

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6095702号
(P6095702)

(45) 発行日 平成29年3月15日 (2017.3.15)

(24) 登録日 平成29年2月24日 (2017.2.24)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A X
CO 7 K 14/47 (2006.01)	CO 7 K 14/47
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 4 (全 95 頁)

(21) 出願番号	特願2015-10255 (P2015-10255)	(73) 特許権者	503259129
(22) 出願日	平成27年1月22日 (2015.1.22)		ノルディック・バイオサイエンス・エー／エス
(62) 分割の表示	特願2012-502618 (P2012-502618) の分割		NORDIC BIOSCIENCE A / S
原出願日	平成22年3月29日 (2010.3.29)		デンマーク国、デーカー 2730 ヘルレフ、ヘルレフ・ホーフエデガーデ 207
(65) 公開番号	特開2015-108635 (P2015-108635A)	(73) 特許権者	504389991
(43) 公開日	平成27年6月11日 (2015.6.11)		ノバルティス アーゲー
審査請求日	平成27年1月22日 (2015.1.22)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ 35
(31) 優先権主張番号	61/211,467	(74) 代理人	100099623
(32) 優先日	平成21年3月30日 (2009.3.30)		弁理士 奥山 尚一
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/289,081		
(32) 優先日	平成21年12月22日 (2009.12.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 線維症バイオマーカーアッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

線維症を有する患者の生体液試料中に天然に存在するネオエピトープ含有タンパク質断片を測定する免疫検定法を実施することを含み、前記免疫検定法が、

前記試料中に天然に存在するタンパク質断片を、プロテイナーゼによるタンパク質の切断によって切断部位において形成されるネオエピトープと反応性の免疫学的結合パートナーと接触させること、および前記ネオエピトープを含むタンパク質断片を測定するために前記免疫学的結合パートナーへのペプチド断片の結合の程度を測定することを含む方法によって実施され、前記タンパク質が、C反応性タンパク質であり、前記免疫学的結合パートナーが、未切断のC反応性タンパク質と反応性ではなく、かつ、前記切断部位を越えて伸びる配列を有するペプチド断片とも反応性ではない、ペプチド断片の定量化の方法。

【請求項 2】

前記免疫学的結合パートナーが、N末端配列 K A F V F P ... (配列番号 1167) を有する C R P の断片に特異的に結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記免疫学的結合パートナーが、C反応性タンパク質の切断によって生成されるペプチド中に存在するN末端アミノ酸配列によって構成されるネオエピトープに特異的に結合し、前記ペプチドが、

【表 1】

CRP		
AFVFPK 配列番号 1033	SFGGNF 配列番号 1305	FGQTDN 配列番号 1306
VSLKAP 配列番号 1172	KAFVFP 配列番号 1167	EVFTKP 配列番号 1201
TDMSRK 配列番号 1307	MSRKAF 配列番号 1308	SRKAFV 配列番号 1309
VFPKES 配列番号 1310	FPKESD 配列番号 1311	KESDTS 配列番号 1312
LSSTRG 配列番号 1313	SSTRGY 配列番号 1314	STRGYS 配列番号 1080
KRQDNE 配列番号 1315	WSKDIG 配列番号 1316	SKDIGY 配列番号 1317
SIILGQ 配列番号 1318	YLGGPF 配列番号 1322	ILGQEQ 配列番号 1320
IYLGGP 配列番号 1321	KYEVQG 配列番号 1294	LGGPFS 配列番号 1323
ALKYEV 配列番号 1133	YTELSS 配列番号 1325	VQGEVF 配列番号 1324
KPQLWP 配列番号 1157	QEQDSF 配列番号 1328	ILIFWS 配列番号 1326
LVGDIG 配列番号 1327	QDSFGG 配列番号 1331	RGYSIF 配列番号 1329
GAEASI 配列番号 1330	DTSYVS 配列番号 1334	TIYLG 配列番号 1332
EINTIY 配列番号 1333	SPDEIN 配列番号 1337	AEASII 配列番号 1335
TSWESA 配列番号 1336	FVLSPD 配列番号 1340	GGPFSP 配列番号 1338
YEVQGE 配列番号 1339	IVEFWV 配列番号 1343	LKKGYT 配列番号 1341
IILGQE 配列番号 1319	EVQGEV 配列番号 1346	ESDTSY 配列番号 1344
RKAFVF 配列番号 1342	SLKAPL 配列番号 1222	FVFPK 配列番号 1059
SDTSYV 配列番号 1347	SYATKR 配列番号 1349	LKAPLT 配列番号 1173
IFSYAT 配列番号 1348	WVDGKP 配列番号 1352	YATKRQ 配列番号 1350
EFWVDG 配列番号 1351	GQEQDS 配列番号 1355	VDGKPR 配列番号 1353
LGQEQD 配列番号 1354	LNWRA 配列番号 1127	QSLVGD 配列番号 1356
SPNVLN 配列番号 1357	GEVFTK 配列番号 1359	LNWRAL 配列番号 1128
QGEVFT 配列番号 1358	VRKSLK 配列番号 1205	VFTKPQ 配列番号 1153
IFWSKD 配列番号 1181	ATKRQD 配列番号 1362	KKGYTV 配列番号 1360
FSYATK 配列番号 1361	NWRAL 配列番号 1253	FWSKDI 配列番号 1363
VLNWRAL 配列番号 1249	DFVLSP 配列番号 1366	NWRALK 配列番号 1364
GSQSLV 配列番号 1365	INTIYL 配列番号 1372	VLSPDE 配列番号 1367
LKYEVQ 配列番号 1134	WRALKY 配列番号 1375	KSLKKG 配列番号 1371
GNFEFS 配列番号 1369	TKPQLW 配列番号 1345	RALKYE 配列番号 1373
FVFPKE 配列番号 1060	KGYTVG 配列番号 1296	GPFSNP 配列番号 1376
FYTELS 配列番号 1374	TKRQDN 配列番号 1368	SLKKG 配列番号 1370

10

20

30

から成る群より選択される N 末端配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記免疫学的結合パートナーが、C 反応性タンパク質の切断によって生成されるペプチド中に存在する C 末端アミノ酸配列によって構成されるネオエピトープに特異的に結合し、前記ペプチドが、

【表 2】

CRP		
AFVFPK 配列番号 1033	KPQLWP 配列番号 1157	PDEINT 配列番号 1377
KESDTS 配列番号 1312	DSFGGN 配列番号 1378	VFTKPQ 配列番号 1153
LTKPLK 配列番号 1379	SDTSYV 配列番号 1347	DTSYVS 配列番号 1334
KDIGYS 配列番号 1380	STRGYS 配列番号 1080	YATKRQ 配列番号 1350
GAEASI 配列番号 1330	DGKPRV 配列番号 1381	VDGKPR 配列番号 1353
SPNVLN 配列番号 1357	GPFSNP 配列番号 1376	NFEGSQ 配列番号 1382
ALKYEV 配列番号 1133	YEVQGE 配列番号 1339	LKYEVQ 配列番号 1134
KAFVFP 配列番号 1167	VSLKAP 配列番号 1172	LKAPLT 配列番号 1173
LKKGYT 配列番号 1341	LGQEQD 配列番号 1354	NVNMWD 配列番号 1383
PRVRKS 配列番号 1384	TVGSEI 配列番号 1385	SRKAFV 配列番号 1309
GYSFTV 配列番号 1386	IILGQE 配列番号 1319	EGSQL 配列番号 1387
INTIYL 配列番号 1372	WSKDIG 配列番号 1316	EQDSFG 配列番号 1388
NVLNWR 配列番号 1389	ASGIVE 配列番号 1390	NTIYLG 配列番号 1391
VGAEAS 配列番号 1392	TDMSRK 配列番号 1307	FVFPKE 配列番号 1060
QDMSR 配列番号 1394	TSYVSL 配列番号 1396	MSRKAF 配列番号 1308
PKESDT 配列番号 1395	QDNEIL 配列番号 1398	ESDTSY 配列番号 1344
DNEILI 配列番号 1397	TVGAEA 配列番号 1401	NEILIF 配列番号 1399
YTVGAE 配列番号 1400	GNFEGS 配列番号 1369	DIGNVN 配列番号 1404
FEGSQS 配列番号 1403	LNWRAL 配列番号 1128	NWRALK 配列番号 1364
LNWRA 配列番号 1127	EVFTKP 配列番号 1201	VFTKPQ 配列番号 1153
KYEVQG 配列番号 1294	RQDNEI 配列番号 1405	IFWSKD 配列番号 1181
KRQDNE 配列番号 1315	VRKSLK 配列番号 1205	SYVSLK 配列番号 1407
FTKPQL 配列番号 1406	TKPLKA 配列番号 1408	SIFSIA 配列番号 1409
SLKAPL 配列番号 1222	GNVNMW 配列番号 1410	SQSLVG 配列番号 1411
GSQSLV 配列番号 1365	GGNFEG 配列番号 1413	LVGDIG 配列番号 1327
FGGNFE 配列番号 1412	RALKYE 配列番号 1373	KKGYTV 配列番号 1360
VQGEVF 配列番号 1324	GKPRVR 配列番号 1414	PFSPNV 配列番号 1402
DMSRKA 配列番号 1415	EILIFW 配列番号 1416	QGEVFT 配列番号 1358
FPKESD 配列番号 1311	IGYSFT 配列番号 1417	SPDEIN 配列番号 1337
APLTKP 配列番号 1393	FWSKDI 配列番号 1363	

10

20

30

から成る群より選択される C 末端配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、慢性傷害の後に線維症を発症する危険性を示すバイオマーカを含む、線維性疾患の診断およびその発症の予測に有用なバイオマーカについてのアッセイに関する。

【0002】

特に、本発明によれば、I、III、IV、VおよびVI型コラーゲン、エラスチン、C反応性タンパク質、ならびにヒグリン、デコリン、パーシカンおよびパールカンを含むプロテオグリカンの分解断片に関するバイオマーカは有用であることが認められる。

【背景技術】

【0003】

線維性疾患（表 1 に列挙するものを含む）は病的状態および死亡の主要原因であり、例えば肝硬変による死亡は世界中で年間 800,000 例に上る¹。

【0004】

40

【表 1】

表 1. 種々の線維性疾患²

組織	原因の例
肝臓	ウイルス性肝炎 住血吸虫症 脂肪性肝炎（アルコール性または非アルコール性）
肺	特発性肺線維症 (IPF) 全身性硬化症 (強皮症)
腎臓	腎性全身性線維症 (NSF) 糖尿病 未治療高血圧症
心臓	心臓発作 高血圧症 アテローム性動脈硬化症 再狭窄
眼	黄斑変性、網膜および硝子体網膜症
皮膚	全身性硬化症および強皮症、ケロイド、過形成性癬痕、熱傷、遺伝因子、NFS
脾臓	自己免疫性/遺伝性の原因
腸	クローン病/炎症性腸疾患
脳	アルツハイマー病、AIDS
骨髄	がん、老化
多臓器線維症	手術の合併症、化学療法剤誘発性線維症、放射線誘発性線維症、機械的損傷

10

20

【 0 0 0 5 】

「線維性疾患」は、主症状としてであるか二次症状としてであるかにかかわらず、線維症を生じさせるあらゆる疾患である。

【 0 0 0 6 】

線維症は、持続性感染、自己免疫反応、アレルギー応答、化学的傷害、放射線および組織損傷を含む様々な刺激によって誘発される慢性炎症反応の最終結果である。線維症は細胞外マトリックス (ECM) の蓄積と再編成を特徴とする。明らかな病因および臨床上的の違いを有するにもかかわらず、ほとんどの慢性的な線維性障害は、共通して、増殖因子、タンパク質分解酵素、血管新生因子および線維形成性サイトカインの産生を維持する持続性刺激原を有し、前記物質は共に、正常組織の構造を漸進的に再構築し、破壊する、結合組織要素、特に、コラーゲンおよびプロテオグリカンの沈着を刺激する^{3、4}。ヒトの健康へのその多大の影響にもかかわらず、現在のところ、線維症の機序を直接標的とする承認された治療法はない⁵。

30

【 0 0 0 7 】

線維症の鍵となる細胞メディエータは筋線維芽細胞であり、筋線維芽細胞は、活性化された場合、主要なコラーゲン産生細胞として働く。

【 0 0 0 8 】

< 細胞外マトリックス (ECM) >

40

線維形成は、通常は組織損傷から生じる複雑な細胞および分子機構を含む動的過程である⁶。線維形成は、漸進的な機能障害を伴う、組織の大きさと密度の増大をもたらす巨大分子の濃度を変化させる正常な ECM 調節が不均衡である結果である。これらの巨大分子は、主として、コラーゲンおよびプロテオグリカンなどの構造および接着機能を有する線維性タンパク質である。

【 0 0 0 9 】

< コラーゲン >

コラーゲンは人体に広く分布する、すなわち人体のタンパク質質量の約 30% がコラーゲンから成る。コラーゲンは大部分の結合組織の ECM の構造的完全性に関与する。ECM 含量は、遺伝子発現とタンパク質分泌の調節を介して、同時にまた内因性プロテアーゼ

50

阻害ならびにメタロプロテイナーゼおよびシステインプロテアーゼによるタンパク質分解を介して、厳密に制御される合成と分解の微妙なバランスから生じる⁷⁻⁹。表2は、主要なコラーゲン型をそれらの主要な組織分布と共に列挙する。

【0010】

【表2】

表2. 主要なコラーゲン型とそれらの組織分布

コラーゲン型	組織分布
I 型	大部分の結合組織
II 型	軟骨、硝子体液
III 型	伸張性結合組織、例えば肝臓、皮膚、肺、脈管系
IV 型	基底膜
V 型	I 型コラーゲンを含有する組織
VI 型	大部分の結合組織
VII 型	皮膚、膀胱、口腔粘膜、臍帯、羊膜
VIII 型	多くの組織、特に内皮
XIII 型	内皮細胞、皮膚、眼、心臓、骨格筋
XIV 型	脈管、骨、皮膚、軟骨、眼、神経、腱、子宮
XXI 型	脈管、心臓、胃、腎臓、骨格筋、胎盤

10

【0011】

I 型コラーゲンは最も豊富なコラーゲンであり、大部分の結合組織で認められる。I 型コラーゲンは骨および皮膚の構造のために特に重要であり、そこでの主要なコラーゲン成分はI 型およびIII 型コラーゲンである¹⁰。

20

【0012】

I 型およびIII 型コラーゲンは、健常組織では1 : 1の割合で肝臓および肺の主要成分である。加えて、IV 型およびV 型コラーゲンは、大部分の組織の基底膜中で認められる。V 型コラーゲンの最も一般的な局在は、I 型およびIII 型コラーゲンに関連して、特徴的なコラーゲン原線維内にある¹⁰。

【0013】

一部のコラーゲンは限られた組織分布を有する：例えば、II 型は、ほとんど排他的に軟骨で認められる¹¹。

30

【0014】

線維形成の間、コラーゲンの正味量が増加する¹²⁻¹⁴。表3は、例として肝線維症におけるコラーゲン増加を示す。

【0015】

【表 3】

表 3. ヒトの正常肝臓から硬変肝臓へのコラーゲンの組成の変化¹⁵

コラーゲン型	鎖	正常肝臓 のコラー ゲン (mg/g)	硬変肝臓の コラーゲン (mg/g)	倍数増加	正常肝臓分 布(%)	硬変肝臓分 布(%)
I	α_1 (I)		16	8	37	42
	α_2 (I)	2				
III	α_1 (III)	2	8	4	37	21
IV	α_1 (IV)	0.5	7	14	9	18
	α_2 (IV)					
V	α_1 (V)	0.9	7	8	17	18
	α_2 (V)					
	α_3 (V)					
VI	α_1 (VI)	0.01	0.1	10	0.2	0.3
	α_2 (VI)					

10

【0016】

<エラスチン>

エラスチンは、多くの結合組織、主として弾性の結合組織中に存在するタンパク質である。アミノ酸のグリシン、バリン、アラニンおよびプロリンの非常に高い含量を有し、分子量は64～66kDaである。830個のアミノ酸から成る不規則なまたはランダムなコイル立体配座で構成されている。エラスチンは、リシルオキシダーゼによって触媒される反応において、多くの可溶性トロポエラスチンタンパク質分子を連結し、不溶性で耐久性のある巨大な架橋アレイを作製することによって作られる。

20

【0017】

エラスチンは、血流を助ける圧力波伝搬のための媒体として動脈において重要な機能を果たし、大動脈のような大きな弾性血管において特に豊富である。エラスチンはまた、肺、弾性靱帯および皮膚においても非常に重要である。

【0018】

エラスチンの合成および代謝回転の理解に多大の努力が費やされてきたにもかかわらず、このマトリックス分子のタンパク質分解切断から生じるネオエピトープは、現在まで線維症の疾患発症に関連付けられていなかった。

30

【0019】

<ビメンチン>

ビメンチンは、中間径フィラメントファミリーのタンパク質の成員である。中間径フィラメントは真核細胞の重要な構造特徴である。それらは、微小管およびアクチンマイクロフィラメントと共に、細胞骨格を構成する。大部分の中間径フィラメントは安定な構造であるが、線維芽細胞においては、ビメンチンは動的構造体として存在する。このフィラメントは中胚葉由来組織についてのマーカーとして使用され、それ自体、肉腫の免疫組織化学的マーカーとして使用されてきた。

40

【0020】

Hertigと共同研究者たち(Hertig et al., J Am Soc Nephrol. 2008 Aug; 19(8):1584-91)は、慢性移植腎症を有する被験者の尿管上皮細胞における上皮間葉移行が移植片における線維症の進行を予測できるかどうかを検討し、これらの被験者からの83例の生検においてビメンチン発現を測定した。Hertigらは、手術の1年後にビメンチン発現の上昇と腸線維症スコアの間に関連性を認めた。

【0021】

肝線維症の別の試験において、Meridenと共同研究者たち(Meriden e

50

t al., Clin Gastro & Hepatol 2010; 8: 289 - 296) は、ビメンチン発現 (F0期で得た生検における) と線維症の進行の間に有意の関連性を認め、高レベルのビメンチン発現は肝線維症の速やかな進行を予測した。

【0022】

従って、本発明者らは、ビメンチンの循環断片が感受性の高い特異的な線維症のバイオマーカーとして働き得るどうかを検討したいと考えた。

【0023】

<プロテオグリカン>

プロテオグリカンは、様々な数のグリコサミノグリカン (GAG) 側鎖をコアタンパク質に共有結合連結する、多様な巨大分子群である¹⁻⁶。これらのGAGは二糖の繰り返し単位 (例えばN - アセチルグルコサミンまたはN - アセチルガラクトサミン) の重合体であり、それらは二糖単位上のヒドロキシル、カルボキシルおよび硫酸側鎖のために酸性である (負に荷電している)。これによりGAGは高度に親水性であり、従って水および陽イオン (例えば細胞外液からのナトリウム) の拡散を助ける¹⁻⁷。さらに、GAGは、例えばヒアルロン酸鎖と非共有結合連結を形成して、さらに一層大きな分子複合体を形成する能力を有する¹⁻⁶。表4は、結合組織に関連する、最も広く検討されているプロテオグリカンを列挙する。

【0024】

【表4】

表4. 結合組織の細胞外マトリックスのプロテオグリカン

群	プロテオグリカン	起源	機能
大型の細胞外プロテオグリカン (集合およびヒアルロン酸結合)	アグリカン ¹⁸	関節軟骨細胞、椎間円板、鼻軟骨	細胞外マトリックスの安定性 (ヒアルロン酸結合)
	パーシカン ^{19, 20}	結合組織: 線維芽細胞、ケラチノサイト、平滑筋細胞、メサングウム細胞	細胞間相互作用および細胞マトリックス相互作用、Ca ²⁺ 依存的な糖鎖の結合
	ニューロロカン ²¹	神経組織	神経細胞接着分子に結合する
	プレビカン ²²	神経組織	細胞外マトリックスの安定性
小型のロイシンリッチプロテオグリカン (コラーゲン結合)	デコリン ²³	結合組織、軟骨、骨	コラーゲン分子に結合し、連結する (マトリックスの安定化および厚さ)、器官発生、TGFβ の結合
	ビグリカン ²⁴	毛細管内皮、皮膚 (ケラチノサイト)、腎臓の上皮	細胞分化、コラーゲン原線維に結合し、連結する
	フィブロモジュリン ¹⁷	結合組織、骨、軟骨	コラーゲン線維の方向を調節する
細胞関連プロテオグリカン	ルミカン ²³	角膜、筋、軟骨、腎臓、肺、腸	コラーゲン線維の間隔と厚さを制御する
	セルゲリン ²⁵	内皮細胞間区画に広く分布	造血細胞分化、リンパ球の接着および活性化
	シンデカン ²⁶	広く分布 - しばしば細胞膜に結合	コラーゲン、フィブロネクチン、トロンボスポンジン、テネイシンおよび bFGF に結合する
	β グリカン ²⁷	広く分布	TGFβ 受容体およびシグナル伝達、TGFβ の貯蔵所の可能性
基底膜プロテオグリカン	パールカン ²⁸	すべての基底膜	巨大分子に対する選択的障壁、細胞接着

10

20

30

40

50

【 0 0 2 5 】

< C 反応性タンパク質 >

C 反応性タンパク質 (C R P) は、炎症、感染または外傷などの種々の臨床状態に応答して肝臓によって産生される急性期血清タンパク質である^{2 9}。C R P の産生は、罹患組織または損傷組織から放出される、I L - 6 などのサイトカインによって誘導される。C R P の生理的役割はまだ不明であり、その前炎症作用または抗炎症作用に関する検討が進められている。

【 0 0 2 6 】

< プロテアーゼ >

線維形成の間の E C M の合成と分解の不均衡は、低密度の内皮下マトリックスの、間質コラーゲンに富むマトリックスへの変換から生じる。コラーゲンおよびプロテオグリカンの増加は、(1) タンパク質産生の減少および(2) タンパク質分解の低下の一方または両方によると考えられる。タンパク質分解の低下は、最近ますます関心を集めている。このプロセスの調節において、マトリックスメタロプロテイナーゼ (M M P) およびそれらの組織阻害剤 (T I M P) は、システインプロテアーゼおよびシスタチンなどの他のプロテアーゼおよびそれらの阻害剤と同様に、重要な役割を果たす。

【 0 0 2 7 】

< M M P >

M M P は、E C M の、すべてではないにせよ大部分の成分を分解することができる、エンドペプチダーゼの大きな群である。現在、2 5 を超える M M P が発見されている。M M P は、金属原子、典型的には亜鉛を含む活性部位を特徴とし、チモーゲンとして分泌される。種々の M M P が種々の組織で発現される。表 5 では、肝臓中の M M P を示す。

【 0 0 2 8 】

【表 5】

表 5. 肝臓中の M M P^{30~32}

ファミリ ー	プロテ アーゼ	供給源	基質
コラゲナ ーゼ	MMP-1	HSC	I、II、III、VII、VIII、X、ゼラチン
	MMP-8	好中球	I、II、III、V、VII、X、ゼラチン
	MMP-13	HSC、 MFB、KC	I、II、III、VII、X、ゼラチン
ストロメ ライシン	MMP-3	HSC	III、IV、V、IX、X、XI、ゼラチン、ラミニン、フィブロネクチン、 プロテオグリカン、糖タンパク質、エラスチン、プロ MMP- 1/13
	MMP-10	HSC	III、IV、V、ゼラチン、エラスチン、アグリカン
	MMP-11	HC	PAI-1、マトリックスタンパク質に対する弱い活性
ゼラチナ ーゼ	MMP-2	HSC、MBF	I、II、III、IV、V、VII、X、XI、ゼラチン、エラスチン、ラミニン
	MMP-9	KC、 HSC、HC	I、II、III、IV、V、VII、X、XI、ゼラチン、エラスチン、ラミニン
	MMP-7	HSC	エンタクチン、ゼラチン、エラスチン、フィブロネクチン、 ビトロネクチン、ラミニン、フィブリノーゲン
メタロエ ラスター ーゼ	MMP-12	マクロフ ージ	エラスチン、ゼラチン、IV、ラミニン、フィブロネクチン、 エンタクチン、ビトロネクチン、プロテオグリカン、ミエリン 塩基性タンパク質、αI アンチトリプシン
MT-MMP	MMP-14	HSC、 MFB、KC	I、II、III、ゼラチン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、 ラミニン、フィブリノーゲン、プロ MMP-2、プロ MMP-13
	MMP-15	HC、BDEC	プロ MMP-2、フィブロネクチン、テネイシン、ラミニン、ア グリカン、パールカン

【 0 0 2 9 】

T I M P は、3 分子複合体中の M M P および膜 1 型メタロプロテイナーゼに対して基質特異的および組織特異的に結合することによって、M M P のタンパク質分解活性をプロッ

クする（表6）。線維症においてTIMPレベルは劇的に上昇し、MMPレベルはやや上昇するかまたは比較的不変のままであり（MMP-2を除く）、全体としてコラーゲンの分解の低下を生じさせる。

【0030】

【表6】

表6. 肝臓中のTIMP³¹

名称	供給源	阻害されるメタロプロテイナーゼ
TIMP-1	HSC、MFB、KC、HC	7° $\square$ MMP-9、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-13
TIMP-2	KC、HSC	MT-MMP-1、MT-MMP-2、7° $\square$ MMP-2、MMP-3、MMP-13、MMP-7
TIMP-3	HC	MT-MMP-1、MT-MMP-2、TACE、MMP-13

10

【0031】

<線維芽細胞活性化タンパク質>

線維芽細胞活性化タンパク質 α サブユニット（FAP α またはFAP、 α ）は、セリンプロテアーゼファミリーに属する内在性膜ゼラチナーゼである。FAP α は、170kDaメラノーマ膜結合ゼラチナーゼ、内在性膜セリンプロテイナーゼ、およびセプラーゼとしても知られるヘテロ二量体膜結合プロテイナーゼ複合体の α サブユニットであり、DPP4（CD26）は β サブユニットである。一部の細胞はFAP α ホモ二量体だけを作製し、また別の細胞はDPP4ホモ二量体だけを作製する。単量体は不活性である。FAP α は、上皮癌の反応性間質線維芽細胞、治癒創傷の顆粒組織、ならびに骨および軟組織肉腫の悪性細胞において選択的に発現される³³。このタンパク質は、発生、組織修復および上皮癌発生の過程で線維芽細胞増殖の制御または上皮間葉相互作用に関与すると考えられる。FAPの発現は線維症の病期と共に上昇することが示されている^{34、35}。

20

【0032】

<線維症バイオマーカー>

多くの生化学的マーカーが、疾患の特異的な生成物ではないが、線維性疾患に関して示唆されてきた。表7は、臨床試験で使用される肝線維症の生化学的マーカーの例である。加えて、他の線維性疾患のバイオマーカーの数多くの例が存在する^{12、36-42}。

【0033】

30

【表 7 A】

表 7. 肝線維症の公知のマーカの一部の要約

バイオマーカ	パラメータ	慢性肝疾患	参考文献
1 パラメータ			
CRP		NASH	43
ヒアルロナン		HCV	44-47
IGF-I		HCV	48
レプチン		HCV	49
PIIIP		HCV	50
複数のパラメータ	パラメータ	慢性肝疾患	参考文献
MP3	PIIINP, MMP1	HCV	51, 52
Zheng et al の指数	HA, PIIICP, PIIINP, ラミニン, C-IV	慢性肝炎	53
Lebensztjen et al の指数	ラミニン-2, C-IV, MMP2, MMP9-TIMP1 指数	HBV	54
	テネイシン、ヒアルロナン、VI 型コラーゲン、TIMP-1	HBV	55
Tsochatzis et al の指数	レプチン、アディポネクチン、レジスチン	HCV、HBC、NASH	56
Patel et al の指数	ヒアルロナン、TIMP-1、 α_2 -マクログロブリン	HCV	57
	TIMP-1、テネイシン、IV 型コラーゲン、PIIINP, MMP2, ラミニン、ヒアルロナン	NASH	58
Forns 指数 (76, 77)	年齢、血小板数、 γ GT、コレステロール	HCV HIV/HCV	51, 59~62
Fibrotest (76, 78)	ハプトグロビン、 α_2 -マクログロブリン、アポリポタンパク質 A1、 γ GT、ビリルビン	HCV HIV/HCV NAFLD 糖尿病患者における NAFLD	45, 51, 60, 61, 63~75
Actitest	フィブロテスト+ALT	HCV	65, 76-78
APRI (Wai 指数)	AST、血小板数	HIV/HCV HCV NAFLD	45, 51, 60, 61, 64, 66, 79~87
Hepascore	ビリルビン、 γ GT、ヒアルロナン、 α_2 -マクログロブリン、年齢、性別	HCV HIV/HCV	51, 61, 64, 66, 68
FIB-4	血小板数、AST、ALT、年齢	HIV/HCV	61, 83
SHASTA	ヒアルロナン、アルブミン、AST	HIV/HCV	61
Fibroindex	FORN+APRI	HCV	89
Fibrometer test	血小板数、プロトロンビン指数、AST、 α_2 -マクログロブリン、ヒアルロナン、尿素、年齢	HIV/HCV HCV NAFLD	51, 61, 64, 66, 81
NFSA	年齢、高血糖症、ボディマス指数、血小板数、アルブミン、AST/ALT	NAFLD	81
超音波+APRI		HCV	82
Metwally et al の指数	血小板数、アルブミン、AST、輸血歴、HBV コア抗体	HCV	90

10

20

30

40

【表 7 B】

Mohamadnejad et al の指数	年齢、HBV DNA レベル、アルカリホスファターゼ、アルブミン、血小板数、AST	HCV	91
FibroSpect II	ヒアルロナン、TIMP-1、 α_2 -マクログロブリン	HCV	85, 92, 93
段階的組合せアルゴリズム	APRI と Fibrotest の組合せ	HCV	94
Imbert-Bismut 指数	α_2 マクログロブリン、AST、ALT、 γ GT、総ビリルビン、アルブミン、 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、アポリポタンパク質 A ₁	HCV	95
Nunes et al	年齢、血小板、INR、CD4、AST/ALT、ヒアルロナン、YKL-40、PIIINP	HCV/HIV HCV	96
Fibroscan+++	Fibroscan、Fibrotest、APRI	HCV	97

10

【 0 0 3 4 】

米国特許第 5 3 8 7 5 0 4 号は、アグリカン部位 N_{3 4 1} ~ F_{3 4 2} においてストロメライシンの作用によって放出されるネオエピトープ、V D I P E N およびこのネオエピトープに特異的なモノクローナル抗体を使用する R I A アッセイを述べる。より一般的には、特異的なストロメライシン切断によって生成されるアグリカンの断片に特異的な単一特異性抗体の使用が記述されている。ストロメライシンの上昇は、変形性関節症、関節リウマチ、アテローム性動脈硬化病変、痛風、炎症性腸疾患（I B D）、特発性肺線維症（I P F）、特定のがん、関節損傷および数多くの炎症性疾患で起こる。ストロメライシンは特発性肺線維症において上昇することが報告され、アグリカンのストロメライシン切断産物を検出するためのアッセイが血液または他の生体液に関して実施できること、およびそのような断片の定量は I P F や他の状態に関して診断的に使用できることが主張されている。しかし、これについての証拠は提供されておらず、本発明者らの知る限り、この予測を実証するその後の公表文献はない。そのような R I A アッセイは長年市販されているが、線維性疾患を診断するまたは観測する際にそれらが成功裏に使用されたという報告は現れていない。

20

【 0 0 3 5 】

米国特許第 7 , 2 2 5 , 0 8 0 号は、患者における炎症性、線維性または癌疾患の診断のための方法であって、前記患者における肝線維症および/または肝の壊死性炎症性病変の存在を調べるために、 α_2 -マクログロブリン、A S T（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ）、A L T（アラニンアミノトランスフェラーゼ）、G G T（ γ グルタミルトランスぺプチダーゼ）、 γ -グロブリン、総ビリルビン、アルブミン、 α_1 -グロブリン、 α_2 -グロブリン、ハプトグロビン、 β -グロブリン、アポ A 1、I L - 1 0、T G F - β 1、アポ A 2 およびアポ B から成る群より選択される少なくとも 4 つの生化学的マーカーの値を前記患者の血清または血漿中で測定し、その後前記の値を組み合わせることによる方法を開示する。この特許は、線維性疾患の間に生成されるネオエピトープを担持するペプチド断片の定量的測定を教示していない。

30

【 0 0 3 6 】

米国特許第 6 , 0 6 0 , 2 5 5 号は、肝線維症の程度を診断するための方法であって、I V 型コラーゲンに特異的に結合する抗体を使用して試料中の I V 型コラーゲンの高分子形態の濃度を測定する段階、および該測定を肝線維症の程度に関連付ける段階を含む方法を述べる。やはり、体内で作用するタンパク質分解酵素によって生成されるネオエピトープは使用されていない。試料は、実際にはペプシンで消化され、このことは試料中のコラーゲン切断の天然パターンをあいまいにし得る。

40

【 0 0 3 7 】

米国特許第 4 , 6 2 8 , 0 2 7 号（G a y）は、結合組織タンパク質に特異的な抗体の作製、より詳細には、ヒトコラーゲンおよびコラーゲン分解に関与する酵素に対する融合細胞ハイブリッドによるモノクローナル抗体の作製を開示する。組織学的、細胞学的およ

50

び生物学的液体試料のコラーゲンプロファイルを確立するための、結合組織タンパク質に対するモノクローナル抗体の使用が述べられている。しかし、この特許は、結合組織タンパク質上のネオエピトープへの抗体の結合に基づく前記結合組織タンパク質の測定を記述していない。

【0038】

Guaneabens N et al, J Bone Miner Res, 1998⁹⁸は、悪化した肝線維症を伴う疾患である原発性胆汁性肝硬変を有する患者において、骨代謝回転マーカであるI型コラーゲンのN-テロペプチド(NTX)、I型コラーゲンのC-テロペプチド(CTX)およびI型コラーゲンのN末端プロペプチド(PINP)を評価した。NTX、CTXおよびPINPのレベルは対照と比較して患者において高く、疾患の組織学的病期と相関した。NTXで使用された抗体は、I型コラーゲンのN末端のカテプシンK切断部位に対して惹起されたものであり、ネオエピトープJYDGKGVG↓に依存する。CTXにおいて使用された抗体は、I型コラーゲンのC末端のカテプシンK切断部位に対して惹起され、ネオエピトープEKAHDDGGR↓に依存する。これらのマーカは、I型コラーゲンのテロペプチド内に位置し、I型コラーゲンの内部(三重らせん部分)には位置しない。PINPアッセイのために使用されたモノクローナル抗体は、ネオエピトープではないPINP配列中の内部エピトープに対して惹起された。

10

【0039】

Moeller S et al, Gut, 1999⁹⁹は、I型コラーゲンのC末端架橋テロペプチド(ICTP)が、アルコール性肝硬変患者では対照と比較して上昇していることを明らかにした。記述されている試験は、生化学的マーカが肝線維症を反映し得ることを示した。ICTPポリクローナル抗体は、トリプシンおよびコラゲナーゼ切断I型コラーゲンに対して惹起された。しかし、抗体はネオエピトープに結合していない。

20

【0040】

Rosen HN et al, Calcif Tissue Int, 2004¹⁰⁰は、ホルモン補充治療(HRT)を受けている女性において骨代謝回転マーカであるI型コラーゲンのN-テロペプチド(NTX)およびI型コラーゲンのC-テロペプチド(CTX)を評価した。試験では、骨代謝回転マーカが治療と共に低下することが認められた。NTXで使用された抗体は、I型コラーゲンのN末端のカテプシンK切断部位に対して惹起されたものであり、ネオエピトープJYDGKGVG↓に依存する。CTXにおいて使用された抗体は、I型コラーゲンのC末端のカテプシンK切断部位に対して惹起され、ネオエピトープEKAHDDGGR↓に依存する。本発明と異なり、これらの抗体は骨代謝の評価のために使用され、線維症の評価のためではなかった。

30

【0041】

Lein M et al, Eur Urol, 2007¹⁰¹は、ゾレドロン酸を摂取している前立腺癌患者においてネオエピトープ特異的な骨代謝回転マーカであるI型コラーゲンのN-テロペプチド(NTX)およびI型コラーゲンのC-テロペプチド(CTX)の使用を評価した。試験では、骨代謝回転マーカが治療と共に低下することが認められた。NTXで使用された抗体は、I型コラーゲンのN末端のカテプシンK切断部位に対して惹起され、ネオエピトープJYDGKGVG↓に依存する。CTXにおいて使用された抗体は、I型コラーゲンのC末端のカテプシンK切断部位に対して惹起され、ネオエピトープEKAHDDGGR↓に依存する。本発明と異なり、これらの抗体は骨転移の浸潤における骨代謝の評価のために使用され、線維症の評価のためではなかった。

40

【0042】

PIIINPは、線維性疾患の重症度を評価する多くの試験において¹⁰²、重度の熱傷外傷後の皮膚線維症を有する患者において¹⁰³、非硬変性原発性胆汁性肝硬変における疾患の進行に関して¹⁰⁴、原発性胆汁性肝硬変および慢性ウイルス性C型肝炎において¹⁰⁵使用されてきた。

【0043】

PIIINPおよびICTPは、心筋の線維症を有する患者において測定された¹⁰⁶

50

。

【 0 0 4 4 】

多くの報告は、生化学的指標の予測値を改善するために生化学的マーカーのセットを組み合わせている。11の異なる血清マーカーがF0～F4の線維症病期を有する205名の患者において測定され、最も有用なマーカーは、 α_2 -マクログロブリン、 α_2 -グロブリン（またはハプトグロビン）、 γ -グロブリン、アポリポタンパク質A1、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ、および総ビリルビンであった¹⁰⁷。これらのマーカーの指数は、0～0.10の範囲のスコア（全患者の12% [41名]）に関しては負の予測値（F2、F3またはF4の不在について100%の確実性）、および0.60～1.00の範囲のスコア（全患者の34% [115名]）に関しては高い正の予測値（F2、F3またはF4の存在について>90%の確実性）を有していた。

10

【発明の概要】

【 0 0 4 5 】

しかし、上記の報告のいずれにおいても、本明細書で特許請求するようなネオエピトープに結合する抗体に基づくペプチド断片の測定が線維性疾患を有する患者の評価のために有用であり得ることは示唆されていない。

【 0 0 4 6 】

本発明は、ここに、線維症の診断の方法であって、患者の生体液試料中に天然に存在するネオエピトープ含有タンパク質断片を測定する免疫検定法を実施するステップと、正常レベルを上回る、前記患者における前記測定の上昇を線維症の存在と関連付けるステップとを含み、ここで、前記免疫検定法は、前記試料中に天然に存在するタンパク質断片を、プロテイナーゼによるタンパク質の切断によって形成されるネオエピトープに対して反応性である免疫学的結合パートナーと接触させるステップと、前記ネオエピトープを含むタンパク質断片を測定するために、前記免疫学的結合パートナーへのペプチド断片の結合の程度を測定するステップとを含む方法によって実施し、かつ、ここで、前記タンパク質が、I型コラーゲン、III型コラーゲン、IV型コラーゲン、V型コラーゲンもしくはVI型コラーゲン、ビグリカン、デコリン、ルミカン、パーシカン、パールカン、ニューロカン、プレビカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、 β グリカン、CRPまたはビメンチンであり、但し、ネオエピトープがI型コラーゲンの切断によって形成される場合、切断は、I型コラーゲンがカテプシンKによって切断される部位ではないことを条件とする方法を提供する。2009年5月14日（その優先日後）に公開された国際公開第WO2009/059972号パンフレットは、III型コラーゲンのネオエピトープについてのアッセイを開示するが、そのような測定の高いレベルが線維症の存在または程度に関連することは開示していない。場合により、本発明によるアッセイは、III型コラーゲン以外の上記に挙げたタンパク質の1つに基づくか、またはIII型コラーゲンに基づく場合、切断部位で形成されるネオエピトープ、PGIPGRNGDP* 配列番号1、*ESCP TGPQNY 配列番号2、またはPKGDTGPRGP* 配列番号3（*は切断部位を示す）の1つに対する免疫学的結合パートナーを利用する。

