(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2008-500952
(P2008-500952A)
(43)公表日　平成20年1月17日(2008.1.17)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47	ZNA	2G041
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00		2G045
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18		4H045
C07K 7/06	(2006.01)	C07K	7/06		
C07K 7/08	(2006.01)	C07K	7/08		

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 195 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2006-519874 (P2006-519874)
(86)(22)出願日　平成16年7月15日 (2004.7.15)
(85)翻訳文提出日　平成18年2月24日 (2006.2.24)
(86)国際出願番号　PCT/EP2004/007842
(87)国際公開番号　WO2005/014635
(87)国際公開日　平成17年2月17日 (2005.2.17)
(31)優先権主張番号　60/487,351
(32)優先日　平成15年7月15日 (2003.7.15)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/487,290
(32)優先日　平成15年7月15日 (2003.7.15)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/487,288
(32)優先日　平成15年7月15日 (2003.7.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　504289071
ジェノバ・リミテッド
ＧＥＮＯＶＡ　ＬＴＤ.
英国領バーミューダ、エイチエム１２、ハミルトン、ビクトリア・ストリート２２番、キャノンズ・コート
(74)代理人　100062144
弁理士　青山　葆
(74)代理人　100067035
弁理士　岩崎　光隆
(72)発明者　ギレーヌ・アルグー－ピュイ
スイス、ツェーハー－１２１７メラン、プレ－ドゥ－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

最終頁に続く

(54)【発明の名称】心臓血管障害で減少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減少した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、予後診断および薬剤開発のためのポリペプチド、そ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含む組成物の使用方法も提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）
ｉ）心臓血管障害血漿ポリペプチド（ＣＰＰ）３０－１４８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；
ｉｉ）ＣＰＰ３０－１４８からなる群から選択されるアミノ酸配列に相対して、１個またはそれ以上のアミノ酸置換、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；および
ｉｉｉ）最低で１０アミノ酸長である前記のｉ）またはｉｉ）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減少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）心臓血管障害血漿ポリペプチド（ＣＰＰ）３０－１４８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；
ｉｉ）ＣＰＰ３０－１４８からなる群から選択されるアミノ酸配列に相対して、１個またはそれ以上のアミノ酸置換、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；および
ｉｉｉ）最低で１０アミノ酸長である前記のｉ）またはｉｉ）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；そして
（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減少が心臓血管障害を発症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】
該心臓血管障害が冠動脈疾患（ＣＡＤ）である、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
該生物学的試料が血漿である、請求項１から３のいずれかに記載の方法。
【請求項５】
該方法をイクスビボで行う、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ポリペプチド配列に融合されている、心臓血管障害血漿ポリペプチド（ＣＰＰ）３０－１４８からなる群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】
ＣＰＰ３０－１４８からなる群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；そして
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つのＣＰＰ生物学的活性が可能な試料条件下でＣＰＰ３０－１４８からなる群から選択されるポリペプチドを試験化合物と接触させること；
ｉｉ）該少なくとも１つのＣＰＰ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；そして
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】
ＣＰＰ３５、３９、４１、６０－６２、６５－６９、７１－７２、９４－１４３、１４６－１４８の群から選択される心臓血管障害血漿ポリペプチド（ＣＰＰ）のアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチド。
【請求項１５】
請求項１４に記載のポリペプチドをコードする単離されたポリペプチド。
【請求項１６】
（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）工程（ａ）のヒト以外の被験動物および工程（ｂ）の対照動物から得られた生物学的試料において：
ｉ）表３に列挙したアミノ酸配列（ＣＰＰ３０－１４８）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；
ｉｉ）表３に列挙したアミノ酸配列（ＣＰＰ３０－１４８）からなる群から選択されるアミノ酸配列に相対して、１個またはそれ以上のアミノ酸置換、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；および
ｉｉｉ）最低で１０アミノ酸長である前記のｉ）またはｉｉ）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；そして
（ｄ）工程（ｃ）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、ヒト以外の被験動物から得られた生物学的試料中のポリペプチドのレベルから対照動物から得られた生物学的試料中のポリペプチドのレベルへの変位が、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１７】
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）表３に列挙したアミノ酸配列（ＣＰＰ３０－１４８）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；
ｉｉ）表３に列挙したアミノ酸配列（ＣＰＰ３０－１４８）からなる群から選択されるアミノ酸配列に相対して、１個またはそれ以上のアミノ酸置換、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；および
ｉｉｉ）最低で１０アミノ酸長である前記のｉ）またはｉｉ）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１個のポリペプチドの血漿レベルの減少を含む、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
（ａ）薬剤の投与の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）表３に列挙したアミノ酸配列（ＣＰＰ３０－１４８）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；
ｉｉ）表３に列挙したアミノ酸配列（ＣＰＰ３０－１４８）からなる群から選択されるアミノ酸配列に相対して、１個またはそれ以上のアミノ酸置換、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；および
ｉｉｉ）最低で１０アミノ酸長である前記のｉ）またはｉｉ）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検出および／または定量すること；
（ｃ）対象から１個またはそれ以上の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）投与前試料中のポリペプチドのレベルを投与後試料中のポリペプチドのレベルと比較すること；そして
（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発症させる危険性を有する対象の薬物によ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の血漿中で減少した濃度の分泌ポリペプチド種、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障害であり、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障害の加速度的な発症を起こしやすくする多くの状態の一般的な特徴である。
【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。

【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。

【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、障害を発症させるリスクは低下する。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発症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やけ、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。

【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。

【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。心臓血管障害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。

【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。

【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、シークエンシング、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。別の実例ではＲＴＰＣＲ、種々のハイブリダイゼーション基盤の技術、およびシークエ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。

【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濃度が差次的に減少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ＣＰＰ３０－１４８として記載され、そしてこれらは表３のトリプシンペプチドから選択される少なくとも１個のアミノ酸配列を含むものである。

【００１３】

本発明は、冠動脈疾患（ＣＡＤ）を有する個体から得られた血漿において低レベルで存在する「心臓血管障害血漿ポリペプチド」（ＣＰＰ）、ＣＰＰのフラグメントおよび翻訳後修飾された種を開示する。好ましい本発明のフラグメントは、配列番号：３－４に記載されている。したがって、本発明のＣＰＰは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障害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、そして容易に検出可能であり、かつ心臓血管障害の薬物開発、診断および予防に有用である。

【００１４】

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減少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ＣＰＰ３０－１４８からなる群から選択されるポリペプチドを含む。好ましいＣＰＰは、ＣＰＰ３０－８３からなる群から選択されるポリペプチドを含む。さらにより好ましいＣＰＰは、ＣＰＰ３０－４１からなる群から選択されるポリペプチドを含む。なおさらにより好ましいＣＰＰは、ＣＰＰ４０－４１からなる群から選択されるポリペプチドを含む。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する方

法が含まれる。本発明の前駆体は未修飾前駆体、表３に列記したトリプシンペプチドのタンパク質分解前駆体、およびＣＰＰ３０－１４８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。

【００１５】

本発明の好ましい局面はリン酸化、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プロセシングまたはスプライシングの結果生じる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。

【００１６】

別の局面では、本発明はＣＰＰ３０－１４８からなる群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ＣＰＰ３０－１４８から選択される配列のいずれか１つとの、少なくとも８０％、そしてさらに好ましくは少なくとも８５％、そしてなおさらに好ましくは少なくとも９０％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ＣＰＰ３０－１４８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９５％同一である配列を含むポリペプチドを含む。

【００１７】

別の局面では、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ＣＰＰ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。

【００１８】

本発明の好ましい局面は単離されたＣＰＰ、すなわちＣＰＰとは明らかに異なる等電点、または明らか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ＣＰＰ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ＣＰＰの等電点および分子量を示すことができる。

【００１９】

好ましい局面では、本発明は表３に列挙したアミノ酸配列（ＣＰＰ３０－１４８）からなる群から選択される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、ＣＰＰ３０－１４８は表１記載の、公共のデータベース内にある対応するポリペプチドの配列からの近接するさらなるアミノ酸を含む。好ましい種はｉ）ＣＰＰ３０－１４８のいずれか１つの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減少したレベルで現れる；そしてｉｉｉ）表１に記載の対応するポリペプチドの配列からのさらなるアミノ酸を含む、ポリペプチドである。

【００２０】

さらに別の局面では、本発明は修飾されたＣＰＰを含む。かかる修飾は保護／遮断基、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。

【００２１】

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。

【００２２】

別の態様では、本発明はｉ）ＣＰＰ生物学的活性の被験モジュレーターを表３に列挙したアミノ酸配列（ＣＰＰ３０－１４８）からなる群から選択される配列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；そして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。

【００２３】

本発明の別の局面は（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）工程（ａ）のヒト以外の被験動物および工程（ｂ）の対照動物から得られた生物学的試料において：（ｉ）表３に列挙したアミノ酸配列（ＣＰＰ３０－１４８）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；（ｉｉ）表３に列挙したアミノ酸配列（ＣＰＰ３０－１４８）からなる群から選択されるアミノ酸配列に相対して、１個またはそれ以上のアミノ酸置換、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；および、（ｉｉｉ）最低で１０アミノ酸長である前記のｉ）またはｉｉ）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；そして、工程（ｄ）工程（ｃ）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、ヒト以外の被験動物から得られた生物学的試料のポリペプチドのレベルから対照動物から得られた生物学的試料のポリペプチドのレベルへの変位は、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を提供する。本発明の好ましい態様は、心臓血管障害に罹患する素因があるまたは罹患しているヒト以外の被験動物が、（ｉ）表３に列挙したアミノ酸配列（ＣＰＰ３０－１４８）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；（ｉｉ）表３に列挙したアミノ酸配列（ＣＰＰ３０－１４８）からなる群から選択されるアミノ酸配列に相対して、１個またはそれ以上のアミノ酸置換、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；および、（ｉｉｉ）最低で１０アミノ酸長である前記のｉ）またはｉｉ）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減少を含むことを提供する。

【００２４】

別の局面では、本発明は、本発明のＣＰＰをコードするポリヌクレオチド、表３に列挙したアミノ酸配列（ＣＰＰ３０－１４８）からなる群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。

【００２５】

別の局面では、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；そして、（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；そして、（ｃ）該ＣＰＰを回収すること；の工程を含む。１つの態様内で、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。

【００２６】

別の局面では、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。ＣＰＰ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ＣＰＰ抗体は精製、診断および予後診断の適用を有する。精製および診断に好ましい抗ＣＰＰ抗体を標識基に結合させる。診断のために好ましいＣＰＰ関連障害には冠動脈疾患（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障害が挙げられる。診断方法には、限定するものではないが、ＣＰＰ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ＣＰＰを検出するための、ならびに組織中のＣＰＰ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、上記の１個またはそれ以上の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。

【００２７】

本発明はさらに体液、好ましくは血漿試料における少なくとも１つのＣＰＰの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。最も好ましくは、上記の診断方法をイクスビボで行う。さらに組織および生物学的液体、好ましくは血漿中のＣＰＰの量を検出および測定するための、ＣＰＰ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ＣＰＰ抗体を含むＣＰＰ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。

【００２８】

本発明のさらなる別の局面は、以下の工程：（ａ）薬剤の投与の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）表３に列挙したアミノ酸配列（ＣＰＰ３０－１４８）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；（ｉｉ）表３に列挙したアミノ酸配列（ＣＰＰ３０－１４８）からなる群から選択されるアミノ酸配列に相対して、１個またはそれ以上のアミノ酸置換、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；および、ｉｉｉ）最低で１０アミノ酸長である前記のｉ）またはｉｉ）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；（ｃ）対象から１個またはそれ以上の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中の少なくとも１つのポリペプチドのレベルと比較すること；そして（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発症させるリスクを有する対象の薬物による処置の有効性をモニタリングするための方法に関する。

【００２９】

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。

【００３０】

１つの態様では、冠動脈疾患（ＣＡＤ）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。ＣＡＤ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ＣＡＤ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応答し、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、ＣＡＤ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。

【００３１】

好ましい態様では、本発明の少なくとも１つのＣＰＰの血漿レベルの下降の検出は個体がＣＡＤを発症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ＣＡＤを発症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ＣＰＰの血漿レベルの下降の検出は個体がＣＡＤ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血漿試料において観察されたＣＰＰの減少量はＣＡＤの予測または診断の確実性に相関する。個体の血漿ＣＰＰ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。好ましい態様では、本発明の方法によりヒト血漿試料中のＣＰＰ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、ＣＡＤの予測または診断は、対照に比較して実験的ＣＰＰ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倍の減少に基づく。

【００３２】

本発明はさらに個体におけるＣＰＰ３０－１４８の異常発現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、ＣＰＰ調整組成物を用いる方法を含む。好ましいＣＰＰ関連障害には冠動脈疾患（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が挙げられる。本発明の好ましい態様は：個体がＣＰＰ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、そしてＣＰＰ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ＣＰＰ関連障害を予防または処置する方法である。

本発明のさらなる局面を明細書および請求項においても記載する。

【００３３】

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発症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発症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。

【００３４】

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。

【００３５】

「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５ｋｂ、４ｋｂ、３ｋｂ、２ｋｂ、１ｋｂ、０．５ｋｂ、または０．１ｋｂ未満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, T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989）。

【００３６】

「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。

【００３７】
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）。

【００３８】
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ー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。

【００３９】
「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個またはそれ以上の類似体（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。

【００４０】

「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個またはそれ以上の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。

【００４１】

「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、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。

【００４２】

「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関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。

【００４３】

「心臓血管障害血漿ポリペプチド」または「ＣＰＰ」なる用語は表３に列記したペプチド配列のいずれか１つにより記載される配列を含むポリペプチドを指す。表３記載のペプチドはそれぞれ、表１記載のＣＰＰ３０－１４８に対応する。故に、ＣＰＰ３０－１４８のポリペプチド配列には、表３に列挙した対応するペプチド（複数可）のアミノ酸配列が含まれる。好ましいＣＰＰ３０－１４８には、表１に記載のような公共のデータベース内の対応するポリペプチドの配列からのさらなる隣接するアミノ酸が含まれる。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、ＣＰＰ３０－１４８の配列の８、１０、１２、１５、２１、または最も好ましくは２７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ＣＰＰ３０－１４８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、ＣＰＰ３０－１４８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ＣＰＰ３０－１４８の少なくとも１つの生物学的活性を保持する。

【００４４】

「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という見込みの減少を示していること；（２）心臓血管障害を有する個体の血流を通して減少レベルで循環すること；（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；（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標的分子との相互作用；（７）特異的なタンパク質分解などの翻訳後プロセシングを受けること；が挙げられる。

【００４５】

「ＣＰＰ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ＣＰＰ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。ＣＰＰ発現または活性を増強させるＣＰＰモジュレーターはＣＰＰ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、ＣＰＰ発現または活性を抑制させるＣＰＰモジュレーターはＣＰＰ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、ＣＰＰ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。ＣＰＰ阻害剤には抗ＣＰＰ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。ＣＰＰ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。

【００４６】

「ＣＰＰ関連障害」または「ＣＰＰ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（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障害が挙げられる。好ましくは、個体がかかる障害を発症させるか、またはすでに有している可能性は、少なくとも１つのＣＰＰの正常血漿レベルよりも低いことにより示される。

【００４７】

本発明の別の局面は抗ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ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（ａｂ）およびＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントが挙げられる。本発明はＣＰＰ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

、ＣＰＰ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ＣＰＰに関して単一の結合親和性を表示する。好ましいＣＰＰ抗体は標識基に結合されている。

【００４８】

「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^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{3}Ｈ、^{125}Ｉ）、蛍光化合物（例えば５－ブ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、ＧＦＰ、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、ＧＳＴ、もしくはビオチンのような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。

【００４９】

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。

【００５０】

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。

【００５１】

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）は宿主細胞への組込み時に宿主細胞のゲノムに組込まれ、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。

【００５２】

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、胸やけ、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。

【００５３】

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ＣＰＰ３０－１４８として記載され、表３に列記したペプチド配列からなる群から選択される配列を含む。ＣＰＰ３０－１４８は、心臓血管障害を有するかまたはそれを発症させるリスクを有する個体の血漿中で減少したレベルで分泌され、そして循環する。好ましいＣＰＰには、ＣＰＰ３０－８３からなる群から選択されるポリペプチドが含まれる。さらにより好ましいＣＰＰには、ＣＰＰ３０－４１からなる群から選択されるポリペプチドが含まれる。さらになおより好ましいＣＰＰには、ＣＰＰ４０－４１からなる群から選択されるポリペプチドが含まれる。

【００５４】

さらにＣＰＰは表３に列記したペプチド配列からなる群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。好ましくは、ＣＰＰ３０－１４８は表１に記載の対応するポリペプチドの配列からのさらなる近接アミノ酸をも含む。かかるさらなるアミノ酸は、近接アミノ酸配列を形成するために選択されたＣＰＰ配列と共にフレーム内に融合される。

【００５５】

興味深いことに、本発明のＣＰＰは心臓血管障害を患う個体の血漿中で劇的に減少する。それ自体では、本発明のＣＰＰは、ＣＰＰの減少したレベルが心臓血管障害を発症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、ＣＰＰ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。

【００５６】

「心臓血管障害血漿ポリペプチド」および「ＣＰＰ」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、表３に記載のペプチド配列からなる群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ＣＰＰを含むヒトに由来するＣＰＰを具体化する。さらに表３に記載のペプチド配列からなる群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。

【００５７】

本発明はＣＰＰ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。好ましい態様では、アミノ酸の連続した広がりは、ＣＰＰ配列におけるアミノ酸の欠失、付加、交換またはト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ＣＰＰ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。

【００５８】

本発明の１つの局面は単離されたＣＰＰおよびその生物学的に活性な部分、ならびに抗ＣＰＰ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ＣＰＰ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。別の態様では、組換えＤＮＡ技術によりＣＰＰを生成する。組換え発現に代わって、「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で記載するように、ペプチド合成技術を用いてＣＰＰを化学的に合成することができる。

【００５９】

典型的には、生物学的に活性な部分は少なくとも１つＣＰＰ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ＣＰＰは、表３に列記したペプチド配列からなる群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、または該配列から、少なくとも１％、２％、３％、５％、８％、１０％、または１５％の変化を含む。

【００６０】

ＣＰＰの特徴付け

本発明のポリペプチド、ＣＰＰ３０－１４８は表１および表３に記載される。それぞれのＣＰＰに関して、表１は：

・関連ポリペプチド配列に対応する、公開されたデータベースにおける受託番号；

・タンパク質型；および

・公開されたデータベースにおけるポリペプチドに関して観察されたポリペプチドを決定するアミノ酸位

を提供する。

【００６１】

タンパク質型について、「親」とは、アミノ酸の列に列記した位置に記載される長さであるが、公開されたデータベースの配列とは他の既知の差異を有しないポリペプチド配列を示す。「変異体」とは、公開されたデータベースのアミノ酸配列から外れるポリペプチドを示す。変異の性質を括弧書きする。「フラグメント」は、アミノ酸の列に記載の位置にわたる、特定の、新しく定義されたフラグメントを示す。「非トリプシンフラグメント」は、非－トリプシン部位で開始または終了する新しく定義されたフラグメントを示す。これら自体は、今まで知られていないタンパク質のインビボプロセシングを示す。そして、「イソ型」とは、ポリペプチド種が、多くの異なる溶出クラスター中、実施例１に記載の方法により検出されるという事実を示す。これらは表２に示され、それは、それぞれのトリプシンペプチドについての第一および第二分画容量に位置する溶出を列記する。

【００６２】

表１に列記した受託番号のほとんどは、SwissPROT/TrEMBLデータベースを参照しており、それらは両方とも、例えばhttp://www.expasy.chなどにより公共に利用可能である。しかしながら、ＣＰＰ４８は、国際ＰＣＴ公開番号第WO01/75067号で配列番号：37638により同定された配列として定義され、ＣＰＰ７２は、以下のGenBank登録：NT_008421.5に基づきFGENESHソフトウェア（バージョン１.１）を実行することにより得られた予測タンパク質配列である。加えて、ＣＰＰ８５－８７および１３４の受託番号は、表１に詳述のように、国際ＰＣＴ公開番号にて同定された配列として定義される。さらに、ＣＰＰ８９－９３、１１５、１３７および１４２の受託番号は、表１に詳述のように、GenBank登録に基づき多くのソフトウェアを実行することにより得られた予測タンパク質配列に相当する。最後に、ＣＰＰ８４、８８、９８、１０２、１０５、１２１および１３８についての受託番号は、NCBI（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）により利用可能なタンパク質登録を示す。

