

(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2020-514368

(P2020-514368A)

(43) 公表日 令和2年5月21日(2020.5.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>CO7K 16/18 (2006.01)</b>	CO7K 16/18 ZNA	4HO45
<b>CO7K 7/06 (2006.01)</b>	CO7K 7/06	
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 D	
<b>GO1N 33/543 (2006.01)</b>	GO1N 33/543 541B	
<b>C12N 15/12 (2006.01)</b>	GO1N 33/543 545A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-550764 (P2019-550764)  
 (86) (22) 出願日 平成30年3月14日 (2018. 3. 14)  
 (85) 翻訳文提出日 令和1年11月12日 (2019. 11. 12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2018/056320  
 (87) 国際公開番号 W02018/167111  
 (87) 国際公開日 平成30年9月20日 (2018. 9. 20)  
 (31) 優先権主張番号 1704182.3  
 (32) 優先日 平成29年3月16日 (2017. 3. 16)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 英国 (GB)

(71) 出願人 503259129  
 ノルディック・バイオサイエンス・エー／エ  
 ス  
 NORDIC BIOSCIENCE A  
 /S  
 デンマーク国、デーカー 2730 ヘル  
 レフ、ヘルレフ・ホーフエダガーデ 20  
 7  
 (74) 代理人 110000659  
 特許業務法人広江アソシエイツ特許事務所  
 (72) 発明者 マノン・イェンセン、ティナ  
 デンマーク国 ブロンドビー デーカー  
 2605、キルケブイエルク アレ 13  
 6

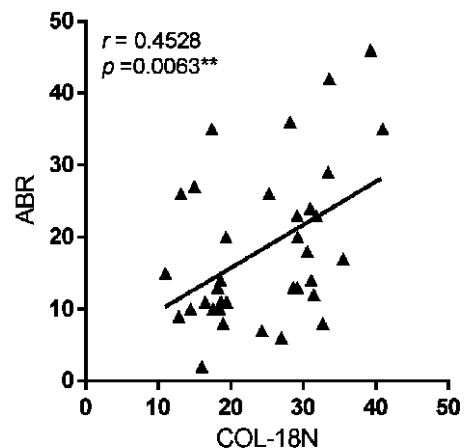
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 X V I I I 型コラーゲンアッセイ

(57) 【要約】

本発明は、抗体に関し、その抗体は、短アイソフォーム X V I I I 型コラーゲンと特異的に反応性であるが、中アイソフォーム X V I I I 型コラーゲンと、または長アイソフォーム X V I I I 型コラーゲンとは反応しない。本発明はまた、短アイソフォーム X V I I I 型コラーゲンを検出または定量化するためのイムノアッセイの方法における抗体の使用に関し、方法は、血友病性疾患を評価するために使用され得る。

Figure 3.



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

短アイソフォーム X V I I I 型コラーゲンと特異的に反応性である抗体であって、前記抗体が、中アイソフォーム X V I I I 型コラーゲンと、または長アイソフォーム X V I I I 型コラーゲンとは反応しない、抗体。

**【請求項 2】**

前記抗体が、短アイソフォーム X V I I I 型コラーゲンの N 末端エピトープと特異的に反応性である、請求項 1 に記載の抗体。

**【請求項 3】**

前記抗体が、 $H_2N - E P E R I S E E V G . . .$  (配列番号 1) の N 末端アミノ酸配列に含まれる N 末端エピトープと特異的に反応性である、請求項 2 に記載の抗体。

10

**【請求項 4】**

前記抗体が、N 末端アミノ酸配列  $H_2N - E P E R I S . . .$  (配列番号 2) を含む N 末端エピトープと特異的に反応性である、請求項 2 に記載の抗体。

**【請求項 5】**

前記抗体が、 $H_2N - A E P E R I S E E V G$  (配列番号 3) である前記 N 末端アミノ酸配列の N 拡張伸長バージョンを特異的に認識もしくは結合しない、かつ/または  $H_2N - P E R I S E E V G$  (配列番号 4) である前記 N 末端アミノ酸配列の N 切断バージョンを特異的に認識もしくは結合しない、請求項 3 または 4 に記載の抗体。

**【請求項 6】**

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗体。

20

**【請求項 7】**

試料において短アイソフォーム X V I I I 型コラーゲンを検出または定量化するためのイムノアッセイの方法であって、前記方法が、前記短アイソフォーム X V I I I 型コラーゲンを含む試料を請求項 1 ~ 6 に記載の抗体と接触させることと、前記抗体の結合の量を決定することと、を含む、方法。

**【請求項 8】**

前記方法が、短アイソフォーム X V I I I 型コラーゲンの N 末端エピトープを検出または定量化することを含む、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記 N 末端エピトープが、前記 N 末端アミノ酸配列  $H_2N - E P E R I S E E V G . . .$  (配列番号 1) に含まれる、請求項 8 に記載の方法。

30

**【請求項 10】**

前記 N 末端エピトープが、前記 N 末端アミノ酸配列  $H_2N - E P E R I S . . .$  (配列番号 2) を含む、請求項 8 または 9 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記試料が、生物流体である、請求項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記生物流体が、血清、血漿、尿、脳脊髄液、または羊水である、請求項 11 に記載の方法。

40

**【請求項 13】**

前記イムノアッセイが、競合アッセイまたはサンドイッチアッセイである、請求項 7 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記イムノアッセイが、ラジオイムノアッセイまたは酵素結合免疫吸着アッセイである、請求項 7 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記方法が、前記方法によって決定される前記短アイソフォーム X V I I I 型コラーゲンの量を、既知の疾患重症度の標準血友病性疾患試料と相関させて、血友病性疾患の重症度を評価することをさらに含む、請求項 7 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 16】

前記方法が、前記方法によって決定される前記短アイソフォームXVII型コラーゲンの量を、健康な対象と関連した標準値と比較して、血友病性疾患の存在および/または重症度を評価することをさらに含む、請求項7～15のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 17】

