

(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2016-519113**(P2016-519113A)**(43) 公表日 **平成28年6月30日 (2016.6.30)**

(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	4 B O 6 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 H O 4 5
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/53 U	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 1 1 A	
	G O 1 N 33/543 5 0 1 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-509446 (P2016-509446)	(71) 出願人	503259129
(86) (22) 出願日	平成26年4月23日 (2014.4.23)		ノルディック・バイオサイエンス・エー／エス
(85) 翻訳文提出日	平成27年12月21日 (2015.12.21)		N O R D I C B I O S C I E N C E A
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/058192		/ S
(87) 国際公開番号	W02014/173927		デンマーク国、デーカー 2730 ヘル
(87) 国際公開日	平成26年10月30日 (2014.10.30)		レフ、ヘルレフ・ホーフエデガーデ 20
(31) 優先権主張番号	1307387.9		7
(32) 優先日	平成25年4月24日 (2013.4.24)	(74) 代理人	100099623
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 奥山 尚一
		(74) 代理人	100096769
			弁理士 有原 幸一
		(74) 代理人	100107319
			弁理士 松島 鉄男
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 V I 型コラーゲン α 1 アッセイ

(57) 【要約】

V I 型コラーゲン α 1 の N 末端球状ドメイン内部アミノ酸配列 - A D W G Q S R D A E E A I S Q - (配列番号 1) に含まれるエピトープに結合する抗体、ならびに生体試料を前記抗体と接触させることおよび前記抗体の結合量を決定することによる、生体試料において、V I 型コラーゲン α 1 の N 末端球状ドメイン内部アミノ酸配列 - A D W G Q S R D A E E A I S Q - (配列番号 1) に含まれるエピトープを検出するためのイムノアッセイの方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

V I 型コラーゲン α 1 のエピトープに結合する抗体であって、前記エピトープが、N 末端球状ドメイン内部アミノ酸配列 - A D W G Q S R D A E E A I S Q - (配列番号 1) に含まれる、抗体。

【請求項 2】

モノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体、または抗体断片である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

ヒトまたは齧歯類 V I 型コラーゲン α 1 の N 末端球状ドメイン内部アミノ酸配列 - A D W G Q S R D A E E A I S Q - (配列番号 1) に含まれるエピトープに結合する、請求項 1 に記載の抗体。

10

【請求項 4】

生体試料中の、V I 型コラーゲン α 1 の N 末端球状ドメイン内部アミノ酸配列 - A D W G Q S R D A E E A I S Q - (配列番号 1) に含まれるエピトープを検出するためのイムノアッセイの方法であって、V I 型コラーゲン α 1 の前記 N 末端球状ドメイン内部アミノ酸配列 - A D W G Q S R D A E E A I S Q - (配列番号 1) に含まれる前記エピトープを含む生体試料を、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体と接触させるステップと、前記抗体の結合量を決定するステップとを含む、方法。

【請求項 5】

生体液中の、アミノ酸配列 A D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号 1) を含むインタクトな V I 型コラーゲン α 1 およびその断片の量を定量化するために使用される、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記生体液が、血清または血漿である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記イムノアッセイが、競合アッセイまたはサンドイッチアッセイである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記イムノアッセイが、ラジオイムノアッセイまたは酵素結合免疫吸着アッセイである、請求項 4 に記載の方法。

30

【請求項 9】

V I 型コラーゲン α 1 と関連する疾患の重症度を評価するために、前記方法によって決定された、アミノ酸配列 A D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号 1) を含むインタクトな V I 型コラーゲン α 1 およびその断片の量を、既知の疾患重症度の標準的な疾患試料と関連付けるステップをさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 10】

前記方法によって決定された、前記アミノ酸配列 A D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号 1) を含むインタクトな V I 型コラーゲン α 1 およびその断片の量を、MRI によって決定された筋肉体積と関連付けるステップをさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

40

【請求項 11】

生体試料中の、前記アミノ酸配列 A D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号 1) を含むインタクトな V I 型コラーゲン α 1 およびその断片の量を決定するためのアッセイキットであって、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体と、

- ストレプトアビジン被覆 96 ウェルプレート
- ビオチン化ペプチドであるビオチン - L - A D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号 2) (式中、L は、任意選択のリンカーである)
- サンドイッチイムノアッセイにおいて使用するための二次抗体
- 前記抗体に結合する、前記配列 A D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号 1) またはその一部分を含むキャリブレーターペプチド

