(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6162115号
(P6162115)

(45)発行日　平成29年7月12日(2017.7.12)　(24)登録日　平成29年6月23日(2017.6.23)

(51)Int.Cl.　F I
G01N 33/53 (2006.01)　G01N 33/53 D
C12Q 1/37 (2006.01)　C12Q 1/37 ZNA

請求項の数 7　(全 80 頁)

(21)出願番号　特願2014-520651 (P2014-520651)
(86)(22)出願日　平成24年7月18日(2012.7.18)
(65)公表番号　特表2014-521098 (P2014-521098A)
(43)公表日　平成26年8月25日(2014.8.25)
(86)国際出願番号　PCT/EP2012/064090
(87)国際公開番号　WO2013/011056
(87)国際公開日　平成25年1月24日(2013.1.24)
審査請求日　平成27年4月3日(2015.4.3)
(31)優先権主張番号　13/187,205
(32)優先日　平成23年7月20日(2011.7.20)
(33)優先権主張国　米国(US)

前置審査

(73)特許権者　503259129
ノルディック・ビオサイエンス・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・ホーフェデガーデ　２０７
(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】病理学バイオマーカーアッセイ

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
患者生体液試料に天然で存在するＮ末端またはＣ末端ネオエピトープ含有タンパク質断片を測定するためのイムノアッセイを行うステップを含むバイオアッセイの方法であって、前記イムノアッセイが、前記試料に天然で存在するタンパク質断片を、ＦＡＰ、ＭＭＰ２、ＭＭＰ８、ＭＭＰ９、ＭＭＰ１２またはＡＤＡＭＴＳ－４によるＩ型、ＩＩＩ型、ＩＶ型、Ｖ型またはＶＩ型コラーゲンの切断によって形成されるＮ末端またはＣ末端ネオエピトープと反応性の免疫学的結合パートナーと接触させるステップと、前記試料における前記ネオエピトープを含むタンパク質断片を測定するためにペプチド断片の前記免疫学的結合パートナーへの結合の程度を測定するステップとを含む方法により行われ、前記免疫学的結合パートナーが、ペプチドのＮ末端に形成される以下のＮ末端ネオエピトープ配列：

【表１Ａ】

コラーゲンＶ型
「.」でマークされた切断部位/配列番号（ ）
.HMGREG (257)
.RRNIDA (253)
.QQGGAG (254)
.QRGAHG (255)
.RVGKMG (256)
コラーゲンＩ型
「.」でマークされた切断部位/配列番号（ ）
.AAGPPG (138)
.AGPVGP (139)
.DGRPGP (140)
.EAGRPG (141)
.GAPGLQ (142)
.GLNGLP (143)
.GLNGLP (144)
.GLPGAK (145)
.GPPGPP (146)
.GPPGPP (147)
.GVRGLT (148)
.LPGPPG (149)
.LPGPPG (150)
.PGARGP (151)
.PGKDGV (152)
.PGPPGP (153)
.PGPPGP (154)
.PGPPGP (155)
.RGEPGP (156)
.RGLPGP (157)
.VGPVGA (158)
.DGLNGL (159)
.AKGEPG (160)
.AGARGN (161)
.VGPPGP (162)
.GAPGKD (163)
.IGSAGP (164)
.AGAPGK (165)
.PPGPPG (166)
.GPPGPP (167)
.YDEKST (168)
.ERGPPG (169)
.IGNVGA (170)
.AGKEGP (171)
.KGADGS (172)
.D(β)GLNGLP(173)

【表１Ｂ】

コラーゲンIII型
「.」でマークされた切断部位/配列番号( )
.AGAQGP (204)
.AGIPGV (205)
.APGAPG (206)
.ERGRPG (207)
.GERGSP (208)
.GFDGRN (209)
.GGPGAD (210)
.GLPGPP (211)
.GLPGTG (212)
.GPPGPA (213)
.GPRGPT (214)
.GSPGPA (215)
.IAGITG (216)
.KGDPGP (217)
.KGDRGE (218)
.LKGENG (219)
.PGENGA (220)
.PGERGE (221)
.PGKNGA (222)
.PGLKGE (223)
.PGMRGM (224)
.PPGKDG (225)
.PQGPKG (226)
.SPGAKG (227)
コラーゲンIV型
「.」でマークされた切断部位/配列番号( )
.IVIGTG (251)
コラーゲンVI型
「.」でマークされた切断部位/配列番号( )
.RIAVAQ (259)
.QLGTVQ (260)
.RDVVFL (261)

のいずれかと特異的に反応する、または、前記免疫学的結合パートナーが、ペプチドのＣ末端に形成される以下のＣ末端ネオエピトープ配列：

【表２Ａ】

コラーゲンＩ型
「.」でマークされた切断部位/配列番号（ ）
AEGSPG. (174)
AGAPGD. (175)
AGPPGP. (176)
AGPPGP. (177)
APQLSY. (178)
APQLSY. (179)
EAGLPG. (180)
GGRYYR. (181)
GNFAPQ. (182)
GNFAPQ. (183)
GPAGAP. (184)
GPPGAD. (185)
GPPSAG. (186)
IGPPGP. (187)
IGPPGP. (188)
IGPPGP. (189)
ISVPGP. (190)
LQGMPG. (191)
NFAPQL. (192)
PGAPGP. (193)
PGPDGK. (194)
PGPMGP. (195)
PGPPGA. (196)
PKGNSG. (197)
PPSAGF. (198)
PQLSYG. (199)
PSAGFD. (200)
QGPPGP. (201)
RGRTGD. (202)
VGARGP. (203)
コラーゲンIII型
「.」でマークされた切断部位/配列番号（ ）
AGQPGD. (228)
ENGSPG. (229)
GDPGPP. (230)
GERGPP. (231)
GLPGAA. (232)
GPAGIP. (233)
GPPGIP. (234)
GPPGPA. (235)
GRPGLP. (236)
GSPGGP. (237)
GSPGPQ. (238)
GVPGAK. (239)
KGEPGP. (240)

【表２Ｂ】

PAGIPG. (241)
AGPRGP. (242)
PGEPGP. (243)
PGKDGP. (244)
PRGAPG. (245)
RGAPGE. (246)
RGEPGP. (247)
SGHPGP. (248)
SGPKGD. (249)
TGPPGP. (250)
コラーゲンIV型
「.」でマークされた切断部位/配列番号( )
GIVIGT. (252)
コラーゲンV型
「.」でマークされた切断部位/配列番号( )
RGITGK. (258)

のいずれかと特異的に反応する、
ここで、表中、Pはヒドロキシプロリンを示し、Mは酸化メチオニンを示し、Kはヒドロキシリジンを示す、バイオアッセイの方法。

【請求項２】

前記免疫学的結合パートナーが、Ｎ末端ネオエピトープ：

.HMGREGREGE

を含むペプチド断片に対する特異的結合親和性を有する、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

前記免疫学的結合パートナーが、Ｎ末端ネオエピトープ：

.AGKEGPVGLP

を含むペプチド断片に対する特異的結合親和性を有する、請求項１に記載の方法。

【請求項４】

前記免疫学的結合パートナーが、Ｎ末端ネオエピトープ：

.GLPGTGGPPG

を含むペプチド断片に対する特異的結合親和性を有する、請求項１に記載の方法。

【請求項５】

前記結合の検出が定量的である、請求項１に記載の方法。

【請求項６】

前記結合の量が、健康な個体の集団、および、線維性疾患または炎症状態により特徴づけられた個体の集団について、確立された対照値と比較される、請求項１に記載の方法。

【請求項７】

前記試料中のペプチドが、前記抗体または抗体断片への結合について、前記抗体または抗体断片に結合する既知の濃度の結合物質と競合する競合アッセイとして行われる、請求項１に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、疾患を発生するリスク、例えば、慢性損傷後に線維症を発生するリスクを示すバイオマーカーを含めた、線維症疾患を含む様々な疾患の診断およびそれの発生の予後に有用なバイオマーカーについてのアッセイに関する。強直性脊椎炎などの炎症性疾患についてのバイオマーカーもまた記載され、心血管疾患（ＣＶＤ）についてのバイオマーカーも同様である。

【０００２】
特に、本発明によれば、コラーゲンＩ型、ＩＩＩ型、ＩＶ型、Ｖ型、およびＶＩ型、エラスチン、Ｃ反応性タンパク質、アポＥ、ルミカン、ＬＡＭＣ１、ＬＡＭＢ１、ＬＡＭＡ５、ならびにビグリカン、デコリン、バーシカン、およびパールカンを含むプロテオグリカンの分解断片に関するバイオマーカーは、有用であることが見出されている。
【背景技術】
【０００３】
（表１に列挙されたものを含む）線維性疾患は、罹患率および死亡率の主な原因であり、例えば、肝硬変は世界中で１年あたり８００，０００人の死亡がある[1]。
【表１】

表１．様々な線維性疾患[2]

組織	原因の例
肝臓	ウイルス性肝炎 住血吸虫症 脂肪性肝炎(アルコール性または非アルコール性)
肺	特発性肺線維症(IPF) 全身性硬化症(強皮症)
腎臓	腎性全身性線維症(NSF) 糖尿病 未処置高血圧
心臓	心臓発作 高血圧 アテローム性動脈硬化 再狭窄
眼	黄斑変性症、網膜および硝子体 網膜症
皮膚	全身性硬化症および強皮症、ケロイド、肥厚性瘢痕、火傷、遺伝因子、NFS
膵臓	自己免疫/遺伝性原因
腸	クローン病/炎症性腸疾患
脳	アルツハイマー病、AIDS
骨髄	がん、老化
多臓器線維症	手術合併症、化学療法薬誘発性線維症、放射線誘発性線維症、機械的損傷

【０００４】
「線維性疾患」は、主な症状としてであるか二次的症状としてであるかに関わらず、線維症を生じる任意の疾患である。
【０００５】
線維症は、持続性感染、自己免疫反応、アレルギー応答、化学的傷害、放射線照射、および組織損傷を含む様々な刺激によって誘発される慢性炎症反応の最終結果である。線維症は、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）の蓄積および再編成によって特徴づけられる。明らかな病原学的および臨床的差異があるにも関わらず、たいていの慢性線維性障害は、結合組織要素、特にコラーゲンおよびプロテオグリカンの沈着（これらは正常な組織構造を進行性にリモデリングして、破壊する[3、4]）を協力し合って刺激する、成長因子、タンパク質分解酵素、血管新生因子、および線維形成性サイトカインの産生を維持する持続性刺激物質を共通して有する。そのヒト健康への多大な影響にも関わらず、線維症の機構を直接、標的にする、認可された処置が現在、存在しない[5]。
【０００６】
線維症の鍵となる細胞メディエータは、筋線維芽細胞であり、これは、活性化された場

合、主要なコラーゲン産生細胞として働く。

【０００７】

＜炎症状態＞

強直性脊椎炎（ＡＳ）は、脊椎および仙腸関節の慢性炎症の一形態である。長期にわたると、脊椎の慢性炎症は、椎骨の完全なセメンテーション（分子病理学がまだ調査されておらず、完全には理解されていない過程）をもたらし得る（１１０）。全身性疾患でもあり、他の関節、ならびに眼、心臓、肺、および腎臓などの器官の炎症または損傷を含む、体中の他の組織を冒す（１１１）。複数の組織を巻き込む、ＡＳにおける炎症関連過程は、大部分の型の結合組織ターンオーバーに見られる、ＭＭＰ活性の増加およびコラーゲン沈着を含む分子過程を伴うようである。

【０００８】

細胞外マトリックス（ＥＣＭ）リモデリングは、組織恒常性の重要な過程である（１１２、１１３）。特異的なタンパク質分解活性は、ＥＣＭ内の一連の細胞機能および相互作用にとっての必要条件である（１１４）。これらの特異的な活性は、正常な生理的状況下で正確に協調されており、特定化された一連の事象は、調節された組織ターンオーバーを生じる。病的状況において、結合組織疾患に特に重点を置くと、正常な修復－応答関係は妨害され（１１５）、過剰なリモデリングおよび組織ターンオーバーをもたらす。このＥＣＭリモデリングの結果は、病的に冒された領域に局所的に発現するプロテアーゼによって生成される、タンパク質の一連の分解産物である、ネオエピトープの放出である。これらのタンパク質分解断片は、それらの未切断の起源と比較して由来の組織に対してより特異的であるため、分子バイオマーカー標的としての役割を果たす可能性がある（１１６）。

【０００９】

マトリックスメタロプロテイナーゼ（ＭＭＰ）などのエンドペプチダーゼは、コラーゲンおよびプロテオグリカンなどのＥＣＭタンパク質の分解において主要な役割を果たす（１１７、１１８）。特に、線維症などの結合組織疾患において、ＭＭＰ－２およびＭＭＰ－９は、高度に上方制御されることが示されている（１１９～１２１）。最近、尿および血清中に見出されるネオエピトープに基づいた生化学的マーカーが、それらの診断的および予後的な潜在能力について、注目度が増加している（１１６）。特に、骨粗鬆症および変形性関節症などの進行が遅い疾患について、Ｉ型およびＩＩ型コラーゲン分解産物にそれぞれ、基づいた、骨吸収マーカーおよび軟骨分解マーカーが広範に研究されている（１２２）。

【００１０】

＜細胞外マトリックス（ＥＣＭ）＞

線維形成は、組織損傷から通常生じる複雑な細胞性および分子性機構を含む動的過程である[6]。線維形成は、高分子の濃度を変化させ、組織サイズおよび密度の増加をもたらす、正常なＥＣＭ制御における不均衡の結果であり、次第に機能が損なわれる。これらの高分子は、主に、コラーゲンおよびプロテオグリカンなどの構造機能および接着機能を有する線維性タンパク質である。

【００１１】

＜コラーゲン＞

コラーゲンは、ヒト身体において広く分布しており、すなわち、ヒト身体におけるタンパク質質量の約３０％がコラーゲンで構成されている。コラーゲンは、ほとんどの結合組織のＥＣＭの構造的完全性を担う。ＥＣＭ内容物は、遺伝子発現およびタンパク質分泌の制御を介してだけでなく、メタロプロテイナーゼおよびシステインプロテアーゼによる内因性プロテアーゼ抑制およびタンパク質分解を介して、厳重に調節される合成と分解の間の微妙な均衡に起因する[7～9]。表２は、主要なコラーゲンの型をそれらの主要な組織分布と共に列挙している。

【表２】

表２．主要なコラーゲンの型およびそれらの組織分布

コラーゲンの型	組織分布
I	ほとんどの結合組織
II	軟骨、硝子体液
III	伸展性結合組織、例えば、肝臓、皮膚、肺、脈管系
IV	基底膜
V	コラーゲンIを含有する組織
VI	ほとんどの結合組織
VII	皮膚、膀胱、口腔粘膜、臍帯、羊膜
VIII	多くの組織、特に内皮
XIII	内皮細胞、皮膚、眼、心臓、骨格筋
XIV	血管、骨、皮膚、軟骨、眼、神経、腱、子宮
XXI	血管、心臓、胃、腎臓、骨格筋、胎盤

【００１２】

Ｉ型コラーゲンは、最も豊富なコラーゲンであり、たいていの結合組織に見出される。コラーゲンは骨および皮膚の構造のために特に重要であり、そこでの主要なコラーゲン成分はＩ型およびＩＩＩ型コラーゲンである[10]。

【００１３】

コラーゲンＩ型およびＩＩＩ型は、健康な組織において１：１の比で存在する、肝臓および肺の主要な構成要素である。加えて、コラーゲンＩＶ型およびＶＩ型は、たいていの組織において基底膜内に見出される。Ｖ型コラーゲンの最も一般的な局在は、コラーゲンＩ型およびＩＩＩ型と会合して、特徴的なコラーゲン原線維内にある[10]。

【００１４】

いくつかのコラーゲンは、限定的な組織分布を有する：例えば、ＩＩ型は、ほとんど軟骨内のみに見出される[11]。

【００１５】

線維形成中、コラーゲンの正味の量は増加する[12～14]。表３は、例として、肝線維症中のコラーゲンの増加を示している。

【表３】

表３．正常ヒト肝臓から硬変性ヒト肝臓へのコラーゲンの組成の変化[15]

コラーゲンの型	鎖	コラーゲン 正常肝臓 (mg/g)	コラーゲン 硬変性肝臓 (mg/g)	増加の倍数	分布 正常肝臓 (%)	分布 硬変性肝臓 (%)
I	α_1(I)		16	8	37	42
	α_2(I)	2				
III	α_1(III)	2	8	4	37	21
IV	α_1(IV)	0.5	7	14	9	18
	α_2(IV)					
V	α_1(V)	0.9	7	8	17	18
	α_2(V)					
	α_3(V)					
VI	α_1(VI)	0.01	0.1	10	0.2	0.3
	α_2(VI)					

【００１６】

Ｖ型コラーゲンは、ｃｏｌ５ａ１－／－マウスにおけるコラーゲン原線維形成のほとんど事実上の欠如によって例示される、コラーゲン原線維の形成に極めて重要であることが実証されている（１２３）。アラインメントにおいて、ヘテロ接合性マウスは、原線維数

および皮膚コラーゲン含有量の５０％低下に関連していた。これは、原線維形成の寿命依存性制御におけるＶ型コラーゲンの中心的役割を示しており、このコラーゲンの型が、多くの結合性疾患における極めて重要な関心対象であることを示唆している。しかしながら、結合性疾患におけるＶ型コラーゲンターンオーバーの役割の理解における概念的欠如が依然としてあり、これは、コラーゲンＶ型分解およびターンオーバーの調査を行う技術的能力がないことに一部より得る。興味深いことに、ごく最近、限定された種々のタンパク質のセットが、Ｖ型コラーゲンに結合することが見出され、この分子の分子機能をより詳細に解明し始めており、ＭＭＰ－２はそれらのうちの１つであった（１２４）。分子の特徴づけに加えて、Ｖ型コラーゲンが、動的運動性および他の細胞活性を誘導することにより異なる細胞表現型に直接、影響するという、より多くの証拠が現れつつあり、このタンパク質が、ＥＣＭの受動的構成要素だけにとどまらない可能性があることを示唆している（１２５、１２６）。これを直接的に支持するものとして、本発明者らは、最近、肝線維症の２つの別々の動物モデルにおいて、肝線維症とＶ型コラーゲン形成との非常に強い相関を記載し（１２７）、過剰な組織ターンオーバーにおけるＶ型コラーゲン形成の中心的役割を示唆した。

【００１７】

Ｖ型コラーゲンは、Ｉ型、ＩＩ型、ＩＩＩ型、およびＸＩ型と共に、原線維形成コラーゲンであり（１１）、３つの異なるα鎖（α１、α２、α３）のヘテロ三量体として形成される。それは、典型的には、Ｉ型およびＩＩＩ型コラーゲンと共にヘテロ原線維を形成し、有機骨マトリックス、角膜実質、ならびに筋肉、肝臓、肺、および胎盤の間質マトリックスに寄与する（１２８）。Ｖ型コラーゲン突然変異は、一連の結合組織疾患を生じ、その疾患のうち、エーラス－ダンロス症候群（ＥＤＳ）が最もよく表している。ＥＤＳは、関節過度可動性、皮膚変化（例えば、過伸展性、痩せ、および脆弱性）によって特徴づけられる、遺伝性障害の混成群である。その疾患は、異なる亜型、ＥＤＳ－ＩおよびＩＩに分けることができる。Ｉ型ＥＤＳおよびＩＩ型ＥＤＳは、萎縮性瘢痕、皮膚過伸展性、および関節弛緩症によって特徴づけられる。両方の亜型は、Ｖ型コラーゲンのポリペプチド鎖の２つをコードするＣＯＬ５Ａ１およびＣＯＬ５Ａ２遺伝子における突然変異に起因することは明らかである（１２９～１３１）。これは、結合組織疾患におけるＶ型コラーゲンの重要性を浮き彫りにしている。

【００１８】

＜エラスチン＞

エラスチンは、多くの結合組織、主に弾性である結合組織内に存在するタンパク質である。エラスチンは、アミノ酸のグリシン、バリン、アラニンおよびプロリンの含有量が非常に高く、６４～６６ｋＤａの分子量を有する。エラスチンは、８３０個のアミノ酸で構成される不規則な、またはランダムコイルの高次構造に組織化されている。エラスチンは、リジルオキシダーゼによって触媒される反応において、多くの可溶性トロポエラスチンタンパク質分子を連結して、塊状の不溶性で耐久性のある架橋したアレイを生成することにより生じる。

【００１９】

エラスチンは、血流を助けるための圧力波伝播の媒体として動脈中、重要な機能を果たし、大動脈などの大きな弾性血管で特に豊富である。エラスチンはまた、肺、弾性靱帯、および皮膚において非常に重要である。

【００２０】

エラスチンの合成およびターンオーバーの理解に多くの努力が注がれたにも関わらず、このマトリックス分子のタンパク質分解性切断から生じるネオエピトープは、これまで、線維症における疾患発生と関連づけられたことはない。

【００２１】

＜ビメンチン＞

ビメンチンは、中間径フィラメントファミリーのタンパク質のメンバーである。中間径フィラメントは、真核細胞の重要な構造的特徴である。それらは、微小管およびアクチン

マイクロフィラメントと共に、細胞骨格を形成する。たいていの中間径フィラメントは安定な構造であるが、線維芽細胞において、ビメンチンは、動的構造として存在する。このフィラメントは、中胚葉由来組織についてのマーカーとして用いられ、その結果、肉腫についての免疫組織化学的マーカーとして用いられている。

【００２２】

Ｈｅｒｔｉｇら（Ｈｅｒｔｉｇら、Ｊ Ａｍ Ｓｏｃ Ｎｅｐｈｒｏｌ．２００８ Ａｕｇ；１９（８）：１５８４～９１）は、慢性移植腎症を有する対象の腎尿細管上皮細胞における上皮間葉転換が、同種移植片における線維症の進行を予測することができるかどうかを調べ、これらの対象から得た８３個の生検においてビメンチン発現を測定した。彼らは、手術後１年目におけるビメンチン発現の上昇と腸線維症スコアとの間の関連を見出した。

【００２３】

肝線維症の別の研究において、Ｍｅｒｉｄｅｎら（Ｍｅｒｉｄｅｎら、Ｃｌｉｎ Ｇａｓｔｒｏ ＆ Ｈｅｐａｔｏｌ ２０１０；８：２８９～２９６）は、（Ｆ０段階に得られた生検における）ビメンチン発現と線維症進行との間の有意な関連を見出し、上昇したレベルが、肝線維症の急速な進行を予測した。

【００２４】

したがって、本発明者らは、ビメンチンの循環断片が、線維症の高感度かつ特異的なバイオマーカーとしての役割を果たすことができるかどうかを調べたいと考えた。

【００２５】

＜プロテオグリカン＞

プロテオグリカンは、コアタンパク質に様々な数のグリコサミノグリカン（ＧＡＧ）側鎖を共有結合している高分子の多様な群である[16]。これらのＧＡＧは、二糖繰り返し（例えば、Ｎ－アセチルグルコサミンまたはＮ－アセチルガラクトサミン）のポリマーであり、二糖単位上のヒドロキシル側鎖、カルボキシル化側鎖、および硫酸化側鎖により酸性（負荷電）である。これは、それらを高親水性にし、それに従って、水および陽イオン（例えば、細胞外液からのナトリウム）の拡散を助ける[17]。さらに、ＧＡＧは、例えば、ヒアルロン酸鎖との非共有結合性連結を形成し、さらにより大きい分子複合体を形成する能力を有する[16]。表４は、結合組織に関連した最も研究されているプロテオグリカンを列挙する。

【表４】

表４．結合組織の細胞外マトリックスのプロテオグリカン

群	プロテオグリカン	起源	機能
高分子細胞外プロテオグリカン(凝集性およびヒアルロナン結合性)	アグリカン[18]	関節軟骨、軟骨細胞、椎間板、鼻軟骨	細胞外マトリックス安定性(ヒアルロナン結合性)
	バーシカン[19、20]	結合組織:線維芽細胞、ケラチノサイト、平滑筋細胞、メサンギウム細胞	細胞-細胞および細胞-マトリックス相互作用 Ca依存性様式での糖の結合
	ニューロカン[21]	神経組織	神経系細胞接着分子に結合する
	ブレビカン[22]	神経組織	細胞外マトリックス安定性
小分子高ロイシンプロテオグリカン(コラーゲン結合性)	デコリン[23]	結合組織、軟骨、骨	コラーゲン分子に結合して、接続する(マトリックス安定化および厚さ) 器官形成 TGFβの結合
	ビグリカン[24]	毛細血管内皮、皮膚(ケラチノサイト)、腎臓の内皮	細胞分化 コラーゲン原線維を結合して、接続する
	フィブロモジュリン[17]	結合組織、骨、軟骨	コラーゲン線維の配向を制御する
	ルミカン[23]	角膜、筋肉、軟骨、腎臓、肺、腸	コラーゲン線維のスペーシングおよび厚さを調節する
細胞結合性プロテオグリカン	セルグリシン[25]	内皮-細胞間コンパートメントに広く分布	造血細胞分化 リンパ球系細胞の接着および活性化
	シンデカン[26]	広く分布-細胞膜に結合している場合が多い	コラーゲン、フィブロネクチン、トロンボスポンジン、テネイシン、およびbFGFに結合する
	ベータグリカン[27]	広く分布	TGFβ受容体およびシグナル伝達 TGFβの可能性のあるリザーバ
基底膜プロテオグリカン	パールカン[28]	全ての基底膜	高分子についての選択性バリア 細胞接着

