

(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2019-507731  
(P2019-507731A)

(43) 公表日 平成31年3月22日(2019.3.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C07K 16/18 (2006.01)</b>	C07K 16/18	ZNA 4H045
<b>G01N 33/53 (2006.01)</b>	G01N 33/53	D
C07K 7/06 (2006.01)	G01N 33/53	U
C12N 15/06 (2006.01)	C07K 7/06	
	C12N 15/06	100
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)		

(21) 出願番号 特願2018-537781 (P2018-537781)  
 (86) (22) 出願日 平成29年1月20日 (2017.1.20)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年7月19日 (2018.7.19)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/051152  
 (87) 国際公開番号 WO2017/129480  
 (87) 国際公開日 平成29年8月3日 (2017.8.3)  
 (31) 優先権主張番号 1601571.1  
 (32) 優先日 平成28年1月28日 (2016.1.28)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(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 2  
 07  
 (74) 代理人 110000855  
 特許業務法人浅村特許事務所  
 (72) 発明者 サンド、ヤニー、マリ、ビューロー  
 デンマーク国、モーレウ、ミルホルメン  
 12  
 (72) 発明者 レーミング、ダイアナ、ジュリー  
 デンマーク国、エспаゲア、ジー1. スト  
 ランヴェイ 209ディー、1. サル

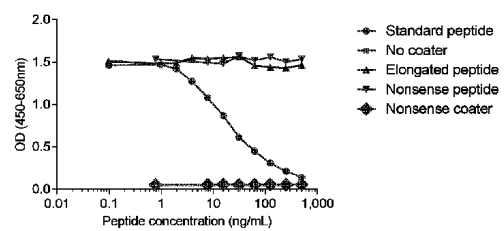
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 V I I 型コラーゲンα1アッセイ

(57) 【要約】

生物学的試料中で、N末端またはC末端ネオエピトープを含むV I I型コラーゲン 1のフラグメントを検出するためのイムノアッセイの方法であって、N末端またはC末端ネオエピトープを含むV I I型コラーゲン 1のフラグメントを含む生物学的試料を本発明の抗体と接触させることと、抗体の結合量を測定することを含む、方法。

Figure 1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

N末端またはC末端ネオエピトープを含むV I I型コラーゲン 1のフラグメントと反応性の抗体であって、前記N末端またはC末端ネオエピトープに結合する抗体。

**【請求項 2】**

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

**【請求項 3】**

前記N末端またはC末端ネオエピトープが、V I I型コラーゲン 1の非コラーゲンアミノ末端ドメインに含まれるか、またはV I I型コラーゲン 1の中央コラーゲン三重らせんドメインに含まれる、請求項 1 または 2 に記載の抗体。

10

**【請求項 4】**

前記抗体が、アミノ酸配列G P P G P P G R L V - C O O H (配列番号 1)に含まれるC末端ネオエピトープに結合する、請求項 1 から 3 に記載の抗体。

**【請求項 5】**

前記抗体が、アミノ酸配列P P G R L V - C O O H (配列番号 2)を含むC末端ネオエピトープに結合する、請求項 1 から 3 に記載の抗体。

**【請求項 6】**

前記抗体が、伸長したアミノ酸配列G P P G P P G R L V X - C O O H (配列番号 3)を認識せずまたはこれに結合せず、ここで、XがV I I型コラーゲン 1の配列の1つ以上のアミノ酸である、請求項 4 または 5 に記載の抗体。

20

**【請求項 7】**

前記抗体が、アミノ酸配列H<sub>2</sub>N - E A P R V R A Q H R (配列番号 4)に含まれるN末端ネオエピトープに結合する、請求項 1 から 3 に記載の抗体。

**【請求項 8】**

前記抗体が、アミノ酸配列H<sub>2</sub>N - E A P R V R (配列番号 5)を含むN末端ネオエピトープに結合する、請求項 1 から 3 に記載の抗体。

**【請求項 9】**

前記抗体が、伸長したアミノ酸配列H<sub>2</sub>N - X E A P R V R A Q H R (配列番号 6)を認識せずまたはこれに結合せず、ここで、XがV I I型コラーゲン 1の配列の1つ以上のアミノ酸である、請求項 7 または 8 に記載の抗体。

30

**【請求項 10】**

生物学的試料中で、N末端またはC末端ネオエピトープを含むV I I型コラーゲン 1のフラグメントを検出するためのイムノアッセイの方法であって、前記N末端またはC末端ネオエピトープを含むV I I型コラーゲン 1の前記フラグメントを含む前記生物学的試料を、請求項 1 から 9 に記載の抗体と接触させることと、前記抗体の結合量を測定することを含む、方法。

**【請求項 11】**

前記方法が、生体液中の前記N末端またはC末端ネオエピトープを含むV I I型コラーゲン 1のフラグメントの量を定量化するために使用される、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記生体液が、血清、血漿、気管支肺胞洗浄液、痰、呼気または尿である、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 10 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 10 に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記方法によって測定されたN末端またはC末端ネオエピトープを含むV I I型コラー

50

ゲン 1 のフラグメントの量を、既知の疾患重症度の標準的な V I I 型コラーゲン関連疾患試料と相関させて、V I I 型コラーゲン関連疾患の重症度を評価することをさらに含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記 V I I 型コラーゲン関連疾患が慢性閉塞性肺疾患 ( C O P D ) または全身性硬化症である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

N 末端ネオエピトープを含む V I I 型コラーゲン 1 のフラグメントの前記 N 末端ネオエピトープのアミノ酸配列に対応する N 末端アミノ酸配列を有するか、または C 末端ネオエピトープを含む V I I 型コラーゲン 1 のフラグメントの前記 C 末端ネオエピトープのアミノ酸配列に対応する C 末端アミノ酸配列を有する、ペプチド。

10

【請求項 1 8】

前記 N 末端ネオエピトープのアミノ酸配列が E A P R V R A Q H R ( 配列番号 4 ) または E A P R V R ( 配列番号 5 ) である、請求項 1 7 に記載のペプチド。

【請求項 1 9】

前記 C 末端ネオエピトープのアミノ酸配列が G P P G P P G R L V ( 配列番号 1 ) または P P G R L V ( 配列番号 2 ) である、請求項 1 7 に記載のペプチド。

【請求項 2 0】

ビオチンに結合されている、請求項 1 7 から 1 9 に記載のペプチド。

【請求項 2 1】

生物学的試料中で N 末端または C 末端ネオエピトープを含む V I I 型コラーゲン 1 のフラグメントの量を測定するためのアッセイキットであって、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の抗体と、

