

(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2021-526639

(P2021-526639A)

(43) 公表日 令和3年10月7日(2021.10.7)

| (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 R | 4 B O 6 4 |
| CO 7 K 16/18 (2006.01) | CO 7 K 16/18 Z N A | 4 H O 4 5 |
| C 1 2 N 15/13 (2006.01) | C 1 2 N 15/13 | |
| GO 1 N 33/543 (2006.01) | GO 1 N 33/543 5 5 5 A | |
| C 1 2 P 21/08 (2006.01) | C 1 2 P 21/08 | |

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2020-567212 (P2020-567212)
 (86) (22) 出願日 令和1年6月5日 (2019.6.5)
 (85) 翻訳文提出日 令和3年2月1日 (2021.2.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2019/064620
 (87) 国際公開番号 W02019/234087
 (87) 国際公開日 令和1年12月12日 (2019.12.12)
 (31) 優先権主張番号 18176524.9
 (32) 優先日 平成30年6月7日 (2018.6.7)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 519113192
 スワール ライフ サイエンス エービー
 スウェーデン国 202 11 マルメ、
 ボックス 50117
 (74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所
 (72) 発明者 ウィット、リスベス
 スウェーデン王国、マルメ、ルンダペーゲ
 ン 151、ユーロ - ダイアグノステ
 イカ アクチエボラグ 気付
 (72) 発明者 ソマーリン、イングビ
 スウェーデン王国、マルメ、ルンダペーゲ
 ン 151、ユーロ - ダイアグノステ
 イカ アクチエボラグ 気付

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 補体C4dアッセイ

(57) 【要約】

本発明は、新規の抗体、ならびにC4dを決定および検出する改善された方法におけるそれらの使用に関する。

【選択図】 図2

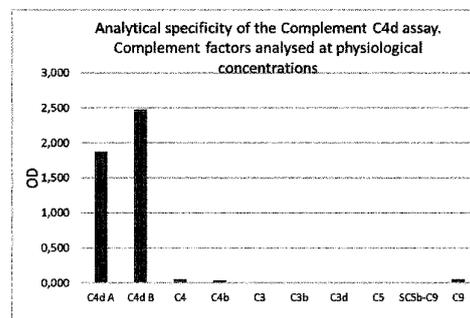


Fig. 2

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) 配列番号 1 で示される配列と少なくとも 70% の配列同一性 (配列番号 1 に、例えば少なくとも約 75% の配列同一性、例えば少なくとも約 80% の配列同一性、例えば少なくとも約 85% の配列同一性、例えば少なくとも約 90% の配列同一性、例えば少なくとも約 95% の配列同一性、例えば少なくとも約 98% の配列同一性、例えば少なくとも約 99% の配列同一性) を有する配列を含むポリペプチド配列、または配列番号 1 に同一のアミノ酸配列を認識しそれへ結合することが可能な抗体、

(b) 図 3 に示される A 鎖と B 鎖 (すなわち配列番号 2 および / または配列番号 3) との間で保存されるポリペプチドまたはその断片を認識しそれらへ結合することが可能である抗体、
を含む、組成物またはキット。

10

【請求項 2】

(b) における前記抗体が配列番号 1 を認識しないかまたはそれへ結合しない、請求項 1 に記載の組成物またはキット。

【請求項 3】

(b) における前記抗体が、図 3 (すなわち配列番号 2 および / または配列番号 3) に示される、前記保存された領域 / アミノ酸配列のうちの少なくとも 4 残基 (例えば少なくとも 5 残基等、例えば少なくとも 6 残基等、例えば少なくとも 7 残基等、例えば少なくとも 8 残基等、例えば少なくとも 9 残基等、例えば少なくとも 10 残基等) のアミノ酸配列を認識することが可能な、請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載の組成物またはキット。

20

【請求項 4】

(b) における前記抗体によって認識される前記アミノ酸残基が、必ずしも連続していない、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物またはキット。

【請求項 5】

前記抗体が、哺乳動物または非哺乳動物の起源である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物またはキット。

【請求項 6】

前記抗体が、ヒト、鳥類またはマウスの起源である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物またはキット。

30

【請求項 7】

前記抗体が、モノクローナルまたはポリクローナルである、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物またはキット。

【請求項 8】

(b) における前記抗体は、任意選択で酵素へコンジュゲートされる、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物またはキット。

【請求項 9】

任意選択で、請求項 1 (b) ~ 8 のいずれか 1 項に記載の前記抗体の Fc 領域へ結合することが可能な二次抗体をさらに含み、前記二次抗体が、酵素へコンジュゲートされる、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物またはキット。

40

【請求項 10】

前記抗体へコンジュゲートされた前記酵素によって消化することが可能な基質をさらに含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の組成物またはキット。

【請求項 11】

前記基質が、前記酵素によって消化された後に任意の好適な手段 (例えば発色手段または蛍光手段) によって、検出を可能にする、先行請求項のいずれか 1 項に記載の組成物またはキット。

【請求項 12】

診断方法における、あるいは疾患および / または病態の診断のための、あるいは補体系活性化の測定および / または薬物もしくは薬物候補のスクリーニングのための、請求項 1

50

～ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物またはキットの使用。

【請求項 13】

前記疾患または病態が、癌または自己免疫の疾患若しくは病態である、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】

前記疾患または病態が、SLE（血清レベル、血小板および赤血球上での沈着）、NSCLC（非小細胞肺癌）（血漿および気管支肺胞上皮のレベル）、抗体媒介性移植拒絶（移植の生検での予測）、血栓性微小血管症、狼瘡性腎炎、ヒト白血病 T 細胞ウイルス（HLTV）に起因する脊髄症である、請求項 12～13 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 15】

生物学的サンプル中の C4d のレベルを測定する方法であって、

(i) 生物学的サンプルを準備し、

(ii) (i) における前記生物学的サンプルを請求項 1(a) および請求項 5～7 のいずれか 1 項に記載の抗体に接触させ、ここで、請求項 1(a) および請求項 5～7 のいずれか 1 項に記載の抗体は、任意選択で固体支持体へ結合され、

(iii) 請求項 1(b)～8 のいずれか 1 項に記載の抗体を (ii) において得られた前記サンプルへ添加し、

(iv) 請求項 1(b)～8 のいずれか 1 項に記載の抗体の Fc 領域へ結合することが可能な二次抗体を、任意選択で、(iii) において得られた前記サンプルへ添加し、ここで、前記二次抗体は酵素へコンジュゲートされており、

(v) 前記二次抗体へコンジュゲートされた前記酵素によって消化されることが可能な基質を (iv) において得られた前記サンプルへ添加し、

(vi) 消化された前記基質のアウトプットを測定することを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の分野は、医療診断および他の医療ツール、並びにその使用である。より具体的には、本発明は、古典的補体経路の活性化の測定を改善する、補体系の成分に対して特異的な抗体を提供する。さらにより具体的には、本発明は、古典的経路およびレクチン経路の活性化を測定するための手段および方法を提供する。さらに、本発明は、生物学的サンプル中の補体成分 C4d 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、炎症の際に互いに反応して宿主の防御を支援する、多数の血漿タンパク質からなる。この活性は、抗体の活性を補足すると言われ、それ故この名称がつけられている。補体系は、解剖学的障壁、食細胞、およびケモカイン（すなわち即時型応答を提供するが持続的な免疫を与えない系）と共に、非特異的免疫系の一部である。補体が先天性免疫応答と適応的免疫応答との間の機能的な懸け橋であるということが、現在知られている。

