

(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2012-508872

(P2012-508872A)

(43) 公表日 平成24年4月12日(2012.4.12)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D	4 H O 4 5
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 O 1 A	
CO 7 K 14/78	(2006.01)	CO 7 K 14/78	Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2011-536002 (P2011-536002)	(71) 出願人	503259129 ノルディック・バイオサイエンス・エー／エス NORDIC BIOSCIENCE A ／S デンマーク国、デーカー 2730 ヘル レフ、ヘルレフ・ホーフエダガーデ 20 7
(86) (22) 出願日	平成21年11月11日(2009.11.11)	(74) 代理人	100099623 弁理士 奥山 尚一
(85) 翻訳文提出日	平成23年7月12日(2011.7.12)	(74) 代理人	100096769 弁理士 有原 幸一
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/064997	(74) 代理人	100107319 弁理士 松島 鉄男
(87) 国際公開番号	W02010/055064		
(87) 国際公開日	平成22年5月20日(2010.5.20)		
(31) 優先権主張番号	0820786.2		
(32) 優先日	平成20年11月13日(2008.11.13)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コラーゲン断片の測定によるタンパク質分解の評価

(57) 【要約】

N末端ネオ - エピトープ及びC末端ネオ - エピトープ(各々がタンパク質のプロテアーゼによる切断により生成される)を含有するタンパク質の断片を生物学的試料において測定するアッセイの方法が、前記N末端ネオ - エピトープを第1の特異的抗体と結合させる、かつ、前記C末端ネオ - エピトープを第2の特異的抗体と結合させるステップと、前記抗体の双方の結合の程度を検出するステップとを含む。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

N末端ネオ - エピトープと、C末端ネオ - エピトープとを含有するタンパク質の断片を生物学的試料において測定するステップを含むアッセイの方法であって、前記ネオ - エピトープは、各々前記タンパク質のプロテアーゼによる切断により生成されるアミノ酸配列であり、前記方法は、前記N末端ネオ - エピトープを該N末端ネオ - エピトープの存在に対して特異的な第1の免疫学的結合パートナーと結合させ、かつ、前記C末端ネオ - エピトープを該C末端ネオ - エピトープの存在に対して特異的な第2の免疫学的結合パートナーと結合させるステップと、並びに前記結合パートナーの双方の結合の程度を検出するステップとを含む方法。

10

【請求項 2】

前記免疫学的結合パートナーの一方を固体支持体に固定化し、前記断片を前記固定化した抗体と結合させ、前記断片に対する前記免疫学的結合パートナーのもう一方の結合を検出するサンドイッチアッセイとして前記アッセイを行う、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記アッセイを均一系サンドイッチアッセイとして行う、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記第1の免疫学的結合パートナーも前記第2の免疫学的結合パートナーもいずれも、前記断片の基となるインタクトなタンパク質と特異的に結合しない、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記第1の免疫学的結合パートナーも前記第2の免疫学的結合パートナーもいずれも、前記プロテアーゼの切断部位を越えて伸長した、各ネオ - エピトープのアミノ酸配列を含有する前記タンパク質の断片と特異的に結合しない、請求項5に記載の方法。

【請求項 6】

前記ネオ - エピトープがII型コラーゲン由来のものである、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記ネオ - エピトープが、MMPによる又はカテプシンKによるII型コラーゲンの切断により産生される、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記第1の免疫学的結合パートナーが、以下のII型コラーゲン切断アミノ酸配列：
D Q G V P G (配列番号54)； R E G S P G (配列番号55)；
* L A G P K G (配列番号56)；及び * L T G P A G (配列番号57)

のうちの1つにより規定されるエピトープに対して特異的である、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

前記第2の免疫学的結合パートナーが、以下のII型コラーゲン切断アミノ酸配列：
. . . . P K G A R G (配列番号58)；. . . . G Q P G P A (配列番号59)；
. . . . E P G G V G (配列番号60)；及び. . . . R D G A A G (配列番号61)
のうちの1つにより規定されるエピトープに対して特異的である、請求項7又は8に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記第1の免疫学的結合パートナーと前記第2の免疫学的結合パートナーとを併用すると、以下の配列：

L T G P A G E P G R E G S P G A D G P P G R D G A A G (配列番号62)

又は

R E G S P G A D G P P G R D G A A G (配列番号63)

のII型コラーゲンペプチド断片と特異的に反応性を有する、請求項1～9のいずれか一

50

項に記載の方法。

【請求項 1 1】

指定された切断部位を過ぎて伸びている場合、前記免疫学的結合パートナーが請求項 7 において規定されるような配列と特異的に結合しない、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 1 2】

異性化アミノ酸残基を含有するエピトープに対して特異的な第 1 の免疫学的結合パートナーと、プロテアーゼにより生成されるネオ - エピトープに対して特異的な第 2 の免疫学的結合パートナーとを含む、免疫学的アッセイキット。

【請求項 1 3】

前記キットが、前記結合パートナーとの免疫反応性を有する少なくとも 1 つの校正基準、洗浄試薬、緩衝剤、前記第 1 の免疫学的結合パートナー又は前記第 2 の免疫学的結合パートナーと試料の成分との間の結合を明らかにするための二次的な免疫学的結合パートナー、酵素標識、酵素標識基質、停止試薬、及び前記キットを使用してアッセイを実施するための取扱説明書をさらに含む、請求項 1 3 に記載のキット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、関節軟骨の分解の定量的評価のための、I I 型コラーゲンのタンパク質分解による切断により生成される、体液中の或る特定のペプチド断片の測定であって、上記ペプチド断片上に位置するネオ - エピトープを各々認識する 2 つの抗体を使用する測定に關する。

20

【背景技術】

【0002】

変形性関節症 (Osteoarthritis) は、世界中における身体障害の主要な原因の 1 つであり、高齢者人口の 10 % 超が症候性疾患を有する (非特許文献 1)。発症率は年齢とともに増大し、65 歳までに 80 % が X 線検査による OA の兆候を有する (非特許文献 2)。したがって変形性関節症は、蔓延しており、かつ患者及び社会にとって重度の負担である。しかしながら現在のところ、罹患した個体に対し、該疾患の予防又は初期段階での治療が提供されることはほとんどない。多くの患者にとって、人工股関節置換術又は人工膝関節置換術が、最終的には唯一の治療の選択肢である。

30

【0003】

現在のところ変形性関節症の病原性は十分には理解されていないが、この緩慢な慢性疾患における中心となる特徴が、骨、軟骨及び滑膜からなる関節における進行性の破壊であることは明らかである。特に軟骨は大きな注目を集めており、O A R S I のワーキンググループにより、O A 軟骨組織病理学の種々のグレード及び段階が近年詳細に記載されている (非特許文献 3)。このシステムは、より進行した O A 疾患におけるより深い軟骨層の病変による 7 つのグレード (又は重症度レベル) を包含しており、5 段階で表現される軟骨の病変の程度と組み合わせると、0 ~ 24 の半定量的なスコア化システムがもたらされる。

【0004】

40

しかしながら、関節軟骨における重要な代謝プロセス及び組織の構造に対する該プロセスの影響を評価する、高感度、特異的かつ高速の分析法がないことが、O A における効果的な薬剤開発に対する主たる障壁である。

【0005】

特に、主たる努力は、軟骨のターンオーバーに関する新たなより良い生化学的マーカーの開発に割り当てられている。

【0006】

軟骨 (関節軟骨を含む) は、大部分が I I 型コラーゲン (乾燥重量の 60 % ~ 70 %) 及びプロテオグリカン (乾燥重量の 10 %) から構成される。軟骨の分解は、MMP 及び密接に関連する A D A M - T S (トロンボスポンジンモチーフを有するディスインテグリ

50

ン及びメタロプロテイナーゼ)により主に仲介されるが、I I型コラーゲンがMMP活性に対して最も感受性が高い(非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6)。これらのプロテアーゼの作用は、様々な細胞外の断片放出をもたらし、これは、軟骨の分解のバイオマーカーとしての候補であり得ると考えられる。

【0007】

I I型コラーゲンのタンパク質分解による切断が多数の研究において報告されており、I I型コラーゲンの複数の種々の分解断片が、軟骨の変性疾患をモニタリングするのに有用であるとして示されている(非特許文献7、非特許文献8、非特許文献9)。

【0008】

I I型コラーゲンのC-テロペプチド断片、すなわちCTX-I Iは、MMP活性により生成され(非特許文献10、非特許文献11)、CTX-I Iの測定が、軟骨の分解を評価する実験的な設定(非特許文献7)及びヒト(非特許文献12)において、I I型コラーゲンの分解のモニタリングに関して報告されている。

10

【0009】

しかしながら、I I型コラーゲン断片を検出する抗体の使用に関する最初の報告はBillingham及び共同研究者(非特許文献13)によって行われ、彼らはコラーゲナーゼによる切断後のI I型コラーゲンのより短い断片上におけるアミノ末端のネオエピトープの検出を記載した。

【0010】

長さが4分の3の断片のC末端におけるC2Cネオエピトープが、文献においてより十分に記載されている(非特許文献14、非特許文献15)。この試験は、アミノ酸配列EGPP(OH)GPQG(配列番号1)に対するモノクローナル抗体の結合に依存する(非特許文献15)。