【００６３】

表１

【表１】

表１

タンパク質	受託番号	タンパク質型	アミノ酸
CPP 30	P48304	親	23-166
CPP 31	P07339	親	19-412
CPP 32	P16562	親	22-243
CPP 33	P18065	親	40-328
CPP 34	P02774	親	17-474
CPP 35	P00734	フラグメント	199-622
CPP 36	Q9H4G4	イソ型	1-154
CPP 37	Q9H4G4	イソ型	1-154
CPP 38	Q9H4G4	イソ型	1-154
CPP 39	P02751	フラグメント	32-440
CPP 40	P78417	親	1-241
CPP 41	Q03591	変異体（YIV＞HIL 157-159）	19-330
CPP 42	P05451	親	23-166
CPP 43	P17931	親	1-249
CPP 44	P81605	親	20-49
CPP 45	Q9BZ98	親	1-90
CPP 46	P81534	親	23-67
CPP 47	P09211	親	1-209
CPP 48	WO200175067の配列番号：37638	親	1-792
CPP 49	P07602	親	405-486
CPP 50	O95885	親	1-376

【表２】

表１

タンパク質	受託番号	タンパク質型	アミノ酸
CPP 51	P04054	親	23-148
CPP 52	P17900	親	32-193
CPP 53	P27469	親	1-103
CPP 54	P14209	親	23-185
CPP 55	Q9NRN8	親	1-268
CPP 56	P01137	親	279-390
CPP 57	P31025	親	19-176
CPP 58	O43866	親	20-347
CPP 59	O00585	親	24-134
CPP 60	O14791	フラグメント	374-398
CPP 61	P06396	フラグメント	627-738
CPP 62	P19823	フラグメント	489-702
CPP 63	P36955	イソ型	16-418
CPP 64	P55056	イソ型	27-127
CPP 65	P55290	フラグメント	23-138

【表３】

表１

タンパク質	受託番号	タンパク質型	アミノ酸
CPP 66	Q13508	フラグメント	27-362
CPP 67	Q14574	フラグメント	28-135
CPP 68	Q14574	変異体（S＞T78）	28-135
CPP 69	Q96PD5	フラグメント	22-136
CPP 70	Q99969	イソ型	17-163
CPP 71	Q9BX49	フラグメント	63-130
CPP 72	NT_008421.5の2876527..2877825位のFGENESH	フラグメント	5-139
CPP 73	O00584	親	25-256
CPP 74	P00746	親	26-253
CPP 75	P00747	親	20-97
CPP 76	P00938	親	1-248
CPP 77	P01028	親	1454-1744
CPP 78	P02675	親	31-44
CPP 79	P04211	親	21-117
CPP 80	P05156	親	340-583

【００６４】

【表４】

表１

タンパク質	受託番号	タンパク質型	アミノ酸
CPP 81	P37837	親	1-337
CPP 82	P41271	親	1-180
CPP 83	P81605	親	63-109
CPP 84	AAH26245	親	1-124
CPP 85	WO0200157190の配列番号：1155	親	1-453
CPP 86	WO0200157182の配列番号：18694	親	1-95
CPP 87	WO0200164835の配列番号：18812	親	1-41
CPP 88	CAD13492	親	1-296
CPP 89	NT_006859.5の3120408..3128769位のGenscan予測タンパク質－方向：逆	親	1-57
CPP 90	NT_021924.4の31785..53502位のGenscan予測タンパク質－方向：正	親	1-109
CPP 91	NT_019599.5の934345..943456位のGrailExp予測タンパク質－方向：逆	親	1-95
CPP 92	NT_009523.5の356260..436374位のFGENESH予測タンパク質－方向：逆	親	1-381
CPP 93	NT_026966.2の620680..627809位のFGENESH予測タンパク質－方向：正	親	1-212
CPP 94	O15350	フラグメント	563-579
CPP 95	P08697	フラグメント	132-150
CPP 96	P18564	フラグメント	628-642
CPP 97	P18564	フラグメント	629-642
CPP 98	AAL84159	フラグメント	1371-1388
CPP 99	Q96LA5	フラグメント	252-266
CPP 100	P10586	フラグメント	1173-1193

【表５】

表１

タンパク質	受託番号	タンパク質型	アミノ酸
CPP 101	P20848	フラグメント	286-303
CPP 102	BAB91138	フラグメント	444-454
CPP 103	Q96HJ4	フラグメント	258-264
CPP 104	Q9P1Z9	フラグメント	899-917
CPP 105	AAB31205	フラグメント	99-115
CPP 106	P01028	フラグメント	1454-1463
CPP 107	P01028	フラグメント	1725-1744
CPP 108	P01028	フラグメント	377-391
CPP 109	P50213	フラグメント	101-115
CPP 110	O94864	フラグメント	266-276
CPP 111	O95178	フラグメント	2-12
CPP 112	Q9Y3K0	フラグメント	479-489
CPP 113	Q14624	フラグメント	31-43
CPP 114	P42702	フラグメント	621-632
CPP 115	NT_008705.5の2388444..2443255位のgenscan予測タンパク質－方向：正	フラグメント	125-136
CPP 116	P02654	非トリプシンフラグメント	31-38
CPP 117	P00995	フラグメント	32-65
CPP 118	P78311	フラグメント	8-14
CPP 119	P05155	フラグメント	191-201
CPP 120	P02647	非トリプシンフラグメント	167-173

【表６】

表１

タンパク質	受託番号	タンパク質型	アミノ酸
CPP 121	AAH28395	フラグメント	100-106
CPP 122	O14791	フラグメント	306-320
CPP 123	Q15485	フラグメント	26-36
CPP 124	Q13508	フラグメント	327-337
CPP 125	Q96MH9	フラグメント	415-429
CPP 126	Q9NWZ7	フラグメント	334-350
CPP 127	O95841	フラグメント	97-117
CPP 128	O43278	フラグメント	245-255
CPP 129	O00466	フラグメント	70-88
CPP 130	Q92902	フラグメント	190-201
CPP 131	P07358	フラグメント	467-486
CPP 132	P07358	フラグメント	405-413
CPP 133	Q9HCB6	フラグメント	769-777
CPP 134	WO200155320の配列番号：5057	フラグメント	32-45
CPP 135	P16562	フラグメント	163-178
CPP 136	P07360	フラグメント	169-184
CPP 137	NT_005229.5の1964215..2120184位のFGENESH予測タンパク質－方向：正	フラグメント	376-390
CPP 138	BAB86362	フラグメント	392-407
CPP 139	P02570	フラグメント	19-28
CPP 140	Q9NQ38	非トリプシンフラグメント	431-442
CPP 141	P05067	フラグメント	688-699
CPP 142	NT_006367.5の499573..562750位のGenscan予測タンパク質－方向：正	フラグメント	294-300
CPP 143	Q9Y287	フラグメント	153-243
CPP 144	Q07985	親	1-231
CPP 145	Q9BRJ2	親	1-306
CPP 146	P98160	フラグメント	4260-4293
CPP 147	Q9HAT0	フラグメント	74-86
CPP 148	Q9BU40	フラグメント	74-92

【００６５】

本発明のポリペプチドであるＣＰＰは、表３に列記したトリプシンペプチドにより定義される。これらのペプチドは、冠動脈疾患患者の血漿から減少したレベルで単離され、そして実施例１に記載のようなMicroProt（商標）法により特徴付けられる。

【００６６】

本発明のＣＰＰは、血漿試料が最初に分子量に基づき分離されるため、すべて２０ｋＤ未満かまたは約２０ｋＤ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され特徴付けられる。実施例１に記載のように、血漿試料を何回もクロマトグラフィ

ー分離を行う。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に記載する。

【００６７】

最初の分離を、漸増塩濃度で溶出される陽イオン交換カラムクロマトグラフィーで行う。１８個の画分を集める。表３のＣＥＸカラムは、それぞれのトリプシンペプチドを含む画分を列記する。表２は、本明細書の実施例１の工程３に記載のプロトコールにより、それぞれの画分が溶出されときのＮａＣｌ濃度を提供する。陽イオン交換による分離は、全体的に正電荷のポリペプチド種の表示を提供する。陽イオン交換の後に、逆相ＨＰＬＣ分離を行う。表３のＲＰ１カラムは、３０画分に溶出されたそれぞれのトリプシンペプチドを列記する。表２は、実施例１の工程４に記載のプロトコールによる、溶出条件（％Ｂ）を示す。逆相による分離は、全体的に疎水性のポリペプチド種の表示を提供する。最後のカラムは、５番目のカラムのトリプシン配列それぞれに関して、対応するＣＥＸおよびＲＰ１画分中、対応するプロテオームについて、トリプシン配列が観察されるＲＰ２画分番号を列記する（二番目の逆相ＨＰＬＣ分離、実施例１参照）。最後のカラム中、それぞれのＲＰ２画分番号の隣に、0lavスコアを括弧内に示す；これらのスコアは、とりわけ、ＭＳ－ＭＳデータ識別ソフトウェアにより検出されるようなノイズを越える実験的ＭＳ－ＭＳシグナルの強度を示し、故に、試料中のタンパク質濃度を示す。

【００６８】

表２

【表７】

CEX 画分番号	NaCl 濃度 (mM)	RP1 画分番号	% B
1-5	75	1	4.1
6-8	100	2	12.5
9-14	175	3	20.8
15-16	225	4	25.96
17	275	5	27.88
18	1000	6	29.8
		7	31.73
		8	33.65
		9	35.7
		10	37.5
		11	39.42
		12	41.34
		13	43.27
		14	45.2
		15	47.1
		16	49.02
		17	50.95
		18	52.87
		19	54.8
		20	56.71
		21	58.64
		22	60.56
		23	62.48
		24	64.4
		25	68.25
		26	69
		27	70.17
		28	72.1
		29	74
		30	87.5

【００６９】

表１に示すように、ＣＰＰ３６、３７および３８は、同じ親ポリペプチドのイソ型である。これらのポリペプチドが独特の溶出プロファイルを示すことは、表２のＲＰ１カラムに示すデータから明らかである。このことは、血漿ポリペプチドの異なるタンパク質分解または修飾（例えば、リン酸化、グリコシル化、アミド化）などの翻訳後プロセシングの結果生じるそれぞれのイソ型の化学特性が異なることを示す。加えて、ＣＰＰ６３、６４および７０は特異的なイソ型であって、そのことは、同じ遺伝子の産物が溶出マップの他のクラスターにも検出されたことを意味する。ＣＰＰ６３、６４および７０それ自体は、対応する遺伝子について異なって発現されたイソ型を示し、そしてそれらは、独特の溶出プロファイルを示す。ＣＰＰ６３に記載のイソ型は、１２より大きいＣＥＸ画分で溶出し（表３参照）、一方、親タンパク質は、ＣＥＸカラムからより早く溶出する。同じことがＣＰＰ６４に当てはまり、それは画分１４に溶出し始める。ＣＰＰ７０は、ＲＰ１カラムからの溶出においてその親ペプチドとは異なる。ＣＰＰ７０は、画分２３かそれより前に

溶出し、一方、親タンパク質はそれより後に溶出される。このことは、血漿ポリペプチドの異なるタンパク質分解または修飾（例えば、リン酸化、グリコシル化、アミド化）などの翻訳後プロセシングの結果生じるそれぞれのイソ型の化学特性が異なることを示す。

【００７０】

適用可能な場合は、対照 対 ＣＡＤ血漿試料のタンパク質レベルの比を、２つの方法により算出する。第一の方法は、ＣＰＰを含むそれぞれの試料からの画分数により対照／ＣＡＤ比を算出する。例えば、ＣＰＰ４０について、この計算は４／１（表３参照）であり、ＣＡＤ血漿中ＣＰＰ４０が４倍減少することを示す；ＣＰＰ３６について、この計算は２０／４（表３参照）であり、ＣＡＤ血漿中ＣＰＰ３６が５倍減少することを示す；ＣＰＰ６９について、この計算は６／１（表３参照）であり、ＣＡＤ血漿中ＣＰＰ６９が６倍減少することを示す；ＣＰＰ１０９について、この計算は６／２（表３参照）であり、ＣＡＤ血漿中ＣＰＰ１１１が３倍減少することを示す。あるいは、より正確には、質量分析データ分析ソフトウェアにてそれぞれのペプチドについて得られたOlavスコアを、加重比を与えるために用いる。ＣＰＰ４０について、その計算は１３６．９１／１２．６６であり、結果は１０．８である。故に、ＣＰＰ４０は、ＣＡＤ血漿と比較して対照血漿で１０．８倍高いレベルで存在する。ＣＰＰ３６について、その計算は８７０．１／１０５．８であり、結果は８．２である。故に、ＣＰＰ３６は、ＣＡＤ血漿と比較して対照血漿にて８．２倍高いレベルで存在する。ＣＰＰ６９について、その計算は４４９．２６／２７．９８であり、結果は１６である。故に、ＣＰＰ６９は、ＣＡＤ血漿と比較して対照血漿中１６倍高いレベルで存在する。ＣＰＰ１１１について、その計算は２２５．４／８６．４であり、結果は２．６である。故に、ＣＰＰ１１１は、ＣＡＤ血漿と比較して対照血漿で２．６倍高いレベルで存在する。ＣＰＰ３０－３２、３７、４２－４３、４５－５７、６０－６２、６８、７２－７３、７５、７７、７９－８３、８５－９１、９３－１０１、１０３－１０８、１１０、１１２－１２６、１２８－１４６および１４８は、対照血漿試料でのみ検出された。MicroProt（商標）法は、数百のｐＭの範囲にて血漿濃度の非常に少量のタンパク質を検出することができる。故に、これらのポリペプチドは、たとえＣＡＤに罹患する個体からの血漿においても、ほとんどなしに近いレベルで存在する。ＣＰＰは、有用な診断手段を提供し、ここでＣＰＰの減少したレベルは、心臓血管障害の発症のリスクの増加を示すか、または心臓血管障害の存在を示す。

【００７１】

表３

【表８】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 30	対照	10	16	ISCPEGTNAYR (179)	8 (42.49)
CPP 30	対照	10	23	ISCPEGTNAYR (179)	4 (27.38)
CPP 31	対照	9	16	FDGILGMAYPR (180)	14 (17.23)
CPP 31	対照	9	16	ISVNNVLPVFDNLMQQK (181)	14 (22.68)、14 (35.79)、16 (26.95)
CPP 31	対照	9	16	YSQAVPAVTEGPIPEVLK (182)	16 (56.29)
CPP 31	対照	9	17	ISVNNVLPVFDNLMQQK (181)	12 (31.58)
CPP 32	対照	11	23	YYYVCQYCPAGNNMNR (178)	2 (32.69)
CPP 32	対照	13	13	EIVNKHNELR (177)	11 (14.9)、10 (30.36)
CPP 32	対照	13	13	YYYVCQYCPAGNNMNR (178)	9 (19.86)、10 (14.44)
CPP 32	対照	14	12	EIVNKHNELR (177)	10 (18.38)、9 (25.98)
CPP 32	対照	14	14	YYYVCQYCPAGNNMNR (178)	7 (4.25)
CPP 33	CAD	9	9	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	13 (30.42)
CPP 33	CAD	9	10	CPPCTPERLAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (183)	8 (0.04)
CPP 33	CAD	9	10	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	8 (36.34)、8 (49.95)、9 (31.83)
CPP 33	CAD	10	8	CYPHPGSELPLQALVMGEGTCEK (184)	13 (68.51)、13 (58.03、14 (59.43)、15 (59.25)
CPP 33	CAD	10	8	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	12 (52.99)、15 (39.63)
CPP 33	CAD	10	9	CYPHPGSELPLQALVMGEGTCEK (184)	13 (27.96)、13 (109.52)、13 (36.13)、15 (105.56)、15 (100.88)、15 (103.06)、16 (66.73)、16 (97.1)、17 (107.79)、17 (90.44)、18 (108.75)
CPP 33	CAD	10	9	EPGCGCCSVCAR (185)	13 (16.99)、17 (22.18)

【表９】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 33	CAD	10	9	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	15 (43.08)、17 (20.56)、13 (42.66)、13 (35.01)、14 (37.74)、14 (27.67)、15 (36.33)、15 (34.98)、16 (32.77)、18 (36.17)
CPP 33	CAD	10	9	LEGEACGVYTPR (192)	14 (34.35)、16 (32.28)、16 (23.24)
CPP 33	CAD	10	9	MPCAELVR (194)	16 (19.72)、13 (18.86)、14 (18.65)、18 (21.68)
CPP 33	CAD	10	9	MPCAELVREPGCGCCSVCAR (195)	16 (59.43)、18 (27.23)
CPP 33	CAD	10	10	CYPHPGSELPLQALVMGEGTCEK (184)	8 (90)、8 (46.53)、9 (93.85)、9 (64.35)、9 (95.6)、10 (48.49)、10 (84.71)
CPP 33	CAD	10	10	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	8 (53.79)、8 (33.9)、9 (20.49)、9 (29.34)、9 (37.16)、10 (44.82)
CPP 33	CAD	10	10	LEGEACGVYTPR (192)	10 (32.22)、8 (40.07)
CPP 33	CAD	11	9	CYPHPGSELPLQALVMGEGTCEK (184)	15 (68.26)、16 (84.12)、17 (85.55)
CPP 33	CAD	11	9	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	15 (48.72)、16 (30.39)
CPP 33	CAD	11	11	CYPHPGSELPLQALVMGEGTCEK (184)	9 (84.4)
CPP 33	CAD	11	11	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	9 (31.53)
CPP 33	CAD	12	9	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	9 (42.35)、11 (38.06)、8 (36.28)

【表１０】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 33	CAD	12	10	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	9 (30.77)
CPP 33	CAD	17	12	GDPECHLFYNEQQEAR (186)	8 (45.12)
CPP 33	CAD	17	12	GPLEHLYSLHIPNCDK (188)	7 (34.92)
CPP 33	CAD	17	12	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	7 (31.4)
CPP 33	CAD	17	13	CYPHPGSELPLQALVMGEGTCEK (184)	7 (59.06)
CPP 33	CAD	17	13	LEGEACGVYTPR (192)	7 (28.26)
CPP 33	CAD	17	13	LIQGAPTIR (193)	7 (25.02)
CPP 33	CAD	17	14	CYPHPGSELPLQALVMGEGTCEK (184)	6 (76.82)
CPP 33	CAD	17	14	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	6 (36.39)
CPP 33	CAD	17	16	GDPECHLFYNEQQEAR (186)	4 (10.91)
CPP 33	CAD	17	16	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	4 (19.27)
CPP 33	CAD	17	17	CYPHPGSELPLQALVMGEGTCEK (184)	5 (40.62)、5 (30.56)
CPP 33	CAD	18	11	GPLEHLYSLHIPNCDK (188)	9 (46.93)、9 (47.3)、9 (44.72)、10 (59.07)、10 (52.05)
CPP 33	CAD	18	11	HHLGLEEPKK (190)	9 (35.17)
CPP 33	CAD	18	11	TPCQQELDQVLER (197)	10 (71.03)
CPP 33	CAD	18	12	GPLEHLYSLHIPNCDK (188)	6 (38.5)
CPP 33	対照	10	8	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	9 (23.98)
CPP 33	対照	10	9	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	10 (5.65)
CPP 33	対照	10	9	LEGEACGVYTPR (192)	10 (7.71)

【表１１】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 33	対照	10	10	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	8 (49.2)
CPP 33	対照	10	11	CYPHPGSELPLQALVMGEGTCEK (184)	8 (62.33)
CPP 33	対照	10	13	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	7 (25.35)
CPP 33	対照	17	9	GDPECHLFYNEQQEAR (186)	12 (49.67)
CPP 33	対照	17	9	GECWCVNPNTGK (187)	12 (12.6)
CPP 33	対照	17	9	GPLEHLYSLHIPNCDK (188)	12 (38.6)
CPP 33	対照	17	9	LIQGAPTIR (193)	12 (24.85)、12 (34.56)、13 (22.24)
CPP 33	対照	17	9	TPCQQELDQVLER (197)	12 (52.58)、12 (48.66)
CPP 33	対照	17	10	GDPECHLFYNEQQEAR (186)	9 (46.61)
CPP 33	対照	17	10	LEGEACGVYTPR (192)	9 (19.77)
CPP 33	対照	17	10	TPCQQELDQVLER (197)	9 (31.43)
CPP 33	対照	17	11	CYPHPGSELPLQALVMGEGTCEK (184)	11 (90.27)、12 (75.32)
CPP 33	対照	17	11	GDPECHLFYNEQQEAR (186)	12 (23.43)、13 (22.11)
CPP 33	対照	17	11	GECWCVNPNTGK (187)	8 (54.46)
CPP 33	対照	17	11	GPLEHLYSLHIPNCDK (188)	10 (30.27)、8 (23.72)、8 (41.63)、8 (48.66)
CPP 33	対照	17	11	HHLGLEEPK (189)	8 (26.59)、8 (19.35)
CPP 33	対照	17	11	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	11 (18.42)、13 (27.5)
CPP 33	対照	17	11	LIQGAPTIR (193)	10 (19.48)、9 (18.52)
CPP 33	対照	17	11	MPCAELVR (194)	11 (27.81)
CPP 33	対照	17	11	MSLNGQRGECWCVNPNTGK (196)	9 (62.07)