20

30

【 0 0 4 7 】

これらの目的に関して、心臓血管疾患は線維症とみなされなくてもよいし、本発明によって検出される線維症は、心臓血管疾患に付随する線維症以外であってもよい。場合により、本発明による免疫検定法における高レベル結果は、皮膚線維症、肺線維症または肝線維症に関連する。

40

【 0 0 4 8 】

本発明の方法は、患者の生体液試料を得る予備段階を含み得る。

【 0 0 4 9 】

本発明は、体液試料中に天然に存在するネオエピトープ含有タンパク質断片を測定する免疫検定の方法を含み、前記免疫検定法は、

前記試料中に天然に存在するタンパク質断片を、プロテイナーゼによるタンパク質の切断によって形成されるネオエピトープと反応性の免疫学的結合パートナーと接触させるステ

50

ップと、前記ネオエピトープを含むタンパク質断片を測定するために、ここで、前記免疫学的結合パートナーへのペプチド断片の結合の程度を測定するステップとを含む方法によって実施され、前記タンパク質は、ニューロカン、プレビカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、βグリカン、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、V型コラーゲン、VI型コラーゲン、CRPまたはビメンチンであり、但し、ネオエピトープがI型コラーゲンの切断によって形成される場合、切断は、I型コラーゲンがカテプシンKによって切断される部位ではないことを条件とする。場合により、本発明によるアッセイは、III型コラーゲン以外の上記に挙げたタンパク質の1つに基づくか、またはIII型コラーゲンに基づく場合、切断部位で形成されるネオエピトープ、PGIPGRNGDP* 配列番号1、*ESCPTGPQNY 配列番号2、またはPKGDTGPRGP* 配列番号3(*は切断部位を示す)の1つに対する免疫学的結合パートナーを利用する。

10

【0050】

前記免疫学的結合パートナーは、C末端ネオエピトープまたはN末端ネオエピトープを含むペプチド断片に対して特異的結合親和性を有し得る。

【0051】

ネオエピトープとの特異的反応性またはネオエピトープに対する免疫学的親和性は、関連する免疫学的結合パートナーが、該ネオエピトープが由来する未切断タンパク質と反応性ではないことを意味する。好ましくは、前記免疫学的結合パートナーは、配列がそれぞれの切断部位を越えて伸びる場合は、以下に列挙する配列のようなネオエピトープ配列と反応性ではない。

20

【0052】

本明細書で使用される「免疫学的結合パートナー」という用語は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体ならびにFabまたはF(ab')₂のような抗体の特異的結合断片も包含する。従って、前記免疫学的結合パートナーは、モノクローナル抗体または特異的結合親和性を有するモノクローナル抗体の断片であり得る。

【0053】

好ましくは、前記ペプチド断片は、I型、III型、IV型、V型もしくはVI型コラーゲン、エラスチン、C反応性タンパク質、またはプロテオグリカンであるピグリカン、デコリン、パーシカンおよびパールカンのうちの1つの断片である。結合組織タンパク質が好ましい。好ましくは、免疫学的結合パートナーが結合するネオエピトープ配列は、いかなる他のタンパク質においても認められないか、または本発明の方法が関連する他のタンパク質のいずれにおいても認められない。

30

【0054】

いくつかの候補プロテアーゼは、線維組織中のタンパク質の消化に関与し得る。おそらく、これは、疾患のレベルに依存して異なるネオエピトーププロファイルを生じさせる広範囲の複雑なプロセスの結果である。

【0055】

<コラーゲンアッセイ>

I型コラーゲン

本発明者らは、以下の表に列挙する酵素が少なくとも以下の切断部位(「.」で示す)でI型コラーゲンを切断すると判定した。

40

【0056】

【表 8】

表 8. I 型コラーゲン切断部位

プロテアーゼ	I 型コラーゲン
MMP-2	V. PGPMPGSGPRGLPGPPGAPGPQG. F 配列番号 4
MMP-2	S. VPGPMGSGPRGLPGPPGAPGPQG. F 配列番号 5
MMP-2	G. ISVPGMPGSGPRGLPGPPGAPGPQG. F 配列番号 6
MMP-9	G. ISVPGMPGSGPRGLPGPPGAPGPQG. F 配列番号 6
MMP-13	G. FQGPPGEPGEPGASGPMGRPGPPPG. K 配列番号 7
MMP-13	V. PGPMPGSGPRGLPGPPGAPGPQG. F 配列番号 8
MMP-2	F. SGLDGAAGDAGAPGPKGEPGSPGENGAPGQMGPRG. L 配列番号 9
MMP-9	F. SGLDGAAGDAGAPGPKGEPGSPGENGAPGQMGPRG. L 配列番号 9
MMP-13	F. SGLDGAAGDAGAPGPKGEPGSPGENGAPGQMGPRG. L 配列番号 9
MMP-9	G. LPGAERGRGAPGPAG. A 配列番号 10
MMP-13	G. LPGAERGRGAPGPAG. A 配列番号 10
MMP-2	G. LTGSPGSPGPDGKTGPPGPAG. Q 配列番号 11
MMP-2	E. RGSPGPAGPKGSPGEAGRPGEAGLPAGAG. L 配列番号 12
MMP-2	G. ERGSPGPAGPKGSPGEAGRPGEAGLPAGAG. L 配列番号 13
MMP-9	G. LTGSPGSPGPDGKTGPPGPAG. Q 配列番号 14
MMP-9	G. LTGSPGSPGPDGKTGPPGPAGQDGRPGPPGPPG. A 配列番号 15
MMP-9	G. LTGSPGSPGPDGKTGPPGPAGQDGRPGPPGPPGARG. Q 配列番号 16
MMP-13	G. LTGSPGSPGPDGKTGPPGPAG. Q 配列番号 14
MMP-13	G. ERGSPGPAGPKGSPGEAGRPGEAGLPAGAG. L 配列番号 13
MMP-9	G. QDGRPGPPGPPGARG. Q 配列番号 17
MMP-9	G. LTGSPGSPGPDGKTGPPGPAGQDGRPGPPGPPGARG. Q 配列番号 18
MMP-2	G. KDGEAGAQGPPGPAGPAGERGEQGPAGSPGF. Q 配列番号 19
MMP-2	G. ERGEQGPAGSPGF. Q 配列番号 20
MMP-3	E. RGVPGPAGVGPAGKDGEAGAQGPPGPAGPAGERGEQGPAGSPGF. Q 配列番号 21
MMP-8	E. RGVPGPAGVGPAGKDGEAGAQGPPGPAGPAGERGEQGPAGSPGF. Q 配列番号 21
-	113 PKGDTGPRGP. 122 配列番号 22

10

20

【0057】

P はヒドロキシプロリンを示し、M は酸化メチオニンを示し、K はヒドロキシリシンを示す。

30

【0058】

免疫学的結合パートナーは、カテプシン K の I 型コラーゲン部位における切断を除き、I 型コラーゲンの切断によって形成される C 末端または N 末端ネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【0059】

適切な免疫学的結合パートナーは、従って、ペプチドの N 末端の以下の配列のいずれかと特異的に反応性であり得る。

【0060】

【表 9】

表 9. プロテアーゼによって生成される I 型コラーゲンのペプチド断片の N 末端配列 (「.」の記号は切断部位を示す)

I 型コラーゲン、 $\alpha 1$		
. ISVPGP 配列番号 23	. VPGPMG 配列番号 24	. PGPMGP 配列番号 25
. LPGPGG 配列番号 26	. FQGPPG 配列番号 27	. KNGDDG 配列番号 28
. ARGLPG 配列番号 29	. SGLDGA 配列番号 30	. LDGAKG 配列番号 31
. LPERG 配列番号 32	. VRGEPG 配列番号 33	. PGAKGA 配列番号 34
. GGPPGP 配列番号 35	. NSGEPG 配列番号 36	. DGVAGP 配列番号 37
. ERGSPG 配列番号 38	. LTGSPG 配列番号 39	. QDGRPG 配列番号 40
. RGVPGP 配列番号 41	. VGPAGK 配列番号 42	. ERGEQG 配列番号 43
. RGEQGP 配列番号 44	. PGERGV 配列番号 45	. ANGAPG 配列番号 46
. ARGAPG 配列番号 47	. PGDRGE 配列番号 48	. AKGDAG 配列番号 49
. PIGNVG 配列番号 50	. AAGRVG 配列番号 51	. PPGPAG 配列番号 52
. GADGPA 配列番号 53	. GPQGIA 配列番号 54	. GQRGVV 配列番号 55
. QRGVVG 配列番号 56	. GLPGQR 配列番号 57	. PGLPGP 配列番号 58
. PMGPPG 配列番号 59	. MGPPGL 配列番号 60	. DKGETG 配列番号 61
. LQGPPG 配列番号 62	. SAGAPG 配列番号 63	. RTGDAG 配列番号 64
. FDFS 配列番号 65	. DFSF 配列番号 66	. ATGAAG 配列番号 67
. AKGEAG 配列番号 68	. GIAGAP 配列番号 69	. IAGAPG 配列番号 70
. VQGPPG 配列番号 71	. LPGPPG 配列番号 72	. AGPKGS 配列番号 73
. RGSPGP 配列番号 74	. FAGPPG 配列番号 75	. QAGVMG 配列番号 76
. ARGQAG 配列番号 77	. NVGAPG 配列番号 78	. PAGERG 配列番号 79
. KDGEAG 配列番号 80	. GEVGPP 配列番号 81	. ARGERG 配列番号 82
. QGLPGP 配列番号 83	. IAGQRG 配列番号 84	. LTGPIG 配列番号 85
. AGLPGP 配列番号 86	. RGVVGL 配列番号 87	. AGPPGA 配列番号 88
. LAGPPG 配列番号 89	. EPGKQG 配列番号 90	. ATGFPG 配列番号 91
. PSGASG 配列番号 92	. GKQGGS 配列番号 93	. GPPGPA 配列番号 94
. AGQRGV 配列番号 95	. ARGPAG 配列番号 96	. ASGPAG 配列番号 97
. VVGLPG 配列番号 98	. VGPPGP 配列番号 99	. GPPGPP 配列番号 100
. TGDAGP 配列番号 175		

10

20

30

【 0 0 6 1 】

あるいは、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドの C 末端の以下の配列のいずれかと特異的に反応性であり得る。

【 0 0 6 2 】

【表 10】

表 10. プロテアーゼによって生成される I 型コラーゲンのペプチド断片の C 末端配列 (「.」の記号は切断部位を示す)

I 型コラーゲン、 $\alpha 1$		
QLSYGY. 配列番号 101	EKSTGG. 配列番号 102	PPGPQG. 配列番号 103
KGHRGF. 配列番号 104	PSGPRG. 配列番号 105	APGPQG. 配列番号 106
APGPAG. 配列番号 107	FPGAVG. 配列番号 108	SEGPQG. 配列番号 109
GANGAP. 配列番号 110	ANGAPG. 配列番号 46	SGPQGP. 配列番号 112
EPGPVG. 配列番号 113	EPGPTG. 配列番号 114	RGFPGA. 配列番号 115
KGPAGE. 配列番号 116	RGSPGP. 配列番号 74	LPGAKG. 配列番号 118
PPGPPG. 配列番号 119	PPGARG. 配列番号 120	PGKAGE. 配列番号 121
AVGPAG. 配列番号 122	PAGPAG. 配列番号 123	AGPAGE. 配列番号 124
APGPDG. 配列番号 125	RGERGF. 配列番号 126	PAGPRG. 配列番号 127
KDGVRG. 配列番号 128	PAGPTG. 配列番号 129	TGARGA. 配列番号 130
PGPAGF. 配列番号 131	EPGDAG. 配列番号 132	PAGPPG. 配列番号 133
SAGPPG. 配列番号 134	ATGFPG. 配列番号 91	NAGPPG. 配列番号 136
GEVGPP. 配列番号 81	GEKGSP. 配列番号 138	GAPGTP. 配列番号 139
PGPQGI. 配列番号 140	GPQGIA. 配列番号 54	PQGIAQ. 配列番号 142
IAGQRG. 配列番号 84	GQRGVV. 配列番号 55	
GPSGEP. 配列番号 146	ERGPPG. 配列番号 147	RGPPGP. 配列番号 148
PVGPVG. 配列番号 149	PQGPRG. 配列番号 150	HRGFSG. 配列番号 151
EQGPSG. 配列番号 152	PRGPPG. 配列番号 153	PPGPRG. 配列番号 154
GPPGPP. 配列番号 100	GPPSAG. 配列番号 156	PPSAGF. 配列番号 157
	PPGPAG. 配列番号 52	TPGPQG. 配列番号 160
QMGPARG. 配列番号 161	PGPPGA. 配列番号 162	QGIAGQ. 配列番号 163
PGADGQ. 配列番号 164	AGSPGF. 配列番号 165	LPGPSG. 配列番号 166
PPGPKG. 配列番号 167	PGERGA. 配列番号 168	PMGPPG. 配列番号 59
PKGPAQ. 配列番号 170	GRNGDP. 配列番号 171	SPGEGG. 配列番号 172
GPAGRP. 配列番号 173	PPGPIG. 配列番号 174	TGDAGP. 配列番号 175
TGPRGP. 配列番号 177		

10

20

【0063】

30

I I I 型コラーゲン

本発明者らは、以下の表に列挙する酵素が少なくとも以下の切断部位 (* で示す) で I I I 型コラーゲンを切断すると判定した。

【0064】

【表 1 1 A】

表 1 1. I I I 型コラーゲンにおける切断部位

プロテアーゼ	ネオエピトープ
MMP-1	A*GIPGAPGLMGARGPPGPA*G 配列番号 178
MMP-1	K*GDPGPPGIPGRNGDPGI*P 配列番号 179
MMP-1	G*LAGPPGMPGPRGSPGPQG*V 配列番号 180
MMP-1	G*ERGLPGPPGIKGPAGIPGF*P 配列番号 181
MMP-1	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPR*G 配列番号 182
MMP-1	G*IKGHRGFPGNPGAPGSPGPAG*Q 配列番号 183
MMP-1	A*RGLAGPPGMPGPRGSPGPQGV*K 配列番号 184
MMP-1	I*TGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQG*V 配列番号 185
MMP-1	I*TGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQGV*K 配列番号 186
MMP-1	G*ITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQG*V 配列番号 187
MMP-1	G*VKGESGKPGANGLSGERGPPGPQG*L 配列番号 188
MMP-1	G*SRGAPGPQGPGRDKGETGERGAAG*I 配列番号 189
MMP-1	P*KGDAGQPGEGKSPGAQPPGAPPLG*I 配列番号 190
MMP-1	G*ITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQGV*K 配列番号 191
MMP-1	G*LRGGAGPPGEGGKGAAGPPGPPGAAGTPG*L 配列番号 192
MMP-1	G*HAGAQQPPGPPGINGSPPGKGEMGPAGIPGAPG*L 配列番号 193
MMP-1	A*GKSGDRGESGPAGPAGAPGAPGPRGDKGETGERGAAG*I 配列番号 194
MMP-1	G*LQGLPGTGGPPGENGKPGEPGPKGDAGAPAGGKGDAGAPGERGPPG*L 配列番号 195
MMP-3	G*ERGLPGPPGIKGPAGIPGF*P 配列番号 196
MMP-3	A*VGGLAGYPGAPGPPGPPGPGT*S 配列番号 197
MMP-3	K*DGTSGHGPIGPPGPRGNRGER*G 配列番号 198
MMP-3	A*VGGLAGYPGAPGPPGPPGPGTSGHPG*S 配列番号 199
MMP-3	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQG*V 配列番号 200
MMP-3	A*PGAPGGKGDAGAPGERGPPGLAGAPGLRG*G 配列番号 201
MMP-3	A*VGGLAGYPGAPGPPGPPGPGTSGHPGSPG*S 配列番号 202
MMP-2	A*IGSPGAPGPRGPVGPSPGPG*K 配列番号 203
MMP-3 + -8	G*AIGSPGAPGPRGPVGPSPGPG*K 配列番号 204
MMP-8	P*AGQQGAIGSPGPA*G 配列番号 205
MMP-8	G*GPPGVAGPPGGSGPAGPP*G 配列番号 206
MMP-8	L*AGPPGMPGPRGSPGPQG*V 配列番号 207
MMP-8	G*LSGERGPPGPQGLPGLA*G 配列番号 208
MMP-8	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQG*V 配列番号 209
MMP-8	G*LAGPPGMPGPRGSPGPQGV*K 配列番号 210
MMP-8	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGV*K 配列番号 211
MMP-8	G*PQGGPGKNGETGPQGGPG*T 配列番号 212
MMP-8	G*VKGERGSPGGGAAGFPGAR*G 配列番号 213
MMP-8	A*RGLAGPPGMPGPRGSPGPQG*V 配列番号 214
MMP-8	N*GLSGERGPPGPQGLPGLAGTA*G 配列番号 215
MMP-8	A*VGGLAGYPGAPGPPGPPGPGT*S 配列番号 216
MMP-8	G*SPGKGEMGPAGIPGAPGLMGA*R 配列番号 217
MMP-8	T*GARGLAGPPGMPGPRGSPGPQG*V 配列番号 218
MMP-8	V*KGESGKPGANGLSGERGPPGPQG*L 配列番号 219
MMP-8	G*VKGERGSPGGGAAGFPGARGLGPPGSNGNPPGSPGKDGPPGPAG*N 配列番号 220
MMP-8	G*SPGAQGGPPGAPPLGIAGITGARGLAGPPG*M 配列番号 221
MMP-8	R*GAPGEKGEPPGVAGPPGGSGPAGPPGPQ*G 配列番号 222
MMP-8	R*GAPGEKGEPPGVAGPPGGSGPAGPPGPQ*G 配列番号 223
MMP-8	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQG*V 配列番号 224

10

20

30

40

【表 1 1 B】

MMP-9	G*IKGPAGIPGFPG*M 配列番号 225
MMP-9	G*QPGVMGFPGPKG*N 配列番号 226
MMP-9	G*IKGPAGIPGFPGMK*G 配列番号 227
MMP-9	G*IKGPAGIPGFPGMK*H 配列番号 228
MMP-9	I*PGAPGLMGARGPPGPAG*A 配列番号 229
MMP-9	G*ERGLPGPGIKGPAGIP*G 配列番号 230
MMP-9	G*IPGAPGLMGARGPPGPAG*A 配列番号 231
MMP-9	G*FRGPAGPNGIPGEKGPAG*E 配列番号 232
MMP-9	P*GIPGQPGSPGSPGPGIC*E 配列番号 233
MMP-9	G*ERGLPGPGIKGPAGIPGF*P 配列番号 234
MMP-9	A*VGGLAGYPGAPPPGPPPG*T 配列番号 235
MMP-9	G*VKGERGSPGGPGAAGFPGARG*L 配列番号 236
MMP-9	G*DAGAPGAPGGKGDAGAPGERGPPG*L 配列番号 237
MMP-9	Q*GPPGPTGPGDKGDTGPPGPQG*L 配列番号 238
MMP-9	G*INGSPGGKGEMGPAGIPGAPGLM*G 配列番号 239
MMP-9	Q*GPPGEPGQAGSPGPPPGAIGPS*G 配列番号 240
MMP-9	P*GPPGINGSPGGKGEMGPAGIPGAP*G 配列番号 241
MMP-9	R*GLPGPPGSGNPGPPGSPGSGDKGPPGPAG*N 配列番号 242
MMP-9	G*KNGETGPQGGPPTGPGDKGDTGPPGPQG*L 配列番号 243
MMP-9	G*LPGLAGPRGSPGERGETGPPGAPFPGAPG*Q 配列番号 244
MMP-9	G*INGSPGGKGEMGPAGIPGAPGLMGARGPPGPAG*A 配列番号 245
MMP-9	P*GINGSPGGKGEMGPAGIPGAPGLMGARGPPGPAG*A 配列番号 246
MMP-9	P*PGENGKPGEPGPKGDAGAPGAGGKGDAGAPGERGPPG*L 配列番号 247
MMP-9	G*LKGENGLPGENGAPGPMGPRGAPGERGRPLGAAG*A 配列番号 248
MMP-9	G*NTGAPGSPGVSGPKGDAGQGEKGSQAQPPGAPGLG*I 配列番号 249
MMP-9	G*LMGARGPPGPAGANGAPGLRGGAGEPGKNGAKGEPGPRG*E 配列番号 250
MMP-9	G*LRGAGPPGPEGGKAAGPPGPPGAAGTPGLQGMPPGERGGLGSPGPKG*D 配列番号 251
MMP-8 および -9	G*QQGAI GSPGAPGRGPVGPSPGPPG*K 配列番号 252
MMP-9	K*GDPGPPGIPGRNGDPGIPGQPG*S 配列番号 253
MMP-9	G*LRGAGPPGPEGGKGAAGPPGPPG*A 配列番号 254
MMP-9	G*KNGETGPQGGPPTGPGDKGDTGPPGPQG*L 配列番号 255
MMP-9	G*YQGGPPGEPGQAGPSGPPGPPG*A 配列番号 256
MMP-9	G*VAGPPGSGSPAGPPGPQG*V 配列番号 257
MMP-8, -9 および -13	G*DKGEPGGGADGVPGKDGPRGPTGPIGPPGPAG*Q 配列番号 258
ADAMTS-5	Q*GHAGAQQGPPGPPGIN*G 配列番号 259
カテブシンK	A*GERGAPGA*G 配列番号 260
カテブシンK	A*GIPGFPGMK*G 配列番号 261
カテブシンK	F*PGMKGHRGFD*G 配列番号 262
カテブシンK	G*FPGARGLPGPPG*S 配列番号 263
カテブシンK	A*GFPARGLPGPPG*S 配列番号 264
カテブシンK	P*PGPPGPPGTSHP*G 配列番号 265
カテブシンK	G*FPGMKGHRGFD*G 配列番号 266
カテブシンK	Q*PGDKGEGGAPGLPGI*A 配列番号 267
カテブシンK	R*GDKGETGERGAAGIK*G 配列番号 268
カテブシンK	D*GRNGEKGETGAPGLK*G 配列番号 269
カテブシンK	A*GQPGDKGEGGAPGLPGIA*G 配列番号 270
カテブシンK	G*GPPGKPGEPGPKGD*A 配列番号 271
カテブシンK	A*GIPGFPGMKGHRGFD*G 配列番号 272
カテブシンK	R*GGAGEPGKNGAKGEPGPR*G 配列番号 273
カテブシンK	K*GERGSPGGPGAAGFPGARGLPGP*G 配列番号 274
カテブシンK	I*PGVPGAKGEDGKDGSPGEPGANGLP*G 配列番号 275

10

20

30

40

【表 11C】

カテブシンK	G*AAGFPGARGLPGPPGSNGNPGPPGPS*G 配列番号 276	
カテブシンK	R*PGPPGPSGPRGQPGVMGFGPKGN*D 配列番号 277	
カテブシンK	Q*GPPGPPGINGSPPGGKMGMPAGIPGAP*G 配列番号 278	
カテブシンK	A*GKDGEGRGPRGERGLPGPPGIK*G 配列番号 279	
カテブシンK	A*GARGNDGARGSDGQPPGPPGTAGFGP*S 配列番号 280	
カテブシンK	S*PGVSGPKGDAGQPGKEKSGPAQGPAGP*P 配列番号 281	
カテブシンK	R*GSDGQPPGPPGTAGFGSPGAKGEVGPA*G 配列番号 282	
カテブシンK	Q*GPPGPPGINGSPPGGKMGMPAGIPGAPGLM*G 配列番号 283	
カテブシンK	A*GPPGPPGPPGTSGHPGSPGSPGYQPPGEPG*Q 配列番号 284	
カテブシンK	F*PGAPQNGEPGGKGERGAPGEKGEPPGVA*G 配列番号 285	10
カテブシンK	A*GFGAPQNGEPGGKGERGAPGEKGEPPGV*V 配列番号 286	
カテブシンK	A*GARGNDGARGSDGQPPGPPGTAGFGSPGAKGEVGPA*G 配列番号 287	
カテブシンK	R*GAAGEPRDGVPPGPMRGMPSGPGSGDGKPGPPSGGESGRPGPPGPS*G 配列番号 288	
カテブシンS	G*IAGITGARGL*A 配列番号 289	
カテブシンS	A*GPPGPPGAAGTPGLQG*M 配列番号 290	
カテブシンS	N*GLSGERGPPGQGLPG*L 配列番号 291	
カテブシンS	M*GARGPPGAPAGANGAPGLR*G 配列番号 292	
カテブシンS	N*GLSGERGPPGQGLPLA*G 配列番号 293	
カテブシンS	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPRG*S 配列番号 294	
カテブシンS	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPG*V 配列番号 295	
カテブシンS	R*GGAGPPGPEGKGAAGPPGPPGAAGTPGLQ*G 配列番号 296	
カテブシンS	S*GPKGDAGQPGKEKSGPAQGPAGPLG*I 配列番号 297	
カテブシンS	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPGVK*G 配列番号 298	20
カテブシンS	S*GPKGDAGQPGKEKSGPAQGPAGPLG*I 配列番号 299	
カテブシンS	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPGVK*G 配列番号 300	
カテブシンS	A*VGGLAGYPGAPGPPGPPGTSGHPGSPGSPGYQ*G 配列番号 301	
カテブシンS	E*PGPQGHAGAQQPPGPPGINGSPPGGKMGMPAGIPGAPG*L 配列番号 302	
ADAMTS1	I*PGFPGMKGHR*G 配列番号 303	
ADAMTS1	R*GSPGPGAAGFPGAR*G 配列番号 304	
ADAMTS1	K*GPAGIPGFPGMKGHR*G 配列番号 305	
ADAMTS1	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQ*G 配列番号 306	
ADAMTS1	A*GITGARGLAGPPGMPGPR*G 配列番号 307	
ADAMTS1	L*GIAGITGARLAGPPGMPGPR*G 配列番号 308	
ADAMTS1	T*GARLAGPPGMPGPRGSPGPQ*G 配列番号 309	
ADAMTS1	Q*GPPGPPGINGSPPGGKMGMPAG*I 配列番号 310	30
ADAMTS1	L*PGPPGIKGPAGIPGFPGMKGHR*G 配列番号 311	
ADAMTS1	A*GITGARLAGPPGMPGPRGSPGPQ*G 配列番号 312	
ADAMTS1	T*GARLAGPPGMPGPRGSPGPQVK*G 配列番号 313	
ADAMTS1	R*GLPGPPGIKGPAGIPGFPGMKGHR*G 配列番号 314	
ADAMTS1	G*RPGLPGAAGARGNDGARGSDGQPPGP*P 配列番号 315	
ADAMTS1	N*GAPGPMGPRGAPGERGRPLPGAAGAR*G 配列番号 316	
ADAMTS1	A*GSRGAPGPQPRGDKGETGERGAAGIK*G 配列番号 317	
ADAMTS1	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQVKGESGKPGAN*G 配列番号 318	
ADAMTS1	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQVKGESGKPGANGL*S 配列番号 319	
ADAMTS1	P*GPPGSNGNPGPPGSGSPGKDGPPGAGNTGAPGS*P 配列番号 320	
ADAMTS1	T*GARLAGPPGMPGPRGSPGPQVKGESGKPGAN*G 配列番号 321	
ADAMTS1	R*GAPGEKGEPPGVAGPPGSGPAGPPGPQGVKGER*G 配列番号 322	
ADAMTS1	G*GPPGVAGPPGSGPAGPPGPQGVKGERGSPGGPGAAGF*P 配列番号 323	40
ADAMTS1	K*SGDRGESGPAGAPGAPGSRGAPGPQPRGDKGETGERGAAGIK*G 配列番号 324	
ADAMTS4	I*PGFPGMKGHR*G 配列番号 325	
ADAMTS4	R*GLAGPPGMPGPR*G 配列番号 326	
ADAMTS4	G*PQGLQGLPGTGGPP*G 配列番号 327	

【表 1 1 D】

ADAMTS4	K*GPAGIPGFPGMKGHR*G 配列番号 328	
ADAMTS4	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPG*V 配列番号 329	
ADAMTS4	G*GPPGENGKPGEPGPKGDAGAP*G 配列番号 330	
ADAMTS4	A*PGFRGPAGPNGIPGEKGPAGER*G 配列番号 331	
ADAMTS4	E*KGSPGAQGGPPGAPGLGIAGITGAR*G 配列番号 332	
ADAMTS4	L*PGPPGIKGPAGIPGFPGMKGHR*G 配列番号 333	
ADAMTS4	R*GAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGER*G 配列番号 334	
ADAMTS4	R*GLPGPPGIKGPAGIPGFPGMKGHR*G 配列番号 335	
ADAMTS4	R*GPVPSGPPGKDGTSGHGPIGPPGPR*G 配列番号 336	
ADAMTS4	A*PGPQGPGRGDKGETGERGAAGIKGHR*G 配列番号 337	10
ADAMTS4	R*GAPGPPGPRGDKGETGERGAAGIKGHR*G 配列番号 338	
ADAMTS4	R*GFPGNPAGPGSPGAPGQGAIGSPGAPPR*G 配列番号 339	
ADAMTS4	L*PGPPGIKGPAGIPGFPGMKGHRGDFGR*N 配列番号 340	
ADAMTS4	D*AGQPGGKSPGAQGGPPGAPGLGIAGITGAR*G 配列番号 341	
ADAMTS4	R*GPTGPIGPPGAPGQGDKEGGAPGLGIAGPR*G 配列番号 342	
ADAMTS4	K*GDAGQPGGKSPGAQGGPPGAPGLGIAGITGAR*G 配列番号 343	
ADAMTS4	R*NGEKGETGAPGLKGENLPGENGAPGPMGPR*G 配列番号 344	
ADAMTS4	A*PGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGAPPRGA*A 配列番号 345	
ADAMTS4	R*GAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGAPPR*G 配列番号 346	
ADAMTS4	R*GSPGERGETGPPGAPGFPAGQNGEPGKGER*G 配列番号 347	
ADAMTS4	G*HAGAQQPPGPPGINGSPGKGEMGAPGIPGAPGLMG*A 配列番号 348	
ADAMTS4	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPGVKGESGKPGANGLSGER*G 配列番号 349	20
ADAMTS8	L*GIAGITGARGL*A 配列番号 350	
ADAMTS8	I*PGFPGMKGHR*G 配列番号 351	
ADAMTS8	R*GLAGPPGMPGPR*G 配列番号 352	
ADAMTS8	Q*GPPGAPGLGIAGITGAR*G 配列番号 353	
ADAMTS8	A*GITGARGLAGPPGMPGPR*G 配列番号 354	
ADAMTS8	A*GIPGAPGLMGARGPPGAGAN*G 配列番号 355	
ADAMTS8	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPGVKG*E 配列番号 356	
ADAMTS8	K*GSPGAQGGPPGAPGLGIAGITGAR*G 配列番号 357	
ADAMTS8	L*PGPPGIKGPAGIPGFPGMKGHR*G 配列番号 358	
ADAMTS8	K*DTSGHPGPIGPPGPRGNRGER*G 配列番号 359	
ADAMTS8	A*GITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPG*G 配列番号 360	
ADAMTS8	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPGVKGESG*K 配列番号 361	
ADAMTS8	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPGVKGESGKPGAN*G 配列番号 362	30
ADAMTS8	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPGVKGESGKPGANGL*S 配列番号 363	
ADAMTS8	P*GPPGSGNPNPGPPGSPGKDGPPGAGNTGAPGS*P 配列番号 364	
ADAMTS8	R*GAPGEKGEPPGPGVAGPPGSGPAGPPGPGVKGER*G 配列番号 365	
ADAMTS8	K*SGDRGESGPAGAPGAPGSRGAPGPGPRGDKGETGERGA*A 配列番号 366	
ADAMTS8	R*GAPGEKGEPPGPGVAGPPGSGPAGPPGPGVKGERGSPGGPGAAGFPGAR*G 配列番号 367	
MMP9	*AIGPSG_* 配列番号 368	
MMP9	117' PGIPGRNGDP* 124' 配列番号 369	
MMP9	142' . *ESCPTGPQNY 151' 配列番号 370	
MMP9	113' PKGDTGPRGP* 122' 配列番号 371	

【 0 0 6 5 】

免疫学的結合パートナーは、I I I 型コラーゲンの切断によって形成される C 末端または N 末端ネオエピトープと特異的に反応性のものであり得る。

40

【 0 0 6 6 】

適切な免疫学的結合パートナーは、従って、ペプチドの N 末端の以下の配列のいずれかと、またはペプチドの C 末端の以下の配列のいずれかと特異的に反応性であり得る。

【 0 0 6 7 】

【表 1 2】

表 1 2. プロテアーゼによって生成される I I I 型コラーゲンのペプチド断片の N 末端配列

I I I 型コラーゲン		
GIPGAP 配列番号 372	GDPGPP 配列番号 373	LAGPPG 配列番号 89
IAGITG 配列番号 375	IKGHRG 配列番号 376	RGLAGP 配列番号 377
TGARGL 配列番号 378	ITGARG 配列番号 379	VKGESG 配列番号 380
KGDAGQ 配列番号 381	LRGGAG 配列番号 382	ERGLPG 配列番号 385
GKSGDR 配列番号 383	LQGLPG 配列番号 384	AIGSPG 配列番号 143
DGTSGH 配列番号 135	VGGLAG 配列番号 155	LSGERG 配列番号 176
GPPGVA 配列番号 158	AGPPGM 配列番号 145	IGSPGP 配列番号 386
GLSGER 配列番号 387	GLAGPP 配列番号 388	PQGPPG 配列番号 389
GARGLA 配列番号 111	KGESGK 配列番号 374	VKGERG 配列番号 159
GAPGEK 配列番号 141	QPGVMG 配列番号 144	IKGPAG 配列番号 169
IPGAPG 配列番号 117	FRGPAG 配列番号 137	QQAIG 配列番号 390
GPPGPT 配列番号 391	INGSPG 配列番号 392	GPPGEP 配列番号 393
GLPGPP 配列番号 394	KNGETG 配列番号 395	LPGLAG 配列番号 396
GINGSP 配列番号 397	PGENGK 配列番号 398	LKGENG 配列番号 399
LMGARG 配列番号 400	YQGPPG 配列番号 401	GERGAP 配列番号 402
DKGEFG 配列番号 403	GHAGAQ 配列番号 404	GSDGQP 配列番号 405
PGMKGH 配列番号 406	FPGARG 配列番号 407	GFPGAR 配列番号 408
FPGMKG 配列番号 409	PGDKGE 配列番号 410	GDKGET 配列番号 411
GQPGDK 配列番号 412	GPPGEN 配列番号 413	GIPGFP 配列番号 414
GERGSP 配列番号 415	PGVPGA 配列番号 416	AAGFPG 配列番号 417
GPPGPP 配列番号 100	GKDGES 配列番号 418	GARGND 配列番号 419
GFPGAP 配列番号 420	NTGAPG 配列番号 437	GAAGEP 配列番号 421
IAGITG 配列番号 375	GLSGER 配列番号 387	GARGPP 配列番号 422
GPPGSN 配列番号 423	GPKGDA 配列番号 424	GGAGPP 配列番号 425
PGPQGH 配列番号 426	PGFPGM 配列番号 427	GSPGGP 配列番号 428
SGDRGE 配列番号 429	GITGAR 配列番号 430	GIAGIT 配列番号 431
PGPPGI 配列番号 432	ESCPTG 配列番号 433	HAGAQG 配列番号 434
GAPGFR 配列番号 435	RPGLPG 配列番号 436	GAPGPM 配列番号 438
GSPGER 配列番号 439	PQGLQG 配列番号 440	GPAGIP 配列番号 441
AIGPSG 配列番号 368	PGFRGP 配列番号 443	KGSPGA 配列番号 444
GAPGPQ 配列番号 445	GFPGNP 配列番号 446	GPVGPS 配列番号 447
GPTGPI 配列番号 448	GDAGQP 配列番号 449	NGEKGE 配列番号 450
SRGAPG 配列番号 451	VAGPPG 配列番号 452	PGPQGP 配列番号 453
AGQPGE 配列番号 454	PGAPGG 配列番号 455	PGAPGQ 配列番号 456
AGQQGA 配列番号 457	PGPPGP 配列番号 458	SPGGKG 配列番号 459
GARGLA 配列番号 111	GRNGEK 配列番号 460	GPPGAP 配列番号 461
GSRGAP 配列番号 462	GGAGEP 配列番号 463	GSPGAQ 配列番号 464
SPGAQG 配列番号 465	PGVSGP 配列番号 466	PGAPGL 配列番号 467
GIPGQP 配列番号 468	DAGAPG 配列番号 469	GPPGIN 配列番号 470

10

20

30

40

【表 13】

表 13. プロテアーゼによって生成される I I I 型コラーゲンのペプチド断片の C 末端配列

I I I 型コラーゲン		
GPPGPA 配列番号 94	NGDPGI 配列番号 471	SPGPQG 配列番号 472
GMPGPR 配列番号 473	SPGPAG 配列番号 474	PGPQGV 配列番号 475
ERGAAG 配列番号 476	PGPLGI 配列番号 477	AAGTPG 配列番号 478
ERGPPG 配列番号 147	PGPPGT 配列番号 479	GNRGER 配列番号 480
	APGLRG 配列番号 481	HPGSPG 配列番号 482
PSGPPG 配列番号 483	GSPGPA 配列番号 484	GPAGPP 配列番号 485
GLPGLA 配列番号 486	GPPGPQ 配列番号 490	QGPPGP 配列番号 487
GLAGTA 配列番号 488	FPGPKG 配列番号 491	PGLMGA 配列番号 489
LAGPPG 配列番号 89	GPAGIP 配列番号 441	FPGARG 配列番号 407
IPGFPG 配列番号 492	PPGPPG 配列番号 119	GFPGMK 配列番号 493
FPGAPG 配列番号 494	GAIGPS 配列番号 495	AGIPGF 配列番号 496
GPPGIC 配列番号 2187	LPGAAG 配列番号 2188	APGPLG 配列番号 2189
PGPQGL 配列番号 497	GAPGLM 配列番号 498	GPPGIN 配列番号 470
SPGPKG 配列番号 499	GEPGPR 配列番号 500	IPGQPG 配列番号 501
TGAPGS 配列番号 502	GHRGFD 配列番号 503	LPGPPG 配列番号 72
PGPKGD 配列番号 506	PGLPGI 配列番号 504	GAAGIK 配列番号 505
GLPGIA 配列番号 507	PQGLPG 配列番号 508	GAPGLR 配列番号 509
GLPGPP 配列番号 394	GANGLP 配列番号 510	GPPGPS 配列番号 511
IPGAPG 配列番号 117	GPPGIK 配列番号 512	TAGFPG 配列番号 513
GEVGPA 配列番号 514	PPGPQG 配列番号 103	GPPGVA 配列番号 158
GEVGPA 配列番号 499	GFPGAR 配列番号 408	TGARGL 配列番号 378
EKGPA 配列番号 515	EPGPRG 配列番号 516	PPGAPG 配列番号 517
TSGHPG 配列番号 518	GAPGPA 配列番号 519	TPGLQG 配列番号 520
GTPGLQ 配列番号 521	GTSGHP 配列番号 522	MPGPRG 配列番号 523
GPQGVK 配列番号 524	GAPGLK 配列番号 525	GSPGYQ 配列番号 526
PPGPAG 配列番号 52	PGPKGN 配列番号 527	GAAGAR 配列番号 528
FPGMKG 配列番号 409	PGANGL 配列番号 529	GTGGPP 配列番号 530
GLSGER 配列番号 387	TGPRGP 配列番号 177	GITGAR 配列番号 430
GMKGHR 配列番号 531	EGGPPG 配列番号 532	GSPGPQ 配列番号 533
EMGPAG 配列番号 534	GIAGPR 配列番号 535	QPGPPG 配列番号 536
GRNGDP 配列番号 171	GKPGAN 配列番号 537	VKGESG 配列番号 380
GVKGER 配列番号 538	PGAAGF 配列番号 539	TGERGA 配列番号 540
PQGVKG 配列番号 541	GDAGAP 配列番号 542	GPAGER 配列番号 543
GPPGPR 配列番号 544	GPAGPR 配列番号 545	RGFDGR 配列番号 546
AGPRGA 配列番号 547	GGKGER 配列番号 548	APGLMG 配列番号 549
GPAGAN 配列番号 550		