20

【0011】

I I型コラーゲン断片に関する他の試験はC1, 2Cを含むが、これはI型及びI I型の両方に見出されるアミノ酸配列EGPP(OH)GPQG(配列番号2)に基づいている(非特許文献13(Billinghursts et al., 1997))。また、コラーゲナーゼの作用により生成される別の断片はTIINE断片であり(非特許文献16)、ネオエピトープGly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly-COOH(配列番号3)を認識するモノクローナル抗体9A4を使用して検出することができる。捕捉抗体としてモノクローナル抗体5109(非特許文献17)と組み合わせると、サンドイッチ試験は、I I型コラーゲン断片に対して特異的であると言える。モノクローナル抗体5109は内部アミノ酸配列GEPGD DAPS(配列番号20)と結合し、サンドイッチ試験はモノクローナル抗体5109の結合配列のN末端において可変長のコラーゲン断片を検出する。

30

【0012】

Zhen及び共同研究者(非特許文献18)は、I I型コラーゲン断片を含む、ヒト関節軟骨のタンパク質分解によるペプチド生成物の同定及び特徴付けを開示している。

【0013】

I I型コラーゲンのカテプシンKによる切断が幾つかの研究において報告されている。カテプシンKをI I型コラーゲンの切断と関連付ける最初の研究は、非特許文献19により報告された。Kafienah及び共同研究者は、カテプシンKによるI I型コラーゲンのヘリックス状の切断部位を記載し、1つの切断部位に関するアミノ酸配列、すなわち

40

PGDDGEAGKPG KSGERGGPPG(ウシの配列)(配列番号5)を提示した。

【0014】

10年後、Kefienah(非特許文献20)により報告されたカテプシンK切断部位、すなわち

PGDDGEAGKPG KAGERGGPPG(配列番号6)

のC末端ネオエピトープ(C2K)に対するポリクローナル抗体に基づく酵素結合免疫吸着アッセイの開発が報告された。

50

【 0 0 1 5 】

このエピトープのC末端の7アミノ酸、すなわちG E A G K P G (配列番号20)はI型コラーゲンにおいても同様に見出すことができるため、この試験は、カテプシンKの活性により生成されるI型コラーゲン断片とII型コラーゲンの断片とを識別しない。これに対し、本発明によれば、II型コラーゲン断片に対する特異性を増大させるために、このような配列は除外される。

【 0 0 1 6 】

特許文献1 (Saltarelli)は、II型コラーゲンが他のコラーゲン断片から識別されるように、捕捉抗体及び検出抗体の組み合わせを使用してII型コラーゲン断片に関して尿をモニタリングする方法を開示している。

10

【 0 0 1 7 】

特許文献2 (Otterness)は、コラゲナーゼによる切断により得られるII型コラーゲン断片を検出する抗体を開示している。特に、以下の配列が開示されている。

- ・ GPPGPQG (配列番号7)
- ・ GEPGDDGPSG (配列番号8)
- ・ APGEDGRPGPPGP (配列番号9)
- ・ GKVGPSGAPGEDGRPG (配列番号10)
- ・ AEGPPGPQG (配列番号11)
- ・ GPPGPQGLAG (配列番号12)
- ・ GEPGDDGPS (配列番号13)
- ・ GEPGDDGPSGAEGPPG (配列番号14)
- ・ EKGEPPGDDAPSGAEGPPGPQG (配列番号15)
- ・ GPPGPPGKPGDDGEAGKPGKA (配列番号16)
- ・ GPPGPRGRSGETGPAGPPGNP (配列番号17)
- ・ GAPGPQGFQGNPGEPEGVSY (配列番号18)
- ・ GEPGDDAGPSGAEGPPGPQG (配列番号19)

20

【 0 0 1 8 】

一連の特許(特許文献3、特許文献4、特許文献5、特許文献6、特許文献7、特許文献8、特許文献9、特許文献10、特許文献11、特許文献12、特許文献13、特許文献14、特許文献15)(Eyre)は、II型コラーゲンのテロペプチド中のエピトープと結合する抗体を利用する軟骨再吸収アッセイのためのペプチド及び方法に関する。

30

【 0 0 1 9 】

特許文献16 (Robins)は、リジルピリジノリン又はヒドロキシリジルピリジノリンで架橋したコラーゲン断片を検出する方法を記載している。

【 0 0 2 0 】

特許文献17 (Reginster)は、II型コラーゲンのヘリックス領域に位置するアミノ酸配列H R G Y P G L D G (配列番号23)中のエピトープと結合する抗体を使用してコラゲナーゼにより生成されるII型コラーゲンの断片を検出する方法を開示した。

【 0 0 2 1 】

特許文献18 (Poole)は、折りたたまれていない(未変性の(native))II型コラーゲン断片と結合せずコラゲナーゼによる切断により生成される断片のみと結合する抗体を使用して軟骨の分解を検出する方法を開示している。特に、II型コラーゲン由来の以下のアミノ酸配列が含まれる。

40

- ・ CGKVGPSGAPGEDGRPGPPGPQY (配列番号21)
- ・ APGEDGRPGPPGP (配列番号22)
- ・ GQPG (配列番号24)
- ・ GPPGPQG (配列番号7)
- ・ CGGEGPPGPQG (配列番号25)
- ・ GAEGPPGPQGLAGQRGIVG (配列番号26)
- ・ GAPGTPGPQGIAGQRGVVG (配列番号27)

50

- ・ GPPGTPGPQGLLGGAPGILG (配列番号 2 8)
- ・ GPPGAPGLGIAGITGARG (配列番号 2 9)
- ・ CGGEGPPGPQGL (配列番号 3 0)
- ・ CGGEGPPGPQGLA (配列番号 3 1)
- ・ CGGEGPPGPQ (配列番号 3 2)
- ・ CGGEGPPGP (配列番号 3 3)
- ・ CGPPGPQG (配列番号 3 4)

【 0 0 2 2 】

特許文献 1 9 (Welsch) は、 I I 型コラーゲンの酵素による切断により得られるペプチドを同定及び定量化する質量分析の使用を記載している。該技法は、変形性関節症及び関節リウマチにおけるタンパク質分解酵素の活性を評価するための、生物学的試料におけるペプチドの同定及び定量化のために使用される。特に、ヒト由来の以下の配列が開示されている。

- ・ GPPGPQG (配列番号 7)
- ・ LQGPAGPPGEKGEPEGDDGPPSGAEGPPGPQG (配列番号 3 5)
- ・ PQG
- ・ PGPQG (配列番号 3 6)
- ・ PPGPQG (配列番号 3 7)
- ・ VLQGPAGPPGEKGEPEGDDGPPSGAEGPPGPQG (配列番号 3 8)
- ・ KGARGDSGPPGRAGEPGLQGPAGPPGEKGEPEGDDGPPSGAEGPPGPQG (配列番号 3 9)
- ・ ARGDSGPPGRAGEPGLQGPAGPPGEKGEPEGDDGPPSGAEGPPGPQG (配列番号 4 0)
- ・ GPAGPPGEKGEPEGDDGPPSGAEGPPGPQG (配列番号 4 1)
- ・ GPIGPPGERGAPGNRGGFPQQDGLAGPKGAPGERGPPSLAGPKGANGDPGRPGEPGLPGARGLTGRPGDAGPQGGKVG
PSGAPGEDGRGPPGPQARGQPGVMGFPGPKGANGEPGKAGEKGLPGAPGLGLPGKDGGETGAEGPPPA

. (配列番号 4 2)

【 0 0 2 3 】

特許文献 2 0 (Cook) は、哺乳動物の I I 型コラーゲンの C B ペプチド、特に C B 1 0 を使用するコラーゲンに対する抗体の検出を記載している。臭化シアンは、メチオニン残基のカルボキシル末端を切断することにより、C B ペプチドを産生する。C B 1 0 ペプチドは以下の配列を有する。

- ・ MPGERGAAGIAGPKGDRGDVGEKGEPEGAPGKDGGRGLTGP I GPPGPAGANGEKGEVGPAGSAGARGAPGERGE
TGPPGTSGIAGPPGADGQPGAKGEQGEAGQKGDAGAPGPQGPSGAPGPQGTGVTGPKGARGAQGPPGATGFPGAAGRVG
PPGNSGNPGLPSPGPPGSGKDGPKGARGDSGPPGRAGEPGLQGPAGPPGEKGEPEGDDGPPSGAEGPPGPQGLAGQRG I VGLP
GQRGERGFPLPSPGEPGQQGAPGASGDRGPPGPVGPGLTGPAGEPGREGSPGADGPPGRDGAAGVKGDRGETGAVGA
PGAPGPPGSPGAPPTGKQDRGEAGAQQPM (配列番号 4 3)

【 0 0 2 4 】

特許文献 2 1 (Rosenquist) は、アミノ酸配列 E K G P D P (配列番号 4 4) に対して特異的な単一の抗体を使用して I I 型コラーゲンのテロペプチド断片を検出するサンドイッチイムノアッセイを開示している。