【表１２】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 33	対照	17	11	TPCQQELDQVLER (197)	9 (40.08)、10 (26.78)、13 (21.57)
CPP 33	対照	17	12	CYPHPGSELPLQALVMGEGTCEK (184)	8 (45.33)、8 (59.61)
CPP 33	対照	17	12	GECWCVNPNTGK (187)	7 (39.4)
CPP 33	対照	17	12	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	7 (45.51)
CPP 33	対照	17	12	TPCQQELDQVLER (197)	7 (43.57)
CPP 33	対照	17	13	GPLEHLYSLHIPNCDK (188)	7 (40.68)
CPP 33	対照	17	13	LIQGAPTIR (193)	7 (16.43)
CPP 33	対照	17	13	TPCQQELDQVLER (197)	7 (37.57)
CPP 33	対照	17	14	CYPHPGSELPLQALVMGEGTCEK (184)	6 (107.59)、6 (44.37)
CPP 33	対照	17	14	GDPECHLFYNEQQEAR (186)	6 (39.75)
CPP 33	対照	17	14	GPLEHLYSLHIPNCDK (188)	6 (39.69)
CPP 33	対照	17	14	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	6 (13.93)
CPP 33	対照	17	14	TPCQQELDQVLER (197)	6 (39.51)、6 (18.37)
CPP 33	対照	17	20	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	2 (32.24)
CPP 33	対照	17	20	TPCQQELDQVLER (197)	2 (32.29)
CPP 33	対照	17	21	LAACGPPPVAPPAAVAAVAGGAR (191)	2 (11.87)
CPP 34	CAD	6	21	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	13 (53.84)、14 (67.3)
CPP 34	CAD	11	11	KELSSFIDK (208)	16 (36.73)

【００７２】

【表１３】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 34	CAD	16	17	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	12 (40.03)
CPP 34	CAD	16	21	GQELCADYSENTFTEYK (205)	8 (70.57)
CPP 34	CAD	16	21	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	6 (72.27)
CPP 34	CAD	16	21	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	8 (48.29)、7 (27.3)
CPP 34	CAD	17	20	FPSGTFEQVSQLVK (204)	8 (45.31)、8 (78.88)
CPP 34	CAD	17	20	KFPSGTFEQVSQLVK (209)	6 (64.19)
CPP 34	CAD	17	20	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	6 (40.23)
CPP 34	CAD	17	20	THLPEVFLSK (219)	6 (24.38)
CPP 34	CAD	17	22	LAQKVPTADLEDVLPLAEDITNILSK (211)	5 (46.78)
CPP 34	CAD	17	23	KFPSGTFEQVSQLVK (209)	4 (52.8)
CPP 34	CAD	17	23	LAQKVPTADLEDVLPLAEDITNILSK (211)	4 (93.27)
CPP 34	CAD	17	23	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	4 (57.41)
CPP 34	CAD	17	23	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	4 (39.91)
CPP 34	CAD	17	24	ELSSFIDK (200)	3 (16.38)
CPP 34	CAD	17	24	FPSGTFEQVSQLVK (204)	3 (63.52)
CPP 34	CAD	17	24	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	3 (100.3)
CPP 34	CAD	17	24	LAQKVPTADLEDVLPLAEDITNILSK (211)	2 (113.52)
CPP 34	CAD	17	24	RTHLPEVFLSK (213)	2 (24.6)
CPP 34	CAD	17	24	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	3 (44.78)
CPP 34	CAD	17	24	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	2 (57.21)、3 (64.27)、4 (33.26)
CPP 34	CAD	17	24	YTFELSR (224)	3 (20.76)、3 (10.47)

【表１４】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 34	CAD	17	25	HLSLLTTLSNR (206)	3 (32.03)
CPP 34	CAD	17	25	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	3 (87.71)、3 (76.97)
CPP 34	CAD	17	25	KFPSGTFEQVSQLVK (209)	3 (22.07)
CPP 34	CAD	17	25	RTHLPEVFLSK (213)	3 (39.55)
CPP 34	CAD	17	25	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	3 (43.12)
CPP 34	CAD	17	25	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	3 (32.34)
CPP 34	CAD	17	25	YTFELSR (224)	3 (24.66)
CPP 34	CAD	17	26	ELSSFIDK (200)	3 (20.5)
CPP 34	CAD	17	26	KFPSGTFEQVSQLVK (209)	3 (32.07)
CPP 34	CAD	17	26	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	3 (25.23)、3 (24.11)、3 (56.31)
CPP 34	CAD	17	27	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	3 (60.34)
CPP 34	CAD	17	27	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	3 (57.31)
CPP 34	CAD	17	27	THLPEVFLSK (219)	4 (34.7)
CPP 34	CAD	17	27	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	4 (10.6)、8 (39.87)、8 (51.95)
CPP 34	CAD	17	28	ELSSFIDK (200)	4 (13.02)
CPP 34	CAD	17	28	FPSGTFEQVSQLVK (204)	4 (67.67)
CPP 34	CAD	17	28	HLSLLTTLSNR (206)	4 (37.09)
CPP 34	CAD	17	28	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	4 (61.71)
CPP 34	CAD	17	28	KFPSGTFEQVSQLVK (209)	4 (40.11)
CPP 34	CAD	17	28	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	4 (56.79)
CPP 34	CAD	17	28	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	3 (32.11)、3 (43.14)、3 (24.44)、3 (27.8)、6 (70.49)、7 (35.39)

【表１５】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 34	CAD	17	29	ELSSFIDK (200)	4 (17.41)
CPP 34	CAD	17	29	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	4 (17.43)
CPP 34	CAD	17	30	EVVSLTEACCAEGADPDCYDTR (202)	4 (57.02)
CPP 34	CAD	17	30	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	4 (68.64)、4 (78.93)
CPP 34	CAD	17	30	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	4 (63.21)、5 (38.94)
CPP 34	CAD	17	30	VCSQYAAYGEK (220)	4 (45.2)
CPP 34	CAD	17	30	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	4 (27.82)
CPP 34	CAD	18	17	KFPSGTFEQVSQLVK (209)	10 (20.06)
CPP 34	CAD	18	17	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	10 (60.46)、11 (38.07)
CPP 34	CAD	18	18	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	7 (106.51)、7 (115.6)
CPP 34	CAD	18	18	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	7 (54.67)
CPP 34	CAD	18	20	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	6 (85.7)
CPP 34	CAD	18	21	FPSGTFEQVSQLVK (204)	6 (32.17)
CPP 34	CAD	18	21	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	6 (76.27)
CPP 34	CAD	18	22	LAQKVPTADLEDVLPLAEDITNILSK (211)	4 (70.15)
CPP 34	CAD	18	22	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	5 (62.57)
CPP 34	CAD	18	23	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	5 (60.68)、5 (57.35)
CPP 34	CAD	18	24	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	3 (43.89)、3 (32.6)
CPP 34	CAD	18	26	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	4 (39.5)
CPP 34	CAD	18	28	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	5 (36.55)
CPP 34	CAD	18	29	LAQKVPTADLEDVLPLAEDITNILSK (211)	4 (50.76)

【表１６】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 34	CAD	18	29	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	4 (17.2)
CPP 34	対照	15	14	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	13 (66.89)
CPP 34	対照	15	14	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	12 (56.64)、15 (64.84)、17 (59.49)、18 (66.51)、18 (69.09)、19 (64.76)、20 (38.76)
CPP 34	対照	16	18	EVVSLTEACCAEGADPDCYDTR (202)	7 (19.56)、8 (52.89)、9 (19.62)
CPP 34	対照	16	18	GQELCADYSENTFTEYK (205)	8 (16.25)、9 (38.52)
CPP 34	対照	16	18	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	7 (59.43)
CPP 34	対照	16	18	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	8 (32.12)、9 (69.84)、10 (50.89)
CPP 34	対照	16	18	VCSQYAAYGEK (220)	7 (29.19)
CPP 34	対照	16	22	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	4 (25.7)
CPP 34	対照	16	22	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	4 (18.34)
CPP 34	対照	16	25	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	3 (61.45)
CPP 34	対照	16	25	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	3 (44.04)
CPP 34	対照	16	27	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	4 (54.53)

【表１７】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 34	対照	17	16	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	10 (52.44)
CPP 34	対照	17	16	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	10 (46.41)、11 (59.16)、11 (29.73)
CPP 34	対照	17	17	EDFTSLSLVLYSR (198)	9 (45.9)、10 (22.48)
CPP 34	対照	17	17	EFSHLGK (199)	10 (8.03)
CPP 34	対照	17	17	ELSSFIDK (200)	11 (14.11)、9 (15.73)、10 (11.35)
CPP 34	対照	17	17	EVVSLTEACCAEGADPDCYDTR (202)	9 (49.63)、9 (31.76)、10 (59.52)
CPP 34	対照	17	17	GQELCADYSENTFTEYK (205)	9 (99.45)、10 (82.59)、10 (52.64)、11 (49.1)
CPP 34	対照	17	17	HLSLLTTLSNR (206)	10 (46.6)
CPP 34	対照	17	17	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	10 (65.83)、10 (40.84)、10 (128.87)、8 (73.48)、10 (108.32)
CPP 34	対照	17	17	KFPSGTFEQVSQLVK (209)	9 (47.05)、9 (40.1)
CPP 34	対照	17	17	KLCMAALK (210)	10 (16.61)
CPP 34	対照	17	17	LCDNLSTK (212)	9 (26.76)、10 (27.69)、11 (19.43)
CPP 34	対照	17	17	RTHLPEVFLSK (213)	11 (21.16)、9 (32.38)、10 (36.41)
CPP 34	対照	17	17	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	10 (66.54)、11 (87.33)、12 (8.13)
CPP 34	対照	17	17	SDFASNCCSINSPPLYCDSEIDAELK (215)	10 (49.89)
CPP 34	対照	17	17	SLGECCDVEDSTTCFNAK (217)	9 (48.9)、9 (71.68)、10 (48.75)、10 (40.6)、11 (76.27)
CPP 34	対照	17	17	SYLSMVGSCCTSASPTVCFLK (218)	10 (91.39)、9 (64.13)、9 (74.15)、10 (68.84)、11 (30.61)

【表１８】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 34	対照	17	17	THLPEVFLSK (219)	10 (27.4)
CPP 34	対照	17	17	VCSQYAAYGEK (220)	10 (27.51)、10 (26.82)、11 (39.94)、12 (16.35)、8 (24.73)、9 (44.65)、10 (42.89)、11 (34.6)、11 (52.85)
CPP 34	対照	17	17	VMDKYTFELSR (222)	11 (31.78)
CPP 34	対照	17	17	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	9 (22.44)、11 (6.56)、12 (36.62)、8 (57.1)、10 (32.58)
CPP 34	対照	17	17	YTFELSR (224)	10 (20.01)、11 (22.82)
CPP 34	対照	17	18	EVVSLTEACCAEGADPDCYDTR (202)	7 (36)
CPP 34	対照	17	18	FPSGTFEQVSQLVK (204)	7 (23.87)
CPP 34	対照	17	18	HLSLLTTLSNR (206)	7 (23.49)
CPP 34	対照	17	18	KFPSGTFEQVSQLVK (209)	7 (37.78)
CPP 34	対照	17	18	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	7 (39.3)
CPP 34	対照	17	18	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	7 (36.51)、7 (43.77)
CPP 34	対照	17	19	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	7 (104.29)
CPP 34	対照	17	19	LAQKVPTADLEDVLPLAEDITNILSK (211)	7 (87.72)
CPP 34	対照	17	19	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	7 (38.48)
CPP 34	対照	17	19	VCSQYAAYGEK (220)	7 (35.08)
CPP 34	対照	17	20	RTHLPEVFLSK (213)	6 (17.94)、6 (38.64)
CPP 34	対照	17	20	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	6 (49.74)
CPP 34	対照	17	20	SYLSMVGSCCTSASPTVCFLK (218)	6 (69.93)

【表１９】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 34	対照	17	20	VCSQYAAYGEK (220)	6 (33.89)
CPP 34	対照	17	20	VMDKYTFELSR (222)	6 (27.53)、6 (22.04)
CPP 34	対照	17	21	ELSSFIDK (200)	6 (14.4)
CPP 34	対照	17	21	EVVSLTEACCAEGADPDCYDTR (202)	6 (22.49)
CPP 34	対照	17	21	GQELCADYSENTFTEYK (205)	6 (73.26)
CPP 34	対照	17	21	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	6 (93.71)
CPP 34	対照	17	21	KFPSGTFEQVSQLVK (209)	6 (15.75)
CPP 34	対照	17	21	RTHLPEVFLSK (213)	6 (22.74)
CPP 34	対照	17	21	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	5 (55.58)、6 (53.75)
CPP 34	対照	17	21	SLGECCDVEDSTTCFNAK (217)	6 (30.59)
CPP 34	対照	17	21	SYLSMVGSCCTSASPTVCFLK (218)	6 (80.45)
CPP 34	対照	17	21	VCSQYAAYGEK (220)	5 (12.27)
CPP 34	対照	17	21	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	5 (52.14)、6 (41.34)、6 (48.42)
CPP 34	対照	17	21	YTFELSR (224)	6 (20.65)
CPP 34	対照	17	22	ELSSFIDK (200)	4 (21.53)
CPP 34	対照	17	22	EVVSLTEACCAEGADPDCYDTR (202)	4 (46.72)
CPP 34	対照	17	22	HLSLLTTLSNR (206)	4 (46.45)
CPP 34	対照	17	22	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	4 (96.07)
CPP 34	対照	17	22	KFPSGTFEQVSQLVK (209)	4 (29.51)
CPP 34	対照	17	22	KLCMAALK (210)	4 (25.95)
CPP 34	対照	17	22	RTHLPEVFLSK (213)	4 (37.59)、5 (42.1)
CPP 34	対照	17	22	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	4 (89.3)
CPP 34	対照	17	22	YTFELSR (224)	4 (33.96)
CPP 34	対照	17	23	ELSSFIDK (200)	4 (28.03)
CPP 34	対照	17	23	EVVSLTEACCAEGADPDCYDTR (202)	4 (75.6)、5 (37.18)

【００７３】

【表２０】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 34	対照	17	23	HLSLLTTLSNR (206)	4 (38.71)
CPP 34	対照	17	23	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	5 (96.69)
CPP 34	対照	17	23	RTHLPEVFLSK (213)	4 (34.81)
CPP 34	対照	17	23	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	4 (72.74)、5 (47.32)
CPP 34	対照	17	23	SLGECCDVEDSTTCFNAK (217)	4 (69.92)
CPP 34	対照	17	23	SYLSMVGSCCTSASPTVCFLK (218)	4 (76.8)、5 (79.76)
CPP 34	対照	17	23	VCSQYAAYGEK (220)	4 (39.39)、5 (38.9)
CPP 34	対照	17	23	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	4 (14.78)、5 (5.75)、5 (53.11)
CPP 34	対照	17	23	YTFELSR (224)	4 (27.5)
CPP 34	対照	17	24	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	2 (54.41)
CPP 34	対照	17	24	LAQKVPTADLEDVLPLAEDITNILSK (211)	3 (59.67)、3 (26.73)
CPP 34	対照	17	24	RTHLPEVFLSK (213)	3 (27.82)
CPP 34	対照	17	24	VCSQYAAYGEK (220)	3 (33.99)
CPP 34	対照	17	24	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	3 (56.11)、2 (17.54)、4 (28.3)
CPP 34	対照	17	25	GQELCADYSENTFTEYK (205)	3 (38.23)
CPP 34	対照	17	25	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	3 (94.73)

【表２１】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 34	対照	17	25	KFPSGTFEQVSQLVK (209)	3 (32.29)
CPP 34	対照	17	25	LAQKVPTADLEDVLPLAEDITNILSK (211)	2 (113.63)、3 (70.64)
CPP 34	対照	17	25	LCDNLSTK (212)	2 (28.89)
CPP 34	対照	17	25	RTHLPEVFLSK (213)	2 (20.51)
CPP 34	対照	17	25	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	2 (67.89)、2 (43.5)、3 (62.36)
CPP 34	対照	17	25	SDFASNCCSINSPPLYCDSEIDAELKNIL (216)	2 (46.5)
CPP 34	対照	17	25	SYLSMVGSCCTSASPTVCFLK (218)	3 (45.91)
CPP 34	対照	17	25	VCSQYAAYGEK (220)	3 (32.48)、2 (46.05)
CPP 34	対照	17	25	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	3 (29.81)、4 (71.26)、6 (58.7)
CPP 34	対照	17	25	YTFELSR (224)	3 (24.41)
CPP 34	対照	17	26	ELSSFIDKGQELCADYSENTFTEYK (201)	4 (52.77)
CPP 34	対照	17	26	EVVSLTEACCAEGADPDCYDTR (202)	4 (27.22)
CPP 34	対照	17	26	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	5 (58.31)
CPP 34	対照	17	26	LAQKVPTADLEDVLPLAEDITNILSK (211)	4 (70.45)、6 (47.28)
CPP 34	対照	17	26	RTHLPEVFLSK (213)	4 (20.92)、4 (38.12)
CPP 34	対照	17	26	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	4 (59.37)
CPP 34	対照	17	26	VCSQYAAYGEK (220)	4 (45.27)、4 (45.65)
CPP 34	対照	17	26	VCSQYAAYGEKK (221)	4 (22.73)
CPP 34	対照	17	26	VMDKYTFELSR (222)	4 (44.59)

【表２２】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 34	対照	17	27	ELSSFIDK (200)	4 (14.55)
CPP 34	対照	17	27	EVVSLTEACCAEGADPDCYDTR (202)	4 (36.88)
CPP 34	対照	17	27	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	4 (111.05)
CPP 34	対照	17	27	KFPSGTFEQVSQLVK (209)	4 (67.15)
CPP 34	対照	17	27	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	4 (93.17)、5 (41.52)
CPP 34	対照	17	27	SYLSMVGSCCTSASPTVCFLK (218)	4 (39.49)
CPP 34	対照	17	27	VCSQYAAYGEK (220)	4 (17.08)
CPP 34	対照	17	27	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	4 (53.38)
CPP 34	対照	17	27	YTFELSR (224)	4 (20.65)
CPP 34	対照	17	28	EVVSLTEACCAEGADPDCYDTR (202)	4 (29.74)
CPP 34	対照	17	28	GQELCADYSENTFTEYK (205)	4 (38.13)
CPP 34	対照	17	28	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	3 (79.72)、5 (38.9)
CPP 34	対照	17	28	RTHLPEVFLSK (213)	4 (31.97)
CPP 34	対照	17	28	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	4 (85.61)
CPP 34	対照	17	28	SLGECCDVEDSTTCFNAK (217)	4 (29.93)
CPP 34	対照	17	28	SYLSMVGSCCTSASPTVCFLK (218)	4 (81.6)
CPP 34	対照	17	28	VCSQYAAYGEK (220)	3 (24.58)
CPP 34	対照	17	28	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	4 (15.46)、3 (46.79)、4 (46.04)、4 (4.86)、5 (9)、5 (45.67)、7 (79.39)
CPP 34	対照	17	29	ELSSFIDK (200)	4 (14.81)

