

(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2019-510210

(P2019-510210A)

(43) 公表日 平成31年4月11日(2019.4.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53	Z N A D 4 H O 4 5
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C O 7 K 7/06 (2006.01)	C O 7 K 7/06	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2018-540058 (P2018-540058)	(71) 出願人	508072822 ノルディック バイオサイエンス エイ/エス デンマーク国 ディケイ - 2730 ヘルレブ、ヘルレブ ホベドゲイド 207
(86) (22) 出願日	平成29年2月2日 (2017.2.2)	(74) 代理人	110000855 特許業務法人浅村特許事務所
(85) 翻訳文提出日	平成30年7月31日 (2018.7.31)	(72) 発明者	ジェノヴェーゼ、フェデリカ デンマーク国、フレゼレクスベア、ラドマ ンド スタインズ アレ 33、2 26
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/052271	(72) 発明者	ニールセン、メッテ、ジュール デンマーク国、コペンハーゲン エス、コ ーンブルームストヴェイ 3、エスティ ーヴィ
(87) 国際公開番号	W02017/134172		
(87) 国際公開日	平成29年8月10日 (2017.8.10)		
(31) 優先権主張番号	15/014, 241		
(32) 優先日	平成28年2月3日 (2016.2.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

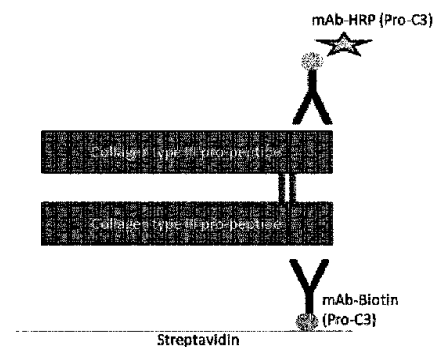
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 線維症の組み合わせたバイオマーカー測定

(57) 【要約】

本明細書では、インタクトな I I I 型プロコラーゲンの N - プロテアーゼ開裂によって作られる P I I I N P の C 末端のネオエピトープをそれぞれ含む鎖間架橋によって一緒に接続した P I I I N P の少なくとも2つの鎖を有する架橋 P I I I N P を検出するためのサンドイッチ免疫アッセイが提供される。架橋 P I I I N P を含む生体サンプルを、第 1 の表面結合したモノクローナル抗体と接触させ、次いで、第 2 のモノクローナル抗体と接触させ、両方とも P I I I N P の C 末端のネオエピトープと特異的に反応し、次いで、第 2 のモノクローナル抗体の結合を決定する。また、免疫アッセイを介してリシルオキシダーゼを標的とするアンタゴニスト薬の効果を評価する方法、および第 1 のモノクローナル抗体に結合する固体支持体を含み、第 2 のモノクローナル抗体を含有するキットも提供される。

Figure 7.



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

生体サンプルにおいて架橋 P I I I N P を検出するためのサンドイッチイムノアッセイであって、前記架橋 P I I I N P が、鎖間架橋によって一緒に接続した P I I I N P の少なくとも 2 つの鎖を含み、この方法が、

前記架橋 P I I I N P を含む前記生体サンプルと、ある表面に結合した第 1 のモノクローナル抗体とを接触させることであって、架橋 P I I I N P に含まれるそれぞれの P I I I N P 鎖が、インタクトな I I I 型プロコラーゲンの N - プロテアーゼ開裂によって生成する P I I I N P の C 末端ネオエピトープを有する、接触させることと、

第 2 のモノクローナル抗体を加えることと、

前記第 2 のモノクローナル抗体の結合量を決定することとを含み、

前記第 1 のモノクローナル抗体および前記第 2 のモノクローナル抗体は、両方とも、P I I I N P の前記 C 末端ネオエピトープに特異的に反応し、前記ネオエピトープは、C 末端アミノ酸配列 C P T G X Q N Y S P - C O O H を含み、X は G l y または P r o である、サンドイッチイムノアッセイ。

10

## 【請求項 2】

前記モノクローナル抗体が、C P T G X Q N Y S P Q Z - C O O H である前記 C 末端アミノ配列の伸長形態を実質的に認識しないか、または実質的に結合せず、ここで、Z は、存在しないか、または I I I 型コラーゲンの配列の 1 つ以上のアミノ酸である、請求項 1 に記載のサンドイッチイムノアッセイ。

20

## 【請求項 3】

前記サンドイッチイムノアッセイを使用し、前記生体サンプル中の架橋 P I I I N P の量を定量する、請求項 1 または 2 に記載のサンドイッチイムノアッセイ。

## 【請求項 4】

前記方法によって決定された架橋 P I I I N P の量と、既知の疾患重篤度の標準的な線維性疾患サンプルとを関連づけて線維性疾患の重篤度を評価することをさらに含む、請求項 3 に記載のサンドイッチイムノアッセイ。

## 【請求項 5】

前記線維性疾患が肝疾患である、請求項 4 に記載のサンドイッチイムノアッセイ。

## 【請求項 6】

前記生体サンプルが、生体液である、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項に記載のサンドイッチイムノアッセイ。

30

## 【請求項 7】

前記生体液が、血清、血漿、尿、羊水、組織上清または細胞上清である、請求項 6 に記載のサンドイッチイムノアッセイ。

## 【請求項 8】

前記サンドイッチイムノアッセイが、ラジオイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイまたは酵素結合免疫吸着法である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のサンドイッチイムノアッセイ。

## 【請求項 9】

前記第 2 のモノクローナル抗体が、標識されている、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のサンドイッチイムノアッセイ。

40

## 【請求項 10】

前記第 2 のモノクローナル抗体が、酵素結合抗体である、請求項 9 に記載のサンドイッチイムノアッセイ。

## 【請求項 11】

前記酵素が、西洋ワサビペルオキシダーゼ ( H R P ) である、請求項 10 に記載のサンドイッチイムノアッセイ。

## 【請求項 12】

前記第 2 のモノクローナル抗体が、放射性標識されているか、またはフルオロフォアに

50

結合している、請求項 9 に記載のサンドイッチイムノアッセイ。

【請求項 13】

前記第 2 のモノクローナルを認識するさらに標識された抗体を使用し、前記第 2 のモノクローナル抗体の結合量を決定する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のサンドイッチイムノアッセイ。

【請求項 14】

リシルオキシダーゼ (LOX) を標的とするアンタゴニスト薬の効果を評価するための方法であって、請求項 1 に記載のサンドイッチイムノアッセイを用い、少なくとも 2 つの生体サンプル中の架橋 P I I I N P の量を定量することを含み、前記生体サンプルが、対象に対してアンタゴニスト薬を投与する期間中、第 1 の時間点と少なくとも 1 つのその後の時間点で対象から得られたものであり、アンタゴニスト薬を投与する期間中、第 1 の時間点から少なくとも 1 つのその後の時間点までに架橋 P I I I N P の量が減少することは、LOX を標的とする有効なアンタゴニスト薬の指標である、方法。

10

【請求項 15】

前記方法が、LOXL2 を標的とするアンタゴニスト薬の効果を評価する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

サンドイッチアッセイで使用するためのキットであって、  
請求項 1 に記載の第 1 のモノクローナル抗体に結合する固体支持体と、  
請求項 1 に記載の第 2 のモノクローナル抗体とを含み、前記第 2 のモノクローナル抗体が標識を含む、キット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体サンプルにおいて架橋 P I I I N P を検出するためのサンドイッチイムノアッセイ、およびリシルオキシダーゼ (LOX) を標的とする薬剤の効果を評価する際のその使用に関する。本発明は、サンドイッチイムノアッセイを実施するためのキットにも関する。

【背景技術】

【0002】

線維性疾患 (表 1 に列挙されているものを含む) は、例えば硬変の罹患率および死亡率の主因であり、世界中で 1 年に 80 万人が死亡している (1)。

30

【0003】

## 【表 1】

表 1. 様々な線維性疾患 (2)

組織	原因の例
肝臓	ウイルス性肝炎 住血吸虫症 脂肪性肝炎 (アルコール性または非アルコール性)
肺	特発性肺線維症 (IPF) 全身性強皮症 (強皮症)
腎臓	腎性全身性線維症 (NSF) 糖尿病 未治療の高血圧
心臓	心臓発作 高血圧 アテローム性動脈硬化症 再狭窄
眼	黄斑変性、網膜および硝子体の網膜症
皮膚	全身性強皮症および強皮症、ケロイド、肥厚性癬痕、熱傷、 遺伝的要因 NF S
膵臓	自己免疫/遺伝的原因
腸	クローン病/炎症性腸疾患
脳	アルツハイマー病、AIDS
骨髄	癌、老化
多臓器線維症	外科的合併症、化学療法薬誘発線維症、放射線誘発線維症、 機械的傷害

10

20

## 【0004】

「線維性疾患」は、主症状または副症状のいずれかとして、線維症を引き起こす任意の疾患である。線維症は、持続的な感染、自己免疫反応、アレルギー反応、化学物質による傷害、放射線、および組織損傷を含む様々な刺激によって誘発される慢性炎症反応の最終的な結果である。線維症は、細胞外マトリックス (ECM) の蓄積および再編成によって特徴付けられる。明らかな病因の差異および臨床的な差異を有するにもかかわらず、ほとんどの慢性線維性障害には、成長因子、タンパク質分解酵素、血管新生因子および線維形成性サイトカインの産生を維持する共通の永続的な刺激物があり、これらが合わさって結合組織要素 (特にコラーゲンおよびプロテオグリカン) の蓄積を刺激し、正常な組織構造を次第にリモデリングし、破壊してしまう (3、4)。ヒトの健康に大きな影響を与えているにもかかわらず、現時点で、線維症の機構を直接的に標的とする承認された治療法は存在しない (5)。

30

40

細胞外マトリックス (ECM)

## 【0005】

ECMは、タンパク質の凝集体を形成する能力を有する超分子構造であり、これにより、三次元網目構造で細胞を連結する動的な足場を形成する。この足場は、プロテアーゼのアップレギュレーションおよびダウンレギュレーションによって、細胞-マトリックスの相互作用と、細胞の運命を制御する (6)。ECMは、種々の量および組み合わせでのコラーゲン、ラミニン、プロテオグリカンおよび他の糖タンパク質からなり、それによって個々の組織の必要性を満たす特定の機能を有する足場を生成するためにプロテアーゼによって改変することができる種々の生体構成要素を与える (7)。

## 【0006】

50

I型およびIII型のコラーゲンは、人体における主要な構造タンパク質である。III型コラーゲンは、心血管系および他の器官におけるI型コラーゲンの原線維形成に必須である(8、9)。原線維集合の間、III型プロコラーゲンのN末端プロペプチド(3個の同一の鎖からなり、全分子量が42kDa)が、ECMの成熟コラーゲンに組み込まれる前に、特異的なN-プロテアーゼによって開裂する。開裂したプロペプチドは、ECM中に保持されてもよく、または循環系へと放出されてもよい。しかし、プロペプチドの開裂は、不完全なときがあり、プロペプチドが分子に結合させたまま残ることがある。これにより、異常な架橋を有する細いフィブリルが生成し、その結果、異常な分子は迅速な代謝ターンオーバーを起こしやすくなる(10、11)。したがって、適切なサンプル中のIII型コラーゲンのN末端プロペプチド(PIIINP)のレベルは、III型コラーゲンの形成および/または分解のマーカーであり得る。

