

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-528472

(P2017-528472A)

(43) 公表日 平成29年9月28日 (2017.9.28)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C O 7 K 16/18	(2006.01)	C O 7 K 16/18	Z N A	4 H O 4 5
G O 1 N 33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53	R	
C O 7 K 7/06	(2006.01)	C O 7 K 7/06		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2017-513702 (P2017-513702) (86) (22) 出願日 平成27年9月8日 (2015.9.8) (85) 翻訳文提出日 平成29年5月2日 (2017.5.2) (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/070526 (87) 国際公開番号 W02016/038055 (87) 国際公開日 平成28年3月17日 (2016.3.17) (31) 優先権主張番号 14184140.3 (32) 優先日 平成26年9月9日 (2014.9.9) (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP) (31) 優先権主張番号 15152765.2 (32) 優先日 平成27年1月27日 (2015.1.27) (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	(71) 出願人 510129509 ユーロディアグノスティカ アーベー Euro-Diagnostica AB スウェーデン国 マルメ ビー. オー. ボ ックス 50117 ユーロディアグノ スティカ アーベー (74) 代理人 100075557 弁理士 西教 圭一郎 (72) 発明者 ブロム, アンナ スウェーデン国 マルメ インガ マリエ ニルソンズ ストリート 53 ザ ウ オーレンバーグ ラボラトリー フロア 4 最終頁に続く
---	--

(54) 【発明の名称】 補体成分 C 4 d に対して特異的な抗体、およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、医薬診断および医療機器と、それらの使用の分野に関する。本発明は、補体系の成分に特異的に向けられ、補体活性化の古典的経路の改良された測定を可能にする抗体を提供する。特に、本発明は、補体活性化の古典的経路の活性化を検出するための手段および方法を提供する。特に、本発明は、試料中の補体成分 C 4 d の存在を検出するための手段および方法を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

補体成分 C 4 d と特異的に反応し、補体成分 C 4 b または C 4 と反応しない抗体であって、アミノ酸配列 N V T L S S T G R - C O O H からなるエピトープを含むペプチドに反応し、アミノ酸配列 N V T L S S T G R N G F K - C O O H を含むペプチドに反応しないことを特徴とする抗体。

【請求項 2】

モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

ポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

10

【請求項 4】

マウス抗体、ラット抗体、またはウサギ抗体であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 5】

動物が、実質的にアミノ酸配列 S S T G R - C O O H からなるペプチドによって免疫されることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を産生する方法。

【請求項 6】

請求項 5 に従った方法によって取得可能であることを特徴とする抗体。

【請求項 7】

試料中の補体成分 C 4 d の検出のための *in vitro* 方法であって、当該試料を、請求項 1 ~ 4 または 6 のいずれか 1 項に従った抗体に接触させ、当該抗体と C 4 d との間の結合が検出されることを特徴とする方法。

20

【請求項 8】

前記試料は、血液試料、血清試料、血漿試料、滑液試料、または液状試料であることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記試料は、熱不活性化されることを特徴とする請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

E L I S A、R I A、E I A、および免疫組織化学からなる群から選択されることを特徴とする請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 11】

S L E、抗体媒介移植片拒絶、関節リウマチ、強皮病、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、血管炎、腎炎、抗リン脂質症候群、シェーグレン症候群、筋炎、肺がん、および血液腫瘍からなる群から選択される疾患の、診断または予後のための *in vitro* 方法であって、請求項 1 ~ 4 または 6 のいずれか 1 項に従った抗体を、個体に由来する試料に接触させ、当該試料が、所定の参照値に比較して、高いレベルの補体成分 C 4 d を含む場合、前記個体が、前記疾患を罹患するか、または発達させる高いリスクを有すると結論付けることを特徴とする方法。

【請求項 12】

個体における疾患活動性を監視するための *in vitro* 方法であって、前記疾患は、S L E、血管炎、および抗体媒介移植片拒絶からなる群から選択され、請求項 1 ~ 4 または 6 のいずれか 1 項に係る抗体を、前記個体に由来する試料に接触させ、当該試料中に存在する C 4 d のレベルが経時的に監視されることを特徴とする方法。

40

【請求項 13】

個体における疾患の処置の効率を決定するための *in vitro* 方法であって、前記疾患が、肺がん、S L E、血管炎、および抗体媒介移植片拒絶からなる群から選択され、請求項 1 ~ 4 または 6 のいずれか 1 項に従った抗体を、処置の前後に個体から取得された試料に接触させ、処置後に取得された試料が、処置前に取得された試料中の C 4 d レベルに比べて、減少または低下した C 4 d レベルを有する場合、前記個体が、前記処置に反応すると結論付けることを特徴とする方法。

50

【請求項 1 4】

固体支持体に固定化された請求項 1 ~ 4 または 6 のいずれか 1 項に従った抗体と、免疫複合体の検出のための試薬とを含むことを特徴とする補体成分 C 4 d の検出のためのキット。

【請求項 1 5】

全身エリテマトーデスの個体における疾患活動性の再燃を予測または診断するための *in vitro* 方法であって、請求項 1 ~ 4 または 6 のいずれか 1 項に従った抗体が、前記個体に由来する試料と接触させられることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、医療診断法、および他の医療器具、ならびにそれらの使用の分野に属する。より詳細には、本発明は、補体系の成分に特異的に向けられた抗体であって、古典的補体経路の活性化の改良測定を可能にする抗体を提供する。さらに詳細には、本発明は、古典的補体経路の活性化を検出するための、手段および方法を提供する。さらに、本発明は、生物学的試料における補体成分 C 4 d の存在を測定するための、手段および方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

補体系は、病原体を生物体から排除するために、抗体、および食細胞の能力を補助、または「補完」する。補体系は、適応可能ではなく、個体の生存期間にわたって変化しない自然免疫系 (1) と称される免疫系の一部である。しかしながら、補体系は、適応免疫系によって、迅速に形成され、作動することができる。

20

【0003】

補体系は、血中に見出される多くのタンパク質であって、一般的に肝臓によって合成され、通常、不活性な前駆体 (前駆タンパク質) として循環するタンパク質からなる。いくつかのトリガーの 1 つによって刺激されたとき、前記系におけるプロテアーゼは、特定のタンパク質を切断し、アナフィラトキシンを放出し、さらなる切断カスケードの増幅を惹起する。この活性カスケードの最終結果は、反応の大量増幅、および細胞を死滅させる膜攻撃複合体の活性化である。30 以上のタンパク質、およびタンパク質フラグメントが、血中において高濃度で見出される可溶タンパク質、および細胞膜受容体を含む補体系を構成する。それらは、血清のグロブリン画分の約 5 % を占め、オプソニンとして機能可能である。

30

【0004】

補体系を構成するタンパク質は、主に肝細胞によって合成される。また、組織マクロファージ、血中単球、ならびに尿生殖器管、および消化管の上皮細胞によって相当量が製造される。補体系は、古典的経路、副経路、およびレクチン経路の、3 つの生化学的経路によって惹起可能である (2)。

【0005】

活性化の 3 つの経路は全て、タンパク質性 C 3 コンバーター類似体と、膜攻撃形態をもたらす一般的な終末経路とを生じる。古典的補体経路は、典型的に、活性化のために抗原抗体複合体 (免疫複合体) を必要とするが、副経路、およびマンノース結合レクチン経路は、抗体の存在なしに、それぞれ自然な C 3 加水分解、または炭水化物によって活性化することができる。全ての 3 つの経路において、C 3 コンバーターゼは、補体 C 3 を切断、および活性化し、C 3 a および C 3 b を生じ、さらなる切断、および活性化事象のカスケードをもたらす。

40

【0006】

古典的経路は、C 1 複合体の活性化によって惹起される。C 1 複合体は、1 分子の C 1 q、2 分子の C 1 r および 2 分子の C 1 s からなるか、または C 1 q r ² s ² からなる。C 1 複合体は、C 1 q が、抗原に複合化した、I g M または I g G に結合したときに活性

50

化される。単一の I g M は、前記経路を惹起することができるが、I g G は、複数必要である。このことは、C 1 q が病原体の表面に直接に結合したときに生じる。そのような結合は、C 1 q 分子における立体構造変化をもたらし、2 つの C 1 r 分子の活性化をもたらす。C 1 r は、セリンプロテアーゼである。活性化された C 1 r は、C 1 s を切断する（別のセリンプロテアーゼ）。C 1 r² s² 成分は、C 4 と、C 2 とに分かれ、C 4 a、C 4 b、C 2 a、および C 2 b を生じる。C 4 b、および C 2 a は、結合し、C 3 を C 3 a および C 3 b に切断することを促進する古典的経路 C 3 コンバーターゼ（C 4 b 2 a 複合体）を形成する。C 3 b は、後に C 4 b 2 a（C 3 コンバーターゼ）に加わり、C 5 コンバーターゼ（C 4 b 2 a 3 b 複合体）を形成する。

【0007】

古典的経路の活性化の間に形成された C 4 b は、続いてセリンプロテアーゼ因子 I によって迅速に分解され、当該セリンプロテアーゼ因子 I は、C 4 b 結合タンパク質などの共因子の存在下において、古典的補体経路の活性化によってのみ現れる、C 4 b 分解の最終生成物である C 4 d を生じる。C 4 d は、したがって、*in vivo*、および *in vitro* における古典的補体活性化のための優れたマーカーである。近年、全身血液中の C 4 d は、肺がんの診断および予後マーカーとして記載された（3）。C 4 d は、全身エリテマトーデス（SLE）（4）、および抗体媒介移植片拒絶（5）のマーカーとして広く使用されている。C 4 d の大部分は、古典的補体経路を最初に活性化した細胞の表面に結合したままであるが、ある部分は、放出され、血中において検出可能である。C 4 d 形成のスキームは、図 1 に示される。

【0008】

いくつかの疾患の原因となる、C 4 d の役割、および古典的経路活性化を調査、および理解するために、C 4 d に対して特異的な試薬、特に抗体が求められている。本願は、その要求について取り組むものである。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、補体成分 C 4 d に特異的に反応するが、補体成分 C 4 b または C 4 には反応しない抗体であって、アミノ酸配列 N V T L S S T G R - C O O H からなるエピトープを含むペプチドに反応し、アミノ酸配列 N V T L S S T G R N G F K - C O O H を含むペプチドに反応しないエピトープに関する。

【0010】

本発明は、そのような抗体を作製する方法であって、実質的にアミノ酸配列 S S T G R - C O O H からなるペプチドが、抗原として使用される方法を提供する。

