

(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2014-526042

(P2014-526042A)

(43) 公表日 平成26年10月2日(2014.10.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A D	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-519505 (P2014-519505)
 (86) (22) 出願日 平成24年7月6日 (2012.7.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年1月10日 (2014.1.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/063278
 (87) 国際公開番号 W02013/007643
 (87) 国際公開日 平成25年1月17日 (2013.1.17)
 (31) 優先権主張番号 1111788.4
 (32) 優先日 平成23年7月11日 (2011.7.11)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 503259129
 ノルディック・バイオサイエンス・エー／エ
 ス
 N O R D I C B I O S C I E N C E A
 / S
 デンマーク国、デーカー 2730 ヘル
 レフ、ヘルレフ・ホーフエダガーデ 20
 7
 (74) 代理人 100099623
 弁理士 奥山 尚一
 (74) 代理人 100096769
 弁理士 有原 幸一
 (74) 代理人 100107319
 弁理士 松島 鉄男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 チチンタンパク質のネオエピトープアッセイによる心血管イベントのインビトロ評価

(57) 【要約】

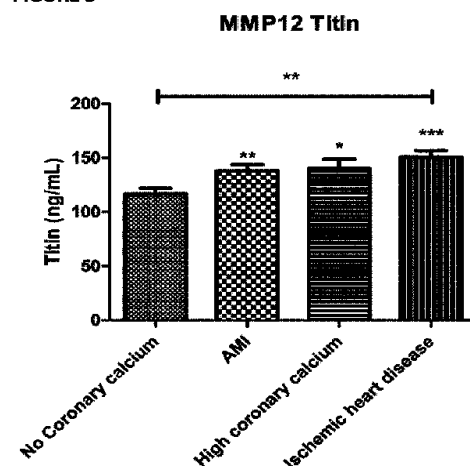
プロテイナーゼによるチチンタンパク質の切断によっ
 て形成されるネオエピトープを含むペプチド断片の定量
 化のためのバイオアッセイが、サンプルを、前記ネオエ
 ピトープに特異的に結合する抗体と接触させるステップ
 と、結合のレベルを決定するステップとを含む。検出さ
 れ得るチチンの部分配列として：

【表 1】

3519' ↓GEYVDCGTD '13528
 3532' NVTVEARLIK ↓ '13542
 3543' ↓VEKPLYGVEV '1553

が挙げられる。

FIGURE 3



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロテイナーゼによるチチンタンパク質の切断によって形成されるネオエピトープを含むペプチド断片の定量化のためのバイオアッセイ方法であって、前記ペプチド断片を含むサンプルを、前記ネオエピトープに対して特異的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、前記免疫学的結合パートナーの、前記サンプル中のペプチド断片に対する結合のレベルを決定するステップとを含む方法。

【請求項 2】

前記免疫学的結合パートナーが、前記チチンタンパク質の C 末端ネオエピトープを含むペプチド断片に対して特異的結合親和性を有する請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記免疫学的結合パートナーが、前記チチンタンパク質の N 末端ネオエピトープを含むペプチド断片に対して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、プロテアーゼによるチチンタンパク質の切断によって形成され、チチンの以下の部分配列：

【表 1】

13519' ↓GEYVCD CGTD '13528

13532' NVTVEARLIK↓ '13542

13543' ↓VEKPLYGVEV '1553

20

のいずれか 1 つを示すネオエピトープを含むペプチド断片に対して特異的結合親和性を有する請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記免疫学的結合パートナーが、ペプチドの N 末端の以下の配列：

【表 2】

13519' ↓GEYVCD

13543' ↓VEKPLY

のいずれか、またはペプチドの C 末端の以下の配列：

30

【表 3】

EARLIK↓ '13542

に対して特異的結合親和性を有する請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記免疫学的結合パートナーが、ペプチドの C 末端の以下の配列：

【表 4】

NVTVEARLIK↓ '13542.

