

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4307250号
(P4307250)

(45) 発行日 平成21年8月5日(2009.8.5)

(24) 登録日 平成21年5月15日(2009.5.15)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68	
CO 7 K 16/18	(2006.01)	CO 7 K 16/18	

請求項の数 3 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2003-510960 (P2003-510960)	(73) 特許権者	501154389
(86) (22) 出願日	平成14年6月17日 (2002.6.17)		ベ-・エル・ア-・ハ-・エム・エス・ア
(65) 公表番号	特表2005-500044 (P2005-500044A)		クティエンゲゼルシャフト
(43) 公表日	平成17年1月6日 (2005.1.6)		ドイツ・D-16761・ヘ-ニッヒスト
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/006660		ルフ・ノイエンドルフシュトラ-セ・25
(87) 国際公開番号	W02003/005035	(74) 代理人	100064908
(87) 国際公開日	平成15年1月16日 (2003.1.16)		弁理士 志賀 正武
審査請求日	平成17年5月10日 (2005.5.10)	(74) 代理人	100108578
(31) 優先権主張番号	101 31 922.3		弁理士 高橋 詔男
(32) 優先日	平成13年7月2日 (2001.7.2)	(74) 代理人	100089037
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 渡邊 隆
		(74) 代理人	100101465
			弁理士 青山 正和
		(74) 代理人	100094400
			弁理士 鈴木 三義

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症性疾患及び敗血症の診断及び治療のための、カルシニューリンB様タンパク質 (CHP) の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

敗血症の疑いがある患者からの組織サンプルをカルシニューリンB様タンパク質 (CHP) の存在について試験する工程を含む前記患者における敗血症を検出するための方法であって、コントロール群と比較して前記サンプル中の前記CHPのより高い量が敗血症を示す方法。

【請求項2】

前記CHPの存在を免疫診断的測定方法によって測定する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

配列番号1、配列番号2、配列番号4、または配列番号5の配列を含むCHP断片に特異的に結合する抗体を用いてCHPを測定する、請求項2に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、炎症性疾患及び敗血症の医学的診断及び治療のための、カルシニューリンB様タンパク質 (CHP) と称されるものの新規な使用に関する。本発明は、敗血症または全身性炎症が毒素の投与によって実験的に引き起こされた霊長類の肝組織におけるCHPの著しく増大した濃度の初めての検出に基づく。

【0002】

本発明は、炎症及び感染、特に感染性の病因の炎症及び敗血症の診断及び治療の更なる

改良に関する、本出願人の過度の研究的作業に由来する。

【背景技術】

【0003】

炎症は、各種の外的な作用、例えば傷害、火傷、アレルギー、細菌及び真菌及びウイルスのような微生物による感染に対する、拒絶反応を誘導する外来組織に対する、または身体の特定の炎症性の疾患、例えば自己免疫疾患及びガンに対する、生物の特定の生理学的反応によって非常に一般的に定義される。炎症は、身体は無害で局所的な反応として生じるが、個々の組織、器官、器官の一部、及び組織の一部の数多くの重大で慢性及び急性の疾患の典型的な特徴でもある。

【0004】

局所的な炎症は一般的に、有害な作用に対する身体の健全な免疫反応の一部であり、それ故身体の自己保存防御機構の一部である。しかしながら、炎症が、例えば自己免疫疾患のような特定の内因性のプロセスに対する身体の誤った反応の一部であるならば、及び/または慢性の性質を有するならば、あるいはそれらが全身性炎症反応症候群(SIRS)の場合、または感染によって引き起こされる重篤な敗血症の場合のような、全身性の度合いに到達するのであれば、炎症反応の典型的な生理学的プロセスは制御不能となり、急性で、しばしば生命を脅かす病理学的プロセスとなる。

【0005】

炎症プロセスの起源と経過は、主にタンパク質またはペプチドの性質を有するかなりの数の物質によって制御され、または多かれ少なかれ制限された時間についての特定の生体分子の出現によって達成されることが知られている。炎症反応に関与する内因性物質は、特にサイトカイン、メディエーター、血管作用性物質及び早期タンパク質、及び/またはホルモン調節因子から由来するものを含む。炎症反応は、炎症プロセスを活性化する内因性物質と、脱活性化物質(例えばインターロイキン-10)の両者が関与する複雑な生理学的反応である。

【0006】

敗血症または敗血症性ショックの場合のような全身性の炎症では、炎症特異的反応カスケードは、全身に亘り非制御的な態様で広がり、過度の免疫反応の意味で生命を脅かすようになる。内因性炎症特異的物質の個々の群の出現と考え得る役割についての現在の知見に関しては、例えばA. Beishuizen等, "Endogenous Mediators in Sepsis and Septic Shock", *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 33, 1999, 55-131; 及びC. Gabay等, "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。敗血症及び関連する全身性炎症性疾患の理解、及び故に認識されている定義は、数年で変化しているため、K. Reinhart等, "Sepsis und septischer Schock" [Sepsis and septic shock], *Intensivmedizin*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2001, 756-760が参照され、ここでは敗血症の最近の定義が与えられている。本願の文脈においては、使用される用語、敗血症及び炎症性疾患は、述べられた3種の参考文献で与えられた定義に基づく。

