

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-138891

(P2016-138891A)

(43) 公開日 平成28年8月4日(2016.8.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/68</b> (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
<b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53	D 4 B O 6 3
<b>C 1 2 Q 1/02</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53	V 4 H O 4 5
<b>CO 7 K 14/47</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53	N
<b>CO 7 K 16/18</b> (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 有 請求項の数 23 O L (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-39857 (P2016-39857)	(71) 出願人	511232293
(22) 出願日	平成28年3月2日 (2016.3.2)		ザ チャンセラー, マスターズ アンド
(62) 分割の表示	特願2014-102475 (P2014-102475)		スカラーズ オブ ザ ユニバーシティ
	の分割		オブ オックスフォード
原出願日	平成22年5月13日 (2010.5.13)		イギリス国 オックスフォード オーエック
(31) 優先権主張番号	61/178, 334		クス1 3キューユー, サウス パークス
(32) 優先日	平成21年5月14日 (2009.5.14)		ロード
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100092783
			弁理士 小林 浩
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微量ヒト血漿タンパク質バイオマーカーの新規なパネルを使用した肝線維症の臨床診断

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 肝線維症および硬変症を診断するための、ヒト血漿タンパク質バイオマーカーの新規なパネルを提供する。

【解決手段】 a) 患者から得た生体試料中の少なくとも1つの HF - ASSOCIATED ポリペプチドのレベルを決定するステップ、および b) 前記線維症の陽性または陰性診断を決定するために前記 (a) のレベルを前記 HF - ASSOCIATED ポリペプチドの対照レベルと比較するステップを含む方法。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

線維症 / 硬変症の重症度を検出および評価する方法であって、

a) 患者から得た生体試料中の少なくとも 1 つの HF - ASSOCIATED ポリペプチドのレベルを決定するステップ、および

b) 前記線維症の陽性または陰性診断を決定するために前記 (a) のレベルを前記 HF - ASSOCIATED ポリペプチドの対照レベルと比較するステップを含む方法。

## 【請求項 2】

前記線維症が肝線維症である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記ポリペプチドが、14-3-3 タンパク質ゼータ / デルタ、アディポネクチン、アフミン、アルファ - 1 - アンチトリプシン、アルファ - 2 - HS - 糖タンパク質、アポリポタンパク質 C - III、アポリポタンパク質 E、C4b - 結合タンパク質ベータ鎖、完全 / 切断型補体 C3dg、コルチコステロイド結合グロブリン、フィブリノゲンガンマ鎖、pH 5.46 ~ 5.49 のベータハプトグロビン、ハプトグロビン関連タンパク質、ヘモペキシン、免疫グロブリン J 鎖、ロイシンリッチアルファ - 2 - 糖タンパク質、脂質輸送阻害剤タンパク質、レチノール結合タンパク質 4、血清パラオキシナーゼ / アリールエステラーゼ 1、性ホルモン結合グロブリンおよび亜鉛 - アルファ - 2 - 糖タンパク質からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

線維症が HF - ASSOCIATED ポリペプチドの示差的制御を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

生体試料が血清または血漿である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

線維症の重症度をスケールリングするための方法であって、

a) 患者から得た生体試料中の少なくとも 1 つの HF - ASSOCIATED ポリペプチドのレベルを決定するステップ、および

b) 前記患者の生体試料中の HF - ASSOCIATED ポリペプチドの前記レベルを、線維化なしから硬変までの範囲の患者集団中の前記 HF - ASSOCIATED ポリペプチドの予め決定されたレベルと比較するステップを含む方法。

## 【請求項 7】

前記線維症が肝線維症である、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記ポリペプチドが、14-3-3 タンパク質ゼータ / デルタ、アディポネクチン、アフミン、アルファ - 1 - アンチトリプシン、アルファ - 2 - HS - 糖タンパク質、アポリポタンパク質 C - III、アポリポタンパク質 E、C4b - 結合タンパク質ベータ鎖、完全 / 切断型補体 C3dg、コルチコステロイド結合グロブリン、フィブリノゲンガンマ鎖、pH 5.46 ~ 5.49 のベータハプトグロビン、ハプトグロビン関連タンパク質、ヘモペキシン、免疫グロブリン J 鎖、ロイシンリッチアルファ - 2 - 糖タンパク質、脂質輸送阻害剤タンパク質、レチノール結合タンパク質 4、血清パラオキシナーゼ / アリールエステラーゼ 1、性ホルモン結合グロブリンおよび亜鉛 - アルファ - 2 - 糖タンパク質からなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 9】

線維症が HF - ASSOCIATED ポリペプチドの示差的制御を含む、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 10】

線維症の予後評価に有用であるキットであって、HF - ASSOCIATED ポリペプチドを特異的に検出する HF - ASSOCIATED 作用物質を含むキット。

## 【請求項 11】

10

20

30

40

50

前記作用物質が H F - A S S O C I A T E D ポリペプチドと結合する抗体またはその機能的等価物である、請求項 10 に記載のキット。

【請求項 12】

前記抗体を使用して E L I S A アッセイが実施される、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 13】

H F - A S S O C I A T E D ポリペプチドを検出する方法であって、

- a) 線維症を有する患者から生体試料を単離するステップ、
- b) 線維症を有さない患者から生体試料を単離するステップ、
- c) 2 D - P A G E を使用して a) および b) の試料を分析するステップ、および
- d) 2 D - P A G E の結果を比較して線維症を有する患者と有さない患者の間で示差的発現を有するポリペプチドを同定するステップを含む方法。

10

【請求項 14】

線維症の予後評価を決定する方法であって、

- a) 患者から得た生体試料中の H F - A S S O C I A T E D ポリペプチドのレベルを決定するステップ、および
- b) 前記線維症の陽性または陰性診断を決定するために前記 ( a ) のレベルを前記 H F - A S S O C I A T E D ポリペプチドの対照レベルと比較するステップを含む方法。

【請求項 15】

前記線維症が肝線維症である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記ポリペプチドが、14-3-3 タンパク質ゼータ/デルタ、アディポネクチン、アフミン、アルファ-1-アンチトリプシン、アルファ-2-HS-糖タンパク質、アポリポタンパク質 C - I I I、アポリポタンパク質 E、C4b-結合タンパク質ベータ鎖、完全/切断型補体 C3dg、コルチコステロイド結合グロブリン、フィブリノゲンガンマ鎖、pH 5.46 ~ 5.49 のベータハプトグロビン、ハプトグロビン関連タンパク質、ヘモベキシン、免疫グロブリン J 鎖、ロイシンリッチアルファ-2-糖タンパク質、脂質輸送阻害剤タンパク質、レチノール結合タンパク質 4、血清パラオキシナーゼ/アリアルエステラーゼ 1、性ホルモン結合グロブリンおよび亜鉛-アルファ-2-糖タンパク質からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

20

【請求項 17】

線維症が H F - A S S O C I A T E D ポリペプチドの示差的制御によって特徴付けられる、請求項 14 に記載の方法。

30

【請求項 18】

疾患と関係があるバイオマーカーまたはポリペプチドを検出する方法であって、

- a) 前記疾患を有する患者から生体試料を単離するステップ、
- b) 前記疾患を有さない患者から生体試料を単離するステップ、
- c) 狭域 2 D - P A G E を使用して a) および b) の試料を分析するステップ、
- d) 狭域 2 D - P A G E の結果を比較して前記疾患を有する患者と有さない患者の間で示差的発現を有するバイオマーカーまたはポリペプチドを同定するステップを含む方法。

【請求項 19】

狭域 pH 範囲が、pH 3 ~ 5.6、pH 3 ~ 6、pH 3.9 ~ 5.1、pH 4.7 ~ 5.9、pH 5 ~ 8、pH 5.3 ~ 6.5、pH 5.5 ~ 6.7、pH 6 ~ 11、pH 6.2 ~ 7.5、pH 6.3 ~ 8.3、pH 7 ~ 10、pH 7 ~ 11、pH 3.5 ~ 4.5、pH 3 ~ 7、および pH 6 ~ 9 からなる群から選択される、請求項 18 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2009年5月14日に本出願された米国仮出願第 61 / 178,334 号からの優先権を主張するものである。

50

## 【0002】

本出願は、極微量肝臓癒痕化バイオマーカーの新規なパネルを標的とする抗体のパネルを使用した、肝線維症または硬変症を診断するための方法に関する。これらの新規なタンパク質は、肝炎、肝細胞癌（HCC）のバイオマーカー、および肝臓癒痕化、肝炎およびHCCの薬剤標的としても働き得る。

## 【背景技術】

## 【0003】

肝線維症。肝線維症（肝臓の線維症）は、肝臓における癒痕組織（すなわち、細胞外マトリクス）の過剰な蓄積によって特徴付けられる創傷治癒応答である。組織の正常な構造要素が、過剰量の非機能性癒痕組織に置換される。肝針生検は線維症を診断および評価するための主なツールであるが、患者の不快感、痛み、出血、および稀な場合は死亡を含めた、この技術に対するいくつかの文書で十分に立証された制約および不利点が存在する。さらに、線維症が肝臓全体で均質ではない場合、生検は信頼できない可能性がある。肝線維症は、アルコールおよびウイルスを含めた様々な要因によって引き起こされる可能性がある。

10

## 【0004】

硬変症（cirrhosis）。肝硬変は肝臓癒痕化の最も重症な形態であり、肝線維症と異なり、不可逆性および結節性であると一般に考えられる。硬変症は英国では毎年6000例を超える死亡、および米国では約27,000例の死亡の原因であり、9番目に多い死因となっている（MacSweenら、（2002）、Pathology of the Liver、第4版、Churchill Livingstone）。硬変症はHCCの主な危険因子であり、肝臓癌のこの段階では、唯一の治療手法は肝臓移植である。ウイルス誘発性肝臓癌の場合、肝臓癒痕化およびHCCが移植後に再発する可能性がある。不可逆性硬変症を予防することができるように、可逆性肝臓癒痕化の初期段階で線維症を診断することは必須である。

20

## 【0005】

C型肝炎ウイルス。世界中で約1億7千万人、すなわち世界の人口の3%（例えば、WHO、J. Viral Hepat. 1999; 6: 35~47参照）、および米国における約4百万人の人々がC型肝炎ウイルス（HCV、HepC）に感染している。HCVは肝線維症および硬変症の主な原因である。HCVに急性感染した約80%の個体は慢性感染状態になる。したがって、HCVは慢性肝炎の主な原因である。慢性感染後、治療を行わずにウイルスが除去されることはほとんどない。稀な場合、HCV感染は臨床上急性の疾患およびさらには肝不全を引き起こす。慢性HCV感染は個体間で劇的に異なる可能性があり、臨床的に重要でないまたはわずかな肝臓疾患を有し合併症を発症することはない個体もいれば、臨床的に明らかな慢性肝炎を有し、続いて肝線維症および硬変症を発症し得る個体もいる。肝炎を発症しHCVを有する個体の約20%は末期の肝臓疾患を発症し、原発性肝癌を発症する高いリスクを有する。

30

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

患者の肝線維症および硬変症を診断する改良された方法が必要である。

40

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明は、線維症および硬変症を検出するための方法を提供する。

