	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0048156 (43) 공개일자 2014년04월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) G01N 33/573 (2006.01) C07K 16/40 (2006.01)		(71) 출원인 길리아드 바이오로직스, 인크.
(21) 출원번호 10-2013-7034711		미국 94404 캘리포니아 포스터 시티 레이크사이드 드라이브 333
(22) 출원일자(국제) 2012년06월01일 심사청구일자 없음		(72) 발명자 스미스, 빅토리아
(85) 번역문제출일자 2013년12월27일		미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 레이크사이드 드라이브 333 길리아드 사이언시즈, 인크. 내
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/040585		아담케비치, 조앤, 아이.
(87) 국제공개번호 WO 2012/167181 국제공개일자 2012년12월06일		미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 레이크사이드 드라이브 333 길리아드 사이언시즈, 인크. 내
(30) 우선권주장 61/492,210 2011년06월01일 미국(US) (뒷면에 계속)		(74) 대리인 김영, 양영준

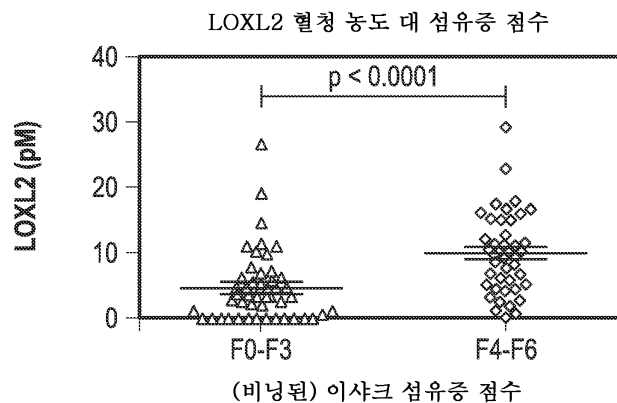
전체 청구항 수 : 총 47 항

(54) 발명의 명칭 리실 옥시다제-유사 2 검정 및 그의 사용 방법

(57) 요약

본 개시내용은 개체에서 순환하는 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2) 폴리펩티드를 검출 및/또는 정량하는 검정법을 제공한다. 본 검정법은 진단 및 예후 적용에서 유용하며, 이 또한 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

리만, 수잔, 케이.

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 레이크사이드 드라이브 333 길리아드 사이언시즈, 인크. 내

치옌, 제이슨

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 레이크사이드 드라이브 333 길리아드 사이언시즈, 인크. 내

리, 시아오밍

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 레이크사이드 드라이브 333 길리아드 사이언시즈, 인크. 내

샤오, 리신

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 레이크사이드 드라이브 333 길리아드 사이언시즈, 인크. 내

본스테인, 제프리, 디.

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 레이크사이드 드라이브 333 길리아드 사이언시즈, 인크. 내

(30) 우선권주장

61/550,895 2011년10월24일 미국(US)

61/578,813 2011년12월21일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

- a) 질환 또는 병증에 대한 치료를 받고 있는 개체로부터 수득된 액체 샘플을 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)에 특이적인 항체와 접촉시키는 단계; 및
- b) 액체 샘플 중에 존재하는 LOXL2와 항체의 결합을 검출하여 액체 샘플 중 LOXL2 수준을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서 검출된 LOXL2 수준은 개체에서 질환 또는 병증의 존재 또는 부재를 나타내거나, 질환 또는 병증의 치료에 대해 개체가 반응할 가능성을 나타내는 것인 방법.

청구항 2

- a) 질환 또는 병증을 앓고 이에 대한 치료를 받고 있는 개체로부터 수득된 액체 샘플을 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)에 특이적인 항체와 접촉시키는 단계; 및
- b) 액체 샘플 중에 존재하는 LOXL2와 항체의 결합을 검출하여 액체 샘플 중 LOXL2를 검출하는 단계를 포함하며, 여기서 검출된 LOXL2 수준은 질환 또는 병증의 결과, 사례, 또는 종점의 가능성을 나타내는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (b)에서 검출된 LOXL2 수준이 개체에서 조기 시점에 측정된 수준보다 낮다면, 이는 치료의 효능이 있음을 나타내는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 조기 시점에 측정된 수준이 치료 이전 수준인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 및 제6항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 액체 샘플이 혈액, 혈액 분획, 뇨, 타액, 객담, 또는 기관지폐포 세척액인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 및 제7항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, LOXL2에 특이적인 항체가 검출가능한 표지를 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 및 제8항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 액체 샘플 중에 존재하는 LOXL2를 불용성 지지체 상에 고정화시키는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 고정화 단계는 액체 샘플을 LOXL2에 특이적인 2차 항체와 접촉시켜 2차 항체-LOXL2 복합체를 형성함으로써 수행하고, 이때 2차 항체는 불용성 지지체 상에 고정화되어 있는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 고정화 단계를 단계 (a) 이전에 수행하는 것인 방법.

청구항 9

- a) 개체로부터 수득된 액체 샘플을 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)에 특이적인 항체와 접촉시키며, 여기서 항체는 LOXL2가 LOXL2의 효소 활성을 억제시키는 작용제에 결합할 때 LOXL2에 결합할 수 있는 것인 단계; 및
- b) 액체 샘플 중에 존재하는 LOXL2와 항체의 결합을 검출하여 액체 샘플 중 LOXL2 수준을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서 검출된 LOXL2 수준은 개체에서 질환 또는 병증의 존재 또는 부재를 나타내거나, 질환 또는

병증의 결과, 사례, 또는 종점의 가능성을 나타내는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 작용제가 LOXL2 효소 활성의 알로스테릭(allosteric) 억제제인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 알로스테릭 억제제가 항-LOXL2 모노클로날 항체인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 항-LOXL2 모노클로날 항체가 LOXL2의 SRCR3-4 도메인 내의 에피토프에 결합하는 것인 방법.

청구항 13

- a) 개체로부터 수득된 액체 샘플을 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)에 특이적인 항체와 접촉시키는 단계;
- b) 액체 샘플 중에 존재하는 LOXL2와 항체의 결합을 검출하여 액체 샘플 중 LOXL2 수준을 검출하는 단계; 및
- c) 상기 검출된 수준을 정상적인 대조군 값과 비교하며, 여기서 검출된 수준이 정상적인 대조군 값보다 높다면, 이는 개체가 질환 또는 병증의 치료에 대해 반응할 가능성이 있음을 나타내는 것인 단계; 및
- d) 개체가 질환 또는 병증의 치료에 대해 반응할 가능성을 측정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 및 제15항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 병증이 섬유성 질환 또는 암인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 질환 또는 병증이 섬유성 질환이고, 순환하는 LOXL2 수준이 정상적인 대조군 수준보다 더 크다면, 이는 개체가 섬유성 질환의 치료에 대해 유익한 임상 반응을 보일 가능성이 있음을 나타내는 것인 방법.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 질환 또는 병증이 폐 섬유증, 간 섬유증, 신장 섬유증, 심장 섬유증, 또는 골수 섬유증, 간경변증, 만성 바이러스 감염, C형 바이러스 감염 (HCV) 또는 B형 바이러스 감염 (HBV)인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 질환 또는 병증이 특발성 폐 섬유증 (IPF)인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 검출된 수준이 개체에서 IPF 질환 결과, 종점, 또는 사례의 가능성을 나타내는 것인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, IPF 질환 결과, 종점, 또는 사례가 IPF 질환 진행, 폐 기능 감소, 호흡기 질환에 의한 입원, 무이식 생존, 사망, 또는 치료에 대한 반응성인 방법.

청구항 20

- a) IPF를 앓는 개체로부터 수득된 액체 샘플을 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)에 특이적인 항체와 접촉시키는 단계; 및
- b) 액체 샘플 중에 존재하는 LOXL2와 항체의 결합을 검출하여 액체 샘플 중 LOXL2 수준을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서 검출된 수준은 IPF 질환 진행, 폐 기능 감소, 호흡기 질환에 의한 입원, 무이식 생존, 사망, 또는 치료에 대한 반응성을 나타내는 것인 방법.

청구항 21

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 노력성 폐활량 (FVC) 예측치(%), 일산화탄소 확산능 (DL_{CO}) 예측치(%), 6분 보행 거리 (6MWD), 평균 폐 동맥압 (mPAP), 최저 휴식기 산소 포화도 (SpO₂), 종합 생리 지수 (CPI), 세인트 조지 호흡기 설문 점수 (SGRQ), 전이 호흡곤란 지수 (TDI) 점수, 치료에 대한 반응성, 및 IPF 질환의 바이오마커로 이루어진 군으로부터 선택되는, IPF 질환 중증도 또는 기능 상태에 대한 척도를 개체에서 검출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 및 제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 예측 모델을 사용하여 LOXL2 수준을 분석하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 23

- a) 질환 또는 병증을 앓는 개체로부터 수득된 액체 샘플을 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)에 특이적인 항체와 접촉시키는 단계;
 - b) 액체 샘플 중에 존재하는 LOXL2와 항체의 결합을 검출하여 액체 샘플 중 LOXL2 수준을 검출하며, 여기서 검출된 수준은 개체에서 질환 또는 병증의 존재 또는 부재를 나타내거나, 질환 또는 병증의 치료에 대해 개체가 반응할 가능성을 나타내는 것인 단계; 및
 - c) 액체 샘플 중에서 검출된 LOXL2 수준에 기초하여 개체에서 질환 또는 병증에 대한 치료를 변경 또는 중단하는 단계
- 를 포함하는 방법.

청구항 24

- a) 질환 또는 병증을 앓는 개체로부터 수득된 액체 샘플을 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)에 특이적인 항체와 접촉시키는 단계;
 - b) 액체 샘플 중에 존재하는 LOXL2와 항체의 결합을 검출하여 액체 샘플 중 LOXL2 수준을 검출하는 단계; 및
 - c) 개체가 하나 이상의 추가 진단 검사를 받게 하는 단계
- 를 포함하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 하나 이상의 추가 진단 검사가 폐 기능 검사 또는 간 기능 검사인 방법.

청구항 26

- a) 개체로부터 수득된 액체 샘플을 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)에 특이적인 항체와 접촉시키는 단계; 및
 - b) 액체 샘플 중에 존재하는 LOXL2와 항체의 결합을 검출하여 액체 샘플 중 LOXL2 수준을 검출하는 단계
- 를 포함하며, 여기서 검출된 수준은 개체가 활동성인 섬유성 질환 또는 진행 단계의 섬유성 질환을 앓는다는 것을 나타내는 것인 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 활동성인 섬유성 질환이 METAVIR F1 또는 F2 간 섬유증이거나, 진행 단계의 섬유성 질환이 METAVIR F4 간 섬유증인 방법.

청구항 28

개체로부터 수득된 액체 생물학적 샘플 중 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2) 폴리펩티드의 수준을 측정하는 데 사용하기 위한 검정용 장치로서,
장치는 측유로의 경계를 짓는 매트릭스를 포함하고, 매트릭스는

- i) 유체 샘플을 받으며 유로의 상류 단부에 있는 샘플 수납 영역;
- ii) 유로 내에 배치되어 있으며 샘플 수납 영역으로부터 하류 쪽에 있는 하나 이상의 시험 영역으로서, 이들 각각이 LOXL2-특이적 항체를 포함하고 LOXL2-특이적 항체는 액체 샘플 중에 존재하는 LOXL2 폴리펩티드에 결합하여 항-LOXL2 항체/LOXL2 복합체를 형성할 수 있는 것인 하나 이상의 시험 영역; 및
- iii) 유로 내에 배치되어 있으며 샘플 수납 영역으로부터 하류 쪽에 있는 하나 이상의 대조군 영역을 포함하는 것인

검정용 장치.

청구항 29

제28항에 있어서, 하나 이상의 시험 영역이 둘 이상의 시험 영역을 포함하고, 하나 이상의 대조군 영역 중 하나 이상이 두 시험 영역 사이에 배치되어 있는 것인 검정용 장치.

청구항 30

제29항에 있어서, 둘 이상의 시험 영역 및 하나 이상의 대조군 영역이 임의의 대조군 영역의 상류 쪽에 배치된 시험 영역을 시작으로 유로 내에서 교대 포맷으로 배치되어 있는 것인 검정용 장치.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 상기 하나 이상의 시험 영역 중 하나 이상에서의 항-LOXL2 항체가 시험 영역에서의 매트릭스 상에 고정화되어 있는 것인 검정용 장치.

청구항 32

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서,

LOXL2-특이적 항체에 특이적인 표지된 항체를 포함하는 표지 영역을 추가로 포함하며, 여기서 표지된 항체는 항-LOXL2 항체/LOXL2 복합체에 존재하는 항-LOXL2 항체에 결합하여 표지된 항-LOXL2 항체/LOXL2를 형성할 수 있고, 액체 샘플 존재하에 이동가능한 것인 검정용 장치.

청구항 33

제32항에 있어서, 표지된 항체가 화학발광 작용제, 미립자 표지, 비색측정용 작용제, 에너지 전달제, 효소, 형광 작용제, 및 방사성 동위원소로 이루어진 군으로부터 선택된 표지 성분을 포함하는 것인 검정용 장치.

청구항 34

제28항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 매트릭스가 지지체 및 임의로 커버를 포함하는 하우징 내에 배치되어 있으며, 여기서 하우징은 적용 개구 및 하나 이상의 관찰구를 함유하는 것인 검정용 장치.

청구항 35

제29항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 테트스 스트립인 검정용 장치.

청구항 36

제29항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 딥스틱(dipstick) 검정용 장치인 검정용 장치.

청구항 37

- a) LOXL2에 특이적인 1차 항체; 및
- b) LOXL2에 특이적인 2차 항체

를 포함하는, 개체로부터 수득된 생물학적 샘플 중 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2) 폴리펩티드의 수준을 측정하기 위한 키트.

청구항 38

제37항에 있어서, 표준 곡선 작성에 사용하기 위한 정제된 LOXL2를 추가로 포함하는 키트.

청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, 상기 항체 중 하나 이상이 검출가능한 표지를 포함하는 것인 키트.

청구항 40

제39항에 있어서, 검출가능한 표지가 화학발광 작용제, 미립자 표지, 비색측정용 작용제, 에너지 전달제, 효소, 형광 작용제, 및 방사성 동위원소를 포함하는 것인 키트.

청구항 41

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 접촉 및 검출 단계를 제28항 내지 제36항 중 어느 한 항의 검정용 장치 또는 제37항 내지 제40항 중 어느 한 항의 키트를 사용하여 수행하는 것인 방법.

청구항 42

제1항 내지 제27항 및 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 검출된 LOXL2 수준이 약 700 pg/mL 초과인 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 검출된 LOXL2 수준이 약 800 pg/mL 초과인 방법.

청구항 44

제1항 내지 제27항 및 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 검출된 LOXL2 수준이 약 750 pg/mL 초과인 방법.

청구항 45

제1항 내지 제27항 및 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 검출된 LOXL2 수준이 LOXL2의 역치 수준보다 더 큰지 여부를 측정하여 개체에서 질환 결과, 종점, 또는 사례의 가능성을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 역치량이 약 700, 750, 또는 800 pg/mL인 방법.

청구항 47

제1항 내지 제16항 및 제22항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 병증이 원발성 담즙성 간경변증 (PBC) 또는 원발성 경화성 담관염 (PSC)인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2011년 6월 1일 출원된 미국 가출원 번호 제61/492,210호, 2011년 10월 24일 출원된 미국 가출원 번호 제61/550,895호, 및 2011년 12월 21일 출원된 미국 가출원 번호 제61/578,813호의 이점을 주장하고, 이들 가출원은 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함된다.

[0003] EFS-WEB를 통해 제출된 서열 목록에 대한 참조

[0004] MPEP § 1730 II.B.2(a)(C)에서 공인되고 그에 기술되어 있는, USPTO EFS-WEB 서버를 통해 전자 제출된 하기 서열 목록의 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함된다. 서열 목록은 하기 전자 출원된 텍스트 파일로 확인된다:

[0005]

파일명	작성일	크기(바이트)
246102008340Seqlist.txt	2012년 6월 1일	25,654 바이트

배경기술

[0006] 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)는 세포의 기질 단백질이다. 건강한 성인의 조직에서는 세포의 LOXL2이 거의 관찰되지 않지만, 다양한 섬유성 질환 및 종양에서는 그의 발현이 유도된다. 이는 활성화된 섬유모세포, 질환 관련 평활근 세포, 내피 세포, 및 상피에 의해 분비된다.

발명의 내용

[0007] 개요

[0008] 본 개시내용은 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2), 예컨대 LOXL2 폴리펩티드의 검출, 및 진단, 예후, 및 예측 방법에서의 그의 용도에 관한 것이다. 예를 들어, LOXL2를 검출 및/또는 정량하는 검정법, 예컨대 개체에서 순환하는 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2) 폴리펩티드를 검출 및/또는 정량하는 검정법을 제공한다. 또한, 진단, 예후, 및 예측 적용에서의 방법 및 용도, 예컨대 그러한 적용에서의 검정법 및 상기에서 사용하기 위한 검정용 장치 키트를 제공한다.

[0009] 개체에서 LOXL2, 전형적으로 순환하는 LOXL2를 검출하는 방법을 제공한다. 제공된 방법 중에서도 검출, 진단, 예측, 모니터링, 및 예후 방법을 제공한다. 일부 예에서, 본 방법은 개체로부터 수득된 샘플, 일반적으로 액체 샘플을 LOXL2에 특이적인 항체와 접촉시키고, 샘플 중에 존재하는 폴리펩티드, 예컨대 LOXL2 폴리펩티드에 대한 항체의 결합을 검출함으로써 수행된다. 일부 예에서, 본 검정법을 통해 액체 샘플 중 300, 250, 200, 175 pg/mL 이하까지의 LOXL2가 검출되거나, 또는 낮게는 300, 250, 200, 175 pg/mL까지, 예를 들어 낮게는 약 150 pg/mL 내지 약 175 pg/mL, 약 125 pg/mL 내지 약 150 pg/mL, 약 100 pg/mL 내지 약 125 pg/mL, 약 75 pg/mL 내지 약 100 pg/mL, 약 50 pg/mL 내지 약 75 pg/mL, or 약 40 pg/mL 내지 약 50 pg/mL 정도의 농도로 까지 샘플 중 LOXL2가 검출된다.

[0010] 일부 예에서, 검출된 LOXL2 수준이 질환 또는 병증의 존재 또는 부재를 시사한다. 일부 예에서, 이는 개체가 그 질환을 위한 특정 치료에 대해 반응할 가능성을 나타내거나, 치료의 효능을 시사할 것이다. 일부 예에서, 예컨대 방법이 예후 방법일 경우, LOXL2의 검출된 수준은 질환 또는 병증의 결과, 사례, 또는 종점의 가능성을 시사한다. 일부 측면에서, 질환 또는 병증은 순환하는 LOXL2, 또는 순환하는 LOXL2 상승을 특징으로 하거나, 그와 관련이 있다. 일부 측면에서, 개체는 질환 또는 병증을 앓는 개체이다; 일부 측면에서, 개체는 질환 또는 병증을 앓을 것으로 의심되는 개체이다. 일부 측면에서, 본 방법은 개체가 질환 또는 병증을 앓는지 여부, 특정 치료에 대하여 반응할 가능성이 있는지 여부, 또는 특정 결과 또는 사례를 보일 가능성이 있는지 여부를 측정하는 단계, 또는 치료가 효과가 있는지 여부를 측정하는 단계를 포함한다.

[0011] 일부 예에서, 개체는 질환 또는 병증에 대한 치료를 받고 있는 중인 개체이고, 검출된 LOXL2 수준이 조기 시점, 예컨대 치료 이전 수준에 측정된 수준보다 낮다면, 이는 치료가 효능이 있음을 나타내는 것이다.

[0012] 샘플은 전형적으로 액체 샘플, 예컨대 혈액, 혈액 분획, 예컨대 혈청 또는 혈장, 뇨, 타액, 객담, 또는 기관지 폐포 세척액이다.

[0013] 일부 예에서, 항체는 검출가능한 표지를 포함하고; 예시적인 표지로는 화학발광 작용제, 미립자 표지, 비색측정용 작용제, 에너지 전달제, 효소, 형광 작용제, 및 방사성 동위원소를 포함한다. 일부 예에서, 액체 샘플을 LOXL2에 특이적인 2차 항체와 접촉시켜 2차 항체-LOXL2 복합체를 형성함으로써 샘플 중에 존재하는 LOXL2를 불용성 지지체 상에 고정화시킨다. 일례에서, 2차 항체를 불용성 지지체 상에 고정화시킨다. 또 다른 일례에서, 샘플을 항체와 접촉시키기 전에 2차 항체-LOXL2 복합체를 형성한다. 고정화된 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날일 수 있다. 일부 예에서, LOXL2가 LOXL2의 효소 활성을 억제시키는 작용제, 예컨대 LOXL2 효소 활성의 알로스테릭(allosteric) 억제제, 예컨대 SRCR3-4 도메인 내의 에피토프에 결합하는 것과 같은 항-LOXL2 모노클로날 항체에 결합할 경우에, 항체는 LOXL2에 결합한다.

[0014] 제공된 방법 및 실시양태와 함께 사용하기 위한 항-LOXL2 항체에 대한 예로는 예를 들어, AB0023, AB0024, 서열 번호 6, 8, 10, 11, 또는 12에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 6, 8, 10, 11, 또는 12와 75% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상 상동성인 아미노산 서열, 또는 서열 번호 6, 8, 10, 11, 또는 12에 기재된 가변 영역 서열의 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 가지고/거나, 서열 번호 7, 9, 13, 또는 14에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 7과 75% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상 상동성인 아미노산 서열, 또는 서열 번호 7, 9, 13, 또는 14에 기재된 가변 영역 서열의 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 예컨대 서열 번호 8에 기재된 가변 영역 서열의 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3, 또는 상기 가변 영역 서열의 전체 서열을 갖는 중쇄 및 서열 번호 9에 기재된 가변 영역 서열의 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3, 또는 상기 가변 영역 서열의 전체

서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 포함한다.

- [0015] 일부 예에서, 본 방법은 검출된 수준을 정상적인 대조군 값과 비교하며, 여기서 검출된 수준이 정상적인 대조군 값보다 높다면, 이는 질환 또는 병증의 존재, 개체가 질환 또는 병증에 대한 치료에 대하여 반응할 가능성, 또는 병리학적 결과의 가능성을 나타내는 것인 단계를 추가로 포함한다. 예를 들어, 일부 예에서, 본 방법은 순환하는 LOXL2의 병리학적 수준을 검출한다. 상기 방법은 검출된 수준을 정상적인 대조군 값 또는 다른 참조 값과 비교하여, 여기서 검출된 수준이 정상적인 대조군 값 또는 참조 값보다 높다면, 이는 병리를 나타내는 것인 단계를 포함할 수 있다.
- [0016] 또한, 개체가 순환하는 리실 옥시다제 유사-2 (LOXL2) 상승을 특징으로 하거나, 그와 관련된 질환 또는 병증을 앓고 있는지 여부를 측정하거나, 상기 질환 또는 병증을 진단하거나, 또는 상기 질환 또는 병증과 관련된 예측 또는 예후를 측정하는 방법을 제공한다. 예에서, 상기 방법은 예를 들어, 본원에서 제공된 검정법 및 방법에 따라, 예컨대 상기 기술된 것에 따라 개체로부터 유래된 샘플, 예컨대 액체 샘플 중의 LOXL2의 수준을 검출함으로써 수행된다. 전형적으로, LOXL2의 수준이 정상적인 대조군 수준, 참조 수준보다 더 크거나, 또는 일부 경우에서, 기준선보다 더 크다면, 이는 개체가 순환하는 LOXL2 상승을 특징으로 하는 질환을 앓고 있음을 나타내거나, 또는 질환 또는 병증에 대한 예후 또는 예측 정보를 나타내거나, 예컨대 특정 결과의 가능성, 또는 개체가 특정 질환 치료에 대하여 반응할 가능성을 예측하는 것이다.
- [0017] 제공된 방법 중 일부 측면에서, 질환 또는 병증은 섬유증 또는 암 또는 그와 관련된 질환이다. 그 예로는 폐 섬유증 (예컨대, 특발성 폐 섬유증 (IPF)), 간 섬유증, 신장 섬유증, 심장 섬유증, 골수섬유증, 간경변증, 만성 바이러스 간염, C형 바이러스 간염 (HCV) 및 B형 바이러스 간염 (HBV)을 포함한다. 일부 측면에서, 질환 또는 병증은 특발성 폐 섬유증 (IPF)이다.
- [0018] 본 방법은 개체가 하나 이상의 추가 진단 검사를 받게 하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 상기 추가 진단 검사는 폐 기능 검사, 심장 기능 검사, 및 간 기능 검사를 포함할 수 있다.
- [0019] 또한, 섬유성 질환을 앓는 개체가 섬유성 질환에 대한 치료에 대하여 유익한 임상 반응을 보일 가능성을 측정하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 예컨대, 상기 기술된 방법에 의해 예를 들어, 개체로부터 취득된 액체 샘플 중의 순환하는 리실 옥시다제 유사-2 (LOXL2)의 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 한 측면에서, 순환하는 LOXL2 수준이 정상적인 대조군 수준보다 더 크다면, 이는 개체가 섬유성 질환에 대한 치료에 대하여 유익한 임상 반응을 보일 가능성이 증가되어 있음을 나타내는 것이다. 일부 예에서, 측정된 가능성에 기초하여 기록을 작성된다. 일부 예에서, 본 방법은 섬유성 질환에 대하여 개체를 치료하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 예에서, 개체는 활동성인 섬유성 질환, 예컨대 METAVIR F1 또는 F2 간 섬유증, 및/또는 진행 단계의 섬유성 질환, 예컨대 METAVIR F4 간 섬유증을 앓는 개체이다.
- [0020] 또한, 개체에서 리실 옥시다제 유사-2 (LOXL2) 상승을 특징을 하는 질환에 대한 치료의 효능을 측정하는 방법을 제공한다. 일부 예에서, 상기 방법은 상기 및 본원에 기술된 검출 방법에 따라, 상기 질환에 대한 치료를 받고 있는 개체에서의 순환하는 LOXL2 수준을 일정 시점에 측정함으로써 수행된다. 전형적으로, 샘플 중의 순환하는 LOXL2의 수준이 초기 시점, 예컨대 치료 이전 수준에 샘플로부터 취득된 수준보다 더 낮다면, 이는 치료가 효능이 있음을 나타내는 것이다. 별법으로, 샘플 중의 순환하는 LOXL2의 수준은 처음에는 증가한 후, 이후 체내에서 제거될 수 있다.
- [0021] 또한, 제공된 방법 중에서 특발성 폐 섬유증 (IPF)을 예측 및 예후하는 방법을 제공한다. 일부 예에서, 상기 방법은 개체로부터 샘플을 취득하고; 예컨대, 본원에 기술된 방법을 사용하여 샘플 중 LOXL2의 수준을 검출함으로써 수행된다. 일반적으로, LOXL2의 수준이 개체에서의 IPF 질환 결과 또는 사례의 가능성을 시사한다.
- [0022] 상기의 제공된 방법들 및 다른 방법들은 또한 검출된 LOXL2 수준을 정상적인 대조군의 LOXL2 수준과 비교하고, 여기서 정상적인 대조군 수준에 비하여 LOXL2 수준이 상승되어 있다면, 이는 개체에서 IPF 질환 결과 또는 사례의 발생 가능성이 증가되어 있음을 나타내는 것인 단계를 포함할 수 있다. 제공된 방법의 일부 실시양태에서, 역치 기준선 수준보다 높은 LOXL2 수준은 대상체에서 음의 결과 또는 사망과 상관관계가 있다. 일례에서, 샘플 중 역치 LOXL2 수준은 800 피코그램 (pg)/밀리리터 (mL) 이상, 600 pg/mL 이상, 400 pg/mL 이상, 또는 200 pg/mL 이상이다. 또 다른 일례에서, 샘플 중 역치 LOXL2 수준은 440 pg/mL 이상이다. 일례에서, 본 방법은 LOXL2 수준이 정상적인 대조군 LOXL2 수준 또는 기준선인 대상체와 비교하여 IPF 질환 결과 가능성이 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 또는 7배 이상 증가되어 있는 것을 시사한다.
- [0023] IPF 질환 결과 및 사례 중에는 IPF 질환 진행 (예컨대, 임의 원인에 의한 사망, 호흡기 질환에 의한 입원, 또는

카테고리별 폐 기능 감소로 정의되는 것), 폐 기능 감소, 호흡기 질환에 의한 입원, 무이식 생존, 사망, 및 치료에 대한 반응성이 있다. 일부 경우에서, 본 방법을 통해 개체에서의 IPF와 관련된 결과, 사례, 또는 중점, 또는 그의 가능성을 예측할 수 있다. 일부 경우에서, 본 방법을 통해 또 다른 방법 또는 검정법에 의해, 예컨대 개인별 임상 및 분자 사망가능 지수(PCMI: Personal Clinical and Molecular Mortality index), 또는 하나 이상의 다른 바이오마커, 예컨대 MMP7, ICAM1, IL8, VCAM1, 및 S100A12의 수준에 기초하여 해당 결과, 중점, 또는 기능성에 대하여 (또는 상기 다른 방법 또는 검정법에 결과, 사례, 중점, 또는 그의 가능성을 검출하지 못하거나, 검출할 수 없는 것에 대하여) "음성"인 것으로 간주되는 개체에서 결과, 중점, 또는 그의 가능성을 예측할 수 있다.

[0024] 예측 또는 예후 IPF 방법은 노력성 폐활량 (FVC) 예측치(%), 일산화탄소 확산능 (DL_{CO}) 예측치(%), 6분 보행 거리 (6MWD), 평균 폐 동맥압 (mPAP), 최저 휴식기 산소 포화도 (SpO₂), 종합 생리 지수 (CPI), 세인트 조지 호흡기 설문 점수 (SGRQ: St. George's Respiratory Questionnaire), 및 전이 호흡곤란 지수 (TDI) 점수, 치료에 대한 반응성, 및 IPF 질환의 바이오마커로 이루어진 군으로부터 선택되는, 개체에서의 IPF 질환 중증도 또는 기능 상태에 대한 척도를 검출하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 일부 예에서, 본 방법은 예측 모델을 사용하여 LOXL2 수준 및/또는 질환 중증도 또는 기능 상태에 대한 척도를 분석하는 것을 추가로 포함한다.

[0025] IPF 치료에 대한 개체의 반응을 모니터링하거나, 또는 개체가 치료에 대하여 반응할 가능성을 측정하는 방법 또한 제공한다. 일례에서, 상기 방법은 IPF에 대한 치료를 받고 있는 개체로부터 샘플을 수득하고; 샘플 중의 LOXL2 수준을 검출함으로써 수행된다. 전형적으로, LOXL2 수준이 치료에 대한 개체의 반응, 또는 개체가 치료에 대하여 반응할 가능성을 시사한다.

[0026] 일부 경우에서, 본 방법은 개체에서 IPF 치료를 개시, 변경, 또는 중단하는 것을 추가로 포함한다. 일부 예에서, 치료는 본 방법에 의해 측정된 정보, 예컨대 LOXL2 수준 또는 상대적 수준, 예후 또는 예측 정보에 기초하여 개시, 변경, 또는 중단된다. 일부 예에서, 치료는 LOXL2 수준 측정 이전에 개시된다.

[0027] 제공된 방법에서 사용하기 위한, 예컨대 개체로부터 수득된 액체 생물학적 샘플 중 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2) 폴리펩티드의 수준을 측정하는 데 사용하기 위한 검정용 장치 및 키트 또한 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 장치는 측유로의 경계를 짓는 매트릭스를 포함하며, 상기 매트릭스는 i) 유체 샘플을 받으며 유로의 상류 단부에 있는 샘플 수납 영역; ii) 유로 내에 배치되어 있으며 샘플 수납 영역으로부터 하류 쪽에 있는 하나 이상의 시험 영역으로서, 이들 각각이 LOXL2-특이적 항체를 포함하고, 여기서 각각의 LOXL2-특이적 항체는 액체 샘플 중에 존재하는 LOXL2 폴리펩티드에 결합하여 항-LOXL2 항체/LOXL2 복합체를 형성할 수 있는 것인 하나 이상의 시험 영역; 및 iii) 유로 내에 배치되어 있으며 샘플 수납 영역으로부터 하류 쪽에 있는 하나 이상의 대조군 영역을 포함한다.

[0028] 하나 이상의 대조군 영역은 2개의 시험 영역이 존재할 때, 이 시험 영역들 사이에 배치될 수 있다. 시험 영역 및 대조군 영역은 임의의 대조군 영역의 상류 쪽에 배치된 시험 영역을 시작으로 유로 내에서 교대 포맷으로 배치되어 있을 수 있다. 일례에서, 하나 이상의 항-LOXL2 항체가 시험 영역 중 매트릭스에 고정화되어 있다.

[0029] 일부 예에서, 장치는 LOXL2-특이적 항체에 특이적인 표지된 항체를 포함하는 표지 영역을 포함한다. 일반적으로, 표지된 항체는 항-LOXL2 항체/LOXL2 복합체 중에 존재하는 항-LOXL2 항체와 결합하여 표지된 항-LOXL2 항체/LOXL2를 형성할 수 있고, 여기서 표지된 항체는 액체 샘플 존재하에 이동가능하다. 표지된 항체는 화학발광 작용제, 미립자 표지, 비색측정용 작용제, 에너지 전달제, 효소, 형광 작용제, 및 방사성 동위원소 중에서 선택되는 표지 성분을 포함할 수 있다.

[0030] 장치의 일부 예에서, 매트릭스는 지지체 및 임의로 커버를 포함하는 하우징 내에 배치되어 있으며, 여기서 하우징은 적용 개구 및 하나 이상의 관찰구를 포함한다. 제공된 장치 중에는 테스트 스트립 및 딥스틱(dipstick) 검정용 장치가 있다.

[0031] 개체로부터 수득된 생물학적 샘플 중 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2) 폴리펩티드의 수준을 측정하기 위한 것으로 제공된 키트 중에는 LOXL2에 특이적인 1차 항체 및 LOXL2에 특이적인 2차 항체를 포함하는 것이 있다. 키트는 또한 표준 곡선 작성에 사용하기 위한, 정제된 LOXL2를 추가로 포함할 수 있다. 일례에서, 키트 중의 항체 중 하나 이상은 검출가능한 표지, 예컨대 화학발광 작용제, 미립자 표지, 비색측정용 작용제, 에너지 전달제, 효소, 형광 작용제, 및 방사성 동위원소를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0032]

도 1은 87명의 만성 C형 바이러스 감염 (HCV) 감염 환자에 대한 LOXL2 혈청 농도 대 이샤크(Ishak) 섬유증 점수를 도시한 것이다.

도 2는 간 섬유증 진단을 받은 환자로부터 수득된 혈청 샘플 중의 LOXL2 수준 (pg/ml)을 도시한 것이다.

도 3은 특발성 폐 섬유증 환자로부터 수득된 혈청 샘플 중의 LOXL2 수준을 도시한 것이다.

도 4는 인간 LOXL2의 아미노산 서열 (서열 번호 1)을 제공하는 것이다.

도 5는 인간 (H) (서열 번호 2), 마우스 (M) (서열 번호 3), 래트 (R) (서열 번호 4) 및 시노몰구스 원숭이 (C) (서열 번호 5)로부터의 LOXL2 단백질의 촉매 도메인의 아미노산 서열 정렬을 보여주는 것이다. 인간 단백질의 것과 상이한, 마우스, 래트 및 시노몰구스 원숭이 단백질 중의 잔기는 밑줄로 표시되어 있다.

도 6은 만성 HCV 감염 환자로부터 수득된 간 조직의 면역조직화학적 (IHC) 염색에 의해 측정된, 인간 섬유성 간 조직에서의 LOXL2 발현을 보여주는 것이다. 좌측 패널 (5x 대물 렌즈 배율)에서, 검은색 화살표는 문맥 영역 및 문맥관으로의 섬유 확장 부위를 가리키는 것이다. 흰색 화살표는 간 소엽 주변의 짧은 섬유 격막 부위를 가리키는 것이다. 우측 패널 (40x 대물 렌즈 배율)은 간세포 (H)와의 계면에서, 동모양 혈관주위 공간내 (화살표 표시), 및 간 실질내 근섬유모세포에서의 섬유 격막 (S) 관찰되는 LOXL2 면역반응성을 보여주는 것이다.

도 7은 LOXL2 면역검정법에 대한 표준 교정계 곡선을 보여주는 것으로서, 여기서 y축에는 원시 ECL (전기화학발광) 계수가 플롯팅되어 있고, x축에는 LOXL2 농도 (nM/L)가 플롯팅되어 있다. 정제된 재조합 전장의 LOXL2 단백질을 플롯팅된 정상적인 인간 혈청으로 첨가한 후, 혈청 중에서 일련으로 희석시켜 교정계 곡선을 작성하였다. 각각의 데이터 점은 3개의 복제 웰의 평균값을 나타내고; 4개의 독립 플레이트에 대한 곡선이 제시되어 있다.

