

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6505749号  
(P6505749)

(45) 発行日 平成31年4月24日(2019.4.24)

(24) 登録日 平成31年4月5日(2019.4.5)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 C
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37 Z N A

請求項の数 11 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2016-563251 (P2016-563251)	(73) 特許権者	503259129
(86) (22) 出願日	平成27年1月8日(2015.1.8)		ノルディック・バイオサイエンス・エー／エス
(65) 公表番号	特表2017-504040 (P2017-504040A)		NORDIC BIOSCIENCE A
(43) 公表日	平成29年2月2日(2017.2.2)		／S
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/050269		デンマーク国、デーカー-2730 ヘル
(87) 国際公開番号	W02015/104342		レフ、ヘルレフ・ホーフエデガーデ 20
(87) 国際公開日	平成27年7月16日(2015.7.16)		7
審査請求日	平成29年9月21日(2017.9.21)	(74) 代理人	100099623
(31) 優先権主張番号	1400472.5		弁理士 奥山 尚一
(32) 優先日	平成26年1月13日(2014.1.13)	(74) 代理人	100096769
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 有原 幸一
		(74) 代理人	100107319
			弁理士 松島 鉄男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺疾患および他の疾患用の生化学マーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

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

【化1】

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

の1つに対して特異的な結合親和性を有し、

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

【請求項 2】

前記免疫学的結合パートナーが、特異的な結合親和性を有するモノクローナル抗体またはモノクローナル抗体のフラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記免疫学的結合パートナーおよび競合剤が前記サンプルの存在下でインキュベートされて、前記競合剤が前記サンプル中の前記ペプチドフラグメントと競合して前記免疫学的結合パートナーに結合する競合免疫アッセイとして行われる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記競合剤が、前記ネオエピトープを明らかにするような、合成ペプチドであるか、またはエラスチンの切断によって形成される精製された天然ペプチドである、請求項 3 に記載の方法。

10

【請求項 5】

前記免疫学的結合パートナーと、前記免疫学的結合パートナーが結合するペプチドフラグメント中に含有されるペプチド配列に対して特異的な結合親和性を有する更なる免疫学的結合パートナーとを前記サンプルの存在下でインキュベートして、その両方を前記サンプル中の前記ペプチドフラグメントと一緒に結合させるサンドイッチ免疫アッセイとして行われる、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記サンプルが、尿、血清、血液、血漿、または唾液のサンプルである、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記サンプルが、患者由来のサンプルであり、前記ペプチドフラグメントの前記結合の前記判定レベルを、( a ) 比較可能な健常な個体および / または ( b ) 病的状態に特有の値と比較することをさらに含む、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

エラスチンから誘導された末端配列

【化 2】

.....FGPGVV  '334	(配列番号2)	30
.....VPGLGV  '602	(配列番号3)	
208'   IKAPKL.....	(配列番号4)	

の 1 つと特異的に反応する免疫学的結合パートナーであって、

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

【請求項 9】

40

モノクローナル抗体またはその結合フラグメントである、請求項 8 に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のモノクローナル抗体を産生する細胞株。

【請求項 11】

請求項 8 または 9 のいずれか 1 項に記載の免疫学的結合パートナーと、前記免疫学的結合パートナーと結合する競合剤とを含む免疫アッセイキットであって、場合によっては、洗浄試薬、バッファ、反応停止試薬、酵素標識、酵素標識基質、校正標準、抗マウス抗体、および前記キットを用いてアッセイを行うための説明書の 1 つまたは複数を含む、キット。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

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

## 【背景技術】

## 【0002】

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

## 【0003】

驚くべきことに、発明者らは、種々の肺疾患の診断および予後について信頼性が高いバイオマーカーとして役立ち得る、エラスチンの特定のHNE-またはMMP7-誘導フラグメントを同定することができた。

## 【0004】

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

## 【0005】

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

## 【0006】

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

## 【0007】

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

10

20

30

40

50

## 【0008】

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

## 【0009】

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

10

## 【発明の概要】

## 【0010】

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

20

## 【0011】

## 【化1】

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

の1つに対して特異的な結合親和性を有する、方法を提供する。

30

## 【0012】

記号

## 【化2】

||

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

40

## 【0013】

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

## 【0014】

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

## 【0015】

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

50

【 0 0 1 6 】

本発明は、エラスチンから誘導された末端配列

【 0 0 1 7 】

【 化 3 】

.....FGPGVV||'334

.....VPGLGV||'602

208' ||IKAPKL.....

