

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-7978

(P2019-7978A)

(43) 公開日 平成31年1月17日(2019.1.17)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)		GO 1 N 33/53	Z N A D	4 H O 4 5
C O 7 K 14/78 (2006.01)		C O 7 K 14/78		

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 89 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2018-169570 (P2018-169570)</p> <p>(22) 出願日 平成30年9月11日 (2018. 9. 11)</p> <p>(62) 分割の表示 特願2017-42739 (P2017-42739) の分割</p> <p>原出願日 平成24年7月18日 (2012. 7. 18)</p> <p>(31) 優先権主張番号 13/187, 205</p> <p>(32) 優先日 平成23年7月20日 (2011. 7. 20)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p> <p>(特許庁注：以下のものは登録商標)</p> <p>1. T W E E N</p>	<p>(71) 出願人 503259129 ノルディック・バイオサイエンス・エー／エス N O R D I C B I O S C I E N C E A / S 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</p> <p>(74) 代理人 100099623 弁理士 奥山 尚一</p> <p>(74) 代理人 100096769 弁理士 有原 幸一</p> <p>(74) 代理人 100107319 弁理士 松島 鉄男</p>
---	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 病理学バイオマーカーアッセイ

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 病的状態の診断方法または定量化方法を提供する。

【解決手段】 コラーゲン I 型、コラーゲン I I I 型、コラーゲン I V 型、コラーゲン V 型、コラーゲン V I 型、エラスチン、ビグリカン、デコリン、ルミカン、パーシカン、C 反応性タンパク質、及びアポ E 等の患者生体液試料に天然で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ためのイムノアッセイを行うステップと、正常レベルより上への患者における測定の上昇を、病態の存在または程度と関連づけるステップとを含む。イムノアッセイは、試料に天然で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する免疫学的結合パートナーと接触させるステップと、試料における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ペプチド断片の免疫学的結合パートナーへの結合の程度を測定するステップを含む。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者生体液試料に天然で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ための免疫アッセイを行うステップを含むバイオアッセイの方法であって、前記免疫アッセイが、前記試料に天然で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ップと、前記試料における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ペプチド断片の前記免疫学的結合パートナーへの結合の程度を測定するステップとを含む方法により行われ、前記ネオエピトープが、以下の表に示される切断部位のいずれか 1 つにおける前記タンパク質の切断によって形成され、

【表 1 A】

コラーゲン I 型

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位; ()内に配列番号
FAP	Q.GAPGLQGMPG.E (1)
FAP	D.RGEPGPPGPAGFAGPPGAD.G (2)
FAP	D.GVRGLTGPIGPPGPAGAPD.K (3)
FAP	A.GLPGAKGLTGSPGSPGPDGK.T (4)
FAP	D.AGPVGP ¹ PPG ² PPG ³ PPG ⁴ PPG ⁵ PSAG.F (5)
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTG.D.A (6)
FAP	S.PGKDGVRGLTGPIGPPGPAGAP.G (7)
FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (8)
FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (9)
FAP	P.GPPGPPGPPGLGGNFAPQLSY.G (10)
FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S (11)
FAP	F.PGARGPSG ¹ QGG ² PPG ³ PKNSG.E (12)
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (13)
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (14)
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (15)
FAP	D.AGPVGP ¹ PPG ² PPG ³ PPG ⁴ PPSAGFD.F (16)
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGVGP ¹ PPG ² PPG ³ PPG ⁴ PPSAG.F (17)
FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQLSYGYDEKSTGGISVPGMP.S (18)
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGVGP ¹ PPG ² PPG ³ PPG ⁴ PPG ⁵ PPSAGFD.F (19)
MMP9+FAP	D.RGEPGPPGPAGFAGPPGAD.G (20)
MMP9+FAP	D.GVRGLTGPIGPPGPAGAPD.K (21)
MMP9+FAP	D.AGPVGP ¹ PPG ² PPG ³ PPG ⁴ PPSAG.F (22)
MMP9+FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTG.D.A (23)
MMP9+FAP	D.AGPVGP ¹ PPG ² PPG ³ PPG ⁴ PPSAGF.D (24)
MMP9+FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (25)
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGLGGNFAPQLSY.G (26)
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S (27)
MMP9+FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (28)
MMP9+FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S (29)
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGPPSAGFDFSFLPQQPEKAHDGGYYR.A (30)
MMP9+FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGVGP ¹ PPG ² PPG ³ PPG ⁴ PPG ⁵ PPSAGFD.F (19)
MMP9	G.AAGPPG.T (31)
MMP9	P.VGPVGARGP.A (32)
MMP9	P.AGPVGPVGARGP.A (33)
MMP9	P.RGLPGPPGAPG.Q (34)
MMP9	G.EAGRPGEAGLPG.A (35)
MMP9	Q.DGRPGPPGPPGA.R (36)
MMP9	K.DGLNGLPGPIGPPG.R (37)
MMP9	G.AKGEPG ¹ VGVQ ² PPG.P.A (38)
MMP9	P.AGARGNDGATGAAGPPG.T (39)
MMP9	P.VGPPGPPGPPGPPGPPSAGF.D (40)
MMP9	A.GAPGKDGLNGLPGPIGPPG.R (41)
MMP9	D.AGPVGP ¹ PPG ² PPG ³ PPG ⁴ PPSAG.F (42)
MMP9	S.AGAPGKDGLNGLPGPIGPPG.R (43)
MMP9	G.PPGPPGPPGLGGNFAPQLSYG.Y (44)
MMP9	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S (45)

10

20

30

40

【表 1 B】

MMP9	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (46)
MMP9	G.ERGPMPGPPGLAGPPGESGREGAPGAEGSPG.R (47)
FAP	853'.IGNVGAPGAK'862 (α 2 鎖) (48)
FAP	462'.AGKEGPVGLP'471 (α 2 鎖) (49)
FAP	249'.IGSAGPPGFP'258 (α 2 鎖) (50)
FAP	1153'.DGLNGLPGPI'1162 (α 1 鎖) (51)
FAP	1153'.D(β)GLNGLPGPI'1162 (α 1 鎖) (52)
FAP	751'.KGADGSPGKD'760 (α 1 鎖) (53)
FAP	171'.STGGISVPGP.'180 (α 1 鎖) (54)
FAP	167'.YDEKSTGGIS'176 (α 1 鎖) (55)

10

コラーゲン III 型

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
FAP	E.AGIPGVPGAK.G (56)
FAP	P.KGDPGPPGIP.G (57)
FAP	G.PQGPKGDPGPP.G (58)
FAP	G.PGMRGMPGSPGGP.G (59)
FAP	D.GPPGPAGNTGAPGSPGVSGPKGD.A (60)
FAP	H.AGAQPPGPPGINGSPPGKKGEMGPAGIP.G (61)
FAP	D.GPRGPTGPIGPPGAGQPGD.K (62)
MMP9	D.GPPGPAGNTGAPGSPGVSGPKGD.A (63)
MMP9	P.GSPGPAGQQAIGSPGPAGPRGP.V (64)
MMP9	G.ERGRPGLP.G (65)
MMP9	G.KGDRGENGSPG.A (66)
MMP9	E.PGKNGAKGEPGP.R (67)
MMP9	S.PGERGETGPPGP.A (68)
MMP9	P.GGPGADGVPGKDGP.R (69)
MMP9	G.PPGKDGTSGHPGP.I (70)
MMP9	R.GLPGPPGIKGPAGIPG.F (71)
MMP9	L.PGENGAPGPMGPRGAPGE.R (72)
MMP9	G.APGAPGGKGDAGAPGERGPP.G (73)
MMP9	A.PGLKGENGLPGENGAPGPMGPRGAPG.E (74)
MMP9	G.IAGITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQ.G (75)
MMP9	G.SPGAKGEVGPAGSPGSNGAPGQRGEPGP.Q (76)
MMP9	G.LKGENGLPGENGAPGPMGPRGAPGERGRPGLPGAA.G (77)
MMP9+FAP	D.GPPGPAGNTGAPGSPGVSGPKGD.A (78)
ADAMTS-4	267'.GFDGRNGEKG'276 (79)
FAP	533'.PGMRGMPGSP'542 (α 1 鎖) (80)
不明	642'.GLPGTGGPPG'651 (81)
不明	652'.ENKPGEPGP.'661 (82)
不明	861'.GERGSPGGPG'870 (83)
不明	899'.PGKDGPPGPA.'908 (α 1 鎖) (84)
MMP9, ADAMTS-4	442'.GLPGTGGPPG'451 (85)

20

30

40

【表 1 C】

コラーゲン IV 型

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP9	333' .IVIGTGPLGE' 342 (α 1 鎖) (86)
MMP9	328' PGPPGIVIGT.' 337 (α 1 鎖) (87)

コラーゲン V 型

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP2	920' ERGPRGITGK.' 929 (α 1 鎖) (88)
MMP2/9	1584' .RRNIDASQLL' 1593 (α 1 鎖) (89)
MMP2/9	229' .QQGGAGPTGP' 238 (α 2 鎖) (90)
MMP2/9	355' .QRGAHGMPGK' 364 (α 2 鎖) (91)
MMP9	525' .RVGKMGRPGA' 534 (α 3 鎖) (92)
MMP2/9	1317' .HMGREGREGE' 1326 (α 3 鎖) (93)

コラーゲン VI 型

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP8	873' .RIAVAQYSDD ' 883 (94)
MMP8	1192' .QLGTVQQVIS ' 1202 (95)
MMP12	1231' .RDVVFLIDGS ' 1241 (96)

アポ E

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP9	81' .LMDETM ' 86 (97)
Cat K	246' RLDEVK. ' 251 (98)
MMP9	101 ' TPVAEE. ' 106 (99)
Cat K	126' .MEEMGS ' 131 (100)

ビグリカン

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP3	219' .KLTGIPKDLPE ' 228 (101)
MMP3	226' DLPETLNEH. ' 235 (102)
MMP12	220' LTGIPKDLPE. ' 229 (103)
MMP13	329' .RAYYNGISLF ' 338 (104)
MMP13	334' GISLFNPNVP. ' 343 (105)
MMP12	87' .EISPDTLLD ' 96 (106)
MMP12	97' LQNNDISELR. ' 106 (107)
MMP9	188' .IEMGGNPLENS ' 198 (108)
MMP9	200' FEPGAFDGLK. ' 209 (109)
MMP9	148' .NHLVEIPPNL ' 157 (110)
MMP9	151' VEIPPNLPSS. ' 160 (111)
MMP9	232' .NELHLDHNK' 240 (112)
MMP9	344' .YWEVQPATFR' 353 (113)
MMP9, MMP12	241' .IQAIELEDLL' 250 (114)

デコリン

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
ADAM-TS4	75' .VPKDLPPDPTT ' 84 (115)

【表 1 D】

バーシカン

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
カテプシン K	3247' .YENWRPNQPD '3256 (116)
カテプシン K	3255' PDSFFSAGED. '3264 (117)
カテプシン K	3221' .HDYQWIGLN '3229 (118)
MMP8	3306' .KTFGKMKPRY '3316 (119)
MMP8	486' .SVTQIEQIEV '495 (120)
MMP8	491' EQIEVGPLVT. '500 (121)

10

CRP

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
シグナルペプチド	013' LSHAFG. '018 (122)
MMP3/8/9, Cat S/K	011' TSLSHA. '016 (123)

エラスチン

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
シグナルペプチド	21' LHPSRP. '26 (124)
ADAMTS1/4/8 MMP8/9	379' KAAKYG. '384 (125)
MMP9/12	547' GIGPGG. '552 (126)

20

ルミカン

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP9	75' NNQIDHIDEK. '84 (127)

LAMC1

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP2/9	664' SAGYLDDVTL. '673 (128)
MMP9	1232' LNRKYEQAKN. '1241 (129)

30

LAMA2

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP2	1240' .QFEGKLMAY '1249 (130)
MMP2/9	2314' .GLWNFREKEG '2323 (131)

LAMB1

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP9	209' ALDPAFKIED. '218 (132)
MMP2/9	1629' .SIESETAASE '1638 (133)
MMP2/9	1639' ETLFNASQRI. '1648 (134)

40

LAMA5

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP9	2402' .NSRNQERLEE '2411 (135)
MMP2/9	2901' EMDTLNEEVV. '2910 (136)
MMP9	3056' DLELADAYYL. '3065 (137)

表中、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はヒドロキシリジンを示す、バイオアッセイの方法。

50

【請求項 2】

患者生体液試料に天然で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ためのイムノアッセイを行うステップを含むバイオアッセイの方法であって、前記イムノアッセイが、前記試料に天然で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する免疫学的結合パートナーと接触させるステップと、前記試料における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ペプチド断片の前記免疫学的結合パートナーへの結合の程度を測定するステップとを含む方法により行われ、前記タンパク質がアポEまたはラミニンである、バイオアッセイの方法。

【請求項 3】

前記免疫学的結合パートナーが、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する特異的結合親和性を有する、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、ペプチドのN末端における以下の配列のいずれかと特異的に反応する、請求項1に記載の方法。

【表 2 A】

コラーゲン I 型	
「.」でマークされた切断部位/配列番号()	
.AAGPPG	(138)
.AGPVGP	(139)
.DGRPGP	(140)
.EAGRPG	(141)
.GAPGLQ	(142)
.GLNGLP	(143)
.GLNGLP	(144)
.GLPGAQ	(145)
.GPPGPP	(146)
.GPPGPP	(147)
.GVRGLT	(148)
.LPGPPG	(149)
.LPGPPG	(150)
.PGARGP	(151)
.PGKDGV	(152)
.PGPPGP	(153)
.PGPPGP	(154)
.PGPPGP	(155)
.RGEPPG	(156)
.RGLPGP	(157)
.VGPVGA	(158)
.DGLNGL	(159)
.AKGEPG	(160)
.AGARGN	(161)
.VGPPGP	(162)
.GAPGKD	(163)
.IGSAGP	(164)
.AGAPGK	(165)
.PPGPPG	(166)
.GPPGPP	(167)
.YDEKST	(168)
.ERGPPG	(169)
.IGNVGA	(170)
.AGKEGP	(171)
.KGADGS	(172)
.D(β)GLNGLP	(173)
コラーゲン III 型	
「.」でマークされた切断部位/配列番号()	
.AGAQGP	(204)
.AGIPGV	(205)
.APGAPG	(206)
.ERGRPG	(207)
.GERGSP	(208)
.GFDGRN	(209)
.GGPGAD	(210)
.GLPGPP	(211)
.GLPGTG	(212)
.GPPGPA	(213)

10

20

30

40

【表 2 B】

.GPRGPT (214)	
.GSPGPA (215)	
.IAGITG (216)	
.KGDPGP (217)	
.KGDRGE (218)	
.LKGENG (219)	
.PGENGA (220)	
.PGERGE (221)	
.PGKNGA (222)	
.PGLKGE (223)	10
.PGMRGM (224)	
.PPGKDG (225)	
.PQGPKG (226)	
.SPGAKG (227)	
コラーゲン IV 型	
「.」でマークされた切断部位/配列番号()	
.IVIGTG (251)	
コラーゲン V 型	
「.」でマークされた切断部位/配列番号()	
.RRNIDA (253)	20
.QQGGAG (254)	
.QRGAHG (255)	
.RVGKMG (256)	
.HMGREG (257)	
コラーゲン VI 型	
「.」でマークされた切断部位/配列番号()	
.RIAVAQ (259)	
.QLGTVQ (260)	
.RDVVFL (261)	
ビグリカン	
「.」でマークされた切断部位/配列番号()	30
.KLTGIP (262)	
.RAYYNG (263)	
.EISPDT (264)	
.IEMGGN (265)	
.NHLVEI (266)	
.NELHLD (267)	
.YWEVQP (268)	
.IQAIEL (269)	
デコリン	
「.」でマークされた切断部位/配列番号()	40
.VPKDLP (276)	

【表 2 C】

バーシカン		
「.」でマークされた切断部位/配列番号()		
.YENWRP (277)		
.HDYQWI (278)		
.KTFGKM (279)		
SVTQIE (304)		
アポ E		
「.」でマークされた切断部位/配列番号()		
.LMDETM (288)		10
.MEEMGS (289)		
LAMA2		
「.」でマークされた切断部位/配列番号()		
.QFEGKK (294)		
.GLWNFR (295)		
LAMB1		
「.」でマークされた切断部位/配列番号()		
.SIESET (296)		
LAMA5		
「.」でマークされた切断部位/配列番号()		20
.NSRNQE (299)		

【請求項 5】

前記免疫学的結合パートナーが、ペプチドの C 末端における以下の配列のいずれかと特異的に反応する、請求項 1 に記載の方法。

【表 3 A】

コラーゲン I 型	
「.」でマークされた切断部位/配列番号()	
AEGLPG.	(174)
AGAPGD.	(175)
AGPPGP.	(176)
AGPPGP.	(177)
APQLSY.	(178)
APQLSY.	(179)
EAGLPG.	(180)
GGRYYR.	(181)
GNFAPQ.	(182)
GNFAPQ.	(183)
GPAGAP.	(184)
GPPGAD.	(185)
GPPSAG.	(186)
IGPPGP.	(187)
IGPPGP.	(188)
IGPPGP.	(189)
ISVPGP.	(190)
LQMPG.	(191)
NFAPQL.	(192)
PGAPGP.	(193)
PGPDGK.	(194)
PGPMGP.	(195)
PGPPGA.	(196)
PKGNSG.	(197)
PPSAGF.	(198)
PQLSYG.	(199)
PSAGFD.	(200)
QGPPGP.	(201)
RGRTGD.	(202)
VGARGP.	(203)
コラーゲン III 型	
「.」でマークされた切断部位/配列番号()	
AGQPGD.	(228)
ENGSPG.	(229)
GDPGPP.	(230)
GERGPP.	(231)
GLPGAA.	(232)
GPAGIP.	(233)
GPPGIP.	(234)
GPPGPA.	(235)
GRPGLP.	(236)
GSPGGP.	(237)
GSPGPQ.	(238)
GVPGAK.	(239)
KGEPGP.	(240)

10

20

30

40

【表 3 B】

PAGIPG. (241)
AGPRGP. (242)
PGEPGP. (243)
PGKDGP. (244)
PRGAPG. (245)
RGAPGE. (246)
RGEPGP. (247)
SGHPGP. (248)
SGPKGD. (249)
TGPPGP. (250)
コラーゲン IV 型
「.」でマークされた切断部位/配列番号()
GIVIGT. (252)
コラーゲン V 型
「.」でマークされた切断部位/配列番号()
RGITGK. (258)
ヒグリカン
「.」でマークされた切断部位/配列番号()
TLNELH. (270)
PKDLPE. (271)
FNNPVP. (272)
DISELR. (273)
AFDGLK. (274)
PNLPSS. (275)
パーシカン
「.」でマークされた切断部位/配列番号()
FSAGED. (280)
VGPLVT. (281)
ルミカン
「.」でマークされた切断部位/配列番号()
DHIDEK. (282)
CRP
「.」でマークされた切断部位/配列番号()
LSHAFG. (283)
TSLSHA. (284)
エラスチン
「.」でマークされた切断部位/配列番号()
LHPSRP. (285)
KAACYG. (286)
GIGPGG. (287)
アポ E
「.」でマークされた切断部位/配列番号()
RLDEVK. (290)
TPVAEE. (291)

10

20

30

40

【表 3 C】

LAMC1
「.」でマークされた切断部位/配列番号()
LDDVTL. (292)
YEQAKN. (293)
LAMB1
「.」でマークされた切断部位/配列番号()
AFKIED. (297)
NASQRI. (298)
LAMA5
「.」でマークされた切断部位/配列番号()
LNEEVV. (300)
ADAYYL. (301)

10

【請求項 6】

前記結合の検出が定量的である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記結合の量が、健康な個体の集団、および、線維性疾患または炎症状態により特徴づけられた個体の集団について、確立された対照値と比較される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記試料中のペプチドが、前記抗体または抗体断片への結合について、前記抗体または抗体断片に結合する既知の濃度の結合物質と競合する競合アッセイとして行われる、請求項 1 に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、疾患を発生するリスク、例えば、慢性損傷後に線維症を発生するリスクを示すバイオマーカーを含めた、線維症疾患を含む様々な疾患の診断およびその発生の予後に有用なバイオマーカーについてのアッセイに関する。強直性脊椎炎などの炎症性疾患についてのバイオマーカーもまた記載され、心血管疾患(CVD)についてのバイオマーカーも同様である。

30

【0002】

特に、本発明によれば、コラーゲン I 型、III 型、IV 型、V 型、および VI 型、エラスチン、C 反応性タンパク質、アポ E、ルミカン、LAMC1、LAMB1、LAMA5、ならびにピグリカン、デコリン、パーシカン、およびパ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ーは、有用であることが見出されている。

【背景技術】

【0003】

(表 1 に列挙されたものを含む) 線維性疾患は、罹患率および死亡率の主な原因であり、例えば、肝硬変は世界中で 1 年あたり 800,000 人の死亡がある¹。

40

【表 1】

表 1. 様々な線維性疾患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 未処置高血圧
心臓	心臓発作 高血圧 アテローム性動脈硬化 再狭窄
眼	黄斑変性症、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、肥厚性瘢痕、火傷、遺伝因子、NFS
脾臓	自己免疫/遺伝性原因
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	手術合併症、化学療法薬誘発性線維症、放射線誘発性線維症、機械的損傷

10

20

【0004】

「線維性疾患」は、主な症状としてであるか二次的症狀としてであるかに関わらず、線維症を生じる任意の疾患である。

30

【0005】

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、放射線照射、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)の蓄積および再編成によって特徴づけられる。明らかな病原学および臨床的差異があるにも関わらず、たいていの慢性線維性障害は、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(これらは正常な組織構造を進行性にリモデリングして、破壊する^{3、4})を協力し合って刺激する、成長因子、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物質を共通して有する。そのヒト健康への多大な影響にも関わらず、線維症の機構を直接、標的にする、認可された処置が現在、存在しない⁵。

40

【0006】

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、これは、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。

【0007】

<炎症状態>

強直性脊椎炎(AS)は、脊椎および仙腸関節の慢性炎症の一形態である。長期にわたると、脊椎の慢性炎症は、椎骨の完全なセメンテーション(分子病理学がまだ調査されておらず、完全には理解されていない過程)をもたらし得る(110)。全身性疾患でもあり、他の関節、ならびに眼、心臓、肺、および腎臓などの器官の炎症または損傷を含む、体中の他の組織を冒す(111)。複数の組織を巻き込む、ASにおける炎症関連過程は