40

に対して特異的結合親和性を有する請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記免疫学的結合パートナーが、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る請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記方法が競合イムノアッセイとして行われ、前記免疫学的結合パートナーおよび競合薬剤が前記サンプルの存在下でインキュベートされ、前記競合薬剤が、前記サンプル中の前記ペプチド断片と競合して前記免疫学的結合パートナーに結合する請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

50

前記競合薬剤が、前記ネオエピトープを示すような、合成ペプチドである、または前記エピトープが由来する前記タンパク質の切断によって形成される精製された天然のペプチドである請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

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 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

前記サンプルが患者由来のサンプルであり、前記方法が、前記ペプチド断片の決定された前記結合のレベルと、(a) 比較可能な健康個体および/または (b) 病的な心臓状態に特徴的な値とを比較するステップをさらに含む請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 12】

チチンタンパク質のプロテイナーゼ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免疫学的結合パートナー。

【請求項 13】

アミノ酸配列の N 末端：

【表 5】

13519' ↓GEYVCD

13543' ↓VEKPLY

20

のいずれか、またはアミノ酸配列の C 末端：

【表 6】

EARLIK↓ '13542

と特異的に免疫反応性である請求項 11 に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 14】

モノクローナル抗体またはその結合断片である請求項 12 または請求項 13 に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 15】

請求項 14 に記載のモノクローナル抗体を産生する細胞株。

30

【請求項 16】

請求項 4 に記載の前記タンパク質の前記部分配列のいずれか 1 つにおける、プロテアーゼによるチチンタンパク質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。

【請求項 17】

前記ペプチドに対する免疫応答をもたらすための、担体にハプテンとしてコンジュゲートされている、または、イムノアッセイで使用するための、固体表面に固定されるか、もしくは検出可能なマーカーにコンジュゲートされている請求項 16 に記載のペプチド。

【請求項 18】

請求項 4 に記載の前記タンパク質の前記部分配列のいずれか 1 つにおける、プロテアーゼによる前記タンパク質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核酸分子。

40

【請求項 19】

請求項 4 に記載の前記タンパク質の前記部分配列のいずれか 1 つにおける、プロテアーゼによる前記タンパク質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コード配列および発現シグナルを含む核酸配列を含むベクター。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の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。

【請求項 21】

50

請求項 12 ~ 14 のいずれか一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に結合する競合薬剤と、任意選択的に、洗浄試薬、バッファー、停止試薬、酵素標識、酵素標識基質、校正基準物質、抗マウス抗体、およびイムノアッセイキットを用いてアッセイを行うための使用説明書の 1 つ以上とを含むイムノアッセイキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、心血管イベント（急性心筋梗塞（AMI）、冠状動脈の高石灰化および症候性非AMIが挙げられるがこれらに限られない）の評価に有用なバイオマーカーアッセイに関する。特に、本発明によれば、チチンの分解断片に関するバイオマーカーが有用であることがわかる。

10

【背景技術】

【0002】

チチンは、コネクチンとしても知られ、心筋および骨格筋で発現されるサルコメアのタンパク質である。チチンは、知られている最大の哺乳動物タンパク質であり、最大 3700 kDa に達することがあるサイズを有する¹。この主な機能および十分に説明されている機能は、心筋のストレッチ中にパッシブ型張力を回復させることによって、長い分子スプリングとして作用することである²⁻⁴。チチンは、サルコメアにおいて共発現される 2 つのアイソタイプを有し、N2A は、2 つのうちでより大きいものであり、骨格筋および心筋の双方においてみられ、アイソタイプ N2B は、より小さく、より固く、心筋においてのみみられる^{1, 5-7}。チチンのアイソタイプの異なる剛性のために、2 つのアイソタイプの間での、適応的な、または非適応的な比率の変更は、これらの対応するキナーゼ領域との相乗効果で、病理学的イベント中に、心筋収縮特性に影響を及ぼす原因となり得ると提唱されている^{3, 5, 8-12}。アイソタイプの修飾および比率の変更は、動物モデルにおいて初めて記載されたが、臨床研究によっても、拡張型心筋症（DCM）、大動脈弁狭窄（AS）、拡張期心不全（DHF）および虚血性心疾患（IHD）中のアイソタイプシフトが報告されている^{11, 13-16}。チチン関連の研究の主な限界は、チチンアイソタイプレベルを検出および定量化するのに利用できる方法にあり、これらの方法は、イムノブロットングおよびゲル電気泳動等の感度が十分でない方法、または量的 RT-PCR 等の、より高い感度を実現できるが、チチンアイソタイプレベルの総量に関する情報を提供できるだけである技法のいずれかに基づいている。これらの方法は全て、組織を採集および同定する侵襲性的手段を利用するものである。感度および特異性が低いことが、これらの方法の診断バイオマーカーまたは予後バイオマーカーとしての不十分な利用に寄与するおそれがあり、かつチチンアイソタイプレベルの機能的研究との相関関係を制限するおそれがある。対照的に、本発明者らは、本発明によって、チチンの特定の分解断片の検出が、いくつかの重要な臨床的状況において優れた臨床的有用性を有するということを発見した。