【００２６】

＜Ｃ反応性タンパク質＞

Ｃ反応性タンパク質（ＣＲＰ）は、炎症、感染、または外傷などの種々の臨床状態に応答して肝臓により産生される急性期血清タンパク質である[29]。ＣＲＰの産生は、患部組織または損傷組織から放出されるＩＬ－６などのサイトカインにより誘導される。ＣＲＰの生理学的役割はまだわかっておらず、それの炎症促進性または抗炎症性作用の議論が進行中である。

【００２７】

＜アポリポタンパク質Ｅ＞

アポリポタンパク質Ｅ（アポＥ）は、肝細胞および末梢細胞上の特定の受容体に結合する、キロミクロン（大きいリポタンパク質粒子）および中間密度リポタンパク質粒子に見出されるアポリポタンパク質の分類である。アポＥは、トリグリセリドリッチなリポタンパク質成分の正常な代謝に必須である。アポＥは、２９９アミノ酸長であり、リポタンパ

ク質、脂溶性ビタミン、およびコレステロールをリンパ系へ、その後、血液へ輸送する。それは、主に肝臓内で合成されるが、脳、腎臓、および脾臓などの他の組織内でも見出されている。アポＥは、トリグリセリドリッチなリポタンパク質成分の正常な代謝に必須である。アポＥは、最初、リポタンパク質代謝および心血管疾患におけるそれの重要性で知られていた。

【００２８】

＜エラスチン＞

エラスチンは、組織の弾性に関与する細胞外マトリックス分子であり、最初、その役割に限定されると考えられていた。エラスチン分解が、正常細胞および腫瘍細胞の幅広いパネルにおいて細胞走化性、細胞増殖、およびプロテアーゼ合成に影響する生理活性ペプチドの産生をもたらし得ることが今や、確立されている。

【００２９】

＜ＬＡＭＣ１、ＬＡＭＡ２、ＬＡＭＢ１、およびＬＡＭＡ５＞

細胞外マトリックス糖タンパク質のファミリーである、ラミニンは、基底膜の主要な非コラーゲン性成分である。それらは、細胞接着、分化、遊走、シグナル伝達、神経突起伸長、および転移を含む幅広い種類の生物学的過程に結びつけられている。ラミニンは、３つの非同一鎖：ラミニンα、β、およびγ（以前は、それぞれ、Ａ、Ｂ１、およびＢ２）で構成され、３つの短腕（それぞれが異なる鎖によって形成されている）、および全ての３つの鎖で構成される長腕からなる十字型構造を形成する。各ラミニン鎖は、別々の遺伝子によってコードされる、マルチドメインタンパク質である。各鎖のいくつかのアイソフォームが記載されている。異なるα鎖、β鎖、およびγ鎖のアイソマーが組み合わさって、異なるヘテロ三量体ラミニンアイソフォームを生じ、それらは、それらの発見の順番にアラビア数字で表されている。種々の鎖および三量体分子の生物機能は大部分、知られていないが、その鎖のいくつかは、それらの組織分布に関して異なることが示されており、おそらくインビボでの多様な機能を反映している。

【００３０】

ＬＡＭＣ１（以前はＬＡＭＢ２）は、ラミニンサブユニットγ－１である。

【００３１】

ＬＡＭＡ２は、ラミニンサブユニットα－２である。

【００３２】

ＬＡＭＢ１は、ラミニンサブユニットβ－１である。

【００３３】

ＬＡＭＡ５は、ラミニンサブユニットα－５である。

【００３４】

＜プロテアーゼ＞

線維形成中のＥＣＭの合成と分解の間の不均衡は、低密度内皮下マトリックスの、間質コラーゲンに富んだマトリックスへの変換に起因する。コラーゲンおよびプロテオグリカンの増加は、（１）タンパク質産生の減少、ならびに（２）タンパク質分解障害と、その結果としてのマトリックス分解の減少の、一方または両方による可能性がある。タンパク質分解の減少は、最近、注目されることが増えている。この過程の制御において、マトリックスメタロプロテイナーゼ（ＭＭＰ）およびそれらの組織インヒビター（ＴＩＭＰ）、加えて、システインプロテアーゼおよびシスタチンなどの他のプロテアーゼおよびそれらのインヒビターは、重要な役割を果たす。

【００３５】

ＭＭＰ

ＭＭＰは、ＥＣＭの全部の構成要素ではないにしても、大部分の構成要素を分解する能力がある、エンドペプチダーゼの大きな群である。現在、２５個より多いＭＭＰが見出されている。ＭＭＰは、金属原子、典型的には亜鉛を含有する活性部位によって特徴づけられ、酵素前駆体として分泌される。異なるＭＭＰは異なる組織に発現している。表５において、肝臓におけるＭＭＰが示されている。

【表５】

表５．肝臓におけるMMP[30~32]

ファミリー	プロテアーゼ	源	基質
コラゲナーゼ	MMP-1	HSC	I型、II型、III型、VII型、VIII型、X型、ゼラチン
	MMP-8	好中球	I型、II型、III型、V型、VII型、X型、ゼラチン
	MMP-13	HSC，MFB，KC	I型、II型、III型、VII型、X型、ゼラチン
ストロメライシン	MMP-3	HSC	III型、IV型、V型、IX型、X型、XI型、ゼラチン、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン、糖タンパク質、エラスチン、プロMMP-1/13
	MMP-10	HSC	III型、IV型、V型、ゼラチン、エラスチン、アグリカン
	MMP-11	HC	PAI-1、マトリックスタンパク質に対して弱い活性
ゼラチナーゼ	MMP-2	HSC，MBF	I型、II型、III型、IV型、V型、VII型、X型、XI型、ゼラチン、エラスチン、ラミニン
	MMP-9	KC，HSC，HC	I型、II型、III型、IV型、V型、VII型、X型、XI型、ゼラチン、エラスチン、ラミニン
	MMP-7	HSC	エンタクチン、ゼラチン、エラスチン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、フィブリノーゲン
メタロエラスターゼ	MMP-12	マクロファージ	エラスチン、ゼラチン、IV型、ラミニン、フィブロネクチン、エンタクチン、ビトロネクチン、プロテオグリカン、ミエリン塩基性タンパク質、α1-アンチトリプシン
MT-MMPs	MMP-14	HSC，MFB，KC	I型、II型、III型、ゼラチン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、フィブリノーゲン、プロMMP-2、プロMMP-13
	MMP-15	HC，BDEC	プロMMP-2、フィブロネクチン、テネイシン、ラミニン、アグリカン、パールカン

【００３６】

ＴＩＭＰは、ＭＭＰおよび膜１型メタロプロテイナーゼに、３分子複合体として、基質特異的および組織特異的に結合することによって、ＭＭＰのタンパク質分解活性をブロックする（表６）。線維症中、ＴＩＭＰレベルは劇的に増加し、ＭＭＰレベルは、中程度に増加するか、または相対的に変化しないままであり（ＭＭＰ－２を除く）、全体で、コラーゲンの分解の減少を生じる。

【表６】

表６．肝臓におけるTIMP[31]

名前	源	阻害されるメタロプロテイナーゼ
TIMP-1	HSC, MFB, KC, HC	プロMMP-9, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13
TIMP-2	KC, HSC	MT-MMP-1, MT-MMP-2, proMMP-2, MMP-3, MMP-13, MMP-7
TIMP-3	HC	MT-MMP-1, MT-MMP-2, TACE, MMP-13

【００３７】

＜線維芽細胞活性化タンパク質＞

線維芽細胞活性化タンパク質αサブユニット（ＦＡＰａ、またはＦＡＰ，α）は、セリンプロテアーゼファミリーに属する内在性膜ゼラチナーゼである。ＦＡＰａは、１７０ｋＤａメラノーマ膜ゼラチナーゼ、内在性膜セリンプロテイナーゼ、およびセプラーゼとしても知られたヘテロ二量体膜結合型プロテイナーゼ複合体のαサブユニットであり、ＤＰＰ４（ＣＤ２６）はβサブユニットである。ある細胞は、ＦＡＰａホモ二量体のみを生成し、ある細胞はＤＰＰ４ホモ二量体のみを生成する。単量体は不活性である。ＦＡＰαは、上皮癌の反応性間質線維芽細胞、回復期創傷の肉芽組織、ならびに骨肉腫および軟部肉腫の悪性細胞において選択的に発現している[33]。このタンパク質は、発生中、組織修復中、および上皮発癌中、線維芽細胞増殖または上皮間葉相互作用の調節に関与すると考えられている。ＦＡＰの発現は、線維症の病期と共に増加することが示されている[34、35]。

【００３８】

＜ＡＤＡＭＴＳ＞

ＡＤＡＭＴＳ（トロンボスポンジンモチーフを有するディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ）は、ペプチダーゼのファミリーであり、これまで、このファミリーの１９個のメンバーがヒトにおいて同定されている。ＡＤＡＭＴＳプロテアーゼの既知の機能には、プロコラーゲンおよびフォンビルブランド因子のプロセシング、加えて、アグリカン、バーシカン、ブレビカン、およびニューロカンの切断が挙げられる。それらは、結合組織の組織化、凝固、炎症、関節炎、血管新生、および細胞遊走において重要な役割をもつことが実証されている。

【００３９】

＜カテプシン＞

プロテアーゼのカテプシンファミリーには十数個のメンバーがあり、それらは、それらの構造、触媒機構、およびそれらがどのタンパク質を分解するかによって区別される。そのメンバーの大部分は、リソソームにおいて見出される低ｐＨにおいて、活性化する。したがって、このファミリーの活性は、ほとんど完全に、それらの細胞小器官内にある（ただし、多くの例外がある）。例えば、（いくつかある活性の中で）骨吸収において破骨細胞による分泌後に細胞外で働くカテプシンＫなど。

【００４０】

カテプシンＫ（ＣＡＴ－Ｋ）およびカテプシンＳ（ＣＡＴ－Ｓ）はどちらもシステインプロテアーゼである。

【００４１】

＜線維症バイオマーカー＞

線維性疾患の特異的な産物ではないが、この疾患のいくつかの生化学的マーカーが示唆されている。表７において、臨床試験に用いられる肝線維症の生化学的マーカーの例がある。加えて、他の線維性疾患のバイオマーカーの多数の例がある[12、36～42]。

【表７Ａ】

表７．肝線維症の既知のマーカーの一部の概要

バイオマーカー	パラメータ	慢性肝疾患	参考文献
１パラメータ			
CRP		NASH	43
ヒアルロナン		HCV	44-47
IGF-I		HCV	48
レプチン		HCV	49
PIIIP		HCV	50
数個のパラメータ	パラメータ	慢性肝疾患	参考文献
MP3	PIIINP, MMP1	HCV	51, 52
Zhengら指数	HA, PIIICP, PIIINP, ラミニン, C-IV	慢性肝炎	53
Lebensztjenら指数	ラミニン-2, C-IV, MMP2, MMP9-TIMP1指数	HBV	54
	テネイシン、ヒアルロナン、コラーゲンVI型、TIMP-1	HBV	55
Tsochatzisら指数	レプチン、アディポネクチン、レジスチン	HCV, HBC, NASH	56
Patelら指数	ヒアルロナン、TIMP-1、α_2-マクログロブリン	HCV	57
	TIMP-1、テネイシン、コラーゲンIV型、PIIINP、MMP2、ラミニン、ヒアルロナン	NASH	58
Forns指数（76, 77）	年齢、血小板数、γGT、コレステロール	HCV HIV/HCV	51, 59-62
FibroTest (76, 78)	ハプトグロビン、α_2-マクログロブリン、アポリポタンパク質A1、γGT、ビリルビン	HCV HIV/HCV NAFLD 糖尿病患者におけるNAFLD	45, 51, 60, 61, 63-75
Actitest	FibroTest + ALT	HCV	65, 76-78
APRI（Wai指数）	AST、血小板数	HIV/HCV HCV NAFLD	45, 51, 60, 61, 64, 66, 79-87
Hepascore	ビリルビン、γGT、ヒアルロナン、α_2-マクログロブリン、年齢、性別	HCV HIV/HCV	51, 61, 64, 66, 88
FIB-4	血小板数、AST、ALT、年齢	HIV/HCV	61, 83
SHASTA	ヒアルロナン、アルブミン、AST	HIV/HCV	61
Fibroindex	FORN+APRI	HCV	89
Fibrometer試験	血小板数、プロトロンビン指数、AST、α_2-マクログロブリン、ヒアルロナン、尿素、年齢	HIV/HCV HCV NAFLD	51, 61, 64, 66, 81
NFSA	年齢、高血糖、肥満度指数、血小板、アルブミン、AST/ALT	NAFLD	81

【表７Ｂ】

超音波+APRI		HCV	82
Metwallyら指数	血小板数、アルブミン、AST、輸血の経歴、HBVコア抗体	HCV	90
Mohamadnejadら指数	年齢、HBV DNAレベル、アルカリフォスファターゼ、アルブミン、血小板数、AST	HCV	91
FibroSpect II	ヒアルロナン、TIMP-1、α_2-マクログロブリン	HCV	85, 92, 93
段階的組み合わせアルゴリズム	APRIとFibrotestの組み合わせ	HCV	94
Imbert-Bismut指数	α_2-マクログロブリン、AST、ALT、γGT、総ビリルビン、アルブミン、α_1グロブリン、α_2グロブリン、βグロブリン、γグロブリン、アポリポタンパク質A_1	HCV	95
Nunesら	年齢、血小板、INR、CD4、AST/ALT、ヒアルロナン、YKL-40、PIIINP	HCV/HIV HCV	96
Fibroscan +++	Fibroscan, Fibrotest, APRI,	HCV	97

【００４２】

米国特許第５３８７５０４号は、アグリカン部位N_{341}－F_{342}におけるストロメライシンの作用によって放出されるネオエピトープＶＤＩＰＥＮ、およびこのネオエピトープに特異的なモノクローナル抗体を用いるＲＩＡアッセイを記載する。より一般的には、特異的なストロメライシン切断によって生成されるアグリカンの断片に特異的な単一特異性抗体の使用が記載されている。ストロメライシンの上昇は、変形性関節症、関節リウマチ、アテローム性動脈硬化病変、痛風、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、特発性肺線維症（ＩＰＦ）、特定の癌、関節損傷、および多数の炎症性疾患で起こる。ストロメライシンは、特発性肺線維症において上昇することが報告されており、そのアッセイを、血液または他の生体液で行って、アグリカンのストロメライシン切断産物を検出することができること、およびそのような断片の定量化がＩＰＦ、加えて他の状態に関して診断的に用いることができることが主張されている。しかしながら、これの証拠は提供されず、本発明者らが知る限りでは、この予測を確証するその後の刊行物は存在していない。そのようなＲＩＡアッセイは、長年、市販されており、いかなる線維性疾患を診断またはモニターすることにおいても、それらを用いて成功したという報告は現れていない。

【００４３】

米国特許第７，２２５，０８０号は、患者において炎症性、線維性、または癌性疾患の診断のための方法であって、前記患者における肝線維症および／または肝臓壊死性炎症性病変の存在を決定するために、前記患者の血清または血漿においてα２－マクログロブリン、ＡＳＴ（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ）、ＡＬＴ（アラニンアミノトランスフェラーゼ）、ＧＧＴ（γ－グルタミルトランスペプチダーゼ）、γ－グロブリン、総ビリルビン、アルブミン、α１－グロブリン、α２－グロブリン、ハプトグロビン、β－グロブリン、アポＡ１、ＩＬ－１０、ＴＧＦ－β１、アポＡ２、およびアポＢからなる群から選択される少なくとも４つの生化学的マーカーの値を測定し、その後、前記値を組み合わせることによる、方法を開示する。その特許は、線維性疾患中に生成された、ネオエピトープを有するペプチド断片の定量的測定を教示していない。

【００４４】

米国特許第６，０６０，２５５号は、肝線維症の程度を診断するための方法であって、ＩＶ型コラーゲンに特異的に結合する抗体を用いて試料において、ＩＶ型コラーゲンの高

分子量型の濃度を測定するステップ、およびその測定値を肝線維症の程度に関係づけるステップを含む方法を記載する。この場合もやはり、身体中で作用するタンパク質分解酵素によって生じるネオエピトープは利用されていない。実際、試料はペプシンで消化され、そのことは、試料におけるコラーゲン切断の天然のパターンを不明瞭にする可能性がある。

【００４５】

米国特許第４，６２８，０２７号（Ｇａｙ）は、結合組織タンパク質に特異的な抗体の産生、より具体的には、ヒトコラーゲン、およびコラーゲン分解に関与する酵素に対する融合細胞ハイブリッドによるモノクローナル抗体の産生を開示する。組織学的、細胞学的、および生物学的液体試料のコラーゲンプロファイルを確立するための、結合組織タンパク質に対するモノクローナル抗体の使用が記載されている。しかしながら、その特許は、前記結合組織タンパク質上のネオエピトープへの抗体の結合に基づいた結合組織タンパク質の測定を記載していない。

【００４６】

Ｇｕａｎａｂｅｎｓ Ｎら、Ｊ Ｂｏｎｅ Ｍｉｎｅｒ Ｒｅｓ、１９９８[９８]は、肝線維症の増加を伴う疾患である原発性胆汁性肝硬変を有する患者において、骨ターンオーバーのマーカー、Ｉ型コラーゲンのＮ－テロペプチド（ＮＴＸ）、Ｉ型コラーゲンのＣ－テロペプチド（ＣＴＸ）、およびコラーゲンＩ型のＮ末端プロペプチド（ＰＩＮＰ）を評価した。ＮＴＸ、ＣＴＸ、およびＰＩＮＰのレベルは、対照と比較して患者において上昇し、その疾患の組織学的段階と相関した。ＮＴＸに用いられた抗体は、コラーゲンＩ型のＮ末端におけるカテプシンＫ切断部位に対して産生され、ネオエピトープＹＤＧＫＧＶＧ↓（配列番号３０２）により決定される。ＣＴＸに用いられた抗体は、コラーゲンＩ型のＣ末端におけるカテプシンＫ切断部位に対して産生され、ネオエピトープＥＫＡＨＤＧＧＲ↓（配列番号３０３）により決定される。これらのマーカーは、コラーゲンＩ型のテロペプチド内に位置し、コラーゲンＩ型の内部部分（三重らせん部分）に位置しない。ＰＩＮＰアッセイに用いられるモノクローナル抗体は、ネオエピトープではないＰＩＮＰ配列における内部エピトープに対して産生された。

【００４７】

Ｍｏｌｌｅｒ Ｓら、Ｇｕｔ．、１９９９[９９]は、Ｉ型コラーゲンのＣ末端架橋テロペプチド（ＩＣＴＰ）が、対照と比較して、アルコール性肝硬変患者において上昇することを実証した。記載された研究は、生化学的マーカーが、肝線維症を反映し得ることを示した。ＩＣＴＰポリクローナル抗体は、トリプシンおよびコラゲナーゼに切断されたコラーゲンＩ型に対して産生されている。しかしながら、その抗体は、ネオエピトープに結合しない。

【００４８】

Ｒｏｓｅｎ ＨＮら、Ｃａｌｃｉｆ Ｔｉｓｓｕｅ Ｉｎｔ、２００４[１００]は、ホルモン補充処置（ＨＲＴ）を受ける女性において、骨ターンオーバーのマーカー、Ｉ型コラーゲンのＮ－テロペプチド（ＮＴＸ）およびＩ型コラーゲンのＣ－テロペプチド（ＣＴＸ）を評価した。その研究において、骨ターンオーバーのマーカーは処置と共に減少することが観察された。ＮＴＸに用いられた抗体は、コラーゲンＩ型のＮ末端におけるカテプシンＫ切断部位に対して産生され、ネオエピトープＹＤＧＫＧＶＧ↓（配列番号３０２）により決定される。ＣＴＸに用いられた抗体は、コラーゲンＩ型のＣ末端におけるカテプシンＫ切断部位に対して産生され、ネオエピトープＥＫＡＨＤＧＧＲ↓（配列番号３０３）により決定される。本発明とは違って、これらの抗体は、骨代謝の評価について用いられ、線維症の評価については用いられなかった。

【００４９】

Ｌｅｉｎ Ｍら、Ｅｕｒ Ｕｒｏｌ、２００７[１０１]は、ゾレドロン酸を受ける前立腺癌患者においてネオエピトープ特異的骨ターンオーバーのマーカー、Ｉ型コラーゲンのＮ－テロペプチド（ＮＴＸ）およびＩ型コラーゲンのＣ－テロペプチド（ＣＴＸ）の使用を評価した。その研究において、骨ターンオーバーのマーカーは処置と共に減少することが

観察された。ＮＴＸに用いられた抗体は、コラーゲンＩ型のＮ末端におけるカテプシンＫ切断部位に対して産生され、ネオエピトープＹＤＧＫＧＶＧ↓（配列番号３０２）により決定される。ＣＴＸに用いられた抗体は、コラーゲンＩ型のＣ末端におけるカテプシンＫ切断部位に対して産生され、ネオエピトープＥＫＡＨＤＧＧＲ↓（配列番号３０３）により決定される。本発明とは違って、これらの抗体は、骨転移の浸潤中の骨代謝の評価について用いられ、線維症の評価については用いられなかった。

【００５０】

ＰＩＩＩＮＰは、いくつかの研究、すなわち、線維性疾患の重症度を評価するための研究[１０２]、重度の熱傷後の皮膚線維症を有する患者においての研究[１０３]、非硬変性原発性胆汁性肝硬変における疾患進行についての研究[１０４]、原発性胆汁性肝硬変および慢性ウイルス性Ｃ型肝炎においての研究[１０５]に用いられている。

【００５１】

ＰＩＩＩＮＰおよびＩＣＴＰは、心筋の線維症を有する患者において測定された。

【００５２】

多くの報告は、生化学的指数の予測値を向上させるために１セットの生化学的マーカーを組み合わせている。１１個の異なる血清マーカーが、Ｆ０からＦ４までの線維性病期分類を有する２０５人の患者において測定され、最も情報価値のあるマーカーは、α２マクログロブリン、α２グロブリン（またはハプトグロビン）、γグロブリン、アポリポタンパク質Ａ１、γグルタミルトランスペプチダーゼ、および総ビリルビンであった[１０７]。これらのマーカーの指数は、ゼロから０．１０までの範囲のスコア（全患者の１２％［４１］）について陰性適中率（Ｆ２、Ｆ３、またはＦ４の非存在の１００％確実性）、および０．６０から１．００までの範囲のスコア（全患者の３４％［１１５］）について高い陽性適中率（Ｆ２、Ｆ３、またはＦ４の存在の＞９０％確実性）を有した。

【００５３】

ＷＯ２０１０／１１５７４９は、線維症バイオマーカーとして上記タンパク質の一部の多数のネオエピトープを開示し、ＷＯ２００９／０５９９７２は、心血管疾患のバイオマーカーとして上記タンパク質の一部の多数のネオエピトープを開示する。

【００５４】

しかしながら、上で挙げた報告のいずれにおいても、ここで主張されているようなネオエピトープへの抗体の結合に基づいたペプチド断片の測定が線維性疾患または炎症性疾患を有する患者の評価に有用であり得ることは示唆されていない。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００５５】

本発明は、ここで、イムノアッセイを行って、患者生体液試料に天然で存在するネオエピトープ含有タンパク質断片を測定することを含むバイオアッセイの方法であって、前記イムノアッセイが、前記試料に天然で存在するタンパク質断片を、プロテイナーゼによるタンパク質の切断によって形成されるネオエピトープと反応する免疫学的結合パートナーと接触させるステップと、ペプチド断片の前記免疫学的結合パートナーへの結合の程度を測定して、その中において、前記ネオエピトープを含むタンパク質断片を測定するステップであって、前記ネオエピトープが、以下の表に示された切断部位のいずれか１つにおける前記タンパク質の切断によって形成される、ステップとを含む方法によって行われる、バイオアッセイの方法を提供する。

【表８Ａ】

表８
コラーゲンＩ型

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;( )内に配列番号
FAP	Q.GAPGLQGMPG.E (1)
FAP	D.RGEPGPPGPAGFAGPPGAD.G (2)
FAP	D.GVRGLTGPIGPPGPAGAPGD.K (3)
FAP	A.GLPGAKGLTGSPGSPGPDGK.T (4)
FAP	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F (5)
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGD.A (6)
FAP	S.PGKDGVRGLTGPIGPPGPAGAP.G (7)
FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (8)
FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (9)
FAP	P.GPPGPPGPPGLGGNFAPQLSY.G (10)
FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S (11)
FAP	F.PGARGPSGPQGPGGPPGPKGNSG.E (12)
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (13)
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (14)
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (15)
FAP	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAGFD.F (16)
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F (17)
FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQLSYGYDEKSTGGISVPGPMGP.S (18)
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAGFD.F (19)
MMP9+FAP	D.RGEPGPPGPAGFAGPPGAD.G (20)
MMP9+FAP	D.GVRGLTGPIGPPGPAGAPGD.K (21)
MMP9+FAP	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F (22)
MMP9+FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGD.A (23)
MMP9+FAP	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAGF.D (24)
MMP9+FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (25)
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGLGGNFAPQLSY.G (26)
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S (27)
MMP9+FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (28)
MMP9+FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S (29)
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGPPSAGFDFSFLPQPPQEKAHDGGRYYR.A (30)
MMP9+FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAGFD.F (19)
MMP9	G.AAGPPGP.T (31)
MMP9	P.VGPVGARGP.A (32)
MMP9	P.AGPVGPVGARGP.A (33)
MMP9	P.RGLPGPPGAPGP.Q (34)
MMP9	G.EAGRPGEAGLPG.A (35)
MMP9	Q.DGRPGPPGPPGA.R (36)
MMP9	K.DGLNGLPGPIGPPGP.R (37)
MMP9	G.AKGEPGPVGVQGPPGP.A (38)
MMP9	P.AGARGNDGATGAAGPPGP.T (39)
MMP9	P.VGPPGPPGPPGPPGPPSAGF.D (40)
MMP9	A.GAPGKDGLNGLPGPIGPPGP.R (41)
MMP9	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F (42)
MMP9	S.AGAPGKDGLNGLPGPIGPPGP.R (43)
MMP9	G.PPGPPGPPGLGGNFAPQLSYG.Y (44)