【0011】

また、本発明は、試料中の補体成分 C 4 d の検出方法であって、当該試料を本明細書に記載されたように抗体に接触させ、抗体と C 4 d との間の結合が検出される検出方法を提供する。

【0012】

また、本発明は、肺がん、SLE、血管炎、および抗体媒介性移植片拒絶からなる群から選択される疾患の、診断または予後のための方法であって、本明細書に記載されたような抗体を、個体に由来する試料に接触させ、当該試料が、コントロール対象の試料と比較して、補体成分 C 4 d の高いレベルを含む場合、前記個体が、前記疾患を、罹患または発症する高いリスクを有すると結論付ける方法を提供する。

【0013】

また、本発明は、疾患活動性を監視するための方法であって、疾患が、疾患活性の再燃によって特徴付けられる方法を提供する。そのような疾患は、SLE、血管炎、および抗体媒介性移植片拒絶からなる群から選択されてもよく、本明細書に記載されたような抗体を、個体に由来する試料に接触させ、当該試料中に存在する C 4 d レベルが経時的に監視される。

【0014】

また、本発明は、疾患の処置の効率を決定するための方法を提供する。特に、疾患は、肺がん、S L E、血管炎、および抗体媒介性移植片拒絶からなる群から選択される。そのような方法において、本明細書に記載されたような抗体を、処置の前後に個体から取得された試料に接触させ、処置後に取得された試料が、処置前に取得された試料におけるC 4 dレベルと比べて減少または低下したC 4 dレベルを有する場合、個体が処置に対して反応すると結論付けられる。

【発明を実施するための形態】

【0015】

C 4 dに反応する抗体は、当該分野において公知であり、市販されている。しかしながら、C 4 dの存在についての診断試薬として有用であるためには、抗体が、補体活性化の結果として生じた遊離のC 4 dに特異的であることが不可避であり、このことは、当該抗体が、C 4 dのみを認識するが、C 4 bまたはC 4を認識しないことを意味する。C 4 dは、C 4 bおよびC 4の断片であるので、このことは、簡単な問題ではない。

10

【0016】

活性化された補体タンパク質が、それらの親分子に存在しない特定の構造的エピトープを示すことが結論付けられた(6~8)。そのようなエピトープは、多くの場合、ネオエピトープと表わされる。A 2 5 1抗体などの、C 4 dにおけるネオエピトープに対する抗体は、Quidel社(12544 High Bluff Drive, Suite 200、サンディエゴ、カルフォルニア、米国)から市販されており、Quidel Specialty Products社によって販売されている市販のMicroVue(商標)C4d EIAキットの基礎である。Quidel C4d MicroVue ELISAは、血清または血漿におけるC 4 d断片の測定のための試験として、国際補体学会によって推奨されるアッセイである(9)。このアッセイは、捕捉抗体として抗C 4 dモノクローナル抗体A251に基づくものであり、検出抗体としてヤギポリクローナル抗体C 4 dを採用している。我々は、C 4 dに特異的に反応するA251抗体を試験し、当該抗体がC 4およびC 4 bを認識することを見出した(実施例7、図2)。

20

【0017】

C 4 dに対する抗体の他の代表的な例は、ヒト血漿から精製されたC 4 dに対して産生されたAb167093抗体(クローンLP69)である。この抗体は、Abcam社から市販されている(330 Cambridge Science Park、ケンブリッジ、CB4 0FL、英国)。我々は、C 4 dに特異的に向けられた抗体を試験し、当該抗体がC 4およびC 4 bに交差反応することを明らかにした(実施例7、図3)。したがって、ヒト血漿から精製されたC 4 dは、C 4 d特異的抗体を生成するために適したソースではないと考えられる。

30

【0018】

C 4 d特異的抗体を産生する他の手法は、抗原としてC 4 dの内部配列に由来する合成ペプチドの使用に依拠する。このグループの代表的な例は、ウサギモノクローナル抗体Ab136921、クローンA24-Tであり、Abcam社から市販されている。我々は、C 4 dに特異的に向けられたAb136921抗体を試験した。この抗体も、C 4およびC 4 bに交差反応するようである(実施例7、図4)。

【0019】

C 4 dに特異的に反応する他の抗体は、参考文献No. 20(A l i ら)に記載されたウサギポリクローナル抗体12~5000である。この抗体は、American Research products社から得られ、C 4 dに特異的に向けて試験された。この抗体も、C 4およびC 4 bに交差反応するようである(実施例7、図16)。

40

【0020】

したがって、C 4 dに由来する内部ペプチドも、C 4 d特異的抗体を得るために好適な抗原として使用することができないと考えられる。

【0021】

疑わしいC 4 d特異的抗体のさらなる種類は、C 4 dのC末端半分に由来するペプチドに対して産生された抗体である。我々は、そのような抗体の3つの代表例を試験した。Abcam社から市販のウサギモノクローナル抗体183311、クローンSP91も、C 4 dに対して特異

50

的でないことが見出された。なぜなら、この抗体は、C 4 と C 4 b とに反応するからである (図 5)。

【 0 0 2 2 】

我々は、C 4 d に由来する C 末端ペプチドで免疫されたウサギに由来するポリクローナル抗体を試験した。この抗体 (Abcam社から市販のAb58781) は、C 4 d に特異的ではない。なぜなら、この抗体は、C 4 と C 4 b とに反応するからである (図 1 7)。

【 0 0 2 3 】

また、我々は、C 4 d に由来する C 末端ペプチドで免疫されたウサギに由来する別のポリクローナル抗体を試験した。この抗体 (CPAMD2、カタログ番号AP15376PU-S、Acris社から市販) は、C 4 d に特異的ではない。なぜなら、この抗体は、C 4 と C 4 b とに反応するからである (図 1 8)。これらの結果は、C 4 d に由来する C 末端ペプチドによる免疫化が、C 4 b および / または C 4 に交差反応しない、C 4 d に特異的な抗体を得るための効果的な戦略ではないことも示している。

10

【 0 0 2 4 】

C 4 d に対して真に特異的な抗体を得るために、我々は、グリシン / システインスペーサに付着された、C 4 d の N 末端、および C 末端配列に由来する 5 アミノ酸に対応するペプチドでウサギを免疫した (ペプチドあたりウサギ 2 匹)。このことは、実施例 4 に詳述される。免疫化に使用された 2 つのペプチドの配列は、

N 末端 C 4 d 部分 : NH₂ - T L E I P G - G G C (配列番号 1)

C 末端 C 4 d 部分 : C G G - S S T G R - C O O H (配列番号 2) であった。

20

【 0 0 2 5 】

太い字体で示されたアミノ酸は、C 4 d アミノ酸配列の一部であり、グリシン残基、およびシステイン残基は、スペーサとして使用される。ウサギ 1 および 2 は、配列番号 1 に係るペプチドで免疫された。ウサギ 3 および 4 は、配列番号 2 に係るペプチドで免疫された。免疫化および採血は、Agriser AB社 (スウェーデン) によって行われ、集められた抗血清は、上記で使用されたような同一のアッセイにおいて、C 4、C 4 b、および C 4 d に対する反応性について E L I S A で試験された。

【 0 0 2 6 】

配列 S S T G R - C O O H を含む C 末端ペプチドによって免疫された、ウサギ 3 および 4 の両方は、C 4 d に特異的な抗体を産生した。それらは、C 4 d に等しく良好に反応し、C 4 または C 4 b に反応しなかった (ウサギ 3 に由来する抗体のみが図 6 に示されている)。C 末端ペプチド C G G S S T G R - C O O H (配列番号 2) で免疫された、ウサギ 3 および 4 に由来する 2 つの血清は、同一の特異性を有するようであった。本明細書に記載された実験は、ウサギ 3 に由来する抗体で全て行われた。ウサギ 4 に由来する抗体が使用されたとき、それらは、同一の結果をもたらした。ウサギ 3 に由来する抗体は、さらに、本明細書において、B L O K C 4 d 抗体として表わされた。配列 N H₂ - T L E I P G を含む N 末端ペプチドで免疫された 2 匹のウサギ (1 および 2) に由来する抗体は、C 4、C 4 b、または C 4 d に反応せず、廃棄された。

30

【 0 0 2 7 】

B L O K C 4 d によって認識されるエピトープは、C y s - N V T L S S T G R - C O O H ペプチド (配列番号 3) に対する B L O K C 4 d の反応性と、C y s - N V T L S S T G R N G F K - C O O H ペプチド (配列番号 4) に対する反応性の欠如とによって示されるように、C 4 d の最終 C 末端に置かれた。

40

【 0 0 2 8 】

配列番号 3 は、遊離のカルボキシル基を有する C 4 d の最終 C 末端を表し、一方、配列番号 4 は、C 4 d および C 4 c の C 末端の間の結合を表す (図 1 を参照)。したがって、B L O K C 4 d 抗体は、C 4 d に特異的なエピトープであって、その前駆体 C 4 b または C 4 に存在しない、C 4 d の最終 C 末端に存在するエピトープを認識すると結論付けられる。

【 0 0 2 9 】

50

上述された市販の抗C4d抗体は、配列番号3および配列番号4に係るペプチドについてそれらの反応性を試験された。市販の抗体はいずれも、配列番号3または配列番号4に係るペプチドに反応しなかった。このことは、図7に図示される。

【0030】

本発明は、したがって、アミノ酸配列NVTLSSSTGR-COOHからなるエピトープを含むペプチドに特異的に反応するが、アミノ酸配列NVTLSSSTGRNGFK-COOHを含むペプチドに反応しない抗体についての一態様に関する。そのような抗体は、C4dに特異的に反応し、C4またはC4bに反応しない。

【0031】

表現「アミノ酸配列NVTLSSSTGR-COOHからなるエピトープを含むペプチドに特異的に反応するが、アミノ酸配列NVTLSSSTGRNGFK-COOHを含むペプチドに反応しない」は、抗体が、アミノ酸SSSTGRと遊離のC末端アルギニン残基(R-COOHとして示された)とを含むC4dのC末端におけるエピトープに特異的に反応することを示すために、本明細書において使用される。さらに、アミノ酸配列NVTLSSSTGR-COOHからなるエピトープを含むペプチドに特異的に反応するが、4つのC末端アミノ酸(NGFK)の余分のストレッチによってのみ異なる同一のペプチド、すなわち、アミノ酸配列NVTLSSSTGRNGFK-COOHを含む同一のペプチドに反応しない。

10

【0032】

さらに異なる用語において、本発明に係る抗体は、ペプチドNVTLSSSTGR-COOHに含まれるエピトープに反応するが、NVTLSSGRNGFK-COOHに反応しない抗体として記載されてもよい。

