

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-287503

(P2005-287503A)

(43) 公開日 平成17年10月20日(2005.10.20)

| | | |
|---|---------------|-------------|
| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
| C 1 2 Q 1/68 | C 1 2 Q 1/68 | Z N A Z |
| A 6 1 K 45/00 | A 6 1 K 45/00 | 2 G O 4 5 |
| A 6 1 P 7/02 | A 6 1 P 7/02 | 4 B O 2 4 |
| A 6 1 P 9/00 | A 6 1 P 9/00 | 4 B O 6 3 |
| A 6 1 P 9/10 | A 6 1 P 9/10 | 4 C O 8 4 |
| 審査請求 未請求 請求項の数 33 O L 外国語出願 (全 47 頁) 最終頁に続く | | |

| | | | |
|--------------|----------------------------|----------|---------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2005-34114 (P2005-34114) | (71) 出願人 | 397056695 |
| (22) 出願日 | 平成17年2月10日 (2005. 2. 10) | | アベンティス・ファーマ・ドイツユラント |
| (31) 優先権主張番号 | 60/558471 | | ・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンク |
| (32) 優先日 | 平成16年4月1日 (2004. 4. 1) | | テル・ハフツング |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | ドイツ連邦共和国デー—65929フラン |
| | | | クフルト・アム・マイン、プリュニングシ |
| | | | ユトラーセ50 |
| | | (74) 代理人 | 100091731 |
| | | | 弁理士 高木 千嘉 |
| | | (74) 代理人 | 100127926 |
| | | | 弁理士 結田 純次 |
| | | (74) 代理人 | 100105290 |
| | | | 弁理士 三輪 昭次 |
| 最終頁に続く | | | |

(54) 【発明の名称】 T A F I - I I e 3 4 7 多型を決定することによって血栓形成性障害に関する危険性を同定する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 血栓形成性障害、一過性虚血発作 (T I A)、アテローム硬化性脳血管疾患 (C V D)、および/または、冠動脈心疾患) に関する危険性を同定する方法や血栓形成性障害を治療または予防するための薬剤を同定する方法などを提供する。

【解決手段】 アミノ酸配列 (T A F I - I I e 3 4 7) を有するトロンピン活性化線溶抑制因子 (T A F I) のスレオニンからイソロイシンへのアミノ酸置換の存在を決定する事を含む、血栓形成性障害に関する危険性を同定する方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中で、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列 (T A F I - I l e 3 4 7) を有するトロンビン活性化線溶抑制因子 (T A F I) の 3 4 7 位でのスレオニンからイソロイシンへのアミノ酸置換の存在を決定することを含む、血栓形成性障害に関する危険性を同定する方法。

【請求項 2】

血栓形成性障害に関する危険性は、心房細動、卒中、長期の断続的な神経障害 (P R I N D)、一過性虚血発作 (T I A)、アテローム硬化性脳血管疾患 (C V D)、および/または、冠動脈心疾患に関する危険性を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

サンプルは糖尿病患者由来である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

アミノ酸置換は、T A F I タンパク質中で決定される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

アミノ酸置換は、アミノ酸配列解析によって、または、特に T A F I - I l e 3 4 7 に対して向けられた結合タンパク質もしくは結合ペプチドもしくはアプタマーによって決定される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

結合タンパク質または結合ペプチドは、抗体、抗体の抗原結合部位、および/または、タンパク質の足場、好ましくはアンチカリンである、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

アミノ酸置換は、T A F I 遺伝子中で、好ましくは T A F I 遺伝子の両方の対立遺伝子上で決定される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

T A F I 遺伝子中の決定は、核酸の配列解析によって、または、該 T A F I 遺伝子中の突然変異に対して特異的に向けられた抗体、抗体の抗原結合部位もしくはタンパク質の足場、好ましくはアンチカリン、および/または、相補的核酸によって行われる、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

サンプル中で、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有するトロンビン活性化線溶抑制因子 (T A F I) の 3 4 7 位でのスレオニンからイソロイシンへのアミノ酸置換の存在を決定することを含む、血栓形成性障害に関する危険性を有する患者を選択する方法。

【請求項 10】

血栓形成性障害に関する危険性は、心房細動、卒中、長期の断続的な神経障害 (P R I N D)、一過性虚血発作 (T I A)、アテローム硬化性脳血管疾患 (C V D)、および/または、冠動脈心疾患に関する危険性を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

サンプルは糖尿病患者由来である、請求項 9 または 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

アミノ酸置換は、T A F I タンパク質中で決定される、請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

アミノ酸置換は、T A F I - I l e 3 4 7 に対して特異的に向けられた結合タンパク質または結合ペプチドまたはアプタマーによって決定される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

結合タンパク質または結合ペプチドは、抗体、抗体の抗原結合部位、および/または、タンパク質の足場、好ましくはアンチカリンである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

50

アミノ酸置換は、T A F I 遺伝子中で、好ましくはT A F I 遺伝子の両方の対立遺伝子上で決定される、請求項 9 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

T A F I 遺伝子中の決定は、該T A F I 遺伝子中の突然変異に対して特異的に向けられた抗体、抗体の抗原結合部位もしくはタンパク質の足場、好ましくはアンチカリン、および/または、相補的核酸によって行われる、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

(a) T A F I - I l e 3 4 7 またはT A F I - I l e 3 4 7 遺伝子を提供する工程、
(b) 試験化合物を提供する工程、および、
(c) T A F I - I l e 3 4 7 またはT A F I - I l e 3 4 7 遺伝子に対する該試験化合物の作用を測定または検出する工程、
を含む、血栓形成性障害の治療および/または予防のための、T A F I - I l e 3 4 7 の薬剤、好ましくは阻害剤を同定する方法。 10

【請求項 1 8】

試験化合物は、化学化合物ライブラリーの形態で提供される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

T A F I - I l e 3 4 7 またはT A F I - I l e 3 4 7 遺伝子に対する試験化合物の作用は、ヘテロジニアスアッセイまたはホモジニアスアッセイで測定または検出される、請求項 1 7 または 1 8 に記載の方法。 20

【請求項 2 0】

ヘテロジニアスアッセイは、E L I S A (酵素結合免疫吸着検査法) 、 D E L F I A (解離促進ランタニド蛍光イムノアッセイ) 、または、S P A (シンチレーション近接分析) である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

ホモジニアスアッセイは、T R - F R E T (時間分解蛍光共鳴エネルギー移動) 分析、F P (蛍光偏光) 分析、A L P H A (増幅ルミネッセンス近接ホモジニアスアッセイ法) 、E F C (酵素断片コンプリメンテーション) 分析、または、遺伝子分析である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】 30

方法はアレイ上で行われる、請求項 1 7 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

方法は、ロボットシステムで行われる、請求項 1 7 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

方法は、マイクロフルイディクスを用いて行われる、請求項 1 7 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

方法は、ハイスループットスクリーニング法である、請求項 1 7 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 2 6】

(a) 請求項 1 7 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法に従って、血栓形成性障害の治療および/または予防のための薬剤を同定する工程、

(b) 工程 (a) に従って同定された十分な量の薬剤を提供する工程、および、

(c) 1 またはそれ以上の製薬上許容できるキャリアーまたは補助剤と共に、該薬剤を製剤化する工程、

を含む、血栓形成性障害の予防および/または治療的処置のための医薬品を製造する方法。

【請求項 2 7】

血栓形成性障害は、心房細動、卒中、長期の断続的な神経障害 (P R I N D) 、一過性 50

虚血発作 (T I A)、および/または、アテローム硬化性脳血管疾患 (C V D) を含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

血栓形成性の疾患を同定するための診断剤を製造するための、T A F I - I l e 3 4 7 または T A F I - I l e 3 4 7 遺伝子の使用。

【請求項 29】

血栓形成性の障害は、心房細動、卒中、長期の断続的な神経障害 (P R I N D)、一過性虚血発作 (T I A)、アテローム硬化性脳血管疾患 (C V D)、および/または、冠動脈心疾患に関する危険性を含む、請求項 28 に記載の使用。

【請求項 30】

糖尿病患者における血栓形成性疾患を同定するための、請求項 28 または 29 に記載の使用。

【請求項 31】

(a) サンプル中で、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列 (T A F I - I l e 3 4 7) を有するトロンビン活性化線溶抑制因子 (T A F I) の 3 4 7 位でのスレオニンからイソロイシンへのアミノ酸置換の存在を決定すること、および、

(b) 工程 (a) の結果に従って医薬品の投与量を適合させること、を含む、血栓形成性障害の予防および/または治療的処置のための医薬品の投与量を適合させる方法。

【請求項 32】

血栓形成性障害は、心房細動、卒中、長期の断続的な神経障害 (P R I N D)、一過性虚血発作 (T I A)、アテローム硬化性脳血管疾患 (C V D)、および/または、冠動脈心疾患を含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

サンプルは糖尿病患者由来である、請求項 31 または 32 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血栓形成性障害 (例えば、これらに限定されないが、心房細動、卒中、長期の断続的な神経障害 (P R I N D)、一過性虚血発作 (T I A)、アテローム硬化性脳血管疾患 (C V D)、および/または、冠動脈心疾患) に関する危険性を同定する方法、同様に、血栓形成性障害に関する危険性を有する患者を選択する方法、血栓形成性障害を治療または予防するための薬剤を同定する方法、同様に、T A F I - I l e 3 4 7 多型を用いることによって医薬品および診断剤を製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

トロンビン活性化線溶抑制因子 (T A F I) は、プレプロペプチドとして肝臓で合成される既知の血漿の酵素前駆体であり、分子量 55 k D a の 423 個のアミノ酸からなる (図 1)。プレプロペプチドは、22 個のアミノ酸長のシグナルペプチド (アミノ酸番号 1 ~ 22)、92 個のアミノ酸長の活性化ペプチド、および、309 個のアミノ酸長の触媒ドメインを含む。その核酸配列は、1723 個のヌクレオチドを含む (図 2)。T A F I のタンパク質配列の受入番号 (N C B I タンパク質データベース) は、N P _ 0 0 1 8 6 3 であり、ヌクレオチド配列の受入番号 (N C B I ヌクレオチドデータベース) は、N M _ 0 0 1 8 7 2 であり、O M I M (O n l i n e M e n d e l i a n I n h e r i t a n c e i n M a n ^{T M}) における T A F I 情報に関する受入番号は、603101 である。

【0003】

T A F I は、トロンビン、プラスミンまたはトロンビン/トロンボモジュリン複合体によってによって活性化される。プロセッシング後、T A F I は、フィブリン血栓からリシン残基を除去することによって血栓溶解を減弱させる。活性化およびプロセッシングされた T

10

20

30

40

50

A F I は、37 で不安定であり、約8分間の半減期を有する。それゆえに、T A F I は、恒常性において中心的な役割を果たし、そこで有効なフィブリン溶解抑制因子として機能する。ヒトT A F I 遺伝子は、染色体13q14.11にマッピングされている。ヒトT A F I 遺伝子は11個のエキソンからなり、長さ約48kbのゲノム領域にわたる(B o f f a 等(1999年) *B i o c h e m i s t r y*, 38, 6547~6558)。

【0004】

ヒトにおけるT A F I 遺伝子の遺伝分析により、プロモーター領域とコード領域に数種の可変のヌクレオチド(S N P, 単一ヌクレオチド多型)があることがわかった。T A F I 遺伝子のプロモーター領域におけるS N P に関して、これらの多型のうちいくつかは、血液中の変化したT A F I タンパク質レベルに関連することがわかっている(F r a n c o 等(2001年) *H a e m a t o l o g i c a*, 86, 510~517; H e n r y 等(2001年) *B l o o d*, 97巻, 7号, 2053~2058)。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

近年、T A F I 遺伝子のコード領域中で、対応するT A F I タンパク質でアミノ酸置換を起こす2つのS N P が同定されており、これら多型は、T 169A(169位のT = スレオニン(Th r)がA = アラニン(Al a)へ)およびT 347I(347位のスレオニンがI = イソロイシン(I l e)へ)である。T A F I - I l e 347変異体は、試験されたインビトロ条件下で、8分間から15分間への半減期の延長を示すようであり、60%高められた抗フィブリン溶解能を示すようである(B r o u w e r s 等(2001年) *B l o o d*, 98巻, 6号, 1992~1993; S c h n e i d e r 等(2001年) *J . B i o l o g i c a l C h e m i s t r y*, 277巻, 2号, 1021~1030)。T A F I タンパク質の169位での変異は、T A F I の抗フィブリン溶解能にほとんど効果を有さないようである(上記S c h n e i d e r 等(2001年))。しかしながら、現在、血栓形成性障害などに関して、T A F I - I l e 347変異を含む多型の臨床的効果に関する利用可能なデータはほとんどない。

20

【0006】

本発明により、特に、T A F I - I l e 347多型を有する個人が、卒中や一過性虚血発作(T I A)に関する増加した危険性を有することが見出された。それゆえに、遺伝的なT A F I - I l e 347多型は、遺伝子マーカーとして用いることができる、例えば、血栓形成性障害に関する危険性の同定、例えば臨床研究における血栓形成性障害に関する危険性を有する患者の選択、血栓形成性障害の治療および/または予防のための薬剤の同定、血栓形成性障害の予防および/または治療的処置のための医薬品の製造、血栓形成性障害を同定するための診断剤の製造、および/または、血栓形成性障害を治療および/または予防するための医薬品の投与量の適合のために、用いることができる。