20

ストレプトアビジンで被覆された 9 6 ウェルプレート

ビオチン残基と前記ペプチドの間に位置する任意選択のリンカーを伴う、請求項 1 7 から 1 9 に記載のビオチン化ペプチド、

サンドイッチイムノアッセイに使用するためのビオチン化二次抗体

請求項 1 7 から 1 9 に記載のキャリブレーションペプチド

抗体 H P R 標識キット

抗体放射性標識キット

アッセイ視覚化キット

30

の少なくとも 1 つとを含む、アッセイキット。

【請求項 2 2】

L が任意選択のリンカーであるビオチン化ペプチド、ビオチン - L - G P P G P P G R L V ( 配列番号 7 ) と、C 末端配列 G P P G P P G R L V - C O O H ( 配列番号 1 ) を含むキャリブレーションペプチドとを含む、請求項 2 0 に記載のアッセイキット。

【請求項 2 3】

L が任意選択のリンカーであるビオチン化ペプチド E A P R V R A Q H R - L - ビオチン ( 配列番号 8 ) と、N 末端配列 H <sub>2</sub> N - E A P R V R A Q H R ( 配列番号 4 ) を含むキャリブレーションペプチドとを含む、請求項 2 0 に記載のアッセイキット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、N 末端または C 末端ネオエピトープを含む V I I 型コラーゲン 1 のフラグメントと反応性である抗体、V I I 型コラーゲン 1 のフラグメントを検出および定量するためのアッセイにおける抗体の使用、ならびに慢性閉塞性肺疾患 ( C O P D ) または全身性硬化症を評価するためのアッセイの使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

V I I 型コラーゲンは、基底膜をその下の間質マトリックスに結合する係留線維の主成

50

分である。これは、2つの非コラーゲン(NC)ドメインおよび中央のコラーゲン三重らせんドメインを有する3つの同一の1鎖から成る。VII型コラーゲンは、皮膚および粘膜の基底膜において同定されている[1]。

【0003】

VII型コラーゲンは、主として、重篤な皮膚疾患である栄養障害型表皮水疱症におけるその役割について検討されてきた。VII型コラーゲン1鎖の突然変異は、真皮からの表皮の分離、したがって皮膚の水疱形成を引き起こす、異常な係留線維の形成、係留線維の減少または欠如をもたらす[1]。VII型コラーゲンはまた、皮膚および粘膜の水疱形成を引き起こす自己免疫疾患である後天性表皮水疱症における原因タンパク質としても同定されている。この疾患は、VII型コラーゲンのNC1ドメインに対するIgG自己抗体によって引き起こされる[2]。

10

【0004】

VII型コラーゲンに対する自己免疫はまた、炎症性腸疾患および水疱性全身性エリテマトーデスにも関連付けられている[3-4]。

【0005】

全身性硬化症に罹患している患者の皮膚におけるVII型コラーゲンレベルの上方調節が同定されている[5]。全身性硬化症の患者は、皮膚線維症を有し、肺を含む内臓器官の線維症を呈し得る。1つの試験では、喘息のサルモデルにおいて気道の係留線維中のVII型コラーゲンタンパク質のレベル低下も同定されている[6]。

20

【0006】

VII型コラーゲンに関連する病原性状態を評価するためには、病原性状態に関連する種を検出および定量化することができるアッセイを作製することが必要である。

【0007】

Chenら、SalehらおよびKimらは、独立して、VII型コラーゲンのNC1またはNC2ドメインに対する自己抗体を検出するためのELISAを開発した[7-9]。これらの方法は、VII型コラーゲン1の組換えNC1および/またはNC2ドメインでマイクロタイタープレートを被覆し、関心対象の血清試料を添加し、抗ヒトIgG抗体を使用して血清試料中に存在する自己抗体を検出することを含む。

【0008】

Reckeらは、VII型コラーゲンのNC1ドメインに対する自己抗体の生成を記述し、後天性表皮水疱症のヒトエクスピボモデルにおいて潜在的病原性を検討した[10]。彼らは、これを診断ツールとして使用することを提案した。

30

【0009】

Sakaiらは、VII型コラーゲンに対するモノクローナル抗体を惹起した[11]。このmAbは無傷のVII型コラーゲンとのみ反応性であった。

【0010】

VII型コラーゲンを標的とするモノクローナルおよびポリクローナル抗体は、いくつかの供給業者から商業的に入手することができる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

40

【0011】

【非特許文献1】Chung, H. J. および J. Uitto. 2010. VII型コラーゲン: 栄養障害型表皮水疱症の原因となる係留線維タンパク質 (Type VII collagen: the anchoring fibril protein at fault in dystrophic epidermolysis bullosa). *Bermosa. Dermatol Clin.* 28: 93-105.

【非特許文献2】Chen, M., G. H. Kim, L. Prakash および D. T. Woodley. 2012. 後天性表皮水疱症: 係留線維コラーゲンに対する自己免疫 (Epidermolysis bullosa acquisita: autoimmunity to anchoring fibril collagen). *Auto*

50

immunity 45:91-101。

【非特許文献3】Hundorfean, G., M. F. NeurathおよびC. Sitaru. 2010。炎症性腸疾患におけるVII型コラーゲンに対する自己免疫(Autoimmunity against type VII collagen in inflammatory bowel disease.)。J. Cell Mol. Med. 14:2393-2403。

【非特許文献4】Gammon, W. R., D. T. Woodley, K. C. DoleおよびR. A. Briggaman. 1985。全身性エリテマトーデスの水疱性発疹における抗基底膜部抗体が後天性表皮水疱症の自己抗原を認識する証拠(Evidence that anti-basement membrane zone antibodies in bullous eruption of systemic lupus erythematosus recognize epidermolysis bullosa acquisita autoantigen.)。J. Invest Dermatol. 84:472-476。

【非特許文献5】Rudnicka, L., J. Varga, A. M. Christiano, R. V. Iozzo, S. A. JimenezおよびJ. Uitto. 1994。全身性硬化症の患者の皮膚におけるVII型コラーゲンの発現上昇。トランスフォーミング増殖因子による調節(Elevated expression of type VII collagen in the skin of patients with systemic sclerosis. Regulation by transforming growth factor-beta.)。J. Clin. Invest 93:1709-1715。