10

#### 【0007】

ECMの改変された構成要素および非コード改変が、組織の剛直性と、インタクトなECMおよびそのフラグメントのシグナル電位の変化を引き起こすため、ECMのリモデリングは、種々の疾患の病因において、重要な役割を果たす。ECMのリモデリングは、組織の機能および修復にとって重要な前提条件であり、ECMの合成および分解を担う酵素によって厳密に制御されている。

#### 【0008】

線維性疾患などの病的な事象の間、ECMの形成と分解のバランスが乱れ、ECMの組成が変化する。このような変化は、組織機能の変化を引き起こす(12、13)。PIIINPを、いくつかの線維性疾患のバイオマーカーとして使用可能であることが示唆されている(例えば、肺傷害(14)、ウイルス性および非ウイルス性の肝炎(15)、全身性強皮症(16)、血管リモデリング(17)および腎疾患(18))。

20

#### 【0009】

骨格筋組織におけるECMリモデリングには、あまり注目されていなかった。ラットモデルでは、運動後の大腿四頭筋および前脛骨筋において、増加したコラーゲン遺伝子発現および生合成が実証されている(19、20)。さらに、運動後の臨床試験において、PIIINPの血清レベルの上昇が実証されている(21)。したがって、骨格筋タンパク質のリモデリングは、循環中のPIIINPの量を増加させ、初期の筋肉同化を検出するためのバイオマーカーとして役立つ。PIIINPの血清レベルは、テストステロン(22)、組換えヒト成長ホルモン(23)またはそれらの組み合わせ(24、25)に対する筋肉組織応答のバイオマーカーとして以前から示唆されている。

30

#### 【0010】

肝線維症では、I型およびIII型の線維状コラーゲンが高度にアップレギュレーションされている(26、27)。III型コラーゲンは、線維症の初期で支配的であり、一方、I型コラーゲンのアップレギュレーションは、線維症の後期に関係がある。肝臓で起こる線維症によって、コラーゲンの沈着およびプロペプチド(主にPIIINP)の放出が起こる。結果として、PIIINPは、線維形成について最もよく研究されたマーカーの1つである(28、29、30)。何年にもわたり、PIIINPの定量化のために、いくつかのラジオイムノアッセイが開発されており、硬変の検出について、感度が94%まで、特異性が81%まで達している(31、32)。しかし、従来のアッセイはいずれもネオエピトープ特異性ではない。さらに、PIIINPを定量するための現在市販されているアッセイは、プロコラーゲンまたはプロペプチドの内部配列を標的とするポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を利用し、III型コラーゲンの形成および/または分解を特異的に区別するものではない(31、32)。

40

#### 【0011】

したがって、III型コラーゲンの形成と分解を区別するために、本願発明者らは、形成過程でのみ産生されるネオエピトープフラグメント(すなわち、III型コラーゲンの形成において産生されるが、III型コラーゲンの分解において産生されないフラグメント)を決定し、検出することが必要であると考えている。

50

## 【0012】

国際公開第2014/170312号は、C末端アミノ酸配列CPTGXQNYSP - COOH（配列番号4）の末端アミノ酸に含まれるC末端PIIINPネオエピトープに特異的なモノクローナル抗体を開示し、ここで、Xは、GlyまたはProであってもよい。

## 【0013】

Brocks（31）は、改変されたウシC末端PIIINP配列IC\*QSCPTGGENYSP - COOH（配列番号1）（C\* = アセトアミド保護されたCys；GlnがGluで置き換えられている（E））を対象とするポリクローナル抗体を開示しているが、この抗体は、ウシPIIINPのC末端配列ICQSCPTGGQNYSP - COOH（配列番号2）の末端アミノ酸に対して非特異的であり、さらに、この抗体は、ヒトPIIINPを認識しない。

10

## 【0014】

Bayer（33）は、配列H<sub>2</sub>N - GSPGPPGICQSCPTGPQNYSP - COOH（配列番号3）に向けられた検出モノクローナル抗体を利用するサンドイッチELISAを開示しているが、結合エピトープは定義されていない。

## 【0015】

本出願人は、国際公開第2014/170312号に開示されるPIIINPのC末端ネオエピトープに向けられたネオエピトープに特異的な抗体を利用する特異的サンドイッチイムノアッセイが、リシルオキシダーゼ（LOX）を標的とする薬物、特に、LOXアンタゴニスト薬の効果を評価するのに有用であり得ることを発見した。LOXによる酵素的コラーゲン架橋およびプロコラーゲンの処理は、組織の成熟および安定性にとって重要である。臓器線維症の患者では、コラーゲンは高度に架橋されるようになるため、線維症の解消が起こりにくい。LOXL2は、特殊なLOXであり、線維性組織における病態生理学的なコラーゲン架橋の主要因であり、新規なLOXL2アンタゴニストは、現在臨床試験中である。したがって、LOXアンタゴニストなどのLOXを標的とする薬物の効果を評価するために使用可能なアッセイは、明らかに製薬産業にとって有用なツールである。

20

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

30

## 【0016】

【特許文献1】国際公開第2014/170312号

## 【非特許文献】

## 【0017】

【非特許文献1】World Health Organization. Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Reducing Risks, Promoting Healthy Life, Geneva: WHO, 2002: 1 - 230。

【非特許文献2】Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. J Pathol 2008; 214: 199 - 210。

40

【非特許文献3】Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and the therapeutic implications. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2004; 1: 98 - 105。

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

50

- 【非特許文献5】Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007; 117: 524 - 529.
- 【非特許文献6】Bosman, F. T. および Stamenkovic, I. 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol.* 200: 423 - 428.
- 【非特許文献7】Bruckner, P. 2010. Suprastructures of extracellular matrices: paradigms of functions controlled by aggregates rather than molecules. *Cell Tissue Res.* 339: 7 - 18.
- 【非特許文献8】Bao X, Zeng Y, Wei S, Wang G, Liu C, Sun Y, Chen Q および Li H. Developmental changes of Col3a1 mRNA expression in muscle and their association with intramuscular collagen in pigs. *J Genet Genomics* 2007; 34(3): 223 - 228.
- 【非特許文献9】Jensen LT and Host NB. Collagen: scaffold for repair or execution. *Cardiovasc Res* 1997; 33(3): 535 - 539.
- 【非特許文献10】Niemiela O, Risteli L, Parkkinen J および Risteli J. Purification and characterization of the N-terminal propeptide of human type III procollagen. *Biochem J* 1985; 232(1): 145 - 150.
- 【非特許文献11】Wang WM, Ge G, Lim NH, Nagase H および Greenspan DS. TIMP-3 inhibits the procollagen N-proteinase ADAMTS-2. *Biochem J* 2006; 398(3): 515 - 519.
- 【非特許文献12】Van den Steen PE, Opdenakker G, Wormald MR, Dwek RA および Rudd PM. Matrix remodeling enzymes, the protease cascade and glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1528(2-3): 61 - 73.
- 【非特許文献13】Cuzner ML および Opdenakker G. Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 1999; 94(1-2): 1 - 14.
- 【非特許文献14】Meduri GU, Tolley EA, Chinn A, Stentz F および Postlethwaite A. Procollagen type I and III aminoterminal propeptide levels during acute respiratory distress syndrome and in response to methylprednisolone treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(5 Pt 1): 1432 - 1441.
- 【非特許文献15】Teare JP, Sherman D, Greenfield S

- M, Simpson J, Bray G, Catterall AP, Murray-Lyon IM, Peters TJ, Williams RおよびThompson RP. Comparison of serum procollagen III peptide concentrations and PGA index for assessment of hepatic fibrosis. *Lancet* 1993; 342(8876): 895-898.
- 【非特許文献16】Schejda A, Akesson AおよびHorslev-Petersen K. Serum levels of aminoterminal type III procollagen peptide and hyaluronan predict mortality in systemic sclerosis. *Scand J Rheumatol* 1992; 21(1): 5-9. 10
- 【非特許文献17】Lin YH, Ho YL, Wang TD, Liu CP, Kao HL, Chao CL, Chien KL, Hung CS, Wu VC, Tsai IJ, Yen RF, Shiau YCおよびChen WJ. The relation of amino-terminal propeptide of type III procollagen and severity of coronary artery disease in patients without myocardial infarction or hibernation. *Clin Biochem* 2006; 39(9): 861-866.
- 【非特許文献18】Teppo AM, Tornroth T, Honkanen EおよびGronhagen-Riska C. Urinary amino-terminal propeptide of type III procollagen (PIIINP) as a marker of interstitial fibrosis in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; 75(12): 2113-2119. 20
- 【非特許文献19】Han XY, Wang W, Komulainen J, Koskinen SO, Kovanen V, Vihko V, Trackman PCおよびTakala TE. Increased mRNAs for procollagens and key regulating enzymes in rat skeletal muscle following downhill running. *Pflugers Arch* 1999; 437(6): 857-864. 30
- 【非特許文献20】Koskinen SO, Ahtikoski AM, Komulainen J, Hesselink MK, Drost MRおよびTakala TE. Short-term effects of forced eccentric contractions on collagen synthesis and degradation in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch* 2002; 444(1-2): 59-72.
- 【非特許文献21】Cramer RM, Langberg H, Teisner B, Magnusson P, Schroder HD, Olesen JL, Jensen CH, Koskinen S, Suetta CおよびKjaer M. Enhanced procollagen processing in skeletal muscle after a single bout of eccentric loading in humans. *Matrix Biol* 2004; 23(4): 259-264. 40
- 【非特許文献22】Chen F, Lam R, Shaywitz D, Hendrickson RC, Opitck GJ, Wishengrad D, Liaw A, Song Q, Stewart AJ, Cummings CE, Beals C, Yarasheski KE, Reicin A, Ruddy M, Hu X, Yates NA, Menetski JおよびHerman GA. Evaluation of early biomarkers of muscle anabolic respo 50

nse to testosterone. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2011; 2(1): 45 - 56。

【非特許文献23】Longobardi S, Keay N, Ehrnborg C, Cittadini A, Rosen T, Dall R, Boroujerdi MA, Bassett EE, Healy ML, Pentecost C, Wallace JD, Powrie J, Jorgensen JOおよびSacca L. Growth hormone (GH) effects on bone and collagen turnover in healthy adults and its potential as a marker of GH abuse in sports: a double blind, placebo-controlled study. *The GH-2000 Study Group. J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(4): 1505 - 1512。 10

【非特許文献24】Bhasin S, He EJ, Kawakubo M, Schroeder ET, Yarasheski K, Opiteck GJ, Reicin A, Chen F, Lam R, Tsou JA, Castaneda-Sceppa C, Binder EF, Azen SPおよびSattler FR. N-terminal propeptide of type III procollagen as a biomarker of anabolic response to recombinant human GH and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(11): 4224 - 4233 20

【非特許文献25】Nelson AE, Meinhardt U, Hansen JL, Walker IH, Stone G, Howe CJ, Leung KC, Seibel MJ, Baxter RC, Handelsman DJ, Kazlauskas RおよびHo KK. Pharmacodynamics of growth hormone abuse biomarkers and the influence of gender and testosterone: a randomized double-blind placebo-controlled study in young recreational athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(6): 2213 - 2222。 30

【非特許文献26】Zachariae H, Heickendorff LおよびSogaard H. The value of amino-terminal propeptide of type III procollagen in routine screening for methotrexate-induced liver fibrosis: a 10-year follow-up. *Br J Dermatol* 2001; 144(1): 100 - 103。

【非特許文献27】Gressner AMおよびWeiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10(1): 76 - 99。 40