30

【課題を解決するための手段】

【0007】

それゆえに、本発明の一実施形態は、血栓形成性障害(例えば、これらに限定されないが、心房細動、卒中、長期の断続的な神経障害(P R I N D)、一過性虚血発作(T I A)、および、アテローム硬化性脳血管疾患(C V D)、および/または、冠動脈心疾患)に関する危険性を同定するためのインビトロまたはインビボでの方法に関し、前記方法は、サンプル中で、配列番号1に記載のアミノ酸配列(T A F I - I l e 347)を有するトロンピン活性化線溶抑制因子(T A F I)の347位でのスレオニンからイソロイシンへのアミノ酸置換の存在を決定することを含む。糖尿病はしばしば線溶低下を示すため、好ましくは、サンプルは糖尿病患者由来である。一般的に、サンプルは、細胞または体液、例えば血液または、動物もしくはは人体から単離された動物細胞もしくははヒト細胞である。

40

【0008】

T I A、P R I N D および卒中は、血栓形成性障害のような血管疾患による突然発症を

50

伴う神経障害であり、これらは、再回復の期間と重症度が異なるだけである。例えば、T I A は、通常持続時間が24時間未満の神経障害であり、永久的な脳障害は起こらない。P R I N D は、通常24時間を超えて持続する神経障害であり、永久的な脳障害は伴わない。卒中は、通常永久的な脳障害を起こす。

【0009】

一般的に、T A F I - I l e 3 4 7 多型は、当業者既知の方法で決定することができる。一つの方法は、アミノ酸置換を決定することであり、これは、アミノ酸配列解析、例えば標準的なタンパク質分解もしくはマススペクトロメトリーを用いたタンパク質配列フラグメントの分析、タンパク質の酵素処理、および、それに続く分解産物の分析によって、または、T A F I - I l e 3 4 7 に対して特異的に向けられた結合タンパク質もしくは結合ペプチドもしくはアプタマーによって、特に、抗体、抗体の抗原結合部位、および/または、タンパク質の足場 (s c a f f o l d)、好ましくはアンチカリン (a n t i c a l i n) によってなされる。

10

【0010】

本発明において、用語「結合タンパク質」または「結合ペプチド」は、特異的にT A F I またはT A F I - I l e 3 4 7 に結合するタンパク質またはペプチドのクラスを意味し、例えば、これらに限定されないが、T A F I またはT A F I - I l e 3 4 7 に対して特異的に向けられた、単一特異性ポリクローナルまたはモノクローナル抗体、抗体フラグメント、および、タンパク質の足場が挙げられ、例えばアンチカリンであり、これは、特にT A F I - I l e 3 4 7 に対して向けられている。用語「特異的に」は、結合タンパク質または結合ペプチドが、T A F I - I l e 3 4 7 と、T A F I のアミノ酸347位におけるその他の多型 (特にT A F I - T h r 3 4 7) とを識別することを意味する。

20

【0011】

T A F I のアミノ酸347位でのその他の多型、特にT A F I - T h r 3 4 7 の決定は、本発明の方法における参照またはコントロールとして用いてもよい。

【0012】

抗体または抗体フラグメントを製造する手順は、当業者周知の方法で達成することができる、例えば、必要に応じて例えばフロインドアジュバントおよび/または水酸化アルミニウムゲルの存在で、T A F I またはT A F I - I l e 3 4 7 で哺乳動物 (例えばウサギ) を免疫化することによって達成することができる (例えば、D i a m o n d , B . A . 等 (1 9 8 1 年) T h e N e w E n g l a n d J o u r n a l o f M e d i c i n e : 1 3 4 4 ~ 1 3 4 9 を参照) 。それに続いて、免疫反応の結果として動物で形成されたポリクローナル抗体を、周知の方法を用いて血液から単離し、例えばカラムクロマトグラフィーによって精製することができる。モノクローナル抗体は、例えば、W i n t e r およびM i l s t e i n の既知の方法に従って製造することができる (W i n t e r , G . およびM i l s t e i n , C . (1 9 9 1 年) N a t u r e , 3 4 9 , 2 9 3 ~ 2 9 9) 。

30

【0013】

本発明において、用語「抗体」または「抗体フラグメント」はまた、抗体またはそれらの抗原結合部位を意味するものと理解され、これらは、組換えによって製造され、必要に応じて修飾されており、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、多機能の抗体、二重特異性または多重特異性抗体、一本鎖抗体およびF (a b) またはF (a b)₂ フラグメントが挙げられる (例えば、E P - B 1 - 0 3 6 8 6 8 4、U S 4, 8 1 6, 5 6 7、U S 4, 8 1 6, 3 9 7、W O 8 8 / 0 1 6 4 9、W O 9 3 / 0 6 2 1 3、または、W O 9 8 / 2 4 8 8 4 を参照) 。

40

【0014】

典型的な抗体の代替物としては、例えば、T A F I またはT A F I - I l e 3 4 7 に対するタンパク質の足場、例えば、リポカリンをベースとするアンチカリン (B e s t e 等 (1 9 9 9 年) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 6 , 1 8 9 8 ~ 1 9 0 3) の使用も可能である。リポカリンの天然のリガンド結合部位、例えばレチノール結

50

合タンパク質またはピリン結合タンパク質は、例えば、それらが選択されたハプテン、ここではTAFIまたはTAFI-Ile347に結合するような様式で「コンビナトリアルタンパク質設計」アプローチによって変更することができる(Skerra, 2000年, Biochim. Biophys. Acta, 1482, 337~50)。分子認識のための抗体の代替物として、その他の既知のタンパク質の足場が知られている(Skerra (2000年) J. Mol. Recognit, 13, 167~187)。

【0015】

アプタマーは、高い親和性でポリペプチド、ここではTAFIまたはTAFI-Ile347に結合する核酸である。アプタマーは、SELEXのような選択方法によって、様々な一本鎖RNA分子の大規模なプールから単離することができる(例えば、Jayasena (1999年) Clin. Chem., 45, 1628~50; KlugおよびFamulok (1994年) M. Mol. Biol. Rep., 20, 97~107; US5, 582, 981を参照)。アプタマーは合成することもでき、それらの鏡像体中で例えばL-リボヌクレオチドとして選択することもできる(Nolte等(1996年) Nat. Biotechnol, 14, 1116~9; Klusmann等(1996年) Nat. Biotechnol., 14, 1112~5)。この方法で単離された形態は、天然に存在するリボヌクレアーゼで分解されないために、より大きい安定性を有するという利点がある。

【0016】

TAFI-Ile347多型を決定するその他の方法は、TAFI遺伝子を分析すること、特に、1064位でのシチジンからチミジンへのヌクレオチド置換の検出に関して核酸配列を分析することである。一般的に、ヌクレオチド置換の決定は、核酸の配列解析によって行うことができ、例えばパイロシーケンシング(pyrosequencing)、放射標識したヌクレオチドまたは蛍光色素で標識したヌクレオチドを用いた配列解析方法、プライマー伸長分析、マススペクトロメトリーを用いた配列フラグメント分析によって、または、前記TAFI遺伝子中の突然変異に対して特異的に向けられた、抗体、抗体の抗原結合部位またはタンパク質の足場、好ましくはアンチカリン、および/または、相補的核酸によって行うことができる。

【0017】

この形態において、用語「特異的に」は、抗体、抗体の抗原結合部位またはタンパク質の足場、好ましくはアンチカリン、および/または、相補的核酸が、TAFI-Ile347遺伝子と、TAFIのアミノ酸347位のヌクレオチドコドンのその他の多型(特にTAFI-Thr347)とを識別することを意味する。347位でのアミノ酸の多型に関する好ましいヌクレオチド置換は、1064位のヌクレオチドである。

【0018】

相補的核酸は、好ましくは一本鎖DNA分子であり、これらは、例えばホスホトリエステル法に従って化学合成することができる(例えば、Uhlmann, E. および Peyman, A. (1990年) Chemical Reviews, 90, 543~584を参照)。これら相補的核酸は、例えばDNAマイクロアレイ上でのハイブリダイゼーションプローブとして、または、例えば蛍光発生5'ヌクレアーゼ分析のTaqMan^(R)分析(Taqman^(R)ラボラトリー)での増幅プローブとして用いることができる。

【0019】

抗体、抗体の抗原結合部位またはタンパク質の足場は、上述したように適宜に生産することができる。

【0020】

いずれの場合においても、好ましくは上述したような方法を用いて、参照またはコントロールとして、TAFIのアミノ酸347位、例えばTAFI-Thr347でのその他の可能性のある多型をさらに決定することが本発明の方法にとって有利である。

【0021】

一般的に、本発明の方法を用いて、参照またはコントロールと比較して高い血管疾患(

10

20

30

40

50

例えば、これらに限定されないが、心房細動、卒中、長期の断続的な神経障害（P R I N D）、一過性虚血発作（T I A）、アテローム硬化性脳血管疾患（C V D）、および/または、冠動脈心疾患）に関する危険性を同定することができ、それにより、個人（例えば糖尿病患者）の予防および/または治療的処置、または、投与される薬剤の用量の適合を得ることが可能である（以下でさらに説明する）。

【0022】

それゆえに、本発明の他の実施形態は、血栓形成性障害（例えば、これらに限定されないが、心房細動、卒中、長期の断続的な神経障害（P R I N D）、一過性虚血発作（T I A）、アテローム硬化性脳血管疾患（C V D）、および/または、冠動脈心疾患）に関する危険性を有する患者を選択するための、インビトロまたはインビボでの方法であり、前記方法は、サンプル（好ましくは糖尿病患者由来）中で、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するトロンビン活性化線溶抑制因子（T A F I）の347位でのスレオニンからイソロイシンへのアミノ酸置換の存在を決定することを含む。

10

【0023】

本発明の血管疾患に関する危険性を有する患者を選択する方法は、上述の血管疾患に関する危険性を同定するための方法と同様に特徴付けられ、実施することができる。

【0024】

本発明の他の実施形態は、血栓形成性障害（例えば、これらに限定されないが、心房細動、卒中、長期の断続的な神経障害（P R I N D）、一過性虚血発作（T I A）、および、アテローム硬化性脳血管疾患（C V D）、および/または、冠動脈心疾患）の治療および/または予防のための薬剤、好ましくはT A F I - I l e 3 4 7の阻害剤を同定する方法に関し、前記方法は、以下の工程を含む：

20

- (a) T A F I - I l e 3 4 7またはT A F I - I l e 3 4 7遺伝子を提供する工程、
- (b) 試験化合物を提供する工程、および、
- (c) T A F I - I l e 3 4 7またはT A F I - I l e 3 4 7遺伝子に対する前記試験化合物の作用を測定または検出する工程。

【0025】

本発明において、用語「阻害剤」は、T A F I - I l e 3 4 7の酵素前駆体、特にフィブリン血栓からのリシン残基の除去を阻害または減少させる生化学的または化学的な化合物、および/または、T A F I - I l e 3 4 7の半減期を減少させる、少なくとも約20%～約50%、好ましくは少なくとも約30%～約45%、特に約45%を減少させる生化学的または化学的な化合物を意味する。用語「約」は、一般的に、誤差範囲が+/-20%、特に+/-10%、好ましくは+/-5%であることを意味する。

30

【0026】

一般的に、T A F I - I l e 3 4 7またはT A F I - I l e 3 4 7遺伝子は、例えば分析システムに提供され、例えば化学化合物ライブラリーの形態で、試験化合物、特に生化学的または化学的な試験化合物と直接的または間接的に接触させる。次に、T A F I - I l e 3 4 7またはT A F I - I l e 3 4 7遺伝子に対する前記試験化合物の作用が測定または検出される。その後、適切な阻害剤を、解析および/または単離することができる。化学化合物ライブラリーのスクリーニングには、当業者既知の、または、市販されているハイスループット分析の使用が好ましい。

40

【0027】

本発明において、用語「化学化合物ライブラリー」は、化学合成された分子や天然産物などのあらゆる多様な源から集められた多数の化学化合物、または、コンビナトリアルケミストリー技術で製造された多数の化学化合物を意味する。

【0028】

一般的に、T A F I - I l e 3 4 7またはT A F I - I l e 3 4 7遺伝子に対する前記試験化合物の作用は、ヘテロジニアスアッセイまたはホモジニアスアッセイで測定または検出される。本発明で用いられるヘテロジニアスアッセイは、1またはそれ以上の洗浄工程を含む分析であり、一方で、ホモジニアスアッセイでは、このような洗浄工程は必要な

50

い。試薬および化合物は、単に混合され、測定される。

【0029】

適切な機能分析は、TAFI-Ile347の遺伝子発現に基づくものが可能である。試験しようとする生化学的または化学的な化合物がTAFI-Ile347遺伝子発現の阻害剤として存在する場合、一般的に当業者既知の手段や上述の上述したような手段によって直接的な阻害を測定することができる。例えば、TAFI（例えば参照またはコントロールとして）、および/または、TAFI-Ile347の酵素活性を測定するために、血栓溶解、および/または、フィブリンからのリシン残基の除去、または、一般的には、例えば合成カルボキシペプチダーゼ基質のアニシルアゾホルミルリシンを用いたそのカルボキシペプチダーゼ活性を、当業者既知の適切な分析で測定することができる（例えば、上記のSchneider, M.等（2002年）を参照）。

10

【0030】

ヘテロジニアスアッセイは、例えば、ELISA（酵素結合免疫吸着検査法）、DELFLIA、SPAおよびフラッシュプレート分析である。

【0031】

ELISAは、一般的に、マーカー分子として酵素を用いる既知の分析であり、例えばペルオキシダーゼ染色反応をペルオキシダーゼ基質の添加により開始させ、光学密度を適切なデンシトメーターで測定する。

