

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-514369  
(P2020-514369A)

(43) 公表日 令和2年5月21日(2020.5.21)

(51) Int.Cl.

**C07K 16/40** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 33/543** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**C12Q 1/26** (2006.01)

F 1

C07K 16/40  
G01N 33/53  
G01N 33/543  
G01N 33/574  
C12Q 1/26

Z N A  
D  
501A  
A  
1/26

テーマコード(参考)

4B063  
4B064  
4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-550787 (P2019-550787)  
(86) (22) 出願日 平成30年3月14日 (2018.3.14)  
(85) 翻訳文提出日 令和1年11月12日 (2019.11.12)  
(86) 國際出願番号 PCT/EP2018/056364  
(87) 國際公開番号 WO2018/167132  
(87) 國際公開日 平成30年9月20日 (2018.9.20)  
(31) 優先権主張番号 1704206.0  
(32) 優先日 平成29年3月16日 (2017.3.16)  
(33) 優先権主張国・地域又は機関 英国(GB)

(71) 出願人 503259129  
ノルディック・バイオサイエンス・エー／エス  
NORDIC BIOSCIENCE A／S  
デンマーク国、デーカー-2730 ヘルレフ、ヘルレフ・ホーフェデガーデ 207  
(74) 代理人 110000659  
特許業務法人広江アソシエイツ特許事務所  
(72) 発明者 オースネス-レーミング、ディアナ  
デンマーク国 ヘアリウ 2730, ヘアリウ ホーウェゲーゼ 205-207

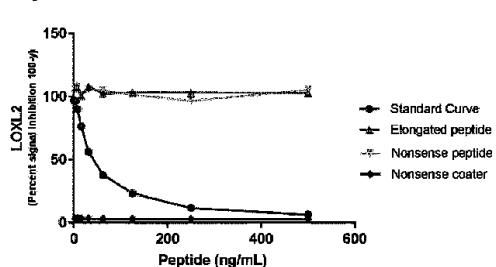
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】リシリオキシダーゼ様2アッセイ

## (57) 【要約】

本発明は、リシリオキシダーゼ様2(LOXL2)のN末端に特異的に結合する抗体、および試料中のLOXL2を検出または定量化するためのイムノアッセイの方法におけるその使用に関する。方法は、LOXL2関連疾患を評価するために使用することができ、また抗LOXL2治療薬の有効性を評価するためにも使用することができる。

Figure 1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

リシリオキシダーゼ様 2 ( L O X L 2 ) の N 末端に特異的に結合する、抗体。

**【請求項 2】**

前記抗体が、N 末端アミノ酸配列 H<sub>2</sub>N - Q Y D S W P H Y P E ( 配列番号 1 ) に特異的に結合する、請求項 1 に記載の抗体。

**【請求項 3】**

前記抗体が、前記 N 末端アミノ酸配列の N 拡張伸長バージョンを特異的に認識または結合しない、請求項 2 に記載の抗体。

**【請求項 4】**

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 3 に記載の抗体。

**【請求項 5】**

試料中の L O X L 2 を検出または定量化するためのイムノアッセイの方法であって、前記方法が、前記 L O X L 2 を含む試料を請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体と接触させることと、前記抗体の結合の量を決定することと、を含む、方法。

**【請求項 6】**

前記試料が、生物流体である、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記生物流体が、血清、血漿、尿、または羊水である、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記イムノアッセイが、競合イムノアッセイまたはサンドイッチイムノアッセイである、請求項 5 ~ 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記イムノアッセイが、ラジオイムノアッセイまたは酵素結合免疫吸着アッセイである、請求項 5 ~ 7 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記方法が、前記方法によって決定される L O X L 2 の量を、既知の疾患重症度の標準 L O X L 2 関連疾患試料と相關させて、前記 L O X L 2 関連疾患の重症度を評価するステップをさらに含む、請求項 5 ~ 9 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記 L O X L 2 関連疾患が、線維症または癌である、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記 L O X L 2 関連疾患が、特発性肺線維症 ( I P F ) 、慢性閉塞性肺疾患 ( C O P D ) 、非小細胞肺癌 ( N S C L C ) 、小細胞肺癌 ( S C L C ) 、結腸癌、黑色腫、卵巣癌、肺臓癌、前立腺癌、または乳癌である、請求項 10 または 11 に記載の方法。

**【請求項 13】**

抗 L O X L 2 治療薬の有効性を評価するための方法であって、前記方法が、請求項 5 ~ 9 のいずれかに記載の方法を使用して、少なくとも 2 つの試料中の L O X L 2 の量を定量化することを含み、前記試料が、対象から第 1 の時点および前記対象への前記抗 L O X L 2 治療薬の投与期間中の少なくとも 1 つのその後の時点で得られており、前記第 1 の時点から前記抗 L O X L 2 治療薬の前記投与期間中の前記少なくとも 1 つのその後の時点までの前記 L O X L 2 の量の低減が、有効な抗 L O X L 2 治療薬であることを示す、方法。

**【請求項 14】**

前記試料が、生物流体である、請求項 13 に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記生物流体が、血清、血漿、尿、または羊水である、請求項 15 に記載の方法。

**【請求項 16】**

前記抗 L O X L 2 治療薬が、対象における L O X L 2 を標的とし、その量を低減する、小分子 L O X L 2 アンタゴニスト薬またはバイオシミラーである、請求項 13 に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 17】**

請求項 5 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法における使用のためのキットであって、前記キットが、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗体と、

- ストレプトアビジン被覆 96 ウェルプレート
- 前記抗体と反応性であり、ビオチン化ペプチド H<sub>2</sub>N - Q Y D S W P H Y P E - L - ビオチン（配列番号 4）であり得、式中、L が、任意のリンカーである、ペプチド
- サンドイッチャイムノアッセイにおける使用のための任意にビオチン化された二次抗体
- N 末端配列 H<sub>2</sub>N - Q Y D S W P H Y P E . . . （配列番号 5）を含むキャリブレータペプチド
- 抗体 HRP 標識キット
- 抗体放射性標識キット
- アッセイ可視化キットのうちの少なくとも 1 つと、を含む、キット。