## 【0008】

一実施形態では、本発明は、線維症および硬変症を検出および評価する方法であって、（a）患者から得た生体試料中のHF-ASSOCIATEDポリペプチドのレベルを決定するステップ、および（b）前記線維症の陽性または陰性診断を決定するために前記（a）のレベルを前記HF-ASSOCIATEDポリペプチドの対照レベルと比較するステップを含む方法を提供する。これらのバイオマーカーは、肝線維症、腎線維症、心筋線

50

維化、皮膚線維化、腓線維化などの線維症を示す任意の疾患に適用することができるが、特定の実施形態では、線維症は肝線維症である。本発明は、14-3-3タンパク質ゼータ/デルタ、アディポネクチン、アフアミン、アルファ-1-アンチトリプシン、アルファ-2-HS-糖タンパク質、アポリポタンパク質C-I-I-I、アポリポタンパク質E、C4b-結合タンパク質ベータ鎖、完全/切断型補体C3dg、コルチコステロイド結合グロブリン、フィブリノゲンガンマ鎖、pH5.46~5.49のベータハプトグロビン、ハプトグロビン関連タンパク質、ヘモベキシン、免疫グロブリンJ鎖、ロイシンリッチアルファ-2-糖タンパク質、脂質輸送阻害剤タンパク質、レチノール結合タンパク質4、血清パラオキシナーゼ/アリアルエステラーゼ1、性ホルモン結合グロブリンおよび亜鉛-アルファ-2-糖タンパク質からなる群からポリペプチドを選択する。これらのバイオマーカーは、特にアルファ-トリプシン阻害剤重鎖H4断片、アルファ1アンチキモトリプシン、アポリポタンパク質L1、プレアルブミン、アルブミン、CD5抗原様タンパク質のアイソフォーム、ベータ2糖タンパク質I、アルファ2マクログロブリンおよび免疫グロブリン成分、ハプトグロビンのアルファ1、アルファ2およびベータ鎖、補体成分(C3、C4および因子H関連タンパク質1)、アディポネクチン、ApoE、プロトロンビン、クラスτεリン、およびアンジオテンシノーゲンを含めた、WO/2008/031051中のポリペプチドと共に使用することができる。他の実施形態では、線維症はHF-ASSOCIATEDポリペプチドの示差的制御を含む。他の実施形態では、試料は血清または血漿から得る。

10

#### 【0009】

20

別の実施形態では、本発明は、HF-ASSOCIATEDポリペプチドを検出するための方法であって、a)線維症または硬変症を有する患者から生体試料を単離するステップ、b)線維症を有さない患者から生体試料を単離するステップ、c)2D-PAGEを使用してa)およびb)の試料を分析するステップ、およびd)2D-PAGEの結果を比較して線維症または硬変症を有する患者と有さない患者の間で示差的発現を有するポリペプチドを同定するステップを含む方法を提供する。2D-PAGEを使用するとき、pH3~10、pH3~11またはpH4~7などの一般に使用される広いpH範囲を使用してバイオマーカーを検出することができる。極微量バイオマーカーは、これらには限られないが、pH3~5.6、pH3~6、pH3.9~5.1、pH4.7~5.9、pH5~8、pH5.3~6.5、pH5.5~6.7、pH6~11、pH6.2~7.5、pH6.3~8.3、pH7~10、pH7~11、pH3.5~4.5、pH3~7、およびpH6~9などの、pH3~11間の任意の狭いpH範囲を使用して検出することができる。これらの狭いpH範囲を含む2D-PAGEゲルを使用して、他の疾患における新規なバイオマーカーおよび薬剤標的を同定することもできる。

30

#### 【0010】

別の実施形態では、本発明は、線維症の重症度を測定するための方法であって、a)患者から得た生体試料中の少なくとも1つのHF-ASSOCIATEDポリペプチドのレベルを決定するステップ、およびb)前記患者の生体試料中のHF-ASSOCIATEDポリペプチドの前記レベルを、線維化なしから硬変までの範囲の患者集団中の前記HF-ASSOCIATEDポリペプチドの予め決定されたレベルと比較するステップを含む方法を提供する。

40

#### 【0011】

別の実施形態では、本発明は、HF-ASSOCIATEDポリペプチドを特異的に検出するHF-ASSOCIATED作用物質を含む、未治療個体におけるおよび治療の経過中の線維症の予後評価に有用であるキットを提供する。特定の実施形態では、作用物質はHF-ASSOCIATEDポリペプチドと結合する抗体またはその機能的等価物である。これらの抗体を使用して、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ、タンパク質ドットプロット、ウエスタンプロット、比濁法、ネフェロメトリーなどのイムノアッセイを実施することができる。これらには限られないが、質量分析を使用した多重反応モニタリングなどの非抗体手法を使用して、HF-ASSOCIATED

50

T E D ポリペプチドを定量化することも可能である。キットは、予後評価指標として有用な別の遺伝子または遺伝子産物を特異的に検出するための少なくとも1つの標的をさらに含むことができる。

【0012】

別の実施形態では、本発明は、線維症の予後評価を決定する方法であって、(a)患者から得た生体試料中のH F - A S S O C I A T E D ポリペプチドのレベルを決定するステップ、および(b)前記線維症の陽性または陰性診断を決定するために前記(a)のレベルを前記H F - A S S O C I A T E D ポリペプチドの対照レベルと比較するステップを含む方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

10

【0013】

【図1】図1~4は、主な新規バイオマーカーの発現において観察された変化を示す。それぞれの画像は、同定タンパク質の相対位置を丸で囲んだ2D - P A G E ゲルの拡大領域を示す。代表的な血漿ゲル画像を、健常個体および硬変症を有する患者に関して示す。脂質輸送阻害剤タンパク質は正常な血漿中には存在するが、硬変症患者由来の血漿中では減少することを示す図である。

【図2】亜鉛 - アルファ - 2 - 糖タンパク質は正常な血漿中には存在するが、硬変症患者由来の血漿中では減少することを示す図である。

【図3】p H 5 . 4 6 ~ 5 . 4 9 でのベータハプトグロビンの特徴の減少を示す図である。上図 - 正常な血漿と硬変症患者由来の血漿の間の有意な差を示さない、ベータハプトグロビンスポットの等間隔配置。下図 - 約 p H 5 . 4 6 ~ 5 . 4 9 で観察されたベータハプトグロビンスポットの拡大画像は、正常な血漿中には存在するが、硬変症患者由来の血漿中では減少することを示す。

20

【図4】硬変症における補体C3の切断の減少を示す図である。上図 - 補体C3 d g は正常な血漿中には存在しないが、硬変症患者由来の血漿中には存在することを示す。下図 - そのチオエステル部位の前にある補体C3アルファ鎖の断片は正常な血漿中には存在するが、硬変症患者由来の血漿中には存在しないことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下の記載は、上記で要約した本発明を略述する。しかしながら本発明は、記載した特定の方法、プロトコル、細胞系、動物種または属、構築物、および試薬に限られず、したがって変化し得る。同様に、本明細書で使用する技術用語は単に特定の実施形態を説明するのみであり、本発明の範囲を制限することは目的としない。

30

【0015】

本発明者らは、健常個体と比較したとき、H C V 誘発性硬変症患者のヒト血漿試料において、様々なタンパク質が示差的に発現されることを発見している。この発見は、ゲルマトリクスにおいて二次元でタンパク質を分離する技法を使用してこれらの血漿試料を比較して、別々のタンパク質スポットを与えることによって得た。この手法は、W O / 2 0 0 8 / 0 3 1 0 5 1 中で使用されたp H 3 ~ 1 0 固定p H 勾配ゲルとは異なる、狭域p H 3 ~ 5 . 6 固定p H 勾配ゲルを使用する。

40

【0016】

他に定義しない限り、本明細書で使用する全ての技術用語および科学用語は、当業者に一般に理解されるのと同じ意味を有する。

【0017】

本明細書で言及する全ての刊行物および特許は、例えば、現在記載する本発明に関して使用することができる刊行物中に記載される構築物および方法を記載および開示する目的で、ここで参照によって本明細書に組み込む。上記および本文全体において論じる刊行物は、単に本出願の出願日より前のそれらの開示のために記載されている。本明細書において、本発明者らが従来の特許によるそのような開示に先行する権利がないことを認めるものとして解釈するべきものはない。

50

## 【0018】

## a. 定義

便宜上、明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲中で利用する特定の用語および語句の意味を以下に記載する。

## 【0019】

単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が明らかに他のことを示さない限り、複数の指示対象を含む。

## 【0020】

「2D-PAGE」は二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動を指す。

## 【0021】

「ELISA」は酵素結合免疫吸着アッセイを指す。

## 【0022】

「HCC」は肝細胞癌を指す。

## 【0023】

「HCV」はC型肝炎ウイルスを指す。

## 【0024】

「HF」は肝線維症を指す。

## 【0025】

「kDa」はキロダルトンを指す。

## 【0026】

「PBS」はリン酸緩衝生理食塩水を指す。

## 【0027】

「PBS-T」はPBS溶液を含有するTweenを指す。

## 【0028】

「生体試料」は、診断またはモニタリングアッセイにおいて使用可能である生物から得られる様々な試料の種類を包含する。この用語は、生物起源の血液および他の液体試料、生検材料などの固形組織試料、またはそれらに由来する組織培養物もしくは細胞、およびそれらの子孫を包含する。さらに、この用語は、循環腫瘍または他の細胞を包含することができる。この用語は具体的には臨床試料を包含し、細胞培養中の細胞、細胞懸濁液、細胞溶解液、血清、血漿、尿、羊水、生物体液、および組織試料をさらに含む。この用語は、試薬を用いた処理、可溶化、または特定の構成要素の濃縮などの任意の方法で、調達後に操作された試料も包含する。

## 【0029】

「生体分子配列」または「配列」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の全てまたは一部を指す。

## 【0030】

「BLAST」は、所与のクエリー配列と一致するギャップのない部分配列を検出するための技法である、ベーシックローカルアライメント検索ツール(Basic Local Alignment Search Tool)を指す。「BLASTP」は、タンパク質配列データベースに対してアミノ酸クエリー配列を比較するBLASTのプログラムである。「BLASTX」は、タンパク質配列データベースに対してヌクレオチドクエリー配列(両鎖)の6フレームの概念上の翻訳産物を比較するBLASTのプログラムである。

## 【0031】

本明細書で互換的に使用する「癌」、「新生物」、および「腫瘍」は、細胞増殖制御の相当な消失によって特徴付けられる異常な増殖表現型を示す細胞または組織を指す。本発明の方法および組成物は、前癌性(すなわち良性)、悪性、前転移性、転移性、および非転移性細胞に特に適用する。

## 【0032】

「線維症がHF-ASSOCIATEDポリペプチドの示差的制御によって特徴付けら

10

20

30

40

50

れる」は、癍痕を示し、H F - A S S O C I A T E Dタンパク質が示差的発現を有する組織を有する対象を指す。

【0033】

「線維症の表現型」は、線維症細胞に特徴的である任意の様々な生物学的現象を指す。この現象は線維症の型と共に変わる可能性はあるが、線維症の表現型は一般に癍痕組織形成の異常によって同定される。