【 0 0 2 5 】

特許文献 2 2 及び特許文献 2 3 (Fledelius) は、イソアスパラギン酸残基を含有する I I 型コラーゲンのアミノ酸配列と結合する抗体を使用してコラーゲンの分解の速度 (rate) を測定する方法を開示している。また、イソアスパラギン酸残基を含有する I I 型コラーゲンのアミノ酸配列を有する合成ペプチドの使用も記載されている。特に、I I 型コラーゲン由来の以下の配列が記載されている。

- ・ G D I K * D I V (配列番号 4 5)
- ・ E K G P * D (配列番号 4 6)

ここで (*) は、異性化ペプチド結合を示す。

【 0 0 2 6 】

特許文献 2 4 (Fledelius) は、D - アミノ酸を含有する断片とその L - アミノ酸を含

10

20

30

40

50

有する類似体とを区別することが可能な抗体を使用する、体液中のタンパク質の D - アミノ酸を含有する断片の量の決定を記載している。特に、その応用は、I I 型コラーゲン由来の以下のペプチド配列を含む。

- ・ GDIKDIV (配列番号 4 7)
- ・ EKGPD (配列番号 4 8)

【 0 0 2 7 】

特許文献 2 5 及び特許文献 2 6 (Bonde) は、I I 型コラーゲンの分解を特徴付ける方法を記載している。異なる免疫学的結合パートナーを各々使用する少なくとも 2 つの相異なる免疫学的アッセイを使用し、アッセイの結果の差異を表す数値的指標を形成する。特に、以下の I I 型コラーゲン配列が開示されている。

- ・ EKGPD (配列番号 4 4)
- ・ EKGPD (配列番号 4 8)
- ・ GVK
- ・ PGVKG (配列番号 4 9)
- ・ PGPKGE (配列番号 5 0)
- ・ GQKGEP (配列番号 5 1)
- ・ GDIKDIV (配列番号 4 7)

【 0 0 2 8 】

特許文献 2 7、特許文献 2 8、特許文献 2 9 及び特許文献 3 0 (Qvist) は、コラーゲン断片を検出するための、合成ペプチドを認識する抗体の使用を記載している。特に、以下のアミノ酸配列が含まれる。

- ・ PGPKGE (配列番号 5 0)
- ・ GQKGEP (配列番号 5 1)
- ・ GDIKDIV (配列番号 4 7)
- ・ EKGPD (配列番号 4 8)
- ・ GVK
- ・ PGVKG (配列番号 4 9)

【 0 0 2 9 】

特許文献 3 1 (Te Koppelle) は、コラーゲンテロペプチド架橋部位からの距離が最大 1 6 5 アミノ酸のコラーゲン分子上に存在するエピトープを対象とする第 1 の抗体と、架橋されたコラーゲン分子の別のエピトープを対象とする第 2 の抗体とを使用する、コラーゲンの分解を検出するサンドイッチイムノアッセイの使用を開示している。

【 0 0 3 0 】

特許文献 3 2 (Barrach) は、I I 型コラーゲンと特異的に結合するがそのペプチドとは結合しない (又はその逆の) モノクローナル抗体を開示している。特に、以下の I I 型コラーゲン配列が含まれる。

- ・ GFQGL-Xaa-G-Xaa-Xaa-G-Xaa-Xaa-G (配列番号 5 2)
- ・ GLQGL-Xaa-G-Xaa-Xaa-G-Xaa-SG (配列番号 5 3)

【 0 0 3 1 】

上で言及された特許のいずれも、各々が同じ I I 型コラーゲン断片上のネオ - エピトープと結合する 2 つの抗体の使用を開示していない。

【 0 0 3 2 】

特許文献 1 (Saltarelli) はサンドイッチ法において 2 つの抗体を使用しているが、該抗体のいずれもネオ - エピトープと特異的に結合することは必要とされていない。捕捉抗体は I 型又は I I I 型のコラーゲン断片とのいかなる結合も実質的に排除されるように I I 型コラーゲン断片と結合することが要求され、他の抗体 (すなわち検出抗体) はコラーゲナーゼにより生成されるコラーゲン断片と特異的に結合する必要がある。しかしながら、切断部位におけるアミノ酸配列、すなわちネオ - エピトープに対する特異性は必要とされていない。

【 0 0 3 3 】

10

20

30

40

50

また、特許文献 2 1 (Rosenquist) は I I 型コラーゲンに対するサンドイッチイムノアッセイを開示しているが、それは単一の抗体を使用するものである。本発明によれば、異なるエピトープ特異性、すなわち各ネオ - エピトープに対する特異性を有する 2 つの抗体が必要とされる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0034】

- 【特許文献 1】米国特許第 6, 642, 007 号
- 【特許文献 2】米国特許第 6, 030, 792 号
- 【特許文献 3】米国特許第 6, 602, 980 号
- 【特許文献 4】米国特許第 6, 566, 492 号
- 【特許文献 5】米国特許第 6, 348, 320 号
- 【特許文献 6】米国特許第 6, 255, 056 号
- 【特許文献 7】米国特許第 6, 153, 732 号
- 【特許文献 8】米国特許第 6, 143, 511 号
- 【特許文献 9】米国特許第 6, 100, 379 号
- 【特許文献 10】米国特許第 5, 919, 634 号
- 【特許文献 11】米国特許第 5, 702, 909 号
- 【特許文献 12】米国特許第 5, 688, 652 号
- 【特許文献 13】米国特許第 5, 641, 837 号
- 【特許文献 14】米国特許第 5, 641, 687 号
- 【特許文献 15】米国特許第 5, 532, 169 号
- 【特許文献 16】米国特許第 5, 283, 197 号
- 【特許文献 17】米国特許第 7, 410, 770 号
- 【特許文献 18】米国特許第 6, 132, 976 号
- 【特許文献 19】米国特許第 7, 115, 378 号
- 【特許文献 20】米国特許第 6, 706, 490 号
- 【特許文献 21】米国特許第 7, 195, 883 号
- 【特許文献 22】米国特許第 6, 420, 125 号
- 【特許文献 23】米国特許第 6, 107, 047 号
- 【特許文献 24】米国特許第 6, 300, 083 号
- 【特許文献 25】米国特許第 6, 372, 442 号
- 【特許文献 26】米国特許第 6, 210, 902 号
- 【特許文献 27】米国特許第 6, 355, 442 号
- 【特許文献 28】米国特許第 6, 342, 361 号
- 【特許文献 29】米国特許第 6, 323, 314 号
- 【特許文献 30】米国特許第 6, 110, 689 号
- 【特許文献 31】米国特許第 6, 010, 863 号
- 【特許文献 32】米国特許第 5, 541, 295 号

10

20

30

40

【非特許文献】

【0035】

- 【非特許文献 1】Woolf & Pflieger, 2003
- 【非特許文献 2】Lawrence et al., 1998
- 【非特許文献 3】Pritzker et al., 2006
- 【非特許文献 4】Dean et al., 1989
- 【非特許文献 5】Reboul et al., 1996
- 【非特許文献 6】Hui et al., 2003
- 【非特許文献 7】Schaller et al., 2005
- 【非特許文献 8】Sumer et al., 2006
- 【非特許文献 9】Birmingham et al., 2006

50

- 【非特許文献 1 0】Christgau et al., 2001
- 【非特許文献 1 1】Mouritzen et al., 2003
- 【非特許文献 1 2】Reijman et al., 2004
- 【非特許文献 1 3】Billinghamurst et al., 1997
- 【非特許文献 1 4】Fraser et al., 2003
- 【非特許文献 1 5】Poole et al., 2004
- 【非特許文献 1 6】Otterness et al., 1997
- 【非特許文献 1 7】Downs et al., 2001
- 【非特許文献 1 8】Zhen et al., 2008
- 【非特許文献 1 9】Kafienah et al. (1998)
- 【非特許文献 2 0】Dejica et al. (2008)
- 【発明の概要】

10

【0036】

ここで本発明は、N末端ネオ-エピトープとC末端ネオ-エピトープとを含有するタンパク質断片を、生物学的試料において測定するステップを含むアッセイの方法であって、前記ネオ-エピトープは、各々前記タンパク質のプロテアーゼによる切断により生成されるアミノ酸配列であり、前記方法は、前記N末端ネオ-エピトープを該N末端ネオ-エピトープの存在に対して特異的な第1の免疫学的結合パートナーと結合させ、かつ、前記C末端ネオ-エピトープを該C末端ネオ-エピトープの存在に対して特異的な第2の免疫学的結合パートナーと結合させるステップと、前記結合パートナーの双方の(dual)結合の程度を検出するステップとを含む方法を提供する。

20

【0037】

生物学的試料は、特に体液試料であってもよく、血液、血清、血漿又は尿であってもよい。

【0038】

前記アッセイを、前記免疫学的結合パートナーの一方を固体支持体に固定化し、前記断片を前記固定化した抗体と結合させ、前記断片に対する前記免疫学的結合パートナーのもう一方の結合を検出するサンドイッチアッセイとして行うことができる。前記サンドイッチアッセイを、均一系サンドイッチアッセイとして、又は不均一系サンドイッチアッセイとして行うことができる。