20

30

【0003】

細胞外マトリックス（ECM）の構成要素が、マトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）を含むいくつかの異なるプロテアーゼによって分解される。MMP に由来するタンパク質の分解では、特定の切断部位 / 断片が生じ、これにより今度は新しいエピトープが生産される。本発明者らは以前、ネオエピトープが、いくつかの異なる病理における不均衡な ECM リモデリングのバイオマーカーとしての潜在的な有用性を有し得ること、血清、血漿および尿などの数々の生体液において測定され得ることを報告した¹⁷⁻²²。このアプローチの重要な利点は、それが、タンパク質の特有の「フィンガープリント」のタンパク質分解的切断を表し、かつ生理学および病理学の双方において、特定の組織ターンオーバーを直接的に反映する、特定のネオエピトープを測定する非侵襲性的方法であることである。

40

【発明の概要】

【0004】

50

従って、本発明は、第1態様において、プロテイナーゼによるチチンタンパク質の切断によって形成されるネオエピトープを含むペプチド断片の定量化のためのバイオアッセイ方法であって、前記ペプチド断片を含むサンプルを、前記ネオエピトープに対して特異的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、前記免疫学的結合パートナーの、前記サンプル中のペプチド断片に対する結合のレベルを決定するステップとを含む方法を提供する。

【0005】

チチンタンパク質は、チチンの全アイソタイプを含み、それぞれ上述したものが挙げられる。検出されるチチン断片は、任意の哺乳動物、例えば、齧歯類（特にマウスおよびラットを含む）、イヌ、およびサルを含む霊長類に由来するサンプル中に存在してよい。しかしながら、サンプルは好ましくはヒトに由来するものである。同様に、アッセイが基礎とするチチン配列は、これらの供給源のいずれかに由来してよい。通常、検出される断片は、天然に形成され、かつ前記サンプル中に天然に存在する。

10

【0006】

前記免疫学的結合パートナーは、前記チチンタンパク質のC末端ネオエピトープを含むペプチド断片に対して、または前記チチンタンパク質のN末端ネオエピトープを含むペプチド断片に対して、特異的結合親和性を有してよい。

【0007】

前記免疫学的結合パートナーは、プロテアーゼによるチチンタンパク質の切断によって形成され、チチンの以下の部分配列：

20

【表1】

13519' ↓GEYVDCGTD `13528	配列番号1
13532' NVTVEARLIK↓ `13542	配列番号2
13543' ↓VEKPLYGVEV `1553	配列番号3

のいずれか1つを示すネオエピトープを含むペプチド断片に対して特異的結合親和性を有してよい。

【0008】

前記免疫学的結合パートナーは、ペプチドのN末端の以下の配列：

【表2】

13519' ↓GEYVCD	配列番号4
13543' ↓VEKPLY	配列番号5

30

のいずれか、またはペプチドのC末端の以下の配列：

【表3】

EARLIK↓ `13542	配列番号6
----------------	-------

に対して特異的結合親和性を有してよい。

【0009】

40

前記免疫学的結合パートナーは好ましくは、ペプチドのC末端の以下の配列：NVTVEARLIK `13542に対して特異的結合親和性を有してよい。

【0010】

好ましくは、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る。

【0011】

前記方法は、好ましくは競合イムノアッセイとして行われ、前記免疫学的結合パートナーおよび競合薬剤が、前記サンプルの存在下でインキュベートされ、前記競合薬剤は、前記サンプル中の前記ペプチド断片と競合して前記免疫学的結合パートナーに結合する。任意選択的に、前記競合薬剤は、前記ネオエピトープを示すような、合成ペプチドであるか

50

、前記エピトープが由来する前記タンパク質の切断によって形成される精製された天然のペプチドである。

【0012】

前記サンプルは、好ましくは、尿、血清、血液、血漿または唾液のサンプルである。本発明には、前記サンプルが、患者に由来するサンプルであり、前記方法が、前記ペプチド断片の決定された前記結合レベルと、(a)比較可能な健康個体および/または(b)病的な心臓状態に特徴的な値とを比較することをさらに含む方法が含まれる。

【0013】

さらなる態様において、本発明は、チチンタンパク質のプロテイナーゼ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免疫学的結合パートナーを含む。