【0034】

「細胞型」は、所与の供給源（例えば、組織もしくは器官）由来の細胞または所与の分化状態の細胞、または所与の病状または遺伝的構成と関係がある細胞を指す。

【0035】

「相補的」は、プローブ分子とその標的の相互作用表面の形態的適合性または一致を指す。標的とそのプローブは相補的として記載することができ、さらに、それらの接触表面特性は互いに相補的である。

【0036】

用語「検出可能」は、本出願中に記載され当業者によく知られている技法を使用して観察することができる、ポリペプチドの発現パターンを指す。例えば、ポリペプチドの発現は、ウエスタンブロットなどのイムノアッセイを含めた標準的な技法によって「検出」することができる。

【0037】

「診断」および「診断する」は、疾患または障害に対する対象の易罹患性の決定、対象が現在疾患または障害に罹患しているかどうかに関する決定、疾患または障害に罹患した対象の予後評価（例えば、前転移性または転移性癌状態または線維症の同定）、およびセラメトリクス（*therapeutics*）（例えば、療法の効果もしくは有効性に関する情報を与えるための、対象の状態のモニタリング）を一般に含む。

【0038】

「示差的発現」は、遺伝子の時間的および組織発現パターンの定量的差異と定性的差異の両方を指す。例えば、示差的に発現される遺伝子は、正常の状態又は疾患状態で活性化または完全に不活性化されるその発現を有しうる。このような定性的に制御される遺伝子は、所与の組織、細胞型、または対象の血清/血漿において、対照もしくは疾患状態の一方で検出可能、または示差的発現をしながら両方で検出可能である発現パターンを示しうる。本明細書で使用する「示差的に発現されるタンパク質」は、試料中で示差的に発現されるタンパク質の検出が、試料中で示差的に発現されるタンパク質の存在と関係があるように、示差的に発現されるタンパク質を特異的に同定するアミノ酸配列を指す。

【0039】

「発現」は、検出可能なレベルのアミノ酸配列またはタンパク質が発現されるように、ポリヌクレオチド配列が正常な転写および翻訳を経るプロセスを一般に指す。本明細書の特定の文脈では、発現はmRNAの生成を指す。他の文脈では、発現はタンパク質またはその断片の生成を指す。正常もしくは疾患状態に特徴的な酵素による切断または生物学的プロセスによって、これらの断片が生成され得る。

【0040】

「発現産物」または「遺伝子産物」は、生物中の遺伝子が転写または翻訳または翻訳後修飾されるときに生成される、タンパク質またはmRNAなどの生体分子である。

【0041】

「タンパク質の断片」は、タンパク質の一部を指す。例えば、タンパク質の断片は、培養細胞から単離した完全長タンパク質の消化によって得られるポリペプチドを含むことができる。一実施形態では、タンパク質断片は少なくとも約6個のアミノ酸を含む。別の実施形態では、断片は少なくとも約10個のアミノ酸を含む。さらに別の実施形態では、タンパク質断片は少なくとも約16個のアミノ酸を含む。

【0042】

本出願において、用語「機能的等価物」は、天然H F - A S S O C I A T E Dタンパク

10

20

30

40

50

質の全てまたは一部と実質的に類似した機能または構造特性を有するタンパク質を指す。用語「機能的等価物」は、天然 H F - A S S O C I A T E D タンパク質の「断片」、「突然変異体」、「誘導体」、「対立遺伝子」、「ハイブリッド」、「変異体」、「類似体」、または「化学的誘導体」を含むものとする。

【 0 0 4 3 】

免疫グロブリンに関しては、用語「機能的等価物」は、親免疫グロブリンと実質的に類似した免疫結合性を示す免疫グロブリン分子を指す。「免疫結合性」は、免疫グロブリン分子とその免疫グロブリンが特異的である抗原の間で起こる非共有結合相互作用の型を指す。実際、モノクローナル抗体免疫グロブリンの機能的等価物は、例えば、親モノクローナル抗体とその抗原の結合を阻害することができる。機能的等価物は、免疫グロブリンが親免疫グロブリンの特性を示す限り、F ( a b ' ) 2 断片、F ( a b ) 分子、F v 断片、ファージ上に提示される単鎖断片可変領域 ( s c F v )、単鎖ドメイン抗体、キメラ抗体などを含むことができる。

10

【 0 0 4 4 】

用語「融合タンパク質」は、典型的にはそれらの本来の状態で連結していないが、ペプチド結合を介してそれらの各々のアミノおよびカルボキシル末端により連結して1つの連続したポリペプチドを形成する、2つ以上のポリペプチドで構成されるタンパク質を指す。2つ以上のポリペプチド構成要素は、直接連結させるか、またはペプチドリンカー/スパーサーを介して間接的に連結させるかのいずれかが可能であることは理解される。

【 0 0 4 5 】

「遺伝子」は、ポリペプチドまたは前駆体の生成に必要な制御およびコード配列を含むポリヌクレオチド配列を指す。ポリペプチドは完全長コード配列によって、またはコード配列の任意の部分によってコードされ得る。遺伝子は連続コード配列を構成することができ、または遺伝子は、適切なスプライス連結によって結合した1つまたは複数のイントロンを含むことができる。さらに遺伝子は、発現産物の生物活性もしくは化学構造、発現率、または発現制御の形式に影響を与え得るコード領域または非翻訳領域中のいずれかに1つまたは複数の修飾を含有することができる。このような修飾には、1つまたは複数のヌクレオチドの突然変異、挿入、欠失、および置換があるが、これらだけには限られない。この点で、このような修飾遺伝子は「天然」遺伝子の「変異体」と呼ぶことができる。

20

【 0 0 4 6 】

「遺伝子発現」は、それによってポリヌクレオチド配列が、検出可能なレベルのヌクレオチド配列が発現されるように、良好な転写および翻訳を経るプロセスを指す。

30

【 0 0 4 7 】

本明細書で使用する用語「相同性」は相補性の程度を指す。部分的相同性または完全相同性（すなわち、同一性）が存在し得る。部分的相補配列は、標的ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションから同一配列を少なくとも部分的に阻害する配列であり、それは技術用語を使用して「実質的に相同的」と呼ばれる。完全相補配列と標的配列のハイブリダイゼーションの阻害は、低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイゼーションアッセイ（サザンまたはノーザンプロット、溶液中ハイブリダイゼーションなど）を使用して調べることができる。実質的に相同的な配列またはプローブは、低ストリンジェンシー条件下での標的配列と完全相同配列またはプローブの結合（すなわち、ハイブリダイゼーション）に関して競合し阻害する。これは、低ストリンジェンシー条件は非特異的結合が許容されるような条件であるということではなく、低ストリンジェンシー条件は、2つの配列の互いの結合が特異的（すなわち、選択的）相互作用であることを必要とする。非特異的結合が存在しないことは、部分的相補度（例えば、約30%未満の同一性）さえない第二の標的配列の使用によって試験することができ、非特異的結合の非存在下では、プローブは第二の非相補的標的配列とハイブリダイズしない。

40

【 0 0 4 8 】

本明細書で互換的に使用する「個体」、「対象」、「宿主」、および「患者」は、診断、治療、または療法が望まれる任意の哺乳動物対象を指す。好ましい一実施形態では、個

50

体、対象、宿主、または患者はヒトである。他の対象には、HCCおよび肝炎を発症することが知られているウッドチャックおよびアヒルが含まれる。他の対象は、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、霊長類、およびマウスを含み得るが、これらだけには限られない。

【0049】

「単離された」は、そのポリヌクレオチド、ポリペプチド、免疫グロブリン、または宿主細胞が本来存在する環境と異なる環境中に存在するポリヌクレオチド、ポリペプチド、免疫グロブリン、または宿主細胞を指す。

【0050】

「標識」は、直接的に、またはシグナル生成系の1つまたは複数の他のメンバーとの相互作用を介したいずれかで、検出可能なシグナルを与えることができる作用物質を指す。直接検出可能であり本発明において用途を見出すことができる標識は、蛍光標識を含む。具体的なフルオロフォアは、フルオレセイン、ローダミン、BODIPY、シアニン色素などを含む。本発明は、標識として例えば<sup>35</sup>S、<sup>32</sup>P、<sup>3</sup>Hなどの放射性同位体の使用も企図する。コロイド金または着色ガラスもしくはプラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス）ビーズなどの比色標識も利用することができる。例えば、米国特許第4,366,241号、同第4,277,437号、同第4,275,149号、同第3,996,345号、同第3,939,350号、同第3,850,752号、および同第3,817,837号を参照。

10

【0051】

用語「正常な生理条件」は、生物または細胞内で典型的である条件を意味する。いくつかの器官または生物は極端な条件をもたらすが、生物内および細胞内環境は通常約pH7（すなわち、pH6.5～pH7.5）で変化し、主な溶媒として水を含み、0を越える50未満の温度で存在する。様々な塩の濃度は、参照として使用する器官、生物、細胞、または細胞内区画に依存する。

20

【0052】

本明細書で互換的に使用する「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、任意の長さのポリマー型のヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドのいずれかを指す。したがって、これらの用語は、プリンおよびピリミジン塩基、または他の天然、化学的もしくは生化学的に修飾された、非天然、または誘導体化ヌクレオチド塩基を含む、一本鎖、二本鎖、または多重鎖DNAまたはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、またはポリマーを含むが、これらだけには限られない。これらの用語は、イントロン配列を含むmRNAまたはcDNAをさらに含むが、これらだけには限られない。ポリヌクレオチドの骨格は、(RNAもしくはDNAにおいて典型的に見ることができる)糖およびリン酸基、または修飾もしくは置換糖もしくはリン酸基を含むことができる。あるいは、ポリヌクレオチドの骨格はホスホラミダイトなどの合成サブユニットのポリマーを含むことができ、したがってオリゴデオキシヌクレオチドホスホラミダイトまたは混合型ホスホラミダイト-ホスホジエステルオリゴマーであり得る。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体、ウラシル、他の糖、およびフルオロリボースおよびチオエート、およびヌクレオチド分岐などの連結基などの修飾ヌクレオチドを含むことができる。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド構成要素によって割り込まれる可能性がある。標識構成要素との結合などによって、重合後にポリヌクレオチドをさらに修飾することができる。この定義内に含まれる他の型の修飾は、キャップ、類似体と1つまたは複数の天然に存在するヌクレオチドの置換、およびポリヌクレオチドとタンパク質、金属イオン、標識構成要素、他のポリヌクレオチド、または固形担体を結合させるための手段の導入である。用語「ポリヌクレオチド」はペプチド核酸も包含する。ポリヌクレオチドはゲノムDNA、cDNA、またはDNA-RNAハイブリッドをさらに含むことができる。