50

、大部分の型の結合組織ターンオーバーに見られる、MMP活性の増加およびコラーゲン沈着を含む分子過程を伴うようである。

【0008】

細胞外マトリックス（ECM）リモデリングは、組織恒常性の重要な過程である（112、113）。特異的なタンパク質分解活性は、ECM内の一連の細胞機能および相互作用にとっての必要条件である（114）。これらの特異的な活性は、正常な生理的状況下で正確に協調されており、特定化された一連の事象は、調節された組織ターンオーバーを生じる。病的状況において、結合組織疾患に特に重点を置くと、正常な修復-応答関係は妨害され（115）、過剰なリモデリングおよび組織ターンオーバーをもたらす。このECMリモデリングの結果は、病的に冒された領域に局所的に発現するプロテアーゼによって生成される、タンパク質の一連の分解産物である、ネオエピトープの放出である。これらのタンパク質分解断片は、それらの未切断の起源と比較して由来の組織に対してより特異的であるため、分子バイオマーカー標的としての役割を果たす可能性がある（116）。

10

【0009】

マトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）などのエンドペプチダーゼは、コラーゲンおよびプロテオグリカンなどのECMタンパク質の分解において主要な役割を果たす（117、118）。特に、線維症などの結合組織疾患において、MMP-2およびMMP-9は、高度に上方制御されることが示されている（119～121）。最近、尿および血清中に見出されるネオエピトープに基づいた生化学的マーカーが、それらの診断的および予後的な潜在能力について、注目度が増加している（116）。特に、骨粗鬆症および変形性関節症などの進行が遅い疾患について、I型およびII型コラーゲン分解産物にそれぞれ、基づいた、骨吸収マーカーおよび軟骨分解マーカーが広範に研究されている（122）。

20

【0010】

<細胞外マトリックス（ECM）>

線維形成は、組織損傷から通常生じる複雑な細胞性および分子性機構を含む動的過程である⁶。線維形成は、高分子の濃度を変化させ、組織サイズおよび密度の増加をもたらす、正常なECM制御における不均衡の結果であり、次第に機能が損なわれる。これらの高分子は、主に、コラーゲンおよびプロテオグリカンなどの構造機能および接着機能を有する線維性タンパク質である。

30

【0011】

<コラーゲン>

コラーゲンは、ヒト身体において広く分布しており、すなわち、ヒト身体におけるタンパク質量の約30%がコラーゲンで構成されている。コラーゲンは、ほとんどの結合組織のECMの構造的完全性を担う。ECM内容物は、遺伝子発現およびタンパク質分泌の制御を介してだけでなく、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内因性プロテアーゼ抑制およびタンパク質分解を介して、厳重に調節される合成と分解の間の微妙な均衡に起因する^{7～9}。表2は、主要なコラーゲンの型をそれらの主要な組織分布と共に列挙している。

40

【表 2】

表 2. 主要なコラーゲンの型およびそれらの組織分布

コラーゲンの型	組織分布
I	ほとんどの結合組織
II	軟骨、硝子体液
III	伸展性結合組織、例えば、肝臓、皮膚、肺、脈管系
IV	基底膜
V	コラーゲンIを含有する組織
VI	ほとんどの結合組織
VII	皮膚、膀胱、口腔粘膜、臍帯、羊膜
VIII	多くの組織、特に内皮
XIII	内皮細胞、皮膚、眼、心臓、骨格筋
XIV	血管、骨、皮膚、軟骨、眼、神経、腱、子宮
XXI	血管、心臓、胃、腎臓、骨格筋、胎盤

10

【0012】

I型コラーゲンは、最も豊富なコラーゲンであり、たいていの結合組織に見出される。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

【0013】

コラーゲンI型およびIII型は、健康な組織において1:1の比で存在する、肝臓および肺の主要な構成要素である。加えて、コラーゲンIV型およびVI型は、たいていの組織において基底膜内に見出される。V型コラーゲンの最も一般的な局在は、コラーゲンI型およびIII型と会合して、特徴的なコラーゲン原線維内にある¹⁰。

【0014】

いくつかのコラーゲンは、限定的な組織分布を有する：例えば、II型は、ほとんど軟骨内のみに見出される¹¹。

【0015】

線維形成中、コラーゲンの正味の量は増加する¹²⁻¹⁴。表3は、例として、肝線維症中のコラーゲンの増加を示している。

30

【表 3】

表 3. 正常ヒト肝臓から硬変性ヒト肝臓へのコラーゲンの組成の変化¹⁵

コラーゲンの型	鎖	コラーゲン 正常肝臓 (mg/g)	コラーゲン 硬変性肝臓 (mg/g)	増加の倍数	分布 正常肝臓 (%)	分布 硬変性肝臓 (%)
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)					

40

【0016】

V型コラーゲンは、col5a1-/-マウスにおけるコラーゲン原線維形成のほとんど事実上の欠如によって例示される、コラーゲン原線維の形成に極めて重要であることが

50

実証されている(123)。アラインメントにおいて、ヘテロ接合性マウスは、原線維数および皮膚コラーゲン含有量の50%低下に関連していた。これは、原線維形成の寿命依存性制御におけるV型コラーゲンの中心的役割を示しており、このコラーゲンの型が、多くの結合性疾患における極めて重要な関心対象であることを示唆している。しかしながら、結合性疾患におけるV型コラーゲンターナーオーバーの役割の理解における概念的欠如が依然としてあり、これは、コラーゲンV型分解およびターナーオーバーの調査を行う技術的能力がないことに一部より得る。興味深いことに、ごく最近、限定された種々のタンパク質のセットが、V型コラーゲンに結合することが見出され、この分子の分子機能をより詳細に解明し始めており、MMP-2はそれらのうちの1つであった(124)。分子の特徴づけに加えて、V型コラーゲンが、動的運動性および他の細胞活性を誘導することにより異なる細胞表現型に直接、影響するという、より多くの証拠が現れつつあり、このタンパク質が、ECMの受動的構成要素だけにとどまらない可能性があることを示唆している(125、126)。これを直接的に支持するものとして、本発明者らは、最近、肝線維症の2つの別々の動物モデルにおいて、肝線維症とV型コラーゲン形成との非常に強い相関を記載し(127)、過剰な組織ターナーオーバーにおけるV型コラーゲン形成の中心的役割を示唆した。

10

20

30

40

50

【0017】

V型コラーゲンは、I型、II型、III型、およびXI型と共に、原線維形成コラーゲンであり(11)、3つの異なる鎖(1、2、3)のヘテロ三量体として形成される。それは、典型的には、I型およびIII型コラーゲンと共にヘテロ原線維を形成し、有機骨マトリックス、角膜実質、ならびに筋肉、肝臓、肺、および胎盤の間質マトリックスに寄与する(128)。V型コラーゲン突然変異は、一連の結合組織疾患を生じ、その疾患のうち、エラス-ダンロス症候群(EDS)が最もよく表している。EDSは、関節過度可動性、皮膚変化(例えば、過伸展性、痩せ、および脆弱性)によって特徴づけられる、遺伝性障害の混成群である。その疾患は、異なる亜型、EDS-IおよびIIに分けることができる。I型EDSおよびII型EDSは、萎縮性瘢痕、皮膚過伸展性、および関節弛緩症によって特徴づけられる。両方の亜型は、V型コラーゲンのポリペプチド鎖の2つをコードするCOL5A1およびCOL5A2遺伝子における突然変異に起因することは明らかである(129~131)。これは、結合組織疾患におけるV型コラーゲンの重要性を浮き彫りにしている。

【0018】

<エラスチン>

エラスチンは、多くの結合組織、主に弾性である結合組織内に存在するタンパク質である。エラスチンは、アミノ酸のグリシン、バリン、アラニンおよびプロリンの含有量が非常に高く、64~66kDaの分子量を有する。エラスチンは、830個のアミノ酸で構成される不規則な、またはランダムコイルの高次構造に組織化されている。エラスチンは、リジ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て、塊状の不溶性で耐久性のある架橋したアレイを生成することにより生じる。

【0019】

エラスチンは、血流を助けるための圧力波伝播の媒体として動脈中、重要な機能を果たし、大動脈などの大きな弾性血管で特に豊富である。エラスチンはまた、肺、弾性靱帯、および皮膚において非常に重要である。

【0020】

エラスチンの合成およびターナーオーバーの理解に多くの努力が注がれたにも関わらず、このマトリックス分子のタンパク質分解性切断から生じるネオエピトープは、これまで、線維症における疾患発生と関連づけられたことはない。

【0021】

<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メンバーである。中間径

フィラメントは、真核細胞の重要な構造的特徴である。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、細胞骨格を形成する。たいていの中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、ビメンチンは、動的構造として存在する。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用いられ、その結果、肉腫についての免疫組織化学的マーカーとして用いられている。

【0022】

Hertigら (Hertigら、J Am Soc Nephrol. 2008 Aug; 19(8): 1584~91) は、慢性移植腎症を有する対象の腎尿細管上皮細胞における上皮間葉転換が、同種移植片における線維症の進行を予測することができるかどうかを調べ、これらの対象から得た83個の生検においてビメンチン発現を測定した。彼らは、手術後1年目におけるビメンチン発現の上昇と腸線維症スコアとの間の関連を見出した。

10

【0023】

肝線維症の別の研究において、Meridenら (Meridenら、Clin Gastro & Hepatol 2010; 8: 289~296) は、(F0段階に得られた生検における) ビメンチン発現と線維症進行との間の有意な関連を見出し、上昇したレベルが、肝線維症の急速な進行を予測した。

【0024】

したがって、本発明者らは、ビメンチンの循環断片が、線維症の高感度かつ特異的なバイオマーカーとしての役割を果たすことができるかどうかを調べたいと考えた。

20

【0025】

<プロテオグリカン>

プロテオグリカンは、コアタンパク質に様々な数のグリコサミノグリカン (GAG) 側鎖を共有結合している高分子の多様な群である^{1 6}。これらのGAGは、二糖繰り返し (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) のポリマーであり、二糖単位上のヒドロキシル側鎖、カルボキシル化側鎖、および硫酸化側鎖により酸性 (負荷電) である。これは、それらを高親水性にし、それに従って、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、ヒアルロン酸鎖との非共有結合性連結を形成し、さらにより大きい分子複合体を形成する能力を有する^{1 6}。表4は、結合組織に関連した最も研究されているプロテオグリカンを列挙する。

30

【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
高分子細胞外プロテオグリカン (凝集性およびヒアルロナン結合性)	アグリカン ¹⁸	関節軟骨、軟骨細胞、椎間板、鼻軟骨	細胞外マトリックス安定性 (ヒアルロナン結合性)
	バーシカン ^{19、20}	結合組織:線維芽細胞、ケラチノサイト、平滑筋細胞、メサンギウム細胞	細胞-細胞および細胞-マトリックス相互作用 Ca 依存性様式での糖の結合
	ニューロカン ²¹	神経組織	神経系細胞接着分子に結合する
小分子高ロイシンプロテオグリカン (コラーゲン結合性)	ブレビカン ²²	神経組織	細胞外マトリックス安定性
	デコリン ²³	結合組織、軟骨、骨	コラーゲン分子に結合して、接続する (マトリックス安定化および厚さ) 器官形成 TGF β の結合
	ビグリカン ²⁴	毛細血管内皮、皮膚 (ケラチノサイト)、腎臓の内皮	細胞分化 コラーゲン原線維を結合して、接続する
細胞結合性プロテオグリカン	フィブロモジュリン ¹⁷	結合組織、骨、軟骨	コラーゲン線維の配向を制御する
	ルミカン ²³	角膜、筋肉、軟骨、腎臓、肺、腸	コラーゲン線維のスペーシングおよび厚さを調節する
	セルグリシン ²⁵	内皮-細胞間コンパートメントに広く分布	造血細胞分化 リンパ球系細胞の接着および活性化
	シンデカン ²⁶	広く分布-細胞膜に結合している場合が多い	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
基底膜プロテオグリカン	ベータグリカン ²⁷	広く分布	TGF β 受容体およびシグナル伝達 TGF β の可能性のあるリザーバ
	パールカン ²⁸	全ての基底膜	高分子についての選択性バリア 細胞接着

10

20

30

【0026】

40

< C 反応性タンパク質 >

C 反応性タンパク質 (CRP) は、炎症、感染、または外傷などの種々の臨床状態に回答して肝臓により産生される急性期血清タンパク質である²⁹。CRP の産生は、患部組織または損傷組織から放出される IL - 6 などのサイトカインにより誘導される。CRP の生理学的役割はまだわかっておらず、その炎症促進性または抗炎症性作用の議論が進行中である。

【0027】

< アポリポタンパク質 E >

アポリポタンパク質 E (アポ E) は、肝細胞および末梢細胞上の特定の受容体に結合する、キロミクロン (大きいリポタンパク質粒子) および中間密度リポタンパク質粒子に見

50

出されるアポリポタンパク質の分類である。アポEは、トリグリセリドリッチナリポタンパク質成分の正常な代謝に必須である。アポEは、299アミノ酸長であり、リポタンパク質、脂溶性ビタミン、およびコレステロールをリンパ系へ、その後、血液へ輸送する。それは、主に肝臓内で合成されるが、脳、腎臓、および脾臓などの他の組織内でも見出されている。アポEは、トリグリセリドリッチナリポタンパク質成分の正常な代謝に必須である。アポEは、最初、リポタンパク質代謝および心血管疾患におけるその重要性で知られていた。

【0028】

<エラスチン>

エラスチンは、組織の弾性に関与する細胞外マトリックス分子であり、最初、その役割に限定されると考えられていた。エラスチン分解が、正常細胞および腫瘍細胞の幅広いパネルにおいて細胞走化性、細胞増殖、およびプロテアーゼ合成に影響する生理活性ペプチドの産生をもたらし得ることが今や、確立されている。

10

【0029】

<LAMC1、LAMA2、LAMB1、およびLAMA5>

細胞外マトリックス糖タンパク質のファミリーである、ラミニンは、基底膜の主要な非コラーゲン性成分である。それらは、細胞接着、分化、遊走、シグナル伝達、神経突起伸長、および転移を含む幅広い種類の生物学的過程に結びつけられている。ラミニンは、3つの非同鎖：ラミニン、および（以前は、それぞれ、A、B1、およびB2）で構成され、3つの短腕（それぞれが異なる鎖によって形成されている）、および全ての3つの鎖で構成される長腕からなる十字型構造を形成する。各ラミニン鎖は、別々の遺伝子によってコードされる、マルチドメインタンパク質である。各鎖のいくつかのアイソフォームが記載されている。異なる鎖、鎖、および鎖のアイソマーが組み合わさって、異なるヘテロ三量体ラミニンアイソフォームを生じ、それらは、それらの発見の順番にアラビア数字で表されている。種々の鎖および三量体分子の生物機能は大部分、知られていないが、その鎖のいくつかは、それらの組織分布に関して異なることが示されており、おそらくインビボでの多様な機能を反映している。

20

【0030】

LAMC1（以前はLAMB2）は、ラミニンサブユニット - 1である。

【0031】

LAMA2は、ラミニンサブユニット - 2である。

30

【0032】

LAMB1は、ラミニンサブユニット - 1である。

【0033】

LAMA5は、ラミニンサブユニット - 5である。

【0034】

<プロテアーゼ>

線維形成中のECMの合成と分解の間の不均衡は、低密度内皮下マトリックスの、間質コラーゲンに富んだマトリックスへの変換に起因する。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、ならびに（2）タンパク質分解障害と、その結果としてのマトリックス分解の減少の、一方または両方による可能性がある。タンパク質分解の減少は、最近、注目されることが増えている。この過程の制御において、マトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）およびそれらの組織インヒビター（TIMP）、加えて、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インヒビターは、重要な役割を果たす。

40

【0035】

MMP

MMPは、ECMの全部の構成要素ではないにしても、大部分の構成要素を分解する能力がある、エンドペプチダーゼの大きな群である。現在、25個より多いMMPが見出されている。MMPは、金属原子、典型的には亜鉛を含有する活性部位によって特徴づけら

50

れ、酵素前駆体として分泌される。異なる MMP は異なる組織に発現している。表 5 において、肝臓における MMP が示されている。

【表 5】

表 5. 肝臓における MMP^{30~32}

ファミリー	プロテアーゼ	源	基質	
コラゲナーゼ	MMP-1	HSC	I 型、II 型、III 型、VII 型、VIII 型、X 型、ゼラチン	10
	MMP-8	好中球	I 型、II 型、III 型、V 型、VII 型、X 型、ゼラチン	
	MMP-13	HSC, MFB, KC	I 型、II 型、III 型、VII 型、X 型、ゼラチン	
ストロメライシン	MMP-3	HSC	III 型、IV 型、V 型、IX 型、X 型、XI 型、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	20
	MMP-10	HSC	III 型、IV 型、V 型、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して弱い活性	
ゼラチナーゼ	MMP-2	HSC, MBF	I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型、VII 型、X 型、XI 型、ゼラチン、エラスチン、ラミニン	30
	MMP-9	KC, HSC, HC	I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型、VII 型、X 型、XI 型、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	
メタロエラスターゼ	MMP-12	マクロファージ	エラスチン、ゼラチン、IV 型、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、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン	
MT-MMPs	MMP-14	HSC, MFB, KC	I 型、II 型、III 型、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	40
	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 3 6 】

TIMP は、MMP および膜 1 型メタロプロテイナーゼに、3 分子複合体として、基質特異的および組織特異的に結合することによって、MMP のタンパク質分解活性をブロックする (表 6)。線維症中、TIMP レベルは劇的に増加し、MMP レベルは、中程度に増加するか、または相対的に変化しないままであり (MMP - 2 を除く)、全体で、コラーゲンの分解の減少を生じる。

【表 6】

表 6. 肝臓における TIMP³¹

名前	源	阻害されるメタロプロテイナーゼ
TIMP-1	HSC, MFB, KC, HC	プロ MMP-9, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13
TIMP-2	KC, HSC	MT-MMP-1, MT-MMP-2, proMMP-2, MMP-3, MMP-13, MMP-7
TIMP-3	HC	MT-MMP-1, MT-MMP-2, TACE, MMP-13

10

【0037】

< 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 サブユニット (FAPa、または FAP,) 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。FAPa は、170 kDa メラノーマ膜ゼラチナーゼ、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たヘテロ二量体膜結合型プロテイナーゼ複合体の サブユニットであり、DPP4 (CD26) は サブユニットである。ある細胞は、FAPa ホモ二量体のみを生成し、ある細胞は DPP4 ホモ二量体のみを生成する。単量体は不活性である。FAP は、上皮癌の反応性間質線維芽細胞、回復期創傷の肉芽組織、ならびに骨肉腫および軟部肉腫の悪性細胞において選択的に発現している³³。このタンパク質は、発生中、組織修復中、および上皮発癌中、線維芽細胞増殖または上皮間葉相互作用の調節に関与すると考えられている。FAP の発現は、線維症の病期と共に増加することが示されている^{34, 35}。

20

【0038】

< ADAMTS >

ADAMTS (トロンボスポンジンモチーフを有するディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ) は、ペプチダーゼのファミリーであり、これまで、このファミリーの 19 個のメンバーがヒトにおいて同定されている。ADAMTS プロテアーゼの既知の機能には、プロコラーゲンおよびフォンビルブランド因子のプロセッシング、加えて、アグリカン、パーシカン、プレビカン、およびニューロカンの切断が挙げられる。それらは、結合組織の組織化、凝固、炎症、関節炎、血管新生、および細胞遊走において重要な役割をもつことが実証されている。

30

【0039】

< カテプシン >

プロテアーゼのカテプシンファミリーには十数個のメンバーがあり、それらは、それらの構造、触媒機構、およびそれらがどのタンパク質を分解するかによって区別される。そのメンバーの大部分は、リソソームにおいて見出される低 pH において、活性化する。したがって、このファミリーの活性は、ほとんど完全に、それらの細胞小器官内にある (ただし、多くの例外がある)。例えば、(いくつかある活性の中で) 骨吸収において破骨細胞による分泌後に細胞外で働くカテプシン K など。

40

【0040】

カテプシン K (CAT-K) およびカテプシン S (CAT-S) はどちらもシステインプロテアーゼである。

【0041】

< 線維症バイオマーカー >

線維性疾患の特異的な産物ではないが、この疾患のいくつかの生化学的マーカーが示唆されている。表 7 において、臨床試験に用いられる肝線維症の生化学的マーカーの例がある。加えて、他の線維性疾患のバイオマーカーの多数の例がある^{12, 36-42}。

【表 7 A】

表 7. 肝線維症の既知のマーカーの一部の概要

バイオマーカー	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
数個のパラメータ			
MP3	PIIINP, MMP1	HCV	51, 52
Zheng ら指数	HA, PIIICP, PIIINP, ラミニン, C-IV	慢性肝炎	53
Lebensztjen ら指数	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、コラーゲン VI 型、TIMP-1	HBV	55
Tsochatzis ら指数	レプチン、アディポネクチン、レジスチン	HCV, HBC, NASH	56
Patel ら指数	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、コラーゲン IV 型、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	FibroTest + 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, 88
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 試験	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、肥満度指数、血小板、アルブミン、AST/ALT	NAFLD	81

10

20

30

40

【表 7 B】

超音波+APRI		HCV	82
Metwally ら指数	血小板数、アルブミン、AST、輸血の経歴、HBV コア抗体	HCV	90
Mohamadnejad ら指数	年齢、HBV DNA レベル、アルカリフォスファターゼ、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
段階的組み合わせアルゴリズム	APRI と Fibrotest の組み合わせ	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 ら	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

20

【0042】

米国特許第 5 3 8 7 5 0 4 号は、アグリカン部位 N₃₄₁ - F₃₄₂ における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VDIPE 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用いるRIAアッセイを記載する。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載されている。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（IBD）、特発性肺線維症（IPF）、特定の癌、関節損傷、および多数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ており、そのアッセイを、血液または他の生体液で行って、アグリカンのストロメライシン切断産物を検出することができること、およびそのような断片の定量化がIPF、加えて他の状態に関して診断的に用いることができることが主張されている。しかしながら、これの証拠は提供されず、本発明者らが知る限りでは、この予測を確認するその後の刊行物は存在していない。そのようなRIAアッセイは、長年、市販されており、いかなる線維性疾患を診断またはモニターすることにおいても、それらを用いて成功したという報告は現れていない。