【0007】

少なくともヨーロッパでは、陽性の血液培養長によって検出可能な全身性の細菌感染は、用語、敗血症を特徴付ける一方で、敗血症は現在では、感染によって引き起こされる全身性の炎症であると主に理解されているが、病理的なプロセスとして、他の原因によって誘導される全身性の炎症と非常に類似性を有している。前記敗血症の理解の変遷は、診断的アプローチにおける変化を引き起こしている。かくして、細菌病原体の直接的検出は、生理学的パラメーターの複雑なモニタリングによって置換または補足され、より最近では、特に敗血症プロセスまたは炎症プロセスに関与する特定の内因性物質、即ち特異的「バイオマーカー」の検出によって置換または補足されている。

【0008】

炎症プロセスに関与していることが知られている数多くのメディエーター及び早期タンパク質の中で、診断目的に適しているものは、特に炎症性疾患に非常に特異的な出現、ま

10

20

30

40

50

たは炎症性疾患の特定の時期に非常に特異的な出現を有するものであり、その濃度は有意な態様で劇的且つ特徴的に変化し、さらに通常の測定に必要とされる安定性を有し、高濃度の値に到達するものである。診断目的のために、病理学的なプロセス（炎症、敗血症）と、それぞれのバイオマーカーとの信頼できる相関関係が、第一義的な重要性を有し、炎症プロセスに關与する内因性物質の複雑なカスケードにおける役割を知る必要性は存在しない。

【 0 0 0 9 】

敗血症のバイオマーカーとして特に適している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、感染性の病因（敗血症）の全身性の炎症の条件の下で、非常に高い値に到達する血清濃度を有するプロホルモンである一方で、健康なヒトでは実際に検出できない濃度を有する。高い値のプロカルシトニンはさらに、敗血症の比較的早期でも到達し、そのためプロカルシトニンの測定は、敗血症の早期の診断に適しており、感染によって引き起こされる敗血症を、他の原因を有する重篤な炎症から容易に区別するのにも適している。敗血症マーカーとしてのプロカルシトニンの測定は、M. Assicot等, "High serum procalsitonin concentrations in patients with sepsis and infection", *The Lancet*, Vol. 341, No. 8844, 1993, 515-518; 及び特許DE 42 27 454 C2及びEP 0 656 121 B1及びUS 5,639,617の文献の主題である。本記載を補う目的で、前記特許、及び前記文献に挙げられている早期の参考文献が参照される。近年では、プロカルシトニンの主題に関する文献の数は非常に増加している。それ故さらに、W. Karzai等, "Procalcitonin - A New Indicator of the Systemic Response to Severe Infection", *Infection*, Vol. 25, 1997, 329-334; 及びM. Oczenski等, "Procalcitonin: a new parameter for the diagnosis of bacterial infection in the peri-operative period", *European Journal of Anaesthesiology*, 1998, 15, 202-209; 及びさらに、H. Redl等, "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; 及びH. Redl等, "Non-Human Primate Models of Sepsis", *Sepsis* 1998; 2: 243-253; 及び、最近印刷されたレビューのようなこれらで引用されている更なる文献が参照される。

【非特許文献1】A. Beishuizen等, "Endogenous Mediators in Sepsis and Septic Shock", *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 33, 1999, 55-131

【非特許文献2】C. Gabay等, "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等, "Sepsis und septischer Schock" [Sepsis and septic shock], *Intensivmedizin*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2001, 756-760

【非特許文献4】M. Assicot等, "High serum procalsitonin concentrations in patients with sepsis and infection", *The Lancet*, Vol. 341, No. 8844, 1993, 515-518

【特許文献1】DE 42 27 454 C2

【特許文献2】EP 0 656 121 B1

【特許文献3】US 5,639,617

【非特許文献5】W. Karzai等, "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等, "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等, "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等, "Non-Human Primate Models of Sepsis", *Sepsis* 1998; 2: 243-253

10

20

30

40

50

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

敗血症マーカーであるプロカルシトニンの利用可能性は、敗血症の研究に所定のかなりの刺激を有しており、プロカルシトニンの測定を補うことができ、及び/または細かい診断若しくは各種の診断の目的のための更なる情報を提供できる更なるバイオマーカーを見出すことに、過度の努力が現在なされている。しかしながら、潜在的な新規な敗血症バイオマーカーについての研究は、炎症または敗血症プロセスに關与する特定の内因性物質の出現についての正確な機能または正確な理由に關して、しばしばほとんど全くまたは全然知られていないという事実によって面倒になっている。

10

【0011】

更なる潜在的な敗血症マーカーの測定に対する実りある純粋に仮説的なアプローチの実験的試験の結果は、DE 198 47 690 A1及びWO 00/22439に見出すことができる。そこでは、敗血症の場合に、プロホルモンプロカルシトニンの濃度が増大するだけでなく、ペプチドプロホルモンの中に含まれるであろう他の物質についても、有意に増大した濃度が観察されることが示されている。記載された現象は十分に報告されている一方、敗血症におけるプロホルモンの濃度の増大の原因は、依然として実質的に説明できるものではない。

