

(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2018-511601

(P2018-511601A)

(43) 公表日 **平成30年4月26日(2018.4.26)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/18 (2006.01)	CO7K 16/18	ZNA 4H045
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	D
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543	SO1A
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00	A
CO7K 14/78 (2006.01)	CO7K 14/78	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁)

(21) 出願番号 特願2017-550733 (P2017-550733)
 (86) (22) 出願日 平成28年3月31日 (2016. 3. 31)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年11月27日 (2017. 11. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/057127
 (87) 国際公開番号 W02016/156526
 (87) 国際公開日 平成28年10月6日 (2016. 10. 6)
 (31) 優先権主張番号 1505654. 2
 (32) 優先日 平成27年4月1日 (2015. 4. 1)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(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・ホーフエダガーデ 20
 7
 (74) 代理人 100099623
 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型コラーゲン配列に関するイムノアッセイ

(57) 【要約】

本発明は、V I型コラーゲン 3鎖のC5ドメインのC末端エピトープと反応性がある免疫学的結合パートナー、およびC末端エピトープを検出し定量化するための免疫学的結合パートナーを使用したイムノアッセイの方法を提供する。本発明は、細胞外マトリックスの形成率を調べる方法、およびインスリン増感剤で治療するのに適した対象を確認するための方法も提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

VI型コラーゲンの 3鎖のC5ドメインのC末端エピトープと反応性がある免疫学的結合パートナー。

【請求項 2】

C末端アミノ酸配列 . . . K P G V I S V M G T - C O O H中に含まれる前記C末端エピトープと特異的に結合する、請求項1に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 3】

モノクローナルまたはポリクローナル抗体である、請求項1または2に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 4】

前記C末端アミノ酸配列の伸長型である . . . K P G V I S V M G T A - C O O Hを認識しないかまたはそれと特異的に結合しない、請求項1～3のいずれか1項に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 5】

伸長型アミノ酸配列 . . . K P G V I S V M G T A - C O O Hに対する前記免疫学的結合パートナーの親和性に対する、アミノ酸配列 . . . K P G V I S V M G T - C O O Hに対する前記免疫学的結合パートナーの親和性の比が、1に対して10より大きい、請求項1～4のいずれか1項に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 6】

前記C末端アミノ酸配列の切断型である . . . K P G V I S V M G - C O O Hを認識しないかまたはそれと特異的に結合しない、請求項1～5のいずれか1項に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 7】

切断型アミノ酸配列 . . . K P G V I S V M G - C O O Hに対する前記免疫学的結合パートナーの親和性に対する、アミノ酸配列 . . . K P G V I S V M G T - C O O Hに対する前記免疫学的結合パートナーの親和性の比が、1に対して10より大きい、請求項1～6のいずれか1項に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 8】

試料におけるVI型コラーゲンの 3鎖のC5ドメインのC末端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、前記VI型コラーゲンの 3鎖のC末端エピトープを含む試料と請求項1～7のいずれか1項に記載の免疫学的結合パートナーを接触させるステップと、前記免疫学的結合パートナーの結合の量を決定するステップとを含む方法。

【請求項 9】

前記C末端エピトープがC末端アミノ酸配列 . . . K P G V I S V M G T - C O O H中に含まれる、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

生体液における前記VI型コラーゲンの 3鎖のC末端エピトープの量を定量化するために使用される、請求項8または9に記載の方法。

【請求項 11】

前記生体液が血清、血漿、尿または羊水である、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

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8～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 13】

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12に記載の方法。

【請求項 14】

前記方法によって決定した前記VI型コラーゲンの 3鎖のC末端エピトープの量と前

10

20

30

40

50

記 V I 型コラーゲンの 3 鎖の C 末端エピトープの標準正常値を関連付けて、正常レベルからの変化を評価するステップをさらに含む、請求項 8 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

細胞外マトリックスの形成率を調べる方法であって、生体液試料における請求項 9 で定義したエピトープを含む V I 型コラーゲン 3 断片のレベルの測定値を得るために、請求項 10 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法によりアッセイを実施するステップを含む方法。

【請求項 16】

V I 型コラーゲン 3 断片の測定レベルを、同一試料における V I 型コラーゲンの分解のバイオマーカーの測定レベルと比較する指標を作成するステップをさらに含む、請求項 15 に記載の方法。

10

【請求項 17】

インスリン増感剤による治療に適した対象を同定するための方法であって、
i) 請求項 10 の方法に従って、対象から得た生体液における V I 型コラーゲン 3 鎖の C 5 ドメインの C 末端エピトープの量を定量化するステップと、
ii) ステップ i) により決定した上昇値とインスリン増感剤による治療に適した対象とを関連付けるステップとを含む方法。

20

【請求項 18】

前記インスリン増感剤がチアゾリジンジオンである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 C 末端エピトープが C 末端アミノ酸配列 . . . K P G V I S V M G T - C O O H 中に含まれる、請求項 17 または 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記ステップ ii) の上昇値が第 2 または第 3 の三分位値の範囲内の値に相当する、請求項 17 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記ステップ ii) の上昇値が V I 型コラーゲンの 3 鎖の C 末端エピトープの 6 . 3 n g / m L 以上に相当する、請求項 17 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 22】

生物試料における V I 型コラーゲン 3 鎖の C 5 ドメインの C 末端エピトープの量を決定するためのアッセイキットであって、本発明の免疫学的結合パートナー、および、以下の少なくとも 1 つ：

ストレプトアビジンでコーティングされた 96 ウェルプレート

前記抗体と反応性があるペプチド、これは、ビオチニル化ペプチドであるビオチン - L - K P G V I S V M G T - C O O H (L は任意選択のリンカー) であってよい

任意選択的に、サンドイッチイムノアッセイにおいて使用するためのビオチニル化二次抗体

C 末端配列 . . . K P G V I S V M G T - C O O H を含むキャリブレーターペプチド

抗体 H R P 標識キット

抗体放射標識キット

アッセイ視覚化キット

を含む、アッセイキット。

40

【請求項 23】

前記 C 末端エピトープが C 末端アミノ酸配列 . . . K P G V I S V M G T - C O O H 中に含まれる、請求項 22 に記載のアッセイキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、V I型コラーゲン 3鎖のC末端に存在するエピトープと結合する抗体、および前記エピトープを検出するイムノアッセイに関する。

【背景技術】

【0002】

筋肉の量と機能は、年齢、一定範囲の病状、および不活動状態と共に、ならびにしばしばこの3つの組合せが原因で消失する。個体は50歳から1年あたり1~2%の骨格筋を消失すること(Hughes)、筋肉量の2~3%が不動状態中1週間あたりで消失し(Hortobagyi et al. 2000)、悪液質ではさらに急速に消失することが報告されている。高齢者または入院中個体における筋肉機能の障害は(併存)疾患状態および死亡率と関係がある(Cruz-Jentoft)。先進国における人口の年齢の増大と共に、機能的自立の維持がそれ故ますます重要になっている。筋肉消失の診断法および管理法は、画像検査、例えば磁気共鳴映像法(MRI)、コンピューター断層撮影法(CT)および二重エネルギーX線吸収測定法(DXA)に未だ依存している(Cruz-Jentoft)。しかしながら、このような検査は、通常の臨床試験で使用するには高価または不便のいずれかである。クレアチニンおよび3-メチルヒスチジンなどの尿および血清バイオマーカーも、筋肉消失の管理を手助けするのに使用される。しかしながら、これらのアッセイの大きな変動性と低い確実性によって、それらの使用は制限される(Nedergaard 2013)。要約すると、筋肉機能の診断および予後評価、ならびにアンチカタボリック治療の結果のモニタリングにおいて使用することができるバイオマーカーが早急に必要である(Sharf)。

10

20

【0003】

筋肉量の消失は、筋肉細胞外タンパク質の不均衡な代謝回転によって誘導される(Rennie 2010およびWelle 2002)。タンパク質、特に細胞外タンパク質の代謝回転によってタンパク質分解断片が循環中に放出され得るので、タンパク質代謝の定量的または定性的変化は、筋肉の量または機能のモニタリングにおいて使用することができるバイオマーカー概略を与え得る(Nedergaard 2013)。

【0004】

コラーゲンは、筋肉の受動的伸張に貢献し得る、骨格筋の重要な細胞外タンパク質である(Granzier)。

【0005】

I I I型コラーゲンは骨以外のI型コラーゲン含有組織の大部分で発現され、結合組織、筋肉組織および皮膚などの重要な成分である(Gelse)。P I I I N PはI I I型コラーゲンのN末端プロペプチドであり、これは成熟I I I型コラーゲン合成中に除去される(Niemela)。それはホルモン治療のアナボリック応答と関係があることが報告されている(Bhasin 2009およびChen 2011)。近年、N末端プロコラーゲンのN-プロテアーゼ切断部位を標的化したモノクローナル抗体を施用することによる、新たなELISAキットが開発され、これはI I I型コラーゲンの真の合成を評価することが可能である(Nielsen 2013)。

30

【0006】

V I型コラーゲンは、細胞の基底膜内に独自の微小線維網を形成することができる特異的な細胞外コラーゲンである。それは、コラーゲン、パイグリカン、およびプロテオグリカンを含めた、他のマトリックスタンパク質と相互作用することができる(Kuo 1997、Bidanset 1992およびStallcup 1990)。筋肉中では、V I型コラーゲンは筋線維鞘の一部であり、筋肉内細胞外マトリックスへの筋線維の固定に関与し、したがって力の伝達に関与する(Bonaldo 1990およびKeene 1988)。さらに、V I型コラーゲンの突然変異は、ベスレムミオパチーおよびウールリッヒ型先天性筋ジストロフィーを引き起こす可能性がある(Lampe)。V I型コラーゲン 3鎖のC末端は、分泌後に成熟V I型微小線維から切断除去されることが報告されている(Aigner 2002およびLamande 2006)。

40

【0007】

50

しかしながら、V I型コラーゲンは筋肉および筋肉消失にのみ関与しているわけではない。

【0008】

慢性閉塞性肺疾患（COPD）は、慢性的炎症、構造変化、および小気道狭窄が原因の永続的気流制限によって特徴付けられる、不均質にゆっくりと進行する疾患である（世界的問題...）。肺の細胞外マトリックス（ECM）の主な構造タンパク質はコラーゲン、エラスチン、およびプロテオグリカンである。ECM再編成は健常な組織維持の一部であり、この場合古いタンパク質は分解され新たなタンパク質が形成される（Cox）。しかしながら、過度のECM再編成は、COPDにおいて肺機能の消失を促進する構造変化を誘導する。COPDにおける重要な課題は、疾患進行のバイオマーカーの同定である（Vestbo）。肺構造タンパク質の評価によるECMの研究によって、疾患活動性と予後のバイオマーカーを与えることができる。

10

【0009】

増悪は、疾患活動性が増大する期間であり、肺機能の消失を加速させ（Donaldson 2002）、生活の質を低下させ（Seemungal）、死を引き起こす（Sofor-Cataluna）まで、COPD進行が誘導される。全COPD段階の患者が増悪を経験し得るが、彼らは疾患重症度の増大をより頻繁に経験する（Hurst）。それらの発生を予測することは難しく、将来的増悪の最も確実な予測因子は増悪歴である（Hurst 2010およびDonaldson 2006）。増悪はCOPD発病における重要な事象であるが、これらの事象中の肺組織の構造変化に関してはほとんど知られていない。安定状態のCOPDと比較して、増悪時にCOPD患者の喀痰中の組織メタロプロテイナーゼ阻害物質1（TIMP-1）のレベルは低下し（Mercer）、破滅的環境を示唆する一方で、マトリックスメタロプロテイナーゼ9（MMP-9）のレベルは上昇することが知られている。

20

【0010】

近年の研究によって、ECMには内分泌器官の性質があり、その構造タンパク質は、細胞遊走、分化、および血管新生を含めた細胞プロセスを遠位で調節できるシグナル伝達分子を生成することが明らかになった。これらの分子は、XVII型コラーゲンに由来する強力な抗血管新生ペプチドエンドスタチン、ならびにそれぞれIV型、VII型、およびXV型コラーゲンから放出されるタムスタチン、パスタチン、およびレスチンを含む（Karsdal, 2015）。

30

【0011】

構成鎖 1（VI）、 2（VI）、および 3（VI）で構成される3重らせん分子であるマイクロフィラメント間質性VI型コラーゲンは、大部分の結合組織中、主に脂肪組織中で発現され（Park, 2012）、そこで他のECMタンパク質との相互作用によって細胞を固定する（Mak, 2012）。マイクロフィラメントの形成中、その3重らせんコアはタンパク質分解によってそのプロペプチドから放出される（Aigner, 2002; Lamande, 2006）。ここで、 3（VI）鎖のC末端プロペプチドのさらなる切断によって、新たに同定されたアディポカインであるエンドトロフィンが生成する（本明細書では「Pro-C6」と呼ぶ）。エンドトロフィンは、主に脂肪組織によって生成され、形質転換増殖因子（TGF-）の上方制御、脂肪組織線維化、血管新生、炎症を誘導し、動物モデルでは、インスリン感受性、食物摂取、エネルギー収支、および脂肪組織炎症など幾つかの代謝機能を不都合に調節することが示されている（Sun, 2014; Dankel, 2014; Park, 2013; Khan, 2009; Pasarica, 2009）。これらの発見は、血中エンドトロフィンのレベルは、代謝機能障害を有する患者、特に2型糖尿病を有する患者を分類および/またはモニタリングするのに有用であり得ることを示唆する。

40

【0012】

チアゾリジンジオン（TZD）は、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体（PPAR）のアゴニストであり、これらは広く使用され、インスリン感受性を改善し、グルコー

50

スレベルを低下させ、インスリンの需要を減らすそれらの能力によって2型糖尿病を治療する(Cho、2008; Charbonnel、2010)。しかしながら、ピオグリタゾンなどのTZDの使用は、心不全(Home、2009)、体重増加(Takada、2007)、末梢性浮腫(Karalliedde、2007)、および女性における骨消失(Soroceanu、2004)などの関連有害事象(AE)によって実質上制限されている。PPAR アゴニストのAEを最少にするための試みでは、一部のPPAR 下流シグナルのみを誘発するPPAR の部分的活性化剤であるパラグリタゾンなどが開発されている(Berger、2005; Agrawal、2012)。このような部分的アゴニストによって、少ないAEで優れた糖制御が実現する(Larsen、2008)。治療応答者を最適に定義し得る血清バイオマーカーは、このようなグリタゾンの有効性と安全性をさらに改善する可能性がある。