【非特許文献28】Jarcuska P, Janicko M, Veseliny E, Jarcuska PおよびSkladany L. Circulating markers of liver fibrosis progression. *Clin Chim Acta* 2010; 411(15-16): 1009 - 1017。

【非特許文献29】Frei A, Zimmermann AおよびWeigand K. The N-terminal propeptide of collagen type III in serum reflects activity and degree of fibrosis in patients with chronic liver disease. *Hepatology* 1984; 4(5): 83 50

0 - 834。

【非特許文献30】Fabris P, Marranconi F, Bozzola L, Biasin MR, De Lazzari F, Plebani M, Benedetti P, Tositti G, Pellizzer G, Stecca Cおよびde LF. Fibrogenesis serum markers in patients with chronic hepatitis C treated with alpha-IFN. *J Gastroenterol* 1999; 34(3): 345-350。

【非特許文献31】Brocks DG, Steinert C, Gerl M, Knolle J, Neubauer HPおよびGunzler V. A radioimmunoassay for the N-terminal propeptide of rat procollagen type III. Application to the study of the uptake of the N-terminal propeptide of procollagen type III in isolated perfused rat liver. *Matrix* 1993; 13(5): 381-387。

【非特許文献32】Rohde H, Vargas L, Hahn E, Kalbfleisch H, Bruguera MおよびTimpl R. Radioimmunoassay for type III procollagen peptide and its application to human liver disease. *Eur J Clin Invest* 1979; 9(6): 451-459。

【非特許文献33】Bayer Aktiengesellschaft. (1999) Monoclonal antibody and assay for detecting PIIINP. 特許協力条約出願WO99/61477号。

【発明の概要】

【0018】

本発明は、生体サンプルにおいて架橋PIIINPを検出するためのサンドイッチイムノアッセイに関し、ここで、架橋PIIINPは、鎖間架橋によって一緒に接続したPIIINPの少なくとも2つの鎖を含む。この方法は、架橋PIIINPを含む生体サンプルと、ある表面に結合した第1のモノクローナル抗体とを接触させることであって、架橋PIIINPに含まれるそれぞれのPIIINP鎖が、インタクトなIII型プロコラーゲンのN-プロテアーゼ開裂によって生成するPIIINPのC末端ネオエピトープを有する、接触させることと、第2のモノクローナル抗体を加えることとを含む。両モノクローナル抗体は、PIIINPのC末端ネオエピトープと特異的に反応し、前記ネオエピトープは、C末端配列CPTGXQNYSP-COOHを含み、XはGlyまたはProである。この方法は、第2のモノクローナル抗体の結合量を決定することをさらに含む。

【0019】

本発明は、リシルオキシダーゼ(LOX)を標的とするアンタゴニスト薬の効果を評価するための方法にも関する。この方法は、本明細書に記載のサンドイッチイムノアッセイを用い、対象に対してアンタゴニスト薬を投与する期間中、第1の時間点と少なくとも1つのその後の時間点で対象から得られた少なくとも2つの生体サンプル中の架橋PIIINPの量を定量することを含む。アンタゴニスト薬を投与する期間中、第1の時間点から少なくとも1つのその後の時間点までに架橋PIIINPの量が減少することは、LOXを標的とする有効なアンタゴニスト薬の指標である。

【0020】

本発明は、さらに、本明細書に記載のサンドイッチイムノアッセイに使用するためのキットにも関する。キットは、上述の第1のモノクローナル抗体に結合する固体支持体と、本明細書に記載の標識された第2のモノクローナル抗体とを含む。

【図面の簡単な説明】

【0021】

10

20

30

40

50

【図1】ヒト種の標的とされる P I I I N P 1 鎖配列 (配列番号 14) およびラット種の標的とされる P I I I N P 1 鎖配列 (配列番号 15) のアラインメント (四角によって強調される)。I I I 型コラーゲンの N 末端プロペプチドの 1 鎖内の対応するヒト配列の位置 (直線) およびラット配列の位置 (波線)。アラインメントは、N L P C L U S T A L W ソフトウェアを用いて行われた。

【図2】モノクローナル抗体 N B 6 1 N 6 2 (レーン 1 および 3) および N B 6 1 N 6 2 + 選択ペプチド (レーン 2 + 4) によって認識される (a) ラットおよび (b) ヒトに由来する羊水中の I I I 型コラーゲンの N 末端プロペプチド型コラーゲンの N 末端プロペプチドの特異的なバンドを示すウェスタンブロット。ラットでは、52 ~ 60 k D A 付近の 2 つのバンドが観察されたが、ヒトでは 1 つのバンドが観察された。選択ペプチドを添加すると、ラットおよびヒトの両方についてバンド強度が弱くなった。

【図3A】ヒト、げっ歯類およびマウスの材料に対する典型的な検量線および天然の反応性を示す、P R O - C 3 E L I S A の試行。健康なヒト血清、血漿および羊水 (A F) を用いた、競合 P R O - C 3 E L I S A の検量線および阻害。検量線は、76.31 ng / mL から 2 倍に希釈され、一方、天然物質は、( - - ) で示されているように、1 : 2 から 1 : 16 まで希釈された。

【図3B】ヒト、げっ歯類およびマウスの材料に対する典型的な検量線および天然の反応性を示す、P R O - C 3 E L I S A の試行。健康なラット血清、血漿および A F を用いた、競合 P R O - C 3 E L I S A の較正曲線および阻害。検量線は、200 ng / mL から 2 倍に希釈され、一方、天然物質は、( - - ) で示されているように、未希釈から 1 : 8 まで実施された。

【図3C】ヒト、げっ歯類およびマウスの材料に対する典型的な検量線および天然の反応性を示す、P R O - C 3 E L I S A の試行。健康なマウス血清および血漿を用いた、競合 P R O - C 3 E L I S A の検量線および阻害。検量線は、200 ng / mL から 2 倍に希釈され、一方、天然物質は、( - - ) で示されているように、未希釈から 1 : 4 まで実施された。

【図3D】ヒト、げっ歯類およびマウスの材料に対する典型的な検量線および天然の反応性を示す、P R O - C 3 E L I S A の試行。伸長されたペプチド (すなわち、C 末端の 1 つのさらなるアミノ酸を用いた較正ペプチドのペプチド配列) を用いた、P I I I N P ネオエピトープ特異性抗体のネオエピトープ特異性。検量線、伸長されたペプチドおよびナンセンスペプチドを 76.31 ng / mL から 2 倍に希釈した。シグナルは、ペプチド濃度の関数として 650 nm でのバックグラウンドを差し引いた 450 nm での光学密度として見られる。

【図4】肺線維芽細胞のインビトロモデルの結果 (「s c a r - i n - a - j a r」)。

【図5】ケロイドからの抽出と、正常皮膚からの抽出における P r o - C 3 X レベルの比較。

【図6A】肝線維症を有する患者の試験結果。

【図6B】肝線維症を有する患者の試験結果。

【図7】P r o - C 3 X アッセイの図的記述。

【図8】アルコール性脂肪性肝炎患者の試験結果。

【図9】S c a r - i n - a - J a r モデルから 10 日目に採取した上清中の P r o - C 3 X レベル。有意性は、それぞれの条件を T G F - 単独と比較したダネットの多重比較試験を用い、o n e - w a y A N O V A によって評価した。データは、S D を伴う平均として示す。\* \* \* \* p < 0.0001。B A P N、 - アミノプロピオニトリル; T G F - 、トランスフォーミング増殖因子。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本明細書中で使用される場合、「ネオエピトープ」という用語は、ポリペプチドの端 (すなわち、ポリペプチドの N 末端または C 末端) にある N 末端または C 末端のペプチド配列を指し、その一般的な方向を意味するものと解釈されるべきではない。

10

20

30

40

50

## 【0023】

本明細書で使用される場合、「競合ELISA」という用語は用語は、競合酵素結合免疫吸着法を指し、当業者に公知の技術である。

## 【0024】

本明細書で使用される場合、「サンドイッチ免疫アッセイ」という用語は、サンプル中の抗原を検出するために少なくとも2つの抗体を使用することを指し、当業者に公知の技術である。

## 【0025】

本明細書で使用される場合、モノクローナル抗体NB61N-62という用語は、PIIINPのC末端ネオエピトープに対する、ネオエピトープに特異的な抗体を指し、このネオエピトープは、C末端配列CPTGXQNYSP-COOH（配列番号4）を含み、Xは、GlyまたはProである。

10

## 【0026】

本明細書で使用される場合、「PRO-C3」という用語は、本明細書に記載されるPIIINPアッセイを、PIIINPに由来するネオエピトープの特異的な結合に基づかない当該技術分野で公知のPIIINPアッセイと区別するために使用される。

## 【0027】

本明細書で使用される場合、「PRO-C3X」アッセイという用語は、架橋PIIINPを検出し、定量するための本明細書に記載のサンドイッチ免疫アッセイを指す。

## 【0028】

本発明の方法における使用に適したモノクローナル抗体は、国際公開第2014/170312号に開示されており、PIIINPのC末端ネオエピトープと特異的に反応し、このネオエピトープは、C末端アミノ酸配列CPTGXQNYSP-COOH（配列番号4）を含み、Xは、GlyまたはProであり、このモノクローナル抗体は、CPTGXQNYSPQZ-COOH（配列番号5）である前記C末端アミノ配列の伸長形態を実質的に認識しないか、または実質的に結合せず、ここで、Zは、存在しないか、またはIII型コラーゲンの配列の1つ以上のアミノ酸である。

20

## 【0029】

好ましくは、このモノクローナル抗体は、ヒトPIIINPにおけるネオエピトープのC末端配列CPTGPQNYSP-COOH（配列番号6）に特異的に反応し、この配列は、ヒトPIIINPのアミノ酸P153-Q154間のPro-Gln結合にあるインタクトなIII型プロコラーゲンからのPIIINPのN-プロテアーゼ開裂によって作られる。

30

## 【0030】

または、このモノクローナル抗体は、げっ歯類PIIINPにおけるネオエピトープのC末端配列CPTGGQNYSP-COOH（配列番号7）に特異的に反応してもよく、このネオエピトープは、げっ歯類PIIINPのアミノ酸P154-Q155間のPro-Gln結合にあるインタクトなIII型プロコラーゲンからのPIIINPのN-プロテアーゼ開裂によって作られる。

## 【0031】

好ましくは、アミノ酸配列CPTGXQNYSP-COOH（配列番号4）に対するモノクローナル抗体のアフィニティと、伸長されたアミノ酸配列CPTGXQNYSPQZ-COOH（配列番号5）に対する同じモノクローナル抗体のアフィニティの比率は、少なくとも10対1、好ましくは少なくとも100対1、より好ましくは少なくとも1,000対1、より好ましくは少なくとも10,000対1、より好ましくは少なくとも100,000対1、最も好ましくは少なくとも1,000,000対1である。

40

## 【0032】

好ましくは、モノクローナル抗体は、PIIINPのC末端ネオエピトープを認識しないか、またはこれに結合せず、この短くなったネオエピトープは、アミノ酸配列CPTGXQNYSP（配列番号8）を有する。

50

## 【0033】

好ましくは、アミノ酸配列CPTGXQNYSP - COOH（配列番号4）に対するモノクローナル抗体のアフィニティと、短くなったアミノ酸配列CPTGXQNY S（配列番号8）に対する同じモノクローナル抗体のアフィニティの比率は、少なくとも10対1、好ましくは少なくとも100対1、より好ましくは少なくとも1,000対1、より好ましくは少なくとも10,000対1、より好ましくは少なくとも100,000対1、最も好ましくは少なくとも1,000,000対1である。