도 8은 비닝된 기준선 이샤크 섬유증 점수 및 시간에 의한 LOXL2 혈청 수준을 보여주는 것이다. 각 패널에는 명시된 시점에 대한, 이샤크 섬유증 점수 (각각 1-3 및 5-6)에 따라 분류된 2개의 환자군의 LOXL2 농도 (pg/mL)가 제시되어 있다. 플롯 범위 밖의 LOXL2 농도인 3개의 가외치 (LOXL2 농도 = 5,529, 6,621, 8,845 pg/mL)는 모두 이샤크 섬유증 점수가 5인 동일 대상체로부터의 것이었다.

도 9는 4주째부터 30주째까지에 걸쳐 LOXL2 혈청 농도 중앙값으로 계산된, 이샤크 섬유증 점수 (각각 1-3 및 5-6)에 따라 분류된 2개의 환자군에 대한 대상체내 LOXL2 혈청 수준 중앙값을 보여주는 것이다. 평균 대상체내 변동 계수는 22%였다.

도 10은 비닝된 기준선 이샤크 섬유증 점수에 의해 시간 (주) 경과에 따른 LOXL2 혈청 농도 중앙값 (pg/mL) (95% 신뢰 구간)을 보여주는 것이다. 25주째부터 28주째까지에 걸쳐 연구 생검들 사이에서 오직 단 1명의 대상체만이 이샤크 섬유증 점수에서 2 이상의 변화를 가졌다.

도 11은 명시된 이샤크 점수 (1-6)를 갖는 대상체에 대한 대상체내 LOXL2 수준 중앙값 대 히알루론산 (HA) (좌측 패널) 및 메탈로프로테이나제-1의 조직 억제제 (TIMP1) (우측 패널) 수준을 보여주는 것이다. 대상체내 발현 중앙값은 4주째부터 30주째까지에 걸친 발현 중앙값으로서 계산되었다. 국지 가중 산점도 평활법을 사용하여 곡선을 작성하였다.

도 12는 실시예 9에 기술된 바와 같이, 기준선 LOXL2 수준 (여기서, 패널 (a)의 것은 비변환된 LOXL2 수준이고, 패널 (b)의 것은 로그₁₀X 변환된 LOXL2 수준이다)과 특발성 폐 섬유증 (IPF) 중증도 및 기능 상태에 대한 기준선 척도 사이의 상관관계를 입증하는 산점도 매트릭스를 보여주는 것이다. 각 패널에서, 제1행 제1열은 x축 및 y축은 각각 기준선 LOXL2 수준을 나타내고; 제2행 제2열의 x축 및 y축은 각각 기준선 노력성 폐활량 (FVC) 예측치를 나타내고; 제3행 제3열의 x축 및 y축은 각각 일산화탄소 확산능 (DL_{CO}) 예측치를 나타내고; 제4행 제4열의 x축 및 y축은 각각 기준선 6분 보행 거리 (6MWD)를 나타내고; 제5행 제5열의 x축 및 y축은 각각 기준선 종합 생리 지수 (CPI)를 나타내고; 제6행 제6열의 x축 및 y축은 각각 기준선 세인트 조지 호흡기 설문 점수를 나타내고; 제7행 제7열의 x축 및 y축은 각각 기준선 전이 호흡곤란 지수 점수를 나타낸다. LOXL2와 IPF 중증도 및 성능 상태에 대한 기준선 척도 사이의 상관관계는 패널 (a) 및 (b) 맨 윗줄의 다크 박스내에 강조 표시되어 있다.

도 13은 질환 진행 (PFS) (패널 (a)) 및 그의 성분: 폐 기능 감소 (패널 (b)), 호흡기 질환에 의한 입원 (패널 (c)) 및 사망 (패널 (d))에 대한, 낮은 (≤ 800 pg/mL) 및 높은 (> 800 pg/mL) LOXL2 수준을 비교하는, 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 곡선을 보여주는 것이다. 각 패널에서, 상부의 보다 진한 선은 기준선 혈청 LOXL2 수준이 낮은 (≤ 800 pg/mL) 환자를 나타내는 것이고, 하부의 보다 옅은 선은 기준선 LOXL2 수준이 높은 (> 800

pg/mL) 환자를 나타내는 것이다. 모든 환자를 암브리센탄(Ambrescentan)으로 처리하였다. 각각의 y축은 주어진 사례를 보이지 않는 환자의 비율(%)을 나타내고 (이는 축을 따라 0, 25, 50, 75, 및 100으로 마킹되어 있다), 각각의 x축은 경과일수를 나타내는 것이다 (이는 축을 따라 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 및 800일로 마킹되어 있다).

도 14는 ARTEMIS-IPF 대상체 및 GAP 코호트 대상체 (14A: 위약 및 암브리센탄 처리된 대상체(조합); 14B: 암브리센탄만)에서의 기준선 LOXL2 분포 비교를 보여주는 것이다.

도 15a는 GAP 코호트 연구에서 기준선 이후 6개월째 (상단 좌측 패널), 12개월째 (상단 우측 패널), 18개월째 (하단 좌측 패널) 및 24개월째 (하단 우측 패널)의 낮은 (상부선, ≤ 440 pg/mL) 대 높은 (하부선, > 440 pg/mL) 혈청 LOXL2 수준에 따른 모든 원인의 사망에 대한 카플란-마이어 곡선을 보여주는 것이다. 도 15b는 ARTEMIS-IPF 연구에서 기준선 이후 6개월째 (상단 좌측 패널), 12개월째 (상단 우측 패널), 18개월째 (하단 좌측 패널) 및 24개월째 (하단 우측 패널)의 낮은 (상부선, ≤ 800 pg/mL) 대 높은 (하부선, > 800 pg/mL) 혈청 LOXL2 수준에 따른 모든 원인의 사망에 대한 카플란-마이어 곡선을 보여주는 것이다.

도 16은 다양한 대상체 군에 대한 평균 혈청 LOXL2 수준 (pg/mL)을 보여주는 것이다. 도 16a는 상응하는 대상체의 이샤크 섬유증 점수 (좌측에서 우측으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6)에 따라 분류된, 기준선 및 240주째의 샘플 (총 162개의 샘플: 81명의 대상체 각각에 대하여 기준선에서 하나 및 240주째 하나)에 대한 평균 혈청 LOXL2 수준을 보여주는 것이다. LOQ = 정량 수준. 도 16b는 기준선 및 240주째 주어진 이샤크 병기 (좌측에서 우측으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6)를 갖는 대상체에 대한 기준선 및 240주째의 평균 혈청 LOXL2 수준을 보여주는 것이다. 도 16c는 1 내지 3 및 4 내지 6의 상응하는 이샤크 병기를 갖는 환자의 기준선, 240주째, 및 전체 혈청 LOXL2 수준을 보여주는 것이다.

도 17은 본 연구에서 각각 주어진 이샤크 병기 (1, 2, 3, 4, 5, 6 (개별 막대 좌측에서 우측으로))를 가지며, 제시된 혈청 LOXL2 수준 (pg/mL)을 갖는 것으로 측정된 대상체의 비율(%)을 보여주는 것이다. LOD=검출한계; LOQ=정량한계. 예를 들어, 1,500=1,001-1,500 pg/mL와 같이, 제시된 각 카테고리를 이전 카테고리의 상한으로부터 확장시켰다.

도 18은 기준선 및 처리 후 240주째의 개별 CHB 대상체에 대한 혈청 LOXL2 수준 (pg/mL)을 보여주는 것이다. 도 18a: 간경변증이 지속되고 있는 대상체 (n=16); 도 18b: 240주째까지 간경변증의 역전이 일어난 대상체 (n=42); 도 18c: 240주째까지 섬유성 병기 (이샤크)에는 변함이 없는, 비-간경변증 대상체; 도 18d: 연구 기간 동안에 걸쳐 간경변증으로의 진행을 경험한 대상체; 및 도 18e: 섬유증이 2기 (이샤크 점수) 이상 감소된 비-간경변증 대상체. LOQ (정량한계)=440 pg/mL, LOD (검출한계)=180 pg/mL.

도 19는 주어진 기준선 혈청 LOXL2 수준 ($<1,500$, $>1,500$, 1,500-3,000, $<3,000$, 및 $>3,000$ pg/mL)을 가지며, 240주째 조직학상 개선된 것으로 보이는 ("Y") 경화성 CHB 대상체의 비율(%), 및 동일한 주어진 기준선 혈청 LOXL2 수준을 가지며, 240주째 조직학상 개선되지 않은 것으로 측정된 ("N") 간경변증 대상체의 비율(%)을 보여주는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본원에서 사용되는 바, "항체"라는 용어는 항원성 에피토프에 특이적으로 결합하는 필수 가변 영역 서열을 포함하는 단리된 또는 제조된 결합 작용제를 의미한다. 그러므로, 항체는 예컨대, 특이적인 표적 항원에의 결합과 같은, 원하는 생물학적 활성을 보이는 임의 형태의 항체 또는 그의 단편이다. 따라서, 이는 가장 광범위한 의미로 사용되며, 구체적으로는 원하는 생물학적 활성을 보이는 한, 모노클로날 항체 (전장의 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 나노바디, 디아바디, 다중특이성 항체 (예컨대, 이중특이성 항체), 및 scFv, Fab, 및 Fab₂를 포함하나, 이에 한정되지 않는 항체 단편을 포함한다. 그러므로, "인간 항체"라는 용어는 가능한 비-인간 상보성 결정 영역 (CDR) 영역을 제외한, 인간 기원의 서열을 함유하는 항체를 의미하며, 이는 Ig 분자의 전체 구조가 존재하여야 한다는 것을 의미하는 것이 아니라, 단지 항체는 인간에서 최소의 면역원성 효과를 가진다는 것을 의미하는 것이다.

[0034] "항체 단편"은 온전한 항체의 일부, 예를 들어 온전한 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체 (문헌 [Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)]); 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체를 포함한다. 항체를 파파인으로 분해하면, 각각 단일 항원 결합 부위를 포함하는, "Fab" 단편이라 불리는 2개의 동일한 항원

결합 단편과, 쉽게 결정화할 수 있는 능력을 반영한 명칭인 나머지 "Fc" 단편이 생성된다. 펩신 처리하면, 2개의 항원 결합 부위를 가지며, 여전히 항원과 가교 결합할 수 있는 $F(ab')_2$ 단편이 생성된다.

[0035] "Fv"는 완전한 항원 인식 부위 및 항원 결합 부위를 함유하고, 비공유 회합으로 긴밀하게 결합되어 있는 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인으로 이루어진 이량체로 구성된 항체 단편이다. 각 가변 도메인의 3개의 CDR은 이러한 배열 형태로 상호작용하여 V_H - V_L 이량체의 표면 상의 항원 결합 부위를 정의한다. 종합해 보면, 6개의 CDR이 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 CDR을 단지 3개만 포함하는 Fv의 절반부) 조차도, 비록 그 친화성은 전체 결합 부위보다는 낮지만, 항원을 인식하고 그에 결합할 수 있는 능력을 가진다.

[0036] "Fab" 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH_1)을 함유한다. Fab 단편은 중쇄 CH_1 도메인의 카르복시 말단에서의 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 비롯한, 몇몇 잔기의 부가라는 점에서 Fab' 단편과 상이한 것이다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올기를 보유하는 것인 Fab'에 대해 본원에서 사용되는 명칭이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 원래 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편 쌍으로서 제조되었다. 항체 단편에 대한 다른 화학적 커플링 또한 공지되어 있다.

[0037] 본원에서 사용되는 바, "생물학적 샘플"이라는 용어는 검출, 진단, 예후, 또는 모니터링 검정에서 사용될 수 있는, 개체로부터 수득된 다양한 샘플 유형을 의미할 수 있다. 액체 생물학적 샘플로는 예를 들어, 혈액, 혈액 분획 (예컨대, 혈청 또는 혈장), 뇨, 타액, 기관지폐포 세척액, 객담, 또는 뇌척수액을 포함할 수 있다. 본 정의는 또한 이를 입수한 후 임의 방식으로, 예컨대 시약 처리, 가용화, 또는 특정 성분, 예컨대 단백질에 대한 농축에 의해 조작된 샘플을 포함한다.

[0038] 본원에서 사용되는 바, "축류"란 하나 이상의 시험 및/또는 대조군 영역을 포함하는 특정 매트릭스 또는 물질을 통해 흐르는 측면, 수직, 또는 횡방향 유동을 의미한다. 특정 장치, 검정법 또는 방법에서 고려되는 유동의 유형은 장치 구조에 따라 달라진다. 이론으로 제한하지 않으면서, 수직 또는 횡방향 유동은 특정 매트릭스의 한쪽 단부 또는 측면상의 유체 접촉점 (상류 또는 근위 단부)으로부터 상기 접촉점 하류에 있는 (또는 원위부의) 영역으로의 유체 샘플의 유동을 의미할 수 있다. 하류 영역은 유체 접촉점으로부터 매트릭스의 동일 측면 또는 반대 측면에 있을 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 특정 실시양태의 수직 유동 장치에서, 축류는 수직 방향으로 제1 부재로부터 그를 통과하여 (상부에서 하부로) 제2 부재로, 및 해당 위치에서 흡착 매체로 진행할 수 있다. 추가의 일례로, 및 당업자가 이해하는 바와 같이, 구성된 수직 유동 장치, 예를 들어 디프스트릭에서, 유체 샘플은 문자 그대로 장치 위쪽으로 유동할 수 있는데, 그러나, 이러한 경우, 유체 샘플의 장치에의 제1 접촉점은 그림에도 불구하고 상류 (즉, 근위) 단부인 것으로 간주되고, 유동 종결점은 하류 (즉, 원위) 단부인 것으로 간주된다.

[0039] 본원에서 사용되는 바, 축류와 관련하여 "상류" 및 "하류"라는 용어는 유체 샘플과 본 개시내용의 대표적인 장치의 접촉 이후에 진행되는 유체 샘플의 유동 방향을 의미하는 것으로, 여기서 일반 작동 조건하에서 유체 샘플의 유동 방향은 상류 위치에서 하류 위치로 진행된다. 예를 들어, 유체 샘플이 먼저 샘플 수납 영역과 접촉하였을 때에는, 유체 샘플은 이어서 표지 영역을 통해 하류로 유동하게 된다.

[0040] 본 발명의 실시양태를 추가로 기술하기 앞서, 본 발명은 기술된 특정 실시양태로 제한하고자 하는 것은 아니며, 따라서, 이는 물론 달라질 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 또한, 본원에서 사용된 용어는 단지 특정 실시양태를 기술하기 위한 목적으로 사용된 것이며, 제한하고자 하는 것은 아님을 이해하여야 한다.

[0041] 값이 범위로 제공된 경우, 상기 범위 및 언급된 임의의 다른 값의 상한 내지 하한 사이의 각각의 중간값 (문맥 상 달리 명확하게 언급되지 않는 한, 하한 단위의 소수점 첫째자리까지) 또는 상기 언급된 범위의 중간값을 포함한다는 것을 이해하여야 한다. 이러한 더 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 더 작은 범위로 포함될 수 있고, 이는 또한 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 제한된 한계를 조건으로 포함된다. 언급된 범위가 한계 중 하나 또는 그 둘 모두를 포함할 경우, 상기 포함된 한계 중 하나 또는 그 둘 모두를 제외한 범위 또한 포함된다.

[0042] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명의 속하는 당업계의 숙련가가 보편적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 비록 본원에 기술된 것과 유사하거나, 또는 등가인 임의의 방법 및 물질 또한 본 발명의 실시양태를 실시하거나, 검사하는 데 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질은 이제 기술될 것이다. 본원에서 언급된 모든 공개 문헌은 공개 문헌이 인용된 것과 관련하여 본 발명 및/또는 물질을

개시하고 기술하기 위해 본원에서 참고로 포함된다.

- [0043] 본원 및 첨부된 특허청구범위에서 사용되는 바, 단수 형태인 "하나"("a," "an") 및 "그"라는 것은 문맥상 달리 명확하게 언급되지 않는 한 복수 개의 지시 대상을 포함한다는 것에 주의하여야 한다. 따라서, 예를 들어 "LOXL2-특이적 항체"라고 언급하는 것은 복수 개의 상기 항체를 포함하는 것이고, "그 LOXL2 폴리펩티드"라고 언급하는 것은 하나 이상의 LOXL2 폴리펩티드 및 당업자에게 공지된 그의 등가물 등을 언급하는 것을 포함한다. 추가로, 특허청구범위는 임의의 임의적 요소를 배제시키도록 초안 작성될 수 있다는 점에 주의한다. 따라서, 상기와 같은 진술은 특허청구범위 요소 인용, 또는 "부정문" 규제 조건을 사용하는 것과 관련하여 "단독으로," "오직"과 같은 배타적 용어를 사용하기 위한 선행 기조로서의 역할을 하는 것으로 한다.
- [0044] 명확하게 하기 위해 문맥상 별개의 실시양태로 기술된 본 발명의 특정 특징들은 또한 단일 실시양태와의 조합을 제공될 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 역으로, 간략하게 하기 위해 문맥상 단일 실시양태로 기술된, 제공된 다양한 특징들 또한 별개로, 또는 임의의 적합한 서브-조합으로 제공될 수 있다. 제공된 실시양태의 모든 조합은 구체적으로 본 개시내용에 포함되며, 마치 각각의 모든 조합이 개별적으로 및 명확하게 개시된 것과 같이 본원에 개시된다. 추가로, 다양한 실시양태의 모든 서브-조합 및 그의 요소 또한 구체적으로 본 개시내용에 포함되며, 마치 각각의 모든 서브-조합이 본원에서 개별적으로 및 명확하게 개시된 것과 같이 본원에 개시된다.
- [0045] 본원에서 논의된 공개 문헌은 본 출원의 출원일 이전에 개시된 그의 개시내용에 대해서만 제공된다. 본원에서는 본 발명이 선행 발명에 의해 공개문헌보다 선행할 자격이 없다는 것을 인정하는 것으로 해석되서는 안된다. 추가로, 제공된 공개일은 독립적으로 확인하는 데 필요할 수 있는 실제 공개일과 상이할 수 있다.
- [0046] **상세한 설명**
- [0047] 본 개시내용은 개체에서 LOXL2, 일반적으로 순환하는 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2) 폴리펩티드를 검출 및/또는 정량하는 검정법을 제공한다. 본 검정법은 진단 및 예후 적용에서 유용하며, 이 또한 제공한다.
- [0048] 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)는 섬유성 인간 간 조직에서 발현되며, 여기서 콜라겐과 다른 매트릭스 성분 사이의 가교 결합을 수행하게 되고, 이로써, 강성, 병적 섬유모세포의 활성화, 및 매트릭스 리모델링 및 섬유발생의 동적 과정은 증가하게 된다 (문헌 [[Barry-Hamilton V, Spangler R, Marshall D, et al., "Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment," *Nat Med.* 2010. 16: 1009-1017]]). LOXL2는 경화성 담관염을 앓는 마우스 모델 이외에도, C형 간염 감염 1, 비-알콜성 지방간염 (NASH)1, 알콜성 지방간염 (ASH), 윌슨병 (문헌 [Vadasz Z, Kessler O, Akiri G, et al., "Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson's disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2," *J Hepatology.* 2005. 43: 499-507]), 및 원발성 담즙성 간경변증2를 비롯한, 다양한 병인의 인간 질환으로부터의 섬유성 간 조직에서 발현된다 (문헌 [Nakken KE, Nygard S, Haaland T, et al. "Multiple inflammatory-, tissue remodelling- and fibrosis genes are differentially transcribed in the livers of Abcb4 (-/-) mice harbouring chronic cholangitis," *Scand J Gastroent.* 2007. 42: 1245-1255])
- [0049] 모노클로날 항체를 사용하여 LOXL2를 알로스테릭 방식으로 억제시키는 것이 간 및 폐 섬유증 모델을 비롯한, 다양한 질환 모델에서 섬유증을 억제시키는 데 효과적이다. LOXL2를 억제시키면, TGF β 신호절단 및 여러 중요한 전 섬유성 매개인자 (예컨대, TGF-1, CTGF, 엔도텔린, CXCL12)은 하향조절되고; LOXL2는 섬유성 질환에 있어서 중요한 경로 표적이다 (문헌 [Mehar WZ, Iredale J, & Friedman SL., "Expressway to the core of fibrosis," *Nat Med.* 2011. 17: 552-553]).
- [0050] 콜라겐이 간 실질에 점진적으로 축적되는 것이 만성 간 질환의 일반적인 최종 경로이다. 이와 같은 섬유증의 점진적 축적은 최종적으로는 간의 간경변증 및 말기 간 질환으로 이어질 수 있다. LOXL2는 콜라겐 피브릴의 가교 결합을 촉매화시키며, 섬유발생에 있어 중요한 조절 단백질이다. LOXL2 발현은 이화된 간 조직에서는 증가되어 있다.
- [0051] 건강한 성인 조직에서는 LOXL2가 거의 발현되지 않고; 정상적인 (예컨대, 비-질환) 조건하에서 순환하는 LOXL2 양은 낮거나, 검출불가능하다. 특정 질환 조건하에서 순환하는 LOXL2는 상승되어 있다. 예를 들어, LOXL2는 만성 간 질환 환자, 예컨대 만성 C형 간염 환자의 혈청 중에는 상승되어 있을 수 있으며, 더욱 진행성인 섬유증을 앓는 환자에서의 그 수준은 더욱 크다. 따라서, 순환하는 LOXL2를 검출하는 것이 개체가 순환하는 LOXL2 수준이 상승된 질환을 앓는지 여부를 측정하는 데 유용하다. 상기 질환으로는 섬유증 및 암을 포함한다. 본 개시내용은 개체가 순환하는 LOXL2 수준 상승과 관련된 질환을 앓는지 여부를 측정하는 진단 방법을 제공한다.

진단을 확인하거나, 또는 개체가 특정 질환을 앓을 가능성을 배제시키기 위해 순환하는 LOXL2 검출 후 다른 진단 방법으로 후처리할 수 있다.

[0052] 순환하는 LOXL2 수준은 섬유증 병기와 상관관계가 있다는 것이 밝혀졌다.

[0053] 순환하는 LOXL2 수준이 섬유증을 앓는 개체가 섬유증에 대한 치료를 잘 받아들이는지 여부에 관한 징후를 제공하고, 질환에 관한 다른 예후 및 예측 정보, 예컨대 특정 종점, 결과, 또는 사례, 예컨대 질환 결과 또는 치료에 대한 반응성에 대한 가능성을 제공한다는 것 또한 밝혀졌다. 본 개시내용은 개체가 섬유성 질환에 대한 치료에 대하여 반응할 가능성 및/또는 상기와 같은 결과, 종점, 또는 사례의 가능성을 측정하는 방법을 제공한다.

[0054] HCV 감염 환자에 대한 치료 결정을 간 생검보다는 비침윤성 혈청 감사에 기초하여 진행하는 것이 점점 더 증가하고 있다. 그러나, 혈청 검사가 전적으로 최적인 것은 아니다 (문헌 [Castera, L., "Invasive and non-invasive methods for the assessment of fibrosis and disease progression in chronic liver disease," *Best Pract Res Clin Gastroent.* 2011. 25: 291-303] 참조).

[0055] **순환하는 LOXL2를 검출하는 방법**

[0056] 본 개시내용은 개체에서 순환하는 LOXL2 폴리펩티드를 검출 및/또는 정량하는 검정법을 제공한다. 실제로, LOXL2는 시험되는 개체로부터 수득된 액체 샘플 중에서 검출되며, 여기서 액체 샘플은 혈액 또는 혈액 분획, 예컨대 혈장 또는 혈청, 또는 다른 액체 샘플일 수 있다.

[0057] 일부 실시양태에서, 제공되는 방법 및 검정법은 예컨대, 만성 HCV 감염 또는 HBV 감염 환자에서 간 섬유증 정도를 비-침윤적인 방식으로 대리 측정하는 데 유용하다.

[0058] **LOXL2 폴리펩티드**

[0059] "LOXL2 폴리펩티드"란 도 4에 도시된 아미노산 서열 중 약 100개의 아미노산 (aa) 내지 약 200개의 aa, 약 200개의 aa 내지 약 300개의 aa, 약 300개의 aa 내지 약 400개의 aa, 약 400개의 aa 내지 약 500개의 aa, 약 500개의 aa 내지 약 600개의 aa, 약 600개의 aa 내지 약 700개의 aa, 또는 약 700개의 aa 내지 774개의 aa로 이루어진 인접한 스트레치와 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. "LOXL2"는 또한 도 4에 도시된 인간 LOXL2 아미노산 서열, 및 그의 천연적으로 발생된 변이체 (다형태)를 의미한다.

[0060] 도 4에는 인간 LOXL2의 아미노산 서열이 도시되어 있으며, 시스테인이 풍부한, 4개의 스캐빈저 수용체 (SRCR) 도메인이 제시되어 있다. LOXL2 폴리펩티드는 전장의 폴리펩티드 또는 성숙한 (절단 형태: 프로세싱된 형태) LOXL2 폴리펩티드일 수 있다. 예측된 신호 절단은 Ala25-Gln26 사이에서 이루어진다. 프리프로펩티드로부터 신호 펩티드의 절단을 통해 LOXL2 프로펩티드가 형성된다. LOXL2 프로펩티드는 SRCR2와 SRCR3 사이 (예컨대, 도 4에 도시된 서열의 아미노산 301과 326 사이)에서 절단되면, SRCR3, SRCR4, 및 리실 옥시다제 (촉매성) 도메인을 포함하는 LOXL2 폴리펩티드가 남게 된다.

[0061] LOXL2 폴리펩티드는 효소적으로 활성화될 수 있다. 예를 들어, LOXL2 폴리펩티드는 리신 및 히드록시리신 잔기의 ε-아미노기의 산화적 탈아미노화를 촉매화시킬 수 있고, 이로써 펩티딜 리신에서 펩티딜-α-아미노아디핀-δ-세미알데하이드 (알리신)로의 전환이 일어나고, 암모니아 및 과산화수소가 화학량론적인 양으로 유리된다. 이러한 반응은 대개 세포외에서, 예컨대 콜라겐 및 엘라스틴 중의 리신 잔기 상에서 일어난다.

[0062] 일부 경우에서, 대상 LOXL2 검정법을 사용하여 검출되는 LOXL2 폴리펩티드는 신호 서열을 포함하지 않는 전장의 LOXL2 폴리펩티드, 예컨대 SRCR1-2, SRCR3-4, 및 촉매 도메인을 포함하는 것이다. 일부 경우에서, 대상 LOXL2 검정법을 사용하여 검출되는 LOXL2 폴리펩티드는 오직 SRCR3-4 도메인 및 촉매 도메인만을 포함하는 성숙한 LOXL2 폴리펩티드 (즉, 신호 서열을 포함하지 않고, SRCR1-2를 포함하지 않는 것)이다. 성숙한 LOXL2 폴리펩티드 (SRCR3-4 및 촉매 도메인; 신호 서열 및 SRCR1-2 도메인 비포함)를 검출하는 것에 대한 별법으로, 또는 그 이외에도, 대상 LOXL2 검정법은 SRCR1-2 도메인은 포함하지만, SRCR3-4 또는 촉매 도메인은 포함하지 않는 N-말단 LOXL2 단편을 검출할 수 있다.

[0063] **생물학적 샘플**

[0064] 적합한 액체 생물학적 샘플로는 전혈; 혈액 분획 (이는 또한 "혈액 생성물"로서 지칭됨) (적합한 혈액 분획으로는 혈청 및 혈장을 포함하나, 이에 한정되지 않는다); 타액; 뇨; 기관지폐포 세척액; 뇌척수액; 객담 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 생물학적 샘플은 신선한 혈액 또는 보관된 혈액 (예컨대, 혈액 은행 보관된 것)

또는 혈액 분획일 수 있다. 생물학적 샘플은 명확하게 본 개시내용의 검정법을 위해 수득된 액체 샘플, 또는 본 개시내용의 검정법을 위해 서브샘플링될 수 있는 또 다른 목적을 위해 수득된 액체 샘플일 수 있다.

[0065] 일례로서, 생물학적 샘플은 전혈일 수 있다. 전혈은 표준 임상 방법을 사용하여 대상체로부터 수득될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈장이다. 혈장은 항-응고처리된 혈액의 원심분리에 의해 전혈 샘플로부터 수득될 수 있다. 상기 공정을 통해 백혈구 성분의 연막 및 혈장 상청액을 제공할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈청이다.

[0066] 샘플을 필요에 따라, 적절한 완충제 용액 중에서 희석하여 전처리할 수 있거나, 원하는 경우, 농축시킬 수 있거나, 초원심 분리, 고속 단백질 액체 크로마토그래피 (FPLC)에 의한 분획화, 또는 침전법을 포함하나, 이에 한정되지 않는 많은 방법에 의해 분획할 수 있다. 샘플로부터 하나 이상의 비-LOXL2 단백질 또는 다른 비-LOXL2 성분을 제거하기 위해 샘플을 예컨대, 면역친화성 방법에 의해 분획화할 수 있고; 예컨대, 항-알부민 항체를 사용하여 샘플로부터 알부민을 제거할 수 있다. 생리학적 pH에서, 예컨대 포스페이트, 트리스 등과 같은 다양한 완충제 중 하나를 사용하는 다수의 표준 수성 완충제 용액 중 임의의 것이 사용될 수 있다.

[0067] **항-LOXL2 항체**

[0068] 대상 방법은 액체 샘플 중의 LOXL2를 고정화시키고 검출하기 위하여 LOXL2에 특이적인 항체를 사용하였다. 대상 검정 방법에서 사용되는 항체는 LOXL2에 특이적이며, 예컨대 항체는 LOXL2 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는데, 여기서 특이적인 결합이란 약 10^{-7} M 이상, 약 10^{-8} M 이상, 약 10^{-9} M 이상, 약 10^{-10} M 이상, 약 10^{-11} M 이상, 또는 약 10^{-12} M 이상, 또는 10^{-12} M 초과와 친화도로 결합하는 것을 의미한다. 비특이적인 결합은 약 10^{-7} M 미만의 친화도로 결합, 예컨대 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M 등의 친화도로 결합하는 것을 의미할 것이다.

[0069] LOXL2-특이적 항체는 실질적으로는, LOXL2 폴리펩티드 이외의 임의의 다른 리실 옥시다제-유사 폴리펩티드에는 결합하지 않으며, 예컨대 LOXL2-특이적 항체는 실질적으로는 LOXL1, LOXL3, 또는 LOXL4 폴리펩티드에 결합하지 않거나, 리실 옥시다제 (LOX) 폴리펩티드에 결합하지 않는다.

[0070] 일부 실시양태에서, LOXL2-특이적 항체는 LOXL2 폴리펩티드가 액체 생물학적 샘플 중에 존재할 때, 결합을 위해 접근이 가능한 에피토프(들)에 결합하고, 예컨대 LOXL2-특이적 항체가 결합하는 에피토프(들)은 표면 접근가능하고/거나, 액체 생물학적 샘플에 존재할 수 있는 하나 이상의 비-LOXL2 단백질에 의해 차폐되지 않은 것이다.

[0071] 대상 검정 방법에서 사용하기에 적합한 항체로는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 나노바디, 디아바디, 다중특이성 항체 (예컨대, 이중특이성 항체), 및 항원-결합 항체 단편을 포함한다.

[0072] 일부 경우에서, 대상 방법에서 사용되는 항-LOXL2 항체는 검출가능한 표지를 포함한다. 적합한 검출가능한 표지s를 포함하나, 이에 한정되지 않는다., 자기 비드 (예컨대, 다이아비즈(Dynabeads)TM), 형광 염료 (예컨대, 플루오르세인 이소티오시아네이트, 텍사스 레드, 로다민, 녹색 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 황색 형광 단백질 등), 방사선 표지(예컨대, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, 또는 ³²P), 효소 (예컨대, 호스 래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 루시페라제, 및 효소 결합 면역 흡착 검정법 (ELISA)에서 보편적으로 사용되는 다른 효소, 및 비색 표지, 예컨대 콜로이드성 금 또는 착색된 유리 또는 플라스틱 (예컨대, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 라텍스 등) 비드를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0073] 항-LOXL2 항체가 검출가능한 표지를 포함할 경우, 항-LOXL2 항체는 상기 표지에 의해 발생하는 신호 (예컨대, 항-LOXL2 항체에 부착된 효소의 생성물로서 제조된 발색단, 발광단 등; 표지에 의해 직접 발생하는 신호 등)를 검출함으로써 검출될 수 있다. 일부 경우에서, 항-LOXL2 항체는 검출가능한 표지를 포함하지 않으며; 그 대신, 항-LOXL2 항체는 검출가능한 표지를 포함하는 2차 항체를 사용하여 검출된다. 적합한 2차 항체로는 항-LOXL2 항체의 불변 영역 도메인(들) 중의 에피토프(들)에 특이적인 모노클로날 및 폴리클로날 항체를 포함한다. 2차 항체는 자기 비드 (예컨대, 다이아비즈TM), 형광 염료 (예컨대, 플루오르세인 이소티오시아네이트, 텍사스 레드, 로다민, 녹색 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 황색 형광 단백질 등), 방사선 표지 (예컨대, 예컨대 ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, 또는 ³²P), 효소 (예컨대, 호스 래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 루시페라제, 및 효소 결합 면역 흡착 검정법 (ELISA)에서 보편적으로 사용되는 다른 효소, 및 비색 표지, 예컨대 콜로이드성 금 또는 착색된 유리 또는 플라스틱 (예컨대, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 라텍스 등) 비드를 포함하나, 이에 한정되지 않는 다양한 검출가능한 표지 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 메조스케일 디스커버리(MesoScale Discovery)로

부터 입수한 술포-태그(SULFO-TAG)TM 표지 또한 검출가능한 표지로서 사용하기에 적합하다. 술포-태그TM 표지는 루테늄(II) 트리스-비피리달 태그로서, 이는 루테늄(II) 트리스-비피리딘-(4-메틸술포) N-히드록시숙신이미드(NHS)-에스테르와 1차 아민(예컨대, 리신 측쇄)와의 반응을 통해 폴리펩티드(예컨대, 2차 항체)에 부착될 수 있다.

[0074] 일부 경우에서, 대상 검정 방법에서 사용되는 항-LOXL2 항체는 불용성 지지체에 고정화될 것이다. 적합한 불용성 지지체는 폴리비닐 디플루오라이드(PVDF), 셀룰로스, 니트로셀룰로스, 나일론, 유리, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드, 폴리프로필렌, 이산화규소, 폴리에틸렌, 폴리카르보네이트, 텍스트란, 아밀로스, 천연 및 변형된 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 폴리아크릴아미드 겔 중에 포매된 실리카, 아가로스, 반란암, 자철석 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 다양한 물질을 포함할 수 있다. 불용성 지지체는 다양한 형태(예컨대, 크기, 형상) 중 임의의 것, 예를 들어 예컨대 테스트 스트립으로 사용되는 시트; 덩스틱 검정 포맷; 다중 웰 플레이트(예컨대, ELISA에서 사용되는 것) 등일 수 있다.

[0075] LOXL2-특이적 항체의 비제한적인 예로는 미국 특허 공개 번호 2009/0104201, 및 미국 특허 공개 번호 2009/0053224에 개시된 LOXL2-특이적 항체를 포함한다.

[0076] 일부 경우에서, 적합한 항체는 LOXL2 SRCR1 도메인 중의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 경우에서, 적합한 항체는 LOXL2 SRCR2 도메인 중의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 경우에서, 적합한 항체는 LOXL2 SRCR3 도메인 중의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 경우에서, 적합한 항체는 LOXL2 SRCR4 도메인 중의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 경우에서, 적합한 항체는 LOXL2 촉매 도메인 중의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 도 5에는 LOXL2 촉매 도메인의 아미노산 서열이 제공되어 있다. 일부 경우에서, 적합한 항체(예컨대, 폴리클로날 항체)는 1, 2, 3개 이상의 LOXL2 도메인 중의 다중 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0077] 일부 경우에서, 항체는 SRCR1-2, SRCR3-4, 및 촉매 도메인을 비롯한, 신호 서열이 없는 전장의 LOXL2 폴리펩티드를 검출한다. 일부 경우에서, 항체는 단, SRCR3-4 도메인 및 촉매 도메인은 포함하는, 성숙한 LOXL2 폴리펩티드(즉 신호 서열이 없고, SRCR1-2이 없는 것)를 검출한다. 다른 경우에서, 항체는 SRCR1-2 도메인은 포함하지만, SRCR3-4 또는 촉매 도메인은 포함하지 않는 것인 N-말단 LOXL2 단편을 검출한다.

