

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号
特開2025-11237
(P2025-11237A)

(43)公開日 令和7年1月23日(2025.1.23)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 Q	1/37 (2006.01)	C 1 2 Q	1/37	4 B 0 6 3	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D Z N A	
G 0 1 N	33/543(2006.01)	G 0 1 N	33/543	5 0 1 A	
C 1 2 N	9/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/543	5 7 5	
		G 0 1 N	33/53	D	
		審査請求 有	請求項の数 1	O L (全60頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号 特願2024-178873(P2024-178873)		(71)出願人 518370644		4 ティーン 4 ファーマシューティカルズ ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテ ル ハフツング ドイツ連邦共和国, 1 6 7 6 1 ヘニッ ヒスドルフ, ノイエンドルフシュトラ ー セ 1 5 アー (74)代理人 100099759 弁理士 青木 篤 (74)代理人 100123582 弁理士 三橋 真二 (74)代理人 100117019 弁理士 渡辺 陽一 (74)代理人 100141977 弁理士 中島 勝	
(22)出願日 令和6年10月11日(2024.10.11)					
(62)分割の表示 特願2022-110620(P2022-110620)					
)の分割					
原出願日 平成29年4月20日(2017.4.20)					
(31)優先権主張番号 16166476.8					
(32)優先日 平成28年4月21日(2016.4.21)					
(33)優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁(EP)					
(特許庁注 : 以下のものは登録商標)					
1 . T W E E N					
2 . T R I T O N					

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 D P P 3 の定量方法および治療方法

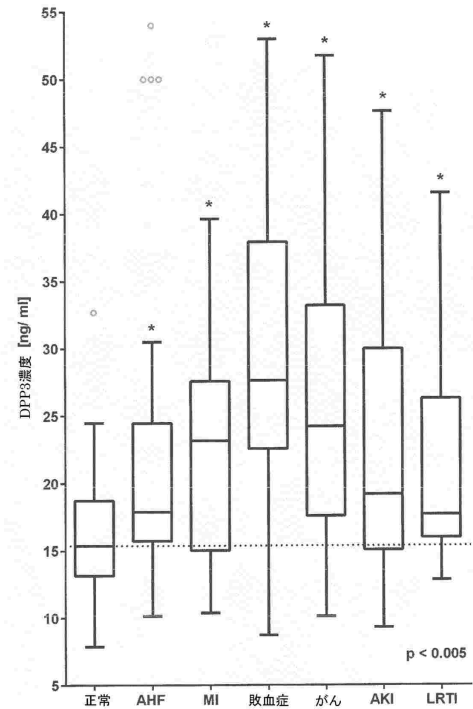
(57)【要約】

【課題】壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法を提供する。

【解決手段】体液試料中の活性D P P 3 を定量する。

【選択図】図 2 A

Fig. 2 A:



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法であって、
前記被験者の体液試料中の D P P 3 総量を定量し、かつ / または活性 D P P 3 の量を定量することと、
定量された前記 D P P 3 総量または活性 D P P 3 の量を所定の閾値と比較することとを含み、
定量された前記量が前記所定の閾値を超える場合、前記被験者は壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する疾患または状態を有すると診断される、方法。

10

【請求項 2】

前記 D P P 3 総量または活性 D P P 3 の量は濃度の単位で定量される、請求項 1 に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

【請求項 3】

前記試料は全血、血清、血漿を含む群から選択される、請求項 1 または 2 に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

【請求項 4】

前記疾患は、心不全、慢性心不全、急性心不全 (A H F)、心筋梗塞 (M I)、卒中、肝不全、熱傷、外傷、重症感染症 (微生物、ウイルス (たとえば後天性免疫不全症候群 (A I D S)、寄生虫 (たとえばマラリア))、全身性炎症反応症候群 (S I R S) または敗血症、がん、急性腎障害 (A K I)、中枢神経系 (C N S) 障害 (たとえば発作、神経変性疾患)、自己免疫疾患および血管疾患 (たとえば川崎症候群)、ならびに低血圧症を含む群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

20

【請求項 5】

前記 D P P 3 総量および / または活性 D P P 3 の量は前記被験者の体液試料中で定量され、かつ
前記試料を全長 D P P 3 に特異的に結合する捕捉結合剤に接触させる工程と、
前記捕捉結合剤に結合した D P P 3 を分離する工程と、
前記分離済み D P P 3 に D P P 3 の基質を添加する工程と、
D P P 3 の基質の転化率を測定し定量することにより前記活性 D P P 3 を定量する工程とを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

30

【請求項 6】

前記捕捉結合剤は抗体、抗体断片、または非 I g G 足場の群から選択されてもよい、請求項 5 に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

【請求項 7】

前記捕捉結合剤は抗体である、請求項 5 または 6 に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

40

【請求項 8】

前記捕捉結合剤は表面に固定化される、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

【請求項 9】

前記分離工程は、前記試料のうち前記捕捉結合剤に結合していない成分を捕捉済み D P P 3 から除去する洗浄工程である、請求項 5 ~ 8 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

【請求項 10】

D P P 3 基質の転化は、蛍光発生基質 (たとえば A r g - A r g - β N A、A r g - A

50

r g - A M C) の蛍光、発色基質の色変化、アミノルシフェリンに結合された基質 (Pro mega Protease-Glo (商標) Assay) の発光、質量分析、H P L C / F P L C (逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー)、薄層クロマトグラフィー、キャピラリーゾーン電気泳動、ゲル電気泳動後に活性染色 (固定された活性 D P P 3) またはウェスタンブロット (切断産物) を行うことを含む群から選択される方法で検出される、請求項 5 ~ 9 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

【請求項 1 1】

前記基質は、アンギオテンシン I I、I I I、I V、L e u エンケファリン、M e t エンケファリン、エンドモルフィン 1 および 2、パロルフィン、 β -カゾモルフィン、ダイノルフィン、プロクトリン、副腎皮質刺激ホルモン (A C T H)、およびメラノサイト刺激ホルモン (M S H) ; ならびに蛍光色素分子、発色団、またはアミノルシフェリンに結合されたジペプチドを含む群から選択されてもよく、前記ジペプチドは A r g - A r g である、請求項 5 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

10

【請求項 1 2】

前記基質は、蛍光色素分子、発色団、またはアミノルシフェリンに結合されたジペプチドを含む群から選択されてもよく、前記ジペプチドは A r g - A r g である、請求項 5 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

20

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の診断方法を少なくとも 2 回行う、壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を監視する方法。

【請求項 1 4】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための D P P 3 活性阻害剤。

【請求項 1 5】

前記阻害剤は抗 D P P 3 抗体および抗 D P P 3 抗体断片、ならびに抗 D P P 3 非 I g 足場を含む群から選択される、請求項 1 4 に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための D P P 3 活性阻害剤。

30

【請求項 1 6】

前記疾患は、心不全、慢性心不全、急性心不全 (A H F)、心筋梗塞 (M I)、卒中、肝不全、熱傷、外傷、重症感染症 (微生物、ウイルス (たとえば A I D S)、寄生虫 (たとえばマラリア))、S I R S または敗血症、がん、急性腎障害 (A K I)、C N S 障害 (たとえば発作、神経変性疾患)、自己免疫疾患および血管疾患 (たとえば川崎症候群)、ならびに低血圧症を含む群から選択される、請求項 1 4 または 1 5 に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための D P P 3 活性阻害剤。

【請求項 1 7】

前記阻害剤は単一結合特異性 (m o n o - b i n d i n g) または少なくとも二重結合特異性 (t w o - b i n d i n g) の抗体である、請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための D P P 3 活性阻害剤。

40

【請求項 1 8】

前記阻害剤は、配列番号 1 に結合し特に配列番号 2 に結合する抗 D P P 3 抗体または抗 D P P 3 抗体断片、あるいは抗 D P P 3 非 I g 足場である、請求項 1 4 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための D P P 3 活性阻害剤。

【請求項 1 9】

前記阻害剤は D P P 3 に対し 10^{-7} M 以下の最低結合親和性を示す抗体または断片あ

50

るいは足場である、請求項 14 ~ 18 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための DPP3 活性阻害剤。

【請求項 20】

前記阻害剤は単一特異性の抗体または断片あるいは足場である、請求項 14 ~ 19 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための DPP3 活性阻害剤。

【請求項 21】

前記阻害剤は、全長 DPP3 に結合し DPP3 の活性を少なくとも 10 % または少なくとも 50 %、より好ましくは少なくとも 60 %、さらに好ましくは 70 % 超、さらに好ましくは 80 % 超、さらに好ましくは 90 % 超、さらに好ましくは 95 % 超、阻害する抗体または断片あるいは足場である、請求項 14 ~ 20 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための DPP3 活性阻害剤。

10

【請求項 22】

前記阻害剤は DPP3 に選択的かつ / または特異的であり、かつ細胞膜および / または血液脳関門を通過しない、請求項 14 ~ 21 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための DPP3 活性阻害剤。

【請求項 23】

20

前記被験者は、体液試料中に所定の閾値を超える DPP3 総量および / または活性 DPP3 の量を有する、請求項 14 ~ 22 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための DPP3 活性阻害剤。

【請求項 24】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための請求項 14 ~ 23 のいずれか一項に記載の DPP3 活性阻害剤を含む、医薬組成物。

【請求項 25】

アフエーシスと親和性クロマトグラフィーを含む、血漿から DPP3 を体外除去する方法における請求項 14 ~ 23 のいずれか一項に記載の DPP3 活性阻害剤の使用。

30

【請求項 26】

被験者の体液試料中の活性 DPP3 を定量する方法であって、
前記試料を全長 DPP3 に特異的に結合する捕捉結合剤に接触させる工程と、
前記捕捉結合剤に結合した DPP3 を分離する工程と、
前記分離済み DPP3 に DPP3 の基質を添加する工程と、
DPP3 の基質の転化率を測定し定量することにより前記活性 DPP3 を定量する工程とを含む方法。

【請求項 27】

前記捕捉結合剤は抗体、抗体断片、または非 IgG 足場の群から選択されてもよい、請求項 26 に記載の被験者の体液試料中の活性 DPP3 を定量する方法。

40

【請求項 28】

前記捕捉結合剤は抗体である、請求項 26 または 27 に記載の被験者の体液試料中の活性 DPP3 を定量する方法。

【請求項 29】

前記捕捉結合剤は表面に固定化される、請求項 26 ~ 28 のいずれか一項に記載の被験者の体液試料中の活性 DPP3 を定量する方法。

【請求項 30】

前記分離工程は、前記試料のうち前記捕捉結合剤に結合していない成分を捕捉済み DPP3 から除去する洗浄工程である、請求項 26 ~ 29 のいずれか一項に記載の被験者の体

50

液試料中の活性 D P P 3 を定量する方法。

【請求項 3 1】

D P P 3 基質の転化は、蛍光発生基質（たとえば A r g - A r g - β N A、A r g - A r g - A M C）の蛍光、発色基質の色変化、アミノルシフェリンに結合された基質（Pro mega Protease-Glo（商標）Assay）の発光、質量分析、H P L C / F P L C（逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー）、薄層クロマトグラフィー、キャピラリーゾーン電気泳動、ゲル電気泳動後に活性染色（固定された活性 D P P 3）またはウェスタンブロット（切断産物）を行うことを含む群から選択される方法で検出される、請求項 2 6 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する方法。

10

【請求項 3 2】

前記基質は、蛍光色素分子、発色団、またはアミノルシフェリンに結合されたジペプチドを含む群から選択されてもよく、前記ジペプチドは A r g - A r g である、請求項 2 6 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する方法。

【請求項 3 3】

前記試料は全血、血清、血漿を含む群から選択される血液試料である、請求項 2 6 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する方法。

【請求項 3 4】

被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する検定またはキットであって、全長 D P P 3 に特異的に結合する捕捉結合剤と、D P P 3 の基質を含む、検定またはキット。

20

【請求項 3 5】

前記捕捉結合剤は抗体、抗体断片、または非 I g G 足場の群から選択されてもよい、請求項 3 4 に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する検定またはキット。

【請求項 3 6】

前記捕捉結合剤は、D P P 3 活性を液相検定で 5 0 % 未満、好ましくは 4 0 % 未満、より好ましくは 3 0 % 未満阻害する、請求項 3 4 または 3 5 に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する検定またはキット。

【請求項 3 7】

前記捕捉結合剤に対する D P P 3 の結合領域は配列番号 1 のアミノ酸 3 1 6 ~ 6 6 9 の領域内にない、請求項 3 4 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する検定またはキット。

30

【請求項 3 8】

前記捕捉結合剤は抗体である、請求項 3 4 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する検定またはキット。

【請求項 3 9】

前記捕捉結合剤は表面に固定化される、請求項 3 4 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する検定またはキット。

【請求項 4 0】

前記基質は、アンギオテンシン I I、I I I、I V、L e u エンケファリン、M e t エンケファリン、エンドモルフィン 1 および 2、バロルフィン、 β -カゾモルフィン、ダイノルフィン、プロクトリン、A C T H、および M S H；ならびに蛍光色素分子、発色団、またはアミノルシフェリンに結合されたジペプチドを含む群から選択されてもよく、前記ジペプチドは A r g - A r g である、請求項 3 4 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する検定またはキット。

40

【請求項 4 1】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断または監視する方法における、請求項 2 6 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する方法の使用、または請求項

50

34～40のいずれか一項に記載の検定またはキットの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、体液試料中の活性DPP3を定量する方法、体液試料中の活性DPP3を定量する検定またはキット、壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法、および前記疾患を治療する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ジペプチジルペプチダーゼ3（ジペプチジルアミノペプチダーゼIII、ジペプチジルアリールアミダーゼIII、ジペプチジルペプチダーゼIII、エンケファリナーゼBまたは赤血球アンギオテンシナーゼとしても知られており、省略名はDPP3、DPPIII）は、エンケファリンやアンギオテンシンなどの生理活性ペプチドからジペプチドを除去するメタロペプチダーゼである。

10

【0003】

DPP3は1967年にEllisとNuenkeにより、精製ウシ脳下垂体前葉抽出物で最初に同定され、その活性が測定された。EC3.4.14.4として登録されているこの酵素は約83kDaの分子量を有し、原核生物および真核生物で高度に保存されている（Prajapati & Chauhan 2011）。そのヒト変異体のアミノ酸配列を配列番号1に示す。ジペプチジルペプチダーゼIIIは遍在的に発現される主に細胞質のペプチダーゼである。シグナル配列が存在しないにもかかわらず、膜での活性がいくつかの研究で報告されている（Lee & Snyder 1982）。

20

【0004】

DPP3はM49ペプチダーゼファミリーに属する亜鉛依存性エキソペプチダーゼであり、様々な組成の3、4個～10個のアミノ酸のオリゴペプチドに対して広い基質特異性を有し、プロリンの後を切断することもできる。DPP3は、その基質（アンギオテンシンII、III、IV；LeuエンケファリンおよびMetエンケファリン；エンドモルフィン1および2など）のN末端からジペプチドを加水分解することが知られている。メタロペプチダーゼであるDPP3はpH8.0～9.0で最適な活性を有し、 Co^{2+} および Mg^{2+} のような二価の金属イオンの添加によって活性化できる。DPP3の構造解析により、基質結合および加水分解に重要な以下のアミノ酸Glu316、Tyr318、Asp366、Asn391、Asn394、His568、Arg572、Arg577、Lys666、およびArg669と共に触媒モチーフHELLEGH（hDPP3、450～455）およびEECRAE（hDPP3、507～512）が明らかになった（Prajapati & Chauhan 2011およびKumar et al. 2016；番号はヒトDPP3の配列を示す（配列番号1を参照のこと））。基質結合および加水分解に関するすべての既知のアミノ酸または配列領域を考慮すると、ヒトDPP3の活性部位は、アミノ酸316～669の間の領域と定義できる。

30

【0005】

DPP3の活性は、様々な一般的なプロテアーゼ阻害剤（たとえば、PMSF、TPCK）、スルフヒドリル試薬（たとえば、pHMB、DTNB）、および金属キレート剤（EDTA、o-フェナントロリン）で非特異的に阻害できる（Abramic et al. 2000）。

40

【0006】

DPP3活性は様々な種類の化合物で特異的に阻害できる：内在性DPP3阻害物質はスピノルフィンというペプチドである。数種の合成スピノルフィン誘導体（たとえばチノルフィン）が生成されており、様々な程度でDPP3活性を阻害することが示されている（Yamamoto et al. 2000）。公開されている他のDPP3のペプチド阻害剤はプロピオキサチンAおよびB（US4804676）、ならびにプロピオキサチンA類似体（Inaoka et al. 1988）である。

【0007】

50

D P P 3 は、フルオスタチン類およびベンズイミダゾール誘導体などの小分子によっても阻害できる。フルオスタチン A および B はストレプトミセス属の種 (Streptomyces sp.) T A - 3 3 9 1 で産生される抗生物質で、毒性はなく、D P P 3 活性を強く阻害する。これまでに 2 0 種の様々なベンズイミダゾール誘導体が合成され公開されている (Agic et al. 2007 ; Rastija et al. 2015) が、そのうち 2 種類の化合物 1 ' および 4 ' が最も強い阻害効果を示す (Agic et al. 2007) 。 D P P 3 阻害剤の完全な一覧については表 2 を参照のこと。

【 0 0 0 8 】

細胞生理学における D P P 3 の正確な生物学的機能はわかっていないが、最近の知見は、タンパク質代謝だけでなく血圧制御、疼痛調節および炎症過程でも役割を果たすと示している (Prajapati & Chauhan 2011) 。 10

【 0 0 0 9 】

D P P 3 はいくつかの文献 (いずれも細胞内 D P P 3 について記載) で有望なバイオマーカーであることが示されている。卵巣および子宮内膜腫瘍のホモジネートで D P P 3 活性が上昇することが示されている。D P P 3 活性は、これらの腫瘍の重症度 / 悪性度とともにさらに増加する (Simaga et al. 1998, 2003) 。膠芽腫細胞株の免疫組織学検査およびウエスタンブロット分析も D P P 3 レベルの上昇を示した (Singh et al. 2014) 。

【 0 0 1 0 】

細胞内または膜 D P P 3 は、有望な動脈リスクマーカー (US2011008805) およびリウマチ様関節症のマーカーであることも提唱されている (US2006177886) 。特許出願 WO2005106486 は、細胞表面または細胞表面内に D P P 3 が遍在的に発現することから、D P P 3 の発現やあらゆる種類の疾患の診断マーカーとしての活性、ならびに治療剤としての D P P 3 について記載している。EP1498480 は、D P P 3 を含む加水分解酵素の潜在的な診断・治療用途について記載している。 20

【 0 0 1 1 】

D P P 3 はいくつかの生物活性ペプチドを切断できるため、有望なバイオマーカーとして提案されているだけでなく、有望な治療標的としても提案されている。D P P 3 の過剰発現は、神経芽腫細胞を酸化ストレスから保護する (Liu et al. 2007) 。インフルエンザ A ウイルスは、複製のために宿主の D P P 3 レベルを変える (細胞培養研究、Melopoulos et al. 2012) 。エンケファリンおよび / またはアンギオテンシンの分解酵素は一般に、D P P 3 も含め、疼痛、循環器疾患 (C V D) 、およびがんの治療の標的として、また、対応する阻害剤は疼痛、精神疾患、および C V D の有望な治療方法として、治療可能性をもつ (Khaket et al. 2012, Patel et al. 1993, Igic et al. 2007) 。 30

【 0 0 1 2 】

D P P 3 は細胞内タンパク質として知られているが、D P P 3 活性は数種の体液、すなわち胎盤後血清 (Shimamori et al. 1986) 、精漿 (Vanha-Perttula et al. 1988) 、および脳脊髄液 (C S F) (Aoyagi et al. 1993) で検出された。C S F では、アルツハイマー病患者で測定した D P P 3 活性レベルが上昇した (AD, Aoyagi et al. 1993) 。Wattiaux et al. (2007) は、細胞培養系の死細胞および / または瀕死細胞のマーカーとして細胞内 D P P 3 を放出することが提唱されている。壊死細胞からの D P P 3 の放出がマウスモデルの免疫応答に影響を及ぼすことも提唱されている (Gamreke lashvili et al. 2013) 。 40

【 発明の概要 】

【 0 0 1 3 】

本発明の目的は、体液試料中の活性 D P P 3 を特異的に定量する (すなわち、その活性 D P P 3 は定量されるが D P P 3 以外のアミノペプチダーゼは定量されない) 方法を提供することである。

本発明の目的は、それぞれの検定およびキットを提供することである。

【 0 0 1 4 】

本発明の別の目的は、壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法、および前記疾患を治療する方法を提供することである。

【0015】

本発明の対象は、被験者の体液試料中の活性DPP3を定量する方法であって、前記試料を全長DPP3に特異的に結合する捕捉結合剤に接触させる工程と、前記捕捉結合剤に結合したDPP3を分離する工程と、前記分離済みDPP3にDPP3の基質を添加する工程と、前記DPP3の基質の転化率を測定することによりDPP3活性を定量する工程とを含む方法である。

【0016】

本発明の特定の態様では、前記方法は酵素捕捉検定(ECA;たとえばUS5612186AおよびUS5601986Aを参照のこと)である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本明細書で指定する定義および特定の態様はすべて、本発明のすべての態様および目的に当てはまるものとする。なお、本発明の1つの側面または目的について詳細に説明された定義および特定の態様は、本発明の他の側面および目的についての定義および特定の態様でもあるものとする。たとえば、捕捉結合剤または特異的捕捉の定義は、本発明のすべての態様(たとえば、DPP3を定量する方法、検定およびキット、診断方法、治療方法)に当てはまる。本明細書では、そのような定義については繰り返さない場合がある。

【0018】

「全長DPP3に特異的に結合する」とは、前記捕捉結合剤がDPP3以外のタンパク質に結合しないことを意味する。また、「全長DPP3に特異的に結合する」とは、前記捕捉結合剤がDPP3以外のアミノペプチダーゼに結合しないことを意味する。

【0019】

全長DPP3に結合する結合剤は、配列番号1のタンパク質に結合する結合剤である。全長DPP3に結合する結合剤は、配列番号1に結合する結合剤である。

【0020】

特定の態様では、前記捕捉結合剤は、DPP3活性を液相検定で50%未満、好ましくは40%未満、好ましくは30%未満阻害する。液相検定は、DPP3による基質の切断が液相中で起こる検定である。

【0021】

液相検定での結合剤によるDPP3活性の阻害は、本発明によれば以下の方法で定量されてもよい。液相検定で、可能性のあるDPP3捕捉結合剤を組み換えDPP3または精製天然DPP3、ならびに特定のDPP3基質と共に保温する。ECA用の捕捉結合剤としては、最も阻害能の低いものを選択することが好ましい。捕捉結合剤は、50%未満、好ましくは40%未満、好ましくは30%未満、DPP3活性を阻害するべきである。可能性のある捕捉結合剤の阻害能を定量する特定の液相DPP3活性検定は実施例1に詳細に記載されており、以下の工程を含む。