20

【0033】

別の態様において、本発明は、補体成分C4dに特異的に反応し、補体成分C4bに反応しない抗体であって、アミノ酸配列NVTLSSSTGR-COOHからなるエピトープを含むペプチドに反応し、アミノ酸配列NVTLSSSTGRNGFK-COOHを含むペプチドに反応しない抗体に関する。

【0034】

そのような抗体は、当該技術分野において知られた従来の免疫化法を用いて作製されてもよい。好ましい実施形態において、そのような抗体は、ポリクローナル抗体である。ポリクローナル抗体は、それらの標的抗原に結合する高いアビジティおよび高いアフィニティについて知られている。別の好ましい実施形態において、本発明に係る抗体は、マウスモノクローナル抗体、ラットモノクローナル抗体、またはウサギモノクローナル抗体などのモノクローナル抗体であってもよい。そのようなモノクローナル抗体は、無制限の供給で製造することができるのに、抗体の品質を保つという利点を有する。

30

【0035】

本発明に係る抗体は、当該技術分野において知られた従来法によって得ることができ、実質的にアミノ酸配列SSSTGR-COOHからなるペプチドが免疫原として使用される。言い換えれば、本発明は、上述されたような抗体を産生する方法であって、実質的にアミノ酸配列SSSTGR-COOHからなるペプチドが免疫原として使用される方法に関する。本発明の他の態様は、したがって、そのような方法によって得ることができる抗体に関する。

40

【0036】

産生された抗体は、したがって、従来技術の抗体に対して顕著な利点を有し、本明細書に記載されたような予期せぬ特性を示す。

【0037】

A251抗体が捕捉抗体として使用されているQuidelMicroVue(商標)C4d EIAキット(カタログ番号 A008)は、血清または血漿におけるC4d断片の測定用の試験として国際補体学会によって推奨されている(6)。我々は、このアッセイが、多くの欠点および欠陥を抱えることを見出した。第1に、何度も凍結融解された試料で行われたとき、一

50

貫性のない結果をもたらす。我々は、本明細書において、12回凍結融解された2つの試料（1および8）を用いて得られた結果を示す。これらの試料は、凍結融解サイクルの数が増加するとともに増加するC4dレベルを示した（図8）。これらと同じ試料が、B L O K C 4 d抗体が捕捉抗体として使用されたサンドイッチアッセイにおいて分析されたとき、結果は、一貫しており、凍結融解サイクル数の増加とともに変化することはない（図9）。

【0038】

市販のQuidelMicroVue（商標）C4d EIAキットの別の欠陥は、熱不活性化された血清を使用することができないことである。正常ヒト血清（N H S）が熱不活性化の前後で試験されたとき、Quidelアッセイは、非常に多くの偽陽性反応を生じたが、一方、B L O K C 4 d抗体を用いるサンドイッチアッセイでは、生じなかった（図10）。

10

【0039】

また、図10に示されるデータは、B L O K C 4 d抗体を採用するアッセイが、非常に高い、従って良好な信号対雑音比を有するが、一方、QuidelMicroVue（商標）アッセイは、信号対雑音比10をもたらす（高標準物質/低標準物質）、捕捉抗体としてB L O K C 4 dを採用するサンドイッチE L I S Aアッセイは、同一の高標準物質および低標準物質が使用されたとき、信号対雑音比300をもたらした。

【0040】

本発明に係る抗体は、したがって、C4dの検出のための改良アッセイの製造を可能にする。また、本発明は、したがって、試料中の補体成分C4dの*in vitro*検出方法であって、当該試料を、上述のように抗体に接触させ、抗体とC4dとの間の結合が検出される検出方法に関する。

20

【0041】

有利な実施形態において、本発明は、上述のような方法であって、試料が、血液試料、血清試料、血漿試料、滑液試料、または液体試料である方法に関する。本発明に従った方法は、臨床研究に由来する保存試料を用いる場合にはよくあることであるが、試料を、複数回にわたって熱不活性化または融解するとき、特に良好な結果をもたらすことができる。

【0042】

本発明に従った抗体は、多くの免疫学的アッセイフォーマットにおいて使用可能である。E L I S A、R I A、E I A、および免疫組織化学におけるその使用が特に好ましい。

30

【0043】

さらに、我々は、リツキシマブを用いる処置を行われた白血病患者における古典的補体経路の活性化の評価を試みた。リツキシマブは、C D 2 0を保有するがん細胞に結合したとき、C 1複合体に結合し、古典的経路を直接に活性化する。

【0044】

我々は、リツキシマブの注入の前後に得られた試料中のC4dのレベルを測定した。また、我々は、古典的経路の活性化のさらなる下流マーカである終末補体複合体（T C C）のレベルを測定した。

【0045】

T C Cは、以下のように生じる。C 3コンバーターゼは、C 3bを生じるC 3を活性化し、C 3bは、続いて、その特異性を変化するC 3コンバーターゼに結合し、C 5コンバーターゼとなる。この酵素複合体は、C 5をC 5bに活性化し、C 6、C 7、C 8、およびC 9と相互作用して、細胞膜に入り、細胞死をもたらすT C Cを形成する。C 5b - 9複合体のいくらかは、溶液中に残り、E L I S Aによって測定可能である（10）。

40

【0046】

リツキシマブなどの分子が古典的経路を活性化するとき、当業者は、生成された、C 4d（経路の初期）およびT C C（経路の最後）の間の相関を予測することができるであろう。

【0047】

50

血漿試料は、ストックホルムのカロリンスカ大学病院からの、抗CD20mAb（リツキシマブ（商標））で処置された、非ホジキンリンパ腫または慢性リンパ性白血病（CLL）患者から得られた。試料は、リツキシマブ未処置の患者からのみ集められた。我々は、リツキシマブ注入の直前および直後に集められた11人の患者に由来する試料を得、BLOK C4d抗体を採用する本発明に従ったC4d ELISAにおいて、およびQuidel社のC4dMicroVue（商標）アッセイにおいてそれらを試験した。リツキシマブ処置の前後における、試料中のC4dレベルの増加は、両方のアッセイについて測定され、終末補体複合体（TCC）のレベルと比較された。

【0048】

図11および図12は、それぞれ2つのC4d ELISAにおいて測定されたようにC4dの増加が示され、TCC ELISAを用いて得られた結果に対してプロットされた。我々は、本発明に従ったC4d ELISAにおいて得られたデータが、TCCアッセイとよく相関し（スピアマン $r = 0.88$, $p = 0.0007$, 図11）、一方、Quidelアッセイを用いて得られたC4dデータは、TCCデータと相関しなかった（スピアマン $r = -0.29$, $p = 0.38$, 図12）。

10

【0049】

我々は、本発明に従った抗体および方法は、従来技術の抗体および方法よりも生物学的な試料においてC4dを検出するために適していると結論付ける。

【0050】

補体成分C4dは、最近、SLE、抗体媒介移植片拒絶、関節リウマチ、血管炎、腎炎、抗リン脂質症候群、強皮症、シェーグレン症候群、筋炎、肺がん、および血液腫瘍などの多くの疾患の診断および予後マーカーとして記載された。

20

【0051】

全身エリテマトーデスは、複雑な病因を有し、多臓器が関与する慢性の自己免疫疾患である。補体の清掃機能は、感染しやすいので、SLEの病状が補体系における欠陥に関連するとの証拠が存在する。（Pickering et al., 2000）。他方、本体が、SLEの経過の間に処分されない自己抗原は、補体活性化の潜在能力を保持しており、それによって疾患を悪化させる（Leffler et al., 2012）。

【0052】

SLEは、再燃と名付けられた悪化した臨床症状の繰り返し期間と、寛解と称される疾患度が低下した期間とによって特徴付けられる。SLEについての根治的治療は存在しないので、治療的介入の目的は、再燃症状を和らげることによって臓器損傷を最小化することである。補体C3タンパク質および補体C4タンパク質の総レベルの測定を含む、バイオマーカーの大規模なアレイは、SLEを診断し、監視するために使用されるが、それらは、再燃の予測において信頼性がない。

30

【0053】

我々は、したがって、本発明に従った抗体および方法がSLEの再燃を予測可能であるか否かを検討し、SLE患者が前記疾患の再燃を経験したか否かを、実際に予測し、正確に決定することが可能であることを見出した。これらの実験は、実施例12に記載されている。

40

【0054】

本発明は、したがって、請求項1～4、または6のいずれか1項に従った抗体が、個体に由来する試料に接触させられる、全身エリテマトーデスの個体の臨床状態を監視するためのin vitro方法に関する。そのような監視は、疾患活動性における再燃を、予測または診断することを含んでもよい。

【0055】

本発明者らは、本発明に従った抗体が、C4dについて、より正確で、特異的なアッセイを可能にし、本発明に従った抗体は、SLE、抗体媒介移植片拒絶、関節リウマチ、強皮病、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、血管炎、腎炎、抗リン脂質症候群、シェーグレン症候群、筋炎、肺がん、および血液腫瘍からなる群から選択された疾患の、診断または予後

50

のための方法において有利に使用されてもよく、本発明に従った抗体を、個体に由来する試料に接触させ、当該試料が、所定の参照値と比較して、補体成分 C 4 d の高いレベルを含む場合、個体が、前記疾患に罹患するか、または発症する高いリスクを有すると結論付けることを確立した。当業者は、たとえば、コントロール対象の試料に由来する参照値を得るための様々な方法を十分に把握している。

【 0 0 5 6 】

また、本発明は、疾患活動性を監視するための方法であって、疾患が疾患活動性の再燃によって特徴付けられる方法を提供する。そのような疾患は、S L E、血管炎、および抗体媒介性移植片拒絶からなる群から選択されてもよく、本明細書に記載されたような抗体を、個体に由来する試料に接触させ、試料中に存在する C 4 d のレベルが、経時的に監視される。

10

【 0 0 5 7 】

また、本発明は、疾患の処置の効率を決定するための方法を提供する。特に、疾患は、肺がん、血液腫瘍、S L E、血管炎、および抗体媒介性移植片拒絶からなる群から選択される。処置の効率の決定は、様々な方法で行われてもよい。たとえば、血液腫瘍のための処置は、腫瘍細胞が、補体によって死滅するように、作動機構として補体を使用する。したがって、薬剤に対する臨床応答は、補体活性化と、結果的により高い C 4 d とに付随する。上述されたような、多くの他の疾患において、高レベルの C 4 d は、病気、自発的な補体活性化の印であり、処置は、標的における補体活性化の除去を後にもたらず、病原性因子の除去を目的とする。そのような方法においては、本明細書に記載されたような抗体を、処置の前後に個体から取得された試料に接触させ、処置後に取得された試料が、処置前に取得された試料における C 4 d レベルに比べて、C 4 d の減少または低下したレベルを有する場合、個体が処置に反応すると結論付けられる。

