

(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2012-531396

(P2012-531396A)

(43) 公表日 平成24年12月10日(2012.12.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/18</b> (2006.01)	C O 7 K 16/18 Z N A	4 B O 6 4
<b>GO1N 33/53</b> (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 H O 4 5
<b>C12P 21/08</b> (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2012-516812 (P2012-516812)	(71) 出願人	508347579 ヒュテスト アエルテデー、 HYTEST LTD. フィンランド国、エフアイ-20520 トゥルク、ヨウカハイセンカトゥ 6、イ ンテッゲート 6階
(86) (22) 出願日	平成22年6月29日 (2010.6.29)	(74) 代理人	100116838 弁理士 渡邊 潤三
(85) 翻訳文提出日	平成23年11月29日 (2011.11.29)	(72) 発明者	カトゥルーカ、アレクセイ ジー、 フィンランド国、エフアイ-20610 トゥルク、ナパトゥルンカトゥ 3 イー 32
(86) 国際出願番号	PCT/FI2010/050559		
(87) 国際公開番号	W02011/001029		
(87) 国際公開日	平成23年1月6日 (2011.1.6)		
(31) 優先権主張番号	20095733		
(32) 優先日	平成21年6月29日 (2009.6.29)		
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)		
(31) 優先権主張番号	61/221, 225		
(32) 優先日	平成21年6月29日 (2009.6.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 診断方法のための IGFBP-4 断片の検出

## (57) 【要約】

本発明は、患者試料中の IGFBP-4 (インスリン様成長因子結合タンパク質-4) 断片の検出による、循環器疾患または癌疾患の診断方法に関する。IGFBP-4 の酵素依存性開裂によって発生する新規エピトープを特異的に認識する抗体も開示する。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

I G F B P - 4 の新規エピトープを認識する抗体であって、該エピトープは、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列または配列番号 3 と少なくとも 80 % の相同性を有するアミノ酸配列を包含する I G F B P - 4 の酵素依存性開裂によって発生するものであることを特徴とする抗体。

**【請求項 2】**

I G F B P - 4 の酵素依存性開裂によって発生する新規エピトープを、全長 I G F B P - 4 を認識するよりも高い親和性をもって特異的に認識することを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体。

10

**【請求項 3】**

I G F B P - 4 の新規エピトープを特異的に認識し、且つ、全長 I G F B P - 4 を認識しない抗体であって、該エピトープは、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列または配列番号 3 と少なくとも 80 % の相同性を有するアミノ酸配列を包含する I G F B P - 4 の酵素依存性開裂によって発生するものであることを特徴とする抗体。

**【請求項 4】**

I G F B P - 4 の M 1 3 5 と K 1 3 6 との間で生じる酵素依存性開裂によって発生する新規エピトープを特異的に認識し、且つ、全長 I G F B P - 4 を認識しないことを特徴とする、請求項 3 に記載の抗体。

**【請求項 5】**

I G F B P - 4 の M 1 3 5 と K 1 3 6 との間で生じる酵素依存性開裂によって発生する新規エピトープを特異的に認識することを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体。

20

**【請求項 6】**

I G F B P - 4 の M 1 3 5 と K 1 3 6 との間で生じる酵素依存性開裂によって発生する新規エピトープを、全長 I G F B P - 4 を認識するよりも高い親和性をもって特異的に認識することを特徴とする、請求項 5 に記載の抗体。

**【請求項 7】**

I G F B P - 4 の M 1 3 5 と K 1 3 6 との間で生じる P A P P - A による開裂の結果として発生する新規エピトープを、全長 I G F B P - 4 を認識するよりも高い親和性をもって特異的に認識することを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体。

30

**【請求項 8】**

請求項 1 ~ 4 のいずれかの抗体と同等の特異性を有するアプタマーまたはその他のバインダー。

**【請求項 9】**

モノクローナル抗体またはその断片である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗体。

**【請求項 10】**

ポリクローナル抗体またはその断片である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗体。

**【請求項 11】**

組み換え抗体またはその断片である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗体。

**【請求項 12】**

請求項 1 ~ 4 の抗体から選ばれる少なくとも 1 種を用いる、I G F B P - 4 のタンパク質分解断片を定性的または定量的に検出する方法。

40

**【請求項 13】**

請求項 8 のアプタマーまたはその他のバインダーから選ばれる少なくとも 1 種を用いる、I G F B P - 4 のタンパク質分解断片を定性的または定量的に検出する方法。

**【請求項 14】**

診断的免疫アッセイ法であることを特徴とする、請求項 12 または 13 に記載の方法。

**【請求項 15】**

循環器系疾患の診断用である、請求項 14 に記載の方法。

**【請求項 16】**

50

癌の診断用である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

内因性 IGFBP-4 タンパク質分解断片、組み換え IGFBP-4 タンパク質分解断片、または IGFBP-4 の酵素依存性開裂によって発生する新規エピトープに相当するエピトープを包含する合成ペプチドを標準物質として用いて検量曲線を作製することを包含し、診断方法として使用することを特徴とする、請求項 12 または 13 に記載の方法。

【請求項 18】

検出された IGFBP-4 タンパク質分解断片のレベルを、作製した検量曲線と比較することを更に包含する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

免疫アッセイ法が、第 1 の捕捉抗体および第 2 の検出抗体を用いるサンドイッチ免疫アッセイ法である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 20】

請求項 1～4 のいずれかのモノクローナル抗体および請求項 8 のアプタマーまたはバインダーからなる群より選ばれる少なくとも 1 種を包含する免疫アッセイにおける、内因性 IGFBP-4 タンパク質分解断片、組み換え IGFBP-4 タンパク質分解断片、または IGFBP-4 の酵素依存性開裂によって発生する新規エピトープに相当するエピトープを包含する合成ペプチドの、標準物質または検量物質としての使用。

【請求項 21】

請求項 1～4 のいずれかの抗体と同等の特異性を有する抗体の製造における、内因性 IGFBP-4 タンパク質分解断片、組み換え IGFBP-4 タンパク質分解断片、または IGFBP-4 の酵素依存性開裂によって発生する新規エピトープに相当するエピトープを包含する合成ペプチドの、抗原としての使用。

【請求項 22】

患者試料中の IGFBP-4 タンパク質分解断片の診断的アッセイを行うための免疫アッセイキットであって、

(a) 請求項 1～4 のいずれかの抗体と同等の特異性を有する抗体、

(b) 全長 IGFBP-4 のいずれかのエピトープに特異的な他の抗体、および

(c) 請求項 20 において定義した標準物質または検量物質

を包含するキット。

【請求項 23】

請求項 1～4 のいずれかのモノクローナル抗体および請求項 8 のアプタマーまたはバインダーからなる群より選ばれる少なくとも 1 種を用いるアッセイの使用によって、患者試料中の PAPP-A のタンパク質分解活性を測定することを包含する診断方法。

【請求項 24】

請求項 23 の診断方法のための標準物質または検量物質である、酵素学的に活性な内因性 PAPP-A または組み換え PAPP-A。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、IGFBP-4 (インスリン様成長因子結合タンパク質-4) の断片を患者血液から検出することを包含する、循環器系疾患および癌疾患を含むヒト疾患の診断方法に関する。

【0002】

本発明は、特異的なタンパク質分解酵素である PAPP-A による IGFBP-4 分子の開裂後に発生する、IGFBP-4 のタンパク質分解断片 (N 末端断片と C 末端断片のいずれか) に特異的な抗体、ならびに前記抗体のエピトープを提供する。これら特定のエピトープを認識する抗体は、IGFBP-4 断片のみに対して特異的であり、全長 IGFBP-4 分子との交差反応性は全くないか低度のものである。抗体は、ヒト血液中の IGFBP-4 断片の定量的または定性的な検出のための免疫アッセイ法の開発に使用するこ

10

20

30

40

50

とができる。

【背景技術】

【0003】

以前はソマトメジン類として知られていたインスリン様成長因子 I ( I G F - I ) およびインスリン様成長因子 II ( I G F - I I ) は、インスリンと構造的に関連しており、ヒト血漿中に最も豊富に循環している 2 種のポリペプチド成長因子である ( 1 )。I G F は、正常な組織の成長と再生を司る多能性成長因子である。更に I G F は、そのグルコース低下作用およびインスリン感作作用によって、グルコース恒常性に有益な効果をもたらすことが示唆されている。しかし、I G F の全ての効果が好ましいわけではなく、疫学的研究によって、I G F - I および I G F - I I の通常癌、アテローム性動脈硬化症および 2 型糖尿病の発生における関与が示唆されている ( 2 )。

10

【0004】

I G F は、平滑筋細胞やマクロファージなどを含む多数種の細胞によって分泌されている。I G F の細胞効果は、膜に結合した高親和性受容体によって仲介されている。I G F 受容体には 2 つの個別の種類があり、広範囲にわたる細胞種によって発現されている。I G F は強力な平滑筋細胞マイトジェンであり、パラ分泌機構、自己分泌機構または内分泌機構によるアテローム硬化性病変の形成におけるこれらポリペプチドの寄与が示唆されている ( 3 )。

【0005】

血漿およびその他の体液において I G F は、I G F 結合タンパク質 ( I G F B P ) と呼ばれる、構造的に関連したタンパク質群からなるファミリーのタンパク質と複合体を形成している。I G F B P は、循環 I G F プールの約 99% と結合する。このタンパク質ファミリーには少なくとも 6 種の I G F B P が含まれる。I G F B P は I G F 受容体とは別のものである。I G F B P は、骨などを含む種々の組織において I G F の効果を調節すると考えられている ( 4 )。