・25ng/mlの組み換えGST-hDPP3を5μg/mlの各捕捉結合剤または緩衝液(対照)と共に[50mMのトリス-HCl(pH7.5)、100μMのZnCl₂]に溶解し、室温で1時間それぞれ保温する。

・蛍光発生基質Arg-Arg-βNA(20μl、2mM)を添加する。

・37℃で保温し、Twinkle LB 970マイクロプレート蛍光光度計(Berthold Technologies GmbH)で遊離βNAの生成を1時間監視し、340nmで励起し410nmで発光を測定することにより、βNAの蛍光を検出する。

・様々な試料の蛍光増加の傾き(相対蛍光単位(RFU)/分)を計算する。GST-hDPP3と緩衝液(対照)の場合の傾きを活性100%とする。可能性のある捕捉結合剤の阻害能は、前記捕捉結合剤と共に保温することによるGST-hDPP3活性の低下(%)で定義される。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

これに対し、固相検定は各結合事象が固相中で起こる検定である（実施例 4 および 5 を参照のこと）。

【 0 0 2 3 】

明確にするために言えば、活性 D P P 3 の定量方法は液相検定として実施されてもよいし固相検定として実施されてもよいが、D P P 3 活性の阻害は上記の手順に従って液相検定で定量されてもよい。

【 0 0 2 4 】

したがって、固相検定は本発明の一態様である。前記試料と全長 D P P 3 に特異的に結合する捕捉結合剤との接触は液相で起こってもよく（液相捕捉検定）、その後、分離工程は前記捕捉結合剤と D P P 3 の複合体の固定化を含んでもよい。あるいは、捕捉結合剤を表面に固定化してもよく、そうすれば（D P P 3 との捕捉結合剤の）結合事象は固相で起こる（固相捕捉検定）。

【 0 0 2 5 】

特定の一態様では、先に説明した液相検定で D P P 3 の完全な阻害を避け D P P 3 活性を 5 0 % 未満、好ましくは 4 0 % 未満、好ましくは 3 0 % 未満阻害するために、捕捉結合剤は D P P 3 を配列番号 1 のアミノ酸 3 1 6 ~ 6 6 9 の領域内にまたはその領域に結合させないことが好ましい。配列番号 1 のアミノ酸 3 1 6 ~ 6 6 9 の領域は、D P P 3 の活性中心および基質結合領域を含む（Prajapati & Chauhan 2011; Kumar et al. 2016）。

D P P 3 活性は D P P 3 に特異的な基質の切断産物を検出することによって測定できる。

【 0 0 2 6 】

既知のペプチドホルモン基質としては、アンギオテンシン I I、I I I、I V、Leu エンケファリン、Met エンケファリン、エンドモルフィン 1 および 2、バロルフィン（valorphin）、 β -カゾモルフィン、ダイノルフィン、プロクトリン、ACTH（副腎皮質刺激ホルモン）、および MSH（メラノサイト刺激ホルモン）が挙げられる（Abramic et al. 2000, Barsun et al. 2007, Dhanda et al. 2008）。上述のペプチドホルモンおよびタグのない他のオリゴペプチド（たとえば、Ala-Ala-Ala-Ala（Dhanda et al. 2008））の切断は、各切断産物の検出によって監視できる。検出方法としては、HPLC 分析（たとえば Lee & Snyder 1982）、質量分析（たとえば Abramic et al. 2000）、 ^1H -NMR 分析（たとえば Vandenberg et al., 1985）、キャピラリーゾーン電気泳動（CE；たとえば Barsun et al., 2007）、薄層クロマトグラフィー（たとえば Dhanda et al. 2008）、逆相クロマトグラフィー（たとえば Mazocco et al. 2006）などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 2 7 】

D P P 3 による蛍光発生基質の加水分解によって生じる蛍光の検出は、D P P 3 活性を監視する標準的な方法である。それらの基質は蛍光色素分子に結合された特定のジペプチド類またはトリペプチド類である（Arg-Arg、Ala-Ala、Ala-Arg、Ala-Phe、Asp-Arg、Gly-Ala、Gly-Arg、Gly-Phe、Leu-Ala、Leu-Gly、Lys-Ala、Phe-Arg、Suc-Ala-Ala-Phe）。蛍光色素分子としては、 β -ナフチルアミド（2-ナフチルアミド、 β NA、2NA）、4-メトキシ- β -ナフチルアミド（4-メトキシ-2-ナフチルアミド）、7-アミノ-4-メチルクマリン（AMC、MCA；Abramic et al. 2000, Ohkubo et al. 1999）などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらの蛍光発生基質の切断により、蛍光性の β -ナフチルアミドまたは 7-アミノ-4-メチルクマリンがそれぞれ遊離される。液相検定または ECA では、基質と D P P 3 をたとえば 96 ウェルプレートの形式で保温し、蛍光検出器で蛍光を測定する（Ellis & Nuenke 1967）。また、D P P 3 担持試料を固定化し、ゲルで電気泳動によって分離するこ

10

20

30

40

50

とができる。ゲルを蛍光発生基質（たとえば $\text{Arg} - \text{Arg} - \beta\text{NA}$ ）およびファストガーネット GBC で染色し、蛍光タンパク質バンドを蛍光リーダーで検出する（Ohkubo et al. 1999）。

【0028】

同じペプチド類（ $\text{Arg} - \text{Arg}$ 、 $\text{Ala} - \text{Ala}$ 、 $\text{Ala} - \text{Arg}$ 、 $\text{Ala} - \text{Phe}$ 、 $\text{Asp} - \text{Arg}$ 、 $\text{Gly} - \text{Ala}$ 、 $\text{Gly} - \text{Arg}$ 、 $\text{Gly} - \text{Phe}$ 、 $\text{Leu} - \text{Ala}$ 、 $\text{Leu} - \text{Gly}$ 、 $\text{Lys} - \text{Ala}$ 、 $\text{Phe} - \text{Arg}$ 、 $\text{Suc} - \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Phe}$ ）を p - ニトロアニリド二酢酸塩などの発色団に結合することもできる。発色基質の加水分解による色変化の検出を利用して DPP3 活性を監視できる。

【0029】

DPP3 活性の検出のための別の選択肢は、Protease-Glo（商標）Assay（Promega より市販）である。前記方法のこの態様では、DPP3 に特異的なジペプチドまたはトリペプチド（ $\text{Arg} - \text{Arg}$ 、 $\text{Ala} - \text{Ala}$ 、 $\text{Ala} - \text{Arg}$ 、 $\text{Ala} - \text{Phe}$ 、 $\text{Asp} - \text{Arg}$ 、 $\text{Gly} - \text{Ala}$ 、 $\text{Gly} - \text{Arg}$ 、 $\text{Gly} - \text{Phe}$ 、 $\text{Leu} - \text{Ala}$ 、 $\text{Leu} - \text{Gly}$ 、 $\text{Lys} - \text{Ala}$ 、 $\text{Phe} - \text{Arg}$ 、 $\text{Suc} - \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Phe}$ ）はアミノルシフェリンに結合されている。DPP3 によって切断されるとアミノルシフェリンは遊離され、結合したルシフェラーゼによる検出可能な発光を生じる反応のための基質として機能する。

【0030】

好ましい態様では、蛍光発生基質 $\text{Arg} - \text{Arg} - \beta\text{NA}$ を添加し蛍光をリアルタイムで監視することによって DPP3 活性を測定する。

【0031】

被験者の体液試料で DPP3 結合剤による阻害効果および / または DPP3 活性を定量する前記方法の特定の態様では、前記結合剤は、抗体、抗体断片、非 IgG 足場の群から選択されてもよい。

【0032】

本発明の抗体は、抗原に特異的に結合する免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコードされる 1 個以上のポリペプチドを含むタンパク質である。認識されている免疫グロブリン遺伝子としては、 κ 、 λ 、 α （IgA）、 γ （IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄）、 δ （IgD）、 ϵ （IgE）、および μ （IgM）定常領域遺伝子、ならびに種々の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。全長免疫グロブリン軽鎖は一般に約 25 kD すなわち 214 アミノ酸長である。全長免疫グロブリン重鎖は一般に約 50 kD すなわち 446 アミノ酸長である。軽鎖は NH₂ 末端の可変領域（約 110 アミノ酸長）遺伝子と COOH 末端の κ または λ 定常領域遺伝子によってコードされる。重鎖も同様に、可変領域（約 116 アミノ酸長）遺伝子とそれ以外の定常領域遺伝子の 1 つによってコードされる。

【0033】

抗体の基本的な構造単位は一般に、免疫グロブリン鎖の 2 つの同一の対からなり、各対はそれぞれ 1 本の軽鎖と 1 本の重鎖を有する四量体である。各対で軽鎖および重鎖の可変領域は抗原に結合し、定常領域はエフェクター機能を仲介する。免疫グロブリンは様々な他の形態（たとえば、Fv、Fab、および $(\text{Fab}')_2$ 、ならびに二機能性ハイブリッド抗体および単鎖など）でも存在する（たとえば、Lanzavecchia et al. 1987；Huston et al. 1988；Bird et al. 1988；Hood et al. 1984；Hunkapiller & Hood, 1986）。免疫グロブリンの軽鎖または重鎖の可変領域は、3 つの超可変領域（相補性決定領域（CDR）ともいう）で遮られたフレームワーク領域を含む（Kabat et al. 1983 を参照のこと）。上述のように、CDR は主に抗原のエピトープへの結合に関与する。免疫複合体は、抗原に特異的に結合した抗体（モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体、あるいは機能性抗体断片など）の抗体である。

【0034】

キメラ抗体は、異なる種に属する免疫グロブリン可変領域および定常領域遺伝子から一

10

20

30

40

50

般に遺伝子工学によって軽鎖および重鎖遺伝子が構築された抗体である。たとえば、マウスモノクローナル抗体由来の遺伝子の可変セグメントを κ 、 γ 1または γ 3などのヒトの定常セグメントに連結することができる。したがって、一例では、治療用キメラ抗体はマウス抗体由来の可変ドメインすなわち抗原結合ドメインとヒト抗体由来の定常ドメインすなわちエフェクタードメインからなるハイブリッドタンパク質であり（ただし他の哺乳動物種も使用できる）、あるいは可変領域を分子技術で作製することができる。キメラ抗体を作製する方法は当技術分野で周知である（たとえば米国特許第5,807,715号を参照のこと）。「ヒト化」免疫グロブリンは、ヒトのフレームワーク領域とヒト以外の（マウス、ラット、または合成の）免疫グロブリン由来の1つ以上のCDRを含む免疫グロブリンである。CDRを提供するヒト以外の免疫グロブリンを「ドナー」と呼び、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンを「アクセプター」と呼ぶ。一態様では、ヒト化免疫グロブリンのすべてのCDRはドナー免疫グロブリン由来である。定常領域は存在しなくてもよいが、存在する場合、それらはヒト免疫グロブリンの定常領域と実質的に同一でなければならない。したがって、ヒト化免疫グロブリンのすべての部分（おそらくCDRを除く）は天然ヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。「ヒト化抗体」は、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。ヒト化抗体は、CDRを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合する。ヒト化免疫グロブリンすなわち抗体のアクセプターフレームワークは、ドナーフレームワークから得られるアミノ酸による限られた数の置換を有していてもよい。ヒト化または他のモノクローナル抗体は、抗原結合または他の免疫グロブリン機能に実質的に影響を及ぼさないさらなる保存的アミノ酸置換を有することもできる。保存的置換の例としては、たとえばグリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、スレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシンが挙げられる。ヒト化免疫グロブリンは、遺伝子工学によって構築できる（たとえば米国特許第5,585,089号を参照のこと）。ヒト抗体は、軽鎖および重鎖遺伝子がヒトに由来する抗体である。ヒト抗体は当技術分野で公知の方法を用いて生成できる。ヒト抗体は、目的の抗体を分泌するヒトB細胞を不死化することによって作製できる。たとえば、EBV感染によって、またはヒトB細胞を骨髄腫細胞またはハイブリドーマ細胞と融合させてトリオーマ細胞を作製することによって不死化を達成できる。ヒト抗体は、ファージ提示法で作製されてもよく（たとえば、PCT公開公報第91/17271号、第92/001047号、第92/20791号を参照のこと；これらの文献を本明細書中に援用する）、あるいはヒト組み換えモノクローナル抗体ライブラリー（MorphoSysのウェブサイトを参照のこと）から選択されてもよい。ヒト免疫グロブリン遺伝子をもつ遺伝子導入動物を用いてヒト抗体を作製することもできる（たとえば、PCT公開公報第93/12227号および第91/10741号を参照のこと；これらの文献を本明細書中に援用する）。

【0035】

したがって、DPP3抗体は、当技術分野で公知の型を有していてもよい。例としては、ヒト抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、CDR移植抗体などがある。好ましい態様では、本発明による抗体は、たとえば典型的な全長免疫グロブリンであるIgGとして、または重鎖および/または軽鎖の少なくともFvドメインを含む抗体断片（たとえば化学結合された抗体（抗原結合断片））として、組み換えによって作製された抗体である。そのような抗体断片としては、Fab低分子化抗体（minibody）、単鎖Fab抗体、エピトプタグを有する一価のFab抗体（たとえばFab-V5Sx2）などのFab断片；CH3ドメインと二量体化された二価のFab（ミニ抗体）；たとえば異種のドメインを用いた多量体化によって（たとえばdHLXドメインの二量体化によって）作製された二価のFabまたは多価のFab（たとえばFab-dHLX-FSx2）；たとえばG以外のクラスに由来するF(ab')₂断片、scFv断片、多量体化された多価かつ/または多重特異性のscFv断片、二価かつ/または二重特異性の

二特異性抗体、BITE（登録商標）（二重特異性T細胞結合体（engager））、三機能性抗体、多価抗体；単ドメイン抗体（たとえば、ラクダまたは魚の免疫グロブリンに由来するナノ抗体（nanobody））；ならびに他の多くのものが挙げられる。

【0036】

抗DPP3抗体に加え、他の生体高分子足場が標的分子と複合することが当技術分野で周知であり、標的への特異性の高い生体高分子を作製するのに用いられている。例としては、アプタマー、シュピーゲルマー（spiegelmer）、アンチカリン類（anticalin）、およびコノトキシン類が挙げられる。

【0037】

非Ig足場は、タンパク質足場であってもよく、それらはリガンドまたは抗原に結合できるため、抗体模倣物として用いられてもよい。非Ig足場は、テトラネクチンに基づく非Ig足場（たとえば、US2010/0028995に記載）；フィブロネクチン足場（たとえば、EP1266025に記載）；リポカリンに基づく足場（たとえば、WO2011/154420に記載）；ユビキチン足場（たとえば、WO2011/073214に記載）、トランスフェリン足場（例えば、US2004/0023334に記載）、プロテインA足場（たとえば、EP2231860に記載）、アンキリン反復に基づく足場（たとえば、WO2010/060748に記載）、マイクロタンパク質（システインノットを形成するマイクロタンパク質が好ましい）足場（たとえば、EP2314308に記載）、Fyn SH3ドメインに基づく足場（たとえば、WO2011/023685に記載）、EGFR-Aドメインに基づく足場（たとえば、WO2005/040229に記載）、およびKunitzドメインに基づく足場（たとえば、EP1941867に記載）を含む群から選択されてもよい。非Ig足場は、ペプチドまたはオリゴヌクレオチドアプタマーであってもよい。アプタマーは通常、それら大規模なランダム配列プールから選択することによって作製され、オリゴヌクレオチド（DNA、RNA、またはXNA）の短鎖（Xu et al. 2010, Deng et al. 2014）またはタンパク質足場に結合された短い可変ペプチドドメインである（Li et al. 2011）。

【0038】

本発明の一態様では、本発明の抗DPP3抗体は以下のように作製されてもよい。

【0039】

組み換えDPP3（たとえばUSBio（米国、セイラム）のGST-hDPP3）、DPP3のアミノ酸配列の部分を含む（たとえばBSAに結合された）ペプチド、天然の精製DPP3（たとえばヒト赤血球由来のもの（Abramic et al. 1988））のいずれかでマウスを免疫化する。

【0040】

Balb/cマウスに、組み換えGST-hDPP3、天然精製hDPP3、またはDPP3ペプチド-BSA複合体を、0日目に100μg（TiterMax Gold Adjuvantで乳化）を、14日目に100μg（フロイント完全アジュバントで乳化）、21日目と28日目に50μg（フロイント不完全アジュバント中）、腹腔内（i.p.）注射した。49日目、動物にGST-hDPP3、天然精製hDPP3、またはDPP3ペプチド-BSA複合体50μg（生理食塩水に溶解）を静脈内（i.v.）注射した。3日後、マウスを殺し、免疫細胞融合を行った。

【0041】

免疫マウス由来の脾細胞と骨髓腫細胞株SP2/0の細胞を、50%ポリエチレングリコール1mlを用いて37℃で30秒かけて融合させた。洗浄後、細胞を96ウェル細胞培養プレートに播種した。HAT培地〔20%ウシ胎仔血清およびHAT-Supplementを補充したRPMI 1640培地〕で増殖させることによってハイブリッドクローンを選択した。1週間後、HAT培地をHT培地に替えて3回継代培養した後、通常の細胞培地に戻した。

【0042】

融合の2週間後、まずIgG抗体に結合する組換えDPP3について細胞培養液上清を

10

20

30

40

50

スクリーニングした。したがって、組換え GST タグ付き DPP3 (USBiologicals (米国、セイラム)) を 96 ウェルプレート (100 ng / ウェル) に固定化し、50 µl / ウェルの細胞培養液上清と共に室温で 2 時間保温した。プレートを洗浄した後、50 µl / ウェルの POD - ウサギ抗マウス IgG を添加し、室温で 1 時間保温した。次の洗浄工程の後、50 µl の色素原溶液 (3.7 mM の o - フェニレンジアミンを [クエン酸塩 / リン酸水素塩緩衝液、0.012 % の H₂O₂] に溶解した液) を各ウェルに添加し、室温で 15 分間保温し、4 N の硫酸 50 µl を添加することにより発色反応を停止した。490 nm で吸収を検出した。

【0043】

陽性の試験微生物培養液を増殖のために 24 ウェルプレートに移した。再試験の後、選

10

【0044】

GST タグ付きヒト DPP3 または DPP3 ペプチドに対する抗体を標準的な抗体作製方法 (Marx et al., 1997) で作製し、プロテイン A で精製した。抗体純度は、SDS

【0045】

以下の手順に従いファージ提示法で抗体を作製してもよい。

ヒトナীব抗体遺伝子ライブラリー HAL7 / 8 を DPP3 ペプチドに対する組換え単鎖 Fv ドメイン (scFv) の単離に使用した。2 種類の異なるスパーサーを介して DPP3 ペプチド配列にビオチンタグが連結されたペプチドの使用を含むパニング戦略で抗体遺伝子ライブラリーをスクリーニングした。非特異的に結合した抗原を用いるパニングラウンドとストレプトアビジンに結合した抗原を用いるパニングラウンドを混合することにより、非特異的結合剤のバックグラウンドを最小化した。3 回目のパニングで溶出されたファージを用いて大腸菌 (E. coli) 株を発現するモノクローナル scFv を作製する。これらのクローン株の培養で得た上清を抗原の酵素結合免疫吸着検定 (ELISA) 試験に直接使用する (Hust et al. 2011; Schutte et al. 2009 も参照のこと)。

20

【0046】

マウス抗体のヒト化は以下の手順で行われてもよい。

マウス由来の抗体をヒト化するには、フレームワーク領域 (FR) および相補性決定領域 (CDR) と抗原の構造的相互作用について抗体配列を解析する。構造モデリングに基づき、適切なヒト由来 FR を選択し、そのヒト FR にマウス CDR 配列を移植する。CDR または FR のアミノ酸配列に多様性を導入して、FR 配列に関する種の転換によって消失した構造的相互作用を回復させてもよい。この構造的相互作用の回復は、ファージ提示ライブラリーを用いたランダムな手法で達成されてもよく、分子モデリングによって導かれる直接的な手法 (Almagro & Fransson 2008) で達成されてもよい。

30

【0047】

別の態様では、DPP3 抗体の型は、Fv 断片、scFv 断片、Fab 断片、scFab 断片、F(ab)₂ 断片、および scFv - Fc 融合タンパク質を含む群から選択される。別の好ましい態様では、抗体の型は、scFab 断片、Fab 断片、scFv 断片、および生体利用度が最適化されたそれらの複合体 (PEG 化断片) を含む群から選択される。

40

【0048】

被験者の体液試料中の活性 DPP3 を定量する前記方法の特定の態様では、前記結合剤は抗体である。

【0049】

一態様では、DPP3 を検出かつ / または定量する捕捉または結合検定を実施してもよい。DPP3 タンパク質に反応するが液相検定でペプチダーゼ活性に対する阻害が 50 % より高くない (好ましくは 40 % 未満、好ましくは 30 % 未満である) 結合剤を固相に固定化してもよい。一態様では、DPP3 の阻害を防ぐため、捕捉結合剤は、DPP3 の配

50

列番号 1 のアミノ酸 3 1 6 ~ 6 6 9 の領域に結合しないことが好ましい。配列番号 1 のアミノ酸 3 1 6 ~ 6 6 9 の領域は D P P 3 の活性中心および基質結合領域を含む (Prajapati & Chauhan 2011 ; Kumar et al. 2016)。

【 0 0 5 0 】

被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する前記方法の特定の態様では、前記結合剤は、抗体、抗体断片、非 I g 足場、アプタマーの群から選択されてもよい。

【 0 0 5 1 】

被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する前記方法の特定の態様では、D P P 3 に反応する前記捕捉結合剤は固相に固定化される。

【 0 0 5 2 】

固定化された結合剤の上に試験試料を通液すると、D P P 3 は (存在する場合) 結合剤に結合し、それ自体が検出のために固定化される。次いで基質を添加してもよく、試験試料中の D P P 3 の存在または量を示す反応産物を検出してもよい。本明細書の目的では、「固相」という用語は、そこで検定を実施してもよい任意の材料または容器を包含するように使用されてもよく、多孔質材料、非多孔質材料、試験管、ウェル、スライド、アガロース樹脂 (たとえば、GE Healthcare Life Sciences の Sepharose)、磁性粒子 (たとえば、Thermo Fisher Scientific の Dynabeads (商標) または Pierce (商標) 磁気ビーズ) などが包含されるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 5 3 】

タンパク質またはペプチドに由来する結合剤 (たとえば、抗体、抗体断片、非 I g 足場) は、物理吸着 (たとえば、静電相互作用または疎水相互作用)、生体親和性による固定化 (たとえば、アビジン - ビオチン、プロテイン A / G / L、His タグ、Ni²⁺ - NTA、GST タグ、およびグルタチオン、DNA ハイブリダイゼーション、アプタマー)、共有結合 (たとえば、アミンおよび N - ヒドロキシスクシンイミド)、または前記固定化方法の組み合わせ (Kim & Herr 2013) を含む方法で固相に固定化される。オリゴヌクレオチド由来の結合剤 (たとえばアプタマー) は、(ストレプト) アビジン - ビオチン系の利用によって固相に固定化されてもよい (Muller et al. 2012, Deng et al. 2014)。

