

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-504040

(P2017-504040A)

(43) 公表日 平成29年2月2日(2017.2.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 C	
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37 Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2016-563251 (P2016-563251)	(71) 出願人	503259129 ノルディック・バイオサイエンス・エー／エス N O R D I C B I O S C I E N C E A ／ S デンマーク国、デーカー 2730 ヘル レフ、ヘルレフ・ホーフエデガーデ 20 7
(86) (22) 出願日	平成27年1月8日 (2015.1.8)	(74) 代理人	100099623 弁理士 奥山 尚一
(85) 翻訳文提出日	平成28年9月12日 (2016.9.12)	(74) 代理人	100096769 弁理士 有原 幸一
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/050269	(74) 代理人	100107319 弁理士 松島 鉄男
(87) 国際公開番号	W02015/104342		
(87) 国際公開日	平成27年7月16日 (2015.7.16)		
(31) 優先権主張番号	1400472.5		
(32) 優先日	平成26年1月13日 (2014.1.13)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺疾患および他の疾患用の生化学マーカー

(57) 【要約】

インピボでエラスチンをプロテイナーゼにより切断することによって切断部位に形成されたネオエピトープを含む、COPD、SCC、またはIPF等の肺疾患において上昇するペプチドフラグメントの定量化のためのバイオアッセイ方法であって、サンプルを、ネオエピトープアミノ酸配列に対して特異的な結合親和性を有する抗体と接触させるステップと、結合のレベルを判定するステップとによってなされ、抗体は、末端配列..... F G P G V V ..... V P G L G V I K A P K L .....の1つと結合する、方法、ならびにそのような方法に用いられる抗体および免疫アッセイキット。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

インビボでエラスチンをプロテイナーゼにより切断部位で切断することによって前記部位に形成されたネオエピトープを含むペプチドフラグメントの定量化のためのバイオアッセイ方法であって、前記ペプチドフラグメントを含むサンプルを、前記ネオエピトープに対して特異的な結合親和性を有する免疫学的結合パートナーと接触させるステップと、前記サンプル中のペプチドフラグメントへの、前記免疫学的結合パートナーの結合のレベルを判定するステップとを含み、前記免疫学的結合パートナーが、末端配列

## 【化 1】

.....FGPGVV||'334 (配列番号2)

.....VPGLGV||'602 (配列番号3)

208' ||IKAPKL..... (配列番号4)

10

の 1 つに対して特異的な結合親和性を有する、方法。

## 【請求項 2】

前記免疫学的結合パートナーが、配列.....FGPGVVと反応するならば、.....FGPGVVG (配列番号 5) と特異的に反応せず、.....VPGLGVと反応するならば、.....VPGLGVG (配列番号 6) と特異的に反応せず、IKAPKL.....と反応するならば、PIKAPKL..... (配列番号 7) と特異的に反応しない、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 3】

前記免疫学的結合パートナーが、特異的な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フラグメントである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記免疫学的結合パートナーおよび競合剤が前記サンプルの存在下でインキュベートされて、前記競合剤が前記サンプル中の前記ペプチドフラグメントと競合して前記免疫学的結合パートナーに結合する競合免疫アッセイとして行われる、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

## 【請求項 5】

前記競合剤が、前記ネオエピトープを明らかにするような、合成ペプチドであるか、またはエラスチンの切断によって形成される精製された天然ペプチドである、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記免疫学的結合パートナーと、前記免疫学的結合パートナーが結合するペプチドフラグメント中に含有されるペプチド配列に対して特異的な結合親和性を有する更なる免疫学的結合パートナーとを前記サンプルの存在下でインキュベートして、その両方を前記サンプル中の前記ペプチドフラグメントと一緒に結合させるサンドイッチ免疫アッセイとして行われる、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

## 【請求項 7】

前記サンプルが、尿、血清、血液、血漿、または唾液のサンプルである、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記サンプルが、患者由来のサンプルであり、前記ペプチドフラグメントの前記結合の前記判定レベルを、(a) 比較可能な健常な個体および / または (b) 病的状態に特有の値と比較することをさらに含む、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 9】

エラスチンから誘導された末端配列

## 【化 2】

.....FGPGVV||'334 (配列番号2)  
 .....VPGLGV||'602 (配列番号3)  
 208' ||IKAPKL..... (配列番号4)

の 1 つと特異的に反応する免疫学的結合パートナー。

## 【請求項 10】

配列 ..... F G P G V V と反応するならば、 ..... F G P G V V G (配列番号 5) と特異的に反応せず、 ..... V P G L G V と反応するならば、 ..... V P G L G V G (配列番号 6) と特異的に反応せず、 I K A P K L ..... と反応するならば、 P I K A P K L ..... (配列番号 7) と特異的に反応しない、請求項 9 に記載の免疫学的結合パートナー。

10

## 【請求項 11】

モノクローナル抗体またはその結合フラグメントである、請求項 9 または 10 に記載の免疫学的結合パートナー。

## 【請求項 12】

請求項 9 に記載のモノクローナル抗体を産生する細胞株。

## 【請求項 13】

請求項 9 から 11 のいずれか 1 項に記載の免疫学的結合パートナーと、前記免疫学的結合パートナーと結合する競合剤とを含む免疫アッセイキットであって、場合によっては、洗浄試薬、バッファ、反応停止試薬、酵素標識、酵素標識基質、校正標準、抗マウス抗体、および前記キットを用いてアッセイを行うための説明書の 1 つまたは複数を含む、キット。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、エラスチンのフラグメントの検出または定量のための免疫学的方法および材料に関する。

## 【背景技術】

30

## 【0002】

エラスチンは、細胞外マトリックスの構造および機能に必須のタンパク質である。ヒトエラスチンのアミノ酸配列は、配列番号 1 である。これは、多くの器官および組織に回復力および弾性を提供する。多くの器官は、肺、皮膚、大動脈、靭帯、腱、および軟骨組織を含む。エラスチンは、前駆体トロポエラスチンから形成され、プリジニウム構造、デスマシン構造、およびイソデスマシン構造によって形成される架橋結合を含む。エラスチンは非常に安定しているが、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) およびセリンプロテアーゼ、例えばヒト好中球エラスターゼ (HNE) が、エラスチン線維を分解させて、弾性および機能を喪失させることができる。肺において、この弾性の喪失は、病理学的特徴、例えば肺気腫が共存する慢性閉塞性肺疾患 (COPD) を引き起こす可能性がある (MacLay ら 2012)。さらに、肺中のエラスチン由来ペプチドの「莫大な」堆積が、間質性疾患、例えば特発性肺線維症 (IPF) を引き起こす可能性がある。あるエラスチン由来フラグメントが、肺線維性障害に罹った患者由来の血清中でアップレギュレートされるという調査が示された (Skjot-Arkil ら 2012)。