30

【0039】

好ましくは、前記第1の免疫学的結合パートナーも前記第2の免疫学的結合パートナーも、前記断片が得られるインタクトなタンパク質と特異的に結合せず、好ましくは、前記第1の免疫学的結合パートナーも前記第2の免疫学的結合パートナーも、前記プロテアーゼの切断部位を越えて伸長した、そのそれぞれの前記ネオ-エピトープのアミノ酸配列を含有する前記タンパク質の断片と特異的に結合しない。

【0040】

好ましくは、前記ネオ-エピトープがII型コラーゲン由来のものであり、それにより前記アッセイが軟骨の変性の診断に関するものであってもよく、関節炎に関して診断用指標を提供するものであってもよい。

40

【0041】

前記ネオ-エピトープが、MMPによる又はカテプシンKによるII型コラーゲンの切断により産生され得る。

【0042】

好ましくは、前記第1の免疫学的結合パートナーが、以下のII型コラーゲン切断アミノ酸配列：

D Q G V P G (配列番号54) ; R E G S P G (配列番号55) ;

* L A G P K G (配列番号56) ; 及び * L T G P A G (配列番号57)

のうちの1つにより規定されるエピトープに対して特異的である。

50

【 0 0 4 3 】

好ましくは、前記第 2 の免疫学的結合パートナーが、以下の I I 型コラーゲン切断アミノ酸配列：

．．． P K G A R G （配列番号 5 8 ）；．．． G Q P G P A （配列番号 5 9 ）；
 ．．． E P G G V G （配列番号 6 0 ）；及び．．． R D G A A G （配列番号 6 1 ）
 のうちの 1 つにより規定されるエピトープに対して特異的である。

【 0 0 4 4 】

好ましくは、前記第 1 の免疫学的結合パートナー及び前記第 2 の免疫学的結合パートナーが、組み合わせると、以下の配列：

LTGPAGEPGREGSPGADGPPGRDGAAG（配列番号 6 2 ）

又は

REGSPGADGPPGRDGAAG（配列番号 6 3 ）

の I I 型コラーゲンペプチド断片と特異的に反応性を有する。

【 0 0 4 5 】

必要に応じて、被験体における関節炎進行の重症度が、健康な被験体において及びノ又は病的な関節炎の活性を有する被験体において、上記アッセイにおいて測定される結合のレベルを過去に設定されたレベルと比較することにより評価される。

【 0 0 4 6 】

本発明は、異性化アミノ酸残基を含有するエピトープに対して特異的な第 1 の免疫学的結合パートナーと、プロテアーゼにより生成されるネオ - エピトープに対して特異的な第 2 の免疫学的結合パートナーとを含む、免疫学的アッセイキットを含む。前記キットは、前記結合パートナーとの免疫反応性を有する少なくとも 1 つの校正基準、洗浄試薬、緩衝剤、前記第 1 の免疫学的結合パートナー又は前記第 2 の免疫学的結合パートナーと試料の成分との結合を明らかにするための二次的な免疫学的結合パートナー、酵素標識、酵素標識基質、停止試薬、及び前記キットを使用してアッセイを実施するための取扱説明書をさらに含んでいてもよい。

【 0 0 4 7 】

本発明により有用なアッセイ形式は、不均一系サンドイッチアッセイ形式及び均一系サンドイッチアッセイ形式の両方を含む。

【 0 0 4 8 】

均一系アッセイ形式は、それぞれのビーズと結合させた 2 つの異なる免疫学的結合パートナーの使用であって、該ビーズが、そのそれぞれの結合パートナー（両方が単一の断片分子上の部位と結合する）が該ビーズに接近すると活性化される検出可能な近接（proximity）シグナルを組み込む使用を含む。

【 0 0 4 9 】

不均一系アッセイ形式は、前記免疫学的結合パートナーの一方を固体支持体に固定化し、前記断片を前記固定化した抗体と結合させ、前記断片に対する前記免疫学的結合パートナーのもう一方の結合を検出する形式を含む。

【 0 0 5 0 】

本発明において使用する免疫学的結合パートナーは、抗体、特にモノクローナル抗体、及び特異的な結合親和性を有する抗体断片を含む。これらは F a b 又は F (a b ')₂ 等の結合断片を含む。

【 0 0 5 1 】

本発明によるアッセイは、上記アッセイにおいて検出可能な断片の放出をもたらす病態に関する診断又は疾患の進行のモニタリングに有用である。示される疾患は、測定される断片に応じて異なる。変形性関節症の診断又はモニタリングに関して特別に関心が持たれるものは、I I 型コラーゲンである。軟骨の破壊を伴う他の疾患を、本発明による試験を用いて診断及びモニタリングすることもできると考えられる。このような疾患は、関節リウマチを含む。

【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

50

II型コラーゲンのタンパク質分解による切断により生じるネオエピトープの例は、カテプシンKにより生成されるネオエピトープ、及びMMPにより生成されるネオエピトープを含む。また、アグリカナゼ、例えばADAM-TS4及びADAM-TS5によるII型コラーゲンのタンパク質分解による切断により生成される断片が含まれる。カテプシンKネオエピトープ及びMMP9ネオエピトープ(neopitopes)を保有するII型コラーゲン配列の同定を、以下に記載するように行うことができると考えられる。同様に、他のMMP又はアグリカナゼにより生成されるネオエピトープを保有するII型コラーゲン配列を同定することもできると考えられ、又はMMPにより生成されるネオエピトープはヒト関節軟骨のMMPにより生成されるペプチド生成物に関する公的に利用可能な情報に基づき得ると考えられる(非特許文献18)。タンパク質及びプロテアーゼの特異性を確認するために、好ましい切断部位によるバイオマーカーネオエピトープを、以下のように選択することができる。

10

【0053】

ヒトII型コラーゲン(BIOLCOL、BC-3001)を、10mMの酢酸中に溶解した(1mgのII型コラーゲンに400 μ lを添加した)。10 μ gのカテプシンK(Calbiochem、342001)を、10mM DTT及び5mMのEDTAを含有する200 μ lの100mM酢酸ナトリウム(pH3.9)を室温で40分間添加することにより活性化した。10 μ gのMMP9(Calbiochem、444231)を、1mMのAPMA/DMSO溶液200 μ lを37 $^{\circ}$ Cで2時間添加することにより活性化した。カテプシンKによる切断のために、60 μ lのII型コラーゲンを、20mMのL-システインを含有する120 μ lの50mM酢酸ナトリウム(pH5.5)及び24 μ lの活性化カテプシンKに、37 $^{\circ}$ Cで4時間添加した。MMP9による切断のために、60 μ lのII型コラーゲンを、120 μ lの100mM Tris-HCl、100mMの塩化ナトリウム、10mMの塩化カルシウム、2mM 塩化亜鉛(pH8.0)及び20 μ lのMMP9に、37 $^{\circ}$ Cで3日間添加した。得られたタンパク質分解による切断により生じる断片を、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)-タンデム質量分析(MS/MS)分析により特徴付けた。MS/MSスペクトルを、Sequest及びX!Tandemデータベース検索アルゴリズムを使用してタンパク質データベースに対して検索した。カテプシンKにより切断されたII型コラーゲンに関して、以下の断片の配列ヒットが見出された。

20

AQGPPGATGFPGAAGR (配列番号64)

30

ASGDRGPPGPV (配列番号65)

ASGDRGPPGPVGGPPG (配列番号66)

GANGEKGEVGGPPGA (配列番号67)

GAPGEDGRPGPPGPQ (配列番号68)

GARGAPGERGETGPPGPA (配列番号69)

GDRGPPGPV (配列番号70)

GERGFPG (配列番号71)

GERGFPGER (配列番号72)

GESGSPGENGSPGPM (配列番号73)

GLPGPPGPPGEGGKPG (配列番号74)

40

GPIGPPGPA (配列番号75)

GPPGPPGKPGDDGEAGKPG (配列番号76)

GPPGPV (配列番号77)

GPPGPVGGPA (配列番号78)

LPGPPGPPGEGGKPG (配列番号79)

NPGPPGPPGPPGPG (配列番号80)

PIGPP (配列番号81)

REGSPGADGPPGRDGAAGVK (配列番号82)

SNGNPGPPGPPGPS (配列番号83)

50

【0054】

同定されたカテプシン K により生成された断片を、ヒト I I 型コラーゲンに関する配列 (s p | P 0 2 4 5 8 | C O 2 A 1 _ H U A N C o l l a g e n a l p h a - 1 (I I) c h a i n) と整列させ、矢印により示すように切断部位を位置決めした。