【0032】

DELFLIA（解離促進ランタニド蛍光イムノアッセイ; dissociation enhanced lanthanide fluoro immuno assay）に基づく分析は、固相分析である。その抗体は、通常、ユーロピウムまたはその他のランタニドで標識され、未結合のユーロピウム標識抗体を洗浄除去した後にユーロピウム蛍光が検出される。

20

【0033】

SPA（シンチレーション近接分析）、および、フラッシュプレート分析は、通常、放射標識された基質を捕獲するために、ピオチン/アビジン相互作用を利用する。一般的に、反応混合物は、ピオチン化ペプチド基質を含む。反応後、ピオチン化ペプチドは、ストレプトアビジンに捕獲される。SPA検出においては、ストレプトアビジンは、シンチラントを含むビーズ上に結合し、それに対して、フラッシュプレート検出においては、ストレプトアビジンは、シンチラントを含むマイクロプレートのウェル内部に結合する。固定されたら、放射標識された基質は、光の放出を刺激するのに十分な程度にシンチラントに近接する。

30

【0034】

その他のホモジニアスアッセイとしては、例えば、TR-FRET、FP、ALPHA、EFC、および、遺伝子分析が挙げられる。

【0035】

TR-FRET（時間分解蛍光共鳴エネルギー移動）に基づく分析は、通常、ユーロピウムと、APC、修飾アロフィコシアニン、または、その他のオーバーラップするスペクトルを有する色素（例えばCy3/Cy5、または、Cy5/Cy7）との間の蛍光共鳴エネルギー移動を利用する分析である（Schobel, U.等（1999年）Bioconjugate Chem. 10, 1107~1114）。例えば337nmの光でユーロピウムを励起した後、分子は、620nmで蛍光を発する。しかしながら、このフルオロフォアがAPCと十分に近接している場合、ユーロピウムは、その励起エネルギーをAPCに移動させ、665nmで蛍光を発する。反応後、ユーロピウムで標識した抗体を、ストレプトアビジン-APCと共に加える。APCのユーロピウムフルオロフォアへの近接により、APC蛍光が付与される時点でユーロピウム蛍光の消光が起こる（FRET）。

40

【0036】

蛍光偏光（FP）に基づく分析は、偏光を用いて溶液中で蛍光基質ペプチドを励起させ

50

る分析である。これら蛍光ペプチドは、溶液中で遊離しており、崩壊し、放出された光を脱偏光 (depolarise) させる。しかしながら、基質ペプチドがより大きい分子に結合すると、その崩壊速度は極めて低くなり、放出された光は強く偏光したままである。

【0037】

ALPHA (増幅ルミネッセンス近接ホモジニアス) に基づく分析は、近接させられたドナーとアクセプタービーズとの間の一重項酸素の移動に基づく分析である。680 nmでの励起において、ドナービーズ中の光増感剤は、周囲の酸素を一重項状態の酸素に変換し、その酸素が200 nmの距離まで拡散する。アクセプタービーズ中の化学発光基は、エネルギーをビーズ内の蛍光アクセプターに移動させ、続いて約600 nmで光を放出する。

10

【0038】

EF C (酵素断片コンプリメンテーション) に基づく分析またはそれと同等の分析は、特に化合物のハイスループットスクリーニングで用いることができる。EF C分析は、2つのフラグメント、すなわち酵素アクセプター (EA) および酵素ドナー (ED) からなる加工された - ガラクトシダーゼ酵素に基づく。フラグメントが分離すると、- ガラクトシダーゼ活性が失われるが、フラグメントが合わさると、それらは連携して (補い合っ) 、活性酵素を形成する。EF C分析は、ED - 分析物結合体を利用し、この場合、分析物は、抗体または受容体のような特異的結合タンパク質によって認識が可能である。特異的結合タンパク質の非存在下では、ED - 分析物結合体は、EAを補い、活性 - ガラクトシダーゼを形成することが可能であり、正の発光シグナルを生産する。ED - 分析物結合体と特異的結合タンパク質とが結合する場合、EAとの補完が阻害され、シグナルは生じない。遊離の分析物が (サンプル中に) 提供される場合、その分析物は、特異的結合タンパク質に対する結合に関してED - 分析物結合体と競合する。遊離の分析物は、EAとの補完のためにED - 分析物結合体を解放し、サンプル中に存在する遊離の分析物の量に応じてシグナルを生産する。

20

【0039】

遺伝子分析の例としては、ツーハイブリッドシステム分析 (FieldsおよびSternglanz (1994年) Trends in Genetics, 10, 286 ~ 292; ColasおよびBrent (1998年) TIBTECH, 16, 355 ~ 363) がある。この試験において、細胞は、本発明に係るポリペプチドと、転写因子 (例えばGal4またはLexA) のDNA結合ドメインとからなる融合タンパク質を発現する発現ベクターで形質転換される。形質転換細胞は、レポーター遺伝子 (そのプロモーターが対応するDNA結合ドメインのための結合部位を含む) をさらに含む。既知または未知のポリペプチドと活性化ドメイン (例えばGal4または単純疱疹ウイルスVP16から) とからなる第二の融合タンパク質を発現する他の発現ベクターで形質転換することによって、第二の融合タンパク質が本ポリペプチドと相互作用する場合にレポーター遺伝子の発現を大きく増加させることができる。その結果、この試験システムは、TAFI - Ile347とその基質 (例えばフィブリン) との相互作用を阻害する生化学的または化学的な化合物のスクリーニングに用いることができる。この方法で、新規の活性化合物を迅速に同定することが可能である。

30

40

【0040】

その他の分析は、固相に結合したポリペプチド (例えばTAFI - Ile347) に基づく。従って、試験化合物は、例えば、検出可能なマーカーを含み、例えば、このような化合物は、放射活性標識、蛍光標識または発光標識が可能である。その上、化合物は、タンパク質にカップリングされていてもよく、それにより、例えば、色素生産性の基質を用いるペルオキシダーゼ分析による酵素的な触媒作用による、または、検出可能な抗体を結合させることによる間接的な検出が可能である。その他の可能性は、マススペクトロメトリによって固相に結合したタンパク質複合体を調査することである (SELDI)。例えば、試験物質との相互作用の結果として活性化状態にあるTAFI - Ile347のコ

50

ンフォメーション変化は、例えば、ポリペプチド中の内在性のトリプトファン残基の蛍光変化によって検出することができる。

【0041】

固相に結合したポリペプチドはまた、アレイの一部をなすこともできる。固相化学と光不安定性の保護基を用いてこのようなアレイを製造する方法は、例えばUS 5,744,305に開示されている。これらアレイはまた、試験化合物または化合物ライブラリーと接触させ、相互作用、例えば結合、またはコンフォメーション変化に関して試験することができる。

【0042】

有利には、本発明の方法は、例えばマイクロフルイディクス (microfluidics) (すなわち溝をつけた構造の) を用いた、例えばロボット式プレーティングやロボット式液体移動システムを含むロボットシステムで行われる。

【0043】

本発明の他の実施形態において、本方法は、ハイスループットスクリーニング システムの形態で行われる。このようなシステムにおいて有利には、スクリーニング方法は、自動化および小型化されており、特に、ロボットで制御された小型化したウェルと、マイクロフルイディクスを用いる。

【0044】

本発明の他の実施形態は、血栓形成性障害 (例えば、これらに限定されないが、心房細動、卒中、長期の断続的な神経障害 (PRIND)、一過性虚血発作 (TIA)、および、アテローム硬化性脳血管疾患 (CVD)、および/または、冠動脈心疾患) の予防および/または治療的処置のための医薬品を製造する方法に関し、前記方法は、以下の工程を含む：

(a) 上述の方法に従って、血栓形成性障害の治療および/または予防のための薬剤を同定する工程、

(b) 工程 (a) に従って同定された十分な量の薬剤を提供する工程、および、

(c) 1またはそれ以上の製薬上許容できるキャリアーまたは補助剤を用いて前記薬剤を製剤化する工程。

【0045】

本発明の医薬品を製造するために、同定された薬剤は通常、1またはそれ以上の製薬上許容できるキャリアーまたは補助剤を用いて製剤化され、このようなキャリアーとしては、投与の種類によって、例えば生理緩衝液溶液、例えば塩化ナトリウム溶液、脱塩水、安定剤、例えばプロテアーゼまたはヌクレアーゼ阻害剤、好ましくはアプロチニン、アミノカプロン酸またはペプスタチンA、または、金属イオン封鎖剤、例えばEDTA、ゲル化剤、例えば白色ワセリン、低粘度パラフィン、および/または、黄色ワックスなどが挙げられる。

【0046】

適切なさらなる添加剤としては、例えば、界面活性剤、例えばトリトン (Triton) X-100、または、デオキシコール酸ナトリウム、さらに、ポリオール、例えばポリエチレングリコールまたはグリセロール、糖類、例えばスクロースまたはグルコース、両性イオン性化合物、例えばアミノ酸、例えばグリシン、または、特にタウリンまたはベタイン、および/または、タンパク質、例えば、ウシまたはヒト血清アルブミンが挙げられる。界面活性剤、ポリオール、および/または、両性イオン性化合物が好ましい。

【0047】

生理緩衝液溶液は、好ましくは、pHが約6.0~8.0、特にpH約6.8~7.8、特にpH約7.4であり、および/または、浸透圧モル濃度が約200~400ミリオスモル/リットル、好ましくは約290~310ミリオスモル/リットルである。本医薬品のpHは、一般的に、適切な有機または無機緩衝液を用いて、例えば、好ましくは、リン酸緩衝液、トリス緩衝液 (トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン)、HEPES緩衝液 ([4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジノ]-エタンスルホン酸)、または、MOP

10

20

30

40

50

S緩衝液(3-モルホリノ-1-プロパンスルホン酸)を用いて調節される。各緩衝液の選択は、一般的に、望ましい緩衝液のモル濃度による。例えば、注射溶液および輸液には、リン酸緩衝液が適切である。

【0048】

本医薬品は、従来の様式で投与することができ、例えば、経口投与形態、例えば錠剤またはカプセルによって、粘膜、例えば鼻もしくは口腔経路で、皮下に埋め込む処理形態で、本発明に係る医薬品を含む注射、輸液またはゲルによって投与することができる。さらに、上述したような特定の関節疾患を治療するために、必要に応じてリポソーム複合体の形態で、医薬品を局所および局部的に投与することが可能である。さらに、医薬品の一時的な放出制御を可能にする経皮治療システム(TTS)によって治療を行うことができる。TTSは、例えばEP0 944 398(A1)、EP0 916 336(A1)、EP0 889 723(A1)またはEP0 852 493(A1)で既知である。

10

【0049】

比較的少量の溶液または懸濁液(例えば約1~約20ml)を体に投与すればいい場合には、一般的に、注射溶液が用いられる。より大量の溶液または懸濁液(例えば1リットル以上)を投与する場合には、一般的に、輸液溶液が用いられる。輸液溶液とは異なり、注射溶液の場合は数ミリリットルだけを投与するため、注射液における血液または組織液のpHおよび浸透圧のわずかな差は、痛みの感覚に関して、それ自体重要ではないか、または、それ自体問題にならない程度の重要性しか有さない。それゆえに、通常、使用前の本発明に係る製剤の希釈は必要ではない。しかしながら、比較的大量の投与の場合、本発明に係る製剤は、投与前に、少なくともほぼ等張の溶液が得られるような程度に簡単に希釈されるべきである。等張溶液の例は、0.9%濃度の塩化ナトリウム溶液である。輸液の場合、希釈は、例えば滅菌水を用いて行うことができ、一方で、投与は、例えばいわゆるバイパスを介して行うことができる。

20

【0050】

他の実施形態において、TAFI-Ile347またはTAFI-Ile347遺伝子は、特に糖尿病の血管疾患(例えば、これらに限定されないが、心房細動、卒中、長期の断続的な神経障害(PRIND)、一過性虚血発作(TIA)、アテローム硬化性脳血管疾患(CVD)、および/または、冠動脈心疾患)の同定のための診断剤を製造するために用いることができる。

30

【0051】

例えば、TAFI-Ile347は、上述したような結合タンパク質または結合ペプチドまたはアプタマーを製造するために用いることができ、これらは診断剤の手段として用いることができる。TAFI-Ile347遺伝子そのものを、特にその一本鎖形態で用いることができ、または、相補的核酸の製造のためには、好ましくは、相補的一本鎖DNAを用いることができ、この相補的一本鎖DNAは、一般的に当業者既知のハイブリダイゼーションおよび/または増幅プローブとして用いることができる。

【0052】

本発明の他の実施形態は、血栓形成性障害(例えば、これらに限定されないが、心房細動、卒中、長期の断続的な神経障害(PRIND)、一過性虚血発作(TIA)、アテローム硬化性脳血管疾患(CVD)、および/または、冠動脈心疾患)を治療および/または予防するための医薬品の投与量を適合させる方法に関し、前記方法は、

40

(a) 例えば糖尿病由来のサンプル中で、配列番号1に記載のアミノ酸配列(TAFI-Ile347)を有するトロンビン活性化線溶抑制因子(TAFI)の347位でのスレオニンからイソロイシンへのアミノ酸置換の存在を決定すること、および、

(b) 工程(a)の結果に従って前記医薬品の投与量を適合させること、を含む。

【0053】

上で説明したように、TAFI-Ile347は、長い半減期、および、インビトロで

50

の高い抗フィブリン溶解活性、および、好ましくは卒中およびT I Aに関する高い危険性を示す。それゆえに、T A F I - I l e 3 4 7多型を有する個人は、例えば、血栓形成性障害を治療および/または予防するための医薬品をより大量に必要とする。一般的に、医薬品の投与量は、有利には、個人または患者の、特に、3 4 7位でイソロイシンがホモ接合型である個体または患者の遺伝学的T A F Iプロフィールに適合させるべきである。本発明の方法の決定工程(a)は、上で説明したように行うことができる。

