCETCK(配列番号3)に対応する。この断片の理論分子量は1253.498である。LASP-1のアミノ酸配列では、この配列が位置28~36に生ずる。

【0052】

質量1291.745は、配列KPYCNAHYPK(配列番号4)に対応する。この断片の理論分子量は1290.617である。LASP-1のアミノ酸配列では、この配列が位置50~59に生ずる。

【0053】

質量1360.813は、配列VNCLDKFWHK(配列番号5)に対応する。この断片の理論分子量は1359.675である。LASP-1のアミノ酸配列では、この配列が位置18~27に生ずる。

【0054】

10

20

30

40

50

質量1418.898は、配列GFSVVADTPELQR(配列番号6)に対応する。この断片の理論分子量は1417.719である。LASP-1のアミノ酸配列では、この配列が位置97~109に生ずる。

【0055】

質量1443.959は、配列LKQQSELQSQVR(配列番号7)に対応する。この断片の理論分子量は1442.783である。LASP-1のアミノ酸配列では、この配列が位置74~85に生ずる。

【0056】

質量1489.826は、配列MGPSGGEGMEPERR(配列番号8)に対応する。この断片の理論分子量は1488.644である。LASP-1のアミノ酸配列では、この配列が位置131~144に生ずる。

【0057】

質量1551.943を、配列TGDTGMLPANYVEAI(配列番号9)に割り当てた。この断片の理論分子量は1550.728である。LASP-1のアミノ酸配列では、この配列が位置247~261に生ずる。

【0058】

質量1604.040は、配列GKGFSVVADTPELQR(配列番号10)に対応する。この断片の理論分子量は1602.836である。LASP-1のアミノ酸配列では、この配列が位置95~109に生ずる。

【0059】

質量1608.960は、配列QSFTMVADTPENLR(配列番号11)に対応する。この断片の理論分子量は1607.761である。LASP-1のアミノ酸配列では、この配列が位置60~73に生ずる。

【0060】

記述した10個の同定断片のうち、9個の断片は、LASP-1のアミノ酸1~200のセグメントに生じ、すなわちいわゆるSH3ドメインの前に存在するようなタンパク質セグメントは、アミノ酸202で始まる。

【0061】

認められている解釈の原則によれば、そのような一致は、少なくともアミノ酸1~200の範囲内でLASP-1に対応するタンパク質として、タンパク質スポットからの生成物を安全に同定したものと見なされる。しかし非リン酸化LASP-1の分子量(261アミノ酸;配列番号1参照)は、わずかに29,717ダルトンである。しかし文献からわかることは、ゲル電気泳動によるモル質量の決定の場合、配列番号1によるアミノ酸配列を有するLASP-1として見出された物質の同定とは対照的に、モル質量に関して見出されずれが必ずしも必要ではないように、LASP-1が不規則な挙動を示すように見られることである。

【0062】

しかし同様に、検出された生成物が前記LASP-1とは異なること、例えば選択的スプライシングの生成物であることを、完全に除外することはできない。したがって、別の関連ある発現生成物ではないかという可能性を探るため、見出されたタンパク質スポットを密接に関連したより長いタンパク質に割り当てる可能性を探る意図で、後続の調査を実施した。cDNAデータベースに暗黙的に存在する情報を使用して実施した後続の調査によって、LASP-1に関係しかつ選択的スプライシングの生成物である可能性があり、さらにSH3ドメインの代わりに123アミノ酸の選択的C末端アミノ酸残基を有する、より長いタンパク質を発見するに至った。このタンパク質は同じアミノ酸1~200 LASP-1を有し、したがってLASP-1に匹敵する免疫反応性が予想された。前記関係するタンパク質に、LAP-1という名称を与えた。その同定に関し、さらなる情報が以下の第5節で見出される。

【0063】

4. ヒト患者の血清におけるLASP-1免疫反応性の免疫診断決定

4.1. イムノアッセイ-材料および方法

4.1.1. ペプチド合成

ヒトLASP-1の既知のアミノ酸配列から得られた、3つの範囲(位置121~137:ペプチド範囲1、位置147~159:ペプチド範囲2、位置170~187:ペプチド範囲3)を選択した。N末端システイン残基により補われるどの場合にも、これらの範囲を、標準的な方法によって可溶性ペプチドとして化学的に合成し、精製し、質量分析法および逆相HPLCを用いた品質管理にかけ、一定分量に分けて凍結乾燥した(JERINI AG、ベルリン、ドイツ)。合成ペプチドのアミノ酸配列は、

10

20

30

40

50

ペプチドPKE18 CKYHEEFKSRMGPSGGE (配列番号13)
 ペプチドPQ14 CQDGSSYRRPLEQQ (配列番号14)
 ペプチドPVK19 CVYQQPQQQPVAQSYGGYK (配列番号17)
 である。

【0064】

標準のペプチドとして、配列番号1によるLASP-1の位置121~137、147~159、170~187からなる以下のペプチドも合成した。

ペプチドPKK54 KYHEEFKSRMGPSGGEQQDGSSYRRPLEQQGGGVYQQPQQQPVAQSYGGYK (配列番号15)

【0065】

以下の考慮すべき事項は、ペプチドの選択に極めて重要であった。

【0066】

261アミノ酸を含むタンパク質LASP-1は、2つの潜在的なタンパク質結合ドメインを含有し、すなわちLIMドメインをN末端に有し(位置5~56)、SH3ドメインをC末端に有する(位置202~261)(上記引用したTomasetto他、1995参照)。これらのドメインを介してLASP-1が上記タンパク質結合に進入するかどうか、またどのタンパク質結合に進入するのか、今日までわかっていない。2つの可能なアクチン結合ドメインが、LASP-1の別の構造的特徴として記載されており、それらは位置61~133の範囲内に連続して直接位置付けられ(上記引用したSchreiber他、1998参照)、LASP-1は実際にアクチンに結合できることが示されている(上記引用したSchreiber他、1998参照)。アクチンとの結合は、位置99および146でのリン酸化の影響を受ける(上記引用したChew他、2002)。