40

## 【0003】

驚くべきことに、発明者らは、種々の肺疾患の診断および予後について信頼性が高いバイオマーカーとして役立ち得る、エラスチンの特定の HNE - または MMP 7 - 誘導フラグメントを同定することができた。

## 【0004】

他の MMP によって分解したエラスチンに対する ELISA が記載されてきた (Skj

50

ot - Arkil、 Clausen、 Nguyen、 Wang、 Zheng、 Martinez、 Hogaboam、 Han、 Klickstein、 Larsen、 Nawrocki、 LeemingおよびKarsdal 2012； Skjot - Arkilら 2013）。これは、MMP9およびMMP12による切断によって誘導されるエラスチンのフラグメントを標的とするモノクローナル抗体を利用する。このアッセイはまた、肺障害にも適用される。本明細書中に記載されるバイオマーカーは、HNEおよび/またはMMP7によって誘導された、選択されたエラスチンフラグメントに基づくので、異なっている。当該バイオマーカーは、MMP9およびMMP12プロテアーゼと比較して、肺障害により特異的である (Finlayら 1997； Rosasら 2008； Starcherら 1996； Zhangら 2005)。

10

**【0005】**

無傷のMMP7およびHNEを定量化するELISAキットが知られているが、これらはプロテアーゼの濃度を測定するのみであり、標的分子に及ぼす影響、すなわちエラスチンのネオエピトープの発生を測定するものでない。

**【0006】**

無傷のエラスチンを定量化するELISAキットも入手可能である。これは、無傷のエラスチンを検出するのではなくエラスチンの分解中に生じるネオエピトープを検出する本発明と異なる。

**【0007】**

多くのHNE由来のエラスチンフラグメントが、消化エラスチンの質量分析によって検出されてきた。例えば、He、TurinoおよびLin 2010参照。そこでは、少数のエラスチンフラグメントもまた、血漿および/または痰において検出かつ定量化されている。しかしながら、検出かつ定量化されたこれらのペプチドは、本発明で用いられるフラグメントと異なる。

20

**【0008】**

COPD患者中の成熟エラスチン(デスミン架橋結合)が、質量分析によって定量化された (Ma、LinおよびTurino 2007)。著者らは、無傷のエラスチンの産生を定量化しただけであり、プロテアーゼ誘導フラグメントを定量化しなかった。

**【0009】**

種々のプロテアーゼによるエラスチンの切断部位が既に決定され、公開されている。これはまた、HNE切断エラスチン (Barroso、AbelloおよびBischoff 2006； He、TurinoおよびLin 2010a) およびMMP7 (Heinzら 2011) 切断エラスチンを含む。しかしながら、これらの開示は、エラスチンのタンパク質分解中に生じたネオエピトープに特異的な抗体を用いた、エラスチンフラグメントの検出を記載していない。これらは、インピロで形成されたエラスチンのどのフラグメントが診断に関連するのか、インピボで形成されるのか、生物学的流体サンプルにおいて検出が可能なのかさえも開示していない。

30

**【発明の概要】****【0010】**

本発明は、インピボでエラスチンをプロテイナーゼにより切断部位で切断することによって前記部位に形成されたネオエピトープを含むペプチドフラグメントの定量化のためのバイオアッセイ方法であって、前記ペプチドフラグメントを含むサンプルを、前記ネオエピトープに対して特異的な結合親和性を有する免疫学的結合パートナーと接触させるステップと、前記サンプル中のペプチドフラグメントへの、前記免疫学的結合パートナーの結合のレベルを判定するステップとを含み、前記免疫学的結合パートナーが、末端配列

40

**【0011】**

## 【化1】

.....FGPGVV||'334 (配列番号2)  
 .....VPGLGV||'602 (配列番号3)  
 208' ||IKAPKL..... (配列番号4)

の1つに対して特異的な結合親和性を有する、方法を提供する。

## 【0012】

記号

## 【化2】

||

は、配列番号1の番号付けされた点と、C末端切断フラグメントの場合には次のアミノ酸と、そしてN末端切断の場合には前のアミノ酸との間での、エラスチン配列の切断を示す。

## 【0013】

免疫学的結合パートナーは、配列.....FGPGVVと反応するならば、好ましくは...  
 .....FGPGVVG (配列番号5) と特異的に反応せず、.....VPGLGVと反応する  
 ならば、.....VPGLGVG (配列番号6) と特異的に反応せず、IKAPKL.....と  
 反応するならば、PIKAPKL..... (配列番号7) と特異的に反応しない。

## 【0014】

好ましくは、免疫学的結合パートナーはまた、エラスチンアミノ酸配列の関連部分が付  
 いて切断部位を越えてさらに拡張したペプチドと特異的に反応しない。

## 【0015】

前記免疫学的結合パートナーは、特異的な結合親和性を有するモノクローナル抗体であ  
 ってもモノクローナル抗体のフラグメントであってもよい。

## 【0016】

本発明は、エラスチンから誘導された末端配列

## 【0017】

## 【化3】

.....FGPGVV||'334  
 .....VPGLGV||'602  
 208' ||IKAPKL.....

の1つと特異的に反応する免疫学的結合パートナーを含む。

## 【0018】

好ましくは、免疫学的結合パートナーは、配列.....FGPGVVと反応するならば、  
 .....FGPGVVGと特異的に反応せず、.....VPGLGVと反応するならば、.....  
 ...VPGLGVGと特異的に反応せず、IKAPKL.....と反応するならば、PIKAP  
 KL.....と特異的に反応しない。

## 【0019】

免疫学的結合パートナーは、モノクローナル抗体であってもその結合フラグメントであ  
 ってもよい。

## 【0020】

本発明は、記載される免疫学的結合パートナーと、前記免疫学的結合パートナーと結合  
 する競合剤とを含む免疫アッセイキットであって、場合によっては、洗浄試薬、バッファ

10

20

30

40

50

、反応停止試薬 ( s t o p p i n g r e a g e n t ) 、酵素標識、酵素標識基質、校正標準、抗マウス抗体、および前記キットを用いてアッセイを行うための説明書の1つまたは複数を含む、キットを含む。

【0021】

前記アッセイの結果は、COPD、IPF、もしくはSCCの存在の、特定の患者におけるリスクの程度、またはそのような状態の程度もしくは重篤度を示す指標をもたらし得る。前記測定値が閾値レベルを上回る患者は、更なる調査が、またはその治療のための医薬品の処方推奨されてよく、そしてそのような追跡調査または治療が、本発明の方法の一部を形成してよい。

【0022】

先に記載される複数のペプチドのアッセイが、別々に行われてよく、そしてそれらの、先に記載される複数のペプチドについて組み合わせられた結果が、一緒に測定されてよい。

【0023】

本発明に従うアッセイの結果は、診断または予後の値の複合指数を形成するために、1つまたは複数の他の測定されたバイオマーカーと組み合わせられてよい。

【0024】

本明細書中で用いられる用語「免疫学的結合パートナー」は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、そしてまたFabまたはF(ab')<sub>2</sub>等の抗体の特異的結合フラグメントを含む。ゆえに、前記免疫学的結合パートナーは、結合親和性が特異的であるモノクローナル抗体であってもモノクローナル抗体のフラグメントであってもよい。