【0069】

I V 型コラーゲン

本発明者らは、以下の表に列挙する酵素が少なくとも以下の切断部位（「・」で示す）で I V 型コラーゲンを切断すると判定した。

【0070】

10

20

30

40

【表 1 4 A】

表 1 4. I V 型コラーゲンの切断部位

プロテアーゼ	ネオエピトープ
FAP	D. IDGYRGPPGP. Q 配列番号 551
FAP	S. MGPPGTPSVDHGF. L 配列番号 552
FAP	P. DGLPGSMGPPGTPSVDHG. F 配列番号 553
FAP	P. DGLPGSMGPPGTPSVDHGF. L 配列番号 554
FAP	P. DGLPGSMGPPGTPSVDHGFL. V 配列番号 555
FAP	P. SGRDGLGPPGSPGPPGQPGY. T 配列番号 556
FAP	P. SGRDGLGPPGSPGPPGQPGYTN. G 配列番号 557
FAP	P. SGRDGLGPPGSPGPPGQPGYTN. I 配列番号 558
FAP	I. PGSKGEQGFMPGPPGQPGPLPGS. P 配列番号 559
FAP	P. RGFPGPPGPDGLPGSMGPPGTPSVD. H 配列番号 560
FAP	E. PGPPGLPGSVGSPG. V 配列番号 561
FAP	I. DGYRGPPGQGP. P 配列番号 562
FAP	P. RGFPGPPGPDGLPGSMG. P 配列番号 563
FAP	D. GLPGSMGPPGTPSVDHGF. L 配列番号 564
FAP	D. GLPGSMGPPGTPSVDHGFL. V 配列番号 565
FAP	P. GLPGQQGAPGIPGFPKSGKGMVMGTP. G 配列番号 566
FAP	I. GIPGMPGSPGLKGSPPGSPGSPGLPGE. K 配列番号 567
FAP	P. GPPGPPGEGKQMGSLFQGPKGDKGDQGVSGPPGP. G 配列番号 568
FAP	P. GIGPPGARGPPGGGPPGLSGPPGKGEKGFPGFPL. D 配列番号 569
FAP	E. PGLPGIPGVSGPK. G 配列番号 570
FAP	G. EKGQKGDTPGPPGGLV. I 配列番号 571
FAP	L. PGIGVQGPPPGPPGIPGPIGQPLHGIPGEKGDPPG. G 配列番号 572
FAP	G. SPGIPGHQGEHG. P 配列番号 573
FAP	E. PGMQGEPPGPPG. P 配列番号 574
FAP	G. PPGRGLGAPGTPGLPG. R 配列番号 575
FAP	P. PGPKGFPGIPG. P 配列番号 576
FAP	A. KGQPGPLGFPGT. P 配列番号 577
FAP	D. RGPPGPPGIRGPPG. P 配列番号 578
FAP	P. GPPGEGKPGQDGI PG. A 配列番号 579
FAP	L. LGSKEGEGPLPGIPGVSGPKGY. Q 配列番号 580
MMP-9	D. GLPGSMGPPGTPSVDHG. F 配列番号 581
MMP-9	D. GLPGSMGPPGTPSVDHGF. L 配列番号 582
MMP-9	T. GPLGEKGERGYPTGPRGE. P 配列番号 583
MMP-9	G. LQGIRGEPGPPGLPGSVGSPGVPGIPPGARGPPGGQPPG. L 配列番号 584
MMP-9	P. DGLPGSMGPPGTPSVDHGFL. V 配列番号 585
MMP-9	D. PGLKGDGDVGLPGKPGSMDKVDMS. M 配列番号 586
MMP-9	L. PGPMGPPGLPGIDGV. K 配列番号 587
MMP-9	D. GLPGSMGPPGTPSVDHGFL. V 配列番号 588
MMP-9	G. IRGEPGPPGLPGSVGSPGVPGIPPG. A 配列番号 589
MMP-9	G. FPGPPGPDGLPGSMGPPGTPSVDHGF. L 配列番号 590
MMP-9	G. LQGIRGEPGPPGLPGSVGSPGVPGIPPG. A 配列番号 591
MMP-9	G. IRGEPGPPGLPGSVGSPGVPGIPPGARGPPGGQPPG. L 配列番号 592
MMP-9	E. DGVIGMMGFPGAIGP. P 配列番号 593
MMP-9	Y. PGNPGILGPPGEDGVIGMMGFPGAIGPPGPPG. N 配列番号 594
MMP-9	I. PPSDEICEGPPGP. P 配列番号 595
MMP-9	L. PGLPGKGEPLPGYGNPGIKGS. V 配列番号 596
MMP-9	G. IKDKGSMGHGPKGPP. G 配列番号 597

10

20

30

40

10

20

30

40

適切な免疫学的結合パートナーは、従って、ペプチドのN末端の以下の配列のいずれかと、またはペプチドのC末端の以下の配列のいずれかと特異的に反応性であり得る。

【 0 0 7 3 】

【表 15】

表 15. プロテアーゼによって生成される I V 型コラーゲンのペプチド断片の N 末端配列

I V 型コラーゲン		
IDGYRG 配列番号 609	MGPPGT 配列番号 610	DGLPGS 配列番号 611
PGSKGE 配列番号 612	RGFP GP 配列番号 613	PGPPGL 配列番号 614
GPPGPP 配列番号 100	GLPGSM 配列番号 615	GLPGQQ 配列番号 616
LGSKGE 配列番号 617	GIGPPG 配列番号 611	PGLPGI 配列番号 504
PGIGVQ 配列番号 618	SPGIPG 配列番号 619	PGMQGE 配列番号 620
PGPKGF 配列番号 621	KGQ PGL 配列番号 622	RGPPGP 配列番号 148
PPSDEI 配列番号 623	PGLKGD 配列番号 624	GPLGEK 配列番号 625
IRGE PG 配列番号 626	FPGPPG 配列番号 627	LQGIRG 配列番号 628
DGVIGM 配列番号 629	PGNPGI 配列番号 630	PGLPGP 配列番号 58
IKGDKG 配列番号 631	PGSPGC 配列番号 632	GAPGPQ 配列番号 445
GPPGVP 配列番号 633	DQGDQG 配列番号 634	DRGPQG 配列番号 442
KGSIGI 配列番号 635	PPGRLG 配列番号 636	EKGQKG 配列番号 637
ERGSPG 配列番号 38	GIPGAP 配列番号 372	DGGVPN 配列番号 638
SGRDGL 配列番号 639	GPPGEK 配列番号 640	A EGLPG 配列番号 641
DGYRGP 配列番号 642	GPPGLM 配列番号 643	LPGFAG 配列番号 644
GIPGMP 配列番号 645	PGPMGP 配列番号 25	. PGIPGT 配列番号 2227
. ILGHVP 配列番号 2212	. LPGPDG 配列番号 2214	. PGDIVF 配列番号 2215
. PGLPGQ 配列番号 2213	. LRGIPG 配列番号 760	. GNKGDP 配列番号 2216
. SGYPGN 配列番号 2217	. PGFPGA 配列番号 2218	. PGPRGK 配列番号 2219
. VSGPPG 配列番号 2220	. QQGNRG 配列番号 2221	. PGPPGP 配列番号 458
. KRGP PG 配列番号 2223	. VGQPGP 配列番号 2222	. SKGEKG 配列番号 2226
. LHGFPG 配列番号 2225	. GEPGMQ 配列番号 2224	. GEPGPP 配列番号 675

10

20

【 0 0 7 4 】

【表 16】

表 16. プロテアーゼによって生成される I V 型コラーゲンのペプチド断片の C 末端配列

I V 型コラーゲン		
RGPPGP 配列番号 148	SVDHGF 配列番号 646	PSVDHG 配列番号 647
VDHGFL 配列番号 648	PGQPGY 配列番号 649	QPGYTN 配列番号 650
PGLPGS 配列番号 651	GTPSVD 配列番号 652	SVGSPG 配列番号 653
LPGSMG 配列番号 654	GPPGVP 配列番号 633	PGFPGL 配列番号 655
PGLPGE 配列番号 656	GDPGPP 配列番号 373	HQGEMG 配列番号 657
GPPGLV 配列番号 658	PGIPGP 配列番号 659	PGFPGT 配列番号 660
PGLPGP 配列番号 58	DGIPGP 配列番号 661	SGPKGY 配列番号 662
PGPRGE 配列番号 663	GQGPPG 配列番号 664	KVDMGS 配列番号 665
GIGPPG 配列番号 611	PGIDGV 配列番号 666	KGHMGE 配列番号 667
PGAIGP 配列番号 668	PPGPPG 配列番号 119	KGLPGP 配列番号 669
GPKGPP 配列番号 671	SPGPPG 配列番号 672	GPKGLP 配列番号 670
GSGVYP 配列番号 673	PQGPPG 配列番号 389	PPGSPG 配列番号 674
GEPGPP 配列番号 675	AGNPGP 配列番号 676	PGIKGS 配列番号 677
PGYTNG 配列番号 678	FPGPQG 配列番号 679	PGPQGP 配列番号 453
LSGPPG 配列番号 680	PGAPGL 配列番号 467	GVMGTP 配列番号 681
GVSGPK 配列番号 682	PGPPGP 配列番号 458	
HVPGML 配列番号 2228	LPVPGQ 配列番号 2229	LGPPGL 配列番号 2230
GVPGQA 配列番号 2231	VPGQAQ 配列番号 2232	GPDGFL 配列番号 2233
QEGPLG 配列番号 2234	LPGEVL 配列番号 2235	RGIPGF 配列番号 2236
NRGLGF 配列番号 2238	IPSDTL 配列番号 2239	PAGEKG 配列番号 2240
GEKGNK 配列番号 2241	PVGPPG 配列番号 2242	DIVFRK 配列番号 2243
PPGPKG 配列番号 167	RGKPGM 配列番号 2244	PGTRGL 配列番号 2245
GEKGSK 配列番号 2246	EKGSKG 配列番号 2247	SGQPGL 配列番号 2248
AGIPQK 配列番号 2237		

10

20

【0075】

V 型コラーゲン

本発明者らは、以下の表に列挙する酵素が少なくとも以下の切断部位（「・」で示すか、または「・」が存在しない場合は配列の末端）で V 型コラーゲンを切断すると判定した。

【0076】

30

【表 17A】

表 14A. V型コラーゲンの切断断片

プロテアーゼ	ネオエピトープ (COV)
MMP2, $\alpha 3$	K. GDPGPPGPIGSLG. H 配列番号 683
MMP2, $\alpha 3$	G. LRGIPGPVGEPG. L 配列番号 684
MMP2, $\alpha 3$	V. IGPPGLQGLPGPPGE. K 配列番号 685
MMP2, $\alpha 3$	G. KDGIPGPLGPLGPPG. A 配列番号 686
MMP2, $\alpha 3$	G. LRGIPGPVGEPGLL. G 配列番号 687
MMP2, $\alpha 3$	G. VLGPQKGTGEVGPLG. E 配列番号 688
MMP2, $\alpha 3$	K. DGIPGPLGPLGPPGAA. G 配列番号 689
MMP2, $\alpha 3$	G. EDGERGAEGPPGPTG. Q 配列番号 690
MMP2, $\alpha 3$	G. LQGPPGFPGPKGPPG. H 配列番号 691
MMP2, $\alpha 3$	P. IGSLGHPGPPGVAGPLG. Q 配列番号 692
MMP2, $\alpha 3$	G. IRGPPGTVMMPFQ. F 配列番号 693
MMP2, $\alpha 3$	G. QMGPPGPLGPSGLPLK. G 配列番号 694
MMP2, $\alpha 3$	G. LLGAPGQMGPPLGPSG. L 配列番号 695
MMP2, $\alpha 3$	G. LRGIPGPVGEPGLLAGPG. Q 配列番号 696
MMP2, $\alpha 3$	G. LLGPRGSPGPTGRPGVTG. I 配列番号 697
MMP2, $\alpha 3$	G. IRGPPGTVMMPFQF. A 配列番号 698
MMP2, $\alpha 3$	G. KDGIPGPLGPLGPPGAAGP. S 配列番号 699
MMP2, $\alpha 3$	G. KDGIPGPLGPLGPPGAAGPSG. E 配列番号 700
MMP2, $\alpha 3$	Q. GLPGLGREGAKGELGPPGLG. K 配列番号 701
MMP2, $\alpha 3$	L. GPIGEKKGSKTGQPGLEGERGPPGSRG. E 配列番号 702
MMP2, $\alpha 3$	G. LRGIPGPVGEPGLLAGPGQMGPPLGPSG. L 配列番号 703
MMP2, $\alpha 3$	G. ANGSPGERGPLGAGGIGLPQSGSEGPVGPA. K 配列番号 704
MMP2, $\alpha 3$	G. LIGTPGEKGPNGIPGLPGSDGPLGHPGHEGPTG. E 配列番号 705
MMP2, $\alpha 1$	G. LPGEPPRG. L 配列番号 706
MMP2, $\alpha 1$	L. ALRGPAGPMG. L 配列番号 707
MMP2, $\alpha 1$	R. LALRGPAGPMG. L 配列番号 708
MMP2, $\alpha 1$	G. LTGRPGVPVPPGSGG. L 配列番号 709
MMP2, $\alpha 1$	G. LLGPKGPPGPPGPPG. V 配列番号 710
MMP2, $\alpha 1$	G. IPGRPGPQGPVGPAG. E 配列番号 711
MMP2, $\alpha 1$	P. GPDGPPGPMGPPGLP. G 配列番号 712
MMP2, $\alpha 1$	G. QPGPSGADGEPGPRG. Q 配列番号 713
MMP2, $\alpha 1$	G. ETGFQGKTGPPGPPG. V 配列番号 714
MMP2, $\alpha 1$	G. LRGFPGDRGLPGPV. G 配列番号 715
MMP2, $\alpha 1$	G. LRGFPGDRGLPGPVG. A 配列番号 716
MMP2, $\alpha 1$	G. KTGPIGPQAGPKGPDG. L 配列番号 717
MMP2, $\alpha 1$	G. PGRPGLPGADGLGPPG. T 配列番号 718
MMP2, $\alpha 1$	G. LKNEGPPGPPGAGSPGE. R 配列番号 719
MMP2, $\alpha 1$	G. LRGFPGDRGLPGVAGL. L 配列番号 720
MMP2, $\alpha 1$	G. ERGHPGPPGPPGEQGLPG. L 配列番号 721
MMP2, $\alpha 1$	I. GPPGEQGEKDRGLPGPQG. S 配列番号 722
MMP2, $\alpha 1$	G. EAGHPGPPGPPGPPGEVIQPLP. I 配列番号 723
MMP2, $\alpha 1$	K. PGPKGNSGGDPAGPPGERGPNP. Q 配列番号 724
MMP2, $\alpha 1$	G. EQGLPGSPGDPGPPGPMGPPGLPG. L 配列番号 725
MMP2, $\alpha 1$	E. GPPGEKGGQPPGPPGPIGYGPRG. V 配列番号 726
MMP2, $\alpha 1$	G. FPGPKGPPGPPGKDGHPGQRG. E 配列番号 727
MMP2	L. PFRFGGGGDA 配列番号 728
MMP2 および 9	GSKGPMVSAQ. E 配列番号 729

10

20

30

40

【表 17B】

MMP2 および 9	Q. ESQAQAILQQ 配列番号 730
MMP9, α 1	L. ALRGPAGPMG. L 配列番号 707
MMP9, α 1	G. AIGPPGEKGLG. K 配列番号 731
MMP9, α 1	G. GPNGDPLGPPG. E 配列番号 732
MMP9, α 1	P. PGPPGEQGLPL. A 配列番号 733
MMP9, α 1	G. LLGPKGPPGPPGPPG. V 配列番号 734
MMP9, α 1	G. IPGRPGPQGPAG. E 配列番号 711
MMP9, α 1	G. QPGPSGADGEPGRG. Q 配列番号 713
MMP9, α 1	G. QQGNPGAQGLPGQG. A 配列番号 735
MMP9, α 1	G. KEGPPGEKGGQPPG. P 配列番号 736
MMP9, α 1	G. ETGFQKGTGPPGPPG. V 配列番号 737
MMP9, α 1	G. EKGHPGLIGLIGPPG. E 配列番号 738
MMP9, α 1	G. LRGFPGDRGLPGVG. A 配列番号 716
MMP9, α 1	G. KTGPIGPQGAPGKPGPDG. L 配列番号 739
MMP9, α 1	P. GPDGPPGPMGPPGLPLK. G 配列番号 740
MMP9, α 1	G. ERGHPGPPGPPGEQGLPG. L 配列番号 721
MMP9, α 1	G. ERGPNGPQGTGFPGKGPMPG. K 配列番号 741
MMP9, α 1	L. IGLIGPPGEQGEKGRGLPGQGS. S 配列番号 742
MMP9, α 1	E. GPPGEKGGQPPGPPGPIGYPGRG. V 配列番号 726
MMP9, α 1	I. GPPGPPGLPMPGPKGAKGSSGPTGPKGE. A 配列番号 743
MMP9, α 1	P. LGPPGEKGLGVPLPGYPGRQGPGLK. G 配列番号 744
MMP9, α 1	Q. GPKGSI GFPGFPGANGKEKGRGTPGKPGPRG. Q 配列番号 745
MMP9, α 3	P. GPKGDPGPPGPIG. S 配列番号 746
MMP9, α 3	K. GDPGPPGPIGSLG. H 配列番号 683
MMP9, α 3	A. PGIPGEKGLPL. Q 配列番号 747
MMP9, α 3	Q. GPPGPKGDPGPPG. I 配列番号 748
MMP9, α 3	G. SLGHPGPPGVAGPLG. Q 配列番号 749
MMP9, α 3	G. KDGIPGLPLGPPG. A 配列番号 686
MMP9, α 3	G. VLGPGQKTGEVGPLG. E 配列番号 688
MMP9, α 3	G. ELGFQGTGPPGPAG. V 配列番号 750
MMP9, α 3	G. EDGERGAEGPPGPTG. Q 配列番号 690
MMP9, α 3	G. LQGPFGPGKGPMPG. H 配列番号 691
MMP9, α 3	G. EKGHIGLIGLIGPPG. E 配列番号 751
MMP9, α 3	G. QMGPPGLGPSGLPLK. G) 配列番号 694
MMP9, α 3	G. PVGEPGLLAGPQMGPMPG. P 配列番号 752
MMP9, α 3	G. LRGI PGVPGEPLLAGP. Q 配列番号 696
MMP9, α 3	G. LLGPRGSPGPTGRPGVTG. I 配列番号 697
MMP9, α 3	G. KDGIPGLPLGPPGAAGPSG. E 配列番号 700
MMP9, α 3	Q. GLPGLGREGAKGELGPPGPLG. K 配列番号 701
MMP9, α 3	G. SRGERGPPGTGKDGIPGLPLG. P 配列番号 753
MMP9, α 3	G. EKGKSGKTGQPGLEGERGPPGSRG. E 配列番号 754
MMP9, α 3	L. GPIGEKKGKSGKTGQPGLEGERGPPGSRG. E 配列番号 702
MMP9, α 3	G. ANGSPGERGPLGAGGIGLPGQSGSEGPVGPA. K 配列番号 704
MMP9, α 3	G. LIGTPGEKGPMPNPGIPGLPGSDGPLGHPGHEGPTG. E 配列番号 705
MMP13, α 1	L. PGEPGRG. L 配列番号 755
MMP13, α 1	A. LRGPAGPMG. L 配列番号 756
MMP13, α 1	G. LPGEPPRG. L 配列番号 706
MMP13, α 1	L. ALRGPAGPMG. L 配列番号 707
MMP13, α 1	R. LALRGPAGPMG. L 配列番号 708
MMP13, α 1	G. LRGFPGDRGLPGVG. A 配列番号 716
MMP13, α 1	Q. ESQAQAILQARLA. L 配列番号 730
MMP13, α 1	P. GPDGPPGPMGPPGLPLK. G 配列番号 740

10

20

30

40

【表 17C】

MMP13, α 1	G. PQGAIGPPGEKGPLGKPLGMPGADGPPGHPG. K 配列番号 757
MMP13, α 1	A. GPMGLTGRPGVGPVGGSGGLKGEPPGDVGPQGPGRG. V 配列番号 758
MMP13, α 3	G. VLGPGQKTGEVGPLG. E 配列番号 688
MMP13, α 3	G. LRGIPGPVGEPLGAPG. Q 配列番号 696
MMP13, α 3	G. LRGIPGPVGEPLGAPGQMGPPGPGPSG. L 配列番号 703
MMP13, α 3	G. LRGIPGPVGEPLGAPGQMGPPGPGSGLPG. L 配列番号 759

【0077】

10

P はヒドロキシプロリンであり、K はヒドロキシリシン、グリコシル化、リボキシ化または架橋を示す。

【0078】

免疫学的結合パートナーは、V 型コラーゲンの切断によって形成される C 末端または N 末端ネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【0079】

適切な免疫学的結合パートナーは、従って、ペプチドの N 末端の以下の配列のいずれかと、またはペプチドの C 末端の以下の配列のいずれかと特異的に反応性であり得る：

【0080】

【表 18】

20

表 15 a. プロテアーゼによって生成される V 型コラーゲンのペプチド断片の N 末端配列

V 型コラーゲン		
GDPGPP 配列番号 373	LRGIPG 配列番号 760	IGPPGI 配列番号 761
LQGPPG 配列番号 62	IGSLGH 配列番号 762	IRGPPG 配列番号 763
ANGSPG 配列番号 764	LIGTPG 配列番号 765	LPGEPPG 配列番号 766
IPGRPG 配列番号 767	GPDGPP 配列番号 768	QPGPSG 配列番号 769
LKGNEG 配列番号 770	ERGHPPG 配列番号 771	GPPGEQ 配列番号 772
FPGPKG 配列番号 491	PFRFGG 配列番号 773	ESQAQA 配列番号 774
LLGPKG 配列番号 775	QQGNPG 配列番号 776	KEGPPG 配列番号 777
IGLIGP 配列番号 778	GPPGPP 配列番号 100	LGPPGE 配列番号 779
GPPGPK 配列番号 780	SLGHPPG 配列番号 781	KDGIPG 配列番号 782
PVGEPPG 配列番号 783	LRGIPG 配列番号 760	KDGIPG 配列番号 782
ANGSPG 配列番号 764	LIGTPG 配列番号 765	PGEPGP 配列番号 784
LLGAPG 配列番号 785	GLPGLE 配列番号 786	GIPGEK 配列番号 787
LALRGP 配列番号 788	LTGRPG 配列番号 789	LLGPKG 配列番号 775
LRGFPG 配列番号 790	KTGPIG 配列番号 791	PPGRPG 配列番号 792
PGPKGN 配列番号 527	EQGLPG 配列番号 793	GPPGEK 配列番号 640
AIGGPP 配列番号 794	GPNGDP 配列番号 795	PGPPGE 配列番号 796
LLGPRG 配列番号 797	GPDGPP 配列番号 768	ERGPNG 配列番号 798
GPKGDP 配列番号 799	GDPGPP 配列番号 373	PGIPGE 配列番号 800
LQGPPG 配列番号 62	EKGHIG 配列番号 801	QMGPPG 配列番号 802
SRGERG 配列番号 803	EKGKSG 配列番号 804	GPIGEK 配列番号 805
LPGEPPG 配列番号 766	PQGAIG 配列番号 806	GPMGLT 配列番号 807
QMGPPG 配列番号 802	ETGFQG 配列番号 808	GSKGPM 配列番号 809
ALRGPA 配列番号 810	EAGHPG 配列番号 811	EKGHPG 配列番号 812
KDGIP 配列番号 813	VLGPQG 配列番号 814	EDGERG 配列番号 815
GPKGSI 配列番号 816	ELGFQG 配列番号 817	LRGPAG 配列番号 818

30

40

【0081】

P はヒドロキシプロリンであり、K はヒドロキシリシン、グリコシル化、リボキシ化または架橋を示す。

50

【 0 0 8 2 】

【 表 1 9 】

表 1 6 a. プロテアーゼによって生成される V 型コラーゲンのペプチド断片の C 末端配列

V 型コラーゲン		
PIGSLG 配列番号 819	PVGEPG 配列番号 783	PGPPGE 配列番号 796
PPGPTG 配列番号 820	PKGPPG 配列番号 821	VAGPLG 配列番号 822
RPGVTG 配列番号 823	MMPFQF 配列番号 824	PGAAGP 配列番号 825
PVGPA G 配列番号 826	HEGPTG 配列番号 827	EPGPRG 配列番号 516
GPPGLP 配列番号 828	GQGPPG 配列番号 664	PPGPPG 配列番号 119
AGSPGE 配列番号 829	PVGALG 配列番号 830	EQGLPG 配列番号 793
YGPARG 配列番号 831	HPGQRG 配列番号 832	GGGDA 配列番号 833
LIGPPG 配列番号 834	GLPGLK 配列番号 835	PPGPPG 配列番号 119
PPGPIG 配列番号 174	KGLPGL 配列番号 836	PGPPGP 配列番号 458
QMPPG 配列番号 802	LLGAPG 配列番号 785	RPGVTG 配列番号 823
QARLA 配列番号 837	PPGHPG 配列番号 838	PQGPRG 配列番号 150
PLGPPG 配列番号 839	GEPGLL 配列番号 840	EVGPLG 配列番号 841
IMMPFQ 配列番号 842	GLPGLK 配列番号 835	PLGPSG 配列番号 843
AAGPSG 配列番号 844	PPGPLG 配列番号 845	PPGSRG 配列番号 846
PAGPMG 配列番号 847	PPGSGG 配列番号 848	PPGPPG 配列番号 119
GLPGPV 配列番号 849	LPGVPG 配列番号 850	KPGPDG 配列番号 851
LPGPQG 配列番号 852	VIQPLP 配列番号 853	RGPNGP 配列番号 854
PGPQGS 配列番号 855	EKGPLG 配列番号 856	PLGPPG 配列番号 839
GPPGAA 配列番号 857	TGPKGE 配列番号 858	GPKGSI 配列番号 816
PPGPAG 配列番号 52	PPGPAG 配列番号 52	PPGPTG 配列番号 820
QGLPGL 配列番号 859	PSGLPG 配列番号 860	LLGAPG 配列番号 785
PPGSRG 配列番号 846	LPGPPG 配列番号 72	PPGLPG 配列番号 861
PPGPLG 配列番号 845	KGPARG 配列番号 862	PKGPPG 配列番号 821
PLGPLG 配列番号 863	PPGSRG 配列番号 846	

10

20

【 0 0 8 3 】

P はヒドロキシプロリンであり、K はヒドロキシリシン、グリコシル化、リボキシ化または架橋を示す。

【 0 0 8 4 】

V I 型コラーゲン

本発明者らは、以下の表に列挙する酵素が少なくとも以下の切断部位（「 . 」で示すか、または「 . 」が存在しない場合は配列の末端）で V I 型コラーゲンを切断すると判定した。

【 0 0 8 5 】

30

【表 20】

表 14 B. V I 型コラーゲンの切断断片

プロテアーゼ	ネオエピトープ
MMP2	G. YRGPEGPGPPG. H 配列番号 864
MMP2	G. PIGPKGYRGDEGPP. G 配列番号 865
MMP2, (a3)	I. GIGIGNADIT. E 配列番号 866
MMP2, (a3)	G. AQGPAGPAGPPG. L 配列番号 867
MMP9	G. LIGEQGISGPRG. S 配列番号 868
MMP9	P. PGLIGEQGISGPR. G 配列番号 869
MMP9	E. PGEPGPKGGIGNRG. P 配列番号 870
MMP9	G. ISGPRGSGGAAGAPGERGRTGLG. R 配列番号 871
MMP13	PGPAGPPGDPGLMG 配列番号 872
FAP-1	VAAKPAAVRPPAAAAKPVATKPEVPRP 配列番号 873
FAP-1	GEPGLNGTTGPKGI 配列番号 874
FAP-1	IGPKGIPGEDGYRGYPG 配列番号 875
FAP-1	VAVVQHAPSESVDNASMPVKVEFSL 配列番号 876
FAP-2	LGPMGVPRD 配列番号 877
FAP-2	GEPGPPGEKGEAGDEGNPGPDGAPGERG 配列番号 878
FAP-2	RGPIGSIGPKGIPGEDGYRGYPGDEGGP 配列番号 879
FAP-2	PPPPQPARSAS 配列番号 880
FAP-2	FGPSAATPAPP 配列番号 881
FAP-2	GPKGETGDLGPMGVPRDGVPGGPGETGK 配列番号 882

10

20

【0086】

免疫学的結合パートナーは、V型コラーゲンの切断によって形成されるC末端またはN末端ネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【0087】

適切な免疫学的結合パートナーは、従って、ペプチドのN末端の以下の配列のいずれかと、またはペプチドのC末端の以下の配列のいずれかと特異的に反応性であり得る。

【0088】

【表 21】

30

表 15 b. プロテアーゼによって生成されるV I 型コラーゲンのペプチド断片のN末端配列

V I 型コラーゲン		
YRGPEG 配列番号 883	PIGPKG 配列番号 865	GIGIGN 配列番号 885
ISGPRG 配列番号 886	PGPAGP 配列番号 887	VAAKPA 配列番号 888
GEPGPP 配列番号 675	RGPIGS 配列番号 889	PPPPQP 配列番号 890
AQGPAG 配列番号 891	LIGEQG 配列番号 892	PGLIGE 配列番号 893
GEPGLN 配列番号 894	IGPKGI 配列番号 895	VAVVQH 配列番号 896
FGPSAA 配列番号 897	GPKGET 配列番号 898	PGEPGP 配列番号 784
LGPMGV 配列番号 899		

40

【0089】

【表 2 2】

表 1 6 b. プロテアーゼによって生成される V I 型コラーゲンのペプチド断片の C 末端配列

V I 型コラーゲン		
GDEGPP 配列番号 900	GNADIT 配列番号 901	PAGPPG 配列番号 133
DPGLMG 配列番号 902	PEVPRP 配列番号 903	TGPKGI 配列番号 904
GDEGGP 配列番号 905	PARSAS 配列番号 906	TPAPPG 配列番号 915
ISGPRG 配列番号 886	GISGPR 配列番号 907	GIGNRG 配列番号 908
YRGYPG 配列番号 909	KVEFSL 配列番号 910	GVPGRD 配列番号 911
PGETGK 配列番号 912	RTGPLG 配列番号 913	APGERG 配列番号 914

10

【 0 0 9 0 】

プロテオグリカン

本発明のもう 1 つの態様では、前記ペプチド断片は、プロテオグリカンのバーシカン、ルミカン、パールカン、ビグリカンおよびデコリンの断片であり、それらはすべて線維性組織において同定される。

【 0 0 9 1 】

いくつかの候補プロテアーゼは、線維性病変中のプロテオグリカンの消化に関与し得る。本発明者らは、表 1 7 に列挙する酵素が、少なくとも以下の切断産物を生じさせるルミカン、バーシカン、ビグリカン、パールカンおよびデコリンを生成すると判定した。

20

【 0 0 9 2 】

【表 23】

表 17. ビグリカン、デコリン、バーシカン、ルミカンおよびパールカンの切断断片

プロテアーゼ	ビグリカン
MMP-3	SVPKEISPDITLLDLQNNDISE 配列番号 916
MMP-3	KSPVKEISPDITLLDLQNNDISE 配列番号 917
MMP-9	NSGFEPGAFDGLKLNLRISSEAK 配列番号 918
MMP-9	LKSPVKEISPDITLLDLQNNDISE 配列番号 919
MMP-12	LRISSEAKLTGIPKDLPET 配列番号 920
MMP-13	LKSPVKEISPDITLLDLQNNDISE 配列番号 919
MMP-13	LTGIPKDLPETLNLHLDHNKIQAI 配列番号 921
ADAMTS4	RISSEAKLTGIPKDLPETLNE 配列番号 922
ADAMTS4	AI ELEDLLRYSK 配列番号 923
ADAMTS4	AI ELEDLLRY 配列番号 924
ADAMTS4	EAKLTGIPKDLPETLNE 配列番号 925
ADAMTS4	LKAVPKEISPDITLLDLQNNDISE 配列番号 926
MMP-8	LLDLQNNDISELRKDD 配列番号 927
MMP-8	IELEDLLRYS 配列番号 928
カテプシン S	NSGFEPGAFDGLK 配列番号 929
プロテアーゼ	デコリン
MMP-12	IVIELGTNPLK 配列番号 930
MMP-3	DEASGIGPEVPDDR 配列番号 931
MMP-3	LHLDGNKISRVDAA 配列番号 932
MMP-3	VNNKISKVSPGAFTPL 配列番号 933
MMP-3	LILVNNKISKVSPGAFTPLVKLER 配列番号 934
MMP-9	SNPVQYWEIQPSTFR 配列番号 935
カテプシン K	SSGIENGAFQGMK 配列番号 884
カテプシン K	SSGIENGAFQGMKKLS 配列番号 946
ADAMTS1	KITEIKDGDFFK 配列番号 936
ADAMTS1	GLPPSLTELHLDGNK 配列番号 937
	バーシカン
不明	LLASDAGLYR 配列番号 938
不明	LATVGELQAAWR 配列番号 939
不明	ETTVLVAQNGNIK 配列番号 940
	ルミカン
不明	SLEDLQLTHNK 配列番号 941
不明	LKEDAVSAAFK 配列番号 942
	パールカン
不明	SIEYSPQLEDAGSR 配列番号 943
不明	LEGDTLIIIPR 配列番号 944
ADAMTS4	VSEAVVEKLEPEYR 配列番号 945
ADAMTS4	EVSEAVVEKLEPEYR 配列番号 947
ADAMTS4	SIEYSPQLEDASAKEFR 配列番号 948

【0093】

免疫学的結合パートナーは、バーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグ리카ンの切断によって形成される C 末端または N 末端ネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【0094】

適切な免疫学的結合パートナーは、従って、ペプチドの N 末端の以下の配列のいずれかと、またはペプチドの C 末端の、表 19 中の以下の配列のいずれかと特異的に反応性であり得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 5 】

【 表 2 4 】

表 18. プロテアーゼによって生成されるビグリカン、デコリン、ルミカン、パーシカンおよびパールカンのペプチド断片のN末端配列

ビグリカン		
SVPKEI 配列番号 949	GLKLN 配列番号 950	RISEAK 配列番号 951
NSGFEP 配列番号 952	LKSVPK 配列番号 953	AIELED 配列番号 954
IELEDL 配列番号 957	QCSDLG 配列番号 955	EAKLTG 配列番号 956
LRISEA 配列番号 958	LTGIPK 配列番号 959	LKAVPK 配列番号 960
LLDLQN 配列番号 961		
デコリン		
IVIELG 配列番号 962	DEASGI 配列番号 963	VNNKIS 配列番号 964
NGLNQM 配列番号 965	LHLDGN 配列番号 966	LILVNN 配列番号 967
SSGIEN 配列番号 968	KITEIK 配列番号 969	GLPPSL 配列番号 970
SNPVQY 配列番号 971		
パーシカン		
LLASDA 配列番号 972	LATVGE 配列番号 973	ETTVLV 配列番号 974
ENQDAR 配列番号 975	NGFDQC 配列番号 976	SLTVVK 配列番号 977
ルミカン		
SLEDLQ 配列番号 978	LKEDAV 配列番号 979	HLQHNR 配列番号 980
LQHNRL 配列番号 985		
パールカン		
SIEYSP 配列番号 981	LVNFTR 配列番号 982	VSEAVV 配列番号 983
EVSEAV 配列番号 984		

10

20

【 0 0 9 6 】

【 表 2 5 】

表 19. プロテアーゼによって生成されるビグリカン、デコリン、ルミカン、パーシカンおよびパールカンのペプチド断片のC末端配列

ビグリカン		
NNDISE 配列番号 986	YWEVQP 配列番号 987	EDLLRY 配列番号 988
RISEAK 配列番号 951	KIQAIE 配列番号 989	PETLNE 配列番号 990
LRKDDF 配列番号 991	LLRYSK 配列番号 992	ELRKDD 配列番号 993
KDLPET 配列番号 994	DLLRYS 配列番号 995	AFDGLK 配列番号 996
LNELHL 配列番号 997		
デコリン		
GTNPLK 配列番号 998	EVPPDR 配列番号 999	GAFTPL 配列番号 1000
SSGIEN 配列番号 968	RVDAAS 配列番号 1001	LVKLER 配列番号 1002
GMKKLS 配列番号 1003	KDGDFK 配列番号 1004	HLDGNK 配列番号 1005
QPSTFR 配列番号 1006	AFQGMK 配列番号 1007	
パーシカン		
CDVMYG 配列番号 1008	NGFDQC 配列番号 976	QNGINK 配列番号 1009
IGQDYK 配列番号 1010		
ルミカン		
QLTHNK 配列番号 1011	VSAAFK 配列番号 1012	GLKSLE 配列番号 1013
パールカン		
EDAGSR 配列番号 1014	EFREVS 配列番号 1015	VAQQDS 配列番号 1016
SAKEFR 配列番号 1017	LEPEYR 配列番号 1018	

30

40

50

【 0 0 9 7 】

C R P

いくつかの候補プロテアーゼは線維組織中の C R P の消化に関与すると考えられ、文献は、線維性組織中の多くの異なるプロテアーゼを報告している。おそらく、これは、最終的に線維症へと至る広範囲の複雑なプロセスの結果である。しかし、本発明者らの評価では、初期は様々な M M P で構成され得るが、後期はマトリックスのカテプシン K 分解に大きく依存すると考えられ、疾患のレベルに依存して異なるネオエピトーププロフィールを生じさせる。本発明者らは、純粋な天然タンパク質の様々なインビトロ切断を通して、以下の表に列挙する酵素が少なくとも以下の切断部位（表 2 0 では * で示すが、表 2 1 では各配列の末端）で C R P を切断すると判定した。

10

【 0 0 9 8 】

【表 2 6 】

表 2 0 . 特異的プロテアーゼによって生成される C R P 断片

プロテアーゼ/タンパク質	ネオエピトープ
CRP + CatK	K*ESDTSYVSLKAPLT*K 配列番号 1019
CRP + CatK	G*GNFEGSQSLVGDIG*N 配列番号 1020
CRP + MMP9	A*LKYEYQGEVFTKPQ*L 配列番号 1021
CRP + MMP9	G*IVEFWVDGKPRV*R 配列番号 1022
CRP + MMP1/MMP3	R*KAFVFPKE*S 配列番号 1023
CRP + MMP3	K*YEVQGEVFTKPQLWP*- 配列番号 1024
CRP + MMP3	D*SFGGNFEGSQS*L 配列番号 1025
CRP + MMP3	D*FVLSPEINT*I 配列番号 1026
CRP + MMP3	S*LKKGYTVGAEAS*S 配列番号 1027
CRP + MMP3	A*FGQTDMSRKA*F 配列番号 1028
CRP + MMP3	S*LKKGYTVGAEAS*I 配列番号 1029
CRP + MMP3	G*EVFTKPQLWP*- 配列番号 1030
CRP + MMP3	S*IILGQEQDSFGGN.F 配列番号 1031
CRP + MMP3	K*YEVQGEVFTKPQ.L 配列番号 1032