【0054】

以下の実施例、表および図面は、本発明の範囲を限定することなく、本発明を説明するものである。

図1は、T A F Iのタンパク質配列を示す。

10

図2は、T A F Iのヌクレオチド配列を示す。

【0055】

略語

T A F I遺伝子の両方の対立遺伝子上で対応する位置での多型の結果として、タンパク質の3 4 7位にスレオニン¹を有するT A F I変異体は、T A F I - 3 4 7 - T Tと呼ばれる。

【0056】

T A F I遺伝子の両方の対立遺伝子の一方上で対応する位置での多型の結果として、タンパク質の3 4 7位にスレオニンとイソロイシン²を有するT A F I変異体は、T A F I - 3 4 7 - T Iと呼ばれる。

20

【0057】

T A F I遺伝子の両方の対立遺伝子上で対応する位置での多型の結果として、タンパク質の3 4 7位にイソロイシン³を有するT A F I変異体は、T A F I - 3 4 7 - I Iと呼ばれる。

【実施例】

【0058】

心臓血管性の事象(events)または指標(end points)を有する、または、有さない患者群で、T A F Iタンパク質の3 4 7位でのT A F I多型(タンパク質配列のNCBI受入番号: NP__001863; 図1)を解析した。

【0059】

30

1. 配列解析および分析によるSNP(単一ヌクレオチド多型)の検出

1.1 対象の多型を有するゲノムDNA領域の増幅

T A F I - I l e 3 4 7タンパク質変異体を生じる、NCBI受入番号NM__001872のT A F I配列(表2)の1064位でのシチジンからチミジンへのヌクレオチド置換の検出のために、以下の増幅プライマーを用いた:

フォワードプライマー: 5' - C A C A C C A G C T T T G C T A C C - 3'、

リバースプライマー: 5' - C A T T T T C C A C T G T T T A G C T C C - 3'。

【0060】

増幅するために、以下のPCRプロトコルを用い、増幅のための以下の試薬の全てをアプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems, フォスターシティ, 米国)から得た: ゲノムDNA(20ng); TaqGoldポリメラーゼ(1ユニット); 1xTaqポリメラーゼ緩衝液; 500μMのdNTP; 2.5mMのMgCl₂; 200nMの各増幅プライマー対(配列については、上記の増幅プライマー対1.を参照); H₂Oを加えて5μlにする。

40

【0061】

PCR/遺伝子型解析のための増幅プログラム:

95 で×10分×1サイクル

95 で×30秒

70 で×30秒×2サイクル;

95 で×30秒

50

65 で×30秒×2サイクル；
 95 で×30秒
 60 で×30秒×2サイクル；
 95 で×30秒
 56 で×30秒
 72 で×30秒×40サイクル；
 72 で×10分
 4 で×30秒×1サイクル。

【0062】

1.2 対象の多型の同定

多型のミニシーケンスおよび検出のために、以下のプロトコルを用いた、一方で、以下の試薬の全ては、アプライド・バイオシステムズ（フォスターシティ，米国）から得た。精製したPCR産物（2μl）；ビッグダイ（BigDye）ターミネーターキット（1.5μl）；200nMの1種の配列解析プライマー（配列に関しては、上記のフォワードまたはリバース増幅プライマー 1を参照）；H₂Oを加えて10μlにした。

10

【0063】

配列解析のための増幅プログラム：

96 で×2分×1サイクル；
 96 で×10秒
 55 で×10秒
 65 で×4分×30サイクル；
 72 で×7分
 4 で×30秒×1サイクル。

20

【0064】

生データを抽出するために、まず配列解析ツール（アプライド・バイオシステムズ，フォスターシティ，米国）を用いて配列を解析し、次に、Phred（ベースコーラー）、Phrap（アsembler）、polyphred（SNPコーラー）、および、Consed（結果のビューワー）を用いて加工した。Phred、Phrap、PolyphredおよびConsedは、ワシントン大学（University of Washington）で、Phil Greenによって設計されたソフトウェアである（<http://www.genome.washington.edu>）。

30

【0065】

1.3 遺伝子型/表現型の関連に関する統計学的アプローチ

SAS統計パッケージ（SAS statistical package）（バージョン6.12またはそれ以上、SASインスティテュート社（SAS Institute GmbH），ハイデルベルグ/ドイツ）を用いて全ての解析を行った。遺伝学的多型と多数の臨床関連パラメーターとの関連を検出するために、記述統計を計算し（中位数，四分位数）、ウィルコクソンの順位和検定を行った。2つの独立したサンプルを比較するために、ウィルコクソンの順位和検定を用いた。試験統計値の計算は、プールしたサンプルにおける順位に基づく。

40

【0066】

SNPと危険因子と病気との関連を検索するために、2乗検定を行って数とパーセンテージを計算し、データを説明する。2乗検定は、2つの変数の依存性を計算するための統計学的試験である。変数の値は、2またはそれ以上のクラスに含まれる。これら変数の関連を解析するために、分割表を用いた。この表は、多数の行を第一の変数の認識数として含み、多数の列を第二の変数の認識数として含む。全てのセルは、特定の患者の指標を含む。試験の統計を構築するために、計算された頻度と観察された頻度との差を計算した。

【0067】

結果を調査した後、関連する変数を選択した。交絡する共変数を考慮して、ロジスティ

50

ック回帰を用いて結果を確認した。ロジスティック回帰法を用いて、特定の応答変数に対する数種の説明変数の影響を解析した。関連する統計学的試験により p 値を得た。この p 値から、関連する説明変数の有意な影響があると解釈される。

【0068】

バイナリ変数に関して、オッズ比を計算した。オッズ比とは、事象が1つの群で生じるオッズの、その事象が他の群で生じるオッズに対する比である。

【0069】

2. 結果

患者群の亜群を解析することによって結果を得、また、亜群は、以下の特徴を有していた：全て糖尿病患者、ACE抑制因子ラミプリルでの治療なし、アルコールなし。

10

【表1】

表

| | | TAFI 347 変異体 | | | | N 総数 |
|-----|----|--------------|-------|-------|-------|------|
| | | II | | TT/TI | | |
| | | N | % | N | % | |
| 卒中 | 有り | 5 | 7,35 | 19 | 3,35 | 24 |
| | 無し | 63 | 92,25 | 549 | 96,65 | 612 |
| TIA | 有り | 3 | 4,41 | 4 | 0,7 | 7 |
| | 無し | 65 | 95,59 | 564 | 99,3 | 629 |

20

【0070】

表からわかるように、全てのTAFI - I347I多型を有する個体は、TAFI - I347TおよびTAFI - T347T多型を有する個体に比べて、卒中に関する危険性（7.35%対3.35%）、および、TIAに関する危険性（4.41%対0.7%）が大きかった。

30

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】TAFIのタンパク質配列を示す。

【図2】TAFIのヌクレオチド配列を示す。

【 図 1 】

1 M K L C S L A V L V P I V L F C E Q H V F A F Q S G Q V L A
 31 A L P R T S R Q V Q V L Q N L T T T Y E I V L W Q P V T A D
 61 L I V K K K Q V H F F V N A S D V D N V K A H L N V S G I P
 91 C S V L L A D V E D L I Q Q Q I S N D T V S P R A S A S Y Y
 121 E Q Y H S L N E I Y S W I E F I T E R H P D M L T K I H I G
 151 S S F E K Y P L Y V L K V S G K E Q T A K N A I W I D C G I
 181 H A R E W I S P A F C L W F I G H I T Q F Y G I I G Q Y T N
 211 L L R L V D F Y V M P V V N V D G Y D Y S W K K N R M W R K
 241 N R S F Y A N N H C I G T D L N R N F A S K H W C E E G A S
 271 S S S C S E T Y C G L Y P E S E P E V K A V A S F L R R N I
 301 N Q I K A Y I S M H S Y S Q H I V F P Y S Y T R S K S K D H
 331 E E L S L V A S E A V R A I E K T S K N T R Y T H G H G S E
 361 T L Y L A P G G G D D W I Y D L G I K Y S F T I E L R D T G
 391 T Y G F L L P E R Y I K P T C R E A F A A V S K I A W H V I
 421 R N V

【 図 2 】

1 GTTGTACAGA AAATTGCTGT TGGGATGAAG CTTTGCAGCC TTGCAGTCTT TGTACCCATT
 61 GTTCTCTTCT GTGAGCAGCA TGTCTTCGCG TTTCAGAGTG GCCAAGTTCT AGTCGTCTTT
 121 CCTAGAACCT CTAGGCAAGT TCAAGTTCTA CAGAATCTTA CTACAACATA TGAGATTGTT
 181 CTCTGGCAGC CGGTAACAGC TGACCTTATT GTGAAGAAA AACAAGTCCA TTTTTTGTGA
 241 AATGATCTG ATGTCGACAA TGTGAARAGC CATTAAATG TGAGCGGAAT TOCATGCAGT
 301 GTCTTGCTGG CAGACGTGGA AGATCTTATT CAACAGCAGA TTTCCAACGA CACAGTCAGC
 361 CCCGAGCCT COGCATCGTA CTATGAACAG TATCACTCAC TAAATGAAAT CTATTCTTGG
 421 ATAGAATTTA TAACTGAGAG GCATCCTGAT ATGCTTACAA AAATCCACAT TGGATCCTCA
 481 TTTGAGAAGT ACCCACTCTA TGTTTTAAAG GTTCTGGAA AAGAACAAC AGCCAAAAT
 541 GCCATATGGA TTGACTGTGG AATCCAIGCC AGAGAATGGA TCCTCTCTGC TTTCTGCTTG
 601 TGGTTCATAG GCCATATAAC TCAATCTAT GGGATAATAG GGCAATATAC CAATCTCTG
 661 AGGCTTGTGG ATTTCTATGT TATGCCGGTG GTTAACTGG ACGGTTATGA CTACTCATGG
 721 AAAAGAATC GAATGTGGAG AAAGAACCCT TCTTCTATG CGAACAATCA TTGCATCGGA
 781 ACAGACCTGA ATAGGAACCT TGCTTCCAAA CACTGGTGTG AGGAAGGTGC ATCCAGTTCC
 841 TCATGCTCGG AAACCTACTG TGGACTTTAT CCTGAGTCAG AACCAGAAT GAAGGCAGTG
 901 GCTAGTTTCT TGAGAAGAAA TATCAACCAG ATTAAGCAT ACATCAGCAT GCATTCATAC
 961 TCCCAGCATA TAGTGTTCC ATATTCCTAT ACACGAAGTA AAGCAAGA CCATGAGGAA
 1021 CTGCTCTAG TAGCCAGTGA AGCAGTTCGT GCTATTGAGA AACTAGTAA AAATACCAGG
 1081 TATACAGATG GCCATGGCTC AGAACCTTA TACCTAGCTC CTGGAGGTGG GGACATTTGG
 1141 ATCTATGATT TGGGCATCAA ATATTCGTTT ACAAATGAAC TTCGAGATAC GGGCACATAC
 1201 GGATTTCTGC TGCCGGAGCG TTACATCAA CCCACCTGTA GAGAAGCTTT TGCCGCTGTC
 1261 TCTAAAATAG CTGGCATGT CATTAGGAAT GTTTAATGCC CCTGATTTA TCATTCTGCT
 1321 TCCGTATTTT AATTTACTGA TTCCAGCAAG ACCAAATCAT TGTATCAGAT TATTTTTAAG
 1381 TTTTATCCGT AGTTTGTATA AAAGATTTTC CTATCTCTTG GTCTGTGAC AGAACCTAAT
 1441 AAGTGCTACT TTGCCATTA GGCAGACTAG GGTTCATGTC TTTTACCCT TTAATAAAAA
 1501 TTGAAAAGT CTAGTTACCT ACTTTTTCTT TGATTTTCGA CGTTTACTA GCCATCTCAA
 1561 GCAACTTTG ACGTTTACT AGCCATCTCA AGCAAGTTTA ATCAAAGATC ATCTCACGCT
 1621 GATCATTGGA TCCTACTCAA CAAAAGGAAG GGTGGTCAGA AGTACATTA AGATTCTGTC
 1681 TCCAAATTTT CAATAAATTT CTGCTTGTGC CTTTAGAAT ACA

【 配列表 】

2005287503000001.app

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
|--------------------------|--------------------|------------|
| A 6 1 P 25/00 | A 6 1 P 9/10 1 0 1 | |
| C 1 2 N 15/09 | A 6 1 P 25/00 | |
| G 0 1 N 33/15 | G 0 1 N 33/15 | Z |
| G 0 1 N 33/50 | G 0 1 N 33/50 | Z |
| G 0 1 N 33/53 | G 0 1 N 33/53 | D |
| | C 1 2 N 15/00 | A |

- (72)発明者 デトレフ・コツィアン
ドイツ連邦共和国65795ハッテルスハイム・シュールシュトラッセ23
- (72)発明者 シュテファン・シェーファー
ドイツ連邦共和国65835リーダーバッハ・フランクフルターアレー8
- (72)発明者 ベルンヴァルト・シェールケンス
ドイツ連邦共和国65779ケルクハイム・ヘルダーリーンシュトラッセ62
- (72)発明者 カール・エルンスト・ジークラー
ドイツ連邦共和国67069ルートヴィヒスハーフェン・ホルスト・ショルク・シュトラッセ19
- (72)発明者 ジャン・フランソワ・デレーズ
フランス国77380コムラヴィル・リュードゥリエーレ4
- (72)発明者 シールヴェン・リカール
フランス国75013パリ・ブルヴァールヴァンサンオリオール120
- (72)発明者 サンドラン・マセ
フランス国78350ジュウイ・アン・ジョザ・リュールイシャグノ11
- Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 FB02 FB03
4B024 AA11 CA01 CA11 HA11
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ42 QQ52 QR08 QR42 QR62 QS25 QS36
QX02
4C084 AA02 AA03 AA17 BA44 MA17 MA22 MA23 MA24 MA28 MA35
MA37 MA52 MA57 MA59 MA66 MA67 NA14 ZA022 ZA362 ZA402
ZA452 ZC352

【 外国語明細書 】

Method for the Identification of a Risk for a Thrombogenic Disorder by Determining the TAFI -Ile347 Polymorphism

The present invention is directed to a method identifying a risk for a thrombogenic disorder including, without limitation, atrial fibrillation, stroke, prolonged intermitted neurological deficit (PRIND), transitory ischemic attack (TIA), atherosclerotic cerebrovascular disease (CVD) and/or coronary heart disease, as well as to a method for selecting patients with a risk for a thrombogenic disorder, to a method for identifying a pharmaceutical for the therapy or prophylaxis of a thrombogenic disorder as well as to a method for producing a medicament and a diagnostic by employing the TAFI-Ile347 polymorphism.