前記方法が、対象から第1の時点および少なくとも1つのその後の時点で得られる少なくとも2つの試料中のXVII型コラーゲンの量を定量化することをさらに含み、

前記第1の時点から前記少なくとも1つのその後の時点までのXVII型コラーゲンの量の増加が、前記第1の時点から前記少なくとも1つのその後の時点までの血友病性疾患の悪化を示し、

前記第1の時点から前記少なくとも1つのその後の時点までのXVII型コラーゲンの量の減少が、前記第1の時点から前記少なくとも1つのその後の時点までの血友病性疾患の改善を示す、請求項7～14のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記血友病性疾患が、血友病性関節症であり得る、請求項15～17に記載の方法。

## 【請求項 19】

血友病性疾患を治療するための薬物の有効性を評価するための方法であって、前記方法が、請求項7～14のいずれか一項に記載の方法を使用して、対象から第1の時点、および前記対象への前記薬物の投与の期間中の少なくとも1つのその後の時点で得られる少なくとも2つの試料中のXVII型コラーゲンの量を定量化することを含み、

前記第1の時点から前記薬物の投与の期間中の前記少なくとも1つのその後の時点までのXVII型コラーゲンの量の低減が、血友病性疾患を治療するための有効な薬物であることを示す、方法。

## 【請求項 20】

短アイソフォームXVII型コラーゲンの量を決定するためのアッセイキットであって、前記キットが、請求項1～6のいずれか一項に記載の抗体と、

- ストレプトアビジン被覆96ウェルプレート
- 前記抗体と反応性であり、ピオチン化ペプチド $H_2N-EPERISEEVG-L$ -ピオチン(配列番号5)であり得、Lが、任意のリンカーである、ペプチド
- サンドイッチイムノアッセイにおける使用のための任意にピオチン化された二次抗体
- N末端配列 $H_2N-EPERISEEVG$ ・・・(配列番号6)を含むキャリブレーションペプチド
- 抗体HRP標識キット
- 抗体放射性標識キット
- アッセイ可視化キットのうちの少なくとも1つと、を含む、キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、XVII型コラーゲンの短アイソフォームを検出するための方法、および血友病性疾患の評価におけるその方法の使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

血管破裂による再発性関節血症は、血友病における主要な合併症であり、血友病性(HF)関節症を引き起こす進行性関節損傷の一因となっている。出血事象を低減するHF分野における医療ニーズは、血友病患者における年間出血率(ABR)の測定を必要とする。粗い尺度であるものの、ABRは、HF関節症と関連付けられる[1]が、臨床試験における重要なパラメータでもあり、患者に対する定量化可能な利益を保証する[2～4]。内皮細胞機能障害およびマトリックス品質は、関節出血およびその後のHF関節症の発症と関連付けられ得る。

## 【0003】

10

20

30

40

50

血管破裂は、内皮細胞の直下に位置する基底膜（BM）の品質およびターンオーバーと関連付けられる。細胞外マトリックスターンオーバーは、上皮または内皮細胞損傷による多くの疾患における中心的な病理学的特徴である。内皮細胞機能は論じられているが、出血後、内皮細胞の基底をなすBMの露出をもたらす、血管内皮に対する損傷を特異的に定量化するための定量化可能な方法は存在しない。

【0004】

内皮細胞に特異的なBMタンパク質を定量化することは、したがって、血友病患者における内皮細胞安定性および破裂に対する特定の関連性を有し得る。

【0005】

IV、XV、およびXVII型コラーゲンは、血管壁構造および膜の統合性の維持を担う、血管BMの最もよく知られているコラーゲンを表す（図1A）[5~7]。

10

【0006】

XVII型コラーゲンは、様々な基底膜領域に局在する、短、中、および長の3つのアイソフォームで存在する[4~6]（図1B）。全ての3つのアイソフォームは、トロポスポンジン1様ドメイン、および11個の非コラーゲンドメイン（NC1~11）に隣接する10個の三重らせんコラーゲンドメイン（Col1~10）を含有する。NC1ドメインは、抗血管新生特性を有するC末端エンドスタチンドメインを含有する[7]。短アイソフォームは、内皮特異的であり、血管中および筋肉構造の周りで見られる。ここには、ゼロまたは非常に低い量のみの中および長アイソフォームが存在する[5]。血管BMのリモデリング、損傷、および分解後、XVII型コラーゲンの短アイソフォームは、他のタイプのコラーゲンで起こったように、影響および分解され、XVII型コラーゲンの測定可能な断片を放出し得る[8、9]。

20

【0007】

XVII型コラーゲンにおける突然変異はまた、常染色体劣性障害Knobloch症候群（KS）と関連付けられている。KSは、若齢での失明を引き起こす様々な眼球異常によって特徴付けられる[11、12]。また、col18a1-/-ノックアウトマウスは、網膜の表面に沿った硝子体における血管の退行遅延、網膜血管の血管新生機能障害、および虹彩BM構造変化を示した[8、13~16]。よって、XVII型コラーゲンは、目における血管形成を制御するために必須であり、場合によっては血管系全体のBM領域における重要な成分である[17]。

30

【0008】

本出願人は、XVII型コラーゲンの短アイソタイプに特異的ないずれのバイオマーカーおよび/または抗体についても把握していない。市販の抗体の大部分は、XVII型コラーゲンのC末端エンドスタチン末端を認識するので、それらの抗体を用いて3つのアイソタイプを区別することはできない。

【0009】

よって、内皮XVII型コラーゲン含有量の検出に関して血管特異的基底膜ターンオーバーを定量化するために、XVII型コラーゲンの特異的短アイソタイプを測定し、2つの他のアイソフォームを除外する抗体および/またはバイオマーカーの必要性がある。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

出願人はここで、XVII型コラーゲンの短アイソフォームを検出するためのアッセイを開発し、そのアッセイを使用して、HF関節症と診断された患者におけるXVII型コラーゲンのターンオーバーの臨床的関連性を評価した。

