

(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2006-523191
(P2006-523191A)

(43) 公表日 平成18年10月12日(2006.10.12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 14/47 (2006.01)	CO7K 14/47	2GO41
GO1N 33/68 (2006.01)	GO1N 33/68 ZNA	2GO45
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	4HO45
GO1N 27/62 (2006.01)	GO1N 27/62 V	
CO7K 16/18 (2006.01)	CO7K 16/18	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 148 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-505052 (P2006-505052)	(71) 出願人	504289071 ジェノバ・リミテッド GENOVA LTD. 英国領パーミュダ、エイチエム12、ハ ミルトン、ピクトリア・ストリート22番 、キャノンズ・コート
(86) (22) 出願日	平成16年4月7日(2004.4.7)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稜
(85) 翻訳文提出日	平成17年10月7日(2005.10.7)	(74) 代理人	100067035 弁理士 岩崎 光隆
(86) 国際出願番号	PCT/EP2004/003737	(74) 代理人	100064610 弁理士 中嶋 正二
(87) 国際公開番号	W02004/090551		
(87) 国際公開日	平成16年10月21日(2004.10.21)		
(31) 優先権主張番号	60/461, 558		
(32) 優先日	平成15年4月8日(2003.4.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/461, 623		
(32) 優先日	平成15年4月8日(2003.4.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/471, 479		
(32) 優先日	平成15年5月16日(2003.5.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心臓血管障害に関連する分泌ポリペプチド種

(57) 【要約】

本発明は心臓血管障害を有する患者の血漿において高レベルで循環するヒト分泌ポリペプチドを開示する。本発明はまた診断、予後診断および薬物開発のためのポリペプチド、これらをコードするポリヌクレオチド、およびこれらのポリペプチドに特異的な抗体をも提供する。

SEQ ID NO:1
1 APGPRGIILN LENGELCMNS AQCKSNCCQH SSALGLARCT SMASENSECS VKTLYGIYYK
61 CPCBRGLTCE GDKTIVGSIT NTNFGICHDA GRSKQ

SEQ ID NO:2
1 GIIINLENGE LCMNSAQCKE NCCQHSALG LARCTSMASE NSECSVKTLY GIYYKPCER
61 GLTCEGDKTIL VGSITNTNFG ICHDAGRSKQ

SEQ ID NO:3
1 SNCCQHSAL GLAR

SEQ ID NO:4
1 CTSMASENSE CSVK

SEQ ID NO:5
1 TIVGSITNTN FGICHDAGR

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a)

i) 配列番号 : 1 - 2、6 - 7、11 - 12、15 - 17、および 24 - 25 からなる群の 1 個から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド ;

ii) 配列番号 : 1、2、11、12、15、16 または 17 で示されるアミノ酸配列に相対して、1 個またはそれより多いアミノ酸置換、欠失、または挿入を有する少なくとも 75 % の配列同一性を有する変異体 ;

iii) 配列番号 : 6 または 7 で示されるアミノ酸配列に相対して、1 個またはそれより多いアミノ酸置換、欠失、または挿入を有する少なくとも 85 % の配列同一性を有する変異体 ;

iv) 配列番号 : 24 または 25 で示されるアミノ酸配列に相対して、1 個またはそれより多いアミノ酸置換、欠失、または挿入を有する少なくとも 95 % の配列同一性を有する変異体 ; および

v) 最低で 10 アミノ酸長である前記の i)、ii)、iii)、または iv) で定義されるポリペプチドのフラグメント ;

から選択されるポリペプチドのレベルを対象からの生物学的試料において検出および / または定量すること ;

(b) 該レベルを対照試料のレベルと比較すること ;

の工程を含み、ここで、対照のレベルに相対する該レベルの上昇が心臓血管障害を示すものである、対象における心臓血管障害のスクリーニングおよび / または診断の方法。

【請求項 2】

(a)

i) 配列番号 : 1 - 2、6 - 7、11 - 12、15 - 17、および 24 - 25 からなる群の 1 個から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド ;

ii) 配列番号 : 1、2、11、12、15、16 または 17 で示されるアミノ酸配列に相対して、1 個またはそれより多いアミノ酸置換、欠失、または挿入を有する少なくとも 75 % の配列同一性を有する変異体 ;

iii) 配列番号 : 6 または 7 で示されるアミノ酸配列に相対して、1 個またはそれより多いアミノ酸置換、欠失、または挿入を有する少なくとも 85 % の配列同一性を有する変異体 ;

iv) 配列番号 : 24 または 25 で示されるアミノ酸配列に相対して、1 個またはそれより多いアミノ酸置換、欠失、または挿入を有する少なくとも 95 % の配列同一性を有する変異体 ; および

v) 最低で 10 アミノ酸長である前記の i)、ii)、iii)、または iv) で定義されるポリペプチドのフラグメント ;

から選択されるポリペプチドのレベルを対象からの生物学的試料において検出および / または定量すること ;

(b) 該レベルを対照試料のレベルと比較すること ;

の工程を含み、ここで、対照のレベルに相対する該レベルの上昇が心臓血管障害を進行させる危険性を示すものである、対象における心臓血管障害を予測する方法。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 の 2 個またはそれより多いポリペプチドのレベルを該対象からの生物学的試料において検出および / または定量する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

該心臓血管障害が冠動脈疾患 (CAD) である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

生物学的試料が血漿である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

該ポリペプチドが質量分析により検出および/または定量される、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

該ポリペプチドが酵素結合免疫吸着アッセイにより検出および/または定量される、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

該ポリペプチドが異種性ポリペプチド配列に融合されている配列番号：1 - 5、6 - 10、11 - 14、15 - 23、および 24 - 28 からなる群の 1 個から選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 9】

配列番号：1 - 5、6 - 10、11 - 14、15 - 23、および 24 - 28 からなる群の 1 個から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに選択的に結合する、抗心臓血管障害血漿ポリペプチド (CPP) 抗体。

【請求項 10】

i) 抗体結合を可能にする条件下で請求項 8 に記載の抗体を生物学的試料と接触させること；および

ii) ；夾雑物を除去すること；

の工程を含む、心臓血管障害血漿ポリペプチド (CPP) に抗体を結合させる方法。

【請求項 11】

該抗体が標識基に結合している、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

該試料がヒト血漿である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

i) 少なくとも 1 個の CPP 生物学的活性を許容する試料条件下で配列番号：1 - 5、6 - 10、11 - 14、15 - 23、および 24 - 28 からなる群の 1 個から選択されるアミノ酸配列を含む CPP に被験化合物を接触させること；

ii) CPP の少なくとも 1 個の該生物学的活性のレベルを決定すること；

iii) 該レベルを該被験化合物を欠く対照試料のレベルと比較すること；ならびに

iv) 心臓血管障害の予防および/または治療的処置のための CPP モジュレーターとしてさらに試験するために該レベルに変化を引き起こす被験化合物を選択すること；

の工程を含む、心臓血管障害血漿ポリペプチド (CPP) モジュレーターを同定する方法。

【請求項 14】

(a) 心臓血管障害に罹患する素因があるかまたは罹患しているヒト以外の被験動物に候補薬剤を投与すること；

(b) 心臓血管障害に罹患する素因がないかまたは罹患していないヒト以外の適合する対照の被験動物に (a) の候補薬剤を投与すること；

(c) (a) のヒト以外の被験動物または (b) の対照動物から得られた生物学的試料において：

i) 配列番号：1 - 2、6 - 7、11 - 12、15 - 17、および 24 - 25 からなる群の 1 個から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

ii) 配列番号：1、2、11、12、15、16 または 17 で示されるアミノ酸配列に相対して、1 個またはそれより多いアミノ酸置換、欠失、または挿入を有する少なくとも 75% の配列同一性を有する変異体；

iii) 配列番号：6 または 7 で示されるアミノ酸配列に相対して、1 個またはそれより多いアミノ酸置換、欠失、または挿入を有する少なくとも 85% の配列同一性を有する変異体；

iv) 配列番号：24 または 25 で示されるアミノ酸配列に相対して、1 個またはそれより多いアミノ酸置換、欠失、または挿入を有する少なくとも 95% の配列同一性を有する変異体；および

10

20

30

40

50

v) 最低で10アミノ酸長である前記のi)、ii)、iii)、またはiv)で定義されるポリペプチドのフラグメント；
から選択される少なくとも1個のポリペプチドのレベルを検出および/または同定すること；ならびに

(d) 工程(c)の少なくとも1個のポリペプチドのレベルを比較すること；
の工程を含み、ここで、少なくとも1個のポリペプチドのレベルの変化が、候補薬剤が心臓血管障害のモジュレーターであることを示すものである、心臓血管障害のモジュレーターを同定する方法。

【請求項15】

心臓血管障害に罹患する素因があるかまたは罹患しているヒト以外の被験動物が：

10

i) 配列番号：1 - 2、6 - 7、11 - 12、15 - 17、および24 - 25からなる群の1個から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

ii) 配列番号：1、2、11、12、15、16または17で示されるアミノ酸配列に相対して、1個またはそれより多いアミノ酸置換、欠失、または挿入を有する少なくとも75%の配列同一性を有する変異体；

iii) 配列番号：6または7で示されるアミノ酸配列に相対して、1個またはそれより多いアミノ酸置換、欠失、または挿入を有する少なくとも85%の配列同一性を有する変異体；

iv) 配列番号：24または25で示されるアミノ酸配列に相対して、1個またはそれより多いアミノ酸置換、欠失、または挿入を有する少なくとも95%の配列同一性を有する変異体；および

20

v) 最低で10アミノ酸長である前記のi)、ii)、iii)、またはiv)で定義されるポリペプチドのフラグメント；
から選択される少なくとも1個のポリペプチドの血漿レベルの上昇を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

(a) 薬剤の投与前に対象から投与前生物学的試料を入手すること；

(b) 該対象からの生物学的試料において：

i) 配列番号：1 - 2、6 - 7、11 - 12、15 - 17、および24 - 25からなる群の1個から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

30

ii) 配列番号：1、2、11、12、15、16または17で示されるアミノ酸配列に相対して、1個またはそれより多いアミノ酸置換、欠失、または挿入を有する少なくとも75%の配列同一性を有する変異体；

iii) 配列番号：6または7で示されるアミノ酸配列に相対して、1個またはそれより多いアミノ酸置換、欠失、または挿入を有する少なくとも85%の配列同一性を有する変異体；

iv) 配列番号：24または25で示されるアミノ酸配列に相対して、1個またはそれより多いアミノ酸置換、欠失、または挿入を有する少なくとも95%の配列同一性を有する変異体；および

v) 最低で10アミノ酸長である前記のi)、ii)、iii)、またはiv)で定義されるポリペプチドのフラグメント；
から選択される少なくとも1個のポリペプチドのレベルを検出および/または定量すること；

40

(c) 対象から1個またはそれより多い投与後生物学的試料を入手すること；

(d) 投与後の試料または複数の試料中の少なくとも1個のポリペプチドのレベルを検出すること；

(e) 投与前試料中の少なくとも1個のポリペプチドのレベルを投与後試料中の少なくとも1個のポリペプチドのレベルと比較すること；ならびに

(f) それに応じて薬剤の投与を調整すること；

を含む、心臓血管障害を有するかまたはそれを進行させる危険性を有する対象の薬物によ

50

る処置の有効性をモニタリングするための方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は心臓血管障害を有する個体において優先的に分泌されるポリペプチド種、かかるポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド、その多型変異体、ならびに心臓血管障害診断および薬物開発のための、検出アッセイにおける該核酸およびポリペプチドまたはその組成物の使用に関する。

【0002】

発明の背景

心臓血管障害は工業国で重大な健康リスクである。冠動脈疾患(CAD)はアテローム性動脈硬化症または動脈の硬化を特徴とする。アテローム性動脈硬化症は最も一般的な心臓血管疾患であり、心臓発作、卒中および四肢の壊疽の主要な原因であり、そしてそれにより米国の主要な死因である。アテローム性動脈硬化症は多くの細胞型および分子因子(例えばRoss, Nature 362: 801-809 (1993)に記載)が関与する複合疾患である。正常な環境では、動脈壁の内皮細胞および平滑筋細胞(SMC)への損傷に対する保護応答は炎症が先行し、かつ、伴う、線維脂肪および線維病変またはプラークの形成からなる。アテローム性動脈硬化症の病変の進行は関係する動脈を閉塞させ、そして多様な形態の損傷に対する過剰な炎症-線維増殖応答の結果であり得る。血管内皮細胞の傷害または機能不全は、個体にアテローム性心臓血管疾患の加速度的進展を生じやすくする多くの状態の一般的な特徴である。

10

20

【0003】

アテローム斑は関係する血管を閉塞し、そして血流を制限し、結果的に虚血を生じる。虚血は不十分な灌流のために、器官の組織における酸素供給の欠如を特徴とする状態である。かかる不十分な灌流はアテローム性または再狭窄性病変、貧血または卒中を含む多くの自然の原因を有し得る。心臓における虚血の最も一般的な原因は心外膜冠動脈のアテローム性動脈硬化症である。これらの血管の内腔の縮小により、アテローム性動脈硬化症は基底状態の心筋灌流の絶対的低下を引き起こすか、または流れに対する要求が高まったときに、適切な灌流の増加を制限する。冠動脈血液流はまた動脈血栓、痙攣、および、稀であるが、冠動脈血栓により、ならびに梅毒性大動脈炎による入口部狭窄によっても制限され得る。肺動脈からの左冠動脈前下行枝異常起始のような先天性異常は幼児の心筋虚血および梗塞を引き起こし得るが、この原因は成人では非常に稀である。

30

【0004】

心筋虚血はまた、高血圧症または大動脈弁狭窄症による重篤な心室性肥大に見られるように、心筋酸素要求が異常に高まった場合にも生じ得る。後者は冠動脈アテローム性動脈硬化症により引き起こされるものと区別できない狭心症を示し得る。極端に重篤な貧血またはカルボキシヘモグロビンの存在下で見られるように、血液の酸素担持能力の低下は稀に心筋虚血の原因になる。往々にして、左心室肥大および冠動脈アテローム性動脈硬化症に続く酸素供給の低下のための酸素要求の増大のような2つまたはそれ以上の虚血の原因が共存する。

40

【0005】

多数の臨床試験により心臓血管障害のリスクを高める因子が同定されている。年齢、性別、および家族病歴のようなこれらの危険因子のいくつかは変えることはできない。その他の危険因子には以下のものが挙げられる：喫煙、高血圧、高脂肪および高コレステロール食、糖尿病、運動不測、肥満、およびストレス。

【0006】

幸いにも、多くの関与する因子はライフスタイルの変化を通して制御可能である。喫煙者の心臓血管障害のリスクは非喫煙者のリスクの2倍以上である。ヒトが喫煙を止めると、過去に彼または彼女がどのくらい喫煙していたかに関わらず、障害を進展させるリスク

50

は低下する。血清コレステロールレベルは心臓血管障害の有病率に直接関係し、そして高血圧症または高血圧は重要な危険因子である。身体的活動は種々のメカニズムを通して心臓血管障害を進展させるリスクを低下させると主張されている：これは心筋酸素供給を増加させ、酸素要求を低下させ、そして心筋収縮およびその電気刺激安定性を改善する。酸素要求の低下および心筋運動は安静時の心拍数および血圧の低下に反映される。身体的活動はまた冠動脈の直径および拡張能を増加させ、側副動脈形成を増加させ、そして冠動脈アテローム性動脈硬化症の進行速度を低下させる。肥満および血清脂肪酸は活動により低下する。

【0007】

安静時の心臓血管障害の顕著な症状はないかもしれないが、胸部圧迫感のような症状は活動またはストレスの増加と共に生じ得る。現れ得るその他の最初の徴候は胸焼け、悪心、嘔吐、痺れ感、息切れ、ひどい冷や汗、原因不明の疲労、および不安感である。心臓血管障害のさらに重篤な症状は胸痛（狭心症）、律動障害（不整脈）、卒中または心臓発作（心筋梗塞）である。卒中および心臓発作は各々脳および心臓組織の動脈遮断の結果である。症状は異なるので、選択される試験および処置は患者によって大きく異なり得る。

10

【0008】

心臓血管障害の程度および重篤度を決定するのに有用な診断試験には：心電図（EKG）、ストレス試験、核医学検査、冠動脈血管造影法、安静時EKG、EKG多相情報診断指標（EKG Multiphase Information Diagnosis Indexes）、ホルターモニター、遅延電位、EKGマッピング、心エコー図、タリウムスキャン、PET、MRI、CT、血管造影図およびIVUSが挙げられる。さらに別の危険因子測定および有用な診断学は一般的であり、そして医学の分野の当業者に最良に適用されている。疾患の重篤度に依存して多様な治療研究法がある。多くのヒトにとって心臓血管障害はライフスタイルの変化および薬物治療で管理される。さらに重篤な診断により外科手術の必要性が示される場合もある。

20

【0009】

虚血性アテローム性動脈硬化症の処置に対する外科的アプローチにはバイパス移植術、冠動脈血管形成術、レーザー血管形成術、アテローム切除術、動脈内膜切除術および経皮経管的血管形成術（PCTA）が挙げられる。これらのアプローチの後、閉塞が再発し、そしてしばしばさらに悪化する再狭窄による失敗率は異常に高い（30 - 50%）。再狭窄の多くはさらなる炎症、平滑筋蓄積および血栓によると思われる。心臓血管疾患に対するさらに別の治療研究法には、虚血性心臓および四肢疾患のような症状における血管形成を勧める処置が含まれる。

30

【0010】

ほとんどのCADおよび心臓血管障害の症状の非特異的特性は明確な診断を困難にしている。より定量的な診断方法は個体間および単一の個体における測定値間の双方の変動性に苦慮する。このように、診断用測定は標準化され、そして十分に実証され、そして広範な病歴の個体に適用されなければならない。さらに、現在の診断方法はしばしば所定の観察または測定値に関する根本的な原因を示さない。したがって、特定の陽性結果に基づく治療計画は原因となる問題に対処せず、そして個体に有害にさえなり得る。

40

【0011】

ヌクレオチド検出に依存する診断方法には遺伝学的アプローチおよび発現プロファイリングが挙げられる。例えば心臓血管障害に関与することが知られている遺伝子を、シーケンシング、ハイブリダイゼーション基盤の技術、またはPCRのような一般的な遺伝子型決定法を用いて変異に関してスクリーニングすることができる。別の事例ではRT-PCR、種々のハイブリダイゼーション基盤の技術、およびシーケンシングを含む標準的な技術により、既知の遺伝子からの発現を追跡することができる。これらの試験計画ではしばしば実施者がmRNAプロセッシングおよびスプライシング、翻訳率、mRNA安定性、ならびにタンパク質分解性プロセッシング、リン酸化、グリコシル化、およびアミド化のような翻訳後修飾における差異を検出することができない。

50

【0012】

心臓血管障害の分野の診断状況の現在の弱点に対処するために、本発明は対照血漿に比較して、冠動脈疾患を有する個体からの血漿において差次的に増加する特異的血漿ポリペプチドを提供する。実際のポリペプチド種を提供することにより、mRNAプロセッシングおよびスプライシング、翻訳率、mRNA安定性、ならびにタンパク質分解性プロセッシング、リン酸化、グリコシル化、およびアミド化のような翻訳後修飾における差異が示される。したがって本発明のポリペプチドは「心臓血管障害血漿ポリペプチド」または「CPP」と記載される。これらのポリペプチド配列は配列番号：1-2、6-7、11-12、15-17、および24-25として記載され、そしてこれらは配列番号：3-5、8-10、13-14、18-23、および26-28から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むものである（図1-5参照）。これらのポリペプチドはより正確には「心臓血管障害血漿ポリペプチド2、9、17、20および21」（CPP2は配列番号：1-15に相当、CPP9は配列番号：6-10に相当、CPP17は配列番号：15-23に相当、CPP20は配列番号：24-28に相当、およびCPP21は配列番号：11-14に相当）と称され、そして冠動脈疾患（CAD）を有する個体から得られた血漿において高レベルで存在するCPPのフラグメントおよび翻訳後修飾された種を含む。本発明の好ましいフラグメントは配列番号：3-5、8-10、13-14、18-23および26-28として記載されているものである。したがって、本発明のCPPは冠動脈疾患（CAD）、冠動脈心臓疾患（CHD）、末梢血管疾患、脳虚血（卒中）、うっ血性心不全、アテローム性動脈硬化症、高血圧症およびその他の心臓血管疾患のリスクを決定するための重要な診断手段を表す。CPPは分泌因子であり、そしてそれ自体容易に検出可能であり、そして薬物開発、診断、および心臓血管疾患の予防に有用である。

【0013】

発明の要旨

本発明は心臓血管障害を有する個体からの血漿において優先的に増加する分泌ポリペプチド種に関する組成物を指向する。これらのポリペプチド種を本明細書では「心臓血管障害血漿ポリペプチド」またはCPPと称する。かかる心臓血管障害血漿ポリペプチドは配列番号：1-5、6-10、11-14、15-23、および24-28からなる群の1つから選択されるアミノ酸配列を含み、そして各々CPP2、CPP9、CPP17、CPP20およびCPP21と称される。組成物はCPP前駆体、モノクローナル抗体を含むCPPに特異的な抗体、およびそれらから誘導されるその他の結合組成物を含む。さらにこれらの組成物を作成および使用方法が含まれる。本発明の前駆体は未修飾前駆体、配列番号：1-28のタンパク質分解前駆体、および配列番号：1-28のアミノ酸配列のまた別のタンパク質分解部位から得られた中間体を含む。

【0014】

本発明の好ましい態様はリン酸化、グリコシル化、アセチル化、アミド化またはC-、N-もしくはO-結合炭水化物基のような翻訳後修飾を有するCPPを含む。これに加えて分子内または分子間相互作用、例えば高次構造を生じるジスルフィドおよび水素結合を有するCPPが好ましい。差次的mRNAプロセッシングまたはスプライシングの結果であるCPPもまた好ましい。好ましくは、CPPは心臓血管障害を有する個体からの血漿中に存在する翻訳後修飾種、構造変異体、またはスプライス変異体を表す。

【0015】

別の態様では、本発明は配列番号：1-5および11-23からなる群の1つから選択される配列に少なくとも75%同一である配列を含むCPPを含む。好ましくは、本発明は配列番号：1-5および11-23から選択される配列のいずれか1つとの、少なくとも85%、そしてさらに好ましくは少なくとも90%、そしてなおさらに好ましくは少なくとも95%の同一性を含むポリペプチドを含む。最も好ましくは、本発明は配列番号：1-5および11-23からなる群の1つから選択される配列に対して少なくとも99%同一である配列を含むポリペプチドを含む。

【0016】

別の態様では、本発明は配列番号：6 - 10 からなる群から選択される配列に対して少なくとも85%同一である配列を含むC P Pを含む。好ましくは、本発明は配列番号：6 - 10 から選択される配列のいずれか1つとの、少なくとも90%、そしてさらに好ましくは少なくとも95%、そしてなおさらに好ましくは少なくとも97%の同一性を含むポリペプチドを含む。最も好ましくは、本発明は配列番号：6 - 10 からなる群から選択される配列に対して少なくとも99%同一である配列を含むポリペプチドを含む。

【0017】

別の態様では、本発明は配列番号：24 - 28 からなる群から選択される配列に対して少なくとも95%同一である配列を含むC P Pを含む。好ましくは、本発明は配列番号：24 - 28 から選択される配列のいずれか1つとの、少なくとも97%、そしてさらに好ましくは少なくとも98%、そしてなおさらに好ましくは少なくとも99%の同一性を含むポリペプチドを含む。最も好ましくは、本発明は配列番号：24 - 28 からなる群から選択される配列に対して少なくとも99%同一である配列を含むポリペプチドを含む。

10

【0018】

別の態様では、本発明は選択された集団において少なくとも2%の頻度を有するC P Pの天然の変異体を含む。さらに好ましくは、かかる天然の変異体は選択された集団において少なくとも5%、そしてなおさらに好ましくは、少なくとも10%の頻度を有する。最も好ましくは、かかる天然の変異体は選択された集団において少なくとも20%の頻度を有する。選択された集団は集団遺伝学の分野における任意の認められた研究集団でよい。好ましくは選択された集団は白色人種、黒色人種またはアジア人である。さらに好ましくは、選択された集団はフランス人、ドイツ人、イギリス人、スペイン人、スイス人、日本人、中国人、アイルランド人、韓国人、シンガポール人、アイスランド人、北米インディアン、イスラエル人、アラブ人、トルコ人、ギリシャ人、イタリア人、ポーランド人、太平洋諸島系人、フィンランド人、ノルウェー人、スウェーデン人、エストニア人、オーストリア人またはインド人である。さらに好ましくは、選択された集団はアイスランド人、サーミ人、フィンランド人、白色人種系のフランス人、スイス人、中国人系のシンガポール人、韓国人、日本人、ケベック人、北米ピマインディアン、ペンシルバニアアーミッシュおよびアーミッシュメノー派、ニューファンドランド人、またはポリネシア人である。

20

【0019】

本発明の好ましい態様は単離されたC P P、すなわちC P Pとは有意に異なる等電点、または有意に異なる見かけの分子量を有するタンパク質またはタンパク質アイソフォームを含有しないC P Pを含む組成物を提供する。親和性およびサイズ基盤の分離クロマトグラフィー、2次元ゲル分析、および質量分析によりC P Pの等電点および分子量を示すことができる。

30

【0020】

好ましい態様では、本発明は配列番号：3 - 5、8 - 10、13 - 14、18 - 23、および26 - 28 からなる群の1つから選択されるアミノ酸配列を含む特定のポリペプチド種を提供する。好ましくは、特定のポリペプチド種はさらに各々配列番号：1 - 2、6 - 7、11 - 12、15 - 17、および24 - 25からの近接するアミノ酸配列を含む。好ましい種はi) 配列番号：3 - 5、8 - 10、13 - 14、18 - 23、および26 - 28 からなる群の1つから選択されるアミノ酸配列を含む；ii) 心臓血管障害を有する個体からの血漿において高レベルで現れる；そしてiii) 場合によっては各々配列番号：1 - 2、6 - 7、11 - 12、15 - 17、および24 - 25のポリペプチドのタンパク質分解性プロセッシングの結果であるポリペプチドである。

40

【0021】

さらに別の態様では、本発明は配列番号：1 - 5、6 - 10、11 - 14、15 - 23、および24 - 28 からなる群の1つから選択される2つまたはそれ以上のポリペプチドの組合せを提供する。

【0022】

さらに別の態様では、本発明は修飾されたC P Pを含む。かかる修飾は保護/遮断基、

50

抗体分子またはその他の細胞リガンドに対する結合、ならびにタンパク質の検出および単離を可能にする酵素、蛍光、同位体または親和性標識のような検出可能な標識を含む。限定するものではないが、臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、NaBH₄、アセチル化、ホルミル化、酸化、還元、またはツニカマイシンの存在下での代謝的合成による特異的化学的切断を含む公知の技術により化学的修飾を実施することができる。

【0023】

ポリペプチド溶解性、安定性および循環時間の増大、または免疫原性の低下のようなさらに別の利点を提供し得る本発明のポリペプチドの化学的修飾誘導体もまた本発明により提供される（例えばポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコール共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコールのような水溶性ポリマー）。CPPは分子内の無作為な位置で、または分子内の予め決定された位置で修飾され、そして1、2、3またはそれ以上の結合した化学基を含むことができる。

10

【0024】

別の実施態様では、本発明はi) CPP生物学的活性の被験モジュレーターを表1(CPP2、CPP9、CPP17、CPP20およびCPP21)に列挙するアミノ酸配列からなる群の1つから選択されるアミノ酸を含むポリペプチドと接触させること；ii) 該CPP生物学的活性のレベルを検出すること；およびiii) 該CPP生物学的活性のレベルを、該被験モジュレーターを欠如する対照試料のレベルと比較すること：の工程を含む少なくとも1つのCPP生物学的活性のモジュレーターを同定する方法を提供する。CPPタンパク質生物学的活性のレベルにおける差異が減少である場合、被験モジュレーターは少なくとも1つのCPP生物学的活性の阻害剤である。CPP生物学的活性のレベルにおける差異が増加である場合、被験物質は少なくとも1つのCPP生物学的活性のアクチベーターである。CPP2に関して、試験したCPP生物学的活性はリパーゼ活性の増加/減少であるのが好ましい。

20

【0025】

本発明の別の態様は(a)候補薬剤を、心臓血管障害に罹患する素因があるかまたは罹患しているヒト以外の被験動物に投与すること；(b)(a)の候補薬剤を、心臓血管障害に罹患する素因がないかまたは罹患していないヒト以外の適合する対照動物に投与すること；(c)(a)にヒト以外の被験動物または(b)の対照動物から得られた生物学的試料において：(i)配列番号：1-2、6-7、11-12、15-17、および24-25からなる群の1つから選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；(ii)配列番号：1、2、11、12、15、16、または17に示されるアミノ酸配列に相対して1つまたはそれより多いアミノ酸置換、欠失または挿入を有する少なくとも75%配列同一性を有する変異体；(iii)配列番号：6、または7に示されるアミノ酸配列に相対して1つまたはそれより多いアミノ酸置換、欠失または挿入を有する少なくとも85%配列同一性を有する変異体；(iv)配列番号：24、または25に示されるアミノ酸配列に相対して1つまたはそれより多いアミノ酸置換、欠失または挿入を有する少なくとも95%配列同一性を有する変異体；および(v)最低で10アミノ酸長である前記のi)、ii)、iii)、またはiv)で定義されるポリペプチドのフラグメントから選択される少なくとも1つのポリペプチドのレベルを検出および/または同定すること；ならびに工程(d)工程(c)の少なくとも1つのポリペプチドのレベルを比較すること：の工程を含み、ここで、ポリペプチドのレベルの変化が候補薬剤が心臓血管障害のモジュレーターであることを示しているものである、心臓血管障害のモジュレーターを同定する方法に関する。本発明の好ましい実施態様は、心臓血管障害に罹患する素因があるかまたは罹患しているヒト以外の被験動物が、(i)配列番号：1-2、6-7、11-12、15-17、および24-25からなる群の1つから選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；(ii)配列番号：1、2、11、12、15、16、または17に示されるアミノ酸配列に相対して1つまたはそれより多いアミノ酸置換、欠失または挿入を有する少なくと

30

40

50

も75%配列同一性を有する変異体；(iii)配列番号：6、または7に示されるアミノ酸配列に相対して1つまたはそれより多いアミノ酸置換、欠失または挿入を有する少なくとも85%配列同一性を有する変異体；(iv)配列番号：24、または25に示されるアミノ酸配列に相対して1つまたはそれより多いアミノ酸置換、欠失または挿入を有する少なくとも95%配列同一性を有する変異体；および(v)最低で10アミノ酸長である前記の(i)、(ii)、(iii)、または(iv)で定義されるポリペプチドのフラグメント；から選択される少なくとも1つのポリペプチドの血漿レベルの上昇を含むことを提供する。

【0026】

本発明のさらに別の態様では、(a)薬剤の投与前に対象から投与前生物学的試料を入手すること；(b)該対象からの生物学的試料において：(i)配列番号：1-2、6-7、11-12、15-17、および24-25からなる群の1つから選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；(ii)配列番号：1、2、11、12、15、16、または17に示されるアミノ酸配列に相対して1つまたはそれより多いアミノ酸置換、欠失または挿入を有する少なくとも75%配列同一性を有する変異体；(iii)配列番号：6、または7に示されるアミノ酸配列に相対して1つまたはそれより多いアミノ酸置換、欠失または挿入を有する少なくとも85%配列同一性を有する変異体；(iv)配列番号：24、または25に示されるアミノ酸配列に相対して1つまたはそれより多いアミノ酸置換、欠失または挿入を有する少なくとも95%配列同一性を有する変異体；および(v)最低で10アミノ酸長である前記の(i)、(ii)、(iii)、または(iv)で定義されるポリペプチドのフラグメント；から選択される少なくとも1つのポリペプチドのレベルを検出および/または定量すること；および工程(c)対象から1つまたはそれより多い投与後生物学的試料を入手すること；(d)投与後試料または複数の試料において少なくとも1つのポリペプチドのレベルを検出すること；(e)投与前試料中の少なくとも1つのポリペプチドのレベルを投与後試料の少なくとも1つのポリペプチドのレベルと比較すること；ならびに(f)それに応じて薬剤の投与を調整すること：の工程を含む、心臓血管障害を進展させているかまたは進展させるリスクを有する対象の薬剤での処置の有効性をモニタリングするための方法が提供される。

【0027】

別の態様では、本発明は本発明のCPPをコードするポリヌクレオチド、配列番号：1-5、6-10、11-14、15-23、および24-28からなる群の1つから選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、診断および分析アッセイ(例えばPCR、ハイブリダイゼーション基盤の技術)のためのCPP遺伝子配列に相補的なオリゴヌクレオチド、ならびにCPPを発現するベクターを含む。

【0028】

別の態様では、本発明はCPPをコードするDNAを含むベクターを提供する。本発明はまたかかるベクターを含む宿主細胞およびヒト以外のトランスジェニック動物をも含む。CPPまたはCPP前駆体を作成する方法もまた提供される。1つの好ましい方法は(a)前記で開示した発現ベクターを含有する宿主細胞を提供すること；(b)それによりDNAセグメントが発現される条件下で宿主細胞を培養すること；および(c)DNAセグメントによりコードされるタンパク質を回収すること；の工程を含む。別の好ましい方法は：(a)CPPを発現することができる宿主細胞を提供すること；(b)該CPPの発現を可能にする条件下で該宿主細胞を培養すること；および(c)該CPPを回収すること；の工程を含む。1つの実施態様内で、発現ベクターはさらにDNAセグメントに作動可能なように連結された分泌シグナル配列を含み、細胞はタンパク質を培養培地に分泌し、そしてタンパク質は培地から回収される。CPPを作成する特に好ましい方法には、「CPP組成物の化学的製造」と題したセクションおよび実施例2において記載するような、標準的なペプチド合成技術を用いる化学的合成が含まれる。

【0029】

別の態様では、本発明は前記したいずれかのポリペプチド、ペプチドフラグメント、ま

たはペプチドに特異的な単離された抗体を含む。好ましくは、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。C P Pに排他的に結合する抗体、すなわちその他のポリペプチドを高い親和性で認識しない抗体がさらに好ましい。抗C P P抗体は精製、診断、および予後診断の適用を有する。精製および診断のために好ましい抗C P P抗体を標識基に結合させる。診断のために好ましいC P P関連障害には冠動脈疾患(C A D)、冠動脈心臓疾患(C H D)、末梢血管疾患、脳虚血(卒中)、うっ血性心不全、アテローム性動脈硬化症、高血圧症、およびその他の心臓血管疾患が挙げられる。診断方法には、限定するものではないが、C P P抗原に特異的な抗体または抗体誘導組成物を用いる方法が挙げられる。特定の組織試料および生物学的液体(好ましくは血漿)中のC P Pを検出するための、ならびに組織中のC P Pの発現レベルを検出するための診断方法もまた本発明の一部を成す。薬学的に許容される担体と一緒に、前記した1つまたはそれより多い抗体を含む組成物もまた、例えばインビボ診断および薬物スクリーニングアッセイに関する本発明の範囲内である。

10

【0030】

本発明はさらに体液の試料、好ましくは血漿中で本明細書に開示した少なくとも1つのC P Pまたはその任意の組み合わせの存在またはレベルを検出することを含む心臓血管障害の診断のための方法を提供する。さらに組織および生物学的液体、好ましくは血漿中のC P Pの量を検出および測定するための、C P P遺伝子に相補的なプライマーおよび/またはメッセンジャーRNAならびに抗C P P抗体を含むC P P組成物を用いる方法が含まれる。これらの方法はまた臨床スクリーニング、予後診断、治療結果のモニタリング、特定の治療的処置に対する応答の可能性の最も高い患者の同定、薬物スクリーニングおよび開発、ならびに薬物処置のための新しい標的の同定にも適当である。

20

【0031】

本発明は前記で列挙した方法において用いることができ、そして単一もしくは複数の調製物または抗体を、必要によりその他の試薬、標識基、基質、および使用のための指示書と一緒に含み得るキットを提供する。キットを疾患の診断に用いることができるか、またはキットは新しい診断用および/または治療用薬剤の同定のためのアッセイでよい。

【0032】

1つの実施態様では、冠動脈疾患(C A D)は少なくとも1つの症状の発現により定義される。かかる症状は疾患の進行につれて重篤になる。C A Dはしばしば左心室容量または拍出量の低下が伴う。初期のC A Dの症状にはコレステロールおよび低密度リポタンパク質(特に酸化型)の血漿レベルの上昇、ならびに多血小板血漿凝集が挙げられる。血管内皮細胞は炎症に反応し、そしてしたがってプラークを形成し、そして炎症およびフィブリノーゲン因子のレベルが上昇する。加えて、C A Dまたはアテローム性動脈硬化症は血管石灰化および動脈の硬化を特徴とする。その結果である血管の部分的閉塞は高血圧症および虚血性心臓疾患を招く。最終的な完全な血管閉塞は心筋梗塞、卒中、または壊疽に至る。

30

【0033】

好ましい実施態様では、本発明の少なくとも1つのC P Pの血漿レベルの上昇の検出は個体がC A Dを進展させるリスクの上昇を示す。好ましくは、該検出は、個体が少なくとも1.05倍、1.1倍、1.15倍、およびさらに好ましくは少なくとも1.2倍高いC A Dを進展させる可能性を有することを示している。あるいは、本発明の少なくとも1つのC P Pの血漿レベルの上昇の検出は個体がC A Dを有していることを示している。対照試料と比較した個体において観察されたC P Pの増加量はC A Dの予測または診断の確実性に相関する。個体の血漿C P Pレベルは家族歴およびその他の危険因子に依存して変動するので、各々を個別に試験するのが好ましい。好ましい実施態様では、本発明の方法によりヒト血漿試料中のC P Pを検出する。特に好ましい技術は質量分析および免疫検出である。好ましくは、C A Dの予測または診断は、対照と比較して実験的C P Pレベルにおいて少なくとも1.1倍、1.15倍、1.2倍、1.25倍およびさらに好ましくは1.5倍の増加に基づく。

40

50

【 0 0 3 4 】

本発明はさらに個体における配列番号：1 - 28のC P Pの発現異常またはプロセシングに関連する障害を予防または処置するための、C P P調整組成物を用いる方法を含む。好ましいC P P関連障害には冠動脈疾患（C A D）、冠動脈心臓疾患（C H D）、末梢血管疾患、脳虚血（卒中）、うっ血性心不全、アテローム性動脈硬化症、高血圧症およびその他の心臓血管疾患が挙げられる。本発明の好ましい実施態様は：個体がC P P関連障害を患うかまたはそのリスクを有することを決定すること、およびC P P調整組成物を該個体に導入すること；の工程を含む個体におけるC P P関連障害を予防または処置する方法である。

【 0 0 3 5 】

本発明のさらなる態様を明細書および請求項においても記載する。

【 0 0 3 6 】

配列表の簡単な説明

配列番号：1および2は冠動脈疾患を有する個体の血漿試料に存在するポリペプチドのアミノ酸配列を記載する（以後配列番号：2をC P P 2と称する）。

配列番号3 - 5は冠動脈疾患を有する個体の血漿試料中でM S - M Sおよび/またはM S - M A L D I質量分析で見出されたトリプシンペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：6は好酸球由来のニューロトキシンのアミノ酸配列を記載し（E D N、以後C P P 9）、一方配列番号：7は成熟タンパク質のポリペプチド配列である。

配列番号：8、9および10は冠動脈疾患を有する個体の血漿試料中でM S - M S質量分析により見出されたトリプシンペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：11はヒト精巣上体分泌タンパク質（H E）のアミノ酸配列を記載し、一方配列番号：12は成熟タンパク質のポリペプチド配列である（以後C P P 21）。

配列番号：13 - 14は冠動脈疾患を有する個体の血漿試料中でM S - M S質量分析により高レベルで見出されたトリプシンペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：15はデフェンシン1前駆体のアミノ酸配列を記載し、一方配列番号：16はプレタンパク質のポリペプチド配列であり、そして配列番号：17はデフェンシン1の配列である（以後C P P 17）。

配列番号：18 - 23は冠動脈疾患を有する個体の血漿試料中でM S - M S質量分析により顕著に見出されたトリプシンペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：24はプラスミノゲン関連プロテインB前駆体のアミノ酸配列を記載し、一方配列番号：25は成熟タンパク質のポリペプチド配列である（以後C P P 20）。

配列番号：26 - 28は冠動脈疾患を有する個体の血漿試料中でタンデム質量分析により見出されたトリプシンペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 3 7 】

図面の簡単な説明

図1は成熟ヒトコリパーゼポリペプチド配列（配列番号：1および2）および冠動脈疾患を有する個体の血漿中でタンデム質量分析により同定されたトリプシンペプチドの配列（配列番号：3 - 5）を示す。配列番号：1および2のトリプシンペプチドには下線を付している。

図2はC P P 9の配列（配列番号：6）および冠動脈疾患を有する個体の血漿中でM S - M S質量分析により見出されたペプチド配列（配列番号：8 - 10）を示す。配列番号：6および7でタンデム質量分析により観察されたトリプシンペプチドには下線を付している。シグナルペプチドには二重下線を付している。

図3は前駆体タンパク質（配列番号：11）および成熟タンパク質（配列番号：12、C P P 21）の配列ならびに冠動脈疾患を有する個体の血漿中でM S - M S質量分析により見出されたペプチド配列（配列番号：13 - 14）を示す。配列番号：11および12でタンデム質量分析により観察されたトリプシンペプチドには下線を付している。シグナルペプチドには二重下線を付している。

図4はC P P 17（配列番号：17）の配列および冠動脈疾患を有する個体の血漿中で

10

20

30

40

50

MS - MS 質量分析により見出されたペプチド配列 (配列番号: 18 - 23) を示す。配列番号: 15 および 16 でタンデム質量分析により観察されたトリプシンペプチドには下線を付しており、これは各々前駆体およびプレタンパク質を表している。配列番号: 15 でシグナルペプチドには二重下線を付している。

図5は本発明の前駆体 (配列番号: 24) および成熟タンパク質 (CPP20、配列番号: 25) の配列、ならびに冠動脈疾患を有する個体の血漿中でタンデム質量分析により見出されたペプチド配列 (配列番号: 26 - 28) を示す。配列番号: 24 および 25 でタンデム質量分析により観察されたトリプシンペプチドには下線を付している。配列番号: 24 でシグナルペプチドには二重下線を付している。

【0038】

発明の詳細な説明

以下で詳細に記載する本発明は特定の治療的処置に応答する可能性が最も高い個体を同定するための; 心臓血管障害治療の結果をモニタリングするための; CPPモジュレーターをスクリーニングするための; および薬物開発のための; 哺乳動物個体における心臓血管障害のスクリーニング、診断、および予後診断に有用な方法、組成物、およびキットを提供する。本発明はまた心臓血管障害を処置または予防するための治療用組成物の哺乳動物個体への投与をも包含する。哺乳動物個体はヒト以外の哺乳動物でよいが、好ましくはヒト、さらに好ましくは成人である。開示を明確にするために、そして限定のためではなく、本発明は血漿試料の分析に関して記載する。しかしながら、当業者には理解されるように、以下に記載するアッセイおよび技術を、心臓血管障害を有するかまたはそれを進展させるリスクを有する個体からのその他の生物学的液体試料 (例えば脳脊髄液、リンパ液、胆汁、血清、唾液または尿) または組織試料に適用することができる。本発明の方法および組成物は生存個体のスクリーニング、診断および予後診断に有用であるが、例えば同一の障害を進展させるリスクを有する家族のメンバーを同定するために、個体の死後診断にも有用であろう。

【0039】

定義

「核酸」および「核酸分子」なる用語は本明細書中で使用される際には、DNA分子 (例えばcDNAまたはゲノムDNA) およびRNA分子 (例えばmRNA) ならびにヌクレオチド類似体を用いて作成されたDNAまたはRNAの類似体を含むことを意図する。核酸分子は一本鎖または二本鎖でよいが、好ましくは二本鎖DNAである。本明細書全体にわたって、ポリヌクレオチドまたは核酸を区別せずに示すために「ヌクレオチド配列」なる表現を用いることができる。さらに正確には、「ヌクレオチド配列」なる表現は核酸材料そのものを包含し、そしてしたがって、特定のDNAまたはRNA分子を生化学的に特徴付ける配列情報 (すなわち4つの塩基文字の中から選択される文字の連続) に限定されない。また、本明細書では「核酸」、「オリゴヌクレオチド」、および「ポリヌクレオチド」なる用語を互換的に用いる。

【0040】

「単離された」核酸分子は核酸の天然の供給源において存在するその他の核酸分子から分離されたものである。好ましくは、「単離された」核酸分子は、核酸が由来する生物のゲノムDNAにおいて核酸を天然にフランキングする配列 (すなわち核酸の5' および3' 末端に位置する配列) を含まない。例えば種々の実施態様では、単離されたCPP核酸分子は、核酸が由来する細胞のゲノムDNAにおいて核酸分子を天然にフランキングする約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb、または0.1 kb未滿のヌクレオチド配列を含有することができる。さらにcDNA分子のような「単離された」核酸分子は、組換え技術により生成された場合、その他の細胞性材料もしくは培養培地を実質的に含有できないか、または化学的に合成された場合、化学的前駆体もしくはその他の化学物質を実質的に含有できない。核酸の全部または一部をハイブリダイゼーションプローブとして用いる場合、標準的なハイブリダイゼーションおよびクローニング技術を用いてCPP核酸分子を単離することができる (例えばSambrook, J., Fritsh, E.F., and Maniatis

10

20

30

40

50

, T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)。

【 0 0 4 1 】

「にハイブリダイズする」なる用語は本明細書中で使用される際には、穏やかなストリンジェントな、または高度にストリンジェントなハイブリダイゼーションのための条件を記載することを意図し、ここでハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、少なくとも60%互いに相同であるヌクレオチド配列が互いにハイブリダイズしたままであることを可能にするのが好ましい。好ましくは、少なくとも約70%、さらに好ましくは少なくとも約80%、なおさらに好ましくは少なくとも約85%、90%、95%、または98%互いに相同である配列が典型的には互いにハイブリダイズしたままであるような条件である。ストリンジェント条件は当業者に公知であり、そしてCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出すことができる。好ましい非限定例では、核酸相互作用に関するストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は以下のとおりである：ハイブリダイゼーション工程は6×SSCバッファー、5×Denhardt溶液、0.5%SDSおよび100μg/mlサケ精子DNAの存在下65℃で実施される。ハイブリダイゼーション工程の後に4回の洗浄工程が続き：

- ・好ましくは2×SSCおよび0.1%SDSバッファー中65℃で、5分間に2回洗浄；

- ・好ましくは2×SSCおよび0.1%SDSバッファー中65℃で、30分間に1回洗浄；

- ・好ましくは0.1×SSCおよび0.1%SDSバッファー中65℃で、10分間に1回洗浄；

これらのハイブリダイゼーション条件は約20ヌクレオチドの長さの核酸分子に適している。前記したハイブリダイゼーション条件は、当業者に周知の技術に従って望ましい核酸の長さに応じて適合され、例えばHames and Higgins S.J. (1985) Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach. Hames and Higgins Ed., IRL Press, Oxford; およびCurrent Protocols in Molecular Biologyに開示される技術によって適合される。

【 0 0 4 2 】

本明細書では「相同性パーセント」を用いて核酸配列およびアミノ酸配列の双方を指す。アミノ酸または核酸「同一性」はアミノ酸または核酸「相同性」に等価である。2つのアミノ酸配列または2つの核酸の相同性パーセントを決定するために、最適な比較目的に関して配列をアラインする（例えば第2のアミノ酸または核酸配列との最適なアラインメントのために、第1のアミノ酸の配列または核酸配列にギャップを導入することができ、そして非相同性配列を比較目的に関して無視することができる）。比較目的のためにアラインした参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、さらに好ましくは少なくとも50%、なおさらに好ましくは少なくとも60%、そしてなおさらに好ましくは少なくとも70%、80%、90%または95%である。次いで対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置でのアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列のある位置が、第2の配列の対応する位置と同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドにより占められている場合、分子はその位置で相同である。2つの配列間での相同性パーセントは、配列により共有される同一の位置の数の関数である（すなわち相同性パーセント = 同一位置の数 / 位置の全数100）。

【 0 0 4 3 】

数学的アルゴリズムを用いて2つの配列間の配列の比較および相同性パーセントの決定を達成することができる。配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定例はKarlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68のアルゴリズム、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77のような修正版であり、その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする。かかるアルゴリズムはAltschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれている。本発明の配列に相同なヌクレオチド配列を得るために、NBLAST

Tプログラム、スコア = 100、ワード長 = 12でBLASTヌクレオチド検索を行うことができる。本発明のポリペプチド配列に相同なアミノ酸配列を得るために、XBLASTプログラム、スコア = 50、ワード長 = 3でBLASTタンパク質検索を行うことができる。比較目的のためにギャップ付きアラインメントを得るために、Altschul, et al. (1997) *Nucleic Acids Research* 25(17):3389-3402に記載されるようなギャップ付きBLASTを利用することができる。BLASTおよびギャップ付きBLASTを利用する場合、各々のプログラム(例えばXBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメータを用いることができる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。(その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする)参照のこと。配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定例は、Myers and Miller, CABIOS(1989) (その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする)のアルゴリズムである。かかるアルゴリズムは、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれている。アミノ酸配列を比較するためにALIGNプログラムを利用する場合、PAM120重み残基表、ギャップ長ペナルティー12、およびギャップペナルティー4を用いることができる。

10

20

30

40

50

【0044】

「ポリペプチド」なる用語はポリマーの長さには関係なく、アミノ酸のポリマーを指す；したがって、ペプチド、オリゴペプチド、およびタンパク質はポリペプチドの定義に含まれる。この用語はまたポリペプチドの翻訳後修飾を特定または排除せず、例えばグリコシル、アセチル、リン酸、アミド、脂質、カルボキシル、アシルまたは炭水化物基の共有結合を含むポリペプチドはポリペプチドなる用語に明確に包含される。またアミノ酸の1つまたはそれより多い類似体(例えば非天然発生アミノ酸、関連性のない生物学的な系でしか天然発生しないアミノ酸、哺乳動物系からの修飾アミノ酸等を含む)、天然発生および非天然発生の双方の、置換結合および当分野で公知のその他の修飾を有するポリペプチドを含有するポリペプチドもまた定義に含まれる。

【0045】

「タンパク質」なる用語は本明細書中で使用される際には、「ポリペプチド」なる用語と同義的に用いることができるか、または加えて、ペプチド結合以外の結合により連結され得る2つまたはそれより多いポリペプチドの複合体、例えばタンパク質を構成するポリペプチドがジスルフィド結合により連結され得るようなものを指すことができる。「タンパク質」なる用語はまた、同一のアミノ酸配列を有するが、特にかかるタンパク質が真核細胞宿主において発現される場合に加えられ得るような翻訳後修飾が異なるポリペプチドのファミリーを含むことができる。