【表８Ｂ】

MMP9	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S (45)
MMP9	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L (46)
MMP9	G.ERGPPGPMGPPGLAGPPGESGREGAPGAEGSPG.R (47)
FAP	853'.IGNVGAPGAK '862 (α2鎖) (48)
FAP	462'.AGKEGPVGLP '471 (α2鎖) (49)
FAP	249'.IGSAGPPGFP '258 (α2鎖) (50)
FAP	1153'.DGLNGLPGPI '1162 (α1鎖) (51)
FAP	1153'.D(β)GLNGLPGPI'1162 (α1鎖) (52)
FAP	751'.KGADGSPGKD'760 (α1鎖) (53)
FAP	171'STGGISVPGP.'180 (α1鎖) (54)
FAP	167'.YDEKSTGGIS'176 (α1鎖) (55)

コラーゲンIII型

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;( )内に配列番号
FAP	E.AGIPGVPGAK.G (56)
FAP	P.KGDPGPPGIP.G (57)
FAP	G.PQGPKGDPGPP.G (58)
FAP	G.PGMRGMPGSPGGP.G (59)
FAP	D.GPPGPAGNTGAPGSPGVSGPKGD.A (60)
FAP	H.AGAQGPPGPPGINGSPGGKGEMGPAGIP.G (61)
FAP	D.GPRGPTGPIGPPGPAGQPGD.K (62)
MMP9	D.GPPGPAGNTGAPGSPGVSGPKGD.A (63)
MMP9	P.GSPGPAGQQGAIGSPGPAGPRGP.V (64)
MMP9	G.ERGRPGLP.G (65)
MMP9	G.KGDRGENGSPG.A (66)
MMP9	E.PGKNGAKGEPGP.R (67)
MMP9	S.PGERGETGPPGP.A (68)
MMP9	P.GGPGADGVPGKDGP.R (69)
MMP9	G.PPGKDGTSGHPGP.I (70)
MMP9	R.GLPGPPGIKGPAGIPG.F (71)
MMP9	L.PGENGAPGPMGPRGAPGE.R (72)
MMP9	G.APGAPGGKGDAGAPGERGPP.G (73)
MMP9	A.PGLKGENGLPGENGAPGPMGPRGAPG.E (74)
MMP9	G.IAGITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQ.G (75)
MMP9	G.SPGAKGEVGPAGSPGSNGAPGQRGEPGP.Q (76)
MMP9	G.LKGENGLPGENGAPGPMGPRGAPGERGRPGLPGAA.G (77)
MMP9+FAP	D.GPPGPAGNTGAPGSPGVSGPKGD.A (78)
ADAMTS-4	267'.GFDGRNGEKG'276 (79)
FAP	533'.PGMRGMPGSP'542 (α1鎖) (80)
不明	642'.GLPGTGGPPG'651 (81)
不明	652'ENGKPGEPGP.'661 (82)
不明	861'.GERGSPGGPG'870 (83)
不明	899'PGKDGPPGPA.'908 (α1鎖) (84)
MMP9, ADAMTS-4	442'.GLPGTGGPPG'451 (85)

【表８Ｃ】

コラーゲンIV型

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;( )内に配列番号
MMP9	333'.IVIGTGPLGE'342 (α1鎖) (86)
MMP9	328'PGPPGIVIGT.'337 (α1鎖) (87)

コラーゲンV型

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;( )内に配列番号
MMP2	920'ERGPRGITGK.'929 (α1鎖) (88)
MMP2/9	1584'.RRNIDASQLL'1593 (α1鎖) (89)
MMP2/9	229'.QQGGAGPTGP'238 (α2鎖) (90)
MMP2/9	355'.QRGAHGMPGK'364 (α2鎖) (91)
MMP9	525'.RVGKMGRPGA'534 (α3鎖) (92)
MMP2/9	1317'.HMGREGREGE'1326 (α3鎖) (93)

コラーゲンVI型

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP8	873'.RIAVAQYSDD `883 (94)
MMP8	1192'.QLGTVQQVIS `1202 (95)
MMP12	1231'.RDVVFLIDGS `1241 (96)

アポE

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;( )内に配列番号
MMP9	81'.LMDETM '86 (97)
Cat K	246' RLDEVK. '251 (98)
MMP9	101 'TPVAEE. '106 (99)
Cat K	126'.MEEMGS '131 (100)

ビグリカン

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;( )内に配列番号
MMP3	219'.KLTGIPKDLP '228 (101)
MMP3	226' DLPETLNELH. '235 (102)
MMP12	220' LTGIPKDLPE. '229 (103)
MMP13	329' .RAYYNGISLF '338 (104)
MMP13	334' GISLFNNPVP. '343 (105)
MMP12	87` .EISPDTTLLD '96 (106)
MMP12	97' LQNNDISELR. '106 (107)
MMP9	188` .IEMGGNPLENS '198 (108)
MMP9	200` FEPGAFDGLK. '209 (109)
MMP9	148` .NHLVEIPPNL '157 (110)
MMP9	151` VEIPPNLPSS. '160 (111)
MMP9	232` .NELHLDHNK' 240 (112)
MMP9	344` .YWEVQPATFR' 353 (113)
MMP9, MMP12	241` .IQAIELEDLL' 250 (114)

デコリン

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;( )内に配列番号
ADAM-TS4	75' .VPKDLPPDTT '84 (115)

【表８Ｄ】

バーシカン

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;( )内に配列番号
カテプシンＫ	3247′ .YENWRPNQPD ′3256 (116)
カテプシンＫ	3255′ PDSFFSAGED. ′3264 (117)
カテプシンＫ	3221′ .HDYQWIGLN ′3229 (118)
MMP8	3306′ .KTFGKMKPRY ′3316 (119)
MMP8	486′ .SVTQIEQIEV ′495 (120)
MMP8	491′ EQIEVGPLVT. ′500 (121)

CRP

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;( )内に配列番号
シグナルペプチド	013′ LSHAFG. ′018 (122)
MMP3/8/9, Cat S/K	011′ TSLSHA. ′016 (123)

エラスチン

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;( )内に配列番号
シグナルペプチド	21′ LHPSRP. ′26 (124)
ADAMTS1/4/8 MMP8/9	379′ KAAKYG. ′384 (125)
MMP9/12	547′ GIGPGG. ′552 (126)

ルミカン

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;( )内に配列番号
MMP9	75‵ NNQIDHIDEK. ′84 (127)

LAMC1

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;( )内に配列番号
MMP2/9	664' SAGYLDDVTL.'673 (128)
MMP9	1232' LNRKYEQAKN.'1241 (129)

LAMA2

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;( )内に配列番号
MMP2	1240' .QFEGKKLMAY '1249 (130)
MMP2/9	2314' .GLWNFREKEG '2323 (131)

LAMB1

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;( )内に配列番号
MMP9	209' ALDPAFKIED. '218 (132)
MMP2/9	1629' .SIESETAASE '1638 (133)
MMP2/9	1639' ETLFNASQRI. '1648 (134)

LAMA5

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位;( )内に配列番号
MMP9	2402' .NSRNQERLEE '2411 (135)
MMP2/9	2901' EMDTLNEEVV. '2910 (136)
MMP9	3056' DLELADAYYL. '3065 (137)

【００５６】

本明細書を通してのアミノ酸配列において、Ｐはヒドロキシプロリンを示し、Ｍは酸化メチオニンを示し、Ｋはヒドロキシリジンを示す。

【００５７】

本発明は、患者生体液試料に天然で存在するネオエピトープ含有タンパク質断片を測定するためのイムノアッセイを行うステップを含むバイオアッセイの方法であって、前記イムノアッセイが、前記試料に天然で存在するタンパク質断片を、プロテイナーゼによるタンパク質の切断によって形成されるネオエピトープと反応性の免疫学的結合パートナーと接触させるステップと、前記試料における前記ネオエピトープを含むタンパク質断片を測定するためにペプチド断片の前記免疫学的結合パートナーへの結合の程度を測定するステップとを含む方法により行われ、前記タンパク質がアポＥまたはラミニンである、方法を含む。これらのタンパク質は、好ましくはヒトであり、試料は、好ましくはヒトであるが、試料および／またはタンパク質は、特に齧歯類、例えば、マウスもしくはラットを含む哺乳類であってもよく、またはイヌ、もしくはサルを含む霊長類であってもよい。

【００５８】

上記方法は、正常レベルより上への前記患者における前記測定値の上昇を、線維症または炎症性疾患の存在と関連づけることを含んでもよい。

【００５９】

任意選択的に、本発明によるイムノアッセイにおける上昇した結果は、皮膚線維症、肺線維症、もしくは肝線維症、または心血管疾患と関連づけられる。任意選択的に、本発明によるイムノアッセイにおける上昇した結果は、強直性脊椎炎などの炎症状態と関連づけられてもよい。方法は、患者生体液試料を得る予備ステップを含んでもよい。

【００６０】

前記免疫学的結合パートナーは、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断片に対する特異的結合親和性を有してもよい。

【００６１】

ネオエピトープに対する特異的な反応性または免疫学的親和性は、関連した免疫学的結合パートナーが、ネオエピトープが由来する未切断のタンパク質とは反応しないことを意味する。好ましくは、前記免疫学的結合パートナーは、下記に列挙される配列などのネオエピトープ配列に対して、その配列がそれぞれの切断部位をまたいで伸びている場合には、反応しない。これは、測定されるペプチドが、指定された配列で終結していることを意味する。

【００６２】

本明細書で用いられる場合、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、ならびにまた、ＦａｂまたはＦ（ａｂ’）$_2$などの抗体の特異的結合性断片を含む。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もよい。

【００６３】

好ましくは、免疫学的結合パートナーが結合するネオエピトープ配列は、いかなる他のタンパク質に見出されず、または本発明の方法が関係する他のタンパク質のいずれにおいても見出されない。

【００６４】

いくつかの候補プロテアーゼが線維性組織内でのタンパク質の消化に関与し得る。おそらく、これは、疾患のレベルに依存した異なるネオエピトーププロファイルを生じる、広い範囲の複雑な過程の結果である。

【００６５】

＜コラーゲンアッセイ＞

＜コラーゲンＩ型＞

本発明者らは、以下の表に列挙される酵素が、Ｉ型コラーゲンを少なくとも以下の切断部位（「．」でマーク）で切断することを決定している。

【表９Ａ】

表９．コラーゲンＩ型切断部位

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位	配列番号( )
FAP	Q.GAPGLQGMPG.E	(1)
FAP	D.RGEPGPPGPAGFAGPPGAD.G	(2)
FAP	D.GVRGLTGPIGPPGPAGAPGD.K	(3)
FAP	A.GLPGAKGLTGSPGSPGPDGK.T	(4)
FAP	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F	(5)
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGD.A	(6)
FAP	S.PGKDGVRGLTGPIGPPGPAGAP.G	(7)
FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	P.GPPGPPGPPGLGGNFAPQLSY.G	
FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S	
FAP	F.PGARGPSGPQGPGGPPGPKGNSG.E	
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAGFD.F	
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F	
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F	
FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQLSYGYDEKSTGGISVPGPMGP.S	
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAGFD.F	
MMP9+FAP	D.RGEPGPPGPAGFAGPPGAD.G	
MMP9+FAP	D.GVRGLTGPIGPPGPAGAPGD.K	
MMP9+FAP	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F	
MMP9+FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGD.A	
MMP9+FAP	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAGF.D	
MMP9+FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGLGGNFAPQLSY.G	
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S	
MMP9+FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
MMP9+FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S	
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGPPSAGFDFSFLPQPPQEKAHDGGRYYR.A	
MMP9+FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAGFD.F	
MMP9	G.AAGPPGP.T	
MMP9	P.VGPVGARGP.A	
MMP9	P.AGPVGPVGARGP.A	
MMP9	P.RGLPGPPGAPGP.Q	
MMP9	G.EAGRPGEAGLPG.A	
MMP9	Q.DGRPGPPGPPGA.R	
MMP9	K.DGLNGLPGPIGPPGP.R	
MMP9	G.AKGEPGPVGVQGPPGP.A	
MMP9	P.AGARGNDGATGAAGPPGP.T	
MMP9	P.VGPPGPPGPPGPPGPPSAGF.D	
MMP9	A.GAPGKDGLNGLPGPIGPPGP.R	
MMP9	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F	
MMP9	S.AGAPGKDGLNGLPGPIGPPGP.R	
MMP9	G.PPGPPGPPGLGGNFAPQLSYG.Y	
MMP9	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S	

【表９Ｂ】

MMP9	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
MMP9	G.ERGPPGPMGPPGLAGPPGESGREGAPGAEGSPG.R	
FAP	P.IGNVGAPGAK (α1 鎖)	
FAP	P.AGKEGPVGLP (α2 鎖)	
FAP	P.IGSAGPPGFP (α2 鎖)	
FAP	853′.IGNVGAPGAK ′862 (α2 鎖)	
FAP	462′.AGKEGPVGLP′471 (α2 鎖)	
FAP	249′.IGSAGPPGFP ′258 (α2 鎖)	
FAP	1153′.DGLNGLPGPI′1162 (α1 鎖)	
FAP	1153′.D(β)GLNGLPGPI′1162 (α1 鎖)	
FAP	751′.KGADGSPGKD′760 (α1 鎖)	
FAP	171′STGGISVPGP.′180 (α1 鎖)	
FAP	167′.YDEKSTGGIS′176 (α1 鎖)	
FAP	Q.GAPGLQGMPG.E	
FAP	D.RGEPGPPGPAGFAGPPGAD.G	
FAP	D.GVRGLTGPIGPPGPAGAPGD.K	
FAP	A.GLPGAKGLTGSPGSPGPDGK.T	
FAP	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F	
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGD.A	
FAP	S.PGKDGVRGLTGPIGPPGPAGAP.G	
FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	P.GPPGPPGPPGLGGNFAPQLSY.G	
FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S	
FAP	F.PGARGPSGPQGPGGPPGPKGNSG.E	
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
FAP	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAGFD.F	
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F	
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F	
FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQLSYGYDEKSTGGISVPGPMGP.S	
FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAGFD.F	
MMP9+FAP	D.RGEPGPPGPAGFAGPPGAD.G	
MMP9+FAP	D.GVRGLTGPIGPPGPAGAPGD.K	
MMP9+FAP	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F	
MMP9+FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGD.A	
MMP9+FAP	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAGF.D	
MMP9+FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGLGGNFAPQLSY.G	
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S	
MMP9+FAP	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
MMP9+FAP	L.PGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S	
MMP9+FAP	P.GPPGPPGPPGPPSAGFDFSFLPQPPQEKAHDGGRYYR.A	
MMP9+FAP	D.GLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAGFD.F	
MMP9	G.AAGPPGP.T	
MMP9	P.VGPVGARGP.A	
MMP9	P.AGPVGPVGARGP.A	

【表９Ｃ】

MMP9	P.RGLPGPPGAPGP.Q	
MMP9	G.EAGRPGEAGLPG.A	
MMP9	Q.DGRPGPPGPPGA.R	
MMP9	K.DGLNGLPGPIGPPGP.R	
MMP9	G.AKGEPGPVGVQGPPGP.A	
MMP9	P.AGARGNDGATGAAGPPGP.T	
MMP9	P.VGPPGPPGPPGPPGPPSAGF.D	
MMP9	A.GAPGKDGLNGLPGPIGPPGP.R	
MMP9	D.AGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAG.F	
MMP9	S.AGAPGKDGLNGLPGPIGPPGP.R	
MMP9	G.PPGPPGPPGLGGNFAPQLSYG.Y	
MMP9	P.GPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL.S	
MMP9	G.LPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQ.L	
MMP9	G.ERGPPGPMGPPGLAGPPGESGREGAPGAEGSPG.R	
FAP	P.IGNVGAPGAK　(α1 鎖)	
FAP	P.AGKEGPVGLP　(α2 鎖)	
FAP	P.IGSAGPPGFP　(α2 鎖)	

【００６６】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのＮ末端における以下の配列のいずれかと特異的に反応し得る。

【表１０】

表10．コラーゲンＩ型のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片のＮ末端配列(印「.」は切断部位を示す)

「.」でマークされた切断部位/配列番号( )
.AAGPPG (138)
.AGPVGP (139)
.DGRPGP (140)
.EAGRPG (141)
.GAPGLQ (142)
.GLNGLP (143)
.GLNGLP (144)
.GLPGAK (145)
.GPPGPP (146)
.GPPGPP (147)
.GVRGLT (148)
.LPGPPG (149)
.LPGPPG (150)
.PGARGP (151)
.PGKDGV (152)
.PGPPGP (153)
.PGPPGP (154)
.PGPPGP (155)
.RGEPGP (156)
.RGLPGP (157)
.VGPVGA (158)
.DGLNGL (159)
.AKGEPG (160)
.AGARGN (161)
.VGPPGP (162)
.GAPGKD (163)
.IGSAGP (164)
.AGAPGK (165)
.PPGPPG (166)
.GPPGPP (167)
.YDEKST (168)
.ERGPPG (169)
.IGNVGA (170)
.AGKEGP (171)
.KGADGS (172)
.D(β)GLNGLP(173)

【００６７】

あるいは、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのＣ末端における以下の配列のいずれかと特異的に反応し得る。

【表１１】

表11．コラーゲンｉ型のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片のｃ末端配列(印「.」は切断部位を示す)

「.」でマークされた切断部位/配列番号( )
AEGSPG. (174)
AGAPGD. (175)
AGPPGP. (176)
AGPPGP. (177)
APQLSY. (178)
APQLSY. (179)
EAGLPG. (180)
GGRYYR. (181)
GNFAPQ. (182)
GNFAPQ. (183)
GPAGAP. (184)
GPPGAD. (185)
GPPSAG. (186)
IGPPGP. (187)
IGPPGP. (188)
IGPPGP. (189)
ISVPGP. (190)
LQGMPG. (191)
NFAPQL. (192)
PGAPGP. (193)
PGPDGK. (194)
PGPMGP. (195)
PGPPGA. (196)
PKGNSG. (197)
PPSAGF. (198)
PQLSYG. (199)
PSAGFD. (200)
QGPPGP. (201)
RGRTGD. (202)
VGARGP. (203)

【００６８】

＜コラーゲンＩＩＩ型＞

本発明者らは、以下の表に列挙される酵素が、ＩＩＩ型コラーゲンを少なくとも以下の切断部位（＊でマーク）で切断することを決定している。

【表１２】

表12．コラーゲンIII型における切断部位

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
FAP	E.AGIPGVPGAK.G
FAP	P.KGDPGPPGIP.G
FAP	G.PQGPKGDPGPP.G
FAP	G.PGMRGMPGSPGGP.G
FAP	D.GPPGPAGNTGAPGSPGVSGPKGD.A
FAP	H.AGAQGPPGPPGINGSPGGKGEMGPAGIP.G
FAP	D.GPRGPTGPIGPPGPAGQPGD.K
MMP9	D.GPPGPAGNTGAPGSPGVSGPKGD.A
MMP9	P.GSPGPAGQQGAIGSPGPAGPRGP.V
MMP9	G.ERGRPGLP.G
MMP9	G.KGDRGENGSPG.A
MMP9	E.PGKNGAKGEPGP.R
MMP9	S.PGERGETGPPGP.A
MMP9	P.GGPGADGVPGKDGP.R
MMP9	G.PPGKDGTSGHPGP.I
MMP9	R.GLPGPPGIKGPAGIPG.F
MMP9	L.PGENGAPGPMGPRGAPGE.R
MMP9	G.APGAPGGKGDAGAPGERGPP.G
MMP9	A.PGLKGENGLPGENGAPGPMGPRGAPG.E
MMP9	G.IAGITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQ.G
MMP9	G.SPGAKGEVGPAGSPGSNGAPGQRGEPGP.Q
MMP9	G.LKGENGLPGENGAPGPMGPRGAPGERGRPGLPGAA.G
MMP9+FAP	D.GPPGPAGNTGAPGSPGVSGPKGD.A
ADAMTS-4	267‘.GFDGRNGEKG’276
FAP	533’.PGMRGMPGSP’542　(α1鎖)
不明	642’.GLPGTGGPPG’651
不明	652’ENGKPGEPGP.’661
不明	861’.GERGSPGGPG’870
	697' GAGPPGPEGG'706　(α1鎖)
	804' GPPGPAGFPG’813　(α1鎖)
	899'PGKDGPPGPA.'908　(α1鎖)
	1008'GEPGRDGNPG'1017　(α1鎖)
MMP9, ADAMTS-4	442’.GLPGTGGPPG’451

【００６９】

免疫学的結合パートナーは、ＩＩＩ型コラーゲンの切断により形成されたＣ末端またはＮ末端ネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【００７０】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのＮ末端における以下の配列：

【表１３】

表13．コラーゲンIII型のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片のN末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号（）
.AGAQGP (204)
.AGIPGV (205)
.APGAPG (206)
.ERGRPG (207)
.GERGSP (208)
.GFDGRN (209)
.GGPGAD (210)
.GLPGPP (211)
.GLPGTG (212)
.GPPGPA (213)
.GPRGPT (214)
.GSPGPA (215)
.IAGITG (216)
.KGDPGP (217)
.KGDRGE (218)
.LKGENG (219)
.PGENGA (220)
.PGERGE (221)
.PGKNGA (222)
.PGLKGE (223)
.PGMRGM (224)
.PPGKDG (225)
.PQGPKG (226)
.SPGAKG (227)

のいずれか、またはペプチドのＣ末端における以下の配列：

【表１４】

表14．コラーゲンIII型のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片のC末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号（）
AGQPGD. (228)
ENGSPG. (229)
GDPGPP. (230)
GERGPP. (231)
GLPGAA. (232)
GPAGIP. (233)
GPPGIP. (234)
GPPGPA. (235)
GRPGLP. (236)
GSPGGP. (237)
GSPGPQ. (238)
GVPGAK. (239)
KGEPGP. (240)
PAGIPG. (241)
AGPRGP. (242)
PGEPGP. (243)
PGKDGP. (244)
PRGAPG. (245)
RGAPGE. (246)
RGEPGP. (247)
SGHPGP. (248)
SGPKGD. (249)
TGPPGP. (250)

のいずれかと特異的に反応し得る。

【００７１】

＜コラーゲンＩＶ＞

本発明者らは、以下の表に列挙される酵素が、ＩＶ型コラーゲンを少なくとも以下の切断部位（「．」でマーク）で切断することを決定している。

【表１５】

表15．コラーゲンIV型の切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP9	333′.IVIGTGPLGE′342 （α1鎖）
MMP9	328′PGPPGIVIGT.′337 （α1鎖）

【００７２】

免疫学的結合パートナーは、ＩＶ型コラーゲンの切断により形成されたＣ末端またはＮ末端ネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【００７３】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのＮ末端における以下の配列：

【表１６】

表16．コラーゲンIV型のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片のN末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号（ ）
.IVIGTG （251）

またはペプチドのＣ末端における以下の配列：

【表１７】

表17．コラーゲンIV型のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片のC末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号（ ）
GIVIGT. （252）

と特異的に反応し得る。

【００７４】

＜コラーゲンＶ＞

本発明者らは、以下の表に列挙される酵素が、Ｖ型コラーゲンを少なくとも以下の切断部位（「．」でマーク、または「．」がない場合は配列の末端で）で切断することを決定している。

【表１８】

表18．コラーゲンV型の切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP2	920′ERGPRGITGK.′929 （α1鎖）
MMP2/9	1584′.RRNIDASQLL′1593 （α1鎖）
MMP2/9	229′.QQGGAGPTGP′238 （α2鎖）
MMP2/9	355′.QRGAHGMPGK′364 （α2鎖）
MMP9	525′.RVGKMGRPGA′534 （α3鎖）
MMP2/9	1317′.HMGREGREGE′1326 （α3鎖）

【００７５】

免疫学的結合パートナーは、Ｖ型コラーゲンの切断により形成されたＣ末端またはＮ末端ネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【００７６】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのＮ末端における以下の配列：

【表１９】

表19．コラーゲンＶ型のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片のＮ末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号（）
.RRNIDA (253)
.QQGGAG (254)
.QRGAHG (255)
.RVGKMG (256)
.HMGREG (257)

のいずれか、またはペプチドのＣ末端における以下の配列：

【表２０】

表20．コラーゲンＶ型のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片のＣ末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号（）
RGITGK. (258)

と特異的に反応し得る。

【００７７】

＜コラーゲンＶＩ＞

本発明者らは、以下の表に列挙される酵素が、ＶＩ型コラーゲンを少なくとも以下の切断部位（「．」でマーク、または「．」がない場合は配列の末端で）で切断することを決定している。

【表２１】

表21．コラーゲンVI型の切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP8	873′. RIAVAQYSDD 883′
MMP8	1192′. QLGTVQQVIS 1202′
MMP12	1231′.RDVVFLIDGS 1241′

【００７８】

免疫学的結合パートナーは、ＶＩ型コラーゲンの切断により形成されたＮ末端ネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【００７９】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのＮ末端における以下の配列のいずれかと特異的に反応し得る。

【表２２】

表22．コラーゲンVI型のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片のＮ末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号（）
.RIAVAQ (259)
.QLGTVQ (260)
.RDVVFL (261)

