

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-525400
(P2018-525400A)

(43) 公表日 平成30年9月6日(2018.9.6)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)		C07K 16/18	ZNA	4B064
G01N 33/53 (2006.01)		G01N 33/53	D	4H045
C12P 21/08 (2006.01)		C12P 21/08		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2018-508168 (P2018-508168)	(71) 出願人	503259129 ノルディック・バイオサイエンス・エー/エス NORDIC BIOSCIENCE A/S デンマーク国、デーカー 2730 ヘルレフ、ヘルレフ・ホーフエダガーデ 207
(86) (22) 出願日	平成28年8月16日 (2016.8.16)	(74) 代理人	100099623 弁理士 奥山 尚一
(85) 翻訳文提出日	平成30年4月13日 (2018.4.13)	(74) 代理人	100096769 弁理士 有原 幸一
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/069453	(74) 代理人	100107319 弁理士 松島 鉄男
(87) 国際公開番号	W02017/029300		
(87) 国際公開日	平成29年2月23日 (2017.2.23)		
(31) 優先権主張番号	1514658.2		
(32) 優先日	平成27年8月18日 (2015.8.18)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

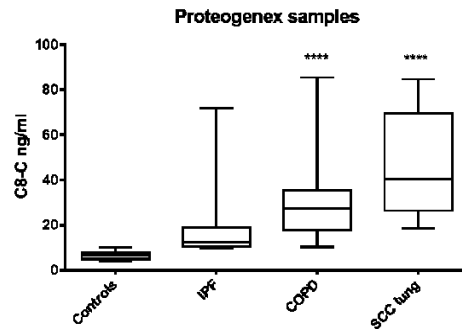
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 V I I I 型コラーゲン配列のイムノアッセイ

(57) 【要約】

本発明は、V I I I 型コラーゲンの a 1 鎖の C 末端エピトープまたは V I I I 型コラーゲンの成熟形態の a 1 鎖の N 末端エピトープと特異的に反応する免疫学的結合パートナー、および試料中の V I I I 型コラーゲンの成熟 a 1 鎖の C 末端エピトープまたは N 末端エピトープを検出または定量するためのイムノアッセイ方法を提供する。

Figure 2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

V I I I 型コラーゲンの 1 鎖の C 末端エピトープまたは V I I I 型コラーゲンの成熟形態の 鎖の N 末端エピトープと特異的に反応する免疫学的結合パートナー。

【請求項 2】

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

【請求項 3】

前記 C 末端アミノ酸配列の C 延長伸長バージョンである

【化 1】



を認識せず、それに結合もしない、請求項 2 に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 4】

前記 C 末端アミノ酸配列の C 短縮バージョンである . . S F S G Y L L Y P - C O O H を認識せず、それに結合もしない、請求項 2 に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 5】

アミノ酸配列 . . S F S G Y L L Y P M - C O O H への前記抗体の親和性の、伸長アミノ酸配列

【化 2】



への前記抗体の親和性に対する比、および / または短縮アミノ酸配列 . . S F S G Y L L Y P - C O O H への前記抗体の親和性に対する比が、10 対 1 より大きい、請求項 2 に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 6】

前記比が、1000 対 1 より大きい、請求項 5 に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 7】

N 末端アミノ酸配列 $\text{NH}_2 - \text{G A Y Y G I K P L P} . . .$ に含まれる前記 N 末端エピトープと特異的に結合する、請求項 1 に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 8】

前記 N 末端アミノ酸配列の N 延長伸長バージョンである

【化 3】



を認識せず、それに結合もしない、請求項 7 に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 9】

前記 N 末端アミノ酸配列の N 短縮バージョンである $\text{NH}_2 - \text{A Y Y G I K P L P} . . .$ を認識せず、それに結合もしない、請求項 7 に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 10】

アミノ酸配列 $\text{NH}_2 - \text{G A Y Y G I K P L P} . . .$ への前記免疫学的結合パートナーの親和性の、前記伸長アミノ酸配列

【化 4】



への前記免疫学的結合パートナーの親和性に対する比、および / または前記短縮アミノ酸配列 $\text{NH}_2 - \text{A Y Y G I K P L P} . . .$ への前記免疫学的結合パートナーの親和性に対する比が、10 対 1 より大きい、請求項 7 に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 11】

前記比が、1000 対 1 より大きい、請求項 10 に記載の免疫学的結合パートナー。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 1 3】

試料中の V I I I 型コラーゲンの成熟 1 鎖の C 末端エピトープまたは N 末端エピトープを検出または定量するためのイムノアッセイ方法であって、前記末端エピトープを含む試料と請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の免疫学的結合パートナーとを接触させるステップと、前記免疫学的結合パートナーの結合量を判定するステップとを含む方法。

【請求項 1 4】

前記試料が、生体液である、請求項 1 3 に記載の方法。

10

【請求項 1 5】

前記生体液が、血清、血漿、尿または羊水である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記イムノアッセイが、競合アッセイまたはサンドイッチアッセイである、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記イムノアッセイが、ラジオイムノアッセイまたは酵素結合免疫吸着アッセイである、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記方法により判定された V I I I 型コラーゲンの 1 鎖の前記 C 末端または N 末端エピトープの量を、V I I I 型コラーゲンの 1 鎖の前記 C 末端または N 末端エピトープの標準正常値と相関させて、正常値からのその変化を評価するステップをさらに含む、請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 1 9】

V I I I 型コラーゲンの 1 鎖の C 末端エピトープまたは N 末端エピトープの量を判定するためのアッセイキットであって、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の免疫学的結合パートナーと、以下の：

- ストレプトアビジン被覆 9 6 ウェルプレート

- ビオチン化ペプチド：ビオチン - L - S F S G Y L L Y P M - C O O H (式中、L は任意選択のリンカーである) でありうる、前記免疫学的結合パートナーと反応するペプチド

30

- ビオチン化ペプチド：NH₂ - G A Y Y G I K P L P - L - ビオチン (式中、L は任意選択のリンカーである) でありうる、前記免疫学的結合パートナーと反応するペプチド