[0078] 예를 들어, 일부 실시양태에서, 적합한 항-LOXL2 항체는 "SRCR3-4"으로 지칭되는 SRCR3-링커-SRCR4 영역 내의 에피토프에 특이적으로 결합한다. SRCR3-4 영역은 서열 번호의 아미노산 325 내지 544와, 아미노산 325 내지 547과, 아미노산 303 내지 544와, 또는 아미노산 303 내지 547과 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 따라서, 예컨대 일부 실시양태에서, 적합한 항-LOXL2 항체는 서열 번호 1의 아미노산 325 내지 544와, 아미노산 325 내지 547과, 아미노산 303 내지 544와, 또는 아미노산 303 내지 547과 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 내의 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0079] 특정 실시양태에서, 적합한 항-LOXL2 항체는 링커-SRCR3-링커-SRCR4-링커 영역 내의 에피토프에 특이적으로 결합하고, 예컨대 일부 경우에서, 적합한 항-LOXL2 항체는 서열 번호 1의 아미노산 303 내지 544와, 아미노산 303 내지 545와, 아미노산 303 내지 546과, 또는 아미노산 303 내지 547과 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 내의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 대상 항-LOXL2 항체는 SRCR3-링커-SRCR4-링커 영역 내의 에피토프에 특이적으로 결합하고, 예컨대 일부 경우에서, 적합한 항-LOXL2 항체는 서열 번호 1의 아미노산 325 내지 544와, 아미노산 325 내지 545와, 아미노산 325 내지 546과, 또는 아미노산 325 내지 547과 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 내의 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0080] 특정 실시양태에서, 적합한 항-LOXL2 항체는, SRCR3 영역이 서열 번호 1의 아미노산 325 내지 425와, 아미노산 303 내지 425와, 아미노산 303 내지 434와, 또는 아미노산 325 내지 434와 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있는 것인 SRCR3 영역 내의(및 SRCR4 내의 것이 아닌) 에피토프에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 적합한 항-LOXL2 항체는 링커-SRCR3 영역 내의 에피토프에 특이적으로 결합하고, 예컨대 일부 경우에서, 적합한 항-LOXL2 항체는 서열 번호 1의 아미노산 303 내지 425와 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 내의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 적합한 항-LOXL2 항체는 SRCR3-링커 영역 내의 에피토프에 특이적으로 결합하고, 예컨대 일부 경우에서, 적합한 항-LOXL2 항체는 서열 번호 1의 아미노산 325 내지 434와 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상,

또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 내의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 적합한 항-LOXL2 항체는 링커-SRCR3-링커 영역 내의 에피토프에 특이적으로 결합하고, 예컨대 일부 경우에서, 적합한 항-LOXL2 항체는 서열 번호 1의 아미노산 303 내지 434와 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 내의 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0081] 특정 실시양태에서, 적합한 항-LOXL2 항체는 링커-SRCR4-링커 영역 내의 에피토프에 특이적으로 결합하고, 예컨대 일부 경우에서, 적합한 항-LOXL2 항체는 서열 번호 1의 아미노산 426 내지 544와, 아미노산 426 내지 545와, 아미노산 426 내지 546과, 또는 아미노산 426 내지 547과 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 내의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 적합한 항-LOXL2 항체는, SRCR4 영역이 서열 번호 1의 아미노산 435 내지 544와, 아미노산 435 내지 545와, 아미노산 435 내지 546과, 또는 아미노산 435 내지 547과 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있는 것인 SRCR4 영역 내의 (및 SRCR3 내의 것이 아닌) 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0082] 일부 실시양태에서, 적합한 항-LOXL2 항체는 "SRCR1-2"로 지칭되는 SRCR1-링커-SRCR2 영역 내의 에피토프에 특이적으로 결합한다. SRCR1-2 영역은 서열 번호 1에 도시된 아미노산 서열 (도 4)의 아미노산 58 내지 302, 또는 58 내지 324와 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 적합한 항-LOXL2 항체는 서열 번호 1에 도시된 아미노산 서열의 아미노산 58 내지 324와 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 내의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 적합한 항-LOXL2 항체는, SRCR1 영역이 서열 번호 1에 도시된 아미노산 서열의 아미노산 58 내지 159와 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있는 것인 SRCR1 영역 내의 (및 SRCR2 내의 것이 아닌) 에피토프에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 적합한 항-LOXL2 항체는, SRCR1-링커 영역이 서열 번호 1에 도시된 아미노산 서열의 아미노산 58 내지 187과 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있는 것인 SRCR1-링커 영역 내의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 적합한 항-LOXL2 항체는, SRCR2 영역이 서열 번호 1에 도시된 아미노산 서열의 아미노산 188 내지 302와 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있는 것인 SRCR1 영역 내의 (및 SRC2 내의 것이 아닌) 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0083] 비제한적인 일례로서, 적합한 항체는 LOXL2 촉매 도메인 중의 에피토프에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 AB0030이다. 예컨대, US 2009/0053224를 참조할 수 있으며, 여기서 항체 AB0030은 프로BM20에 상응하는 것이다.

[0084] 일부 실시양태에서, 적합한 항체는 LOXL2가 LOXL2 효소 활성을 억제시키는 작용제에 결합할 때, LOXL2에 특이적으로 결합하는 것이다. LOXL2 효소 활성을 억제시키는 작용제로는 LOXL2 효소 활성의 알로스테릭 억제제를 포함한다. 일부 경우에서, 알로스테릭 억제제는 LOXL2의 항-LOXL2 모노클로날 항체, 예컨대 "SRCR3-4" 도메인 내의 에피토프에 결합하는 항-LOXL2 모노클로날 항체이다. LOXL2 효소 활성을 억제시키고, SRCR3-4 도메인 내의 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체에 대한 비제한적인 예로는 AB0023 및 AB0024가 있다; 예컨대, US 2009/0053224를 참조할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 적합한 항-LOXL2 항체는 a) SRCR3-4 내의 에피토프에 특이적으로 결합하고; ii) SRCR3-4 내의 에피토프에 결합에 대하여 AB0023 항체 및/또는 AB0024 항체와 경쟁하지 않는다.

[0085] 예를 들어, 일부 실시양태에서, 항체는 하기 CDR 및 그 사이에 개입되어 있는 골격 영역을 갖는 가변 중쇄 영역을 갖는 항체이다 (이는 AB0023의 것에 상응, CDR1, CDR2, 및 CDR3의 서열은 밑줄로 표시):

MEWSRVFIFLLSVTAGVHSQVQLQSGAELVRPGTSVKVSCSKASGYAFTYYLIEWVK
QRPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARNW
MNF~~DI~~WGQGTTLTVSS

[0086]

[0087] (서열 번호 6). 일부 실시양태에서, 항체는 서열 번호 6와 75% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 가진다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 번호 6에 기재된 가변 영역 서열의 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 가진다.

[0088] 일부 실시양태에서, 항체는 하기 CDR 및 그 사이에 개입되어 있는 골격 영역을 갖는 가변 경쇄 영역을 갖는 항체이다 (이는 AB0023의 것에 상응, CDR1, CDR2, 및 CDR3의 서열은 밑줄로 표시):

MRCLAEFLGLLVLPWGAIGDIVMTQAAPSVSVTPGESVSISCRSSKSLLSN
GNTYLYWFLQRPQSPQFLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGV
 YYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIK

[0090] (서열 번호 7). 일부 실시양태에서, 항체는 서열 번호 7과 75% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 가진다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 번호 7에 기재된 가변 영역 서열의 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 가진다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 번호 6에 기재된 가변 영역 서열의 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 7에 기재된 가변 영역 서열의 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 가진다.

[0091] 일부 실시양태에서, 항체는 상기 항체, 예컨대 미국 특허 출원 공개 번호 US 2009/0053224 (2009년 2월 26일)에 기술되어 있는 것, 예컨대 AB0024로 지정된 것, 및/또는 AB0024의 CDR (CDR1, CDR2, 및 CDR3)을 갖는 중쇄 및/또는 AB0024의 CDR (CDR1, CDR2, 및 CDR3)을 갖는 경쇄를 갖는 것의 인간화된 버전이다.

[0092] 예를 들어, 한 실시양태에서, 항체는 하기 CDR 및 그 사이에 개입되어 있는 골격 영역을 갖는 가변 중쇄 영역을 갖는 항체이다 (이는 AB0024의 것에 상응, CDR1, CDR2, 및 CDR3의 서열은 밑줄로 표시):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYAFTYYLIEWVRQAPGQGLE
 WIGVINPGSGGTNYNEKFKGRATITADKSTSTAYMELSSLRSEDAVYFCARNWMN
FDYWGQGTTVTVSS

[0094] (서열 번호 8).

[0095] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 번호 8과 75% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 가진다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 번호 8에 기재된 가변 영역 서열의 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 가진다.

[0096] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 번호 8, 서열 번호 10

(QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCASGYAFTYYLIEWVKAPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKG
 RATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDAVYFCARNWMNFDYWGQGTTVTVSS)

[0098] 서열 번호 11

(QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYAFTYYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKG
 RATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDAVYFCARNWMNFDYWGQGTTVTVSS)

[0100] 또는 서열 번호 12

(QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYAFTYYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKG
 RVITITADKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARNWMNFDYWGQGTTVTVSS)

[0102] 에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 8, 10, 11, 또는 12와 75% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 아미노산을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 9, 서열 번호 13

(DIVMTQTPLSLSVTPGPASISCRSSKSLLSNNGNTYLYWFLQKPGQSPQFLIYRMSNLASGVPDRFSG
 SSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKVEIK)

[0104] 또는 서열 번호 14

(DIVMTQTPLSLSVTPGPASISCRSSKSLLSNNGNTYLYWYLQKPGQSPQFLIYRMSNLASGVPDRFSG
 SSGSGTIDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKVEIK)

[0105] 에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 9, 13, 또는 14와 75% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 아미노산을 갖는 경쇄 가변 영역을 가진다.

[0106] 일부 실시양태에서, 항체는 하기 CDR 및 그 사이에 개입되어 있는 골격 영역을 갖는 가변 경쇄 영역을 갖는 항체이다 (이는 AB0024의 것에 상응, CDR1, CDR2, 및 CDR3의 서열은 밑줄로 표시):

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSKSLHNSNGNTYLYWFLQKPGQSP
QFLIYRMSNLA⁵SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPTFGG
GTKVEIK

[0107]

[0108]

(서열 번호 9). 일부 실시양태에서, 항체는 서열 번호 9와 75% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 가진다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 번호 9에 기재된 가변 영역 서열의 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 가진다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 번호 8에 기재된 가변 영역 서열의 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 9에 기재된 가변 영역 서열의 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 가진다.

[0109]

작용제가 LOXL2 효소 활성을 억제시키는지 여부는 임의의 공지된 검정법을 사용함으로써 측정될 수 있다. 예를 들어, 기질로서 디아미노펜탄 (DAP)을 사용하여, 또는 기질로서 콜라겐을 사용하여 LOXL2 효소 활성에 대한 검정법을 수행할 수 있다. 상기 두 검정법 모두에서, LOXL2의 효소 활성은 (기질의 탈아미도화시에 LOXL2에 의해 유리되는) 과산화수소의 생산을 암플렉스[®] 레드(Amplex[®] Red) (인비트로젠(Invitrogen: 미국 캘리포니아주 칼즈배드))의 레조루핀 (형광 생성물)로의 호스 래디쉬 퍼옥시다제 촉매화 전환과 커플링시키는 검정법을 사용함으로써 측정될 수 있다.

[0110]

일부 실시양태에서, 적합한 항-LOXL2 항체는 LOXL2 폴리펩티드의 효소 활성을 억제시킨다. 다른 실시양태에서, 적합한 항-LOXL2 항체는 LOXL2 폴리펩티드의 효소 활성을 억제시키지 않는다.

[0111]

적합한 항-LOXL2 항체로는 예컨대, RPDS-1M1, RPDS-1M3, RPDS-1M8, RPDS-1M9, RPDS-1M11, RPDS-1M15, RPDS-1M17, RPDS-1M19, RPDS-1M20 (AB0030), RPDS-1M22, RPDS-1M24, RPDS-1M25, RPDS-1M27, RPDS-1M28, RPDS-1M29, RPDS-1M30, RPDS-1M31, RPDS-1M32, RPDS-2M1, RPDS-2M2, RPDS-2M3, RPDS-2M4, RPDS-2M5, RPDS-2M6, RPDS-2M7, RPDS-2M8, RPDS-2M9, RPDS-2M10, RPDS-2M11, RPDS-2M12, RPDS-2M13, RPDS-2M14, RPDS-2M15, RPDS-2M16, RPDS-2M17, RPDS-2M18, 및 RPDS-2M19를 포함하며, 여기서 상기 항체는 미국 특허 출원 시리얼 번호 13/021,555에 기술된 것이다. 모노클로날 항체 RPDS-1M1, RPDS-1M3, RPDS-1M8, RPDS-1M9, RPDS-1M11, RPDS-1M15, RPDS-1M17, RPDS-1M19, RPDS-1M20 (AB0030), RPDS-1M22, RPDS-1M24, RPDS-1M25, RPDS-1M27, RPDS-1M28, RPDS-1M29, RPDS-1M30, RPDS-1M31, RPDS-1M32, RPDS-2M1, RPDS-2M2, RPDS-2M3, RPDS-2M4, RPDS-2M5, RPDS-2M6, RPDS-2M7, RPDS-2M8, RPDS-2M9, RPDS-2M10, RPDS-2M11, RPDS-2M12, RPDS-2M13, RPDS-2M14, RPDS-2M15, RPDS-2M16, RPDS-2M17, RPDS-2M18, 및 RPDS-2M19는 LOXL2의 촉매 도메인 내의 것에 결합한다.

[0112]

검정 포맷

[0113]

개체에서 순환하는 LOXL2를 검출하는 대상 검정법은 일반적으로 a) 개체로부터 수득된 액체 샘플을 LOXL2에 특이적인 항체와 접촉시키는 단계; 및 b) 항체와 액체 샘플 중에 존재하는 LOXL2의 결합을 검출하는 단계를 포함한다. 적합한 검정 방법은 효소 결합 면역 흡착 검정법 (ELISA), 방사면역검정법 (RIA), 면역 침전 검정법, 측방 유동 검정법 또는 측류 검정법, 질량 분석법 등을 포함한다.

[0114]

대상 검정 방법은 액체 샘플 중의 LOXL2를 175 pg/mL 이하까지 검출할 수 있고, 예컨대 대상 검정 방법은 액체 샘플 중의 LOXL2를 약 150 pg/ml 내지 약 175 pg/ml, 약 125 pg/ml 내지 약 150 pg/ml, 약 100 pg/ml 내지 약 125 pg/ml, 약 75 pg/ml 내지 약 100 pg/ml, 약 50 pg/ml 내지 약 75 pg/ml, 또는 약 40 pg/ml 내지 약 50 pg/ml까지 검출할 수 있다. 예를 들어, 대상 검정 방법은 LOXL2가 액체 샘플 중에 10 ng/ml 미만인 농도로, 예컨대 약 10 ng/ml 내지 약 5 ng/ml, 약 5 ng/ml 내지 약 1 ng/ml, 약 1 ng/ml 내지 약 500 pg/ml, 약 500 pg/ml 내지 약 400 pg/ml, 약 400 pg/ml 내지 약 300 pg/ml, 약 300 pg/ml 내지 약 200 pg/ml, 약 200 pg/ml 내지 약 175 pg/ml, 약 200 pg/ml 내지 약 150 pg/ml, 약 150 pg/ml 내지 약 100 pg/ml, 약 100 pg/ml 내지 약 75 pg/ml, 약 75 pg/ml 내지 약 50 pg/ml, 또는 약 50 pg/ml 내지 약 40 pg/ml인 농도로 존재할 때, 액체 샘플 중의 LOXL2를 검출할 수 있다. 일부 경우에서, 대상 검정 방법은 LOXL2가 액체 샘플 중에 약 175 pg/ml 내지 약 5 ng/ml (또는 5 ng/ml 초과) 범위의 농도로 존재할 때, 액체 샘플 중의 LOXL2를 검출할 수 있다. 일부 경우에서, 대상 검정 방법은 LOXL2가 액체 샘플 중에 약 40 pg/ml 내지 약 5 ng/ml (또는 5 ng/ml 초과) 범위의 농도로 존재할 때, 액체 샘플 중의 LOXL2를 검출할 수 있다. 일부 경우에서, 대상 검정 방법은 액체 샘플 중의 LOXL2를 배경 평균의 검출 하한 + 2.5 x SD (배경의 표준 편차)까지 검출한다.

[0115]

일부 경우에서, 대상 검정 방법은 2가지 LOXL2-특이적 항체를 사용하는 것은 포함한다. 2가지 LOXL2-특이적 항체는 둘 모두 모노클로날 항체일 수 있거나; 2가지 LOXL2-특이적 항체는 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체일 수 있거나; 또는 일부 다른 상기와 같은 조합일 수 있다.

- [0116] 예를 들어, 제1 LOXL2-특이적 항체는 액체 샘플과 접촉하게 되고, 여기서 제1 LOXL2-특이적 항체는 액체 샘플 중에 존재하는 LOXL2와 복합체를 형성한다. 제1 LOXL2-특이적 항체를 불용성 지지체 상에 고정화시킬 수 있고, 이로써, 제1 LOXL2-특이적 항체/LOXL2 복합체를 불용성 지지체 상에 고정화시킬 수 있다. 별법으로, 제1 LOXL2-특이적 항체는 용액 중에 존재할 수 있고, 제1 LOXL2-특이적 항체/LOXL2 복합체는 불용성일 수 있으며, 이로써, 제1 LOXL2-특이적 항체/LOXL2 복합체는 면역침전하게 된다. 제1 LOXL2-특이적 항체/LOXL2 복합체는 제2 LOXL2-특이적 항체를 사용하여 검출될 수 있다. 일부 경우에서, 제1 LOXL2-특이적 항체는 폴리클로날 항체이고; 제2 LOXL2-특이적 항체는 모노클로날 항체이다.
- [0117] 일부 실시양태에서, 대상 검정 방법은 개체로부터 수득된 액체 샘플을 고정화된 LOXL2-특이적 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는데, 여기서 고정화된 LOXL2-특이적 항체는 불용성 지지체 상에 고정화되어 있는 것이다. 샘플 중에 존재하는 임의의 LOXL2는 고정화된 LOXL2-특이적 항체에 결합하게 되고, 이로써 고정화된 항-LOXL2/LOXL2 복합체를 형성하게 될 것이다. 고정화된 항-LOXL2/LOXL2 복합체는 제2 (비-고정화된) LOXL2-특이적 항체를 사용하여 검출될 수 있다. 제2 LOXL2-특이적 항체는 검출가능하게 표지될 수 있거나, 또는 검출가능하게 표지된 2차 항체를 사용하여 검출될 수 있다.
- [0118] 따라서, 일부 실시양태에서, 개체에서 순환하는 LOXL2를 검출하는 대상 방법은 a) 개체로부터 수득된 액체 샘플을 LOXL2에 특이적인 1차 항체와 접촉시켜 1차 항체와 LOXL2가 복합체를 형성할 수 있도록 하는 단계; b) LOXL2-1차 항체 복합체와 LOXL2에 특이적인 2차 항체를 접촉시키는 단계; 및 c) 2차 항체의 LOXL2-1차 항체 복합체에의 결합을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0119] 불용성 지지체는 다중 웰 플레이트의 하나 이상의 웰, 테트스 스트립, 덤스틱 포맷 등일 수 있다. 상기 기술된 검정 포맷 중 임의의 것에서, 비결합 성분을 제거하기 위해 1회 이상의 세척 단계를 수행할 수 있다.
- [0120] 본 개시내용의 검정법은 개체 중 순환하는 LOXL2의 병리학적 수준을 검출할 수 있다. 예를 들어, 대상 검정 방법은 a) 개체로부터 수득된 액체 샘플을 LOXL2에 특이적인 항체와 접촉시키는 단계; b) 항체와 액체 샘플 중에 존재하는 LOXL2의 결합을 검출하는 단계; 및 c) 검출된 수준을 정상적인 대조군 값과 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 검출된 수준이 정상적인 대조군 값보다 높다면, 이는 병리 (예컨대, 암 또는 섬유증)를 나타내는 것이다.
- [0121] **대조군 값**
- [0122] 시험 대상체로부터 수득된 액체 샘플 중의 LOXL2의 수준을 정상적인 대조군 값(들) 또는 정상적인 대조군 값의 범위와 비교할 수 있다. 대조군 값은 대조군 집단, 예컨대 인간 대상체로 이루어진 일반 집단 또는 엄선된 집단으로부터 수득된 비교가능한 샘플 (예컨대, 혈액, 혈장, 또는 혈청 샘플, 또는 다른 액체 생물학적 샘플) 중의 LOXL2 수준에 기초한 것일 수 있다. 예를 들어, 엄선된 집단은 외관상 건강한 대상체, 예컨대 이전에 섬유증 또는 암의 어떤 징후 또는 증상도 보이지 않은 개체로 구성될 수 있다. 다르게는 외관상 건강한 개체는 또한 일반적으로 어떤 질환 증상도 보이지 않는 개체이다. 다시 말해, 상기 개체는 전문 의료진을 통해 검사받았다면, 건강하거나, 어떤 질환 증상도 보이지 않는 것을 특징으로 할 것이다.
- [0123] 대조군 값은 다양한 형태의 것을 취할 수 있다. 대조군 값은 단일 절사값, 예컨대 중앙값 또는 평균일 수 있다. 정상적인 대조군 값은 정상적인 대조군 범위일 수 있다.
- [0124] 일부 경우에서, 정상적인 대조군 값은 대상 검정 방법의 검출 하한 미만인 값이고, 예컨대 정상적인 값은 약 175 pg/ml 미만, 약 150 pg/ml 미만, 약 100 pg/ml 미만, 약 75 pg/ml 미만, 약 50 pg/pg/ml 미만, 또는 약 40 pg/ml 미만일 수 있다.
- [0125] **시험 대상체**
- [0126] 상기 언급된 바와 같이, 대상 LOXL2 검정법을 사용하여 개체로부터 수득된 액체 샘플을 시험한다. 대상 LOXL2 검정법을 사용하여 시험하는 데 적합한 개체로는 질환 진단을 받지 않았지만, 의사에게 증상 및/또는 통증을 제시하는 개체 (예컨대, 진단받지 않은 장애 또는 질환을 앓고 있는 개체); 암 진단을 받은 개체; 암을 앓고 있을 것으로 의심되지만, 아직 암 진단을 받지 않은 개체; 외관상 건강하며, 정기 검진을 받는 개체; 섬유증 진단을 받은 개체; 섬유증을 앓고 있을 것으로 의심되지만, 아직 섬유증 진단을 받지 않은 개체; C형 바이러스 감염 (HCV) 감염, 예컨대 만성 HCV, 또는 B형 바이러스 감염 (HBV) 감염, 예컨대 만성 HBV (CHB) 진단을 받은 개체; 및 암 또는 섬유성 질환 치료를 받고 있는 개체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0127] **중양 환자**

- [0128] 대상 LOXL2 검정법을 사용하여 시험하는 데 적합한 개체로는 암을 앓고 있는 것으로 진단받은 개체로서, 이는 양성 종양을 앓는 개체, 원발성 종양을 앓는 개체, 종양 전이를 앓는 개체, 및 비-고형 종양 유형의 암을 앓는 개체를 포함한다. 대상 LOXL2 검정법을 사용하여 시험하는 데 적합한 개체로는 암을 앓고 있지만, 아직 암 진단을 받지 않은 개체를 포함한다. 따라서, 대상 LOXL2 검정법을 사용하여 시험하는 데 적합한 개체로는 암종, 육종, 백혈병, 및 림프종을 비롯한, 매우 다양한 암을 앓는 개체를 포함한다.
- [0129] 암종으로는 식도 암종, 간세포 암종, 기저 세포 암종 (피부암 형태), 편평 세포 암종 (각종 조직), 방광 암종 (전이 세포 암종 (방광의 악성 신생물) 포함), 기관지 암종, 결장 암종, 결장직장 암종, 위 암종, 폐 암종 (폐의 소세포 암종 및 비-소세포 암종 포함), 부신 피질 암종, 갑상샘 암종, 췌장 암종, 유방 암종, 난소 암종, 전립선 암종, 선암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 낭선종, 수질성 암종, 신세포 암종, 유관 상피내암종 또는 담관 암종, 융모막암종, 정상피종, 배아 암종, 윌름스 종양, 자궁경부 암종, 자궁 암종, 고환 암종, 골원성 암종, 상피 암종, 및 비인두 암종 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0130] 육종으로는 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 척삭종, 골원성 육종, 골육종, 혈관육종, 내피 육종, 림프관 육종, 림프관내피육종, 윤활막종, 중피종, 유잉 육종, 평활근육종, 횡문근육종, 및 다른 연조직 육종을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0131] 고형 종양으로는 신경아교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막종, 송과체종, 혈관아세포종, 청신경초종, 희소돌기아교세포종, 뇌수막종, 흑색종, 신경아세포종, 및 망막아세포종을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0132] 백혈병으로는 a) 만성 골수증식성 증후군 (다능성 조혈 줄기 세포의 신생물성 장애); b) 급성 골수성 백혈병 (다능성 조혈 줄기 세포 또는 제한된 계통 잠재능을 가진 조혈 세포의 신생물성 형질전환); c) 만성 림프구성 백혈병 (CLL; 면역학적으로 미숙한 및 기능성 무능력한 소형 림프구의 클로날 증식) (B-세포 CLL, T-세포 CLL 전림프구성 백혈병, 및 모발상 세포 백혈병; 및 d) 급성 림프아구성 백혈병 (림프아구의 축적을 특징으로 하는 것)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 림프종은 B-세포 림프종 (예컨대, 버킷 림프종); 호지킨 림프종 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0133] 양성 종양으로는 예컨대, 혈관종, 간세포 샘종, 해면 혈관종, 초점성 결절성 과증식, 청신경초종, 신경섬유종, 담관 샘종, 담관 낭선종, 섬유종, 지방종, 평활근종, 중피종, 기형종, 점액종, 결절성 재생 과증식, 트라코마 및 화농 육아종을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0134] 원발성 및 전이성 종양으로는 예컨대, 폐암 (폐 선암종, 편평 세포 암종, 대세포 암종, 세기관지폐포 암종, 비-소세포 암종, 소세포 암종, 중피종을 포함하나, 이에 한정되지 않는다); 유방암 (유관 암종, 소엽 암종, 염증성 유방암, 투명 세포 암종, 점액 암종을 포함하나, 이에 한정되지 않는다); 결장직장암 (결장암, 직장암을 포함하나, 이에 한정되지 않는다); 및 암; 췌장암 (췌장 선암종, 섬세포 암종, 신경내분비 종양을 포함하나, 이에 한정되지 않는다); 전립선암; 난소 암종 (난소 상피 암종 또는 표면 상피-간질 종양 (장액성 종양 포함), 자궁내막암 종양 및 점액 낭선종, 성삭-간질 종양을 포함하나, 이에 한정되지 않는다); 간 및 담관 암종 (간세포 암종, 담관암종, 혈관종을 포함하나, 이에 한정되지 않는다); 식도 암종 (식도 선암종 및 편평 세포 암종을 포함하나, 이에 한정되지 않는다); 비-호지킨 림프종; 방광 암종; 자궁 암종 (자궁내막 선암종, 자궁 유두상 장액 암종, 자궁 투명 세포 암종, 자궁 육종 및 평활근육종, 혼합 밀러 종양을 포함하나, 이에 한정되지 않는다); 신경아교종, 아교모세포종, 수모세포종, 및 다른 뇌 종양; 신장암 (신세포 암종, 투명 세포 암종, 윌름스 종양을 포함하나, 이에 한정되지 않는다); 두부경부암 (편평 세포 암종을 포함하나, 이에 한정되지 않는다); 위암 (위 선암종, 위장 간질 종양을 포함하나, 이에 한정되지 않는다); 다발성 골수종; 고환암; 생식 세포 종양; 신경내분비 종양; 자궁경부암; 위장관, 유방, 및 다른 기관의 카르시노이드; 및 반지 세포 암종을 포함한다.
- [0135] 일부 경우에서, 종양 환자는 현재 암 치료를 받고 있는 환자이다. 일부 경우에서, 치료는 LOXL2 폴리펩티드의 효소 활성을 억제시키는 작용제를 투여하는 것을 포함한다. LOXL2 효소 활성을 억제시키는 작용제로는 LOXL2 효소 활성의 알로스테릭 억제제를 포함한다. 일부 경우에서, 알로스테릭 억제제는 항-LOXL2 모노클로날 항체, 예컨대 LOXL2의 "SRCR3-4" 도메인 내의 에피토프에 결합하는 항-LOXL2 모노클로날 항체이다. LOXL2 효소 활성을 억제시키고, SRCR3-4 도메인 내의 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체에 관한 비제한적인 예는 AB0023 및 AB0024이다; 예컨대, US 2009/0053224를 참조할 수 있다.
- [0136] **상피에서 중간엽으로의 전이**
- [0137] 대상 검정 방법을 사용하여 시험하는 데 적합한 개체로는 상피 세포의 상피에서 중간엽으로의 전이 (EMT)가 발

생한 개체를 포함한다. 대상 검정 방법을 사용하여 시험하는 데 적합한 개체로는 (종양 및 섬유성 질환의 병적 미세환경을 생성하는 것으로 간주되는 인자인) 섬유조직형성 및 섬유모세포 활성화가 발생한 개체를 포함한다. 상기 개체는 전암성 세포를 가질 수 있고/거나, 암 발병에 있어 초기 단계에 있는 개체일 수 있다.

[0138] 섬유증

[0139] 대상 LOXL2 검정 방법을 사용하여 시험하는 데 적합한 개체로는 섬유증 (섬유성 질환), 예컨대 간 섬유증, 신장 섬유증, 폐 섬유증, 골수섬유증, 심장 섬유증, 또는 다른 유형의 섬유증을 앓는 것으로 진단받은 개체를 포함한다. 대상 LOXL2 검정 방법을 사용하여 시험하는 데 적합한 개체로는 섬유성 질환 (예컨대, 간 섬유증, 신장 섬유증, 폐 섬유증, 골수섬유증, 심장 섬유증, 또는 다른 유형의 섬유증)을 앓고 있지만, 아직 섬유성 질환 진단을 받지 않은 개체를 포함한다.

[0140] 일부 경우에서, 적합한 시험 대상체는 진행성 형태의 섬유증을 앓는 대상체이지만, 이는 여전히 섬유증에 대한 치료 요법을 이용한 치료에 적합할 수 있다. 예를 들어, 적합한 시험 대상체는 활동성 (말기는 아닌) 섬유증을 앓는 대상체를 포함한다. 일부 경우에서, 적합한 시험 대상체는 섬유증을 앓고 있는 대상체, 질환이 신속하게 진행될 것으로 예상될 수 있는 대상체이다.

[0141] 일부 경우에서, 대상 LOXL2 검정법을 사용하여 시험하고자 하는 개체는 섬유성 질환 치료를 현재 받고 있는 개체이다. 일부 경우에서, 치료는 LOXL2 폴리펩티드의 효소 활성을 억제시키는 작용제를 투여하는 것을 포함한다. LOXL2 효소 활성을 억제시키는 작용제로는 LOXL2 효소 활성의 알로스테릭 억제제를 포함한다. 일부 경우에서, 알로스테릭 억제제는 항-LOXL2 모노클로날 항체, 예컨대 LOXL2의 "SRCR3-4" 도메인 내의 에피토프에 결합하는 항-LOXL2 모노클로날 항체이다. LOXL2 효소 활성을 억제시키고, SRCR3-4 도메인 내의 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체에 관한 비제한적인 예는 AB0023 및 AB0024이다; 예컨대, US 2009/0053224를 참조할 수 있다.

[0142] 간 섬유증

[0143] 간 섬유증은 많은 간 질환의 병상과 연루되어 있다. 섬유증은 혈액소침착증, 윌슨병, 알콜 중독, 주혈흡충증, 바이러스 감염, 담관 폐색, 독소에의 노출, 및 대사 장애의 합병증으로서 발생할 수 있다. 간 섬유증을 검사받지 않고 그대로 두면, 이는 (피막화된 결정의 존재로 정의되는) 간경변증, 간부전, 및 사망으로 진행된다.

[0144] 간 섬유증으로는 간경변증, 및 관련 병증, 예컨대 만성 바이러스 감염, 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD), 알콜성 지방간염 (ASH), 비-알콜성 지방간염 (NASH), 원발성 담즙성 간경변증 (PBC), 담즙성 간경변증, 원발성 경화성 담관염, 및 자가면역 간염을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0145] 기생충 및 바이러스 감염 (예컨대, B형 바이러스 감염 (HBV), HCV, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 주혈흡충증), 또는 알콜 소비로 인한 장기간의 스트레스가 근원이 되는 만성 간 손상을 인해 전형적으로 간은 재형성되고, 가장진대, 손상된 부위는 피막화되고, 남아있는 간 조직은 손상으로부터 보호된다 (문헌 [Li and Friedman, *Gastroenterol. Hepatol.* 14:618-633, 1999]). 간 섬유증 결과, 세포의 기질은 변화하게 되는데 총 콜라겐 함량으 3-10배 증가하게 되고, 저밀도 기저막은 고밀도 기질로 대체되는데, 이는 간세포, 간 정상 세포 및 내피세포의 대사 및 합성 기능을 손상시킨다 (문헌 [[Girogescu, M., *Non-invasive Biochemical Markers of Liver Fibrosis*, J. Gastrointest. Liver Dis., 15(2): 149-159 (2006)]].

[0146] 간 섬유증의 정도 및 중증도를 정량적으로 평가하는 표준화된 점수화 체계가 다수 존재하다. 이러한 것으로 METAVIR, 도텔(Knodell), 쇼이어(Scheuer), 루트비히(Ludwig), 및 이샤크 점수화 체계를 포함한다. 간 섬유증을 앓는 개체로는 METAVIR, 도텔, 쇼이어, 루트비히, 및 이샤크 점수화 체계 중 임의 것에 기초하여, 임의 정도 및 중증도의 간 섬유증을 앓는 개체를 포함한다.

[0147] METAVIR 점수화 체계는 섬유증 (문맥 섬유증, 중심소엽 섬유증, 및 간경변증); 괴사 (조각 및 소엽 괴사, 호산성 수축, 및 풍선 변성); 염증 (문맥관 염증, 문맥 림프성 응집체, 및 문맥 염증 분포); 담관 변화; 및 도텔 지수 (문맥 주위 괴사, 소엽 괴사, 문맥 염증, 섬유증, 및 전체 질환 활동성 점수)를 비롯한, 간 생검의 다양한 특징을 분석하는 것에 기초한다. METAVIR 체계에서 각 병기는 하기와 같이 정의된다: 점수: 0, 섬유증 없음; 점수: 1, 문맥관의 정상 비대, 격막 형성 없음; 점수: 2, 문맥관 비대와 함께 격막 형성이 드물게 보임; 점수: 3, 간경변증없이 많은 격막이 보임; 및 점수: 4, 간경변증.

[0148] 조직학적 활동성 지수(Histology Activity Index)로도 불리는 도텔 점수화 체계는 조직학적 특징 점수에 기초하여 표본을 4개의 카테고리로 분류한다: I. 문맥 주위 및/또는 가교 괴사; II. 소엽내 변성 및 국소 괴사; III.

문맥 염증; 및 IV. 섬유증. 도넬 병기 분류 체계에서, 점수는 하기와 같다: 점수: 0, 섬유증 없음; 점수: 1, 경미한 섬유증 (섬유 문맥 확장); 점수: 2, 중간 정도의 섬유증; 점수: 3, 중증 섬유증 (가교 섬유증); 및 점수: 4, 간경변증. 점수가 높을수록 간 조직 손상 정도는 심각한 것이다 (문헌 [Knodel (1981) *Hepatology*, 1:431]).

[0149] 쇼이어 점수화 체계에서, 점수는 하기와 같다: 점수: 0, 섬유증 없음; 점수: 1, 섬유 문맥관 비대; 점수: 2, 문맥 주위 또는 문맥-문맥 격막, 그러나, 온전한 구조; 점수: 3, 구조적 왜곡을 보이는 섬유증, 뚜렷한 간경변증은 보이지 않음; 점수: 4, 가능 또는 확진 간경변증 (문헌 [Scheuer (1991) *J. Hepatology*, 13:372]).

[0150] 이샤크 점수화 체계는 문헌 [Ishak (1995) *J. Hepatology*, 22:696-699]에 기술되어 있다. 병기 0, 섬유증 없음; 병기 1, 일부 문맥 부위의 섬유 확장, 짧은 섬유 격막을 보이거나, 보이지 않음; 병기 2, 대부분의 문맥 부위의 섬유 확장, 짧은 섬유 격막을 보이거나, 보이지 않음; 병기 3, 대부분의 문맥 부위의 섬유 확장과 함께, 문맥과 문맥 (P-P)의 간헐적 가교; 병기 4, 문맥 부위의 섬유 확장과 함께, 뚜렷한 가교 (P-P) 뿐만 아니라, 문맥-중추 (P-C); 병기 5, 뚜렷한 가교 (P-P 및/또는 P-C)와 함께, 간헐적 결절 (불완전 간경변증); 병기 6, 가능 또는 확진 간경변증.

[0151] 신장 섬유증

[0152] 간 섬유증과 같이, 신장 섬유증은 각종 질환 및 신장 손상으로부터 유발될 수 있다. 상기 질환 및 손상의 예로는 만성 신장 질환, 대사 증후군, 방광 요관 역류, 세뇨관 간질성 신장 섬유증, 당뇨병 (당뇨 신장병 포함), 및 그 결과로 생기는, 국소 분절 사구체경화증, 및 막 사구체신염, 사구체 혈관 간질 모세관 GN을 포함하나, 이에 한정되지 않는 사구체 신염 (GN)을 포함한다.