【 0 0 5 4 】

被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する前記方法の特定の態様では、前記分離工程は、試料のうち前記捕捉結合剤に結合していない成分を捕捉済み D P P 3 から除去する洗浄工程である。この分離工程は、前記捕捉結合剤に結合された D P P 3 を前記体液試料の成分から分離する任意の他の工程であってもよい。

【 0 0 5 5 】

被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する前記方法の特定の態様では、固定化された D P P 3 による前記 D P P 3 基質の転化は、蛍光発生基質 (たとえば Arg - Arg - βNA、Arg - Arg - AMC) の蛍光、発色基質の色変化、アミノルシフェリンに結合された基質 (Promega Protease-Glo (商標) Assay) の発光、質量分析、HPLC / FPLC (逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー)、薄層クロマトグラフィー、キャピラリーゾーン電気泳動、ゲル電気泳動後に活性染色 (固定された活性 D P P 3) またはウェスタンブロット (切断産物) を行うことを含む群から選択される方法で測定 (検出) される。

【 0 0 5 6 】

被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する前記方法の特定の態様では、前記基質は、アンギオテンシン II、III、IV、Leu エンケファリン、Met エンケファリン、エンドモルフィン 1 および 2、バロルフィン、β - カゾモルフィン、ダイノルフィン、プロクトリン、ACTH、および MSH ; ならびに蛍光色素分子、発色団、またはアミノルシフェリンに結合された (Promega Protease-Glo (商標) Assay) ジペプチド類またはトリペプチド類を含む群から選択されてもよい。D P P 3 によって切断されるジペプチド類またはトリペプチド類としては、Arg - Arg、Ala - Ala、Ala - A

10

20

30

40

50

r g、A l a - P h e、A s p - A r g、G l y - A l a、G l y - A r g、G l y - P h e、L e u - A l a、L e u - G l y、L y s - A l a、P h e - A r g、S u c - A l a - A l a - P h eなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。蛍光色素分子としては、 β -ナフチルアミド(2-ナフチルアミド、 β N A、2 N A)、4-メトキシ- β -ナフチルアミド(4-メトキシ-2-ナフチルアミド)、7-アミノ-4-メチルクマリン(A M C、M C A;Abramic et al. 2000, Ohkubo et al. 1999)などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらの蛍光発生基質の切断により、蛍光性の β -ナフチルアミドまたは7-アミノ-4-メチルクマリンがそれぞれ遊離される。発色団としてはp-ニトロアニリド二酢酸塩(p N A)が挙げられるが、これに限定されるものではない。発色基質のペプチド-p N A結合が加水分解されるとp N Aが遊離され、色変化が起こる。したがって、吸光度の変化(D A / 分)は酵素活性に正比例する。Protease-Glo(商標) Assay(Promega)を用いる場合、D P P 3によって切断されるとアミノルシフェリンは遊離され、結合したルシフェラーゼによる検出可能な発光を生じる反応のための基質として機能する。

【0057】

好ましい態様では、蛍光発生基質A r g - A r g - β N Aを添加し蛍光をリアルタイムで監視することによってD P P 3活性を測定する。被験者の体液試料中の活性D P P 3を定量する前記方法の特定の一態様では、前記試料は全血、血清、血漿、脳脊髄液、尿、唾液、痰、および胸水を含む群から選択される。

【0058】

被験者の体液試料中の活性D P P 3を定量する前記方法の特定の一態様では、前記試料は全血、血清、および血漿を含む群から選択される血液試料である。

【0059】

本発明の別の態様は、

被験者の体液試料中の活性D P P 3を定量する検定またはキットであって、
 全長D P P 3に特異的に結合する捕捉結合剤と、
 D P P 3の基質
 を含む、検定またはキットである。

このキットは検量用試料をさらに含んでもよい。

・検量用試料は、(天然、精製、または組み換え)D P P 3の濃度がわかっている試料であってよい。

・検量用試料は、遊離蛍光色素分子(たとえば2-ナフチルアミド)、遊離発色団(たとえばp-ニトロアニリド)または遊離ルシフェリンなどの切断産物自体であってもよい。

キットは、洗浄試薬をさらに含んでもよい。

・洗浄試薬は、任意の水性緩衝液(洗浄剤を含んでも含まなくてもよい)であってもよい。本明細書では、発明者らは8 m Mのトリス-H C l (p H 7 . 5)、6 0 m MのN a C l、0 . 0 2 %のT w e e n 2 0を用いた。

特定の態様では、前記検定は酵素捕捉検定(E C A)(たとえばUS5612186A、US5601986A)である。

【0060】

特定の態様では、全長D P P 3に結合する前記捕捉結合剤は液相検定でD P P 3活性を5 0 %未満、好ましくは4 0 %未満、より好ましくは3 0 %未満、特異的に阻害する。液相検定の定義については上記を参照のこと。特定の一態様では、D P P 3の阻害を防ぐため、捕捉結合剤は、D P P 3の活性中心および基質結合領域(配列番号1のアミノ酸3 1 6 ~ 6 6 9)周辺の領域に結合するべきではない。

【0061】

被験者の体液試料中の活性D P P 3を定量する前記検定またはキットの特定の態様では、前記結合剤は抗体、抗体断片、非I g G足場の群から選択されてもよい。

【0062】

被験者の体液試料中の活性D P P 3を定量する前記検定またはキットの特定の態様では

、前記結合剤は抗体である。

【0063】

「抗体」という用語は一般に、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、ならびにそれらの結合性断片（特にFc断片やいわゆる「単鎖抗体」（Bird et al. 1988））、キメラ抗体、ヒト化抗体（特にCDR移植抗体）、二重または四重特異性抗体（Holliger et al. 1993）を包含する。たとえばファージ提示法などの技術によって選択される、試料に含まれる目的の分子に特異的に結合する免疫グロブリン様タンパク質も包含される。これに関連し、「特異的結合」という用語は、目的の分子またはその断片に対する抗体を指す。抗体は、目的の分子またはその前記断片に対する親和性とその目的分子を含有する試料に含まれている他の分子に対する親和性の好ましくは少なくとも50倍、より好ましくは100倍、最も好ましくは少なくとも1000倍である場合に特異的であると考えられる。抗体を作製する方法および所与の特異性を有する抗体を選択する方法は当技術分野で周知である。

10

【0064】

被験者の体液試料中の活性DPP3を定量する前記検定またはキットの特定の態様では、前記捕捉結合剤は表面に固定化される。

【0065】

被験者の体液試料中の活性DPP3を定量する前記検定またはキットの特定の態様では、前記基質は、アンギオテンシンII、III、IV、Leuエンケファリン、Metエンケファリン、エンドモルフィン1および2、バロルフィン、β-カゾモルフィン、ダイノルフィン、プロクトリン、ACTH、およびMSH；ならびに蛍光色素分子、発色団、またはアミノルシフェリンに結合された（Promega Protease-Glo（商標）Assay）ジペプチド類またはトリペプチド類を含む群から選択されてもよい。DPP3によって切断されるジペプチド類またはトリペプチド類としては、Arg-Arg、Ala-Ala、Ala-Arg、Ala-Phe、Asp-Arg、Gly-Ala、Gly-Arg、Gly-Phe、Leu-Ala、Leu-Gly、Lys-Ala、Phe-Arg、Suc-Ala-Ala-Pheなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。蛍光色素分子としては、β-ナフチルアミド（2-ナフチルアミド、βNA、2NA）、4-メトキシ-β-ナフチルアミド（4-メトキシ-2-ナフチルアミド）、7-アミノ-4-メチルクマリン（AMC、MCA；Abramic et al. 2000, Ohkubo et al. 1999）などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらの蛍光発生基質の切断により、蛍光性のβ-ナフチルアミドまたは7-アミノ-4-メチルクマリンがそれぞれ遊離される。発色団としてはp-ニトロアニリド二酢酸塩（pNA）が挙げられるが、これに限定されるものではない。発色基質のペプチド-pNA結合が加水分解されるとpNAが遊離され、色変化が起こる。したがって、吸光度の変化（DA/分）は酵素活性に正比例する。Protease-Glo（商標）Assay（Promega）を用いる場合、DPP3によって切断されるとアミノルシフェリンは遊離され、結合したルシフェラーゼによる検出可能な発光を生じる反応のための基質として機能する。

20

30

【0066】

好ましい態様では、蛍光発生基質Arg-Arg-βNAを添加し蛍光をリアルタイムで監視することによってDPP3活性を測定する。

40

【0067】

被験者の体液試料中の活性DPP3を定量する前記検定またはキットの特定の態様では、前記検量用試料は、A）組み換えDPP3（たとえばUSBio社のGST-hDPP3）、精製天然DPP3（たとえばヒトの赤血球に由来のもの（Abramic et al. 1988））、およびDPP3断片（天然、合成、または組み換え）；ならびにB）切断産物自体、すなわち蛍光、色変化、および生物発光シグナルを定量するための遊離蛍光色素分子（たとえば2-ナフチルアミド）、遊離発色団（たとえばp-ニトロアニリド）、または遊離ルシフェリンを含む群から選択される。

【0068】

50

D P P 3 を診断用バイオマーカーとして使用する本発明の一態様は、たとえば放射性免疫測定法 (R I A)、化学発光免疫測定法および蛍光免疫測定法、酵素結合免疫測定法 (E L I S A)、Luminexを利用したビーズアレイ、タンパク質マイクロアレイ測定法などの様々な形式の免疫測定法と、たとえば免疫クロマトグラフィーストリップ試験などの迅速試験形式を包含する。

【 0 0 6 9 】

検定は、均一測定法または不均一測定法であってもよく、競合型測定法および非競合サンドイッチ測定法であってもよい。特に好ましい態様では、本発明の2種類の抗体を用いる場合、検定はサンドイッチ測定法 (非競合型免疫測定法) の形態であり、ここで検出かつ / または定量される D P P 3 またはその断片は第1の抗体および第2の抗体に結合される。第1の抗体は、固相 (たとえば、ビーズ、ウェルまたは他の容器の表面、チップまたはストリップ) に結合されてもよく、第2の抗体は、たとえば色素、放射性同位体、あるいは反応性部分または触媒活性部分で標識された抗体である。次いで、分析物に結合した標識抗体の量を適切な方法で測定する。「サンドイッチ測定法」に関する一般的な組成や手順は、十分に確立されており、当業者に公知である (The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, 2005 ; Hultschig et al. 2006)。

10

【 0 0 7 0 】

特に好ましい態様では、検定は反応混合液を含み、第1の標識成分は第1の抗体に結合されており、前記第1の標識成分は蛍光消光または化学発光消光あるいは増幅に基づく標識系の一部であり、前記標識系の第2の標識成分は第2の抗体に結合されており、したがって両抗体が分析物に結合すると測定可能な信号が生成され、それによって試料を含む溶液中で形成されたサンドイッチ複合体を検出できる。

20

【 0 0 7 1 】

本発明に関して、蛍光を利用する検定は色素の使用を含む。色素は、たとえば、FAM (5 - または 6 - カルボキシフルオレセイン)、VIC、NED、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート (F I T C)、IRD-700/800、シアニン色素 (CY3、CY5、CY3.5、CY5.5、Cy7 など)、キサンテン、6 - カルボキシ - 2 ' , 4 ' , 7 ' , 4 , 7 - ヘキサクロロフルオレセイン (HEX)、TET、6 - カルボキシ - 4 ' , 5 ' - ジクロロ - 2 ' , 7 ' - ジメトキシフルオレセイン (JOE)、N , N , N ' , N ' - テトラメチル - 6 - カルボキシローダミン (TAMRA)、6 - カルボキシ - X - ローダミン (ROX)、5 - カルボキシローダミン - 6 G (R6G5)、6 - カルボキシローダミン - 6 G (RG6)、ローダミン、Rhodamine Green、Rhodamine Red、Rhodamine 110、BODIPY 色素類 (BODIPY TMR など)、Oregon Green、クマリン類 (ウンベリフェロン)、ベンズイミド類 (Hoechst 33258) ; フェナントリジン類 (Texas Red など)、Yakima Yellow、Alexa Fluor、P E T、臭化エチジウム、アクリジニウム色素類、カルバゾール色素類、フェノキサジン色素類、ポルフィリン色素類、ポリメチン色素類などを含む群から選択されてもよい。

30

【 0 0 7 2 】

本発明に関して、化学発光を利用する検定は色素の使用を含む。このことは Kirk-Othmer, Encyclopedia of chemical technology, 4th ed., executive editor, J. I. Kroschwitz; editor, M. Howe-Grant, John Wiley & Sons, 1993, vol. 15, p. 518-562 (この文献の内容を本明細書に援用する) 化学発光材料について記載されている物理的原理 (551 ~ 562 頁の引用を含む) に基づいている。好ましい化学発光色素はアクリジニウムエステル類である。

40

【 0 0 7 3 】

本発明の一態様は D P P 3 に関する化学的検定を含む。この検定は、D P P 3 と反応して検出可能な反応産物を生成する酵素基質を用いる。あるいは、基質の反応速度を監視して試料中の D P P 3 の有無または量を決定することができる。適切な酵素基質としては、A r g - A r g - β N A または A r g - A r g - A M C などのジペプチド基質が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

50

【 0 0 7 4 】

このような試薬および反応を具体化する検定は、任意の適切な反応容器（たとえば、試験管またはマイクロタイタープレートのウェル）で実施できる。あるいは、尿試験紙や試験紙の器具形式など、当業者に周知であり、かつ製造・使用が容易な使い捨て式の形態で検定器具を開発してもよい。このような使い捨て式の検定器具は、必要な材料、試薬、および使用説明書をすべて含むキットの形態で梱包されていてもよい。

【 0 0 7 5 】

本発明の検定器具は尿試験紙または試験紙の器具形式であることが有利な場合がある。たとえば、尿試験紙はD P P 3に対する発色基質を含む吸水性材料の小片でできていてもよい。あるいは、尿試験紙は基質が塗布された非多孔質材料でできていてもよい。器具を所望の試験試料に接触させると、基質と試料中に存在するすべてのD P P 3とが相互作用し、器具上で検出可能な反応を生じる。

10

【 0 0 7 6 】

別の態様では、器具は、吸水性材料の小片の長さに沿った1つ以上の領域に基質が含まれている試験紙であってもよい。小片の一方の端を所望の試験試料に接触させると、液体試料は吸水性材料に沿って移動する。基質の反応および検出可能なシグナルの発生は、試験試料中にD P P 3が存在することを示す。複数の領域をもつ器具で、小片の長さに沿った別々の（すなわち独立した）検出可能なシグナルを生成する領域の数が試験試料中に存在するD P P 3の量を示してもよい。あるいは、試験紙の大部分が基質を含んでいてもよい。このような一つの長い基質領域をもつ試験紙で発色した反応の長さを用いて試験試料中のD P P 3の有無または量を示してもよい。

20

【 0 0 7 7 】

別の検定の態様では、反応が起こる速度を試験試料中に存在するD P P 3の量の指標として検出してもよい。たとえば、基質が反応する速度を用いて試験試料中に存在するD P P 3の量を示してもよい。あるいは、反応産物が生成される速度を用いて試験試料中に存在するD P P 3の量を示してもよい。

【 0 0 7 8 】

さらに別の態様では、プロテアーゼを検出かつ/定量するために捕捉または結合検定を実施してもよい。たとえば、D P P 3タンパク質と反応するがペプチダーゼ活性に干渉しない抗体を固相に固定化してもよい。固定化された抗体の上に試験試料を通液すると、D P P 3は（存在する場合）抗体に結合し、それ自体が検出のために固定化される。次いで基質を添加してもよく、試験試料中のD P P 3の存在または量を示す反応産物を検出してもよい。本明細書の目的では、「固相」という用語は、そこで検定を実施してもよい任意の材料または容器を包含するように使用されてもよく、多孔質材料、非多孔質材料、試験管、ウェル、スライドなどが包含されるが、これらに限定されるものではない。

30

【 0 0 7 9 】

別の特定の態様では、D P P 3のE C Aを試験紙による検定として実施してもよい。例示的な試験紙型器具では、任意選択で試験試料塗布パッドが多孔質の小片の一端に取り付けられる。この小片は、D P P 3に結合することによってその後の検出のために所定の部位にD P P 3を固定する固定化抗体を含有する。任意選択的に、器具は、試験紙のうち試験試料接触部位から離れた遠位端に位置する検定指示薬の端部を含んでいてもよい。検定用指示薬の端部は、試験試料または検定用試薬と接触すると検出可能なシグナルを生成することによって検定が完了したことを示す。

40

【 0 0 8 0 】

試験試料塗布パッドは多孔質小片自体の一部分であってもよいし、流体流と多孔質小片の端部（近位端と呼ぶ）の接触部分にある、試験試料が塗布パッドから多孔質小片へ通過または移動できるような材料であってもよい。流体流の接触は、塗布パッドと多孔質小片が物理的に接触している場合だけでなく、塗布パッドと多孔質小片との間に流体が流れることができる介在スペースまたは追加の材料によって塗布パッドが多孔質小片から分離されている場合も含むことができる。実質的に塗布パッド全体が多孔質小片と重なることに

50

よって試験試料が塗布パッドの実質的にどの部分からも多孔質小片の近位端へ通過できるようにすることができる。あるいは、塗布パッドの一部分のみが流体流と多孔質小片との接触部にあってもよい。塗布パッドは、試験試料を多孔質小片に移動できる任意の材料であってよい。

【0081】

検定器具の多孔質小片は、毛管作用すなわち吸い上げ作用によって分析物を含有する試験試料を輸送できる任意の適切な吸収性材料、多孔質材料、吸水性材料、クロマトグラフィー材料、または毛管を有する材料であってよい。天然材料、合成材料、または天然に存在する材料を合成によって改変したものを多孔質小片として使用できる。材料の例としては、紙、セルロース、セルロース誘導体（酢酸セルロースおよびニトロセルロースなど）などのセルロース材料；ガラス繊維；天然布（綿）および合成布（ナイロン）；シリカゲル、アガロース、デキストラン、ゼラチンなどの多孔質ゲル；多孔質繊維基材；架橋デキストラン鎖などのデンプン系材料；セラミック材料；ポリ塩化ビニルやポリ塩化ビニルとシリカの組み合わせでできたフィルムなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。多孔質小片は、検出可能なシグナルの発生に干渉してはならない。多孔質小片は妥当な固有強度を有するべきであり、あるいは補助的な支持体によって強度を与えることができる。

10

【0082】

多孔質小片の具体的な寸法は、関連する試験試料のサイズ、検定のプロトコル、シグナルの検出および測定の手段などに応じて、都合に合わせて選択できる。たとえば、流体移動の速度や多孔質小片によって吸収される試験試料の量を調節するために寸法を選択してもよい。

20

【0083】

可能性のある1つの本発明の試験紙型器具では、DPP3基質および/またはDPP3捕捉抗体を多孔質小片に固定化して少なくとも1つの分析物検出部位（すなわち、多孔質小片のその領域は非拡散的に付着した1種以上の検定試薬を有する）を形成してもよい。別の器具の態様では、試験紙の測定または検出領域はDPP3基質および/または固定化された抗DPP3抗体を含有する複数の部位を含んでもよい。必要に応じて、異なる検出部位は異なる量の基質および/または固定化された抗DPP3抗体を含有していてもよい（すなわち、第1の検出部位では量がより多く、続く部位では量がより少ない）。たとえば、20ナノグラムの抗体が1nmol/分/ml相当のDPP3を捕捉した場合、検出器具の第1の検出部位は50ナノグラムの抗DPP3抗体を含み、続く部位は10ナノグラム、20ナノグラム、30ナノグラムなどの抗体を含んでいると考えられる。試験試料を添加したときに検出可能なシグナルを表示する部位の数は、試料中に存在するDPP3の量の定量的指標となる。検出部位は任意の適切に検出可能な形状で構成されていてもよく、一般的には試験紙の幅にわたる棒の形状である。

30

【0084】

必要に応じて、複数の捕捉部位をもつ器具は、閾値量のDPP3が試験試料中に存在しない場合、実質的にすべてのDPP3が第1の捕捉部位の抗体に結合することによってその部位に固定化されるように作製されてもよい。閾値量を超える量のDPP3が試験試料中に存在する場合、残りのDPP3は試験紙の長さに沿って後続の固定化抗体の検出領域に結合する。試験試料中のDPP3の量が多いほど、DPP3の存在によって検出可能なシグナルを示す捕捉部位の数は多くなる。当業者には理解されていることだが、個々の部位の基質の量が定量的または半定量的な検定結果をもたらすように設計された複数のDPP3基質部位を含む器具を製造することもできる。

40

【0085】

本発明の別の重要な態様は、壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法であって、前記被験者の体液試料中のDPP3総量を定量するか活性DPP3の量を定量することと

50

定量された前記量を所定の閾値と比較することと
を含み、

定量された前記量が前記所定の閾値を超える場合、前記被験者は壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する疾患または状態を有すると診断される、方法である。

【0086】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する前記方法の特定の態様では、前記 DPP3 総量または活性 DPP3 の量は濃度の単位で定量される。

【0087】

DPP3 総量または活性 DPP3 の量を定量する方法は当業者に公知である。壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する本発明の方法に関して、最新の方法および検定を用いてもよいし、上記の DPP3 を定量する方法および検定を用いてもよい。

【0088】

閾値は、健常対照の DPP3 濃度および / または DPP3 活性を測定し、たとえば対応する 75 パーセンタイル、より好ましくは 90 パーセンタイル、さらに好ましくは 95 パーセンタイルを計算することによってあらかじめ設定される。75 パーセンタイル、より好ましくは 90 パーセンタイル、さらに好ましくは 95 パーセンタイルの高い方の境界は、健常者と疾患患者の間の閾値を定める。前記パーセンタイルに関して、健常者と疾患患者を分ける閾値は、サンドイッチ型抗 DPP3 免疫測定（実施例 3 参照）を用いた場合に血漿中 5 ~ 25 ng / ml、より好ましくは 7 ~ 20 ng / ml、より好ましくは 8 ~ 18 ng / ml、最も好ましくは 10 ~ 15 ng / ml であってもよい。血漿中の DPP3 に特異的な酵素捕捉活性検定では、健常者と疾患患者を分ける閾値は、0.5 ~ 2 nmol (βNA) min⁻¹ ml⁻¹、より好ましくは 0.7 ~ 1.8 nmol (βNA) min⁻¹ ml⁻¹、より好ましくは 0.8 ~ 1.5 nmol (βNA) min⁻¹ ml⁻¹、最も好ましくは 1.0 ~ 1.3 nmol (βNA) min⁻¹ ml⁻¹（実施例 5 参照）であってもよい。