## 【0034】

本発明は、生体サンプルにおいて架橋PIIINPを検出するためのサンドイッチイムノアッセイであって、前記架橋PIIINPが、鎖間架橋によって一緒に接続したPIIINPの少なくとも2つの鎖を含み、この方法が、

前記架橋PIIINPを含む前記生体サンプルと、ある表面に結合した第1のモノクローナル抗体とを接触させることであって、架橋PIIINPに含まれるそれぞれのPIIINP鎖が、インタクトなIII型プロコラーゲンのN-プロテアーゼ開裂によって生成するPIIINPのC末端ネオエピトープを有する、接触させることと、

第2のモノクローナル抗体を加えることと、

前記第2のモノクローナル抗体の結合量を決定することとを含み、

前記第1のモノクローナル抗体および前記第2のモノクローナル抗体は、両方とも、PIIINPの前記C末端ネオエピトープに特異的に反応し、前記ネオエピトープは、C末端アミノ酸配列CPTGXQNYSP - COOHを含み、XはGlyまたはProである、サンドイッチイムノアッセイに関する。

## 【0035】

好ましくは、モノクローナル抗体は、CPTGXQNYSPQZ - COOHである前記C末端アミノ配列の伸長形態を実質的に認識しないか、または実質的に結合せず、ここで、Zは、存在しないか、またはIII型コラーゲンの配列の1つ以上のアミノ酸である。

## 【0036】

本明細書に記載のサンドイッチイムノアッセイは、捕捉抗体および検出抗体といった両抗体と同じ抗体を使用するため、二本鎖ペプチド（すなわち、架橋したものを）、このアッセイによって認識することができる。

## 【0037】

好ましくは、サンドイッチイムノアッセイを用い、生体液中の架橋PIIINPの量を定量し、前記生体液は、限定されないが、血清、血漿、尿、羊水、組織上清または細胞上清であってもよい。

## 【0038】

サンドイッチイムノアッセイは、限定されないが、ラジオイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイまたは酵素結合免疫吸着法であってもよい。

## 【0039】

好ましい実施形態では、第2のモノクローナル抗体の結合量を決定するために、第2のモノクローナル抗体が標識されてもよい。

## 【0040】

好ましくは、第2のモノクローナル抗体は、酵素結合抗体であってもよい。酵素は、限定されないが、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）であってもよい。

## 【0041】

好ましくは、第2のモノクローナル抗体は、放射性標識されていてもよく、フルオロフォアに結合していてもよい。

## 【0042】

これらは、本発明と共に使用される好ましい標識であるが、限定されないが、DNAレポーターまたは電気化学発光タグなどの任意の適切な標識システムを使用してもよいことが想定される。

## 【0043】

10

20

30

40

50

または、第2のモノクローナルを認識するさらに標識された抗体を使用し、第2のモノクローナル抗体の結合量を決定してもよい。さらに標識された抗体は、上述のような標識を用いて標識されてもよい。

【0044】

本発明の好ましい実施形態では、サンドイッチイムノアッセイは、前記方法によって決定された架橋PIIINPの量と、線維性疾患の重篤度を評価するための既知の疾患重篤度の標準的な線維性疾患サンプルとを関連づけることをさらに含んでいてもよい。このような線維性疾患は、限定されないが、肝疾患であってもよい。

【0045】

さらなる態様では、本明細書に記載のサンドイッチイムノアッセイを、リシルオキシダーゼ(LOX)を標的とする薬剤(例えば、LOXを標的とするアンタゴニスト薬)の効能を評価するための方法に使用してもよい。

【0046】

したがって、本発明は、リシルオキシダーゼ(LOX)を標的とするアンタゴニスト薬の効能を評価するための方法であって、この方法が、本明細書に記載のサンドイッチイムノアッセイを用い、少なくとも2つの生体サンプル中の架橋PIIINPの量を定量することを含み、前記生体サンプルが、対象に対してアンタゴニスト薬を投与する期間中、第1の時間点と少なくとも1つのその後の時間点で対象から得られたものであり、アンタゴニスト薬を投与する期間中、第1の時間点から少なくとも1つのその後の時間点までに架橋PIIINPの量が減少することは、LOXを標的とする有効なアンタゴニスト薬の指標である、方法にも関する。

【0047】

好ましくは、この方法は、アンタゴニスト薬の有効性を定量する。

【0048】

好ましくは、この方法は、LOXL2を標的とするアンタゴニスト薬の効能を評価する。

【0049】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のサンドイッチイムノアッセイに使用するためのキットであって、このキットが、上述の第1のモノクローナル抗体に結合する固体支持体と、上述の標識された第2のモノクローナル抗体とを含む、キットに関する。

【実施例】

【0050】

材料と一般的な考慮事項

実験で使用した全ての試薬は、Merck(ホワイトハウスステーション、NJ、USA)製およびSigma Aldrich(セントルイス、MO、USA)製の高級化学品であった。モノクローナル抗体製造およびバリデーションに使用される合成ペプチドは、(1)免疫原性ペプチド:オボアルブミン(OVA)-CGG-CPTGPQNYSP(配列番号10)、(2)スクリーニングペプチド:ピオチン-CGG-CPTGPQNYSP(配列番号11)および(3)選択ペプチド:CPTGPQNYSP(配列番号6)であった。全ての合成ペプチドは、中国北京のChinese Peptide Companyから購入した。

実施例1-モノクローナル抗体NB61-N62

モノクローナル抗体の生成

【0051】

III型コラーゲンのN末端プロペプチドの配列は、ヒト、ラットおよびマウスの種間でアライメントされ、種間の相同性と、タンパク質プラスティングによる他のECMタンパク質の中の固有性から選択された。1鎖PIIINP中のアミノ酸配列145'-CPTGPQNYSP-'153(配列番号6)は、ヒトとラットの間で100%相同性である(図1)。モノクローナル抗体の生成は、フロイントの不完全アジュバントを用い、200μlの乳化した抗原と50μgのPIIINPネオエピトープC末端配列(OVA

10

20

30

40

50

- C G G - C P T G P Q N Y S P ( 配列番号 1 0 ) ) を用いた 4 ~ 5 週齢の B a l b / C マウスの皮下免疫化によって開始した。安定した血清力価レベルに達するまで、2 週間ごとに免疫化を繰り返した。最も高い血清力価を有するマウスを、融合のために選択した。マウスを 1 ヶ月間休憩させ、次いで、1 0 0  $\mu$  l の 0 . 9 % N a C l 溶液中 5 0  $\mu$  g の P I I I N P ネオエピトープネオエピトープ C 末端配列のを 3 日間静脈内投与して免疫性を高めた後、脾臓を単離した。脾臓細胞を S P 2 / 0 ミエロマ細胞と融合させ、( 3 4 ) に記載されるようにハイブリドマを作成し、半媒体方法を用いて培養皿内でクローニングした。このクローンを、確実にモノクローナルを増殖させるために限定希釈方法を用いてさらに増殖させるために、9 6 ウェルマイクロタイタープレートに蒔いた。上清を、ストレプトアビジンコーティングしたプレートを用いた間接 E L I S A において、校正ペプチドおよび天然物質に対する反応性についてスクリーニングした。ビオチン - C G G - C P T G P Q N Y S P ( 配列番号 1 1 ) をスクリーニングペプチドとして使用し、一方、遊離ペプチド C P T G P Q N Y S P ( 配列番号 6 ) をキャリアレーターとして使用し、クローンのさらなる特異性を試験した。

クローンのキャラクタライゼーション

#### 【 0 0 5 2 】

ストレプトアビジンコーティングされたマイクロタイタープレート上、2 n g / m l のビオチン化ペプチドを用い、増殖させたモノクローナルハイブリドマ細胞からの上清を用いた予備的 E L I S A において、ヒトおよびラット両方からの尿、血清および羊水 ( A F ) などの異なる生体材料を用い、ペプチドの天然の反応性およびアフィニティを評価した。ヒト A F は、Beijing Obstetrics Gynecology Hospital で 2 ヶ月間にわたって選択的な下部帝王切開を受けた 3 0 人の女性から得られた。切開直後に 1 0 0 ~ 2 0 0 m l の A F を採取し、使用するまで、この液体を - 2 0

で保存した。地元の倫理委員会は、この試験を承認し、全ての女性には、採取前に書面による同意を得た。妊娠した W i s t a r ラットの子宮から、予想出産日の 2 日前にラット A F を採取した。抗体特異性を、除外ペプチドおよび伸長されたペプチド ( すなわち、それぞれ、1 0 個のアミノ酸置換を有する校正ペプチドと、開裂部位に 1 個のさらなるアミノ酸を含む校正ペプチド ) を用いた予備アッセイで試験した。モノクローナル抗体のアイソタイプを、Clonotyping System - HRP キット、カタログ番号 5 3 0 0 - 0 5 ( Southern Biotech、パーミングハム、A L、U S A ) を用いて決定した。

抗体のキャラクタライゼーション

#### 【 0 0 5 3 】

ウェスタンブロッティングの前に、ヒトおよびラットの A F の総タンパク質濃度を、ピシンコニン酸 ( B C A ) タンパク質アッセイを製造者の指示に従って使用して測定した。簡単に言うと、B C A を 2 m g / m l から P B S で 2 倍に希釈し、サンプルの計算のための標準的な列を作成した。サンプルを 1  $\times$  リン酸緩衝化生理食塩水 ( P B S ) で 1 : 4 に希釈し、2 5  $\mu$  l のサンプルを 2 0 0  $\mu$  l の作業試薬 ( 試薬 A および B を 5 0 : 1 の比率で混合したもの ) と共にマイクロタイタープレートに添加した。内容物をプレートシェーカー上で 3 0 秒間混合し、続いて 3 7  $^{\circ}$  C で 3 0 分間インキュベートした。インキュベート終了後、プレートを室温まで冷却し、E L I S A リーダーで、5 6 2 n m で吸光度を測定した ( M o l e c u l a r D e v i c e s、S p e c t r a M a x M、C A、U S A ) 。その後、ラットまたはヒトの A F をサンプルバッファー ( 2 倍 ) および還元剤 ( 1 0 倍 ) と混合し、7 0  $^{\circ}$  C で 1 0 分間加熱し、4 ~ 2 0 % のトリス - グリセリン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 ( S D S - p a g e ) にかき、1 8 0 V で 1 時間実施した。製造業者の指示に従って I n v i t r o g e n i - B l o t ゲル転移システムを用いてタンパク質バンドをニトロセルロース膜上にブロッティングした。膜をブロッキングバッファー ( T w e e n を含む T r i s 緩衝化生理食塩水中の 5 % スキムミルク ( T B S T ) ) 中、4  $^{\circ}$  C で一晩かけてブロッキングし、1  $\mu$  g / m l の西洋ワサビペルオキシダーゼ ( H R P ) が接合した P I I I N P のネオエピトープに特異的なモノク

ーナル抗体NB61N-62と共に2時間インキュベートした。PIIINPのネオエピトープに特異的なモノクローナル抗体の特異性を、過剰なPIIINPネオエピトープ較正ペプチドと抗体を10:1の比率で加え、1時間ブレイクインキュベートした後、一晚インキュベートするために膜に添加することによって観察した。インキュベートの後、膜をTBS-Tで4×10分間洗浄し、4mlの化学発光検出キット(ELC)と共にインキュベートし、Amersham Hyperfilmを用いて現像した。