【0012】

本願では、更なる炎症または敗血症特異的バイオマーカーについての探索における別の純粋に実験的なアプローチの結果が報告される。これらの実験的な調査はさらに、感染性の病因の全身的な炎症反応に關連するプロカルシトニンの測定で開始する。かくして、非常に早期の段階で、プロカルシトニンは、ホルモンカルシトニンの前駆体である場合と敗血症において同様な態様では明らかに形成されないことが観察されている。かくして、高いプロカルシトニン濃度はまた、甲状腺が除去されている患者でも観察された。それ故甲状腺は、プロカルシトニンが敗血症の間で形成または分泌される器官であるはずはない。H. Redl等, "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; 及びH. Redl等, "Non-Human Primate Models of Sepsis", Sepsis 1998; 2: 243-253による文献では、敗血症におけるプロカルシトニンの形成を説明することを企図すると称される実験的調査の結果が報告されている。前記作業では、人工的な敗血症が、霊長類(ヒヒ)にエンドトキシン投与によって生産され、血液中の最高のプロカルシトニン濃度が到達される実験的に生産された状態が測定されている。前記作業において記載された実験動物モデルの更なる開発は、ペプシン性またはタンパク質の性質の新規な内因性敗血症特異的バイオマーカーを測定するために、本願の文脈において機能し、当該バイオマーカーの出現は、敗血症または特定の形態の敗血症に特徴的であり、それ故敗血症の特異的診断を許容する。霊長類モデルは、霊長類とヒトの生理学の非常に顕著な類似性、及び多くの治療上及び診断上のヒトの試薬との高い交差反応性のために選択された。

20

30

【0013】

炎症の間で形成される内因性物質は、身体の複雑な反応カスケードの一部であるため、そのような物質は診断上興味を有するだけでなく、例えば敗血症の間で広がり観察されている炎症の全身性の広がりをできるだけ早期に停止させるために、このタイプの個々の物質の形成及び/または濃度に影響することによって、炎症プロセスに治療上介入するための試みが、過度の努力で現在実施されている。この文脈では、炎症プロセスに關与することが示されている内因性物質はまた、潜在的な治療上の標的として考慮される。炎症プロセスの特定のメディエーターに基づき、前記プロセスに陽性の治療上の影響を有することが企図される試みは、例えばE.A. Panacek, "Anti-TNF strategies", Journal fur Anaesthesie und Intensivbehandlung"; No. 2, 2001, 4-5; T. Calandra等, 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。

40

50

これらの治療上のアプローチは、炎症促進性物質の濃度を低下すること、またはそのような物質の形成を阻害すること、及び特に特異的抗体（TNF - またはMIFに対する；E.A. Panacek, "Anti-TNF strategies", Journal fur Anasthesie und Intensivbehandlung; No. 2, 2001, 4-5; T. Calandra等, "Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor", Nature Medicine, Vol. 6, No. 2, 2000, 164-170参照）の使用によりそれを実施すること、または炎症カスケードに阻害効果を有する内因性物質（プロテインC；K. Garber, "Protein C May be sepsis solution", Nature Biotechnology, Vol. 18, 2000, 917-918）の濃度を増加することを企図している。最後に挙げられた文献は、選択された内因性標的分子に影響することによって、炎症プロセスに対する治療上の影響を有するそのような試みの概略を与え、その試みは、不幸にも一般的に今日までほとんど成功を収めていない。今日までむしろ失望を感じさせる治療上のアプローチに鑑み、できるだけ炎症または敗血症に特異的であり、治療上の標的として、炎症と格闘する点で成功に対する新たな予測を開く更なる内因性生体分子を同定することに大きな興味を持たれている。

10

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、カルシニューリンB様タンパク質（CHP）と称されるものが、感染によって引き起こされる炎症を有する霊長類及びヒトにおいてかなりの濃度で検出できる一方、健康な被験者では、それは見いだせないかまたは検出の分析的限界での濃度でのみ見いだせるという事実に基づくものであり、このことは、このタンパク質CHPを、炎症診断/敗血症診断の両者について、及び新規な治療上の標的として適切なものとする。

20

【0015】

炎症または敗血症の実験的シミュレーションの最初の時点でのCHPの検出される出現のため生じる診断及び治療での使用が、請求項1に一般的な形態で記載されている。

【0016】

請求項2から4は、診断的な使用または方法に関する。

【0017】

請求項5は、特に敗血症を含む炎症及び感染の治療の領域における、新規な潜在的治療上の使用に一般的な形態に関連し、請求項6及び7は、生理学的なCHP濃度に影響する目的を有する治療上の応用のために企図される製薬組成物に関連する。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

実験の部分で以下に詳細に記載されるように、本発明は、エンドトキシン投与（Salmonella Typhimurinから得たLPS）によってヒビにおいて人工的な敗血症の実験的な誘導と、2次元ゲル電気泳動による処理動物の肝組織の精密検査の後に、処理動物においてのみ同定可能であるペプチドまたはタンパク質産物としてCHPを見出すことが可能であったという事実に基づく。その同定のため、処理動物の場合でのみ見出され、ゲル電気泳動によって22900 ± 700ドルトンの分子量と、約6.2の等電点を有することが見出された新規なタンパク質スポットが、電気泳動ゲルから単離され、トリプシン切断により断片に分離され、それを本質的に既知の態様でマススペクトロメトリーによって分析し、既知のトリプシン処理タンパク質と比較することによって同定した。

40

【0019】

新規なタンパク質スポットのトリプシン切断のマス分析において、以下のマス（m/z）を有する断片が見出された：1169.52；1469.50；1550.56；1569.7；1645.6；1920.81；2386.78。7のマス（1169.52及び1920.81）は、既知のトリプシン処理タンパク質のいずれのマスとも合致できなかった。残りの5のマスについては、分析に引き続き、CHPの既知の配列と合致が生じた（配列番号6参照；データベースSWISS-PROT: Entry Ca22_Human: Accession number Q99653; Lin X., Barber D.L. "A calcineurin homologous protein inhibits GTPase-stimulated Na-H exchange", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 12636 (1996))

