

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4388515号
(P4388515)

(45) 発行日 平成21年12月24日(2009.12.24)

(24) 登録日 平成21年10月9日(2009.10.9)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68
GO 1 N 33/493 (2006.01)	GO 1 N 33/493 A
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 J
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D

請求項の数 14 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2005-270160 (P2005-270160)	(73) 特許権者	501249191
(22) 出願日	平成17年9月16日(2005.9.16)		モナッシュ ユニバーシティ
(62) 分割の表示	特願2000-589950 (P2000-589950) の分割		オーストラリア国 3800 ビクトリア 州, クレイトン, ウェリントン ロード
原出願日	平成11年12月20日(1999.12.20)	(74) 代理人	100108350
(65) 公開番号	特開2006-38877 (P2006-38877A)		弁理士 鐘尾 宏紀
(43) 公開日	平成18年2月9日(2006.2.9)	(72) 発明者	コンパー, ウェイン, ディー,
審査請求日	平成17年9月16日(2005.9.16)		オーストラリア国 3134 ビクトリア 州, ノースリングウッド, オールド ワランダイト ロード 387
(31) 優先権主張番号	PP 7843	審査官	山村 祥子
(32) 優先日	平成10年12月21日(1998.12.21)		
(33) 優先権主張国	オーストラリア(AU)		
(31) 優先権主張番号	09/415,217		
(32) 優先日	平成11年10月12日(1999.10.12)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腎臓病の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) 尿サンプルの全てのタンパク質を分離し、
(ii) 尿サンプル中の少なくとも一つのタンパク質の未変質の天然の形態及び該未変質の天然の形態に対して特異的な抗体によって検出できない、実質的に全長のタンパク質の形態である、前記タンパク質の損なわれていない変質した形態を検出し、そして
(iii) 尿中の前記天然の形態及び損なわれていない変質した形態のタンパク質の存在から、腎臓病及び疾病の腎臓合併症の治療条件を決定するための指標を得ることよりなる、腎臓病変の発症の前の患者の尿中の天然及び損なわれていない変質した形態のタンパク質を検出する方法。

【請求項2】

疾病が、腎症、腎臓の疾病（腎系体炎、バクテリア及びウイルス性腎系体炎、IgA腎症、及びヘノッホ-シェーンライン紫斑病、膜状増殖性糸系腎炎、膜性腎症、ジェーグレン徴候群、糖尿病、ネフローゼ症候群（極少病変、巣状腎系球体硬化症及び関連する機能不全）、急性腎不全、急性管状間質性腎炎、腎盂腎臓炎、GU路炎症性疾病、プレクランプシア、腎移植拒絶、乾癬、逆流性腎症、腎石症）、遺伝性腎臓病（髄質嚢胞、髄質スポンジ、多嚢胞腎臓病（オートゾーム優性多嚢胞腎臓病、オートゾーム劣性多嚢胞腎臓病、管状硬化症）、フォン・ヒッペル-リンドウ病、家族性薄糸球体基部膜病、コラーゲンIII腎系球体病、フィブロネクチン腎系球体病、アルポート症候群、ファブリー病、爪・膝蓋骨症候群、先天性泌尿器異常）を含む請求項1記載の方法。

【請求項 3】

タンパク質がアルブミンである請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

変質したタンパク質を非抗体的手段によって検出する請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

上記非抗体的手段がクロマトグラフィー、電気泳動又は沈殿法を含む請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

上記非抗体的手段が、分配クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、濾紙クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、気-液クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、親和クロマトグラフィー、又は疎水性相互反応クロマトグラフィー、移動界面電気泳動法、ゾーン電気泳動法、又は等電集束法を含む請求項 5 記載の方法。

10

【請求項 7】

上記非抗体的手段が疎水性相互反応クロマトグラフィーよりなる請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

疎水性相互反応クロマトグラフィーが高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）装置において実施される請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

損なわれていない変質した形態のタンパク質が天然及び変質した形態のタンパク質の両者に対して特異的な抗体によって検出される請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 10】

抗体が損なわれていない変質したタンパク質に対して特有である請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

抗体を、酵素性、放射性、蛍光性又は化学発光性の標識に添着させることよりなり、検出手段が、ラジオイムノアッセイ、免疫性ラジオメトリックアッセイ、蛍光イムノアッセイ、酵素結合イムノアッセイ、又はプロテイン A イムノアッセイよりなる請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

損なわれていない変質した形態のタンパク質が尿中に存在して時間の経過により量が増加する場合、疾病の初期の段階が検出される請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 13】

損なわれていない変質したタンパク質が慣用のラジオイムノアッセイによって検出されない請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

(a) 所定のタンパク質の未変質の天然の形態に対して特異的な抗体によって検出できない、実質的に全長のタンパク質の形態である所定のタンパク質の損なわれていない変質した形態に対して特異的な標識化された抗体を含む容器、

(b) 抗体反応を進展するための試薬を含む少なくとも一つの容器、及び

(c) 診断を行うための要素 (a) 及び (b) の使い方についての指示書き

40

よりなり、尿中に発見される損なわれていない変質した形態のタンパク質が疾病のインディケーターとなることよりなる、

尿サンプル中の損なわれていない変質した形態のタンパク質を検出するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腎臓病及び/又は疾病の腎臓合併症の初期の段階を検知するタンパク質の検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

50

(発明の背景)

尿中に過剰のアルブミンの如きタンパク質が出現することは、腎臓病であることを示している。糖尿病性腎症はそのような疾病である。過剰のアルブミンが検出されるまでに、病気は、恐らくは、取り返しができず、処置の効果が殆どない段階に進行している。それ故、本発明の目的は、疾病を阻止するか或いは疾病の処置を早期に開始できるようにするよう、そのような疾病をできるだけ早期に検出するための、現在知られている放射免疫測定法よりも感受性のある試験法を提供することにある。

【0003】

所定のタンパク尿、及び特にアルブミン尿(ミクロ-又はマクロ-)は、腎臓の疾病(腎糸体炎、バクテリア及びウイルス性腎糸体炎、IgA腎症、及びヘノッホ-シェーンライン紫斑病、膜性増殖性糸体腎炎、膜性腎臓病、ジェーグレン徴候群、糖尿病、ネフローゼ症候群(極少病変、巣状腎糸球体硬化症及び関連する機能不全)、急性腎不全、急性管状間質性腎炎、腎盂腎臓炎、GU路炎症性疾病、プレクランプシア(Pre-clampsia)、腎移植拒絶、乾癬、逆流性腎症、腎石症)、遺伝性腎臓病(髄質嚢胞、髄質スポンジ、多嚢胞腎臓病(オートゾーム優性多嚢胞腎臓病、オートゾーム劣性多嚢胞腎臓病、管状硬化症)、フォン・ヒッペル-リンドウ病、家族性薄糸球体基部膜病(familial thin-glomerular basement membrane disease)、コラーゲンIII腎糸球体病、フィブロネクチン腎糸球体病、アルポート症候群、ファブリー病、爪・膝蓋骨症候群、先天性泌尿器異常)、モノクロナール高ガンマグロブリン血症(多発性骨髄細胞腫、アミロイド症及び関連する機能異常)、熱病(家族性地中海熱、HIV感染エイズ)、炎症性疾病(全身的脈管炎(結節性多発性動脈炎、ウエグナー多発性肉芽腫症、多発性動脈炎、壊死性及び半月状腎糸球体炎)、多発性筋炎、皮膚筋炎、膵臓炎、ロイマチス様関節炎、全身的紅斑性狼瘡、通風)、血液機能異常(鎌状赤血球病、血栓性血小板減少紫斑病、溶血尿毒症症候群、急性皮質(corticoid)壊死、腎臓の血栓性栓塞)、外傷及び手術(広い範囲の損傷、火傷、腹部及び尿管の手術、麻酔薬の注入)、薬物(ペニシラミン、ステロイド類)及び薬物乱用、悪性の疾病(上皮細胞の(肺、乳房)、悪性腺腫(腎臓の)、黒色腫、リンパ性網内症、多発性骨髄細胞腫)、循環器の疾病(心筋梗塞、心不全、末梢血管病、高血圧、冠状心臓血管病、非アテローム硬化性心臓血管病、アテローム硬化性心臓血管病)、皮膚病(乾癬、全身的硬化症)、呼吸器の疾病(COPD、閉塞性睡眠無呼吸、高標高におけるヒポイア(hypoxia))、及び内分泌の疾病(アクロメガリー、真性糖尿病、尿崩症)を含む疾病の製造元である。

【0004】

腎臓病は、バクテリア感染、アレルギー、先天性の欠陥、石、抗生物質、免疫抑制剤、抗ネオプラスチック、非ステロイド系抗炎症薬、鎮痛薬、重金属、腫瘍、化学物質に起因する。

【0005】

出願人は、アルブミンを含むタンパク質が、天然(native)タンパク質と腎臓通過の間に特定の作られたフラグメントとの混合物として正常に排泄されることを発見した(Osicka, T. M. 他(1996)「Nephrology」第2巻、第199~212頁)。タンパク質は、管状細胞を含むポスト糸球体(基部膜)細胞によって、腎臓通過の間に厳しく劣化される。腎管状細胞のリソソームが、腎臓通過の間に排泄されるタンパク質の分解の原因となっている(図1参照)。分解生成物は管状内腔に排泄される。正常な個体では、尿内のアルブミンの殆どがフラグメント化される。

【0006】

リソソームの活性が、又はリソソームに対する基質を支配する細胞内プロセスが低下する場合は、高い分子量の、そして実質的には全長のアルブミンがより多く尿に現れる。これは腎臓組織における細胞プロセスが不均衡になっていることを反映している。