【0025】

通常、以前に知られている全ての免疫測定フォーマットが、本発明に従って用いられよく、異質フォーマットおよび均質フォーマット、サンドイッチアッセイ、競合アッセイ、酵素結合アッセイ、および放射免疫アッセイ等を含む。ゆえに、場合によっては、前記方法は、前記免疫学的結合パートナーおよび競合剤が前記サンプルの存在下でインキュベートされて、競合剤がサンプル中のペプチドフラグメントと競合して免疫学的結合パートナーに結合する競合免疫アッセイとして行われる。

【0026】

前記競合剤は、合成ペプチドであってもよいし、エラスチンの切断によって形成される精製された天然ペプチドであってもよい。

【0027】

あるいはその代わりに、前記方法は、前記免疫学的結合パートナーと、前記免疫学的結合パートナーが結合するペプチドフラグメント中に含有されるペプチド配列に対して特異的な結合親和性を有する更なる免疫学的結合パートナーとを前記サンプルの存在下でインキュベートして、その両方をサンプル中の前記ペプチドフラグメントと一緒に結合させるサンドイッチ免疫アッセイとして行われる。適切な一方法が、エラスチンのフラグメントのネオエピトープに結合するモノクローナル抗体または抗体結合フラグメントを用いる競合免疫アッセイであり得る。

【0028】

マイクロタイタープレートの固体表面上にコーティングされた、適切に選択された合成ペプチドが、モノクローナル抗体または結合フラグメントへの結合についてサンプルと競合し得る。あるいはその代わりに、モノクローナル抗体または結合フラグメントによって認識されるネオエピトープを有するこれらのタンパク質の1つまたは複数から精製された天然のフラグメントが、固体表面上に用いられよい。さらに別の代替物は、モノクローナル抗体または結合フラグメントを固体表面上に固定してから、サンプルを、シグナル分子、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼまたはビオチンに適切に結合した合成ペプチドと共にインキュベートするものである。

【0029】

ある好ましい方法において、サンプルは患者由来のサンプルであり、本方法はさらに、前記ペプチドフラグメントの前記結合の判定レベルを、(a)比較可能な健常な個体およ

10

20

30

40

50

び/または (b) 関連する病的状態に特有の値と比較するステップと、場合によっては、より高いレベルの測定ペプチド (通常、より高いレベルの結合によって示される) を、より重度の前記状態と関連させるステップとを含む。サンプルは、一例として、尿、血清、血液、血漿、または唾液のサンプルであってよい。

【0030】

本発明の態様は、先に記載されるように、ネオエピトープを認識するモノクローナル抗体の開発に関する。これは、エラスチンのアミノ酸配列 (特に、先に記載される配列、またはその中で終結する配列) に由来する合成ペプチドでマウスを免疫化し、選択されたマウス由来の脾臓細胞を骨髄腫細胞に融合し、かつ関連する合成ペプチド上のネオエピトープへの結合についてモノクローナル抗体を試験することによって、達成され得る。ネオエピトープに対する特異性は、合成ペプチドとの反応性、および (C末端ネオエピトープについて) 免疫化ペプチドのC末端延長形態 (prolongated form) または (N末端ネオエピトープについて) 免疫化ペプチドのN末端延長形態との反応性の欠如を要求することによって、確実にされ得る。ネオエピトープ用抗体はまた、無傷のエラスチンへの結合能力の欠如を確立したことが評価され得る。あるいはその代わりに、ネオエピトープに対する特異性は、抗体の反応性が、末端アミノ酸の1つに共有結合したビオチンまたは他の官能基の存在にネガティブに依存することを要求することによって、確実にされ得る。

10

【0031】

本発明は、先に記載される部分配列のいずれか1つにおける、プロテアーゼによるエラスチンの終端での切断によって形成されるネオエピトープと特異的に免疫反応性を示す免疫学的結合パートナーを含み、例えば、モノクローナル抗体またはその結合フラグメントであってよい。

20

【0032】

本発明は、先に記載される部分配列のいずれか1つにおける配列の、エラスチンの終端での切断によって形成されるC末端ネオエピトープまたはN末端ネオエピトープに対するモノクローナル抗体を産生する細胞株を含む。

【0033】

本発明はさらに、先に記載される部分配列のいずれか1つにおけるエラスチンの切断によって形成されるC末端ネオエピトープまたはN末端ネオエピトープを含むペプチドを提供する。そのようなペプチドは、前記ペプチドに対する免疫応答をもたらすためにキャリアにハプテンとして結合してもよいし、固体表面に固定されてもよいし、免疫アッセイに用いられる検出可能マーカーに結合してもよい。

30

【0034】

本発明はさらに、先に記載される部分配列のいずれか1つにおけるエラスチンの切断によって形成されるC末端ネオエピトープまたはN末端ネオエピトープを含むペプチドをコードする単離された核酸分子を含む。

【0035】

本発明はさらに、先に記載される部分配列のいずれか1つにおけるエラスチンの切断によって形成されるC末端ネオエピトープまたはN末端ネオエピトープを含むペプチドの発現をコードする発現シグナルおよびコード配列を含む核酸配列を含むベクターを含み、そしてさらに、そのようなベクターで形質転換され、かつ前記ペプチドを発現する宿主細胞を含む。

40

【0036】

本発明のさらに別の態様は、先に記載される方法を実行するのに好都合に用いられ得るキットに関する。そのようなキットは、(1) ネオエピトープの配列を有する合成ペプチドでコーティングされたマイクロタイタープレート; (2) 前記合成ペプチドと反応性の本発明のモノクローナル抗体または抗体結合フラグメント; および (3) 標識付き抗マウスIgG免疫グロブリンを含んでよい。あるいはその代わりに、そのようなキットは、(1) 精製された天然のタンパク質フラグメントでコーティングされたマイクロタイター