【0003】

補体系は、血液中で見出される多数のタンパク質からなり、概して肝臓および食細胞によって合成され、通常は不活性な前駆体（プロタンパク質）として循環する。複数のトリガーの 1 つによって刺激されると、系中のプロテアーゼは、特異的補体タンパク質を切断し、活性化タンパク質であるアナフィラトキシンとし、さらなる切断の増幅カスケードを開始する。この活性化カスケードの最終結果は、細胞殺傷性の膜侵襲複合体の応答および活性化の大規模な増幅である。30 を超えるタンパク質およびタンパク質断片が補体系を作り上げ、血液および細胞膜受容体中で高濃度で見出される可溶性タンパク質が含まれる。それらは血液血清のグロブリン分画の約 5% を占め、オプソニンに寄与し得る。

【0004】

10

20

30

40

50

補体系を構成するタンパク質は主として肝細胞によって合成される。かなりの量が、組織マクロファージ、血中単球、ならびに尿生殖路および胃腸管の上皮細胞によっても産生される。

【0005】

補体系は、3つの生化学プロセス：古典的経路、代替経路、およびレクチン経路によって開始され得る。

【0006】

活性化の3つの経路はすべて類似したタンパク質溶解性C3転化酵素を生成し、共通の末端経路は膜侵襲の形成をもたらす。古典的補体経路は典型的には、活性化のために抗原：抗体複合体（免疫複合体）を要求するが、代替経路およびマンノース結合レクチン経路は、抗体の存在無しに、それぞれ自然発生性C3加水分解または炭水化物によって活性化され得る。3つのすべての経路において、C3転化酵素は成分C3を切断し活性化し、C3aおよびC3bを生成し、さらなる切断および活性化事象のカスケードを引き起こす。

10

【0007】

古典的経路は、C1複合体の活性化がきっかけとなって起きる。C1複合体は、1分子のC1q、2分子のC1r、および2分子のC1s（すなわち $C1qr^2s^2$ ）から構成される。C1qが、抗原と複合体化したIgMまたはIgGへ結合すると、C1複合体が活性化される。単一のIgMは経路を開始することができる一方で、IgGは複数必要である。C1qが病原体の表面へ直接結合する場合にも、これが起こる。かかる結合はC1q分子の立体配座的变化を導き、それは2つのC1r分子の活性化を導く。C1rはセリンプロテアーゼである。活性化されたC1rは、C1s（別のセリンプロテアーゼ）を切断する。C1r²s²成分は、ここでC4、次いでC2を切断し、C4a、C4b、C2a、およびC2bを産生する。C4bおよびC2aは結合して古典的経路のC3転化酵素（C4b2a複合体）を形成し、これはC3を切断してC3aおよびC3bとすることを増進し、C3bは後にC4b2a（C3転化酵素）と連結してC5転化酵素（C4b2a3b複合体）を生じさせる。

20

【0008】

次いで古典的経路の活性化の間に形成されたC4bは、セリンプロテアーゼ第I因子によって急速に分解され、それは、C4b結合タンパク質等のコファクターの存在下においてC4dを生成する。C4および下流のプロセスは古典的経路とレクチン経路との間で共有される。古典的経路は通常レクチン経路よりも頻繁に起きるので、C4dは、古典的経路、特に自己免疫疾患のマーカーとして理想的であることが証明された。最近、全身の血液中のC4dは、肺癌の診断および予後のマーカーとして記載された。それは、全身性紅斑性狼瘡（SLE）および抗体媒介性移植拒絶のマーカーとして広く使用されている。大部分のC4dは細胞の表面へ結合されたままであり、それは元々古典的補体経路を活性化していたが、ある部分は放出され、血液中を検出可能である。

30

【0009】

C4dの役割およびいくつかの疾患の根底にある古典的経路活性化を研究および理解するために、C4dについて特異的な試薬（典型的には抗体）についての当技術分野における必要性がある。本出願はその必要性に対処する。

40

【発明の概要】

【0010】

一態様において、本発明は、C4dへ特異的に結合することが可能な抗体（抗C4d）に関する。抗体は、好適な酵素（例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（ALP）、ウレアーゼ、または当技術分野において公知の任意の他の好適な酵素等）とコンジュゲートされてもコンジュゲートされなくてもよい。

【0011】

抗体は、任意の起源（例えば哺乳動物等、例えばヒトまたはマウスなど等）であり得る。別の態様において、抗体は、鳥類のものであり得る。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。抗体は、好適にはC4dの両方のアレル変異体（すなわちC4

50

dのA鎖およびB鎖)へ結合する。任意のホモ接合体の対象を取り扱うため、および主な集団中の分析感度を増加させるために、これらの抗体は、C4dの両方のアレルアイソフォームを結合するように選択される。

【0012】

詳細には、本発明は、新しく形成され曝露されたタンパク質分解産物のC末端を認識することが可能であるが、インタクトまたは未消化のタンパク質形態で存在するアミノ酸の同じ配列を認識することまたはそれらへ結合することはできない、ネオエピトープ結合抗体に関する。それゆえ、これらの抗体は抗C4d-neoと表わされ得る。

【0013】

本発明に記載の抗体は、任意の起源(例えば哺乳動物、例えばヒト、マウス等、または鳥類等の起源など)であり得る。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。上で記載された抗体は捕捉抗体として記載され得、モノクローナル抗体の事例において、これらは捕捉mAbと表わされ得る。

【0014】

さらに、本発明の一態様において、本発明は、組換えヒトC4dにも関する。組換えヒトC4dは、好適には、上で言及される抗体を使用してアッセイを遂行する場合に基準および/または対照として使用される。

【0015】

さらなる態様において、本発明は、C4dの定量化のためのアッセイに関する。定量化は、本明細書において言及される抗体ならびに基準および/または対照としての組換えヒトC4dを用いることによって遂行され得る。

【0016】

アッセイは、C4dがバイオマーカーとして作用することが可能な任意の好適な目的のために使用され得る。C4dレベルの増加は多くの病理学的状態と関連し、例えばSLE(血清レベル、血小板および赤血球上での沈着)、NSCLC(非小細胞肺癌)(血漿および気管支肺胞上皮のレベル)、抗体媒介性移植拒絶(移植の生検中での予測)、血栓性微小血管症、狼瘡性腎炎、ヒト白血病T細胞ウイルス(HLV)に起因する脊髄症など等である。概して、C4dは様々な腫瘍および自己免疫疾患と関連する。

【0017】

本明細書において記載される本発明の他の適用は、例えば組織学的な目的のためでもあり得る。かかる適用において、本発明に記載の抗体は、フルオロフォアまたは他の実体へコンジュゲートされなくてもよい。かかる結合抗体を検出するために、さらなる抗体(検出抗体)が添加され、本発明に記載の抗体のFc領域へ結合することが可能であり、検出抗体は本明細書において規定されるような酵素へコンジュゲートされ、検出はコンジュゲートされた酵素によって消化可能な基質の添加によって可能となる。別の例において、本発明に記載の抗体は、酵素へ直接コンジュゲートされ得、検出は本明細書において記載される標準的なELISA技法に従って行われる。