20

【0006】

I G F B P - 4 は、最初はヒト骨細胞馴化培地から 25 k D a のタンパク質として精製された。その後、I G F B P - 4 は、種々の細胞種について回収した馴化培地からも精製され、様々な細胞種による I G F B P - 4 の発現が明らかとなった ( 5 , 6 )。ヒト I G F B P - 4 タンパク質の一次構造は、ヒト胎盤相補 DNA ( c D N A ) ライブラリーおよびヒト骨肉種 c D N A ライブラリーから演繹された ( 7 , 8 )。ヒト I G F B P - 4 の c D N A は 258 残基からなるタンパク質をコードし、このタンパク質は、シグナル配列の除去によってプロセシングされ、アスパラギン結合グリコシル化部位を 1 つ有する 237 残基 ( 25.6 k D a ) の成熟タンパク質になる ( 7 )。様々な細胞種が培養条件下ではグリコシル化型 I G F B P - 4 ( 28 ~ 29 k D a ) と非グリコシル化型 I G F B P - 4 ( 24 ~ 25 k D a ) の両方を分泌するものの、典型的には非グリコシル化型が正常ヒト血液に最も豊富に含まれるものである ( 5 , 6 )。

30

【0007】

6 種の I G F B P の中でも、2 つの余分のシステイン残基を可変 L ドメインに有する I G F B P - 4 はユニークなタンパク質である。I G F B P - 4 のユニークな特性によって、I G F B P - 4 の独自の生物学的機能が生じていると考えられる ( 13 )。

40

【0008】

成人血清における平均 I G F B P - 4 レベルは、I G F B P - 1、I G F B P - 2 および I G F B P - 6 のいずれのレベルよりも高く、I G F B P - 5 レベルとほぼ同等であり、I G F B P - 3 レベルよりも低い。血清 I G F B P - 4 が年齢と共に増加する傾向は、I G F B P - 1 および I G F B P - 2 に関する報告と類似しているが、年齢と共に減少する I G F B P - 3 および I G F B P - 5 のレベルとは異なることから、種々の I G F B P のヒト血清レベルは、加齢と共に差動的に調節されることを示唆している ( 12 )。

【0009】

血清 I G F B P - 4 の正確な機能的役割は完全に明らかでないが、in vitro の

50

研究によって、IGFBP-4は骨細胞やその他の細胞においてIGF活性を阻害することが示された。Mohan et al. (9, 10)は、IGFBP-4が胎生ニワトリ頭蓋冠細胞およびMC3T3-E1マウス骨芽細胞のIGF-I誘導性細胞増殖およびIGF-II誘導性細胞増殖の両方を阻害することを明らかにした。IGFBP-4は、IGF-I促進性およびIGF-II促進性のDNA合成を種々の細胞種において阻害する(6)。

#### 【0010】

IGFBP-4の合成は、全身ホルモンおよび局所成長因子によって、転写レベルまたは転写後のレベルにおいて調節されている可能性がある(11)。In vitroの研究によって、副甲状腺ホルモン、1,25-ジヒドロキシビタミンD、IGF-I、IGF-II、トランスフォーミング増殖因子- $\alpha$ および骨形成タンパク質1/骨形成タンパク質7は、ヒト骨細胞におけるIGFBP-4産生の主要な調節因子であることが判明した(8, 9)。

10

#### 【0011】

特異的なタンパク質分解は、IGFBP-4機能の主な調節機構である。IGF依存性IGFBP-4特異的タンパク質分解酵素は、最初はヒト真皮線維芽細胞馴化培地およびヒツジ真皮線維芽細胞馴化培地の両方について報告された。このタンパク質分解酵素は、後に妊娠関連血漿タンパク質A(PAPP-A)であると同定された。同じタンパク質分解活性が、培養したヒト骨芽細胞、血管平滑筋細胞、顆粒膜細胞、栄養芽細胞および脱落膜性子宮内膜間質細胞のそれぞれに由来する馴化培地のみならず、卵胞液およびヒト妊娠血清からも検出された(13)。

20

#### 【0012】

PAPP-Aは、ヒト妊娠血清から1974年に、好酸球のプロ主要塩基性タンパク質(promBP)と共に形成した四量体複合体として初めて単離された。PAPP-Aは、メタロプロテアーゼである大きなメトジンシンファミリーに属することが判明した。組み換えPAPP-Aは、IGFBP-4をM135/K136(アミノ酸残基の1文字表記を使用)の間の単一部位で開裂させることのできる、活性型タンパク質分解酵素であることが示されている。PAPP-AによるIGFBP-4開裂は、IGFBPがIGFと複合体を形成している場合にのみ可能である。PAPP-Aは、IGFBP-5をS143/K144の間でも開裂させるが、この場合は、IGFの存在は必要ない。

#### 【0013】

妊娠関連血漿タンパク質Aは、Bayes-Genis et al. (16)の研究に鑑みて、最初はアテローム性動脈硬化薬の不安定性に対する生物学的マーカーとして提案された。上記著者らは、不安定な動脈硬化薬の細胞外マトリクスにおいてPAPP-Aが高レベルであることを実証した。いくつかの研究によって、急性冠動脈症候群(ACS)の患者血液におけるPAPP-A濃度が、安定な冠動脈疾患の患者血液または対照個体の血液の場合よりも高いことが示されている。従ってPAPP-Aは、不安定な狭心症や心筋梗塞などの冠状動脈血液凝固に関連した循環器系疾患のマーカーとしての用途が提案されている。

30

#### 【0014】

アテローム性動脈硬化薬において、活性化平滑筋細胞によって発現されたPAPP-Aは、IGFと複合体を形成したIGFBP-4を開裂させる活性酵素として機能することが可能であり、その結果、IGFのバイオアベイラビリティを増強するとの仮説が立てられた。IGFシステムは、急性冠状動脈症状に繋がる、アテローム性動脈硬化薬の発生、脱安定化および破裂に寄与している可能性もある(17)。

40

#### 【0015】

IGFBP-4は、肺腺癌、非小細胞肺癌、乳癌、結腸癌腫、濾胞性甲状腺癌腫、胃癌、神経膠腫、肝臓癌、骨髄腫、神経芽腫、骨肉腫および前立腺癌などの腫瘍に由来する種々の細胞による発現が知られている。In vitroおよびin vivoの研究は、IGFBP-4が、おそらくは自己分泌IGFの活性阻害によって、種々の腫瘍の増殖制御において重要な役割を担っていると示唆している。IGFのバイオアベイラビリティの調節は、腫瘍の増殖および発生において重要な役割を担っている可能性がある(13)。

50

## 【 0 0 1 6 】

入手可能な証拠は、不安定なアテローム性動脈硬化巣を有する患者のみならず、癌を有する患者の識別における血漿 P A P P - A 濃度の測定値の有用性を示唆するよう見受けられる。しかし、今では、P A P P - A の正確な血液測定は簡単な作業ではないことが判明した。これは、まず初めに、患者血漿中のこのタンパク質の濃度が非常に低レベルであるという事実によるものである。更にヘパリン注射が患者血漿中の P A P P - A レベルに影響を与えていることも知られている ( 1 8 )。

## 【 0 0 1 7 】

我々は、P A P P - A 酵素活性によって生じた産物の測定の方が、直接 P A P P - A を測定するよりも臨床的価値が高いことを提案した。なぜなら、このような産物は P A P P - A よりも高濃度で血中に存在し、その血中濃度は、ヘパリン注射の影響を受けないはずだからである。

10

## 【 0 0 1 8 】

本発明は、体内で上昇した P A P P - A 活性のマーカー、更には P A P P - A の濃度および活性の上昇に関連した種々の疾患のためのマーカーとしての、I G F B P - 4 断片の利用に関する。患者試料中の完全な I G F B P - 4 の存在の影響を受けることなく、I G F B P - 4 のタンパク質分解断片を特異的に測定するために設計した免疫アッセイ法は、A C S や癌などの種々の病理の診断または予測において、実用価値を発揮しうるものである。

## 【 発明の概要 】

20

## 【 0 0 1 9 】

本発明は、循環器系疾患および癌などのヒト病理のための新規な血液マーカーである、I G F B P - 4 のタンパク質分解断片の発見に基づくものである。

## 【 0 0 2 0 】

我々の研究においては、アテローム性動脈硬化巣において発現されている P A P P - A が、活性タンパク質分解酵素であることを示した。アテローム性動脈硬化症の血管から得た P A P P - A を均一になるまで精製し、それが I G F - I I の存在下で効果的に I G F B P - 4 を開裂することを示した。P A P P - A は、I G F B P - 4 をアミノ酸残基 M 1 3 5 と K 1 3 6 との間で開裂し、2つの I G F B P - 4 断片、即ち、(完全 I G F B P - 4 分子の N 末端から M 1 3 5 までを含む)「N 末端断片」および(完全 I G F B P - 4 分子の K 1 3 6 から C 末端までを含む)「C 末端断片」をもたらす。

30

## 【 0 0 2 1 】

I G F B P - 4 タンパク質分解断片に特異的であり、全長分子とは全くまたは低度しか交差反応性を示さないモノクローナル抗体を得た。これらの M A b は、P A P P - A による I G F B P - 4 のアミノ酸残基 M 1 3 5 と K 1 3 6 との間の開裂の結果として発生する新規エピトープのみを認識し、完全(全長) I G F B P - 4 分子とは全くまたは低度しか交差反応性を示さなかった。具体的には、本発明の抗体は、I G F B P - 4 の酵素依存性開裂によって発生した新規エピトープを、全長 I G F B P - 4 を認識する場合よりも高い親和性をもって特異的に認識する。

## 【 0 0 2 2 】

40

これらの断片特異的抗体の1種を、完全 I G F B P - 4 を認識する別の抗体とペアで使用することによって、いくつかのサンドイッチ免疫アッセイを設計した。これらアッセイは、試料中の全長 I G F B P - 4 の存在の影響を受けることなく、I G F B P - 4 断片を定量するためのアッセイに適している(図 2 B)。

