

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-521117

(P2020-521117A)

(43) 公表日 令和2年7月16日(2020.7.16)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
<b>G01N 33/48</b> (2006.01)	G01N 33/48	Z NAM	2 G O 4 5
<b>G01N 33/53</b> (2006.01)	G01N 33/53	Y	4 B O 6 3
<b>C12Q 1/02</b> (2006.01)	G01N 33/53	V	4 C O 6 2
<b>A61P 25/28</b> (2006.01)	C12Q 1/02		4 C O 6 3
<b>A61P 21/00</b> (2006.01)	A61P 25/28		4 C O 7 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-560086 (P2019-560086)	(71) 出願人	518126074 シワ コーポレーション アメリカ合衆国、イリノイ州 60601 , シカゴ, #3913, 400 イースト ランドルフ
(86) (22) 出願日	平成30年5月3日 (2018.5.3)	(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(85) 翻訳文提出日	令和1年12月10日 (2019.12.10)	(74) 代理人	100102255 弁理士 小澤 誠次
(86) 國際出願番号	PCT/US2018/030931	(74) 代理人	100096482 弁理士 東海 裕作
(87) 國際公開番号	W02018/204679	(74) 代理人	100113860 弁理士 松橋 泰典
(87) 國際公開日	平成30年11月8日 (2018.11.8)	(74) 代理人	100131093 弁理士 堀内 真
(31) 優先権主張番号	62/501, 424		
(32) 優先日	平成29年5月4日 (2017.5.4)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/610, 003		
(32) 優先日	平成29年12月22日 (2017.12.22)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】診断用終末糖化産物抗体

## (57) 【要約】

患者における細胞老化と関連した疾患、障害又は病的状態を診断する方法は、患者から試料を得るステップと、試料中の細胞表面AGEを示す細胞の数を測定するステップと、試料中の細胞表面AGEを示す細胞の数が、対照における細胞表面AGEを示す細胞の数より大きい場合、患者を細胞老化と関連した疾患、障害又は病的状態と診断するステップとを含む。

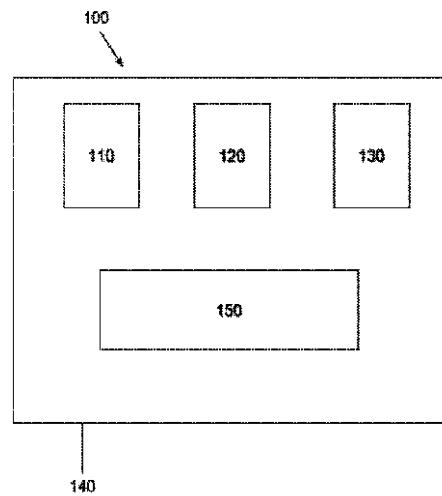


FIG. 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

以下のステップを含む、患者における細胞老化と関連した疾患、障害、又は病的状態を診断する方法。

前記患者から試料を得るステップ；

前記試料中の細胞表面AGEを示す細胞の数を測定するステップ；及び

前記試料中の細胞表面AGEを示す細胞の数が、対照における細胞表面AGEを示す細胞の数より大きい場合、前記患者を、細胞老化と関連した疾患、障害、又は病的状態と診断するステップ；

**【請求項 2】**

10

以下のステップを含む、患者の生物学的年齢を決定する方法。

患者から、細胞及び非細胞物質を含有する試料を得るステップ；

前記細胞と前記非細胞物質とを分離するステップ；

前記細胞を抗AGE抗体と接触させ、細胞表面AGEと前記抗AGE抗体との結合を検出することにより、前記試料中の細胞表面AGEを示す細胞の数を測定するステップ；

前記非細胞物質を抗AGE抗体と接触させ、非結合AGEと前記抗AGE抗体との結合を検出することにより、前記試料中の非結合AGEの数を測定するステップ；及び

前記試料中の細胞表面AGEと非結合AGEの比を比較するステップ；

**【請求項 3】**

20

以下のステップを含む、患者における細胞老化による進行した生物学的老化と関連した疾患、障害、又は病的状態を診断する方法。

患者から、細胞及び非細胞物質を含有する試料を得るステップ；

前記細胞と前記非細胞物質とを分離するステップ；

前記細胞を抗AGE抗体と接触させ、細胞表面AGEと前記抗AGE抗体との結合を検出することにより、前記試料中の細胞表面AGEを示す細胞の数を測定するステップ；

前記非細胞物質を抗AGE抗体と接触させ、非結合AGEと前記抗AGE抗体との結合を検出することにより、前記試料中の非結合AGEの数を測定するステップ；

前記試料中の細胞表面AGEと非結合AGEの比を比較して前記患者の生物学的年齢を決定するステップ；及び

前記患者の生物学的年齢が前記患者の暦年齢を上回る場合、前記患者を細胞老化による進行した生物学的老化と関連した疾患、障害、又は病的状態と診断するステップ；

**【請求項 4】**

30

以下のステップを含む、患者における細胞老化による進行した生物学的老化と関連した疾患、障害、又は病的状態を診断する方法。

患者から試料を得るステップ；

前記試料中の細胞表面AGEを示す細胞の数を測定するステップ；

前記試料中の細胞表面AGEを示す細胞の数を、年齢をマッチさせた対照における細胞表面AGEを示す細胞の数と比較することにより、前記患者の生物学的年齢を決定するステップ；及び

前記患者の生物学的年齢が前記患者の暦年齢より高い場合、前記患者を細胞老化による進行した生物学的老化と関連した疾患、障害、又は病的状態と診断するステップ；

**【請求項 5】**

40

対象におけるAGE修飾細胞をインビオで検出する方法であって、

検出可能な標識で標識されている抗AGE抗体を、前記対象に投与するステップを含む、前記方法。

**【請求項 6】**

細胞表面終末糖化産物を発現する細胞を検出するためのキットであって、

抗AGE抗体と、

対照試料とを含み、

任意で、前記抗AGE抗体に結合する試薬を含む

50

前記キット。

**【請求項 7】**

試料が、唾液試料、口腔スワブ、血液試料、皮膚試料、及び尿試料からなる群から選択される、請求項 1～5 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 8】**

細胞が、T 細胞、赤血球、線維芽細胞、及び上皮細胞からなる群から選択される、請求項 1～5 及び 7 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 9】**

測定するステップが、ELISA、セルソーティング、又はセルカウンティングを含む、請求項 1～5、7、及び 8 のいずれかに記載の方法。 10

**【請求項 10】**

診断するステップが、試料中の細胞の少なくとも 5 % が細胞表面AGE を示す場合、患者を細胞老化と関連した疾患、障害、又は病的状態と診断するステップを含む、請求項 1～5 及び 7～9 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 11】**

診断するステップが、試料中の細胞の少なくとも 25 % が細胞表面AGE を示す場合、患者を細胞老化と関連した疾患、障害、又は病的状態と診断するステップを含む、請求項 1～5 及び 7～10 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 12】**

細胞老化と関連した疾患、障害、又は病的状態が、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、慢性閉塞性肺疾患、ハンチントン舞蹈病、特発性肺線維症、筋ジストロフィー、黄斑変性症、白内障、糖尿病性網膜症、パーキンソン病、早老症、白斑、囊胞性線維症、アトピー性皮膚炎、湿疹、関節炎、アテローム性動脈硬化症、がん及び転移性がん、がん療法関連身体障害又はがん療法副作用、高血圧、緑内障、骨粗しょう症、サルコペニア、悪液質、脳卒中、心筋梗塞、心房細動、移植拒絶、I型糖尿病、II型糖尿病、放射線曝露、HIV 治療副作用、化学兵器曝露、中毒症、炎症、腎症、レビー小体病、プリオン病、脊柱湾曲、自己免疫障害、脂肪組織の喪失、乾癬、クローン病、喘息、加齢の生理学的影響、特発性ミオパチー、多発性硬化症、視神経脊髄炎、てんかん、及び副腎白質ジストロフィーからなる群から選択される少なくとも 1 つの疾患、障害、又は病的状態を含む、請求項 1～5 及び 7～11 のいずれかに記載の方法。 20

**【請求項 13】**

抗AGE 抗体が、FFI、ピラリン、AFGP、ALI、カルボキシメチルリジン、カルボキシエチルリジン及びペントシジンからなる群から選択される AGE 修飾を示す細胞表面タンパク質又はペプチドに結合する、請求項 1～5 及び 7～12 のいずれかに記載の方法。 30

**【請求項 14】**

抗AGE 抗体が、カルボキシメチルリジン修飾タンパク質又はペプチドに結合する、請求項 1～5 及び 7～13 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 15】**

抗AGE 抗体が、カルボキシエチルリジン修飾タンパク質又はペプチドに結合する、請求項 1～5 及び 7～14 のいずれかに記載の方法。 40

**【請求項 16】**

抗AGE 抗体が、重鎖と軽鎖とを含み、

前記重鎖が、配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性、好ましくは少なくとも 95 % の配列同一性、より好ましくは少なくとも 98 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

前記軽鎖が、配列番号 3 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性、好ましくは少なくとも 95 % の配列同一性、より好ましくは少なくとも 98 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、

請求項 1～5 及び 7～15 のいずれかに記載の方法。 50

**【請求項 17】**

患者が、ヒト、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ラクダ、イヌ、及びネコからなる群から選択される、請求項1～5及び7～16のいずれかに記載の方法。

**【請求項 18】**

患者がヒトである、請求項1～5及び7～17のいずれかに記載の方法。

**【請求項 19】**

対象を、標識を検出することができる装置に曝露させるステップをさらに含む、請求項1～5及び7～18のいずれかに記載の方法。

**【請求項 20】**

AGE修飾細胞が老化細胞である、請求項1～5及び7～19のいずれかに記載の方法

10

。

**【請求項 21】**

AGE修飾細胞が転移性がん細胞である、請求項1～5及び7～20のいずれかに記載の方法。

**【請求項 22】**

標識が、放射標識、蛍光標識、金ナノ粒子、ガドリニウムナノ粒子、陽電子放出体、近赤外で放出する色素、量子ドット、超常磁性酸化鉄、カーボンナノチューブ、及び微小気泡からなる群から選択される少なくとも1つの標識を含む、請求項1～5及び7～21のいずれかに記載の方法。

**【請求項 23】**

抗AGE抗体に結合する試薬をさらに含む、請求項6に記載のキット。

20

**【請求項 24】**

試薬が二次抗体を含む、請求項6又は23に記載のキット。

**【請求項 25】**

抗AGE抗体、対照試料、及び試薬が滅菌されている、請求項6、23及び24のいずれかに記載のキット。

**【請求項 26】**

容器をさらに含む、請求項6及び23～25のいずれかに記載のキットであって、抗AGE抗体、対照試料、及び試薬が、前記容器中にある、前記キット。

30

**【請求項 27】**

抗AGE抗体及び/又は試薬が標識されている、請求項6及び23～26のいずれかに記載のキット。

**【請求項 28】**

標識が、蛍光標識、放射標識、及び金粒子からなる群から選択される少なくとも1つの標識を含む、請求項6及び23～27のいずれかに記載のキット。

**【請求項 29】**

診断された患者に老化細胞除去剤の有効量を投与するステップをさらに含む、請求項1～5及び7～22のいずれかに記載の方法。

**【請求項 30】**

老化細胞除去剤が、治療的抗AGE抗体、毒素にコンジュゲートされた抗AGE抗体、セノリティック剤、及びそれらの組み合わせを含む、請求項1～5、7～22及び29のいずれかに記載の方法。

40

**【請求項 31】**

患者における細胞老化と関連した疾患、障害、又は病的状態の治療における使用のための老化細胞除去剤であって、前記患者の生物学的年齢が、前記患者の暦年齢を上回る、前記老化細胞除去剤。

**【請求項 32】**

患者の生物学的年齢が上記の方法を用いて決定される、請求項31に記載の老化細胞除去剤。

**【請求項 33】**

50

患者における細胞老化と関連した疾患、障害、又は病的状態を治療する方法であって、それを必要とする患者に老化細胞除去剤の治療有効量を投与するステップを含み、

前記患者の生物学的年齢が前記患者の暦年齢を上回る、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

【背景技術】

老化細胞は、一部機能性又は非機能性の細胞であり、増殖停止の状態にある。老化は、細胞の特徴的な状態であり、バイオマーカー p 1 6 I n k 4<sup>a</sup> の活性化、及び - ガラクトシダーゼの発現などのバイオマーカーと関連している。老化は、細胞の損傷又はストレス（増殖因子による過剰刺激など）で始まる。

【0002】

終末糖化産物（AGE, advanced glycation end-product；AGE修飾タンパク質、又は最終糖化産物とも呼ばれる）は、糖とタンパク質側鎖との非酵素的反応から生じる（Ando, K. et al., Membrane Proteins of Human Erythrocytes Are Modified by Advanced Glycation End Products during Aging in the Circulation, Biochem Biophys Res Commun., Vol. 258, 123, 125 (1999)）。このプロセスは、還元糖とアミノ基とが可逆反応してシップ塩基を形成することに始まり、次に、共有結合したアマドリ転位産物を形成する。アマドリ産物は形成されると、さらに転位を経てAGEを產生する。高血糖及び酸化ストレスは、膜タンパク質のこの翻訳後修飾を促進する（Lindsey JB, et al., "Receptor For Advanced Glycation End-Products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): Cardiovascular Implications," Diabetes Vascular Disease Research, Vol. 6(1), 7-14, (2009)）。AGEはまた、他のプロセスからも形成され得る。例えば、終末糖化産物、N - (カルボキシメチル)リジンは、脂質過酸化反応及び糖酸化反応の両方の産物である。AGEは、炎症、網膜症、腎症、アテローム性動脈硬化症、脳卒中、内皮細胞機能障害、及び神経変性障害を含む複数の病的状態と関連している（Bierhaus A, "AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept," Cardiovasc Res, Vol. 37(3), 586-600 (1998)）。

【0003】

AGE修飾タンパク質はまた、老化細胞のマーカーでもある。最終糖化産物と老化とのこの関連性は、当技術分野で周知である。例えば、Gruber, L. (国際公開第2009/143411号パンフレット、2009年11月26日)、Ando, K. et al. (Membrane Proteins of Human Erythrocytes Are Modified by Advanced Glycation End Products during Aging in the Circulation, Biochem Biophys Res Commun., Vol. 258, 123, 125 (1999))、Ahmed, E.K. et al. ("Protein Modification and Replicative Senescence of WI-38 Human Embryonic Fibroblasts" Aging Cells, vol. 9, 252, 260 (2010))、Vlassara, H. et al. (Advanced Glycosylation Endproducts on Erythrocyte Cell Surface Induce Receptor-Mediated Phagocytosis by Macrophages, J. Exp. Med., Vol. 166, 539, 545 (1987))及びVlassara et al. ("High-affinity-receptor-mediated Uptake and Degradation of Glucose-modified Proteins: A Potential Mechanism for the Removal of Senescent Macromolecules" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, 5588, 5591 (1985))参照。さらに、Ahmed, E.K. et al.は、最終糖化産物が「細胞タンパク質及び細胞外タンパク質の自然損傷の主要原因の1つ」であることを示している（Ahmed, E.K. et al.、上記、353頁参照）。したがって、最終糖化産物の蓄積は、老化及び機能不全と関連している。

【0004】

細胞老化の原因となる損傷又はストレスはまた、細胞内のミトコンドリアDNAに悪影響を及ぼしてフリーラジカルを生成させる。フリーラジカルは、細胞内の糖と反応してメ

10

20

30

40

50

チルグリオキサール (M G) を形成する。M G は今度は、タンパク質又は脂質と反応して終末糖化産物を生成する。タンパク質成分リジンの場合、M G は、AGE であるカルボキシエチルリジンを形成するように反応する (Al-Abed, Y. et al., "N -Carboxymethyllysine formation by direct addition of glyoxal to lysine during the Maillard reaction", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 5, No. 18, pp. 2161-2162 (1995)).