50

レート；(2)前記タンパク質のいずれか1つのフラグメント上のネオエピトープを認識し、かつ前記精製されたフラグメントと反応性のモノクローナル抗体；および(3)標識付き抗マウスIgG免疫グロブリンを含んでよい。あるいはその代わりに、そのようなキットは、(1)ストレプトアビジンでコーティングされたマイクロタイタープレート；(2)ビオチンに結合した合成ペプチドであって、ネオエピトープの配列を有する合成ペプチド；(3)前記タンパク質フラグメント上のネオエピトープを認識し、かつ前記合成ペプチドと反応性のモノクローナル抗体；および(4)標識付き抗マウスIgG免疫グロブリンを含んでよい。さらに別の代替物は、(1)ストレプトアビジンでコーティングされたマイクロタイタープレート；(2)ビオチンに結合した合成ペプチドであって、ネオエピトープの配列を有するペプチド；(3)前記タンパク質フラグメント上のネオエピトープを認識し(かつ前記合成ペプチドと反応性の)、かつセイヨウワサビペルオキシダーゼに結合するモノクローナル抗体を含むキットであってよい。さらに別の代替物は、(1)前記タンパク質フラグメント上のネオエピトープを認識するモノクローナル抗体またはそのフラグメントで(直接的に、または間接的に)コーティングされたマイクロタイタープレート；(2)ネオエピトープの配列を有するHRP標識付き合成ペプチドを含むキット、あるいは(1)前記タンパク質フラグメント上のネオエピトープを認識するモノクローナル抗体またはそのフラグメントで(直接的に、または間接的に)コーティングされたマイクロタイタープレート；(2)ネオエピトープの配列を有するビオチン標識付き合成ペプチド；(3)HRP標識付きストレプトアビジンを含むキットであってよい。

10

20

#### 【0037】

ゆえに、本発明は、本明細書中に記載される免疫学的結合パートナーと、前記免疫学的結合パートナーと結合する競合剤とを含む免疫アッセイキットであって、場合によっては、洗浄試薬、パuffa、反応停止試薬、酵素標識、酵素標識基質、校正標準、抗マウス抗体、および前記免疫アッセイを行うための説明書の1つまたは複数を含む、キットを含む。

#### 【0038】

本明細書中に記載されるアッセイは、記載される疾患、および一般に患者におけるエラスチン関連病状の診断に有用である。また、試験は、疾患進行の評価、および治療に対する反応の監視に有用である。本発明の免疫学的結合パートナーはまた、本明細書中に記載されるエラスチンの切断産物の存在または位置を示すための免疫染色に用いられてもよい。

30

#### 【0039】

本発明はさらに、好ましい実施形態の原理および実施を示す以下の実施例を参照して記載かつ例示されることとなる。実施例は、添付の図面に示される結果を参照する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0040】

【図1】実施例3において得られたELISAの結果を示しており、遊離ペプチドおよび伸長ペプチド(NB590)の、NB590モノクローナル抗体とのインキュベーション後の濃度と比較した、測定 $B/B_0$ 比を示す。伸長ペプチドに対する反応性はほとんどない。

40

【図2】実施例3において得られた、NB590モノクローナル抗体を特徴付ける結果を示す。

【図3】実施例3において得られた、患者および対照のCOPD、IPF、および扁平上皮癌(SCC)由来の血清中のNB590遊離ペプチドの濃度を示す。\*はp値0.05を表し、\*\*はp値0.05を表す。平均値の標準誤差も示される。

【図4】実施例4において得られたELISAの結果を示しており、遊離ペプチドおよび伸長ペプチド(NB592)の、NB592モノクローナル抗体とのインキュベーション後の濃度と比較した、測定 $B/B_0$ 比を示す。伸長ペプチドに対する反応性はほとんどない。

【図5】実施例4において得られた、NB592モノクローナル抗体を特徴付ける結果を

50

示す。

【図6】実施例4において得られた、患者および対照のCOPD、IPF、および扁平上皮癌(SCC)由来の血清中のNB592遊離ペプチドの濃度を示す。平均値の標準誤差が示される。遊離ペプチド濃度が基準として適用された。

【図7】実施例5において得られたELISAの結果を示しており、遊離ペプチド(NB593)(配列番号11)および伸長ペプチド(配列番号13)の、NB593モノクローナル抗体とのインキュベーション後の濃度と比較した、測定 $B/B_0$ 比を示す。伸長ペプチドに対する反応性はほとんどない。

【図8】実施例5において得られた、NB593モノクローナル抗体を特徴付ける結果を示す。

【図9】患者および健常な対照由来の種々の疾患サンプルにNB593抗体を試験した結果を示す。NB593フラグメントは、血清中で検出不可能であった。

【図10】実施例6において行われたELISAの結果を示しており、NB595モノクローナル抗体の、遊離ペプチド(NB595)(配列番号12)および伸長ペプチド(配列番号14)による、シグナルのパーセント阻害を示す。伸長ペプチドによる阻害はほとんどない。

【図11】実施例6において得られた、NB595モノクローナル抗体を特徴付ける結果を示す。

【図12】COPD患者および健常な対照由来の血清中のNB595フラグメントの濃度を示す。NB595フラグメントは、COPDにおいて高められていない。

【図13】実施例7において行われたELISAの結果を示しており、NB599モノクローナル抗体の、遊離ペプチド(NB599)(配列番号10)および伸長ペプチド(配列番号15)による、シグナルのパーセント阻害を示す。遊離ペプチドと比較して、伸長ペプチドに対する抗体との反応性が低い。

【図14】実施例7において得られた、NB599モノクローナル抗体を特徴付ける結果を示す。

【図15】対照、扁平上皮癌(SCC)、COPD、およびIPFの患者由来の血清中のNB599エラスチンフラグメントの濃度を示す。対照とSCCとの間に、そしてCOPDと対照との間に、有意差がある。IPFと対照との間にも、統計的差異がある。

【実施例1】

【0041】

免疫化用のペプチドの選択

免疫化用に以下のペプチドを選択した。

【0042】

【表1】

- NB590: アミノ酸 # 325'GGPGFGPGVV||'334 (配列番号8) (HNE由来)
- NB592: アミノ酸 #593'VGAGVPGLGV||'602 (配列番号9) (HNE由来)
- NB599: アミノ酸 #208' ||IKAPKLPGGY'217 (配列番号10) (MMP7由来)
- NB593: アミノ酸 #743' ||GLGGVLGGA'752 (配列番号11) (HNE由来)
- NB595: アミノ酸 #41' ||VFYPGAGLGA'50 (配列番号12) (MMP7由来)

【0043】

含まれる切断部位は、他者によって以前に決定された切断部位である(He、TurinoおよびLin 2010d; Heinzら 2011a)。発明者らは、切断部位の下流または上流の最初の10のアミノ酸について、免疫化ペプチドを選択した。

【実施例2】

【0044】

モノクローナル抗体の開発

10

20

30

40

50

標準的な手順に従って、C末端エピトープの場合はN末端で、N末端エピトープの場合はC末端でKLHに結合する言及した免疫原ペプチドを用いて、200 $\mu$ Lの乳化抗原（免疫化1回あたり50 $\mu$ g）で腹部中に皮下接種して6頭の4～6週齢のBalb/Cマウスを免疫化した。安定した力価レベルが得られるまで、免疫化を続けた。

【0045】

力価が最も高いマウスを融合用を選択して、細胞融合用の脾臓の単離の3日前に、100 $\mu$ Lの0.9%塩化ナトリウム溶液中の50 $\mu$ gの免疫原によって静脈内にブーストした。

【0046】

融合手順に続いて、既知の手順を行った（Gefter、MarguliesおよびScharff 1977）。上澄みを収集し、プロテインGカラムを用いて製造者（GE Healthcare Life Science）の説明書に従ってモノクローナル抗体を精製した。