50

- 抗体ビオチン化キット
- 抗体HRP標識キット
- 抗体放射性標識キット
- アッセイ可視化キット

のうちの少なくとも1つを含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、V I型コラーゲン α 1のエピトープに結合する抗体、ならびにV I型コラーゲン α 1を検出および定量化するためのイムノアッセイの方法におけるその使用に関する。

10

【背景技術】

【0002】

細胞外マトリックス(E C M)は、タンパク質の凝集体を形成する能力を有し、これにより細胞を互いに連結する三次元網目構造の動的な足場を形成する、超分子構造である。この足場が、プロテアーゼの上方調節および下方調節によって、細胞-マトリックス相互作用および細胞の運命を制御する[1]。E C Mは、様々な量および組合せの、コラーゲン、ラミニン、プロテオグリカン、および他の糖タンパク質からなり、これにより、プロテアーゼによって修飾されて特定の機能を有する足場を生成し、個々の組織の必要性を満たすことができる、様々な生体成分をもたらす[2]。

20

【0003】

<コラーゲン>

細胞外マトリックス中で最も存在量の多いタンパク質は、コラーゲンファミリーのメンバーである。コラーゲンは、細胞外足場形成に寄与する特徴的なフィブリル状構造を有するタンパク質の一群であり、すべての結合組織の主要な構造要素である。また、コラーゲンは事実上すべての実質器官の間質組織において見出され、組織および器官の安定性に寄与し、それらの構造的完全性を維持している。コラーゲンファミリーのすべてのメンバーは、三量体コラーゲン三重らせんの形成に関与する、プロリンに富むトリペプチドG l y - X - Yの繰返しを含むドメインを含有する。

【0004】

30

コラーゲンの分子構造、生合成、構築およびターンオーバーについての知識は、多くのヒト疾患と関連する病理学的過程を理解する上で重要である。様々なコラーゲン型の発現および機能の探求もまた、コラーゲン遺伝子の分子欠損に基づく疾患をよりよく理解することに貢献する。

【0005】

< V I型コラーゲン>

V I型コラーゲンは、短い三重らせンドメインと延在した球形末端とを有する3つの異なる α 鎖(α -1、 α -2、 α -3)からなる、ヘテロ三量体である[3][4]。細胞外マトリックス中への分泌後、V I型コラーゲンはフィラメントへと凝集し、骨を除く事実上すべての結合組織において、独立したマイクロフィブリル状ネットワークを形成する[5][6][7]。V I型コラーゲンフィブリルは、超微細構造レベルにおいて、微細フィラメント、マイクロフィブリルまたは110nm周期のかすかな横縞を有するセグメントのように見える[7]~[12]。対応するV I型コラーゲン遺伝子の欠損は、これまでに広範な先天性筋ジストロフィー表現型、とりわけ、限定されないが、ベスレムミオパチーおよびウールリッヒミオパチーと関連付けられているに過ぎないものの、このことは、筋肉組織における不可欠な役割を示している[13]。

40

【0006】

生体試料においてV I型コラーゲンの量を正確に定量化する方法は、V I型コラーゲンの病理、または筋肉量もしくは筋肉組織のターンオーバーなどのV I型コラーゲンのターンオーバーに影響を与える生理学的過程について、よりよく理解することを可能にし得る

50

。よって、そのような方法が明らかに求められている。

【 0 0 0 7 】

WO 2 0 1 3 / 0 1 1 0 5 6 は、生体液において V I 型を含むコラーゲンのネオエピトープを検出および定量化する方法、ならびにこれを使用して病態を評価する方法を開示している。

【 0 0 0 8 】

WO 2 0 1 0 / 1 1 5 7 4 9 は、イムノアッセイを実施して、V I 型コラーゲンに由来しうる、生体液試料中に天然に存在するネオエピトープ含有タンパク質断片を測定すること、および患者における前記測定値の正常レベルを超えた上昇を、線維症の存在または程度と関連付けることを含む、線維症を診断および定量化する方法を開示している。

10

【 0 0 0 9 】

EP 2 0 5 1 0 7 3 は、とりわけ V I 型コラーゲンを認識することができるモノクローナル抗体を含む、早期子宮頸部軟化の予測において有用なイムノアッセイの方法およびキットを開示している。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

本明細書に記載される発明は、V I 型コラーゲン α 1 の N 末端球状ドメイン内部アミノ酸配列 - A D W G Q S R D A E E A I S Q - 中のエピトープに対する抗体、ならびにアミノ酸配列 - A D W G Q S R D A E E A I S Q - (配列番号 1) を含むインタクトな V I 型コラーゲン α 1 およびその断片を検出およびそれらの量を定量化するためのイムノアッセイの方法に関する。