#### 【0005】

ミトコンドリアDNAに対する損傷又はストレスはまた、細胞周期遮断タンパク質を產生するように細胞を誘導するDNA損傷応答も引き起こす。これらの遮断タンパク質は、細胞が分裂するのを阻止する。損傷又はストレスの継続はmTOR産生の原因となり、これが今度は、タンパク質合成を活性化し、タンパク質分解を不活性化する。細胞のさらなる刺激は、プログラム細胞死(アポトーシス)につながる。

10

#### 【0006】

p16は、S期(合成期)を阻害することにより細胞周期の制御に関するタンパク質である。p16は、老化時に、又はDNA損傷、酸化ストレス若しくは薬物への曝露などの様々なストレスに応答して活性化され得る。p16は典型的には、DNA損傷に応答して細胞を老化させ、細胞が過剰増殖状態に入るのを不可逆的に阻止する腫瘍抑制因子タンパク質と見なされる。しかし、p16の過剰発現を示す腫瘍もあれば、一方で、下方制御された発現を示すものもあることから、この点に関していくらかの曖昧さがある。証拠は、いくつかの腫瘍におけるp16の過剰発現が、網膜芽細胞腫タンパク質(「Rb」)欠損から生じることを示唆している。p16はRbに作用してS期を阻害し、Rbはp16を下方制御し、負のフィードバックを生じさせる。Rb欠損はS期を阻害することも、p16を下方制御することもできず、故に過剰増殖細胞におけるp16の過剰発現をもたらす (Romagosa, C. et al., p16<sup>Ink4a</sup> overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors, Oncogene, Vol. 30, 2087-2097 (2011))。

20

#### 【0007】

老化細胞は、炎症促進性因子を含む細胞間シグナル伝達に関する多くの因子の分泌に関連しており、これらの因子の分泌は、細胞老化関連分泌現象(senescence-associated secretory phenotype)、又はSASPと呼ばれている (Freund, A. "Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences" Trends Mol Med. 2010 May;16(5):238-46)。クローン病及び関節リウマチなどの自己免疫疾患は、慢性炎症と関連している (Ferraccioli, G. et al. "Interleukin-1 and Interleukin-6 in Arthritis Animal Models: Roles in the Early Phase of Transition from Acute to Chronic Inflammation and Relevance for Human Rheumatoid Arthritis" Mol Med. 2010 Nov-Dec; 16(11-12): 552-557)。慢性炎症は、ベースラインより高いが、急性炎症で見出されるものより低いレベルでの病変部位付近の炎症促進性因子の存在を特徴とし得る。これらの因子の例には、TNF、IL-1、IL-1、IL-5、IL-6、IL-8、IL-12、IL-23、CD2、CD3、CD20、CD22、CD52、CD80、CD86、C5補体タンパク質、BAFF、APRIL、IgE、4-1インテグリン及び4-7インテグリンが含まれる。老化細胞はまた、IL-1、IL-8、ICAM1、TNFAP3、ESM1及びCCL2を含む、炎症において役割を有する遺伝子を上方制御する (Burton, D.G.A. et al., "Microarray analysis of senescent vascular smooth muscle cells: a link to atherosclerosis and vascular calcification", Experimental Gerontology, Vol. 44, No. 10, pp. 659-665 (October 2009))。老化細胞は、炎症促進性因子を生成するため、これらの細胞を除去するだけで、炎症並びに炎症促進性因子の量及び濃度の顕著な低減をもたらす。

30

#### 【0008】

老化細胞は、SASPの一部としての活性酸素種(「ROS」, reactive oxygen species)を分泌する。ROSは、細胞の老化の維持において重要な役割を果たしていると考

40

50

えられている。ROSの分泌は、老化細胞が隣接細胞に老化を誘導するバイスタンダー効果を生じさせる。すなわち、ROSは、p16発現を活性化し、老化につながることが知られている細胞損傷そのものを生じさせる(Nelson, G., A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence, *Aging Cell*, Vol. 11, 345-349 (2012))。p16/Rb経路はROSの誘導につながり、これが今度は、ROSをさらに増強する正のフィードバックループを生じさせ、不可逆的細胞周期停止の維持を助けるタンパク質キナーゼCデルタを活性化する。さらに、がん細胞をROSに曝露させると、過剰増殖細胞において細胞期停止を誘導することによりがんを治療するのに有効である可能性があることが示唆されている(Rayess, H. et al., Cellular senescence and tumor suppressor gene p16, *Int J Cancer*, Vol. 130, 1715-1725 (2012))。

10

#### 【0009】

老化細胞の相対的レベルは、疾患と特異的に相關している。老化細胞は、がん及び転移性がんと長年関連付けられており、10%老化線維芽細胞との細胞培養は増殖刺激を証明した(Krtolica, A. et al., "Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 98, No. 21, pp. 12072-12077 (2001))。生物学的老化の尺度であるエアロビックフィットネスは、37%少ない老化CD4+及びCD8+T細胞と関連していた(Spielmann, G. et al., "Aerobic fitness is associated with lower proportions of senescent blood T-cells in man", *Brain, Behavior and Immunity*, Vol. 25, No. 8, pp. 1521-1529 (2011))。同様に、老化CD4+T細胞は、アイアンマントライアスロンに向けた6ヶ月のトレーニングの2週間後のトライアスロン選手において192%増加した(Cosgrove, C. et al., "The impact of 6-month training preparation for an Ironman triathlon on the proportions of naive, memory and senescent T cells in resting blood", *European Journal of Applied Physiology*, Vol. 112, No. 8, pp. 2989-2998 (2012))。

20

#### 【0010】

老化細胞の表面で発現される終末糖化産物のレベルの増加は、様々な疾患、障害及び病的状態のマーカーとして認識してきた。カルボキシメチルリジン(CML, carboxymethyllysine)のレベルの増加は、線維筋痛症患者の血清及び筋肉組織で見出されている(Ruster, M. et al., "Detection of elevated N-carboxymethyllysine levels in muscular tissue and in serum of patients with fibromyalgia", *Scandinavian Journal of Rheumatology*, Vol. 34, No. 6, pp. 460-463 (2005))。皮膚の薄化又は小じわなどの皮膚の老化の加速は、糖尿病患者で容易に目立つ(Schmid, D. et al., "Collage glycation and skin aging", *Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide*, available online at [mibellebiochemistry.com/app/uploads/2015/03/GSP-T-for-Skin\\_Collagen-glycation-and-skin-aging-CT-2002.pdf](http://mibellebiochemistry.com/app/uploads/2015/03/GSP-T-for-Skin_Collagen-glycation-and-skin-aging-CT-2002.pdf) (accessed on April 27, 2017))。同様に、糖尿病患者の皮膚自家蛍光値は、ペントシジン及びCMLの組織レベルと相關し、冠状動脈性心疾患及び予測死亡率と強い関係がある(Meerwaldt, R. et al., "Skin autofluorescence is a strong predictor of cardiac mortality in diabetes", *Diabetes Care*, Vol. 30, No. 1, pp. 107-112 (2007))。故に、AGEレベルの上昇は、細胞老化と関連した疾患、障害及び病的状態の一般に認められているマーカーである。

30

#### 【0011】

試料中のAGEの絶対値は、疾患と特異的に相關している。血漿CMLのレベルは、対照と比較して前立腺がん患者で30μg/mL高かった(Yang, S. et al., "Impact of oxidative stress biomarkers and carboxymethyllysine (an advanced glycation end product) on prostate cancer: a prospective study", *Clinical Genitourinary Cancer*, Vol. 13, No. 5, pp. e347-e351 (2015))。

40

#### 【0012】

同様に、老化細胞と加齢又は加齢関連障害との関係は、国際公開第2009/143411号パンフレットに記載されているように、診断標的になる加齢マーカーをもたらした

50

。テロメアは、生物学的老化と長年関連付けられており、短いテロメア長は、糖尿病、心血管疾患及びがんなどの加齢関連疾患の早期発症の指標として使用されている（“Telomere Testing White Paper”, Titanovo, available online at titanovo.com/telomere-length-testing/ (accessed on April 20, 2017)）。テロメア長は、DNA試料においてポリメラーゼ連鎖反応（PCR, polymerase chain reaction）分析を用いて測定することができる。加齢及び加齢関連障害を検出するのにテロメア長を使用することの重大な制約は、全ての老化がテロメアに関わるわけではないことである。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0013】

10

【特許文献1】国際公開第2009/143411号パンフレット

## 【非特許文献】

## 【0014】

【非特許文献1】Ando, K. et al., Membrane Proteins of Human Erythrocytes Are Modified by Advanced Glycation End Products during Aging in the Circulation, Biochem Biophys Res Commun., Vol. 258, 123, 125 (1999)

【非特許文献2】Lindsey JB, et al., "Receptor For Advanced Glycation End-Products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): Cardiovascular Implications," Diabetes Vascular Disease Research, Vol. 6(1), 7-14, (2009)

【非特許文献3】Bierhaus A, "AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept," Cardiovasc Res, Vol. 37(3), 586-600 (1998)

20

【非特許文献4】Ahmed, E.K. et al. ("Protein Modification and Replicative Senescence of WI-38 Human Embryonic Fibroblasts" Aging Cells, vol. 9, 252, 260 (2010))

【非特許文献5】Vlassara, H. et al. (Advanced Glycosylation Endproducts on Erythrocyte Cell Surface Induce Receptor-Mediated Phagocytosis by Macrophages, J. Exp. Med., Vol. 166, 539, 545 (1987))

【非特許文献6】Vlassara et al. ("High-affinity-receptor-mediated Uptake and Degradation of Glucose-modified Proteins: A Potential Mechanism for the Removal of Senescent Macromolecules" Proc. Natl. Acad. Sci. USAI, Vol. 82, 5588, 5591 (1985))

30

【非特許文献7】Al-Abed, Y. et al., "N-Carboxymethyllysine formation by direct addition of glyoxal to lysine during the Maillard reaction", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 5, No. 18, pp. 2161-2162 (1995)

【非特許文献8】Romagosa, C. et al., p16Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors, Oncogene, Vol. 30, 2087-2097 (2011)

【非特許文献9】Freund, A. "Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences" Trends Mol Med. 2010 May;16(5):238-46

【非特許文献10】Ferraccioli, G. et al. "Interleukin-1 and Interleukin-6 in Arthritis Animal Models: Roles in the Early Phase of Transition from Acute to Chronic Inflammation and Relevance for Human Rheumatoid Arthritis" Mol Med. 2010 Nov-Dec; 16(11-12): 552-557

40

【非特許文献11】Burton, D.G.A. et al., "Microarray analysis of senescent vascular smooth muscle cells: a link to atherosclerosis and vascular calcification", Experimental Gerontology, Vol. 44, No. 10, pp. 659-665 (October 2009)

【非特許文献12】Nelson, G., A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence, Aging Cell, Vol. 11, 345-349 (2012)

【非特許文献13】Rayess, H. et al., Cellular senescence and tumor suppressor gene p16, Int J Cancer, Vol. 130, 1715-1725 (2012)

50

【非特許文献 14】Krtolica, A. et al., "Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging", Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 98, No. 21, pp. 12072-12077 (2001)

【非特許文献 15】Spielmann, G. et al., "Aerobic fitness is associated with lower proportions of senescent blood T-cells in man", Brain, Behavior and Immunity, Vol. 25, No. 8, pp. 1521-1529 (2011)

【非特許文献 16】Cosgrove, C. et al., "The impact of 6-month training preparation for an Ironman triathlon on the proportions of naive, memory and senescent T cells in resting blood", European Journal of Applied Physiology, Vol. 112, No. 8, pp. 2989-2998 (2012)

【非特許文献 17】Ruster, M. et al., "Detection of elevated N -carboxymethyllysine levels in muscular tissue and in serum of patients with fibromyalgia", Scandinavian Journal of Rheumatology, Vol. 34, No. 6, pp. 460-463 (2005)