QMAGGFDEKAGGAQLGVMQGMGPMGPRGPPGPAGAPGPQGFQGNPGEPEGVSQGMGPR GPPGPPGKPGDDGEAGK
PG KAGERGPPGPQARGFPPTPLGPKVKGHRGYPGLDGAKGEAGAPGVK GESGSPGENGSPGPM GPRGLPGERG
RTGPAGAAGARGNDGQPGPA GPPGPV GPA GPGFPGAPGAKGEAGPTGARGPEGAQGPGEPTGSPGPAGAS
GNPGLTDGIPGAKGSAGAPG IAGAPGFPGPRGPPGPQATGPLGPKGQTGEPIAGFKGEQGPKEGPPAGPQGAPGPAGE
EGKRGARGEPGGVG PIGPP GERGAPGNRGFPGQDGLAGPKGAPGERGPSGLAGPKGANGDPGRPGEPGLPGARGLT
GRPGDAGPQKVGPS GAPGEDGRPGPPGPQ GARGQPGVMGFPGPKGANGEPGKAGEKGLPGAPGLRGLPGKDGETG
AAGPPGPAGPAGERGEQAGPSPGFQ G LPGPPGPPGEGGKPG DQGVPEAGAPGLVGPR GERGFPG ER
GSPGAQQLQPRGLPGTDPGPKGASGPAGPPGAQPPGLQMPGERGAAG IAGPKGDRGDVGEKGEAGPKDGGRL
T GPIGPPGPA GANGEKGEVGGPPGPA GSA GARGAPGERGETGPPGPA GFAGPPGADGQPGAKGEQGEAGQK
GDAGAPGPQGPSGAPGPQPTGVTGPKGARG AQGPPGATGFFPGAAGR VGPPG SNGNPGPPGPPGPS GKDGPK
GARGDSGPPGRAGEPGLQGPAGPPGEGKGEPEGDDGSPGAEPPGPQGLAGQRG I VGLPGQRGERGFPLPGPSGEPGKQGA
PG AS GDRGPPGPV GPPG LTGPAGEPG REGSPGADGPPGRDGAAGVK GDRGETGAVGAPGAPPPGSPG
PAGPTGKQDRGEAGAQQPMGPSGPAGARG I QGPQGRDKGEAGEPGERGLKGHRGFTGLQGLPGGPPSGDQGASGPA
GPSGRGPPGPVGPSPKDGANG I PGP I GPPGPRGRSGETGPAGPPG NPGPPGPPGPPGPG IDMSAFAGLGPKEKGP
DPLQYMRA (配列番号 8 4)

10

【 0 0 5 5 】

M M P 9 により切断された I I 型コラーゲンに関して、以下の断片の配列ヒットが見出された：

20

AAGARGNDGQGPAGPPGPVGA (配列番号 8 5)
AQGPRGEPGTGSPGPAG (配列番号 8 6)
ARGAPGERGETGPPGPAG (配列番号 8 7)
ASGDRGPPGPV (配列番号 8 8)
ASGDRGPPGPV (配列番号 8 9)
ATGPLGPKG (配列番号 9 0)
DRGPPGPVGGP (配列番号 9 1)
ERGAPGNRGFPGQDGLAGPKGAPGERGPSG (配列番号 9 2)
FQGLPGGPPGEGGKPGDQGVPEAGAPGLVGPR (配列番号 9 3)
FQGLPGGPPGEGGKPGDQGVPEAGAPGLVGPRG (配列番号 9 4)
FTGLQGLPGGPPGPSG (配列番号 9 5)
FTGLQGLPGGPPSGDQGASGPAGSPGRGPPGPVGPSG (配列番号 9 6)
GANGEKGEVGGPPGPA (配列番号 9 7)
GAPGEDGRPGPPGPQ (配列番号 9 8)
GAPGEDGRPGPPGPQ (配列番号 9 9)
GAPGERGETGPPGPA (配列番号 1 0 0)
GESGSPGENGSPGPM (配列番号 1 0 1)
GPIGPPGPA (配列番号 1 0 2)
GPPGPV (配列番号 1 0 3)
GPPGPVGGP (配列番号 1 0 4)
GPRGPPGPAGAPGPQ (配列番号 1 0 5)
GVMQGMGPMGPRGPPGPAGAPGPQ (配列番号 1 0 6)
IVGLPGQRGERGFPLPGPSGEPGK (配列番号 1 0 7)
KQDRGEAGAQQPMGPSGPAG (配列番号 1 0 8)
KVGPSGAPGEDGRPGPPGPQ (配列番号 1 0 9)
LPGKDGETGAAGPPGPAGPAG (配列番号 1 1 0)
LPGKDGETGAAGPPGPAGPAGERGEQAGPSPG (配列番号 1 1 1)
LQGLPGGPPSGDQGASGPAGSPGRGPPGPVGPSG (配列番号 1 1 2)
LTGPAGEPGREGSPGAD (配列番号 1 1 3)

30

40

50

LTGPAGEPGREGSPGADGPPGRDGAAG (配列番号 6 2)
 LTGPIGPPGPAG (配列番号 1 1 5)
 LTGRPGDAGPQKVGPSGAPGEDGRPGPPGPQG (配列番号 1 1 6)
 QGPMGPMGPRGPPGPAGAPGPQG (配列番号 1 1 7)
 QGPRGLPGTPGTDGPKGASGPAGPPGAQGPP (配列番号 1 1 8)
 RSGETGPAGPPGNPGPPGPPGPPGID (配列番号 1 1 9)
 RVGPPGSNGNPGPPGPPGPSG (配列番号 1 2 0)
 SNGNPGPPGPPGPS (配列番号 1 2 1)
 SPGPMGPRG (配列番号 1 2 2)
 VKGESGSPGENGSPGPMGPRG (配列番号 1 2 3)

10

【 0 0 5 6 】

同定された M M P 9 により生成された断片を、ヒト I I 型コラーゲンに関する配列 (s p | P 0 2 4 5 8 | C O 2 A 1 _ _ H U A N C o l l a g e n a l p h a - 1 (I I) c h a i n) と整列させ、星印により示すように切断部位を位置決めした。

QMAGGFDEKAGGAQL * GVM * QGPMGPM * GPRGPPGPAGAPGPQG * FQGNPGEPGEPVSGPMGPRGPPGPPGKPGD
 DGEAGKPGKAGERGPPGPQGARGFPPTPLPGVKGHRGYPGLDGAKGEAGAPG * VK * GESGSPGENG * SPGPM * GP
 RG * LPERGRTGPAG * AAGARGNDGQPGPAGPPGPVGA * GPGFPGAPGAKGEAGPTGARGPEG * AQGPRGEPGT
 PGSPGPAG * ASGNPGTDGIPGAKGSAGAPG IAGAPGFPGPRGPPGPQG * ATGPLGPKG * QTGEPIAGFKGEQGPKG
 EPGPAGPQAGPAGEEGKRGARGEPGGVGP I GPPG * ERGAPGNRFGPQDGLAGPKGAPGERGPSG * LAGPKGANGD
 PGRPGEPGLPGARG * LTGRPGDAGPQG * KVGPS * GAPGEDGRPGPPGPQ * G * ARGQPGVMGFPGPKGANGEPGKA
 GEKGLPGAPGLRG * LPGKDGETGAAGPPGPAGPAG * ERGEQAGGPSG * FQGLPGGPPGEGGKPGDQGVPEAGA
 PGLVGPR * G * ERGFPERGSPGAQGL * QGPRGLPGTPGTDGPKGASGPAGPPGAQGPP * GLQGMPPERGAAG IAGP
 KGDRGDVGEKGPAGPKDGGRG * LT * GP I GPPGPA * G * ANGEKGEVGGPPGA * GSAG * AR * GAPGERGETGP
 PGPA * G * FAGPPGADGQPGAKGEQGEAGQKGDAGAPGQGPSGAPGQGPPTGVTGPKGARGAQGPPGATGFPGAAG *
 RVGPPG * SNGNPGPPGPPGPS * G * KDGPKGARGDSGPPGRAGEPGLQGPAGPPGEKGEPEGDDGPSGAEGPPGPQGLA
 GQRG * IVGLPQQRGERGFPLPGPSGEPGK * QGAPG * ASG * DR * GPPGPV * G * PPG * LTGPAGEPGREGSPG
 AD * GPPGRDGAAG * VKGDRGETGAVGAPGAPGPPGSPGPAGPTG * KQGDRGEAGAQQPMGSPGPAG * ARG I QGPQG
 PRGDKGEAGEPGERGLKGHRG * FTG * LQGLPGGPPGPSG * DQGASGPAGPSGPRGPPGPVGPSG * KDGANG I G P I G
 PPGPRG * RSGETGPAGPPGNPGPPGPPGPPGID * MSAFAGLGPREGKPDPLQYMRA (配列番号 8 4)