20

【 0 0 1 1 】

上記で引用された技術は、いずれも、特定のアミノ酸配列 A D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号 1) もしくはその部分配列、または前記配列および / もしくはその部分配列に特異的な抗体を開示していない。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 2 】

第 1 の態様では、本発明は、V I 型コラーゲン α 1 のエピトープに結合する抗体であって、前記エピトープが、N 末端球状ドメイン内部アミノ酸配列 - A D W G Q S R D A E E A I S Q - (配列番号 1) に含まれる、抗体に関する。

30

【 0 0 1 3 】

本発明の好ましい実施形態では、前記抗体は、V I 型コラーゲン α 1 の N 末端球状ドメイン内部アミノ酸配列 - A D W G Q S R D A E E A I S Q - (配列番号 1) に含まれるエピトープと特異的に反応する。

【 0 0 1 4 】

本発明の好ましい実施形態では、前記抗体は、モノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体、または抗体断片である。

【 0 0 1 5 】

本発明の好ましい実施形態では、前記抗体は、ヒトまたは齧歯類 V I 型コラーゲン α 1 の N 末端球状ドメイン内部アミノ酸配列 - A D W G Q S R D A E E A I S Q - (配列番号 1) に含まれるエピトープに結合する。

40

【 0 0 1 6 】

別の態様では、本発明は、生体試料において、V I 型コラーゲン α 1 の N 末端球状ドメイン内部アミノ酸配列 - A D W G Q S R D A E E A I S Q - (配列番号 1) に含まれるエピトープを検出するためのイムノアッセイの方法であって、V I 型コラーゲン α 1 の前記 N 末端球状ドメイン内部アミノ酸配列 - A D W G Q S R D A E E A I S Q - (配列番号 1) に含まれる前記エピトープを含む前記生体試料を、本発明の抗体と接触させるステップと、前記抗体の結合量を決定するステップとを含む、方法に関する。

【 0 0 1 7 】

50

本発明の好ましい実施形態では、前記イムノアッセイの方法は、生体液において、アミノ酸配列 A D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号 1) を含むインタクトな V I 型コラーゲン α 1 およびその断片の量を定量化するために使用され、前記生体液は、限定されないが、血清または血漿であってもよい。

【 0 0 1 8 】

本発明の好ましい実施形態では、前記イムノアッセイの方法は、限定されないが、競合アッセイまたはサンドイッチアッセイであってもよい。

【 0 0 1 9 】

本発明の好ましい実施形態では、前記イムノアッセイの方法は、限定されないが、ラジオイムノアッセイまたは酵素結合免疫吸着アッセイであってもよい。

10

【 0 0 2 0 】

本発明の好ましい実施形態では、前記イムノアッセイの方法は、V I 型コラーゲン α 1 と関連する疾患の重症度を評価するために、前記方法によって決定された、前記アミノ酸配列 A D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号 1) を含むインタクトな V I 型コラーゲン α 1 およびその断片の量を、既知の疾患重症度の標準的な疾患試料と関連付けるステップをさらに含む。

【 0 0 2 1 】

本発明の好ましい実施形態では、前記イムノアッセイの方法は、前記方法によって決定された、前記アミノ酸配列 A D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号 1) を含むインタクトな V I 型コラーゲン α 1 およびその断片の量を、MRI によって決定された筋肉体積と関連付けるステップをさらに含む。

20

【 0 0 2 2 】

別の態様では、本発明は、生体試料において、アミノ酸配列 A D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号 1) を含むインタクトな V I 型コラーゲン α 1 およびその断片の量を決定するためのアッセイキットであって、本明細書において記載される抗体と、

- ストレプトアビジン被覆 9 6 ウェルプレート
- ビオチン化ペプチドである、ビオチン - L - A D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号 2) (式中、L は、任意選択のリンカーである)
- サンドイッチイムノアッセイにおいて使用するための二次抗体
- 前記抗体に結合する、前記配列 A D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号 1) またはその一部分を含むキャリブレーターペプチド
- 抗体ビオチン化キット
- 抗体 H R P 標識キット
- 抗体放射性標識キット
- アッセイ可視化キット

30

のうちの少なくとも 1 つとを含む、キットに関する。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 3 】

< 定義 >

「I C 6」は、本明細書に記載される V I 型コラーゲン α 1 アッセイを、当技術分野において公知の V I 型コラーゲン α 1 アッセイと区別するために使用される。

40

【 0 0 2 4 】

「抗体」とは、本明細書において使用される場合、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、もしくは、F a b 断片、F (a b ')₂ 断片、F v 断片、もしくは s c F v 断片などの抗体断片、またはこれらのいずれかの化学的に修飾された誘導体を指す。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 5 】