【0089】

当業者は過去に実施された研究から閾値を決定する方法を知っている。当業者は、特定の閾値は後に通常に使用できる所定の閾値を計算するのに用いられたコホートに依存する可能性があることをわかっている。当業者は、特定の閾値は検定に用いられた較正に依存する可能性があることをわかっている。当業者は、特定の閾値は、実施者にとって許容できると考えられる感度および / または特異度に依存する可能性があることをわかっている。

【0090】

診断検査の感度および特異度は、検査の分析上の「性質」だけでなく、異常な結果を構成するものの定義にも依存する。実際、受信者動作特性曲線（ROC 曲線）は、一般に、「正常」（すなわち健康だと思われる）集団および「疾患」（すなわち感染症に罹患している患者）集団において変数の値を相対的頻度に対してプロットすることによって計算される。対処すべき特定の診断上の問題に応じて、基準群は必ずしも「正常」である必要はなく、別の疾患または状態に罹患した患者群であってもよく、基準群は目的の患者群とは区別される。いずれの特定のマーカーについても、疾患を有する被験者と疾患がない被験者でマーカーのレベルの分布が重複する可能性が高い。そのような条件下では、試験によって正常と疾患が 100% の精度で絶対的に区別されることはなく、重複領域は、試験によって正常を疾患と区別することができない領域を示す。閾値を選択し、その値を超えた場合（あるいは、マーカーが疾患と共にどのように変化するかによっては、その値未満である場合）試験を異常であると見なし、その値未満であれば試験を正常であると見なす。ROC 曲線の下面積は、認識された測定値によって状態を正しく識別できる確率の 1 つの尺度である。ROC 曲線は、検査結果から必ずしも正確な数値が得られない場合にも使用できる。結果をランク付けできる限り、ROC 曲線を作成することができる。たとえば

、「疾患」の試料での検査結果を程度に従ってランク付けしてもよい（たとえば、1 = 低い、2 = 正常、3 = 高い）。このランク付けを「正常」集団での結果と相関させることができ、ROC 曲線が作成される。これらの方法は当業者には周知である（たとえば Hartley et al, 1982 を参照のこと）。閾値は、ROC 曲線の面積が約 0.5 よりも大きく、より好ましくは約 0.7 より大きくなるように選択されるのが好ましい。この文脈では、「約」という用語は所与の測定値の $\pm 5\%$ を意味する。

【0091】

過去の研究コホートを用い、上記のすべての点を考慮して閾値が決定されると、医師は本発明による疾患を診断する方法に所定の閾値を使用し、適切な診断を行うために、被験者が前記所定の閾値よりも高い値を有するか低い値を有するかを決定する。

10

【0092】

組織ホモジネートおよび体液中の DPP3 濃度は、いくつかの（たとえば LifeSpan BioSciences より）市販の DPP3 ELISA キットを用いて測定することができる。これらの検定はいずれもサンドイッチ型検定の原理に基づいており、研究目的でのみ使用される。

【0093】

DPP3 レベルを測定する標準的な手順は、液相検定 (Ellis & Nuenke 1967) で蛍光発生基質（たとえば Arg-Arg- β -ナフチルアミド）を用いて DPP3 活性を定量することである。（たとえば BPS Bioscience より）市販のキットは、通常、結合性の低い黒色マイクロタイタープレートと、組換え DPP3 と、蛍光発生基質と、それぞれの緩衝液とを含有する。これらのキットは、DPP3 基質および阻害剤のスクリーニング検定として通常使用されている。

20

【0094】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する前記方法の特定の態様では、前記試料は全血、血清、および血漿を含む群から選択される。本発明の方法に関して、体液は、血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿、唾液、痰、および胸水の群から選択されてもよい。

【0095】

壊死性の経過は、本明細書では、細胞死と細胞質から細胞外空間および/または体液への DPP3 放出をもたらす体内のすべての経過によって定義される。これらの経過としては、壊死、アポトーシス、ネクロトーシス、エリプトトーシスが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

【0096】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する前記方法の特定の態様では、前記疾患は、心不全、慢性心不全、急性心不全 (AHF)、心筋梗塞 (MI)、卒中、肝不全、熱傷、外傷、重症感染症（微生物、ウイルス（たとえば AIDS）、寄生虫（たとえばマラリア））、SIRS または敗血症、がん、急性腎障害 (AKI)、中枢神経系 (CNS) 障害（たとえば発作、神経変性疾患）、自己免疫疾患、血管疾患（たとえば川崎症候群）、ならびに低血圧症を含む群から選択される。表 1 は、壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する臨床症状/疾患と各壊死性の事象の一覧である。

40

【0097】

別の態様では、前記疾患は、急性心不全 (AHF)、心筋梗塞 (MI)、肝不全、熱傷、重症感染症（微生物、ウイルス（たとえば AIDS）、寄生虫（たとえばマラリア））、SIRS または敗血症、がん、ならびに急性腎障害 (AKI) を含む群から選択される。

一態様では、前記疾患は低血圧症である。

【表 1】

臨床症状/疾患	壊死性/アポトーシス性の事象	参照文献
急性心不全	細胞/組織領域/器官の突然死	Fischer et al. 2005, Zong et al. 2006
心筋梗塞		
卒中		
肝不全/肝障害		
腎不全/腎障害		
熱傷		
外傷（例：外傷性脳障害）； 多発外傷		Lanier et al. 2011 Raghupathi 2004
ウイルス+微生物+ 寄生虫感染症	マクロファージの死、宿主細胞の溶解など	Zong et al. 2006； Fink et al. 2005
AIDS	進行性の免疫細胞死	Fischer et al. 2005
敗血症	免疫反応による壊死/免疫細胞のアポトーシス	Pinheiro da Silva et al. 2009
マラリア	宿主の赤血球の溶解（エリプトーシス）	Lang et al. 2015
神経変性疾患（例：AD、ハンチントン病）	ゆっくりと進行する神経細胞死	Fischer et al. 2005
他のCNS障害（例：発作）	興奮毒性細胞死	Zong et al. 2006
がん	炎症の増加	Wallach et al. 2014
自己免疫疾患		
川崎病	炎症の増加、小血管の壊死	Dimitrades et al. 2014

表 1:壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する疾患

【0098】

アポトーシスは、多細胞生物に起こり得るプログラム細胞死（PCD）の過程である。生化学的事象によって特徴的な細胞変化（形態学）および細胞死が起こる。これらの変化には、小胞形成、細胞収縮、核断片化、クロマチン凝縮、および染色体DNAの断片化が含まれる。概説についてはElmore 2007. Toxicol Pathol 35(4): 495-516を参照のこと。

【0099】

壊死は細胞傷害の一形態であり、自己分解によって生存組織の細胞の早期死をもたらす（Vanlangenakker et al. 2008. Current Molecular Medicine 8(3): 207-220）。壊死は、細胞成分の無秩序な消化をもたらす細胞外または組織外の因子（感染、毒素、または外傷など）によって引き起こされる。

【0100】

アポトーシスは生物に有益な作用をもたらすことが多いが、壊死はほぼ常に有害であり、致命的となる可能性がある。

【0101】

壊死による細胞死はアポトーシスシグナル伝達経路には従わず、様々な受容体が活性化され、その結果、細胞膜の完全性は損なわれ、細胞死による生成物が制御不能に細胞外空間へ放出されることになる。すると周辺組織で炎症反応が開始し、近くの貪食細胞が死細胞を見つけて貪食によって排除するのを妨げる。このため、外科的に壊死組織を除去する必要がある場合が多く、この手順は壊死組織切除術として知られている。壊死を処置しな

いと、細胞死の部位またはその近傍に死んだ組織および細胞破片が腐敗し蓄積する。

【0102】

プログラムされた壊死の形態（ネクローシスという）はプログラム細胞死の別の形態として認識されている。ネクローシスは、アポトーシスシグナル伝達がウイルスまたは突然変異などの内因性または外因性の因子によって阻止された場合、アポトーシスの補助となる細胞死として作用する場合がある（Linkermann et al. 2014. NEJM 370(5): 455-465）。最近、ネクローシスおよびアポトーシスといくつかのシグナル伝達事象が共通している他の種類の制御された壊死も発見されている（Vanden Berghe et al. 2014. Nature Reviews 15 (135-147)。

【0103】

心不全（HF）は、心臓の構造または機能の問題によって身体に必要な十分な血流を供給する能力が損なわれたときに発生する心臓の状態である。心不全は多様な症状を引き起こす可能性があり、特に、安静時または運動中の息切れ（SOB）、体液停留の徴候（肺うっ血、くるぶし腫脹など）、安静時の心臓の構造または機能の異常の客観的証拠がある。

【0104】

心不全は、心機能障害によって引き起こされる一連の症状および徴候を特徴とする臨床的症候群である。先進国では罹病と死亡の主要な原因の1つであり、有病率は1～2%である。心不全は慢性HFと急性HFに分類できる。慢性HF患者は、安定な慢性HF、徴候や症状が悪化しつつある慢性HF、急性代償不全の慢性HFに分類できる。急性心不全（AHF）は、緊急の治療または入院を必要とする急速な心不全の徴候および症状の発症と定義されている。AHFは、新規急性HF（過去に心機能不全のなかった患者にAHFが新たに発症すること）または慢性HFの急性代償不全として現れる可能性がある。AHFは65歳を超える成人の入院の主な原因である。主にこの数十年の治療の進歩に関連して慢性心不全患者の予後は顕著に改善したが、患者が非代償性の心不全で入院すると短期的にも長期的にも転帰は非常に悪いままである。AHFの入院患者のほぼ25%は退院後30日以内に再入院が必要であり、入院後5年よりも長く生存するのは50%未満である。罹患した患者の生存期間や生活の質を著しく低下させるだけでなく、AHFによる医療制度に関する金銭的負担は非常に大きい。心不全治療の総費用は2012年には米国だけで310億ドルと推定されており、この費用の大半は入院中の治療に関連している。人口の高齢化により、この費用は2030年には前例のない700億ドルに増加すると予測されている。

【0105】

心不全は左室駆出率（LVEF）が正常な（一般に50%以上と考えられる）、EFが保持されたHF（HFpEF）ともいわれる患者から、LVEFが低下している（一般に40%未満と考えられる）、EFが低下したHF（HFrEF）ともいわれる患者まで、広範囲の患者を含む。LVEFが40～49%の範囲の患者は「灰色領域」であり、EFが中程度のHF（HFmrEF）と定義される（Ponikowski et al. 2016. European Heart Journal 18(8): 891-975）。

心不全は急性または慢性心不全として起こる可能性がある。

【0106】

「急性」という用語は急速な発症を意味し、悪化した、または非代償性の心不全について述べるために使用され、緊急の治療または入院が必要となる心不全の徴候および症状の変化があることによって患者を特徴づけることができる症状の発現を指す。

【0107】

「慢性」という用語は、長い持続期間を指す。慢性心不全は長期的な状態であり、症状の治療によって通常は安定に保たれている（安定な慢性HF）。

安定な慢性HFの特徴は以下のとおりである。

（i）身体に必要な十分な血流を供給する能力を損なう心臓の構造または機能の欠陥がある。

10

20

30

40

50

(i i) 体液量過剰 (肺および / または全身のうっ血によって示される) および / または心拍出量の深刻な低下 (低血圧症、腎不全、および / またはショック症候群によって示される) がない。

患者は緊急の治療または治療調整の必要がなく入院の必要がない。

【 0 1 0 8 】

徴候および症状が悪化しつつある慢性 H F の特徴は以下のとおりである。

(i) 身体に必要な十分な血流を供給する能力を損なう心臓の構造または機能の欠陥がある。

(i i) 体液量過剰 (肺および / または全身のうっ血によって示される) および / または心拍出量の深刻な低下 (低血圧症、腎不全、および / またはショック症候群によって示される) 。

10

患者は緊急の治療の必要はなく入院の必要はないが、治療調整は必要である。

【 0 1 0 9 】

慢性心不全は、非代償性である (急性非代償性心不全または急性代償不全の慢性心不全という) 可能性がある。これは、併発疾患 (肺炎など)、心筋梗塞、不整脈、管理不良高血圧症、または患者が水分制限、食事制限、薬物療法を維持できなかったことによって起こるのが最も一般的である。治療後、急性代償不全の慢性 H F 患者は、安定な代償性の慢性状態 (安定な慢性 H F) に戻ることがある。

【 0 1 1 0 】

新規発症の急性 H F および急性代償不全の慢性 H F の特徴は以下のとおりである。

20

(i) 身体に必要な十分な血流を供給する能力を損なう心臓の構造または機能の欠陥がある。

(i i) 体液量過剰 (肺および / または全身のうっ血によって示される) および / または心拍出量の深刻な低下 (低血圧症、腎不全、および / またはショック症候群によって示される) 。

患者は緊急の治療および治療調整の必要があり、入院の必要がある。

【 0 1 1 1 】

【 表 2 】

30

急性HF		慢性HF	
新規発症のAHF	急性非代償性HF = 急性代償不全の慢性HF	徴候/症状が悪化しつつある慢性HF	安定な慢性HF

【 0 1 1 2 】

新規発症の A H F であるか、急性非代償性 H F すなわち慢性 H F の急性代償不全であるか、徴候 / 症状が悪化しつつある慢性心不全であるかという上記の急性心不全の定義は、Voors et al., European Journal of Heart Failure (2016), 18, 716-726 に一致する。

40

【 0 1 1 3 】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する前記方法の特定の態様では、D P P 3 活性を液相活性検定または酵素捕捉活性検定で定量することができる。

【 0 1 1 4 】

液相検定では、体液試料を蛍光発生基質 (たとえば A r g - A r g - β N A) に直接さらす。血漿には多くの異なるアミノペプチダーゼが存在する (Sanderink et al. 1988) ため、使用した基質が D P P 3 以外のペプチダーゼによって切断される可能性がある。この問題を回避するため、特異的な D P P 3 活性を検出する 1 つの好ましい方法は、酵素捕捉活性検定を用いることである。

50

【0115】

特定の一態様では、酵素捕捉検定における活性DPP3の定量は、前記試料を全長DPP3に結合するが好ましくは液相検定でDPP3活性を50%未満、好ましくは40%未満、より好ましくは30%未満阻害する捕捉結合剤に接触させる工程（DPP3の阻害を避けるため、捕捉結合剤はDPP3の活性中心および基質結合領域（配列番号1のアミノ酸316～669）周辺の領域に結合するべきではない）と、前記捕捉結合剤に結合したDPP3を体液試料から分離する工程と、前記分離済みDPP3にDPP3の基質を添加する工程と、DPP3の基質の転化率を測定することによりDPP3活性を定量する工程と、測定したシグナルを、疾患でない対照と比較して評価する工程（閾値は、たとえば健常対照のDPP3濃度またはDPP3活性を測定し、対応する75パーセントイルを計算することによってあらかじめ設定されてもよい。75パーセントイルの高い方の境界は、健常者と疾患患者の間の閾値を定める）とを含む。

【0116】

特定の一態様では、活性DPP3の定量は上記の本発明の方法に従って実施される。

【0117】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する前記方法の特定の一態様では、前記結合剤は抗体、抗体断片、非IgG足場の群から選択されてもよい。

【0118】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する前記方法の特定の一態様では、酵素捕捉検定（ECA）（US5612186A、US5601986A）である。この検定ではDPP3の結合剤は抗体である。

【0119】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する前記方法の特定の一態様では、前記捕捉結合剤は表面に固定されている。DPP3タンパク質に反応するがペプチダーゼ活性に対する阻害が50%より高くない（好ましくは40%未満、好ましくは30%未満である）結合剤を固相に固定化してもよい。DPP3の阻害を防ぐため、捕捉結合剤は、DPP3の活性中心および基質結合領域（配列番号1のアミノ酸316～669）周辺の領域に結合するべきではない。

【0120】

被験者の体液試料中の活性DPP3を定量する前記方法の特定の一態様では、前記結合剤は、抗体、抗体断片、非IgG足場、アプタマーの群から選択されてもよい。

【0121】

固定化された結合剤の上に試験試料を通液すると、DPP3は（存在する場合）結合剤に結合し、それ自体が検出のために固定化される。次いで基質を添加してもよく、試験試料中のDPP3の存在または量を示す反応産物を検出してもよい。本明細書の目的では、「固相」という用語は、そこで検定を実施してもよい任意の材料または容器を包含するように使用されてもよく、多孔質材料、非多孔質材料、試験管、ウェル、スライド、アガロース樹脂（たとえば、GE Healthcare Life SciencesのSepharese）、磁性粒子（たとえば、Thermo Fisher ScientificのDynabeads（商標）またはPierce（商標）磁気ビーズ）などが包含されるが、これらに限定されるものではない。

【0122】

タンパク質またはペプチドに由来する結合剤（たとえば、抗体、抗体断片、非IgG足場）は、物理吸着（たとえば、静電相互作用または疎水相互作用）、生体親和性による固定化（たとえば、アビジン-ビオチン、プロテインA/G/L、HisタグおよびNi²⁺-NTA、GSTタグおよびグルタチオン、DNAハイブリダイゼーション、アプタマー）、共有結合（たとえば、アミンおよびN-ヒドロキシスクシンイミド）、または前記固定化方法の組み合わせ（Kim & Herr 2013）を含む方法で固相に固定化される。オリゴヌクレオチド由来の結合剤（たとえばアプタマー）は、（ストレプト）アビジン-ビオ

チン系の利用によって固相に固定化されてもよい (Muller et al. 2012, Deng et al. 2014)。

【0123】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する前記方法の特定の態様では、前記分離工程は、試料のうち前記捕捉結合剤に結合していない成分を捕捉済みDPP3から除去する洗浄工程である。

【0124】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する前記方法の特定の態様では、前記DPP3基質の転化は、蛍光発生基質 (たとえばArg-Arg-2NA、Arg-Arg-AMC) の蛍光、発色基質の色変化、アミノルシフェリンに結合された基質 (Promega Protease-Glo (商標) Assay) の発光、質量分析、HPLC/FPLC (逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー)、薄層クロマトグラフィー、キャピラリーゾーン電気泳動、ゲル電気泳動後に活性染色 (固定された活性DPP3) またはウェスタンブロット (切断産物) を行うことを含む群から選択される方法で測定される。

【0125】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する前記方法の特定の態様では、前記基質は、アンギオテンシンII、III、Leuエンケファリン、Metエンケファリン、エンドモルフィン1および2、パロルフィン、β-カゾモルフィン、ダイノルフィン、プロクトリン、ACTH、およびMSH; ならびに蛍光色素分子、発色団、またはアミノルシフェリンに結合された (Promega Protease-Glo (商標) Assay) ジペプチド類またはトリペプチド類を含む群から選択されてもよい。DPP3によって切断されるジペプチド類またはトリペプチド類としては、Arg-Arg、Ala-Ala、Ala-Arg、Ala-Phe、Asp-Arg、Gly-Ala、Gly-Arg、Gly-Phe、Leu-Ala、Leu-Gly、Lys-Ala、Phe-Arg、Suc-Ala-Ala-Pheなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。蛍光色素分子としては、β-ナフチルアミド (2-ナフチルアミド、βNA、2NA)、4-メトキシ-β-ナフチルアミド (4-メトキシ-2-ナフチルアミド)、7-アミノ-4-メチルクマリン (AMC、MCA; Abramic et al. 2000, Ohkubo et al. 1999) などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらの蛍光発生基質の切断により、蛍光性のβ-ナフチルアミドまたは7-アミノ-4-メチルクマリンがそれぞれ遊離される。発色団としてはp-ニトロアニリド二酢酸塩 (pNA) が挙げられるが、これに限定されるものではない。発色基質のペプチド-pNA結合が加水分解されるとpNAが遊離され、色変化が起こる。したがって、吸光度の変化 (DA/分) は酵素活性に正比例する。Protease-Glo (商標) Assay (Promega) を用いる場合、DPP3によって切断されるとアミノルシフェリンは遊離され、結合したルシフェラーゼによる検出可能な発光を生じる反応のための基質として機能する。

【0126】

好ましい態様では、蛍光発生基質Arg-Arg-βNAを添加し蛍光をリアルタイムで監視することによってDPP3活性を測定する。

【0127】

本発明の別の重要な態様は、壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するためのDPP3活性阻害剤である。

【0128】

阻害剤は、好ましくはDPP3活性を有意に阻害する分子である。このような分子はペプチドおよび小分子 (表2参照) または抗体 (表3参照) であってもよい。有意に阻害するとは、上記のように液相検定で80%を超える、好ましくは90%を超える、より好ましくはほぼまたは実際に100%の阻害を意味する。

【0129】

DPP3のペプチド阻害剤としては、スピノルフィン、合成スピノルフィン誘導体 (チ

10

20

30

40

50

ノルフィンおよび他のペプチド類（表 2 参照）；Yamamoto et al. 2000）、プロピオキサチン A および B（US4804676）、ならびに合成プロピオキサチン A 類似体（Inaoka et al. 1988）などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【 0 1 3 0 】

D P P 3 の小分子阻害剤としては、フルオスタチン類およびベンズイミダゾール誘導体などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。フルオスタチン A および B はストレプトミセス属の種（*Streptomyces* sp.）T A - 3 3 9 1 で産生される抗生物質で、毒性はなく、D P P 3 活性を強く阻害する。これまでに 2 0 種の様々なベンズイミダゾール誘導体が合成され公開されている（Agic et al. 2007；Rastija et al. 2015）が、そのうち 2 種類の化合物 1 ' および 4 ' が最も強い阻害効果を示す（Agic et al. 200 10 7）。

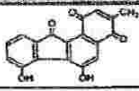
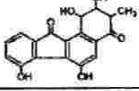
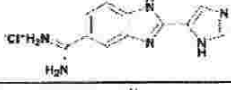
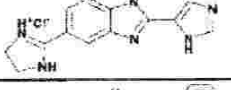
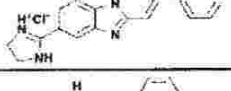
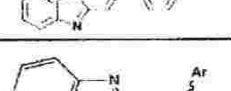
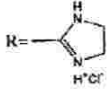
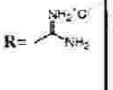
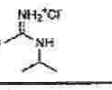
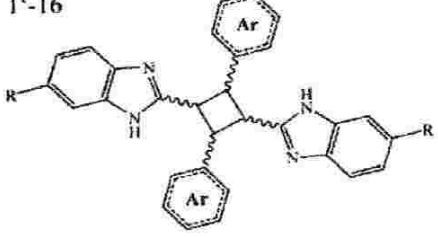
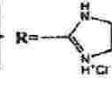
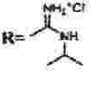
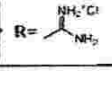
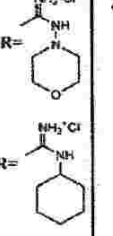
20

