

(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2016-519761

(P2016-519761A)

(43) 公表日 平成28年7月7日(2016.7.7)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)	
G01N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	Z N A D	4 B 0 5 0
G01N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543	5 4 5 A	4 B 0 6 3
C12Q 1/37 (2006.01)	C12Q 1/37		4 C 0 8 4
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00		
A61P 43/00 (2006.01)	A61P 43/00	1 1 1	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-502967 (P2016-502967)	(71) 出願人	507021757 バイエル・ヘルスケア・エルエルシー B a y e r H e a l t h C a r e L L C
(86) (22) 出願日	平成26年3月14日 (2014.3.14)	(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月12日 (2015.11.12)	(74) 代理人	100119253 弁理士 金山 賢教
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/029040	(74) 代理人	100124855 弁理士 坪倉 道明
(87) 國際公開番号	W02014/144572	(74) 代理人	100129713 弁理士 重森 一輝
(87) 國際公開日	平成26年9月18日 (2014.9.18)		
(31) 優先権主張番号	61/799,658		
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

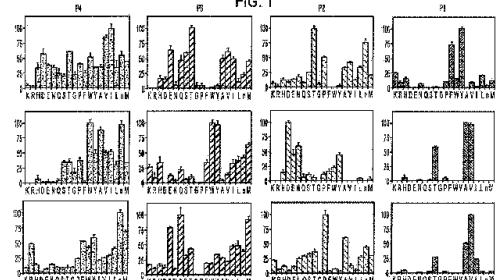
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】好中球細胞外トラップにおけるプロテアーゼの基質プロファイリング

(57) 【要約】

プロテアーゼを含む、NETosisに関連する疾患のためのタンパク質バイオマーカーが本明細書において提供される。このようなプロテアーゼの基質配列およびその使用も提供される。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

好中球細胞死を形成する細胞外トラップであるN E T o s i s に関する炎症状態を有する被検体を特定するための方法であって、

(a) N E T に関するプロテアーゼ含有物についての情報を前記被検体からのサンプルから得ることと；

(b) N E T に関するプロテアーゼ含有物のレベルと、健康な被検体からの匹敵するサンプルのものとを比較することと、

(c) 前記サンプルの前記N E T に関するプロテアーゼ含有物が、前記健康な被検体からの前記匹敵するサンプルのものより大きい場合、前記被検体がN E T o s i s に関する炎症状態を有することを特定することとを含む方法。
10

【請求項 2】

前記サンプルが血液サンプルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記プロテアーゼが、好中球エラスターーゼ (N E) 、カテプシン G (C G) 、プロテイナーゼ 3 (P R 3) および好中球が分泌するタンパク質 4 (N S P 4) からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記N E T o s i s に関する炎症状態を処置することをさらに含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。
20

【請求項 5】

前記炎症状態が、感染、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、囊胞性線維症、深部静脈血栓、子癇前症、歯周炎、虫垂炎、結核およびクローン病からなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

処置することは、プロテアーゼ阻害剤を前記被検体に投与することを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記プロテアーゼ阻害剤は、図 4 ~ 9 に示された配列を含むペプチド基質の開裂を阻害する、請求項 6 に記載の方法。
30

【請求項 8】

処置することは、ステロイドまたは非ステロイド系抗炎症薬を前記被検体に投与することを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 9】

処置することは、抗生物質を前記被検体に投与することを含む、請求項 4 に記載の方法。
。

【請求項 10】

情報を得ることは、前記被検体からのサンプルを得ることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

情報を得ることは、プロテアーゼ含有物評価を前記サンプルに行うこととを含む、請求項 1 に記載の方法。
40

【請求項 12】

前記プロテアーゼ含有物評価は、酵素結合免疫吸着測定法 (E L I S A) 、質量分析、クロマトグラフィー、電気泳動、ラジオイムノアッセイ、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別 (F A C S) 、またはウエスタンプロットティングによって決定される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記サンプルと前記匹敵するサンプルとの間の前記プロテアーゼ含有物の差は、 + 1 0 % 、 + 2 0 % 、 + 2 5 % 、 + 3 0 % 、 + 4 0 % 、 + 5 0 % 、 + 7 5 % または + 1 0 0 % で
50

ある、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記被検体がヒトである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記被検体が非ヒト哺乳動物である、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(優先権の主張)

本出願は、2013年3月15日に出願された米国仮出願第61/799,658号明細書に対する優先権の利益を主張し、その内容全体は、参照によって本明細書に組み込まれている。 10

【0 0 0 2】

本出願は、好中球細胞外トラップ（（1または複数の）NETとも呼ばれる）に関する。 20

【背景技術】

【0 0 0 3】

好中球は、血漿中に最も多く存在する白血球である。好中球は、病原体侵入に応答して傷害部位に動員される最初の細胞であり、好中球は、自然免疫防御の最初のラインで作用する。好中球は、細胞内食作用によって機能し溶菌プロテアーゼ、反応性酸素種（ROS）および殺菌性タンパク質を感染因子の攻撃のために使用する炎症性応答および急性免疫のためのエフェクター細胞と伝統的に考えられていた。最近の研究は、好中球が、他の免疫細胞、例えば、樹状細胞、B細胞およびT細胞を用いたシグナル伝達のためにサイトカイン、ケモカイン、Fc受容体および補体成分を発現することによって免疫調節能も有することを示している（Mantovani、Cassatellaら、2011）。 20

【0 0 0 4】

プロテアーゼは、好中球の重要なエフェクターである。プロテアーゼは、直接的に殺菌活性に寄与するだけではなく、ケモカイン、サイトカインおよび受容体のタンパク質分解プロセシングにおいて機能する（Pham 2006；Meyer-HoffertおよびWiedow 2010）。この調整活性は、NE、PR3およびCGによるIL-1およびIL-18のカスパーゼ非依存性活性化（Robertson、Youngら、2006；Guma、Ronacherら、2009；Joosten、Neteaら、2009）、またはNEおよびPR3による抗炎症性プログラニュリンから炎症誘発性グラニュリンへの変換（Kenssensbrock、2008）によって例示される。また、NEは、好中球細胞外トラップ（NET）上の組織因子経路阻害剤を開裂することによって、好中球が媒介する炎症と凝固経路とを結びつけることが示されている。 30

【0 0 0 5】

NETは、NETosisと呼ばれる特定の細胞死の形態において、刺激された好中球によって放出される。NETosisは、病原体侵入に対する応答して、好中球が媒介する自然免疫の新しい機構を表すという仮説がある（Brinkmann、Reichardら、2004；Remijse、Kuijpersら、2011）。NETosisは、脱凝縮されたクロマチンおよび抗菌性タンパク質およびペプチドから作られるネットワークであるNETの形成を特徴とする。自然免疫防御の最初のラインで作用するNETosisは、多くの態様においてアポトーシスおよび壞死とは異なる細胞死の新しい典型を表す。核断片化または膜小胞形成は観察されず、活性化は、カスパーゼ活性化とは独立しているが、NADPHオキシダーゼおよびMAPKキナーゼ経路を必要とする。NETosisは、NE、ミエロペルオキシダーゼ、ならびにヒストンシトルリン化およびクロマチン脱凝集に関する酵素であるペプチジルアルギニンデイミナーゼ4の活性化にも関与する（Wang、Liら、2009；Papayannopoulos、Metzlerら、2010）。NETの主な機能は、病原体を捕捉し死滅させることであるという仮 40

説がある。それに加え、主な機能は、その後に起こる自然免疫応答および獲得免疫応答のためのエフェクターおよびメディエーターの高い局所濃度のためのマトリックスも提供する。NET成分の以前のプロテオミクス研究は、3つの主要なプロテアーゼ、すなわち、好中球NE、CGおよびPR3を特定した(Urban、Ermertら、2009)。