【非特許文献6】Evans, M. J., M. V. Fanucchi, L. A. Miller, M. A. Carlson, S. J. NishioおよびD. M. Hyde. 2010。ハウスダストダニに暴露された乳児アカゲザルの気道基底膜部におけるVII型コラーゲン係留線維の減少(Reduction of collagen VII anchoring fibrils in the airway basement membrane zone of infant rhesus monkeys exposed to house dust mite.)。Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 298:L543-L547。

【非特許文献7】Chen, M., L. S. Chan, X. Cai, E. A. O'Toole, J. C. SampleおよびD. T. Woodley. 1997。後天性表皮水疱症における抗VII型コラーゲン自己抗体の迅速検出のためのELISAの開発(Development of an ELISA for rapid detection of anti-type VII collagen autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita.)。J. Invest Dermatol. 108:68-72。

【非特許文献8】Saleh, M. A., K. Ishii, Y. J. Kim, A. Murakami, N. Ishii, T. Hashimoto, E. Schmidt, D. Zillikens, Y. Shilkata, K. Hashimotoら、2011。後天性表皮水疱症患者の診断および経時変化の分析のためのVII型コラーゲンELISAのNC1およびNC2ドメインの開発(Development of NC1 and NC2 domains of type VII collagen ELISA for the diagnosis and analysis of the time course of epidermolysis bullosa acquisita patients.)。J. Dermatol. Sci 62:169-175。

【非特許文献9】Kim, J. H., Y. H. Kim, S. Kim, E. B. Noh, S. E. Kim, A. Vorobyev, E. Schmidt, D. ZillikensおよびS. C. Kim. 2013。後天性表皮水疱症の患者において酵素結合免疫吸着アッセイによって検出された抗VII型コラーゲン抗体の血清レベルは、皮膚病変の重症度と

10

20

30

40

50

相関する (Serum levels of anti-type VII collagen antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay in patients with epidermolysis bullosa acquisita are correlated with the severity of skin lesions.)。J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol. 27: e224 - e230。

【非特許文献10】Recke, A., C. Sitaru, G. Vidarsson, M. Evensen, M. T. Chiriac, R. J. LudwigおよびD. Zillikens. 2010。VII型コラーゲンに対するIgGサブクラス自己抗体の病原性: 真皮-表皮分離の誘導 (Pathogenicity of IgG subclass autoantibodies to type VII collagen: induction of dermal-epidermal separation.)。J. Autoimmun. 34: 435 - 444。

【非特許文献11】Sakai, L. Y., D. R. Keene, N. P. MorrisおよびR. E. Burgeson. 1986。VII型コラーゲンは係留線維の主要な構成成分である (Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils.)。J. Cell Biol. 103: 1577 - 1586。

#### 【発明の概要】

##### 【0012】

現在、VII型コラーゲン 1のフラグメントが循環中で検出可能であり、VII型コラーゲンに関連する病理学的状態を評価するための潜在的なバイオマーカーとしての役割を果たし得ることが見出されている。具体的には、VII型コラーゲン 1フラグメントと、病理学的状態であるCOPDおよび全身性硬化症との間の関連が同定されている。

##### 【0013】

したがって、第一の態様では、本発明は、N末端またはC末端ネオエピトープを含むVII型コラーゲン 1のフラグメントと反応性の抗体に関し、抗体はN末端またはC末端ネオエピトープに結合する。

##### 【0014】

抗体は、好ましくはモノクローナル抗体であるが、ポリクローナル抗体または所望の生物学的活性を示す抗体フラグメントであってもよい。

##### 【0015】

好ましくは、抗体は無傷のVII型コラーゲン 1を認識しないまたはこれに結合しない。

##### 【0016】

好ましい実施形態では、抗体は、VII型コラーゲン 1の非コラーゲンアミノ末端ドメイン (NC1) に含まれるか、またはVII型コラーゲン 1の中央コラーゲンドメインに含まれるN末端またはC末端ネオエピトープに結合し得る。

##### 【0017】

別の好ましい実施形態では、抗体は、VII型コラーゲン 1の中央コラーゲンドメインに含まれるC末端ネオエピトープに結合し得る。好ましくは、抗体は、アミノ酸配列GPPGPPGR LV - COOH (配列番号1) に含まれるC末端ネオエピトープに結合する。好ましくは、抗体は、アミノ酸配列PPGR LV - COOH (配列番号2) を含むかまたはこれから成るC末端ネオエピトープに結合する。このC末端ネオエピトープは、VII型コラーゲン 1の中央コラーゲンドメイン内のアミノ酸V1709 - D1710の間のVal - Asp結合におけるヒトVII型コラーゲン 1の切断によって形成され得る。好ましくは、抗体は、伸長したアミノ酸配列GPPGPPGR LV X - COOH (配列番号3) を認識せずまたはこれに結合せず、ここで、XはVII型コラーゲン 1の配列の1つ以上のアミノ酸である。

10

20

30

40

50

## 【0018】

別の好ましい実施形態では、抗体は、V I I型コラーゲン 1の非コラーゲンアミノ末端ドメイン(N C 1)に含まれるN末端ネオエピトープに結合し得る。好ましくは、抗体は、アミノ酸配列H<sub>2</sub>N - E A P R V R A Q H R (配列番号4)に含まれるN末端ネオエピトープに結合し得る。好ましくは、抗体は、アミノ酸配列H<sub>2</sub>N - E A P R V R (配列番号5)を含むかまたはこれから成るN末端ネオエピトープに結合する。このN末端ネオエピトープは、V I I型コラーゲン 1の非コラーゲンアミノ酸末端ドメイン内のアミノ酸A 16 - E 17の間のA l a - G l u結合におけるヒトV I I型コラーゲン 1の切断によって形成され得る。好ましくは、抗体は、伸長したアミノ酸配列H<sub>2</sub>N - X E A P R V R A Q H R (配列番号6)を認識せずまたはこれに結合せず、ここで、XはV I I型コラーゲン 1の配列の1つ以上のアミノ酸である。

10

## 【0019】

本明細書に記載する抗体は、N末端またはC末端ネオエピトープアミノ酸配列に対応する合成ペプチドに対して惹起され得る。

## 【0020】

第二の態様では、本発明は、生物学的試料中で、N末端またはC末端ネオエピトープを含むV I I型コラーゲン 1のフラグメントを検出するためのイムノアッセイの方法に関し、方法は、N末端またはC末端ネオエピトープを含むV I I型コラーゲン 1のフラグメントを含む生物学的試料を本明細書に記載する抗体と接触させることと、抗体の結合量を測定することとを含む。