10

【0014】

前記免疫学的結合パートナーは、アミノ酸配列のN末端：

【表4】

13519' ↓GEYVCD

13543' ↓VEKPLY

のいずれか、またはアミノ酸配列のC末端：

【表5】

EARLIK↓ `13542

20

と特異的に免疫反応性であってよい。

【0015】

前記免疫学的結合パートナーは、モノクローナル抗体またはその結合断片であってよい。

【0016】

本発明は、さらなる態様において、上述のモノクローナル抗体を産生する細胞株を含む。

【0017】

さらなる態様において、本発明は、上記の前記タンパク質の前記部分配列のいずれか1つにおける、プロテアーゼによるチチンタンパク質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。前記ペプチドは、前記ペプチドに対する免疫応答をもたらすための、担体にハプテンとしてコンジュゲートされてよく、または、イムノアッセイで使用するための、固体表面に固定されるか、もしくは検出可能マーカーにコンジュゲートされてよい。

30

【0018】

さらなる態様において、本発明は、上記の前記タンパク質の前記部分配列のいずれか1つにおける、プロテアーゼによる前記タンパク質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核酸分子を提供する。

40

【0019】

なおさらなる態様において、本発明は、上記の前記タンパク質の前記部分配列のいずれか1つにおける、プロテアーゼによる前記タンパク質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コード配列および発現シグナルを含む核酸配列を含むベクターを提供する。

【0020】

なおさらなる態様において、本発明は、上述した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提供する。

【0021】

なおさらなる態様において、本発明は、上述した免疫学的結合パートナーと、前記免疫

50

学的結合パートナーに結合する競合薬剤と、任意選択的に、洗浄試薬、バッファー、停止試薬、酵素標識、酵素標識基質、校正基準物質、抗マウス抗体、およびイムノアッセイキットを用いてアッセイを行うための使用説明書の1つ以上とを含むイムノアッセイキットを提供する。

【0022】

数々の外因性メタロプロテアーゼによるヒト組織の消化中に、多数のタンパク質分解されたペプチド産物を、質量分光測定法^{2,3}を用いて同定した。これらのうち、チチン特異的断片12670' NVTVEARLIK 12679'が、MMP12切断特異的であると同定された。プロテオーム分析により、配列はN2Bチチンアイソタイプに特有のものであり、かつヒトおよびマウスと相同であることが明らかとなった。少なくともマウスモデルでは、MMP12は、アテローム発生等の心血管イベントに関係しているが、関連文献においてチチン分解に影響を及ぼすと以前に説明された唯一のMMPは、心臓サルコメアのZ盤領域に位置するMMP2であり、虚血および再灌流関連イベントにおけるチチン分解に寄与している^{2,4,25}。本発明者らの質量分光測定法に導かれた発見により、本発明者らは、MMP12が、関連の病理学的イベントに以前に記載されるよりも活発に関与する物質であり得ると仮定し、本発明者らは、この仮定により、質量分光測定法で同定されるチチンのN2BアイソタイプのMMP12特異的断片が、病理学的な心血管イベントを監視するのに潜在的に有用であり得ると仮定した。

10

【0023】

本発明によれば、以下のペプチド配列および切断部位が有用である。

20

プロテアーゼ切断部位に を付す

MMP12 13519' GEYVCD CGTD ' 13528
 MMP12 13532' NVTVEARLIK ' 13542
 MMP12 13543' VEKPLYGVEV ' 1553

【0024】

本発明は、添付の図面を参照する以下の実施例によってさらに記載され、説明される。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】以下の例1において測定される、本発明のモノクローナル抗体の、標的ペプチドに対する反応性を示す図である。

30

【図2】例2において決定される、モノクローナル抗体の、ヒト血清および尿サンプルに対する反応性を示す図である。

【図3】例3において得られる、対照患者および心臓病に罹患している患者に由来するヒト血清におけるチチン断片含有量の測定値を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0026】

[例1]

<チチン断片に対するモノクローナル抗体の開発>

実験に用いた試薬は全て、Merck (Whitehouse Station, NJ, USA) およびSigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) からの標準の高品質化学製品であった。モノクローナル抗体の産生に用いた合成ペプチドは、Chinese Peptide Company、Beijing、Chinaから購入した。

40

【0027】

<免疫化用ペプチドの選択>

アッセイ用に選択したペプチドの配列を、ヒト組織に対して実施された質量分光測定法^{2,3}に基づいて選んだ。ペプチド断片は、Uniprotを利用して同定した(受託番号C0JYZ2)。同定した配列の各遊離末端の最初の10アミノ酸を、ターゲット配列とみなした。全ての関連配列を相同性について分析し、続いて、CHECK XX NPS