- サンドイッチイムノアッセイにおいて使用するための、任意選択でビオチン化された二次抗体

- C 末端配列 . . S F S G Y L L Y P M - C O O H を含むキャリブレーターペプチド

- N 末端配列 NH₂ - G A Y Y G I K P L P . . . を含むキャリブレーターペプチド

- 抗体 H R P 標識キット

- 抗体放射標識キット

- アッセイ可視化キット

40

のうちの少なくとも 1 つと

を含むアッセイキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、V I I I 型コラーゲン 1 鎖の C 末端に存在するエピトープに結合する抗体、および前記エピトープを検出するイムノアッセイに関する。

【0 0 0 2】

本発明はまた、成熟 (すなわち、シグナル配列除去後の) V I I I 型コラーゲン 1 鎖の N 末端に存在するエピトープに結合する抗体、および前記エピトープを検出するイムノ

50

アッセイに関する。

【背景技術】

【0003】

V I I I型コラーゲンは、内皮細胞、ケラチノサイト、マスト細胞、微小血管内皮細胞および一部の腫瘍細胞の産物である。V I I I型コラーゲンは、強膜、皮膚および糸球体など多岐にわたる様々な細胞外マトリックス中にも存在する。V I I I型コラーゲンの機能は不明確であるが、最近の研究は、脈管構造におけるこのコラーゲンの重要性に光を当てている。特に重大なことは、平滑筋細胞遊走におけるそのアップレギュレーション、また平滑筋細胞表現型の維持における潜在的役割であろう。このコラーゲンが、様々な細胞の基質となり、血管新生における内皮細胞、血管内膜侵入における平滑筋細胞、および線維性状態における筋線維芽細胞の移動を助長することができるという推測 [1] は興味深い。

10

【0004】

V I I I型コラーゲンは、短鎖非線維性コラーゲンであり、角膜内皮細胞のデスメ膜（角膜内皮細胞と角膜実質を隔てる基底膜）の主成分である。V I I I型コラーゲンは、血管内皮の一部であり、細動脈および細静脈中に存在し、したがって心臓、脳、肝臓、肺、筋肉などにおいて見いだされるが、軟骨における軟骨細胞の周囲においても見いだされる [1]。ヒト 1プロコラーゲン遺伝子は、3番染色体上に位置し、その一方でヒト 2プロコラーゲン遺伝子は、1番染色体上に位置する。各鎖は、おおよそ60kDaの分子量を有する [2]。以前に、V I I I型コラーゲンは、2本の 1鎖および1本の 2鎖からなるヘテロ三量体として記載された [3] が、インビトロの研究により、 1または 2どちらかのホモ三量体も形成されることがあることが証明された [4]。加えて、これらのホモ三量体はペプシン耐性であり、また、免疫組織化学研究により、それらは必ずしも角膜、視神経、大動脈および臍帯に共同在するとは限らないことが証明された [5]。

20

【0005】

V I I I型コラーゲンは、大動脈および角膜内皮細胞はもちろん、肺動脈内皮細胞および微小血管内皮細胞によっても合成される。すべての内皮細胞がV I I I型コラーゲンを発現するとは限らず、したがってこのコラーゲンが大血管および小血管に存在しないこともある [6]。ヒトマスト細胞が正常および病的状態でV I I I型コラーゲンを産生することも証明されており、血管新生、組織再構築および線維化の一因となると推測されている [7]。

30

【0006】

血管新生、組織再構築および線維化は、腫瘍の形成および進行の重要な部分である [8]。肺は、表面積が大きく、基底膜および間質マトリックスが付随し、肺疾患を有する患者では、I型、I I I型、I V型およびV I型コラーゲンならびにエラスチンなどのマトリックスタンパク質が増加していることが周知である [9 ~ 13]。ほとんどの悪性腫瘍において腫瘍血管新生が見受けられるので、V I I I型コラーゲンは、がんに関連している可能性がある。腫瘍血管新生は、細胞増殖および転移などの腫瘍形成事象に間接的に関与する。前記腫瘍形成事象は、酸素および栄養素と腫瘍老廃物との交換に依存するためである [14]。血管新生中に、内皮細胞は、増殖および遊走するように誘導されるとともに、シグナル経路を活性化するようにも誘導され、その結果、細胞形態変化および血管新生性出芽が駆動される [15]。さらに、腫瘍血管は、散発的な血管新生および漏出性血管の形成につながる組織再構築の変化のため、休止状態になることができないことが多い。血管新生と同様に、線維化は、多くの悪性腫瘍において観察される現象である。がん線維化は、線維増生としても公知である。線維増生では、コラーゲンを含む細胞外マトリックス（ECM）タンパク質の発現の増加および変化を示す、永続的に活性化され続けるがん関連線維芽細胞（CAF）の蓄積が観察される [16]。線維増生は、腫瘍発生および進行に関与する重要かつ能動的な過程として明らかになりつつあり、とりわけ、がん細胞の遊走を促進することができる [17]。

40

50

【発明の概要】

【0007】

したがって、本発明の目的は、血管再構築および血管新生に関連する疾患、例えば、線維症およびがんと診断された患者からの血清試料中のV I I I型コラーゲンを定量することである。

【0008】

ヒトコラーゲンアルファ-1 (V I I I) の配列を配列番号1に示す。シグナルペプチド1-27 (M A V L P G P L Q L L G V L L T I S L S S I R L I Q A) は切断されて、成熟アルファ-1タンパク質鎖28-744が生じる。したがって、成熟アルファ-1タンパク質鎖のN末端の配列は、NH₂-G A Y Y G I K P L P . . . であり、C末端の配列は、. . . S F S G Y L L Y P M - C O O Hである。

10

【0009】

本発明者らは、成熟V I I I型-1鎖のC末端を標的にするモノクローナル抗体およびE L I S Aキットを今般開発した。本発明者らは、このキットおよびそれを用いて測定される反応性を、本明細書では「C8-C」と呼ぶ。

【0010】

本発明者らは、C8-Cのレベルが、様々なタイプのがんとともに、特発性肺線維症 (I P F)、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D) および肺扁平上皮癌において、対照と比較して上昇することを確認した。