【0046】

「単離された」もしくは「精製された」タンパク質またはその生物学的に活性な部分は、本発明のタンパク質(すなわちCPPまたはその生物学的に活性なフラグメント)が由来する細胞もしくは組織供給源からの細胞材料もしくはその他の夾雑タンパク質を実質的に含有しないか、または化学的に合成された場合、化学的前駆体もしくはその他の化学物質を実質的に含有しない。「細胞材料を実質的に含有しない」なる言語は、タンパク質が、それが単離されるかまたは組換えにより生成される細胞の細胞成分から分離されている、本発明によるタンパク質の調製物を含む。1つの実施態様では、「細胞材料を実質的に含有しない」なる言語は、約30%(乾燥重量)未満の本発明のタンパク質以外のタンパク質(本明細書では「夾雑タンパク質」とも称される)、さらに好ましくは約20%未満の本発明によるタンパク質以外のタンパク質、なおさらに好ましくは約10%未満の本発明によるタンパク質以外のタンパク質、そして最も好ましくは約5%未満の本発明によるタンパク質以外のタンパク質を有する本発明によるタンパク質の調製物を含む。本発明によるタンパク質またはその生物学的に活性な部分を組換えにより生成する場合、好ましくは培養培地を実質的に含有せず、すなわち培養培地はタンパク質調製物の容量の約20%未満、さらに好ましくは約10%未満、そして最も好ましくは約5%未満に相当する。

【0047】

「化学的前駆体またはその他の化学物質を実質的に含有しない」なる言語は、タンパク質が、タンパク質の合成に關与する化学的前駆体またはその他の化学物質から分離されている本発明のタンパク質の調製物を含む。1つの実施態様では「化学的前駆体またはその他の化学物質を実質的に含有しない」なる言語は、約30%（乾燥重量）未満の化学的前駆体または非タンパク質化学物質、さらに好ましくは約20%未満の化学的前駆体または非タンパク質化学物質、なおさらに好ましくは約10%未満の化学的前駆体または非タンパク質化学物質、そして最も好ましくは約5%未満の化学的前駆体または非タンパク質化学物質を有する本発明によるタンパク質の調製物を含む。

本明細書では「組換えポリペプチド」なる用語を用いて人工的に設計され、そしてその最初の天然の環境で近接するポリペプチドとして見出されない少なくとも2つのポリペプチド配列を含むポリペプチドを指すか、または組換えポリヌクレオチドから発現されたポリペプチドを指す。

【0048】

「心臓血管障害血漿ポリペプチド」または「CPP」なる用語は配列番号：1-28の任意の1つにより記載される配列を含むポリペプチドを指す。かかるポリペプチドは本明細書に記載するような翻訳後修飾を行われていてよい。CPPはまたジスルフィド結合、または複合2次もしくは3次構造に至る水素およびアミド結合のようなアミノ酸側鎖相互作用のようなその他の構造的または化学的修飾を含有することもできる。CPPはまた欠失、付加、交換、またはトランケーション変異体のような変異ポリペプチド、かかるポリペプチドを含む融合ポリペプチド、および少なくとも3個の、しかし好ましくは、そして適用可能な場合、配列番号：1-28の配列の8、10、12、15、または21個の近接アミノ酸のポリペプチドフラグメントをも含む。さらにCPPは配列番号：1-28からなる群から選択される配列のタンパク質分解性前駆体および中間体を含む。本発明は、配列番号：1-28の配列から構成される、本質的に構成される、またはこれを含む単離されたCPPを含む、CPP遺伝子またはCPP mRNA種、好ましくはヒトCPP遺伝子およびmRNA種の核酸配列によりコードされるポリペプチドを具体化する。好ましいCPPは配列番号：1-2、6-7、11-12、15-17、および24-25の配列の1つを含む配列を有する。好ましいCPPフラグメントは配列番号：3-5、8-10、13-14、18-23、および26-28の配列の1つを含む配列を有する。好ましいCPPは配列番号：1-28のCPPの少なくとも1つの生物学的活性を保持する。

【0049】

「生物学的活性」なる用語は本明細書中で使用される際には、CPPにより実施される任意の単一の機能を指す。これらには、限定するものではないが：(1)個体が心臓血管障害を有しているかまたは将来有することを示していること；(2)心臓血管障害を有する個体の血流を通して循環すること；(3)抗原性、すなわち抗CPP特異的抗体に結合する能力；(4)免疫原性、すなわち抗CPP特異的抗体を作成する能力；およびCPP2に関しては：(5)CPP標的タンパク質、好ましくはリパーゼと相互作用すること；(6)リパーゼの活性部位を安定化すること；(7)リパーゼ活性を上昇させること；(8)リン脂質、ミセルまたはトリグリセリドのようなCPP標的分子と相互作用すること；および(9)少なくとも1つのジスルフィド結合を形成すること；CPP9に関しては：(5)水素、アミド、または好ましくはジスルフィド結合のような分子内アミノ酸側鎖相互作用を形成すること；(6)CPP標的分子、好ましくはRNA分子または(呼吸器合胞体ウイルスすなわちRSVのような)ピリオンとの相互作用；(7)抗ウイルス活性、および(8)RNAリン酸ジエステル結合の加水分解；CPP21に関しては：(5)水素、アミド、または好ましくはジスルフィド結合のような分子内アミノ酸側鎖相互作用を形成すること；および(6)CPP標的分子、特にコレステロールと相互作用すること；CPP17に関しては：(5)水素、アミド、または好ましくはジスルフィド結合のような分子内アミノ酸側鎖相互作用を形成すること；(6)CPP標的分子、好ましくは細菌性エンドトキシンとの相互作用；(7)細菌性エンドトキシンを中和すること；(8)肥満細胞走化性を促進すること；(9)翻訳後プロセッシング、例えば特異的タンパク質分

10

20

30

40

50

解を受けること；(10)抗微生物防御として機能すること、および；(11)平滑筋細胞の収縮を阻止すること；ならびにC P P 20に関しては：(5)水素、アミド、または好ましくはジスルフィド結合のような分子内アミノ酸側鎖相互作用を形成すること；(6)C P P 標的分子、特にプラスミノゲンのようなクリングドメイン含有ペプチドと相互作用すること；および(7)腫瘍成長を低減させること；が挙げられる。

【0050】

「C P P モジュレーター」は本明細書中で使用される際には、本発明のC P P の発現または生物学的活性のいずれかを調整する(すなわち上昇または低下させる)ことができる分子(例えばポリヌクレオチド、ポリペプチド、小型分子または抗体)である。C P P 発現または活性を増強させるC P P モジュレーターはC P P アクチベーターまたはアゴニストとして記載される。逆に、C P P 発現または活性を抑制させるC P P モジュレーターはC P P 阻害剤またはアンタゴニストとして記載される。好ましくは、C P P モジュレーターは少なくとも5、10または20%まで発現または活性を上昇/低下させる。C P P 阻害剤には抗C P P 抗体、そのフラグメント、アンチセンスポリヌクレオチドおよび、本明細書に記載するようなスクリーニングアッセイにより特徴付けられる分子が挙げられる。C P P アゴニストにはポリヌクレオチド発現ベクターおよび本明細書に記載するようなスクリーニングアッセイにより特徴付けられる分子が挙げられる。

10

【0051】

「C P P 関連障害」または「C P P 関連疾患」は心臓血管障害を記載する。好ましい障害には冠動脈疾患(C A D)、冠動脈心臓疾患(C H D)、末梢血管疾患、脳虚血(卒中)、うっ血性心不全、アテローム性動脈硬化症、高血圧症およびその他の心臓血管疾患が挙げられる。好ましくは、個体がかかる障害を進展させるか、またはすでに有している可能性は、少なくとも1つのC P P の正常血漿レベルよりも高いことにより示される。

20

【0052】

本発明の別の態様は抗C P P 抗体に関連する。「抗体」なる用語は本明細書中で使用される際には、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的活性部分、すなわちC P P のような抗原に特異的に結合する(免疫反応する)抗原結合部位を含有する分子、またはその生物学的に活性なフラグメントもしくは相同体を指す。好ましい抗体はC P P に排他的に結合し、そしてその他のポリペプチドを高い親和性を伴って認識することはない。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の実例には、抗体をペプシンのような酵素で処理することにより作成することができるF(a b)およびF(a b')₂フラグメントが挙げられる。本発明はC P P または生物学的に活性なそのフラグメントもしくは相同体に結合するポリクローナルおよびモノクローナル抗体を提供する。「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」なる用語は本明細書中で使用される際には、C P P の特定のエピトープと免疫反応することができる抗原結合部位の1つの種のみを含有する抗体分子の集団を指す。したがってモノクローナル抗体組成物は典型的にはそれが免疫反応する特定のC P P に関して単一の結合親和性を表示する。好ましいC P P 抗体は標識基に結合されている。

30

【0053】

「標識基」は本明細書中で使用される際には、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド(抗体を含む)に結合している場合、該ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの検出または精製を可能にする任意の化合物である。該標識基に特異的な抗体を含む2次化合物により標識基を直接的または間接的に検出または精製することができる。有用な標識基には放射性同位元素(例えば³²P、³⁵S、³H、¹²⁵I)、蛍光化合物(例えば5-プロモデスオキシウリジン、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、フィコエリスリンアセチルアミノフルオレン、ジゴキシゲニン)、発光化合物(例えばルミノール、G F P、ルシフェリン、エクオリン)、酵素もしくは酵素コファクター検出標識(例えばペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼ)、またはストレプアビジン、G S T、もしくはピ

40

50

オチンのような2次因子により認識される化合物が挙げられる。好ましくは、標識基はポリヌクレオチドまたはポリペプチドの生物学的活性と干渉しないような方式でポリヌクレオチドまたはポリペプチドに結合している。

【0054】

放射性同位元素は放射線放出の直接計数、フィルム暴露により、または例えばシンチレーション計数により検出することができる。酵素標識は適当な基質の、通常蛍光反応を引き起こす生成物への変換を決定することにより検出することができる。蛍光および発光化合物ならびに反応を、例えば放射線放出、蛍光顕微鏡法、蛍光活性化細胞ソーティング、またはルミノメーターにより検出することができる。

【0055】

抗体に関して本明細書中で使用される際には、目的の標的を含む試料、例えば生物学的試料において抗体が目的の標的を認識および結合するが、その他の分子を実質的に認識および結合しない場合、抗体は標的に「選択的に結合する」または「特異的に結合する」と称される。

【0056】

本明細書中で使用される際には、「ベクター」なる用語はそれが連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。ベクターの1つの型は「プラスミド」であり、これはさらに別のDNAセグメントがライゲートすることができる環状二本鎖DNAループを指す。別の型のベクターは、さらに別のDNAセグメントがウイルスゲノムにライゲートすることができるウイルスベクターである。特定のベクターは、それが導入される宿主細胞において自己複製することができる(例えば細菌性の複製起点を有する細菌性ベクターおよびエピソーム性哺乳動物ベクター)。その他のベクター(例えば非エピソーム性哺乳動物ベクター)は宿主細胞への組み込み時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、そしてそれにより宿主ゲノムと一緒に複製される。さらに、特定のベクターは、それが作動可能なように連結されている遺伝子の発現を指向することができる。かかるベクターを本明細書では「発現ベクター」と称する。一般的に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターはしばしばプラスミドの形態である。プラスミドは最も一般的に用いられるベクターの形態であるので、本明細書では「プラスミド」および「ベクター」を互換的に用いることができる。しかしながら、本発明は等価の機能を提供するウイルスベクター(例えば複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)のような、このようなその他の形態の発現ベクターを含むことを意図する。

【0057】

本明細書中で使用される際には、「有効量」は望ましい効果を有するのに十分な薬剤、好ましくは本発明のCPPモジュレーターの量を記載する。例えば、抗心臓血管障害の有効量は少なくとも1、2、5、10、15または好ましくは25%まで個体における心臓血管障害の症状を低減させるのに必要な薬剤の量である。その用語はまた個体における、心臓血管障害により引き起こされる症状を改善するのに必要な薬剤の量をも記載する。心臓血管障害の共通の症状には：胸部圧迫感、胸焼け、悪心、嘔吐、痺れ感、息切れ、ひどい冷や汗、原因不明の疲労、および不安感が挙げられる。心臓血管障害のさらに重篤な症状は胸痛(狭心症)、律動障害(不整脈)、卒中または心臓発作である。特定の患者のための有効量は、測定される症状の診断方法、処置される状態の状況、患者の全体的な健康状態、投与の方法、および副作用の重篤度のような因子に依存して異なり得る。

【0058】

本発明のCPP

本発明の心臓血管障害血漿ポリペプチド(CPP)は配列番号：1-2、6-7、11-12、15-17、および24-25として列挙される配列に記載される。配列番号：1-2、6-7、11-12、15-17、および24-25からなる群の1つから選択されるアミノ酸配列を含むCPPは、心臓血管障害を有するかまたはそれを進展させるリスクを有する個体の血漿中で高レベルで分泌され、そして循環する。

【0059】

10

20

30

40

50

さらにC P Pは配列番号：3 - 5、8 - 10、13 - 14、18 - 23、および26 - 28からなる群の1つから選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。かかるC P Pはまた血漿中で分泌され、そして循環する。好ましくはかかるC P Pはまた配列番号：1 - 2、6 - 7、11 - 12、15 - 17、および24 - 25の群の1つからのさらに別のアミノ酸をも含む。かかるさらに別のアミノ酸は、配列番号：1 - 2、6 - 7、11 - 12、15 - 17、および24 - 25のタンパク質から近接アミノ酸配列を形成するために選択された配列と共にフレーム内に融合される。

【0060】

興味深いことに、本発明のC P Pのレベルは心臓血管障害を患う個体の血漿中で上昇する。それ自体では、本発明のC P Pは、C P Pのレベル上昇が心臓血管障害を進展させるリスクの上昇かまたは心臓血管障害の存在を示す、有用な診断手段を提供する。さらに、C P Pは薬物設計のために、ならびに心臓血管障害の予防および処置のための治療計画において有用である。

10

【0061】

配列番号：2のC P P 2はタンパク質コリパーゼの配列を示す。コリパーゼは膵臓トリグリセリドリパーゼ(P T L)のための小型のタンパク質コファクターであり、これは効率のよい食事性脂質加水分解に必要である。成熟コリパーゼは90アミノ酸長であり、5個の保存されたジスルフィド結合を有する。タンパク質はプレプロコリパーゼとして合成され、112個のアミノ酸を有し、そこからN末端でさらに別の5個のアミノ酸が切断され、そしてプロコリパーゼにプロセッシングされる。コリパーゼはリパーゼのC末端非触媒性ドメインに結合し、それにより疎水性の活性な結合部位に寄与し；胆汁のような阻害物質の存在下で活性を安定化し；そして油 - 水界面に酵素を指向させる分泌タンパク質である。コリパーゼの5個の残基：A r g 39、G l u 40、G l u 59、A r g 60、およびA s n 84はP T Lと極性相互作用を形成する。活性なコンフォメーションではG l u 10およびA r g 33もまたP T Lと相互作用する。リパーゼ - コリパーゼ複合体はミセルにより活性化され、これはまた開放型コンフォメーションを安定化し、そして疎水性の活性部位を暴露する。P T Lおよびコリパーゼは十二指腸において機能し、食事性脂肪酸の50 - 70%を放出する(Crandall WV and Lowe ME, J Biol Chem (2001) 276:12505-12; van Tilbeurgh H. et al., Biochim Biophys Acta (1999) 1441:173-84; Pignol D, et al., JBC, (2000) 275:4220-4224;およびLowe ME, et al., Annu.Rev.Nutr (1997) 17: 141-58参照)。

20

30

【0062】

コリパーゼは正常には十二指腸に存在し、そして活性であるため、ヒト血漿中のその存在は生物学的異常を示している。これはさらに正常ヒト血漿中の本発明のC P Pの不在により証明される。コリパーゼは先に急性膵炎の患者の血清中で観察されている(Junge, W. and Leybold, K, Clin.Chim.Acta (1982) 123(3), 293-302)。それ自体では、本発明のC P Pは薬物設計、ならびに心臓血管障害の予防および処置のための治療計画において有用である。この点で興味深いことに、リパーゼ阻害剤、オーリスタットの使用による肥満に対する治療的研究法が開発されている(Stemby, B. et al., Clin.Nutr. (2002) 21(5), 395-402)。阻害剤はトリグリセリド摂取の低下を介して作用すると考えられ、そしてコリパーゼの欠損にも関連する異常である脂肪便を引き起こすことが観察されている(Gaskin, K.J. et al., Gastroenterology (1984) 86(1), 1-7)。

40

【0063】

C P P 9全長(配列番号：7)は4個のジスルフィド結合を形成し；グリコシル化されており、稀なC結合グリコシル化を含み；主要な好酸性顆粒成分であり、RNAリン酸ジエステル結合を分解し、そして抗ウイルス活性を有している。C P P 9全長は非分泌性RNAアーゼ2の配列を有している。リボヌクレアーゼはRNA鎖のリン酸ジエステル結合の加水分解を触媒する。ヒトリボヌクレアーゼには：RNAアーゼ1、または分泌性/膵臓性、非分泌性RNAアーゼ2、または好酸球由来のニューロトキシン(EDN)、非分泌性RNAアーゼ3、すなわち好酸性カチオンタンパク質(E C P)、RNAアーゼ4、アンギオゲ

50

ニン、および最近記載されたRNアーゼk6が挙げられる。RNアーゼ2-4および6はRNアーゼAファミリーに属し、抗病原性活性を有している (Zhang J and Rosenberg HF, *Genetics* 2000; 156:1949-58)。非分泌性リボヌクレアーゼであるEDNは3'から5'の方向で一本鎖ポリヌクレオチドを加水分解することによりmRNAを分解する。EDNは主要な好酸性顆粒タンパク質であり、そしてそれ自体は、膵臓、肝臓、肺、脾臓、および体液を含む、好酸球により影響を受ける組織において見出される。

【0064】

ヒトRNアーゼ1の血清レベルの上昇は膵臓癌を示している (Fernandez-Sales, et al., *Eur.J.Biochem.*, 2000, 267(5):1484-94)。特に、EDNの脳室内注射は、プルキンエ細胞の喪失および小脳機能障害に至るGordon現象、高好酸球症候群の促進に参与している (Newton, D.L. et al., *J.Neurosci.*, 1994, 14(2):538-44)。加えて、好酸球およびEDNは一本鎖RNAウイルス呼吸器合胞体ウイルス (RSV; パラミクソウイルス科ファミリー) により引き起こされる呼吸器疾患に应答する。好酸球はRSV感染に应答して肺柔組織に補充される。一度補充されると、これらは相互作用し、そしてRSVビリオンにより直接活性化され、脱顆粒に至る (Domachowske JW, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Dec 1; 26(23):5327-32)。EDNはRNアーゼ依存性であり、しかもEDN特異的なメカニズムで細胞外RSVビリオンの破壊を促進する。

10

【0065】

本発明のCPP21 (配列番号: 12) はヒト精巣上体分泌タンパク質 (HE) 1の血漿型を表す。ディファレンシャルスクリーニングにより単離された新規ヒト精巣上体遺伝子生成物であるHE1は、豊富な小型の分泌グリコペプチドを予測する。HE1は十分に保存された単一のコピー遺伝子によりコードされる (Kirchhoff, et al., *Biol Reprod*, 1996, 54:847-56)。遺伝子は広く、睾丸、腎臓、および肝臓において最も高レベルで発現される。HE1タンパク質は正常にはリソソーム区画において存在し、そして精巣上体液分泌の主要な成分を成す。

20

【0066】

遺伝的神経変性疾患であるNiemann-Pick C2型 (NPC2) は、異常に高い細胞コレステロール蓄積を引き起こすHE1 (またはNPC2) 遺伝子における変異の結果である (Naureckiene S et al., *Science* (2000) 290:2298およびWO02059369)。Niemann-Pick C型疾患は細胞内コレステロールおよび糖脂質輸送障害に関連する (Ong YY et al., *Exp Brain Res* (2001) 141:218-31)。NPC2の患者ではコレステロールは後期エンドソーム/リソソーム系を通して輸送されず、そしてリソソームに蓄積するが、一方細胞から遊離のコレステロールを奪う。結果的に、既に過剰のコレステロールが蓄積されているにも関わらず、細胞はさらなるコレステロールを生成して欠損を補う (Garver W S et al., *Curr Mol Med*, (2002) 2:485-505)。HE1の疎水性のステロール結合ポケットはコレステロールと高い親和性を伴って相互作用する ($K(d) = 30 - 50 \text{ nM}$) (Ko, et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 2003, 100:2518-25)。

30

【0067】

本発明の方法を用いてHE1が冠動脈疾患の患者の血漿において見出されている。このタンパク質は正常には細胞内輸送および精巣上体分泌に随伴され、そしてしたがって対照個体の血漿中では予測されない。したがって、HE1は心臓血管障害の重要なバイオマーカーである。

40

【0068】

CPP17 (配列番号: 17) は抗微生物ペプチドデフェンシン1-3の血漿型である。デフェンシン1-3 (アルファ-デフェンシン) は白血病細胞ライブラリーからクローン化され、そして正常骨髄および循環リンパ球において発現が見出された (Daher, et al., *PNAS*. 85:7327-7331 (1988))。アルファ-デフェンシンは好中球において構成的に発現され、そして細胞タンパク質の5%までを構成し得る。全長タンパク質をプロセッシングして、微生物およびウイルス感染に应答して放出される29-35アミノ酸ペプチドを形成する。これらのカチオン性ペプチドは原核細胞膜を挿入し、そして崩壊させる (Hill,

50

et al., Science 251:1481-1485 (1991))。加えて、アルファ - デフェンシンは C D 8 T 細胞因子 C A F に応答して H I V 複製を低減する (Zhang, et al., Science 298:995-1000 (2002))。

【 0 0 6 9 】

アルファ - デフェンシンは血中の低密度リポタンパク質 (L D L) 粒子に結合し、そして L D L 受容体結合および続く分解を防御する (Higazi, et al., Blood 96:1393-1398(2000)およびそこに引用された参照文献)。その後、アルファ - デフェンシンが小胞平滑筋細胞と相互作用し、そして収縮を阻止することが見出されている (Nassar, et al. Blood 100:4026-32(2002))。

【 0 0 7 0 】

本発明者は冠動脈疾患を有する個体の血漿中で高レベルのアルファ - デフェンシンペプチドを示している。これらの結果はアルファ - デフェンシンが疾患の有用な血漿バイオマーカーであることの直接的な証拠を提供する。

10

【 0 0 7 1 】

C P P 2 0 (配列番号 : 2 5) はプラスミノゲン関連プロテイン B の血漿型である。プラスミノゲン関連プロテイン B (プラシミラーも同様) を軟骨細胞からクローン化し、そしてプラスミノゲンの N 末端に高度に相同性である (Ichinose, Biochemistry 31:3113-8 (1992))。19 個のアミノ酸のシグナル配列を除去した後、96 アミノ酸長の前駆体タンパク質を分泌する。プラスミノゲン関連プロテイン B はクリングルドメインに結合し、そしてフィブリンまたはアルファ 2 - 抗プラスミンに結合するプラスミノゲンと干渉すると考えられている (Lewis, et al., Eur J Biochem. 259:618-625 (1999))。プラスミノゲン関連プロテイン B は転移性腫瘍細胞において発現される (W O 9 3 2 1 3 4 1 および Weissbach and Treadwell, Biochem. Biophys. Res. Commun. 186:1108-1114(1992))。加えて、Lewis ら (Anticancer Res 21:2287-91(2001)) はタンパク質がマウスに移植された腫瘍の成長を低減させるが、プラスミノゲンにはほとんど影響がないことを実証した。したがって、悪性の状態の処置および血管形成関連障害の処置について記載されている (W O 9 9 4 6 2 8 2)。

20

【 0 0 7 2 】

本発明の方法を用いて、プラスミノゲン関連プロテイン B が冠動脈疾患の患者の血漿中に見出されている。このタンパク質は正常では細胞外マトリックスと結合し、そして対照個体の血漿中では検出されない。したがって、プラスミノゲン関連プロテイン B は心臓血管障害の重要なバイオマーカーである。

30

【 0 0 7 3 】

「心臓血管障害血漿ポリペプチド」および「C P P」なる用語は、本明細書中で使用される際には本発明の任意のおよび全てのペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質を包含する。本発明のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、およびかかるポリペプチドを含む融合ポリペプチドもまた本発明の一部を成す。本発明は、配列番号 : 1 - 5、6 - 10、11 - 14、15 - 23、および 24 - 28 からなる群の 1 つから選択されるアミノ酸配列から構成される、本質的に構成される、またはこれを含む単離されたまたは精製された C P P を含むヒトに由来する C P P を具体化する。さらに配列番号 : 1 - 5、6 - 10、11 - 14、15 - 23、および 24 - 28 からなる群の 1 つから選択される配列の非修飾前駆体、タンパク質分解性前駆体および中間体がさらに含まれる。

40

【 0 0 7 4 】

本発明は C P P 生物学的活性を有する少なくとも 3 個のアミノ酸、好ましくは少なくとも 8 から 10 個のアミノ酸の連続した長さの単離された、精製された、および組換えポリペプチドを具体化する。好ましい実施態様では、アミノ酸の連続した広がり、C P P 配列におけるアミノ酸の欠失、付加、交換またはランケーションを含む変異または機能的変異の部位を含む。本発明はまた本発明の C P P ヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド、またはその相補的配列もしくはそのフラグメントにも関する。

【 0 0 7 5 】

50

本発明の1つの態様は単離されたC P Pおよびその生物学的に活性な部分、ならびに抗C P P抗体を上昇させる免疫原として使用するのに適当なポリペプチドフラグメントに関する。1つの実施態様では、標準的なタンパク質精製技術を用いて適切な精製スキームにより元来のC P Pペプチドを血漿、細胞または組織供給源から単離することができる。別の実施態様では、組換えDNA技術によりC P Pを生成する。組換え発現に代わって、「C P P組成物の化学的製造」と題したセクションおよび実施例2で記載するように、ペプチド合成技術を用いてC P Pを化学的に合成することができる。

【0076】

典型的には、生物学的に活性な部分は少なくとも1つC P Pの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。生物学的に活性なC P Pは、配列番号：1 - 5、6 - 10、11 - 14、15 - 23、および24 - 28からなる群の1つから選択される配列から、例えば少なくとも1、2、3または5個のアミノ酸変化を含むか、または配列番号：1 - 5、6 - 10、11 - 14、15 - 23、および24 - 28からなる群の1つから選択される配列から、少なくとも1%、2%、3%、5%、8%、10%、または15%の変化を含む。

10

【0077】

C P Pの特徴付け

本発明のポリペプチド、C P Pは表1に列挙する配列番号：3 - 5、8 - 10、13 - 14、18 - 23、および26 - 28のトリプシンペプチドにより定義される。実施例1に記載するように、これらのペプチドを冠動脈疾患の患者から単離し、そしてMicroProt (商標)法によって特徴付けした。配列番号：1 - 2、6 - 7、11 - 12、15 - 17、および24 - 25はトリプシンペプチドが放出されたCAD血漿において見出されたポリペプチド種を表す。

20

【0078】

血漿試料を最初に分子量に基づいて分離するので、本発明のC P Pは全てほぼ20 k Dまたはそれ未満の分子量である。高分子量ポリペプチド種は異なる方法により分離および特徴付けする。実施例1に記載するように、血漿試料を多くのクロマトグラフィー分離に供する。これらのクロマトグラフィー法についての詳細を実施例1で示す。

【0079】

第1の分離はカチオン交換クロマトグラフィーカラムにおいてであり、これを漸増塩濃度で溶出する。18個の分画を収集する。表1のCEXの列は、どの分画が各トリプシンペプチドを含有するか、およびその溶出条件列挙している。カチオン交換による分離により、ポリペプチド種の全体的な正電荷の表示が提供される。カチオン交換の次に逆相HPLC分離が続く。表1のRP1の列は30分画のどれが各トリプシンペプチドを溶出したか、およびその溶出条件列挙している。逆相による分離により、ポリペプチド種の全体的な疎水性の表示が提供される。実行番号と記した列の最後の2つの数字は、24個の溶出された分画のどれが第2の逆相HPLC分離からのトリプシンペプチドを含有するかを表示している(実施例1参照)。プロテオームは、C P P 17に関しては、どの試料で各トリプシンペプチドが観察されたかを表示している。C P P 2、C P P 9、C P P 20およびC P P 21に関しては、全ての観察を疾患(CAD)試料だけで行った。OLAVスコアは、存在する場合、MS-MSデータ同定ソフトウェアにより検出されるように、とりわけノイズを超える実験的MS-MSシグナルの強度を反映し、そしてしたがって試料中のタンパク質濃度を表示する。

30

40

【0080】

表1 a - C P P 2

【表 1】

CPP#	配列	CEX	塩	RP1	%B	実行
CPP2	SNCCQHSSALGLAR	10	175 mM	9	35.7	89870_13
	SNCCQHSSALGLAR	10	175 mM	9	35.7	89870_14
	CTSMASENSECSVK	10	175 mM	9	35.7	89870_13
	CTSMASENSECSVK	10	175 mM	9	35.7	89870_14
	TIVGSITNTNFGICH DAGR	9	175 mM	9	35.7	108111_10

表 1 b - C P P 9

10

【表 2】

CPP #	配列	CEX	塩	RP1	%B	実行
CPP 9 クラスター1	DPPQYPVVPVHLDR	2	75 mM	8	33.7	84158_22
	DPPQYPVVPVHLDR	2	75 mM	8	33.7	84158_22
	DPPQYPVVPVHLDR	2	75 mM	8	33.7	84158_22
	DPPQYPVVPVHLDR	2	75 mM	8	33.7	84158_22
	DPPQYPVVPVHLDR	2	75 mM	8	33.7	84158_22
	RDPPQYPVVPVHLDR	2	75 mM	8	33.7	84158_22
	RDPPQYPVVPVHLDR	2	75 mM	8	33.7	84158_23
	YAQTPANMFYIVACDNR	2	75 mM	8	33.7	84158_19
	YAQTPANMFYIVACDNR	2	75 mM	8	33.7	84158_20
	YAQTPANMFYIVACDNR	2	75 mM	8	33.7	84158_21
	YAQTPANMFYIVACDNR	2	75 mM	8	33.7	84158_22
	YAQTPANMFYIVACDNR	2	75 mM	8	33.7	84158_23
YAQTPANMFYIVACDNR	2	75 mM	8	33.7	84158_24	
CPP 9 クラスター2	YAQTPANMFYIVACDNR	3	75 mM	10	37.5	84274_13
	YAQTPANMFYIVACDNR	3	75 mM	11	39.4	84286_14
	YAQTPANMFYIVACDNR	3	75 mM	11	39.4	84286_15
	RDPPQYPVVPVHLDR	4	75 mM	10	37.5	88113_12
	YAQTPANMFYIVACDNR	4	75 mM	10	37.5	88113_12
	YAQTPANMFYIVACDNR	4	75 mM	10	37.5	88113_13
	YAQTPANMFYIVACDNR	5	75 mM	11	39.4	101105_13
CPP 9 クラスター3	YAQTPANMFYIVACDNR	8	100 mM	12	41.3	95713_07
	YAQTPANMFYIVACDNR	9	175 mM	11	39.4	105000_10
	YAQTPANMFYIVACDNR	9	175 mM	11	39.4	105000_13
	RDPPQYPVVPVHLDR	9	175 mM	12	41.3	105012_08
	YAQTPANMFYIVACDNR	9	175 mM	12	41.3	105012_08
	YAQTPANMFYIVACDNR	9	175 mM	12	41.3	105012_09

20

30

40

【0081】

CPP 9 に関しては、表 1 b 提供された情報は C A D 患者の血漿中に存在するポリペプチド種の多くの特徴を表す。以下は表 1 b に含まれるデータの実例的説明を表す。表 1 b は同一のトリプシンペプチドが所定の分離の 1 つ以上の分画において見出されることを示している。いくつかの分画の間を広く空けているが、これはトリプシンペプチドが異なる循環ポリペプチド種から放出されることを示している。例えば、CPP 9 は 2 から 5 の連続する一連の C E X 分画において、そして次に 8 から 9 の連続する一連の C E X 分画にお

50

いて再度観察された。これは、トリプシンペプチドが誘導された、異なる正電荷特性を保有する少なくとも2つのポリペプチド種の存在を示している。これは1つの種においてさらに別のアミノ酸または荷電した修飾（例えばリン酸基）が存在するが、その他の種では存在しないことを示している。同様に、CPP9はRP1分画8で、そして次に10から12の連続する一連のRP1分画において観察された。再び、これはトリプシンペプチドが誘導された、異なる疎水性指標を保有する少なくとも2つのポリペプチド種の存在を示している。一緒にして考えると、これらの観察により、観察されたペプチドが3つの非配列特異的溶出クラスター：第1の溶出クラスターはCEX分画2およびRP1分画8で溶出されたフラグメントを含む；第2のクラスターはCEX分画3 - 5およびRP1分画10 - 11で溶出されたフラグメントを含む；そして第3のクラスターはCEX分画8 - 9およびRP1分画11 - 12で溶出されたフラグメントを含む；に入ることが示される。配列番号：3 - 5のトリプシンペプチドに関して合わせた分画情報に基づいて、CPP9の3つの異なる形態または種がCADを有する個体の血漿中で循環する可能性がある。これらのCPP9形態は翻訳後修飾および/またはアミノ酸の長さで異なっている可能性がある。配列番号：8 - 10のトリプシンペプチドは配列番号：7のポリペプチドから誘導され、これはCADを有する個体の血漿中に存在する異なるポリペプチド種を形成するようにプロセッシングされる。

10

【0082】

表1c - CPP21

【表3】

CPP #	ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行番号
CPP 21	AVVHGILMGVVPVFPPIPEPDGCK	3	75	13	43.27	84318_14
	AVVHGILMGVVPVFPPIPEPDGCK	3	75	13	43.27	84318_15
	AVVHGILMGVVPVFPPIPEPDGCK	3	75	13	43.27	84318_15
	AVVHGILMGVVPVFPPIPEPDGCK	2	75	10	37.5	84178_22
	AVVHGILMGVVPVFPPIPEPDGCK	3	75	13	43.27	84318_15
	SGINCPIQK	3	75	13	43.27	84318_15
	SGINCPIQK	2	75	10	37.5	84178_22

20

30

【0083】

表1d - CPP17

【表 4】

ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行	プロテオーム	Olav スコア
YGTCIYQGR	5	75	13	43.27	117962_07	対照	19.8
YGTCIYQGR	6	100	8	33.65	130804_09	対照	12.59
YGTCIYQGR	6	100	8	33.65	130804_10	対照	20.62
YGTCIYQGR	6	100	9	35.7	130820_10	対照	30.84
IPACIAGER	7	100	7	31.73	130782_15	対照	23.41
IPACIAGER	7	100	7	31.73	130782_13	対照	16
IPACIAGER	7	100	7	31.73	130782_13	対照	12.8
IPACIAGER	7	100	7	31.73	130782_15	対照	11.73
IPACIAGER	7	100	7	31.73	130782_14	対照	23.61
YGTCIYQGR	7	100	7	31.73	130782_13	対照	44.04
YGTCIYQGR	7	100	7	31.73	130782_13	対照	52.39
YGTCIYQGR	7	100	7	31.73	130782_14	対照	49.92
YGTCIYQGR	7	100	7	31.73	130782_14	対照	47.62
YGTCIYQGR	7	100	7	31.73	130782_14	対照	36.78
YGTCIYQGR	7	100	7	31.73	130782_12	対照	42.07
YGTCIYQGR	7	100	7	31.73	130782_15	対照	43.83
IPACIAGER	7	100	8	33.65	130808_10	対照	27.5
IPACIAGER	7	100	8	33.65	130808_08	対照	25.2
IPACIAGER	7	100	8	33.65	130808_11	対照	24.8

10

20

【表 5】

ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行	プロテオーム	Olav スコア
IPACIAGER	7	100	8	33.65	130808_09	対照	23.61
YGTCIYQGR	7	100	8	33.65	130808_08	対照	42.42
IPACIAGER	7	100	10	37.5	130836_07	対照	29.46
YGTCIYQGR	7	100	10	37.5	130836_07	対照	48.61
IPACIAGER	7	100	12	41.34	130868_12	対照	15.48
IPACIAGER	8	100	8	33.65	121059_08	対照	24.97
IPACIAGER	8	100	8	33.65	121059_11	対照	21.05
RYGTCIYQGR	8	100	8	33.65	121059_08	対照	46.79
RYGTCIYQGR	8	100	8	33.65	121059_08	対照	35.9
YGTCIYQGR	8	100	8	33.65	121059_11	対照	28.98
IPACIAGER	8	100	9	35.7	121071_08	対照	12.3
IPACIAGER	8	100	9	35.7	121071_08	対照	28.34
IPACIAGER	8	100	9	35.7	121071_11	対照	28.63
IPACIAGER	8	100	9	35.7	121071_07	対照	12.19
IPACIAGER	8	100	9	35.7	121071_09	対照	33.23
RYGTCIYQGR	8	100	9	35.7	121071_08	対照	30.23
YGTCIYQGR	8	100	9	35.7	121071_10	対照	34.47

30

40

【表 6】

ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行	プロテオーム	Olav スコア
YGTCIQGR	8	100	9	35.7	121071_08	対照	41.24
YGTCIQGR	8	100	9	35.7	121071_11	対照	52.02
YGTCIQGR	8	100	9	35.7	121071_09	対照	53.73
YGTCIQGR	8	100	9	35.7	121071_07	対照	35.05
YGTCIQGR	8	100	9	35.7	121071_12	対照	25.16
LWAFCC	8	100	9	35.7	121071_09	対照	17.74
IPACIAGER	8	100	10	37.5	121091_08	対照	25.38
YGTCIQGR	8	100	10	37.5	121091_07	対照	42.97
YGTCIQGR	8	100	10	37.5	121091_08	対照	45.46
YGTCIQGR	8	100	10	37.5	121091_09	対照	47.15
IPACIAGER	8	100	11	39.42	121095_07	対照	26.69
IPACIAGER	8	100	11	39.42	121095_08	対照	32.28
IPACIAGER	8	100	11	39.42	121095_09	対照	27.02
YGTCIQGR	8	100	11	39.42	121095_09	対照	42.21
YGTCIQGR	8	100	11	39.42	121095_14	対照	16.66
YGTCIQGR	8	100	11	39.42	121095_09	対照	36.49
YGTCIQGR	8	100	11	39.42	121095_07	対照	42.61
YGTCIQGR	8	100	11	39.42	121095_08	対照	36.09
LWAFCC	8	100	11	39.42	121095_08	対照	17.02
LWAFCC	8	100	11	39.42	121095_07	対照	20.09
IPACIAGER	8	100	12	41.34	121115_12	対照	15.91
IPACIAGER	8	100	12	41.34	121115_05	対照	29.01
IPACIAGER	8	100	12	41.34	121115_07	対照	28.02
IPACIAGER	8	100	12	41.34	121115_06	対照	30.2
YGTCIQGR	8	100	12	41.34	121115_09	対照	27
YGTCIQGR	8	100	12	41.34	121115_07	対照	48.94

10

20

30

【表 7】

ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行	プロテ オーム	Olav スコア
YGTCIQGR	8	100	12	41.34	121115_06	対照	37.44
YGTCIQGR	8	100	12	41.34	121115_05	対照	57.97
IPACIAGER	8	100	13	43.27	121127_06	対照	30.44
IPACIAGER	8	100	13	43.27	121127_05	対照	29.38
IPACIAGER	8	100	13	43.27	121127_07	対照	24.45
YGTCIQGR	8	100	13	43.27	121127_06	対照	48.37
YGTCIQGR	8	100	13	43.27	121127_05	対照	50.08
IPACIAGER	8	100	15	47.1	121155_08	対照	18.26
IPACIAGER	9	175	7	31.73	130774_13	対照	25.57
IPACIAGER	9	175	7	31.73	130774_11	対照	25.79
IPACIAGER	9	175	7	31.73	130774_13	対照	28.54
IPACIAGER	9	175	7	31.73	130774_12	対照	11.1
IPACIAGER	9	175	7	31.73	130774_12	対照	31.51
RYGTCIQGR	9	175	7	31.73	130774_13	対照	18.08
YGTCIQGR	9	175	7	31.73	130774_13	対照	48.73
YGTCIQGR	9	175	7	31.73	130774_13	対照	48.83
YGTCIQGR	9	175	7	31.73	130774_11	対照	42.52
YGTCIQGR	9	175	7	31.73	130774_12	対照	61.96
YGTCIQGR	9	175	7	31.73	130774_14	対照	60.25
YGTCIQGR	9	175	7	31.73	130774_12	対照	44.13
YGTCIQGR	9	175	7	31.73	130774_10	対照	14.34
LWAFCC	9	175	7	31.73	130774_12	対照	18.2
IPACIAGER	9	175	8	33.65	130786_11	対照	24.81
IPACIAGER	9	175	8	33.65	130786_08	対照	21.49

10

20

30

【表 8】

ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行	プロテオーム	Olav スコア
YGTCIYQGR	9	175	8	33.65	130786_08	対照	19.16
IPACIAGER	9	175	12	41.34	130860_10	対照	31.05
IPACIAGER	9	175	12	41.34	130860_11	対照	29.74
YGTCIYQGR	9	175	12	41.34	130860_10	対照	50.91
YGTCIYQGR	9	175	12	41.34	130860_11	対照	40.12
IPACIAGER	9	175	13	43.27	130876_10	対照	14.94
IPACIAGER	9	175	13	43.27	130876_12	対照	33.64
YGTCIYQGR	9	175	13	43.27	130876_12	対照	42.65
YGTCIYQGR	9	175	13	43.27	130876_10	対照	25.55
YGTCIYQGR	9	175	13	43.27	130876_12	対照	26.9
IPACIAGER	10	175	8	33.65	110332_08	対照	25.99
IPACIAGER	10	175	8	33.65	110332_11	対照	34.38
IPACIAGER	10	175	8	33.65	110332_12	対照	13.51
IPACIAGER	10	175	8	33.65	110332_09	対照	13.77
YGTCIYQGR	10	175	8	33.65	110332_10	対照	23.53
YGTCIYQGR	10	175	8	33.65	110332_11	対照	43.26
YGTCIYQGR	10	175	8	33.65	110332_08	対照	20.07
YGTCIYQGR	10	175	9	35.7	110348_09	対照	47.8
IPACIAGER	11	175	8	33.65	110336_09	対照	29.91
YGTCIYQGR	11	175	8	33.65	110336_12	対照	33.38
YGTCIYQGR	11	175	8	33.65	110336_11	対照	45.59
YGTCIYQGR	11	175	8	33.65	110336_12	対照	54.61
IPACIAGER	11	175	9	35.7	110344_10	対照	21.1
IPACIAGER	11	175	9	35.7	110344_09	対照	32.42
YGTCIYQGR	11	175	9	35.7	110344_09	対照	46.58
IPACIAGER	12	175	8	33.65	121083_08	対照	33.79

10

20

30

【表 9】

ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行	プロテ オーム	Olav スコア
YGTCIYQGR	12	175	8	33.65	121083_08	対照	49.15
YGTCIYQGR	13	175	9	35.7	110352_09	対照	27.99
IPACIAGER	14	175	7	31.73	117862_13	対照	33.6
YGTCIYQGR	14	175	7	31.73	117862_13	対照	28.57
IPACIAGER	4	75	8	33.65	88177_09	CAD	15.34
IPACIAGER	5	75	9	35.7	101089_16	CAD	14.38
IPACIAGER	5	75	9	35.7	101089_11	CAD	18.62
YGTCIYQGR	5	75	9	35.7	101089_12	CAD	39.54
IPACIAGER	6	100	8	33.65	111981_09	CAD	26.89
IPACIAGER	6	100	9	35.7	100782_09	CAD	14.96
YGTCIYQGR	6	100	9	35.7	100782_10	CAD	12.18
YGTCIYQGR	6	100	9	35.7	100782_11	CAD	36.7
IPACIAGER	7	100	8	33.65	108099_11	CAD	26.83
IPACIAGER	7	100	8	33.65	108099_09	CAD	22.09
IPACIAGER	7	100	8	33.65	108099_12	CAD	13.52
IPACIAGER	7	100	8	33.65	108099_10	CAD	25.05
RYGTCIYQGR	7	100	8	33.65	108099_09	CAD	29.38
YGTCIYQGR	7	100	8	33.65	108099_08	CAD	49.46
YGTCIYQGR	7	100	8	33.65	108099_12	CAD	33.68
YGTCIYQGR	7	100	8	33.65	108099_09	CAD	46.69
YGTCIYQGR	7	100	8	33.65	108099_11	CAD	33.65

10

20

【表 10】

ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行	プロテ オーム	Olav スコア
IPACIAGER	7	100	9	35.7	108103_11	CAD	18.78
IPACIAGER	7	100	9	35.7	108103_08	CAD	26.41
IPACIAGER	7	100	9	35.7	108103_10	CAD	28.48
IPACIAGER	7	100	9	35.7	108103_09	CAD	29.11
YGTCIYQGR	7	100	9	35.7	108103_09	CAD	47.95
YGTCIYQGR	7	100	9	35.7	108103_11	CAD	35.85
YGTCIYQGR	7	100	9	35.7	108103_08	CAD	45.28
YGTCIYQGR	7	100	9	35.7	108103_10	CAD	51.77
IPACIAGER	7	100	10	37.5	105004_07	CAD	15.75
YGTCIYQGR	7	100	10	37.5	105004_08	CAD	43.36
YGTCIYQGR	7	100	10	37.5	105004_07	CAD	44.2
IPACIAGER	7	100	11	39.42	104992_08	CAD	31.77
YGTCIYQGR	7	100	11	39.42	104992_07	CAD	33.44
YGTCIYQGR	7	100	11	39.42	104992_08	CAD	28.08
IPACIAGER	7	100	12	41.34	105020_07	CAD	16.56
YGTCIYQGR	7	100	12	41.34	105020_07	CAD	13.61
IPACIAGER	8	100	8	33.65	98379_16	CAD	15.58
IPACIAGER	8	100	8	33.65	98379_11	CAD	25.88
IPACIAGER	8	100	8	33.65	98379_08	CAD	24.81
IPACIAGER	8	100	8	33.65	98379_12	CAD	26.89
RYGTCIYQGR	8	100	8	33.65	98379_09	CAD	38.01
RYGTCIYQGR	8	100	8	33.65	98379_09	CAD	35.93
YGTCIYQGR	8	100	8	33.65	98379_13	CAD	32.74
YGTCIYQGR	8	100	8	33.65	98379_08	CAD	49.34
YGTCIYQGR	8	100	8	33.65	98379_12	CAD	15.42

10

20

30

【表 1 1】

ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行	プロテオーム	Olav スコア
YGTCIYQGR	8	100	8	33.65	98379_09	CAD	50.78
YGTCIYQGR	8	100	8	33.65	98379_08	CAD	47.12
YGTCIYQGR	8	100	8	33.65	98379_08	CAD	46.31
YGTCIYQGR	8	100	8	33.65	98379_10	CAD	16.91
YGTCIYQGR	8	100	8	33.65	98379_10	CAD	36.03
YGTCIYQGR	8	100	8	33.65	98379_11	CAD	40.69
YGTCIYQGRLWAFCC	8	100	8	33.65	98379_08	CAD	41.85
YGTCIYQGR	8	100	8	33.65	98379_07	CAD	38.06
YGTCIYQGR	8	100	8	33.65	98379_12	CAD	52.75
LWAFCC	8	100	8	33.65	98379_11	CAD	17.02
LWAFCC	8	100	8	33.65	98379_08	CAD	20.09
LWAFCC	8	100	8	33.65	98379_09	CAD	20.09
LWAFCC	8	100	8	33.65	98379_12	CAD	21.28
IPACIAGER	8	100	9	35.7	98395_16	CAD	29.25
IPACIAGER	8	100	9	35.7	98395_12	CAD	21.9
IPACIAGER	8	100	9	35.7	98395_12	CAD	17.76
IPACIAGER	8	100	9	35.7	98395_10	CAD	22.35

10

20

【表 1 2】

ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行	プロテオーム	Olav スコア
IPACIAGER	8	100	9	35.7	98395_12	CAD	20.93
IPACIAGER	8	100	9	35.7	98395_17	CAD	28.01
IPACIAGER	8	100	9	35.7	98395_09	CAD	23.18
IPACIAGER	8	100	9	35.7	98395_09	CAD	30.94
IPACIAGER	8	100	9	35.7	98395_08	CAD	20.52
IPACIAGER	8	100	9	35.7	98395_13	CAD	25.13
IPACIAGER	8	100	9	35.7	98395_12	CAD	30.76
IPACIAGER	8	100	9	35.7	98395_11	CAD	26.5
IPACIAGER	8	100	9	35.7	98395_08	CAD	20.09
IPACIAGER	8	100	9	35.7	98395_09	CAD	16.16
IPACIAGER	8	100	9	35.7	98395_14	CAD	26.79
RYGTCIYQGR	8	100	9	35.7	98395_14	CAD	29.34
RYGTCIYQGR	8	100	9	35.7	98395_11	CAD	27.02
RYGTCIYQGR	8	100	9	35.7	98395_08	CAD	29.27
RYGTCIYQGR	8	100	9	35.7	98395_10	CAD	33.39
RYGTCIYQGR	8	100	9	35.7	98395_12	CAD	25.61
YGTCIYQGR	8	100	9	35.7	98395_14	CAD	41.77
YGTCIYQGRLWAFCC	8	100	9	35.7	98395_08	CAD	48.82
YGTCIYQGR	8	100	9	35.7	98395_12	CAD	51.26
YGTCIYQGRLWAFCC	8	100	9	35.7	98395_08	CAD	46.62
YGTCIYQGR	8	100	9	35.7	98395_11	CAD	38.68

30

40

50

【表 1 3】

ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行	プロテ オーム	Olav スコア
YGTCIYQGR	8	100	9	35.7	98395_18	CAD	21.98
YGTCIYQGR	8	100	9	35.7	98395_13	CAD	38.58
YGTCIYQGR	8	100	9	35.7	98395_09	CAD	25.39
YGTCIYQGR	8	100	9	35.7	98395_17	CAD	36.39
YGTCIYQGR	8	100	9	35.7	98395_08	CAD	38.27
YGTCIYQGR	8	100	9	35.7	98395_08	CAD	43.61
YGTCIYQGRLWAFCC	8	100	9	35.7	98395_12	CAD	57.23
LWAFCC	8	100	9	35.7	98395_09	CAD	21.28
LWAFCC	8	100	9	35.7	98395_12	CAD	17.04
LWAFCC	8	100	9	35.7	98395_10	CAD	20.09
IPACIAGER	8	100	10	37.5	95685_11	CAD	27.27
IPACIAGER	8	100	10	37.5	95685_08	CAD	24.75
IPACIAGER	8	100	10	37.5	95685_10	CAD	16.84
IPACIAGER	8	100	10	37.5	95685_06	CAD	24.88
IPACIAGER	8	100	10	37.5	95685_14	CAD	24.62
IPACIAGER	8	100	10	37.5	95685_09	CAD	19.98
IPACIAGER	8	100	10	37.5	95685_13	CAD	10.65
IPACIAGER	8	100	10	37.5	95685_06	CAD	31.36
RYGTCIYQGR	8	100	10	37.5	95685_06	CAD	31.07
RYGTCIYQGR	8	100	10	37.5	95685_07	CAD	38.34
YGTCIYQGR	8	100	10	37.5	95685_16	CAD	20.45
YGTCIYQGR	8	100	10	37.5	95685_14	CAD	32.12
YGTCIYQGR	8	100	10	37.5	95685_13	CAD	23.06