【課題を解決するための手段】

【0011】

第1の態様では、本発明は、短アイソフォームXVII型コラーゲンと特異的に反応性である抗体に関し、その抗体は、中アイソフォームXVII型コラーゲンと、または

50

長アイソフォームXVII型コラーゲンとは反応しない。好ましくは、抗体は、短アイソフォームXVII型コラーゲンのN末端エピトープと特異的に反応性である。好ましくは、N末端エピトープは、短アイソフォームXVII型コラーゲンのN末端シグナルペプチドの切断および除去後に露出するエピトープである。好ましくは、抗体は、 $H_2N$ -EPERISEEVG... (配列番号1)のN末端アミノ酸配列に含まれるN末端エピトープと特異的に反応性である。好ましくは、抗体は、N末端アミノ酸配列 $H_2N$ -EPERIS... (配列番号2)を含むN末端エピトープと特異的に反応性である。

【0012】

好ましくは、抗体は、 $H_2N$ -AEPERISEEVG (配列番号3)であるそのN末端アミノ酸配列のN拡張伸長バージョンを特異的に認識もしくは結合しない、かつ/または $H_2N$ -PERISEEVG (配列番号4)であるそのN末端アミノ酸配列のN切断バージョンを特異的に認識もしくは結合しない。

10

【0013】

抗体は、モノクローナルまたはポリクローナル抗体であり得る。好ましくは、抗体は、モノクローナル抗体である。

【0014】

第2の態様では、本発明は、試料において短アイソフォームXVII型コラーゲンを検出または定量化するためのイムノアッセイの方法に関し、その方法は、その短アイソフォームXVII型コラーゲンを含む試料を上に記載の抗体と接触させることと、その抗体の結合の量を決定することと、を含む。

20

【0015】

本発明は、ヒト患者において短アイソフォームXVII型コラーゲンを検出する方法を対象とし得、その方法は、

a. ヒト患者から試料を得ることと、

b. 試料を抗体(上に記載)と接触させ、短アイソフォームXVII型コラーゲンと抗体との間の結合を検出することによって、その短アイソフォームXVII型コラーゲンが試料中に存在するかを検出することと、を含む。

【0016】

好ましくは、方法は、短アイソフォームXVII型コラーゲンのN末端エピトープを検出または定量化することを含む。N末端エピトープは、好ましくは、N末端アミノ酸配列 $H_2N$ -EPERISEEVG... (配列番号1)に含まれる。好ましくは、N末端エピトープは、N末端アミノ酸配列 $H_2N$ -EPERIS... (配列番号2)を含む。

30

【0017】

好ましくは、試料は、生物流体である。生物流体は、これらに限定されないが、血清、血漿、尿、脳脊髄液、または羊水であり得る。

【0018】

イムノアッセイは、競合アッセイまたはサンドイッチアッセイであり得る。イムノアッセイは、ラジオイムノアッセイまたは酵素結合免疫吸着アッセイであり得る。

【0019】

方法は、その方法によって決定されるその短アイソフォームXVII型コラーゲンの量を、既知の疾患重症度の標準血友病性疾患試料と相関させて、血友病性疾患の重症度を評価することをさらに含み得る。これに関して、「標準血友病性疾患試料」は、既知の重症度の血友病性疾患を有することが知られる対象から得られる試料を意味する。

40

【0020】

あるいは、または加えて、方法は、その方法によって決定されるその短アイソフォームXVII型コラーゲンの量を、健康な対象と関連した標準値と比較して、血友病性疾患の存在および/または重症度を評価することをさらに含み得る。これに関して、「健康な対象と関連した標準値」は、健康である、すなわち、血友病性疾患を有しないとみなされる対象について上に記載される方法によって決定される短アイソフォームXVII型コラーゲンの標準化された量を意味する。標準化は、健康な対象の身長、体重、性別などに

50

依存するであろう。

【0021】

あるいは、または加えて、方法は、対象から第1の時点および少なくとも1つのその後の時点で得られる少なくとも2つの試料中のXV III型コラーゲンの量を定量化することをさらに含み得、第1の時点から少なくとも1つのその後の時点までのXV III型コラーゲンの量の増加は、第1の時点から少なくとも1つのその後の時点までの血友病性疾患の悪化を示すか、または第1の時点から少なくとも1つのその後の時点までのXV III型コラーゲンの量の減少は、第1の時点から少なくとも1つのその後の時点までの血友病性疾患の改善を示す。

【0022】

血友病性疾患は、血友病性関節症であり得る。上に記載される方法は、Knobloch症候群を評価するためにも使用され得る。

【0023】

別の態様では、本発明は、血友病性疾患を治療するための薬物の有効性を評価するための方法を対象とする。方法は、上に記載の方法を使用して、対象から第1の時点および対象への薬物の投与の期間中の少なくとも1つのその後の時点で得られる少なくとも2つの生物学的試料中のXV III型コラーゲンの量を定量化することを含む。第1の時点から薬物の投与の期間中の少なくとも1つのその後の時点までのXV III型コラーゲンの量の低減は、血友病性疾患を治療するための有効な薬物であることを示す。

【0024】

最後の態様では、本発明は、短アイソフォームXV III型コラーゲンの量を決定するためのアッセイキットに関し、上に記載の抗体と、

- ストレプトアビジン被覆96ウェルプレート
- その抗体と反応性であり、ビオチン化ペプチド $H_2N-EPERISEEVG-L$ -ビオチン(配列番号5)であり得、Lが、任意のリンカーである、ペプチド
- サンドイッチイムノアッセイにおける使用のための任意にビオチン化された二次抗体
- N末端配列 $H_2N-EPERISEEVG...$ (配列番号6)を含むキャリブレーションペプチド
- 抗体HRP標識キット
- 抗体放射性標識キット
- アッセイ可視化キットのうちの少なくとも1つと、を含む。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1A】血管BMの構造。毛細血管内皮下層は、BMおよび間質マトリックス(IM)で構成される。血管BMの主成分には、IV型コラーゲン、ラミニン、およびニドゲンが含まれる。微量成分には、XV型コラーゲンおよびXV III型コラーゲンが含まれる。BMの成分は、シート状構造に自己組織化する。BMは、IおよびVI型コラーゲンとIVおよびXV型コラーゲンとの間の相互作用によってIMに緊密に結合する。