【0067】

LASP-1用イムノアッセイの開発のため、およびLASP-1も細胞外から検出可能であるかどうかに関する問題を検討するため、すなわち健康者および病気の人々の血清/血漿サンプルにおける免疫反応性として検討するために、本発明者等は、LASP-1の構造に関する上述の既知の情報を利用した。すなわちLIMおよびSH3ドメインの範囲内には無い3つのペプチドを免疫化用として選択し、それはLASP-1中のこれらドメインが、結合しているタンパク質によって抗体に接触していない可能性があるからである。さらに、選択された3つのタンパク質は、記述したリン酸化部位を含有していない。これらペプチドの1つについては、一部が、可能なアクチン結合範囲内にあることが認められた。

【0068】

4.1.2. 結合および免疫化

MBS(m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)を用いることにより、ペプチドPKE18、PQ14、およびPVK19をそれぞれ担体タンパク質KLH(キーホールリンペットヘモシアニン)に結合させた(PIERCE、Rockford、IL、USAからの作業説明書「NHS-エステル-マレイミド架橋剤」参照)。以下のスキームに従い、ヒツジをこれらの結合体で免疫化した。最初に、各ヒツジに結合体100 μ gを与え(結合体のペプチド含量に基づき示された質量)、次いで4週間ごとに結合体50 μ gを与えた(結合体のペプチド含量に基づき示された質量)。免疫化開始後4カ月から、ヒツジ1頭当たり700mlの血液を4週間ごとに採取し、そこから遠心分離によって抗血清を得た。結合、免疫化、および抗血清の回収は、MicroPharm、Carmarthenshire、UKによって実施した。

【0069】

4.1.3. 抗体の精製

1段階の方法では、ペプチド特異的抗体を、免疫化後4カ月から得られた抗血清から調製した。

【0070】

このため、ペプチドPKE18、PQ14、およびPVK19を最初にSulfoLinkゲルに結合させた(PIERCE、Rockford、IL、USAからの作業説明書「SulfoLink Kit」参照)。ゲル5ml当たりペプチド5mgを結合に供した。

【0071】

10

20

30

40

50

両ペプチドに対するヒツジ抗血清からのペプチド特異的抗体の親和性精製は、以下の通り実施した。

【0072】

最初にペプチドカラムを、それぞれ10mlの溶出緩衝液(50mMクエン酸、pH2.2)および結合緩衝液(100mMリン酸ナトリウム、0.1% Tween、pH6.8)で交互に3回洗浄した。抗血清50mlを0.2 μ mに通して濾過し、存在するカラム材料を加えた。このため、カラムからの結合緩衝液10mlでゲルを定量的に濯いだ。インキュベーションは、攪拌しながら室温で一晩行った。それぞれのバッチを空のカラム(NAP 25、Pharmacia、空にしたもの)に定量的に移した。カラム通過物を廃棄した。次いで材料を、タンパク質が含まれないように、結合緩衝液250mlで洗浄した(洗浄溶出液のタンパク質含量<0.02 A280nm)。溶出緩衝液をこの洗浄したカラムに加え、1mlの画分を収集した。各画分のタンパク質含量は、BCA法を用いて決定した(PIERCE、Rockford、IL、USAからの作業説明書参照)。タンパク質濃度が>0.8mg/mlである画分を貯め、PBS緩衝液で中和し、タンパク質濃度が約1mg/mlになるように希釈した。収量は、抗PKE18抗体45mg、抗PQQ14抗体59mg、および抗PVK19抗体14mgであった。

【0073】

4.1.4. マーキング

抗体の化学発光マーキングでは、MA70アクリジニウムNHSエステル(1mg/ml; HOECHST Beringから)10 μ lの分量を、抗PVK19抗体(1mg/ml)100mlおよび抗PQQ14抗体(0.8mg/ml)125 μ lに添加し、室温で15分間インキュベートした。その後、1Mグリシン400 μ lをそれぞれの場合に添加し、インキュベーションをさらに10分間行った。その後、作業説明書に従ってこれらマーキングバッチを、それぞれ1mlの移動相A(50mMリン酸カリウム、100mM NaCl、pH7.4)中、NAP-5ゲル濾過カラム(Pharmacia)を使用してバッファチェンジ(buffer change)にかけ、それによって低分子量成分から切り離した。抗体に結合していない標識の最終残留物を分離除去するため、ゲルHPLCを実施した(カラム: Waters Protein Pak SW300)。サンプルを適用し、移動相Aを使用して1ml/分の流量でクロマトグラフィーにかけた。波長280nmおよび368nmを、流動式光度計を使用して測定した。抗体マーキング度の指標としての吸収比368nm/280nmは、いずれの抗体についても0.10であった。抗体を含有するモノマー画分(保持時間8~10分)を収集し、3mlの、100mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl、5%ウシ血清アルブミン、0.1%アジ化ナトリウム、pH7.4中に収集した。

【0074】

4.1.5 結合

照射された5mlポリスチレンチューブ(Greiner製)を、以下のように抗PQQ14抗体または抗PKE18抗体で被覆した。すなわちこれら抗体を、50mM Tris、100mM NaCl、pH7.8中に、6.6 μ g/mlの濃度になるように希釈した。この溶液300 μ lを各チューブにピペット分注した。これらチューブを22 $^{\circ}$ Cで20時間インキュベートした。溶液を吸引濾過した。次いで各チューブに、4.2mlの、10mMリン酸ナトリウム、2% Karion FP、0.3%ウシ血清アルブミン、pH6.5を満たした。20時間後、この溶液を吸引濾過した。最後に、チューブを真空乾燥器内で乾燥した。

【0075】

4.2. イムノアッセイおよびその評価の実施

4.2.1. アッセイの設計および手順

以下の組成を有するアッセイ用緩衝液を調製した。

100mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl、5%ウシ血清アルブミン、0.1%非特異的ヒツジIgG、0.1%アジ化ナトリウム、pH7.4

【0076】

LASP-1の位置121~137、147~159、170~187を含有する、化学合成された人工ペプチドPKK54は(配列番号15)、標準物質として役立てた。このペプチドを、正常なウマ血清(SIGMA製)中に連続希釈した。このように調製した複数の標準物質に、計量したペプチドの量に応じて濃度を割り当てた。