【0006】

NETに関連するタンパク質分解活性を不偏の様式で特性決定するために、NETに捕捉されたタンパク質が放出され、Multiplex Substrate Profiling by Mass Spectrometry (MSP-MS) 方法でアッセイされた(O'Donoghueら、2012)。この方法は、開裂部位の検出のためのタンデム型液体クロマトグラフィー-質量分析での多重アッセイにおいて、高度に多様化した124のペプチドのライブラリを利用する。MSP-MSアッセイを使用して、複雑なNETosisサンプル中の各酵素の寄与は、精製されたヒト好中球プロテアーゼからの基質特異性プロフィールと比較することによってデコンボリューションされた。それに加え、NE、CG、PR3およびNSP4の非プライマー側の基質特異性は、テトラペプチド蛍光基質ライブラリを使用して調査された。本発明者らが知る限りでは、本発明者NE、PR3、CGおよびNSP4の広範囲の基質特異性を同一の条件で並行して比較する最初の完全な研究がここに報告されている。3人の独立した健康なドナーからのNETに関連するプロテアーゼ混合物の分析によって、主要な活性は、NEに起因し得る。NE活性の免疫枯渇は、PR3からの活性に寄与し、より少ない程度でCGからの活性に寄与し、わずかなNSP4活性に寄与することを明らかに示した。基質特異性、およびNETに関連する全体的な活性へのNETに関連する各プロテアーゼの寄与を特定することによって、急性および慢性の免疫疾患における病的NETosisのための改良された治療介入を開発することができる。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Mantovani、Cassatellaら、2011

【非特許文献2】Pham 2006; Meyer-HoffertおよびWiedow 2010

【非特許文献3】Robertson、Youngら、2006

【非特許文献4】Guma、Ronacherら、2009

【非特許文献5】Joosten、Neteaら、2009

【非特許文献6】Kenssenbrock、2008

【非特許文献7】Brinkmann、Reichardら、2004

【非特許文献8】Remijse、Kuijpersら、2011

【非特許文献9】Wang、Liら、2009

【非特許文献10】Papayannopoulos、Metzlerら、2010

【非特許文献11】Urban、Ermertら、2009

【非特許文献12】O'Donoghueら、2012

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

NETosisに関連する疾患のためのタンパク質バイオマーカーが本明細書において提供される。ある実施形態では、このようなバイオマーカーは、例えば、好中球エラスターーゼ(NE)、カテプシンG(CG)、プロテイナーゼ3(PR3)および好中球が分泌するタンパク質4(NSP4)を含むプロテアーゼである。

【0009】

好中球エラスターーゼ(NE)、カテプシンG(CG)、プロテイナーゼ3(PR3)および好中球が分泌するタンパク質4(NSP4)が認識および/または開裂する基質配列も提供される。

【0010】

ある実施形態では、基質配列は、このようなプロテアーゼのプローブまたは阻害剤を開発するために使用できる。さらに、このような基質配列は、開裂がNETossisに関連する疾患において望ましいポリペプチド中の開裂部位を開発するために使用できる。

【0011】

よって、好中球細胞死を形成する細胞外トラップであるNETossisに関連する炎症状態を有する被検体を特定するための方法であって、(a)NETに関連するプロテアーゼ含有物についての情報を被検体からのサンプルから得ることと；(b)NETに関連するプロテアーゼ含有物のレベルと、健康な被検体からの匹敵するサンプルのものとを比較することと、(c)サンプルのNETに関連するプロテアーゼ含有物が、健康な被検体からの匹敵するサンプルのものより大きい場合、被検体がNETossisに関連する炎症状態を有することを特定することとを含む方法が提供される。

10

【0012】

サンプルは、血液サンプルであってもよい。プロテアーゼは、好中球エラスターーゼ(N E)、カテプシンG(C G)、プロテイナーゼ3(P R 3)および好中球が分泌するタンパク質4(N S P 4)からなる群から選択されてもよい。方法は、NETossisに関連する炎症状態、例えば、感染、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、囊胞性線維症、深部静脈血栓、子癇前症、歯周炎、虫垂炎、結核およびクローン病を処置することをさらに含んでもよい。処置することは、プロテアーゼ阻害剤を被検体に投与することを含んでもよい。プロテアーゼ阻害剤は、図4～9に示された配列を含むペプチド基質の開裂を阻害してもよい。処置することは、ステロイドもしくは非ステロイド系抗炎症薬、または抗生素を被検体に投与することも含んでもよい。被検体は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物であってもよい。

20

【0013】

方法は、情報を得ることも含んでもよく、情報を得ることは、例えば、プロテアーゼ含有物評価をサンプルに行うことによって、被検体からのサンプルを得ることを含む。評価は、酵素結合免疫吸着測定法(E L I S A)、質量分析、クロマトグラフィー、電気泳動、ラジオイムノアッセイ、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別(F A C S)、またはウエスタンプロットティングによるものであってもよい。サンプルと匹敵するサンプルとの間のプロテアーゼ含有物の差は、+10%、+20%、+25%、+30%、+40%、+50%、+75%または+100%である。

30

【0014】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の特定の態様をさらに実証するために含まれる。本発明は、本明細書に提示された特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせて、これらの図面のうちの1つまたは複数を参照することによってよりよく理解され得る。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】好中球セリンプロテアーゼ(上段の列：カテプシンG(100nM)、中段の列：プロテイナーゼ3(50nM)、下段の列：エラスターーゼ(50nM))の非プライマー側の特異性の比較を示すグラフである。

40

【図2】好中球セリンプロテアーゼの広範囲の基質特異性の比較を示す図である。

【図3】エラスターーゼ(E L A)、プロテイナーゼ3(P R 3)およびカテプシンG(C G)の開裂を同時に監視するための蛍光基質の特定、ならびにドナーの好中球中の全タンパク質分解を決定するためのこの基質の使用を示す図である。

【図4】NETのタンパク質分解プロフィールおよび主要な活性の免疫枯渇の比較を示す図である。

【図5】エラスターーゼ開裂部位、ならびにエラスターーゼがカテプシンGおよびプロテイナーゼ3と共有する開裂部位を示す図である。

【図6】プロテイナーゼ3開裂部位、ならびにプロテイナーゼ3がエラスターーゼおよびカテプシンGと共有する開裂部位を示す図である。

50

【図7】カテプシンG開裂部位、ならびにカテプシンGがエラスターーゼおよびプロテイナーゼ3と共有する開裂部位を示す図である。

【図8】NETosisドナーからのプロテアーゼ開裂部位を示す図である。

【図9】エラスターーゼ、プロテイナーゼ3、カテプシンG、好中球が分泌するタンパク質4の開裂部位、およびNETosisドナーからのプロテアーゼ開裂結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本明細書に記載された任意の方法または組成物は、本明細書に記載された任意の他の方法または組成物に対して実施できることが企図される。本発明のこれらの実施形態および他の実施形態は、以下の説明および添付の図面と組み合わせて考慮される場合、よりよく認識および理解されよう。しかし、以下の説明は、本発明の種々の実施形態および多くの特定のそれらの詳細を示しているが、例示として与えられ、限定するものではないことを理解されたい。多くの置換、改変、付加および／または再編成が、本発明の精神から逸脱することなく本発明の範囲内でなされてもよく、本発明は、このようなすべての置換、改変、付加および／または再編成を含む。

【0017】

本開示は、記載された特定の方法論、プロトコル、細胞株、動物の種または属、構築物および試薬に限定されず、そのため異なってもよいことを理解されたい。本明細書で使用する用語は、特定の実施形態を説明する目的のみであり、本開示の範囲を限定することを意図しておらず、本開示の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることも理解されたい。

【0018】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、「1つの(a)」、「1つの(an)」、「その(the)」といった単数形は、内容が特に明確に示さない限り、複数形の言及を含むことに留意されたい。よって、例えば、「1つのプロテアーゼ(a protease)」の言及は、1つ以上のプロテアーゼの言及であり、当業者に公知のその均等物などを含む。