【図1B】XV III型コラーゲンのアイソフォーム。XV III型コラーゲンは、それらのN末端が異なる、3つのアイソフォームで存在する。COL18A1遺伝子は、2つのプロモーターおよび選択的スプライシングの使用によって、これらのバリエーションをコードする。短アイソフォームは、他の2つとは異なるシグナルペプチドを有し、プロモーター1によってコードされ、他方は、同じシグナルペプチドを有し、共にプロモーター2によってコードされる。全てのアイソフォームは、トロンボスポンジン様ドメイン、ヘパリン硫酸鎖、およびXV III型コラーゲン断片、エンドスタチンを含有する球状C末端を含む。

【図2】XV III型コラーゲンに対するCOL-18N抗体特異的反応性。標準ペプチド、切断、伸長、および選択解除ペプチドに対するモノクローナルNB632-13H11/G5抗体反応を示す。抗体は、標準ペプチドに対する高い反応性を有し、他のペプチドとの交差反応性を有さないか、または最小限の交差反応性を有する。

10

20

30

40

50

【図3】ABRとのCOL-18N相関。35人の26歳以上の男性HF患者からの血清を、COL-18N ELISAで測定した。血管内皮XVII型コラーゲン濃度とABRとの間の相関は、Spearman順位相関係数を用いて分析され、 $r = 0.45$ 、 $p < 0.006$ を示した。ABRとCOL-18Nレベルとの間の差は、 $p < 0.05$ である場合に統計的に有意とみなし、 $* = p < 0.05$ 、 $** = p < 0.01$ 、および $*** = p < 0.001$ と示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

定義

本明細書で使用されるとき、「N末端エピトープ」という用語は、ポリペプチドの末端にある、すなわち、ポリペプチドのN末端にある、N末端ペプチド配列を指し、その一般的な方向における意味として解釈されるものではない。

【0027】

本明細書で使用されるとき、「競合ELISA」という用語は、競合酵素結合免疫吸着アッセイを指し、当業者に知られている技法である。

【0028】

本明細書で使用されるとき、「サンドイッチイムノアッセイ」という用語は、試料中の抗原の検出のための少なくとも2つの抗体の使用を指し、当業者に知られている技法である。

【0029】

本明細書で使用されるとき、「XVII型コラーゲンの短アイソフォーム」という用語は、プロモーター1によって生成されるXVII型コラーゲンのアイソフォームを指し、N末端非コラーゲン領域は、トロンボスポンジン-1様ドメイン(TSP-1)を含むが、未知機能のドメイン(DUF)またはFrizzledドメイン(FZ)を含有しない。「XVII型コラーゲンの中アイソフォーム」という用語は、プロモーター2によって生成されるXVII型コラーゲンの選択的スプライシングされたアイソフォームを指し、N末端非コラーゲン領域は、TSP-1およびDUFを含むが、FZを含まない。「XVII型コラーゲンの長アイソフォーム」という用語は、プロモーター2によって生成されるXVII型コラーゲンの選択的スプライシングされたアイソフォームを指し、N末端非コラーゲン領域は、TSP-1、DUF、およびFZを含む。

【0030】

本明細書で使用されるとき、「COL-18N」という用語は、XVII型コラーゲンの短アイソフォームのN末端配列EPERISEEVG(配列番号1)に特異的な本明細書で開示されるアッセイを記載するための省略表現として使用される。

【実施例】

【0031】

本開示の実施形態は、以下の実施例に記載され、これは、本開示の理解を助けるために記述され、その後続く特許請求の範囲において定義される本開示の範囲をいずれの方法でも限定するものと解釈されるべきではない。以下の例は、当業者に、記載される実施形態の作製および使用方法の完全な開示および説明を提供するように記述され、本開示の範囲を限定することは意図されず、以下の実験が行われた全てまたは唯一の実験であることを表すことも意図されない。使用される数値(例えば、量、温度など)に関する精度を確保する努力がなされたが、いくらかの実験誤差および偏差が考慮されるべきである。特に指示されない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏温度であり、圧力は大気またはそれに近い。

【0032】

患者試料

血清を、35人の26歳以上の男性HF患者から収集した。このカットオフ年齢は、コラーゲンターンオーバーが約25歳の年齢での成長板の閉鎖で徐々に減少するため、選択された[21]。患者は、出血エピソード時の必要に応じた投薬、または5~10IU/

10

20

30

40

50

kgの組換えFVIIII、2～3回/週の低用量の予防薬の摂取のいずれかの治療歴を有した。患者は、世界血友病連盟身体検査スコア(Gilbertスコア)によって、およびPetterssonスコアに従った放射線学的評価によって定義される様々な程度のHF関節症を有した。患者の平均ABRは18.1であり、2～46の範囲であった。除外基準は、血友病以外の出血障害、ヒト免疫不全ウイルス感染、慢性閉塞性肺疾患、関節疾患または肝線維症の病歴、および抗炎症性生物学的製剤またはステロイドでの治療であった。研究参加者は、Department of Haematology, Peking Union Medical College Hospital, Beijing, Chinaに登録された。研究は、Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Ethics Review Boardによって整理番号S-720で承認された。署名されたインフォームドコンセントを全ての対象から得た。