10

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、抗 LOXL2 抗体、および LOXL2 を検出または定量化するためのイムノアッセイの方法におけるその使用に関する。

**【背景技術】****【0002】**

細胞外マトリックス（ECM）の翻訳後修飾は、タンパク質の ECM 成熟および細胞シグナル伝達特性の重要な態様であり（1）、特にリシリオキシダーゼ（LOX）のファミリーによるコラーゲンおよびエラスチン架橋は、肺領域における線維症につながる疾患において、および癌において、ますます注目を集めている（2）（3）（4）。LOXL2 は、LOX および LOX 様タンパク質 1 ~ 4（LOXL1、LOXL2、LOXL3、および LOXL4）をコードする哺乳動物ゲノムにおいて 5 つの LOX ファミリー遺伝子が同定されている。リシリオキシダーゼ（LOX）遺伝子ファミリーのメンバーである（5、6）。ファミリーのフルメンバーは、COOH 末端に位置する保存された触媒ドメインを有するが、LOX アイソフォームの NH<sub>2</sub> 末端領域は、より分岐しており、各アイソエンザイムの個別の役割および組織分布を決定すると考えられる（7）。LOX ファミリーメンバーは、制御されていない状態で線維性組織において線維素溶解への耐性を促進する、増加した組織剛性をもたらす正常および病理関連架橋の原因であることが知られている（8、9）。LOX は、特に活性化線維芽細胞によって生成される線維性病変の微小環境において過剰発現し（10）、LOX ファミリーの 9 つのメンバーのうち、進行した線維症ステージにおいて最も高度に発現するので、LOXL2 が注目されている（8、11、12）。LOX は、リシン由来架橋の形成を介した架橋を誘発する、ECM の安定化に必須である銅依存性プロテアーゼであり、非特異的プロテアーゼによって行われるタンパク質分解に対する本質的な防御を構成し得る。LOX は、細線維の形態で沈殿したコラーゲンおよびクラスター形態のエラスチンについて最も高い親和性を有する（13）。

20

**【0003】**

LOXL2 活性および発現は、癌増殖および脱分化におけるシグナル伝達の役割、ならびに線維形成中に蓄積するコラーゲンの増加した安定性（14 ~ 16）を含む、癌および線維症（9）と関連することが示されている。コラーゲン分子あたりの架橋の数は、健康状態と比較して線維性組織において上昇することが示されている（9）。LOX は、ほとんどの組織において発現するが、LOXL2 は、線維症および癌の影響を受ける組織とり関連していると考えられ、腫瘍グレードおよび線維症ステージの悪化と関連している（17）。線維症および癌進行の阻害に注目するこの酵素およびその架橋活性を標的とする治療介入は、ヒト化モノクローナル抗体を用いて試験されており（17）、線維性非アルコール性脂肪性肝炎および原発性硬化性胆管炎を有する患者における臨床研究が進行中である（18、19）。LOXL2 は、特発性肺線維症（IPF）患者からの肺組織試料において、特に活性化線維芽細胞、反応性肺細胞、および線維芽細胞巣の脈管系を有する組

30

40

50

織において過剰発現することが見出された(8、12、17)。これは肺線維症の発症中のLOX活性の劇的な増加によって実証された(8)。それにもかかわらず、最近、IPF患者を含む第III相臨床試験において使用されたヒト化モノクローナル抗体の有効性の欠如が報告された(20)。

#### 【0004】

新しい抗LOXL2治療薬の有効性を評価および/または監視するために、循環中のLOXL2の量を正確に定量化することができるアッセイを提供することが必要である。

#### 【0005】

循環中のLOXL2の定量的評価は、以前に説明されている。Chienら(Eur respire J(2014):1430-1438)は、全長組換えヒトLOXL2タンパク質(R&D Systems)に対するポリクローナル抗体および組換えC末端触媒ドメインに対するモノクローナル抗体に基づくサンドイッチアッセイを開発した。同アッセイは、Chien、WO2012/167181(両方ともウサギ抗LOXL2 pAbおよびmAb AB0030を利用する)に開示されている。IPFを有するほとんどの対象において上昇したレベルのLOXL2が報告された一方で、健康な対象の約90%は、血清中に検出可能なLOXL2を有さず、すなわち、検出下限(LLOD)を下回るLOXL2レベルを有した。同様に、LOXL2アッセイは、IPFに罹患していることが知られる15人のうちの5人の患者の血清試料においてLOXL2の存在を陽性と同定することができなかった。健康なヒト対象において、およびIPFに罹患していることが知られる何人かの対象において、低レベルの循環LOXL2を定量化することができないことは、正常バックグラウンドレベルを上回るLOXL2の濃度の増加が非常に小さいものにすぎないことが予想される、早期病理変化を検出できないことを示す。さらに、Chienらにおける結論は、より高いLOXL2レベルとIPF転帰不良の増加したりスクとの間には関係があるが、得られた結果は、血清LOXL2がIPFに適したバイオマーカーではない場合があることを示したと述べている。

10

20

30

40

50

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

したがって、循環中のLOXL2を正確に定量化し、正常バックグラウンドレベルを上回るLOXL2の濃度の増加が非常に小さいものにすぎないことが予想される、LOXL2血清レベルにおける早期病理変化を検出するのに十分に感度のよいアッセイの必要性が残る。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

そのようなものとして、本願の発明者らは、循環中の生物化学的变化が非常に小さいことが予想される、疾患の早期にLOXL2レベルを定量化することに特に重点を置いた、LOXL2を定量化するためのそのようなアッセイを開発することを目的とした。

#### 【0008】

これを達成するために、本発明者らは、LOXL2の遊離N末端を対象とするアッセイを開発した。そのアッセイを用いてヒト対象からの血清において、健康な個体に由来する血清においても、予想外に高レベルの循環LOXL2が検出され、早期病理変化の検出を可能にし得ることを示した。驚くべきことに、通常はサンドイッチ型ノアッセイよりも感度が低いとみなされている、LOXL2の遊離N末端を対象とする競合型ノアッセイでも、健康な対象におけるLOXL2の循環レベルを検出および定量化することができ、健康な対象からの全ての試料が、LLODを上回るLOXL2レベルを有したことが見出された。したがって、LOXL2の遊離N末端は、循環LOXL2レベルを評価するための優れたバイオマーカーであると考えられる。