20

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 8 】

【図 1】C 4 c および C 4 d への補体成分 C 4 b の処理。

【図 2】固定化された補体成分 C 4、C 4 b、および C 4 d に対するマウスモノクローナル抗体 A251 (Quidel 社) の反応性。

【図 3】固定化された補体成分 C 4、C 4 b、および C 4 d に対するマウスモノクローナル抗体 LP69 (Abcam 社) の反応性。

30

【図 4】固定化された補体成分 C 4、C 4 b、および C 4 d に対するウサギモノクローナル抗体 A24-T (Abcam 社) の反応性。

【図 5】固定化された補体成分 C 4、C 4 b、および C 4 d に対するウサギモノクローナル抗体 SP91 (Abcam 社) の反応性。

【図 6】固定化された補体成分 C 4、C 4 b、および C 4 d に対する、C 4 d の C 末端エピトープ S S T G R - C O O H を含むペプチドを用いて免疫されたウサギ 3 に由来する血漿の反応性。ウサギ 4 に由来する血清は、同一の結果をもたらし、血清 3 および 4 は、抗体 B L O K C 4 d を形成するために組み合わせられた。

【図 7】C 4 d に含まれるペプチド N V T S S T G R - C O O H に対する B L O K C 4 d 抗体の特異的反応と、C 4 b においてのみ生じるペプチド N V T S S T G R N G F K に対する反応性の欠如とを示すグラフである。

40

【図 8】凍結 / 融解サイクル数の増加とともに Quidel MicroVue (商標) C4d ELISA の反応性を示すグラフである。

【図 9】凍結 / 融解サイクル数の増加とともに、B L O K C 4 d 抗体を採用するサンドイッチ E L I S A の反応性を示すグラフである。

【図 10】Quidel MicroVue (商標) アッセイと、B L O K C 4 d 抗体を採用するサンドイッチ E L I S A との結果の比較を示すグラフである。低標準物質、および高標準物質 (それぞれ 0 および 2 4 2 n g / m l) と、正常ヒト血清 (N H S) と、熱不活性化された正常ヒト血清とが試験された。

【図 11】リツキシマブ (商標) で処置された 1 1 人の白血病患者における、B L O K

50

C 4 d E L I S A の結果と、T C C E L I S A の結果との相関を示すグラフである。

【図 1 2】リツキシマブ（商標）で処置された 1 1 人の白血病患者における、QuidelMicroVue（商標）C4d ELISA の結果と、T C C E L I S A の結果との相関を示すグラフである。

【図 1 3】I 因子阻害抗体の量の増加（0、0.5、1、および 2 マイクロリットル）にともなう、I g G 活性化された正常ヒト血清に対する B L O K C 4 d 抗体の反応性を示すグラフである。

【図 1 4】S L E の患者に由来する血清における C 4 d レベルが、疾患の寛解および再燃時において取得された。同一の血清における C 3 および C 4 のレベルが、比較のために示される。

【図 1 5】同一の患者から得られる再燃 - 寛解の組み合わせによる、S L E の患者に由来する血清における C 4 d レベルの比較。

【図 1 6】固定化された補体成分 C 4、C 4 b、および C 4 d に対する American research products 社のウサギポリクローナル抗体 1 2 ~ 5 0 0 0 の反応性。

【図 1 7】固定化された補体成分 C 4、C 4 b、および C 4 d に対する Abcam 社のウサギポリクローナル抗体 58781 の反応性。

【図 1 8】固定化された補体成分 C 4、C 4 b、および C 4 d に対する Acris 社のウサギポリクローナル抗体 15376 カタログ番号 AP15376PU-S の反応性。

【図 1 9】選択された患者の血清に対する B L O K C 4 d 抗体の反応性。

【実施例】

【0059】

実施例 1：C 4 d タンパク質の作製

200 マイクログラム / m l の C 4 b 溶液（Complement Technology 社 4801 Troup Hwy, Suite 701、タイラー、テキサス、75703 米国、カタログ番号 A108、ロット #5C）を、20 マイクログラム / m l の血漿精製 I 因子と混合し（11）、p H 8.0 T r i s 緩衝生理食塩水で 50 マイクロリットルの最終体積の、400 マイクログラム / m l の血漿精製 C 4 B P（12）は、37 で 5 時間にわたってインキュベートされた。

【0060】

実施例 2：C 4 と、その断片 C 4 b および C 4 d とを用いる E L I S A

マイクロタイタープレート（Maxisorp、Nunc 社）を室温（R T）で一晩コートした。実施例 1 に記載されたように取得した、P B S 中の 5 マイクログラム / m l の C 4 溶液（Complement technology 社、カタログ番号 A105、ロット #22a）、または C 4 b（Complement Technology 社、カタログ番号 A108、ロット #5C）、もしくは C 4 d 調製物の 50 マイクロリットルを各ウェルに添加した。マイクロタイタープレートは、続いて洗浄緩衝液（50 m M T r i s p H 8、150 m M N a C l、0.1% T w e e n 20）で洗浄され、R T で 2 時間にわたって、200 マイクロリットルのブロッキング緩衝液（洗浄緩衝液中の 1% B S A）を用いてブロッキングされた。50 マイクロリットルのブロッキング緩衝液中に 1：1000 で希釈された、血清または精製された抗体を、1 時間にわたって添加し、R T でインキュベートし、続いて洗浄し、同じブロッキング緩衝液中に希釈された 50 マイクロリットルのヤギ抗ウサギ - H R P 抗体（Dako 社）を用いてインキュベートした。最終的な洗浄後、50 マイクロリットルの標準 O P D タブレット溶液（Dako 社、製造者の指示書に従って作製した）をウェルに添加し、十分な色が得られると直ちに 0.5 M H 2 S O 4 を用いて発色反応を停止した。吸光度は、マイクロプレートリーダー（Varian 社）において 490 n m で測定された。

【0061】

実施例 3：ウサギの免疫

我々は、グリシン / システインスパーサで伸長された C 4 d の N 末端および C 末端配列からの 5 アミノ酸に対応するペプチドを用いてウサギ（ペプチドあたりウサギ 2 匹）を免疫した。免疫に使用された 2 つのペプチドの配列は、N 末端 C 4 d 部分：N H 2 - T L E I P G G G C（配列番号 1）、および C 末端 C 4 d 部分：C G G S S T G R - C O O H（

10

20

30

40

50

配列番号 2) であった。

【 0 0 6 2 】

ペプチドは、Innovagen AB社（スウェーデン）によって、標準の F - m o c 化学を用いて合成された。ペプチドは、続いてキーホールリンペットヘモシアニンに結合された。免疫は、Agrisera AB社の標準的なプロトコールに従って行われた。簡潔には、ウサギは、 $t = 0$ において、フロイント完全アジュバント（F C A）中の 2 0 0 マイクログラムのペプチドを用いて免疫され、続いて、 $t = 27$ 日目において、フロイント不完全アジュバント（F I A）中の 2 0 0 マイクログラムのペプチドの 2 回の追加免疫を注入され、 $t = 54$ および $t = 81$ 日目において、F I A 中の 1 0 0 マイクログラムのペプチドの 2 回の追加免疫を注入された。動物は、 $t = 92$ 日において、採血され、屠殺された。C 末端ペプチドを用いて免疫された 2 匹のウサギに由来する血清は、特異性の点で同様であり、B L O K C 4 d 抗体として明細書において言及される。

10

【 0 0 6 3 】

実施例 4 B L O K C 4 d 抗体の特異性

我々は、C 4 d の形成が、I 因子（ヒト I 因子（ 1 ））に対するマウスモノクローナル抗体 Quidel Corp社（米国）に対する抗体によって阻害された試料に対するその反応性を決定することによって B L O K C 4 d の特異性を確かめた。補体因子 I（f I）は、補体系のタンパク質であり、モルモット血清において 1966 年に最初に単離され（14）、細胞に結合した、または液相の C 3 b および C 4 b を切断することによって補体活性化を制御する（15）。I 因子が阻害されたとき、C 4 b に由来する C 4 d の形成は、阻害される。

20

【 0 0 6 4 】

2 マイクロリットルの正常ヒト血清は、0、0.5、1、および 2 マイクロリットルの I 因子抗体（1、2 mg / ml）と混合され、5 分間氷上でインキュベートされた。2 マイクロリットルの熱凝集 I g G（10 mg / ml）は、1 mM C a および M g を含む 2.5 マイクロリットルの P B S と混合され、37 で 45 分間にわたってインキュベートされた。混合物は、続いて 40 mM E D T A - G V B 緩衝液を用いて 300 マイクロリットルまで希釈された。50 マイクロリットルのこの調製物は、実施例 6 に従って作製されたマイクロ E L I S A プレートのウェル毎に使用された。

30

【 0 0 6 5 】

試料の C 4 d レベルは、抗体を阻害する I 因子の量の増加とともに減少することが観察された（図 13）。

【 0 0 6 6 】

我々は、B L O K C 4 d 抗体が、C 4 d に特異的であると結論付けた。なぜなら、B L O K C 4 d 抗体は、C 4 d を除く、古典的補体経路の全ての成分を含む試料に対して全く反応性を示さなかったからである。

【 0 0 6 7 】

熱不活性化されたヒト血清を用いて行われたコントロール実験は、全くシグナルを示さなかったが、I 因子に対する抗体が、等量のコントロール抗体（タンパク質 S に対する M K 54）によって置き換えられた試料において 100% のシグナルが得られた。

40

【 0 0 6 8 】

実施例 5 試薬の作製

熱不活性化された正常ヒト血清（N H S）は、成分を不活性化するために 56 で 60 分間にわたって N H S をインキュベートすることによって作製された。

【 0 0 6 9 】

熱凝集 I g G は、P B S 中の 10 mg / ml の I g G 溶液（Immuno社、オーストリア）を 63 で 30 分間にわたって加熱することによって作製された。15.000 × G で 5 分間の遠心分離後、ペレットは、廃棄された。