【0019】

本明細書で使用される場合、用語「約」は、提供された単位値の±10%を指す。本明細書で使用される場合、用語「実質的に」は、目的の特徴または特性の全体またはおおよその程度を示す定性的な状態を指す。生物学的および化学的な組成物および材料の試験、製造および貯蔵に影響を与える多くの変数のため、かつ生物学的および化学的な組成物および材料の試験、製造および貯蔵において使用される設備および装置における固有の誤差のため、生物学的現象および化学的現象は、存在すれば、絶対的な結果を達成するまたは避けることはまれであることが生物学の当業者には理解されよう。したがって、実質的という用語は、多くの生物学的現象および化学的現象における固有の完全さの潜在的欠如をとらえるために本明細書において使用される。

【0020】

特に定義されていない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者に一般的に理解されているのと同じ意味を有する。本明細書に記載されたものと同様または均等の任意の方法、デバイスおよび材料を、本発明の実施または試験において使用することができるが、好ましい方法、デバイスおよび材料をここに記載する。

【0021】

本明細書に述べられたすべての刊行物および特許は、例えば、本実施形態に関して使用し得る刊行物に記載の構築物および方法論を記載および開示するために、参照によって本明細書に組み込まれている。上記の刊行物および本文全体に記載された刊行物は、本出願の出願日より前のそれらの開示を単に与えている。従来発明という観点で、本発明より、このような開示の日付が前であるという権利を有することを認めるものではないと解釈す

10

20

30

40

50

べきである。

【0022】

セリンプロテアーゼは、好中球が媒介する免疫の重要なエフェクターであり、好中球が媒介する免疫は自然免疫応答の最前線で機能する。好中球セリンプロテアーゼは、毒性の病原性因子を分解することによって直接的に機能し、サイトカイン、ケモカインおよび受容体を含むそれらの基質のプロセシングを介して間接的に機能する。プロテアーゼは、好中球細胞死の新しい形態であるNETosisにおける重要なエフェクターであるとも予想される。NETosisは、侵入する病原体を捕捉し死滅させるために好中球によって利用される細胞外防御機構であるという仮説がある。これらの好中球細胞外トラップ(NET)は、細胞外DNAのウェブに埋め込まれた抗菌性分子の宿主からなる。

10

【0023】

ここで、不偏のペプチドライブリを図5～9に示されている基質として使用するNETに関連するプロテアーゼの全体的なプロファイリングが報告される。これらのペプチド系アッセイでは、好中球エラスター(NE)、カテプシンG(CG)、プロテイナーゼ3(PR3)および好中球が分泌するタンパク質4(NSP4)は、重複する異なるエンドペプチダーゼ活性を有し、同じペプチド基質の中の固有の部位で開裂されたことが多い。NETにおける優性なタンパク質分解活性は、NEに起因したが、CG活性およびPR3活性に対応する開裂部位は明らかであった。NEが免疫枯渇された場合、残りの活性は、CGに起因し、より少ない程度でPR3およびNSP4に起因した。よって、NE活性を遮断することは、NETに関連する主なプロテアーゼ活性を抑止し得る。それに加え、新しく特定された基質特異性署名は、NETに関連するプロテアーゼを標的とするより特異的なプローブおよび阻害剤を設計するために使用できる。

20

【0024】

2つの異なる相補的なペプチド系基質ライブリ、つまり、PS-SCLおよびMSP-MSを使用し、NE、PR3、CGおよびNSP4の4つの好中球セリンプロテアーゼの基質特異性が決定された。P1位置での好ましいアミノ酸および好ましくないアミノ酸が、それぞれの方法と強く相関関係にあり、一方、NEおよびPR3が、複数の部位で強い相関関係を有することが観察された。CGは、PS-SCLライブリ対MSP-MSライブリにはおよそ100倍大きな配列多様性があるが、PS-SCL法によって不完全にプロファイリングされるプロテアーゼの一例である可能性がある。設計によって、CGの活性は、P2'の占有を必要とする場合があり、または、P1'での蛍光ACC基によって悪影響を受ける場合がある。

30

【0025】

以前、PICSは、NE、CGおよびNSP4の広範囲にわたる基質特異性プロファイルを作成するために利用してきた(Schilling & Overall 2008; Perera 2012)が、PR3の基質特異性プロファイルを作成するためには利用されていない。これらの研究では、プロテオーム由来のペプチドが基質ライブリとして使用され、好中球セリンプロテアーゼによる開裂は、質量分析によって監視された。PS-SCL方法について観察されたように、各酵素のP1基質プロファイルは、本発明者らのMSP-MSデータとの非常に強い相関関係を示し、したがって、このクラスの酵素に対する基質選択性のほとんどがこのサブサイトで起こる可能性がある。それに加え、NEおよびCGのS2'部位が、これらの部位が方法間で強く相関関係があるため、基質認識に重要であり得ると決定された。各好中球セリンプロテアーゼに対して選択的である蛍光基質が開発できる。これらの基質は、セルピンの反応性ループ由来の配列、結晶学的データまたは位置スキャニングから設計された(Polanaowska, 1998; Hajjar, J. Med. Chem. 2006; Wysocka 2012)。これにより、特定された選択的な基質は、切断性結合のプライマー側および非プライマー側の両方でより大きな選択性を有する基質を開発するために利用できる。

40

【0026】

ヒト血清から単離された新しい好中球はPMAで処理されてNETosisを誘発し、

50

その後、NETに埋め込まれたタンパク質は、ヌクレアーゼでの処理の後、放出された。プロテオミクス分析は、NETから放出されたタンパク質を特定するために使用され、タンパク質の多くは、以前の研究で観察されている（Urban、Ermentら、2009）。興味深いことに、NEは、インタクトなDNAに密に結合したままであり、ヌクレアーゼ処理なしのサンプルにおいて見出されなかった。CGは、処理計画と独立してすべてのサンプルにおいて見出されたが、一方、PR3およびNSP4は、まったく観察されなかった。機能的なレベルで、上澄みにおけるタンパク質分解活性は、埋め込まれたNETタンパク質の放出の際に増加し、したがって、多重基質プロファイリングのための一連のヒト好中球調製物を提供した。

【0027】

10

MSP-MSは、複雑な生体サンプルをプロファイリングするのに理想的な技術であり、なぜなら、PS-SCL方法およびPICS方法とは異なり、基質集団は所定の一連のペプチドからなり、したがって、開裂部位は特定の酵素に直接的に結合させることができるのである。3つの独立したドナーサンプルにおいて開裂された基質のほとんどが同一であったため、サンプル調製およびプロテアーゼアッセイの両方の再現性は明らかであった。これにより、すべての共通の開裂部位について基質署名を作成することができた。この署名は、特にP4からP2'までのサブサイトでNE署名と同様の特徴を有し、したがって、NEは、好中球調製物において優勢なタンパク質分解活性である可能性があった。その後、この優勢さは、酵素の免疫沈降がNEに特異的な開裂部位の欠損および全体的な基質署名の変更を結果としてもたらしたとき、確認された。残った活性は、CGの産物である可能性があり、より少ない程度でPR3、NSP4および他のまだ特定されていない好中球プロテアーゼの産物である可能性があった。

20

【0028】

全体的な不偏の基質プロファイリングアッセイの利点は、すべてのプロテアーゼの活性が同時に監視できることである。それに加え、優勢なプロテアーゼは簡単に特定できる。この研究では、NET上のNEの標的化が、NETosisに関連する調節されていないタンパク質分解のいかなる有害な影響も最小限にすることは明らかである。この研究で特定された好中球セリンプロテアーゼの選択的な開裂配列は、基質、阻害剤およびプロテアーゼによって活性化可能なプロドラッグの設計に有益になる（Choi 2012； PMID 22400063）。それに加え、NETに関連するプロテアーゼ活性の基質署名は、好中球NETosisによって駆り立てられる炎症性疾患のためのバイオマーカーとして監視できる。

30

【0029】

[実施例]