【0077】

10

20

30

40

50

測定サンプルは、明らかな健常者、敗血症罹患患者、アルツハイマー病罹患患者、および心筋梗塞離間患者からのEDTA血漿または血清であった。

【0078】

3タイプのサンドイッチアッセイを実施した。以下の抗体の組合せを使用した。

チューブ:抗PKE18/トレーサー:抗PVK19

チューブ:抗PQQ14/トレーサー:抗PKE18

チューブ:抗PQQ14/トレーサー:抗PVK19

【0079】

全てのアッセイを以下の通りに実施した。

【0080】

それぞれ50 μ lの標準物質またはサンプルと150 μ lのアッセイ緩衝液を、試験管にピペットで分注した。インキュベーションを、振盪させながら22 $^{\circ}$ Cで2時間行った。次いで試験管1本当たり毎回1mlの洗浄溶液(0.1% Tween 20)を用いて4回洗浄を行った。次いで0.5 $\times 10^6$ RLUのMA70でマークしたトレーサー抗体を含有するアッセイ緩衝液200 μ lを、各試験管にピペットで分注した。インキュベーションを、振盪させながら22 $^{\circ}$ Cで2時間行った。次いで試験管1本当たり毎回1mlの洗浄溶液(0.1% Tween 20)を用いて4回洗浄を行い、その試験管から雫を落とし、試験管に結合した化学発光をルミノメータ(BERTHOLD、LB952T;塩基性試薬BRAHMS AG)で測定した。

【0081】

MultiCalcソフトウェア(スプラインフィット)を使用して、LASP-1免疫反応性の濃度を

10

20

読み取った。

【0082】

4.2.2. 結果

驚くべきことに、上記3つのサンドイッチアッセイ全てに関し、敗血症罹患患者の血清において十分かつ比較可能なLASP-1免疫反応性が検出可能であることがわかった(図3参照)。この免疫反応性は、健常者からの対照サンプルの場合よりも十分に高かった。血液循環系でLASP-1免疫反応性の出現が検出されたことは、LASP-1が分子の細胞外局在化を予測可能にする構造的特徴(シグナル配列など)を含んでいないので、そのLASP-1の背景知識に反して驚きであった。また従来技術では、そのような可能性ある局在化の指標を全く示していない。むしろ、細胞膜伸長での細胞内局在化について記述されている(上記引用され

30

【0083】

これらアッセイのうち1つでは(チューブ:抗PQQ14/トレーサー:抗PVK19)、より大規模な測定を実施した。ウマ血清中に標準ペプチドPKK54を希釈したものを、標準化のために使用した。敗血症罹患患者からの血清の非常に多くの場合について、LASP-1免疫反応性の十分な増大が確認された(図4)。健康な対照に比べて同様に増大した免疫反応性は、アルツハイマー病罹患患者に関しても検出され(図5)、また若干少ない程度で、心筋梗塞罹患患者に関しても検出された(図6)。

【0084】

4.2.3. 血清におけるLASP-1のタンパク質結合に関する情報

40

個々の血清サンプルに関するシグナル強度は、サンドイッチイムノアッセイでは検体濃度にほぼ比例したものであり、3つの異なるアッセイの間で相関していた(図3)。この相関は、全ての測定サンプルで使用された抗体の結合のため、3個のエピトープ全てが同様の手法で近付き易いことを示している。その他のタンパク質に結合していない検体の場合、このことは予想することができ意外なことではない。しかしLASP-1では、タンパク質の結合に関していくつかの可能性が記載されている(上記引用文)。エピトープの1つ(位置121~137)はアクチン結合部位に重なっている。したがって明らかに、この結合部位は、この血清中で測定可能な検体においてLASP-1免疫反応性に関与しない。その他の2個のエピトープ(位置147~159および位置170~187)は、タンパク質結合ドメインの外側にある(アクチン結合部位LIM、SH3)。したがって、結合タンパク質によるこれら同位元素での抗体結

50

合に及ぼす直接的な影響は、予測されない。しかし、タンパク質結合の場合、抗体結合の間接的立体障害が生ずる可能性を、排除することはできない。しかし、これは明らかに事実とは異なる。血清中のLASP-1免疫反応性が実際に自由に存在するかどうかは、本発明の分析によってまだ証明されておらず、さらなる調査によって決定しなければならないと考えられる。

【0085】

5. 血清中のLASP-1免疫反応性の同一性

全ての既知のヒトタンパク質またはcDNAから得られたタンパク質に関してGenBankデータベースに登録された配列と共に抗LASP-1抗体を生成するのに使用された3つのペプチドPKE18(LASP-1内の位置121~137;配列番号13)、PQQ14(LASP-1内の位置147~159;配列番号14)、およびPVK19(LASP-1内の位置170~187;配列番号17)アミノ酸配列の比較は、LASP-1(例えば受入番号BC012460)の他に、これらの配列を含有する第2のタンパク質(受入番号BC0075660)が存在することを示していた。これを以後LAP-1と呼ぶ。配列番号16による配列を割り当てることができる。したがって、上述のイムノアッセイによって測定された免疫反応性は、LASP-1(配列番号1)そのものとLAP-1(配列番号16)との両方に由来すると考えられる。

【0086】

本出願人はまだ、データベースへの1次構造の登録に加え、LAP-1に関するいかなる従来技術も承知していない。したがって、LAP-1と比較したLASP-1の構造および発生に関するより詳細な情報を得るために、本発明者自身がより大規模な分析を実施したが、その結果を以下にまとめる。

【0087】

LASP-1およびLAP-1は明らかに、全く同一の遺伝子の1次転写物の異なるスプライシングから得られ、LASP-1およびLAP-1(受入番号BC007560およびBC012460)のcDNAの配列を、ヒトゲノムの配列と比較した。関連する遺伝子は、染色体17に、すなわち17q21に近い領域39.023K~39.076Kに局在化した。これらの配列の比較により、遺伝子のエキソン-イントロン構造を導き出すことが可能であった。LASP-1およびLAP-1に関するcDNAは、8個のエキソンのスプライシングから得られる。エキソン2~5は、2つのcDNAに関して異なっていない。しかしエキソン6、7、および8は2つのcDNAに関して同一ではなく、互いに重複している。エキソン1は、5'末端の長さに関して2つのcDNAで異なっている。依然として不明瞭なのは、2つのcDNAの異なる長さのエキソン1が、mRNAの逆転写における異なる転写開始部から得られるのかあるいは異なる切断部から得られるのかどうかである。翻訳された領域は、どちらのcDNAに関しても、エキソン7の3'領域から5'領域へと延びており、2つの翻訳生成物のアミノ酸配列は、アミノ酸プロリン(位置200)まで同一であるが、その後は完全に異なっている(配列番号16と比較した配列番号1参照)。LASP-1は、261のアミノ酸を一緒に含み、LAP-1は323のアミノ酸を含む。LASP-1では、SH3ドメインが位置202で始まる。このSH3領域はLAP-1に存在せず、既知の機能を持つ別の領域により置き換えられることは確かである。LAP-1内にはSH3が欠けているので、そのように命名された(「LASP-1」では、SがSH3ドメインを表す)。