【0007】

今日まで、慣用のラジオイムノアッセイ(放射免疫測定法)が、サンプル中の所定のタンパク質の全て(全量)の検出に相当であると考えられていた。しかしながら、タンパク

10

20

30

40

50

質の全内容は、慣用のラジオイムノアッセイ（RIA）を用いる公知の抗体によって確認可能なもの以上のものを含んでいる。現在利用できるラジオイムノアッセイは、アルブミンの如きタンパク質を検出するための抗体に依存している。抗体検出は、ナノグラムのレベルまで非常に正確である。しかしながら、抗体の特異性がタンパク質の検出に影響する。抗体は或るエピトープを検出する。もしもアルブミン上に所定のエピトープが存在しなかったり、変化したり又はマスクされたり、或いはアルブミンが他の方法で変質し、そのため抗体がアルブミンの検出に失敗するならば、慣用のラジオイムノアッセイは尿サンプルに存在するアルブミンの真の量についての正しい表示をしていないことになる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0008】

本発明の幾つかの目的は、腎臓病を含む疾病の初期の徴候を検知し、患者の病気になる傾向を確定し、病気の発症を阻止し、そして可能な最も初期の段階で病気を処置することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、腎臓病及び/又は疾病の腎臓合併症の初期の段階を検出する方法に関するものである。すなわち、本発明は、腎臓病変の発症の前の患者の尿中の天然及び損なわれていない変質した形態のたんぱく質を検出する方法であって、

(i) 尿サンプルの全てのタンパク質を分離し、

20

(ii) 尿サンプル中の少なくとも一つのタンパク質の未変質の天然の形態及び該未変質の天然の形態に対して特異的な抗体によって検出できない、実質的に全長のタンパク質の形態である、前記タンパク質の損なわれていない変質した形態を検出し、そして

(iii) 尿中の前記天然の形態及び損なわれていない変質した形態のタンパク質の存在から、腎臓病及び疾病の腎臓合併症の治療条件を決定するための指標を得ることよりなることを特徴とする。

【0010】

特定の疾病に限定されるものではないけれども、本発明の方法によれば、診断される疾病には、腎症、尿崩症、I型糖尿病、II型糖尿病、腎臓の疾病（腎系体炎、バクテリア及びウイルス性腎系体炎、IgA腎症、及びヘノッホ-シェーンライン紫斑病、膜状増殖性系体腎炎、膜性腎症、ジューグレン徴候群、糖尿病、ネフローゼ症候群（極少病変、巣状腎系球体硬化症及び関連する機能不全）、急性腎不全、急性管状間質性腎炎、腎盂腎臓炎、GU路炎症性疾病、プレ克蘭プシア、腎移植拒絶、乾癬、逆流性腎症、腎石症）、遺伝性腎臓病（髄質嚢胞、髄質スポンジ、多嚢胞腎臓病（オートゾーム優性多嚢胞腎臓病、オートゾーム劣性多嚢胞腎臓病、管状硬化症）、フォン・ヒッベル-リンドウ病、家族性薄系球体基部膜病、コラーゲンIII腎系球体病、フィブロネクチン腎系球体病、アルポート症候群、ファブリー病、爪・膝蓋骨症候群、先天性泌尿器異常）、モノクロナル高ガンマグロブリン血症（多発性骨髄細胞腫、アミロイド症及び関連する機能異常）、熱病（家族性地中海熱、HIV感染エイズ）、炎症性疾病（全身の脈管炎（結節性多発性動脈炎、ウエゲナー多発性肉芽腫症、多発性動脈炎、壊死性及び半月状腎系球体炎）、多発性筋炎、皮膚筋炎、膵臓炎、ロイマチス様関節炎、全身の紅斑性狼瘡、通風）、血液機能異常（鎌状赤血球病、血栓性血小板減少紫斑病、溶血尿毒症症候群、急性皮質壊死、腎臓の血栓性栓塞）、外傷及び手術（広い範囲の損傷、火傷、腹部及び脈管の手術、麻酔薬の注入）、薬物（ペニシラミン、ステロイド類）及び薬物乱用、悪性の疾病（上皮細胞の（肺、乳房）、悪性腺腫（腎臓の）、黒色腫、リンパ性網内症、多発性骨髄細胞腫）、循環器の疾病（心筋梗塞、心不全、末梢血管病、高血圧、冠状心臓血管病、非アテローム硬化性心臓血管病、アテローム硬化性心臓血管病）、皮膚病（乾癬、全身的硬化症）、呼吸器の疾病（COPD、閉塞性睡眠無呼吸、高標高におけるヒポイア）、及び内分泌の疾病（アクロメガリー、真性糖尿病、尿崩症）が含まれる。

30

40

50

【 0 0 1 1 】

さらに、本方法は、如何なるタンパク質、好ましくは、アルブミン、グロブリン（ α -グロブリン（ α_1 -グロブリン、 α_2 -グロブリン）、 β -グロブリン、 γ -グロブリン）、ユウグロブリン、プソイドグロブリンI及びII、フィブリノーゲン、 α_1 酸性糖タンパク質（オロソムコイド）、 α_1 糖タンパク質、 α_1 リポプロテイン、セルロプラスミン、 α_2 19S糖タンパク質、 α_1 トランスフェリン、 α_1 リポタンパク質、免疫グロブリンA、E、GおよびM、ホースラディッシュ・ベルオキシダーゼ、ラクテート・デヒドロゲナーゼ、グルコース・オキシダーゼ、ミオグロビン、リゾチーム、タンパク質ホルモン、成長ホルモン、インスリン、又は上皮小体ホルモンを用いても行うことができる。

【 0 0 1 2 】

本方法は、クロマトグラフィー、電気泳動又は沈殿法のような方法を用いる非抗体的手段を用いて行うことができ、そしてそれらはさらに、分配クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、濾紙クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、気-液クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、親和クロマトグラフィー、又は疎水性相互反応クロマトグラフィー（hydrophobic interaction chromatography）、移動界面電気泳動、ゾーン電気泳動、又は等電集束法の如き方法を含む。

【 0 0 1 3 】

特に、本発明の方法は、高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）装置における疎水性相互反応クロマトグラフィーを用いることに関する。

【 0 0 1 4 】

また、本発明は、腎臓病及び/又は疾病の腎臓合併症の初期の段階を診断するための抗体検出法に関する。本発明の方法は、尿において慣用の手段によっては正常に同定することができない、損なわれていない/変質したタンパク質（intact/modified protein）をアッセイすることによって実施される。本発明の損なわれていない/変質したタンパク質は、病人の、又は病気がかかり易い人の尿サンプル中に、天然タンパク質が検知される前に存在している。それ故、尿サンプル中に損なわれていない/変質したタンパク質が検出されることは、被験者が他の点で正常に見えても、被験者が病気になったか又は病気にかかり易いかのいずれかの初期の段階にあることを示している。本発明のアッセイ法は、タンパク質の変質した又は未変質の形態の両者に対して特異的な抗体によって、損なわれていない/変質したタンパク質を検出することを含んでいる。抗体は変質したタンパク質に対して特異的であるのが好ましい。抗体は、酵素性、放射性、蛍光性又は化学発光性の標識に添着させることができ、そして検出手段は、ラジオイムノアッセイ、免疫性ラジオメトリックアッセイ、蛍光イムノアッセイ、酵素結合イムノアッセイ、又はプロテインAイムノアッセイよりなる。

【 0 0 1 5 】

本発明の方法において、変質したタンパク質が尿中に存在し、時間の経過により量が増加し、そして慣用のラジオイムノアッセイが変質したタンパク質を検知しないときに、疾病が初期の段階であると診断される。

【 0 0 1 6 】

また、本発明は、腎臓病及び/又は疾病の腎臓合併症の初期の段階を検出するための物品に関し、

- (a) タンパク質の変質した形態に対して特異的な標識化された抗体を含む容器、
- (b) 抗体反応を進展するための試薬を含む容器、及び
- (c) 診断を行うための要素(a)及び(b)の使い方についての指示書きよりなる。

【 0 0 1 7 】

さらにまた、本発明は腎臓病及び/又は疾病の腎臓合併症のための治療剤を決定する方法であって、

- (a) 疾病の処置が可能であると思われる薬剤を必要とする人にそれを投与し、
- (b) その人から尿サンプルを採取し、そして
- (c) サンプル中のタンパク質の変質した形態をアッセイすることよりなり、そして尿中

10

20

30

40

50

にタンパク質の変質した形態が存在するか又は存在しないか、又は時間の経過でタンパク質の変質した形態の量が低下するかのいずれかであることが、その薬剤が腎臓病及び/又は疾病の腎臓合併症のための治療剤であることを示す。

【0018】

また、本発明は、上記の方法に従って得られた治療剤の有効量を、それを必要とする人に投与することよりなる、病気の状態が所定のプロテイン尿によって示されるような病気にかかった人を処置する方法に利用できる。好ましくは治療剤はリソソーム活性化化合物である。

【0019】

本発明のこれら及び他の目的は、本発明の次の記載、添付の参照図面及び添付の請求の範囲からより一層十分に理解されるであろう。

【0020】

(発明の詳細な説明)

本出願人は、アルブミンおよび免疫グロブリンの如き大部分の血漿タンパク質を含むタンパク質が腎臓によって濾過される場合、物質が排泄される前にそれらは腎臓の細胞によって引き続いて分解されることを発見した。濾過されたタンパク質は、管状細胞によって引き取られるようである。管状細胞は腎臓フィルターを越えて横たわり、そして最初の濾液と直接接触する。タンパク質が管状細胞によって内部に取り込まれると、それらはリソソームに向けられ、そこで種々のサイズのフラグメントに部分的に分解され、そして次いで細胞の外側に噴き戻される。これらの噴き戻されたフラグメントは、特定の型のタンパク質のどれかから生じた少なくとも60の異なるフラグメントであり、次いで尿中に排泄される。