【図 1】ヒト血清、ヒト血漿およびラット血清を使用した競合 E L I S A の、校正曲線および阻害を示す。

【図 2】4 パラメータ数学的フィッティング ($y = (A - D) / (1 + (x / C)^B) +$

50

D))モデルを使用してプロットされた、I C 6 E L I S A 較正曲線を示す。

【図3】M R I によって決定された筋肉体積に対してプロットされた、本明細書に記載されるI C 6 E L I S A によって決定されたV I 型コラーゲン α 1を示す。

【実施例】

【0026】

<材料および概説>

実験において使用したすべての試薬は、Merck (Whitehouse Station, NJ, USA) およびSigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) などの企業による、高水準の化学物質である。モノクローナル抗体の生成および検証のために使用した合成ペプチドは、1) 免疫原性ペプチド: A D W G Q S R D A E E A I S Q - G G C - K L H (スカシガイヘモシアニン) (配列番号3)、2) スクリーニングペプチド: ビオチン - A D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号2)、および3) 選択ペプチド: A D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号1)であった。すべての合成ペプチドは、Chinese Peptide Company, Beijing, China から購入したものである。

10

【0027】

[実施例1]

<モノクローナル抗体の生成>

抗原ペプチドアミノ酸配列を、コンセンサスV I 型コラーゲン α 1配列 (NP__001839) から生成した。これはN末端球状ドメインに対するものであり、他のヒトタンパク質に対する相同性を最小にするために、および免疫原性の最適化のために選択されたものである。得られたエピトープアミノ酸配列は、A D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号1)であった。200 μ l の乳化抗原と、スカシガイヘモシアニンにコンジュゲートされた50 μ g のV I 型コラーゲン α 1エピトープ配列A D W G Q S R D A E E A I S Q - G G C - K L H (配列番号3)とを用いて、4~5週齢B a l b / Cマウスを皮下免疫することにより、モノクローナル抗体の生成を惹起した。安定な血清力価レベルに達するまで、2週間ごとに免疫を繰り返した。血液試料を2回目の免疫時に採取した。それぞれの血液サンプリング時に、血清力価を決定し、最大の抗血清力価を有するマウスを融合のために選択した。4回目の免疫後、このマウスを1カ月間休息させ、次いで、細胞融合のための脾臓の摘出の3日前に、100 μ l の0.9%塩化ナトリウム溶液中の50 μ g のC O 6 - M M P ([14]に記載)を用いて、静脈内で追加免疫処理した。融合手順を、G e f t e r ら[15]によって記載されている通りに実施した。簡潔に述べると、マウス脾細胞を、S P 2 / 0 骨髓腫融合パートナー細胞と融合させた。半流動培地法を使用してハイブリドーマ細胞をクローニングし、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中に移し、C O 2 インキュベーター中でインキュベートした。標準的な限界希釈法を使用して、単クローン性の増殖を促進させた。上清を、ストレプトアビジン被覆プレートを使用した間接E L I S A において、キャリブレーターペプチドおよび天然の材料に対する反応性についてスクリーニングした。ビオチン - A D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号2)をスクリーニングペプチドとして使用し、同時に遊離ペプチドA D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号1)をキャリブレーターとして使用して、クローンのさらなる特異性について試験した。

20

30

40

【0028】

<クローンの特性評価>

ペプチドの本来の反応性および親和性を、ストレプトアビジン被覆マイクロタイタープレート上に対するビオチン化ペプチド被覆物および増殖中のモノクローナルハイブリドーマ細胞から得られた上清を使用した予備的なE L I S A において、ヒト血清、ヒト血漿およびラット血清などの異なる生体材料を使用して評価した。クローンの遊離ペプチド (A D W G Q S R D A E E A I S Q (配列番号1)) に対する特異性を試験した。C l o n o t y p i n g S y s t e m - H R P キット、カタログ番号5300-05 (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) を使用して、モノクロ

50

ーナル抗体のアイソタイピングを実施した。選別されたクローンを、製造業者の取扱説明書 (GE Healthcare Life Science、Little Chalfont、Buckinghamshire、UK) に従って、プロテインGカラムを使用して精製した。選別されたモノクローナル抗体を、製造業者 (Innovabioscience、Babraham、Cambridge、UK) の取扱説明書に従って、Lightning link HRP 標識キットを使用して、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) によって標識した。