本明細書に記載された実施例および実施形態は、例示としてのものであり限定するものではないこと、ならびに特定の実施形態の精神および範囲から逸脱することなく特許請求の範囲に示されているように他の実施例が使用されてもよいことが当業者には明らかであろう。

【0030】

40

[実施例1. 材料および方法]

コンビナトリアル蛍光発生基質ライプラリを使用するタンパク質分解活性

切断性結合に対し、N末端配列としての非プライマー側の配列特異性は、プロテアーゼ命名法で名付けられ、コンビナトリアル蛍光発生基質ライプラリを使用して、プロテアーゼについてアッセイされた（Harris、2000）。この蛍光ペプチドライプラリは、精製されたセリンプロテアーゼの詳細なプロファイリングに好適であり、密接に関係する酵素におけるサブサイト好ましさを区別する。ヒトNE（50nM）、CG（100nM）、PR3（50nM）（Athens Research & Technology、カタログ番号16-14-051200；カタログ番号16-14-030107；カタログ番号16-14-161820）およびNSP4（100nM）を、0.01%のTween-20を含有するDulbeccoのPBS中、この蛍光発生ライプラリで

50

アッセイした。各位置でのアミノ酸好ましさは、1秒あたり放出されるフルオロフォアのピコモルの単位で活性を直接的に比較することによって決定できる。

【0031】

多重基質プロファイリング - 質量分析によるペプチド開裂部位特定

ヒトNE(1nM)、CG(5nM)、PR3(2nM)およびNSP4(25nM)を、O'Donoghueら、2012によって記載されたようにMSP-MSアッセイを使用してプロファイリングした。それに加え、PMA誘発されMNase処理された3つのドナーNETサンプルにおけるタンパク質分解活性を、MSP-MSアッセイを使用して決定した。対照サンプルは、PMAまたはMNase処理されず、各ドナーからの全タンパク質の等しい混合物からなった。すべてのアッセイは、全反応容積900μL中、0.4μg/mLのドナータンパク質および500nMの各ペプチドを含有した。15分後、60分後、240分後および1200分後に小分け分を除去し、最終pHが2.5になるまで濃ギ酸でクエンチした。サンプルを脱塩し、LC-MS/MSペプチドシーケンシングによって分析した。

10

【0032】

LC-MS/MSのために、10,000psiシステムナノACUITY(Waters)UPLC装置が取り付けられたLTQ-FT質量分析計(Thermo)を、C18カラム(BEH130、ビーズ粒径1.7μm、100μm×100mm)での逆相クロマトグラフィーに使用した。LCを流速600nL/minで操作し、42分かけて2%Bから30%Bまでの線形勾配を使用して、溶媒A:0.1%ギ酸水溶液および溶媒B:70%アセトニトリル中の0.1%ギ酸でペプチドを分離した。Surveyスキャンを350~1800m/z範囲にわたって記録され、MS/MSをCIDフラグメント化で6つの最も強い前駆体イオンを行った。質量分析ピークリストを、PAVAと呼ばれる自社のソフトウェアを使用して作成し、Protein Prospectorソフトウェアv.5.10.0を使用してデータを検索した(Chalkley、Bakerら、2008)。124の14マー合成ペプチドの配列を含むデータベースに対してデータを検索し、同じ124エントリーについて、ランダム化された配列の4つの異なるコピーと連結して、偽陽性率を推定するための620配列の最終的なデータベースを作成した(O'Donoghueら、2012)。データベース検索のために、酵素特異性要件なしで、GlnからのTrp、ProおよびPheおよびN末端pyroGluの酸化を含むさまざまな改変でペプチド配列をマッチさせた。最小タンパク質スコアが20であり、最小ペプチドスコアが15であり、「タンパク質」について最大予測値が0.1であり、ペプチドマッチについて0.05であるようにProtein Prospectorスコアの閾値を選択し、結果としてペプチド偽陽性率0.2%を得た。開裂部位データを、「MSP extractor」ソフトウェアと呼ばれる自社のスクリプトを使用するProtein Prospectorから抽出した(O'Donoghueら、2012)。ライブラリにおけるすべての可能な結合(n=1612)の2.5%以上(n=41)が開裂される一番早い時間間隔を選択して、酵素特異性を比較した。NE、PR3およびCGは、それぞれ240分、1200分および60分でこの値に達し、一方、NSP4は、アッセイの過程にわたってペプチド結合の1.2%(n=19)のみを開裂した。基質特異性を比較するために、iceLogoソフトウェアを使用して、特定された開裂部位に隣接する±4位でのアミノ酸についての基質特異性logoをP値の統計0.05以下で作成した(Colaert、Helsenら、2009)。

20

30

40

【0033】

健康なドナーからの好中球の単離

赤血球細胞(RBC)沈降、その後のFicoll密度勾配遠心分離を使用する単球の除去を使用する2工程精製プロトコルによってヒト好中球細胞を単離した。簡単にいうと、50mlの新しいヒト全血を、ヘパリンを収容する収集管に収集した。血液を比(5:1)でHetaSep(STEM cell、カタログ番号07906)と混合して、RBCおよび血小板を沈殿させた。白血球および単球に富む上澄みを、Ficoll-PA

50

QUE PLUS (GE Healthcare、カタログ番号 17-1440-03) の上部に層状にした。Ficoll勾配遠心分離の後、好中球を、上澄み中の単球から分離し、ペレット化した。RBC溶解バッファー (Miltenyi Biotech、カタログ番号 130-094-183) を使用する細胞溶解を繰り返すことによって、混入しているRBCをさらに除去した。CD66b抗体 (BD Pharmingen、カタログ番号 555724) を使用するフローサイトメトリーによって確認した際に 50 ~ 100 百万の好中球を、好中球純度が 98 % より大きくなるようにこの方法によって単離した。

【0034】

NETosis誘発およびNET調製

10

精製された好中球を 5 回洗浄して血漿タンパク質を除去し、次いで、10 mm 培養プレート中のグルタミンを追加した RPMI 1640 培地に 1.7×10^6 細胞 / ml の密度で接種した。好中球を 50 nM のホルボール - 12 - ミリストート - 13 - アセテート (PMA、Sigma P8139) で、5 % CO₂ インキュベーター中、37 °C で刺激することによって、NETosis を in vitro で誘発した。3 時間インキュベートした後、培地を除去し、プレートを暖かい培地で 3 回穏やかに洗浄した。このインキュベーション時間は、PMA 処理後の NET からの最大タンパク質放出に必要な最適時間として選択された。次いで、NET を Micrococcal Nuclease (MNase) (20 U / ml) (Thermo Scientific、P 番号 88216) によって 10 ~ 40 分間消化して、NET を培地内に分解した。その後、上澄みを遠心分離して、細胞および細胞片を除去した。PMA 未処理の好中球および PMA 処理された MNase 消化なしの好中球からの上澄みを負の対照として調製した。各サンプルのフラクションをプロテアーゼ阻害剤カクテルで処理してプロテオミクス分析のためのサンプルを保存し、一方、プロテアーゼ活性スクリーニングのためのサンプルの残りは、プロテアーゼ阻害剤で処理されなかった。Sytox Orange (Life Technologies、S11368) を使用して、細胞を含まない DNA を測定することによって、NETosis の進行を監視した。フィルタが 544 nm (ex) / 590 nm (em) に設定され既知の濃度の DNA 標準で標準曲線によって較正した SpectraMax M2 蛍光計 (Molecular Devices) での相対的な蛍光測定によって DNA を定量化した。EnzChek (登録商標) エラスターーゼアッセイキット (Invitrogen、カタログ番号 12056) を使用して NE 活性を測定することによって、NETosis も定量化した。最後に、共焦点免疫蛍光顕微鏡によって、NETosis を視覚的に調べた。好中球 (5 × 10⁵ 細胞 / ml) をポリ - L - リジンでコーティングされたカバースリップに接種し、50 nM PMA で処理したか、または処理しなかった。NETosis 誘発後の異なる時間点で、4 % パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、次いで 0.05 % Triton X-100 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中 10 % FBS で透過処理し、ブロックした。ヒストン染色のために、カバースリップをマウス抗ヒトコアヒストン抗体 (Millipore、Anti-histone Clone H11-4、MAB3422) と共にインキュベートし、その後、テトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC) が接合した二次抗体 (Invitrogen カタログ番号 T2762) と共にインキュベートした。Hoechst 33342 (AnaSpec Inc、カタログ番号 83218) で DNA を対比染色した。獲得前に、Prolong Gold 設置培地 (Invitrogen カタログ番号 P36930) を使用して、ガラススライド上にカバースリップを設置した。