20

【 0 0 9 9 】

30

【表 2 7 A】

表 2 1. 特異的プロテアーゼによって生成されるCRP断片

プロテアーゼ	ネオエピトープ	アミノ酸番号
MMP9	AFVFPK 配列番号 1033	026-031
MMP9	FGQTDMSR 配列番号 1034	017-024
MMP9	FGQTDMSRK 配列番号 1035	017-025
MMP9	FGQTDMSRKA 配列番号 1036	017-026
MMP9	FGQTDMSRKAF 配列番号 1037	017-027
MMP9	FGQTDMSRKAFVFPKE 配列番号 1038	017-032
MMP9	FGQTDMSRKAFVFPKESDTS 配列番号 1039	017-036
MMP9	FGQTDMSRKAFVFPKESDTSYV 配列番号 1040	017-038
MMP9	FGQTDMSRKAFVFPKESDTSYVS 配列番号 1041	017-039
MMP9	TDMSRKAFVFPKESDTSYV 配列番号 1042	020-038
MMP9	MSRKAFVFPKESDTS 配列番号 1043	022-036
MMP9	SRKAFVFPKESDTSYV 配列番号 1044	023-038
MMP9	RKAFVFPKE 配列番号 1045	024-032
MMP9	RKAFVFPKESDTSYV 配列番号 1046	024-038
MMP9	RKAFVFPKESDTSYVS 配列番号 1047	024-039
MMP9	KAFVFPKE 配列番号 1048	025-032
MMP9	KAFVFPKESD 配列番号 1049	025-034
MMP9	KAFVFPKESDT 配列番号 1050	025-035
MMP9	KAFVFPKESDTS 配列番号 1051	025-036
MMP9	KAFVFPKESDTSYV 配列番号 1052	025-038
MMP9	KAFVFPKESDTSYVS 配列番号 1053	025-039
MMP9	AFVFPKE 配列番号 1054	026-032
MMP9	AFVFPKESDT 配列番号 1055	026-035
MMP9	AFVFPKESDTSYV 配列番号 1056	026-038
MMP9	AFVFPKESDTSYVS 配列番号 1057	026-039
MMP9	AFVFPKESDTSYVSL 配列番号 1058	026-040
MMP9	FVFPK 配列番号 1059	027-031
MMP9	FVFPKE 配列番号 1060	027-032
MMP9	FVFPKESD 配列番号 1061	027-034
MMP9	FVFPKESDTS 配列番号 1062	027-036
MMP9	FVFPKESDTSY 配列番号 1063	027-037
MMP9	FVFPKESDTSYV 配列番号 1064	027-038
MMP9	FVFPKESDTSYVS 配列番号 1065	027-039
MMP9	FVFPKESDTSYVSL 配列番号 1066	027-040
MMP9	VFPKESDTS 配列番号 1067	028-036
MMP9	VFPKESDTSYV 配列番号 1068	028-038
MMP9	VFPKESDTSYVS 配列番号 1069	028-039
MMP9	VFPKESDTSYVSL 配列番号 1070	028-040
MMP9	FPKESDTSYVS 配列番号 1071	029-039
MMP9	KESDTSYVSLKAPLTKP 配列番号 1072	031-047
MMP9	SDTSYVSLKAPLTKP 配列番号 1073	033-047
MMP9	SLKAPLTKP 配列番号 1074	039-047
MMP9	SLKAPLTKPLK 配列番号 1075	039-049
MMP9	LKAPLTKPLK 配列番号 1076	040-049
MMP9	FYTELSSTRGYS 配列番号 1077	057-068
MMP9	LSSTRGYS 配列番号 1078	061-068
MMP9	SSTRGYS 配列番号 1079	062-068

10

20

30

40

【表 2 7 B】

MMP9	STRGYS 配列番号 1080	063-068
MMP9	IFSATKRQ 配列番号 1081	069-077
MMP9	IFSATKRQDNEILI 配列番号 1082	069-083
MMP9	SYATKRQDNEILI 配列番号 1083	071-083
MMP9	YATKRQDNEIL 配列番号 1084	072-082
MMP9	YATKRQDNEILI 配列番号 1085	072-083
MMP9	YATKRQDNEILIF 配列番号 1086	072-084
MMP9	TKRQDNEILI 配列番号 1087	074-083
MMP9	TKRQDNEILIF 配列番号 1088	074-084
MMP9	TKRQDNEILIFWSKI 配列番号 1089	074-089
MMP9	KRQDNEILI 配列番号 1090	075-083
MMP9	KRQDNEILIF 配列番号 1091	075-084
MMP9	WSKDIGYS 配列番号 1092	085-092
MMP9	SKDIGYS 配列番号 1093	086-092
MMP9	IVEFWVDGKPRV 配列番号 1094	124-135
MMP9	EFWVDGKPR 配列番号 1095	126-134
MMP9	WVDGKPRV 配列番号 1096	128-135
MMP9	VDGKPRV 配列番号 1097	129-135
MMP9	SLKKGYTVGAE 配列番号 1098	138-148
MMP9	SLKKGYTVGAEA 配列番号 1099	138-149
MMP9	SLKKGYTVGAEAS 配列番号 1100	138-150
MMP9	LKKGYTV 配列番号 1101	139-145
MMP9	LKKGYTVG 配列番号 1102	139-146
MMP9	LKKGYTVGA 配列番号 1103	139-147
MMP9	LKKGYTVGAE 配列番号 1104	139-148
MMP9	LKKGYTVGAEA 配列番号 1105	139-149
MMP9	LKKGYTVGAEAS 配列番号 1106	139-150
MMP9	LKKGYTVGAEASI 配列番号 1107	139-151
MMP9	SIILGQEQDSFGGN 配列番号 1108	150-163
MMP9	SIILGQEQDSFGGNFEGSQ 配列番号 1109	150-168
MMP9	SIILGQEQDSFGGNFEGSQS 配列番号 1110	150-169
MMP9	IILGQEQDSFGGNFEGS 配列番号 1111	151-067
MMP9	IILGQEQDSFGGNFEGSQS 配列番号 1112	151-169
MMP9	ILGQEQDSFGGN 配列番号 1113	152-163
MMP9	ILGQEQDSFGGNFEGSQ 配列番号 1114	152-168
MMP9	ILGQEQDSFGGNFEGSQS 配列番号 1115	152-169
MMP9	LGQEQDSFGGNFEGSQ 配列番号 1116	153-168
MMP9	LGQEQDSFGGNFEGSQS 配列番号 1117	153-169
MMP9	GQEQDSFGGNFEGSQS 配列番号 1118	154-169
MMP9	SFGGNFEGSQS 配列番号 1119	159-169
MMP9	QSLVGDIGNVN 配列番号 1120	168-178
MMP9	INTIYLGGPFSPNV 配列番号 1121	189-202
MMP9	INTIYLGGPFSPNVLN 配列番号 1122	189-204
MMP9	IYLGPFSPNVLN 配列番号 1123	192-204
MMP9	YLGPFSPNVLN 配列番号 1124	193-204
MMP9	LGGPFSPN 配列番号 1125	194-201
MMP9	SPNVLNWRALKYEVQGEVFTKPLWP 配列番号 1126	199-224
MMP9	LNWRA 配列番号 1127	203-207
MMP9	LNWRAL 配列番号 1128	203-208
MMP9	LNWRALK 配列番号 1129	203-209
MMP9	WRALKYE 配列番号 1130	205-211
MMP9	WRALKYEV 配列番号 1131	205-212

10

20

30

40

【表 27C】

MMP9	WRALKYEVQGE 配列番号 1132	205-215
MMP9	ALKYEV 配列番号 1133	207-212
MMP9	LKYEVQ 配列番号 1134	208-213
MMP9	LKYEVQG 配列番号 1135	208-214
MMP9	LKYEVQGE 配列番号 1136	208-215
MMP9	LKYEVQGEVFTKP 配列番号 1137	208-220
MMP9	LKYEVQGEVFTKPQ 配列番号 1138	208-221
MMP9	LKYEVQGEVFTKPQLWP 配列番号 1139	208-224
MMP9	KYEVQGE 配列番号 1140	209-215
MMP9	KYEVQGEVFTKPQ 配列番号 1141	209-221
MMP9	KYEVQGEVFTKPQLWP 配列番号 1142	209-224
MMP9	YEVQGEVFTKP 配列番号 1143	210-220
MMP9	YEVQGEVFTKPQ 配列番号 1144	210-221
MMP9	YEVQGEVFTKPQLWP 配列番号 1145	210-224
MMP9	VQGEVFTKPQ 配列番号 1146	212-221
MMP9	VQGEVFTKPQLWP 配列番号 1147	212-224
MMP9	QGEVFTKPQ 配列番号 1148	213-221
MMP9	GEVFTKP 配列番号 1149	214-220
MMP9	GEVFTKPQ 配列番号 1150	214-221
MMP9	EVFTKPQ 配列番号 1151	215-221
MMP9	EVFTKPQLWP 配列番号 1152	215-224
MMP9	VFTKPQ 配列番号 1153	216-221
MMP9	FTKPQ 配列番号 1154	217-221
MMP9	FTKPQLWP 配列番号 1155	217-224
MMP9	TKPQLWP 配列番号 1156	218-224
MMP9	KPQLWP 配列番号 1157	219-224
MMP12	FGQTDMSRKA 配列番号 1036	017-026
MMP12	MSRKAFVFP 配列番号 1158	022-030
MMP12	MSRKAFVFPKE 配列番号 1159	022-032
MMP12	MSRKAFVFPKESD 配列番号 1160	022-034
MMP12	MSRKAFVFPKESDTS 配列番号 1043	022-036
MMP12	MSRKAFVFPKESDTSYVS 配列番号 1161	022-039
MMP12	SRKAFVFP 配列番号 1162	023-030
MMP12	SRKAFVFPKESD 配列番号 1163	023-034
MMP12	SRKAFVFPKESDTS 配列番号 1164	023-036
MMP12	RKAFVFP 配列番号 1165	024-030
MMP12	RKAFVFPKESD 配列番号 1166	024-034
MMP12	KAFVFP 配列番号 1167	025-030
MMP12	KAFVFPKE 配列番号 1048	025-032
MMP12	KAFVFPKESD 配列番号 1049	025-034
MMP12	AFVFPKE 配列番号 1054	026-032
MMP12	AFVFPKESDTS 配列番号 1168	026-036
MMP12	AFVFPKESDTSYVS 配列番号 1057	026-039
MMP12	FVFPKE 配列番号 1060	027-032
MMP12	FVFPKESD 配列番号 1061	027-034
MMP12	FVFPKESDTS 配列番号 1062	027-036
MMP12	FVFPKESDTSY 配列番号 1063	027-037
MMP12	FVFPKESDTSYVS 配列番号 1065	027-039
MMP12	VFPKESD 配列番号 1169	028-034
MMP12	KESDTSY 配列番号 1170	031-037
MMP12	KESDTSYVS 配列番号 1171	031-039
MMP12	VSLKAP 配列番号 1172	038-043

10

20

30

40

【表 27D】

MMP12	LKAPLT 配列番号 1173	040-045
MMP12	LKAPLTKP 配列番号 1174	040-047
MMP12	YTELSSTRGYS 配列番号 1175	058-068
MMP12	LSSTRGYS 配列番号 1078	061-068
MMP12	STRGYS 配列番号 1080	063-068
MMP12	YATKRQDNE 配列番号 1176	072-080
MMP12	YATKRQDNEI 配列番号 1177	072-081
MMP12	YATKRQDNEIL 配列番号 1084	072-082
MMP12	TKRQDNEIL 配列番号 1178	074-082
MMP12	KRQDNEIL 配列番号 1179	075-082
MMP12	ILIFWSKD 配列番号 1180	081-088
MMP12	IFWSKD 配列番号 1181	083-088
MMP12	SKDIGYS 配列番号 1093	086-092
MMP12	WVDGKPRV 配列番号 1096	128-135
MMP12	WVDGKPRVR 配列番号 1182	128-136
MMP12	VRKSLKKGYTVGAEAS 配列番号 1183	135-150
MMP12	SLKKGYT 配列番号 1184	138-144
MMP12	SLKKGYTVG 配列番号 1185	138-146
MMP12	SLKKGYTVGA 配列番号 1186	138-147
MMP12	SLKKGYTVGAE 配列番号 1098	138-148
MMP12	SLKKGYTVGAEA 配列番号 1099	138-149
MMP12	SLKKGYTVGAEAS 配列番号 1100	138-150
MMP12	SLKKGYTVGAEASI 配列番号 1187	138-151
MMP12	LKKGYTV 配列番号 1101	139-145
MMP12	LKKGYTVG 配列番号 1102	139-146
MMP12	LKKGYTVGA 配列番号 1103	139-147
MMP12	LKKGYTVGAE 配列番号 1104	139-148
MMP12	LKKGYTVGAEA 配列番号 1105	139-149
MMP12	LKKGYTVGAEAS 配列番号 1106	139-150
MMP12	LKKGYTVGAEASI 配列番号 1107	139-151
MMP12	KKGTVGAEAS 配列番号 1188	140-150
MMP12	KGYTVGAEAS 配列番号 1189	141-150
MMP12	KGYTVGAEASI 配列番号 1190	141-151
MMP12	SIILGQEQDSFGGN 配列番号 1108	150-163
MMP12	IILGQEQD 配列番号 1191	151-158
MMP12	IILGQEQDSFGGN 配列番号 1192	151-163
MMP12	IILGQEQDSFGGNFEGSQS 配列番号 1112	151-169
MMP12	ILGQEQDSFGGN 配列番号 1113	152-163
MMP12	LVGDI GNVMWD 配列番号 1193	170-181
MMP12	INTIYLGGPFSPNVLN 配列番号 1122	189-204
MMP12	IYLGPFSPN 配列番号 1194	192-201
MMP12	IYLGPFSPNV 配列番号 1195	192-202
MMP12	IYLGPFSPNVLN 配列番号 1123	192-204
MMP12	LGGPFSPNVLN 配列番号 1196	194-204
MMP12	WRALKYE 配列番号 1130	205-210
MMP12	YEVQGEVFTKP 配列番号 1143	210-220
MMP12	YEVQGEVFTKPQ 配列番号 1144	210-221
MMP12	YEVQGEVFTKPQLWP 配列番号 1145	210-224
MMP12	EVQGEVFTKP 配列番号 1197	211-220
MMP12	EVQGEVFTKPQLWP 配列番号 1198	211-224
MMP12	VQGEVFTKP 配列番号 1199	212-220
MMP12	VQGEVFTKPQ 配列番号 1146	212-221

10

20

30

40

【表 27E】

MMP12	VQGEVFTKPQLWP 配列番号 1147	212-224
MMP12	GEVFTKPQLWP 配列番号 1200	214-224
MMP12	EVFTKP 配列番号 1201	215-220
MMP12	EVFTKPQLWP 配列番号 1152	215-224
MMP12	VFTKPQ 配列番号 1153	216-221
MMP12	VFTKPQL 配列番号 1202	216-222
MMP12	VFTKPQLWP 配列番号 1203	216-224
MMP12	FTKPQLWP 配列番号 1155	217-224
MMP12	TKPQLWP 配列番号 1156	218-224
MMP1	AFVFPK 配列番号 1033	006-031
MMP1	KAFVFPK 配列番号 1204	025-031
MMP1	VRKSLK 配列番号 1205	135-140
MMP1	YEVQGEVFTKPQLWP 配列番号 1145	210-224
MMP3	FGQDMSRKA 配列番号 1036	017-026
MMP3	FGQDMSRKAF 配列番号 1037	017-027
MMP3	MSRKAFVFPKESDTSYV 配列番号 1206	022-038
MMP3	MSRKAFVFPKESDTSYVS 配列番号 1161	022-039
MMP3	SRKAFVFPKESDTSYV 配列番号 1044	023-038
MMP3	SRKAFVFPKESDTSYVS 配列番号 1207	023-039
MMP3	RKAFVFPKESDTSYV 配列番号 1046	024-038
MMP3	RKAFVFPKESDTSYVS 配列番号 1047	024-039
MMP3	KAFVFPKE 配列番号 1048	025-032
MMP3	KAFVFPKESDTS 配列番号 1051	025-036
MMP3	KAFVFPKESDTSYVS 配列番号 1053	025-039
MMP3	KAFVFPKESDTSYVSL 配列番号 1208	025-040
MMP3	KAFVFPKESDTSYVSLK 配列番号 1209	025-041
MMP3	AFVFPKESDTSYVS 配列番号 1057	026-039
MMP3	AFVFPKESDTSYVSL 配列番号 1058	026-040
MMP3	AFVFPKESDTSYVSLKAP 配列番号 1210	026-043
MMP3	FVFPKESDTSYV 配列番号 1064	027-038
MMP3	FVFPKESDTSYVSLK 配列番号 1211	027-041
MMP3	VFPKESDTSYVSLK 配列番号 1212	028-041
MMP3	KESDTSYVSLKAP 配列番号 1213	031-043
MMP3	TKRQDNEILIFW 配列番号 1214	074-085
MMP3	IVEFWVDGKPRVRKS 配列番号 1215	124-138
MMP3	SLKKGYTVGAEA 配列番号 1099	138-149
MMP3	SLKKGYTVGAEAS 配列番号 1100	138-150
MMP3	LKKGYTVGAEA 配列番号 1105	139-149
MMP3	LKKGYTVGAEAS 配列番号 1106	139-150
MMP3	LKKGYTVGAEASI 配列番号 1107	139-151
MMP3	LKKGYTVGAEASII 配列番号 1216	139-152
MMP3	SIILGQEQDSFGGNFEGSQS 配列番号 1110	150-169
MMP3	IILGQEQDSFGGN 配列番号 1192	151-163
MMP3	IILGQEQDSFGGNFEGSQS 配列番号 1112	151-169
MMP3	ILGQEQDSFGGNFEGSQS 配列番号 1115	152-169
MMP3	LGQEQDSFGGNFEGSQS 配列番号 1117	153-169
MMP3	QEQDSFGGNFEGSQS 配列番号 1217	155-169
MMP3	SFGGNFEGSQS 配列番号 1119	159-169
MMP3	LVGDIIGNVMWD 配列番号 1193	170-181
MMP3	FVLSPDEINT 配列番号 1218	182-191
MMP3	YLGPFSPNVLN 配列番号 1124	193-204
MMP3	LKYEVQGEVFTKPQ 配列番号 1138	208-221

10

20

30

40

【表 27F】

MMP3	KYEVQGEVFTKPQ 配列番号 1141	209-221
MMP3	KYEVQGEVFTKPQLWP 配列番号 1142	209-224
MMP3	YEVQGEVFTKPQ 配列番号 1144	210-221
MMP3	YEVQGEVFTKPQLWP 配列番号 1145	210-224
MMP3	EVQGEVFTKPQLWP 配列番号 1198	211-224
MMP3	VQGEVFTKPQLWP 配列番号 1147	212-224
MMP3	GEVFTKPQLWP 配列番号 1200	214-224
MMP3	EVFTKPQLWP 配列番号 1152	215-224
MMP3	SKDIGYSFTVGGSEI 配列番号 1219	86-100
MMP8	FGQTDMSR 配列番号 1034	017-024
MMP8	FGQTDMSRK 配列番号 1035	017-025
MMP8	FGQTDMSRKA 配列番号 1036	017-026
MMP8	FGQTDMSRKAF 配列番号 1037	017-027
MMP8	FGQTDMSRKAFV 配列番号 1220	017-028
MMP8	FGQTDMSRKAFVFPKESDTSYV 配列番号 1040	017-038
MMP8	MSRKAFVFPKESDTSYV 配列番号 1206	022-038
MMP8	SRKAFVFPKESDTSYV 配列番号 1044	023-038
MMP8	RKAFVFPKESDTSYV 配列番号 1046	024-038
MMP8	KAFVFPKESDT 配列番号 1050	025-035
MMP8	KAFVFPKESDTS 配列番号 1051	025-036
MMP8	KAFVFPKESDTSYV 配列番号 1052	025-038
MMP8	KAFVFPKESDTSYVS 配列番号 1053	025-039
MMP8	AFVFPKESDTSYV 配列番号 1056	026-038
MMP8	FVFPKESDTSYV 配列番号 1064	027-038
MMP8	VFPKESDTSYV 配列番号 1068	028-038
MMP8	FPKESDTSYV 配列番号 1221	029-038
MMP8	SLKAPL 配列番号 1222	039-044
MMP8	SLKAPLTKP 配列番号 1074	039-047
MMP8	SLKAPLTKPLKA 配列番号 1223	039-050
MMP8	RGYSIFSIA 配列番号 1224	065-073
MMP8	FSYATKRQDNEILI 配列番号 1225	070-083
MMP8	SYATKRQDNEILI 配列番号 1083	071-083
MMP8	YATKRQDNEILI 配列番号 1085	072-083
MMP8	ATKRQDNEILI 配列番号 1226	073-083
MMP8	TKRQDNEILI 配列番号 1087	074-083
MMP8	TKRQDNEILIF 配列番号 1088	074-084
MMP8	FWSKDIGYS 配列番号 1227	084-092
MMP8	FWSKDIGYSFT 配列番号 1228	084-094
MMP8	FWSKDIGYSFTV 配列番号 1229	084-095
MMP8	WSKDIGYSFTV 配列番号 1230	085-095
MMP8	KSLKKGTVGAEA 配列番号 1231	137-149
MMP8	SLKKGTVGAEA 配列番号 1099	138-149
MMP8	LKKGYTV 配列番号 1101	139-145
MMP8	LKKGYTVGAEA 配列番号 1105	139-149
MMP8	LKKGYTVGAEAS 配列番号 1106	139-150
MMP8	KKGYTVGAEA 配列番号 1232	140-149
MMP8	GAEASIIIGQE 配列番号 1233	146-156
MMP8	GAEASIIIGQE 配列番号 1234	146-158
MMP8	SIILGQE 配列番号 1235	150-158
MMP8	SIILGQE QDSFGNFEGSQ 配列番号 1109	150-168
MMP8	SIILGQE QDSFGNFEGSQS 配列番号 1110	150-169
MMP8	IILGQE QDSFGN 配列番号 1192	151-163

10

20

30

40

【表 2 7 G】

MMP8	IILGQEQDSFGGNFEGSQ 配列番号 1236	151-168
MMP8	IILGQEQDSFGGNFEGSQS 配列番号 1112	151-169
MMP8	ILGQEQDSFGGN 配列番号 1113	152-163
MMP8	ILGQEQDSFGGNFEGS 配列番号 1237	152-167
MMP8	ILGQEQDSFGGNFEGSQ 配列番号 1114	152-168
MMP8	ILGQEQDSFGGNFEGSQS 配列番号 1115	152-169
MMP8	LGQEQDSFGGN 配列番号 1238	153-163
MMP8	LGQEQDSFGGNFEGS 配列番号 1239	153-167
MMP8	LGQEQDSFGGNFEGSQ 配列番号 1116	153-168
MMP8	LGQEQDSFGGNFEGSQS 配列番号 1117	153-169
MMP8	LGQEQDSFGGNFEGSQSL 配列番号 1240	153-170
MMP8	LGQEQDSFGGNFEGSQSLV 配列番号 1241	153-171
MMP8	QDSFGGNFEGSQS 配列番号 1242	157-169
MMP8	SFGGNFEGSQ 配列番号 1243	159-168
MMP8	SFGGNFEGSQS 配列番号 1119	159-169
MMP8	SFGGNFEGSQSLV 配列番号 1244	159-171
MMP8	LVGDIGNVMW 配列番号 1245	170-180
MMP8	INTIYLGGPFSPN 配列番号 1246	189-201
MMP8	TIYLGGPFSPN 配列番号 1247	191-201
MMP8	IYLGGPFSPN 配列番号 1194	192-201
MMP8	YLGPFSPNV 配列番号 1248	193-202
MMP8	YLGPFSPNVLN 配列番号 1124	193-204
MMP8	LGGPFSPNVLN 配列番号 1196	194-204
MMP8	VLNWR 配列番号 1249	202-207
MMP8	VLNWRAL 配列番号 1250	202-208
MMP8	VLNWRALK 配列番号 1251	202-209
MMP8	LNWRAL 配列番号 1128	203-208
MMP8	LNWRALK 配列番号 1129	203-209
MMP8	LNWRALKYEV 配列番号 1252	203-212
MMP8	NWRAL 配列番号 1253	204-208
MMP8	NWRALKY 配列番号 1254	204-210
MMP8	NWRALKYEV 配列番号 1255	204-212
MMP8	NWRALKYEVQ 配列番号 1256	204-213
MMP8	WRALKY 配列番号 1130	205-211
MMP8	WRALKYEVQ 配列番号 1257	205-213
MMP8	WRALKYEVQE 配列番号 1132	205-215
MMP8	RALKYEV 配列番号 1258	206-212
MMP8	RALKYEVQ 配列番号 1259	206-213
MMP8	RALKYEVQE 配列番号 1260	206-215
MMP8	ALKYEV 配列番号 1133	207-212
MMP8	ALKYEVQGEVFTKPQ 配列番号 1261	207-221
MMP8	LKYEVQE 配列番号 1136	208-215
MMP8	LKYEVQGEVFTKPQ 配列番号 1138	208-221
MMP8	KYEVQGEVFTKPQ 配列番号 1141	209-221
MMP8	KYEVQGEVFTKPQLWP 配列番号 1142	209-224
MMP8	YEVQGEVFTKPQ 配列番号 1144	210-221
MMP8	YEVQGEVFTKPQLWP 配列番号 1145	210-224
MMP8	EVQGEVFTKPQ 配列番号 1262	211-221
MMP8	EVQGEVFTKPQLWP 配列番号 1198	211-224
MMP8	VQGEVFTKPQ 配列番号 1146	212-221
MMP8	VQGEVFTKPQLWP 配列番号 1147	212-224
MMP8	QGEVFTKPQ 配列番号 1148	213-221

10

20

30

40

【表 27H】

MMP8	QGEVFTKPQL 配列番号 1263	213-222
MMP8	QGEVFTKPQLWP 配列番号 1264	213-224
MMP8	GEVFTKPQ 配列番号 1150	214-221
MMP8	GEVFTKPQLWP 配列番号 1200	214-224
MMP8	VFTKPQ 配列番号 1153	216-221
MMP8	VFTKPQLWP 配列番号 1203	216-224
MMP8	FTKPQLWP 配列番号 1155	217-224
MMP8	TKPQLWP 配列番号 1156	218-224
ADAMTS-1	ESDTSYVSLK 配列番号 1265	032-041
ADAMTS-1	QEQDSFGGNFEGSQ 配列番号 1266	155-168
ADAMTS-1	QEQDSFGGNFEGSQSLVG 配列番号 1267	155-172
ADAMTS-1	GNFEGSQSLVG 配列番号 1268	162-172
ADAMTS-1	YEVQGEVFT 配列番号 1269	210-218
ADAMTS-1	YEVQGEVFTKPQ 配列番号 1144	210-221
ADAMTS-1	GEVFTKPQ 配列番号 1150	214-221
ADAMTS-8	VFPKESDTSYVS 配列番号 1069	028-039
ADAMTS-8	QEQDSFGGNFEGSQSLVG 配列番号 1267	155-172
ADAMTS-8	EINTIYL 配列番号 1270	188-194
ADAMTS-8	KYEVQ 配列番号 1271	209-213
ADAMTS-8	KYEVQGE 配列番号 1140	209-215
Cat K	FGQTDMSR 配列番号 1034	017-024
Cat K	AFVFPK 配列番号 1033	026-031
Cat K	FVFPK 配列番号 1059	027-031
Cat K	ESDTSYVSLK 配列番号 1265	032-041
Cat K	ESDTSYVSLKAPLT 配列番号 1272	032-045
Cat K	SDTSYVSLK 配列番号 1273	033-041
Cat K	DTSYVSLK 配列番号 1274	034-041
Cat K	STRGYS 配列番号 1080	063-068
Cat K	IFWSKDIG 配列番号 1275	083-090
Cat K	KGYTVGAE 配列番号 1276	141-148
Cat K	AEASII LGQEQDSFG 配列番号 1277	147-161
Cat K	LGQEQDSFG 配列番号 1278	153-161
Cat K	LGQEQDSFGGNFE 配列番号 1279	153-165
Cat K	GQEQDSFG 配列番号 1280	154-161
Cat K	GQEQDSFGGNFE 配列番号 1281	154-165
Cat K	GQEQDSFGGNFEGSQ 配列番号 1282	154-168
Cat K	GQEQDSFGGNFEGSQS 配列番号 1118	154-169
Cat K	QEQDSFGGN 配列番号 1283	155-163
Cat K	QEQDSFGGNFE 配列番号 1284	155-165
Cat K	QEQDSFGGNFEG 配列番号 1285	155-166
Cat K	QEQDSFGGNFEGS 配列番号 1286	155-167
Cat K	QEQDSFGGNFEGSQ 配列番号 1266	155-168
Cat K	QEQDSFGGNFEGSQS 配列番号 1217	155-169
Cat K	GNFEGSQSLV 配列番号 1287	162-171
Cat K	GNFEGSQSLVG 配列番号 1268	162-172
Cat K	GNFEGSQSLVGDIG 配列番号 1288	162-175
Cat K	GSQSLVGDIG 配列番号 1289	166-175
Cat K	GSQSLVGDIGNVN 配列番号 1290	166-178
Cat K	DFVLPDEIN 配列番号 1291	181-190
Cat K	FVLSPDEINT 配列番号 1218	182-191
Cat K	VLPSPDEINT 配列番号 1291	183-191
Cat K	GPFSPNVLN 配列番号 1292	196-204

10

20

30

40

【表 27I】

Cat K	SPNVLNWR 配列番号 1293	199-206
Cat K	KYEVQG 配列番号 1294	209-214
Cat K	YEVQGEVFT 配列番号 1269	210-218
Cat K	YEVQGEVFTKPQ 配列番号 1144	210-221
Cat K	VQGEVFTKPQ 配列番号 1146	212-221
Cat K	GEVFTKPQ 配列番号 1150	214-221
Cat K	EVFTKPQ 配列番号 1151	215-221
Cat S	FGQTDMSR 配列番号 1034	017-024
Cat S	AFVFPKESDTSYVS 配列番号 1057	026-039
Cat S	FVFPKESDTSYVS 配列番号 1065	027-039
Cat S	VFPKESDTSYVS 配列番号 1069	028-039
Cat S	FPKESDTSYVS 配列番号 1071	029-039
Cat S	ESDTSYVSLK 配列番号 1265	032-041
Cat S	TSWESASGIVE 配列番号 1295	116-126
Cat S	KGYTVG 配列番号 1296	141-146
Cat S	QEQDSFGGNFE 配列番号 1284	155-165
Cat S	QEQDSFGGNFEG 配列番号 1285	155-166
Cat S	QEQDSFGGNFEGSQ 配列番号 1266	155-168
Cat S	QEQDSFGGNFEGSQS 配列番号 1217	155-169
Cat S	QEQDSFGGNFEGSQSLV 配列番号 1297	155-171
Cat S	QEQDSFGGNFEGSQSLVG 配列番号 1267	155-172
Cat S	SFGGNFEGSQSLVG 配列番号 1298	159-172
Cat S	GNFEGSQSLVG 配列番号 1268	162-172
Cat S	GNFEGSQSLVGDIG 配列番号 1288	162-175
Cat S	SPDEINTIYL 配列番号 1299	185-194
Cat S	SPDEINTIYLG 配列番号 1300	185-195
Cat S	LGGPFSPNVLN 配列番号 1196	194-204
Cat S	GGPFSPNVLN 配列番号 1301	195-204
Cat S	GPFSPNVLN 配列番号 1292	196-204
Cat S	ALKYE 配列番号 1302	207-211
Cat S	ALKYEVQ 配列番号 1303	207-213
Cat S	YEVQGEVF 配列番号 1304	210-217
Cat S	YEVQGEVFT 配列番号 1269	210-218
Cat S	YEVQGEVFTKPQ 配列番号 1144	210-221
Cat S	YEVQGEVFTKPQLWP 配列番号 1145	210-224
Cat S	VQGEVFTKPQLWP 配列番号 1147	212-224
Cat S	GEVFTKPQ 配列番号 1150	214-221
Cat S	GEVFTKPQLWP 配列番号 1200	214-224
Cat S	EVFTKPQLWP 配列番号 1152	215-224
Cat S	TKPQLWP 配列番号 1156	218-224
Cat S	KPQLWP 配列番号 1157	219-224

* CRPの配列中の番号

【0100】

従って、本発明の方法では、前記ペプチド断片は、好ましくは、表 20 中の CRP の上記部分配列のいずれか 1 つの * 記号で示される部位での、または表 21 中の CRP の任意の部分配列のいずれかの末端での、プロテアーゼによる CRP の切断によって形成されるネオエピトープを含む。

【0101】

免疫学的結合パートナーは、CRP の切断によって形成される C 末端または N 末端ネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【0102】

適切な免疫学的結合パートナーは、従って、ペプチドの N 末端の以下の配列のいずれかと、またはペプチドの C 末端の以下の配列のいずれかと特異的に反応性であり得る：

【0103】

10

20

30

40

50

【表 2 8】

表 2 2. プロテアーゼによって生成されるCRPのペプチド断片のN末端配列

CRP		
AFVFPK 配列番号 1033	SFGGNF 配列番号 1305	FGQDM 配列番号 1306
VSLKAP 配列番号 1172	KAFVFP 配列番号 1167	EVFTKP 配列番号 1201
TDMSRK 配列番号 1307	MSRKAF 配列番号 1308	SRKAFV 配列番号 1309
VFPKES 配列番号 1310	FPKESD 配列番号 1311	KESDTS 配列番号 1312
LSSTRG 配列番号 1313	SSTRGY 配列番号 1314	STRGYS 配列番号 1080
KRQDNE 配列番号 1315	WSKDIG 配列番号 1316	SKDIGY 配列番号 1317
SIILGQ 配列番号 1318	IILGQE 配列番号 1319	ILGQEQ 配列番号 1320
IYLGGP 配列番号 1321	YLGPPF 配列番号 1322	LGGPFS 配列番号 1323
ALKYEV 配列番号 1133	KYEVQG 配列番号 1294	VQGEVF 配列番号 1324
KPQLWP 配列番号 1157	YTELSS 配列番号 1325	ILIFWS 配列番号 1326
LVGDIG 配列番号 1327	QEQDSF 配列番号 1328	RGYSIF 配列番号 1329
GAEASI 配列番号 1330	QDSFGG 配列番号 1331	TIYLG 配列番号 1332
EINTIY 配列番号 1333	DSYVS 配列番号 1334	AEASII 配列番号 1335
TSWESA 配列番号 1336	SPDEIN 配列番号 1337	GGPFSP 配列番号 1338
YEVQGE 配列番号 1339	FVLSPD 配列番号 1340	LKKGYT 配列番号 1341
RKAFVF 配列番号 1342	IVEFWV 配列番号 1343	ESDTSY 配列番号 1344
TKPQLW 配列番号 1345	EVQGEV 配列番号 1346	FVFPK 配列番号 1059
SDTSYV 配列番号 1347	SLKAPL 配列番号 1222	LKAPLT 配列番号 1173
IFSYAT 配列番号 1348	SYATKR 配列番号 1349	YATKRQ 配列番号 1350
EFWVDG 配列番号 1351	WVDGKP 配列番号 1352	VDGKPR 配列番号 1353
LGQEQD 配列番号 1354	GQEQDS 配列番号 1355	QSLVGD 配列番号 1356
SPNVLN 配列番号 1357	LNWRA 配列番号 1127	LNWRAL 配列番号 1128
QGEVFT 配列番号 1358	GEVFTK 配列番号 1359	VFTKPQ 配列番号 1153
IFWSKD 配列番号 1181	VRKSLK 配列番号 1205	KKGYTV 配列番号 1360
FSYATK 配列番号 1361	ATKRQD 配列番号 1362	FWSKDI 配列番号 1363
VLNwRA 配列番号 1249	NWRAL 配列番号 1253	NWRALK 配列番号 1364
GSQSLV 配列番号 1365	DFVLSP 配列番号 1366	VLSPDE 配列番号 1367
LKYEVD 配列番号 1134	TKRQDN 配列番号 1368	KGYTVG 配列番号 1296
GNFEGS 配列番号 1369	SLKKGY 配列番号 1370	KSLKKG 配列番号 1371
FVFPKE 配列番号 1060	INTIYL 配列番号 1372	RALKYE 配列番号 1373
FYTELS 配列番号 1374	WRALKY 配列番号 1375	GPFSN 配列番号 1376

10

20

30

【 0 1 0 4 】

【表 2 9】

表 2 3. プロテアーゼによって生成されるCRPのペプチド断片のC末端配列

CRP		
AFVFPK 配列番号 1033	KPQLWP 配列番号 1157	PDEINT 配列番号 1377
SPDEIN 配列番号 1337	DSFGGN 配列番号 1378	VFTKPQ 配列番号 1153
KESDTS 配列番号 1312	SDTSYV 配列番号 1347	DTSYVS 配列番号 1334
LTKPLK 配列番号 1379	STRGYS 配列番号 1080	YATKRQ 配列番号 1350
KDIGYS 配列番号 1380	DGKPRV 配列番号 1381	VDGKPR 配列番号 1353
GAEASI 配列番号 1330	QGEVFT 配列番号 1358	NFEGSQ 配列番号 1382
SPNVLN 配列番号 1357	GPFSNP 配列番号 1376	RALKYE 配列番号 1373
ALKYEV 配列番号 1133	YEVQGE 配列番号 1339	LKYEVS 配列番号 1134
KAFVFP 配列番号 1167	VSLKAP 配列番号 1172	LKAPLT 配列番号 1173
LKKGYT 配列番号 1341	LGQEQD 配列番号 1354	NVNMWD 配列番号 1383
PRVRKS 配列番号 1384	TVGSEI 配列番号 1385	SRKAFV 配列番号 1309
GYSFTV 配列番号 1386	IILGQE 配列番号 1319	EGSQSL 配列番号 1387
INTIYL 配列番号 1372	WSKDIG 配列番号 1316	EQDSFG 配列番号 1388
NVLNWR 配列番号 1389	ASGIVE 配列番号 1390	NTIYLG 配列番号 1391
VGAEAS 配列番号 1392	APLTKP 配列番号 1393	FVFPKE 配列番号 1060
QTDMSR 配列番号 1394	TDMSRK 配列番号 1307	MSRKAF 配列番号 1308
PKESDT 配列番号 1395	TSYVSL 配列番号 1396	ESDTSY 配列番号 1344
DNEILI 配列番号 1397	QDNEIL 配列番号 1398	NEILIF 配列番号 1399
YTVGAE 配列番号 1400	TVGAEA 配列番号 1401	PFSPNV 配列番号 1402
FEGSQS 配列番号 1403	GNFEGS 配列番号 1369	DIGNVN 配列番号 1404
LNWRA 配列番号 1127	LNWRAL 配列番号 1128	NWRALK 配列番号 1364
KYEVQG 配列番号 1294	EVFTKP 配列番号 1201	VFTKPQ 配列番号 1153
KRQDNE 配列番号 1315	RQDNEI 配列番号 1405	IFWSKD 配列番号 1181
FTKPQL 配列番号 1406	VRKSLK 配列番号 1205	SYVSLK 配列番号 1407
SLKAPL 配列番号 1222	TKPLKA 配列番号 1408	SIFSVA 配列番号 1409
GSQSLV 配列番号 1365	GNVNMW 配列番号 1410	SQSLVG 配列番号 1411
FGGNFE 配列番号 1412	GGNFEG 配列番号 1413	LVGDIG 配列番号 1327
VQGEVF 配列番号 1324	GKPRVR 配列番号 1414	FWSKDI 配列番号 1363
DMSRKA 配列番号 1415	EILIFW 配列番号 1416	KKGYTV 配列番号 1360
FPKESD 配列番号 1311	IGYSFT 配列番号 1417	

【0105】

エラスチン

いくつかの候補プロテアーゼは、線維性組織中のエラスチンの消化に関与し得る。本発明者らは、純粋な天然タンパク質の様々なインビトロ切断を通して、以下の表に列挙する酵素が、少なくとも以下の配列の各末端の切断部位で、または「・」で示す切断部位で、または「・」が示されていない場合は配列の末端でエラスチンを切断すると判定した。