30

40

50

【表 3 - 1】

化合物の種類		完全名称/アミノ酸配列	参考文献
小分子	フルオスタチン	フルオスタチンA 	Akiyama et al. 1998
		フルオスタチンB 	
	ベンズイミダゾール誘導体	化合物 1 	Agic et al. 2007
		化合物 2 	
		化合物 3 	
		化合物 4 	
		化合物 1'-8' 	
		1' Ar=フェニル 4' Ar=o-Cl-フェニル 7' Ar=2-フリル 8' Ar=2-チエニル R=  H ⁺ Cl ⁻ 2' Ar=フェニル 5' Ar=o-Cl-フェニル R=  NH ₂ ⁺ Cl ⁻ 3' Ar=フェニル 6' Ar=o-Cl-フェニル R=  NH ₂ ⁺ Cl ⁻	
		化合物 1'-16 	Rastija et al. 2015
		1 Ar=フェニル 5 Ar=o-Cl-フェニル 9 Ar=2-フリル 13 Ar=2-チエニル R=  H ⁺ Cl ⁻ 3 Ar=フェニル 7 Ar=o-Cl-フェニル 11 Ar=2-フリル 15 Ar=2-チエニル R=  NH ₂ ⁺ Cl ⁻ 2 Ar=フェニル 6 Ar=o-Cl-フェニル 10 Ar=2-フリル R=  NH ₂ ⁺ Cl ⁻ 4 Ar=フェニル 8 Ar=o-Cl-フェニル 12 Ar=2-フリル 16 Ar=2-チエニル R=  NH ₂ ⁺ Cl ⁻	

10

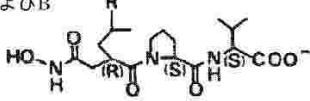
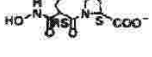
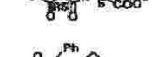
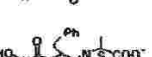
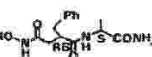
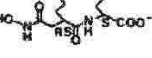
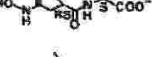
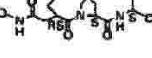
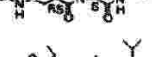
20

30

40

50

【表 3 - 2】

化合物の種類		完全名称/アミノ酸配列	参考文献
ペプチド	プロピオキサチンおよびプロピオキサチンA類似体	プロピオキサチンAおよびB A: R = H B: R = CH ₃ 	US 4804676 A/ Inaoka et al. 1986
		プロピオキサチンA類似体(化合物1~17) 1  2  3  4  5  6  7  8  9  10  11  12  13  14  15  16  17 	Inaoka et al. 1988

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

	スピノルフィンとその誘導体	スピノルフィン(LVYPWT)	Yamamoto et al. 2000; Chiba et al. 2003
		チノルフィン(VVYPW)	
		スピノルフィン誘導体(AVYPW, FIVPW, FVAPW, FVYPW, GVYPW, IVYPW, LVYPW, LVVYP, LVVYPW, LVYPW, PWT, SVYPW, VVYP, VVYPWT, VYP, VYPW, VYPWT, WVYPW, YAIPW, YPW, YPWT, YSIPW, YSVPW, YVYPW)	

表2:DPP3のペプチド阻害剤および小分子阻害剤

10

【0131】

本発明の好ましい態様では、選択された阻害剤は医薬的に許容されるものであり、DPP3に選択的かつ/または特異的であり、かつ細胞膜および/または血液脳関門を通過しない。選択的かつ特異的なDPP3阻害剤は他のタンパク質/酵素に結合したり他のタンパク質/酵素が結合したりせず、DPP3以外のいずれの酵素/プロテアーゼ/ペプチダーゼも阻害しない。小さなペプチドは非特異的なアミノペプチダーゼによって結合かつ切断される可能性があり、小分子阻害剤は細胞膜および血液脳関門を容易に通過する。抗DPP3抗体、抗DPP3抗体断片、または抗DPP3非Ig足場は、特異的かつ選択的にDPP3に結合し、細胞膜および血液脳関門を通過しない。したがって、好ましいDPP3活性阻害剤は特異的な抗DPP3抗体、抗体断片、または非Ig足場である。

20

【0132】

本発明の特定の態様では、DPP3活性阻害剤は壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用され、前記阻害剤は、抗DPP3抗体、抗DPP3抗体断片、抗DPP3非Ig足場を含む群から選択される。

【0133】

本発明の特定の態様では、DPP3活性の阻害剤または作動剤は壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用され、前記疾患は、心不全、慢性心不全、急性心不全(AHF)、心筋梗塞(MI)、卒中、肝不全、熱傷、外傷、重症感染症(微生物、ウイルス(たとえばAIDS)、寄生虫(たとえばマラリア))、SIRSまたは敗血症、がん、急性腎障害(AKI)、中枢神経系(CNS)障害(たとえば、発作、神経変性疾患)、自己免疫疾患および血管疾患(たとえば川崎症候群)、ならびに低血圧症を含む群から選択される。

30

【0134】

別の態様では、前記疾患は、急性心不全(AHF)、心筋梗塞(MI)、肝不全、熱傷、重症感染症(微生物、ウイルス(たとえばAIDS)、寄生虫(たとえばマラリア))、SIRSまたは敗血症、がん、急性腎障害(AKI)を含む群から選択される。

【0135】

本発明の特定の態様では、DPP3活性阻害剤は被験者の疾患または状態の予防に使用され、前記疾患または状態は、急性心不全(AHF)、心筋梗塞(MI)、肝不全、がん、急性腎障害(AKI)、および低血圧症である。

40

【0136】

本発明の特定の態様では、DPP3活性阻害剤は被験者の疾患または状態の治療に使用され、前記疾患または状態は、急性心不全(AHF)、心筋梗塞(MI)、肝不全、がん、急性腎障害(AKI)、および低血圧症である。

【0137】

本発明のすべての態様について、特定の態様では、前記疾患はアルツハイマー病ではない。本発明のすべての態様について、特定の態様では、前記疾患はがんではない。本発明のすべての態様について、特定の態様では、前記疾患は関節リウマチではない。

50

特定の一態様では、前記疾患または状態は低血圧症である。

【0138】

本発明の特定の一態様では、DPP3 活性阻害剤は壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用され、前記阻害剤は単一結合特異性 (mono-binding) または少なくとも二重結合特異性 (two-binding) の抗体である。

【0139】

本発明の特定の一態様では、DPP3 活性の阻害剤または作動剤は壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用され、前記阻害剤または作動剤は、配列番号 1 に結合する抗 DPP3 抗体または抗 DPP3 抗体断片、あるいは抗 DPP3 非 Ig 足場であり、特定の一態様では配列番号 2 に結合する抗 DPP3 抗体または抗 DPP3 抗体断片、あるいは抗 DPP3 非 Ig 足場である。

10

【0140】

本発明の特定の一態様では、DPP3 活性の阻害剤または作動剤は壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用され、前記阻害剤または作動剤は、DPP3 に対し 10^{-7} M 未満の最低結合親和性を示す抗体または断片あるいは足場である。

【0141】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を予防または治療する方法の特定の一態様では、前記阻害剤または作動剤は、全長 DPP3 に結合し DPP3 の活性を少なくとも 10 % または少なくとも 50 %、より好ましくは少なくとも 60 %、さらに好ましくは 70 % 超、さらに好ましくは 80 % 超、さらに好ましくは 90 % 超、さらに好ましくは 95 % 超、阻害する抗体または断片あるいは足場である。上記のとおり、活性は液相検定で定量されてもよい。

20

【0142】

本発明の特定の一態様では、DPP3 活性の阻害剤または作動剤は壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用され、前記阻害剤または作動剤は単一特異性の抗体または断片あるいは足場である。

【0143】

単一特異性抗 DPP3 抗体または単一特異性抗 DPP3 抗体断片、あるいは単一特異性抗 DPP3 非 Ig 足場は、前記抗体または抗体断片あるいは非 Ig 足場が標的 DPP3 内の少なくとも 5 個のアミノ酸を含む 1 つの特異的な領域に結合することを意味する。単一特異性抗 DPP3 抗体または単一特異性抗 DPP3 抗体断片、あるいは単一特異性抗 DPP3 非 Ig 足場は、いずれも同じ抗原に対して親和性をもつ抗 DPP3 抗体または抗 DPP3 抗体断片、あるいは抗 DPP3 非 Ig 足場である。

30

【0144】

別の特定の一態様では、DPP3 に結合する抗 DPP3 抗体または抗 DPP3 抗体断片、あるいは抗 DPP3 非 Ig 足場は、それぞれ単一特異性の抗体、抗体断片、または非 Ig 足場であり、「単一特異性」は前記抗体または抗体断片あるいは非 Ig 足場が標的 DPP3 内の少なくとも 4 個のアミノ酸を含む 1 つの特異的な領域に結合することを意味する。本発明の単一特異性の抗体または断片あるいは非 Ig 足場は、いずれも同じ抗原に対して親和性をもつ抗体または断片あるいは非 Ig 足場である。モノクローナル抗体は単一特異性であるが、単一特異性抗体は一般的な胚細胞からモノクローナル抗体を作製する以外の方法で作製されてもよい。

40

【0145】

本発明の特定の一態様では、DPP3 活性の阻害剤または作動剤は壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用され、前記被験者は DPP3 のレベルが上昇している。「レベルが上昇している」とはレベルが所定の閾値を超えていることである。

【0146】

50

本発明の別の態様は、壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための上記 D P P 3 活性阻害剤を含む医薬組成物である。

【 0 1 4 7 】

本発明の別の態様は、D P P 3 活性阻害剤を投与する、壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を予防または治療する方法である。

【 0 1 4 8 】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を予防または治療する方法の特定の態様では、前記阻害剤は、抗 D P P 3 抗体、抗 D P P 3 抗体断片、抗 D P P 3 非 I g 足場を含む群から選択される。

10

【 0 1 4 9 】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を予防または治療する方法の特定の態様では、前記疾患は、心不全、慢性心不全、急性心不全 (A H F)、心筋梗塞 (M I)、卒中、肝不全、熱傷、外傷、重症感染症 (微生物、ウイルス (たとえば A I D S)、寄生虫 (たとえばマラリア))、S I R S または敗血症、がん、急性腎障害 (A K I)、C N S 障害 (たとえば、発作、神経変性疾患)、自己免疫疾患および血管疾患 (たとえば川崎症候群)、ならびに低血圧症を含む群から選択される。

【 0 1 5 0 】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を予防または治療する方法の特定の態様では、前記阻害剤は単一結合特異性または少なくとも二重結合特異性の抗体である。

20

【 0 1 5 1 】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を予防または治療する方法の特定の態様では、前記阻害剤は、配列番号 1 に結合する抗 D P P 3 抗体または抗 D P P 3 抗体断片、あるいは抗 D P P 3 非 I g 足場であり、特定の態様では配列番号 2 に結合する抗 D P P 3 抗体または抗 D P P 3 抗体断片、あるいは抗 D P P 3 非 I g 足場である。

【 0 1 5 2 】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を予防または治療する方法の特定の態様では、前記阻害剤は、D P P 3 に対し 10^{-7} M 未満の最低結合親和性を示す抗体または断片あるいは足場である。

30

【 0 1 5 3 】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を予防または治療する方法の特定の態様では、前記阻害剤または作動剤は、単一特異性の抗体または断片あるいは足場である。

【 0 1 5 4 】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を予防または治療する方法の特定の態様では、前記阻害剤または作動剤は、全長 D P P 3 に結合し D P P 3 の活性を少なくとも 10 % または少なくとも 50 %、より好ましくは少なくとも 60 %、さらに好ましくは 70 % 超、さらに好ましくは 80 % 超、さらに好ましくは 90 % 超、さらに好ましくは 95 % 超、阻害する抗体または断片あるいは足場である。

40

【 0 1 5 5 】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を予防または治療する方法の特定の態様では、前記被験者は D P P 3 のレベルが上昇している。「レベルが上昇している」とはレベルが所定の閾値を超えていることである。閾値については先に定義されている。

【 0 1 5 6 】

本発明の別の態様は患者の血液からの D P P 3 の排除である。排除はいくつかのアフェレーシス技術および / または親和性クロマトグラフィー工程によって達成できる (Balogun et al. 2010)。このような方法としては、アガロース樹脂に結合された特異的か

50

つ高親和性のD P P 3抗体を含有する吸着体を介して患者の血漿を濾過すること（可能性のある吸着体材料に結合したD P P 3の分析については実施例12を参照のこと）が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0157】

本発明の医薬組成物は、目的の投与経路に適合するように製剤される。投与経路は一般に、物質が投与される場所によって分類される。一般的な例としては、経口投与、皮膚投与、皮下投与、皮内投与、舌下投与、筋肉内投与、動脈内投与、静脈内投与、および腹腔内投与が挙げられる。

【0158】

医薬組成物は中枢神経系（CNS）を経由して投与されてもよい。このような投与の例としては、硬膜外腔への注射または輸液による硬膜外投与、脳への直接注入による脳内（大脳への）投与、脳室内（脳の脳室系への）投与または髄腔内（脊髄管への）投与などが挙げられる。

10

以下の本発明の特定の態様について概要を述べる。

（項目1）

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法であって、

前記被験者の体液試料中のD P P 3総量を定量し、かつ／または活性D P P 3の量を定量することと、

定量された前記D P P 3総量または活性D P P 3の量を所定の閾値と比較することとを含み、

20

定量された前記量が前記所定の閾値を超える場合、前記被験者は壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する疾患または状態を有すると診断される、方法。

（項目2）

前記D P P 3総量または活性D P P 3の量は濃度の単位で定量される、項目1に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

（項目3）

前記試料は全血、血清、血漿を含む群から選択される、項目1または2に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

（項目4）

30

前記疾患は、心不全、慢性心不全、急性心不全（AHF）、心筋梗塞（MI）、卒中、肝不全、熱傷、外傷、重症感染症（微生物、ウイルス（たとえば後天性免疫不全症候群（AIDS）、寄生虫（たとえばマラリア））、全身性炎症反応症候群（SIRS）または敗血症、がん、急性腎障害（AKI）、中枢神経系（CNS）障害（たとえば発作、神経変性疾患）、自己免疫疾患および血管疾患（たとえば川崎症候群）、ならびに低血圧症を含む群から選択される、項目1～3のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

（項目5）

前記D P P 3総量および／または活性D P P 3の量は前記被験者の体液試料中で定量され、かつ

40

前記試料を全長D P P 3に特異的に結合する捕捉結合剤に接触させる工程と、

前記捕捉結合剤に結合したD P P 3を分離する工程と、

前記分離済みD P P 3にD P P 3の基質を添加する工程と、

D P P 3の基質の転化率を測定し定量することにより前記活性D P P 3を定量する工程とを含む、項目1～4のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

（項目6）

前記捕捉結合剤は抗体、抗体断片、または非IgG足場の群から選択されてもよい、項目5に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

50

(項目 7)

前記捕捉結合剤は抗体である、項目 5 または 6 に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

(項目 8)

前記捕捉結合剤は表面に固定化される、項目 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

(項目 9)

前記分離工程は、前記試料のうち前記捕捉結合剤に結合していない成分を捕捉済み D P P 3 から除去する洗浄工程である、項目 5 ~ 8 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

10

(項目 10)

D P P 3 基質の転化は、蛍光発生基質（たとえば A r g - A r g - β N A、A r g - A r g - A M C）の蛍光、発色基質の色変化、アミノルシフェリンに結合された基質（Pro mega Protease-Glo（商標）Assay）の発光、質量分析、H P L C / F P L C（逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー）、薄層クロマトグラフィー、キャピラリーゾーン電気泳動、ゲル電気泳動後に活性染色（固定された活性 D P P 3）またはウェスタンブロット（切断産物）を行うことを含む群から選択される方法で検出される、項目 5 ~ 9 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

(項目 11)

20

前記基質は、アンギオテンシン I I、I I I、I V、L e u エンケファリン、M e t エンケファリン、エンドモルフィン 1 および 2、パロルフィン、 β -カゾモルフィン、ダイノルフィン、プロクトリン、副腎皮質刺激ホルモン（A C T H）、およびメラノサイト刺激ホルモン（M S H）；ならびに蛍光色素分子、発色団、またはアミノルシフェリンに結合されたジペプチドを含む群から選択されてもよく、前記ジペプチドは A r g - A r g である、項目 5 ~ 10 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

(項目 12)

前記基質は、蛍光色素分子、発色団、またはアミノルシフェリンに結合されたジペプチドを含む群から選択されてもよく、前記ジペプチドは A r g - A r g である、項目 5 ~ 11 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法。

30

(項目 13)

項目 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の診断方法を少なくとも 2 回行う、壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を監視する方法。

(項目 14)

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための D P P 3 活性阻害剤。

(項目 15)

前記阻害剤は抗 D P P 3 抗体および抗 D P P 3 抗体断片、ならびに抗 D P P 3 非 I g 足場を含む群から選択される、項目 14 に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための D P P 3 活性阻害剤。

40

(項目 16)

前記疾患は、心不全、慢性心不全、急性心不全（A H F）、心筋梗塞（M I）、卒中、肝不全、熱傷、外傷、重症感染症（微生物、ウイルス（たとえば A I D S）、寄生虫（たとえばマラリア））、S I R S または敗血症、がん、急性腎障害（A K I）、C N S 障害（たとえば発作、神経変性疾患）、自己免疫疾患および血管疾患（たとえば川崎症候群）、ならびに低血圧症を含む群から選択される、項目 14 または 15 に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための D P P 3 活性阻害剤。

50

(項目 17)

前記阻害剤は単一結合特異性 (mono-binding) または少なくとも二重結合特異性 (two-binding) の抗体である、項目 14 ~ 16 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための DPP3 活性阻害剤。

(項目 18)

前記阻害剤は、配列番号 1 に結合し特に配列番号 2 に結合する抗 DPP3 抗体または抗 DPP3 抗体断片、あるいは抗 DPP3 非 Ig 足場である、項目 14 ~ 17 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための DPP3 活性阻害剤。

10

(項目 19)

前記阻害剤は DPP3 に対し 10^{-7} M 以下の最低結合親和性を示す抗体または断片あるいは足場である、項目 14 ~ 18 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための DPP3 活性阻害剤。

(項目 20)

前記阻害剤は単一特異性の抗体または断片あるいは足場である、項目 14 ~ 19 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための DPP3 活性阻害剤。

(項目 21)

前記阻害剤は、全長 DPP3 に結合し DPP3 の活性を少なくとも 10 % または少なくとも 50 %、より好ましくは少なくとも 60 %、さらに好ましくは 70 % 超、さらに好ましくは 80 % 超、さらに好ましくは 90 % 超、さらに好ましくは 95 % 超、阻害する抗体または断片あるいは足場である、項目 14 ~ 20 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための DPP3 活性阻害剤。

20

(項目 22)

前記阻害剤は DPP3 に選択的かつ / または特異的であり、かつ細胞膜および / または血液脳関門を通過しない、項目 14 ~ 21 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための DPP3 活性阻害剤。

30

(項目 23)

前記被験者は、体液試料中に所定の閾値を超える DPP3 総量および / または活性 DPP3 の量を有する、項目 14 ~ 22 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための DPP3 活性阻害剤。

(項目 24)

項目 14 ~ 23 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態の予防または治療に使用するための DPP3 活性阻害剤を含む、医薬組成物。

40

(項目 25)

アフエーシスと親和性クロマトグラフィーを含む、血漿から DPP3 を体外除去する方法における項目 14 ~ 23 のいずれか一項に記載の DPP3 活性阻害剤の使用。

(項目 26)

被験者の体液試料中の活性 DPP3 を定量する方法であって、
前記試料を全長 DPP3 に特異的に結合する捕捉結合剤に接触させる工程と、
前記捕捉結合剤に結合した DPP3 を分離する工程と、
前記分離済み DPP3 に DPP3 の基質を添加する工程と、
DPP3 の基質の転化率を測定し定量することにより前記活性 DPP3 を定量する工程とを含む方法。

50

(項目 27)

前記捕捉結合剤は抗体、抗体断片、または非 I g G 足場の群から選択されてもよい、項目 26 に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する方法。

(項目 28)

前記捕捉結合剤は抗体である、項目 26 または 27 に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する方法。

(項目 29)

前記捕捉結合剤は表面に固定化される、項目 26 ~ 28 のいずれか一項に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する方法。

(項目 30)

前記分離工程は、前記試料のうち前記捕捉結合剤に結合していない成分を捕捉済み D P P 3 から除去する洗浄工程である、項目 26 ~ 29 のいずれか一項に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する方法。

(項目 31)

D P P 3 基質の転化は、蛍光発生基質（たとえば A r g - A r g - β N A、A r g - A r g - A M C）の蛍光、発色基質の色変化、アミノルシフェリンに結合された基質（Pro mega Protease-Glo（商標）Assay）の発光、質量分析、H P L C / F P L C（逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー）、薄層クロマトグラフィー、キャピラリーゾーン電気泳動、ゲル電気泳動後に活性染色（固定された活性 D P P 3）またはウェスタンブロット（切断産物）を行うことを含む群から選択される方法で検出される、項目 26 ~ 30 のいずれか一項に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する方法。

(項目 32)

前記基質は、蛍光色素分子、発色団、またはアミノルシフェリンに結合されたジペプチドを含む群から選択されてもよく、前記ジペプチドは A r g - A r g である、項目 26 ~ 31 のいずれか一項に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する方法。

(項目 33)

前記試料は全血、血清、血漿を含む群から選択される血液試料である、項目 26 ~ 32 のいずれか一項に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する方法。

(項目 34)

被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する検定またはキットであって、全長 D P P 3 に特異的に結合する捕捉結合剤と、D P P 3 の基質を含む、検定またはキット。

(項目 35)

前記捕捉結合剤は抗体、抗体断片、または非 I g G 足場の群から選択されてもよい、項目 34 に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する検定またはキット。

(項目 36)

前記捕捉結合剤は、D P P 3 活性を液相検定で 50 % 未満、好ましくは 40 % 未満、より好ましくは 30 % 未満阻害する、項目 34 または 35 に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する検定またはキット。

(項目 37)

前記捕捉結合剤に対する D P P 3 の結合領域は配列番号 1 のアミノ酸 316 ~ 669 の領域内にない、項目 34 ~ 36 のいずれか一項に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する検定またはキット。

(項目 38)

前記捕捉結合剤は抗体である、項目 34 ~ 37 のいずれか一項に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する検定またはキット。

(項目 39)

前記捕捉結合剤は表面に固定化される、項目 34 ~ 38 のいずれか一項に記載の被験者

10

20

30

40

50

の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する検定またはキット。

(項目 4 0)

前記基質は、アンギオテンシン I I、I I I、I V、L e u エンケファリン、M e t エンケファリン、エンドモルフィン 1 および 2、バロルフィン、 β -カゾモルフィン、ダイノルフィン、プロクトリン、A C T H、および M S H；ならびに蛍光色素分子、発色団、またはアミノルシフェリンに結合されたジペプチドを含む群から選択されてもよく、前記ジペプチドは A r g - A r g である、項目 3 4 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する検定またはキット。