20

30

40

【0035】

NET上澄みからのエラスターーゼの枯渇

NET サンプルの MNase 調製物は、37 °C で、DNase (100 U / ml) で 10 分間二次的に消化されて、NET に関連するタンパク質を完全に放出した。次いで、NET 上澄みを、エラスターーゼ抗体 (Sigma、カタログ番号 PAI-74132) でコーティングされた Pierce G / A 磁気ビーズ (Thermo Scientific)

50

c、カタログ番号 88802) と 4 で 1 時間混合した。インキュベーション後、DYNAL - 磁気ビーズ分離ラック (Invitrogen カタログ番号 123-21D) で上澄みをビーズから分離した。EnzCheck (登録商標) エラスターーゼアッセイを使用してプロテアーゼの枯渇を確認した。

【0036】

質量分析によるNETタンパク質特定

NETによって誘発されたサンプルにおけるタンパク質特定を、すでに報告されたように質量分析によるペプチドシーケンシングを使用して行った (O'Donoghueら、2012)。NETサンプルを、3人のドナーから上述のように以下の組合せ、+PMA/+MNase、+PMA/-MNaseおよび-PMA/+MNaseの処理で調製した。+PMA/+MNase処理されたサンプルを、各ドナーについて個々にアッセイし、一方、+PMA/-MNaseおよび-PMA/+MNase対照サンプルを、3人のドナーからの質量をマッチさせたプールサンプルとして調製した。NETタンパク質濃度は、PBS中 25~40 μg/ml の範囲であり、したがって、溶液中のトリプシン消化プロトコルをわずかに修正したものを以下のように適用した。サンプルを、100 mM 炭酸水素アンモニウムバッファー (合計体積 700 μL 中約 20 μg) で 30 μg/ml の標準化された濃度にし、これに、最終 4 M になるまで固体尿素を加えた。サンプルを 56

10 分間の 10 mM DTT インキュベーションで還元し、次いで、12 mM ヨードアセトアミド (45 分、暗状態、21) でアルキル化し、次いで、5 mM のさらなる DTT でクエンチした。最終的な容積を、さらなる 100 mM の炭酸水素アンモニウムで 1.4 ml に調整し、尿素濃度を 2 M にした。トリプシン (シーケンシンググレード、Promega) を 1:50 のトリプシン:合計タンパク質で加えて、37 での一晩の消化を行った。次いで、サンプルをギ酸で酸性化して pH 2~3 にし、C18 OMIX チップ (Varian) を使用して脱塩した。上記の LTQ - FT システムと同一の分離および分析条件で操作される LTQ - Orbitrap (Thermo) 質量分析計を使用する 2 つの技術的な複製物の LC - MS / MS 分析で各サンプルをアッセイした。

【0037】

62,611 エントリーを含む *H. sapiens* UniProt データベース (2012 年 3 月 21 日にダウンロードした) に対してデータベース検索を行った。偽陽性率を推定するために、このデータベースを、完全にランダム化された一連の配列エントリーと連結した (Elias および Gygi 2007)。親イオンについて質量許容差 20 ppm およびフラグメントイオンについて 0.8 Da でデータを検索した。ペプチド配列を、失われた開裂がないトリプシン性ペプチドおよび固定された改変としてのカルバミドメチル化システインとマッチさせた。さまざまな改変は、Gln からの Met、N 末端 pyroGlu の酸化、Met の欠失および N 末端アセチル化を含んだ。タンパク質前駆体スコアパラメータは、最小タンパク質スコアが 2.2 であり、最小ペプチドスコアが 1.5 であり、タンパク質について最大予想値が 0.01 であり、ペプチドマッチについて 0.01 であり、結果として偽陽性率 1.1 % が得られた。タンパク質特定結果を、固有のペプチド数、タンパク質存在量の概算値としてのペプチド数、配列包含率およびタンパク質特定の確率についての予想値と共に報告する (Choi, Fermiinら、2008) (Liú, Sadaygovら、2004)。タンパク質は、試験された 3 つの条件 (+PMA/+MNase、+PMA/-MNase および -PMA/+MNase) の 1 つにおいて、少なくとも 2 つの固有のペプチドで特定して報告する必要があった。

【0038】

[実施例 2. PS - SCL および MSP - MS による好中球セリンプロテアーゼの基質プロファイリング]

今まで、80 を超えるエンドプロテアーゼの基質特異性が、PS - SCL アッセイ (PMID 10869434) を使用してプロファイリングされており、一方、最近開発された MSP - MS アッセイは、今までに 30 を超えるプロテアーゼをプロファイリングしており、プロテアーゼはエンド型およびエキソ型で作用するプロテアーゼを含む (O

10

20

30

40

50

’ Donoghue ら、2012)。NE、CG、PR3 および NSP4 の不偏の包括的な基質プロフィールを得るために、本発明者らは、同一のバッファー条件で PS - SCL および MSP - MS 方法を使用して、各酵素をアッセイした。PS - SCL ライブリは、テトラペプチド配列のカルボキシ末端に結合した 7 - アミノ - 4 - カルバモイルメチルクマリン (ACC) 基を使用する。ライブリは、非プライマー側 (切断性結合に対して N 末端) の基質特異性を決定するために使用でき、相同性が高いプロテアーゼを区別するために特に情報価値がある (Choe、Leonettila、2006)。PS - SCL 方法を使用する本発明者らの研究では、NE および PR3 の両方が、P1 部位で、バリンおよびアラニンが好ましく、より少ない程度でトレオニンが好ましい (図 1)。NE は、この位置でイソロイシンを収容することもできるが、PR3 はそのようなことはない。対照的に、CG は、これらのアミノ酸に対する許容性が低く、その P1 部位でチロシンおよびフェニルアラニンを好み、一方、NSP4 は、アルギニンが非常に好ましい。NE がプロリンおよびアラニンを好み、一方、PR3 が、アスパラギン酸、グルタミン酸およびアスパラギンへの好ましさを示すため、NE および PR3 は P2 特異性によって簡単に区別可能である。興味深いことに、CG および NSP4 は、P2 でトレオニン、セリン、プロリンおよび他の小さな疎水性アミノ酸を好むが、NSP4 ではそうではなく、この活性は、アルギニンに対する P1 部位特異性について最小である。P3 で、NE および CG は、同様の特異性プロフィールを有し、一方、PR3 は、嵩高い残基、特に、トリプトファンおよびチロシンについて異なる好ましさを有する。最後に P4 で、NE、CG および NSP4 は、幅広い特異性を有し、一方、PR3 は、この部位でフェニルアラニンまたは任意の帶電したアミノ酸を許容しない。