【0088】

LASP-1とLAP-1のいずれについても、EST(発現配列タグ)が、関連あるGenBank「ヒトESTエントリー」データベース内に存在する(例えば、LASP-1についてはBU553748であり、LAP-1についてはBG281978である)。これは、上述のエントリーBC007560およびBC012460が唯一の観察項目でもアーチファクトでもなく、むしろどちらのスプライシング変種も実際に発現することを表していることを、明らかに示している。しかし、遺伝子がLASP-1またはLAP-1内で発現する条件は分かっていない。

【0089】

LASP-1での実質的な配列同一性に基づいて、LAP-1の決定および/または共同決定も本発明による決定と見なす。

【0090】

10

20

30

40

50

アッセイの方法に関し、例えばサンドイッチアッセイでの結合パートナー(固相に結合されまたはマークされたもの)を選択することによって、その少なくとも1つがLASP-1またはLASP-1の位置200を超える場所、特にLASP-1の位置200を超える場所のC末端部分のエピトープを特異的に認識するような方法で、そのアッセイでLASP-1とLAP-1とを区別できるように試薬を選択する場合、生体液中で検出されたLASP-1免疫反応性が完全にまたは部分的にLAP-1に起因するのかどうかをチェックすることが可能になり、またLAP-1も、LASP-1のみによりまたはLASP-1とLAP-1の総量と共に決定することができ、さらに敗血症および/またはアルツハイマー病に関するLAP-1の存在の臨床的関連性をこのようにより正確に探ることができる。

【0091】

10

新規な発見の治療可能性

病的状態で観察された、血液循環系内で大幅に増大したLASP-1免疫反応性の機能は、不明確である。しかし、増大が病的状態に伴うものである状況は、LASP-1の免疫反応性が疾患の分子メカニズムにまたは疾患と闘おうという内因的な試みに関与することを単に示唆しており、それによっておそらくは重要な役割も演じていることを示している。したがって、本願における発見に基づきかつ治療の目的でさらなる調査を実施することは、将来有望なことである。LASP-1免疫反応性が有害なものになり易いかまたは有用なものになり易いかに応じて、治療上の利益は、LASP-1免疫反応性の外因的な減少または増大によって生じることになる。

【0092】

20

発見されたLASP-1またはおそらくはLAP-1の濃度の増加によって初めて、これを敗血症および炎症用、特に感染性炎症用、およびアルツハイマー病用の新規な生物マーカーとして使用することが可能になり、また心疾患に関連し、特に心筋梗塞およびその他の重篤な心臓血管疾患において、さらに条件付きで癌においても使用することが可能になる。初めて証明された、敗血症、アルツハイマー病、および心筋梗塞に罹患した患者の循環系における疾患中のLASP-1の出現は、関連ある疾患の治療に関して新規な興味ある研究態様をさらに広げる。

【図面の簡単な説明】

【0093】

【図1】健康なヒヒの細胞質脳タンパク質(A)と、LPS投与によって敗血症が誘発された5時間後のヒヒの脳タンパク質(B)とのスポットパターンの比較が可能な、2D電気泳動ゲルを示す図である。矢印は、本発明による敗血症特異的生成物(LASP-1)の位置を示し、図(B)では円により強調されている。

30

【図2】2Dゲル電気泳動のゲルから分離されたトリプシン消化生成物の質量スペクトルを示す図である。

【図3】固相結合形態またはマークされた形態で使用され、かつLASP-1のアミノ酸配列121~137、147~159、および170~187を認識する、3個の抗体の異なる対を用いたイムノアッセイを使用して、LASP-1(1-200)免疫反応性を測定した結果を比較する図である。全ての対に関し、実質的に同一な結果が得られたことがわかる。