【００８０】

＜プロテオグリカン＞

本発明の別の態様において、前記ペプチド断片は、プロテオグリカンのバーシカン、ルミカン、ビグリカン、およびデコリンの断片であり、それらは全て、線維性組織内に同定されている。

【００８１】

いくつかの候補プロテアーゼが線維性病変におけるプロテオグリカンの消化に関与し得る。本発明者らは、表２３に列挙される酵素が、ビグリカン断片を生成し、少なくとも以下の切断産物を生じることを決定している。

【００８２】

＜ビグリカン＞

【表２３】

表23．ビグリカンの切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP3	219’.KLTGIPKDLP’228
MMP3	226’DLPETLNELH.’235
MMP12	220’LTGIPKDLPE.’229
MMP13	329’.RAYYNGISLF’338
MMP13	334’GISLFNNPVP.’343
MMP12	87‘.EISPDTTLLD’96
MMP12	97‘LQNNDISELR.’106
MMP9	188‘.IEMGGNPLENS’198
MMP9	200‘FEPGAFDGLK.’209
MMP9	148‘.NHLVEIPPNL’157
MMP9	151‘VEIPPNLPSS.’160
MMP9	232‘.NELHLDHNK’240
MMP9	344‘.YWEVQPATFR’353
MMP9, MMP12	241‘.IQAIELEDLL’250

【００８３】

免疫学的結合パートナーは、ビグリカンの切断により形成されたＣ末端またはＮ末端のネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【００８４】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのＮ末端における以下のいずれか：

【表２４】

表24．ビグリカンのプロテアーゼにより生成されたペプチド断片のＮ末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号（）
.KLTGIP (262)
.RAYYNG (263)
.EISPDT (264)
.IEMGGN (265)
.NHLVEI (266)
.NELHLD (267)
.YWEVQP (268)
.IQAIEL (269)

またはペプチドのＣ末端における表２５における以下の配列：

【表２５】

表25．ビグリカンのプロテアーゼにより生成されたペプチド断片のＣ末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号（）
TLNELH. (270)
PKDLPE. (271)
FNNPVP. (272)
DISELR. (273)
AFDGLK. (274)
PNLPSS. (275)

と特異的に反応し得る。

【００８５】

＜デコリン＞

【表２６】

表 26．デコリンの切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
ADAM-TS4	75′.VPKDLPPDTT′84

【００８６】

免疫学的結合パートナーは、デコリンの切断により形成されたＮ末端ネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【００８７】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのＮ末端における以下と特異的に反応し得る。

【表２７】

表 27．デコリンのプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の N 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号（ ）
.VPKDLP　(276)

【００８８】

バーシカン

【表２８】

表 28．バーシカンの切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
カテプシン K	3247′.YENWRPNQPD′3256
カテプシン K	3255′PDSFFSAGED.′3264
カテプシン K	3221′.HDYQWIGLN′3229
MMP8	3306′.KTFGKMKPRY′3316
MMP8	486′.SVTQIEQIEV′495
MMP8	491′EQIEVGPLVT.′500

【００８９】

免疫学的結合パートナーは、バーシカンの切断により形成されたＣ末端またはＮ末端のネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【００９０】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのＮ末端における以下：

【表２９】

表 29．バーシカンのプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の N 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号（ ）
.YENWRP　(277)
.HDYQWI　(278)
.KTFGKM　(279)
.SVTQIE　(304)

のいずれか、またはペプチドのＣ末端における表３０における以下の配列：

【表３０】

表 30．バーシカンのプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の C 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号（ ）
FSAGED.　(280)
VGPLVT.　(281)

のいずれかと特異的に反応し得る。

【００９１】

＜ルミカン＞

【表３１】

表 31．ルミカンの切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP9	75‘NNQIDHIDEK.’84

【００９２】

免疫学的結合パートナーは、ルミカンの切断により形成されたＮ末端ネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【００９３】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのＣ末端における以下の配列と特異的に反応し得る。

【表３２】

表 32．ルミカンのプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の c 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号（）
DHIDEK.　(282)

【００９４】

＜ＣＲＰ＞

いくつかの候補プロテアーゼが線維性組織内のＣＲＰの消化に関与し得る。文献は、線維性組織内の多くの異なるプロテアーゼを報告している。おそらく、これは、最終的に、線維症をもたらす広い範囲の複雑な過程の結果である。しかしながら、本発明者らの評価において、初期相は、一連のＭＭＰからなり得るが、後期は、マトリックスのカテプシンＫ分解により多く頼る可能性があり、その結果として、疾患のレベルに依存する異なるネオエピトーププロファイルを生じる。本発明者らは、純粋な天然のタンパク質の一連のインビトロ切断を通して、以下の表に列挙された酵素が、表３３において「．」でマークされた少なくとも以下の切断部位でＣＲＰを切断したことを決定している。

【表３３】

表 33．特異的なプロテアーゼにより生成された CRP 断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
不明	013’LSHAFG.’018
MMP3/8/9, Cat S/K	011’TSLSHA.’016

【００９５】

したがって、本発明の方法において、前記ペプチド断片は、好ましくは、表３３のＣＲＰの上記の部分的配列のいずれか１つにおける、印「．」によってマークされた部位でのプロテアーゼによるＣＲＰの切断により形成されるネオエピトープを含む。

【００９６】

免疫学的結合パートナーは、ＣＲＰの切断により形成されたＮ末端ネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【００９７】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのＣ末端における以下の配列のいずれかと特異的に反応し得る。

【表３４】

表 34．CRP のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の c 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号（）
LSHAFG.　(283)
TSLSHA.　(284)

【００９８】

＜エラスチン＞

いくつかの候補プロテアーゼが線維性組織内のエラスチンの消化に関与し得る。本発明者らは、純粋な天然のタンパク質の一連のインビトロ切断を通して、以下の表に列挙された酵素が、少なくとも、以下の配列の各末端における切断部位で、または「．」でマークされた切断部位でエラスチンを切断したことを決定している。

【表３５】

表35．特異的なプロテアーゼにより生成されたエラスチン断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
シグナルペプチド	21′LHPSRP.′26
ADAMTS1/4/8 MMP8/9	379′KAAKYG.′384
MMP9/12	547′GIGPGG.′552

＊アミノ酸残基番号は、ヒトエラスチン配列からである。

【００９９】

したがって、本発明の方法において、前記ペプチド断片は、好ましくは、表３５のエラスチンの部分的配列のいずれか１つにおいて、Ｃ末端部位でのプロテアーゼによるエラスチンの切断により形成されるネオエピトープを含む。

【０１００】

免疫学的結合パートナーは、エラスチンの切断により形成されたＣ末端ネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【０１０１】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのＣ末端における以下の配列のいずれかと特異的に反応し得る。

【表３６】

表36．エラスチンのプロテアーゼにより生成されたペプチド断片のｃ末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号（）
LHPSRP.　(285)
KAAKYG.　(286)
GIGPGG.　(126)

【０１０２】

＜アポＥ＞

いくつかの候補プロテアーゼが線維性組織内のアポＥの消化に関与し得る。本発明者らは、純粋な天然のタンパク質の一連のインビトロ切断を通して、以下の表に列挙された酵素が、少なくとも、以下の配列の各末端における切断部位で、または「．」でマークされた切断部位でアポＥを切断したことを決定している。

【表３７】

表37．アポｅの切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP9	81′.LMDETM′86
Cat K	246′RLDEVK.′251
MMP9	101′TPVAEE.′106
Cat K	126′.MEEMGS′131

【０１０３】

したがって、本発明の方法において、前記ペプチド断片は、好ましくは、表３７のアポＥの部分的配列のいずれか１つにおける、Ｎ末端もしくはＣ末端部位での、または表示されている場合、印「．」によってマークされた部位でのプロテアーゼによるアポＥの切断により形成されるネオエピトープを含む。

【０１０４】

免疫学的結合パートナーは、アポＥの切断により形成されたＣ末端またはＮ末端のネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【０１０５】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのＮ末端における以下の配列：

【表３８】

表 38．アポ E のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の N 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号( )
.LMDETM (288)
.MEEMGS (289)

のいずれか、またはペプチドのＣ末端における以下の配列：

【表３９】

表 39．アポ E のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の C 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号( )
RLDEVK. (290)
TPVAEE. (291)

のいずれかと特異的に反応し得る。

【０１０６】

＜ＬＡＭＣ１＞

いくつかの候補プロテアーゼが線維性組織内のＬＡＭＣ１の消化に関与し得る。本発明者らは、純粋な天然のタンパク質の一連のインビトロ切断を通して、酵素が、少なくとも、以下の配列の各末端における切断部位で、または「．」でマークされた切断部位でＬＡＭＣ１を切断することを決定している。

【表４０】

表 40．LAMC1 の切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP2/9	664' SAGYLDDVTL.'673
MMP9	1232'LNRKYEQAKN.'1241

【０１０７】

したがって、本発明の方法において、前記ペプチド断片は、好ましくは、表４０のＬＡＭＣ１の部分的配列のいずれか１つにおける、Ｃ末端部位でのプロテアーゼによるＬＡＭＣ１の切断により形成されるネオエピトープを含む。

【０１０８】

免疫学的結合パートナーは、ＬＡＭＣ１の切断により形成されたＣ末端またはＮ末端のネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【０１０９】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのＣ末端における以下の配列のいずれかと特異的に反応し得る。

【表４１】

表 41．LAMC1 のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の C 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号( )
LDDVTL. (292)
YEQAKN. (293)

【０１１０】

＜ＬＡＭＡ２＞

いくつかの候補プロテアーゼが線維性組織内のＬＡＭＡ２の消化に関与し得る。本発明者らは、純粋な天然のタンパク質の一連のインビトロ切断を通して、酵素が、少なくとも

、以下の配列の各末端における切断部位で、または「．」でマークされた切断部位でＬＡＭＡ２を切断することを決定している。

【表４２】

表 42．LAMA2 の切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP2	1240'.QFEGKKLMAY'1249
MMP2/9	2314'.GLWNFREKEG'2323

【０１１１】

したがって、本発明の方法において、前記ペプチド断片は、好ましくは、表４２のＬＡＭＡ２の部分的配列のいずれか１つにおける、Ｎ末端部位でのプロテアーゼによるＬＡＭＡ２の切断により形成されるネオエピトープを含む。

【０１１２】

免疫学的結合パートナーは、ＬＡＭＡ２の切断により形成されたＣ末端またはＮ末端のネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【０１１３】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのＮ末端における以下の配列のいずれかと特異的に反応し得る。

【表４３】

表 43．LAMA2 のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の N 末端配列

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位/配列番号( )
MMP2	.QFEGKK　(294)
MMP2/9	.GLWNFR　(295)

【０１１４】

＜ＬＡＭＢ１＞

いくつかの候補プロテアーゼが線維性組織内のＬＡＭＢ１の消化に関与し得る。本発明者らは、純粋な天然のタンパク質の一連のインビトロ切断を通して、酵素が、少なくとも、以下の配列の各末端における切断部位で、または「．」でマークされた切断部位でＬＡＭＢ１を切断することを決定している。

【表４４】

表 44．LAMB1 の切断断片

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP9	209'ALDPAFKIED.'218
MMP2/9	1629'.SIESETAASE'1638
MMP2/9	1639'ETLFNASQRI.'1648

【０１１５】

したがって、本発明の方法において、前記ペプチド断片は、好ましくは、表４４のＬＡＭＢ１の部分的配列のいずれか１つにおける、Ｎ末端またはＣ末端部位でのプロテアーゼによるＬＡＭＢ１の切断により形成されるネオエピトープを含む。

【０１１６】

免疫学的結合パートナーは、ＬＡＭＢ１の切断により形成されたＣ末端またはＮ末端のネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【０１１７】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのＮ末端における以下の配列：

【表４５】

表 45．LAMB1 のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の N 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号( )
.SIESET　(296)

またはペプチドのＣ末端における以下の配列：

【表４６】

表 46．LAMB1 のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の C 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号( )
AFKIED.　(297)
NASQRI.　(298)

のいずれかと特異的に反応し得る。

【０１１８】

ＬＡＭＡ５

いくつかの候補プロテアーゼが線維性組織内のＬＡＭＡ５の消化に関与し得る。本発明者らは、純粋な天然のタンパク質の一連のインビトロ切断を通して、酵素が、少なくとも、以下の配列の各末端における切断部位で、または「．」でマークされた切断部位でＬＡＭＡ５を切断することを決定している。

【表４７】

表 47．LAMA5 の切断部位

プロテアーゼ	「.」でマークされた切断部位
MMP9	2402'.NSRNQERLEE'2411
MMP2/9	2901'EMDTLNEEVV.'2910
MMP9	3056'DLELADAYYL.'3065

【０１１９】

したがって、本発明の方法において、前記ペプチド断片は、好ましくは、表２４のＬＡＭＡ５の部分的配列のいずれか１つにおける、Ｎ末端もしくはＣ末端部位で、または表示されている場合、印「．」によってマークされた部位でのプロテアーゼによるＬＡＭＡ５の切断により形成されるネオエピトープを含む。

【０１２０】

免疫学的結合パートナーは、ＬＡＭＡ５の切断により形成されたＣ末端またはＮ末端のネオエピトープと特異的に反応するものであり得る。

【０１２１】

したがって、適切な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのＮ末端における以下の配列：

【表４８】

表 48．LAMA5 のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の N 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号( )
.NSRNQE　(299)

またはペプチドのＣ末端における以下の配列：

【表４９】

表 49．LAMA5 のプロテアーゼにより生成されたペプチド断片の C 末端配列

「.」でマークされた切断部位/配列番号( )
LNEEVV.　(300)
ADAYYL.　(301)

のいずれかと特異的に反応し得る。

【０１２２】

同様の様式によってアッセイされ得るネオエピトープを定義するさらなる切断部位は、コラーゲン、エラスチン、ＣＲＰ、およびプロテオグリカン、または上記で言及された他の組織タンパク質を、本明細書に記載された酵素のいずれかに曝露し、それにより産生されたペプチドを単離およびシーケンシングすることにより、同定することができる。さらに、アッセイは、例証された切断部位に隣接して生成される、すなわち、上記で示されたＮ末端エピトープへと繋がるＣ末端配列、および記載されたＣ末端エピトープに接続しているＮ末端配列における、ネオエピトープに基づいてもよい。

【０１２３】

上記のペプチドのうちの１つより多くについてのアッセイを、別々に行い、それらの結果を組み合わせてもよく、または上記のペプチドのうちの１つより多くを一緒に測定してもよい。

【０１２４】

本発明によるアッセイの結果を、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て、診断値または予後値の複合指数を形成してもよい。

【０１２５】

一般的に、全ての以前に知られたイムノアッセイの方式は、本発明に従って用いることができ、それらには、不均一および均一型式、サンドイッチアッセイ、競合アッセイ、酵素結合アッセイ、放射免疫アッセイなどが挙げられる。したがって、任意選択的に、前記方法は、前記免疫学的結合パートナーおよび競合作用物質が、前記試料の存在下でインキュベートされ、競合作用物質が、試料中のペプチド断片と、免疫学的結合パートナーに結合することにおいて競合する、競合イムノアッセイとして行われる。

【０１２６】

前記競合作用物質は、（１）コラーゲンＩ型、ＩＩＩ型、ＩＶ型、Ｖ型、もしくはＶＩ型の配列由来、またはＣＲＰ由来、またはプロテオグリカンのバーシカン、ルミカン、デコリン、およびビグリカンペプチドのいずれか、アポＥ、ルミカン、ＬＡＭＣ１、ＬＡＭＢ１、もしくはＬＡＭＡ５由来の合成ペプチド、あるいは（２）前記ネオエピトープを顕わにするプロテアーゼによって切断される上記で名前を挙げられた精製された天然タンパク質由来の競合作用物質であってもよい。

【０１２７】

１つの適切な方法は、上記で名前を挙げられたタンパク質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断片を用いる競合イムノアッセイであり得る。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は、試料と、モノクローナル抗体または結合断片への結合において競合することができる。あるいは、モノクローナル抗体または結合断片によって認識されるネオエピトープを有する精製された天然タンパク質断片は、固体表面上に用いることができる。さらに別の代替法は、固体表面上にモノクローナル抗体または結合断片を固定化し、その後、試料を、シグナル分子、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼまたはビオチンに、適切に連結された合成ペプチドと共に、共インキュベートすることである。

【０１２８】

試料は、血清、血液、もしくは血漿、または他の種類、例えば、線維性組織生検の試料であってもよい。

【０１２９】

アッセイは、前記ネオエピトープと特異的に反応する第１の免疫学的結合パートナーと、ネオエピトープが属する関連タンパク質と反応する第２の免疫学的結合パートナーとを用いるサンドイッチアッセイとして行われてもよい。任意で、前記第２の免疫学的結合パートナーは、同じタンパク質の第２のネオエピトープに向けられる。

【０１３０】

特定の好ましい方法において、上記方法は、前記ペプチド断片の前記結合の決定された

レベルを、（ａ）比較し得る健康な個体および／または（ｂ）病的状態に特有な値と比較するステップと、任意選択的に、測定されたペプチドのより高いレベル（通常には、結合のより高いレベルによって示される）を前記状態のより重篤な度合いと関連づけるステップとをさらに含む。前記状態は、線維性状態であってもよいし、または炎症性状態であってもよい。

【０１３１】

本発明の態様は、上記のような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、名前を挙げられたタンパク質の分子のアミノ酸配列から生じる合成ペプチド（上記で列挙された配列、またはその配列で終結する配列を含む）によりマウスを免疫し、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、関連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り達成することができる。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は）その免疫したペプチドのＣ末端側に延長した形、または（Ｎ末端ネオエピトープについては）その免疫したペプチドのＮ末端側に延長した形のいずれに対する反応性も欠如していることを必要とすることにより保証することができる。ネオエピトープに対する抗体はまた、天然タンパク質に対する結合能力の欠如を確立するように評価され得る。あるいは、ネオエピトープに対する特異性は、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機能性群の存在に非依存性である抗体の反応性を必要とすることにより保証することができる。

【０１３２】

本発明は、上記で提示された部分的配列のいずれか１つにおける末端部位でのプロテアーゼによる関連タンパク質の切断により形成されるネオエピトープと特異的に免疫反応し、例えば、モノクローナル抗体またはその結合断片であってもよい、免疫学的結合パートナーを含む。

【０１３３】

本発明は、上記で提示された部分的配列のいずれか１つにおける末端部位での関連タンパク質の切断により形成されるＣ末端または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。

【０１３４】

本発明はさらに、上記で提示されたこれらのタンパク質の部分的配列のいずれか１つにおける、関連タンパク質の切断により形成されるＣ末端または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を、前記ペプチドに対して免疫応答を生じるためにハプテンとして担体にコンジュゲートしてもよく、またはイムノアッセイに用いるために、固体表面に固定化し、もしくは検出可能なマーカーにコンジュゲートしてもよい。

【０１３５】

本発明はさらに、上記で提示された部分的配列のいずれか１つにおける、関連タンパク質の切断により形成されるＣ末端または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。

【０１３６】

本発明はさらに、発現シグナル、および上記で提示された部分的配列のいずれか１つにおける、関連タンパク質の切断により形成されるＣ末端またはＮ末端のネオエピトープを含むペプチドの発現をコードするコード配列を含む核酸配列を含むベクターを含み、さらに、そのようなベクターで形質転換され、前記ペプチドを発現する宿主細胞を含む。

【０１３７】

本発明のさらに別の態様は、上記の方法を実行するために便利に用いることができるキットに関する。そのようなキットは、（１）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する、本発明のモノクローナル抗体または抗体結合断片、および（３）標識された抗マウスＩｇＧ免疫グロブリンを含んでもよい。あるいは、そのようなキットは、（１）精製された天然のタンパク質断片でコーティ

ングされたマイクロタイタープレート、（２）その関連断片上のネオエピトープを認識し、かつ前記精製タンパク質断片と反応するモノクローナル抗体、および（３）標識された抗マウスＩｇＧ免疫グロブリンを含んでもよい。あるいは、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）ビオチンに連結した合成ペプチド、（３）タンパク質断片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するモノクローナル抗体、および（４）標識された抗マウスＩｇＧ免疫グロブリンを含んでもよい。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）ビオチンに連結した合成ペプチド、（３）関連タンパク質断片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し）、かつ西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートしたモノクローナル抗体を含むキットであり得る。

【０１３８】

したがって、本発明は、本明細書に記載された免疫学的結合パートナー、ならびに前記免疫学的結合パートナーに結合する競合作用物質、ならびに、任意選択的に、洗浄試薬、緩衝剤、停止試薬、酵素標識、酵素標識基質、キャリブレーション標準、抗マウス抗体、および使用説明書のうちの１つまたは複数を含むイムノアッセイキットを含む。

【０１３９】

本明細書に記載されたアッセイは、患者における線維症または炎症状態の診断に有用である。加えて、その検査は、疾患進行の評価、および治療に対する応答のモニタリングに有用である。本発明の免疫学的結合パートナーはまた、開示されたタンパク質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。

【０１４０】

本発明は、以下の実施例および添付の図面を参照して、さらに記載および例証される。

【図面の簡単な説明】

【０１４１】

【図１】パネルＡおよびＢにおいて、本発明によるモノクローナル抗体の特異性を調べた結果を示す図である。

【図２】強直性脊椎炎患者由来のヒト血清においてコラーゲンＶネオエピトープ所有断片の量を調べた結果を示す図である。

【図３】実施例５において得られた標準曲線を示す図である。

【図４】実施例５においてエクスビボ培養物から測定されたペプチド放出を示す図である。

【図５】実施例５において得られたさらなるペプチド測定を示す図である。

【図６】パネル（ａ）～（ｄ）において、実施例５において得られたさらなる測定を示す図である。

【図７】実施例５において得られた血清中のさらなるペプチド測定を示す図である。

【図８】実施例６において測定された血清中のペプチドを示す図である。

【図９】実施例７において記載された抗体特異性の試験を示す図である。

【図１０】実施例７において測定されたペプチドの血漿中レベルを示す図である。

【図１１】実施例７において得られたＲＯＣ曲線を示す図である。

【図１２】実施例８において得られたＥＬＩＳＡ結果を示す図である。

【図１３】実施例８において得られた強直性脊椎炎に関してのペプチド測定を示す図である。

【図１４】実施例９において得られた結果を示す図である。

【実施例１】

【０１４２】

＜酵素切断によるＶ型コラーゲン断片の同定＞

［試薬］

本実験に用いられる全ての試薬は、Ｍｅｒｃｋ（Ｗｈｉｔｅｈｏｕｓｅ　Ｓｔａｔｉｏｎ、ＮＪ、ＵＳＡ）およびＳｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、ＵＳ

A）などの会社からの標準高品質化学物質であった。モノクローナル抗体産生に用いられた合成ペプチドを、Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｂｅｉｊｉｎｇ、Ｃｈｉｎａから購入した。

【０１４３】

インビトロ切断

ヒト胎盤由来の精製されたＶ型コラーゲン（カタログ番号ａｂ７５３７、Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）を、プロＭＭＰ－２またはプロＭＭＰ－９（カタログ番号４４４２１３；４４４２３１；Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、Ｍｅｒｃｋ、Ｗｈｉｔｅｈｏｕｓｅ　Ｓｔａｔｉｏｎ、ＮＪ、ＵＳＡ）で切断した。５０μｇのＭＭＰ－２またはＭＭＰ－９を、ジメチルスルホキシド中で２０μｌの１ｍＭ酢酸４－アミノフェニル水銀で活性化し、３７℃で３時間、インキュベートした。０．５Ｍ酢酸中に溶解したＶ型コラーゲンを加えた。ＭＭＰ切断を促進するために、そのタンパク質を、酢酸を除去するように２日間、透析した。１０ｋＤａ未満のタンパク質を除去するためにその液体を濾過した（Ｍｉｃｒｏｃｏｎ　Ｕｌｔｒａｃｅｌ　ＹＭ－１０、カタログ番号４２４０７、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ、ＵＳＡ）。ＭＭＰ緩衝液（１００ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、１００ｍＭのＮａＣｌ、１０ｍＭの$CaCl_2$、２ｍＭの酢酸Ｚｎ、ｐＨ８．０）中、１００μｇのＶ型コラーゲンと１μｇのＭＭＰ－２またはＭＭＰ－９のいずれかを混合することにより、各ＭＭＰ切断を別々に実施した。対照として、１００μｇのコラーゲンを、ＭＭＰ緩衝液単独と混合した。その溶液を、３７℃で２時間、インキュベートした。切断反応を、１μＭの最終濃度になる５０μＭのエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）を用いて停止した。製造会社の使用説明書に従ってＳｉｌｖｅｒＸｐｒｅｓｓ（登録商標）Ｓｉｌｖｅｒ　Ｓｔａｉｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（カタログ番号ＬＣ６１００、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、Ｃａ、ＵＳＡ）を用いる可視化により、切断を検証した。