20

【0011】

本発明は、V I I I型コラーゲンの1鎖のC末端エピトープと反応する免疫学的結合パートナーを、今般提供するものである。

【0012】

好ましくは、前記免疫学的結合パートナーは、C末端アミノ酸配列 . . . S F S G Y L L Y P M - C O O H に含まれる前記C末端エピトープと特異的に結合する。

【0013】

本明細書で使用する用語「免疫学的結合パートナー」は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含み、抗体の特異的結合断片、例えば、F a bまたはF (a b ')₂も含む。したがって、前記免疫学的結合パートナーは、特異的結合親和性を有するモノクローナル抗体またはその断片であってもよい。

30

【0014】

好ましくは、前記免疫学的結合パートナーは、. . . S F S G Y L L Y P M A - C O O H である前記C末端アミノ酸配列の伸長バージョンを認識せず、それに結合もしない。

【0015】

好ましくは、前記免疫学的結合パートナーは、. . . S F S G Y L L Y P - C O O H である前記C末端アミノ酸配列の短縮バージョンを認識せず、それに結合もしない (または認識せず、それに結合もしない)。

【0016】

好ましくは、アミノ酸配列 . . . S F S G Y L L Y P M - C O O H への前記抗体の親和性の、伸長アミノ酸配列 . . . S F S G Y L L Y P M A - C O O H への前記抗体の親和性に対する比、および/または短縮アミノ酸配列 . . . S F S G Y L L Y P - C O O H に対する比は、10対1より大きい。

40

【0017】

より一般的には、アミノ酸配列 . . . S F S G Y L L Y P M - C O O H への前記免疫学的結合パートナーの親和性の、前記伸長アミノ酸配列への前記免疫学的結合パートナーの親和性に対する比は、好ましくは10対1より大きく、好ましくは50対1より大きく、好ましくは100対1より大きく、好ましくは500対1より大きく、好ましくは1000対1より大きく、および最も好ましくは10,000対1より大きい。

【0018】

同様に好ましくは、アミノ酸配列 . . . S F S G Y L L Y P M - C O O H への前記免疫学

50

的結合パートナーの親和性の、前記短縮アミノ酸配列への前記免疫学的結合パートナーの親和性に対する比は、10対1より大きく、好ましくは50対1より大きく、好ましくは100対1より大きく、好ましくは500対1より大きく、好ましくは1000対1より大きく、および最も好ましくは10,000対1より大きい。

【0019】

本発明者らは、1鎖のN末端を標的にするモノクローナル抗体およびELISAキットも今般開発した。本発明者らは、このキットおよびそれを用いて測定される反応性を本明細書では「C8-N」と呼ぶ。

【0020】

したがって、本発明は、VII型コラーゲンの1鎖のN末端エピトープと反応する免疫学的結合パートナーも今般提供する。

10

【0021】

好ましくは、前記免疫学的結合パートナーは、N末端アミノ酸配列NH₂-GAYYG I K P L P . . . に含まれる前記N末端エピトープと特異的に結合する。

【0022】

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

【0023】

好ましくは、前記免疫学的結合パートナーは、NH₂-AGAYYG I K P L P . . . である前記N末端アミノ酸配列の伸長バージョンを認識せず、それに結合もしない。

20

【0024】

好ましくは、前記免疫学的結合パートナーは、NH₂-AYYG I K P L P . . . である前記N末端アミノ酸配列の短縮バージョンを認識せず、それに結合もしない(または認識せず、それに結合もしない)。

【0025】

より好ましくはさらに、アミノ酸配列NH₂-GAYYG I K P L P . . . への前記抗体の親和性の、伸長アミノ酸配列NH₂-AGAYYG I K P L P . . . への前記抗体の親和性に対する比、および/または短縮アミノ酸配列NH₂-AYYG I K P L P . . . に対する比は、10対1より大きい。

30

【0026】

より一般的には、アミノ酸配列NH₂-GAYYG I K P L P . . . への前記免疫学的結合パートナーの親和性の、前記伸長アミノ酸配列への前記免疫学的結合パートナーの親和性に対する比は、好ましくは10対1より大きく、好ましくは50対1より大きく、好ましくは100対1より大きく、好ましくは500対1より大きく、好ましくは1000対1より大きく、および最も好ましくは10,000対1より大きい。

【0027】

同様に好ましくは、アミノ酸配列NH₂-GAYYG I K P L P . . . への前記免疫学的結合パートナーの親和性の、前記短縮アミノ酸配列への前記免疫学的結合パートナーの親和性に対する比は、10対1より大きく、好ましくは50対1より大きく、好ましくは100対1より大きく、好ましくは500対1より大きく、好ましくは1000対1より大きく、および最も好ましくは10,000対1より大きい。

40

【0028】

本発明は、試料中のVII型コラーゲンの成熟1鎖のC末端エピトープまたはN末端エピトープを検出または定量するためのイムノアッセイの方法であって、前記末端エピトープを含む試料と上記の免疫学的結合パートナーとを接触させるステップ、および前記免疫学的結合パートナーの結合量を判定するステップを含む方法を含む。

【0029】

前記方法を使用して、生体液(biofluid)中のまたは細胞培養物の上清中のVII型コラーゲンの1鎖の前記C末端またはN末端エピトープの量を定量することが

50

できる。

【0030】

前記生体液は、例えば、血清、血漿、尿、痰または羊水でありうる。

【0031】

前記イムノアッセイは、競合アッセイまたはサンドイッチアッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイまたは酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）でありうる。

【0032】

そのような方法は、前記方法により判定されたV I I I型コラーゲンの 1鎖の前記C末端またはN末端エピトープの量を、V I I I型コラーゲンの 1鎖の前記C末端またはN末端エピトープの標準正常値と相関させて、正常値からのその変化を評価するステップをさらに含むことができる。

10

【0033】

このバイオマーカーを使用することにより、病状の診断を支援することができ、または、どの患者が、急速な状態悪化を被る可能性が高く、妥当な処置の臨床試験に参入させるのにより妥当な患者であるとするかについての診断を提供することができる。そのような病状および/または状態は、線維症およびがんを含む。線維性状態は、特発性肺線維症（IPF）および慢性閉塞性肺疾患（COPD）を（これらに限定されないが）含み、がんは、乳がん、結腸がん、黒色腫、肺扁平上皮癌（NSCLC）、卵巣がん、膵がん、前立腺がんおよび肺扁平上皮癌（SCLC）を（これらに限定されないが）含む。