【図4】294人の健康な対照人物と96人の敗血症罹患患者との血清における、LASP-1(1-200)免疫反応性の免疫診断決定の結果を示す図である。

40

【図5】294人の健康な対照人物と80人のアルツハイマー病罹患患者との血清における、LASP-1(1-200)免疫反応性の免疫診断決定の結果を示す図である。

【図6】294人の健康な対照人物と20人の心筋梗塞罹患患者との血清における、LASP-1(1-200)免疫反応性の免疫診断決定の結果を示す図である。

【 図 1 】

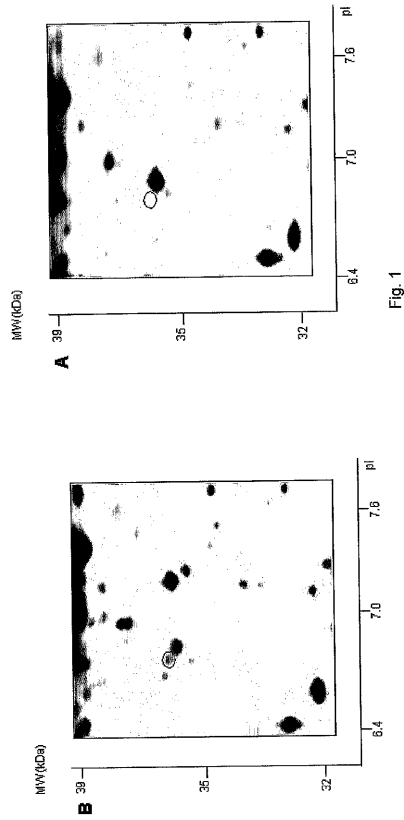


Fig. 1

【 図 2 】

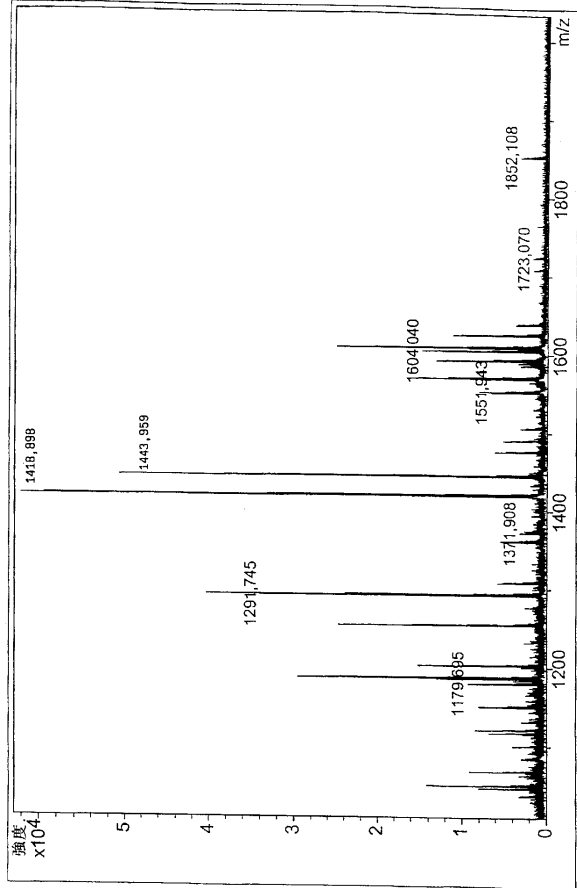


Fig. 2

【 図 3 】

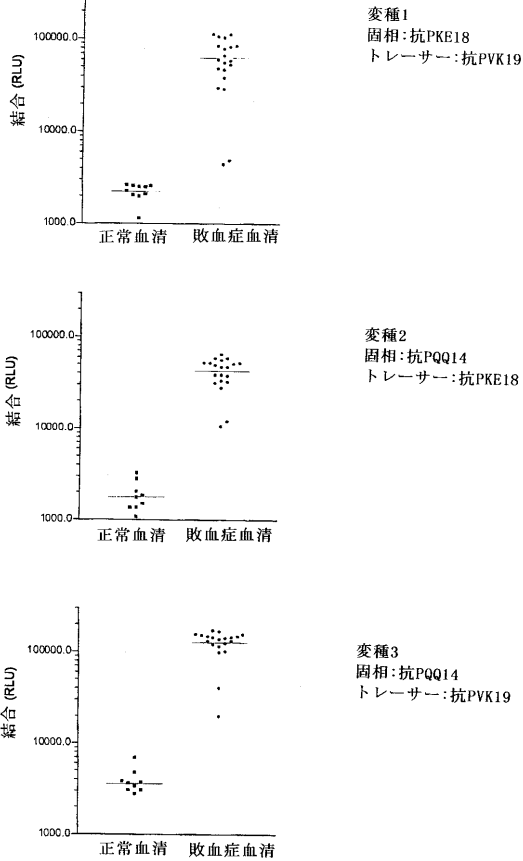


Fig. 3

【 図 4 】

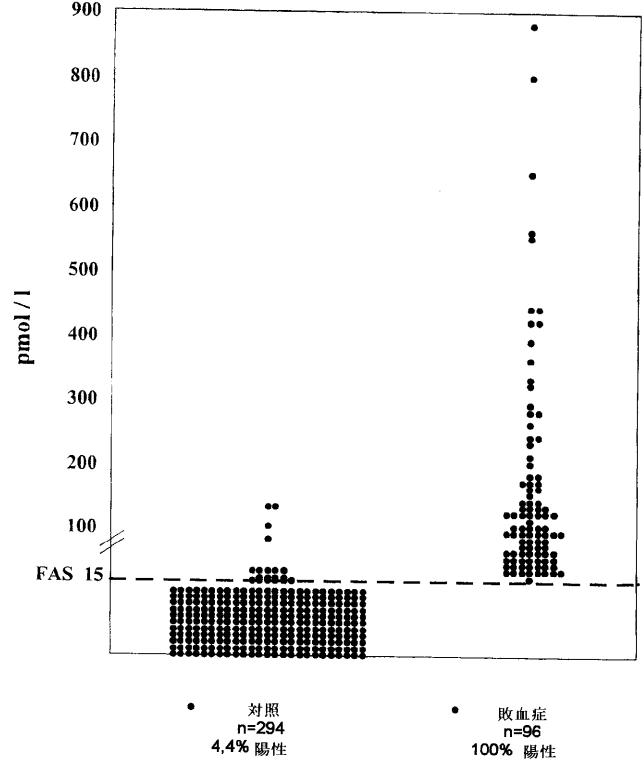


Fig. 4

【 図 5 】

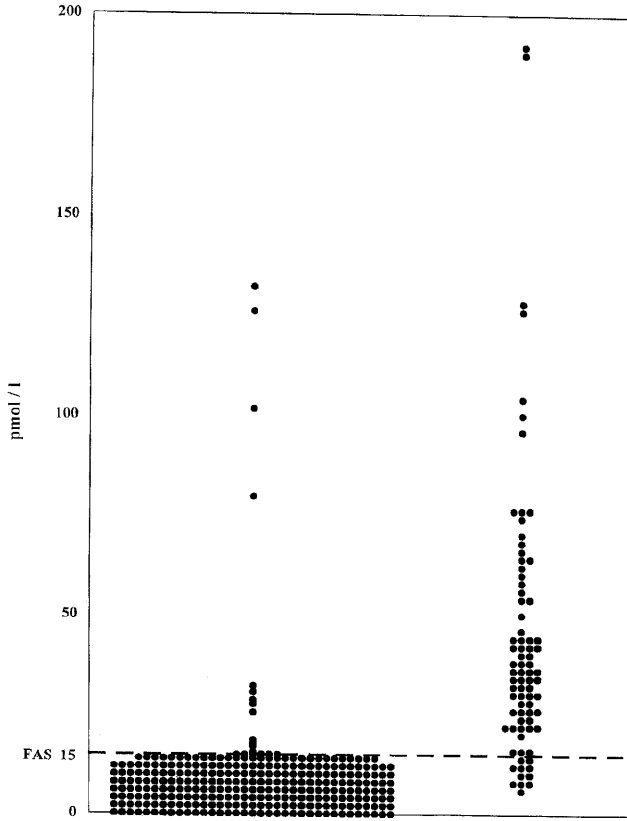


Fig. 5 ● 対照 n=294 4.4% 陽性
● アルツハイマー病 n=80 86.3% 陽性

【 図 6 】

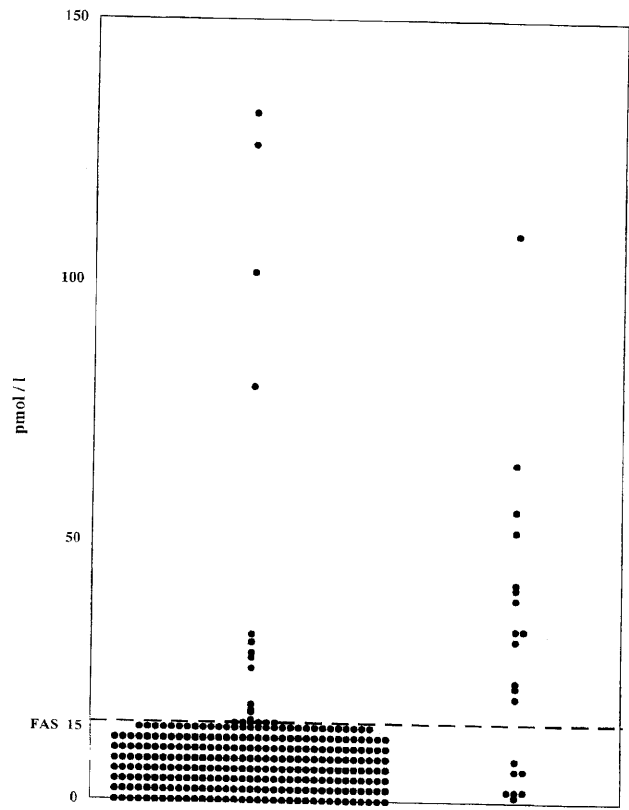


Fig. 6 ● 対照 n=294 4.4% 陽性
● 心筋梗塞 n=20 65% 陽性

【 配列表 】

2005523452000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/03940

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 G01N33/574 C07K14/47 A61K38/17		
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) IPC 7 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, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 981 218 A (BYRNE JENNIFER ET AL) 9 November 1999 (1999-11-09) column 13 -column 16	1,7,8, 10,11,18
X	SCHREIBER VALERIE ET AL: "Lasp-1, a novel type of actin-binding protein accumulating in cell membrane extensions." MOLECULAR MEDICINE (NEW YORK), vol. 4, no. 10, October 1998 (1998-10), pages 675-687, XP008019832 ISSN: 1076-1551	1,5-7, 9-11,18
Y	the whole document	12-15
X	WO 01 85986 A (ICOS CORP ;SADHU CHANCAL (US)) 15 November 2001 (2001-11-15)	1-3, 5-11,18
Y	page 16, line 1 -page 22, line 24; claim 1	12-15
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 22 July 2003		Date of mailing of the international search report 10/11/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schallich, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP 03/03940

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	BUTT ELKE ET AL: "Actin binding of human LIM and SH3 protein is regulated by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation on serine 146." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 18, 2 May 2003 (2003-05-02), pages 15601-15607, XP002248493 ISSN: 0021-9258 the whole document	1,7,10, 11,18
Y	WO 01 25268 A (ANDERSEN JENS ;MANN MATTHIAS (DK); KING ANGUS (DK); KUESTER BERNHA) 12 April 2001 (2001-04-12) the whole document	14,15
Y	WO 01 36975 A (BINAX INC) 25 May 2001 (2001-05-25) the whole document	14