10

【0047】

ネオエピトープ特異的モノクローナル抗体の選択：

抗体は、免疫化に用いた非結合形態の相同ペプチド（選択ペプチド）を用いて、ペプチド特異性に基いて選択することによって、さらにエラスチン配列の1アミノ酸だけ切断部位を越えて拡張したペプチドの伸長バージョンを除外することによって、ネオエピトープ特異性を有する抗体のみを確実に更なる分析のために選択した。

20

【0048】

その後、無傷の、天然の、および切断されたエラスチンに対する抗体の反応性を試験した。

【0049】

最終的に、健常な対象および罹患対象由来の血清サンプルを、上述のアッセイプロトコルにおいて試験した。

【0050】

アッセイプロトコル：

96ウェルストレプトアビジンプレートを、コーターバッファ中に溶解したスクリーニングペプチドでコーティングし、20 $\times$ にて30分間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄バッファ（20mMトリス、50mM NaCl、pH7.2）中で5回洗浄した。20 $\mu$ Lのペプチド（選択、除外、またはナンセンス）またはヒトサンプルを適切なウェルに2連で加えた後に、100 $\mu$ LのPOD結合モノクローナル抗体を加えてから、プレートをシェーカー上で1時間インキュベートした。洗浄後、100 $\mu$ Lテトラメチルベンジジン（TMB）（Kem-En-Tec）を加え、プレートを暗所で20 $\times$ にて15分間インキュベートした。

30

【0051】

全ての上記インキュベーション工程は、300rpmでの振盪を含んだ。

【0052】

TMB反応は、100 $\mu$ Lの反応停止溶液（1%  $H_2SO_4$ ）を加えることによって止めた。吸光度は、650nmを基準として、450nmで測定した。選択ペプチドから作成したマスターキャリプレータを較正曲線として用い、4パラメトリック数理フィットモデルを用いてプロットした。

40

【0053】

全ての血清サンプルは、測定前にインキュベーションバッファ中で1：2に希釈した。

【実施例3】

【0054】

モノクローナル抗体NB590

図1は、NB590抗体に対する、遊離および伸長ペプチドの反応性を示す。吸光度の低下が、遊離ペプチド濃度の上昇と共に見られる。これは、ウェル内でスクリーニングペプチドの代わりに遊離ペプチドとの反応が増大したことによる。これは、伸長ペプチドに

50

は見られなかった。というのも、安定した  $B/B_0$  レベルにより、NB590-01抗体と伸長ペプチドとの間で反応が非常に低かった、または反応がなかったことが示されたためである。

【0055】

その後、NB590抗体を、エラスチン(ELN)、MMP2、MMP7、MMP9およびHNEでインビトロ切断したエラスチン、ならびにそれらの各バッファ中のプロテアーゼに対して試験した(図2)。それらのバッファ中の選択されたプロテアーゼのみの反応性も含めている。NB590モノクローナル抗体は、明らかに、HNEによって誘導されたエラスチンフラグメントを区画している。遊離ペプチド濃度を基準として適用した。NB590抗体は、HNEで切断したエラスチンに対する反応性が非常に高い。NB590抗体および無傷のエラスチンまたは他のプロテアーゼで切断したエラスチンの反応性は、アッセイの検出下限に近い。

10

【0056】

最後に、NB590抗体を、COPD、IPF、または扁平上皮癌の患者由来の血清サンプル中で試験し、健常な対照と比較した(図3)。健常な対照と比較して、COPDおよび扁平上皮癌の患者において、NB590フラグメントの濃度に有意差がある。より高いレベルの傾向が観察されたが、対照とIPF患者との間に統計的有意差はなかった。このことは、これが横断研究であったという事実によって説明されるかもしれない。一方、IPF患者の長期的な研究によって、より有意な差異が示されるかもしれない。

20

【実施例4】

【0057】

モノクローナル抗体NB592

図4は、NB592抗体に対する、遊離および伸長ペプチドの反応性を示す。吸光度の低下が、遊離ペプチド濃度の上昇と共に見られる。これは、ウェル内でスクリーニングペプチドの代わりに遊離ペプチドとの反応が増大したことによる。これは、伸長ペプチドには見られなかった。というのも、安定した  $B/B_0$  レベルにより、伸長ペプチドとNB592抗体との間で反応が非常に低かった、または反応がなかったことが示されたためである。

【0058】

その後、NB592抗体の反応性を、エラスチン、MMP2、MMP7、MMP9およびHNEでインビトロ切断したエラスチン、ならびにそれらの各バッファ中のプロテアーゼに対して試験した(図5)。それらのバッファ中の選択されたプロテアーゼのみの反応性も含めている。NB592モノクローナル抗体は、明らかに、HNEによって誘導されたエラスチンフラグメントを区画している。遊離ペプチド濃度を基準として適用した。NB592抗体は、HNEで切断したエラスチンに対する反応性が非常に高い。NB592抗体および無傷のエラスチンまたは他のプロテアーゼで切断したエラスチンの反応性は、アッセイの検出下限に近い。微量のシグナルが、HNEおよびそのバッファについてのみ示されるが、シグナルは、HNEで切断されたエラスチンについてのシグナルよりも100倍以上小さい。

30

【0059】

最後に、NB592抗体を、COPD、IPF、または扁平上皮癌の患者由来の血清サンプル中で試験し、健常な対照と比較した(図6)。レベル増大の高い傾向が観察されたが、健常な対照と比較して、COPDおよび扁平上皮癌の患者において、NB592フラグメントの濃度に有意差はなかった( $p < 0.05$ )。対照とIPF患者との間に差はなかった。このことは、これが横断研究であったという事実によって説明されるかもしれない。一方、IPF患者の長期的な研究によって、差異が示されるかもしれない。

40

【実施例5】

【0060】

(比較)モノクローナル抗体NB593

図7は、NB593抗体に対する、遊離および伸長ペプチドの反応性を示す。吸光度の

50

低下が、遊離ペプチド濃度の上昇と共に見られる。これは、ウェル内でスクリーニングペプチドの代わりに遊離ペプチドとの反応が増大したことによる。これは、伸長ペプチドには見られなかった。というのも、安定した $B/B_0$ レベルにより、NB593抗体間で反応が非常に低かった、または反応がなかったことが示されたためである。

【0061】

その後、NB593抗体の反応性を、エラスチン、HNEでインビトロ切断したエラスチン、およびHNEバッファに対して試験した。593モノクローナル抗体は、明らかに、無傷のエラスチンと比較して、HNEによって誘導されたエラスチンフラグメントに対する反応性が非常に高く、そのようなフラグメントを区画している。遊離ペプチド濃度を基準として適用した。無傷のエラスチンまたはHNEバッファに対するNB593抗体の反応性は、非常に低い。