10

の1つと特異的に反応する免疫学的結合パートナーを含む。

【 0 0 1 8 】

好ましくは、免疫学的結合パートナーは、配列..... F G P G V Vと反応するならば、..... F G P G V V Gと特異的に反応せず、..... V P G L G Vと反応するならば、..... V P G L G V Gと特異的に反応せず、I K A P K L.....と反応するならば、P I K A P K L.....と特異的に反応しない。

【 0 0 1 9 】

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

【 0 0 2 0 】

本発明は、記載される免疫学的結合パートナーと、前記免疫学的結合パートナーと結合する競合剤とを含む免疫アッセイキットであって、場合によっては、洗浄試薬、バッファ、反応停止試薬 ( s t o p p i n g r e a g e n t )、酵素標識、酵素標識基質、較正標準、抗マウス抗体、および前記キットを用いてアッセイを行うための説明書の1つまたは複数を含む、キットを含む。

20

【 0 0 2 1 】

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

30

【 0 0 2 2 】

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

【 0 0 2 3 】

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

【 0 0 2 4 】

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

40

【 0 0 2 5 】

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

【 0 0 2 6 】

50

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

【0027】

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

10

【0028】

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

【0029】

ある好ましい方法において、サンプルは患者由来のサンプルであり、本方法はさらに、前記ペプチドフラグメントの前記結合の判定レベルを、(a)比較可能な健常な個体および/または(b)関連する病的状態に特有の値と比較するステップと、場合によっては、より高いレベルの測定ペプチド(通常、より高いレベルの結合によって示される)を、より重度の前記状態と関連させるステップとを含む。サンプルは、一例として、尿、血清、血液、血漿、または唾液のサンプルであってよい。

20

【0030】

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

30

40

【0031】

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

【0032】

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

【0033】

50

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

【0034】

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

【0035】

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

【0036】

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

【0037】

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

【0038】

本明細書中に記載されるアッセイは、記載される疾患、および一般に患者におけるエラスチン関連病状の診断に有用である。また、試験は、疾患進行の評価、および治療に対す

10

20

30

40

50

る反応の監視に有用である。本発明の免疫学的結合パートナーはまた、本明細書中に記載されるエラスチンの切断産物の存在または位置を示すための免疫染色に用いられてもよい。

【0039】

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

【図面の簡単な説明】

【0040】

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

10

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

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

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

20

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

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

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

30

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

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

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

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

40

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

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

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

【図15】対照、扁平上皮癌(SCC)、COPD、およびIPFの患者由来の血清中のNB599エラスチンフラグメントの濃度を示す。対照とSCCとの間に、そしてCOP

50

Dと対照との間に、有意差がある。IPFと対照との間にも、統計的差異がある。

【実施例1】

【0041】

免疫化用のペプチドの選択

免疫化用に以下のペプチドを選択した。

【0042】

【表1】

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

10

【0043】

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

【実施例2】

【0044】

モノクローナル抗体の開発

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

【0045】

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

20

30

【0046】

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

【0047】

ネオエピトープ特異的モノクローナル抗体の選択:

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

40

【0048】

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

【0049】

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

【0050】

アッセイプロトコル:

96ウェルストレプトアビジンプレートを、コーターバッファ中に溶解したスクリーニ

50

ングペプチドでコーティングし、20℃にて30分間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄バッファ(20 mM トリス、50 mM NaCl、pH 7.2)中で5回洗浄した。20 µLのペプチド(選択、除外、またはナンセンス)またはヒトサンプルを適切なウェルに2連で加えた後に、100 µLのPOD結合モノクローナル抗体を加えてから、プレートをシェーカー上で1時間インキュベートした。洗浄後、100 µLテトラメチルベンジジン(TMB)(Kem-En-Tec)を加え、プレートを暗所で20℃にて15分間インキュベートした。