【0021】

出願人は、腎臓病においては、蛋白質のフラグメント化が阻止されることを発見した。このことは、濾過された実質的に全長のタンパク質が腎臓病に罹患した人では排泄されることを意味する。排泄されたタンパク質の、このフラグメント化からフラグメント化阻止への転移は、新しい薬剤および診断アッセイの発展のための出発点となる。例えば、糖尿病における腎合併症の発症が起こる最初の変化は、排泄されたアルブミンのフラグメント化プロフィールにおける変化に関連する。これは、糖尿病性腎症の進行と同義である外見上明らかなミクロアルブミン尿症に導く。これは、糖尿病において管状細胞のリソソーム活性が抑制されることによるらしい。したがって、薬剤は腎合併症が起こる糖尿病においてリソソーム活性に向けられるように処方することができる。また、薬剤はリソソーム活性が影響する他の腎臓病に、またはリソソーム活性が非腎臓組織において消える状態にある腎合併症のない糖尿病に有用である。その様な薬剤には、抗癌薬の如き抗増殖性剤が含まれる。

【0022】

出願人は、所定のタンパク質の変質した形態を検出するための独特なアッセイであって、そしてそれは、所定のタンパク質の未変質の形態がラジオイムノアッセイの如き慣用のアッセイを用いて検知される前に、或る被験者の尿において検出されることを発見した。

【0023】

(定義)

「フラグメント化タンパク質又はフラグメントアルブミン」は、腎臓通過の間に生じる化学的、酵素的又は物理的分解の後のポスト系球体分解生成物を含む。これらの成分は、小さくなったサイズをもつか、及び/又は疎水性に変化する。

【0024】

ここで用いる「損なわれていないアルブミン、変質したアルブミン、又はアルブミンの変質した形態」は、天然アルブミンと同様なサイズ及び構造的特徴をもつ化合物であって、アミノ酸連鎖が天然アルブミンと実質的に同一であるものを意味する。濾過された損なわれていない蛋白質が好ましい。それは高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)において天然アルブミンと同じ位置又はその近くで溶離される(図5参照)。しかしながら、そ

10

20

30

40

50

の構造は、小さな酵素が介在した変質又はその塩基構造の付加のいずれかによって生化学的に変質しているか、及び/又は慣用的に用いる抗アルブミン抗体による検知から逃れるような3次元構造の変化によって物理的に変質している。生化学的変質は、エンド又はエキソ-ペプチターゼの如き酵素によってなされてもよい。アルブミンの3次元構造は、幾つかの方法で変えることができる。リガンドがアルブミンに結合するか、又はこれらのどのような組合せでもよい。本発明の方法によって検出される変質したアルブミンは、入手可能な抗体を使用する現在の、及び慣用のラジオイムノアッセイによっては検出できない。

【0025】

慣用の抗アルブミン抗体は、免疫化学品の供給者から購入することができる。例えば、モノクロナール抗体カタログ番号A6684(クローンno.HSA-11)、及びA2672(クローンno.HSA-9)、並びに液体血清、凍結乾燥分別品、液体IgG留分、及び腹水流体の形態のモノクロナール抗体は、カタログ「1994 Sigma-Biochemicals Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents」の第1151~1152頁における免疫化学品に見付けられるように、シグマ、セントルイス、MOから得ることができる。

【0026】

ここで用いる損なわれていない/変質したアルブミンには、実質的に全長(full-length)アルブミン、フラグメント化された、化学的に変質した、又は物理的に変質したアルブミンが含まれる。ここで用いる損なわれていない/変質したアルブミンは、全長アルブミンよりも、以下の、同等の又は以上の分子量をもつアルブミンを示し、そしてクロマトグラフィー、好ましくはHPLC、最も好ましくは疎水HPLCの如き、分離媒体における天然アルブミンの位置又はその近くで溶離されることを意味する。ここで用いるフラグメント化されたアルブミンは、慣用の抗アルブミン抗体によって検出されないアルブミンのフラグメントに関するものを意味し、その存在により、腎臓病及び/又は疾病の腎臓合併症の初期の段階で診断することが検知される。損なわれていない/変質したアルブミンの存在の検出により、腎臓病になりやすいことが示される。

【0027】

ここで用いる「損なわれていないタンパク質、変質したタンパク質又はタンパク質の変質した形態」は、慣用のラジオイムノアッセイによって検出できない実質的に全長のタンパク質の形態のものを含む。限定されるものではないが、蛋白質には、アルブミン、グロブリン(α-グロブリン(α₁-グロブリン、α₂-グロブリン)、β-グロブリン、γ-グロブリン)、ユウグロブリン、ブソイドグロブリンI及びII、フィブリノーゲン、α₁酸性糖タンパク質(オロソムコイド)、α₁糖タンパク質、α₁リポタンパク質、セルロプラスミン、α₂19S糖タンパク質、α₁トランスフェリン、α₁リポプロテイン、免疫グロブリンA、E、GおよびM、成長ホルモン、インスリン、上皮小体ホルモンを含む蛋白質ホルモン類、及びホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、ラクテート・デヒドロゲナーゼ、グルコース・オキシダーゼ、ミオグロビン、リゾチームを含む他の蛋白質が含まれる。

【0028】

ここで用いる「腎臓病」は、腎臓の如何なる機能不全をも含む。腎臓病は、尿中に損なわれていない又は変質したアルブミンが存在することによって確認される。好ましくは、腎臓病の早期の診断は、尿中の変質したタンパク質の存在、又は時間の経過で尿中の変質したタンパク質の増加を検出することによって行われる。

【0029】

ここで用いる「低リソソーム活性」は、正常な個体におけるリソソーム活性の正常なレベルに対して、及び/又はリソソームにタンパク質を渡すリソソーム機構に対して比較される。その活性は、リソソームに関してタンパク質をフラグメントにするには不十分であって、そのため損なわれていないタンパク質が正常な低いレベルよりも多量に排泄される。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 0 】

ここで用いる「リソソーム活性化化合物」は、リソソームの再活性化に有益な化合物をいう。この化合物は、リソソームに直接又は間接的に作用して、リソソームの機能を活性化する。これらの化合物には、限定されるものではないが、抗癌化合物、抗増殖化合物、パラセタモール、ビタミンA（レチン酸）又はレチノールの誘導体が含まれる。

【 0 0 3 1 】

「マクロアルブミン尿」は、個体が、慣用のラジオイムノアッセイ（RIA）によって測定されたものとして、尿にアルブミン $200 \mu\text{g}/\text{min}$ よりも多く排泄する状態である。

【 0 0 3 2 】

「マイクロアルブミン尿」は、個体が、慣用のラジオイムノアッセイ（RIA）によって測定されたものとして、尿にアルブミンを少なくとも $20 \mu\text{g}/\text{min}$ 排泄する状態である。RIAは、 $15.6 \text{ ng}/\text{ml}$ まで測定し、 $6 \mu\text{g}/\text{min}$ より低いクリアランスをもつ正常な被験者の尿中のアルブミンを測定することが可能である。しかしながら、アルブミン排泄が $20 \mu\text{g}/\text{min}$ を超える場合、腎臓病の処置は限定され、そしてこの時点から完全な回復は困難になる。

【 0 0 3 3 】

ここで用いる「マイクロアルブミン尿性」は、慣用のラジオイムノアッセイ（RIA）によって測定されたものとして、少なくとも $20 \mu\text{g}/\text{min}$ の排泄割合で、アルブミンが尿に排泄される時の状態である。

【 0 0 3 4 】

ここで用いる「天然」及び「未変質」は、有機物、好ましくは人間に自然に見出されるタンパク質を記載するために用いられ、腎系球体の濾過工程によって変質しなかったものである。

【 0 0 3 5 】

ここで用いる「正常な個体」は、尿中に発見される損なわれていないアルブミンが病気のインディケイターとなる病気をもたない個体である。好ましくは、病気は腎臓病である。

【 0 0 3 6 】

「リソソーム活性の正常レベル」は、正常な個体の病気にかかっていない腎臓に見出されるリソソーム活性のレベルである。

【 0 0 3 7 】

ここで用いる「ノルモアルブミン尿性」は、アルブミンが尿に排泄され、そしてRIAによって検出できないか又は $20 \mu\text{g}/\text{min}$ （RIAで測定されるものとして）より少なく排泄される状態を意味する。

【 0 0 3 8 】

ここで用いる「病気になる傾向」は、変質したアルブミンの如き変質したタンパク質の存在及び排泄速度の測定によって判断されるものとして、個体に結果として病気があることを意味する。

【 0 0 3 9 】

ここで用いる「タンパク尿」は、尿にタンパク質が、通常、アルブミンの形態で存在するものであり、そのタンパク質は、水溶性であり、熱によって凝固する。これに関して「特定のタンパク尿」は、尿に所定のタンパク質が存在することをいう。