クローンの選択とキャラクタライゼーション

#### 【0054】

サブタイプは、IgG1サブタイプであると判定された。ウェスタンブロット分析から、PIIINPのネオエピトープに特異的なモノクローナル抗体NB61N-62は、ラット羊水中で約52~60kDaの分子量を有する2つのバンドを認識したが、ヒト羊水中では52kDa前後のバンドは1つしか検出されなかったことがわかった。さらに、シグナルはラットの選択ペプチドによって部分的に阻害され、ヒトにおいて阻害された(図2)。天然の反応性は、ELISAにおいてNB61N-62抗体を用いて観察された。天然の反応性は、ヒト血清、血漿およびAF、げっ歯類の血清、血漿およびAFに対して見られた(図3A~図3C)。このシグナルは、マウス血清および血漿に対してわずかに阻害された。競合ELISAのシグナルは、ヒト、げっ歯類およびマウスの天然物質においてそれぞれ1:2から1:16、未希釈から1:8まで、または未希釈から1:4までを用いて阻害された。天然物質の希釈は、3種全てについて、ほぼ検量線と同じ希釈パターンに従った。ヒトAFは、シグナルを100%まで阻害し、ラットAFでは80%、ヒト血清および血漿、ラット血清では70%、ラット血漿では44%、マウス血清および血漿では35%まで阻害した。伸長されたペプチド(CPTGPQNYSPQ(配列番号6))およびナンセンスペプチド(GSPGKDGVRG(配列番号12))を用い、ゼロ阻害を観察した(図3D)。

実施例2-NB61N-62を用いたPRO-C3 ELISA

#### 【0055】

抗体を産生するハイブリドーマからの上清を回収し、HiTrapアフィニティカラム(GE Healthcare Life Science、リトルチャルフォント、バッキンガムシャー、UK)を用いてモノクローナル抗体を精製し、Lightning-Link(商標)HRP Conjugation Kit(Innova Biosciences、パブラハム、ケンブリッジ、UK)を用い、製造業者の指示に従って、HRPで標識した。

#### 【0056】

PRO-C3競合ELISAの手順は、以下の通りであった。Roche製の96ウェルストレプトアビジンコーティングされたELISAプレート(カタログ番号11940279)を、コーターバッファー(50mM PBS-BTE+10%ソルビトール、pH7.4)中に溶解させたビオチン化ペプチドBiotin-CGG-CPTGPQNYSP(配列番号11)でコーティングし、暗所で、20で30分間インキュベートし、その後、洗浄バッファー(20mM Tris、50mM NaCl、pH7.2)で洗浄した。その後、20μlのペプチドキャリブレーターまたはサンプルを適切なウェルに加え、その後、100μlのHRPが接合したモノクローナル抗体NB61N-62をインキュベーションバッファー(50mM PBS-BTB+10%Liquid II(Roche)、pH7.4)に溶解し、プレートを4で20時間インキュベートし、洗浄した。最後に、100μlのテトラメチルベンジジン(TMB)(Kem-En-Tecカタログ番号:4380H)を加え、暗所で、プレートを20で15分間インキュベートし、反応を止めるために、100μlの停止溶液(1% $H_2SO_4$ )を加え、プレートをELISAリーダーで、650nmをリファレンスとして450nmで分析した(Molecular Devices、SpectraMax M、CA、USA)。検量線は、4パラメータ数学フィッティングモデルを用いてプロットされた。

技術的評価

## 【0057】

ヒトおよびラットからの健康な血清および血漿サンプルの2倍希釈を用いて直線性を決定し、100%サンプルの回収率%として計算した。抗体特異性は、100%の校正ペプチド(CPTGPQNYSP(配列番号:6))、伸長されたペプチド(CPTGPQNYSPQ(配列番号13))、ナンセンスペプチド(GSPGKDGVRG(配列番号12))の回収率%として計算された。検出下限(LLOD)は、標準K(すなわち、バッファー)の21回の測定値からのブランクの平均+3×標準偏差(SD)として計算された。検出上限(ULOD)は、標準Aの10回の測定値の平均-3×SDとして決定された。定量下限(LLOQ)は、30%未満の精度で再現可能に測定された最低濃度として測定された。アッセイ内変動およびアッセイ間変動は、8QCサンプルの10回の独立した試行によって決定され、各試行は、サンプルの2回ずつの決定からなっていた。サンプルの正確さを、標準曲線またはヒト羊水を有意な濃度で添加した健康なヒト血清サンプルで測定し、理論血清量の回収率%として計算した。干渉を、ヘモグロビン、脂肪血およびビオチンを有意な濃度で添加した健康なヒト血清中で測定し、理論血清量の回収率%として計算した。

10

結果

## 【0058】

ヒトPRO-C3 ELISAの測定範囲は、ULODおよびLLOQを計算することによって決定され、0.867~60.1ng/mlの範囲が与えられ、LLODは0.606ng/mlであった。PRO-C3 ELISAの技術的性能は、アッセイ間変動およびアッセイ内変動が平均でそれぞれ11.03%および4.11%であり(表1)、許容範囲はそれぞれ15%未満および10%未満であった。

20

## 【0059】

## 【表2】

表1:ヒト血清品質コントロールサンプル1~8番(HS1~HS8)を用いたPRO-C3アッセイのアッセイ間変動およびアッセイ内変動。この変動は、各サンプルの10個の個々の測定値間の平均変動として計算した。

サンプル	値 (ng/mL)	アッセイ内変動率%	アッセイ間変動率%
HS1	24.24	2.28	5.94
HS2	11.62	2.90	6.45
HS3	8.40	5.31	11.99
HS4	6.54	4.46	11.31
HS5	6.36	3.88	13.09
HS6	5.23	3.98	12.31
HS7	4.29	3.53	12.94
HS8	2.98	4.66	18.56

30

## 【0060】

ヒト、ラットおよびマウスに由来する健康な血清サンプルおよび血漿サンプルを用い、希釈回収率を実施した。希釈回収率は、許容可能な100±20%の回収率の範囲内であった(表2)。さらに希釈すると、LLOQよりも低い測定値が得られた。

40

## 【0061】

## 【表 3】

表 2：ヒト、ラットおよびマウスのサンプルを用いた PRO-C3 アッセイの希釈回収率%。ヒト血清 (HS)、ヒト血漿 (HP)、ラット血清 (RS)、マウス血清 (MS)、マウス血漿 (MP)。

PIIINP ng/ml	HS (n=2)	HP (n=3)	RS (n=10)	MS (n=2)	MP (n=2)
未希釈	100%	—	100%	100%	—
希釈 1:2	98	100%	116	96	100%
希釈 1:4	103	91	110	118	114
希釈 1:8	114	87	—	—	—
希釈 1:16	—	92	—	—	—
平均	105	90	113	107	114

10

## 【0062】

血清中または血漿中の較正ペプチドの添加によって、それぞれ 56% および 55% の平均回収率を得た (表 3)。

## 【0063】

## 【表 4】

表 3：ヒト血清または血漿中の較正ペプチドの添加回収率、およびヒト血清または血漿中のヒト AF の添加回収率。回収率は、純粋な血清/血漿と比較した、血清/血漿中のペプチド/AF の計算値の回収率% として計算した。較正ペプチドの濃度は、38.16 ng/ml (Std B)、19.08 ng/ml (Std C)、9.54 ng/ml (Std D)、4.77 ng/ml (Std E)、2.39 ng/ml (Std F) および 1.19 ng/ml (Std G) であった。AF を 1:2 から出発し、2 倍希釈して加えた。

20

Std を追加	血清 (n=3) sRE%	血漿 (n=3) sRE%	AF を追加	血清 (n=3) sRE%	血漿 (n=3) sRE%
Std B	16	15	2 倍	101	103
Std C	29	25	4 倍	103	108
Std D	42	38	8 倍	106	113
Std E	58	54	16 倍	103	112
Std F	70	69	32 倍	104	115
Std G	82	83	64 倍	103	110
バッファー	92	100	バッファー	99	104
平均 sRE%	56	100	平均 sRE%	55	111

30

## 【0064】

しかし、1:2 から出発して 2 倍希釈したヒト AF を健康なヒト血清または血漿に添加すると、平均回収率はそれぞれ 100% および 111% であった。異なる濃度のヘモグロビン、ビオチンおよび脂肪血を添加した血清では、干渉は観察されなかった (表 4)。

40

## 【0065】

## 【表 5】

表 4：様々な濃度で添加されたヒト血清におけるヘモグロビン、脂肪血症およびビオチンの干渉。全てのデータは、純粋な血清と比較した回収率%として示される。

	ヘモグロビン		脂肪血		ビオチン	
	mmol/L	RE%	mmol/L	RE%	ng/L	RE%
	0.5	68	0.56	101	160,000	134
	0.25	74	0.28	103	80,000	113
	0.13	81	0.14	99	40,000	96
	0.063	81	0.07	104	20,000	97
	0.031	82	0.04	101	10,000	94
	0.016	86	0.00	100	5,000	87
	0.008	95			2,500	100
	0.000	100			0	100
平均		83		101		103

10

## 【0066】

検体の安定性は、1回の凍結/解凍サイクルと比較して、 $100 \pm 20\%$ の回収率で4回までの凍結/解凍サイクルが許容範囲であった(表5)。

## 【0067】

20

## 【表 6】

表 5：4回の凍結/解凍サイクルにおける3つのヒト血清サンプルおよび血漿サンプルにおける検体の安定性。全てのデータは、1回の凍結/解凍サイクルと比較した平均回収率%として示される。

凍結/解凍 サイクル	血清 平均回収率 %	EDTA血漿 平均回収率 %	ヘパリン血漿 平均回収率 %	クエン酸塩血漿 平均回収率 %
1	100%	100%	100%	100%
2	103	102	103	109
3	99	99	98	103
4	102	100	98	100

30

## 実施例 3 - 結合アフィニティ比の決定

## 【0068】

標的配列に対するモノクローナル抗体の結合アフィニティと、伸長された配列または短くなった配列に対するモノクローナル抗体の結合アフィニティとの比を決定するために、それぞれの配列を合成し、実施例 2 に記載される PRO-C3 ELISA における較正ペプチドとして使用した。得られた検量線を用いて、各配列/抗体の組み合わせの  $IC_{50}$  値を決定する。 $IC_{50}$  [標的] /  $IC_{50}$  [伸長したもの、または短くなったもの] の比は、結合アフィニティの比を規定する。

40

## 実施例 4 - PRO-C3 X アッセイ

## 【0069】

上述のように、リシルオキシダーゼ (LOX) による酵素的コラーゲン架橋およびプロコラーゲンの処理は、組織の成熟および安定性にとって重要である。したがって、酵素処理の前に III 型プロコラーゲンの鎖間架橋を監視することは、LOX のインビボ活性を監視するために有用であると考えられる。これは、架橋 PIIINP (すなわち、酵素によるプロコラーゲン処理の前に、III 型プロコラーゲンの LOX によって作られる鎖間

50

架橋によって一緒に結合した P I I I N P の 2 つ以上の鎖)を検出し、定量することによって達成することができる。循環系で検出されたより高いレベルの架橋 P I I I N P は、より大きな L O X 活性の指標となるだろう。したがって、L O X アンタゴニストなどの L O X を標的とする薬物の薬物試験中に架橋 P I I I N P のレベルを監視することで、前記薬物の有用な効能データを提供することができる。