30

【0043】

米国特許第 7, 2 2 5, 0 8 0 号は、患者において炎症性、線維性、または癌性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/または肝臓壊死性炎症性病変の存在を決定するために、前記患者の血清または血漿において α_2 -マクログロブリン、AST（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ）、ALT（アラニンアミノトランスフェラーゼ）、GGT（ γ -グルタミルトランスペプチダーゼ）、 α_1 -グロブリン、 α_2 -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、 γ -グロブリン、アポA1、IL-10、TGF- β 1、アポA2、およびアポBからなる群から選択される少なくとも4つの生化学的マーカーの値を測定し、その後、前記値を組み合わせることによる、方法を開示する。その特許は、線維性疾患中に生成された、ネオエピトープを有するペプチド断片の定量的測定を教示していない。

40

【0044】

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、

50

I V型コラーゲンに特異的に結合する抗体を用いて試料において、I V型コラーゲンの高分子量型の濃度を測定するステップ、およびその測定値を肝線維症の程度に関係づけるステップを含む方法を記載する。この場合もやはり、身体中で作用するタンパク質分解酵素によって生じるネオエピトープは利用されていない。実際、試料はペプシンで消化され、そのことは、試料におけるコラーゲン切断の天然のパターンを不明瞭にする可能性がある。

【0045】

米国特許第4,628,027号(Gay)は、結合組織タンパク質に特異的な抗体の産生、より具体的には、ヒトコラーゲン、およびコラーゲン分解に關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産生を開示する。組織学的、細胞学的、およ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記載されている。しかしながら、その特許は、前記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いた結合組織タンパク質の測定を記載していない。

10

【0046】

Guanabens Nら、J Bone Miner Res、1998⁹⁸は、肝線維症の増加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、骨ターンオーバーのマーカ、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)、およびコラーゲンI型の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上昇し、その疾患の組織学的段階と相関した。NTXに用いられた抗体は、コラーゲンI型のN末端におけるカテプシンK切断部位に対して産生され、ネオエピトープYDGKGVG(配列番号302)により決定される。CTXに用いられた抗体は、コラーゲンI型のC末端におけるカテプシンK切断部位に対して産生され、ネオエピトープEKAHDDGR(配列番号303)により決定される。これらのマーカは、コラーゲンI型のテロペプチド内に位置し、コラーゲンI型の内部部分(三重らせん部分)に位置しない。PINPアッセイに用いられるモノクローナル抗体は、ネオエピトープではないPINP配列における内部エピトープに対して産生された。

20

【0047】

Moller Sら、Gut、1999⁹⁹は、I型コラーゲンのC末端架橋テロペプチド(ICTP)が、対照と比較して、アルコール性肝硬変患者において上昇することを実証した。記載された研究は、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に切断されたコラーゲンI型に対して産生されている。しかしながら、その抗体は、ネオエピトープに結合しない。

30

【0048】

Rosen HNら、Calcif Tissue Int、2004¹⁰⁰は、ホルモン補充処置(HRT)を受ける女性において、骨ターンオーバーのマーカ、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。その研究において、骨ターンオーバーのマーカは処置と共に減少することが観察された。NTXに用いられた抗体は、コラーゲンI型のN末端におけるカテプシンK切断部位に対して産生され、ネオエピトープYDGKGVG(配列番号302)により決定される。CTXに用いられた抗体は、コラーゲンI型のC末端におけるカテプシンK切断部位に対して産生され、ネオエピトープEKAHDDGR(配列番号303)により決定される。本発明とは違って、これらの抗体は、骨代謝の評価について用いられ、線維症の評価については用いられなかった。

40

【0049】

Lein Mら、Eur Urol、2007¹⁰¹は、ゾレドロン酸を受ける前立腺癌患者においてネオエピトープ特異的骨ターンオーバーのマーカ、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

50

評価した。その研究において、骨ターンオーバーのマーカ―は処置と共に減少することが観察された。NTXに用いられた抗体は、コラーゲンI型のN末端におけるカテプシンK切断部位に対して産生され、ネオエピトープY D G K G V G (配列番号302)により決定される。CTXに用いられた抗体は、コラーゲンI型のC末端におけるカテプシンK切断部位に対して産生され、ネオエピトープE K A H D G G R (配列番号303)により決定される。本発明とは違って、これらの抗体は、骨転移の浸潤中の骨代謝の評価について用いられ、線維症の評価については用いられなかった。

【0050】

PIINPは、いくつかの研究、すなわち、線維性疾患の重症度を評価するための研究¹⁰²、重度の熱傷後の皮膚線維症を有する患者における研究¹⁰³、非硬変性原発性胆汁性肝硬変における疾患進行についての研究¹⁰⁴、原発性胆汁性肝硬変および慢性ウイルス性C型肝炎における研究¹⁰⁵に用いられている。

10

【0051】

PIINP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。

【0052】

多くの報告は、生化学的指数の予測値を向上させるために1セットの生化学的マーカ―を組み合わせている。11個の異なる血清マーカ―が、F0からF4までの線維性病期分類を有する205人の患者において測定され、最も情報価値のあるマーカ―は、2マクログロブリン、2グロブリン(またはハプトグロビン)、グロブリン、アポリポタンパク質A1、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―の指数は、ゼロから0.10までの範囲のスコア(全患者の12%[41])について陰性適中率(F2、F3、またはF4の非存在の100%確実性)、および0.60から1.00までの範囲のスコア(全患者の34%[115])について高い陽性適中率(F2、F3、またはF4の存在の>90%確実性)を有した。

20

【0053】

WO2010/115749は、線維症バイオマーカ―として上記タンパク質の一部の多数のネオエピトープを開示し、WO2009/059972は、心血管疾患のバイオマーカ―として上記タンパク質の一部の多数のネオエピトープを開示する。

【0054】

しかしながら、上で挙げた報告のいずれにおいても、ここで主張されているようなネオエピトープへの抗体の結合に基づいたペプチド断片の測定が線維性疾患または炎症性疾患を有する患者の評価に有用であり得ることは示唆されていない。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0055】

本発明は、ここで、イムノアッセイを行って、患者生体液試料に天然で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ことを含むバイオアッセイの方法であって、前記イムノアッセイが、前記試料に天然で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する免疫学的結合パートナーと接触させるステップと、ペプチド断片の前記免疫学的結合パートナーへの結合の程度を測定して、その中において、前記ネオエピトープを含むタンパク質断片を測定するステップであって、前記ネオエピトープが、以下の表に示された切断部位のいずれか1つにおける前記タンパク質の切断によって形成される、ステップとを含む方法によって行われる、バイオアッセイの方法を提供する。

40

【表 8 A】

表 8
コラーゲン I 型

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位; ()内に配列番号
FAP	Q.GAPGLQGMPG.E (1)
FAP	D.RGEPGPPGPAGFAGPPGAD.G (2)
FAP	D.GVRGLTGPIGPPGPAGAPD.K (3)
FAP	A.GLPGAKGLTGSPGSPGPDGK.T (4)
FAP	D.AGPVGP ¹ PPGPPGPPGPPGPPSAG.F (5)
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTG.D (6)
FAP	S.PGKDGVRGLTGPIGPPGPAGAP.G (7)
FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (8)
FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (9)
FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQLS.Y (10)
FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S (11)
FAP	F.PGARGPSGPQGGPPGPKNSG.E (12)
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (13)
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (14)
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (15)
FAP	D.AGPVGP ¹ PPGPPGPPGPPGPPSAGFD.F (16)
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGP ¹ PPGPPGPPGPPGPPSAG.F (17)
FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQLSYGYDEKSTGGISVPGPMGP.S (18)
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGP ¹ PPGPPGPPGPPGPPSAGFD.F (19)
MMP9+FAP	D.RGEPGPPGPAGFAGPPGAD.G (20)
MMP9+FAP	D.GVRGLTGPIGPPGPAGAPD.K (21)
MMP9+FAP	D.AGPVGP ¹ PPGPPGPPGPPGPPSAG.F (22)
MMP9+FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTG.D (23)
MMP9+FAP	D.AGPVGP ¹ PPGPPGPPGPPGPPSAGF.D (24)
MMP9+FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (25)
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQLS.Y (26)
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S (27)
MMP9+FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (28)
MMP9+FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S (29)
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGPPSAGFDFSLPQPPQEKAHDGGRYYR.A (30)
MMP9+FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGP ¹ PPGPPGPPGPPGPPSAGFD.F (19)
MMP9	G.AAGPPG.T (31)
MMP9	P.VGPVGARGP.A (32)
MMP9	P.AGPVGPVGARGP.A (33)
MMP9	P.RGLPGPPGAPG.Q (34)
MMP9	G.EAGRPGEAGLPG.A (35)
MMP9	Q.DGRPGPPGPPGA.R (36)
MMP9	K.DGLNGLPGPIGPPG.R (37)
MMP9	G.AKGEPGPVGVQGGP.A (38)
MMP9	P.AGARGNDGATGAAGPPG.T (39)
MMP9	P.VGPPGPPGPPGPPGPPSAGF.D (40)
MMP9	A.GAPGKDGLNGLPGPIGPPG.R (41)
MMP9	D.AGPVGP ¹ PPGPPGPPGPPGPPSAG.F (42)
MMP9	S.AGAPGKDGLNGLPGPIGPPG.R (43)
MMP9	G.PPGPPGPPGPPGLGGNFAPQLSYG.Y (44)

10

20

30

40

【表 8 B】

MMP9	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S (45)
MMP9	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (46)
MMP9	G.ERGPMPGPPGLAGPPGESGREGAPGAEGSPG.R (47)
FAP	853'.IGNVGAPGAK'862 ($\alpha 2$ 鎖) (48)
FAP	462'.AGKEGPVGLP'471 ($\alpha 2$ 鎖) (49)
FAP	249'.IGSAGPPGFP'258 ($\alpha 2$ 鎖) (50)
FAP	1153'.DGLNGLPGPI'1162 ($\alpha 1$ 鎖) (51)
FAP	1153'.D(β)GLNGLPGPI'1162 ($\alpha 1$ 鎖) (52)
FAP	751'.KGADGSPGKD'760 ($\alpha 1$ 鎖) (53)
FAP	171'.STGGISVPGP.'180 ($\alpha 1$ 鎖) (54)
FAP	167'.YDEKSTGGIS'176 ($\alpha 1$ 鎖) (55)

10

コラーゲン III 型

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位; ()内に配列番号
FAP	E.AGIPGVPGAK.G (56)
FAP	P.KGDPGPPGIP.G (57)
FAP	G.PQGPKGDPGPP.G (58)
FAP	G.PGMRGMPGSPGGP.G (59)
FAP	D.GPPGPAGNTGAPGSPGVS GPKGD.A (60)
FAP	H.AGAQGPPGPPGINGSPPGKKGEMGPAGIP.G (61)
FAP	D.GPRGPTGPIGPPGPAGQPGD.K (62)
MMP9	D.GPPGPAGNTGAPGSPGVS GPKGD.A (63)
MMP9	P.GSPGPAGQQAIGSPGPAGPRGP.V (64)
MMP9	G.ERGRPGLP.G (65)
MMP9	G.KGDRGENGSPG.A (66)
MMP9	E.PGKNGAKGEPGP.R (67)
MMP9	S.PGERGETGPPGP.A (68)
MMP9	P.GGPGADGVPGKDGP.R (69)
MMP9	G.PPGKDGTSGHPGP.I (70)
MMP9	R.GLPGPPGIKGPAGIPG.F (71)
MMP9	L.PGENGAPGPMGPRGAPGE.R (72)
MMP9	G.APGAPGGKGDAGAPGERGPP.G (73)
MMP9	A.PGLKGENGLPGENGAPGPMGPRGAPG.E (74)
MMP9	G.IAGITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQ.G (75)
MMP9	G.SPGAKGEVGPAGSPGSNGAPGQGEPPG.Q (76)
MMP9	G.LKGENGLPGENGAPGPMGPRGAPGERGRPGLPGAA.G (77)
MMP9+FAP	D.GPPGPAGNTGAPGSPGVS GPKGD.A (78)
ADAMTS-4	267'.GFDGRNGEKG'276 (79)
FAP	533'.PGMRGMPGSP'542 ($\alpha 1$ 鎖) (80)
不明	642'.GLPGTGGPPG'651 (81)
不明	652'.ENKPGEPGP.'661 (82)
不明	861'.GERGSPGGPG'870 (83)
不明	899'.PGKDGP GPPA.'908 ($\alpha 1$ 鎖) (84)
MMP9, ADAMTS-4	442'.GLPGTGGPPG'451 (85)

20

30

40

【表 8 C】

コラーゲン IV 型

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;()内に配列番号
MMP9	333' .IVIGTGPLGE' 342 (α 1 鎖) (86)
MMP9	328' PGPPGIVIGT.' 337 (α 1 鎖) (87)

コラーゲン V 型

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;()内に配列番号
MMP2	920' ERGPRGITGK.' 929 (α 1 鎖) (88)
MMP2/9	1584' .RRNIDASQLL' 1593 (α 1 鎖) (89)
MMP2/9	229' .QQGGAGPTGP' 238 (α 2 鎖) (90)
MMP2/9	355' .QRGAHGMPGK' 364 (α 2 鎖) (91)
MMP9	525' .RVGKMGRPGA' 534 (α 3 鎖) (92)
MMP2/9	1317' .HMGREGREGE' 1326 (α 3 鎖) (93)

コラーゲン VI 型

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP8	873' .RIAVAQYSDD `883 (94)
MMP8	1192' .QLGTVQQVIS `1202 (95)
MMP12	1231' .RDVVFLIDGS `1241 (96)

アポ E

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;()内に配列番号
MMP9	81' .LMDETM `86 (97)
Cat K	246' RLDEVK. `251 (98)
MMP9	101 `TPVAEE. `106 (99)
Cat K	126' .MEEMGS `131 (100)

ビグリカン

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;()内に配列番号
MMP3	219' .KLTGIPKDLP `228 (101)
MMP3	226' DLPETLNELH. `235 (102)
MMP12	220' LTGIPKDLPE. `229 (103)
MMP13	329' .RAYNGISLF `338 (104)
MMP13	334' GISLFNPNVP. `343 (105)
MMP12	87 `EISPDTTLLD `96 (106)
MMP12	97' LQNNDISELR. `106 (107)
MMP9	188 `IEMGGNPLENS `198 (108)
MMP9	200 `FEPGAFDGLK. `209 (109)
MMP9	148 `NHLVEIPPNL `157 (110)
MMP9	151 `VEIPPNLPS. `160 (111)
MMP9	232 `NELHLDHNK' 240 (112)
MMP9	344 `YWEVQPATFR' 353 (113)
MMP9, MMP12	241 `IQAIELEDLL' 250 (114)

デコリン

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;()内に配列番号
ADAM-TS4	75' .VPKDLPPDTT `84 (115)

【表 8 D】

パーシカン

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位; ()内に配列番号
カテプシン K	3247' .YENWRPNQPD '3256 (116)
カテプシン K	3255' PDSFFSAGED. '3264 (117)
カテプシン K	3221' .HDYQWIGLN '3229 (118)
MMP8	3306' .KTFGKMKPRY '3316 (119)
MMP8	486' .SVTQIEQIEV '495 (120)
MMP8	491' EQIEVGPLVT. '500 (121)

10

CRP

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位; ()内に配列番号
シグナルペプチド	013' LSHAFG. '018 (122)
MMP3/8/9, Cat S/K	011' TSLSHA. '016 (123)

エラスチン

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位; ()内に配列番号
シグナルペプチド	21' LHPSRP. '26 (124)
ADAMTS1/4/8 MMP8/9	379' KAAKYG. '384 (125)
MMP9/12	547' GIGPGG. '552 (126)

20

ルミカン

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位; ()内に配列番号
MMP9	75' NNQIDHIDEK. '84 (127)

LAMC1

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位; ()内に配列番号
MMP2/9	664' SAGYLDDVTL. '673 (128)
MMP9	1232' LNRKYEQAKN. '1241 (129)

30

LAMA2

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位; ()内に配列番号
MMP2	1240' .QFEGKMLMAY '1249 (130)
MMP2/9	2314' .GLWNFREKEG '2323 (131)

LAMB1

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位; ()内に配列番号
MMP9	209' ALDPAFKIED. '218 (132)
MMP2/9	1629' .SIESETAASE '1638 (133)
MMP2/9	1639' ETLFNASQRI. '1648 (134)

40

LAMA5

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位; ()内に配列番号
MMP9	2402' .NSRNQERLEE '2411 (135)
MMP2/9	2901' EMDTLNEEVV. '2910 (136)
MMP9	3056' DLELADAYYL. '3065 (137)

【 0 0 5 6 】

本明細書を通してのアミノ酸配列において、Pはヒドロキシプロリンを示し、Mは酸化

50

メチオニンを示し、Kはヒドロキシリジンを示す。

【0057】

本発明は、患者生体液試料に天然で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ためのイムノアッセイを行うステップを含むバイオアッセイの方法であって、前記イムノアッセイが、前記試料に天然で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ップと、前記試料における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ペプチド断片の前記免疫学的結合パートナーへの結合の程度を測定するステップとを含む方法により行われ、前記タンパク質がアポEまたはラミニンである、方法を含む。これらのタンパク質は、好ましくはヒトであり、試料は、好ましくはヒトであるが、試料および/またはタンパク質は、特に齧歯類、例えば、マウスもしくはラットを含む哺乳類であってもよく、またはイヌ、もしくはサルを含む霊長類であってもよい。

10

【0058】

上記方法は、正常レベルより上への前記患者における前記測定値の上昇を、線維症または炎症性疾患の存在と関連づけることを含んでもよい。

【0059】

任意選択的に、本発明によるイムノアッセイにおける上昇した結果は、皮膚線維症、肺線維症、もしくは肝線維症、または心血管疾患と関連づけられる。任意選択的に、本発明によるイムノアッセイにおける上昇した結果は、強直性脊椎炎などの炎症状態と関連づけられてもよい。方法は、患者生体液試料を得る予備ステップを含んでもよい。

20

【0060】

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する特異的結合親和性を有してもよい。

【0061】

ネオエピトープに対する特異的な反応性または免疫学的親和性は、関連した免疫学的結合パートナーが、ネオエピトープが由来する未切断のタンパク質とは反応し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、下記に列挙される配列などのネオエピトープ配列に対して、その配列がそれぞれの切断部位をまたいで伸びている場合には、反応しない。これは、測定されるペプチドが、指定された配列で終結していることを意味する。

30

【0062】

本明細書で用いられる場合、用語「免疫学的結合パートナー」は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、ならびにまた、FabまたはF(ab')₂などの抗体の特異的結合性断片を含む。したがって、前記免疫学的結合パートナーは、特異的結合親和性を有する、モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体の断片であってもよい。

【0063】

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見出されず、または本発明の方法が関係する他のタンパク質のいずれにおいても見出されない。

【0064】

いくつかの候補プロテアーゼが線維性組織内で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た異なるネオエピトーププロファイルを生じる、広い範囲の複雑な過程の結果である。

40

【0065】

<コラーゲンアッセイ>

<コラーゲンI型>

本発明者らは、以下の表に列挙される酵素が、I型コラーゲンを少なくとも以下の切断部位(「・」でマーク)で切断することを決定している。

【表 9 A】

表 9. コラーゲン I 型切断部位

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位	配列番号()
FAP	Q.GAPGLQGMPG.E	(1)
FAP	D.RGEPGPPGPAGFAGPPGAD.G	(2)
FAP	D.GVRGLTGPIGPPGPAGAPGD.K	(3)
FAP	A.GLPGAKGLTGSPGSPGPDGK.T	(4)
FAP	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F	(5)
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGD.A	(6)
FAP	S.PGKDGVRGLTGPIGPPGPAGAP.G	(7)
FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	P.GPPGPPGPPGLGGNFAPQLS.Y	
FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S	
FAP	F.PGARGPSGPQGGPPGPKGNSG.E	
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAGFD.F	
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGPPGPPGPPGPPSAG.F	
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGPPGPPGPPGPPSAG.F	
FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQLSYGYDEKSTGGISVFGPMGP.S	
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGPPGPPGPPGPPSAGFD.F	
MMP9+FAP	D.RGEPGPPGPAGFAGPPGAD.G	
MMP9+FAP	D.GVRGLTGPIGPPGPAGAPGD.K	
MMP9+FAP	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F	
MMP9+FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGD.A	
MMP9+FAP	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAGF.D	
MMP9+FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGLGGNFAPQLS.Y	
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S	
MMP9+FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
MMP9+FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S	
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGPPSAGFDFSFLPQPPQEKAHDGGRYR.A	
MMP9+FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGPPGPPGPPGPPSAGFD.F	
MMP9	G.AAGPPGP.T	
MMP9	P.VGPVGARGP.A	
MMP9	P.AGPVGPVGARGP.A	
MMP9	P.RGLPGPPGAPGP.Q	
MMP9	G.EAGRPEAGLPG.A	
MMP9	Q.DGRPGPPGPPGA.R	
MMP9	K.DGLNGLPGPIGPPGP.R	
MMP9	G.AKGEPGPGVQVQPPGP.A	
MMP9	P.AGARGNDGATGAAGPPGP.T	
MMP9	P.VGPPGPPGPPGPPGPPSAGF.D	
MMP9	A.GAPGKDGLNGLPGPIGPPGP.R	
MMP9	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F	
MMP9	S.AGAPGKDGLNGLPGPIGPPGP.R	
MMP9	G.PPGPPGPPGLGGNFAPQLSYG.Y	
MMP9	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S	