## 【 0 0 2 3 】

A C S 患者血液および健常ドナー血液について、I G F B P - 4 の2種のタンパク質分解断片を測定するために免疫アッセイ法を使用した。I G F B P - 4 タンパク質分解断片のレベルは、健常ドナー血液よりも A C S 患者血液において有意に高いことが示された。A C S 患者の血漿における I G F B P - 4 断片の平均レベルは、健常ドナーの血漿の 3 . 2 倍も高かった (  $p < 0 . 0 0 0 5$  ) ( 図 3 )。これら知見に基づき、我々は、I G F B

50

P - 4 の 2 種 の タンパク質分解断片は、どちらもアテローム性動脈硬化巣の不安定化および破裂のマーカーとして使用できることを提案した。

【 0 0 2 4 】

従って、本発明においては、循環器系疾患を含むヒト病理に対する新規マーカーとなる I G F B P - 4 の断片、ならびに患者血液中の I G F B P - 4 断片の測定値を用いた A C S の予後判定および診断のための方法について詳述する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 5 】

【 図 1 】アテローム性動脈硬化症の組織から精製した P A P P - A のタンパク質分解酵素活性を示す、I G F B P - 4 のタンパク質分解断片のウェスタンブロッティングによる検出。I G F B P - 4 ( レーン当たり 2 0 0 n g ) を次の酵素で処理した。レーン 1 : 組み換え P A P P - A、レーン 2 : アテローム性動脈硬化症の組織の P A P P - A、レーン 3 : P A P P - A なし。レーン 4 : 分子量標準物質、k D a で示した。ウサギ抗 I G F B P - 4 ポリクローナル抗体を免疫染色に用いた。

【 図 2 A 】E L I S A による I G F B P - 4 断片特異的 M A b の試験。1 0 n g の全長組み換え I G F B P - 4、または P A P P - A 依存性開裂によって作製した I G F B P - 4 断片をポリスチレンプレートに吸着させた。洗浄した後、断片特異的 M A b である I B P 3、I B P 1 2、I B P 2 7、I B P 1 3 および I B P 2 8 ( 1 0 μ g / m l ) をウェル内、振盪下で 3 0 分間インキュベートした。特異的に結合した抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼと結合した抗マウス I g G ポリクローナル抗体で検出した ( 基質 : T M B )。

【 図 2 B 】I G F B P - 4 の断片に特異的なサンドイッチ免疫アッセイ。免疫アッセイ条件は次の通りである。捕捉 M A b : I B P 5 1 3、I B P 5 2 1 ( 2 0 0 n g / ウェル )。検出 M A b : 安定な E u <sup>3+</sup> キレートで標識した I B P 1 2、I B P 2 7 および I B P 3 0 ( 1 μ g / m l )。抗原 : 1 0 0 n g / m l の、全長組み換え I G F B P - 4、または P A P P - A 依存性開裂によって作製した I G F B P - 4 断片。インキュベーション容量 : 0 . 1 m l。インキュベーション時間 : 室温で 3 0 分。C P S はカウント / 秒、A U ( 4 5 0 n m ) は 4 5 0 n m における吸光度である。

【 図 3 】ヒト血漿における I G F B P - 4 断片の検出。免疫アッセイ条件は次の通りである。捕捉 M A b : I B P 5 2 1 ( 2 0 0 n g / ウェル )。検出 M A b : 安定な E u <sup>3+</sup> キレートで標識した I B P 3 0 ( 1 μ g / m l )。M A b I B P 5 2 1 は、全長 I G F B P - 4 のみならず、P A P P - A 仲介性タンパク質分解によって生成されたその C 末端断片も認識する。M A b I B P 3 0 は、I G F B P - 4 の C 末端断片のみを特異的に認識し、全長 I G F B P - 4 は認識しない。インキュベーション容量 : 0 . 1 m l。インキュベーション時間 : 室温で 3 0 分。C P S はカウント / 秒である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 6 】

発明の好ましい態様に関する詳細な説明

本発明においては、I G F B P - 4 の N 末端タンパク質分解断片および C 末端タンパク質分解断片を、A C S 患者や数種の癌患者の血漿試料において、健常ドナーの血漿よりも有意に高いレベルで存在するバイオマーカーとして開示する。I G F B P - 4 断片の免疫アッセイは、A C S または癌の早期発見、あるいは疾患発症の危険度を決定するために使用することができる。

【 0 0 2 7 】

I G F B P - 4 ペプチドに特異的なモノクローナル抗体のみならず、完全 I G F B P - 4 に特異的なモノクローナル抗体を開発するために、標準的なプロトコルに従った。モノクローナル抗体を得るために動物の免疫に用いた合成ペプチドである特定の I G F B P - 4 断片は、P A P P - A 依存性開裂によって生じる I G F B P - 4 タンパク質分解断片に対応していた。合成ペプチドは、カップリングのために、( 推定タンパク質分解部位とは反対の末端に ) 追加の末端システインを含有していた。配列は質量分析によって確認し、ペプチドは担体タンパク質に結合させた。得られた結合タンパク質を、マウス免疫用の抗

原として使用した。

【0028】

ペプチド結合性モノクローナル抗体は、当業者に知られた標準的な技術(19~22)に基づいて作製した。動物の免疫を数サイクル繰り返した後、マウス脾臓細胞を骨髓腫細胞系の細胞と融合させた。このようなプロトコルには、形成されたハイブリドーマクローンについて、所望の特異性を示す産生抗体のスクリーニングを行う工程も含まれる。本発明の抗体を得るために、IGFBP-4タンパク質分解断片に相当するIGFBP-4ペプチドとの特異的結合を示し、且つ、同時に完全なIGFBP-4とは無反応であるハイブリドーマクローンのスクリーニングを行った。この手法によって、タンパク質のPAPP-A依存性開裂の過程で発生したIGFBP-4の新規エピトープに特異的なモノクローナル抗体を産生する数種のハイブリドーマクローンを見出すことができた(図2A)。

10

【0029】

実験においては、PAPP-A依存性開裂によって作製したIGFBP-4のタンパク質分解断片に特異的な一群のモノクローナル抗体を製造し、完全なIGFBP-4との交差反応性が5%未満のものを選択した。しかし、得られる交差反応性のパーセンテージは、例えば、使用した実験方法に依存するため、5%という値を低交差反応性の限界値と考えるべきではない。

【0030】

こうして得られたペプチド特異的抗体を、完全(全長)IGFBP-4に特異的なモノクローナル抗体と共にサンドイッチ免疫アッセイで試験した。この試験は、完全な全長IGFBP-4の存在の影響を受けることなく、IGFBP-4タンパク質分解断片の特異的な検出を行うためのサンドイッチ免疫アッセイの開発に適した二重抗体(two-site antibodies)の組み合わせを見つけるための試験である。完全なIGFBP-4に特異的なモノクローナル抗体を捕捉抗体として使用し、IGFBP-4のタンパク質分解断片に特異的なモノクローナル抗体を検出用抗体として使用した。いくつかの態様においては、2つの抗体を反対に配置することも可能である。本願に記載したサンドイッチ免疫アッセイは、IGFBP-4のタンパク質分解断片に対する特異性が高い(図2B)。

20

【0031】

本発明においては、開発したサンドイッチ免疫アッセイ法の検出用抗体を、安定なEu<sup>3+</sup>キレートで標識した。他の種々の態様においては、検出用抗体は、種々の標準的な手法、例えば、発光、化学発光、蛍光、吸光度や放射能の検出、あるいは顕微鏡観察、画像化処理などによって視覚化または検出可能な様々な種類のシグナルを発生しうる様々な種類の標識を付すことが可能である。免疫アッセイには、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、ウェスタンブロッティング、ネフェロ分析、比濁分析、免疫放射線アッセイ、ラテラルフロー免疫組織化学/サイトメトリーや、他の当業者に知られた方法が含まれる。

30

【0032】

免疫アッセイは、試料中の生物マーカーの存在または不存在の検出のみならず、試料中の生物マーカーの量の検出にも用いることができる。試料中のIGFBP-4タンパク質分解断片の量は、試料中に存在することが分かっている参照物質または標準物質、例えば、完全なIGFBP-4やその他のポリペプチド、との比較によって(またはそれらに対する比として)求めることができる。試料中のIGFBP-4タンパク質分解断片の量は、参照値または標準値、例えば、参照試料または対照試料に含まれる内因性IGFBP-4断片量、組み換えIGFBP-4断片量または合成IGFBP-4断片量など、との比較によって求めることもできる。従って、試料中の生物マーカーの量は絶対値として定量する必要はなく、参照物質または対照物質に対する相対値として測定することができる。

40

【0033】

本発明においては、ACSの血漿試料に含まれるIGFBP-4タンパク質分解断片の検出を行った。IBP521-IBP30サンドイッチペアの使用によって、断片の顕著な増加が明らかとなった(図3)。本発明の種々の態様には、ACS発症危険度の評価を

50

目的とした、患者血漿試料中の I G F B P - 4 の N 末端断片または C 末端断片の検出、あるいは I G F B P - 4 の C 末端断片および N 末端断片の同時検出が含まれる。

【 0 0 3 4 】

本発明の更なる態様は、試料中の I G F B P - 4 タンパク質分解断片の検出または I G F B P - 4 タンパク質分解断片量の測定のための免疫アッセイキットである。このようなキットは、( i ) N 末端 I G F B P - 4 タンパク質分解断片または C 末端 I G F B P - 4 タンパク質分解断片に特異的なモノクローナル抗体、( ii ) 完全な I G F B P - 4 のいずれかの適切なエピトープに特異的な、第 2 の検出用モノクローナル抗体、および( iii ) 標準物質または検量物質となる、内因性 I G F B P - 4 断片または I G F B P - 4 断片の配列の少なくとも一部に対応する組み換えタンパク質を包含してもよい。第 2 のモノクローナル抗体は、抗体 - I G F B P - 4 断片複合体を検出するために適切に標識されていてもよい。