20

【 0 0 5 7 】

カテプシン K により生成される部位に関して矢印により、及び M M P 9 により生成され
 る部位に関して星印により示すように、切断部位を位置決めした。

QMAGGFDEKAGGAQL * GVM * QGPMGPM * GPRGPPGPAGAPGPQG * FQGNPGEPGEPVSGPMGPR GPPGPPGK
 GDDGEAGKPG KAGERGPPGPQGARGFPPTPLPGVKGHRGYPGLDGAKGEAGAPG * VK * GESGSPGENG * SPG
 PM * GPRG * LPERGRTGPAG * AAGARGNDGQPGPA GPPGPV GPA * GPGFPGAPGAKGEAGPTGARGP
 EG * AQGPRGEPGTGSPGPAG * ASGNPGTDGIPGAKGSAGAPG IAGAPGFPGPRGPPGPQG * ATGPLGPKG * QTGE
 PGIAGFKGEQGPKEPAGPQAGPAGEEGKRGARGEPGGVG P I GPP G * ERGAPGNRFGPQDGLAGPKGAPG
 ERGPSG * LAGPKGANGDPGRPGEPGLPGARG * LTGRPGDAGPQG * KVGPS * GAPGEDGRPGPPGPQ * G * A
 RGQPGVMGFPGPKGANGEPGKAGEKGLPGAPGLRG * LPGKDGETGAAGPPGPAGPAG * ERGEQAGGPSG * FQ G
 LPGPPGPPGEGGKPG DQGVPEAGAPGLVGPR * G * ERGFPG ER GSPGAQGL * QGPRGLPGTPGTDGP
 KGASGPAGPPGAQGPP * GLQGMPPERGAAG IAGPKGDRGDVGEKGPAGPKDGGRG * LT * GP I GPPGPA * G
 * ANGEKGEVGGPPGA * GSA G * AR * GAPGERGETGPPGPA * G * FAGPPGADGQPGAKGEQGEAGQKGD
 GAPGQGPSGAPGQGPPTGVTGPKGARG AQGPPGATGFPGAAG * R VGPPG * SNGNPGPPGPPGPS * G *
 KDGPKGARGDSGPPGRAGEPGLQGPAGPPGEKGEPEGDDGPSGAEGPPGPQGLAQQRG * IVGLPQQRGERGFPLPGPSG
 EPK * QGAPG * AS G * DR * GPPGPV * G * PPG * LTGPAGEPG REGSPGAD * GPPGRDGAAG * V
 K GDRGETGAVGAPGAPGPPGSPGPAGPTG * KQGDRGEAGAQQPMGSPGPAG * ARG I QGPQGPRGDKGEAGEPGERG
 LKGHRG * FTG * LQGLPGGPPGPSG * DQGASGPAGPSGPRGPPGPVGPSG * KDGANG I G P I G P P G P R G * R S G E T G P
 AGPPG NPGPPGPPGPPG ID * MSAFAGLGPREGKPDPLQYMRA (配列番号 8 4)

40

【 0 0 5 8 】

I I 型コラーゲンのタンパク質分解による切断により生じるさらなるネオエピトープは

50

、ヒト関節軟骨のプロテアーゼにより生成されるペプチド生成物に関する公的に利用可能な情報に基づき得ると考えられる（非特許文献18）。

【0059】

考え得る生成される断片のいずれもが、バイオマーカーを構成することができると考えられる。バイオマーカーは、断片のN末端及びC末端に切断部位を有しかつ中間には他の切断部位を有していなくてもよいと考えられ、又はバイオマーカーは、N末端及びC末端に切断部位を有し、かつ、中間に1つ又は複数の考え得る切断部位を有していてもよいと考えられる。

【0060】

2つのネオエピトープを保有する好ましいII型コラーゲン配列は、以下のように選択された。

【0061】

好ましいバイオマーカーネオエピトープを、タンパク質特異性に基づき選択した。切断部位のタンパク質特異性を、切断部位のいずれかの部位上における6アミノ末端残基又は6カルボキシ末端残基の同一性検索により評価した。公的に利用可能なプログラム「Pattnprot」を、UNIPROT/SWISSPROTデータベースの検索に使用した。カテプシンK切断部位（矢印）及びノ又はMMP切断部位（星印）の好ましいバイオマーカーネオエピトープを、下線を付した配列により示す。

QMAGGFDEKAGGAQLGVMQGMGPMGPRGPPGAPAGPQGFQGNPGEPEGVSQPMGPRGPPGPPGKPGDDGEAGKPG
KAGERGPPGPQARGFPPTPLPGVKGHRGYPGLDGAKGEAGAPGVKGESGSPGENGSPGPMGPRGLPGERGRTGPAGAA
GARGNDGQPGPA GPPGPVGPAGGPGFPGAPGAKGEAGPTGARGPEGAQGPGEPTGSPGAPAGASGNPGTDGIPGAK
GSAGAPGIGAPGFPGRGPPGPPGQATGPLGPKGQTGEPGIGAFKGEQGPKEGPPGAPGQAPGAPAGEEGKRGARGEPGG
VGPIGPPGERGAPGNRFGPQDGLAGPKGAPGERGPSG*LAGPKGANGDPGRPGEPGLPGARGLTGRPGDAGPQGGK
V
GPSGAPGEDGRGPPGPPGQARGQPGVMGFPGPKGANGEPGKAGEKGLPGAPGLRGLPGKDGGETGAAGPPGAPGAGERGE
QGAPGPSGFQGLPGPPGPPGEGGKPG DQGVPEAGAPGLVGPGRGERGFPGERGSPGAQGLQGPRLPGTPTDGPKGA
SGPAGPPGAQGPGLQGMGERGAAGIGAPKGDGRDVGEGKPEGAPGKDGGRGLTGPIGPPGPAGANGEKGEVGP
SAGARGAPGERGETGPPGAPGAGPPGADGQPGAKGEQGEAGQKGDAGAPGPPGQPSGAPGPPGPTGVTGPKGARG AQG
PPGATGFPGAAGRVP
PPGNSGNP
PPGPPGSPGKDGPKGARGDSGPPGRAGEPGLQGPAGPPGEGKGEPEGDDGPPSGAEGPP
GPQGLAGQRGIVGLPGQRGERGFPGLPGPSGEPGKQGAPGASGDRGPPGPPGPPG*LTGPAGEPGREGSPGADGP
PGRDGAAG*VKDGRGETGAVGAPGAPGPPGSPGAPGPTGKQDGRGEAGAQQPMGSPGAPARGIQGPQGRGDKGEAGE
PGERGLKGHRGFTGLQGLPGPPGSPGDQGASGPAGPSGPRGPPGPPGVPSPGKDGANGIPGPIGPPGPRGRSGETGPAGPPG
NPGPPGPPGPPGPGIDMSAFAGLGPREGKPDPLQYMRA（配列番号84）

【0062】

好ましいバイオマーカー断片に関する付加的な要件は切断部位の位置が互いに近接していることであり、すなわち標的断片は、好ましくは最大で、50アミノ酸残基、より好ましくは40アミノ酸残基以下、より好ましくは30アミノ酸残基以下の長さを有する必要がある。好ましいバイオマーカー断片の例は以下の通りである。

1 LTGPAGEPGREGSPGADGPPGRDGAAG（配列番号62）

2 REGSPGADGPPGRDGAAG（配列番号63）

【0063】

断片1に関しては、免疫学的結合パートナーは好ましくは、LTGPAG...（配列番号57）のN末端ネオエピトープ、及び...RDGAAG（配列番号61）のC末端ネオエピトープに対する特異的な結合親和性を有する必要がある。

【0064】

断片2に関しては、免疫学的結合パートナーは好ましくは、REGSPG...（配列番号55）のN末端ネオエピトープ、及び...RDGAAG（配列番号61）のC末端ネオエピトープに対する特異的な結合親和性を有する必要がある。

【0065】

他のタンパク質の関連する断片を、同様に規定することができる。本発明を、生物学的試料における他のタンパク質の分解生成物の検出に適用することができる。

10

20

30

40

50

【0066】

本発明を、添付の図面を参照して、以下の実施例によりさらに説明及び例示する。

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1】実施例1において検討された血清における抗体の結合を示す図である。

【図2】実施例1において観察されたモノクローナル抗体の結合を示す図である。

【実施例】

【0068】

実施例1

<ネオエピトープを認識するモノクローナル抗体の生成>

合成ペプチドを、標準的な技法により調製した。免疫原性を増大させるために、ペプチド(LTGPAGGGGC(配列番号124))をそのC末端で、システインを介する部位特異的結合技術を使用してキャリアタンパク質KLHと結合させた。免疫化の前に、免疫原をフロイント不完全アジュバントと1:1の比で混合し、混合物をBalb/cマウスに皮下注射した。免疫化は2週間毎に2ヶ月間繰り返し(4回免疫)、その後各免疫化の間隔を4週間として継続した。免疫化を開始する前及び各免疫化の1週間後に、マウスから血液を取得した。C末端をビオチン化した合成ペプチド(LTGPAGEPGK-ビオチン(配列番号125))に対するマウス免疫血清の結合反応性を試験することにより、免疫応答を評価した。マウス免疫血清の結合反応性に関する試験は、ストレプトアビジンでコーティングしたマイクロタイタープレートの表面と結合させたビオチン化合成ペプチドに対する免疫血清の結合に基づくものとした。インキュベーション及び洗浄の後、結合した抗体を、セイヨウワサビペルオキシダーゼと複合体形成した抗マウスIgGとのインキュベーション、洗浄、及び色素原TMBの添加により実証した(図1)。

【0069】

上で言及したスクリーニング試験において十分な免疫血清の力価を達成した後、選択したマウスを少なくとも4週間休ませ、アジュバントを含まない免疫原を用いて腹腔内に追加免疫した。3日後脾臓を取り出し、標準的な技法を使用する骨髓腫細胞との融合に使用した。増殖中のハイブリドーマから得た抗体を、上で記載したようなアッセイにおけるビオチン化合成ペプチドに対するその結合反応性により評価した。さらに抗体の切断特異性を、1残基伸長させたコーター(coater)ペプチド(GLTGPAGEPGK-ビオチン(配列番号126))に対する結合反応性が極めて小さいこと、及び非類似のコーターペプチド(ビオチン-KGATGPLGPK(配列番号127))に対して結合しないことにより実証した(図2)。