10

【0062】

最後に、図9は、NB593抗体の反応性、ならびにCOPD患者および健常な対照由来のヒト血清サンプルを示す。データは、健常な対照および罹患者の血清中で、抗体NB593によって認識されるフラグメントが不在であること、または検出不可能な量で存在するのみであることを示す。

【実施例6】

【0063】

(比較)モノクローナル抗体NB595

図10は、NB595抗体に対する、遊離および伸長ペプチドの反応性を示す。吸光度の低下が、遊離ペプチド濃度の上昇と共に見られる。これは、ウェル内でスクリーニングペプチドの代わりに遊離ペプチドとの反応が増大したことによる。これは、伸長ペプチドには見られなかった。というのも、安定した $B/B_0$ レベルにより、NB595抗体との反応が非常に低かった、または反応がなかったことが示されたためである。

20

【0064】

その後(図11)、NB595抗体の反応性を、エラスチン、MMP2、MMP7、MMP9およびHNEでインビトロ切断したエラスチン、ならびにそれらの各バッファ中のプロテアーゼに対して試験した。595モノクローナル抗体は、明らかに、MMP7によって誘導されたエラスチンフラグメントを区画し、MMP7で切断したエラスチンに対する反応性が高い。遊離ペプチド濃度を基準として適用した。無傷のエラスチンまたは他のプロテアーゼで切断したエラスチンに対するNB595抗体の反応性は、アッセイの検出下限に近い。

30

【0065】

最後に、図12はNB595抗体の反応性、ならびにCOPD患者および健常な対照由来のプールしたヒト血清サンプルを示す。データは、NB595フラグメントが、COPD患者において高められていないことを示す。したがって、この抗体についての生物学的妥当性は限られている。

【実施例7】

【0066】

NB599

図13は、NB599抗体に対する、遊離した伸長ペプチドの反応性を示す。吸光度の低下が、遊離ペプチド濃度の上昇と共に見られる。これは、ウェル内でスクリーニングペプチドの代わりに遊離ペプチドとの反応が増大したことによる。吸光度の低下は、伸長ペプチドについて、有意により低かった。というのも、 $B/B_0$ レベルにより、ペプチドとNB599抗体との反応が弱いことが示されたためである。

40

【0067】

その後、NB599抗体の、エラスチン、MMP2、MMP7、MMP9およびHNEでインビトロ切断したエラスチン、ならびにそれらの各バッファ中のプロテアーゼに対する反応性(図14)を判定した。NB599モノクローナル抗体は、明らかに、MMP7によって誘導されたエラスチンフラグメントを区画している。NB599抗体は、MMP

50

7で切断したエラスチンに対する反応性が、他のプロテアーゼで切断したエラスチンよりもかなり高い。HNE + HNEバッファに対する反応性が多少存在したが、これは、HNEで切断したエラスチンよりもかなり低い。

【0068】

最後に、NB599試験を用いて、エラスチンフラグメントの存在を、COPD、IPF、または扁平上皮癌の患者由来の血清サンプル中で試験し、健常な対照と比較した(図15)。健常な対照と比較して、COPD、IPF、および扁平上皮癌の患者において、NB599フラグメントの濃度に有意差がある。とりわけ、扁平上皮癌およびCOPDの患者は、NB599エラスチンフラグメントのレベルが増大していた。

【0069】

本明細書において、特に明示的に示されない限り、用語「または」は、述べられる条件の一方または双方が満たされる場合に真の値を返す演算子の意味で用いられ、条件の1つのみが満たされることを要求する演算子「排他的離接(exclusive or)」とは対照的である。用語「含む(comprising)」は、「からなる」を意味するのではなく「含む(including)」の意味で用いられる。上述された先の教示は全て、参照により本明細書中に組み込まれる。本明細書中における全ての先に公開された文書の記載が、その当時の豪州他における共通の一般的知識であったという承認または陳述であるとは認められないものとする。

【0070】

## 【表 2 A】

## References

- Barroso, B., Abello, N., & Bischoff, R. 2006, "Study of human lung elastin degradation by different elastases using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry", *Anal.Biochem.*, vol. 358, no. 2, pp. 216-224. 10
- Carter, R. I., Mumford, R. A., Treonze, K. M., Finke, P. E., Davies, P., Si, Q., Humes, J. L., Dirksen, A., Piitulainen, E., Ahmad, A., & Stockley, R. A. 2011, "The fibrinogen cleavage product Aalpha-Val360, a specific marker of neutrophil elastase activity in vivo", *Thorax*, vol. 66, no. 8, pp. 686-691.
- Carter, R. I., Ungurs, M. J., Mumford, R. A., & Stockley, R. A. 2013, "Aalpha-Val360: a marker of neutrophil elastase and COPD disease activity", *Eur.Respir.J.*, vol. 41, no. 1, pp. 31-38. 20
- Finlay, G. A., O'Driscoll, L. R., Russell, K. J., D'Arcy, E. M., Masterson, J. B., Fitzgerald, M. X., & O'Connor, C. M. 1997, "Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema", *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, vol. 156, no. 1, pp. 240-247.
- Gefter, M. L., Margulies, D. H., & Scharff, M. D. 1977, "A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells", *Somatic.Cell Genet.*, vol. 3, no. 2, pp. 231-236. 30
- He, J., Turino, G. M., & Lin, Y. Y. 2010, "Characterization of peptide fragments from lung elastin degradation in chronic obstructive pulmonary disease", *Exp.Lung Res.*, vol. 36, no. 9, pp. 548-557.
- Heinz, A., Taddese, S., Sippl, W., Neubert, R. H., & Schmelzer, C. E. 2011, "Insights into the degradation of human elastin by matrilysin-1", *Biochimie*, vol. 93, no. 2, pp. 187-194. 40
- Ma, S., Lin, Y. Y., & Turino, G. M. 2007, "Measurements of desmosine and isodesmosine by mass spectrometry in COPD", *Chest*, vol. 131, no. 5, pp. 1363-1371.

## 【表 2 B】

Maclay, J. D., McAllister, D. A., Rabinovich, R., Haq, I., Maxwell, S., Hartland, S., Connell, M., Murchison, J. T., van Beek, E. J., Gray, R. D., Mills, N. L., & Macnee, W. 2012, "Systemic elastin degradation in chronic obstructive pulmonary disease", *Thorax*, vol. 67, no. 7, pp. 606-612.