【非特許文献 18】Schmid, D. et al., "Collage glycation and skin aging", Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide, available online at mibellebiochemistry.com/app/uploads/2015/03/GSP-T-for-Skin\_Collagen-glycation-and-skin-aging-CT-2002.pdf (accessed on April 27, 2017)

【非特許文献 19】Meerwaldt, R. et al., "Skin autofluorescence is a strong predictor of cardiac mortality in diabetes", Diabetes Care, Vol. 30, No. 1, pp. 107-112 (2007)

【非特許文献 20】Yang, S. et al., "Impact of oxidative stress biomarkers and carboxymethyllysine (an advanced glycation end product) on prostate cancer: a prospective study", Clinical Genitourinary Cancer, Vol. 13, No. 5, pp. e347-e351 (2015)

【非特許文献 21】"Telomere Testing White Paper", Titanovo, available online at titanovo.com/telomere-length-testing/ (accessed on April 20, 2017)

#### 【発明の概要】

#### 【0015】

第1の態様において、本発明は、患者における細胞老化と関連した疾患、障害又は病的状態を診断する方法であって、患者から試料を得るステップと、試料中の細胞表面AGEを示す細胞の数を測定するステップと、試料中の細胞表面AGEを示す細胞の数が、対照における細胞表面AGEを示す細胞の数より大きい場合、患者を細胞老化と関連した疾患、障害又は病的状態と診断するステップとを含む方法である。

#### 【0016】

第2の態様において、本発明は、患者の生物学的年齢を決定する方法であって、患者から、細胞及び非細胞物質を含有する試料を得るステップと、細胞と非細胞物質とを分離するステップと、細胞を抗AGE抗体と接触させ、細胞表面AGEと抗AGE抗体との結合を検出することにより、試料中の細胞表面AGEを示す細胞の数を測定するステップと、非細胞物質を抗AGE抗体と接触させ、非結合AGEと抗AGE抗体との結合を検出することにより、試料中の非結合AGEの数を測定するステップと、試料中の細胞表面AGEと非結合AGEの比を比較するステップとを含む方法である。

#### 【0017】

第3の態様において、本発明は、患者における細胞老化による進行した生物学的老化と関連した疾患、障害又は病的状態を診断する方法であって、患者から、細胞及び非細胞物質を含有する試料を得るステップと、細胞と非細胞物質とを分離するステップと、細胞を抗AGE抗体と接触させ、細胞表面AGEと抗AGE抗体との結合を検出することにより、試料中の細胞表面AGEを示す細胞の数を測定するステップと、非細胞物質を抗AGE抗体と接触させ、非結合AGEと抗AGE抗体との結合を検出することにより、試料中の非結合AGEの数を測定するステップと、試料中の細胞表面AGEと非結合AGEの比を比較して患者の生物学的年齢を決定するステップと、患者の生物学的年齢が患者の曆年齢

10

20

30

40

50

を上回る場合、患者を細胞老化による進行した生物学的老化と関連した疾患、障害又は病的状態と診断するステップとを含む方法である。

【0018】

第4の態様において、本発明は、患者における細胞老化による進行した生物学的老化と関連した疾患、障害又は病的状態を診断する方法であって、患者から試料を得るステップと、試料中の細胞表面AGEを示す細胞の数を測定するステップと、試料中の細胞表面AGEを示す細胞の数を、年齢をマッチさせた対照における細胞表面AGEを示す細胞の数と比較することにより患者の生物学的年齢を決定するステップと、患者の生物学的年齢が患者の暦年齢より高い場合、患者を細胞老化による進行した生物学的老化と関連した疾患、障害又は病的状態と診断するステップとを含む方法である。

10

【0019】

第5の態様において、本発明は、対象におけるAGE修飾細胞をインビボで検出する方法であって、対象に検出可能な標識で標識されている抗AGE抗体を投与するステップを含む方法である。

【0020】

第6の態様において、本発明は、細胞表面終末糖化産物を発現する細胞を検出するためのキットであって、抗AGE抗体と、対照試料と、任意で、抗AGE抗体に結合する試薬とを含むキットである。

【0021】

第7の態様において、本発明は、患者における細胞老化と関連した疾患、障害又は病的状態を治療する方法であって、それを必要とする患者に老化細胞除去剤の治療有効量を投与するステップを含む方法である。患者の生物学的年齢は、患者の暦年齢を上回る。

20

【0022】

定義

用語「ペプチド」は、2～50個のアミノ酸からなる分子を意味する。

【0023】

用語「タンパク質」は、50個を超えるアミノ酸からなる分子を意味する。

【0024】

用語「終末糖化産物」、「AGE」、「AGE修飾タンパク質又はペプチド」及び「最終糖化産物」は、糖とタンパク質側鎖との反応の結果として形成され、さらに転位し、不可逆的架橋を形成する修飾タンパク質又はペプチドを指す。このプロセスは、還元糖とアミノ基とが可逆反応してシップ塩基を形成することに始まり、次に、共有結合したアマドリ転位産物を形成する。アマドリ産物は形成されると、さらに転位を経てAGEを产生する。AGE修飾タンパク質及びAGE修飾タンパク質に対する抗体は、Bucalaの米国特許第5,702,704号明細書（「Bucala」）及びAl-Abed et al.の米国特許第6,380,165号明細書（「Al-Abed」）に記載されている。AGEを形成するのに必要な転位を経ていない、糖化アルブミンで見出されるN-デオキシフルクトシルリジンなどの糖化タンパク質又はペプチドは、AGEではない。AGEは、2-(2-フロイル)-4(5)-(2-フラニル)-1H-イミダゾール（「FFI」）；5-ヒドロキシメチル-1-アルキルピロール-2-カルバルデヒド（「ピラリン」）；1-アルキル-2-ホルミル-3,4-ジグリコシリピロール（「AFGP」）、非蛍光モデルAGE；カルボキシメチルリジン；カルボキシエチルリジン；及びペントシジンなどのAGE修飾（AGEエピトープ又はAGE部分とも呼ばれる）の存在によって同定することができる。別のAGEであるALIはAl-Abedに記載されている。

30

【0025】

「抗AGE抗体」又は「AGE抗体」は、AGE修飾タンパク質又はペプチドに結合し、好ましくは抗体の定常領域を含む抗体、抗体断片又は他のタンパク質若しくはペプチドを意味する。AGE修飾タンパク質又はペプチドは、細胞、好ましくは哺乳動物細胞、より好ましくはヒト、ネコ、イヌ、ウマ、ラクダ科動物（例えば、ラクダ又はアルパカ）、ウシ、ヒツジ、又はヤギ細胞の表面に結合した状態で通常見出されるタンパク質又はペプ

40

50

チドであってもよい。或いは、AGE修飾タンパク質又はペプチドは、細胞の表面に結合していないタンパク質又はペプチド（遊離、非結合又は循環タンパク質又はペプチドとも呼ばれる）であってもよい。「抗AGE抗体」又は「AGE抗体」は、AGE修飾タンパク質又はペプチド、及び同じ非AGE修飾タンパク質又はペプチドの両方に同じ特異性及び選択性で結合する抗体又は他のタンパク質を含まない（すなわち、AGE修飾の存在は結合を増加させない）。「抗AGE抗体」又は「AGE抗体」は、例えば毒素、薬物、又は他の化学物質若しくは粒子にコンジュゲートされる抗体を含む。好ましくは、抗体はモノクローナル抗体であるが、ポリクローナル抗体もまたあり得る。

## 【0026】

用語「老化細胞」は、増殖停止の状態にあり、p<sub>16</sub><sup>Ink4a</sup>の活性化又は老化関連ガラクトシダーゼの発現などの、1又は2以上の老化のバイオマーカーを発現する細胞を意味する。また、含まれるのは、老化の1又は2以上のバイオマーカーを発現し、インビトロでは増殖しないが、特定の条件下でインビトロで増殖し得る、ALS患者の筋肉で見出されるいくつかのサテライト細胞などの細胞である。

10

## 【0027】

用語「セノリティック剤(senolytic agent)」は、老化細胞を破壊する分子量900ダルトン未満の小分子を意味する。用語「セノリティック剤」には、抗体、抗体コンジュゲート、タンパク質、ペプチド又は生物学的療法が含まれない。

## 【0028】

用語「老化細胞除去剤(senescent cell removal agent)」は、老化細胞を破壊する物質を意味する。老化細胞除去剤には、米国特許第9,161,810号明細書に記載されたものなどの治療的抗AGE抗体、及びセノリティック剤が含まれる。

20

## 【0029】

用語「バリアント」は、1個又は2個以上のヌクレオチド、タンパク質又はアミノ酸残基が欠失、置換又は付加されている、具体的に同定された配列とは異なるヌクレオチド、タンパク質又はアミノ酸配列を意味する。バリアントは、天然に存在する対立遺伝子バリアント、又は天然に存在しないバリアントであってもよい。同定された配列のバリアントは、同定された配列の機能的特徴のいくつか又は全てを保持してもよい。

## 【0030】

用語「配列同一性パーセント(%)」は、配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入して配列同一性最大パーセントを得た後の、及びいかなる保存的置換も配列同一性の一部として見なさない、参照ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列のアミノ酸残基の割合として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアライメントは、BLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNASTAR社)ソフトウェアなどの公開されているコンピュータソフトウェアを用いて、様々な方法で得ることができる。好ましくは、配列同一性%値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc.社(サウスサンフランシスコ、CA)から公開されており、又は米国著作権局にユーザー文書と共に提出された、米国著作権登録番号TXU510087の下に登録されているソースコードからコンパイルすることができる。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含むUNIXオペレーションシステムで使用するためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメーターは、ALIGN-2プログラムによって設定されており、変動しない。

30

## 【0031】

ALIGN-2がアミノ酸配列比較に使用される状況において、任意のアミノ酸配列Bへの、任意のアミノ酸配列Bとの、又は任意のアミノ酸配列Bに対する、任意のアミノ酸配列Aの配列同一性%（或いは、任意のアミノ酸配列Bに、任意のアミノ酸配列Bと、又は任意のアミノ酸配列Bに対して、特定のアミノ酸配列同一性%を有する又は含む任意のアミノ酸配列Aと表現され得る）は、次のように計算される：分数X/Yの100倍（式中、Xは、配列アライメントプログラムALIGN-2によって、A及びBのそのプログ

40

50

ラムのアライメントにおいて同一マッチとして採点されるアミノ酸残基の数であり、Yは、Bにおけるアミノ酸残基の総数である)。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さに等しくない場合、BへのAのアミノ酸配列同一性%は、AへのBのアミノ酸配列同一性%に等しくならない。特に具体的な記載のない限り、本明細書で使用される全てのアミノ酸配列同一性%値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られる。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0032】

【図1】細胞表面終末糖化産物を発現する細胞を検出するためのキットを例示する図である。

【図2】抗体結合実験における応答対時間のグラフである。

10

【図3A】赤色に染色されたカルボキシメチルリジン(ダークグレー)及び緑色に染色されたリン酸化タウ(ライトグレー)を示すアルツハイマー病試料の細胞の写真である。

【図3B】赤色に染色されたカルボキシメチルリジン(ダークグレー)及び緑色に染色されたアミロイド前駆体タンパク質(ライトグレー)を示すアルツハイマー病試料の細胞の写真である。

【図3C】赤色に染色されたカルボキシメチルリジン(ダークグレー)及び緑色に染色されたシヌクレイン(ライトグレー)を示す、黒質由来のパーキンソン病試料の細胞の写真である。

【図3D】赤色に染色されたカルボキシメチルリジン(ダークグレー)及び緑色に染色されたシヌクレイン(ライトグレー)を示す腹側被蓋野由来のパーキンソン病試料の細胞の写真である。

20

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0033】

細胞老化と様々な疾患、障害及び病的状態との定量可能な関連性を認識することは、診断標的になる老化細胞をもたらした。例えば、CD57は、ナチュラルキラー(NK, natural killer)細胞及びT細胞などの免疫細胞を含む老化細胞の既知のマーカーである(Kared, H. et al., "CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes", Cancer Immunology, Immunotherapy, Vol. 65, No. 4, pp. 441-452 (2016))。Miltenyi Biotec社(ベルギッシュ・ラッダバッハ、ドイツ)製のCD8+CD57+T細胞単離キットなどのCD57単離キットが市販されているが、これらの定量的測定ツールは、研究用途のみが対象となる。Miltenyi Biotec社製T細胞単離キットのデータシートは、キットが診断用途又は治療用途向けではないことを明記している。

30

##### 【0034】

終末糖化産物の検出及び定量化は、質量分析及び高速液体クロマトグラフィーなどのタンパク質を検出することができる分析法で実施してきた。しかし、これらの手法は扱いにくく、複雑な実験室機器にしばしば依存する。抗AGE抗体を用いる終末糖化産物の測定のための免疫アッセイなどのウェットラボ手法は、著しく使用しやすい。Kamiya Biomedical Company社(シアトル、W A、U S A)製のCarboxymethyl Lysine(CML)ELISAカタログ番号KT-32428などの抗AGEアッセイが市販されている。老化細胞検出ツールとまさに同じように、これらの定量的測定ツールは、研究用途のみが対象となる。Kamiya Biomedical Company社CML ELISA(カタログ番号KT-32428)のデータシートは、製品が診断手順における用途のためではないことを明記している。したがって、診断目的での抗AGE抗体の使用は、日常的でも従来的でもない。

40

##### 【0035】

本発明は、老化関連疾患、障害又は病的状態を診断及び監視するために終末糖化産物修飾タンパク質及びペプチドに結合する抗体を使用する。AGE修飾タンパク質及びペプチド、特に、一部機能性及び非機能性細胞の表面のAGE修飾タンパク質及びペプチドは、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)、セルソーティング及びセルカウンティングを含む抗体ベースの診断方法のための固有の標的で