【 0 0 7 0 】

標準物質は、2 マイクロリットルの N H S と 2 マイクロリットルの熱凝集 I g G（10

50

mg/ml)とを混合することによって作製され、1 mM CaおよびMgを含むPBS緩衝液を用いて25マイクロリットルまで希釈され、37℃で1時間にわたってインキュベートされた。混合物は、続いて40 mM EDTA-GVB (2.075 mM ベロナール緩衝液 pH 7.3、10 mM EGTA、7 mM MgCl₂、0.083%ゼラチン、116 mM グルコース、60 mM NaCl)を用いて200マイクロリットルまで希釈された。50マイクロリットルのそのような試料は、ELISAウェル每に入れられ、C4dの1任意単位(AU)を含むと規定されたが、この標準物質の連続希釈液は、標準曲線を満たした。緩衝液のみ(40 mM EDTA-GVB)を、0値とした。

【0071】

実施例6 C4d捕捉アッセイ

Maxisorp 96ウェルプレート(Nunc社)は、0.02%アジ化ナトリウムを含む0.1 M 炭酸塩緩衝液 pH 9.6中に10倍希釈された50マイクロリットルのBLOK C4d抗体を用いて一晚コートされた。マイクロタイタープレートは、37℃で1時間にわたって200マイクロリットルのブロッキング緩衝液(洗浄緩衝液中の3%フィッシュゼラチン(Nordic社))を用いてブロッキングされた。洗浄後、50マイクロリットルの試料が入れられ、37℃で1時間にわたってインキュベートされた。洗浄後、50マイクロリットルの検出抗体(抗C4dマウスモノクローナル、Quidel社、#A213、ブロッキング緩衝液中に1:1500で希釈された)は、後続の別の洗浄サイクルを適用され、50マイクロリットルのヤギ抗マウスHRP(Dako社)は、ブロッキング緩衝液中に1:1000で希釈された。50マイクロリットルの標準OPDタブレット溶液(Dako社、製造者の指示書に従って作製された)は、ウェルに添加され、発色反応は、十分な色が得られると、0.5 M H₂SO₄を用いて停止された。吸光度は、マイクロプレートリーダーにおいて490 nmで測定された。コントロール実験は、実施例11に記載されたようにアフィニティ精製された抗体を用いて行われ、3.5マイクログラム/ml IgGの最終濃度まで希釈された。アフィニティ精製された抗体は、BLOK C4d抗体と同一の結果をもたらした。

【0072】

実施例7 市販の抗C4d抗体およびBLOK C4d抗体の反応性

本明細書において使用された市販の抗体は、Quidel社のA251、ロット番号910499、Abcam社のクローンLP69、製造番号ab167093、ロット番号GR126509-6、Abcam社のクローンA24-T、製造番号ab136921、ロット番号GR161597-2、Abcam社のクローンSP91、製造番号ab183311、ロット番号GR181800-1、American Research Products社のウサギポリクローナル抗C4d12-5000、ロット番号41200、Abcam社のウサギポリクローナル抗C4d 58781、ロット番号GR173176-3、およびAcris社のウサギポリクローナル抗C4d Ab CPAMD2、カタログ番号AP15376PU-S、ロット番号130618MCであった。

【0073】

ELISAアッセイは、実施例2に詳述されたように準備され、実施された。全ての抗体は、1:50に希釈された抗体SP91と、製造者によって予め希釈された既製のAbcam社のウサギポリクローナル抗C4d 抗C4d 58781とを除いて、10マイクログラム/mlで試験された。

【0074】

ブロッキング緩衝液中に好適に希釈された抗体(50マイクロリットル)は、37℃で1時間にわたってインキュベートされ、洗浄後、50マイクロリットルの二次抗体(A24-T、SP91、およびBLOK C4dに対する1:1000に希釈されたDako社のヤギ抗ウサギHRP、またはLP69およびA251に対する1:1000に希釈されたDako社のヤギ抗マウスHRP)を用いて1時間にわたってインキュベートされた。最後の洗浄後、50マイクロリットルの標準OPDタブレット溶液(Dako社、製造者の指示書に従って作製された)は、ウェルに添加され、発色反応は、十分な色が得られると、0.5 M H₂SO₄を用いて停止された。吸光度は、マイクロプレートリーダーで490 nmにおいて測定された。最終結果は、ネガティブコントロールの読み取り値(一次Abが添加されないとき、4

10

20

30

40

50

90 nmにおける測定値)を減算することによって計算された。結果は、図2～図6、および図16～図18に示される。

【0075】

実施例8 ペプチドELISA

C末端C4d部分についてのELISAは、配列Cys-NVTLSSTGR-COOH(配列番号3)、またはCys-NVTLSSTGRNGFK(配列番号4)を有するペプチドを50マイクログラム/ml含む50マイクロリットルのPBSを用いて、Maxisorpプレート(Nunc社)を37で1時間にわたってコーティングすることによって作製された。

【0076】

マイクロタイタープレートは、続いて洗浄緩衝液(50mM Tris pH8、150mM NaCl、0.1% Tween 20)を用いて洗浄され、200マイクロリットルのブロッキング緩衝液(洗浄緩衝液中に1%BSA)を用いてRTで2時間にわたってブロッキングされた。ブロッキング緩衝液中に希釈された抗体(50マイクロリットル)は、37で1時間にわたってインキュベートされ、続いて洗浄され、50マイクロリットルの二次抗体(A24-T、SP91、およびBLOK C4dに対するDako社の1:1000希釈されたヤギ抗ウサギ-HRP、またはLP69およびA251に対する1:1000希釈されたDako社のヤギ抗マウスHRP)を用いて1時間インキュベートされた。最後の洗浄後、50マイクロリットルの標準OPDタブレット溶液(Dako社、製造者の指示書に従って作製された)は、ウェルに添加され、発色反応は、十分な色が得られれば、0.5M H₂SO₄を用いて停止された。吸光度は、マイクロプレートリーダーにおいて490nmで測定された。最終結果は、ネガティブコントロール(一次Abが添加されないとき、490nmにおける測定値)についての読み取り値の減算によって計算された。

【0077】

実施例9 白血病/リンパ腫患者群

非ホジキンリンパ腫、または慢性リンパ性白血病(CLL)の患者は、スウェーデン、ストックホルムのカロリンスカ大学病院にて診断され、Anders Osterborg教授によって扱われた。リツキシマブ処置(単一薬治療として、または化学療法計画とともに)に認定された患者に由来するEDTA血漿試料は、標準的な薬用量(375mg/m²)の薬剤の第1注入の直後および直前に採取された。

【0078】

血漿試料のいくつかは、凍結融解サイクルを通じてC4dの読み取り値の安定性のために試験された。この目的のために、それらは、10マイクロリットルに分割され、続いて-80で凍結され、液体状態になるまでRTで融解された。凍結融解は、所望のサイクル数に従って繰り返された。

【0079】

実施例10 TCCアッセイ

TCCアッセイは、以前に記載されたように(13)、捕捉抗体として、抗C9-ネオエピトープ抗体、クローンae11、検出抗体として、ビオチン化抗C6モノクローナル抗体、クローン9C4を用いて実施された。0.02%のアジ化ナトリウムを含むPBS中に希釈されたウェルあたり100マイクロリットルの捕捉抗体を、Maxisorpプレート(Nunc社)にRTで一晩固定化した。二次抗体の検出は、ウェルあたり100マイクロリットルのストレプトアビジン-HRPコンジュゲート(R&D社、米国)を用いて実施され、その後、アッセイは、OPDタブレット(Dako社)を用いて開発され、490nmにおける吸光度が測定された。

【0080】

実施例11 BLOK C4d抗体のアフィニティ精製

特異性および感受性の点で優れた結果が提供されたという事実があるものの、抗体は、本明細書に開示されたように、ペプチドを用いるアフィニティ精製によってさらに精製されてもよい。特に有利な方法は、以下の通りである。

【0081】

3 ml のウサギ C 4 d 抗血清は、アフィニティークロマトグラフィーを用いて C 4 d 特異的な抗体を精製するために使用された。Sulpholink ビーズ (10 ml のビーズ、Thermo Scientific 社) は、製造者のプロトコールに従って、12 mg の配列番号 3 (GenScript 社、米国) に従ったペプチドを用いてコンジュゲートされた。カラムは、PBS 緩衝液を用いて平衡化され、抗血清試料が入れられた。PBS を用いる洗浄後、ペプチド結合画分は、0.1 M グリシン pH 2.5 を用いて溶出され、直ちに 1/10 体積の 1 M Tris pH 8.0 を用いて中和された。溶出液の中和画分は、配列番号 4 に従ったペプチド (GenScript 社、米国) にコンジュゲートされた別の Sulpholink カラムに入れられた。このカラムは、C 4 d - C 4 c 境界エпитープ (もしあれば) に潜在的に結合可能であるので、C 4 d に特異的ではない抗体のネガティブ選別に使用される。未結合画分は、集められ、PBS 緩衝液に対して透析され、10 kDa のカットオフ装置 (Vivaspin、米国) を用いて濃縮された。

【0082】

実施例 12 B L O K C 4 d 抗体は、S L E の再燃を予測および診断する。

4 つ以上のアメリカ関節リウマチ学会の分類基準 (Tan et al., 1982) を満たす 98 人の S L E 患者は、本試験に含まれる。患者に由来する血漿は、1984 年 ~ 2009 年までスウェーデンのルンド大学のリウマチ科において集められた。2 つの時点に由来する試料が選択された。1 つの時点は、患者が最も高い S L E 疾患活動性インデックス 2000 (SLEDAI-2K, Gladmann, D., et al., J. Rheumatol (2002) 29: 288-291) を有するときであり、これは、「再燃」と定義され、別の時点は、患者が経験を積んだ熟練医によって評価される最も低い疾患活動性を有するときであり、「寛解」と定義される。

【0083】

日常の実験室分析によるデータセット (C 3 および C 4 の測定値など) は、全ての試料について利用可能であった。77 人の健常ドナーに由来する血漿試料は、コントロールとして含まれた。C 4 d レベルは、実施例 6 に記載されたような B L O K 抗体に基づく C 4 d E L I S A を用いて、患者とコントロールとにおいて測定された。Quidel C4d Micro Vue キットの精製された C 4 d の希釈液は、標準物質として使用された。

【0084】

全ての患者が分析に入れられたとき、総 C 3 および C 4 レベルにおける相違 ($p = 0.063$ および 0.2065 、n.s.) とは対照的に、再燃および寛解の C 4 d レベルの間で高い有意差が検出可能であった (図 14、マンホイットニー検定 t によって、 $p = 0.0005$ 、***)。