20

## 【0021】

この方法は、生体液中のN末端またはC末端ネオエピトープを含むV I I型コラーゲン 1のフラグメントの量を定量化するために使用し得る。生体液は、血清、血漿、気管支肺胞洗浄液、痰、唾液、呼気または尿であり得るが、これらに限定されない。

## 【0022】

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が、これらに限定されない。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が、これらに限定されない。

## 【0023】

この方法は、方法によって測定されたN末端またはC末端ネオエピトープを含むV I I型コラーゲン 1のフラグメントの量を、既知の疾患重症度の標準的なV I I型コラーゲン関連疾患試料と関連させて、V I I型コラーゲン関連疾患の重症度を評価する工程をさらに含み得る。

30

## 【0024】

このようなV I I型コラーゲン関連疾患は、慢性閉塞性肺疾患(C O P D)または全身性硬化症であり得るが、これらに限定されない。

## 【0025】

本発明の方法は、このようなV I I型コラーゲン関連疾患の定量、診断および/または予後において利用し得ることが想定される。

## 【0026】

第三の態様では、本発明はペプチドに関し、ペプチドは、N末端ネオエピトープを含むV I I型コラーゲン 1のフラグメントのN末端ネオエピトープのアミノ酸配列に対応するN末端アミノ酸配列を有するか、またはC末端ネオエピトープを含むV I I型コラーゲン 1のフラグメントのC末端ネオエピトープのアミノ酸配列に対応するC末端アミノ酸配列を有する。好ましくは、ペプチドは、10アミノ酸残基の長さ、より好ましくは9アミノ酸残基、より好ましくは8アミノ酸残基、より好ましくは7アミノ酸残基、最も好ましくは6アミノ酸残基の長さである。ペプチドはビオチン化されていてもよい。

40

## 【0027】

好ましい実施形態では、ペプチドは、アミノ酸配列E A P R V R A Q H R (配列番号4)またはE A P R V R (配列番号5)を有する。

50

## 【0028】

別の好ましい実施形態では、ペプチドは、アミノ酸配列GPPGPPGRLV（配列番号1）またはPPGRLV（配列番号2）を有する。

## 【0029】

第四の態様では、本発明は、生物学的試料中でN末端またはC末端ネオエピトープを含むVII型コラーゲン 1のフラグメントの量を測定するためのアッセイキットに関し、キットは、本明細書に記載する抗体と、

ストレプトアビジンで被覆された96ウェルプレート

ビオチン残基とペプチドの間に位置する任意選択のリンカーを伴う、N末端またはC末端ネオエピトープのアミノ酸配列に対応するビオチン化ペプチド、

サンドイッチイムノアッセイに使用するためのビオチン化二次抗体

N末端またはC末端ネオエピトープのアミノ酸配列に対応するキャリブレーションペプチド

抗体HPR標識キット

抗体放射性標識キット

アッセイ視覚化キット

の少なくとも1つとを含む。

## 【0030】

好ましくは、アッセイキットは、Lが任意選択のリンカーであるビオチン化ペプチド、ビオチン-L-GPPGPPGRLV（配列番号7）と、C末端配列GPPGPPGRLV-COOH（配列番号1）を含むキャリブレーションペプチドとを含む。

## 【0031】

好ましくは、アッセイキットは、Lが任意選択のリンカーであるビオチン化ペプチド、EAPRVRAQHR-L-ビオチン（配列番号8）と、N末端配列H<sub>2</sub>N-EAPRVRAQHR（配列番号4）を含むキャリブレーションペプチドとを含む。

## 【0032】

定義

用語「抗体」は、最も広い意味で本発明に従って使用され、具体的には、所望の生物学的活性を示す限り、無傷のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および抗体フラグメントを包含する。

## 【0033】

本発明による「抗体フラグメント」は、無傷の抗体の一部、好ましくはその抗原結合領域または可変領域を含む、無傷の抗体の一部を含む。抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、FvおよびFcフラグメントが含まれる。

## 【0034】

本発明による「VII型コラーゲン 1のフラグメント」は、VII型コラーゲンのプロテアーゼ切断によって生成されるペプチドフラグメントを意味する。

## 【0035】

本発明による「N末端またはC末端ネオエピトープ」は、VII型コラーゲン 1のプロテアーゼ切断部位で形成されるN末端またはC末端エピトープを意味する。例えば、VII型コラーゲン 1の以下の配列：

. . . PGPPGPPGRLV DTGPGAREKGE . . .

は、V<sup>1709</sup>-D<sup>1710</sup>ペプチド結合の間の部位でプロテアーゼによって切断された場合、記号「<sup>1709</sup>」で表されるように、N末端ネオエピトープH<sub>2</sub>N-DTGPAREKGE . . . およびC末端ネオエピトープ . . . PGPPGPPGRLV-COOHを生成する。

## 【0036】

本明細書で使用される「C7」は、C末端ネオエピトープGPPGPPGRLV-COOH（配列番号1）を含むVII型コラーゲン 1のフラグメントを指す。

## 【0037】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される「NB677」は、N末端ネオエピトープH<sub>2</sub>N-EAPRVRAQHR（配列番号4）を含むVII型コラーゲン1のフラグメントを指す。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】「C7」アッセイの検量線を示す。

【図2】「C7」とCOPDとの相関を示す。

【図3】「C7」と全身性硬化症との相関を示す。

【図4】「NB677」アッセイの検量線を示す。

【図5】全身性硬化症における血清C7の臨床評価。健常ドナー（n = 70）および全身性硬化症を有する患者のコホート（SSc；n = 119）において血清C7レベルを評価した。データはテューキーの箱ひげ図として提示する。統計的有意性は、マンホイットニー検定によって評価した。\*\*\* p < 0.0001。

10

【発明を実施するための形態】

【0039】

例1 - COPDバイオマーカー（「C7」アッセイ）

理論的根拠

COPDを有する患者、特発性肺線維症（IPF）を有する患者および健常ドナーからの血清試料に関して質量分析を実施した。

【0040】

最初の質量分析は、血清中のVII型コラーゲンに由来するペプチドを同定した。IMAC Cupizeを用いて血清からペプチドを単離した。個々のペプチドについての同一性の有意性閾値は51であった。血清試料は、オービトラップ（OrbiB）装置を用いて分析した。