The Thrombin-Activable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) is a known plasma zymogen synthesized in the liver as a prepropeptide consisting of 423 amino acids with a molecular weight of 55kDa (Fig. 1). The prepropeptide contains a 22 amino acids long signal peptide (amino acids No. 1-22), a 92 amino acids long activation peptide and a 309 amino acids long catalytic domain. The nucleic acid sequence contains 1723 nucleotides (Fig. 2). The protein sequence accession number (NCBI protein database) of TAFI is NP_001863, the nucleotide sequence accession number (NCBI nucleotide database) is NM_001872 and the accession number for TAFI information in OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man™) is 603101.

TAFI is activated by thrombin, plasmin or the thrombin/thrombomodulin complex. After processing, TAFI attenuates clot lysis by removing lysine residues from a fibrin clot. Activated and processed TAFI is unstable at 37°C and has a half-life of about 8 minutes. Therefore, TAFI plays a central role in homeostasis where it functions as a potent fibrinolysis inhibitor. The human TAFI gene has been mapped to chromosome 13q14.11. It consists of 11 exons and spans a genomic region of about 48 kb in length (Boffa et al. (1999) *Biochemistry*, 38, 6547 – 6558).

Genetic analyses of the TAFI gene in humans revealed several variable nucleotides (SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms) in the promoter and the coding region. For SNPs in the promoter region of the TAFI gene it has been shown, that some of these polymorphisms are associated with altered TAFI protein levels in the blood (Franco et al. (2001) *Haematologica*, 86, 510 - 517; Henry et al. (2001) *Blood*, vol. 97, no. 7, 2053 – 2058).

Recently two SNPs have been identified in the coding region of the TAFI gene leading to an amino acid exchange in the corresponding TAFI protein, these polymorphism are T169A (T=Threonine (Thr) at position 169 to A=Alanine (Ala)) and T347I (Threonine at position 347 to I=Isoleucine (Ile)). The TAFI-Ile347 variant seems to display an extended half-life from 8 minutes to 15 minutes and seems to exhibit an enhanced antifibrinolytic potential of 60% (Brouwers et al. (2001) *Blood*, vol. 98, no. 6, 1992 – 1993; Schneider et al. (2001) *J. Biological Chemistry*, vol. 277, no. 2, 1021 – 1030) under the tested in vitro conditions. Variations at position 169 of the TAFI protein do not seem to have any effect on the antifibrinolytic potential of TAFI (Schneider et al. (2001) *supra*). However, currently no data are available about the clinical effects, if any, of the described polymorphisms including the TAFI-Ile347 variant for thrombogenic or other disorders.

According to the present invention it has been found that in particular individuals with a TAFI-Ile347 polymorphism have an increased risk for stroke and transitory ischemic attack (TIA). Therefore, the genetic TAFI-Ile347 polymorphism can be used as a genetic marker, e.g. for the identification of a risk for a thrombogenic disorder, for the selection of patients with a risk for a thrombogenic disorder, e.g. in clinical studies, for the identification of a pharmaceutical for the therapy and/or prophylaxis of a thrombogenic disorder, for the production of a medicament for the preventive and/or therapeutic treatment of a thrombogenic disorder, for the production of a diagnostic for the identification of a thrombogenic disorder and/or for the adaptation of the dosage of a medicament for the treatment and/or prophylaxis of a thrombogenic disorder.

Therefore, one embodiment of the present invention is directed to an in vitro or in vivo method for identifying a risk for a thrombogenic disorder including, without limitation, the risk for an atrial fibrillation, stroke, prolonged intermitted neurological deficit (PRIND), transitory ischemic attack (TIA) and, atherosclerotic cerebrovascular disease (CVD) and/or coronary heart disease, wherein the method comprises determining in a sample the presence of an amino acid exchange from threonine to isoleucine at position 347 of the Thrombin-Activable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) with the amino acid sequence according to SEQ ID NO: 1 (TAFI-Ile347). Because diabetics often show hypofibrinolysis the sample is preferably from a diabetic. Generally, the sample is a cell or a body fluid, e.g. blood or an animal or a human cell, isolated from an animal or human body.

TIA, PRIND and stroke are neurological deficits with a sudden onset due to a vascular disease such as a thrombogenic disorder which differs only in the time period of convalescence and in the severity. For example, for TIA the neurologic deficits generally last less than 24 hours and no permanent brain damage results. For PRIND the neurologic deficits generally last for more than 24 hours without permanent brain damages. A stroke generally results in a permanent brain damage.

The TAFI-Ile347 polymorphism can be generally determined by methods known to a person skilled in the art. One method is to determine the amino acid exchange by amino acid sequencing, e.g. standard protein degradation or analysis of protein sequence fragments with mass spectrometry, enzymatic treatment of the protein and subsequent analysis of degradation products or by means of a binding protein or a binding peptide or aptamer, specifically directed against TAFI-Ile347, in particular by means of an antibody, an antigen-binding part of an antibody and/or a protein-scaffold, preferably an anticalin.

According to the present invention the term "binding protein" or "binding peptide" refers to a class of proteins or peptides which specifically bind TAFI or TAFI-Ile347 including, without limitation, monospecific polyclonal or monoclonal antibodies, antibody fragments and protein scaffolds specifically directed against TAFI or TAFI-Ile347, e.g. anticalins which are specifically directed against TAFI-Ile347. The term "specifically" means that the binding protein or binding peptide discriminates between TAFI-Ile347 and other polymorphisms at amino acid position No. 347 of TAFI, in particular TAFI-Thr347.

The determination of other polymorphisms at amino acid position No. 347 of TAFI, in particular TAFI-Thr347 may be used as a reference or control in the method of the present invention.

The procedure for preparing an antibody or antibody fragment is effected in accordance with methods which are well known to the skilled person, e.g. by immunizing a mammal, for example a rabbit, with TAFI or TAFI-Ile347, where appropriate in the presence of, for example, Freund's adjuvant and/or aluminium hydroxide gels (see, for example, Diamond, B.A. et al. (1981) *The New England Journal of Medicine*: 1344-1349). The polyclonal antibodies which are formed in the animal as a result of an immunological reaction can subsequently be isolated from the blood using well known methods and, for example, purified by means of column chromatography. Monoclonal antibodies can, for example, be prepared in accordance with the known method of Winter & Milstein (Winter, G. & Milstein, C. (1991) *Nature*, 349, 293-299).

According to the present invention the term "antibody" or "antibody fragment" is also understood as meaning antibodies or antigen-binding parts thereof, which have been prepared recombinantly and, where appropriate, modified, such as chimeric antibodies, humanized antibodies, multifunctional antibodies, bispecific or oligospecific antibodies, single-stranded antibodies and F(ab) or F(ab)₂ fragments (see, for example, EP-B1-0 368 684, US 4,816,567, US 4,816,397, WO 88/01649, WO 93/06213 or WO 98/24884).

As an alternative to the classical antibodies it is also possible, for example, to use protein scaffolds against TAFI or TAFI-Ile347, e.g. anticalins which are based on lipocalin (Beste et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1898-1903). The natural ligand-binding sites of the lipocalins, for example the retinol-binding protein or the bilin-binding protein, can be altered, for example by means of a "combinatorial protein design" approach, in such a way that they bind to selected haptens, here to TAFI or TAFI-Ile347 (Skerra, 2000, Biochim. Biophys. Acta, 1482, 337-50). Other known protein scaffolds are known as being alternatives to antibodies for molecular recognition (Skerra (2000) J. Mol. Recognit., 13, 167-187).

Aptamers are nucleic acids which bind with high affinity to a polypeptide, here TAFI or TAFI-Ile347. Aptamers can be isolated by selection methods such as SELEX (see e.g. Jayasena (1999) Clin. Chem., 45, 1628-50; Klug and Famulok (1994) M. Mol. Biol. Rep., 20, 97-107; US 5,582,981) from a large pool of different single-stranded RNA molecules. Aptamers can also be synthesized and selected in their mirror-image form, for example as the L-ribonucleotide (Nolte et al. (1996) Nat. Biotechnol., 14, 1116-9; Klussmann et al. (1996) Nat. Biotechnol., 14, 1112-5). Forms which have been isolated in this way enjoy the advantage that they are not degraded by naturally occurring ribonucleases and, therefore, possess greater stability.

Another method to determine the TAFI-Ile347 polymorphism is the analysis of the TAFI gene, in particular the nucleic acid sequence at position 1064 for the detection of the nucleotide exchange from cytidine to thymidine. In general, the determination of the nucleotide exchange can be carried out by nucleic acid sequencing, e.g. pyrosequencing, sequencing methods using radio-labelled nucleotides or nucleotides labelled with a fluorescent dye, primer extension assay, analysis of sequence fragments with mass spectrometry, or by means of an antibody, an antigen-binding part of an antibody or a protein-scaffold, preferably an anticalin and/or a complementary nucleic acid, specifically directed against the mutation in the TAFI gene.

In this respect the term “specifically” means that the antibody, an antigen-binding part of an antibody or a protein-scaffold, preferably an anticalin, and/or a complementary nucleic acid discriminates between the TAFI-Ile347 gene and other polymorphisms of the nucleotide codon for amino acid position No. 347 of TAFI, in particular TAFI-Thr347. The preferred nucleotide exchange for the polymorphism of the amino acid at position No. 347 is the nucleotide at position 1064.

The complementary nucleic acids, which are preferably single stranded DNA molecules, can be synthesized chemically, e.g. in accordance with the phosphotriester method (see, for example, Uhlmann, E. & Peyman, A. (1990) Chemical Reviews, 90, 543-584). These complementary nucleic acids can be used as hybridization probes, e.g. on DNA microarrays, or as amplification probes, e.g. in the TaqMan[®] analysis (Taqman[®] Laboratory) which is a fluorogenic 5' nuclease assay.

The antibody, antigen-binding part of an antibody or the protein-scaffold can be produced accordingly as described above.

In any case it is advantageous for the method of the present invention to additionally determine other potential polymorphisms at amino acid position 347 of TAFI, e.g. TAFI-Thr347, as a reference or control preferably with a method as described above.

Generally, with the method of the present invention an increased risk for a vascular disorder including, without limitation, atrial fibrillation, stroke, prolonged intermitted neurological deficit (PRIND), transitory ischemic attack (TIA), atherosclerotic cerebrovascular disease (CVD) and/or coronary heart disease compared to a reference or control can be identified which may lead to a prophylactic and/or therapeutic treatment of an individual, e.g. a diabetic, or to the adaptation of the dosage of a pharmaceutical to be administered as described further below.

Therefore, another embodiment of the present invention is an in vitro or in vivo method for selecting patients with a risk for a thrombogenic disorder including, without limitation, the risk for an atrial fibrillation, stroke, prolonged intermitted neurological deficit (PRIND), transitory ischemic attack (TIA), atherosclerotic cerebrovascular disease (CVD) and/or coronary heart disease, wherein the method comprises determining in a sample, preferably from a diabetic, the presence of an amino acid exchange from threonine to isoleucine at position 347 of the Thrombin-Activable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) with the amino acid sequence according to SEQ ID NO: 1.

The present method for selecting patients with a risk for a vascular disorder is characterized and can be carried out in the same way as the method for identifying a risk for a vascular disorder described above.

Another embodiment of the present invention is directed to a method for identifying a pharmaceutical, preferably an inhibitor of TAFI-Ile347, for the therapy and/or prophylaxis of a thrombogenic disorder including, without limitation, an atrial fibrillation, stroke, prolonged intermitted neurological deficit (PRIND), transitory ischemic attack (TIA) and, atherosclerotic cerebrovascular disease (CVD) and/or coronary heart disease, wherein the method comprises the steps of:

- (a) providing TAFI-Ile347 or the TAFI-Ile347 gene,
- (b) providing a test compound, and
- (c) measuring or detecting the influence of the test compound on TAFI-Ile347 or the TAFI-Ile347 gene.

According to the present invention the term "inhibitor" refers to a biochemical or chemical compound which inhibits or reduces the zymogenic activity of TAFI-Ile347, in particular the removal of lysine residues from a fibrin clot, and/or reduces the half-life of TAFI-Ile347, especially by at least about 20% to about 50%, preferably at least by about 30% to about 45%, in particular by about 45%. The term "about" means generally an error range of +/- 20%, especially +/- 10%, preferably +/- 5%.