#### 【0009】

したがって、第1の態様では、本発明は、抗体に関し、その抗体は、LOXL2のN末端に特異的に結合する。

## 【0010】

好ましくは、抗体は、N末端アミノ酸配列 H<sub>2</sub>N - Q Y D S W P H Y P E (配列番号1)に含まれるN末端エピトープに特異的に結合する。さらに好ましくは、抗体は、N末端アミノ酸配列 H<sub>2</sub>N - Q Y D S W P (配列番号2)に特異的に結合する。

## 【0011】

抗体は、好ましくは、モノクローナル抗体である。

## 【0012】

好ましくは、抗体は、そのN末端アミノ酸配列のN拡張伸長バージョンを特異的に認識または結合しない。これに関して、「そのN末端アミノ酸配列のN拡張伸長バージョン」は、1つ以上のアミノ酸が配列 H<sub>2</sub>N - Q Y D S W P H Y P E (配列番号1)のN末端を越えて拡張することを意味する。例えば、N末端アミノ酸配列 H<sub>2</sub>N - Q Y D S W P H Y P E (配列番号1)がアラニン残基によって伸長された場合、対応する「N拡張伸長バージョン」は、H<sub>2</sub>N - A Q Y D S W P H Y P E . . . (配列番号3)であろう。

10

## 【0013】

第2の態様では、本発明は、試料中のLOXL2を検出または定量化するためのイムノアッセイの方法に関し、その方法は、そのLOXL2を含む試料を上に記載される抗体と接触させることと、その抗体の結合の量を決定することと、を含む。

20

## 【0014】

好ましくは、試料は、これらに限定されないが、血清、血漿、尿、または羊水などの生物流体である。

## 【0015】

イムノアッセイは、競合アッセイまたはサンドイッチアッセイであり得る。イムノアッセイは、これらに限定されないが、ラジオイムノアッセイまたは酵素結合免疫吸着アッセイであり得る。

30

## 【0016】

イムノアッセイの方法は、その方法によって決定されるLOXL2の量を、既知の疾患重症度の標準LOXL2関連疾患試料と相關させて、そのLOXL2関連疾患の重症度を評価するステップをさらに含み得る。そのようなLOXL2関連疾患は、これらに限定されないが、IPFもしくは慢性閉塞性肺疾患(COPD)などの線維症、または非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、結腸癌、黒色腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、もしくは乳癌などの癌であり得る。

30

## 【0017】

イムノアッセイの方法は、新規抗LOXL2治療薬の有効性の評価においても使用され得る。これに関して、方法は、対象から第1の時点および対象への抗LOXL2治療薬の投与期間中の少なくとも1つのその後の時点で得られる少なくとも2つの生物学的試料中のLOXL2の量を定量化することをさらに含む。第1の時点から抗LOXL2治療薬の投与期間中の少なくとも1つのその後の時点までのLOXL2の量の低減は、有効な抗LOXL2治療薬であることを示す。

40

## 【0018】

これに関して、「抗LOXL2治療薬」は、これらに限定されないが、対象におけるLOXL2を標的とし、その量を低減する、小分子LOXL2アンタゴニスト薬またはバイオシミラー(例えば、モノクローナル抗体療法)であり得る。

## 【0019】

本発明はさらに、本明細書に記載されるイムノアッセイにおける使用のためのキットを対象とする。キットは、上に記載される抗体と、

- ストレプトアビジン被覆96ウェルプレート
- その抗体と反応性であり、ビオチン化ペプチド H<sub>2</sub>N - Q Y D S W P H Y P E - L - ビオチン(配列番号4)であり得、Lが、任意のリンカーである、ペプチド
- サンドイッチイムノアッセイにおける使用のための任意にビオチン化された二次抗体
- N末端配列 H<sub>2</sub>N - Q Y D S W P H Y P E . . . (配列番号5)を含むキャリブレー

50

## タペプチド

- 抗体 H R P 標識キット
- 抗体放射性標識キット
- アッセイ可視化キットのうちの少なくとも 1 つと、を含む。

### 【図面の簡単な説明】

#### 【0020】

【図1】LOXL2 ELISAの特異性：標的ペプチド (QYDSWPHYPE、配列番号1)、伸長ペプチド (AQYDSWPHYPE、配列番号3)、ナンセンスペプチド (IKAPKLPGGY、配列番号6)、およびナンセンスコーティングペプチド (ビオチン - IKAPKLPGGY、配列番号7)に対するLOXL2 ELISAにおいて使用されるモノクローナル抗体の活性。反応性を、450 nm (650 nmのバックグラウンドを引いた) の光学密度 (OD) として、およびペプチド濃度の関数として評価されたゼロ試料 (バッファー) シグナルの阻害パーセントとして示した。

【図2】組換えLOXL2に対する反応性：組換えLOXL2 (rLOXL2) を、指示された濃度でLOXL2 ELISAに添加した。LOXL2 ELISAデータを、各rLOXL2濃度についての二重決定の平均として示す。

【図3】LOXL2を、2つの異なるコホートに含まれる患者の血清において評価した。コホート1 (図3A) は、乳癌 (n = 20)、結腸癌 (n = 7)、胃癌 (n = 8)、黒色腫 (n = 19)、NSCLC (n = 8)、SCLS (n = 7)、卵巣癌 (n = 9)、膵臓癌 (n = 5)、または前立腺癌 (n = 14) を有する患者を含んだ。データを、ノンパラメトリックデータの Kruskal-Wallis 比較検定を用いて比較した。データを、箱ひげ図として示す。有意性レベル：\*\*\* : p < 0.001 および \*\*\*\* : p < 0.0001。コホート2 (図3B) は、IPFと診断された患者 (n = 120) および健康対照 (n = 51) からの血清試料を含んだ。群を、対応のない両側Mann-Whitney 検定を用いて比較した。データを、箱ひげ図として示す。有意性レベル：\*\*\* : p < 0.001 および \*\*\*\* : p < 0.0001。