20

【0041】

C末端ネオエピトープGPPGPPGRLV-COOH（「C7」）（配列番号1）を含むVII型コラーゲン1のフラグメントは、COPD試料中に見出されたが、IPFまたは健常ドナー試料中では認められなかった。ネオエピトープは、ヒトVII型コラーゲンの1709位1710位のアミノ酸Val-Aspの間に位置する切断部位に対応する。この切断に関するプロテアーゼは未だ不明である。この配列をBLASTを用いて分析し、VII型コラーゲン1鎖にユニークであることが判明した。

30

【0042】

抗体

モノクローナル抗体を、C末端ネオエピトープのアミノ酸配列GPPGPPGRLV-COOH（配列番号1）に対して惹起させた。

【0043】

簡単に述べると、フロイントの不完全アジュバントを使用して、4～6週齢のBalb/Cマウスを乳化抗原200μLおよびC7合成ペプチド（KLH-CGG-GPPGPPGRLV、配列番号9）50μgで皮下免疫した。安定な血清力価レベルに達するまで、2週間ごとに免疫を行った。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ヶ月間休息させ、次いで、細胞融合のために脾臓を単離する3日前に、0.9%塩化ナトリウム溶液100μL中のC7ペプチド50μgで静脈内に追加免疫した。マウスの脾臓細胞をSP2/0骨髓腫融合パートナー細胞と融合させた。得られたハイブリドーマ細胞を半固体培地法を用いてクローニングし、さらなる増殖のために96ウェルマイクロタイタープレートに移し、CO<sub>2</sub>インキュベーター中でインキュベートした。モノクローナル増殖を促進するために、標準的な限界希釈法を用いた。

40

【0044】

E L I S A

C7に対して惹起させたモノクローナル抗体を使用した競合ELISAを、以下の手順を用いて実施した。

【0045】

50

ストレプトアビジン被覆プレートをアッセイ緩衝液(50 mM TBS - BTB、2 g / L NaCl、pH 8.0)で希釈した2.5 ng/mLのビオチン標識ペプチド(ビオチン-KKGPPGPPGRLV、配列番号10)100 µL/ウェルで被覆し、20にて、300 rpmで振とうしながら30分間インキュベートした。プレートを洗浄緩衝液(20 mM TRIS、50 mM NaCl、pH 7.2)中で5回洗浄した。試料または標準ペプチド(20 µL)を二重測定において添加し、続いて直ちに、アッセイ緩衝液で希釈した200 ng/mLのHRP標識モノクローナル抗体100 µL/ウェルを添加し、プレートを20にて300 rpmで振とうしながら3時間インキュベートした。標準ペプチドは、125 ng/mLの出発濃度で、11ポイントの検量線を作成するために2倍に希釈した合成ペプチド(GPPGPPGRLV、配列番号1)であった(図1)。インキュベーション後、プレートを洗浄緩衝液中で5回洗浄した。3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(TMB)100 µLを添加し、暗所で20にて15分間インキュベートした。TMBの酵素反応を停止させるために、0.1%硫酸100 mLを添加し、ELISAリーダーを用いて、650 nmを基準として450 nmで吸光度を測定した。検量線は、4パラメトリック数学的適合モデルを用いてプロットした。各ELISAプレートは、アッセイ間変動を観測するためにキット対照および社内品質管理試料の両方を含んだ。すべての試料をアッセイの範囲内で測定した。検出の下限(LLOD)未満のすべての試料にはLLODの値を割り当てた。

10

【0046】

C7 ELISAの技術的特徴は以下のとおりである。

20

【0047】

【表1】

技術的特徴	結果
生物学的マトリックス	ヒト血清(未希釈の測定値)
測定範囲	1.5-105.6ng/mL
健常血清の正常範囲	3.5ng/mL
アッセイ間変動	13%(15%未満であれば許容)
アッセイ内変動	9%(10%未満であれば許容)
希釈回収率	許容(1:8に希釈せず)
スパイク回収率	166%(血清中のペプチド) 131%(血清中の血清)
分析物の安定性	許容(凍結/解凍および保存)

30

40

【0048】

ELISAは、標準ペプチドに対しては反応性が見られたが、伸長ペプチド(GPPGPPGRLVD、配列番号11)には見られなかったもので、切断部位に特異的であることが示され、このアッセイが無傷のVII型コラーゲンタンパク質を認識しないことを指し示した(図1)。

【0049】

臨床的有用性

50

## C O P D

C O P Dを有する68名の患者のコホートでは、健常ドナーと比較してC7の血清レベルが有意に上昇していた(図2)。

## 【0050】

これらの結果は、C O P Dを同定する上でのC7アッセイの有用性を示し、例えば診断または予後予測ツールとして、C O P Dを評価するのに有用であることを実証し得る。

## 【0051】

## 全身性硬化症

初期のびまん性全身性硬化症の20名の患者では、健常対照と比較してC7の血清レベルが有意に上昇していた( $p = 0.022$ ) (図3)。全身性硬化症の初期段階は高い疾患活動性に関連するが、後期段階の患者は緩やかに進行する。初期びまん性疾患の患者群では、中間の進行速度(皮膚厚さの進行速度によって定義される)を有する亜集団が、対照と比較して有意に高いレベルを有していた( $p = 0.016$ )。

10

## 【0052】

後期全身性硬化症と比較した場合の初期段階全身性硬化症におけるC7レベルの上昇は、C7アッセイが全身性硬化症の初期段階と後期段階とを区別することができ、それによって全身性硬化症を評価するための潜在的に有用な診断および/または予後予測ツールを提供し得ることを示唆する。

## 【0053】

## 例2(「NB677」アッセイ)

V I I型コラーゲン1のシグナルペプチドは、アミノ酸116に見出される[12]。シグナルペプチドの切断によって形成されるN末端ネオエピトープ配列(17' . E A P R V R A Q H R ' 26)を、B L A S Tを用いて分析し、V I I型コラーゲン1鎖にユニークであることが判明した。

20

## 【0054】

C O P Dについての「C7」アッセイの成功に続いて、このユニークなV I I型コラーゲン1ネオエピトープは、C O P Dおよび/または全身性硬化症の同定および/または評価にも有用であり得ると考えられる。