50

。

【 0 0 2 0 】

マス 1 4 6 9 . 5 0 は、配列 L - Y - S - R - F - T - S - L - D - K (配列番号 1) に対応する。アミノ酸 S (セリン、二度出現する) 及び T (トレオニン) では、配列は各々の場合でリン酸基によって修飾されている。この断片の理論的な分子量は 1 4 6 9 . 4 9 9 である。C H P のアミノ酸配列 (前述の Lin X. によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない) では、この配列は 3 1 - 4 0 位で見出される。

【 0 0 2 1 】

マス 1 5 5 0 . 5 6 は、配列 K - E - T - G - F - S - H - S - Q - I - T (配列番号 2) に対応し、2 のリン酸基によって補われている。この断片の理論的分子量は 1 5 5 0 . 5 6 4 である。C H P のアミノ酸配列 (前述の Lin X. によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない) では、この配列は 1 9 - 3 0 位で見出される。

10

【 0 0 2 2 】

マス 1 5 6 9 . 7 は、配列 T - L - A - H - F - R - P - I - E - D - N - E - K (配列番号 3) に対応する。この断片の理論的分子量は 1 5 6 9 . 7 である。C H P のアミノ酸配列 (前述の Lin X. によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない) では、この配列は 8 6 - 9 8 位で見出される。

【 0 0 2 3 】

マス 1 6 4 5 . 6 は、配列 A - S - T - L - L - R - D - E - E - I - K (配列番号 4) に対応する。この断片の理論的分子量は 1 6 4 5 . 5 9 7 である。C H P のアミノ酸配列 (前述の Lin X. によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない) では、この配列は 5 - 1 8 位で見出される。

20

【 0 0 2 4 】

マス 2 3 8 6 . 7 8 は、配列 I - I - N - A - F - F - P - E - G - E - D - Q - V - N - F - R - G - F - M - R (配列番号 5) に対応する。この断片の理論的分子量は 2 3 8 6 . 7 8 である。C H P のアミノ酸配列 (前述の Lin X. によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない) では、この配列は 6 6 - 8 5 位で見出される。

【 0 0 2 5 】

解釈の認識されている原理によれば、そのような一致は、タンパク質スポットから得た産物の C H P としての信頼できる同定が考慮される。C H P (1 9 4 アミノ酸) の分子量は 2 2 3 2 5 ドルトンである。

30

【 0 0 2 6 】

肝臓における敗血症の間の C H P の出現の同定は、かなりの科学的、診断上、及び治療上の興味を有する。

【 0 0 2 7 】

ヒトタンパク質 C H P は、1 9 9 6 年に最初に記載され (X. Lin 及び D.L. Barber, A calcineurin homologous protein inhibits GTPase-stimulated Na-H exchange, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 12631-12636, 1996)、同じ年のわずかに事前に Ca^{2+} 結合タンパク質として記載されたラットタンパク質 p 2 2 と実質的に同一であることが分かった (M.R. Barroso 等, A Navel Ca^{2+} -binding protein, p22, Is Required for Constitutive Membrane Traffic, J. Biol. Chem., 271: 10183-101878, 1996)。カルシニューリン B 様タンパク質 (C H P) の名称は、カルシニューリンの調節 B サブユニットに対するこのタンパク質の高い類似性を示す (6 5 %)。さらに、C H P と更なる Ca^{2+} 結合タンパク質カルモジュリンとの間で高い類似性が存在する。

40

【 0 0 2 8 】

C H P は多くのヒト組織で発現されており、偏在して発現される Na^{+} / H^{+} エクスチェンジャーである N H E 1 の調節のための必須の補因子であることが分かっており、N H E 1 は活性化されると、細胞内 pH を増大し、細胞増殖、細胞分化、及び新形成性トランスフォーメーションの活性化を引き起こす。C H P のリン酸化の度合いは、細胞分裂の間の N H E 1 調節にとって重要である。さらに、C H P の一過的過剰発現が、血清及び G T

50

P a s e 刺激的 N H E 1 活性を阻害することが見出されている。

【 0 0 2 9 】

C H P の生理学的役割に関する更なる調査は、N H E 調節についてのその重要性を確認した(T. Pang等, Calcineurin Homologous Protein as an Essential Cofactor for Na⁺/H⁺ Exchangers, J. Biol. Chem., 276: 17367-17372, 2001)。それらはまた、C H P がカルシニューリン活性を阻害することを示した(X. Lin等, Inhibition of Calcineurin Phosphatase Activity by a Calcineurin B Homologous Protein, J. Biol. Chem., 274: 36125-36131, 1999)。とりわけカルシニューリンは、T細胞活性化、かくして免疫応答の誘導において重要な役割を演じているため、この発見はかなり興味深い。このため、カルシニューリンはまた、免疫抑制製薬学的活性物質シクロスポリン A 及び F K 5 0 6 の標的でもある。これらの結果に照らして、タンパク質 C H P は、カルシニューリン活性、及び免疫系の活性化の以前に未認識の内因性インヒビターであると分かっている。

10

【 0 0 3 0 】

C H P の生理学的濃度が、いずれかの疾患において有意に変化し、それ故 C H P 濃度の測定は、診断の観点から興味を有するといえることは、今まで知られていなかった。同様に、規定された治療上の目的を達成するための生理学的な C H P 濃度に影響するための提案はほとんど存在しなかった。