30

40

【0053】

本明細書で互換的に使用する「ポリペプチド」および「タンパク質」は、翻訳された、

50

非翻訳の、化学的に修飾された、生化学的に修飾された、および誘導体化アミノ酸を含み得る、任意の長さのポリマー型のアミノ酸を指す。ポリペプチドまたはタンパク質は天然、組換え、または合成、またはこれらの任意の組合せであってよい。さらに、ポリペプチドまたはタンパク質は、天然に存在するタンパク質又はペプチドの断片を含むことができる。ポリペプチドまたはタンパク質は単分子であってよく、または多分子複合体であってよい。さらに、このようなポリペプチドまたはタンパク質は修飾ペプチド骨格を有するものであってよい。これらの用語は、N末端メチオニン残基有りまたは無しの、異種アミノ酸配列を有する融合タンパク質、異種および相同リーダー配列を有する融合タンパク質、免疫タグタンパク質などを含めた、融合タンパク質を含む。

【0054】

疾患または障害に対する「素因」は、そのような疾患または障害に対する個体の易罹性を指す。罹患しやすい個体は、正常/野生型個体と比較して、例えば癌または線維症を有する可能性が統計上高い。

【0055】

用語「予後評価」および「予後評価する」は、疾患の過程を予想する操作または技術を指す。さらにこれらの用語は、その疾患の通常過程から予想される、または個々の症例の特別な特徴によって示される疾患からの生存および回復の見込みを指す。さらにこれらの用語は、その兆候および症状から疾患を確認する操作または技術を指す。

【0056】

用語「予後評価指標」または「指標」は、予後評価の根拠もしくは基盤として働く、またはそれと関係がある可能性がある全てを指す。これらの用語は、本明細書に記載する遺伝子発現の試験および特徴付けの結果、および類似した症状を示す他の疾患または状態の区別を含めた、鑑別診断の任意の根拠もしくは基盤をさらに指す。さらに、用語「指標」または「予後評価指標」は、考えられる悪性疾患過程を区別するために使用することができる、本明細書に記載する遺伝子発現の試験および特徴付けの結果を含めた、任意の根拠もしくは基盤を指す。

【0057】

「タンパク質捕捉物質」は、それ自体がタンパク質と結合することができる一分子または多分子複合体を指す。一実施形態では、タンパク質捕捉物質は、実質的に特異的な形式でそれらの結合パートナーと結合する。一実施形態では、タンパク質捕捉物質は約  $10^{-6}$  未満の解離定数 (KD) を示す可能性がある。タンパク質捕捉物質は、タンパク質またはポリヌクレオチドなどの生体分子を含むことができる。生体分子は、天然に存在する、組換え、または合成生体分子をさらに含むことができる。タンパク質捕捉物質の例には、免疫グロブリン、抗原、受容体、または他のタンパク質、またはそれらの一部分もしくは断片がある。さらに、タンパク質捕捉物質は、非共有結合相互作用を介してそれらの結合パートナーのみと相互作用する作用物質に限られないと理解される。そうではなく、タンパク質捕捉物質は、それらが結合するタンパク質と共有結合した状態になる可能性もある。例えば、タンパク質捕捉物質は、結合後にその結合パートナーと光架橋することができる。

【0058】

「配列同一性」は類似性または相補性の程度を指す。部分的同一性または完全同一性が存在し得る。部分的相補配列は、標的ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションから同一配列を少なくとも部分的に阻害する配列であり、それは技術用語を使用して「実質的に同一」と呼ばれる。完全相補配列と標的配列のハイブリダイゼーションの阻害は、低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイゼーションアッセイ (サザンまたはノーザンプロット、溶液中ハイブリダイゼーションなど) を使用して調べることができる。実質的に同一な配列またはプローブは、低ストリンジェンシー条件下での標的配列と完全同一配列またはプローブの結合 (すなわち、ハイブリダイゼーション) に関して競合し阻害する。これは、低ストリンジェンシー条件は非特異的結合が許容されるような条件であるということではなく、低ストリンジェンシー条件は、2つの配列の互いの結合が特異的 (すなわち

10

20

30

40

50

、選択的)相互作用であることを必要とする。非特異的結合が存在しないことは、部分的相補度(例えば、約30%未満の同一性)さえない第二の標的配列の使用によって試験することができ、非特異的結合の非存在下では、プローブは第二の非相補的標的配列とハイブリダイズしない。

#### 【0059】

2つの核酸またはポリペプチド配列に関する配列同一性を調べる別の方法は、特定領域にわたり最大対応性でアラインメントをとるとき同一である2配列中の残基の参照を含む。本明細書で使用する配列同一性の割合(percentage)は、比較ウィンドウにわたる2つの最適にアラインメントをとる配列を比較することによって決定した値を意味し、この場合、比較ウィンドウ中のポリヌクレオチド配列の一部分は、2配列の最適アラインメントで(付加または欠失を含まない)参照配列と比較して付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含む可能性がある。この割合は、両配列中の同一核酸塩基が存在する位置の数を決定して一致した位置の数を得ること、比較ウィンドウ中の位置の総数で一致した位置の数を割ること、およびその結果に100を掛けて配列同一性の割合を得ることによって計算する。

10

#### 【0060】

「ストリンジェントな条件」は、その条件下でプローブはその標的ポリヌクレオチド配列とハイブリダイズすることができるが、他の配列とはハイブリダイズすることができない条件を指す。ストリンジェントな条件は配列依存的である(例えば、より長い配列はより高い温度で特異的にハイブリダイズする)。一般に、定義したイオン強度およびpHで特定配列に関して熱融点( $T_m$ )より約5%低いストリンジェントな条件が選択される。 $T_m$ は標的配列と相補的なプローブの50%が平衡状態で標的配列とハイブリダイズする(定義したイオン強度、pH、およびポリヌクレオチド濃度下での)温度である。典型的には、ストリンジェントな条件は、塩濃度が約pH7.0~約pH8.3において少なくとも約0.01~約1.0Mナトリウムイオン濃度(または他の塩)であり、温度が短いプローブ(例えば、10~50ヌクレオチド)に関して少なくとも約30%である条件である。ホルムアミドなどの不安定化剤を加えることによって、ストリンジェントな条件を得ることもできる。

20

#### 【0061】

「実質的に精製された」は、その本来の環境から除去され、それが本来結合していた他の構成要素を少なくとも約60%含まない、少なくとも約65%含まない、少なくとも約70%含まない、少なくとも約75%含まない、少なくとも約80%含まない、少なくとも約83%含まない、少なくとも約85%含まない、少なくとも約88%含まない、少なくとも約90%含まない、少なくとも約91%含まない、少なくとも約92%含まない、少なくとも約93%含まない、少なくとも約94%含まない、少なくとも約95%含まない、少なくとも約96%含まない、少なくとも約97%含まない、少なくとも約98%含まない、少なくとも約99%含まない、少なくとも約99.9%含まない、または少なくとも約99.99%以上含まない化合物を指す。

30

#### 【0062】

「標的タンパク質」は、タンパク質捕捉物質が特異的にハイブリダイズまたは結合する生体試料に由来することが多いポリペプチドを指す。それは検出される標的タンパク質の有無、または定量化される標的タンパク質の量のいずれかである。標的タンパク質は、標的に対する対応するタンパク質捕捉物質によって認識される構造を有する。標的タンパク質またはアミノ酸は、タンパク質捕捉物質が対象とする大きなタンパク質の特異的構造、またはその発現レベルを検出することが望ましい全体構造(例えば、遺伝子またはmRNA)を指すこともできる。

40

#### 【0063】

用語「治療」、「治療すること」、「治療する」などは、望ましい薬理および/または生理効果を得ることを指す。この効果は疾患またはその症状を完全または部分的に予防する点で予防的であってもよく、および/または疾患および/またはその疾患に起因する悪

50

影響を部分的または完全な安定化もしくは治癒する点で治療的であってもよい。「治療」は哺乳動物、特にヒトにおける疾患の任意の治療を包含し、(a) 疾患または症状の素因がある可能性があるがそれを有するとまだ診断されていない対象中の疾患または症状の発生を予防すること、(b) 疾患症状を抑制すること、すなわちその発症を抑えること、または(c) 疾患症状を軽減すること、すなわち疾患または症状の退行を引き起こすことを含む。

【0064】

b. HF - ASSOCIATEDポリペプチド

一態様では、本発明は、その示差的発現が肝線維症と関係があるポリペプチドを含む「HF - ASSOCIATEDポリペプチド」に関する。HF - ASSOCIATEDポリペプチドは天然に存在するタンパク質の変異体も含み、このような変異体は天然に存在するタンパク質と同一または実質的に類似している。一般に、変異体ポリペプチドは、BLASTにより測定して、本明細書に記載するHF - ASSOCIATEDポリペプチドと少なくとも約80%、通常は少なくとも約90%、およびより通常は少なくとも約98%の配列同一性を有する配列を有する。変異体ポリペプチドは、天然または非天然グリコシル化状態である可能性がある。

10

【0065】

一般に、本明細書に記載するHF - ASSOCIATEDポリペプチドの変異体は、BLASTなどの当技術分野でよく知られている方法により決定して、少なくとも約65%を超える、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約83%、少なくとも約85%、少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.9%または少なくとも約99.99%を超える可能性がある配列同一性を有する。

20

【0066】

一実施形態では、変異体HF - ASSOCIATEDポリペプチドは突然変異体ポリペプチドであってよい。HF - ASSOCIATEDポリペプチドの突然変異は、これらには限られないが、アミノ酸置換、付加または欠失から生じる可能性がある。アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換、または非必須アミノ酸を除去するための置換であってよい。一般に、保存的アミノ酸置換は、置換されるアミノ酸の総電荷、疎水性、親水性、および/または立体的大きさ(bulk)を保持する置換である。

30

【0067】

いくつかの突然変異体HF - ASSOCIATEDポリペプチドでは、アミノ酸を置換してリン酸化部位またはアセチル化部位を改変することができる。

【0068】

重要なことに、変異体ポリペプチドは、タンパク質の特定領域(例えば、機能ドメインおよび/または、ポリペプチドがタンパク質ファミリーのメンバーである場合、コンセンサス配列と関係がある領域)の高い生物活性を保持または保有するように設計することができる。変異体を生成するためのアミノ酸改変の選択は、アミノ酸のアクセシビリティ(内部対外部)、変異体ポリペプチドの熱安定性、所望のグリコシル化部位、所望のジスルフィド架橋、所望の金属結合部位、およびプロリンループ内の所望の置換に基づくことができる。システイン欠損ムテインはUSPN 4, 959, 314中に開示されたように生成することができる。

40

【0069】

変異体は、本明細書で開示するHF - ASSOCIATEDポリペプチドの断片、特に生物活性断片および機能ドメインに対応する断片も含む。対象の断片は典型的には少なくとも約10アミノ酸~少なくとも約15アミノ酸長、通常は少なくとも約50アミノ酸長であり、最長では300アミノ酸長以上である。本明細書に記載するタンパク質変異体は、本発明の範囲内にあるポリヌクレオチドによってコードされる。

50

## 【0070】

本発明のHF - ASSOCIATEDポリペプチドは本来存在しない環境で与えられる、例えば、それらの本来存在する環境から分離する。特定の実施形態では、HF - ASSOCIATEDタンパク質が実質的に精製された形で存在する。

## 【0071】

c. HF - ASSOCIATED作用物質：モジュレーターおよび結合パートナー別の態様では、本発明は「HF - ASSOCIATED作用物質」を提供し、これは「HF - ASSOCIATEDポリペプチド結合パートナー」からなるクラスの分子を指す。