10

【 0 0 3 5 】

いくつかの態様においては、I G F B P - 4 断片の競合的測定のためのキットは、( i ) N 末端 I G F B P - 4 タンパク質分解断片または C 末端 I G F B P - 4 タンパク質分解断片に特異的なモノクローナル抗体、および( ii ) 標準物質または検量物質となる、検出用に標識された、内因性 I G F B P - 4 断片または I G F B P - 4 断片の配列の少なくとも一部に対応する組み換えタンパク質を包含してもよい。分析試料中の I G F B P - 4 断片レベルは、I G F B P - 4 断片からなる標識標準物質の競合的除去の程度によって決定することができる。

20

【 実施例 1 】

【 0 0 3 6 】

I G F B P - 4 の新規なタンパク質分解仲介性エピトープに特異的な、マウスモノクローナル抗体の作製

マウスの免疫のために入手した合成ペプチド：

ペプチド - 1 ( 配列番号 1 )

ペプチド - 2 ( 配列番号 2 )

【 0 0 3 7 】

ペプチド - 1 およびペプチド - 2 は、固相 F m o c 化学 ( 2 3 ) を用いて合成した。ペプチドは、p - アルコキシベンジルアルコール樹脂上に調製した。樹脂から切り離した後、粗ペプチド標品を逆相高圧液体クロマトグラフィーで精製した。C 1 8 分取カラムに 0 . 1 % トリフルオロ酢酸水溶液および 0 . 1 % トリフルオロ酢酸のアセトニトリル溶液の濃度勾配をかけた。精製度 ( > 9 5 % ) は、分析用 C 1 8 高圧液体クロマトグラフィーおよび質量分光測定法 ( 精度が ± 0 . 5 ダルトンの、マトリックス補助レーザー脱離 / イオン化質量分析法 ) で決定した。

30

【 0 0 3 8 】

I G F B P - 4 ペプチド - 1 ( 配列番号 1 ) は、I G F B P - 4 断片 1 2 2 - 1 3 5 と同一のアミノ酸配列と、その N 末端に更に付加された 1 つのシステイン残基を含有していた。I G F B P - 4 ペプチド - 2 ( 配列番号 2 ) は、I G F B P - 4 断片 1 3 6 - 1 5 0 と同一のアミノ酸配列と、その C 末端に更に付加された 1 つのシステイン残基を含有していた。これら付加されたシステイン残基のスルフヒドリル基を、担体タンパク質とのペプチド結合体を作製するために使用した。

40

【 0 0 3 9 】

担体タンパク質とのペプチド結合体の作製には、Pierce社 ( イリノイ州、ロックフォード ) より入手したスルフォ - S M C C を製造者の説明書に従って使用した。結合のために、2 . 5 m g の担体タンパク質、具体的には、ウシ血清アルブミン ( B S A ) または卵白アルブミン ( 共にミズーリ州、セントルイス、Sigma Chemicals より入手 ) を、1 0 m M の K H P O <sub>4</sub>、1 5 0 m M の N a C l、p H 7 . 4 ( 即ち、P B S ) に 1 0 m g / m l の濃度に溶解した。0 . 1 m l のジメチルスルフォキシドに溶解した 2 m g のスルフォ - S M C C をタンパク質溶液に加えた。担体タンパク質の活性化反応を、室温で 2 時間実施し

50

た。過剰なスルフォ - S M C C を、N A P - 5 カラム ( ニュージャージー州、ピスカタウェイ、GE Healthcare Life Sciencesより入手 ) を用いたゲル濾過で除去した。N A P - 5 カラムは 1 0 m M の K H P O <sub>4</sub>、1 5 0 m M の N a C l、p H 7 . 2 で事前に平衡化しておいた。次に、2 m g の合成ペプチド - 1 または合成ペプチド - 2 をタンパク質溶液に加え、結合を開始した。反応は、恒常的な振盪と共に氷上で 2 時間実施した。未反応ペプチド画分を、P B S で平衡化しておいた N A P - 5 カラムを用いたゲル濾過によってタンパク質 - ペプチド結合体から除去した。ペプチドの適切な担体タンパク質への結合は、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動で求めたタンパク質分子量の 3 ~ 5 k D a の増加によって確認した。結合体は分注し、使用まで - 2 0 で保存した。

#### 【 0 0 4 0 】

##### ペプチド - ( 担体タンパク質 ) 結合体によるマウスの免疫

1 群が 5 匹の B A L B / c マウスを、ペプチド - タンパク質結合体で 5 回免疫した。

グループ 1 . 1 次免疫 : 1 0 μ g の B S A - ペプチド - 1 を含有する P B S 溶液 0 . 2 m l を 6 0 % のフロインド完全アジュバントと共に腹腔内投与。2 次免疫 : 3 0 日目に、5 μ g の B S A - ペプチド - 1 を含有する P B S 溶液 0 . 2 m l を 6 0 % のフロインド完全アジュバントと共に腹腔内投与。3 次免疫 : 6 0 日目に、2 . 5 μ g の B S A - ペプチド - 1 を含有する P B S 溶液 0 . 2 m l を腹腔内投与。

#### 【 0 0 4 1 】

グループ 2 . 1 次免疫 : 1 0 μ g の B S A - ペプチド - 2 を含有する P B S 溶液 0 . 2 m l を 6 0 % のフロインド完全アジュバントと共に腹腔内投与。2 次免疫 : 3 0 日目に、5 μ g の B S A - ペプチド - 2 を含有する P B S 溶液 0 . 2 m l を 6 0 % のフロインド完全アジュバントと共に腹腔内投与。3 次免疫 : 6 0 日目に、2 . 5 μ g の B S A - ペプチド - 2 を含有する P B S 溶液 0 . 2 m l を腹腔内投与。

#### 【 0 0 4 2 】

3 次免疫の 2 0 日後に、ペプチド特異的抗体の力価が最も高いマウスを最終免疫およびハイブリダイゼーションのために選択した。グループ 1 のマウスには、1 0 μ g の B S A - ペプチド - 1 を含有する P B S 溶液 0 . 2 m l を静脈注射し、グループ 2 のマウスには、1 0 μ g の B S A - ペプチド - 2 を含有する P B S 溶液 0 . 2 m l を静脈注射した。次の日にも、同じプロトコルに従って静脈注射を行った ( 5 次免疫 ) 。5 次免疫の 2 日後には、免疫したマウスの脾臓を無菌的に単離し、既報 ( 1 9 ~ 2 2 ) に従って、ホモジェナイズした組織をマウス骨髄腫細胞系 s p 2 / 0 と融合した。

#### 【 0 0 4 3 】

生育中のハイブリドーマの馴化培地について、酵素結合免疫吸着測定法 ( E L I S A ) で抗体のスクリーニングを行った。ペプチド - 1 またはペプチド - 2 に特異的な抗体を産生したハイブリドーマを、卵白アルブミン - ペプチド - 1 または卵白アルブミン - ペプチド - 2 のそれぞれを前吸着用抗体として用いた E L I S A によって選択した。N S 0 細胞系の発現したヒト組み換え I G F B P - 4 ( ミズーリ州、セントルイス、Sigma Chemicals より入手 ) も、更なる試験において前吸着用抗体として使用した。アッセイのために、ウェル当たり 5 0 n g の卵白アルブミン - ペプチド - 1、卵白アルブミン - ペプチド - 2 またはヒト組み換え I G F B P - 4 を含む P B S 0 . 1 m l を免疫アッセイ用ポリスチレンプレート ( マサチューセッツ州、ケンブリッジ、Corning より入手 ) に吸着させた。抗原吸着を 4 0 分間行った後、プレートを 2 回洗浄し、0 . 1 % の界面活性剤 T w e e n 2 0 を含む P B S ( 即ち、P B S T ) で 1 0 分間ブロッキングした。次にプレートを、生育中のハイブリドーマから回収した馴化培地 0 . 0 5 m l と共に 3 0 分間インキュベートし、P B S T で 2 回洗浄した。前吸着させておいた抗原に結合したマウス抗体は、H R P と結合した 2 次抗マウス I g G ポリクローナル抗体 ( P B S T で 1 0 0 0 倍希釈したものをウェル当たり 0 . 1 m l ) と 3 0 分間インキュベートすることによって顕在化させた。2 次抗体は、ミズーリ州、セントルイス、Sigma Chemicals より入手した。2 次抗体とのインキュベーションの後にプレートを P B S T で 6 回洗浄し、0 . 0 3 % の過酸化水素を添加した、3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン ( T M B ) 含有パーオキシダー

10

20

30

40

50

ゼ発色基質を加えた。15分間のインキュベーションの後に0.1mlの0.5Mリン酸溶液を加えて反応を停止し、ウェルの吸光度を450nmで測定した。吸光度の測定は、Labsystems Multiscan マイクロプレートリーダー（フィンランド国、Labsystems製）で行った。

#### 【0044】

卵白アルブミンと結合した適切なペプチドに特異的であり（上記条件において450nmで測定した吸光度のバックグラウンド値に対する増加が0.5を超え）、且つ同時に、ヒト組み換えIGFBP-4とは反応しない（450nmで測定した吸光度のバックグラウンド値に対する増加が0.025未満）の抗体を産生するハイブリドーマを、更なる研究のために選択した。このようなハイブリドーマを、限界希釈法でクローニングした。所望のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマクローンを、10%胎仔ウシ血清（ユタ州、ローガン、HyClone Laboratories製）を含むダルベッコの修飾イーグル培地（DMEM）で培養した。

10

#### 【0045】

##### 抗体のアフィニティー精製

選択したハイブリドーマクローンを腹腔内に注射し、モノクローナル抗体をマウス腹水中で産生した。タンパク質Aアフィニティークロマトグラフィーを用いて、腹水から抗体を精製した。樹脂はGE Healthcare Life Sciences（ニュージャージー州、ピスカタウェイ）より入手し、精製は製造者の説明書に従って実施した。精製モノクローナル抗体は、50%硫酸アンモニウムの懸濁液として4℃で保存した。