### 【実施例】

#### 【0021】

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

#### 【0022】

以下の例では、以下の材料および方法を使用した。

#### 【0023】

### ペプチドの選択

「Uniprot.org」データベースでは、LOXL2 (ヒトLOXL2、UniProtKB Q9Y4K0) からシグナルペプチドを分離するN末端切断部位は、アミノ酸位置25'で予測される。この切断部位 ( ) に特異的な抗体を產生するために、シグナルペプチド切断部位に隣接する10個のアミノ酸の配列を標的として選択した：26' QYDSWPHYPE'35。この配列を、マウスの免疫化に用い、アッセイ開発における標準ペプチドとして用いた。配列を、種相同性および他のヒト分泌細胞外マトリックスタンパク質との相同性について、Prabix-Lyon-Gerland 「NPS@Network Protein Sequence Analysis with the UniprotKB/Swiss-prot database」ソフトウェア

10

20

30

40

50

をオンラインで使用してBLASTした(4)。

【0024】

モノクローナル抗体産生およびELISAアッセイの検証に使用される合成ペプチドは、Chinese Peptide Company(中国)およびGenScript(Picataway、NJ、米国)から購入した。ビオチン化ペプチド(QYDSWPYP-E - ビオチン)を、ストレプトアビジン被覆ELISAプレート上のコーティングペプチドとして含めた。抗体の特異性を、標的ペプチド配列のN末端に付加された追加のアミノ酸を有する伸長選択ペプチド(AQYDSWPYP-E、配列番号1)、ならびにナンセンス選択ペプチド(IKAPKLPGGY、配列番号6)およびナンセンスピオチン化コーティングペプチド(ビオチン-IKAPKLPGGY、配列番号7)をアッセイ検証に含めることによって試験した。免疫原性ペプチド(QYDSWPYP-E-KLH、配列番号8)を、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、SMCC(Thermo Scientific、Waltham、MA、米国、カタログ番号22336)を用いて、選択ペプチドをKeyhole Limpet Hemocyanin(KLH)担体タンパク質と共有結合的に架橋することによって生成した。  
10

【0025】

モノクローナル抗体産生

4~6週齢Balb/Cマウスを、フロイント不完全アジュバント(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、米国)と混合した200μLの乳化抗原および50μgの免疫原性ペプチド(QYDSWPYP-E-KLH、配列番号8)の皮下注射によって免疫化した。連続免疫化を、安定な血清力価レベルに到達するまで2週間間隔で行った。4週間安静にした最も高い力価を有するマウスに、100μLの0.9%NaCl溶液中の50μgの免疫原性ペプチドを追加で静脈内注射した。ハイブリドーマ細胞を、以前に記載されるように脾臓細胞をSP2/0骨髄腫細胞と融合することによって生成した(Gefter ML, Margulies DH, Scharff MD. A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. Somatic Cell Genet. 1977; 3: 231-6)。得られたハイブリドーマ細胞を96ウェルマイクロタイープレートにおいて培養し、標準限界希釈を用いてモノクローナル成長を確保した。上清を、ビオチン化コーティングペプチド(QYDSWPYP-E-ビオチン、配列番号9)を用いて、反応性についてスクリーニングした。  
20

【0026】

クローン特徴分析

モノクローナル抗体の天然反応性およびペプチド親和性を、ストレプトアビジン被覆マイクロタイープレート(Roche、Basel、Switzerland、カタログ番号11940279)上の10ng/mLのビオチン化コーティングペプチドおよびモノクローナルハイブリドーマ細胞を生成する抗体からの上清を用いる予備ELISAにおいて、ヒト血清試料および選択/標準ペプチド(QYDSWPYP-E、配列番号1)を用いる置換によって評価した。最良のペプチドおよび天然反応性を有するクローンを、タンパク質Gカラムを製造業者の指示(GE Healthcare Life Sciences、Little Chalfont、英国、カタログ番号17-0404-01)に従って用いて精製した。アッセイ開発および検証のためのモノクローナル抗体の最終選択は、選択/標準ペプチド、ヒト血清試料を含む関連天然試料および組換えLOXL2、赤モログ2(RnD system、カタログ番号2639-AO)に対する高い反応性に基づいた。  
30

【0027】

LOXL2 ELISAプロトコル

最適インキュベーションバッファー、時間、および温度、ならびに抗体およびコーティ

10

20

30

40

50

ングペプチドの最適濃度を決定し、完成した L O X L 2 競合 E L I S A プロトコルを、以下のプロトコルに発展させた：

96 ウエルストレプトアビジン被覆マイクロタイタープレートを、アッセイバッファー (25 mM TBS - BTTB、4 g / L NaCl、pH 7.4) で希釈した 0.5 ng / mL のビオチン化コーティングペプチドで被覆し、暗所で振盪 (300 rpm) しながら 30 分間 20 でインキュベートした。20 μL の標準ペプチド (500 ng / mL) または予備希釈血清試料 (1 : 2) を、適切なウェルに添加し、続いてアッセイバッファーに 14 ng / mL の濃度まで溶解した 100 μL のモノクローナル抗体を各ウェルに添加し、暗所で振盪 (300 rpm) しながら 1 時間 20 でインキュベートした。アッセイバッファーで 1 : 5000 に希釈した 100 μL のウサギ P O D 共役抗マウス IgG 抗体 (Jackson Immunoresearch Laboratories, PA、米国、カタログ番号 119936) を、各ウェルに添加し、暗所で振盪 (300 rpm) しながら 1 時間 20 でインキュベートした。全てのインキュベーションステップの後、洗浄バッファー (20 mM Tris、50 mM NaCl、pH 7.2) での 5 回の洗浄を行った。最後に、100 μL のテトラメチルベンジニジン (TMB) (cat. 4380 H, Kem-En-Tec Diagnostics、デンマーク) を各ウェルに添加し、プレートを暗所で振盪 (300 rpm) しながら 15 分間 20 でインキュベートした。酵素反応を、0.18 M の H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を添加することによって停止し、吸光度を、650 nm を参照として 450 nm で測定した。検量線を、4 パラメータロジスティック曲線あてはめを用いてプロットした。データを、SoftMax Pro v. 6.3 ソフトウェアを用いて分析した。  
10  
20  
30