Y	WO 00 22439 A (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH ;WEGLOEHNER WOLFGANG (DE); STRUCK JOACHIM) 20 April 2000 (2000-04-20) the whole document	12,13
Y	WO 98 27213 A (MEDICAL RES COUNCIL ;AGUADO BEGONA (GB); CAMPBELL ROBERT DUNCAN (G) 25 June 1998 (1998-06-25) the whole document	13
Y	WO 02 00857 A (MEYERS RACHEL A ; TSAI FONG YING (US); MILLENNIUM PHARM INC (US)) 3 January 2002 (2002-01-03) the whole document	13
Y	WO 92 10200 A (UNIV NEW YORK) 25 June 1992 (1992-06-25) the whole document	13
Y	DE 199 15 485 A (KATUS HUGO A ;REMPPIIS ANDREW (DE)) 19 October 2000 (2000-10-19) the whole document	13
Y	WO 01 86288 A (MACROCHIP S R L ;STANTA GIORGIO (IT)) 15 November 2001 (2001-11-15) the whole document	13
Y	WO 02 10771 A (CAREPOINT DIAGNOSTICS INC ;SHEBUSKI RONALD J (US); LEAHY DAVID C () 7 February 2002 (2002-02-07) the whole document	13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP03/03940

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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:
- SEE SUPPLEMENTARY SHEET FURTHER INFORMATION
PCT/ISA/210**
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP03/03940

Box I.2

Claims 1-9 (relating to the use "for the purposes of medical diagnosis"), Claims 1-4 and 5-18 (relating to "LASP-1 immunoreactivity" and the "detection of a protein which at least partially (in the 200 N-terminal amino acids) matches LASP-1"), Claims 2-8 (relating to early detection, prognosis and seriousness of the disease) and Claims 12 and 14 (relating to the "concurrent detection of a disease-related parameter") relate to methods characterised in each case by a desirable attribute but lacking in support of a technical nature. The claims therefore encompass all methods that have this attribute or property, yet the application provides support in the description (PCT Article 5) for only a limited number of such methods. In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the full range of protection sought. Moreover, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define some of the methods in terms of the results which are to be achieved. This lack of clarity too is such that it is impossible to carry out a meaningful search covering the full range of protection sought. The search was therefore directed to the following parts of the claims:

- Claims 1-9: Diagnosis of inflammations, sepses, Alzheimer's disease, tumours and cardiovascular diseases
- Claims 1-4 and 5-18: LAP-1 and LASP-1. The gene for these two proteins is found in a position on chromosome 17 that is often affected by chromosomal rearrangements. There is probably therefore more than one fusion protein containing a LASP-1 portion. However, only LAP-1 and LASP-1 are disclosed in and supported by the description. (Because the known fusion proteins are associated with fusions with the C-terminus of LASP-1, the use of LAP-1 is acknowledged to be novel and inventive.)
- Claims 2-18: Detection of the following diseases: inflammations, sepses, Alzheimer's disease, tumours and cardiovascular diseases. The description does not disclose or provide technical support for early detection, prognosis assessment or seriousness of the disease.
- Claims 12 and 14: The additional inflammation parameters for which support is provided: procalcitonin, CA 125, CA 19-9, S100B, S100A proteins, TPS, soluble cytokeratin 1 fragments, the peptides inflammin and CHP, glycine-N-acyltransferase, carbamoyl phosphate synthetase 1, and the C-reactive protein.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP03/03940

of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subject matter that has not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/03940

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5981218	A	09-11-1999	CA 2228999 A1 EP 0854923 A2 JP 11510393 T WO 9706256 A2	20-02-1997 29-07-1998 14-09-1999 20-02-1997
WO 0185986	A	15-11-2001	AU 5757101 A WO 0185986 A2	20-11-2001 15-11-2001
WO 0125268	A	12-04-2001	AU 7508100 A WO 0125268 A1	10-05-2001 12-04-2001
WO 0136975	A	25-05-2001	AU 1779401 A WO 0136975 A1	30-05-2001 25-05-2001
WO 0022439	A	20-04-2000	DE 19847690 A1 WO 0022439 A2 EP 1121600 A2 JP 2002527753 T	20-04-2000 20-04-2000 08-08-2001 27-08-2002
WO 9827213	A	25-06-1998	AU 5328598 A WO 9827213 A1	15-07-1998 25-06-1998
WO 0200857	A	03-01-2002	AU 6844001 A WO 0200857 A2 US 2002164745 A1	08-01-2002 03-01-2002 07-11-2002
WO 9210200	A	25-06-1992	AU 9164591 A WO 9210200 A1	08-07-1992 25-06-1992
DE 19915485	A	19-10-2000	DE 19915485 A1 CA 2369826 A1 WO 0061742 A2 EP 1169441 A2 JP 2002542168 T	19-10-2000 19-10-2000 19-10-2000 09-01-2002 10-12-2002
WO 0186288	A	15-11-2001	IT MI20001002 A1 AU 7050501 A WO 0186288 A2 EP 1281087 A2	08-11-2001 20-11-2001 15-11-2001 05-02-2003
WO 0210771	A	07-02-2002	AU 8095901 A WO 0210771 A1 US 2002076833 A1	13-02-2002 07-02-2002 20-06-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/03940

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/68 G01N33/574 C07K14/47 A61K38/17		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RESEARCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 981 218 A (BYRNE JENNIFER ET AL) 9. November 1999 (1999-11-09) Spalte 13 -Spalte 16 ---	1,7,8, 10,11,18
X	SCHREIBER VALERIE ET AL: "Lasp-1, a novel type of actin-binding protein accumulating in cell membrane extensions." MOLECULAR MEDICINE (NEW YORK), Bd. 4, Nr. 10, Oktober 1998 (1998-10), Seiten 675-687, XP008019832 ISSN: 1076-1551	1,5-7, 9-11,18
Y	das ganze Dokument ---	12-15
X	WO 01 85986 A (ICOS CORP ;SADHU CHANCAL (US)) 15. November 2001 (2001-11-15)	1-3, 5-11,18
Y	Seite 16, Zeile 1 -Seite 22, Zeile 24; Anspruch 1 ---	12-15
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie auszuführen) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benützung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindersicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindersicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 22. Juli 2003		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 10/11/2003
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Schalich, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/03940

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	BUTT ELKE ET AL: "Actin binding of human LIM and SH3 protein is regulated by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation on serine 146." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 278, Nr. 18, 2. Mai 2003 (2003-05-02), Seiten 15601-15607, XP002248493 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	1,7,10, 11,18
Y	WO 01 25268 A (ANDERSEN JENS ;MANN MATTHIAS (DK); KING ANGUS (DK); KUESTER BERNHA) 12. April 2001 (2001-04-12) das ganze Dokument	14,15
Y	WO 01 36975 A (BINAX INC) 25. Mai 2001 (2001-05-25) das ganze Dokument	14
Y	WO 00 22439 A (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH ;WEGLOEHNER WOLFGANG (DE); STRUCK JOACHIM) 20. April 2000 (2000-04-20) das ganze Dokument	12,13
Y	WO 98 27213 A (MEDICAL RES COUNCIL ;AGUADO BEGONA (GB); CAMPBELL ROBERT DUNCAN (G) 25. Juni 1998 (1998-06-25) das ganze Dokument	13
Y	WO 02 00857 A (MEYERS RACHEL A ; TSAI FONG YING (US); MILLENNIUM PHARM INC (US)) 3. Januar 2002 (2002-01-03) das ganze Dokument	13
Y	WO 92 10200 A (UNIV NEW YORK) 25. Juni 1992 (1992-06-25) das ganze Dokument	13
Y	DE 199 15 485 A (KATUS HUGO A ;REMPPIIS ANDREW (DE)) 19. Oktober 2000 (2000-10-19) das ganze Dokument	13
Y	WO 01 86288 A (MACROCHIP S R L ;STANTA GIORGIO (IT)) 15. November 2001 (2001-11-15) das ganze Dokument	13
Y	WO 02 10771 A (CAREPOINT DIAGNOSTICS INC ;SHEBUSKI RONALD J (US); LEAHY DAVID C () 7. Februar 2002 (2002-02-07) das ganze Dokument	13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/03940

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210

3. Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der Internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03 03940