10

20

30

40

【表 9 B】

MMP9	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
MMP9	G.ERGPMPGPPGLAGPPGESGREGAPGAEGSPG.R	
FAP	P.IGNVGAPGAK ($\alpha 1$ 鎖)	
FAP	P.AGKEGPVGLP ($\alpha 2$ 鎖)	
FAP	P.IGSAGPPGFP ($\alpha 2$ 鎖)	
FAP	853'.IGNVGAPGAK'862 ($\alpha 2$ 鎖)	
FAP	462'.AGKEGPVGLP'471 ($\alpha 2$ 鎖)	
FAP	249'.IGSAGPPGFP'258 ($\alpha 2$ 鎖)	
FAP	1153'.DGLNGLPGPI'1162 ($\alpha 1$ 鎖)	10
FAP	1153'.D(β)GLNGLPGPI'1162 ($\alpha 1$ 鎖)	
FAP	751'.KGADGSPGKD'760 ($\alpha 1$ 鎖)	
FAP	171'.STGGISVPGP.'180 ($\alpha 1$ 鎖)	
FAP	167'.YDEKSTGGIS'176 ($\alpha 1$ 鎖)	
FAP	Q.GAPGLQMPG.E	
FAP	D.RGEPGPPGAGFAGPPGAD.G	
FAP	D.GVRGLTGPIGPPGAGAPD.K	
FAP	A.GLPGAKGLTGSPGSPGPDGK.T	
FAP	D.AGPVGGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F	
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGD.A	20
FAP	S.PGKDGVRGLTGPIGPPGAGAP.G	
FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQLS.G	
FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S	
FAP	F.PGARGPSGPQGGPPGPKGNSG.E	
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	D.AGPVGGPPGPPGPPGPPGPPSAGFD.F	
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGGPPGPPGPPGPPSAG.F	30
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGGPPGPPGPPGPPSAG.F	
FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQLSYGYDEKSTGGISVPGMGP.S	
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGGPPGPPGPPGPPSAGFD.F	
MMP9+FAP	D.RGEPGPPGAGFAGPPGAD.G	
MMP9+FAP	D.GVRGLTGPIGPPGAGAPD.K	
MMP9+FAP	D.AGPVGGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F	
MMP9+FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGD.A	
MMP9+FAP	D.AGPVGGPPGPPGPPGPPGPPSAGF.D	
MMP9+FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQLS.G	
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S	40
MMP9+FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
MMP9+FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S	
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGPPSAGFDFSFLPQPPQEKAHDGGRYYR.A	
MMP9+FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGGPPGPPGPPGPPSAGFD.F	
MMP9	G.AAGPPGP.T	
MMP9	P.VGPVGARGP.A	
MMP9	P.AGPVGPVGARGP.A	

【表 9 C】

MMP9	P.RGLPGPPGAPGP.Q	
MMP9	G.EAGRPGEAGLPG.A	
MMP9	Q.DGRPGPPGPPGA.R	
MMP9	K.DGLNGLPGPIGPPGP.R	
MMP9	G.AKGEPGVGVQGP.A	
MMP9	P.AGARGNDGATGAAGPPGP.T	
MMP9	P.VGPPGPPGPPGPPSAGF.D	
MMP9	A.GAPGKDGLNGLPGPIGPPGP.R	
MMP9	D.AGPVGPPGPPGPPGPPSAG.F	
MMP9	S.AGAPGKDGLNGLPGPIGPPGP.R	
MMP9	G.PPGPPGPPGLGGNFAPQ.SYG.Y	
MMP9	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L.S	
MMP9	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
MMP9	G.ERGPPGPMGPPGLAGPPGESGREGAPGAEGSPG.R	
FAP	P.IGNVGAPGAK (α1 鎖)	
FAP	P.AGKEGPVGLP (α2 鎖)	
FAP	P.IGSAGPPGFP (α2 鎖)	

10

【 0 0 6 6 】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのN末端における以下の配列のいずれかと特異的に反応し得る。

20

【表 10】

表 10. コラーゲン I 型のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の N 末端配列 (印「.」は切断部位を示す)

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
.AAGPPG (138)
.AGPVGP (139)
.DGRPPG (140)
.EAGRPG (141)
.GAPGLQ (142)
.GLNGLP (143)
.GLNGLP (144)
.GLPGAK (145)
.GPPGPP (146)
.GPPGPP (147)
.GVRGLT (148)
.LPGPPG (149)
.LPGPPG (150)
.PGARGP (151)
.PGKDG (152)
.PGPPGP (153)
.PGPPGP (154)
.PGPPGP (155)
.RGEPGP (156)
.RGLPGP (157)
.VGPVGA (158)
.DGLNGL (159)
.AKGEPG (160)
.AGARGN (161)
.VGPPGP (162)
.GAPGKD (163)
.IGSAGP (164)
.AGAPGK (165)
.PPGPPG (166)
.GPPGPP (167)
.YDEKST (168)
.ERGPPG (169)
.IGNVGA (170)
.AGKEGP (171)
.KGADGS (172)
.D(β)GLNGLP(173)

10

20

30

【0067】

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 末端における以下の配列のいずれかと特異的に反応し得る。

40

【表 1 1】

表 11. コラーゲン I 型のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の C 末端配列 (印「.」は切断部位を示す)

「.」でマークされた切断部位/配列番号 ()	
AE G SPG. (174)	
AGAPGD. (175)	
AGPPGP. (176)	
AGPPGP. (177)	
APQ L SY. (178)	
APQ L SY. (179)	10
EAGLPG. (180)	
GGRYYR. (181)	
GNFAPQ. (182)	
GNFAPQ. (183)	
GPAGAP. (184)	
GPPGAD. (185)	
GPPSAG. (186)	
IGPPGP. (187)	
IGPPGP. (188)	
IGPPGP. (189)	
ISVPGP. (190)	20
LQGM P G. (191)	
NFAPQ L . (192)	
PGAPGP. (193)	
PGPDGK. (194)	
PGPMGP. (195)	
PGPPGA. (196)	
PKGNSG. (197)	
PPSAGF. (198)	
PQ L SYG. (199)	
PSAGFD. (200)	
QGPPGP. (201)	30
RGRTGD. (202)	
VGARGP. (203)	

【 0 0 6 8 】

< コラーゲン I I I 型 >

本発明者らは、以下の表に列挙される酵素が、I I I 型コラーゲンを少なくとも以下の切断部位 (* でマーク) で切断することを決定している。

【表 1 2】

表 12. コラーゲン III 型における切断部位

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
FAP	E.AGIPGVPGAK.G
FAP	P.KGDPGPPGIP.G
FAP	G.PQGPKGDPGPP.G
FAP	G.PGMRGMPGSPGGP.G
FAP	D.GPPGPAGNTGAPGSPGVSGPKGD.A
FAP	H.AGAQPPGPPGINGSPPGKKGEMGPAGIP.G
FAP	D.GPRGPTGPIGPPGPAGQPGD.K
MMP9	D.GPPGPAGNTGAPGSPGVSGPKGD.A
MMP9	P.GSPGPAGQQGAIGSPGPAGPRGP.V
MMP9	G.ERGRPGLP.G
MMP9	G.KGDRGENGSPG.A
MMP9	E.PGKNGAKGEPGP.R
MMP9	S.PGERGETGPPGP.A
MMP9	P.GGPGADGVPGKDGP.R
MMP9	G.PPGKDGTSGHPPGP.I
MMP9	R.GLPGPPGIKGPAGIPG.F
MMP9	L.PGENGAPGPMGPRGAPGE.R
MMP9	G.APGAPGGKGDAGAPGERGPP.G
MMP9	A.PGLKGENGLPGENGAPGPMGPRGAPG.E
MMP9	G.IAGITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQ.G
MMP9	G.SPGAKGEVGPAGSPGSNGAPGQRGEPGP.Q
MMP9	G.LKGENGLPGENGAPGPMGPRGAPGERGRPGLPGAA.G
MMP9+FAP	D.GPPGPAGNTGAPGSPGVSGPKGD.A
ADAMTS-4	267'.GFDGRNGEKG'276
FAP	533'.PGMRGMPGSP'542 (α1鎖)
不明	642'.GLPGTGGPPG'651
不明	652'.ENKPGEPGP.'661
不明	861'.GERGSPGGPG'870
	697'.GAGPPGPEGG'706 (α1鎖)
	804'.GPPGPAGFPG'813 (α1鎖)
	899'.PGKDGPFGPA.'908 (α1鎖)
	1008'.GEPGRDGNPG'1017 (α1鎖)
MMP9, ADAMTS-4	442'.GLPGTGGPPG'451

10

20

30

【0069】

免疫学的結合パートナーは、III型コラーゲンの切断により形成された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。

40

【0070】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのN末端における以下の配列

【表 13】

表 13. コラーゲン III 型のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の N 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
.AGAQQP (204)
.AGIPGV (205)
.APGAPG (206)
.ERGRPG (207)
.GERGSP (208)
.GFDGRN (209)
.GGPGAD (210)
.GLPGPP (211)
.GLPGTG (212)
.GPPGPA (213)
.GPRGPT (214)
.GSPGPA (215)
.IAGITG (216)
.KGDPGP (217)
.KGDRGE (218)
.LKGENG (219)
.PGENGA (220)
.PGERGE (221)
.PGKNGA (222)
.PGLKGE (223)
.PGMRGM (224)
.PPGKDG (225)
.PQGPKG (226)
.SPGAKG (227)

10

20

のいずれか、またはペプチドの C 末端における以下の配列：

【表 14】

表 14. コラーゲン III 型のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の C 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
AGQPGD. (228)
ENGSPG. (229)
GDPGPP. (230)
GERGPP. (231)
GLPGAA. (232)
GPAGIP. (233)
GPPGIP. (234)
GPPGPA. (235)
GRPGLP. (236)
GSPGGP. (237)
GSPGPQ. (238)
GVPGAK. (239)
KGEPGP. (240)
PAGIPG. (241)
AGPRGP. (242)
PGEPPG. (243)
PGKDGP. (244)
PRGAPG. (245)
RGAPGE. (246)
RGEPPG. (247)
SGHPGP. (248)
SGPKGD. (249)
TGPPGP. (250)

10

20

のいずれかと特異的に反応し得る。

【0071】

< コラーゲン IV >

本発明者らは、以下の表に列挙される酵素が、IV型コラーゲンを少なくとも以下の切断部位(「.」でマーク)で切断することを決定している。

30

【表 15】

表 15. コラーゲン IV 型の切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP9	333'.IVIGTGPLGE'342 ($\alpha 1$ 鎖)
MMP9	328'PGPPGIVIGT.'337 ($\alpha 1$ 鎖)

【0072】

免疫学的結合パートナーは、IV型コラーゲンの切断により形成された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。

40

【0073】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのN末端における以下の配列：

【表 16】

表 16. コラーゲン IV 型のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の N 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
.IVIGTG (251)

またはペプチドのC末端における以下の配列：

【表 17】

表 17. コラーゲン IV 型のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の C 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
GIVIGT. (252)

と特異的に反応し得る。

【0074】

< コラーゲン V >

本発明者らは、以下の表に列挙される酵素が、V 型コラーゲンを少なくとも以下の切断部位(「.」でマーク、または「.」がない場合は配列の末端で)で切断することを決定している。

10

【表 18】

表 18. コラーゲン V 型の切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP2	920' ERGPRGITGK.' 929 ($\alpha 1$ 鎖)
MMP2/9	1584' .RRNIDASQLL' 1593 ($\alpha 1$ 鎖)
MMP2/9	229' .QQGGAGPTGP' 238 ($\alpha 2$ 鎖)
MMP2/9	355' .QRGAHGMPGK' 364 ($\alpha 2$ 鎖)
MMP9	525' .RVGKMGRPGA' 534 ($\alpha 3$ 鎖)
MMP2/9	1317' .HMGREGREGE' 1326 ($\alpha 3$ 鎖)

20

【0075】

免疫学的結合パートナーは、V 型コラーゲンの切断により形成された 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。

【0076】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドの N 末端における以下の配列：

【表 19】

表 19. コラーゲン V 型のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の N 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
.RRNIDA (253)
.QQGGAG (254)
.QRGAHG (255)
.RVGKMG (256)
.HMGREG (257)

30

のいずれか、またはペプチドの C 末端における以下の配列：

【表 20】

表 20. コラーゲン V 型のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の C 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
RGITGK. (258)

40

と特異的に反応し得る。

【0077】

< コラーゲン VI >

本発明者らは、以下の表に列挙される酵素が、VI 型コラーゲンを少なくとも以下の切断部位(「.」でマーク、または「.」がない場合は配列の末端で)で切断することを決定している。

【表 2 1】

表 21. コラーゲン VI 型の切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP8	873'. RIAVAQYSDD 883'
MMP8	1192'. QLGTVQQVIS 1202'
MMP12	1231'. RDVVFLIDGS 1241'

【0078】

免疫学的結合パートナーは、VI型コラーゲンの切断により形成された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。

10

【0079】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのN末端における以下の配列のいずれかと特異的に反応し得る。

【表 2 2】

表 22. コラーゲン VI 型のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の N 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
.RIAVAQ (259)
.QLGTVQ (260)
.RDVVFL (261)

20

【0080】

<プロテオグリカン>

本発明の別の態様において、前記ペプチド断片は、プロテオグリカンのパーシカン、ルミカン、ビグリカン、およびデコリンの断片であり、それらは全て、線維性組織内に同定されている。

【0081】

いくつかの候補プロテアーゼが線維性病変におけるプロテオグリカンの消化に関与し得る。本発明者らは、表 2 3 に列挙される酵素が、ビグリカン断片を生成し、少なくとも以下の切断産物を生じること決定している。

【0082】

<ビグリカン>

30

【表 2 3】

表 23. ビグリカンの切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP3	219'. KLTGIPKDLP' 228
MMP3	226' DLPETLNELH.' 235
MMP12	220' LTGIPKDLPE.' 229
MMP13	329'. RAYYNGISLF' 338
MMP13	334' GISLFPNNPVP.' 343
MMP12	87'. EISPDTLLD' 96
MMP12	97' LQNNDISELR.' 106
MMP9	188'. IEMGGNPLENS' 198
MMP9	200' FEPGAFDGLK.' 209
MMP9	148'. NHLVEIPPNL' 157
MMP9	151' VEIPPNLPS.' 160
MMP9	232'. NELHLDHNK' 240
MMP9	344'. YWEVQPATFR' 353
MMP9, MMP12	241'. IQAIELEDLL' 250

40

【0083】

免疫学的結合パートナーは、ビグリカンの切断により形成されたC末端またはN末端の

50

ネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【0084】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのN末端における以下のいずれか：

【表24】

表24. ビグリカンのプロテアーゼにより生成されたペプチド断片のN末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
.KLTGIP (262)
.RAYYNG (263)
.EISPDT (264)
.IEMGGN (265)
.NHLVEI (266)
.NELHLD (267)
.YWEVQP (268)
.IQAIEL (269)

10

またはペプチドのC末端における表25における以下の配列：

【表25】

表25. ビグリカンのプロテアーゼにより生成されたペプチド断片のC末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
TLNELH. (270)
PKDLPE. (271)
FNNPVP. (272)
DISELR. (273)
AFDGLK. (274)
PNLPSS. (275)

20

と特異的に反応し得る。

【0085】

<デコリン>

【表26】

表26. デコリンの切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
ADAM-TS4	75'.VPKDLPPDTT'84

30

【0086】

免疫学的結合パートナーは、デコリンの切断により形成された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】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのN末端における以下と特異的に反応し得る。

【表27】

表27. デコリンのプロテアーゼにより生成されたペプチド断片のN末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
.VPKDLP (276)

40

【0088】

パーシカン

【表 28】

表 28. パーシカンの切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
カテプシン K	3247' .YENWRPNQPD' 3256
カテプシン K	3255' PDSFFSAGED.' 3264
カテプシン K	3221' .HDYQWIGLN' 3229
MMP8	3306' .KTFGKMKPRY' 3316
MMP8	486' .SVTQIEQIEV' 495
MMP8	491' EQIEVGPLVT.' 500

10

【0089】

免疫学的結合パートナーは、パーシカンの切断により形成された C 末端または N 末端のネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【0090】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドの N 末端における以下：

【表 29】

表 29. パーシカンのプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の N 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
.YENWRP (277)
.HDYQWI (278)
.KTFGKM (279)
.SVTQIE (304)

20

のいずれか、またはペプチドの C 末端における表 30 における以下の配列：

【表 30】

表 30. パーシカンのプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の C 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
FSAGED. (280)
VGPLVT. (281)

30

のいずれかと特異的に反応し得る。

【0091】

<ルミカン>

【表 31】

表 31. ルミカンの切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP9	75 'NNQIDHIDEK.' 84

【0092】

免疫学的結合パートナーは、ルミカンの切断により形成された 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。

40

【0093】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドの C 末端における以下の配列と特異的に反応し得る。

【表 32】

表 32. ルミカンのプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の C 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
DHIDEK. (282)

【0094】

50

<CRP>

いくつかの候補プロテアーゼが線維性組織内のCRPの消化に参与し得る。文献は、線維性組織内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、線維症をもたらす広い範囲の複雑な過程の結果である。しかしながら、本発明者らの評価において、初期相は、一連のMMPからなり得るが、後期は、マトリックスのカテプシンK分解により多く頼る可能性があり、その結果として、疾患のレベルに依存する異なるネオエピトーププロファイルを生じる。本発明者らは、純粋な天然のタンパク質の一連のインビトロ切断を通して、以下の表に列挙された酵素が、表33において「.」でマークされた少なくとも以下の切断部位でCRPを切断したことを決定している。

【表33】

表33. 特異的なプロテアーゼにより生成されたCRP断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
不明	013' LSHAFG.' 018
MMP3/8/9, Cat S/K	011' TSLSHA.' 016

10

【0095】

したがって、本発明の方法において、前記ペプチド断片は、好ましくは、表33のCRPの上記の部分的配列のいずれか1つにおける、印「.」によってマークされた部位でのプロテアーゼによるCRPの切断により形成されるネオエピトープを含む。

20

【0096】

免疫学的結合パートナーは、CRPの切断により形成された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。

【0097】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのC末端における以下の配列のいずれかと特異的に反応し得る。

【表34】

表34. CRPのプロテアーゼにより生成されたペプチド断片のC末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
LSHAFG. (283)
TSLSHA. (284)

30

【0098】

<エラスチン>

いくつかの候補プロテアーゼが線維性組織内のエラスチンの消化に参与し得る。本発明者らは、純粋な天然のタンパク質の一連のインビトロ切断を通して、以下の表に列挙された酵素が、少なくとも、以下の配列の各末端における切断部位で、または「.」でマークされた切断部位でエラスチンを切断したことを決定している。

【表35】

表35. 特異的なプロテアーゼにより生成されたエラスチン断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
シグナルペプチド	21' LHPSRP.' 26
ADAMTS1/4/8 MMP8/9	379' KAAKYG.' 384
MMP9/12	547' GIGPGG.' 552

40

* アミノ酸残基番号は、ヒトエラスチン配列からである。

【0099】

したがって、本発明の方法において、前記ペプチド断片は、好ましくは、表35のエラスチンの部分的配列のいずれか1つにおいて、C末端部位でのプロテアーゼによるエラスチンの切断により形成されるネオエピトープを含む。

50

【0100】

免疫学的結合パートナーは、エラスチンの切断により形成されたC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。

【0101】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのC末端における以下の配列のいずれかと特異的に反応し得る。

【表36】

表36. エラスチンのプロテアーゼにより生成されたペプチド断片のC末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
LHPSRP. (285)
KAAKYG. (286)
GIGPGG. (126)

10

【0102】

<アポE>

いくつかの候補プロテアーゼが線維性組織内のアポEの消化に関与し得る。本発明者らは、純粋な天然のタンパク質の一連のインビトロ切断を通して、以下の表に列挙された酵素が、少なくとも、以下の配列の各末端における切断部位で、または「.」でマークされた切断部位でアポEを切断したことを決定している。

【表37】

表37. アポEの切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP9	81'.LMDETM'86
Cat K	246'.RLDEVK.'251
MMP9	101'.TPVAEE.'106
Cat K	126'.MEEMGS'131

20

【0103】

したがって、本発明の方法において、前記ペプチド断片は、好ましくは、表37のアポEの部分的配列のいずれか1つにおける、N末端もしくはC末端部位での、または表示されている場合、印「.」によってマークされた部位でのプロテアーゼによるアポEの切断により形成されるネオエピトープを含む。

30

【0104】

免疫学的結合パートナーは、アポEの切断により形成されたC末端またはN末端のネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【0105】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのN末端における以下の配列：

【表38】

表38. アポEのプロテアーゼにより生成されたペプチド断片のN末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
.LMDETM (288)
.MEEMGS (289)

40

のいずれか、またはペプチドのC末端における以下の配列：

【表 39】

表 39. アポ E のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の C 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()	
RLDEVK.	(290)
TPVAEE.	(291)

のいずれかと特異的に反応し得る。

【0106】

< L A M C 1 >

いくつかの候補プロテアーゼが線維性組織内の L A M C 1 の消化に関与し得る。本発明者らは、純粋な天然のタンパク質の一連のインビトロ切断を通して、酵素が、少なくとも、以下の配列の各末端における切断部位で、または「.」でマークされた切断部位で L A M C 1 を切断することを決定している。

10

【表 40】

表 40. LAMC1 の切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP2/9	664' SAGYLDDVTL.'673
MMP9	1232' LNRKYEQAKN.'1241

【0107】

したがって、本発明の方法において、前記ペプチド断片は、好ましくは、表 40 の L A M C 1 の部分的配列のいずれか 1 つにおける、C 末端部位でのプロテアーゼによる L A M C 1 の切断により形成されるネオエピトープを含む。

20

【0108】

免疫学的結合パートナーは、L A M C 1 の切断により形成された C 末端または N 末端のネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【0109】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドの C 末端における以下の配列のいずれかと特異的に反応し得る。

【表 41】

表 41. LAMC1 のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の C 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()	
LDDVTL.	(292)
YEQAKN.	(293)

30

【0110】

< L A M A 2 >

いくつかの候補プロテアーゼが線維性組織内の L A M A 2 の消化に関与し得る。本発明者らは、純粋な天然のタンパク質の一連のインビトロ切断を通して、酵素が、少なくとも、以下の配列の各末端における切断部位で、または「.」でマークされた切断部位で L A M A 2 を切断することを決定している。

40

【表 42】

表 42. LAMA2 の切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP2	1240' .QFEGKKL MAY'1249
MMP2/9	2314' .GLWNFREKEG'2323

【0111】

したがって、本発明の方法において、前記ペプチド断片は、好ましくは、表 42 の L A M A 2 の部分的配列のいずれか 1 つにおける、N 末端部位でのプロテアーゼによる L A M