50

@ : network protein sequence analysis²⁸を用いて相同性についてblast検索した。アミノ酸位置12670'と12679'(チチン)との間に位置する配列NVTVEARLIKを、免疫原として選択した。配列は、UniProtおよびPBIL network protein sequence analysisによって、ヒトチチンおよびマウスチチンに特有であると同定された。選択した配列はまた、選択的スプライシングによって生産された8つのチチンアイソタイプ中、6つに存在することもわかった。これらは、アイソタイプ3(small cardiac N2-B)、7(cardiac novex-2)および8(cardiac novex-1)(心筋に存在することが知られている)(UniProt受託番号Q8WZ42-3、Q8WZ42-7およびQ8WZ42-8)、ならびにアイソタイプ2、4および5(UniProt受託番号Q8WZ42-2、Q8WZ42-4およびQ8WZ42-5)であった²⁶、²⁷。

10

20

30

40

50

【0028】

<免疫化手順>

4から6週齢の6匹のBalb/Cマウスに、フロインド不完全アジュバント(KLH-CGG-NVTVEARLIK配列番号7)を用いて200 μ Lの乳化された抗原(免疫化1回につき50 μ g)をその腹部に皮下接種によって免疫化した。安定した力価レベルが得られるまで、免疫化を2週間隔で実行した。各採血時に、血清抗体力価を測定し、抗体力価が最も高く、かつ血清および尿に対する反応性が最も良かったマウスを、融合用を選択した。選択したマウスは、細胞融合のために脾臓を外科的摘出する3日前に、0.9%塩化ナトリウム溶液100 μ L中の50 μ gの免疫原を用いて静注によりブーストした。

【0029】

<融合および抗体スクリーニング>

融合手順は、他の文献で説明されている²⁹。簡潔に言うと、マウス脾細胞を、SP2/0ミエローマ融合パートナー細胞と融合させた。ハイブリドーマ細胞を、限界希釈法を用いてクローン化し、96ウェルマイクロタイタプレート内に移してさらに増殖させた。標準的な限界希釈を用いてモノクローナル増殖を促進した。間接ELISAを用いて上清をスクリーニングし、ビオチン化したペプチドBiotin-CGG-NVTVEARLIKを、ストレプトアビジンコーティングしたマイクロタイタプレート上の捕捉ペプチドとして用いた。

【0030】

<クローンの特性評価>

ヒトの血清、血漿および尿における、モノクローナル抗体の本来の反応性およびペプチド結合を、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を使用して評価した。クローン特異性を、遊離ペプチド(NVTVEARLIK)およびナンセンスペプチドに対して試験した。モノクローナル抗体のアイソタイプ化を、Clonotyping System-HRPキット(cat. 5300-05(Southern Biotech, Birmingham, AL, USA))を用いて実行した。メーカーの使用説明書に従って、選択したクローンを、Protein Gカラムを用いて精製し、透析した(GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)。

【0031】

図1において、標的配列NVTVEARLIKに対するモノクローナル抗体の反応性(円、破線)を、脱選択(deselection)(かつC末端伸長)配列NVTVEARLIKV(四角、実線)と比較する。データから明らかに、標的配列NVTVEARLIKに対する反応性が強く、伸長ペプチドに対しては結合が検出されないことが示される。これらのデータから、遊離C末端リジン残基を有する配列との強い結合親和性、すな

わち、モノクローナル抗体のネオエピトープ特異性が確認されることが示唆される。

【0032】

[例2]

< MMP12チチンアッセイプロトコール >

以下の競合的ELISAプロトコールを最適化して、MMP12チチンモノクローナル抗体に使用した。選択したモノクローナル抗体を、Lightning-Link Horseradish Peroxidase (HRP) 抗体標識キット (Innovabioscience, Babraham, Cambridge, UK) をメーカーの使用説明書に従って用いてホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) で標識した。96ウェルストレプトアビジンプレート (Roche diagnostics, Basel, Switzerland) を、アッセイバッファーである25mMのトリスBTB中に溶解した6.8ngのビオチン化合成ペプチドBiotin-CGG-NVTVEARLIKでコーティングし、4で30分間インキュベートした。20μLのペプチドキャリアプレートまたはサンプル、その後、100μLの280ngコンジュゲートモノクローナル抗体を適当なウェルに加え、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 (cat. 4380H), Tastrup, Denmark) を加え、プレートを暗所にて20で15分間インキュベートした。上述の全て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の後、プレートを洗浄バッファー (20mM トリス、50mM NaCl、pH 7.2) 中で5回洗浄した。TMB反応は、100μLの停止溶液 (1% HCl) を加えることによって停止させ、650nmを基準として450nmにて測定した。校正曲線を、4パラメトリック数学適合モデルを用いて、2倍に希釈した後の標準ペプチドについて200ngの出発濃度としてプロットした。