Rosas, I. O., Richards, T. J., Konishi, K., Zhang, Y., Gibson, K., Lokshin, A. E., Lindell, K. O., Cisneros, J., Macdonald, S. D., Pardo, A., Sciurba, F., Dauber, J., Selman, M., Gochuico, B. R., & Kaminski, N. 2008, "MMP1 and MMP7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis", *PLoS.Med.*, vol. 5, no. 4, p. e93. 10

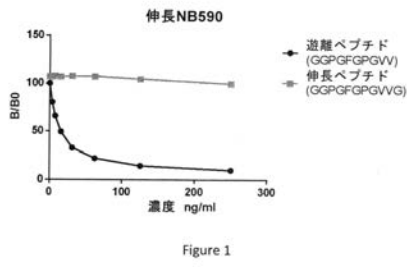
Skjot-Arkil, H., Clausen, R. E., Nguyen, Q. H., Wang, Y., Zheng, Q., Martinez, F. J., Hogaboam, C. M., Han, M., Klickstein, L. B., Larsen, M. R., Nawrocki, A., Leeming, D. J., & Karsdal, M. A. 2012, "Measurement of MMP-9 and -12 degraded elastin (ELM) provides unique information on lung tissue degradation", *BMC.Pulm.Med.*, vol. 12, no. 1, p. 34. 20

Skjot-Arkil, H., Clausen, R. E., Rasmussen, L. M., Wang, W., Wang, Y., Zheng, Q., Mickley, H., Saaby, L., Diederichsen, A. C., Lambrechtsen, J., Martinez, F. J., Hogaboam, C. M., Han, M., Larsen, M. R., Nawrocki, A., Vainer, B., Krustrup, D., Bjorling-Poulsen, M., Karsdal, M. A., & Leeming, D. J. 2013, "Acute Myocardial Infarction and Pulmonary Diseases Result in Two Different Degradation Profiles of Elastin as Quantified by Two Novel ELISAs", *PLoS.One.*, vol. 8, no. 6, p. e60936. 30

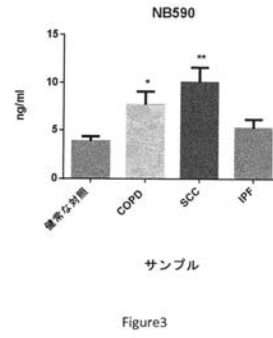
Starcher, B., O'Neal, P., Granstein, R. D., & Beissert, S. 1996, "Inhibition of neutrophil elastase suppresses the development of skin tumors in hairless mice", *J.Invest Dermatol.*, vol. 107, no. 2, pp. 159-163.

Zhang, J., Jin, X., Fang, S., Wang, R., Li, Y., Wang, N., Guo, W., Wang, Y., Wen, D., Wei, L., Dong, Z., & Kuang, G. 2005, "The functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-7 promoter increases susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma, gastric cardiac adenocarcinoma and non-small cell lung carcinoma", *Carcinogenesis*, vol. 26, no. 10, pp. 1748-1753. 40

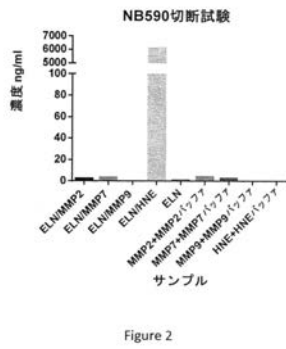
【 図 1 】



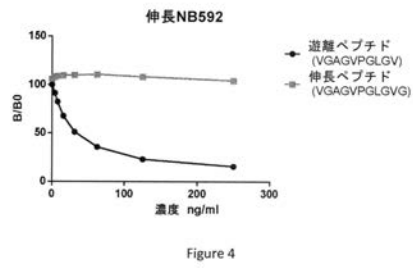
【 図 3 】



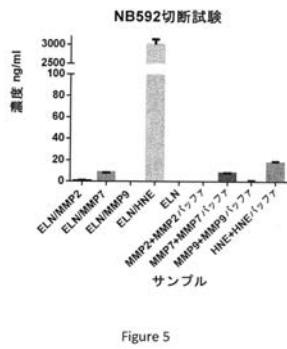
【 図 2 】



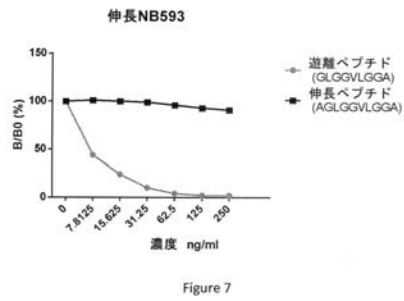
【 図 4 】



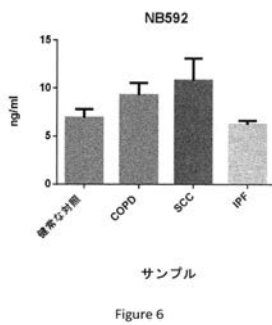
【 図 5 】



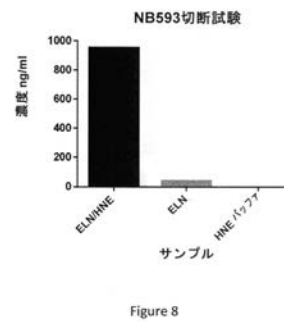
【 図 7 】



【 図 6 】



【 図 8 】



【 図 9 】

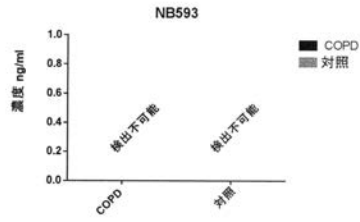


Figure 9

【 図 1 1 】

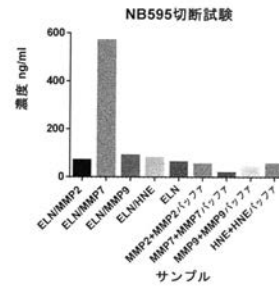


Figure 11

【 図 1 0 】

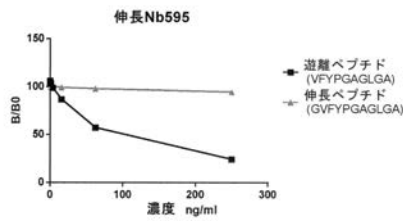


Figure 10

【 図 1 2 】

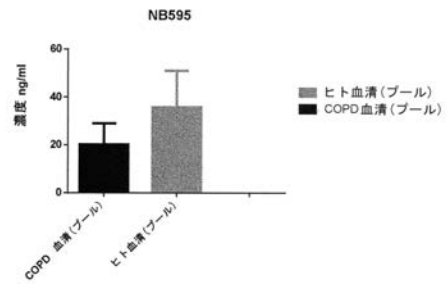


Figure 12

【 図 1 3 】

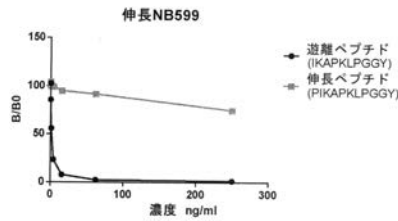


Figure 13

【 図 1 5 】

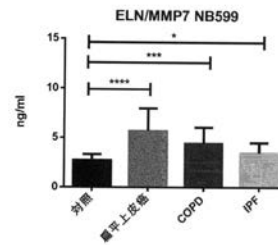


Figure 15

【 図 1 4 】

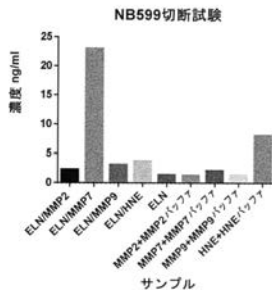


Figure 14

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2015/050269

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a.  forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/050269