50

ある。例えば、周知の終末糖化産物である、細胞結合カルボキシメチルリジン（CML）の検出が、試料中の老化細胞の総数、濃度又は比を決定するのに使用されてもよい。患者は、対照における細胞表面AGEを示す細胞の数と比較した試料中の細胞表面AGEを示す細胞の数に基づき、又は試料中の細胞表面AGEを示す細胞の数が臨床閾値を上回る場合、治療を必要とする同定され得る。或いは、又はさらに、細胞結合AGEと遊離（非結合）AGEの比の比較は、試料中の老化細胞の数を標準化し、及び疾患進行又は生物学的老化を監視するのに使用されてもよい。細胞結合AGEのより大きな比は、内部源及び細胞機能障害によるより大量の細胞老化を示している。抗AGE抗体ベースの診断方法は、低侵襲及び実施しやすいという利点を提供し、そのような検査が診察室又は診療所で実施されることを可能にする。

10

#### 【0036】

老化細胞が細胞表面終末糖化産物を発現することから、抗AGE抗体は、試料中の老化細胞の存在を検出するのに使用されてもよい。1つの実施形態では、試料が提供される。試料は、ヒト患者から得られ得る。次に、試料を抗AGE抗体と接触させ、細胞表面AGEと抗AGE抗体との結合を検出することにより、試料中の細胞表面AGEの存在が決定又は測定される。対照試料は、比較のためのベースラインとして、患者から又は健康な対象から得てもよい。比較のためのベースラインはまた、健康な対照群からAGE修飾を示す細胞の平均数として得ることもできる。好ましくは、対照試料は、試料が得られる患者と同じ暦年齢の健康な対象（「年齢をマッチさせた」又は「年齢順」対照としても知られる）から得られる。

20

#### 【0037】

細胞表面AGEを示す細胞の数は、定性的又は定量的測定を用いて決定することができる。測定は、健康な対照との比較に有用な情報を提供することが意図される。定量的測定の例には、試料中の細胞表面AGEを示す細胞の総数、平均数、濃度、比又は割合を測定することが含まれる。定性的測定の例には、免疫組織化学又は免疫細胞化学的手法で組織試料を分析することが含まれる。例えば、試料内の糖化の位置は、細胞老化と関連した疾患、障害又は病的状態を示し得る。

30

#### 【0038】

試料中の老化細胞の測定は、細胞老化と関連した疾患、障害若しくは病的状態を有する患者を診断し、又は治療を必要としている患者を同定するのに使用することができる。細胞機能障害のレベルの上昇は、試料中の細胞表面AGEを示す細胞の総数、平均数、濃度、比又は割合が、対照における細胞表面AGEを示す細胞の総数、平均数、濃度、比又は割合を上回る場合に示され得る。例えば、5%を超える老化細胞を含有する試料は、細胞機能障害のレベルの上昇を示す。患者は、症状を示す前又は医療専門家から臨床診断を受ける前に、細胞老化と関連した疾患、障害若しくは病的状態と診断され、又は治療を必要としている同定され得る。好ましくは、患者は、細胞老化と関連した疾患、障害又は病的状態の同定に役立つ検査の前に、細胞老化と関連した疾患、障害又は病的状態の少なくとも1つの症状を既に示す。試料中の老化細胞の測定はまた、重複又は類似する症状と疾患、障害又は病的状態を区別するための鑑別診断において使用することもできる。

30

#### 【0039】

細胞機能障害のレベルの上昇はまた、試料中の細胞表面AGEを示す細胞の数が臨床閾値を上回る場合にも示され得る。例えば、試料が、少なくとも6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、30%、35%、40%及び45%の老化細胞を含む、5%～50%の老化細胞を含有するならば、患者は、細胞老化と関連した疾患、障害若しくは病的状態と診断され、又は治療を必要としている同定され得る。臨床閾値は、健康な患者から得られる試料のコレクションにおいて見出されるAGE修飾細胞の最高数又は平均数に基づいてもよい。

40

#### 【0040】

試料中の老化細胞の測定はまた、患者の生物学的年齢を決定するのに使用することもで

50

きる。老化細胞は年齢と共に蓄積することから、年齢をマッチさせた対照と比較して試料中のより大量の老化細胞は、生物学的年齢の進行を示す。患者の生物学的年齢が患者の曆年齢より高い場合、患者は治療を必要としていると同定され得る。例えば、患者は、彼女の生物学的年齢が、彼女の曆年齢より少なくとも 15%、20%、25%、30%、35%、40% 及び 45% 高い場合を含む、彼女の曆年齢より 10% ~ 50% 高い場合、生物学的年齢が進行していると診断され得る。同様に、患者は、彼女の生物学的年齢が、彼女の曆年齢より少なくとも 10 歳、15 歳、20 歳、25 歳、30 歳、35 歳、40 歳及び 45 歳高い場合を含む、彼女の曆年齢より 5 ~ 50 歳高い場合、生物学的年齢が進行していると診断され得る。

#### 【0041】

抗AGE抗体は、試料中の遊離（非結合）AGE及びAGE修飾タンパク質又はペプチドを検出するのに使用することもできる。遊離AGEは、細胞老化と関連がない終末糖化産物の尺度となり得る。試料中の細胞表面AGEの数は、試料中の老化細胞の数を標準化するために遊離AGEの数と比較することができる。例えば、細胞表面AGEと遊離AGEの比は、細胞表面に蓄積しているAGE割合を決定するのに使用することができ、高い比率は細胞老化の増加を示す。試料中の老化細胞の割合もまた、患者の生物学的年齢の尺度として使用することができる。

#### 【0042】

試料は、老化している可能性がある細胞を含有する患者から得られる任意の物質であってもよい。適切な試料の例には、唾液、口腔スワブ、血液試料、尿試料、皮膚試料及び生検が含まれる。試料は、遠心分離などにより物理的に処理されていてもよく、又はトリプシン処理などにより化学的に処理されていてもよい。試料処理は、血液試料の血清及び血漿への分離など、試料の特定の部分を分離するのに使用することができる。

#### 【0043】

細胞表面終末糖化産物の存在について検査される試料内の細胞は、細胞老化を起こすことができる任意の細胞であってもよい。検査される適切な細胞の例には、T 細胞、赤血球、線維芽細胞及び上皮細胞が含まれる。T 細胞は、検査に好ましい細胞である。

#### 【0044】

試料中のAGE修飾ペプチド又はタンパク質の存在は、任意の抗体ベースの同定法によって決定することができる。適切な抗体同定法の例には、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA, radioimmunoassay）及びリアルタイム免疫定量PCR（iqPCR, real-time immunoquantitative PCR）、セルソーティング、例えば蛍光活性化セルソーティング（FACS, fluorescent activated cell sorting）、フローサイトメトリー及び磁気セルソーティング、セルカウンティング、ウエスタンプロット、免疫組織化学（IHC, immunohistochemistry）、免疫細胞化学（ICC, immunochemistry）、免疫沈降並びに酵素結合免疫スポット（ELISPOT, enzyme linked immunospot）などの免疫アッセイが含まれる。好ましくは、抗体同定法は免疫アッセイである。

#### 【0045】

組織試料中の老化細胞を検出するための好ましい手法は、免疫組織化学（IHC）染色である。組織試料の組織学的分析は、組織試料中の特定のタンパク質を同定するための十分に確立された手法である。例えば、AGEは、アテローム硬化病変及び膵臓がんの組織試料で検出されている（Wendel, U. et al., “A novel monoclonal antibody targeting carboxymethyllysine, an advanced glycation end product in atherosclerosis and pancreatic cancer”, PLoS One, Vol. 13, No. 2, e0191872 (2018)）。免疫組織化学染色は、糖化の特定の部位の検出を可能にする。

#### 【0046】

診断法は、試料が得られた現場で実施することができる。或いは、試料は、研究所などの現場を離れた検査施設へ送られてもよい。

#### 【0047】

10

20

30

40

50

抗AGE抗体は、老化細胞の表面で発現されるAGE修飾タンパク質又はペプチドを含むAGE修飾タンパク質又はペプチドに結合する任意の抗体であってもよい。抗AGE抗体は当技術分野で公知であり、市販されている。例には、米国特許第5,702,704号明細書(Bucala)及び米国特許第6,380,165号明細書(Al-Abed et al.)に記載されたものが含まれる。抗体は、FFI、ピラリン、AFGP、ALI、カルボキシメチルリジン(CML)、カルボキシエチルリジン(CEL, carboxyethyllysine)及びペントシジンなどのAGE修飾を有する1又は2以上のAGE修飾タンパク質又はペプチド、並びにそのような抗体の混合物に結合することができる。抗体は、モノクローナル又はポリクローナルであってもよい。好ましくは、抗体はモノクローナル抗体である。

## 【0048】

10

好ましい抗AGE抗体には、カルボキシメチルリジン又はカルボキシエチルリジンAGE修飾を示すタンパク質又はペプチドに結合するものが含まれる。カルボキシメチルリジン(N(イブシロン)-(カルボキシメチル)リジン、N(6)-カルボキシメチルリジン、又は2-アミノ-6-(カルボキシメチルアミノ)ヘキサン酸としても知られる)及びカルボキシエチルリジン(N-イブシロン-(カルボキシエチル)リジンとしても知られる)は、酸化ストレス及び化学的糖化の結果としてタンパク質又はペプチド及び脂質で見出される。CML及びCEL修飾タンパク質又はペプチドは、様々な細胞で発現される受容体RAGEによって認識される。CML及びCELは十分に試験されており、CML及びCEL関連製品が市販されている。例えば、Cell Biolabs, Inc.社は、CML-BSA抗原、CMLポリクローナル抗体、CML免疫プロットキット、及びCML競合的ELISAキット([www.cellbiolabs.com/cml-assays](http://www.cellbiolabs.com/cml-assays))並びにCEL-BSA抗原及びCEL競合的ELISAキット([www.cellbiolabs.com/cel-n-epsilon-carboxyethyl-lysine-assays-and-reagents](http://www.cellbiolabs.com/cel-n-epsilon-carboxyethyl-lysine-assays-and-reagents))を販売している。好ましい市販の抗AGE抗体は、R&D Systems, Inc.社(ミネアポリス、MN; カタログ番号MAB3247)から入手可能な、キーホールドペットヘモシニアンとコンジュゲートされたカルボキシメチルリジンに対して産生されるマウス抗最終糖化産物抗体(Clone 318003)である。

20

## 【0049】

抗AGE抗体は、配列番号1のタンパク質配列を有する重鎖、及び配列番号3のタンパク質配列を有する軽鎖を有してもよく又は含んでもよい。重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、それぞれ配列番号2及び配列番号4に示されている。さらなる抗AGE抗体のDNA及びタンパク質配列は、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2017/143073号パンフレット、国際特許出願公開第PCT/US2017/18185号に見出すことができる。

30

## 【0050】

抗AGE抗体は、2つの異なるエピトープを対象にする抗体である二重特異性抗体であってもよい。そのような抗体は、1つの抗AGE抗体由来の可変領域(又は相補性決定領域)、及び異なる抗体由来の可変領域(又は相補性決定領域)を含む。

## 【0051】

40

抗体断片が、抗体全体の代わりに使用されてもよい。例えば、免疫グロブリンGは、酵素による消化によってより小さな断片に分解され得る。パパイン消化は、重鎖内ジスルフィド架橋のN末端側を切断してFab断片を生成する。Fab断片は、軽鎖、及び重鎖の2つのN末端ドメイン(Fd断片としても知られる)のうちの1つを含む。ペプシン消化は、重鎖内ジスルフィド架橋のC末端側を切断してF(ab')<sub>2</sub>断片を生成する。F(ab')<sub>2</sub>断片は、軽鎖、及びジスルフィド架橋によって連結された2つのN末端ドメインの両方を含む。ペプシン消化はまた、Fv(可変断片(fragment variable))及びFc(結晶性断片(fragment crystallizable))断片を形成することもできる。Fv断片は、2つのN末端可変ドメインを含有する。Fc断片は、細胞上の免疫グロブリン受容体、及び補体カスケードの最初のエレメントと相互作用するドメインを含有する。ペプシンはまた、重鎖(C<sub>H</sub>3)の第3定常ドメインの前で免疫グロブリンGを切断して、大きな断片F(abc)及び小さな断片pFc'を生成することもできる。抗体断片は、或いは

50

組換え的に生成することができる。

#### 【0052】

抗体は、周知の方法を用いて生成することができる。例えば、ポリクローナル抗体（p A b）は、免疫原、及び所望であればアジュバントの1回又は2回以上の注射によって哺乳動物宿主において產生され得る。典型的には、免疫原（及びアジュバント）は、皮下又は腹腔内注射によって哺乳動物に注射される。免疫原は、AGE - アンチトロンビンIII、AGE - カルモジュリン、AGE - インスリン、AGE - セルロプラスミン、AGE - コラーゲン、AGE - カテプシンB、AGE - アルブミン、例えばAGE - ウシ血清アルブミン（AGE - BSA）、AGE - ヒト血清アルブミン及びオボアルブミンなど、AGE - クリストリン、AGE - プラスミノーゲン活性化因子、AGE - 内皮血漿膜タンパク質、AGE - アルデヒドレダクターゼ、AGE - トランスフェリン、AGE - フィブリノーゲン、AGE - 銅 / 亜鉛 SOD、AGE - アポB、AGE - フィブロネクチン、AGE - 脳臍リポース、AGE - アポA - I 及びII、AGE - ヘモグロビン、AGE - Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> - ATPアーゼ、AGE - プラスミノーゲン、AGE - ミエリン、AGE - リゾチーム、AGE - 免疫グロブリン、AGE - 赤血球グルタミン酸輸送タンパク質、AGE - - N - アセチルヘキソミナーゼ、AGE - アポE、AGE - 赤血球膜タンパク質、AGE - アルドースレダクターゼ、AGE - フェリチン、AGE - 赤血球スペクトрин、AGE - アルコールデヒドロゲナーゼ、AGE - ハプトグロビン、AGE - チューブリン、AGE - 甲状腺ホルモン、AGE - フィブリノーゲン、AGE - - 2 - ミクログロブリン、AGE - ソルビトールデヒドロゲナーゼ、AGE - 1 - アンチトリプシン、AGE - 炭酸脱水酵素、AGE - リボヌクレアーゼ、AGE - 低密度リポタンパク質、AGE - ヘキソキナーゼ、AGE - アポC - I、AGE - リボヌクレアーゼ、AGE - ヘモグロビン、例えばAGE - ヒトヘモグロビンなど、AGE - 低密度リポタンパク質（AGE - LDL）並びにAGE - コラーゲンIVなどの細胞のAGE修飾タンパク質又はペプチドであってもよい。完全な、溶解された、又は部分的に消化されたAGE修飾赤血球などのAGE修飾細胞はまた、AGE抗原として使用することもできる。アジュバントの例には、フロイント完全アジュバント、モノホスホリルリピドA合成 - トレハロースジコリノミコレート、水酸化アルミニウム（ミョウバン）、熱ショックタンパク質HSP70又はHSP96、モノホスホリルリピドAを含有するスクアレンエマルジョン、2 - マクログロブリン、並びに油エマルジョン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン及びジニトロフェノールを含む界面活性物質が含まれる。免疫応答を改善するために、免疫原は、キーホールリンベットヘモシニアン（KLH, keyhole limpet hemocyanin）、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、コレラ毒素、不安定性エンテロトキシン、シリカ粒子又は大豆トリプシンインヒビターなどの、宿主における免疫原性であるポリペプチドにコンジュゲートされてもよい。好ましい免疫原コンジュゲートは、AGE - KLHである。或いは、pAbは、IgY分子を產生するニワトリで作製され得る。