50

A 2 の切断により形成されるネオエピトープを含む。

【 0 1 1 2 】

免疫学的結合パートナーは、L A M A 2 の切断により形成された C 末端または N 末端の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 3 】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドの N 末端における以下の配列のいずれかと特異的に反応し得る。

【表 4 3】

表 43. LAMA2 のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の N 末端配列

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位/配列番号()
MMP2	.QFEGKK (294)
MMP2/9	.GLWNFR (295)

10

【 0 1 1 4 】

< L A M B 1 >

いくつかの候補プロテアーゼが線維性組織内の L A M B 1 の消化に関与し得る。本発明者らは、純粋な天然のタンパク質の一連のインビトロ切断を通して、酵素が、少なくとも、以下の配列の各末端における切断部位で、または「.」でマークされた切断部位で L A M B 1 を切断することを決定している。

【表 4 4】

20

表 44. LAMB1 の切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP9	209'ALDPAFKIED.'218
MMP2/9	1629'.SIESETAASE'1638
MMP2/9	1639'ETLFNASQRI.'1648

【 0 1 1 5 】

したがって、本発明の方法において、前記ペプチド断片は、好ましくは、表 4 4 の L A M B 1 の部分的配列のいずれか 1 つにおける、N 末端または C 末端部位でのプロテアーゼによる L A M B 1 の切断により形成されるネオエピトープを含む。

30

【 0 1 1 6 】

免疫学的結合パートナーは、L A M B 1 の切断により形成された C 末端または N 末端の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 7 】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドの N 末端における以下の配列：

【表 4 5】

表 45. LAMB1 のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の N 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
.SIESET (296)

40

またはペプチドの C 末端における以下の配列：

【表 4 6】

表 46. LAMB1 のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の C 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
AFKIED. (297)
NASQRI. (298)

50

のいずれかと特異的に反応し得る。

【0118】

L A M A 5

いくつかの候補プロテアーゼが線維性組織内の L A M A 5 の消化に関与し得る。本発明者らは、純粋な天然のタンパク質の一連のインビトロ切断を通して、酵素が、少なくとも、以下の配列の各末端における切断部位で、または「.」でマークされた切断部位で L A M A 5 を切断することを決定している。

【表47】

表 47. LAMA5 の切断部位

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP9	2402'.NSRNQERLEE'2411
MMP2/9	2901'EMDTLNEEVV.'2910
MMP9	3056'DLELADAYYL.'3065

10

【0119】

したがって、本発明の方法において、前記ペプチド断片は、好ましくは、表24の L A M A 5 の部分的配列のいずれか1つにおける、N末端もしくはC末端部位で、または表示されている場合、印「.」によってマークされた部位でのプロテアーゼによる L A M A 5 の切断により形成されるネオエピトープを含む。

【0120】

免疫学的結合パートナーは、L A M A 5 の切断により形成されたC末端またはN末端のネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

20

【0121】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのN末端における以下の配列：

【表48】

表 48. LAMA5 のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の N 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
.NSRNQE (299)

30

またはペプチドのC末端における以下の配列：

【表49】

表 49. LAMA5 のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の C 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号()
LNEEVV. (300)
ADAYYL. (301)

のいずれかと特異的に反応し得る。

【0122】

同様の様式によってアッセイされ得るネオエピトープを定義するさらなる切断部位は、コラーゲン、エラスチン、CRP、およびプロテオグリカン、または上記で言及された他の組織タンパク質を、本明細書に記載された酵素のいずれかに曝露し、それにより産生されたペプチドを単離およびシーケンシングすることにより、同定することができる。さらに、アッセイは、例証された切断部位に隣接して生成される、すなわち、上記で示されたN末端エピトープへと繋がるC末端配列、および記載されたC末端エピトープに接続しているN末端配列における、ネオエピトープに基づいてもよい。

40

【0123】

上記のペプチドのうちの一つより多くについてのアッセイを、別々に行い、それらの結果を組み合わせてもよく、または上記のペプチドのうちの一つより多くを一緒に測定して

50

もよい。

【0124】

本発明によるアッセイの結果を、1つまたは複数の他の測定されたバイオマーカーと組み合わせ、診断値または予後値の複合指数を形成してもよい。

【0125】

一般的に、全ての以前に知られたイムノアッセイの方式は、本発明に従って用いることができ、それらには、不均一および均一型式、サンドイッチアッセイ、競合アッセイ、酵素結合アッセイ、放射免疫アッセイなどが挙げられる。したがって、任意選択的に、前記方法は、前記免疫学的結合パートナーおよび競合作用物質が、前記試料の存在下でインキュベートされ、競合作用物質が、試料中のペプチド断片と、免疫学的結合パートナーに結合することにおいて競合する、競合イムノアッセイとして行われる。

10

【0126】

前記競合作用物質は、(1)コラーゲンI型、III型、IV型、V型、もしくはVI型の配列由来、またはCRP由来、またはプロテオグリカンのパーシカン、ルミカン、デコリン、およびビグリカンペプチドのいずれか、アポE、ルミカン、LAMC1、LAMB1、もしくはLAMA5由来の合成ペプチド、あるいは(2)前記ネオエピトープを顕わにするプロテアーゼによって切断される上記で名前を挙げられた精製された天然タンパク質由来の競合作用物質であってもよい。

【0127】

1つの適切な方法は、上記で名前を挙げられたタンパク質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用いる競合イムノアッセイであり得る。マイクロタイタープレートの固体表面上にコーティングされた適切に選択された合成ペプチドは、試料と、モノクローナル抗体または結合断片への結合において競合することができる。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有する精製された天然タンパク質断片は、固体表面上に用いることができる。さらに別の代替法は、固体表面上にモノクローナル抗体または結合断片を固定化し、その後、試料を、シグナル分子、例えば西洋ワサビ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、共インキュベートすることである。

20

【0128】

試料は、血清、血液、もしくは血漿、または他の種類、例えば、線維性組織生検の試料であってもよい。

30

【0129】

アッセイは、前記ネオエピトープと特異的に反応する第1の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と反応する第2の免疫学的結合パートナーとを用いるサンドイッチアッセイとして行われてもよい。任意で、前記第2の免疫学的結合パートナーは、同じタンパク質の第2のネオエピトープに向けられる。

【0130】

特定の好ましい方法において、上記方法は、前記ペプチド断片の前記結合の決定されたレベルを、(a)比較し得る健康な個体および/または(b)病的状態に特有な値と比較するステップと、任意選択的に、測定されたペプチドのより高いレベル(通常には、結合のより高いレベルによって示される)を前記状態のより重篤な度合いと関連づけるステップとをさらに含む。前記状態は、線維性状態であってもよいし、または炎症性状態であってもよい。

40

【0131】

本発明の態様は、上記のような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、名前を挙げられたタンパク質の分子のアミノ酸配列から生じる合成ペプチド(上記で列挙された配列、またはその配列で終結する配列を含む)によりマウスを免疫し、選択されたマウス由来の脾臓細胞を骨髄腫細胞に融合し、関連合成ペプチド上のネオエピトープへの結合についてモノクローナル抗体を試験することにより達成することができる。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(C末端ネ

50

オエピトープについては)その免疫したペプチドのC末端側に延長した形、または(N末端ネオエピトープについては)その免疫したペプチドのN末端側に延長した形のいずれに対する反応性も欠如していることを必要とすることにより保証することができる。ネオエピトープに対する抗体はまた、天然タンパク質に対する結合能力の欠如を確立するように評価され得る。あるいは、ネオエピトープに対する特異性は、末端アミノ酸の1つに共有結合したビオチンまたは他の機能性群の存在に非依存性である抗体の反応性を必要とすることにより保証することができる。

【0132】

本発明は、上記で提示された部分的配列のいずれか1つにおける末端部位でのプロテアーゼによる関連タンパク質の切断により形成されるネオエピトープと特異的に免疫反応し、例えば、モノクローナル抗体またはその結合断片であってもよい、免疫学的結合パートナーを含む。

10

【0133】

本発明は、上記で提示された部分的配列のいずれか1つにおける末端部位での関連タンパク質の切断により形成される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。

【0134】

本発明はさらに、上記で提示されたこれらのタンパク質の部分的配列のいずれか1つにおける、関連タンパク質の切断により形成されるC末端またはN末端ネオエピトープを含むペプチドを提供する。そのようなペプチドを、前記ペプチドに対して免疫応答を生じるためにハプテンとして担体にコンジュゲートしてもよく、またはイムノアッセイに用いるために、固体表面に固定化し、もしくは検出可能なマーカーにコンジュゲートしてもよい。

20

【0135】

本発明はさらに、上記で提示された部分的配列のいずれか1つにおける、関連タンパク質の切断により形成される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された核酸分子を含む。

【0136】

本発明はさらに、発現シグナル、および上記で提示された部分的配列のいずれか1つにおける、関連タンパク質の切断により形成されるC末端またはN末端のネオエピトープを含むペプチドの発現をコードするコード配列を含む核酸配列を含むベクターを含み、さらに、そのようなベクターで形質転換され、前記ペプチドを発現する宿主細胞を含む。

30

【0137】

本発明のさらに別の態様は、上記の方法を実行するために便利に用いることができるキットに関する。そのようなキットは、(1)合成ペプチドでコーティングされたマイクロタイタープレート、(2)前記合成ペプチドと反応する、本発明のモノクローナル抗体または抗体結合断片、および(3)標識された抗マウスIgG免疫グロブリンを含んでもよい。あるいは、そのようなキットは、(1)精製された天然のタンパク質断片でコーティングされたマイクロタイタープレート、(2)その関連断片上のネオエピトープを認識し、かつ前記精製タンパク質断片と反応するモノクローナル抗体、および(3)標識された抗マウスIgG免疫グロブリンを含んでもよい。あるいは、そのようなキットは、(1)ストレプトアビジンでコーティングされたマイクロタイタープレート、(2)ビオチンに連結した合成ペプチド、(3)タンパク質断片上のネオエピトープを認識し、かつ前記合成ペプチドと反応するモノクローナル抗体、および(4)標識された抗マウスIgG免疫グロブリンを含んでもよい。さらに別の代替物は、(1)ストレプトアビジンでコーティングされたマイクロタイタープレート、(2)ビオチンに連結した合成ペプチド、(3)関連タンパク質断片上のネオエピトープを認識し(かつ前記合成ペプチドと反応し)、かつ西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートしたモノクローナル抗体を含むキットであり得る。

40

【0138】

50

したがって、本発明は、本明細書に記載された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作用物質、ならびに、任意選択的に、洗浄試薬、緩衝剤、停止試薬、酵素標識、酵素標識基質、キャリブレーション標準、抗マウス抗体、および使用説明書のうちの1つまたは複数を含むイムノアッセイキットを含む。

【0139】

本明細書に記載されたアッセイは、患者における線維症または炎症状態の診断に有用である。加えて、その検査は、疾患進行の評価、および治療に対する応答のモニタリングに有用である。本発明の免疫学的結合パートナーはまた、開示されたタンパク質切断産物の存在または位置を示すための免疫染色に用いられてもよい。

【0140】

本発明は、以下の実施例および添付の図面を参照して、さらに記載および例証される。

【図面の簡単な説明】

【0141】

【図1】パネルAおよびBにおいて、本発明によるモノクローナル抗体の特異性を調べた結果を示す図である。

【図2】強直性脊椎炎患者由来のヒト血清においてコラーゲンVネオエピトープ所有断片の量を調べた結果を示す図である。

【図3】実施例5において得られた標準曲線を示す図である。

【図4】実施例5においてエクスピボ培養物から測定されたペプチド放出を示す図である。

【図5】実施例5において得られたさらなるペプチド測定を示す図である。

【図6】パネル(a)~(d)において、実施例5において得られたさらなる測定を示す図である。

【図7】実施例5において得られた血清中のさらなるペプチド測定を示す図である。

【図8】実施例6において測定された血清中のペプチドを示す図である。

【図9】実施例7において記載された抗体特異性の試験を示す図である。

【図10】実施例7において測定されたペプチドの血漿中レベルを示す図である。

【図11】実施例7において得られたROC曲線を示す図である。

【図12】実施例8において得られたELISA結果を示す図である。

【図13】実施例8において得られた強直性脊椎炎に関してのペプチド測定を示す図である。

【図14】実施例9において得られた結果を示す図である。

【実施例1】

【0142】

< 酵素切断によるV型コラーゲン断片の同定 >

[試薬]

本実験に用いられる全ての試薬は、Merck (Whitehouse Station, NJ, USA) およびSigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) などの会社からの標準高品質化学物質であった。モノクローナル抗体産生に用いられた合成ペプチドを、Chinese Peptide Company, Beijing, China から購入した。

【0143】

インビトロ切断

ヒト胎盤由来の精製されたV型コラーゲン(カタログ番号ab7537、Abcam, Cambridge, UK)を、プロMMP-2またはプロMMP-9(カタログ番号444213; 444231; Calbiochem, Merck, Whitehouse Station, NJ, USA)で切断した。50μgのMMP-2またはMMP-9を、ジメチルスルホキシド中で20μlの1mM酢酸4-アミノフェニル水銀で活性化し、37で3時間、インキュベートした。0.5M酢酸中に溶解したV型コラーゲンを加えた。MMP切断を促進するために、そのタンパク質を、酢酸を除去するように2日間、

10

20

30

40

50

透析した。10 kDa未満のタンパク質を除去するためにその液体を濾過した(Microcon Ultracel YM-10、カタログ番号42407、Millipore、Billerica、MA、USA)。MMP緩衝液(100 mMのTris-HCl、100 mMのNaCl、10 mMのCaCl₂、2 mMの酢酸Zn、pH 8.0)中、100 µgのV型コラーゲンと1 µgのMMP-2またはMMP-9のいずれかを混合することにより、各MMP切断を別々に実施した。対照として、100 µgのコラーゲンを、MMP緩衝液単独と混合した。その溶液を、37 °Cで2時間、インキュベートした。切断反応を、1 µMの最終濃度になる50 µMのエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を用いて停止した。製造会社の使用説明書に従ってSilver Xpress(登録商標) Silver Staining Kit(カタログ番号LC6100、Invitrogen、Carlsbad、Ca、USA)を用いる可視化により、切断を検証した。

10

【0144】

[ペプチド同定]

インビトロで切断された試料中のペプチド断片を、液体クロマトグラフィ(LC)結合型エレクトロスプレーイオン化(ESI)タンデム質量分析(LC-MS/MS)を用いて同定した。LC-MS試料を、10 kDaより上のタンパク質を除去するために限外濾過を行い、pHを、ギ酸を用いて2.0に調整し、4 µLの試料をLC-MS/MSによって分析した。LCを、nanoACQUITY UPLC BEH C₁₈カラム(Waters、Milford、MA、USA)でギ酸/アセトニトリル勾配を用いて実施した。MSおよびMS/MSを、Synapt高分解能質量分析四重極飛行時間型MS(QUAD-TOF; Waters、Milford、MA、USA)において、MSについては350~1600 m/z、MS/MSについては50~2000 m/zの獲得範囲で実施した。ソフトウェア「ProteinLynx Global SERVER(PLGS)」(Waters、Milford、MA、USA)を用いて、スペクトルを分析し、ピークリストを作成した。ペプチドを同定するために、MSおよびMS/MSデータを、Mascot 2.2(Matrix Science、Boston、MA、USA)ソフトウェアを用いてV型コラーゲン(FASTA)タンパク質データベースに対して、ESI-QUAD-TOF設定、および可変性修飾として、カルバミドメチル(C)、メチオニン(M)の酸化、リジン(K)の酸化、およびプロリン(P)の酸化を用いて、検索した。

20

30

【0145】

MSによって同定されたペプチドのN末端またはC末端における6個のアミノ酸を、問題のプロテアーゼによって生成されたネオエピトープとみなした。全てのプロテアーゼによって生成された配列を、相同性および他の切断部位までの距離を分析し、NPS@:ネットワークタンパク質配列分析(Combet C、Blanchet C、Geourjon C、Deleage G. NPS@:network protein sequence analysis. Trends Biochem Sci 2000; 25:147~50)を用いて相同性について試験した。

【実施例2】

【0146】

40

<同定された断片についてのELISAアッセイの開発>

[ペプチドコンジュゲーション]

ペプチドコンジュゲーションを、マレイミド活性化免疫原コンジュゲーションキット(Maleimide Activated Immunogen Conjugation Kit)(Sigma-Aldrich、MO、USA)を用いて実施した。簡単に述べれば、1個の遊離スルフヒドリル(-SH)基を有するシステイン含有免疫原性ネオエピトープ(HMGREGREGE-GGC、5 mg/mlにおける400 µlペプチド)を、スルフヒドリル含有ペプチドと反応することができる利用可能なマレイミド基を有する、担体タンパク質としてのマレイミド活性化オボアルブミン(OVA)(10 mg/mlにおける180 µl OVA)と、コンジュゲーション緩衝液において、混合し、室

50

温で2時間、インキュベートした。コンジュゲートされた生成物から、2日間の脱塩または透析によりEDTAおよびアジ化ナトリウムを除去した。ビオチンコンジュゲート化ペプチドについて、固相ペプチド合成手順において、ビオチンコンジュゲート化リジンを加えた。

【0147】

[モノクローナル抗体開発]

4~6週齢Balb/Cマウスを、約200 μ lの乳化抗原および50 μ gのネオエpitepCO5-MMP(HMGREGREGE-GGC-OVA)を皮下に免疫した。フロイント不完全アジュバントにおいて安定した血清力価レベルに達するまで2週間間隔で連続免疫化を実施した。2回目の免疫化から血液試料を収集した。各血液試料採取時点において、血清力価を決定し、最高抗血清力価を有するマウスを融合のために選択した。4回目の免疫化後、このマウスを1ヶ月間、休息させ、その後、細胞融合のための脾臓の単離の3日前に、50 μ gのCO5-MMP/100 μ lの0.9%塩化ナトリウム溶液中を静脈内にブーストした。

【0148】

[融合および抗体スクリーニング]

Gefter¹³²によって記載されているように、融合手順を実施した。簡単に述べれば、マウス脾臓細胞を、SP2/0骨髓腫融合パートナー細胞と融合した。ハイブリドーマ細胞を、半流動性培地方法を用いてクローン化し、さらなる増殖のために96ウェルマイクロタイタープレート内へ移し、CO₂インキュベータ内でインキュベートした。標準限界希釈法を用いて、モノクローナル増殖を促進した。ストレプトアビジンコーティングされたマイクロタイタープレートおよび捕獲ペプチドとしてのHMGREGREGE-K-ビオチンでの間接的ELISAを用いて、上清をスクリーニングした。

【0149】

[クローンの特徴づけ]

モノクローナル抗体の天然の反応性およびペプチド結合を、ストレプトアビジンコーティングされたマイクロタイタープレート上の10ng/mLのビオチン化ペプチドコーターおよび増殖中のモノクローナルハイブリドーマ由来の上清を用いた予備的ELISAに対し、天然試料(ヒト/ラット/マウス血清、血漿、および尿)を置換することによって評価した。クローンの遊離ペプチド(HMGREGREGE)、ナンセンスなペプチド、および伸長させたペプチド(GHMGREGREG)に対する特異性を試験した。Clonotyping System-HRPキット、カタログ番号5300-05(Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)を用いて、モノクローナル抗体のアイソタイプ分類を実施した。選択されたクローンを、製造会社(GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)の使用説明書に従ってプロテインGカラムを用いて、精製した。選択されたモノクローナル抗体を、製造会社(Innovabioscience, Babraham, Cambridge, UK)の使用説明書に従ってLightning Link HRP標識キットを用いて、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)で標識した。

【0150】

[CO5-MMPのELISAの手順]

予備実験において、本発明者らは、いくつかのチェッカーボード分析を実施することにより、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。CO5-MMPのELISAを以下のように開発した。96ウェルのストレプトアビジンプレートを、アッセイ緩衝液(25mMのTris、1%BSA、0.1%Tween-20、pH7.4)中に溶解した5ng/mLのビオチン化合成ペプチドHMGREGREGE-K-ビオチンでコーティングし、300rpmで絶えず振盪することにより20で30分間、インキュベートした。アッセイ緩衝液中に溶解した20 μ lのペプチドキャリアまたは試料を、適切なウェルに加え、続いて、100 μ Lのコンジュゲート化モノクロー

10

20

30

40

50

ナル抗体 (125 ng/mL) を加え、300 rpm で絶えず振盪することにより4 で1時間、インキュベートした。最後に、100 µL のテトラメチルベンジジン (TMB) (Kem-En-Tec カタログ番号4380H) を加え、プレートを、暗闇および300 rpm での振盪において20 で15分間、インキュベートした。各インキュベーションステップ後、プレートを洗浄緩衝液 (20 mM の Tris、50 mM の NaCl、pH 7.2) 中で5回、洗浄した。TMB 反応を、100 µL の停止溶液 (1% HCL) を加えることにより停止し、450 nm で分光光度的に測定し、参照として650 nm を用いた。標準曲線を、CO5-MMPペプチド (HMGREGREG) の段階希釈により実施し、4-パラメトリック数学的フィットモデルを用いてプロットした。標準濃度は、0 ng/mL、15.625 ng/mL、31.25 ng/mL、62.5 ng/mL、125 ng/mL、250 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL だった。

10

【0151】

技術的評価

プールされた血清試料の2倍希釈から、100% 試料の回収のパーセンテージとして直線性を計算した。検出下限 (LDL) を、最低標準 (ゼロ標準) の21個の決定値から計算し、平均 + 3 × 標準偏差として計算した。アッセイ間およびアッセイ内変動を、5個のQC試料の10回の独立した実行により決定し、各実行は、試料の2回の決定についての2個のレプリカからなった。最後に、各アッセイについて、アミノ酸分析により正確に定量化された合成ペプチドから調製されたマスターキャリブプレートを、キャリブレーションのために用いた。

20

【0152】

分析物安定性を、10回の凍結および解凍のサイクルの期間に、3つのヒト血清試料について決定した。

【実施例3】

【0153】

< ELISA 特徴づけ >

開発したCO5-MMP ELISAを、20 µL の試料 (未切断V型コラーゲン、MMP-2で切断されたV型コラーゲン、MMP-9で切断されたV型コラーゲン、MMP-13で切断されたV型コラーゲン、および伸長させたCO5-MMPアミノ酸配列 (GHMGREGREG)) を用いて評価した。交差反応性を、インビトロで切断されたコラーゲンI型を用いて試験した。