10

20

【表 1 4】

ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行	プロテ オーム	Olav スコア
YGTCIYQGR	8	100	10	37.5	95685_07	CAD	38.95
YGTCIYQGR	8	100	10	37.5	95685_11	CAD	42.46
YGTCIYQGR	8	100	10	37.5	95685_15	CAD	19.41
YGTCIYQGR	8	100	10	37.5	95685_06	CAD	45.03
LWAFCC	8	100	10	37.5	95685_06	CAD	17.74
LWAFCC	8	100	10	37.5	95685_09	CAD	15.84
LWAFCC	8	100	10	37.5	95685_08	CAD	20.09
LWAFCC	8	100	10	37.5	95685_06	CAD	13.49
LWAFCC	8	100	10	37.5	95685_07	CAD	17.74
IPACIAGER	8	100	11	39.42	100948_09	CAD	25.95
IPACIAGER	8	100	11	39.42	100948_07	CAD	10.92
IPACIAGER	8	100	11	39.42	100948_11	CAD	13.34
IPACIAGER	8	100	11	39.42	100948_09	CAD	10.92
IPACIAGER	8	100	11	39.42	100948_05	CAD	12.53
IPACIAGER	8	100	11	39.42	100948_08	CAD	27.09
IPACIAGER	8	100	11	39.42	100948_06	CAD	27.26
IPACIAGER	8	100	11	39.42	100948_12	CAD	23.02
IPACIAGER	8	100	11	39.42	100948_07	CAD	17.37
IPACIAGER	8	100	11	39.42	100948_06	CAD	25.87
IPACIAGER	8	100	11	39.42	100948_07	CAD	27.12
RYGTCIYQGR	8	100	11	39.42	100948_06	CAD	23.52
YGTCIYQGR	8	100	11	39.42	100948_08	CAD	34.01
YGTCIYQGR	8	100	11	39.42	100948_09	CAD	29.05
YGTCIYQGR	8	100	11	39.42	100948_05	CAD	19.43
YGTCIYQGR	8	100	11	39.42	100948_06	CAD	39.1

10

20

30

【表 15】

ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行	プロテ オーム	Olav スコア
YGTCIYQGR	8	100	11	39.42	100948_07	CAD	17.02
YGTCIYQGR	8	100	11	39.42	100948_06	CAD	46.21
YGTCIYQGR	8	100	11	39.42	100948_06	CAD	42.1
LWAFCC	8	100	11	39.42	100948_06	CAD	14.67
LWAFCC	8	100	11	39.42	100948_07	CAD	21.28
LWAFCC	8	100	11	39.42	100948_07	CAD	20.09
IPACIAGER	8	100	12	41.34	95713_04	CAD	9.75
IPACIAGER	8	100	12	41.34	95713_04	CAD	16.21
IPACIAGER	8	100	12	41.34	95713_06	CAD	34.47
IPACIAGER	8	100	12	41.34	95713_04	CAD	20.55
IPACIAGER	8	100	12	41.34	95713_04	CAD	29.89
IPACIAGER	8	100	12	41.34	95713_09	CAD	28.65
IPACIAGER	8	100	12	41.34	95713_08	CAD	13.7
YGTCIYQGR	8	100	12	41.34	95713_08	CAD	12.11
YGTCIYQGR	8	100	12	41.34	95713_04	CAD	60.22
YGTCIYQGR	8	100	12	41.34	95713_06	CAD	55.12
IPACIAGER	8	100	13	43.27	95721_04	CAD	28.38
IPACIAGER	8	100	13	43.27	95721_05	CAD	28.84

10

20

【表 1 6】

ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行	プロテ オーム	Olav スコア
IPACIAGER	8	100	13	43.27	95721_06	CAD	35.38
YGTCIYQGR	8	100	13	43.27	95721_04	CAD	58.93
YGTCIYQGR	8	100	13	43.27	95721_05	CAD	50.27
IPACIAGER	8	100	14	45.2	95729_02	CAD	18.23
IPACIAGER	8	100	14	45.2	95729_04	CAD	21.34
IPACIAGER	8	100	14	45.2	95729_03	CAD	31.93
YGTCIYQGR	8	100	14	45.2	95729_02	CAD	41.07
YGTCIYQGR	8	100	14	45.2	95729_04	CAD	36.34
LWAFCC	8	100	14	45.2	95729_03	CAD	9.71
ADEVAAPEQIAADIPEV VVSLAWDESLAPK	8	100	14	45.2	95729_06	CAD	21.57
IPACIAGER	8	100	15	47.1	100961_03	CAD	14.11
YGTCIYQGR	8	100	15	47.1	100961_03	CAD	37.92
IPACIAGER	9	175	8	33.65	108107_11	CAD	22.35
IPACIAGER	9	175	8	33.65	108107_07	CAD	25.09
IPACIAGER	9	175	8	33.65	108107_08	CAD	27.93
IPACIAGER	9	175	8	33.65	108107_12	CAD	19.97
IPACIAGER	9	175	8	33.65	108107_10	CAD	18.89
IPACIAGER	9	175	8	33.65	108107_09	CAD	24.95
RYGTCIYQGR	9	175	8	33.65	108107_09	CAD	41.98
RYGTCIYQGR	9	175	8	33.65	108107_11	CAD	33.57
RYGTCIYQGR	9	175	8	33.65	108107_08	CAD	44.88
RYGTCIYQGR	9	175	8	33.65	108107_11	CAD	25.03
IPACIAGER	9	175	9	35.7	108111_13	CAD	27.29
IPACIAGER	9	175	9	35.7	108111_20	CAD	21.68
IPACIAGER	9	175	9	35.7	108111_18	CAD	13.34
IPACIAGER	9	175	9	35.7	108111_14	CAD	29.32
IPACIAGER	9	175	9	35.7	108111_11	CAD	26.21
IPACIAGER	9	175	9	35.7	108111_09	CAD	28.44
IPACIAGER	9	175	9	35.7	108111_17	CAD	25.43

10

20

30

【表 17】

ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行	プロテ オーム	Olav スコア
IPACIAGERR	9	175	9	35.7	108111_08	CAD	26.44
IPACIAGER	9	175	9	35.7	108111_15	CAD	26.58
IPACIAGER	9	175	9	35.7	108111_10	CAD	28.97
IPACIAGER	9	175	9	35.7	108111_08	CAD	25.32
IPACIAGER	9	175	9	35.7	108111_19	CAD	18.61
RYGTCIYQGR	9	175	9	35.7	108111_09	CAD	46.86
RYGTCIYQGR	9	175	9	35.7	108111_09	CAD	36.76
RYGTCIYQGR	9	175	9	35.7	108111_08	CAD	26.49
YGTCIYQGR	9	175	9	35.7	108111_13	CAD	18.83
YGTCIYQGR	9	175	9	35.7	108111_14	CAD	13.45
YGTCIYQGR	9	175	9	35.7	108111_11	CAD	17.98
LWAFCC	9	175	9	35.7	108111_09	CAD	14.67
LWAFCC	9	175	9	35.7	108111_09	CAD	17.76
LWAFCC	9	175	9	35.7	108111_08	CAD	16.32
LWAFCC	9	175	9	35.7	108111_11	CAD	14.67
IPACIAGER	9	175	10	37.5	104996_08	CAD	32.55
YGTCIYQGR	9	175	10	37.5	104996_07	CAD	46.07
YGTCIYQGR	9	175	10	37.5	104996_08	CAD	51.13
YGTCIYQGR	9	175	10	37.5	104996_08	CAD	46
LWAFCC	9	175	10	37.5	104996_07	CAD	13.49
LWAFCC	9	175	10	37.5	104996_07	CAD	15.84
IPACIAGER	9	175	11	39.42	105000_08	CAD	26.79
YGTCIYQGR	9	175	11	39.42	105000_07	CAD	48.16
YGTCIYQGR	9	175	11	39.42	105000_08	CAD	31.81
LWAFCC	9	175	11	39.42	105000_08	CAD	18.91
IPACIAGER	9	175	12	41.34	105012_07	CAD	21.86
IPACIAGER	9	175	12	41.34	105012_07	CAD	22.47
YGTCIYQGR	9	175	12	41.34	105012_06	CAD	38.63

10

20

30

【表 18】

ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行	プロテ オーム	Olav スコア
ADEVAAPEQIAADIPEV VVSLAWDESLAPK	9	175	12	41.34	105012_08	CAD	73.1
IPACIAGER	9	175	14	45.2	105036_08	CAD	30.12
IPACIAGER	9	175	15	47.1	105028_09	CAD	31.09
IPACIAGER	9	175	15	47.1	105028_08	CAD	30.44
IPACIAGER	10	175	7	31.73	89838_15	CAD	12.17
IPACIAGER	10	175	7	31.73	89838_16	CAD	40.44
IPACIAGER	10	175	7	31.73	89838_21	CAD	25.98
YGTCIYQGR	10	175	7	31.73	89838_21	CAD	13.57
YGTCIYQGR	10	175	7	31.73	89838_16	CAD	21.43
LWAFCC	10	175	7	31.73	89838_16	CAD	20.09
IPACIAGER	10	175	8	33.65	89854_11	CAD	33.26
IPACIAGER	10	175	8	33.65	89854_15	CAD	25.36
IPACIAGER	10	175	8	33.65	89854_09	CAD	30.91
IPACIAGER	10	175	8	33.65	89854_13	CAD	27.05
YGTCIYQGR	10	175	8	33.65	89854_10	CAD	29.63
YGTCIYQGR	10	175	8	33.65	89854_09	CAD	30.73
YGTCIYQGR	10	175	9	35.7	89870_10	CAD	47.83
IPACIAGER	10	175	14	45.2	89866_08	CAD	27.9
IPACIAGER	11	175	7	31.73	88249_16	CAD	33.62
YGTCIYQGR	11	175	7	31.73	88249_17	CAD	26.13

10

20

【表 19】

ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行	プロテ オーム	Olav スコア
YGTCIYQGR	11	175	7	31.73	88249_16	CAD	39.49
IPACIAGER	11	175	8	33.65	88265_09	CAD	39.79
IPACIAGER	11	175	8	33.65	88265_10	CAD	17.77
IPACIAGER	11	175	8	33.65	88265_13	CAD	21.59
IPACIAGER	11	175	8	33.65	88265_11	CAD	16.46
IPACIAGER	11	175	9	35.7	88277_10	CAD	29.52
YGTCIYQGR	11	175	9	35.7	88277_09	CAD	53.19
IPACIAGER	11	175	10	37.5	88205_07	CAD	25.87
YGTCIYQGR	11	175	11	39.42	88221_07	CAD	17.31
IPACIAGER	11	175	13	43.27	88253_13	CAD	29.07
IPACIAGER	12	175	8	33.65	101029_07	CAD	16.26
IPACIAGER	12	175	8	33.65	101029_09	CAD	13.61
IPACIAGER	12	175	8	33.65	101029_06	CAD	10.92
YGTCIYQGR	12	175	8	33.65	101029_09	CAD	36.99
YGTCIYQGR	12	175	8	33.65	101029_07	CAD	31.12
YGTCIYQGR	12	175	8	33.65	101029_07	CAD	29.94
LWAFCC	12	175	8	33.65	101029_07	CAD	6.25
LWAFCC	12	175	8	33.65	101029_07	CAD	13.49
IPACIAGER	12	175	9	35.7	101053_09	CAD	20.24
IPACIAGER	12	175	9	35.7	101053_08	CAD	14.04
IPACIAGER	12	175	10	37.5	100965_08	CAD	26.08

10

20

【表 2 0】

ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行	プロテ オーム	Olav スコア
YGTCIYQGR	12	175	10	37.5	100965_08	CAD	27.37
ADEVAAPEQIAADIPEV VVSLAWDESLAPK	12	175	12	41.34	101001_09	CAD	69.47
ADEVAAPEQIAADIPEV VVSLAWDESLAPK	12	175	14	45.2	101037_08	CAD	58.63
IPACIAGER	13	175	8	33.65	89762_09	CAD	25.42
IPACIAGER	13	175	8	33.65	89762_14	CAD	28.91
YGTCIYQGR	13	175	8	33.65	89762_14	CAD	37
YGTCIYQGR	13	175	8	33.65	89762_13	CAD	37.54
LWAFCC	13	175	8	33.65	89762_09	CAD	14.67
IPACIAGER	13	175	9	35.7	89774_14	CAD	18.53
IPACIAGER	13	175	9	35.7	89774_13	CAD	40.87
YGTCIYQGR	13	175	9	35.7	89774_09	CAD	14.42
YGTCIYQGR	13	175	9	35.7	89774_10	CAD	15.03
LWAFCC	13	175	9	35.7	89774_09	CAD	18.93
LWAFCC	13	175	9	35.7	89774_10	CAD	17.74
YGTCIYQGR	13	175	10	37.5	89706_10	CAD	22.71
IPACIAGER	13	175	15	47.1	89786_09	CAD	24.05
IPACIAGER	14	175	9	35.7	92232_10	CAD	42.27
IPACIAGER	14	175	9	35.7	92232_11	CAD	25.42
LWAFCC	14	175	9	35.7	92232_10	CAD	21.28

10

20

【表 2 1】

ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行	プロテオーム	Olav スコア
IPACIAGER	14	175	10	37.5	92204_07	CAD	27.84
ADEVAAAPEQIAADIPEV VVSLAWDESLAPK	14	175	12	41.34	92582_10	CAD	61.03
ADEVAAAPEQIAADIPEV VVSLAWDESLAPK	14	175	12	41.34	92582_09	CAD	70.47
IPACIAGER	14	175	13	43.27	92590_06	CAD	25.73
IPACIAGER	15	225	9	35.7	95617_12	CAD	17.02
IPACIAGER	15	225	9	35.7	95617_15	CAD	31.49
IPACIAGER	15	225	9	35.7	95617_14	CAD	29.94
IPACIAGER	15	225	9	35.7	95617_18	CAD	14.9
IPACIAGER	15	225	9	35.7	95617_17	CAD	21.35
IPACIAGER	15	225	9	35.7	95617_08	CAD	21.9
YGTCIYQGR	15	225	9	35.7	95617_16	CAD	23.54
YGTCIYQGR	15	225	9	35.7	95617_15	CAD	44.53
YGTCIYQGR	15	225	9	35.7	95617_10	CAD	38.13
LWAFCC	15	225	9	35.7	95617_09	CAD	15.3
LWAFCC	15	225	9	35.7	95617_09	CAD	18.93
YGTCIYQGR	18	1000	8	33.65	101101_08	CAD	51.06

10

20

【0084】

CPP17に関しては、対照血漿試料に対するCADにおけるタンパク質レベルの比率を2つの方法により算出する。第1の方法はCPP17を含有する各試料からの分画の数によりCAD/対照比率を算出する。結果は2.4である(表1d参照)。これに代えて、そしてさらに正確には、質量分析データ分析ソフトウェアにおいて各ペプチドに関して得られたOLAVスコアを用いて加重比率が得られる。この結果は2.1であり、これは本発明のCPPが対照血漿と比較して2.1倍のレベルでCAD血漿中に存在することを示している。それ自体では、CPPは、CPPのレベル上昇が心臓血管障害を進展させるリスクが高いかまたは心臓血管障害が存在することを示す有用な診断手段を提供する。

30

【0085】

対照分画の数：116
CAD分画の全数：279
全CAD/対照：2.4

【0086】

OLAVスコア対照：3720.25
OLAVスコア全CAD：7946.59
全CAD/対照：2.1

40

【0087】

表1dが配列番号：16のプレタンパク質から誘導され、そしてそれ自体、血漿中で見出されると予測されていない、配列番号：18(ADEVAAAPEQIAADIPEVVVSLAWDESLAPK)のトリプシンペプチドを表示することに注目することは興味深いことである。加えて、このトリプシンペプチドは疾患血漿においてのみ同定された。この観察は疾患の場合のプレタンパク質のプロセッシングの変化を反映し得る。

【0088】

表1e - CPP20

【表 2 2】

CPP #	ペプチド配列	CEX	塩	RP1	% B	実行番号
CPP 20	AFQYHSK	5	75	9	35.7	101089_11
	CEEDKEFTCR	10	175	9	35.7	89870_11
	CEEDKEFTCR					89870_09
	EPLDDYVNTQGPSLFSVTK			10	37.5	89802_08
	CEEDKEFTCR					89802_08
	CEEDKEFTCR	11	175	10	37.5	89802_08
	EPLDDYVNTQGPSLFSVTK					88205_08
	EPLDDYVNTQGPSLFSVTK			10	37.5	88205_08
	CEEDKEFTCR					88205_08
	EPLDDYVNTQGPSLFSVTK	11	39.42	88221_08		

10

【0089】

CPP 核酸

本発明の1つの態様は、さらに本明細書に記載するようなCPPまたは生物学的に活性なその部分をコードする精製された、または単離された核酸分子、およびその核酸フラグメントに関連する。該核酸を例えばさらに本明細書に記載するような、治療（DNAワクチン）および診断方法において、ならびに薬物スクリーニングアッセイにおいて使用することができる。

20

【0090】

本発明の対象はCPPをコードする精製された、単離された、または組換え核酸、それに相補的な配列、およびそのフラグメントである。本発明はまたCPPをコードするポリヌクレオチドと少なくとも95%のヌクレオチド同一性、CPPをコードするポリヌクレオチドと有利には99%のヌクレオチド同一性、好ましくは99.5%のヌクレオチド同一性、そして最も好ましくは99.8%のヌクレオチド同一性を有するポリヌクレオチド、またはそれに相補的な配列もしくはその生物学的に活性なフラグメントを含む精製された、または単離された核酸分子にも関連する。本発明の別の対象は、本明細書で定義するストリンジェントハイブリダイゼーション条件下でCPPをコードするポリヌクレオチド、またはそれに相補的な配列もしくはその変異体もしくはその生物学的に活性なフラグメントとハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む精製された、単離された、または組換え核酸に関する。

30

【0091】

別の好ましい態様では、本発明はCPPの一部または変異体をコードする精製された、または単離された核酸分子に関連し、そこにおいては一部または変異体はCPP生物学的活性を表示する。好ましくは該部分または変異体は天然発生CPPまたはその前駆体の一部または変異体である。

【0092】

本発明の別の対象は、配列番号：1 - 5、6 - 10、11 - 14、15 - 23、および24 - 28の群の1つから選択されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む、本質的にそれから構成される、またはそれから構成される、CPPをコードする精製された、単離された、または組換え核酸であり、そこにおいては単離された核酸分子は、CPP2に関しては：リパーゼ結合領域、疎水性面、またはジスルフィド結合；CPP9に関しては：基質RNA結合部位、基質ビリオン結合部位（好ましくはRSVビリオン）、リボヌクレアーゼ活性部位、またはジスルフィド結合；CPP21に関しては：コレステロール結合ドメイン、グリコシル化部位、またはジスルフィド結合；CPP17に関しては：細菌性エンドトキシン結合部位、またはジスルフィド結合；CPP20に関しては：クリングル結合ドメイン、またはジスルフィド結合；のような、1つまたはそれより多いモチーフ

40

50

フをコードする。

【0093】

C P Pコード化遺伝子のクローニングから決定されたヌクレオチド配列により、その他のC P P（例えば新規機能的ドメインを共有する）およびその他の種に由来するC P P相同体を同定および/またはクローニングするのに使用するために設計されたプローブおよびプライマーの作成が可能になる。

【0094】

「C P Pの生物学的に活性な部分」をコードする核酸フラグメントは、C P Pの生物活性を有するポリペプチドをコードする、C P Pをコードするヌクレオチド配列の一部を単離することにより、そして、そのC P Pのコード化部分を発現（例えばインビトロまたはインビボでの組換え発現による）し、そしてC P Pのコード化部分の活性を評価することにより調製することができる。

10

【0095】

本発明はさらに遺伝子コードの縮重により本発明のC P Pヌクレオチド配列とは異なり、そして本発明の同一のC P Pをコードする核酸分子を包含する。

【0096】

前記したC P Pヌクレオチド配列に加えて、C P Pのアミノ酸配列に変化を導くDNA配列多型性が集団（例えばヒト集団）内に存在し得ることは、当業者に理解されよう。かかる遺伝子多型は天然のアレル変異体のために集団内の個体間に存在し得る。かかる天然のアレル変異体は典型的にはC P Pコード化遺伝子のヌクレオチド配列または核酸配列で1 - 5%の分散に至る。

20

【0097】

ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で、標準的なハイブリダイゼーション技術によって、天然のアレル変異体に相当する核酸分子および本発明のC P P核酸の相同体を、本明細書に開示するcDNA、またはその一部をハイブリダイゼーションプローブとして用いて、本明細書に開示するC P P核酸に対する相同性に基づいて単離することができる。

【0098】

本発明が、本発明の任意のポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むことは理解されよう。

30

【0099】

C P P核酸の使用

C P Pをコードするポリヌクレオチド配列（またはその相補体）は、染色体および遺伝子マッピングにおける、およびアンチセンスRNAおよびDNAの作成におけるハイブリダイゼーションプローブとしての用途を含む種々の適用を有している。加えて、本明細書に記載するように、C P Pコード化核酸は薬学的な介入のための、例えばDNAワクチンの開発のための、および組換え技術によるC P Pの調製のための標的として有用である。その配列変異体を含む、本明細書に記載するポリヌクレオチドを診断アッセイに用いることができる。したがって体液または組織試料中のかかるポリヌクレオチドの存在の検出に基づく診断方法は本発明の特徴である。本発明による核酸基盤の診断アッセイの実例には、限定するものではないが、ハイブリダイゼーションアッセイ、例えばインサイチュハイブリダイゼーション、およびPCR基盤のアッセイが挙げられる。本明細書に記載するように、ポリヌクレオチドの伸長、配列変異体およびそのフラグメントを含むポリヌクレオチドを用いてかかるアッセイで使用するためのハイブリダイゼーションプローブまたはPCRプライマーを作成することができる。かかるプローブおよびプライマーは、本明細書に記載するC P Pポリヌクレオチドに類似するか、または相補的なゲノム配列を含むポリヌクレオチド配列を検出することができる。

40

【0100】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドのセグメントを増幅するためのPCRを実施するためのプライマー対を含む。各プライマー対は、i) 対の一方のプライマーは本発明のポ

50

リヌクレオチドの1本鎖と完全に対合した二本鎖を形成し、そして対の他方のプライマーは同一のポリヌクレオチドの相補鎖と完全に対合した二本鎖を形成する、および*i i*)プライマー対は10と2500ヌクレオチドの間の間隔で分けられたポリヌクレオチドの部位でこのような完全に対合する2本鎖を形成する;のような15と30ヌクレオチドの間の長さを有するオリゴヌクレオチドである。好ましくは、各プライマー対のその各々の相補的配列へのアニーリング温度は実質的に同一である。

【0101】

本発明のポリヌクレオチドから誘導されたハイブリダイゼーションプローブを、例えば顕微鏡スライド上に調製された固定または凍結組織切片または懸濁された細胞のような組織試料でインサイチュハイブリダイゼーションを実施するのに用いることができる。簡単には、制御された条件下で、標識されたDNAまたはRNAプローブを、準備された顕微鏡上の組織切片のそのDNAまたはRNA標的試料に結合させることが可能である。一般的に、プラスミドまたはバクテリオファージDNAベクターにクローン化された目的のDNAからなるdsDNAプローブをこの目的で用いるが、ssDNAまたはssRNAプローブもまた用いることができる。プローブは一般的に約15と40ヌクレオチドの間の長さのオリゴヌクレオチドである。あるいは、プローブはPCRランダムプライミングプライマー伸長またはプラスミドからのRNAのインビトロ転写により作成されたポリヌクレオチドプローブでよい(リポプローブ)。これらの後者のプローブは典型的には数百の長さの塩基対である。多くの標識基のうちのいずれかによりプローブを標識することができ、そしてプローブで利用される標識の型には特定の検出方法が対応する(例えば、必要に応じて、オートラジオグラフィ、X線検出、蛍光または可視顕微鏡分析)。蛍光標識プローブに存在する蛍光部分に対して指向する抗体のような、使用した検出分子の標識に対して指向する免疫細胞化学的技術を用いて反応物をさらにインサイチュ増幅することができる。特異的標識およびインサイチュ検出方法を、例えばHoward, G.C., Ed., *Methods in Nonradioactive Detection*, Appleton & Lange, Norwalk, Conn., (1993) (出典明示により本明細書の一部とする)に見出すことができる。

【0102】

ハイブリダイゼーションプローブおよびPCRプライマーもまた、天然発生ポリペプチドをコードする遺伝子のプロモーター、エンハンサーエレメントおよびイントロンを含む、本発明によって同定された全長タンパク質に相当するゲノム配列から選択することができる。またCPPをコードするヌクレオチド配列を用いて、そのCPPをコードする遺伝子をマッピングするための、および個体の遺伝子分析のためのハイブリダイゼーションプローブを構築することもできる。種々の技術により本発明のCPPをコードする遺伝子の変化、または変異を担持する個体をDNAレベルで検出することができる。診断に用いられる核酸を、例えば組織生検および死亡解剖材料を含む患者の細胞から入手することができる。ゲノムDNAを直接検出に用いることができるか、または分析の前にPCRを用いて酵素的に増幅することができる(Saiki, et al., *Nature* 324:163-166(1986))。またRNAまたはcDNAを同一の目的のために用いることもできる。実例としては、本発明の核酸に相補的なPCRプライマーを用いて本発明の遺伝子における変異を同定および分析することができる。正常な遺伝子型と比較して、増幅された生成物の大きさの変化により欠失および挿入を検出することができる。増幅させたDNAを本発明の放射性標識したRNA、またはこれに代えて本発明の放射性標識したアンチセンスDNA配列にハイブリダイズさせることにより点変異を同定することができる。RNAアーゼおよびS1保護のようなヌクレアーゼ保護アッセイにより、または化学的切断方法(例えばCotton, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397-4401(1985))により、または融点の差により特定の位置での配列変化を表すこともできる。「分子指標」(Kostrikis L.G. et al., *Science* 279:1228-1229(1998))、ヘアピン型、本発明の核酸に相補的であるプローブ配列を含有する一本鎖合成オリゴヌクレオチドを用いて点変異またはその他の配列変化を検出する、およびCPPの発現レベルをモニタリングすることもできる。

【0103】

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチドおよびアンチセンス化合物

PCRプライマーおよびアンチセンス化合物を含む本発明のオリゴヌクレオチドを市販されている自動DNA合成器、例えばApplied Biosystems (Foster City, CA) モデル380B、392または394 DNA/RNA合成器または同様の装置で慣用される手段により合成する。好ましくは、例えば以下の参照文献に開示されるようなホスホラミダイト化学を用いる：Beaucage and Iyer, Tetrahedron, 48:2223-2311(1992); Molko et al., 米国特許第4980460号; Koster et al., 米国特許第4725677号; Caruthers et al., 米国特許第4415732号; 第4458066号; および4973679号; 等。治療用途では、ヌクレアーゼ抵抗性バックボーンが好ましい。ヌクレアーゼ抵抗性を付与する多くの型の修飾オリゴヌクレオチド、例えばホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホスホラミダート等が利用可能であり、多くの文献、例えばホスホロチオアート：Stec et al., 米国特許第5151510号; Hirschbein, 米国特許第5166387号; Bergot, 米国特許第5183885号; ホスホラミダート：froehler et al. 国際出願PCT/US90/03138; およびさらに別の適用可能な化学の概説に関しては：Uhlmann and Peyman (前記で引用) に記載されている。アンチセンスオリゴヌクレオチドの長さは、特異的結合が望ましい標的ポリヌクレオチドでのみ生じ、そしてその他の偶発的な部位では生じないことを確実にするのに十分大きくなければならない。長さの範囲の上限は、約30 - 40ヌクレオチド以上の長さのオリゴマーを合成および精製する不都合および経費、短いオリゴヌクレオチドよりも長いオリゴヌクレオチドで誤対合に関する寛容性がより大きいこと等を含む、いくつかの因子により決定される。好ましくは、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは15から40ヌクレオチドの反応の長さを有している。さらに好ましくは、オリゴヌクレオチド部分は約18から25ヌクレオチドの範囲の長さを有している。

【0104】

プライマーおよびプローブ

例えば適切な配列のクローニングおよび制限ならびにNarang SA et al., (Methods Enzymol 1979;68:90-98) のリン酸ジエステル法、Brown EL et al., (Methods Enzymol 1979;68:109-151) のリン酸ジエステル法、Beaucage et al., (Tetrahedron Lett 1981,22:1859-1862) のジエチルホスホラミダイト、および欧州特許第0707592号に記載される固体支持体法のような方法(これらの開示はその全てを出典明示により本明細書の一部とする)による直接化学的合成を含むいずれかの適当な方法により本発明のプライマーおよびプローブを調製することができる。

【0105】

検出プローブは一般的には、例えば国際特許出願WO92/20702に開示されているペプチド核酸、米国特許第5185444号; 第5034506号および第5142047号に記載されるモルホリノ類似体などの核酸配列または非荷電性核酸類似体である。所望により、さらに別のdNTPをプローブに付加できないということでプローブを「伸長不可」にすることができる。類似体はそれ自体、通常伸長不可であり、そしてヒドロキシル基がもはや伸長に参加できないようなプローブの3'末端の修飾により核酸プローブを伸長不可にすることができる。例えば、それによりヒドロキシル基を消費またはそうでなければ遮断するために、プローブの3'末端を捕捉または検出標識で機能化することができる。

【0106】

分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的または化学的手段により検出可能にするために所望により当分野で公知の任意の標識基を組み込むことにより、本発明のポリヌクレオチドのいずれかを標識することができる。さらに別の事例には、Urdea et al., (Nucleic Acids Research, 11:4937-4957, 1988) またはSanchez-Pescador et al., (J.Clin.Microbiol. 26(10):1934-1938, 1988) に記載されるような、核酸フラグメントの非放射性標識が挙げられる。加えて、本発明によるプローブはシグナル増幅を可能にするような構造特性を有することができる、かかる構造特性は、例えばUrdea et al., (Nucleic Acids Sym

p. Ser. 24:197-200, 1991) または欧州特許第 0 2 2 5 8 0 7 号 (Chiron) に記載されるもののような分岐した DNA プローブである。

【0107】

固体支持体上でのプライマーまたは増幅された DNA のようなプライマー伸長生成物の固定を促進するために、標識を用いてプライマーを捕捉することもできる。捕捉標識はプライマーまたはプローブに結合し、そして固相試薬の特異的結合メンバーと結合対を形成する特異的結合メンバー (例えばビオチンおよびストレプトアビジン) でよい。したがってポリヌクレオチドまたはプローブにより担持される標識の型に依存して、標的 DNA の捕捉または検出を行うことができる。さらに、本明細書にて提供されるポリヌクレオチド、プライマーまたはプローブは、それ自体捕捉標識として提供され得る。例えば固相試薬の結合メンバーが核酸配列である場合、それによりプライマーまたはプローブを固相に固定するために、プライマーまたはプローブの相補的部分に結合するようにそれを選択することができる。ポリヌクレオチドプローブ自体が結合メンバーとして提供される場合、プローブが標的に相補的でない配列または「テイル」を含有することは当業者には認識されよう。ポリヌクレオチドプライマー自体が捕捉標識として提供される場合、プライマーの少なくとも一部が固相の核酸と自由にハイブリダイズする。DNA 標識技術は当業者に公知である。

10

【0108】

本発明のプローブは多くの目的に関して有用である。ゲノム DNA へのサザンハイブリダイゼーションにおいてこれらを特に使用することができる。プローブを使用して PCR 増幅産物を検出することもできる。その他の技術を用いて、これらを使用して CPP コード化遺伝子または mRNA における誤対合を検出することもできる。

20

【0109】

本発明のいずれかの核酸、ポリヌクレオチド、プライマーおよびプローブを便宜的に固体支持体に固定することができる。固体支持体は当業者に公知であり、そして反応トレイのウェルの壁、試験管、ポリスチレンビーズ、磁性ビーズ、ニトロセルロースストリップ、膜、ラテックス粒子のような微粒子、ヒツジ (またはその他の動物) 赤血球、デュラサイト等を含む。固体支持体はそれほど重要でなく、そして当業者により選択され得る。したがって、ラテックス粒子、微粒子、磁性または非磁性ビーズ、膜、プラスチック管、マイクロタイターウェルの壁、ガラスまたはシリコンチップ、ヒツジ (またはその他の動物) 赤血球およびデュラサイトは全て適当な実例である。固相に核酸を固定するための適当な方法には、イオン性、疎水性、共有結合相互作用等が挙げられる。固体支持体は本明細書中で使用される際には、不溶性であるか、または続く反応により不溶化することができる任意の材料を指す。捕捉試薬に引き付け、そして固定するその固有の能力に関して固体支持体を選択することができる。あるいは、固相は捕捉試薬を引き付け、そして固定する能力を有するさらに別の受容体を保持することができる。さらに別の受容体には、捕捉試薬自体、または捕捉試薬に結合された荷電物質に関して逆に荷電している荷電物質が挙げられる。さらに別の代替として、受容体分子は固体支持体に結合した任意の特異的結合メンバーでよく、そしてこれは特異的結合反応を介して捕捉試薬を固定する能力を有する。受容体分子は、アッセイの実施前またはアッセイの実施中の捕捉試薬の固体支持体材料への間接的な結合を可能にする。したがって固相はプラスチック、誘導体化されたプラスチック、磁性または非磁性金属、試験管のガラスまたはシリコン表面、マイクロタイターウェル、シート、ビーズ、微粒子、チップ、ヒツジ (またはその他の動物) 赤血球、デュラサイトおよび当業者に公知のその他の形態でよい。本発明の核酸、ポリヌクレオチド、プライマーおよびプローブを固体支持体に個別に、または単一の固体支持体に対し本発明の少なくとも 2、5、8、10、12、15、20 または 25 個の異なるポリヌクレオチドの群で結合または固定することができる。加えて、本発明のもの以外のポリヌクレオチドを本発明の 1 つまたはそれより多いポリヌクレオチドと同一の固体支持体に結合することができる。

30

40

【0110】

50

本明細書で提供する任意のポリペプチドを固体支持体上で重複部分または無作為の位置で結合させることができる。あるいは、本発明のポリヌクレオチドを、任意のその他のポリヌクレオチドの結合部位と重複しない、固体支持体の異なった領域に結合させている秩序のあるアレイに結合させることができる。好ましくは、かかるポリヌクレオチドの秩序のあるアレイを、明確な位置が記録され、そしてアッセイ手順の一部として評価され得る「アドレス可能」になるように設計する。アドレス可能なポリヌクレオチドのアレイは典型的には異なる既知の位置で基質の表面に結合している複数の異なるオリゴヌクレオチドプローブを含む。各ポリヌクレオチド位置の正確な位置の知識によりこれらの「アドレス可能」なアレイがハイブリダイゼーションアッセイにおいて特に有用になる。当分野で公知のアドレス可能なアレイ技術を本発明のポリヌクレオチドと共に用いることができる。これらのポリヌクレオチドアレイの1つの特定の実施態様はGenechipとして公知であり、そして米国特許第5143854号；PCT公開第WO90/15070号および第92/10092号に一般的に記載されており、その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする。

10

【0111】

変異体核酸およびポリペプチドを得るための方法

集団で存在し得るC P P配列の天然発生アレル変異体に加えて、C P Pをコードするヌクレオチド配列に変異により変化を導入し、それによりC P Pの機能的な能力を変化させるかまたは変化させずに、コードされたC P Pのアミノ酸配列に変化を導くことができることは当業者には理解されよう。

20

【0112】

変異体のいくつかの型には1) 1つもしくはそれより多いアミノ酸残基を保存的、もしくは非保存的アミノ酸残基で置換し、かかる置換されたアミノ酸残基は遺伝子コードによりコードされるものであってもなくてもよいもの；2) 1つもしくはそれより多いアミノ酸残基が置換基を含むもの；または3) 変異したC P Pが、ポリペプチドの半減期を増す化合物のような別の化合物（例えばポリエチレングリコール）と融合されているもの、または4) リーダー、シグナルもしくはアンカー配列、C P Pの精製に用いられる配列、もしくは前駆体タンパク質に由来する配列のようなさらに別のアミノ酸がC P Pに融合されているもの；を含むことが企図されている。かかる変異体は当業者の範囲内であると考えられる。

30

【0113】

例えば、タンパク質の生物学的活性を実質的に変化させない配列のアミノ酸置換に至るヌクレオチド置換を作ることができる。生物学的活性を変化させずに、C P Pをコードする野生型配列またはその生物学的活性フラグメントもしくはその相同体からアミノ酸残基を変化させることができる。一般的に、本発明のC P P間で共有されるアミノ酸残基はあまり変化を受け易くないと予測される。

【0114】

別の態様では、本発明は生物学的活性の上昇、または生物学的活性の修飾に至るアミノ酸残基における変化を含有する、C P Pをコードする核酸分子に関連する。別の態様では、本発明はC P P生物学的活性に必須であるアミノ酸残基において変化を含有するC P Pをコードする核酸分子に関連する。かかるC P Pは配列番号：1 - 5、6 - 10、11 - 14、15 - 23、および24 - 28からのアミノ酸配列で異なり、そして活性の低下、または1つまたはそれより多いC P P生物学的活性の本質的な欠如を表示する。

40

【0115】

部位特異的変異誘発およびPCR媒介の変異誘発のような標準的な技術により、変異、置換、付加または欠失を配列番号：1 - 5、6 - 10、11 - 14、15 - 23、および24 - 28のいずれかに導入することができる。例えば、保存的アミノ酸置換を1つまたはそれより多い予測される非必須アミノ酸残基に作ることができる。「保存的アミノ酸置換」はアミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基と置き換わっているものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当分野で定義されている。これらのファ

50

ミリーには塩基性側鎖（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、荷電していない極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、無極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が挙げられる。したがって、C P Pの予測される非必須アミノ酸残基、またはその生物学的に活性なフラグメントもしくはその相同体を同一側鎖ファミリーからのまた別のアミノ酸残基と置き換えることができる。あるいは、別の実施態様では、飽和変異誘発によるように、C P Pコード化配列の全てまたは一部に沿って無作為に変異を導入することができ、そして得られた変異体をC P P生物学的活性に関してスクリーニングして活性を保持する変異体を同定することができる。配列番号：1 - 5、6 - 10、11 - 14、15 - 23、および24 - 28の1つをコードするヌクレオチドの変異誘発の後、コードされたタンパク質を無作為に発現させ、そして例えば本明細書にて提供されるような任意の適当なアッセイでタンパク質の活性を決定することができる。

10

【0116】

本発明またはC P Pキメラまたは融合タンパク質をも提供する。C P P「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は本明細書中で使用される際には、非C P Pポリペプチド配列に作動可能なように連結されているかまたはフレーム内で融合されている本発明のC P Pまたはそのフラグメントを含む。好ましい実施態様では、C P P融合タンパク質は少なくとも1つのC P Pの生物学的活性部分を含む。さらに別の好ましい実施態様では、C P P融合タンパク質は少なくとも2つのC P Pの生物学的活性部分を含む。例えば1つの実施態様では、融合タンパク質は、C P Pドメイン配列がG S T配列のC末端に融合されているG S T - C P P融合タンパク質である。かかる融合タンパク質は組換えC P Pの精製を促進することができる。さらに別の実施態様では、融合タンパク質は、例えば特定の宿主細胞における望ましい細胞局在を可能にするために、そのN末端で異種性のシグナル配列を含有するC P Pである。なおさらに別の実施態様では、融合はC P P生物学的活性フラグメントおよび免疫グロブリン分子である。かかる融合タンパク質は、例えばC P P結合部位の価数を増加させるのに有用である。例えば生物学的に活性なC P PフラグメントをI g G F c部分に融合させることにより、2価のC P P結合部位を形成することができる。

20

30

【0117】

本発明のC P P融合タンパク質を免疫原として用いて対象において、抗C P P抗体を生成物し、C P PまたはC P Pリガンドを精製し、そしてスクリーニングアッセイにおいてC P Pモジュレーターを同定することができる。

【0118】

さらに、かかるペプチドをコードする対応する核酸のフラグメントから、組換えにより生成されたペプチドをスクリーニングすることにより、単離されたC P Pのフラグメントを得ることもできる。加えて、慣用されるメリフィールド固相f - M o cまたはt - B o c化学のような、当分野で公知の技術を用いてフラグメントを化学的に合成することができる。例えば、本発明のC P Pを適宜フラグメントの重複を含まない望ましい長さのフラグメントに分割するか、または好ましくは望ましい長さの重複フラグメントに分割することができる。（組換えによるか、または化学的合成により）フラグメントを生成し、そして例えばマイクロインジェクションアッセイまたはインビトロタンパク質結合アッセイにより試験して、C P P生物学的活性を有するこれらのペプチジルフラグメントを同定することができる。説明のための実施態様では、C P P標的結合領域のようなC P Pのペプチジル部分を、その各々がC P Pの別個のフラグメントを含有するチオレドキシ融合タンパク質として発現することにより、C P P活性に関して試験することができる（例えば米国特許第5270181号および第5292646号；およびP C T公開第W O 9 4 / 0 2 5 0 2 参照（その開示は出典明示により本明細書の一部とする））。

40

50

【0119】

加えて、C P Pコード化配列のフラグメントのライブラリーを用いて、C P Pの変異体のスクリーニングおよび続く選択のためのC P Pフラグメントの変化に富んだ集団を作成することができる。1つの実施態様では、分子あたり約1回のみニックングを生じる条件下で、C P Pコード化配列の二本鎖P C Rフラグメントをヌクレアーゼで処理し、二本鎖D N Aを変性し、D N Aを再生して異なるニックングされた生成物からのセンス/アンチセンス対を含み得る二本鎖D N Aを形成し、S 1ヌクレアーゼでの処理により再形成された二本鎖から一本鎖部分を除去し、そして得られたフラグメントライブラリーを発現ベクターにライゲートすることにより、コード化配列フラグメントのライブラリーを作成することができる。この方法により、種々の大きさのC P PのN末端、C末端および内部のフラグメントをコードする発現ライブラリーを誘導することができる。

【0120】

ペプチドのアミノ酸配列における変化が機能的C P P相同体に至るかどうかを、種々のペプチドの少なくとも1つのC P P生物学的活性を評価することにより容易に決定することができる。1つ以上の置換が生じたペプチドを同一の様式で容易に試験することができる。

【0121】

C P P組成物の化学的製造

標準的な技術(例えばStewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Ed., Pierce Chemical Company, Rockford, IL, 1984)により本発明のペプチドを合成する。好ましくは市販のペプチド合成器、例えばApplied Biosystems, Inc. (Foster City, CA) モデル430Aを用い、そして収束合成研究法、例えばKent et al., 米国特許第6184344号およびDawson and Kent, Annu. Rev. Biochem., 69:923-960 (2000)で複数の、別個に合成された、そして精製されたペプチドから本発明のポリペプチドを組み立てることができる。カルボキシル末端残基から出発し、そして段階的な様式で全ペプチドが形成されるまでアミノ酸を付加して、架橋ポリスチレン支持体上で固相合成により本発明のペプチドを組み立てることができる。以下の参照文献は合成の間に用いた化学に対する手引きである: Schnolzer et al., Int. J. Peptide Protein Res., 40:180-193 (1992); Merrifield, J. Amer. Chem. Soc., 85:2149(1963); Kent et al., Peptide 1984, Ragnarsson, Ed. (Almquist and Weksell, Stockholm, 1984) pg185; Kent et al., Peptide Chemistry 84, Izumiya, Ed. (Protein Research Foundation, B.H. Osaka, 1985) pg217; Merrifield, Science 232:341-347(1986); Kent, Ann. Rev. Biochem. 57:957-989(1988)、およびこれらの後者の2つの参照文献で引用された参照文献。

【0122】

好ましくは、Dawson et al., Science 266:776-779(1994)およびKent et al., 米国特許第6184344号に記載されるように、本発明のポリペプチドの化学合成を従来の化学的ライゲーションによるペプチドフラグメントの組み立てにより実施する。簡単には、研究法では、第1のペプチドフラグメントに酸化されていないスルフヒドリル側鎖を有するN末端システインを提供し、そして第2のペプチドフラグメントにC末端チオエステルを提供する。次いでN末端システインの酸化されていないスルフヒドリル側鎖をC末端チオエステルと縮合して、第1および第2のペプチドフラグメントが - アミノチオエステルで連結されている中間ペプチドフラグメントを生成する。次いで中間ペプチドフラグメントの - アミノチオエステルに分子内再構成を行い、第1および第2のペプチドフラグメントがアミド結合で連結されているペプチドフラグメント生成物を生成する。好ましくは、以下に記載するように、環状チアゾリジン保護基により内部フラグメントのN末端システインを望ましくない環化および/または連結反応から保護する。好ましくは、かかる環状チアゾリジン保護基はチオプロリニル基である。

【0123】

C末端チオエステルを有するペプチドフラグメントを以下の参照文献(これは出典明示により本明細書の一部とする)に記載されるように生成することができる: Kent et al.,

米国特許第 6 1 8 4 3 4 4 号 ; Tam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 92:12485-12489 (1995) ; Blake, Int. J. Peptide Protein Res., 17:273 (1981) ; Cann et al., Tetrahedron Letters, 36:1217-1220 (1995) ; Hackeng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94:7845-7850 (1997) ; または Hackeng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 96:10068-10073 (1999)。好ましくは、Hackeng et al. (1999) に記載される方法を用いる。簡単には、Schnolzer et al., Int. J. Peptide Protein Res., 40:180-193 (1992) (これは出典明示により本明細書の一部とする) に開示される Boc 化学のインサイチュ中和 / HBTU 活性化手順を用いることにより、固相支持体 (前記で記載) 上で典型的には 0.25 ミリモルのスケールでペプチドフラグメントを合成する。(HBTU はヘキサフルオロリン酸 2 - (1H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウムであり、そして Boc は tert - ブトキシカルボニルである)。各合成サイクルは無溶媒の TFA との 1 から 2 分間処理、1 分間の DMF 流洗浄、DIEA の存在下で予め活性化された Boc - アミノ酸 1.0 ミリモルの 10 から 20 分間の結合時間、および第 2 の DMF 流洗浄による N - Boc 除去からなる。(TFA はトリフルオロ酢酸であり、DMF は N, N - ジメチルホルムアミドであり、そして DIEA は N, N - ジイソプロピルエチルアミンである)。過剰の DIEA (3 ミリモル) の存在下、N - Boc アミノ酸 (1.1 ミリモル) を HBTU (DMF 中 0.5 M) 1.0 ミリモルで 3 分間、予め活性化する。各々の結合工程の後、例えば Sarin et al., Anal. Biochem., 117:147-157 (1981) に開示されるような、慣用される定量的ニヒドリンアッセイで残留する遊離のアミンを測定することにより収量を決定する。Gln 残基の結合の後、TFA を用いる脱保護の前および後に、DCM 流洗浄を用いて、起こり得る高温 (TFA / DMF) 触媒されるピロリドン形成を防御する。鎖の組み立てが完了した後、ペプチドフラグメントを脱保護し、そして 0 で 1 時間、スカベンジャーとして 4 % p - クレゾールを伴って無水 HF で処理することにより、樹脂から切断する。イミダゾール側鎖 2, 4 - ジニトロフェニル (dnp) 保護基を His 残基に残すが、それは dnp 除去手順が C 末端チオエステル基と適合しないからである。しかしながら、dnp はライゲーション反応の間にチオールにより徐々に除去される。切断の後、ペプチドフラグメントを氷冷ジエチルエーテルで沈殿させ、アセトニトリル水溶液に溶解し、そして凍結乾燥する。

10

20

30

40

50

【0124】

Hackeng et al., (1999) または匹敵するプロトコールに開示されるように作られたトリチル結合メルカプトプロピオン酸 - ロイシン (TAMPAL) 樹脂上で前記したチオエステルペプチドフラグメントを合成するのが好ましい。簡単には、DIEA 6 ミリモルの存在下、HBTU 3.6 ミリモルで N - Boc - Leu (4 ミリモル) を活性化し、そして p - メチルベンズヒドリルアミン (MBHA) 樹脂 2 ミリモル、または等価物に 16 分間結合させる。次に、DIEA 6 ミリモルの存在下、S - トリチルメルカプトプロピオン酸 3 ミリモルを HBTU 2.7 ミリモルで活性化し、そして Leu - MBHA 樹脂に 16 分間結合させる。TFA 中 3.5 % トリイソプロピルシランおよび 2.5 % H₂O で 1 分間処理を 2 回でトリチル保護基を除去した後、得られた TAMPAL 樹脂をポリペプチド鎖組み立てのための出発樹脂として用いることができる。Schnolzer et al., (前記で引用) に開示されるように標準的なインサイチュ中和ペプチド結合プロトコールを 1 時間用いることにより、任意の望ましいアミノ酸でチオエステル結合を形成することができる。最終的なペプチドフラグメントを無水 HF で処理することにより、C 末端活性化されたメルカプトプロピオン酸 - ロイシン (MPAL) チオエステルペプチドフラグメントを生じる。

【0125】

好ましくは、Hackeng et al., (1999) に記載される条件、または同様の条件下で元来の (native) 化学的ライゲーションにおいてチオゾリジン保護されたチオエステルペプチドフラグメント中間体を用いる。簡単には、6 M グアニジン、4 (容量 / 容量) % ベンジルメルカプタンおよび 4 (容量 / 容量) % チオフェノールを含有する 0.1 M リン酸塩バッファ (pH 8.5) をライゲートする乾燥ペプチドに加えて、チオールおよび TFA の

添加のために凍結乾燥したペプチドから低下したpH約7で、1-3mMの最終ペプチド濃度が得られる。好ましくは、加熱ブロック中37でライゲーション反応を行い、そして定期的にボルテックスしてチオール添加物を平衡にする。MALDI-MSまたはHPLCおよびエレクトロスプレーイオン化MSにより、反応を完了の程度に関してモニタリングすることができる。

【0126】

元来の化学的ライゲーション反応を完了または停止した後、生成物のN末端チアゾリジン環をO-メチルヒドロキシルアミン(0.5M)のようなシステイン脱保護剤とpH3.5-4.5で37で2時間の処理により開環し、その後10倍過剰のトリス-(2-カルボキシエチル)-ホスフィン反応混合物に加えて、慣用される調製用HPLCによる生成物の精製の前に任意の酸化反応成分を完全に還元する。好ましくは、ライゲーション生成物を含有する分画をエレクトロスプレーMSにより同定し、プールし、そして凍結乾燥する。