【０１４４】

［ペプチド同定］

インビトロで切断された試料中のペプチド断片を、液体クロマトグラフィ（ＬＣ）結合型エレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）タンデム質量分析（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）を用いて同定した。ＬＣ－ＭＳ試料を、１０ｋＤａより上のタンパク質を除去するために限外濾過を行い、ｐＨを、ギ酸を用いて２．０に調整し、４μＬの試料をＬＣ－ＭＳ／ＭＳによって分析した。ＬＣを、ｎａｎｏＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣ　ＢＥＨ　C_{18}カラム（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ、ＵＳＡ）でギ酸／アセトニトリル勾配を用いて実施した。ＭＳおよびＭＳ／ＭＳを、Ｓｙｎａｐｔ高分解能質量分析四重極飛行時間型ＭＳ（ＱＵＡＤ－ＴＯＦ；Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ、ＵＳＡ）において、ＭＳについては３５０～１６００ｍ／ｚ、ＭＳ／ＭＳについては５０～２０００ｍ／ｚの獲得範囲で実施した。ソフトウェア「ＰｒｏｔｅｉｎＬｙｎｘ　Ｇｌｏｂａｌ　ＳＥＲＶＥＲ（ＰＬＧＳ）」（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ、ＵＳＡ）を用いて、スペクトルを分析し、ピークリストを作成した。ペプチドを同定するために、ＭＳおよびＭＳ／ＭＳデータを、Ｍａｓｃｏｔ　２．２（Ｍａｔｒｉｘ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｂｏｓｔｏｎ、ＭＡ、ＵＳＡ）ソフトウェアを用いてＶ型コラーゲン（ＦＡＳＴＡ）タンパク質データベースに対して、ＥＳＩ－ＱＵＡＤ－ＴＯＦ設定、および可変性修飾として、カルバミドメチル（Ｃ）、メチオニン（Ｍ）の酸化、リジン（Ｋ）の酸化、およびプロリン（Ｐ）の酸化を用いて、検索した。

【０１４５】

ＭＳによって同定されたペプチドのＮ末端またはＣ末端における６個のアミノ酸を、問題のプロテアーゼによって生成されたネオエピトープとみなした。全てのプロテアーゼによって生成された配列を、相同性および他の切断部位までの距離を分析し、ＮＰＳ@：ネットワークタンパク質配列分析（Ｃｏｍｂｅｔ　Ｃ、Ｂｌａｎｃｈｅｔ　Ｃ、Ｇｅｏｕｒｊｏｎ　Ｃ、Ｄｅｌｅａｇｅ　Ｇ．　ＮＰＳ@：ｎｅｔｗｏｒｋ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ａｎａｌｙｓｉｓ．Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｓｃｉ　２０００；２５：１４７～５０）を用いて相同性について試験した。

【実施例２】
【０１４６】
＜同定された断片についてのＥＬＩＳＡアッセイの開発＞
［ペプチドコンジュゲーション］
ペプチドコンジュゲーションを、マレイミド活性化免疫原コンジュゲーションキット（Ｍａｌｅｉｄｉｄｅ Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎ Ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ Ｋｉｔ）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ＭＯ、ＵＳＡ）を用いて実施した。簡単に述べれば、１個の遊離スルフヒドリル（－ＳＨ）基を有するシステイン含有免疫原性ネオエピトープ（ＨＭＧＲＥＧＲＥＧＥ－ＧＧＣ、５ｍｇ／ｍｌにおける４００μｌペプチド）を、スルフヒドリル含有ペプチドと反応することができる利用可能なマレイミド基を有する、担体タンパク質としてのマレイミド活性化オボアルブミン（ＯＶＡ）（１０ｍｇ／ｍｌにおける１８０μｌ ＯＶＡ）と、コンジュゲーション緩衝液において、混合し、室温で２時間、インキュベートした。コンジュゲートされた生成物から、２日間の脱塩または透析によりＥＤＴＡおよびアジ化ナトリウムを除去した。ビオチンコンジュゲート化ペプチドについて、固相ペプチド合成手順において、ビオチンコンジュゲート化リジンを加えた。
【０１４７】
［モノクローナル抗体開発］
４～６週齢Ｂａｌｂ／Ｃマウスを、約２００μｌの乳化抗原および５０μｇのネオエピトープＣＯ５－ＭＭＰ（ＨＭＧＲＥＧＲＥＧＥ－ＧＧＣ－ＯＶＡ）を皮下に免疫した。フロイント不完全アジュバントにおいて安定した血清力価レベルに達するまで２週間間隔で連続免疫化を実施した。２回目の免疫化から血液試料を収集した。各血液試料採取時点において、血清力価を決定し、最高抗血清力価を有するマウスを融合のために選択した。４回目の免疫化後、このマウスを１ヶ月間、休息させ、その後、細胞融合のための脾臓の単離の３日前に、５０μｇのＣＯ５－ＭＭＰ／１００μｌの０．９％塩化ナトリウム溶液中を静脈内にブーストした。
【０１４８】
［融合および抗体スクリーニング］
Ｇｅｆｔｅｒら[132]によって記載されているように、融合手順を実施した。簡単に述べれば、マウス脾臓細胞を、ＳＰ２／０骨髄腫融合パートナー細胞と融合した。ハイブリドーマ細胞を、半流動性培地方法を用いてクローン化し、さらなる増殖のために９６ウェルマイクロタイタープレート内へ移し、CO_2インキュベータ内でインキュベートした。標準限界希釈法を用いて、モノクローナル増殖を促進した。ストレプトアビジンコーティングされたマイクロタイタープレートおよび捕獲ペプチドとしてのＨＭＧＲＥＧＲＥＧＥ－Ｋ－ビオチンでの間接的ＥＬＩＳＡを用いて、上清をスクリーニングした。
【０１４９】
［クローンの特徴づけ］
モノクローナル抗体の天然の反応性およびペプチド結合を、ストレプトアビジンコーティングされたマイクロタイタープレート上の１０ｎｇ／ｍＬのビオチン化ペプチドコーターおよび増殖中のモノクローナルハイブリドーマ由来の上清を用いた予備的ＥＬＩＳＡに対し、天然試料（ヒト／ラット／マウス血清、血漿、および尿）を置換することによって評価した。クローンの遊離ペプチド（ＨＭＧＲＥＧＲＥＧＥ）、ナンセンスなペプチド、および伸長させたペプチド（ＧＨＭＧＲＥＧＲＥＧ）に対する特異性を試験した。Ｃｌｏｎｏｔｙｐｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍ－ＨＲＰキット、カタログ番号５３００－０５（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ、ＡＬ、ＵＳＡ）を用いて、モノクローナル抗体のアイソタイプ分類を実施した。選択されたクローンを、製造会社（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｌｉｔｔｌｅ Ｃｈａｌｆｏｎｔ、Ｂｕｃｋｉｎｇｈａｍｓｈｉｒｅ、ＵＫ）の使用説明書に従ってプロテインＧカラムを用いて、精製した。選択されたモノクローナル抗体を、製造会社（Ｉｎｎｏｖａｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、Ｂａｂｒａｈａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）の使用説明書に従ってＬｉ

ｇｈｔｎｉｎｇ　ｌｉｎｋ　ＨＲＰ標識キットを用いて、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）で標識した。

【０１５０】

［ＣＯ５－ＭＭＰのＥＬＩＳＡの手順］

予備実験において、本発明者らは、いくつかのチェッカーボード分析を実施することにより、試薬、それらの濃度、およびインキュベーション期間を最適化した。ＣＯ５－ＭＭＰのＥＬＩＳＡを以下のように開発した。９６ウェルのストレプトアビジンプレートを、アッセイ緩衝液（２５ｍＭのＴｒｉｓ、１％ＢＳＡ、０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０、ｐＨ７．４）中に溶解した５ｎｇ／ｍＬのビオチン化合成ペプチドＨＭＧＲＥＧＲＥＧＥ－Ｋ－ビオチンでコーティングし、３００ｒｐｍで絶えず振盪することにより２０℃で３０分間、インキュベートした。アッセイ緩衝液中に溶解した２０μｌのペプチドキャリブレータまたは試料を、適切なウェルに加え、続いて、１００μＬのコンジュゲート化モノクローナル抗体（１２５ｎｇ／ｍＬ）を加え、３００ｒｐｍで絶えず振盪することにより４℃で１時間、インキュベートした。最後に、１００μＬのテトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）（Ｋｅｍ－Ｅｎ－Ｔｅｃカタログ番号４３８ＯＨ）を加え、プレートを、暗闇および３００ｒｐｍでの振盪において２０℃で１５分間、インキュベートした。各インキュベーションステップ後、プレートを洗浄緩衝液（２０ｍＭのＴｒｉｓ、５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．２）中で５回、洗浄した。ＴＭＢ反応を、１００μｌの停止溶液（１％ＨＣＬ）を加えることにより停止し、４５０ｎｍで分光光度的に測定し、参照として６５０ｎｍを用いた。標準曲線を、ＣＯ５－ＭＭＰペプチド（ＨＭＧＲＥＧＲＥＧＥ）の段階希釈により実施し、４－パラメトリック数学的フィットモデルを用いてプロットした。標準濃度は、０ｎｇ／ｍＬ、１５．６２５ｎｇ／ｍＬ、３１．２５ｎｇ／ｍＬ、６２．５ｎｇ／ｍＬ、１２５ｎｇ／ｍＬ、２５０ｎｇ／ｍＬ、５００ｎｇ／ｍＬ、１０００ｎｇ／ｍＬだった。

【０１５１】

技術的評価

プールされた血清試料の２倍希釈から、１００％試料の回収のパーセンテージとして直線性を計算した。検出下限（ＬＤＬ）を、最低標準（ゼロ標準）の２１個の決定値から計算し、平均＋３×標準偏差として計算した。アッセイ間およびアッセイ内変動を、５個のＱＣ試料の１０回の独立した実行により決定し、各実行は、試料の２回の決定についての２個のレプリカからなった。最後に、各アッセイについて、アミノ酸分析により正確に定量化された合成ペプチドから調製されたマスターキャリブレータを、キャリブレーションのために用いた。

【０１５２】

分析物安定性を、１０回の凍結および解凍のサイクルの期間に、３つのヒト血清試料について決定した。

【実施例３】

【０１５３】

＜ＥＬＩＳＡ特徴づけ＞

開発したＣＯ５－ＭＭＰ　ＥＬＩＳＡを、２０μｌの試料（未切断Ｖ型コラーゲン、ＭＭＰ－２で切断されたＶ型コラーゲン、ＭＭＰ－９で切断されたＶ型コラーゲン、ＭＭＰ－１３で切断されたＶ型コラーゲン、および伸長させたＣＯ５－ＭＭＰアミノ酸配列（ＧＨＭＧＲＥＧＲＥＧ））を用いて評価した。交差反応性を、インビトロで切断されたコラーゲンＩ型を用いて試験した。

【０１５４】

結果は、図１、パネルＡおよびＢに示されており、Ａ）遊離ペプチド（ＨＭＧＲＥＧＲＥＧＥ）、未切断Ｖ型コラーゲン、ＭＭＰ－９切断型Ｖ型コラーゲン、ＭＭＰ－２切断型Ｖ型コラーゲン；Ｂ）遊離ペプチド（ＨＭＧＲＥＧＲＥＧＥ）、ＭＭＰ－１３切断型Ｖ型コラーゲン、ＭＭＰ－９切断型Ｉ型コラーゲン、伸長させたペプチド（ＧＨＭＧＲＥＧＲＥＧ）のシグナルのパーセント阻害を示している。パネルＡにおいて、抗体が未切断コラーゲンＶ型と実質的に反応しないが、切断型コラーゲンＶ型と反応すること、およびパネ

ルＢにおいて、抗体が、Ｎ末端伸長型ペプチドと反応しないことがわかる。したがって、抗体は、酵素切断によって生じたＮ末端ネオエピトープと特異的に反応することが示されている。

【実施例４】

【０１５５】

＜臨床的有用性＞

［健康な対象およびＡＳ患者］

その生化学的マーカーを、強直性脊椎炎（ＡＳ、改訂ニューヨーク基準による）と診断された患者由来の血清中において評価し、Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ３ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｅｒｌａｎｇｅｎ－Ｎｕｒｅｍｂｅｒｇから入手した性別および年齢をマッチさせた非疾患性血清試料と比較した。非疾患群は、平均年齢が４３．０歳、１８～６６歳の範囲である、２１人の健康な女性および１９人の健康な男性からなった。ＡＳ群は、平均年齢が４２．５歳、２９～６３歳の範囲である、１９人の女性および２１人の男性からなった。

【０１５６】

［統計］

その２つの群間のＣＯ５－ＭＭＰの血清レベルを、ＥＬＩＳＡを用いて測定し（結果は図２に示されている）、両側ノンパラメトリックマンホイットニー検定を用いて比較した。図２において、バーは、平均レベル±平均値の標準誤差（ＳＥＭ）を示す。ＲＯＣに関して、曲線下面積を測定した。オッズ比を、分割表から外挿し、全ての対象を、低レベル（正常集団の平均の２ＳＤ内）または高レベル（＞ＳＤ）のバイオマーカーを有するとして分類した。Ｐ＜０．０５である場合、結果を有意とみなした。

【０１５７】

これらの結果は、コラーゲンＶ型の測定されたネオエピトープがＡＳについての価値あるマーカーであることを強く示唆している。

【実施例５】

【０１５８】

＜ＮＢ２０２ビグリカンアッセイ：ＢＧＭ ．ＹＷＥＶＱＰＡＴＦＲ（配列番号１１３）＞

本発明者らは、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１２、およびＭＭＰ－１３によって生成されたＢＧＮネオエピトープの測定のための酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）の開発を本明細書で実証し、肝線維症の２匹のラットモデルにおいてそのアッセイの生物学的妥当性を試験する。

【０１５９】

方法：ＢＧＮを、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１２、およびＭＭＰ－１３によってインビトロで切断し、$^{\downarrow 344}$「ＹＷＥＶＱＰＡＴＦＲ」^{353}ペプチド（ＢＧＮ－３４４）を、可能性のあるネオエピトープとして選択した。その選択されたペプチドに対して産生されたモノクローナルマウス抗体を、ＭＭＰ分解型ＢＧＮネオエピトープを測定する競合ＥＬＩＳＡの開発に用いた。そのアッセイを、肝線維症の２匹のラットモデル、四塩化炭素（CCl_4）誘発性線維症モデル、および胆管結紮（ＢＤＬ）モデルにおいて確認した。

【０１６０】

結果：対照群と比較して１６週間（２００ｎｇ／ｍｌ対１２０ｎｇ／ｍｌ、ｐ＝０．００１３）および２０週間（１９０ｎｇ／ｍｌ対１００ｎｇ／ｍｌ、ｐ＝０．０１９）のCCl_4で処理されたラットにおいて、加えて、偽手術された群と比較してＢＤＬを受けた全ての群のラットにおいて、血清ＢＧＮ－３４４の有意な上昇が見出された。さらに、CCl_4モデルにおいて、肝臓切片のシリウスレッド染色によって決定された肝線維症の程度と血清ＢＧＮ－３４４レベルとの有意な相関があった。

【０１６１】

結論：本発明者らは、ＭＭＰ分解型ＢＧＮの特定の病理学的組織リモデリング産物、すなわち、ネオエピトープＢＧＮ－３４４が、CCl_4モデルおよびＢＤＬモデルにおいて、

インビボおよびエクスビボの両方のレベルで、肝線維症中、増加することを実証した。

【０１６２】

アッセイ開発：

融合から得られた、選択されたモノクローナル抗体のアッセイ開発は、ＳＯＰによる以下の全部の試験を含んだ（データは示されていない）。１）チェッカーボード（すなわち、抗体－抗原結合親和性）－異なるインキュベーション時間、インキュベーション温度、およびインキュベーション緩衝液での抗体対コーター濃度、２）標準ペプチド、ナンセンスなペプチド、ヒト血清、天然ＢＧＮ、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１２、およびＭＭＰ－１３でインビトロ処理された天然ＢＧＮに対する抗体特異性および感度を評価するための置換（すなわち、競合強度）、３）Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ－Ｌｉｎｋ（商標）西洋ワサビペルオキシダーゼ標識キット（Ｉｎｎｏｖａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　Ｌｔｄ、Ｂａｂｒａｈａｍ、ＵＫ）を用いて評価されるペルオキダーゼに対する標識親和性。これらの試験の結果に基づいて、最終アッセイ開発として、モノクローナル抗体ＮＢ２０２－７－５Ａ１を選択した。

【０１６３】

ＢＧＮ－３４４競合ＥＬＩＳＡ手順を以下のように開発した。９６ウェルのストレプトアビジンコーティングされたプレートを、１．２５ｎｇ／ｍｌのＹＷＥＶＱＰＡＴＦＲ－Ｋ－ビオチン（配列番号３０５）で、３００ｒｐｍ、２０℃で３０分間、コーティングした。その後、ウェルを、標準洗浄緩衝液で５回洗浄した。標準列を、２５０ｎｇ／ｍｌから開始する、５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＢＴＢ中に２倍に前希釈した標準ペプチド（ＹＷＥＶＱＰＡＴＦＲ）により調製した。試料（すなわち、ヒト血清、マウス血清、ラット血清）を同様に希釈した。標準および試料（２０μｌ／ウェル）、続いて、５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＢＴＢ緩衝液中の２０ｎｇ／ｍｌのペルオキシダーゼ標識ＮＢ２０２－７－５Ａ１抗体の１００μｌ／ウェルを加えた。プレートを３００ｒｐｍ、４℃で１時間、インキュベートした。インキュベーション時間後、ウェルを５回、洗浄し、１００μｌのＴＭＢと、４℃、３００ｒｐｍで１５分間、インキュベートし、続いて、各ウェル中に、１００μｌの停止溶液を加えた。比色反応を、標準実験室用プレートリーダーにおいて、６５０ｎｍでの測定を参照として、４５０ｎｍで測定した。データを、ＳｏｆｔＭａｘ　Ｐｒｏ　ｖ５．０プログラムを用いて取得した。

【０１６４】

CCl_4誘発性肝線維症のラットモデル：

肝線維症のCCl_4吸入ラットモデルにおいてＢＧＮ－３４４レベルを測定した。その研究の完全な詳細は別の所で記載されている（１３３）。その研究は、CCl_4で処理された５２匹の雄ウィスターラット、および２８匹の雄ウィスター対照ラットを含んだ（Ｃｈａｒｌｅｓ－Ｒｉｖｅｒ、Ｓａｉｎｔ　Ａｕｂｉｎ　ｌｅｓ　Ｅｌｓｅｕｆ、Ｆｒａｎｃｅ）。肝線維症の誘発を、以前に記載されているように（１３４）、実施した。簡単に述べれば、CCl_4を、吸入により週に２回、投与し、フェノバルビタール（０．３ｇ／ｌ）を飲料水に加えた。対照ラットは、フェノバルビタールのみを受けた。動物を、８週間、１２週間、１６週間、または２０週間のCCl_4処理または対照処理を受ける群へ層別化した（各群について、CCl_4がｎ＝１３；対照がｎ＝７）。Ｈｏｓｐｉｔａｌ　Ｃｌｉｎｉｃ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔａｒｉの調査倫理委員会（Ｂａｒｃｅｌｏｎａ、Ｓｐａｉｎ）、承認＃Ｂ－ＮＮＰ－２３３／０９によって明確に承認された書面におけるインフォームドコンセントの後、研究を実施した。CCl_4群由来の４匹の動物が研究中、死亡した。終了時点に血液を収集し、２５０ｒｐｍでの１０分間の遠心分離の前に、室温で２０分間、置いておき、凝固させた。試料を、バイオマーカー評価の前に－８０℃で保存した。肝臓切片（厚さ４μｍ）を、飽和ピクリン酸（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）中の０．１％シリウスレッドＦ３Ｂ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）において染色した。分析された各動物から、線維症の量を、３６個のフィールドについて全肝臓面積に占めるパーセンテージとして表し、平均値を示した（１３５）。

【０１６５】

胆管結紮（ＢＤＬ）誘発性肝線維症のラットモデル：

胆管結紮により誘発された肝線維症のラットモデルにおいてＢＧＮ－３４４レベルを測定した。その研究の完全な詳細は別の所で記載されている（１３３、１３６）。その研究は、合計８１匹の月齢６ヶ月の雌スプラーグドーリーラットを含んだ。胆管を２箇所で結紮し、腹部の縫合前に結紮間を切開する標準ＢＤＬにより、麻酔されたラットにおいて肝線維症を誘発した。偽手術されたラットにおいて、腹部をＢＤＬなしに縫合した。

【０１６６】

ラットを以下の４つの群に分けた。群１（１０匹のＢＤＬ、８匹の偽）は１週間後に殺害し、群２（１２匹のＢＤＬ、８匹の偽）は２週間後に殺害し、群３（１３匹のＢＤＬ、８匹の偽）は３週間後に殺害し、群４（１４匹のＢＤＬ、８匹の偽）は４週間後に殺害した。

【０１６７】

図３は、ａ）競合ＥＬＩＳＡ設定における標準曲線の例、ｂ）インビトロＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１２、およびＭＭＰ－１３分解型ビグリカン（ＢＧＮ／ＭＭＰ９、ＢＧＮ／ＭＭＰ１２、およびＢＧＮ／ＭＭＰ１３）について、ならびに未切断ビグリカン（ＢＧＮ）についてのＢＧＮ－３４４ペプチド測定を示す。

【０１６８】

図４は、５つの複製物において培養の３日目および１７日目に測定された、ウシ移植片のエクスビボ培養物からのＢＧＮ－３４４ペプチド放出を示す。ｗ／ｏ＝いかなる刺激も受けていない培養物；ＭＩ＝液体窒素での処理による代謝的に不活性の培養物；Ｔ＋Ｏ＝ＴＮＦα［２０ｎｇ／ｍｌ］およびオンコスタチン［１０ｎｇ／ｍｌ］での異化サイトカイン刺激；Ｔ＋Ｏ＋ＧＭ６００１＝選択性ＭＭＰ阻害剤ＧＭ６００１を追加した異化サイトカインＴＮＦα［２０ｎｇ／ｍｌ］およびオンコスタチン［１０ｎｇ／ｍｌ］；Ｔ＋Ｏ＋Ｅ６４＝選択性システインプロテアーゼ阻害剤Ｅ６４を追加した異化サイトカインＴＮＦα［２０ｎｇ／ｍｌ］およびオンコスタチン［１０ｎｇ／ｍｌ］（＊＊＊＝ｐ＜０．００１）。

【０１６９】

図５は、処理８週間、１２週間、１６週間、および２０週間で決定されたＣＣＬ４処理ラットにおけるシリウスレッド定量化の絶対値を示す。（各群について、CCl_4処理動物：ｎ＝１３；対照：ｎ＝７）。

【０１７０】

図６は、ａ）８週間目、１２週間目、１６週間目、および２０週間目に測定された肝線維症の四塩化炭素（CCl_4）誘発性ラットモデルにおける平均循環血清ＢＧＮ－３４４レベルを示す（各群について、CCl_4処理動物：ｎ＝１３；対照：ｎ＝７）。ｂ）シリウスレッドにより決定された肝臓における総コラーゲン含有量に従って、四分位数に層別化された全対照ラットおよび全CCl_4ラットにおける血清ＢＧＮ－３４４レベル；（ｎｓ＝有意でない、＊＝ｐ＜０．０５、＊＊＝ｐ＜０．０１、＊＊＊＝ｐ＜０．００１）。ｃ）CCl_4処理ラットおよびｄ）対照における、循環血清ＢＧＮ－３４４と、肝線維症の程度を決定する組織学的シリウスレッド定量化との相関。

【０１７１】

図７は、ベースライン、および１週間目、２週間目、３週間目、４週間目での終了時点での、ＢＤＬラットおよび偽手術されたラットにおける平均循環血清ＢＧＮ－３４４レベルを示す。データは、平均±平均値の標準誤差（ＳＥＭ）として示されている（＊＝ｐ＜０．０５、＊＊＝ｐ＜０．０１、＊＊＊＝ｐ＜０．００１）。

【実施例６】

【０１７２】

＜ＮＢ９１　Ｉ型コラーゲンアッセイ（生成されたＦＡＰ）：．ＡＧＫＥＧＰＶＧＬＰ（配列番号４９）ＣＯ１－４６２アッセイプロトコール＞

本発明者らは、製造会社（Ｉｎｎｏｖａｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、Ｂａｂｒａｈａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）の使用説明書に従い、Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ　ｌｉｎｋ　ＨＲＰ

標識キットを用いて、選択されたモノクローナル抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）で標識した。９６ウェルストレプトアビジンプレートを、アッセイ緩衝液（５０ｍＭのＴｒｉｓ、１％ＢＳＡ、０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０、２０℃でｐＨ７．４に調整）中に溶解したビオチン化合成ペプチドＡＧＫＥＧＰＶＧＬＰ－ビオチンでコーティングし、２０℃で３０分間、インキュベートした。２０μｌのペプチドキャリブレータまたは試料を、適切なウェルに加え、続いて、１００μＬのコンジュゲート化モノクローナル抗体３Ｈ２－ＨＲＰを加え、２０℃で１時間、インキュベートした。最後に、１００μＬのテトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）（Ｋｅｍ－Ｅｎ－Ｔｅｃカタログ番号４３８ＯＨ）を加え、プレートを、暗闇中、２０℃で１５分間、インキュベートした。全ての上記のインキュベーションステップは３００ｒｐｍでの振盪を含んだ。各インキュベーションステップ後、プレートを洗浄緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．２）中で５回、洗浄した。ＴＭＢ反応を、１００μＬの停止溶液（１％ＨＣｌ）を加えることにより停止し、４５０ｎｍで測定し、参照として６５０ｎｍを用いた。検量線を、４－パラメトリック数学的フィットモデルを用いてプロットした。