【0106】

【表 3 0 A】

表 2 4 : 特異的プロテアーゼによって生成されるエラスチン断片

プロテアーゼ	切断部位の間の配列	番号 *
MMP9+12	GVPGAIPGGVPG 配列番号 1418	028-039
MMP9+12	AIPGGVPGGVFYPGAGLG 配列番号 1419	032-049
MMP9+12	AIPGGVPGGVFYPGAGLGA 配列番号 1420	032-050
MMP9+12	GVPGGVFYPGAGLGA 配列番号 1421	036-050
MMP9+12	GVPGGVFYPGAGLGALG 配列番号 1422	036-052
MMP9+12	VPGGVFYPGAGLGALGG 配列番号 1423	037-053
MMP9+12	GVFYPGAGLGALGGGALGPGG 配列番号 1424	040-060
MMP9+12	VFYPGAGLG 配列番号 1425	041-049
MMP9+12	VFYPGAGLGA 配列番号 1426	041-050
MMP9+12	VFYPGAGLGAL 配列番号 1427	041-051
MMP9+12	VFYPGAGLGALG 配列番号 1428	041-052
MMP9+12	VFYPGAGLGALGG 配列番号 1429	041-053
MMP9+12	VFYPGAGLGALGGG 配列番号 1430	041-054
MMP9+12	VFYPGAGLGALGGGAL 配列番号 1431	041-056
MMP9+12	VFYPGAGLGALGGGALG 配列番号 1432	041-057
MMP9+12	VFYPGAGLGALGGGALGPG 配列番号 1433	041-059
MMP9+12	VFYPGAGLGALGGGALGPGG 配列番号 1434	041-060
MMP9+12	VFYPGAGLGALGGGALGPGGKPLKPVPVG 配列番号 1435	041-069
MMP9+12	LGALGGGALGPGGKPLKPVPVG 配列番号 1436	048-069
MMP9+12	ALGGGALGPGGKPLKPVPVG 配列番号 1437	050-069
MMP9+12	LGGGALGPGGKPLKPVPG 配列番号 1438	051-068
MMP9+12	LGGGALGPGGKPLKPVPVG 配列番号 1439	051-069
MMP9+12	GGALGPGGKPLKPVPVG 配列番号 1440	053-069
MMP9+12	LGPGGKPLKPVPVG 配列番号 1441	056-069
MMP9+12	GPGGKPLKPVPVG 配列番号 1442	057-069
MMP9+12	PGGKPLKPVPVG 配列番号 1443	058-069
MMP9+12	GKPLKPVPVG 配列番号 1444	060-069
MMP9+12	PLKPVPVG 配列番号 1445	062-069
MMP9+12	LKPVPVG 配列番号 配列番号 1446	063-069
MMP9+12	GLAGAGLGAGLGAFP 配列番号 1447	069-083
MMP9+12	GLAGAGLGAGLGAFPA 配列番号 1448	069-084
MMP9+12	LAGAGLGAGLG 配列番号 1449	070-080
MMP9+12	LAGAGLGAGLGAFP 配列番号 1450	070-083
MMP9+12	LAGAGLGAGLGAFPA 配列番号 1451	070-084
MMP9+12	LAGAGLGAGLGAFPAVT 配列番号 1452	070-086
MMP9+12	LAGAGLGAGLGAFPAVTFG 配列番号 1453	070-089
MMP9+12	LAGAGLGAGLGAFPAVTFGA 配列番号 1454	070-090
MMP9+12	LAGAGLGAGLGAFPAVTFGALVPGG 配列番号 1455	070-095
MMP9+12	LAGAGLGAGLGAFPAVTFGALVPGGVA 配列番号 1456	070-097
MMP9+12	LAGAGLGAGLGAFPAVTFGALVPGGVADAAAA 配列番号 1457	070-102

10

20

30

40

【表 3 0 B】

MMP9+12	AGAGLGAGLGAFPAVTFPGALVPGG 配列番号 1458	071-095
MMP9+12	GAGLGAGLGAFPA 配列番号 1459	072-084
MMP9+12	GAGLGAGLGAFPAVTFPGA 配列番号 1460	072-090
MMP9+12	AGLGAGLGAFPA 配列番号 1461	073-084
MMP9+12	GLGAGLGAFPA 配列番号 1462	074-084
MMP9+12	LGAGLGAFPA 配列番号 1463	075-084
MMP9+12	LGAGLGAFPAVTFPGA 配列番号 1464	075-090
MMP9+12	LGAGLGAFPAVTFPGALVPGG 配列番号 1465	075-095
MMP9+12	LGAGLGAFPAVTFPGALVPGGVADAAAA 配列番号 1466	075-102
MMP9+12	AGLGAFPAVTFPG 配列番号 1467	077-089
MMP9+12	LGAFPAVTFPGA 配列番号 1468	079-090
MMP9+12	LGAFPAVTFPGALVPGGVA 配列番号 1469	079-097
MMP9+12	LGAFPAVTFPGALVPGGVADAAAA 配列番号 1470	079-102
MMP9+12	AFPAVTFPGALVPGG 配列番号 1471	081-095
MMP9+12	AVTFPGALVPGG 配列番号 1472	084-095
MMP9+12	AVTFPGALVPGGVADAAAA 配列番号 1473	084-102
MMP9+12	VTTFPGALVPGG 配列番号 1474	085-095
MMP9+12	VTTFPGALVPGGVADAAAA 配列番号 1475	085-102
MMP9+12	LVPGGVADAAAA 配列番号 1476	091-102
MMP9+12	LVPGGVADAAAAAYK 配列番号 1477	091-104
MMP9+12	VADAAAAAYK 配列番号 1478	096-104
MMP9+12	KAAGA 配列番号 1479	104-110
MMP9+12	LGVSAGAVVPQPGA 配列番号 1480	121-134
MMP9+12	VPGVGLPGVYPGGVLPGAR 配列番号 1481	141-159
MMP9+12	PGVGLPGVYPGGVLPGAR 配列番号 1482	142-159
MMP9+12	GLPGVYPGGVLPGAR 配列番号 1483	145-159
MMP9+12	PGVYPGGVLPGAR 配列番号 1484	147-159
MMP9+12	ARFPGVG 配列番号 1485	158-164
MMP9+12	ARFPGVGLPG 配列番号 1486	158-168
MMP9+12	RFPVGLPGVPTGAG 配列番号 1487	159-174
MMP9+12	FPGVGLPGVPTG 配列番号 1488	160-172
MMP9+12	FPGVGLPGVPTGA 配列番号 1489	160-173
MMP9+12	FPGVGLPGVPTGAGV 配列番号 1490	160-175
MMP9+12	FPGVGLPGVPTGAGVKPK 配列番号 1491	160-178
MMP9+12	KPKAPGV 配列番号 1492	176-182
MMP9+12	PKAPGV 配列番号 1493	177-182
MMP9+12	GAFAGIPGVPGFPG 配列番号 1494	184-196
MMP9+12	VPGFPGPQPGVPLGYP 配列番号 1495	192-207
MMP9+12	GPQPGVPLGYP 配列番号 1496	197-207
MMP9+12	PQPGVPLGYP 配列番号 1497	198-207
MMP9+12	PGVPLGYP 配列番号 1498	200-207
MMP9+12	GYPIKAPK 配列番号 1499	205-212
MMP9+12	PKLPGGY 配列番号 1500	211-217
MMP9+12	YTTGKLPGYGP 配列番号 1501	221-233
MMP9+12	YTTGKLPGYGPGGVAGAAGK 配列番号 1502	221-241
MMP9+12	TTGKLPGYG 配列番号 1503	222-231

10

20

30

40

【表 3 0 C】

MMP9+12	TTGKLPYGYGPGGVAGAAGK 配列番号 1504	222-241
MMP9+12	LPYGYGPGGVAGAAGK 配列番号 1505	226-241
MMP9+12	GYGPGGVAGAAGK 配列番号 1506	229-241
MMP9+12	YGP GG VAGAAGK 配列番号 1507	230-241
MMP9+12	AGYPTGTGVPQAAAAAAK 配列番号 1508	242-261
MMP9+12	TGVGPQAAAAAAK 配列番号 1509	248-261
MMP9+12	PQAAAAAAK 配列番号 1510	252-261
MMP9+12	FGAGAAGVLPVGGAGVPGVPGAIPGIGG 配列番号 1511	266-294
MMP9+12	FGAGAAGVLPVGGAGVPGVPGAIPGIGGIAGVGTPAA 配列番号 1512	266-303
MMP9+12	GVLPVGGAGVPGVPG 配列番号 1513	272-287
MMP9+12	VLPGVGGAGVPGVPGAIPGIGG 配列番号 1514	273-294
MMP9+12	VLPGVGGAGVPGVPGAIPGIGGIAGVGTPA 配列番号 1515	273-302
MMP9+12	VLPGVGGAGVPGVPGAIPGIGGIAGVGTPAA 配列番号 1516	273-303
MMP9+12	GAGVPGVPGAIPG 配列番号 1517	279-291
MMP9+12	GAGVPGVPGAIPGIGGIAGVG 配列番号 1518	279-299
MMP9+12	AGVPGVPGAIPGIG 配列番号 1519	280-293
MMP9+12	AGVPGVPGAIPGIGG 配列番号 1520	280-294
MMP9+12	AGVPGVPGAIPGIGGIAG 配列番号 1521	280-297
MMP9+12	AGVPGVPGAIPGIGGIAGVGTPA 配列番号 1522	280-302
MMP9+12	GVPGVPGAIPGIGG 配列番号 1523	281-294
MMP9+12	GVPGVPGAIPGIGGIA 配列番号 1524	281-296
MMP9+12	GVPGVPGAIPGIGGIAGVG 配列番号 1525	281-299
MMP9+12	VPGVPGAIPGIGG 配列番号 1526	282-294
MMP9+12	GVPGAIPGIGGIAGVGTPA 配列番号 1527	284-302
MMP9+12	VPGAIPGIGGIAGVG 配列番号 1528	285-299
MMP9+12	VPGAIPGIGGIAGVGTPA 配列番号 1529	285-302
MMP9+12	VPGAIPGIGGIAGVGTPAAA 配列番号 1530	285-304
MMP9+12	VPGAIPGIGGIAGVGTPAAAAAAK 配列番号 1531	285-312
MMP9+12	AIPGIGGIAGVG 配列番号 1532	288-299
MMP9+12	AIPGIGGIAGVGTPA 配列番号 1533	288-302
MMP9+12	AIPGIGGIAGVGTPAA 配列番号 1534	288-303
MMP9+12	AIPGIGGIAGVGTPAAA 配列番号 1535	288-304
MMP9+12	AIPGIGGIAGVGTPAAAAA 配列番号 1536	288-307
MMP9+12	AIPGIGGIAGVGTPAAAAAAK 配列番号 1537	288-312
MMP9+12	IPGIGGIAGVGTPAAA 配列番号 1538	289-304
MMP9+12	IGGIAGVGTPAAA 配列番号 1539	292-305
MMP9+12	GIAGVGTPAAA 配列番号 1540	294-305
MMP9+12	GIAGVGTPAAAAA 配列番号 1541	294-309
MMP9+12	GIAGVGTPAAAAAAK 配列番号 1542	294-312
MMP9+12	IAGVGTPAAAAA 配列番号 1543	295-309
MMP9+12	IAGVGTPAAAAA 配列番号 1544	295-310
MMP9+12	IAGVGTPAAAAAAK 配列番号 1545	295-312
MMP9+12	TPAAAAAAK 配列番号 1546	300-312
MMP9+12	PAAAAAAK 配列番号 1547	301-312
MMP9+12	AAAAAAK 配列番号 1548	302-312
MMP9+12	AAAAAAK 配列番号 1549	303-312

10

20

30

40

【表 3 0 D】

MMP9+12	AAAAAAAK 配列番号 1550	304-312
MMP9+12	AAAAAAAKA 配列番号 1551	304-313
MMP9+12	AAAAAAAK 配列番号 1552	305-312
MMP9+12	LVPGGPGFPGVGVGPGA 配列番号 1553	322-339
MMP9+12	GPFGPGVGVGPG 配列番号 1554	326-338
MMP9+12	GPFGPGVGVGPGAGVPGVG 配列番号 1555	326-345
MMP9+12	GPFGPGVGVGPGAGVPGVGPGAGIPVVP 配列番号 1556	326-356
MMP9+12	PGFGPGVGVGPG 配列番号 1557	327-338
MMP9+12	PGFGPGVGVGPGA 配列番号 1558	327-339
MMP9+12	PGFGPGVGVGPGAG 配列番号 1559	327-340
MMP9+12	PGVGVGPGAGVPG 配列番号 1560	331-343
MMP9+12	PGVGVGPGAGVPGVG 配列番号 1561	331-348
MMP9+12	PGVGVGPGAGVPGVGPGAGIPVVP 配列番号 1562	331-357
MMP9+12	VGVGPGAGVPGVGPGA 配列番号 1563	333-349
MMP9+12	VGVGPGAGVPGVGPGAGIPVVP 配列番号 1564	334-372
MMP9+12	AGVPGVGVGPGAGIPVVP 配列番号 1565	339-356
MMP9+12	GVPGVGPGAGIPVVP 配列番号 1566	340-356
MMP9+12	GVPGVGPGAGIPVVP 配列番号 1567	340-357
MMP9+12	VPGVGVGPGAGIPVVP 配列番号 1568	341-356
MMP9+12	VGVGPGAGIPVVP 配列番号 1569	344-356
MMP9+12	VGVGPGAGIPVVP 配列番号 1570	344-361
MMP9+12	VPGAGIPVVP 配列番号 1571	346-356
MMP9+12	AGIPVVP 配列番号 1572	349-361
MMP9+12	AGIPVVP 配列番号 1573	349-375
MMP9+12	GIPVVP 配列番号 1574	350-361
MMP9+12	IPGAAVPGVVSPEAAK 配列番号 1575	359-375
MMP9+12	GAAVPGVVSPEAAK 配列番号 1576	361-375
MMP9+12	AVPGVVSPEAAK 配列番号 1577	363-375
MMP9+12	VPGVVSPEAAK 配列番号 1578	364-375
MMP9+12	YGARPGVG 配列番号 1579	383-390
MMP9+12	YGARPGVG 配列番号 1580	383-392
MMP9+12	YGARPGVGGIPT 配列番号 1581	383-396
MMP9+12	YGARPGVGGIPTY 配列番号 1582	383-397
MMP9+12	YGARPGVGGIPTYG 配列番号 1583	383-398
MMP9+12	YGARPGVGGIPTYGVG 配列番号 1584	383-400
MMP9+12	YGARPGVGGIPTYGVGA 配列番号 1585	383-401
MMP9+12	YGARPGVGGIPTYGVGAG 配列番号 1586	383-402
MMP9+12	GARPGVG 配列番号 1587	384-391
MMP9+12	GARPGVG 配列番号 1588	384-393
MMP9+12	GARPGVG 配列番号 1589	384-395
MMP9+12	GARPGVGGIPTY 配列番号 1590	384-397
MMP9+12	GARPGVGGIPTYGV 配列番号 1591	384-399
MMP9+12	GARPGVGGIPTYGVG 配列番号 1592	384-400
MMP9+12	GARPGVGGIPTYGVGAGGF 配列番号 1593	384-404
MMP9+12	GARPGVGGIPTYGVGAGGFP 配列番号 1594	384-407
MMP9+12	GARPGVGGIPTYGVGAGGFP 配列番号 1595	384-408

10

20

30

40

【表 3 0 E】

MMP9+12	GARPGVGVGGIPTYGVGAGGFPFGVGVG 配列番号 1596	384-412
MMP9+12	ARPGVGVGG 配列番号 1597	385-393
MMP9+12	ARPGVGVGGIP 配列番号 1598	385-395
MMP9+12	ARPGVGVGGIPTY 配列番号 1599	385-397
MMP9+12	ARPGVGVGGIPTYGVGA 配列番号 1600	385-401
MMP9+12	ARPGVGVGGIPTYGVGAGG 配列番号 1601	385-403
MMP9+12	ARPGVGVGGIPTYGVGAGGFPG 配列番号 1602	385-406
MMP9+12	ARPGVGVGGIPTYGVGAGGFPGF 配列番号 1603	385-407
MMP9+12	RPGVGVG 配列番号 1604	386-392
MMP9+12	RPGVGVGG 配列番号 1605	386-393
MMP9+12	PGVGVGGIPTY 配列番号 1606	387-397
MMP9+12	PGVGVGGIPTYG 配列番号 1607	387-398
MMP9+12	PGVGVGGIPTYGVGAG 配列番号 1608	387-412
MMP9+12	VGGIPTYGVGAG 配列番号 1609	391-402
MMP9+12	GVGAGGFPFGVGVGGIPGVA 配列番号 1610	398-418
MMP9+12	VGAGGFPFGVGVG 配列番号 1611	399-412
MMP9+12	VGVGGIPGVAGVPSVGGVPGVGVPGVGISPEA 配列番号 1612	409-441
MMP9+12	VAGVPSVGGVPGVGVPGV 配列番号 1613	417-434
MMP9+12	VAGVPSVGGVPGVGVPGVGVGISPEA 配列番号 1614	417-441
MMP9+12	SVGGVPGVGVPGVGVGISPEA 配列番号 1615	422-441
MMP9+12	VGGVPGVGVPGVGVGISPEA 配列番号 1616	423-441
MMP9+12	GVPGVGGVPGVGVIS 配列番号 1617	425-438
MMP9+12	GVPGVGGVPGVGVGISPEA 配列番号 1618	425-441
MMP9+12	GVPGVGGVPGVGVGISPEAQA 配列番号 1619	425-443
MMP9+12	GVPGVGVISPEAQAATAAK 配列番号 1620	431-448
MMP9+12	GVGTAAAAAK 配列番号 1621	482-492
MMP9+12	TPAAAAAK 配列番号 1622	485-492
MMP9+12	FGLVPGVGVAPGVG 配列番号 1623	500-513
MMP9+12	FGLVPGVGVAPGVGVAPG 配列番号 1624	500-517
MMP9+12	FGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPG 配列番号 1625	500-523
MMP9+12	FGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVG 配列番号 1626	500-525
MMP9+12	FGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPG 配列番号 1627	500-529
MMP9+12	FGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPG 配列番号 1628	500-535
MMP9+12	FGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGV 配列番号 1629	500-536
MMP9+12	FGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPG 配列番号 1630	500-541
MMP9+12	GLVPGVGVAPG 配列番号 1631	501-511
MMP9+12	GLVPGVGVAPGV 配列番号 1632	501-512
MMP9+12	GLVPGVGVAPGVGVA 配列番号 1633	501-515
MMP9+12	GLVPGVGVAPGVGVAP 配列番号 1634	501-516
MMP9+12	GLVPGVGVAPGVGVAPG 配列番号 1635	501-517
MMP9+12	GLVPGVGVAPGVGVAPGVG 配列番号 1636	501-519
MMP9+12	GLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPG 配列番号 1637	501-523
MMP9+12	GLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVL 配列番号 1638	501-524
MMP9+12	GLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLA 配列番号 1639	501-525
MMP9+12	GLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPG 配列番号 1640	501-527
MMP9+12	GLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVG 配列番号 1641	501-529

10

20

30

40

【表 3 0 F】

MMP9+12	GLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVA 配列番号 1642	501-531
MMP9+12	GLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPG 配列番号 1643	501-533
MMP9+12	LVPGVGVAPGVG 配列番号 1644	502-513
MMP9+12	LVPGVGVAPGVGVAPG 配列番号 1645	502-517
MMP9+12	LVPGVGVAPGVGVAPGVG 配列番号 1646	502-519
MMP9+12	LVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVG 配列番号 1647	502-525
MMP9+12	LVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVG 配列番号 1648	502-537
MMP9+12	PGVGVAPGVGVAPG 配列番号 1649	504-517
MMP9+12	VGVPAGVGVAPGVGV 配列番号 1650	506-520
MMP9+12	VGVPAGVGVAPGVGVAPGVG 配列番号 1651	506-525
MMP9+12	VGVPAGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPG 配列番号 1652	506-535
MMP9+12	VAPGVGVAPGVGVAPG 配列番号 1653	508-523
MMP9+12	VAPGVGVAPGVGVAPGVG 配列番号 1654	508-525
MMP9+12	VAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVG 配列番号 1655	508-531
MMP9+12	VAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPG 配列番号 1656	508-535
MMP9+12	VGVPAGVGVAPGVGLA 配列番号 1657	512-527
MMP9+12	VGVPAGVGVAPGVGLAPGVGVAPG 配列番号 1658	512-535
MMP9+12	VGVPAGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVPAGIGPGG 配列番号 1659	512-552
MMP9+12	VAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVG 配列番号 1660	514-537
MMP9+12	VAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVGVA 配列番号 1661	514-539
MMP9+12	VAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPG 配列番号 1662	514-541
MMP9+12	VAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGIGP 配列番号 1663	514-550
MMP9+12	VAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGIGPGG 配列番号 1664	514-552
MMP9+12	PGVGVAPGVGLAPG 配列番号 1665	516-529
MMP9+12	PGVGVAPGVGLAPGVGVAP 配列番号 1666	516-534
MMP9+12	PGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVG 配列番号 1667	516-537
MMP9+12	VGVPAGVGLAPGVGVA 配列番号 1668	518-533
MMP9+12	VGVPAGVGLAPGVGVAP 配列番号 1669	518-534
MMP9+12	VGVPAGVGLAPGVGVAPGVGVAPG 配列番号 1670	518-541
MMP9+12	VGVPAGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVG 配列番号 1671	518-543
MMP9+12	VGVPAGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPG 配列番号 1672	518-547
MMP9+12	VGVPAGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGIGPGG 配列番号 1673	518-552
MMP9+12	GVAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGIGPGG 配列番号 1674	519-552
MMP9+12	VAPGVGLAPGVGVA 配列番号 1675	520-533
MMP9+12	VAPGVGLAPGVGVAPG 配列番号 1676	520-535
MMP9+12	VAPGVGLAPGVGVAPGVG 配列番号 1677	520-537
MMP9+12	VAPGVGLAPGVGVAPGVGVA 配列番号 1678	520-539
MMP9+12	VAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPG 配列番号 1679	520-541
MMP9+12	VAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVA 配列番号 1680	520-545
MMP9+12	VAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGIGPGG 配列番号 1681	520-552
MMP9+12	PGVGLAPGVGVAPG 配列番号 1682	522-535
MMP9+12	GVGLAPGVGVAPGVGVAPG 配列番号 1683	523-541
MMP9+12	VGLAPGVGVAPGVG 配列番号 1684	524-537
MMP9+12	VGLAPGVGVAPGVGVAPG 配列番号 1685	524-541
MMP9+12	VGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGIG 配列番号 1686	524-549
MMP9+12	VGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGIGPGG 配列番号 1687	524-552

10

20

30

40

【表 3 0 G】

MMP9+12	VGLAPGVGAPGVGAPGVGAPGIGPG 配列番号 1688	524-553
MMP9+12	VGLAPGVGAPGVGAPGVGAPGIGPGGAAA 配列番号 1689	524-556
MMP9+12	LAPGVGAPGVGAPGVG 配列番号 1690	526-543
MMP9+12	LAPGVGAPGVGAPGVGVA 配列番号 1691	526-545
MMP9+12	LAPGVGAPGVGAPGVGAPGIGP 配列番号 1692	526-550
MMP9+12	LAPGVGAPGVGAPGVGAPGIGPGG 配列番号 1693	526-552
MMP9+12	GVGAPGVGAPGVGAPGIGPGG 配列番号 1694	529-552
MMP9+12	VGAPGVGAPGVGVA 配列番号 1695	530-545
MMP9+12	VGAPGVGAPGVGAPG 配列番号 1696	530-547
MMP9+12	VGAPGVGAPGVGAPGIGPG 配列番号 1697	530-551
MMP9+12	VGAPGVGAPGVGAPGIGPGG 配列番号 1698	530-552
MMP9+12	VGAPGVGAPGVGAPGIGPGGAAA 配列番号 1699	530-556
MMP9+12	VAPGVGAPGVGAP 配列番号 1700	532-546
MMP9+12	VAPGVGAPGVGAPGIG 配列番号 1701	532-549
MMP9+12	VAPGVGAPGVGAPGIGPGG 配列番号 1702	532-552
MMP9+12	PGVGAPGVGAPGIGPG 配列番号 1703	534-551
MMP9+12	PGVGAPGVGAPGIGPGG 配列番号 1704	534-552
MMP9+12	VGAPGVGAPGIGPGG 配列番号 1705	536-552
MMP9+12	VGAPGVGAPGIGPGGAAA 配列番号 1706	536-555
MMP9+12	VAPGVGAPGIGPG 配列番号 1707	538-551
MMP9+12	PGVGAPGIGPG 配列番号 1708	540-551
MMP9+12	VGAPGIGPGGAAA 配列番号 1709	542-555
MMP9+12	PGGAAAAK 配列番号 1710	550-558
MMP9+12	LRAAAGL 配列番号 1711	569-575
MMP9+12	LRAAAGLG 配列番号 1712	569-576
MMP9+12	LRAAAGLGA 配列番号 1713	569-577
MMP9+12	AAAGLGAGIPGLGVG 配列番号 1714	571-585
MMP9+12	AAAGLGAGIPGLGVGVG 配列番号 1715	571-587
MMP9+12	LGAGIPGLGVG 配列番号 1716	575-585
MMP9+12	LGAGIPGLGVGVG 配列番号 1717	575-587
MMP9+12	LGAGIPGLGVGVGPGLGVG 配列番号 1718	575-594
MMP9+12	LGAGIPGLGVGVGPGLGVG 配列番号 1719	575-590
MMP9+12	LGAGIPGLGVGVGPGLGVGA 配列番号 1720	575-595
MMP9+12	LGAGIPGLGVGVGPGL 配列番号 1721	575-591
MMP9+12	LGAGIPGLGVGVGPPLG 配列番号 1722	575-592
MMP9+12	LGAGIPGLGVGVGPPLGVGAGVPG 配列番号 1723	575-599
MMP9+12	LGAGIPGLGVGVGPPLGVGAGVPGLG 配列番号 1724	575-601
MMP9+12	LGAGIPGLGVGVGPPLGVGAGVPGLGVG 配列番号 1725	575-603
MMP9+12	LGAGIPGLGVGVGPPLGVGAGVPPLGVGAGVPGFG 配列番号 1726	575-610
MMP9+12	GAGIPGLGVGVGPPLG 配列番号 1727	576-592
MMP9+12	AGIPGLGVGVGPGLG 配列番号 1728	577-590
MMP9+12	GIPGLGVGVGPPLGVGA 配列番号 1729	578-595
MMP9+12	LGVGVPPLGVGA 配列番号 1730	582-595
MMP9+12	VGVPPLGVGAGVPG 配列番号 1731	586-599
MMP9+12	VGVPPLGVGAGVPGL 配列番号 1732	586-600
MMP9+12	VGVPPLGVGAGVPPLG 配列番号 1733	586-601

10

20

30

40

【表 3 0 H】

MMP9+12	VGVPGLGVGAGVPGLGVG 配列番号 1734	586-603
MMP9+12	VGVPGLGVGAGVPGLGVGA 配列番号 1735	586-604
MMP9+12	VGAGVPGLGVGAGVPGFG 配列番号 1736	593-610
MMP9+12	PGALAAAK 配列番号 1737	646-653
MMP9+12	AKYGAAPGVLGGLGA 配列番号 1738	655-670
MMP9+12	YGAAVPGVLGG 配列番号 1739	657-667
MMP9+12	YGAAVPGVLGGLG 配列番号 1740	657-669
MMP9+12	YGAAVPGVLGGLGA 配列番号 1741	657-670
MMP9+12	YGAAVPGVLGGLGALG 配列番号 1742	657-672
MMP9+12	YGAAVPGVLGGLGALGGVGIPGG 配列番号 1743	657-679
MMP9+12	YGAAVPGVLGGLGALGGVGIPGGVVGAGPAA 配列番号 1744	657-687
MMP9+12	GAAPGVLGGLG 配列番号 1745	658-669
MMP9+12	GAAPGVLGGLGALGGVGIPGG 配列番号 1746	658-679
MMP9+12	AVPGVLGGLGA 配列番号 1747	660-670
MMP9+12	AVPGVLGGLGALGGVGIPGG 配列番号 1748	660-679
MMP9+12	VLGGLGALGGVGIPGG 配列番号 1749	664-679
MMP9+12	GGLGALGGVGIPGGVVGAGPA 配列番号 1750	666-686
MMP9+12	GGLGALGGVGIPGGVVGAGPAAA 配列番号 1751	666-688
MMP9+12	LGALGGVGIPGG 配列番号 1752	668-379
MMP9+12	LGALGGVGIPGGVVGAGPA 配列番号 1753	668-686
MMP9+12	LGALGGVGIPGGVVGAGPAA 配列番号 1754	668-687
MMP9+12	LGALGGVGIPGGVVGAGPAAA 配列番号 1755	668-688
MMP9+12	LGALGGVGIPGGVVGAGPAAAA 配列番号 1756	668-689
MMP9+12	ALGGVGIPGGVVGAGPAA 配列番号 1757	670-687
MMP9+12	ALGGVGIPGGVVGAGPAAA 配列番号 1758	670-688
MMP9+12	LGGVGIPGGV 配列番号 1759	671-680
MMP9+12	LGGVGIPGGVVGAGPA 配列番号 1760	671-686
MMP9+12	LGGVGIPGGVVGAGPAAA 配列番号 1761	671-688
MMP9+12	LGGVGIPGGVVGAGPAAAA 配列番号 1762	671-690
MMP9+12	LGGVGIPGGVVGAGPAAAAAAK 配列番号 1763	671-693
MMP9+12	GVGIPGGVVGAGPAAAA 配列番号 1764	673-689
MMP9+12	GVGIPGGVVGAGPAAAAAAK 配列番号 1765	673-693
MMP9+12	VGIPGGVVGAGPAAA 配列番号 1766	674-688
MMP9+12	VGIPGGVVGAGPAAAAAAK 配列番号 1767	674-693
MMP9+12	IPGGVVGAGPAAAA 配列番号 1768	676-689
MMP9+12	VVGAGPAAAAAAK 配列番号 1769	680-693
MMP9+12	VGAGPAAAAAAK 配列番号 1770	681-693
MMP9+12	AGPAAAAAAK 配列番号 1771	683-693
MMP9+12	GPAAAAAAK 配列番号 1772	684-693
MMP9+12	PAAAAAAK 配列番号 1773	685-693
MMP9+12	FGLVGAAGLGGLVGGLGVPGVGG 配列番号 1774	701-724
MMP9+12	GLVGAAGLGGLG 配列番号 1775	702-713
MMP9+12	GLVGAAGLGGLVGG 配列番号 1776	702-716
MMP9+12	GLVGAAGLGGLVGGLGVPGVG 配列番号 1777	702-723
MMP9+12	GLVGAAGLGGLVGGLGVPGVGG 配列番号 1778	702-724
MMP9+12	LVGAAGLGGLVG 配列番号 1779	703-715

10

20

30

40

【表 3 0 I】

MMP9+12	LVGAAGLGGGLGVGG 配列番号 1780	703-716
MMP9+12	LVGAAGLGGGLGVGGL 配列番号 1781	703-717
MMP9+12	LVGAAGLGGGLGVGGLGVPGVGGLG 配列番号 1782	703-726
MMP9+12	LVGAAGLGGGLGVGGLGVPGVGGLGGIPAAA 配列番号 1783	703-733
MMP9+12	VGAAGLGGGLGVGG 配列番号 1784	704-716
MMP9+12	LGGLGVGGLGVPG 配列番号 1785	709-721
MMP9+12	LGGLGVGGLGVPGVG 配列番号 1786	709-723
MMP9+12	LGGLGVGGLGVPGVGGL 配列番号 1787	709-725
MMP9+12	LGGLGVGGLGVPGVGGLG 配列番号 1788	709-726
MMP9+12	LGVGGLGVPGVGGLG 配列番号 1789	712-726
MMP9+12	GLGVPGVGGLGGIPAAAAK 配列番号 1790	716-735
MMP9+12	LGGIPAAAAK 配列番号 1791	725-735
MMP9+12	LGGVLGGAGQFPL 配列番号 1792	744-756
MMP9+12	LGGVLGGAGQFPLGGVAAR 配列番号 1793	744-762
MMP9+12	LGGVLGGAGQFPLGGVAARPG 配列番号 1794	744-764
MMP9+12	LGGVLGGAGQFPLGGVAARPGFG 配列番号 1795	744-766
MMP9+12	GGVLGGAGQFPLGGVAARPG 配列番号 1796	745-764
MMP9+12	GAGQFPLGGVAAR 配列番号 1797	750-762
MMP9+12	GAGQFPLGGVAARPGFG 配列番号 1798	750-766
MMP9+12	AGQFPLGGVAARPGFG 配列番号 1799	751-766
MMP9+12	FPLGGVAARPG 配列番号 1800	754-764
MMP9+12	PLGGVAAR 配列番号 1801	755-762
MMP9+12	PLGGVAARPG 配列番号 1802	755-764
MMP9+12	PLGGVAARPGFG 配列番号 1803	755-766
MMP9+12	PLGGVAARPGFGL 配列番号 1804	755-767
MMP9+12	PLGGVAARPGFGLSPIFG 配列番号 1805	755-773
MMP9+12	LGGVAAR 配列番号 1806	756-762
MMP9+12	LGGVAARP 配列番号 1807	756-763
MMP9+12	LGGVAARPG 配列番号 1808	756-764
MMP9+12	LGGVAARPGF 配列番号 1809	756-765
MMP9+12	LGGVAARPGFG 配列番号 1810	756-766
MMP9+12	LGGVAARPGFGL 配列番号 1811	756-767
MMP9+12	LGGVAARPGFGLSP 配列番号 1812	756-769
MMP9+12	LGGVAARPGFGLSPIFG 配列番号 1813	756-773
MMP9+12	LGGVAARPGFGLSPIFGG 配列番号 1814	756-774
MMP9+12	LGGVAARPGFGLSPIFGGA 配列番号 1815	756-775
MMP9+12	GGVAARPGFG 配列番号 1816	757-766
MMP9+12	GGVAARPGFGL 配列番号 1817	757-767
MMP9+12	GGVAARPGFGLSPIFGGA 配列番号 1818	757-775
MMP9+12	GVAARPGFGLSPIF 配列番号 1819	758-771
MMP9+12	GVAARPGFGLSPIFP 配列番号 1820	758-772
MMP9+12	VAARPGFG 配列番号 1821	759-766
MMP9+12	VAARPGFGLSPIFP 配列番号 1822	759-772
MMP9+12	VAARPGFGLSPIFG 配列番号 1823	759-773
MMP9+12	RPGFGLSPIFG 配列番号 1824	762-773
MMP9+12	PGFGLSPIFGG 配列番号 1825	763-774

10

20

30

40

【表 30 J】

MMP9+12	PGFGLSPIFPGGA 配列番号 1826	763-775
ADAMTS-1	P. GVGLPGVYPGGVLPGAR. F 配列番号 1827	143- 159
ADAMTS-1	G. VGLPGVYPGGVLPGAR. F 配列番号 1828	144- 159
ADAMTS-1	G. LPGVYPGGVLPGAR. F 配列番号 1829	146- 159
ADAMTS-1	P. GVYPGGVLPGAR. F 配列番号 1830	148- 159
ADAMTS-1	K. AGYPTGTGVGPQAAAAAAK. A 配列番号 1831	242- 261
ADAMTS-1	G. GPGFGPGVVGVPAGVPGVGPVGA. G 配列番号 1832	326- 349
ADAMTS-1	G. FPGGVVGVPAGVPGVGPVGA. A 配列番号 1833	329- 348
ADAMTS-1	F. GPGVVGPAGVPGVGPVGA. A 配列番号 1834	330- 348
ADAMTS-1	G. VPGVGPAGVPGVGPVGA. A 配列番号 1835	341- 356
ADAMTS-1	G. ARPGVGGIPTYGVG. A 配列番号 1836	385- 400
ADAMTS-1	G. ARPGVGGIPTYGVGAGG. F 配列番号 1837	385- 403
ADAMTS-1	A. RPPGVGGIPTYGVGAG. G 配列番号 1838	386- 402
ADAMTS-1	G. GVPGVGGVPGVGPVGPVGA. A 配列番号 1839	425- 446
ADAMTS-1	G. VPGVGPVGPVGPVGPVGA. A 配列番号 1840	432- 448
ADAMTS-1	G. VGPVGPVGPVGPVGPVGA. A 配列番号 1841	435- 448
ADAMTS-1	V. PPGVGPVGPVGPVGPVGPVGA. A 配列番号 1842	504- 526
ADAMTS-1	G. VAPGVGPVGPVGPVGPVGPVGA. V 配列番号 1843	508- 535
ADAMTS-1	G. VGPVGPVGPVGPVGPVGPVGA. V 配列番号 1844	512- 531
ADAMTS-1	G. VGPVGPVGPVGPVGPVGPVGA. V 配列番号 1845	512- 537
ADAMTS-1	A. PPGVGPVGPVGPVGPVGPVGA. G 配列番号 1846	528- 551
ADAMTS-1	G. VAPGVGPVGPVGPVGPVGPVGA. G 配列番号 1847	532- 551
ADAMTS-1	G. AAVPGVLGGLGALGGVGIPG. G 配列番号 1848	659- 678
ADAMTS-1	G. AAGLGGLGVGGLGVPGVGG. G 配列番号 1849	706- 726
ADAMTS-4	P. GVGLPGVYPGGVLPGAR. F 配列番号 1827	143- 159
ADAMTS-4	G. LPGVYPGGVLPGAR. F 配列番号 1829	146- 159
ADAMTS-4	K. AGYPTGTGVGPQAAAAAAK. A 配列番号 1831	242- 261
ADAMTS-4	G. GAGVPGVPAIPGIGGIAGVG. T 配列番号 1850	279- 299
ADAMTS-4	G. AGVPGVPAIPGIGGIAGVG. T 配列番号 1851	280- 299
ADAMTS-4	A. GVGTPAAAAAAK. A 配列番号 1852	297- 312
ADAMTS-4	G. VGTPAAAAAAK. A 配列番号 1853	298- 312
ADAMTS-4	G. GPGFGPGVVGVPAGVPGVGPVGA. A 配列番号 1854	326- 348
ADAMTS-4	G. ARPGVGGIPTYGVGA. G 配列番号 1855	385- 401
ADAMTS-4	A. RPPGVGGIPTYGVGAG. G 配列番号 1838	386- 402
ADAMTS-4	A. RPPGVGGIPTYGVGAGG. F 配列番号 1856	386- 403
ADAMTS-4	G. VGPVGPVGPVGPVGPVGA. A 配列番号 1841	435- 448
ADAMTS-4	G. VGPVGPVGPVGPVGPVGPVGA. V 配列番号 1857	506- 531
ADAMTS-4	A. PPGVGPVGPVGPVGPVGPVGA. P 配列番号 1858	516- 539
ADAMTS-4	G. VGPVGPVGPVGPVGPVGPVGA. V 配列番号 1859	518- 537
ADAMTS-4	L. APGVGPVGPVGPVGPVGPVGPVGA. G 配列番号 1860	527- 551
ADAMTS-4	Y. GAAVPGVLGGLGALGGVGIPG. G 配列番号 1861	658- 678
ADAMTS-4	G. AAVPGVLGGLGALGGVGIPG. G 配列番号 1848	659- 678
ADAMTS-4	G. GAGQFPLGGVAARPGFGL. S 配列番号 1862	750- 767
ADAMTS-8	L. VPGGVADAAAAYK. A 配列番号 1863	092- 104
ADAMTS-8	G. VGLPGVYPGGVLPGAR. F 配列番号 1828	144- 159
ADAMTS-8	G. LPGVYPGGVLPGAR. F 配列番号 1829	146- 159