20

#### 【0046】

##### モノクローナル抗体の特異性に関する研究

選択したモノクローナル抗体の特異性を確認するために、IGFBP-4タンパク質分解断片を得た。PAPP-A依存性タンパク質分解反応を、既報（14）の条件に従って実施した。2μgのヒト組み換えIGFBP-4を、2mMのCaCl<sub>2</sub>、1.8μgのIGF-1I（ミズーリ州、セントルイス、Sigma Chemicalsより入手）、40ngのヒト組み換えPAPP-A（フィンランド国、トゥルク、HyTest製）および2μlのタンパク質分解酵素阻害剤カクテル（ミズーリ州、セントルイス、Sigma Chemicalsより入手）の存在下で、0.23mlの50mM Tris-HCl（pH7.5）中でインキュベートした。反応は37℃で15時間実施し、試料を-20℃で凍結することによって反応を停止した。IGFBP-4のPAPP-A依存性開裂の程度は、Abcam社（マサチューセッツ州、ケンブリッジ）より入手した特異的ウサギポリクローナル抗体1μg/mlを用いたウェスタンブロッティングで決定した（図1）。

30

#### 【0047】

選択したモノクローナル抗体のIGFBP-4タンパク質分解断片に対する特異性の研究は、アフィニティー精製抗体を用いた間接ELISA法で実施した（図2A）。10ngの全長組み換えIGFBP-4またはPAPP-A依存性開裂によって調製した（方法は上述したとおり）IGFBP-4断片をポリスチレンプレートに吸着させた。40分間のインキュベーション後にプレートを2回洗浄し、0.1%の界面活性剤Tween 20を含有するPBS（即ち、PBST）で10分間ブロックした。選択したMAb（10μg/ml）を振盪下、室温で30分間インキュベートし、その後、PBSTで2回洗浄した。特異的に結合した抗体は、HRPを結合した抗マウスIgGポリクローナル抗体（PBSTで1000倍希釈したものをウェル当たり0.1ml）で検出した。2次抗体は、ミズーリ州、セントルイス、Sigma Chemicalsより入手した。2次抗体とのインキュベーションの後、プレートをPBSTで6回洗浄し、0.03%の過酸化水素を添加した3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）含有ペルオキシダーゼ発色基質を加えた。15分間のインキュベーションの後に0.1mlの0.5Mリン酸溶液を加えて反応を停止し、ウェルの吸光度を450nmで測定した。IGFBP-4のPAPP-A依存性開裂によって産生されたタンパク質分解断片に特異的であり、完全なIGFBP-4との交差反応性が5%未満である以下のモノクローナル抗体群を最終的に選択した：IB

40

50

P 2 8、I B P 2 7、I B P 1 2、I B P 3、I B P 4、I B P 7、I B P 1 3、I B P 1 8、I B P 1 9、I B P 2 0、I B P 3 0、I B P 1 6 7、I B P 1 6 6、I B P 1 6 8、I B P 1 7 4、I B P 1 6 0、I B P 1 6 1、I B P 1 6 4、I B P 1 7 1。I g M アイソタイプである I B P 3 0 以外の全てのモノクローナル抗体が、I g G アイソタイプであった。

#### 【 0 0 4 8 】

##### I G F B P - 4 断片の定量化のためのサンドイッチ免疫アッセイの設計

アフィニティー精製したモノクローナル抗体の特異性を、サンドイッチ免疫アッセイでも確認した(図 2 B)。I G F B P - 4 のタンパク質分解断片(N 末端断片または C 末端断片)に特異的な 1 種のモノクローナル抗体(間接 E L I S A における全長分子との交差反応性は 5 % 未満)、および完全な I G F B P - 4 いずれかのエピトープを認識する別の M A b を用いる、数種のサンドイッチアッセイを開発した。完全な I G F B P - 4 に特異的なマウスモノクローナル抗体の作製については、実施例 2 に記載した。

10

#### 【 0 0 4 9 】

サンドイッチ蛍光免疫アッセイを実施するために、Hyytia et al. ( 2 4 ) に記載の安定化 E u <sup>3+</sup> キレートで標識した検出用 M A b を用いた。このアッセイに用いる捕捉抗体は完全な I G F B P - 4 に特異的であるが、一方、検出用抗体は、I G F B P - 4 のタンパク質分解性新規エピトープに特異的である。ウェル当たり 2 μ g の捕捉抗体(I B P 5 1 3、I B P 5 2 1)を含む 1 0 0 μ L のリン酸緩衝化生理食塩水を、9 6 穴の免疫アッセイプレート中で、恒常的な振盪のもと、室温で 3 0 分間インキュベートした。プレートを、0 . 1 5 M の N a C l、0 . 0 2 5 % の T w e e n 2 0 および 0 . 5 g / L の N a N <sub>3</sub> を添加した 1 0 m M の T r i s - H C l ( p H 7 . 8 ) 緩衝液(即ち、緩衝液 A)で洗浄した。洗浄後、1 0 0 n g / m l の全長ヒト組み換え I G F B P - 4 または P A P P - A 依存性開裂によって作製した I G F B P - 4 断片を添加した 0 . 1 m l のアッセイ用緩衝液(5 0 m M の T r i s - H C l 緩衝液(p H 7 . 7)、9 g / L の N a C l、0 . 0 1 % の T w e e n 4 0、0 . 5 % の B S A および 0 . 5 g / L の N a N <sub>3</sub>)をプレートに加えた。プレートを、恒常的な振盪下、室温で 3 0 分間インキュベートした。緩衝液 A で洗浄した後、0 . 1 m l の検出用抗体(I B P 1 2、I B P 2 7 および I B P 3 0)のアッセイ用緩衝液溶液(1 m g / L)を添加した。プレートを、恒常的な振盪下、室温で 3 0 分間インキュベートした。緩衝液 A で洗浄した後、各ウェルに 0 . 2 m l の増強溶液(1 . 7 5 M の N a S C N、1 M の N a C l、5 % のグリセロール、2 0 % の 1 - プロパノール、5 m M の N a <sub>2</sub> C O <sub>3</sub>、5 0 m M のグリシン - N a O H、p H 1 0 . 0)を添加し、穏やかな振盪下、室温で 3 分間インキュベートした。E u <sup>3+</sup> の蛍光を Victor 1420 マルチラベルカウンター(Wallac-Perkin Elmer 製)で測定した。蛍光は、1 秒当たりのカウント(C P S)で表した。

20

30

#### 【 0 0 5 0 】

開発したサンドイッチ免疫アッセイは、P A P P - A 依存性開裂によって作製した I G F B P - 4 断片のみを検出し、全長 I G F B P - 4 との交差反応は生じなかった(あるいは非常に低く、1 % 未満だった)。

#### 【 実施例 2 】

40

#### 【 0 0 5 1 】

##### 完全な I G F B P - 4 に特異的なマウスモノクローナル抗体の作製

##### マウスの免疫

5 匹の B A L B / c マウスを、哺乳動物 N S 0 細胞系で発現させたヒト組み換え I G F B P - 4 で 5 回免疫した。このタンパク質は、ミズーリ州、セントルイス、Sigma Chemicals より入手した。1 次免疫：5 μ g の I G F B P - 4 を含有する P B S 溶液 0 . 2 m l を 6 0 % のフロインド完全アジュバントと共に腹腔内投与。2 次免疫：3 0 日目に、2 μ g の I G F B P - 4 を含有する P B S 溶液 0 . 2 m l を 6 0 % のフロインド完全アジュバントと共に腹腔内投与。3 次免疫：6 0 日目に、2 μ g の I G F B P - 4 を含有する P B

50

S 溶液 0.2 ml を腹腔内投与。

【0052】

3 次免疫の 20 日後に、タンパク質特異的抗体の力価が最も高いマウスを、次の免疫およびハイブリダイゼーションのために選択した。マウスに対する 4 回目の注射は、2 μg の IGFBP-4 を含有する PBS 溶液 0.2 ml の静脈注射で行った。最後の静脈注射は、次の日に同じプロトコルに従って実施した（5 次免疫）。2 日後には、免疫したマウスの脾臓を無菌的に単離し、既報（19～22）に従って、ホモジェナイズした組織をマウス骨髄腫細胞系 sp2/0 と融合した。

【0053】

生育中のハイブリドーマの馴化培地について、ELISA 法で IGFBP-4 特異的抗体のスクリーニングを行った。完全な IGFBP-4 に特異的な抗体を産生するハイブリドーマを、間接 ELISA で選択した。アッセイのために、ウェル当たり 50 ng の全長ヒト組み換え IGFBP-4 を含む PBS 0.1 ml を免疫アッセイ用ポリスチレンプレートに吸着させた。40 分間のインキュベーションの後にプレートを 2 回洗浄し、0.1% の界面活性剤 Tween 20 を含む PBS（即ち、PBST）で 10 分間ブロックした。次にプレートを、生育中のハイブリドーマの入ったウェルから回収した馴化培地 0.05 ml と共に 30 分間インキュベートした。インキュベーションの後に、プレートを PBST で 2 回洗浄した。洗浄後にプレートを、HRP と結合した 2 次抗マウス IgG ポリクローナル抗体（PBST で 1000 倍希釈したものをウェル当たり 0.1 ml）と共に 30 分間インキュベートした。2 次抗体とのインキュベーションの後にプレートを PBST で 6 回洗浄し、TMB および 0.03% の過酸化水素を含有するペルオキシダーゼ発色基質を加えた。15 分間のインキュベーションの後に 0.1 ml の 0.5 M リン酸溶液を加えて反応を停止し、ウェルの吸光度を 450 nm で測定した。

【0054】

全長 IGFBP-4 に特異的な（上記条件において 450 nm で測定した吸光度のバックグラウンド値に対する増加が 0.5 を超える）抗体を産生するハイブリドーマを、限界希釈法でクローニングした。所望のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマクローンを、10% 胎仔ウシ血清を含む DMEM で培養した。