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 1-9 (bezüglich der Verwendung "zum Zwecke der medizinischen Diagnostik"), 1-4, 5-18 (bezüglich der "LASP-1 Immunreaktivität" bzw. bezüglich der "Bestimmung eines Proteins, das zumindestens teilweise (in den 200 N-terminalen Aminosäuren) mit LASP-1 übereinstimmt"), 2-8 (bezüglich Früherkennung, Verlaufsprognose und Erkrankungsgrad) sowie 12 und 14 (bezüglich der "Mitbestimmung eines krankheitsrelevanten Parameters") beziehen sich auf Methoden jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit aber ohne eine Stütze technischer Natur. Die Patentansprüche umfassen daher alle Methoden, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, manche der Methoden über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf folgende Teile der Patentansprüche gerichtet:

Patentansprüche 1-9: Diagnose von Entzündungen, Sepsis, Alzheimer Erkrankung, Tumoren und Kardiovaskulärerkrankungen
 Patentansprüche 1-4, 5-18: LAP-1 und LASP-1. Das Gen für diese beiden Proteine liegt nämlich an einer Stelle von Chromosom 17, die häufig von chromosomalen Rearrangements betroffen ist. Daher existieren wahrscheinlich mehrere Fusionsproteine mit einem LASP-1 Anteil. Offenbart und gestützt werden aber nur LASP-1 und LAP-1 (Weil die bekannten Fusionsproteine Fusionen mit dem C-Terminus von LASP-1 betreffen, wird die Neuheit und erfinderische Tätigkeit für die Verwendung von LAP-1 anerkannt)
 Patentansprüche 2-18: Erkennung der folgenden Erkrankungen: Entzündungen, Sepsis, Alzheimer Erkrankung, Tumoren und Kardiovaskulärerkrankungen. Für die Früherkennung oder Beurteilung von Verlauf oder Schwere der Erkrankung fehlt jegliche Offenbarung oder Stütze technischer Natur.
 Patentansprüche 12 und 14: jene zusätzlichen Entzündungsparameter, für die Stütze vorhanden ist: Procalcitonin, CA 125, CA 19-9, S100B, S100A-Proteine, TPS, löslichen Cytokeratin-1-Fragmenten, den Peptiden Inflammin und CHP, Glycin-N-Acyltransferase, Carbamoylphosphat Synthetase 1 und dem C-reaktiven Protein

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03 03940

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II
PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/03940

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5981218	A	09-11-1999	CA 2228999 A1 EP 0854923 A2 JP 11510393 T WO 9706256 A2	20-02-1997 29-07-1998 14-09-1999 20-02-1997
WO 0185986	A	15-11-2001	AU 5757101 A WO 0185986 A2	20-11-2001 15-11-2001
WO 0125268	A	12-04-2001	AU 7508100 A WO 0125268 A1	10-05-2001 12-04-2001
WO 0136975	A	25-05-2001	AU 1779401 A WO 0136975 A1	30-05-2001 25-05-2001
WO 0022439	A	20-04-2000	DE 19847690 A1 WO 0022439 A2 EP 1121600 A2 JP 2002527753 T	20-04-2000 20-04-2000 08-08-2001 27-08-2002
WO 9827213	A	25-06-1998	AU 5328598 A WO 9827213 A1	15-07-1998 25-06-1998
WO 0200857	A	03-01-2002	AU 6844001 A WO 0200857 A2 US 2002164745 A1	08-01-2002 03-01-2002 07-11-2002
WO 9210200	A	25-06-1992	AU 9164591 A WO 9210200 A1	08-07-1992 25-06-1992
DE 19915485	A	19-10-2000	DE 19915485 A1 CA 2369826 A1 WO 0061742 A2 EP 1169441 A2 JP 2002542168 T	19-10-2000 19-10-2000 19-10-2000 09-01-2002 10-12-2002
WO 0186288	A	15-11-2001	IT MI20001002 A1 AU 7050501 A WO 0186288 A2 EP 1281087 A2	08-11-2001 20-11-2001 15-11-2001 05-02-2003
WO 0210771	A	07-02-2002	AU 8095901 A WO 0210771 A1 US 2002076833 A1	13-02-2002 07-02-2002 20-06-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/00	
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/543	5 2 1
// C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	

(72)発明者 アンドレアス・ベルクマン

ドイツ・1 2 3 5 1・ベルリン・バウムロイファーヴェーク・4 7

(72)発明者 クリスティーナ・フィッシャー - シュルツ

ドイツ・1 3 5 0 7・ベルリン・ブルノーシュトラッセ・4 7

(72)発明者 ヨアヒム・シュトルック

ドイツ・1 2 1 6 1・ベルリン・ホルシュタイニツシェ・シュトラッセ・2 8

Fターム(参考) 4C084 AA17 NA14 ZA16 ZA36 ZB11 ZB35

4H045 AA11 AA30 BA10 BA15 BA16 CA40 DA76 DA86 EA52 FA71

专利名称(译)	通过测定LASP-1免疫反应性来诊断炎性疾病和感染的方法		
公开(公告)号	JP2005523452A	公开(公告)日	2005-08-04
申请号	JP2003586616	申请日	2003-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	布拉姆斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	裴埃尔啊她IMS股份公司		
[标]发明人	アンドレアスベルクマン クリスティーナフィッシャーシュルツ ヨアヒムシュトルック		
发明人	アンドレアス・ベルクマン クリスティーナ・フィッシャー-シュルツ ヨアヒム・シュトルック		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/17 A61K45/00 A61P9/00 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 G01N33/566 G01N33/6893 G01N33/6896 G01N2800/26		
FI分类号	G01N33/53.D A61K45/00 A61P9/00 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 G01N33/543.521 C07K14/47 C07K16/18		
F-TERM分类号	4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA16 4C084/ZA36 4C084/ZB11 4C084/ZB35 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA52 4H045/FA71		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	2002008840 2002-04-19 EP		
其他公开文献	JP4515099B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种早期检测和鉴定炎性疾病和感染性疾病的方法，特别是与阿尔茨海默病相似的败血症和全身性感染，当然预后，严重程度评估和治疗过程中的评估。上。根据该方法，患者的生物流体或从组织样品，游离形式和/或蛋白质中的任何选择键合形式LASP-1 (SEQ ID NO : 1) 或蛋白质LAP-1, (SEQ ID NO : 16) 或者，所述蛋白质的一种免疫反应性片段的存在和/或量优选地被确定为免疫反应性和炎性疾病。关于感染治疗的存在，预期过程，严重程度或成功，特定蛋白质的存在和/或量引起了关注。