【0051】

全ての上記インキュベーション工程は、300 rpmでの振盪を含んだ。

【0052】

TMB反応は、100 µLの反応停止溶液(1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)を加えることによって止めた。吸光度は、650 nmを基準として、450 nmで測定した。選択ペプチドから作成したマスターキャリブプレートを較正曲線として用い、4パラメトリック数理フィットモデルを用いてプロットした。

【0053】

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

【実施例3】

【0054】

モノクローナル抗体NB590

図1は、NB590抗体に対する、遊離および伸長ペプチドの反応性を示す。吸光度の低下が、遊離ペプチド濃度の上昇と共に見られる。これは、ウェル内でスクリーニングペプチドの代わりに遊離ペプチドとの反応が増大したことによる。これは、伸長ペプチドには見られなかった。というのも、安定したB/B<sub>0</sub>レベルにより、NB590-01抗体と伸長ペプチドとの間で反応が非常に低かった、または反応がなかったことが示されたためである。

【0055】

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

【0056】

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

【実施例4】

【0057】

モノクローナル抗体NB592

図4は、NB592抗体に対する、遊離および伸長ペプチドの反応性を示す。吸光度の低下が、遊離ペプチド濃度の上昇と共に見られる。これは、ウェル内でスクリーニングペプチドの代わりに遊離ペプチドとの反応が増大したことによる。これは、伸長ペプチドには見られなかった。というのも、安定したB/B<sub>0</sub>レベルにより、伸長ペプチドとNB592抗体との間で反応が非常に低かった、または反応がなかったことが示されたためである。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 8 】

その後、NB 5 9 2 抗体の反応性を、エラスチン、MMP 2、MMP 7、MMP 9 および HNE でインビトロ切断したエラスチン、ならびにそれらの各バッファ中のプロテアーゼに対して試験した(図 5)。それらのバッファ中の選択されたプロテアーゼのみの反応性も含めている。NB 5 9 2 モノクローナル抗体は、明らかに、HNE によって誘導されたエラスチンフラグメントを区画している。遊離ペプチド濃度を基準として適用した。NB 5 9 2 抗体は、HNE で切断したエラスチンに対する反応性が非常に高い。NB 5 9 2 抗体および無傷のエラスチンまたは他のプロテアーゼで切断したエラスチンの反応性は、アッセイの検出下限に近い。微量のシグナルが、HNE およびそのバッファについてのみ示されるが、シグナルは、HNE で切断されたエラスチンについてのシグナルよりも 10

10

## 【 0 0 5 9 】

最後に、NB 5 9 2 抗体を、COPD、IPF、または扁平上皮癌の患者由来の血清サンプル中で試験し、健常な対照と比較した(図 6)。レベル増大の高い傾向が観察されたが、健常な対照と比較して、COPD および扁平上皮癌の患者において、NB 5 9 2 フラグメントの濃度に有意差はなかった( $p < 0.05$ )。対照と IPF 患者との間に差はなかった。このことは、これが横断研究であったという事実によって説明されるかもしれない。一方、IPF 患者の長期的な研究によって、差異が示されるかもしれない。

## 【 実施例 5 】

## 【 0 0 6 0 】

(比較)モノクローナル抗体 NB 5 9 3

図 7 は、NB 5 9 3 抗体に対する、遊離および伸長ペプチドの反応性を示す。吸光度の低下が、遊離ペプチド濃度の上昇と共に見られる。これは、ウェル内でスクリーニングペプチドの代わりに遊離ペプチドとの反応が増大したことによる。これは、伸長ペプチドには見られなかった。というのも、安定した  $B/B_0$  レベルにより、NB 5 9 3 抗体間で反応が非常に低かった、または反応がなかったことが示されたためである。

20

## 【 0 0 6 1 】

その後、NB 5 9 3 抗体の反応性を、エラスチン、HNE でインビトロ切断したエラスチン、および HNE バッファに対して試験した。5 9 3 モノクローナル抗体は、明らかに、無傷のエラスチンと比較して、HNE によって誘導されたエラスチンフラグメントに対する反応性が非常に高く、そのようなフラグメントを区画している。遊離ペプチド濃度を基準として適用した。無傷のエラスチンまたは HNE バッファに対する NB 5 9 3 抗体の反応性は、非常に低い。