【 0 0 4 0 】

ここで用いる「ラジオイムノアッセイ」は、放射性的に標識化された所定の抗体又は抗原を用いて物質を検出及び測定する方法である。

【 0 0 4 1 】

ここで用いる「リソソームの再活性化」は、リソソーム活性が活性化して、タンパク質、特にアルブミンの分解がリソソームの不活性状態に比較して増加することを含む。

【 0 0 4 2 】

10

20

30

40

50

ここで用いる「回復」は、回復された要素がその前の機能と比較して改善された機能を持つように、完全に又は部分的に回復することを意味する。

【0043】

ここで用いる「全タンパク質」は、天然の、未変質の、変質した又は尿に排泄されたフラグメント化された形態で存在する所定の濾過されたタンパク質をいう。これは慣用のラジオイムノアッセイ又はタンパク質の検出に現在使用されている慣用の方法によっては検出されないタンパク質を含んでいる。

【0044】

本発明の方法による検出を利用して処置できる疾病には、限定されるものではないが、腎臓病（腎系体炎、バクテリア及びウイルス性腎系体炎、IgA腎症、及びヘノッホ-シェーンライン紫斑病、膜性増殖性腎系体炎、膜性腎臓病、ジェーグレン徴候群、糖尿病、ネフローゼ症候群（極少病変、巣状腎系球体硬化症及び関連する機能不全）、急性腎不全、急性管状間質性腎炎、腎盂腎臓炎、GU路炎症性疾患、プレクランプシア(Pre-clampsia)、腎移植拒絶、乾癬、逆流性腎症、腎石症）、遺伝性腎臓病（髄質嚢胞、髄質スポンジ、多嚢胞腎臓病（オートゾーム優性多嚢胞腎臓病、オートゾーム劣性多嚢胞腎臓病、管状硬化症）、フォン・ヒッペル-リンドウ病、家族性薄糸球体基部膜病(familial thin-glomerular basement membrane disease)、コラーゲンIII腎系球体病、フィブロネクチン腎系球体病、アルポート症候群、ファブリー病、ネール-パテラ症候群、先天性泌尿器異常)が含まれる。

【0045】

本発明の一態様において、腎臓病及び/又は疾病の腎臓合併症になる傾向又は早期の検出を決定する方法を提供する。この方法は、尿サンプル中のアルブミン含有量の変化を測定することを含む。疾病は腎臓病に限定される必要はないけれども、腎臓病であってもよい。

【0046】

本発明の方法において、尿で検出されるタンパク質の例として、ここではアルブミンのみが用いられている。患者におけるアルブミンが慣用のRIAによって分析された場合には、ノルモアルブミン尿症患者又は正常な個体は、若年者で $3 \sim 10 \mu\text{g}/\text{min}$ の範囲、そして老年者ではそれ以上のアルブミンを尿に有する。しかしながら、ノルモアルブミン尿症患者はまた、もしもHPLCによって測定されるならば、尿中にアルブミンの複数のレベルを示す。出願人は、これらのレベルは、 $5 \mu\text{g}/\text{min}$ のオーダーにあることを見出した。腎臓病の進行に伴い、損なわれていない/変質したアルブミンのレベルは、RIAにより測定されるものとして $20 \sim 200 \mu\text{g}/\text{min}$ のオーダーのマクロアルブミン尿のレベルまで増加するであろう。これはHPLC、又は変質したアルブミンを含む全アルブミンを測定する方法によって測定された場合、非常に高くなるであろう。損なわれていない/変質したアルブミンをモニターすることによって、腎臓病の初期の徴候が検出される。しかしながら、これらのレベルは、現在商業的に利用されている抗体を用いるラジオイムノアッセイの如き、現在利用可能な方法では、恐らく、抗体が或るエピトープを検出するために、検出することができない。もしもアルブミンが上記したどれかの方法で変質しているならば、エピトープはそれによって破壊されて、変質したアルブミンを検知不可能にする。

【0047】

糖尿病性腎症をもつことが疑われる患者は、RIA法の如き、現在利用されている方法によってアルブミンを検出する場合には、10年ないし15年後まで腎臓悪化の徴候を示さないであろう。個体がマイクロアルブミン尿の状態に入った場合に、少なくとも $20 \mu\text{g}/\text{min}$ の尿排泄速度がRIAによって検出される。また、変質したアルブミンの排泄を観察することによって、腎臓における変化及び腎臓病の発症可能性が検出される。

【0048】

ノルモアルブミン尿の被験者、又はノルモアルブミン尿性糖尿病患者は、RIAによる測定として、 $20 \mu\text{g}/\text{min}$ よりも低い低アルブミン排泄速度を何年も持ち続ける。尿

10

20

30

40

50

中のアルブミンの存在は、腎臓の機能が害されている兆候である。このレベルが変化し始めるや否や、処置を開始することができる。

【 0 0 4 9 】

正常の個体においては、少量のアルブミンが尿中で検出可能である。全濾過アルブミンは、尿中にフラグメント化したアルブミンとして主に現れる。いくつかのアルブミンは、ノルモアルブミン尿の個体において検出される。しかしながら、ノルモアルブミン尿の個体において、尿におけるアルブミンの排泄速度は、 $5 \mu\text{g} / \text{min}$ 程度に低い。このレベルは一般にRIAによって検出可能である。

【 0 0 5 0 】

本発明の変質したタンパク質は、特に限定されるものではないが、クロマトグラフィー、電気泳動、沈殿法、又はそれらの組み合わせを含む当業界で公知の種々の方法によって検出することができる。それらは、Karger BL、 Hancock WS(eds.), High Resolution Separation and Analysis of biological Macromolecules. Part A Fundamentals in Methods in Enzymology, Vol.270, 1996 (Academic Press, San Diego, California, USA) ; Karger BL, Hancock WS(eds.), High Resolution Separation and Analysis of biological Macromolecules. Part B Applications in Methods in Enzymology, Vol.271, 1996 (Academic Press, San Diego, California, USA) ; 又はHarding SE, Rowe, AJ, Horton JC (eds.) Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science. 1992, Royal Soc. Chemistry, Cambridge, UK に記載され、これらの文献はそっくりそのまま参照によりここに組み入れる。

【 0 0 5 1 】

電気泳動法には、限定されるものではないが、移動界面電気泳動法、ゾーン電気泳動法、及び等電集束法が含まれる。

【 0 0 5 2 】

クロマトグラフ法には、分配クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、濾紙クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、気-液クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、親和クロマトグラフィー、及び疎水性相互反応クロマトグラフィーが含まれる。好ましくは、これはサイジングゲルクロマトグラフィー及び疎水性相互反応クロマトグラフィーである。さらに好ましくは、HPLCカラムを用いる疎水性相互反応クロマトグラフィーである。

【 0 0 5 3 】

出願人は、糖尿病の中で、ノルモアルブミン尿性糖尿病患者が慣用のRIAによって分析した時に、殆ど検出できないレベルのアルブミンをもつことを見出した。彼等は、正常であるように見える。しかしながら、尿をHPLCによって試験した場合、変質したアルブミンのレベルは、正常の個体で見られるよりも遥かに大きい。このアルブミンの差異は、損なわれていない又は変質した形態にある全てのアルブミン(全アルブミン)を十分に検出するためには、慣用のRIAは無力であるということに帰する。したがって、HPLCは、フラグメント化プロフィールを作るのに好適である。HPLC上のフラグメント化プロフィールは、損なわれていない又は変質した形態にあるアルブミンの多数の種類を表す一連のピークによって特徴付けられる。

【 0 0 5 4 】

本発明の好ましい態様において、被験者について腎臓病になる傾向又は早期の診断を決定する方法は、被験者がマイクロアルブミン尿症になる前になされる。

【 0 0 5 5 】

本発明のHPLC法によるサンプル中のアルブミン含有量の測定は、慣用のRIAによる測定とは異なる結果をもたらす。HPLC技術では、低いレベルのアルブミンが正常の個体において観察される。変質したアルブミンのレベルが検出され始め、そしてそのレベルが上昇し、そしてマイクロアルブミン尿症に進行した時、患者は腎臓病になる傾向をもつと決定することができる。

【 0 0 5 6 】

正常な個体においては、HPLCが作るフラグメント化プロフィールは、全長天然アルブミンが溶離する領域にはピークが存在しないことによって特徴付けられる。その代り、多数のフラグメント化されたアルブミンが検出できる。純粋なタンパク質生成物（未変質の）は、本質的に単一のピークを作る。例えば、疎水性HPLCを用いて、アルブミンが39～44分間の範囲で溶離することが観察された（図5）。したがって、正常な個体は、腎臓病がないか又は腎臓病になる傾向がないことを示す明確なフラグメント化プロフィールを作る。しかしながら、腎臓病の進行に従って、最初に変質したアルブミン量の増加、次いでその後天然の形態が検出される。フラグメント化プロフィールは変化し始め、そして全長アルブミンの領域においてより多くの生成物が、追加のピークとして、又は尿中のより多くの損なわれない/変質したアルブミンを表す拡大されたピークとして現れる。

10

【0057】

尿サンプルのフラグメント化プロフィールが作られるHPLCにおいて、変質したアルブミンは、天然アルブミンが溶離する領域に現れ、しかし変質したアルブミンの多数の形態の存在を示す多数のピークとして現れる。

【0058】

さらに好ましい実施態様において、腎臓病になる傾向は、少なくとも1種の変質したアルブミンの存在を測定又は同定することによって評価される。これは、HPLCプロフィール上の特定のピークの存在によって測定又は同定され、好ましくは、ピークは天然アルブミンの溶離位置に相当する位置の範囲内にある。

20

【0059】

変質したアルブミン又は未変質アルブミンを検出するためのHPLCカラムは、Zorbax 300 SB-CB (4.6 mm x 150 mm) の如き疎水性カラムであってもよい。50 µlのサンプルループを用いることができる。アルブミン及びその分解生成物の検出においてHPLCに好適な溶離溶剤には、アセトニトリル溶剤の如き標準溶離溶剤が含まれる。好ましくは、水/1%トリフルオロ酢酸(TFA)の緩衝液、続いて60%アセトニトリル/0.09%TFAの緩衝液を用いることができる。0ないし100%の勾配の60%アセトニトリル/0.09%TFAが好ましいことが分かった。