## 【0055】

## 抗体

したがって、N末端ネオエピトープのアミノ酸配列 $H_2N - E A P R V R A Q H R$ (配列番号4)に対するモノクローナル抗体を惹起させた。

30

## 【0056】

簡単に述べると、フロイントの不完全アジュバントを使用して、4~6週齢のB a l b / Cマウスを乳化抗原 $200 \mu L$ およびNB677合成ペプチド( $E A P R V R A Q H R - G G C - K L H$ 、配列番号12) $50 \mu g$ で皮下免疫した。安定な血清力価レベルに達するまで、2週間ごとに免疫を行った。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ヶ月間休息させ、次いで、細胞融合のために脾臓を単離する3日前に、0.9%塩化ナトリウム溶液 $100 \mu L$ 中のNB677ペプチド $50 \mu g$ で静脈内に追加免疫した。マウスの脾臓細胞をS P 2 / 0骨髄腫融合パートナー細胞と融合させた。得られたハイブリドーマ細胞を半固体培地法を用いてクローニングし、さらなる増殖のために96ウェルマイクロタイタープレートに移し、 $CO_2$ インキュベーター中でインキュベートした。モノクローナル増殖を促進するために、標準的な限界希釈法を用いた。

40

## 【0057】

## E L I S A

モノクローナル抗体を使用した競合E L I S Aを、以下の手順を用いて実施した。

## 【0058】

ストレプトアビジン被覆プレートを被覆緩衝液( $50 mM$  P B S - B T E、 $8 g / L$  N a C l、10%ソルビトール)で希釈した $2.0 ng / mL$ のビオチン標識ペプチド( $E A P R V R A Q H R - L y s -$ ビオチン、配列番号13) $100 \mu L$ /ウェルで被覆

50

し、20 にて、300 rpmで振とうしながら30分間インキュベートした。プレートを洗浄緩衝液(20 nM TRIS、50 mM NaCl、pH 7.2)中で5回洗浄した。標準ペプチド(20 μL)を二重測定において添加し、続いて直ちに、アッセイ緩衝液(25 mM PBS-BTB、8 g/L NaCl)で希釈した120 ng/mLモノクローナル抗体100 μL/ウェルを添加し、プレートを、4 にて300 rpmで振とうしながら20時間インキュベートした。標準ペプチドは、100 ng/mLの出発濃度で、検量線を作成するために2倍に希釈した合成ペプチド(EAPRVRAQHR、配列番号4)であった(図4)。インキュベーション後、プレートを洗浄緩衝液中で5回洗浄した。100 μL/ウェルの二次HRP標識抗体(ウサギ抗マウスIgG)をアッセイ緩衝液で1:3000に希釈して添加し、プレートを、20 にて300 rpmで振とうしながら1時間インキュベートした。3, 3'、5, 5'-テトラメチルベンジジン(TMB)100 μLを添加し、暗所で20 にて15分間インキュベートした。TMBの酵素反応を停止させるために、0.1%硫酸100 mLを添加し、ELISAリーダーを用いて、650 nmを基準として450 nmで吸光度を測定した。検量線は、4パラメトリック数学的適合モデルを用いてプロットした。VII型コラーゲン 1のN末端ネオエピトープに対するモノクローナル抗体は、標準ペプチドに対する反応性による評価で、所望の配列を認識することが確認された。

10

【0059】

例3

C7 ELISAを、全身性硬化症(SSc)を有する患者の第二のより大きなコホートで評価した。ヒト血清における評価の精度を改善するためにC7 ELISAを(前の例と比較して)再校正した。

20

【0060】

結果：健常ドナー(n=70)における血清レベルをSSc患者(n=119)と比較することによって、C7 ELISAの生物学的関連性を評価した。データを図5に示す。健常ドナー(3.9 ng/mL [IQR 2.3 - 8.3 ng/mL]; p < 0.0001)と比較して、SSc患者(9.3 ng/mL [IQR 6.7 - 13.2])では血清C7レベルの中央値が有意に上昇していた。

【0061】

臨床データは、SScを有する患者において血清C7レベルが上昇することを裏付ける。

30

【0062】

結論として、本明細書に記載の新規アッセイは、VII型コラーゲン 1のN末端またはC末端ネオエピトープに特異的な抗体を利用する。我々が知る限り、VII型コラーゲンがCOPDと関連付けられたのはこれが初めてである。したがって、これらのアッセイは、COPDおよび全身性硬化症を評価するために使用し得ることが想定される。

【0063】

本明細書では、明確に別段の指示がない限り、単語「または」は、条件のうちの1つだけが満たされることを求める演算子「排他的なまたは」とは対照的に、記載された条件のいずれかまたは両方が満たされた場合に真の値を返す演算子の意味で使用される。単語「含む」は、「から成る」を意味するのではなく、「包含する」の意味で使用される。上記で認められたすべての先行教示は、参照により本明細書に組み込まれる。先行して公表された資料の本明細書における承認は、その教示がその時点でオーストラリアまたは他の場所における共通の一般的な知識であったことの承認または表明であるとみなされるべきではない。

40

【0064】

参考文献

[1] Chung, H. J. および J. Uitto. 2010. VII型コラーゲン：栄養障害型表皮水疱症の原因となる係留線維タンパク質(Type VII collagen: the anchoring fibril protein at faul

50

t in dystrophic epidermolysis bullosa. )。 Bermosa. Dermatol Clin. 28: 93 - 105。

[2] Chen, M., G. H. Kim, L. Prakash および D. T. Woodley. 2012。 後天性表皮水疱症：係留線維コラーゲンに対する自己免疫 (Epidermolysis bullosa acquisita: autoimmunity to anchoring fibril collagen. )。 Autoimmunity 45: 91 - 101。

[3] Hundorfean, G., M. F. Neurath および C. Sitaru. 2010。 炎症性腸疾患におけるVII型コラーゲンに対する自己免疫 (Autoimmunity against type VII collagen in inflammatory bowel disease. )。 J. Cell Mol. Med. 14: 2393 - 2403。 10

[4] Gammon, W. R., D. T. Woodley, K. C. Dole および R. A. Briggaman. 1985。 全身性エリテマトーデスの水疱性発疹における基底膜部抗体が後天性表皮水疱症の自己抗原を認識する証拠 (Evidence that anti-basement membrane zone antibodies in bullous eruption of systemic lupus erythematosus recognize epidermolysis bullosa acquisita autoantigen. )。 J. Invest Dermatol. 84: 472 - 476。 20