【0018】

一態様において、可溶性のC4dおよび/または本発明は、表面へ結合された(例えば細胞表面上に結合された等)C4dの両方に関する。特定の態様において、本発明は、可溶性C4dに関する。

【0019】

別の態様において、本発明は、診断方法における、または組織学的な目的のための、本明細書において記載される1つまたは複数の抗体の使用に関する。

【0020】

なおさらなる方法において、本発明は、キットまたはキットのパーツにおける、本明細書において記載される1つまたは複数の抗体の使用に関する。

【0021】

別の態様において、本発明は、C4dの定量化のための、本明細書において記載される1つまたは複数の抗体の使用に関する。

10

20

30

40

50

【0022】

なおさらなる態様において、本発明は、容器が本明細書において記載される抗体のうちの1つまたは複数によりコーティングされた表面を有するような1つまたは複数の前記容器を含む、キットまたはキットのパーツに関する。

【0023】

本発明に記載のキット中に存在する1つまたは複数の抗体は、互いから独立して好適な酵素（例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（ALP）、ウレアーゼ、当技術分野において公知の他の好適な酵素等）とコンジュゲートされ得る。抗体へコンジュゲートされ得る他の実体は、例えば他の酵素、放射性元素、またはフルオロフォアである。酵素のさらなる非限定例は、 α -ガラクトシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼおよびカタラーゼならびに同種のものであり得る。

10

【0024】

さらに、キットは、好適な基準および/または対照を含み得る。基準および/または対照は、ヒトC4d（例えば組換えヒトC4d等）であり得る。

【0025】

キットは、追加でおよび随意に、好適な基質を含み得る。基質は、コンジュゲートされた酵素が基質を消化することが可能なように考案された任意の基質であり得る。基質は、いったん基質が酵素によって消化されたならば、検出が任意の好適な手段によって可能になり、その結果としてC4dの定量化が可能になるような、実体を少なくとも含む。

20

【0026】

本発明は、C4dの量を決定する方法にも関する。

【0027】

具体的には、生物学的サンプル中のC4dの量を決定する方法は、本明細書において記載され以下に詳述される1つまたは複数の抗体の使用を含み得る。典型的には、本発明に記載の方法は、本出願のテキスト中で詳述される様々なキットまたはキットのパーツを用い得る。

【0028】

方法は、好適な対照の使用を含み得る。対照または内部基準として、例えばC4dそれ自体が使用され得る。好ましくは、対照または内部基準として使用されるC4dはヒトであり、さらにより好ましくは、ヒトC4dは組換えである。

30

【0029】

キットは、任意選択で停止溶液または停止剤をさらに含み得る。停止溶液の意図される使用は、アッセイにおいて使用される反応を停止することである。停止溶液の使用により、シグナルの読み取り/検出を直接遂行すること、または、読み取りに直接専念する必要性を省き、停止溶液が添加されるまでかかる行為を延期することのいずれかが、使用者に可能となる。この節中で言及されるように、停止溶液は、随意であり、使用される基質に依存する。いくつかの事例において、停止溶液はまとめて分注され得る。1つの非限定的な停止溶液または停止剤は、例えば硫酸であり得る。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】本発明に記載のアッセイセットアップの1つの例を図示し、より詳細には直接サンドイッチELISAを例示する。旗は、酵素、フルオロフォア、または放射性元素であり得るレポーターを表わす。

40

【図2】本生理的濃度でのC4、C4b、C3、C3b、C3d、C5、SC5b-C9、またはC9への交差反応性無しで、補体因子C4dに対する特異性を提示する、発明に記載の補体C4dアッセイを例示する。本発明による例示されたアッセイは、C4dタンパク質のAおよびBの変異体の両方に結合し、高い分析感度をもたらす。

【図3】アミノ酸残基957~1336からの切断されたC4dのアミノ酸配列の一部分を図示し、ペアで図示される両方の対立遺伝子タイプ（AタイプおよびBタイプ）を示す。ネオエピトープはC末端に見られ、太字スタイルのみでマークされる。可変領域/アミ

50

ノ酸は、太字且つ下線のスタイルでマークされる。Aタイプは配列番号2で参照され、Bタイプは配列番号3で参照される。

【発明を実施するための形態】

【0031】

本発明は、C4dへの結合におけるより高い特異性、およびノまたは生物学的サンプル中のC4dの定量におけるより高い感度を提供する。西欧諸国中の集団の約30%がC4dのAまたはBバリエーションのいずれかのみを有していると推定される。したがって、本発明は、両方のバリエーションが検出可能であるということにおいて、先行技術方法の主要な改善を示す。

【0032】

一態様において、本発明は、NVTLSSTGR（配列番号1）を含むアミノ酸配列を含むエピトープおよび特にネオエピトープに関する。さらに、本発明は、配列番号1で示される配列と少なくとも70%の配列同一性（配列番号1に、例えば少なくとも約75%の配列同一性、例えば少なくとも約80%の配列同一性、例えば少なくとも約85%の配列同一性、例えば少なくとも約90%の配列同一性、例えば少なくとも約95%の配列同一性、例えば少なくとも約98%の配列同一性、例えば少なくとも約99%の配列同一性）のある配列を含むアミノ酸配列、または配列番号1に同一のアミノ酸配列にも関する。一態様において、本発明は、ペプチド配列の配列番号1を含むかもしくはそれからなるネオエピトープ配列、または配列番号1に少なくとも約90%の配列同一性（例えば少なくとも約95%の配列同一性、例えば少なくとも約96%の配列同一性、例えば少なくとも約97%の配列同一性、例えば少なくとも約99%の配列同一性）を有するペプチド配列に関する。

【0033】

別の態様において、本発明は、C4dへ特異的に結合することが可能な抗体（抗C4d）に関する。具体的には、抗体は、配列NVTLSSTGR（配列番号1）を含むアミノ酸を認識しそれへ結合することが可能である。したがって、本発明に記載の抗体は、配列番号1、または配列番号1で示される配列と少なくとも70%の配列同一性（配列番号1に、例えば少なくとも約75%の配列同一性、例えば少なくとも約80%の配列同一性、例えば少なくとも約85%の配列同一性、例えば少なくとも約90%の配列同一性、例えば少なくとも約95%の配列同一性、例えば少なくとも約98%の配列同一性、例えば少なくとも約99%の配列同一性）のある配列、または配列番号1に同一のアミノ酸配列を認識することが可能である。

【0034】

上で言及されるように、本発明に記載の抗体は、ネオエピトープへ結合しそれを認識することが可能であるが、配列番号1を含む切断されていないアミノ酸配列であって、配列番号1が埋め込まれ、したがってペプチド配列のC末端ではない、アミノ酸配列を認識しない。したがって、ネオエピトープはC末端であり、配列番号1がペプチド配列のC末端のアミノ酸配列であることが意図される。違ったやり方で表現すると、配列NVTLSSTGRは、したがって当該配列であっても配列の一部であってもよく、当該配列はC末端であり、したがって配列はNVTLSSTGR（-COOH）であり得る。