[0153] 대사 증후군은 당뇨 홀마크, 예컨대 인슐린 저항성 뿐만 아니라, 중심부 또는 내장 비만 및 고혈압을 비롯한 비정상의 집합체인 것으로 인식되어 왔다. 거의 모든 사례에서, 글로코스의 조절장애가 일어나면 시토킨 방출은 자극받게 되고, 세포의 기질 침착은 상향조절된다. 만성 신장 질환, 당뇨병, 대사 증후군, 및 사구체신염의 원인이 되는 추가의 요인으로는 고지혈증, 고혈압, 및 단백뇨를 포함하는데, 이들은 모두 신장을 추가로 손상시키며, 세포의 기질 침착을 추가로 자극시킨다. 따라서, 1차적인 원인과는 상관없이, 신장이 손상되면 신장 섬유증이 유발될 수 있고, 이에 수반하여 신장 기능도 손실될 수 있다 (문헌 [Schena, F. and Gesualdo, L., *Pathogenic Mechanisms of Diabetic Nephropathy*, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 16: S30-S33 (2005)]; [Whaley-Connell, A., and Sower, J.R., *Chronic Kidney Disease and the Cardiometabolic Syndrome*, *J. Clin. Hypert.*, 8(8): 546-48 (2006)]).

[0154] 폐 섬유증

[0155] 폐 섬유증은 많은 증후군 및 질환을 포함한다. 예시적인 질환은 특발성 폐 섬유증 (IPF), 특발성 간질 폐렴, 및 급성 호흡곤란 증후군(ARDS)을 포함한다. 폐 섬유증은 또한 잠재 섬유성 폐포염, 만성 섬유성 간질 폐렴, 간질 폐 질환 (ILD), 및 미만성 실질 폐 질환 (DPLD)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0156] 상기 언급된 질환을 비롯한 대부분의 폐 섬유증에 대한 발병기전은 잘 이해되고 있지 못하지만, 이들 모두는 염증성 세포 유입, 및 이어지는 콜라겐이 풍부한 세포의 기질의 합성 및 침착 증가를 특징으로 한다 (문헌 [Chua et al., *Am J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 33:9-13 (2005)]; [Tzortzaki et al., *J. Histochem. & Cytochem.*, 54(6): 693-700 (2006)]; [Armstrong et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 160: 1910-1915 (1999)]).

[0157] IPF는 비록 하기의 두 증상은 또한 해리될 수도 있기는 하지만, 이는 폐 조직의 염증, 및 최종적으로는 섬유증을 특징으로 한다. IPF의 원인에 대해서는 알려져 있지 않다; 이는 자가면역 장애로부터, 또는 감염의 결과로서 유발될 수 있다. IPF의 증상으로는 질환이 진행됨에 따라 주요 증상이 되는 호흡곤란 (즉, 숨가쁨), 및 다른 기침을 포함한다. 사망의 원인이 저산소혈증, 우심부전, 심장마비, 폐 색전증, 뇌졸중 또는 폐 감염이 될 수도 있으며, 이들 모두는 상기 질환에 의해 유발될 수 있다.

[0158] 일부 경우에서, 대상 LOXL2 검정법을 사용하여 시험하고자 하는 개체는 현재 IPF에 대한 치료를 받고 있는 개체이다. 일부 경우에서, 치료는 LOXL2 폴리펩티드의 효소 활성을 억제시키는 작용제를 투여하는 것을 포함한다. LOXL2 효소 활성을 억제시키는 작용제로는 LOXL2 효소 활성의 알로스테릭 억제제를 포함한다. 일부 경우에서, 알로스테릭 억제제는 항-LOXL2 모노클로날 항체, 예컨대 LOXL2의 "SRCR3-4" 도메인 내의 에피토프에 결합하는 항-LOXL2 모노클로날 항체이다. LOXL2 효소 활성을 억제시키고, SRCR3-4 도메인 내의 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체에 관한 비제한적인 예는 AB0023 및 AB0024이다; 예컨대, US 2009/0053224를 참조할 수 있다.

- [0159] 골수섬유증
- [0160] 원발성 골수섬유증에서 발병 과정은 원발성 거대핵세포-가중 클론성 골수증식 및 골수 섬유증, 섬유증, 골경화증, 혈관신생, 및 골수의 조혈을 포함하는 부신생물성 기질 반응을 포함한다. 골수 반응은 세포외 기질 단백질, 예컨대 원섬유 콜라겐의 과도한 침착, 저세포성, 골수 섬유모세포의 활성화 및 동원, 과도한 시토카인 및 성장 인자 생산, 및 조혈 능력을 감소시키는 다른 변화를 포함한다. 속발성 골수섬유증은 진성 적혈구 증가증 또는 본태성 혈소판 증가증으로부터 일어날 수 있다.
- [0161] **치료를 받고 있는 개체**
- [0162] 일부 경우에서, 대상 LOXL2 검정법을 사용하여 시험하고자 하는 개체는 섬유성 질환에 대해 또는 암에 대해 현재 치료받고 있는 개체이다. 일부 경우에서, 치료는 LOXL2 폴리펩티드의 효소 활성을 억제시키는 작용제를 투여하는 것을 포함한다. LOXL2 효소 활성을 억제시키는 작용제로는 LOXL2 효소 활성의 알로스테릭 억제제를 포함한다. 일부 경우에서, 알로스테릭 억제제는 항-LOXL2 모노클로날 항체, 예컨대 LOXL2의 "SRCR3-4" 도메인 내의 에피토프에 결합하는 항-LOXL2 모노클로날 항체이다. LOXL2 효소 활성을 억제시키고, SRCR3-4 도메인 내의 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체에 관한 비제한적인 예는 AB0023 및 AB0024이다; 예컨대, US 2009/0053224를 참조할 수 있다.
- [0163] **진단 방법**
- [0164] 본 개시내용은 LOXL2 수준 상승, 예컨대 순환 LOXL2 상승과 관련되거나, 또는 그를 특징으로 하는 질환 및 병증을 비롯한, LOXL2와 관련된 질환 및 병증에 대한 다양한 진단 방법을 제공한다. 예를 들어, 개체가 순환하는 LOXL2 상승을 특징으로 하는 질환을 앓는지 여부를 측정하는 방법을 제공한다. 또한, 상기 질환 또는 병증의 활동성 또는 중증을 평가하는 방법을 제공한다. 진단 방법은 일반적으로 상기 기술된 바와 같이, 대상 LOXL2 검정법을 사용하여 개체에서 순환하는 LOXL2 수준을 검출하는 것을 포함한다. 순환하는 LOXL2 상승을 특징으로 하는 질환으로는 암 및 섬유증을 포함한다.
- [0165] 주어진 샘플에서 LOXL2의 수준은 중량 농도, 또는 본원에 기술된 검출 방법의 다른 판독치에 의해 표현될 수 있다. 한 측면에서, 순환하는 LOXL2의 수준이 정상적인 대조군 수준 또는 다른 참조 수준보다 크다면, 이는 개체가 순환하는 LOXL2 상승을 특징으로 하는 질환을 앓고 있음을 나타내는 것이다. 예를 들어, 순환하는 LOXL2의 수준이 정상적인 대조군 또는 다른 참조 수준보다 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 또는 50% 초과만큼 더 높다면, 이는 개체가 순환하는 LOXL2 상승을 특징으로 하는 질환을 앓고 있음을 나타내는 것일 수 있다. 또 다른 일례로서, 순환하는 LOXL2의 수준이 약 40 pg/ml 초과, 약 50 pg/ml 초과, 약 75 pg/ml 초과, 약 100 pg/ml 초과, 약 150 pg/ml 초과, 약 175 pg/ml 초과, 약 200 pg/ml 초과, 약 250 pg/ml 초과, 약 300 pg/ml 초과, 약 350 pg/ml 초과, 약 400 pg/ml 초과, 약 450 pg/ml 초과, 약 500 pg/ml 초과, 약 550 pg/ml 초과, 약 600 pg/ml 초과, 약 650 pg/ml 초과, 약 700 pg/ml 초과, 약 750 pg/ml 초과, 약 800 pg/ml 초과라면, 이는 개체가 순환하는 LOXL2 상승을 특징으로 하는 질환을 앓고 있음을 나타내는 것일 수 있고/거나, 예컨대 활동성 질환 또는 특정 활동성 수준을 시사함으로써 상기 질환 또는 병증에 대한 예후 또는 예측 정보를 제공하는 것일 수 있다. 일부 경우에서, 상기 수준은 대상체에서 활동성인 섬유발생을 나타내는 것이다. 본원에서 사용되는 바, LOXL2와 관련하여 "정상적인 대조군 수준," 및 "참조 수준"이라는 용어는 샘플, 예컨대 시험 샘플 중의 LOXL2 수준의 비교 대상이 되는 LOXL2 수준을 의미한다. 일례에서, 정상적인 대조군 또는 참조 수준은 일반적으로 건강한 개체, 예컨대 대상 질환 또는 병증, 예컨대 LOXL2-관련 질환 또는 병증을 앓지 않는 개체로부터 수득된 샘플 중에서 관찰되는 수준이다. 또 다른 일례에서, LOXL2-관련 질환 또는 병증을 앓는 개체, 예컨대 활동성이 더 낮은 질환, 상대적으로 더 우수한 예후, 또는 특정 결과, 종점, 또는 사례, 예컨대 생존 또는 치료에 대한 반응성과 관련되는 더욱 유리한 기회를 가진 개체에서 관찰되는 수준이다. 예를 들어, 참조 또는 정상적인 대조군 수준은 최종적으로는 유리한 결과, 종점, 또는 사례를 보인 개체로부터 수득된 샘플 중의, 특정 시점에 관찰되는 수준, 예컨대 기준선 수준일 수 있다. 또 다른 일례에서, 정상적인 대조군 또는 참조 수준은 검정하는 샘플과 비교의 대상이 되는 상이한 시점에서 동일한 개체로부터 얻은 샘플 중에서 관찰되는 수준, 예를 들어 치료 이전의 기준선 수준, 또는 질환 진행의 초기 시점의 수준 또는 질환 검출 이전의 수준이다. 또 다른 일례에서, 정상적인 또는 참조 수준은 표준 수준, 예컨대 사전 정의된 LOXL2 농도를 가지도록 제조된 샘플 중의 수준, 또는 간단하게 사전 정의된 수준이다. 본원에서 사용되는 바, "기준선"이란 특정 사례 또는 기간 이전의 시점, 예컨대 치료 이전의 시점, 또는 질환 진행을 모니터링하는 연구를 개시하기 이전의 시점에서의 특정 변수의 양, 수준, 측정치를 의미한다. 따라서, 한 측면에서, LOXL2의 참조 또는 정상적인 대조군 수준은 기준선 수준, 예컨대 동일한 개체로부터, 또는 또 다른 개체로서의 기준선 수준이

다.

[0166] **대조군 값**

[0167] 시험 대상체로부터 수득된 액체 샘플 중의 LOXL2의 수준을 정상적인 대조군 값(들) 또는 정상적인 대조군 값의 범위와 비교할 수 있다. 대조군 값은 대조군 집단, 예컨대 인간 대상체로 이루어진 일반 집단 또는 엄선된 집단으로부터 수득된 비교가능한 샘플 (예컨대, 혈액, 혈장, 또는 혈청 샘플, 또는 다른 액체 생물학적 샘플) 중의 LOXL2 수준에 기초한 것일 수 있다. 예를 들어, 엄선된 집단은 외관상 건강한 대상체, 예컨대 이전에 섬유증 또는 암의 어떤 징후 또는 증상도 보이지 않은 개체로 구성될 수 있다. 다르게는 외관상 건강한 개체는 또한 일반적으로 어떤 질환 증상도 보이지 않는 개체이다. 다시 말해, 상기 개체는 전문 의료진을 통해 검사받았다면, 건강하거나, 어떤 질환 증상도 보이지 않는 것을 특징으로 할 것이다. 별법으로, 평가된 값을 다른 참조 값, 예컨대 특정 질환 또는 병증을 앓는 대상체 집단에 대하여 관찰된 평균(average), 평균(mean) 또는 중앙값 또는 값들과 비교할 수 있다. 예를 들어, 상기 참조 값은 특정 개체에 대해 평가된 수준과 비교하는 데 사용될 수 있으며, 이어서, 상기 특정 개체는 예를 들어, 참조 값 입수의 기점된 전체 환자 코호트와 비교하여 더욱 활동적인 질환을 앓는 것으로 측정된다.

[0168] 대조군 값은 다양한 형태의 것을 취할 수 있다. 대조군 값은 단일 절사값, 예컨대 중앙값 또는 평균일 수 있다. 정상적인 대조군 값은 정상적인 대조군 범위일 수 있다.

[0169] **시험하고자 하는 개체**

[0170] 시험 대상체로는 상기 열거된 대상체를 포함한다. 대상 검정법을 사용하여 시험하는 데 적합한 개체로는 아직 질환 진단을 받지 않았지만, 의사에게 증상 및/또는 통증을 제시하는 개체 (예컨대, 진단받지 않은 장애 또는 질환을 앓고 있는 개체); 암 진단을 받은 개체; 암을 앓고 있을 것으로 의심되지만, 아직 암 진단을 받지 않은 개체; 외관상 건강하며, 정기 검진을 받는 개체; 섬유증 진단을 받은 개체; 섬유증을 앓고 있을 것으로 의심되지만, 아직 섬유증 진단을 받지 않은 개체; C형 바이러스 간염 (HCV) 감염, 또는 B형 바이러스 간염 (HBV) 감염을 앓는 것으로 진단받은 (및 임의로 HCV 감염- 또는 HBV 감염-관련 간 손상을 앓는 것으로 진단받은) 개체; 및 암 또는 섬유성 질환 치료를 받고 있는 개체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0171] 일부 경우에서, 시험하고자 하는 개체는 진단받지 않은 장애 또는 질환을 앓고 있는 개체, 예컨대 증상 및/또는 통증을 제시하는 개체이다. 대상 진단 방법은 상기 개체가 섬유성 질환 또는 암을 앓는지 여부를 측정하는 데 사용될 수 있다. 대상 진단 방법은 감별 진단의 일부일 수 있고; 일부 경우에서, 이는 예컨대, 진단을 확인하거나, 또는 배제시키기 위해 하나 이상의 진단 시험과 함께 사용될 수 있다.

[0172] **보고서 작성**

[0173] 대상 진단 방법은 개체가 섬유성 질환 또는 암을 앓을 가능성이 있는지 여부를 보여주는 보고서를 작성하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 보고서는 정보, 예컨대 추가 평가에 관한 권고; 치료학적 약물 치료에 관한 권고 등을 포함할 수 있다.

[0174] 대상 보고서는 1) 서비스 제공자 정보; 2) 환자 데이터; 3) LOXL2 수준에 관한 데이터; 4) 후처리 평가 권고; 5) 치료학적 약물 치료; 및 6) 다른 특징 중 하나 이상의 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0175] **추가 평가**

[0176] (상기 기술된 바와 같이) LOXL2 수준 검출에 기초하여, 및/또는 보고서에 기초하여, 의사 또는 다른 유자격 의료인은 시험 대상체 (환자)에 대한 추가 평가가 필요한지 여부를 판단할 수 있다. 추가 평가로는 예컨대, 폐 기능 검사 (예컨대, 폐 섬유증이 의심되는 경우); 간 기능 검사 (예컨대, 간 섬유증이 의심되는 경우); 및 의심되는 암 유형에 따라 달라질 수 있는, 암에 대한 각종 검사를 포함할 수 있다.

[0177] 일례로서, 개체가 암을 앓고 있을 것으로 의심되는 경우, 암에 대한 다양한 검사 중 임의의 것이 수행될 수 있으며, 여기서 상기 검사로는 예컨대, 암성 세포의 존재에 대하여 조직 생검을 분석하는 조직화학적 분석법; 종양 관련 항원의 존재에 대한 검사 등을 포함한다.

[0178] 또 다른 일례로서, 개체가 폐 섬유성 장애를 앓고 있을 것으로 의심되는 경우, 개체는 폐 섬유성 장애의 증상에 대하여 평가받을 수 있다. 폐 섬유성 장애의 증상으로는 체중 감소, 폐 중량 증가, 폐 섬유증, 병적 폐 구조 (예컨대, "봉소상" 폐), 애쉬크로프트(Ashcroft) 점수 증가, 폐 콜라겐 수준 증가, CD45⁺/콜라겐⁺ 세포 개수 증가, 폐세포 증식 및 확장, 및 기관지폐포 세척액 (BAL) 중 백혈구 개수 증가를 포함할 수 있으나, 이에 한정

되지 않는다. 증상으로는 또한 예를 들어, 하기 분자: LOXL2, α -평활근 액틴 (α -SMA), 형질전환 성장 인자 β -1 (TGF β -1), 기질 유래 인자-1 (SDF-1) (예컨대, SDF-1 α), 엔도텔린-1 (ET-1) 및 인산화된 SMAD2 중 하나 이상의 폐 수준 증가를 포함할 수 있다.

[0179] 추가의 예로서, 개체가 간 섬유증을 앓고 있을 것으로 의심되는 경우, 개체는 간 기능의 마커에 대하여 평가받을 수 있다. 간 기능은 단백질, 예컨대 혈청 단백질 (예컨대, 알부민, 응고 인자, 알칼리성 포스파타제, 아미노트랜스퍼라제 (예컨대, 알라닌 트랜스아미나제, 아스파르테이트 트랜스아미나제), 5'-뉴클레오시다제, γ -글루타미닐트랜스펩티다제 등) 합성, 빌리루빈 합성, 콜레스테롤 합성, 및 담즙산 합성; 탄수화물 대사, 아미노산 및 암모니아 대사, 호르몬 대사, 및 지질 대사를 포함하나, 이에 한정되지 않는, 간 대사 기능; 외인성 약물의 해독; 내장 및 문맥 혈류역학적 성질을 비롯한, 혈류역학적 기능 성질 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 표준 검정법을 사용하여 혈청 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT) 수준을 측정한다. 일반적으로, ALT 수준이 약 45 국제 단위 미만인 것이 정상인 것으로 간주된다. ALT 수준이 상승되었다면, 이는 간 기능이 손상되었음을 나타내는 것일 수 있다. 간 저장 기능에 대한 정량적 검사 또한 간 기능을 평가하는 데 사용될 수 있으며, 상기와 같은 검사는 예컨대, 인도시아닌 그린 청소율 (ICG), 갈락토스 제거능 (GEC), 아미노피리딘 호흡 검사 (ABT), 항피리딘 청소율, 모노에틸글리신-크실리디드 (MEG-X) 청소율, 및 카페인 청소율을 포함한다.

[0180] 요법

[0181] (상기 기술된 바와 같이) LOXL2 수준 검출에 기초하여, 및/또는 보고서에 기초하여, 의사 또는 다른 유자격 의료인은 예컨대, 섬유성 질환을 치료하는 데, 암 등을 치료하는 데 적절한 치료학적 약물 치료가 권고될 수 있는지 여부를 판단할 수 있다.

[0182] 예를 들어, 순환하는 LOXL2 수준에 기초하여, 및 임의로 추가 평가 (예컨대, 조직 생검의 조직화학적 분석법)에 기초하여 조기 암을 앓는 것으로 측정된 개체에서는 암 화학 요법적 약물 요법을 개시할 수 있고/거나, 상기 개체를 방사선 요법으로 치료할 수 있고/거나, 암을 제거하는 외과 수술을 받을 수 있다.

[0183] 암 화학요법 작용제 ("화학요법제")로는 세포독성 및 세포 증식 억제 약물을 포함한다. 화학요법제는 예컨대, 형질전환된 상태에서 분화된 상태로의 역전과 같이, 세포에 대해 다른 효과를 미치는 것, 또는 세포 복제를 억제시키는 것을 포함할 수 있다. 공지된 세포독성제의 예는 예를 들어, 문헌 [Goodman et al., "The Pharmacological Basis of Therapeutics," Sixth Edition, A.B. Gilman et al., eds./Macmillan Publishing Co. New York, 1980]에 열거되어 있다. 이는 타산, 예컨대 파클리탁셀 및 도세탁셀; 질소, 예컨대 메클로레타민, 멜팔란, 우리실 머스타드 및 클로람부실; 에틸렌이민 유도체, 예컨대 티오테파; 알킬 술포네이트, 예컨대 부술판; 니트로소우레아, 예컨대 로무스틴, 세무스틴 및 스트렙토조신; 트리아젠, 예컨대 다카바진; 엽산 유사체, 예컨대 메토폭세이트; 피리미딘 유사체, 예컨대 플루오로우라실, 시타라빈 및 아자리빈; 퓨린 유사체, 예컨대 머캅토피린 및 티오구아닌; 빈카 알칼로이드, 예컨대 빈블라스틴 및 빈크리스틴; 항생제, 예컨대 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 및 미토마이신; 금속 착화합물, 예컨대 백금 배위 착화합물, 예컨대 시스플라틴; 치환된 우레아, 예컨대 히드록시우레아; 메틸 히드라진 유도체, 예컨대 프로카바진; 부신 피질 억제제, 예컨대 미토탄; 호르몬 및 길항제, 예컨대 아드레노코르티코스테로이드 (프레드니손), 프로게스틴 (히드록시프로게스테론 카프로에이트, 아세테이트 및 메게스테롤 아세테이트), 에스트로겐 (디에틸stil베스트롤 및 에티닐 에스트라디올), 및 안드로겐 (테스토스테론 프로피오네이트 및 플루옥시메스테론)을 포함한다.

[0184] 또 다른 일례로서, 예를 들어 순환하는 LOXL2 수준에 기초하여, 및 임의로 추가 평가 (예컨대, 폐 기능 검사)에 기초하여 IPF를 앓는 것으로 측정된 개체는 IPF에 대한 제약 치료 및/또는 IPF에 대한 다른 치료로 치료할 수 있다. IPF에 대한 1차 치료는 제약 치료이고, IPF 치료에 사용되는 가장 보편적인 약물은 코르티코스테로이드 (예컨대, 프레드니손), 페니실라민, 및 각종 항산화제 (예컨대, 시클로포스파미드, 아자티오프린, 클로람부실, 빈크리스틴 및 콜히친)이다. 다른 치료로는 산소 투여를 포함하고, 극단적인 경우에는 폐 이식을 포함한다.

[0185] 추가의 일례로서, 순환하는 LOXL2 수준에 기초하여, 및 임의로 추가 평가 (예컨대, 간 기능 검사; HCV, HBV로의 감염에 대한 검사 등)에 기초하여 간 섬유증을 앓는 것으로 측정된 개체는 예컨대, 항바이러스제, 예컨대 HCV 또는 HBV 감염 또는 다른 간염 바이러스 감염을 치료하는 데 적합한 작용제로 치료할 수 있다. 예를 들어, HCV 감염을 인터페론-알파 (IFN- α), 비라미딘, 리바비린, 레보비린, HCV NS3 억제제, HCV NS5B 억제제, 또는 상기 중 하나 이상의 것의 조합으로 치료할 수 있다.

[0186] 치료의 효능을 모니터링하는 방법

- [0187] 본 개시내용은 일반적으로 대상 LOXL2 검정법을 사용하여 개체에서의 순환하는 LOXL2 수준을 일정 시점에 측정하는 단계를 포함하는, LOXL2-관련된 질환 또는 병증, 예컨대 순환하는 LOXL2 상승을 특징으로 하는 질환에 대한 치료의 효능을 모니터링하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 샘플 중의 LOXL2 수준이 초기 시점에 개체로부터 취득된 수준보다 낮다면, 이는 치료가 효능이 있다는 것을 나타내는 것이다. 또 다른 측면에서, 대조군 또는 참조 샘플과 비교하여 수준이 더 낮다면, 이는 치료가 효능이 있다는 것을 나타내는 것이다. 또 다른 측면에서, LOXL2 수준, 예컨대 더 높은 LOXL2 수준은 개체가 치료, 예컨대 LOXL2를 표적화하는 요법에 대해 바람직하게 반응할 것이라는 것을 나타내는 것이다.
- [0188] 예를 들어, 개체에서 제1 시점 및 제2 시점에 순환하는 LOXL2 수준을 측정하는 데, 여기서 제2 시점은 제1 시점 이후의 시점이다. 제1 시점은 치료 개시 이전 시점일 수 있고; 제2 시점은 치료가 진행되는 기간 동안의 시점(예컨대, 치료 요법이 시작된 이후의 시점)일 수 있다. 제1 시점은 치료가 진행되는 기간 동안의 시점일 수 있고; 제2 시점은 치료가 진행되는 기간 동안의 시점 이후의 시점일 수 있다. 제2 시점은 제1 시점 이후 약 1시간 내지 약 1년이 경과한 때의 시점일 수 있고, 예컨대 제2 시점은 제1 시점 이후 약 1시간 내지 약 2시간, 약 2시간 내지 약 4시간, 약 4시간 내지 약 8시간, 약 8시간 내지 약 16시간, 약 16시간 내지 약 24시간, 약 24시간 내지 약 36시간, 약 36시간 내지 약 72시간, 약 72시간 내지 약 4일, 약 4일 내지 약 1주, 약 1주 내지 약 2주, 약 2주 내지 약 1개월, 약 1개월 내지 약 3개월, 약 3개월 내지 약 6개월, 또는 약 6개월 내지 약 1년, 또는 1년 초과 시간의 시점일 수 있다.
- [0189] 따라서, 예컨대 일부 실시양태에서, 순환하는 LOXL2 상승을 특징으로 하는 질환에 대한 치료의 효능을 측정하는 대상 방법은 a) (제1 시점에 개체로부터 취득된 액체 샘플 중의 LOXL2 수준을 측정함으로써) 제1 시점에 개체에서 순환하는 LOXL2 수준을 측정하는 단계; b) (제2 시점에 개체로부터 취득된 액체 샘플 중의 LOXL2 수준을 측정함으로써) 제2 시점에 개체에서 순환하는 LOXL2 수준을 측정하는 단계; 및 제1 및 제2 시점으로부터의 LOXL2 수준을 비교하는 단계를 포함한다.
- [0190] 제2 시점의 순환하는 LOXL2 수준이 제1 시점의 순환하는 LOXL2 수준보다 낮다면, 순환하는 LOXL2 상승을 특징으로 하는 질환에 대한 치료가 효과적인 것이라 결론지을 수 있으며; 이러한 경우, 치료 요법을 계속 진행할 것을 권고할 수 있다. 제2 시점의 순환하는 LOXL2 수준이 제1 시점의 순환하는 LOXL2 수준보다 높다면, 순환하는 LOXL2 상승을 특징으로 하는 질환에 대한 치료가 효과적인 것이 아니라고 결론지을 수 있으며; 이러한 경우, 치료 요법을 중단하거나, 치료 요법에 사용되는 약물의 용량을 증가시키거나, 투약 빈도를 증가시키거나, 또는 대체 치료 요법을 수행할 것을 권고할 수 있다. 제2 시점의 순환하는 LOXL2 수준이 제1 시점의 순환하는 LOXL2 수준과 유의적인 차이가 없다면, 순환하는 LOXL2 상승을 특징으로 하는 질환에 대한 치료가 효과적인 것이 아니라고 결론지을 수 있거나, 또는 치료 요법을 변경하여야 한다고 결론지을 수 있으며; 이러한 경우, 치료 요법을 중단하거나, 치료 요법에 사용되는 약물의 용량을 증가시키거나, 투약 빈도를 증가시키거나, 또는 대체 치료 요법을 수행할 것을 권고할 수 있다.
- [0191] **시험 대상체**
- [0192] 치료의 효능을 모니터링하는 대상 방법을 사용하여 예컨대, 암 진단을 받고, 암에 대한 치료를 받고 있는 개체; 섬유증 진단을 받고, 섬유증에 대한 치료를 받고 있는 개체; HCV 또는 HBV 감염 진단을 받고, HCV 또는 HBV 감염에 대한 치료를 받고 있는 개체; HCV 또는 HBV 감염-관련 간 손상 진단을 받고, HCV 또는 HBV 감염 및/또는 간 손상에 대한 치료를 받고 있는 개체를 비롯한, 다양한 개체들 중 임의의 개체를 시험할 수 있다.
- [0193] 일부 경우에서, 대상 LOXL2 검정법을 사용하여 치료하고자 하는 개체는 현재 암 치료를 받고 있는 개체이다. 암 화학요법은 다양한 세포독성제 중 임의의 것일 수 있다. 상기와 같은 세포독성제로는 탁산, 예컨대 파클리탁셀 및 도세탁셀; 질소 예컨대, 메클로레타민, 멜팔란, 우리실 머스타드 및 클로람부실; 에틸렌이민 유도체, 예컨대 티오테파; 알킬 술포네이트, 예컨대 부술판; 니트로소우레아, 예컨대 로무스틴, 세무스틴 및 스트렙토조신; 트리아젠, 예컨대 다카바진; 엽산 유사체, 예컨대 메토타렉세이트; 피리미딘 유사체, 예컨대 플루오로우라실, 시타라빈 및 아자리빈; 퓨린 유사체, 예컨대 머캅토피린 및 티오구아닌; 빈카 알칼로이드, 예컨대 빈블라스틴 및 빈크리스틴; 항생제, 예컨대 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 및 미토마이신; 금속 착화합물, 예컨대 백금 배위 착화합물, 예컨대 시스플라틴; 치환된 우레아, 예컨대 히드록시우레아; 메틸 히드라진 유도체, 예컨대 프로카바진; 부신 피질 억제제, 예컨대 미토탄; 호르몬 및 길항제, 예컨대 아드레노코르티코스테로이드 (프레드니손), 프로게스틴 (히드록시프로게스테론 카프로에이트, 아세테이트 및 메게스테롤 아세테이트), 에스트로겐 (디에틸stil베스트롤 및 에티닐 에스트라디올), 및 안드로겐 (테스토스테론 프로피오네이트 및 플루옥시메스테론)을 포함한다.

- [0194] 일부 경우에서, 암 치료는 LOXL2 폴리펩티드의 효소 활성을 억제시키는 작용제를 투여하는 것을 포함한다. LOXL2 효소 활성을 억제시키는 작용제로는 LOXL2 효소 활성의 알로스테릭 억제제를 포함한다. 일부 경우에서, 알로스테릭 억제제는 항-LOXL2 모노클로날 항체, 예컨대 LOXL2의 "SRCR3-4" 도메인 내의 에피토프에 결합하는 항-LOXL2 모노클로날 항체이다. LOXL2 효소 활성을 억제시키고, SRCR3-4 도메인 내의 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체에 관한 비제한적인 예는 AB0023 및 AB0024이다; 예컨대, US 2009/0053224를 참조할 수 있다.
- [0195] 또 다른 예로서, 간 섬유증 치료를 받고 있는 개체, 또는 간 섬유증을 유발할 수 있는 질환에 대한 치료를 받고 있는 개체는 대상 방법을 사용하여 시험하는 데 적합하다. 일례로서, HCV 감염 치료를 받고 있는 개체가 대상 방법을 사용하여 시험하는 데 적합하다. 예를 들어, HCV 감염은 IFN- α , 비라미딘, 리바비린, 레보비린, HCV NS3 억제제, HCV NS5B 억제제, 또는 상기 중 하나 이상의 것의 조합으로 치료할 수 있다.
- [0196] 또 다른 예로서, IPF 치료를 받고 있는 개체가 대상 방법을 사용하여 시험하는 데 적합하다. IPF를 치료하는 데 보편적으로 사용되는 약물로는 예컨대, 코르티코스테로이드 (예컨대, 프레드니손), 페니실라민, 및 각종 항신생물제 (예컨대, 시클로포스파미드, 아자티오프린, 클로람부실, 빈크리스틴 및 콜히친)를 포함한다.
- [0197] **대조군 값**
- [0198] 시험 대상체로부터 취득된 액체 샘플 중의 LOXL2 수준을 정상적인 대조군 값(들) 또는 정상적인 대조군 값의 범위, 또는 본원에 기술된 다른 참조 값과 비교할 수 있다. 대조군 값은 대조군 집단, 예컨대 인간 대상체로 이루어진 일반 집단 또는 엄선된 집단으로부터 취득된 비교가능한 샘플 (예컨대, 혈액, 혈장, 또는 혈청 샘플, 또는 다른 액체 생물학적 샘플) 중의 LOXL2 수준에 기초한 것일 수 있다. 예를 들어, 엄선된 집단은 외관상 건강한 대상체, 예컨대 이전에 섬유증 또는 암의 어떤 징후 또는 증상도 보이지 않은 개체로 구성될 수 있다. 다르게는 외관상 건강한 개체는 또한 일반적으로 어떤 질환 증상도 보이지 않는 개체이다. 다시 말해, 상기 개체는 전문 의료진을 통해 검사받았다면, 건강하거나, 어떤 질환 증상도 보이지 않은 것을 특징으로 할 것이다.
- [0199] 대조군 값은 다양한 형태의 것을 취할 수 있다. 대조군 값은 단일 절사값, 예컨대 중앙값 또는 평균일 수 있다. 정상적인 대조군 값은 정상적인 대조군 범위일 수 있다. 일부 경우에서, 정상적인 대조군 값은 대상 검정 방법의 검출 하한 미만인 값이고, 예컨대 약 175 pg/ml 미만, 약 150 pg/ml 미만, 약 125 pg/ml 미만, 약 100 pg/ml 미만, 약 75 pg/ml 미만, 약 50 pg/pg/ml 미만, 또는 약 40 pg/ml이다.
- [0200] **예후 방법**
- [0201] 다양한 예후 및 예측 방법 또한 제공한다. 예를 들어, 본 개시내용은 섬유성 질환을 앓는 개체가 섬유성 질환에 대한 치료에 대하여 유익한 임상 반응을 보일 가능성을 측정하는 방법을 제공한다. 또 다른 일례에서, 본 방법은 특정 질환 결과 또는 종점, 또는 치료에 대한 반응성의 가능성 또는 위험을 측정한다. 본 방법은 일반적으로 대상 LOXL2 검정법을 사용하여 예컨대, 개체로부터 취득된 액체 샘플 중 순환하는 LOXL2 수준을 측정하는 것을 포함한다. 한 측면에서, LOXL2 수준이 정상적인 대조군 또는 다른 참조 수준보다 더 크다면, 이는 개체가 섬유성 질환에 대한 치료에 대하여 유익한 임상 반응을 보일 가능성이 증가되어 있음을 나타내는 것이다. 또 다른 측면에서, 수준이 비교적 낮다면, 이는 특정 질환 결과 또는 종점, 또는 다른 예후 정보 발생 가능성 또는 위험이 상대적으로 더 낮다는 것을 나타내는 것이다. 유사하게, LOXL2 수준이 비교적 높다면, 이는 예후가 더 불량하다는 것, 예컨대 특정 질환 또는 병증 결과가 발생할 위험 또는 가능성이 증가되어 있거나, 특정 종점에 도달할 위험 또는 가능성이 증가되어 있음을 나타내는 것일 수 있다. 섬유성 질환으로는 상기 기술된 바와 같이, 폐 섬유증, 간 섬유증, 심장 섬유증, 및 골수섬유증을 포함한다. 일부 경우에서, 예컨대 순환하는 LOXL2 수준이 대상체가 섬유성 질환에 대한 치료에 대하여 유익한 임상 반응을 보일 가능성을 시사한 경우, 대상 방법은 추가로 개체를 섬유성 질환에 대해 치료하는 것을 포함한다.
- [0202] 대상 검정 방법을 사용하여 시험하는 데 적합한 개체로는 섬유증, 예컨대 간 섬유증, 신장 섬유증, 폐 섬유증, 골수섬유증, 심장 섬유증, 또는 다른 유형의 섬유증을 앓는 것으로 진단받은 개체를 포함한다. 간 섬유증은 간경변증, 및 관련 병증, 예컨대 만성 바이러스 간염 (예컨대, HCV 또는 HBV 감염으로부터 유발된 것), NAFLD, ASH, NASH, PBC, 담즙성 간경변증, 원발성 경화성 담관염, 및 자가면역 간염을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 신장 섬유증은 다양한 질환 및 손상으로부터 유발될 수 있고, 그러한 질환 및 손상의 예로는 만성 신장 질환, 대사 증후군, 방광 요관 역류, 세뇨관 간질성 신장 섬유증, 당뇨병 (당뇨 신장병 포함), 및 그 결과로 생기는, 국소 분절 사구체경화증, 및 막 사구체신염, 사구체 혈관 간질 모세관 GN을 포함하나, 이에 한정되지 않는 사구체 신염 (GN)을 포함한다. 폐 섬유증으로는 많은 증후군 및 질환을 포함하며, 예시적인 질환으로 IPF, 특발성 간질 폐렴, 및 ARDS를 포함한다. 폐 섬유증은 또한 잠재 섬유성 폐포염, 만성 섬유성 간질 폐렴,

ILD, 및 DPLD를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0203] 일부 경우에서, 적합한 시험 대상체는 진행성 형태의 섬유증을 앓는 대상체이지만, 이는 여전히 섬유증에 대한 치료 요법을 이용한 치료에 적합할 수 있다. 예를 들어, 적합한 시험 대상체는 활동성 (말기는 아닌) 섬유증을 앓는 대상체를 포함한다. 일부 경우에서, 적합한 시험 대상체는 섬유증을 앓고 있는 대상체, 질환이 신속하게 진행될 것으로 예상될 수 있는 대상체이다. 일례로서, 개체는 진행 단계의, 예컨대 METAVIR F4의 간 섬유증을 앓을 수 있고; METAVIR F4 섬유증 및 양성 LOXL2 (예컨대, 대상 LOXL2 검정법을 사용하여 측정된 바, 액체 샘플 중의 LOXL2 수준이 정상보다 더 큰 경우)인 개체는 여전히 섬유증 치료에 대한 후보자일 수 있다. 음성 LOXL2 (예컨대, 대상 LOXL2 검정법을 사용하여 측정된 바, 액체 샘플 중의 LOXL2 수준이 정상인 경우)인 METAVIR F4 간 섬유증 환자는 섬유증 치료에 대한 후보자로 간주되지 않을 수 있다. 또 다른 예로서, 초기 단계의 간 섬유증 (예컨대, METAVIR F1 또는 F2)을 앓는, LOXL2가 상승되어 있는 (예컨대, 대상 LOXL2 검정법을 사용하여 측정된 바, 액체 샘플 중의 LOXL2 수준이 정상보다 더 큰 경우) 개체는 섬유증 치료에 대한 후보자로 간주될 수 있다.