【0055】

抗体のアフィニティー精製

選択したハイブリドーマクローンを腹腔内注射し、全長 IGFBP-4 に特異的なモノクローナル抗体をマウス腹水中で産生した。タンパク質 A アフィニティークロマトグラフィーを用いて、腹水から抗体を精製した。樹脂は GE Healthcare Life Sciences（ニュージャージー州、ピスカタウェイ）より入手し、精製は製造者の説明書に従って実施した。精製モノクローナル抗体は、50% 硫酸アンモニウムの懸濁液として 4℃ で保存した。

【実施例 3】

【0056】

アテローム性動脈硬化症由来 PAPP-A のタンパク質分解活性

ヒト アテローム性動脈硬化症の冠状血管試料は、使用するまで -70℃ で保存した。アテローム性動脈硬化症の冠状動脈からの PAPP-A の抽出は、0.15 M の NaCl、0.5% の Triton X 100 およびタンパク質分解酵素阻害剤カクテルを含有する 50 mM の Tris-HCl（pH 7.8）緩衝液中で組織をホモジェナイズした後にを行った。抽出した PAPP-A は、アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。PAPP-A の精製に用いたアフィニーマトリックスは、PAPP-A 特異的モノクローナル抗体 4G11（フィンランド国、トゥルク、HyTest より入手）を用いて調製した。精製タンパク質が PAPP-A であることを確認するために、数種の PAPP-A 特異的モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットングおよび液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法を使用した。

【0057】

アテローム性動脈硬化症由来 PAPP-A のタンパク質分解活性を解析するために、2

10

20

30

40

50

$\mu\text{g}$  のヒト組み換え IGFBP-4 を、 $2\text{mM}$  の  $\text{CaCl}_2$ 、 $1.8\mu\text{g}$  の IGF-1I (ミズーリ州、セントルイス、Sigma Chemicalsより入手)、 $40\text{ng}$  のアテローム性動脈硬化症由来 PAPP-A および  $2\mu\text{l}$  のタンパク質分解酵素阻害剤カクテル (ミズーリ州、セントルイス、Sigma Chemicalsより入手) の存在下で、 $0.23\text{ml}$  の  $50\text{mM}$  Tris-HCl ( $\text{pH}7.5$ ) 中でインキュベートした。反応は  $37^\circ\text{C}$  で  $15$  時間実施し、試料を  $-20^\circ\text{C}$  で凍結することによって反応を停止した。IGFBP-4 の PAPP-A 依存性開裂の程度は、IGFBP-4 特異的ウサギポリクローナル抗体 (マサチューセッツ州、ケンブリッジ、Abcamより入手) を用いたウェスタンブロッティングで決定した (図 1)。

【0058】

アテローム性動脈硬化症由来 PAPP-A は、組み換え PAPP-A と同じ効率で IGFBP-4 を開裂することが明らかになった。これをもって、ヒト プラークの発現する内因性 PAPP-A が、IGF-1I の存在下で IGFBP-4 を開裂することが可能な活性化タンパク質分解酵素であることが初めて明らかとなった。

【実施例 4】

【0059】

#### ACS 患者の血漿試料における IGFBP-4 断片の測定

(ST 上昇型の) ACS 患者 43 人の血液と、健常ドナー由来の 34 例の血漿試料について、断片特異的なサンドイッチ免疫アッセイで試験した。全ての血漿試料を EDTA の存在下で採取し、測定まで  $-70^\circ\text{C}$  で保存した。

【0060】

サンドイッチ免疫アッセイによる測定のために、ウェル当たり  $2\mu\text{g}$  の捕捉抗体 (IBP521) を含む  $0.1\text{ml}$  のリン酸緩衝化生理食塩水を 96 穴の免疫アッセイプレート中で、恒常的な振盪のもと、室温で 30 分間インキュベートした。プレートを緩衝液 A で洗浄した後、アッセイ緩衝液で 1:1 に希釈した患者の血漿試料  $0.1\text{ml}$  をプレートに加えた。プレートは、恒常的な振盪下、室温で 30 分間インキュベートした。緩衝液 A で洗浄した後、検出用抗体 IBP30 ( $1\text{mg/L}$ ) を含むアッセイ用緩衝液溶液  $0.1\text{ml}$  を添加した。プレートは、恒常的な振盪下、室温で 30 分間インキュベートした。緩衝液 A で洗浄した後、各ウェルに  $0.2\text{ml}$  の増強溶液を添加し、穏やかな振盪下、室温で 3 分間インキュベートした。Eu<sup>3+</sup> の蛍光を Victor 1420 マルチラベルカウンター (Wallac-Perkin Elmer 製) で測定した。ACS 患者の血漿における IGFBP-4 断片レベルは、健常ドナーの血漿におけるレベルよりも 3.2 倍も高かった ( $p < 0.0005$ ) (図 3)。平均  $\pm$  標準偏差を図面に記した。蛍光は、1 秒当たりのカウント (CPS) で表した。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0061】

【非特許文献 1】Spencer EM 著 . Modern concepts of insulin-like growth factors (インスリン様成長因子の現代的概念) . ニューヨーク州、Elsevier 発行、1991 .

【非特許文献 2】Frystyk J., Free insulin-like growth factors - measurements and relationships to growth hormone secretion and glucose homeostasis. Growth Horm IGF Res. 2004; 14(5):337-75.

【非特許文献 3】Ferns GA et al. The insulin-like growth factors: their putative role in atherogenesis. Artery 1991; 18(4): 197-225.

【非特許文献 4】Rosenfeld RG, Lamson G, Pham H, Oh Y, Conover C, De Leon DD, Donovan SM, Ocran I, Giudice L. Insulin-like growth factor-binding proteins. Recent Prog Horm Res. 1990; 46:99-159.

【非特許文献 5】Baxter RC, Martin JL. Binding proteins for the insulin-like growth factors: structure, regulation and function. Prog in Growth Factor Res. 1989; 1:49-68.

10

20

30

40

50

【非特許文献 6】Rechler MM., Insulin-like growth factor binding proteins. *Vitam Horm.* 1993; pp. 471-114.

【非特許文献 7】La Tour D, Mohan S, Linkhart TA, Baylink DJ, Strong DD. Inhibitory insulin-like growth factor binding protein: cloning, complete sequence, and physiologic regulation. *Mol Endocrinol.* 1990; 4:1806-1814.

【非特許文献 8】Shimasaki S, Uchiyama F, Shimonaka M, Ling N., Molecular cloning of the cDNAs encoding a novel insulin-like growth factor binding protein from rat and human. *Mol Endocrinol.* 1990, 4:1451-1458.

【非特許文献 9】Mohan S, Bautista C, Wergedal J, Baylink DJ. Isolation of an inhibitory insulin-like growth factor (IGF) binding protein from bone conditioned medium: a potential local regulator of IGF action. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1989; 86:8338-8342.

【非特許文献 10】Mohan S, Nakao Y, Honda Y, et al., Studies on the mechanisms by which insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-5 modulate IGF actions in bone cells. *J Biol Chem.* 1995; 270:20424-20431.

【非特許文献 11】Mohan S, Strong DD, Linkhart TA, Baylink DJ. Regulation and actions of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-4 and IGFBP-5 in bone: physiological and clinical implications. *Excerpta Medica* 発行、Baxter RC, Gluckman PD, Rosenfeld RG 編の *The insulin-like growth factors and their regulatory proteins* (インスリン様成長因子およびそれらの調節タンパク質) に掲載; 1994; 205-215.

【非特許文献 12】Honda Y, Landale EC, Strong DD, Baylink DJ., Recombinant Synthesis of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-4 (IGFBP-4): Development, Validation, and Application of a Radioimmunoassay for IGFBP-4 in Human Serum and Other Biological Fluids. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996; 81(4): 1389-1396.

【非特許文献 13】Zhou R, Diehl D, Hoeflich A, Lahm H, Wolf E., IGF-binding protein-4: biochemical characteristics and functional consequences. *Journal of Endocrinology* 2003; 178: 177-193.

【非特許文献 14】Overgaard MT, Haaning J, Boldt HB, Olsen IM, Laursen LS, Christiansen M, Gleich GJ, Sottrup-Jensen L, Conover CA, Oxvig C Expression of recombinant human pregnancy-associated plasma protein-A and identification of the proform of eosinophil major basic protein as its physiological inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 2000; 275: 31128-31133.

【非特許文献 15】Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS. The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis. *Circ Res.* 2000; 86:125-30.

【非特許文献 16】Bayes-Genis A, Conover CA, Overgaard MT, Bailey KR, Christiansen M, Holmes DR Jr, et al. Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2001; 345:1022-9.

【非特許文献 17】Libby P, What happens inside an atherosclerotic plaque? *International Congress Series*, 2004; 1262 253-256

【非特許文献 18】Wittfooth S, Qin Q, Pettersson K., Performance of immunofluorometric point-of-care assays for free pregnancy-associated plasma protein A detection in whole blood samples. *Clin Chem Lab Med*; 2008; 46 (1)18-20

【非特許文献 19】Kohler G, Milstein C, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256(5517):495-7.

【非特許文献 20】Kohler G, Milstein C, Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol.* 1976; 6(7):511-9

10

20

30

40

50

【非特許文献 2 1】Kohler G, Howe SC, Milstein C, Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. Eur J Immunol. 1976; 6(4):292-5.

【非特許文献 2 2】Hammerling, G.J., Hammerling, U. および Kearney J.F. 編、Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas (モノクローナル抗体とT細胞ハイブリドーマ)、ニューヨーク州、ノースホーランド、Elsevier発行 ; pp. 563-587.

【非特許文献 2 3】Fields CG, Fields GB, Noble RL, Cross TA., Solid phase peptide synthesis of 15N-gramicidins A, B, and C and high performance liquid chromatographic purification. Int J Pept Protein Res. 1989; 33(4):298-303.