【0070】

実施例2

<2つのネオ-エピトープを保有するコラーゲン断片を検出するイムノアッセイの開発>

上で記載したようなアミノ酸配列LTGPAGGGGC(配列番号124)のN末端と結合する1つのモノクローナル抗体を、標準的な手順に従ってビオチン化し、サンドイッチELISAにおいて捕捉抗体として使用した。アミノ酸配列CGGGRDGAAG(配列番号128)のC末端と結合する検出抗体を、標準的な技法に従ってセイヨウワサビペルオキシダーゼで標識した。これらの2つの試薬、及びストレプトアビジンでコーティングしたマイクロタイタープレートを使用して、抗体をウシ血清アルブミン(1%)及びTween20(0.1%)を含む10mMリン酸緩衝溶液(PBS)(総体積100μL)で予備希釈し、その後マイクロタイタープレート中で50μLのヒト血清試料と共にインキュベートした。N末端ネオ-エピトープ及びC末端ネオ-エピトープの両方を含有するアミノ酸配列LTGPAGEPGREGSPGADGPPGRDGAAG(配列番号62)を有する合成ペプチドを、較正物質として使用した。2時間のインキュベーション後、ウェルを洗浄し、色素原(TMB)と共に15分間インキュベートした。その後、発色反応を0.18Mの硫酸の添加により停止した。

【0071】

10

20

30

40

50

異化条件及び同化条件で培養したヒト関節軟骨からの断片の放出の測定により、アッセイの固有の (native) 反応性を試験した。図3は、異化条件が軟骨からの断片の放出を増大させるが、同化条件は断片の放出を減少させることを示す。これにより、この断片が軟骨のターンオーバーのマーカーであることが示される。

【0072】

上で記載したELISAにおけるOA患者由来の20個のヒト尿試料、及び健康な被験体由来の20個の試料の測定により、疾患を有する被験体におけるII型コラーゲン断片の濃度の50%超の増大 ($p < 0.05$) が実証された (図4)。

【0073】

実施例3

< 1つのネオ-エピトープを保有するコラーゲン断片を検出するイムノアッセイの開発 - 当該切断が本来のMMP切断部位であるか否かに関する試験。 >

上で記載したようなアミノ酸配列LTGPAGGGGC (配列番号124) のN末端と結合する1つのモノクローナル抗体を、標準的な手順に従ってペルオキシダーゼ標識し、競合ELISAにおいてビオチン化コターペプチドと共に使用した。

【0074】

コターペプチド (LTGPAGGGGC - ビオチン (配列番号124)) 及び抗体を、ウシ血清アルブミン (1%) 及びTween 20 (0.1%) を含む10mMのリン酸緩衝溶液 (PBS) (総体積100 μ L) で予備希釈し、その後マイクロタイタープレート中で20 μ Lのヒト血清試料と共にインキュベートした。N末端ネオ-エピトープ及びC末端ネオ-エピトープの両方を含有するアミノ酸配列LTGPAGEPGREGSPGADGPPGRDGAAG (配列番号62) を有する合成ペプチドを、校正物質として使用した。2時間のインキュベーション後、ウェルを洗浄し、色素原 (TMB) と共に15分間インキュベートした。その後、発色反応を0.18Mの硫酸の添加により停止した。

【0075】

これが実際にMMP由来のものであるか否かを試験するために、種々の阻害剤を軟骨移植片培養物に添加し、培地への断片 (LTGPAGGGGC (配列番号124)) の放出を測定した。図5は、プロテアーゼ阻害剤を添加したときの断片のレベルに対する効果を示す。使用した阻害剤は以下である: メタロプロテイナーゼ阻害剤 (GM6001)、システインプロテアーゼ阻害剤 (E64)、アスパルチルペプチダーゼ阻害剤ペプスタチンA (Pep. A) 及びセリンプロテアーゼ阻害剤アプロチニン (Aprotenin) (apro.). 全ての条件に対して異化サイトカインを添加することにより放出を刺激した。GM6001のみが断片の放出を阻止することができ、これが真のMMP由来の断片であることが示されたが、MMPを間接的に阻害するセリンプロテアーゼ阻害剤も或る程度放出を阻害することができた (図5)。これにより、断片が真にMMP由来の断片であることが確認される。

【0076】

実施例4

< 1つのネオ-エピトープを保有するコラーゲン断片を検出するイムノアッセイの開発 - 当該切断が本来のMMP切断部位であるか否かに関する試験。 >

上で記載したようなアミノ酸配列GPPGRDGAAG (配列番号114) のC末端と結合する1つのモノクローナル抗体を、標準的な手順に従ってペルオキシダーゼ (peroxidase) 標識し、競合ELISAにおいてビオチン化コターペプチドと共に使用した。

【0077】

コターペプチド (ビオチン - GPPGRDGAAG (配列番号114)) 及び抗体をウシ血清アルブミン (1%) 及びTween 20 (0.1%) を含む10mMリン酸緩衝溶液 (PBS) (総体積100 μ L) で予備希釈し、その後マイクロタイタープレート中で20 μ Lのヒト血清試料と共にインキュベートした。N末端ネオ-エピトープ及びC末端ネオ-エピトープの両方を含有するアミノ酸配列LTGPAGEPGREGSPGADGPPGRDGAAG (配列番号62) を有する合成ペプチドを、校正物質として使用

10

20

30

40

50

した。2時間のインキュベーション後、ウェルを洗浄し、色素原（TMB）と共に15分間インキュベートした。その後、発色反応を0.18Mの硫酸の添加により停止した。

【0078】

この断片が実際にMMP由来のものであるか否かを試験するために、種々の阻害剤を軟骨移植片培養物に添加し、培地への断片（GPPGRDGAAG（配列番号114））の放出を測定した。図6は、プロテアーゼ阻害剤を添加したときの断片のレベルに対する効果を示す。使用した阻害剤は以下である：メタロプロテイナーゼ阻害剤（GM6001）、システインプロテアーゼ阻害剤（E64）、アスパルチルペプチダーゼ阻害剤ペプスタチンA（Pep.A）及びセリンプロテアーゼ阻害剤アプロチニン（apro.）。全ての条件に対して異化サイトカインを添加することにより放出を刺激した。GM6001のみが断片の放出を阻止することができ、これが真のMMP由来の断片であることが示された。MMPを間接的に阻害するセリンプロテアーゼ阻害剤も、有意にはないが或る程度放出を阻害することができた（図6）。これにより、断片が真にMMP由来の断片であることが確認される。

10

【0079】

本明細書では、他に明示的に示されぬ限り、「又は（or）」という単語は、記載される条件のうちの一つだけが満たされることを要求する「排他的な『又は』（exclusive or）」という作用素（operator：演算子）に対立するものとして、該条件のいずれか又は両方が満たされる場合に真の値を返す作用素の意味で使用される。「を含む（comprising）」という単語は、「からなる（consisting of）」を意味するというよりも「を含む（including）」の意味で使用される。上で確認した全ての過去の教示は、参照により本明細書に援用される。本明細書における過去に公開された文献のいずれについての確認も、その教示がこの日付においてオーストラリア又は他の場所で一般的な周知の知識であったことの承認又は表明であると解釈すべきではない。

20

【0080】

<文献>

【表 1 A】

Zhen EY, Brittain IJ, Laska DA, Mitchell PG, Sumer EU, Karsdal MA, Duffin KL. Characterization of metalloprotease cleavage products of human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 2008 Aug;58(8):2420-31

Kafienah W, Brömme D, Buttle DJ, Croucher LJ, Hollander AP. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem J.* 1998 May 1;331 (Pt 3):727-32

10

Dejica VM, Mort JS, Laverty S, Percival MD, Antoniou J, Zukor DJ, Poole AR. Cleavage of type II collagen by cathepsin K in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol.* 2008 Jul;173(1):161-9. Epub 2008 May 29

Dean, D.D., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Howell, D.S., and Woessner, J.F., Jr. 1989. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* **84**:678-685.

20

Reboul, P., Pelletier, J.P., Tardif, G., Cloutier, J.M., and Martel-Pelletier, J. 1996. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest* **97**:2011-2019.

Hui, W., Rowan, A.D., Richards, C.D., and Cawston, T.E. 2003. Oncostatin M in combination with tumor necrosis factor alpha induces cartilage damage and matrix metalloproteinase expression in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* **48**:3404-3418.

30

Schaller, S., Henriksen, K., Hoegh-Andersen, P., Sondergaard, B.C., Sumer, E.U., Tanko, L.B., Qvist, P., and Karsdal, M.A. 2005. In vitro, ex vivo, and in vivo methodological approaches for studying therapeutic targets of osteoporosis and degenerative joint diseases: how biomarkers can assist? *Assay. Drug Dev. Technol.* **3**:553-580.