30

## 【 0 0 6 2 】

最後に、図 9 は、NB 5 9 3 抗体の反応性、ならびに COPD 患者および健常な対照由来のヒト血清サンプルを示す。データは、健常な対照および罹患者の血清中で、抗体 NB 5 9 3 によって認識されるフラグメントが不在であること、または検出不可能な量で存在するのみであることを示す。

## 【 実施例 6 】

## 【 0 0 6 3 】

(比較)モノクローナル抗体 NB 5 9 5

図 10 は、NB 5 9 5 抗体に対する、遊離および伸長ペプチドの反応性を示す。吸光度の低下が、遊離ペプチド濃度の上昇と共に見られる。これは、ウェル内でスクリーニングペプチドの代わりに遊離ペプチドとの反応が増大したことによる。これは、伸長ペプチドには見られなかった。というのも、安定した  $B/B_0$  レベルにより、NB 5 9 5 抗体との反応が非常に低かった、または反応がなかったことが示されたためである。

40

## 【 0 0 6 4 】

その後(図 11)、NB 5 9 5 抗体の反応性を、エラスチン、MMP 2、MMP 7、MMP 9 および HNE でインビトロ切断したエラスチン、ならびにそれらの各バッファ中のプロテアーゼに対して試験した。5 9 5 モノクローナル抗体は、明らかに、MMP 7 によ

50

って誘導されたエラスチンフラグメントを区画し、MMP7で切断したエラスチンに対する反応性が高い。遊離ペプチド濃度を基準として適用した。無傷のエラスチンまたは他のプロテアーゼで切断したエラスチンに対するNB595抗体の反応性は、アッセイの検出下限に近い。

【0065】

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

【実施例7】

【0066】

NB599

図13は、NB599抗体に対する、遊離した伸長ペプチドの反応性を示す。吸光度の低下が、遊離ペプチド濃度の上昇と共に見られる。これは、ウェル内でスクリーニングペプチドの代わりに遊離ペプチドとの反応が増大したことによる。吸光度の低下は、伸長ペプチドについて、有意により低かった。というのも、B/B<sub>0</sub>レベルにより、ペプチドとNB599抗体との反応が弱いことが示されたためである。

【0067】

その後、NB599抗体の、エラスチン、MMP2、MMP7、MMP9およびHNEでインビトロ切断したエラスチン、ならびにそれらの各バッファ中のプロテアーゼに対する反応性(図14)を判定した。NB599モノクローナル抗体は、明らかに、MMP7によって誘導されたエラスチンフラグメントを区画している。NB599抗体は、MMP7で切断したエラスチンに対する反応性が、他のプロテアーゼで切断したエラスチンよりもかなり高い。HNE+HNEバッファに対する反応性が多少存在したが、これは、HNEで切断したエラスチンよりもかなり低い。