10

20

30

40

【0039】

MSP - MS アッセイは、プロテアーゼの特異性をプロファイリングするために、基質ライブリとして 124 テトラデカペプチドの混合物を使用する。切断性結合のアミノおよびカルボキシ側での開裂されたペプチドは、質量分析を使用するペプチドシーケンシングによって簡単に特定できる。アッセイは、プロテアーゼ開裂事象の定性的評価を得るために種々の時間間隔でクエンチできる。すべての 4 つのプロテアーゼは、P1 位置でアミノ酸の顕著な富化を有し (図 2)、アミノ酸の好ましさは、Pearson 分析によって -1.0 から 1.0 までのスケールでスコアが 0.4 以上である PS - SCL 方法において観察されたものと強い相関関係があった (表 1)。ここで、NE は、バリンおよびトレオニンよりイソロイシンを好み、一方、PR3 は、アラニン、バリン、トレオニンおよびイソロイシンについてほぼ等しい好ましさを有した。CG は、P1 で、チロシンおよびリジンよりもフェニルアラニンを好むが、アラニンを好まず、一方、NSP4 は、アルギニンについて厳格な好ましさを有した。P1 サブサイトの外側で、各酵素に対する特異性は、異なるサブサイトに由来し、特に、P3 では、グルタミンおよびロイシンが好ましく、NE の P2' ではトリプトファンが好ましく、PR3 の P2 ではグルタミン酸およびアスパラギン、CG の P2 ではノルロイシンが好ましい。興味深いことに、PR3 および NE は、これらの 2 つの方法間で比較できる P4 - P1 部位内で強い相関関係を有し、CG は、PS - SCL 方法における設計によって試験されていないプライマー側の特異性が潜在的な原因で (図 2)、より弱い相関関係を有した (表 1)。MSP - MS 結果は、プロテアーゼ開裂部位のプロテオミクス特定 (PICS) 方法を使用して作成された (Schilling 2008、Perera 2012) P2' 部位および P1 での NE および CG の両方についての以前公開された特異性データとの強い相関関係を示した (表 1)。

【0040】

表 1. MSP - MS からの基質特異性と、PS - SCL および PI CS からの基質特異性との比較

【表1】

MSP-MS v PS-SCL					MSP-MS v PICS							
	P4	P3	P2	P1	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
NE	0.53	0.72	0.41	0.51	-0.15	0.53	0.29	0.87	-0.03	0.46	0.01	0.05
PR3	0.62	0.25	0.84	0.77	-0.23	0.21	0.03	0.81	0.34	0.65	0.11	0.14
CG	0.06	0.28	0.12	0.81	-	-	-	-	-	-	-	-
NSP4	-0.19	0.14	0.20	0.96	0.15	0.22	-0.32	0.93	0.10	0.01	-0.23	-0.10

【0041】

陰影のついていない値は、弱い相関関係があること、または相関関係がないことを示し、一方、灰色および黒色は、それぞれ、強い関係および非常に強い関係を表す。

10

【0042】

[実施例3. プロテアーゼ活性に富むNETの誘発]

好中球においてPMAで誘発されたNETosisにおいてタンパク質分解活性を推定するために、本発明者らは、内部でクエンチされた一連の蛍光ペプチドをスクリーニングし、4つの好中球セリンプロテアーゼのうち3つによって簡単に開裂された基質を特定した。この基質K(mca)-PLGKQVEY-K(dnp)は、以前、真菌から分泌されたグルタミン酸プロテアーゼをアッセイするために使用された(O'Donoghue、2008)。このプローブを使用して、PMAおよびMNase処理された好中球由来のNETから放出されたタンパク質分解活性は、PMA処理なしの対照サンプルよりもおよそ5倍大きく、MNase処理なしの対照サンプルより20~40倍大きかった(図3)。本発明者らは、同じサンプルを分析するためにMSP-MSも用い、NETに関連するプロテアーゼ由来の98の開裂されたペプチド結合を観察した。蛍光基質を使用する本発明者らの研究において明らかのように、PMA処理のみのサンプルおよびMNase処理のみのサンプルの両方において活性プロテアーゼが存在するが、これらの低いレベルの開裂は、好中球のPMA処理およびMNase処理の後に観察された開裂された合計結合の15~19%のみを占める。これらを合わせると、これらの研究は、好中球が誘発されて、タンパク質分解活性に富むNETを形成することができることを決定した。

20

【0043】

[実施例4. NETに関連するタンパク質の特定]

NETに埋め込まれたタンパク質の全成分を特定するために、上記の同じNETosisによって誘発された好中球からのタンパク質調製物をプロテオミクス分析に供して、誘発されたNET対誘発されていないNETのタンパク質組成を評価した(表2)。質量分析を使用して、試験された3つの条件(+PMA/+MNase、+PMA/-MNaseおよび-PMA/+MNase)で、NETに関連する15個のタンパク質を特定した。NETに関連するタンパク質は、それらの機能および細胞位置(核タンパク質、アクチンに関連するタンパク質、酵素、殺菌性ペプチドおよびシグナル伝達)に基づいて6クラスに分類できる。これらの中で、最も存在量が多いタンパク質のうちのほとんどである21個のタンパク質は、NETosisによって誘発された好中球において以前特定された(Urban、Ermer等、2009)。以前の研究からの3個のタンパク質、プロテイナーゼ3、-アクチニンおよびカタラーゼのみが、本発明者らの最適化された手順を使用して検出されなかつたが、これらの脱落は、本発明者らがDNase処理の代わりにMNase処理を使用して、これらの3個のタンパク質が脱落し得るようにNETを覆い隠したことによって説明され得る。29個のタンパク質は、PMAおよびMNase処理された好中球サンプルにおいて以前は特定されていないことが明らかに示された。しかし、これらのタンパク質のうちの11個のみが、すべての3人のドナーにおいて再現可能に特定された。新しく見出されたタンパク質の中で、本発明者らは、SH3ドメインが結合したグルタミン酸-rcb様タンパク質3(SH3BGR3)(Q5T123)が、炎症のシグナル伝達経路に関与していることを見出した。NETおよび不活性なセリンプロテアーゼファミリーメンバー、アズロシジンは、すべての3つのドナーサンプルにおいて見出され、一方、CGは、単一のドナーサンプルのみにおいて観察された。驚くべきこと

30

40

50

に、本発明者らの酵素研究は、対照サンプルと比較して、PMAおよびMNase処理された好中球(NET)におけるタンパク質分解活性の富化を示したが、質量分析ベースのプロテオミクスによって分析されたとき、同じサンプルにおいてプロテアーゼの富化がほとんど存在しないか、または存在しなかった。NEは、MNase処理なしのいずれのサンプルにおいても見出されなかつたが、これはNEが、インタクトなNET上で効率的に捕捉されることを示す。

【0044】

表2. 3人の健康なドナーのLC-MS/MSによって特定されたNETに関連するタンパク質

【表2】

Uniprot 寄託番号	PMAで誘発されたNET	PMAで誘発され スクレアーゼ 放出なし	誘発されて おらずMNase 処理されたNET			
固有の 番号	平均ペプ チド数	N=3の中 から観察 された時間	固有の 番号	ペプチ ド数	固有の ペプチ ド番号	タンパク質 MW
B4E335 P05164 A5K9U8 P08246 B4DL9 B2R4P9 A3KPC7 P20160 B2R4R0 P35579	43 99 71 59 43 38 33 30	17.33 97.33 41.67 68.33 42.00 54.33 39.33 32.67 51.00 23	1 3 2 3 1 3 2 3 3	97 27 80 36 14 10 21 8 23	173 43 128 64 24 13 12 9 30	73 35 47 141 21 12 13 20 41
B3K514 P06733 A3R0T8 B2R4CS P08311 B2R4M6 P59665 A4UCT1	8 14 11 17 15 3 14 25.00	2.57 7.33 7.00 6.33 6.00 1.00 25.00 4.67	1 3 3 1 1 1 3 3	8 18 21 23 14 14 16 59	11 25 23 18 20 24 28 37	24 7 12 23 10 16 28 13
B2R829 A2A418 CSH213 B4DE36 P67737 P31146 A5K4W6 B4DNK4 P80723 B0YJ24				20	27	31 32 32 37 37 37 37 37 37
B4E112 A2VCK8 P12724 P0S109 A8K220 AGMX94 F22393	4 2 3 5 5 4 6 6 6 1	1.33 1.00 3.00 1.67 1.67 7 7 7 6 6 0.33	2 2 2 3 3 1 1 1 1 1	13 12 3 7 11 8 6 6 10	14 21 3 10 22 9 7 6 16	17 21 10 10 22 11 11 3 16
B4D0J2 A8K2Y9 P49913 O60234				4	6	7 22 7 9 7 7 4 4
D6R9A6	1	0.67	1	6	14	2 22 7 9 7 7 4 4
A8K2L4 P80511	2	1.00	1	3	4	1 1
B3KU11 BSBU38 A7X2E4	1	1.33	3	3	4	4 4 3 3
QST123	3	1.67	2	2	3	3 3 3
P05204				3	8	2 11
B0QZK8				2	2	
B7Z507				2	2	
Q68D08				2	2	