10

### 【0033】

#### COL-18Nのためのモノクローナル抗体開発

ヒトXVIIII型コラーゲン 1鎖の短アイソフォームのN末端エピトープの最初の10個のアミノ酸に対応するペプチド(シグナルペプチド、<sup>3 4</sup> EPERISEEVG<sup>4 3</sup>を除く)を用いて、モノクローナルネオエピトープ特異的抗体を産生した。Beijing Administration Office of Laboratory AnimalおよびNordic Bioscienceの動物倫理委員会が動物実験を承認した。モノクローナル抗体の産生を、60μgのキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に結合したペプチドを含む200μLの乳化したフロイント完全アジュバントを用いる6～8週齢Balb/Cマウスの皮下免疫化によって開始した。連続免疫化を、安定な力価レベルに到達するまで、フロイント不完全アジュバントにおいて2週間間隔で行った。マウスに100μLの0.9%塩化ナトリウム溶液中の50μgの免疫原を追加で静脈内投与し、3日後、脾臓細胞をSP2/0骨髄腫細胞(LGC Standard s AB, Borås, Sweden)と融合した。ハイブリドーマを、96ウェルプレートにおいて成長させ、モノクローナル成長を、限界希釈によって確認した。クローンを、特異的エピトープ(EPERISEEVG、配列番号1)、伸長エピトープ(AEPERISEEVG、配列番号3)、および切断エピトープ(PERISEEVG、配列番号4)に対してスクリーニングした。mAb産生クローン、NB632-13H11/G5を、上記ペプチドに対する反応性に基づいて選択し、抗体を、Protein Gカラム(GE Healthcare, Hillerød, Denmark)を用いて精製した。

20

30

### 【0034】

#### COL-18N ELISAプロトコル

競合COL-18N ELISAを次の通り行った。96ウェルストレプトアビジン被覆プレート(Roche cat.: 11940279)を、100μl/ウェルのコーティングバッファー(20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、3.7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、137mM NaCl、2.7mM KCl、0.1% Tween 20、1% BSA、pH 7.4)に溶解した1.25ng/mLのビオチン化合成ペプチドEPERISEEVG-K-ビオチン(配列番号7)で被覆し、30分間20℃でインキュベートした。プレートを、洗浄バッファー(20mM Tris、50mM NaCl、pH 7.2)で5回洗浄した。インキュベーションバッファー(20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、3.7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、137mM NaCl、2.7mM KCl、0.1% Tween 20、1% BSA、5% Liquid I I pH 7.4)に希釈した20μLの標準ペプチド(EPERISEEVG、配列番号6)または試料を、適切なウェルに添加し、続いて100μL/ウェルのモノクローナル抗体NB632-13H11/G5を添加し、1時間20℃でインキュベートした。洗浄後、100μlのウサギ抗マウス抗体(Jackson, 315-035-045)を添加し、コーティングバッファーに1:3000で溶解し、1時間20℃、300rpmでインキュベートした。最後の5回の洗浄後、ウェルを100μ

40

50

Lのテトラメチルベンジジン (TMB) (Kem-En-Tec cat. 4380H) と暗所で15分間20、300 rpmでインキュベートし、続いて100 μL/ウェルの停止溶液 (1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) を添加した。比色反応を、650 nmを参照として450 nmで測定し、検量線を、4パラメトリック数理あてはめモデルを用いてプロットした。

【0035】

#### COL-18N技術的評価

技術的アッセイ検証を国際的ガイドラインに従って行った。検出下限 (LLOD) を、21個のゼロ試料 (すなわち、アッセイバッファー) から決定される平均 + 3 × 標準偏差 (SD) として計算した。検出上限 (ULOD) を、標準A (1000 ng/ml) の10個の測定値の平均 - 3 × SDとして決定した。定量下限 (LLOQ) を、30%未満の不正確性で可能な最低濃度によって決定した。アッセイ内およびアッセイ間変動を、2通りの10の独立したランによる7つのヒト試料の変動の平均として計算した。希釈回収を、2つのヒト血清および3つのヒトクエン酸血漿の2倍希釈物において決定し、未希釈物と比較した希釈マトリックスの回収パーセンテージとして計算した。添加回収を、測定範囲全体を網羅する濃度で標準ペプチドが添加されたヒト血清およびクエン酸血漿において、または濃度を2倍にするために同様の濃度の2つの試料を組み合わせることによって評価した。添加回収を、理論量の測定量回収パーセンテージとして計算した。ヘモグロビン、血清脂質、ピオチン、およびヒト抗マウス抗体 (HAMA) によるマウス抗原に対するヒト抗体による干渉を、2倍希釈物を既知の濃度の血清試料に添加することによって決定した。濃度は、0.500 mmol/lのヘモグロビン、0.56 mmol/lの血清脂質、160 μg/lのピオチン、および2010 ng/mlのHAMAで開始した。回収パーセンテージを、正常血清試料を参照値として計算した。分析物安定性を、4つの凍結-融解サイクルにわたる2つの健康なヒト血清試料および1つの健康なクエン酸血漿試料について決定し、第1の凍結-融解サイクルの回収パーセンテージとして計算した。同じ試料を、非ストレス分析物に対して4 および20 で2時間、4時間、および24時間で試験した。最後に、抗体特異性を、標準 (EPERISEEVG、配列番号1)、伸長 (AEPERISEEVG、配列番号3)、切断 (PERISEEVG、配列番号4)、および選択解除ペプチド (EPQIDEKKK (配列番号8) およびCPERALER (配列番号9)) に対する反応性を試験するサニティーチェックによって評価した。

【0036】

#### 統計

血清COL18-N濃度とABRとの間の相関は、GraphPad Prism v6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) でSpearman順位相関係数を用いて分析した。差は、p < 0.05である場合に統計的に有意とみなした。

【0037】

#### 結果および考察

ヒト血清および血漿 (クエン酸、EDTA、ヘパリン) 中のCOL-18Nを検出するためにモノクローナル抗体を用いる新規競合ELISAを開発および評価した。

【0038】

主な所見は次の通りであった。

血清COL-18Nレベルは、HF患者においてABRと相関した。

許容可能なアッセイ内-アッセイ間変動ならびに許容可能な希釈および添加回収を有するヒト血清およびヒト血漿中のCOL-18Nを検出するための技術的に安定なアッセイ。

【0039】

#### COL-18N ELISAの特徴分析

内皮BM分解を評価することができる競合COL-18N ELISAを開発した。ELISAの技術的性能を表1にまとめ、4.8 ~ 671 ng/mlの測定範囲、それぞれ7%および13%のアッセイ内およびアッセイ間変動性、100 ± 20%以内の希釈およ