【0035】

本発明による抗C4d抗体は、任意の起源（例えば任意の動物またはヒトの起源等）であり得る。好ましくは、抗体はヒト起源である。抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであり得る。好ましくは、抗体はモノクローナルであり、さらにより好ましくは抗体はモノクローナルヒト抗体であり得る。別の実施形態において、抗体はマウス起源であり得、具体的には例えばマウス抗体であり得る。さらなる実施形態において、抗体は鳥類起源であり得る。

【0036】

本発明のさらなる態様において、本発明の抗体は、天然起源または非天然起源であってもなくてもよい。それらが任意の天然の生物体において存在しないという意味で、抗体は

10

20

30

40

50

人工であり得る。

【0037】

上で言及されるように、本発明は、C4dの両方のアレルアイソフォーム（すなわちC4dのA鎖およびB鎖の両方）へ特異的に結合することが可能な抗体にも関する。

【0038】

したがって一態様において、本発明は、配列番号1、または配列番号1で示される配列と少なくとも70%の配列同一性、（配列番号1に、例えば少なくとも約75%の配列同一性、例えば少なくとも約80%の配列同一性、例えば少なくとも約85%の配列同一性、例えば少なくとも約90%の配列同一性、例えば少なくとも約95%の配列同一性、例えば少なくとも約96%の配列同一性、例えば少なくとも約97%の配列同一性、例えば少なくとも約98%の配列同一性、例えば少なくとも約99%の配列同一性）のある配列、または配列番号1に同一のアミノ酸配列を認識することが可能な抗体、およびC4dの両方のアレルアイソフォーム（すなわちC4dのA鎖およびB鎖の両方）を認識しそれらへ特異的に結合することが可能な異なる抗体に関する。

10

【0039】

C4dの両方のアレルアイソフォームへ結合することが可能な抗体は、A鎖およびB鎖の両方中で保存された領域（すなわちC4dのA鎖およびB鎖中で含有される同一のアミノ酸配列の領域）へ結合することが可能である。したがって一態様において、A鎖およびB鎖の両方へ結合することが可能な抗体は、配列番号2および/または配列番号3、または配列番号2および/または配列番号3で示される配列と少なくとも70%の配列同一性（配列番号2および/または配列番号3に、例えば少なくとも約75%の配列同一性、例えば少なくとも約80%の配列同一性、例えば少なくとも約85%の配列同一性、例えば少なくとも約90%の配列同一性、例えば少なくとも約95%の配列同一性、例えば少なくとも約96%の配列同一性、例えば少なくとも約97%の配列同一性、例えば少なくとも約98%の配列同一性、例えば少なくとも約99%の配列同一性）のある配列、または配列番号2および/または配列番号3に同一のアミノ酸配列へ結合するかまたはそれらを認識することが可能である。

20

【0040】

一態様において、ネオトープへ結合する抗体は、捕捉抗体として表記され得る。C4dの両方のアレルアイソフォーム（すなわちC4dのA鎖およびB鎖の両方）へ結合する抗体は、検出抗体として表記され得る。

30

【0041】

上で言及されるように、検出抗体は、C4dのA鎖およびB鎖の両方へ、ならびに両方の鎖中の同一のアミノ酸配列のみへ結合することが可能である。関連のアミノ酸配列は図3中にある。具体的には、太字且つ下線のアミノ酸残基がA鎖とB鎖との間で異なることが図3中で見られ、それゆえ、アミノ酸配列がA鎖とB鎖との間で同一の領域のみが、検出抗体の結合が可能な関連のアミノ酸配列である。上記に代替して、抗体は、図3中で参照され、AタイプとBタイプとの間で保存される領域/アミノ酸配列のうちの少なくとも4残基（例えば少なくとも5残基等、例えば少なくとも6残基等、例えば少なくとも7残基等、例えば少なくとも8残基等、例えば少なくとも9残基等、例えば少なくとも10残基等）のアミノ酸配列を認識できるべきである。これらのアミノ酸残基が連続する必要はないことが指摘される。

40

【0042】

一態様において、本発明は、診断方法における、配列番号1、または配列番号1で示される配列と少なくとも70%の配列同一性、（配列番号1に、例えば少なくとも約75%の配列同一性、例えば少なくとも約80%の配列同一性、例えば少なくとも約85%の配列同一性、例えば少なくとも約90%の配列同一性、例えば少なくとも約95%の配列同一性、例えば少なくとも約98%の配列同一性、例えば少なくとも約99%の配列同一性）の有る配列、または配列番号1に同一のアミノ酸配列を認識することが可能な抗体、およびC4dの両方のアレルアイソフォーム（すなわちC4dのA鎖およびB鎖の両方）を

50

認識しそれらへ特異的に結合することが可能な異なる抗体の使用に関する。さらなる態様において、抗体はアッセイにおいて使用され得る。なおさらなる態様において、本発明に記載の抗体は、いわゆるサンドイッチアッセイにおいて使用され得る。

【0043】

上で言及されるように、本発明は、アッセイまたは他の診断方法における本発明に記載の抗体の使用に関する。原理上はアッセイは、当技術分野において公知の任意のタイプのアッセイであり得る。1つのタイプのアッセイは、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）タイプのアッセイであり得る。ELISAアッセイは、例えば間接ELISA、サンドイッチELISA、または競合ELISA等の当技術分野において公知の任意のタイプであり得る。非限定的文脈において以下に例示されるアッセイの別の例は、ラジオイムノアッセイ（RIA）である。

10

【0044】

一態様において、本発明に記載の1つまたは複数の抗体は、原理上は、診断用の使用等の任意の好適な使用のため、またはスクリーニング目的のためのものであり得る。スクリーニングまたは診断の目的に関して、本発明に記載の抗体は、補体系活性化の測定のために使用され得る。別の態様において、本発明に記載の抗体は、薬物候補またはリード化合物のスクリーニングのために使用されて、かかる薬物が補体系を引き起こす程度を調査することができる。

【0045】

ラジオイムノアッセイ（RIA）

一態様において、本発明は、RIAにおける使用のための抗体に関する。抗体は、本明細書において開示されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列へ結合することが可能である。かかるアッセイにおいて、アッセイは、抗体が結合することが可能な放射性標識標的をさらに含み得る。一態様において、標的は、放射性標識C4dであり得る。さらに、抗体の使用において、患者サンプル中に存在するC4dは、本発明の抗体へ競合的に結合し、放出された放射性C4dが測定されるだろう。患者サンプル中のC4dは、配列番号1を含むアミノ酸配列に関するネオエピトープであると理解される。抗体は、固体支持体（ウェルの壁または任意の表面等）上に固定化されても固定化されなくてもよい。

20

【0046】

例えば、本発明の抗体は、放射性標識標的（例えば放射性標識C4d等）と混合され得る。抗体の利用可能な結合部位は、したがって結合された放射性標識標的により飽和されるだろう。放射性標識標的（C4d）へ結合された抗体と生物学的サンプルとの接触に際して、放射性標識されてない標的は抗体へ競合的に結合し、その後、放出された放射性標識標的の測定が遂行され、定量的測定を可能にする。