【0060】

疎水性カラム用の好適なHPLC条件は次の通りである。

30

溶剤A H₂O、 1%トリフルオロ酢酸

溶剤B 60%アセトニトリル、0.09%TFA

溶剤A 2 99.96 > 00.00 : 49.58 min

圧力 9.014 Mパスカル (~ 1100 psi)

溶剤B 2 0.04 > 100.0 : 49.58 min

圧力 7.154 Mパスカル

HPLCにおいて用いられる波長は約214 nmである。

【0061】

40

変質したアルブミンは、39～44分の間で溶離する（図5参照）。アルブミンフラグメントは、非常に早く、主に20分より以下で溶離する。

【0062】

腎臓病になる傾向を決定する方法は、如何なる個体にも適用可能である。腎臓病は、バクテリア感染、アレルギー、先天性の欠陥、石、腫瘍、化学物質又は糖尿病を含む多数の要因によって引き起こされる。好ましくは、本方法は、腎臓病に進行するかも知れない糖尿病患者について腎臓病になる傾向を確定するために適用できる。個体はノルモアルブミン尿性糖尿病であるのが好ましい。しかしながら、正常な個体について、尿中の損なわれない又は変質したアルブミンのレベルが増加するのを測定することによって、病気になる傾向をモニターすることができる。

50

【 0 0 6 3 】

本発明の方法は、上記した非抗体分離法を用いて実施することができる。しかしながら、変質したタンパク質に対して特異的な抗体もまた変質したタンパク質の存在を検出するために用いることができる。

【 0 0 6 4 】

変質したタンパク質に対する抗体は、次の方法によって得ることができる。実施例によりアルブミンに関する処理のみを特に記載するが、尿中の他の如何なるタンパク質に対する抗体製造にも容易に適用することができる。この方法は、例えば腎臓合併症に進行するであろう糖尿病患者を同定するために、どの変質したアルブミン分子が最も感受性あるマーカーであるかを追求する。

10

【 0 0 6 5 】

変質したアルブミンは、例えば予備的 H P L C により、変質したアルブミン分子の定量的分離を行うことによって特徴付けられる。変質したタンパク質は、グリケーションの如き、リガンドの結合について分析される。続いて、個々の変質したタンパク質のアミノ酸連鎖が、好ましくは、例えば、Karger BL, Hancock WS(eds.), High Resolution Separation and Analysis of biological Macromolecules. Part A Fundamentals in Methods in Enzymology. Vol.270, 1996 (Academic Press, San Diego, California, USA) ; 又は Karger BL, Hancock WS(eds.), High Resolution Separation and Analysis of biological Macromolecules. Part B Applications in Methods in Enzymology, Vol.271, 1996 (Academic Press, San Diego, California, USA) に記載された方法を用いる質量分析法によって測定され、そしてこれらの文献は、そっくりそのまま参照によりここに組み入れる。好ましい実施態様において、約 3 ないし 4 の変質したアルブミンスピーシーズがある。

20

【 0 0 6 6 】

変質したアルブミンに対する抗体を発生させる方法は、糖尿病患者、例えば、腎臓合併症に進行する患者を予言する変質したアルブミンのための診断的イムノアッセイの発展を追求する。これを遂行するために、H P L C によって十分な量の変質したアルブミンが用意される。抗体は、良好な力価を発生させるために、変質したアルブミンを兎等の動物に連続的に注入することによって作られ、そして抗体は、例えば、Goding JW, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 2nd Edition 1986, Academic Press, London, UK ; 又は Johnstone A, Thorpe R, Immunochemistry in Practice, 3rd edition 1996, Blackwell Science Ltd., Oxford, UK に記載の方法を用いる慣用の技術によって単離される。これらの文献はそっくりそのまま参照によりここに組み入れる。得られた抗体は、ポリクロナール抗体またはモノクロナール抗体である。

30

【 0 0 6 7 】

好ましくは、変質したアルブミンの少なくとも 1 つのスピーシーズが単離され、そして腎臓病になる傾向を決定するのに用いるために同定される。単離されたスピーシーズは、イムノアッセイに用いるための抗体を発生させるために用いられる。抗体には、酵素性、放射性、蛍光性または化学的発光性ラベルが付けられる。限定されるものではないが、検出方法には、ラジオイムノアッセイ、免疫性ラジオメトリックアッセイ、蛍光イムノアッセイ、酵素結合イムノアッセイ、又はプロテイン A イムノアッセイが含まれる。アッセイは、例えば、Goding JW, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 2nd Edition 1986, Academic Press, London, UK ; Johnstone A, Thorpe R, Immunochemistry in Practice, 3rd edition 1996, Blackwell Science Ltd., Oxford, UK ; または Price CP, Newman DJ(eds.) Principles and Practice of Immunoassay, 2nd Edition, 1997 Stockton Press, New York, NY, USA に記載された方法によって行われる。これらの文献はそっくりそのまま参照によりここに組み入れる。

40

【 0 0 6 8 】

本発明の目的は、所望により定量的にまたは非定量的に、サンプル中の変質したアルブ

50

ミンの如き変質したタンパク質の存在または不存在を迅速、かつ正確に測定するための物品またはキットを提供することにある。キットの各要素は、その適当な容器に個々に包装させることができる。個々の容器はまた、内容が確認できるようにラベル付けをしてもよい。さらに、個々の包装された要素は所望の全要素を保持できる、より大きな容器に入れてもよい。キットに関連して、キットの使い方を説明する指示書きがあってもよい。これらの指示書きはキットの上にかかれるか又はキットに添付してもよい。

【0069】

また、本発明は、腎臓病及び/又は疾病の腎臓合併症のための治療剤を決定する方法であって、

(a) 疾病の処置が可能であると思われる薬剤を必要とする人にそれを投与し、
(b) その人から尿サンプルを採取し、そして
(c) サンプル中のタンパク質の変質した形態をアッセイすることよりなり、そして尿中にタンパク質の変質した形態が存在するか又は存在しないか、又は時間の経過でタンパク質の変質した形態の量が低下するかのいずれかであることが、その薬剤が腎臓病及び/又は疾病の腎臓合併症のための治療剤であることを表す。治療剤は、リソソームに直接または間接的に作用して活性化するリソソーム活性化剤であってもよく、そしてそれによって、リソソームがポスト糸球体濾過タンパク質を消化させるが、それは健康な腎臓のしるしである。

【0070】

リソソームへのタンパク質の授受の過程は、糖尿病におけるアルブミン尿のメカニズムにおいて役割を演ずる。授受において巻き込まれる細胞内分子は、プロテインキナーゼC (PKC) である。薬剤または治療剤は、リソソーム授受を活性化するか、またはPKCを阻止するように処方することができる。

【0071】

したがって、本発明の一態様において、リソソームに対する基質、又はリソソームから離れる生成物を支配して、リソソームまたはプロセスを再活性化するのに使用するためのリソソーム活性化化合物が提供される。

【0072】

本発明の他の態様において、リソソーム活性化化合物およびキャリアを含む組成物が提供される。

【0073】

本発明のさらに他の態様において、腎臓病を阻止または処置する方法が提供され、その方法は、被験者にリソソーム活性化化合物の有効量を投与することを含んでいる。

【0074】

本発明のさらに他の態様は、リソソームに対する基質、又はリソソームから離れる生成物を支配して、リソソームまたはプロセスを再活性化することが可能な化合物を同定するために、多数の化合物を選別する方法を提供し、その方法は、次の工程を含む：

(a) 上記化合物をリソソームにさらし、そしてリソソームを活性化する能力に関して上記化合物をアッセイし、ここで活性化された時に該リソソームは変化した活性を持つものであり、

(b) 腎臓組織において細胞プロセスを実質的に正常なレベルに回復させる能力についてアッセイし、ここで上記腎臓組織は低いリソソーム活性を持つものであり、及び/又は

(c) 組織を回復して実質的に正常なレベルの腎臓組織に転換する能力についてアッセイすることよりなり、ここで上記腎臓組織は低いリソソーム活性を持つものである。

【0075】

リソソームは、腎臓において、タンパク質、特にアルブミンの分解に関係する。ミクロアルブミン尿の場合、非活性化リソソームのために、実質的な量のアルブミンがリソソームによる分解をどうしても免れる。リソソームによる分解の回復は、腎臓における細胞プロセス及び組織転換のバランスを回復することである。

リソソーム活性化化合物は、リソソームに直接又は間接的に作用する化合物であっても

10

20

30

40

50

よい。間接的に作用することによって、化合物はリソソームの活性に影響する成分に作用する。それにも拘らず、結果はリソソームの活性化をもたらし、それによってタンパク質の分解が増進される。

【0076】

本発明の他の態様において、リソソーム活性化化合物及びキャリアを含む組成物が提供される。

【0077】

この組成物は、生理学的に許容可能な又は製剂的に許容可能な組成物であってもよい。しかしながら、リソソーム活性化化合物の安定貯蔵のために許される組成物であるべきである。組成物が製剂的に許容可能な組成物である場合、腎臓病を阻止又は処置する方法に用いるのに適している。