【0085】

ウィルコクソン符号順位検定 (同一の患者から得られた再燃 - 寛解の対合が考慮された) が、同一のデータセットにおいて実施されたとき、再燃と寛解との C 4 d レベルの間において高い有意差を検出可能であった (図 15、 $p = < 0.0001$ ***)。これに対して、C 3 レベルは、寛解に比べて再燃の間にわずかに減少し、非常に低いレベルにおいて顕著になった ($p = 0.0275$ *)。C 4 レベルは、全く有意差を示さなかった ($p = 0.1085$ 、n.s.)。

【0086】

本発明者らは、分析が、全コホートについて、または個々の患者からの結果に組み合わせて実施されるとき、本発明に従った C 4 d 抗体および方法が、S L E 再燃を寛解から顕著に ($p < 0.05$) 識別可能である改良アッセイをもたらすと結論付けた。

【0087】

実施例 13 B L O K C 4 d 抗体は、関節リウマチ、強皮症、乾癬性関節炎、および強直性脊椎炎の患者を健常コントロールから識別する。

試料は、関節リウマチ、強皮症、乾癬性関節炎、または強直性脊椎炎に罹患した 20 人の個体から得られた。20 人の健常な個人の集団は、コントロールとして機能する。これらの血清は、本明細書に記載されたように B L O K C 4 d E L I S A において試験さ

れた。我々は、B L O K C 4 d 抗体が、患者群を通常のコントロールから識別することができることを見出した（表 1 および図 1 9 ）。

【表 1】

患者血清に対する B L O K C 4 d 抗体の反応性

群	群サイズ N=	平均	標準偏差	P 値*
正常コントロール	20	1.87	3.96	
関節リウマチ	20	38.05	28.02	< 0.001
強皮症	20	20.10	13.73	< 0.001
乾癬性関節炎	20	34.86	19.72	< 0.001
強直性脊椎関節炎	20	24.07	12.88	< 0.001

* ダン多重比較検定およびクラスカル・ワリス検定に従って、健康（正常）コントロール群に対する比較のために計算された。

10

20

【 0 0 8 8 】

参考文献

1. Janeway CAJ, Traves P, Walport M: Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. The Immune System in Health and Disease 2001, New York.
2. Walport MJ: Complement. First of two parts. The New England journal of medicine 2001, 344:1058-1066.
3. Ajona D, Pajares MJ, Corrales L, Perez-Gracia JL, Agorreta J, Lozano MD, Torre W, Massion PP, de-Torres JP, Jantus-Lewintre E, et al: Investigation of complement activation product c4d as a diagnostic and prognostic biomarker for lung cancer. Journal of the National Cancer Institute 2013, 105:1385-1393.
4. Kalunian KC, Chatham WW, Massarotti EM, Reyes-Thomas J, Harris C, Furie RA, Chitkara P, Putterman C, Gross RL, Somers EC, et al: Measurement of cell-bound complement activation products enhances diagnostic performance in systemic lupus erythematosus. Arthritis and rheumatism 2012, 64:4040-4047.
5. Djamali A, Kaufman DB, Ellis TM, Zhong W, Matas A, Samaniego M: Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 2014, 14:255-271.
6. Nuijens JH, Huijbregts CC, Eerenberg-Belmer AJ, Abbink JJ, Strack van Schijndel RJ, Felt-Bersma RJ, Thijs LG, Hack CE: Quantification of plasma factor XIIa-Cl(-)-inhibitor and kallikrein-Cl(-)-inhibitor complexes in sepsis. Blood 1988, 72:1841-1848.
7. Garred P, Mollnes TE, Lea T, Fischer E: Characterization of a monoclonal antibody MoAb bH6 reacting with a neoepitope of human C3 expressed on C3b, iC3b, and C3c. Scandinavian journal of immunology 1988, 27:319-327.
8. Mollnes TE, Lea T, Harboe M, Tschopp J: Monoclonal antibodies recognizing a

30

40

50

neoantigen of poly(C9) detect the human terminal complement complex in tissue and plasma. *Scandinavian journal of immunology* 1985, 22:183-195.

9. Bergseth G, Ludviksen JK, Kirschfink M, Giclas PC, Nilsson B, Mollnes TE: An international serum standard for application in assays to detect human complement activation products. *Molecular immunology* 2013, 56:232-239.

10. Deppisch R, Schmitt V, Bommer J, Hansch GM, Ritz E, Rauterberg EW: Fluid phase generation of terminal complement complex as a novel index of bioincompatibility. *Kidney international* 1990, 37:696-706.

11. Blom AM, Kask L, Dahlbäck B: CCP1-4 of the C4b-binding protein α -chain are required for Factor I mediated cleavage of C3b. *Mol Immunol* 2003, 39:547-556.

12. Dahlbäck B: Purification of human C4b-binding protein and formation of its complex with vitamin K-dependent protein S. *Biochem J* 1983, 209:847-856.

13. Mollnes TE, Redl H, Hogasen K, Bengtsson A, Garred P, Speilberg L, Lea T, Oppermann M, Gotze O, Schlag G: Complement activation in septic baboons detected by neopeptide-specific assays for C3b/iC3b/C3c, C5a and the terminal C5b-9 complement complex (TCC). *Clinical and experimental immunology* 1993, 91:295-300.

14. Nelson R, Jensen J, Gigli I, Tamura N (1966). "Methods for the separation, purification and measurement of nine components of hemolytic complement in guinea-pig serum". *Immunochemistry* 3 (2): 111-35

15. Lachmann P, Müller-Eberhard H (1968). "The demonstration in human serum of "conglutinin-activating factor" and its effect on the third component of complement". *Journal of Immunology* 100 (4): 691-8.

16. Leffler J., Martin M., Gullstrand B., Tyden H., Lood C., Truedsson L., Bengtsson A. A. and Blom A. M., 2012. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol* 188, 3522-31.

17. Pickering M. C., Botto M., Taylor P. R., Lachmann P. J. and Walport M. J., 2000. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Advances in immunology* 76, 227-324.

18. Tan E. M., Cohen A. S., Fries J. F., Masi A. T., McShane D. J., Rothfield N. F., Schaller J. G., Talal N. and Winchester R. J., 1982. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 25, 1271-7.

19. Gladmann D.D., Ibanez D. and Urowitz M.B., Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J. Rheumatol.*, 2002 29(2): 288-291.

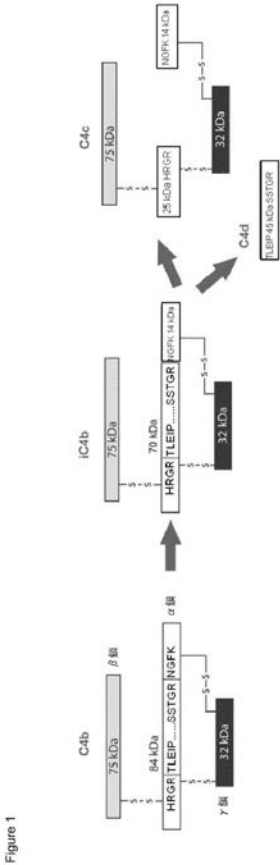
20. Ali, S.A. et al., Frequent expression of C4d in hepatic graft-versus-host disease: Potential clue for diagnosis and distinguishing acute and chronic form, *Transplant Immunology*, 23: 77-80 (2010).