## 【0072】

HF - ASSOCIATEDポリペプチド結合パートナーは、HF - ASSOCIATEDポリペプチドと結合する分子である。例示的なポリペプチド結合パートナーは免疫グロブリンである。結合パートナーは、必ずしもそうする必要はないが、HF - ASSOCIATEDポリペプチドの生物活性を調節することができる。

## 【0073】

## d. 免疫グロブリン

HF - ASSOCIATEDタンパク質を同定するために使用するHF - ASSOCIATED作用物質は、HF - ASSOCIATEDポリペプチドと特異的に結合する免疫グロブリンおよび免疫グロブリンの機能的等価物を含む。用語「免疫グロブリン」と「抗体」は、本明細書では互換的かつその最も広い意味で使用する。したがって、それらが望ましい生物活性を示す限り、それらは少なくとも2つの完全抗体から形成される完全モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）および抗体断片を包含する。一実施形態では、対象免疫グロブリンは少なくとも1つのヒト定常ドメインを含む。別の実施形態では、HF - ASSOCIATED免疫グロブリン作用物質は、ヒト定常ドメインと少なくとも約90～95%の配列同一性を示しヒトエフェクター機能を依然保持する定常ドメインを含む。免疫グロブリンHF - ASSOCIATED作用物質またはその機能的等価物はヒト、キメラ、ヒト化、マウス、CDR移植、ファージディスプレイ、細菌ディスプレイ、酵母ディスプレイ、トランスジェニックマウスで生成、突然変異誘発、およびランダム化することができる。

## 【0074】

## i. 一般的抗体

用語「抗体」および「免疫グロブリン」は、組換え抗体および抗体断片を含めた、抗原と結合することができる完全構築抗体および抗体断片（例えばFab'、F'(ab)<sub>2</sub>、Fv、単鎖抗体、ダイアボディ）を包含する。免疫グロブリンおよび抗体は、キメラ、ヒト、またはヒト化であることが好ましい。

## 【0075】

重鎖および軽鎖の可変ドメインは、同族抗原の特定エピトープを認識し、またはそれと結合する。用語「エピトープ」を使用して、免疫グロブリンの可変末端が結合する抗原上の特異的結合部位または抗原決定基を指す。エピトープは直鎖状であってよい、すなわち一次HF - ASSOCIATED配列中に見られるアミノ酸残基の配列で構成されてよい。免疫グロブリンがフォールディングしたHF - ASSOCIATED分子において見られる3-D構造を認識するように、エピトープは立体構造的であってよい。エピトープは、直鎖状要素と立体構造要素の組合せであってよい。さらに、標的含有腫瘍細胞によって発現される分子の炭水化物部分もエピトープであり得る。

## 【0076】

1) それらが閾値レベルの結合活性を示す、および/または2) それらが公知の関連ポリペプチド分子と有意に交差反応しない場合、免疫グロブリンは「特異的に結合している」と言える。免疫グロブリンの結合親和性は、例えばScatchard分析(Scatchard, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660～672, 1949)によって、当業者により容易に決定することができる。いくつかの実施形態では、本発明の免

10

20

30

40

50

疫グロブリンは、他のタンパク質より少なくとも  $10^3$ 、より好ましくは少なくとも  $10^4$ 、より好ましくは少なくとも  $10^5$ 、およびさらにより好ましくは少なくとも  $10^6$  倍高く HF - ASSOCIATED と結合する。

【0077】

i i . ポリクローナルおよびモノクローナル抗体

本発明の免疫グロブリンはポリクローナルまたはモノクローナルであってよく、当技術分野でよく知られている任意の方法によって作製することができる。

【0078】

ポリクローナル抗体は、関連抗原およびアジュバントの多数回皮下 (s c)、腹腔内 (i p) または筋肉内 (i m) 注射によって動物中で産生させることが好ましい。免疫処置する種に免疫原性があるタンパク質と、関連抗原を結合させることは有用であり得る。さらに、ミョウバンおよびその他などの凝集剤を適切に使用して免疫応答を高める。

10

【0079】

用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指す。モノクローナル抗体は非常に特異的であり、1つの抗原部位を対象とする。さらに、異なる抗原決定基に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、それぞれのモノクローナル抗体は抗原上の1つの抗原決定基に対するものである。

【0080】

それらの特異性以外に、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンによって汚染されずに、それらを合成することができる点で有利である。例えば、ハイブリドーマ法によって、または組換え DNA 法によってモノクローナル抗体を作製することができる。モノクローナル抗体 HF - ASSOCIATED 作用物質は、ファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

20

【0081】

i i i . キメラおよびヒト化抗体

HF - ASSOCIATED ポリペプチド結合免疫グロブリンまたは抗体は、可変領域がげっ歯類などの一種に由来する可能性があり、定常領域がヒトなどの第二の種に由来する可能性があるという意味で「キメラ」であり得る。

【0082】

「ヒト化」型の非ヒト HF - ASSOCIATED タンパク質結合抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有するキメラ抗体である。その大部分に関して、ヒト化抗体は、その中でレシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類などの非ヒト種 (ドナー抗体) の超可変領域由来の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン (レシピエント抗体) である。いくつかの場合、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域 (FR) 残基は対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体中またはドナー抗体中では見られない残基を含むことができる。

30

【0083】

一般に、ヒト化抗体は、その中で全てまたは実質的に全ての超可変ループが非ヒト免疫グロブリンのループに対応し、全てまたは実質的に全ての FR がヒト免疫グロブリン配列の FR である、少なくとも1つ、および典型的には2つの実質的に全ての可変ドメインを含むことができる。一実施形態では、ヒト化抗体は、アクセプター (非ヒト) FR、例えばマウス FR と少なくとも 65% の配列同一性を示すヒト化 FR を含む。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域 (Fc)、特にヒト免疫グロブリン配列の少なくとも一部分を含むこともできる。

40

【0084】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は当技術分野で記載されている。ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からそれに導入された1つまたは複数のアミノ酸残基を有することが好ましい。これらの非ヒトアミノ酸残基は、「移入」可変ドメインから典型的に得られる「移入」残基と呼ばれることが多い。超可変領域配列とヒト抗体の対応する配列を置換する

50

ことによって、ヒト化を本質的に実施することができる。したがって、このようなヒト化抗体は、実質的に完全未満のヒト可変ドメインが非ヒト種由来の対応する配列によって置換されているキメラである。実際、ヒト化抗体は典型的には、その中でいくつかの超可変領域残基、およびおそらくいくつかのFR残基がげっ歯類抗体中の類似部位由来の残基によって置換されているヒト抗体である。ヒト化抗体を作製する際に使用するヒト可変ドメイン、軽鎖と重鎖両方の選択は、抗原性を低下させるために非常に重要である。

【0085】

他の方法は一般に、抗体アクセプター可変領域フレームワークにドナーCDR結合親和性を与えることを含む。1つの方法は、可変領域結合断片の結合親和性を同時に移し最適化することを含む。別の方法は、抗体可変領域の結合親和性の最適化に関する。

10

【0086】

i v . 抗体断片

「抗体断片」は、完全抗体の一部、好ましくはその抗原結合または可変領域を含む。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')<sup>2</sup>、Fv断片、ダイアボディ、直鎖状抗体、単鎖抗体分子、および抗体断片から形成される多重特異性抗体がある。

【0087】

パパインによる抗体の消化によって、それぞれ1つの抗原結合部位を有する「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片、および残基「Fc」断片を生成する。Fab断片は、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第一定常ドメイン(CH1)も含有する。

【0088】

ペプシン処理によって、2つの抗原結合部位を有し依然として抗原と架橋することができるF(ab')<sup>2</sup>断片が生じる。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つまたは複数のシステインを含めた、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に数個の残基を加えることによってFab断片と異なる。Fab'-SHは本明細書では、その中で定常ドメインのシステイン残基(複数可)が少なくとも1つの遊離チオール基を有するFab'を示す。F(ab')<sup>2</sup>抗体断片は、それらの間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として最初に作製された。抗体断片の他の化学的カップリングは当技術分野でよく知られている。

20

【0089】

「Fv」は、完全抗原認識および抗原結合部位を含有する最小抗体断片である。この領域は、堅い非共有結合状態の、1つの重鎖および1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この形状では、それぞれの可変ドメインの3つの超可変領域が相互作用して、VH-VL二量体の表面上の抗原結合部位を画定する。集散的に、6つの超可変領域が抗体に抗原結合特異性をもたらす。しかしながら、1つの可変ドメイン(または抗原に特異的な3つの超可変領域のみを含むFvの半分)でさえ、結合部位全体より低い親和性ではあるが、抗原を認識しそれと結合する能力を有する。

30

【0090】

「単鎖Fv」または「scFv」抗体断片は抗体のVHおよびVLドメインを含み、これらのドメインは一本のポリペプチド鎖中に存在する。Fvポリペプチドは、scFvが抗原結合に望ましい構造を形成するのを可能にするポリペプチドリンカーを、VHドメインとVLドメインの間にさらに含むことができる。PLUCKTHUN、113 THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES 269~315 (Rosenburg and Moore eds. 1994)を参照。WO93/16185; 米国特許第5,587,458号および同第5,571,894号も参照。

40

【0091】

抗体断片を作製するための様々な技法が開発されている。従来、これらの断片は完全抗体のタンパク質消化分解によって誘導された。しかしながら、現在これらの断片は組換え宿主細胞によって直接産生することができる。

【0092】

50

#### v . 結合および標識

抗HF - ASSOCIATEDタンパク質抗体はそれらの「裸状態」または非結合型で投与することができ、またはそれらと結合する他の作用物質を有することができる。

##### 【0093】

例えば、抗体は検出可能に標識された型であってよい。放射性同位体、親和性標識（例えばビオチン、アビジンなど）、酵素標識（例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど）、蛍光標識（例えばFITCまたはローダミンなど）、常磁性原子などを使用することによって抗体を検出可能に標識することができる。このような標識を実施するための手順は当技術分野でよく知られている。

##### 【0094】

#### vi . 二重特異性抗体

本発明の二重特異性抗体は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片である。それぞれの断片は、同じポリペプチド鎖（VH - VL）中で軽鎖可変ドメイン（VL）と結合した重鎖可変ドメイン（VH）を含む。同じ鎖上において2ドメイン間で対形成するのを可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、これらのドメインを別の鎖の相補ドメインと対形成させ、2つの抗原結合部位を形成する。

##### 【0095】

二重特異性抗体を作製するための方法は当技術分野でよく知られている。完全長二重特異性抗体の従来作製は、2本の鎖が異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対の同時発現に基づく。

##### 【0096】

別の手法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン（抗体 - 抗原組合せ部位）を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合することができる。具体的には、可変ドメインを、ヒンジ、CH2、およびCH3領域の少なくとも一部分を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインと融合させる。一実施形態では、融合タンパク質は第一の重鎖定常領域（CHI）を含む。それが軽鎖結合に必要な部位を含有するからである。免疫グロブリン重鎖融合体、および望ましい場合、免疫グロブリン軽鎖をコードするポリヌクレオチドを別の発現ベクターに挿入することができ、適切な宿主生物にコトランスフェクトすることができる。これは、構築中に使用する不均等な割合の3つのポリペプチド鎖が最適収率をもたらすときの実施形態において、3つのポリペプチド断片の相互比を調節する際に高い柔軟性をもたらす。しかしながら、等しい割合の少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高い収率をもたらすとき、またはその割合が特に有意ではないとき、1つの発現ベクター中に2つまたは3つ全てのポリペプチド鎖のコード配列を挿入することができる。