#### 【0053】

モノクローナル抗体（mAb）は、宿主又は宿主由来のリンパ球を免疫し、mAb分泌（又は分泌する可能性がある）リンパ球を採取し、それらのリンパ球を不死化細胞（例えば、骨髄腫細胞）に融合し、所望のmAbを分泌する細胞を選択することによって作製され得る。EBVハイブリドーマ法などの他の手法が使用されてもよい。所望であれば、mAbは、タンパク質Aセファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、硫酸塩析又は親和性クロマトグラフィーなどの従来の手順によって、培養培地又は腹水液から精製されてもよい。

#### 【0054】

抗AGE抗体は、細胞老化を特徴とする任意の疾患、障害若しくは病的状態の発症を診断する、又は細胞老化を特徴とする任意の疾患、障害若しくは病的状態の進行を測定するのに使用することができる。細胞老化と関連している疾患、障害及び病的状態の例には、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症（ALS, amyotrophic lateral sclerosis又はルーゲーリック病）、慢性閉塞性肺疾患（COPD, chronic obstructive pulmonary di

10

20

30

40

50

sease)、ハンチントン舞蹈病、特発性肺線維症、筋ジストロフィー(ベッカー型、デュシェンヌ型、肢帶及びヤマモト型(Yamamoto's muscular dystrophy)筋ジストロフィーを含む)、黄斑変性症、白内障、糖尿病性網膜症、パーキンソン病、早老症(ウェルナー症候群及びハッチンソンギルフォード早老症を含む)、白斑、囊胞性線維症、アトピー性皮膚炎、湿疹、関節炎(骨関節炎、関節リウマチ及び若年性関節リウマチを含む)、アテローム性動脈硬化症、がん及び転移性がん(例えば、乳がん、トリブルネガティブ乳がん、肺がん、黒色腫、結腸がん、腎細胞がん、前立腺がん、子宮頸がん、膀胱がん、直腸がん、食道がん、肝臓がん、口腔及び咽頭がん、多発性骨髄腫、卵巣がん、胃がん、膵臓がん及び網膜芽細胞腫がんを含む)、がん療法関連身体障害又はがん療法副作用、高血圧、緑内障、骨粗しょう症、サルコペニア、悪液質、脳卒中、心筋梗塞、心房細動、移植拒絶、I型糖尿病、II型糖尿病、放射線曝露、HIV治療副作用、化学兵器曝露、中毒症、炎症、腎症、レビー小体病、ブリオン病(牛海綿状脳症、クロイツフェルトヤコブ病、スクレイパー、慢性消耗病、クーラー病及び致死性家族性不眠症を含む)、脊柱湾曲(lordosis)、自己免疫障害、脂肪組織の喪失、乾癬、クローン病、喘息、加齢の生理学的影響(しわ、老人性色素斑、脱毛、皮下脂肪組織の減少及び皮膚の薄化をなどの「美容的」影響を含む)、特発性ミオパチー(idiopathic myopathy)(例えば、特発性炎症性ミオパチー、特発性炎症性筋炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、孤発性封入体筋炎及び若年性筋炎を含む)、多発性硬化症、視神經脊髓炎(NMO, neuromyelitis optica、デビック病又はデビック症候群)、てんかん並びに副腎白質ジストロフィー(ALD, adrenoleukodystrophy、X連鎖副腎白質ジストロフィー、X-ALD、脳ALD又はcALD)が含まれる。  
10

#### 【0055】

細胞老化と関連した疾患、障害又は病的状態を発症し得るいすれの対象も、本明細書に記載された方法によって診断され得る。対象は、哺乳動物であってもよい。ヒトは、診断に好ましい対象である。診断され得る他の対象には、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ラクダ及びイヌ又はネコなどのコンパニオンアニマルが含まれる。

#### 【0056】

細胞老化と関連した疾患、障害若しくは病的状態と診断された、又は治療を必要としていると同定された患者は、老化細胞を標的にし、破壊するための老化細胞除去剤を投与され得る。老化細胞除去剤の例には、治療的抗AGE抗体、毒素にコンジュゲートされた抗AGE抗体、ダサチニブ及び/又はケルセチンなどのセノリティック剤、並びにそれらの組み合わせが含まれる。老化細胞はまた、治療用超音波の適用によって破壊することもできる。老化細胞破壊法は、所望の治療成績を達成するように組み合わせることができる。例えば、患者は、機能性細胞を残しながら老化細胞を選択的に破壊するために、ダサチニブ及びケルセチン並びに高密度焦点式超音波の組み合わせを投与されてもよい。老化細胞除去剤の治療有効量は、使用される特定の老化細胞除去剤に応じて異なるであろう。例えば、抗AGE抗体の適当な投与量レベルは、一般に、約0.01~250mg/kg、約0.05~100mg/kg、及び約0.1~50mg/kgを含む、約0.01~500mg/kg患者体重となるであろう。同様に、併用療法ダサチニブ及びケルセチンの適当な投与量レベルは、一般に、約5mg/kg患者体重ダサチニブ及び約50mg/kg患者体重ケルセチンとなるであろう。治療有効性は、細胞表面AGEを示す細胞の数の反復測定によって監視され得る。  
30

#### 【0057】

老化細胞除去剤の投与は、サルコペニア、アテローム性動脈硬化症及び転移性がんの治療において有効であると証明されている。老化細胞除去剤の投与による治療に特に適切である、細胞老化と関連した他の疾患、障害及び病的状態には、炎症、自己免疫病、骨関節炎、アルツハイマー病及びパーキンソン病が含まれる。

#### 【0058】

上記に記載されたインビトロ診断方法に加えて、抗AGE抗体はまた、インビボ診断方法において使用することもできる。インビボ診断検査は、AGE修飾タンパク質及びペプ

10

20

20

30

40

40

50

チドを検出する非侵襲的方法を提供する。インビボ診断検査は、転移性がん細胞などの、細胞表面終末糖化産物を発現する老化細胞を検出するために特に有用である（例えば、国際公開第2017/143073号パンフレット参照）。抗AGE抗体は、検出可能な標識又はトレーサーで標識し、次いで対象に投与されてもよい。標識された抗AGE抗体は、AGE修飾タンパク質又はペプチドに特異的に結合し、標識を検出することができる任意の適切な装置でAGE修飾タンパク質又はペプチドを検出できるようにする。インビボ診断方法の例には、ポジトロン放出断層撮影（PET, positron emission tomography）及び免疫PET、磁気共鳴画像（MRI, magnetic resonance imaging）、単一光子放射型コンピュータ断層撮影（SPECT, single photon emission computed tomography）、光学イメージング、超音波、放射免疫シンチグラフィ及びそれらの組み合わせが含まれる。抗体にコンジュゲートされている放射標識、蛍光標識、陽電子放出体、近赤外（NIR, near infrared）で放出する色素、金及びガドリニウムなどのナノ粒子、量子ドット、超常磁性酸化鉄（SPIO, superparamagnetic iron oxide）、カーボンナノチューブ又は微小気泡などの、任意の診断法に適当であるいずれの標識も使用され得る。

10

#### 【0059】

図1は、細胞表面終末糖化産物を発現する細胞を検出するためのキット100を例示する。キットは、抗AGE抗体110、対照120及び、任意で、抗AGE抗体を検出するための試薬130を含み得る。抗AGE抗体、対照及び任意の試薬は、ボトル、アンプル、エンベロープ、試験管、バイアル、フラスコ又はシリنجなどの任意の適切な容器で供給され得る。抗AGE抗体及び／又は試薬は、蛍光標識、放射標識又は金粒子などで標識されていてもよい。対照は、既知量のAGE修飾タンパク質若しくはペプチド、又はAGE修飾を示す固定若しくは保存細胞を含有する溶液である、二次抗体が作製された動物由来の正常な血清であってもよい。抗AGE抗体を検出するための試薬の例には、ロバで作製され、ローダミンで標識された抗ヒトポリクローナル抗体などの二次抗体が含まれる。キットは、容器140に収容されていてもよい。キットは、印刷された説明書150を含んでいてもよい。好ましくは、キットの内容物は滅菌であり、使用できる状態である。

20

#### 【0060】

キットは、キット成分を収容するための容器を含んでいてもよい。容器は、プラスチックなどの強固な耐久性のある材料で形成されてもよく、又は袋若しくは側面が柔らかい箱などのように柔軟であってもよい。

30

#### 【0061】

キットは、使用説明書を含んでいてもよい。説明書は、印刷された説明書として、若しくはユニバーサルシリアルバス（USB, universal serial bus）ドライブ、セキュアデジタル（SD, secure digital）カードなどでの電子フォーマットで提供されてもよく、又はインターネット上で提供され、クイックレスポンス（QR, quick response）コードを通じてアクセスできてもよい。

30

#### 【0062】

キットは、緩衝液、固定液、遮断溶液、プロテアーゼ阻害剤、分析用基材、例えば顕微鏡スライド及び／又はカバースリップ、マイクロタイタープレートなど、並びに界面活性剤及び清浄液などの細胞抽出試薬などの、さらなる診断用材料又は機器を含有していてよい。

40

#### 【実施例】

#### 【実施例1】

#### 【0063】

#### 口腔上皮細胞の収集

患者は生理食塩水を30秒間口の中でグチュグチュする。患者は次いで、溶液をコップに吐き出す。コップからの生理食塩水1.5mLを次いで、マイクロピペットを用いて遠心分離管に移す。遠心分離管をバランス遠心分離機に入れ、10,000～14,000 RPMで2分間遠心分離した。遠心分離は、遠心分離管の底にペレットが見えるまで繰り返してもよい。上清を次いで、デカントして及び／又はマイクロピペットで除去して捨て

50

た。ペレットは、上皮細胞のいずれかが老化しているかを決定するために、細胞表面AGEの存在について検査され得る単離口腔上皮細胞を含有する。

#### 【実施例2】

##### 【0064】

###### 皮膚細胞に基づく診断及び治療

表皮細胞は、テープ採取プロセスを用いて収集する。粘着テープ(Adhesives Research社、グレンロック、PA)を直径約17mmの円板に加工する。テープを患者の皮膚に適用し、次いで除去して角質層から表皮細胞を採取する。テープ採取をさらに3回繰り返して、合計4つの表皮試料を得る。表皮細胞を次いで細胞表面AGEの存在について検査して、表皮細胞のいずれかが老化しているかを決定する。

10

##### 【0065】

真皮細胞は薄片生検を用いて収集する。外科用メスの刃を使用して、表皮を通り真皮にアクセスして試料を得るのに十分な皮膚を除去する。試料内の線維芽細胞を次いで、細胞表面AGEの存在について検査して、線維芽細胞のいずれかが老化しているかを決定する。薄片生検における少なくとも5%の老化細胞の存在は、皮膚損傷、及び老化した皮膚細胞の数を低減する治療の必要性を示す。患者は、老化した皮膚細胞を標的にし、除去するための老化細胞除去剤を投与される。

20

#### 【実施例3】

##### 【0066】

###### 抗AGE抗体を用いた直接結合ELISA

マウス及びキメラ抗AGE抗体の結合を、直接結合ELISAによって調査した。抗カルボキシメチルリジン(CML)抗体(R&D Systems社、MAB3247)を対照として使用した。CMLをKLH(CML-KLH)にコンジュゲートし、CML及びCML-KLHの両方をELISAプレートに一晩コーティングした。HRP-ヤギ抗マウスFcを使用して、対照及びマウス抗AGE抗体を検出した。HRP-ヤギ抗ヒトFcを使用して、キメラ抗AGE抗体を検出した。

30

##### 【0067】

抗原を、pH6.5の1×リン酸緩衝液で1μg/mLに希釈した。96ウェルマイクロタイターELISAプレートを100μL/ウェルの希釈抗原でコーティングし、4度一晩寝かせた。プレートを1×PBS、2.5%BSAでブロックし、翌日室温で1~2時間静置した。抗体試料を、50μg/mLの開始濃度で1×PBS、1%BSAによる連続希釈で調製した。二次抗体を1:5,000希釈した。抗体希釈物100μLを各ウェルに適用した。プレートをマイクロプレートシェーカーで0.5~1時間、室温でインキュベートした。プレートを1×PBSで3回洗浄した。100μL/ウェル希釈HRPコンジュゲートヤギ抗ヒトFc二次抗体をウェルに適用した。プレートをマイクロプレートシェーカーで1時間インキュベートした。プレートを次いで、1×PBSで3回洗浄した。100μL HRP基質TMBを各ウェルに添加して、プレートを展開した。3~5分が経過した後、100μLの1N HClを添加して反応を停止した。2回目の直接結合ELISAはCMLコーティングのみで行なった。OD450での吸光度を、マイクロプレートリーダーを用いて読み取った。