30

【0047】

間接ELISA

さらなる態様において、本発明に記載の抗体は、本明細書において記載される好適な酵素とコンジュゲートされない。かかる抗体は、一次抗体として表わされ得る。一次抗体は配列番号1を含むアミノ酸配列へ結合することが可能である。

【0048】

一次抗体が酵素とコンジュゲートされない事例において、本発明は、一次抗体のFc部分を認識することが可能な抗体をさらに含む。かかる抗体は、二次抗体として表わされ得る。二次抗体は、任意選択で好適な酵素（例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（ALP）、ウレアーゼ、または当技術分野において公知の任意の他の好適な酵素等）とコンジュゲートされ得る。

40

【0049】

検出および最終的に定量化を可能にするために、二次抗体へコンジュゲートされた酵素によって消化することが可能な基質が添加される。基質は、コンジュゲートされた酵素によって消化することが可能な任意の好適な基質であり得る。かかる基質の非限定例は、例えばテトラメチルベンジジン（TMB）、2,2'-アジノビス[3-エチルベンゾチア

50

ゾリン - 6 - スルホン酸] - ニアンモニウム塩 (A B T S)、パラニトロフェニルリン酸、二ナトリウム塩 (P N P P)、o - フェニレンジアミンジヒドロクロライド (O P D) などである。

【 0 0 5 0 】

サンドイッチ E L I S A

本発明は、本明細書において記載されるネオエピトープとは異なる部位 (すなわちアミノ酸配列の配列番号 1 とは異なる配列を有する部位) で C 4 d へ特異的に結合することが可能な検出抗体にも関する。それゆえ、検出抗体は、アミノ酸配列の配列番号 1 へ結合することが可能な本発明に記載の抗体とは異なり、それゆえ、抗原 (例えば C 4 d 等) の異なるエピトープ (それはこの例において C 4 d の A 鎖および B 鎖である) へ結合する。この文脈において、配列番号 1 へ結合することが可能な本発明に記載の抗体は、捕捉抗体として表わされる。C 4 d の A 鎖および B 鎖へ結合することが可能な抗体は、検出抗体として表わされ、したがって、配列番号 2 および / または配列番号 3 へ結合することが可能である。

10

【 0 0 5 1 】

結合された抗原の検出および最終的に定量化を可能にするために、二次抗体が添加され得る。二次抗体は、検出抗体の F c 部分を認識することが可能である。二次抗体は、任意選択で好適な酵素 (例えばホースラディシュペルオキシダーゼ (H R P)、アルカリホスファターゼ (A L P)、ウレアーゼ、または当技術分野において公知の任意の他の好適な酵素等) とコンジュゲートされ得る。

20

【 0 0 5 2 】

検出および最終的に定量化を可能にするために、コンジュゲートされた酵素によって消化することが可能な基質が添加される。基質は、コンジュゲートされた酵素によって消化することが可能な任意の好適な基質であり得る。かかる基質の非限定例は、例えばテトラメチルベンジジン (T M B)、2 , 2 ' - アジノビス [3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸] - ニアンモニウム塩 (A B T S)、パラニトロフェニルリン酸、二ナトリウム塩 (P N P P)、o - フェニレンジアミンジヒドロクロライド (O P D) などである。

【 0 0 5 3 】

本発明の他の態様において、検出抗体は、アミノ酸配列の配列番号 1 へ結合することが可能な本発明に記載の抗体であり得る。かかる事例において、捕捉抗体は、配列番号 1 とは異なるエピトープを有する問題になっている抗原へ特異的に結合することが可能な抗体である。したがってこの概念は、上記のものの逆方向のバージョンを表わす。この態様によれば、上で言及される二次抗体は、配列番号 1 を認識しそれへ結合する抗体の F c 部分を認識することが可能である。

30

【 0 0 5 4 】

競合 E L I S A

一態様において、本発明は、抗原が配列番号 1 を含む、生物学的サンプルの抗原へ結合することが可能な抗体に関する。この抗体は、この事例において、一次抗体として表わされ得る。

40

【 0 0 5 5 】

この態様において、本発明は、一次抗体の F c 部分へ結合することが可能な抗体にさらに関する。したがってこの抗体は、好適には二次抗体として表わされ得る。二次抗体は、任意選択で好適な酵素 (例えばホースラディシュペルオキシダーゼ (H R P)、アルカリホスファターゼ (A L P)、ウレアーゼ、または当技術分野において公知の任意の他の好適な酵素等) とコンジュゲートされ得る。

【 0 0 5 6 】

検出および最終的に定量化を可能にするために、コンジュゲートされた酵素によって消化することが可能な基質が添加される。基質は、コンジュゲートされた酵素によって消化することが可能な任意の好適な基質であり得る。かかる基質の非限定例は、例えばテトラ

50

メチルベンジジン (T M B)、2, 2' - アジノビス [3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸] - ニアンモニウム塩 (A B T S)、パラニトロフェニルリン酸、二ナトリウム塩 (P N P P)、o - フェニレンジアミンジヒドロクロライド (O P D) などである。

【 0 0 5 7 】

検出および定量化を可能にするために、一次抗体は、生物学的サンプルからの抗原と共にインキュベーションされる。生物学的サンプルからのその抗原へ結合された一次抗体は、次いで表面 (典型的には任意のタイプの容器の表面であり得る) へ添加される。表面は、同じ抗原によりプレコーティングされる。任意の未結合の一次抗体 (すなわち前記表面へ結合されなかった) は、任意の好適な方法 (例えばリンス等) によって典型的には除去される。次いで前記表面は二次抗体と接触させられ、次いでそれは前記表面へ結合された一次抗体の F c 部分へ結合する。次いで好適な基質が添加され、それは、二次抗体へコンジュゲートされた酵素の消化に際して、検出および定量化を可能にする。

10

【 0 0 5 8 】

全体としておよび本明細書において言及されるように、本出願のテキストを通して言及される関連の抗体は、好適な酵素へコンジュゲートされてもコンジュゲートされなくてもよい。好適な酵素は当技術分野において公知であり、本出願のテキストを通して例示される。本明細書において言及されるアッセイの遂行において、好適な基質は、検出および定量化の目的のために添加される。複数の好適な基質は当技術分野において公知であり、それゆえ、本明細書において記載される方法およびキットは、基質 (消化に際して、発色または蛍光シグナルをもたらす、それは検出および / または定量化をさらに可能にする) を含んでも含まなくてもよい。

20

【 0 0 5 9 】

本発明は、野生型 C 4 d であり得る C 4 d それ自体にも関する。具体的には、本発明は、組換え C 4 d、およびより具体的にはヒト組換え C 4 d にさらに関する。本発明の文脈において、ヒト組換え C 4 d は対照および / または基準として使用され得る。1つの非限定例は、例えば P 0 C 0 L 5 [9 5 7 - 1 3 3 6] であり得る。

【 0 0 6 0 】

R I A

本発明は、抗原の存在を定量化する方法にも関する。抗原は、原理上は、任意の抗原 (例えば生物学的サンプル中の C 4 d 等) であり得る。

30

【 0 0 6 1 】

それゆえ、本発明に記載の方法は、

- a) 本発明に記載の抗体であって、放射性標識抗原によりプレロードされた前記抗体を提供すること、
 - b) a) における放射性標識抗原へ結合された抗体を、患者サンプルと接触させること、
 - c) 放出された放射性標識抗原を測定すること、
- を含み得る。