10

【発明の概要】**【0013】**

本発明者らは、3鎖のC末端を標的化するモノクローナル抗体とELISAキットをこの度開発した。本発明者らは、このキット、およびそれを用いて測定する反応性を本明細書において「Pro-C6」と呼ぶ。

【0014】

本発明者らは、Pro-C6のレベルは筋肉代謝回転率を反映すること、およびタンパク質再編成断片のバイオマーカーにより全身で評価したECM再編成は、疾患活動性が高いCOPDの増悪中に加速されることも立証した。

20

【0015】

本発明者らは、血清中の高レベルのエンドトロフィン(すなわち「Pro-C6」)によって2つのインスリン増感剤(パラグリタゾンとピオグリタゾン)に対する応答を予測し、副作用を低減し、PPAR アゴニスト治療の恩恵を受ける2型糖尿病を有する患者を特定できることも立証した。

【0016】

ここで、本発明は、VI型コラーゲンの3鎖のC5ドメインのC末端エピトープと反応性がある免疫学的結合パートナーを提供する。

【0017】

前記免疫学的結合パートナーは、C末端アミノ酸配列...KPGVISVMGT-COOH中に含まれる前記C末端エピトープと特異的に結合することが好ましい。

30

【0018】

前記免疫学的結合パートナーは、モノクローナルまたはポリクローナル抗体である。免疫学的結合パートナーは、以下でさらに説明するような結合特異性を有する抗体断片であってよい。

【0019】

前記免疫学的結合パートナーは、...KPGVISVMGTA-COOHである前記C末端アミノ酸配列が伸長されたもの(伸長型のアミノ酸配列)を認識しないかまたはそれと結合しないことが好ましい。

【0020】

前記免疫学的結合パートナーは、...KPGVISVMG-COOHである前記C末端アミノ酸配列が切り詰められたもの(切断型のアミノ酸配列)を認識しないかもしくはそれと結合しない(またはさらに認識しないかもしくはそれと結合しない)ことが好ましい。

40

【0021】

伸長型のアミノ酸配列...KPGVISVMGTA-COOHに対する前記抗体の親和性および/または切断型のアミノ酸配列...KPGVISVMG-COOHに対する前記抗体の親和性に対する、アミノ酸配列...KPGVISVMGT-COOHに対する前記抗体の親和性の比は、1に対して10より大きいことがさらに好ましい。

【0022】

50

より一般的には、前記伸長型のアミノ酸配列に対する前記免疫学的結合パートナーの親和性に対する、アミノ酸配列 . . . K P G V I S V M G T - C O O H に対する前記免疫学的結合パートナーの親和性の比は、好ましくは 1 に対して 10 より大きく、好ましくは 1 に対して 50 より大きく、好ましくは 1 に対して 100 より大きく、好ましくは 1 に対して 500 より大きく、好ましくは 1 に対して 1000 より大きく、最も好ましくは 1 に対して 10,000 より大きい。

【0023】

さらに好ましくは、前記切断型のアミノ酸配列に対する前記免疫学的結合パートナーの親和性に対する、アミノ酸配列 . . . K P G V I S V M G T - C O O H に対する前記免疫学的結合パートナーの親和性の比は、1 に対して 10 より大きく、好ましくは 1 に対して 50 より大きく、好ましくは 1 に対して 100 より大きく、好ましくは 1 に対して 500 より大きく、好ましくは 1 に対して 1000 より大きく、最も好ましくは 1 に対して 10,000 より大きい。

10

【0024】

本発明は、試料における V I 型コラーゲンの 3 鎖の C 末端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、前記 V I 型コラーゲンの 3 鎖の C 末端エピトープを含む試料と前に記載した免疫学的結合パートナーを接触させるステップと、前記免疫学的結合パートナーの結合の量を決定するステップを含む方法を含む。

【0025】

前記 C 末端エピトープは、C 末端アミノ酸配列 . . . K P G V I S V M G T - C O O H 中に含まれることが好ましい。

20

【0026】

前記方法は、生体液における前記 V I 型コラーゲンの 3 鎖の C 末端エピトープの量を定量化するために使用してもよい。

【0027】

前記生体液は、例えば血清、血漿、尿または羊水であってよい。

【0028】

前記イムノアッセイは、競合アッセイまたはラジオイムノアッセイもしくは酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) などのサンドイッチアッセイであってよい。

【0029】

このような方法は、前記方法によって決定した前記 V I 型コラーゲンの 3 鎖の C 末端エピトープの量と前記 V I 型コラーゲンの 3 鎖の C 末端エピトープの標準正常値を関連付けて、正常レベルからのその変化を評価するステップをさらに含むことができる。

30

【0030】

本発明は、細胞外マトリックスの形成率を調べる方法であって、生体液試料における C 末端アミノ酸配列 . . . K P G V I S V M G T - C O O H 中に含まれるエピトープを含む V I 型コラーゲン 3 断片のレベルの測定値を得るために、前に記載した方法によりアッセイを実施するステップを含む方法を含む。

【0031】

このような方法は、V I 型コラーゲン 3 断片の測定レベルを、同一試料における V I 型コラーゲンの分解のバイオマーカーの測定レベルと比較する指標を作成するステップをさらに含むことができる。このような分解のバイオマーカーは、M M P 分解 V I 型コラーゲンの断片であってよい。V e i d a l 2011 中および W O 2010 / 115749 中に記載されたように、このようなアッセイは N 末端配列 Y R G P E G P Q G P . . . に対する抗体反応性に基づくものであってよい。

40

【0032】

本発明者らは、床上安静の型での長期無負荷およびその後の再負荷に応じた血清学的コラーゲンペプチドバイオマーカーの調節を調べており、C O P D 増悪事象においてこれらのバイオマーカーを同様に試験した。

【0033】

50

床上安静の調査では、対象を振動対策デバイス有りまたは無しで8週間床上安静状態で固定し、次に通常の身体活動により再可動させた。両群共に固定状態中に筋肉の量と強度が消失し、安静群より対照群において、よりわずかに消失した。両群共に再可動中に筋肉の量と強度が回復した。

【0034】

固定状態中、III型コラーゲンプロペプチドのバイオマーカー（PRO-C3）と本発明のVI型コラーゲンバイオマーカー（PRO-C6）は、一時的にある程度類似したパターンを示す。本発明のそれは固定開始後当初はわずかに下降する一方で、PRO-C3とPRO-C6はいずれも経時的に固定期間と共に最終的に増大する。

【0035】

再可動開始時には、わずかな初期低下を再度観察し、次いで、PRO-C6の一部においてRVE群より対照において高い増大、次に両バイオマーカーにおけるベースラインへの回復を観察することができる。

【0036】

C6Mバイオマーカーは床上安静の無負荷にはほとんど応答しないが、再負荷に応答してわずかに上昇し、群間で有意な差はない。

【0037】

したがってPRO-C6は、身体活動の変化およびLBM（除脂肪体重）の変化と関連した再編成のバイオマーカーであるとみなすことができる。ベースラインでの低いPRO-C6は、回復と消失両方のLBMの変化の影響をより受けやすい表現型と関連がある。したがって、この配列に関するアッセイを使用して、不本意な固定状態、例えば入院の影響を特に受けやすい個体、筋肉消失のリスクが高い個体を確認することができる。したがってLBM消失に対処する治療決定をすることができる。

【0038】

さらに、結合組織再編成、特に筋肉代謝回転の速度をモニタリングし、その速度を調節する治療薬候補の有効性に関する情報を与えるために、このアッセイを使用することができる。

【0039】

本発明のバイオマーカーは、COPD増悪事象の診断を手助けするために、またはどの患者がその状態のより急速な悪化を被る可能性があるかに関して予後予測を与えるために使用してもよく、それによって彼らは臨床試験に移行するのにより適した患者となり得る。

【0040】

本発明のバイオマーカーは、チアゾリジンジオンクラスの化合物（例えば、バラグリタゾンまたはピオグリタゾン）などのインスリン増感剤に対する応答を予測するために使用することもできる。本発明のバイオマーカーはインスリン増感剤に最適に応答し得る患者の確認およびモニタリングを可能にし、これによって2型糖尿病および/または非アルコール性脂肪性肝炎（NAFLD）の治療におけるPPAR α アゴニストのベネフィットリスク比を改善する。これに関連して、本発明は、インスリン増感剤で治療するのに適した対象を確認するための方法であって、

- i) 本発明のPro-C6アッセイ法を使用して対象から得た生体液におけるVI型コラーゲン 3鎖のC5ドメインのC末端エピトープの量を定量化するステップと、
 - ii) ステップi)により決定した上昇値とインスリン増感剤で治療するのに適した対象を関連付けるステップと
- を含む方法をさらに提供する。

【0041】

本発明のさらなる態様は、生物試料におけるVI型コラーゲン 3鎖のC5ドメインのC末端エピトープ、好ましくはC末端アミノ酸配列...KPGVISVMGT-COOH中に含まれるC末端エピトープの量を決定するためのアッセイキットであって、本発明の免疫学的結合パートナー、および、以下の少なくとも1つ：

10

20

30

40

50

ストレプトアビジンでコーティングされた96ウェルプレート

前記抗体と反応性があるペプチド、これは、ビオチニル化ペプチドであるビオチン-L-KPGVISVMGT-COOH(Lは任意選択のリンカー)であってよい、

任意選択的に、サンドイッチイムノアッセイにおいて使用するためのビオチニル化二次抗体

C末端配列...KPGVISVMGT-COOHを含むキャリブレーターペプチド

抗体HRP標識キット

抗体放射標識キット

アッセイ視覚化キット

を含む、アッセイキットを提供する。

10

【0042】

本明細書で使用する用語「免疫学的結合パートナー」は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、ならびにFabまたはF(ab')₂などの抗体の特異的結合断片も含む。したがって、前記免疫学的結合パートナーは、特異的結合親和性を有するモノクローナル抗体またはモノクローナル抗体の断片であってよい。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】モノクローナル抗体10A3のペプチド特異性試験の結果を、標準ペプチド、伸長型ペプチド、および切断型ペプチドの連続2倍希釈によって生じたODシグナルとして示す図である。STDペプチド=KPGVISVMGT、伸長型ペプチド=KPGVISVMGTA、および切断型ペプチド=KPGVISVMG。ELISAの性質上、低いODは強い反応性に相当する。

20

【図2】ヒト血清および羊水と、モノクローナル抗体10A3との反応性の試験の結果を示す図である。パネルAは、競合ELISA中でODとして測定した抗体結合が、ヒト血清およびヒト羊水により部分的に阻害されたことを示す。パネルBは、ヒト血清(レーン1、2)および羊水(レーン3、4)における特異的バンドを示すウエスタンブロットであり、標準ペプチドの存在下でバンドが遮断され得ることを示す(レーン6~9)。

【図3】3種の異なる血漿と血清で測定したPro-C6レベルの線形回帰分析からの結果を示す図であり、血清レベルと各種血漿の間の強い相関関係を示す($P < 0.0001$)。

30

【図4】上から順に3つのパネルにおいて、床上安静および再可動(BBR)試験における経時的なPro-C3、Pro-C6およびC6Mレベルを示す図である。

【図5】上から順にパネルA、BおよびCにおいて、実施例3中で測定したバイオマーカーレベルを示す図である。

【図6】パネルA、BおよびCにおいて、実施例3中で測定したIII型コラーゲン、IV型コラーゲンおよびVI型コラーゲンの分解/形成マーカー比のレベルを示す図である。

【図7】血清中グルコースおよび血中HbA1cに対する断食の影響を示す図である。ベースライン血清Pro-C6に従った、小群における断食中のベースラインから治療終了(第26週)までの血清中グルコース(左側のパネル)および血中HbA1c(右側のパネル)の経時的絶対変化(三分位値)。

40

【図8】ベースラインにおけるPro-C6と比較した、26週の治療期間中の断食における血清中グルコース(左側のパネル)および血中HbA1c(右側のパネル)の平均絶対変化を示す図である。26週の治療期間前(X')および最後の(' / X)プラセボに対する治療の有意水準(ダネット検定により調整)。na:不適切、ns:有意性なし、*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ 、***: $p < 0.001$ 。

【図9】上位2つのエンドトロフィン三分位値($> 7.7 \text{ ng/mL}$)対最小三分位値(7.7 ng/mL)で第26週における応答者に関するオッズ比を示す図である。HbA1cにおける1%(3.83、95%CI(1.62; 9.04)、 $p < 0.002$)または0.5%(3.85、95%CI(1.94; 7.61)、 $p < 0.001$)の臨

50

床上有意な変化に関するオッズ比。

【図10】26週の治療期間中のHOMA-IRの平均絶対変化を示す図である。26週の治療期間前(X/′)および最後の(′/X)プラセボに対する治療の有意水準(ダネット検定により調整)。na:不適切、ns:有意性なし、*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ 、***: $p < 0.001$ 。

【図11】左側のパネルは、血清中Pro-C6レベルに対する治療の影響の図である。血清中Pro-C6は、ベースラインPro-C6の三分位値に従い治療の最後(第26週)までのベースラインと比較した変化率として表す。これらの図は最小二乗推定値(±標準誤差)を示す。右側のパネルは、26週の治療期間前(X/′)および最後の(′/X)プラセボに対する治療の有意水準(ダネット検定により調整)を使用して、ベースラインと比較したPro-C6の平均変化の図である。na:不適切、ns:有意性なし、*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ 、***: $p < 0.001$ 。

【図12】26週の治療期間中の下肢体積の平均絶対変化を示す図である。26週の治療期間前(X/′)および最後の(′/X)プラセボに対する治療の有意水準(ダネット検定により調整)。na:不適切、ns:有意性なし、*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ 、***: $p < 0.001$ 。

【実施例】

【0044】

[実施例1:Pro-C6用抗体の開発]

本発明者らは、免疫原性ペプチドとしてVI型コラーゲン 3鎖の末尾10アミノ酸(3168 , KPGVISVMGT, 3177)を使用して特定のエピトープに対するモノクローナル抗体を作製した。モノクローナル抗体開発に使用した方法は以前に記載された通りであった(Barascuk)。簡単に言うと、4~6週齢のBalb/Cマウスを、 $200\mu\text{l}$ の乳化抗原および $60\mu\text{g}$ の免疫原性ペプチドを用いて皮下免疫処置した。安定した血清力価レベルに達するまで、連続免疫処置を2週間間隔でフロイント不完全アジュバントにおいて実施し、2回目の免疫処置マウスから採血した。それぞれの採血時に、血清力価を検出し、最大抗血清力価および最良天然反応性を有するマウスを融合用に選択した。選択したマウスは1カ月間休養させ、次いで細胞融合用の脾臓を単離する3日前に、 $100\mu\text{l}$ の0.9%塩化ナトリウム溶液に溶かした $50\mu\text{g}$ 免疫原性ペプチドを用いて静脈内追加抗原刺激した。