40

##### 【0068】

CML及びCML-KLH ELISAのOD450吸光度生データを、以下のプレートマップに示す。ウェルプレートの96ウェルのうちの48ウェルを使用した。プレートマップのプランクウェルは未使用ウェルを示す。

##### 【0069】

CML及びCML-KLH ELISAのプレートマップ:

##### 【0070】

## 【表1】

濃度 (ug/mL)	1	2	3	4	5	6	7
50	0.462	0.092	0.42		1.199	0.142	1.852
16.67	0.312	0.067	0.185		0.31	0.13	0.383
5.56	0.165	0.063	0.123		0.19	0.115	0.425
1.85	0.092	0.063	0.088		0.146	0.099	0.414
0.62	0.083	0.072	0.066		0.108	0.085	0.248
0.21	0.075	0.066	0.09		0.096	0.096	0.12
0.07	0.086	0.086	0.082		0.098	0.096	0.098
0	0.09	0.085	0.12		0.111	0.083	0.582

R&D 親 キメラ  
陽性 抗 抗  
対照 AGE AGE  
CML-KLHコーティング

R&D 親 キメラ  
陽性 抗 抗  
対照 AGE AGE  
CMLコーティング

## 【0071】

CMLのみのELISAに関するOD450吸光度生データを、以下のプレートマップに示す。ウェルプレートの96ウェルのうちの24ウェルを使用した。プレートマップのプランクウェルは未使用ウェルを示す。

## 【0072】

CMLのみELISAのプレートマップ

## 【0073】

## 【表2】

濃度 (ug/mL)	1	2	3	4	5	6	7
50	1.913	0.165	0.992				
16.66667	1.113	0.226	0.541				
5.555556	0.549	0.166	0.356				
1.851852	0.199	0.078	0.248				
0.617284	0.128	0.103	0.159				
0.205761	0.116	0.056	0.097				
0.068587	0.073	0.055	0.071				
0	0.053	0.057	0.06				

R&D 親 キメラ  
陽性 抗 抗  
対照 AGE AGE

## 【0074】

対照及びキメラ抗AGE抗体は、CML及びCML-KLHの両方への結合を示した。マウス（親）抗AGE抗体は、CML又はCML-KLHのどちらかへの極めて弱い結合～結合無しを示した。反復ELISAからのデータは、CMLへの対照及びキメラ抗AGE抗体の結合を裏付けている。全ての緩衝液対照は、陰性シグナルを示した。

## 【0075】

このデータは、AGE及びAGE-免疫原コンジュゲートに結合する抗AGE抗体の能力を裏付けている。周知のAGEカルボキシメチルリジンへの結合の証拠は、診断適用における抗AGE抗体の適合性を支持するものである。

## 【実施例4】

## 【0076】

10

20

30

40

50

### 血液試料に基づく診断及び治療

血液試料を患者から採血する。血液試料を遠心分離して血清を単離する。CD57+T細胞を、Miltenyi Biotec社製CD8+CD57+T細胞単離キット（ベルギッシュ・グラッドバッハ、ドイツ）を用いて単離する。CD57+T細胞を血球計算盤を用いて計数する。血清及び単離CD57+T細胞を次いで、抗CML抗体への結合について検査する。標識抗CML抗体に結合する単離CD57+T細胞50%以上と組み合わされた血清CML 152 μg/mL以下は、患者が老化細胞除去剤による治療を必要としていることを示す。老化細胞を標的にし、除去する抗AGE抗体を患者に投与する。

#### 【実施例5】

#### 【0077】

### 口腔スワブに基づく診断及び治療

試料を口腔スワブによって患者から得る。スワブからの口腔上皮細胞及び唾液を分離する。口腔細胞をトリプシン処理し、抗CMLモノクローナル抗体と混合する。混合物を次いで血球計算盤に通して、老化した口腔細胞を計数する。遊離CMLを唾液のELISAによって測定する。抗CML抗体に結合する口腔細胞50%以上と組み合わされた唾液CML 3 μg/mL以下は、患者が老化細胞除去剤による治療を必要としていることを示す。老化細胞を標的にし、除去する毒素にコンジュゲートされた抗AGE抗体を患者に投与する。

#### 【実施例6】

#### 【0078】

### 生物学的年齢の決定

試料を口腔スワブによって50歳患者から得る。スワブからの口腔上皮細胞及び唾液を分離する。口腔細胞をトリプシン処理し、抗CMLモノクローナル抗体と混合する。混合物を次いで血球計算盤に通して、老化した口腔細胞を計数する。遊離CMLを唾液のELISAによって測定する。唾液中の細胞表面CMLを発現する口腔細胞と遊離CMLの比は、5:1である。この比は、健康な50歳に対して予測される比より大きく、患者が、彼女の暦年齢より高い生物学的年齢を有することを証明するものである。結果は、患者が、細胞老化による加齢及び加齢関連疾患、障害又は病的状態の早期発症を経験していることを示している。これらの結果はまた、患者が老化細胞除去剤による治療を必要としていることを示している。

#### 【実施例7】

#### 【0079】

### 細胞老化による進行した生物学的老化と関連した疾患、障害又は病的状態の診断及び治療

血液試料を45歳患者から得る。血液試料を遠心分離して血清を単離する。CD57+T細胞を、Miltenyi Biotec社製CD8+CD57+T細胞単離キット（ベルギッシュ・グラッドバッハ、ドイツ）を用いて単離する。CD57+T細胞を血球計算盤を用いて計数する。血清及び単離CD57+T細胞を次いで、抗CML抗体への結合について検査する。血清中の細胞表面CMLを発現する細胞と遊離CMLの比は、10:1である。この比は、患者が生物学的年齢65を有することを示している。患者の生物学的年齢が患者の暦年齢を上回ることから、患者は、細胞老化による進行した生物学的老化と関連した疾患、障害又は病的状態と診断される。老化細胞を標的にし、除去する抗AGE抗体を患者に投与する。

#### 【実施例8】

#### 【0080】

### 抗最終糖化産物抗体の投与のインビオ試験

抗最終糖化産物抗体の効果を調べるために、抗体を3週間にわたり週1回（1、8及び15日目）、1日2回静脈内注射によって高齢CD1（ICR）マウス（Charles River Laboratories社）に投与し、その後に10週間の無治療期間が続いた。検査抗体は、キーホールリンペットヘモシニアンとコンジュゲートされたカルボキシメチルリジンに対して產生される市販のマウス抗最終糖化産物抗体であり、R&D Systems, Inc.社（ミネアポリ

10

20

30

40

50

ス、M N : カタログ番号 M A B 3 2 4 7 ) から入手可能なカルボキシメチルリジン M A b ( C l o n e 3 1 8 0 0 3 ) であった。対照動物では生理食塩水の対照参照を使用した。

#### 【 0 0 8 1 】

「若齢」と呼ばれるマウスは 8 週齢であり、一方、「老齢」と呼ばれるマウスは 88 週 ( ± 2 日 ) 齢であった。抗体の投与からの有害事象は見られなかった。試験に使用された動物の種々の群を表 1 に示す。

#### 【 0 0 8 2 】

#### 【 表 3 】

表1: 試験に使用された動物の種々の群

10

群番号	検査材料	マウス	用量レベル ( $\mu\text{g/gm}/1\text{日} 2\text{回/週}$ )	動物数	
				主要試験	無治療
				メス	メス
1	生理食塩水	若齢	0	20	-
2	生理食塩水	老齢	0	20	20
3	抗体	老齢	2.5	20	20
4	なし	老齢	0	20	pre
5	抗体	老齢	5.0	20	20

- = 該当なし、Pre=脂肪組織の収集のために治療開始前に安楽死させた動物のサブ

20

セット

#### 【 0 0 8 3 】

老化細胞のマーカーである P 1 6 I N K 4 a mRNA を、リアルタイム q P C R によって群の脂肪組織で定量化した。結果を表 2 に示す。表中、  $C_t = C_t$  平均対照群 ( 2 ) -  $C_t$  平均実験群 ( 1 又は 3 又は 5 ) ; 倍数発現 ( fold expression ) =  $2^{-C_t}$  。

#### 【 0 0 8 4 】

#### 【 表 4 】

30

表2: 脂肪組織で定量化した P16<sup>INK4a</sup> mRNA

計算(群4に対しては 未補正:5.59)	群2 vs 群1		群2 vs 群3		群2 vs 群5	
	群2	群1	群2	群3	群2	群5
平均 $\Delta C_t$	5.79	7.14	5.79	6.09	5.79	7.39
$\Delta \Delta C_t$	-	-1.35	-	-0.30	-	-1.60
倍数発現		<b>2.55</b>		<b>1.23</b>		<b>3.03</b>

#### 【 0 0 8 5 】

上記の表は、予測通り、未治療老齢マウス ( 対照群 2 ) が、未治療若齢マウス ( 対照群 1 ) より 2.55 倍多くの P 1 6 I N K 4 a mRNA を発現することを示している。これは、85 日目の回復終了時点での安樂死させた群 2 未治療老齢マウスを、22 日目の治療終了時点での安樂死させた群 1 未治療若齢マウスと比較した場合に観察された。群 2 未治療老齢マウスからの結果を、85 日目に安樂死させた群 3 治療老齢マウスからの結果と比較した場合、 P 1 6 I N K 4 a mRNA は群 3 より群 2 で 1.23 倍高いことが観察された。したがって、老齢マウスを 2.5  $\mu\text{g}$  / グラム / 1 日 2 回 / 週の抗体で治療した場合、 P 1 6 I N K 4 a mRNA 発現のレベルはより低かった。

40

#### 【 0 0 8 6 】

群 2 ( 対照 ) 未治療老齢マウスからの結果を、22 日目に安樂死させた群 5 ( 5  $\mu\text{g}$  /

50

グラム)治療老齢マウスからの結果と比較した場合、P16INK4<sup>a</sup> mRNAは、群5(5 μg/グラム)より群2(対照)で3.03倍高いことが観察された。この比較は、5.0 μg/グラム/1日2回/週で治療した場合、群5動物はより低レベルのP16INK4<sup>a</sup> mRNA発現を有し、若齢未治療マウス(すなわち群1)に匹敵するp16INK4<sup>a</sup> mRNA発現レベルを示すことを示した。85日目の回復終了時点で安樂死させた群3(2.5 μg/グラム)マウスとは異なり、群5マウスは22日目の治療終了時点で安樂死させた。

#### 【0087】

これらの結果は、抗AGE抗体の投与が老化細胞の死滅をもたらしたことを証明するものである。

10

#### 【0088】

サルコペニアに対する抗体投与の効果を決定するために、腓腹筋量も測定した。結果を表3に示す。結果は、対照と比較して抗体の投与は筋肉量を増加させたが、5.0 μg/g m/1日2回/週のより高い投与量でのみ増加させたことを示している。

#### 【0089】

#### 【表5】

表3:腓腹筋量に対する抗体投与の効果

群	要約情報	腓腹筋の絶対重量	腓腹筋の体重と比べた重量
1	平均	0.3291	1.1037
	SD	0.0412	0.1473
	N	20	20
2	平均	0.3304	0.7671
	SD	0.0371	0.1246
	N	20	20
3	平均	0.3410	0.7706
	SD	0.0439	0.0971
	N	19	19
5	平均	0.4074	0.9480
	SD	0.0508	0.2049
	N	9	9

20

30

40

#### 【0090】

これらの結果は、細胞のAGEに結合する抗体の投与が、老化のバイオマークターであるp16INK4<sup>a</sup>を発現する細胞の低減をもたらしたことを証明するものである。データは、老化細胞の低減が老齢マウスにおける筋肉量の増加に直接つながることを示している。これらの結果は、サルコペニアの古典的な徴候である筋肉量の喪失が、細胞のAGEに結合する抗体などの老化細胞除去剤の投与によって治療され得ることを示している。

#### 【0091】

このデータは、抗AGE抗体が、細胞表面AGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチドを発現する細胞に選択的に結合することができることを裏付けている。選択的結合の証拠は、診断適用における抗AGE抗体の適合性を支持するものである。データはまた、抗AGE抗体がインビボでの使用に安全であることも証明している。

#### 【実施例9】

50

## 【0092】

## 検査抗体の親和性及び動態

実施例8で使用した検査抗体の親和性及び動態を、細胞のAGE修飾タンパク質のモデル基質としてN,N'-ビス(カルボキシメチル)-L-リジントリフルオロ酢酸塩(Sigma-Aldrich社、セントルイス、MO)を用いて解析した。ラベルフリー相互作用解析をBIACORE(商標)T200(GE Healthcare社、ピツバーグ、PA)で、Fc1をプランクとして設定し、Fc2を検査抗体(150,000Daの分子量)で固定化したSeries SセンサーチップCM5(GE Healthcare社、ピツバーグ、PA)を用いて実施した。ランニング緩衝液は、25の温度のHBS-EP緩衝液(10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA及び0.05%P-20、pH7.4)であった。ソフトウェアは、BIACORE(商標)T200評価ソフトウェア、バージョン2.0であった。解析では二重参照(Fc2-1及び緩衝液注射のみ)を使用し、データをラングミュア1:1結合モデルにフィットさせた。

## 【0093】

## 【表6】

表4:親和性及び動態解析の実験セットアップ

結合及び解離	
フローパス	Fc1 及び Fc2
流速(μl/分)	30
結合時間(秒)	300
解離時間(秒)	300
試料濃度(μM)	20 - 5 - 1.25(x2) - 0.3125 - 0.078 - 0

## 【0094】

応答対時間のグラフを図2に例示する。以下の値は解析から決定した:  $k_a$ (1/Ms) = 1.857 × 10<sup>3</sup>;  $k_d$ (1/s) = 6.781 × 10<sup>-3</sup>;  $K_D$ (M) = 3.651 × 10<sup>-6</sup>;  $R_{max}$ (RU) = 19.52; 及び  $Chi^2$  = 0.114。フィッティングの  $Chi^2$  値は  $R_{max}$  の 10% 未満であるため、フィットは信頼性がある。