10

【0127】

合成が完了し、そして最終生成物を精製した後、最終的なペプチド生成物を、慣用される技術、例えばCreighton, Meth.Enzymol., 107:305-329 (1984); White, Meth.Enzymol., 11:481-484 (1967); Wetlaufer, Meth.Enzymol., 107:301-304 (1984); 等によりリフォールディングすることができる。好ましくは、最終生成物を以下の方法等による空気酸化によりリフォールディングする:還元された凍結乾燥生成物を100mMトリス、10mMメチオニンを含む1M塩酸グアニジン(または同様のカオトロピック剤)(pH8.6)中に溶解する(約0.1mg/ml)。穏やかに一晩攪拌した後、リフォールディングした生成物を慣用されるプロトコルで逆相HPLCにより単離する。

20

【0128】

組換え発現ベクターおよび宿主細胞

本明細書に記載するポリヌクレオチド配列を、適切な宿主細胞において対応するポリペプチドの発現を指向する組換えDNA分子に用いることができる。遺伝子コードの縮重のために、その他のDNA配列は等価のアミノ酸配列をコードすることができ、そしてクローニングおよびC/Pの発現に用いることができる。特定の宿主細胞に好ましいコドンを選択し、そして天然発生ヌクレオチド配列に置換して発現の率および/または効率を上昇させることができる。望ましいC/Pをコードする核酸(例えばcDNAまたはゲノムDNA)をクローニング(DNAの増幅)、または発現のための複製可能なベクターに挿入することができる。当分野で公知の方法によって、ポリペプチドをいずれかの多くの発現系で組換えにより発現することができる(Ausubel et al., editors, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1990)。適切な宿主細胞には、酵母、細菌、始原細菌、真菌、ならびに昆虫および哺乳動物細胞を含む動物細胞、例えば限定するものではないが骨髄幹細胞を含む幹細胞を含む初代細胞が挙げられる。さらに具体的には、これらには、限定するものではないが組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌、および酵母発現ベクターで形質転換された酵母のような微生物が挙げられる。また(バキュロウイルスのような)組換え昆虫ウイルスおよび哺乳動物発現系で感染された昆虫細胞もまた含まれる。発現される核酸配列を種々の手順によりベクターに挿入することができる。一般的には、当分野で公知の技術を用いてDNAを適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入する。ベクター成分には一般的には、限定するものではないが、1つまたはそれより多いシグナル配列、複製起点、1つまたはそれより多いマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーターおよび転写終止配列が挙げられる。1つまたはそれより多いこれらの成分を含有する適切なベクターの構築は当業者に公知の標準的なライゲーション技術を用いる。

30

40

タンパク質の発現を誘起するかまたは引き起こすのに適切な条件下で、C/Pをコードする核酸を含有する発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養することにより本発明のC/Pを生成する。当業者により確認されているように、C/P発現に適切な条件は発現ベクターおよび宿主細胞の選択で異なる。例えば発現ベクターにおける構成的プロモ-

50

ターの使用は宿主細胞成長および増殖の通常的な最適化を必要とし得るが、誘導プロモーターの使用は誘導のための適切な成長条件を必要とする。加えて、いくつかの実施態様では、収集の時期が重要である。例えば昆虫細胞発現で用いるバキュロウイルス系は溶解ウイルスであり、そして収集時期の選択は生じる生成物に重要である。

【0129】

挿入された配列の発現を調整する、または望ましい様式で発現されたタンパク質をプロセッシングする能力に関して宿主細胞株を選択することができる。タンパク質のかかる修飾には、限定するものではないがグリコシル、アセチル、リン酸塩、アミド、脂質、カルボキシル、アシルまたは炭水化物基が挙げられる。タンパク質の「プレプロ」形態を切断する翻訳後プロセッシングもまた正確な挿入、フォールディングおよび/または機能に重要である。10

実例としては、CHO、HeLa、BHK、MDCK、293、W138等のような宿主細胞は特異的細胞機構およびかかる翻訳後活性のための特徴的なメカニズムを有し、そして導入された外来のタンパク質の正確な修飾およびプロセッシングを確実にするとうに選択することができる。特に興味深いのはキロショウジョウバエ細胞、出芽酵母およびその他の酵母、大腸菌、枯草菌、SF9細胞、C129細胞、293細胞、パンカビ属、BHK、CHO、COSおよびHeLa細胞、線維芽細胞、シュワノーマ細胞系、不死化哺乳動物骨髄およびリンパ細胞系、ジャーカット細胞、ヒト細胞およびその他の初代細胞である。

【0130】

CPPをコードする核酸は、それを別の核酸配列と機能的な関係に置くことにより「作動可能なように連結」されなければならない。例えば、プレ配列または分泌リーダーのためのDNAは、ポリペプチドの分泌に参加するプレタンパク質として発現される場合、ポリペプチドのDNAに作動可能なように連結されている；プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写に影響する場合、コード化配列に作動可能なように連結されている；またはリボソーム結合部位は、翻訳を促進するように位置している場合、コード化配列に作動可能なように連結されている。一般的に、「作動可能なように連結された」DNA配列は近接しており、そして分泌リーダーまたはその他のポリペプチド配列の場合、近接しており、そして読み取りの相にある。しかしながら、エンハンサーは近接している必要はない。都合の良い制限部位でのライゲーションにより連結を達成する。かかる部位が存在しない場合、慣行に従って合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを用いる。30

プロモーター配列は構成的または誘導プロモーターのいずれかをコードする。プロモーターは天然発生プロモーターかまたはハイブリッドプロモーターのいずれかでよい。1つ以上のプロモーターのエレメントを組合せるハイブリッドプロモーターもまた当分野で公知であり、そして本発明において有用である。発現ベクターはさらに別のエレメントを含むことができ、例えば発現ベクターは2つの複製系でよく、したがって2つの生物、例えば発現のためには哺乳動物または昆虫細胞で、およびクローニングおよび増幅のためには原核細胞宿主で、それを維持することが可能になる。双方の発現およびクローニングベクターは、ベクターが1つまたはそれより多い選択された宿主細胞において複製するのを可能にする核酸配列を含有する。かかる配列は種々の細菌、酵母、およびウイルスに関して周知である。プラスミドpBR322に由来する複製起点はたいていのグラム陰性細菌に相当40

であり、2：プラスミド起点は酵母に相当であり、そして種々のウイルス起点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSVまたはBPV)は哺乳動物細胞のクローニングベクターに有用である。さらに、発現ベクターを組込むために、発現ベクターは少なくとも1つの、宿主細胞ゲノムに対する配列相同体、および好ましくは発現構築物をフランキングする2つの相同配列を含有する。組込みベクターはベクターの封入に関して適切な相同配列を選択することにより、宿主細胞における特定の位置を指向することができる。組込みベクターの構築は当分野で公知である。さらに別の実施態様では、相同組換えにより異種性発現制御エレメントは宿主細胞の内因性遺伝子と作動可能なように連結することができる(米国特許第6410266号および第6361972号に記載、その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする)。この技術により選択された制御エレメントで発現50

を望ましいレベルまで調節することが可能になるが、宿主細胞により内因的に発現される C P P の適切なプロセッシングおよび修飾を確実にする。有用な異種性発現制御エレメントには、限定するものではないが C M V 前初期プロモーター、H S V チミジンキナーゼプロモーター、初期および後期 S V 4 0 プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (R S V) のプロモーターのようなレトロウイルス L T R のプロモーター、およびメタロチオネインプロモーターが挙げられる。

【 0 1 3 1 】

好ましくは、発現ベクターは形質転換された宿主細胞の選択を可能にする選択マーカー遺伝子を含む。選択遺伝子は当分野で公知であり、そして用いる宿主細胞で異なる。発現およびクローニングベクターは典型的には選択マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は (a) 抗生物質もしくはその他の毒素、例えばアンピシリン、ネオマイシン、メソトレキセートもしくはテトラサイクリンに対する耐性を付与する ; (b) 栄養要求欠損を補う ; または (c) 複合培地から利用できない必須栄養、例えば桿菌には D - アラニンラセマーゼをコードする遺伝子を供給する ; タンパク質をコードする。

10

【 0 1 3 2 】

C P P をコードするヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞を、細胞培養からのコードされたタンパク質の発現および回収に適切な条件下で培養することができる。用いる配列および / またはベクターに依存して、組換え細胞により生成されたタンパク質を分泌する、膜結合する、または細胞内に含有することができる。当業者に理解されるように、C P P をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを、原核または真核細胞膜を通した C P P の分泌を指向するシグナル配列と共に設計することができる。望ましい C P P を直接的のみならず、異種性ポリペプチドとの融合ポリペプチドとして組換えにより生成することもできる、この異種性ポリペプチドはシグナル配列または成熟タンパク質もしくはポリペプチドの N 末端で特異的切断部位を有するその他のポリペプチドでよい。一般的にシグナル配列はベクターの成分でよいが、またはベクターに挿入される C P P コード化 D N A の一部でよい。シグナル配列は例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、l p p、または熱安定性エンテロトキシン I I リーダーの群から選択される原核細胞シグナル配列でよい。酵母分泌に関しては、シグナル配列は例えば酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー (サッカロミセスおよびクルイペロミセス a 因子リーダー、後者は米国特許第 5 0 1 0 1 8 2 号に記載)、または酸ホスファターゼリーダー、カンジダ・アルピカンズグルコアミラーゼリーダー (1 9 9 0 年 4 月 4 日に公開された欧州特許第 3 6 2 1 7 9 号)、または 1 9 9 0 年 1 1 月 1 5 日に公開された W O 9 1 1 3 6 4 6 に記載されるシグナルでよい。哺乳動物細胞発現では、同一のまたは関連する種の分泌ポリペプチドからのシグナル配列のような哺乳動物シグナル配列、およびウイルス分泌リーダーを用いてタンパク質の分泌を指向することができる。選択した発現系によってコード化配列を適当なベクターに挿入し、これは今度は特定の特徴的な「制御エレメント」または「調節配列」の存在を必要とする。適切な構築物は一般的に当分野で公知であり (Ausubel, et al., 1990)、そして多くの場合、Invitrogen (San Diego, Calif.)、Stratagene (La Jolla, Calif.)、Gibco BRL (Rockville, Md.) または Clontech (Palo Alto, Calif.) のような商業用提供者から入手可能である。

20

30

40

【 0 1 3 3 】

細菌系における発現

「 B L U E S C R I P T 」 Phagemid (Stratagene) または 「 p S P O R T 1 」 (Gibco BRL) のハイブリッド l a c Z プロモーターのような誘導プロモーターを用いて細菌細胞の形質転換を達成することができる。加えて、限定するものではないが、「 B L U E S C R I P T 」 (a - ガラクトシダーゼ ; Stratagene) または p G E X (グルタチオン S - トランスフェラーゼ ; Promega, Madison, Wis.) を含む、容易に検出および / または精製することができる切断可能な融合タンパク質を生成するために細菌細胞で使用するための多くの発現ベクターを選択することができる。適当な細菌プロモーターは、細菌 R N A ポリ

50

メラゼを結合し、そしてC P P遺伝子のコード化配列のm R N Aへの下流(3')転写を開始することができる任意の核酸配列である。細菌プロモーターは、通常コード化配列の5'末端に近位に位置する転写開始領域を有している。この転写開始領域は典型的にはR N Aポリメラーゼ結合部位および転写開始部位を含む。代謝経路酵素をコードする配列は特に有用なプロモーター配列を提供する。事例には、ガラクトース、ラクトースおよびマルトースのような糖代謝酵素から誘導されるプロモーター配列、ならびにトリプトファンのような生合成酵素から誘導される配列が挙げられる。バクテリオファージに由来するプロモーターを使用することもでき、そして当分野で公知である。加えて、合成プロモーターおよびハイブリッドプロモーターもまた有用である；例えばt a tプロモーターはt r pおよびl a cプロモーター配列のハイブリッドである。さらに、細菌プロモーターは、細菌性R N Aポリメラーゼに結合しそして転写を開始する能力を有する非細菌起源の天然発生プロモーターを含むことができる。効率的なリボソーム結合部位もまた望ましい。発現ベクターは細菌においてC P Pの分泌を提供するシグナルペプチド配列を含むこともできる。シグナル配列は典型的には、当分野で公知のような、細胞からのタンパク質の分泌を指向する疎水性アミノ酸からなるシグナルペプチドをコードする。タンパク質は、成長培地(グラム陽性細菌)、または細胞の膜の内と外の間位置する細胞膜周辺腔(グラム陰性細菌)のいずれかに分泌される。細菌性発現ベクターはまた形質転換されている細菌株の選択を可能にする選択マーカー遺伝子を含むこともできる。適当な選択遺伝子は、アンピシリン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、カナマイシン、ネオマイシンおよびテトラサイクリンのような薬物抵抗遺伝子を含む。選択マーカーはまたヒスチジン、トリプトファンおよびロイシン生合成経路の遺伝子のような生合成遺伝子を含むこともできる。例えば抗生物質の誘導のために多量のC P Pが必要とされる場合、容易に精製される融合タンパク質の高レベル発現を指向するベクターが望ましい。かかるベクターには、限定するものではないが、ハイブリッドタンパク質を生成するためにC P Pコード化配列がアミノ末端M e tおよびベータ-ガラクトシダーゼの続く7個の残基の配列と共にフレーム内でベクターにライゲートされ得るB L U E S C R I P T (Stratagene)のような多機能大腸菌クローニングおよび発現ベクター；P I Nベクター(Van Heeke & Schuster J Biol Chem 264:5503-5509 (1989))；P E Tベクター(Novagen, Madison Wis.)；等が挙げられる。細菌のための発現ベクターは前記で示した種々の成分を含み、そして当分野で公知である。事例には、とりわけ枯草菌、大腸菌、ストレプトコッカス・クレモリス、およびストレプトコッカス・リビダンスのベクターが挙げられる。塩化カルシウム媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション等のような当分野で公知の技術を用いて細菌性発現ベクターを細菌宿主細胞に形質転換する。

10

20

30

40

50

【0134】

酵母における発現

酵母発現系は当分野で公知であり、そして出芽酵母、カンジダ・アルピカンスおよびカンジダ・マルトサ、ハンゼヌラ・ポリモルファ、クワイベロミセス・フラギリスおよびクワイベロミセス・ラクティス、ピチア・ギレルモンジおよびピチア・パストリス、シゾサッカロミセス・ボンベ、ならびにヤロウィア・リポリティカが挙げられる。酵母宿主における使用に適当なプロモーターの実例には3-ホスホグリセラートキナーゼのプロモーター(Hitzeman et al., J.Biol.Chem. 255:2073(1980))または、エノラーゼ、グリセロールデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、アルファ因子、A D H 2 1 G A P D Hプロモーター、グルコキナーゼアルコールオキシダーゼ、およびP G Hのようなその他の糖分解酵素(Hess et al., J.Adv .Enzyme Reg. 7:149(1968)；Holland, Biochemistry 17:4900(1978))が挙げられる。例えばAusubel et al., 1990；Grant et al., Methods in Enzymology 153:516-544(1987)を参照のこと。誘導可能なその他の酵母プロモーターは成長条件により制御されるさらに別の転写の利点を有し、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸ホスファ

ターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、メタロチオネイン、グリセロアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ、ならびにマルトースおよびガラクトース利用に寄与する酵素のプロモーター領域が挙げられる。酵母発現において使用するのに適当なベクターおよびプロモーターはさらに欧州特許第 7 3 6 5 7 号に記載されている。酵母選択マーカーにはツニカマイシンに対する耐性を付与する A D E 2 . H I S 4 . L E U 2 . T R P 1 . および A L L G 7 ; G 4 1 8 に対する耐性を付与するネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 ; ならびに銅イオンの存在下で酵母が成長するのを可能にする C U P 1 遺伝子が挙げられる。目的の C P P をコードする D N A からの C P P の細胞内生成または分泌のための酵母発現ベクターを構築することができる。例えば、C P P の直接的な細胞内発現のために選択されたプラスミドの適当な制限部位に、選択されたシグナルペプチドおよび適切な構成的または誘導プロモーターを挿入することができる。C P P の分泌のために、選択されたプラスミドに C P P をコードする D N A を、C P P の発現のために、プロモーターをコードする D N A 、酵母アルファ因子分泌シグナル / リーダー配列、およびリンカー配列 (必要に応じて) と一緒にクローン化することができる。次いで酵母細胞を前記で記載した発現プラスミドで形質転換し、そして適切な発酵培地中で培養することができる。次にかかると形質転換された酵母により生成されたタンパク質を、10%トリクロロ酢酸での沈殿により濃縮し、そして SDS - P A G E による分離およびクマシーブルー色素でのゲルの染色の後分析することができる。組換え C P P を続いて単離し、そして当業者に公知の技術により発酵培地から精製することができる。

10

【 0 1 3 5 】

20

哺乳動物系における発現

哺乳動物細胞において C P P を発現することができる。哺乳動物発現系は当分野で公知であり、そしてレトロウイルスベクター媒介発現系を含む。後期プロモーターおよびトリパータイトリーダー配列からなるアデノウイルス転写 / 翻訳複合体にコード化領域をライゲートすることができるアデノウイルスのような多くの異なるウイルス基盤発現系のいずれかで、哺乳動物宿主細胞を形質転換することができる。ウイルスゲノムの非必須 E 1 または E 3 における挿入の結果、感染した宿主細胞における目的のポリペプチドの発現が可能な生存ウイルスに到る。好ましい発現ベクター系は一般的に P C T / U S 9 7 / 0 1 0 1 9 および P C T / U S 9 7 / 1 0 1 0 4 8 に記載されるようなレトロウイルスベクター系である。適当な哺乳動物発現ベクターは、哺乳動物 R N A ポリメラーゼを結合し、そして C P P のコード化配列の m R N A への下流 (3 ') 転写の開始が可能である任意の D N A 配列である哺乳動物プロモーターを含有する。プロモーターは、転写開始部位の上流に位置する 2 5 - 3 0 塩基対を用いて、通常コード化配列の 5 ' 末端の近位に置かれる転写開始領域、および T A T A ボックスを有する。T A T A ボックスは R N A ポリメラーゼ I I に正確な部位で R N A 合成を開始させると考えられている。哺乳動物プロモーターはまた典型的には T A T A ボックスの上流 1 0 0 から 2 0 0 塩基対内に位置する上流プロモーターエレメント (エンハンサーエレメント) を含有する。上流プロモーターエレメントは転写が開始され、そしていずれかの方向で作用し得る比率を決定する。ウイルス遺伝子はしばしば高度に発現され、そして広範な宿主範囲を有するので、哺乳動物プロモーターとして特に有用なものは哺乳動物ウイルス遺伝子に由来するプロモーターである。实例には、かかるプロモーターが宿主細胞系に適合するという条件で、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス (1 9 8 9 年 7 月 5 日公開の U K 2 2 1 1 5 0 4) 、 (アデノウイルス 2 のような) アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B 型肝炎ウイルスおよびシミアンウイルス 4 0 (S V 4 0) のようなウイルスのゲノムから、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーターから、および熱ショックプロモーターから得られたプロモーターが挙げられる。高等真核細胞による C P P をコードする D N A の転写を、エンハンサー配列のベクターへの挿入により増加させることができる。エンハンサーは、プロモーターに作用してその転写を増加させる約 1 0 から 3 0 0 b p の D N A のシス作用性エレメントである。今や哺乳動物遺伝子からの多くのエンハンサー配列が公知である (グロブ

30

40

50

リン、エラストラーゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、およびインスリン)。しかしながら典型的には真核細胞ウイルスに由来するエンハンサーが用いられる。实例には、SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、後期の複製起点のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。エンハンサーは好ましくはプロモーターから5'の部位に位置する。一般的に、哺乳動物細胞により認識される転写終止およびポリアデニル化配列は翻訳停止コドンに対して3'に位置する調節領域であり、そしてしたがって、プロモーターエレメントと一緒にコード化配列をフランキングする。成熟mRNAの3'末端は部位特異的翻訳後切断およびポリアデニル化により形成される。転写ターミネーターおよびポリアデニル化シグナルの实例には、SV40から誘導されたものが挙げられる。組換えタンパク質の長期的、高収量の生成は安定した発現系で行うことができる。ウイルス性複製起点または内因性発現エレメントおよび選択マーカー遺伝子を含む発現ベクターをこの目的のために用いることができる。哺乳動物細胞で使用するための選択マーカーを含む適切なベクターは市販により容易に入手可能であり、そして当業者に公知である。かかる選択マーカーの实例には、限定するものではないが、各々tk-またはhprt-細胞で使用するための、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼおよびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼが挙げられる。外因性核酸の哺乳動物宿主およびその他の宿主への導入方法は当分野で公知であり、そして用いる宿主で異なる。技術にはデキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ウイルス感染、リポソーム内の(複数の)ポリヌクレオチドの封入、およびDNAの核への直接マイクロインジェクションが挙げられる。

【0136】

CPPコード化配列を担持する発現ベクターにより一過性に、または安定して形質転換された哺乳動物細胞の培養上清からCPPを精製することができる。好ましくは、pcD発現ベクターにより一過性にトランスフェクトされたCOS7細胞の培養上清からCPPを精製する。COS7細胞のpcDでのトランスフェクションは以下のように進行する：トランスフェクションの1日前におよそ 10^6 個のCOS7細胞を、10%ウシ胎仔血清および2mMグルタミンを含むダルベッコ変法イーグル培地(DEM)の個々の100mmプレートに播く。トランスフェクションを行うために、各プレートから培地を吸引し、そして50mMトリスHCl(pH7.4)、400mg/mlDEAE-デキストランおよびプラスミドDNA50 μ gを含むDME4mlと置き換える。プレートを37°Cで4時間インキュベートし、次いでDNA含有培地を除去し、そして血清不含DME5mlで2回洗浄する。DMEをもとのプレートに加え、次いでこれを37°Cでさらに3時間インキュベートする。プレートをDMEで1回洗浄し、その後4%ウシ胎仔血清、2mMグルタミン、ペニシリン(100U/l)およびストレプトマイシン(100 μ g/l)を標準的な濃度で含むDMEを加える。次いで細胞を37°Cで72時間インキュベートし、その後、CPPの精製のために成長培地を収集する。トランスフェクションのためのプラスミドDNAは、CPPコード化cDNAインサートを含むpcD(SR)または同様の発現ベクターを大腸菌MC1061(Casadaban and Cohen, J. Mol. Biol. 138:179-207(1980))または同様の生物の中で成長させることにより得られる。標準的な技術、例えばSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989) または Ausubel et al., (1990、前記で引用)によりプラスミドDNAを培養物から単離する。

【0137】

昆虫細胞の発現

CPPを昆虫細胞においても生成することができる。昆虫細胞の形質転換のための発現ベクター、および特にバキュロウイルス基盤の発現ベクターは当分野で公知である。かかる系の1つでは、CPPコード化DNAをバキュロウイルス発現ベクター内に含まれるエピトプタグの上流に融合する。オートグラフィア・カリフォルニカ核多角体病ウイルス(AcNPV)をベクターとして用いてスポドプテラ・フルギペルダ Sf9細胞またはト

リコプルシア・ラルバエに外来性遺伝子を発現する。C P Pコード化配列をポリヘドリン遺伝子のようなウイルスの非必須領域にクローン化し、そしてポリヘドリンプロモーターの制御下に置く。C P Pコード化配列の連続的な挿入はポリヘドリン遺伝子を不活性化し、そして外殻タンパク質の外殻を欠く組換えウイルスを生成する。次いで組換えウイルスを用いて、C P Pを発現するスポドプテラ・フルギベルダ細胞またはトリコプルシア・ラルバエを感染する (Smith et al., J.Wol.46:584(1994); Engelhard E K et al., Proc.Natl.Acad.Sci. 91:3224-3227(1994))。C P Pコード化DNAに融合するのに適当なエピトープタグにはポリhisタグおよび免疫グロブリンタグ (I g GのFc領域と同様) が挙げられる。p V L 1 3 9 3 (Novagen) のような市販のプラスミドを含む種々のプラスミドを用いることができる。簡単には、C P Pコード化DNAまたはC P Pコード化DNAの望ましい部分を5'および3'領域に相補的なプライマーを用いてPCRにより増幅する。5'プライマーはフランキング制限部位を組み込むことができる。次いでPCR生成物を選択された制限酵素で消化し、そして発現ベクターにサブクローニングする。リポフェクチン (GIBCO-BRLから市販)、または当業者に公知のその他の方法を用いて、前記のプラスミドおよびBaculoGold (商標) ウイルスDNA (Pharmingen) をスポドプテラ・フルギベルダ (「S f 9」) 細胞 (A T C C C R L 1 7 1 1) に同時トランスフェクトすることにより組換えバキュロウイルスを作成する。S f 9細胞中28で4-5日の培養によりウイルスを生成し、そしてさらなる増幅に用いる。O'Reilley et al., BACULOVI RUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL, Oxford University Press (1994) にさらに記載されるような手順を実施する。Rupert et al., Nature 362:175-179(1993) に記載されるように組換えウイルス感染S f 9細胞から抽出物を調製することができる。あるいは、アフィニティークロマトグラフィーにより発現されたエピトープ-タグ化C P Pを精製することができるか、または例えばプロテインAもしくはプロテインGカラムクロマトグラフィーを含むクロマトグラフィー技術を用いてI g Gタグ化 (またはFcタグ化) C P Pの精製を行うことができる。

【0138】

遺伝子発現の評価

例えば当業者に公知の標準的な技術、例えば本明細書で提供する配列に基づいた適当な標識プローブを用いて、mRNAの転写を決定するためのノーザンブロッティング、ドットブロッティング (DNAまたはRNA) またはインサイチュハイブリダイゼーションにより、試料中の遺伝子発現を直接評価することができる。あるいは、ポリペプチド、DNA二本鎖、RNA二本鎖、およびDNA-RNAハイブリッド二本鎖またはDNA-タンパク質二本鎖を含む特定の二本鎖などの核酸の検出のためにアッセイにおいて抗体を用いることができる。表面上に二本鎖を形成するとき、二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができるように、かかる抗体を標識し、そして二本鎖が表面に結合しているアッセイを行うことができる。あるいは、C P Pポリペプチドまたはポリヌクレオチドの発現を直接評価するために、細胞または組織切片の免疫組織化学的染色、および細胞培養または体液のアッセイにより遺伝子発現を測定することができる。かかる免疫学的アッセイに有用な抗体はモノクローナルまたはポリクローナルのいずれかがよく、そして元来の配列C P Pに対して調製することができる。質量分析によりタンパク質レベルを検出することもできる。タンパク質検出の別の方法はタンパク質チップを用いる。

【0139】

発現されたタンパク質の精製

当業者に公知の種々の方法のいずれかを用いて、発現の後、発現されたC P Pを精製または単離することができる。適切な技術は、試料中に他にどんな成分が存在するかに依存して異なる。単離または精製により除去される夾雑成分は、典型的にはポリペプチドの診断または治療用途に干渉する材料であり、そして酵素、ホルモンおよびその他の溶質を挙げることができる。選択される (複数の) 精製工程は、例えば用いられた生成方法および生成された特定のC P Pの性質に依存する。C P Pは分泌されるので、培養培地から回収することができる。あるいは、C P Pを宿主細胞ライゼートから回収することができる。

膜結合している場合、適当なデタージェント溶液（例えばTriton - X 100）を用いて、または酵素的切断によりそれを放出させることができる。あるいは、凍結 - 解凍の繰り返し、ソニケーション、機械的崩壊のような種々の物理学的もしくは化学的手段により、または細胞溶解剤の使用によりC P Pの発現に用いた細胞を崩壊させることができる。精製方法の実例としては、限定するものではないが、イオン交換カラムクロマトグラフィー；シリカゲルまたはD E A Eのようなカチオン交換樹脂を用いるクロマトグラフィー；例えばSephadex G - 75を用いるゲル濾過；I g Gのような夾雑物を除去するためのプロテインAセファロースカラム；C P Pのエピトープ - タグ化形態に結合させるために金属キレートカラムを用いるクロマトグラフィー；エタノール沈殿；逆相H P L C；クロマトフォーカシング；S D S - P A G E；および硫酸アンモニウム沈殿が挙げられる。通常、単離されたC P Pは少なくとも1つの精製工程により調製される。例えば、標準的な抗C P P抗体カラムを用いてC P Pを精製することができる。タンパク質濃縮と組合せた限外濾過および透析技術もまた有用である（例えば、Scopes, R., PROTEIN PURIFICATION, Springer-Verlag, New York, N.Y., 1982参照）。必要な精製の程度はC P Pの用途に依存して異なる。精製が必要でない例もある。一度発現され、そして必要により精製されると、本発明のC P Pおよび核酸は以下に詳記するような多くの適用において有用である。

10

【0140】

トランスジェニック動物

本発明の宿主細胞を用いてヒト以外のトランスジェニック動物を生成することもできる。例えば、1つの実施態様では、本発明の宿主細胞は、C P Pコード化配列が導入されている受精した卵細胞または胚幹細胞である。次いでかかる宿主細胞を用いて、外因性のC P P配列がそのゲノムに導入されているヒト以外のトランスジェニック動物、または内因性C P P配列が変化している相同組換え動物を創成することができる。かかる動物はC P Pまたはそのフラグメントの機能および/または活性を研究するのに、ならびにC P P生物学的活性のモジュレーターを同定および/または評価するのに有用である。「トランスジェニック動物」は本明細書中で使用される際には、1つまたはそれより多い動物の細胞が導入遺伝子を含む、ヒト以外の動物、好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはラットまたはマウスのようなげっ歯類である。トランスジェニック動物のその他の事例にはヒト以外の霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類等が挙げられる。導入遺伝子は、そこからトランスジェニック動物が発達する細胞のゲノムに組込まれ、そして成熟動物のゲノムに残る外因性D N Aであり、それによりトランスジェニック動物の1つまたはそれより多い細胞型または組織においてコード化遺伝子生成物の発現を指向する。「相同組換え動物」は本明細書中で使用される際には、動物の発達の前に、内因性遺伝子と、動物の細胞、例えば動物の胚細胞に導入された外因性D N A分子との間の相同組換えにより内因性遺伝子が増加している、ヒト以外の動物、好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはマウスである。

20

30

【0141】

例えばマイクロインジェクションまたはレトロウイルス感染によりC P Pコード化核酸の受精卵細胞を雄性前核に導入し、そして偽妊娠した雌里親動物において卵細胞を発達させることを可能にすることにより、本発明のトランスジェニック動物を創成することができる。C P P c D N A配列またはそのフラグメントを導入遺伝子としてヒト以外の動物のゲノムに導入することができる。あるいは、マウスまたはラットに由来するような、ヒトC P Pコード化遺伝子のヒト以外の相同体を導入遺伝子として用いることができる。導入遺伝子の発現の効率を上昇させるために、イントロン配列およびポリアデニル化シグナルもまた導入遺伝子に含むことができる。（複数の）組織特異的調節配列をC P P導入遺伝子に作動可能なように連結させて、特定の細胞にC P Pの発現を指向させることができる。胚操作およびマイクロインジェクションを介してトランスジェニック動物、特にマウスのような動物を作成するための方法が当分野で慣用されるようになっており、そして例えば双方共にLeder et al.,による米国特許第4736866号および第4870009号、Wagner et al.,による米国特許第4873191号、ならびにHogan, B., Manipulati

40

50

ng the Mouse Embryo (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986 (その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする))に記載されている。類似の方法をその他のトランスジェニック動物の生成に用いる。そのゲノムにおけるC P P導入遺伝子の存在および/または動物の組織もしくは細胞におけるC P P m R N Aの発現に基づいて導入遺伝子創始動物を同定することができる。次いで導入遺伝子創始動物を用いて導入遺伝子を担持するさらに別の動物を繁殖させることができる。さらに、C P Pをコードする導入遺伝子を担持するトランスジェニック動物をさらに繁殖させて、その他の導入遺伝子を担持するその他のトランスジェニック動物にすることができる。

【0142】

相同組換えにより望ましい核酸がゲノムに導入されている動物を創成するために、それによりC P Pコード化配列を変化させる、例えば機能的に崩壊させるために欠失、付加または置換が導入されている、C P Pコード化配列の少なくとも一部を含有するベクターを調製する。C P Pコード化配列はヒト遺伝子でよいが、さらに好ましくは、ヒトC P Pコード化配列のヒト以外の相同体である(例えばストリンジェントハイブリダイゼーションにより単離されたC P Pをコードするヌクレオチド配列を有するc D N A)。例えば、マウスC P Pコード化配列を用いてマウスゲノムの内因性遺伝子を変化させるのに適当な相同組換えベクターを構築することができる。好ましい実施態様では、相同組換え時に内因性C P Pコード化配列を機能的に崩壊させる(すなわちもはや機能的タンパク質をコードしない; また「ノックアウト」ベクターとも称される)ようにベクターを設計する。あるいは、相同組換え時に内因性C P Pコード化配列が変異するか、または別の方法で変化するが、依然機能的タンパク質をコードする(例えば上流の調節領域を変化させて、それにより内因性C P Pコード化配列の発現を変化させる)ようなベクターを設計する。相同組換えベクターでは、C P Pコード化配列の変化した部分はその5'および3'末端でC P P遺伝子のさらに別の核酸配列によりフランキングされ、ベクターにより担持される外因性配列と胚幹細胞の内因性遺伝子との間で相同組換えを生じるのを可能にする。付加されるフランキング核酸配列は内因性遺伝子との相同組換えに成功するのに十分な長さである。典型的には、数千塩基のフランキングD N A (5'および3'末端の双方)はベクターに含まれる(例えばThomas, K.R. and Capecchi, M.R. (1987) Cell 51:503 (相同組換えベクターの記載に関するその開示は全て出典明示により本明細書の一部とする)参照)。ベクターを胚幹細胞系に導入し(例えばエレクトロポレーションによる)、そして導入されたC P Pコード化配列が内因性遺伝子と相同組換えされている細胞を選択する(例えばLi, E. et al., (1992) Cell 69:915 (その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする))。次いで選択された細胞を動物(例えばマウス)の胚盤胞に注射して凝集キメラを形成する(例えばBradley, A. Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells. A Practical Approach, E.J. Robertson ed. (IRL, Oxford, 1987)113-152 (その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする)参照)。次いでキメラ胚を適当な偽妊娠雌里親動物に移植し、そして胎仔を出産させる。生殖細胞に相同組換えされたD N Aを宿す子孫を用いて、導入遺伝子の生殖細胞系伝達により動物の全細胞が相同組換えD N Aを含有する動物を繁殖させることができる。相同組換えベクターおよび相同組換え動物を構築するための方法はBradley, A. (1991) Current Opinion in Biotechnology 2:823-829およびLe Mouellec et al., によるP C T国際公開第W O 9 0 / 1 1 3 5 4号; Smithies et al., による第W O 9 1 / 0 1 1 4 0号; Zijlstra et al., による第W O 9 2 / 0 9 6 8号ならびにBerns et al., によるW O 9 3 / 0 4 1 6 9に記載されており、その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする。

【0143】

別の実施態様では、導入遺伝子の調節された発現を可能にする選択された系を含有するヒト以外のトランスジェニック動物を生成することができる。かかる系の一例はバクテリオファージP 1のc r e / l o x Pリコンビナーゼ系である。c r e / l o x Pリコンビナーゼ系の記載に関しては、例えばLakso et al., (1992) PNAS 89:6232-6236 (その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする)を参照のこと。リコンビナーゼ系の別の実

例は出芽酵母のFLPリコンビナーゼ系である(O'Gorman et al., (1991) Science 251:1351-1355 (その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする))。cre/loxPリコンビナーゼ系を用いて導入遺伝子の発現を調節する場合、Creリコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の双方をコードする導入遺伝子を含有する動物が必要とされる。例えば一方は選択されたタンパク質をコードする導入遺伝子を含有し、そして他方はレコンビナーゼをコードする導入遺伝子を含有する2つのトランスジェニック動物を交配させることにより、「二重」トランスジェニック動物を構築することによりかかる動物を提供することができる。

【0144】

C P P 活性の評価

本発明はさらにC P Pの機能的フラグメントおよび変異体ならびにC P P配列の活性を試験する、またはそれ入手する方法を提供することは理解されよう。かかる方法は、変異体または修飾されたC P Pコード化核酸を提供すること、およびコード化ポリペプチドがC P P生物学的活性を表示するかどうかを評価することに関係する。したがってC P Pの機能を評価する方法は：(a) C P Pまたは生物学的に活性なそのフラグメントもしくは相同体を提供すること；および(b) C P P活性に適切な条件下で該C P Pまたは生物学的に活性なそのフラグメントもしくは相同体をC P P生物学的活性に関して試験すること；を含む。細胞不含、細胞基盤およびインビボアッセイを用いてC P P活性を試験することができる。例えば、該アッセイは宿主細胞においてC P P核酸を発現すること、ならびに該細胞およびその他の影響を受けた細胞においてC P P活性を観察することを含むことができる。別の事例では、C P Pまたは生物学的に活性なそのフラグメントもしくは相同体を細胞と接触させ、そしてC P P生物学的活性を観察する。

【0145】

C P P生物学的活性には：(1) 個体が心臓血管障害を有しているかまたは有することを示していること；(2) 心臓血管障害を有する個体の血流を通して循環すること；(3) 抗原性、すなわち抗C P P特異的抗体に結合する能力；(4) 免疫原性、すなわち抗C P P特異的抗体を作成する能力；およびC P P 2に関しては：(5) C P P標的タンパク質、好ましくはリパーゼと相互作用すること；(6) リパーゼの活性部位を安定化すること；(7) リパーゼ活性を上昇させること；(8) リン脂質、ミセルまたはトリグリセリドのようなC P P標的分子と相互作用すること；および(9) 少なくとも1つのジスルフィド結合を形成すること；C P P 9に関しては：(5) 水素、アミド、または特にジスルフィド結合のような分子内アミノ酸側鎖相互作用を形成すること；(6) C P P標的分子、好ましくはRNA分子または(呼吸器合胞体ウイルスすなわちRSVのような)ピリオンの相互作用；(7) 抗ウイルス活性、および(8) RNAリン酸ジエステル結合の加水分解；C P P 21に関しては：(5) 水素、アミド、または好ましくはジスルフィド結合のような分子内アミノ酸側鎖相互作用を形成すること；および(6) C P P標的分子、特にコレステロールと相互作用すること；C P P 17に関しては：(5) 水素、アミド、または好ましくはジスルフィド結合のような分子内アミノ酸側鎖相互作用を形成すること；(6) C P P標的分子、好ましくは低密度リポタンパク質または細菌性エンドトキシンとの相互作用；(7) 細菌性エンドトキシンを中和すること；(8) 肥満細胞走化性を促進させること；(9) 翻訳後プロセッシング、例えば特異的タンパク質分解を受けること；(10) 抗微生物防御として機能すること、および；(11) 平滑筋細胞の収縮を阻止すること；ならびにC P P 20に関しては：(5) 水素、アミド、または好ましくはジスルフィド結合のような分子内アミノ酸側鎖相互作用を形成すること；(6) C P P標的分子、特にプラスミノーゲンのようなクリングルドメイン含有ペプチドと相互作用すること；および(7) 腫瘍成長を低減させること；が挙げられる。

【0146】

当分野で公知の任意の適当な方法によりC P P生物学的活性を検定することができる。例えば「抗C P P抗体」および「C P P抗体の使用」と題したセクションに記載するように、抗原性および免疫原性を検出することができる。「診断および予後診断用途」に記載

10

20

30

40

50

するように血漿中の循環を検出することができる。例えば「薬物スクリーニングアッセイ」と題したセクションで、本明細書に記載するいずれかの方法によって、C P P 標的分子との相互作用を検出することができる。

【0147】

C P P 標的分子と結合または相互作用するC P Pの能力の決定を、当分野で一般的であるような直接的または間接的に結合を決定するための方法により達成することができる。かかる方法は細胞基盤（例えば膜結合C P Pへの結合を検出する）または細胞不含でよい。C P Pまたはその生物学的に活性な部分のその同族標的分子に対する結合を、複合体のその標識されたC P Pまたは生物学的に活性な部分を検出することにより決定することができるように、例えばC P Pまたはその生物学的に活性な部分を標識基と結合させることにより、被験化合物のC P Pとの相互作用を検出することができる。例えば、複合体を免疫沈殿させることにより、またはゲル電気泳動を実施することにより複合体形成の程度を測定することができる。C P PのC P P標的分子に結合する能力の決定を、リアルタイム生体分子相互作用分析（B I A）のような技術を用いて達成することもできる。Sjolander, S. and Urbaniczky, C. (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345およびSzabo et al., (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705（その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする）。「B I A」は本明細書中で使用される際には、いずれの相互作用物質をも標識しない、リアルタイムで生体特異的相互作用を研究するための技術である（例えばB I Aコア）。表面プラスモン共鳴（S P R）の光学的現象における変化を、生物学的分子間のリアルタイム反応の指標として用いることができる。

【0148】

C P P 2に関しては、リパーゼにより触媒される加水分解反応を検出することができる任意のアッセイによりリパーゼ活性を決定することができる。例えば、被験試料中の基質の量の減少、または別法として、生成物の量の増加を測定することができる。好ましいアッセイはPanteghini, et al., (*Ann Clin Biochem*(2001) 38:365-370（その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする））により記載されている。簡単には、アッセイ混合物中でリパーゼ、胆汁塩、カルシウムおよびコリパーゼと共に発色性基質、D G G Rを提供する。発色団生成物であるメチルレゾルフィンの形成を580 nmで検出することにより、基質のリパーゼ活性を測定する。リパーゼの活性部位を安定化し、そしてリパーゼ活性を上昇させるC P Pの生物学的活性を検出するために、理想的にはリパーゼ活性を測定する。かかる方法の実例は：リパーゼの活性に適切な条件下で生物学的試料を発色性基質およびリパーゼのアッセイ混合物と接触させること；およびリパーゼ活性を検出すること；の工程を含む。好ましくは、生物学的試料は血漿、さらに好ましくは心臓血管障害を有することが疑われる個体からの血漿である。適切な陰性対照と比較した場合、C P P活性はリパーゼの活性の上昇により示される。

【0149】

C P P 9に関しては、以下の実例的な技術によりR Nアーゼ活性を検定することができる。酵素をバッファーB（1 mM還元型グルタチオン（Sigma Chemical Co., St Louis, MO）、0.5 mM酸化型グルタチオン、0.1 mM D T T、0.5 mMトリスH C l 8.2、0.01 mM E D T Aおよび0.1 mM尿素）中、基質として酵母t R N A（Sigma）1 u gと共に37 で15分間インキュベートする。1.5%アガロースゲルで、0.09 mMトリス-リン酸、0.002 mM E D T A、および0.5 μ g / m l臭化エチジウム中、電気泳動を行う。U VによりR N Aを可視化する。R Nアーゼ活性は全長R N Aを消失させる。あるいは、R Nアーゼ活性を分光光度法で検出することができる。簡単には、40 mMリン酸ナトリウム（p H 7.5）バッファー中、所定の量のR Nアーゼにより酸不溶性酵母t R N A（Sigma）から作成された過塩素酸溶解性リボヌクレオチドの濃度を分光光度法により260 nmで測定する。例えば、およそ100 mM組換えR Nアーゼに相当するR Nアーゼ含有試料を4 m g / m l酵母t R N A 10 μ lと共に0.8 m lの反応容量で加える。R Nアーゼ活性の上昇は260 nm値の低下を招く。

【0150】

50

C P P 9 に関しては、以下のように抗ウイルス活性を検出することができる。簡単には、種々の濃度の C P P 9 含有試料を（またはバッファ対照）、培養培地（10%熱不活性化ウシ胎仔血清および2 mMグルタミンを含むイスコフ変法ダルベッコ培地）中のピリオン（ $2 - 5 \times 10^3$ 感染単位 / ml）を含有する懸濁液に直接加え、そして室温で穏やかに回転しながらインキュベートする。2時間のインキュベーションの後、懸濁液200 μ l を用いて、1ドラムシェルバイアル（Viomed, Minneapolis, MN）内のカバースリップ上のコンフルエント単層（ $3 - 4 \times 10^5$ セル / 単層）に存在する標的細胞（呼吸器合胞体ウイルスの場合、ヒト呼吸器上皮 H E p - 2 細胞）を感染させる。スピン増殖（22で700 g）および16時間のインキュベーション（37、5%CO₂）の後、免疫蛍光染色（マウス抗RSVブレンド、FITC標識；Chemicon International, Temecula, CA）により1次感染細胞を同定する。データを感染単位 \pm S D として表す。

10

【0151】

C P P 1 7 に関しては、L D L 粒子との相互作用を Higazi, et al., Blood 96:1393-1398(2000)の方法（その関連する開示は出典明示により本明細書の一部とする）に従って検出することができる。簡単には、目的のペプチドを放射性ヨウ素で標識した。L D L または B S A 対照（10 n M）を $0 - 5 \mu$ M^{1 2 5} I - デフェンシンと共に37で1時間インキュベートした。混合物をポリアクリルアミドゲルに適用し、そして適切な分子量の分画の放射活性の量を記録した。B S A と比較して、L D L に結合した放射活性ペプチドの量の増加により特異的 L D L 結合を定義した。Porter et al., (Infect. Immun. 65:2396-2401(1997)) に記載される方法のような、当分野で公知の任意の方法に従って、抗微生物活性を検出することができる。簡単には、リステリア・モノサイトゲネス E G D、大腸菌 M L 3 5 p、ネズミチフス菌 1 4 0 2 8 S および 7 9 5 3 S、ならびにカンジダ・アルビカンス 8 2 0 を用いる。細菌培養物を成育期中期に収集し、洗浄し、そして10 mMリン酸ナトリウム（p H 7 . 4）、1%Trypticase Soy Broth中 10^6 細菌 / ml の希釈で再懸濁する。同一の様式であるが、静止期に単離したカンジダ・アルビカンスを収集する。被験化合物、陽性対照化合物の存在下、または化合物不在下で記載されるようにコロニー形成単位（C F U）アッセイおよび放射状拡散アッセイを実施する。化合物不含の対照と比較して、被験化合物の存在下で、C F U または放射状拡散アッセイのいずれかで得られた値の低下は、化合物が抗微生物活性を有していることを示している。

20

30

【0152】

C P P 2、C P P 9、C P P 1 7、C P P 2 0 および C P P 2 1 に関しては、配列基盤の構造予測により分子内相互作用を検出することができる。かかる予測は一般的に類似する配列を有するポリペプチドに関する X 線結晶学または N M R 構造データに基づく。分子内相互作用の検出を S D S - P A G E を用いて達成することもできる。ジスルフィド結合の実例に関しては、所定のタンパク質の異なる部分間で形成された連結はさらにコンパクトなタンパク質に至り、そしてしたがって、見かけの分子量の低下に至る。還元剤、例えばジチオスレイトール（D T T）によりジスルフィド結合を崩壊させることができる。したがって、S D S - P A G E により還元剤で処理したタンパク質試料を未処理の対照と比較して、見かけの分子量における変化を検出することができる。かかる方法は当分野で一般的である。

40

【0153】

C P P 1 7 に関しては、Porter, et al., (Infect. Immun. 65:2396-2401(1997)) に記載される方法のような当分野で公知の方法に従って抗微生物活性を検出することができる。簡単には、リステリア・モノサイトゲネス E G D、大腸菌 M L 3 5 p、ネズミチフス菌 1 4 0 2 8 S および 7 9 5 3 S、ならびにカンジダ・アルビカンス 8 2 0 を用いる。細菌培養物を成育期中期に収集し、洗浄し、そして10 mMリン酸ナトリウム（p H 7 . 4）、1%Trypticase Soy Broth中 10^6 細菌 / ml の希釈で再懸濁する。同一の様式であるが、静止期に単離したカンジダ・アルビカンスを収集する。被験化合物、陽性対照化合物の存在下、または化合物不在下で記載されるようにコロニー形成単位（C F U）アッセイおよび放射状拡散アッセイを実施する。化合物不含の対照と比較して、被験化合物の存在下

50

で、CFUまたは放射状拡散アッセイのいずれかで得られた値の低下は、化合物が抗微生物活性を有していることを示している。

【0154】

CPP17に関しては、試料ペプチドの分子量を既知の分子量のペプチドと比較することにより、特異的タンパク質分解を検出することができる。SDS-PAGE、ゲルクロマトグラフィー、または質量分析のような当分野で一般的な任意の方法に従って分子量を容易に比較することができる。好ましくは、被験ペプチドの分子量を質量分析により得て、そして翻訳後修飾を伴うペプチドの分子量を含むデータベースと比較する。データベースの実例には、Genept、SWISSPOT、EMBLおよびProtein Sequence Databaseが挙げられる。このような技術は、本明細書にさらに詳述する。

10

【0155】

CPP17に関しては、米国特許第5837247号のT細胞に関して記載されるように走化活性を評価することができる。簡単には、48ウェルマイクロケモタキシスチャンパー(Neuro Probe Inc. Cabin John, Md.)を用いてリンパ球遊走を評価した。走化溶媒で希釈した、試験する試料25 μ lを下部区画に、そして細胞懸濁液50 μ l(5 \times 10⁶セル/ml)を上部区画に置いた。2つの区画を10 μ g/ml IV型コラーゲンで4で一晚コーティングしたポリカーボネートフィルター(T細胞に関しては孔径5 μ m、その他のリンパ球に関してはより大きい)により分離した。5%CO₂を含む加湿空气中、37で3時間装置をインキュベートした。インキュベーション期間の終わりにフィルターを除去し、固定し、そしてLeukoStat(Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.)で染色した。光学顕微鏡により高倍率視野あたりのフィルターを通して遊走した細胞の数を計数した。結果は3試料ずつの遊走の平均(\pm SD)値として表され、そして少なくとも3回の実験を表す。刺激に応答した細胞遊走の数の、対照培地に対する統計学的有意性をStudentのt検定を用いて算出した。インビボアッセイに関しては、BALB/CおよびCB-17scid/scid(SCID)マウスをアニマル・プロダクション・エリア(NCI-FCRDC, Frederick, Md.)から入手した。8-12週齢のマウスを用い、そして無菌状態で維持した。SCIDマウスを抗ASGM-1で処置し、そして1 \times 10⁸huPBLを腹腔内に注射した。その後すぐに化合物1.0 μ gの精製された調製物を含むPB5または対照PB50.1mlを同一の注射部位に毎日皮下注射した。1回目の4時間後、または2回目の注射の4時間後までの24時間のいずれかに注射部位を組織学的に試験した。群あたり3から4匹のマウスを2検体ずつで実験を行った。

20

30

【0156】

CPP17に関しては、Nassar, et al., (Blood 100:4026-32(2002))または欧州特許第0582631B1号(その関連する開示は出典明示により本明細書の一部とする)に記載されるように、血管平滑筋収縮を測定することができる。一般的に、ラットまたはその他の適当な動物の大動脈輪組織切片をアッセイに用いる。組織切片輪を例えば強力な収縮刺激剤であるエピネフリンで処理し、そして被験物質の存在下および不在下で長さを測定する。陰性対照に相対して切片の長さの増加は、物質が収縮活性を低下させたことを示している。