10

20

30

40

50

び添加回収、ならびにイムノアッセイ干渉なしの分析安定性を提供する。血清 (16.6 ng/ml)、クエン酸血漿 (12.5 ng/ml)、EDTA血漿 (13.2 ng/ml)、およびヘパリン血漿 (15.8 ng/ml) 中のCOL-18Nの正常濃度は、マトリックスにかかわらず一貫していた。

#### 【0040】

NB632-13H11/G5抗体は、N末端XVII型コラーゲン 1鎖の最初の10個のアミノ酸、短アイソフォーム (選択) を特異的に認識した (図2)。抗体は、関連ペプチドに対する反応性を示さないか、最小限の反応性を示し、高い特異性を示した (図2)。XVII型コラーゲンの中および長形態のN末端との交差反応性の可能性は、もっともらしくない。XVII型コラーゲンの3つのアイソフォームは、COL18A1遺伝子によって、2つの異なるプロモーターおよび選択的スプライシングの使用によってコードされる (18、19) (図1B)。結果として、短アイソフォームのN末端は、他の2つのアイソフォームのN末端とは全く異なってくる。

10

#### 【0041】

競合COL-18N ELISAの技術的評価は、アッセイの高い正確性および精度を含むXVII型コラーゲンの血管形態のN末端に対する高い特異性を有する安定な感度のよいアッセイを明らかにした。

表1. COL-18N ELISAの技術的性能

#### 【表1】

測定値	技術的特徴
検出下限	4.8 ng/ml
検出上限	671 ng/ml
定量下限	7.3 ng/ml
アッセイ内変動性	7% (許容<10%)
アッセイ間変動性	13% (許容<15%)
希釈回収	100±20%以内
添加回収	100±20%以内
凍結-融解安定性 (4サイクル)	100±20%以内
分析物安定性 (4℃および20℃で0~20時間)	100±20%以内
干渉 (Hgb、脂質、ビオチン、HAMA)	干渉なし
ヒト健康血清 (n=10、平均値)	16.6 ng/ml
ヒト健康血漿クエン酸 (n=10、平均値)	12.5 ng/ml
ヒト健康血漿EDTA (n=10、平均値)	13.2 ng/ml
ヒト健康血漿ヘパリン (n=10、平均値)	15.8 ng/ml

20

30

#### 【0042】

COL-18Nは、HF患者において年間出血率と相関する。出血性障害血友病は、適切な治療の不在下で不可避の関節症を引き起こす反復性関節血症によって臨床的に明らかになる。血友病における医薬介入の1つの基本的な特徴は、ABRの低下であるが、高分解能を有する客観的な定量化可能なパラメータが欠如している。

40

#### 【0043】

血友病の出血重症度は、一般的には血漿中のFVII/IX活性の程度と反比例するが、出血傾向の実質的な変動性は周知である。低減した特発性出血およびより低い因子濃縮物の要件が、重症HF患者の10~15%のサブセットで報告されている [23、24]。また、非重症HF患者における阻害剤の開発は、出血表現型をかなり高め得る [25]。

#### 【0044】

出血表現型は、アッセイの標準化によって引き起こされるFVIIアッセイ間の大き

50

な相違によってさらに損なわれ得 [ 26 ]、療法中に使用される F V I I I 濃縮物のタイプによっても影響され得る [ 27、28 ]。他のアッセイは、トロンビン生成と同様に、HF 患者において出血表現型と相関する [ 29 ] が、トロンビン生成の発生にかかわらず F V I I I 阻害剤を有する HF 患者において一貫性がない [ 30 ]。

#### 【 0045 】

血友病では、i) 内皮細胞損傷、ii) 出血、ならびに iii) 血栓形成および創傷治療の遅延の結果として、血友病の臨床症状および病態生理学的疾患表現の一因となる内皮リモデリングが影響を受け得る。本明細書に記載されるアッセイを使用して、血管内皮 X V I I I 型コラーゲンは、HF 患者において A B R と相関することがここで見出された ( 図 3、 $r = 0.45$ 、 $p < 0.006$  )。病理学的プロセスの客観的バイオマーカーは、A B R と関連する分解された X V I I I 型コラーゲンのものと同様に、治療をベンチマークし、患者を監視するのを補助し得、結果として患者の利益のための薬物開発を補助し得る。

10

#### 【 0046 】

##### 結論

要約すると、組み合わせられたデータは、技術的にロバストな C O L - 18 N バイオマーカーが、X V I I I 型コラーゲンの短アイソフォームの分解に影響を及ぼす、血管 B M 分解およびリモデリングを含む病理に関連し得ることを示す。加えて、データは、C O L - 18 N バイオマーカーが、関節症の発症を予防するために患者の最適な治療および監視のために A B R を評価することを可能にする。

20

#### 【 0047 】

本明細書において、特に明示的に指示されない限り、「または ( 論理和 ) 」という語は、条件のうちの一つのみが満たされることを必要とする演算子「排他的論理和」とは対照的に、記述される条件の一方または両方が満たされる場合に真の値を返すという演算子の意味で使用される。「含む ( c o m p r i s i n g ) 」という語は、「からなる ( c o n s i s t i n g o f ) 」を意味するものではなく、「含む ( i n c l u d i n g ) 」の意味で使用される。上記で認識される全ての先行する教示は、本明細書に参照により組み込まれる。いずれの先行公表文献の認識も、その教示が、これに関する日付でオーストラリアまたは他の場所において共有一般知識であったことを認めるか、または表すものであると解釈されるべきではない。