(項目 4 1)

項目 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断または監視する方法における、項目 2 6 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の被験者の体液試料中の活性 D P P 3 を定量する方法または項目 3 4 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の検定またはキットの使用。 10

【実施例】

【 0 1 5 9 】

(1 . 実施例 1)

様々な疾患の患者 (急性心筋梗塞 (A M I)、心原性ショック、敗血症性ショック、および肝不全の患者) の血漿中の D P P 3 活性を、特異的な D P P 3 捕捉活性検定を用いて定量し、健常対照の血漿の D P P 3 活性と比較した。

(1 . 1 . 研究コホート)

【 0 1 6 0 】

最初の症状で直接救急科に入院した 3 8 8 名の患者から血漿試料を得た。最終診断によって患者を急性心筋梗塞 (A M I)、心原性ショック、敗血症性ショック、および肝不全の患者の 4 つの亜群に分けることができた。対照群は、9 3 名の健常対照の血漿試料群であった。

(1 . 2 . h D P P 3 捕捉活性検定)

【 0 1 6 1 】

血漿試料 (1 0 μ l) の D P P 3 を最初に親和精製工程によって濃縮し、次に蛍光発生基質 A r g - A r g - β N A を添加してその活性を測定した (詳細な説明については実施例 4 を参照のこと)。様々な試料の蛍光増加の傾き (n m o l (β N A) / m i n / m l (試料) [n m o l (β N A) m i n $^{-1}$ m l $^{-1}$]) の計算値は 1 0 μ l の試料サイズに関する。 30

(1 . 3 . 結果)

【 0 1 6 2 】

患者の試料を健常対照と比較したところ、重症または臓器不全のあるすべての患者の D P P 3 活性値は有意に高かった (図 1 0)。

(2 . 実施例 2)

【 0 1 6 3 】

本実験では、組み換え h D P P 3 を健常なラットに注射した場合の効果について、血圧を監視することにより研究した。 40

(2 . 1 . 方法)

【 0 1 6 4 】

2 ~ 3 カ月齢の雄のウイスターラット (Charles River Laboratories (ドイツ)) を本研究に使用した。血圧 (B P) の測定および記録のため、カテーテル (Introcan - W ; 2 2 G / 1 ' ' ; B . Braun) を右総頸動脈に挿入した。N 末端に G S T タグを付けたヒト組み換えジペプチジルペプチダーゼ 3 (r e c G S T - h D P P 3) を尾静脈注射した。

【 0 1 6 5 】

最初に動物をイソフルランで麻酔し、体重測定 (すべて g) し、長時間の麻酔のために 1 . 2 g / k g (体重) のウレタン (濃度 = 0 . 4 g / m L) を腹腔内 (i . p .) 注射した。次いで首の腹側領域の毛を刈り、エタノールで拭いた。血管を準備し、カテーテル 50

を挿入した。最後に、両方のカテーテルをヘパリン処置された等張食塩水で洗い流す。次いで血圧測定器 (Medex Logical (Medex Medical Ltd.)) を患者監視システム (Datex-Ohmeda (GE)) に接続した。ラップトップコンピュータを B P モニターに接続し、S / 5 Collect Software で B P データを個別に記録した。

【 0 1 6 6 】

ラットを r e c G S T - h D P P 3 の P B S 溶液 0 . 2 m g / k g で尾静脈注射によって処置した。D P P 3 の注射の前後の血圧を常に監視した。

(2 . 2 . 結果)

【 0 1 6 7 】

健常なラットに組み換え G S T - h D P P 3 を注射すると、血圧はすぐに低下する (図 1 1) 。

(3 . 実施例 3)

【 0 1 6 8 】

抗体の作製と D P P 3 結合能力の定量：数種のマウス抗体を作製し、ヒト D P P 3 への結合能力によってサンドイッチ検定または活性検定でスクリーニングした (表 3 参照) 。

(3 . 1 . 方法)

(免疫用のペプチド / 結合体)

【 0 1 6 9 】

免疫用の D P P 3 ペプチドを合成した (表 3 参照) (J P T Technologies (ドイツ、ベルリン)) 。ペプチドをウシ血清アルブミン (B S A) と結合するため、N 末端にシステイン残基を追加した (選択された D P P 3 配列にシステインが存在しない場合) 。SulfoLink-Coupling Gel (Perbio-Science (ドイツ、ボン)) を用いてペプチドを B S A に共有結合した。カップリング手順はPerbio社の説明書に従って実行された。組み換え G S T - h D P P 3 はUSBio製であった。

(マウスの免疫化、免疫細胞融合およびスクリーニング)

【 0 1 7 0 】

B a l b / c マウスに G S T - h D P P 3 または D P P 3 ペプチド - B S A 結合体を、0 日目にそれぞれ 8 4 μ g と 1 0 0 μ g (TiterMax Gold Adjuvant で乳化) 、1 4 日目にそれぞれ 8 4 μ g と 1 0 0 μ g (フロイント完全アジュバントで乳化) 、2 1 日目と 2 8 日目にそれぞれ 4 2 μ g と 5 0 μ g (フロイント不完全アジュバントに溶解) 、腹腔内 (i . p .) 注射した。4 9 日目、生理食塩水に溶解した G S T - h D P P 3 (4 2 μ g) または D P P 3 ペプチド - B S A 結合体 (5 0 μ g) を動物に静脈内 (i . v .) 注射した。3 日後、マウスを 殺し、免疫細胞融合を行った。

【 0 1 7 1 】

免疫マウス由来の脾細胞と骨髓腫細胞株 S P 2 / 0 の細胞を、5 0 % ポリエチレングリコール 1 m l を用いて 3 7 °C で 3 0 秒かけて融合させた。洗浄後、細胞を 9 6 ウェル細胞培養プレートに播種した。H A T 培地 [2 0 % ウシ胎仔血清および H A T - Supplement を補充した R P M I 1 6 4 0 培地] で増殖させることによってハイブリッドクローンを選択した。1 週間後、H A T 培地を H T 培地に替えて 3 回継代培養した後、通常の細胞培地に戻した。

【 0 1 7 2 】

融合の 2 週間後、まず I g G 抗体に結合する組換え D P P 3 について細胞培養液上清をスクリーニングした。したがって、組換え G S T タグ付き D P P 3 (USBiologicals (米国、セイラム)) を 9 6 ウェルプレート (1 0 0 n g / ウェル) に固定化し、5 0 μ l / ウェルの細胞培養液上清と共に室温で 2 時間保温した。プレートを洗浄した後、5 0 μ l / ウェルの P O D - ウサギ抗マウス I g G を添加し、室温で 1 時間保温した。次の洗浄工程の後、5 0 μ l の色素原溶液 (3 . 7 m M の o - フェニレンジアミンを [クエン酸塩 / リン酸水素塩緩衝液、0 . 0 1 2 % H ₂ O ₂] に溶解した液) を各ウェルに添加し、室温で 1 5 分間保温し、4 N の硫酸 5 0 μ l を添加することにより発色反応を停止した。4 9 0 m m で吸収を検出した。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 3 】

陽性の試験微生物培養液を増殖のために24ウェルプレートに移した。再試験の後、選択された培養液を限界希釈法でクローン化および再クローン化し、アイソタイプを決定した。

(マウスモノクローナル抗体の作製)

【 0 1 7 4 】

GSTタグ付きヒトDPP3またはDPP3ペプチドに対する抗体を標準的な抗体作製方法(Marx et al., 1997)で作製し、プロテインAで精製した。抗体純度は、SDSゲル電気泳動分析に基づいて90%以上であった。

(抗体の特性評価 - hDPP3 阻害の分析)

【 0 1 7 5 】

様々な抗体および抗体クローンによるDPP3阻害能を分析するために、既知の手順(Jones et al., 1982)でDPP3活性検定を行った。組換えGSTタグ付きhDPP3を検定緩衝液に希釈(25 ng/mlのGST-DPP3を[50 mMのトリス-HCl (pH 7.5)、100 μMのZnCl₂]に溶解)し、この溶液200 μlを各抗体10 μgと共に室温で保温した。1時間の前保温の後、蛍光発生基質Arg-Arg-βNA(20 μl、2 mM)を溶液に添加し、経時的な遊離βNAの生成を37 °CでTwinkle LB 970マイクロプレート蛍光光度計(Berthold Technologies GmbH & Co. KG)を用いて監視した。340 nmで励起し410 nmで発光を測定することにより、βNAの蛍光を検出する。様々な試料の蛍光増加の勾配(RFU/分)を計算する。緩衝液(対照)とGST-hDPP3の場合の勾配を活性100%とする。可能性のある捕捉結合剤の阻害能は、前記捕捉結合剤と共に保温することによるGST-hDPP3活性の低下(%)で定義される。その結果低下したDPP3活性を図1aおよび表3に示す。

(3.2. 結果)

【 0 1 7 6 】

以下の表は、得られた抗体の選択とその最大阻害率を示す(表3)。以下に示すDPP3領域に対するモノクローナル抗体を天然DPP3への結合能力によって選択した(mAb-FL-DPP3__2555を固相、__2553をトレーサーとして免疫測定に使用した。詳細については実施例2を参照のこと)。

【 0 1 7 7 】

固定化DPP3活性検定(実施例4および5参照)のためには、DPP3活性の阻害が強すぎない固相抗体を選択する必要があった。抗体スクリーニングのカットオフ(境界)として、固相抗体はDPP3活性を50%よりも強く阻害するべきではない。mAbDPP3__2555は最も低い阻害率を示した(表3、図1A)。

【 0 1 7 8 】

治療に使用できる強いDPP3阻害剤(実施例6~11参照)を作製するには、最も高い阻害率を示すDPP3結合剤を選択する必要があった。DPP3活性を70%阻害する能力をもつモノクローナル抗体mAbDPP3__1967を、可能性のある治療抗体として選択し(図1Aおよび表3を参照のこと)、この抗体を用いて以降のすべての分析を実行した。図1Bは、IC₅₀値が0.2041 μg/mlであるmAbDPP3__1967の阻害曲線を示す。

10

20

30

40

【表 4】

配列番号	抗原/免疫原	hDPP3 領域	名称	クローン	最大DPP3 阻害率
配列番号1	GSTタグ付き組み換えFL-DPP3	1-737	mAb-FL-DPP3	2552	65%
				2553	35%
				2554	30%
				2555	25%
配列番号2	CETVINPETGEQIQSWYRSGE	474-493	mAb-pep1-DPP3	1963	60%
				1964	60%
				1965	70%
				1966	65%
				1967	70%
				1968	65%
				1969	70%

表3: 作製した抗DPP3抗体の免疫原配列、名称、および特性

(4 . 実施例 4)
【 0 1 7 9 】
h D P P 3 免疫測定で高いシグナル / ノイズ (S / N) 比を生じた抗体の組み合わせを決定する。

(4 . 1 . 方法)
(モノクローナル抗体の作製)
【 0 1 8 0 】

G S T タグ付きヒト D P P 3 に対する抗体を標準的な抗体作製方法 (Marx et al., 1997) で作製し、プロテイン A で精製した。S D S ゲル電気泳動分析に基づく抗体純度は 9 0 % 以上であった。異なるクローンの D P P 3 結合能力を分析した。結果が陽性のクローンを固相またはトレーサー抗体として用いた。

(固相)
【 0 1 8 1 】

9 6 ウェルのポリスチレンマイクロプレート (Greiner Bio-One International A G (オーストリア)) に 1 つの抗 D P P 3 抗体クローン (捕捉用抗体) を (室温で 1 時間) 塗布した (1 . 5 μ g / 0 . 2 5 m L の抗体、1 0 0 m m o l / L の N a C l 、5 0 m m o l / L の トリス / H C l ; p H 7 . 8) 。5 % ウシ血清アルブミンでブロックした後、マイクロプレートを真空乾燥した。

(標識の手順 (トレーサー))
様々な抗 D P P 3 抗体 1 0 0 μ g (1 0 0 μ l) (検出用抗体、1 m g / m l を P B S に溶解、p H 7 . 4) を 1 0 μ l のアクリジニウム N H S エステルと混合し (1 m g / m l をアセトニトリルに溶解) (InVent GmbH (ドイツ) ; E P 0 3 5 3 9 7 1) 、室温で 3 0 分間保温した。標識した抗 D P P 3 抗体を Shodex Protein 5 μ m K W - 8 0 3 (昭和電工 (日本)) でゲル濾過 H P L C によって精製した。精製した標識付き抗体を検定緩衝液 (5 0 m m o l / l のリン酸カリウム、1 0 0 m m o l / l の N a C l 、1 0 m m o l / l の N a 2 - E D T A 、5 g / l のウシ血清アルブミン、1 g / l のマウス I g G 、1 g / l のウシ I g G 、5 0 μ m o l / l のアマスタチン、1 0 0 μ m o l / l のロイペプチン ; p H 7 . 4) に希釈した。最終濃度は、2 0 0 μ l あたりの標識付き化合物の相対発光量 (R L U) で約 7 × 1 0 6 (標識付き抗体約 2 0 n g) であった。アクリジニウムエステルの化学発光を Centro LB 9 6 0 蛍光光度計 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG) で測定した。

(検量用試料)

【0182】

組み換えヒトGST-DPP3 (USBiological (米国)) の原液 (PBS 溶液、pH 7.4) を (50 mmol/L のリン酸カリウム、100 mmol/L の NaCl、10 mmol/L の Na-EDTA、5 g/L のウシ血清アルブミン、1 g/L のマウス IgG、1 g/L のウシ IgG、50 μmol/L のアマスタチン、100 μmol/L のロイペプチン; pH 7.4) を用いて線形希釈した。原液を -80 で保存した。検量用試料を使用前に調製した。

(hDPP3 免疫測定)

塗布済み 96 ウェルマイクロプレートに試料 (または検量用試料) 10 μl をピペットで移し、標識を付け希釈した検出用抗体 (200 μl) を添加した後、プレートを 2 ~ 8 で 18 ~ 24 時間保温した。結合しなかったトレーサーを、350 μl の洗浄液 (20 mM の PBS (pH 7.4)、0.1% の Triton X-100) で 4 回洗浄することによって除去した。十分に結合した化学発光を Centro LB 960 発光光度計 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG) で測定した。

(4.2. 結果)

【0183】

すべての抗体を以下のバリエーション (表 4 および 5) で塗布済みマイクロプレートおよび標識付き抗体として組み合わせ、サンドイッチ免疫測定に使用した。hDPP3 免疫測定の項に記載されたように保温を行った。組み換えヒトGST-DPP3 (100、10、1 ng/mL) および血漿試料中の天然 hDPP3 の結果を特異的シグナル / 背景シグナルの比で示す。

【表 5】

S/N 比 (組み換え DPP3)		トレーサー				
		2552	2553	2554	2555	
SP-AB	2552	-	5.210 496 46	258 26 3	8.882 815 76	100 ng/mL 10 ng/mL 1 ng/mL
	2553	2.403 169 15	-	1.773 86 8	3.406 306 29	
	2554	428 31 4	3.320 300 30	-	8.388 750 71	
	2555	3.819 273 25	1.289 115 10	1.906 102 8	-	

表4: 抗DPP3抗体ペアのシグナル/ノイズ比-組み換えGST-hDPP3の測定 (SP: 固相)

【表 6】

S／N比 (天然 DPP 3)		トレーサー				
		2552	2553	2554	2555	
SP-AB	2552		2.042	2	2.302	天然試料 1
		-	1.499	2	1.579	天然試料 2
	2553	712		424	1.163	
		475	-	362	977	
	2554	5	631		1.087	
		5	367	-	527	
	2555	1.513	737	702		
		894	527	400	-	

表5: 抗DPP3抗体ペアのシグナル/ノイズ比-ヒト血漿試料の測定 (SP: 固相)

【0184】

組み換え GST-hDPP3 について、すべての組み合わせは良好なシグナル/ノイズ比を示した。さらに、天然試料について、2552と2554を除くすべての組み合わせは良好なシグナル/ノイズ比を示した。したがって、残るすべての組み合わせをさらなる調査に使用できる。RLUシグナルの絶対値が最も高いことに関して、2555を固相抗体、2553を標識付き抗体として用いた。

(5. 実施例 5)

【0185】

様々な疾患の患者（急性心不全（AHF）、心筋梗塞（MI）、敗血症、がん、急性腎障害（AKI）、および下気道感染症（LRTI）の患者）の血漿 DPP3 濃度を hDPP3 免疫測定で定量し、健常対照の血漿 DPP3 濃度と比較した。

(5. 1. 研究コホート)

【0186】

最初の症状で直接救急科または腫瘍科に入院した 214 名の患者から血漿試料を得た。最終診断によって患者を急性心不全（AHF）、心筋梗塞（MI）、敗血症、がん、急性腎障害（AKI）、下気道感染症（LRTI）の患者の 6 つの亜群に分けることができた。対照群は、93 名の健常対照の血漿試料群であった。

(5. 2. hDPP3 免疫測定)

【0187】

mAbDPP3 __ 2555 を固相抗体として、mAbDPP3 __ 2553 を標識付きトレーサー抗体として用いた。抗体の固定化、標識、保温は実施例 2 に記載のとおりに行った。

(5. 3. 結果)

【0188】

対応する診断の詳細と共に、得られたデータを統計的に分析した（図 2A）。すべての患者は、健常対照（正常）と比較して有意に高い血漿 DPP3 濃度を示した。表 6 は、対照群の 75 パーセンタイルを超える DPP3 値を有する患者の割合とそれぞれの診断を示す。血漿 DPP3 レベルの分析結果は、患者の疾患状態を示している。この発見は診断分野でも使用でき、また、（たとえば DPP3 の阻害による）治療処置の基礎を築いた。

10

20

30

40

50

【表 7】

	対照群の75パーセントイルを超えるDPP3値を有する患者の割合					
徴候	AHF	MI	敗血症	がん	AKI	LRTI
サンドイッチ検定	48.7	64.3	85.5	91.7	51.4	53.3

表 6: サンドイッチ型免疫測定における疾患患者と健常対照の DPP3 値の比較

【0189】

10

同じ研究コホートを死亡によって分析した。救急科に入院した後に死亡した患者は、病院で生存した救急患者よりも有意に高い血漿 DPP3 レベルを有していた。したがって、DPP3 濃度の上昇は死亡に関して悪い予後を示す（図 2 B）。

（6．実施例 6）

【0190】

ヒト血漿中の DPP3 の量は、DPP3 濃度だけでなく、活性検定でも定量できる。1 つの標準的な手順は、蛍光発生基質として Arg - Arg - β NA を使用する可溶活性検定である。

【0191】

天然ヒト DPP III の活性を、Arg - Arg - β - ナフチルアミド（Bachem Holding AG（スイス））を加水分解し蛍光性の β - ナフチルアミドを生成することによって定量した。200 μl の緩衝液（50 mM のトリス / HCl（pH 8.8）、0.04 % の NaN₃、50 μM のアマスタチン、100 μM のロイペプチン）と 10 μl の試料（ヒト血漿）を 96 ウェルの黒色マイクロプレート（Greiner Bio-One International GmbH（オーストリア））にピペットで移し、37 °C で 10 分間予熱した。基質（200 μl、2 mM）を添加し、蛍光の増加を 37 °C で 1 時間、340 nm の励起波長と 410 nm の発光波長で Twinkle LB 970 マイクロプレート蛍光光度計（Berthold Technologies GmbH & Co. KG）で監視した。様々な試料の蛍光増加の傾きを、検量用試料である遊離 β NA に関して nmol（β NA）/ min / ml（試料）[nmol（β NA）min⁻¹ ml⁻¹] で計算する。

20

30

【0192】

記載された標準の可溶 DPP3 活性検定では、DPP3 活性を測定しているのか血漿中の他のアミノペプチダーゼの活性を測定しているのか判断できない。DPP3 に特異的なシグナルを生成するために、酵素捕捉検定を行った。この検定では、最初の工程でモノクローナル抗体への結合によって DPP3 が表面に固定化され、洗浄工程の後、特異的な DPP3 活性のみを測定できる。

【0193】

96 ウェルの黒色マイクロプレート（Greiner Bio-One International GmbH（オーストリア））を用いて、実施例 3 に記載されたとおりに固相を調製した。10 μl の試料（血漿または標準）と 200 μl の緩衝液（50 mmol / l のリン酸カリウム、100 mmol / l の NaCl、5 g / l のウシ血清アルブミン、1 g / l のマウス IgG、1 g / l のウシ IgG、50 μmol / l のアマスタチン、100 μmol / l のロイペプチン；pH 7.4）をピペットで前記の塗布済みマイクロプレートに移し、保温した（2 ~ 8 °C、600 rpm で 18 ~ 24 時間）。結合しなかった分析物を、洗浄液で洗浄（3 × 350 μl）することによって除去した。基質を添加（200 μl 中、100 μM を [50 mM のトリス / HCl（25 °C の pH 8.8）、0.04 % NaN₃] に溶解）した後、蛍光の増加を 37 °C で 1 時間、340 nm の励起波長と 410 nm の発光波長で Twinkle LB 970 マイクロプレート蛍光光度計（Berthold Technologies GmbH & Co. KG）で監視した。様々な試料の蛍光増加の傾きを、検量用試料である遊離 β NA に関して nmol（β NA）/ min / ml（試料）[nmol（β NA）min⁻¹ ml⁻¹] で計算する。

40

50

$\cdot^{-1}$] で計算する。

【 0 1 9 4 】

それぞれの活性検定の種類で、遊離 β N A を検定の検量用試料として用いた。したがって、 β N A 濃度を増加し (2 0 0 μ l 中、5 0 m M のトリス / H C l (2 5 での p H 8 . 8) 、0 . 0 4 % N a N ₃ に 0 、 4 、 8 、 1 6 、 3 2 、 6 4 、 1 2 5 、 2 5 0 μ M の β N A をそれぞれ溶解)、3 7 度、3 4 0 n m の励起波長と 4 1 0 n m の発光波長で T w i n k l e L B 9 7 0 マイクロプレート蛍光光度計 (B e r t h o l d T e c h n o l o g i e s G m b H & C o . K G) で測定した。すべての試料の測定値をこの β N A 標準で較正した。

(7 . 実施例 7)

【 0 1 9 5 】

様々な疾患の患者 (急性心不全 (A H F) 、敗血症、急性腎障害 (A K I) 、および下気道感染症 (L R T I) の患者) の血漿の D P P 3 活性を特異的な D P P 3 捕捉活性検定で定量し、健常対照の血漿の D P P 3 活性と比較した。

(7 . 1 . 方法)

【 0 1 9 6 】

実施例 3 で分析したコホートの一部を D P P 3 に特異的な酵素捕捉活性検定に供した。この検定では血漿試料 (1 0 μ l) の D P P 3 を最初に親和精製工程によって濃縮し、次に蛍光発生基質 A r g - A r g - β N A を添加してその活性を測定した (詳細な説明については実施例 4 を参照のこと) 。様々な試料の蛍光増加の傾き (n m o l (β N A) / m i n / m l (試料) [n m o l (β N A) m i n ⁻¹ m l ⁻¹]) の計算値は 1 0 μ l の試料サイズに関する。

(7 . 2 . 結果)

【 0 1 9 7 】

患者の試料を健常対照と比較したところ、すべての患者 (A H F 、敗血症、A K I 、および L T R I) の D P P 3 活性値は有意に高かった (図 3) 。

【 0 1 9 8 】

表 7 は、対照群の 7 5 パーセンタイルを超える D P P 3 値を有する患者の割合とそれぞれの診断を示す。活性はより十分な健常対照と疾患患者の境界を示した。

【表 8 】

	対照群の75パーセンタイルを超えるDPP3値を有する患者の割合					
徴候	AHF	MI	敗血症	がん	AKI	LRTI
サンドイッチ型検定	48.7	64.3	85.5	91.7	51.4	53.3
活性検定	77.8	活性なし	87.0	活性なし	70.0	85.7

表7:サンドイッチ型免疫測定および酵素捕捉活性検定における疾患患者と健常対照のDPP3値の比較.