【０１７３】

ラット胆管結紮肝線維症モデル：

ＣＯ１－４６２を、肝線維症のＢＤＬラットモデルにおいて評価した。コペンハーゲン、ＤＫにおけるデンマーク動物保護局「Ｄｙｒｅｆｏｒｓｏｇｓｔｉｌｓｙｎｅｔ」が承認し、その研究の書面におけるインフォームドコンセントを与えている；承認＃２００８／５６１－１４５０。その研究は、別の所で詳細に記載されている（Ｖｅｉｄａｌら、２０１０ｂ）。簡単に述べれば、１７匹の月齢６ヶ月の雌スプラーグドーリーラットを以下の４群に層別化した。２週間後または４週間後に屠殺される、ＢＤＬラットまたは偽手術されたラット。胆管を２箇所で結紮し、腹部の縫合前に２つの結紮間を切開する標準ＢＤＬにより、麻酔されたラットにおいて肝線維症を誘発した。偽手術されたラットにおいて、腹部をＢＤＬ手術なしに縫合した。血液試料を、ベースラインおよび終了時点において、少なくともその前の１４時間、断食させたラットの後眼窩洞からCO_2／O_2麻酔下で採取した。収集した血液を、室温で３０分間、放置して、凝固させ、続いて、１５００ｇで１０分間の遠心分離を２回、行った。その後、血清を、きれいなチューブに移し、使用まで－８０℃で保存した。ＢＤＬモデルの妥当性は、（１３７）によって実証された。

【０１７４】

結果は図８に示されている。測定されたシグナルの有意な上昇は、２週間後に見られた。

【実施例７】

【０１７５】

＜ＮＢ１５８バーシカンアッセイ：ＶＣＡＮ　３３０６（．ＫＴＦＧＫＭＫＰＲＹ）＞

細胞外マトリックスリモデリングは、アテローム性動脈硬化病変発生において鍵となる特徴であり、かつプラーク破綻の前提条件である。プロテオグリカンのバーシカンは、アテローム性動脈硬化プラーク内に位置し、それは、マクロファージリッチな領域に存在するＭＭＰについての潜在的基質である。本発明者らは、特定のＭＭＰ１２由来バーシカン分解断片（ＶＣＡＮ－３３０６）を検出し、アテローム性動脈硬化を診断するためのバイオマーカーとしてのそれの可能性を評価するためのイムノアッセイを開発している。

【０１７６】

方法および結果：ＶＣＡＮ－３３０６に対して産生されたマウスモノクローナル抗体を、競合ＥＬＩＳＡの開発のために用いた。異なる程度のアテローム性動脈硬化を有する患者由来の臨床血漿試料を、アッセイ確証のために用いた。５人の死亡した成人の冠動脈におけるＶＣＡＮ－３３０６を、ＶＣＡＮ－３３０６－ｍＡｂを用いて検出した。最低のプラーク量を有する動脈は、ＶＣＡＮ－３３０６－ｍＡｂに対して高い反応性を示した中間および大きいアテローム性動脈硬化プラークによって冒された動脈と比較して、ほとんど、または全く反応性を示さなかった。Ｉ）急性冠動脈症候群を経験する患者（ｎ＝３０）、ＩＩ）安定型虚血性心疾患を経験する患者（ｎ＝３０）、およびＩＩＩ）高レベルの冠動

脈カルシウム沈着を示す患者（ｎ＝３０）は、検出可能な動脈カルシウム沈着をもたない個体の対照群（ｎ＝３０）と比較して、ＶＣＡＮ－３３０６の有意に高い血漿レベルを有した。さらに、高い動脈カルシウム沈着レベルを有する患者において、ＶＣＡＮ－３３０６の存在と、ＬＤＬおよび総コレステロールとの間に強い関連が示された。

【０１７７】

結論：ＭＭＰ１２によって生成されたバーシカンのネオエピトープは、ヒトアテローム性動脈硬化プラーク内に存在する。ＭＭＰ１２仲介性バーシカン分解は、アテローム性動脈硬化疾患を有する患者において有意に上昇し、アテローム性動脈硬化についての可能性のあるバイオマーカーとしてのＶＣＡＮ－３３０６を示唆した。

【０１７８】

ＶＣＡＮ－３３０６アッセイプロトコール：

選択されたモノクローナル抗体を、製造会社（Ｉｎｎｏｖａ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、Ｂａｂｒａｈａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）の使用説明書に従い、Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ－Ｌｉｎｋ Ｈｏｒｓｅｒａｄｉｓｈ Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ（ＨＲＰ）抗体標識キットを用いて、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）で標識した。Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ（Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、Ｂａｓｅｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）から購入した９６ウェルの、ストレプトアビジンで事前にコーティングされたプレートを、アッセイ緩衝液５０ｍＭのＰＢＳ－ＢＴＢ中に溶解した２．５ｎｇのビオチン化合成ペプチドＫＴＦＧＫＭＫＰＲＹ－Ｋ－ビオチン（配列番号３０６）によってコーティングし、２０℃で３０分間、インキュベートした。２０μＬのペプチドキャリブレータまたは試料を、適切なウェルに加え、続いて、１００μＬの２０ｎｇ／ｍｌコンジュゲート化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。最後に、１００μＬのテトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）（Ｋｅｍ－Ｅｎ－Ｔｅｃカタログ番号４３８ＯＨ、Ｔａａｓｔｒｕｐ、Ｄｅｎｍａｒｋ）展開液を加え、プレートを、暗闇中、２０℃で１５分間、インキュベートした。全ての上記のインキュベーションステップは３００ｒｐｍでの振盪を含んだ。各インキュベーションステップ後、プレートを洗浄緩衝液（２０ｍＭのＴｒｉｓ、５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．２）中で５回、洗浄した。ＴＭＢ反応を、１００μＬの停止溶液（１％ＨＣｌ）を加えることにより停止し、４５０ｎｍで測定し、参照として６５０ｎｍを用いた。標準検量線を、標準ペプチドについての開始濃度が１０ｎｇで、続いて、２倍希釈する、４－パラメトリック数学的フィットモデルを用いてプロットし、最後の標準はゼロ標準であった。

【０１７９】

免疫組織化学法についての試料および手順：

検体：以前に記載されているように（１３８）、Ｎｏｒｔｈ Ｃａｒｏｌｉｎａ Ｂａｐｔｉｓｔ Ｈｏｓｐｉｔａｌ、Ｗｉｎｓｔｏｎ－Ｓａｌｅｍ、ＵＳＡで１８ヶ月間の間に死亡した２５歳より上の患者から冠動脈を入手した。

【０１８０】

組織病理学的手順：解剖により得られた５つの心臓を、生理食塩水で洗い流し、４％中性緩衝ホルムアルデヒド溶液で、１００ｍｍＨｇの圧力で１時間、灌流固定した。組織学的切片作製（各３ｍｍ長）のための隣接組織ブロックを、左前下行枝（ＬＡＤ）、左回旋枝、および右冠動脈の長軸（近位３ｃｍ）に対して垂直に切断した。２個の５μｍの組織学的切片を各ブロックから作製した。１個をヘマトキシリン－エオシンで、１個をＶｅｒｈｏｅｆｆ－ｖａｎ Ｇｉｅｓｏｎ染色で染色した。

【０１８１】

それぞれが異なる程度のアテローム性動脈硬化を有する５人の個体由来のヒト左前下行枝のＶＣＡＮ－３３０６染色のために、標準Ｎｏｒｄｉｃ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅプロトコールを用いた。簡単に述べれば、パラフィン包埋動脈を、５μｍ切片へ切断し、脱パラフィンし、ペルオキシダーゼをブロックし、再水和した。切片を、８００Ｗでのマイクロ波における２×５分間の前処理に供した。この後、切片をＴＢＣ＋１％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００中で洗浄し、ＴＢＳ中０．５％カゼインにおいてブロッキングし、ＴＢＳ緩衝液

中に希釈したＶＣＡＮ－３３０６に対する２．２５μｇ／ｍｌ　ｍＡｂと、４℃で一晩、インキュベートした。その後、切片をＴＢＳ＋１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００中で洗浄し、Ｓｕｐｅｒ　Ｓｅｎｓｉｔｉｖｅ中で３０分間、インキュベートし、再び洗浄し、ＤＡＢ基質で処理した（６～１０分間）。切片を、マイヤーのヘマトキシリン中に１２秒間、浸漬し、マウントし、放置して乾燥させた。

【０１８２】

患者および試料収集：

異なる程度のアテローム動脈硬化性心疾患を有する、それぞれ３０人の個体の４つの群を３つの大きな研究（ＤＡＮＲＩＳＫ、ＤＥＦＡＭＩ、およびＯｄｅｎｓｅ　Ａｒｔｅｒｙ　Ｂｉｏｂａｎｋ）から選択した。これらの研究における参加者は、同時にＯｄｅｎｓｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｈｏｓｐｉｔａｌ、Ｏｄｅｎｓｅ、Ｄｅｎｍａｒｋによって登録された。４つの群は以下からなった。１）検出可能な冠動脈カルシウムをもたない３０人の無症状の個体（ＣＴ－ｎｏＣａ）、２）冠動脈カルシウムの存在によって定義される無症候性ＣＶＤを有する３０人の無症状の対象（ＣＴ－ｐｌｕｓＣａ）、３）冠動脈バイパス手術をされるべき、安定虚血性心疾患（ＩＨＤ）を有する３０人の患者、ならびに４）急性冠動脈症候群（ＡＣＳ）および過去２４時間以内の発症を有する３０人の患者（表１）。全ての試料は、Ｏｄｅｎｓｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｈｏｓｐｉｔａｌ（Ｏｄｅｎｓｅ、Ｄｅｎｍａｒｋ）におけるＤｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ａｎｄ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙによって取り扱われ、かつ試験された。

【０１８３】

５０歳～６０歳の１８２５人の男性および女性のランダムな試料である、ＤＡＮＲＩＳＫコホートから、群１および群２の患者を採用し、２００９年に冠動脈疾患についてのスクリーニングに招いた。スクリーニングは、心臓ＣＴスキャン、続いてＡｇａｔｓｔｏｎスコアを用いる冠動脈カルシウム量の見積もりを含んだ。招かれた個体から、１２５７人をスクリーニングに検討したが、すでに虚血性心疾患または糖尿病を有する者（ｎ＝１００）を除外した後、１１５７人の患者を分析に登録した。６０歳のこれらの個体（ｎ＝６４７）の中で、検出可能な冠動脈カルシウムをもたない３０人の患者（ＣＴ－ｎｏＣａ）の群１、およびＡｇａｔｓｔｏｎスコア≧４００を有する（ＣＴ－ｐｌｕｓＣａ）３０人の群２を選択した。これらの２つの群の選択にはまた、総コレステロールおよび血圧についてのマッチングも関係させた。心臓スコアは、臨床医が、個体の心血管系リスクの低下を最適化するのを援助することを目的とする。このリスク推定は、リスク因子（性別、年齢、喫煙、収縮期血圧、および総コレステロール）に基づき、最終的に１０年後に起こるだろう致死的なＣＶＤイベントの数を予測する。致死的心血管イベントに基づいた高リスクについての閾値は、「５％より高い」と定義される（１３９）。

【０１８４】

安定ＩＨＤを有する患者の群である、群３は、冠動脈バイパス手術を受けた患者から予備の動脈組織および血液試料を集めるＯｄｅｎｓｅ　Ａｒｔｅｒｙ　Ｂｉｏｂａｎｋに由来した。血液試料は、バイパス術の前日に採取された。本発明者らは、約６０歳の平均年齢および上記の集団に類似した性別分布をもつ３０人の患者を選択した。ＡＣＳを有する患者の群である、群４は、ＤＥＦＡＭＩコホートから採用し、そのコホートにおける全ての患者は、２００９年１０月１日から２０１０年４月３０日の間にＯｄｅｎｓｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｈｏｓｐｉｔａｌに入院し、ＡＣＳの疑いでトロポニン分析を受けており、登録された。これらの患者において、連続的血液試料採取は、発症の最初の２４時間以内に実施された。ＤＥＦＡＭＩコホートにおける８２２人の患者のうち、非ＳＴ上昇型心筋梗塞（ＮＳＴＥＭＩ、ｎ＝２４）または不安定狭心症（ｎ＝６）を有する３０人の患者が選択され、本研究に参加した。彼らの年齢は約６０歳であり、彼らの性別分布は、２つのＤＡＮＲＩＳＫ部分群（群１および群２）にマッチした。ＮＳＴＥＭＩは、典型的な臨床症状の存在に関連して、０．０３μｇ／ｌより上のＴｎＩレベルの典型的な上昇および／または降下が示されたかどうかについて規定された。不安定狭心症は、ＳＴ部分抑制

またはＴ波ゆらぎと共に、安静時または最小身体活動中に典型的な胸痛の存在があるが、正常なＴｎＩレベル（０．０３μｇ／ｌ未満）を有するとして定義された。不安定狭心症を有する全ての患者はまた、少なくとも１つの有意な冠動脈狭窄（＞５０％直径狭窄）を示す必要があった。したがって、この研究において、ＡＣＳ患者は、ＮＳＴＥＭＩおよび不安定狭心症を有する患者を含んだ。ＳＴ部分上昇型心筋梗塞（ＳＴＥＭＩ）を有する患者は含まれず、これらの患者において、ヘパリンでの薬物療法および緊急ＰＣＩが行われる前に十分な連続的血液試料を得ることは可能ではないだろうからである。両方の介入は、生化学的アッセイにおいて干渉する可能性がある。３０人のＡＣＳ患者（群４）における平均ＴｎＩレベルは０．６２μｇ／ｌ（０．０１～５．２３μｇ／ｌの範囲）であった。

【０１８５】

群１～４の全患者（ｎ＝１２０）において、高血圧は、その患者が降圧性医学的処置を用いたかどうかが考慮され、糖尿病は、抗糖尿病薬物療法が処方されたかどうかについて規定された。収縮期および拡張期血圧を、血液試料採取と同じ日に測定した。Ａｇａｔｓｔｏｎスコアを、群１および群２の患者において計算した。ＡＣＳ群におけるＴｎＩを、本血液試料採取の前の、入院時すぐに、測定した。総コレステロール、ＬＤＬ、ＨＤＬ、およびトリグリセリドもまた、本研究のための血液試料採取の前に測定した。血液試料を、ＥＤＴＡを含むチューブ中に回収し、２００ｇで１０分間、遠心分離した。血漿を、生化学的分析まで、－８０℃で保存した。

【０１８６】

ＤＡＮＲＩＳＫ、ＤＥＦＡＭＩ、およびＯｄｅｎｓｅ Ａｒｔｅｒｙ Ｂｉｏｂａｎｋ研究のための研究プロトコールは、研究の開始前に倫理委員会によって承認された。インフォームドコンセントは、全ての参加した患者から得られた。

表５０．［］内に平均値および標準偏差を示す、研究に含まれる各群の個体群統計学。ＣＴ－ｎｏＣａ：検出可能な冠動脈カルシウムなしの無症状の個体；ＣＴ－ｐｌｕｓＣａ：高い冠動脈カルシウムを有する無症状のＣＶＤ；ＡＣＳ（急性冠動脈症候群）；ＩＨＤ：安定虚血性心疾患を有する患者。平均値［＋／－ＳＴＤ］；＃幾何平均値［＋／－ＳＴＤ］、および一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）からのｐ値。対照群「ＣＴ－ｎｏＣａ」に対する各群の比較からのｐ値の有意性のレベルは、ダネットの方法による多重比較として調整された（＊：ｐ＜０．０５；＊＊：ｐ＜０．０１；＊＊＊：ｐ＜０．００１）。

【表５０】

	CT-noCa n=30	CT-plus Ca n=30	ACS n=30	IHD n=30	ANOVA p値
年齢(年)	60.2 [59.8; 60.7]	60.3 [60.0-60.6]	64.5** [56.0; 73.0]	59.7 [56.8; 62.6]	0.0001
トリグリセリド# (mmol/L)	1.57 [0.85; 2.93]	1.49 [1.00; 2.21]	1.30 [0.78; 2.19]	1.48 [0.92; 2.30]	0.52
HDLコレステロール# (mmol/L)	1.28 [0.93; 1.75]	1.36 [0.98; 1.89]	1.13 [0.83; 1.52]	1.30 [0.90;1.87]	0.14
LDLコレステロール (mmol/L)	3.14 [2.13; 4.16]	3.26 [2.29; 4.22]	2.93 [1.74; 4.11]	2.41* [1.27; 3.55]	0.02
総コレステロール (mmol/L)	5.25 [4.06; 6.43]	5.47 [4.29; 6.64]	4.74 [3.44; 6.04]	4.45* [3.20; 5.71]	0.007
収縮期血圧 (mmHg)	145 [131; 159]	147 [128; 167]	159* [132; 187]	145 [123; 168]	0.04
拡張期血圧 (mmHg)	86 [76; 95]	85 [75; 96]	88 [72; 103]	83 [74; 92]	0.56
Agatstonスコア#	0	1299 [717; 2352]	-	-	-
心臓スコア#	6.33 [2.23; 8.92]	8.30 [3.10;12.42]	-	-	0.3

表５１．検出可能な冠動脈カルシウムなしの対照群（ＣＴ－ｎｏＣａ）と比較した、高い冠動脈カルシウム群（ＣＴ－ｐｌｕｓＣａ）、急性冠動脈症候群の群（ＡＣＳ）、および虚血性心疾患群（ＩＨＤ）におけるＲＯＣ曲線の結果。ＡＵＣは、標準誤差およびｐ値と共に示されている。

【表５１】

ROC曲線;AUC[標準誤差]p値			
パラメータ	CT-plus Ca対 CT-no Ca	ACS対CT-no Ca	IHD対CT-no Ca
VCAN-3306	0.748 [0.068] 0.0003	0.775 [0.062] <0.0001	0.669 [0.077] 0.03

表５２．ＶＣＡＮ－３３０６のスピアマン相関係数および標準測定パラメータが、ｒ値およびｐ値で提示されている。

【表５２】

スピアマン相関係数	全群 r値 p値	CT-plus Ca	ACS	IHD
年齢	0.1675 0.4038	-0.0147 0.9386	- 0.1387 0.4647	0.0769 0.7027
トリグリセリド	-0.1011 0.6160	0.3281 0.0767	0.1409 0.4577	-0.0806 0.6895
LDL	-0.2291 0.2503	0.4665 **0.0094****	0.3186 0.0862	-0.1394 0.4880
HDL	-0.0501 0.8041	0.1945 0.3030	0.0309 0.8714	0.2688 0.1752
総コレステロール	-0.2062 0.3022	0.5993 **0.0005*****	0.3187 0.0860	0.0504 0.8028
BP-収縮期	0.2745 0.1659	0.0982 0.6057	0.1953 0.3011	-0.0527 0.8304
BP-拡張期	0.0266 0.8952	0.2060 0.2747	0.0720 0.7053	0.0330 0.8933

【０１８７】

図９は、抗体のエピトープに対する特異性の試験の結果を示す。競合ＥＬＩＳＡ設定において加えられて、試験された試料は以下であった。伸長させたペプチド（２０ｎｇ／ｍｌ）、非切断型バーシカン（ＶＣＡＮ）、ＭＭＰ－８切断型バーシカン（ＶＣＡＮ＋ＭＭＰ８）、ＭＭＰ－１２切断型バーシカン（ＶＣＡＮ＋ＭＭＰ１２）、およびカテプシンＫ切断型バーシカン（ＶＣＡＮ＋ＣａｔＫ）。

【０１８８】

図１０は、急性冠動脈症候群（ＡＣＳ）、冠動脈カルシウムの高沈着（ＣＴ－ｐｌｕｓＣａ）、安定虚血性心疾患（ＩＨＤ）と診断された患者において測定され、かつ検出可能な冠動脈カルシウム沈着がない個体を含む年齢をマッチさせた対照（ＣＴ－ｎｏＣａ）と比較した、ＶＣＡＮ－３３０６の血漿レベルを示す。＊＝ｐ＜０．０５；＊＊＊＝ｐ＜０．０００５；個々の値、および線と誤差バーとしての群平均とＳＥＭが示されている。

【０１８９】

図１１は、高い冠動脈カルシウム沈着（ＣＴ－ｐｌｕｓＣａ）を有する無症状の患者の群におけるａ）ＬＤＬと組み合わされたＶＣＡＮ－３３０６、およびｂ）コレステロールと組み合わされたＶＣＡＮ－３３０６についてのＲＯＣ曲線を示す。

【実施例８】

【０１９０】

＜ＮＢ１８５　Ｖ型アッセイ：Ｃ５Ｍ．ＨＭＧＲＥＧＲＥＧＥ（配列番号９３）＞

脊椎の慢性炎症強直性脊椎炎（ＡＳ）は、椎骨の完全なセメンテーション（関節に見出されるいくつかのコラーゲンのターンオーバーを含む過程）がもたらされ得る。診断的評価および患者特徴づけは、結合組織ターンオーバーのマーカーの測定によって向上する可能性がある。コラーゲンのタンパク質分解は、細胞外マトリックスリモデリングにおいて、およびそれにより、ＡＳの発病において重要な役割を果たす。この分解は、ネオエピトープと呼ばれる小さいペプチド断片を生じ、それは、線維性事象の新しいクラスのバイオマーカーであることが証明される可能性がある。この研究の目的は、ＭＭＰ－２およびＭＭＰ－９によって生成されたＶ型コラーゲンの断片を検出する能力がある競合ＥＬＩＳＡを開発すること、ならびにＡＳについてのバイオマーカーとしてのこのアッセイの使用を評価することであった。

【０１９１】

材料および方法：ＭＭＰ－２およびＭＭＰ－９によって分解されたＶ型コラーゲンの質量分光分析により、多数のプロテアーゼ生成ネオエピトープが明らかにされた。これらのデータから、Ｖ型コラーゲンに特有で、かつＭＭＰ－２およびＭＭＰ－９によって生成さ

れた断片を、ＥＬＩＳＡ開発のための標的として選択した。このネオエピトープに対してモノクローナル抗体が産生され、それは、Ｖ型コラーゲン断片をアミノ酸位置１３１７において検出した（ＣＯ５－ＭＭＰ）。そのアッセイを用いて、４０人のＡＳ患者および４０人の年齢をマッチさせた対照の血清においてＣＯ５－ＭＭＰネオエピトープの含有量を評価した。

【０１９２】

結果：ＥＬＩＳＡは、もっぱらＭＭＰ－２およびＭＭＰ－９分解のＣＯ５－ＭＭＰネオエピトープ断片だけを検出することが実証され、アッセイ間およびアッセイ内変動は、それぞれ、９．１３％および４．３８％であった。ＣＯ５－ＭＭＰのレベルは、ＡＳ患者において有意により高く、２２９％の増加（Ｐ＜０．０００１）があった。ＡＵＣは８３％であった。

【０１９３】

結論：この新規なＥＬＩＳＡは、Ｖ型コラーゲンネオエピトープを評価するために開発された最初のアッセイである。Ｖ型コラーゲンの高いターンオーバーは、病態生理学的役割を示唆する。ＣＯ５－ＭＭＰは、進行中の線維形成の候補マーカーである。

【０１９４】

［方法］

健康な対象およびＡＳ患者

生化学的マーカーを、強直性脊椎炎（ＡＳ、改訂ニューヨーク基準による）と診断された患者由来の血清中において評価し、Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ３ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｅｒｌａｎｇｅｎ－Ｎｕｒｅｍｂｅｒｇからの性別および年齢をマッチさせた非疾患性血清試料と比較した。非疾患群は、平均年齢が４３．０歳、１８～６６歳の範囲である、２１人の健康な女性および１９人の健康な男性からなった。ＡＳ群は、平均年齢が４２．５歳、２９～６３歳の範囲である、１９人の女性および２１人の男性からなった（表５３）。

【０１９５】

ＣＯ５－ＭＭＰのＥＬＩＳＡの手順

予備実験において、本発明者らは、いくつかのチェッカーボード分析を実施することにより、試薬、それらの濃度、およびインキュベーション期間を最適化した。ＣＯ５－ＭＭＰ　ＥＬＩＳＡを以下のように開発した。９６ウェルのストレプトアビジンプレートを、アッセイ緩衝液（２５ｍＭのＴｒｉｓ、１％ＢＳＡ、０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０、ｐＨ７．４）中に溶解した５ｎｇ／ｍＬのビオチン化合成ペプチドＨＭＧＲＥＧＲＥＧＥ－Ｋ－ビオチン（配列番号３０７）でコーティングし、３００ｒｍｐで絶えず振盪することにより２０℃で３０分間、インキュベートした。アッセイ緩衝液中に溶解した２０μｌのペプチドキャリブレータまたは試料を、適切なウェルに加え、続いて、１００μＬのコンジュゲート化モノクローナル抗体（１２５ｎｇ／ｍＬ）を加え、３００ｒｐｍで絶えず振盪することにより４℃で１時間、インキュベートした。最後に、１００μＬのテトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）（Ｋｅｍ－Ｅｎ－Ｔｅｃカタログ番号４３８ＯＨ）を加え、プレートを、暗闇および３００ｒｐｍでの振盪において２０℃で１５分間、インキュベートした。各インキュベーションステップ後、プレートを洗浄緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．２）中で５回、洗浄した。ＴＭＢ反応を、１００μｌの停止溶液（１％ＨＣＬ）を加えることにより停止し、４５０ｎｍで分光光度的に測定し、参照として６５０ｎｍを用いた。標準曲線を、ＣＯ５－ＭＭＰペプチド（ＨＭＧＲＥＧＲＥＧＥ）の段階希釈により実施し、４－パラメトリック数学的フィットモデルを用いてプロットした。標準濃度は、０ｎｇ／ｍＬ、１５．６２５ｎｇ／ｍＬ、３１．２５ｎｇ／ｍＬ、６２．５ｎｇ／ｍＬ、１２５ｎｇ／ｍＬ、２５０ｎｇ／ｍＬ、５００ｎｇ／ｍＬ、１０００ｎｇ／ｍＬだった。

【表５３】

表53．研究に関する記載

	対照	AS
N(女性/男性)	40 (21/19)	40 (19/21)
年齢(範囲)	43.0年 (18-66)	42.5年 (29-63)
CRP [95% CI]	3016 ng/ml [1595, 4438]	4061 ng/ml [2426, 5696]
BASDAI		3.79 [0.01, 0.45]
mSASSS		5.08 [0.04, 1.14]