【0034】

20

本発明のさらなる態様は、V I I I型コラーゲンの 1鎖のC末端エピトープまたはN末端エピトープの量を判定するためのアッセイキットであって、本発明の免疫学的結合パートナーと、

- ストレプトアビジン被覆96ウェルプレート

- ビオチン化ペプチド：ビオチン-L-SFSGYLLYPM-COOH（式中、Lは任意選択のリンカーである）でありうる、前記免疫学的結合パートナーと反応するペプチド

- ビオチン化ペプチド：NH₂-GAYYG I K P L P-L-ビオチン（式中、Lは任意選択のリンカーである）でありうる、前記免疫学的結合パートナーと反応するペプチド

- サンドイッチイムノアッセイにおいて使用するための、任意選択でビオチン化された二次抗体

30

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

- N末端配列NH₂-GAYYG I K P L P...を含むキャリブレーターペプチド

- 抗体HRP標識キット

- 抗体放射標識キット

- アッセイ可視化キット

のうちの少なくとも1つと

を含むアッセイキットを提供する。

【0035】

添付の図面を参照して本発明をさらに説明し、例証することにする。

40

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】2つのモノクローナル抗体のペプチド特異性試験からの結果を示す図である。

【図2】ヒト血清中のモノクローナル抗体13G5の反応性についての試験からの結果を示す図である。

【図3】ヒト血清中のモノクローナル抗体13G5の反応性についてのさらなる試験からの結果を示す図である。

【図4】ヒト血清中のモノクローナル抗体13G5の反応性についてのさらなる試験からの結果を示す図である。

【実施例】

50

【0037】

[実施例1]

< C 8 - C アッセイのための抗体開発 (クローン 1 3 G 5) >

本発明者らは、特異的エピトープモノクローナル抗体を生成するための免疫原性ペプチドとして、V I I I 型コラーゲン 1 鎖の最後の 1 0 個のアミノ酸 (^{7 3 5} S F S G Y L L Y P M ^{7 4 4}) を使用した。モノクローナル抗体の開発に使用した方法は、以前 [1 8] に記載された通りであった。簡単に言うと、4 ~ 6 週齢の B a l b / c マウスを、5 0 μ g の免疫原性ペプチドを含有する 2 0 0 μ l の乳化抗原で皮下免疫した。2 週間間隔で、フロイント不完全アジュバント中のもので、安定した血清力価レベルが達成されるまで逐次的に免疫処置を行い、2 回目の免疫処置以降マウスから採血した。各採血時、血清力価を検出し、最高の抗血清力価および最良の自然反応性 (n a t i v e r e a c t i v i t y) を有するマウスを融合のために選択した。選択したマウスを 1 カ月間休ませ、その後、1 0 0 μ L の 0 . 9 % 塩化ナトリウム溶液中の 5 0 μ g の免疫原性ペプチドで静脈内追加免疫し、その 3 日後、細胞融合のために脾臓を単離した。

10

【0038】

融合手順は、別の所 [1 9] で説明されている。簡単に言うと、マウス脾細胞を S P 2 / 0 骨髓腫融合パートナー細胞と融合した。融合細胞を、9 6 ウェルプレートにて培養し、C O 2 インキュベーターでインキュベートした。ここで、標準的な限界希釈法を用いてモノクローナルな増殖を促進した。選択ペプチドに特異的な細胞株であって、伸長ペプチド (S F S G Y L L Y P M A 、 C h i n e s e P e p t i d e C o m p a n y 、 C h i n a) と交差反応性でない細胞株を選択し、サブクローニングした。最後に、I g G カラムを使用してそれらの抗体を精製した。

20

【0039】

< C 8 - C アッセイプロトコル >

アッセイ開発に使用した E L I S A プレートには、R o c h e から入手したストレプトアビジン被覆 E L I S A プレート (カタログ番号 1 1 9 4 0 2 7 9) を用いた。すべての E L I S A プレートを、M o l e c u l a r D e v i c e s (C A , U S A) 製の E L I S A リーダー、S p e c t r a M a x M で分析した。本発明者らは、L i g h t n i n g l i n k H R P 標識キットを、その製造業者 (I n n o v a b i o s c i e n c e , B a b r a h a m , C a m b r i d g e , U K) の説明書に従って使用して、選択モノクローナル抗体をホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P) で標識した。アッセイ緩衝液 (5 0 m M T r i z m a , 0 . 4 6 m M T w e e n 2 0 , 0 . 0 8 m M フェノールレッド、3 4 m M N a C l , 0 . 3 6 % B r o n i d o x L 5 , 1 % B S A , p H 7 . 4) に溶解したビオチン合成ペプチド: ビオチン - K K K S F S G Y L L Y P M (C h i n e s e P e p t i d e C o m p a n y , C h i n a) で 9 6 ウェルストレプトアビジンプレートを被覆し、3 0 分間、2 0 でインキュベートした。アッセイ緩衝液で希釈した 2 0 μ L の標準ペプチドまたは試料を適切なウェルに添加し、その後、1 0 0 μ L の H R P 結合モノクローナル抗体 1 3 G 5 を添加し、2 0 時間、4 でインキュベートした。最後に、1 0 0 μ L のテトラメチルベンジジン (T M B) (K e m - E n - T e c カタログ番号 4 3 8 O H) を添加し、プレートを 1 5 分間、2 0 で暗所においてインキュベートした。上記インキュベーションステップすべてが、3 0 0 r p m 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 (2 0 m M T r i s , 5 0 m M N a C l) で 5 回洗浄した。1 0 0 μ L の停止用液 (1 % H ₂ S O ₄) の添加により T M B 反応を停止させ、6 5 0 n m を参照として用い、4 5 0 n m で測定した。

30

40

【0040】

< C 8 - C 技術的評価 >

検出下限 (L L O D) を 2 1 個のゼロ試料 (すなわち緩衝液) から決定し、平均 + 3 x 標準偏差として算出した。各実験が試料の二重判定からなる、8 Q C 試料の 1 2 回の独立した実験により、アッセイ内変動およびアッセイ間変動を判定した。希釈回収率 (d i l

50

ution recovery) を4つの血清試料および4つのEDTA血漿試料において判定し、100%試料からの希釈試料の回収パーセンテージとして算出した。技術的な検証についてのデータは、表1に示される。

【0041】

【表1】

表1.