【0045】

融合手順は他の所で記載されている(Geffer)。簡単に言うと、マウス脾臓細胞をSP2/0ミエロマ融合パートナー細胞と融合させた。融合細胞は96ウェルプレート中で培養し、CO₂インキュベーター中でインキュベートした。ここで、標準限界希釈法を使用してモノクローナル抗体の増殖を促進した。選択ペプチドに特異的であり伸長型のペプチド(KPGVISVMGTA、Chinese Peptide Company、中国)または切断型のペプチド(KPGVISVMG、American Peptide Company、米国)のいずれとも交差反応性がない細胞株を選択しサブクローニングした。最後に、IgGカラムを使用して抗体を精製した。

【0046】

<Pro-C6アッセイプロトコール>

アッセイ開発に使用したELISAプレートは、Roche製のストレプトアビジンでコーティングされたプレート(cat.:11940279)であった。全てのELISAプレートは、Molecular Devices製(CA、米国)の、SpectraMax M、ELISAリーダーで分析した。本発明者らは、製造者(Innovabioscience、Babraham、Cambridge、英国)の説明書に従い、Lightning Link HRP標識キットを使用して、選択したモノクローナル抗体をホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)により標識した。96ウェルのストレプトアビジンプレートは、コーティングバッファー(40mMのNa₂HPO₄、7mMのKH₂PO₄、137mMのNaCl、2.7mMのKCl、0.1%のTwee

10

20

30

40

50

n 20、1%のBSA、pH 7.4)中に溶かしたビオチニル化合物ペプチド：ビオチン-KPGVISVMGT (Chinese Peptide Company、中国)でコーティングし、20 で30分間インキュベートした。20 μ Lの標準ペプチドまたはインキュベーションバッファー(40 mMのNa₂HPO₄、7 mMのKH₂PO₄、137 mMのNaCl、2.7 mMのKCl、0.1%のTween 20、1%のBSA、5%のLiquid II、pH 7.4)中に希釈した試料を適切なウェルに加え、次いで、100 μ LのHRP結合モノクローナル抗体10A3を加え、4 で21時間インキュベートした。最後に、100 μ Lのテトラメチルベンジジン(TMB)(Kem-En-Tec cat. 4380H)を加え、プレートは暗所において20 で15分間インキュベートした。前述の全てのインキュベーションステップは300 rpmでの振とうを含んでいた。それぞれのインキュベーションステップ後、プレートは洗浄バッファー(20 mMのTris、50 mMのNaCl)により5回洗浄した。TMB反応は100 μ Lの停止溶液(1% H₂SO₄)を加えることによって停止させ、450 nmおよび参照としての650 nmで測定した。

【0047】

<Pro-C6の技術的評価>

検出下限(LLOD)を21のゼロ試料(すなわちバッファー)から決定し、平均+3 \times 標準偏差として計算した。アッセイ内変動とアッセイ間変動は、各実験が試料の二重測定からなる、8QC試料の12の個別の実験により決定した。希釈回収率は4血清試料および4ヘパリン血漿試料において決定し、100%試料から希釈した試料の回収率として計算した。

【0048】

[実施例2：筋肉消失試験におけるPro-C6]

<ベルリン床上安静試験におけるPro-C3、C6Mアッセイの測定>

3鎖のC末端のレベルは、新たに形成される成熟VI型コラーゲンのレベルを反映すると予想される。VI型コラーゲンの合成を調べるため、本発明者らは、3鎖のC末端を標的化する前述のPro-C6-ELISAキットを開発した。さらに、VI型コラーゲンはMMPの基質でもある(Veidal 2011)。以前の試験は、MMP-2とMMP-9の両方が筋萎縮と関係があることを示した(Reznick 2003およびGianneli 2005)。したがって、MMP-2およびMMP-9によって生成するVI型コラーゲン分解断片がこのようなプロセスにおける関心対象となる。

【0049】

この試験において、本発明者らは、筋萎縮と肥大のヒトモデルとして床上安静固定および再可動を使用し、ベルリン床上安静試験でIII型およびVI型コラーゲンの代謝回転を直接測定する以下の3つのバイオマーカー：(C末端3(VI)鎖を測定する)Pro-C6、および(MMP-2およびMMP-9によって分解されるVI型コラーゲン断片を測定する)C6M(Veidal 2011)、および(III型コラーゲンの真の合成を測定する)Pro-C3(Nielsen)を測定した。

【0050】

ベルリン床上安静試験は他の所で記載されている(Rittweger 2006およびBelavy 2009)。簡単に言うと、20人の健康な若い男性を動員し、厳密な8週間の床上安静試験を施した。次いで20人の若い男性をランダムに2群に分けた。抵抗性振動療法エクササイズ群(RVE)群には、1週間毎に11回の抵抗性振動療法エクササイズを割り当てた。抵抗性振動療法エクササイズは、ベッド端で振動療法エクササイズ器具により、ウエストおよびショルダーストラップ、ならびにプレートに対象を引き寄せるためのハンドルを備える振動プレートに対象を引き寄せることによって実施した。対照群(CTRL)には、8週間の床上安静中いかなるエクササイズも実施させなかった。試験2日前(BDC-2)、床上安静期間中(BR+)および後の回復期(R+)に血清試料を得た。血清試料は、さらなる測定まで-80 で保存した。両群の筋肉量は、この3期間中にMRIとDXAによって評価した。

10

20

30

40

50

【0051】

Pro-C3およびC6Mアッセイのプロトコールは他の所で記載されている(Nielson 2013およびKuo 1997)。Pro-C3アッセイは、III型コラーゲンのプロペプチド断片のレベルを測定する。C6Mアッセイは、成熟VI型コラーゲンのMMP分解断片を測定する。簡単に言うと、Pro-C3アッセイでは、96ウェルのストレプトアビジンプレートをビオチニル化合成ペプチドでコーティングし、20で30分間インキュベートした。20μLの標準ペプチドまたは1:2に希釈した血清試料を適切なウェルに加え、次いで、100μLのHRP結合モノクローナル抗体NB61N-62を加え、4で20時間インキュベートした。最後に、100μLのTMBを加え、プレートは暗所において20で15分間インキュベートした。TMB反応は100μLの停止溶液(1% H₂SO₄)を加えることによって停止させ、450nmおよび参照としての650nmで測定した。C6Mアッセイでは、ビオチニル化合成ペプチドを96ウェルのストレプトアビジンプレートにコーティングする。20μLの標準ペプチドまたは1:2に希釈した血清試料、次いで、100μLのHRP結合モノクローナル抗体を加え、20で1時間インキュベートした。TMBによる発色後、プレートを読み取った。

10

【0052】

<結果>

選択した抗体10A3は、C末端のCOL6A3の末尾の10アミノ酸:3186'KPGVISVMGT'3177を特異的に認識したが、伸長型のペプチドKPGVISVMGTAも切断型のペプチドKPGVISVMGも認識しなかった(図1)。選択した抗体の天然反応性は、ヒト血清プールおよびヒト羊水プールを使用して評価した。競合ELISAでは、血清と羊水の両方によりシグナルが部分的に阻害された(図2、パネルA)。この抗体が10kD付近のバンドを認識し、一方で標準ペプチドの存在下でシグナルが完全に遮断された結果を、ウエスタンブロットにより確認した(図2、パネルB)。

20

【0053】

0.15ng/ml~58.39ng/mlの範囲という条件で、Pro-C6競合ELISAの測定範囲をLODおよびULODによって決定した。アッセイ間変動とアッセイ内変動はそれぞれ15.2%と4.8%である。ヒト血清およびヘパリン血漿における希釈回収率はいずれも100±20%内であった(表1)。ヘパリン血漿、クエン酸血漿およびEDTA血漿のそれぞれとヒト血清間の相関関係は比較的高く(図3、p<0.0001)、これは異なる血液調製法にもかかわらずPro-C6レベルが一定であったことを示した。

30

【0054】

【表1】

表1: 希釈回収率を示す表。

血清サンプル	希釈回収率	ヘパリン血漿 サンプル	希釈回収率
希釈せず	100	希釈せず	100
希釈1:2	91	希釈1:2	105
希釈1:4	91	希釈1:4	100
希釈1:8	80	希釈1:8	109

40

【0055】

試料は連続2倍希釈ステップにおいて希釈し、これらの連続希釈において濃度を測定した。測定した濃度と希釈倍率とをかけることにより希釈回収率を得て、非希釈(開始)試料の濃度の割合として表した。この表は、シグナルは直線的に弱まり+/-20%内および8倍希釈範囲内に留まることを示す。

【0056】

<ベルリン床上安静試験におけるバイオマーカーのプロファイル>

50

ベルリン床上安静試験 (BBR) において測定した前述の3バイオマーカーのレベルは図4中に見られる。時間地点「BR」は床上安静固定の時間地点を表し、時間地点「R」は再可動の時間地点を表す。接尾の数字は床上安静または再可動期間までの日数を表す。「a」はベースラインとの有意差を表し、「b」は固定期間の最終時間地点との有意差を表す。データは平均 + / - SEMとして表す。

【0057】

図4中に見られるように、PRO-C3は、固定による約20%の初期減少 (BR3からBR12までベースラインと有意に異なる、全時間地点に関して $p < 0.004$)、次に固定の最後の増大 (BR40がベースラインと有意に異なる、 $p = 0.05$) という形での有意な時間効果を示した。興味深いことに、再可動の開始時に、初期減少 (時間地点R3 ~ R28がベースラインより有意に高い、全時間地点に関して $p < 0.03$ 、かつR3が固定の最終時間地点、BR56より有意に高い、 $p = 0.02$)、次に増大で同様のパターンを観察することができた。最後の2箇所の時間地点、再可動開始後13週で、バイオマーカーレベルはベースラインに戻った。有意な群間の差も、有意な時間 * 治療相互作用効果もなかった。

10

【0058】

本発明者らが、PRO-C3の個々のバイオマーカーレベルとLBMおよびその変化を比較したところ、本発明者らは、PRO-C3の個々のレベルはベースラインでLBMと有意に相関関係があったことを発見した ($R^2 = 0.2869$ 、 $R = 0.536$ 、 $p = 0.0149$)。さらに本発明者らは、BR47におけるそのピークでのバイオマーカーのレベルは、固定状態中に失われたLBMの量と有意に相関関係があったことを発見した ($R^2 = 0.2056$ 、 $R = 0.453$ 、 $p = 0.0447$)。

20

【0059】

PRO-C6バイオマーカーは、固定の行程中経時的に変化し、約1週間の固定後には増大し (有意な時間効果、 $p < 0.0001$)、固定の最後の数週間にはベースラインより約30%高いピークレベルに達した (BR19からR28までベースラインより有意に高かった、BR47でピーク、 $p = 0.0002$)。固定期間中、群間の差はなかった (有意な治療効果または治療 * 時間相互作用もなかった)。

【0060】

再可動中、時間と時間 * 治療相互作用効果の両方が表面化した。これは、再可動1週間でピークに達した増大 (固定最終日、BR56と比較して20%の増大、 $p = 0.011$)、次にベースライン値への段階的回復の型であった。R7時間地点での大きな変動が原因で、相互作用効果は如何なる事後検定においても表面化しなかった。

30

【0061】

本発明者らが、PRO-C6の個々のバイオマーカーレベルとLBMおよびその変化を比較したところ、本発明者らは、PRO-C6のレベルはLBMと全く関係なかったが、固定中のLBMの変化とプラスの関係があり、PRO-C6の高レベルはLBMの消失の少なさと関連があることを意味することを発見した ($R^2 = 0.2794$ 、 $R = 0.529$ 、 $p = 0.0166$)。本発明者らは、PRO-C6は再可動中に (再) 回復するLBMの量とマイナスの関係があり、高レベルは再可動中のLBMの (再) 回復の少なさと関連があることを意味することも発見した ($R^2 = 0.3365$ 、 $R = 0.580$ 、 $p = 0.0073$)。

40

【0062】

C6Mバイオマーカーは固定によってほとんど影響を受けなかったが (固定時間期間中の時間効果なし)、再可動の初期に30 ~ 40%一時的に増大した ($p < 0.0001$ で固定期間中に有意な時間効果)。固定中に治療効果はなく、C6Mシグナルの増大はRV群中よりCTRL群中で大きかったようであるが、これが有意な状態に達することはなかった (時間 * 治療相互作用が有意な状態に達することはなく、したがって事後検定は行わなかった)。これらの群間に差はなかった。

【0063】

50

本発明者らが、PRO-C6の個々のバイオマーカールレベルとLBMおよびその変化を比較したところ、本発明者らは、PRO-C6のレベルはLBMと全く関係なかったが、固定中の筋肉消失とプラスの関係があり ($R^2 = 0.2794$ 、 $R = 0.529$ 、 $p = 0.0166$)、再可動中の筋肉量の(再)回復とマイナスの関係があったことを発見した ($R^2 = 0.3365$ 、 $R = 0.580$ 、 $p = 0.0073$)。

【0064】

【表2】

表2：バイオマーカール対人体測定値に関する相関マトリックス。BioM(バイオマーカール)、除脂肪体重(LBM)、脚筋体積(LMV、MRIからの値)、消失は固定中の絶対的LBM変化であり、すなわち高いマイナス値は大きな消失に等しい。回復は再可動中の全体LBMの再回復である。

	PRO-C3		PRO-C6		C6M	
	R	p	R	p	R	p
バイオマーカールベースライン対 除脂肪体重ベースライン	0.536	0.0149*	0.022	0.9270	0.595	0.0057*
バイオマーカールBR47対脚部 除脂肪体重消失	0.453	0.0447*	0.529	0.0166*	0.102	0.6684
バイオマーカールR3対脚部 除脂肪体重回復	-0.171	0.4705	-0.580	0.0073*	-0.269	0.2509

10

20

【0065】

PRO-C6は、身体活動の変化およびLBMの変化と関連した再編成のバイオマーカールであるとみなされる。ベースラインでの低いPRO-C6は、回復と消失両方のLBMの変化の影響をより受けやすい表現型と関連がある。

【0066】

[実施例3：COPDにおけるPRO-C6]

<試験設計>

医療コンサルタントによって2011年および2012年中にCOPD増悪であるとみなされた病院に入院中の患者を、入院の24時間以内に動員した。血液試料を増悪時と回復時に回収し、4週間のフォローアップ往診を入院後平均30日実施した(IQR28~34)。フォローアップ往診時に、標準的な気管支拡張後肺活量測定を患者に施し、6分間歩行距離(6MWD)試験を実施した。患者の報告された測定値は、フォローアップ往診時の、医学研究審議会(Medical Research Council)(MRC)の呼吸困難スケールを使用した呼吸困難のアセスメント、および喫煙歴を含んでいた。