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/68 C07K16/18 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/115749 A2 (NORDIC BIOSCIENCE A/S [DK]) 14 October 2010 (2010-10-14) abstract page 5, line 1 - line 17 page 19, line 24 - line 30 page 66 Table 25 (SEQ ID NO 2046) page 86, line 22 page 88, line 3 page 89, line 6 - line 11 claims 1,14 page 85 ----- -/--	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 April 2015		04/05/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Giry, Murielle

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/050269
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 2009/059972 A2 (NORDIC BIOSCIENCE A/S [DK]) 14 May 2009 (2009-05-14) abstract page 18 - page 19 page 52 - page 55 claims 13-30</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13
Y	<p>SKJØT-ARKIL H. ET AL.: "Acute myocardial infarction and pulmonary diseases result in two different degradation profiles of elastin as quantified by two novel ELISAs", PLOS ONE, vol. 8, no. 6, E60936, 21 June 2013 (2013-06-21), pages 1-11, XP55183266, abstract column 1, last paragraph - column 2, paragraph 2 page 6, column 1 figure 5</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13
Y	<p>US 2013/273586 A1 (TURINO G.M. [US] ET AL.) 17 October 2013 (2013-10-17) abstract paragraphs [0004] - [0011] example 7 Table 7 (peptides 8, 12, 16, 20, 23)</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13
A	<p>SKJØT-ARKIL H. ET AL.: "Macrophage-mediated proteolytic remodeling of the extracellular matrix in atherosclerosis results in neoepitopes: A potential new class of biochemical markers", ASSAY DRUG DEV. TECHNOL., vol. 8, no. 5, October 2010 (2010-10), pages 542-552, XP55183378, abstract page 545, column 2 figure 3</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/050269

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010115749 A2	14-10-2010	CN 103238071 A	07-08-2013
		DK 2414844 T3	02-03-2015
		EP 2414844 A2	08-02-2012
		EP 2770327 A1	27-08-2014
		ES 2529101 T3	16-02-2015
		JP 2012522233 A	20-09-2012
		KR 20110137823 A	23-12-2011
		US 2010209940 A1	19-08-2010
		WO 2010115749 A2	14-10-2010
		WO 2009059972 A2	14-05-2009
EP 2208073 A2	21-07-2010		
EP 2538218 A2	26-12-2012		
EP 2538221 A2	26-12-2012		
EP 2538222 A2	26-12-2012		
EP 2538223 A2	26-12-2012		
JP 2011503564 A	27-01-2011		
JP 2015007638 A	15-01-2015		
US 2010323377 A1	23-12-2010		
WO 2009059972 A2	14-05-2009		
US 2013273586 A1	17-10-2013	US 2013273586 A1	17-10-2013
		WO 2011094343 A1	04-08-2011

## 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 100114591

弁理士 河村 英文

(74) 代理人 100125380

弁理士 中村 綾子

(74) 代理人 100142996

弁理士 森本 聡二

(74) 代理人 100166268

弁理士 田中 祐

(74) 代理人 100170379

弁理士 徳本 浩一

(74) 代理人 100180231

弁理士 水島 亜希子

(72) 発明者 クリステンセン, ヤコブ・フル

デンマーク国, 2860 セーボー, セーボーフース・パーク 6, 1.th.

(72) 発明者 レーミング, ディアーナ・ジュリー

デンマーク国, 3060 エスパゲア, ガメル・ストランヴァイ 209D, 1.Sal

(72) 発明者 カルスダール, モルテン

デンマーク国, 2100 コペンハーゲン オー・スラッシュ, エッケルスベリイスゲーゼ 13

Fターム(参考) 4B063 QA18 QA19 QQ03 QR16 QR48 QS33 QX01

专利名称(译)	肺病和其他疾病的生化标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017504040A</a>	公开(公告)日	2017-02-02
申请号	JP2016563251	申请日	2015-01-08
申请(专利权)人(译)	北欧生物科学ER / ES		
[标]发明人	クリステンセンヤコブフル レーミングディアーナジュリー カルスダルモルテン		
发明人	クリステンセン, ヤコブ・フル レーミング, ディアーナ・ジュリー カルスダル, モルテン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/536 C12Q1/37		
CPC分类号	G01N33/6878 C07K16/18 C07K16/40 C07K2317/33 C07K2317/34 G01N33/577 G01N33/6893 G01N2333/78 G01N2333/96411 G01N2333/96419 G01N2800/122 G01N2800/7052		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/536.C C12Q1/37.ZNA		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QR16 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QX01		
代理人(译)	河村 英文 中村 綾子 田中 宇 徳本 光一		
優先権	2014000472 2014-01-13 GB		
其他公开文献	JP6505749B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

**摘要(译)**  
 一种用于定量检测在肺部疾病如COPD, SCC或IPF中升高的肽片段的生物测定方法, 该方法包括通过在体内用蛋白酶裂解弹性蛋白在裂解位点形成的新表位, 包括与对新表位氨基酸序列具有特异性结合亲和力的抗体接触并确定结合水平的步骤, 其中该抗体的末端序列为  
 .....FGPGVV.....VPGLGV IKAPKL..... 结合至一种抗体的方法, 以及用于此类方法的抗体和免疫测定试剂盒。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公表特許公報(A)	(11) 特許出願公表番号 特表2017-504040 (P2017-504040A)
		(43) 公表日 平成29年2月2日(2017.2.2)
(51) Int. Cl.	F I	ターマコード (参考) 4 B 0 6 3
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	
<b>GO 1 N 33/536 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/536 C	
<b>C 1 2 Q 1/37 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/37 Z N A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-563251 (P2016-563251)	(71) 出願人 503259129	
(86) (22) 出願日 平成27年1月8日(2015.1.8)	ノルディック・バイオサイエンス・エー/エス	
(85) 翻訳文提出日 平成28年9月12日(2016.9.12)	NORDIC BIOSCIENCE A	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2015/050269	/S	
(87) 国際公開番号 W02015/104342	デンマーク国、サーカー - 2730 ヘル	
(87) 国際公開日 平成27年7月16日(2015.7.16)	レフ、ヘルレフ・ホーフエガダー 20	
(81) 優先権主張番号 1400472.5	7	
(32) 優先日 平成26年1月13日(2014.1.13)	(74) 代理人 100099623	
(33) 優先権主張国 英国 (GB)	弁理士 奥山 尚一	
	(74) 代理人 100096769	
	弁理士 有原 幸一	
	(74) 代理人 100107319	
	弁理士 松島 鉄男	
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 肺疾患および他の疾患用の生化学マーカー		