【表２３】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 34	対照	17	29	EVVSLTEACCAEGADPDCYDTR (202)	4 (32.7)
CPP 34	対照	17	29	EYANQFMWEYSTNYGQAPLSLLVSYTK (203)	4 (69.84)
CPP 34	対照	17	29	GQELCADYSENTFTEYK (205)	4 (25.1)
CPP 34	対照	17	29	HLSLLTTLSNR (206)	4 (27.64)
CPP 34	対照	17	29	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	4 (111.15)
CPP 34	対照	17	29	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	4 (66.55)
CPP 34	対照	17	29	SLGECCDVEDSTTCFNAK (217)	4 (53.4)
CPP 34	対照	17	29	VCSQYAAYGEK (220)	4 (34.7)、6 (24.99)
CPP 34	対照	17	29	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	4 (68.55)、4 (24.08)、5 (53.42)、6 (46.79)
CPP 34	対照	17	30	ELSSFIDK (200)	4 (18.43)
CPP 34	対照	17	30	EVVSLTEACCAEGADPDCYDTR (202)	4 (25.81)
CPP 34	対照	17	30	GQELCADYSENTFTEYK (205)	4 (68.14)
CPP 34	対照	17	30	HLSLLTTLSNR (206)	4 (32.43)
CPP 34	対照	17	30	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	4 (29.55)
CPP 34	対照	17	30	LCDNLSTK (212)	4 (27.55)
CPP 34	対照	17	30	RTHLPEVFLSK (213)	4 (32.88)
CPP 34	対照	17	30	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	7 (31.26)、4 (68.57)、5 (44.75)、6 (38.66)
CPP 34	対照	17	30	SDFASNCCSINSPPLYCDSEIDAELK (215)	4 (81.52)
CPP 34	対照	17	30	SLGECCDVEDSTTCFNAK (217)	4 (29.54)、5 (19.16)
CPP 34	対照	17	30	SYLSMVGSCCTSASPTVCFLK (218)	4 (92.95)
CPP 34	対照	17	30	VCSQYAAYGEK (220)	4 (45.37)
CPP 34	対照	17	30	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	4 (14.55)、4 (52.56)
CPP 34	対照	17	30	YTFELSR (224)	4 (21.48)

【表２４】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 34	対照	18	16	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	9 (93.14)、10 (71.64)
CPP 34	対照	18	16	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	9 (57.9)、10 (42.09)
CPP 34	対照	18	17	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	10 (85.89)、11 (78.97)
CPP 34	対照	18	17	SCESNSPFPVHPGTAECCTK (214)	9 (53.51)、10 (48.63)、11 (58.15)
CPP 34	対照	18	17	VCSQYAAYGEK (220)	10 (25.4)
CPP 34	対照	18	21	HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR (207)	6 (88.08)
CPP 34	対照	18	22	VPTADLEDVLPLAEDITNILSK (223)	5 (52.38)
CPP 35	CAD	17	25	TATSEYQTFFNPR (24)	2 (49.22)、2 (29.27)
CPP 35	CAD	17	29	HQDFNSAVQLVENFCR (21)	3 (51.05)
CPP 35	CAD	17	29	TFGSGEADCGLRPLFEK (25)	3 (12.73)
CPP 35	対照	17	15	ELLESYIDGR (18)	12 (24.64)
CPP 35	対照	17	15	ETAASLLQAGYK (19)	12 (23.72)
CPP 35	対照	17	15	GQPSVLQVVNLPIVERPVCK (20)	13 (11.85)
CPP 35	対照	17	15	IVEGSDAEIGMSPWQVMLFR (22)	11 (24.8)
CPP 35	対照	17	15	LAVTTHGLPCLAWASAQAK (23)	12 (62.78)、13 (26.94)
CPP 35	対照	17	15	TATSEYQTFFNPR (24)	11 (49.22)、12 (32.95)
CPP 35	対照	17	16	ELLESYIDGR (18)	7 (15.09)
CPP 35	対照	17	16	GQPSVLQVVNLPIVERPVCK (20)	8 (35.66)、7 (14.65)
CPP 35	対照	17	16	LAVTTHGLPCLAWASAQAK (23)	7 (3)
CPP 35	対照	17	16	TATSEYQTFFNPR (24)	8 (13.31)

【表２５】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 35	対照	17	18	IVEGSDAEIGMSPWQVMLFR (22)	6 (31.78)
CPP 35	対照	17	18	LAVTTHGLPCLAWASAQAK (23)	6 (51.75)
CPP 35	対照	17	22	HQDFNSAVQLVENFCR (21)	3 (43.5)
CPP 35	対照	17	24	HQDFNSAVQLVENFCR (21)	2 (24.46)、2 (26.95)
CPP 35	対照	17	27	GQPSVLQVVNLPIVERPVCK (20)	3 (16.8)
CPP 35	対照	17	27	LAVTTHGLPCLAWASAQAK (23)	3 (30.41)
CPP 35	対照	17	28	LAVTTHGLPCLAWASAQAK (23)	3 (41.12)
CPP 35	対照	17	28	TATSEYQTFFNPR (24)	3 (25.44)
CPP 35	対照	17	29	GQPSVLQVVNLPIVERPVCK (20)	3 (12.23)
CPP 36	CAD	18	12	ASASDGSSFVVAR (26)	7 (11.17)
CPP 36	CAD	18	12	EAQQYSEALASTR (27)	7 (29.34)、8 (21.92)
CPP 36	CAD	18	12	GQCGENLAWASYDQTGK (28)	8 (43.37)
CPP 36	対照	17	11	ASASDGSSFVVAR (26)	9 (39.25)、11 (46.35)、12 (62.89)
CPP 36	対照	17	11	EAQQYSEALASTR (27)	12 (33.2)
CPP 36	対照	17	11	NLNREAQQYSEALASTR (30)	10 (23.99)
CPP 36	対照	17	12	ASASDGSSFVVAR (26)	8 (52.43)、8 (58.42)
CPP 36	対照	17	12	GQCGENLAWASYDQTGK (28)	8 (56.22)、8 (68.05)
CPP 36	対照	17	12	WYSEIK (32)	8 (17.48)
CPP 36	対照	17	13	ASASDGSSFVVAR (26)	7 (10.36)、8 (62.59)
CPP 36	対照	17	13	EAQQYSEALASTR (27)	8 (27.55)
CPP 36	対照	17	13	GQCGENLAWASYDQTGK (28)	8 (96.33)
CPP 36	対照	17	13	HGVPPLK (29)	8 (15.7)
CPP 36	対照	17	13	NYNFQQPGFTSGTGHFTAMVWK (31)	8 (41.62)
CPP 36	対照	17	14	ASASDGSSFVVAR (26)	6 (57.72)、6 (49.26)
CPP 36	対照	17	14	EAQQYSEALASTR (27)	6 (30.42)
CPP 36	対照	18	13	EAQQYSEALASTR (27)	8 (20.25)
CPP 37	対照	17	16	ASASDGSSFVVAR (33)	5 (31.53)
CPP 37	対照	17	18	ASASDGSSFVVAR (33)	3 (59.2)

【００７４】

【表２６】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 37	対照	17	18	EAQQYSEALASTR (34)	3 (4.67)
CPP 37	対照	18	16	NYNFQQPGFTSGTGHFTAMVWK (35)	5 (36.14)
CPP 37	対照	18	17	ASASDGSSFVVAR (33)	5 (36.35)
CPP 37	対照	18	18	ASASDGSSFVVAR (33)	3 (17.15)
CPP 38	CAD	18	20	ASASDGSSFVVAR (36)	2 (35.91)
CPP 38	対照	17	22	ASASDGSSFVVAR (36)	1 (54.65)
CPP 38	対照	17	23	NYNFQQPGFTSGTGHFTAMVWK (37)	1 (52.44)
CPP 39	CAD	15	9	VGDTYERPK (48)	12 (50.7)
CPP 39	CAD	17	10	GNLLQCICTGNGR (40)	7 (54.78)
CPP 39	CAD	17	10	IGDTWSK (43)	8 (27)
CPP 39	CAD	17	10	ISCTIANR (44)	8 (32.46)
CPP 39	CAD	17	10	RPHETGGYMLECVCLGNGK (46)	8 (66.19)
CPP 39	CAD	17	16	GNLLQCICTGNGR (40)	3 (58.95)
CPP 39	CAD	17	16	HTSVQTTSSGSGPFTDVR (41)	3 (28.85)
CPP 39	CAD	17	16	ISCTIANR (44)	3 (32.73)
CPP 39	CAD	17	16	TYLGNALVCTCYGGSR (47)	3 (46.84)
CPP 39	対照	17	9	GFNCESKPEAEETCFDK (38)	10 (37.43)、10 (23.43)、11 (18.72)
CPP 39	対照	17	9	GFNCESKPEAEETCFDKYTGNTYR (39)	10 (22.63)
CPP 39	対照	17	9	GNLLQCICTGNGR (40)	9 (45)
CPP 39	対照	17	9	HTSVQTTSSGSGPFTDVR (41)	11 (16.69)
CPP 39	対照	17	9	HYQINQQWER (42)	9 (19.62)
CPP 39	対照	17	9	TYLGNALVCTCYGGSR (47)	10 (44.89)
CPP 39	対照	17	10	HYQINQQWER (42)	7 (14.44)

【表２７】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 39	対照	17	11	GFNCESKPEAEETCFDK (38)	7 (62.45)
CPP 39	対照	17	11	ISCTIANR (44)	7 (33.15)
CPP 39	対照	17	12	GFNCESKPEAEETCFDK (38)	6 (50.17)
CPP 39	対照	17	12	TYLGNALVCTCYGGSR (47)	6 (37.38)、6 (28.47)
CPP 39	対照	17	13	GFNCESKPEAEETCFDK (38)	6 (35.75)
CPP 39	対照	17	14	GFNCESKPEAEETCFDK (38)	4 (29.1)、5 (33.27)
CPP 39	対照	17	14	GNLLQCICTGNGR (40)	4 (20.08)、4 (44.43)、5 (49.18)
CPP 39	対照	17	14	HYQINQQWER (42)	4 (24.88)
CPP 39	対照	17	14	ISCTIANR (44)	4 (23.09)、5 (31.9)
CPP 39	対照	17	14	QAQQMVQPQSPVAVSQSKPGCYDNGK (45)	4 (42.24)
CPP 39	対照	17	14	RPHETGGYMLECVCLGNGK (46)	4 (33.11)
CPP 39	対照	17	14	TYLGNALVCTCYGGSR (47)	4 (32.92)
CPP 39	対照	17	18	ISCTIANR (44)	1 (21.13)、2 (27.54)
CPP 40	CAD	17	22	VPSLVGSFIR (176)	7 (12.66)
CPP 40	対照	17	20	EDPTVSALLTSEK (175)	9 (40.94)
CPP 40	対照	17	20	VPSLVGSFIR (176)	8 (26.44)、9 (34.29)
CPP 40	対照	18	20	VPSLVGSFIR (176)	9 (35.24)
CPP 41	CAD	14	12	TGESAEFVCK (14)	9 (30.01)
CPP 41	CAD	18	26	CLHPCVISR (1)	1 (28.81)
CPP 41	CAD	18	26	EATFCDFPK (2)	1 (40.34)
CPP 41	CAD	18	26	EIMENYNIALR (3)	1 (17.82)、1 (18.74)、1 (20.42)、1 (42.2)

【表２８】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 41	CAD	18	26	INHGILYDEEK (5)	1 (19.1)、1 (43.48)
CPP 41	CAD	18	26	ITCTEEGWSPTPK (6)	1 (53.4)
CPP 41	CAD	18	26	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	1 (17.85)
CPP 41	CAD	18	26	TGESAEFVCK (14)	1 (15.89)
CPP 41	CAD	18	29	EATFCDFPK (2)	1 (43.05)
CPP 41	CAD	18	29	EIMENYNIALR (3)	1 (34.36)
CPP 41	CAD	18	29	INHGILYDEEK (5)	1 (39.31)
CPP 41	CAD	18	29	ITCTEEGWSPTPK (6)	1 (13.13)、1 (61.14)
CPP 41	CAD	18	29	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	1 (49.89)
CPP 41	CAD	18	29	TTCWDGKLEYPTCAK (16)	1 (41.85)、1 (60.47)
CPP 41	対照	12	12	LQNNENNISCVER (8)	9 (32.7)
CPP 41	対照	12	12	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	9 (18.87)
CPP 41	対照	15	11	ITCTEEGWSPTPK (6)	15 (23.31)、16 (31.12)
CPP 41	対照	15	11	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	15 (32.61)、16 (52.1)
CPP 41	対照	15	11	TGESAEFVCKR (15)	16 (13.97)
CPP 41	対照	16	29	YKPFSQVPTGEVFYYSCEYNFVSPSK (17)	1 (69.97)
CPP 41	対照	17	12	CLHPCVISR (1)	9 (33.75)
CPP 41	対照	17	12	EIMENYNIALR (3)	9 (11.24)
CPP 41	対照	17	12	INHGILYDEEK (5)	9 (16.83)
CPP 41	対照	17	12	ITCTEEGWSPTPK (6)	9 (47.67)
CPP 41	対照	17	12	LQNNENNISCVER (8)	9 (12.22)
CPP 41	対照	17	12	SFWTRITCTEEGWSPTPK (12)	9 (18.72)
CPP 41	対照	17	12	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	9 (22.11)
CPP 41	対照	17	12	TGESAEFVCKR (15)	9 (26.42)
CPP 41	対照	17	12	TTCWDGKLEYPTCAK (16)	9 (18.9)、9 (23.61)、9 (29.41)、9 (54.75)

【表２９】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 41	対照	17	13	CLHPCVISR (1)	9 (17.62)
CPP 41	対照	17	13	EATFCDFPK (2)	9 (39.58)
CPP 41	対照	17	13	EIMENYNIALR (3)	9 (27.99)、9 (33.79)
CPP 41	対照	17	13	GWSTPPK (4)	9 (19.58)
CPP 41	対照	17	13	INHGILYDEEK (5)	9 (37.61)
CPP 41	対照	17	13	ITCTEEGWSPTPK (6)	9 (15.64)、9 (47.42)
CPP 41	対照	17	13	LQNNENNISCVER (8)	9 (42.08)、9 (46.32)
CPP 41	対照	17	13	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	9 (80.33)
CPP 41	対照	17	13	TTCWDGKLEYPTCAK (16)	9 (40.37)、9 (58.12)
CPP 41	対照	17	14	EIMENYNIALR (3)	7 (29.92)
CPP 41	対照	17	14	INHGILYDEEK (5)	7 (36)
CPP 41	対照	17	14	ITCTEEGWSPTPK (6)	7 (54.9)
CPP 41	対照	17	14	LQNNENNISCVER (8)	7 (18.62)、7 (61.62)
CPP 41	対照	17	14	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	7 (39)
CPP 41	対照	17	14	YKPFSQVPTGEVFYYSCEYNFVSPSK (17)	7 (72.77)
CPP 41	対照	17	16	EATFCDFPK (2)	5 (26.48)、5 (29.19)、5 (30.48)、5 (31.19)
CPP 41	対照	17	16	EIMENYNIALR (3)	5 (19.53)、5 (29.35)
CPP 41	対照	17	16	LQNNENNISCVER (8)	5 (26.18)
CPP 41	対照	17	16	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	5 (66.49)、5 (46.45)、5 (67.77)
CPP 41	対照	17	16	TGESAEFVCK (14)	5 (10.92)
CPP 41	対照	17	16	TTCWDGKLEYPTCAK (16)	5 (20.37)
CPP 41	対照	17	18	CLHPCVISR (1)	4 (21.08)、4 (30.09)
CPP 41	対照	17	18	EATFCDFPK (2)	4 (36.35)
CPP 41	対照	17	18	EIMENYNIALR (3)	4 (25.17)、4 (38.46)
CPP 41	対照	17	18	INHGILYDEEK (5)	4 (36.82)、4 (42.45)

【表３０】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 41	対照	17	18	ITCTEEGWSPTPK (6)	4 (42.18)
CPP 41	対照	17	18	LEYPTCAK (7)	4 (29.38)
CPP 41	対照	17	18	SFWTR (11)	4 (21.02)
CPP 41	対照	17	18	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	4 (43.02)
CPP 41	対照	17	18	TTCWDGKLEYPTCAK (16)	4 (21.84)、4 (49.26)
CPP 41	対照	17	20	EATFCDFPK (2)	3 (13.9)、3 (30.1)
CPP 41	対照	17	20	EIMENYNIALR (3)	3 (33.67)、3 (36.92)
CPP 41	対照	17	20	INHGILYDEEK (5)	3 (43.41)
CPP 41	対照	17	20	ITCTEEGWSPTPK (6)	3 (18.68)、3 (46.48)、3 (37.29)、3 (47.83)
CPP 41	対照	17	20	LQNNENNISCVER (8)	3 (34.32)
CPP 41	対照	17	20	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	3 (21.56)、3 (41.66)、3 (47.33)
CPP 41	対照	17	20	TGESAEFVCKR (15)	3 (34.94)
CPP 41	対照	17	20	TTCWDGKLEYPTCAK (16)	3 (49.55)、3 (52.33)、3 (33.68)、3 (51.14)
CPP 41	対照	17	20	YKPFSQVPTGEVFYYSCEYNFVSPSK (17)	3 (34.21)
CPP 41	対照	17	22	EATFCDFPK (2)	1 (26.19)、1 (28.88)
CPP 41	対照	17	22	EIMENYNIALR (3)	1 (27.86)、1 (30.54)
CPP 41	対照	17	22	INHGILYDEEK (5)	1 (29.82)
CPP 41	対照	17	22	ITCTEEGWSPTPK (6)	1 (61.05)
CPP 41	対照	17	22	NGQWSEPPKCLHPCVISR (10)	1 (23.86)
CPP 41	対照	17	22	SFWTRITCTEEGWSPTPK (12)	1 (22)
CPP 41	対照	17	22	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	1 (36.22)
CPP 41	対照	17	22	TTCWDGKLEYPTCAK (16)	1 (66.98)
CPP 41	対照	17	23	CLHPCVISR (1)	1 (22.17)、1 (25.52)
CPP 41	対照	17	23	EATFCDFPK (2)	1 (12.22)、1 (29)

【表３１】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 41	対照	17	23	INHGILYDEEK (5)	1 (37.91)
CPP 41	対照	17	23	ITCTEEGWSPTPK (6)	1 (62.19)
CPP 41	対照	17	23	NGQWSEPPK (9)	1 (14.57)、1 (23.67)
CPP 41	対照	17	23	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	1 (38.06)
CPP 41	対照	17	23	TGESAEFVCK (14)	1 (24.24)
CPP 41	対照	17	23	TTCWDGKLEYPTCAK (16)	1 (50.66)
CPP 41	対照	17	26	EATFCDFPK (2)	1 (33.82)
CPP 41	対照	17	26	EIMENYNIALR (3)	1 (40.15)
CPP 41	対照	17	26	GWSTPPK (4)	1 (16.71)
CPP 41	対照	17	26	INHGILYDEEK (5)	1 (25.31)
CPP 41	対照	17	26	ITCTEEGWSPTPK (6)	1 (49.09)
CPP 41	対照	17	26	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	1 (42.6)
CPP 41	対照	17	26	TGESAEFVCKR (15)	1 (32.78)
CPP 41	対照	17	27	CLHPCVISR (1)	1 (22.64)、1 (33.76)
CPP 41	対照	17	27	EATFCDFPK (2)	1 (25.36)
CPP 41	対照	17	27	EIMENYNIALR (3)	1 (14.61)、1 (35.44)
CPP 41	対照	17	27	INHGILYDEEK (5)	1 (28.37)、1 (41.98)
CPP 41	対照	17	27	ITCTEEGWSPTPK (6)	1 (54.97)
CPP 41	対照	17	27	LEYPTCAK (7)	1 (4.62)、1 (12.77)
CPP 41	対照	17	27	LQNNENNISCVER (8)	1 (59.18)
CPP 41	対照	17	27	SFWTR (11)	1 (17.6)
CPP 41	対照	17	27	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	1 (18.37)
CPP 41	対照	17	29	CLHPCVISR (1)	1 (25.53)
CPP 41	対照	17	29	EATFCDFPK (2)	1 (34.57)
CPP 41	対照	17	29	EIMENYNIALR (3)	1 (25.61)、1 (35.36)、1 (36.11)
CPP 41	対照	17	29	INHGILYDEEK (5)	1 (40.87)、1 (42.85)、1 (43.85)
CPP 41	対照	17	29	ITCTEEGWSPTPK (6)	1 (49.97)、1 (51.98)、1 (54.28)、1 (39.58)