【0029】

< クローンの選別 >

このサブタイプは、IgG1サブタイプであると決定された。ヒト血清、ヒト血漿およびラット血清に対して本来の反応性が見られた (図1)。競合ELISAのシグナルは、1:2から1:16までの希釈を使用して阻害された。天然の材料の希釈は、キャリブレーション曲線と同じ希釈パターンに概ね従った。

10

【0030】

[実施例 2]

IC6 酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)

< ELISA アッセイの構築 / 最適化 >

バッファの種類、被覆物濃度、抗体濃度およびインキュベーション条件を、標準的な方法を使用して最適化した。

【0031】

20

< IC6 ELISA プロトコール >

競合IC6 ELISA手順は、以下の通りであった。Roche、カタログ番号11940279による96ウェルストレプトアビジン被覆ELISAプレートを、6 ng / ml の被覆物バッファ (25 mM PBS - BTB、pH 7.4) 100 µl 中に溶解させたビオチン化ペプチド: ビオチン - ADWGQSRDAEEIAISQ (配列番号2) で被覆し、暗所において20 で30分間インキュベートし、続いて、洗浄バッファ (20 mM トリス、50 mM NaCl、pH 7.2) で洗浄した。その後、20 µl のペプチドキャリブレーションまたは試料を適当なウェルに添加した後、インキュベーションバッファ (25 mM PBS - BTB、pH 7.4) 中に190 ng / ml で溶解させた100 µl のHRPコンジュゲートモノクローナル抗体 (実施例1で記載されている) を添加した。プレートを4 で20時間インキュベートし、洗浄した。最後に、100 µl のテトラメチルベンジジン (tetramethylbenzidine) (TMB) (Kem-En-Tecカタログ番号: 4380H) を添加し、プレートを暗所において20 で15分間インキュベートし、100 µl の停止溶液 (1% H₂SO₄) を添加することによって反応を停止させた。プレートを、650 nmを参照として用い、450 nmにおいてELISAリーダーで分析した (Molecular Devices、SpectraMax M、CA、USA)。4パラメータ数学的フィッティング ($y = (A - D) / (1 + (x / C)^B) + D$) モデルを使用して、校正曲線をプロットした (図2)。

30

【0032】

40

< IC6 ELISA の技術的評価 >

プールされた血清試料および血漿試料の2倍希釈により、100%試料の回収の百分率として、直線性を計算した。ラット試料の場合は1:2 ~ 1:8の希釈範囲で、ヒト試料の場合は全範囲 (1:16の低さまで) にわたって、希釈回収率は100 +/- 20%以内であった (表1)。

【0033】

【表 1】

表1.IC6アッセイ希釈回収。希釈回収は、参照(無希釈)試料におけるシグナルに対して相対的な、希釈度を乗じたシグナルとして定義される。

	ラット 血清 (n=4)	ヒト 血清 (n=4)	EDTA- 血漿 (n=2)	クエン酸塩- 血漿 (n=2)	ヘパリン- 血漿 (n=2)
希釈係数	dRE%	dRE%	dRE%	sRE%	
無希釈	100	100	100	100	100
2x	77	90	81	84	88
4x	90	89	80	81	78
8x	103	103	82	87	86
16x	178	119	92	95	99

10

20

【0034】

検出下限 (LDL) を、最低水準 (ゼロ水準) の 21 の測定値から計算し、平均 + 3 × 標準偏差として計算した。アッセイについての低い方の LDL は、0.032 ng/mL であった。アッセイ間変動およびアッセイ内変動を、5つのQC試料による10回の独立した実験 (各実験は、試料について二重の測定値を与える、2回の同一の実験からなる) によって決定した。

【0035】

【表 2】

表2.それぞれ同じプレートまたは別個のプレート上における同じヒト対照試料についての10回の反復測定を使用して測定された、アッセイ内変動およびアッセイ間変動。

30

試料	濃度 (ng/ml)	アッセイ内変動 (%)	アッセイ間変動 (%)
HS1	0.76	15.34	14.80
HS2	1.83	14.30	10.15
HS3	1.94	10.71	8.68
HS4	2.48	9.56	8.86
HS5	2.40	11.20	11.18
HS6	2.64	10.23	12.33
HS7	3.09	8.79	13.11
HS8	4.97	8.30	14.92
平均	2.51	11.05	11.75

40

【0036】

50

アッセイ間変動およびアッセイ内変動は、それぞれ平均で 11.75% および 11.05% であった。各アッセイについて、校正のために、アミノ酸分析によって正確に定量化された合成ペプチドから調製された、マスターキャリブレーターを使用した。分析物安定性を、6つの血清試料（3つはラットで3つはヒト）に対して、10回の凍結解凍サイクルについて決定した。分析物の安定性は、4回の連続する凍結/解凍サイクルに対して、100 + / - 20% 以内で許容可能であることが見出された。