#### 【0028】

#### L O X L 2 E L I S A の技術的評価

アッセイ間およびアッセイ内変動を、各ランが試料の二重決定からなる、検出範囲を網羅する 8 つの品質管理試料および 2 つの内部管理を含む 10 の独立したランによって決定した。5 つの品質管理試料は、そのうちの 2 つに合成特異的ペプチドが添加された 4 つのヒト血清試料、および合成特異的ペプチドが添加されたバッファーの 1 つの試料で構成された。アッセイ内変動をプレート内の平均変動係数 (CV%) として計算し、アッセイ間変動を 10 の個別ラン間の平均 CV% として計算した。3 つのヒト血清試料の 2 倍希釈物を用いて線形性を計算した。回収パーセンテージを、未希釈、1 : 2、または 1 : 4 試料を参照値として計算した。検出下限 (LOD) をゼロ試料 (アッセイバッファー) の 2 1 の測定から決定し、平均 + 3 つの標準偏差として計算した。検出上限 (ULOD) を、最も高い標準ペプチド濃度の 10 の独立したランから決定し、平均バックキャリブレーション計算 + 3 つの標準偏差として計算した。定量下限 (LOQ) を、段階希釈した血清試料の 3 つの独立したランから決定し、30 % 未満の変動係数を有する血清中の定量化可能な最も高い L O X L 2 レベルとして計算した。第 1 に、分析物安定性を、4 つの凍結 / 融解サイクルで 3 つのヒト血清試料において L O X L 2 レベルを測定することによる、血清試料の反復凍結 / 融解の効果によって決定した。凍結 / 融解回収を、ゼロサイクルを参照として計算した。第 2 に、分析物安定性を、4 または 20 のいずれかでの貯蔵の 0 、2、4、24、および 48 時間後に 3 つのヒト血清試料において L O X L 2 レベルを測定することによって、異なる時点および温度で決定した。回収を、0 時間を参照として計算した。干渉を、低 / 高含有量のヘモグロビン (0.155 / 0.310 mM)、血清脂質 / 脂質 (4.83 / 10.98 mM)、およびビオチン (30 / 90 ng / mL) を既知の濃度の血清試料に添加することによって決定した。回収パーセンテージを、正常血清試料を参照として計算した。  
40  
50

#### 【0029】

#### L O X L 2 の臨床検証 - 患者血清試料

コホート 1 における患者血清試料は、悪性黒色腫、乳癌、結腸癌、肺癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、および結腸鏡検査陰性対照を含んだ。コホートは、商業的ベンダー Proteogenex (Culver City, CA、米国) および Asterand B

ioscience (Hertfordshire、英国) から入手した。コホート 2 は、IPF と診断された患者からの血清試料 (ベースライン試料、CT.gov reg. NCT00786201) および商業的ベンダー Valley Biomedical (Winchester、VA、米国) から入手した健康対照血清試料を含んだ。研究の詳細を表 1 に示す。全ての研究は、患者が提出したインフォームドコンセントを含む適切な施設内審査委員会 / 独立倫理委員会が承認した試料収集を受けた。

表 1. コホート 1 および 2 の臨床および患者デモグラフィックの概要。SD : 標準偏差。

SCLC : 小細胞肺癌、NSCLC : 非SCLC。

【表 1】

10

コホート	試料	対象数	平均年齢 (SD)	性別 (女性 %)
1	結腸鏡検査陰性対照	16	55.5 (5.6)	44
1	NSCLC 患者	19	60.4 (9.3)	21
1	SCLC 患者	7	61.4 (12.6)	29
1	乳癌患者	20	55 (10.3)	95
1	結腸癌患者	7	61.9 (8.6)	86
1	胃癌患者	8	69.3 (9.2)	38
1	黒色腫患者	7	45.6 (14.4)	43
1	卵巣癌	9	55.9 (11.2)	100
1	膵臓癌	5	68.4 (10.1)	60
1	前立腺癌	14	63.7 (5.7)	0
2	IPF 患者	124	65 (8.1)	20
2	健康対照	51	35.9 (11.9)	19

20

30

40

### 【0030】

#### 統計分析

血清試料中のLOXL2のレベルを、Tukey の多重比較検定 (パラメトリックデータ) に適合させた一元配置分散分析、Dunn の多重比較検定 (ノンパラメトリックデータ) に適合させた Kruskal-Wallis、または対応のない両側 Mann-Whitney 検定を用いて比較した。診断能力を、受信者動作特性 (AUROC) 下の面積によって調査した。感度および特異性を、ROC 曲線に基づく最適なカットオフ値について決定した。P 値 < 0.05 を有意とみなした。グラフおよび統計分析を、GraphPad Prism バージョン 6 (GraphPad Software, Inc.、CA、米国) またはおよび MedCalc Statistical Software バージョン 12 (MedCalc Software、Ostend、ベルギー) を用いて行った。

### 【0031】

#### 結果

LOXL2 アッセイにおいて利用される抗体の選択および特異性

ヒト血清試料に対する最良の天然反応性および選択ペプチドに対する親和性を有するモ

50

ノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンを、 E L I S A 最適化および検証のために選択した。

【 0 0 3 2 】

ヒト標的配列の N 末端部位、 2 6 ' Q Y D S W P H Y P E ' 3 5 を、 シグナルペプチド切断として選択した( )。配列プラストは、 *Pongo Abelii* に対して 1 0 0 % 相同性、 ならびに *Bos Taurus* に対してシグナルペプチド切断部位からアミノ酸位置 3 および 6 でのミスマッチを含む 8 0 % 相同性を示す。タンパク質プラストは、他の類似する配列が、他のタンパク質において見つけることができ、 アッセイにおいて潜在的な交差反応タンパク質として作用することができることを示さなかった。