30

【0067】

試験対象患者基準には、顧問医によってなされた入院時の急性COPD増悪の臨床診断結果を用いた。肺炎に関する医師の診断結果または放射線痕跡は除外基準であった。この試験は、フォローアップ往診時に確認した気道閉塞(0.7未満の1秒間努力呼気量(FEV1)と努力肺活量(FVC)の比)を有する69の患者をペア試料で含んでいた。

40

【0068】

<ECM再編成のバイオマーカール>

血清およびヘパリン血漿試料は分析するまで-80において保存した。C3M、C4M、Pro-C3、P4NP7S、ELM7、およびEL-NEを血清において測定し、一方C6M、Pro-C6、およびVCANMをヘパリン血漿において測定した。細胞外マトリックス再編成を評価するためこの試験において使用した、アッセイの概要を表4中に表す。

【0069】

50

【表 3】

表 4

アッセイ	標的	検出範囲 (ng/ml)	アッセイ内 変動および アッセイ間 変動 (%)	参照レベル (ng/ml)、 平均(SD)	参照
C3M	MMPによって分解される III型コラーゲン	5.52~ 177	3.4および 9.8	15.3 (3.8)	[28]
C4M	MMPによって分解される IV型コラーゲン	22.8~ 748	4.2および 18.5	55.4 (17.8)	[29]
C6M	MMPによって分解される VI型コラーゲン	4.88~ 420	8.0および 11.0	8.85 (5.1)	[30]
ELM7	MMP-7によって分解される エラスチン	1.16~ 36.6	8.1および 9.1	2.23 (0.74)	予備データ
EL-NE	好中球エラスターゼによっ て分解されるエラスチン	1.76~ 167	8.6および 12.9	4.09 (2.24)	予備データ
VCANM	MMPによって分解される ベルシカン	0.78~ 7.13	3.0および 7.6	1.20 (0.23)	[31]
Pro-C3	III型コラーゲンプロペプチ ド(N末端)	5.32~ 96.4	6.5および 12.4	12.3 (4.4)	[32]
P4NP 7S	IV型コラーゲン7Sドメイン (内部)	32.9~ 3460	9.4および 14.2	263 (91.3)	[33]
Pro-C6	VI型コラーゲンプロペプチ ド(C末端)	2.81~ 117	4.8および 15.2	4.37 (0.69)	予備データ

10

20

30

40

【0070】

基準値は製造者(Nordic Bioscience)によって提供されたものであり、関連マトリックス、すなわち血清(C3M、C4M、Pro-C3、P4NP7S、ELM7、EL-NE)またはヘパリン血漿(C6M、Pro-C6、VCANM)における健常集団のバイオマーカーレベルを指す。SD、標準偏差。MMP、マトリックスメタロプロテイナーゼ。

【0071】

患者の統計データおよび臨床的特徴を表5中に要約する。患者は大部分が男性(71%)で以前の喫煙者であった(55%)。彼らは平均[IQR]3[2~6]日入院し、フォローアップ往診は入院後30[28~34]日で実施した。

【0072】

【表4】

表5：増悪開始後4週間でのフォローアップ往診時のCOPD集団の基本的特徴。

変数	患者 (n=69)
年齢(年)、中央値(IQR)	67 (61~75)
女性、n (%)	20 (29)
BMI (kg/m ²)	25.7 (6.3)
現在の喫煙者、n (%)	31 (45)
喫煙年(年)	52 (26)
入院の長さ(日数)、中央値(IQR)	3 (2~6)
FEV ₁ (リットル)	1.19 (0.50)
FEV ₁ (予想%)	45.8 (16.1)
FVC (リットル)	2.55 (0.81)
FVC (予想%)	77.5 (19.0)
FEV ₁ /FVC比	0.46 (0.11)
6MWD (メートル)	166 (119)
MRC呼吸困難スコア、中央値(IQR)	4 (3~4)

10

20

他に言及しない限り、変数は平均(標準偏差)として列挙する。IQR、四分位数間範囲。BMI、体格指数。FEV₁、1秒間努力呼気量。FVC、努力肺活量。6MWD、6分間歩行距離。MRC、医学研究審議会。

【0073】

増悪時および30日フォローアップ時の臨床的に安定した疾患期に放出されたタンパク質断片の循環レベルを表6中に表す。

30

【0074】

【表 5】

表 6 : 増悪および30日フォローアップ時の循環タンパク質断片のレベル。

	増悪(ng/ml)	フォローアップ(ng/ml)	P値
C3M	29.24 [26.32~32.49]	22.64 [20.78~24.67]	< 0.0001
C4M	95.96 [85.83~107.28]	73.30 [66.59~80.69]	< 0.0001
C6M	19.78 [16.82~23.27]	13.27 [11.56~15.23]	< 0.0001
ELM7	4.50 [3.91~5.17]	3.79 [3.37~4.27]	< 0.0001
EL-NE	7.79 [6.30~9.63]	5.23 [4.41~6.21]	< 0.0001
VCANM	1.69 [1.58~1.80]	1.87 [1.78~1.97]	0.0001
Pro-C3	12.10 [10.60~13.81]	12.79 [11.35~14.42]	0.2549
P4NP 7S	510.99 [440.91~592.21]	359.20 [312.28~413.17]	< 0.0001
Pro-C6	5.36 [4.81~5.99]	6.38 [5.71~7.14]	< 0.0001

10

【 0 0 7 5 】

20

結果は、増悪時およびフォローアップ時のタンパク質断片の循環レベルを比較した幾何平均 [9 5 % 信頼区間] および対応する P 値として表す。

【 0 0 7 6 】

I I I 型コラーゲン (C 3 M)、I V 型コラーゲン (C 4 M)、V I 型コラーゲン (C 6 M)、およびエラスチン (E L M 7 と E L - N E) の分解断片は、フォローアップ時と比較して増悪時に有意に増大した (全て $P < 0.0001$ 、図 5、パネル A と B)。対照的に、ベルシカン分解の断片 (V C A N M) は有意に減少した平均レベルを増悪時に示した ($P < 0.0001$ 、図 5、パネル B)。タンパク質形成と関係した断片のレベルは、フォローアップ時と比較して増悪時に、I I I 型コラーゲンに関しては有意に変化しなかったが、I V 型コラーゲンに関しては増大し ($P < 0.0001$) V I 型コラーゲンに関しては減少した ($P < 0.0001$) (図 5、パネル C)。タンパク質断片の循環レベルに対する喫煙の影響を調べるため、現在および以前の喫煙者に分析を個別に実施し、結果は類似していた (データ示さず)。

30

【 0 0 7 7 】

コラーゲンの分解と形成の間の収支を、I I I 型、I V 型、および V I 型コラーゲンに関する断片の分解と形成の間の比を計算することによって調べた (図 6)。平均分解 / 形成比 [9 5 % C I] は、I I I 型コラーゲン (2 . 3 3 [2 . 0 3 ~ 2 . 6 6] 対 1 . 7 2 [1 . 5 1 ~ 1 . 9 6]、 $P < 0.0001$) および V I 型コラーゲン (3 . 6 1 [2 . 8 6 ~ 4 . 5 6] 対 2 . 0 0 [1 . 6 4 ~ 2 . 4 4]、 $P < 0.0001$) に関して増悪時に有意に増大した。対照的に、I V 型コラーゲンの分解 / 形成比は増悪時に 0 . 1 8 [0 . 1 7 ~ 0 . 2 0] であり、フォローアップ時は 0 . 2 0 [0 . 1 9 ~ 0 . 2 2] に増大した ($P = 0.0008$)。

40

【 0 0 7 8 】

フォローアップ時に、B M I は C 3 M ($\beta = -0.271$ 、 $P = 0.029$)、Pro - C 3 ($\beta = -0.357$ 、 $P = 0.010$)、および Pro - C 6 ($\beta = -0.338$ 、 $P = 0.017$) とマイナスの関連があった。年齢は C 6 M ($\beta = -0.249$ 、 $P = 0.039$) および Pro - C 6 ($\beta = -0.310$ 、 $P = 0.026$) とマイナスの関連があった。喫煙年数、M R C スコア、入院の長さ、喀痰生成、または白血球細胞数との関連は見られなかった。Pro - C 3 のレベルは F E V 1 予想値 % (予想 %) および F V C 予想 % とプラスの関連があり、これらは年齢、性別、B M I、喫煙年数、および喫煙状

50

態の補正後依然として有意であった(表4)。6MWDはC3M、C4M、C6M、およびP4NP7Sとマイナスの関連があった(表4)。年齢、性別、BMI、喫煙年数、および喫煙状態の補正後、C3MおよびC6Mとの関連は依然有意であったが、一方C4Mはボーダーラインでは有意であり、P4NP7Sは有意ではなかった(表7)。

【0079】

【表6】

表7：循環タンパク質断片のレベルと臨床パラメーターの間の関連。

	FEV1予想%	FVC予想%	6MWD
C3M	0.020	-0.182	-0.370** (-0.311*)
C4M	-0.002	-0.148	-0.313* (-0.252E)
C6M	-0.012	-0.224	-0.354** (-0.354**)
ELM7	-0.041	-0.175	-0.125
EL-NE	-0.016	-0.125	-0.189
VCANM	0.021	-0.084	-0.096
Pro-C3	0.391** (0.320*)	0.312* (0.305*)	-0.009
P4NP 7S	0.042	-0.186	-0.278* (-0.230)
Pro-C6	0.058	-0.013	-0.188

10

20

30

40

50

【0080】

結果は各マーカーに関するスピアマンの順位相関係数()として表す。有意性を示すマーカーに関する多変量相関係数を括弧内に記載する。多変量線形回帰解析は、他の注釈変数として年齢、性別、BMI、喫煙年数、および喫煙状態を含んでいた。有意性レベル： $P < 0.07$ 、 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 。FEV1、1秒間努力呼気量。%pred、予想値の割合。FVC、努力肺活量。6MWD、6分間歩行距離。

【0081】

全てのアッセイは、分解もしくは形成中にMMP切断によって生じるタンパク質断片、または内部タンパク質配列のいずれかを対象とするモノクローナル抗体を利用した。この試験中で使用したアッセイの概要およびそれらの技術仕様は表4中に与える。全ての試料は各アッセイの定量化範囲内で測定し、検出下限(LLOD)未満の値を有する任意の試料にLLODの値を割り当てた。

【0082】

前述の結果は、タンパク質再編成断片のバイオマーカーにより全身で評価したECM再編成は、疾患活動性が高いCOPDの増悪中に加速されることを立証する。

【0083】

[実施例4：II型糖尿病におけるPro-C6]

ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体(PPAR)の完全アゴニストを用いた糖尿病患者の治療は、インスリン感受性を改善するが、体重増加、心不全、末梢性浮腫、および骨消失と関連がある。VI型プロコラーゲンの3鎖のC末端断片(Pro-C6とも呼ばれる)であるエンドトロフィンは、脂肪組織マトリックス再編成と代謝制御の両方に関与する。本発明者らは、この新規なアディポカインがPPARアゴニストに最適に回答する2型糖尿病(DM2)患者を確認することができ、リスクベネフィット比を改善し得るかどうか評価するための、エンドトロフィンに関する血清アッセイを確立した。

【0084】

< 試験設計 >

BALLETTS (Birmingham and Lambeth Liver Evaluation Testing Strategies) 試験は、安定的インスリン療法での2型糖尿病を有する対象における6カ月のパラグリタゾンまたはピオグリタゾン治療の有効性と安全性を決定するための、フェーズIIIの、ランダムな、二重盲検、並行群、プラセボおよび活性コンパレーター対照臨床試験であった。そのベースライン統計データ、CONSORTダイアグラム、ならびに有効性および安全性データは以前に公開されている(Henriksen, 2011)。本発明の試験では、本発明者らは、以前に記載されたように(Henriksen, 2011)均一に4群に分散させた299対象(プラセボ、2用量のパラグリタゾン、および1用量のピオグリタゾン)からなるBALLETTS試験の集団をプロトコル毎に使用し、いずれもベースラインおよび最大6個のフォローアップパラメーターは療法下で血糖制御およびPro-C6決定と関係があった。

10

【0085】

< 統計解析 >

この統計解析は、血清中Pro-C6のベースライン測定値を有する集団由来の対象をプロトコル毎に含んでいた。それらのベースラインPro-C6値に基づいて、3つの三分位値の1つに対象を分類した。三分位値1は6.2ng/mL以下のベースライン血清中Pro-C6を有する対象を含み、三分位値2は6.3ng/mL~7.7ng/mLのベースライン血清中Pro-C6を有し、および、三分位値3は7.8ng/mL以上のベースライン血清中Pro-C6を有していた。3つの小群間のベースライン特性は分散分析(ANOVA)によって比較し、それぞれの三分位値における性別の割合の比較はフィッシャーの正確検定によって比較した。

20

【0086】

スピアマンの順位相関係数の計算を、血清中Pro-C6、断食中血清グルコース(FSG)、血中HbA1c、体格指数(BMI)、ならびにインスリン抵抗性(HOMA-IR)および脂肪肝指数(FLI)の誘導パラメーターのベースラインレベルで実施した。HOMA-IRは血清中グルコースおよびインスリンを含めた恒常性モデルアセスメント(Feigh, 2011)に従い計算し、FLIは(Bedogni et al, 2006によって記載されたように)以下の等式を使用して計算した。

30

【数1】

FLI

$$= \frac{(e^{0.953 \cdot \log_e(\text{トリグリセリド}) + 0.139 \cdot BMI + 0.718 \cdot \log_e(\text{ggT}) + 0.053 \cdot \text{腰周囲の長さ} - 15.745})}{(1 + e^{0.953 \cdot \log_e(\text{トリグリセリド}) + 0.139 \cdot BMI + 0.718 \cdot \log_e(\text{ggT}) + 0.053 \cdot \text{腰周囲の長さ} - 15.745})}$$

* 100

【0087】

ベースラインからのFSG、血中HbA1c、および血清中Pro-C6の変化を、3つの三分位値のそれぞれにおいて時間と治療の関数として試験した。最小二乗平均(LS平均)および標準誤差を、従属変数としてベースラインからの変化を用いた混合効果反復測定モデル(ベースラインレベル、往診(治療12週後)および治療終了時(26週後)、ならびに、ベースラインレベル対往診および治療終了時対往診の相互作用(固定された効果)、ならびに、対象に対する無構造の共分散構造分析)から推測した。