##### 【0097】

二重特異性抗体は、ロイシンジッパーおよび単鎖Fv（sFv）二量体を使用しても作製されている。

##### 【0098】

#### e . 線維症療法の診断、予後評価、および評価

別の態様では、したがって本発明は、本明細書に記載するHF - ASSOCIATEDポリペプチドを使用して線維症を診断および予後評価するための方法を提供する。具体的な非制限的实施形態では、これらの方法は、細胞または血清/血漿中のHF - ASSOCIATEDポリペプチドを検出する、対象の線維症および線維症の重症度の診断を容易にする、対象の予後評価の決定を容易にする、対象における線維症に対する易罹患性を決定する、および（例えば、化学療法レジメンの最中またはその後腫瘍負荷を評価することにより、治療効果の指標を与えることによって）療法に対する対象の応答性を評価するのに有用である。このような方法は、患者の生体試料、例えば血清/血漿または疑わしいもしくは予期される線維症組織もしくは細胞中のHF - ASSOCIATEDポリペプチドのレベルの検出を含むことができる。本発明の検出法は、単離細胞、または全組織もしくは体液、例えば血液、血漿、血清、尿などにおいて、in vitroまたはin vivoで実施することができる。一実施形態では、HF - ASSOCIATEDポリペプチ

10

20

30

40

50

ドを使用して線維症を検出および評価することができる。これらのバイオマーカーは、例えば肝線維症、腎線維症、心筋線維化、皮膚線維化、膵線維化などの線維症を示す任意の疾患に適用することができるが、より好ましくは、線維症は肝線維症である。

#### 【0099】

##### f. HF - ASSOCIATEDポリペプチドの検出

血清または血漿中のHF - ASSOCIATEDポリペプチドを検出するための方法を提供する。コードされるポリペプチドに特異的な抗体を使用したイムノアッセイ、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、タンパク質ドットプロット、ウエスタンプロット、比濁法、ネフェロメトリーなど、およびコードされるポリペプチド、例えば生物活性に関する機能アッセイを含むが、これらには限られない、任意の様々な公知の方法を検出に使用することができる。これらには限られないが、質量分析を使用した多重反応モニタリングなどの非抗体手法を使用して、HF - ASSOCIATEDポリペプチドを定量化することも可能である。

10

#### 【0100】

本明細書を読むことによって当業者には容易に明らかになるように、本明細書に記載する検出法および他の方法は容易に変更することができる。このような変更は本発明の意図する範囲内にある。例えば、前述の検出スキームでは、検出において使用するためのプローブを固形担体に固定することが可能であり、試験試料は固定プローブと接触させることが可能である。次いでプローブと試験試料の結合を、様々な方法で、例えば試験試料と結合した検出可能な標識を検出して、試験試料固定プローブ複合体の検出を容易にすることによって検出することができる。

20

#### 【0101】

本発明は、HF - ASSOCIATEDポリペプチドに特異的な抗体を使用して、生体試料中のHF - ASSOCIATEDポリペプチドの存在を検出するおよび/またはそのレベルを測定するための方法をさらに提供する。具体的には、生体試料中のHF - ASSOCIATEDポリペプチドの存在を検出するための方法は、試料とモノクローナル抗体を接触させるステップ、および試料中の抗体とHF - ASSOCIATEDポリペプチドの結合を検出するステップを含むことができる。より具体的には、放射標識、酵素、クロモフォアおよびフルオロフォアを含むが、これらには限られない化合物を使用して、抗体を標識して検出可能なシグナルを生成することができる。

30

#### 【0102】

HF - ASSOCIATEDポリペプチドに特異的な抗体、またはその機能的等価物の特異的結合の検出は、適切な対照と比較した場合、HF - ASSOCIATEDポリペプチドが試料中に存在するという指標である。適切な対照は、HF - ASSOCIATEDポリペプチドを含有しないことが知られている試料、およびコードされるポリペプチドに非特異的な抗体、例えば抗イディオタイプ抗体と接触した試料を含む。特異的抗体 - 抗原相互作用を検出するための様々な方法が当技術分野で知られており、これらには限られないが、標準的な免疫組織学的方法、免疫沈降法、酵素イムノアッセイ、およびラジオイムノアッセイを含めた方法において使用することができる。一般に、特異的抗体は、直接的または間接的のいずれかで検出可能に標識され得る。直接標識には、放射性同位体、その産物が検出可能である酵素(例えば、ルシフェラーゼ、3 - ガラクトシターゼなど)、蛍光標識(例えば、フルオレセインイソチシアネート、ローダミン、フィコエリスリンなど)、蛍光発光金属(例えば、EDTAなどの金属キレート基によって抗体と結合した、112Eu、または他のランタノイド系)、化学発光化合物(例えば、ルミノール、イソルミノール、アクリジニウム塩など)、生物発光化合物(例えば、ルシフェリン、イクオリン(緑色蛍光タンパク質)など)がある。抗体は、ポリスチレンプレートまたはビーズなどの不溶性担体と結合(カップリング)することができる。間接標識には、第二の抗体が上記のように標識された、コードされるポリペプチドに特異的な抗体(「第一の特異的抗体」)に特異的な第二の抗体、および特異的結合対、例えば、ビオチン - アビジンのメンバーなどがある。生体試料は、細胞、細胞粒子、または可溶性タンパク質を固定するこ

40

50

とができる、ニトロセルロースなどの固形支持体もしくは担体と接触させ固定することが可能である。次いで支持体は、検出可能に標識された第一の特異的抗体との接触後に、適切な緩衝液で洗浄することができる。検出法は当技術分野で知られており、検出可能な標識により発せられるシグナルに応じて適切に選択され得る。検出は一般に、適切な対照および適切な標準と比較して実施される。

#### 【0103】

##### g. キット

検出法はキットの一部として提供することができる。したがって本発明は、生体試料中のHF-ASSOCIATEDポリペプチドの存在および/またはレベルを検出するためのキットをさらに提供する。これらのキットを使用した手順は、臨床研究所、実験研究所、医療従事者、または私人によって実施され得る。線維症中に示差的に発現されるHF-ASSOCIATEDポリペプチドを検出するための本発明のキット。キットは、これらには限られないが、緩衝液、現像試薬、標識、反応表面、検出手段、対照試料、標準、説明書、および解釈情報を含めた、手順中に有用である他の構成要素を提供することができる。

#### 【0104】

##### (実施例)

正常な健常個体由来の血漿を硬変症患者と比較したときの、示差的に発現されるタンパク質の確立

本発明者らは、健常個体と比較したとき、HCV誘発性硬変症患者のヒト血漿試料中で様々なタンパク質が示差的に発現されることを発見している。この発見は、二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動(2D-PAGE)、ゲルマトリクスにおいて二次元でタンパク質を分離して別個のタンパク質スポットを得る技法を使用して、これらの血漿試料を比較することによって得た。広いpH3~10範囲を使用した2D-PAGEがWO/2008/031051において以前に使用され、肝線維症の血清中でバイオマーカーが同定された。本明細書における本発明の線維症バイオマーカーの同定は、狭域pH3~5.6範囲を使用したものでWO/2008/031051と異なる。それが3つの最も多量に存在する血漿/血清中タンパク質、すなわち、アルブミン、IgGおよびトランスフェリンの主要アイソフォームの範囲外にあるため、このpH範囲を選択した。このpH3~5.6範囲がバイオマーカーの発見に使用されたのはこれが初めてである。

#### 【0105】

疾患における新規なバイオマーカーの発見は、10桁に及ぶ血清および血漿中の動的タンパク質濃度範囲によって妨げられる。したがって、非常に多量のタンパク質、特にアルブミン、免疫グロブリンおよびトランスフェリンが微量タンパク質の検出を制限する。バイオマーカーを発見する際のこの問題を克服するために、多くの者が、電気泳動前に試料から多量のタンパク質を除去して微量タンパク質の表示を改善するための、抗体-および色素親和性ベースの事前分画戦略を試みてきた。しかしながら、免疫沈降はこれらの多量のタンパク質を除去するのに必要とされる多量の抗体のため高価であり、色素親和性ベースの方法は、多数の非アルブミンタンパク質の望ましくない除去、およびしたがってプロテオーム解析中に可能性のあるバイオマーカーを除去する可能性があるため、有効性が低く特異性が低い。本発明において使用する多量のタンパク質(2mg)と異なり、多量のタンパク質の除去中の回収問題および濃縮中の損失のため、多量の試料の除去後に同様の高レベルのタンパク質を充填することは非常に難解である。

#### 【0106】

血漿中の多量のタンパク質の問題にもかかわらず、WO/2008/031051では2D-PAGEを広いpH3~10範囲で使用して、肝臓の線維症のいくつかの新規な候補バイオマーカーを同定することに成功している。本発明では、この肝線維症のバイオマーカーのパネルが、アルブミン、免疫グロブリンおよびトランスフェリンの主要アイソフォームの範囲外に及ぶ狭域pH3~5.6で2D-PAGEを使用し、WO/2008/031051の4倍を超えるタンパク質を充填することを可能にすることによって増大す

る。これによって微量の特徴の表示 (representation) を高め、分離を改善することができた。血清と血漿の両方に関する酸性プロテオームの大幅に改善されたゲルベースの分離はこの pH 範囲を使用して実施し、広い pH 3 ~ 10 範囲を使用した WO / 2008 / 031051 では見られなかった肝線維症の微量バイオマーカーの同定を可能にした。

【実施例 1】

【0107】

二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (2D - PAGE)

HCV 誘発性肝臓癩痕化のバイオマーカーを同定するため、健常個体および HCV 誘発性硬変症患者 (各群中に 6 個体) の血漿試料を 2D - PAGE ベースのプロテオミクス試験で分析した。全ての血漿試料は P100 チューブ (BD、Oxford、UK) に回収した。任意の他の血液回収チューブと異なり、これらの P100 血漿チューブは血液回収時に即座に可溶化する独自のタンパク質安定化剤を含有し、これによってタンパク質の回収および保存が高まり、それらがプロテオーム解析およびバイオマーカー発見のために理想的となるため、これらの P100 血漿チューブを選択した。様々な程度の肝線維症を有する患者由来の血清を分析した WO / 2008 / 031051 と異なり、本発明は、健常個体および硬変症患者由来の試料間で示差的に発現するタンパク質のみに焦点を当てる。軽度および中等度の線維症において以前に同定された全ての示差的に発現するタンパク質は硬変症でも見られたので、この手法を採用し、この試験におけるこれらの中間段階線維症の分析はさらなる候補線維症バイオマーカーを与えないであろうことが示唆された。2 ミリグラムの血漿タンパク質を、一次元ゲルで pH 3 ~ 5.6 非線形勾配を使用して電荷によって、次に 9 ~ 16 % (w/v) SDS - PAGE 勾配を使用して二次元で分子量 (サイズ) によって分離した。ゲルの電気泳動、蛍光染色およびスキャンは Gangadharanら、(2007)、Clin. Chem、53、1792 により記載されたように実施した。