## 【実施例10】

## 【0095】

## カルボキシメチルリジンモノクローナル抗体の投与のインビオ試験

腫瘍増殖、転移の可能性及び悪液質に対するカルボキシメチルリジン抗体の効果を調査した。インビオ試験をマウス乳がん腫瘍モデルを用いてマウスで実施した。メスBALB/cマウス(BALB/cAnNCrl, Charles River社)は、試験1日目に11週齢であった。

## 【0096】

4T1マウス乳腺腫瘍細胞(ATCC CRL-2539)を、10%ウシ胎仔血清、2mMグルタミン、25μg/mLゲンタマイシン、100単位/mLペニシリンGナトリウム及び100μg/mL硫酸ストレプトマイシンを含有するRPMI 1640培地で培養した。腫瘍細胞を、5%CO<sub>2</sub>及び95%空気の雰囲気中、37で加湿インキュベーターの組織培養フラスコで維持した。

## 【0097】

培養乳がん細胞を次いでマウスに移植した。4T1細胞を対数期増殖中に採取し、移植当日に1×10<sup>6</sup>細胞/mLの濃度でリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に再懸濁した。1

10

20

30

40

50

$\times 10^5$  4T1細胞 (0.1 mL 懸濁液) を各検査動物の右側腹部に皮下移植して、腫瘍を惹起した。腫瘍を、その体積が 80 ~ 120 mm<sup>3</sup> の標的範囲に近づいたときに監視した。腫瘍体積を、式：腫瘍体積 = (腫瘍幅)<sup>2</sup> (腫瘍長さ) / 2 を用いて決定した。腫瘍体積 1 mm<sup>3</sup> が重量 1 mg を有するという仮定を用いて、腫瘍重量を概算した。試験 1 日目として指定した移植 13 日後、マウスを、108 ~ 126 mm<sup>3</sup> の個々の腫瘍体積及び 112 mm<sup>3</sup> の群平均腫瘍体積を有する 4 群 (n = 15 / 群) に選別した。4 つの治療群を以下の表 5 に示す。

【0098】

【表 7】

表5:治療群

群	説明	薬剤	投薬 (μg/g)
1	対照	リン酸緩衝生理食塩水(PBS)	N/A
2	低用量	カルボキシメチルリジンモノクローナル抗体	5
3	高用量	カルボキシメチルリジンモノクローナル抗体	10
4	観察のみ	なし	N/A

10

20

30

40

50

【0099】

抗カルボキシメチルリジンモノクローナル抗体を、治療剤として使用した。250 mg のカルボキシメチルリジンモノクローナル抗体は、R&D Systems社 (ミネアポリス、MN) から入手した。カルボキシメチルリジンモノクローナル抗体の投薬溶液を媒体 (PBS) 中 1 及び 0.5 mg / mL で調製して、10 mL / kg の投薬容量中、それぞれ 10 及び 5 μg / g の活性投与量を得た。投薬溶液を光から保護して、4 で保管した。

【0100】

全ての治療は、マウスに 1 回投与した試験 1 日目を除いて、21 日間、1 日 2 回、静脈内 (i.v.) 投与された。尾静脈劣化のために i.v. 投与することができない動物については、試験 19 日目に i.v. 投薬を腹腔内 (i.p.) 投薬に変更した。投薬容量は、体重 (10 mL / kg) 20 グラムあたり 0.200 mL であり、個々の動物の体重に合わせて調整した。

【0101】

試験は 23 日間継続した。腫瘍を 1 週間に 2 回、キャリバーを用いて測定した。動物の体重を 1 ~ 5 日目は毎日、次いで試験の終了までは 1 週間に 2 回測定した。任意の副作用についてもマウスを観察した。許容可能な毒性は、試験期間中の 20 % 未満の群平均体重減少、及び 10 % 以下の治療関連死として定義した。治療有効性は、試験の最終日 (23 日目) からのデータを用いて決定した。

【0102】

腫瘍増殖を阻害する抗カルボキシメチルリジン抗体の能力を、群 1 ~ 3 の腫瘍体積中央値 (MTV, median tumor volume) を比較して決定した。腫瘍体積は、上記に記載したように測定した。腫瘍増殖阻害パーセント (TGI %) は、対照群の MTV の割合として表される、対照群 (群 1) の MTV と薬物治療群の MTVとの差として定義した。TGI % は、式：TGI % = (1 - MTV<sub>治療</sub> / MTV<sub>対照</sub>) × 100 に従って計算することができる。

【0103】

がん転移を阻害する抗カルボキシメチルリジン抗体の能力を、群 1 ~ 3 の肺がん病巣を比較して決定した。阻害パーセント (阻害 %) は、対照群の転移病巣の平均カウントの割

合として表される、対照群の転移病巣の平均カウントと、薬物治療群の転移病巣の平均カウントとの差として定義した。阻害%は、以下の式：阻害% = (1 - 病巣治療の平均カウント / 病巣対照の平均カウント) × 100 に従って計算することができる。

#### 【0104】

悪液質を阻害する抗カルボキシメチルリジン抗体の能力を、群1～3の肺及び腓腹筋の重量を比較して決定した。組織重量はまた、100g体重に標準化した。

#### 【0105】

治療有効性もまた、試験期間中に観察された退縮応答の発生率及び程度によって評価した。治療は、動物における腫瘍の部分的退縮(PR, partial regression)又は完全退縮(CR, complete regression)をもたらし得る。PR応答では、腫瘍体積は、試験の経過中の3回連続測定に関して1日目の体積の50%以下であり、これらの3回測定のうちの1又は2回以上に関して13.5mm<sup>3</sup>以上であった。CR応答では、腫瘍体積は、試験の経過中の3回連続測定に関して13.5mm<sup>3</sup>未満であった。

#### 【0106】

統計分析を、Windows 6.07用Prism(GraphPad社)を用いて実施した。2群間の23日目の平均腫瘍体積(MTV, mean tumor volume)の差の統計分析を、Mann-Whitney U検定を用いて達成した。転移病巣の比較を、ANOVA-Dunnettによって評価した。標準化した組織重量をANOVAによって比較した。両側統計分析を有意水準P=0.05で行った。結果を、統計的に有意又は統計的に有意ではないとして分類した。

#### 【0107】

試験の結果を以下の表6に示す。

#### 【0108】

#### 【表8】

表6:結果

群	MTV (mm <sup>3</sup> )	TGI%	肺病巣	阻害%	PR	CR	腓腹筋重量/ 標準 (mg)	肺重量/ 標準 (mg)
1	1800	N/A	70.4	N/A	0	0	353.4/19.68	2799.4/292.98
2	1568	13%	60.3	14%	0	0	330.4/21.62	2388.9/179.75
3	1688	6%	49.0	30%	0	0	398.6/24.91	2191.6/214.90

#### 【0109】

全ての治療レジメンは許容される耐容性を示し、治療関連死はなかった。唯一の動物死は、転移による非治療関連死であった。TGI%は、5μg/g(群2)及び10μg/g治療群(群3)で有意傾向であった(P>0.05、Mann-Whitney)。阻害%は、5μg/g治療群で有意傾向であった(P>0.05、ANOVA-Dunnett)。阻害%は、10μg/g治療群で統計的に有意であった(P<0.01、ANOVA-Dunnett)。悪液質を治療するカルボキシメチルリジン抗体の能力は、治療群と対照群との肺及び腓腹筋の臓器重量の比較に基づき、有意傾向であった(P>0.05、ANOVA)。結果は、抗カルボキシメチルリジンモノクローナル抗体の投与が、がん転移を低減できることを示している。

#### 【0110】

このデータは、抗AGE抗体が、細胞表面AGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチ

10

20

30

40

50

ドを発現する細胞に選択的に結合することができるこ<sup>10</sup>とを裏付けている。選択的結合の証拠は、診断適用における抗AGE抗体の適合性を支持するものである。データはまた、抗AGE抗体がインビトロでの使用に安全であることも証明している。

#### 【実施例11】

##### 【0111】

###### 老化した軟骨細胞にインビトロで結合する抗AGE抗体

老化した軟骨細胞は、骨関節炎関節から得た。抗AGE抗体は、老化した軟骨細胞にインビトロで結合した。これらの結果は、抗AGE抗体が、老化細胞に結合することができることを裏付けている。結果はまた、診断適用における抗AGE抗体の適合性も裏付けている。

#### 【実施例12】

##### 【0112】

###### 免疫組織化学的試験

組織試料は、アルツハイマー病及びパーキンソン病患者から得た。2つのアルツハイマー病試料は、海馬から採取した。1つのパーキンソン病試料は黒質から採取し、第2のパーキンソン病試料は腹側被蓋野から採取した。全ての細胞を、上記に記載したように抗AGE抗体を用いてカルボキシメチルリジン(CML)に対して染色した。アルツハイマー病細胞は、リン酸化タウ(ホスホタウ)又は別個にアミロイド前駆体タンパク質に対して染色した。パーキンソン病細胞は、アルファシヌクレインに対して染色した。細胞の核染色を、DAPI対比染色を用いて同定した(実験は、アリゾナ州立大学のDiego Mastroeni博士によって実施され、画像が作成された)。

##### 【0113】

図3Aは、赤色に染色されたカルボキシメチルリジン及び緑色に染色されたリン酸化タウを示すアルツハイマー病試料の細胞の写真である。

##### 【0114】

図3Bは、赤色に染色されたカルボキシメチルリジン及び緑色に染色されたアミロイド前駆体タンパク質を示すアルツハイマー病試料の細胞の写真である。

##### 【0115】

図3Cは、赤色に染色されたカルボキシメチルリジン及び緑色に染色されたアルファシヌクレインを示す黒質由来のパーキンソン病試料の細胞の写真である。

##### 【0116】

図3Dは、赤色に染色されたカルボキシメチルリジン及び緑色に染色されたアルファシヌクレインを示す腹側被蓋野由来のパーキンソン病試料の細胞の写真である。

##### 【0117】

周知のAGEであるCMLは、アルツハイマー病及びパーキンソン病における確立された病態と共に存しなかった。代わりに、CMLはグリア細胞で見つかった。アルツハイマー病試料におけるCML免疫反応性はミクログリアによるものであり、パーキンソン病試料におけるCML免疫反応性は星状膠細胞によるものであることが疑われた。結果は、アルツハイマー病及びパーキンソン病における老化したグリア細胞の存在を証明する。抗AGE抗体を用いる老化したグリア細胞の除去は、神経幹/前駆細胞によるグリア細胞の再生をもたらすことが予測される(例えば、Leonard, B.W. et al., "Subventricular zone neural progenitors from rapid brain autopsies of elderly subjects with and without neurodegenerative disease", The Journal of Comparative Neurology, Vol. 515, pp. 269-294 (2009)参照)。

##### 【0118】

このデータは、様々な神経変性疾患を有する患者から得られた組織試料中の細胞に存在するAGEに結合する抗AGE抗体の能力を裏付けている。この証拠は、診断適用における抗AGE抗体の適合性をさらに裏付けるものである。

##### 【0119】

###### (参考文献)

10

20

30

40

50

1. Lowe, R. et al., "Buccals are likely to be a more informative surrogate tissue than blood for epigenome-wide association studies", *Epigenetics*, Vol. 8, No. 4, pp. 445-454 (2013)
2. Kared, H. et al., "CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes", *Cancer Immunology, Immunotherapy, Immunotherapy*, Vol. 65, No. 4, pp. 441-452 (2016)
3. Yoon, M-S. et al., "Characterisation of advanced glycation endproducts in saliva from patients with diabetes mellitus", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 323, Issue 2, pp. 377-381 (2004)
4. Pearce, M.S. et al., "Childhood growth, IQ and education as predictors of white blood cell telomere length at age 49-51 years: the Newcastle Thousand Families Study", *PLoS ONE*, Vol. 7, Issue 7, e40116 (2012) 10
5. "Telomere Testing White Paper", Titanovo, available online at [titanovo.com/telomere-length-testing/](http://titanovo.com/telomere-length-testing/) (accessed on April 20, 2017)
6. "Carboxymethyl Lysine (CML) ELISA Cat. No. KT-32428", Kamiya Biomedical Company, available online at [www.kamiyabiomedical.com/pdf/KT-32428.pdf](http://www.kamiyabiomedical.com/pdf/KT-32428.pdf) (accessed on April 20, 2017)
7. "CD8+CD57+ T Cell Isolation Kit Data Sheet", Miltenyi Biotec, available online at [www.miltenyibiotec.com/~/media/Images/Products/Import/0001600/IM0001652.a.shx?force=1](http://www.miltenyibiotec.com/~/media/Images/Products/Import/0001600/IM0001652.a.shx?force=1) (2008) 20
8. "CD8+CD57+ T Cell Isolation Kit, human", Miltenyi Biotec, available online at [www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/mac-s-cell-separation/cell-separation-reagents/t-cells/cd8-cd57-t-cell-isolation-kit-human.aspx](http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/mac-s-cell-separation/cell-separation-reagents/t-cells/cd8-cd57-t-cell-isolation-kit-human.aspx) (accessed on April 19, 2017)
9. "Extraction of genomic DNA from buccal epithelial cells", available online at [authors.fhcrc.org/591/1/Buccal%20Cell%20DNA%20Isol%20v2.pdf](http://authors.fhcrc.org/591/1/Buccal%20Cell%20DNA%20Isol%20v2.pdf) (accessed on April 19, 2017)
10. Severin, F.F. et al., "Advanced glycation of cellular proteins as a possible basic component of the 'Master Biological Clock'", *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 78, No. 9, pp. 1331-1336 (2013)
11. Wong, R. et al., "Use of RT-PCR and DNA microarrays to characterize RNA recovered by non-invasive tape harvesting of normal and inflamed skin", *The Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 123, pp. 159-167 (2004) 30
12. Yang, S. et al., "Impact of oxidative stress biomarkers and carboxymethyllysine (an advanced glycation end product) on prostate cancer: a prospective study", *Clinical Genitourinary Cancer*, Vol. 13, No. 5, pp. e347-e351 (2015)
13. Meerwaldt, R. et al., "Skin autofluorescence is a strong predictor of cardiac mortality in diabetes", *Diabetes Care*, Vol. 30, No. 1, pp. 107-112 (2007)
14. Cosgrove, C. et al., "The impact of 6-month training preparation for an Ironman triathlon on the proportions of naive, memory and senescent T cells in resting blood", *European Journal of Applied Physiology*, Vol. 112, No. 8, pp. 2989-2998 (2012) 40
15. Krtolica, A. et al., "Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 98, No. 21, pp. 12072-12077 (2001)
16. Schmid, D. et al., "Collage glycation and skin aging", *Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide*, available online at [mibellebiochemistry.com/app/uploads/2015/03/GSP-T-for-Skin\\_Collagen-glycation-and-skin-aging-CT-2002.pdf](http://mibellebiochemistry.com/app/uploads/2015/03/GSP-T-for-Skin_Collagen-glycation-and-skin-aging-CT-2002.pdf) (accessed on April 27, 2017)
17. Spielmann, G. et al., "Aerobic fitness is associated with lower proportions of senescent blood T-cells in man", *Brain, Behavior and Immunity*, Vol. 25, No. 50