40

【0088】

それぞれの対象に関して、ベースラインからの平均変化はトラペゾイダル法により曲線下面積として計算し、LS平均および標準誤差は、従属変数として平均変化、共分散分析値としてベースラインレベル、および一定効果として治療値を用いた共分散分析モデル(ANCOVA)から推測した。各々の活性治療群内のそれぞれの三分位値をプラセボ群と

50

比較し、有意性のレベルはダネットの多重比較法で調節した。ベースラインからの平均変化が0と異なったかどうかのアセスメントはLS平均の標準誤差に基づいた。

【0089】

全ての統計値の計算はSASソフトウェアパッケージを使用して実施した。この試験はClinicalTrials.govの識別番号NCT00515632で登録されている。

【0090】

<結果>

血清中エンドトロフィンは代謝パラメーターと相関関係がある

BALLET試験における代謝パラメーターおよび安全性データによって評価した治療の有効性は以前に公開されている(Henriksen、2011)。メタボリックシンドローム関連パラメーターとエンドトロフィンのベースライン相関関係は表8中に表す。

【0091】

【表 7】

表 8 : 小群におけるベースラインPRO-C6の統計データおよびベースライン特性				
	エンドトロフィン (2.4~6.2 ng/mL) n=96	エンドトロフィン (6.3~7.7 ng/mL) n=101	エンドトロフィン (7.8~16 ng/mL) n=100	p値
治療	Bala 10 mg: n=27 Bala 20 mg: n=22 Pio 45 mg: n=24 プラセボ n= 23	Bala 10 mg: n=21 Bala 20 mg: n=21 Pio 45 mg: n=29 プラセボ n= 30	Bala 10 mg: n=25 Bala 20 mg: n=25 Pio 45 mg: n=31 プラセボ n= 19	-
年齢(年)	57.6 (8.1)	60.6 (8.3)	63.4 (8.0)	<0.0001
性別	女: 21 (22%) 男: 75 (78%)	女: 32 (32%) 男: 69 (68%)	女: 43 (43%) 男: 57 (57%)	p=0.007
BMI (kg/m ²)	32.0 (3.9)	33.6 (4.7)	34.9 (6.3)	0.0005
腰周囲の長さ (cm)	110 (10)	114 (12)	117 (14)	0.001
臀部周囲の長さ (cm)	109 (8)	111 (10)	115 (12)	0.0002
DXA全体脂肪 量(kg)	30.8 (8.4)	33.86 (8.9)	36.1 (9.8)	0.0006
DXA体幹脂肪 量(kg)	18.3 (5.2)	20.0 (5.0)	21.7 (5.6)	0.0001
血中HbA1C (%)	8.7 (1.4)	8.4 (1.3)	8.8 (1.5)	ns
血清中グルコー ス(mmol/L)	9.4 (3.3)	9.2 (3.2)	9.8 (3.4)	Ns
血清中AST (U/L)	28 (12)	32 (13)	32 (12)	Ns
血清中ALT (U/L)	31 (15)	34 (19)	33 (17)	Ns
血清中GGT (U/L)	45 (38)	55 (56)	54 (47)	Ns
血清中ALP (U/L)	163 (49)	172 (46)	187 (56)	0.004
血清中ビリルビ ン(μmol/L)	9 (3.3)	9 (5.1)	9 (3.7)	Ns
血清中トリグリ セリド(mmol/L)	1.52 (0.94)	1.85 (1.16)	2.05 (1.07)	0.002
血清中コレステ ロール (mmol/L)	4.34 (0.96)	4.28 (0.85)	4.45 (1.04)	Ns
血清中HDLコレ ステロール (mmol/L)	1.31 (0.35)	1.23 (0.29)	1.25 (0.27)	Ns
血清中LDLコレ ステロール (mmol/L)	2.61 (0.90)	2.54 (0.76)	2.61 (0.97)	Ns

エンドトロフィンレベルはHOMA - IR、FLI、トリグリセリド、およびBMIと有意に相関関係があったが、FSGおよびHbA1cとは相関関係がなく、この結果は、実際にエンドトロフィンが脂肪細胞機能、脂肪量、およびインスリン感受性の幾つかの態様と関係があるアディポカインであることを支持した。エンドトロフィンレベルは、コレステロールレベルまたは肝臓酵素とは相関関係がなかった。

【0093】

6カ月の治療期間の最後に、プラセボ群において、エンドトロフィンとこれらの代謝パラメーターの間の相関関係が維持された(表9、10A)。しかしながら、いずれかのPPAR α アゴニストで治療した群では、HOMA - IRとエンドトロフィンの間の相関関係は失われ、一方でエンドトロフィンとBMIまたはFLIの間の相関関係は継続し、さらに強くなる傾向さえ示した(表10B~C)。

【0094】

【表8】

表9：ベースラインでのスピアマンの順位相関係数(Rho)

	エンド トロフ イン	血清中 グルコース	ベース ライン HbA1c	HOMA- IR	FLI	BMI
PRO-C6	1	0.07	0.06	0.16**	0.32***	0.24***
血清中 グルコース	-	1	0.47***	0.27***	0.20***	0.17**
ベースライ ン HbA1c	-	-	1	0.15**	0.17**	0.10
HOMA-IR	-	-	-	1	0.42***	0.33***
FLI	-	-	-	-	1	0.86***
BMI	-	-	-	-	-	1

【0095】

10

20

30

【表 9】

	エンドト ロフィン	血清中 グルコース	HbA1c	HOMA- IR	FLI	BMI
PRO-C6	1	0.05	-0.07	0.28*	0.34**	0.26*
血清中 グルコース	-	1	0.24*	0.23*	0.18	0.26*
HbA1c	-	-	1	0.12	0.16	0.11
HOMA-IR	-	-	-	1	0.35**	0.23
FLI	-	-	-	-	1	0.87***
BMI	-	-	-	-	-	1

10

20

【 0 0 9 6 】

【表 1 0】

	エンドト ロフィン	血清中 グルコース	HbA1c	HOMA- IR	FLI	BMI
PRO-C6	1	-0.21	-0.31**	0.02	0.39***	0.31**
血清中 グルコース	-	1	0.48***	0.02	-0.11	-0.14
HbA1c	-	-	1	-0.06	-0.13	-0.12
HOMA-IR	-	-	-	1	0.30**	0.25*
FLI	-	-	-	-	1	0.84***
BMI	-	-	-	-	-	1

30

40

【 0 0 9 7 】

エンドトロフィンによってグリタゾン療法に対する応答者を確認する

体重およびBMIは、全4治療群中で下部三分位値より上部三分位値において高かった(表1)。治療群間でグルコース恒常性の差は見られなかった。

【 0 0 9 8 】

50

F S G および H b A 1 c の絶対レベルは、試験中ゼロとして設定したベースラインと比較したエンドトロフィンの2つの上部三分位値においてのみであるが、プラセボと比較して全3治療群中で低下した(図7 A ~ F)。

【0099】

ベースラインから治療終了(第26週)までのF S Gの平均絶対変化を経時的に評価すると(図8、左側のパネル)、F S Gの減少は大きく(約2.5 mM)、下部三分位値と比較すると2つの上部三分位値において統計的に有意であり、この場合ベースラインと比較した減少は全治療群にわたり有意ではなかった。同様にH b A 1 cに関して(図8、右側のパネル)、26週間の治療期間中のエンドトロフィンレベルの平均絶対変化は、いずれもプラセボおよびベースラインレベルと比較したところ、下部三分位値ではなく2つの上部三分位値においてのみ有意であった。療法に対する応答性を調べたところ、ベースライン血清中エンドトロフィンの2つの上部三分位値における患者は、グリタゾン療法に対して臨床上有意な応答を示す可能性が著しく高かった。これらの患者において、1%超および0.5%超のH b A 1 cの減少に関するオッズ比はそれぞれ4.1 ($p < 0.001$) および4.3 ($p < 0.001$)であった(図9)。療法下において(H O M A - I Rにより)インスリン感受性の変化を評価したところ、エンドトロフィンの上部三分位値における対象は最高の改善を再度示し(図10 A ~ C)、最大三分位値は統計的有意性をわずかに欠いていた。興味深いことに、療法の様々な有効性にもかかわらず、エンドトロフィンレベルの三分位値の間に体重増加の顕著な差はなかった(データ示さず)。

10

【0100】

ベースラインと比較した変化率として表した、(治療の中間点および最後を試験するための)治療と時間の関数としての血清中エンドトロフィンに対する影響を図11中に示す。エンドトロフィンのレベルは2つの最低三分位値に関してプラセボ群と治療群の両方で増大したが、最高三分位値では増大しなかった。

20

【0101】

<有害事象>

下肢浮腫は、水の移動が原因の体積増大として測定したところ、ベースライン血清中エンドトロフィン三分位値と相関関係があった。グリタゾン療法は下部および中間三分位値において下肢体積の増大をもたらしたが、一方で上部三分位値では治療群とプラセボ群の間に差はなかった(図12)。血清中エンドトロフィンの異なる三分位値におけるA Eおよび重症A E(S A E)は表11中に表す。エンドトロフィンレベルに従い階層化したところ、3つの異なる治療群においてA EまたはS A Eの発生の有意な差はなかった。表11中のS A Eと図12中に報告した下肢浮腫の間の差は、定量測定値である下肢体積と患者の報告されたアウトプットである浮腫の報告値の関数である(図10)。

30

【0102】

【表 1 1 A】

表 11:小群中、各治療群中のベースラインエンドトروفインの有害事象の概要

N (%) E	プラセボ	パラグリタ ゾン 10mg	パラグリタ ゾン 20mg	ピオグリタ ゾン 45mg
三分位値 1:有害事象				
対象数	n=23	n=27	n=22	n=24
全有害事象	16 (70%) 30	20 (74%) 38	17 (77%) 33	19 (79%) 45
重大有害事象	0 (0%) 0	1 (4%) 1	1 (5%) 1	1 (4%) 1
三分位値 2:有害事象				
対象数	n=30	n=21	n=21	n=29
全有害事象	23 (77%) 51	17 (81%) 35	15 (71%) 36	17 (59%) 37
重大有害事象	3 (10%) 3	1 (5%) 1	0 (0%) 0	2 (6%) 3
三分位値 3:有害事象				
対象数	n=19	n=25	n=25	n=31
全有害事象	14 (74%) 41	20 (60%) 55	20 (60%) 43	25 (81%) 66
重大有害事象	0 (0%) 0	1 (4%) 1	6 (24%) 6	4 (13%) 6
三分位値 1:重症有害事象				
心不全	0 (0%) 0	0 (0%) 0	0 (0%) 0	0 (0%) 0
心筋虚血	1 (4%) 1	0 (0%) 0	2 (9%) 2	0 (0%) 0
末梢性浮腫	0 (0%) 0	2 (7%) 2	2 (9%) 2	5 (21%) 5
全重症有害事象	1 (4%) 1	2 (7%) 2	4 (18%) 4	5 (21%) 5
三分位値 2:重症有害事象				
心不全	0 (0%) 0	0 (0%) 0	0 (0%) 0	0 (0%) 0
心筋虚血	1 (3%) 1	1 (5%) 1	0 (0%) 0	1 (3%) 1
末梢性浮腫	1 (3%) 1	3 (14%) 3	2 (10%) 2	5 (17%) 5

10

20

30

40

【表 1 1 B】

全重症有害事象	2 (7%) 2	4 (19%) 4	2 (10%) 2	5 (17%) 6
三分位値 3:重症有害事象				
心不全	0 (0%) 0	0 (0%) 0	0 (0%) 0	1 (3%) 1
心筋虚血	1 (5%) 1	0 (0%) 0	1 (4%) 1	3 (10%) 4
末梢性浮腫	1 (5%) 2	1 (8%) 1	1 (4%) 1	2 (6%) 2
全重症有害事象	2 (11%) 3	1 (8%) 1	2 (8%) 2	6 (19%) 7

10

【0103】

< 考察 >

血清中エンドトロフィン (Pro-C6) によって、2 型糖尿病患者において、インスリン増感剤、ピオグリタゾンおよびパラグリタゾンに対する応答を予測した。したがって、2つの上部三分位値における Pro-C6 血清中レベルを有する患者は、下部三分位値における患者と比較したところ 4 倍を超える治療応答性を有する可能性がある。グリタゾンは非致死性心不全および骨折などの安全問題と関連があるので、最少 AE で最も治療効果を得る最適患者の確認は、依然として非常に有効なインスリン増感剤と考えられるこれらの薬剤を、継続して使用するのに重要である。ちょうど一致して、FPG および HbA1c 三分位値の減少に回答した上部三分位値におけるベースライン Pro-C6 の患者は、グリタゾン治療に関する主要 AE の 1 つである下肢浮腫の増大を発症しなかった。これらの有効性と安全性を組合せたデータは、グリタゾンで治療した患者に関する副作用を予想する改善利点と非常に関連があり、これは患者の他の徴候を再考慮する際にも当てはまるはずであり、特に非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の治療が考えられる。

20

【0104】

肥満症におけるエンドトロフィン媒介性の代謝機能障害は、エネルギー消費の減少と結びついた脂肪組織における前炎症状態および線維症の誘導を介して誘導される可能性が高い。したがって、その抑制によってインスリン感受性が改善され脂肪組織炎症を弱め (Sun、2014)、これは血清中エンドトロフィンレベルの上昇は PPAR アゴニストに対する応答を示すものであるという、本発明者らの発見とよく相関する。さらに、エンドトロフィン前駆体、プロコラーゲン 3 (VI) の mRNA レベルは肥満脂肪組織において上方制御され、脂肪組織炎症と線維症が再度平行し、一般に脂肪細胞と脂肪組織のモジュレーターとしての VI 型プロコラーゲンの重要な役割を支持する (Dankeel、2014)。ECM および特に VI 型プロコラーゲンおよびエンドトロフィンは、脂肪性肝疾患およびその重症型、NASH、2 型糖尿病と少なくとも部分的な重複を示す肝臓の代謝障害・線維症と非常に関連があり得る。したがって本発明者らは、この新規なバイオマーカーは、インスリン抵抗性と肝臓線維症の両方の治療を要するサブ集団においてインスリン増感剤が有用であり得、NASH 患者の診断および管理においても役立つと予想する。ここで、線維症 NASH を明らかにするためには、ECM、特にコラーゲン / VI 型コラーゲン、および脂肪肝への移行におけるそれらの機能的役割をさらに調べる必要がある。これと一致して、本発明の試験において本発明者らは、NASH 炎症活性と相関があり重症度の肝臓線維症を予測する FLI 指標と、血清中トリグリセリドとの強い相関関係を観察した (Bedogni、2006)。NASH 関連線維症における VI 型コラーゲンの役割を支持するに際して、従来試験は活性化瘢痕形成領域におけるその顕著な発現を実証し (Burt、1990; Griffiths、1992)、(エンドトロフィン