【０１９６】

図１２は、以下のシグナルのパーセント阻害を示すＣＯ５－ＭＭＰのＥＬＩＳＡの特徴づけにおいて得られた結果を示す。Ａ）遊離ペプチド（ＨＭＧＲＥＧＲＥＧＥ）、未切断Ｖ型コラーゲン、ＭＭＰ－９切断型Ｖ型コラーゲン、ＭＭＰ－２切断型Ｖ型コラーゲン；Ｂ）遊離ペプチド（ＨＭＧＲＥＧＲＥＧＥ）、ＭＭＰ－１３切断型Ｖ型コラーゲン、ＭＭＰ－９切断型Ｉ型コラーゲン、伸長させたペプチド（ＧＨＭＧＲＥＧＲＥＧ）。

【０１９７】

図１３は、非疾患対象（ＮＤ、ｎ＝４０）および強直性脊椎炎患者（ＡＳ、ｎ＝４０）におけるＣＯ５－ＭＭＰの測定の結果を示す。バーは、平均レベル±平均値の標準誤差（ＳＥＭ）を示す。群を、マンホイットニーによって比較した。

【実施例９】

【０１９８】

＜エラスチンＥＬＮ－５５２（ＥＬＭ－２）ＧＶＡＰＧＩＧＰＧＧ．（配列番号３０８）＞

［材料および方法］

表５４．エラスチンネオエピトーププログラムの記載。下向きの矢印は切断部位を示し、伸長させたペプチドにおいて伸長しているアミノ酸には下線が引かれている。

【表５４】

プログラム番号	標的配列（ヒト）	標的に関する記載	相同性	ID	選択ペプチドおよび除外ペプチド
NB244	GIGPGG↓ Aa 547-552 ELN-552 アッセイ	分解マーカーとしてのMMP9/12により切断されたエラスチン	ヒト	インビトロおよびインビボでの切断	gvapGIGPGG gvapGIGPGGVA 配列番号309

【０１９９】

［ＥＬＩＳＡ手順ＥＬＮ－５５２（ＥＬＭ２）］

アッセイ緩衝液およびプレートを室温に平衡させた。アッセイ緩衝液（５０ｍＭのＰＢＳ、１％ＢＳＡ、０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０、ｐＨ７．４０）中に２．５ｎｇ／ｍＬに希釈した１００μＬのビオチン化ペプチド（ビオチン－ＣＧＧ－ＧＶＡＰＧＩＧＰＧＧ　配列番号２８７）を用いて、９６ウェルのストレプトアビジンコーティングされたプレートをコーティングした。プレートを、３００ｒｐｍで振盪させながら、２０℃で３０分間、インキュベートし、洗浄緩衝液（２０ｍＭのＴｒｉｓ、５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．２）中で５回、洗浄した。各血清試料を、アッセイ緩衝液中に２倍に希釈し、２０μＬの血清希釈溶液またはペプチドキャリブレータ（２５０ｎｇ／ｍＬから開始）を各ウェルに加えた。６５ｎｇ／ｍＬの濃度の１００μＬのＨＲＰ標識ＮＢ２４４－２Ｂ４抗体を各ウェ

ルに加え、プレートを、３００ｒｐｍで振盪させながら、２０℃で１時間、インキュベートさせておいた。プレートを洗浄緩衝液中で５回、洗浄し、１００μＬのＴＭＢを加え、プレートを暗闇中、２０℃で１５分間、インキュベートした。１００μＬの停止溶液（１％H_2SO_4）を加え、プレートを、ＥＬＩＳＡリーダーにおいて４５０ｎｍで読み取り、参照として６５０ｎｍを用いた。検量線を、４パラメータ数学的フィットモデルを用いてフィットさせた。

【０２００】

［ＥＬＮ－５５２アッセイの臨床的確証］

ＥＬＮ－５５２アッセイを、アテローム性動脈硬化コホートである、ＢｉｏＣｏｒｅコホートにおいて試験した。コホートを、アッセイにおいて希釈せずに実行した。ＢｉｏＣｏｒｅコホートにおける患者は、臨床症状に基づいて以下の４つの群に分けられる。確認された急性心筋梗塞を有する患者であるＡＭＩ群、ＡＭＩが疑われるが、トロポニン－Ｔレベルに基づいた診断がない患者である非ＡＭＩ群、ａｇａｔｓｔｏｎスコアに基づいた高い冠動脈カルシウムを示すが、臨床症状がない患者である、高冠動脈カルシウム群、および陰性対照群である冠動脈カルシウムなしの群。冠動脈カルシウムなしの群における患者は、彼らのＣＰＲ数に基づいてランダムに選択され、アテローム性動脈硬化の臨床症状またはバイオマーカー徴候をもたない。全ては、コホートの残りの部分と性別および年齢がマッチされている。各群において３０人の患者があり、１２０人の患者の研究となっている。ＢｉｏＣｏｒｅデータの一部の個体群統計学的表は表５５に見られる。

表５５．ＢｉｏＣｏｒｅコホートに関する個体群統計学的データ

値は、平均±標準偏差である。高Ｃｏｒ　Ｃａ：高い冠動脈カルシウム群、Ｃｏｒ　Ｃａなし：冠動脈カルシウムなしの群。ＢＰ：血圧、＊心臓スコアは、年齢、収縮期血圧、ｍｍｏｌ／Ｌでの総コレステロール、および喫煙状態に基づいた心血管疾患のリスクの評価である。＊＊１人の患者のみからのＡｇａｔｓｔｏｎスコア。

【表５５】

群	年齢(年)	収縮期血圧 (mmHg)	拡張期血圧 (mmHg)	総コレステロール (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)	Agatston スコア	心臓スコア
AMI (n=30)	64.5±9	159±28	88±16	4.7±1.3	1.2±0.3	2.9±1.2	・---	9.7±5.4
非 AMI (n=30)	60.2±8	143±26	81±14	4.9±0.9	1.5±0.7	2.7±0.7	498**	8.7±5.7
高 Cor Ca (n=30)	60.3±0.3	147±20	86±11	5.5±1.2	1.4±0.5	3.3±1	1509±1070	8.3±6.2
Cor Caなし (n=30)	60.3±0.4	145±14	86±10	5.2±1.2	1.3±0.4	3.1±1	0.00	6.3±4.5

【０２０１】

統計学

ＥＬＮ－５５２アッセイにおいて２つのコホートを検定する際、データを、ダゴスティーノ－ピアソンのオムニバス検定を用いてガウス分布についてチェックし、ヒストグラムを作成することにより分布を視覚的にチェックした。その後、異なる群を、ノンパラメトリックｔ検定を用いて差について検定した。

【０２０２】

結果

ＥＬＮ－５５２は、急性心筋梗塞を有する患者において上昇している

ＥＬＮ－５５２を、ＢｉｏＣｏｒｅアテローム性動脈硬化コホートにおいて試験した。ＥＬＮ－５５２のレベルは、非ＡＭＩと比較して、ＡＭＩを有する患者由来の血清において有意に高かった（ｐ＜０．０１）（エラー！参照源が見つからない。１４）。患者は、臨床症状および画像化マーカーに基づいて群に分けられている。ＡＭＩ群および非ＡＭＩ群を網羅するバーは、ノンパラメトリックｔ検定によって計算されたこれらの群の間での有意差を示す。＊＊は０．０１未満のｐ値を示す。比較について、ｙ軸は、（エラー！参照源が見つからない）におけるものと同じ値を有する。ノンパラメトリックｔ検定を用いて、群間の最も高い差はＡＭＩ群と非ＡＭＩ群の間で見出されることが明らかである。ＡＭＩ群と冠動脈カルシウムなしの群の間において、ｐ＝０．０７のほぼ有意な差があり、非ＡＭＩ群と高冠動脈カルシウム群の間では、０．０８のｐ値があり、より大きい患者の群、およびそれにより高い検出力が、これらの差を確認し得、かつ、さらにアッセイを特徴づけ得ることを示唆した。

【０２０３】

本明細書において、明確に他に指示がない限り、単語「または（ｏｒ）」は、提示された条件のうちの１つのみが満たされることを必要とする機能語「排他的ｏｒ」とは対照的に、その条件のうちの一方または両方が満たされる場合、真の値を戻す機能語の意味で用いられる。単語「含むこと（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」は、「からなること（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」を意味するよりむしろ、「含むこと（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」の意味で用いられる。上記で認知された全ての先行の教示は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書におけるいかなる先行の公表された文書の認知も、その教示が、オーストラリアまたは他の場所においてその公表日時点で、共通の一般知識であったことの承認または表示であると解釈されるべきではない。

【０２０４】

［文献リスト］

【表５６Ａ】

Reference List

1. World Health Organization. Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Peducing Risks, Promoting Healthy Life, Geneva: WHO, 2002:1-230.

2. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. J Pathol 2008;214:199-210.

3. Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2004;1:98-105.

4. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3:349-363.

5. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. J Clin Invest 2007;117:524-529.

6. Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. Hepatology 2002;36:S47-S56.

7. Gagliano N, Arosio B, Grizzi F, Masson S, Tagliabue J, Dioguardi N, Vergani C, Annoni G. Reduced collagenolytic activity of matrix metalloproteinases and development of liver fibrosis in the aging rat. Mech Ageing Dev 2002;123:413-425.

8. Laurent GJ. Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. Am J Physiol 1987;252:C1-C9.

9. Mays PK, McAnulty RJ, Campa JS, Laurent GJ. Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues. Importance of degradation of newly synthesized collagen in regulating collagen production. Biochem J 1991;276 (Pt 2):307-313.

10. Garrone R, Lethias C, Le Guellec D. Distribution of minor collagens during skin development. Microsc Res Tech 1997;38:407-412.

11. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev 2003;55:1531-1546.

【表５６Ｂ】

12. Phan SH, Thrall RS. Pulmonary Fibrosis. Lung Biology in Health and Disease. 80 ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995.

13. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The hepatic extracellular matrix. II. Ontogenesis, regeneration and cirrhosis. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1993;423:77-84.

14. Gilliam AC. Scleroderma. Curr Dir Autoimmun 2008;10:258-279.

15. Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. J Cell Mol Med 2006;10:76-99.

16. Heinegard D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. FASEB J 1989;3:2042-2051.

17. Svensson L, Oldberg A, Heinegard D. Collagen binding proteins. Osteoarthritis and Cartilage 2001;9:S23-S28.

18. Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. Structure and function of aggrecan. Cell Res 2002;12:19-32.

19. Krusius T, Gehlsen KR, Ruoslahti E. A fibroblast chondroitin sulfate proteoglycan core protein contains lectin-like and growth factor-like sequences. J Biol Chem 1987;262:13120-13125.

20. Yang BL, Zhang Y, Cao L, Yang BB. Cell adhesion and proliferation mediated through the G1 domain of versican. J Cell Biochem 1999;72:210-220.

21. Rauch U, Karthikeyan L, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK. Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain. J Biol Chem 1992;267:19536-19547.

22. Yamada H, Watanabe K, Shimonaka M, Yamaguchi Y. Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family. J Biol Chem 1994;269:10119-10126.

【表５６Ｃ】

23. Blochberger TC, Cornuet PK, Hassell JR. Isolation and partial characterization of lumican and decorin from adult chicken corneas. A keratan sulfate-containing isoform of decorin is developmentally regulated. J Biol Chem 1992;267:20613-20619.

24. Fisher LW, Termine JD, Young MF. Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. J Biol Chem 1989;264:4571-4576.

25. Toyama-Sorimachi N, Sorimachi H, Tobita Y, Kitamura F, Yagita H, Suzuki K, Miyasaka M. A novel ligand for CD44 is serglycin, a hematopoietic cell lineage-specific proteoglycan. Possible involvement in lymphoid cell adherence and activation. J Biol Chem 1995;270:7437-7444.

26. Bartlett AH, Hayashida K, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. Mol Cells 2007;24:153-166.

27. Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. Cell 1993;73:1435-1444.

28. Olsen BR. Life without perlecan has its problems. J Cell Biol 1999;147:909-912.

29. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med 1999;340:448-454.

30. Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. Semin Liver Dis 2001;21:373-384.

31. Guo J, Friedman SL. Hepatic fibrogenesis. Semin Liver Dis 2007;27:413-426.

32. Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJ, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, Clark N, Murphy G. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. Hepatology 1996;24:176-184.

【表５６Ｄ】

33. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Lee CS, Chun JG, McKee PA. Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. Blood 2006;107:1397-1404.

34. Acharya PS, Zukas A, Chandan V, Katzenstein AL, Pure E. Fibroblast activation protein: a serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis. Hum Pathol 2006;37:352-360.

35. Levy MT, McCaughan GW, Marinos G, Gorrell MD. Intrahepatic expression of the hepatic stellate cell marker fibroblast activation protein correlates with the degree of fibrosis in hepatitis C virus infection. Liver 2002;22:93-101.

36. Meyer O. Prognostic markers for systemic sclerosis. Joint Bone Spine 2006;73:490-494.

37. Hummers LK. Microvascular damage in systemic sclerosis: detection and monitoring with biomarkers. Curr Rheumatol Rep 2006;8:131-137.

38. McHugh NJ, Distler O, Giacomelli R, Riemekasten G. Non organ based laboratory markers in systemic sclerosis. Clin Exp Rheumatol 2003;21:S32-S38.

39. Muller-Quernheim J. Serum markers for the staging of disease activity of sarcoidosis and other interstitial lung diseases of unknown etiology. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 1998;15:22-37.

40. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. Clin Chim Acta 2007;381:107-113.

41. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of hepatic fibrosis, fibrogenesis and genetic pre-disposition pending between fiction and reality. J Cell Mol Med 2007;11:1031-1051.

42. Mariat C. [Diagnosis and follow-up of chronic kidney graft dysfunction: from DFG to new biomarkers]. Nephrol Ther 2008;4 Suppl 3:S204-S207.

【表５６Ｅ】

43. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, Kato S, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Abe Y, Kubota K, Saito S, Iwasaki T, Terauchi Y, Togo S, Maeyama S, Nakajima A. High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. J Gastroenterol 2007;42:573-582.

44. Wong VS, Hughes V, Trull A, Wight DG, Petrik J, Alexander GJ. Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. J Viral Hepat 1998;5:187-192.

45. Parise ER, Oliveira AC, Figueiredo-Mendes C, Lanzoni V, Martins J, Nader H, Ferraz ML. Noninvasive serum markers in the diagnosis of structural liver damage in chronic hepatitis C virus infection. Liver Int 2006;26:1095-1099.

46. McHutchison JG, Blatt LM, de Medina M, Craig JR, Conrad A, Schiff ER, Tong MJ. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. J Gastroenterol Hepatol 2000;15:945-951.

47. Camacho VR, Silveira TR, Oliveira JR, Barros SG, Cerski CT. Relationship between serum concetrations of type III procollagen, hyluronic acid and histopathological findings in the liver of HCV-positive blood donors. Arq Gastroenterol 2007;44:118-122.

48. Lorenzo-Zuniga V, Bartoli R, Masnou H, Montoliu S, Morillas RM, Planas R. Serum concentrations of insulin-like growth factor-I (igf-I) as a marker of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Dig Dis Sci 2007;52:3245-3250.

49. Manolakopoulos S, Bethanis S, Liapi C, Stripeli F, Sklavos P, Margeli A, Christidou A, Katsanika A, Vogiatzakis E, Tzourmakliotis D, Theocharis S. An assessment of serum leptin levels in patients with chronic viral hepatitis: a prospective study. BMC Gastroenterol 2007;7:17.

【表５６Ｆ】

50. Camacho VR, Silveira TR, Oliveira JR, Barros SG, Cerski CT. Relationship between serum concetrations of type III procollagen, hyluronic acid and histopathological findings in the liver of HCV-positive blood donors. Arq Gastroenterol 2007;44:118-122.

51. Leroy V, Hilleret MN, Sturm N, Trocme C, Renversez JC, Faure P, Morel F, Zarski JP. Prospective comparison of six non-invasive scores for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. J Hepatol 2007;46:775-782.

52. Trocme C, Leroy V, Sturm N, Hilleret MN, Bottari S, Morel F, Zarski JP. Longitudinal evaluation of a fibrosis index combining MMP-1 and PIIINP compared with MMP-9, TIMP-1 and hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C treated by interferon-alpha and ribavirin. J Viral Hepat 2006;13:643-651.

53. Zheng M, Cai WM, Weng HL, Liu RH. ROC curves in evaluation of serum fibrosis indices for hepatic fibrosis. World J Gastroenterol 2002;8:1073-1076.

54. Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska ME, Bauer M, Kaczmarski M, Voelker M, Schuppan D. Serum fibrosis markers as predictors of an antifibrotic effect of interferon alfa in children with chronic hepatitis B. Eur J Gastroenterol Hepatol 2005;17:843-848.

55. 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;12:3338-3343.

56. Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Hadziyannis E, Georgiou A, Kafiri G, Tiniakos DG, Manesis EK, Archimandritis AJ. Serum adipokine levels in chronic liver diseases: association of resistin levels with fibrosis severity. Scand J Gastroenterol 2008;43:1128-1136.

57. Patel K, Gordon SC, Jacobson I, Hezode C, Oh E, Smith KM, Pawlotsky JM, McHutchison JG. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. J Hepatol 2004;41:935-942.

【表５６Ｇ】

58. Lieber CS, Weiss DG, Paronetto F. Value of fibrosis markers for staging liver fibrosis in patients with precirrhotic alcoholic liver disease. Alcohol Clin Exp Res 2008;32:1031-1039.

59. Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez-Bauer E, Bruguera M, Sanchez-Tapias JM, Rodes J. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. Hepatology 2002;36:986-992.

60. Bourliere M, Penaranda G, Renou C, Botta-Fridlund D, Tran A, Portal I, Lecomte L, Castellani P, Rosenthal-Allieri MA, Gerolami R, Ouzan D, Deydier R, Degott C, Halfon P. Validation and comparison of indexes for fibrosis and cirrhosis prediction in chronic hepatitis C patients: proposal for a pragmatic approach classification without liver biopsies. J Viral Hepat 2006;13:659-670.

61. Cacoub P, Carrat F, Bedossa P, Lambert J, Penaranda G, Perronne C, Pol S, Halfon P. Comparison of non-invasive liver fibrosis biomarkers in HIV/HCV co-infected patients: the fibrovic study--ANRS HC02. J Hepatol 2008;48:765-773.

62. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. J Acquir Immune Defic Syndr 2005;40:538-544.

63. Grigorescu M, Rusu M, Neculoiu D, Radu C, Serban A, Catanas M, Grigorescu MD. The FibroTest value in discriminating between insignificant and significant fibrosis in chronic hepatitis C patients. The Romanian experience. J Gastrointestin Liver Dis 2007;16:31-37.

64. Halfon P, Bacq Y, De MA, Penaranda G, Bourliere M, Ouzan D, Tran A, Botta D, Renou C, Brechot MC, Degott C, Paradis V. Comparison of test performance profile for blood tests of liver fibrosis in chronic hepatitis C. J Hepatol 2007;46:395-402.

【表５６Ｈ】

65. Halfon P, Bourliere M, Deydier R, Botta-Fridlund D, Renou C, Tran A, Portal I, Allemand I, Bertrand JJ, Rosenthal-Allieri A, Rotily M, Sattonet C, Benderitter T, Saint Paul MC, Bonnot HP, Penaranda G, Degott C, Masseyeff MF, Ouzan D. Independent prospective multicenter validation of biochemical markers (fibrotest-actitest) for the prediction of liver fibrosis and activity in patients with chronic hepatitis C: the fibropaca study. Am J Gastroenterol 2006;101:547-555.

66. Leroy V, Halfon P, Bacq Y, Boursier J, Rousselet MC, Bourliere M, De MA, Sturm N, Hunault G, Penaranda G, Brechot MC, Trocme C, Cales P. Diagnostic accuracy, reproducibility and robustness of fibrosis blood tests in chronic hepatitis C: a meta-analysis with individual data. Clin Biochem 2008;41:1368-1376.

67. Ratziu V, Massard J, Charlotte F, Messous D, Imbert-Bismut F, Bonyhay L, Tahiri M, Munteanu M, Thabut D, Cadranel JF, Le BB, de L, V, Poynard T. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. BMC Gastroenterol 2006;6:6.

68. Poynard T, Imbert-Bismut F, Ratziu V, Chevret S, Jardel C, Moussalli J, Messous D, Degos F. Biochemical markers of liver fibrosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial. J Viral Hepat 2002;9:128-133.

69. Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le CS, Messous D, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratziu V. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. Clin Chem 2004;50:1344-1355.

70. Poynard T, Morra R, Halfon P, Castera L, Ratziu V, Imbert-Bismut F, Naveau S, Thabut D, Lebrec D, Zoulim F, Bourliere M, Cacoub P, Messous D, Munteanu M, de L, V. Meta-analyses of FibroTest diagnostic value in chronic liver disease. BMC Gastroenterol 2007;7:40.

【表５６Ｉ】

71. Ngo Y, Munteanu M, Messous D, Charlotte F, Imbert-Bismut F, Thabut D, Lebray P, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratziu V, Poynard T. A prospective analysis of the prognostic value of biomarkers (FibroTest) in patients with chronic hepatitis C. Clin Chem 2006;52:1887-1896.

72. Naveau S, Raynard B, Ratziu V, Abella A, Imbert-Bismut F, Messous D, Beuzen F, Capron F, Thabut D, Munteanu M, Chaput JC, Poynard T. Biomarkers for the prediction of liver fibrosis in patients with chronic alcoholic liver disease. Clin Gastroenterol Hepatol 2005;3:167-174.

73. Myers RP, Tainturier MH, Ratziu V, Piton A, Thibault V, Imbert-Bismut F, Messous D, Charlotte F, Di M, V, Benhamou Y, Poynard T. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. J Hepatol 2003;39:222-230.

74. Jacqueminet S, Lebray P, Morra R, Munteanu M, Devers L, Messous D, Bernard M, Hartemann-Heurtier A, Imbert-Bismut F, Ratziu V, Grimaldi A, Poynard T. Screening for liver fibrosis by using a noninvasive biomarker in patients with diabetes. Clin Gastroenterol Hepatol 2008;6:828-831.

75. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. J Acquir Immune Defic Syndr 2005;40:538-544.

76. Poynard T, Zoulim F, Ratziu V, Degos F, Imbert-Bismut F, Deny P, Landais P, El HA, Slama A, Blin P, Thibault V, Parvaz P, Munteanu M, Trepo C. Longitudinal assessment of histology surrogate markers (FibroTest-ActiTest) during lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B infection. Am J Gastroenterol 2005;100:1970-1980.

【表５６Ｊ】

77. Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le CS, Messous D, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratziu V. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. Clin Chem 2004;50:1344-1355.

78. Myers RP, Tainturier MH, Ratziu V, Piton A, Thibault V, Imbert-Bismut F, Messous D, Charlotte F, Di M, V, Benhamou Y, Poynard T. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. J Hepatol 2003;39:222-230.

79. Carvalho-Filho RJ, Schiavon LL, Narciso-Schiavon JL, Sampaio JP, Lanzoni VP, Ferraz ML, Silva AE. Optimized cutoffs improve performance of the aspartate aminotransferase to platelet ratio index for predicting significant liver fibrosis in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus co-infection. Liver Int 2008;28:486-493.

80. Al-Mohri H, Cooper C, Murphy T, Klein MB. Validation of a simple model for predicting liver fibrosis in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. HIV Med 2005;6:375-378.

81. Cales P, Laine F, Boursier J, Deugnier Y, Moal V, Oberti F, Hunault G, Rousselet MC, Hubert I, Laafi J, Ducluzeaux PH, Lunel F. Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD. J Hepatol 2008.

82. Paggi S, Colli A, Fraquelli M, Vigano M, Del PP, Facciotto C, Colombo M, Ronchi G, Conte D. A non-invasive algorithm accurately predicts advanced fibrosis in hepatitis C: a comparison using histology with internal-external validation. J Hepatol 2008;49:564-571.

83. Trang T, Petersen JR, Snyder N. Non-invasive markers of hepatic fibrosis in patients co-infected with HCV and HIV: comparison of the APRI and FIB-4 index. Clin Chim Acta 2008;397:51-54.

84. Snyder N, Gajula L, Xiao SY, Grady J, Luxon B, Lau DT, Soloway R, Petersen J. APRI: an easy and validated predictor of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C. J Clin Gastroenterol 2006;40:535-542.

【表５６Ｋ】

85. Snyder N, Nguyen A, Gajula L, Soloway R, Xiao SY, Lau DT, Petersen J. The APRI may be enhanced by the use of the FIBROSpect II in the estimation of fibrosis in chronic hepatitis C. Clin Chim Acta 2007;381:119-123.

86. Hongbo L, Xiaohui L, Hong K, Wei W, Yong Z. Assessing routine and serum markers of liver fibrosis in CHB patients using parallel and serial interpretation. Clin Biochem 2007;40:562-566.

87. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. J Acquir Immune Defic Syndr 2005;40:538-544.

88. Adams LA, Bulsara M, Rossi E, DeBoer B, Speers D, George J, Kench J, Farrell G, McCaughan GW, Jeffrey GP. Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. Clin Chem 2005;51:1867-1873.

89. Koda M, Matunaga Y, Kawakami M, Kishimoto Y, Suou T, Murawaki Y. FibroIndex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Hepatology 2007;45:297-306.

90. Metwally MA, Zein CO, Zein NN. Predictors and noninvasive identification of severe liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Dig Dis Sci 2007;52:582-588.