【 0 1 9 9 】

D P P 3 活性検定と濃度検定をさらに十分に比較するため、R O C (受信者動作特性) 分析を健常対照と A H F 患者との境界 (図 4 A) または敗血症患者との境界 (図 4 B) について行った。曲線の下面積 (A U C) および信頼区間 (C I) の値を表 8 に示す。データ分析から、サンドイッチ型免疫測定に比べて活性検定の特異度が高いことがわかった。

10

20

30

40

50

【表 9】

	値	サンドイッチ型検定	活性検定
正常 対 AHF	AUC	0.6747	0.8506
	95 % CI	0.5638 – 0.7853	0.7482 – 0.9530
	p値	< 0.005	< 0.0001
正常 対 敗血症	AUC	0.8875	0.9384
	96 % CI	0.8270 – 0.9479	0.8865 – 0.9479
	p値	< 0.0001	< 0.0001

表8: ROC分析のデータ (AUC: 曲線下面積; CI: 信頼区間).

(8 . 実施例 8)

【 0 2 0 0 】

本実験では、健常なマウスでm A b D P P 3 の用量を増やした場合の全般的な安全性を監視した。

(8 . 1 . 方法)

【 0 2 0 1 】

到着時に 4 ~ 5 週齢、体重約 1 5 ~ 1 8 g の雌の B A L B / c ヌードマウス (C A n N . C g - F o x n 1 n u / C r l) (Charles River GmbH (ドイツ、ズルツフェルト)) を、最適な衛生条件のもと、空調管理し 1 時間に 1 0 ~ 1 5 回換気を行い、温度の目標範囲 2 2 ± 3 、相対湿度の目標範囲 3 0 ~ 7 0 % 、人工の蛍光照明 1 2 時間 / 暗期 1 2 時間の持続的に監視された環境で飼育した。個別換気ケージ (I V C) あたり最大 4 匹を飼育し、M - Zucht (ssniff Spezialdiäten GmbH) からなる餌とオートクレーブした公共水道水を与えた。

【 0 2 0 2 】

4 日間の順化期間の後、m A b D P P 3 の投与を開始した。3 つの異なる m A b D P P 3 濃度 (0 . 6 5 m g / k g 、 1 . 9 m g / k g 、および 5 . 7 5 m g / k g) を P B S に溶解し、各群 4 匹のマウスに注射した。1 日目、3 日目、5 日目、7 日目に m A b D P P 3 を腹腔内 (i . p .) 投与し、マウスを 1 4 日間監視した。

(8 . 2 . 結果)

【 0 2 0 3 】

マウスはいずれも、1 4 日間の処置の間、副作用なく生存し、最も多い用量の場合も同様であった。m A b D P P 3 は他の動物実験 (常に 1 . 9 m g / k g の濃度で実施) に用いても安全である。

(9 . 実施例 9)

【 0 2 0 4 】

本実験では、健常なラットにおける m A b D P P 3 処置の全般的な安全性を、平均血圧を監視することによって研究した。

(9 . 1 . 方法)

【 0 2 0 5 】

2 ~ 3 ヶ月齢の雄のウィスターラット (Charles River Laboratories (ドイツ)) を本研究に使用した。血圧 (B P) の測定および記録のため、カテーテル (Introcan - W ; 2 2 G / 1 ' ' ; B . Braun) を右総頸動脈に挿入した。投与物およびサンプリングカテーテルは左頸静脈に入れた。

【 0 2 0 6 】

最初に動物をイソフルランで麻酔し、体重測定 (すべて g) し、長時間の麻酔のために 1 . 2 g / k g (体重) のウレタン (濃度 = 0 . 4 g / m L) を腹腔内 (i . p .) 注射

10

20

30

40

50

した。次いで首の腹側領域の毛を刈り、エタノールで拭いた。血管を準備し、カテーテルを挿入した。最後に、両方のカテーテルをヘパリン処置された等張食塩水で洗い流す。次いで血圧測定器 (Medex Logical (Medex Medical Ltd.)) を患者監視システム (Datex-Ohmeda (GE)) に接続した。ラップトップコンピュータを B P モニターに接続し、S/5 Collect Software で B P データを個別に記録した。

【0207】

ラットを、P B S、m A b D P P 3 の P B S 溶液 1 . 9 m g / k g または 5 . 7 5 m g / k g でそれぞれ処置した (各群 n = 3)。化合物は静脈カテーテルから投与した。血圧を化合物の投与の 1 時間前と化合物の投与後 6 時間にわたり監視した。

(9 . 2 . 結果)

10

【0208】

ラットは m A b D P P 3 処置によく反応した。高用量の m A b D P P 3 で処置したラットは平均血圧のわずかな上昇を示した (図 5)。一般に m A b D P P 3 も、高用量の場合でもラットモデルに使用しても安全である。

(10 . 実施例 10)

【0209】

本研究では、m A b D P P 3 による処置が敗血症の死亡率にどのような影響を及ぼす可能性があるかを C L P マウスモデルで分析した。

(10 . 1 . 方法)

【0210】

20

12 ~ 15 週齢の雄の C 5 7 B 1 / 6 マウス (Charles River Laboratories (ドイツ)) を本研究に用いた。軽度のイソフルラン麻酔下で腹膜炎を外科的に誘発した。腹腔の左上腹部 (盲腸の正常な位置) を切開した。盲腸を露出させ、小腸の導入部から遠位側に縫合糸で盲腸の周囲をきつく結紮した。盲腸に 24 ゲージの針で 1 つの穿刺創を作り、その創から少量の盲腸内容物を出した。盲腸を腹腔内に戻し、開腹手術部位を閉鎖した。最後に、動物を餌と水に自由に到達できるようにケージに戻した。補液として生理食塩水 500 μ l を皮下 (s . c .) 投与した。

【0211】

m A b D P P 3 (1 . 9 m g / k g を P B S に溶解) を溶媒 (P B S) と比較して試験した。化合物または溶媒を C L P (予防処置) の 5 分前と敗血症が完全に発症した後 C L P (治療処置) の 2 時間後にそれぞれ静脈内 (i . v .) 注射した。各群には 10 匹のマウスが含まれ、7 日間経過を観察した。

30

(10 . 2 . 結果)

【0212】

図 6 から、m A b D P P 3 抗体は P B S 投与に比べて死亡率を大きく低下させたことがわかる。m A b D P P 3 で処置した場合、4 日後にはマウスの 75 % が生存していた。これに対し、溶媒で処置した場合、4 日後にはほぼすべてのマウスが死亡した。

(11 . 実施例 11)

【0213】

敗血症性ショックのモデルを用いてラットに心不全を誘発し、心機能に対する m A b D P P 3 の影響を特性評価した。

40

(11 . 1 . 方法)

(研究設計)

【0214】

研究の流れを以下の図 7 A に示す。C L P または偽手術の後、動物を自由に水と餌に自由に到達できるようにして 20 時間休ませた。その後、ラットを麻酔し、気管切開をして動脈・静脈ラインを配置した。C L P 手術の 24 時間後、m A b D P P 3 または溶媒 (生理食塩水) を 2 m g / k g 投与した。循環動態を観血的に継続監視 (t = 0 ~ 3 h) した。手術の直後と m A b D P P 3 または生理食塩水注射の 15 分後、1 時間後、2 時間後、および 3 時間後に心臓の心エコー検査を行った。

50

(敗血症のCLPモデル)

【0215】

Centre d'élevage Janvier (フランス) から入手した雄のウィスターラット (2 ~ 3ヶ月齢、300 ~ 400 g、群の大きさについては表1を参照のこと) を無作為に3つの群のうちの1つに割り当てた。すべての動物を塩酸ケタミン (90 mg / kg) およびキシラジン (9 mg / kg) で腹腔内 (i.p.) 麻酔した。多微生物性敗血症を誘発するため、盲腸結紮・穿刺法 (CLP) をRittirschのプロトコルを微修正して行った。腹側正中切開 (1.5 cm) を行い、盲腸を露出させた。次いで盲腸を回盲弁の直下で結紮し、18ゲージの針で1回穿刺した。次いで腹腔を二層で閉じ、補液蘇生 (3 ml / 100 g (体重) の生理食塩水を皮下注射) し、動物をケージに戻す。偽処置群の動物には盲腸穿刺をせずに手術を行った。

(観血的血圧)

【0216】

AcqKnowledgeシステム (BIOPAC Systems, Inc. (米国)) を用いて循環動態的変数を求めた。これにより完全に自動化された血圧分析システムが得られる。BIOPACシステムに圧力センサーを介してカテーテルを接続する。

【0217】

この手順のため、ラットを麻酔した (ケタミンおよびキシラジン)。動物を温熱パッドに移して所望の体温 (37 ~ 37.5 °C まで) にした。温度フィードバックプローブを直腸に挿入した。ラットを仰臥位で手術台に置いた。気管を開き、外部人工呼吸器のために頸動脈および迷走神経を傷つけないようにカテーテル (16 G) を挿入した。動脈カテーテルを右頸動脈に挿入した。頸動脈を迷走神経から分離してから結紮する。

【0218】

左頸静脈から中心静脈カテーテルを挿入し、薬物を投与できるようにした。

【0219】

手術の後、動物を安定状態になるように休息させてから循環動態的測定を行った。次いで血圧 (BP) 基準値を記録した。データ採取の間、動脈ラインからの生理食塩水の輸液を停止した。

(心エコー検査)

【0220】

動物を塩酸ケタミンで麻酔した。胸部の毛を刈り、ラットを臥位で置いた。

【0221】

経胸壁エコー検査 (TTE) には高周波 (14 MHz) リニア型プローブと心臓プローブ (10 MHz) を備えた市販のGE Healthcare Vivid 7 Ultra-sound Systemを使用した。その後のオフラインでの分析のため、全ての試験をデジタルで記録し保存した。

【0222】

グレースケールの画像を2 cmの深度で記録した。大動脈弁輪径および肺動脈径を測定するために傍胸骨長軸像で二次元検査を開始した。また、Mモードを用いて左室 (LV) の大きさを測定し、短縮率 (FS (%)) を評価した。LVFSをLV拡張末期径 - LV収縮末期径 / LV拡張末期径として計算し、%で表した。したがって、拡張末期の時間はLVの最大径で定義された。その結果、収縮末期は、同じ心臓周期における最小径として定義された。全てのパラメータを手動で測定した。各測定について3回の心臓周期を平均化した。

【0223】

同じ傍胸骨長軸像からパルス・ドップラー法で肺動脈流を記録した。肺動脈の流出量の速度時間積分を測定した。

【0224】

心尖部五腔像からパルス・ドップラー法で僧帽弁先端部の位置の僧帽弁血流を記録した。

10

20

30

40

50

(実験の時点と動物群)

【 0 2 2 5 】

手術後、B P 基準値と心エコー図を記録した。次いでm A b D P P 3 (2 m g / k g) または溶媒 (生理食塩水) を注射し (i . v . ; 手術の 5 分後) 、生理食塩水の輸液を開始した。循環動態的な項目 (B P および心エコー図) をm A b D P P 3 または溶媒を注射した 1 5 分後、1 時間後、2 時間後、3 時間後に記録した。下表に 1 つの対照群と 2 つの C L P 群の概要を示す (表 9) 。実験の最後に動物を安楽死させ、血液を採取して E D T A - 血漿を作製し、臓器を回収してさらに分析した。

【 表 1 0 】

10

群	群の大きさ	CLP	処置
1 - 偽手術	7	無	生理食塩水
2 - CLP-生理食塩水	7	有	生理食塩水
3 - CLP-mAbDPP3	10	有	mAbDPP3

表9:実験群

(1 1 . 2 . 結果)

【 0 2 2 6 】

20

偽手術群の動物に比べて、敗血症ラットは非常に血圧が低く、心臓の短縮率が低下している。m A b D P P 3 の投与によって短縮率は有意に上昇し (図 7 B) 、平均血圧は上昇し (図 7 C) 、敗血症ラットの健康状態も大いに改善した。

(1 2 . 実施例 1 2)

【 0 2 2 7 】

ここに記載する研究の目的は、数種のがん細胞株を用いてm A b D P P 3 の潜在的な抗増殖効果を生体外の細胞培養系で評価することであった。

(1 2 . 1 . 方法)

【 0 2 2 8 】

m A b D P P 3 の原液 (1 m g / m l を P B S に溶解) を希釈し、最終濃度が 0 ~ 1 0 0 μ g / m l の範囲になるようにした。P B S を基準化合物として用いた。樹立されているがん細胞株 (A 5 4 9 、H C T 1 1 6 、M D A - M B 2 3 1) に由来するがん細胞を、1 0 % F C S およびペニシリン / ストレプトアビジンを含む D M E M で培養した。

30

【 0 2 2 9 】

A 5 4 9 細胞はヒト肺胞基底上皮腺がん細胞である。この細胞株は、外植された 5 8 歳の男性の腫瘍の肺がん組織を取り出して培養することによって最初に樹立された。本来はこれらの細胞は扁平であり、水や電解質などのいくつかの物質が肺の肺胞を越えて拡散することに関与する。前記 A 5 4 9 細胞を生体外で培養すると、単層細胞として成長し、培養フラスコに付着する。さらなる特徴は、これらの細胞がレシチンを合成でき、高濃度の不飽和脂肪酸を含有していることである。A 5 4 9 細胞株は、薬物代謝に関する I I 型肺

40

【 0 2 3 0 】

H C T 1 1 6 細胞株はヒト大腸がん細胞である。これらの上皮細胞は付着しやすいという培養特性をもち、成人男性に由来する。この細胞株は、適切なトランスフェクション宿主である。この株は r a s がん原遺伝子のコドン 1 3 に変異を有しており、このコドンの変異に関する P C R 検定の陽性対照として使用することができる。

【 0 2 3 1 】

M D A - M B 2 3 1 細胞株は、上皮形態をもつヒト乳腺がん細胞である。これらの細胞は、コーカス人の乳がん患者の胸水から単離された。

50

【0232】

各細胞株について、96ウェルの懸濁細胞培養プレートを作製した。100μLの軟寒天の底層（最終濃度は完全培地中0.6%）を注入し、固化させた。次いで対応する細胞および細胞数を含む軟寒天の最上層（最終濃度0.4%）50μLを上に加えて固化させ、この96ウェルプレートを37℃、10%CO₂で一晩保温した。

【0233】

翌日、化合物をプレートの内側ウェルに添加した。続いて、試験物を細胞培養インキュベータで保温した。最後にAlamar Blueで試験物を発色させ、37℃で3～5時間保温して蛍光強度を測定した（励起：560nm、発光：590nm）。低対照として、細胞を10⁻⁵Mスタウロスポリン（6倍値）で処理した。高対照として、細胞を0.1%DMSO（溶媒対照、6倍値）で処理した。

10

【0234】

生データをそれぞれ100%と0%に設定された高対照（溶媒0.1%DMSO）および低対照（10⁻⁵Mスタウロスポリン）に対する軟寒天の成長（%）に変換した。GraphPad Prism 5ソフトウェアを用いて、傾きが変化するS字型応答に適合するモデルで（軟寒天成長0%を制約範囲の下限とし、また下限を設定せずに、軟寒天成長100%を上限としてIC₅₀を計算した。

（12.2.結果）

【0235】

細胞培養系で、使用した様々なmAbDPP3投与量に応じた3つのがん細胞株（A549、HCT116、MDA-MB231）の成長を評価した（図8）。制約範囲の上限（軟寒天成長100%）である溶媒対照のシグナルおよび下限（軟寒天成長0%）であるスタウロスポリン対照のシグナルに基づく標準パラメータを用いてIC₅₀値を求めた。それぞれのIC₅₀値を表10に要約する。

20

mAbDPP3処置は、試験した3つの細胞株に対して抗増殖効果があった。

【表11】

細胞株	組織起源	保温時間	IC ₅₀
A549	肺	8日間	6.3 μg/ ml
HCT116	結腸	8日間	2.0 μg/ ml
MDA-MB231	乳房	11日間	8.7 μg/ ml

30

表10: mAbDPP3処置したときのIC₅₀値

（13.実施例13）

【0236】

ここに記載する研究の目的は、mAbDPP3の腫瘍形成を予防する能力を乳がんおよび大腸がんの異種移植片モデルで評価することであった（腫瘍成長阻害研究）。

（13.1.方法）

40

【0237】

単層MDA-MB-231細胞（乳がん）およびHCT-116細胞（大腸がん）をそれぞれ、DMEM+10%FCS中で増殖させた。細胞を空気90%、二酸化炭素10%の加湿雰囲気下、37℃で培養した。培地を定期的に3日毎に交換した。3～4日毎に、密集した培養物をトリプシン/EDTAで1:3～1:3に分割し、密度が約3～4×10⁶細胞/15cm²+25mL培地になるように播種した。

【0238】

到着時に4～5週齢、体重約15～18gの雌のBALB/cヌードマウス（CAnN.Cg-Foxn1^{nu}/CrI）（Charles River GmbH（ドイツ、ズルツフェルト））を、最適な衛生条件のもと、空調管理し1時間に10～15回換気を行い、温度の目標範囲22±3

50

、相対湿度の目標範囲 30 ~ 70 %、人工の蛍光照明 12 時間 / 暗期 12 時間の持続的に監視された環境で飼育した。個別換気ケージ (I V C) あたり最大 4 匹を飼育し、M-Zucht (ssniff Spezialdiäten GmbH) からなる餌とオートクレーブした公共水道水を与えた。

【 0 2 3 9 】

A T C C より提供されたヒトの乳がん細胞 M D A - M B - 2 3 1 および大腸がん細胞 H C T - 1 1 6 を本研究に使用する。5 代以内の細胞継代培養物をマウスに接種した。 3×10^6 細胞 / 0.1 mL をマウスの右脇腹に皮下注射した。腫瘍体積が約 100 ~ 200 mm³ に達すると、適切なサイズの腫瘍を有する 20 匹のマウスを、腫瘍体積および体重に従って無作為に群に分ける (各群 10 匹)。動物は腫瘍体積および体重にしたがって投薬され、投与を開始する。以下の表に群について示す (表 1 1)。

【 表 1 2 】

群	濃度	経路	計画	基材	細胞株	観察期間	動物数
mAbDPP3-乳がん	1.9 mg/ kg	静脈	1、3、5、7、9日後	PBS	MDA-MB231	24日間	10
mAbDPP3-大腸がん					HCT116	28日間	10
PBS-乳がん	-	静脈	1、3、5、7、9日後	PBS	MDA-MB231	24日間	10
PBS-大腸がん					HCT116	28日間	10

表11:処置戦略の概要

【 0 2 4 0 】

24 日間、動物の行動と健康状態を毎日観察し、ノギス測定法で腫瘍成長を 2 日毎に記録した。原発腫瘍のサイズをノギス測定 (OMC Fontana の手動ノギス) によって測定した。式 $V = W^2 \times L / 2$ (L = 長さ、 W = 腫瘍の垂直幅、 $L > W$) に従って腫瘍サイズを計算した。個々の相対的腫瘍体積 ($R T V$) を以下のように計算した: $R T V = V_t / V_0$ (V_t は各日の体積、 V_0 は処置開始時の体積である)。

(1 3 . 2 . 結果)

【 0 2 4 1 】

異種移植片がんモデルでは、調査したすべての腫瘍の形成が m A b D P P 3 の投与によって低減された (図 9 A ~ D)。m A b D P P 3 で処置した場合、乳房細胞腫瘍は 20 倍の大きさに成長するのに 2 日長くかかり (図 9 B)、結腸細胞腫瘍は 10 倍の大きさまで成長するのに 2 日長くかかる (図 9 D)。このモデルでは、大腸がん細胞株によって誘発された腫瘍は乳がん細胞株によって誘発された腫瘍よりも成長が非常に遅かった。

(1 4 . 実施例 1 4)

【 0 2 4 2 】

D P P 3 吸着体の使用によって血漿から余剰の D P P 3 を除去する能力を評価するために、D P P 3 が抗 D P P 3 カラムに十分に結合するかを分析するべきである。D P P 3 結合抗体を GlycoLink カラム (Thermo Fisher) に固定化することによって親和性クロマトグラフィーカラムを作製した。これらのカラムに通液する前後の D P P 3 濃度を測定することによってカラムとの D P P 3 の結合を分析した。

(1 4 . 1 . 方法)

【 0 2 4 3 】

最初の工程ですべての D P P 3 結合抗体 (m A b D P P 3 _ 2 5 5 2、2 5 5 3、2 5 5 4、2 5 5 5) を、それぞれ指導説明書に従い 1 つの GlycoLink カラムに酸化させ固定化した。次に組み換え G S T - h D P P 3 (USBio) または患者の血漿試料をカラムに注入し、D P P 3 の結合を監視した。

(抗体の酸化)

【 0 2 4 4 】

10

20

30

40

50

したがって、3 mg / ml の各 DPP3 抗体溶液 300 μ l を 700 μ l の GlycoLink Coupling Buffer に希釈し、最終体積が 1 ml、pH < 6 になるようにした。抗体の糖質群を酸化させるため、メタ過ヨウ素酸ナトリウム 2.1 mg を溶液に添加し、室温で 30 分間保温した。脱塩カラムを用いて抗体溶液から酸化剤を除去した。

(GlycoLink カラムの作製)

【 0 2 4 5 】

カップリング反応を触媒するために、酸化した抗体に 0.1 M のアニリンを添加した。次いで平衡化した GlycoLink カラムに溶液を注入し、室温で 4 時間保温した。結合していない物質をカラムから流した後カラムを洗浄し、平衡化して次に使用するまで保管した。

10

(DPP3 の親和精製)

【 0 2 4 6 】

組み換え GST - h DPP3 または患者の血漿をカップリング緩衝液に希釈 (組み換え DPP3 の最終濃度 = 100 ng / ml、1 ml ; 血漿 1 ml + カップリング緩衝液 1 ml) し、平衡化した mAb DPP3 カラムに注入して室温で 30 分間保温した。結合効率と結合能力を評価できる全体流入量を保った。カラムを洗浄し、結合したタンパク質を GlycoLink Elution Buffer で溶出し、平衡化してから保存した。