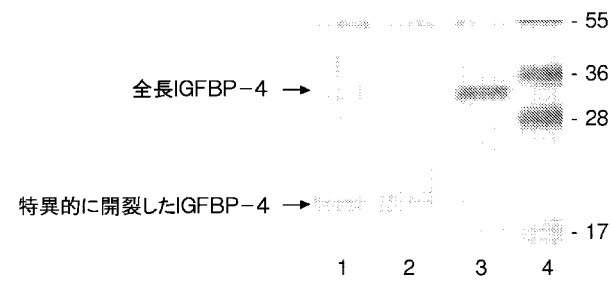
【非特許文献 2 4】Hyytia H, Ristiniemi N, Airas L, Pettersson K, Hellman J, Development of an immunoassay for the detection of cystatin C dimers. J Immunol Methods 2010; 355(1-2): 14-20.

【配列表フリーテキスト】

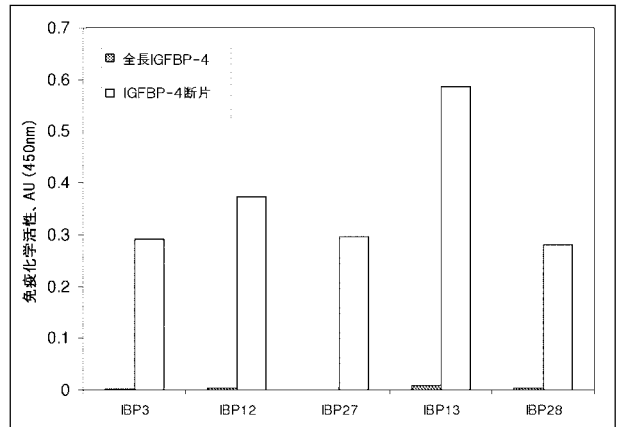
【 0 0 6 2 】

配列番号 3 : P A P P - A 開裂部位

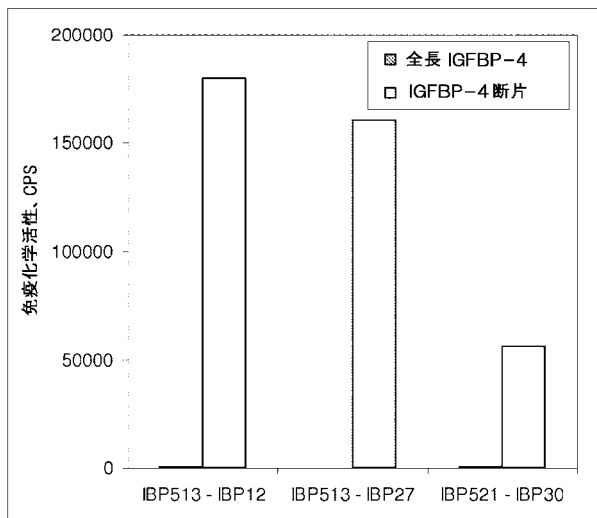
【 図 1 】



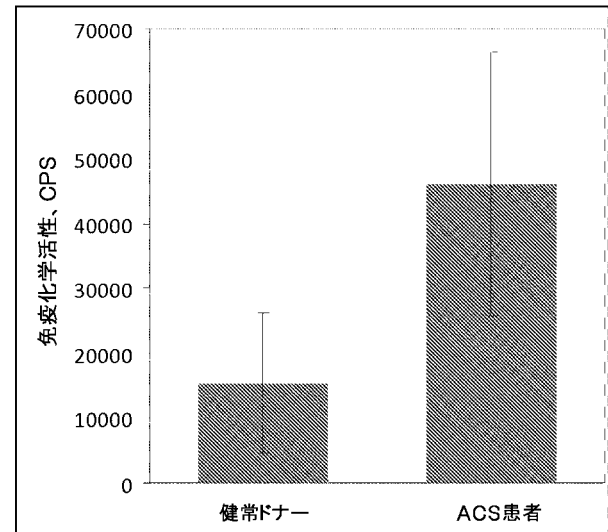
【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



【 図 3 】



## 【 配列表 】

2012531396000001.app

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成23年10月7日(2011.10.7)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

## 【 請求項 1 】

配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を包含するヒト I G F B P - 4 またはその断片の酵素依存性開裂によって発生する新規エピトープを特異的に認識する抗体または他のバインダー。

## 【 請求項 2 】

配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を包含するヒト I G F B P - 4 またはその断片の酵素依存性開裂によって発生する新規エピトープを特異的に認識する抗体または他のバインダーであって、全長ヒト I G F B P - 4 に対する交差反応性が 5 % 未満であることを特徴とする抗体または他のバインダー。

## 【 請求項 3 】

配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を包含するヒト I G F B P - 4 またはその断片の酵素依存性開裂、あるいは配列番号 3 と少なくとも 8 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を包含する分子の酵素依存性開裂によって発生する新規エピトープを特異的に認識し、且つ、全長ヒト I G F B P - 4 または全長ヒト I G F B P - 4 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質を認識しない抗体または他のバインダー。

## 【請求項 4】

新規エピトープを、全長ヒト IGFBP - 4 を認識するよりも高い親和性をもって特異的に認識することを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体または他のバインダー。

## 【請求項 5】

ヒト IGFBP - 4 の酵素依存性開裂が、アミノ酸残基 M 1 3 5 と K 1 3 6 との間で生じることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗体または他のバインダー。

## 【請求項 6】

開裂させる酵素が PAPP - A であることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗体または他のバインダー。

## 【請求項 7】

モノクローナル抗体またはその断片である、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗体。

## 【請求項 8】

組み換え抗体またはその断片である、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗体。

## 【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれかの抗体または他のバインダーを用いる、酵素依存性開裂によって発生する IGFBP - 4 タンパク質分解断片の少なくとも 1 種を定性的または定量的に検出する方法。

## 【請求項 10】

酵素依存性開裂によって発生するヒト IGFBP - 4 タンパク質分解断片の少なくとも 1 種を定性的または定量的に検出する方法であって、

該断片を含有する生物学的試料を請求項 1 または 2 の抗体または他のバインダーと接触させ、そして

抗体または他のバインダーと該断片との複合体の存在を検出することを包含する方法。

## 【請求項 11】

酵素依存性開裂によって発生する IGFBP - 4 タンパク質分解断片の少なくとも 1 種を定性的または定量的に検出する方法であって、

該断片を含有する生物学的試料を請求項 3 または 4 の抗体または他のバインダーと接触させ、そして

抗体または他のバインダーと該断片との複合体の存在を検出することを包含する方法。

## 【請求項 12】

IGFBP - 4 断片と全長 IGFBP - 4 タンパク質を区別することを特徴とする、請求項 9 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 13】

配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を包含するヒト IGFBP - 4 の酵素依存性開裂、または配列番号 3 と少なくとも 80 % の相同性を有するアミノ酸配列を包含する分子の酵素依存性開裂によって発生する IGFBP - 4 断片の少なくとも 1 種を定性的または定量的に検出する方法であって、該方法は、断片のみに特異的であり、全長 IGFBP - 4 分子に対する交差反応性がないことを特徴とする方法。

## 【請求項 14】

生物学的試料をモノクローナル抗体または組み換え抗体と接触させることを特徴とする、請求項 9 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 15】

診断方法であることを特徴とする、請求項 13 または 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

第 1 の捕捉抗体および第 2 の検出抗体を用いるサンドイッチ免疫アッセイ法である、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 17】

循環器系疾患の診断用である、請求項 9 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 18】

癌の診断用である、請求項 9 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 19】

(a) 内因性ヒト IGFBP - 4 タンパク質分解断片、組み換えヒト IGFBP - 4 タンパク質分解断片または合成ペプチドであって、IGFBP - 4 の酵素依存性開裂によって発生する新規エピトープに相当するエピトープを包含する断片またはペプチドを標準物質として用いて検量曲線を作製し、そして

(b) 抗体によって検出された断片を、作製した検量曲線と比較することによって、試料中に存在する抗体検出断片の量を決定する

ことを包含し、診断方法として使用することを特徴とする、請求項 9 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 20】

請求項 1 ~ 6 のいずれかのモノクローナル抗体または他のバインダーの少なくとも 1 種を包含するアッセイにおける、内因性 IGFBP - 4 タンパク質分解断片、組み換え IGFBP - 4 タンパク質分解断片、または IGFBP - 4 の酵素依存性開裂によって発生する新規エピトープに相当するエピトープを包含する合成ペプチドの、標準物質または検量物質としての使用。

## 【請求項 21】

請求項 1 ~ 6 のいずれかの抗体または他のバインダーと同等の特異性を有する抗体の製造における、内因性 IGFBP - 4 タンパク質分解断片、組み換え IGFBP - 4 タンパク質分解断片、または IGFBP - 4 の酵素依存性開裂によって発生する新規エピトープに相当するエピトープを包含する合成ペプチドの、抗原としての使用。

## 【請求項 22】

患者試料中の IGFBP - 4 タンパク質分解断片の診断的アッセイを行うためのキットであって、

(a) 請求項 1 ~ 6 のいずれかの抗体または他のバインダーと同等の特異性を有する抗体または他のバインダー、

(b) 全長 IGFBP - 4 のエピトープに特異的であり、且つ上記 (a) の抗体または他のバインダーの認識する新規エピトープに対して特異的ではない別の抗体またはバインダー、

(c) ヒト IGFBP - 4 の酵素依存性開裂によって発生する新規エピトープに相当するエピトープを包含する、内因性 IGFBP - 4 タンパク質分解断片、組み換え IGFBP - 4 タンパク質分解断片または合成ペプチド、および

(d) 請求項 20 において定義した標準物質または検量物質を包含するキット。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/FI2010/050559