【００７５】

【表３２】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 41	対照	17	29	LQNNENNISCVER (8)	1 (74.85)、1 (42.35)
CPP 41	対照	17	29	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	1 (45.7)、1 (55)
CPP 41	対照	17	29	TGESAEFVCK (14)	1 (33.93)、1 (35.45)、1 (52.15)、1 (13.82)
CPP 41	対照	17	29	TTCWDGKLEYPTCAK (16)	1 (12.36)、1 (66.83)、1 (32.43)、1 (38.99)
CPP 41	対照	17	29	YKPFSQVPTGEVFYYSCEYNFVSPSK (17)	1 (79.79)
CPP 41	対照	17	30	CLHPCVISR (1)	1 (23.65)、1 (28.89)
CPP 41	対照	17	30	EIMENYNIALR (3)	1 (11.11)
CPP 41	対照	17	30	INHGILYDEEK (5)	1 (21.32)、1 (26.98)
CPP 41	対照	17	30	ITCTEEGWSPTPK (6)	1 (22.14)、1 (28.7)
CPP 41	対照	17	30	LQNNENNISCVER (8)	1 (44.48)
CPP 41	対照	17	30	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	1 (31.23)
CPP 41	対照	17	30	TTCWDGKLEYPTCAK (16)	1 (43.24)
CPP 41	対照	18	12	CLHPCVISR (1)	9 (24.33)、10 (22)
CPP 41	対照	18	12	EATFCDFPK (2)	9 (31.02)、9 (32.28)、10 (33.64)
CPP 41	対照	18	12	EIMENYNIALR (3)	9 (32.97)
CPP 41	対照	18	12	INHGILYDEEK (5)	9 (22.99)、9 (27.13)、10 (23.94)、10 (28.08)
CPP 41	対照	18	12	ITCTEEGWSPTPK (6)	9 (45.75)
CPP 41	対照	18	12	LQNNENNISCVER (8)	9 (39.54)、10 (27.26)
CPP 41	対照	18	12	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	9 (37.31)、10 (34.78)
CPP 41	対照	18	12	TGESAEFVCKR (15)	9 (27.54)
CPP 41	対照	18	12	TTCWDGKLEYPTCAK (16)	9 (35.45)、10 (40.87)
CPP 41	対照	18	18	EATFCDFPK (2)	4 (12.75)
CPP 41	対照	18	18	EIMENYNIALR (3)	4 (22.94)

【表３３】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 41	対照	18	18	LQNNENNISCVER (8)	4 (54.87)
CPP 41	対照	18	18	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	4 (19.64)
CPP 41	対照	18	18	TTCWDGKLEYPTCAK (16)	4 (38.26)
CPP 41	対照	18	19	EATFCDFPK (2)	4 (23.17)
CPP 41	対照	18	19	EIMENYNIALR (3)	4 (37.68)
CPP 41	対照	18	19	INHGILYDEEK (5)	4 (24.29)
CPP 41	対照	18	19	ITCTEEGWSPTPK (6)	4 (42.02)
CPP 41	対照	18	19	LQNNENNISCVER (8)	4 (49.08)
CPP 41	対照	18	19	NGQWSEPPK (9)	4 (27.6)
CPP 41	対照	18	19	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	4 (46.94)
CPP 41	対照	18	20	LQNNENNISCVER (8)	3 (68.48)
CPP 41	対照	18	20	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	3 (27.22)
CPP 41	対照	18	20	TGESAEFVCKR (15)	3 (41.68)
CPP 41	対照	18	20	TTCWDGKLEYPTCAK (16)	3 (41)
CPP 41	対照	18	22	EATFCDFPK (2)	1 (40.46)
CPP 41	対照	18	22	INHGILYDEEK (5)	1 (29.19)
CPP 41	対照	18	22	ITCTEEGWSPTPK (6)	1 (36.89)
CPP 41	対照	18	22	LQNNENNISCVER (8)	1 (54.91)
CPP 41	対照	18	22	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	1 (47.52)
CPP 41	対照	18	22	TGESAEFVCKR (15)	1 (48.76)
CPP 41	対照	18	22	TTCWDGKLEYPTCAK (16)	1 (63.41)
CPP 41	対照	18	29	EATFCDFPK (2)	1 (36.99)
CPP 41	対照	18	29	EIMENYNIALR (3)	1 (29.51)
CPP 41	対照	18	29	ITCTEEGWSPTPK (6)	1 (32.94)
CPP 41	対照	18	29	LQNNENNISCVER (8)	1 (41.42)
CPP 41	対照	18	29	STDTSCVNPPTVQNAHILSR (13)	1 (43.61)
CPP 42	対照	10	16	ISCPEGTNAYR (274)	8 (42.49)
CPP 42	対照	10	23	ISCPEGTNAYR (274)	4 (27.38)
CPP 43	対照	10	13	GNDVAFHFNPR (278)	10 (25.69)

【表３４】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 44	CAD	5	3	YDPEAASAPGSGNPCHEASAAQK (265)	12 (27.74)
CPP 44	CAD	9	3	YDPEAASAPGSGNPCHEASAAQK (265)	11 (49.25)
CPP 44	対照	10	3	YDPEAASAPGSGNPCHEASAAQK (265)	12 (19)、11 (76.94)、12 (21.18)、11 (22.89)
CPP 45	対照	16	13	GAILPMLYALCYVKMPSFQHGPGR (272)	4 (36.49)
CPP 46	対照	10	18	CAVLSCLPK (228)	6 (30.46)
CPP 46	対照	10	20	CAVLSCLPK (228)	4 (19.8)
CPP 46	対照	11	14	CAVLSCLPK (228)	10 (32.48)
CPP 47	対照	9	17	ALPGQLKPFETLLSQNQGGK (231)	17 (83)
CPP 48	対照	17	17	SSGLISHHR (68)	7 (21.79)
CPP 49	対照	17	19	QEILAALEK (233)	10 (7.74)
CPP 50	対照	11	17	QCFSCLPFTMKK (232)	13 (36.21)
CPP 50	対照	12	12	QCFSCLPFTMKK (232)	8 (29.5)
CPP 51	対照	16	12	ECEAFICNCDR (229)	7 (21.59)
CPP 51	対照	16	13	FLLDNPYTHTYSYSCSGSAITCSSK (230)	7 (37.52)
CPP 52	対照	9	16	SEFVVPDLELPSWLTTGNYR (263)	14 (76.88)
CPP 52	対照	9	16	TYGLPCHCPFK (264)	14 (20.5)
CPP 53	対照	3	7	DQEAAVAELQAALER (262)	12 (38.35)、12 (23.23)
CPP 53	対照	4	7	DQEAAVAELQAALER (262)	12 (22.41)
CPP 54	対照	4	24	ENAEQGEVDMESHR (271)	7 (28.7)、7 (21.38)

【表３５】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 55	対照	16	25	KILECVIK (269)	3 (15.94)
CPP 56	対照	18	13	ALDTNYCFSSTEK (226)	13 (29.44)、12 (29.69)
CPP 56	対照	18	13	VEQLSNMIVR (227)	12 (29.07)
CPP 57	対照	15	19	NNLEALEDFEK (270)	22 (15.03)
CPP 58	CAD	15	11	EATLQDCPSGPWGK (52)	14 (62.83)、15 (58.85)
CPP 58	CAD	15	11	GQWGTVCDDGWDIK (56)	14 (45.68)
CPP 58	CAD	15	11	IWLDNVR (61)	12 (18.3)
CPP 58	CAD	17	12	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	8 (59.46)
CPP 58	CAD	17	12	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	8 (102.13)
CPP 58	CAD	17	12	LVGGDNLCSGR (65)	8 (43.06)
CPP 58	CAD	17	13	EATLQDCPSGPWGK (52)	7 (24.56)、10 (7.51)
CPP 58	CAD	17	13	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	10 (6.99)
CPP 58	CAD	17	13	GQWGTVCDDGWDIK (56)	7 (17.19)、8 (28.43)、9 (31.71)
CPP 58	CAD	17	13	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	9 (43.62)、11 (52.72)
CPP 58	CAD	17	13	KPIWLSQMSCSGR (63)	11 (22.29)
CPP 58	CAD	17	13	LVGGDNLCSGR (65)	10 (25.89)、9 (14.83)、11 (13.49)
CPP 58	CAD	17	13	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	7 (37.41)、8 (45.01)
CPP 58	CAD	17	14	CSGEEQSLEQCQHR (49)	6 (43.07)
CPP 58	CAD	17	14	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	6 (64.04)
CPP 58	CAD	17	14	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	6 (70.45)
CPP 58	CAD	17	15	CSGEEQSLEQCQHR (49)	6 (36.47)
CPP 58	CAD	17	15	EATLQDCPSGPWGK (52)	6 (28.44)
CPP 58	CAD	17	15	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	6 (66.09)
CPP 58	CAD	17	15	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	6 (68.71)
CPP 58	CAD	17	15	IWLDNVR (61)	6 (13.28)
CPP 58	CAD	17	15	KPIWLSQMSCSGR (63)	6 (33.29)
CPP 58	CAD	17	15	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	6 (55.63)

【００７６】

【表３６】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	CAD	17	16	EATLQDCPSGPWGK (52)	4 (28.39)
CPP 58	CAD	17	16	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	4 (12.46)
CPP 58	CAD	17	16	GQWGTVCDDGWDIK (56)	5 (49.79)
CPP 58	CAD	17	16	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	5 (64.26)
CPP 58	CAD	17	16	IWLDNVR (61)	5 (12.89)
CPP 58	CAD	17	16	LVGGDNLCSGR (65)	4 (39.24)、4 (42.47)
CPP 58	CAD	17	17	EATLQDCPSGPWGK (52)	5 (56.37)
CPP 58	CAD	17	17	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	5 (71.95)
CPP 58	CAD	17	17	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	5 (62.8)
CPP 58	CAD	17	22	KPIWLSQMSCSGR (63)	1 (79.99)
CPP 58	CAD	17	23	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	1 (63.89)
CPP 58	CAD	18	11	CSGEEQSLEQCQHR (49)	12 (35.69)、12 (65.69)、13 (54.6)
CPP 58	CAD	18	11	DVAVLCR (51)	11 (26.46)
CPP 58	CAD	18	11	EATLQDCPSGPWGK (52)	10 (35.1)、12 (82.81)、13 (63.71)、14 (17.85)、14 (20.75)
CPP 58	CAD	18	11	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	11 (67.18)、12 (37.27)、12 (46.48)、13 (36.14)
CPP 58	CAD	18	11	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	12 (42.41)、11 (56.44)、12 (53.44)
CPP 58	CAD	18	11	GQWGTVCDDGWDIK (56)	11 (81.12)、12 (61.41)、12 (70.94)、13 (30.84)
CPP 58	CAD	18	11	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	11 (32.98)
CPP 58	CAD	18	11	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	13 (14.8)、11 (49.55)、11 (64.04)、11 (96.67)、12 (34.87)
CPP 58	CAD	18	11	IWLDNVR (61)	12 (17.6)、12 (19.03)、13 (23.98)

【表３７】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	CAD	18	11	KPIWLSQMSCSGR (63)	11 (42.44)、11 (49.12)、11 (68.66)、12 (45.07)、12 (45.27)
CPP 58	CAD	18	11	LVGGDNLCSGR (65)	13 (51.41)、11 (44.1)、12 (34.86)、14 (30.28)、15 (13.76)
CPP 58	CAD	18	11	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	12 (95.2)、13 (38.51)
CPP 58	CAD	18	12	CSGEEQSLEQCQHR (49)	8 (37.87)、8 (48.33)
CPP 58	CAD	18	12	EATLQDCPSGPWGK (52)	7 (50.43)
CPP 58	CAD	18	12	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	7 (28.25)、7 (48.07)、8 (27.36)、8 (31.05)
CPP 58	CAD	18	12	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	7 (44.16)
CPP 58	CAD	18	12	GQWGTVCDDGWDIK (56)	7 (57.62)、7 (59.87)
CPP 58	CAD	18	12	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	7 (79.55)
CPP 58	CAD	18	12	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	7 (47.33)、7 (68.21)
CPP 58	CAD	18	12	LVGGDNLCSGR (65)	8 (17.48)
CPP 58	CAD	18	12	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	7 (71.36)、8 (59.69)、10 (66.1)、11 (37.71)、12 (46.68)
CPP 58	CAD	18	13	CSGEEQSLEQCQHR (49)	18 (27)

【表３８】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	CAD	18	13	EATLQDCPSGPWGK (52)	7 (38.03)、7 (54.08)、8 (47.28)、9 (17.34)、10 (38.51)、12 (62.23)、13 (53.87)、16 (53.7)、16 (68.89)
CPP 58	CAD	18	13	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	9 (24.21)、14 (48.76)
CPP 58	CAD	18	13	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	7 (34.83)
CPP 58	CAD	18	13	GQWGTVCDDGWDIK (56)	8 (36.35)、8 (53.79)、9 (54.17)、10 (42.29)、13 (28.48)、17 (53.69)
CPP 58	CAD	18	13	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	14 (30.68)、15 (40.55)、20 (53.32)、21 (70.53)、23 (26.84)、16 (37.79)、17 (48.71)、17 (64.22)、22 (63.39)
CPP 58	CAD	18	13	GVWGSVCDDNWGEK (58)	7 (41.85)、7 (52.9)

【表３９】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	CAD	18	13	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	7 (28.99)、8 (63.69)、12 (60.81)、13 (64.77)、14 (77.16)、15 (50.5)、18 (59.45)、19 (62.07)、20 (65.2)、23 (43.8)、16 (23.08)、17 (63.08)
CPP 58	CAD	18	13	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	19 (48.78)、23 (45.41)
CPP 58	CAD	18	13	LVGGDNLCSGR (65)	17 (32.74)、13 (33.14)、14 (22.59)、15 (30.49)、18 (37.96)、19 (40.69)、20 (33.1)、23 (25.51)、24 (21.8)、16 (37.77)、22 (14.01)
CPP 58	CAD	18	13	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	14 (31.24)、21 (50.02)、23 (66.32)、7 (12.75)、7 (48.51)、7 (62.24)、7 (69.62)、9 (69.6)、15 (76.74)、18 (48.52)、19 (54.85)、20 (58.04)、23 (60.38)、24 (72.35)、16 (31.94)、17 (68.07)、22 (41.69)
CPP 58	CAD	18	14	CSGEEQSLEQCQHR (49)	6 (58.75)、6 (61.36)

【表４０】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	CAD	18	14	EATLQDCPSGPWGK (52)	6 (37.84)
CPP 58	CAD	18	14	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	6 (40.14)、6 (49.38)
CPP 58	CAD	18	14	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	6 (59.28)
CPP 58	CAD	18	14	GQWGTVCDDGWDIK (56)	6 (15.49)、6 (49.25)
CPP 58	CAD	18	14	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	6 (46.71)
CPP 58	CAD	18	14	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	6 (57.13)、6 (61.71)
CPP 58	CAD	18	14	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	6 (33.84)、6 (87.23)
CPP 58	CAD	18	14	LVGGDNLCSGR (65)	5 (33.2)
CPP 58	CAD	18	14	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	5 (36.14)、6 (46.4)、6 (84.4)
CPP 58	CAD	18	15	EATLQDCPSGPWGK (52)	6 (35.8)、6 (52.12)
CPP 58	CAD	18	15	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	6 (24.25)、6 (57.47)
CPP 58	CAD	18	15	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	6 (46.44)

【表４１】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	CAD	18	15	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	6 (103.12)
CPP 58	CAD	18	15	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	6 (39.25)、6 (67.21)
CPP 58	CAD	18	15	LVGGDNLCSGR (65)	6 (38.52)
CPP 58	CAD	18	15	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	6 (62.71)、7 (48.1)
CPP 58	CAD	18	16	CSGEEQSLEQCQHR (49)	4 (56.03)、4 (57.26)
CPP 58	CAD	18	16	EATLQDCPSGPWGK (52)	4 (63.31)、5 (34.29)
CPP 58	CAD	18	16	GQWGTVCDDGWDIK (56)	4 (33.11)、4 (64.26)
CPP 58	CAD	18	16	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	4 (79.99)、5 (15.77)
CPP 58	CAD	18	16	GVWGSVCDDNWGEK (58)	4 (41.16)
CPP 58	CAD	18	16	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	4 (76.43)、4 (80.78)、5 (39.33)
CPP 58	CAD	18	16	KCYGPGVGR (62)	4 (16.61)
CPP 58	CAD	18	16	KPIWLSQMSCSGR (63)	4 (28.19)
CPP 58	CAD	18	16	LVGGDNLCSGR (65)	4 (38.82)
CPP 58	CAD	18	16	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	4 (57.75)、5 (74.5)

【表４２】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	CAD	18	17	CSGEEQSLEQCQHR (49)	5 (36.51)、4 (27.5)、4 (56.2)、5 (22.11)
CPP 58	CAD	18	17	EATLQDCPSGPWGK (52)	4 (49.68)、4 (67.6)、5 (53.79)
CPP 58	CAD	18	17	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	4 (32.82)、5 (59.52)
CPP 58	CAD	18	17	GQWGTVCDDGWDIK (56)	4 (69.88)、5 (68.59)
CPP 58	CAD	18	17	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	4 (55.53)、5 (69.08)
CPP 58	CAD	18	17	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	4 (75.15)、5 (70.99)
CPP 58	CAD	18	17	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	4 (107.68)、5 (81.61)、5 (91.79)
CPP 58	CAD	18	17	IWLDNVR (61)	4 (21.84)、5 (19.83)
CPP 58	CAD	18	17	KPIWLSQMSCSGR (63)	5 (59.3)
CPP 58	CAD	18	17	LEVLHK (64)	4 (19.41)
CPP 58	CAD	18	17	LVGGDNLCSGR (65)	4 (52.02)、5 (39.2)
CPP 58	CAD	18	17	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	4 (37.29)、4 (66.15)、4 (71.89)、4 (72.3)、5 (68.54)、5 (87.93)

【表４３】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	CAD	18	18	CSGEEQSLEQCQHR (49)	2 (27.71)、3 (40.43)、3 (51.67)、3 (60.17)
CPP 58	CAD	18	18	EATLQDCPSGPWGK (52)	2 (69.46)、3 (74.62)
CPP 58	CAD	18	18	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	2 (36.85)、3 (26.52)、3 (64.63)
CPP 58	CAD	18	18	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	3 (36.09)、3 (46.47)
CPP 58	CAD	18	18	GQWGTVCDDGWDIK (56)	2 (43.68)、3 (68.87)
CPP 58	CAD	18	18	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	2 (60.17)、3 (69.71)
CPP 58	CAD	18	18	GVWGSVCDDNWGEK (58)	3 (28.18)
CPP 58	CAD	18	18	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	2 (68.19)、3 (84.82)
CPP 58	CAD	18	18	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	2 (41.9)、3 (49.86)、3 (73.39)、3 (111.51)

【表４４】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	CAD	18	18	IWLDNVR (61)	3 (17.78)、3 (20.54)
CPP 58	CAD	18	18	KPIWLSQMSCSGR (63)	3 (38.24)、3 (67.31)
CPP 58	CAD	18	18	LEVLHK (64)	2 (34.17)、3 (17.42)
CPP 58	CAD	18	18	LVGGDNLCSGR (65)	3 (38.85)、2 (51.05)
CPP 58	CAD	18	18	LVGGLHR (66)	3 (30.94)
CPP 58	CAD	18	18	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	3 (71.32)
CPP 58	CAD	18	19	CSGEEQSLEQCQHR (49)	3 (46.64)、3 (55.6)
CPP 58	CAD	18	19	EATLQDCPSGPWGK (52)	3 (55.49)
CPP 58	CAD	18	19	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	3 (29.72)
CPP 58	CAD	18	19	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	3 (63.18)、3 (63.81)
CPP 58	CAD	18	19	GQWGTVCDDGWDIK (56)	3 (48.7)、3 (67.15)

【表４５】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	CAD	18	19	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	3 (80.37)
CPP 58	CAD	18	19	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	4 (54.11)、3 (74.82)
CPP 58	CAD	18	19	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	3 (35.84)、3 (49.72)、3 (82.16)
CPP 58	CAD	18	19	IWLDNVR (61)	3 (21.88)
CPP 58	CAD	18	19	KPIWLSQMSCSGR (63)	3 (27.32)、3 (44.08)、3 (56.9)、3 (71.41)、3 (73.29)
CPP 58	CAD	18	19	LVGGDNLCSGR (65)	3 (46.42)
CPP 58	CAD	18	19	LVGGLHR (66)	3 (25.1)
CPP 58	CAD	18	19	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	3 (31.3)、3 (67.62)、4 (85.88)
CPP 58	CAD	18	20	EATLQDCPSGPWGK (52)	2 (44.65)、2 (52.34)

【表４６】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	CAD	18	20	LVGGDNLCSGR (65)	1 (39.13)
CPP 58	CAD	18	21	EATLQDCPSGPWGK (52)	1 (24.13)、2 (62.03)
CPP 58	CAD	18	21	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	2 (54.4)、1 (18.43)、1 (53.29)、2 (23.47)
CPP 58	CAD	18	21	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	2 (39.23)
CPP 58	CAD	18	21	GQWGTVCDDGWDIK (56)	1 (38)
CPP 58	CAD	18	21	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	1 (36.94)、2 (76.17)
CPP 58	CAD	18	21	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	1 (90.55)、2 (76.38)
CPP 58	CAD	18	21	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	1 (83.5)
CPP 58	CAD	18	21	LVGGDNLCSGR (65)	2 (31)
CPP 58	CAD	18	21	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	1 (94.27)、2 (65.8)
CPP 58	CAD	18	23	CSGEEQSLEQCQHR (49)	1 (31.71)
CPP 58	CAD	18	23	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	1 (41.37)
CPP 58	CAD	18	23	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	1 (64.44)
CPP 58	CAD	18	23	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	1 (61.24)