30

##### 参考文献

- 1 Funk MB, Schmidt H, Becker S, Escuriola C, Klarmann D, Klingebiel T, Kreuz W. Modified magnetic resonance imaging score compared with orthopaedic and radiological scores for the evaluation of haemophilic arthropathy. *Haemophilia* 2002; 8: 98 - 103.
- 2 Fischer K, Steen Carlsson K, Petrini P, Holmstrom M, Ljung R, van den Berg HM, Berntorp E. Intermediate-dose versus high-dose prophylaxis for severe hemophilia: comparing outcome and costs since the 1970s. *Blood* 2013; 122: 1129 - 36.
- 3 Gringeri A, Lundin B, von Mackensen S, Mantovani L, Mannucci PM. A randomized clinical trial of prophylaxis in children with hemophilia A (the ESPRIT Study). *J Thromb Haemost* 2011; 9: 700 - 10.
- 4 Lundin B, Ljung R, Pettersson H. MRI scores of ankle joints in children with haem

40

50

- ophilia - comparison with clinical data. *Haemophilia* 2005;11:116-22.
- 5 Tomono Y, Naito I, Ando K, Yonezawa T, Sado Y, Hirakawa S, Arata J, Okigaki T, Ninomiya Y. Epitope-defined monoclonal antibodies against multiplexin collagens demonstrate that type XV and XVIII collagens are expressed in specialized basement membranes. *Cell Struct Funct* 2002;27:9-20. 10
- 6 Ricard-Blum S, Ruggiero F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol* 2005;53:430-42.
- 7 Manon-Jensen T, Kjeld NG, Karsdal MA. Collagen-mediated hemostasis. *J Thromb Haemost* 2016;14:438-48.
- 8 Elamaa H, Snellman A, Rehn M, Autio-Harminen H, Pihlajaniemi T. Characterization of the human type XVIII collagen gene and proteolytic processing and tissue location of the variant containing a frizzled motif. *Matrix Biol* 2003;22:427-42. 20
- 9 Saarela J, Rehn M, Oikarinen A, Autio-Harminen H, Pihlajaniemi T. The short and long forms of type XVIII collagen show clear tissue specificities in their expression and location in basement membrane zones in humans. *Am J Pathol American Society for Investigative Pathology*;1998;153:611-26. 30
- 10 Seppinen L, Pihlajaniemi T. The multiple functions of collagen XVIII in development and disease. *Matrix Biol International Society of Matrix Biology*;2011;30:83-92.
- 11 Marneros AG, Olsen BR. Physiological role of collagen XVIII and endostatin. *FASEB J* 2005;19:716-28.
- 12 Passos-Bueno MR, Suzuki OT, Armelin-Correa LM, Sertie AL, Errera FI V, Bagatini K, Kok F, Leite KRM. Mutations in collagen 18A1 (COL18A1) and their relevance to the human phenotype. *An Acad Bras Cienc* 2006;78:123-31. 40
- 13 Marneros AG, Keene DR, Hansen U, Fukai N, Moulton K, Goletz PL, Moiseyev G, Pawlyk BS, Halfter W, Dong S, Shibata M, Li T, Crouch RK, Bruckner P, Olsen BR. Collagen XVIII/endostatin is essential for vision and retinal pigment epithelial function. *EMBO J* 50

- 2004;23:89-99.
- 14 Utriainen A, Eklund L, Pihlajaniemi and T. Structurally altered basement membranes and hydrocephalus in a type XVIII collagen deficient mouse line. *Hum Mol Genet* 2004;13:2089-99.
- 15 Marneros AG, Olsen BR. Age-Dependent Iris Abnormalities in Collagen XVIII/Endostatin Deficient Mice with Similarities to Human Pigment Dispersion Syndrome. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 2003;44:2367. 10
- 16 Fukai N. Lack of collagen XVIII/endostatin results in eye abnormalities. *EMBO J* 2002;21:1535-44.
- 17 Aikio M, Elamaa H, Vicente D, Izzì V, Kaur I, Seppinen L, Speedy HE, Kaminska D, Kuusisto S, Sormunen R, Heljasvaara R, Jones EL, Muilu M, Jauhainen M, Pihlajaniemi J, Savolainen MJ, Shoulders CC, Pihlajaniemi T. Specific collagen XVIII isoforms promote adipose tissue accrual via mechanisms determining adipocyte number and affect fat deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:E3043-52. 20
- 18 Carmeliet P, Collen D. Molecular Analysis of Blood Vessel Formation and Disease. *Am J Physiol* 1997;273:2091-104.
- 19 Karsdal MA, Bay-Jensen AC, Leeming DJ, Henriksen K, Christiansen C. Quantification of "end products" of tissue destruction in inflammation may reflect convergence of cytokine and signaling pathways - implications for modern clinical chemistry. *Biomarkers* 2013;18:375-8. 30
- 20 Karsdal MA, Nielsen MJ, Sand JM, Henriksen K, Genovese F, Bay-Jensen A-C, Smith V, Adamkewicz JI, Christiansen C, Leeming DJ. 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 Drug Dev Technol* 2013;11:70-92. 40
- 21 Iki M, Akiba T, Matsumoto T, Nishino H, Kagamimori S, Kagawa Y, Yoneshima H. Reference database of biochemical markers of bone turnover for the Japanese female population. Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Study. *Osteoporos Int* 2004;15: 50

981 - 91 .