【 0 0 6 2 】

抗体は、配列番号 1 を含むアミノ酸配列へ結合することができる抗体であり得、そこで、エピトープは、配列番号 1 を含む

40

【 0 0 6 3 】

間接 E L I S A

代替的に、方法は、

- a) 対象からの生物学的サンプルを提供すること、
 - b) サンプルを、本発明に記載の一次抗体と接触させること、
 - c) 本発明に記載の二次抗体をサンプルへ添加すること、
 - d) 好適な基質をサンプルへ添加すること、および
 - e) 消化された基質のアウトプットを測定すること、
- を含み得る。

50

【0064】

アウトプットは、発色シグナルまたは蛍光シグナルであり得る。

【0065】

サンドイッチELISA

さらなる代替として、本発明に記載の方法は、

- a) 対象からの生物学的サンプルを提供すること、
 - b) サンプルを、本発明に記載の捕捉抗体と接触させること、
 - c) 本発明に記載の一次抗体をサンプルへ添加すること、
 - d) 本発明に記載の二次抗体をサンプルへ添加すること、
 - e) 好適な基質をサンプルへ添加すること、および
 - f) 消化された基質のアウトプットを測定すること、
- のステップを含み得る。

10

【0066】

アウトプットは、発色シグナルまたは蛍光シグナルであり得る。

【0067】

競合ELISA

なおさらなる代替において、本発明に記載の方法は、

- a) 本発明に記載の一次抗体を、抗原を含有する生物学的サンプルと接触させること、
 - b) ステップa)からの一次抗体-抗原複合体を、a)におけるものと同じ抗原によりプレコーティングされた表面と接触させること、
 - c) ステップb)における任意の未結合の抗体を除去すること、
 - d) 二次抗体を前記表面へ添加すること、
 - e) 基質を添加すること、および
 - f) 消化された基質のアウトプットを測定すること、
- のステップを含み得る。

20

【0068】

アウトプットは、発色シグナルまたは蛍光シグナルであり得る。

【0069】

上で記載される方法は、方法中のステップのうちの任意のもの間にリンスするステップを含み得ることが理解される。例えば、リンスするステップは、好適には例えばステップb)とステップc)との間で起こり得る。本明細書において記載される方法において、停止溶液は酵素反応を停止するために任意選択で添加され得る。これは、読み取りシグナルの測定前のステップにおいて添加され得る。

30

【0070】

全体として、本発明は、当技術分野において公知の検出の任意の形態を可能にする任意の基質を含み得ることも理解される。例えば、基質は、C4dを定量化するために、吸光度もしくは蛍光による、または電気化学的シグナルによる検出に使用され得る。他の態様において、読み取りは、サンプルの放射能の測定によるものであり得る。

【0071】

方法は、好適な対照および/または基準の使用を含み得る。対照または内部基準として、C4dそれ自体が使用され得る。好ましくは、対照または内部基準として使用されるC4dはヒトであり、さらにより好ましくは、ヒトC4dは組換えである。C4dの測定/定量化は、対照または内部基準からのシグナルによりサンプルからの検出シグナルを割ることによって通常行われるか、または代替的に、サンプルからのシグナルは、対照または内部基準のシグナルに対して比較される。

40

【0072】

本発明は、キットまたはキットのパーツにも関する。キットは、好適な酵素(例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ(ALP)、ウレアーゼ、または当技術分野において公知の任意の他の好適な酵素等)と任意選択でコンジュゲートされた、本明細書において記載される1つまたは複数の抗体を含み得る。1つま

50

たは複数の抗体は、本明細書において記載される一次抗体または検出抗体であり得る。これらの抗体は、好適な酵素へ任意選択でコンジュゲートされ得る。

【0073】

キットは、好適な酵素（例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（ALP）、ウレアーゼ、または当技術分野において公知の任意の他の好適な酵素等）と任意選択でコンジュゲートされた、本明細書において記載される二次抗体をさらに含み得る。

【0074】

キットは、本明細書において記載されるネオエピトープとは異なる部位（すなわちアミノ酸配列の配列番号1とは異なる部位）で抗原（例えばC4d等）へ特異的に結合することが可能な捕捉抗体をさらに含み得る。捕捉抗体は、一次抗体とは異なる。いくつかの態様において、捕捉抗体は、溶液中にある。好ましい態様において、捕捉抗体は、任意の種類の表面へ直接的または間接的に付着される。例えば、捕捉抗体は、ウェル（例えばマイクロタイタープレートまたは任意のフォーマットのウェル等）の表面へ付着され得る。

10

【0075】

キットは、さらに好適な基質を含み得る。基質は、関連する抗体へ事例に応じてコンジュゲートされた酵素によって消化することが可能な任意の基質かもしれない。

【0076】

キットは、対照および/または内部基準も含み得る。

【0077】

キットは、任意の好適な形態（1つまたは複数の容器を含む等）であり得る。例えば、キットは、任意の好適なフォーマットのマイクロタイタープレートを含み得る。1つまたは複数の容器は、1つまたは複数の容器の1つまたは複数の表面上で、本発明に記載の捕捉抗体によりコーティングされ得る。一態様において、容器は、関連する（一次）抗体によって認識することが可能な抗原によってもコーティングされ得る。

20

【0078】

具体的には、本発明に記載のキットまたはキットのパーツは、アッセイおよびその方法論（ハイスループットスクリーニングなど等）のために所望される文脈に適するようにデザインされ得る。

【0079】

R I Aのためのキット

一態様において、本発明に記載のキットは、

- a) 配列番号1を含む抗原を結合することが可能な本発明に記載の抗体、
 - b) a)に記載の抗体が結合の可能な放射性標識抗原
- を含み得る。

30

【0080】

抗原は、例えばC4dであり得る。

【0081】

間接E L I S Aのためのキット

本発明の一態様において、本発明に記載のキットは、

- a) 配列番号1を含む抗原を結合することが可能な本発明に記載の抗体、
 - b) a)における抗体のFc部分へ結合することが可能な、酵素へ任意選択でコンジュゲートされた抗体、
 - c) 任意選択でb)における酵素によって消化可能な基質、
- を含み得る。

40

【0082】

サンドイッチE L I S Aのためのキット

本発明のさらなる態様において、本発明に記載のキットは、

- a) 配列番号1を含む抗原を結合することが可能な本発明に記載の抗体、
- b) a)における同じ抗原へ結合することができるが、配列番号1へ結合しない抗体、

50

c) b)における抗体のFc部分へ結合することが可能な、酵素へ任意選択でコンジュゲートされた抗体、
 d)任意選択でc)における酵素によって消化可能な基質、
 を含み得る。

【0083】

競合ELISAのためのキット

本発明のなおさらなる態様において、本発明に記載のキットは、

a)配列番号1を含む抗原を結合することが可能な本発明に記載の抗体、
 b) a)における抗原によりプレコーティングされた表面、
 c) a)における抗体のFc部分へ結合することが可能な、酵素へ任意選択でコンジュゲートされた抗体、
 d)任意選択でc)における酵素によって消化可能な基質、
 を含み得る。