【0037】

[実施例 3]

< I C 6 E L I S A 対筋肉体積評価 >

10人の男性（表3）から血清試料を採取し、本明細書に記載された競合 I C 6 E L I S A を使用して、V I 型コラーゲン α 1 エピトープ濃度を決定した。

【0038】

【表 3】

表3-対象の統計情報

対象の統計情報	
	若年者
n	10
年齢	24.4 $\pm$ 0.5
身長	181.4 $\pm$ 1.8
体重	72.2 $\pm$ 2.3
BMI	22.1 $\pm$ 0.5
体脂肪率	24.5 $\pm$ 5.7
活性化レベル	5.0 $\pm$ 0.9

【0039】

M R I を使用して同じ 10 人の男性のそれぞれの筋肉体積を決定し、これらの結果を、上記で決定された、I C 6 E L I S A によって評価された V I 型コラーゲン α 1 エピトープ濃度に対してプロットした（図 3）。V I 型コラーゲン α 1 エピトープ濃度は、筋肉体積と統計的に有意な相関を示した（ $R^2 = 0.6523$ 、 $p = 0.0045$ ）。

【0040】

この明細書において、明示的に別の指示がなされない限り、「または」という単語は、述べられている条件のうち的一方のみを満たすことが必要とされる「排他的論理和」という演算子とは異なり、その条件のいずれかまたは両方を満たす場合に真値を返す演算子の意味で使用される。「含む（comprising）」という単語は、「からなる（consisting of）」を意味するのではなく、「含む（including）」の意味で使用される。上記で事実と認められたすべての先行する教示は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書において、いずれかの先行する公開文献を事実と認めることは、その教示が出願日においてオーストラリアまたは他の地域で技術常識であったことを認めるまたは表現していると解釈されるべきではない。

【0041】

[文献]

【表 4 A】

References

- [1] Bosman, F.T., and Stamenkovic, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol.* 2003;200:423-428. 10
- [2] Bruckner, P. Suprastructures of extracellular matrices: paradigms of functions controlled by aggregates rather than molecules. *Cell Tissue Res.* 2010;339:7-18.
- [3] D. Weil, M.-G. Mattei, E. Passage, N. Van Cong, D. Pribula-Conway, K. Mann, R. Deutzmann, R. Timpl, M.-L. Chu, Cloning and chromosomal localization of human genes encoding the three chains of type VI collagen, *Am. J. Hum. Genet.* 1988;42:435-445. 20
- [4] M.-L. Chu, K.-H. Mann, R. Deutzmann, D. Pribula-Conway, C.C. Hsu-Chen, M.P. Bernard, R. Timpl, Characterization of three constituent chains of collagen type VI by peptide sequences and cDNA clones, *Eur. J. Biochem.* 1987;168:309- 317. 30
- [5] H. von der Mark, M. Aumailley, G. Wick, R. Fleischmajer, R. Timpl, Immunocytochemistry, genuine size and tissue localization of collagen VI, *Eur. J. Biochem.* 1984;142:493-502. 40
- [6] R. Timpl, M.-L. Chu, Microfibrillar collagen type VI, in: P.D. Yurchenco, D. Birk, R.P. Mecham (Eds.), *Extracellular Matrix Assembly and Structure*, Academic Press, Orlando, 1994; pp. 207-242.

【表 4 B】

- [7] D.R. Keene, E. Engvall, R. Glanville, Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network, *J. Cell Biol.* 1988;107:1995-2006.
- [8] J. Engel, H. Furthmayr, E. Obermatt, H. von der Mark, M. Aumailley, R. Fleischmajer, R. Timpl, Structure and macromolecular organization of type VI collagen, *Ann. N.Y. Acad Sci.* 1985;460:25-37. 10
- [9] C.A. Poole, S. Ayad, R.T. Gilbert, Chondrons from articular cartilage-V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy, *J. Cell. Sci.* 1992;103:1101-1110. 20
- [10] R.R. Bruns, Beaded filaments and long-spacing fibrils: relation to type VI collagen, *J. Ultrastruct. Res.* 1984;89:136-146. 30
- [11] R.R. Bruns, W. Press, E. Engvall, R. Timpl, J. Gross, Type VI collagen in extracellular, 100-nm periodic filaments and fibrils: identification by immunoelectron microscopy, *J. Cell Biol.* 1986;103:393-404.
- [12] M.-C. Ronzie`re, S. Ricard-blum, J. Tiollier, D.J. Hartmann, R. Garrone, D. Herbage, Comparative analysis of collagens solubilized from human foetal, and normal and osteoarthritic adult articular cartilage, with emphasis on type VI collagen, *Biochim. Biophys. Acta* 1990;1038:222-230. 40

【表 4 C】

[13] Bönemann CG. The collagen VI-related myopathies: muscle meets its matrix. Nat Rev Neurol 2011;7:379-90.