【表４７】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	CAD	18	27	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	1 (40.59)
CPP 58	CAD	18	27	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	1 (65.71)
CPP 58	CAD	18	28	EATLQDCPSGPWGK (52)	1 (55.62)
CPP 58	CAD	18	28	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	1 (39.44)、1 (75.24)、1 (75.67)
CPP 58	CAD	18	28	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	1 (70.63)
CPP 58	CAD	18	30	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	1 (13.41)
CPP 58	CAD	18	30	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	1 (77.52)
CPP 58	対照	17	10	CSGEEQSLEQCQHR (49)	11 (32.59)、11 (47.49)、12 (18.69)
CPP 58	対照	17	10	EATLQDCPSGPWGK (52)	10 (48.41)、11 (46.67)、11 (62.53)
CPP 58	対照	17	10	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	10 (40.86)
CPP 58	対照	17	10	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEKEQK (54)	11 (41.53)
CPP 58	対照	17	10	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	11 (20.86)、11 (25.64)
CPP 58	対照	17	10	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	11 (66.95)、11 (76.72)
CPP 58	対照	17	10	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	11 (55.53)、11 (82.46)

【表４８】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	17	10	IWLDNVR (61)	11 (15.46)
CPP 58	対照	17	10	KPIWLSQMSCSGR (63)	10 (53.83)、10 (58.74)、12 (27.11)
CPP 58	対照	17	10	LVGGDNLCSGR (65)	10 (22.17)、11 (24.9)
CPP 58	対照	17	10	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	10 (76.98)、10 (81.95)、11 (73.36)、12 (25.02)
CPP 58	対照	17	11	CSGEEQSLEQCQHR (49)	10 (45.52)、11 (27.88)、11 (38.93)、12 (51.6)、13 (36.22)、14 (41.44)、15 (23.91)、9 (33.13)
CPP 58	対照	17	11	CYGPGVGR (50)	12 (15.91)
CPP 58	対照	17	11	EATLQDCPSGPWGK (52)	11 (60.5)、10 (39.12)、12 (50.82)、12 (50.87)

【表４９】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	17	11	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	11 (18.96)、9 (39.09)、10 (68.4)、11 (57.13)、12 (43.99)、13 (39.24)、13 (57.66)、14 (15.33)、11 (44.54)
CPP 58	対照	17	11	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	10 (12.03)、11 (21.08)、11 (22.7)
CPP 58	対照	17	11	GQWGTVCDDGWDIK (56)	11 (42.94)、10 (58.3)、11 (53.07)、11 (75.68)
CPP 58	対照	17	11	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	10 (48.97)、10 (50.32)、11 (74.92)、9 (46.86)、11 (33.03)
CPP 58	対照	17	11	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	11 (65.77)、12 (30.01)、12 (62.95)、9 (32.38)、11 (75.23)、12 (35.43)
CPP 58	対照	17	11	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	10 (19.65)、9 (51.31)、10 (84.2)、11 (20.25)、11 (75.48)、12 (72.22)、11 (101.27)、12 (58.29)
CPP 58	対照	17	11	IWLDNVR (61)	13 (19.74)、11 (11.87)、11 (13.75)

【００７７】

【表５０】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	17	11	KPIWLSQMSCSGR (63)	10 (65.57)、11 (24.86)、12 (26.98)、12 (65.74)、13 (30.14)、11 (36.49)、12 (26.41)
CPP 58	対照	17	11	LVGGDNLCSGR (65)	12 (37.24)、9 (24.19)、10 (37.1)、12 (24.52)、14 (26.91)、15 (13.25)、9 (49.15)、11 (43.44)、11 (48.69)、14 (16.86)
CPP 58	対照	17	11	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	9 (20.8)、10 (95.7)、11 (65.7)、11 (76.24)、13 (49.94)、11 (31.67)、12 (22.69)、12 (63.44)
CPP 58	対照	17	12	CSGEEQSLEQCQHR (49)	7 (66.19)、8 (42.49)
CPP 58	対照	17	12	EATLQDCPSGPWGK (52)	7 (37.28)
CPP 58	対照	17	12	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	7 (28.52)、8 (54.36)
CPP 58	対照	17	12	GQWGTVCDDGWDIK (56)	8 (46.67)、7 (61.18)、7 (61.43)
CPP 58	対照	17	12	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	7 (53.55)、8 (69.14)、7 (83.46)
CPP 58	対照	17	12	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	7 (45.59)、8 (66.5)

【表５１】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	17	12	IWLDNVR (61)	7 (17.34)
CPP 58	対照	17	12	KPIWLSQMSCSGR (63)	7 (20.29)
CPP 58	対照	17	12	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	8 (60.02)、8 (77.09)、7 (73.61)
CPP 58	対照	17	13	CSGEEQSLEQCQHR (49)	8 (57.48)
CPP 58	対照	17	13	EATLQDCPSGPWGK (52)	7 (38.88)、8 (45.06)
CPP 58	対照	17	13	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	7 (24.28)、7 (15.54)、7 (31.37)、8 (15.44)
CPP 58	対照	17	13	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	7 (18.4)
CPP 58	対照	17	13	GQWGTVCDDGWDIK (56)	8 (28.53)、7 (59.62)、8 (59.97)、8 (70.71)
CPP 58	対照	17	13	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	8 (41.33)、7 (70.41)、8 (72.4)

【表５２】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	17	13	GVWGSVCDDNWGEK (58)	8 (61.65)
CPP 58	対照	17	13	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	8 (74.21)、8 (73.94)
CPP 58	対照	17	13	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	7 (90.46)、8 (84.77)
CPP 58	対照	17	13	IWLDNVR (61)	7 (15.9)、8 (9.27)
CPP 58	対照	17	13	KPIWLSQMSCSGR (63)	7 (69.63)、8 (9.83)、8 (77.25)
CPP 58	対照	17	13	LEVLHK (64)	8 (11.57)
CPP 58	対照	17	13	LVGGDNLCSGR (65)	7 (24.46)、7 (24.05)、8 (29.47)
CPP 58	対照	17	13	LVGGLHR (66)	7 (11.25)
CPP 58	対照	17	13	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	8 (64.47)、8 (37.96)、8 (71.87)
CPP 58	対照	17	14	CSGEEQSLEQCQHR (49)	6 (42.84)、6 (57.36)、6 (26.76)、6 (31.36)
CPP 58	対照	17	14	CYGPGVGR (50)	6 (20.13)

【表５３】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	17	14	EATLQDCPSGPWGK (52)	6 (44.56)
CPP 58	対照	17	14	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	5 (26.87)、6 (20.52)、6 (59.78)、6 (45.15)
CPP 58	対照	17	14	GQWGTVCDDGWDIK (56)	6 (60.41)
CPP 58	対照	17	14	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	5 (15.07)、6 (50.05)、6 (90.79)
CPP 58	対照	17	14	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	6 (46.4)、6 (81.84)
CPP 58	対照	17	14	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	5 (55.52)、6 (39.94)、6 (98.49)、6 (104.94)
CPP 58	対照	17	14	KCYGPGVGR (62)	6 (15.45)
CPP 58	対照	17	14	KPIWLSQMSCSGR (63)	6 (43.5)、6 (83.92)
CPP 58	対照	17	14	LVGGDNLCSGR (65)	5 (47.97)、6 (42.34)
CPP 58	対照	17	14	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	5 (32.35)、6 (64.21)、6 (63.13)、7 (51.92)

【表５４】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	17	15	CSGEEQSLEQCQHR (49)	6 (44.8)
CPP 58	対照	17	15	CYGPGVGR (50)	6 (16.53)
CPP 58	対照	17	15	EATLQDCPSGPWGK (52)	6 (31.62)
CPP 58	対照	17	15	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	6 (36.67)、6 (35.12)
CPP 58	対照	17	15	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	6 (23.86)
CPP 58	対照	17	15	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	6 (68.03)、6 (82.51)
CPP 58	対照	17	15	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	6 (38.82)、6 (70.45)
CPP 58	対照	17	15	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	6 (20.28)、6 (109.97)、6 (44.69)
CPP 58	対照	17	15	KPIWLSQMSCSGR (63)	6 (30.25)、6 (52.66)

【表５５】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	17	15	LVGGDNLCSGR (65)	6 (39.76)、5 (28.86)、6 (25.73)
CPP 58	対照	17	15	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	7 (69.8)、6 (29.53)
CPP 58	対照	17	16	CSGEEQSLEQCQHR (49)	4 (23.14)、4 (50.12)、5 (61.18)
CPP 58	対照	17	16	EATLQDCPSGPWGK (52)	4 (18.18)
CPP 58	対照	17	16	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	5 (50.96)、5 (37.7)、4 (10.11)
CPP 58	対照	17	16	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	5 (20.54)
CPP 58	対照	17	16	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	4 (44.48)、5 (60.36)
CPP 58	対照	17	16	LVGGDNLCSGR (65)	4 (37.44)、4 (27.87)、5 (11.19)
CPP 58	対照	17	16	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	4 (49.77)、5 (97.82)、4 (44.59)、5 (77.92)

【表５６】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	17	17	EATLQDCPSGPWGK (52)	5 (54.49)
CPP 58	対照	17	17	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	4 (20.4)、4 (61.28)
CPP 58	対照	17	17	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	4 (50.76)、5 (56.32)
CPP 58	対照	17	17	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	4 (29.39)、5 (48.15)
CPP 58	対照	17	17	IWLDNVR (61)	5 (5.05)
CPP 58	対照	17	17	KPIWLSQMSCSGR (63)	4 (13.49)、5 (4.35)
CPP 58	対照	17	17	LVGGDNLCSGR (65)	4 (33.71)、5 (35.63)
CPP 58	対照	17	17	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	5 (19.72)、4 (53.07)、5 (63.2)
CPP 58	対照	17	18	CSGEEQSLEQCQHR (49)	3 (52.7)
CPP 58	対照	17	18	CYGPGVGR (50)	3 (10.22)
CPP 58	対照	17	18	EATLQDCPSGPWGK (52)	3 (54.81)、3 (71.46)
CPP 58	対照	17	18	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	3 (48.34)、4 (38.51)
CPP 58	対照	17	18	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	3 (44.25)、3 (36.93)
CPP 58	対照	17	18	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	4 (36.16)
CPP 58	対照	17	18	IWLDNVR (61)	3 (15.7)
CPP 58	対照	17	18	KPIWLSQMSCSGR (63)	3 (69.39)、3 (74.54)
CPP 58	対照	17	18	LVGGDNLCSGR (65)	3 (39.08)、3 (19.78)

【表５７】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	17	18	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	3 (64.46)、3 (66.26)
CPP 58	対照	17	19	CSGEEQSLEQCQHR (49)	3 (26.46)
CPP 58	対照	17	19	EATLQDCPSGPWGK (52)	3 (48.11)
CPP 58	対照	17	19	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	3 (21.17)
CPP 58	対照	17	19	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	3 (64.13)
CPP 58	対照	17	19	IWLDNVR (61)	3 (11.87)
CPP 58	対照	17	19	KPIWLSQMSCSGR (63)	3 (19.53)
CPP 58	対照	17	19	LVGGDNLCSGR (65)	3 (38.89)
CPP 58	対照	17	19	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	3 (71.52)
CPP 58	対照	17	20	EATLQDCPSGPWGK (52)	1 (48.88)、2 (16.79)、2 (20.9)、2 (64.54)
CPP 58	対照	17	20	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	1 (68.3)、2 (22.17)、2 (66.93)

【表５８】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	17	20	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	2 (16.94)
CPP 58	対照	17	20	GQWGTVCDDGWDIK (56)	1 (41.61)
CPP 58	対照	17	20	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	2 (28.72)、2 (62.46)
CPP 58	対照	17	20	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	2 (63.91)
CPP 58	対照	17	20	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	1 (46.83)、1 (26.52)、2 (79.32)
CPP 58	対照	17	20	IWLDNVR (61)	2 (7.12)
CPP 58	対照	17	20	KPIWLSQMSCSGR (63)	2 (26.89)、2 (49.83)、2 (61.82)
CPP 58	対照	17	20	LVGGDNLCSGR (65)	2 (33.88)、2 (11.85)
CPP 58	対照	17	20	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	1 (65.37)、2 (78.89)
CPP 58	対照	17	21	CSGEEQSLEQCQHR (49)	1 (33.63)、2 (60.41)
CPP 58	対照	17	21	CYGPGVGR (50)	2 (28.2)、3 (10.81)
CPP 58	対照	17	21	EATLQDCPSGPWGK (52)	2 (48.67)、2 (64.73)
CPP 58	対照	17	21	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	1 (35.1)、2 (31.51)、2 (53.45)、2 (73.17)、1 (39.37)、2 (60.49)

【表５９】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	17	21	GQWGTVCDDGWDIK (56)	2 (73.16)
CPP 58	対照	17	21	GVWGSVCDDNWGEK (58)	2 (12.02)
CPP 58	対照	17	21	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	2 (70.11)
CPP 58	対照	17	21	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	1 (13.1)、2 (77.28)
CPP 58	対照	17	21	IWLDNVR (61)	2 (7.65)
CPP 58	対照	17	21	KPIWLSQMSCSGR (63)	2 (36.03)、2 (15.69)
CPP 58	対照	17	21	LVGGDNLCSGR (65)	1 (16.23)、2 (40.92)、1 (26.27)、2 (23.14)
CPP 58	対照	17	21	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	1 (64.65)、2 (61.86)、2 (81.94)、3 (62.17)
CPP 58	対照	17	22	EATLQDCPSGPWGK (52)	1 (38.9)、1 (56.64)
CPP 58	対照	17	22	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	1 (24.07)、1 (43.23)
CPP 58	対照	17	22	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEKEQK (54)	1 (52.49)

【００７８】

【表６０】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	17	22	GQWGTVCDDGWDIK (56)	1 (60.72)
CPP 58	対照	17	22	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	1 (50.27)、1 (50.4)、1 (50.82)
CPP 58	対照	17	22	LVGGDNLCSGR (65)	1 (34.59)
CPP 58	対照	17	22	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	1 (76.35)、1 (79.36)
CPP 58	対照	17	23	CSGEEQSLEQCQHR (49)	1 (31.56)、1 (33.39)
CPP 58	対照	17	23	EATLQDCPSGPWGK (52)	1 (13.72)
CPP 58	対照	17	23	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	1 (29.35)
CPP 58	対照	17	23	GQWGTVCDDGWDIK (56)	1 (46.83)、1 (65.92)
CPP 58	対照	17	23	GVWGSVCDDNWGEK (58)	1 (18.9)
CPP 58	対照	17	23	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	1 (81.26)
CPP 58	対照	17	23	IWLDNVR (61)	1 (13.38)
CPP 58	対照	17	23	KPIWLSQMSCSGR (63)	1 (30.08)
CPP 58	対照	17	23	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	1 (64.5)、1 (38.4)
CPP 58	対照	17	28	IWLDNVR (61)	1 (16.05)
CPP 58	対照	17	28	LVGGDNLCSGR (65)	1 (23)
CPP 58	対照	17	28	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	1 (33.72)
CPP 58	対照	17	29	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	1 (53.25)
CPP 58	対照	17	30	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	1 (24.14)

【表６１】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	18	11	CSGEEQSLEQCQHR (49)	9 (37.51)、9 (15.32)、9 (16.6)、9 (38.31)、10 (30.22)、11 (23.53)、14 (22.55)、14 (35.87)
CPP 58	対照	18	11	DVAVLCR (51)	10 (11.91)
CPP 58	対照	18	11	EATLQDCPSGPWGK (52)	9 (48.54)、10 (54.75)、11 (52.49)、11 (53.72)、12 (68.71)、13 (29.75)
CPP 58	対照	18	11	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	10 (27.5)、10 (37.97)、11 (22.43)、11 (50.97)、13 (38.31)
CPP 58	対照	18	11	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEKEQK (54)	9 (39.22)、9 (15.27)、14 (19.32)
CPP 58	対照	18	11	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	10 (24.22)
CPP 58	対照	18	11	GQWGTVCDDGWDIK (56)	10 (49.12)、11 (36.92)

【表６２】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	18	11	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	9 (48.74)、10 (51.47)、11 (61.89)
CPP 58	対照	18	11	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	9 (17.45)、10 (60.34)、12 (41.42)、12 (79)
CPP 58	対照	18	11	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	10 (31.63)、9 (90.63)、10 (85.18)、11 (66.39)、11 (91.85)、12 (94.81)、13 (58.32)
CPP 58	対照	18	11	IWLDNVR (61)	10 (12.4)、11 (13.03)
CPP 58	対照	18	11	KPIWLSQMSCSGR (63)	11 (54.11)、10 (35.58)、10 (60.89)、13 (47.32)
CPP 58	対照	18	11	LEVLHK (64)	10 (14.54)
CPP 58	対照	18	11	LVGGDNLCSGR (65)	9 (20.57)、11 (30.34)、12 (13.97)、12 (24.55)、12 (46.05)、13 (24.61)
CPP 58	対照	18	11	LVGGLHR (66)	9 (14.19)

【表６３】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	18	11	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	10 (67.41)、11 (65.64)、12 (79.76)、13 (17.75)
CPP 58	対照	18	12	EATLQDCPSGPWGK (52)	7 (61.53)
CPP 58	対照	18	12	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	8 (60.31)、12 (36.98)
CPP 58	対照	18	12	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	7 (20.18)、9 (12.18)
CPP 58	対照	18	12	GQWGTVCDDGWDIK (56)	8 (51.38)、7 (71.72)
CPP 58	対照	18	12	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	7 (53.32)
CPP 58	対照	18	12	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	7 (70.53)
CPP 58	対照	18	12	IWLDNVR (61)	8 (12.14)
CPP 58	対照	18	12	LVGGDNLCSGR (65)	13 (20.83)

【表６４】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	18	12	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	7 (79.93)、8 (67.04)、9 (54.95)
CPP 58	対照	18	13	CSGEEQSLEQCQHR (49)	7 (27.19)
CPP 58	対照	18	13	DVAVLCR (51)	7 (10.14)
CPP 58	対照	18	13	EATLQDCPSGPWGK (52)	8 (61.17)
CPP 58	対照	18	13	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	7 (23.24)、7 (37.4)、8 (18.78)、8 (21.68)
CPP 58	対照	18	13	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	7 (31.22)
CPP 58	対照	18	13	GQWGTVCDDGWDIK (56)	7 (62.15)、8 (51.44)
CPP 58	対照	18	13	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	7 (67.62)
CPP 58	対照	18	13	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	7 (79.11)、8 (62.4)
CPP 58	対照	18	13	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	7 (90.71)、8 (70.46)

【表６５】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	18	13	IWLDNVR (61)	7 (13.3)
CPP 58	対照	18	13	KPIWLSQMSCSGR (63)	7 (28.01)、7 (32.94)、7 (37.64)、8 (9.8)
CPP 58	対照	18	13	LEVLHK (64)	7 (13)
CPP 58	対照	18	13	LVGGDNLCSGR (65)	7 (31.1)、8 (40.78)、12 (14.15)
CPP 58	対照	18	13	LVGGLHR (66)	7 (21.07)
CPP 58	対照	18	13	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	8 (78.26)、9 (38.63)
CPP 58	対照	18	14	CSGEEQSLEQCQHR (49)	6 (36.32)
CPP 58	対照	18	14	EATLQDCPSGPWGK (52)	6 (52.96)
CPP 58	対照	18	14	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	6 (56.34)、6 (48.66)
CPP 58	対照	18	14	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	6 (58.66)
CPP 58	対照	18	14	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	6 (67.05)
CPP 58	対照	18	14	IWLDNVR (61)	6 (15.9)