10

【0078】

本発明を利用するさらに他の態様において、腎臓病を阻止又は処置する方法が提供され、そしてその方法は、被験者にリソソーム活性化化合物の有効量を投与することを含む。

【0079】

上記したように、リソソーム活性化化合物は、リソソームを再活性化するように作用して、細胞プロセス及び組織転換が全面的に又は一部回復され、それ故に腎臓が部分的に又は全面的に回復することになる。如何なる場合においても、腎臓病を持つ動物にリソソーム活性化化合物を投与することによって、リソソーム活性が完全に又は部分的に回復する。

20

【0080】

投与の方法は、経口または非経口投与であってもよい。経口投与には、錠剤、カプセル、粉末、シロップ等で投与することが含まれる。非経口投与には、静脈内、筋肉内、皮下、または腹腔内のルートが含まれる。

【0081】

リソソームの変化した活性は、好ましくは、リソソームの活性を増大して、アルブミン分解が改善されるような変化である。リソソームのみならず、細胞プロセス及び/または組織転換を改善する能力は、最も望ましいリソソーム活性化化合物の特徴である。リソソーム活性化化合物は腎臓機能の回復に使用するのが望ましい。

【0082】

本発明を利用する他の態様において、被験者における腎臓病を阻止する方法を提供し、その方法は、

(a) 尿サンプルの全アルブミン含有量を測定し、

(b) 慣用のRIA法によって検出できないように変質した、尿中の損なわれていないアルブミンの量の変化を測定し、ここでその変化は腎臓病になる傾向を示すものであり、そして

変化が測定された時に腎臓病の動物を処置することよりなる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0083】

次の実施例は、本発明の説明のために示したものであり、そして限定するためのものではない。

40

【実施例】

【0084】

[実施例1] 人漿液アルブミン(HSA)のサイズ・エクスクルージョン・クロマトグラフィー(Size Exclusion Chromatography)

【0085】

尿中のアルブミンの分配を分析するための尿を提供するために、正常で健康なボランティアを採用した。

【0086】

^3H [HSA]を健康なボランティアに注射し、そして尿及び血漿を集め、G-100

50

カラムを用いるサイズ・エクスクルージョン・クロマトグラフィーによって分析した。カラムは、4 において 20 ml/hr で PBS ($\text{pH} = 7.4$) を用いて溶離した。カラムのポイド容積 (V_0) は青色デキストラン T2000 で測定し、全容積をトリチウム原子含有水で測定した。

【0087】

トリチウム放射能は、 1 ml の水性サンプルで、 3 ml のシンチラントを用いて測定し、そして Wallac 1410 液体シンチレーション計数管 ($\text{Wallac Turku, Finland}$) 上で計測した。

図2は、尿及び血漿中のアルブミンの分配を説明する。

【0088】

[実施例2] : 正常で健康なボランティア及び糖尿病患者のアルブミン排泄

【0089】

実施例1において用いられた ^3H [HSA] を正常で健康なボランティア及び糖尿病患者に注射した。尿のサンプルを集め、そして ^3H [HSA] が実施例1におけるように測定した。

【0090】

正常で健康なボランティア (図3) は、実施例1において行ったようなサイズ・エクスクルージョン・クロマトグラフィー上にアルブミンのフラグメントが排泄されたことを示している。

【0091】

糖尿病患者 (図4) は、サイズ・エクスクルージョン・クロマトグラフィー上に実質的に全長の及びフラグメント化されたアルブミンが存在していることを示している。しかしながら、これらの方法で検出可能なアルブミンの排泄速度は、 $5 \mu\text{g/min}$ (対照) 及び $1457 \mu\text{g/min}$ (糖尿病) であった。

【0092】

[実施例3] : HPLC 上の全アルブミン及び損なわれていない/変質したアルブミンの測定

【0093】

正常で健康なボランティア、ノルモアルブミン尿性糖尿病患者及びマクロアルブミン尿症患者から、尿サンプルを集めた。尿は、 50 ml 尿標本容器に中ほどまで集められた。尿はさらに使用するまで凍結させた。 HPLC 分析に先立って、尿は 5000 g で遠心処理した。

【0094】

サンプルを、疎水性カラム: Zorbax 300SB-CB ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$) を用いて HPLC 上で分析した。 $50 \mu\text{l}$ のサンプルループが使用された。

【0095】

サンプルは、次の条件を用いてカラムから溶離した。

溶剤 A H_2O 、1%トリフルオロ酢酸

溶剤 B 60%アセトニトリル、0.09%TFA

溶剤 A 2 $99.96 > 00.00 : 49.58 \text{ min}$

圧力 9.014 MPa ($\sim 1100 \text{ psi}$)

溶剤 B 2 $0.04 > 100.0 : 49.58 \text{ min}$

圧力 7.154 MPa

214 nm の波長を用いた。

【0096】

(結果)

図5は、アルブミン単独の HPLC プロフィールを示す。ほぼ $39 \sim 44$ 分の保持時間において溶離した本質的に単一のピークが得られた。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 7 】

図 6 は、血漿の H P L C プロフィールを示すものであって、およそ 3 9 ~ 4 4 分の保持時間における明確なアルブミンピーク並びに他の血漿タンパク質に相当するピークを示している。

【 0 0 9 8 】

図 7 は、尿サンプルにアルブミンのピークを示さない正常で健康なボランティアの H P L C プロフィールを示す。この個体は、尿に排泄されたアルブミンを恐らく活性リソソームを經由して分解する。フラグメント化された実質の生成物は、幾つかのスピーシズ、特に約 1 4 . 5 分より以下の保持時間におけるスピーシズが目立つことを示していることが明らかである。

10

【 0 0 9 9 】

ノルモアルブミン尿性糖尿病患者の尿 (R I A により測定されたものとして、アルブミン排泄速度 $8 . 0 7 \mu \text{g} / \text{min}$) を分析したとき (図 8)、少量の変質したアルブミンがおよそ 3 9 ~ 4 4 分の保持時間において溶離することが明らかである。慣用の試験では、尿サンプルに $< 6 \text{mg} / \text{l}$ のアルブミンの存在を示すが、本発明の方法では、尿サンプルの真のアルブミン含有量が $2 6 . 7 \text{mg} / \text{l}$ であることを示した。この個体に対しては疾病の治療を開始すべきである。アルブミン副生物又はフラグメント化したアルブミンは、正常で健康なボランティアにおけるように存在していた。

【 0 1 0 0 】

ノルモアルブミン尿性糖尿病患者の他の尿サンプル (アルブミン排泄速度 $1 7 . 0 4 \mu \text{g} / \text{min}$) を分析した (図 9)。R I A 試験ではこの患者についてアルブミンが尿に排泄されたことを示す。しかしながら、H P L C 上に (図 9) およそ 3 9 ~ 4 4 分の保持時間においてアルブミンまたは変質したアルブミンのピークが明白である。慣用の試験では尿サンプルに $< 6 \text{mg} / \text{l}$ のアルブミンの存在を示すが、本発明の方法では、尿サンプルの真のアルブミン含有量が $8 1 . 3 \text{mg} / \text{l}$ であることを示した。この個体に対しては疾病の治療を開始すべきである。このピークは、多数のピーク外観を示し始める。損なわれていないアルブミンに相当する小さいピークは、変質したアルブミンが 3 9 ~ 4 4 分のピークとして現れたことを示している。アルブミンのピークを持たない正常で健康なボランティアのプロフィールと比較して、このアルブミンのピークの存在は、損なわれていない / 変質したアルブミン量の検出可能なレベルに変化があることを示している。これは腎臓病になる傾向を合図している。

20

30

【 0 1 0 1 】

ノルモアルブミン尿性糖尿病患者からの他の尿サンプル (アルブミン排泄速度 $4 . 3 7 \mu \text{g} / \text{min}$) を分析した。そして H P L C プロフィールを図 1 0 に示す。また、変質したアルブミンが、およそ 3 9 ~ 4 4 分の保持時間に多数のピークを示すものとして検出された。この患者は R I A により再び正常アルブミンとして登録された。慣用の試験では、尿サンプルに $< 6 \text{mg} / \text{l}$ のアルブミンの存在を示すが、本発明の方法では、尿サンプルの真のアルブミン含有量が $4 9 1 \text{mg} / \text{l}$ であることを示した。この個体に対しては疾病の治療を開始すべきである。変質したアルブミンのアセスメントがこれらの変化を同定するために必要であることが明らかである。この患者は腎臓病になる傾向を持つと決定されるであろう。腎臓病が進行するに従って、変質したアルブミンピークは増え続けるであろう。

40

【 0 1 0 2 】

このことは、マクロアルブミン尿患者の尿サンプルを分析した図 1 1 に示されている。およそ 3 9 ~ 4 4 分の保持時間に多数のピークを示す非常に重要なアルブミンピークがあることが明白であった。この患者のアルブミン含有量は $1 7 9 6 \text{mg} / \text{l}$ であった。この個体の処置は進行中である。

【 0 1 0 3 】

本発明方法により、図 1 2 ~ 図 1 4 に経時の調査によって示しているように、腎臓病になる傾向が早期に検知できるようになる。図 1 2 ~ 図 1 4 は、糖尿病の A C E インヒビタ

50

一処置が、本発明の変質したアルブミンの検出法が用いられるべきであるよりも後に開始された状態を示している。本発明による方法を用いた変質したタンパク質の検出は、慣用のRIAを用いるよりも腎臓病の発症を予言するためのより有効な方法である。

ここで引用された文献の全ては、その全体が参照される。

【0104】

最後に、種々の他の改変及び/または変更が、ここに示された本発明の精神を逸脱することなくなされることが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1】図1は、濾過された損なわれていないタンパク質が管状細胞中を進行すること及びアルブミンが分解して排泄アルブミンフラグメントを生じることが示す。 10