- 8, pp. 1521-1529 (2011)
18. Pauwels, E.K.J. et al., "Radiolabelled monoclonal antibodies: a new diagnostic tool in nuclear medicine", Radiotherapy and Oncology, Vol. 1, No. 4, pp. 333-338 (1984)
19. 米国特許出願公開第2016/0017033号明細書
20. Khoja, L. et al., "A pilot study to explore circulating tumour cells in pancreatic cancer as a novel biomarker", British Journal of Cancer, Vol. 106, No. 3, pp. 508-516 (2012)
21. Ruster, M. et al., "Detection of elevated N<sup>-</sup>-carboxymethyllysine levels in muscular tissue and in serum of patients with fibromyalgia", Scandinavian Journal of Rheumatology, Vol. 34, No. 6, pp. 460-463 (2005) 10
22. Al-Abed, Y. et al., "N<sup>-</sup>-Carboxymethyllysine formation by direct addition of glyoxal to lysine during the Maillard reaction", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 5, No. 18, pp. 2161-2162 (1995)
23. Freise, A.C. et al., "In vivo imaging with antibodies and engineered fragments", Molecular Immunology, Vol. 67, No. 2, pp. 142-152 (2015)
24. Wendel, U. et al., "A novel monoclonal antibody targeting carboxymethyllysine, an advanced glycation end product in atherosclerosis and pancreatic cancer", PLoS One, Vol. 13, No. 2, e0191872 (2018)

【図1】

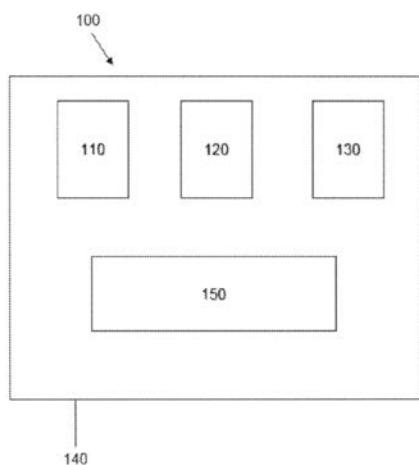


FIG. 1

【図2】

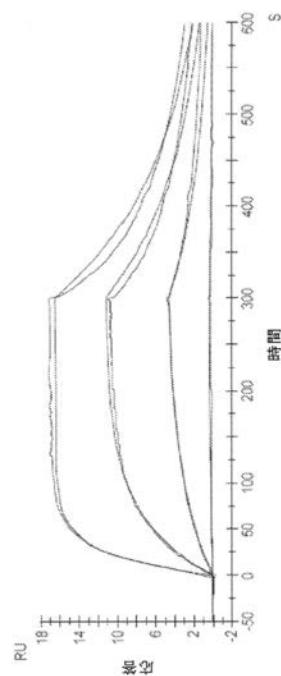


FIG. 2

【図3A】



FIG. 3A

【図3B】



FIG. 3B

【図3C】



FIG. 3C

【図3D】

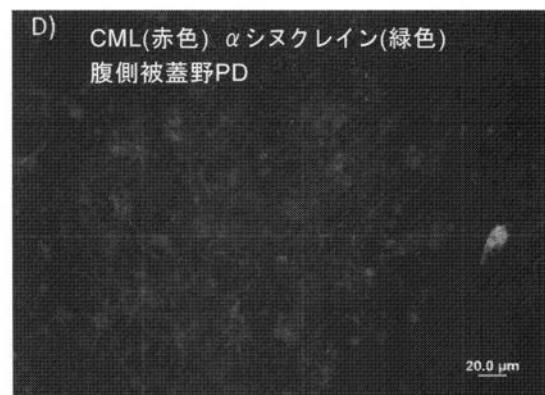


FIG. 3D

【配列表】

2020521117000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2018/030931												
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/68 ADD.														
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, INSPEC, WPI Data														
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 2010/005531 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; SEMBA RICHARD DAVID [US]; FERRUCCI LUIGI [US]) 14 January 2010 (2010-01-14) claims 1,33</td> <td style="padding: 2px;">6,23-28</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">----- US 5 702 704 A (BUCALA RICHARD J [US]) 30 December 1997 (1997-12-30)  abstract column 3, line 60 - column 4, line 4 column 4, line 39 - line 44 column 15, line 39 - line 48 ----- -/--</td> <td style="padding: 2px;">1,3, 7-18, 20-22, 29,30</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;"></td> <td style="padding: 2px;">1,3, 7-18, 20-22, 29,30</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2010/005531 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; SEMBA RICHARD DAVID [US]; FERRUCCI LUIGI [US]) 14 January 2010 (2010-01-14) claims 1,33	6,23-28	Y	----- US 5 702 704 A (BUCALA RICHARD J [US]) 30 December 1997 (1997-12-30)  abstract column 3, line 60 - column 4, line 4 column 4, line 39 - line 44 column 15, line 39 - line 48 ----- -/--	1,3, 7-18, 20-22, 29,30	Y		1,3, 7-18, 20-22, 29,30
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	WO 2010/005531 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; SEMBA RICHARD DAVID [US]; FERRUCCI LUIGI [US]) 14 January 2010 (2010-01-14) claims 1,33	6,23-28												
Y	----- US 5 702 704 A (BUCALA RICHARD J [US]) 30 December 1997 (1997-12-30)  abstract column 3, line 60 - column 4, line 4 column 4, line 39 - line 44 column 15, line 39 - line 48 ----- -/--	1,3, 7-18, 20-22, 29,30												
Y		1,3, 7-18, 20-22, 29,30												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report													
5 July 2018	10/09/2018													
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Jacques, Patrice													

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2018/030931
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/047629 A2 (SIWA CORP [US]; GRUBER LEWIS [US]) 12 April 2012 (2012-04-12)  paragraphs [0003], [0012] - [0014] ----- WO 2017/065837 A1 (SIWA CORP [US]) 20 April 2017 (2017-04-20)  paragraphs [0006] - [0007] ----- ANDO KEN ET AL: "Membrane proteins of human erythrocytes are modified by advanced glycation end products during aging in the circulation", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 258, no. 1, 29 April 1999 (1999-04-29), pages 123-127, XP002729025, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1006/BBRC.1999.0606 the whole document ----- SHUMAN YANG ET AL: "Impact of Oxidative Stress Biomarkers and Carboxymethyllysine (an Advanced Glycation End Product) on Prostate Cancer: A Prospective Study", CLINICAL GENITOURINARY CANCER, vol. 13, no. 5, 1 October 2015 (2015-10-01), pages e347-e351, XP055487649, US ISSN: 1558-7673, DOI: 10.1016/j.clgc.2015.04.004 the whole document ----- R. MEERWALDT ET AL: "Skin Autofluorescence Is a Strong Predictor of Cardiac Mortality in Diabetes", DIABETES CARE, vol. 30, no. 1, 27 December 2006 (2006-12-27), pages 107-112, XP055488237, US ISSN: 0149-5992, DOI: 10.2337/dc06-1391 the whole document ----- -/-	1,3, 7-18, 20-22, 29,30  1,3, 7-18, 20-22, 29,30  1,3, 6-18, 20-30  1,3, 6-18, 20-30  1,3, 6-18, 20-30  1,3, 6-18, 20-30
3		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2018/030931
---

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>NAGAI RYOJI ET AL: "Antibody-based detection of advanced glycation end-products: promisesvs. limitations", GLYCOCONJUGATE JOURNAL, CHAPMAN &amp; HALL, BOSTON, vol. 33, no. 4, 15 July 2016 (2016-07-15), pages 545-552, XP036024132, ISSN: 0282-0080, DOI: 10.1007/S10719-016-9708-9 [retrieved on 2016-07-15] the whole document</p> <p>-----</p>	1,3, 6-18, 20-30

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2018/030931

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 2010005531	A2	14-01-2010	US	2011319499 A1		29-12-2011
			US	2015051161 A1		19-02-2015
			WO	2010005531 A2		14-01-2010
<hr/>						
US 5702704	A	30-12-1997	AT	196549 T		15-10-2000
			AU	681340 B2		28-08-1997
			CA	2126209 A1		08-07-1993
			CN	1079825 A		22-12-1993
			DE	69231473 D1		26-10-2000
			DE	69231473 T2		08-02-2001
			EP	0623216 A1		09-11-1994
			ES	2150936 T3		16-12-2000
			JP	H07502534 A		16-03-1995
			KR	100257733 B1		01-06-2000
			PT	101147 A		31-03-1994
			US	5624804 A		29-04-1997
			US	5629408 A		13-05-1997
			US	5683887 A		04-11-1997
			US	5702704 A		30-12-1997
			US	5712101 A		27-01-1998
			US	5733546 A		31-03-1998
			WO	9313421 A1		08-07-1993
<hr/>						
WO 2012047629	A2	12-04-2012	EP	2621534 A2		07-08-2013
			US	2013243785 A1		19-09-2013
			US	2017216435 A1		03-08-2017
			WO	2012047629 A2		12-04-2012
<hr/>						
WO 2017065837	A1	20-04-2017	AU	2016336959 A1		12-04-2018
			CA	3000815 A1		20-04-2017
			CN	108431044 A		21-08-2018
			EP	3362483 A1		22-08-2018
			KR	20180056689 A		29-05-2018
			WO	2017065837 A1		20-04-2017
<hr/>						

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US2018/030931

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

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

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

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

see additional sheet

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

1, 3(completely); 6-18, 20-30(partially)

**Remark on Protest**

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

International Application No. PCT/ US2018/ 030931

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1, 3(completely); 6-18, 20-30(partially)

Methods of diagnosing a disease, disorder or pathological condition associated with cellular senescence in a patient, comprising measuring the number of cells that exhibit cell-surface AGEs in the sample; a kit.  
---

2. claims: 2, 4(completely); 6-18, 20-30(partially)

Methods of determining the biological age of a patient, a method for diagnosing a disease based on said biological age. a kit.  
---

3. claims: 5, 19(completely); 6, 13-16, 22-30(partially)

A method of detecting AGE-modified cells in a subject *in vivo*, comprising: administering to the subject an anti-AGE antibody that has been labeled with a detectable label. A kit.  
---

4. claims: 31-33

A senescent cell removal agent for use in treating a disease, disorder or pathological condition associated with cellular senescence in a patient, wherein the biological age of the patient exceeds the chronological age of the patient. A method of treatment comprising administering a senescent cell removal agent.  
---

## 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 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 21/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/14	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 25/14	4 C 0 8 6
A 6 1 P 27/12	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 27/12	
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 17/04	(2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/04	
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 35/04	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 9/12	(2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 27/06	(2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 19/10	(2006.01)	A 6 1 P 27/06	
A 6 1 P 7/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 39/02	(2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 39/02	
A 6 1 P 13/12	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 11/06	(2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 25/08	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 47/55	(2017.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 47/68	(2017.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 31/506	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	C
A 6 1 K 31/352	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 K 47/55	
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 K 47/68	
C 0 7 D 417/12	(2006.01)	A 6 1 K 31/506	
C 0 7 D 311/30	(2006.01)	A 6 1 K 31/352	
		A 6 1 P 3/10	
		A 6 1 P 37/06	
		C 0 7 D 417/12	
		C 0 7 D 311/30	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. UNIX
2. プルロニック
3. WINDOWS

(74)代理人 100150902  
弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391  
弁理士 園元 修一

(74)代理人 100198074  
弁理士 山村 昭裕

(74)代理人 100096013  
弁理士 富田 博行

(72)発明者 グルバー ルイス エス.  
アメリカ国 60601 イリノイ シカゴ イーストランドルフ 400 #3911

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA25 AA26 CA25 CB03 CB07 CB09 CB30 FB03 FB08

FB11 FB12

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ79 QR48 QR56 QS33 QX02

4C062 EE54

4C063 AA01 BB09 CC62 DD29 EE01

4C076 AA95 CC29 CC41 EE41 EE59 FF32 FF33 FF34

4C084 AA17 AA19 MA01 MA02 NA05 NA14 ZA01 ZA06 ZA15 ZA16

ZA36 ZA42 ZA45 ZA51 ZA59 ZA68 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96

ZA97 ZB07 ZB08 ZB11 ZB21 ZB26 ZC35 ZC75

4C085 AA13 AA14 AA21 AA27 EE01 EE03

4C086 AA01 AA02 BA08 BC82 GA07 GA10 GA12 MA01 MA02 MA04

MA07 NA05 NA14 ZA01 ZA06 ZA15 ZA16 ZA33 ZA36 ZA42

ZA45 ZA51 ZA59 ZA68 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZA97 ZB07

ZB08 ZB11 ZB21 ZB26 ZC35 ZC75