【表６６】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	18	14	KPIWLSQMSCSGR (63)	6 (11.06)、6 (29.07)、6 (47.68)
CPP 58	対照	18	14	LVGGDNLCSGR (65)	6 (24.51)
CPP 58	対照	18	14	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	6 (10.35)、6 (43.14)、6 (58.51)
CPP 58	対照	18	16	CSGEEQSLEQCQHR (49)	5 (21.52)
CPP 58	対照	18	16	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	5 (60.48)
CPP 58	対照	18	16	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	5 (30.85)
CPP 58	対照	18	16	LVGGDNLCSGR (65)	5 (33.52)
CPP 58	対照	18	16	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	5 (56.52)
CPP 58	対照	18	17	CSGEEQSLEQCQHR (49)	4 (14.99)、4 (62.53)
CPP 58	対照	18	17	EATLQDCPSGPWGK (52)	5 (18.82)
CPP 58	対照	18	17	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	5 (54.11)、4 (75.91)
CPP 58	対照	18	17	LVGGDNLCSGR (65)	5 (38.01)
CPP 58	対照	18	17	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	4 (54.11)、4 (43.53)、5 (77.84)
CPP 58	対照	18	18	CSGEEQSLEQCQHR (49)	3 (30.4)

【表６７】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	18	18	EATLQDCPSGPWGK (52)	3 (45.91)
CPP 58	対照	18	18	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	3 (37.6)
CPP 58	対照	18	18	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	3 (26.12)、3 (30.45)
CPP 58	対照	18	18	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	3 (70.96)
CPP 58	対照	18	18	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	3 (83.26)
CPP 58	対照	18	18	IWLDNVR (61)	3 (17.74)
CPP 58	対照	18	18	KPIWLSQMSCSGR (63)	3 (63.42)
CPP 58	対照	18	18	LEVLHK (64)	3 (24.36)
CPP 58	対照	18	18	LVGGDNLCSGR (65)	2 (25.38)、2 (38.86)、3 (44)
CPP 58	対照	18	18	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	3 (54.59)、3 (71.52)
CPP 58	対照	18	19	CSGEEQSLEQCQHR (49)	3 (48.49)、3 (63.96)

【表６８】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	18	19	CYGPGVGR (50)	3 (11.98)
CPP 58	対照	18	19	EATLQDCPSGPWGK (52)	3 (33.47)、3 (62.07)
CPP 58	対照	18	19	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	3 (37.13)
CPP 58	対照	18	19	GQWGTVCDDGWDIK (56)	3 (68.87)
CPP 58	対照	18	19	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	3 (87.76)
CPP 58	対照	18	19	GVWGSVCDDNWGEK (58)	3 (45.09)
CPP 58	対照	18	19	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	3 (53.65)、3 (99.85)
CPP 58	対照	18	19	IWLDNVR (61)	3 (18.76)
CPP 58	対照	18	19	KPIWLSQMSCSGR (63)	3 (42.82)、3 (69.08)、3 (71.28)
CPP 58	対照	18	19	LVGGDNLCSGR (65)	3 (36.42)
CPP 58	対照	18	19	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	3 (22.7)、3 (74.11)

【表６９】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	18	20	CSGEEQSLEQCQHR (49)	1 (64.07)
CPP 58	対照	18	20	EATLQDCPSGPWGK (52)	2 (67.29)
CPP 58	対照	18	20	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	2 (21.85)
CPP 58	対照	18	20	FWGFHDCTHQEDVAVICSG (55)	2 (28.89)
CPP 58	対照	18	20	GQWGTVCDDGWDIK (56)	2 (79.23)
CPP 58	対照	18	20	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	2 (44.3)、2 (80.97)
CPP 58	対照	18	20	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	2 (81.38)
CPP 58	対照	18	20	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	2 (22.32)、2 (69.58)、2 (83.22)
CPP 58	対照	18	20	IWLDNVR (61)	2 (23.07)
CPP 58	対照	18	20	KPIWLSQMSCSGR (63)	2 (13.62)、2 (14.67)、2 (59.96)
CPP 58	対照	18	20	LVGGDNLCSGR (65)	2 (42.09)
CPP 58	対照	18	20	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	2 (59.58)、2 (37.68)

【００７９】

【表７０】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	18	21	EATLQDCPSGPWGK (52)	2 (35.06)
CPP 58	対照	18	21	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	1 (16.69)、2 (75.75)
CPP 58	対照	18	21	HQNQWYTVCQTGWSLR (60)	2 (92.97)
CPP 58	対照	18	21	IWLDNVR (61)	2 (13.3)
CPP 58	対照	18	21	LVGGDNLCSGR (65)	1 (32.72)、2 (38.3)
CPP 58	対照	18	21	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	1 (34.97)、2 (35.57)、2 (93.56)
CPP 58	対照	18	22	EATLQDCPSGPWGK (52)	1 (32.43)
CPP 58	対照	18	22	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEKEQK (54)	1 (51.59)
CPP 58	対照	18	22	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	1 (70.96)
CPP 58	対照	18	22	IWLDNVR (61)	1 (14.15)、1 (16.11)

【表７１】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 58	対照	18	22	KPIWLSQMSCSGR (63)	1 (75.7)
CPP 58	対照	18	22	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	1 (85.13)
CPP 58	対照	18	23	EATLQDCPSGPWGK (52)	1 (34.07)、1 (56.55)
CPP 58	対照	18	23	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	1 (15.15)、1 (19.32)
CPP 58	対照	18	23	GQWGTVCDDGWDIKDVAVLCR (57)	1 (20.3)
CPP 58	対照	18	23	GVWGSVCDDNWGEKEDQVVCK (59)	1 (82.79)
CPP 58	対照	18	23	LVGGDNLCSGR (65)	1 (42.67)
CPP 58	対照	18	23	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	1 (75.74)
CPP 58	対照	18	26	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	1 (69.25)
CPP 58	対照	18	26	LVGGDNLCSGR (65)	1 (15.22)
CPP 58	対照	18	27	NTCNHDEDTWVECEDPFDLR (67)	1 (47.49)
CPP 58	対照	18	28	KPIWLSQMSCSGR (63)	1 (45.58)
CPP 58	対照	18	30	ELGCGAASGTPSGILYEPPAEK (53)	1 (27.07)

【表７２】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 59	CAD	15	9	KQEPSLGCSIPAILFLPR (285)	9 (67.55)、9 (65.35)
CPP 59	CAD	15	9	QEPSLGCSIPAILFLPR (286)	9 (45.92)
CPP 59	CAD	17	12	ELWVQQLMQHLDK (284)	7 (27.26)
CPP 59	対照	16	10	KQEPSLGCSIPAILFLPR (285)	7 (28.89)
CPP 59	対照	16	12	ELWVQQLMQHLDK (284)	7 (14.43)、7 (34.68)
CPP 59	対照	16	12	KQEPSLGCSIPAILFLPR (285)	6 (25.2)
CPP 59	対照	17	11	ELWVQQLMQHLDK (284)	8 (32.56)、8 (17.24)
CPP 59	対照	17	11	KQEPSLGCSIPAILFLPR (285)	7 (25.35)、8 (12.17)
CPP 60	対照	12	18	VAQELEEKLNILNNNYK (110)	8 (50.62)、8 (39.98)
CPP 61	対照	10	19	AQPVQVAEGSEPDGFWEALGGK (111)	8 (38.33)
CPP 61	対照	10	19	YIETDPANR (112)	7 (24.52)
CPP 62	対照	17	23	FYNQVSTPLLR (109)	7 (27.87)
CPP 63	CAD	13	23	LQSLFDSPDFSK (117)	8 (44.05)
CPP 63	対照	12	22	DTDTGALLFIGK (114)	8 (22.41)
CPP 63	対照	13	19	DTDTGALLFIGK (114)	9 (23.24)
CPP 63	対照	13	22	ALYYDLISSPDIHGTYK (113)	8 (37.16)

【表７３】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 63	対照	13	22	DTDTGALLFIGK (114)	8 (57.05)、9 (54.97)
CPP 63	対照	13	22	IAQLPLTGSMSIIFFLPLK (115)	8 (38.21)
CPP 63	対照	13	22	LAAAVSNFGYDLYR (116)	8 (35.9)、8 (31.69)
CPP 63	対照	13	22	LQSLFDSPDFSK (117)	8 (58.5)、9 (41.62)
CPP 63	対照	13	22	TVQAVLTVPK (118)	8 (35.68)、9 (51.18)
CPP 64	CAD	14	12	DGWQWFWSPSTFR (72)	9 (34.91)
CPP 64	CAD	14	13	AWFLESK (71)	11 (20.37)
CPP 64	CAD	14	13	DGWQWFWSPSTFR (72)	11 (63.52)
CPP 64	CAD	14	13	GFMQTYYDDHLR (75)	11 (19.29)
CPP 64	CAD	14	14	GFMQTYYDDHLR (75)	8 (15.84)
CPP 64	CAD	14	15	DGWQWFWSPSTFR (72)	10 (23.12)、9 (45.72)
CPP 64	CAD	14	15	GFMQTYYDDHLR (75)	9 (44.98)
CPP 64	CAD	14	17	DGWQWFWSPSTFR (72)	8 (44.67)
CPP 64	CAD	15	13	AWFLESK (71)	8 (19.61)

【表７４】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	CAD	15	13	DGWQWFWSPSTFR (72)	10 (32.9)、8 (31.84)、9 (37.71)、9 (35.16)
CPP 64	CAD	15	13	GFMQTYYDDHLR (75)	9 (28.76)
CPP 64	CAD	15	15	AWFLESK (71)	9 (17.39)
CPP 64	CAD	15	15	DGWQWFWSPSTFR (72)	9 (31.64)
CPP 64	CAD	15	15	ELLETVVNR (74)	9 (31.84)
CPP 64	CAD	15	15	GFMQTYYDDHLR (75)	9 (17)
CPP 64	CAD	15	16	DGWQWFWSPSTFR (72)	7 (56.31)
CPP 64	CAD	15	16	ELLETVVNR (74)	8 (47.75)
CPP 64	CAD	15	16	MKELLETVVNR (78)	7 (57.45)
CPP 64	CAD	15	17	ELLETVVNR (74)	9 (31.27)、10 (39.45)
CPP 64	CAD	15	17	GFMQTYYDDHLR (75)	9 (31.57)、9 (32.66)
CPP 64	CAD	15	18	DGWQWFWSPSTFR (72)	6 (31.92)
CPP 64	CAD	15	18	GFMQTYYDDHLR (75)	7 (54.39)
CPP 64	CAD	16	11	AWFLESK (71)	13 (25.82)
CPP 64	CAD	16	11	DGWQWFWSPSTFR (72)	13 (41.45)、12 (36.06)
CPP 64	CAD	16	11	ELLETVVNR (74)	13 (32.18)

【表７５】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	CAD	16	13	AWFLESK (71)	10 (18.55)、13 (15.73)、14 (16.9)
CPP 64	CAD	16	13	DGWQWFWSPSTFR (72)	11 (41.87)、9 (31.85)、14 (22.68)、13 (25.11)、10 (26.26)、16 (18.28)、10 (21.97)
CPP 64	CAD	16	13	ELLETVVNR (74)	14 (26.19)、13 (31.86)、10 (50.87)
CPP 64	CAD	16	13	GFMQTYYDDHLR (75)	14 (35.06)、12 (47.46)、12 (20.78)、14 (31.62)、8 (22.92)、13 (54.27)、11 (13.87)、11 (36.28)、10 (70.01)、11 (62.41)、13 (41.02)、14 (25.82)、10 (24.91)、9 (25.61)、14 (29.73)、10 (30.53)、10 (58.11)
CPP 64	CAD	16	13	MKELLETVVNR (78)	10 (32.47)
CPP 64	CAD	16	14	DGWQWFWSPSTFR (72)	9 (19.91)、7 (25.52)

【表７６】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	CAD	16	14	ELLETVVNR (74)	9 (38.19)、7 (39.32)
CPP 64	CAD	16	14	GFMQTYYDDHLR (75)	9 (41.67)、8 (38.59)、7 (22.86)
CPP 64	CAD	16	15	AWFLESK (71)	17 (19.41)、8 (23.7)
CPP 64	CAD	16	15	DGWQWFWSPSTFR (72)	9 (32.55)、14 (43.33)、9 (24.89)、16 (62.51)、8 (26.84)、15 (49.73)
CPP 64	CAD	16	15	ELLETVVNR (74)	16 (29.72)、14 (30.4)、8 (47.83)、9 (46.36)、11 (36.23)、10 (35.79)、7 (38.56)
CPP 64	CAD	16	15	GFMQTYYDDHLR (75)	14 (29.44)、14 (29.5)、7 (32.15)、14 (45.78)

【表７７】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	CAD	16	15	MKELLETVVNR (78)	16 (58.87)、14 (50.1)、17 (49.65)、16 (58.02)
CPP 64	CAD	16	15	TRDGWQWFWSPSTFR (80)	15 (49.09)
CPP 64	CAD	16	16	AWFLESK (71)	7 (23.23)
CPP 64	CAD	16	16	DGWQWFWSPSTFR (72)	8 (44.74)
CPP 64	CAD	16	16	ELLETVVNR (74)	8 (42.41)、7 (48.86)
CPP 64	CAD	16	16	GFMQTYYDDHLR (75)	8 (55.45)、8 (72.71)
CPP 64	CAD	16	17	AWFLESK (71)	15 (20.01)、8 (19.28)、17 (16.63)、18 (21.77)、9 (20.73)、9 (13.43)、16 (22.57)、18 (27.52)
CPP 64	CAD	16	17	DGWQWFWSPSTFR (72)	6 (24.08)、7 (32.96)、18 (43.12)、15 (12.69)、18 (49.39)、17 (36.98)

【表７８】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	CAD	16	17	DLGPLTK (73)	9 (30.95)
CPP 64	CAD	16	17	ELLETVVNR (74)	18 (38.49)、19 (21.8)、17 (43.78)、16 (36.7)
CPP 64	CAD	16	17	GFMQTYYDDHLR (75)	16 (34.52)、15 (37.46)、17 (38.4)、18 (15.74)、8 (51.98)、17 (24.99)、15 (49.12)、8 (37.13)、17 (65.33)、16 (23.19)、9 (51.4)、7 (35.57)、8 (50.09)
CPP 64	CAD	16	17	MKELLETVVNR (78)	18 (23.08)
CPP 64	CAD	16	17	WSLVR (81)	18 (26.71)
CPP 64	CAD	16	18	DGWQWFWSPSTFR (72)	6 (61.57)、4 (35.33)、6 (49.41)
CPP 64	CAD	16	18	ELLETVVNR (74)	6 (41.55)
CPP 64	CAD	16	20	AWFLESK (71)	3 (18.93)
CPP 64	CAD	16	20	ELLETVVNR (74)	5 (41.23)、4 (34.56)、6 (31.71)
CPP 64	CAD	16	22	ELLETVVNR (74)	1 (21.91)

【表７９】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	CAD	16	24	ELLETVVNR (74)	2 (34.72)、1 (34.01)
CPP 64	CAD	16	25	ELLETVVNR (74)	1 (29.76)
CPP 64	CAD	16	28	AWFLESK (71)	3 (21.07)
CPP 64	CAD	16	28	ELLETVVNR (74)	2 (40.73)、3 (22.25)、3 (42.51)
CPP 64	CAD	16	29	ELLETVVNR (74)	4 (42.3)
CPP 64	CAD	16	30	DGWQWFWSPSTFR (72)	3 (23.03)
CPP 64	CAD	16	30	ELLETVVNR (74)	3 (39.68)、2 (31.97)、1 (33.02)、4 (44.68)
CPP 64	CAD	16	30	GFMQTYYDDHLR (75)	4 (30.85)、1 (19.99)
CPP 64	CAD	17	13	ELLETVVNR (74)	8 (35.16)、7 (35.57)
CPP 64	CAD	17	14	AWFLESK (71)	6 (28.35)
CPP 64	CAD	17	14	DGWQWFWSPSTFR (72)	6 (22.83)、6 (54.39)、6 (43.93)
CPP 64	CAD	17	15	AWFLESK (71)	7 (17.17)
CPP 64	CAD	17	15	GFMQTYYDDHLR (75)	7 (42.5)、7 (30.06)、6 (28.19)

【表８０】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	CAD	17	16	AWFLESK (71)	5 (12.51)、5 (22.59)
CPP 64	CAD	17	16	DGWQWFWSPSTFR (72)	6 (48.38)、5 (34.22)
CPP 64	CAD	17	16	ELLETVVNR (74)	7 (38.39)
CPP 64	CAD	17	16	GFMQTYYDDHLR (75)	5 (34.89)、5 (53.06)、5 (31.11)、6 (65.44)、6 (47.6)、6 (15.61)
CPP 64	CAD	17	17	AWFLESK (71)	5 (24.24)
CPP 64	CAD	17	17	DGWQWFWSPSTFR (72)	7 (42.36)、7 (41.75)、7 (52.34)、7 (35.65)
CPP 64	CAD	17	17	GFMQTYYDDHLR (75)	7 (44.98)、7 (51.36)
CPP 64	CAD	17	17	GFMQTYYDDHLRDLGPLTK (76)	7 (33.4)、7 (55.38)
CPP 64	CAD	17	17	MKELLETVVNR (78)	7 (47.29)、7 (47.02)
CPP 64	CAD	17	18	AWFLESK (71)	7 (30.01)、6 (26.75)、5 (25.59)

【表８１】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	CAD	17	18	DGWQWFWSPSTFR (72)	7 (52.66)、6 (50.19)
CPP 64	CAD	17	18	GFMQTYYDDHLR (75)	6 (64.45)、6 (61.48)
CPP 64	CAD	17	20	AWFLESK (71)	6 (16.67)
CPP 64	CAD	17	20	ELLETVVNR (74)	5 (15.65)
CPP 64	CAD	17	21	DGWQWFWSPSTFR (72)	5 (36.97)
CPP 64	CAD	17	21	ELLETVVNR (74)	5 (23.44)
CPP 64	CAD	17	22	ELLETVVNR (74)	4 (28.84)
CPP 64	CAD	17	23	DGWQWFWSPSTFR (72)	4 (6.32)
CPP 64	CAD	18	12	DGWQWFWSPSTFR (72)	8 (32.02)、9 (24.6)
CPP 64	CAD	18	12	ELLETVVNR (74)	8 (31.06)、5 (24.91)
CPP 64	CAD	18	13	ELLETVVNR (74)	7 (29.81)、8 (20.85)
CPP 64	CAD	18	14	ELLETVVNR (74)	7 (34.24)
CPP 64	CAD	18	14	GFMQTYYDDHLR (75)	7 (20.48)、6 (21.18)

【００８０】

【表８２】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	CAD	18	16	DGWQWFWSPSTFR (72)	6 (20.45)
CPP 64	CAD	18	17	AWFLESK (71)	8 (22.4)
CPP 64	CAD	18	17	ELLETVVNR (74)	7 (48.1)、8 (44.35)
CPP 64	CAD	18	17	GFMQTYYDDHLR (75)	8 (34.27)、8 (66.14)
CPP 64	CAD	18	17	WSLVR (81)	8 (29.1)
CPP 64	CAD	18	18	AWFLESK (71)	6 (17.79)
CPP 64	CAD	18	18	DGWQWFWSPSTFR (72)	6 (38.39)
CPP 64	CAD	18	18	ELLETVVNR (74)	6 (48.62)
CPP 64	CAD	18	18	GFMQTYYDDHLR (75)	7 (62.41)
CPP 64	CAD	18	19	GFMQTYYDDHLR (75)	6 (49.32)
CPP 64	対照	14	11	GFMQTYYDDHLR (75)	11 (32.48)
CPP 64	対照	14	14	DGWQWFWSPSTFR (72)	8 (24.05)
CPP 64	対照	14	14	MKELLETVVNR (78)	8 (28.12)
CPP 64	対照	15	11	DGWQWFWSPSTFR (72)	13 (42.3)、11 (24.17)
CPP 64	対照	15	13	DGWQWFWSPSTFR (72)	12 (36.29)、14 (36.62)
CPP 64	対照	15	13	ELLETVVNR (74)	12 (40.9)
CPP 64	対照	15	13	GFMQTYYDDHLR (75)	11 (43.03)、12 (37.59)

【表８３】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	対照	15	13	GFMQTYYDDHLRDLGPLTK (76)	13 (50.05)
CPP 64	対照	15	14	DGWQWFWSPSTFR (72)	10 (41.56)、12 (34.58)
CPP 64	対照	15	14	ELLETVVNR (74)	12 (40.74)、11 (43.9)
CPP 64	対照	15	14	GFMQTYYDDHLR (75)	10 (28.33)、12 (36)
CPP 64	対照	15	14	MKELLETVVNR (78)	10 (38.12)
CPP 64	対照	15	15	ELLETVVNR (74)	11 (39.51)、10 (33.04)、14 (42.96)、13 (40.28)
CPP 64	対照	15	15	GFMQTYYDDHLR (75)	10 (27.79)、11 (23.07)
CPP 64	対照	15	15	GFMQTYYDDHLRDLGPLTK (76)	13 (74.01)
CPP 64	対照	16	13	DGWQWFWSPSTFR (72)	7 (38.19)、7 (26.07)
CPP 64	対照	16	14	DLGPLTK (73)	6 (15.39)
CPP 64	対照	16	14	ELLETVVNR (74)	6 (40.84)