【図2】図2 a及び2 bは、正常で健康なボランティアからサイズ・イクスクルージョン・クロマトグラフィーによって集められた(a)尿及び(b)血漿における(³H)HSAの代表的なプロフィールを示す。尿は殆どフラグメント化されたアルブミンを含んでいる。そして血漿は、殆ど損なわれていないアルブミンを含んでいる。

【図3】図3は、フラグメント化されたアルブミンピークを示すが、サイズ・イクスクルージョン・クロマトグラフィーからの損なわれていないアルブミンのピークのない正常で健康なボランティアからの尿を示す。

【図4】図4は、サイズ・イクスクルージョン・クロマトグラフィーからの損なわれていない及びフラグメント化されたアルブミンのピークの両者を示す糖尿病患者からの尿を示す。 20

【図5】図5は、アルブミン単独のHPLCプロフィールを示す。

【図6】図6は、アルブミンピークを示す正常で健康なボランティアからの血漿のHPLCプロフィールを示す。

【図7】図7は、アルブミンのフラグメント化された生成物を含むが、損なわれていないアルブミンのピークがない正常で健康なボランティアからの尿のHPLCプロフィールを示す。

【図8】図8は、アルブミン分解生成物、及びおよそ39～44分の保持時間において小さな変質したアルブミンのピークを示しているノルモ(正常)アルブミン尿性糖尿病患者からの尿サンプルのHPLCプロフィールを示す。 30

【図9】図9は、腎不全の徴候を示し、およそ39～44分の保持時間において特徴的スパイク状のアルブミンピークの存在を示しているノルモアルブミン尿性糖尿病患者からの尿サンプルのHPLCプロフィールを示す。

【図10】図10は、腎不全の徴候を示し、およそ39～44分の保持時間において特徴的スパイク状の変質したアルブミンのピークの存在を示しているノルモアルブミン尿性糖尿病患者のHPLCプロフィールを示す。

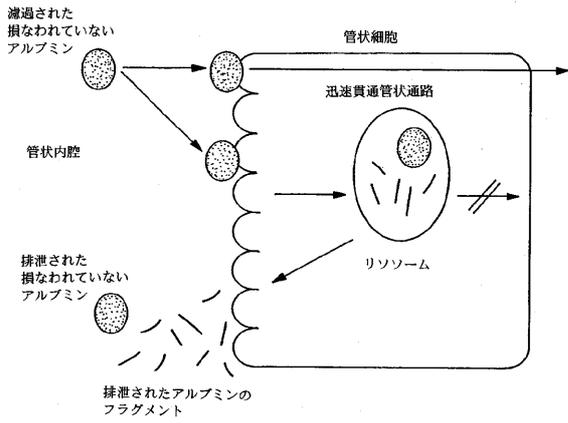
【図11】図11は、高いレベルのノーマルアルブミン、及びおよそ39～44分の保持時間において特徴的スパイク状の外観を示しているマクロアルブミン尿性糖尿病患者のHPLCを示す。

【図12】図12は、糖尿病性腎症の発症の前に変質したタンパク質が検出された患者の経時の調査を示し、糖尿病性腎症になりやすいことを示し、そして慣用のRIA法に依存することにより処置が遅延することを示している。 40

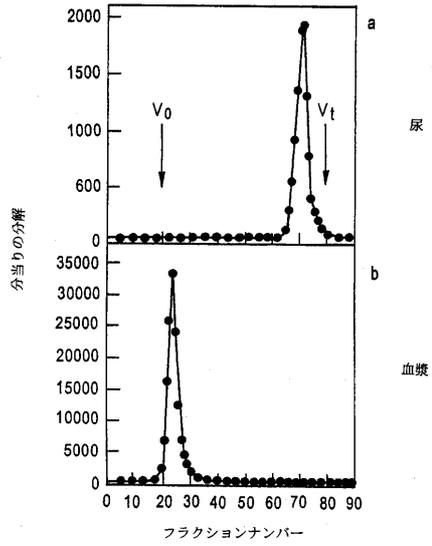
【図13】図13は、糖尿病性腎症の発症の前に変質したタンパク質が検出された患者の経時の調査を示し、糖尿病性腎症になりやすいことを示し、そして慣用のRIA法に依存することにより処置が遅延することを示している。

【図14】図14は、糖尿病性腎症の発症の前に変質したタンパク質が検出された患者の経時の調査を示し、糖尿病性腎症になりやすいことを示し、そして慣用のRIA法に依存することにより処置が遅延することを示している。

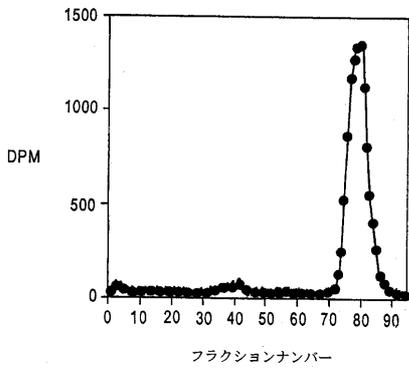
【図1】



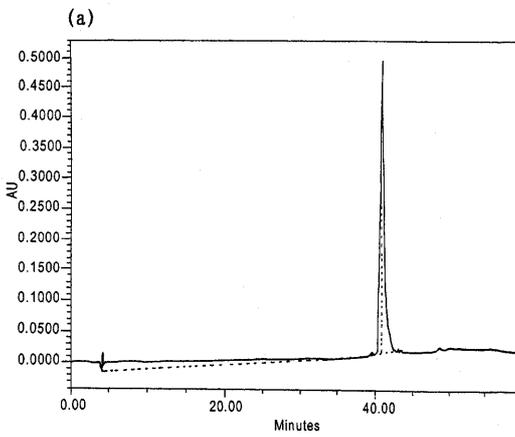
【図2】



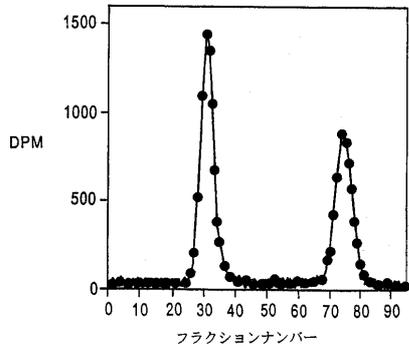
【図3】



【図5】



【図4】

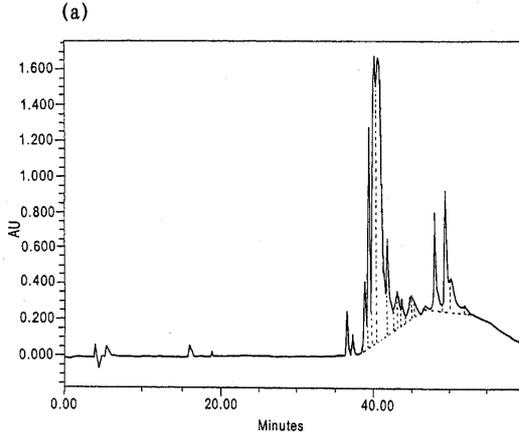


(b)

ピークの結果

#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		4.117	329140	40683		BB
2		4.883	15767507	16240		BB
3		39.467	101020	6703		BB
4		40.000	46216	3171		BB
5		40.733	3138458	242228		BV
6		41.017	13063671	466192		VB
7		43.233	62005	5618		BV
8		43.700	33150	2909		VB
9		48.683	76368	3554		BB

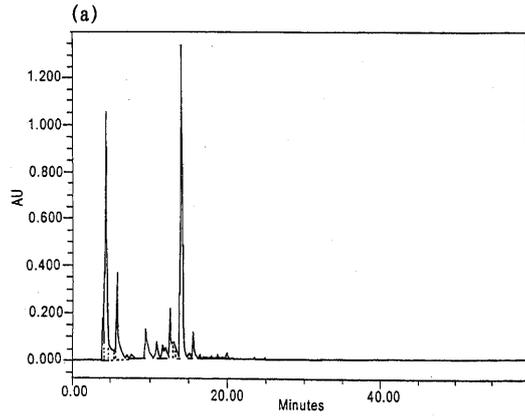
【 図 6 】



(b) ピークの結果

#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		4.133	1802825	122050		BB
2		4.933	1874787	51415		BV
3		5.550	2903127	94067		VB
4		14.633	31135	3556		BB
5		15.617	54780	5951		BV
6		16.117	1518301	71355		VB
7		18.817	354458	32687		BB
8		28.717	18597	2098		BB
9		31.967	41230	4687		BB
10		32.567	107938	2454		BB
11		36.633	3763801	256381		BV
12		37.383	2135643	127492		VV
13		37.933	3054	872		VB
14		38.233	16226	2010		BB
15		38.950	8424624	387355		BV

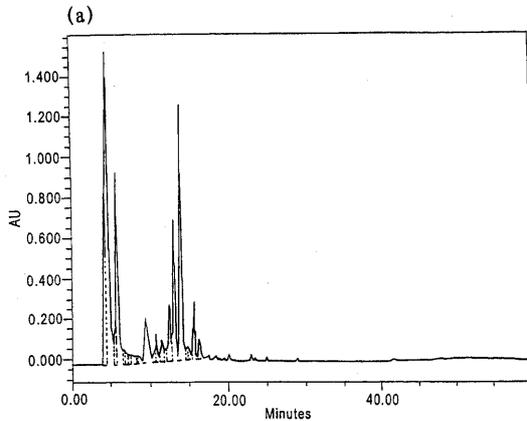
【 図 7 】



(b) ピークの結果

#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		4.067	2434486	185800		BV
2		4.483	16280311	1058547		VV
3		4.833	3884081	191585		VV
4		5.600	705286	46936		VV
5		5.983	670449	371288		VV
6		7.133	451038	24299		VB
7		7.617	542780	22245		VB
8		9.600	3088571	128855		BV
9		10.333	151779	12552		VV
10		10.767	284984	25595		VV
11		11.017	919890	80160		VV
12		11.350	108494	10375		VV
13		11.650	738559	61334		VV
14		12.033	705972	48248		VV
15		12.200	429100	36385		VV