10

【0084】

本発明に記載の方法、キットおよび/または抗体は、任意の診断用または組織学的な設定または文脈における使用のためのものであり得る。それゆえ、本発明は、生物学的サンプル中のC4dの存在または非存在の検出に関する。重要なことには、本発明は、生物学的サンプル中のC4dの定量化に関する。C4dの存在もしくは非存在、または事例に応じてC4dの量は、C4dと関連する任意の疾患の存在または非存在を可能にし得る。それを使用して、C4dと関連する任意の疾患の進行またはステージを決定することもできる。代替的に、本発明に記載の方法、キットおよび/または抗体を使用して、それを必要とする対象の治療方法をモニターすることができる。その帰結として、本発明は、対象の好適な治療の選択を可能にし得る。

20

【0085】

C4dと関連する疾患または病態は、例えば腫瘍および自己免疫疾患と関連する任意の病態、またはより具体的にはSLE(血清レベル、血小板および赤血球上での沈着)、糸球体腎炎、NSCLC(非小細胞肺癌)(血漿および気管支肺胞上皮のレベル)、抗体媒介性移植拒絶(移植の生検中での予測)、血栓性微小血管症、狼瘡性腎炎、全身性紅斑性狼瘡、ヒト白血病T細胞ウイルス(HLTV)に起因する脊髄症などであり得る。

30

【実施例】

【0086】

進化遺伝的に関連するタンパク質C3、C4およびC5、ならびにその派生物は、構造類似性を有し得るので、試験を遂行して、補体C4dアッセイの分析的特異性を分析した。分析的特異性を、補体因子C4、C4b、C3、C3b、C3d、C5、SC5b-9およびC9の分析によって確認した。交差反応性を調査するために、抗原を、生理的濃度をわずかに超える濃度でELISAアッセイにおいて分析した。分析した補体因子は、C4dアッセイにおいてシグナルを与えなかった(図2)。使用指示書中で記載される手順に従って、試験を遂行した。

【0087】

ELISAアッセイがC4dの両方の興奮性バリエーション(AおよびB)を検出する能力を分析した。個体は、C4A遺伝子またはC4B遺伝子のいずれかを欠損し得る。C4AまたはC4Bの部分的な欠損は、正常なコーカサス人の集団中で31%を超える組み合わせ頻度で、ヒトにおける公知の最も一般的な遺伝性免疫欠損である。したがって、分析程度を両方のバリエーションについて試験して、全集団のためのアッセイの結合有効性を決定した。

40

【0088】

一態様において、本発明は以下の条項に関する。

【0089】

条項

1. 配列番号1がペプチド配列のC末端および/またはN末端である、前記配列番号1

50

を含むポリペプチド配列。

【0090】

2. 前記ポリペプチド配列が、配列番号1で示される配列と少なくとも70%の配列同一性、(配列番号1に、例えば少なくとも約75%の配列同一性、例えば少なくとも約80%の配列同一性、例えば少なくとも約85%の配列同一性、例えば少なくとも約90%の配列同一性、例えば少なくとも約95%の配列同一性、例えば少なくとも約98%の配列同一性、例えば少なくとも約99%の配列同一性)の有る配列、または配列番号1に同一のアミノ酸配列を含む、条項1に記載のポリペプチド配列。

【0091】

3. 前記ポリペプチド配列が、C4dのネオエピトープである、条項1~2のいずれか1項に記載のポリペプチド配列。 10

【0092】

4. 疾患の診断のための、条項1~3のいずれか1項に記載のポリペプチドの使用。

【0093】

5. 前記疾患が、癌または自己免疫の疾患または病態である、条項4に記載の使用。

【0094】

6. 前記疾患が、SLE(血清レベル、血小板および赤血球上での沈着)、NSCLC(非小細胞肺癌)(血漿および気管支肺胞上皮のレベル)、抗体媒介性移植拒絶(移植の生検中での予測)、血栓性微小血管症、狼瘡性腎炎、ヒト白血病T細胞ウイルス(HLTV)に起因する脊髄症である、条項4~5のいずれか1項に記載の使用。 20

【0095】

7. 条項1~3のいずれか1項に記載のポリペプチド配列へ結合することが可能な抗体。

【0096】

8. 前記抗体が、哺乳動物または非哺乳動物の起源である、条項7に記載の抗体。

【0097】

9. 前記抗体が、ヒト、鳥類またはマウスの起源である、条項7~8のいずれか1項に記載の抗体。

【0098】

10. 前記抗体が、モノクローナルまたはポリクローナルである、条項7~9のいずれか1項に記載の抗体。 30

【0099】

11. 疾患の診断のための、条項7~10のいずれか1項に記載の抗体の使用。

【0100】

12. 前記疾患が、癌または自己免疫の疾患または病態である、条項11に記載の使用。

【0101】

13. 前記疾患が、SLE(血清レベル、血小板および赤血球上での沈着)、NSCLC(非小細胞肺癌)(血漿および気管支肺胞上皮のレベル)、抗体媒介性移植拒絶(移植の生検中での予測)、血栓性微小血管症、狼瘡性腎炎、ヒト白血病T細胞ウイルス(HLTV)に起因する脊髄症である、条項11~12のいずれか1項に記載の使用。 40

【0102】

14. 条項7~10のいずれか1項に記載の抗体を含む、キットまたはキットのパーツ。

【0103】

15. 生物学的サンプル中のC4dのレベルを決定する方法であって、
a) 生物学的サンプルを条項7~10のいずれか1項に記載の抗体と接触させ、前記抗体が、放射性標識抗原によりプレロードされるか、または好適な酵素へコンジュゲートされること、
b) 前記抗体へコンジュゲートされた前記酵素によって消化することが可能な基質を任意 50

選択で添加すること、
c) 放出された前記放射性標識抗原を測定するか、または消化された前記基質のアウトプットを測定して、それによって前記サンプル中に存在するC4dのレベルを測定すること、
を含む、前記方法。

【 図 1 】

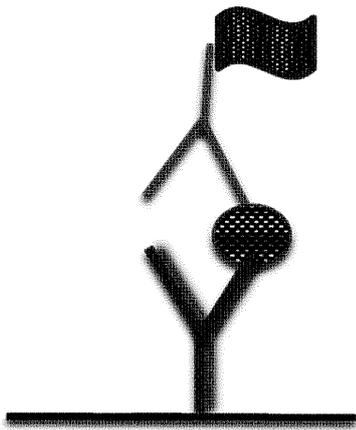
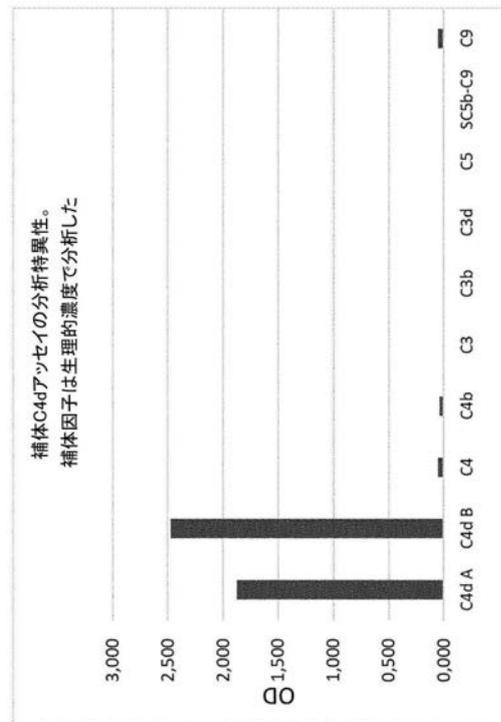