[0204] **대조군 값**

[0205] 시험 대상체로부터 수득된 액체 샘플 중의 LOXL2 수준을 정상적인 대조군 값(들) 또는 정상적인 대조군 값의 범위와 비교할 수 있다. 대조군 값은 대조군 집단, 예컨대 인간 대상체로 이루어진 일반 집단 또는 엄선된 집단 으로부터 수득된 비교가능한 샘플 (예컨대, 혈액, 혈장, 또는 혈청 샘플, 또는 다른 액체 생물학적 샘플) 중의 LOXL2 수준에 기초한 것일 수 있다. 예를 들어, 엄선된 집단은 외관상 건강한 대상체, 예컨대 이전에 섬유증의 어떤 징후 또는 증상도 보이지 않은 개체로 구성될 수 있다. 다르게는 외관상 건강한 개체는 또한 일반적으로 어떤 질환 증상도 보이지 않는 개체이다. 다시 말해, 상기 개체는 전문 의료진을 통해 검사받았다면, 건강하거나, 어떤 질환 증상도 보이지 않은 것을 특징으로 할 것이다.

[0206] 대조군 값은 다양한 형태의 것을 취할 수 있다. 대조군 값은 단일 절사값, 예컨대 중앙값 또는 평균일 수 있다. 정상적인 대조군 값은 정상적인 대조군 범위일 수 있다. 일부 경우에서, 정상적인 대조군 값은 대상 검정 방법의 검출 하한 미만인 값이고, 예컨대 약 175 pg/ml 미만, 약 150 pg/ml 미만, 약 125 pg/ml 미만, 약 100 pg/ml 미만, 약 75 pg/ml 미만, 약 50 pg/pg/ml 미만, 또는 약 40 pg/ml이다.

[0207] **보고서 작성**

[0208] 순환하는 LOXL2 수준을 측정함으로써 환자가 섬유성 질환에 대한 치료에 대하여 유의한 임상 반응을 보일 가능성을 평가한다. 환자가 섬유성 질환에 대한 치료에 대하여 유의한 임상 반응을 보일 가능성은 보고서로 제공된다. 보고서는 환자의 반응 가능성에 관한 정보를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 대상 방법은 대상체의 반응 가능성 평가 결과를 제공하는 보고서를 작성하거나, 출력하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 상기 보고서는 전자 매체 (예컨대, 컴퓨터 모니터 상의 전자 디스플레이) 형태로, 또는 유형의 매체 (예컨대, 용지상에 인쇄된 보고서 또는 다른 유형의 매체) 형태로 제공될 수 있다.

[0209] 본원에 기술된 바, "보고서"란 대상체의 가능성에 대한 평가 및 그 결과와 관련된, 관심의 대상이 되는 성부를 제공하는 보고 요소를 포함하는, 전자 또는 유형의 문서이다. 대상 보고서는 적어도 가능성 평가, 섬유성 질환 환자가 섬유성 질환에 대한 치료에 대하여 유의한 임상 반응을 보일 가능성에 관한 징후를 포함한다. 대상 보고서는 완전하게 또는 부분적으로 전자식으로 작성될 수 있다. 대상 보고서는 1) 검사 설비에 관한 정보; 2) 서비스 제공자 정보; 3) 환자 데이터; 4) 샘플 데이터; 5) a) 징후; b) 시험 데이터, 예컨대 순환하는 LOXL2 수준을 비롯한, 각종 정보를 포함할 수 있는, 해석용 보고서; 및 6) 다른 특징 중 하나 이상의 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0210] **IPF 예후 및 예측 방법**

[0211] 일부 실시양태에서, 특발성 폐 섬유증 (IPF)를 진단, 예후, 및 예측하는 방법을 제공한다. 본원의 실시예에 제시된 바와 같이, IPF 환자 혈청에서는 정상적인 대조군 샘플과 비교하여 증가된 LOXL2 발현이 검출되고; 추가로, 순환하는 LOXL2 수준 증가는 활동성인 IPF 표현형 및 각종 질환 결과의 위험이 증가되어 있음을 나타내는 것이다. 또한, IPF 환자의 폐 조직에서는 LOXL2 발현이 더 높게 검출된다. 따라서, IPF 질환의 마커로서, 예컨대 IPF 질환의 활동성, 또는 활동성인 IPF 표현형에 대한 마커로서 LOXL2를 사용하는 방법을 제공한다. 따라서, 제공된 방법의 일부 실시양태에서, LOXL2는 IPF에 대한 진단, 예후, 및/또는 예측 마커로서 사용된다. 한 측면에서, LOXL2 수준을 사용하여 섬유발생 및/또는 다양한 IPF 병기, 중증도, 또는 결과, 특정 질환 결과 또는 치료에 대한 반응 가능성을 평가할 수 있다.

- [0212] 또 다른 측면에서, LOXL2 수준은 활동성인 질환 또는 질환 활동성 수준을 시사한다. 또 다른 측면에서, LOXL2 수준, 전형적으로, 혈청 수준이 대조군 또는 다른 참조 샘플과 비교하여 더 높다면, 이는 특정 질환 결과가 발생하거나, 또는 특정 기간에 특정 질환 결과가 발생할 위험이 있음을 나타내는 것이다. 다른 측면에서, LOXL2 수준은 환자가 특정 치료에 대하여 반응할 가능성을 나타내거나, 현재 진행되는 치료, 예컨대 LOXL2 억제제를 이용하는 치료 또는 다른 치료에 대한 반응성에 관한 정보를 제공한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 방법은 LOXL2 수준의 예측치 또는 검출치에 기초하여 질환 치료 접근법을 개시, 중단, 또는 변경하는 것을 추가로 포함한다.
- [0213] 본 방법을 사용하여 평가 또는 예측되는 예시적인 질환 결과로는 IPF 질환 진행 (하기: 임의 원인에 의한 사망, 무진행 생존 (PFS) 불량, 호흡기 질환에 의한 입원, 폐 기능 감소, 예컨대 (일산화탄소 확산능 (DL_{CO})의 5% 감소와 함께 노력성 폐활량 (FVC)의 10% 감소, 또는 FVC의 5% 감소와 함께 DL_{CO}의 15% 감소로서 정의될 수 있는) 폐 기능의 카테고리별 감소, 및 사망 중 하나로 정의되는 종합 중점)을 포함한다.
- [0214] 본 방법은 일반적으로 환자 샘플을 수득하고/거나, (예를 들어, 본원에 기술된 방법을 사용하여) 샘플 중 LOXL2 수준을 측정하고, 상기 및 다른 정보에 기초하여 각종 통계학적 분석을 실시하는 것을 포함한다. 일례에서, 환자 또는 샘플의 LOXL2 수준이 높은지 또는 낮은지, 예를 들어 순환하는 또는 혈청 LOXL2 수준이 낮은지 또는 높은지 여부를 측정한다. 이러한 정보는 예를 들어, 주어진 집단, 예컨대 샘플 집합체에서 측정된 LOXL2 수준 분포에 기초하여 LOXL2 수준을 이분화시키고, LOXL2 수준이 "낮음" 및 "높음"에 대한 절사점을 지정함으로써 측정될 수 있다. 예를 들어, LOXL2 수준이 높다는 것은 주어진 샘플 중 수준이 특정 농도 이상이거나, 그를 초과하는 수준, 예컨대 혈청 1 밀리리터 (mL)당 800 피코그램 (pg) LOXL2 또는 약 800 피코그램 (pg) LOXL2 초과인 것으로 간주될 수 있다. 별법으로, LOXL2 혈청 수준이 높다는 것은 집단 내의 샘플에 대한 수준 분포에 기초하여, 또는 대조군 또는 참조 샘플과 비교하였을 때의 특정 변화 배수에 기초하여 정의될 수 있다.
- [0215] 일부 측면에서, 본 방법은 다른 측정치, 예컨대 질환 중증도 또는 기능 상태를 나타내는 마커, 예컨대 IPF에 대한 기준선 척도, 예컨대 IPF 중증도를 반영하는 것, 예컨대 노력성 폐활량 (FVC) 예측치(%), 일산화탄소 확산능 (DL_{CO}) 예측치(%), 6분 보행 거리 (6MWD), 평균 폐 동맥압 (mPAP), 최저 휴식기 산소 포화도 (SpO₂), 종합 생리 지수 (CPI), 세인트 조지 호흡기 설문 점수 (SGRQ), 및 전이 호흡곤란 지수 (TDI) 점수, 치료에 대한 반응성, 및/또는 질환 또는 질환 중증도에 대한 다른 바이오마커와 관련하여 LOXL2 수준을 측정함으로써 수행된다. 따라서, 본 예측 모델 및 방법의 일부 측면에서, LOXL2는 질환 중증도 또는 기능 상태 및/또는 다른 바이오마커의 척도와 통합되는 IPF 질환 결과의 바이오마커이다.
- [0216] **진단, 예후 및 예측 방법에 대한 통계학적 분석**
- [0217] 일부 예에서, LOXL2 수준 및 다른 측정에 기초하여 통계학적 분석을 수행한다. 일례에서, 비변환, 또는 로그₁₀x 변환된 LOXL2 수준을 평가하기 위해 예를 들어, 표준 히스토그램을 사용하여 LOXL2 수준을 평가한다. 통계학적 분석은 개체 샘플 및/또는 환자에 대한 다양한 값, 예컨대 LOXL2 발현 수준 및/또는 기준선 변수에 대한 평균, 예컨대 기하 평균, 또는 중앙값을 측정하고, 다양한 샘플 또는 조건들 간의 표준 편차 및 변화 배수를 계산하고, 예를 들어 기준선 변수 및 LOXL2 발현 수준 분포를 비교하는 데 사용될 수 있는 다수의 주지된 검정 중 임의의 것, 예컨대 스튜던츠 t 검정을 사용하여 발현 수준 및/또는 다른 변수를 비교하는 것을 포함할 수 있다.
- [0218] 일부 측면에서, 피어슨 상관관계 (PC: Pearson's Correlation)를 사용하여 (예컨대, PC 계수를 계산함으로써) 쌍을 이룬 값들 간의, 예를 들어 LOXL2 발현 수준과 다른 변수, 예컨대 본원에 기술된 기준선 IPF 변수(들) 간의 선형 관계 (상관관계)를 평가한다. 상기 분석을 사용하여 (실시예 9에 제시된 바와 같이, 개별 매트릭스의 x 및 y축으로 플롯팅된) 쌍을 이룬 개별 변수에 대한 PC 계수를 계산함으로써 발현 패턴 분포를 선형으로 분리할 수 있다.
- [0219] **예측 모델링**
- [0220] 일부 실시양태에서, 예측 방법은 추가로 통계학적 분석 사용 및 예측 모델 및 시스템 사용을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 상기 모델 및 시스템을 사용하여 LOXL2 수준, 및 전형적으로 다른 정보, 예컨대 질환 중증도를 나타내는 변수 및 다른 바이오마커에 기초하여 질환 결과, 중점, 반응성, 및/또는 사례를 예측한다. 예를 들어, 생존 모델을 사용하여 LOXL2 수준 및 다른 공변량과 하나 이상의 사례, 중점, 또는 결과, 예컨대 질환 결과, 예컨대 IPF 결과(들) 및 하나 이상의(들)에 대한 반응성 사이의 관계를 조사할 수 있다; 상기 모델을 사용

하여 특정 환자가 사례, 중점, 또는 결과를 보일 가능성, 또는 그러한 결과가 특정 시간 이내에 발생할 가능성을 예측할 수 있다.

[0221] 상기와 같은 일례에서, LOXL2 수준 (및 임의로 다른 공변량, 예컨대 본원에 기술된 기준선 IPF 변수 및 질환 결과와 관련될 수 있는 다른 변수, 예컨대 다른 질환 바이오마커)과 결과, 예컨대 IPF 결과 사이의 관계를 조사하기 위해 콕스 비례 위험 모델링, 예컨대 단계식 콕스 비례 위험 모델링을 수행한다. 주지된 통계학적 방법을 사용하여, 공변량, 예컨대 LOXL2 수준과 대상 결과, 중점, 또는 사례 사이의 관계를 나타내는 위험비 (HR)을 계산한다. 따라서, 일부 측면에서, 제공된 방법은 상기 모델을 사용하여 LOXL2 수준 및 다른 공변량에 대한 값에 기초하여 개체 환자에서 결과, 중점, 및/또는 사례, 예컨대 IPF 질환 결과를 예측하는 것을 포함한다. 일례에서, 모델은 LOXL2 수준 (예를 들어, "고"수준의 LOXL2 존재 또는 부재), 6MWD, 및/또는 CPI를 포함한다.

[0222] 상기 모델링에 사용하기 위한 IPF 결과, 사례, 및 중점으로는 질환 진행 또는 중증도를 나타내는 중점 또는 사례, 예컨대 전형적으로 IPF 임상 시험 또는 치료 요법에서 언급되는 임의의 중점, 상기 IPF 질환 진행, 폐 기능 감소, 호흡기 질환에 의한 입원, 및 사망을 포함한다. 일부 측면에서, 질환 진행은 하기: 임의의 원인에 의한 사망, 호흡기 질환에 의한 입원, 또는 일산화탄소 확산능 (DL_{CO})의 5% 감소와 함께 노력성 폐활량 (FVC)의 10% 감소, 또는 FVC의 5% 감소와 함께 DL_{CO}의 15% 감소로서 정의되는, 폐 기능의 카테고리별 감소로 정의되는 종합 중점을 나타낸다. 폐 기능 중점은 폐 기능 검사를 사용하여 측정될 수 있다. 일부 예에서, 2가지 이상의 검사를 사용하며, 이 둘은 4주 이상의 간격을 두고 수행된다. 다른 예시적인 중점은 모든 원인의 사망, 무이식 생존, 및 사망이다. 결과는 상기 중점에 도달하기 전 경과한 시간으로서 정의될 수 있다.

[0223] 수신자 조작 특성 (ROC: Receiver Operating Characteristic) 곡선을 사용하여 시스템의 특이성 대 민감도를 평가할 수 있다. 주지된 방법을 사용하여 곡선하면적 (AUC)을 산정한다.

[0224] 예측 모델의 일부 예에서, LOXL2는 예를 들어, 특정 역치량, 예컨대 0.05 미만의 P 값에 기초하여 예를 들어, 특정 신뢰 구간 (CI) 및 신뢰수준, 예컨대 95% 신뢰 구간에서 하나 이상의 결과 또는 사례, 예컨대 질환 진행과 유의적인 관련이 있다. 위험비를 사용하여 예컨대, 주어진 공변량, 예컨대 고수준의 LOXL2에 대한 특정 결과의 위험의 변화 배수를 측정할 수 있다. 일부 측면에서, 주어진 LOXL2 수준은 특정 결과, 예컨대 질환 진행, 입원, 폐 기능 감소, 또는 본원에 기술된 다른 결과가 발생될 위험이 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 또는 7배 이상 이 것과 관련, 예컨대 통계학적 유의적인 관련이 있다. 예를 들어, 위험 변화 배수는 정상적인 대상체, 예컨대 LOXL2 수준이 상승되지 않은 대상체, 또는 "저"수준의 LOXL2를 갖는 대상체와의 비교로 표시될 수 있다. 일례에서, LOXL2 수준, 예컨대 "고"수준의 LOXL2는, 모델에 다른 공변량, 예컨대 6MWD 및 CPI이 포함될 때, 결과, 예컨대 질환 진행과 통계학적 유의적인 관련이 있다.

[0225] 키트 및 검정용 장치

[0226] 본 개시내용은 순환하는 LOXL2에 대한 대상 검정법을 수행하는 키트 및 검정용 장치를 제공한다.

[0227] 일부 실시양태에서, 대상 키트는 a) LOXL2에 특이적인 1차 항체; 및 b) LOXL2에 특이적인 2차 항체를 포함한다. 일부 경우에서, 1차 항체는 폴리클로날 LOXL2-특이적 항체이고; 2차 항체는 모노클로날 LOXL2-특이적 항체이다. 다른 경우에, 1차 항체는 모노클로날 LOXL2-특이적 항체이고; 2차 항체는 모노클로날 LOXL2-특이적 항체이다. 다른 경우에, 1차 항체는 폴리클로날 LOXL2-특이적 항체이고; 2차 항체는 폴리클로날 LOXL2-특이적 항체이다. 일부 경우에서, 제1 및/또는 2차 항체는 검출가능한 표지를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 1차 항체도 2차 항체도 검출가능한 표지를 포함하지 않는다.

[0228] 1차 항체는 불용성 지지체 상에 고정화될 것이다. 별법으로, 불용성 지지체는 키트와 함께 제공되고, 사용하는 1차 항체를 불용성 지지체 상에 고정화시키는 것을 수행할 것이다. 따라서, 일부 경우에서, 대상 키트는 a) LOXL2에 특이적인 1차 항체; b) LOXL2에 특이적인 2차 항체; 및 c) 불용성 지지체를 포함한다. 불용성 지지체는 상기 기술된 바와 같이, 다양한 물질 및 포맷 중 임의의 것으로 제공될 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에서, 불용성 지지체는 플라스틱 다중 웰 플레이트, 테트스 스트립, 또는 덤스틱이다.

[0229] 상기 언급된 바와 같이, 일부 경우에서, 1차 항체도 2차 항체도 검출가능한 표지를 포함하지 않는다. 이러한 경우, 검출가능한 표지를 포함하고, 2차 항체에 결합하는 제3 항체를 제공할 수 있고; 상기 항체는 일반적으로 2차 항체로 지칭된다. 검출가능한 표지는 예컨대, 화학발광 작용제, 미립자 표지, 비색측정용 작용제, 에너지 전달제, 효소, 형광 작용제, 또는 방사성 동위원소일 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 대상 키트는 a) LOXL2에 특이적인 1차 항체; b) LOXL2에 특이적인 2차 항체; 및 c) 제3 항체를 포함하며, 여기서 제3 항체는 검

출가능한 표지를 포함하고, 2차 항체에 결합한다. 일부 경우에서, 대상 키트는 a) LOXL2에 특이적인 1차 항체; b) LOXL2에 특이적인 2차 항체; c) 검출가능한 표지를 포함하고, 2차 항체에 결합하는, 제3 항체; 및 d) 불용성 지지체를 포함한다. 불용성 지지체는 상기 기술된 바와 같이, 다양한 물질 및 포맷 중 임의의 것으로 제공될 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에서, 불용성 지지체는 플라스틱 다중 웰 플레이트, 테트스 스트립, 또는 덤스틱이다.

[0230] 대상 키트는 추가로 표준 곡선 작성에 사용하기 위한, 정제된 LOXL2를 추가로 포함할 수 있다.

[0231] 대상 키트는 추가로 하나 이상의 추가 성분, 예컨대 완충제; 프로테아제 억제제; 검출가능한 표지; 세척용 시약; 차단제 등을 포함할 수 있다. 원하는 바에 따라, 키트의 다양한 성분들은 개별 용기에 존재할 수 있거나, 특정 화합성 성분은 단일 용기로 사전에 배합될 수 있다.

[0232] 상기 언급된 성분 이외에도, 대상 키트는 대상 방법을 실시하기 위해 키트의 성분을 사용하는 것에 관한 설명서를 포함할 수 있다. 대상 방법 실시에 관한 설명서는 일반적으로는 적합성 기록 매체 상에 기록되어 있다. 예를 들어, 설명서는 기판, 예컨대 용지 또는 플라스틱 등에 인쇄되어 있을 수 있다. 따라서, 설명서는 패키지 인서트로서 키트에, 키트, 또는 그의 성분 (즉, 패키징 또는 서브패키징과 관련된 것)의 용기의 라벨링 등에 존재할 수 있다. 다른 실시양태에서, 설명서는 적합한 컴퓨터 판독가능한 저장 매체, 예컨대 콤팩트 디스크 읽기 전용 메모리 (CD-ROM), 디지털 다목적 디스크 (DVD), 디스켓 등의 위에 존재하는 전자 저장 데이터 파일로서 존재한다. 다른 추가 실시양태에서, 실제 설명서는 키트에 존재하지 않고, 예컨대 인터넷을 통해 원격리 공급원으로부터 설명서를 입수하는 수단을 제공한다. 본 실시양태의 예는 설명서를 볼 수 있고/거나, 설명서를 다운로드할 수 있는 웹 주소를 포함하는 키트이다. 설명서와 같이, 설명서를 입수하는 상기 수단은 적합한 기관상에 기록되어 있다.

[0233] **검정용 장치**

[0234] 본 개시내용은 개체로부터 수득된 액체 생물학적 샘플 중 LOXL2를 검출하는 데 사용하기 위한 검정용 장치를 제공한다. 상기 장치는 축유로의 경계를 짓는 매트릭스를 포함할 수 있다.

[0235] 매트릭스는 i) 액체 샘플을 받으며 유로의 상류 단부에 있는 샘플 수납 영역; ii) 유로 내에 배치되어 있으며 샘플 수납 영역으로부터 하류 쪽에 있는 하나 이상의 시험 영역으로서, 이들 각각이 각 시험 영역에서 그에 고정화되어 있는 LOXL2에 특이적인 항체를 포함하며, 이로써 고정화된 항-LOXL2/LOXL2 복합체를 형성하는 것인 하나 이상의 시험 영역; 및 iii) 유로 내에 배치되어 있으며 샘플 수납 영역으로부터 하류 쪽에 있는 하나 이상의 대조군 영역으로서, 여기서 하나 이상의 대조군 영역은 양성 및/또는 음성 대조군을 포함할 수 있는 것인 하나 이상의 대조군 영역을 포함할 수 있다. 시험 영역 및 대조군 영역은 임의의 대조군 영역의 상류 쪽에 배치된 시험 영역을 시작으로 유로 내에서 교대 포맷으로 배치되어 있을 수 있다.

[0236] 매트릭스는 i) 액체 샘플을 받으며 유로의 상류 단부에 있는 샘플 수납 영역; ii) 유로 내에 배치되어 있으며 샘플 수납 영역으로부터 하류 쪽에 있는 하나 이상의 시험 영역으로서, 이들 각각이 각 시험 영역에 LOXL2에 특이적인 항체를 포함하며, 이로써 항-LOXL2/LOXL2 복합체를 형성하는 것인 하나 이상의 시험 영역; 및 iii) 유로 내에 배치되어 있으며 샘플 수납 영역으로부터 하류 쪽에 있는 하나 이상의 대조군 영역으로서, 여기서 하나 이상의 대조군 영역은 양성 및/또는 음성 대조군을 포함할 수 있는 것인 하나 이상의 대조군 영역을 포함할 수 있다. 시험 영역 및 대조군 영역은 임의의 대조군 영역의 상류 쪽에 배치된 시험 영역을 시작으로 유로 내에서 교대 포맷으로 배치되어 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, LOXL2에 특이적인 항체는 고정화되어 있지 않고; 항-LOXL2 항체가 샘플 중에 존재하는 임의의 LOXL2와 결합하게 되었을 때, 항-LOXL2 항체/LOXL2 복합체는 이동 가능하다. 예를 들어, 제1 시험 영역에서 형성된 항-LOXL2 항체/LOXL2 복합체는 이동하여 고정화된 항-LOXL2 항체를 포함하는 제2 시험 영역으로 진입할 수 있고, 여기서 항-LOXL2 항체/LOXL2 복합체는 고정화된 항-LOXL2 항체에 결합하여 고정화된 항-LOXL2 항체/LOXL2 복합체를 형성할 수 있다.

[0237] 일부 실시양태에서, 상기와 같은 검정용 장치를 사용할 때, 액체 샘플을 장치의 샘플 수납 영역에 적용시키기 전에, 먼저 표지된 LOXL2에 특이적인 항체를 액체 샘플과 함께 혼합하고, 여기서 상기 혼합을 통해 표지된 항체/LOXL2 복합체가 형성된다. 상기 실시양태에서, 표지된 항체/LOXL2 복합체를 포함하는 액체 샘플을 검정용 장치의 샘플 수납 영역에 적용시킨다. 액체 샘플은, 액체 샘플이 시험 영역에 도달할 때까지, 장치를 따라 유동한다. 시험 영역 중에 존재하는 항체는 표지된 항체/LOXL2 복합체에 존재하는 LOXL2에 결합하게 되고; 이어서, 이를 검출할 수 있다.

[0238] 검정용 장치는 추가로 LOXL2에 특이적인 표지된 항체를 포함하는 표지 영역을 포함할 수 있으며, 여기서 표지된

항체는 고정화된 LOXL2/항-LOXL2 항체 복합체 중에 존재하는 LOXL2와 결합하여 표지된 LOXL2/항-LOXL2 항체 복합체를 형성할 수 있고, 여기서 표지된 항체는 액체 샘플 존재하에 이동가능하다. 상기 검정용 장치를 사용할 때, LOXL2를 포함할 수 있는 액체 샘플을 장치의 샘플 수납 영역에 적용시키고; 표지 영역 중에 존재하는 항-LOXL2 항체는 LOXL2와 결합하여, 표지된 항체와 같이 이동가능한 표지된 항체/LOXL2 복합체를 형성하게 되고; 표지된 항체/LOXL2 복합체는 액체 샘플이 시험 영역에 도달할 때까지 장치를 따라 유동한다. 시험 영역 중에 존재하는 항-LOXL2 항체는 표지된 항체/LOXL2 복합체 중에 존재하는 LOXL2와 결합하고; 이어서, 이를 검출할 수 있다.

[0239] 별법으로, 검정용 장치는 항-LOXL2 항체에 특이적인 표지된 항체를 포함하는 표지 영역을 포함할 수 있고, 여기서 표지된 항체는 시험 영역(들)에서 형성된 임의의 항-LOXL2 항체/LOXL2 복합체에 결합할 수 있다. 일부 경우에서, 표지된 항체는 이동가능하다.

[0240] 표지된 항체는 표지, 예컨대 화학발광 작용제, 미립자 표지, 비색측정용 작용제, 에너지 전달제, 효소, 형광 작용제, 또는 방사성 동위원소를 포함할 수 있다.

[0241] 대조군 영역은 양성 대조군 영역 및 음성 대조군 영역을 포함한다.

[0242] 매트릭스는 일반적으로 불용성 지지체이며, 적합한 불용성 지지체로는 폴리비닐 디플루오라이드 (PVDF), 셀룰로스, 니트로셀룰로스, 나일론 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 매트릭스는 가요성일 수 있거나, 또는 상대적으로 비가요성일 수 있다. 매트릭스는 지지체 및 임의로 커버를 포함하는 하우징 내에 배치되어 있을 수 있으며, 여기서 하우징은 적용 개구 및 하나 이상의 관찰구를 포함한다. 검정용 장치는 다양한 포맷 중 임의의 것, 예컨대 테트스 스트립, 딥스틱 등일 수 있다.

[0243] 실시예

[0244] 하기 실시예는 본 발명자들이 그들의 발명인 것으로 간주하는 것의 범주를 제한하고자 하는 것도 아니고; 하기 실험이 실시된 실험 전부이거나, 또는 오직 그러한 실험만을 나타낸 것임을 표현하고자 하는 것은 아니다. 사용된 수치 (예컨대, 양, 온도 등)와 관련하여 정확을 기하기 위해 노력하였지만, 일부 실험상의 오차 및 편차가 있음이 설명되어야 한다. 달리 명시되지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 평균 분자량이며, 온도는 섭씨 온도이고, 압력은 대기압 또는 대기압에 가까운 값이다. 예컨대, bp, 염기쌍(들); kb, 킬로베이스(들); pi, 피코리터(들); s 또는 sec, 초(들); min, 분(들); h 또는 hr, 시간(들); aa, 아미노산(들); kb, 킬로베이스(s); bp, 염기쌍(들); nt, 뉴클레오티드(들); i.m., 근육내(로); i.p., 복강내(로); s.c, 피하(로) 등과 같은 표준 약어가 사용될 수 있다.

[0245] 실시예 1: 인간 혈청 또는 혈장 샘플 중의 LOXL2를 검출하기 위한 면역검정법

[0246] 물질 및 방법

[0247] 항체

[0248] 정제된 재조합 전장의 LOXL2 단백질에 대한 토끼 폴리클로날 항체 ("토끼 A")를 유도하였다; 상기 항체는 LOXL2의 모든 도메인 내의 다중 에피토프를 인식한다. 마우스 모노클로날 항체, AB0030은 LOXL2의 촉매 도메인에 결합하며, 전장의 LOXL2 단백질, 및 (SRCR2 및 SRCR3 도메인 사이가 절단된) 성숙한 LOXL2 단백질, 둘 모두를 인식한다.

[0249] MSD 플랫폼 상에서의 LOXL2 면역검정법

[0250] 메조스케일 디스커버리 (MSD)로부터의 표준 단일-스팟 비코팅 전극 플레이트 (카탈로그 번호 L15XA-3)를 포스페이트 완충처리된 염수 (PBS) 중에서 제제화된 30 μ l 부피의 3 μ g/ml 토끼 항-인간-LOXL2 폴리클로날 항체 용액으로 4°C에서 밤새도록 코팅하였다. 코팅한 후, PBS 중의 5% (w/v) 블로커(Blocker) A 용액 (MSD 카탈로그 번호 R93AA-1)을 첨가하여 플레이트 웰을 차단시켰다. 차단 단계 후, 플레이트를 0.05% 트윈-20 비이온성 계면활성제를 함유하는 PBS 중에서 자동 플레이트 세척기를 사용하여 3회에 걸쳐 세척하였다. 시험하고자 하는 인간 샘플 (혈청 또는 혈장)은 따로 PBS 중에서 1:4 (1부 혈청, 3부 PBS)로 희석시켜 (1부 혈청, 3부 PBS) 제조하였다. 이어서, 샘플을 플레이트의 각 웰에 첨가하고, 샘플을 실온에서 2-3시간 동안 회전식으로 진탕시키면서 (300-600 rpm) 인큐베이션시켰다. 샘플 결합 후, 플레이트를 다시 0.05% 트윈-20 비이온성 계면활성제를 함유하는 PBS 중에서 자동 플레이트 세척기를 사용하여 3회에 걸쳐 세척하였다.

[0251] 1차 항체인 AB0030은 LOXL2 촉매 도메인에 결합하는 마우스 항-인간-LOXL2 모노클로날 항체이다. PBS 중 2%

(w/v) 블로커 A 중의 1 $\mu\text{g/ml}$ AB0030 용액을 각 웰에 첨가한 후, 이어서, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 회전식으로 진탕시키면서 (300-600 rpm) 인큐베이션시켰다. AB0030 결합 후, 플레이트를 다시 0.05% 트윈-20 비이온성 계면활성제를 함유하는 PBS 중에서 자동 플레이트 세척기를 사용하여 3회에 걸쳐 세척하였다.

[0252] 2차 항체는 술포태그 염료 (MSD 카탈로그 번호 R32AC-5)에 컨쥬게이트된 염소-항-마우스-IgG 분자이다. PBS 중 2% (w/v) 블로커 A 중의 1 $\mu\text{g/ml}$ 2차 항체 용액을 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 회전식으로 진탕시키면서 (300-600 rpm) 인큐베이션시켰다. 2차 항체 결합 후, 플레이트를 0.05% 트윈-20 비이온성 계면활성제를 함유하는 PBS 중에서 자동 플레이트 세척기를 사용하여 3회에 걸쳐 세척하였다.

[0253] 서팩턴츠(Surfactants)를 함유하는 1x 리드 버퍼 T(1x Read Buffer T) (MSD 카탈로그 번호 R92TC-2)를 각 웰에 첨가한 후, MSD 섹토르이미저(SectorImager) 2400 장치 상에서 플레이트를 즉시 측정하였다.

[0254] 시험 인간 샘플은 정상적인 건강한 기증자로부터 폴링된 인간 혈청 또는 혈장에 알려진 농도로 첨가된 정제된 재조합 인간 LOXL2 단백질 (R&D 시스템즈(R&D Systems))로 구성된 동일한 검정 플레이트 상의 교정계 곡선과의 비교로 상대적인 정량적 값으로 제공되었다. 표준 기법을 사용하여 교정계 곡선 피팅 및 미지의 샘플 보간을 수행하였다.

[0255] 표준 포맷을 이용한 LOXL2 면역검정법

[0256] 코스타 3922 고-결합 다중 웰 플레이트를 사용하였다. 토끼 폴리클로날 항체 (Ab) (토끼 "A")를 CB2 코팅 완충제 (이뮤노케미칼 테크놀로지스(Immunochemical Technologies) CB2 (6248)) 중에 0.625 $\mu\text{g/ml}$ 로 희석시켰다. 희석된 폴리클로날 Ab를 50 μl /웰의 부피로 플레이트의 웰에 첨가하고, 플레이트를 4°C에서 밤새도록 보관하였다. 웰을 폴리클로날 항체로 코팅한 후, 웰을 실온 (RT)에서 1-3 hr 동안 200 μl /웰의 BB 1 차단액 (이뮤노케미칼 테크놀로지스 제품 번호 640)으로 차단시켰다. 차단 후, 200 μl /웰 PBS-T (0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS)를 사용하여 플레이트를 3회에 걸쳐 세척하였다.

[0257] 25 μl 하이스펙(HiSpec) 희석제 (AbD 세로테크 BUF049B)를 각 웰에 첨가하였다. 동량의 시험 혈청을 각 웰에 첨가하고; 플레이트를 실온에서 2시간 동안 유지시켰다. 혈청 샘플이 결합할 수 있게 한 후, 플레이트를 3회에 걸쳐 세척하였다.

[0258] 1차 항체 (AB0030)를 PBS-T + 0.5% 우혈청 알부민 (BSA) 중에 5 $\mu\text{g/ml}$ 로 희석시키고; 희석된 1차 항체 50 μl 를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 보관한 후, PBS-T로 3회에 걸쳐 세척하였다. 2차 항체 (호스 래디쉬 퍼옥시다제 (HRP)-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 항체 (잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch), 0.8 mg/ml)를 PBS-T + 0.5% BSA 중에서 1: 10,000으로 희석시켰다. 이어서, 희석된 2차 항체 50 μl 를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 보관한 후, PBS-T로 3회에 걸쳐 세척하였다.

[0259] 실시예 2: 만성 C형 바이러스 감염 (HCV) 감염을 앓는 환자에서 간 섬유증 예측을 위한 혈청 LOXL2 측정

[0260] 면역조직화학법 (IHC)에 의해 섬유성 간 조직을 분석한 결과, LOXL2는 섬유모세포, 신생 맥관 구조, 염증성 세포 및 간세포로 구성된 섬유발생성 계면에서 국소적으로 발현되는 것으로 나타났는데, 이는 LOXL2가 활동성인 섬유발생성 질환과 관련이 있음을 제안하는 것이다. 혈청 LOXL2와 섬유성 간 질환의 관계를 추가로 조사하기 위해, 실시예 1에 기술된 바와 같은 LOXL2 특이 ELISA를 사용하였다. 87명의 만성 HCV 감염 환자로부터 간 생검과 함께 혈청 샘플을 수집하였다. 혈청 LOXL2 수준, 및 확립된 바이오마커인 히알루론산 (HA) 및 메탈로프로테이나제-1의 조직 억제제 (TIMP1)의 혈청 수준을 면역검정법에 의해 측정하고, 이차크 점수화 체계를 사용하여 각 생검에 대해 간 섬유증의 조직학적 병기를 평가하였다. 별개로, 30명 초과와 건강한 기증자로부터도 또한 혈청 샘플을 수집하고, 혈청 LOXL2 수준에 대하여 평가하였다. 섬유증 점수에 의해 비닝된(비닝된) 샘플에 대하여 ANOVA 검정 뿐만 아니라, 만-휘트니(Mann-Whitney) U 검정을 사용하여 혈청 바이오마커와 섬유증 점수 사이의 상관관계를 연구하였다.

[0261] 결과

[0262] 결과는 도 1 및 2에 제시되어 있다. LOXL2 단백질은 83%의 만성 HCV 감염 환자 혈청에서 검출되었지만, 임의의 정상적인 건강한 기증자로부터 수득된 혈청 중에서는 검출되지 않았다. HA, TEMP1, 및 LOXL2의 혈청 수준과 섬유증 병기 사이에는 양의 상관관계가 존재하였다. 혈청 결과는 IHC 결과와 일치하였는데, 비감염 또는 건강한 개체로부터 수득된 샘플 중에서는 LOXL2 단백질 수준이 낮거나, 검출불가능한 수준인 것에 비하여 활동성인 섬유증 영역에서 LOXL2 단백질 수준은 높은 것으로 나타났다.