91. Mohamadnejad M, Montazeri G, Fazlollahi A, Zamani F, Nasiri J, Nobakht H, Forouzanfar MH, Abedian S, Tavangar SM, Mohamadkhani A, Ghoujeghi F, Estakhri A, Nouri N, Farzadi Z, Najjari A, Malekzadeh R. Noninvasive markers of liver fibrosis and inflammation in chronic hepatitis B-virus related liver disease. Am J Gastroenterol 2006;101:2537-2545.

92. Zaman A, Rosen HR, Ingram K, Corless CL, Oh E, Smith K. Assessment of FIBROSpect II to detect hepatic fibrosis in chronic hepatitis C patients. Am J Med 2007;120:280-14.

【表５６Ｌ】

93. Patel K, Nelson DR, Rockey DC, Afdhal NH, Smith KM, Oh E, Hettinger K, Vallee M, Dev A, Smith-Riggs M, McHutchison JG. Correlation of FIBROSpect II with histologic and morphometric evaluation of liver fibrosis in chronic hepatitis C. Clin Gastroenterol Hepatol 2008;6:242-247.

94. Sebastiani G, Vario A, Guido M, Noventa F, Plebani M, Pistis R, Ferrari A, Alberti A. Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C. J Hepatol 2006;44:686-693.

95. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. Lancet 2001;357:1069-1075.

96. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. J Acquir Immune Defic Syndr 2005;40:538-544.

97. Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le BB, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, de L, V. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. Gastroenterology 2005;128:343-350.

98. Guanabens N, Pares A, Alvarez L, Martinez de Osaba MJ, Monegal A, Peris P, Ballesta AM, Rodes J. Collagen-related markers of bone turnover reflect the severity of liver fibrosis in patients with primary biliary cirrhosis. J Bone Miner Res 1998;13:731-738.

99. Moller S, Hansen M, Hillingso J, Jensen JE, Henriksen JH. Elevated carboxy terminal cross linked telopeptide of type I collagen in alcoholic cirrhosis: relation to liver and kidney function and bone metabolism. Gut 1999;44:417-423.

【表５６Ｍ】

100. Rosen HN, Parker RA, Greenspan SL, Iloputaife ID, Bookman L, Chapin D, Perlmutter I, Kessel B, Qvist P, Rosenblatt M. Evaluation of ability of biochemical markers of bone turnover to predict a response to increased doses of HRT. Calcif Tissue Int 2004;74:415-423.

101. Lein M, Wirth M, Miller K, Eickenberg HU, Weissbach L, Schmidt K, Haus U, Stephan C, Meissner S, Loening SA, Jung K. Serial Markers of Bone Turnover in Men with Metastatic Prostate Cancer Treated with Zoledronic Acid for Detection of Bone Metastases Progression. Eur Urol 2007.

102. Attallah AM, Toson EA, Shiha GE, Omran MM, bdel-Aziz MM, El-Dosoky I. Evaluation of serum procollagen aminoterminal propeptide III, laminin, and hydroxyproline as predictors of severe fibrosis in patients with chronic hepatitis C. J Immunoassay Immunochem 2007;28:199-211.

103. Ulrich D, Noah EM, von HD, Pallua N. TIMP-1, MMP-2, MMP-9, and PIIINP as serum markers for skin fibrosis in patients following severe burn trauma. Plast Reconstr Surg 2003;111:1423-1431.

104. Farkkila M, Rautiainen H, Karkkainen P, Karvonen AL, Nurmi H, Niemela O. Serological markers for monitoring disease progression in noncirrhotic primary biliary cirrhosis on ursodeoxycholic acid therapy. Liver Int 2008;28:787-797.

105. Guechot J, Poupon RE, Giral P, Balkau B, Giboudeau J, Poupon R. Relationship between procollagen III aminoterminal propeptide and hyaluronan serum levels and histological fibrosis in primary biliary cirrhosis and chronic viral hepatitis C. J Hepatol 1994;20:388-393.

106. Klappacher G, Franzen P, Haab D, Mehrabi M, Binder M, Plesch K, Pacher R, Grimm M, Pribill I, Eichler HG, . Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. Am J Cardiol 1995;75:913-918.

【表５６Ｎ】

107. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. Lancet 2001;357:1069-1075.

108. Suzuki,K., Enghild,J.J., Morodomi,T., Salvesen,G., and Nagase,H. 1990. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). Biochemistry 29:10261-10270.

109. Lijnen,H.R. 2001. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. Thromb. Haemost. 86:324-333.

110. Tam LS, Gu J, Yu D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis. Nat Rev Rheumatol 2010 Jul;6(7):399-405.

111. Braun J, Pincus T. Mortality, course of disease and prognosis of patients with ankylosing spondylitis. Clin Exp Rheumatol 2002 Nov;20(6 Suppl 28):S16-S22.

112. Kumar VAAKFN. Tissue renewal and repair: regeneration, healing, and fibrosis. Pathologic basis of disease.Philadelphia, Pennsylvania, USA: Elsevier Saunders, 2005. 87-118.

113. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. Semin Liver Dis 2001 Aug;21(3):351-372.

114. Lochter A, Bissell MJ. An odyssey from breast to bone: multi-step control of mammary metastases and osteolysis by matrix metalloproteinases. APMIS 1999 Jan;107(1):128-136.

115. Karsdal MA, Madsen SH, Christiansen C, Henriksen K, Fosang AJ, Sondergaard BC. Cartilage degradation is fully reversible in the presence of aggrecanase but not matrix metalloproteinase activity. Arthritis Res Ther 2008;10(3):R63.

116. Karsdal MA, Henriksen K, Leeming DJ, Mitchell P, Duffin K, Barascuk N, et al. Biochemical markers and the FDA Critical Path: how biomarkers may contribute to the understanding of pathophysiology and provide unique and necessary tools for drug development. Biomarkers 2009 May;14(3):181-202.

【表５６０】

117. Bay-Jensen AC, Hoegh-Madsen S, Dam E, Henriksen K, Sondergaard BC, Pastoureau P, et al. Which elements are involved in reversible and irreversible cartilage degradation in osteoarthritis? Rheumatol Int 2010 Feb;30(4):435-442.

118. Zhen EY, Brittain IJ, Laska DA, Mitchell PG, Sumer EU, Karsdal MA, et al. Characterization of metalloprotease cleavage products of human articular cartilage. Arthritis Rheum 2008 Aug;58(8):2420-2431.

119. Boeker KH, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Manns MP, Lichtinghagen R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Clin Chim Acta 2002 Feb;316(1-2):71-81.

120. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. J Hepatol 2007 May;46(5):955-975.

121. Kirimlioglu H, Kirimlioglu V, Yilmaz S. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in donor liver, cirrhotic liver, and acute rejection after human liver transplantation. Transplant Proc 2008 Dec;40(10):3574-3577.

122. Schaller S, Henriksen K, Hoegh-Andersen P, Sondergaard BC, Sumer EU, Tanko LB, et al. In vitro, ex vivo, and in vivo methodological approaches for studying therapeutic targets of osteoporosis and degenerative joint diseases: how biomarkers can assist? Assay Drug Dev Technol 2005 Oct;3(5):553-580.

123. Wenstrup RJ, Florer JB, Brunskill EW, Bell SM, Chervoneva I, Birk DE. Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. J Biol Chem 2004 Dec 17;279(51):53331-53337.

124. Symoens S, Renard M, Bonod-Bidaud C, Syx D, Vaganay E, Malfait F, et al. Identification of binding partners interacting with the alpha1-N-propeptide of type V collagen. Biochem J 2010 Dec 22;433(2):371-381.

【表５６Ｐ】

125. Berendsen AD, Bronckers AL, Smit TH, Walboomers XF, Everts V. Collagen type V enhances matrix contraction by human periodontal ligament fibroblasts seeded in three-dimensional collagen gels. Matrix Biol 2006 Oct;25(8):515-522.

126. Murasawa Y, Hayashi T, Wang PC. The role of type V collagen fibril as an ECM that induces the motility of glomerular endothelial cells. Exp Cell Res 2008 Dec 10;314(20):3638-3653.

127. Vassiliadis E, Veidal SS, Simonsen H, Larsen DV, Vainer B, Chen X, et al. Immunological detection of the type V collagen propeptide fragment, PVCP-1230, in connective tissue remodeling associated with liver fibrosis. Biomarkers 2011 May 25.

128. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Linsenmayer TF. Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. J Cell Biol 1988 Mar;106(3):999-1008.

129. Wenstrup RJ, Florer JB, Willing MC, Giunta C, Steinmann B, Young F, et al. COL5A1 haploinsufficiency is a common molecular mechanism underlying the classical form of EDS. Am J Hum Genet 2000 Jun;66(6):1766-1776.

130. Schwarze U, Atkinson M, Hoffman GG, Greenspan DS, Byers PH. Null alleles of the COL5A1 gene of type V collagen are a cause of the classical forms of Ehlers-Danlos syndrome (types I and II). Am J Hum Genet 2000 Jun;66(6):1757-1765.

131. Michalickova K, Susic M, Willing MC, Wenstrup RJ, Cole WG. Mutations of the alpha2(V) chain of type V collagen impair matrix assembly and produce ehlers-danlos syndrome type I. Hum Mol Genet 1998 Feb;7(2):249-255.

132. Gefter ML, Margulies DH, Scharff MD. A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. Somatic Cell Genet 1977 Mar;3(2):231-236.

【表５６Ｑ】

133. Segovia-Silvestre T, Reichenbach V, Fernandez-Varo G, Vassiliadis E, Barascuk N, Morales-Ruiz M, Karsdal MA, Jimenez W. Circulating CO3-610, a degradation product of collagen III, closely reflects liver collagen and portal pressure in rats with fibrosis. Fibrogenesis Tissue Repair 2011; 4: 19

134. Clarià J , Jimenez W. Renal dysfunction and ascites in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats. 1999; 379-96

135. Munoz-Luque J, Ros J, Fernandez-Varo G, Tugues S, Morales-Ruiz M, Alvarez CE, Friedman SL, Arroyo V, Jimenez W. Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. J Pharmacol Exp Ther 2008; 324: 475-83

136. Veidal SS, Karsdal MA, Nawrocki A, Larsen MR, Dai Y, Zheng Q, Hagglund P, Vainer B, Skjot-Arkil H, Leeming DJ. Assessment of proteolytic degradation of the basement membrane: a fragment of type IV collagen as a biochemical marker for liver fibrosis. Fibrogenesis Tissue Repair 2011; 4: 22

137. Veidal SS, Vassiliadis E, Barascuk N, Zhang C, Segovia-Silvestre T, Klickstein L, Larsen MR, Qvist P, Christiansen C, Vainer B, Karsdal MA. Matrix metalloproteinase-9-mediated type III collagen degradation as a novel serological biochemical marker for liver fibrogenesis. Liver Int 2010; 30: 1293-304

138. Clarkson TB, Prichard RW, Morgan TM, Petrick GS, Klein KP. Remodeling of coronary arteries in human and nonhuman primates. JAMA 1994; 271: 289-94

139. Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De BG, De BD, Ducimetiere P, Jousilahti P, Keil U, Njolstad I, Oganov RG, Thomsen T, Tunstall-Pedoe H, Tverdal A, Wedel H, Whincup P, Wilhelmsen L, Graham IM. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. Eur Heart J 2003; 24: 987-1003

【図１】

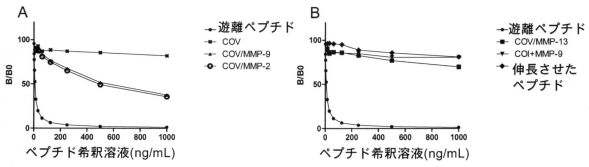


図1

【図２】

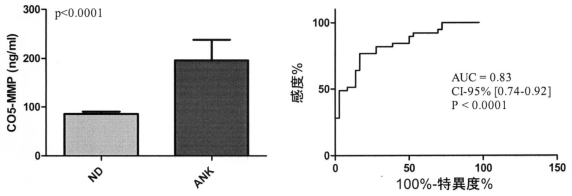


図2

【図３】

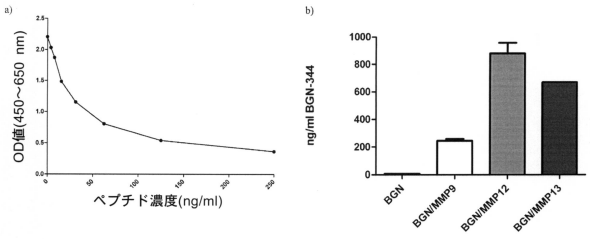


図3

【図４】

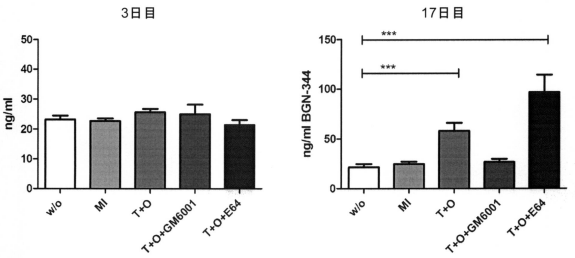


図4

【図５】

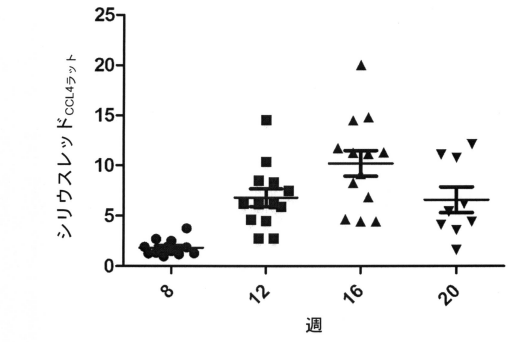


図5

【図６】

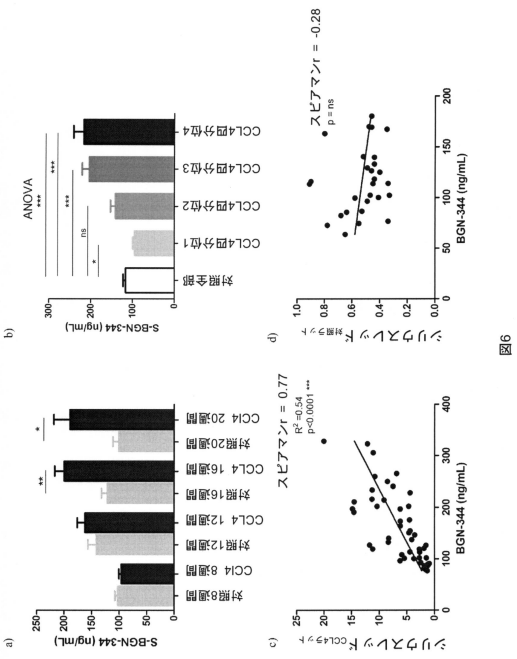


図6

【図７】

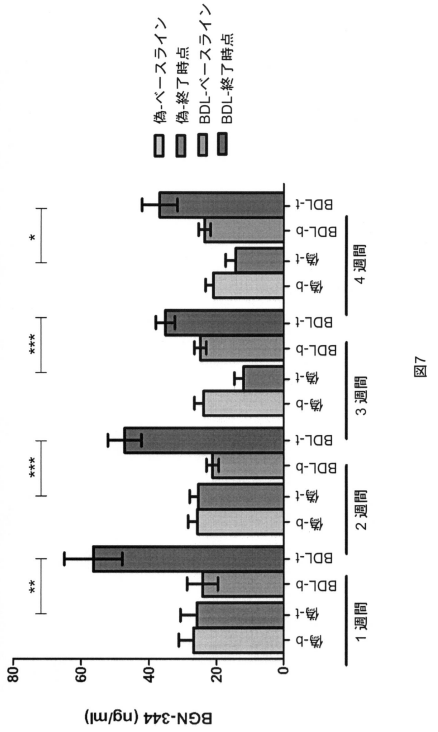


図7

【図８】

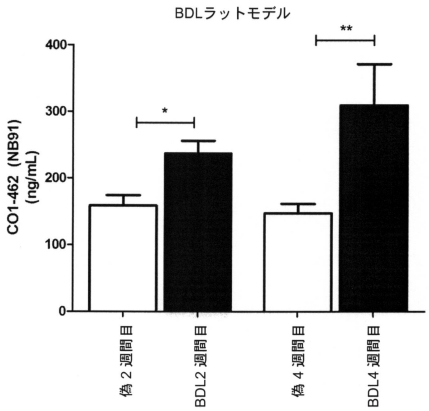


図8

【図９】

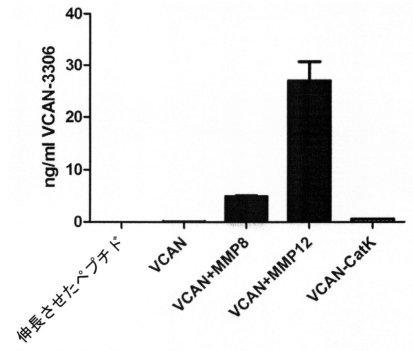


図9

【図１０】

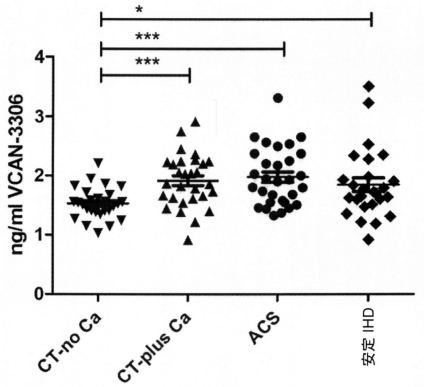


図10

【図１１】

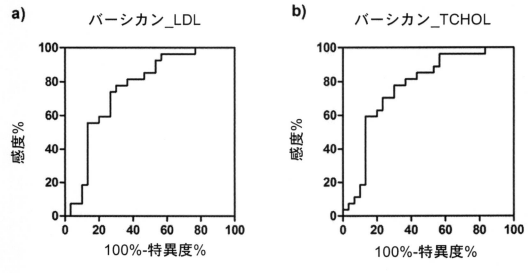
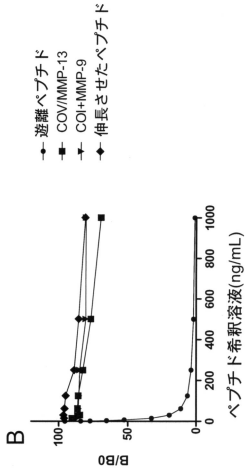


図11

【図１２】



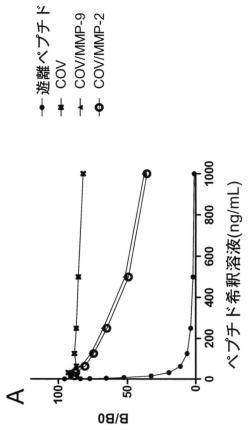


図12

【図１３】

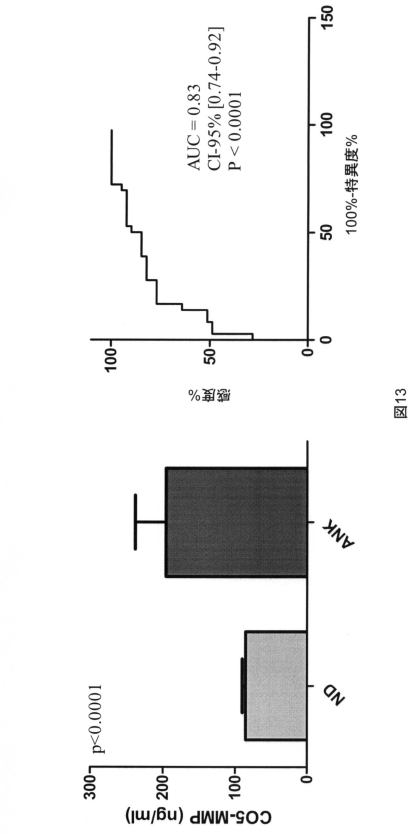


図13

【図１４】

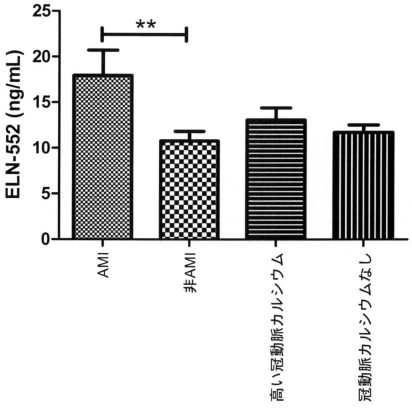


図14

【配列表】
0006162115000001.app

フロントページの続き

(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　100180231
弁理士　水島　亜希子
(72)発明者　ヴァイダル，サンネ・エス
デンマーク国，３６５０　オルスティッケ，ビルケモーセン　３３
(72)発明者　カルスダル，モルテン・エイ
デンマーク国，２１００　コペンハーゲン　オー・スラッシュ，エッケルスベリィスガーデ　１３
(72)発明者　レーミング，ディアーナ・ジェイ
デンマーク国，２４５０　コペンハーゲン　エスヴイ，ペテル・ホルムスヴァイ　２５，３．２
(72)発明者　バラスクク，ナターシャ
デンマーク国，２３００　コペンハーゲン　エス，アイランズ・ブリュッゲ　７７Ｃ，１．ｔｖ
(72)発明者　ショート‐アルキル，ヘレーネ
デンマーク国，２３００　コペンハーゲン　エス，イェンス・オットー・クラーグス・ガーデ　１８，４．ｔｖ
(72)発明者　ヴァシリアディス，エフスタティオス
デンマーク国，２６１０　レズオウア，タルンヴァイ　５９ｍｆ

審査官　草川　貴史

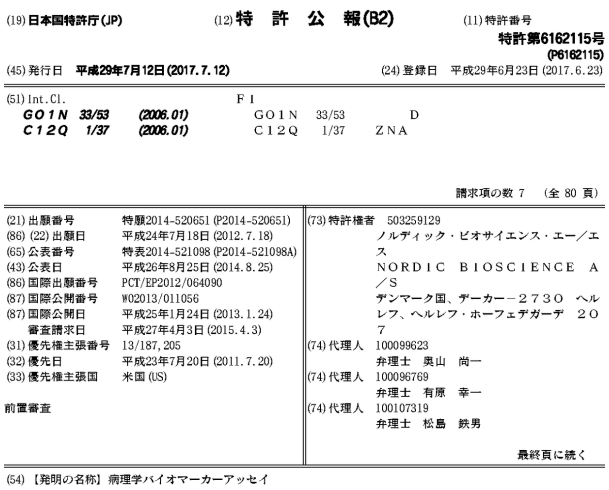
(56)参考文献　国際公開第２００９／０５９９７２（WO，Ａ２）
米国特許出願公開第２０１１／０２１４９９０（ＵＳ，Ａ１）
国際公開第２０１１／０２７８５０（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ　３３／４８－３３／９８
Ｃ１２Ｑ　１／３７

专利名称(译)	病理生物标志物测定		
公开(公告)号	JP6162115B2	公开(公告)日	2017-07-12
申请号	JP2014520651	申请日	2012-07-18
申请(专利权)人(译)	北欧生物科学ER / ES		
当前申请(专利权)人(译)	北欧生物科学ER / ES		
[标]发明人	ヴァイダルサンネエス カルスダルモルテンエイ レーミングディアーナジェイ バラスククナターシャ ショートアルキルヘレーネ ヴァシリアディスエフスタティオス		
发明人	ヴァイダル,サンネ·エス カルスダル,モルテン·エイ レーミング,ディアーナ·ジェイ バラスクク,ナターシャ ショート-アルキル,ヘレーネ ヴァシリアディス,エフスタティオス		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/37		
CPC分类号	C07K14/78 C12Q1/37 G01N33/6893 G01N2333/4737 G01N2333/775 G01N2333/78 G01N2800/32		
FI分类号	G01N33/53.D C12Q1/37.ZNA		
代理人(译)	中村绫子		
优先权	13/187205 2011-07-20 US		
其他公开文献	JP2014521098A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

诊断或定量病理状况的方法包括进行免疫测定以测量天然存在于生物流体样品中的含有新表位的蛋白质片段，以及使所述患者中所述测定的升高高于正常水平与病理的存在或程度相关。 所述免疫测定通过以下方法进行：包括使所述样品中天然存在的蛋白质片段与与通过蛋白酶切割蛋白质形成的新表位反应的免疫结合伴侣接触，并测量肽片段与所述免疫结合的结合程度。 伴侣测量其中包含所述新表位的蛋白质片段。 描述了来自I型胶原，III型胶原，IV型胶原，V型胶原，VI型胶原，弹性蛋白，双糖链蛋白聚糖，decorin，lumican，versican，C反应蛋白，ApoE和层粘连蛋白的新表位。



(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号 特許第6162115号 (P6162115)

(45)発行日　平成29年7月12日(2017.7.12)　(24)登録日　平成29年6月23日(2017.6.23)

(51)Int.Cl.　F I
G01N 33/53 (2006.01)　G01N 33/53 D
C12Q 1/37 (2006.01)　C12Q 1/37 ZNA

請求項の数 7　(全 80 頁)

(21)出願番号　特願2014-520651 (P2014-520651)
(86)(22)出願日　平成24年7月18日(2012.7.18)
(65)公表番号　特表2014-521098 (P2014-521098A)
(43)公表日　平成26年8月25日(2014.8.25)
(86)国際出願番号　PCT/EP2012/064090
(87)国際公開番号　WO2013/011056
(87)国際公開日　平成25年1月24日(2013.1.24)
審査請求日　平成27年4月3日(2015.4.3)
(31)優先権主張番号　13/187,205
(32)優先日　平成23年7月20日(2011.7.20)
(33)優先権主張国　米国(US)

前置審査

(73)特許権者　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・ホーフェデガーデ　２０７
(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】病理学バイオマーカーアッセイ