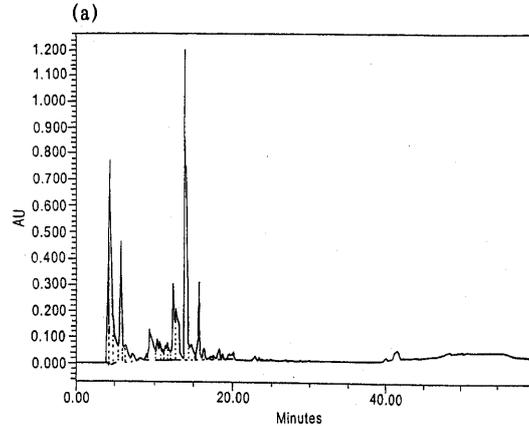
【 図 8 】



(b) ピークの結果

#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		4.067	11142185	841146		BV
2		4.467	42897717	1567808		VV
3		5.333	2771843	185077		VV
4		5.750	16970479	962668		VV
5		6.433	1506454	80128		VV
6		6.800	1187124	68430		VV
7		7.150	1105355	55641		VV
8		7.500	322553	40826		VV
9		7.833	1108215	42173		VV
10		8.183	522250	38801		VV
11		8.400	1110198	40131		VV
12		9.317	7318384	222305		VV
13		10.400	886048	57487		VV
14		10.667	2300590	148511		VV
15		11.050	399236	32655		VV

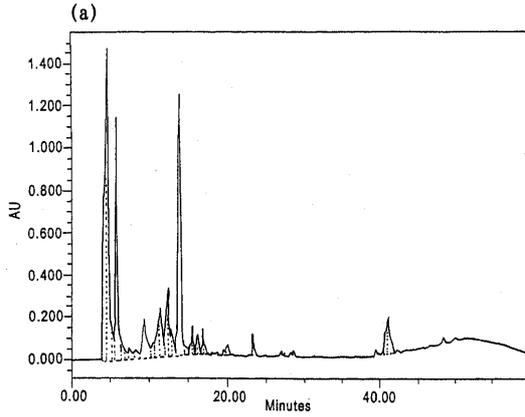
【 図 9 】



(b) ピークの結果

#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		4.083	3547997	287840		BV
2		4.417	13488709	786559		VV
3		4.787	4659330	247452		VV
4		5.750	8516445	470707		VV
5		6.317	2011722	70109		VV
6		7.200	883132	30217		VB
7		8.150	94619	7076		BB
8		9.017	439810	25556		BV
9		9.517	3872051	120729		VV
10		10.333	1180270	78798		VV
11		10.650	1054310	76753		VV
12		11.033	385789	28538		VV
13		11.333	761432	56664		VV
14		11.700	1033818	69004		VV
15		11.950	384784	35582		VV

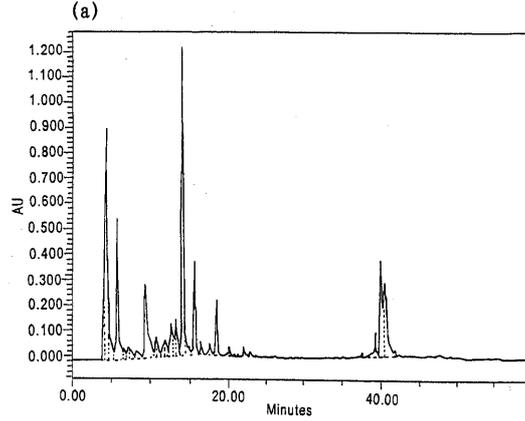
【 図 1 0 】



(b) ピークの結果

#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		4.083	10519737	792810		BV
2		4.367	14687929	1410389		VV
3		4.533	22637504	1494339		VV
4		5.163	3593396	219439		VV
5		5.717	22692299	1152174		VV
6		6.817	980777	80477		VV
7		7.150	682488	44596		VV
8		7.500	1795219	58004		VV
9		8.250	1518279	43057		VV
10		9.250	7251773	190341		VV
11		10.367	1000343	60821		VV
12		10.833	1192302	77226		VV
13		11.050	2788523	178468		VV
14		11.417	6180036	248690		VV
15		12.200	4008326	298350		VV

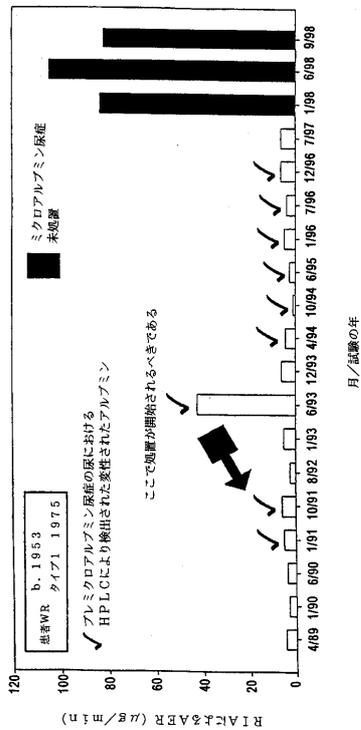
【 図 1 1 】



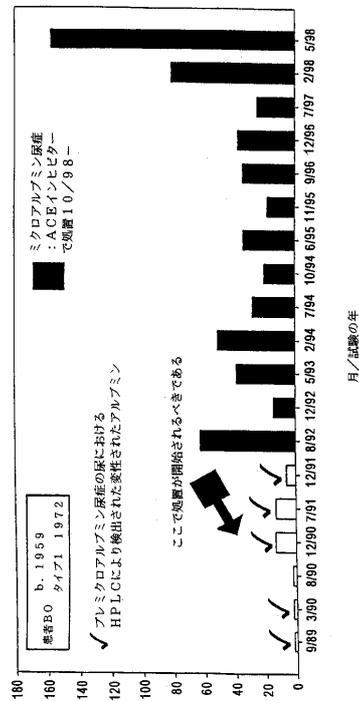
(b) ピークの結果

#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		4.100	2979946	236299		BV
2		4.450	15028113	321410		VV
3		4.817	4812815	249694		VV
4		5.550	814070	71678		VV
5		5.850	9688029	563550		VV
6		6.600	914291	48982		VV
7		7.000	272597	28204		VV
8		7.250	1918070	53043		VV
9		8.267	1161101	29288		VV
10		9.367	9258559	294071		VV
11		10.617	903487	62562		VV
12		10.833	1216206	83275		VV
13		11.250	178790	15563		VV
14		11.550	532841	42407		VV
15		11.867	1315340	70286		VV

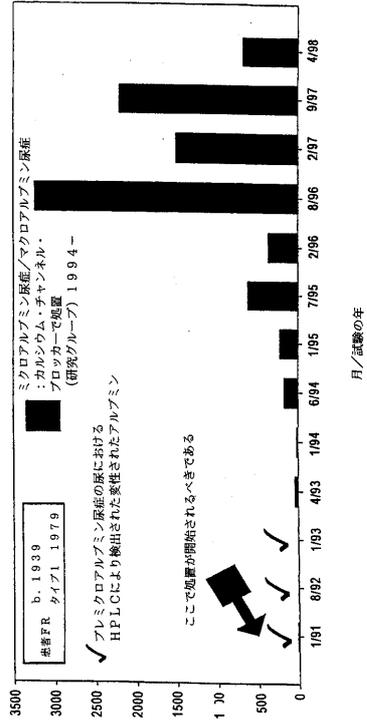
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 14 】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開平06-160384(JP,A)
特開平05-302922(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-98

G01N 30/88

专利名称(译)	检测肾脏疾病的方法		
公开(公告)号	JP4388515B2	公开(公告)日	2009-12-24
申请号	JP2005270160	申请日	2005-09-16
申请(专利权)人(译)	莫纳什大学		
当前申请(专利权)人(译)	莫纳什大学		
[标]发明人	コンパーウエインディー		
发明人	コンパー,ウエイン,ディー.		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/493 G01N30/88 G01N33/53 A61K45/00 A61P1/18 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P21/00 A61P25/30 A61P29/00 A61P31/18 A61P35/00 G01N27/447 G01N33/532		
CPC分类号	A61P1/18 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P21/00 A61P25/30 A61P29/00 G01N33/50 G01N33/5091 G01N33/68 Y10S436/811		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/493.A G01N30/88.J G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA16 2G045/AA25 2G045/CB03 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB03 2G045/FB06		
优先权	1998PP7843 1998-12-21 AU 09/415217 1999-10-12 US		
其他公开文献	JP2006038877A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过使用疾病指示剂作为在未被损害的尿液中发现的畸形蛋白质，公开一种在早期检测疾病的方法。ZSOLUTION：该方法包括使用免疫学或非免疫学技术检测尿液样本以检测畸形蛋白质的存在。还公开了阻断和治疗疾病的方法。Z

(b)

ピークの結果

#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		4.117	329140	40683		BB
2		4.883	15767507	16240		BB
3		39.467	101020	6703		BB
4		40.000	46216	3171		BB
5		40.733	3138458	242228		BV
6		41.017	13063671	486192		VB
7		43.233	62005	5618		BV
8		43.700	33150	2909		VB
9		48.683	76368	3554		BB