[14] Veidal SS, Karsdal MA, Vassiliadis E, Nawrocki A, Larsen MR, Nguyen QHT, et al. MMP mediated degradation of type VI collagen is highly associated with liver fibrosis--identification and validation of a novel biochemical marker assay. PLoS ONE 2011;6:e24753.

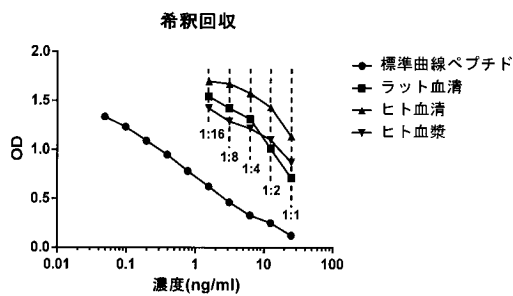
10

[15] Gefter ML, Margulies DH, Scharff MD. A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. Somatic Cell Genet. 1977;3:231-6.

20

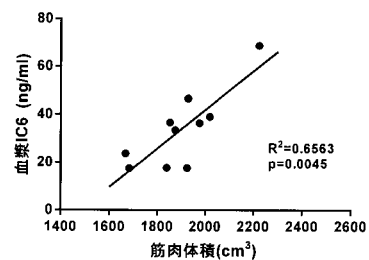
【図 1】

図1



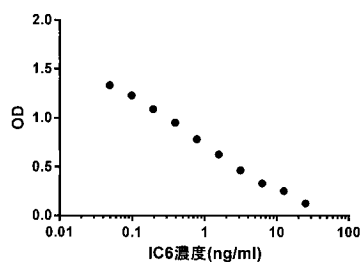
【図 3】

図3



【図 2】

図2



【配列表】

2016519113000001.app

【 国 際 調 査 報 告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2014/058192

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☒

in the international application as filed

☐

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/058192

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/18 G01N33/577 G01N33/68
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 G01N

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, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	NEDERGAARD ANDERS ET AL: "Type VI collagen turnover-related peptides-novel serological biomarkers of muscle mass and anabolic response to loading in young men.", JOURNAL OF CACHEXIA, SARCOPENIA AND MUSCLE DEC 2013, vol. 4, no. 4, December 2013 (2013-12), pages 267-275, XP002726604, ISSN: 2190-5991 the whole document, in particular supplementary material of the online version ----- -/--	1-11

☒ 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

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 July 2014

Date of mailing of the international search report

21/07/2014

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/EP2014/058192

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/129408 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; ZHANG HUI [US]; TIAN YUAN [US]; CHAN DANIEL W) 27 September 2012 (2012-09-27) page 7, line 9 - line 15 page 13, line 11 - page 14, line 3 page 22, line 5 - page 23, line 8 figures 6 and 7, in particular figure sheets 18/66 and 29/66 -----	1-9,11
A	VEIDAL SANNE SKOVGARD ET AL: "MMP Mediated Degradation of Type VI Collagen Is Highly Associated with Liver Fibrosis - Identification and Validation of a Novel Biochemical Marker Assay", PLOS ONE, vol. 6, no. 9, September 2011 (2011-09), pages 1-9, XP002726605, DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0024753 the whole document -----	1-11
A	NEDERGAARD ANDERS ET AL: "Serological muscle loss biomarkers: an overview of current concepts and future possibilities.", JOURNAL OF CACHEXIA, SARCOPENIA AND MUSCLE MAR 2013, vol. 4, no. 1, March 2013 (2013-03), pages 1-17, XP002726606, ISSN: 2190-5991 the whole document, in particular table 3, page 11, right-hand column - page 12, left-hand column, first paragraph and conclusion -----	1-11
A	WO 2013/011056 A2 (NORDIC BIOSCIENCE AS [DK]; VEIDAL SANNE S [DK]; KARSDAL MORTEN A [DK];) 24 January 2013 (2013-01-24) cited in the application page 1, line 1 - line 14 page 4, line 10 - page 7, line 5 page 21, line 13 - line 16 page 24, line 5 - page 25, line 2 page 39, line 19 - page 40, line 19 page 51, line 6 - page 53, line 28 claims 1-8; examples 1-9 -----	1-11
A	WO 2010/115749 A2 (NORDIC BIOSCIENCE AS [DK]; VEIDAL SANNE S [DK]; KARSDAL MORTEN A [DK];) 14 October 2010 (2010-10-14) cited in the application the whole document, in particular page 45, table 15b and claim 18 -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/058192