30

40

50

メインを欠く) V I 型コラーゲンコア構造の血清中レベルの増大はげっ歯類 (V e i d a 1、2011) および患者 (L e b e n s z t e j n、2006; S t i c k e l、2001) における進行した肝臓線維症、および門脈圧の上昇と関連があることが示されている (L e e m i n g、2013)。プロコラーゲン 3 (V I) の発現は P P A R によって制御され、これは本発明者らの発見とちょうど一致する。実際、プロコラーゲン 3 (V I) の m R N A は、P P A R に対する s i R N A で処理した脂肪細胞培養物におけるその m R N A の増大、および、P P A R アゴニストであるピオグリタゾンで治療した 2 型糖尿病患者 (特に高いベースライン組織レベルのプロコラーゲン 3 (V I) m R N A を有する患者) の皮下脂肪組織におけるその転写産物の減少により実証されたように、P P A R によって抑制される。これらのデータによって、ベースラインから治療終了までの、エンドトロフィン / P r o - C 6 血清中レベルと H b A 1 c または H O M A - I R の間の相関関係の変化、特にグリタゾン治療後のエンドトロフィンと代謝パラメーターの間の相関関係の欠如を部分的に説明することができる。したがって、末梢脂肪組織において (プロコラーゲン 3 (V I) m R N A により測定した) エンドトロフィン前駆体の発現は、重度に肥満の、インスリン抵抗性患者において B M I または全体脂肪量に依存しなかった。別の臨床試験では、肥満対象における組織エンドトロフィンレベルは慢性炎症および全身インスリン抵抗性と相関関係があった (P a r k、2013)。プロコラーゲン V I、脂肪組織線維症およびグルコース感受性の低下の間の直接的関連のさらなる証拠は、白色脂肪組織中コラーゲン V I の不在下での (機能性レプチン遺伝子を欠く) o b / o b マウスにおける試験によって与えられる。これらのマウスは、脂肪組織線維症および炎症の不在下で有意に改善されたインスリン感受性を有していた (K h a n、2009)。初見では、これらのデータは、本発明者らの試験において見られた血清中エンドトロフィンと B M I、F L I、および H O M A - I R の間の強い相関関係と矛盾するようである。しかしながら、タンパク質分解によるアディポカインエンドトロフィンの生成に関する十分な前提条件ではなく、プロコラーゲン V I の存在のみが必要である。したがって、エンドトロフィン生成プロテアーゼを同定すること、およびその上流制御を特徴付けることは興味深い。さらに、レプチンは V I 型プロコラーゲンの発現を誘導し、これはレプチン抵抗性、代謝機能障害、およびエンドトロフィンの間の関連をさらに支持する。

【0105】

前に論じたように、E C M は現在まで大部分が不活化足場であると考えられてきた。V I 型コラーゲンは、ベスレムミオパチー、ウールリッヒ型先天性筋ジストロフィー、手足 - 肢帯筋ジストロフィー、および常染色体劣性筋硬化症などの筋肉障害を引き起こし、その 3 構成鎖をコードする遺伝子 C O L 6 A 1、C O L 6 A 2、および C O L 6 A 3 の突然変異によって大部分が認識されている (L a m p e、2005; B o n a l d o、1998; B u s h b y、2014)。これは代謝機能障害との興味深い関連をもたらす。筋肉はインスリン抵抗性の重要なレギュレーターとなるからである。したがって、全ての利用可能な証拠は、V I 型コラーゲンは不活化 E C M 成分を超えるものであり、インスリン抵抗性と関連した脂肪 (および肝臓) 代謝機能障害、2 型糖尿病、および N A S H の重要なメディエーターであることを強く示唆する。

【0106】

結論として、脂肪細胞および脂肪組織に顕著に由来する循環エンドトロフィンは、インスリン抵抗性に対して上昇し、インスリン増感剤に対する応答性を予測するものである。これによってインスリン増感剤に最適に応答し得る患者を確認およびモニタリングすることができ、このことが 2 型糖尿病およびおそらく N A S H の治療において P P A R アゴニストのベネフィットリスク比を改善する。

【0107】

本明細書中、明らかに他のことを示さない限り、語句「または」は、条件の 1 つのみが適合することを必要とする演算子「排他的論理和 (exclusive or)」と対照的に、言及する条件の一方もしくは両方が適合するとき真の値に戻る演算子の意味で使用する。語句「含む」は、「からなる」を意味することではなく「包含する」の意味で使用する。前で承

認した全ての従来教示は参照により本明細書に組み込まれている。本明細書中の如何なる従来公開文書の承認も、それらの教示が本明細書の日付時点でオーストラリアまたは他の国において共通の一般知識であったことを容認または描写するものであると考えるべきではない。

【 0 1 0 8 】

[文献]

【表 1 2 A】

References

1. Agrawal R, Jain P, Dikshit SN. Balaglitazone: a second generation peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma (gamma) agonist. *Mini Rev Med Chem* 2012 February;12(2):87-97.
2. Aigner T, Hambach L, Soder S, Schlotzer-Schrehardt U, Poschl E. 10
The C5 domain of Col6A3 is cleaved off from the Col6 fibrils immediately after secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:743-8.
3. Armbrecht G, Belavý DL, Gast U, et al. (2010) Resistive vibration exercise attenuates bone and muscle atrophy in 56 days of bed rest: biochemical markers of bone metabolism. *Osteoporos Int* 21:597-607. 20
doi: 10.1007/s00198-009-0985-z
4. Atkinson JC, Ruhl M, Becker J, Ackermann R, Schuppan D. Collagen VI regulates normal and transformed mesenchymal cell proliferation in vitro. *Exp Cell Res* 1996 Nov 1; 228: 283-291.
5. Barascuk N, Genovese F, Larsen L, Byrjalsen I, Zheng Q, Sun S, Hosbond S, Poulsen TS, Diederichsen A, Jensen JM, Mickley H, 30
Register TC, Rasmussen LM, Leeming DJ, Christiansen C, Karsdal MA. A MMP derived versican neo-epitope is elevated in plasma from patients with atherosclerotic heart disease. *Int J Clin Exp Med* 2013; 6: 174-184.
6. Barascuk N, Veidal SS, Larsen L, et al. A novel assay for 40
extracellular matrix remodeling associated with liver fibrosis: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for a MMP-9 proteolytically revealed neo-epitope of type III collagen. *Clin Biochem* 2010;43: 899-904.

【表 1 2 B】

7. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 2006;6:33.
8. Belavý DL, Miokovic T, Armbrecht G, et al. (2009) Resistive vibration exercise reduces lower limb muscle atrophy during 56-day bed-rest. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 9:225-235. 10
9. Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci* 2005 May;26(5):244-51.
10. Bhasin S, He EJ, Kawakubo M, et al. (2009) N-terminal propeptide of type III procollagen as a biomarker of anabolic response to recombinant human GH and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 94:4224-4233. doi: 10.1210/jc.2009-1434 20
11. Bidanset DJ, Guidry C, Rosenberg LC, et al. Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. *J Biol Chem* 1992;267:5250-6. 30
12. Bonaldo P, Russo V, Bucciotti F, Doliana R, Colombatti A. Structural and functional features of the alpha 3 chain indicate a bridging role for chicken collagen VI in connective tissues. *Biochemistry* 1990;29: 1245-54.
13. Bonaldo P, Sandri M (2012) Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech* 6:25-39. doi: 10.1242/dmm.010389 40
14. Burt AD, Griffiths MR, Schuppan D, Voss B, MacSween RN. Ultrastructural localization of extracellular matrix proteins in liver biopsies using ultracryomicrotomy and immuno-gold labelling. *Histopathology* 1990 January;16(1):53-8.

【表 1 2 C】

15. Bushby KM, Collins J, Hicks D. Collagen type VI myopathies. *Adv Exp Med Biol* 2014;802:185-99
16. Carter RI, Ungurs MJ, Mumford RA, Stockley RA. Aalpha-Val360: a marker of neutrophil elastase and COPD disease activity. *Eur Respir J* 2013 Jan; 41: 31-38. 10
17. Charbonnel B, DeFronzo R, Davidson J, Schmitz O, Birkeland K, Pirags V et al. Pioglitazone use in combination with insulin in the prospective pioglitazone clinical trial in macrovascular events study (PROactive19). *J Clin Endocrinol Metab* 2010 May;95(5):2163-71.
18. Chen F, Lam R, Shaywitz D, et al. Evaluation of early biomarkers of muscle anabolic response to testosterone. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2011;2: 45-56. 20
19. Cho N, Momose Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as insulin sensitizers: from the discovery to recent progress. *Curr Top Med Chem* 2008;8(17):1483-507.
20. Corhay JL, Moermans C, Henket M, Nguyen DD, Duysinx B, Louis R. Increased of exhaled breath condensate neutrophil chemotaxis in acute exacerbation of COPD. *Respir Res* 2014; 15: 115. 30
21. Cox TR, Erler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech* 2011 Mar; 4: 165-178.
22. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 2010;39: 412-23. 40

【表 1 2 D】

23. Dankel SN, Svard J, Mattha S, Claussnitzer M, Kloting N, Glunk V et al. COL6A3 expression in adipocytes associates with insulin resistance and depends on PPARgamma and adipocyte size. *Obesity* (Silver Spring) 2014 August;22(8):1807-13.
24. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002 Oct; 57: 847-852. 10
25. Donaldson GC, Wedzicha JA. COPD exacerbations .1: *Epidemiology*. *Thorax* 2006 Feb; 61: 164-168.
26. Engvall E, Hessel H, Klier G. Molecular assembly, secretion, and matrix deposition of type VI collagen. *J Cell Biol* 1986 Mar; 102: 703-710. 20
27. Feigh M, Henriksen K, Andreassen KV, Hansen C, Henriksen JE, Beck-Nielsen H et al. A novel oral form of salmon calcitonin improves glucose homeostasis and reduces body weight in diet-induced obese rats. *Diabetes Obes Metab* 2011 October;13(10):911-20.
28. Geftter ML, Margulies DH, Scharff MD. A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Somatic Cell Genet* 1977;3: 231-6. 30
29. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55: 1531-46.
30. Giannelli G, De MA, Marinosci F, Antonaci S. Matrix metalloproteinase imbalance in muscle disuse atrophy. *Histol Histopathol* 2005;20: 99-106. 40
31. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. www.goldcopd.org. Date last updated: January 2014. Date last accessed: October 22 2014.

【表 1 2 E】

32. Granzier HL, Irving TC. Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys J* 1995;68: 1027-44.
33. Griffiths MR, Shepherd M, Ferrier R, Schuppan D, James OF, Burt AD. Light microscopic and ultrastructural distribution of type VI collagen in human liver: alterations in chronic biliary disease. *Histopathology* 1992 October;21(4):335-44. 10
34. Hallgren O, Nihlberg K, Dahlback M, Bjermer L, Eriksson LT, Erjefalt JS, Lofdahl CG, Westergren-Thorsson G. Altered fibroblast proteoglycan production in COPD. *Respir Res* 2010; 11: 55.
35. Heinemeier KM, Olesen JL, Haddad F, et al. (2009) Effect of unloading followed by reloading on expression of collagen and related growth factors in rat tendon and muscle. *J Appl Physiol* 106:178-186. doi: 10.1152/jappphysiol.91092.2008 20
36. Henriksen K, Byrjalsen I, Qvist P, Beck-Nielsen H, Hansen G, Riis BJ et al. Efficacy and safety of the PPARgamma partial agonist balaglitazone compared with pioglitazone and placebo: a phase III, randomized, parallel-group study in patients with type 2 diabetes on stable insulin therapy. *Diabetes Metab Res Rev* 2011 May;27(4):392-401. 30
37. Home PD, Pocock SJ, Beck-Nielsen H, Curtis PS, Gomis R, Hanefeld M et al. Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial. *Lancet* 2009 June 20;373(9681):2125-35. 40
38. Hortobagyi T, Dempsey L, Fraser D, et al. (2000) Changes in muscle strength, muscle fibre size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans. *J Physiol* 524 Pt 1:293-304.

【表 1 2 F】

39. Huang R, Merrilees MJ, Braun K, Beaumont B, Lemire J, Clowes AW, Hinek A, Wight TN. Inhibition of versican synthesis by antisense alters smooth muscle cell phenotype and induces elastic fiber formation in vitro and in neointima after vessel injury. *Circ Res* 2006 Feb 17; 98: 370-377. 10
40. Hughes VA, Frontera WR, Roubenoff R, Evans WJ, Singh MA. Longitudinal changes in body composition in older men and women: role of body weight change and physical activity. *Am J Clin Nutr* 2002;76: 473-81.
41. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Mullerova H, Tal-Singer R, Miller B, Lomas DA, Agustí A, Macnee W, Calverley P, Rennard S, Wouters EF, Wedzicha JA. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2010 Sep 16; 363: 1128-1138. 20
42. Karalliedde J, Buckingham RE. Thiazolidinediones and their fluid-related adverse effects: facts, fiction and putative management strategies. *Drug Saf* 2007;30(9):741-53. 30
43. Karsdal MA, Delvin E, Christiansen C. Protein fingerprints - relying on and understanding the information of serological protein measurements. *Clin Biochem* 2011 Nov; 44: 1278-1279.
44. Karsdal MA, Manon-Jensen T, Genovese F, Kristensen JH, Nielsen MJ, Sand JM et al. Novel insights into the function and dynamics of extracellular matrix in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015 May 15;308(10):G807-G830. 40

【表 1 2 G】

45. Karsdal MA, Nielsen MJ, Sand JM, Henriksen K, Genovese F, Bay-Jensen AC, Smith V, Adamkewicz JI, Christiansen C, Leeming DJ. Extracellular matrix remodeling: the common denominator in connective tissue diseases. Possibilities for evaluation and current understanding of the matrix as more than a passive architecture, but a key player in tissue failure. *Assay Drug Dev Technol* 2013 Mar; 11: 70-92. 10
46. Keene DR, Engvall E, Glanville RW. 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.
47. Kenagy RD, Plaas AH, Wight TN. Versican degradation and vascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2006 Aug; 16: 209-215. 20
48. Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N et al. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol* 2009 March;29(6):1575-91.
49. Kuo HJ, Maslen CL, Keene DR, Glanville RW. Type VI collagen anchors endothelial basement membranes by interacting with type IV collagen. *J Biol Chem* 1997;272: 26522-9. 30
50. Lamande SR, Morgelin M, Adams NE, Selan C, Allen JM. The C5 domain of the collagen VI alpha3(VI) chain is critical for extracellular microfibril formation and is present in the extracellular matrix of cultured cells. *J Biol Chem* 2006;281: 16607-14. 40
51. Lampe AK, Bushby KMD (2005) Collagen VI related muscle disorders. *J Med Genet* 42:673-685. doi: 10.1136/jmg.2002.002311