検出範囲	0.37nM~111nM
定量下限	3.4nM
アッセイ内変動	6%
アッセイ間変動	12.70%
血清試料の希釈範囲	1:2 (推奨)
血漿試料(EDTA)の希釈範囲	1:2 (推奨)
血清における希釈回収率	97.50%
血清(EDTA)における希釈回収率	91%
分析物安定性 血清(24時間、4C/20C)	94%/67.3%
分析物安定性 血漿(EDTA)(24時間、4C/20C)	83.3%/74.4%

10

表1.C8-Cアッセイの技術的な検証。

20

【0042】

[実施例2]

< C8 - Nのための抗体開発 >

モノクローナル抗体を実施例1の場合と同様の方法で生成した。

【0043】

本発明者らは、特異的エピトープモノクローナル抗体を生成するための免疫原性ペプチドとして、VII型コラーゲン1鎖のシグナルペプチドの後の最初の10個のアミノ酸(28' G A Y Y G I K P L P ' 37')を使用した。クローン7F10および16F4を生成した。

【0044】

図1は、N末端に対するモノクローナル抗体7F10および16F4、ならびにC末端に対するモノクローナル抗体13G5および16A5のペプチド特異性試験からの結果を、選択ペプチド、伸長ペプチド、ナンセンスペプチド、ヒトのプール血清、ヒトのプール血漿およびラットのプール尿の2倍系列希釈物により生成されたODシグナルとして、示すものである。C8 - Cに使用したペプチド：選択ペプチド = S F S G Y L L Y P M、伸長ペプチド = S F S G Y L L Y P M A、およびナンセンスペプチド = Y L S G P F M S Y L。C8 - Nに使用したペプチド：選択ペプチド = G A Y Y G I K P L P、伸長ペプチド = A G A Y Y G I K P L P、およびナンセンスペプチド = G Y I Y A G L K P P。

30

【0045】

E L I S A の性質のため、低いODほど強い反応性に相当する。

40

【0046】

[実施例3]

モノクローナル抗体13G5を使用して、Proteogenex(Culver City, CA)から得たCOPDと診断された患者からの血清試料(n=13)、IPFと診断された患者からの血清試料(n=10)および扁平上皮肺癌と診断された患者からの血清試料(n=10)におけるC8 - Cを測定し、非罹患対照と比較した。結果を図2に示す。

【0047】

結果を平均±平均についての標準誤差(SEM)として示す。平均値の差をノンパラメトリックなクラスカル・ウォリス一元配置ANOVA検定により比較した。すべての統計

50

解析を Graph Pad Prism ソフトウェア v. 6 (Graph Pad Software, San Diego, CA) で行った。0.05 未満の P 値を有意と見なした。

【0048】

C8 - C のレベルは、これらすべての臨床状態において上昇することが判明した。

【0049】

[実施例 4]

より大きい COPD コホートにおいて C8 - C を評価した。Hvidovre Hospital (Hvidovre Hospital, Denmark) から得た COPD と診断された患者からの血清試料 (n = 68) において C8 - C の濃度を測定し、非罹患対照 (n = 20) と比較した。

10

【0050】

図 3 は、C8 - C の濃度が、COPD と診断された患者において対照と比較して有意に上昇したことを示す ($p < 0.0001$)。

【0051】

[実施例 5]

モノクローナル抗体 13G5 を使用して、Asterand (Detroit, MI) から得た乳がん と診断された患者からの血清試料 (n = 13)、結腸がん と診断された患者からの血清試料 (n = 7)、胃がん と診断された患者からの血清試料 (n = 9)、黒色腫がん と診断された患者からの血清試料 (n = 7)、NSCLC と診断された患者からの血清試料 (n = 12)、卵巣がん と診断された患者からの血清試料 (n = 10)、膵がん と診断された患者からの血清試料 (n = 5)、前立腺がん と診断された患者からの血清試料 (n = 14) および SCLC がんと診断された患者からの血清試料 (n = 8) における C8 - C レベルを測定し、非罹患対照 (n = 43) と比較した。C8 - C アッセイでは試料を 1 : 2 希釈した。結果を図 4 に示す。

20

【0052】

C8 - C のレベルは、これらすべての臨床状態において上昇されることが判明した。

【0053】

<考察>

本発明者らが知る限り、これは、V I I I 型コラーゲンの C 末端に対するモノクローナル抗体の評価のための新規競合 ELISA の開発および検証を記載する初めての開示である。このアッセイが技術的に堅牢であり、これにより、LLOD、アッセイ内およびアッセイ間変動、ならびに許容可能な希釈回収率および分析物安定性への干渉について低い値を示すことを明らかにした。ヒト、ラット、マウスおよびウシの V I I I 型コラーゲン C 末端の配列アラインメントは、種間の 100% 相同性を示す。モノクローナル抗体 13G5 は、C 末端配列 S F S G Y L L Y P M に対して特異的である。アッセイは、伸長ペプチド (追加のアミノ酸 1 個) もナンセンスペプチドも検出しなかった。これは、モノクローナル抗体が V I I I 型コラーゲンの C 末端に対して特異的であることを示す。C8 - C 競合 ELISA は、ヒトマトリックスと齧歯動物マトリックスの両方における評価に役立ち、これにより良好なトランスレーショナル科学が可能になる。

30

40

【0054】

利用可能な他の商業用 V I I I 型コラーゲンアッセイは、正確なエピトープが不明であるモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のどちらかを利用するので、今般記載する C8 - C アッセイは、他の市販のアッセイとは異なる。Kapoor は、デスメ膜に由来する 50 kD 断片からの V I I I 型コラーゲンの三重らせんドメインに対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方を作製した [20、21]。免疫処置に使用した断片は、ペプシン耐性であるが、コラゲナーゼに対しては耐性でない [21]。組織内では、タンパク質の形成と分解を繊細にバランスさせることで、再構築が絶えず進行している。線維症またはがんなどの疾患では、組織代謝回転が増加し、バランスが形成にシフトし、その結果、マトリックスタンパク質の純増加に至るが、マトリックスタンパク質の