10

20

【実施例 2】

【0108】

示差的画像解析およびタンパク質同定

生成したスポットの二次元配置を、コンピュータ支援画像解析によって正常血漿試料と硬変症血漿試料の間で比較した。全 2D - PAGE ゲルのスキャン画像を、Gangadharanら、(2007)、Clin. Chem、53、1792 により記載されたコンピュータ支援画像解析によって分析した。2 倍以上異なっていた示差的に発現した変化は有意であると考えた。合計 57 の示差的に発現した特徴を切除し、トリプシンで消化し、Gangadharanら、(2007)、Clin. Chem、53、1792 により記載されたように質量分析法によって分析した。

30

【実施例 3】

【0109】

硬変症が原因である肝線維症のヒト血漿バイオマーカーの同定

示差的画像解析は、可能性のある血漿バイオマーカーの最初の証拠を明らかにした。図 1 ~ 4 を参照されたい。この解析は、脂質輸送阻害剤タンパク質、亜鉛 - アルファ - 2 - 糖タンパク質、pH 5.46 ~ 5.49 のベータハプトグロビン、ハプトグロビン関連タンパク質、アポリポタンパク質 C - III、アポリポタンパク質 E、C4b - 結合タンパク質ベータ鎖、パラオキソナーゼ / アリアルエステラーゼ 1、レチノール結合タンパク質 4、アフアミン、アルファ - 2 - HS - 糖タンパク質、コルチコステロイド結合グロブリン、ロイシンリッチアルファ - 2 - 糖タンパク質およびフィブリノゲンガンマ鎖の発現は硬変症血清において低下し、一方で完全補体 C3dg、免疫グロブリン J 鎖、性ホルモン結合グロブリン、14 - 3 - 3 タンパク質ゼータ / デルタ、アディポネクチンおよびアルファ - 1 - アンチトリプシンの発現は増大したことを示した。糖タンパク質ヘモペキシンの翻訳後修飾も観察された。

40

【0110】

WO / 2008 / 031051 中で既に言及された線維症バイオマーカー、CD5 抗原

50

様タンパク質および I g アルファ / カッパ鎖の増大、アルファ - 1 - アンチキモトリプシン、クラスτεリン、補体 C 4、インター - トリプシン阻害剤重鎖 H 4 およびトランスチレチンの低下も同定された。インター - トリプシン阻害剤重鎖 H 4 の場合、質量分析法によるペプチド配列分析によって、以前に W O / 2 0 0 8 / 0 3 1 0 5 1 中で 3 5 および 7 0 k D a 切断断片のみが減少すると同定されたとき、このタンパク質の非切断型が減少することが確認された。

【 0 1 1 1 】

全ての前述のタンパク質は、質量分析法によって上位スコアタンパク質として同定した。他の低スコアタンパク質はゲル特徴で同定し、これを排除することはできないが、示差的に発現した変化の原因である可能性は低い。同定したタンパク質の低スコアは、I g ラムダ鎖およびアポリポタンパク質 A I で増大し、アルブミン、A M B P、プロトロンビン、色素上皮由来因子および血清アミロイド P 成分で減少した。

10

【 0 1 1 2 】

【表 1】

硬変症を有する患者	
減少	増大
脂質輸送阻害剤タンパク質	完全補体 C3dg
亜鉛-アルファ-2-糖タンパク質	免疫グロブリン J鎖
pH5.46~5.49のベータハプトグロビン	性ホルモン結合グロブリン
ハプトグロビン関連タンパク質	14-3-3タンパク質ゼータ/デルタ
アポリポタンパク質 C-III	アディポネクチン
アポリポタンパク質 E	アルファ-1-アンチトリプシン
C4b-結合タンパク質ベータ鎖	
パラオキシナーゼ/アリアルエステラーゼ 1	
レチノール結合タンパク質 4	
アフアミン	
アルファ-2-HS-糖タンパク質	
コルチコステロイド結合グロブリン	
ロイシンリッチアルファ-2-糖タンパク質	
フィブリノゲンガンマ鎖	

20

30

【実施例 4】

【 0 1 1 3 】

血清 / 血漿中のこれらの新規なタンパク質の測定は、線維症と硬変症の両方の信頼できる診断を容易にし、これによって肝生検の必要性を排除することができる。これらの測定は、これらのタンパク質を標的とする抗体を用いたイムノアッセイを使用して実施することができる。

【 0 1 1 4 】

補体 C 3 の断片は硬変症において増大することが分かり、約 p I 4 . 9 の等電点で 3 9 k D a において 2 D - P A G E ゲル上で観察された。この断片に関して質量分析法により同定したアミノ酸は 9 5 5 から 1 2 0 1 に及んだ。補体 C 3 d g に関するアミノ酸は 9 5 5 から 1 3 0 3 に及び、その理論上の分子量および等電点 ( 3 9 k D a および p I 5 ) は観察されたゲル特徴と一致し、特徴内の補体 C 3 の断片が補体 C 3 d g であることを裏付ける。補体 C 3 d g はアミノ酸 1 0 1 0 から 1 0 1 3 にチオエステル部位を有することが知られており、これは、繊維素溶解に関与する酵素、プラスミンによって切断され得る。プラスミンは線維症において減少することが知られており、これは硬変症で観察した高レベルの非切断型補体 C 3 d g と一致する。W O / 2 0 0 8 / 0 3 1 0 5 1 では、補体 C 3 の断片は線維症および硬変症において減少することが分かり、これは 4 9 k D a p I 6 . 9 で観察され、質量分析法により同定したアミノ酸はそれがチオエステル部位の前にある補体 C 3 のアルファ鎖であることを示し、線維症における補体 C 3 のプラスミン仲介型

40

50

切断の減少を裏付けた (Gangadharanら、(2007)、Clin. Chem、53、1792)。したがって本発明では、補体C3のプラスミン切断部位に対する(すなわち、アミノ酸1010から1013においてチオエステル部位と重複する)抗体は、切断の程度を決定するのに役立つことができる。現在、補体C3のチオエステル部位の領域に対する市販の抗体は存在しないようである。切断領域に対する抗体は、肝臓癒痕化における高レベルの非切断型補体C3を決定するのにより確実に役立つことができる。

#### 【0115】

全ハプトグロビンは線維症において減少することが知られており、肝臓の線維症を診断するために他のタンパク質と共に現在使用されている(WO0216949参照)。本発明では、pH5.46~5.49のベータハプトグロビンを含有する2D-PAGE特徴は硬変症において減少することが分かり、全ハプトグロビンより信頼性が高いようであった。ハプトグロビンは4個の潜在的グリコシル化部位を有することが知られており、これらはいずれもそのベータ鎖上に存在する。ベータハプトグロビンは血漿/血清中では通常グリコシル化状態である。2D-PAGEによって血漿/血清を分離するとき、ベータハプトグロビンはpH4.7と5.8の間の等間隔の特徴の配置として見られ、これは肝臓癒痕化の減少を示す可能性がある。本発明では、ハプトグロビン、pH5.46~5.49の2D-PAGEゲル特徴は硬変症において減少し、pH4.7と5.8の間でのベータハプトグロビンの他の特徴より信頼性が高いようであった。

#### 【実施例5】

##### 【0116】

それぞれの新規なバイオマーカーに関する線維症スコアリングスケールは公式化することができる。様々な段階の肝臓の線維症にわたる、血清中のこれらのバイオマーカーの平均濃度を決定する。0~6のスケールをここで使用して臨床試験で肝臓の線維症を評価し、この場合0は線維化がないことを表し、1~5は軽度から中程度/重度まで重症度が増大する中間段階の線維症を表し、6は硬変症である(Ishak、(1995)、J Hepatol、22、696)。これらの7段階中の新規なバイオマーカーの濃度範囲を決定することによって、0~6の同様のスコアリングシステムを割り当てることができる。全ての新規なバイオマーカーのスコアのさらなる結果は、個々のバイオマーカーを調べるより信頼性の高い線維症の程度の指標を与える。

#### 【実施例6】

##### 【0117】

##### イムノアッセイ

本発明は、HF-ASSOCIATEDポリペプチドを検出する線維症を評価するためのキットを提供する。これはHF-ASSOCIATEDポリペプチドと結合する抗体を使用して実施する。これらの抗体を使用して、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ、タンパク質ドットプロット、ウエスタンプロット、比濁法、ネフェロメトリーなどのイムノアッセイを実施することができる。これらには限られないが、質量分析を使用した多重反応モニタリングなどの非抗体手法を使用して、HF-ASSOCIATEDポリペプチドを定量化することも可能である。

##### 【0118】

ELISAの場合、アッセイは96ウェルプレート中で実施することができる。1つの選択肢は、非競合部位結合ELISAを使用することである。このアッセイでは、知られている濃度の抗原(この実施例では、新規なバイオマーカーおよび血清試料)を重炭酸緩衝液中に調製し、96ウェルプレートに加え、4℃で一晩インキュベートした。次いでウェルをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)およびTween(PBS-T)の溶液で3回洗浄し、次にウシ血清アルブミンを含有するPBS溶液でブロッキングする。37℃で1時間のインキュベーション後、抗原(この実施例では、対象のバイオマーカー)に対する一次抗体を加え、プレートは37℃で1時間インキュベートし、次いでPBS-Tで3回洗浄する。次いで、動物起源の一次抗体に対するホースラディッシュペルオキシダーゼ結合二次抗体を加え、プレートは37℃で1時間インキュベートし、次にPBS-Tで3回

10

20

30

40

50

洗浄する。最後に、2, 2'-アジノ-ビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)などのペルオキシダーゼ基質をそれぞれのウェルに加え、30分後405nmにおいてプレートリーダーで吸光度を読み取る。

【0119】

代替として、サンドウィッチELISAを使用することができる。この型のアッセイでは、1つの抗体がプレートウェルの底部に結合している。抗原、この場合バイオマーカータンパク質を加え、非結合産物は洗浄によって除去する。次いで、第二の、抗原と結合する標識抗体を加える。結合した二次抗体の量は、通常比色定量法を使用して定量化する。新規なバイオマーカー以外に、本発明者らは、ELISAによってハプトグロビンを測定することができることを提案する。血清中のハプトグロビンのレベルは、臨床医によって

10

【0120】

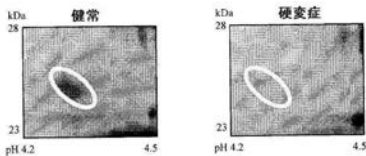
前述の記載は特定の好ましい実施形態を指すが、本発明がそのように限定されないことが理解されよう。開示されている実施形態に対して様々な変更形態がなされてもよいこと、およびこのような変更形態が本発明の範囲内にあると考えられることは、当業者には思い当たるはずである。