10

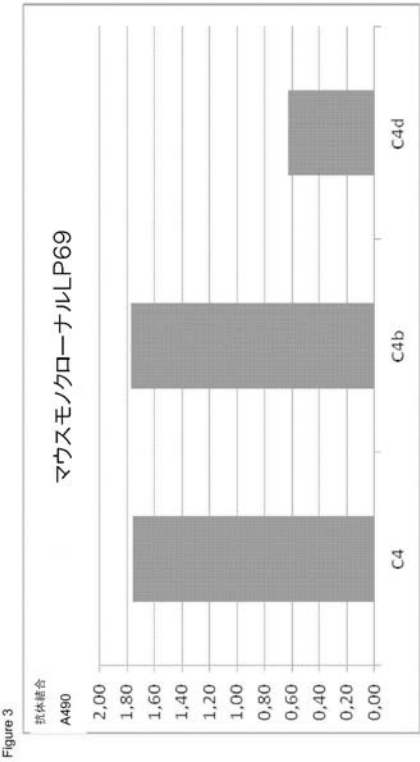
20

30

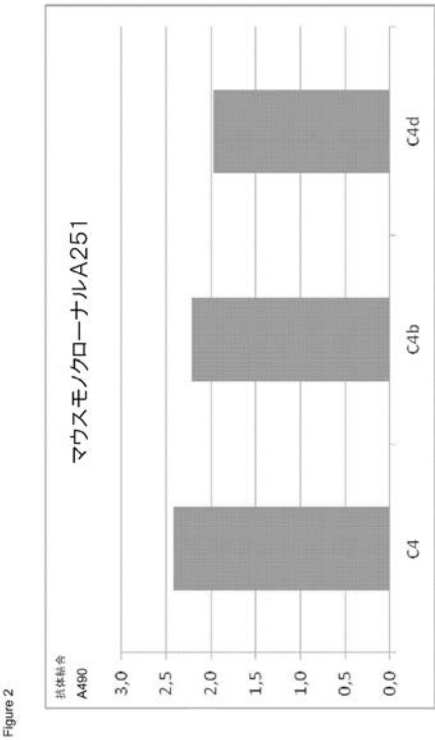
【 図 1 】



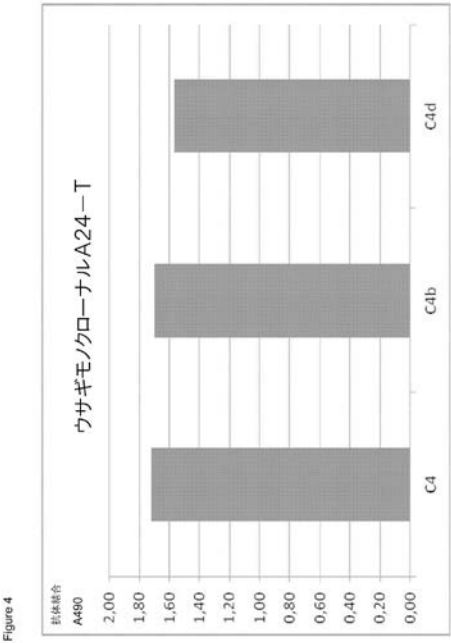
【 図 3 】



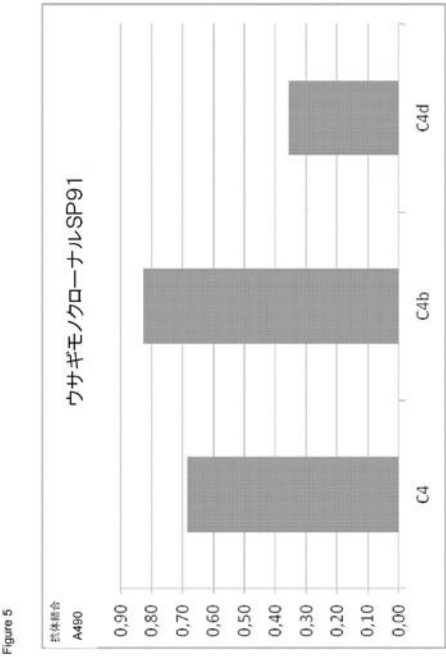
【 図 2 】



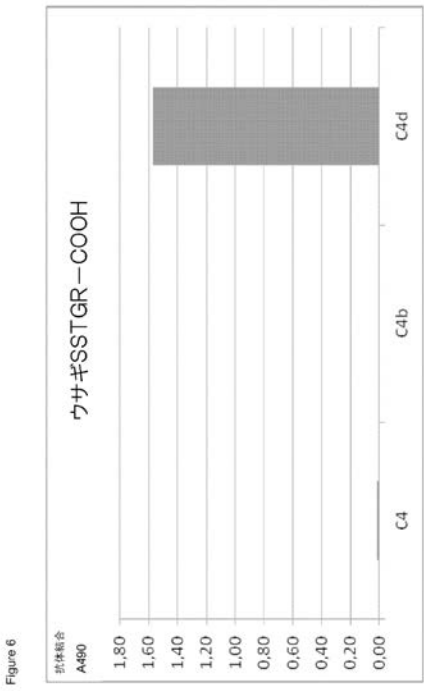
【 図 4 】



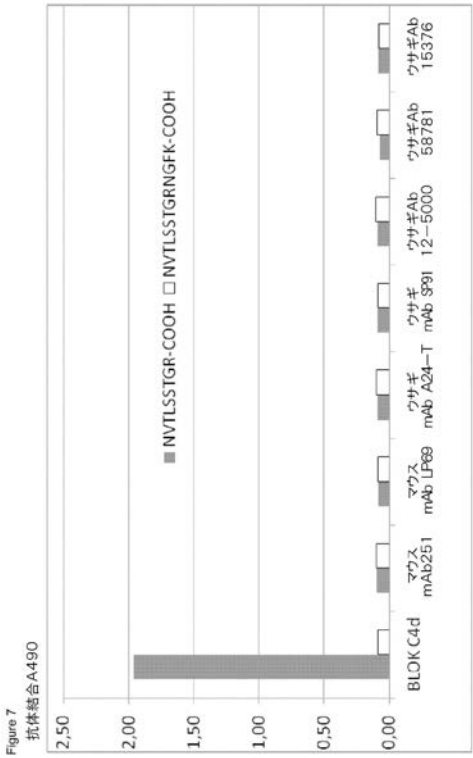
【 図 5 】



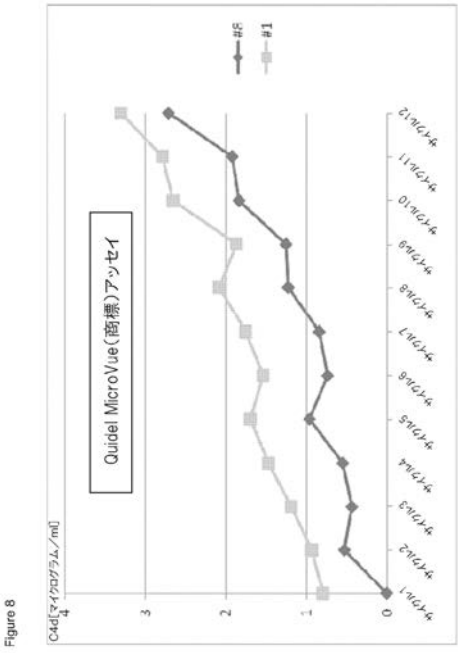
【 図 6 】



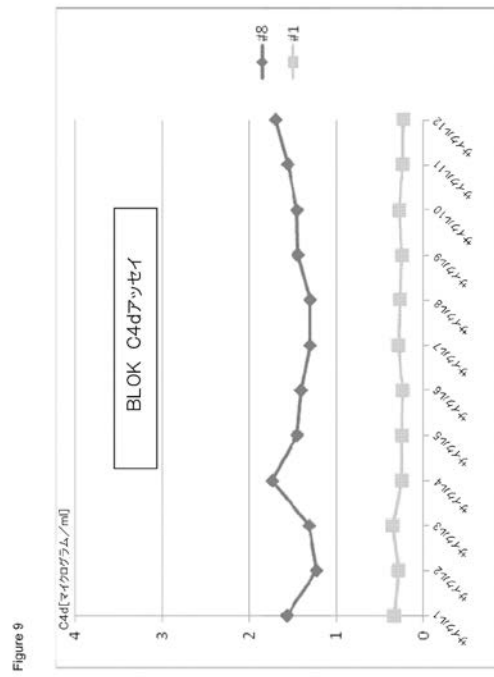
【 図 7 】



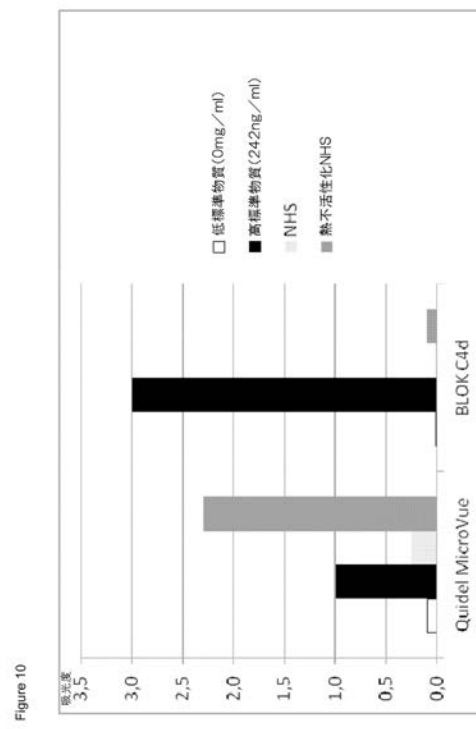
【 図 8 】



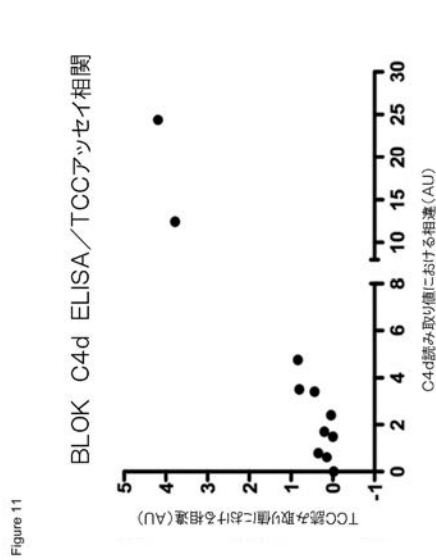
【 図 9 】



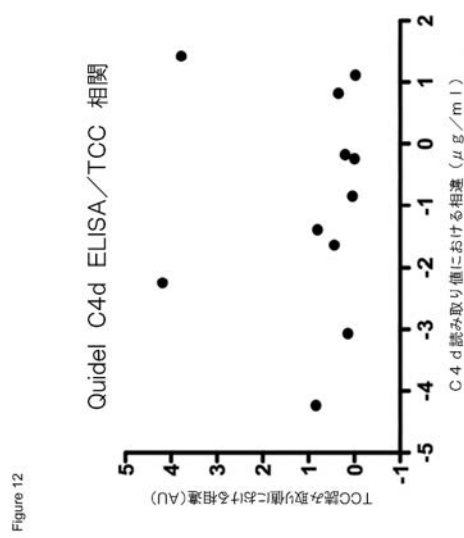
【 図 10 】



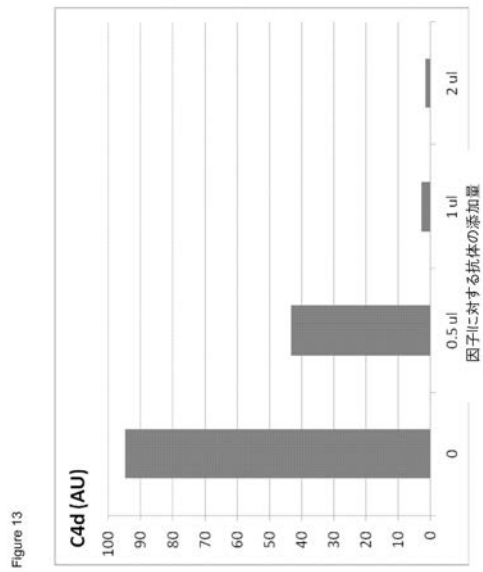
【 図 11 】



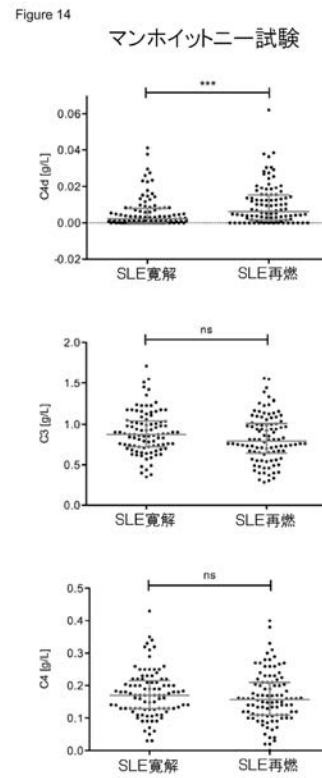
【 図 12 】



【図 13】

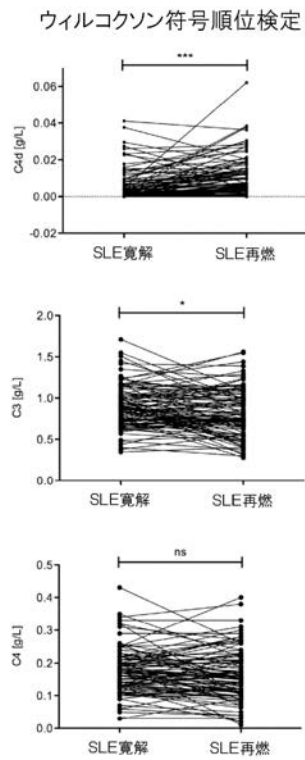


【図 14】

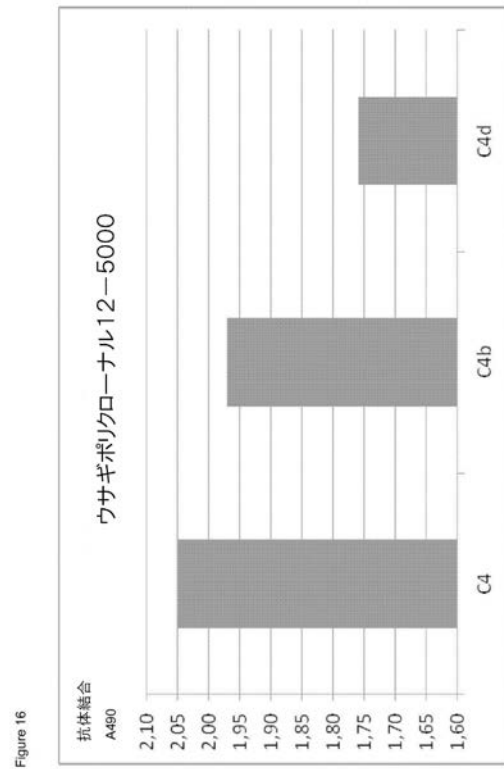


【図 15】

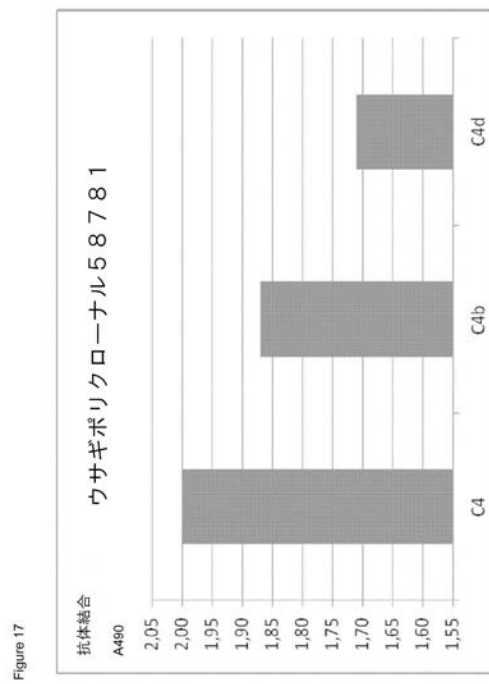
Figure 15



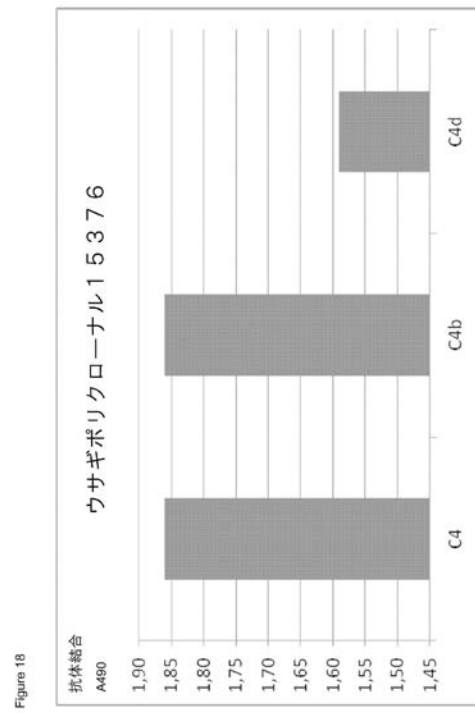
【図 16】



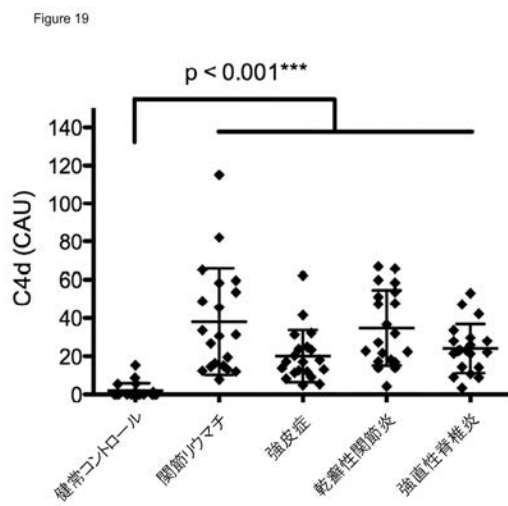
【図 17】



【図 18】



【図 19】



【配列表】

2017528472000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/070526

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/18

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALI S A ET AL: "Frequent expression of C4d in hepatic graft-versus-host disease: Potential clue for diagnosis and distinguishing acute and chronic form", TRANSPLANT IMMUNOLOGY, ELSEVIER, NL, vol. 23, no. 1-2, 1 May 2010 (2010-05-01), pages 77-80, XP027089341, ISSN: 0966-3274 [retrieved on 2010-03-15] the whole document, especially page 79, left-hand column, first paragraph -/--	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 October 2015

Date of mailing of the international search report

29/10/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bayer, Annette

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/070526

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	-& Anonymous: "Anti-C4d Antibody, Human, 12-5000 ARP American Research Products, Inc.", 1 January 2008 (2008-01-01), XP055152495, Retrieved from the Internet: URL:http://www.arp1.com/Anti-Human-C4d-Antibody-p/12-5000.htm [retrieved on 2014-11-12] the whole document ----- Anonymous: "Anti-C4d antibody, prediluted ab58781, abcam", 1 January 2014 (2014-01-01), XP055152498, Retrieved from the Internet: URL:http://www.abcam.com/C4d-antibody-prediluted-ab58781.pdf [retrieved on 2014-11-12] the whole document ----- Anonymous: "Polyclonal Antibody to Complement C4d (C-term) - Purified, Acris Antibodies, Inc.", 1 January 2013 (2013-01-01), XP055152500, Retrieved from the Internet: URL:http://ml.acris-antibodies.com/pdf/AP15376PU-S.pdf [retrieved on 2014-11-12] the whole document ----- Shinji Maeda ET AL: "Identification of a surface structure in the fourth component of human complement, C4, which becomes hidden upon activation by Cis", Biochem. J, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 503-508, XP055152434, Retrieved from the Internet: URL:http://www.biochemj.org/bj/289/0503/2890503.pdf [retrieved on 2014-11-12] abstract page 504, left-hand column, paragraph 2 page 504, right-hand column, paragraph 4 - page 507, right-hand column, paragraph 1 ----- -/--	1-15 1-15 1-15 1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/070526