In general, TAFI-Ile347 or the TAFI-Ile347 gene is provided e.g. in an assay system and brought directly or indirectly into contact with a test compound, in particular a biochemical or chemical test compound, e.g. in the form of a chemical compound library. Then, the influence of the test compound on TAFI-Ile347 or the TAFI-Ile347 gene is measured or detected. Thereafter, suitable inhibitors can be analyzed and/or isolated. For the screening of chemical compound libraries, the use of high-throughput assays are preferred which are known to the skilled person or which are commercially available.

According to the present invention the term "chemical compound library" refers to a plurality of chemical compounds that have been assembled from any of multiple sources, including chemically synthesized molecules and natural products, or that have been generated by combinatorial chemistry techniques.

In general, the influence of the test compound on TAFI-Ile347 or the TAFI-Ile347 gene is measured or detected in a heterogeneous or homogeneous assay. As used herein, a heterogeneous assay is an assay which includes one or more washing steps, whereas in a homogeneous assay such washing steps are not necessary. The reagents and compounds are only mixed and measured.

Suitable functional assays may be based on the gene expression of TAFI-Ile347. In the presence of a biochemical or chemical compound to be tested as an inhibitor of TAFI-Ile347 gene expression, the direct inhibition can be measured by means generally known to a skilled person and as described above. For example, in order to measure the enzymatic activity of TAFI (e.g. as a reference or control) and/or TAFI-Ile347 the clot lysis and/or the removal of lysin residues from fibrin or generally its carboxypeptidase activity using e.g. the synthetic carboxypeptidase substrate anisylazofornyllysine can be measured in an appropriate assay known to a person skilled in the art (see e.g. Schneider, M. et al. (2002) supra).

Heterogeneous assays are, for example, ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay), DELFIA, SPA and flashplate assays.

ELISA is a generally known assay which uses an enzyme as the marker molecule, e.g. a peroxidase colour reaction is initiated by addition of the peroxidase substrate and the optical density is measured in a suitable densitometer.

DELFI (dissociation enhanced lanthanide fluoro immuno assay)-based assays are solid phase assay. The antibody is usually labelled with Europium or another lanthanide and the Europium fluorescence is detected after having washed away unbound Europium-labelled antibodies.

SPA (scintillation proximity assay) and the flashplate assay usually exploit biotin/avidin interactions for capturing radiolabeled substrates. Generally the reaction mixture includes a biotinylated peptide substrate. After the reaction, the biotinylated peptides are captured by streptavidin. In the SPA detection, streptavidin is bound on scintillant containing beads whereas in the flashplate detection, streptavidin is bound to the interior of the well of scintillant containing microplates. Once immobilized, the radiolabelled substrate is close enough to the scintillant to stimulate the emission of light.

Alternative homogeneous assays are, for example, TR-FRET, FP, ALPHA, EFC and gene assays.

TR-FRET (time-resolved fluorescence resonance energy transfer)-based assays are assays which usually exploit the fluorescence resonance energy transfer between Europium and APC, a modified allophycocyanin, or other dyes with overlapping spectra such as Cy3/Cy5 or Cy5/Cy7 (Schobel, U. et al. (1999) *Bioconjugate Chem.* 10, 1107-1114). After excitation e.g. of Europium with light at 337 nm, the molecule fluoresces at 620 nm. But if this fluorophore is close enough to APC, the Europium will transfer its excitation energy to APC, which fluoresces at 665 nm. After the reaction, Europium-labelled- antibodies are added along with streptavidin-APC. The close proximity of the APC to the Europium fluorophore will cause a quenching of the Europium fluorescence at benefit of the APC fluorescence (FRET).

Fluorescence polarisation (FP)-based assays are assays which use polarized light to excite fluorescent substrate peptides in solution. These fluorescent peptides are free in solution and tumble, causing the emitted light to become depolarised. When the substrate peptide binds to a larger molecule, however, its tumbling rates are greatly decreased, and the emitted light remains highly polarized.

ALPHA (amplified luminescent proximity homogenous)-based assays, are assays which rely on the transfer of singlet oxygen between donor and acceptor beads brought into proximity. Upon excitation at 680 nm, photosensitisers in donor beads convert ambient oxygen to singlet-state oxygen, which diffuses up to a distance of 200 nm. Chemiluminescent groups in the acceptor beads transfer energy to fluorescent acceptors within the bead, which then emits light at approximately 600 nm.

EFC (enzyme fragment complementation)-based assays or equivalent assays can be used in particular for high-throughput screening of compounds. The EFC assay is based on an engineered β -galactosidase enzyme that consists of two fragments - the enzyme acceptor (EA) and the enzyme donor (ED). When the fragments are separated, there is no β -galactosidase activity, but when the fragments are together they associate (complement) to form active enzyme. The EFC assay utilizes an ED-analyte conjugate in which the analyte may be recognized by a specific binding protein, such as an antibody or receptor. In the absence of the specific binding protein, the ED-analyte conjugate is capable of complementing EA to form active β -galactosidase, producing a positive luminescent signal. If the ED-analyte conjugate is bound by a specific binding protein, complementation with EA is prevented, and there is no signal. If free analyte is provided (in a sample), it will compete with the ED-analyte conjugate for binding to the specific binding protein. Free analyte will release ED-analyte conjugate for complementation with EA, producing a signal dependent upon the amount of free analyte present in the sample.

An example of a gene assay is the two-hybrid system assay (Fields and Sternglanz (1994) Trends in Genetics, 10, 286-292; Colas and Brent (1998) TIBTECH, 16, 355-363). In this test, cells are transformed with expression vectors which are expressing fusion proteins consisting of the polypeptide according to the invention and a DNA-binding domain of a transcription factor such as Gal4 or LexA. The transformed cells additionally contain a reporter gene whose promoter contains binding sites for the corresponding DNA-binding domain. By transforming with another expression vector which is expressing a second fusion protein consisting of a known or unknown polypeptide and an activation domain, for example from Gal4 or herpes simplex virus VP16, the expression of the reporter gene can be greatly increased if the second fusion protein interacts with the polypeptide. Consequently this test system can be used for screening for biochemical or chemical compounds which inhibit an interaction between TAFI-Ile347 and its substrate, e.g. fibrin. In this way, it is possible to identify novel active compounds rapidly.

Another assay is based on solid phase-bound polypeptides such as TAFI-Ile347. Thus, a test compound, for example, contains a detectable marker, for example, the compound can be radioactively labelled, fluorescence-labelled or luminescence-labelled. Furthermore, compounds can be coupled to proteins which permit indirect detection, for example by means of enzymatic catalysis employing a peroxidase assay which uses a chromogenic substrate or by means of binding a detectable antibody. Another possibility is that of investigating the solid phase-bound protein complexes by means of mass spectrometry (SELDI). Changes in the conformation of e.g. TAFI-Ile347 during its activation as the result of interaction with a test substance can be detected, for example, by the change in the fluorescence of an endogenous tryptophan residue in the polypeptide.

The solid phase-bound polypeptides can also be part of an array. Methods for preparing such arrays using solid phase chemistry and photolabile protecting groups are disclosed, for example, in US 5,744,305. These arrays can also be brought into contact with test compound or compound libraries and tested for interaction, for example binding or changing conformation.

Advantageously the method of the present invention is carried out in a robotics system e.g. including robotic plating and a robotic liquid transfer system, e.g. using microfluidics, i.e. channelled structured.

In another embodiment of the present invention, the method is carried out in form of a high-through put screening system. In such a system advantageously the screening method is automated and miniaturized, in particular it uses miniaturized wells and microfluidics controlled by a roboter.

Another embodiment of the present invention is directed to a method for producing a medicament for the preventive and/or therapeutic treatment of a thrombogenic disorder including, without limitation, an atrial fibrillation, stroke, prolonged intermitted neurological deficit (PRIND), transitory ischemic attack (TIA) and, atherosclerotic cerebrovascular disease (CVD) and/or coronary heart disease, wherein the method comprises the steps of:

- (a) identifying a pharmaceutical for the therapy and/or prophylaxis of a thrombogenic disorder according to the method described above,
- (b) providing an adequate amount of the pharmaceutical identified according to step (a), and
- (c) formulating the pharmaceutical with one or more pharmaceutically acceptable carriers or auxiliary substances.

For the production of the medicament of the present invention the identified pharmaceutical is usually formulated with one or more pharmaceutically acceptable carriers or auxiliary substances, such as physiological buffer solution, e.g. sodium chloride solution, demineralized water, stabilizers, such as protease or nuclease inhibitors, preferably aprotinin, ϵ -aminocaproic acid or pepstatin A or sequestering agents such as EDTA, gel formulations, such as white vaseline, low-viscosity paraffin and/or yellow wax, etc. depending on the kind of administration.

Suitable further additives are, for example, detergents, such as, for example, Triton X-100 or sodium deoxycholate, but also polyols, such as, for example, polyethylene glycol or glycerol, sugars, such as, for example, sucrose or glucose, zwitterionic compounds, such as, for example, amino acids such as glycine or in particular taurine or betaine and/or a protein, such as, for example, bovine or human serum albumin. Detergents, polyols and/or zwitterionic compounds are preferred.

The physiological buffer solution preferably has a pH of approx. 6.0-8.0, especially a pH of approx. 6.8-7.8, in particular a pH of approx. 7.4, and/or an osmolarity of approx. 200-400 milliosmol/liter, preferably of approx. 290-310 milliosmol/liter. The pH of the medicament is in general adjusted using a suitable organic or inorganic buffer, such as, for example, preferably using a phosphate buffer, tris buffer (tris(hydroxymethyl)aminomethane), HEPES buffer ([4-(2-hydroxyethyl)piperazino]-ethanesulphonic acid) or MOPS buffer (3-morpholino-1-propanesulphonic acid). The choice of the respective buffer in general depends on the desired buffer molarity. Phosphate buffer is suitable, for example, for injection and infusion solutions.

The medicament can be administered in a conventional manner, e.g. by means of oral dosage forms, such as, for example, tablets or capsules, by means of the mucous membranes, for example the nose or the oral cavity, in the form of dispositories implanted under the skin, by means of injections, infusions or gels which contain the medicaments according to the invention. It is further possible to administer the medicament topically and locally in order to treat the particular joint disease as described above, if appropriate, in the form of liposome complexes.

Furthermore, the treatment can be carried out by means of a transdermal therapeutic system (TTS), which makes possible a temporally controlled release of the medicaments. TTS are known for example, from EP 0 944 398 A1, EP 0 916 336 A1, EP 0 889 723 A1 or EP 0 852 493 A1.

Injection solutions are in general used if only relatively small amounts of a solution or suspension, for example about 1 to about 20 ml, are to be administered to the body. Infusion solutions are in general used if a larger amount of a solution or suspension, for example one or more litres, are to be administered. Since, in contrast to the infusion solution, only a few millilitres are administered in the case of injection solutions, small differences from the pH and from the osmotic pressure of the blood or the tissue fluid in the injection do not make themselves noticeable or only make themselves noticeable to an insignificant extent with respect to pain sensation. Dilution of the formulation according to the invention before use is therefore in general not necessary. In the case of the administration of relatively large amounts, however, the formulation according to the invention should be diluted briefly before administration to such an extent that an at least approximately isotonic solution is obtained. An example of an isotonic solution is a 0.9% strength sodium chloride solution. In the case of infusion, the dilution can be carried out, for example, using sterile water while the administration can be carried out, for example, via a so-called bypass.

In another embodiment the TAFI-Ile347 or the TAFI-Ile347 gene can be used for the manufacturing of a diagnostic for the identification of a vascular disease, in particular of a diabetic, including, without limitation, an atrial fibrillation, stroke, prolonged intermitted neurological deficit (PRIND), transitory ischemic attack (TIA), atherosclerotic cerebrovascular disease (CVD) and/or coronary heart disease.

For example, the TAFI-Ile347 can be used for the production of binding proteins or binding peptides or aptamers, as described above, which can be employed as diagnostic means. The TAFI-Ile347 gene can be used itself, in particular in its single stranded form, or for the production of a complementary nucleic acid, preferably a complementary single-stranded DNA, which can be employed as a hybridization and/or amplification probe, generally known by a person skilled in the art.

Another embodiment of the present invention is directed to a method for adapting the dosage of a medicament for the treatment and/or prophylaxis of a thrombogenic disorder including, without limitation, includes an atrial fibrillation, stroke, prolonged intermitted neurological deficit (PRIND), transitory ischemic attack (TIA), atherosclerotic cerebrovascular disease (CVD) and/or coronary heart disease, wherein the method comprises

- (a) determining in a sample, e.g. from a diabetic, the presence of an amino acid exchange from threonine to isoleucine at position 347 of the Thrombin-Activable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) with the amino acid sequence according to SEQ ID NO: 1 (TAFI-Ile347), and
- (b) adapting the dosage of the medicament according to the result of step (a).

As explained above, the TAFI-Ile347 shows an extended half-life and an enhanced antifibrinolytic activity in vitro and preferably an increased risk for stroke and TIA. Therefore, individuals with a TAFI-Ile347 polymorphism need e.g. a higher amount of a medicament for the treatment and/or prophylaxis of a thrombogenic disorder. In general, the dosage of a medicament should advantageously be adapted to the genetic TAFI profile of an individual or patient, in particular of individuals or patients who are homozygous for isoleucine at position 347. The determination step (a) of the present method can be carried out as explained above.

The following Examples, Table and Figures shall explain the present invention without limiting the scope of the invention.

Description of the Figures

Figure 1 shows the protein sequence of TAFI.