[0263] 실시예 3: IPF 환자에서 혈청 LOXL2

[0264] 특발성 폐 섬유증 (IPF) 진단을 받은 15명의 환자로부터 수득된 혈청 샘플을 LOXL2에 대하여 시험하였다. 결과는 도 3에 제시되어 있다. 개별 환자의 식별 번호가 제시되어 있다. 시험된 15명의 환자 중 10명이 양성이고; 나머지 5명은 검출 하한 미만이었으며, 이를 "비검출"로 기록하였다. 연령-대응의 정상적인 대상체 또한 시험하였다; 이들 모두 혈청 LOXL2에 대해 음성이었다 (비검출"; 검출 하한 미만).

[0265] 실시예 4: 중앙 환자에서 혈청 LOXL2

[0266] 암 치료를 위한 항-LOXL2 (AB0024) 항체로 치료받고 있는 8명의 암 환자를 연구하였다. 환자 식별 번호 ("Pt ID"); 암 진단; 항-LOXL2 항체 용량 수준; 진행 시간; 및 원시(original) 원발성 종양으로부터 단리된 고정된 조직의 샘플 (~5 mm 절편) 중에서 역조직화방법으로 조사된 LOXL2 발현이 하기 표 1에 제시되어 있다.

표 1

Pt ID	진단	용량 수준 (mpk)	진행 시간	LOXL2 발현
001	신세포	1	44일	혈관
002	결장직장	1	안정 (~7개월)	양성 결합조직형성
003	자궁내막 혼합 필러	1	57일	최소; 결합조직형성 아님
004	유방	3	38일	최소;반점형
005	결장직장	3	56일	양성 결합조직형성
006	흑색종	3	42일	양성
007	결장 SC	10	57일	
008	전립선	10	30일	양성 결합조직형성
009	난소/유방	10	51일	미약, 결합조직형성 아님

[0267]

[0268] 항-LOXL2 치료를 시작한 날인 1일째 (항-LOXL2 치료 이전에 샘플 채취); 항-LOXL2 치료를 시작한 후 29일 및 57일째에 혈액 샘플을 수득하였다.

[0269] 결과

[0270] 이용가능한 모든 시점에서 8명 환자 중 8명의 혈장 중에서, 및 8명 환자 중 5명의 혈청 샘플 중에서 LOXL2가 검출되었다. AB0024 투여가 LOXL2 신호를 제거하거나, 차폐시키지는 못했다.

[0271] 실시예 5: 만성 HCV 감염, 비-알콜성 지방간염 (NASH)1, 및 알콜성 지방간염 (ASH)을 앓는 환자로부터 수득된 간 조직에서의 LOXL2 발현

[0272] 면역조직화학적 (IHC) 염색을 통해 만성 HCV 감염 환자로부터 수득된 간 조직 중에서 LOXL2 발현이 입증되었다. 쿠렐린(Cureline: 미국 캘리포니아주 벨링게임) 및 애스터랜드(Asterand: 미국 미시간주 디트로이트)로부터 급속 냉동된 인간 조직 샘플을 입수하고, 항-LOXL2를 이용하여 일련의 절편을 염색시켰다.

[0273] 결과

[0274] 만성 HCV 감염 환자로부터 수득된 절편으로부터의 결과는 도 6에 제시되어 있는데, 이는 상기 환자의 간 조직에서 LOXL2 단백질이 발현되었음을 보여주고 있다. 도 6의 좌측 패널 (5x 대물 렌즈 배율)에서, 검은색 화살표는 문맥 영역 및 문맥관으로의 섬유 확장 부위를 가리키는 것이다. 흰색 화살표는 간 소엽 주변의 짧은 섬유 격막 부위를 가리키는 것이다. 도 6의 우측 패널 (40x 대물 렌즈 배율)은 간세포 (H)와의 계면에서, 동모양 혈관주위 공간내 (화살표 표시), 및 간 실질내 근섬유모세포에서의 섬유 격막 (S) 관찰되는 LOXL2 면역반응성을 보여주는 것이다. 본 연구에서 LOXL2는 만성 HCV 감염 환자의 간 조직에서 발현되었고, 발현은 제공된 검정법의 실시양태에 의해 측정가능하다는 것이 결과를 통해 밝혀졌다. 또 다른 IHC 연구에서, 건강한 간을 제외한, NASH, HCV-관련 섬유증, 및 ASH에서 활동성인 질환 계면의 간 조직에서 LOXL2가 국소적으로 강하게 발현된 것으로 나타났다 (데이터는 제시되지 않음).

[0275] 실시예 6: 인간 혈청 매트릭스에서 LOXL2 면역검정법에 대한 교정계 표준

[0276] 실시예 1에 기술된 LOXL2 면역검정법 (메조스케일 디스커버리 플랫폼에서 개발된 샌드위치 면역검정법)을 사용하여 실시하였을 때, 건강한 개체로부터 수득된 혈청 중에서는 LOXL2가 검출되지 않았다. 교정계 곡선을 작성하기 위해 정제된 제조업 전장의 LOXL2 단백질을 풀링된 정상적인 인간 혈청으로 첨가한 후, 혈청 중에서 일련으로 회석시켰다.

[0277] **결과**

[0278] 결과는 도 7에 제시되어 있다. 각각의 데이터 점은 3개의 복제 웰의 평균값을 나타내고; 4개의 독립 플레이트에 대한 곡선이 제시되어 있다.

[0279] 하기 표 2에는 인간 혈청 매트릭스에서 교정계 표준의 특징이 제시되어 있다. 표 2에서, 검출 하한 (LLOD)은 블랭크 웰 (원시 값, 외삽된 것)의 평균 + 2.5* stdev이고; 정량하한 (LLOQ)은 원시 측정치에 대한 상대 오차가 < 30%이고, 변동 계수가 < 30%인 최저 교정계 표준이다. 검정내 및 검정간의 정밀도는 발생 샘플을 사용하여 측정하였다.

표 2

LOXL2 면역검정법: 인간 혈청 매트릭스에서 교정계 표준의 특징

검정 특징	결과
정확도(상대 오차)	<15%
검정내의 정밀도	3.5%
검정간의 정밀도	15.5%
냉동/해동 사이클 후 회복율	1회 사이클시 70%, 2회 이상 사이클시 >70%
검출 하한 (LLOD)	150-200 pg/ml
정량 하한 (LLOQ)	180-550 pg/ml
정량 상한 (ULOQ)	비측정

[0280]

[0281] 실시예 7: 경미 내지 중간 정도의 간 섬유증을 앓는 대상체와의 비교시, 간 간경변증을 앓는 대상체에서의 혈청 LOXL2 수준 증가

[0282] 임상 시험의 위약 암(arm)에 등록된 만성 C형 간염 감염을 앓는 26명의 성인으로부터 환자 혈청 샘플을 수집하였다. 이차크 섬유증 점수 (1-3: 경미 내지 중간 정도의 섬유증; 5-6: 간경변증)에 의해 대상체를 분류하였다. 대상체의 인구 통계학적 특징은 하기 표 3에 제시되어 있다.

표 3

HCV 대상체의 인구 통계학적 특징

특징	이샤크 점수 1-3 (n=14)	이샤크 점수 5-6 (n=12)	전체 (n=26)		
연령*	53 (50.5, 56.0)	55 (47.8, 55.0)	53.5 (49.3, 55.8)		
성별					
남성	9 (64.3%)	9 (75.0%)	18 (69.2%)		
여성	5 (35.7%)	3 (25.0%)	8 (30.8%)		
인종					
백인	11 (78.6%)	10 (83.3%)	21 (80.8%)		
흑인	3 (21.4%)	2 (16.7%)	5 (19.2%)		
기준선 이샤크 섬유증 점수 (n)					
F1	F2	F3	F4	F5	F6
3	6	5	0	7	5

* 중앙값 및 사분범위 (25%, 75%) 기록

[0283]

[0284] 연구 기준선에 대해 상대적인 6개의 시점: 4, 8, 16, 24, 26, 및 30주째에 혈청 샘플을 채취하였다. 맹검 방식으로 중추 병리학자에 의해 쌍을 이룬 간 생검 (스크리닝시 및 24주째)을 평가하였다 (문헌 [Manns M, Palmer R, Flisiak E, et al., *J Hepatology*. 2011, 54 Supplement 1: S55-S56] 참조). 실시예 1에 기술된 LOXL2 면

역검정법 (메조스케일 디스커버리 플랫폼에서 개발된 샌드위치 면역검정법)을 사용하여 혈청 LOXL2를 측정하였다.

[0285] 통계학적 분석을 위해, 이샤크 섬유증 점수 (1-3: 경미 내지 중간 정도의 섬유증; 5-6: 간경변증)에 의해 대상체를 분류하였다. 본 연구에서 기준선 이샤크 섬유증 점수가 4인 대상체는 관찰되지 않았다. 검출가능한 LOXL2가 검정 정량하한 (LLOQ) 미만인 혈청 샘플은 LLOQ로 설정하였다. 바이오마커 수준차를 기술적으로 및 그 래프로 요약하였다. 1군당 관찰되는 샘플의 크기를 교체해 가면서 샘플링을 사용하여 중앙값에 대해 10,000회의 부트스트랩을 통해 95% 신뢰 구간 (CI)을 구축하였다. 시점 이내의 군들을 비교할 때에는 윌콕슨(Wilcoxon) 순위 합계 검정을 사용하고, 모든 시점 전체에 걸쳐 군들을 비교할 때에는 대상체내 임의 효과를 이용하는 반복 측정 선형 모델에 의해 P값을 계산하였다.

[0286] 결과

[0287] 도 8에는 비닝된 기준선 이샤크 섬유증 점수 및 시간에 의한 LOXL2 혈청 수준이 제시되어 있다. 각 패널에는 명시된 시점 (4, 8, 16, 24, 26, 30주째)에 대한, 이샤크 섬유증 점수 (각각 1-3 및 5-6)에 따라 분류된 2개의 환자군의 LOXL2 농도 (pg/mL)가 제시되어 있다. 플롯 범위 밖의 LOXL2 농도인 3개의 가외치 (LOXL2 농도 = 5,529, 6,621, 8,845 pg/ml)는 모두 이샤크 섬유증 점수가 5인 동일 대상체로부터의 것이었다.

[0288] 도 9에는 4주째부터 30주째까지에 걸쳐 LOXL2 혈청 농도 중앙값으로 계산된, 이샤크 섬유증 점수 (각각 1-3 및 5-6)에 따라 분류된 2개의 환자군에 대한 대상체내 LOXL2 혈청 수준 중앙값이 제시되어 있다. 평균 대상체내 변동 계수는 22%였다.

[0289] 도 10에는 비닝된 기준선 이샤크 섬유증 점수에 의해 시간 (주) 경과에 따른 LOXL2 혈청 농도 중앙값 (pg/mL) (95% 신뢰 구간)이 제시되어 있다. 25주째부터 28주째까지에 걸쳐 연구 생검들 사이에서 오직 단 1명의 대상체만이 이샤크 섬유증 점수에서 2 이상의 변화를 가졌다.

[0290] 하기 표 4에는 각 시점에 대한 LOXL2 농도 중앙값 (pg/mL)이 제시되어 있으며, 여기서 p-값은 경미 내지 중간 정도의 섬유증을 앓는 대상체와 비교하여 간 간경변증을 앓는 대상체에서의 증가의 통계학적 유의도를 나타낸다.

표 4

비닝된 섬유증 점수에 따른 LOXL2 혈청 수준의 통계학적 유의도

시점	LOXL2 농도 중앙값 (pg/ml)		P값
	이샤크 F1-F3	이샤크 F5-F6	
4주째	641	1684	0.0149
8주째	786	1700	0.0091
16주째	814	1457	0.0407
24주째	881	1616	0.0596
26주째	865	1763	0.0716
30주째	711	1118	0.5890
전체	810	1591	0.0275

[0291]

[0292] 상기 결과를 통해 제공된 면역검정법의 LOXL2 단백질의 혈청 농도를 측정할 수 있는 능력을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 혈청 LOXL2 단백질 수준은 경미 내지 중간 정도의 섬유증을 앓는 대상체와 비교하여 간 간경변증을 앓는 대상체에서 유의적으로 증가되어 있고, 그러한 증가는 제공된 검정법의 실시양태를 사용하여 혈청 중에서 측정가능하다는 것도 또한 본 결과를 통해서 입증되었다.

[0293] 실시예 8: 만성 HCV 감염을 앓는 대상체에서 혈청 LOXL2 수준은 혈청 히알루론산 TIMP1 수준과 상관관계가 있었다.

[0294] 실시예 7에서와 같이 면역검정법 및 통계학적 분석을 수행하였다. 추가로, 시판되는 면역검정용 키트를 사용하여 히알루론산 (HA) 및 TIMP1을 측정하였다. 스페어만 순위 상관관계(Spearman rank correlation)를 사용하여 바이오마커 (LOXL2와 HA 또는 TIMP1) 사이의 관련성을 평가하였다.

[0295] 결과

[0296] 도 11에는 명시된 이샤크 점수 (1-6)를 갖는 대상체에 대한 대상체내 LOXL2 수준 중앙값 대 히알루론산 (HA)

(좌측 패널) 및 메탈로프로테이나제-1의 조 직 억제제 (TIMP1) (우측 패널) 수준이 제시되어 있다. 대상체내 발현 중앙값은 4주째부터 30주째까지에 걸친 발현 중앙값으로서 계산되었다. 국지 가중 산점도 평활법을 사용하여 곡선을 작성하였다.

[0297] 본 연구에서 제공된 면역검정법의 실시양태를 사용하여 측정된 바, 혈청 LOXL2 수준은 혈청 HA 및 TIMP1 수준과 상관관계가 있다는 것이 본 결과를 통해 입증되었다.

[0298] 실시예 9: IPF 환자에서 기준선 LOXL2 수준

[0299] A. ARTEMIS-IPF 환자

[0300] 혈청 샘플은 ARTEMIS-IPF 시험에 참가한 대상체로부터 수집하였다. 상기 시험은 무작위 이중 맹검 위약 대조군 사례-유도 시험이었다. 대상체를 ETA 수용체의 선택성 길항제인 암브리센탄, 또는 위약을 받는 것으로 2:1의 비율로 무작위화하였다. 본 연구는 초기에 종결되었다; 660명의 대상체가 등록하였다.

[0301] IPF 중증도 및 기능 상태를 반영하는 기준선 변수를 수집하였다. 기준선 변수로는 노력성 폐활량 (FVC) 예측치 (%), 일산화탄소 확산능 (DL_{CO}) 예측치(%), 6분 보행 거리 (6MWD), 평균 폐 동맥압 (mPAP), 최저 휴식기 산소 포화도 (SpO₂), 종합 생리 지수 (CPI), 세인트 조지 호흡기 설문 점수 (SGRQ), 및 전이 호흡곤란 지수 (TDI) 점수를 포함한다. mPAP는 우심 카테터법을 통해 측정하였는데, 이는 기준선에서 모든 연구 대상체에 요구되는 것이었다. CPI는 환자 흉부 컴퓨터 단층 촬영 스캔에서 관찰된 섬유증 정도를 추정하기 위해 FVC, 1초간 노력성 호기량 (FEV₁) 및 DL_{CO}를 도입한 유효 다차원 모델이었다. 1차 종점은 하기: 임의 원인에 의한 사망, 호흡기 질환에 의한 입원, 또는 일산화탄소 확산능 (DL_{CO})의 5% 감소와 함께 노력성 폐활량 (FVC)의 10% 감소, 또는 FVC의 5% 감소와 함께 DL_{CO}의 15% 감소로서 정의되는, 폐 기능의 카테고리별 감소로 정의되는 종합 종점인 IPF 질환 진행 시간이었다. 폐 기능 종점은 4주 이상의 간격을 두고 수행된 2가지 검사에 의해 확인하였다.

[0302] LOXL2의 기준선 수준은 실시예 1에 기술된 것으로서 항-LOXL2 항체를 사용하는, 메조스케일 디스커버리 플랫폼에서 개발된 면역검정법을 사용하여 3중으로 측정하였다.

[0303] 비변환, 또는 로그₁₀x 변환된 기준선 LOXL2 수준을 평가하기 위해 표준 히스토그램을 사용하였다. 스튜던츠 T-검정을 사용하여 기준선 변수의 분포를 비교하였다. 피어슨 상관 계수를 사용하여 기준선 LOXL2 수준과 기준선 변수 사이의 관계를 조사하였다. 단계식 콕스 비례 위험 모델링을 사용하여 기준선 LOXL2 수준과 IPF 결과 사이의 관계를 조사하였다. 수신자 조작 곡선을 사용하여 곡선하면적을 추정하였다.

[0304] **결과**

[0305] 치료 의향(intent-to-treat) 코호트 중 69명의 대상체로부터 수득된 혈청 샘플을 본 분석에 이용할 수 있었다. 어떤 혈청 샘플도 이용이 불가능한, ARTEMIS-IPF로부터의 423명의 대상체와 비교하였을 때, IPF 중증도 또는 기능 상태에 대한 기준선 척도에서의 통계학적 유의적인 차이는 없었다 (하기 표 5). 그러나, 69명의 대상체 중에서 암브리센탄 처리군 및 위약 처리군을 비교하였을 때에는 IPF 중증도 및 기능 상태에 대한 기준선 척도에서 통계학적 유의적인 차이가 있었다 (하기 표 6). 암브리센탄 군의 대상체는 더 낮은 기준선 DL_{CO} (p=0.035), 더 낮은 기준선 6MWD (p=0.004), 더 높은 기준선 mPAP (p=0.016), 더 높은 기준선 CPI (p=0.05) 및 더 높은 기준선 SGRQ (p=0.011)를 가졌다. 평균 기준선 LOXL2 수준은 암브리센탄 대상체에서 더 높았다 (p=0.026).

[0306] 기준선 LOXL2 수준 분포를 분석한 결과, 8명의 대상체의 LOXL2 수준은 약 88 pg/mL 미만이고, 34명의 대상체의 LOXL2 수준은 약 88 내지 약 440 pg/mL이고, 28명의 대상체의 LOXL2 수준은 약 440 pg/mL을 초과하는 것으로 나타났다. LOXL2 수준 중앙값은 약 325 pg/mL였고, 사분범위는 약 147 pg/mL 내지 약 770 pg/mL이고, 최저치는 약 18 pg/mL이고, 최대치는 약 5,400 pg/mL였다.

[0307] 피어슨 상관 계수 기준으로 기준선 LOXL2 수준과 상기의 IPF 중증도 및 기능 상태에 대한 기준선 척도 사이의 상관관계는 미약하였다. 도 12에는 기준선 LOXL2 수준과 FVC, DL_{CO}, 6MWD, CPI, SGRQ, 및 TDI 사이의 관계를 나타내는 산점도 매트릭스가 제시되어 있다. LOXL2와 기준선 중증도 척도 사이의 상관관계는 패널 (a) 및 (b) 맨 윗줄의 다크 박스내에 강조 표시되어 있다. LOXL2와 개별 기준선 중증도 척도 사이의 상관관계 계수는 하기와 같았다: -0.21 (FCV), -0.11 (DL_{CO}), 0.03 (6MWD), 0.10 (mPAP), -0.07 (SpO₂), 0.14 (CPI), 0.06 (SGRQ), 및 -0.05 (TDI)였다. 기준선 LOXL2 수준의 로그₁₀x 변환으로 분포는 정규화된 반면, LOXL2와 IPF 중증도 및 기

능 상태에 대한 기준선 척도 사이의 상관관계는 여전히 미약하였다 (도 12b).

[0308] 대부분의 기준선 LOXL2 수준이 약 800 pg/mL 미만인 것을 고려하며, 남은 분석을 위해 기준선 LOXL2 수준을 ≤ 800 pg/mL ("낮음") 대 > 800 pg/mL ("높음")로 이분화시켰다. 기준선 LOXL2 수준이 약 440 pg/mL 초과인 28명의 대상체 중 12명은 약 440-800 pg/mL의 낮은 기준선 LOXL2 수준을 가졌으며, 이는 낮은 군으로 분류되었고; 16명은 800 pg/mL 초과인 기준선 LOXL2 수준을 가졌으며, 이는 높은 군으로 분류되었다.

[0309] 기준선 LOXL2 수준이 "높은" 군과 "낮은" 군 사이의 질환 진행 비교는 도 13에 제시되어 있다. (누구도 어떤 사례도 보이지 않는) 위약군에서는 단 2명의 환자만이 "높은" LOXL2 기준선 라인을 가지고 있었기 때문에, 도 13에서는 암브리센탄 군 중의 "낮은" 및 "높은" 기준선 LOXL2 수준만을 비교하였다. 높은 기준선 LOXL2 수준은 더 많은 질환 진행 사례 (도 13a)와 관련이 있고, 높은 기준선 LOXL2 수준은 더 많은 폐 기능 감소 사례 (도 13b), 더 많은 호흡기 질환에 의한 입원 (도 13c) 및 더 많은 사망 (도 13d)과 관련이 있다는 것이 결과를 통해 나타났다.

[0310] 추가로, 하기 표 7에 제시된 바와 같이, 높은 기준선 LOXL2 수준이 존재하는 것은 질환 진행 위험이 5배 증가 (위험비 [HR] 4.95, 95% 신뢰 구간 [CI] 1.52-16.18, $p=0.008$), 폐 기능 감소가 7배 증가 (HR 7.36, 95% CI 1.16-46.74, $p=0.034$), 및 호흡기 질환에 의한 입원 위험이 5배 증가 (HR 4.85, 95% CI 1.09-21.68, $p=0.039$) 한 것과 관련이 있다는 것이 콕스 비례 위험 모델링을 통해 나타났다. 상기 통계학적 모델 모두를 처리 배정, 및 기준선 6MWD 및 CPI 점수에 대하여 조정하였다. 높은 기준선 LOXL2 수준은 사망 위험의 유의적 증가와는 유의적인 관계가 없었다 (HR 1.59, 95% CI 0.24-10.53, $p=0.633$).

[0311] 샘플을 또한 MMP7, ICAM1, IL8, VCAM1, 및 S100A12 수준에 대해서도 분석하였다. 상기 단백질 중 어느 것도 처리 결과와 유의적인 관계는 없었다. 높은 기준선 LOXL2 수준은 사망이 아닌, IPF 질환 진행 위험이 5-7배 증가한 것과 관련이 있었다.

표 5

ARTEMIS-IPF에서 혈청의 이용가능성에 따른 기준선 IPF 중증도 및 기능 상태 비교

IPF 중증도의 기준선 척도	무혈청 N=423	혈청 N=69	P값
평균 FVC(%) (SD)	69 (14)	70 (12)	0.649
평균 DLCO(%) (SD)	43 (14)	42 (11)	0.487
평균 6MWD(m) (SD)	416 (120)	399 (116)	0.256
평균 PAP (mmHg)(SD)	20 (7)	20 (6)	0.920
평균 최저 SpO2(%) (SD)	88 (6)	88 (6)	0.825
평균 CPI (SD)	52 (11)	53 (9)	0.784
평균 SGRQ(SD)	39 (20)	38 (18)	0.605
평균 TDI (SD)	7 (2)	8 (2)	0.588

[0312]

표 6

이용가능한 기준선 혈청을 갖는 대상체 중 ARTEMIS-IPF에서의 처리 배정에 따른 기준선 IPF 중증도 및 기능 상태 비교

IPF 중증도의 기준선 척도	암브리센탄 N=49	위약 N=20	P값
평균 FVC(%) (SD)	68 (12)	73 (12)	0.128
평균 DLCO(%) (SD)	40 (11)	47 (9)	0.035
평균 6MWD(m) (SD)	373 (109)	461 (110)	0.004
평균 PAP (mmHg)(SD)	22 (6)	18 (5)	0.016
평균 최저 SpO ₂ (%) (SD)	87 (6)	87 (5)	0.166
평균 CPI (SD)	54 (9)	49 (8)	0.050
평균 SGRQ (SD)	42 (19)	29 (15)	0.011
평균 TDI (SD)	7 (2)	8 (2)	0.083
평균 LOXL2 (SD)	903 (1172)	295 (288)	0.026

[0313]

표 7

IPF 환자에서 기준선 LOXL2 수준 및 그와 연구 종점과의 관계

종점	사례수		높은 LOXL2에 대한 위험비(95% CI)	P값
	낮은 LOXL2	높은 LOXL2		
질환 진행	10	8	4.95 (1.52-16.18)	0.008
폐 기능 감소	5	4	7.36 (1.16-46.74)	0.034
호흡기 질환에 의한 입원	6	6	4.85 (1.09-21.68)	0.039
사망	5	4	1.59 (0.24-10.53)	0.633

[0314]

[0315] B. GAP 코호트 IPF 환자

[0316] 다른 폐 질환에 대한 병력이 없는 111명의 IPF 대상체 (GAP 코호트로 간주)에서 질환 진행을 평가한 것인 제2 임상 IPF 전향적 후처리 연구에서 대상체에서의 혈청 LOXL2 수준을 평가하였다. GAP 코호트 대상체는 모두 외과적 폐 생검 또는 방사선 촬영을 통해 관찰된 늑막하 봉소상 변화에 대한 소견에 의해 확인된 ATS/ERS 가이드라인, 견인성 기관지 확장증, 및 병인이 없는 55세 초과의 환자에서 최소의 폐포 충전에 따라 IPF인 것으로 진단을 받은 대상체였다. 폐 기능 검사를 통해 노력성 폐활량 예측치는 40-70%인 것으로 나타났다. 대상체는 임상 시설에서 현재 진행 중인 관리 및 후처리 모두를 받을 수 있었다.

[0317] 최초 방문시, 각 참가자들은 채혈하고, 폐 기능 검사, 6분 보행 검사 (6MWT), 심장초음파검사, 및 CT 스캔, 및 환자가 감지하고 있는지를 측정하도록 디자인된 설문지를 받았다. 3-8개월의 간격을 두고 진행된 후처리 방문시에는 혈액 샘플을 수집하고, PFT, 설문, 및 6MWT를 반복하였다. FVC, FEV1, 및 DL_{CO} 중앙값은 각각 예측치의 65.7 ± 17.5%, 76.8 ± 18.7%, 및 47.3 ± 17.9%였다.

[0318] ARTEMIS-IPF 대상체에 대하여 상기 기술된 바와 같이 LOXL2의 기준선 혈청 수준을 측정하였다. 표준 히스토그램을 사용하여 자연 로그 포맷으로 LOXL2 기준선 혈청 수준을 평가하였다. 실험을 통해 LLOD는 180 pg/mL이고, LLOQ는 440 pg/mL인 것으로 측정되었다.

[0319] 회귀 방법을 사용하여 자연 로그 변환한 후, GAP 코호트에 대한 LOXL2 수준을 ARTEMIS-IPF 데이터로 정규화하였

다. 결과는 도 14에 제시되어 있다.

[0320] 모든 원인의 사망까지의 시간을 평가하였는데, 폐 이식이 사망 사례인 것으로 간주하였다 (대부분의 폐 이식 환자는 사망하였다). 기준선 혈청 LOXL2 수준의 이분화를 위한 최적의 역치 또는 절사점을 선택하기 위한 비편향 접근법으로서 분류 회귀 트리 (CART: classification and regression tree) 방법을 적용시켰다. GAP 코호트에서, 로그(LOXL2)만이 유일한 변수였을 때, CART 분석법에서는 절사점으로써 440 pg/mL (자연 로그 스케일로 6.08)를 선택하였다.

[0321] 하기 표 8A에는 GAP 코호트 대상체의 기준선 및 인구 통계학적 특징이 제시되어 있고, 하기 표 8B에는 상기 코호트에서 다양한 기준선 값 사이의 상관관계가 제시되어 있다.

표 8

표 8A: GAP 코호트 기준선 및 인구 통계학적 특징

변수	N	평균 (Std)	중앙값(최소값, 최대값)
성별	M: 74 (67%) F: 37 (33%)		
연령(세)	111	67 (9.3)	67 (3, 84)
FVC 예측치(%)	73	66 (18)	64 (34, 113)
FEV ₁ 예측치(%)	73	77 (19)	74 (37, 129)
DLCO 예측치(%)	73	48 (18)	46 (14, 109)
CPI	73	52 (13)	52 (12, 78)
6분 보행 거리	17	912 (420)	890 (100, 1555)
LOXL2	111	1495 (2307)	717 (90, 15708)
로그 (LOXL2)	111	7 (1)	7 (5, 10)
로그 (LOXL2) *	111	6 (1)	6 (5, 9)

* 회귀 방법을 통해 정규화된 LOXL2

표 8B: 기준선 변수들 간의 상관관계

	연령	FVC 예측치(%)	FEV1 예측치(%)	DLCO 예측치(%)	CPI
로그 LOXL2	-0.7	-0.03	-0.06	-0.28	-0.24
연령		0.07	0.23	0.02	0.05
FVC 예측치(%)			0.93	0.38	-0.61
FEV1 예측치(%)				0.47	-0.60
DLCO 예측치(%)					-0.95

[0322]

[0323] 기준선 후 육 (6)개월, 십이 (12)개월, 십팔 (18) 개월, 및 이십사 (24)개월째에 콕스 비례 위험 모델링 및 카플란-마이어 생존 플롯을 사용하여 이분화된 LOXL2 수준과 모든 원인의 사망 사이의 상관관계를 평가하였다. 데이터를 이용할 수 없었기 때문에 기준선 LOXL2 수준과 입원 및 폐 기능 감소 사이의 상관관계는 평가하지 않았다.

[0324] 기준선 LOXL2 수준 분포를 분석한 결과, ARTEMIS-IPF 코호트에 대해 관찰된 것과 유사하게, 더 낮은 스펙트럼 쪽으로 편향된 분포를 보였다. 기준선 LOXL2 수준 중앙값은 716.5 pg/mL였다 (사분범위 358.3 pg/mL, 1,446.6 pg/mL). LOXL2와 기준선 인구 통계학적 특징 및 IPF 중증도를 나타내는 기준선 임상 지표 사이의 상관관계는 미약하였다 (연령에 대한 상관 계수 -0.07, FVC에 대한 상관 계수 - 0.03, DLCO에 대한 상관 계수 -0.28). 질환 중증도에 대한 어떤 추가의 임상 지표도 추가 분석을 위해 이용할 수 없었다.

[0325] 기준선 혈청 LOXL2 수준의 역치가 440 pg/mL인 것은 모든 원인의 사망에 대한 위험과 상관관계가 있다는 것이 결과를 통해 나타났다. 혈청 중 기준선 LOXL2 수준이 440 pg/mL보다 높게 존재하는 것은 기준선 이후 12-, 18-, 및 24개월째 더 많이 사망하는 것과 관련이 있었다 (도 15a 및 b).

[0326] 다변량 콕스 비례 위험 모델링 (공변량은 연령 및 성별 포함)은 LOXL2 수준이 440 pg/mL보다 높게 존재하는 것

은 기준선 이후 12-, 18-, 및 24개월째 사망 위험이 2.3배 증가한 것과 관련이 있다고 제안하였다 (하기 표 9A 및 B 참조).

표 9

표 9A: GAP 코호트에서 기준선 이후 6-, 12-, 18-, 및 24개월째에 기준선 LOXL2 수준이 낮은 (≤ 440 pg/mL) 대상체 대 기준선 LOXL2 수준이 높은 (> 440 pg/mL) 대상체에 대한 사례 비율 및 위험비

기준선 이후 경과 시간	사례 비율		위험비* (95% CI)	P값
	낮은 LOXL2	높은 LOXL2		
6개월째	5/52 (10%)	10/59 (17%)	1.76 (0.60, 5.22)	0.3051
12개월째	10/52 (19%)	23/59 (39%)	2.27 (1.05, 6.98)	0.0319
18개월째	12/52 (23%)	26/59 (44%)	2.22 (1.12, 4.43)	0.0231
24개월째	14/52 (27%)	30/59 (51%)	2.31(1.22, 4.37)	0.0105

* 모델은 공변량으로서 연령 및 성별을 포함.

표 9B: 기준선 이후 6-, 12-, 18-, 및 24개월째에 기준선 LOXL2 수준이 낮은 (≤ 440 pg/mL) 대상체 대 기준선 LOXL2 수준이 높은 (> 440 pg/mL) 대상체에 대한 사례 비율 및 위험비

기준선 이후 경과 시간	사례 비율		위험비 (95% CI)	P값
	낮은 LOXL2	높은 LOXL2		
6개월째	2/36 (6%)	3/13 (23%)	5.08 (0.85, 30.47)	0.0756
12개월째	5/36 (14%)	3/13 (23%)	1.90 (0.45, 7.99)	0.3796
18개월째	5/36 (14%)	3/13 (23%)	1.90 (0.45, 7.99)	0.3796
24개월째	5/36 (14%)	4/13 (31%)	2.11(0.54, 8.24)	0.2846

[0327]

[0328]

대상체의 서브세트에 대해 추가의 혈청 샘플을 전향적 방식으로 수집하였다. 연구 진행 기간 동안, 60명의 대상체로부터 두개 (2)의 샘플을 수집하고, 42명의 대상체로부터 세개 (3)의 샘플을 수집하고, 31명의 대상체로부터 네개 (4)의 샘플을 수집하고, 17명의 대상체로부터 다섯개 (5)의 샘플을 수집하고, 12명의 대상체로부터 여섯개 (6)의 샘플을 수집하고, 일곱명 (7)의 대상체로부터 일곱개 (7)의 샘플을 수집하고, 두명(2)의 대상체로부터 여덟개 (8)의 샘플을 수집하였다. 급성 악화와 관련된 경우에는 어떤 샘플도 수집하지 않았다.

[0329]

혈청 LOXL2 수준과 모든 원인의 사망 사이의 관계를 평가하기 위해 시간 의존성 연속 변수로서 각 샘플 중 LOXL2 수준을 도입하는 다변량 콕스 비례 위험 모델링 (연령 및 성별을 비롯한 공변량 포함)을 사용하였다. 시간 경과에 따라 측정된 혈청 LOXL2 수준은 사망 위험과 관련이 있었다 ($p=0.003$). GAP 코호트에서, 연구 기간 동안 임의 시점에 얻어낸 혈청 LOXL2 수준이 각각 2.7배 증가한 경우, 사망 위험은 1.63배만큼 증가하였다 (95% 신뢰 구간 1.19-2.25).

[0330]

하기 표 10에는 기준선 이후 다양한 시점에서의 혈청 LOXL2 수준을 이용한 다변량 분석 결과가 제시되어 있다.

표 10

기준선 이후 6-, 12-, 18-, 및 24개월째에 낮은 (≤ 440 pg/mL) 혈청 LOXL2 수준 대 높은 (> 440 pg/mL) 혈청 LOXL2 수준에 따른 다변량 분석

반응 변수	모델항	위험비 (95 % CI)	p값
사망까지의 시간 6개월	로그 LOXL2 (\leq 또는 > 6.08)	1.8 (0.6, 5.2)	0.305
	성별	*0.5 (0.1, 1.8)	0.299
	연령(연속)	1.0 (1.0, 1.1)	0.931
사망까지의 시간 12개월	로그 LOXL2 (\leq 또는 > 6.08)	2.3 (1.1, 7.0)	0.032
	성별	*0.4 (0.2, 0.9)	0.037
	연령(연속)	1.0 (1.0, 1.0)	0.647
사망까지의 시간 18개월	로그 LOXL2 (\leq 또는 > 6.08)	2.2 (1.1, 4.4)	0.023
	성별	*0.5 (0.2, 1.0)	0.052
	연령(연속)	1.0 (1.0, 1.0)	0.848
사망까지의 시간 24개월	로그 LOXL2 (\leq 또는 > 6.08)	2.3 (1.2, 4.4)	0.011
	성별	*0.4 (0.2, 1.0)	0.026
	연령(연속)	1.0 (1.0, 1.0)	0.808

* 위험비는 여성 환자를 선호한다.

[0331]

[0332] GAP 코호트의 결과는 상기 기술된 ARTEMIS-IPF 연구의 것과 유사하였다. 두 연구 모두에서, 기준선 혈청 LOXL2 수준이 역치 수준보다 더 높은 것은 IPF 환자에서 음의 결과를 나타낼 위험이 증가되어 있는 것과 관련이 있는 것으로 나타났다.

[0333] 실시예 10: 만성 간염 B (CHB) 환자에서 기준선 혈청 LOXL2 수준

[0334] 테노포비르 디소프록실 푸마레이트 (TDF) 처리 전 및 300 mg의 TDF로 처리한 후 240주가 경과하였을 때 만성 간염 B (CHB) 및 간 섬유증을 앓는 대상체 중의 혈청 LOXL2 수준을 평가하였다. TDF 처리 전 및 TDF로 처리한 후 240주가 경과하였을 때 CHB를 앓는 인간 대상체 348명으로부터 간 생검을 채취하였다. 섬유증 평가를 위해 이샤크 등급을 사용함으로써 병리학자에 의해 생검을 점수화하였다. 본 연구에서, 96.3%의 대상체에서 간 섬유증 개선, 또는 간 섬유증 무진행이 나타났다. 생검을 통해 입증된 간경변증을 이용한 연구를 시작한 96명의 대상체 중 74%에서 처리 후 240주가 경과하였을 때 간경변증이 퇴행한 것으로 나타났다.