【 0 0 3 1 】

本発明によれば、人工的な敗血症が毒素投与によって誘導された霊長類の肝臓における比較的高い C H P 濃度の検出は有意に高く、同時にコントロール動物のそれ以外完全に同一の処理サンプルにおける C H P の検出は不可能である。この出現は、処理動物において、毒素投与による敗血症の誘導の後に比較的短時間でのみ観察されているため、この事実を C H P の測定による有望な敗血症、感染、及び炎症の診断に当てはめるために利用することが可能である。特に興味深いことは、敗血症の予後マーカーとしての C H P の明白な適合性である。

20

【 0 0 3 2 】

C H P は、いずれかの適切な検出方法によって測定できるが、適切に選択された抗体を使用する免疫診断法による、患者の体液における測定が、実際上の観点から最も有利であろう。

【 0 0 3 3 】

実験的に誘導された敗血症において C H P の増大した出現を検出を初めて検出できたという事実に基づいて、炎症及び敗血症に関連する診断及び/又は治療目的のため C H P を利用する可能性がかくして開かれている。この目的のため、C H P またはその適切な部分ペプチドは、合成的に、または従来技術の一部である方法を使用する遺伝学的操作によって、標的化された態様で任意に調製できる。C H P 部分ペプチドは任意に市販形態で存在し、免疫診断測定のための特定のアッセイフォーマットのために、カリブレター、トレーサー、及びコンペティターとして必要とされて良く、説明されている態様でこの目的のために調製されて良い。

30

【 0 0 3 4 】

さらに、C H P 断片またはその適切な部分配列は、患者の体液中の C H P の診断的測定の目的として、及び/または潜在的な治療薬として適切である特異的なポリクローナル、及び特にモノクローナル抗体を生産するために、近年の従来技術の既知の方法によって使用できる。既知の部分ペプチド配列に対する適切なモノクローナル抗体の生産は、一般的な従来技術の一部であり、特に記載する必要はない。さらに、対応する D N A に対する直接的な遺伝学的免疫化の方法を使用する抗体生産もまた、特に言及すべきではない。それ故、そのような免疫化方法の使用で、得ることができる抗体の標本を拡大できることが過去において見出されているため、例えば免疫化のために C H P または C H P 断片の c D N A を使用することは、本発明の範囲内にある。しかしながら、第三者から入手可能な C H P に対する既知の抗体もまた使用されて良い。

40

【 0 0 3 5 】

50

C H Pの免疫学的測定では、例えば選択的なプロカルシトニン測定について記載されているように進行することが特に可能である。P.P. Ghillani等, "Monoclonal antipeptide antibodies as tools to dissect closely related gene products", The Journal of Immunology, Vol. 141, No. 9, 1988, 3156-3163 ; 及びP.P. Ghillani等, "#Identification and Mesurement of Calsitonin Precursors in Serum of Patients with Malignant Diseases", Cancer Reserch, Vol. 49, No. 23, 1989, 6845-6851参照。記載された方法の変形例、及び/または更なる免疫化方法は、標準的な作業及び文献から当業者に利用可能であり、文脈で適用できる。

【 0 0 3 6 】

C H P、または配列番号1、配列番号2、配列番号4、及び/または配列番号5に係る部分配列、またはその部分ペプチドを有するC H P断片は、利用可能な結果に基づいて、炎症及び感染（特に敗血症タイプの全身性の感染）の経過の診断及びモニタリングのための特異的なマーカーペプチド（バイオマーカー）として機能できる。プロカルシトニンの測定と同様に、C H Pの測定は、早期の示差的な診断、及び診断、及び診断の準備のため、敗血症及び感染の経過のひどさの評価、及びその治療に随伴する評価のために効果的であり得、そのような方法では、C H Pの含量は、患者の生物学的液体または組織のサンプル中で測定され、炎症、重篤な感染、または敗血症の存在は、C H Pの確立された存在及び/または量から結論付けられ、得られた結果は、敗血症のひどさと相関し、治療及び/または治療の予測のための可能性が見積もられる。

【 0 0 3 7 】

しかしながら、C H P（または任意にそれをコードするD N A部分）は、炎症、特に感染性の病因の全身性の炎症および敗血症の予防薬または治療において使用できる。

【 0 0 3 8 】

C H Pは免疫抑制効果を有するため、敗血症の場合におけるC H Pの増大した濃度は、敗血症の場合で観察された身体の過度の全身性の免疫反応に対して、身体のカウンター調節として解釈できる。それ故、外的なC H P投与によるこのカウンター反応のサポートは、ここに報告されている、敗血症における増大したC H P濃度の診断上の発見が、新規な治療上の可能性を示すように、身体の敗血症反応を制御する意味で機能することができるはずである。

【 0 0 3 9 】

生理学的C H P濃度が、外的なストレス反応 - 毒素の効果の結果としての前述の動物モデルにおいて - の関数として非常に可変的であるという観察は、内因性免疫抑制性C H Pの濃度のそのような変化が、例えば完全な生物の防御を弱化する局所的炎症の場合において、免疫防御の非所望の弱化を導くことが知られている生理学的状況で生じるが、オーバーワークによる外的なストレスの場合、または感情的ストレスの場合では生じないという事実の更なる指標である。これらの場合では、C H Pによって生産される免疫抑制は非所望である。治療上の効果は、免疫防御を再生するために生理学的C H P濃度を低下する目的で、そのような場合に生じる。そのような場合では、C H Pの濃度は、結合抗体の投与によって、またはアフィニティー吸着による血液の洗浄または血漿搬出によるC H Pの外挿的除去によって減少できる。そのような目的のため、実際の活性物質として、C H PまたはC H P断片に対して生産され、適切な製薬学的キャリアーと共に患者に投与するよう調製された抗体を含む薬剤を提供することも可能である。