50

分解もまた増加されることに注目することが重要である。このことを考えると、V I I I型コラーゲンが組織再構築中にコラゲナーゼにより切断されることは、非常に理にかなっている。C 8 - Cアッセイにおいて活用したN B 6 8 3 - 1 3 G 5抗体には、該抗体が、たった10個のアミノ酸からなる小さい配列に対して特異的であり、これにより、プロテアーゼ分解によって生成される小さい断片であっても該抗体により確実に検出されるという利点がある。K a p o o rらおよびS a w a d aらにより生成された抗体は、分解される可能性が高い極めて大きいペプチドを認識し[2 1、2 2]、したがって、V I I I型コラーゲンのより小さいプールが検出される。

【 0 0 5 5 】

V I I I型コラーゲンは、血管損傷後に増加されることが証明されており、損傷後に起こる組織再構築の一部である[2 3]。加えて、V I I I型コラーゲンは、出芽中には内皮細胞に局在しており、内皮細胞が血管新生因子に曝露されるとV I I I型コラーゲンの4 ~ 6倍増加が見られる[2 4]。V I I I型コラーゲンの遺伝子発現が腫瘍関連間質において増加されることは公知であり、肝癌細胞において増加されることは証明されている[2 5]。本発明者らの知るところでは、V I I I型コラーゲンの濃度がC O P DおよびS C C肺がんと診断された患者の循環器において上昇することを明らかにするのは、本発明者らが初めてである。血管内皮増殖因子(V E G F)がC O P Dにおいてアップレギュレートされることは一般に認知されており、その一方で血管再構築が起こることは周知である。最近、C O P Dを有する患者において血管新生が増加されることが認知された[2 6、2 7]。C O P D患者について観察されたC 8 - Cの濃度上昇を確認するために、C O P D患者のより大きいコホートを評価した。C O P D患者からの血清において対照と比較してC 8 - C濃度の有意な上昇($p < 0.0001$)が見られることが判明した。より正確には、C O P D患者からの血清において対照と比較してC 8 - C濃度の7倍増加が見られた。

【 0 0 5 6 】

加えて、V I I I型コラーゲンの濃度は、乳がん、結腸がん、黒色腫がん、N S C L Cがん、卵巣がん、膵がん、前立腺がんおよびS C L Cがんと診断された患者において有意に上昇したが、胃がんと診断された患者では有意に上昇しなかった。すなわち、胃がんを除いて、様々ながんタイプの中で5 ~ 12倍の増加が見られた。V I I I型コラーゲンの発現が一部のタイプの脳腫瘍およびいくつかの癌の血管において増加されることは以前に証明されている[2 8]。加えて、V I I I型コラーゲンは、内皮細胞および平滑筋細胞により、特に血管損傷後に発現され、ならびに腫瘍細胞により発現される。インテグリン 2 1は、I ~ V I I I型コラーゲンの公知の受容体であり[2 9]、研究により、原発腫瘍における細胞と比較して転移性細胞において増加されることが証明されている[3 0]。この受容体は、腫瘍の進行およびいくつかのがんタイプへの侵入に関連している。V I I I型コラーゲンは、 1受容体により平滑筋細胞(S M C)遊走を制御することができ[2 9]、S M Cは、線維性疾患および腫瘍微小環境における重要なプレイヤーである[3 1]。胃がんは、血清中のC 8 - Cの濃度増加を示さない唯一のがん形態であった。文献には胃がん組織においてE C M再構築が進行していると述べられている[3 2]が、これらのデータは、不特定のコラーゲン代謝またはI、I I IおよびI V型コラーゲンに基づいている。本発明の発明者らは、胃がんと診断された患者の血清中の低いC 8 - C濃度を説明することができる、胃におけるまたは胃関連がんにおけるV I I I型コラーゲンの存在を確認するいかなる文献も、見つけることができなかった。

【 0 0 5 7 】

結論として、技術的に堅牢なV I I I型コラーゲンアッセイを開発し、C O P Dおよび様々なタイプのがんと診断された患者からの血清中のV I I I型コラーゲンの濃度が有意に上昇することを明らかにするのは、本発明の発明者らが初めてである。抗体N B 6 8 3 - 1 3 G 5を生成し、C 8 - C競合E L I S Aに組み入れ、前記抗体がV I I I型コラーゲンのC末端部分に対して特異的であることを見いだした。

【 0 0 5 8 】

10
20
30
40
50

本明細書では、明確な別段の指示がない限り、「または（もしくは）」という語は、条件の一方のみを満たすことを求めるオペレータ「排他的論理和」とは対照的に、述べられている条件のどちらかまたは両方を満たすときに真値を返すオペレータという意味で使用される。「含むこと（comprising）」という語は、「からなること（consisting of）」を意味することにはなく「包含（including）」という意味で使用される。上で是認されているすべての先行教示は、参照により本明細書に組み入れられている。本明細書におけるいずれの先行発行文献についての是認も、その教示が本書の日付にオーストラリアまたは他の地において共通の一般知識であったことを容認するものとも、表すものとも解釈すべきでない。