10

20

30

40

【表 3 0 K】

ADAMTS-8	P. GVYPGGVLPGAR. F 配列番号 1830	148- 159
ADAMTS-8	V. YPGGVLPGAR. F 配列番号 1864	150- 159
ADAMTS-8	F. GPGVVGPAGVPGVGP. A 配列番号 1834	330- 348
ADAMTS-8	G. ARPGVGGIPTYGVA. G 配列番号 1855	385- 401
ADAMTS-8	V. APGVGVAPGVAPGVGLAPGV. A 配列番号 1865	509- 532
ADAMTS-8	L. APGVGVAPGVAPGV. A 配列番号 1866	527- 544
ADAMTS-8	L. APGVGVAPGVAPGVAPGV. I 配列番号 1867	527- 547
ADAMTS-8	L. APGVGVAPGVAPGVAPGV. P 配列番号 1868	527- 549
ADAMTS-8	L. APGVGVAPGVAPGVAPGV. G 配列番号 1869	527- 550
ADAMTS-8	L. APGVGVAPGVAPGVAPGV. G 配列番号 1860	527- 551
ADAMTS-8	L. APGVGVAPGVAPGVAPGV. A 配列番号 1870	527- 555
ADAMTS-8	G. VGVAPGVAPGVAPGV. G 配列番号 1871	530- 551
ADAMTS-8	G. VAPGVAPGVAPGV. G 配列番号 1847	532- 551
ADAMTS-8	G. AAVPGLGGLGALGGV. G 配列番号 1848	659- 678
ADAMTS-8	G. AAVPGLGGLGALGGV. V 配列番号 1872	659- 679
ADAMTS-8	A. AVPGLGGLGALGGV. G 配列番号 1873	660- 678
ADAMTS-8	A. VPGVGLGALGGV. V 配列番号 1874	661- 679
ADAMTS-8	A. GQFPLGGVAARPGFL. S 配列番号 1875	752- 767
Cat K	G. ALVPGGVADAAAAYK. A 配列番号 1876	090- 104
Cat K	G. LPYTTGKLPYGYGP. G 配列番号 1877	219- 233
Cat K	A. AAAAAKAAKFGA. G 配列番号 1878	255- 268
Cat K	A. GVGTPAAAAAAAK. A 配列番号 1852	297- 312
Cat K	A. AAAAAKAAKYGA. A 配列番号 1879	303- 318
Cat K	G. FGPGVVGPAGVPGVGP. A 配列番号 1833	329- 348
Cat K	G. VGISPEAQAAAAAK. A 配列番号 1841	435- 448
Cat K	G. VAPGVAPGVAPGVGLAPGV. V 配列番号 1880	508- 531
Cat K	G. VGVAPGVAPGVAPGV. G 配列番号 1871	530- 551
Cat K	G. VAPGVAPGVAPGV. G 配列番号 1847	532- 551
Cat S	T. FPGALVPGGVADAAAAYK. A 配列番号 1881	087- 104
Cat S	G. VGLPGVYPGGVLPGAR. F 配列番号 1828	144- 159
Cat S	G. LPGVYPGGVLPGARFPGV. V 配列番号 1882	146- 164
Cat S	G. YPTGTGVPQAAAAAAK. A 配列番号 1883	244- 261
Cat S	G. GAGVPGVPAIPGIGGIAGV. T 配列番号 1850	279- 299
Cat S	G. TPAAAAAAKAAK. Y 配列番号 1884	300- 315
Cat S	G. VPGAGVPGVPGAGIPVVP. G 配列番号 1885	336- 355
Cat S	G. VPGAGVPGVPGAGIPVVP. A 配列番号 1886	336- 361
Cat S	G. ISPEAQAAAAKAAK. Y 配列番号 1887	437- 451
Cat S	V. PGVGVAPGVAPGV. P 配列番号 1888	504- 521
Cat S	G. VAPGVAPGVAPGV. A 配列番号 1889	532- 554
Cat S	G. IPGGVVGAGPAAAAAAK. A 配列番号 1890	676- 693
MMP1	G. GVLPGARFPGVGLPGVPTGA. G 配列番号 1891	153- 173
MMP1	G. GVPGVGGVPGVGISPEA. Q 配列番号 1892	425- 441
MMP1	V. PGVGVAPGVAPGV. P 配列番号 1888	504- 521

10

20

30

40

【表 3 0 L】

MMP1	G. VGVAPGVGVAPGVGVAPGVG. L 配列番号 1893	506- 525
MMP1	G. VAPGVGVAPGVGVAPGIGPG. G 配列番号 1847	532- 551
MMP1	A. AVPGVLGGLGALGGVGIPG. G 配列番号 1873	660- 678
MMP1		
MMP3	G. ALVPGGVADAAAAYK. A 配列番号 1876	090- 104
MMP3	G. YPTGTGVGPQAAAAAAK. A 配列番号 1883	244- 261
MMP3	G. VPGVPGAIPGIGGIAGVG. T 配列番号 1894	282- 299
MMP3	F. GPGVVGVPAGVPGVGVPGA. G 配列番号 1895	330- 349
MMP3	G. VGISPEAQAAAAK. A 配列番号 1841	435- 448
MMP3	G. VGVAPGVGVAPGVGLAPGVG. V 配列番号 1844	512- 531
MMP3	G. VAPGVGVAPGVGVAPGIGPG. G 配列番号 1847	532- 551
MMP8	P. GVYPGGVLPGAR. F 配列番号 1830	148- 159
MMP8	K. AGYPTGTGVGPQAAAAAAK. A 配列番号 1831	242- 261
MMP8	G. VPGVPGAIPGIGGIAGVG. T 配列番号 1894	282- 299
MMP8	F. GPGVVGVPAGVPGVGVPGA. A 配列番号 1834	330- 348
MMP8	G. VPGVGVPGAGIPVPGA. G 配列番号 1896	341- 357
MMP8	G. ARPGVGVGGIPTYGVG. A 配列番号 1836	385- 400
MMP8	A. RPGVGVGGIPTYGVGAG. G 配列番号 1838	386- 402
MMP8	G. VGVAPGVGVAPGVGVAP. G 配列番号 1897	506-522
MMP8	G. VGVAPGVGVAPGVGLAPGVG. V 配列番号 1844	512- 531
MMP8	G. VGVAPGVGVAPGVGVAP. G 配列番号 1897	530-546
MMP8	G. IPGGVVGAGPAAAAAAK. A 配列番号 1890	676- 693

* ヒトエラスチン配列中のアミノ酸残基番号

【 0 1 0 7 】

従って、本発明の方法では、前記ペプチド断片は、好ましくは、表 2 4 中のエラスチンの部分配列のいずれか 1 つの N 末端もしくは C 末端部位での、または指示されている場合は「・」記号で示される部位での、プロテアーゼによるエラスチンの切断によって形成されるネオエピトープを含む。

【 0 1 0 8 】

免疫学的結合パートナーは、エラスチンの切断によって形成される C 末端または N 末端ネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【 0 1 0 9 】

適切な免疫学的結合パートナーは、従って、ペプチドの N 末端の以下の配列のいずれかと、またはペプチドの C 末端の以下の配列のいずれかと特異的に反応性であり得る。

【 0 1 1 0 】

10

20

30

【表 3 1 A】

表 25. プロテアーゼによって生成されるエラスチンのペプチド断片のN末端配列

エラスチン

GVPGAI 配列番号 1898	AIPGGV 配列番号 1899	GVPGGV 配列番号 1900
ALGGGA 配列番号 1901	LGGGAL 配列番号 1902	GGALGP 配列番号 1903
PLKPVP 配列番号 1904	LKPVPV 配列番号 1905	GLAGAG 配列番号 1906
GLGAGL 配列番号 1907	LGAGLG 配列番号 1908	AGLGAF 配列番号 1909
LVPGGV 配列番号 1910	VADAAA 配列番号 1911	KAAGAG 配列番号 1912
PVGYPG 配列番号 1913	ARFPGV 配列番号 1914	RFPGGV 配列番号 1915
VGPFGG 配列番号 1916	GPQPGV 配列番号 1917	PQPGVP 配列番号 1918
TTGKLP 配列番号 1919	LPYGYG 配列番号 1920	GYGPGG 配列番号 1921
FGAGAA 配列番号 1922	GVLPGV 配列番号 1923	VLPGGV 配列番号 1924
AGIPGL 配列番号 1925	VPGAIP 配列番号 1926	AIPGIG 配列番号 1927
TPAAAA 配列番号 1928	PAAAAA 配列番号 1929	AAAAAA 配列番号 1930
VGVPGA 配列番号 1931	AVGPGV 配列番号 1932	GVPGGV 配列番号 1933
GIPVVP 配列番号 1934	IPGAAV 配列番号 1935	GAAPGV 配列番号 1936
ARPGVG 配列番号 1937	RPGGGV 配列番号 1938	VGGIPT 配列番号 1939
SVGGVP 配列番号 1940	VGGVPG 配列番号 1941	GVGTPA 配列番号 1942
VGVAPG 配列番号 1943	VAPGGV 配列番号 1944	GVAPGV 配列番号 1945
GVPVAP 配列番号 1946	GAGIPG 配列番号 1947	PGGVAA 配列番号 1948
LGAGIP 配列番号 1949	PGFGPG 配列番号 1950	PGVVGV 配列番号 1951
PGALAA 配列番号 1952	AKYGAA 配列番号 1953	YGAAVP 配列番号 1954
ALGGVG 配列番号 1955	LGGVGI 配列番号 1956	GVGIPG 配列番号 1957
AGPAAA 配列番号 1958	GPAAAA 配列番号 1959	FGLVGA 配列番号 1960
GLGVPG 配列番号 1961	LGGIPP 配列番号 1962	LGGVLG 配列番号 1963
PLGGVA 配列番号 1964	LGGVAA 配列番号 1965	GGVAAR 配列番号 1966
GVGLPG 配列番号 1967	VGLPGV 配列番号 1968	LPGVYP 配列番号 1969
VPGVPV 配列番号 1970	VPGVGI 配列番号 1971	VGISPE 配列番号 1972
APGGVG 配列番号 1973	VPGGVA 配列番号 1974	YPPGVL 配列番号 1975
GPFGFP 配列番号 1976	YPTGTG 配列番号 1977	VPGAGV 配列番号 1978
VPGGVF 配列番号 1979	GVFYPG 配列番号 1980	VFYPGA 配列番号 1981
LGPGGK 配列番号 1982	GPGGKP 配列番号 1983	PGGKPL 配列番号 1984
LAGAGL 配列番号 1985	AGAGLG 配列番号 1986	GAGLGA 配列番号 1987
LGAFPA 配列番号 1988	AFPAVT 配列番号 1989	AVTFPG 配列番号 1990
LGVSAG 配列番号 1991	VPGVGL 配列番号 1992	PGVGLP 配列番号 1993
FPGGVV 配列番号 1994	KPGAPG 配列番号 1995	PKAPGV 配列番号 1996
PGVPLG 配列番号 1996	GYPIKA 配列番号 1997	PKLPGG 配列番号 1998
YGPGGV 配列番号 1999	AGYPTG 配列番号 2000	TGVGPQ 配列番号 2001
GAGVPG 配列番号 2002	AGVPGV 配列番号 2003	GVPGGV 配列番号 2004
IPGIGG 配列番号 2005	IGGIAG 配列番号 2006	GIAGVG 配列番号 2007
VPGGVV 配列番号 2008	VPVGVA 配列番号 2009	VPGAGI 配列番号 2010
AVPGVV 配列番号 2011	VPGVVS 配列番号 2012	YGARPG 配列番号 2013
GVGAGG 配列番号 2014	VGAGGF 配列番号 2015	VGVGGI 配列番号 2016
FGLVPG 配列番号 2017	GLVPGV 配列番号 2018	LVPGGV 配列番号 2019
PGVGLA 配列番号 2020	GVGLAP 配列番号 2021	VGLAPG 配列番号 2022
LRAAAG 配列番号 2023	LVGAAG 配列番号 2024	LVPGGP 配列番号 2025
GIPGLG 配列番号 2026	LGVGGV 配列番号 2027	VGVPLG 配列番号 2028
AAAGLG 配列番号 2029	AVPGVL 配列番号 2030	VLGGLG 配列番号 2031

10

20

30

40

【表 3 1 B】

VGIPGG 配列番号 2032	IPGGVV 配列番号 2033	VVGAGP 配列番号 2034
GLVGAA 配列番号 2035	VGAAGL 配列番号 2036	LGGLGV 配列番号 2037
GGVLGG 配列番号 2038	GAGQFP 配列番号 2039	AFQFPL 配列番号 2040
GVAARP 配列番号 2041	VAARPG 配列番号 2042	RPGFGL 配列番号 2043
GVYPGG 配列番号 2044	LPYTTG 配列番号 2045	FGPGVV 配列番号 2046
AAVPGV 配列番号 2047	AAGLGG 配列番号 2048	FPGALV 配列番号 2049
VPGVLG 配列番号 2050	GQFPLG 配列番号 2051	ALVPGG 配列番号 2052
ISPEAQ 配列番号 2053	GVLPGA 配列番号 2054	VGAGVP 配列番号 2055
LGALGG 配列番号 2056	VPGVPG 配列番号 2057	GGLGAL 配列番号 2058
GKPLKP 配列番号 2059	IAGVGT 配列番号 2060	VGAGPA 配列番号 2061
AGLGAG 配列番号 2062	VVGVPG 配列番号 2063	LGVGGL 配列番号 2064
VTFGPA 配列番号 2065	AGIPVV 配列番号 2066	FPLGGV 配列番号 2067
GLPGVY 配列番号 2068	GARPGV 配列番号 2069	PGFGLS 配列番号 2070
GAFAGI 配列番号 2071	VAGVPS 配列番号 2072	GPGVVG 配列番号 2073
YTTGKL 配列番号 2074	PGVGVA 配列番号 2075	VGTPAA 配列番号 2076
PQAAAA 配列番号 2077	LAPGVG 配列番号 2078	

【 0 1 1 1 】

【表 3 2 A】

表 2 6. プロテアーゼによって生成されるエラスチンのペプチド断片のC末端配列

エラスチン		
PGGVPG 配列番号 2079	PGAGLG 配列番号 2080	GAGLGA 配列番号 1987
GALGGG 配列番号 2081	LGGGAL 配列番号 1902	GGGALG 配列番号 2082
GLGAFP 配列番号 2083	LGAFPA 配列番号 1988	LGAGLG 配列番号 1908
VPGGVA 配列番号 1974	ADAAAA 配列番号 2084	PGVLGG 配列番号 2085
RFPGVG 配列番号 1915	VGVLPG 配列番号 2086	VPTGAG 配列番号 2087
PKAPGV 配列番号 1493	GVGPFG 配列番号 2088	VPLGYP 配列番号 2089
LPYGYG 配列番号 1920	AAAAAK 配列番号 2090	IPGIGG 配列番号 2005
GIAGVG 配列番号 2007	AIPGIG 配列番号 1927	IGGIAG 配列番号 2006
AAAAKA 配列番号 2091	VVGVPG 配列番号 2063	GVPGVG 配列番号 1933
GVGVPG 配列番号 2092	PVVPGA 配列番号 2093	VVSPEA 配列番号 2094
VGGIPT 配列番号 1939	GGIPTY 配列番号 2095	GIPTYG 配列番号 2096
GVGVGG 配列番号 2097	GVGGIP 配列番号 2098	VGVPGL 配列番号 2028
GFPGFG 配列番号 2099	FGVGVG 配列番号 2100	GVGAGG 配列番号 2014
PGVGIS 配列番号 2101	SPEAQA 配列番号 2102	VAPGVG 配列番号 1944
PGVGVA 配列番号 2075	GVGVAP 配列番号 2103	APGVGL 配列番号 2104
GIGPGG 配列番号 2105	APGIGP 配列番号 2106	VAPGIG 配列番号 2107
RAAAGL 配列番号 2108	AAAGLG 配列番号 2029	AAGLGA 配列番号 2109
GVPGLG 配列番号 2110	GVPGFG 配列番号 2111	AGVPGL 配列番号 2112
VLGGLG 配列番号 2031	VGIPGG 配列番号 2032	GAGPAA 配列番号 2113
PAAAAA 配列番号 1929	VPGVGG 配列番号 2114	GLGGLG 配列番号 2115
GLGVPG 配列番号 1961	PGVGGL 配列番号 2116	PAAAAK 配列番号 2117
RPGFGL 配列番号 2043	GVAARP 配列番号 2041	AARPGF 配列番号 2118
LSPIFP 配列番号 2119	AQAAAA 配列番号 2120	GPGIPG 配列番号 2121
GPGGVA 配列番号 2122	TPAAAA 配列番号 1928	PGGVAA 配列番号 1948
GLGALG 配列番号 2123	LGALGG 配列番号 2056	ALGPGG 配列番号 2124
GALGPG 配列番号 2125	VAPVGV 配列番号 2126	KPVPGG 配列番号 2127
AFPAVT 配列番号 1989	AVTFPG 配列番号 1990	VTFGPA 配列番号 2065
AAAAYK 配列番号 2128	AAKAGA 配列番号 2129	VPQPGA 配列番号 2130
PGVPTG 配列番号 2131	GVPTGA 配列番号 2132	AGVKPK 配列番号 2133
PIKAPK 配列番号 2134	KLPGGY 配列番号 2135	YGYGPG 配列番号 2136
VGTPAA 配列番号 2076	VPGVPG 配列番号 2057	GVGTPA 配列番号 1942
GIGGIA 配列番号 2137	GTPAAA 配列番号 2138	AAAAAA 配列番号 1930
IPVVPG 配列番号 2139	VGVPGA 配列番号 1931	GVPGAG 配列番号 2140
GAGIPG 配列番号 1947	PEAAAK 配列番号 2141	ARPGVG 配列番号 1937
PTYGVG 配列番号 2142	TYGVGA 配列番号 2143	YGVGAG 配列番号 2144
IPTYGV 配列番号 2145	PGAIPG 配列番号 2146	VGAGGF 配列番号 2015
AGGFPG 配列番号 2147	GIPGVA 配列番号 2148	GISPEA 配列番号 2149
VGVPAG 配列番号 1943	VGLAPG 配列番号 2022	VPGAPG 配列番号 2150
PGVGLA 配列番号 2020	LAPGVG 配列番号 2078	APGVGV 配列番号 1973
GVAPGV 配列番号 1945	GGVAAA 配列番号 2151	PGIGPG 配列番号 2152
GLGVGG 配列番号 2153	PGLGVG 配列番号 2154	LGVGVG 配列番号 2027
GLGVGA 配列番号 2155	ALAAAK 配列番号 2156	LGGLGA 配列番号 2157
VGAGPA 配列番号 2061	AGPAAA 配列番号 1958	GPAAAA 配列番号 1959
GGLGVG 配列番号 2158	LGVGGL 配列番号 2064	GVGGLG 配列番号 2159
AGQFPL 配列番号 2160	GGVAAR 配列番号 1966	VAARPG 配列番号 2042
GFGLSL 配列番号 2161	PIFPGG 配列番号 2162	IFPGGA 配列番号 2163

10

20

30

40

【表 3 2 B】

AAKFGA 配列番号 2164	AAKYGA 配列番号 2165	AAKAAK 配列番号 2166
AGLGAL 配列番号 2167	GAGVPG 配列番号 2002	GIPGGV 配列番号 2168
LKPVPV 配列番号 1905	PGVGVG 配列番号 2169	IPPAAA 配列番号 2170
ALVPGG 配列番号 2052	RPGVGV 配列番号 1938	ARPGFG 配列番号 2171
VLPGAR 配列番号 2172	GGFPGF 配列番号 2173	GLSPIF 配列番号 2174
PTGAGV 配列番号 2175	VGGVPG 配列番号 1941	GIPVVP 配列番号 1934
AGAAGK 配列番号 2176		

【0 1 1 2】

10

ビメンチン

いくつかの候補プロテアーゼは、線維性組織中のビメンチンの消化に関与し得る。本発明者らは、純粋な天然タンパク質の様々なインビトロ切断を通して、以下の表に列挙する酵素が、少なくとも以下の配列の各末端の切断部位で、または「・」で示す切断部位で、または「・」が示されていない場合は配列の末端でビメンチンを切断すると判定した。

【0 1 1 3】

【表 3 3】

表 2 7 : 特異的プロテアーゼによって生成されるビメンチン断片

プロテアーゼ	切断部位の間の配列	アミノ酸残基番号
MMP2, MMP8, トリプシン	RLRSSVPGVR. 配列番号 2177	69-78
MMP2, MMP8, トリプシン	RLRSSVPGVL. 配列番号 2178	69-78
MMP2, MMP8, トリプシン	.LLQDSVDFSL 配列番号 2179	79-89
MMP2, MMP8, トリプシン	.FADLSEAANR 配列番号 2180	295-304
MMP2	.ISLPLTFSS 配列番号 2181	410-420

20

* ヒトビメンチン配列中

【0 1 1 4】

従って、本発明の方法では、前記ペプチド断片は、好ましくは、表 2 4 中のビメンチンの部分配列のいずれか 1 つの N 末端もしくは C 末端部位での、または指示されている場合は「・」記号で示される部位での、プロテアーゼによるビメンチンの切断によって形成されるネオエピトープを含む。

30

【0 1 1 5】

免疫学的結合パートナーは、ビメンチンの切断によって形成される C 末端または N 末端ネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【0 1 1 6】

適切な免疫学的結合パートナーは、従って、ペプチドの N 末端の以下の配列のいずれかと、またはペプチドの C 末端の以下の配列のいずれかと特異的に反応性であり得る：

【0 1 1 7】

【表 3 4】

40

表 2 8. プロテアーゼによって生成されるビメンチンのペプチド断片の N 末端配列

ビメンチン		
LLQDSV 配列番号 2182	FADLSE 配列番号 2183	ISLPLP 配列番号 2184

【0 1 1 8】

【表 3 5】

表 2 9. プロテアーゼによって生成されるビメンチンのペプチド断片の C 末端配列

ビメンチン	
SVPGVR 配列番号 2185	SVPGVL 配列番号 2186

【 0 1 1 9 】

同様の方法で検定し得るネオエピトープを規定するさらなる切断部位は、コラーゲン、エラスチン、C R P およびプロテオグリカンまたは他の線維性組織タンパク質を本明細書で述べる酵素のいずれかに暴露し、それによって生成されたペプチドを単離して、配列決定することによって同定できる。さらに、アッセイは、例示した切断部位に隣接して生成される、すなわち上記で示した N 末端エピトープに至る C 末端配列および上述した C 末端エピトープに結合する N 末端配列中のネオエピトープに基づき得る。

10

【 0 1 2 0 】

上述したペプチドの 2 以上についてのアッセイは、別々に実施して、それらの結果を組み合わせてもよく、または上述したペプチドの 2 以上を一緒に測定してもよい。

【 0 1 2 1 】

本発明によるアッセイの結果は、診断または予後値の総合指標を形成する 1 またはそれ以上の他の測定バイオマーカーと組み合わせてもよい。

20

【 0 1 2 2 】

一般に、不均一および均一形式、サンドイッチアッセイ、競合アッセイ、酵素結合アッセイ、放射免疫検定法等を含む、これまでに公知のすべての免疫検定法の形式が本発明に従って使用できる。従って、場合により、前記方法は、前記免疫学的結合パートナーと競合物質を前記試料の存在下でインキュベートし、競合物質が免疫学的結合パートナーと結合するために試料中のペプチド断片と競合する競合免疫検定法として実施される。

【 0 1 2 3 】

前記競合物質は、(1) I 型、I I I 型、I V 型、V 型もしくは V I 型コラーゲンの配列、または C R P、またはプロテオグリカンであるパーシカン、ルミカン、パールカン、デコリンおよびビグリカンペプチドのいずれかに由来する合成ペプチドであり得るか、または競合物質は、(2) プロテアーゼによって切断されて前記ネオエピトープとなる、精製された天然の I 型、I I I 型、I V 型、V 型もしくは V I 型コラーゲン、または C R P、またはプロテオグリカンであるニューロカン、プレピカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、β グリカン、パーシカン、ルミカン、パールカン、デコリンおよびビグリカンのいずれかに由来し得る。

30

【 0 1 2 4 】

1 つの適切な方法は、I 型、I I I 型、I V 型、V 型、V I 型コラーゲン、C R P、ビメンチンもしくはプロテオグリカンのニューロカン、プレピカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、β グリカン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカン断片のいずれかのネオエピトープ、または線維性組織に由来する他のタンパク質からのペプチド断片上のネオエピトープに結合するモノクローナル抗体または抗体結合断片を使用した競合免疫検定法であり得る。マイクロタイタープレートの固体表面上に被覆された、適切に選択された合成ペプチドは、モノクローナル抗体または結合断片への結合に関して試料と競合し得る。あるいは、モノクローナル抗体または結合断片によって認識されるネオエピトープを担持する精製天然 I 型、I I I 型、I V 型、V 型、V I 型コラーゲン、C R P、ニューロカン、プレピカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、β グリカン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカン断片を固体表面で使用し得る。さらにもう 1 つの代替例は、モノクローナル抗体または結合断片を固体表面に固定化し、次に、試料を、シグナル分子、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼまたはビオチンに適切に連結された合成ペプチドと共にインキュベ

40

50

トすることである。

【0125】

試料は、血清、血液、血漿または他の、例えば線維性組織生検の試料であり得る。

【0126】

アッセイは、前記ネオエピトープと特異的に反応する第一免疫学的結合パートナーと、ネオエピトープが属する関連タンパク質に対して反応性の第二免疫学的結合パートナーとを用いたサンドイッチアッセイとして実施し得る。場合により、前記第二免疫学的結合パートナーは、同じタンパク質の第二のエピトープに対する結合パートナーである。

【0127】

特定の好ましい方法では、本発明の方法は、前記ペプチド断片の前記結合の測定レベルを、(a) 匹敵する健常個体および/または(b) 病的線維性状態の特徴を示す数値と比較し、場合により測定されたペプチドの高レベル(通常は高い結合レベルによって示される)をより重度の前記状態と関連付けることをさらに含む。

【0128】

本発明の1つの態様は、前述したネオエピトープ、特にI型およびIV型コラーゲンについてのネオエピトープを認識するモノクローナル抗体の開発に関する。これは、I型、III型、IV型、V型、VI型コラーゲン、CRP、ビメンチン、ニューロカン、プレビカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、βグリカン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカン分子のアミノ酸配列(上記に列挙した配列またはその中で終了する配列を含む)に由来する合成ペプチドでマウスを免疫し、選択したマウスからの脾細胞を骨髓腫細胞に融合して、関連合成ペプチド上のネオエピトープに対する結合に関してモノクローナル抗体を試験することによって達成できる。ネオエピトープに対する特異性は、合成ペプチドとの反応性、および免疫ペプチドのC末端延長形態(C末端ネオエピトープに関して)または免疫ペプチドのN末端延長形態(N末端ネオエピトープに関して)との反応性の欠如を求めることによって確実にし得る。天然のI型、III型、IV型、V型、VI型コラーゲン、CRP、ビメンチン、ニューロカン、プレビカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、βグリカン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカンへの結合能力の欠如を確認するために、ネオエピトープに対する抗体も評価し得る。あるいは、ネオエピトープに対する特異性は、抗体の反応性が、末端アミノ酸の1つに共有結合連結されたビオチンまたは他の官能基の存在に負の依存性を有することを求めることによって確実にし得る。

【0129】

本発明は、上記に提示したI型、III型、IV型、V型、VI型コラーゲン、CRP、ビメンチン、ニューロカン、プレビカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、βグリカン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカンの部分配列のいずれか1つの末端部位における、プロテアーゼによるI型、III型、IV型、V型、VI型コラーゲン、CRP、ビメンチン、ニューロカン、プレビカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、βグリカン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカンの切断によって形成されるネオエピトープと特異的に免疫反応性である免疫学的結合パートナーを含み、例えばモノクローナル抗体またはその結合断片であり得る。

【0130】

本発明は、上記に提示したI型、III型、IV型、V型、VI型コラーゲン、CRP、ビメンチン、ニューロカン、プレビカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、βグリカン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカンの部分配列のいずれか1つにおける配列の末端部位でのI型、III型、IV型、V型、VI型コラーゲン、CRP、ビメンチン、ニューロカン、プレビカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、βグリカン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカンの切断によって形成されるC末端またはN末端ネオエピトープに対するモノクローナル抗体を産生する細胞株を含む。

【 0 1 3 1 】

本発明は、上記に提示したこれらのタンパク質の部分配列のいずれか1つにおけるI型、III型、IV型、V型、VI型コラーゲン、CRP、ビメンチン、ニューロカン、プレビカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、βグリカン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカンの切断によって形成されるC末端またはN末端ネオエピトープを含むペプチドをさらに提供する。そのようなペプチドは、前記ペプチドに対する免疫応答を生じさせるためにハプテンとして担体に結合し得るか、または免疫検定法における使用のために固体表面に固定化し得るもしくは検出可能なマーカに結合し得る。

【 0 1 3 2 】

本発明は、上記に提示したI型、III型、IV型、V型、VI型コラーゲン、CRP、ビメンチン、ニューロカン、プレビカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、βグリカン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカンの部分配列のいずれか1つにおける、I型、III型、IV型、V型、VI型コラーゲン、CRP、ビメンチン、ニューロカン、プレビカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、βグリカン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカンの切断によって形成されるC末端またはN末端ネオエピトープを含むペプチドをコードする単離核酸分子をさらに含む。

【 0 1 3 3 】

本発明は、上記に提示したI型、III型、IV型、V型、VI型コラーゲン、CRP、ビメンチン、ニューロカン、プレビカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、βグリカン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカンの部分配列のいずれか1つにおける、I型、III型、IV型、V型、VI型コラーゲン、CRP、ビメンチン、ニューロカン、プレビカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、βグリカン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカンの切断によって形成されるC末端またはN末端ネオエピトープを含むペプチドの発現のための発現シグナルおよび該ペプチドの発現をコードするコード配列を含有する核酸配列を含むベクターをさらに含み、そのようなベクターで形質転換された、前記ペプチドを発現する宿主細胞をさらに含む。

【 0 1 3 4 】

本発明のさらにもう1つの態様は、上述した方法を実施するために好都合に使用できるキットに関する。そのようなキットは、(1)合成ペプチドで被覆されたマイクロタイタープレートと、(2)前記合成ペプチドと反応性の本発明のモノクローナル抗体または抗体結合断片と、(3)標識抗マウスIgG免疫グロブリンとを含み得る。あるいは、そのようなキットは、(1)精製天然I型、III型、IV型、V型、VI型コラーゲン、CRP、ビメンチン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカン断片で被覆されたマイクロタイタープレートと、(2)I型、III型、IV型、V型、VI型コラーゲン、CRP、ビメンチン、ニューロカン、プレビカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、βグリカン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカン断片上のネオエピトープを認識し、前記精製I型、III型、IV型、V型、VI型コラーゲン、CRP、ビメンチン、ニューロカン、プレビカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、βグリカン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカン断片と反応性であるモノクローナル抗体と、(3)標識抗マウスIgG免疫グロブリンとを含み得る。あるいは、そのようなキットは、(1)ストربتアビジンで被覆されたマイクロタイタープレートと、(2)ビオチンに連結された合成ペプチドと、(3)I型、III型、IV型、V型、VI型コラーゲン、CRP、ビメンチン、ニューロカン、プレビカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、βグリカン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカン断片上のネオエピトープを認識し、前記合成ペプチドと反応性であるモノクローナル抗体と、(4)標識抗マウスIgG免疫グロブリンとを含み得る。さらにもう1つの代替例は、(1)ス

10

20

30

40

50

トレプトアビジンで被覆されたマイクロタイタープレートと、(2) ビオチンに連結された合成ペプチドと、(3) I型、III型、IV型、V型、VI型コラーゲン、CRP、ビメンチン、ニューロカン、プレビカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、βグリカン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカン断片上のネオエピトープを認識する(および前記合成ペプチドと反応性である)、ホースラディッシュペルオキシダーゼに結合されたモノクローナル抗体とを含むキットであり得る。

【0135】

従って、本発明は、本明細書で述べる、特にI型およびIV型コラーゲンに関する免疫学的結合パートナー、ならびに前記免疫学的結合パートナーに結合する競合物質、ならびに、場合により洗浄試薬、緩衝液、停止試薬、酵素標識、標識酵素の基質、校正基準、抗マウス抗体および指示書の1またはそれ以上を含む免疫検定キットを包含する。

10

【0136】

本明細書で述べるアッセイは患者における線維症の診断に有用である。加えて、試験は、疾患の進行の評価および治療に対する応答を監視するために有用である。本発明の免疫学的結合パートナーは、I型、III型、IV型、V型、VI型コラーゲン、CRP、ビメンチン、ニューロカン、プレビカン、フィブロモジュリン、セルグリシン、シンデカン、βグリカン、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカンおよびビグリカン切断産物の存在または位置を示すために免疫染色においても使用し得る。

【0137】

以下の実施例および添付の図面を参照して本発明をさらに説明し、例示する。

20

【図面の簡単な説明】

【0138】

【図1】図1は、種々の生物学的試料：プールされたヒト血清試料(血清)；ヒト羊水(AF)；ヒト線維芽細胞培地(Fibr. Cltr.)のCO3 ELISA結果を表示するグラフを示す。

【図2a】偽手術したラット(s)ならびに基線時(b)および終了時(t)の胆管結紮ラットにおけるCO3血清レベルを表示するグラフを示す。

【図2b】ラット血清中のCO3の対応するΔ値：終了時レベル-基線レベルを示す。

【図3】図3は、種々のヒト血清試料中のCO3レベルを表示するグラフを示す。正常血清：健常個体より。COPD：慢性閉塞性肺疾患(肺線維症を導く)。強皮症(皮膚および肺線維症を導く)。HCV：C型ウイルス性肝炎(肝線維症を導く)。

30

【図4】図4は、実施例5で測定した肝重量と肝スコアを示す。

【図5】図5は、実施例5で本発明に従って測定したIII型コラーゲンのMMP-9切断断片のレベルを示す。

【図6】図6は、実施例5で測定したBDLラットまたは偽手術ラットにおけるIII型コラーゲン遺伝子発現のレベルを示す。

【図7】図7は、ウエスタンブロット法によって測定した、実施例5で使用された抗体と反応性のIII型コラーゲンのMMP-9切断断片の発現レベルの変化を示す。

【図8】図8は、実施例5で得た肝切片の組織染色の結果を示す。

【図9】図9は、実施例5で測定した、本発明によるIII型コラーゲンの断片の測定と他の肝バイオマーカの相関を示す。

40

【図10】図10は、実施例6においてヒト血清試料に関して得た結果を示す。

【図11】図11は、CRPからのN末端ネオエピトープを認識するモノクローナル抗体の反応性を試験して得た結果を示す。

【図12】図12は、実施例8で測定したラット肝におけるコラーゲン蓄積を示す。

【図13】図13は、実施例8で得た免疫検定法の結果を示す。

【図14】図14は、肝コラーゲン含量と図13の免疫検定法結果の相関を示す。

【図15】図15は、本発明による免疫検定法の結果と、実施例8におけるヒアルロン酸およびシリウスレッド染色の測定との比較を示す。

【図16】図16は、最初のパネルではシリウスレッド染色と本発明による免疫検定法が

50

らの結果の相関、および2番目のパネルではヒアルロン酸レベルとシリウスレッド染色との相関を示す。

【図17】図17は、本発明の免疫検定法の結果とヒアルロン酸レベルとの間に相関がないことを示す。

【図18】図18は、実施例9で述べる皮膚切片と皮膚の厚さの測定を示す。

【図19】図19は、実施例9における本発明に従った免疫検定法からの結果を示す。

【図20】図20は、パネルAでは実施例9で得たウエスタンブロット像およびパネルBでは本発明による対応する免疫検定法結果を示す。

【図21】図21は、免疫検定法の結果と皮膚厚さ測定との相関を示す。

【図22】図22は、実施例9で述べる尿の免疫検定法結果とウエスタンブロット測定との相関を示す。

【実施例】

【0139】

<実施例1：MMP-9で分解したIII型コラーゲン>
方法

切断：ヒト胎盤から単離したIII型コラーゲンを10mM酢酸に溶解した(1mg/ml)。次に混入断片を除去するためにタンパク質溶液をフィルター(Microcon Ultracel YM-10)に通した。MMP-9を酢酸4-アミノフェニル水銀(APMA, Sigma)で37℃にて3時間予備活性化した。活性化後、III型コラーゲンとMMP-9を100:1で混合し、37℃で3日間、振とうしながらインキュベートした。

【0140】

溶液を液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)によって分析し、Massot検索を実施することによって断片を同定した。ペプチド配列を相同性検索によって選択し、他のタンパク質もしくは関連タンパク質に対する交差反応性、または種間交差反応性がないことを確実にした。

【0141】

抗体設計：ペプチド配列を合成し、オボアルブミン(OVA)に結合した。マウスを2~3週間ごとに5回まで免疫した。抗体価を、選択および非選択の両方のスクリーニングペプチドによって検査した。十分な抗体価が達成された場合、陽性マウスを融合のために選択し、安楽死させて、脾臓を分解し、B細胞を骨髓腫細胞との融合のために取り出した。抗体産生細胞の選択は、単細胞クローン中の生存キメラ細胞を培養し、再接種することによって実施した。ネオエピトープは小さな合成ペプチド配列によって生成され、これは天然タンパク質を反映しないことがあり得るので、クローンを選択および非選択ペプチドによって、次いで天然反応性試験によって選択する(図1)。IgGサブタイプクローンを抗体産生のために選択する。プロテインGカラムによって抗体の精製を行う。

【0142】

アッセイの開発：最適抗体濃度を、抗体被覆およびスクリーニングペプチドの希釈液を用いて、競合ELISAにおいてチェッカーボード解析によって決定する。MMP-9(CO3)アッセイによる分解されたコラーゲンについての種々の測定を表24に示す。

【0143】

【表36】

表24. 検出限界、CO3アッセイ間平均変動およびCO3アッセイ内平均変動

検出限界	0.5 ng/ml
アッセイ間平均変動	3.71 %
アッセイ内平均変動	5.48 %

【0144】

<実施例2：生物学的関連試料中のCO3：偽手術ラットと比較した胆管結紮ラットにおけるCO3レベル>

方法：40匹の雌性Sprague-Dawleyラット（6ヶ月齢）をNordic Bioscienceの動物実験施設に収容した。実験は、デンマーク法務省の実験動物委員会（Experimental Animal Committee of the Danish Ministry of Justice）によって承認され、臨床試験実施基準のヨーロッパ規格（European Standard for Good Clinical Practice）（2008/561-1450）に従って実施された。ラットを、敷き料および巣材（Altromin 1324; Altromin, Lage, Germany）と共に標準的なIII-H型ケージに18~22で収容し、精製水（Milli-Q system; Millipore, Glostrup, Denmark）を自由に摂取させた。ラットを12時間の明/暗周期の条件下で飼育した。

10

【0145】

肝線維症を総胆管結紮（common BDL）によって誘発した。簡単に述べると、ラットを麻酔し、胆管を見つけ出して、胆管の周囲で2つの結紮を実施し、次いで結紮の間を切断して、腹部を閉じた。偽手術したラットでは、胆管結紮を行わずに腹部を閉じた。ラットを2つの群に分けた。第1群（BDLラット10匹と偽手術ラット10匹）は2週間後に犠死させ、第2群（BDLラット9匹と偽手術ラット10匹）は4週間後に犠死させた。試験期間（2または4週間）の終了時に、少なくとも14時間の絶食後、すべての生存動物をCO₂によって窒息させ、瀉血によって犠死させた。