【 0 0 4 0 】

かくしてC H Pは、敗血症及び同様な重篤な炎症の治療のための、潜在的な有望な治療活性物質となるであろう。

【 0 0 4 1 】

もしC H P活性が、治療上の目的のため増大するのであれば、各種の翻訳後修飾形態、例えばグリコシル化またはリン酸化形態で、あるいは製薬学的賦形剤、例えばポリエチレングリコール残基によって置換された形態で、C H Pを含む分子もまた、治療上有用なC H P物質として考慮される。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 2 】

C H P の発見及び同定は以下により詳細に記載され、添付した配列表及びその一部が参照される。図面は、図面の簡単な説明に示された内容を示す。

【実施例】

【 0 0 4 3 】

1 . 動物モデル (ヒヒ) におけるエンドトキシン投与による感染刺激

エンドトキシン注射によるプロカルシトニン分泌の刺激のためのヒヒで実施された実験に基づいて (H. Redl 等 , "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 等 , "Non-Human Primate Models of Sepsis", in : Sepsis 1998; 2: 243-253参照)、ヒヒ (オス、約 2 年 齢、2 7 - 2 9 k g の体重) を、体重の k g 当たり 1 0 0 μ g の L P S (Salmonella Typhimurium 由来の リポ多糖、Sigma 供給) をそれぞれ静脈内に投与した。注射後 5 から 5 . 5 時間後、1 0 m l のドレタールの静脈内投与によって動物を殺傷した。死から 6 0 分以内で、全ての器官 / 組織を切除し、液体窒素中での凍結によって安定化した。

10

【 0 0 4 4 】

更なる加工の間で、1 . 5 m l のバッファー A (5 0 m M トリス / H C l、p H 7 . 1、1 0 0 m M K C l、2 0 % グリセロール) を窒素で冷却しながら個々の凍結組織 (1 g) のサンプルに加え、サンプルを磁気製乳鉢で微粉化し、パウダーを得た (J. Klose , "Fractionated Extraction of Total Tissue Proteins from Mouse and Human for 2-D Electrophoresis", in: Methods in Molecular Biology, Vol. 112: 2-D Proteome Analysis Protocols, Humana Press Inc., Totowa, NJ)。引き続き 4 で 1 0 0 , 0 0 0 g で 1 時間の遠心分離処理の後、得られた上清を回収し、更なる加工のため必要とされるまで - 8 0 で貯蔵した。

20

【 0 0 4 5 】

この態様で得られた組織抽出物を使用して、観察された組織のどの部分が、最大量の既知の敗血症バイオマーカーであるプロカルシトニンをエンドトキシン投与によって生産できるかを測定するために、最初の調査を実施した。次いで、最高レベルのプロカルシトニン形成を有する測定された組織において、エンドトキシン投与の後のみ生じる更なる以前に未同定のタンパク質産物を、ディフェレンシャルプロテオーム分析によって求めた。この目的のため、非処理ヒヒの組織サンプルをコントロール組織サンプルとして使用し、サンプルの殺傷と取得を、処理動物の場合のものと同じの条件下で実施した。

30

【 0 0 4 6 】

2 . エンドトキシン注射の後のサイクレベルのプロカルシトニン形成を有するヒヒ組織の測定

個々の組織のサンプルを、一方でポリスチレンチューブに固定化されたヒヒカルシトニンに対する抗体で、他方でアクリジニウムエステルでマークされ、ヒヒプロカルシトニンの N 末端に対して向けられたモノクローナル抗体で実施する免疫蛍光試験 (ヒトプロカルシトニンの測定のために開発された、本出願人の LU-MI test (登録商標) PCT と類似する) の補助の下で調査した。この試験の目的では、個々のサンプル中のヒヒプロカルシトニンの含量を、組換えヒトプロカルシトニンを使用する試験の較正の後に測定した。

40

【 0 0 4 7 】

この実験により、肝組織が最大量のプロカルシトニンを与えることが示された。それ故、初めに記載された態様で得られたヒヒ肝臓から得たタンパク質抽出物が、新規な敗血症特異的バイオマーカーの探索のために使用された。

【 0 0 4 8 】

3 . ヒヒの細胞質肝細胞タンパク質を使用するプロテオーム分析

一方で健康なヒヒ (コントロール) の、他方で L P S で注射されているヒヒの細胞質肝細胞タンパク質抽出物が、プロテオーム分析で使用された。最初の分析的 2 次元ゲル電気泳動では、1 0 0 μ g のタンパク質を含む肝抽出物が、9 M ウレア、7 0 m M D T T、

50

2%アンフォライト、pH 2 - 4に安定化され、次いでJ. Klose等, "Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome", *Electrophoresis* 1995, 16, 1034-1059に記載されたような分析的2次元ゲル電気泳動によって分離された。2次元電気泳動ゲルにおけるタンパク質の視覚化は、銀染色によって実施された(J. Heukeshoven等, "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)。