【0068】

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

【0069】

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

【0070】

10

20

30

40

## 【表 2 A】

## References

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

## 【表 2 B】

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

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

10

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

20

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

30

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

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

40

【 図 1 】

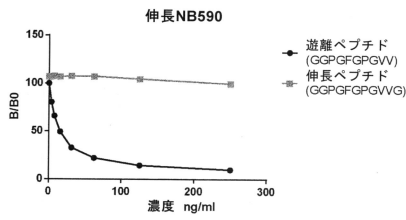


Figure 1

【 図 3 】

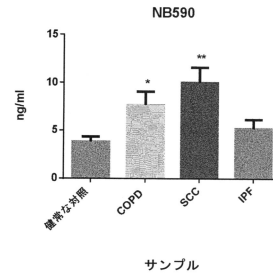


Figure3

【 図 2 】

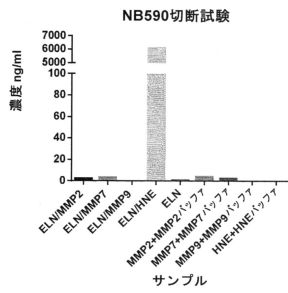


Figure 2

【 図 4 】

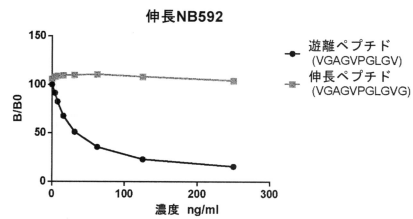


Figure 4

【 図 5 】

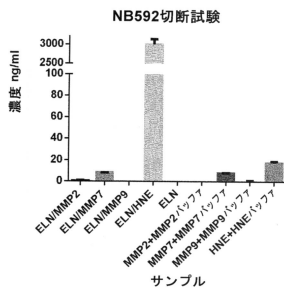


Figure 5

【 図 7 】

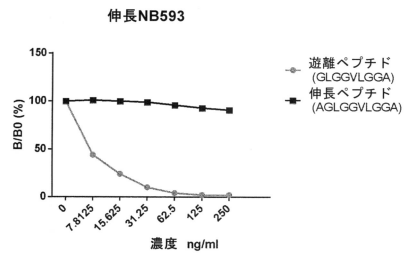


Figure 7

【 図 6 】

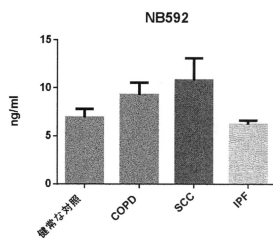


Figure 6

【 図 8 】

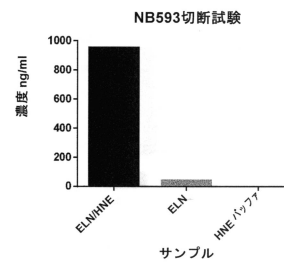


Figure 8

【 図 9 】

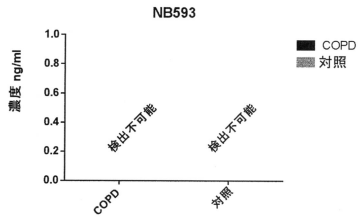


Figure 9

【 図 1 1 】

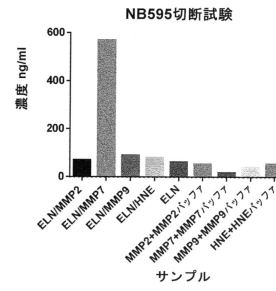


Figure 11

【 図 1 0 】

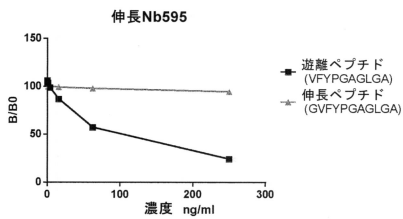


Figure 10

【 図 1 2 】

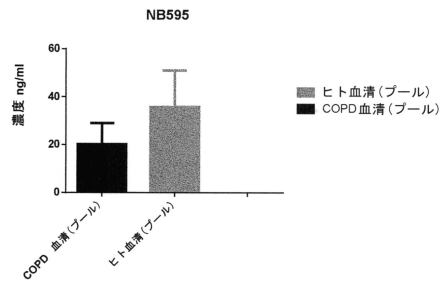


Figure 12

【 図 1 3 】

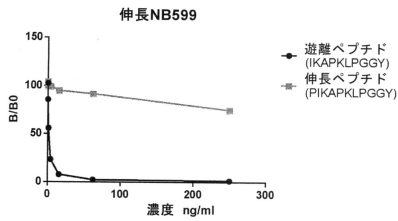


Figure 13

【 図 1 5 】

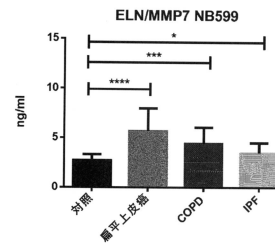


Figure 15

【 図 1 4 】

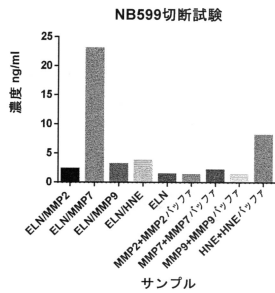


Figure 14

【配列表】

0006505749000001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100114591  
弁理士 河村 英文
- (74)代理人 100125380  
弁理士 中村 綾子
- (74)代理人 100142996  
弁理士 森本 聡二
- (74)代理人 100166268  
弁理士 田中 祐
- (74)代理人 100170379  
弁理士 徳本 浩一
- (74)代理人 100180231  
弁理士 水島 亜希子
- (72)発明者 クリステンセン, ヤコブ・フル  
デンマーク国, 2860 セーボー, セーボーフース・パーク 6, 1 . t h .
- (72)発明者 レーミング, ディアーナ・ジュリー  
デンマーク国, 3060 エスパゲア, ガメル・ストランヴァイ 209D, 1 . S a l
- (72)発明者 カルスダル, モルテン  
デンマーク国, 2100 コペンハーゲン オー・スラッシュ, エッケルスベリイスゲーゼ 13

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 特表2012-522233(JP, A)  
HEINZ, A et al., Insights into the degradation of human elastin by matrilysin-1, Biochimie, 2010年 9月25日, Vol. 93, 187-194  