#### E L I S A

##### 【 0 0 7 0 】

ストレプトアビジンコーティングされたプレートを  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  のビオチン化捕捉抗体 (ビオチン結合した N B 6 1 - N 6 2 ) を用い、 $100 \mu\text{l}$  / ウェルでコーティングし、 $20$ 、 $300 \text{rpm}$  で  $30$  分間振盪しつつインキュベートした。プレートを洗浄バッファ (  $20 \text{nM}$  T R I S、 $50 \text{mM}$  N a C l、 $\text{pH} 7.2$  ) で  $5$  回洗浄した。サンプル、標準またはコントロール (  $20 \mu\text{l}$  ) を添加し、すぐに  $100 \mu\text{l}$  のアッセイバッファを添加し、 $4$ 、 $300 \text{rpm}$  で  $20$  時間振盪しつつインキュベートした。インキュベートの後、プレートを洗浄バッファで  $5$  回洗浄した。 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  H R P 標識された検出抗体 ( H R P 結合した N B 6 1 - N 6 2 ) を  $100 \mu\text{l}$  / ウェルに加え、 $20$ 、 $300 \text{rpm}$  で  $1$  時間振盪しながらインキュベートした。インキュベートの後、プレートを洗浄バッファで  $5$  回洗浄した。容積  $100 \mu\text{l}$  の  $3$ 、 $3'$ 、 $5$ 、 $5'$  - テトラメチルベンジジン ( T M B ) を加え、暗所で、 $20$  で  $15$  分間インキュベートした。T M B の酵素反応を停止させるために、 $100 \mu\text{l}$  の  $0.1\%$  硫酸を添加した。次いで、酵素反応を、二次曲線フィッティングを用い、E L I S A リーダーで読み取った。各 E L I S A プレートには、アッセイ間変動を監視するためのキットコントロールおよび社内品質コントロールサンプルの両方が含まれていた。全てのサンプルを、特異的アッセイの範囲内で測定した。下限量化レベル ( L L O Q ) 未満の全てのサンプルに、L L O Q の値を割り当てた。

##### 【 0 0 7 1 】

##### 【表 7】

アッセイの技術的特徴は以下の通りである。

パラメータ	結果
生物学的マトリックス	血清、血漿、上清、抽出液
アッセイ内変動率	2% (10%未満であれば許容される)
アッセイ間変動率	6% (15%未満であれば許容される)
測定範囲	$0.965 \sim 17.586 \text{ ng}/\text{ml}$
検出下限	$0.251 \text{ ng}/\text{ml}$
健康な血清の正常範囲	$4.022 (\pm 2.24) \text{ ng}/\text{ml}$
必要な容積	血清/血漿 $30 \mu\text{l}$ ; 上清/抽出液 $60 \mu\text{l}$
添加した回収率	血清中のペプチド : 94% 血清中の血清 : 86%

#### 結果

##### 癒痕組織

##### 【 0 0 7 2 】

肺線維芽細胞のインビトロモデル (「s c a r - i n - a - j a r」) を用いた予備試験は、L O X ファミリーの酵素が、P I I I N P の架橋を担っていることを強く示唆している ( T G F - は、リシルオキシダーゼ ( L O X ) 酵素活性を高めることが当該技術分野で知られている )。簡単に言うと、混み合った状態で、T G F - 刺激下、肺線維芽細胞を  $5$  日間培養することによって、P r o - C 3 X (すなわち、架橋 P I I I N P ) を作成した。P r o - C 3 X は、T G F - と共に培養して  $12$  日後に有意に上昇したが、T

GF - 非存在下では、観察された Pro - C3X は、無視できる量であった (図 4)。同様に、Pro - C3X は、正常な皮膚に由来する抽出物と比較した場合、ケロイドからの抽出物では上昇した (図 5)。

#### 肝線維症

##### 【0073】

肝線維症の患者の試験を、「Pro - C3X」アッセイを用いて行い、本明細書に記載の「Pro - C3」競合 ELISA と比較した。Pro - C3X は、線維症がより重篤な場合には、疾患の後期で有意に増加し、疾患の初期には健康なコントロールと同様のレベルであることがわかった (図 6A)。これと比較して、Pro - C3 レベルは、疾患の全段階で異なっていた (図 6B)。

10

##### 【0074】

Pro - C3X アッセイと Pro - C3 アッセイとの選択性の違いは、Pro - C3X が架橋 PI I I N P のみを認識し、一方、Pro - C3 アッセイは、架橋 PI I I N P と架橋していない PI I I N P の両方を認識することに起因する。図 7 は、Pro - C3X アッセイを示し、この結論の背後にある理由のための図による説明を示す。

##### 【0075】

Pro - C3X アッセイ：架橋 PI I I N P が存在する場合、第 1 の抗体は、PI I I N P の第 1 の鎖上の遊離エピトープに結合し、続いて第 2 の抗体は、PI I I N P の第 2 の鎖上の遊離エピトープに結合する。しかし、架橋していない PI I I N P が存在する場合、表面結合抗体は、架橋していない I I I 型コラーゲンの遊離エピトープに結合するが、第 2 の抗体は、結合エピトープが既に占有されているので結合することができず、そのため、第 2 の抗体を添加しても、シグナルを生成することができない。したがって、Pro - C3X アッセイからのシグナルは、もっぱら架橋 PI I I N P の検出に起因するものである。

20

##### 【0076】

これとは逆に、Pro - C3 アッセイの実質的に全ての抗体は、PI I I N P が架橋しているかどうかにかかわらず、遊離結合エピトープを含む PI I I N P の鎖に結合する。したがって、Pro - C3 アッセイから得られたシグナルは、架橋 PI I I N P と架橋していない PI I I N P の凝集物のシグナルである。

##### 【0077】

したがって、LOX を標的とする薬物の効能を評価するための Pro - C3X アッセイの使用を促すのはこの選択性である。上述のように、対象への薬物投与の期間中の LOX 活性の結果であると示唆されている PI I I N P 架橋のレベルを監視することは、薬物活性、したがって該薬物の効能を監視するために使用され得る。

30

#### アルコール性脂肪性肝炎

##### 【0078】

アルコール性脂肪性肝炎患者の試験を、「Pro - C3X」アッセイを用いて実施し、本明細書に記載の「Pro - C3」アッセイと比較した。アルコール性脂肪性肝炎では、Pro - C3 および Pro - C3X の両方が、この疾患の後期に上昇した (Metavir 2 - 4)。しかし、硬変患者について、Pro - C3 は、MELD (末期肝疾患モデル) スコアと相関がなく ( $P = 0.527$ )、一方、Pro - C3X は、強く相関関係があった (corr 係数 3.34、 $P < 0.001$ )。さらに、Pro C3 のみがアルブミンと負の相関があり、Pro C3X は、アルブミン、ビリルビンおよびガンマ - グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) と相関関係にあった (図 8)。Pro - C3X が後期に増加するのは、PI I I N P の架橋の増加を示唆し、これは、肝臓の癒痕の増加 (すなわち、増加した LOX 活性) に一致するだろう。

40

#### 実施例 5 Scar - in - a - Jar モデルにおける Pro - C3X の評価

##### 【0079】

背景：線維症は罹患組織内の細胞外マトリックス (ECM) の蓄積であり、臓器不全および最終的に死に至る可能性がある。例えばトランスフォーミング成長因子 (TGF) -

50

による刺激の後、線維芽細胞は、ECMタンパク質、特にコラーゲンの過剰な蓄積の原因となる主な細胞型である。ここでは、Pro-C3X ELISAと組み合わせて、線維形成中のコラーゲン形成および架橋を調べるために、ECMおよび架橋を生成することが知られているインビトロモデル「Scar-in-a-Jar」の使用について説明する。このツールは、これらの線維化プロセスの調節を評価することによって新規な抗線維性化合物の研究に使用することができる。

#### 【0080】

方法：健康なヒト肺線維芽細胞(L248)をコンフルエント状態になるまで増殖させた後、30,000細胞/ウェルの密度で接種した。0.4%のFCS、225mg/mLのフィコール70、150mg/mLのフィコール400、1%のアスコルビン酸を含むDMEM培地中で細胞を18日間増殖させた。細胞は、クロスリンクの形成を阻害するために、リシルオキシダーゼ(LOX)阻害剤 - アミノプロピオニトリル(BAPN; 0.02mMまたは0.2mM)を含むか、または含まない1ng/mLのTGF- $\beta$ で刺激された。刺激を与えなかった細胞またはフィコールを含有しない培地中で増殖させた細胞をコントロールとして使用した。3日目、6日目、10日目および14日目に培地を交換した。線維芽細胞生存率を、AlamarBlueアッセイを用いて評価した。上述のPro-C3XサンドイッチELISAを用い、採取した上清中のPro-C3Xレベルを評価した。

10

#### 【0081】

結果：TGF- $\beta$  刺激は、3日目からPro-C3Xの放出を誘発し、10日目のPro-C3Xレベルのピークは刺激を受けていない細胞と比較して14倍の増加を示した( $p < 0.0001$ ; 図9)。0.02mM BAPNを用いた治療は有意な効果がなかったが、0.2mM BAPNは、TGF- $\beta$  刺激のみの場合と比較してPro-C3Xレベルの有意な減少を誘発した(0.59倍の変化、 $p < 0.0001$ ; 図9)。

20

#### 【0082】

結論：LOX阻害剤であるBAPNは、0.2mMの濃度でPro-C3Xレベルを有意に減少させ、このことは、Pro-C3X ELISAが架橋エピトープを評価していることを示した。したがって、Pro-C3X ELISAを用いて線維芽細胞の活性を評価し、潜在的な抗線維性化合物をスクリーニングするために使用することができる。TGF- $\beta$  刺激は、架橋されたIII型コラーゲンプロペプチドのマーカであるPro-C3Xの放出を誘発した。

30

#### 【0083】

結論として、Pro-C3Xアッセイは、III型コラーゲンプロペプチドの開裂ネオエピトープと分子内架橋の存在とを組み合わせた第2世代のアッセイである。したがって、このアッセイは、線維症のタイムラインにおける異なる過程を記述するため、Pro-C3の測定にさらなる情報(すなわち、瘢痕内のコラーゲン分子の架橋結合)を提供する。したがって、LOX阻害剤の使用が架橋PIIINPバイオマーカーの存在を減少させることが示されているので、Pro-C3Xアッセイは、LOXを標的とする薬剤、特にLOXアンタゴニスト/阻害剤の効能を試験するために使用することができる。

40

#### 【0084】

本明細書では、明示的に別段の指示がない限り、「または」との単語は、条件の1つだけが満たされることが必要な「排他的なまたは」との演算子とは対照的に、述べられている条件の一方または両方が満たされたときに真の値を返す演算子の意味で使用される。「~を含む(comprising)」との用語は、「~からなる(consisting of)」を意味するのではなく、「~を含む(including)」の意味で使用される。上で認められた全ての従来の特許は、参照により本明細書に組み込まれる。ここで既に公開された文書が、その日時に、その教示がオーストラリアまたは他の場所での共通する一般的な知識であったことを認めるものである、または表すものであることを承認するものではない。

#### 【配列表フリーテキスト】

50

## 【0085】

## 配列表1

<223> 従来技術のペプチド

<223> アセトアミド保護されたCys

配列表2 <223> ウシPIIINPのC末端配列

配列表3 <223> C末端PIIINP配列

## 配列表4

<223> 抗体エピトープ

<223> XaaはProまたはGlyであってもよい

## 配列表5

<223> 伸長されたエピトープペプチド

<223> XaaはProまたはGlyであってもよい

<223> Xaaは存在しなくてもよく、またはIII型コラーゲンの配列の1つ以上のアミノ酸であってもよい

配列表6 <223> ヒトPIIINPネオエピトープC末端配列

配列表7 <223> げっ歯類PIIINPネオエピトープC末端配列

## 配列表8

<223> 短くなったエピトープペプチド

<223> XaaはProまたはGlyであってもよい

## 配列表9

<223> Xaaは存在しないか、またはビオチン化-Cys Gly Glyである

<223> ビオチン化ペプチド

<223> Xaaが存在しない場合、Cysはビオチン化されている

## 配列表10

<223> CysはN末端に結合したオボアルブミンを含む

<223> 結合したオボアルブミン

## 配列表11

<223> CysはN末端がビオチン化されている

<223> ビオチン化ペプチド

配列表12 <223> ナンセンスペプチド

配列表13 <223> 伸長されたペプチド

## 【0086】

以下の参考文献を本明細書で引用する。

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

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

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

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

5. Wynn TA. Common and unique mechanisms

10

20

30

40

50

regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007; 117: 524 - 529.