【0049】

評価のため、非処理動物のサンプルのタンパク質スポットパターンを、処理動物の肝組織サンプルから生じたタンパク質スポットパターンと比較した。コントロールサンプルでは存在しないが、全ての処理動物で付加的に存在する物質を、更なる分析的調査のために選択した。図1は、コントロールサンプル(A)及び処理動物のサンプル(B)についての2次元電気泳動ゲルの比較を示し、(B)における付加的なタンパク質スポットが新規なタンパク質に対応し、その位置は矢印と円によって強調されている。

10

【0050】

次いで、分析的2次元ゲル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パク質を、350 µgのタンパク質を使用する調製的2次元ゲル電気泳動によって調製した(再度(10)を参照)。調製的2次元ゲル電気泳動では、染色はクマシーブリリアントブルーG250で実施した(V. Neuhoff等, "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)。

20

【0051】

更なる分析のために事前に選択されたタンパク質スポットを、A. Otto等, "Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis using an effective sample preparation for mass spectrometry", *Electrophoresis* 1996, 17, 1643-1650に記載された方法を使用してゲルから切り出し、トリプシン切断し、次いで特にG. Neubauer等, "Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex", in: *nature genetics* vol. 20, 1998, 46-50; J. Linger等, "Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase", in: *Science*, Vol. 276, 1997, 561-567; M. Mann等, "Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleotide and protein sequence databases", in: *TRENDS in Biochemical Sciences*, Vol. 26, 1, 2001, 54-61に記載されたようなマスペクトル測定調査の使用で、マスペクトル測定によって分析した。ESI(エレクトロスプレーイオン化)の後、トリプシン切断サンプルをタンデムマスペクトロメトリーにかけた。Micromass, UK社製のナノフロー-Z-スプレーイオンソースと称されるものを有するQ-TOFマスペクトロメーターを使用した。この方法は、装置の製造者の作用説明書に対応した。

30

【0052】

4. CHPの同定

40

図1(A)及び1(B)に示されているように、LPS注射を投与されているヒヒの肝細胞抽出物はとりわけ、約22,900 ± 700ドルトンの分子量が、既知の分子量のマーカー物質と比較してゲル電気泳動に基づいて見積もられ、第一次元のタンパク質の相対的位置から、6.1から6.3の等電点が測定されるタンパク質のスポットを含んだ。

【0053】

新規なタンパク質スポットのトリプシン切断のマス分析において、以下のマス(m/z)を有する断片が見出された: 1169.52; 1469.50; 1550.56; 1569.7; 1645.6; 1920.81; 2386.78。7のマス(1169.52及び1920.81)は、既知のトリプシン処理タンパク質のいずれのマスとも合致できなかった。残りの5のマスについては、分析に引き続き、CHPの既知の配列と合

50

致が生じた（配列番号 6 参照；データベース SWISS-PROT: Entry Ca22_Human: Accession number Q99653; Lin X., Barber D.L. "A calcineurin homologous protein inhibits GTPase-stimulated Na⁺-H exchange", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 12636 (1996))

【 0 0 5 4 】

マス 1 4 6 9 . 5 0 は、配列 L - Y - S - R - F - T - S - L - D - K（配列番号 1）に対応する。アミノ酸 S（セリン、二度出現する）及び T（トレオニン）では、配列は各々の場合でリン酸基によって修飾されている。この断片の理論的な分子量は 1 4 6 9 . 4 9 9 である。CHP のアミノ酸配列（前述の Lin X. によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない）では、この配列は 3 1 - 4 0 位で見出される。

10

【 0 0 5 5 】

マス 1 5 5 0 . 5 6 は、配列 K - E - T - G - F - S - H - S - Q - I - T（配列番号 2）に対応し、2 のリン酸基によって補われている。この断片の理論的な分子量は 1 5 5 0 . 5 6 4 である。CHP のアミノ酸配列（前述の Lin X. によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない）では、この配列は 1 9 - 3 0 位で見出される。

【 0 0 5 6 】

マス 1 5 6 9 . 7 は、配列 T - L - A - H - F - R - P - I - E - D - N - E - K（配列番号 3）に対応する。この断片の理論的な分子量は 1 5 6 9 . 7 である。CHP のアミノ酸配列（前述の Lin X. によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない）では、この配列は 8 6 - 9 8 位で見出される。

20

【 0 0 5 7 】

マス 1 6 4 5 . 6 は、配列 A - S - T - L - L - R - D - E - E - I - K（配列番号 4）に対応する。この断片の理論的な分子量は 1 6 4 5 . 5 9 7 である。CHP のアミノ酸配列（前述の Lin X. によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない）では、この配列は 5 - 1 8 位で見出される。

【 0 0 5 8 】

マス 2 3 8 6 . 7 8 は、配列 I - I - N - A - F - F - P - E - G - E - D - Q - V - N - F - R - G - F - M - R（配列番号 5）に対応する。この断片の理論的な分子量は 2 3 8 6 . 7 8 である。CHP のアミノ酸配列（前述の Lin X. によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない）では、この配列は 6 6 - 8 5 位で見出される。

30

【 0 0 5 9 】

解釈の認識されている原理によれば、そのような一致は、タンパク質スポットから得た産物の CHP としての信頼できる同定が考慮される。CHP（194 アミノ酸）の分子量は 22325 ドルトンである。