[0335] 섬유증 점수가 개선된 여러 대상체를 비롯한, 348명의 대상체 중 81명에 대해 기준선에서 및 240주째에 ELISA에 의해 혈청 LOXL2 수준을 소급해서 평가하였다. 처리 후 240주째, 상기 81명의 대상체 중 42명에서 간경변증이 퇴행한 것으로 나타났고, 16명에서는 간경변증이 지속되는 것으로 나타났고, 2명에서는 치료 기간 동안에 걸쳐 간경변증으로 진행되는 것으로 나타났고, 18명은 섬유증에는 변함이 없는, 비-간경변증 대상체였고, 3명은 이샤크에 측정된 바, 섬유증이 2점 이상 감소된, 비-간경변증 대상체였다.

[0336] 81명의 CHB 대상체 중 91%에서, 및 간경변증 대상체 중 97%에서 기준선 혈청 LOXL2 수준 상승이 일어났다. 하기 제시되는 바와 같이, 간경변증 환자 (이샤크 점수 5 또는 6)는 중증도가 더 낮은 간 섬유증을 앓는 환자와 비교하여 기준선에서 상승된 LOXL2 혈청 수준 중앙값을 가졌다. 이러한 관찰 결과는 만성 C형 간염 감염 환자에서 관찰되는 LOXL2 혈청 수준과 유사하였다. 또한, 조직학적 연구를 통해 LOXL2 단백질은 활동성인 섬유발생 부위에 집중되어 있다는 것이 밝혀졌다 (데이터는 제시되지 않음). 이러한 결과는 간경변증 환자의 간에서는 여전히 활동성이 섬유발생이 일어나고 있다는 것을 제안한다. 또한, 240주간의 처리 기간 동안에 걸쳐 60명의 기준선 간경변증 환자 중 72%에서는 퇴행이 나타나거나, 또는 그의 이샤크 섬유증 점수가 개선된 것으로 나타났다. 또한, 상기 환자는 240주째에 기준선과 비교하였을 때 더 낮은 혈청 LOXL2 수준 중앙값을 가졌다. 본 결과는 전반적인 섬유증 및 섬유발생이 항바이러스 치료에 의해 감소되었다는 것을 제안한다.

[0337] 도 16a는 혈청 LOXL2 수준 (pg/mL)이 섬유증 점수와 상관관계가 있다는 것을 보여주는 것이며, 도 16b 및 16c는 혈청 기준선 LOXL2 수준 (pg/mL)이 기준선 이샤크 섬유증 점수와 상관관계가 있다는 것을 보여주는 것이다. 처리 후 240주째, 평균 혈청 LOXL2 수준은 감소되어 있었고, 더 이상 이샤크 섬유증 점수와는 상관관계가 없었다. 하기 표 11을 참조할 수 있다.

표 11

기준선 및 처리 개시 후 240주째의 이샤크 병기와 비교되는 평균 혈청 LOXL2 수준

	N	기준선	N	240주째
모든 대상체 (평균 LOXL2 (pg/mL))	81	2678.6	81	748.9
이샤크 병기 0-3 (평균 LOXL2 (pg/mL))	18	510.2	56	746.8
이샤크 병기 4-6 (평균 LOXL2 (pg/mL))	63	3298.2	25	753.5

[0338]

[0339] 도 17에 제시된 바와 같이, 기준선 이샤크 병기가 1 내지 3인 대상체 모두 1,500 pg/mL 미만의 혈청 LOXL2 수준을 가졌고, 기준선 이샤크 병기가 4 내지 6인 대상체 중 49%는 1,500 pg/mL 초과 혈청 LOXL2 수준을 가졌다.

[0340] 81명의 대상체 중 79%는 혈청 LOXL2 수준 감소를 경험하였다. (각각 정량화한 미만의 기준선 수준을 갖는) 11%의 대상체의 LOXL2 수준에는 변함이 없었다.

[0341] 도 18에는 하기 군의 개별 대상체에 대한 기준선 및 240주째의 혈청 LOXL2 수준 (pg/mL)이 제시되어 있다: 240주째 간경변증이 지속되고 있는 대상체 (n=16, 도 18a); 240주째까지 간경변증의 역전이 일어난 대상체 (n=42, 도 18b); 240주째까지 섬유성 병기 (이샤크)에는 변함이 없는, 비-간경변증 대상체 (n=18, 도 18c); 연구 기간 동안에 걸쳐 간경변증으로의 진행을 경험한 대상체 (도 18d); 및 240주째까지 섬유증이 2기 이상 감소된 비-간경변증 대상체 (도 18e).

[0342] 하기 표 12에서는 240주째 간경변증이 지속되고 있는 대상체, 240주째 간경변증이 역정된 대상체, 및 연구 기간 동안에 걸쳐 섬유성 변화에는 변함이 없는 비-간경변증 대상체 ("비-간경변증 Δ 없음")에서의 기준선 및 240주째 혈청 LOXL2 수준 (pg/mL)을 비교하였다.

표 12

상이한 CHB 대상체 군에서의 혈청 LOXL2 수준 변화

	간경변증 지속 (n=16)		간경변증 역전 (n=42)		비-간경변증 Δ 없음 (n=18)	
	기준선	Wk 240	기준선	Wk 240	기준선	Wk 240
평균	9124.1	603.8	1355.0	922.6	798.4	436.8
중앙값	1863	LOQ	1073	< LOQ	< LOQ	< LOQ
< LoQ	2 (13%)	8 (50%)	4 (10%)	29 (69%)	10 (56%)	14 (78%)
< LoD	1 (6%)	2 (13%)	1 (2%)	13 (31%)	4 (22%)	8 (44%)
< 1000	5 (31%)	14 (88%)	20 (48%)	35 (83%)	13 (72%)	15 (83%)
> 3000	5 (31%)	0 (0%)	2 (5%)	3 (7%)	1 (6%)	0 (0%)
감소		14 (88%)		37 (88%)		9 (50%)
증가		0 (0%)		5 (12%)		2 (11%)

[0343]

[0344] 표 12에 제시된 바와 같이, 간경증화 대상체 중 88%에서는 LOXL2 수준이 감소되었다. 추가로, 기준선 혈청 LOXL2 수준 측정 결과, 240주째 간경변증이 지속되는 것으로 나타난 대상체의 것이 가장 높았다.

[0345] 도 19에는 주어진 기준선 혈청 LOXL2 수준 (<1,500, >1,500, 1500-3,000, <3,000, 및 >3,000 pg/mL)을 가지며, 240주째 조직학상 개선된 것으로 측정된 ("Y") 간경변증 대상체의 비율(%), 및 동일한 주어진 기준선 혈청 LOXL2 수준을 가지며, 240주째 조직학상 개선되지 않은 것으로 측정된 ("N") 간경변증 대상체의 비율(%)이 제시되어 있다. 제시된 바와 같이, 기준선 혈청 LOXL2 수준이 1,500 pg/mL 미만인 간경변증 대상체에서 퇴행이 이루어질 가능성은 88%였다. 기준선 혈청 LOXL2 수준이 1,500 pg/mL 내지 3,000 pg/mL인 간경변증 대상체에서 퇴행이 이루어질 가능성은 70%인 반면, 기준선 혈청 수준이 3,000 pg/mL를 초과하는 간경변증 대상체에서 퇴행이 이루어질 가능성은 29%에 불과하였다. 따라서, 간경변증 환자 중에서 기준선 혈청 LOXL2 수준이 1,500 pg/mL 미만인 것은 퇴행 가능성이 88%인 것과 관련이 있는 반면, 기준선 혈청 LOXL2 수준 이 3,000 pg/mL를 초과하는 것은 퇴행 가능성이 29%인 것과 관련이 있었다.

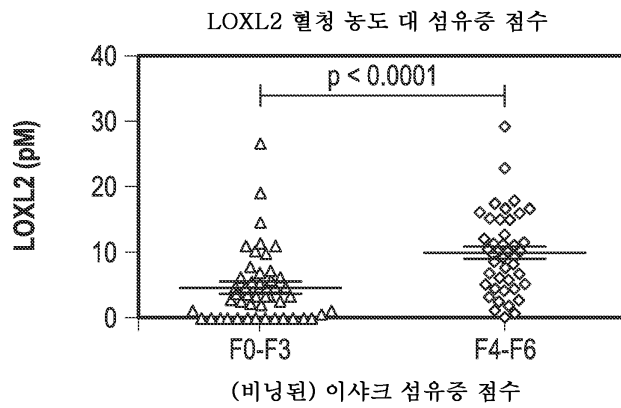
[0346] 기준선 혈청 LOXL2 수준은 기준선 섬유증 병기보다는 240주째의 이샤크 섬유증 병기와 더 큰 상관관계가 있었다. 이는 높은 혈청 LOXL2 수준이 활동성인 섬유발생을 반영한다는 것을 제안한다.

[0347] 본 연구 결과를 통해 혈청 LOXL2 수준은 CHB 환자에서 상승되어 있고, 가장 중증인 섬유증을 앓는 환자에서 가장 높게 나타났다는 것이 입증되었고, 이는 혈청 LOXL2와 섬유증 점수 사이에는 일반적인 상관관계가 존재함을 증명하는 것이다. (예를 들어, 더 높은 기준선 수준은 240주째에 섬유증 병기가 더 높은 것과 관련이 있었다는 점을 고려해 보면) 혈청 LOXL2 수준이 활동성인 질환 및 활동성인 섬유발생을 반영하였다. 근원 CHB를 치료한 결과, 대부분의 환자에서 LOXL2가 감소되었으며, 이는 섬유발생이 하향조절되었음을 제안하는 것이다. 임상적으로 잘 진행하고 있는, 섬유증 점수에는 변함이 없는 환자에서도조차 5년 후에는 혈청 LOXL2가 감소하였다. 상기 결과는 혈청 LOXL2 수준이 활동성인 질환의 마커임을 입증하며, 높은 LOXL2는 퇴행이 이루어지지 않을 것이라는 것을 예측한다는 것을 입증한다.

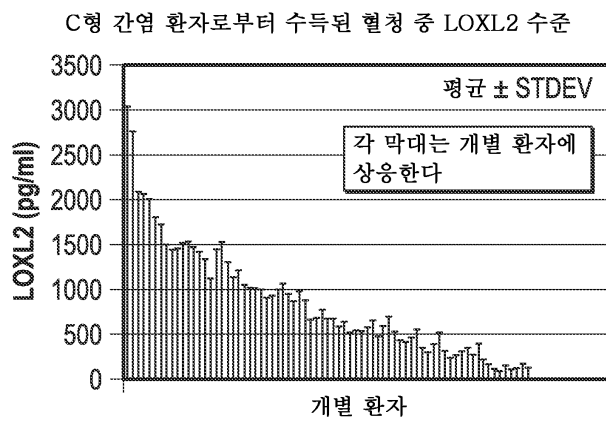
[0348] 본 발명은 그의 구체적인 실시양태를 참고로 하여 기술되었지만, 본 발명의 진정한 정신 및 범주로부터 벗어남 없이 다양한 변형될 수 있고, 등가물로 치환될 수 있다는 것을 당업자는 이해하여야 한다. 추가로, 특정의 상황, 물질, 물질의 조성물, 공정, 공정 단계 또는 단계들에 적합하도록, 본 발명의 목적, 정신 및 범주에 적합하도록 여러 가지로 수정될 수 있다. 상기 수정들 모두 본원에 첨부된 특허청구범위의 범주 내에 포함시키고자 한다.

도면

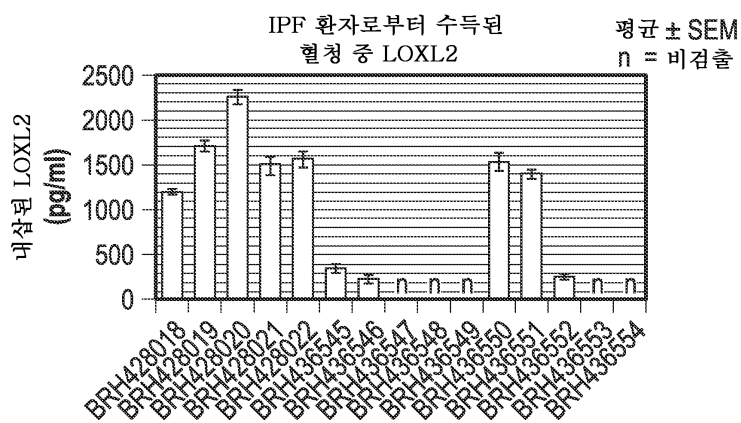
도면1



도면2



도면3



MERPICSHIC SCLAMTALLIS PISLAQYDSW PHYPEYFOOP APEYHQPOAP ANVAKIQLR 60
신호 펄스
AGQRKHSEGE RVEVYYDGQW GTVCDDESI HAAHVCREL GYVEAKSWTA SSSYKGECP 120
SRCR1
IWLNLHCTG NEATLAacts NGWVTDCKH TEDVGVCSD KRIPEKFDN SLINQIENIN 180
IYEDIRIRA ILSTYKRTPE VMEGYEVEKE GKTWKQICDK HMTAKNSRVV CGMEGFPER 240
TYNTKYKMF ASRRKORYWP FMSDCTGTEA HISSCKLGPQ VSIDPMKNVT CENGLPAVVS 300
SRCR2
CVPGQVESPDP GPSRFRKAYK PEQPLVRIRG GAYIGEGRYE VLKNGEMGTV CDDKWDIVSA 360
SVVORELGEFG SAKAVTGRS LGQIGIPIHL NEIOCTGNEK SIIDCKFNAE SQGCNHEEDA 420
SRCR3
GVRCNTPAMG LQKRLRING RNPYEGREYV IVERNGSLYW GWVCGQNWGI VEAMVYCRQL 480
GLGFASTAFQ ETWYMHGDVN SNKVMSGVK CSGTELSLAH CRHDEGVAC POGGYOYGAG 540
SRCR4
VACSETAPDL VLNAMVQOT TYLEDPRPM LQCAMENCI SASAQTDPT TGYRLIRFS 600
추가 노레인
SOLHNNGQSD FRPKNGRHAW IWHDCRHYYH SMEVFTHYDI LNLNGTKVAE GHKASFLED 660
TECHGDIQKN YECANEGDOG ITMGCDMYR HDIDCWMDI TDVPPGDYLF QVYINPNEY 720
AESDYSNNIM KCRSYDGRH IMMYNCHIGG SESETEKKE EHESGLINNO ISPQ 774

서열 번호 1

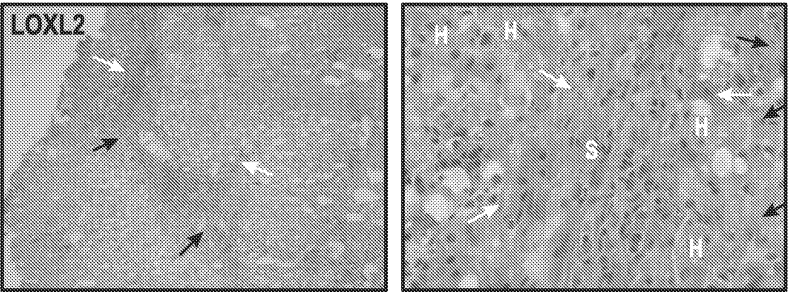
도면4

도면5

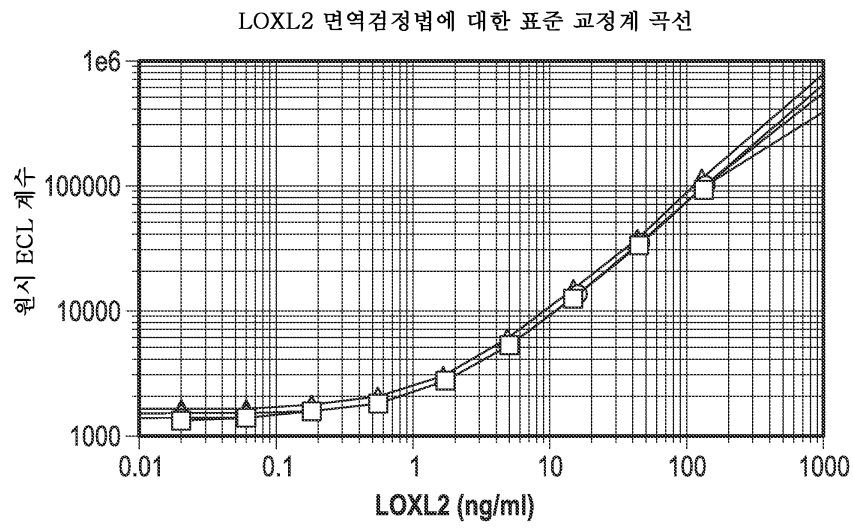
H:	PDLVLNAEMV	QOTTYLEDRP	MFMLQOCAMEE	NCLSASAAQT	DPTTGYRRLT	RESSQIHNNG
M:	PDLVLNAEIV	QOTAYIEDRP	MSLIQOCAMEE	NCLSASAVHT	DPTRGHRRLT	RESSQIHNNG
R:	PDLVLNAEIV	QOTAYIEDRP	MALQOCAMEE	NCLSASAVHT	DPTRGHRRLT	RESSQIHNNG
C:	PDLVLNAEMV	QOTTYLEDRP	MFMLQOCAMEE	NCLSASAAQT	NPTTGYRRLT	RESSQIHNNG
H:	QSDFRPKNGR	HAMIWHDCHR	HYHSMEVFTH	YDLLNLNGTK	VAEGHKASFC	LEDTECEGDI
M:	QSDFRPKNGR	HAMIWHDCHR	HYHSMEVFTH	YDLLNLNGTK	VAEGHKASFC	LEDTECEGDI
R:	QSDFRPKNGR	HAMIWHDCHR	HYHSMEVFTH	YDLLNLNGTK	VAEGHKASFC	LEDTECEGDI
C:	QSDFRPKNGR	HAMIWHDCHR	HYHSMEVFTH	YDLLNLNGTK	VAEGHKASFC	LEDTECEGDI
H:	QKNYECANFG	DQGITMGCWD	MYRHDIDCQW	VDITDVPPGD	YLFQVVINPN	FEVAESDYSN
M:	QKNYECANFG	DQGITMGCWD	MYRHDIDCQW	VDITDVPPGD	YLFQVVINPN	FEVAESDYSN
R:	QKSIECANFG	DQGITMGCWD	MYRHDIDCQW	VDITDVPPGD	YLFQVVINPN	FEVAESDYSN
C:	QKNYECANFG	DQGITMGCWD	MYRHDIDCQW	VDITDVPPGD	YLFQVVINPN	FEVAESDYSN
H:	NIMKCRSRID	GHRIMWYNCH	IGGSFSEETE	KKEHFSGLL	NNQLSPO	(서열 번호 2)
M:	NIMKCRSRID	GHRIMWYNCH	YGGA FSEETE	QKFEHFSGLL	NNQLSYO	(서열 번호 3)
R:	NIMKCRSRID	GHRIMWYNCH	YGGA FSEETE	QKFEHFSGLL	NNQLSYO	(서열 번호 4)
C:	NIMKCRSRID	GHRIMWYNCH	IGGSFSEETE	KKEHFSGLL	NNQLSPO	(서열 번호 5)

도면6

인간 섬유성 간 조직에서의 LOXL2 발현

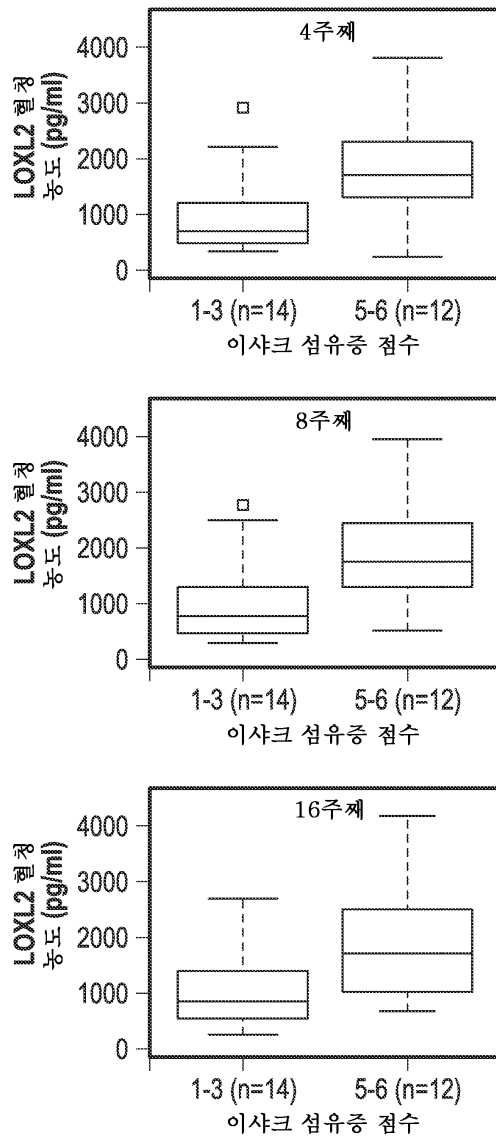


도면7

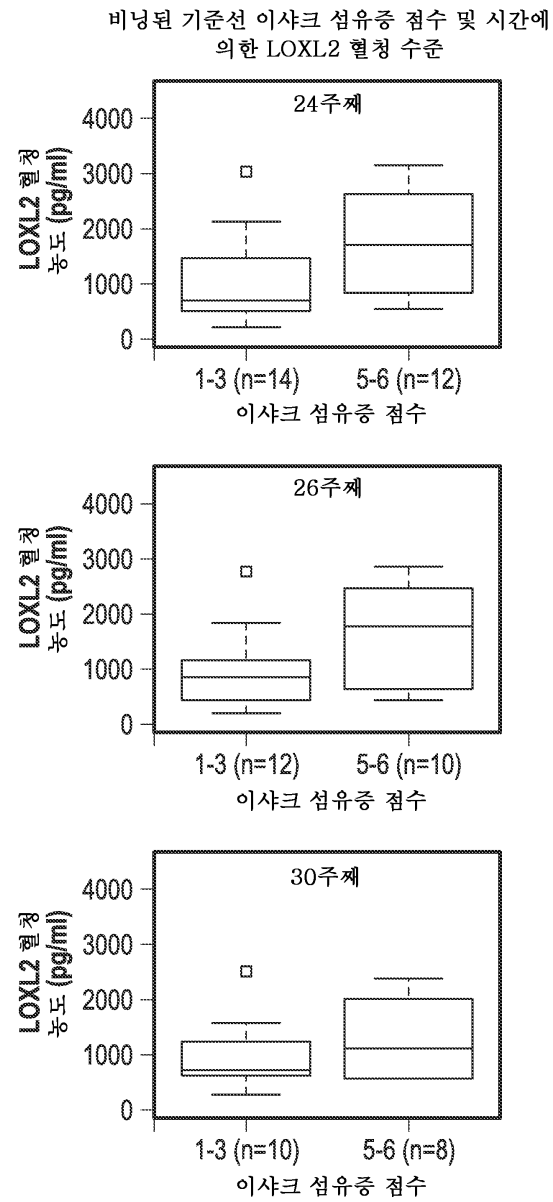


도면8a

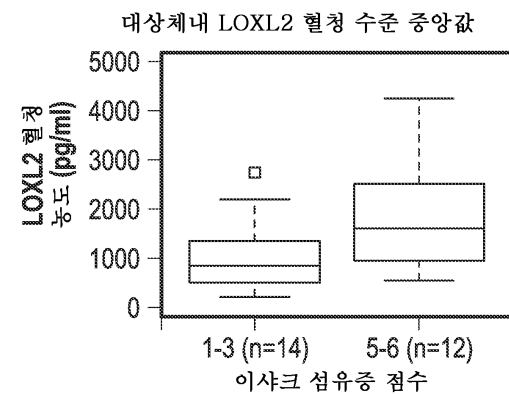
비닐된 기준선 이삭크 섬유증 점수 및 시간에
의한 LOXL2 혈청 수준



도면8b

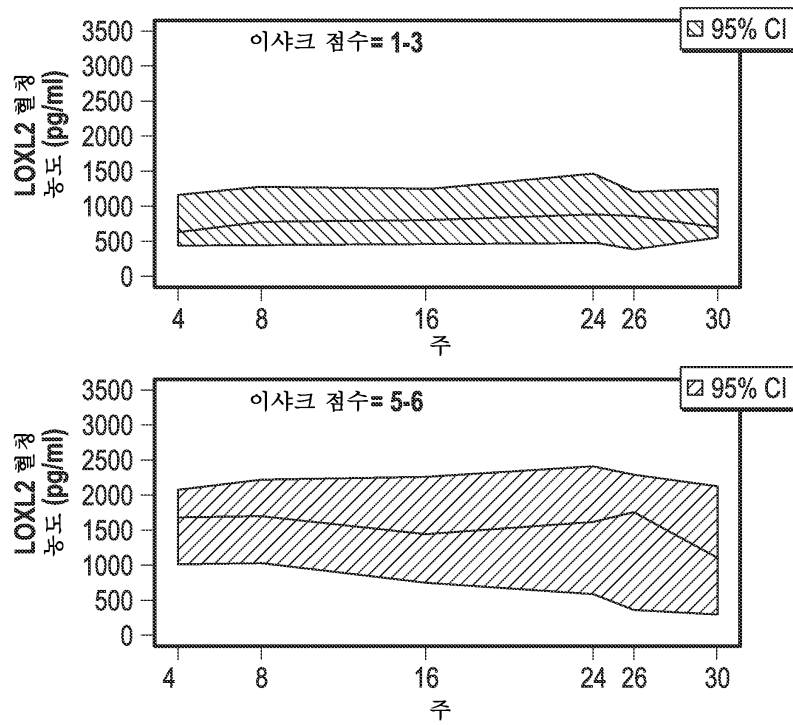


도면9

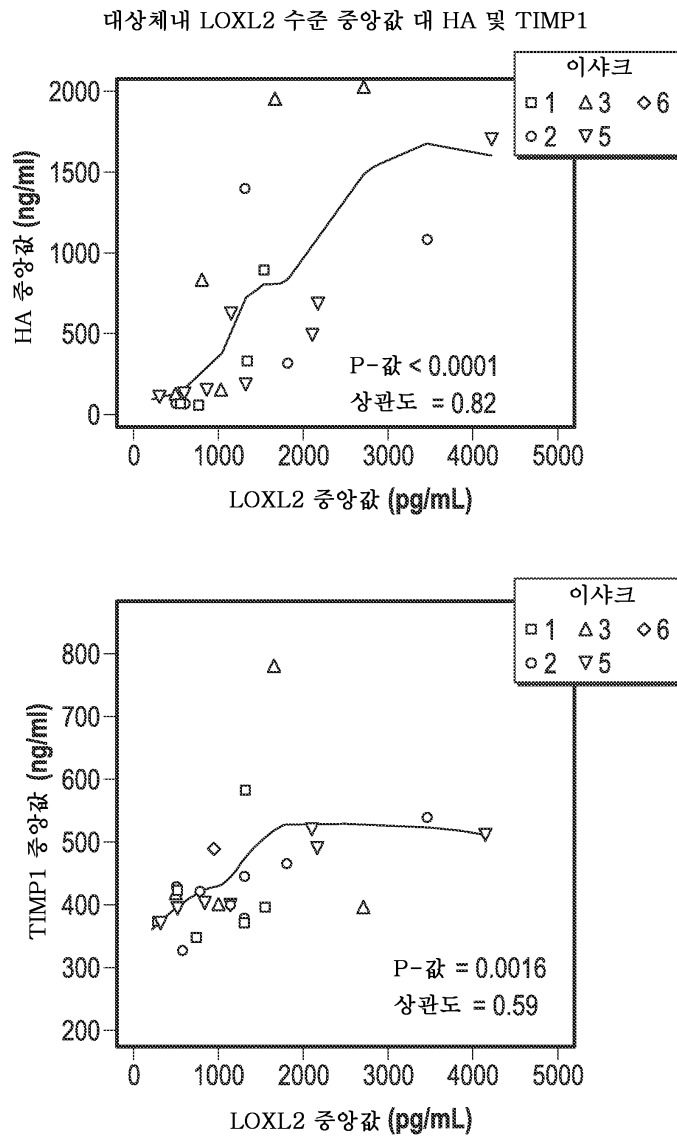


도면10

비닝된 기준선 이삭크 섬유증 점수에 의한 시간 경과에 따른
LOXL2 혈청 농도 중앙값 (95% 신뢰 구간)



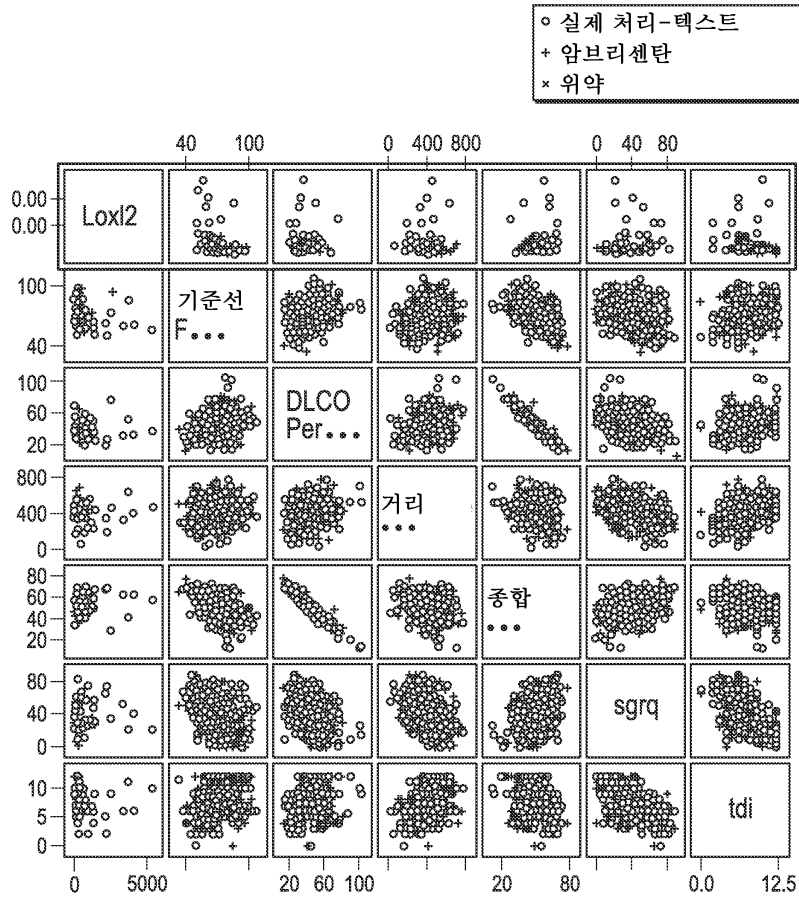
도면11



도면12a

기준선 LOXL2 수준과 IPF 중증도 및 기능 상태에 대한
기준선 척도 사이의 상관관계

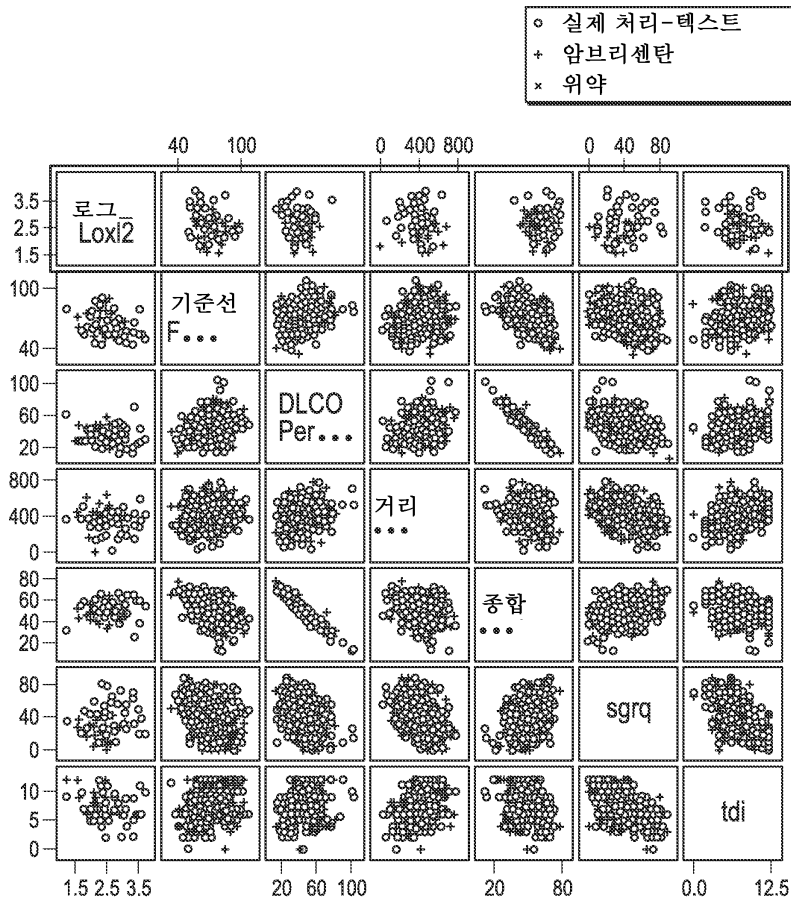
LOXL2 데이터에 대한 산점도 매트릭스



도면12b

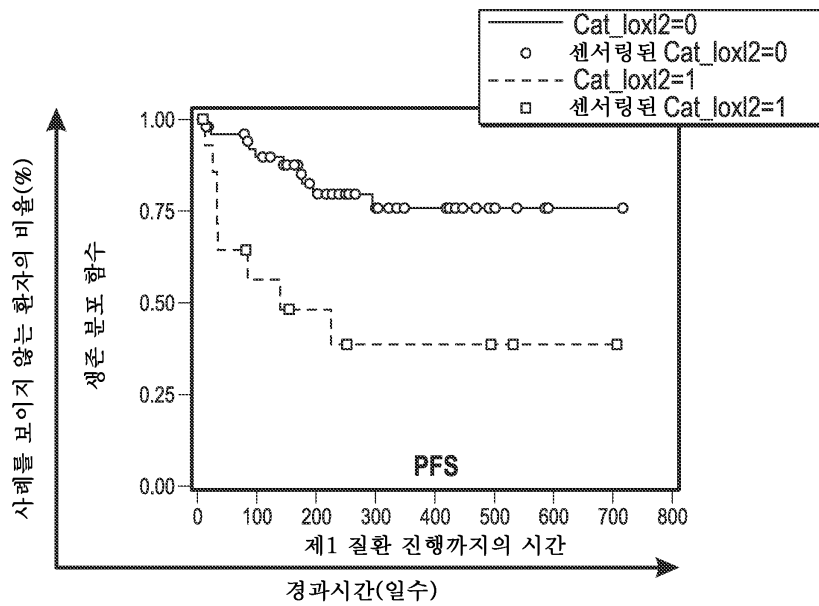
기준선 LOXL2 수준과 IPF 중증도 및 기능 상태에 대한
기준선 척도 사이의 상관관계

LOXL2 데이터에 대한 산점도 매트릭스



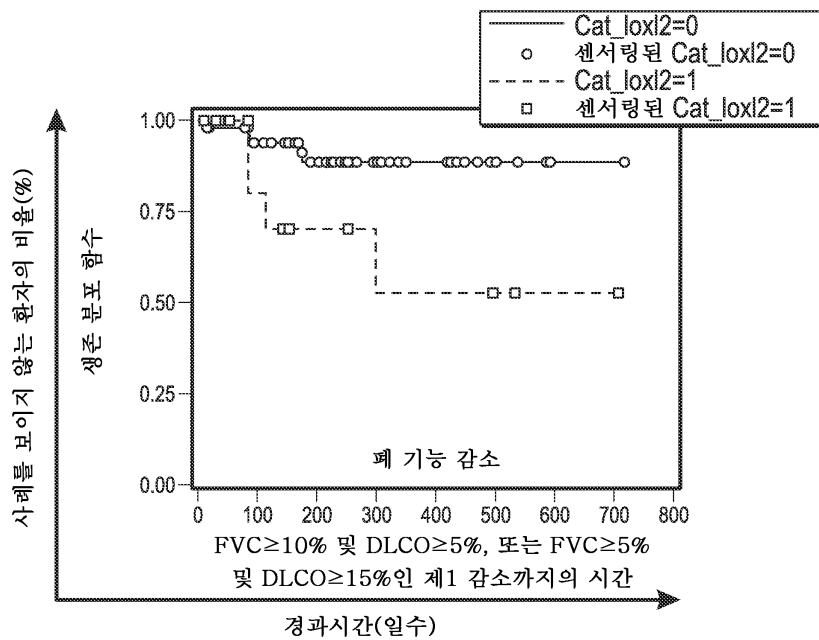
도면13a

질환 진행 (PFS) 및 그의 성분: 폐 기능 감소, 호흡기 질환에 의한
입원 및 사망에 대한, 낮은 및 높은 LOXL2 수준을 비교하는
카플란-마이어 곡선