40

Sumer, E.U., Schaller, S., Sondergaard, B.C., Tanko, L.B., and Qvist, P. 2006. Application of biomarkers in the clinical development of new drugs for

【表 1 B】

chondroprotection in destructive joint diseases: a review. *Biomarkers* **11**:485-506.

Christgau,S., Garnero,P., Fledelius,C., Moniz,C., Ensig,M., Gineyts,E., Rosenquist,C., and Qvist,P. 2001. Collagen type II C-telopeptide fragments as an index of cartilage degradation. *Bone* **29**:209-215.

Mouritzen,U., Christgau,S., Lehmann,H.J., Tanko,L.B., and Christiansen,C. 2003. Cartilage turnover assessed with a newly developed assay measuring collagen type II degradation products: influence of age, sex, menopause, hormone replacement therapy, and body mass index. *Ann. Rheum Dis* **62**:332-336.

Reijman,M., Hazes,J.M., Bierma-Zeinstra,S.M., Koes,B.W., Christgau,S., Christiansen,C., Uitterlinden,A.G., and Pols,H.A. 2004. A new marker for osteoarthritis: cross-sectional and longitudinal approach. *Arthritis Rheum* **50**:2471-2478.

Woolf AD, Pflieger B: Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 2003;**81**:646-56

Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC et al. Estimates of the prevalence of arthritis nad selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum* 1998;**41**:778-99.

Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;**14**:13-29.

Birmingham JD, Vilim V, Kraus VB. Collagen biomarkers for arthritis applications. *Biomarker Insights* 2006; **2**: 61-76.

Fraser A, Fearon U, Billingham RC, Ionescu M, Reece R, Barwick T, Emery P, Poole AR, Veale DJ. Turnover of type II collagen and aggrecan in cartilage matrix at the onset of inflammatory arthritis in humans: relationship to mediators of systemic and local inflammation. *Arthritis Rheum*. 2003 Nov;**48**(11):3085-95.

10

20

30

40

【表 1 C】

Billinghurst RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, Chen J, Van Wart H, Poole AR.

Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest.* 1997 Apr 1;99(7):1534-45.

Poole AR, Ionescu M, Fitzcharles MA, Billinghurst RC. The assessment of cartilage degradation in vivo: development of an immunoassay for the measurement in body fluids of type II collagen cleaved by collagenases. *J Immunol Methods.* 2004 Nov;294(1-2):145-53.

10

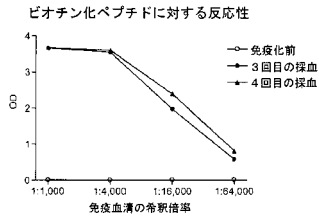
Otterness IG, Downs JT, Lane C, Bliven ML, Stukenbrok H, Scampoli DN, Milici AJ, Mézes PS. Detection of collagenase-induced damage of collagen by 9A4, a monoclonal C-terminal neopeptide antibody. *Matrix Biol.* 1999 Aug;18(4):331-41.

20

Downs JT, Lane CL, Nestor NB, McLellan TJ, Kelly MA, Karam GA, Mezes PS, Pelletier JP, Otterness IG. Analysis of collagenase-cleavage of type II collagen using a neopeptide ELISA. *J Immunol Methods.* 2001 Jan 1;247(1-2):25-34.

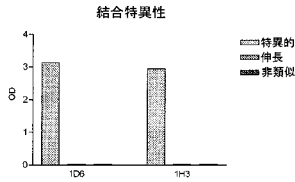
【 図 1 】

Figure 1:



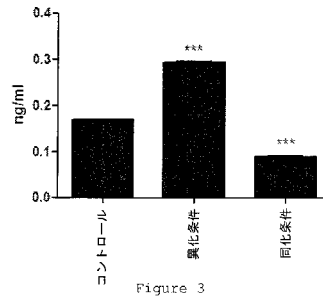
【 図 2 】

Figure 2:



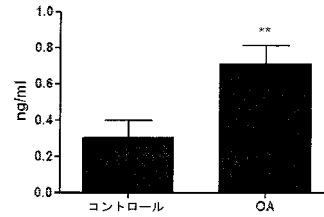
【 図 3 】

軟骨からの LTGPAGEPREGSPGADGPPGRDGAAG断片の放出



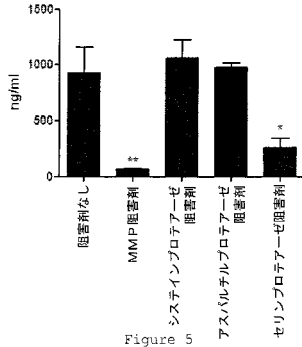
【 図 4 】

尿中の LTGPAGEPREGSPGADGPPGRDGAAG断片のレベル



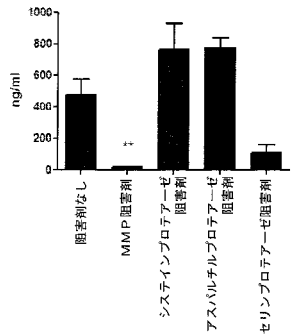
【 図 5 】

軟骨からのLTGPAGGGGC断片の放出



【 図 6 】

軟骨からのGPPGRDGAAG断片の放出



【配列表】

2012508872000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/064997

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. GOIN33/564		
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) GOIN		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BYRJALSEN I ET AL: "110 NEW BIOCHEMICAL MARKERS OF COLLAGEN TYPE II DEGRADATION" OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE, BAILLIERE TINDALL, LONDON, GB, vol. 16, 1 September 2008 (2008-09-01), page S60, XP025689824 ISSN: 1063-4584 [retrieved on 2008-09-01] abstract ----- -/--	1-4,6,7,9,11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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. "8" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 February 2010		Date of mailing of the international search report 19/04/2010
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 Hinchliffe, Philippe

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/064997

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OESTERGAARD ET AL: "The utility of measuring C-terminal telopeptides of collagen type II (CTX-II) in serum and synovial fluid samples for estimation of articular cartilage status in experimental models of destructive joint diseases" OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE, BAILLIERE TINDALL, LONDON, GB, vol. 14, no. 7, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 670-679, XP005491699 ISSN: 1063-4584 figure 1	1-7,11
X	BILLINGHURST R C ET AL: "Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION, US, vol. 99, 1 April 1997 (1997-04-01), pages 1534-1545, XP002107397 ISSN: 0021-9738 cited in the application figure 1	1-7
X	WO 2004/031725 A (SHRINERS HOSPITAL FOR CHILDREN [US]; POOLE A ROBIN [CA]) 15 April 2004 (2004-04-15) paragraph [0017]	1-7
X	DOWNS J T ET AL: "Analysis of collagenase-cleavage of type II collagen using a neopeptide ELISA" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 247, no. 1-2, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 25-34, XP004228396 ISSN: 0022-1759 abstract	1-7
A	US 2003/219843 A1 (WELSCH DEAN J [US] ET AL) 27 November 2003 (2003-11-27) the whole document	10

International Application No. PCT/EP2009/064997

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Neo epitope has no recognised definition and none is provided in the description of the current application. It is assumed to refer to "new epitope" formed by host enzymatic activity.

The invention has only been searched for neopeptides (as defined above) from collagen type II. No neopeptides on other molecules are supported by the examples. Without a specific limitation to a particular protein a general search for any neopeptides would be impractical.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2009/064997**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

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

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

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

see additional sheet

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

see additional sheet(s)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/EP2009 /064997

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application; as follows:

1. claims: 1-11

Methods of detecting two neoepitopes from anything.

2. claims: 12,13

A kit with an antibody against a neo epitope of anything and an antibody against an isomerised amino acid containing epitope of anything.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/064997

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004031725	A	15-04-2004	AU 2003279076 A1 23-04-2004
			CA 2500670 A1 15-04-2004
			EP 1549354 A2 06-07-2005
			JP 2006501479 T 12-01-2006
			KR 20050084608 A 26-08-2005
			US 2004132064 A1 08-07-2004
US 2003219843	A1	27-11-2003	NONE

フロントページの続き

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

(74)代理人 100114591

弁理士 河村 英文

(74)代理人 100118407

弁理士 吉田 尚美

(74)代理人 100125380

弁理士 中村 綾子

(74)代理人 100125036

弁理士 深川 英里

(74)代理人 100142996

弁理士 森本 聡二

(74)代理人 100154298

弁理士 角田 恭子

(74)代理人 100162330

弁理士 広瀬 幹規

(72)発明者 レーミング, ディアーナ・ユリー

スウェーデン国, 2 4 3 3 0 ヘーエー, パルクガータン 1 3

(72)発明者 ビルヤルセン, インゲル

デンマーク国, 2 9 7 0 ヒュアスホルム, メランデルス・ヴェンゲ 5

(72)発明者 クヴィスト, ペール

デンマーク国, 2 9 3 0 クランペンボー, タールベク・ストランヴァイ 1 0 3 G

(72)発明者 カルスダル, モルテン・アセル

デンマーク国, 2 1 0 0 コペンハーゲン オー, ホルスタインスガーデ 2 1, 3 . t h

Fターム(参考) 4H045 BA10 BA13 BA14 BA16 BA17 BA18