[5] Rudnicka, L., J. Varga, A. M. Christiano, R. V. Iozzo, S. A. Jimenez および J. Uitto. 1994。 全身性硬化症の患者の皮膚におけるVII型コラーゲンの発現上昇。 トランスフォーミング増殖因子による調節 (Elevated expression of type VII collagen in the skin of patients with systemic sclerosis. Regulation by transforming growth factor-beta. )。 J. Clin. Invest 93: 1709 - 1715。

[6] Evans, M. J., M. V. Fanucchi, L. A. Miller, M. A. Carlson, S. J. Nishio および D. M. Hyde. 2010。 ハウスダストダニに暴露された乳児アカゲザルの気道基底膜部におけるVII型コラーゲン係留線維の減少 (Reduction of collagen VII anchoring fibrils in the airway basement membrane zone of infant rhesus monkeys exposed to house dust mite. )。 Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 298: L543 - L547。 30

[7] Chen, M., L. S. Chan, X. Cai, E. A. O'Toole, J. C. Sample および D. T. Woodley. 1997。 後天性表皮水疱症における抗VII型コラーゲン自己抗体の迅速検出のためのELISAの開発 (Development of an ELISA for rapid detection of anti-type VII collagen autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita. )。 J. Invest Dermatol. 108: 68 - 72。 40

[8] Saleh, M. A., K. Ishii, Y. J. Kim, A. Murakami, N. Ishii, T. Hashimoto, E. Schmidt, D. Zillikens, Y. Shilkata, K. Hashimotoら、2011。 後天性表皮水疱症患者の診断および経時変化の分析のためのVII型コラーゲンELISAのNC1およびNC2ドメインの開発 (Development of NC1 and NC2 domains of type VII collagen ELISA for the diagnosis and analysis of the time cou 50

rse of epidermolysis bullosa acquisita patients.)。J. Dermatol. Sci 62:169-175。

[9] Kim, J. H., Y. H. Kim, S. Kim, E. B. Noh, S. E. Kim, A. Vorobyev, E. Schmidt, D. Zillikens および S. C. Kim. 2013. 後天性表皮水疱症の患者において酵素結合免疫吸着アッセイによって検出された抗VII型コラーゲン抗体の血清レベルは、皮膚病変の重症度と相関する (Serum levels of anti-type VII collagen antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay in patients with epidermolysis bullosa acquisita are correlated with the severity of skin lesions.)。J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol. 27:e224-e230。

[10] Recke, A., C. Sitaru, G. Vidarsson, M. Evensen, M. T. Chiriac, R. J. Ludwig および D. Zillikens. 2010. VII型コラーゲンに対するIgGサブクラス自己抗体の病原性：真皮-表皮分離の誘導 (Pathogenicity of IgG subclass autoantibodies to type VII collagen: induction of dermal-epidermal separation.)。J. Autoimmun. 34:435-444。

[11] Sakai, L. Y., D. R. Keene, N. P. Morris および R. E. Burgeson. 1986. VII型コラーゲンは係留線維の主要な構成成分である (Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils.)。J. Cell Biol. 103:1577-1586。

[12] Uniprot. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q02388>. 2015年にアクセスした。

【配列表フリーテキスト】

【0065】

配列表3

<223> 伸長したC末端ネオエピトープ

<223> XはVII型コラーゲン 1の配列の1つ以上のアミノ酸である

配列表6

<223> XはVII型コラーゲン 1の配列の1つ以上のアミノ酸である

<223> 伸長したN末端ネオエピトープ

配列表7

<223> ビオチン残基とペプチドの間に位置する任意選択のリンカーを伴ってビオチン化

<223> C末端ネオエピトープ - N末端でビオチン化

配列表8

<223> N末端ネオエピトープ - C末端でビオチン化

<223> ビオチン残基とペプチドの間に位置する任意選択のリンカーを伴ってビオチン化

配列表9

<223> CGGリンカーに結合したKLH

<223> 免疫化ペプチド

配列表10

<223> ビオチン化

<223> 被覆物ペプチド

配列表11

<223> 伸長したC末端配列

10

20

30

40

50

配列表 1 2

< 2 2 3 > 免疫化ペプチド

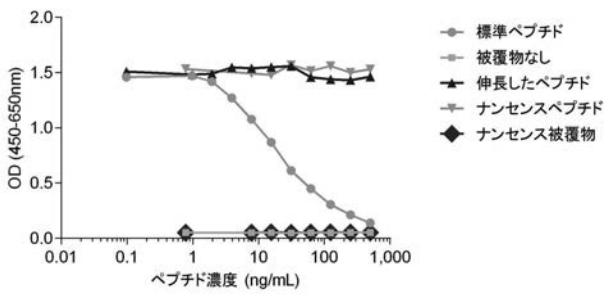
< 2 2 3 > K L H 結合

配列表 1 3

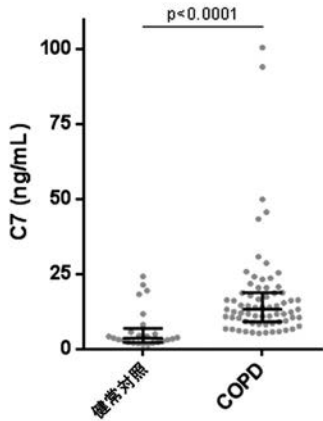
< 2 2 3 > 被覆物ペプチド

< 2 2 3 > ビオチン化

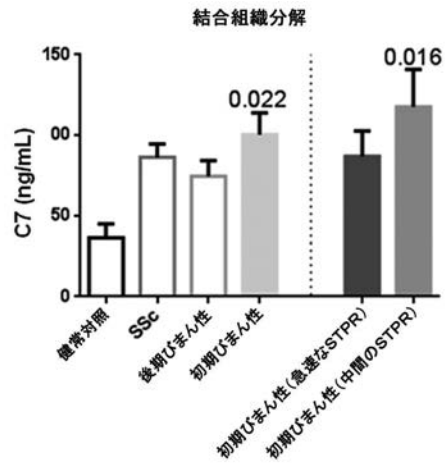
【 図 1 】



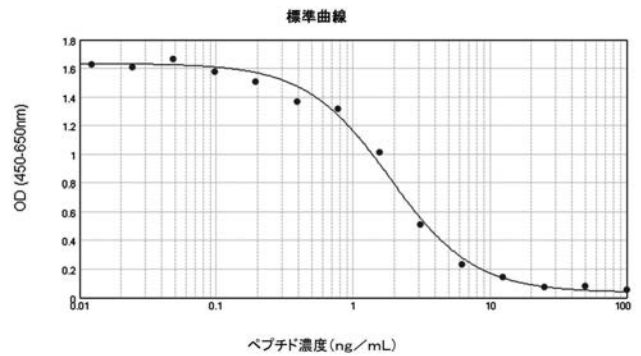
【 図 2 】



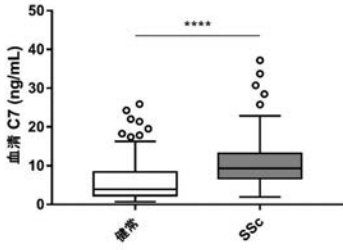
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