Figure 2 shows the nucleotide sequence of TAFI.

Abbreviations

TAFI variants having threonine at position 347 of the protein as a consequence of polymorphisms at the corresponding position on both alleles of the TAFI gene are called TAFI-347-TT.

TAFI variants having threonine and isoleucine at position 347 of the protein as a consequence of a polymorphism at the corresponding position on one of both alleles of the TAFI gene are called TAFI-347-TI.

TAFI variants having isoleucine at position 347 of the protein as a consequence of polymorphisms at the corresponding position on both alleles of the TAFI gene are called TAFI-347-II.

Examples

The TAFI polymorphism at the position 347 of the TAFI protein (NCBI accession number for protein sequence: NP_001863; Fig. 1) was analyzed in a patient cohort with or without cardiovascular events or endpoints.

1. SNP (Single Nucleotide Polymorphism) Detection by Sequencing and Analysis

1.1 Amplification of genomic DNA region with polymorphism of interest

For the detection of the nucleotide exchange cytidine to thymidine at position 1064 of the TAFI sequence with the NCBI accession number NM_001872 leading to TAFI-Ile347 protein variant (Table 2) the following amplification primers were used:

Forward primer : 5'-CACACCAGCTTTGCTACC-3'

Reverse primer : 5'-CATTTTCCACTGTTTAGCTCC-3'

For the amplification the following PCR protocol was used, whereas all of the following reagents for the amplification were from Applied Biosystems (Foster City, USA): 20 ng of genomic DNA; 1 unit of TaqGold polymerase; 1 x Taq polymerase buffer; 500 μ M of dNTP; 2,5 mM of MgCl₂; 200 nM of each amplification primer pair (for sequence see Amplification primer pairs 1. above); H₂O ad 5 μ l.

Amplification program for PCR/genotyping :

95°C x 10min x 1 cycle

95°C x 30sec

70°C x 30sec x 2 cycles;

95°C x 30sec

65°C x 30sec x 2 cycles;

95°C x 30sec

60°C x 30sec x 2 cycles;

95°C x 30sec

56°C x 30sec

72°C x 30sec x 40 cycles;

72°C x 10min

4°C x 30sec x 1 cycle;

1.2 Identification of polymorphisms of interest

For minisequencing and detection of polymorphisms the following protocol was used, whereas all of the following reagents were from Applied Biosystems (Foster City, USA). 2 µl of purified PCR product; 1,5 µl BigDye terminator kit; 200 nM of one sequencing primer (for sequence see forward or reverse Amplification primer 1. above); H₂O ad 10 µl.

Amplification program for sequencing :

96°C x 2' x 1 cycle;

96°C x 10"

55°C x 10"

65°C x 4' x 30 cycles;

72°C x 7'

4°C x 30" x 1 cycle;

The sequences were analyzed first with sequencing analysis tools (Applied Biosystems, Foster City, USA) for raw data extraction, then be processed with Phred (base caller), Phrap (assembler), polyphred (SNP caller) and Consed (results viewer). Phred, Phrap, Polyphred and Consed are softwares designed at the University of Washington by Phil Green (<http://www.genome.washington.edu>).

1.3 Statistical approaches for genotype/phenotype correlation

All analyses were performed with SAS statistical package (Version 6.12 or higher, SAS Institute GmbH, Heidelberg/Germany). For the detection of associations between genetic polymorphisms and a large number of clinical relevant parameters, descriptive statistics were computed (median, quartiles) and Wilcoxon-rank-sum-tests were performed. Wilcoxon-rank-sum-test was used for the comparison of two independent samples. The computation of the test statistic is based on ranks in the pooled sample.

The search for associations between the SNPs and risk factors and diseases, Chi-Square-Test were performed and numbers and percentages were calculated to describe the data. The Chi-Square-Test is a statistical test for calculating the dependence of two variables. The values of the variables are contained in two or more classes. To analyze the association of those variables, a contingency table was used. This table contains as many rows as the number of realizations of the first variable and as many columns as the number of realizations of the second variable. Every cell contains a special patient's characteristic. To construct a test statistic, the differences of calculated and observed frequencies were computed.

After inspecting the results, relevant variables were selected. To take account of confounding co-variables, logistic regression was used to validate the results. The logistic regression method was used to analyze the influence of several explanatory variables on a certain response variable. The associated statistical test gave a p-value. The interpretation of this p-value is that there is a significant influence of the associated explanatory variable.

For a binary variable, the odds ratio were calculated. The odds ratio is the ratio of the odds that an event will occur in one group to the odds that the event will occur in the other group.

2. Results

The results were obtained by analyzing a subgroup of a patient population whereas the subgroup had the following characteristics: all diabetics, no treatment with the ACE inhibitor Ramipril, no alcohol.

Table

| | | TAFI 347 variants | | | | N total |
|--------|-----|-------------------|-------|-------|-------|---------|
| | | II | | TT/II | | |
| | | N | % | N | % | |
| Stroke | yes | 5 | 7,35 | 19 | 3,35 | 24 |
| | no | 63 | 92,25 | 549 | 96,65 | 612 |
| TIA | yes | 3 | 4,41 | 4 | 0,7 | 7 |
| | no | 65 | 95,59 | 564 | 99,3 | 629 |

As can be seen from the Table, all individuals with TAFI-I347I polymorphism have an increased risk for stroke (7.35% vs. 3.35%) and TIA (4.41% vs. 0.7%) compared to individuals with TAFI -I347T and TAFI-T347T polymorphism.

SEQUENCE LISTING

- <110> Aventis Pharma Deutschland GmbH
- <120> Method for the Identification of a Risk for a Thrombogenic Disorder by Determining the TAFI -IIe347 Polymorphism
- <130> SP-2362
- <140>
- <141> 2005-02-10
- <150> DE 03026030.1
- <151> 2003-11-12
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
- <211> 423
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Lys Leu Cys Ser Leu Ala Val Leu Val Pro Ile Val Leu Phe Cys
 1 5 10 15

Glu Gln His Val Phe Ala Phe Gln Ser Gly Gln Val Leu Ala Ala Leu
 20 25 30

Pro Arg Thr Ser Arg Gln Val Gln Val Leu Gln Asn Leu Thr Thr Thr
 35 40 45

Tyr Glu Ile Val Leu Trp Gln Pro Val Thr Ala Asp Leu Ile Val Lys
 50 55 60

Lys Lys Gln Val His Phe Phe Val Asn Ala Ser Asp Val Asp Asn Val
 65 70 75 80

Lys Ala His Leu Asn Val Ser Gly Ile Pro Cys Ser Val Leu Leu Ala
 85 90 95

Asp Val Glu Asp Leu Ile Gln Gln Gln Ile Ser Asn Asp Thr Val Ser
 100 105 110

Pro Arg Ala Ser Ala Ser Tyr Tyr Glu Gln Tyr His Ser Leu Asn Glu
 115 120 125

Ile Tyr Ser Trp Ile Glu Phe Ile Thr Glu Arg His Pro Asp Met Leu
 130 135 140

Thr Lys Ile His Ile Gly Ser Ser Phe Glu Lys Tyr Pro Leu Tyr Val
 145 150 155 160

Leu Lys Val Ser Gly Lys Glu Gln Thr Ala Lys Asn Ala Ile Trp Ile
 165 170 175

Asp Cys Gly Ile His Ala Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala Phe Cys Leu
 180 185 190

Trp Phe Ile Gly His Ile Thr Gln Phe Tyr Gly Ile Ile Gly Gln Tyr
 195 200 205

Thr Asn Leu Leu Arg Leu Val Asp Phe Tyr Val Met Pro Val Val Asn
 210 215 220

Val Asp Gly Tyr Asp Tyr Ser Trp Lys Lys Asn Arg Met Trp Arg Lys
 225 230 235 240

Asn Arg Ser Phe Tyr Ala Asn Asn His Cys Ile Gly Thr Asp Leu Asn
 245 250 255

Arg Asn Phe Ala Ser Lys His Trp Cys Glu Glu Gly Ala Ser Ser Ser
 260 265 270

Ser Cys Ser Glu Thr Tyr Cys Gly Leu Tyr Pro Glu Ser Glu Pro Glu
 275 280 285

Val Lys Ala Val Ala Ser Phe Leu Arg Arg Asn Ile Asn Gln Ile Lys
 290 295 300

Ala Tyr Ile Ser Met His Ser Tyr Ser Gln His Ile Val Phe Pro Tyr
 305 310 315 320

Ser Tyr Thr Arg Ser Lys Ser Lys Asp His Glu Glu Leu Ser Leu Val
 325 330 335

Ala Ser Glu Ala Val Arg Ala Ile Glu Lys Thr Ser Lys Asn Thr Arg
 340 345 350

Tyr Thr His Gly His Gly Ser Glu Thr Leu Tyr Leu Ala Pro Gly Gly
 355 360 365

Gly Asp Asp Trp Ile Tyr Asp Leu Gly Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Ile
 370 375 380

Glu Leu Arg Asp Thr Gly Thr Tyr Gly Phe Leu Leu Pro Glu Arg Tyr
 385 390 395 400

Ile Lys Pro Thr Cys Arg Glu Ala Phe Ala Ala Val Ser Lys Ile Ala
 405 410 415

Trp His Val Ile Arg Asn Val
 420

<210> 2

<211> 1723

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gttgtacaga aaattgctgt tgggatgaag ctttcagcc ttgcagtcct tgtaccatt 60
 gttctcttct gtgagcagca tgtcttcgcg tttcagagt gccaagttct agctgctctt 120
 cctagaacct ctaggcaagt tcaagttcta cagaatetta ctacaacata tgagattggt 180
 ctctggcagc cggtaacagc tgaccttatt gtgaagaaaa aacaagtcca ttttttggta 240
 aatgcatctg atgtcgacaa tgtgaaagcc catttaaag tgagcggaat tccatgcagt 300
 gtcttgcctg cagacgtgga agatcttatt caacagcaga tttccaacga cacagtcagc 360
 ccccgagcct ccgcatcgta ctatgaacag tctactcac taaatgaaat ctattcttgg 420
 atagaattta taactgagag gcatcctgat atgcttaca aatccacat tggatcctca 480
 tttgagaagt acccactcta tgttttaaag gtttctggaa aagaacaaac agccaaaaat 540
 gccatatgga ttgactgtgg aatccatgcc agagaatgga tctctctgc tttctgcttg 600
 tggttcatag gccatataac tcaattctat gggataatag ggcaatatac caatctctg 660
 aggettgtgg atttctatgt tatgccggtg gttaatgtgg acggttatga ctactcatgg 720
 aaaaagaatc gaatgtggag aaagaaccgt tctttctatg cgaacaatca ttgcatcgga 780
 acagacctga ataggaactt tgettccaaa cactggtgtg aggaaggtgc atccagttcc 840

| | |
|--|------|
| tcattgctcgg aaacctactg tggactttat cctgagtcag aaccagaagt gaaggcagtg | 900 |
| gctagtttct tgagaagaaa tatcaaccag attaaagcat acatcagcat gcattcatac | 960 |
| tcccagcata tagtgtttcc atattcctat acacgaagta aaagcaaaga ccatgaggaa | 1020 |
| ctgtctctag tagccagtga agcagttcgt gctattgaga aaactagtaa aaataccagg | 1080 |
| tatacacatg gccatggctc agaaacctta tacctagctc ctggaggtgg ggacgattgg | 1140 |
| atctatgatt tgggcatcaa atattcgttt acaattgaac ttcgagatac gggcacatac | 1200 |
| ggattcttgc tgccggagcg ttacatcaaa cccacctgta gagaagcttt tgccgctgctc | 1260 |
| tctaaaatag cttggcatgt cattaggaat gtttaatgcc cctgatttta tcattctgct | 1320 |
| tccgtatfff aatttactga ttecagcaag accaaatcat tgtatcagat tatttttaag | 1380 |
| ttttatcctg agttttgata aaagatfff cttattccttg gttctgtcag agaacctaat | 1440 |
| aagtgtact ttgccattaa ggcagactag ggttcatgctc tttttaccct ttaaaaaaaaa | 1500 |
| ttgtaaaagt ctagttacct actttttctt tgattttcga cgtttgacta gccatctcaa | 1560 |
| gcaactttcg acgtttgact agccatctca agcaagttta atcaaagatc atctcacgct | 1620 |
| gatcattgga tctactcaa caaaaggaag ggtggtcaga agtacattaa agatttctgc | 1680 |
| tccaaatfff caataaatfff ctgcttgtgc ctttagaaat aca | 1723 |

Claims

1. A method for identifying a risk for a thrombogenic disorder, wherein the method comprises determining in a sample the presence of an amino acid exchange from threonine to isoleucine at position 347 of the Thrombin-Activable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) with the amino acid sequence according to SEQ ID NO: 1 (TAFI-Ile347).
2. The method according to claim 1, wherein the risk for a thrombogenic disorder includes the risk for an atrial fibrillation, stroke, prolonged intermitted neurological deficit (PRIND), transitory ischemic attack (TIA), atherosclerotic cerebrovascular disease (CVD) and/or coronary heart disease.
3. The method according to claim 1 or 2, wherein the sample is from a diabetic.
4. The method according to at least one of the claims 1-3, wherein the amino acid exchange is determined in the TAFI protein.
5. The method according to claim 4, wherein the amino acid exchange is determined by amino acid sequencing or by means of a binding protein or a binding peptide or an aptamer, specifically directed against the TAFI-Ile347.
6. The method according to claim 5, wherein the binding protein or binding peptide is an antibody, an antigen-binding part of an antibody and/or a protein-scaffold, preferably an anticalin.
7. The method according to at least one of the claims 1-3, wherein the amino acid exchange is determined in the TAFI gene, preferably on both alleles of the TAFI gene.