10

20

【0033】

図2において、ヒト血清中に存在するチチン断片に対する反応性を示す。AMIを有する個体から得たヒト血清サンプルを2倍に希釈して、上述したMMP12チチンELISAにおいてインキュベートした。ヒト血清で得られる曲線と標準曲線との類似性から、モノクローナル抗体の親和性は、合成ペプチドNVTVEARLIK、およびヒト血清中に存在する断片と類似していることが示唆される。

30

【0034】

[例3]

< 心血管イベントを有する対象由来の血清サンプルの、MMP12チチンELISAにおける評価 >

急性心筋梗塞 (AMI)、冠状動脈の高石灰化、および症候性非AMIとそれぞれ診断された対象に由来する血清を、MMP12チチンELISAにおいて試験し、健康な対照と比較した (図3)。

【0035】

マーカーの統計的に有意な増大が、3つの全ての患者群について測定された。対照の平均レベルは、116.6ng/mlであると測定された。MMP12チチンレベルは、調査した全ての患者群において上昇し、AMI患者の平均値は137.9ng/ml ($P < 0.05$) であり、冠状動脈の高石灰化患者では140ng/ml ($P < 0.05$) であり、虚血性心疾患では150.6ng/ml ($P < 0.05$) であった (図3)。

40

【0036】

ECM分解由来のタンパク質断片からなる生化学的マーカーが、疾患の症状および進行の情報を示すことができ、このことは診断および予後の目的のために有用である可能性がある。これらのマーカーは潜在的に、治療介入戦略がもたらす変化を検出し得、かつ薬効の代理マーカーとして役立ち得る³⁰。

【0037】

本明細書中では、別段に明示的に示されない限り、語「または」は、述べられてい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るもので

50

あり、条件の1つだけが満たされることを要求する演算子「排他的なまたは (e x c l u s i v e o r) 」とは対照的である。語「含む (c o m p r i s i n g) 」は、「含む (i n c l u d i n g) 」の意味で用いられ、「からなる (c o n s i s t i n g o f) 」を意味するわけではない。上で認めた全ての先行する教示は、参照することによって本明細書の一部をなすものとする。公開されている任意の先行文献の本明細書中での承認は、その教示が、豪州その他において、出願当時、共通の一般的知識であったという自認または表明であるととられるべきでない。

【 0 0 3 8 】

[文献リスト]

【表 6 A】

Reference List

- (1) LeWinter MM, Wu Y, Labeit S, Granzier H. Cardiac titin: structure, functions and role in disease. Clin Chim Acta 2007 January;375(1-2):1-9.
- (2) LeWinter MM, Granzier H. Cardiac titin: a multifunctional giant. Circulation 2010 May 18;121(19):2137-45.
- (3) Wu Y, Bell SP, Trombitas K et al. Changes in titin isoform expression in pacing-induced cardiac failure give rise to increased passive muscle stiffness. Circulation 2002 September 10;106(11):1384-9. 10
- (4) Sutko JL, Publicover NG, Moss RL. Titin: an elastic link between length and active force production in myocardium. Circulation 2001 October 2;104(14):1585-7.
- (5) Jaber WA, Maniu C, Krysiak J et al. Titin isoforms, extracellular matrix, and global chamber remodeling in experimental dilated cardiomyopathy: functional implications and mechanistic insight. Circ Heart Fail 2008 September;1(3):192-9. 20
- (6) Hein S, Gaasch WH, Schaper J. Giant molecule titin and myocardial stiffness. Circulation 2002 September 10;106(11):1302-4.
- (7) LeWinter MM. Titin isoforms in heart failure: are there benefits to supersizing? Circulation 2004 July 13;110(2):109-11.
- (8) Linke WA. Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. Cardiovasc Res 2008 March 1;77(4):637-48.
- (9) Chaturvedi RR, Herron T, Simmons R et al. Passive stiffness of myocardium from congenital heart disease and implications for diastole. Circulation 2010 March 2;121(8):979-88. 30
- (10) Thijssen VL, Borgers M, Lenders MH et al. Temporal and spatial variations in structural protein expression during the progression from stunned to hibernating myocardium. Circulation 2004 November 23;110(21):3313-21.
- (11) Nagueh SF, Shah G, Wu Y et al. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. Circulation 2004 July 13;110(2):155-62.
- (12) Peng J, Raddatz K, Molkentin JD et al. Cardiac hypertrophy and reduced contractility in hearts deficient in the titin kinase region. Circulation 2007 February 13;115(6):743-51. 40
- (13) Linke WA. Titin stiffness in heart disease. Circulation 2003 March 25;107(11):e73.
- (14) Neagoe C, Kulke M, del MF et al. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. Circulation 2002 September 10;106(11):1333-41.