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 221 616 A (KOLB WILLIAM P [US] ET AL) 22 June 1993 (1993-06-22) column 9, line 38 - line 57 column 10, line 64 - column 11, line 28 column 15, line 11 - line 41 column 17, line 19 - line 31 column 20, line 57 - column 21, line 35 column 32, line 60 - column 33, line 39 -----	1-15
A	BERGSETH GRETHE ET AL: "An international serum standard for application in assays to detect human complement activation products", MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 56, no. 3, 17 June 2013 (2013-06-17), pages 232-239, XP028683649, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/J.MOLIMM.2013.05.221 the whole document, in particular page 233, right-hand column, third paragraph -----	1-15
X,P	BLOM ANNA M ET AL: "Antibodies reactive to cleaved sites in complement proteins enable highly specific measurement of soluble markers of complement activation", MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 66, no. 2, 18 March 2015 (2015-03-18), pages 164-170, XP029170616, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/J.MOLIMM.2015.02.029 the whole document, in particular page 166, left-hand column, third paragraph - right-hand column second paragraph and table 1 -----	1-15

Information on patent family members

PCT/EP2015/070526

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 オクロイ, マルシン セバスティアン

スウェーデン国 マルメ インガ マリエ ニルソンズ ストリート 53 ザ ウォーレンバー
グ ラボラトリー フロア 4

Fターム(参考) 4H045 AA11 DA76 EA50 FA71 GA26

专利名称(译)	对补体成分C4d特异的抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2017528472A	公开(公告)日	2017-09-28
申请号	JP2017513702	申请日	2015-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	EURO DIAGNOSTICA		
申请(专利权)人(译)	欧元 - 鹿INGÉ½锡卡安倍晋三		
[标]发明人	ブロムアンナ オクロイマルシンセバステイアン		
发明人	ブロム,アンナ オクロイ,マルシン セバステイアン		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 C07K7/06		
FI分类号	C07K16/18.ZNA G01N33/53.R C07K7/06		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/GA26		
优先权	2014184140 2014-09-09 EP 2015152765 2015-01-27 EP		
其他公开文献	JP6438573B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及医疗诊断和医疗设备及其应用领域。 本发明提供了特异性针对补体系统组分的抗体，从而允许改进的补体激活经典途径的测量。 特别地，本发明提供了用于检测补体激活的经典途径的激活的手段和方法。 特别地，本发明提供了用于检测样品中补体成分C4d的存在的手段和方法。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公 表 特 許 公 報 (A)	(11) 特許出願公表番号 特表2017-528472 (P2017-528472A)
		(43) 公表日 平成29年9月28日 (2017. 9. 28)
(51) Int. Cl.	F I	ターマコード (参考)
C O 7 K 16 / 18 (2006. 01)	C O 7 K 16 / 18	4 H O 4 5
G O 1 N 33 / 53 (2006. 01)	G O 1 N 33 / 53	
C O 7 K 7 / 06 (2006. 01)	C O 7 K 7 / 06	R
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)		
(21) 出願番号 特願2017-513702 (P2017-513702)	(71) 出願人 510129509	
(86) (22) 出願日 平成27年9月8日 (2015. 9. 8)	ユーロ-ディアグノスティカ アーバー	
(85) 翻訳文提出日 平成29年5月2日 (2017. 5. 2)	Euro-Diagnostica AB	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2015/070526	スウェーデン国 マルメー ビー、オー、ボ	
(87) 国際公開番号 W02016/038055	ックス S O 1 1 7 ユーロディアグノス	
(81) 国際公開日 平成28年3月17日 (2016. 3. 17)	ティカ アーバー	
(31) 優先権主張番号 14184140. 3	(74) 代理人 100075557	
(32) 優先日 平成26年9月9日 (2014. 9. 9)	弁理士 西教 圭一郎	
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	ブロム、アンナ	
(31) 優先権主張番号 15152765. 2	(72) 発明者 スウェーデン国 マルメー インガ マリエ	
(32) 優先日 平成27年1月27日 (2015. 1. 27)	ニルソンズ ストリート 53 ザウ	
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	ォレンバーク ラボラトリー フロア	
		4
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 補体成分 C 4 d に対して特異的な抗体、およびその使用		