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC: see extra sheet		
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)		
IPC:C07K, G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE, DK, FI, NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, PAJ, WPI data, BIOSIS, CHEM ABS Data, COMPENDEX, EMBASE, INSPEC, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Chernausek S D et al., "Proteolytic cleavage of insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP-4). Localization of cleavage site to non-homologous region of native IGFBP-4", 1995, vol 270, pages 11377-11382, The Journal of biological chemistry; page 11377, column 2, line 40 - line 48; page 11378, column 2, line 50 - line 58	1-2, 5-13, 20-22
A		3-4, 14-19, 23-24
X	SUN IYC et al., "Pregnancy-associated plasma protein A proteolytic activity is associated with the human placental trophoblast cell membrane", 2002, vol 87, pages 5235-5240, The Journal of Endocrinology & Metabolism; page 5236, column 2, line 9 - page 11; figures 1, 2	1-2, 5-13, 20-22
A		3-4, 14-19, 23-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
08-10-2010		12-10-2010
Name and mailing address of the ISA/SE Patent- och registreringsverket Box 5055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. + 46 8 686 02 86		Authorized officer Patrick Andersson Telephone No. + 46 8 782 25 00

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/FI2010/050559
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 0054806 A1 (MAYO FOUNDATION ET AL), 21 September 2000 (2000-09-21); page 12, line 34 - page 13, line 3	1-2, 5-24
A	--	3-4
A	LAURSEN L S; ET AL, "SUBSTRATE SPECIFICITY OF THE METALLOPROTEINASE PREGNANCY-ASSOCIATED PLASMA PROTEIN-A (PAPP-A) ASSESSED BY MUTAGENESIS AND ANALYSIS OF SYNTHETIC PEPTIDES: SUBSTRATE RESIDUES DISTANT FROM THE SCISSILE BOND ARE CRITICAL FOR PROTEOLYSIS", 2002, vol 367, pages 31-40 , BIOCHEMICAL JOURNAL	1-24
	0; figures 1,2; table 1	
A	STÄNDKER L et al. " Partial IGF affinity of circulating N- and C-terminal fragments of human insulin-like growth factor binding protein-4", 2000, vol 39, pages 5082-5088, Biochemistry; page 5084, column 2, line 1 - line 8	1-24
A	MONGET P et al., "Pregnancy-associated plasma protein-A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles:identification of cleavage site and characterization of IGFBP-2 degradation", 2003, vol 68, pages 77-86, Biology of reproduction	1-24
A	GYRUP C et al., "Quantification of Proteolytically Active Pregnancy-Associated Plasma Protein-A with an Assay Based on Quenched Fluorescence", 2007, vol 53, pages 947-954, Clinical Chemistry; page 953, column 1, line 21 - line 32	1-24
A	WO 2005073727 A1 (QIN QIU-PING ET AL), 11 August 2005 (2005-08-11); whole document; claim 10	8, 13
A	US 6004775 A (SHIMASAKI SHUNICHI ET AL), 21 December 1999 (1999-12-21); whole document	1-24
	-----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/FI2010/050559
--

**Continuation of:** second sheet

**International Patent Classification (IPC)**

**C07K 16/18** (2006.01)

**G01N 33/573** (2006.01)

**Download your patent documents at [www.prv.se](http://www.prv.se)**

The cited patent documents can be downloaded:

- From "Cited documents" found under our online services at [www.prv.se](http://www.prv.se)  
(English version)
- From "Anförda dokument" found under "e-tjänster" at [www.prv.se](http://www.prv.se)  
(Swedish version)

Use the application number as username. The password is **YHGBBXHTCB**.

Paper copies can be ordered at a cost of 50 SEK per copy from PRV InterPat (telephone number 08-782 28 85).

Cited literature, if any, will be enclosed in paper form.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/FI2010/050559

WO	0054806 A1	21/09/2000	AT	361756 T	15/06/2007
			AU	2009200138 A1	12/02/2009
			AU	2005244559 A1	19/01/2006
			AU	3627800 A	04/10/2000
			AU	783035 B2	15/09/2005
			CA	2367360 A1	21/09/2000
			DE	60034779 D1	21/06/2007
			DK	1169058 T3	10/09/2007
			ES	2288470 T3	16/01/2008
			JP	2002538804 T	19/11/2002
WO	2005073727 A1	11/08/2005	AT	412181 T	15/11/2008
			CA	2549066 A1	11/08/2005
			CN	1934449 A	21/03/2007
			DE	602005010548 D1	04/12/2008
			EP	1709448 B1	22/10/2008
			ES	2314624 T3	16/03/2009
			JP	2007519913 T	19/07/2007
			US	20070111254 A1	17/05/2007
			US	6004775 A	21/12/1999

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/FI2010/050559
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 0054806 A1 (MAYO FOUNDATION ET AL), 21 September 2000 (2000-09-21); page 12, line 34 - page 13, line 3	1-2, 5-24
A	--	3-4
A	LAURSEN L S; ET AL, "SUBSTRATE SPECIFICITY OF THE METALLOPROTEINASE PREGNANCY-ASSOCIATED PLASMA PROTEIN-A (PAPP-A) ASSESSED BY MUTAGENESIS AND ANALYSIS OF SYNTHETIC PEPTIDES: SUBSTRATE RESIDUES DISTANT FROM THE SCISSILE BOND ARE CRITICAL FOR PROTEOLYSIS", 2002, vol 367, pages 31-40 , BIOCHEMICAL JOURNAL	1-24
	0; figures 1,2; table 1	
A	STÄNDKER L et al. " Partial IGF affinity of circulating N- and C-terminal fragments of human insulin-like growth factor binding protein-4", 2000, vol 39, pages 5082-5088, Biochemistry; page 5084, column 2, line 1 - line 8	1-24
A	MONGET P et al., "Pregnancy-associated plasma protein-A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles:identification of cleavage site and characterization of IGFBP-2 degradation", 2003, vol 68, pages 77-86, Biology of reproduction	1-24
A	GYRUP C et al., "Quantification of Proteolytically Active Pregnancy-Associated Plasma Protein-A with an Assay Based on Quenched Fluorescence", 2007, vol 53, pages 947-954, Clinical Chemistry; page 953, column 1, line 21 - line 32	1-24
A	WO 2005073727 A1 (QIN QIU-PING ET AL), 11 August 2005 (2005-08-11); whole document; claim 10	8, 13
A	US 6004775 A (SHIMASAKI SHUNICHI ET AL), 21 December 1999 (1999-12-21); whole document	1-24
	-----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/FI2010/050559
--

**Continuation of:** second sheet

**International Patent Classification (IPC)**

**C07K 16/18** (2006.01)

**G01N 33/573** (2006.01)

**Download your patent documents at [www.prv.se](http://www.prv.se)**

The cited patent documents can be downloaded:

- From "Cited documents" found under our online services at [www.prv.se](http://www.prv.se) (English version)
- From "Anförda dokument" found under "e-tjänster" at [www.prv.se](http://www.prv.se) (Swedish version)

Use the application number as username. The password is **YHGBBXHTCB**.

Paper copies can be ordered at a cost of 50 SEK per copy from PRV InterPat (telephone number 08-782 28 85).

Cited literature, if any, will be enclosed in paper form.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/FI2010/050559

WO	0054806 A1	21/09/2000	AT	361756 T	15/06/2007
			AU	2009200138 A1	12/02/2009
			AU	2005244559 A1	19/01/2006
			AU	3627800 A	04/10/2000
			AU	783035 B2	15/09/2005
			CA	2367360 A1	21/09/2000
			DE	60034779 D1	21/06/2007
			DK	1169058 T3	10/09/2007
			ES	2288470 T3	16/01/2008
			JP	2002538804 T	19/11/2002
WO	2005073727 A1	11/08/2005	AT	412181 T	15/11/2008
			CA	2549066 A1	11/08/2005
			CN	1934449 A	21/03/2007
			DE	602005010548 D1	04/12/2008
			EP	1709448 B1	22/10/2008
			ES	2314624 T3	16/03/2009
			JP	2007519913 T	19/07/2007
			US	20070111254 A1	17/05/2007
			US	6004775 A	21/12/1999

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/FI2010/050559
--

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
  - a. (means)
    - on paper
    - in electronic form
  - b. (time)
    - in the international application as filed
    - together with the international application in electronic form
    - subsequently to this Authority for the purposes of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, 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, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ポストニコフ, アレクサンダー ピー .

ロシア国、 1 1 7 1 9 2、モスクワ、モスフィルモヴスカヤ ストリート 7 4 - 5 4

(72)発明者 ソロヴィエワ, タチアナ アイ .

ロシア国、 1 4 3 4 3 0、ナハピノ、モスクワ州、クラスノゴルスキー地区、インスティツスカヤ  
ストリート 6 - 4 0

(72)発明者 カリトノフ, アレクセイ ヴィー .

ロシア国、 1 1 9 4 2 1、モスクワ、ノヴァトロフ ストリート 3 8 ( 3 ) - 3 0 4

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE12 DA13

4H045 AA11 DA76 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	检测IGFBP-4片段用于诊断方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012531396A</a>	公开(公告)日	2012-12-10
申请号	JP2012516812	申请日	2010-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	西特斯特有限公司		
申请(专利权)人(译)	Hyutesuto Aerutede.		
[标]发明人	カトウルーカアレクセイジー ポストニコフアレクサンダービー ソロヴィエワタチアナアイ カリトノフアレクセイヴィー		
发明人	カトウルーカ,アレクセイ ジー. ポストニコフ,アレクサンダー ビー. ソロヴィエワ,タチアナ アイ. カリトノフ,アレクセイ ヴィー.		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	G01N33/6893 C07K16/18 C07K2317/33 G01N33/57407 G01N33/57488 G01N2333/4745 G01N2333/475 G01N2800/32 G01N2800/324		
FI分类号	C07K16/18.ZNA G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	2009005733 2009-06-29 FI 61/221225 2009-06-29 US		
其他公开文献	JP5840605B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及通过检测患者样品中的IGFBP-4 (胰岛素样生长因子结合蛋白-4) 片段来诊断心血管疾病或癌症疾病的方法。还公开了特异性识别由IGFBP-4的酶依赖性切割产生的新表位的抗体。