【 0 0 3 3 】

競合 L O X L 2 E L I S A アッセイの特異性を、 標的(選択)ペプチド、 ナンセンスペプチド、 伸長ペプチド、 およびナンセンスピオチン化コーティングペプチドを使用することに対する反応性を分析することによって評価し、 データを図 1 に示す。抗体は選択ペプチドに対して反応し、 5 パラメトリック曲線に従った標準曲線を生成した。検出可能なシグナルは、 ナンセンスピオチン化コーティングペプチド、 伸長ペプチド、 またはナンセンスペプチドを用いて観察されなかった。これらのデータは、 選択された抗体が、 標的エピトープに対して特異的であったことを示す。さらに、 シグナルペプチドを含まない組換え L O X L 2 タンパク質の試験は、 抗体がこのタンパク質に対して反応することができたことを示した(図 2)。

【 0 0 3 4 】

L O X L 2 E L I S A アッセイの技術的評価

様々な技術的検証を行って、 L O X L 2 E L I S A アッセイを評価した。アッセイの測定範囲( L L O D ~ U L O D )は 5 . 8 ~ 4 0 1 . 5 n g / m L に決定され、 定量下限( L L O Q )は 1 2 . 9 n g / m L であった。アッセイ内およびアッセイ間変動は、 それぞれ、 8 % および 1 2 % であり、 アッセイ内変動について < 1 0 % およびアッセイ間変動について < 1 5 % の我々の許容基準以内であった。推奨ヒト血清希釈は 1 : 2 であり、 線形性は + / - 1 2 0 % 以内であった。3 つの血清における平均分析物回収は、 4 つの凍結 / 融解サイクル後に 1 0 6 % であり、 4 で 2 ~ 4 8 時間の貯蔵後に回収は 8 3 ~ 9 9 % であるか、 または 2 0 で 2 ~ 4 8 時間では回収は 8 4 ~ 9 7 % であった。許容基準は、 1 0 0 % ± 2 0 % 以内の回収であった。これらのデータは、 血清中の分析物が 4 および 2 0 で高度に安定であることを示す。低または高含有量の脂質またはヘモグロビンのいずれからも干渉は検出されず、 回収は 8 5 ~ 1 1 2 % の範囲内であった。許容基準は、 1 0 0 % ± 2 0 % 以内の回収であった。ビオチンについて、 高レベルのビオチンは L O X L 2 のレベルを低減したが、 低レベル( 3 0 n g / m L )ではアッセイに影響を及ぼさなかった。よって、 カットオフレベルは、 ビオチン 3 0 n g / m L 未満であるべきである。

表 2 . L O X L 2 E L I S A の技術的詳細の要約

10

20

30

【表2】

技術的検証ステップ	LOXL2性能	
検出範囲 (LLOD-ULOD)	5.7 - 401.5 ng/mL	
定量下限 (LOQ)	12.9 ng/mL	
アッセイ内変動	8%	
アッセイ間変動	12%	
血清試料の希釈	1:2	10
希釈回収 <sup>1</sup>	102% (95-109%)	
凍結／融解回収 (4サイクル) <sup>1</sup>	106% (104-108%)	
48時間までの分析物安定性、4°C <sup>1</sup>	84% (84-97%)	
48時間までの分析物安定性、20°C <sup>1</sup>	93% (83-99%)	
干渉脂質、低／高	106% / 85%	
干渉ビオチン、低／高	95% / 21%	
干渉ヘモグロビン、低／高	98% / 112%	

<sup>1</sup>パーセンテージは平均として報告され、範囲は括弧内に示される

20

30

## 【0035】

LOXL2は癌およびIPFを有する患者において上昇する

コホート1における血清LOXL2は、健康対照と比較して、乳癌、結腸癌、NSCLC、SCLC、卵巣癌、および肺膿瘍を有する患者において、それぞれ、218、227、375、213、225、および325%上昇した( $p = 0.05 - 0.0001$ )。さらに、血清LOXL2は、IPFを有する患者において高度に上昇し、健康対照と比較してIPF患者において163%増加を示した( $p < 0.0001$ )ことが見出された。AUCによって評価されるLOXL2の診断値は、NSCLCの診断について0.89( $p < 0.0001$ )、ならびに前立腺癌(PCa)および乳癌(BCa)の診断について、それぞれ、0.72( $p = 0.02$ )および0.81( $p < 0.0001$ )であった。健康対照に対するIPFの診断についてのLOXL2の診断値は、0.72( $p < 0.0001$ )のAUCであった(表3)。

表3. LOXL2によるIPFまたは癌の診断のためのAUROC、n > 10を有する患者群。

## 【表3】

疾患	AUC	感度	特異性	P 値	カットオフ ng/mL
NSCLC	0.89	73.7	93.7	<0.0001	51.4
BCa	0.81	70.0	81.2	<0.0001	34.3
PCa	0.72	85.7	62.5	0.02	19.8
IPF	0.72	52.5	88.2	<0.0001	69.0

10

20

30

40

50

## 【0036】

## 考察

本発明は、ヒトLOXL2のN末端ネオエピトープの検出のための新規アッセイを提供する。アッセイは、低い検出限界、許容可能なアッセイ内およびアッセイ間変動および線形性、干渉、ならびに20-および4-での分析物安定性で、技術的にロバストであった。この新たに開発されたLOXL2アッセイを用いて、IPFおよび肺癌などの線維症関連疾患においてLOXL2レベルがより高かったことも示された。さらに、NSCLCおよびIPFについてのLOXL2の診断値は高く、AUROCは0.72~0.89の範囲であった。最後に、この新たに開発されたアッセイは、健康な個体においてLOXL2を検出することができた。

## 【0037】

結論として、本発明は、N末端部位のLOXL2におけるネオエピトープ部位についての技術的にロバストなアッセイを提供し、癌および線維症関連疾患有する患者においてLOXL2のレベルが上昇したことを示した。よって、我々は、この新たに開発されたLOXL2アッセイの実現可能性および潜在的な生物学的価値を実証した。

## 【0038】

このアッセイは、新規抗LOXL2治療薬の評価における有用なツールであり得ると考察される。

## 【0039】

本明細書において、特に明示的に指示されない限り、「または（論理和）」という語は、条件のうちの1つのみが満たされることを必要とする演算子「排他的論理和」とは対照的に、記述される条件の一方または両方が満たされる場合に真の値に戻るという演算子の意味で使用される。「含む（comprising）」という語は、「からなる（consisting of）」を意味するものではなく、「含む（including）」の意味で使用される。上記で認識される全ての先行する教示は、本明細書に参照により組み込まれる。本明細書におけるいづれの先行公表文献の認識も、その教示が、これに関する日付でオーストラリアまたは他の場所において共有一般知識であったことを認めるか、または表すものであると解釈されるべきではない。