30

【0154】

結果は、図1、パネルAおよびBに示されており、A) 遊離ペプチド (HMGREGREG)、未切断V型コラーゲン、MMP-9切断型V型コラーゲン、MMP-2切断型V型コラーゲン; B) 遊離ペプチド (HMGREGREG)、MMP-13切断型V型コラーゲン、MMP-9切断型I型コラーゲン、伸長させたペプチド (GHMGREGREG) のシグナルのパーセント阻害を示している。パネルAにおいて、抗体が未切断コラーゲンV型と実質的に反応しないが、切断型コラーゲンV型と反応すること、およびパネルBにおいて、抗体が、N末端伸長型ペプチドと反応しないことがわかる。したがって、抗体は、酵素切断によって生じたN末端ネオエピトープと特異的に反応することが示されている。

40

【実施例4】

【0155】

< 臨床的有用性 >

[健康な対象およびAS患者]

その生化学的マーカーを、強直性脊椎炎 (AS、改訂ニューヨーク基準による) と診断された患者由来の血清中において評価し、Department of Medicine 3 of the University of Erlangen-Nuremberg から入手した性別および年齢をマッチさせた非疾患性血清試料と比較した。非疾患群は、平均年齢が43.0歳、18~66歳の範囲である、21人の健康な女性および1

50

9人の健康な男性からなった。AS群は、平均年齢が42.5歳、29～63歳の範囲である、19人の女性および21人の男性からなった。

【0156】

[統計]

その2つの群間のCO5-MMPの血清レベルを、ELISAを用いて測定し(結果は図2に示されている)、両側ノンパラメトリックマンホイットニー検定を用いて比較した。図2において、バーは、平均レベル±平均値の標準誤差(SEM)を示す。ROCに関して、曲線下面積を測定した。オッズ比を、分割表から外挿し、全ての対象を、低レベル(正常集団の平均の2SD内)または高レベル(>SD)のバイオマーカーを有するとして分類した。P<0.05である場合、結果を有意とみなした。

10

【0157】

これらの結果は、コラーゲンV型の測定されたネオエピトープがASについての価値あるマーカーであることを強く示唆している。

【実施例5】

【0158】

<NB202ピグリカンアッセイ: BGM . YW E V Q P A T F R (配列番号113)>

本発明者らは、MMP-9、MMP-12、およびMMP-13によって生成されたBGNネオエピトープの測定のための酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)の開発を本明細書で実証し、肝線維症の2匹のラットモデルにおいてそのアッセイの生物学的妥当性を試験する。

20

【0159】

方法: BGNを、MMP-9、MMP-12、およびMMP-13によってインビトロで切断し、³⁴⁴「YW E V Q P A T F R」³⁵³ペプチド(BGN-344)を、可能性のあるネオエピトープとして選択した。その選択されたペプチドに対して産生されたモノクローナルマウス抗体を、MMP分解型BGNネオエピトープを測定する競合ELISAの開発に用いた。そのアッセイを、肝線維症の2匹のラットモデル、四塩化炭素(CCL₄)誘発性線維症モデル、および胆管結紮(BDL)モデルにおいて確認した。

【0160】

結果: 対照群と比較して16週間(200ng/ml対120ng/ml、p=0.0013)および20週間(190ng/ml対100ng/ml、p=0.019)のCCL₄で処理されたラットにおいて、加えて、偽手術された群と比較してBDLを受けた全ての群のラットにおいて、血清BGN-344の有意な上昇が見出された。さらに、CCL₄モデルにおいて、肝臓切片のシリウスレッド染色によって決定された肝線維症の程度と血清BGN-344レベルとの有意な相関があった。

30

【0161】

結論: 本発明者らは、MMP分解型BGNの特定の病理学的組織リモデリング産物、すなわち、ネオエピトープBGN-344が、CCL₄モデルおよびBDLモデルにおいて、インビボおよびエクスピボの両方のレベルで、肝線維症中、増加することを実証した。

【0162】

アッセイ開発:

融合から得られた、選択されたモノクローナル抗体のアッセイ開発は、SOPによる以下の全部の試験を含んだ(データは示されていない)。1)チェッカーボード(すなわち、抗体-抗原結合親和性)-異なるインキュベーション時間、インキュベーション温度、およびインキュベーション緩衝液での抗体対コーター濃度、2)標準ペプチド、ナンセンスなペプチド、ヒト血清、天然BGN、MMP-9、MMP-12、およびMMP-13でインビトロ処理された天然BGNに対する抗体特異性および感度を評価するための置換(すなわち、競合強度)、3)Lightning-Link(商標)西洋ワサビペルオキシダーゼ標識キット(Innova Bioscience Ltd、Babraham、UK)を用いて評価されるペルオキシダーゼに対する標識親和性。これらの試験の結果

40

50

に基づいて、最終アッセイ開発として、モノクローナル抗体NB202-7-5A1を選択した。

【0163】

BGN-344競合ELISA手順を以下のように開発した。96ウェルのストレプトアビジンコーティングされたプレートを、1.25ng/mlのYWEVQPATFR-K-ビオチン(配列番号305)で、300rpm、20で30分間、コーティングした。その後、ウェルを、標準洗浄緩衝液で5回洗浄した。標準列を、250ng/mlから開始する、50mMのTris-BTB中に2倍に前希釈した標準ペプチド(YWEVQPATFR)により調製した。試料(すなわち、ヒト血清、マウス血清、ラット血清)を同様に希釈した。標準および試料(20μl/ウェル)、続いて、50mMのTris-BTB緩衝液中の20ng/mlのペルオキシダーゼ標識NB202-7-5A1抗体の100μl/ウェルを加えた。プレートを300rpm、4で1時間、インキュベートした。インキュベーション時間後、ウェルを5回、洗浄し、100μlのTMBと、4、300rpmで15分間、インキュベートし、続いて、各ウェル中に、100μlの停止溶液を加えた。比色反応を、標準実験室用プレートリーダーにおいて、650nmでの測定を参照として、450nmで測定した。データを、SoftMax Pro v5.0プログラムを用いて取得した。

10

【0164】

CCl₄誘発性肝線維症のラットモデル:

肝線維症のCCl₄吸入ラットモデルにおいてBGN-344レベルを測定した。その研究の完全な詳細は別の所で記載されている(133)。その研究は、CCl₄で処理された52匹の雄ウイスターラット、および28匹の雄ウイスター対照ラットを含んだ(Charles-River, Saint Aubin les Elseuf, France)。肝線維症の誘発を、以前に記載されているように(134)、実施した。簡単に述べれば、CCl₄を、吸入により週に2回、投与し、フェノバルビタール(0.3g/l)を飲料水に加えた。対照ラットは、フェノバルビタールのみを受けた。動物を、8週間、12週間、16週間、または20週間のCCl₄処理または対照処理を受ける群へ層別化した(各群について、CCl₄がn=13;対照がn=7)。Hospital Clinic Universitariの調査倫理委員会(Barcelona, Spain)、承認#B-NNP-233/09によって明確に承認された書面におけるインフォームドコンセントの後、研究を実施した。CCl₄群由来の4匹の動物が研究中、死亡した。終了時点で血液を収集し、250rpmでの10分間の遠心分離の前に、室温で20分間、置いておき、凝固させた。試料を、バイオマーカー評価の前に-80で保存した。肝臓切片(厚さ4μm)を、飽和ピクリン酸(Sigma-Aldrich)中の0.1%シリウスレッドF3B(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)において染色した。分析された各動物から、線維症の量を、36個のフィールドについて全肝臓面積に占めるパーセンテージとして表し、平均値を示した(135)。

20

30

【0165】

胆管結紮(BDL)誘発性肝線維症のラットモデル:

胆管結紮により誘発された肝線維症のラットモデルにおいてBGN-344レベルを測定した。その研究の完全な詳細は別の所で記載されている(133、136)。その研究は、合計81匹の月齢6ヶ月の雌スプラーグドローラットを含んだ。胆管を2箇所結紮し、腹部の縫合前に結紮間を切開する標準BDLにより、麻酔されたラットにおいて肝線維症を誘発した。偽手術されたラットにおいて、腹部をBDLなしに縫合した。

40

【0166】

ラットを以下の4つの群に分けた。群1(10匹のBDL、8匹の偽)は1週間後に殺害し、群2(12匹のBDL、8匹の偽)は2週間後に殺害し、群3(13匹のBDL、8匹の偽)は3週間後に殺害し、群4(14匹のBDL、8匹の偽)は4週間後に殺害した。

【0167】

50

図3は、a)競合ELISA設定における標準曲線の例、b)インビトロMMP-9、MMP-12、およびMMP-13分解型ビグリカン(BGN/MMP9、BGN/MMP12、およびBGN/MMP13)について、ならびに未切断ビグリカン(BGN)についてのBGN-344ペプチド測定を示す。

【0168】

図4は、5つの複製物において培養の3日目および17日目に測定された、ウシ移植片のエキスピボ培養物からのBGN-344ペプチド放出を示す。w/o=いかなる刺激も受けていない培養物；MI=液体窒素での処理による代謝的に不活性の培養物；T+O=TNF [20ng/ml]およびオンコスタチン[10ng/ml]での異化サイトカイン刺激；T+O+GM6001=選択性MMP阻害剤GM6001を追加した異化サイトカインTNF [20ng/ml]およびオンコスタチン[10ng/ml]；T+O+E64=選択性システインプロテアーゼ阻害剤E64を追加した異化サイトカインTNF [20ng/ml]およびオンコスタチン[10ng/ml] (***) = $p < 0.001$ 。

10

【0169】

図5は、処理8週間、12週間、16週間、および20週間で決定されたCCl₄処理ラットにおけるシリウスレッド定量化の絶対値を示す。(各群について、CCl₄処理動物：n=13；対照：n=7)。

【0170】

図6は、a)8週間目、12週間目、16週間目、および20週間目に測定された肝線維症の四塩化炭素(CCl₄)誘発性ラットモデルにおける平均循環血清BGN-344レベルを示す(各群について、CCl₄処理動物：n=13；対照：n=7)。b)シリウスレッドにより決定された肝臓における総コラーゲン含有量に従って、四分位数に層別化された全対照ラットおよび全CCl₄ラットにおける血清BGN-344レベル；(ns=有意でない、* = $p < 0.05$ 、** = $p < 0.01$ 、*** = $p < 0.001$)。c)CCl₄処理ラットおよびd)対照における、循環血清BGN-344と、肝線維症の程度を決定する組織学的シリウスレッド定量化との相関。

20

【0171】

図7は、ベースライン、および1週間目、2週間目、3週間目、4週間目での終了時点での、BDLラットおよび偽手術されたラットにおける平均循環血清BGN-344レベルを示す。データは、平均±平均値の標準誤差(SEM)として示されている(* = $p < 0.05$ 、** = $p < 0.01$ 、*** = $p < 0.001$)。

30

【実施例6】

【0172】

<NB91 I型コラーゲンアッセイ(生成されたFAP)：.AGKEGPVGLP(配列番号49)CO1-462アッセイプロトコール>

本発明者らは、製造会社(Innovabioscience、Babraham、Cambridge、UK)の使用説明書に従い、Lightning link HRP標識キットを用いて、選択されたモノクローナル抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)で標識した。96ウェルストレプトアビジンプレートを、アッセイ緩衝液(50mMのTris、1%BSA、0.1%Tween-20、20でpH7.4に調整)中に溶解したビオチン化合成ペプチドAGKEGPVGLP-ビオチンでコーティングし、20で30分間、インキュベートした。20μlのペプチドキャリブレーションまたは試料を、適切なウェルに加え、続いて、100μlのコンジュゲート化モノクローナル抗体3H2-HRPを加え、20で1時間、インキュベートした。最後に、100μlのテトラメチルベンジジン(TMB)(Kem-En-Tecカタログ番号4380H)を加え、プレートを、暗闇中、20で15分間、インキュベートした。全ての上記のインキュベーションステップは300rpmでの振盪を含んだ。各インキュベーションステップ後、プレートを洗浄緩衝液(20mM Tris、50mM NaCl、pH7.2)中で5回、洗浄した。TMB反応を、100μlの停止溶液(1%HCl)を加えることによ

40

50

り停止し、450 nmで測定し、参照として650 nmを用いた。検量線を、4 - パラメトリック数学的フィットモデルを用いてプロットした。

【0173】

ラット胆管結紮肝線維症モデル：

CO1-462を、肝線維症のBDLラットモデルにおいて評価した。コペンハーゲン、DKにおけるデンマーク動物保護局「Dyreforsogstilsynet」が承認し、その研究の書面におけるインフォームドコンセントを与えている；承認#2008/561-1450。その研究は、別の所で詳細に記載されている（Veidalら、2010b）。簡単に述べれば、17匹の月齢6ヶ月の雌スプラインドローラットを以下の4群に層別化した。2週間後または4週間後に屠殺される、BDLラットまたは偽手術されたラット。胆管を2箇所で結紮し、腹部の縫合前に2つの結紮間を切開する標準BDLにより、麻酔されたラットにおいて肝線維症を誘発した。偽手術されたラットにおいて、腹部をBDL手術なしに縫合した。血液試料を、ベースラインおよび終了時点において、少なくともその前の14時間、断食させたラットの後眼窩洞からCO₂/O₂麻酔下で採取した。収集した血液を、室温で30分間、放置して、凝固させ、続いて、1500gで10分間の遠心分離を2回、行った。その後、血清を、きれいなチューブに移し、使用まで-80で保存した。BDLモデルの妥当性は、(137)によって実証された。

10

【0174】

結果は図8に示されている。測定されたシグナルの有意な上昇は、2週間後に見られた。

20

【実施例7】

【0175】

<NB158パーシカンアッセイ：VCAN 3306(.KTFGKMKPRY)>

細胞外マトリックスリモデリングは、アテローム性動脈硬化病変発生において鍵となる特徴であり、かつプラーク破綻の前提条件である。プロテオグリカンのパーシカンは、アテローム性動脈硬化プラーク内に位置し、それは、マクロファージリッチな領域に存在するMMPについての潜在的基質である。本発明者らは、特定のMMP12由来パーシカン分解断片（VCAN-3306）を検出し、アテローム性動脈硬化を診断するためのバイオマーカーとしてのその可能性を評価するためのイムノアッセイを開発している。

30

【0176】

方法および結果：VCAN-3306に対して産生されたマウスモノクローナル抗体を、競合ELISAの開発のために用いた。異なる程度のアテローム性動脈硬化を有する患者由来の臨床血漿試料を、アッセイ確認のために用いた。5人の死亡した成人の冠動脈におけるVCAN-3306を、VCAN-3306-mAbを用いて検出した。最低のプラーク量を有する動脈は、VCAN-3306-mAbに対して高い反応性を示した中間および大きいアテローム性動脈硬化プラークによって冒された動脈と比較して、ほとんど、または全く反応性を示さなかった。I)急性冠動脈症候群を経験する患者(n=30)、II)安定型虚血性心疾患を経験する患者(n=30)、およびIII)高レベルの冠動脈カルシウム沈着を示す患者(n=30)は、検出可能な動脈カルシウム沈着をもたない個体の対照群(n=30)と比較して、VCAN-3306の有意に高い血漿レベルを有した。さらに、高い動脈カルシウム沈着レベルを有する患者において、VCAN-3306の存在と、LDLおよび総コレステロールとの間に強い関連が示された。

40

【0177】

結論：MMP12によって生成されたパーシカンのネオエピトープは、ヒトアテローム性動脈硬化プラーク内に存在する。MMP12仲介性パーシカン分解は、アテローム性動脈硬化疾患を有する患者において有意に上昇し、アテローム性動脈硬化についての可能性のあるバイオマーカーとしてのVCAN-3306を示唆した。

【0178】

VCAN-3306アッセイプロトコール：

選択されたモノクローナル抗体を、製造会社（Innova Bioscience、

50

Babraham, Cambridge, UK) の使用説明書に従い、Lightning-Link Horseradish Peroxidase (HRP) 抗体標識キットを用いて、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) で標識した。Roche Diagnostics (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) から購入した 96 ウェルの、ストレプトアビジンで事前にコーティングされたプレートを、アッセイ緩衝液 50 mM の PBS - BTB 中に溶解した 2.5 ng のビオチン化合物ペプチド KTFGKMKPRY - K - ビオチン (配列番号 306) によってコーティングし、20 で 30 分間、インキュベートした。20 μ L のペプチドキャリアプレートまたは試料を、適切なウェルに加え、続いて、100 μ L の 20 ng/ml コンジュゲート化モノクローナル抗体を加え、20 で 1 時間、インキュベートした。最後に、100 μ L のテトラメチルベンジジン (TMB) (Kem-En-Tec カタログ番号 4380H, Taastrup, Denmark) 展開液を加え、プレートを、暗闇中、20 で 15 分間、インキュベートした。全ての上記のインキュベーションステップは 300 rpm での振盪を含んだ。各インキュベーションステップ後、プレートを洗浄緩衝液 (20 mM の Tris, 50 mM の NaCl, pH 7.2) 中で 5 回、洗浄した。TMB 反応を、100 μ L の停止溶液 (1% HCl) を加えることにより停止し、450 nm で測定し、参照として 650 nm を用いた。標準検量線を、標準ペプチドについての開始濃度が 10 ng で、続いて、2 倍希釈する、4 - パラメトリック数学的フィットモデルを用いてプロットし、最後の標準はゼロ標準であった。

10

【0179】

20

免疫組織化学法についての試料および手順：

検体：以前に記載されているように (138)、North Carolina Baptist Hospital, Winston-Salem, USA で 18 ヶ月間の間に死亡した 25 歳より上の患者から冠動脈を入手した。

【0180】

組織病理学的手順：解剖により得られた 5 つの心臓を、生理食塩水で洗い流し、4% 中性緩衝ホルムアルデヒド溶液で、100 mmHg の圧力で 1 時間、灌流固定した。組織学的切片作製 (各 3 mm 長) のための隣接組織ブロックを、左前下行枝 (LAD)、左回旋枝、および右冠動脈の長軸 (近位 3 cm) に対して垂直に切断した。2 個の 5 μ m の組織学的切片を各ブロックから作製した。1 個をヘマトキシリン - エオシンで、1 個を Verhoeff-van Gieson 染色で染色した。

30

【0181】

それぞれが異なる程度のアテローム性動脈硬化を有する 5 人の個体由来のヒト左前下行枝の VCAN - 3306 染色のために、標準 Nordic Bioscience プロトコルを用いた。簡単に述べれば、パラフィン包埋動脈を、5 μ m 切片へ切断し、脱パラフィンし、ペルオキシダーゼをブロックし、再水和した。切片を、800 W のマイクロ波における 2 x 5 分間の前処理に供した。この後、切片を TBC + 1% Triton X - 100 中で洗浄し、TBS 中 0.5% カゼインにおいてブロッキングし、TBS 緩衝液中に希釈した VCAN - 3306 に対する 2.25 μ g/ml mAb と、4 で一晩、インキュベートした。その後、切片を TBS + 1% Triton X - 100 中で洗浄し、Super Sensitive 中で 30 分間、インキュベートし、再び洗浄し、DAB 基質で処理した (6 ~ 10 分間)。切片を、マイヤーのヘマトキシリン中に 12 秒間、浸漬し、マウントし、放置して乾燥させた。

40

【0182】

患者および試料収集：

異なる程度のアテローム動脈硬化性心疾患を有する、それぞれ 30 人の個体の 4 つの群を 3 つの大きな研究 (DANRISK、DEFAMI、および Odense Artery Biobank) から選択した。これらの研究における参加者は、同時に Odense University Hospital, Odense, Denmark によって登録された。4 つの群は以下からなった。1) 検出可能な冠動脈カルシウムをもたない 3

50

0人の無症状の個体(CT - noCa)、2)冠動脈カルシウムの存在によって定義される無症候性CVDを有する30人の無症状の対象(CT - plusCa)、3)冠動脈バイパス手術をされるべき、安定虚血性心疾患(IHD)を有する30人の患者、ならびに4)急性冠動脈症候群(ACS)および過去24時間以内の発症を有する30人の患者(表1)。全ての試料は、Odense University Hospital(Odense, Denmark)におけるDepartment of Clinical Biochemistry and Pharmacologyによって取り扱われ、かつ試験された。

【0183】

50歳~60歳の1825人の男性および女性のランダムな試料である、DANRISKコホートから、群1および群2の患者を採用し、2009年に冠動脈疾患についてのスクリーニングに招いた。スクリーニングは、心臓CTスキャン、続いてAgatstonスコアを用いる冠動脈カルシウム量の見積もりを含んだ。招かれた個体から、1257人をスクリーニングに検討したが、すでに虚血性心疾患または糖尿病を有する者(n=100)を除外した後、1157人の患者を分析に登録した。60歳のこれらの個体(n=647)の中で、検出可能な冠動脈カルシウムをもたない30人の患者(CT - noCa)の群1、およびAgatstonスコア400を有する(CT - plusCa)30人の群2を選択した。これらの2つの群の選択にはまた、総コレステロールおよび血圧についてのマッチングも関係させた。心臓スコアは、臨床医が、個体の心血管系リスクの低下を最適化するのを援助することを目的とする。このリスク推定は、リスク因子(性別、年齢、喫煙、収縮期血圧、および総コレステロール)に基づき、最終的に10年後に起こるだろう致死的なCVDイベントの数を予測する。致死的心血管イベントに基づいた高リスクについての閾値は、「5%より高い」と定義される(139)。