【0059】

参考文献

【表 2 A】

References

1. Kittelberger, R., Davis, P. F., Flynn, D. W. & Greenhill, N. S. Distribution of type VIII collagen in tissues: an immunohistochemical study. *Connect. Tissue Res.* **24**, 303-318 (1990).
2. Ma, Z.-H., Ma, J.-H., Jia, L. & Zhao, Y.-F. Effect of enhanced expression of COL8A1 on lymphatic metastasis of hepatocellular carcinoma in mice. *Exp. Ther. Med.* **4**, 621-626 (2012). 10
3. Jander, R., Korsching, E. & Rauterberg, J. Characteristics and in vivo occurrence of type VIII collagen. *Eur. J. Biochem.* **189**, 601-607 (1990).
4. Illidge, C., Kielty, C. & Shuttleworth, A. The alpha1(VIII) and alpha2(VIII) chains of type VIII collagen can form stable homotrimeric molecules. *J. Biol. Chem.* **273**, 22091-5 (1998). 20
5. Greenhill, N. S., Rüger, B. M., Hasan, Q. & Davis, P. F. The alpha1(VIII) and alpha2(VIII) collagen chains form two distinct homotrimeric proteins in vivo. *Matrix Biol.* **19**, 19-28 (2000).
6. Sage H, Balian G, Vogel AM, Bornstein P. Type VIII collagen. Synthesis by normal and malignant cells in culture. *Lab Invest* 1984;50:219-31.
7. Rüger B, Dunbar PR, Hasan Q, Sawada H, Kittelberger R, Greenhill N, et al. Human mast cells produce type VIII collagen in vivo. *Int J Exp Pathol* 1994;75:397-404. 30
8. Lu P. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3.
9. Sand JMB, Knox AJ, Lange P, Sun S, Kristensen JH, Leeming DJ, et al. Accelerated extracellular matrix turnover during exacerbations of COPD. *Respir Res* 2015;16:69. doi:10.1186/s12931-015-0225-3. 40
10. Ricard-Blum S, Dublet B, Rest M van der. Unconventional Collagens: Types VI, VII, VIII, IX, X, XII, XIV, XVI, and XIX. Oxford University Press; 2000.
11. Sand JM, Genovese F, Martinez F, Han M, Hogaboam C, Karsdal MA, et al. Serum levels of a MMP-12 generated type IV collagen fragment is elevated in COPD and IPF patients. *Eur Respir J* 2013;42:P838 - .

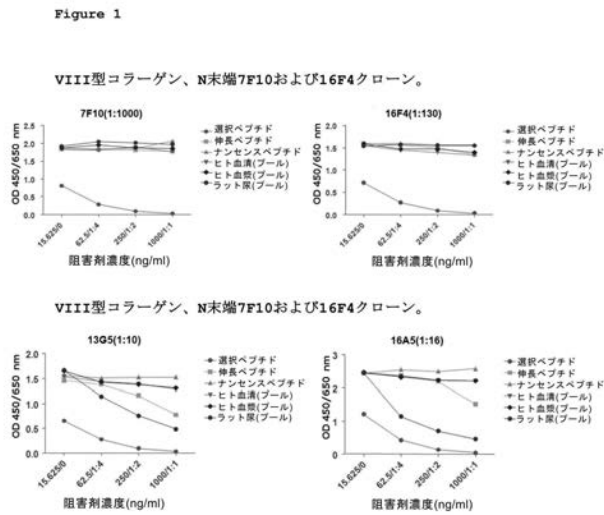
【表 2 B】

12. Willumsen N, Bager CL, Leeming DJ, Smith V, Christiansen C, Karsdal MA, et al. Serum biomarkers reflecting specific tumor tissue remodeling processes are valuable diagnostic tools for lung cancer. *Cancer Med* 2014;3:1136-45. doi:10.1002/cam4.303.
13. Kristensen JH, Larsen L, Dasgupta B, Brodmerkel C, Curran M, Karsdal MA, et al. Levels of circulating MMP-7 degraded elastin are elevated in pulmonary disorders. *Clin Biochem* 2015 doi:10.1016/j.clinbiochem.2015.07.009. 10
14. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2006;2:213-9.
15. Chung, AS. FN. The Extracellular Matrix & Angiogenesis: Role of the Extracellular Matrix in Developing Vessels and Tumor Angiogenesis. *Pathways* 2010:2-5.
16. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:392-401. doi:10.1038/nrc1877. 20
17. Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr Opin Cell Biol* 2010;22:697-706. doi:10.1016/j.ceb.2010.08.015.
18. Barascuk, N. et al. A novel assay for extracellular matrix remodeling associated with liver fibrosis: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for a MMP-9 proteolytically revealed neo-epitope of type III collagen. *Clin. Biochem.* **43**, 899-904 (2010). 30
19. Gefter, M. L., Margulies, D. H. & Scharff, M. D. A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Somatic Cell Genet.* **3**, 231-6 (1977).
20. Kapoor R, Bornstein P, Sage EH. Type VIII collagen from bovine Descemet's membrane: structural characterization of a triple-helical domain. *Biochemistry* 1986;25:3930-7.
21. Kapoor R, Sakai LY, Funk S, Roux E, Bornstein P, Sage EH. Type VIII collagen has a restricted distribution in specialized extracellular matrices. *J Cell Biol* 1988;107:721-30. doi:10.1083/jcb.107.2.721. 40
22. Sawada H, Konomi H, Hirosawa K. Characterization of the collagen in the hexagonal lattice of Descemet's membrane: Its relation to type VIII collagen. *J Cell Biol* 1990;110:219-27. doi:10.1083/jcb.110.1.219.