【表 6 B】

(15) Makarenko I, Opitz CA, Leake MC et al. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res* 2004 October 1;95(7):708-16.

(16) van HL, Borbely A, Niessen HW et al. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation* 2006 April 25;113(16):1966-73.

(17) Karsdal MA, Henriksen K, Leeming DJ 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.

(18) Vassiliadis E, Veidal SS, Simonsen H et al. Immunological detection of the type V collagen propeptide fragment, PVCP-1230, in connective tissue remodeling associated with liver fibrosis
1. *Biomarkers* 2011 May 25.

(19) Vassiliadis E, Larsen DV, Clausen RE et al. Measurement of CO3-610, a Potential Liver Biomarker Derived from Matrix Metalloproteinase-9 Degradation of Collagen Type III, in a Rat Model of Reversible Carbon-Tetrachloride-Induced Fibrosis
4. *Biomark Insights* 2011;6:49-58.

(20) Vassiliadis E, Veidal SS, Barascuk N et al. Measurement of matrix metalloproteinase 9-mediated collagen type III degradation fragment as a marker of skin fibrosis
5. *BMC Dermatol* 2011;11:6.

(21) Veidal SS, Vassiliadis E, Bay-Jensen AC, Tougas G, Vainer B, Karsdal MA. Procollagen type I N-terminal propeptide (PINP) is a marker for fibrogenesis in bile duct ligation-induced fibrosis in rats. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2010;3(1):5.

(22) Barascuk N, Vassiliadis E, Larsen L et al. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of a specific MMP-9 mediated degradation fragment of type III collagen-A novel biomarker of atherosclerotic plaque remodeling. *Clin Biochem* 2011 July;44(10-11):900-6.

(23) Zhen EY, Brittain IJ, Laska DA et al. Characterization of metalloprotease cleavage products of human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2008 August;58(8):2420-31.

(24) Ali MA, Cho WJ, Hudson B, Kassiri Z, Granzier H, Schulz R. Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2010 November 16;122(20):2039-47.

(25) Johnson JL, George SJ, Newby AC, Jackson CL. Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 October 25;102(43):15575-80.

10

20

30

40

【表 6 C】

(26) Bang M-L, Centner R, Fornoff F et al. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual ~700 kDa titin isoform and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. Circ Res 2001;89:1065-72.

(27) Musco G, Tziatzos C, Schuck P, Pastore A. Dissecting titin into its structural motifs: identification of an alpha helix near the N-terminus. Biochemistry 1995;34:553-61.

(28) Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deleage G. NPS@: network protein sequence analysis. Trends Biochem Sci 2000 March;25(3):147-50.

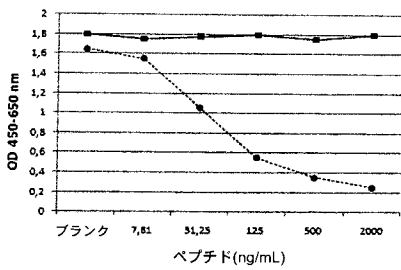
(29) Gefter ML, Margulies DH, Scharff MD. A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. Somatic Cell Genet 1977 March;3(2):231-6.

(30) Munoz-Luque J, Ros J, Fernandez-Varo G et al. Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. J Pharmacol Exp Ther 2008 February;324(2):475-83.

10

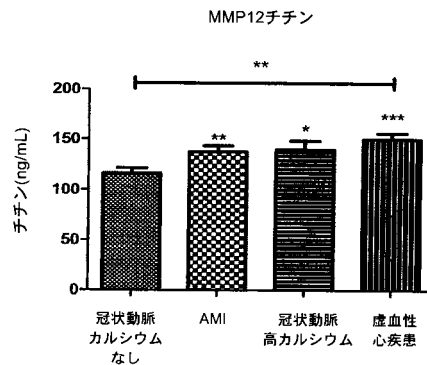
【 図 1 】

図1



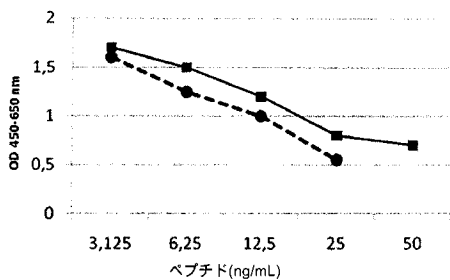
【 図 3 】

図3



【 図 2 】

図2



【配列表】

2014526042000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/063278

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K7/06	C07K16/18 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, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	M. A. M. ALI ET AL: "Titin is a Target of Matrix Metalloproteinase-2: Implications in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury", CIRCULATION, vol. 122, no. 20, 16 November 2010 (2010-11-16), pages 2039-2047, XP55041738, ISSN: 0009-7322, DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.930222 cited in the application ----- -/--	1-21
<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		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
5 November 2012		12/12/2012
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 Behrens, Ralf