【0121】

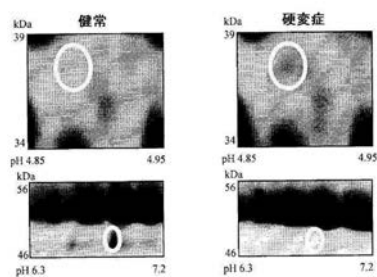
本明細書中に引用する全ての刊行物、特許出願および特許は、それらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

20

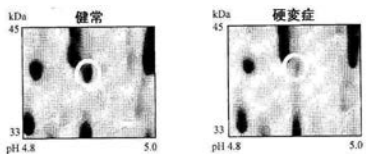
【図1】



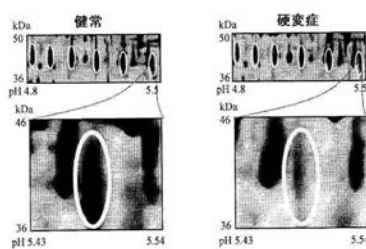
【図4】



【図2】



【図3】



## 【手続補正書】

【提出日】平成28年4月1日(2016.4.1)

## 【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】

肝線維症及び/又は硬変症を検出および評価する方法であって、

a) 患者から得た生体試料中の少なくとも1つのポリペプチドのレベルを決定するステップであって、前記生体試料は患者の血清又は血漿の試料である前記ステップ、および

b) 前記肝線維症及び/又は硬変症の陽性または陰性診断を決定するために前記決定されたレベルを前記少なくとも1つのポリペプチドの対照レベルと比較するステップを含み、

前記少なくとも1つのポリペプチドが、コルチコステロイド結合グロブリンを含む、前記方法。

【請求項2】

前記少なくとも1つのポリペプチドが、脂質輸送阻害剤タンパク質、14-3-3タンパク質ゼータ/デルタ、アディポネクチン、アフアミン、アルファ-1-アンチトリプシン、アルファ-2-HS-糖タンパク質、アポリポタンパク質C-III、アポリポタンパク質E、C4b-結合タンパク質ベータ鎖、完全/切断型補体C3dg、フィブリノゲンガンマ鎖、pH5.46~5.49のベータハプトグロビン、ハプトグロビン関連タンパク質、ヘモペキシン、免疫グロブリンJ鎖、ロイシンリッチアルファ-2-糖タンパク質、レチノール結合タンパク質4、血清パラオキシナーゼ/アリアルエステラーゼ1、性ホルモン結合グロブリンおよび亜鉛-アルファ-2-糖タンパク質の少なくとも1つをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

肝線維症及び/又は硬変症の重症度をスケールリングするための方法であって、

a) 患者から得た生体試料中の少なくとも1つのポリペプチドのレベルを決定するステップであって、前記生体試料は患者の血清又は血漿の試料である前記ステップ、および

b) 前記患者の生体試料中の少なくとも1つのポリペプチドの前記決定されたレベルを、線維化なしから硬変までの範囲の患者集団中の前記少なくとも1つのポリペプチドの予め決定されたレベルと比較するステップを含み、

前記少なくとも1つのポリペプチドが、コルチコステロイド結合グロブリンを含む、前記方法。

【請求項4】

前記少なくとも1つのポリペプチドが、脂質輸送阻害剤タンパク質、14-3-3タンパク質ゼータ/デルタ、アディポネクチン、アフアミン、アルファ-1-アンチトリプシン、アルファ-2-HS-糖タンパク質、アポリポタンパク質C-III、アポリポタンパク質E、C4b-結合タンパク質ベータ鎖、完全/切断型補体C3dg、フィブリノゲンガンマ鎖、pH5.46~5.49のベータハプトグロビン、ハプトグロビン関連タンパク質、ヘモペキシン、免疫グロブリンJ鎖、ロイシンリッチアルファ-2-糖タンパク質、レチノール結合タンパク質4、血清パラオキシナーゼ/アリアルエステラーゼ1、性ホルモン結合グロブリンおよび亜鉛-アルファ-2-糖タンパク質の少なくとも1つをさらに含む、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

肝線維症及び/又は硬変症の予後評価を決定する方法であって、

a) 患者から得た生体試料中の少なくとも1つのポリペプチドのレベルを決定するステップであって、前記生体試料は患者の血清又は血漿の試料である前記ステップ、および

b) 前記肝線維症及び/又は硬変症の陽性または陰性診断を決定するために前記決定されたレベルを前記少なくとも1つのポリペプチドの対照レベルと比較するステップを含み、

前記少なくとも1つのポリペプチドが、コルチコステロイド結合グロブリンを含む、前記方法。

【請求項6】

前記少なくとも1つのポリペプチドが、脂質輸送阻害剤タンパク質、14-3-3タンパク質ゼータ/デルタ、アディポネクチン、アフアミン、アルファ-1-アンチトリプシン、アルファ-2-HS-糖タンパク質、アポリポタンパク質C-II、アポリポタンパク質E、C4b-結合タンパク質ベータ鎖、完全/切断型補体C3dg、フィブリノゲンガンマ鎖、pH5.46~5.49のベータハプトグロビン、ハプトグロビン関連タンパク質、ヘモベキシン、免疫グロブリンJ鎖、ロイシンリッチアルファ-2-糖タンパク質、レチノール結合タンパク質4、血清パラオキシナーゼ/アリアルエステラーゼ1、性ホルモン結合グロブリンおよび亜鉛-アルファ-2-糖タンパク質の少なくとも1つをさらに含む、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記決定するステップが、前記ポリペプチドに特異的な作用物質を使用することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記作用物質が、前記ポリペプチドと結合する抗体又はその機能的等価物である、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記決定するステップはアッセイ方法を用いて実施される、請求項7に記載の方法。

【請求項10】

前記決定するステップは、酵素結合免疫吸着アッセイ、ラジオイムノアッセイ、タンパク質ドットプロット、ウエスタンプロット、比濁法又はネフェロメトリーを用いて実施される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記決定するステップは、質量分析を使用した多重反応モニタリングによって実施される、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

前記決定するステップが、前記ポリペプチドに特異的な作用物質を使用することを含む、請求項3に記載の方法。

【請求項13】

前記作用物質が、前記ポリペプチドと結合する抗体又はその機能的等価物である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記決定するステップはアッセイ方法を用いて実施される、請求項12に記載の方法。

【請求項15】

前記決定するステップは、酵素結合免疫吸着アッセイ、ラジオイムノアッセイ、タンパク質ドットプロット、ウエスタンプロット、比濁法又はネフェロメトリーを用いて実施される、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記決定するステップは、質量分析を使用した多重反応モニタリングによって実施される、請求項3に記載の方法。

【請求項17】

前記決定するステップが、前記ポリペプチドに特異的な作用物質を使用することを含む、請求項5に記載の方法。

【請求項18】

前記作用物質が、前記ポリペプチドと結合する抗体又はその機能的等価物である、請求

項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記決定するステップはアッセイ方法を用いて実施される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

前記決定するステップは、酵素結合免疫吸着アッセイ、ラジオイムノアッセイ、タンパク質ドットプロット、ウエスタンプロット、比濁法又はネフェロメトリーを用いて実施される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記決定するステップは、質量分析を使用した多重反応モニタリングによって実施される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 22】

肝線維症及び/又は硬変症の予後評価のためのキットであって、コルチコステロイド結合グロブリンを含む少なくとも1つのポリペプチドを特異的に検出する作用物質を含むキット。

【請求項 23】

前記少なくとも1つのポリペプチドが、脂質輸送阻害剤タンパク質、14-3-3タンパク質ゼータ/デルタ、アディポネクチン、アフアミン、アルファ-1-アンチトリプシン、アルファ-2-HS-糖タンパク質、アポリポタンパク質C-I I I、アポリポタンパク質E、C4b-結合タンパク質ベータ鎖、完全/切断型補体C3dg、フィブリノゲンガンマ鎖、pH5.46~5.49のベータハプトグロビン、ハプトグロビン関連タンパク質、ヘモペキシン、免疫グロブリンJ鎖、ロイシンリッチアルファ-2-糖タンパク質、レチノール結合タンパク質4、血清パラオキシナーゼ/アリアルエステラーゼ1、性ホルモン結合グロブリンおよび亜鉛-アルファ-2-糖タンパク質の少なくとも1つをさらに含む、請求項 22 に記載のキット。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
 C 0 7 K 14/47  
 C 0 7 K 16/18

(72)発明者 ドゥウェック,レイモンド,エー.  
 イギリス国 オックスフォード オーエックス2 9エーユー,バーノン アベニュー,アンプル  
 サイド

(72)発明者 ガンガドハラン,ベビン  
 イギリス国 オックスフォード オーエックス4 3ディーエル,クリケット ロード 152

(72)発明者 ツイツマン,ニコル  
 イギリス国 オックスフォード オーエックス1 4ティエル,オズウェストリー ロード 12

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA26 DA36 DA37 DA40 DA66  
 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ79 QR48 QS33 QX02  
 4H045 BA10 CA40 DA75 EA50 FA71 GA33

专利名称(译)	一组新的微量人血浆蛋白生物标志物对肝纤维化的临床诊断		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016138891A</a>	公开(公告)日	2016-08-04
申请号	JP2016039857	申请日	2016-03-02
[标]申请(专利权)人(译)	牛津大学之校长及学者		
申请(专利权)人(译)	校长, 硕士和牛津大学学者		
[标]发明人	ドウエックレイモンドエー ガンガドハランベピン ツイツマンニコル		
发明人	ドウエック,レイモンド,エー. ガンガドハラン,ベピン ツイツマン,ニコル		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 C12Q1/02 C07K14/47 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/5767 G01N33/57438 G01N33/6893 G01N2333/47 G01N2333/4728 G01N2333/775 G01N2333/924 G01N2500/00 G01N2800/085 G01N2800/52 G01N2800/54 G01N2800/56 G01N2800/7057		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/53.V G01N33/53.N C12Q1/02 C07K14/47 C07K16/18		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA40 2G045/DA66 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QX02 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/GA33		
代理人(译)	小林 浩 铃木康仁		
优先权	61/178334 2009-05-14 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

用于诊断肝纤维化和肝硬化的一组新的人血浆蛋白生物标志物。该方法包括以下步骤：a) 确定从患者获得的生物样品中至少一种HF相关多肽的水平;和b) 确定所述纤维化的阳性或阴性诊断。将水平与所述HF相关多肽的对照水平进行比较。【选择图表】无

硬変症を有する患者	
減少	増大
脂質輸送阻害剤タンパク質	完全補体C3dg
亜鉛-アルファ-2-糖タンパク質	免疫グロブリンJ鎖
pH5.46~5.49のベータハプトグロビン	性ホルモン結合グロブリン
ハプトグロビン関連タンパク質	14-3-3タンパク質ゼータ/デルタ
アポリポタンパク質C-III	アディポネクチン
アポリポタンパク質E	アルファ-1-アンチトリプシン
C4b-結合タンパク質ベータ鎖	
パラオキシナーゼ/アリアルエステラーゼ1	
レチノール結合タンパク質4	
アフアミン	
アルファ-2-HS-糖タンパク質	
コレチコステロイド結合グロブリン	
ロイシンリッチアルファ-2-糖タンパク質	
フィブリノゲンガンマ鎖	