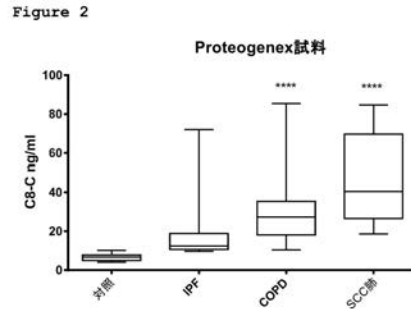
【表 2 C】

23. Leena Karttunen, Ute Felbor, Miikka Vikkula BRO. Vascular Matrix and Disorders. In: Zon LI, editor. Hematop. A Dev. Approach, New York: Oxford University Press, USA; 2001, p. 784-95.
24. Israel Vlodavsky GC. Fibroblast Growth Factors in Tumor Progression and Angiogenesis. In: Teicher BA, editor. Antiangiogenic Agents Cancer Ther., New York: Springer Science & Business Media; 1998, p. 93-119. 10
25. Wang W, Xu G, Ding C-L, Zhao L-J, Zhao P, Ren H, et al. All-trans retinoic acid protects hepatocellular carcinoma cells against serum-starvation-induced cell death by upregulating collagen 8A2. FEBS J 2013;280:1308-19. doi:10.1111/febs.12122.
26. Matarese A, Santulli G. Angiogenesis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease 2012. doi:10.1038/npre.2012.7112.1.
27. Harkness LM, Kanabar V, Sharma HS, Westergren-Thorsson G, Larsson-Callerfelt A-K. Pulmonary vascular changes in asthma and COPD. Pulm Pharmacol Ther 2014;29:144-55. doi:10.1016/j.pupt.2014.09.003. 20
28. Paulus W, Sage EH, Jellinger K, Roggendorf W. Type VIII collagen in the normal and diseased human brain. Acta Histochem Suppl 1992;42:195-9.
29. Adiguzel E, Hou G, Sabatini PJB, Bendeck MP. Type VIII collagen signals via $\beta 1$ integrin and RhoA to regulate MMP-2 expression and smooth muscle cell migration. Matrix Biol 2013;32:332-41. doi:10.1016/j.matbio.2013.03.004. 30
30. Klein CE, Dressel D, Steinmayer T, Mauch C, Eckes B, Krieg T, et al. Integrin alpha 2 beta 1 is upregulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen I fibrils. J Cell Biol 1991;115:1427-36.
31. Sridhara SU, Choudaha N, Kasetty S, Joshi PS, Kallianpur S, Tijare M. Stromal myofibroblasts in nonmetastatic and metastatic oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. J Oral Maxillofac Pathol 2013;17:190-4. doi:10.4103/0973-029X.119758. 40
32. Yamaguchi H, Yoshida N, Takanashi M, Ito Y, Fukami K, Yanagihara K, et al. Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells. PLoS One 2014;9:e85485. doi:10.1371/journal.pone.0085485. 50

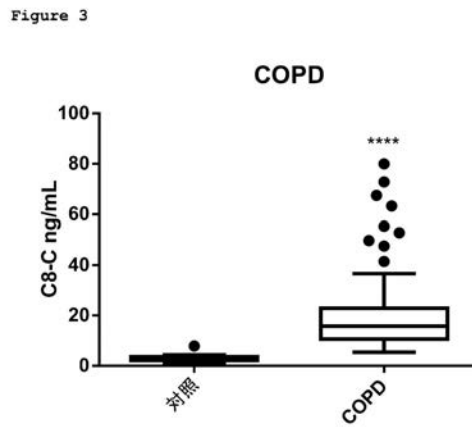
【 図 1 】



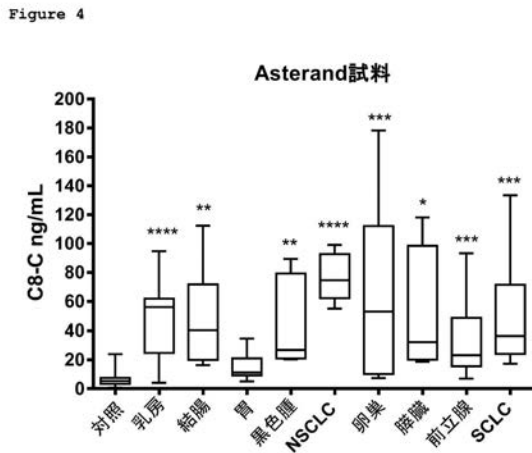
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/069453

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/18 G01N33/574 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	"Anti-Collagen VIII alpha 1 antibody ab58776 - Prodduct darasheet", Abcam Online Catalogue 24 October 2016 (2016-10-24), XP002763305, Retrieved from the Internet: URL: http://www.abcam.com/Collagen-VIII-alpha-1-antibody-ab58776.pdf [retrieved on 2016-10-24] the whole document ----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 October 2016		Date of mailing of the international search report 11/11/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bumb, Peter

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/069453

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KORSCHING E ET AL: "Generation of type VIII collagen-specific antibodies.", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS 15 DEC 1995, vol. 188, no. 1, 15 December 1995 (1995-12-15), pages 51-62, XP002763306, ISSN: 0022-1759 page 53, left-hand column page 57, line first -----	1-13, 16-19
X	MA, Z.-H.; MA, J.-H.; JIA, L.; ZHAO, Y.-F.: "Effect of enhanced expression of COL8A1 on lymphatic metastasis of hepatocellular carcinoma in mice", EXP. THER. MED., vol. 4, 2012, pages 621-626, XP002763307, cited in the application page 622, left-hand column -----	1-13, 16-19

フロントページの続き

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

(74)代理人 100125380
弁理士 中村 綾子

(74)代理人 100142996
弁理士 森本 聡二

(74)代理人 100166268
弁理士 田中 祐

(74)代理人 100170379
弁理士 徳本 浩一

(74)代理人 100180231
弁理士 水島 亜希子

(72)発明者 ハンセン, ニルス・ウルリク・ブランド
デンマーク国, 2400 コペンハーゲン エヌヴィ, フリメステルヴァイ 30, 3.TV

(72)発明者 レーミング, ディアーナ・ジュリー・エルスネス
デンマーク国, 3060 エスパゲア, ガンメル・ストランドヴァイ 209D

(72)発明者 カルスダル, モルテン・アセル
デンマーク国, 2100 コペンハーゲン オー・スラッシュ, エッケルスベリイスゲーゼ 13

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA20 DA13
4H045 AA11 DA76 EA50 FA72

专利名称(译)	免疫测定VIII型胶原序列		
公开(公告)号	JP2018525400A	公开(公告)日	2018-09-06
申请号	JP2018508168	申请日	2016-08-16
申请(专利权)人(译)	北欧生物科学ER / ES		
[标]发明人	ハンセンニルスウルリクブラント レーミングディアーナジュリーエルスネス カルスダルモルテンアセル		
发明人	ハンセン,ニルス・ウルリク・ブラント レーミング,ディアーナ・ジュリー・エルスネス カルスダル,モルテン・アセル		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/18 C07K2317/34 G01N33/6887 G01N2333/78 C07K2317/33 C07K2317/92		
FI分类号	C07K16/18.ZNA G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	中村綾子 田中宇 徳本光一		
优先权	2015014658 2015-08-18 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种免疫结合伴侣，其与样品中的VIII型胶原的a1链的C-末端表位或VIII型胶原的成熟形式的N-末端表位以及VIII型胶原的成熟a1特异性反应。提供了一种用于检测或定量链的C端或N端表位的免疫测定方法。

Figure 2