【0184】

安定IHDを有する患者の群である、群3は、冠動脈バイパス手術を受けた患者から予備の動脈組織および血液試料を集めるOdense Artery Biobankに由来した。血液試料は、バイパス術の前日に採取された。本発明者らは、約60歳の平均年齢および上記の集団に類似した性別分布をもつ30人の患者を選択した。ACSを有する患者の群である、群4は、DEFAMIコホートから採用し、そのコホートにおける全ての患者は、2009年10月1日から2010年4月30日の間にOdense University Hospitalに入院し、ACSの疑いでトロポニン分析を受けており、登録された。これらの患者において、連続的血液試料採取は、発症の最初の24時間以内に実施された。DEFAMIコホートにおける822人の患者のうち、非ST上昇型心筋梗塞(NSTEMI、n=24)または不安定狭心症(n=6)を有する30人の患者が選択され、本研究に参加した。彼らの年齢は約60歳であり、彼らの性別分布は、2つのDANRISK部分群(群1および群2)にマッチした。NSTEMIは、典型的な臨床症状の存在に関連して、 $0.03 \mu\text{g/l}$ より上のTnIレベルの典型的な上昇および/または降下を示されたかどうかについて規定された。不安定狭心症は、ST部分抑制またはT波ゆらぎと共に、安静時または最小身体活動中に典型的な胸痛の存在があるが、正常なTnIレベル($0.03 \mu\text{g/l}$ 未満)を有するとして定義された。不安定狭心症を有する全ての患者はまた、少なくとも1つの有意な冠動脈狭窄(>50%直径狭窄)を示す必要があった。したがって、この研究において、ACS患者は、NSTEMIおよび不安定狭心症を有する患者を含んだ。ST部分上昇型心筋梗塞(STEMI)を有する患者は含まれず、これらの患者において、ヘパリンでの薬物療法および緊急PCIが行われる前に十分な連続的血液試料を得ることは可能ではないだろうからである。両方の介入は、生化学的アッセイにおいて干渉する可能性がある。30人のACS患者(群4)における平均TnIレベルは $0.62 \mu\text{g/l}$ ($0.01 \sim 5.23 \mu\text{g/l}$ の範囲)であった。

【0185】

群1~4の全患者(n=120)において、高血圧は、その患者が降圧性医学的処置を

用いたかどうかは考慮され、糖尿病は、抗糖尿病薬物療法が処方されたかどうかについて規定された。収縮期および拡張期血圧を、血液試料採取と同じ日に測定した。Agatstonスコアを、群1および群2の患者において計算した。ACS群におけるTnIを、本血液試料採取の前の、入院時すぐに、測定した。総コレステロール、LDL、HDL、およびトリグリセリドもまた、本研究のための血液試料採取の前に測定した。血液試料を、EDTAを含むチューブ中に回収し、200gで10分間、遠心分離した。血漿を、生化学的分析まで、-80で保存した。

【0186】

DANRISK、DEFAMI、およびOdense Artery Biobank研究のための研究プロトコールは、研究の開始前に倫理委員会によって承認された。インフォームドコンセントは、全ての参加した患者から得られた。

表50. []内に平均値および標準偏差を示す、研究に含まれる各群の個体群統計学。CT-noCa：検出可能な冠動脈カルシウムなしの無症状の個体；CT-plusCa：高い冠動脈カルシウムを有する無症状のCVD；ACS（急性冠動脈症候群）；IHD：安定虚血性心疾患を有する患者。平均値[+/-STD]；#幾何平均値[+/-STD]、および一元配置分散分析(ANOVA)からのp値。対照群「CT-noCa」に対する各群の比較からのp値の有意性のレベルは、ダネットの方法による多重比較として調整された(*：p<0.05；**：p<0.01；***：p<0.001)。

【表50】

	CT-noCa n=30	CT-plus Ca n=30	ACS n=30	IHD n=30	ANOVA p値
年齢(年)	60.2 [59.8; 60.7]	60.3 [60.0-60.6]	64.5** [56.0; 73.0]	59.7 [56.8; 62.6]	0.0001
トリグリセリド# (mmol/L)	1.57 [0.85; 2.93]	1.49 [1.00; 2.21]	1.30 [0.78; 2.19]	1.48 [0.92; 2.30]	0.52
HDL コレステロ ール# (mmol/L)	1.28 [0.93; 1.75]	1.36 [0.98; 1.89]	1.13 [0.83; 1.52]	1.30 [0.90;1.87]	0.14
LDL コレステロ ール (mmol/L)	3.14 [2.13; 4.16]	3.26 [2.29; 4.22]	2.93 [1.74; 4.11]	2.41* [1.27; 3.55]	0.02
総コレステロー ール (mmol/L)	5.25 [4.06; 6.43]	5.47 [4.29; 6.64]	4.74 [3.44; 6.04]	4.45* [3.20; 5.71]	0.007
収縮期血圧 (mmHg)	145 [131; 159]	147 [128; 167]	159* [132; 187]	145 [123; 168]	0.04
拡張期血圧 (mmHg)	86 [76; 95]	85 [75; 96]	88 [72; 103]	83 [74; 92]	0.56
Agatston スコ ア#	0	1299 [717; 2352]	-	-	-
心臓スコア#	6.33 [2.23; 8.92]	8.30 [3.10;12.42]	-	-	0.3

表51. 検出可能な冠動脈カルシウムなしの対照群(CT-noCa)と比較した、高い冠動脈カルシウム群(CT-plusCa)、急性冠動脈症候群の群(ACS)、および虚血性心疾患群(IHD)におけるROC曲線の結果。AUCは、標準誤差およびp値と共に示されている。

【表 5 1】

ROC 曲線;AUC [標準誤差] p 値			
パラメータ	CT-plus Ca 対 CT-no Ca	ACS 対 CT-no Ca	IHD 対 CT-no Ca
VCAN-3306	0.748 [0.068] 0.0003	0.775 [0.062] <0.0001	0.669 [0.077] 0.03

表 5 2 . V C A N - 3 3 0 6 のスピアマン相関係数および標準測定パラメータが、r 値および p 値で提示されている。

【表 5 2】

スピアマン相関係数	全群 r 値 p 値	CT-plus Ca	ACS	IHD
年齢	0.1675 0.4038	-0.0147 0.9386	- 0.1387 0.4647	0.0769 0.7027
トリグリセリド	-0.1011 0.6160	0.3281 0.0767	0.1409 0.4577	-0.0806 0.6895
LDL	-0.2291 0.2503	0.4665 0.0094**	0.3186 0.0862	-0.1394 0.4880
HDL	-0.0501 0.8041	0.1945 0.3030	0.0309 0.8714	0.2688 0.1752
総コレステロール	-0.2062 0.3022	0.5993 0.0005***	0.3187 0.0860	0.0504 0.8028
BP-収縮期	0.2745 0.1659	0.0982 0.6057	0.1953 0.3011	-0.0527 0.8304
BP-拡張期	0.0266 0.8952	0.2060 0.2747	0.0720 0.7053	0.0330 0.8933

【0187】

図 9 は、抗体のエピトープに対する特異性の試験の結果を示す。競合 E L I S A 設定において加えられて、試験された試料は以下であった。伸長させたペプチド (2 0 n g / m l)、非切断型パーシカン (V C A N)、M M P - 8 切断型パーシカン (V C A N + M M P 8)、M M P - 1 2 切断型パーシカン (V C A N + M M P 1 2)、およびカテプシン K 切断型パーシカン (V C A N + C a t K)。

【0188】

図 1 0 は、急性冠動脈症候群 (A C S)、冠動脈カルシウムの高沈着 (C T - p l u s C a)、安定虚血性心疾患 (I H D) と診断された患者において測定され、かつ検出可能な冠動脈カルシウム沈着がない個体を含む年齢をマッチさせた対照 (C T - n o C a) と比較した、V C A N - 3 3 0 6 の血漿レベルを示す。* = p < 0 . 0 5 ; * * * = p < 0 . 0 0 0 5 ; 個々の値、および線と誤差バーとしての群平均と S E M が示されている。

【0189】

図 1 1 は、高い冠動脈カルシウム沈着 (C T - p l u s C a) を有する無症状の患者の群における a) L D L と組み合わされた V C A N - 3 3 0 6、および b) コレステロールと組み合わされた V C A N - 3 3 0 6 についての R O C 曲線を示す。

【実施例 8】

【0190】

< N B 1 8 5 V 型アッセイ : C 5 M . H M G R E G R E G E (配列番号 9 3) >

脊椎の慢性炎症強直性脊椎炎 (A S) は、椎骨の完全なセメンテーション (関節に見出されるいくつかのコラーゲンのターンオーバーを含む過程) がもたらされ得る。診断的評

10

20

30

40

50

価および患者特徴づけは、結合組織ターンオーバーのマーカの測定によって向上する可能性がある。コラーゲンのタンパク質分解は、細胞外マトリックスリモデリングにおいて、およびそれにより、ASの発病において重要な役割を果たす。この分解は、ネオエピトープと呼ばれる小さいペプチド断片を生じ、それは、線維性事象の新しいクラスのバイオマーカーであることが証明される可能性がある。この研究の目的は、MMP-2およびMMP-9によって生成されたV型コラーゲンの断片を検出する能力がある競合ELISAを開発すること、ならびにASについてのバイオマーカーとしてのこのアッセイの使用を評価することであった。

【0191】

材料および方法：MMP-2およびMMP-9によって分解されたV型コラーゲンの質量分光分析により、多数のプロテアーゼ生成ネオエピトープが明らかにされた。これらのデータから、V型コラーゲンに特有で、かつMMP-2およびMMP-9によって生成された断片を、ELISA開発のための標的として選択した。このネオエピトープに対してモノクローナル抗体が産生され、それは、V型コラーゲン断片をアミノ酸位置1317において検出した(CO5-MMP)。そのアッセイを用いて、40人のAS患者および40人の年齢をマッチさせた対照の血清においてCO5-MMPネオエピトープの含有量を評価した。

【0192】

結果：ELISAは、もっぱらMMP-2およびMMP-9分解のCO5-MMPネオエピトープ断片だけを検出することが実証され、アッセイ間およびアッセイ内変動は、それぞれ、9.13%および4.38%であった。CO5-MMPのレベルは、AS患者において有意により高く、229%の増加($P < 0.0001$)があった。AUCは83%であった。

【0193】

結論：この新規なELISAは、V型コラーゲンネオエピトープを評価するために開発された最初のアッセイである。V型コラーゲンの高いターンオーバーは、病態生理学的役割を示唆する。CO5-MMPは、進行中の線維形成の候補マーカーである。

【0194】

[方法]

健康な対象およびAS患者

生化学的マーカーを、強直性脊椎炎(AS、改訂ニューヨーク基準による)と診断された患者由来の血清中において評価し、Department of Medicine 3 of the University of Erlangen-Nurembergからの性別および年齢をマッチさせた非疾患性血清試料と比較した。非疾患群は、平均年齢が43.0歳、18~66歳の範囲である、21人の健康な女性および19人の健康な男性からなった。AS群は、平均年齢が42.5歳、29~63歳の範囲である、19人の女性および21人の男性からなった(表53)。

【0195】

CO5-MMPのELISAの手順

予備実験において、本発明者らは、いくつかのチェッカーボード分析を実施することにより、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。CO5-MMP ELISAを以下のように開発した。96ウェルのストレプトアビジンプレートを、アッセイ緩衝液(25mMのTris、1%BSA、0.1%Tween-20、pH7.4)中に溶解した5ng/mLのビオチン化合物ペプチドHMGGREGREGGE-K-ビオチン(配列番号307)でコーティングし、300rpmで絶えず振盪することにより20で30分間、インキュベートした。アッセイ緩衝液中に溶解した20μLのペプチドキャリアプレートまたは試料を、適切なウェルに加え、続いて、100μLのコンジュゲート化モノクローナル抗体(125ng/mL)を加え、300rpmで絶えず振盪することにより4で1時間、インキュベートした。最後に、100μLのテトラメチルベンジジン(TMB)(Kem-En-Tecカタログ番号4380H)を加え、プレート

10

20

30

40

50

を、暗闇および300rpmでの振盪において20 で15分間、インキュベートした。各インキュベーションステップ後、プレートを洗浄緩衝液(20mM Tris、50mM NaCl、pH7.2)中で5回、洗浄した。TMB反応を、100μlの停止溶液(1% HCL)を加えることにより停止し、450nmで分光光度的に測定し、参照として650nmを用いた。標準曲線を、CO5-MMPペプチド(HMGREGREG)の段階希釈により実施し、4-パラメトリック数学的フィットモデルを用いてプロットした。標準濃度は、0ng/mL、15.625ng/mL、31.25ng/mL、62.5ng/mL、125ng/mL、250ng/mL、500ng/mL、1000ng/mLだった。

【表53】

10

表53. 研究に関する記載

	対照	AS
N(女性/男性)	40 (21/19)	40 (19/21)
年齢(範囲)	43.0年 (18-66)	42.5年 (29-63)
CRP [95% CI]	3016 ng/ml [1595, 4438]	4061 ng/ml [2426, 5696]
BASDAI		3.79 [0.01, 0.45]
mSASSS		5.08 [0.04, 1.14]

20

【0196】

図12は、以下のシグナルのパーセント阻害を示すCO5-MMPのELISAの特徴づけにおいて得られた結果を示す。A)遊離ペプチド(HMGREGREG)、未切断V型コラーゲン、MMP-9切断型V型コラーゲン、MMP-2切断型V型コラーゲン；B)遊離ペプチド(HMGREGREG)、MMP-13切断型V型コラーゲン、MMP-9切断型I型コラーゲン、伸長させたペプチド(GHMGREGREG)。

【0197】

図13は、非疾患対象(ND、n=40)および強直性脊椎炎患者(AS、n=40)におけるCO5-MMPの測定の結果を示す。バーは、平均レベル±平均値の標準誤差(SEM)を示す。群を、マンホイットニーによって比較した。

30

【実施例9】

【0198】

<エラスチンELN-552(ELM-2)GVAPGIGPGG。(配列番号308)>

【材料および方法】

表54. エラスチンネオエピトーププログラムの記載。下向きの矢印は切断部位を示し、伸長させたペプチドにおいて伸長しているアミノ酸には下線が引かれている。

【表54】

40

プログラム番号	標的配列(ヒト)	標的に関する記載	相同性	ID	選択ペプチドおよび除外ペプチド
NB244	GIGPGG↓ Aa 547-552 ELN-552 アッセイ	分解マーカーとしてのMMP9/12により切断されたエラスチン	ヒト	インビトロおよびインビボでの切断	gvapGIGPGG gvapGIGPGGVA 配列番号309

【0199】

[ELISA手順ELN-552(ELM2)]

50

アッセイ緩衝液およびプレートを室温に平衡させた。アッセイ緩衝液（50 mMのPBS、1% BSA、0.1% Tween-20、pH 7.40）中に2.5 ng/mLに希釈した100 μ Lのビオチン化ペプチド（ビオチン-CGG-GVAPGIGPGG 配列番号287）を用いて、96ウェルのストレプトアビジンコーティングされたプレートをコーティングした。プレートを、300 rpmで振盪させながら、20 で30分間、インキュベートし、洗浄緩衝液（20 mMのTris、50 mMのNaCl、pH 7.2）中で5回、洗浄した。各血清試料を、アッセイ緩衝液中に2倍に希釈し、20 μ Lの血清希釈溶液またはペプチドキャリアプレート（250 ng/mLから開始）を各ウェルに加えた。65 ng/mLの濃度の100 μ LのHRP標識NB244-2B4抗体を各ウェルに加え、プレートを、300 rpmで振盪させながら、20 で1時間、インキュベートさせておいた。プレートを洗浄緩衝液中で5回、洗浄し、100 μ LのTMBを加え、プレートを暗闇中、20 で15分間、インキュベートした。100 μ Lの停止溶液（1% H_2SO_4 ）を加え、プレートを、ELISAリーダーにおいて450 nmで読み取り、参照として650 nmを用いた。検量線を、4パラメータ数学的フィットモデルを用いてフィットさせた。

10

【0200】

[ELN-552アッセイの臨床的検証]

ELN-552アッセイを、アテローム性動脈硬化コホートである、BioCoreコホートにおいて試験した。コホートを、アッセイにおいて希釈せずに行なった。BioCoreコホートにおける患者は、臨床症状に基づいて以下の4つの群に分けられる。確認された急性心筋梗塞を有する患者であるAMI群、AMIが疑われるが、トロポニン-Tレベルに基づいた診断がない患者である非AMI群、agatstonスコアに基づいた高い冠動脈カルシウムを示すが、臨床症状がない患者である、高冠動脈カルシウム群、および陰性対照群である冠動脈カルシウムなしの群。冠動脈カルシウムなしの群における患者は、彼らのCPR数に基づいてランダムに選択され、アテローム性動脈硬化の臨床症状またはバイオマーカー徴候をもたない。全ては、コホートの残りの部分と性別および年齢がマッチされている。各群において30人の患者があり、120人の患者の研究となっている。BioCoreデータの一部の個体群統計学的表は表55に見られる。

20

表55. BioCoreコホートに関する個体群統計学的データ

値は、平均 \pm 標準偏差である。高Cor Ca：高い冠動脈カルシウム群、Cor Caなし：冠動脈カルシウムなしの群。BP：血圧、* 心臓スコアは、年齢、収縮期血圧、mmol/Lでの総コレステロール、および喫煙状態に基づいた心血管疾患のリスクの評価である。* * 1人の患者のみからのAgatstonスコア。

30

【表 5 5】

群	年齢(年)	収縮期血圧 (mmHg)	拡張期血圧 (mmHg)	総コレステロール (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)	Agatston スコア	心臓スコア*
AMI (n=30)	64.5±9	159±28	88±16	4.7±1.3	1.2±0.3	2.9±1.2	.---	9.7±5.4
非AMI (n=30)	60.2±8	143±26	81±14	4.9±0.9	1.5±0.7	2.7±0.7	498**	8.7±5.7
高 Cor Ca (n=30)	60.3±0.3	147±20	86±11	5.5±1.2	1.4±0.5	3.3±1	1509±1070	8.3±6.2
Cor Caなし (n=30)	60.3±0.4	145±14	86±10	5.2±1.2	1.3±0.4	3.1±1	0.00	6.3±4.5

統計学

E L N - 5 5 2 アッセイにおいて2つのコホートを検定する際、データを、ダゴスティーノ・ピアソンのオムニバス検定を用いてガウス分布についてチェックし、ヒストグラムを作成することにより分布を視覚的にチェックした。その後、異なる群を、ノンパラメトリック t 検定を用いて差について検定した。

【0202】

結果

E L N - 5 5 2 は、急性心筋梗塞を有する患者において上昇している

E L N - 5 5 2 を、B i o C o r e アテローム性動脈硬化コホートにおいて試験した。E L N - 5 5 2 のレベルは、非 A M I と比較して、A M I を有する患者由来の血清において有意に高かった ($p < 0.01$) (エラー! 参照源が見つからない。14)。患者は、臨床症状および画像化マーカーに基づいて群に分けられている。A M I 群および非 A M I 群を網羅するバーは、ノンパラメトリック t 検定によって計算されたこれらの群の間での有意差を示す。* * は 0.01 未満の p 値を示す。比較について、y 軸は、(エラー! 参照源が見つからない) におけるものと同じ値を有する。ノンパラメトリック t 検定を用いて、群間の最も高い差は A M I 群と非 A M I 群の間で見出されることが明らかである。A M I 群と冠動脈カルシウムなしの群の間において、 $p = 0.07$ のほぼ有意な差があり、非 A M I 群と高冠動脈カルシウム群の間では、0.08 の p 値があり、より大きい患者の群、およびそれにより高い検出力が、これらの差を確認し得、かつ、さらにアッセイを特徴づけ得ることを示唆した。

10

20

【0203】

本明細書において、明確に他に指示がない限り、単語「または (o r) 」は、提示された条件のうちの一つのみが満たされることを必要とする機能語「排他的 o r 」とは対照的に、その条件のうち的一方または両方が満たされる場合、真の値を戻す機能語の意味で用いられる。単語「含むこと (c o m p r i s i n g) 」は、「からなること (c o n s i s t i n g o f) 」を意味するよりむしろ、「含むこと (i n c l u d i n g) 」の意味で用いられる。上記で認知された全ての先行の教示は、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の公表された文書の認知も、その教示が、オーストラリアまたは他の場所においてその公表日時点で、共通の一般知識であったことの承認または表示であると解釈されるべきではない。

30

【0204】

[文献リスト]

【表 5 6 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. 10
3. Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004;1:98-105.
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. 20
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.
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. 30
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, McAnulty 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. 40
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.

【表 5 6 B】

12. Phan SH, Thrall RS. Pulmonary Fibrosis. Lung Biology in Health and Disease. 80 ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995.
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. 10
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.
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. 20
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. 30
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. 40
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.

【表 5 6 C】

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. 10
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. 20
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. 30
29. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340:448-454.
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. 40
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.

【表 5 6 D】

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. 10
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. 20
37. Hummers LK. Microvascular damage in systemic sclerosis: detection and monitoring with biomarkers. *Curr Rheumatol Rep* 2006;8:131-137.
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. 30
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. 40
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.

【表 5 6 E】

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. 10
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.
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. 20
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.
47. Camacho VR, Silveira TR, Oliveira JR, Barros SG, Cerski CT. Relationship between serum concentrations of type III procollagen, hyaluronic acid and histopathological findings in the liver of HCV-positive blood donors. *Arq Gastroenterol* 2007;44:118-122. 30
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.
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. 40

【表 5 6 F】

50. Camacho VR, Silveira TR, Oliveira JR, Barros SG, Cerski CT. Relationship between serum concentrations of type III procollagen, hyaluronic 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 PIIINP 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. 20
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, Kaczmariski 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. 30
55. Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska ME, Kaczmariski 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. 40
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.

【表 5 6 G】

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.
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. 10
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 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. 20
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.
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. 30
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 Gastrointestin Liver Dis* 2007;16:31-37.
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. 40

【表 5 6 H】

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. 10
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. Ratziu V, Massard J, Charlotte F, Messous D, Imbert-Bismut F, Bonyhay L, Tahiri M, Munteanu M, Thabut D, Cadranel 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. 20
68. Poynard T, Imbert-Bismut F, Ratziu 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. 30
69. Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le CS, Messous D, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratziu 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, Ratziu V, Imbert-Bismut F, Naveau S, Thabut D, Lebrec 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. 40

【表 5 6 I】

71. Ngo Y, Munteanu M, Messous D, Charlotte F, Imbert-Bismut F, Thabut D, Lebray P, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratziu 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, Ratziu 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. 10
73. Myers RP, Tainturier MH, Ratziu 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. 20
74. Jacqueminet S, Lebray P, Morra R, Munteanu M, Devers L, Messous D, Bernard M, Hartemann-Heurtier A, Imbert-Bismut F, Ratziu 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.
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. 30
76. Poynard T, Zoulim F, Ratziu 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

【表 5 6 J】

77. Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le CS, Messous D, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratziu V. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2004;50:1344-1355.
78. Myers RP, Tainturier MH, Ratziu 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. 10
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. 20
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. 30
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.
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. 40
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.

【表 5 6 K】

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. 10
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.
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. 20
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. 30
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. 40
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.