【0146】

20

基線時および終了時に軽いCO₂/O₂麻酔下で、少なくとも14時間絶食させたラットの後眼窩洞から血液試料を採取した。血液を収集し、室温で30分間放置して凝固させ、次いで1500gで10分間遠心分離した。血餅を取り除いた液体全部を新しい管に移し、再び1500gで10分間遠心分離した。次に血清を清浄な管に移し、-80で保存した。CO3をラットからの5倍希釈血清試料中で測定した。偽手術とBDLのレベルを、正規分布を仮定した統計的有意性のマン-ホイットニー両側ノンパラメトリック検定（ $\alpha = 0.05$ ）によって比較した。CO3レベルは、偽手術動物と比較してBDL群において有意に高かった。結果を図2aおよびbに示す。

【0147】

<実施例3：種々の線維性疾患におけるCO3（ヒト血清）>

30

CO3レベルを、3つの異なる線維性疾患（慢性閉塞性肺疾患（COPD）、強皮症およびC型ウイルス性肝炎（HCV））を有するヒトからの血清中で測定した。血清試料はSera Laboratories International Ltd（SLI Ltd）、UKから入手した。CO3レベルは、3つの異なる線維性疾患において上昇していた（図3）。

【0148】

<実施例4：抗体の開発 - マーカCO3-610Cの検出>

III型コラーゲン（Abcam, Cambridge, UK）を活性化MMP-9（Merck KGaA, Darmstadt, Germany）によってインビトロで2日間分解した。分解断片をLS-MS/MSによって配列決定し、MASCOT検索によって同定した。特定ペプチド配列、⁶¹⁰KNGETGPQを抗体作製のために選択した。この配列のN末端はヒトIII型コラーゲンの残基610である。合成ペプチドをオボアルブミンに結合した後、4~6週齢のBalb/Cマウスを乳化抗原約200μLおよびCO3-610C（KNGETGPQGPGGC-OVA）50μgにより皮下免疫した。安定な血清力価レベルに達するまで、フロイント不完全アジュバント中、2週間の間隔で連続免疫を実施した。2回目の免疫時からマウスを採血した。各採血時に、血清力価を測定し、最も高い抗血清力価を有するマウスを融合のために選択した。4回目の免疫後、このマウスを1ヶ月間休息させ、次に0.9%塩化ナトリウム溶液100μL中のCO3-610C 50μgで3日間静脈内追加免疫した後、細胞融合のために脾臓を単離した。

40

50

【0149】

モノクローナル抗体産生クローンを、Chinese Peptide Company, Beijing, Chinaより購入した、a)免疫原性ペプチド：KNGETGPQGP-GGC-オボアルブミン(OVA)(807678)、b)スクリーニングペプチド：KNGETGPQGP-PG-K-ビオチン(807971)、c)非選択ペプチド：II型コラーゲン α 1鎖であるKDGETGAAGPPGK-ビオチン(118318)、I型コラーゲン α 1鎖の分解産物であるKDGEAGAQQGPPGK-ビオチンを用いて選択した。ELISA被覆プレートはNUNC(ThermoFisher, Copenhagen, Denmark)より入手した。ペプチド結合試薬および緩衝液はPierce(ThermoFisher, Copenhagen, Denmark)によって生産された。

10

【0150】

被覆ペプチドを溶解するために使用した緩衝液は以下のもので構成された：40mMの Na_2HPO_4 、12 H_2O 、7mMの KH_2PO_4 、137mMの NaCl 、2.7mMの KCl 、25mMのEDTA、0.1%Tween20、1%BSA、10%ソルビトール、pH7。血清アッセイについては、以下の化学物質を含有する緩衝液を使用した：8mMの Na_2HPO_4 、12 H_2O 、1.5mMの KH_2PO_4 、13.7mMの NaCl 、2.7mMの KCl 、0.1%Tween20、1%BSA、0.003%フェノールレッド、pH7.4。尿のアッセイに使用した異なる緩衝液は、400mMのTRIZMA、0.05%Tween20、0.1%BSA、0.36%Bronidox L5、pH8.0を含んだ。血清及び尿アッセイの両方について、25mMのTRIZMA、50mMの NaCl 、0.036%Bronidox L5、0.1%Tween20から成る洗浄緩衝液、および0.1% H_2SO_4 から成る反応停止緩衝液を使用した。アッセイ開発のために使用したELISAプレートは、Roche(Hvidovre, Denmark)からのストレプトアビジン被覆プレート、カタログ番号：11940279であった。すべてのELISAプレートをMolecular Devices, SpectraMax M(CA, USA)からのELISAリーダーで分析した。

20

【0151】

予備実験において、いくつかのチェッカーボード解析を実施することによって試薬、それらの濃度およびインキュベーション期間を最適化した。ストレプトアビジンで被覆した96穴ELISAプレートを、300rpmで絶えず振とうすることによって20で30分間PBS-TBE緩衝液に溶解した5ng/mlの合成ペプチド、ビオチニル化KNGETGPQGPでさらに被覆した。洗浄緩衝液で洗った後、試料20 μ lを添加し、次いでペルオキシダーゼ結合抗ヒトmAb-NB51-32 CO3-610C溶液(インキュベーション緩衝液中23pg/ml)100 μ lを添加した。プレートを20で1時間インキュベートし、その期間中300rpmで振とうした。その後洗浄し、最後に、テトラメチルベンジリジン(TMB)100 μ l(Kem-En-Tec、カタログ番号4380H)を加えて、プレートを暗所にて300rpmで振とうしながら15分間インキュベートした。反応を停止するため、停止溶液100 μ lを添加し、プレートを、650nmを参照として用いて450nmでELISAリーダーにおいて分析した。

30

40

【0152】

血清アッセイについてはビオチニル化NB51-32 CO3-610Cおよび尿アッセイについてはビオチニル化NB51-134 CO3-610Cの連続希釈によって標準曲線を作成した。標準濃度は、0、0.33、1、3、9、27、81および162ng/mlであった。

【0153】

配列KNGETGPQGPのN末端のアミノ酸Kは、ヒトIII型コラーゲン配列のアミノ酸610であるので、このようにして得られた免疫検定法を用いて検出された断片をCO3-610Cと称する。

【0154】

50

< 実施例 5 : ラットで誘発した肝線維症における C O 3 - 6 1 0 C と他のバイオマーカとの比較 >

試験動物

40 匹の 6 ヶ月齢の雌性 S p r a g u e - D a w l e y ラットを N o r d i c B i o s c i e n c e , C o p e n h a g e n , D e n m a r k の動物実験施設に収容した。実験は、デンマーク法務省の実験動物委員会によって承認され、臨床試験実施基準のヨーロッパ規格 (2 0 0 8 / 5 6 1 - 1 4 5 0) に従って実施された。ラットを、敷き料および巢材 (A l t r o m i n 1 3 2 4 ; A l t r o m i n , L a g e , G e r m a n y) と共に標準的な I I I - H 型ケージに 1 8 ~ 2 2 で収容し、水を自由に摂取させた。ラットを 1 2 時間の明 / 暗周期の条件下で飼育した。

10

【 0 1 5 5 】

試験計画

20 匹のラットにおいて、肝線維症を総 B D L によって誘発した。手術手順は無菌条件下で実施した。ラットを麻酔し、胆管の位置を特定して、2 か所で結紮し、次いで結紮の間を切断して、腹部を閉じた。その他の 20 匹のラットは偽手術に供し、胆管結紮を行わずに腹部を閉じた。次にラットを 2 つの群に分けた。第 1 群 (B D L ラット 10 匹と偽手術ラット 10 匹) は 2 週間後に犠死させ、第 2 群 (B D L ラット 10 匹と偽手術ラット 10 匹) は 4 週間後に犠死させた。試験期間 (2 または 4 週間) の終了時に、少なくとも 1 4 時間の絶食後、すべての生存動物を C O ₂ によって窒息させ、瀉血によって犠死させた。

20

【 0 1 5 6 】

採血

基線時および終了時に軽い C O ₂ / O ₂ 麻酔下で、少なくとも 1 4 時間の絶食後にラットの後眼窩洞から血液試料を採取した。血液を室温で 3 0 分間放置して凝固させ、次いで 1 5 0 0 g で 1 0 分間遠心分離した。血餅を取り除いた液体全部を新鮮な管に移し、再び 1 5 0 0 g で 1 0 分間遠心分離した。次に血清を清浄な管に移し、- 8 0 で保存した。

【 0 1 5 7 】

組織の取扱い

ラットを安楽死させた後、肝臓を慎重に切開し、計量して、4 %ホルムアルデヒド中に少なくとも 2 4 時間固定し、適切な切片に切断して、パラフィンに包埋した。5 μ m の厚さの切片を切断し、スライドガラスに載せて、シリウスレッドで染色した。肝切片を、構造、炎症の存在、胆管の増殖および線維症の評価によって組織学的に評価した。実質中の新たな胆管形成を、以下の採点法を用いて半定量的に評価した：正常 = 0、軽度の変化 (1 / 3 以下の罹患小葉) = 1、中等度の変化 (1 / 3 ~ 2 / 3 の罹患小葉) = 2、および重度の変化 (2 / 3 以上の罹患小葉) = 3。40 倍および 1 0 0 倍の倍率の O l y m p u s B X 6 0 顕微鏡と O l y m p u s 5 0 5 0 ズームデジタルカメラ (O l y m p u s , T o k y o , J a p a n) を使用してデジタル写真を撮影した。

30

【 0 1 5 8 】

総コラーゲンおよび血清 C T X - I I の測定

市販の Q u i c k Z y m e C o l l a g e n A s s a y (Q u i c k Z y m e B i o s c i e n c e , L e i d e n , T h e N e t h e r l a n d s) を使用して総コラーゲン濃度を検定した。市販の R a t C T X - I I キット (I D S N o r d i c , H e r l e v , D e n m a r k) を使用して C T X - I I の濃度を検定した。すべての試料を 2 回重複して検定した。

40

【 0 1 5 9 】

I I I 型コラーゲンの m R N A の定量化

肝組織試料中の I I I 型コラーゲン (C o l 3 a 1) の転写産物の数を、蛍光レポータープロンプを用いて定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) によって測定した。試料中の C o l 3 a 1 コピー数を、C o l 3 a 1 プラスミド c D N A I m a g e C l o n e 7 0 9 7 0 8 1 (G e n e s e r v i c e , C a m b r i d g e , U

50

K)を希釈標準品として使用して得た標準曲線から推定した。Col3a1の量を、ハウスキーピング遺伝子、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1(Hprt1)の量で基準化した。Col3a1およびHprt1 mRNAについてのプライマーおよびプローブは、それぞれNCBI参照配列NM_032085.1およびNM_012583.2(TIB Molbiol GmbH, Berlin, Germany)を鋳型として用いて設計した。Absolutely RNA Miniprepキット(Stratagene, La Jolla, CA, USA)を製造者の指示に従って使用して全RNAを凍結肝試料から抽出し、2100 Bioanalyzer装置(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)を用いてその品質をRNAナノチップ中で評価した。RNAの単離後すぐに、1 µgのRNAを鋳型として用いて、Transcriptor First Strand cDNA合成キット(Roche, Basel, Switzerland)で相補的DNA(cDNA)を合成した。試験した各々の試料について、反応混合物から逆転写酵素を除いた、cDNA合成陰性対照を含めた。Col3a1およびHprt1について別々のPCR反応を、Lightcycler Faststart DNA Master Plus Hybprobeキット(Roche)を製造者の指示に従って使用して20 µL形式で実施した。リアルタイム蛍光データをLightcycler 2.0装置(Roche)で収集した。

10

【0160】

抽出

20

組織をスチール製粉碎機中の過剰の液体窒素中で粉碎した。次に試料を1.5 ml エッペンドルフ管に移し、プロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche)を含有する0.5 M酢酸溶液中、4 °Cで一晩振とうした。次に試料を、60 % 振幅の5 パルスを用いて超音波で破碎し(U50 control、IKA Labortechnik)、4 °Cでさらに2時間放置した後、13,000 rpmで5分間遠心分離した。上清を慎重に取り出し、新しいエッペンドルフ管に移して、-80 °Cで保存した。

【0161】

デンストメトリー

Silk Scientific(give city, country)からのUN-SCAN-ITバージョン6.1を用いてデンストメトリー測定を実施した。

30

【0162】

組織像分析

シリウスレッドで染色した組織学的切片を、Visiopharmソフトウェアバージョン3.2.8.0(give city, country)を用いて分析した。Pixelink PL-A623C顕微鏡デジタルカメラを用いて画像を取得した。

【0163】

SDS-PAGEおよびウエスタンブロット法

組織抽出物20 µgを、還元剤(InvitrogenからのNuPAGE、NP0004)を含有する充填緩衝液(Invitrogen LDS 4x、NP0007)と混合した。次に試料を4~12%ビス-トリス勾配ゲル(InvitrogenからのNP0332BOX)に充填し、200 Vで52分間泳動させた。その後i-Blotトランスファースystem(Invitrogen)を用いてタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、(? Need to spell out?)TTBS中5%乳を用いて4 °Cで一晩ブロックした。βアクチン抗体(AbCam ab8229, give company, city country?)を充填対照として使用した。

40

【0164】

統計分析

平均値および平均の標準誤差(SEM)を、GraphPad Prism(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)を用いて計算し、正規分布を仮定した統計的有意性のスチューデント両側ペアードt検定によって

50

($\alpha = 0.05$)、またはマン - ホイットニー両側ノンパラメトリック検定によって($\alpha = 0.05$)比較した。相関係数(R^2)および対応するp値を線形回帰によって決定した。

【0165】

結果

肝臓の外観：犠死の時点で、対照動物の肝臓は正常な全体形態を示したが、BDL動物の肝臓は腫脹していた。肝重量は、偽手術対照と比較してBDLラットでは有意に増大していた(犠死時の平均重量：手術後2週間目、偽手術では8.1g；BDLでは14.1g；手術後4週間目、偽手術では9.0g；BDLでは19.4g)(図4、パネルA)。0~3等級を用いた肝切片の半定量的採点は、2週間目と比較して4週間目では肝臓の有意に大きな構造変化を示した(図4、パネルB)。図4、パネルAは、胆管結紮(BDL)ラットまたは偽手術ラットにおける肝重量を示す。データは平均+SEMで示している。***、 $P < 0.0001$ 。パネルBは、各群の肝臓における構造変化の採点を示す。データは平均+SEMで示している。**、 $P = 0.0094$ 。パネルCは、手術後2週間目と4週間目の偽手術ラットおよびBDLラットにおける肝構造を示すシリウスレッド顕微鏡写真を示す。門脈路の周囲の肝構造は、偽手術ラットと比較してBDLラットでは明らかに破壊されている。コラーゲンを赤色で強調している。もとの倍率は40倍であった。

【0166】

組織学的検査下で、偽手術動物の肝臓は線維症の徴候を示さず、顕微鏡的に正常であった(図4C)。BDLラットの肝臓では、著明な胆管増殖が観察された。手術後2週間目の群では、増殖は門脈路の周囲に位置したが、4週間目の群では増殖が広がっていた(図4C)。コラーゲン沈着が胆管構造の周囲で認められた。炎症はわずかであり、門脈路に限定された。細胞内胆汁うっ滞、胆管塞栓、胆汁梗塞または肝細胞ロゼット形成のいずれに関しても、胆汁うっ滞の徴候は見られなかった。

【0167】

CO3-610Cレベルの変化：図5は、パネルAでは胆管結紮(BDL)ラットまたは偽手術ラットにおけるMMP-9媒介性CO3分解の血清レベルを示す。データは平均+平均の標準誤差として示している。手術後2週間目、*** $P < 0.0001$ および手術後4週間目、** $P = 0.0014$ 。パネルBでは、CO3-610CのΔ値(終了時-基線時、ペアード)を示す。手術後2週間目、 $P < 0.0001$ および手術後4週間目、 $P = 0.0016$ 。パネルCでは、BDLラットおよび偽手術ラットにおけるCTX-IIレベルを示す。データは平均+平均の標準誤差として示している。

【0168】

BDL群では、偽手術群と比較してCO3-610Cレベルが有意に上昇していた(平均値：手術後2週間目の偽手術群39.7ng/ml、BDL群100.3ng/ml；群間の平均上昇率は153%であった；手術後4週間目の偽手術群39.7、BDL群92.6ng/ml；群間の平均上昇率は133%であった)(図5、パネルAおよびB)。偽手術群では変化がなかった。II型コラーゲン分解を示すCTX-IIレベルは、偽手術群またはBDL群において変化しなかった(図5、パネルC)。

【0169】

III型コラーゲン遺伝子発現：図6は、BDLまたは偽手術ラットにおけるIII型コラーゲン遺伝子発現を示す。データは平均+平均の標準誤差として示している；手術後2週間目、 $P < 0.0001$ および手術後4週間目、 $P = 0.0006$ 。

【0170】

III型コラーゲンa1鎖のmRNAは、偽手術ラットと比較して両方のBDL群で有意に上昇していた。

【0171】

ウェスタンブロット法およびデンシトメトリー：図7は、A)手術後2週間目と4週間目のウェスタンブロット法、およびB)デンシトメトリーによって定量化したウェスタン

プロット法からのバンドによって評価した B D L 群および偽手術群のラットの肝臓における C O 3 - 6 1 0 C の発現の変化を示す。

【 0 1 7 2 】

ウエスタンブロット分析は、偽手術ラットにおいて非常に低いレベルの C O 3 - 6 1 0 C を示した (図 7、パネル A)。手術後 2 週間目およびそれ以後は C O 3 - 6 1 0 C レベルが著しく上昇した (図 7、パネル A)。結果をデンストメトリー分析によって定量化した (図 7、パネル B)。

【 0 1 7 3 】

組織像分析：図 8 のパネル A は、上の列ではシリウスレッドで染色した B D L ラットまたは偽手術ラットからの組織学的切片を示す。下の列は、肝臓における総コラーゲン含量 (赤色) を定量するためにマスクされた組織学的切片を示す。パネル B は、V i s i o p h a r m ソフトウェアによって定量化した総コラーゲンを示す - 手術後 2 週間目、P = 0 . 0 0 8 1 ; 手術後 4 週間目、P = 0 . 0 0 4 7 。

【 0 1 7 4 】

シリウスレッドで染色し、V i s i o p h a r m ソフトウェアを用いて増強した組織学的切片は、B D L 処置ラットにおいて経時的なコラーゲン含量の増加を示した (図 8、パネル A)。コラーゲンを示すマスク中の赤色は、同じソフトウェアを用いて定量化されたものであり (図 8、パネル B)、偽手術ラットと比較して B D L 処置ラットにおける総コラーゲン含量の有意の増加を確認した (手術後 2 週間目、P = 0 . 0 0 8 1 ; 手術後 4 週間目、P = 0 . 0 0 4 7)。

【 0 1 7 5 】

相関：図 9 のパネル A は、C O 3 - 6 1 0 C に対する C o l 3 a 1 の相関が $R^2 = 0 . 6 9 9 3$ 、 $P < 0 . 0 0 0 1$ で認められたことを示す。パネル B では、コラーゲン % に対する C O 3 - 6 1 0 C の相関が $R^2 = 0 . 2 2 7 8$ および $P = 0 . 0 0 5 0$ で認められた。パネル C では、コラーゲン % に対する C o l 3 a 1 の相関が $R^2 = 0 . 5 4 0 9$ 、 $P < 0 . 0 0 0 1$ で認められた。

【 0 1 7 6 】

以下について相関が認められた：C O 3 - 6 1 0 C に対する C o l 3 a 1 m R N A が $R^2 = 0 . 6 9 9 3$ および $P < 0 . 0 0 0 1$ で (図 9 A)、v i s i o p h a r m によって定量化されたコラーゲン % に対する C O 3 - 6 1 0 C が $R^2 = 0 . 2 2 7 8$ および $P = 0 . 0 0 5 0$ で (図 9 B)、ならびに v i s i o p h a r m によって定量化されたコラーゲン % に対する C o l 3 a 1 m R N A が $R^2 = 0 . 5 4 0 9$ および $P < 0 . 0 0 0 1$ で (図 9 C)。

【 0 1 7 7 】

E C M リモデリングは組織の発生、維持および病因の総合プロセスである。正しく且つ最適な組織の方向づけと質のために、タンパク質分解活性は、細胞移動、損傷組織の除去および新しいタンパク質の分離のためのプロセスにおいて不可欠である (1 0 8 : 1 0 9)。特異的なマトリックス分解産物であるネオエピトープは、肝線維症のマトリックス代謝回転の新しい生化学的マーカの同定のためおよび線維症の病因を理解するために重要であると考えられる。現在のところ、線維症の病因における E C M リモデリングの評価を可能にする使用可能な測定技術または生化学的マーカは存在しない。

【 0 1 7 8 】

この実施例では、インビボ状況下で C O 3 - 6 1 0 C マーカを検討するため、6 ヶ月齢の B D L ラットを選択した。前記ラットは、より若齢のラットに比べて低いコラーゲンリモデリングを有することが以前に示されていたからである。ラットは骨格的に成熟し、骨端軟骨板はほとんど休止していて、そのため全体的なコラーゲン代謝回転に寄与する度合がはるかに低い。これは、バイオマーカに対する感受性と特異性に影響を及ぼす。これらのラットは、定量的な組織学的分析および重量増加を伴う腫脹の両方によって評価されたように、明らかに肝線維症を示し、従ってこのモデルは E C M リモデリングの証拠、特に血清中の I I I 型コラーゲンの証拠を探索するために適切であった。

【0179】

本発明のデータは、MMP-9 媒介性 III 型コラーゲン分解からのネオエピトープ CO3-610C が肝線維症についての生化学的診断マーカーであり、BDL 処置ラットでは偽手術ラットから 153% までの血清中の平均上昇を有することを明らかに示す。

【0180】

CO3-610C マーカーの上昇についての生物学的な理論的根拠をさらに検討するため、健常肝臓と疾患肝臓からタンパク質抽出を行った。ウエスタンブロット法によって主要バンドを同定し、これが、疾患肝臓では豊富であるが、健常肝臓では豊富でないタンパク質断片であることを示唆した。これは、この新規マーカーの病理学的正確さの証拠を提供する。

10

【0181】

肝臓の病的代謝回転像をさらに検討するため、III 型コラーゲンの mRNA を測定した。偽手術を受けたラットと比較して BDL ラットでは mRNA の上昇を認め、これはこれまでの所見と一致する。これらのデータは、肝線維症が単なる ECM タンパク質の蓄積だけではなく、組織形成と組織分解の両方が高度に上方調節される、加速された代謝回転状況でもあることを強く示唆する。組織形成は組織分解を上回り、経時的に瘢痕組織の蓄積を導く。これまでの研究者たちは、肝線維症を評価するために他のマトリックス代謝回転タンパク質を使用し、その 1 つは III 型コラーゲン形成マーカーである N 末端 III 型プロコラーゲンであった。このマーカーは III 型コラーゲンの形成を示し、これまでの試験で肝線維症において上昇することが示されている。

20

【0182】

生化学的マーカー CO3-610C の動力学をさらに理解するため、様々な相関関係を検討した。最も重要な点として、定量的組織学検査によって肝臓で測定された線維症の程度に対する CO3-610C の有意の相関が存在した。肝線維症のレベルは III 型コラーゲンの mRNA の発現レベルに相関した。最後に、CO3-610C は肝臓における III 型コラーゲンの mRNA に相関した。合わせて考慮すると、肝臓における病的プロセスと全身性生化学的マーカー CO3-610C のレベルには有意の相関が存在した。加えて、組織抽出は、循環レベルが局所的に生成されることの証拠を提供した。

【0183】

< 実施例 6：ヒト血清試料に関する ELISA >

30

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) (n = 5)、強皮症 (n = 5)、慢性 C 型肝炎ウイルス感染症 (n = 5) を有する患者、および健常対照 (n = 5) からヒト血清試料を得た。CO3-610C 断片の濃度を測定するために血清試料を CO3-610C ELISA において試験した (上記実施例 4 参照)。結果を図 10 に示す。健常被験者からの血清試料は 30 ng/ml 未満の CO3-610C 断片の濃度を有していたが、疾患被験者は循環中で高いレベルを有することが認められ、罹患線維症組織における大量の組織リモデリングを示唆した。

【0184】

< 実施例 7：クローン nb94 の反応性 >

40

マウスを、オボアルブミンに結合した合成ペプチド KAFVFP (配列番号 1167) (KAFVFPKESD-GGC-OVA (配列番号 1049)) で免疫し、脾細胞を融合のために使用して、モノクローナル抗体を、ストレプトアビジンで前被覆したマイクロタイタープレートのウェル中に固定化したビオチニル化 KAFVFP (配列番号 1167)、すなわち (KAFVFPKESD-ビオチン (配列番号 1049)) に対する反応性に関して試験した。ビオチニル化 KAFVFPKESD (配列番号 1049) に結合する抗体をさらなる特徴づけのために選択し、前記抗体は、KAFVFPKESD (配列番号 1049) との共インキュベーションによって阻害され得るが、伸長ペプチド RKAFVFPKESD (配列番号 1166) によっては阻害されない。好ましいモノクローナル抗体を NB94-37-1A7 と称した。

【0185】

50

競合E L I S Aを使用して、基本的にストレプトアビジン被覆マイクロタイタープレート
のウェル中に固定化したビオチニル化K A F V F P K E S D (配列番号1 0 4 9) (0
・ 1 5 n g / m lで使用した) に関して上述したように、試料とモノクローナル抗体N B
9 4 - 3 7 - 1 A 7をインキュベートし(2 0 で9 0分間)、次いで洗浄して、次にペ
ルオキシダーゼ結合抗マウス免疫グロブリンを添加した。競合のために以下の物質を2倍
希釈で使用した: (1) 合成K A F V F P (配列番号1 1 6 7) ペプチド; (2) C R P
に無関係なナンセンスペプチド(K N E G T G); (3) ヒト血清試料のプール; (4)
M M P 3で7日間タンパク質分解切断し、その後プロテアーゼ活性をブロックするために
E D T Aを添加して停止させ、試験時まで- 8 0 で保存したC R P; (5) (4)と同じ
であるがM M P 3の代わりにM M P 8を使用したC R P; (6) M M P 3の代わりにカ
テプシンK (およびカテプシンK活性をブロックするための阻害剤としてE 6 4)を使用
した(2日間) ことを除いて(4)と同じC R P。

10

【 0 1 8 6 】

データは、モノクローナル抗体N B 9 4 - 3 7 - 1 A 7が合成ペプチドK A F V F P K
E S D (配列番号1 0 4 9)、ならびにM M P 3およびM M P 8で切断したC P Rと強く
結合することを明らかにする。カテプシンKによるC R Pの切断は、モノクローナル抗体
N B 9 4 - 3 7 - 1 A 7によって認識される分析物の放出がより少ない。最後に、データ
は、抗体がヒト血清中のペプチド断片に結合することを示し、循環ペプチド断片中にこの
配列が存在することを確認する。

【 0 1 8 7 】

20

< 実施例 8 : 生物学的関連試料中のC O 3 : ラットの四塩化炭素(C C l 4) 誘発性肝硬
変におけるC O 3 レベル >

試験動物および肝硬変の誘発:

この試験は、線維症または肝硬変を有する5 2匹の雄性W i s t a rラットと3 5匹の
雄性W i s t a r対照ラットを含んだ。ラットに線維症または肝硬変を発症させるために
、四塩化炭素(C C l 4) およびフェノバルビタール処置による誘発プログラムに3ヶ月
齢の動物を含めた。C C l 4を吸入によって週に2回投与し、フェノバルビタール(0 .
3 g / l) を飲料水に添加した。試験期間を通じて動物には水と飼料を自由に摂取させた
。

【 0 1 8 8 】

30

線維症の定量化:

肝切片(4 μ m) を飽和ピクリン酸(S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s
, M O) 中の0 . 1 % シリウスレッドF 3 B (S i g m a - A l d r i c h) で染色した
。各動物につきシリウスレッド染色肝切片の3 6視野を分析することによって相対的線維
症面積(総肝面積のパーセンテージとして表す) を評価した。各々の視野を1 0 倍の倍率
で取得した[E 6 0 0 顕微鏡(N i k o n) およびR T - S l i d e r S P O T デジタ
ルカメラ(D i a g n o s t i c I n s t r u m e n t s , I n c . , S t e r l i n
g H e i g h t s , M I) 。結果をコンピュータ化B i o q u a n t L i f e S c
i e n c e 形態計測システムを用いて分析した。相対的線維症面積を評価するため、測定
されたコラーゲン面積を正味の視野面積で除して、次に1 0 0 を乗じた。総視野面積から
血管内腔面積を差し引いて正味線維症面積の最終算定を得た。分析した各動物から、パー
センテージとしての線維症の量を測定し、平均値を提示した。

40

【 0 1 8 9 】

線維症 / 肝硬変病期による群の分類:

動物を線維症および肝硬変の4つの異なる病期に分類し(A 群: 中等度の線維症、B 群
: 進行した線維症、C 群: 中等度の肝硬変、およびD 群: 進行した肝硬変)、この分類は
、シリウスレッド陽性肝面積のパーセンテージによって決定した(A 群: < 5 %、B 群:
5 ~ 1 0 %、C 群: 1 0 ~ 1 5 % およびD 群: > 1 5 %)。このために、対照ラットと線
維症 / 肝硬変ラットを、C C l 4 処置の間の4つの異なる時点: 肝硬変誘発プログラムの
開始後8、1 2、1 6 および2 0 週間目を考慮して検討した。

50

【0190】

ヒアルロン酸測定：

サンドイッチELISAキット(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)を用いて血清ヒアルロナンを測定した。

【0191】

統計：

結果の統計分析は、適切な場合は不對スチューデントt検定によって実施した。データは平均 $\pm$ S.E.M.として表し、0.05以下のp値を有意とみなした。

【0192】

試験計画：

このプロトコールに含めた動物を以下の群の1つに無作為に割り当てた。A / 8週間のCCl₄処置、B / 12週間のCCl₄処置、C / 16週間のCCl₄処置およびD / 20週間のCCl₄処置。並行して、4つの対照群を同じ時点で検討した。13匹の線維症ラットと7匹に対照ラットを各々の群に含めた。試験終了時に、3日間の適応地期間中ラットを標準的な代謝ケージ(Tecniplast Deutschland, Hohe npeissenberg, Germany)に入れ、その後24時間の尿収集を実施した。尿量を重量測定で決定した。適応期間中、ラットに水道水と飼料を自由に摂取させた。次に、24時間の尿試料を2,500rpmで5分間遠心分離し、10のポリプロピレンチューブに分取した(各々400 μ L)。尿試料をその後の分析のために-80で保存した。

【0193】

予定されていた剖検時に、ラットを計量し、ペントバルビタール(50mg/kg)で麻酔して、断頭した。血液を採取し、室温で20分間放置して凝固させ、その後2500rpmで10分間遠心分離した。血清をポリプロピレンチューブにアリコートとして収集し(各々400 μ L)、ドライアイスを通して-80の冷凍庫に移した。CCl₄処置の開始時の基線血液試料の収集は、感染の危険性を上昇させ得るおよび/または誘発される病態生理学的プロセスの進行に支障をきたす可能性がある実験モデルの変化を導入し得る、付加的な介入処置を回避するため、考慮しなかった。組織学的検査およびシリウスレッド染色のために、肝臓の左葉の半分を10%中性緩衝ホルマリン中に16時間入れ、パラフィンに包埋して、4 μ m厚さの切片に切断した。肝線維症の定量化後、使用しなかったパラフィンブロック材料をバイオマーカー定量化のために保存した。左葉の他の半分は液体窒素中で急速冷凍し、ウエスタンブロット法、RT-PCRまたは免疫組織化学分析のために保存した。肝線維症面積、血清および尿重量オスモル濃度、Na⁺およびK⁺、アルブミン、クレアチニン、アラニンアミノトランスフェラーゼおよび乳酸デヒドロゲナーゼの測定を試験材料および方法の章に従って実施した。

【0194】

結果：

モデルの組織学的有効性確認：

肝コラーゲンを、肝切片のシリウスレッド染色によってすべての試験動物において定量した。各動物についての最終データを、36の連続する顕微鏡視野で観察されたレッド染色の平均として収集した(図12)。

【0195】

図12は、四塩化炭素でそれぞれ8週間および20週間処置したラットNo. 1(左側)およびラットNo. 43(右側)の肝臓におけるコラーゲン蓄積を定量するために使用した36の画像の2セットからの代表的写真を示す。

【0196】

血清CO3マーカーは、対照ラットと比較して線維症および肝硬変ラットの両方において統計的に有意の上昇を示す。動物を、線維症を定量するために使用した肝臓の完全自動化シリウスレッド染色手順に従って分類した(図13および14)。

【0197】

図13は、Hospital Clinic (Barcelona)において実施されたCCl₄吸入ラットおよび対照ラットにおける血清CO₃レベルを示す。各々の点は1匹の動物を表す。ラットを、線維症を定量するために使用した肝臓のシリウスレッド染色のコンピュータ画像解析に従って分類した。

【0198】

血清CO₃および肝臓のシリウスレッド染色の定量値を各々の動物において検討した場合、2つの変数の間で統計的に有意の相関を認めた($R^2 = 0.4087$; $n = 21$) (図14)。

【0199】

CO₃-610Cのレベルを肝線維症の血清学的指標であるヒアルロン酸(HA)と比較した。HAレベルを市販のELISAキットで定量し、結果は、肝硬変ラットと線維症動物におけるこのECM成分の有意の上昇を示す(図15および16)。

【0200】

シリウスレッドに対するCO₃の相関はHAの相関を上回った。肝線維症の組織学的定量化における変動の70%以上がCO₃の血清学的測定によって説明できる。残りの30%は未知の変数または固有の変動性によるものである。これに対し、ヒアルロン酸の測定によっては肝線維症の25%しか説明できない(図15)。

【0201】

これまでの結果から予想されたように、CO₃とヒアルロン酸の間で相関は認められず、それらが肝線維症の発症における2つの独立した病態生理学的プロセスの結果であることを示唆した(図17)。

【0202】

実施例9：マウスにおけるブレオマイシン誘発性皮膚線維症

マウスをPBSまたはブレオマイシンの皮膚への適用によって処置した。MMP-9媒介性III型コラーゲン(CO₃)分解断片CO₃-610Cの尿中レベルの上昇は、マウスにおける皮膚線維症の進行と関連した。

【0203】

図18は、処置の8週間目のPBS処置ラットからの皮膚切片(パネルA)および処置の8週間目のブレオマイシン処置ラットからの皮膚切片(パネルB)を示す。2週間($P = 0.0029$)、4週間($P = 0.0004$)、6週間($P < 0.0001$)および8週間($P < 0.0001$)にわたってPBS($n = 7$ /時点)およびブレオマイシン($n = 13$ /時点)で処置したマウスの間での皮膚厚さの増大をパネルCおよびDにプロットしている。全体的な皮膚厚さは、試験期間中、PBS($n = 28$)およびブレオマイシン($n = 52$)処置マウスの間で増大する($P < 0.0001$)。皮膚幅は、写真をサンプリングする代わりに皮膚切片当たりの全体的な数としてVisiopharmソフトウェアによって計算した。

【0204】

図19は、試験の時点全体を通して有意の上昇を明らかにする、CO₃-610C尿アッセイの結果を示す。この図は、各時点についての結果(終了時点についてPBS処置 $n = 7$ 、ブレオマイシン処置 $n = 13$)およびすべての時点についての集合的なCO₃-610Cレベル(PBS処置マウス $n = 28$ およびブレオマイシン処置マウス $n = 52$)を示す。2週間、 $P = 0.0008$ 、4週間、 $P < 0.0001$ 、6週間、 $P < 0.0001$ 、8週間、 $P < 0.0001$ および全体、 $P < 0.0001$ 。

【0205】

図20は、2週間および8週間の処置後の対照CとブレオマイシンBに関するCO₃-610Cウエスタンブロット像を示す(パネルA)。すべての時点についてのCO₃-610Cデンシトメトリー測定(終了時点についてPBS処置 $n = 7$ 、ブレオマイシン処置 $n = 13$)および集合的なCO₃-610Cレベル(PBS処置マウス $n = 28$ およびブレオマイシン処置マウス $n = 52$)をパネルBに示し、CO₃-610Cレベルの統計的に有意の上昇($P < 0.0001$)を明らかにする。

10

20

30

40

50

【 0 2 0 6 】

図 2 1 に認められるように、尿アッセイにおける C O 3 - 6 1 0 レベルは皮膚厚さの進行、従って総コラーゲン沈着と相関することが認められた。 $r = 0.4883$ 、 $R^2 = 0.2384$ 。

【 0 2 0 7 】

図 2 2 に認められるように、統計的に有意の相関が C O 3 - 6 1 0 E L I S A 尿アッセイとウエスタンブロットデンストメトリー測定の間で認められた ($r = 0.6528$ 、 $P < 0.0001$)。

【 0 2 0 8 】

本明細書において、明白に指示されない限り、「または」の語は、記述される状態のいずれかまたは両方を満たす場合、真値を返す演算子 (operator) の意味で使用され、これに対し演算子「排他的にまたは」は状態の 1 つだけを満たすことが求められる。「含む」という語は、「から成る」を意味するのではなく「包含する」の意味で使用される。上記で認識したすべての先行教示は参照により本明細書に組み込まれる。本明細書におけるいかなる先行公表文献の認識も、その教示がその日現在、オーストラリアまたは別の場所での共通の一般的知識であったことの承認または表明であると解釈されるべきではない。

10

【 0 2 0 9 】

[文献リスト]

【表 3 7 A】

Reference List

1. World Health Organization. Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Reducing Risks, Promoting Healthy Life, Geneva: WHO, 2002:1-230.
2. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008;214:199-210.
3. Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004;1:98-105. 10
4. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:349-363.
5. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007;117:524-529.
6. Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S47-S56. 20
7. Gagliano N, Arosio B, Grizzi F, Masson S, Tagliabue J, Dioguardi N, Vergani C, Annoni G. Reduced collagenolytic activity of matrix metalloproteinases and development of liver fibrosis in the aging rat. *Mech Ageing Dev* 2002;123:413-425.
8. Laurent GJ. Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. *Am J Physiol* 1987;252:C1-C9.
9. Mays PK, McNulty RJ, Campa JS, Laurent GJ. Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues. Importance of degradation of newly synthesized collagen in regulating collagen production. *Biochem J* 1991;276 (Pt 2):307-313. 30
10. Garrone R, Lethias C, Le Guellec D. Distribution of minor collagens during skin development. *Microsc Res Tech* 1997;38:407-412.
11. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1531-1546. 40
12. Phan SH, Thrall RS. Pulmonary Fibrosis. *Lung Biology in Health and Disease*. 80 ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995.

【表 3 7 B】

13. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The hepatic extracellular matrix. II. Ontogenesis, regeneration and cirrhosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993;423:77-84.
14. Gilliam AC. Scleroderma. *Curr Dir Autoimmun* 2008;10:258-279.
15. Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006;10:76-99. 10
16. Heinegard D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J* 1989;3:2042-2051.
17. Svensson L, Oldberg A, Heinegard D. Collagen binding proteins. *Osteoarthritis and Cartilage* 2001;9:S23-S28.
18. Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. Structure and function of aggrecan. *Cell Res* 2002;12:19-32.
19. Krusius T, Gehlsen KR, Ruoslahti E. A fibroblast chondroitin sulfate proteoglycan core protein contains lectin-like and growth factor-like sequences. *J Biol Chem* 1987;262:13120-13125. 20
20. Yang BL, Zhang Y, Cao L, Yang BB. Cell adhesion and proliferation mediated through the G1 domain of versican. *J Cell Biochem* 1999;72:210-220.
21. Rauch U, Karthikeyan L, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK. Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain. *J Biol Chem* 1992;267:19536-19547. 30
22. Yamada H, Watanabe K, Shimonaka M, Yamaguchi Y. Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family. *J Biol Chem* 1994;269:10119-10126.
23. Blochberger TC, Cornuet PK, Hassell JR. Isolation and partial characterization of lumican and decorin from adult chicken corneas. A keratan sulfate-containing isoform of decorin is developmentally regulated. *J Biol Chem* 1992;267:20613-20619.
24. Fisher LW, Termine JD, Young MF. Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem* 1989;264:4571-4576. 40
25. Toyama-Sorimachi N, Sorimachi H, Tobita Y, Kitamura F, Yagita H, Suzuki K, Miyasaka M. A novel ligand for CD44 is serglycin, a hematopoietic cell lineage-specific proteoglycan. Possible involvement in lymphoid cell adherence and activation. *J Biol Chem* 1995;270:7437-7444.