【0157】

CPP20に関しては、当分野で公知の任意の方法を用いて腫瘍成長を検定することができる。例えばW099/46282(その関連する開示は出典明示により本明細書の一部とする)に詳記される実験では、C57B16/Jマウスにルイス肺癌腫を移植した。PB5100 μ l中10⁶個の腫瘍細胞の懸濁液をマウスの背に皮下注射した。腫瘍をダイヤルキャリアで測定し、そして楕円球体の容量に関する一般式(幅² \times 長さ \times 0.52)を用いて容量を決定した。腫瘍容量が約160mm³に達すると、マウスを無作為に2群に分けた。1群を被験物質で処置し、そして他の群にはPB5対照を投与した。腫瘍成長を11日間にわたってモニタリングした。

40

【0158】

当業者は個体に関して適切に決定された任意の方法により心臓血管障害を診断すること

50

ができる。症状および診断のさらなる実例は背景のセクションで見出すことができ、そして患者の特定のプロフィールに基づいて当業者により適切に最良に決定される。

【0159】

配列基盤の構造予測により分子内相互作用を検出することができる。かかる予測は一般的に類似する配列を有するポリペプチドに関するX線結晶学またはNMR構造データに基づく。分子内相互作用の検出をSDS-PAGEを用いて達成することもできる。ジスルフィド結合の実例に関しては、所定のタンパク質の異なる部分間で形成された連結はさらにコンパクトなタンパク質に至り、そしてしたがって、見かけの分子量の低下に至る。還元剤、例えばジチオスレイトール(DTT)によりジスルフィド結合を崩壊させることができる。したがって、SDS-PAGEにより還元剤で処理したタンパク質試料を未処理の対照と比較して、見かけの分子量における変化を検出することができる。かかる方法は当分野で一般的である。

10

【0160】

抗CPP抗体

本発明はCPPに特異的な抗体および結合組成物を提供する。かかる抗体および結合組成物にはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、そのFabおよび一本鎖Fvフラグメント、二重特異性抗体、ヘテロ結合体、およびヒト化抗体が含まれる。かかる抗体および結合組成物を、ハイブリドーマ培養、細菌または哺乳動物細胞培養における組換え発現、およびトランスジェニック動物における組換え発現を含む種々の方式で生成することができる。特定の生成方法を選択するための文献、例えばChadd and Chamow, Curr.Opin.Biotechnol., 12:188-194(2001)に多くの手引きがある。

20

【0161】

製造方法の選択は、望ましい抗体構造、抗体上の炭水化物部分の重要性、培養および精製の容易さ、および経費を含むいくつかの因子に依存する。標準的な発現技術を用いて、全長抗体、FabおよびFvフラグメントのような抗体フラグメント、および異なる種に由来する成分を含むキメラ抗体を含む多くの異なる抗体構造を作成することができる。エフェクター機能を有さず、そして薬物動態活性が限定されているFabおよびFvフラグメントのような小型の抗体フラグメントを細菌発現系で作成することができる。一本鎖Fvフラグメントはインビボ腫瘍に高度に選択的であり、良好な腫瘍浸透性および低い免疫原性を示し、そして血液から急速に除去される(例えばFreyre et al., J.Biotechnol., 76:157-163(2000))。したがって、かかる分子は放射免疫検出に望ましい。

30

【0162】

ポリクローナル抗体

本発明の抗CPP抗体はポリクローナル抗体でよい。哺乳動物において例えば免疫剤、および好ましくはアジュバントの1回またはそれより多い注射の後、かかるポリクローナル抗体を生成することができる。典型的には一連の皮下または腹腔内注射により免疫剤および/またはアジュバントを哺乳動物に注射する。免疫剤はCPPまたはその融合タンパク質を含むことができる。免疫される哺乳動物において免疫原性であることが知られているタンパク質に対する抗原を結合するのが有用であろう。かかる免疫原性タンパク質の実例には、限定するものではないが、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、メチル化ウシ血清アルブミン(mBSA)、ウシ血清アルブミン(BSA)、B型肝炎表面抗原、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、および大豆トリプシン阻害剤が挙げられる。アジュバントには、例えばフロイント完全アジュバントおよびMPL-TDMアジュバント(モノホスホリルリピッドA、合成トレハロースジコリノ-ミコラート)が挙げられる。当業者により、標準的なプロトコールに基づいてまたは通常的な実験により、免疫プロトコールを決定することができる。

40

【0163】

別法として、CPPまたはその一部を富化させた粗製タンパク質調製物を用いて抗体を作成することができる。かかるタンパク質、フラグメントまたは調製物を適切なアジュバントの存在下、ヒト以外の哺乳動物に導入する。血清が望ましくないエピトープに対する

50

ポリクローナル抗体を含有する場合、免疫アフィニティークロマトグラフィーによりポリクローナル抗体を精製する。

【0164】

効率的なポリクローナル抗体生成は抗原および宿主の種の双方に関連する多くの因子による影響を受ける。また、宿主動物は接種の部位および用量に応答して変化し、抗原の不十分および過剰用量の結果、低力価抗血清に至る。複数の皮内部位で少量（ngレベル）の抗原投与は最も信頼性が高いようである。ポリクローナル抗血清を生成およびプロセッシングするための技術は当分野で公知であり、例えばMayer and Walker (1987)（その開示は全てを出典明示により本明細書の一部とする）を参照のこと。ウサギのための有効な免疫プロトコルをVaitukaitis, J. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 33:988-991(1971)（その開示は全てを出典明示により本明細書の一部とする）に見出すことができる。一定間隔でブースター注射を投与し、そして半定量的に決定されるように、例えば寒天中二重免疫拡散法により抗原の既知の濃度に対してその抗体力価が低下し始めたとき、抗血清を収集することができる。例えばOuchterlony, O. et al., Handbook of Experimental Immunology D. Wier (ed) Blackwell (1973) Chap. 19を参照のこと。抗体のプラトー濃度は通常血清の0.1から0.2 mg/mlの範囲内である。例えばFisher, D., Manual of Clinical Immunology, 2d Ed (Rose and Friedman, Eds.) Amer. Soc. For Microbiol., Washington, D.C., Chap 42 (1980)に記載されるように、競合結合曲線を準備することにより抗血清の抗原に関する親和性を決定する。

10

【0165】

モノクローナル抗体

あるいは、抗C P P抗体はモノクローナル抗体でよい。マウス、ハムスター、またはその他の適切な動物が免疫剤で免疫されて、免疫剤に特異的に結合する抗体を生成するかまたは生成できるリンパ球を誘起するハイブリドーマによりモノクローナル抗体を生成することができる（例えばKohler and Milstein, Nature 256:495(1975)）。免疫剤には典型的にはC P Pまたはその融合タンパク質および場合によってはキャリヤが挙げられる。あるいは、インビトロでリンパ球を免疫することができる。一般的に、ヒト以外の哺乳動物の供給源が望ましい場合は脾臓細胞またはリンパ節細胞を用い、またはヒト起源の細胞が望ましい場合は末梢血リンパ球（「P B L」）を用いる。ポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化細胞と融合させてハイブリドーマ細胞を生成する（例えばGoding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE, Academic Press, pp.59-103(1986); Liddell and Cryer, A Practical Guide to Monoclonal Antibodies (John Wiley & Sons, New York, 1991); Malik and Lillenoj, Editors, Antibody Techniques (Academic Press, New York, 1994)。一般的に不死化細胞は形質転換された哺乳動物細胞、例えばラット、マウス、ウシまたはヒト起源の骨髄腫細胞である。好ましくは融合されていない不死化細胞の成長または生存を阻止する1つまたはそれより多い物質を含有する適当な培養培地中でハイブリドーマ細胞を培養する。例えば親細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（H G P R T）を欠如する場合、ハイブリドーマ用の培養培地は典型的にはヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン（H A T）、H G P R T欠損細胞の成長を阻止する物質を含む。好ましい不死化細胞系は、効率的に融合し、抗体の安定した高レベル生成を支持し、そしてH A T培地のような培地に感受性があるものである。さらに好ましい不死化細胞系はマウスまたはヒト骨髄腫細胞系であり、これを例えばAmerican Type Culture Collection (A T C C), Rockville, MD.から入手することができる。ヒト骨髄腫細胞およびマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞系もまたヒトモノクローナル抗体の生成に関して記載されている（例えばKozbor, J. Immunol. 133:3001(1984)）; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, pp.51-63(1987)）。

20

30

40

【0166】

ハイブリドーマ細胞を培養する培養培地（上清）を、C P Pに対して指向するモノクローナル抗体の存在に関して検定することができる。好ましくはハイブリドーマ上清に存在

50

するモノクローナル抗体の結合特異性を免疫沈澱により、または放射免疫アッセイ (RIA) または酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) のようなインビトロ結合アッセイにより決定する。適切な技術およびアッセイは当分野で公知である。モノクローナル抗体の結合親和性を、例えば Munson and Pollard, *Anal. Biochem.* 107:220 (1980) のスカッチャード分析により決定することができる。望ましい抗体生成ハイブリドーマを同定した後、限界希釈法により細胞をクローン化し、そして標準的な方法により成長させることができる (Goding, 1986, *supra*)。この目的のための適当な培養培地には例えばダルベッコ変法イーグル培地 (DEM) および RPMI - 1640 培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を哺乳動物の腹水としてインビボで成長させることができる。例えばプロテイン A - セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーのような、当業者に通常的に用いられる免疫グロブリン精製手順により、選択されたクローンにより分泌されるモノクローナル抗体を培養培地または腹水から単離または精製することができる。

10

【0167】

モノクローナル抗体を、米国特許第 4816567 号に記載される方法のような組換え DNA 法により作ることにもできる。例えばマウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより、本発明のモノクローナル抗体をコードする DNA を CPP 特異的ハイブリドーマ細胞から単離し、そしてシーケンシングすることができる。一度単離されると、DNA を発現ベクターに挿入することができ、次いでこれをサル COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞またはそうしなければ免疫グロブリンタンパク質を生成しない骨髓腫細胞のような、宿主細胞にトランスフェクトして、組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体を合成させる。例えばマウス重鎖および軽鎖定常ドメインのコード化配列を相同ヒト配列と置換することにより (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-6855 (1984); Neuberger et al., *Nature* 312:604-608 (1984); Takeda et al., *Nature* 314:452-454 (1985))、または免疫グロブリンコード化配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード化配列の全部もしくは一部を共有結合させることにより DNA を修飾することもできる。非免疫グロブリンポリペプチドを本発明の抗体の定常ドメインと置換するか、または本発明の抗体の 1 つの抗原結合部位の変域ドメインと置換して、キメラ 2 価抗体を創成することができる。抗体はまた 1 価抗体でもよい。1 価抗体を調製するための方法は当分野で公知である。例えば、1 価抗体を調製するのにインビトロ法が適当である。当分野で公知の通常的な技術を用いて、そのフラグメント、特に Fab フラグメントを生成するための抗体の消化を達成することができる。

20

30

【0168】

本発明のハイブリドーマに特徴的な抗体および抗体フラグメントもまた組換え手段により、メッセンジャー RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを構築し、そして抗体分子のセグメントをコードするクローンを選択することにより生成することができる。以下は抗体を生成するための組換え技術を開示する実例的な参照文献である: Well et al., *Nucleic Acids Research*, 5:3113-3128(1978); Zakut et al., *Nucleic Acids Research*, 8:3591-3601(1980); Cabilly et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3273-3277(1984); Bose et al., *Nucleic Acids Research*, 12:3791-3806(1984); Amster et al., *Nucleic Acids Research*, 8:2055-2065(1980); Moore et al., 米国特許第 4642334 号; Skerra et al., *Science* 240:1038-1041(1988); Huse et al., *Science* 246:1275-1281(1989); ならびに米国特許第 6054297 号; 第 5530101 号; 第 4816567 号; 第 5750105 号; および第 5648237 号 (その特許は出典明示により本明細書の一部とする)。特に、かかる技術を用いて、1 つの種の結合領域が別の種の抗体の非結合領域と組み合わせられて免疫原性を低減させる種間モノクローナル抗体を生成することができる (例えば Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:3439-3443(1987)、ならびに特許第 6054297 号および第 5530101 号)。好ましくは、組換えにより生成された Fab および Fv フラグメントが細菌宿主系において発現される。好ましくは、哺乳動物細胞培養技術により全長

40

50

抗体を生成する。最も好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞またはNSO細胞において全長抗体を発現する。

【0169】

ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の双方をELISAによりスクリーニングすることができる。その他の固相イムノアッセイと同様に、試験は高分子がプラスチックに非特異的に吸着する傾向に基づく。この反応の免疫学的活性の喪失を伴わない非可逆性により、かかる複合体の非結合材料からの分離が簡単な抗原-抗体複合体の形成が可能になる。抗ペプチド血清の力価を測定するために、免疫に用いたものとは異なるキャリアに結合したペプチドを96ウェルマイクロタイタープレートのウェルに吸着させる。次いで吸着した抗原をウェル内で抗ペプチド血清の希釈物と反応させる。非結合抗体を洗い流し、そして残りの抗原-抗体複合体を、免疫した動物のIgGに特異的な抗体と反応させる。この第2の抗体はアルカリホスファターゼのような酵素に結合している。酵素基質が添加されたときに生成される可視呈色反応は、どのウェルが抗ペプチド抗体に結合しているかを示す。分光光度計の読みの使用により、ペプチド特異的抗体結合の量のより良好な定量が可能になる。高力価の抗血清は 10^{-3} と 10^{-5} 希釈の間で直線状の力価曲線を生じる。

10

【0170】

CPPペプチドキャリア

本発明はCPPから誘導された免疫原、およびキャリアと本発明のペプチドとの間の複合体を含む免疫原を含む。免疫原なる用語は本明細書中で使用される際には、免疫応答を引き起こすことができる物質を指す。キャリアなる用語は本明細書中で使用される際には、本発明のペプチドに化学的に結合する場合、得られた複合体で免疫された宿主生物に結合したペプチドに特異的な抗体を作成させる任意の物質を指す。キャリアには、赤血球、バクテリオファージ、タンパク質、またはアガロースビーズなどの合成粒子が含まれる。好ましくは、キャリアは血清アルブミン、ガンマグロブリン、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、サイログロブリン、卵白アルブミン、フィブリノーゲン等のようなタンパク質である。

20

【0171】

合成ペプチドをキャリアに連結する一般的な技術はいくつかの文献、例えばSetlow et al., eds., *Genetic Engineering*, 5:61-95 (Plenum Press, N.Y., 1983)のWalterおよびDoolittle、「合成ペプチドに対する抗体」; Green et al., *Cell* 28:477-487 (1982); Lerner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:3403-3407 (1981); Shimizu et al., 米国特許第4474754号; およびGanfield et al., 米国特許第4311639号に記載されている。したがって、これらの参照文献を出典明示により本明細書の一部とする。またハプテンをキャリアに連結させるための用いる技術は前記で参照した技術、例えばTijssen, *Practical and Theory of Enzyme Immunoassays* (Elsevier, New York, 1985), chapter 20と本質的に同一である。ペプチドをキャリアに結合させるために最も一般的に用いられる4つのスキームは(1)例えばJaffe and Behrman, eds. *Methods of Hormone Radioimmunoassay*, (Academic Press, N.Y., 1979)のKagan and Glick, page.328-329およびWalter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol.77:5197-5200(1980)により開示されているようなアミノ結合のためのグルタルアルデヒド; (2)例えばHoare et al., *J. Biol. Chem.* 242:2447-2453(1967)に開示されるようなカルボキシルのアミノへの結合のための水溶性カルボジイミド; (3) Jaffe and Behrman, eds. (前記で引用)のBassiri et al., page.46-47およびWalter et al. (前記で引用)に開示されるような、チロシンのチロシン側鎖結合のためのビス-ジアゾベジジン(BDB); ならびに(4) Kitagawa et al., *J. Biochem. (Tokyo)* 79:233-239 (1976)、およびLerner et al., (前記で引用)に開示されるようなシステイン(またはその他のスルフヒドリル)のアミノ基への結合のためのマレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニイミドエステル(MBS)である。所定のペプチドのタンパク質キャリアへの結合のための適切な方法の選択のための一般的なルールを以下のように述べることができる: 結合に関与する基は配列で1回のみ、好まし

30

40

50

くはセグメントの適切な末端に生じるべきである。例えばチロシン残基がその潜在的な抗原特性のために選択された配列の主要な部分に生じる場合、B D Bを用いてはならない。同様に、中央に位置するリジンはグルタルアルデヒド法から除外され、そしてアスパラギン酸およびグルタミン酸の存在によりしばしばカルボジイミド研究法は排除される。一方、適当な残基は、「元来の」タンパク質配列で生じても生じなくても、結合部位として選択された配列セグメントのいずれかの末端に位置することができる。アミノおよびカルボキシ末端とは異なって、内部セグメントは「非結合末端」で、ポリペプチドバックボーンが連続的である元来のタンパク質で見出されるのと同様の配列とは有意に異なる。アミノ基をアセチル化し、そして次にペプチドをそのカルボキシ末端により結合することによりある程度まで問題を改善することができる。キャリアタンパク質に対する結合効率は、合成の1工程に放射活性アミノ酸を用いるか、またはチロシン残基のヨウ素化により完成したペプチドを標識するいずれかにより調製した放射活性標識したペプチドを用いて都合よく測定される。ペプチドにおけるチロシンの存在により、所望により感度の良い放射免疫アッセイを設定することも可能になる。したがって、チロシンが元来のポリペプチドにより定義されたペプチド配列の一部でない場合、チロシンを末端残基として導入することができる。

10

20

30

40

50

【0172】

好ましいキャリアはタンパク質であり、そして好ましいタンパク質キャリアにはウシ血清アルブミン、ミオグロブリン、卵白アルブミン(OVA)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)等が挙げられる。Liu et al., *Biochemistry*, 18:690-697 (1979)に開示されるように、ペプチドをMBSによりシステインを介してKLHに連結させることができる。ペプチドをリン酸塩緩衝食塩水(pH 7.5)、0.1 Mホウ酸ナトリウムバッファ(pH 9.0)、または1.0 M酢酸ナトリウムバッファ(pH 4.0)に溶解させる。ペプチドの溶解のためのpHはペプチドの溶解性を最適化するように選択する。Ellman法(Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* 82:7077 (1959))により可溶性ペプチドの遊離のシステインの含量を決定する。各ペプチドに関しては、10 mMリン酸ナトリウムバッファ(pH 7.2) 0.25 ml中KLM 4 mgをMBS(ジメチルホルムアミドに溶解させる) 0.7 mgと反応させ、そして室温で30分間攪拌する。KLHは>30%ホルムアミドに不溶性であるので、MBSを滴加してホルムアミドの局所濃度があまり高くないことを確認する。次いで反応生成物KLH-MBSを50 mMリン酸ナトリウムバッファ(pH 6.0)で平衡にしたSephadex G-25に通し、遊離のMBSを除去し、カラム溶出液のピーク分画からKLHの回収(OD 280によりモニタリング)はおおよそ80%であると予測される。次いでKLH-MBSを選択したバッファ1 mlに溶解したペプチド5 mgと反応させる。pHを7-7.5に調整し、そして反応物を室温で3時間攪拌する。リン酸塩緩衝食塩水に対する結合体の試料の透析により、結合効率は放射活性ペプチドでモニタリングされ、そして8%から60%の範囲にわたり得る。一度ペプチド-キャリア結合体を利用されると、例えばCampbell, *Monoclonal Antibody Technology* (Elsevier, New York, 1984); Hurrell, ed. *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications* (CRC Press, Boca Raton, FL, 1982); Schreier et al., *Hybridoma Techniques* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1980); 米国特許第4562003号等が開示されるように、標準的な技術によりポリクローナルまたはモノクローナル抗体を生成する。特に、米国特許第4562003号を出典明示により本明細書の一部とする。

【0173】

ヒト化抗体

本発明の抗CPP抗体はさらにヒト化抗体またはヒト抗体を含み得る。「ヒト化抗体」なる用語は、ヒト以外の抗体から誘導された配列のいくらかを含有するキメラ抗体、免疫グロブリン鎖または(Fv、Fab、Fab'、F(ab'))、または抗体のその他の抗原結合部分配列のような)そのフラグメントであるヒト以外の(例えばマウス)抗体のヒト化形態を指す。ヒト化抗体には、ヒト免疫グロブリンの相補性決定領域(CDR)から

の残基が、望ましい結合特異性、親和性および能力を有するマウス、ラットまたはウサギのようなヒト以外の種のCDRからの残基により置き換えられているヒト免疫グロブリンを含む。一般的に、ヒト化抗体は少なくとも1つの、そして一般的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、ここでCDR領域の全てまたは実質的に全てはヒト以外の免疫グロブリンのものに相当し、そしてFR領域の全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体はまた最適には、免疫グロブリン、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域(Fc)の少なくとも一部を含む(Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)およびPresta, Curr.Op.Struct.Biol. 2:593-596 (1992))。ヒト化したヒト以外の抗体のための方法はお当分野で公知である。一般的に、さらにヒト抗体に酷似するために、ヒト化抗体はヒト以外である供給源からそれに導入された1つまたはそれより多いアミノ酸を有するが、抗体の独自の結合活性は依然保持している。抗体のヒト化のための方法はJones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); およびVerhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988)にさらに詳記されている。かかる「ヒト化」抗体は、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に少ない領域が、ヒト以外の種に由来する対応する配列で置換されている、キメラ抗体である。

10

【0174】

ヘテロ結合型抗体

2つの共有結合した抗体を含むヘテロ結合型抗体もまた本発明の範囲内である。架橋剤に関係するものを含むタンパク質合成化学の公知の方法を用いてインビトロでヘテロ結合型抗体を調製することができる。例えばジスルフィド交換反応を用いて、またはチオエステル結合を形成することにより免疫毒素を調製することができる。

20

【0175】

二重特異性抗体

二重特異性抗体は少なくとも2つの異なる抗原に関する結合特異性を有する。かかる抗体はモノクローナルで、そして好ましくはヒトのまたはヒト化抗体である。本発明の二重特異性抗体の結合特異性の1つはCPPに関してであり、そしてもう1つは好ましくは細胞表面タンパク質または受容体または受容体サブユニットに関してである。二重特異性抗体を作るための方法は当分野で公知であり、そして一般的に二重特異性抗体の組換え生成は、2つの重鎖が異なる特異性を有する、2つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対のハイブリドーマ細胞における同時発現に基づく(例えばMilstein and Cuello, Nature 305:537-539 (1983))。もし免疫グロブリン重鎖および軽鎖の無作為な取り合わせがハイブリドーマにより、可能性としては10個の異なる抗体分子の生成に到る場合、正確な分子の精製は通常ある種の親和性精製、例えばアフィニティークロマトグラフィーを必要とする。

30

【0176】

CPP抗体の使用

CPP抗体は好ましくは本発明のCPPに特異的であり、そしてそれ自体、その他のタンパク質から誘導されたペプチドに高い親和性を伴って結合することはない。「重鎖可変領域」なる用語は本明細書中で使用される際には、(1)110から125アミノ酸長であり、そして(2)そのアミノ酸配列は重鎖のN末端アミノ酸から出発して、本発明の抗体の重鎖の配列に相当するポリペプチドを意味する。同様に「軽鎖可変領域」なる用語は(1)95から115アミノ酸長であり、そして(2)そのアミノ酸配列は軽鎖のN末端アミノ酸から出発して、本発明の抗体の軽鎖の配列に相当するポリペプチドを意味する。「モノクローナル抗体」なる用語は本明細書中で使用される際には、CPPに特異的に結合することができる免疫グロブリンの均質な集団を指す。

40

【0177】

CPP抗体を機能的モジュレーターとして、好ましくはアンタゴニストとして用いることができる。好ましくは本発明の抗体モジュレーターをCPPに特異的なモノクローナル抗体から誘導する。CPPを遮断、または中和することができるモノクローナル抗体を、CPP生物学的活性を阻止するその能力により選択する。

50

【0178】

抗体フラグメントの使用もまた周知である；例えばF a bフラグメント：Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam, 1985)；およびF vフラグメント：Hochman et al., Biochemistry, 12:1130-1135 (1973)、Sharon et al., Biochemistry, 15:1591-1594 (1976)およびEhrlich et al., 米国特許第4355023号；ならびに抗体半分子：Auditore-Hargreaves, 米国特許第4470925号。

【0179】

好ましくは、モノクローナル抗体、F vフラグメント、F a bフラグメント、または本発明のモノクローナル抗体から誘導されるその他の結合組成物はC P Pに関して高い親和性を有している。モノクローナル抗体および関連する分子のC P Pに対する親和性を、プラスモン共鳴、E L I S A、または平衡透析を含む慣用される技術により測定することができる。例えばB I A コア 2 0 0 0 装置 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) を用いて、製造者が推奨するプロトコールに従って、プラスモン共鳴技術による親和性測定を行うことができる。例えば、好ましくは米国特許第6235883号に記載されるように、E L I S Aにより親和性を測定する。好ましくは、C P Pと本発明のモノクローナル抗体との間の解離定数は 10^{-5} モル濃度未満である。さらに好ましくは、かかる解離定数は 10^{-8} モル濃度未満であり；なおさらに好ましくは、かかる解離定数は 10^{-9} モル濃度未満であり；そして最も好ましくは、かかる解離定数は 10^{-9} から 10^{-11} モル濃度の範囲である。

【0180】

加えて、本発明の抗体はC P Pを検出するのに有用である。かかる検出方法は心臓血管障害、特に冠動脈疾患の診断に有利に適用される。本発明の抗体を、抗原抗体反応に関係するたいていのアッセイにおいて用いることができる。アッセイは同種性または異種性でよい。同種アッセイ研究法では、試料は血清、尿、全血、リンパ液、血漿、唾液、細胞、組織、およびインビトロで培養された細胞または組織により分泌された材料のような生物学的試料また液体でよい。必要により試料を前処理して望ましくない材料を除去することができる。免疫学的反応は通常特異的抗体、標識アナライト、および抗原を含有することが疑われる試料を必要とする。標識から生じたシグナルは、抗体の標識アナライトへの結合時に直接的または間接的に修飾される。免疫学的反応およびその程度の検出の双方は均質な溶液で行われる。用いることができる免疫化学的標識には、遊離のラジカル、蛍光色素、酵素、バクテリオファージ、補酵素等が挙げられる。

【0181】

異種アッセイ研究法では、試薬は通常試料、特異的抗体、および検出可能なシグナルを生成するための手段である。一般的に標本をプレートまたはスライドのような支持体上に置き、そして液相の抗体と接触させる。次いで支持体を液相から分離し、そしてかかるシグナルを生成するための手段またはシグナル生成系を用いて、支持相かまたは液相のいずれかを検出可能なシグナルに関して試験する。このシグナルは試料中の抗原の存在に関係する。検出可能なシグナルを生成するための手段には、放射活性標識、蛍光化合物、酵素等の使用が挙げられる。異種イムノアッセイの実例は、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光法、酵素結合イムノアッセイ等である。

【0182】

前記のイムノアッセイ技術のさらに詳細な議論に関しては、Edward T. Maggio, "Enzyme-Immunoassay" CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1980を参照のこと。例えば米国特許第3690834号；第3791932号；第3817837号；第3850578号；第3853987号；第3867517号；第3901654号；第3935074号；第3984533号；第3966345号；および第4098876号もまた参照のこと（この列挙は網羅を意図するものではない）。抗体および抗体フラグメントに標識を結合させる方法は当分野で周知である。かかる方法を米国特許第4220450号；第4235869号；第3935974号；および第3966345号に見出すことができる。本発明の抗体を用いることができる技術の別の実例は免疫ペルオキシダーゼ標識 (Sternber

10

20

30

40

50

ger, Immunocytochemistry (1979) pp.104-169) である。あるいは、抗体を放射活性材料に、または薬物に結合させて各々放射性医薬品または医薬品を形成することができる (Carrasquillo, et al., Cancer Treatment Reports (1984) 68:317-328)。

【0183】

本発明の抗体を用いるアッセイの1つの実施態様は本発明のモノクローナル抗体が結合している表面の使用に関係する。表面の基礎をなす構造はさまざまな形態をとり、さまざまな組成物を有し、そして組成物の混合物または薄板またはその組み合わせでよい。表面は種々の形状および形態をとり、そして使用および測定の様式に依存して寸法が異なるとよい。実例となる表面は平らな、凹型、または凸型でよいパッド、ビーズ、ディスク、またはストリップでよい。厚みは重要ではなく、一般的に約0.1から2mmの厚みであり、そして任意の都合の良い直径またはその他の寸法である。表面は典型的にはロッド、チューブ、キャピラリー、ファイバー、ストリップ、ディスク、プレート、キュベットで支持され、そして典型的には多孔性および多機能であるか、または抗体の共有結合を可能にし、そして検出可能なシグナルを生成するための手段の一部を形成するその他の化合物の結合を可能にするように多機能化することができる。天然および合成の双方の多様な有機および無機ポリマーならびにその組合せを固体表面のための材料として用いることができる。実例的なポリマーには、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(4-メチルブテン)、ポリスチレン、ポリメタアクリレート、ポリ(エチレンテレフタレート)、レーヨン、ナイロン、ポリ(ビニルブチレート)、シリコン、ポリホルムアルデヒド、セルロース、酢酸セルロース、ニトロセルロース、およびラテックスが挙げられる。その他の表面には紙、ガラス、セラミック、金属、メタロイド、半導体材料、セメント、ケイ酸塩等が挙げられる。ゲル、ゼラチン、リポ多糖類、ケイ酸塩、アガロースおよびポリアクリルアミド、もしくはデキストラン、ポリアルキレングリコール(炭素原子2から3個のアルキレン)のようないくつかの水相を形成するポリマーを形成する物質、またはリン脂質のような界面活性剤もまた含まれる。文献で一般的に利用できる周知の技術により抗体の表面への結合を達成することができる(例えばIchiro Chibata, "Immobilized Enzymes" Press, New York (1978)およびCuatrecasas, J.Bio.Chem., 245:3059 (1970)を参照のこと)。本発明のこの態様に従ってアッセイを実施するとき、試料を水性溶媒と混合し、そして溶媒をそこに抗体が結合している表面と接触させる。表面に随伴される検出可能なシグナルを提供するように、標識を水性溶媒に同時に含めるかまたは続いて加えることができる。検出可能なシグナルを生成するための手段は、標識されたアナライトの組込みを必要とし得るか、またはそこに結合された標識を有する第2のモノクローナル抗体の使用を必要とする。分離および洗浄工程は必要により実施する。検出されたシグナルは試料中のC P Pの存在に関連する。同一の支持体上検定することは本発明の範囲内である。本発明によるアッセイの特定の実施態様は、説明のためであって限定するものではないが、スライドまたはペトリ皿のウェルのような支持体の使用に関係する。技術は適切な固定材料を有する支持体上で分析される試料を固定し、そしてモノクローナル抗体を有するスライド上で飼料をインキュベートすることを含む。例えばリン酸塩緩衝食塩水のような適切なバッファーで洗浄した後、標識した、抗体の特異的結合パートナーと支持体を接触させる。所望によりインキュベートした後、スライドを水性バッファーで2回洗浄し、そして標識されたモノクローナル抗体の抗原への結合の決定を行う。標識が蛍光である場合、スライドをカバースリップ上を蛍光抗体マウント液で覆い、そして次に結合の程度を決定するために蛍光顕微鏡で試験することができる。一方、標識をモノクローナル抗体に結合させた酵素でよく、そして沈殿、着色等の形成により示され得る酵素の活性の存在に関してスライドを試験することにより結合の程度を決定することができる。本抗体を利用するアッセイの特定の実例はダブルターミナントE L I S Aアッセイである。慣用される技術により例えばガラスまたはビニルプレートのような支持体をC P Pに特異的な抗体でコーティングする。通常水性溶媒中のC P Pを含有することが疑われる試料と支持体を接触させる。30秒から12時間のインキュベーション期間の後、支持体を溶媒から分離し、例えば水または水性緩衝溶媒で洗浄して未結合のC P Pを除去し、そして再度、通常水性溶媒中でC P

10

20

30

40

50

Pに特異的な抗体と接触させる。例えば西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリ性ホスファターゼのような酵素で抗体を直接的または間接的に標識する。インキュベーションの後、支持体を溶媒から分離し、そして前記のように洗浄する。支持体または水性溶媒の酵素活性を決定する。この酵素活性は試料中のC P Pの量に関連する。

例えば本発明のC P P 9ポリペプチドを検出するイムノアッセイの実例に関しては、Kurokawa, E. et al., Clin.Chim.Acta (1983), 128(1):83-93を参照のこと。

【0184】

本発明はまた前記で開示した方法を実施するためのキット、例えば診断アッセイキットを含む。1つの実施態様では、キットは(a)前記でさらに具体的に定義したモノクローナル抗体ならびに(b)前記のモノクローナル抗体の特異的結合パートナーおよび検出可能なシグナルを生成することができる標識の結合体を含む。試薬はまた緩衝剤およびタンパク質安定剤、例えば多糖類等のような補助剤を含むこともできる。キットはさらに、必要な場合、標識が系のメンバーである、シグナル生成系のその他のメンバー、試験のバックグラウンド干渉を低減させるための薬剤、対照試薬、試験を行うための装置等を含むことができる。別の実施態様では、診断キットは本発明のモノクローナル抗体の結合体および検出可能なシグナルを生成することができる標識を含む。前記したような補助剤もまた存在し得る。

【0185】

さらに、アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈澱のような標準的な技術により抗C P P抗体(例えばモノクローナル抗体)を用いてC P Pを単離することができる。例えば抗C P P抗体は細胞からの天然のC P P、および宿主細胞において発現された組換えにより生成されたC P Pの精製を促進することができる。さらに(例えば血漿、細胞ライゼートまたは細胞上清中の)低濃度のC P Pの検出を助けるために、またはC P Pの発現の存在度およびパターンを評価するために、抗C P P抗体を用いてC P Pを単離することができる。抗C P P抗体を診断に用いて臨床試験手順の一部として、例えば所定の処置計画の有効性を決定するために組織におけるタンパク質レベルをモニタリングすることができる。抗体を標識基に結合させる(すなわち物理学的連結する)ことにより検出を促すことができる。

【0186】

タンパク質アレイ

米国特許第6225027号および米国特許出願第20010014461号(その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする)に記載されるように、リテンテートクロマトグラフィー(好ましくはプロテインアレイもしくはチップ)を用いて本発明のポリペプチドの検出、精製、およびスクリーニングを達成することができる。簡単には、リテンテートクロマトグラフィーは、ポリペプチド(および/またはその他の試料成分)が吸収剤(例えばアレイまたはチップ)に保持され、そして続いて検出される方法を記載する。かかる方法は(1)複数の異なる吸着剤/溶離剤の組合せ(「選択条件」)の下で、試料から基質にポリペプチドを選択的に吸着すること;および(2)脱離分光法により(例えば質量分析により)吸着されたポリペプチドの保持を検出すること;を含む。慣用されるクロマトグラフィー法では、吸着剤のポリペプチドは検出の前に溶出される。吸着クロマトグラフィーの脱離分光法による検出との結合により、並外れた感受性、保持された成分を種々の異なる選択条件で迅速に分析する能力、および異なる溶出条件下でアレイ上の異なる部位に吸着された成分の並行したプロセッシングが提供される。

【0187】

これらの方法は: コンビナトリアル、生化学的分離およびC P Pの精製; 差次的遺伝子発現の研究; タンパク質レベルにおける差異の検出(例えば診断用); ならびに分子認識事象の検出(例えばスクリーニングおよび創薬用); に有用である。したがって、本発明は並行および多重の双方のポリペプチドプロセッシング能力を含むことを特徴とする分子発見および診断装置を提供する。本発明のポリペプチドおよびC P P結合物質は好ましくは標識基に結合されており、そしてしたがって直接検出され、単一ユニット操作の間に同一

10

20

30

40

50

の「サーキット」（すなわちアドレス可能な「チップ」位置）から2つまたはそれより多いシグナルの同時伝達が可能になる。

【0188】

質量分析によるC P Pの検出

本発明に従って、任意の装置、方法、過程等を利用して試料中のタンパク質の同一性および存在度を決定することができる。同一性を得る好ましい方法は、試料中のタンパク質分子をイオン化し、そして次に得られたタンパク質の質量および電荷を検出および決定する質量分析によるものである。

【0189】

タンパク質を分析するのに質量分析を使用するために、タンパク質を気体 - イオン相に変換するのが好ましい。例えば高速イオン照射 (F A B)、プラズマ脱離、レーザー脱離、熱脱離、好ましくはエレクトロスプレーイオン化 (E S I) およびマトリックス支援レーザー脱離 / イオン化 (M A L D I) を含むタンパク質イオン化の種々の方法が有用である。限定するものではないが、飛行時間型 (T O F)、イオントラップ (I T M S)、フーリエ変換イオンサイクロトロン (F T M S)、四重極イオントラップ、およびセクター (電気 / 磁気) 分光計を含む多様な質量分析器がペプチドおよびタンパク質分析に利用可能である。例えばイオントラップ M S に関しては米国特許第 5 5 7 2 0 2 5 号を参照のこと。質量分析器を単独で、またはその他の質量分析器と組合せてタンデム質量分析器で使うことができる。後者の場合、第 1 の質量分析器を用いてお互いからタンパク質イオン (前駆体イオン) を分離し、そして試料中の種々のタンパク質成分の分子量を決定する。第 2 の質量分析器を用いて、例えば不活性ガスを用いることにより、例えば前駆体イオンを生成イオンにフラグメント化することにより各々の別個の成分を分析することができる。例えば三連四重極、タンデム飛行時間型、イオントラップ、および / またはその組合せを含む質量分析器の任意の望ましい組合せを用いることができる。

【0190】

多種の検出器を用いてタンパク質イオンを検出することができる。例えばイオン電子倍増管または低温検出器 (例えば米国特許第 5 6 4 0 0 1 0 号) のような破壊検出器を利用することができる。これに加えて、四重極イオントラップ質量分析器または F T M S のイオン電流ピックアップ装置として用いられるイオントラップのような非破壊検出器を用いることができる。

【0191】

M A L D I - T O F に関しては、乾燥液滴 (Karas and Hillenkamp, Anal.Chem., 60:2299-2301, 1988)、真空乾燥 (Winberger et al., Proceedings of the 41st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, San Francisco, May 31-June 4, 1993, pp.775a-b)、結晶粉碎 (Xiang et al., Rapid Commun.Mass Spectrom., 8:199-204, 1994)、緩慢結晶成長 (Xiang et al., Org.Mass Spectrom, 28:1424-1429, 1993); 活性フィルム (Mock et al., Rapid Commun.Mass Spectrom., 6:233-238, 1992; Bai et al., Anal.Chem. 66:3423-3430, 1994)、空気スプレー (Kochling et al., Proceedings of the 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Atlanta, GA, May 21-May 26, 1995, pp.1225); エレクトロスプレー (Hensel et al., Proceedings of the 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Atlanta, GA, May 21-May 26, 1995, pp.947); 高速溶媒蒸発 (Vorm et al., Anal.Chem. 66:3281-3287, 1994); サンドウィッチ (Li et al., J.Am.Chem.soc. 11(8):11662-11663, 1996); および二層法 (Dal et al., Anal.Chem. 71:1087-1091, 1999) を含む多くの試料調製方法を利用することができる。Liang et al., Rapid Commun. Mass Spectrom., 10:1219-1226, 1996; van Adrichem et al., Anal.Chem. 70:923-930, 1998もまた参照のこと。

【0192】

M A L D I 分析に関しては、試料を液相でエネルギー吸収化合物またはコロイド (マトリックス) と混合し、そして最終的には溶液を不活性プローブの表面上で固体の状態まで乾燥することにより固体の状態の共結晶または薄膜として調製する。エネルギー吸収分子

(EAM)が試料提示表面の不可欠な成分である場合もある。EAM適用計画に関わらず、レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析器(LDIM S)への導入の前にプローブ内容物を固体状態まで乾燥させる。

【0193】

TOF質量分析におけるイオン検出を典型的には電子倍增管(EMP)またはマイクロチャンネルプレート(MCP)のような電気放射検出器を用いて達成する。これらの双方の装置は1次入射荷電粒子の一連の2次、3次、4次等の電子への変換により機能する。単一の入射荷電粒子の衝撃により作成される2次電子の可能性はこの荷電粒子のイオンから電子への変換効率(またはより単純には、変換効率)であると考えられることができる。カスケード事象で生じた全電子は、入射荷電粒子の全数と比較した場合、典型的には検出器獲得として記載される。一般的にはMCPの全体の応答時間はEMPのものにかなり優れているので、質量/電荷分解能強化に関してはMCPが好ましい電子放出検出器である。しかしながら、EMPはイオン集団の費やされた運動エネルギーを検出するために良好に機能し、この場合迅速な応答時間および広い周波数帯域幅は必要ではない。

10

【0194】

好ましい態様では、消化されたタンパク質の分析のために、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析器(LC-TMS)を用いる。この系により、液体クロマトグラフィー、続くタンデム質量分析器の使用による試料分離のさらに別の段階が提供される。

【0195】

好ましい態様では、実施例1に記載する系に従ってカラムから溶出されたタンパク質をMSおよびMS-MS分析の双方を用いて分析する。例えば、RP2から溶出するわずかな無傷のタンパク質をLC-ESI MSを用いるオンライン検出に回すことができる。トリプシンで消化するかまたはしない、MALDI-MS用およびESI-MS用のための調製、ならびに種々のマトリックスを有するMALDIプレートの調製を可能にする多くのプレートにタンパク質を等分する。このように方法により無傷の質量に関する情報に加えて、ペプチド質量フィンガープリンティングおよびMS-MS技術の双方により分析を行うことが可能になる。

20

【0196】

本明細書にて記載するタンパク質を分離および分画化する方法により、少数の識別されるタンパク質を含有する個々のタンパク質または分画が提供される。そのフラグメント化から得られるタンパク質およびペプチドの分子量の質量スペクトル決定によりこれらのタンパク質を同定することができる。タンパク質配列データベースの利用可能な情報を利用することで、インシリコで作成されたタンパク質分解性ペプチド質量パターンと、実験的に観察された質量との間で比較を行うことができる。(いくつかの基準の中でも特に)理論的および実験的タンパク質分解フラグメント間の適合数に基づいて、「ヒットリスト」をコンパイルし、データベースの候補タンパク質をランク付けする。ペプチドマッピングおよび配列データベース検索計画に基づいて、オンラインでのタンパク質同定に関するソフトウェアを提供するいくつかのウェブサイトアクセスできる(例えば<http://www.expasy.ch>)。MSを用いるペプチドマッピングおよびシーケンシングの方法はWO95/252819、米国特許第5538897号、米国特許第5869240号、米国特許第5572259号および米国特許第5696376号に記載されている。Yates, J. Mass Spec., 33:1 (1998)もまた参照のこと。

30

40

【0197】

質量分析器から収集したデータは各検出事象に関する強度および質量対電荷比を含む。例えばグラフ、数値、またはデジタルもしくはアナログ形態のいずれかの電子形式を含む任意の適当な形態でスペクトルデータを記録することができる。好ましくはスペクトルを例えばフロッピーディスク(登録商標)、テープもしくはハードディスクなどの磁気; CD-ROMもしくはレーザーディスクのような光学; またはROM-CHIPを含む保存媒体に記録する。

【0198】

50

所定の試料の質量スペクトルによりタンパク質強度、質量対電荷比、および分子量に関する情報が提供される。本発明の好ましい実施態様では、データベースをクエリーするための適合基準として試料中のタンパク質の分子量を用いる。通常、例えば1価のプロトン化分子イオンに関してイオン化プロトンの質量を引くことにより、測定した質量対電荷比を多価イオンの荷電数で掛け、そしてイオン化プロトンの数を引くことにより分子量を便宜的に算出する。

【0199】

本発明に従って種々のデータベースが有用である。有用なデータベースには、ゲノム配列、発現された遺伝子配列、および/または発現されたタンパク質配列を含有するデータベースが挙げられる。好ましいデータベースは、公知の生物、器官、組織または細胞型に存在するヌクレオチド配列誘導のタンパク質の分子量を含む。オープン・リーディング・フレーム(ORF)を同定し、そしてヌクレオチド配列をタンパク質配列および分子量情報に変換するためのアルゴリズムが多く存在する。SwissPROT/TrEMBLデータベース(<http://www.expasy.ch>)を含むいくつかの公的にアクセス可能なデータベースを利用することができる。

10

【0200】

典型的には質量分析器に、特定の閾値レベルを超えるピークを同定し、検出したイオンの質量、電荷および強度を計算する市販のソフトウェアを装備する。分子量を所定の出力ピークとの相関はスペクトルデータから直接達成でき、すなわちここでイオンの電荷は1であり、そしてしたがって分子量は計算機の値からイオン化プロトンの質量を引いたものに等しい。しかしながら、タンパク質イオンを、N、C、およびK'のような種々の対イオンおよび付加物と複合化することができる。このような場合、所定のタンパク質イオンが、同一タンパク質の異なるイオン状態(または種)を表す、トリプレットのような多重ピークを呈することが予測される。したがって、同一タンパク質から生じるピークのファミリーを決定するために、スペクトルデータを分析および処理することが必要かもしれない。通常、例えばMann et al., anal.Chem. 61:1702-1708 (1989)に記載されるようにこの分析を実施することができる。

20

【0201】

質量分析器から算出した分子量を、ゲノムまたは発現された遺伝子データベースのようなデータベースから予測される分子量に適合させるのに、翻訳後プロセッシングを考慮しなければならないかもしれない。タンパク質分解性プロセッシング、N末端メチオニンの除去、アセチル化、メチル化、グリコシル化、リン酸化等を含む、タンパク質構造を修飾する種々のプロセッシング事象がある。

30

【0202】

未知のタンパク質の分子量に適合するタンパク質の範囲に関してデータベースをクエリーすることができる。装置の精度、試料を調製した方法等により範囲ウィンドウを決定することができる。スペクトルのヒット(ここでヒットは適合である)の数に基づいて、未知のタンパク質またはペプチドを同定または分類する。

【0203】

質量分析器により1つまたはそれより多いC P Pを同定する方法は心臓血管障害の診断および予後診断に有用である。好ましくは、かかる方法を用いて、ヒト血漿に存在する1つまたはそれより多いC P Pを検出する。実例的な技術は米国特許出願第02/0060290号、第02/0137106、第02/0138208、第02/0142343、第02/0155509(その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする)に記載されている。

40

【0204】

診断および予後診断用途

本明細書に記載する核酸分子、タンパク質、タンパク質相同体、および抗体を1つまたはそれより多い以下の方法で使用することができる: 診断アッセイ、予後診断アッセイ、臨床試験のモニタリング、および薬理遺伝学; ならびに本明細書でさらに記載するような

50

薬物スクリーニングにおいて。

本発明はさらに記載するようなC P P核酸およびタンパク質を検出するための診断および予後診断アッセイを提供する。C P PおよびC P P標的分子、特に天然アゴニストおよびアンタゴニスト間の相互作用を検出するための診断および予後診断アッセイもまた提供される。

【0205】

本発明は2つまたはそれより多い試料間で差次的に発現されるポリペプチドを同定するための方法を提供する。「差次的発現」とは試料間のポリペプチドの質または量の差異を指す。かかる差異は翻訳後修飾による転写からのタンパク質発現の任意の段階で生じ得る。例えば、タンパク質アレイ法を用いて、2つの試料を吸着剤（例えばチップ）の異なるセット上の親和性スポットに結合させ、そして認識マップを比較して吸着剤の2つのセットにより差次的に保持されるポリペプチドを同定する。差次的な保持にはポリペプチドの量的な保持および質的な差異が含まれる。例えば、タンパク質の翻訳後修飾の相違は、結合特性の差異（例えばグリコシル化タンパク質はレクチン吸着剤に差次的に結合する）または質量の差異（例えば翻訳後切断生成物）として検出可能な認識マップの差異を生じ得る。特定の実施態様では、吸着剤は疾患または症候群の診断用マーカーの組合せに選択された親和性スポットのアレイを有することができる。

10

【0206】

脱離分光法（例えば質量分析）による分析のための種々の条件に試料を暴露することにより、試料間のポリペプチドレベルにおける差異（例えば血漿試料中に差次的に発現されたC P P）を同定することができる。物理化学的特製（例えば分子量）を検出することにより未知のタンパク質を同定することができ、そしてこの情報を用いて類似のプロフィールを有するタンパク質に関してデータベースを検索することができる。

20

【0207】

C P Pを検出する好ましい方法は質量分析技術を利用する。かかる方法は試料、例えば診断または予後診断のために提示された生物学的試料中に存在する特定のC P Pアイソフォームの大きさおよび特徴についての情報を提供する。質量分析技術を「質量分析によるC P Pの検出」と題したセクションに詳記する。実施例1は、生物学的試料が質量分析による特徴付けの前にクロマトグラフィーにより分離される好ましい検出スキームの概要を示す。本発明は：少なくとも1つのクロマトグラフィー工程により生物学的試料（例えば血漿、血清、リンパ液、脳脊髄液、特定の組織の細胞ライゼート）を分画化すること；分画を質量分析に供すること；および質量分析で観察されたポリペプチド種の特徴を既知のC P Pポリペプチド（例えば表1に開示するようなC P P 2、C P P 9、C P P 17、C P P 20およびC P P 21）の特徴と比較すること；の工程を含む生物学的試料中のC P Pを検出する方法を提供する。

30

【0208】

単離された本発明の核酸分子を用いて、さらに以下に記載するように、例えば（例えば生物学的試料中の）C P P mRNAまたはC P Pコード化遺伝子における遺伝的变化を検出し、そしてC P P活性を調整することができる。加えて、C P Pを用いて天然発生C P P標的分子をスクリーニングし、そしてC P P活性を調整する薬物または化合物をスクリーニングすることができる。さらに、本発明の抗C P P抗体を用いてC P Pを検出および単離し、C P Pの生物学的利用率を調節し、そしてC P P活性を調整することができる。

40

【0209】

したがって本発明の1つの実施態様は本発明の分子（例えばC P P、C P P核酸、またはC P Pモジュレーター）を用いて、例えば前記したいずれかのC P P活性が示される障害を診断、および/または予後診断する使用方法に関係する。別の実施態様では、本発明は、本発明の分子を、例えば前記したいずれかの活性が病理学的に乱されている対象、好ましくはヒト対象の診断および/または予後診断に用いる使用方法に関係する。

【0210】

50

例えば本発明は a) 該生物学的試料を： i) ストリンジェント条件下で C P P 核酸にハイブリダイズするポリヌクレオチド；または i i) C P P に選択的に結合する検出可能なポリペプチド（例えば抗体）と接触させること；および b) 該試料内の該ポリヌクレオチドおよび m R N A 種との間のハイブリダイゼーションの存在もしくは不在、または該検出可能なポリペプチドの該試料内のポリペプチドへの結合の存在もしくは不在を検出すること；を含む、C P P が生物学的試料中で発現されるかどうかを決定する方法を包含する。該ハイブリダイゼーションの、または該結合の検出は、該 C P P が該試料内で発現されていることを示している。好ましくは、ポリヌクレオチドはプライマーであり、そして該ハイブリダイゼーションは、該プライマー配列を含む増幅産物の存在を検出することにより検出されるか、または検出可能なポリペプチドが抗体である。