【表 1 2 H】

52. Larsen PJ, Lykkegaard K, Larsen LK, Fleckner J, Sauerberg P, Wassermann K et al. Dissociation of antihyperglycaemic and adverse effects of partial peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR-gamma) agonist balaglitazone. *Eur J Pharmacol* 2008 October 31;596(1-3):173-9. 10
53. Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska ME, Kaczmarski M, Voelker M, Schuppan D. Matrix-derived serum markers in monitoring liver fibrosis in children with chronic hepatitis B treated with interferon alpha. *World J Gastroenterol* 2006 June 7;12(21):3338-43.
54. Leeming DJ, Nielsen MJ, Dai Y, Veidal SS, Vassiliadis E, Zhang C, He Y, Vainer B, Zheng Q, Karsdal MA. Enzyme-linked immunosorbent serum assay specific for the 7S domain of Collagen Type IV (P4NP 7S): A marker related to the extracellular matrix remodeling during liver fibrogenesis. *Hepatol Res* 2012 May; 42: 482-493. 20
55. Leeming DJ, Sand JM, Nielsen MJ, Genovese F, Martinez FJ, Hogaboam CM, Han MK, Klickstein LB, Karsdal MA. Serological investigation of the collagen degradation profile of patients with chronic obstructive pulmonary disease or idiopathic pulmonary fibrosis. *Biomark Insights* 2012; 7: 119-126. 30
56. Leeming DJ, Karsdal MA, Byrjalsen I, Bendtsen F, Trebicka J, Nielsen MJ et al. Novel serological neo-epitope markers of extracellular matrix proteins for the detection of portal hypertension. *Aliment Pharmacol Ther* 2013 November;38(9):1086-96. 40
57. Mak KM, Sehgal P, Harris CK. Type VI Collagen: Its Biology and Value as a Biomarker of Hepatic Fibrosis. *Austin Biomark Diagn.* 1[2], 9. 2014.

【表 1 2 I】

58. Mercer PF, Shute JK, Bhowmik A, Donaldson GC, Wedzicha JA, Warner JA. MMP-9, TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation. *Respir Res* 2005; 6: 151.
59. Merrilees MJ, Ching PS, Beaumont B, Hinek A, Wight TN, Black PN. Changes in elastin, elastin binding protein and versican in alveoli in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2008; 9: 41. 10
60. Miller BF, Olesen JL, Hansen M, et al. (2005) Coordinated collagen and muscle protein synthesis in human patella tendon and quadriceps muscle after exercise. *J Physiol (Lond)* 567:1021-1033. doi: 10.1113/jphysiol.2005.093690
61. Miller TA, Lesniewski LA, Muller-Delp JM, et al. (2001) Hindlimb unloading induces a collagen isoform shift in the soleus muscle of the rat. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 281:R1710-R1717. 20
62. Nedergaard A, Karsdal MA, Sun S, Henriksen K. Serological muscle loss biomarkers: an overview of current concepts and future possibilities. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2013;4: 1-17. 30
63. Nedergaard A, Sun S, Karsdal MA, et al. (2013) Type VI collagen turnover-related peptides-novel serological biomarkers of muscle mass and anabolic response to loading in young men. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 4:267-275. doi: 10.1007/s13539-013-0114-x
64. Nielsen MJ, Nedergaard AF, Sun S, et al. (2013) The neo-epitope specific PRO-C3 ELISA measures true formation of type III collagen associated with liver and muscle parameters. *Am J Transl Res* 5:303-315. 40
65. Niemela O, Risteli L, Parkkinen J, Risteli J. Purification and characterization of the N-terminal propeptide of human type III procollagen. *Biochem J* 1985;232: 145-50.

【表 1 2 J】

66. O'Reilly PJ, Jackson PL, Wells JM, Dransfield MT, Scanlon PD, Blalock JE. Sputum PGP is reduced by azithromycin treatment in patients with COPD and correlates with exacerbations. *BMJ Open* 2013; 3: e004140.
67. Orkin RW, Gehron P, McGoodwin EB, Martin GR, Valentine T, Swarm R. 10
A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exp Med* 1977 Jan 1; 145: 204-220.
68. Pasarica M, Gowronska-Kozak B, Burk D, Remedios I, Hymel D, Gimble J et al. Adipose tissue collagen VI in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 December;94(12):5155-62.
69. Park J, Scherer PE. Adipocyte-derived endotrophin promotes 20
malignant tumor progression. *J Clin Invest* 2012 November;122(11):4243-56.
70. Park J, Scherer PE. Endotrophin in the tumor stroma: a new therapeutic target for breast cancer? *Expert Rev Anticancer Ther* 2013 February;13(2):111-3.
71. Pfister RR, Haddox JL, Sommers CI, Lam KW. Identification and 30
synthesis of chemotactic tripeptides from alkali-degraded whole cornea. A study of N-acetyl-proline-glycine-proline and N-methyl-proline-glycine-proline. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995 Jun; 36: 1306-1316.
72. Rennie MJ, Selby A, Atherton P, et al. Facts, noise and wishful 40
thinking: muscle protein turnover in aging and human disuse atrophy. *Scand J Med Sci Sports* 2010;20: 5-9.
73. Reznick AZ, Menashe O, Bar-Shai M, Coleman R, Carmeli E.
Expression of matrix metalloproteinases, inhibitor, and acid phosphatase in muscles of immobilized hindlimbs of rats. *Muscle Nerve* 2003;27: 51-9.

【表 1 2 K】

74. Rittweger J, Belavy D, Hunek P, et al. Highly demanding resistive vibration exercise program is tolerated during 56 days of strict bed-rest. *Int J Sports Med* 2006;27: 553-9.
75. Ruhl M, Johannsen M, Atkinson J, Manski D, Sahin E, Somasundaram R, Riecken EO, Schuppan D. Soluble collagen VI induces tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase and activates the MAP kinase erk2 in fibroblasts. *Exp Cell Res* 1999 Aug 1; 250: 548-557. 10
76. Ruhl M, Sahin E, Johannsen M, Somasundaram R, Manski D, Riecken EO, Schuppan D. Soluble collagen VI drives serum-starved fibroblasts through S phase and prevents apoptosis via down-regulation of Bax. *J Biol Chem* 1999 Nov 26; 274: 34361-34368. 20
77. Sand JM, Larsen L, Hogaboam C, Martinez F, Han M, Rossel LM, Nawrocki A, Zheng Q, Karsdal MA, Leeming DJ. MMP mediated degradation of type IV collagen alpha 1 and alpha 3 chains reflects basement membrane remodeling in experimental and clinical fibrosis-validation of two novel biomarker assays. *PLoS One* 2013; 8: e84934. 30
78. Savolainen J, Vaananen K, Vihko V, et al. (1987) Effect of immobilization on collagen synthesis in rat skeletal muscles. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 252:R883-R888.
79. Scharf G, Heineke J. Finding good biomarkers for sarcopenia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2012;3: 145-8. 40
80. Seemungal TA, Donaldson GC, Paul EA, Bestall JC, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 May; 157: 1418-1422.

【表 1 2 L】

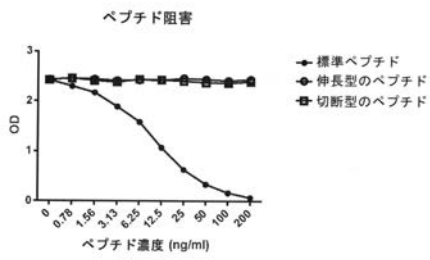
81. Soler-Cataluna JJ, Martinez-Garcia MA, Roman SP, Salcedo E, Navarro M, Ochando R. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2005 Nov; 60: 925-931.
82. Soroceanu MA, Miao D, Bai XY, Su H, Goltzman D, Karaplis AC. Rosiglitazone impacts negatively on bone by promoting osteoblast/osteocyte apoptosis. *J Endocrinol* 2004 October;183(1):203-16. 10
83. Stallcup WB, Dahlin K, Healy P. Interaction of the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan with type VI collagen. *J Cell Biol* 1990;111: 3177-88. 20
84. Stickel F, Urbaschek R, Schuppan D, Poeschl G, Oesterling C, Conradt C et al. Serum collagen type VI and XIV and hyaluronic acid as early indicators for altered connective tissue turnover in alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 2001 September;46(9):2025-32.
85. Sun K, Park J, Gupta OT, Holland WL, Auerbach P, Zhang N et al. Endotrophin triggers adipose tissue fibrosis and metabolic dysfunction. *Nat Commun* 2014;5:3485. 30
86. Takada I, Suzawa M, Matsumoto K, Kato S. Suppression of PPAR transactivation switches cell fate of bone marrow stem cells from adipocytes into osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* 2007 November;1116:182-95.
87. Takamatsu S, Nakabayashi H, Okamoto Y, Nakano H. Noninvasive determination of liver collagen content in chronic hepatitis. Multivariate regression modeling with blood chemical parameters as variables. *J Gastroenterol* 1997 Jun; 32: 355-360. 40
88. Tapanainen P, Knip M, Risteli L, et al. (1997) Collagen metabolites in the prediction of response to GH therapy in short children. *Eur J Endocrinol* 137:621-625.

【表 1 2 M】

89. Tetley TD. Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005 Dec; 4: 607-618.
90. Urciuolo A, Quarta M, Morbidoni V, et al. (2013) Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration. *Nat Commun* 4:1964. doi: 10.1038/ncomms2964 10
91. Veidal SS, Karsdal MA, Vassiliadis E, 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.
92. Vestbo J, Rennard S. Chronic obstructive pulmonary disease biomarker(s) for disease activity needed--urgently. *Am J Respir Crit Care Med* 2010 Oct 1; 182: 863-864. 20
93. Welle S. Cellular and molecular basis of age-related sarcopenia. *Can J Appl Physiol* 2002;27: 19-41.
94. Williams P, Goldspink G (1981) Connective tissue changes in surgically overloaded muscle. *Cell Tissue Res* 221:465-470. doi: 10.1007/BF00216749 30

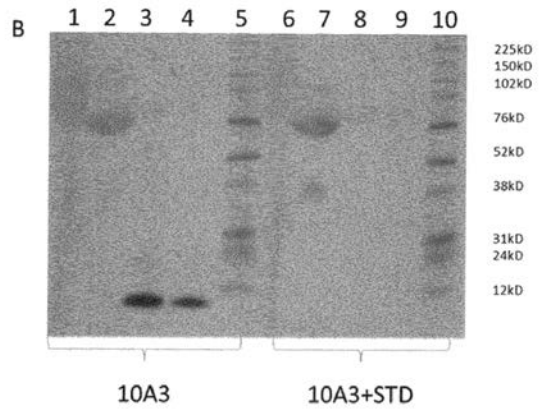
【 図 1 】

Figure 1



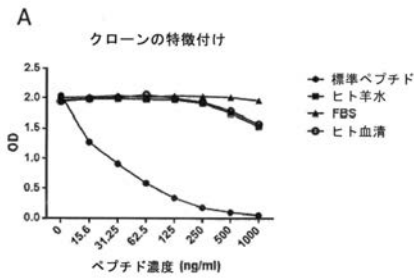
【 図 2 - 2 】

Figure 2 (続き)