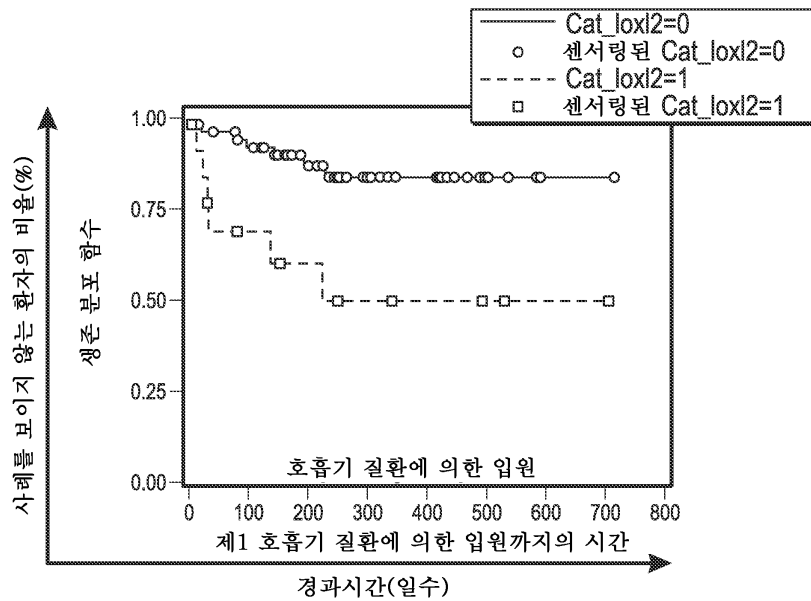
도면13b

질환 진행 (PFS) 및 그의 성분: 폐 기능 감소, 호흡기 질환에
의한 입원 및 사망에 대한, 낮은 및 높은 LOXL2 수준을
비교하는 카플란-마이어 곡선



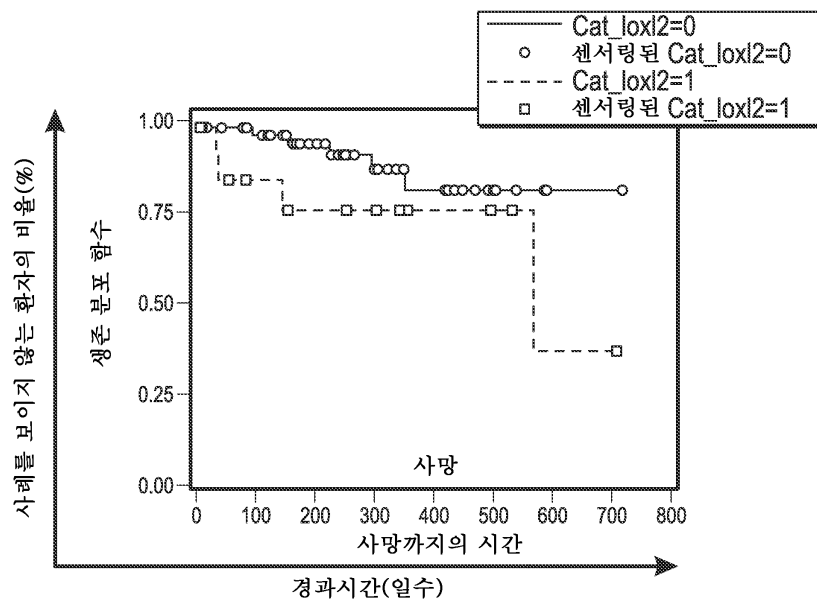
도면13c

질환 진행 (PFS) 및 그의 성분: 폐 기능 감소, 호흡기 질환에 의한 입원 및 사망에 대한, 낮은 및 높은 LOXL2 수준을 비교하는 카플란-마이어 곡선



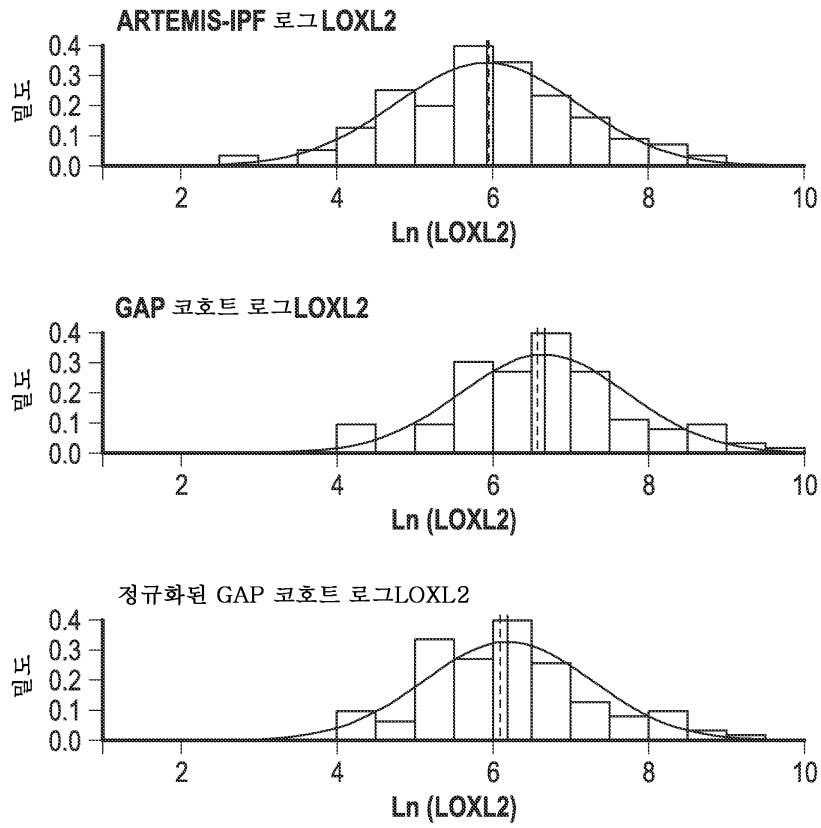
도면13d

질환 진행 (PFS) 및 그의 성분: 폐 기능 감소, 호흡기 질환에 의한 입원 및 사망에 대한, 낮은 및 높은 LOXL2 수준을 비교하는 카플란-마이어 곡선



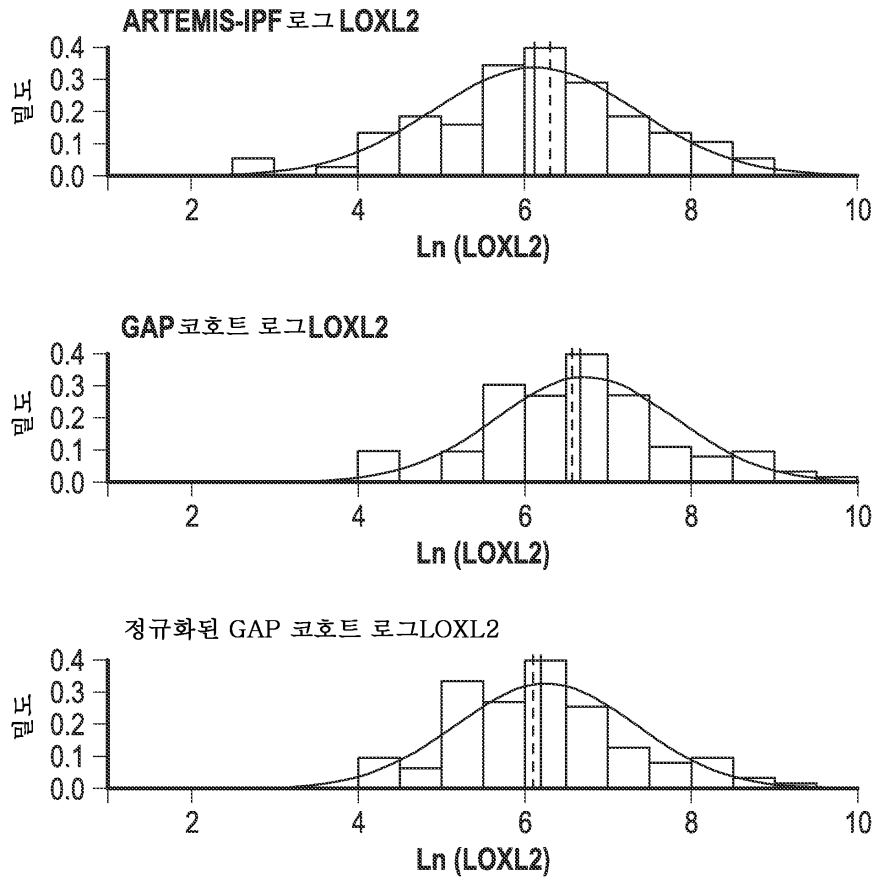
도면14a

ARTEMIS-IPF 대상체 (위약 및 암브리센탄 처리된 대상체(조합))
및 GAP 코호트 대상체에서의 기준선 LOXL2 분포 비교

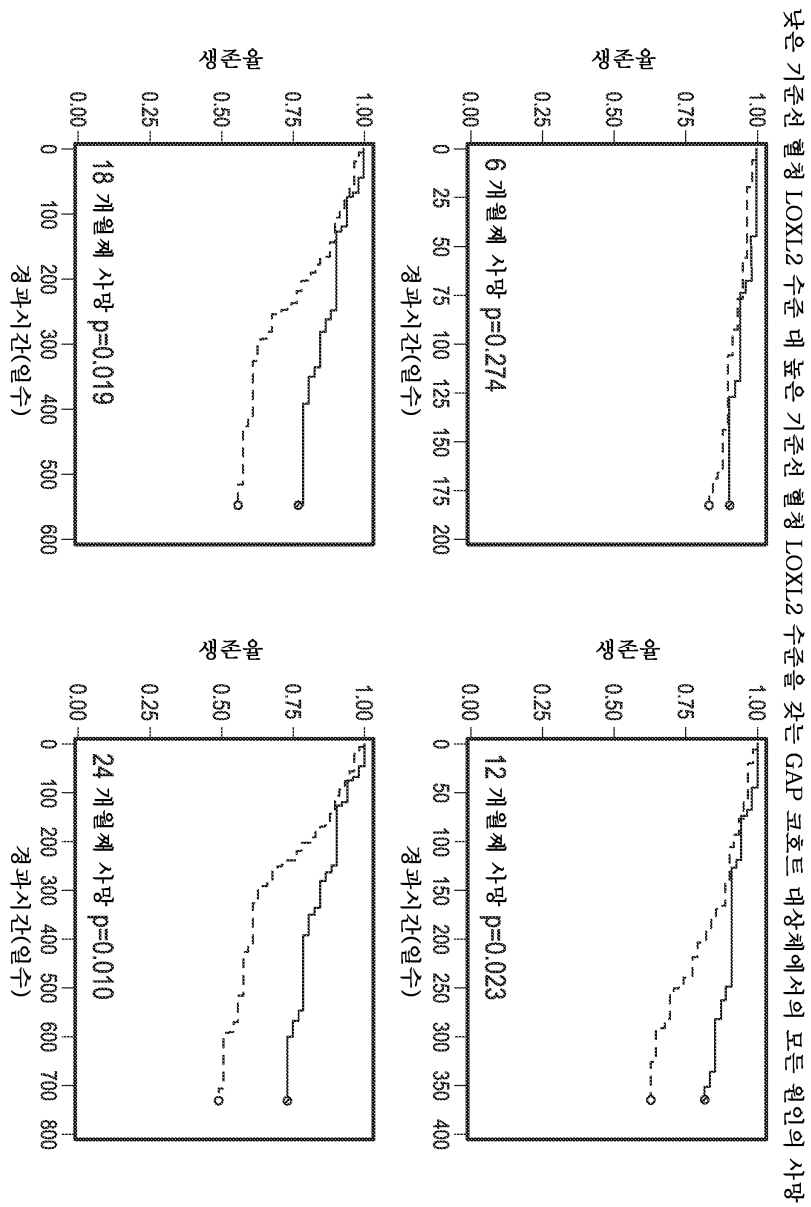


도면14b

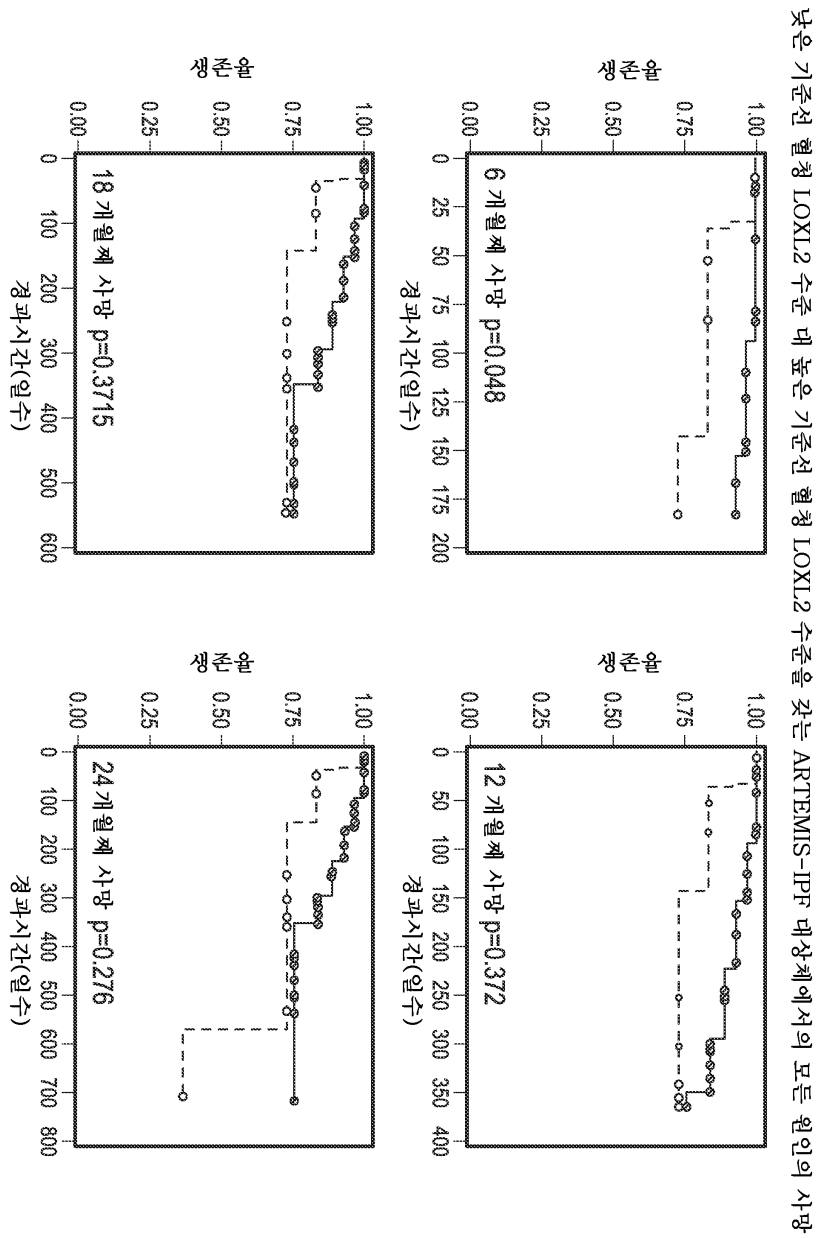
ARTEMIS-IPF 대상체 (암브리센탄 처리된 대상체) 및
GAP 코호트 대상체에서의 기준선 LOXL2 분포 비교



도면15a

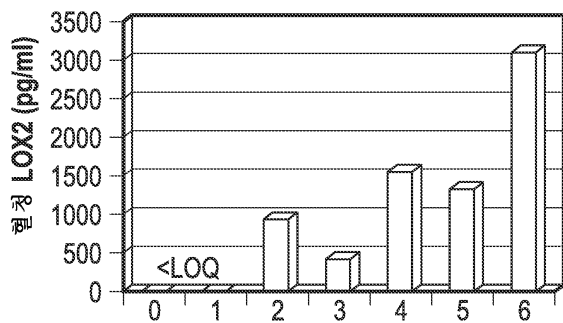


도면15b



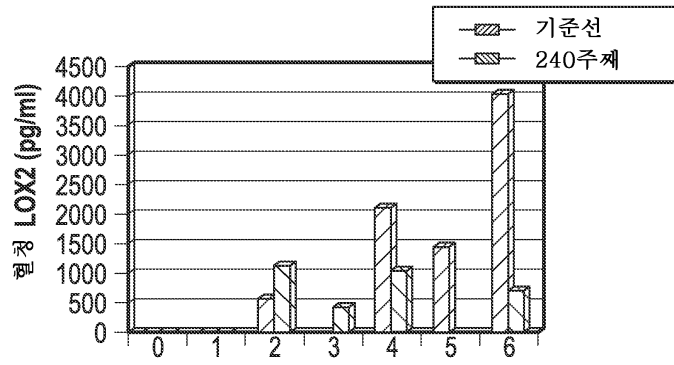
도면16a

이삭크 섬유증 병기에 의해 분류된 CHB 대상체에서의 혈청 LOXL2 수준



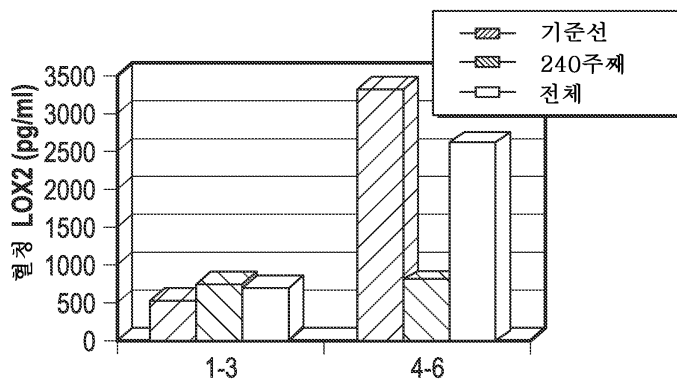
도면16b

이삭크 섬유증 병기에 의해 분류된 CHB 대상체에서의 혈청 LOXL2 수준

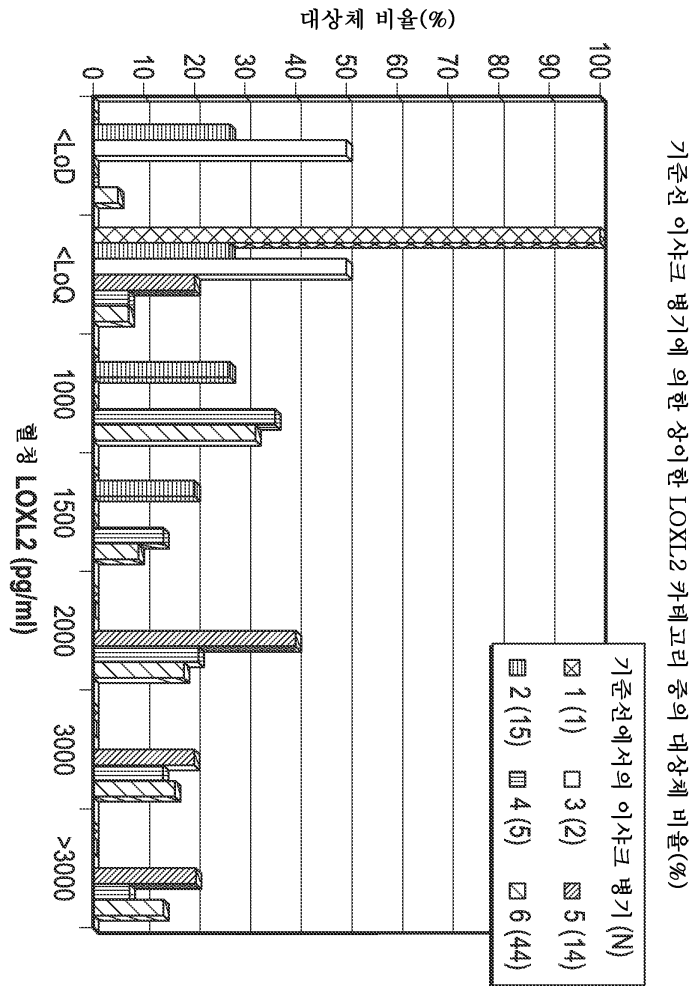


도면16c

이삭크 섬유증 병기에 의해 분류된 CHB 대상체에서의 혈청 LOXL2 수준

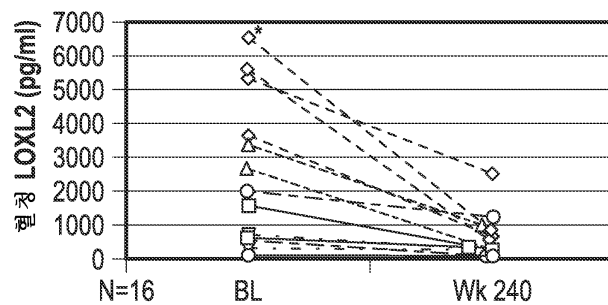


도면17



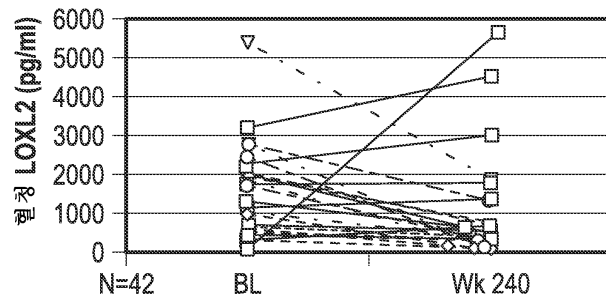
도면18a

CHB 대상체에서 기준선(BL) 및 240주째(WK240)의 혈청 LOXL2 수준
간경변증이 지속되고 있는 대상체



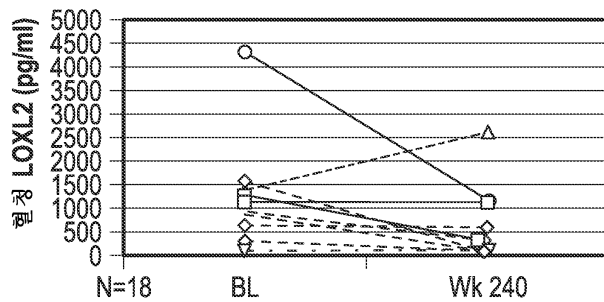
도면18b

CHB 대상체에서 기준선(BL) 및 240주째(WK240)의 혈청 LOXL2 수준
간경변증의 역전이 일어난 대상체



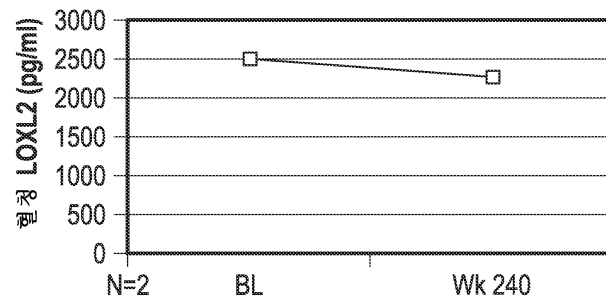
도면18c

CHB 대상체에서 기준선(BL) 및 240주째(WK240)의 혈청 LOXL2 수준
섬유성 병기에는 변함이 없는, 비-간경변증 대상체



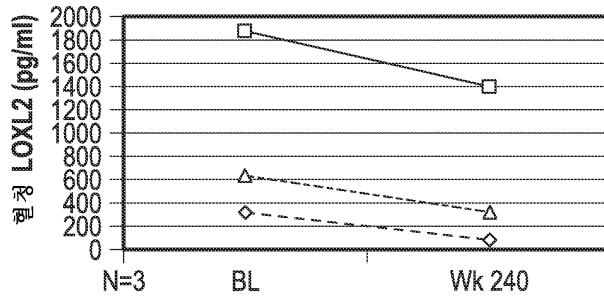
도면18d

CHB 대상체에서 기준선(BL) 및 240주째(WK240)의 혈청 LOXL2 수준
간경변증으로의 진행을 경험한 대상체

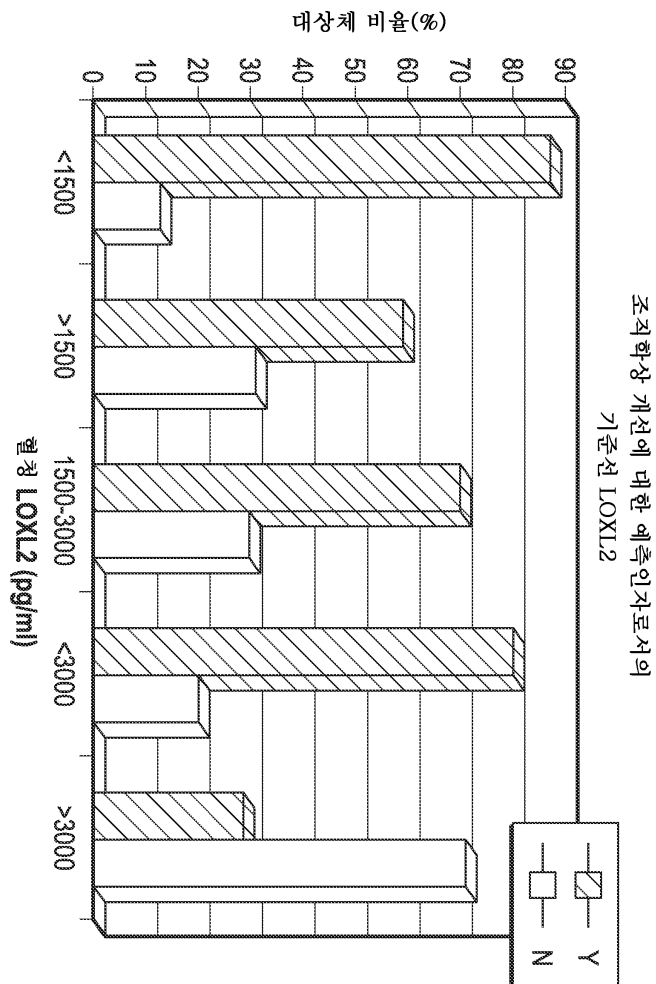


도면18e

CHB 대상체에서 기준선(BL) 및 240주째(WK240)의 혈청 LOXL2 수준
섭유증이 2기 이상 감소된 비-간경변증 대상체



도면19



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> GILEAD BIOLOGICS, INC.

SMITH, Victoria

ADAMKEWICZ, Joanne

LYMAN, Susan K.

CHIEN, Jason

LI, Xiaoming

SHAO, Lixin

<120> LYSYL OXIDASE-LIKE-2 ASSAY AND METHODS
OF USE THEREOF

<130> 246102008340

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 61/492,210

<151> 2011-06-01

<150> US 61/550,895

<151> 2011-10-24

<150> US 61/578,813

<151> 2011-12-21

<160> 14

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 774

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(774)

<223> LOXL2

<400> 1

Met Glu Arg Pro Leu Cys Ser His Leu Cys Ser Cys Leu Ala Met Leu

1 5 10 15

Ala Leu Leu Ser Pro Leu Ser Leu Ala Gln Tyr Asp Ser Trp Pro His

20 25 30

Tyr Pro Glu Tyr Phe Gln Gln Pro Ala Pro Glu Tyr His Gln Pro Gln

35 40 45

Ala Pro Ala Asn Val Ala Lys Ile Gln Leu Arg Leu Ala Gly Gln Lys

50	55	60	
Arg Lys His Ser Glu Gly Arg Val Glu Val Tyr Tyr Asp Gly Gln Trp			
65	70	75	80
Gly Thr Val Cys Asp Asp Asp Phe Ser Ile His Ala Ala His Val Val			
85	90	95	
Cys Arg Glu Leu Gly Tyr Val Glu Ala Lys Ser Trp Thr Ala Ser Ser			
100	105	110	
Ser Tyr Gly Lys Gly Glu Gly Pro Ile Trp Leu Asp Asn Leu His Cys			
115	120	125	
Thr Gly Asn Glu Ala Thr Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asn Gly Trp Gly			
130	135	140	
Val Thr Asp Cys Lys His Thr Glu Asp Val Gly Val Val Cys Ser Asp			
145	150	155	160
Lys Arg Ile Pro Gly Phe Lys Phe Asp Asn Ser Leu Ile Asn Gln Ile			
165	170	175	
Glu Asn Leu Asn Ile Gln Val Glu Asp Ile Arg Ile Arg Ala Ile Leu			
180	185	190	
Ser Thr Tyr Arg Lys Arg Thr Pro Val Met Glu Gly Tyr Val Glu Val			
195	200	205	
Lys Glu Gly Lys Thr Trp Lys Gln Ile Cys Asp Lys His Trp Thr Ala			
210	215	220	
Lys Asn Ser Arg Val Val Cys Gly Met Phe Gly Phe Pro Gly Glu Arg			
225	230	235	240
Thr Tyr Asn Thr Lys Val Tyr Lys Met Phe Ala Ser Arg Arg Lys Gln			
245	250	255	
Arg Tyr Trp Pro Phe Ser Met Asp Cys Thr Gly Thr Glu Ala His Ile			
260	265	270	
Ser Ser Cys Lys Leu Gly Pro Gln Val Ser Leu Asp Pro Met Lys Asn			
275	280	285	
Val Thr Cys Glu Asn Gly Leu Pro Ala Val Val Ser Cys Val Pro Gly			
290	295	300	

Gln Val Phe Ser Pro Asp Gly Pro Ser Arg Phe Arg Lys Ala Tyr Lys
305 310 315 320
Pro Glu Gln Pro Leu Val Arg Leu Arg Gly Gly Ala Tyr Ile Gly Glu
325 330 335
Gly Arg Val Glu Val Leu Lys Asn Gly Glu Trp Gly Thr Val Cys Asp
340 345 350
Asp Lys Trp Asp Leu Val Ser Ala Ser Val Val Cys Arg Glu Leu Gly
355 360 365

Phe Gly Ser Ala Lys Glu Ala Val Thr Gly Ser Arg Leu Gly Gln Gly
370 375 380
Ile Gly Pro Ile His Leu Asn Glu Ile Gln Cys Thr Gly Asn Glu Lys
385 390 395 400
Ser Ile Ile Asp Cys Lys Phe Asn Ala Glu Ser Gln Gly Cys Asn His
405 410 415
Glu Glu Asp Ala Gly Val Arg Cys Asn Thr Pro Ala Met Gly Leu Gln
420 425 430

Lys Lys Leu Arg Leu Asn Gly Gly Arg Asn Pro Tyr Glu Gly Arg Val
435 440 445
Glu Val Leu Val Glu Arg Asn Gly Ser Leu Val Trp Gly Met Val Cys
450 455 460
Gly Gln Asn Trp Gly Ile Val Glu Ala Met Val Val Cys Arg Gln Leu
465 470 475 480
Gly Leu Gly Phe Ala Ser Asn Ala Phe Gln Glu Thr Trp Tyr Trp His
485 490 495

Gly Asp Val Asn Ser Asn Lys Val Val Met Ser Gly Val Lys Cys Ser
500 505 510
Gly Thr Glu Leu Ser Leu Ala His Cys Arg His Asp Gly Glu Asp Val
515 520 525
Ala Cys Pro Gln Gly Gly Val Gln Tyr Gly Ala Gly Val Ala Cys Ser
530 535 540
Glu Thr Ala Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Met Val Gln Gln Thr

545 550 555 560

Thr Tyr Leu Glu Asp Arg Pro Met Phe Met Leu Gln Cys Ala Met Glu

565 570 575

Glu Asn Cys Leu Ser Ala Ser Ala Ala Gln Thr Asp Pro Thr Thr Gly

580 585 590

Tyr Arg Arg Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln

595 600 605

Ser Asp Phe Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp

610 615 620

Cys His Arg His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr His Tyr Asp Leu

625 630 635 640

Leu Asn Leu Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe

645 650 655

Cys Leu Glu Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Asn Tyr Glu

660 665 670

Cys Ala Asn Phe Gly Asp Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met

675 680 685

Tyr Arg His Asp Ile Asp Cys Gln Trp Val Asp Ile Thr Asp Val Pro

690 695 700

Pro Gly Asp Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Phe Glu Val

705 710 715 720

Ala Glu Ser Asp Tyr Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr

725 730 735

Asp Gly His Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Ile Gly Gly Ser Phe

740 745 750

Ser Glu Glu Thr Glu Lys Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn

755 760 765

Asn Gln Leu Ser Pro Gln

770

 $\langle 210 \rangle$ 2

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)...(227)

<223> catalytic domain of LOXL2 protein

<400> 2

Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Met Val Gln Gln Thr Thr Tyr Leu

1 5 10 15

Glu Asp Arg Pro Met Phe Met Leu Gln Cys Ala Met Glu Glu Asn Cys

20 25 30

Leu Ser Ala Ser Ala Ala Gln Thr Asp Pro Thr Thr Gly Tyr Arg Arg

35 40 45

Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln Ser Asp Phe

50 55 60

Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp Cys His Arg

65 70 75 80

His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr His Tyr Asp Leu Leu Asn Leu

85 90 95

Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu

100 105 110

Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Asn Tyr Glu Cys Ala Asn

115 120 125

Phe Gly Asp Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met Tyr Arg His

130 135 140

Asp Ile Asp Cys Gln Trp Val Asp Ile Thr Asp Val Pro Pro Gly Asp

145 150 155 160

Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Phe Glu Val Ala Glu Ser

165 170 175

Asp Tyr Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr Asp Gly His

180 185 190

Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Ile Gly Gly Ser Phe Ser Glu Glu

195 200 205
Thr Glu Lys Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn Asn Gln Leu

210 215 220

Ser Pro Gln

225

<210> 3

<211> 227

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)...(227)

<223> catalytic domain of LOXL2 protein

<400> 3

Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Ile Val Gln Gln Thr Ala Tyr Leu

1 5 10 15

Glu Asp Arg Pro Met Ser Leu Leu Gln Cys Ala Met Glu Glu Asn Cys

20 25 30

Leu Ser Ala Ser Ala Val His Thr Asp Pro Thr Arg Gly His Arg Arg

35 40 45

Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln Ser Asp Phe

50 55 60

Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp Cys His Arg

65 70 75 80

His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr Tyr Tyr Asp Leu Leu Ser Leu

85 90 95

Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu

100 105 110

Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Ser Tyr Glu Cys Ala Asn

115 120 125

Phe Gly Glu Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met Tyr Arg His

130 135 140

Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Pro Pro Gly Asp
145 150 155 160

Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Tyr Glu Val Pro Glu Ser
165 170 175

Asp Phe Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr Asp Gly Tyr
180 185 190

Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Val Gly Gly Ala Phe Ser Glu Glu
195 200 205

Thr Glu Gln Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn Asn Gln Leu
210 215 220

Ser Val Gln

225

<210> 4

<211> 227

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)...(227)

<223> catalytic domain of LOXL2 protein

<400> 4

Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Ile Val Gln Gln Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Glu Asp Arg Pro Met Ala Leu Leu Gln Cys Ala Met Glu Glu Asn Cys
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Ala Val His Thr Asp Pro Thr Arg Gly His Arg Arg

35 40 45

Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln Ser Asp Phe
50 55 60

Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp Cys His Arg
65 70 75 80

His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr Tyr Tyr Asp Leu Leu Ser Leu

85 90 95
Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu

100 105 110
Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Ser Tyr Glu Cys Ala Asn

115 120 125
Phe Gly Glu Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met Tyr Arg His

130 135 140
Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Pro Pro Gly Asp

145 150 155 160
Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Tyr Glu Val Pro Glu Ser

165 170 175
Asp Phe Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr Asp Gly Tyr

180 185 190
Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Val Gly Gly Ala Phe Ser Glu Glu

195 200 205
Thr Glu Gln Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn Asn Gln Leu

210 215 220
Ser Val Gln

225

<210> 5

<211> 227

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)...(227)

<223> catalytic domain of LOXL2 protein

<400> 5

Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Met Val Gln Gln Thr Thr Tyr Leu

1 5 10 15

Glu Asp Arg Pro Met Phe Met Leu Gln Cys Ala Met Glu Glu Asn Cys

20 25 30

Leu Ser Ala Ser Ala Ala Gln Thr Asn Pro Thr Thr Gly Tyr Arg Arg
 35 40 45

 Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln Ser Asp Phe
 50 55 60
 Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp Cys His Arg
 65 70 75 80
 His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr His Tyr Asp Leu Leu Asn Leu
 85 90 95
 Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu
 100 105 110

 Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Asn Tyr Glu Cys Ala Asn
 115 120 125
 Phe Gly Asp Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met Tyr Arg His
 130 135 140
 Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Pro Pro Gly Asp
 145 150 155 160
 Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Phe Glu Val Ala Glu Ser
 165 170 175

 Asp Tyr Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr Asp Gly His
 180 185 190
 Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Ile Gly Gly Ser Phe Ser Glu Glu
 195 200 205
 Thr Glu Lys Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn Asn Gln Leu
 210 215 220
 Ser Pro Gln
 225
 <210> 6
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> synthetic construct

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)...(135)

<223> heavy chain variable region

<400> 6

Met Glu Trp Ser Arg Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg

20 25 30

Pro Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe

35 40 45

Thr Tyr Tyr Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn

65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val

100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Asn Trp Met Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

115 120 125

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 7

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)...(132)

<223> light chain variable region

<400> 7

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro

1 5 10 15

Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ser

20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser

35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg

50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala

65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe

85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr

100 105 110

Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

115 120 125

Leu Glu Ile Lys

130

<210> 8

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)...(116)

<223> heavy chain variable region

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Tyr Tyr
 20 25 30
 Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Trp Met Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)...(112)

<223> light chain variable region

<400> 9

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His

85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 10

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)...(116)

<223> heavy chain variable region

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Tyr Tyr

20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asn Trp Met Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 11

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)...(116)

<223> heavy chain variable region

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Tyr Tyr

20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asn Trp Met Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 12

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)...(116)

<223> heavy chain variable region

<400> 12

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Tyr Tyr

20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asn Trp Met Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)...(112)

<223> light chain variable region

<400> 13

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His

85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)...(112)

<223> light chain variable region

<400> 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95
 Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110