10

【0211】

特定の実施態様では、検出はアンカー P C R または R A C E P C R のようなポリメラーゼ連鎖反応（P C R）（例えば米国特許第 4 6 8 3 1 9 5 号および第 4 6 8 3 2 0 2 号（その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする）参照）における、または別法として、ライゲーション連鎖反応（L C R）（例えば Landegren et al., (1988) Science 241:1077-1080；および Nakazawa et al., (1994) PNAS 91:360-364（その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする）参照）におけるプローブ/プライマーの使用を必要とし、その後者は C P P コード化遺伝子における点変異を検出するのに特に有用であり得る（Abravaya et al., (1995) Nucleic Acids Res. 23:675-682（その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする）参照）。

20

【0212】

a) 該哺乳動物からの生物学的試料を提供すること；および b) 該生物学的試料内の C P P または C P P をコードする C P P R N A 種の量を、対照試料で検出されるか、または予測されるレベルと比較することを含む、哺乳動物、好ましくはヒトの C P P の発現レベルが上昇しているか、または低下しているかを決定する方法もまた想定される。該対照試料から検出されるか、または予測される該レベルと比較した、該生物学的試料内の該 C P P または該 C P P R N A 種の量の増加は、該哺乳動物で C P P 発現レベルが上昇していることを示し、そして該対照試料から検出されるか、または予測される該レベルと比較した、該生物学的試料内の該 C P P または該 C P P R N A 種の量の減少は、該哺乳動物で C P P 発現レベルが低下していることを示す。

30

【0213】

本発明はまた、診断アッセイ、予後アッセイ、および臨床試験のモニタリングを予後診断の目的で使用する予測医学の分野にも関連する。したがって、本発明の 1 つの態様は、それにより個体が異常な C P P 発現もしくは活性に関連する疾患もしくは障害に罹患しているかどうか、または障害を進展させるリスクを有しているかどうかを決定するために、生物学的試料（例えば血液、血漿、細胞、組織）の局面で C P P および/または核酸発現ならびに C P P 活性を決定するための診断アッセイに関する。本発明はまた個体が C P P 、核酸発現または活性が関連する障害を進展させるリスクを有しているかどうかを決定するための予後診断（または予測）アッセイをも提供する。例えば、生物学的試料中の C P P コード化遺伝子における変異を検定することができる。それにより、C P P 発現または活性により特徴付けられるかまたは関連する障害の発症前に予防的に個体を処置するために、かかるアッセイを予後診断または予測目的で用いることができる。

40

【0214】

「生物学的試料」なる用語は個体から単離された組織、細胞および生物学的液体、ならびに個体内に存在する組織、細胞および液体を含むことを意図する。すなわち、本発明の検出方法を用いて生物学的試料中の C P P m R N A、タンパク質またはゲノム D N A をインビトロおよびインビボで検出することができる。好ましい生物学的試料はリンパ液、脳脊髄液、血液および、特に血漿である。例えば、C P P m R N A の検出のためのインビトロ技術にはノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。C P P の検出のためのインビトロ技術には、質量分析、酵素結合免疫

50

吸着アッセイ (ELISA)、ウェスタンブロット、免疫沈澱および免疫蛍光が挙げられる。C P Pコード化ゲノムDNAの検出のためのインビトロ技術にはサザンハイブリダイゼーションが挙げられる。さらにC P Pの検出のためのインビボ技術には標識抗C P P抗体を個体に導入することを含む。

本発明のC P P 9ポリペプチドを検出するイムノアッセイの実例に関しては、Kurokawa, E. et al., Clin.Chim.Acta. (1983), 128(1):83-93を参照のこと。

好ましい実施態様では、対象方法は、一般的に個体(例えばヒト患者)の組織試料中の、(i)対象C P Pの1つをコードする遺伝子の変異;または(ii)C P Pコード化遺伝子の発現ミス;のうちの少なくとも1つを特徴とする遺伝的病変の存在または不在の検出を含むことを特徴とすることができる。説明するために、(i)C P Pコード化遺伝子からの1つまたはそれより多いヌクレオチドの欠失、(ii)1つまたはそれより多いヌクレオチドの遺伝子への付加、(iii)遺伝子の1つまたはそれより多いヌクレオチドの置換、(iv)染色体全体の再配列または遺伝子の増幅、(v)遺伝子のメッセンジャーRNA転写物のレベルの全体的な変化、(vi)ゲノムDNAのメチル化パターンのような遺伝子の異常修飾、(vii)遺伝子のメッセンジャーRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、および(viii)調節エレメントにおける病変、またはC P Pコード化転写物の安定性の低下を示す発現のレベル低下;のうちの少なくとも1つの存在を確認することによりかかる遺伝的病変を検出することができる。

【0215】

さらに別の実例的な実施態様ではメチル化に感受性があり、そしてその認識部位がC P Pコード化遺伝子(フランキングおよびイントロン配列を含む)に存在する、1つまたはそれより多い制限エンドヌクレアーゼで患者の試料に由来するゲノムDNAを消化することによりC P P核酸のメチル化パターンの異常を検出することができる。例えばBuiting et al., (1994) Human Mol Genet 3:893-895を参照のこと。消化したDNAをゲル電気泳動により分離し、そして例えばゲノムまたはcDNA配列から誘導されたプローブでハイブリダイズする。試料DNAから作成した制限パターンを既知のメチル化の標準のパターンと比較することにより、C P Pコード化遺伝子のメチル化状態を決定することができる。

【0216】

さらに別の実施態様では、C P Pの細胞表面または細胞外タンパク質に結合する能力を検出する診断アッセイが提供される。例えば、細胞では相当なレベルで発現されるが、C P P標的タンパク質への結合に欠損がある(標的に関する結合親和性が低減されている、または増強されている、のいずれかである)C P P変異体を検出するのが望ましい。かかる変異体は例えば変異、例えば点変異体から生じることがあり、診断用DNAシーケンシング技術により、または前記したイムノアッセイにより検出することは非現実的であろう。したがって本発明はさらに一般的に試料組織から1つまたはそれより多いC P Pコード化遺伝子をクローニングすること、および組換え遺伝子生成物と標的タンパク質との間の相互作用の検出を可能にする条件下でクローン化された遺伝子を発現することを含む診断スクリーニングアッセイを企図する。本明細書に示す種々の薬物スクリーニングアッセイの記載から明らかなように、多様な技術を用いてC P Pのその他の成分に結合する能力を決定することができる。これらの技術を用いて、野生型C P Pと相対してC P P標的タンパク質に関して高いまたは低い結合親和性を有する変異タンパク質を生じさせるC P Pコード化遺伝子における変異を検出することができる。逆に、C P P標的タンパク質およびC P Pのうち、「ベイト」であるもの、および患者の試料から誘導されるものを交換することにより、対象アッセイを用いて、そのC P P標的タンパク質の野生型形態に相対して、C P Pに関して高いまたは低い結合親和性を有するC P P標的タンパク質変異体を検出することもできる。

【0217】

実例的な実施態様では、本明細書にて記載するような、G S T融合タンパク質およびグルタチオン処理マイクロタイタープレートの使用によるように、標的タンパク質を固定タ

ンパク質（「標的」）として提供することができる。

別の実施態様では、方法はさらに生物学的試料中のC P P、m R N A、またはゲノムD N Aのレベルを測定し、そして対照試料中のC P P、m R N A、またはゲノムD N Aのレベルを被験試料中のC P P、m R N A、またはゲノムD N Aのレベルと比較するために、対照対象から対照生物学的試料を入手すること、対照試料をC P P、m R N A、またはゲノムD N Aの検出ができる化合物または薬剤と接触させることに関する。本発明はまた生物学的試料中のC P P、m R N A、またはゲノムD N Aの存在を検出するためのキットをも包含する。例えばキットは：生物学的試料中のC P P、m R N A、またはゲノムD N Aを検出することができる標識化合物または薬剤；試料中のC P Pの量を決定するための手段；および試料中のC P Pの量を標準と比較するための手段を含むことができる。化合物または薬剤を適当な容器に包装することができる。キットはさらにC P Pまたは核酸を検出するためのキットを使用するための指示書を含むことができる。

10

【0218】

C P Pクラスター

本発明の1つの態様では、心臓血管障害の診断のための方法は、別の心臓血管障害血漿ポリペプチド（C P P）の検出と組合せた、被験生物学的試料において本発明の1つまたはそれより多いC P Pの存在またはレベルを検出することを含む。本発明のC P Pと組合せて心臓血管障害の診断に使用するための特に好ましいその他のC P Pを表2に列挙する。

【0219】

表2

20

【表 2 3】

表 2			
CPP #	CEX	RP1	トリプシン配列 (RP2)
CPP 8	18	6	CLDPVDTPNPTR (7-8), YKKPECQSDWQCPGK (8)
CPP 8	18	7	CLDPVDTPNPTR (7-8)
CPP 8	18	11	CLDPVDTPNPTR (5)
CPP 8	18	13	CLDPVDTPNPTR (3)
CPP 12	10	8	QSGEDNQDLAISFAGNGLSALR (8-9)
CPP 12	11	8	ESLSGVCEISGR (9), QSGEDNQDLAISFAGNGLSALR (9)
CPP 12	11	9	QSGEDNQDLAISFAGNGLSALR (9)
CPP 12	11	10	QSGEDNQDLAISFAGNGLSALR (7)
CPP 12	11	11	ESLSGVCEISGR (7)
CPP 13	13	14	VSAQQVQGVHAR (9, 12)
CPP 13	13	18	FPVYDYPSSLR (5), VNSQSLSPYLFR (5-6)
CPP 13	13	19	DYYVSTAVCR (5-6), FPVYDYPSSLR (6), VSAQQVQGVHAR (6)
CPP 13	13	20	DYYVSTAVCR (4-5), FPVYDYPSSLR (5), VNSQSLSPYLFR (4-5), VSAQQVQGVHAR (5)
CPP 13	13	21	DYYVSTAVCR (5), VNSQSLSPYLFR (5)
CPP 13	13	22	DYYVSTAVCR (10), FPVYDYPSSLR (3), VNSQSLSPYLFR (3-4)
CPP 13	13	23	VNSQSLSPYLFR (3)
CPP 13	13	25	DYYVSTAVCR (1), VNSQSLSPYLFR (1)
CPP 13	14	13	DALSASVVK (15), DSGEDPATCAFQR (15), FPVYDYPSSLR (15), VNSQSLSPYLFR (14), VSAQQVQGVHAR (15)
CPP 13	14	15	DSGEDPATCAFQR (10), VNSQSLSPYLFR (10)
CPP 13	14	19	VSAQQVQGVHAR (7)
CPP 13	14	21	VSAQQVQGVHAR (5, 7, 8)
CPP 13	14	22	VNSQSLSPYLFR (3)
CPP 13	14	25	VSAQQVQGVHAR (2)
CPP 13	15	13	VNSQSLSPYLFR (17-18)
CPP 13	15	15	VNSQSLSPYLFR (11)
CPP 13	18	22	VSAQQVQGVHAR (3)
CPP 14	15	4	GVSLRPIGASCR (10)
CPP 14	16	6	GVSLRPIGASCR (9)
CPP 14	17	5	GVSLRPIGASCRDDSECITR (9-10)
CPP 14	18	7	GVSLRPIGASCR (9)
CPP 15	2	7	LQCYNCNPNTADCK (24)
CPP 15	2	8	AGLQVYNK (15), LQCYNCNPNTADCK (15, 17, 18), LRENELTYCCK (16-18)
CPP 15	2	9	ENELTYCCK (17), FEHCNFNDVTTR (17), LQCYNCNPNTADCK (17), LRENELTYCCK (16-17)
CPP 15	2	10	LQCYNCNPNTADCK (12), LRENELTYCCK (12)
CPP 15	3	9	FEHCNFNDVTTR (15-16), LQCYNCNPNTADCK (15-16)
CPP 15	3	10	AGLQVYNK (9, 11), FEHCNFNDVTTR (10-11), LQCYNCNPNTADCK (8-11, 16), LRENELTYCCK (9-11, 13)
CPP 15	3	11	FEHCNFNDVTTR (9-10), LQCYNCNPNTADCK (9-11), LRENELTYCCK (9-11)
CPP 15	3	12	LQCYNCNPNTADCK (7)
CPP 15	3	13	LQCYNCNPNTADCK (7-8)

10

20

30

40

【表 2 4】

CPP 15	4	9	FEHCNFNDVTTR (14-15), LQCYNCNPNTADCK (14-15), LRENELTYYCCK (14-15)
CPP 15	4	10	FEHCNFNDVTTR (9-11), LQCYNCNPNTADCK (9-10), LRENELTYYCCK (10)
CPP 15	5	11	AGLQVYNK (10), FEHCNFNDVTTR (10)
CPP 15	6	9	LQCYNCNPNTADCK (14)
CPP 15	6	10	FEHCNFNDVTTR (8)
CPP 15	6	11	TAVNCSSDFDACLITK (10)
CPP 15	7	10	FEHCNFNDVTTR (9)
CPP 16	10	15	CLTTDEYDGHSTYPSHQYQ (12), TVAGQDAVIVLLGTR (10), YVAVMPPHIGDQPLTGAYTVTLGDR (11)
CPP 16	10	16	CLTTDEYDGHSTYPSHQYQ (9), LQAVTDDHIR (9), YVAVMPPHIGDQPLTGAYTVTLGDR (9)
CPP 16	10	19	NDLSPTTVMSEGAR (7)
CPP 16	11	14	HDLGHFMLR (9)
CPP 16	11	16	TVAGQDAVIVLLGTR (9)
CPP 16	13	17	NDLSPTTVMSEGAR (10)
CPP 18	10	11	QCIHQLCFTSLR (15-19)
CPP 18	11	6	LPPCENVDLQRPNGL (13)
CPP 18	11	7	SNYFRLPPCENVDLQRPNGL (13)
CPP 18	11	10	QCIHQLCFTSLR (14-15)
CPP 18	11	11	QCIHQLCFTSLR (12-17, 19, 20)
CPP 18	12	7	LPPCENVDLQRPNGL (12), SNYFRLPPCENVDLQRPNGL (9-11)
CPP 18	12	10	QCIHQLCFTSLR (10, 14)
CPP 18	12	11	LYSVHRPVK (11), QCIHQLCFTSLR (11)
CPP 18	13	7	LPPCENVDLQRPNGL (15), SNYFRLPPCENVDLQRPNGL (15)
CPP 19	3	7	MSSSYPTGLADVK (10)

10

20

【表 2 5】

CPP 19	4	7	AGPAQTLIRPQDMK (10), MSSSYPTGLADV (10), MSSSYPTGLADV KAGPAQTLIRPQDMK (10)
CPP 40	17	20	EDPTVSALLTSEK (9), VPSLVGSFIR (8-9)
CPP 40	17	22	VPSLVGSFIR (7)
CPP 40	18	20	VPSLVGSFIR (9)
CPP 41	12	12	LQNNENNISCVER (9), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (9)
CPP 41	14	12	TGESAEFVCK (9)
CPP 41	15	11	ITCTEEGWSPTPK (15-16), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (15-16), TGESAEFVCKR (16)
CPP 41	16	29	YKPFSQVPTGEVFFYSCEYNFVSPSK (1)
CPP 41	17	12	CLHPCVISR (9), EIMENYNIALR (9), INHGILYDEEK (9), ITCTEEGWSPTPK (9), LQNNENNISCVER (9), SFWTRITCTEEGWSPTPK (9), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (9), TGESAEFVCKR (9), TTCWDGKLEYPTCAK (9)
CPP 41	17	13	CLHPCVISR (9), EATFCDFPK (9), EIMENYNIALR (9), GWSTPPK (9), INHGILYDEEK (9), ITCTEEGWSPTPK (9), LQNNENNISCVER (9), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (9), TTCWDGKLEYPTCAK (9)
CPP 41	17	14	EIMENYNIALR (7), INHGILYDEEK (7), ITCTEEGWSPTPK (7), LQNNENNISCVER (7), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (7), YKPFSQVPTGEVFFYSCEYNFVSPSK (7)
CPP 41	17	16	EATFCDFPK (5), EIMENYNIALR (5), LQNNENNISCVER (5), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (5), TGESAEFVCK (5), TTCWDGKLEYPTCAK (5)
CPP 41	17	18	CLHPCVISR (4), EATFCDFPK (4), EIMENYNIALR (4), INHGILYDEEK (4), ITCTEEGWSPTPK (4), LEYPTCAK (4), SFWTR (4), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (4), TTCWDGKLEYPTCAK (4)
CPP 41	17	20	EATFCDFPK (3), EIMENYNIALR (3), INHGILYDEEK (3), ITCTEEGWSPTPK (3), LQNNENNISCVER (3), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (3), TGESAEFVCKR (3), TTCWDGKLEYPTCAK (3), YKPFSQVPTGEVFFYSCEYNFVSPSK (3)
CPP 41	17	22	EATFCDFPK (1), EIMENYNIALR (1), INHGILYDEEK (1), ITCTEEGWSPTPK (1), NGQWSEPPKCLHPCVISR (1), SFWTRITCTEEGWSPTPK (1), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (1), TTCWDGKLEYPTCAK (1)

10

20

30

【表 2 6】

CPP 41	17	23	CLHPCVISR (1), EATFCDFPK (1), INHGILYDEEK (1), ITCTEEGWSPTPK (1), NGQWSEPPK (1), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (1), TGESAEFVCK (1), TTCWDGKLEYPTCAK (1)
CPP 41	17	26	EATFCDFPK (1), EIMENYNIALR (1), GWSTPPK (1), INHGILYDEEK (1), ITCTEEGWSPTPK (1), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (1), TGESAEFVCKR (1)
CPP 41	17	27	CLHPCVISR (1), EATFCDFPK (1), EIMENYNIALR (1), INHGILYDEEK (1), ITCTEEGWSPTPK (1), LEYPTCAK (1), LQNNENNISCVER (1), SFWTR (1), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (1)
CPP 41	17	29	CLHPCVISR (1), EATFCDFPK (1), EIMENYNIALR (1), INHGILYDEEK (1), ITCTEEGWSPTPK (1), LQNNENNISCVER (1), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (1), TGESAEFVCK (1), TTCWDGKLEYPTCAK (1), YKPFSQVPTGEVFFYSCEYNFVSPSK (1)
CPP 41	17	30	CLHPCVISR (1), EIMENYNIALR (1), INHGILYDEEK (1), ITCTEEGWSPTPK (1), LQNNENNISCVER (1), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (1), TTCWDGKLEYPTCAK (1)
CPP 41	18	12	CLHPCVISR (9-10), EATFCDFPK (9-10), EIMENYNIALR (9), INHGILYDEEK (9-10), ITCTEEGWSPTPK (9), LQNNENNISCVER (9-10), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (9-10), TGESAEFVCKR (9), TTCWDGKLEYPTCAK (9-10)
CPP 41	18	18	EATFCDFPK (4), EIMENYNIALR (4), LQNNENNISCVER (4), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (4), TTCWDGKLEYPTCAK (4)
CPP 41	18	19	EATFCDFPK (4), EIMENYNIALR (4), INHGILYDEEK (4), ITCTEEGWSPTPK (4), LQNNENNISCVER (4), NGQWSEPPK (4), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (4)
CPP 41	18	20	LQNNENNISCVER (3), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (3), TGESAEFVCKR (3), TTCWDGKLEYPTCAK (3)
CPP 41	18	22	EATFCDFPK (1), INHGILYDEEK (1), ITCTEEGWSPTPK (1), LQNNENNISCVER (1), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (1), TGESAEFVCKR (1), TTCWDGKLEYPTCAK (1)

10

20

【表 2 7】

CPP 41	18	26	CLHPCVISR (1), EATFCDFPK (1), EIMENYNIALR (1), INHGILYDEEK (1), ITCTEEGWSP TPK (1), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (1), TGESAEFVCK (1)
CPP 41	18	29	EATFCDFPK (1), EIMENYNIALR (1), INHGILYDEEK (1), ITCTEEGWSPTPK (1), LQNNEN NISCVER (1), STDTSCVNPPTVQNAHILSR (1), TTCWDGKLEYPTCAK (1)
CPP 149	13	9	AFTECCVVASQLR (11), CCYDGACVNNDETCEQR (10)
CPP 149	14	9	AFTECCVVASQLR (11), CCYDGACVNNDETCEQR (11)
CPP 149	15	9	AFTECCVVASQLR (8), CCYDGACVNNDETCEQR (8)
CPP 149	15	11	AFTECCVVASQLR (7)
CPP 149	16	8	AFTECCVVASQLR (8-9)
CPP 149	16	9	AFTECCVVASQLR (9)
CPP 149	17	10	AFTECCVVASQLR (7), CCYDGACVNNDETCEQR (7)
CPP 150	14	22	TNFDNDIALVR (12)
CPP 150	14	23	SNALDIIFQDTLTGQK (11), SSNNPHSPIVEEFQVPYNK (11), TNFDNDIALVR (10-11), VEDP ESTLFGSVIR (8)
CPP 150	14	24	DVVQITCLDGFVVEGR (12), EDTPNSVWEPK (9), QFGPYCGHGFPGLNIETK (8-12), SNAL DIIFQDTLTGQK (8-9, 12), SSNNPHSPIVEEFQVPYNK (9), TNFDNDIALVR (8-12)
CPP 150	14	25	QFGPYCGHGFPGLNIETK (9), SNALDIIFQDTLTGQK (5), TNFDNDIALVR (5, 9), VEDPEST LFGSVIR (9)
CPP 150	14	26	GDSGGAFVQDPNDK (8), SNALDIIFQDTLTGQK (7-8), TNFDNDIALVR (7)
CPP 150	14	27	GDSGGAFVQDPNDK (8), QFGPYCGHGFPGLNIETK (5), SNALDIIFQDTLTGQK (6, 8), TNF DNDIALVR (5, 7, 8)
CPP 150	14	28	SSNNPHSPIVEEFQVPYNK (8), TNFDNDIALVR (10)
CPP 150	14	29	QFGPYCGHGFPGLNIETK (7, 11), SSNNPHSPIVEEFQVPYNK (8), TNFDNDIALVR (7-8, 10 , 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20)
CPP 150	14	30	GDSGGAFVQDPNDK (8), QFGPYCGHGFPGLNIETK (11), TNFDNDIALVR (7)
CPP 151	10	22	SFEGLGQLEVLTLDHNQLQEVK (8)
CPP 151	12	21	SFEGLGQLEVLTLDHNQLQEVK (14)
CPP 151	13	23	LAELPADALGPLQR (12), LAYLQPALFSGLAELR (11), LEALPNSLLAPLGR (12), VAGLLEDTF PGLLGLR (11-12)
CPP 501	2	21	EFLEDTCVQYVQK (7), TQSGLQSYLLQFHGLVR (7)

10

20

30

【表 2 8】

CPP 501	2	22	CFLGCELPPEGSR (6), EFLEDTCVQYVQK (6), TQSGLQSYLLQFHGLVR (4, 6)
CPP 501	2	23	EFLEDTCVQYVQK (6), TQSGLQSYLLQFHGLVR (5)
CPP 502	15	2	ALNSIIDVYHK (1)
CPP 502	17	17	ALNSIIDVYHK (9), GADVWFK (9)
CPP 502	17	18	ALNSIIDVYHK (7), LLETECPQYIR (7)
CPP 502	18	16	ALNSIIDVYHK (8)
CPP 502	18	17	ALNSIIDVYHK (8-10), GADVWFK (9), GNFHAVYR (9), LLETECPQYIR (8, 10), MLTELE K (9)
CPP 502	18	18	ALNSIIDVYHK (6-7), GADVWFK (7), LLETECPQYIR (6-7)
CPP 502	18	19	ALNSIIDVYHK (7), LLETECPQYIR (7)
CPP 502	18	20	ALNSIIDVYHK (6), LLETECPQYIR (5)
CPP 502	18	21	LLETECPQYIR (6)
CPP 502	18	22	ALNSIIDVYHK (5), LLETECPQYIR (4)
CPP 502	18	23	LLETECPQYIR (5)
CPP 502	18	24	ALNSIIDVYHK (3), LLETECPQYIR (3)
CPP 502	18	25	ALNSIIDVYHK (3), LLETECPQYIR (3)
CPP 502	18	26	LLETECPQYIR (4)
CPP 502	18	27	ALNSIIDVYHK (4), LLETECPQYIR (4)
CPP 503	16	21	FALLGDFFR (6)
CPP 503	17	18	CMGTVTLNQAR (7), FALLGDFFR (6-8), GSFDISCDK (7)
CPP 503	17	19	CMGTVTLNQAR (7), FALLGDFFR (6-7), IKDFLR (7)
CPP 503	17	20	FALLGDFFR (6), FALLGDFFRK (6)
CPP 503	17	21	FALLGDFFR (5-6), IKDFLR (6), TTQQSPEDCDFK (6)
CPP 503	17	22	CMGTVTLNQAR (4), FALLGDFFR (4, 6)
CPP 503	17	23	CMGTVTLNQAR (4), FALLGDFFR (4), QVLSYKEAVLR (4)

10

20

【表 29】

CPP 503	17	24	CMGTVTLNQAR (2-3), FALLGDFFR (3)
CPP 503	17	25	CMGTVTLNQAR (2), FALLGDFFR (3), FALLGDFFRK (2)
CPP 503	17	26	TTQQSPEDCDFKK (2)
CPP 503	17	27	CMGTVTLNQAR (4), FALLGDFFR (4), TTQQSPEDCDFKK (4)
CPP 503	17	28	FALLGDFFR (5)
CPP 503	17	29	CMGTVTLNQAR (4), FALLGDFFR (4), GSFDISCDK (4), TTQQSPEDCDFK (4), TTQQSPEDCDFKK (4)
CPP 503	17	30	FALLGDFFR (4)
CPP 503	18	12	AIDGINQR (10)
CPP 503	18	18	FALLGDFFR (6-8), GSFDISCDK (7)
CPP 503	18	19	CMGTVTLNQAR (7), FALLGDFFR (6-7), FALLGDFFRK (7)
CPP 503	18	20	CMGTVTLNQAR (5-6), FALLGDFFR (5-6), FALLGDFFRK (5-6)
CPP 503	18	21	CMGTVTLNQAR (6), FALLGDFFR (5-7), IKDFLR (5)
CPP 503	18	22	CMGTVTLNQAR (4), FALLGDFFR (4-5), GSFDISCDK (4), GSFDISCDKDNK (4), IKDFLR (4)
CPP 503	18	23	FALLGDFFR (4-5)
CPP 503	18	24	CMGTVTLNQAR (2), FALLGDFFR (2), FALLGDFFRK (2)
CPP 503	18	25	CMGTVTLNQAR (2), FALLGDFFR (2-3), FALLGDFFRK (2-3), GSFDISCDK (3)
CPP 503	18	26	CMGTVTLNQAR (4), FALLGDFFR (3-4), QVLSYKEAVLR (4)
CPP 503	18	27	CMGTVTLNQAR (4), FALLGDFFR (3-4), TTQQSPEDCDFK (4)
CPP 503	18	28	FALLGDFFR (3)
CPP 503	18	29	FALLGDFFR (3-4)
CPP 503	18	30	CMGTVTLNQAR (3-4), FALLGDFFR (3-4), FALLGDFFRK (3), TTQQSPEDCDFKK (4)
CPP 504	9	15	VPLQQNFQDNQFQGK (15)
CPP 504	9	16	CDYWIR (11), ELTSELK (10), MYATIYELK (10-11), SLGLPENHIVFPVPIDQCIDG (10), SYPGLTSYLVR (11), TFVPGCQPGFTLGNK (10-11), VPLQQNFQDNQFQGK (10-11), VVSTNYNQHAMVFFK (10), WYVVGLAGNAILR (10)
CPP 504	9	18	VPLQQNFQDNQFQGK (8)
CPP 505	6	8	VVEPPEKDDQLVVLFPVQKPK (8)
CPP 505	6	10	AWMETEDTLGR (8)
CPP 505	7	9	VVEPPEKDDQLVVLFPVQKPK (12)

10

20

30

【表 3 0】

CPP 505	8	10	AWMETEDTLGR (8), VVEPPEKDDQLVVLFPVQKPK (8)
CPP 505	8	11	AWMETEDTLGR (8-9), HWPSEQDPEKAWGAR (8), LLTTEEKPR (8), LWVMPNHQVLLGPEEDQDH IYHPQ (8), VVEPPEKDDQLVVLFPVQKPK (8)
CPP 505	9	8	LLTTEEKPR (11-13), VVEPPEKDDQLVVLFPVQKPK (12)
CPP 505	9	9	AWMETEDTLGR (11, 13, 14, 15), GPILPGTK (13), HWPSEQDPEK (14), HWPSEQDPEKAW GAR (12), LLTTEEKPR (10, 13, 15, 17), VVEPPEKDDQLVVLFPVQKPK (11-15)
CPP 505	9	10	AWMETEDTLGR (9-11, 13, 14), DDQLVVLFPVQKPK (9-10), LWVMPNHQVLLGPEEDQDHIYHP Q (10), VVEPPEKDDQLVVLFPVQKPK (11)
CPP 505	9	11	AWMETEDTLGR (9-11, 13), GPILPGTK (11-12), HWPSEQDPEKAWGAR (11), LLTTEEKPR (10-12), LLTTEEKPRGQGR (11), LWVMPNHQVLLGPEEDQDHIYHPQ (11-12), VLSPEPDHDSL YHPPPEEDQGEERPR (11), VVEPPEKDDQLVVLFPVQKPK (10-11)
CPP 505	10	9	AWMETEDTLGR (15-18), LLTTEEKPR (14-16), VVEPPEKDDQLVVLFPVQKPK (17)
CPP 505	10	10	AWMETEDTLGR (8, 10, 11), HWPSEQDPEK (10), LLTTEEKPR (10), LWVMPNHQVLLGPEED QDHIYHPQ (10-11), VVEPPEKDDQLVVLFPVQKPK (9-11)
CPP 505	10	11	AWMETEDTLGR (8), VVEPPEKDDQLVVLFPVQKPK (11)
CPP 505	11	9	LLTTEEKPR (14), VVEPPEKDDQLVVLFPVQKPK (16-17)
CPP 505	11	10	AWMETEDTLGR (11), LWVMPNHQVLLGPEEDQDHIYHPQ (11), VVEPPEKDDQLVVLFPVQKPK (9, 11)
CPP 506	8	19	EVMPSIQSLDALVK (5)
CPP 506	8	20	EVMPSIQSLDALVK (5)
CPP 506	8	22	EVMPSIQSLDALVK (3-4), GLMYSVNPKN (4)
CPP 506	8	24	EVMPSIQSLDALVK (3)
CPP 506	8	25	EVMPSIQSLDALVK (3)
CPP 507	5	7	NANTFISPQQR (11-12)
CPP 507	6	6	NANTFISPQQR (8)
CPP 507	8	8	NANTFISPQQR (7)
CPP 507	10	7	NANTFISPQQR (7-8, 11), YESHESMESYELNPFINRR (12)

10

20

30

【表 3 1】

CPP 507	10	8	NANTFISPQQR (8)
CPP 507	11	8	NANTFISPQQR (8-9, 11, 12)
CPP 507	11	11	NANTFISPQQR (8)
CPP 507	12	8	NANTFISPQQR (8-7, 12)
CPP 507	12	9	NANTFISPQQR (7-9)
CPP 507	13	8	NANTFISPQQR (8)
CPP 507	13	9	NANTFISPQQR (8-12)
CPP 507	14	8	NANTFISPQQR (10)
CPP 507	14	7	NANTFISPQQR (10-14)
CPP 507	14	9	NANTFISPQQR (8)
CPP 507	14	11	NANTFISPQQR (7)
CPP 507	15	7	NANTFISPQQR (16)
CPP 507	16	8	NANTFISPQQR (7)
CPP 508	4	12	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (8)
CPP 508	5	13	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (8-9)
CPP 508	5	16	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (4)
CPP 508	6	11	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (10)
CPP 508	6	12	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (8)
CPP 508	6	13	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (8, 12)
CPP 508	7	10	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (11)
CPP 508	7	11	GFYFNKPTGYGSSSR (11), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (11-13), RAPQTGIVDECCFR (13-14)
CPP 508	7	12	GFYFNKPTGYGSSSR (9), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (8-9)
CPP 508	8	12	APQTGIVDECCFR (8), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (7-8)
CPP 508	8	13	GFYFNKPTGYGSSSR (6-7), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (6-8), RAPQTGIVDECCFR (7)
CPP 508	8	14	APQTGIVDECCFR (6), GFYFNKPTGYGSSSR (6), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (6)
CPP 508	9	11	APQTGIVDECCFR (11), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (10-11)

10

20

30

【表 3 2】

CPP 508	9	12	APQTGIVDECCFR (1, 7, 8, 9), GFYFNKPTGYGSSSR (1, 7, 8), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (1, 7, 8, 9, 10, 11, 12), RAPQTGIVDECCFR (7-8)
CPP 508	9	13	APQTGIVDECCFR (8-9), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (8-9), RAPQTGIVDECCFR (8)
CPP 508	9	14	GFYFNKPTGYGSSSR (7), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (7), RAPQTGIVDECCFR (6-7)
CPP 508	9	15	GFYFNKPTGYGSSSR (7), RAPQTGIVDECCFR (7)
CPP 508	9	16	GFYFNKPTGYGSSSR (5)
CPP 508	9	19	RAPQTGIVDECCFR (3)
CPP 508	10	11	APQTGIVDECCFR (10-12), GFYFNKPTGYGSSSR (8-10, 12), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (8-12)
CPP 508	10	12	APQTGIVDECCFR (8-9), GFYFNKPTGYGSSSR (7-9), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (7-9, 12), RAPQTGIVDECCFR (8), RLEMYCAPLPAK (7)
CPP 508	10	13	GFYFNKPTGYGSSSR (7), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (7-8, 12)
CPP 508	11	10	GFYFNKPTGYGSSSR (11), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (9-11)
CPP 508	11	11	APQTGIVDECCFR (10-12), GFYFNKPTGYGSSSR (9-11), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (9-14), LEMYCAPLPAK (11), RAPQTGIVDECCFR (9-12), RLEMYCAPLPAK (10)
CPP 508	11	12	APQTGIVDECCFR (7-8), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (7-8)
CPP 508	11	13	APQTGIVDECCFR (8), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (8-9)
CPP 508	11	19	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (3)
CPP 508	12	11	APQTGIVDECCFR (8-10), GFYFNKPTGYGSSSR (8-9), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (8-10), LEMYCAPLPAK (9), RAPQTGIVDECCFR (9), RLEMYCAPLPAK (9)
CPP 508	12	12	APQTGIVDECCFR (7-8), GFYFNKPTGYGSSSR (7, 10), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (7-13), RAPQTGIVDECCFR (7)
CPP 508	12	13	APQTGIVDECCFR (12), GFYFNKPTGYGSSSR (11-12), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (8, 12)
CPP 508	12	14	RAPQTGIVDECCFR (6)
CPP 508	12	19	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (3)
CPP 508	12	20	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (1)
CPP 508	13	11	GFYFNKPTGYGSSSR (8), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (9)
CPP 508	13	12	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (8)

10

20

30

【表 3 3】

CPP 508	13	13	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (8-9)	
CPP 508	14	10	APQTGIVDECCFR (9), GFYFNKPTGYGSSSR (9), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (8-10), RAPQ TGIVDECCFR (8)	
CPP 508	14	11	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (9, 11)	
CPP 508	14	12	APQTGIVDECCFR (8), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (7-8)	
CPP 508	14	13	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (8)	
CPP 508	15	10	APQTGIVDECCFR (8), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (8-10)	
CPP 508	15	11	APQTGIVDECCFR (8-9), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (8-9)	
CPP 508	15	12	GFYFNKPTGYGSSSR (7), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (7-8, 10)	10
CPP 508	15	13	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (8)	
CPP 508	16	11	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (9)	
CPP 508	16	12	APQTGIVDECCFR (6), GFYFNKPTGYGSSSR (6), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (6-8)	
CPP 508	16	13	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (7)	
CPP 508	17	11	APQTGIVDECCFR (8), GFYFNKPTGYGSSSR (8), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (7-8)	
CPP 508	17	12	APQTGIVDECCFR (6), GFYFNKPTGYGSSSR (6), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (6-7)	
CPP 508	17	13	APQTGIVDECCFR (6), GFYFNKPTGYGSSSR (6), GPETLCGAELVDALQFVCGDR (6-7)	
CPP 508	17	15	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (5)	
CPP 508	17	20	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (1)	20
CPP 508	18	11	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (8)	
CPP 508	18	12	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (6, 8)	
CPP 508	18	13	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (6-7)	
CPP 508	18	18	GPETLCGAELVDALQFVCGDR (2)	
CPP 509	5	8	AQEPVKGVPVSTKPGSCPIILIR (7-8), VPFNGQDPVK (7)	
CPP 509	6	6	VPFNGQDPVK (10)	
CPP 509	8	8	AQEPVKGVPVSTKPGSCPIILIR (7-8), CAMLNPPNR (7-8), CLKDTDCPGIK (7), VPFNGQDPVK (7), VPFNGQDPVKGGVSVK (7)	
CPP 509	8	8	AQEPVKGVPVSTKPGSCPIILIR (7), CAMLNPPNR (7)	30
CPP 509	9	8	VPFNGQDPVK (7)	
CPP 509	10	8	GPVSTKPGSCPIILIR (8)	

【0220】

表 2 は各 CPP に関して、実施例 1 に記載する手順に従って質量分析により検出された配列を詳記する。加えて、表 2 は各配列が見出された CEX、RP1、および RP2 クロマトグラフィーの分画を示す。

【0221】

表 2 に列挙した CPP は全て、実施例 1 に記載する手順を用いて、心臓血管障害を有する個体および対照個体間で差次的に発現されるとして同定された。特に、表 2 に列挙した各 CPP は、以下の表 3 に詳記するように、対照および疾患試料間で異なることが見出された。

【0222】

表 3

10

20

30

40

【表 3 4】

表 3	
CPP #	差異の傾向
CPP 8	疾患においてのみ同定された
CPP 12	疾患において高レベルで同定された
CPP 13	対照において高レベルで同定された
CPP 14	疾患において高レベルで同定された
CPP 15	疾患において高レベルで同定された
CPP 16	疾患において高レベルで同定された
CPP 18	疾患において高レベルで同定された
CPP 19	対照においてのみ同定された
CPP 40	対照において高レベルで同定された
CPP 41	対照において高レベルで同定された
CPP 149	疾患においてのみ同定された
CPP 150	疾患において高レベルで同定された
CPP 151	疾患において高レベルで同定された
CPP 501	疾患において高レベルで同定された
CPP 502	対照において高レベルで同定された
CPP 503	対照において高レベルで同定された
CPP 504	対照において高レベルで同定された
CPP 505	疾患において高レベルで同定された
CPP 506	疾患において高レベルで同定された
CPP 507	疾患において高レベルで同定された
CPP 508	疾患においてのみ同定された
CPP 509	疾患において高レベルで同定された

10

20

【0 2 2 3】

当業者は、実施例 1 の方法により多くの疾患個体および対照個体で測定された表 2 から
の C P P のレベルの適当な分析を用いて選択される、表 2 からの多くのさらに別の C P P
と共に本発明の C P P を使用することができる。かかる C P P の組合せを見出すための計
画は、各 C P P を 1 つの変量と見なし、そして疾患をこれらの変量の相互作用により引き
起こされる連合の、多変量効果と見なす必要がある。

30

【0 2 2 4】

線形判別分析 (L D A) は、変量 (すなわち C P P) のクラスターと心臓血管疾患の間
の有意な関連性を検出するために用いることができるような分析手順の 1 つである。 L D
A の実施において、一連の重みは各変量 (すなわち C P P) に関係付けられ、その結果、
重みおよび変量の測定値の線形結合により心臓血管疾患を有する対象と心臓血管疾患を有
さない対象とを判別することにより疾患の状態を同定できる。 L D A への機能強化により
、変量を段階的に含める (または除く) ことでモデルの判別力を最適化できるようになる
。したがって L D A の結果は診断、予後診断、治療または薬物開発に関して制限なしに用
いることができる C P P のクラスターである。可変判別分析 (Flexible Discriminant A
nalysis) のようなその他の L D A の強化版により、変量の非線形結合の使用で正常状態
からの疾患状態の判別が可能になる。判別分析の結果を p o s t - h o c 試験により、そ
してまた分類階層 (classification tree) のような代替技術を用いる分析の繰り返しに
より確認することができる。

40

【0 2 2 5】

「薬物スクリーニングアッセイ」

本発明は C P P に結合し、 C P P 発現または好ましくは C P P 生物学的活性に及ぼす調

50

整効果を有する候補モジュレーター（例えば、小型分子およびペプチド、抗体、ペプチド擬似物質またはその他の薬物）を同定するための方法（本明細書中で使用される際には「スクリーニングアッセイ」とも称される）を提供する。いくつかの実施態様では、コンビナトリアル化学を用いて小型分子を作成することができるか、または天然生成物ライブラリーを得ることができる。アッセイは細胞基盤または非細胞基盤アッセイでよい。薬物スクリーニングアッセイは、さらに記載するように、結合アッセイまたはさらに優先的には機能アッセイでよい。

【0226】

本発明を例えばC P Pモジュレーターまたは薬物候補の抗心臓血管障害応答を誘起する能力を決定するために薬物開発に用いる場合、少なくとも1つのC P Pのレベルに関して分析する体液はヒト以外の哺乳動物に由来するのが好ましい。ヒト以外の哺乳動物は、内因性および/または外因性薬剤による抗心臓血管障害応答の誘導が、ヒトにおけるかかる応答の誘導の予測となるものが好ましい。本発明のこの態様で用いるのにげっ歯類（マウス、ラット等）および霊長類が特に適当である。

10

【0227】

さらに本明細書で記載するように、スクリーニングアッセイで用いてC P P活性を少なくとも5%まで、さらに好ましくは少なくとも10%まで、なおさらに好ましくは少なくとも30%まで、なおさらに好ましくは少なくとも50%まで、なおさらに好ましくは少なくとも70%まで、もっと好ましくは少なくとも90%まで調整することが見出された薬剤を予防用および/または治療用抗心臓血管疾患剤としてさらに試験するために選択することができる。

20

【0228】

別の態様では、さらに本明細書で記載するように、スクリーニングアッセイを用いてC P P発現を少なくとも5%まで、さらに好ましくは少なくとも10%まで、なおさらに好ましくは少なくとも30%まで、なおさらに好ましくは少なくとも50%まで、なおさらに好ましくは少なくとも70%まで、もっと好ましくは少なくとも90%まで調整することが見出された薬剤を予防用および/または治療用抗心臓血管疾患剤としてさらに試験するために選択することができる。

【0229】

C P P活性を調整することが見出された薬剤は、単独でまたはその他の適切な薬剤もしくは処置との組合せで、例えば心臓血管障害の処置計画を調整するか、または心臓血管障害の症状を低減させることができる。

30

【0230】

タンパク質アレイ法はスクリーニングおよび創薬に有用である。例えば、受容体/リガンド対の1つのメンバーを吸収剤にドッキングさせ、そして被験物質の存在下、結合パートナーに結合するその能力を決定する。試験できる吸着が迅速であるので、被験物質のコンビナトリアルライブラリーを、相互作用を調整するその能力に関して容易にスクリーニングすることができる。好ましいスクリーニング法では、C P Pを吸着剤にドッキングさせる。結合パートナーは標識されているのが好ましく、したがって相互作用の検出が可能になる。

40

【0231】

あるいは、特定の実施態様では、被験物質を吸着剤にドッキングさせる。本発明のポリペプチドを被験物質に暴露させて、そして結合をスクリーニングする。

【0232】

別の実施態様では、アッセイは、C P Pまたは生物学的に活性なその部分を発現する細胞を被験化合物と接触させ、そして被験化合物がC P P活性を調整する能力を決定する細胞基盤アッセイである。被験化合物がC P P活性を調整する能力の決定を、C P Pまたは生物学的に活性なその部分の生物活性をモニタリングすることにより達成することができる。細胞は例えば哺乳動物起源、昆虫起源、細菌起源、または酵母細胞でよい。

【0233】

50

1つの実施態様では、本発明は、C P Pまたは生物学的に活性なその部分の標的分子である候補物質または被験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。別の実施態様では、本発明はC P Pまたは生物学的に活性なその部分に結合するかまたはその活性を調整する候補物質または被験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。生物学的ライブラリー、空間的にアドレス可能な平行固相または液相ライブラリー；デコンポリューションを必要とする合成ライブラリー法；1ビーズ1化合物ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法を含む、当分野で公知のコンビナトリアル法の多くの研究法のいずれかを用いて本発明の被験化合物を得ることができる。生物学的ライブラリー研究法をペプチドライブラリーと共に用いるが、その他の4つの研究法をペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは化合物の小型分子ライブラリーに適用することができる（Lam, K.S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145（その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする））。

10

【0234】

分子ライブラリーの合成のための方法の実例を当分野で、例えば：DeWitt et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909；Erb et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422；Zuckermann et al., (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678；Cho et al., (1993) *Science* 261:1303；Carrell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059 and 2061；およびGallop et al., (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233（その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする）で見出すことができる。

【0235】

化合物のライブラリーは溶液で（例えばHoughten (1992) *Biotechniques* 13:412-421）またはビーズ（Lam (1991) *Nature* 354:82-84）、チップ（Fodor (1993) *Nature* 364:555-556）、細菌（Ladner 米国特許第5 2 2 3 4 0 9号）、胞子（Ladner 米国特許第' 4 0 9号）、プラスミド上（Cull et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869）、またはファージ上（Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-390）；（Devin (1990) *Science* 249:404-406）；（Cwirla et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382）；（Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310）；（Ladner supra）に存在し得る（その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする）。

20

【0236】

C P Pまたは生物学的に活性なその部分のその同族標的分子への結合を、複合体中の標識されたC P Pまたは生物学的に活性なその部分を検出することにより決定できるように、例えばC P Pまたは生物学的に活性なその部分を標識基に結合させることにより、被験化合物のC P P活性を調整する能力の決定を達成することもできる。例えば複合体を免疫沈澱させることにより、またはゲル電気泳動を実施することにより、複合体形成の程度を測定することができる。

30

【0237】

いずれの反応体をも標識しないで、化合物がその同族標的分子と相互作用する能力を決定することもまた本発明の範囲内である。例えばマイクロフィジオメーターを用いて、化合物も標的分子も標識せずに、化合物とその同族標的分子との相互作用を検出することができる。McConnell, H.M. et al., (1992) *Science* 257:1906-1912（その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする）。サイトセンサーのようなマイクロフィジオメーターは光アドレス可能電位計測法（L A P S）を用いて細胞がその環境を酸性化する速度を測定する分析装置である。この酸性化速度の変化を化合物と受容体との間の相互作用の指標として用いることができる。

40

【0238】

好ましい実施態様では、アッセイは：C P Pまたは生物学的に活性なその部分を発現する細胞を標的分子と接触させて、アッセイ混合物を形成し、アッセイ混合物を被験化合物と接触させ、そして被験化合物がC P Pまたは生物学的に活性なその部分の活性を調整する能力を決定することを含む。被験化合物がC P Pまたは生物学的に活性なその部分の活性を調整する能力を決定することは：被験化合物がC P P発現細胞の生物学的活性を調整

50

する能力（例えば前記で論じたように、C P P 標的分子との相互作用）を決定することを含む。

【0239】

別の好ましい実施態様では、アッセイは、C P P または生物学的に活性なその部分に反応する細胞をC P P または生物学的に活性なその部分に接触させて、アッセイ混合物を形成し、アッセイ混合物を被験化合物と接触させ、そして被験化合物がC P P または生物学的に活性なその部分の活性を調整する能力を決定することを含む。被験化合物がC P P または生物学的に活性なその部分の活性を調整する能力を決定することは：被験化合物がC P P 反応細胞の生物学的活性を調整する能力を決定することを含む。

【0240】

別の実施態様では、アッセイは、C P P 標的分子（すなわちC P P が相互作用する分子）を発現する細胞を被験化合物と接触させ、そして被験化合物がC P P 標的分子の活性を調整する能力を決定することを含む細胞基盤のアッセイである。例えば標的分子の活性を評価すること、またはC P P がC P P 標的分子と結合するかもしくは相互作用する能力を評価することにより、被験化合物がC P P 標的分子の活性を調整する能力の決定を達成することができる。

【0241】

C P P がC P P 標的分子と結合するかまたは相互作用する能力の決定を、例えば結合を直接的または間接的に決定するための前記した方法の1つにより達成することができる。好ましい実施態様では、アッセイは、C P P または生物学的に活性なその部分を該C P P （例えばC P P 抗体または標的分子）と結合する既知の化合物と接触させてアッセイ混合物を形成し、既知の該化合物の前または後にC P P を被験化合物と接触させ、そして被験化合物がC P P と相互作用する能力を決定することを含む。被験化合物がC P P と相互作用する能力の決定は被験化合物が既知の化合物と比較してC P P または生物学的に活性なその部分と優先的に結合する能力を決定することを含む。C P P がC P P 標的分子と結合する能力の決定はまたリアルタイム生体分子間相互作用分析（B I A）のような技術を用いて達成することもできる。Sjolander, S. and Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345およびSzabo et al., (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705（その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする）。「B I A」は本明細書中で使用される際には、いずれの反応体をも標識せずに生体特異的相互作用をリアルタイムで研究するための技術である（例えばBIAcore）。表面プラズモン共鳴（S P R）の光学現象における変化を、生物学的分子間のリアルタイム反応の指標として用いることができる。

【0242】

別の実施態様では、アッセイは、C P P または生物学的に活性なその部分を被験化合物と接触させ、そして被験化合物がC P P または生物学的に活性なその部分の活性を調整する能力を決定する細胞不含アッセイである。好ましい実施態様では、C P P がC P P 標的分子を調整または相互作用する能力の決定を、標的分子の活性を決定することにより達成することができる。例えば、標的分子をC P P またはそのフラグメントと接触させ、そして標的の細胞性2次メッセンジャー（例えばc A M P、S T A T 3、A k t、細胞内C a²⁺、ジアシルグリセロール、I P 3等）の誘導を測定し、適切な基質に関する標的の触媒/酵素活性を検出し、レポーター遺伝子（検出可能なマーカー、例えばルシフェラーゼをコードする核酸に作動可能なように連結された標的応答性調節エレメントを含む）の誘導を検出するか、または標的調節された細胞性応答、例えばシグナル伝達またはタンパク質：タンパク質相互作用を検出することにより標的分子の活性を決定することができる。

【0243】

本発明の細胞不含のアッセイは単離されたタンパク質（例えばC P P もしくは生物学的に活性なその部分またはC P P 標的が結合する分子）の可溶性および/または膜結合形態の双方の使用に適している。膜結合形態の単離されたタンパク質を用いる細胞不含のアッセイの場合、単離されたタンパク質の膜結合形態が溶液に維持されるように可溶化剤を利用するのが望ましいかもしれない。かかる可溶化剤の実例には、n - オクチルグルコシド