he, J et al., Characterization of peptide fragments from lung elastin degradation in chronic obstructive pulmonary disease, Exp Lung Res., 2010年, Vol. 36, No. 9, 548-557

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/48 - 33/98  
C12Q 1/37  
CAplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

专利名称(译)	肺和其他疾病的生化标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP6505749B2</a>	公开(公告)日	2019-04-24
申请号	JP2016563251	申请日	2015-01-08
申请(专利权)人(译)	北欧生物科学ER / ES		
当前申请(专利权)人(译)	北欧生物科学ER / ES		
[标]发明人	クリステンセンヤコブフル レーミングディアーナジュリー カルスダルモルテン		
发明人	クリステンセン,ヤコブ・フル レーミング,ディアーナ・ジュリー カルスダル,モルテン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/536 C12Q1/37		
CPC分类号	G01N33/6878 C07K16/18 C07K16/40 C07K2317/33 C07K2317/34 G01N33/577 G01N33/6893 G01N2333/78 G01N2333/96411 G01N2333/96419 G01N2800/122 G01N2800/7052		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/536.C C12Q1/37.ZNA		
代理人(译)	河村 英文 中村 綾子 田中 宇 徳本 光一		
优先权	2014000472 2014-01-13 GB		
其他公开文献	JP2017504040A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

用于定量在肺病如COPD, SCC或IPF中升高的肽片段的生物测定方法, 包括通过在体内用蛋白酶切割弹性蛋白而在切割位点形成的新表位, 样品通过使抗体与对新表位氨基酸序列具有特异性结合亲和力的抗体接触, 并测定结合水平, 其中抗体具有末端序列..... FGPGVV。结合以下之一的方法, 以及用于此类方法的抗体和免疫测定试剂盒。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6505749号 (P6505749)
(45) 発行日 平成31年4月24日(2019. 4. 24)	(24) 登録日 平成31年4月5日(2019. 4. 5)	
(5) Int. Cl. F I		
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 D	
G O 1 N 33/536 (2006. 01)	G O 1 N 33/536 C	
C 1 2 Q 1/37 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/37 Z N A	
請求項の数 11 (全 18 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-563251 (P2016-563251)	(73) 特許権者 503259129	
(86) (22) 出願日 平成27年1月8日(2015. 1. 8)	ノルディック・バイオサイエンス・エー/エス	
(65) 公表番号 特表2017-504040 (P2017-504040A)	NORDIC BIOSCIENCE A	
(43) 公表日 平成29年2月2日(2017. 2. 2)	/S	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2015/050269	デンマーク国、ゲーカール 2730 ヘル	
(87) 国際公開番号 W02015/104342	レフ、ヘルレフ・ホーフエザガーザ 20	
(87) 国際公開日 平成27年7月16日(2015. 7. 16)	7	
審査請求日 平成29年9月21日(2017. 9. 21)	(74) 代理人 100099023	
(31) 優先権主張番号 1400472. 5	弁理士 奥山 尚一	
(32) 優先日 平成26年1月13日(2014. 1. 13)	(74) 代理人 100096769	
(33) 優先権主張国 英国 (GB)	弁理士 有原 幸一	
	(74) 代理人 100107319	
	弁理士 松島 鉄男	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 肺疾患および他の疾患用の生化学マーカー		