8. The method according to claim 7, wherein the determination in the TAFI gene is carried out by nucleic acid sequencing or by means of an antibody, an antigen-binding part of an antibody or a protein-scaffold, preferably an anticalin, and/or a complementary nucleic acid, specifically directed against the mutation in the TAFI gene.
9. A method for selecting patients with a risk for a thrombogenic disorder, wherein the method comprises determining in a sample the presence of an amino acid exchange from threonine to isoleucine at position 347 of the Thrombin-Activable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) with the amino acid sequence according to SEQ ID NO: 1.
10. The method according to claim 9, wherein the risk for a thrombogenic disorder includes the risk for an atrial fibrillation, stroke, prolonged intermitted neurological deficit (PRIND), transitory ischemic attack (TIA), atherosclerotic cerebrovascular disease (CVD) and/or coronary heart disease.
11. The method according to claim 9 or 10, wherein the sample is from a diabetic.
12. The method according to at least one of the claims 9-11, wherein the amino acid exchange is determined in the TAFI protein.
13. The method according to claim 12, wherein the amino acid exchange is determined by means of a binding protein or a binding peptide or aptamer, specifically directed against the TAFI-Ile347.
14. The method according to claim 13, wherein the binding protein or binding peptide is an antibody, an antigen-binding part of an antibody and/or a protein-scaffold, preferably an anticalin.
15. The method according to at least one of the claims 9-11, wherein the amino acid exchange is determined in the TAFI gene, preferably on both alleles of the TAFI gene.

16. The method according to claim 15, wherein the determination in the TAFI gene is carried out by means of an antibody, an antigen-binding part of an antibody or a protein-scaffold, preferably an anticalin, and/or a complementary nucleic acid, specifically directed against the mutation in the TAFI gene.
17. A method for identifying a pharmaceutical, preferably an inhibitor of TAFI-Ile347, for the therapy and/or prophylaxis of a thrombogenic disorder, wherein the method comprises the steps of:
 - (a) providing TAFI-Ile347 or the TAFI-Ile347 gene,
 - (b) providing a test compound, and
 - (c) measuring or detecting the influence of the test compound on TAFI-Ile347 or the TAFI-Ile347 gene.
18. The method according to claim 17, wherein the test compound is provided in the form of a chemical compound library.
19. The method according to claim 17 or 18, wherein the influence of the test compound on TAFI-Ile347 or the TAFI-Ile347 gene is measured or detected in a heterogeneous or homogeneous assay.
20. The method according to claim 19, wherein the heterogeneous assay is an ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay), a DELFIA (dissociation enhanced lanthanide fluoro immuno assay), or an SPA (scintillation proximity assay).
21. The method according to claim 19, wherein the homogeneous assay is a TR-FRET (time-resolved fluorescence resonance energy transfer) assay, a FP (fluorescence polarisation) assay, an ALPHA (amplified luminescent proximity homogenous assay), an EFC (enzyme fragment complementation) assay or a gene assay.

22. The method according to at least one of the claims 17 to 21, wherein the method is carried out on an array.
23. The method according to at least one of the claims 17 to 22, wherein the method is carried out in a robotics system.
24. The method according to at least one of the claims 17 to 23, wherein the method is carried out using microfluidics.
25. The method according to at least one of the claims 17 to 24, wherein the method is a method of high-through put screening.
26. A method for producing a medicament for the preventive and/or therapeutic treatment of a thrombogenic disorder, wherein the method comprises the steps of:
 - (a) identifying a pharmaceutical for the therapy and/or prophylaxis of a thrombogenic disorder according to the method according to at least one of the claims 17 to 25,
 - (b) providing an adequate amount of the pharmaceutical identified according to step (a), and
 - (c) formulating the pharmaceutical provided with one or more pharmaceutically acceptable carriers or auxiliary substances.
27. The method according to claim 26, wherein the thrombogenic disorder includes an atrial fibrillation, stroke, prolonged intermitted neurological deficit (PRIND), transitory ischemic attack (TIA) and/or atherosclerotic cerebrovascular disease (CVD).
28. A use of the TAFI-Ile347 or the TAFI-Ile347 gene for the manufacturing of a diagnostic for the identification of a thrombogenic disease.

29. The use according to claim 28, wherein the thrombogenic disorder includes the risk for an atrial fibrillation, stroke, prolonged intermitted neurological deficit (PRIND), transitory ischemic attack (TIA), atherosclerotic cerebrovascular disease (CVD) and/or coronary heart disease.
30. The use according to claim 28 or 29 for the identification of a thrombogenic disease in a diabetic.
31. A method for adapting the dosage of a medicament for the preventive and/or therapeutic treatment of a thrombogenic disorder, wherein the method comprises
 - (a) determining in a sample the presence of an amino acid exchange from threonine to isoleucine at position 347 of the Thrombin-Activable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) with the amino acid sequence according to SEQ ID NO: 1 (TAFI-Ile347), and
 - (b) adapting the dosage of the medicament according to the result of step (a).
32. The method according to claim 31, wherein the thrombogenic disorder includes an atrial fibrillation, stroke, prolonged intermitted neurological deficit (PRIND), transitory ischemic attack (TIA), atherosclerotic cerebrovascular disease (CVD) and/or coronary heart disease.
33. The method according to claim 31 or 32, wherein the sample is from a diabetic.

Abstract

The present invention is directed to a method identifying a risk for a thrombogenic disorder including, without limitation, atrial fibrillation, stroke, prolonged intermitted neurological deficit (PRIND), transitory ischemic attack (TIA), atherosclerotic cerebrovascular disease (CVD) and/or coronary heart disease, as well as to a method for selecting patients with a risk for a thrombogenic disorder, to a method for identifying a pharmaceutical for the therapy or prophylaxis of a thrombogenic disorder as well as to a method for producing a medicament and a diagnostic by employing the TAFI-Ile347 polymorphism.

Figure 1

1 MKLCSLAVLVPIVLFCEQHVFAFQSGQVLA
 31 ALPRTSRQVQLQNLTTTYEIVLWQPVTAD
 61 LIVKKKQVHFFVNASDVDNVKAHLNVSGIP
 91 CSVLLADVEDLIQQQISNOTVSPRASASY
 121 EQYHSLNEIYSWIEFITERHPDMLTKIHIG
 151 SSFEKYPLYVLKVSQKEQTAKNAIWIIDCGI
 181 HAREWISPAFLWFIGHITQFYGIIGQYTN
 211 LLRLVDFYVMPVNVVDGYDYSWKKNRMRWRK
 241 NRSFYANNHCIGTDLNRNFASKHWCEEGAS
 271 SSSCSETYCYLYPESEPEVKAVASFLRRNI
 301 NQIKAYISMHSYSQHIVFPYSYTRSKSKDH
 331 EELSLVASEAVRAIEKTSKNTRYTHGHGSE
 361 TLYLAPGGGDDWIYDLGIKYSFTIELRDTG
 391 TYGFLLPERYIKPTCREAFAAVSKIAWHVI
 421 RNV

Figure 2

1 GTTGTACAGA AAATTGCTGT TGGGATGAAG CTTTGCAGCC TTGCAGTCTT TGTACCCATT
 61 GTTCTCTTCT GTGAGCAGCA TGTCTTCGCG TTTCAGAGTG GCCAAGTTCT AGCTGCTCTT
 121 CCTAGAACCT CTAGGCAAGT TCAAGTCTTA CAGAATCTTA CTACAACATA TGAGATTGTT
 181 CTCTGGCAGC CGGTAACAGC TGACCTTATT GTGAAGAAA AACAAGTCCA TTTTTTTGTA
 241 AATGCATCTG ATGTGACAAA TGTGAAAGCC CATTAAATG TGAGCGGAAT TCCATGCAGT
 301 GTCTTGCTGG CAGACGTGGA AGATCTTATT CAACAGCAGA TTTCCAACGA CACAGTCAGC
 361 CCCCAGCCT CGGCATCGTA CTATGAACAG TATCACTCAC TAAATGAAAT CTATTCTTGG
 421 ATAGAATTTA TAACCTGAGG GCATCCTGAT ATGCTTAGAA AATCCACAT TGGATCCTCA
 481 TTTGAGAAGT ACCCACTCTA TTTTTTAAAG GTTCTGGAA AAGAACAAAC AGCCAAAAAT
 541 GCCATATGGA TTGACTGTGG AATCCAIGCC AGAAGATGGA TCCTCTCTGC TTTCTGCTTG
 601 TGGTTCATAG GCCATAAAC TCAATCTAT GGGATAATAG GGCAATATAC CAATCTCTG
 661 AGGCTTGTGG ATTTCTATGT TATGCCGGTG GTTAATGTGG ACGGTTATGA CTAATCATGG
 721 AAAAAGAATC GAATGTGGAG AAAGAACCCT TCTTCTATG CGAACAAATCA TTGCATCGGA
 781 ACAGACCTGA ATAGGAACCT TGCTTCCAAA CACTGGTGTG AGGAAGGTGC ATCCAGTTCC
 841 TCATGCTCGG AAACCTACTG TGGACTTTAT CCTGAGTCAG AACCAGAAGT GAAGGCAGTG
 901 GCTAGTTTCT TGAGAAGAAA TATCAACCAG ATTAAGCAT ACATCAGCAT GCATTCATAC
 961 TCCCAGCATA TAGTGTTTCC ATATCTCTAT ACACGAAGTA AAAGCAAGA CCATGAGGAA
 1021 CTGCTCTAG TAGCCAGTGA AGCAGTTCTG GCTATTGAGA ARACTAGTAA AAATACCAGG
 1081 TATACACATG GCCATGGCTC AGAAACCTTA TACCTAGCTC CTGGAGGTGG GGACGATTGG
 1141 ATCTATGATT TGGGCATCAA ATATTCGTTT ACAATTGAAC TTCGAGATAC GGGCACATAC
 1201 GGATTCCTGC TGCCGGAGCG TTACATCAA CCCACCTGTA GAGAACCTTT TGCCGCTGTC
 1261 TCTAAAATAG CTGGCAGTGT CATTAGGAAT GTTTAATGCC CCTGATTTA TCATCTGCT
 1321 TCCGATTTT AATTTACTGA TTCCAGCAAG ACCAAATCAT TGTATCAGAT TATTTTTAAG
 1381 TTTTATCCGT AGTTTIGATA AAAGATTTTC CTATTCCTTG GTTCTGTCAG AGAACCTAAT
 1441 AAGTGCTACT TTGCCATTAA GGCAGACTAG GGTTCATGTC TTTTACCCT TTAACAAAAA
 1501 TTGTAAGAGT CTAGTTACCT ACTTTTTCTT TGATTTTCGA CGTTTGACTA GCCATCTCAA
 1561 GCAACTTTCG ACGTTTACT AGCCATCTCA AGCAAGTTTA ATCAAAGATC ATCTCAGCT
 1621 GATCATTGGA TCCTACTCAA CAAAAGGAAG GGTGGTCAGA AGTACATTAA AGATTTCTGC
 1681 TCCAAATTTT CAATAAATTT CTGCTTGTGC CTTTGAAGAT ACA

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | tafi-ile347多态性鉴定血栓形成疾病风险的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2005287503A | 公开(公告)日 | 2005-10-20 |
| 申请号 | JP2005034114 | 申请日 | 2005-02-10 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 安万特制药德国疗伤植物GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tzungu | | |
| 申请(专利权)人(译) | 安万特制药Doichiyuranto-GESELLSCHAFT米特Beshurenkuteru-有限公司 | | |
| [标]发明人 | デトレフコツイアン シュテファンシェーファー ベルンヴァルトシェールケンス カールエルンストジークラー ジャンフランソワデレーズ シールヴェンリカール サンドランマセ | | |
| 发明人 | デトレフ・コツイアン シュテファン・シェーファー ベルンヴァルト・シェールケンス カール-エルンスト-ジークラー ジャン-フランソワ-デレーズ シールヴェン・リカール サンドラン・マセ | | |
| IPC分类号 | G01N33/50 A61K45/00 A61P7/02 A61P9/00 A61P9/10 A61P25/00 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 | | |
| FI分类号 | C12Q1/68.ZNA.Z A61K45/00 A61P7/02 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P25/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N15/00.A C12Q1/68.ZZN.A | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA24 4C084/MA28 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA52 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA66 4C084/MA67 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA362 4C084/ZA402 4C084/ZA452 4C084/ZC352 | | |
| 优先权 | 60/558471 2004-04-01 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

需要解决的问题：识别血栓形成障碍，短暂性脑缺血发作（TIA），动脉粥样硬化性脑血管疾病（CVD）和/或冠心病的风险，并治疗血栓形成障碍 可替代地，提供了一种用于识别预防药物等的方法。鉴定血栓形成疾病的风险，包括确定具有氨基酸序列（TAFI-Ile347）的凝血酶激活的纤维蛋白溶解抑制剂（TAFI）的苏氨酸被异亮氨酸氨基酸取代的存在。办法 [选择图]无

| | | TAFI 347 変異体 | | | | N 総数 |
|-----|----|--------------|-------|-------|-------|------|
| | | II | | TT/TI | | |
| | | N | % | N | % | |
| 卒中 | 有り | 5 | 7,35 | 19 | 3,35 | 24 |
| | 無し | 63 | 92,25 | 549 | 96,65 | 612 |
| TIA | 有り | 3 | 4,41 | 4 | 0,7 | 7 |
| | 無し | 65 | 95,59 | 564 | 99,3 | 629 |