10

20

30

40

50

、*n*-ドデシルグルコシド、*n*-ドデシルマルトシド、オクタノイル-N-メチルグルカミド、デカノイル-N-メチルグルカミド、Triton(商標)X-100、Triton(商標)X-114、Thesit(商標)、イソトリデシポリ(エチレングリコールエーテル)*n*、スルホン酸3-[(3-コルアミドプロピル)ジメチルアミノオ]-1-プロパン(CHAPS)、スルホン酸3-[(3-コルアミドプロピル)ジメチルアミノオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパン(CHAPSO)、またはスルホン酸N-ドデシル=N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンのような非イオン性デタージェントが挙げられる。

【0244】

本発明の前記のアッセイ方法の1つ以上の実施態様で、アッセイの自動化に対応するためと同時に、1つまたは双方のタンパク質の非複合形態からの複合形態の分離を促進するためにC P Pまたはその標的分子のいずれかを固定するのが望ましい場合もある。被験化合物のC P Pへの結合または候補化合物の存在下および不在下でのC P Pと標的分子との相互作用を、反応物質を含有するのに適当な任意の容器内で、そして本明細書に記載する任意の固定プロトコールにより達成することができる。あるいは、複合体をマトリックスから解離させ、そして標準的な技術を用いてC P P結合または活性のレベルを決定することができる。

10

【0245】

タンパク質をマトリックス上に固定するためのその他の技術を本発明のスクリーニングアッセイに用いることもできる。例えば、ビオチンおよびストレプトアビジンの複合体を利用してC P PまたはC P P標的分子のいずれかを固定することができる。ビオチン化C P Pまたは標的分子を当分野で周知の技術を用いてビオチン-NHS(N-ヒドロキシサクシンイミド)から調製し(例えばビオチン化キット、Pierce Chemicals, Rockford, Ill.)、そしてストレプトアビジンをコーティングした96ウェルプレートのウェル(Pierce Chemical)に固定することができる。あるいは、C P Pまたは標的分子と反応するが、C P Pのその標的分子への結合と干渉しない抗体をプレートのウェルに誘導体化し、そして未結合の標的またはC P Pは抗体結合によりウェルに捕捉させることができる。かかる複合体を検出するための方法には、GST固定化複合体に関して前記したものに加えて、C P Pまたは標的分子と反応する抗体を用いる複合体の免疫検出、およびC P Pまたは標的分子に随伴される酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

20

【0246】

別の実施態様では、細胞を候補化合物と接触させ、そして細胞中のC P P mRNAまたはタンパク質の発現を決定する方法でC P P発現のモジュレーターを同定する。候補化合物の存在下でC P P mRNAまたはタンパク質の発現のレベルを、候補化合物の不在下でのC P P mRNAまたはタンパク質の発現のレベルと比較する。次いで、この比較に基づいてC P P発現のモジュレーターとして候補化合物を同定することができる。例えば、C P P mRNAまたはタンパク質の発現が候補化合物の存在下でその不在下よりも多い(統計学的に有意に多い)場合、候補化合物をC P P mRNAまたはタンパク質発現の刺激剤として同定する。あるいは、C P P mRNAまたはタンパク質の発現が候補化合物の存在下でその不在下よりも少ない(統計学的に有意に少ない)場合、候補化合物をC P P mRNAまたはタンパク質発現の阻害剤として同定する。細胞中でのC P P mRNAまたはタンパク質発現のレベルを本明細書に記載するC P P mRNAまたはタンパク質を検出する方法により決定することができる。

30

40

【0247】

本発明のさらに別の態様では、2ハイブリッドアッセイまたは3ハイブリッドアッセイでC P Pを「ベイトタンパク質」として用いて(例えば、米国特許第5283317号; Zervos et al., (1993) Cell 72:223-232; Madura et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartel et al., (1993) Biotechniques 14:920-924; Iwabuchi et al., (1993) Oncogene 8:1693-1696; およびBrent WO 94/10300(その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする)参照)、C P Pと結合または相互作用し(「C P P結合タンパク質」または「C P P-bp」)、そしてC P P活性に関与するその他のタンパク質

50

を同定することができる。かかるC P P結合タンパク質はまたC P PまたはC P P標的により、例えばC P P媒介シグナリング経路の下流エレメントとしてシグナルの伝搬に関与する可能性もある。

【0248】

2ハイブリッド系は、分離可能なDNA結合および活性化ドメインからなるほとんどの転写因子のモジュール特性に基づく。簡単には、アッセイは2つの異なるDNA構築物を利用する、一方の構築物では、C P Pまたはそのフラグメントをコードする遺伝子を、既知の転写因子(例えばGAL-4)のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合させる。もう一方の構築物では、同定されていないタンパク質(「プレイ」または「試料」)をコードする、DNA配列のライブラリーからのDNA配列を既知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合させる。「ベイト」および「プレイ」タンパク質がインビボで相互作用してC P P依存性複合体を形成できる場合、転写因子のDNA結合および活性化ドメインは密接に接近ようになる。この接近により、転写因子に応答する転写調節部位に作動可能のように連結されているレポーター遺伝子(例えばlacZ)の転写が可能になる。レポーター遺伝子の発現は検出されることができ、そして機能的転写因子を含有する細胞コロニーは単離され、そしてC P Pと相互作用するタンパク質をコードするクローン化された遺伝子を得るために用いられることができる。

10

【0249】

本発明はさらに前記したスクリーニングアッセイにより同定された新規薬剤、およびこれらのアッセイの使用によりかかる薬剤を生成するための方法に係る。したがって、1つの実施態様では、本発明は前記したスクリーニングアッセイ(例えば細胞基盤のアッセイまたは細胞不含のアッセイ)のいずれか1つの工程を含む方法により得ることができる化合物または薬剤を含む。

20

【0250】

したがって、適切な動物モデルにおいて本明細書に記載したように同定された薬剤をさらに使用することは本発明の範囲内である。例えば、本明細書に記載したように同定された薬剤(例えばC P P調整剤またはC P P結合パートナー)を動物モデルにおいて使用して、かかる薬剤の有効性、毒性または処置の副作用を決定することができる。あるいは、本明細書に記載したように同定された薬剤を動物モデルにおいて使用して、かかる薬剤の作用のメカニズムを決定することができる。さらに、本発明は、本明細書に記載するような処置のための、前記したスクリーニングアッセイにより同定された新規薬剤の使用に係る。

30

【0251】

本発明はまた本明細書に記載するような診断、予後診断、予防、および処置のための、前記したスクリーニングアッセイにより同定された新規薬剤の使用にも関係する。したがって、本明細書に記載するような診断、予後診断、または処置に使用するための薬物または医薬組成物の設計、処方、合成、製造、および/または生成におけるかかる薬剤の使用は本発明の範囲内である。例えば、1つの実施態様では、前記したスクリーニングアッセイの1つにより得ることができる化合物の構造および/または特性を参照して、本発明は薬物または医薬組成物を合成または生成する方法を含む。例えばC P P標的分子を発現する細胞を被験化合物と接触させ、そして被験化合物がC P P標的分子に結合する、またはその活性を調整する能力を決定する方法により得られた化合物の構造および/または特性に基づいて、薬物または医薬組成物を合成することができる。別の実例的な実施態様では、本発明は、C P Pまたは生物学的に活性なその部分を被験化合物と接触させ、そして被験化合物がC P Pまたは生物学的に活性なその部分に結合する、またはその活性を調整する能力を決定する方法により得られた化合物の構造および/または特性に基づいて、薬物または医薬組成物を合成する方法を含む。

40

【0252】

動物基盤の薬物スクリーニング

薬物スクリーニングアッセイをインビボで実施するのも有利である。インビボスクリー

50

ニングアッセイをヒト以外の動物で実施して、心臓血管疾患において役割を果たし得る有効なC P Pモジュレーターを見出す。心臓血管疾患の動物基盤モデル系には、限定するものではないが、非組換え動物およびトランスジェニック動物が挙げられる。

【0253】

心臓血管疾患の非組換え動物モデルには、例えば遺伝モデルが挙げられる。かかる遺伝心臓血管疾患モデルには、a p o Bまたはa p o R欠損ブタ (Rapacz, et al., 1986, Science 234:1573-1577) およびWatanabe 遺伝性高脂血漿 (W H H L) ウサギ (Kita et al., 1987 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:5928-5931) が挙げられる。アテローム性動脈硬化症の非組換え、非遺伝動物モデルには、例えばブタ、ウサギ、またはラットモデルを挙げることができ、ここで動物は例えば餌へのLDL補充による化学的損傷か、またはバルーンカテーテル血管形成による機械的損傷のいずれかに暴露されている。

10

【0254】

当分野で示されているように (Ferns, G.A.A. et al., (1991) Science, 253:1129-1132)、再狭窄のラット頸動脈損傷モデルは治療効果の可能性を示すのに有用であろう。このモデルの実例は米国特許第6500859号に記載されており、その開示は出典明示により本明細書の一部とする。簡単には、国立老化研究所動物実験委員会により承認されたプロトコールは20mg/kg体重ペントバルビタール、2mg/kg体重ケタミンおよび4mg/kg体重キシラジンで腹腔内に麻酔したGRCコロニーからの6か月Wistarラットを使用した。左外頸動脈を2-French Fogarty塞栓除去カテーテルでカニューレ挿入し、食塩水で膨らまし、そして総頸動脈を3回上下に通して膨張性除内皮傷害を生成した。傷害の2時間後に開始する腹腔内注射により適切な用量の被験物質またはベヒクル単独 (例えばDMSO:クレモホルE L:無水エタノール:リン酸塩緩衝食塩水 1:2:2:165のような適切な溶液で1日あたり体重に基づいて) で動物を処理した。被験物質またはベヒクル単独を腹腔内注射として1日1回、次の4日間投与した。11日後、動物 (処理8匹、ベヒクル処理10匹) を前記のように麻酔し、そして頸動脈を単離し、10%緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。頸動脈の横断面を顕微鏡スライドにマウントし、そしてヘマトキシリンおよびエオシン色素で染色した。頸動脈の画像をデジタルボードに投影し、そして内膜および中膜の横断面面積を測定した。新内膜面積の減少 (肥厚) は被験物質が有効な抗再狭窄剤であることを示している。

20

【0255】

因果関係において、腸管の内腔からの胆汁酸の再循環の干渉が血清コレステロールのレベルを低下させることが見出される。かかる低下がアテローム性動脈硬化症の病態の改善に至ることを示す疫学データが蓄積されている (Stedronsky, Biochimica et Biophysica Acta, 1210:255-287 (1994))。コレステリルエステル転送タンパク質 (CETP) の阻止は血漿HDL/LDL比率を効果的に修正することを示し、そして特定の心臓血管疾患の進行および/または形成を抑制すると予測される。CETPの阻止は血漿HDLコレステロールの上昇および血漿LDLコレステロールの低下に至り、それにより治療上有利な血漿脂質プロファイルを提供する (McCarthy, Medicinal Res.Revs., 13:139-159(1993))。¹⁴C-タウロコール酸の胆汁へのラット回腸取り込みを阻止する化合物に関するインビボアッセイが米国特許第6489366号およびUne, et al., Biochimica et Biophysica Acta, 833:196-202 (1985)に開示されており、その開示は出典明示により本明細書の一部とする。

30

40

【0256】

簡単には、雄Wistarラット (200-300g) をイナクチン (100mg/kg) で麻酔する。胆管に10インチの長さのPE10チューブでカニューレ挿入する。小腸を露出させてガーゼパッドの上に置く。カニューレ (1/8"ルアーロック、先細にした雌型アダプター) を小腸および盲腸の接合部から12cmで挿入する。この同一の接合部から4cmでスリットを切断する (8cmの長さの回腸を利用する)。温ダルベッコリン酸塩緩衝食塩水 (PBS) (pH 6.5) 20mlを用いて腸部分を洗い流す。遠位開口部に20cmの長さのシリコンチューブ (内径0.02" x 外径0.037") でカニューレ挿

50

入する。近位カニューレを蠕動ポンプに接続し、そして腸を温PBSで、0.25 ml / 分で20分間洗浄する。腸部分の温度は継続的にモニタリングする。実験の開始時に対照試料(5 mM非放射性標識タウロコール酸を伴う0.05 mCi/mlの¹⁴C-タウロコール酸)2.0 mlを3 mlシリンジで腸部分に負荷し、そして胆汁試料収集を開始する。対照試料を0.25 ml / 分の速度で21分間注入する。胆汁試料分画は手順の最初の27分間、3分毎に収集する。試料注入の21分後、回腸ループを温PBS 20 ml (30 mlシリンジ使用)で洗い流し、そして次にループを温PBSで0.25 ml / 分で21分間洗い流す。前記したように2回目の灌流を開始するが、被験化合物を同様に投与し(21分投与、続いて21分洗い流し)、そして3分毎に最初の27分間胆汁をサンプリングする。必要により、典型的には対照試料を含有する3回目の灌流を前記のように実施する。 10

【0257】

加えて、肝臓コレステロールの濃度の測定は被験物質の心臓血管障害に対する有効性を決定するための有用なアッセイである。このアッセイでは、肝臓組織の重量測定を行い、そしてクロロホルム:メタノール(2:1)中でホモジナイズする。ホモジナイズおよび遠心の後、上清を分離し、そして窒素下で乾燥する。残留物はイソプロパノールに溶解し、そしてAllain, C.A. et al., Clin. Chem., 20:470 (1974) (出典明示により本明細書の一部とする)に記載されるように、コレステロールオキシダーゼおよびペルオキシダーゼの組合せを用いてコレステロール含量を酵素的に測定する。

【0258】

同様に、血清コレステロールを以下のように決定することができる。Wako Fine Chemicals (Richmond, VA) の市販のキット; コレステロールC11、カタログ番号276-64909を用いて全血清コレステロールを酵素的に測定する。この同一のキットを用いて、Sigma Chemical Co. HDLコレステロール試薬、カタログ番号352-3でVLDLおよびLDLを沈殿させた後、HDLコレステロールを検定することができる(硫酸デキストラン法)。全血清トリグリセリド(ブランク)(TGI)もまたSigma Chemical Co. GPO-Trinder、カタログ番号337-Bで酵素的に検定する。VLDLおよびLDL (VLDL + LDL)コレステロール濃度を全コレステロールとHDLコレステロールの間の差として算出する。対照に相対して、被験物質処置した試料のVLDL + LDLの低下は有効な抗心臓血管障害剤であることを示している。 20 30

【0259】

例えば米国特許第6489366号に記載されるように、脂質低下薬を評価するためのイヌモデルを利用することもできる。

簡単には、Marshallファームのような業者から入手し、そして体重6-12 kgの雄ビーグル犬に1日1回2時間食餌を与え、そして水は自由に摂らせた。イヌを無作為に、各6から12匹のイヌからなる投与群: ベヒクル、胃内投与; 1 mg / kg、胃内投与; 2 mg / kg、胃内投与; 4 mg / kg、胃内投与; 2 mg / kg、経口投与(カプセル中粉末); に割り当てることができる。水溶液(例えば0.2% Tween 80溶液[ポリオキシエチレンモノオレアート、Sigma Chemical Co., St. Louis, MO])に溶解した治療物質の胃内投与を、胃管を用いて行うことができる。投与を開始する前に、血清コレステロール(全およびHDL)およびトリグリセリドを評価するために朝に食餌を与える前に橈側皮静脈から血液試料を取ることができる。数日間連続して動物に朝、食餌の前に投与する。動物に2時間食べさせ、その後、残りの食餌すべてを除く。糞便を試験の終わりに2日間収集し、そして胆汁酸または脂質含量を分析することができる。血液サンプルもまた処置期間の終わりに採取し、試験前の血清脂質レベルと比較する。標準スチューデントt検定を用いて $p < 0.05$ で統計学的有意性を決定する。 40

【0260】

血清脂質測定を同様に測定する。絶食イヌの橈側皮静脈から血清分離管(Vacutainer S ST, Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, N.J.)に血液を収集する。血液を2000 rpmで20分間遠心し、そして血清をデカンテーションする。コレステロールオキ 50

シダーゼ反応を利用して比色分析で測定される過酸化水素を生成するWako酵素診断キット（コレステロールC I I）（Wako Chemicals, Richmond, VA）を用いて96ウェル様式で全コレステロールを測定することができる。プレートの最初の2つのカラムで0.5から10ugコレステロール標準曲線を調製する。血清試料（20-40ul、予測される脂質濃度に依存する）または既知の血清対照試料を別個のウェルに2検体ずつで加える。水を加えて各ウェルの容量を100ulにする。呈色試薬100ulアリコート各ウェルに加え、そして37℃で15分間のインキュベーションの後、プレートを500nmで読む。

【0261】

硫酸デキストランおよびMgイオンを利用して選択的にLDLおよびVLDLを沈殿させるSigmaキット番号352-3（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）を用いてHDLコレステロールを検定することができる。各血清試料150ulの容量を個々のマイクロチューブに加え、続いてHDLコレステロール試薬（Sigma352-3）15ulを加える。試料を混合し、そして5000rpmで5分間遠心する。次いで上清の50ulアリコートを食塩水200ulと混合し、そして全コレステロール測定に関するのと同様の手順を用いて検定する。

10

【0262】

Sigmaキット337を用いて96ウェルプレート様式でトリグリセリドを測定する。この手順はグリセロールを測定し、続いてトリグリセリドのリポタンパク質リパーゼとの反応によるその放出を測定する。1から24ugの範囲のグリセロール（Sigma339-1）標準溶液を用いて標準曲線を作成する。血清試料（20-40ul、予測される脂質濃度に依存する）をウェルに2検体ずつで加える。水を加えて各ウェルの容量を100ulにし、そして呈色試薬100ulもまた各ウェルに加える。混合し、そして15分間インキュベートした後、プレートを540nmで読み、そして標準曲線からトリグリセリド値を算出する。ブランク酵素試薬を用いる同型プレートでも実行し、血清試料中の任意の内因性グリセロールに関して補正する。

20

【0263】

米国特許第6462046号（その開示は出典明示により本明細書の一部とする）に記載されるように、db/dbマウス（C57BL/KsJ-db/dbJcl）において血清グルコースおよび血清インスリンに及ぼすその効果に関して被験化合物を評価することができる。化合物をベヒクル（例えば蒸留水中2% Tween80からなる）に溶解し、そして経口投与する。投与量は体重により決定する。実験および動物の処分を含む研究の全態様を、動物が関与する生物医学研究の国際ガイドライン原則（CIOMS 出版番号ISBN9290360194、1985年）に全般的に従って実施する。グルコースHAアッセイキット（Wako, Japan）を用いて血清グルコースを決定し、そしてELISAマウスインスリンアッセイキット（SPI bio, France）を利用してインスリンを決定する。適切な陽性対照はトログリタゾン（Helios Pharmaceutical, Louisville, Ky）である。

30

【0264】

動物を各4匹の動物の20の群に分ける。動物の体重は 52 ± 5 gで、8-10週齢である。実験中、動物には実験用食餌（Fwusow Industry Co., Taiwan）および水を自由に取れるようにする。任意の処置の前に、血液試料（処置前血液）を各動物から採取する。動物の4つの群であるベヒクル群はベヒクルのみを投与される。ベヒクル群の各々は100、30、10または1ml/kg体重のベヒクルを経口投与される。トログリタゾン溶液（Tween80/水中10ml/kg体重）を陽性対照の4群に各々100、30、10および1ml/kg体重の用量で経口投与する。被験化合物を同様に溶液として動物の4群に投与し、各々の群は異なる用量の化合物を投与される。ベヒクル、陽性対照および被験化合物溶液を群に処置前血液を取った後、即座に、24時間および48時間に投与する。最後の投与の後1.5時間に血液を取る（処置後血液）。血清グルコースを酵素的（ムラトース-GOD）に決定し、そしてインスリンレベルをELISA（マウスインスリン

40

50

ンアッセイキット)により決定する。各群の平均SEMを算出し、そして処置前血液と処置後血液との間の比較により血清グルコースおよびインスリン阻止パーセントが得られる。処置前血液に相対して、処置後血液における血清グルコースおよびインスリンレベル低下のパーセンテージを決定し、そして対応のないスチューデントt検定を対照および被験溶液群およびベヒクル群の間の比較に適用する。有意差は $p < 0.05$ と見なした。有効な抗心臓血管障害剤であるトログリタゾンは 10 mg/kg 体重でグルコースレベル低下に到る($25 \pm 2\%$)。

【0265】

米国特許第6121319号(その開示を出典明示により本明細書の一部とする)は高コレステロール血症ウサギのアテローム性動脈硬化症の進行に関するアッセイについて記載している。ウサギを屠殺し、そして大動脈を得る。スタン-4で大動脈を染色し、そして染色の程度を分析する。被験物質処置および未処置脂質食ウサギにおいて損傷に覆われた大動脈表面積のパーセントをグラフ化する。有効な抗アテローム性動脈硬化症剤で処置されたウサギの大動脈はあまり染色されず、これはアテローム性動脈硬化症の低減を示している。加えて、VCAM-1またはRam-11抗原の抗体を用いて、大動脈の切片をVCAM-1発現またはマクロファージ蓄積に関して免疫染色する。対照処置試料と比較して、VCAM-1発現またはマクロファージ蓄積の低下は有効な薬剤を示している。

10

【0266】

LDLコレステロールの低下を霊長類モデルにおいても決定することができる。例えば被験化合物の投与の前に、高脂肪コレステロール食餌を与えることによりカニクイザルを高コレステロール血症にする。次いでサルに被験化合物または対照ベヒクルを2週間経口投与する。この期間中のサルの血清LDLコレステロールパーセンテージの低下は有効な抗アテローム性動脈硬化症剤を示している。

20

【0267】

医薬組成物

本発明のポリペプチドが可溶性形態で、例えば形質転換された酵母または哺乳動物細胞の分泌生成物として発現される場合、硫酸アンモニウム沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、電気泳動、アフィニティークロマトグラフィーの工程を含む当分野の標準的な手順に従って、例えばかかる精製の手引きを提供する「酵素精製および関連する技術」Methods in Enzymology, 22:233-577(1977)、およびScopes,R., Protein Purification: Principles and Practice (Springer-Verlag, New York, 1982)に従ってそれらを精製することができる。同様に、本発明のポリペプチドが不溶性形態で、例えば凝集体または封入体として発現される場合、遠心により崩壊した宿主細胞から封入体を分離すること、カオトロピック剤および還元剤で封入体を可溶化すること、可溶化した混合物を希釈すること、ならびにポリペプチドが生物学的に活性なコンフォメーションをとるようにカオトロピック剤および還元剤の濃度を低下させることを含む適切な技術によりそれらを精製することができる。後者の手順は以下の文献に開示されており、それは出典明示により本明細書の一部とする: Winkler et al., Biochemistry, 25:4041-4045 (1986); Winkler et al., Biotechnology, 3:992-998 (1985); Koths et al., 米国特許第4569790号; および欧州特許出願第86306917.5号および第86306353.3号。

30

40

【0268】

CPPまたはCPP生物学的活性を調整することができる、本発明の小型分子、ペプチド、CPP核酸分子、および抗CPP抗体を含む化合物を投与に適切な医薬組成物に組込むことができる。かかる組成物は典型的には薬学的に許容される担体を含む。「薬学的に許容される担体」なる用語は本明細書中で使用される際には、医薬用投与に適合する任意のおよび全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤等を含むことを意図する。医薬的に活性な物質のためのかかる溶媒および薬剤の使用は当分野で周知である。任意の慣用される溶媒または薬剤が活性化合物と不適合である場合を除いて、組成物におけるその使用が企図される。補助的な活性化合物を組成物に組込むこともできる。

50

【0269】

本発明の組成物をその意図される投与経路に適合するように処方する。投与経路の実例には、非経腸、例えば静脈内、皮内、皮下、経口（例えば吸入）、経皮（局所）、経粘膜および直腸投与が挙げられる。非経腸、皮内または皮下適用に使用される溶液または懸濁液は以下の成分を含むことができる：注射用水、食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたはその他の合成溶媒のような無菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンのような抗細菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムのような抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸のようなキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩のようなバッファーおよび塩化ナトリウムまたはデキストロースのような張性の調整のための薬剤。塩酸または水酸化ナトリウムのような酸または塩基でpHを調整することができる。非経腸調製物をアンプル、使い捨てシリンジまたはガラスもしくはプラスチック製の多回投与用バイアルに入れることができる。

10

【0270】

注射使用に適当な医薬組成物は無菌水溶液（水溶性の場合）または分散液および無菌注射用溶液または分散液の即時調製用無菌粉末を含む。静脈内投与に適当な担体には生理学的食塩水、静菌性水、Cremophor E L（登録商標）（BASF、Parsippany, N.J.）またはリン酸塩緩衝食塩水（PBS）が挙げられる。全例で、組成物は無菌でなければならない、そして容易な注射針通過性が存在する程度まで流動性であるべきである。これは製造および保存条件下で安定でなければならない、そして細菌および真菌のような微生物の夾雑作用に対して保存されなければならない。担体は例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）および適当なその混合物を含有する溶媒または分散媒でよい。例えばレクチンのようなコーティングの使用により、分散液の場合、必要とされる粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用により適切な流動性を維持することができる。種々の抗細菌および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等により微生物作用の防御を達成することができる。多くの場合、等張剤、例えばマンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムのような糖、多価アルコールを組成物中に含むのが好ましい。組成物に吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含めることにより、注射用組成物の吸収延長をもたらすことができる。

20

【0271】

活性化化合物がタンパク質、例えば抗C P P抗体である場合、適切な溶媒中に前記で列挙した成分の1つまたは組合せと共に必要とされる量の活性化化合物を組み込み、必要な場合続いて滅菌濾過することにより、無菌注射用溶液を調製することができる。一般的に、活性化化合物を基本の分散媒および前記で列挙したのから必要とされるその他の成分を含有する無菌ベヒクルに組み込むことにより分散液を調製する。無菌注射用溶液の調製のための無菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、活性成分プラス任意のさらに別の望ましい成分の粉末を生じる、予め滅菌濾過したその溶液からの真空乾燥および凍結乾燥である。

30

【0272】

経口組成物は一般的に不活性希釈剤または食用担体を含む。これらをゼラチンカプセルに封入するか、または錠剤に圧縮することができる。経口治療用投与の目的のために、活性化化合物を賦形剤と共に組み込み、そして錠剤、トローチ、またはカプセルの形態で用いることができる。吸入による投与のために、化合物を適当な噴霧剤、例えば二酸化炭素のような気体を含有する加圧容器もしくはディスペンサー、またはネブライザーからエアロゾルスプレーの形態で送達する。経粘膜または経皮手段により全身投与することもできる。経粘膜または経皮投与用に、通過するバリヤに適切な浸透剤を処方して用いる。かかる浸透剤は一般的に当分野で公知であり、そして例えば経粘膜投与用には、デタージェント、胆汁塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。鼻スプレーまたは坐剤の使用により経粘膜投与を達成することができる。経皮投与用には、当分野で一般的に公知であるような、軟膏、膏薬（salve）、ゲル、またはクリームに活性化化合物を処方する。最も好ましくは、活性化化合物を静脈内注射により対象に送達する。

40

50

【0273】

1つの実施態様では、活性化化合物を、移植およびマイクロカプセル送達系を含む放出制御処方のように、化合物を体内からの急速な排泄に対して保護する担体と共に調製する。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルソエステルおよびポリ乳酸のような生体分解性、生体適合性ポリマーを用いることができる。かかる処方の調製方法は当業者には明らかである。Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc.から市販の材料を入手することもできる。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体で感染細胞にターゲティングされたリポソームを含む）を薬学的に許容される担体として用いることもできる。当業者に公知の方法に従って、例えば米国特許第4522811号（その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする）に記載されるようにこれらを調製することができる。

10

【0274】

別の実施態様では、活性化化合物をマイクロチップ薬物送達装置にコーティングすることができる。かかる装置はかかる組成物に消化を受けさせないで、または個体に注射を受けさせないで、個体の血流、脳脊髄液、リンパ液、または組織へのタンパク質性組成物の制御された送達に有用である。マイクロチップ薬物送達装置の使用方法は米国特許第6123861号、5797898号および米国特許出願第20020119176A1号（その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする）に記載されている。

【0275】

経口または好ましくは非経腸組成物を投与の容易さおよび投与量の均一性のために投与量単位形態に処方するのが特に有利である。投与量単位形態は本明細書中で使用される際には、処置される対象にとって投与量の統一に適した物理的に別個の単位を指し；各単位は望ましい治療効果を生み出すように算出された予め決定された量の活性化化合物を必要とされる医薬用担体と共に含有する。本発明の投与量単位形態に関する明細は、活性化化合物の独特な特性および達成される特定の治療効果、ならびに個体の処置のためのかかる活性化化合物の調合の分野での固有の制限により決定され、そしてそれに直接依存する。

20

【0276】

かかる化合物の毒性および治療効果を、例えばLD50（集団の50%に致死の用量）およびED50（集団の50%に治療上有効な用量）を決定するための、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順により決定することができる。毒性および治療効果の間の用量比は治療指標であり、そしてLD50/ED50比として表現することができる。大きな治療指標を呈する化合物が好ましい。毒性副作用を呈する化合物を使用することができるが、未感染細胞に対する損傷の可能性を最小にし、それにより副作用を低減するために、かかる化合物を罹患組織の部位にターゲティングさせる送達系の設計に注意を払わなければならない。

30

【0277】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータをヒトで使用するための投与量範囲を計算するのに用いることができる。かかる化合物の投与量は、ほとんどまたは全く毒性がなく、ED50を含む循環濃度の範囲内にあるのが好ましい。投与量はこの範囲内で、用いる投与形態および利用する投与経路に依存して変動し得る。本発明の方法において用いられる任意の化合物に関して、治療上有効量を最初に細胞培養アッセイから推測することができる。動物モデルにおいて用量を処方して、循環を達成し、これを用いてヒトにおいて有用な用量をさらに正確に決定する。例えば高速液体クロマトグラフィーにより血漿中のレベルを測定することができる。

40

医薬組成物を投与のための指示書と一緒に容器、パックまたはディスペンサーに含めることができる。

【0278】

心臓血管疾患治療

本発明のCPPモジュレーターおよび抗CPP抗体をCPP関連障害の処置または予防に用いることができる。したがって1つの態様では、本発明はCPPの抗体、抗体フラグ

50

メント、またはペプチドモジュレーターを含有する、好ましくは薬学的に許容される担体または希釈剤を含有する医薬組成物に関する。担体または希釈剤は経口、静脈内、筋肉内または皮下投与に適合しているのが好ましい。医薬組成物は本明細書に記載するC P Pモジュレーター、抗C P P抗体、または抗C P P抗体フラグメントのいずれかを含むかまたは本質的にそれから構成され得る。

多くの薬剤が心臓血管障害の処置および予防に有用である。かかる薬剤をC P P関連組成物と組合わせて有利に用いることができる。

【0279】

例えば、細胞サイクル阻害剤およびプロトオンコジーン (Simari and Nabel, *Semin. Intervent. Cardiol.* 1:77-83(1996)) ; NO (一酸化窒素) ドナー薬物 ; b c l - x のようなプロアポトーシス剤 (Pollman et al., *Nature Med.* 2:222-227(1998)) ; ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (t k) 遺伝子および全身性ガンシクロビル (Ohno et al., *Science* 265:781-784(1994) ; Guzman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10732-10736(1994) ; Chang et al., *Mol. Med.* 1:172-181(1995)) ; および Simari et al., *Circulation* 92:1-501(1995)) はアテローム性動脈硬化症、再狭窄および新内膜平滑筋増殖を処置するのに利用されている。前記の参照文献の開示は出典明示により本明細書の一部とする。

10

【0280】

本発明の組成物との組合せに有用な抗血栓症剤には、例えば I I b / I I I a インテグリンの阻害剤 ; 組織因子阻害剤 ; および抗トロンピン剤が挙げられる。Vukmir, *Am. J. Emer. Med.* 13:459-470(1995) ; Grant, *PACE* 20:432-444(1997) ; Assmann I., *Curr. Med. Res. Opin.* 13:325-343(1995) ; および Lipka et al., *Am. Heart J.* 130:632-640(1995) (その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする) に記載されるような局所麻酔剤 (I 群剤)、交感神経アンタゴニスト (I I 群剤)、抗細動性剤 (I I I 群剤) カルシウムチャネル剤 (I V 群剤) またはアニオンアンタゴニスト (V 群剤) のような抗不整脈剤を用いることもできる。I 群剤の実例には : プロカインアミド ; キニジンまたはジソピラミド ; リドカイン ; フェニトイン ; トカイニドまたはメキシレチン ; エンカイニド ; フレカイニド ; ロルカイニド ; プロパフェノン (I I I) またはモリシジンが挙げられる。交感神経アンタゴニストには : プロプラノロール、エスモロール、メトプロロール、アテネラル、またはアセプトロールが挙げられる。抗細動性剤の実例はブレチリウム、アミオダロン、ソタロール (I I) または N - アセチルプロカインアミドである。I V 群剤にはベラパミル、ジルチアゼムおよびペプリジル、ならびにアリニジンのようなアニオンアンタゴニストが挙げられる。

20

30

【0281】

うっ血性心不全治療剤には Embrel (商標) (Immunex Corp. ; Seattle, Wash.)、T B C 1 1 2 5 1 のような T N F 阻害剤または Natreacor (ネシリチド ; Scios, Inc.) のような A C E (アンジオテンシン変換酵素) 阻害剤が挙げられる。血管新生剤、例えば Genentech により開発された r h V E G F のような組換え V E G F アイソフォーム ; V E G F の 1 2 1 アミノ酸アイソフォームをコードする核酸分子 (BioByPass (商標) ; Gen Vec/Parke Davis) ; または V E G F - 2 をコードする核酸 (Vascular Genetics, Inc.) ; FIBLAST (商標) ; Scios, Inc. (Mountain View, Calif.) および Wyeth Ayerst Laboratories (Radnor, Pa.) により開発されている F G F - 2 の組換え形態、GENERX (商標) または Collateral Therapeutics (San Diego, Calif.) および Schering AG (Miller and Abrams, *Gen. Engin. News* 18:1(1998) 参照 (その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする)) により開発された F G F - 4 をコードするアデノウイルス遺伝子治療ベクターもまた本発明の C P P 関連組成物との組合せに有用である。最後に、アムロジピン (Marche et al., *Int. J. Cardiol.* 62(suppl.):S17-S22(1997) ; Schachter, *Int. J. Cardiol.* 62(suppl.):S85-S90(1997)) ; ニカルジピン、ニフェジピン ; プロパノロール ; 硝酸イソソルピド ; ジルチアゼム ; および イスラジピン (Nayler (Ed.) *Calcium Antagonists* pages 157-260 London: Academic Press (1988) ; Schachter, *Int. J. Cardiol.* 62(suppl.):S9-S15(1997)) のようなカルシウムアンタゴニストもまた心臓血管障害の有利な治療剤である。

40

50

【0282】

本発明を一般的に記載してきたが、説明のみの目的で提供され、そして特記しない場合限定を意図するものではない、特定の具体的な実施例を参照することによりさらなる理解を得ることができる。

【実施例】

【0283】

実施例1:

実験および対照集団におけるC P Pレベルの特徴付け

心臓血管疾患のデュークデータバンクに登録した対象を冠動脈疾患(CAD)に基づいて選択した。CAD患者全241名および対照個体をさらに性別、年齢、および民族性に関してさらに適合させ、そして血漿異常を有する個体を排除した。CAD患者53組および対照個体53組を定めた。各組から6リットルの血漿をプールした。各個体からの血漿のアリコートを維持し、したがってプールした試料の陽性結果を集団の各メンバーに関して確認することが可能になる。かかる確認は、個体の効果を心臓血管障害に無関係である特定のポリペプチドのレベル異常と混同する可能性を払拭するのに貴重である。各集団からプールした血漿の2と1/2リットルを以下のようなMicroProt(商標)法に従って多段階クロマトグラフィー工程による分離に供した:

10

【0284】

工程1: H S A / I g G 枯濁

凍結血漿125mlを解凍し、そして無菌フード内で0.45μm無菌フィルターで濾過した。

20

濾液を各々300ml H S Aリガンドセファロースファストフローカラム(Amersham, Upsala, Sweden)、内径5cm、長さ15cm;および100ml プロテインGセファロースファストフローカラム(Amersham, Upsala, Sweden)、内径5cm、長さ5cmの2つの直列カラムに注入した。

50mM P O 4バッファー(pH7.1)、0.15M N a C lでカラムを平衡にし、そして洗浄した。流速は5ml/分であった。

非保持分画(350ml)を第2工程まで凍結した。20回実行した。

【0285】

工程2: ゲル濾過/逆相捕捉工程

30

工程1からの試料を解凍し、そして無菌フード内で0.45μm無菌フィルターで濾過した。

濾液を2つの直列ゲル濾過カラム: 2×9.5リットルのSuperdex 75(Amersham, UK)カラム、内径4cm、長さ62cmに注入した。50mM P O 4バッファー(pH7.4)、0.1M N a C l、8M尿素でカラムを平衡にした。疎水性不純物を逆相プレカラム: 150ml P L R P S (Polymer Labs, UK)に保持した。プレカラムを試料注入用に交換した。流速40ml/分でゲル濾過を実施した。

低分子量タンパク質(<20kDa)を直列逆相捕捉カラム: 50ml P L R P S 100オングストローム(Polymer Labs, UK)に適応させた。P L R P Sカラムで注入を制御する3方向バルブを33mAU(280nm)のカットオフで切り換えて、ゲル濾過溶出液を逆相捕捉カラムに送った。このカットオフ値はOD値の推定される範囲を提供するために最初にS D S - P A G Eを用いることにより、そして続いて3つのカットオフ値を評価することにより(OD範囲の高、中および低値)確立した。得られる低分子量タンパク質を最大にし、低分子量タンパク質部分が少なくとも85%であるように最終のカットオフ値を選択した。水中0.1% T F A、80% C H 3 C Nの1カラム容量グラジエントにより、低分子量タンパク質およびペプチドを逆相捕捉P L R P Sカラムから溶出した。溶出液分画(50ml)を次の工程まで凍結した。20回実行した。この工程の最後に、全逆相溶出液を解凍し、プールし(1リットル)、そして7個のポリプロピレン容器(143ml)に分けた。次の工程で使用するまで容器を-20度に維持した。

40

【0286】

50

工程 3 : カチオン交換

工程 2 からの試料 (1 4 7 m l) を解凍し、そして等量のカチオン交換バッファー A (G l y / H C l バッファー 5 0 m M , p H 2 . 7 、尿素 8 M) と混合した。

試料を 1 0 0 m l Source 1 5 S カラム (Amersham, Upsala, Sweden) 、内径 3 5 m m 、長さ 1 0 0 m m に注入した。バッファー A でカラムを平衡にし、そして洗浄した。流速は 1 0 m l / 分であった。

タンパク質およびペプチドを 1 0 0 % バッファー A から 1 0 0 % バッファー B (1 M N a C l を含有するバッファー A) までのステップグラジエントで溶出した :

- 7 . 5 % B (7 5 m M N a C l) 3 カラム容量
- 1 0 % B (1 0 0 m M N a C l) 3 カラム容量
- 1 7 . 5 % B (1 7 5 m M N a C l) 3 カラム容量
- 2 2 . 5 % B (2 2 5 m M N a C l) 2 カラム容量
- 2 7 . 5 % B (2 7 5 m M N a C l) 2 カラム容量
- 1 0 0 % B (1 M N a C l) 2 カラム容量

ピークに基づいて 4 5 から 6 0 分画を収集した。7 回実行した。7 回実行を達成した後、1 8 分画を得るために、実行中および間の分画をプールした。次の工程で使用するまで分画を - 2 0 度に維持した。

【 0 2 8 7 】

工程 4 : 還元 / アルキル化および逆相 H P L C 分別 1

濃縮トリス H C l で p H を 8 . 5 に調整した後、1 8 個のカチオン交換分画の各々をジチオスレイトール (D T E 、 3 0 m M 3 7 で 3 時間) で還元し、そしてヨードアセタミド (1 2 0 m M 、暗中 2 5 で 1 時間) でアルキル化した。後者の反応を D T E (3 0 m M) の添加で停止させ、続いて酸性にした (T F A 、 0 . 1 %) 。次いで分画を Uptisphere C 8 、 5 μ m 、 3 0 0 オングストロームカラム (Interchim, French) 内径 2 1 m m 、長さ 1 5 0 m m に注入した、流速 1 0 m l / 分で注入を実施した。

水中 0 . 1 % T F A (溶液 A) で C 8 カラムを平衡にし、そして洗浄した。タンパク質およびペプチドを 1 0 0 % A から 1 0 0 % B (水中 0 . 1 % T F A 、 8 0 % C H 3 C N) までの二相性グラジエントを用いて 6 0 分で溶出した。流速は 2 0 m l / 分であった。4 0 m l の 3 0 分画を収集した。

その分画のタンパク質濃度を反映する、各分画の 2 8 0 n m で測定した光学密度 (O D) に基づいて、類似のタンパク質含量のアリコートを各分画に関して創成した。

各分画あたり 1 つを、過剰な乾燥を防ぐために各分画で水中 1 0 % グリセロール 5 0 0 μ l を添加した後、SpeedVac (Savant, Fischer, Geneva) で乾燥し、それ以外はさらに使用するために全アリコートを凍結し、そして維持した。乾燥した分画は次の工程で使用するまで - 2 0 を維持した。

【 0 2 8 8 】

工程 5 : 逆相 H P L C 分別 2

工程 4 からの乾燥した試料を溶液 A (水中 0 . 0 3 % T F A) 1 m l に再懸濁し、そして Vydac L C M S C 4 カラム、5 マイクロメーター、3 0 0 オングストローム (Vydac, USA) 内径 4 . 6 m m 、長さ 1 5 0 m m に注入した。流速は 0 . 8 m l / 分であった。

溶液 A で C 4 カラムを平衡にし、そして洗浄し、そして逆相 H P L C 分別 1 の試料の溶出位置に適合させた二相性グラジエントを用いてタンパク質およびペプチドを溶出した。エレクトロスプレーイオントラップ質量分析器を用いて未修正の質量データを獲得した。C H 3 C N 濃度範囲 R P 1 分画相当溶媒濃度 ± 5 % で 1 6 個の異なるグラジエントを用いた。3 0 % C H 3 C N に等しいかまたはそれ以上の溶媒濃度で R P 1 で溶出されたタンパク質に関して、R P 2 グラジエントに関する出発溶出条件を、C H 3 C N パーセンテージ、R P 1 溶出濃度マイナス 3 0 % で設定した。2 4 個の溶出された分画をディーブウェルプレートに収集し、最適 SpeedVac 濃縮およびさらなるロボット処理のために設計された、最適化された異なる収集形態に適合させた。

【 0 2 8 9 】

10

20

30

40

50

工程 6 : 質量検出

逆相 HPLC 分別 2 の後、96 ウェルディープウェルプレート (DWP) に約 1300 分画を収集した。容量のごく一部 (2.5%) を LC - ESI - MS (Bruker Esquire) を用いるオンライン分析に転用した。未消化のタンパク質のアリコートに Maldi マトリックスと混合し、そして質量校正標準および感受性標準と一緒に Maldi プレートにスポットした。自動スポッティング装置 (Bruker Maldi 試料調製ロボット) を使用した。2 つの異なる Maldi マトリックスを用いた: シナピン酸 (sinapinic acid) としても公知のシナピク酸 (sinapic acid) (SA)、トランス - 3,5 - ジメトキシ - 4 - ヒドロキシ桂皮酸、およびアルファ - シアノ - 4 - ヒドロキシ桂皮酸 (HCCA)。Maldi プレートを Bruker Reflex III Maldi MS 装置を用いる質量検出に供した。96 ウェルプレートを +4 で保存した。

10

【0290】

96 ウェルプレート (DWP) を回収し、そして 2 連続濃縮工程に供した。SpeedVac で乾燥することにより、容量をウェルあたり 0.8 ml から約 50 μ l まで濃縮し、そして次におよそ 200 μ l に再溶解し、そしてウェルあたり約 50 μ l に再濃縮し、そして +4 で保存した。次いで再緩衝、トリプシンのウェルへの添加、密封および 37 で 12 時間のプレートのインキュベーション、続いてクエンチング (ギ酸を添加して pH を 2.0 まで下げる) することによりタンパク質を消化した。各特定の分画に関して記録した 280 nm での OD に基づいて、ウェルに加えるトリプシンの濃度を調整した。これによりトリプシンの最適な使用および最も濃縮された分画の完全な消化が確実になる。自動スポッティング装置 (Bruker Maldi 試料調製ロボット) を用いて、Maldi プレート上に感受性および質量校正標準と一緒に、HCCA マトリックスと予め混合した、各ウェルからの一定容量を載せた。Bruker Reflex III Maldi MS 装置を用いて Maldi プレートを分析した。96 ウェルプレートの各ウェルからの含量を LC - ESI - MS - MS Bruker Esquire ESI イオントラップ MS 装置で分析した。

20

【0291】

工程 7 : ヒト血漿における低存在度ペプチドの検出および同定

分離した分画をさらに分離および検出のための質量分析 (双方共にマトリックス支援レーザー脱離/イオン化 (Maldi) および MS - MS) に供する。

未修正質量データ、ペプチド質量フィンガープリントおよびペプチド配列データをタンパク質同定および特徴付けのために統合した。Mascot ソフトウェア (Matrix Science Ltd, London, UK) を用いてタンパク質を同定し、そしてペプチド同定からの結果をスペクトルの手分析により確認した。

30

この方法により同定されたタンパク質のうち、カルグラニューリン A (SwissProt 受託番号 P05109 の S100 カルシウム結合タンパク質 A8) が CAD 患者からプールされた試料におけるよりも、対照からプールされた試料において多量に発現されることが見出された (例えばタンパク質からのペプチドは疾患分画と比較して 2 倍も多くの対照分画で観察され、そしてこのタンパク質のマススペクトル同定の間に得られた累積スコアは対照試料に関して 2.5 倍高かった)。カルグラニューリン A は前炎症タンパク質として特徴付けられている (Odink et al., Nature 330(6143):80-82(1987) および多くのその後の参考文献)。これは炎症応答の間の骨髄性細胞の浸出により発現され、ここでこれは上皮細胞のグリコサミノグリカン構造に結合する (Robinson, et al., JBC 277:3658-3665(2002))。興味深いことに、PCT 公開第 WO00/61472 号は、例えばアテローム性動脈硬化症に引き起こされる心不全の処置のためのカルグラニューリン A の使用を開示している。さらに、PCT 公開第 WO00/18970 号は心筋梗塞および高血圧症の予防のための血管膜成長の阻害剤としてのカルグラニューリン A の使用を開示している。したがって、本明細書に記載するタンパク質分離および同定研究法は、疾患試料よりも対照試料において高レベルで検出される場合、研究される疾患の処置に有利な効果を有するタンパク質を提供するのに有効であると思われる。

40

【0292】

50

逆に、対照からプールされた試料との比較によりCAD患者からプールされた試料において過剰発現されるので、マトリックスG1aタンパク質(SwissProt受託番号P08493)の同定が本実施例で記載するタンパク質分離および同定の方法により可能になる(例えばタンパク質からのペプチドは対照分画に比較して疾患分画でほぼ2倍多くなっており、そしてこのタンパク質のマスペクトル同定の間で得られた累積スコアは疾患試料に関して2倍高くなった)。MGPは骨および軟骨の有機基質に関連するビタミンK依存性タンパク質である。Mori et al.,は、MGPが血管石灰化を阻止できることを実証した(FEBS Letters 433:19-22(1998))。MGPレベルは、血管石灰化に対して起こり得るフィードバック応答としてアテローム斑において上昇する。PCT公開第WO01/02863号および第WO01/25427号はアテローム性動脈硬化症および心臓血管障害のためのバイオマーカーとしてMGPについて記載している。したがって、本明細書で記載するタンパク質分離および同定研究法は研究される疾患の診断において認識された用途を有するタンパク質を提供するのに有用であると思われる。

10

【0293】

図1および表1に列挙した配列番号:3-5、8-10、13-14、18-23、および26-28のトリプシンペプチドは、タンデム質量分析により、冠動脈疾患試料のみで観察された。

トリプシンペプチドの存在は、配列番号:3(SNCCQHSSALGLAR)、配列番号:4(CTSMASENSECSV)または配列番号:5(TIVGSIITNTNFGICHDAGR)のアミノ酸配列を含むポリペプチドがCADを有する個体の出発血漿試料に高レベルで存在したことを示している。かかるポリペプチドは配列番号:1および2(CPP2)の配列により表されるものを含む。

20

【0294】

トリプシンペプチドの存在は、配列番号:8(YAQT PANMFYIVACDNR)、配列番号:9(RDPPQYPVVPVHLDR)または配列番号:10(DPPQYPVVPVHLDR)のアミノ酸配列を含むポリペプチドがCADを有する個体の出発血漿試料に高レベルで存在したことを示している。かかるポリペプチドは配列番号:6および7(CPP9)の配列により表されるものを含む。

トリプシンペプチドの存在は、配列番号:13(AVVHGI LMG VPVPFP IPEPDGCK)または配列番号:14(SGINCP IQK)のアミノ酸配列を含むポリペプチドがCADを有する個体の出発血漿試料に高レベルで存在したことを示している。かかるポリペプチドは配列番号:11および12(CPP21)の配列により表されるものを含む。

30

【0295】

トリプシンペプチドの存在は、配列番号:26(EPLDDYVNTQGPSLFSVTK)、配列番号:37(CEEDKEFTCR)または配列番号:28(AFQYHSK)のアミノ酸配列を含むポリペプチドがCADを有する個体の出発血漿試料に高レベルで存在したことを示している。かかるポリペプチドは配列番号:24および25(CPP20)の配列により表されるものを含む。

最後に、図4および表1dに列挙した配列番号:18-23のトリプシンペプチドはタンデム質量分析により冠動脈疾患試料において高レベルで観察された。トリプシンペプチドの存在は、配列番号:18(ADEVA A APEQIAADIPEVVVSLAWDESLAPK)、配列番号:19(IPACIAGER)、配列番号:20(RYGTCIYQGR)、配列番号:21(YGTCIYQGR)、配列番号:22(YGTCIYQGR L WAFCC)または配列番号:23(LWAFCC)のアミノ酸配列を含むポリペプチドがCADを有する個体の出発血漿試料に高レベルで存在したことを示している。かかるポリペプチドは配列番号:15、16および17(CPP17)の配列により表されるものを含む。トリプシンペプチドは非CAD対照試料において減少した。

40

【0296】

CPP2、CPP9、CPP20およびCPP21のトリプシンペプチドは非CAD対

50

照試料では検出されず、そしてこれらはC P P 1 7に関しては非常に低レベルで検出された。さらに、配列番号：1 6のプレタンパク質から誘導される、C P P 1 7からの配列番号：1 8のトリプシンペプチドは、そしてそれは、それ自体血漿では見出されないと予測され、疾患の血漿のみで観察された(表1 d)。この観察は疾患の場合のプレタンパク質のプロセッシングの変化を反映し得る。