【表 3 7 C】

26. Bartlett AH, Hayashida K, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Mol Cells* 2007;24:153-166.
27. Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 1993;73:1435-1444.
28. Olsen BR. Life without perlecan has its problems. *J Cell Biol* 1999;147:909-912.
29. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340:448-454. 10
30. Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373-384.
31. Guo J, Friedman SL. Hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2007;27:413-426.
32. Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJ, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, Clark N, Murphy G. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology* 1996;24:176-184. 20
33. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Lee CS, Chun JG, McKee PA. Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. *Blood* 2006;107:1397-1404.
34. Acharya PS, Zukas A, Chandan V, Katzenstein AL, Pure E. Fibroblast activation protein: a serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol* 2006;37:352-360. 30
35. Levy MT, McCaughan GW, Marinos G, Gorrell MD. Intrahepatic expression of the hepatic stellate cell marker fibroblast activation protein correlates with the degree of fibrosis in hepatitis C virus infection. *Liver* 2002;22:93-101.
36. Meyer O. Prognostic markers for systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 2006;73:490-494.
37. Hummers LK. Microvascular damage in systemic sclerosis: detection and monitoring with biomarkers. *Curr Rheumatol Rep* 2006;8:131-137. 40
38. McHugh NJ, Distler O, Giacomelli R, Riemekasten G. Non organ based laboratory markers in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:S32-S38.
39. Muller-Quernheim J. Serum markers for the staging of disease activity of sarcoidosis and other interstitial lung diseases of unknown etiology. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1998;15:22-37.

【表 3 7 D】

40. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. Clin Chim Acta 2007;381:107-113.
41. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of hepatic fibrosis, fibrogenesis and genetic pre-disposition pending between fiction and reality. J Cell Mol Med 2007;11:1031-1051. 10
42. Mariat C. [Diagnosis and follow-up of chronic kidney graft dysfunction: from DFG to new biomarkers]. Nephrol Ther 2008;4 Suppl 3:S204-S207.
43. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, Kato S, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Abe Y, Kubota K, Saito S, Iwasaki T, Terauchi Y, Togo S, Maeyama S, Nakajima A. High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. J Gastroenterol 2007;42:573-582.
44. Wong VS, Hughes V, Trull A, Wight DG, Petrik J, Alexander GJ. Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. J Viral Hepat 1998;5:187-192. 20
45. Parise ER, Oliveira AC, Figueiredo-Mendes C, Lanzoni V, Martins J, Nader H, Ferraz ML. Noninvasive serum markers in the diagnosis of structural liver damage in chronic hepatitis C virus infection. Liver Int 2006;26:1095-1099.
46. McHutchison JG, Blatt LM, de Medina M, Craig JR, Conrad A, Schiff ER, Tong MJ. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. J Gastroenterol Hepatol 2000;15:945-951. 30
47. Camacho VR, Silveira TR, Oliveira JR, Barros SG, Cerski CT. Relationship between serum concentrations of type III procollagen, hyluronic acid and histopathological findings in the liver of HCV-positive blood donors. Arq Gastroenterol 2007;44:118-122.
48. Lorenzo-Zuniga V, Bartoli R, Masnou H, Montoliu S, Morillas RM, Planas R. Serum concentrations of insulin-like growth factor-I (igf-I) as a marker of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Dig Dis Sci 2007;52:3245-3250. 40
49. Manolakopoulos S, Bethanis S, Liapi C, Stripeli F, Sklavos P, Margeli A, Christidou A, Katsanika A, Vogiatzakis E, Tzourmakliotis D, Theocharis S. An assessment of serum leptin levels in patients with chronic viral hepatitis: a prospective study. BMC Gastroenterol 2007;7:17.

【表 3 7 E】

50. Camacho VR, Silveira TR, Oliveira JR, Barros SG, Cerski CT. Relationship between serum concentrations of type III procollagen, hyluronic acid and histopathological findings in the liver of HCV-positive blood donors. *Arq Gastroenterol* 2007;44:118-122.
51. Leroy V, Hilleret MN, Sturm N, Trocme C, Renversez JC, Faure P, Morel F, Zarski JP. Prospective comparison of six non-invasive scores for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007;46:775-782. 10
52. Trocme C, Leroy V, Sturm N, Hilleret MN, Bottari S, Morel F, Zarski JP. Longitudinal evaluation of a fibrosis index combining MMP-1 and PIINP compared with MMP-9, TIMP-1 and hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C treated by interferon-alpha and ribavirin. *J Viral Hepat* 2006;13:643-651.
53. Zheng M, Cai WM, Weng HL, Liu RH. ROC curves in evaluation of serum fibrosis indices for hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2002;8:1073-1076.
54. Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska ME, Bauer M, Kaczmarek M, Voelker M, Schuppan D. Serum fibrosis markers as predictors of an antifibrotic effect of interferon alfa in children with chronic hepatitis B. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:843-848. 20
55. Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska ME, Kaczmarek M, Voelker M, Schuppan D. Matrix-derived serum markers in monitoring liver fibrosis in children with chronic hepatitis B treated with interferon alpha. *World J Gastroenterol* 2006;12:3338-3343.
56. Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Hadziyannis E, Georgiou A, Kafiri G, Tiniakos DG, Manesis EK, Archimandritis AJ. Serum adipokine levels in chronic liver diseases: association of resistin levels with fibrosis severity. *Scand J Gastroenterol* 2008;43:1128-1136. 30
57. Patel K, Gordon SC, Jacobson I, Hezode C, Oh E, Smith KM, Pawlotsky JM, McHutchison JG. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2004;41:935-942.
58. Lieber CS, Weiss DG, Paronetto F. Value of fibrosis markers for staging liver fibrosis in patients with precirrhotic alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2008;32:1031-1039. 40
59. Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez-Bauer E, Bruguera M, Sanchez-Tapias JM, Rodes J. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002;36:986-992.
60. Bourliere M, Penaranda G, Renou C, Botta-Fridlund D, Tran A, Portal I, Lecomte L, Castellani P, Rosenthal-Allieri MA, Gerolami R, Ouzan D, Deydier R, Degott C, Halfon

【表 3 7 F】

- P. Validation and comparison of indexes for fibrosis and cirrhosis prediction in chronic hepatitis C patients: proposal for a pragmatic approach classification without liver biopsies. *J Viral Hepat* 2006;13:659-670.
61. Cacoub P, Carrat F, Bedossa P, Lambert J, Penaranda G, Perronne C, Pol S, Halfon P. Comparison of non-invasive liver fibrosis biomarkers in HIV/HCV co-infected patients: the fibrovic study--ANRS HC02. *J Hepatol* 2008;48:765-773. 10
62. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:538-544.
63. Grigorescu M, Rusu M, Neculoiu D, Radu C, Serban A, Catanas M, Grigorescu MD. The FibroTest value in discriminating between insignificant and significant fibrosis in chronic hepatitis C patients. The Romanian experience. *J Gastrointest Liver Dis* 2007;16:31-37. 20
64. Halfon P, Bacq Y, De MA, Penaranda G, Bourliere M, Ouzan D, Tran A, Botta D, Renou C, Brechot MC, Degott C, Paradis V. Comparison of test performance profile for blood tests of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007;46:395-402.
65. Halfon P, Bourliere M, Deydier R, Botta-Fridlund D, Renou C, Tran A, Portal I, Allemand I, Bertrand JJ, Rosenthal-Allieri A, Rotily M, Sattonet C, Benderitter T, Saint Paul MC, Bonnot HP, Penaranda G, Degott C, Masseyeff MF, Ouzan D. Independent prospective multicenter validation of biochemical markers (fibrotest-actitest) for the prediction of liver fibrosis and activity in patients with chronic hepatitis C: the fibropaca study. *Am J Gastroenterol* 2006;101:547-555. 30
66. Leroy V, Halfon P, Bacq Y, Boursier J, Rousselet MC, Bourliere M, De MA, Sturm N, Hunault G, Penaranda G, Brechot MC, Trocme C, Cales P. Diagnostic accuracy, reproducibility and robustness of fibrosis blood tests in chronic hepatitis C: a meta-analysis with individual data. *Clin Biochem* 2008;41:1368-1376.
67. Ratzu V, Massard J, Charlotte F, Messous D, Imbert-Bismut F, Bonyhay L, Tahiri M, Munteanu M, Thabut D, Cadranet JF, Le BB, de L, V, Poynard T. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 2006;6:6. 40
68. Poynard T, Imbert-Bismut F, Ratzu V, Chevret S, Jardel C, Moussalli J, Messous D, Degos F. Biochemical markers of liver fibrosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial. *J Viral Hepat* 2002;9:128-133.

【表 3 7 G】

69. Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le CS, Messous D, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratzu V. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2004;50:1344-1355.
70. Poynard T, Morra R, Halfon P, Castera L, Ratzu V, Imbert-Bismut F, Naveau S, Thabut D, Lebrech D, Zoulim F, Bourliere M, Cacoub P, Messous D, Munteanu M, de L, V. Meta-analyses of FibroTest diagnostic value in chronic liver disease. *BMC Gastroenterol* 2007;7:40. 10
71. Ngo Y, Munteanu M, Messous D, Charlotte F, Imbert-Bismut F, Thabut D, Lebray P, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratzu V, Poynard T. A prospective analysis of the prognostic value of biomarkers (FibroTest) in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2006;52:1887-1896.
72. Naveau S, Raynard B, Ratzu V, Abella A, Imbert-Bismut F, Messous D, Beuzen F, Capron F, Thabut D, Munteanu M, Chaput JC, Poynard T. Biomarkers for the prediction of liver fibrosis in patients with chronic alcoholic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:167-174. 20
73. Myers RP, Tainturier MH, Ratzu V, Piton A, Thibault V, Imbert-Bismut F, Messous D, Charlotte F, Di M, V, Benhamou Y, Poynard T. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003;39:222-230.
74. Jacqueminet S, Lebray P, Morra R, Munteanu M, Devers L, Messous D, Bernard M, Hartemann-Heurtier A, Imbert-Bismut F, Ratzu V, Grimaldi A, Poynard T. Screening for liver fibrosis by using a noninvasive biomarker in patients with diabetes. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:828-831. 30
75. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:538-544.
76. Poynard T, Zoulim F, Ratzu V, Degos F, Imbert-Bismut F, Deny P, Landais P, El HA, Slama A, Blin P, Thibault V, Parvaz P, Munteanu M, Trepo C. Longitudinal assessment of histology surrogate markers (FibroTest-ActiTest) during lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B infection. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1970-1980. 40
77. Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le CS, Messous D, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratzu V. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2004;50:1344-1355.

【表 3 7 H】

78. Myers RP, Tainturier MH, Ratzu V, Piton A, Thibault V, Imbert-Bismut F, Messous D, Charlotte F, Di M, V, Benhamou Y, Poynard T. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003;39:222-230.
79. Carvalho-Filho RJ, Schiavon LL, Narciso-Schiavon JL, Sampaio JP, Lanzoni VP, Ferraz ML, Silva AE. Optimized cutoffs improve performance of the aspartate aminotransferase to platelet ratio index for predicting significant liver fibrosis in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus co-infection. *Liver Int* 2008;28:486-493. 10
80. Al-Mohri H, Cooper C, Murphy T, Klein MB. Validation of a simple model for predicting liver fibrosis in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *HIV Med* 2005;6:375-378.
81. Cales P, Laine F, Boursier J, Deugnier Y, Moal V, Oberti F, Hunault G, Rousselet MC, Hubert I, Laafi J, Ducluzeaux PH, Lunel F. Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD. *J Hepatol* 2008.
82. Paggi S, Colli A, Fraquelli M, Vigano M, Del PP, Facciotto C, Colombo M, Ronchi G, Conte D. A non-invasive algorithm accurately predicts advanced fibrosis in hepatitis C: a comparison using histology with internal-external validation. *J Hepatol* 2008;49:564-571. 20
83. Trang T, Petersen JR, Snyder N. Non-invasive markers of hepatic fibrosis in patients co-infected with HCV and HIV: comparison of the APRI and FIB-4 index. *Clin Chim Acta* 2008;397:51-54.
84. Snyder N, Gajula L, Xiao SY, Grady J, Luxon B, Lau DT, Soloway R, Petersen J. APRI: an easy and validated predictor of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:535-542. 30
85. Snyder N, Nguyen A, Gajula L, Soloway R, Xiao SY, Lau DT, Petersen J. The APRI may be enhanced by the use of the FIBROSpect II in the estimation of fibrosis in chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2007;381:119-123.
86. Hongbo L, Xiaohui L, Hong K, Wei W, Yong Z. Assessing routine and serum markers of liver fibrosis in CHB patients using parallel and serial interpretation. *Clin Biochem* 2007;40:562-566. 40
87. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:538-544.

【表 3 7 I】

88. Adams LA, Bulsara M, Rossi E, DeBoer B, Speers D, George J, Kench J, Farrell G, McCaughan GW, Jeffrey GP. Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin Chem* 2005;51:1867-1873.
89. Koda M, Matunaga Y, Kawakami M, Kishimoto Y, Suou T, Murawaki Y. FibroIndex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007;45:297-306.
90. Metwally MA, Zein CO, Zein NN. Predictors and noninvasive identification of severe liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 2007;52:582-588.
91. Mohamadnejad M, Montazeri G, Fazlollahi A, Zamani F, Nasiri J, Nobakht H, Forouzanfar MH, Abedian S, Tavangar SM, Mohamadkhani A, Ghoujehi F, Estakhri A, Nouri N, Farzadi Z, Najjari A, Malekzadeh R. Noninvasive markers of liver fibrosis and inflammation in chronic hepatitis B-virus related liver disease. *Am J Gastroenterol* 2006;101:2537-2545.
92. Zaman A, Rosen HR, Ingram K, Corless CL, Oh E, Smith K. Assessment of FIBROSpect II to detect hepatic fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Am J Med* 2007;120:280-14.
93. Patel K, Nelson DR, Rockey DC, Afdhal NH, Smith KM, Oh E, Hettinger K, Vallee M, Dev A, Smith-Riggs M, McHutchison JG. Correlation of FIBROSpect II with histologic and morphometric evaluation of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:242-247.
94. Sebastiani G, Vario A, Guido M, Noventa F, Plebani M, Pistis R, Ferrari A, Alberti A. Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006;44:686-693.
95. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001;357:1069-1075.
96. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:538-544.
97. Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le BB, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, de L, V. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005;128:343-350.

【表 3 7 J】

98. Guanabens N, Pares A, Alvarez L, Martinez de Osaba MJ, Monegal A, Peris P, Ballesta AM, Rodes J. Collagen-related markers of bone turnover reflect the severity of liver fibrosis in patients with primary biliary cirrhosis. *J Bone Miner Res* 1998;13:731-738.
99. Moller S, Hansen M, Hillingso J, Jensen JE, Henriksen JH. Elevated carboxy terminal cross linked telopeptide of type I collagen in alcoholic cirrhosis: relation to liver and kidney function and bone metabolism. *Gut* 1999;44:417-423.
100. Rosen HN, Parker RA, Greenspan SL, Iloputaife ID, Bookman L, Chapin D, Perlmutter I, Kessel B, Qvist P, Rosenblatt M. Evaluation of ability of biochemical markers of bone turnover to predict a response to increased doses of HRT. *Calcif Tissue Int* 2004;74:415-423.
101. Lein M, Wirth M, Miller K, Eickenberg HU, Weissbach L, Schmidt K, Haus U, Stephan C, Meissner S, Loening SA, Jung K. Serial Markers of Bone Turnover in Men with Metastatic Prostate Cancer Treated with Zoledronic Acid for Detection of Bone Metastases Progression. *Eur Urol* 2007.
102. Attallah AM, Toson EA, Shiha GE, Omran MM, bdel-Aziz MM, El-Dosoky I. Evaluation of serum procollagen aminoterminal propeptide III, laminin, and hydroxyproline as predictors of severe fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J Immunoassay Immunochem* 2007;28:199-211.
103. Ulrich D, Noah EM, von HD, Pallua N. TIMP-1, MMP-2, MMP-9, and PIINP as serum markers for skin fibrosis in patients following severe burn trauma. *Plast Reconstr Surg* 2003;111:1423-1431.
104. Farkkila M, Rautiainen H, Karkkainen P, Karvonen AL, Nurmi H, Niemela O. Serological markers for monitoring disease progression in noncirrhotic primary biliary cirrhosis on ursodeoxycholic acid therapy. *Liver Int* 2008;28:787-797.
105. Guechot J, Poupon RE, Giral P, Balkau B, Giboudeau J, Poupon R. Relationship between procollagen III aminoterminal propeptide and hyaluronan serum levels and histological fibrosis in primary biliary cirrhosis and chronic viral hepatitis C. *J Hepatol* 1994;20:388-393.
106. Klappacher G, Franzen P, Haab D, Mehrabi M, Binder M, Plesch K, Pacher R, Grimm M, Pribill I, Eichler HG, . Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. *Am J Cardiol* 1995;75:913-918.
107. Imbert-Bismut F, Ratzu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study.

10

20

30

40

【表 3 7 K】

Lancet 2001;357:1069-1075.

108. Suzuki, K., Enghild, J.J., Morodomi, T., Salvesen, G., and Nagase, H. 1990. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). Biochemistry 29:10261-10270.
109. Lijnen, H.R. 2001. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. Thromb. Haemost. 86:324-333.

10

【図 1】

標準曲線

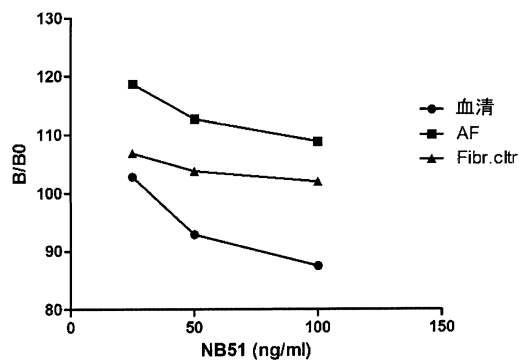


Figure 1

【図 2 b】

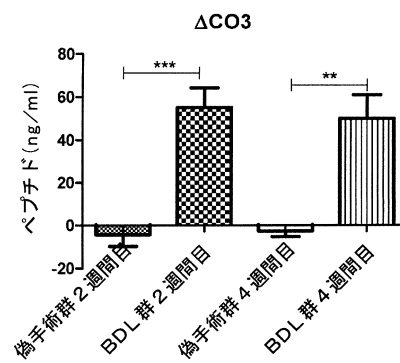


Figure 2b

【図 2 a】

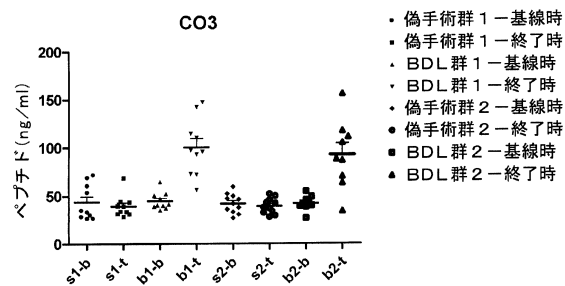


Figure 2a

【図 3】

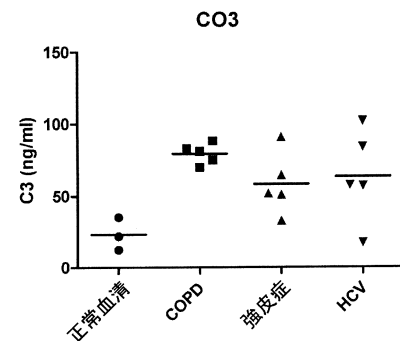


Figure 3

【図 9】

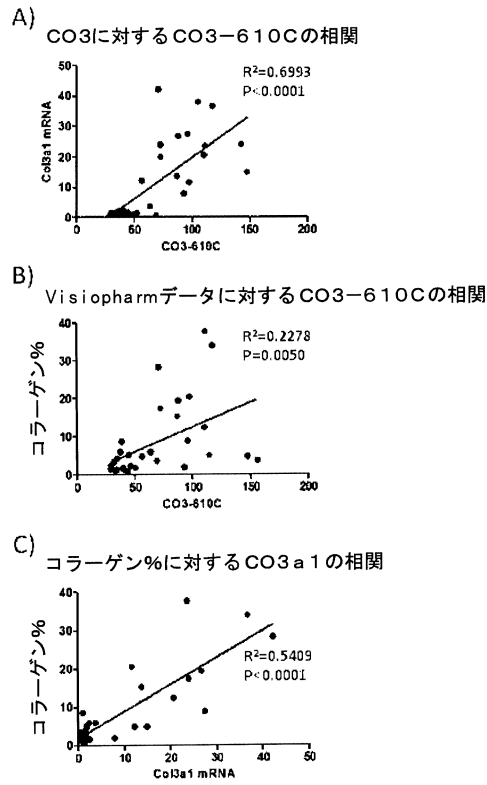


Figure 9

【図 10】

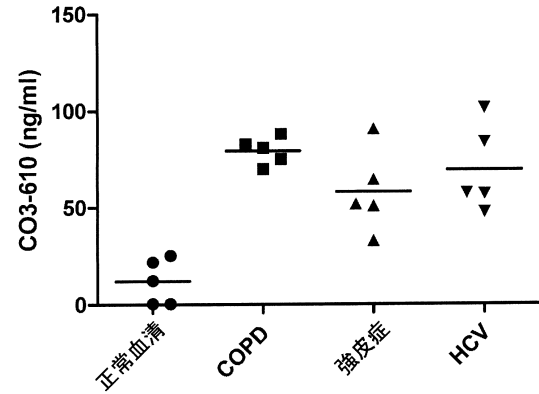


Figure 10

【図 11】

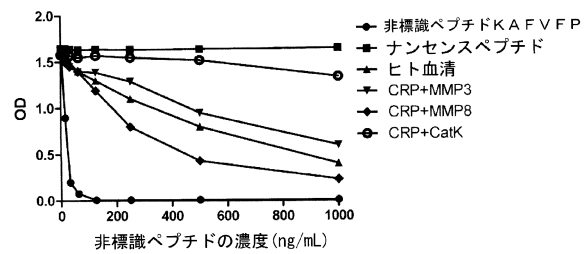


Figure 11

【図 13】

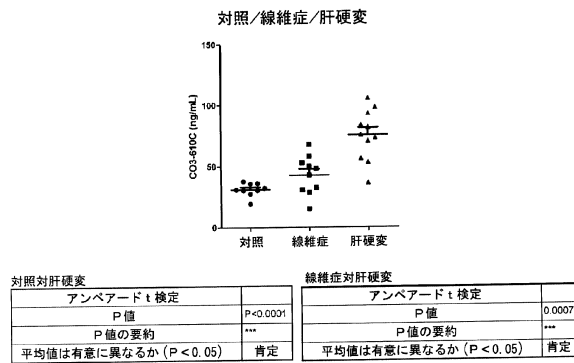


Figure 13

【図 14】

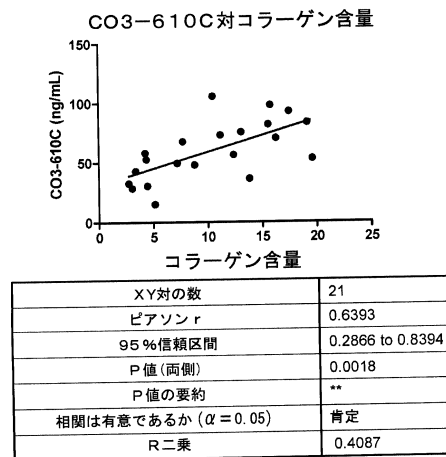


Figure 14

【図 15】

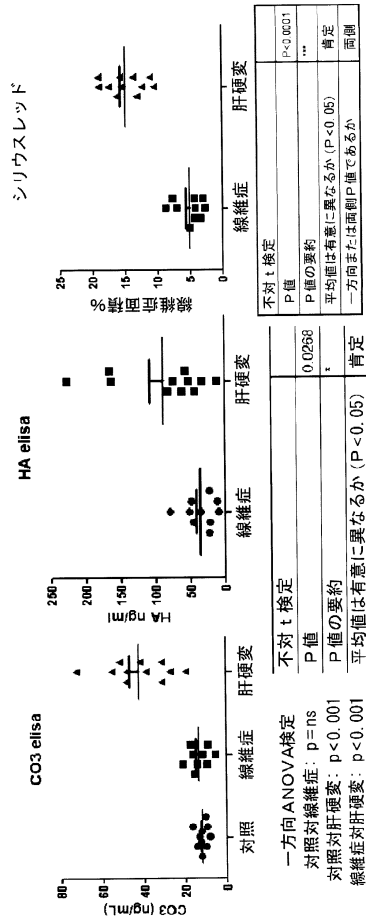


Figure 15

【図 19】

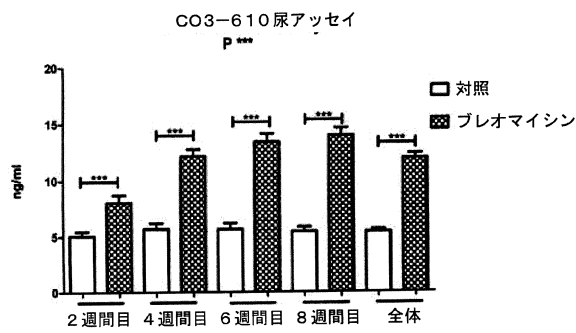


Figure 19

【図 21】

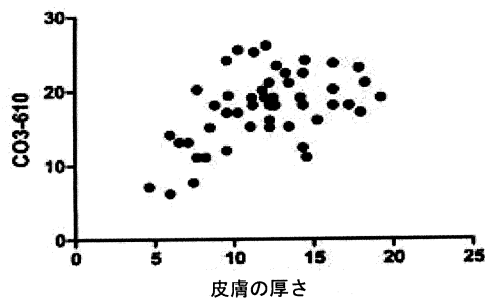


Figure 21

【図 16】

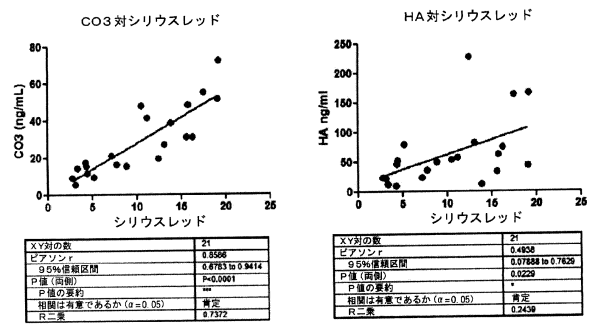


Figure 16

【図 17】

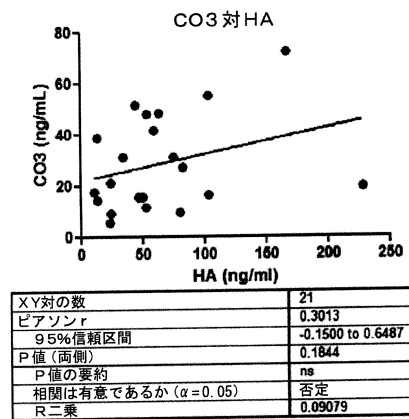


Figure 17

【図 22】

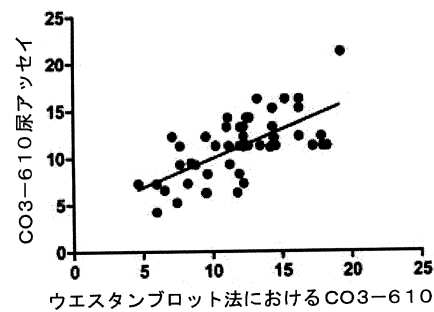


Figure 22

【図 4】

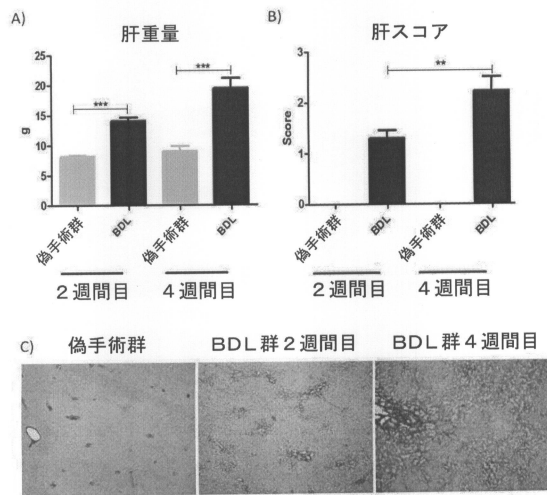


Figure 4

【図 5】

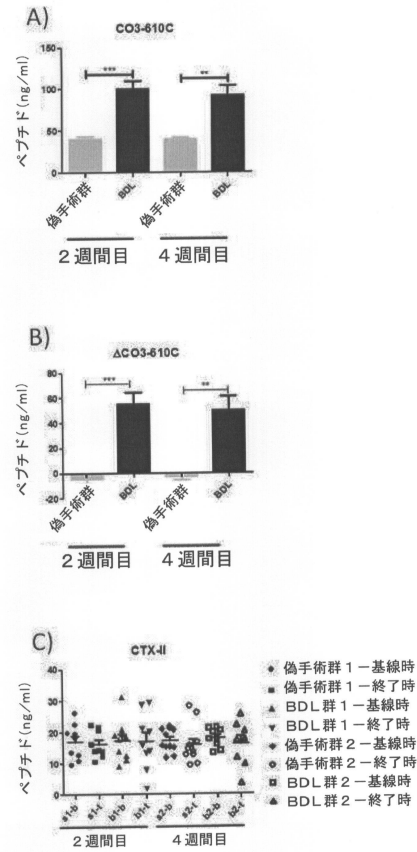


Figure 5

【図 6】

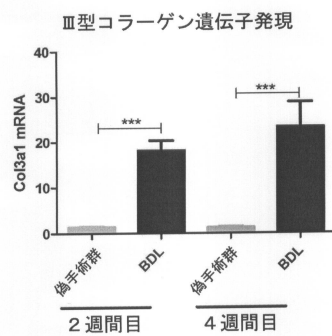


Figure 6

【図 8】

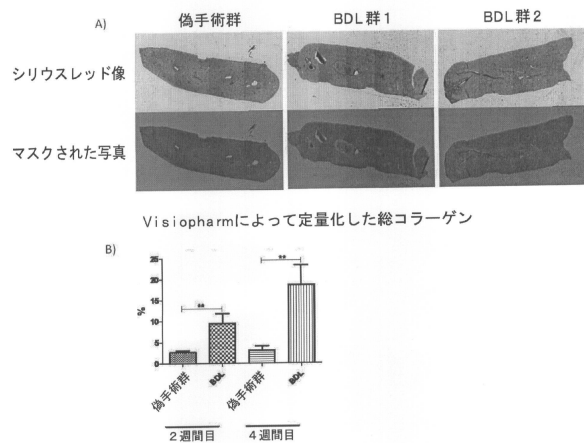


Figure 8

【図 7】

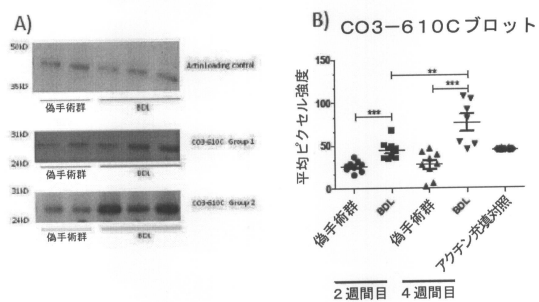


Figure 7

【図 12】

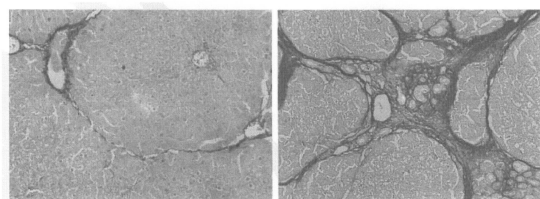


Figure 12

【図 18】

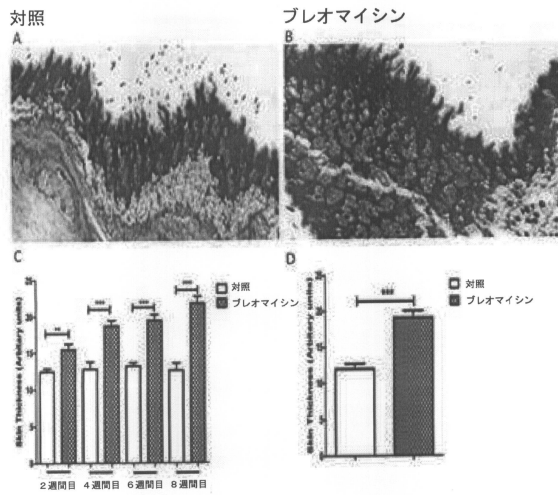


Figure 18

【図 20】

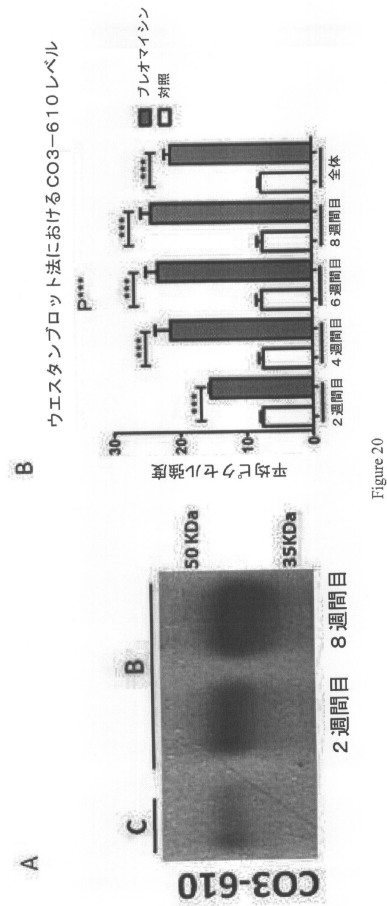


Figure 20

【配列表】

0006095702000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100096769
弁理士 有原 幸一
- (74)代理人 100107319
弁理士 松島 鉄男
- (74)代理人 100114591
弁理士 河村 英文
- (74)代理人 100125380
弁理士 中村 綾子
- (74)代理人 100142996
弁理士 森本 聡二
- (74)代理人 100180231
弁理士 水島 亜希子
- (72)発明者 ヴァイダル, サンネ・エス
デンマーク国, 3 6 5 0 オルスティッケ, ビルケモーセン 3 3
- (72)発明者 カルスダル, モルテン・エイ
デンマーク国, 2 1 0 0 コペンハーゲン, ホルスタインスガーデ 2 1, 3 . t h
- (72)発明者 レーミング, ディアーナ・ジェイ
スウェーデン国, 2 4 3 3 0 ホール, パルクガータン 1 3
- (72)発明者 バラスクク, ナターシャ
デンマーク国, 2 1 0 0 コペンハーゲン, ヘルニンガーデ 2 1, 3 . t v
- (72)発明者 ショート - アルキル, ヘレーネ
デンマーク国, 2 3 0 0 コペンハーゲン, イェンス・オットー・クラグス・ガーデ 1 8, 4 . t v
- (72)発明者 セゴビア - シルベストレ, アントニオ
デンマーク国, 2 2 0 0 コペンハーゲン, バルデシュガーデ 1, 2 T H
- (72)発明者 ヴァシリアダリス, エフスタティオス
デンマーク国, 2 6 1 0 セーボー, タルンヴァイ 5 9 m f

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特表平04 - 505857 (JP, A)
特表2008 - 531599 (JP, A)
特表2007 - 505933 (JP, A)
Potempa LA et al., Expression, detection and assay of a neoantigen (Neo-CRP) associated with a free, human C-reactive protein subunit, Molecular Immunology, Pergamon, 1987年 5月 1日, Vol.24, No.5, 531-541
Ying SC et al., Localization of sequence-determined neopeptides and neutrophil digestion fragments of C-reactive protein utilizing monoclonal antibodies and synthetic peptides, Molecular Immunology, UK, Pergamon Press Ltd, 1992年 5月 1日, Vol.29, No.5, 677-687

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

专利名称(译)	纤维化生物标志物测定		
公开(公告)号	JP6095702B2	公开(公告)日	2017-03-15
申请号	JP2015010255	申请日	2015-01-22
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	北欧生物科学ER / ES 诺华公司		
当前申请(专利权)人(译)	北欧生物科学ER / ES 诺华公司		
[标]发明人	ヴァイダルサンネエス カルスダルモルテンエイ レーミングディアーナジェイ バラスククナターシャ ショートアルキルヘレーネ セゴビアシルベストリアントニオ ヴァシリアディスエフスタティオス		
发明人	ヴァイダル,サンネ・エス カルスダル,モルテン・エイ レーミング,ディアーナ・ジェイ バラスクク,ナターシャ ショート-アルキル,ヘレーネ セゴビア-シルベストレ,アントニオ ヴァシリアディス,エフスタティオス		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/47 C12Q1/68		
CPC分类号	C12Q1/37 G01N33/6893 G01N2800/32 G01N33/53 G01N2333/4737 G01N2333/78 G01N2800/085 G01N2800/50		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.X C07K14/47 C12Q1/68.A G01N33/53.XZN.A		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QR55 4B063/QS25 4B063/QX02 4H045/AA30 4H045 /BA14 4H045/BA15 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/CA40 4H045/EA50		
代理人(译)	河村 英文 中村 綾子		
优先权	61/211467 2009-03-30 US 61/289081 2009-12-22 US		
其他公开文献	JP2015108635A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

诊断或定量纤维化的方法包括进行免疫测定以测量天然存在于生物流体样品中的含有新表位的蛋白质片段，并将所述患者中所述测量值的升高与正常水平相关联与纤维化的存在或程度相关联。免疫测定通过以下方法进行：将天然存在于所述样品中的蛋白质片段与通过蛋白酶切割蛋白质形成的新表位反应的免疫结合配偶体接触，并测量肽片段与所述免疫结合的结合程度。在其中测量包含所述新表位的蛋白质片段，并且其中所述蛋白质是III型胶原蛋白，I型胶原蛋白，IV型胶原蛋白，V型胶原蛋白或VI型胶原蛋白，弹性蛋白，双糖链蛋白聚糖，核心蛋白聚糖，lumican，versican，perlecan，neurocan，brevican，fibromodulin，serglycin，syndecan，betaglycan，vimentin或C-reactive蛋白。

(51) Int. Cl.			F 1		
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53	Z N A X
C O 7 K	14/47	(2006.01)	C O 7 K	14/47	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A

		請求項の数 4 (全 95 頁)	
(21) 出願番号	特願2015-10255 (P2015-10255)	(73) 特許権者	503259129
(22) 出願日	平成27年1月22日 (2015.1.22)		ノルディック・バイオサイエンス・エー／エス
(62) 分割の表示	特願2012-502618 (P2012-502618)の分割		N O R D I C B I O S C I E N C E A / S
原出願日	平成22年3月29日 (2010.3.29)		デンマーク国、デーカークー 2 7 3 0 ヘルレフ、ヘルレフ・ホフエテグアーデ 2 0 7
(65) 公開番号	特開2015-108635 (P2015-108635A)	(73) 特許権者	504389991
(43) 公開日	平成27年6月11日 (2015.6.11)		ノバルティス アーゲー
審査請求日	平成27年1月22日 (2015.1.22)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ 3 5
(31) 優先権主張番号	61/211,467	(74) 代理人	100099623
(32) 優先日	平成21年3月30日 (2009.3.30)		弁理士 奥山 尚一
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/289,081		
(32) 優先日	平成21年12月22日 (2009.12.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 線維症ハイオマーカッセイ