6. Bosman, F. T. および Stamenkovic, I. 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol.* 200: 423 - 428.

7. Bruckner, P. 2010. Suprastructures of extracellular matrices: paradigms of functions controlled by aggregates rather than molecules. *Cell Tissue Res.* 339: 7 - 18.

8. Bao X, Zeng Y, Wei S, Wang G, Liu C, Sun Y, Chen Q および Li H. Developmental changes of Col3a1 mRNA expression in muscle and their association with intramuscular collagen in pigs. *J Genet Genomics* 2007; 34(3): 223 - 228.

9. Jensen LT and Host NB. Collagen: scaffold for repair or execution. *Cardiovasc Res* 1997; 33(3): 535 - 539.

10. Niemela O, Risteli L, Parkkinen J および Risteli J. Purification and characterization of the N-terminal propeptide of human type III procollagen. *Biochem J* 1985; 232(1): 145 - 150.

11. Wang WM, Ge G, Lim NH, Nagase H および Greenspan DS. TIMP-3 inhibits the procollagen N-proteinase ADAMTS-2. *Biochem J* 2006; 398(3): 515 - 519.

12. Van den Steen PE, Opdenakker G, Wormald MR, Dwek RA および Rudd PM. Matrix remodelling enzymes, the protease cascade and glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1528(2-3): 61 - 73.

13. Cuzner ML および Opdenakker G. Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 1999; 94(1-2): 1 - 14.

14. Meduri GU, Tolley EA, Chinn A, Stentz F および Postlethwaite A. Procollagen types I and III aminoterminal propeptide levels during acute respiratory distress syndrome and in response to methylprednisolone treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(5 Pt 1): 1432 - 1441.

15. Teare JP, Sherman D, Greenfield SM, Simpson J, Bray G, Catterall AP, Murray-Lyon IM, Peters TJ, Williams R および Thompson RP. Com

10

20

30

40

50

parison of serum procollagen III peptide concentrations and PGA index for assessment of hepatic fibrosis. *Lancet* 1993; 342 (8876): 895 - 898.

16. Schejda A, Akesson A および Horslev-Petersen K. Serum levels of aminoterminal type I II procollagen peptide and hyaluronan predict mortality in systemic sclerosis. *Scand J Rheumatol* 1992; 21 (1): 5 - 9.

17. Lin YH, Ho YL, Wang TD, Liu CP, Kao HL, Chao CL, Chien KL, Hung CS, Wu VC, Tsai IJ, Yen RF, Shiau YC および Chen WJ. The relation of amino-terminal propeptide of type III procollagen and severity of coronary artery disease in patients without myocardial infarction or hibernation. *Clin Biochem* 2006; 39 (9): 861 - 866.

18. Teppo AM, Tornroth T, Honkanen E および Grohnahagen-Riska C. Urinary amino-terminal propeptide of type III procollagen (PIIINP) as a marker of interstitial fibrosis in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; 75 (12): 2113 - 2119.

19. Han XY, Wang W, Komulainen J, Koskinen SO, Kovanen V, Vihko V, Trackman PC および Takala TE. Increased mRNAs for procollagens and key regulating enzymes in rat skeletal muscle following downhill running. *Pflugers Arch* 1999; 437 (6): 857 - 864.

20. Koskinen SO, Ahtikoski AM, Komulainen J, Hesselink MK, Drost MR および Takala TE. Short-term effects of forced eccentric contractions on collagen synthesis and degradation in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch* 2002; 444 (1 - 2): 59 - 72.

21. Cramer RM, Langberg H, Teisner B, Magnusson P, Schroder HD, Olesen JL, Jensen CH, Koskinen S, Suetta C および Kjaer M. Enhanced procollagen processing in skeletal muscle after a single bout of eccentric loading in humans. *Matrix Biol* 2004; 23 (4): 259 - 264.

22. Chen F, Lam R, Shaywitz D, Hendrickson RC, Opitck GJ, Wishengrad D, Liaw A, Song Q, Stewart AJ, Cummings CE, Beals C, Yarasheski KE, Reicin A, Ruddy M, Hu X, Yates NA, Metski J および Herman GA. Evaluation of early biomarkers of muscle anabolic response to testosterone. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2011; 2 (1): 45 - 56.

10

20

30

40

50

23. Longobardi S, Keay N, Ehrnborg C, Cittadini A, Rosen T, Dall R, Boroujerdi MA, Bassett EE, Healy ML, Pentecost C, Wallace JD, Powrie J, Jorgensen JOおよび Sacca L. Growth hormone (GH) effects on bone and collagen turnover in healthy adults and its potential as a marker of GH abuse in sports: a double blind, placebo-controlled study. The GH-2000 Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(4): 1505-1512. 10
24. Bhasin S, He EJ, Kawakubo M, Schroeder ET, Yarasheski K, Opitack GJ, Reicin A, Chen F, Lam R, Tsou JA, Castaneda-Sceppa C, Binder EF, Azen SPおよび Sattler FR. N-terminal propeptide of type III procollagen as a biomarker of anabolic response to recombinant human GH and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(11): 4224-4233.
25. Nelson AE, Meinhardt U, Hansen JL, Walker IH, Stone G, Howe CJ, Leung KC, Seibel MJ, Baxter RC, Handelsman DJ, Kazlauskas Rおよび Ho KK. Pharmacodynamics of growth hormone abuse biomarkers and the influence of gender and testosterone: a randomized double-blind placebo-controlled study in young recreational athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(6): 2213-2222. 20
26. Zachariae H, Heickendorff Lおよび Sogaard H. The value of amino-terminal propeptide of type III procollagen in routine screening for methotrexate-induced liver fibrosis: a 10-year follow-up. *Br J Dermatol* 2001; 144(1): 100-103. 30
27. Gressner AMおよび Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10(1): 76-99.
28. Jarcuska P, Janicko M, Veseliny E, Jarcuska Pおよび Skladany L. Circulating markers of liver fibrosis progression. *Clin Chim Acta* 2010; 411(15-16): 1009-1017. 40
29. Frei A, Zimmermann Aおよび Weigand K. The N-terminal propeptide of collagen type I II in serum reflects activity and degree of fibrosis in patients with chronic liver disease. *Hepatology* 1984; 4(5): 830-834.
30. Fabris P, Marranconi F, Bozzola L, Biasin MR, De Lazzari F, Plebani M, Benedetti P 50

, Tositti G, Pellizzer G, Stecca C および de LF. Fibrogenesis serum markers in patients with chronic hepatitis C treated with alpha-IFN. J Gastroenterol 1999; 34(3): 345-350.

31. Brocks DG, Steinert C, Gerl M, Knolle J, Neubauer HP および Gunzler V. A radioimmunoassay for the N-terminal propeptide of rat procollagen type III. Application to the study of the uptake of the N-terminal propeptide of procollagen type III in isolated perfused rat liver. Matrix 1993; 13(5): 381-387.

10

32. Rohde H, Vargas L, Hahn E, Kalbfleisch H, Bruguera M および Timpl R. Radioimmunoassay for type III procollagen peptide and its application to human liver disease. Eur J Clin Invest 1979; 9(6): 451-459.

33. Bayer Aktiengesellschaft. (1999) Monoclonal antibody and assay for detecting PIIINP. 特許協力条約出願 WO99/61477号.

20

34. Warming L, Hassager C および Christiansen C. Changes in bone mineral density with age in men and women: a longitudinal study. Osteoporos Int 2002; 13(2): 105-112.

【図1】

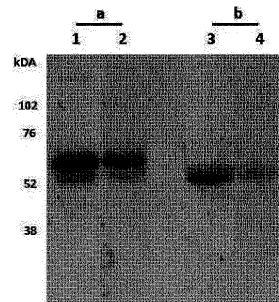
【図2】

```

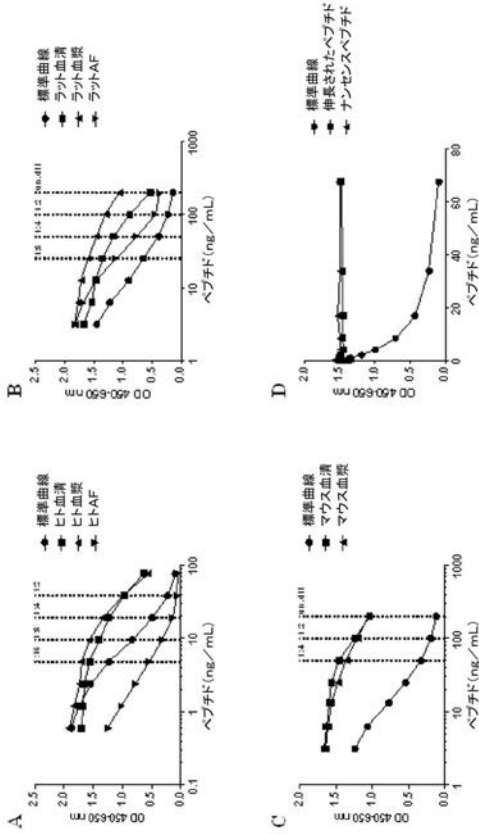
CLUSTAL O(1.1.0) 複数配列のアラインメント
sp|P02461|CO3A1_ヒト      MMSFYKQGSWLLALLHPTIILAQQEAV-EGGCSHLGOSVADRDKWKEPCQICVCDSGS 59
sp|P13941|CO3A1_ラット  MMSFYQCGTWFLTLHLHPSLILAQSNVDELGGNVLGOSVESRDVWKEPCQICVCDSGS 60
*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
sp|P02461|CO3A1_ヒト      VLCDLICDDDELDCEPNEIFEGECCAVCCPPTAFPPNNGGEGGEGKGGEPGPIEGR 119
sp|P13941|CO3A1_ラット  VLCDLIMCDDDELDCEPNEIFEGECCAVCCPPTAFPPNNGGEGGEGKGGEPGPIEGR 120
*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
sp|P02461|CO3A1_ヒト      NGDPELGGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG 179
sp|P13941|CO3A1_ラット  NGDPELGGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG 178
*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