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012129408 A2	27-09-2012	US 2014106369 A1 WO 2012129408 A2	17-04-2014 27-09-2012
WO 2013011056 A2	24-01-2013	EP 2734542 A2 US 2012045781 A1 WO 2013011056 A2	28-05-2014 23-02-2012 24-01-2013
WO 2010115749 A2	14-10-2010	CN 103238071 A EP 2414844 A2 JP 2012522233 A KR 20110137823 A US 2010209940 A1 WO 2010115749 A2	07-08-2013 08-02-2012 20-09-2012 23-12-2011 19-08-2010 14-10-2010

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 P 21/08

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,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,LT,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

(74)代理人 100114591

弁理士 河村 英文

(74)代理人 100125380

弁理士 中村 綾子

(74)代理人 100142996

弁理士 森本 聡二

(74)代理人 100166268

弁理士 田中 祐

(74)代理人 100170379

弁理士 徳本 浩一

(74)代理人 100179154

弁理士 児玉 真衣

(74)代理人 100180231

弁理士 水島 亜希子

(74)代理人 100184424

弁理士 増屋 徹

(72)発明者 レーミング, ディアーナ・ジュリー

デンマーク国, 3 0 6 0 エスパゲア, ガメル・ストランヴァイ 2 0 9 D, 1 . S a l

(72)発明者 ネデルゴー, アンデシュ

デンマーク国, 2 2 0 0 コペンハーゲン エヌ, ナンナゲーゼ 1, 1

(72)発明者 カルスダル, モルテン

デンマーク国, 2 1 0 0 コペンハーゲン オー・スラッシュ, エッケルスベリリスゲーゼ 1 3

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA20 DA13

4H045 AA11 CA40 DA76 EA50 FA72 GA26

专利名称(译)	VI型胶原α1測定		
公开(公告)号	JP2016519113A	公开(公告)日	2016-06-30
申请号	JP2016509446	申请日	2014-04-23
申请(专利权)人(译)	北欧生物科学ER / ES		
[标]发明人	レーミングディアーナジュリー ネデルゴーアンデシュ カルスダルモルテン		
发明人	レーミング,ディアーナ・ジュリー ネデルゴー,アンデシュ カルスダル,モルテン		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 G01N33/543 C12P21/08		
CPC分类号	G01N33/6887 C07K16/18 C07K2317/34 G01N2333/78		
FI分类号	C07K16/18 G01N33/53.D G01N33/53.U G01N33/543.511.A G01N33/543.501.A C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA26		
代理人(译)	河村 英文 中村綾子 田中宇 徳本光一		
優先权	2013007387 2013-04-24 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

抗体とVI型胶原α1-ADWGQSRDAEEAISQ- (SEQ ID NO : 1) のN端球状结构域内部氨基酸序列中包含の表位結合，并通过使生物学样品与抗体接触并确定抗体的结合量 一种用于检测生物样品中VI型胶原α1-ADWGQSRDAEEAISQ- (SEQ ID NO : 1) のN末端球状结构域の氨基酸序列内の氨基酸表位の免疫測定方法。

(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2016-519113 (P2016-519113A) (43) 公表日 平成28年6月30日 (2016. 6. 30)
(51) Int. Cl.	FI	テーマコード (参考)	
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4B064	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	D 4H045	
G01N 33/543 (2006.01)	G01N 33/53	U	
C12P 21/08 (2006.01)	G01N 33/543	511A	
	G01N 33/543	501A	
	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	(全 18 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2016-509446 (P2016-509446)	(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、デーカー 2730 ヘル レフ、ヘルレフ・ホフエテガーデ 207
(86) (22) 出願日	平成26年4月23日 (2014. 4. 23)	(74) 代理人	10009623 弁理士 奥山 尚一
(86) 翻訳文提出日	平成27年12月21日 (2015. 12. 21)	(74) 代理人	100096769 弁理士 有原 幸一
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/058192	(74) 代理人	100107319 弁理士 松島 鉄男
(87) 国際公開番号	W02014/173927		
(87) 国際公開日	平成26年10月30日 (2014. 10. 30)		
(31) 優先権主張番号	1307387.9		
(32) 優先日	平成25年4月24日 (2013. 4. 24)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

(54) 【発明の名称】 VI型コラーゲンα1アッセイ

最終頁に続く