【0045】

[実施例5. NET上のプロテアーゼの多重基質プロファイリング]

MSP-MSアッセイを使用して、NETに関連するプロテアーゼの基質特異性を評価

10

20

30

40

50

した。複数のプロテアーゼを含有する生体サンプルをプロファイリングするための P S - S C L アッセイと比べ、 M S P - M S アッセイを使用する利点は、ペプチド基質を、特定のプロテアーゼに直接的に結合させることができることである。各好中球セリンプロテアーゼのこの基質特異性情報を、これらの酵素の混合物を含有する可能性がある N E T の分析に適用した。 M S P - M S によって、すべての 3 人のドナーは、同様の基質プロファイルを有する。代表的な「ドナー署名」を作成するために、すべての 3 つのドナーサンプルにおいて観察された 40 の開裂は凝集されて、 N E 特異性に非常によく似た単一のモチーフにされた(図 4)。このドナー署名は、3 つの主要な酵素特異性の凝集体であり、 15 、 5 および 1 の開裂は、それぞれ、 N E 、 C G および P R 3 に固有に起因し得る(図 4 にも示されている)。残りの 19 の開裂は、複数の好中球セリンプロテアーゼによって加水分解されたため、固有に帰属させることができなかった。

10

20

30

40

【 0046 】

N E が N E T において主要なタンパク質分解活性であったことを確認するために、本発明者らは、免疫枯渇によって酵素を選択的に除去し、混合物中の残りのプロテアーゼをアッセイした。この場合に、本発明者らは、アッセイ中の N E 枯渇のドナータンパク質の合計量を 15 倍増加させることができ、これは、アッセイの過程にわたって特定された開裂部位の数において 1.7 倍増加のみもたらした。3 人のドナー間に共通の 76 の開裂部位は、主に、 C G 活性に起因し得(36 の固有の開裂)、7 の固有の開裂を有する P R 3 活性が比例的に増加していることを明らかに示した。興味深いことに、わずか単一の開裂が、 N S P 4 活性の産物である可能性があり、4 つの酵素のいずれにも起因し得ない 15 の新しい開裂が今や存在した。よって、 N E 枯渇は、存在量の少ないプロテアーゼについて、より大きな活性を発揮することができた。

【 0047 】

[実施例 6 . N E T 上のプロテアーゼの基質]

図 5 は、エラスターーゼ開裂部位、ならびにエラスターーゼがカテプシン G およびプロテイナーゼ 3 と共有する開裂部位を示す。図 6 は、プロテイナーゼ 3 開裂部位、ならびにプロテイナーゼ 3 がエラスターーゼおよびカテプシン G と共有する開裂部位を示す。図 7 は、カテプシン G 開裂部位、ならびにカテプシン G がエラスターーゼおよびプロテイナーゼ 3 と共有する開裂部位を示す。図 8 は、 N E T o s i s ドナーからのプロテアーゼ開裂部位を示す。図 9 は、エラスターーゼ、プロテイナーゼ 3 、カテプシン G 、好中球が分泌するタンパク質 4 の開裂部位、および N E T o s i s ドナーからのプロテアーゼ開裂結果を示す。

【 0048 】

上記の明細書に述べられたすべての刊行物および特許は、参照によって本明細書に組み込まれている。記載された方法の種々の改変および変形は、本開示の範囲および精神から逸脱することなく、当業者には明らかであろう。本発明は具体的な実施形態に関して記載されたが、請求されているものが、このような具体的な実施形態に過度に限定されるべきではないことを理解されたい。実際に、具体的な実施形態を実施するための上記の態様の当業者に明らかな種々の改変は、以下の特許請求の範囲内であることが意図される。当業者は、通常の実験を超えない実験を使用して、本明細書に記載された具体的な実施形態にに対する多くの均等物を認識するか、または確認することができるであろう。このような均等物は、以下の特許請求の範囲によって包含されることを意図している。

【図1】

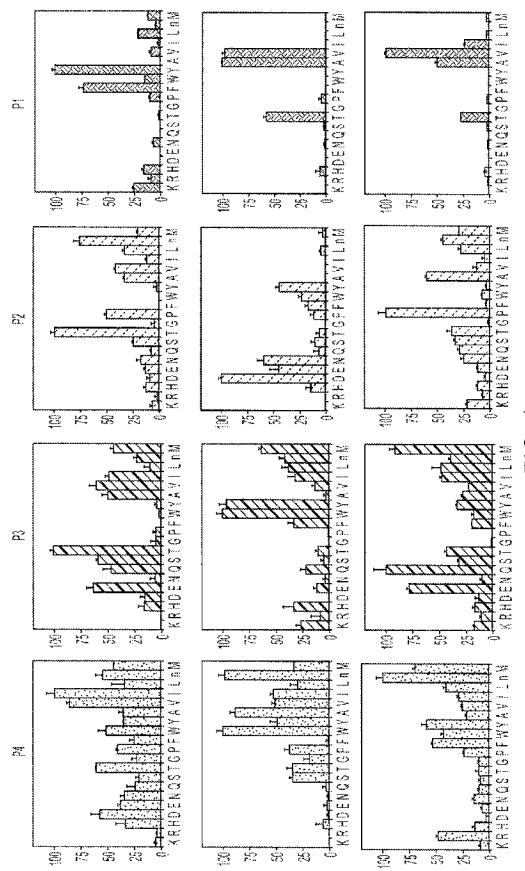


FIG. 1

【図2】

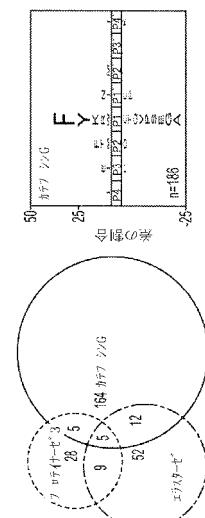


FIG. 2

【図3】

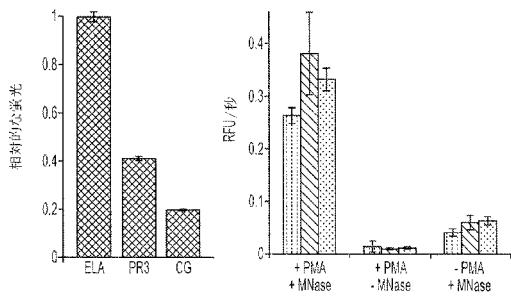


FIG. 3

【図4】

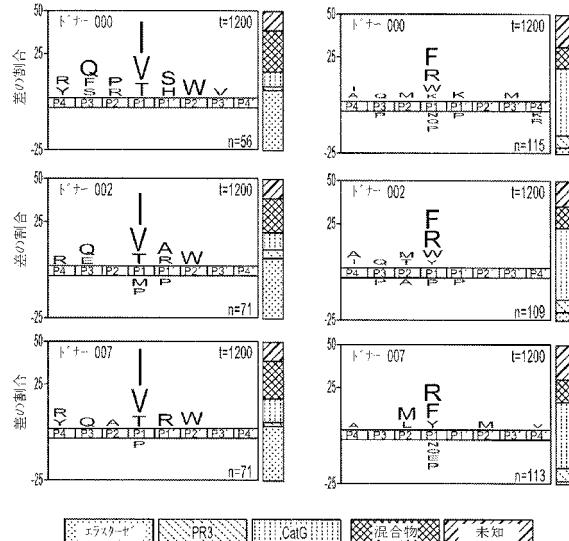


FIG. 4

【 図 5 】

FIG. 5

〔 図 6 〕

EIG. 6

【 义 7 - 1 】

Y	P	I	R	G	G	P	Y
O	Y	N	N	G	G	O	X
V	H	N	N	S	S	X	X
H	A	Y	I	X	X	X	X
O	P	H	I	R	R	P	P
R	I	R	R	N	N	X	X
P	Y	P	P	A	D	S	S
H	E	P	P	O	E	S	X
N	S	P	H	H	X	H	X
A	N	P	S	S	X	I	I
Z	I	V	G	D	P	X	X
A	E	P	H	G	I	D	D
Z	I	I	B	G	D	X	X
E	R	I	P	P	P	H	A
I	T	V	D	P	P	H	I
V	N	P	O	O	H	I	I
X	L	X	D	D	N	G	G
D	F	I	I	C	D	S	S
S	A	H	A	E	E	N	N
H	H	H	H	S	E	H	X
E	O	I	I	F	N	I	I
A	R	N	N	D	V	D	D
N	N	N	N	I	F	H	H
I	F	I	R	R	I	H	X
L	L	R	P	P	V	A	A
D	S	S	S	S	S	G	G