本発明によるタンパク質分離および同定の方法は非常に鋭敏である。Microprot(商標)法は、数百p Mの範囲の血漿濃度を有する非常に低い存在度のタンパク質を検出することができる。ここで記載する方法を実施する間に精度は確認された。特にアテローム性動脈硬化症およびC A Dにおいて、十分に特徴付けられた役割を有するタンパク質はC A Dおよび対照試料において差次的に検出された(前出)。したがって、対照血漿中の列挙したペプチドのいくつかの不在により、対応するC P P(C P P 2、C P P 9、C P P 2 0およびC P P 2 1)が、たとえ存在したとしても、通常血漿中で無視できるほどに低レベルで存在することが示される。

10

【0 2 9 7】

実施例 2 :

C P Pの化学的合成

この実施例では、本発明のC P Pを合成する。ペプチドフラグメント中間体を最初に合成し、そして次に望ましいポリペプチドに組み立てる。

最初にC P Pを、結合されるフラグメントのN末端でC y s残基を有するように選択された例えば5個のフラグメントで調製することができる。フラグメント1を最初にフラグメント2に結合させて、第1の生成物を得て、次いで調製用H P L C精製の後、第1の生成物をフラグメント3に結合させて、第2の生成物を得る。調製用H P L C精製の後、第2の生成物をフラグメント4に結合させて、第3の生成物を得る。最後に、調製用H P L C精製の後、第3の生成物をフラグメント5に結合させて、望ましいポリペプチドを得て、これを精製し、そしてリフォールディングする。

20

【0 2 9 8】

チオエステル形成

前記したようにフラグメント2、3、4および5をチオエステル作成樹脂上で合成する。この目的のために、以下の樹脂を調製する：本質的にはHackengB et al., (1999)に記載される条件下で、S - アセチルチオグリコール酸ペンタフルオロフェニルエステルをL e u - P A M樹脂に結合させる。第1の場合、D M F中1 0%メルカプトエタノール、1 0%ピペリジンで3 0分間処理してアセチル保護基を除去した後、得られた樹脂を出発樹脂として0. 2ミリモルスケールでペプチド鎖の伸長のために用いる。従来のN またはS

30

保護を有するC y sの代わりに、B o c - チオプロリン(B o c - S P r、すなわちB o c - L - チオプロリン)の各々の鎖の末端への結合により、フラグメント2から5のN末端C y s残基のN を保護する(例えばBrik et al., J.Org.Chem., 65:3829-3835(2000))。

【0 2 9 9】

ペプチド合成

Schnolzer et al., J.Peptide Protein Res., 40:180-193(1992)に記載されるように、段階的B o c化学鎖伸長のための、インサイチュ中和/ 2 - (1 H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1, 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸(H B T U)活性化プロトコルを用いて、Applied Biosystemsの特別修正された4 3 3 Aペプチド合成器で固相合成を実施する。各々の合成サイクルは、無溶媒T F Aで1 から2分間処理、1分間のD M Fフロー洗浄、過剰のD I E Aの存在下、予め活性化したB o c - アミノ酸2. 0ミリモルとの1 0分間の結合時間、および2回目のD M Fフロー洗浄によるN - B o c - 除去からなる。N - B o c - アミノ酸(2ミリモル)を過剰のD I E A(6ミリモル)の存在下、H B T U 1. 8ミリモル(D M F中0. 5 M)で3分間予め活性化する。G l n残基の結合の後、T F Aを用いる脱保護の前および後にジクロロメタンフロー洗浄を用いて、起こり得る高温(T F A / D M F) - 触媒ピロリドンカルボン酸形成

40

50

を防御する。側鎖保護アミノ酸はBoc-Arg(p-トルエンシルホニル)-OH、Boc-Asn(キサンチル)-OH、Boc-Asp(O-シクロヘキシル)-OH、Boc-Cys(4-メチルベンジル)-OH、Boc-Glu(O-シクロヘキシル)-OH、Boc-His(ジニトロフェニルベンジル)-OH、Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH、Boc-Ser(ベンジル)-OH、Boc-Thr(ベンジル)-OH、Boc-Trp(シクロヘキシルカルボニル)-OHおよびBoc-Tyr(2-Br-Z)-OH(Orpagen Pharma, Heidelberg, Germany)である。その他のアミノ酸は側鎖保護なしで用いる。C末端フラグメント1をBoc-Leu-O-CH₂-Pam樹脂(負荷した樹脂の0.71ミリモル/g)で合成するが、フラグメント2から5に関しては機械支援合成をBoc-Xas-S-CH₂-CO-Leu-Pam樹脂で出発する。この樹脂は標準的な条件下で、S-アセチルチオグリコール酸ペンタフルオロフェニルエステルのLeu-PAM樹脂への結合により得られる。DMF中10%メルカプトエタノール、10%ピペリジンで30分間処理してアセチル保護基を除去した後、得られた樹脂を出発樹脂として0.2ミリモルスケールでペプチド鎖の伸長のために用いる。

10

20

30

40

50

【0300】

鎖の組み立てを完了した後、ペプチドフラグメントを脱保護し、そしてスカベンジャーとして5%p-クレゾールを用いて、無水フッ化水素と0 で1時間処理することにより樹脂から切断する。フラグメント1を除いて全例で、イミダゾール側鎖2,4-ジニトロフェニル(DNP)保護基はHis残基に残るが、それはDNP除去手順がC末端チオエステル基と適合しないためである。しかしながらDNPはライゲーション反応の間にチオールにより徐々に除去されて、保護されていないHisを生じる。切断後、ペプチドフラグメントを氷冷ジエチルエーテルで沈殿させ、アセトニトリル水溶液に溶解し、そして凍結乾燥する。バッファ-A(H₂O/0.1%トリフルオロ酢酸)中バッファ-B(アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸)の直線グラジエントおよび214nmでのUV検出を用いることにより、C18カラム(Waters)でのRP-HPLCによりペプチドフラグメントを精製する。Esquire装置(Bruker, Bremen, Germany)、または同様の装置を用いてエレクトロスプレー質量分析(ESMS)により試料を分析する。

【0301】

元来の化学的ライゲーション

以下にさらに十分に記載するように、保護されていないフラグメントのライゲーションを以下のように実施する:pHほぼ7で、1-8mMの最終ペプチド濃度を得るために、6M塩酸グアニジン(GuHCl)、0.2Mリン酸塩(pH7.5)中等モル量で乾燥ペプチドを溶解し、そして1%ベンジルメルカプタン、1%チオフェノールを加える。通常一晩反応を実施し、そしてHPLCおよびエレクトロスプレー質量分析によりモニタリングする。ライゲーション産物を続いて処理して依然存在する保護基を除去する。N末端チアゾリジン環の開口はさらにpH3.5で最終濃度0.5Mまでの固体メトキサミンの添加、およびさらに37 で2時間のインキュベーションを必要とする。分取HPLC精製の前に、10倍過剰のトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンを加える。ポリペプチド鎖を含有する分画をESMSにより同定し、プールし、そして凍結乾燥する。

【0302】

フラグメント4および5のライゲーションを6M GuHCl中、pH7.0で実施する。各反応物の濃度は8mMであり、そして1%ベンジルメルカプタンおよび1%チオフェノールを加えて還元環境を創成し、そしてライゲーション反応を促進する。37 で一晩攪拌した後、ほぼ定量的なライゲーション反応が観察される。N末端チアゾリジン環を開くために、反応のこの時点で、CH₃-O-NH₂・HClを溶液に加えて最終濃度0.5Mを得て、そしてpHを3.5に調整する。37 で2時間のインキュベーションの後、ESMSを用いて反応の完了を確認する。続いて反応混合物をペプチドフラグメント上で10倍過剰のトリス(2-カルボキシエチルホスフィン)で処理し、そして15分後、調製用HPLC(例えばC4、20-60%CH₃CN、分あたり0.5%)を用いてライゲーション生成物を精製し、凍結乾燥し、そして-20 で保存する。

残りのライゲーションのために同一の手順にわずかな修正を加えて繰り返す。

【0303】

ポリペプチドフォールディング

還元された凍結乾燥タンパク質(約0.1mg/ml)を1M GuHCl、100mM トリス、10mM メチオニン(pH 8.6)中に溶解することによる空気酸化によりリフォールディングを行う。一晚穏やかに攪拌した後、前記したようにRP-HPLCによりタンパク質溶液を精製する。

【0304】

実施例3

CPP抗体組成物の調製

実質的に純粋なCPPまたはその一部を得る。最終調製物中のタンパク質濃度を例えばAmiconフィルター装置で濃縮することにより、mlあたり数マイクログラムのレベルまで調整する。次いでタンパク質に対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体を「モノクローナル抗体」および「ポリクローナル抗体」と題したセクションで記載するように調製する。

10

【0305】

簡単には、抗CPPモノクローナル抗体を生成するために、マウスに数マイクログラムのCPPまたはその一部を数週間にわたって接種する。次いでマウスを屠殺し、そして脾臓の抗体産生細胞を単離する。脾臓細胞をポリエチレングリコールの手段によりマウス骨髄腫細胞と融合し、そして、アミノプテリンを含む選択培地(HAT培地)上での系の成長より過剰の融合していない細胞を破壊する。うまく融合した細胞を希釈し、そして希釈のアリコートマイクロタイタープレートのウェルに置き、ここで培養物の成長を続けさせる。最初にEngvall, E., Meth. Enzymol. 70:419(1980)(その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする)に記載されたように、ELISAのようなイムノアッセイ手順によりウェルの上清液中の抗体の検出により抗体産生クローンを同定する。選択した陽性クローンを広げ、そしてそのモノクローナル抗体生成物を使用のために収集することができる。モノクローナル抗体産生のための詳細な手順はDavis, L. et al., Basic Methods in Molecular Biology Elsevier, New York, Section 21-2(その開示は全て出典明示により本明細書の一部とする)に記載されている。

20

【0306】

免疫によるポリクローナル抗体生成のために、マウスをCPPまたはその部分で免疫することにより、CPPまたはその部分の異種性エピトープに対する抗体を含有するポリクローナル抗血清を調製し、これを修飾または未修飾して免疫原性を増強させることができる。任意のヒト以外の適当な動物、好ましくはラット、ウサギ、ヤギまたはウマを含むヒト以外の哺乳動物を選択することができる。

30

モノクローナルもしくはポリクローナルプロトコールのいずれかに従って調製した抗体調製物は生物学的試料中のCPP濃度を決定する定量的イムノアッセイに有用であるか; またはこれらを半定量的もしくは定性的に用いて生物学的試料中の抗原の存在を同定する。タンパク質を発現する細胞を殺すため、または体内のタンパク質のレベルを低下させるために、抗体を治療用組成物において使用することもできる。

40

【図面の簡単な説明】

【0307】

【図1】図1は成熟ヒトコリパーゼポリペプチド配列(配列番号: 1および2)および冠動脈疾患を有する個体の血漿中でタンデム質量分析により同定されたトリプシンペプチドの配列(配列番号: 3-5)を示す。配列番号: 1および2のトリプシンペプチドには下線を付している。

【図2】図2はCPP9の配列(配列番号: 6)および冠動脈疾患を有する個体の血漿中でMS-MS質量分析により見出されたペプチド配列(配列番号: 8-10)を示す。配列番号: 6および7でタンデム質量分析により観察されたトリプシンペプチドには下線を付している。シグナルペプチドには二重下線を付している。

50

【図3】図3は前駆体タンパク質（配列番号：11）および成熟タンパク質（配列番号：12、C P P 21）の配列ならびに冠動脈疾患を有する個体の血漿中でM S - M S質量分析により見出されたペプチド配列（配列番号：13 - 14）を示す。配列番号：11および12でタンデム質量分析により観察されたトリプシンペプチドには下線を付している。シグナルペプチドには二重下線を付している。

【図4】図4はC P P 17（配列番号：17）の配列および冠動脈疾患を有する個体の血漿中でM S - M S質量分析により見出されたペプチド配列（配列番号：18 - 23）を示す。配列番号：15および16でタンデム質量分析により観察されたトリプシンペプチドには下線を付しており、これは各々前駆体およびプレタンパク質を表している。配列番号：15でシグナルペプチドには二重下線を付している。

10

【図5】図5は本発明の前駆体（配列番号：24）および成熟タンパク質（C P P 20、配列番号：25）の配列、ならびに冠動脈疾患を有する個体の血漿中でタンデム質量分析により見出されたペプチド配列（配列番号：26 - 28）を示す。配列番号：24および25でタンデム質量分析により観察されたトリプシンペプチドには下線を付している。配列番号：24でシグナルペプチドには二重下線を付している。

【配列表】

4-33624A (5032-W001).ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Genova Ltd.
Argoud-Puy, Guilaine
Bederr, Nassima
Bougueleret, Lydie
Cusin, Isabelle
Mahe, Eve
Niknejad, Anne
Reffas, Samia

<120> SECRETED POLYPEPTIDE SPECIES ASSOCIATED WITH CARDIOVASCULAR DISORDERS

<130> 4-33624A/GEP (5032-W001)

<150> US 60/461,558
<151> 2003-04-08

10

<150> US 60/484,140
<151> 2003-06-30

<150> US 60/461,623
<151> 2003-04-08

<150> US 60/471,479
<151> 2003-05-16

<150> US 60/474,863
<151> 2003-05-30

<160> 146

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 1

Ala Pro Gly Pro Arg Gly Ile Ile Ile Asn Leu Glu Asn Gly Glu Leu
1 5 10 15

Cys Met Asn Ser Ala Gln Cys Lys Ser Asn Cys Cys Gln His Ser Ser
20 25 30

Ala Leu Gly Leu Ala Arg Cys Thr Ser Met Ala Ser Glu Asn Ser Glu
35 40 45

30

Cys Ser Val Lys Thr Leu Tyr Gly Ile Tyr Tyr Lys Cys Pro Cys Glu
50 55 60

Arg Gly Leu Thr Cys Glu Gly Asp Lys Thr Ile Val Gly Ser Ile Thr
65 70 75 80

Asn Thr Asn Phe Gly Ile Cys His Asp Ala Gly Arg Ser Lys Gln
85 90 95

<210> 2
<211> 90
<212> PRT

40

4-33624A (5032-wo01).ST25.txt

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Ile Ile Ile Asn Leu Glu Asn Gly Glu Leu Cys Met Asn Ser Ala
1 5 10 15

Gln Cys Lys Ser Asn Cys Cys Gln His Ser Ser Ala Leu Gly Leu Ala
20 25 30

Arg Cys Thr Ser Met Ala Ser Glu Asn Ser Glu Cys Ser Val Lys Thr
35 40 45

Leu Tyr Gly Ile Tyr Tyr Lys Cys Pro Cys Glu Arg Gly Leu Thr Cys
50 55 60

Glu Gly Asp Lys Thr Ile Val Gly Ser Ile Thr Asn Thr Asn Phe Gly
65 70 75 80

Ile Cys His Asp Ala Gly Arg Ser Lys Gln
85 90

<210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Asn Cys Cys Gln His Ser Ser Ala Leu Gly Leu Ala Arg
1 5 10

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Cys Thr Ser Met Ala Ser Glu Asn Ser Glu Cys Ser Val Lys
1 5 10

<210> 5
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Thr Ile Val Gly Ser Ile Thr Asn Thr Asn Phe Gly Ile Cys His Asp
1 5 10 15

Ala Gly Arg

<210> 6
<211> 161
<212> PRT

10

20

30

40

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

Thr Trp Ala Gln Trp Phe Glu Thr Gln His Ile Asn Met Thr Ser Gln
35 40 45

Gln Cys Thr Asn Ala Met Gln Val Ile Asn Asn Tyr Gln Arg Arg Cys
50 55 60

Lys Asn Gln Asn Thr Phe Leu Leu Thr Thr Phe Ala Asn Val Val Asn
65 70 75 80

Val Cys Gly Asn Pro Asn Met Thr Cys Pro Ser Asn Lys Thr Arg Lys
85 90 95

Asn Cys His His Ser Gly Ser Gln Val Pro Leu Ile His Cys Asn Leu
100 105 110

Thr Thr Pro Ser Pro Gln Asn Ile Ser Asn Cys Arg Tyr Ala Gln Thr
115 120 125

Pro Ala Asn Met Phe Tyr Ile Val Ala Cys Asp Asn Arg Asp Gln Arg
130 135 140

Arg Asp Pro Pro Gln Tyr Pro Val Val Pro Val His Leu Asp Arg Ile
145 150 155 160

Ile

<210> 7

<211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Lys Pro Pro Gln Phe Thr Trp Ala Gln Trp Phe Glu Thr Gln His Ile
1 5 10 15

Asn Met Thr Ser Gln Gln Cys Thr Asn Ala Met Gln Val Ile Asn Asn
20 25 30

Tyr Gln Arg Arg Cys Lys Asn Gln Asn Thr Phe Leu Leu Thr Thr Phe
35 40 45

Ala Asn Val Val Asn Val Cys Gly Asn Pro Asn Met Thr Cys Pro Ser

10

20

30

40

50 4-33624A (5032-wo01).ST25.txt
55 60

Asn Lys Thr Arg Lys Asn Cys His His Ser Gly Ser Gln Val Pro Leu
65 70 75 80

Ile His Cys Asn Leu Thr Thr Pro Ser Pro Gln Asn Ile Ser Asn Cys
85 90 95

Arg Tyr Ala Gln Thr Pro Ala Asn Met Phe Tyr Ile Val Ala Cys Asp
100 105 110

Asn Arg Asp Gln Arg Arg Asp Pro Pro Gln Tyr Pro Val Val Pro Val
115 120 125

10

His Leu Asp Arg Ile Ile
130

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Tyr Ala Gln Thr Pro Ala Asn Met Phe Tyr Ile Val Ala Cys Asp Asn
1 5 10 15

20

Arg

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Arg Asp Pro Pro Gln Tyr Pro Val Val Pro Val His Leu Asp Arg
1 5 10 15

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 10

Asp Pro Pro Gln Tyr Pro Val Val Pro Val His Leu Asp Arg
1 5 10

<210> 11
<211> 151
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Arg Phe Leu Ala Ala Thr Phe Leu Leu Leu Ala Leu Ser Thr Ala

40

4-33624A (5032-W001).ST25.txt
10

1 5 15
 Ala Gln Ala Glu Pro Val Gln Phe Lys Asp Cys Gly Ser Val Asp Gly
 20 25 30
 Val Ile Lys Glu Val Asn Val Ser Pro Cys Pro Thr Gln Pro Cys Gln
 35 40 45
 Leu Ser Lys Gly Gln Ser Tyr Ser Val Asn Val Thr Phe Thr Ser Asn
 50 55 60
 Ile Gln Ser Lys Ser Ser Lys Ala Val Val His Gly Ile Leu Met Gly
 65 70 75 80
 Val Pro Val Pro Phe Pro Ile Pro Glu Pro Asp Gly Cys Lys Ser Gly
 85 90 95
 Ile Asn Cys Pro Ile Gln Lys Asp Lys Thr Tyr Ser Tyr Leu Asn Lys
 100 105 110
 Leu Pro Val Lys Ser Glu Tyr Pro Ser Ile Lys Leu Val Val Glu Trp
 115 120 125
 Gln Leu Gln Asp Asp Lys Asn Gln Ser Leu Phe Cys Trp Glu Ile Pro
 130 135 140
 Val Gln Ile Val Ser His Leu
 145 150

10

<210> 12
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Glu Pro Val Gln Phe Lys Asp Cys Gly Ser Val Asp Gly Val Ile Lys
 1 5 10 15
 Glu Val Asn Val Ser Pro Cys Pro Thr Gln Pro Cys Gln Leu Ser Lys
 20 25 30
 Gly Gln Ser Tyr Ser Val Asn Val Thr Phe Thr Ser Asn Ile Gln Ser
 35 40 45
 Lys Ser Ser Lys Ala Val Val His Gly Ile Leu Met Gly Val Pro Val
 50 55 60
 Pro Phe Pro Ile Pro Glu Pro Asp Gly Cys Lys Ser Gly Ile Asn Cys
 65 70 75 80
 Pro Ile Gln Lys Asp Lys Thr Tyr Ser Tyr Leu Asn Lys Leu Pro Val
 85 90 95

30

40

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

Lys Ser Glu Tyr Pro Ser Ile Lys Leu Val Val Glu Trp Gln Leu Gln
100 105 110

Asp Asp Lys Asn Gln Ser Leu Phe Cys Trp Glu Ile Pro Val Gln Ile
115 120 125

Val Ser His Leu
130

<210> 13
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 13

10

Ala Val Val His Gly Ile Leu Met Gly Val Pro Val Pro Phe Pro Ile
1 5 10 15

Pro Glu Pro Asp Gly Cys Lys
20

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 14

20

Ser Gly Ile Asn Cys Pro Ile Gln Lys
1 5

<210> 15
<211> 94
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 15

Met Arg Thr Leu Ala Ile Leu Ala Ala Ile Leu Leu Val Ala Leu Gln
1 5 10 15

Ala Gln Ala Glu Pro Leu Gln Ala Arg Ala Asp Glu Val Ala Ala Ala
20 25 30

30

Pro Glu Gln Ile Ala Ala Asp Ile Pro Glu Val Val Val Ser Leu Ala
35 40 45

Trp Asp Glu Ser Leu Ala Pro Lys His Pro Gly Ser Arg Lys Asn Met
50 55 60

Ala Cys Tyr Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg Tyr
65 70 75 80

Gly Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys

40

85 4-33624A (5032-W001).ST25.txt
90

<210> 16
<211> 75
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Glu Pro Leu Gln Ala Arg Ala Asp Glu Val Ala Ala Ala Pro Glu Gln
1 5 10 15

Ile Ala Ala Asp Ile Pro Glu Val Val Val Ser Leu Ala Trp Asp Glu
20 25 30

10

Ser Leu Ala Pro Lys His Pro Gly Ser Arg Lys Asn Met Ala Cys Tyr
35 40 45

Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg Tyr Gly Thr Cys
50 55 60

Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys
65 70 75

<210> 17
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 17

Ala Cys Tyr Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg Tyr
1 5 10 15

Gly Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys
20 25 30

<210> 18
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 18

Ala Asp Glu Val Ala Ala Ala Pro Glu Gln Ile Ala Ala Asp Ile Pro
1 5 10 15

Glu Val Val Val Ser Leu Ala Trp Asp Glu Ser Leu Ala Pro Lys
20 25 30

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg

40

4-33624A (5032-w001).ST25.txt

1

5

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Arg Tyr Gly Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg
1 5 10

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 21

Tyr Gly Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg
1 5

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Tyr Gly Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys
1 5 10 15

20

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Leu Trp Ala Phe Cys Cys
1 5

<210> 24
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 24

Met Glu His Lys Glu Val Val Leu Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser
1 5 10 15

Gly Gln Gly Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Pro Ser
20 25 30

Leu Phe Ser Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Arg Glu Glu
35 40 45

Cys Ala Ala Lys Cys Glu Glu Asp Lys Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe
50 55 60

40

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg
65 70 75 80

Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Ala Val Leu Phe Glu Lys
85 90 95

<210> 25
<211> 77
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

10

Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Pro Ser Leu Phe Ser
1 5 10 15

Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Arg Glu Glu Cys Ala Ala
20 25 30

Lys Cys Glu Glu Asp Lys Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe Gln Tyr His
35 40 45

Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg Lys Ser Ser
50 55 60

Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Ala Val Leu Phe Glu Lys
65 70 75

20

<210> 26
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Pro Ser Leu Phe Ser
1 5 10 15

Val Thr Lys

30

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Cys Glu Glu Asp Lys Glu Phe Thr Cys Arg
1 5 10

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

4-33624A (5032-w001).ST25.txt

<400> 28

Ala Phe Gln Tyr His Ser Lys
1 5

<210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Cys Leu Asp Pro Val Asp Thr Pro Asn Pro Thr Arg
1 5 10

10

<210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Tyr Lys Lys Pro Glu Cys Gln Ser Asp Trp Gln Cys Pro Gly Lys
1 5 10 15

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

20

Glu Ser Leu Ser Gly Val Cys Glu Ile Ser Gly Arg
1 5 10

<210> 32
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Gln Ser Gly Glu Asp Asn Gln Asp Leu Ala Ile Ser Phe Ala Gly Asn
1 5 10 15

Gly Leu Ser Ala Leu Arg
20

30

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Asp Ala Leu Ser Ala Ser Val Val Lys
1 5

<210> 34
<211> 13
<212> PRT

40

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

<213> Homo sapiens

<400> 34

Asp Ser Gly Glu Asp Pro Ala Thr Cys Ala Phe Gln Arg
1 5 10

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Asp Tyr Tyr Val Ser Thr Ala Val Cys Arg
1 5 10

10

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Phe Pro Val Tyr Asp Tyr Asp Pro Ser Ser Leu Arg
1 5 10

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

20

Val Asn Ser Gln Ser Leu Ser Pro Tyr Leu Phe Arg
1 5 10

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Val Ser Ala Gln Gln Val Gln Gly Val His Ala Arg
1 5 10

30

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Gly Val Ser Leu Arg Pro Ile Gly Ala Ser Cys Arg
1 5 10

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

<400> 40

Gly Val Ser Leu Arg Pro Ile Gly Ala Ser Cys Arg Asp Asp Ser Glu
1 5 10 15

Cys Ile Thr Arg
20

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

10

Ala Gly Leu Gln Val Tyr Asn Lys
1 5

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Glu Asn Glu Leu Thr Tyr Tyr Cys Cys Lys
1 5 10

<210> 43
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 43

Phe Glu His Cys Asn Phe Asn Asp Val Thr Thr Arg
1 5 10

<210> 44
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Leu Gln Cys Tyr Asn Cys Pro Asn Pro Thr Ala Asp Cys Lys
1 5 10

30

<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Leu Arg Glu Asn Glu Leu Thr Tyr Tyr Cys Cys Lys
1 5 10

<210> 46
<211> 16
<212> PRT

40

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

<213> Homo sapiens

<400> 46

Thr Ala Val Asn Cys Ser Ser Asp Phe Asp Ala Cys Leu Ile Thr Lys
1 5 10 15

<210> 47

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Cys Leu Thr Thr Asp Glu Tyr Asp Gly His Ser Thr Tyr Pro Ser His
1 5 10 15

10

Gln Tyr Gln

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

His Asp Leu Gly His Phe Met Leu Arg
1 5

20

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Leu Gln Ala Val Thr Asp Asp His Ile Arg
1 5 10

<210> 50

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

30

Asn Asp Leu Ser Pro Thr Thr Val Met Ser Glu Gly Ala Arg
1 5 10

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Thr Val Ala Gly Gln Asp Ala Val Ile Val Leu Leu Gly Thr Arg
1 5 10 15

<210> 52

40

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

<211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 52

Tyr Val Ala Val Met Pro Pro His Ile Gly Asp Gln Pro Leu Thr Gly
 1 5 10 15

Ala Tyr Thr Val Thr Leu Asp Gly Arg
 20 25

<210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 53

10

Leu Pro Pro Cys Glu Asn Val Asp Leu Gln Arg Pro Asn Gly Leu
 1 5 10 15

<210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 54

Leu Tyr Ser Val His Arg Pro Val Lys
 1 5

20

<210> 55
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 55

Gln Cys Ile His Gln Leu Cys Phe Thr Ser Leu Arg
 1 5 10

<210> 56
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 56

30

Ser Asn Tyr Phe Arg Leu Pro Pro Cys Glu Asn Val Asp Leu Gln Arg
 1 5 10 15

Pro Asn Gly Leu
 20

<210> 57
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 57

40

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

Ala Gly Pro Ala Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys
1 5 10

<210> 58
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 58

Met Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys
1 5 10

<210> 59
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 59

10

Met Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys Ala Gly Pro
1 5 10 15

Ala Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys
20 25

<210> 60
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 60

20

Glu Asp Pro Thr Val Ser Ala Leu Leu Thr Ser Glu Lys
1 5 10

<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 61

Val Pro Ser Leu Val Gly Ser Phe Ile Arg
1 5 10

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 62

30

Cys Leu His Pro Cys Val Ile Ser Arg
1 5

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

<400> 63

Glu Ala Thr Phe Cys Asp Phe Pro Lys
1 5

<210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

Glu Ile Met Glu Asn Tyr Asn Ile Ala Leu Arg
1 5 10

10

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

Gly Trp Ser Thr Pro Pro Lys
1 5

<210> 66
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 66

Ile Asn His Gly Ile Leu Tyr Asp Glu Glu Lys
1 5 10

<210> 67
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

Ile Thr Cys Thr Glu Glu Gly Trp Ser Pro Thr Pro Lys
1 5 10

30

<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

Leu Glu Tyr Pro Thr Cys Ala Lys
1 5

<210> 69
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

40

4-33624A (5032-w001).ST25.txt

Leu Gln Asn Asn Glu Asn Asn Ile Ser Cys Val Glu Arg
1 5 10

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 70

Asn Gly Gln Trp Ser Glu Pro Pro Lys
1 5

<210> 71
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 71

10

Asn Gly Gln Trp Ser Glu Pro Pro Lys Cys Leu His Pro Cys Val Ile
1 5 10 15

Ser Arg

<210> 72
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 72

20

Ser Phe Trp Thr Arg
1 5

<210> 73
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 73

Ser Phe Trp Thr Arg Ile Thr Cys Thr Glu Glu Gly Trp Ser Pro Thr
1 5 10 15

30

Pro Lys

<210> 74
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 74

Ser Thr Asp Thr Ser Cys Val Asn Pro Pro Thr Val Gln Asn Ala His
1 5 10 15

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

Ile Leu Ser Arg
20

<210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75

Thr Gly Glu Ser Ala Glu Phe Val Cys Lys
1 5 10

<210> 76
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 76

Thr Gly Glu Ser Ala Glu Phe Val Cys Lys Arg
1 5 10

<210> 77
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

Thr Thr Cys Trp Asp Gly Lys Leu Glu Tyr Pro Thr Cys Ala Lys
1 5 10 15

20

<210> 78
<211> 26
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

Tyr Lys Pro Phe Ser Gln Val Pro Thr Gly Glu Val Phe Tyr Tyr Ser
1 5 10 15

Cys Glu Tyr Asn Phe Val Ser Pro Ser Lys
20 25

30

<210> 79
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79

Ala Phe Thr Glu Cys Val Val Ala Ser Gln Leu Arg
1 5 10

<210> 80
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

<400> 80

Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln
1 5 10 15

Arg

<210> 81
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81

10

Asp Val Val Gln Ile Thr Cys Leu Asp Gly Phe Glu Val Val Glu Gly
1 5 10 15

Arg

<210> 82
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82

Glu Asp Thr Pro Asn Ser Val Trp Glu Pro Ala Lys
1 5 10

20

<210> 83
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83

Gly Asp Ser Gly Gly Ala Phe Ala Val Gln Asp Pro Asn Asp Lys
1 5 10 15

<210> 84
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84

30

Gln Phe Gly Pro Tyr Cys Gly His Gly Phe Pro Gly Pro Leu Asn Ile
1 5 10 15

Glu Thr Lys

<210> 85
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85

40

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

Ser Asn Ala Leu Asp Ile Ile Phe Gln Thr Asp Leu Thr Gly Gln Lys
1 5 10 15

<210> 86
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

Ser Ser Asn Asn Pro His Ser Pro Ile Val Glu Glu Phe Gln Val Pro
1 5 10 15

Tyr Asn Lys

10

<210> 87
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87

Thr Asn Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Val Arg
1 5 10

<210> 88
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88

20

Val Glu Asp Pro Glu Ser Thr Leu Phe Gly Ser Val Ile Arg
1 5 10

<210> 89
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89

Leu Ala Glu Leu Pro Ala Asp Ala Leu Gly Pro Leu Gln Arg
1 5 10

30

<210> 90
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90

Leu Ala Tyr Leu Gln Pro Ala Leu Phe Ser Gly Leu Ala Glu Leu Arg
1 5 10 15

<210> 91
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

<400> 91

Leu Glu Ala Leu Pro Asn Ser Leu Leu Ala Pro Leu Gly Arg
1 5 10

<210> 92
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92

Ser Phe Glu Gly Leu Gly Gln Leu Glu Val Leu Thr Leu Asp His Asn
1 5 10 15

10

Gln Leu Gln Glu Val Lys
20

<210> 93
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 93

Val Ala Gly Leu Leu Glu Asp Thr Phe Pro Gly Leu Leu Gly Leu Arg
1 5 10 15

<210> 94
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 94

Cys Phe Leu Gly Cys Glu Leu Pro Pro Glu Gly Ser Arg
1 5 10

<210> 95
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 95

Glu Phe Leu Glu Asp Thr Cys Val Gln Tyr Val Gln Lys
1 5 10

30

<210> 96
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 96

Thr Gln Ser Gly Leu Gln Ser Tyr Leu Leu Gln Phe His Gly Leu Val
1 5 10 15

Arg

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

<210> 97
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 97

Ala Leu Asn Ser Ile Ile Asp Val Tyr His Lys
1 5 10

<210> 98
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 98

Gly Ala Asp Val Trp Phe Lys
1 5

<210> 99
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 99

Gly Asn Phe His Ala Val Tyr Arg
1 5

20

<210> 100
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 100

Leu Leu Glu Thr Glu Cys Pro Gln Tyr Ile Arg
1 5 10

<210> 101
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 101

30

Met Leu Thr Glu Leu Glu Lys
1 5

<210> 102
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 102

Ala Ile Asp Gly Ile Asn Gln Arg
1 5

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

<210> 103
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 103

Cys Met Gly Thr Val Thr Leu Asn Gln Ala Arg
1 5 10

<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 104

Phe Ala Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg
1 5

10

<210> 105
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 105

Phe Ala Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys
1 5 10

<210> 106
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 106

Gly Ser Phe Asp Ile Ser Cys Asp Lys
1 5

20

<210> 107
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 107

Gly Ser Phe Asp Ile Ser Cys Asp Lys Asp Asn Lys
1 5 10

30

<210> 108
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 108

Ile Lys Asp Phe Leu Arg
1 5

<210> 109
<211> 11

40

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 109

Gln Val Leu Ser Tyr Lys Glu Ala Val Leu Arg
1 5 10

<210> 110
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 110

Thr Thr Gln Gln Ser Pro Glu Asp Cys Asp Phe Lys
1 5 10

10

<210> 111
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 111

Thr Thr Gln Gln Ser Pro Glu Asp Cys Asp Phe Lys Lys
1 5 10

<210> 112
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 112

Cys Asp Tyr Trp Ile Arg
1 5

20

<210> 113
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 113

Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys
1 5

30

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 114

Met Tyr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys
1 5

<210> 115
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

<400> 115

Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp
 1 5 10 15

Gln Cys Ile Asp Gly
 20

<210> 116

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Ser Tyr Pro Gly Leu Thr Ser Tyr Leu Val Arg
 1 5 10

<210> 117

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Thr Phe Val Pro Gly Cys Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn Ile
 1 5 10 15

Lys

<210> 118

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys
 1 5 10 15

<210> 119

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys
 1 5 10 15

<210> 120

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Trp Tyr Val Val Gly Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Arg
 1 5 10

10

20

30

40

4-33624A (5032-w001).ST25.txt

<210> 121
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 121

Ala Trp Met Glu Thr Glu Asp Thr Leu Gly Arg
 1 5 10

<210> 122
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 122

Asp Asp Gln Leu Val Val Leu Phe Pro Val Gln Lys Pro Lys
 1 5 10

<210> 123
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 123

Gly Pro Ile Leu Pro Gly Thr Lys
 1 5

<210> 124
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 124

His Trp Pro Ser Glu Gln Asp Pro Glu Lys
 1 5 10

<210> 125
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 125

His Trp Pro Ser Glu Gln Asp Pro Glu Lys Ala Trp Gly Ala Arg
 1 5 10 15

<210> 126
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 126

Leu Leu Thr Thr Glu Glu Lys Pro Arg
 1 5

10

20

30

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

<210> 127
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 127

Leu Leu Thr Thr Glu Glu Lys Pro Arg Gly Gln Gly Arg
 1 5 10

<210> 128
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 128

10

Leu Trp Val Met Pro Asn His Gln Val Leu Leu Gly Pro Glu Glu Asp
 1 5 10 15

Gln Asp His Ile Tyr His Pro Gln
 20

<210> 129
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 129

Val Leu Ser Pro Glu Pro Asp His Asp Ser Leu Tyr His Pro Pro Pro
 1 5 10 15

20

Glu Glu Asp Gln Gly Glu Glu Arg Pro Arg
 20 25

<210> 130
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 130

Val Val Glu Pro Pro Glu Lys Asp Asp Gln Leu Val Val Leu Phe Pro
 1 5 10 15

30

Val Gln Lys Pro Lys
 20

<210> 131
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 131

Glu Val Met Pro Ser Ile Gln Ser Leu Asp Ala Leu Val Lys
 1 5 10

<210> 132

40

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 132

Gly Leu Met Tyr Ser Val Asn Pro Asn Lys
 1 5 10

<210> 133
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 133

Asn Ala Asn Thr Phe Ile Ser Pro Gln Gln Arg
 1 5 10

<210> 134
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 134

Tyr Glu Ser His Glu Ser Met Glu Ser Tyr Glu Leu Asn Pro Phe Ile
 1 5 10 15

Asn Arg Arg

<210> 135
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 135

Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg
 1 5 10

<210> 136
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 136

Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg
 1 5 10 15

<210> 137
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 137

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
 1 5 10 15

10

20

30

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

Val Cys Gly Asp Arg
20

<210> 138
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 138

Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys
1 5 10

<210> 139
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 139

10

Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg
1 5 10

<210> 140
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 140

20

Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys
1 5 10

<210> 141
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 141

Ala Gln Glu Pro Val Lys Gly Pro Val Ser Thr Lys Pro Gly Ser Cys
1 5 10 15

Pro Ile Ile Leu Ile Arg
20

30

<210> 142
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 142

Cys Ala Met Leu Asn Pro Pro Asn Arg
1 5

<210> 143
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

4-33624A (5032-W001).ST25.txt

<400> 143

Cys Leu Lys Asp Thr Asp Cys Pro Gly Ile Lys
1 5 10

<210> 144
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 144

Gly Pro Val Ser Thr Lys Pro Gly Ser Cys Pro Ile Ile Leu Ile Arg
1 5 10 15

10

<210> 145
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 145

Val Pro Phe Asn Gly Gln Asp Pro Val Lys
1 5 10

<210> 146
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 146

Val Pro Phe Asn Gly Gln Asp Pro Val Lys Gly Gln Val Ser Val Lys
1 5 10 15

20

【 図 1 】

FIGURE 1

配列番号:1

1 APGPRGIIIN LENGELCMNS AQCKSNCCQH SSALGLARCT SMASENSECS VKTLYGIYRK
61 CPCERGLTCE GDKTIVGSIT NDNFGICHDA GRSKQ

配列番号:2

1 GIIINLENGE LCMNSAQCKS NCCQHSSALG LARCTSMASE NSECSVKTLY GIYKPCPCER
61 GLTCEGDKTI VGSITNTNFG ICHDAGRSKQ

配列番号:3

1 SNCCQHSSAL GLAR

配列番号:4

1 CTSMASENSE CSVK

配列番号:5

1 TIVGSITNTN FGIChDAGR

【 図 2 】

FIGURE 2

配列番号:6

1 MYPKLFSTSI CLLLLGLLA VEGSLHVKPP QFTWAQWFET QHINMTSQQC TNAMQVINNY
61 QRRCKNQNTF LLTTFANWVN VCGNPNMTCF SNKTRKNCHH SGSQVPLIHC NLTTPSPQNI
121 SNCRYAQTPA NMFYIVACDN RDQRRDPPQY PYVPVHLDR I

配列番号:7

1 KPPQFTWAQW FETQHINMTS QQCTNAMQVI NNQRRCKNQ NTFLLTTFAN VVNVCGNPNM
61 TCPNKNTRKN CHHSGSQVPL IHCNLTTPSP QNISNCRYAQ TPANMFYIYA CDNRDQRRDP
121 PQYPPVPHL DRII

配列番号:8

1 YAQTAMMFY IVACDNR

配列番号:9

1 RDPQYPPVP VHLDR

配列番号:10

1 DPPQYPPVP HLDL

【 図 3 】

FIGURE 3

配列番号:11

1 MRFLAATFLL LALSTAAQAE PVQFKDCGSV DGVIREVNVV PCPTQPCQLS KGGQSYVNVVT
 61 FTSNIQSKSS KAVVHGILMG VPVPPPIPEP DGCKSGINCP IQKDKTYSYL NKLPVKSEYP
 121 SIKLVVEWQL QDDKNQSLFC WEIPVQIVSH L

配列番号:12

1 EPVQFKDCGS VDGVIKEVNV SPCPTQPCQL SKGQSYVNVV TFTSNIQSKS SKAVVHGILM
 61 GVPVPPPIPE PDGCKSGINCP IQKDKTYSY LNKLPKVSEY PSIKLVVEWQ LQDDKNQSLF
 121 CWEIPVQIVS HL

配列番号:13

AVVHGILMGV PVPPPIPEPD GCK

配列番号:14

SGINCPIQK

【 図 4 】

FIGURE 4

配列番号:15

1 MRTLAILAAI LLVALQAQAE PLQARADEVA AAPEQIAADI PEVVVSLAWD ESLAPKHPGS
 61 RKNMACYCRI PACTAGERRY GTCIYQGRW AFCC

配列番号:16

1 EPLQARADEY AAPEQIAAD IPEVVVSLAW DESLAPKHPG SRKNMACYCRI PACTAGERRY
 61 GTCIYQGRW AFCC

配列番号:17

ACYCRIPACI AGERRYGTCL YQGRWAFCC

配列番号:18

ADEVAAAPEQ IAADIPEVVV SLAWDESLAP K

配列番号:19

IPACTAGER

配列番号:20

RYGTCIYQGR

配列番号:21

YGTCIYQGR

配列番号:22

YGTCIYQGRW WAFCC

配列番号:23

LWAFCC

【 図 5 】

FIGURE 5

配列番号:24

1 MEHKEVLLL LLFLKSGQGE PLDDYVNTQG PSLFSVTKKQ LGAGSREECA AKCEDKKEFT
 61 CRAFQYHSKE QQCVIMAENR KSSIIIRMRD AVLF EK

配列番号:25

1 EPLDDYVNTQ GPSLFSVTEK QL GAGSREEC AAKCEDKEF TCRAFQYHSK EQQCVIMAEN
 61 RKSSIIIRMR DAVLF EK

配列番号:26

EPLDDYVNTQ GPSLFSVTK

配列番号:27

CEEDKKEFTCR

配列番号:28

AFQYHSK

【手続補正書】

【提出日】平成17年10月18日(2005.10.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2006523191000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/EP2004/003737
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHAPUS C ET AL: "ROLE OF COLIPASE IN THE INTERFACIAL ADSORPTION OF PANCREATIC LIPASE AT HYDROPHILIC INTERFACES" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 58, no. 1, 1 October 1975 (1975-10-01), pages 155-158, XP002041838 ISSN: 0014-5793 the whole document ----- -/--	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 16 August 2004		Date of mailing of the international search report 29. 11. 2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Weijland, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP2004/003737

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MAHE-GOUHIER N ET AL: "IMMOBILIZED COLIPASE AFFINITIES FOR LIPASES B, A, C AND THEIR TERMINAL PEPTIDE (336-449): THE LIPASE RECOGNITION SITE LYSINE RESIDUES ARE LOCATED IN THE C-TERMINAL REGION" BBA - LIPIDS AND LIPID METABOLISM, ELSEVIER SCIENCE BV. AMSTERDAM, NL, vol. 962, 1988, pages 91-97, XP002041839 ISSN: 0005-2760 the whole document	1-16
A	WO 03/023397 A (LIU KAN-ZHI ; MANTSCH HENRY H (CA); NAT RES COUNCIL (CA); SHAW ANTHONY) 20 March 2003 (2003-03-20) the whole document	1-16
A	US 6 503 540 B1 (BADER DAVID M ET AL) 7 January 2003 (2003-01-07) the whole document	1-16
X	WO 98/30588 A (CHAPUS CATHERINE ; LAPHAL LABORATOIRE DE PHARMACO (FR)) 16 July 1998 (1998-07-16) abstract page 3, paragraph 6	8,13
A	WO 02/06840 A (BIOPREVENTIVE LTD ; GALILI NACHSHON NITSA (IL); RUBIN YORAM (IL); NIMR) 24 January 2002 (2002-01-24) the whole document	1-16
X	WO 98/17807 A (BIOCEM S A ; MEROT BERTRAND (FR); BOURNAT PHILIPPE (FR); GRUBER VERONI) 30 April 1998 (1998-04-30) page 25, line 1 - line 17	9,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/003737

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03023397	A	20-03-2003	CA 2357338 A1	12-03-2003
			WO 03023397 A1	20-03-2003
			CA 2459349 A1	20-03-2003
			EP 1428022 A1	16-06-2004
US 6503540	B1	07-01-2003	NONE	
WO 9830588	A	16-07-1998	FR 2758143 A1	10-07-1998
			AT 273995 T	15-09-2004
			AU 727469 B2	14-12-2000
			AU 5868698 A	03-08-1998
			BR 9806857 A	14-03-2000
			CA 2277778 A1	16-07-1998
			CN 1248264 T	22-03-2000
			CZ 9902414 A3	12-01-2000
			DE 69825733 D1	23-09-2004
			EP 0970118 A1	12-01-2000
			WO 9830588 A1	16-07-1998
			HU 0001458 A2	28-10-2000
			NZ 337087 A	26-01-2001
			US 6432400 B1	13-08-2002
ZA 9800094 A	08-07-1998			
WO 0206840	A	24-01-2002	AU 7272801 A	30-01-2002
			CA 2414897 A1	24-01-2002
			EP 1299731 A2	09-04-2003
			WO 0206840 A2	24-01-2002
			US 2004015101 A1	22-01-2004
WO 9817807	A	30-04-1998	FR 2754827 A1	24-04-1998
			AU 4871997 A	15-05-1998
			CA 2269025 A1	30-04-1998
			EP 0941343 A1	15-09-1999
			WO 9817807 A1	30-04-1998
			JP 2001507928 T	19-06-2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2004/003737**Box 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.: 14-16 (with respect to industrial applicability)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 14-16 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:
1-16 (part)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2004/003737

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-16 (partially)

1. Claims 1-16 (partially)
Screening methods and/or diagnosis, prediction, identifying modulators, monitoring the efficacy of a treatment etc. using SEQ ID NOS 1-5 involving colipase

2. claims: 1-16 (partially)

2. Claims 1-16 (partially)
Screening methods and/or diagnosis, prediction, identifying modulators, monitoring the efficacy of treatment etc. using SEQ ID NOS 6-10 involving eosinophil-derived neurotoxin

3. claims: 1-16 (partially)

Claims 1-16 (partially)
Screening methods and/or diagnosis, prediction, identifying modulators, monitoring the efficacy of treatment etc using SEQ ID Nos 11-14 involving human epididymal secretory protein.

4. claims: 1-16 (partially)

Claims 1-16 (partially)
Screening methods and/or diagnosis, prediction, identifying modulators, monitoring the efficacy of treatment etc. using SEQ ID NOS 15-23 involving Defensin I

5. claims: 1-16 (partially)

Claims 1-16 (partially)
Screening methods and/or diagnosis, prediction, identifying modulators, monitoring the efficacy of treatment etc. using SEQ ID NOS 24-28 involving plasminogen-related protein B

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 5 1 Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z

- (31)優先権主張番号 60/474,863
 (32)優先日 平成15年5月30日(2003.5.30)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/484,140
 (32)優先日 平成15年6月30日(2003.6.30)
 (33)優先権主張国 米国(US)

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)
 レーザーディスク

- (72)発明者 ギレーヌ・アルゲー - ピュイ
 スイス、ツェーハー - 1 2 1 7メラン、プレ - ドウ - ラ - フォンテーヌ2番、ジーンプロット・インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ナッシマ・ベデー
 スイス、ツェーハー - 1 2 1 7メラン、プレ - ドウ - ラ - フォンテーヌ2番、ジーンプロット・インコーポレイテッド内
- (72)発明者 リディ・ブーゲルレ
 スイス、ツェーハー - 1 2 1 7メラン、プレ - ドウ - ラ - フォンテーヌ2番、ジーンプロット・インコーポレイテッド内
- (72)発明者 イザベル・キュサン
 スイス、ツェーハー - 1 2 1 7メラン、プレ - ドウ - ラ - フォンテーヌ2番、ジーンプロット・インコーポレイテッド内
- (72)発明者 イヴ・マエ
 スイス、ツェーハー - 1 2 1 7メラン、プレ - ドウ - ラ - フォンテーヌ2番、ジーンプロット・インコーポレイテッド内
- (72)発明者 アンヌ・ニクネジャ
 スイス、ツェーハー - 1 2 1 7メラン、プレ - ドウ - ラ - フォンテーヌ2番、ジーンプロット・インコーポレイテッド内
- (72)発明者 サミア・ルファ
 スイス、ツェーハー - 1 2 1 7メラン、プレ - ドウ - ラ - フォンテーヌ2番、ジーンプロット・インコーポレイテッド内

Fターム(参考) 2G041 CA01 DA04 FA13 GA09
 2G045 AA34 CB01 DA13 DA36 FB02 FB03
 4H045 AA10 AA11 BA10 BA40 CA42 EA50 FA71 FA74

专利名称(译)	分泌的多肽物种与心血管疾病有关		
公开(公告)号	JP2006523191A	公开(公告)日	2006-10-12
申请号	JP2006505052	申请日	2004-04-07
[标]申请(专利权)人(译)	GENOVA		
申请(专利权)人(译)	热那亚有限公司		
[标]发明人	ギレーヌアルグーピュイ ナッシマベデー リディブーゲルレ イザベルキュサン イヴマエ アンヌニクネジャ サミアルファ		
发明人	ギレーヌ・アルグー・ピュイ ナッシマ・ベデー リディ・ブーゲルレ イザベル・キュサン イヴ・マエ アンヌ・ニクネジャ サミア・ルファ		
IPC分类号	C07K14/47 G01N33/68 G01N33/53 G01N27/62 C07K16/18 G01N33/543 G01N33/50 G01N33/15		
CPC分类号	C07K14/47 G01N33/5088 G01N33/6893 G01N2800/32 G01N2800/52		
FI分类号	C07K14/47 G01N33/68.ZNA G01N33/53.D G01N27/62.V C07K16/18 G01N33/543.551.Z G01N33/50.Z G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA04 2G041/FA13 2G041/GA09 2G045/AA34 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/CA42 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74		
优先权	60/461558 2003-04-08 US 60/461623 2003-04-08 US 60/471479 2003-05-16 US 60/474863 2003-05-30 US 60/484140 2003-06-30 US		
其他公开文献	JP2006523191A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了流通在高水平的患者心血管障碍患者的血浆中的人分泌的多肽。本发明还诊断，预后和药物开发的多肽，多核苷酸编码这些，并且还提供了特异性针对这些多肽的抗体。

【表1】

CPP#	配列	CEX	塩	RP1	%B	実行
CPP2	SNCCQHSSALGLAR	10	175 mM	9	35.7	89870_13
	SNCCQHSSALGLAR	10	175 mM	9	35.7	89870_14
	CTSMASENSECSVK	10	175 mM	9	35.7	89870_13
	CTSMASENSECSVK	10	175 mM	9	35.7	89870_14
	TIVGSITNTNFGICHDAGR	9	175 mM	9	35.7	108111_10