2019507731000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2017/051152

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/18 G01N33/574 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 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, 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.
Y	WO 2010/115749 A2 (NORDIC BIOSCIENCE AS [DK]; VEIDAL SANNE S [DK]; KARSDAL MORTEN A [DK];) 14 October 2010 (2010-10-14) claims 1-23; figures 1-8 -----	1-23
Y	EP 2 479 190 A1 (SHIONOGI & CO [JP]) 25 July 2012 (2012-07-25) examples 1-7 ----- -/--	1-23
<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		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
*E* earlier application or patent but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
10 April 2017	19/04/2017	
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  Cilensek, Zoran	

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/051152

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>K. A. ELSAID ET AL: "Association of articular cartilage degradation and loss of boundary-lubricating ability of synovial fluid following injury and inflammatory arthritis",            ARTHRITIS &amp; RHEUMATISM,            vol. 52, no. 6, 1 June 2005 (2005-06-01),            pages 1746-1755, XP055356235,            US            ISSN: 0004-3591, DOI: 10.1002/art.21038            page 1748, right-hand column, paragraph 4            -----</p>	1-23
Y	<p>L. Y. SAKAI: "Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils",            THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY : JCB,            vol. 103, no. 4,            1 October 1986 (1986-10-01), pages            1577-1586, XP055356256,            US            ISSN: 0021-9525, DOI:            10.1083/jcb.103.4.1577            page 1578, left-hand column, paragraphs 3,            4; figures 1-8            -----</p>	1-23
Y	<p>A. RATTENHOLL ET AL: "Proteinases of the Bone Morphogenetic Protein-1 Family Convert Procollagen VII to Mature Anchoring Fibril Collagen",            JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,            vol. 277, no. 29, 1 May 2002 (2002-05-01),            pages 26372-26378, XP055356545,            US            ISSN: 0021-9258, DOI:            10.1074/jbc.M203247200            figures 1-7            -----</p>	1-23

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2017/051152**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 1-23(partially)  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2017/ 051152

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-23(partially)

Claim 1 is directed to an antibody reactive with a fragment of collagen type VII alpha 1 comprising an N- or C-terminal neo-epitope, wherein said antibody binds to the N- or C-terminal neo-epitope.

Claim 17 is directed to a peptide, wherein the peptide has an N-terminal amino acid sequence corresponding to an amino acid sequence of an N-terminal neo-epitope of a fragment of collagen type VII alpha 1 comprising said N-terminal neo-epitope, or wherein the peptide has a C-terminal amino acid sequence corresponding to an amino acid sequence of an C-terminal neo-epitope of a fragment of collagen type VII alpha 1 comprising said C-terminal neo-epitope.

A complete search of said subject-matter is not possible, since the claims are construed to encompass all possible peptides spanning any of the sequences of collagen type VII alpha 1. There is no structural or functional limitation conveyed by the term "neo-epitope", since neo-epitopes may be found at any position, and arise through numerous mechanisms, which include, but are not limited to protein degradation. Furthermore, the term "epitope" has only a meaning in relation the corresponding binding agent, wherein the latter is not defined in the present case.

It is not possible to direct the search to degradation products of collagen type VII alpha 1 (page 7, lines 22-25), and antibodies specifically detecting such products, since degradation may occur at any place in the sequence, thus giving rise to an enormous number of possible sequences. In an extreme case, it could be envisioned that a single amino acid may be one of the results of such degradation, and thus an amino acid - specific antibody may be considered to be covered by the claims.

This authority finds it only possible to carry out a complete search on an antibody binding: 1) the sequence GPPGPPGRLV, more preferably PPGRLV; or 2) the sequence EAPRVRAQHR, more preferably EAPRVR, wherein the antibody does not recognise the uncleaved type VII collagen. The respective immunogens and methods of use were also searched.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/051152

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 2010115749 A2	14-10-2010	CN 103238071 A	07-08-2013		
		DK 2414844 T3	02-03-2015		
		EP 2414844 A2	08-02-2012		
		EP 2770327 A1	27-08-2014		
		ES 2529101 T3	16-02-2015		
		JP 5978128 B2	24-08-2016		
		JP 6095702 B2	15-03-2017		
		JP 2012522233 A	20-09-2012		
		JP 2015108635 A	11-06-2015		
		KR 20110137823 A	23-12-2011		
		US 2010209940 A1	19-08-2010		
		US 2016091502 A1	31-03-2016		
		WO 2010115749 A2	14-10-2010		
		EP 2479190 A1	25-07-2012	CN 102482348 A	30-05-2012
				EP 2479190 A1	25-07-2012
KR 20120064072 A	18-06-2012				
US 2012237948 A1	20-09-2012				
WO 2011034128 A1	24-03-2011				

---

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

(72)発明者 カルスダル、モルテン

デンマーク国、コペンハーゲン オー、エッケルスベリィスゲーゼ 13

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA50 FA72

专利名称(译)	VII型胶原α1测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019507731A</a>	公开(公告)日	2019-03-22
申请号	JP2018537781	申请日	2017-01-20
发明人	サント、ヤニー、マリー、ビューロー レーミング、ダイアナ、ジュリー カルスダル、モルテン		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 C07K7/06 C12N15/06		
CPC分类号	G01N33/574 C07K16/18 G01N33/6887 G01N2800/12 G01N2800/122 G01N2800/285		
FI分类号	C07K16/18.ZNA G01N33/53.D G01N33/53.U C07K7/06 C12N15/06.100		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
优先权	2016001571 2016-01-28 GB		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

一种用于检测生物样品中含有N端或C端新表位的VII型胶原α1片段的免疫测定方法，该方法包括：一种方法，其包括使含有抗体的生物样品与本发明的抗体接触并测量抗体的结合量。

Figure 1