(DPP3 含量の分析)

【 0 2 4 7 】

親和精製前の試料および組み換え GST - h DPP3 と流入量の DPP3 濃度を、サンドイッチ型発光免疫測定 (詳細は実施例 2 を参照のこと) で測定した。20 μ l の試料 (または検量用試料) を、塗布済み 96 ウェルマイクロプレートにピペットで入れ、希釈した標識付き検出抗体 (200 μ l) を加えた後、プレートを 2 ~ 8 で 18 ~ 24 時間保温した。結合していないトレーサーを、350 μ l の洗浄溶液 (20 mM の PBS (pH 7.4)、0.1 % の Triton X-100) で 4 回洗浄することによって除去した。十分に結合した化学発光を Centro LB 960 蛍光光度計 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG) で測定した。

20

(14.2. 結果)

【 0 2 4 8 】

親和性クロマトグラフィーによって血漿および組み換え DPP3 の溶液中のほぼすべての DPP3 を試料から除去する (表 12 参照)。異なる mAb DPP3 抗体は異なる DPP3 親和性を示す。mAb DPP3 _ 2555 は組み換え DPP3 への結合速度が最高であるため、この抗体を選択して血漿試料のクロマトグラフィーに使用した。表 12 は親和性クロマトグラフィーによって血漿 DPP3 濃度を大きく低減できることを示している。これらの結果から、患者の血漿から余剰の DPP3 を除去するためのアフエレーションに DPP3 吸着体を使用できることがわかる。

30

40

50

【表 13】

試料	固定化抗体	濃度 _{DPP3} [ng/ ml]	
		GlycoLink前	GlycoLink後
組み換えGST-hDPP3	2552	100	16.3
	2553	100	21.6
	2554	100	14.1
	2555	100	8.5
血漿_1	2555	18	1.2
血漿_2		26.1	4.3
血漿_3		37.5	3.7

表12: 示された抗DPP3抗体を用いた親和性クロマトグラフィーの前後の試料中の天然または組み換えDPP3の濃度

(参照文献)

【図面の簡単な説明】

【0249】

【図1A】図1はDPP3活性の阻害を示す。(A)数種の異なる抗DPP3抗体の存在下で組み換えGST-hDPP3の活性を測定した。ペプチドおよび/または全長(FL)天然DPP3に対して作製されたDPP3結合抗体は最大70%の強い阻害効果を示している。

【図1B】(B)阻害性のあるmAbDPP3による組み換えGST-hDPP3の阻害曲線である。特異的抗体によるDPP3の阻害は濃度に依存し、IC₅₀値は約0.2 μg/mlである。

【図2A】図2は、診断用マーカーであるDPP3の濃度を示す。(A)健常対照および様々な疾患(AHF:急性心不全、MI:心筋梗塞、敗血症、がん、AKI:急性腎障害、LRTI:下気道感染症)の患者のEDTA血漿中のDPP3濃度を示す。患者群の中央値は健常対照と有意に差がある(マン・ホイットニーの検定、p値<0.005)。

【図2B】(B)救急科に入院してからすぐに死亡した患者と生存した患者の血漿DPP3濃度の比較を示す。生存患者はDPP3濃度が有意に低い(マン・ホイットニーの検定、p値<0.05)。

【図3】図3は、診断用マーカーとしてのDPP3活性を示す。健常対照および様々な疾患(AHF:急性心不全、敗血症、AKI:急性腎障害、LRTI:下気道感染症)の患者のEDTA血漿中のDPP3活性を示す。患者群の中央値は健常対照と有意に差がある(マン・ホイットニーの検定、p値<0.0001)。

【図4A】図4はDPP3活性および濃度の検定のROCプロット分析である。(A)健常対照およびAHF患者のROC分析結果を示す。

【図4B】(B)健常対照および敗血症患者のROC分析結果を示す。

【図5】図5はmAbDPP3処置の安全性(血圧)を示す。PBSまたはmAbDPP3(5.75 mg/kg)で健常なラットを処置した。右総頸動脈に挿入したカテーテルで血圧(BP)を測定かつ記録した。投与物およびサンプリング用カテーテルを左頸静脈に挿入した。処置によって、PBS処置したラットに比べて相対血圧がわずかに上昇している(各群n=3)。

【図6】図6は敗血症マウスの死亡に対するmAbDPP3の影響を示す。敗血症マウス(CLPモデル)をCLPの5分前と2時間後にPBSまたはmAbDPP3(1.9 mg/kg)で処置した。死亡率を7日間監視した。カプラン・マイヤープロットはmAbDPP3処置後の敗血症マウスの生存期間がより長いことを示している。

【図 7 A】図 7 は敗血症ラットの心不全に対する m A b D P P 3 の影響を示す。(A) 敗血症性ショックのラットの心不全に関する研究の実験設計を示す。

【図 7 B】(B) 偽手術のラットに比べて短縮率が低いことによって示されるように、C L P はラットの心不全を誘発する。この短縮率は m A b D P P 3 処置によって有意に増加する (2 m g / k g ; 各群 n = 7 ; マン・ホイットニーの検定、p 値 < 0 . 0 0 0 1)。

【図 7 C】(C) 溶媒で処置した敗血症ラットの平均血圧は時間と共に下がるが、m A b D P P 3 処置によって m B P は有意に上昇する (2 m g / k g ; 各群 n = 7 ; マン・ホイットニーの検定、p 値 < 0 . 0 0 5)。

【図 8】図 8 は生体外での腫瘍成長に対する m A b D P P 3 の影響を示す。腫瘍細胞株 (肺がん、大腸がん、乳がん) を用いた軟寒天試験を示す。抗 D P P 3 抗体を添加することによって腫瘍細胞成長は低減される。

【図 9 A】図 9 は生体内での腫瘍成長に対する m A b D P P 3 の影響を示す。(A) 乳腺腫瘍の異種移植片を有するマウス (各群 n = 1 0) を P B S または m A b D P P 3 で処置した。2 4 日間の相対的な腫瘍体積の成長曲線は、m A b D P P 3 で処置したマウスの腫瘍成長が低減されていることを示す。

【図 9 B】(B) m A b D P P 3 で処置した場合としない場合の乳房細胞腫瘍の体積が 2 0 倍に増えるのにかかる時間の比較を示す。成長にかかる時間は m A b D P P 3 で処置した場合の方が有意に長い (マン・ホイットニーの検定、p 値 < 0 . 0 5)。

【図 9 C】(C) 結腸腫瘍細胞の異種移植片を有するマウス (各群 n = 1 0) を P B S または m A b D P P 3 で処置した。3 0 日間の相対的な腫瘍体積の成長曲線は、m A b D P P 3 で処置したマウスの腫瘍成長が低減されていることを示す。

【図 9 D】(D) m A b D P P 3 で処置した場合としない場合の結腸細胞腫瘍の体積が 1 0 倍に増えるのにかかる時間の比較を示す。成長にかかる時間は m A b D P P 3 で処置した場合の方が長い。

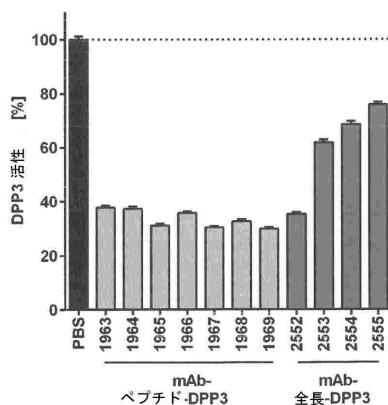
【図 1 0】図 1 0 は、診断用マーカーとしての D P P 3 活性を示す (I I)。健常対照および様々な疾患 (急性心筋梗塞 (A M I)、心原性ショック、敗血症性ショック、および肝不全) の E D T A 血漿中の D P P 3 活性を示す。患者群の中央値は健常対照と有意に差がある (マン・ホイットニーの検定、p 値 < 0 . 0 5)。

【図 1 1】図 1 1 は、健常なラットの血圧に対する D P P 3 の作用を示す。健常な雄のウィスターラットに 0 . 2 m g / k g の組み換え G S T - h D P P 3 を注射した。右総頸動脈に挿入したカテーテルで血圧 (B P) を測定かつ記録した。D P P 3 を尾静脈から静脈内注射した。D P P 3 注射によって B P は低下している。

【図面】

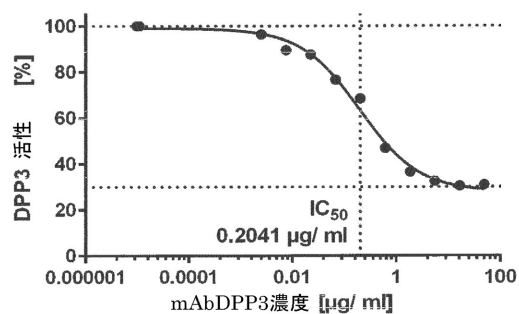
【図 1 A】

Fig. 1 A:



【図 1 B】

Fig. 1 B:



10

20

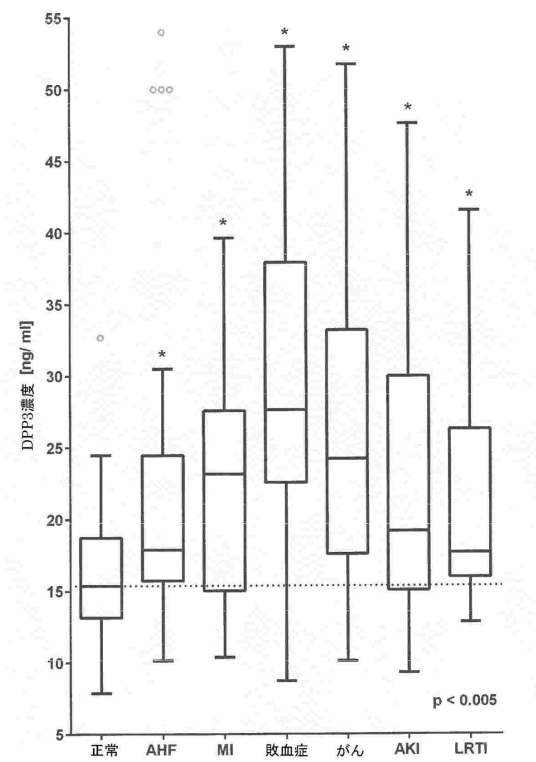
30

40

50

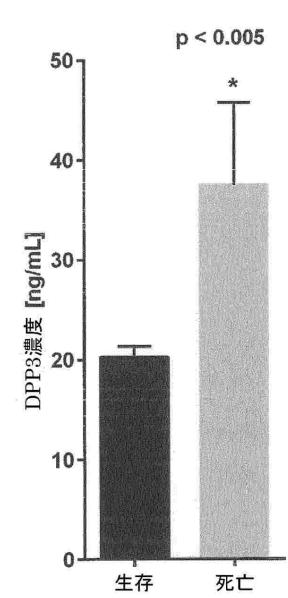
【 図 2 A 】

Fig. 2 A:



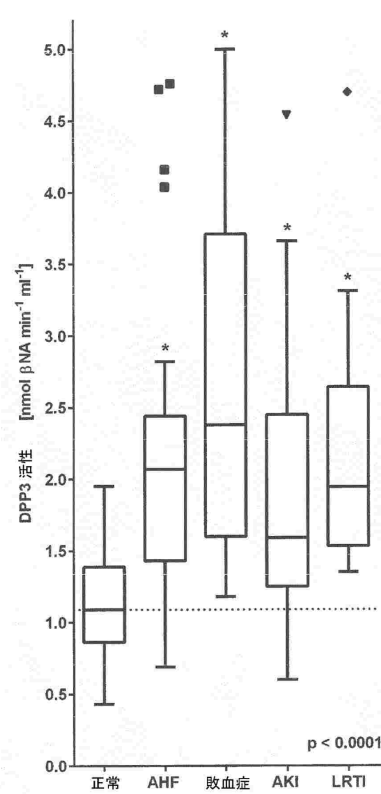
【 図 2 B 】

Fig. 2 B:



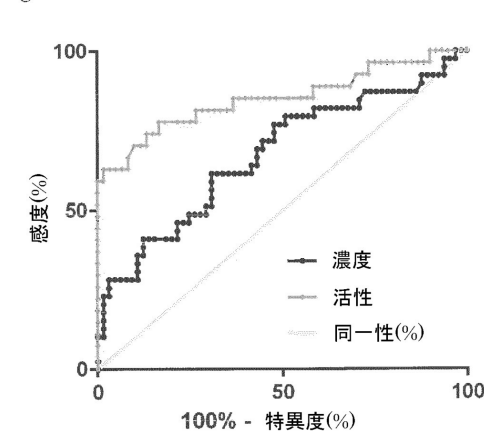
【 図 3 】

Fig. 3:



【 図 4 A 】

Fig. 4 A:



10

20

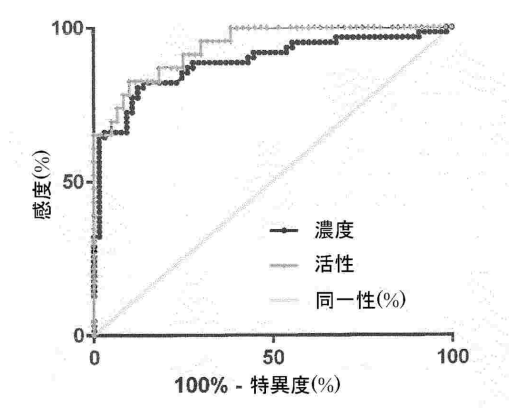
30

40

50

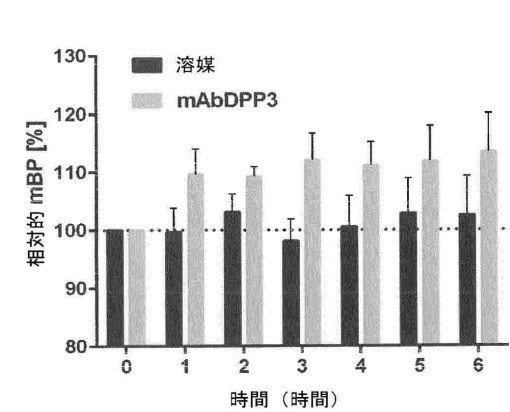
【 図 4 B 】

Fig. 4 B:



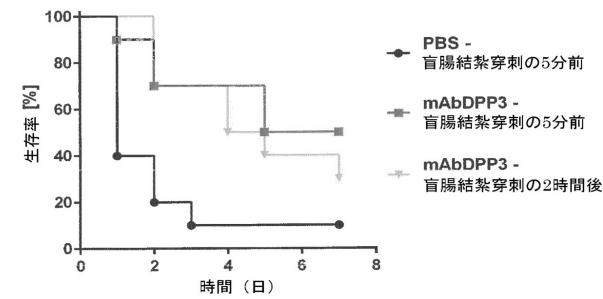
【 図 5 】

Fig. 5:



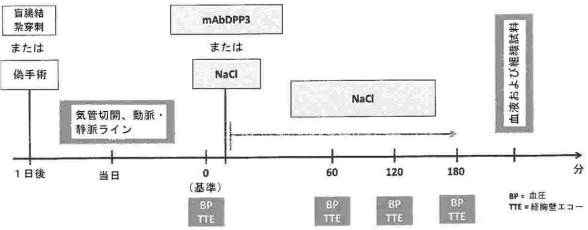
【 図 6 】

Fig. 6:



【 図 7 A 】

Fig. 7 A:



10

20

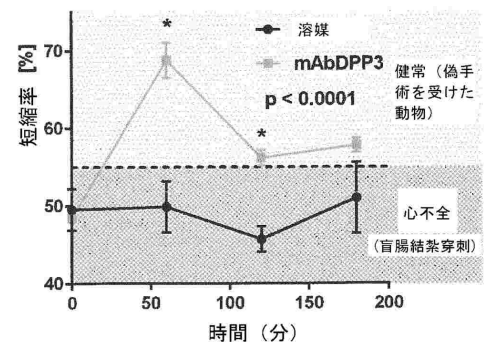
30

40

50

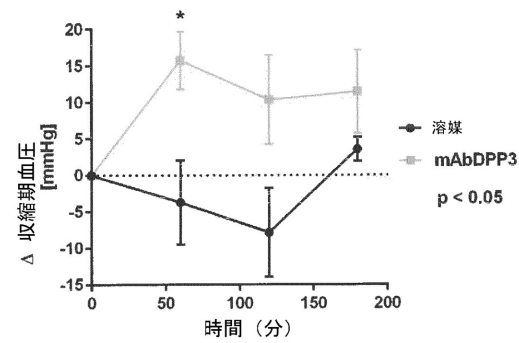
【 図 7 B 】

Fig. 7 B:



【 図 7 C 】

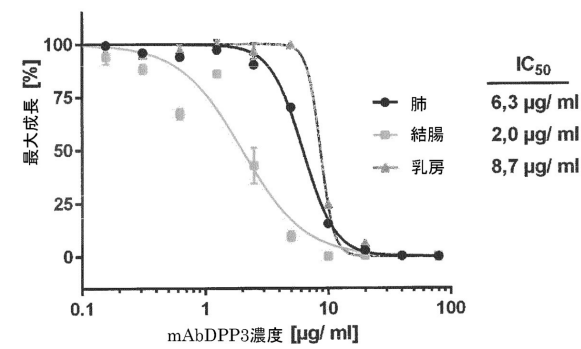
Fig. 7 C:



10

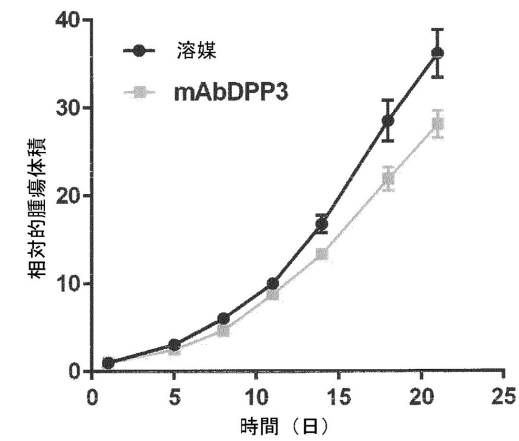
【 図 8 】

Fig. 8:



【 図 9 A 】

Fig. 9 A:



20

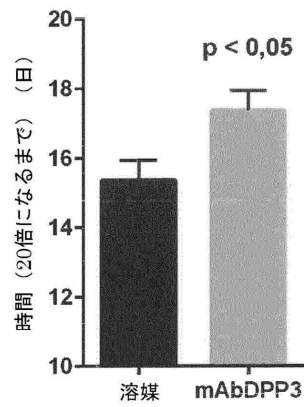
30

40

50

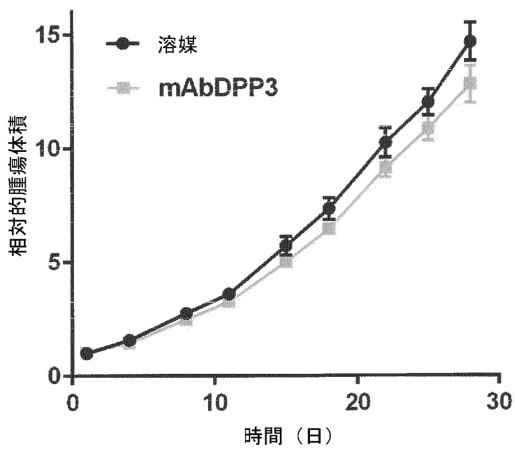
【 図 9 B 】

Fig. 9 B:



【 図 9 C 】

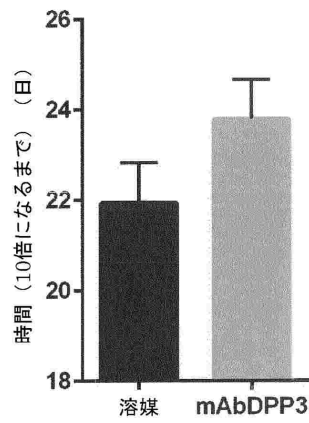
Fig. 9 C:



10

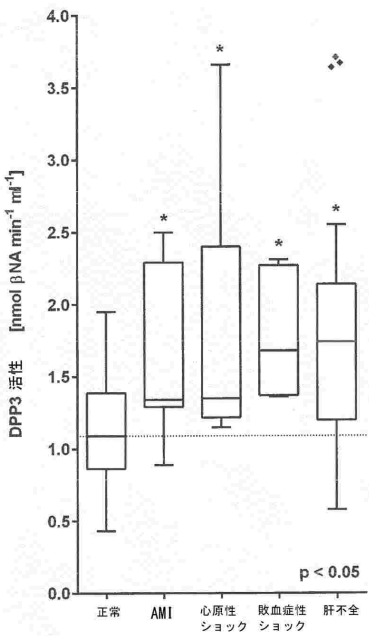
【 図 9 D 】

Fig. 9 D:



【 図 1 0 】

Fig 10:



20

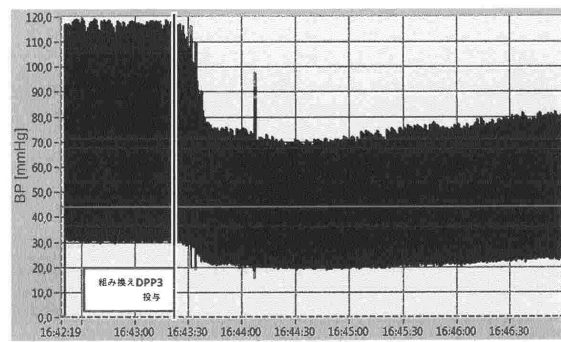
30

40

50

【 図 1 1 】

Fig 11:



10

【 配 列 表 】

2025011237000001.app

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和6年10月11日(2024.10.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

壊死性の経過を伴うか壊死性の経過に関連する被験者の疾患または状態を診断する方法 10
であって、
前記被験者の体液試料中のD P P 3総量を定量し、かつ/または活性D P P 3の量を定量
することと、
定量された前記D P P 3総量または活性D P P 3の量を所定の閾値と比較することとを含
み、
定量された前記量が前記所定の閾値を超える場合、前記被験者は壊死性の経過を伴うか壊
死性の経過に関連する疾患または状態を有すると診断される、方法。

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I		テーマコード (参考)
	C 1 2 Q	1/37	Z N A
	C 1 2 N	9/50	
(74)代理人	100150810		
	弁理士 武居 良太郎		
(74)代理人	100138210		
	弁理士 池田 達則		
(72)発明者	アンドレアス ベルクマン		
	ドイツ連邦共和国, 1 3 4 6 5		
	ベルリン, アム ローゼンアンガー 7 8		
F ターム (参考)	4B063 QA19 QQ03 QQ36 QQ79 QR16 QR48 QR58 QR72 QS03 QS28		
	QS36 QX02		