Fig. 1

【 図 2 】



【 図 3 】

TLEIPGNDPNIIPDGFNSVYRVYVTSADPLDITLSEGALSPGGVAVASLLRPRGCGEQTM(I) (A)
 TLEIPGNDPNIIPDGFNSVYRVYVTSADPLDITLSEGALSPGGVAVASLLRPRGCGEQTM(I) (B)
 YLAPTLAASRYLDKTEQWSTLPPETKDHAVDLIOKGYMIRIQQFRKADGSAVAWLSRDSST (A)
 YLAPTLAASRYLDKTEQWSTLPPETKDHAVDLIOKGYMIRIQQFRKADGSAVAWLSRDSST (B)
 WITAFVLKVLSLAQEQVGGSPKELQETSNNWLLSQQQADGSGFQDPPVLDKRSMQGGLVGN(D) (A)
 WITAFVLKVLSLAQEQVGGSPKELQETSNNWLLSQQQADGSGFQDPPVLDKRSMQGGLVGN(D) (B)
 ETVALTAFVYIALHHGLAVFQDEGAEPKQRVEASISKANSFLGKASAGLLGAHAAAIT (A)
 ETVALTAFVYIALHHGLAVFQDEGAEPKQRVEASISKANSFLGKASAGLLGAHAAAIT (B)
 AYALITKAPVDLIGVAHNNLMAMAQETGDNLYWGSVGTGSQSNVSPPTAPRNPSPDMPQ (A)
 AYALITKAPVDLIGVAHNNLMAMAQETGDNLYWGSVGTGSQSNVSPPTAPRNPSPDMPQ (B)
 APALWIETTAYALLHLLHEGKAEMADQAAWLTROGSGFGFRSTQDVTIADALSAYW (A)
 APALWIETTAYALLHLLHEGKAEMADQAAWLTROGSGFGFRSTQDVTIADALSAYW (B)
 IASHTTEERGLNVTLSSTGR(-COOH) (A)
 IASHTTEERGLNVTLSSTGR(-COOH) (B)

Fig. 3

【 配列表 】

2021526639000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和3年2月1日 (2021.2.1)

【 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 】

(a) 配列番号 1 で示される配列と少なくとも約 98% の配列同一性、例えば少なくとも約 99% の配列同一性を有する配列、または配列番号 1 に同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド配列を認識し結合することが可能な抗体、および

(b) 図 3 に示される A 鎖と B 鎖、すなわち配列番号 2 および / または配列番号 3 との間で保存されるポリペプチドまたはその断片を認識し結合することが可能である抗体、を含む、キット。

【 請求項 2 】

(a) 配列番号 1 で示される配列と少なくとも約 98% の配列同一性、例えば少なくとも約 99% の配列同一性を有する配列、または配列番号 1 に同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド配列を認識し結合することが可能な抗体、および

(b) 図 3 に示される A 鎖と B 鎖、すなわち配列番号 2 および / または配列番号 3 との間で保存されるポリペプチドまたはその断片を認識し結合することが可能である抗体、を含む、組成物。

【 請求項 3 】

前記抗体が、哺乳動物または非哺乳動物の起源である、請求項 1 または 2 に記載の組成物またはキット。

【請求項 4】

前記抗体が、ヒト、鳥類またはマウスの起源である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物またはキット。

【請求項 5】

前記抗体が、モノクローナルまたはポリクローナルである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物またはキット。

【請求項 6】

(b) における前記抗体は、任意選択で酵素へコンジュゲートされる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物またはキット。

【請求項 7】

任意選択で、請求項 1 (b) および 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体の Fc 領域へ結合することが可能な二次抗体をさらに含み、前記二次抗体が、酵素へコンジュゲートされる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物またはキット。

【請求項 8】

前記抗体へコンジュゲートされた前記酵素によって消化することが可能な基質をさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物またはキット。

【請求項 9】

前記基質が、前記酵素によって消化された後に任意の好適な手段、例えば発色手段または蛍光手段によって、検出を可能にする、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物またはキット。

【請求項 10】

診断方法における、あるいは疾患および / または病態の診断のための、あるいは補体系活性化の測定および / または薬物もしくは薬物候補のスクリーニングのための、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物またはキット。

【請求項 11】

前記疾患または病態が、癌または自己免疫の疾患若しくは病態である、請求項 10 に記載の組成物またはキット。

【請求項 12】

前記疾患または病態が、SLE (血清レベル、血小板および赤血球上での沈着)、NSCLC (非小細胞肺癌) (血漿および気管支肺胞上皮のレベル)、抗体媒介性移植拒絶 (移植の生検での予測)、血栓性微小血管症、狼瘡性腎炎、ヒト白血病 T 細胞ウイルス (HLTV) に起因する脊髄症である、請求項 10 または 11 の組成物またはキット。

【請求項 13】

生物学的サンプル中の C4d のレベルを測定する方法であって、

(i) 生物学的サンプルを準備し、

(ii) (i) における前記生物学的サンプルを請求項 1 (a) および請求項 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体に接触させ、ここで、請求項 1 (a) および請求項 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体は、任意選択で固体支持体へ結合され、

(iii) 請求項 1 (b) および請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体を (ii) において得られた前記サンプルへ添加し、

(iv) 請求項 1 (b) および請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体の Fc 領域へ結合することが可能な二次抗体を、任意選択で、(iii) において得られた前記サンプルへ添加し、ここで、前記二次抗体は酵素へコンジュゲートされており、

(v) 前記二次抗体へコンジュゲートされた前記酵素によって消化されることが可能な基質を (iv) において得られた前記サンプルへ添加し、

(vi) 消化された前記基質のアウトプットを測定することを含む、前記方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/064620

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/47 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, Sequence Search | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 2016/038055 A1 (EURO DIAGNOSTICA AB [SE]) 17 March 2016 (2016-03-17) the whole document sequences 3,4 | 1-15 |
| X | ----- 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 table 1 ----- | 1-13,15 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> 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 27 August 2019 | | Date of mailing of the international search report 04/09/2019 |
| 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 Blanco Urgoiti, B |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/064620

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2016038055 A1 | 17-03-2016 | EP 3191509 A1 | 19-07-2017 |
| | | JP 6438573 B2 | 12-12-2018 |
| | | JP 2017528472 A | 28-09-2017 |
| | | WO 2016038055 A1 | 17-03-2016 |
| ----- | | | |

フロントページの続き

(81)指定国・地域 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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

(72)発明者 カールセン、ステファン

スウェーデン王国、マルメ、ルンダベーゲン 151、ユーロ - ダイアグノスティカ アクチ
エボラグ 気付

Fターム(参考) 4B064 AG26 AG27 CA19 DA13

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA50 FA74