## 【0040】

## 参考文献

1. Karsdal MA, Henriksen K, Leeming DJ, Woodworth T, Vassiliadis E, Bay-Jensen AC. Novel combinations of Post-Translational Modification (PTM) neo-epitopes provide tissue-specific biochemical markers - are they

50

- the cause or the consequence of the disease? *Clin. Biochem.* 2010. page 793 - 804 .  
2 . Leeming DJ , Bay - Jensen AC , Vassiliadis E , Larsen MR , Henriksen K , Karsdal MA . Post - translational modifications of the extracellular matrix are key events in cancer progression: opportunities for biochemical marker development . *Biomarkers* . Nordic Bioscience A/S , Herlev Hovedgade 207 , Herlev , Denmark ; 2011 ; 16 : 193 - 205 .  
3 . Kristensen JH , Karsdal MA , Genovese F , Johnson S , Svensson B , Jacobsen S , et al . The role of extracellular matrix quality in pulmonary fibrosis . *Respiration* . 2014 ; 88 : 487 - 99 . 入手元 : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25359084>  
4 . Peinado H , Moreno - Bueno G , Hardisson D , Perez - Gomez E , Santos V , Mendiola M , et al . Lysyl Oxidase - Like 2 as a New Poor Prognosis Marker of Squamous Cell Carcinomas . *Cancer Res* . 2008 ; 68 : 4541 - 50 . 入手元 : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18559498>  
5 . Maki JM , Kivirikko KI . Cloning and characterization of a fourth human lysyl oxidase isoenzyme . *Biochem J* . 2001 ; 355 : 381 - 7 . 入手元 : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11284725>  
6 . Csiszar K . Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family . *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* . 2001 ; 70 : 1 - 32 . 入手元 : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11642359>  
7 . Molnar J , Fong KSK , He QP , Hayashi K , Kim Y , Fong SFT , et al . Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX - like proteins . *Biochim Biophys Acta* . 2003 ; 1647 : 220 - 4 . 入手元 : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12686136>  
8 . Counts DF , Evans JN , Dipetriillo TA , Sterling KM , Kelley J . Collagen lysyl oxidase activity in the lung increases during bleomycin - induced lung fibrosis . *J Pharmacol Exp Ther* . 1981 ; 219 : 675 - 8 . 入手元 : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6170751>  
9 . Brinckmann J , Gaber Y , Gebker R , Neess CM , Sobhi H , Notbohm H , et al . Different Pattern of Collagen Cross - Links in Two Sclerotic Skin Diseases: Lipodermatosclerosis and Circumscribed Scleroderma . *J Invest Dermatol* . 2001 ; 117 : 269 - 73 . 入手元 : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500000>

- bi.nlm.nih.gov/pubmed/11511304  
10. Wong CC-L, Tse AP-W, Huang Y-P, Zhu Y-T, Chiu DK-C, Lai RK-H, et al. Lysyl oxidase-like 2 is critical to tumor microenvironment and metastatic niche formation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2014; 60: 1645-58. 入手元: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.27320>
11. Iisamaa SE, Mearns BM, Lorand L, Graham RM. Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol Rev*. 2009; 89: 991-1023. 入手元: <http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00044.2008>
12. Tzortzaki EG, Tischfield JA, Sahota A, Siafakas NM, Gordon MK, Gerecke DR. Expression of FACIT collagens XII and XIV during bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Anat Rec*. 2003; 275A: 1073-80. 入手元: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613307>
13. Cronlund AL, Smith BD, Kagan HM. Binding of lysyl oxidase to fibrils of type I collagen. *Connect Tissue Res*. 1985; 14: 109-19. 入手元: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2866930>
14. Wang Q, Wang Y, Hyde DM, Gotwals PJ, Koteliansky VE, Ryan ST, et al. Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by transforming growth factor beta soluble receptor in hamsters. *Thorax*. 1999; 54: 805-12. 入手元: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10456973>
15. Mutsaers SE, Marshall RP, Goldsack NR, Laurent GJ, McAnulty RJ. Effect of endothelin receptor antagonist (BQ-485, Ro47-0203) on collagen deposition during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Pulm Pharmacol Ther*. 1998; 11: 221-5. 入手元: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1094553998901420>
16. Borkham-Kamphorst E, Stoll D, Gressner AM, Weiskirchen R. Antisense strategy against PDGF B-chain proves effective in preventing experimental liver fibrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 321: 413-23. 入手元: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15358192>
17. Barry-Hamilton V, Spangler R, Marshall D, McCauley S, Rodriguez HM, Oyasu M, et al. 入手元: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15358192>

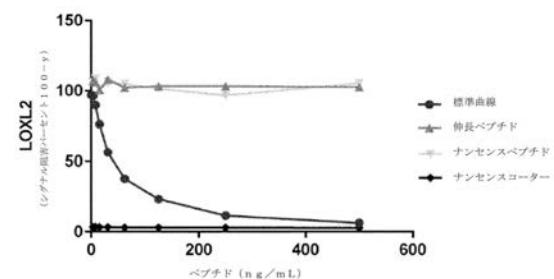
Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat Med.* 2010; 16: 1009-17. 入手元: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm.2208>

18. Romero-Chapman N, Lee J, Tinker D, Uriu-Hare JY, Keen CL, Rucker RR. Purification, properties and influence of dietary copper on accumulation and functional activity of lysyl oxidase in rat skin. *Biochem J.* 1991; 265: 62. 入手元: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1674861>