7

〔 四 7 - 2 〕

EIG 7

【 図 7 - 3 】

EIG. 7

【 図 8 】

88

【図 9 - 1】

6
G.
II

【 図 9 - 2 】

69

【 図 9 - 3 】

PSLAKW	SWAGX	IVWASX	WOTOKY	WOTTEYF
QINQHEK	THERASSE	HELETA	PAEKYST	WOTTEYX
DRGXXX	SVIASSSE	KUTDENT	RUNPXXX	WKLSONW
EFARANG	WEATSTROA	KPDWESS	RWTHXXX	WCLNEY
RHVOLG	WINDGCK	KRTHAWW	RTEHAWX	PSLAKW
ROLFYSH	WYQGTER	KVFCQH	KXPERORV	RPMARAG
SETIAHEH	YXKPELTY	KWSTBWX	ZMTRREK	REHOLG
SLIAKNG	YXIGASTS	LIHEKHN	ESRLEW	ESLAKW
SOPRARD	YXNEPEEV	WAKTKWHE	RTVAKW	RTVAKW
PERITUH	YXNQCGA	WANGTK	RTLIVSN	
XAMTREW	YXVYCTH	WPKVIST	SETIAHEH	
XABATGE	YASSSEK	WLAKEZ	SULAWIG	
XRDVCHL	YDREVCHL	WKEFTEX	VIEFLAT	
YDFTSKX	YDFTSKX	WLRDGS	WOKFVER	
YIAQAWX	YIAQAWX	WPYLGES	WSTESTA	
YNPFLHS	YNTMTEL	WNTMTEL	WHALGE	
YSWAREX	YSEPERALX	WYPERALX	YDNEWAX	
	YWPWPKI	WYWPWPKI	YIATQAW	
	YRFLGRX	WYRFLGRX	YWTLLS	
	YSEFERN	WYSEFERN	YRISQX	
	YWFERN	WYWFERN	YSWAKX	

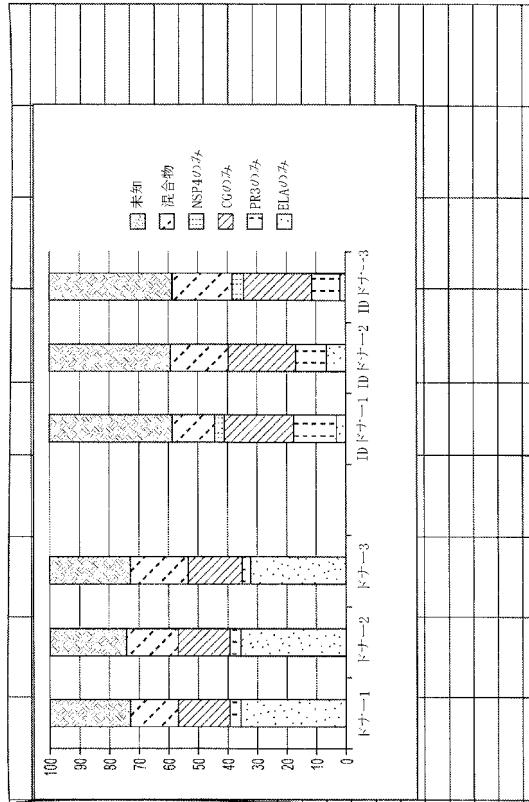
8
G.
E.

【図9-5】

SEOTNHY	
STYHDM	
TARMADD	
TKMEAEII	
TWKIIFT	
VGRSYSC	
VIPPRMT	
VLTAAPV	
WLFEVSA	
WMWUKOM	
YMFKIKW	
XXHOTPFF	
XXLENDT	
YIWWVQA	
YKRPMAN	
YMASILR	
YTKGHEX	

୧୮

【 図 9 - 6 】



65

【配列表】

2016519761000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/029040
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 21/64 (2014.01) USPC - 435/23 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) IPC(8) - C12Q 1/37; G01N 21/64, 33/48 (2014.01) USPC - 435/6.1, 7.1, 23		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - C12Q 1/37; G01N 33/542; 2333/96433, 2800/12, 2800/18, 2800/20 (2014.06)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012/0135443 A1 (SCHULTZ et al) 31 May 2012 (31.05.2012) entire document	1-6, 10, 11, 13, 14
Y		7-9, 12, 15
Y	US 2003/0104479 A1 (BRIGHT et al) 05 June 2003 (05.06.2003) entire document	7
Y	US 2011/0082155 A1 (MURUGAN et al) 07 April 2011 (07.04.2011) entire document	8, 9
Y	US 2008/0213800 A1 (YAMADA et al) 04 September 2008 (04.09.2008) entire document	12, 15
A	WO 2010/022281 A1 (WARDELL et al) 25 February 2010 (25.02.2010) entire document	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 08 August 2014		Date of mailing of the international search report 28 AUG 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
PCT/US2014/029040		
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:		
a. (means)		
<input type="checkbox"/> on paper		
<input checked="" type="checkbox"/> in electronic form		
b. (time)		
<input type="checkbox"/> in the international application as filed		
<input type="checkbox"/> together with the international application in electronic form		
<input checked="" type="checkbox"/> subsequently to this Authority for the purposes of search		
2. <input checked="" type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.		
3. Additional comments:		
Specifically, SEQ ID NO's 1-32 were searched.		

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 P 7/02	(2006.01)	A 6 1 P 29/00 101
A 6 1 P 1/02	(2006.01)	A 6 1 P 7/02
A 6 1 P 1/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/02
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/00
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 11/00
C 12 N 9/64	(2006.01)	A 6 1 P 1/04
		C 12 N 9/64

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

(74)代理人	100137213	弁理士 安藤 健司
(74)代理人	100151448	弁理士 青木 孝博
(74)代理人	100183519	弁理士 櫻田 芳恵
(74)代理人	100196483	弁理士 川寄 洋祐
(74)代理人	100185959	弁理士 今藤 敏和
(74)代理人	100146318	弁理士 岩瀬 吉和
(74)代理人	100127812	弁理士 城山 康文
(72)発明者	ジン, イエ	アメリカ合衆国、カリフォルニア・94582、サン・ラモン、アバーデール・サークル・6685
(72)発明者	マーフィー, ジヨン	アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02110、ボストン、イースト・インディア・ロウ・85、アパートメント・10・エフ
(72)発明者	ハーミストン, テリー	アメリカ合衆国、カリフォルニア・94941、ミル・バレー、イースト・ストロベリー・ドライブ・305

F ターム(参考) 4B050 CC10 DD11 LL03

4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ08 QQ36 QQ95 QR48 QR58 QS28 QX02
 4C084 AA17 NA14 ZA542 ZA592 ZA662 ZA672 ZA682 ZB072 ZB112 ZB152
 ZB322 ZC202