```

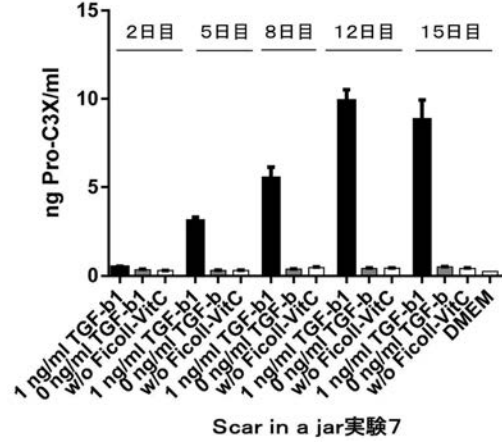
Figure 2



【 図 3 】

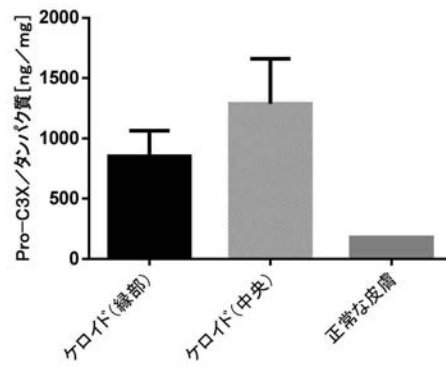


【 図 4 】

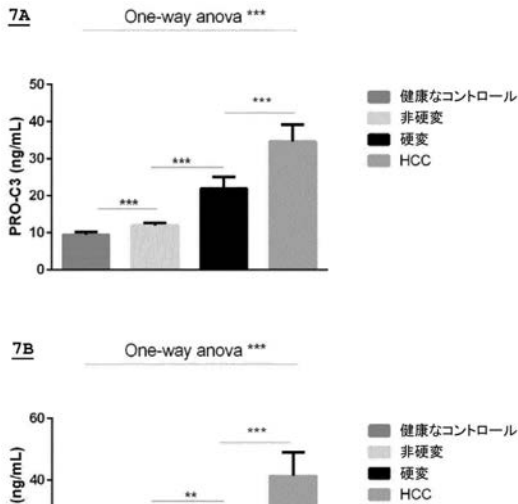


Scar in a jar実験7

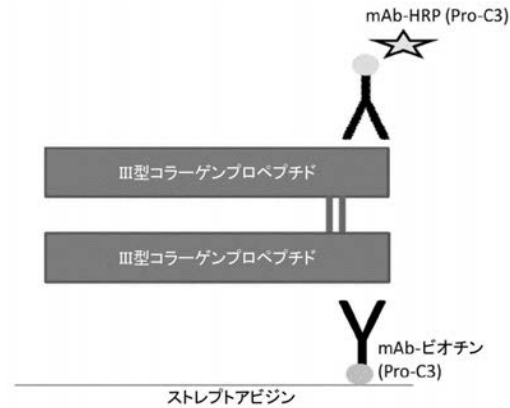
【 図 5 】



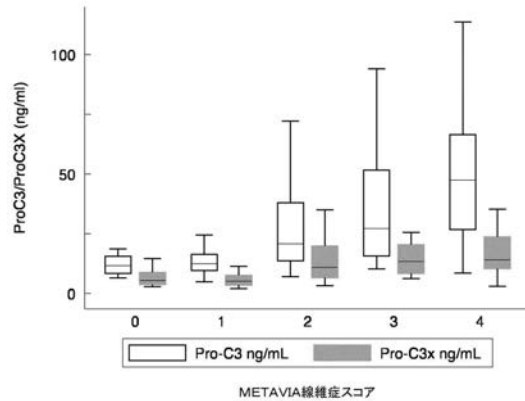
【 図 6 】



【 図 7 】



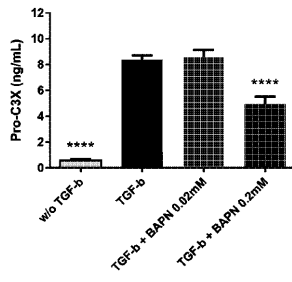
【 図 8 】



METAVIR線維症スコア

【 図 9 】

Figure 9.



【 配列表 】

2019510210000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2017/052271

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/577 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) 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, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Mette J Nielsen ET AL: "Original Article The neo-epitope specific PRO-C3 ELISA measures true formation of type III collagen associated with liver and muscle parameters", Am J Transl Res, 1 January 2013 (2013-01-01), XP055128401, Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3633973/pdf/ajtr0005-0303.pdf">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3633973/pdf/ajtr0005-0303.pdf</a> [retrieved on 2014-07-11] (p 303, col 1-2, bridging para)(p 304, col 1-2, bridging para)(p 312, col 1, first lines)(p 310-311, bridging para) ----- -/--	1-12
<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 :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 21 March 2017		Date of mailing of the international search report 05/04/2017
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 Bigot-Maucher, Cora

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/052271
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	T. R. COX ET AL: "LOX-Mediated Collagen Crosslinking Is Responsible for Fibrosis-Enhanced Metastasis", CANCER RESEARCH, vol. 73, no. 6, 23 January 2013 (2013-01-23), pages 1721-1732, XP055357201, US ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2233 abstract -----	14,15
Y	MORTEN A. KARSDAL ET AL: "Extracellular Matrix Remodeling: The Common Denominator in Connective Tissue Diseases Possibilities for Evaluation and Current Understanding of the Matrix as More Than a Passive Architecture, but a Key Player in Tissue Failure", ASSAY AND DRUG DEVELOPMENT TECHNOLOGIES, vol. 11, no. 2, 1 March 2013 (2013-03-01), pages 70-92, XP055357205, US ISSN: 1540-658X, DOI: 10.1089/adt.2012.474 (p 77, col 1, para 1)(p 77, col 1, first lines; p 78, col 2, fist full para)(p 83, col 2, last para)(fig 4; p 79, col 1, first para) -----	14,15
X	WO 2014/170312 A1 (NORDIC BIOSCIENCE AS [DK]) 23 October 2014 (2014-10-23) cited in the application	13,16
Y	claims 1,9-13,17 -----	1-12
Y	KAUPPILA S ET AL: "CROSS-LINKED TELOPEPTIDES OF TYPE I AND III COLLAGENS IN MALIGNANT OVARIAN TUMOURS IN VIVO", BRITISH JOURNAL OF CANCER, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 81, no. 4, 1 October 1999 (1999-10-01), pages 654-661, XP001206374, ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/SJ.BJC.6690743 (p 659, col 2, last para)(p 659, col 2, last para)(p 657, col 1, para 1) -----	14,15
Y	US 2007/225242 A1 (ERLER JANINE [US] ET AL) 27 September 2007 (2007-09-27) abstract ----- -/--	14,15

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/052271
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/017833 A2 (ARRESTO BIOSCIENCES [US]; SMITH VICTORIA [US]; OGG SCOTT [US]; VAN VLA) 5 February 2009 (2009-02-05) (p 25, last para ff); abstract -----	14,15
Y	US 2010/203062 A1 (STALMANS INGEBORG [BE] ET AL) 12 August 2010 (2010-08-12) paragraph [0086] - paragraph [0087] -----	14,15

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/052271

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014170312 A1	23-10-2014	US 2016061844 A1 WO 2014170312 A1	03-03-2016 23-10-2014
US 2007225242 A1	27-09-2007	NONE	
WO 2009017833 A2	05-02-2009	AU 2008282739 A1 AU 2008299784 A1 AU 2014204536 A1 AU 2017200635 A1 CA 2693208 A1 CA 2693310 A1 CN 101835490 A CN 101842114 A CN 105214085 A CN 105330743 A CN 105622756 A DK 2182981 T3 DK 2185198 T3 EP 2182981 A2 EP 2185198 A1 EP 2537529 A1 EP 2543389 A2 ES 2402334 T3 ES 2534490 T3 HK 1143543 A1 HK 1143736 A1 HR P20130287 T1 HR P20150208 T1 HU E025283 T2 JP 5312459 B2 JP 5659014 B2 JP 5770219 B2 JP 5851555 B2 JP 2010535205 A JP 2010535219 A JP 2013231035 A JP 2014210785 A JP 2015212281 A JP 2016094428 A PT 2182981 E PT 2185198 E SI 2182981 T1 SI 2185198 T1 US 2009053224 A1 US 2009104201 A1 US 2012087917 A1 US 2013095101 A1 US 2013324705 A1 US 2014079707 A1 US 2014128284 A1 US 2014349309 A1 US 2016185877 A1 WO 2009017833 A2 WO 2009035791 A1	05-02-2009 19-03-2009 07-08-2014 23-02-2017 05-02-2009 19-03-2009 15-09-2010 22-09-2010 06-01-2016 17-02-2016 01-06-2016 02-04-2013 20-04-2015 12-05-2010 19-05-2010 26-12-2012 09-01-2013 30-04-2013 23-04-2015 20-11-2015 05-07-2013 31-05-2013 05-06-2015 29-03-2016 09-10-2013 28-01-2015 26-08-2015 03-02-2016 18-11-2010 18-11-2010 14-11-2013 13-11-2014 26-11-2015 26-05-2016 18-04-2013 20-04-2015 31-05-2013 30-04-2015 26-02-2009 23-04-2009 12-04-2012 18-04-2013 05-12-2013 20-03-2014 08-05-2014 27-11-2014 30-06-2016 05-02-2009 19-03-2009
US 2010203062 A1	12-08-2010	AU 2010210489 A1 BR PI1007929 A2 CA 2751438 A1	25-08-2011 01-09-2015 12-08-2010

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/052271

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CN 102439141 A	02-05-2012
		EP 2393923 A1	14-12-2011
		JP 2012517438 A	02-08-2012
		KR 20110140121 A	30-12-2011
		RU 2011136853 A	20-03-2013
		SG 173598 A1	29-09-2011
		US 2010203062 A1	12-08-2010
		WO 2010091279 A1	12-08-2010
-----			

## 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, DJ, 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, KH, KN, KP, KR, KW, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72)発明者 ラーセン、リサ

デンマーク国、カストラップ、フェルボルヴェイ 9

(72)発明者 オールスネス - レーミング、ダイアン、ジュリー

デンマーク国、エスパゲア、ジーアイ・ストランヴェイ 209ディー、1 . サル

(72)発明者 カルスダル、モルテン

デンマーク国、コベンハーゲン オー、エッケルスベリィスゲーゼ 13

Fターム(参考) 4H045 BA10 DA76 EA50 FA72

专利名称(译)	联合生物标志物测量纤维化		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019510210A</a>	公开(公告)日	2019-04-11
申请号	JP2018540058	申请日	2017-02-02
发明人	ジェノヴェーゼ、フェデリカ ニールセン、メッテ、ジュール ラーセン、リサ オールスネス - レーミング、ダイアン、ジュリー カルスダル、モルテン		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12N15/12 C07K7/06		
CPC分类号	G01N33/6887 G01N33/577 G01N2333/78 G01N2800/085 G01N2800/52 G01N2800/7052		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D C07K16/18 C12N15/12 C07K7/06		
F-TERM分类号	4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
优先权	15/014241 2016-02-03 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本文描述的是具有至少两个通过链间桥连接在一起的PIIINP的链的交联的PIIINP，每个链间桥包含通过完整III型原胶原的N-蛋白酶切割制备的PIIINP的C末端新表位。提供了一种夹心免疫测定。将包含交联的PIIINP的生物样品与第一个表面结合的单克隆抗体接触，然后与第二个单克隆抗体接触，两者均与PIIINP的C端新表位特异性反应，然后与第二个单克隆抗体特异性反应。确定两种单克隆抗体的结合。还提供了通过免疫测定评估靶向赖氨酰氧化酶的拮抗药的功效的方法，以及包含第二单克隆抗体的试剂盒，所述第二单克隆抗体包含与第一单克隆抗体结合的固体支持物。

Figure 7.