【表 5 6 L】

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. 10
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. 20
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. 30
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. 40

【表 5 6 M】

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. 10
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. 20
103. Ulrich D, Noah EM, von HD, Pallua N. TIMP-1, MMP-2, MMP-9, and PIIINP 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. 30
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. 40

【表 5 6 N】

107. 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.
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. 10
109. Lijnen, H.R. 2001. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb. Haemost.* 86:324-333.
110. Tam LS, Gu J, Yu D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Nat Rev Rheumatol* 2010 Jul;6(7):399-405.
111. Braun J, Pincus T. Mortality, course of disease and prognosis of patients with ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 2002 Nov;20(6 Suppl 28):S16-S22. 20
112. Kumar VAAKFN. Tissue renewal and repair: regeneration, healing, and fibrosis. Pathologic basis of disease. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Elsevier Saunders, 2005. 87-118.
113. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001 Aug;21(3):351-372. 30
114. Lochter A, Bissell MJ. An odyssey from breast to bone: multi-step control of mammary metastases and osteolysis by matrix metalloproteinases. *APMIS* 1999 Jan;107(1):128-136.
115. Karsdal MA, Madsen SH, Christiansen C, Henriksen K, Fosang AJ, Sondergaard BC. Cartilage degradation is fully reversible in the presence of aggrecanase but not matrix metalloproteinase activity. *Arthritis Res Ther* 2008;10(3):R63. 40
116. Karsdal MA, Henriksen K, Leeming DJ, Mitchell P, Duffin K, Barascuk N, et al. Biochemical markers and the FDA Critical Path: how biomarkers may contribute to the understanding of pathophysiology and provide unique and necessary tools for drug development. *Biomarkers* 2009 May;14(3):181-202.

【表 5 6 O】

117. Bay-Jensen AC, Hoegh-Madsen S, Dam E, Henriksen K, Sondergaard BC, Pastoureaux P, et al. Which elements are involved in reversible and irreversible cartilage degradation in osteoarthritis? *Rheumatol Int* 2010 Feb;30(4):435-442.
118. Zhen EY, Brittain IJ, Laska DA, Mitchell PG, Sumer EU, Karsdal MA, et al. Characterization of metalloprotease cleavage products of human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2008 Aug;58(8):2420-2431. 10
119. Boeker KH, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Manns MP, Lichtinghagen R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2002 Feb;316(1-2):71-81.
120. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* 2007 May;46(5):955-975. 20
121. Kirimlioglu H, Kirimlioglu V, Yilmaz S. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in donor liver, cirrhotic liver, and acute rejection after human liver transplantation. *Transplant Proc* 2008 Dec;40(10):3574-3577.
122. Schaller S, Henriksen K, Hoegh-Andersen P, Sondergaard BC, Sumer EU, Tanko LB, et al. In vitro, ex vivo, and in vivo methodological approaches for studying therapeutic targets of osteoporosis and degenerative joint diseases: how biomarkers can assist? *Assay Drug Dev Technol* 2005 Oct;3(5):553-580. 30
123. Wenstrup RJ, Florer JB, Brunskill EW, Bell SM, Chervoneva I, Birk DE. Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *J Biol Chem* 2004 Dec 17;279(51):53331-53337.
124. Symoens S, Renard M, Bonod-Bidaud C, Syx D, Vaganay E, Malfait F, et al. Identification of binding partners interacting with the alpha1-N-propeptide of type V collagen. *Biochem J* 2010 Dec 22;433(2):371-381. 40

【表 5 6 P】

125. Berendsen AD, Bronckers AL, Smit TH, Walboomers XF, Everts V. Collagen type V enhances matrix contraction by human periodontal ligament fibroblasts seeded in three-dimensional collagen gels. *Matrix Biol* 2006 Oct;25(8):515-522.
126. Murasawa Y, Hayashi T, Wang PC. The role of type V collagen fibril as an ECM that induces the motility of glomerular endothelial cells. *Exp Cell Res* 2008 Dec 10;314(20):3638-3653. 10
127. Vassiliadis E, Veidal SS, Simonsen H, Larsen DV, Vainer B, Chen X, et al. Immunological detection of the type V collagen propeptide fragment, PVCP-1230, in connective tissue remodeling associated with liver fibrosis. *Biomarkers* 2011 May 25.
128. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Linsenmayer TF. Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J Cell Biol* 1988 Mar;106(3):999-1008. 20
129. Wenstrup RJ, Florer JB, Willing MC, Giunta C, Steinmann B, Young F, et al. COL5A1 haploinsufficiency is a common molecular mechanism underlying the classical form of EDS. *Am J Hum Genet* 2000 Jun;66(6):1766-1776.
130. Schwarze U, Atkinson M, Hoffman GG, Greenspan DS, Byers PH. Null alleles of the COL5A1 gene of type V collagen are a cause of the classical forms of Ehlers-Danlos syndrome (types I and II). *Am J Hum Genet* 2000 Jun;66(6):1757-1765. 30
131. Michalickova K, Susic M, Willing MC, Wenstrup RJ, Cole WG. Mutations of the alpha2(V) chain of type V collagen impair matrix assembly and produce ehlers-danlos syndrome type I. *Hum Mol Genet* 1998 Feb;7(2):249-255.
132. Gefter ML, Margulies DH, Scharff MD. A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Somatic Cell Genet* 1977 Mar;3(2):231-236. 40

【表 5 6 Q】

133. Segovia-Silvestre T, Reichenbach V, Fernandez-Varo G, Vassiliadis E, Barascuk N, Morales-Ruiz M, Karsdal MA, Jimenez W. Circulating CO3-610, a degradation product of collagen III, closely reflects liver collagen and portal pressure in rats with fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2011; 4: 19
134. Clarià J, Jimenez W. Renal dysfunction and ascites in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats. 1999; 379-96 10
135. Munoz-Luque J, Ros J, Fernandez-Varo G, Tugues S, Morales-Ruiz M, Alvarez CE, Friedman SL, Arroyo V, Jimenez W. Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324: 475-83
136. Veidal SS, Karsdal MA, Nawrocki A, Larsen MR, Dai Y, Zheng Q, Hagglund P, Vainer B, Skjot-Arkil H, Leeming DJ. Assessment of proteolytic degradation of the basement membrane: a fragment of type IV collagen as a biochemical marker for liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2011; 4: 22 20
137. Veidal SS, Vassiliadis E, Barascuk N, Zhang C, Segovia-Silvestre T, Klickstein L, Larsen MR, Qvist P, Christiansen C, Vainer B, Karsdal MA. Matrix metalloproteinase-9-mediated type III collagen degradation as a novel serological biochemical marker for liver fibrogenesis. *Liver Int* 2010; 30: 1293-304 30
138. Clarkson TB, Prichard RW, Morgan TM, Petrick GS, Klein KP. Remodeling of coronary arteries in human and nonhuman primates. *JAMA* 1994; 271: 289-94
139. Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De BG, De BD, Ducimetiere P, Jousilahti P, Keil U, Njolstad I, Oganov RG, Thomsen T, Tunstall-Pedoe H, Tverdal A, Wedel H, Whincup P, Wilhelmsen L, Graham IM. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 2003; 24: 987-1003 40

【 図 1 】

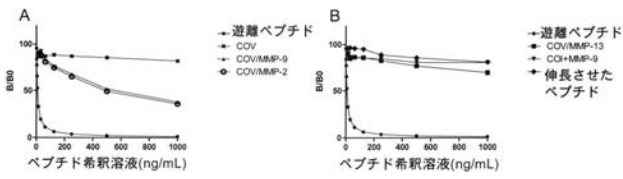


図1

【 図 2 】

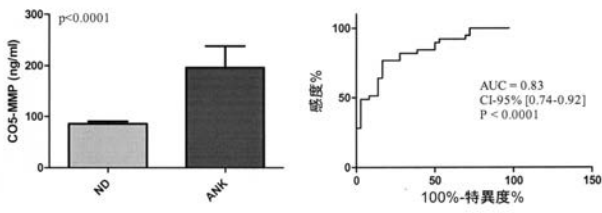


図2

【 図 3 】

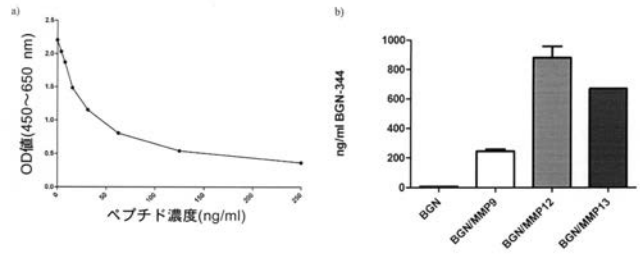


図3

【 図 4 】

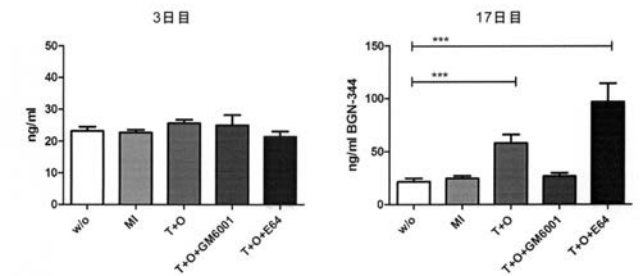


図4

【 図 5 】

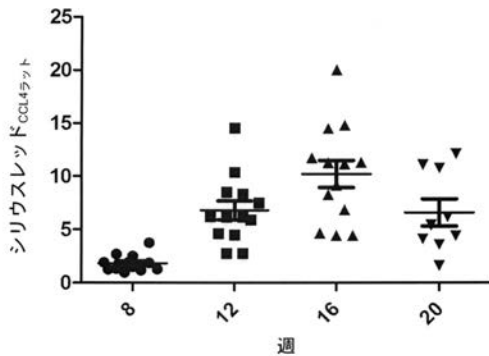


図5

【 図 6 】

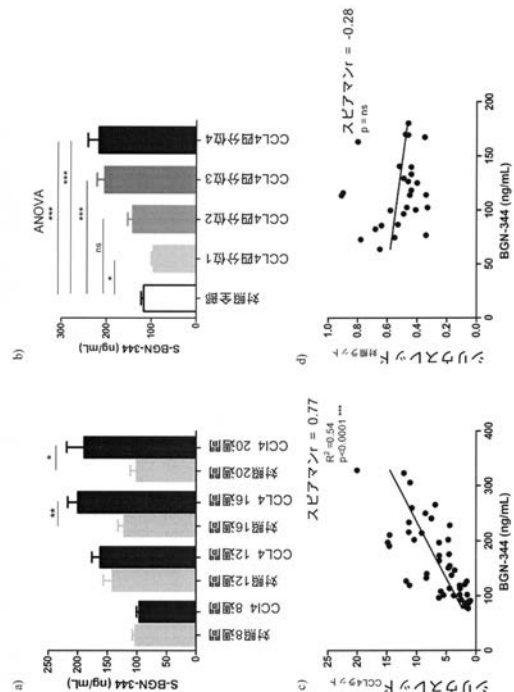


図6

【 図 7 】

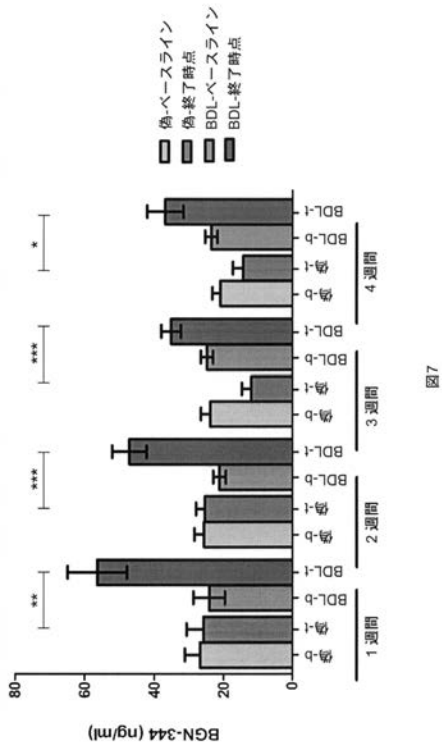


図7

【 図 8 】

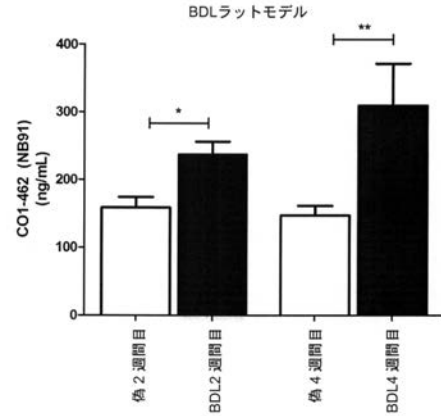


図8

【 図 9 】

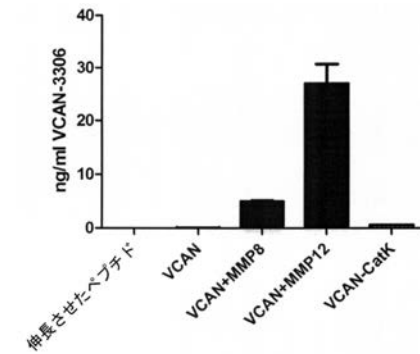


図9

【 図 1 0 】

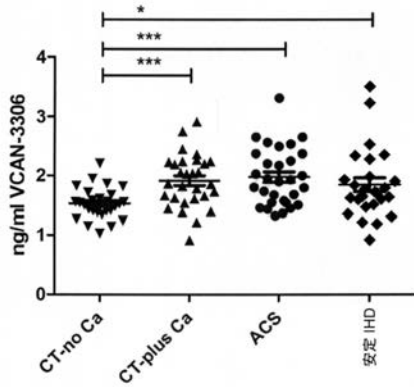


図10

【 図 1 2 】

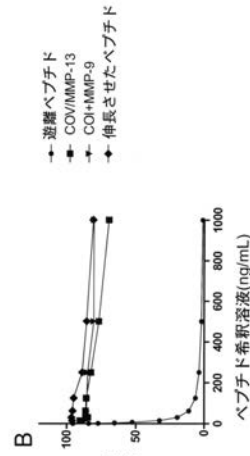


図12

【 図 1 1 】

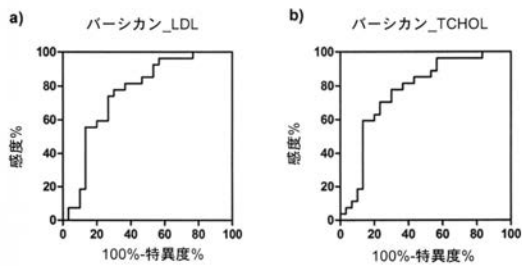
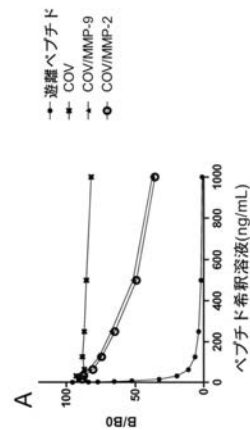


図11



【 図 1 3 】

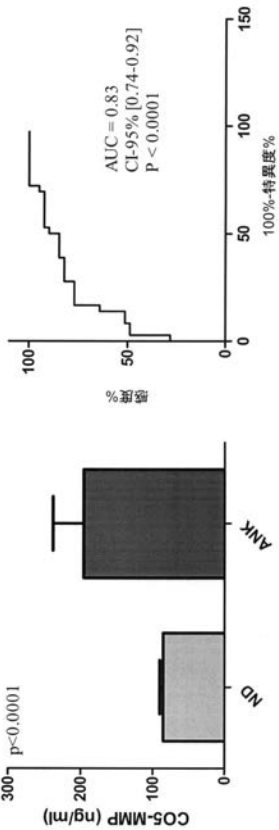


図13

【 図 1 4 】

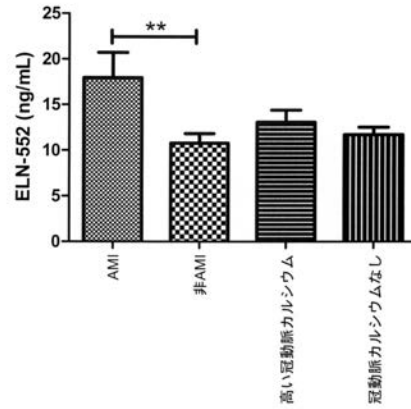


図14

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成30年10月11日 (2018.10.11)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

患者生体液試料に天然で存在する N末端またはC末端ネオエピトープ を含有する パーシカ タンパク質断片 を測定するための イムノアッセイ を行うステップを含む 線維症疾患を評価するためのバイオアッセイ の方法であって、前記イムノアッセイが、前記試料に天然で存在するタンパク質断片を、MMP 8 または カテプシン K による パーシカ の切断によって形成される N末端またはC末端ネオエピトープ と反応性の免疫学的結合パートナーと接触させるステップと、前記試料における前記 N末端またはC末端ネオエピトープ を含むタンパク質断片を測定するためにペプチド断片の前記免疫学的結合パートナーへの結合の程度を測定するステップとを含む方法により行われ、前記 N末端またはC末端ネオエピトープ が、以下の表に示される切断部位における パーシカ の切断によって形成される、

【表 1】

バーシカン	
プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP8	3306' .KTFGKMKPRY ' 3316 (119)
カテプシン K	3247' .YENWRPNQPD ' 3256 (116)
カテプシン K	3255' PDSFFSAGED. ' 3264 (117)
カテプシン K	3221' .HDYQWIGLN ' 3229 (118)
MMP8	486' .SVTQIEQIEV ' 495 (120)
MMP8	491' EQIEVGPLVT. ' 500 (121)

バイオアッセイの方法。

【請求項 2】

前記免疫学的結合パートナーが、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する特異的結合親和性を有する、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、ペプチドのN末端における以下の配列のいずれかと特異的に反応する、請求項 1 に記載の方法。

【表 2】

バーシカン	
「.」でマークされた切断部位/配列番号()	
.KTFGKM	(279)
.YENWRP	(277)
.HDYQWI	(278)
SVTQIE	(304)

【請求項 4】

前記免疫学的結合パートナーが、ペプチドのC末端における以下の配列のいずれかと特異的に反応する、請求項 1 に記載の方法。

【表 3】

バーシカン	
「.」でマークされた切断部位/配列番号()	
FSAGED.	(280)
VGPLVT.	(281)

【請求項 5】

前記結合の検出が定量的である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記結合の量が、健康な個体の集団、および、線維性疾患または炎症状態により特徴づけられた個体の集団について、確立された対照値と比較される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記試料中のペプチドが、前記抗体または抗体断片への結合について、前記抗体または抗体断片に結合する既知の濃度の結合物質と競合する競合アッセイとして行われる、請求項 1 に記載の方法。

フロントページの続き

- (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 100166268
弁理士 田中 祐
- (74)代理人 100170379
弁理士 徳本 浩一
- (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 オー・スラッシュ, エッケルスベリイスガーデ 1 3
- (72)発明者 レーミング, ディアーナ・ジェイ
デンマーク国, 2 4 5 0 コペンハーゲン エスヴィ, ペテル・ホルムスヴァイ 2 5, 3 . 2
- (72)発明者 バラスクク, ナターシャ
デンマーク国, 2 3 0 0 コペンハーゲン エス, アイランズ・ブリュッゲ 7 7 C, 1 . 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 エス, イェンス・オットー・クラークス・ガーデ 1
8, 4 . t v
- (72)発明者 ヴァシリアダイス, エフスタティオス
デンマーク国, 2 6 1 0 レズオウア, タルンヴァイ 5 9 m f
- Fターム(参考) 4H045 AA30 EA50

专利名称(译)	病理学生物标志物测定		
公开(公告)号	JP2019007978A	公开(公告)日	2019-01-17
申请号	JP2018169570	申请日	2018-09-11
申请(专利权)人(译)	北欧生物科学ER / ES		
[标]发明人	ヴァイダルサンネエス カ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 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 ヴァシリアディス,エフスタティオス		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/78		
CPC分类号	C07K14/78 C12Q1/37 G01N33/6893 G01N2333/4737 G01N2333/775 G01N2333/78 G01N2800/32		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D C07K14/78 G01N33/53.DZN.A		
F-TERM分类号	4H045/AA30 4H045/EA50		
代理人(译)	中村綾子 田中宇 徳本光一		
优先权	13/187205 2011-07-20 US		
其他公开文献	JP6706297B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供诊断或量化病理状况的方法。甲I型胶原，III型胶原蛋白，IV型胶原，V型胶原蛋白，胶原蛋白VI型，弹性蛋白，糖链蛋白聚糖，核心蛋白聚糖，基膜聚糖，多功能蛋白聚糖，C反应蛋白，以及天然患者生物流体样品，例如载脂蛋白E基因在包括用于测量所述含新表位的蛋白片段存在，一个在患者至高于正常水平的提高的测量，以及相关关联的病症的存在或程度进行免疫测定的步骤。免疫测定中，样品中存在自然界的蛋白质片段，以测量接触，其与由所述蛋白的切割通过蛋白酶形成的新表位反应的免疫结合配偶体的步骤中，包含在样品中的新表位的蛋白片段至肽片段与免疫结合配偶体的结合程度。【选择图】无

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公開特許公報 (A)	(11) 特許出願公開番号 特開2019-7978 (P2019-7978A)
	(43) 公開日	平成31年1月17日 (2019.1.17)
(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01) C07K 14/78 (2006.01)	FI G01N 33/53 C07K 14/78	ZNAD 4H045 テーマコード (参考)
審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 89 頁)		
(21) 出願番号 (22) 出願日 (62) 分割の表示 原出願日 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国 (特許庁注：以下のものは登録商標) I. TWEEN	特開2018-169570 (P2018-169570) 平成30年9月11日 (2018.9.11) 特開2017-42739 (P2017-42739) の分割 平成24年7月18日 (2012.7.18) 13/187,205 平成23年7月20日 (2011.7.20) 米国 (US)	(71) 出願人 503259129 ノルディック・バイオサイエンス・エー/エス NORDIC BIOSCIENCE A / S デンマーク国、ゲーカール 2730 ヘル レフ、ヘルレフ・ホフエテガータ 20 7 (74) 代理人 100098623 弁理士 奥山 尚一 100096769 弁理士 有原 幸一 100107319 弁理士 松島 鉄男
最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】 病理学バイオマーカーアッセイ