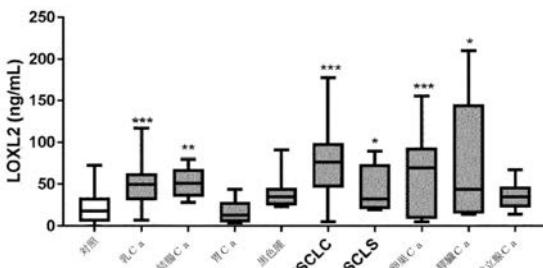
19. Rucker RB, Romero-Chapman N, Wong T, Lee J, Steinberg FM, McGee C, et al. Modulation of lysyl oxidase by dietary copper in rats. *J Nutr.* 1996; 126: 51-60. 入手元: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8558325>

20. Raghu G, Brown KK, Collard HR, Cottin V, Gibson KF, Kaner RJ, et al. Efficacy of simtuzumab versus placebo in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: a randomised, double-blind, controlled, phase 2 trial. *Lancet Respir Med.* 2017; 5: 22-32. 入手元: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27939076>

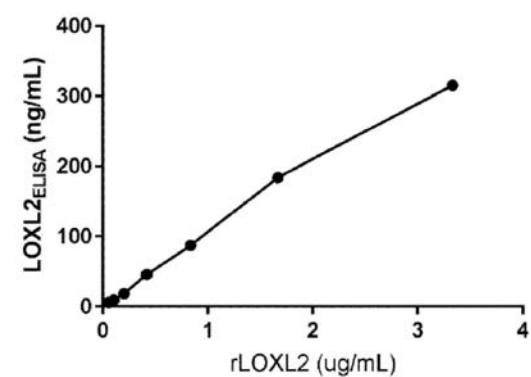
【図1】



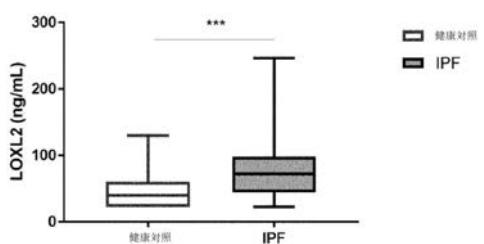
【図3 A】



【図2】



【図3 B】



【配列表】

2020514369000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2018/056364

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C07K16/40  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>XIE JING ET AL: "TNF-[alpha] induced down-regulation of lysyl oxidase family in anterior cruciate ligament and medial collateral ligament fibrobl", THE KNEE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 21, no. 1, 11 March 2013 (2013-03-11), pages 47-53, XP028809243, ISSN: 0968-0160, DOI: 10.1016/J.KNEE.2012.12.015 abstract page 49, right-hand column, paragraph 2; figure 4</p> <p>-/-</p>	1,5,8,9, 17

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier application or patent but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

18 May 2018

28/05/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bayer, Annette

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2018/056364
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>-&amp; Anonymous: "LOXL2 Antibody (N-15)   SCBT - Santa Cruz Biotechnology",      1 January 2014 (2014-01-01), XP055473747,      Retrieved from the Internet:      URL:<a href="https://www.scbt.com/scbt/product/loxl2-antibody-n-15">https://www.scbt.com/scbt/product/loxl2-antibody-n-15</a>      [retrieved on 2018-05-09]      the whole document      -----</p>	1,5,8,9, 17
X	<p>WO 2011/097513 A1 (GILEAD BIOLOGICS INC [US]; MCCUALEY SCOTT ALAN [US]; RODRIGUEZ HECTOR) 11 August 2011 (2011-08-11)      paragraphs [0004] - [0043], [0048],      [0055], [0056], [0083] - [0086],      [0090], [0091], [0097], [0102],      [0118], [0119]; figures 1,2,6      paragraphs [0343] - [0367], [0370] -      [0376]; claims 1-32; examples 4,5-8      -----</p>	1-17
X	<p>WO 2014/070939 A1 (GILEAD SCIENCES INC [US]) 8 May 2014 (2014-05-08)      paragraphs [0003], [0011] - [0026],      [0035], [0039], [0046] - [0062], [0100]      - [0108], [0113] - [0123], [0127]      paragraphs [0175] - [0181], [0185] -      [0200], [0210] - [0214], [0228] -      [0232], [0260] - [0266]; claims 14-20;      examples 1-9      -----</p>	1-17
2		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2018/056364

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011097513 A1	11-08-2011	AU 2011212830 A1 BR 112012019693 A2 CA 2789022 A1 CN 103370080 A CN 105622757 A EP 2531217 A1 JP 6134142 B2 JP 2013518903 A JP 2015212304 A KR 20130008021 A NZ 601615 A RU 2012137515 A RU 2015108348 A SG 183174 A1 US 2011200606 A1 US 2014255951 A1 US 2014302524 A1 WO 2011097513 A1 ZA 201306608 B	23-08-2012 20-06-2017 11-08-2011 23-10-2013 01-06-2016 12-12-2012 24-05-2017 23-05-2013 26-11-2015 21-01-2013 25-07-2014 10-03-2014 20-07-2015 27-09-2012 18-08-2011 11-09-2014 09-10-2014 11-08-2011 25-06-2014
WO 2014070939 A1	08-05-2014	AU 2013337908 A1 AU 2016256820 A1 CA 2889208 A1 CN 104755501 A CN 107982531 A EA 201590630 A1 EP 2914632 A1 HK 1212356 A1 HK 1214615 A1 JP 2016500700 A KR 20150074179 A SG 10291703240R A SG 11201503065P A US 2014120102 A1 US 2017327595 A1 WO 2014070939 A1	30-04-2015 01-12-2016 08-05-2014 01-07-2015 04-05-2018 30-10-2015 09-09-2015 10-06-2016 29-07-2016 14-01-2016 01-07-2015 29-06-2017 28-05-2015 01-05-2014 16-11-2017 08-05-2014

---

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 0 7 K 7/00 (2006.01)	C 0 7 K 7/00	

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(72)発明者 カルスダル , モルテン  
デンマーク国 コペンハーゲン オー・スラッシュュ 2100 , エッケルスペリィスガーデ 13

(72)発明者 ニールセン , シーネ , ホルム  
デンマーク国 コペンハーゲン 2100 , エステー . テーハー . , テルストルップヴァイ 2ビ  
-

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ23 QR48 QR58 QS35 QX02  
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE12 DA13  
4H045 AA11 BA10 BA15 BA51 CA40 DA76 EA50 FA72 FA74 GA26