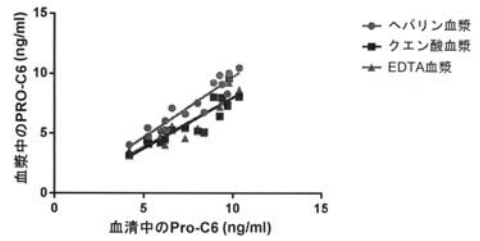
【 図 2 - 1 】

Figure 2



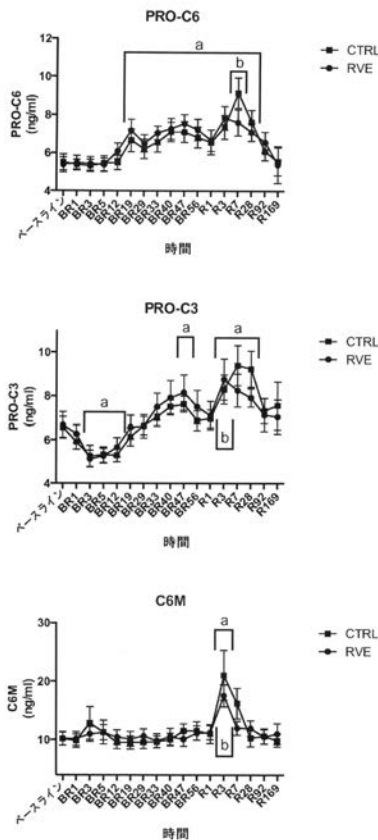
【 図 3 】

Figure 3



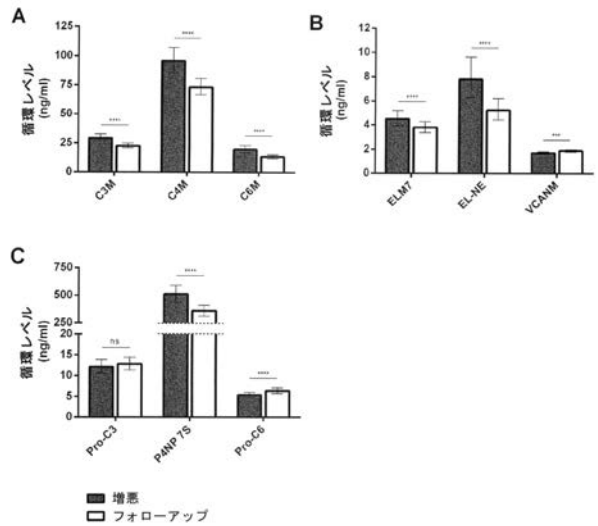
【 図 4 】

Figure 4



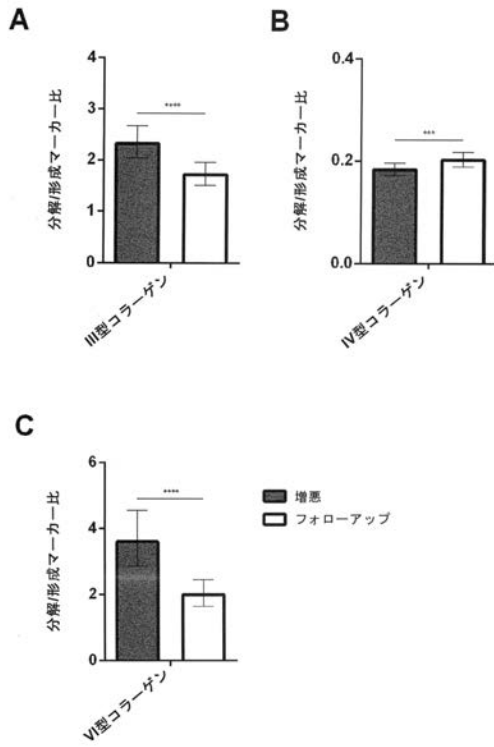
【 図 5 】

Figure 5



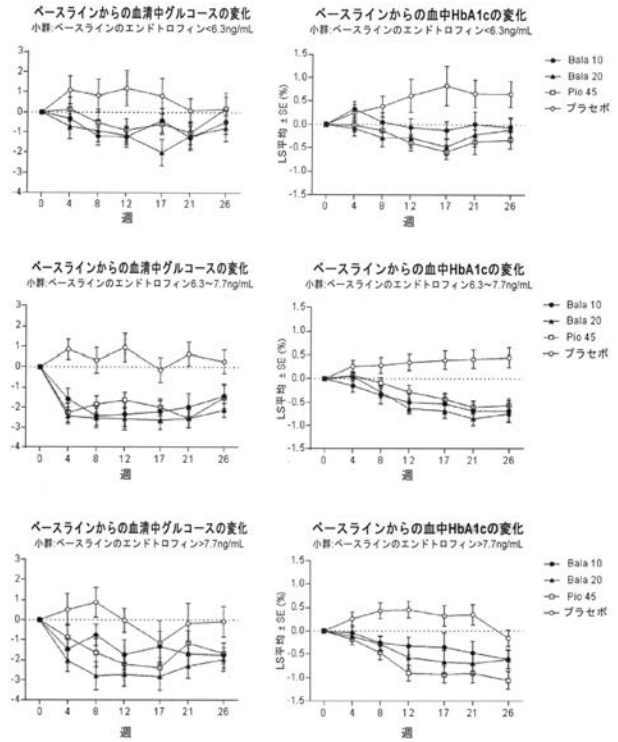
【 図 6 】

Figure 6



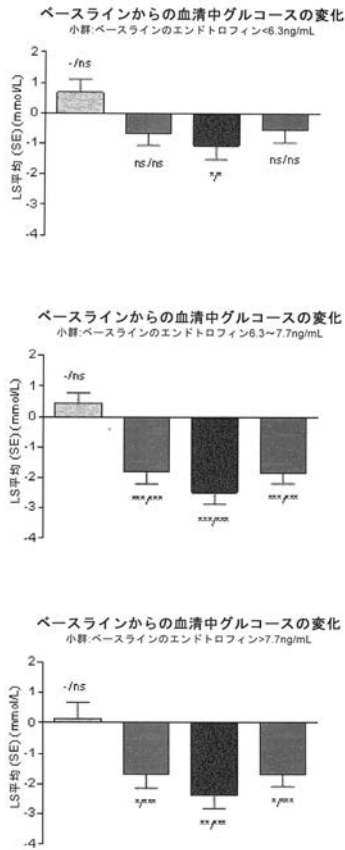
【 図 7 】

Figure 7



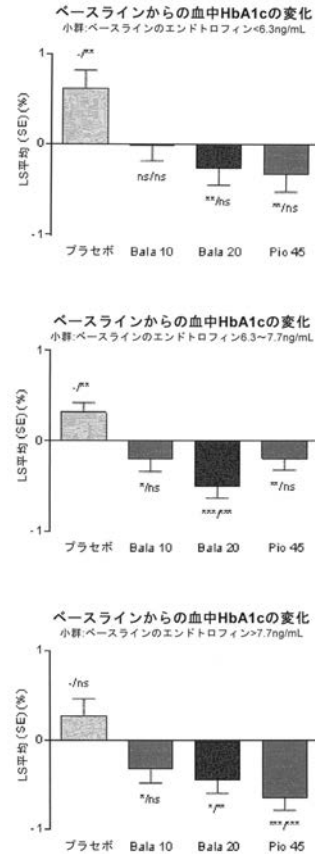
【 図 8 - 1 】

Figure 8

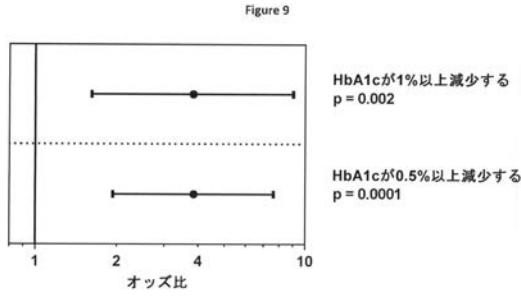


【 図 8 - 2 】

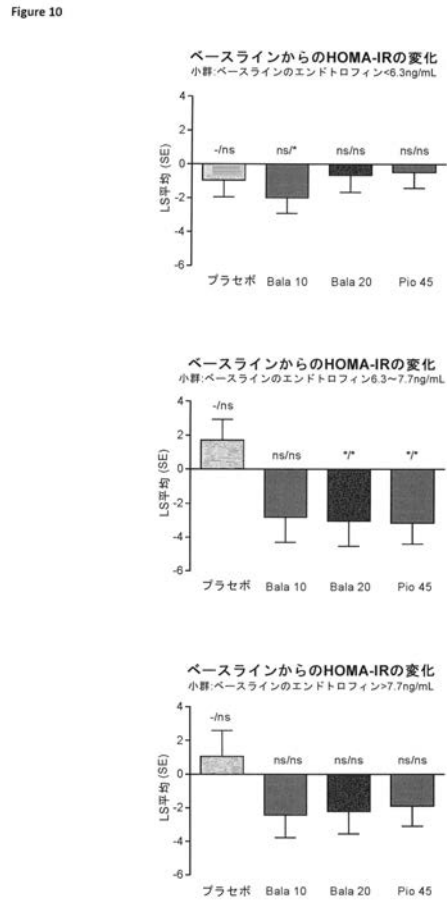
Figure 8 (続き)



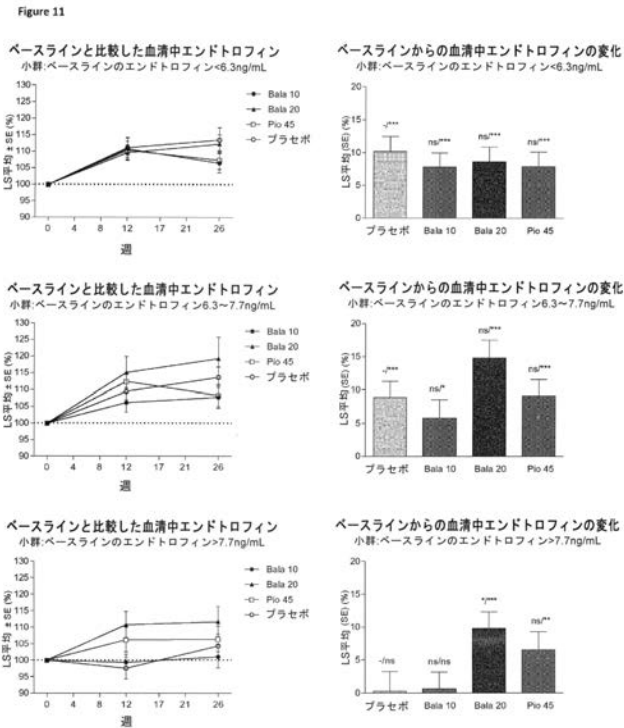
【 図 9 】



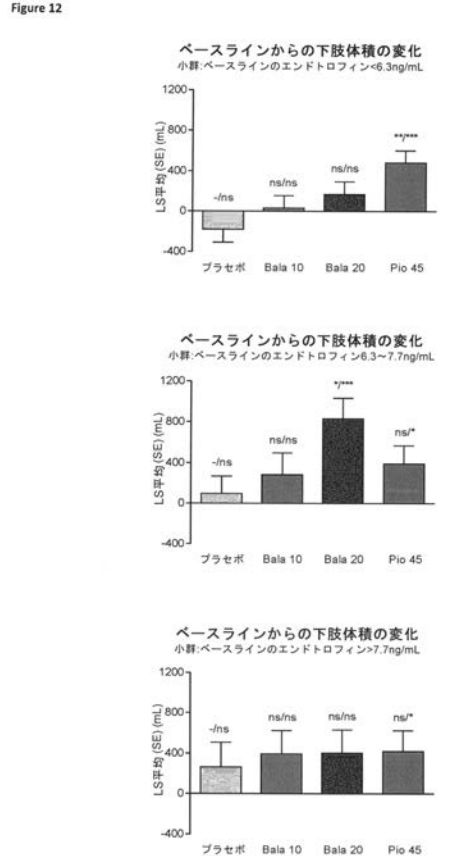
【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【配列表】

2018511601000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/057127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/18 G01N33/53 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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AIGNER T; HAMBACH L; SODER S; SCHLOTZER-SCHREHARDT U; POSCHL E: "The C5 domain of Col6A3 is cleaved off from the Col6 fibrils immediately after secretion", BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN, vol. 290, 2002, pages 743-8, XP55272520, cited in the application page 744, paragraph 2 ----- -/--	1-20,22, 23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 4 July 2016		Date of mailing of the international search report 11/07/2016
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 Wagner, René

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/057127

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S. R. LAMANDE ET AL: "The C5 Domain of the Collagen VI 3(VI) Chain Is Critical for Extracellular Microfibril Formation and Is Present in the Extracellular Matrix of Cultured Cells", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 281, no. 24, 16 June 2006 (2006-06-16), pages 16607-16614, XP55272518, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M510192200 cited in the application page 16608, right-hand column -----	1-20,22
A	JIYOUNG PARK ET AL: "Adipocyte-derived endotrophin promotes malignant tumor progression", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 122, no. 11, 8 October 2012 (2012-10-08), pages 4243-4256, XP55272669, US ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JC163930 figure 2a -----	1-23
X,P	SHU SUN ET AL: "Collagen Type III and VI Turnover in Response to Long-Term Immobilization", PLOS ONE, vol. 10, no. 12, 7 December 2015 (2015-12-07), page e0144525, XP55272524, DOI: 10.1371/journal.pone.0144525 the whole document -----	1-16
A,P	JANNIE M B SAND ET AL: "Accelerated extracellular matrix turnover during exacerbations of COPD", RESPIRATORY RESEARCH, BIOMED CENTRAL LTD., LONDON, GB, vol. 16, no. 1, 11 June 2015 (2015-06-11), page 69, XP021226688, ISSN: 1465-9921, DOI: 10.1186/S12931-015-0225-3 the whole document -----	1-23

フロントページの続き

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

(74)代理人 100125380

弁理士 中村 綾子

(74)代理人 100142996

弁理士 森本 聡二

(74)代理人 100166268

弁理士 田中 祐

(74)代理人 100170379

弁理士 徳本 浩一

(74)代理人 100180231

弁理士 水島 亜希子

(72)発明者 ネーデルガード, アンデシュ

デンマーク国, 2 2 0 0 コペンハーゲン, ナンナスゲーゼ 1, 1

(72)発明者 サンド, ヤンニ・マリー

デンマーク国, 2 7 6 0 モーレウ, ミルホルメン 1 2

(72)発明者 スン, シュー

デンマーク国, 3 5 2 0 ファールム, ビルクハイターラセルネ 4 3 9 C

(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

(72)発明者 ヘンリクセン, キム

デンマーク国, 3 4 0 0 ヒレロズ, ディレハーヴェヴァイ 7 4

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA30 DA75 DA76 EA50

專利名称(译)	VI型胶原序列的免疫分析		
公开(公告)号	JP2018511601A	公开(公告)日	2018-04-26
申请号	JP2017550733	申请日	2016-03-31
申请(专利权)人(译)	北欧生物科学ER / ES		
[标]发明人	ネーデルガードアンデシュ サンドヤンニマリー スンシュー レーミングディアーナジュリー ヘンリクセンキム		
发明人	ネーデルガード,アンデシュ サンド,ヤンニマリー スン,シュー レーミング,ディアーナジュリー ヘンリクセン,キム		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 G01N33/543 C12N15/09 C07K14/78		
CPC分类号	G01N33/6887 C07K16/18 C07K2317/34 G01N2333/78 G01N2800/042 G01N2800/52		
FI分类号	C07K16/18.ZNA G01N33/53.D G01N33/543.501.A C12N15/00.A C07K14/78		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50		
代理人(译)	中村綾子 田中宇 徳本光一		
優先権	2015005654 2015-04-01 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明涉及与VI型胶原α3链的C5结构域的C末端表位反应的免疫结合伴侣，以及使用该免疫结合伴侣检测和定量C末端表位的免疫测定方法。提供。本发明还提供了确定细胞外基质形成速率和鉴定适合用胰岛素敏化剂治疗的受试者的方法。

(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2018-511601 (P2018-511601A) (43) 公表日 平成30年4月26日 (2018.4.26)
(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01) C07K 14/78 (2006.01)	FI C07K 16/18 ZNA G01N 33/53 D G01N 33/543 501A C12N 15/00 A C07K 14/78	テームコード (参考) 4H045
(21) 出願番号 特願2017-550733 (P2017-550733)	(71) 出願人 503259129 ノルディック・バイオサイエンス・エー/エス NORDIC BIOSCIENCE A/S デンマーク国、ゲーカール 2730 ヘル レフ、ヘルレフ・ホフエチガータ 207	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁)
(86) (22) 出願日 平成28年3月31日 (2016.3.31)	(74) 代理人 100098623 弁理士 奥山 尚一	
(85) 翻訳文提出日 平成29年11月27日 (2017.11.27)	(74) 代理人 100096769 弁理士 有原 幸一	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2016/057127	(74) 代理人 100107319 弁理士 松島 鉄男	
(87) 国際公開番号 W02016/156526		
(87) 国際公開日 平成28年10月6日 (2016.10.6)		
(31) 優先権主張番号 1505654.2		
(32) 優先日 平成27年4月1日 (2015.4.1)		
(33) 優先権主張国 英国 (GB)		

(54) 【発明の名称】 VI型コラーゲン配列に関するイムノアッセイ

最終頁に続く