- 22 Gefter ML, Margulies DH, Scharff MD. A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Somatic Cell Genet* 1977;3:231-6.
- 23 Aledort LM, Haschmeyer RH, Pettersson H. A longitudinal study of orthopaedic outcomes for severe factor-VIII-deficient haemophiliacs. The Orthopaedic Outcome Study Group. *J Intern Med* 1994;236:391-9. 10
- 24 Aznar JA, Magallon M, Querol F, Gorina E, Tusell JM. The orthopaedic status of severe haemophiliacs in Spain. *Haemophilia* 2000;6:170-6.
- 25 van Velzen AS, Eckhardt CL, Streefkerk N, Peters M, Hart DP, Hamulyak K, Klamroth R, Meijer K, Nijziel M, Schinco P, Yee TT, van der Bom JG, Fijnvandraat K. The incidence and treatment of bleeding episodes in non-severe haemophilia A patients with inhibitors. *Thromb Haemost* 2015;115:543-50. 20
- 26 Barrowcliffe TW, Raut S, Sands D, Hubbard AR. Coagulation and Chromogenic Assays of Factor VIII Activity: General Aspects, Standardization, and Recommendations. *Semin Thromb Hemost* 2002;28:247-56.
- 27 Mikaelsson M. Influence of phospholipids on the assessment of factor VIII activity. *Haemophilia* 1998;4.
- 28 Mikaelsson M, Oswaldsson U. Assaying the Circulating Factor VIII Activity in Hemophilia A Patients Treated with Recombinant Factor VIII Products. *Semin Thromb Hemost* 2002;28:257-64. 30
- 29 Brummel-Ziedins KE, Branda RF, Butenas S, Mann KG. Discordant fibrin formation in hemophilia. *J Thromb Haemost* 2009;7:825-32.
- 30 Ragni MV, DiMichele DM, Hay CM, Malec LM, Seaman CD, Li J, Yabes JG, Butenas S, Brummel-Ziedins K. Thrombin generation and bleeding in haemophilia inhibitor patients during immune tolerance induction. *Haemophilia* 2016;22:240-7. 40



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2018/056320

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/18 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
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		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JANNA SAARELA ET AL: "The Short and Long Forms of Type XVIII Collagen Show Clear Tissue Specificities in Their Expression and Location in Basement Membrane Zones in Humans", AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY., vol. 153, no. 2, 1 August 1998 (1998-08-01), pages 611-626, XP55472990, US ISSN: 0002-9440, DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65603-9 abstract page 612, right-hand column, paragraph 2 - page 613, left-hand column, paragraph 1 page 614, right-hand column, paragraph 3 - page 615, right-hand column, paragraph 2 page 621, right-hand column, paragraph 1 - page 625, left-hand column, paragraph 2 -/--	1-4,6-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  8 May 2018		Date of mailing of the international search report  17/05/2018
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  Bayer, Annette

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/056320

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p style="text-align: center;">-----</p> <p>ELAMAA HARRI ET AL: "Characterization of the human type XVIII collagen gene and proteolytic processing and tissue location of the variant containing a frizzled motif", MATRIX BIOLOGY, ELSEVIER, NL, vol. 22, no. 5, 1 September 2003 (2003-09-01), pages 427-442, XP002477574, ISSN: 0945-053X, DOI: 10.1016/S0945-053X(03)00073-8 abstract page 430, right-hand column, paragraph 2 - page 433, right-hand column, paragraph 1; figures 1,5; tables 1,2</p>	1-4,6-20
X	<p style="text-align: center;">-----</p> <p>LOTTA SEPPINEN ET AL: "The multiple functions of collagen XVIII in development and disease", MATRIX BIOLOGY, ELSEVIER, NL, vol. 30, no. 2, 22 November 2010 (2010-11-22), pages 83-92, XP028169413, ISSN: 0945-053X, DOI: 10.1016/J.MATBIO.2010.11.001 [retrieved on 2010-12-14] abstract conclusions; page 83, right-hand column, paragraph 1 - page 86, right-hand column, paragraph 2; figure 1</p>	1-4,6-20
A	<p style="text-align: center;">-----</p> <p>BAGER C L ET AL: "Type XVIII Collagen", BIOCHEMISTRY OF COLLAGENS, LAMININS AND ELASTIN: STRUCTURE, FUNCTION AND BIOMARKERS 2016 ACADEMIC PRESS LTD-ELSEVIER SCIENCE LTD, 24-28 OVAL ROAD, LONDON NW1 7DX, UK, BIOCHEMISTRY OF COLLAGENS, LAMININS AND ELASTIN: STRUCTURE, FUNCTION AND BIOMARKERS, 1 January 2016 (2016-01-01), pages 113-121, XP009505174, DOI: 10.1016/B978-0-12-809847-9.00018-0 ISBN: 978-0-12-809847-9 page 113, paragraph 1 - page 115, paragraph 4</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-20

1

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/EP2018/056320

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>Nadja Gad Kjeld ET AL: "The endothelial specific isoform of type XVIII collagen correlates to annual bleeding rate in haemophilia patients", PLoS One, 1 January 2018 (2018-01-01), page e0190375, XP055472393, San Francisco DOI: 10.1371/journal.pone.0190375 Retrieved from the Internet: URL:<a href="http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0190375&amp;type=printable">http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0190375&amp;type=printable</a> the whole document</p> <p>-----</p>	1-20

1

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	C 1 2 N 15/12
			A 6 1 P 7/04

(81) 指定国・地域 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, JO, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72) 発明者 カルスダール, モルテン

デンマーク国 コペンハーゲン オー・スラッシュ デーカー - 2 1 0 0 , エッケルスベリィスガ  
ーデ 1 3

F ターム(参考) 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA15 CA42 DA76 DA86 EA24 EA50  
FA74 GA26

专利名称(译)	xviii型胶原测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2020514368A</a>	公开(公告)日	2020-05-21
申请号	JP2019550764	申请日	2018-03-14
申请(专利权)人(译)	北欧生物科学ER / ES		
[标]发明人	カルスダルモルテン		
发明人	マノン-イエンセン, ティナ カルスダル, モルテン		
IPC分类号	C07K16/18 C07K7/06 G01N33/53 G01N33/543 C12N15/12 A61P7/04		
CPC分类号	C07K16/18 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K14/78 G01N33/5008		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C07K7/06 G01N33/53.D G01N33/543.541.B G01N33/543.545.A C12N15/12 A61P7/04		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA24 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	2017004182 2017-03-16 GB		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种抗体，该抗体与短同工型XVIII胶原特异性反应，但不与中同工型XVIII胶原或长同工型XVIII胶原反应。本发明还涉及该抗体在用于检测或定量短同工型XVIII胶原的免疫测定方法中的用途，该方法可用于评估血友病。

Figure 3.