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/063278

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KARSDAL M A ET AL: "Novel combinations of Post-Translational Modification (PTM) neo-epitopes provide tissue-specific biochemical markers-are they the cause or the consequence of the disease?", CLINICAL BIOCHEMISTRY, ELSEVIER INC, US, CA, vol. 43, no. 10-11, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 793-804, XP027085679, ISSN: 0009-9120 [retrieved on 2010-06-13]</p> <p>-----</p>	1-21
T	<p>EFSTATHIOS VASSILIADIS ET AL: "Clinical evaluation of a matrix metalloproteinase-12 cleaved fragment of titin as a cardiovascular-specific serological biomarker", JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 10, no. 1, 6 July 2012 (2012-07-06), page 140, XP55041854, ISSN: 1479-5876, DOI: 10.1186/1479-5876-10-140</p> <p>-----</p>	
X,P	<p>VASSILIADIS ET AL: "Novel Cardiac-Specific Biomarkers and the Cardiovascular Continuum", BIOMARKER INSIGHTS, 1 January 2012 (2012-01-01), page 45, XP55041856, ISSN: 1177-2719, DOI: 10.4137/BMI.S9536 page 52</p> <p>-----</p>	1-21

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I			テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 2	
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K	14/47		
C 1 2 P 21/06 (2006.01)	C 0 7 K	7/06		
	C 1 2 P	21/06		

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(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 100154298

弁理士 角田 恭子

(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 100161001

弁理士 渡辺 篤司

(74) 代理人 100179154

弁理士 児玉 真衣

(74) 代理人 100180231

弁理士 水島 亜希子

(74) 代理人 100184424

弁理士 増屋 徹

(72) 発明者 レーミング, ディアーナ・ユリー

デンマーク国, 2 4 5 0 コペンハーゲン エスヴィ, ペテル・ホルムスヴァイ 2 5, 3 . 2

(72) 発明者 カルスダール, モルテン

デンマーク国, 2 1 0 0 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 1 3

(72) 発明者 ヴァシリヤディス, エフスタティオス

デンマーク国, 2 6 1 0 レズオウア, タルンヴァイ 5 9 m f

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA02 EA04

4B064 AG01 AG31 CA21 CB06 CD20 DA13

4B065 AA91X AA91Y AB01 AB02 AC14 BA02 BA08 CA24 CA25 CA46

4H045 AA11 BA10 BA14 BA15 CA40 DA86 EA50 FA20 FA74

专利名称(译)	几丁质蛋白新表位检测心血管事件的体外评价		
公开(公告)号	JP2014526042A	公开(公告)日	2014-10-02
申请号	JP2014519505	申请日	2012-07-06
申请(专利权)人(译)	北欧生物科学ER / ES		
[标]发明人	レーミングディアーナユリー カルスダルモルテン ヴァシリアディスエフスタティオス		
发明人	レーミング,ディアーナ・ユリー カルスダル,モルテン ヴァシリアディス,エフスタティオス		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/47 C07K7/06 C12P21/06		
CPC分类号	G01N33/6887 C07K14/4716 C07K16/18 C07K2317/34 G01N33/566 G01N33/6893 G01N2333/4712 G01N2800/32		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N5/00.102 C07K14/47 C07K7/06 C12P21/06		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/EA04 4B064/AG01 4B064/AG31 4B064/CA21 4B064/CB06 4B064/CD20 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA20 4H045/FA74		
代理人(译)	河村 英文 中村 綾子 角田 恭子 田中 宇 徳本 光一 渡边 淳		
优先权	2011011788 2011-07-11 GB		
其他公开文献	JP6175058B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于定量包含通过蛋白酶切割突触蛋白形成的新表位的肽片段的生物测定法包括使样品与特异性结合所述新表位的抗体接触并测定结合水平。可检测到的部分titin序列包括：13519'↓GEYVDCD'GTD'；13528 13532'↓NVTVEARLIK↓'；13542 13543'；↓VEKPLYGVEV'；1553