【 0 0 6 0 】

初めて見出された増大した CHP 濃度は、敗血症及び炎症、特に感染性の炎症のための新規なバイオマーカーとしてのその使用を可能にする。

【 0 0 6 1 】

同じ発見は、特に CHP の投与による身体の敗血症の反応に対する阻害効果を有する活性物質として、CHP の治療上の使用を初めて示唆する。従って本発明は、適切な製薬学的キャリアーと共に、実際の活性物質として CHP を含む製薬組成物、または特定の病理学的プロセスにおいて生理学的 CHP 濃度を低下する目的を有する製薬組成物、例えば CHP または CHP 断片または加工された CHP、例えば特定の形態にリン酸化された CHP に対する抗体を、実際の活性物質として含む製薬組成物に関し、そのような抗体は好ましくは、例えば患者への投与のためヒト化されて調製され、さらに適切な製薬学的キャリアーと共に存在する。

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 6 2 】

【 図 1 】 図 1 は、健康なヒヒの細胞質肝細胞タンパク質（A）と、LPS 投与によって誘導された敗血症の 5 時間後のヒヒの肝細胞タンパク質（B）の、スポットパターンの比較

50

を可能にする2次元電気泳動ゲルの写真を示す図である。矢印は、円によって図面(B)で識別される本発明にかかる敗血症特異的産物、CHPの位置を示す。

【図2】図2は、2次元ゲル電気泳動のゲルから単離されたトリプシン切断産物のマスペクトルを示す図である。

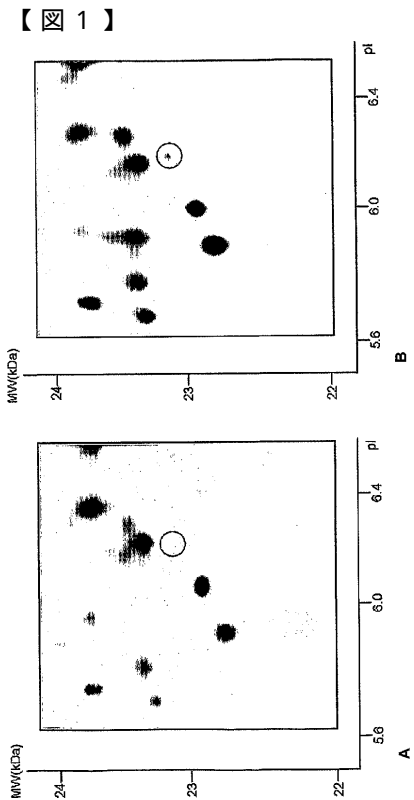


Figure 1

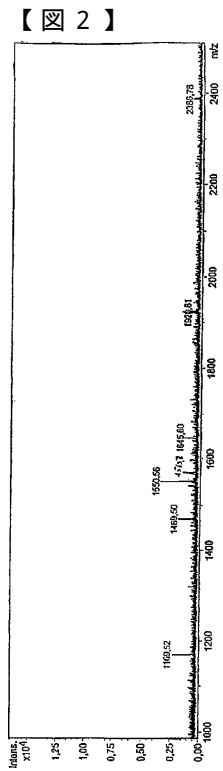


Figure 2

【配列表】

0004307250000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100107836

弁理士 西 和哉

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(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・パウムロイファーヴェーク・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

(72)発明者 モニカ・ユーライン

ドイツ・1 0 4 0 7・ベルリン・フーフェラントシュトラッセ・1 5

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 3 7 7 9 0 (WO , A 1)

国際公開第 0 0 / 0 2 2 4 3 9 (WO , A 1)

国際公開第 0 2 / 0 8 5 9 3 7 (WO , A 1)

国際公開第 0 3 / 0 0 2 6 0 0 (WO , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07K 14/47

G01N 33/68

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

专利名称(译)	使用钙调神经磷酸酶B样蛋白 (CHP) 诊断和治疗炎症性疾病和败血症		
公开(公告)号	JP4307250B2	公开(公告)日	2009-08-05
申请号	JP2003510960	申请日	2002-06-17
[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		
当前申请(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 ヨアヒムシュトルック モニカユーライン		
发明人	アンドレアス・ベルクマン ヨアヒム・シュトルック モニカ・ユーライン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68 C07K16/18 A61K38/00 A61K38/46 A61K39/395 A61P5/22 A61P29/00 A61P31/04 C12N9/16 C12Q1/42 G01N33/569		
CPC分类号	A61K38/1738 A61P29/00 G01N33/56911 G01N33/6893 G01N2800/26 Y10T436/105831 Y10T436/24		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/68 C07K16/18		
代理人(译)	渡边 隆 正和青山 村山彦		
优先权	10131922 2001-07-02 DE		
其他公开文献	JP2005500044A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

使用来自体液或身体组织的钙调神经磷酸酶B同源蛋白 (CHP) 作为标记肽用于诊断，预后和监测炎症和感染的过程和/或作为治疗影响炎症和/或感染过程的靶标。

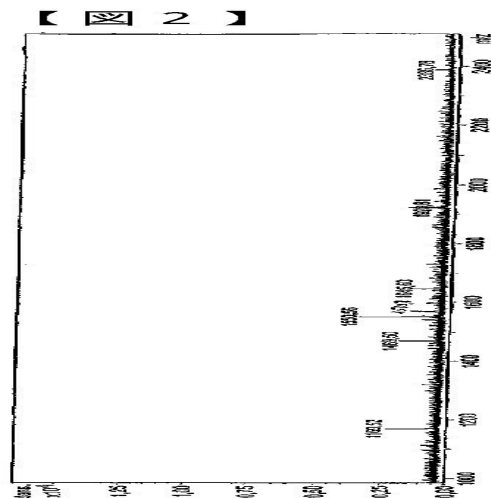


Figure 2