【表８４】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	対照	16	14	GFMQTYYDDHLR (75)	6 (35.13)、6 (21.62)
CPP 64	対照	16	14	KTHSLCPR (77)	6 (31.61)、6 (20.83)
CPP 64	対照	16	14	THSLCPR (79)	6 (15.54)
CPP 64	対照	16	15	AWFLESK (71)	14 (20.81)、16 (21.9)、14 (20.33)、14 (16.94)、17 (22.72)、15 (24.56)
CPP 64	対照	16	15	DGWQWFWSPSTFR (72)	16 (35.64)、15 (32.52)、17 (25.4)、17 (19.47)、15 (40.04)、16 (18.62)
CPP 64	対照	16	15	ELLETVVNR (74)	14 (44.93)、13 (41.64)、13 (38.62)、15 (44.96)、17 (43.84)、15 (39.97)、17 (47.02)、16 (43.46)

【表８５】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	対照	16	15	GFMQTYYDDHLR (75)	14 (19.86)、13 (54.91)、16 (44.69)、15 (48.87)、16 (27.37)、16 (43.86)、13 (32.85)、14 (49.95)、15 (22.51)、15 (22.57)、17 (27.82)、14 (31.43)、14 (59.4)
CPP 64	対照	16	15	MKELLETVVNR (78)	13 (43.63)、16 (12.76)
CPP 64	対照	16	17	AWFLESK (71)	8 (19.34)、7 (18.3)、6 (13.83)
CPP 64	対照	16	17	DGWQWFWSPSTFR (72)	7 (60.09)、6 (45.7)、8 (16.17)
CPP 64	対照	16	17	DLGPLTK (73)	7 (25.19)
CPP 64	対照	16	17	ELLETVVNR (74)	5 (45.74)、7 (31.61)
CPP 64	対照	16	17	GFMQTYYDDHLR (75)	6 (19.42)、8 (28.33)、8 (20.62)、6 (11.55)、5 (34.11)、5 (25.54)、7 (30.31)、7 (19.11)、7 (61.08)
CPP 64	対照	16	17	MKELLETVVNR (78)	8 (14.17)

【表８６】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	対照	16	18	AWFLESK (71)	7 (21.48)、5 (31.05)、6 (10.68)
CPP 64	対照	16	18	DGWQWFWSPSTFR (72)	7 (35.87)
CPP 64	対照	16	18	ELLETVVNR (74)	7 (32.55)、5 (37.5)
CPP 64	対照	16	18	GFMQTYYDDHLR (75)	5 (49.44)、6 (32.09)、3 (25.6)、5 (49.7)、6 (49.74)、7 (26.72)、5 (26.81)、5 (35.82)
CPP 64	対照	16	19	AWFLESK (71)	6 (19.48)
CPP 64	対照	16	19	DGWQWFWSPSTFR (72)	6 (36.21)
CPP 64	対照	16	19	ELLETVVNR (74)	5 (32.29)、6 (35.8)
CPP 64	対照	16	19	GFMQTYYDDHLR (75)	5 (52.86)
CPP 64	対照	16	19	GFMQTYYDDHLRDLGPLTK (76)	6 (54.93)
CPP 64	対照	16	19	MKELLETVVNR (78)	6 (49.78)、6 (53.47)
CPP 64	対照	16	19	TRDGWQWFWSPSTFR (80)	6 (46.29)
CPP 64	対照	16	20	DGWQWFWSPSTFR (72)	5 (48.75)

【表８７】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	対照	16	20	GFMQTYYDDHLR (75)	4 (10.29)、3 (37.9)
CPP 64	対照	16	20	MKELLETVVNR (78)	5 (29.42)、4 (24.1)
CPP 64	対照	16	21	ELLETVVNR (74)	2 (26.87)、5 (38.44)
CPP 64	対照	16	22	AWFLESK (71)	4 (29.44)、3 (23.98)、3 (22.33)
CPP 64	対照	16	22	DGWQWFWSPSTFR (72)	3 (19.19)
CPP 64	対照	16	22	ELLETVVNR (74)	3 (39.76)、4 (47.79)、2 (39.83)
CPP 64	対照	16	22	GFMQTYYDDHLR (75)	4 (47.83)、3 (49.64)
CPP 64	対照	16	22	WSLVR (81)	4 (26.68)、3 (28.08)
CPP 64	対照	16	23	AWFLESK (71)	3 (26.6)
CPP 64	対照	16	23	ELLETVVNR (74)	3 (45.74)、2 (40.65)
CPP 64	対照	16	23	GFMQTYYDDHLR (75)	3 (59.73)
CPP 64	対照	16	24	ELLETVVNR (74)	1 (37.69)
CPP 64	対照	16	24	GFMQTYYDDHLR (75)	2 (10.49)、2 (24.72)、1 (27.75)
CPP 64	対照	16	26	ELLETVVNR (74)	3 (34.86)
CPP 64	対照	16	26	GFMQTYYDDHLR (75)	3 (12.56)

【表８８】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	対照	16	28	ELLETVVNR (74)	3 (34.18)
CPP 64	対照	16	29	ELLETVVNR (74)	3 (37.15)
CPP 64	対照	16	30	ELLETVVNR (74)	2 (32.93)、2 (37.14)
CPP 64	対照	16	30	GFMQTYYDDHLRDLGPLTK (76)	3 (50.38)
CPP 64	対照	17	12	AWFLESK (71)	8 (20.63)
CPP 64	対照	17	12	DGWQWFWSPSTFR (72)	8 (33.88)、8 (45.1)
CPP 64	対照	17	12	ELLETVVNR (74)	8 (42.64)、7 (31.85)
CPP 64	対照	17	13	AWFLESK (71)	8 (16.72)、9 (11.96)
CPP 64	対照	17	13	DGWQWFWSPSTFR (72)	8 (19.74)、9 (38.38)、8 (12.02)、9 (42.75)
CPP 64	対照	17	13	ELLETVVNR (74)	11 (38.29)、10 (30.97)、9 (38.63)
CPP 64	対照	17	13	GFMQTYYDDHLR (75)	11 (21.11)、8 (38.59)、9 (31.71)、10 (11.37)
CPP 64	対照	17	13	MKELLETVVNR (78)	11 (10.03)
CPP 64	対照	17	14	AWFLESK (71)	7 (18.91)
CPP 64	対照	17	14	DGWQWFWSPSTFR (72)	6 (22.92)、7 (52.56)

【表８９】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	対照	17	14	GFMQTYYDDHLR (75)	7 (47.16)、7 (13.79)、6 (38.81)、6 (16.17)、6 (58.82)
CPP 64	対照	17	14	TRDGWQWFWSPSTFR (80)	7 (21.42)、7 (40.25)
CPP 64	対照	17	15	AWFLESK (71)	8 (25.33)、8 (18.38)
CPP 64	対照	17	15	DGWQWFWSPSTFR (72)	7 (29.74)
CPP 64	対照	17	15	ELLETVVNR (74)	8 (27.75)
CPP 64	対照	17	15	GFMQTYYDDHLR (75)	8 (26.23)、7 (28.5)
CPP 64	対照	17	15	MKELLETVVNR (78)	8 (54.35)
CPP 64	対照	17	16	AWFLESK (71)	8 (11.41)、8 (20.83)
CPP 64	対照	17	16	DGWQWFWSPSTFR (72)	7 (44.05)、8 (17.99)、8 (34.98)、8 (31.23)、7 (29.68)
CPP 64	対照	17	16	ELLETVVNR (74)	5 (41.56)、5 (38.03)
CPP 64	対照	17	16	GFMQTYYDDHLR (75)	5 (29.3)、7 (17.85)、8 (47.19)、7 (34.74)

【表９０】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	対照	17	16	MKELLETVVNR (78)	5 (20.96)、7 (31.61)、5 (43.08)、7 (50.45)、8 (23.83)、8 (33.88)
CPP 64	対照	17	16	TRDGWQWFWSPSTFR (80)	8 (59.47)
CPP 64	対照	17	17	AWFLESK (71)	8 (25.15)、6 (11.41)
CPP 64	対照	17	17	DGWQWFWSPSTFR (72)	7 (60.6)、7 (46.33)、8 (39.15)、6 (3.49)
CPP 64	対照	17	17	DLGPLTK (73)	8 (18.58)、8 (18.34)
CPP 64	対照	17	17	ELLETVVNR (74)	8 (42.46)、8 (12.21)、7 (33.47)、7 (12.03)、6 (41.49)、9 (36.44)、8 (39.66)
CPP 64	対照	17	17	GFMQTYYDDHLR (75)	7 (40.46)、7 (23.68)、6 (40.68)、6 (71.21)、5 (34.28)、7 (63.45)、7 (35.26)、6 (17.2)、8 (47.34)
CPP 64	対照	17	17	MKELLETVVNR (78)	5 (15.08)、5 (38.4)
CPP 64	対照	17	18	AWFLESK (71)	6 (21.2)、6 (19.83)、6 (31.3)
CPP 64	対照	17	18	DGWQWFWSPSTFR (72)	6 (32.91)、6 (27.78)、5 (16.42)、7 (28.2)
CPP 64	対照	17	18	DLGPLTK (73)	6 (19.39)

【表９１】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	対照	17	18	ELLETVVNR (74)	7 (42.18)、6 (39.67)、6 (44.15)、7 (35.89)
CPP 64	対照	17	18	GFMQTYYDDHLR (75)	5 (24.13)、6 (22.41)、6 (56.58)、7 (66.48)、7 (54.5)、6 (27.86)
CPP 64	対照	17	19	ELLETVVNR (74)	7 (38.31)、6 (40.03)、5 (19.11)
CPP 64	対照	17	19	GFMQTYYDDHLR (75)	7 (23.52)、6 (26.22)、7 (23.45)
CPP 64	対照	17	20	DGWQWFWSPSTFR (72)	6 (20.96)
CPP 64	対照	17	20	GFMQTYYDDHLRDLGPLTK (76)	6 (29.07)
CPP 64	対照	17	20	MKELLETVVNR (78)	6 (35.08)、4 (28.15)
CPP 64	対照	17	22	ELLETVVNR (74)	3 (32.72)、4 (26.9)
CPP 64	対照	17	22	GFMQTYYDDHLR (75)	4 (30.55)
CPP 64	対照	17	24	GFMQTYYDDHLR (75)	2 (14.4)

【表９２】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	対照	17	25	MKELLETVVNR (78)	2 (40.44)
CPP 64	対照	18	12	ELLETVVNR (74)	8 (28.18)
CPP 64	対照	18	13	AWFLESK (71)	8 (22.08)、9 (14.04)、8 (9.43)
CPP 64	対照	18	13	DGWQWFWSPSTFR (72)	8 (34.78)、8 (39.93)
CPP 64	対照	18	13	ELLETVVNR (74)	10 (31.77)、8 (29.11)
CPP 64	対照	18	13	GFMQTYYDDHLR (75)	9 (15.19)、8 (22.67)、11 (10.75)、9 (52.11)
CPP 64	対照	18	14	DGWQWFWSPSTFR (72)	7 (27.5)
CPP 64	対照	18	16	AWFLESK (71)	7 (17.87)
CPP 64	対照	18	16	DGWQWFWSPSTFR (72)	7 (36.42)
CPP 64	対照	18	16	ELLETVVNR (74)	5 (39.89)、8 (34.1)
CPP 64	対照	18	16	GFMQTYYDDHLR (75)	5 (24.59)、8 (28.58)、8 (25.14)、7 (46.34)
CPP 64	対照	18	16	GFMQTYYDDHLRDLGPLTK (76)	7 (30.44)
CPP 64	対照	18	16	MKELLETVVNR (78)	6 (31.37)、7 (35.28)
CPP 64	対照	18	17	DGWQWFWSPSTFR (72)	8 (11.39)
CPP 64	対照	18	17	ELLETVVNR (74)	8 (36.38)
CPP 64	対照	18	18	AWFLESK (71)	6 (17.56)
CPP 64	対照	18	18	DGWQWFWSPSTFR (72)	6 (39.33)
CPP 64	対照	18	18	ELLETVVNR (74)	5 (40.8)、6 (31.41)、6 (46.19)
CPP 64	対照	18	18	GFMQTYYDDHLR (75)	6 (47.66)

【表９３】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 64	対照	18	19	DGWQWFWSPSTFR (72)	6 (47.36)
CPP 64	対照	18	19	MKELLETVVNR (78)	6 (25.44)
CPP 64	対照	18	20	AWFLESK (71)	5 (20.37)
CPP 64	対照	18	20	DGWQWFWSPSTFR (72)	5 (37.56)
CPP 64	対照	18	21	AWFLESK (71)	5 (14.23)
CPP 64	対照	18	21	DGWQWFWSPSTFR (72)	5 (28.53)、5 (34.79)
CPP 64	対照	18	21	ELLETVVNR (74)	5 (38.93)、6 (29.01)
CPP 64	対照	18	21	GFMQTYYDDHLR (75)	5 (33.07)
CPP 64	対照	18	22	DGWQWFWSPSTFR (72)	3 (14.3)、3 (15.54)
CPP 64	対照	18	22	ELLETVVNR (74)	4 (35.29)
CPP 64	対照	18	22	GFMQTYYDDHLR (75)	4 (25.18)
CPP 64	対照	18	23	GFMQTYYDDHLR (75)	3 (20.98)
CPP 64	対照	18	25	DGWQWFWSPSTFR (72)	2 (11.02)
CPP 65	CAD	1	10	VNSDGGLVALR (92)	22 (40.7)、21 (35.86)
CPP 65	CAD	1	12	DIQGSLQDIFK (90)	22 (27.92)、19 (33.19)、18 (51.16)、21 (41.22)、20 (40.46)

【００８１】

【表９４】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 65	CAD	1	12	TPHAEDMAELVIVGGK (91)	20 (75.27)、18 (63.29)、19 (23.99)
CPP 65	CAD	1	12	VNSDGGLVALR (92)	19 (43.67)、20 (37.95)、17 (22)、18 (43.02)、21 (31.34)
CPP 65	対照	1	12	DIQGSLQDIFK (90)	11 (56.49)、12 (28.01)
CPP 65	対照	1	12	VNSDGGLVALR (92)	11 (37.78)
CPP 65	対照	1	13	DIQGSLQDIFK (90)	12 (46.81)、13 (41.04)
CPP 65	対照	1	13	VNSDGGLVALR (92)	13 (15.02)、12 (32.93)
CPP 65	対照	1	14	DIQGSLQDIFK (90)	9 (46.99)
CPP 65	対照	1	15	DIQGSLQDIFK (90)	10 (37.69)
CPP 65	対照	1	15	VNSDGGLVALR (92)	10 (54.62)
CPP 65	対照	2	11	DIQGSLQDIFK (90)	20 (48.79)、19 (31.29)、18 (32.3)
CPP 65	対照	2	11	VNSDGGLVALR (92)	20 (29.55)、18 (26.64)

【表９５】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 65	対照	2	11	YEVSSPYFK (93)	20 (13.75)、19 (18.18)
CPP 65	対照	2	12	DIQGSLQDIFK (90)	15 (44.78)、16 (37.81)
CPP 65	対照	2	13	DIQGSLQDIFK (90)	16 (30.08)、15 (25.08)
CPP 66	CAD	9	22	TCSHYECAFLGGLK (107)	6 (30.99)
CPP 66	対照	10	23	TCSHYECAFLGGLK (107)	5 (32.37)、6 (50.05)
CPP 66	対照	11	22	TSQGTSFTFGGLNQAR (108)	6 (20.02)
CPP 67	CAD	18	11	EVTVLLEHQK (85)	12 (34.63)
CPP 67	CAD	18	11	SFTIWLSDK (86)	11 (32.71)
CPP 67	CAD	18	11	VLNDGSVYTAR (88)	11 (45.23)、9 (54.29)
CPP 67	CAD	18	11	VNLEECFR (89)	13 (29.6)、11 (27.19)、12 (35.08)
CPP 67	CAD	18	17	VNLEECFR (89)	4 (20.49)
CPP 67	CAD	18	18	VNLEECFR (89)	3 (13.21)
CPP 67	CAD	18	19	VNLEECFR (89)	3 (31.11)
CPP 67	対照	16	12	EVTVLLEHQK (85)	8 (26.33)
CPP 67	対照	16	12	VNLEECFR (89)	8 (20.82)

【表９６】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 67	対照	17	10	EVTVLLEHQK (85)	11 (17.66)
CPP 67	対照	17	10	VLNDGSVYTAR (88)	11 (42.26)、9 (21.88)、10 (50.25)
CPP 67	対照	17	10	VNLEECFR (89)	10 (28.85)、9 (25.22)
CPP 67	対照	17	11	SSDPDFRVLNDGSVYTAR (87)	10 (83.3)
CPP 67	対照	17	11	VLNDGSVYTAR (88)	11 (38.89)
CPP 67	対照	17	11	VNLEECFR (89)	11 (30.31)、9 (26.86)
CPP 67	対照	17	13	EVTVLLEHQK (85)	8 (16.22)
CPP 67	対照	17	13	VLNDGSVYTAR (88)	8 (43.42)
CPP 67	対照	17	13	VNLEECFR (89)	8 (26.82)、7 (21.79)
CPP 67	対照	17	20	VNLEECFR (89)	2 (23.69)
CPP 67	対照	18	11	VLNDGSVYTAR (88)	10 (48.57)
CPP 67	対照	18	11	VNLEECFR (89)	11 (17.69)
CPP 68	対照	17	11	VLNDGTVYTAR (69)	11 (15.31)、11 (42.12)
CPP 68	対照	17	11	VNLEECFR (70)	11 (30.31)
CPP 69	CAD	5	16	EYGVVLAPDGSTVAVEPLLAGLEAGLQGR (119)	16 (27.98)

【表９７】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 69	対照	4	18	EYGVVLAPDGSTVAVEPLLAGLEAGLQGR（119）	8（90.69）、9（85.19）
CPP 69	対照	4	18	SLPLLMDSVIQALAELEQK（120）	8（83.08）、9（76.8）
CPP 69	対照	5	23	EYGVVLAPDGSTVAVEPLLAGLEAGLQGR（119）	5（53.3）
CPP 69	対照	6	22	SLPLLMDSVIQALAELEQK（120）	6（60.2）
CPP 70	CAD	18	13	EAEEHQETQCLR（102）	9（26.51）
CPP 70	CAD	18	13	GLQVALEEFHK（103）	10（18.6）
CPP 70	CAD	18	13	LVHCPIETQVLR（106）	9（47.38）、9（23.06）
CPP 70	CAD	18	14	GLQVALEEFHK（103）	7（32.28）
CPP 70	CAD	18	15	HPPVQWAFQETSVESAVDTPFPAGIFVR（104）	7（87.27）
CPP 70	CAD	18	15	LVHCPIETQVLR（106）	7（30.36）
CPP 70	CAD	18	16	LVHCPIETQVLR（106）	5（56.9）
CPP 70	CAD	18	18	HPPVQWAFQETSVESAVDTPFPAGIFVR（104）	4（101.16）
CPP 70	CAD	18	18	LVHCPIETQVLR（106）	4（40.79）
CPP 70	CAD	18	19	GLQVALEEFHK（103）	4（34.76）

【表９８】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 70	CAD	18	19	HPPVQWAFQETSVESAVDTPFPAGIFVR (104)	4 (54.86)
CPP 70	CAD	18	19	LVHCPIETQVLR (106)	4 (60.77)
CPP 70	CAD	18	21	HPPVQWAFQETSVESAVDTPFPAGIFVR (104)	3 (110.95)
CPP 70	CAD	18	21	LVHCPIETQVLR (106)	2 (20.44)
CPP 70	CAD	18	23	GLQVALEEFHK (103)	1 (37.51)
CPP 70	CAD	18	23	LVHCPIETQVLR (106)	1 (36.32)
CPP 70	対照	17	13	LVHCPIETQVLR (106)	9 (26.57)、9 (58.55)
CPP 70	対照	18	13	GLQVALEEFHK (103)	7 (27.24)、10 (33.33)、11 (30.23)、12 (15.69)、8 (38.28)
CPP 70	対照	18	13	HPPVQWAFQETSVESAVDTPFPAGIFVR (104)	8 (103.32)
CPP 70	対照	18	13	LVHCPIETQVLR (106)	11 (60.26)、11 (27.7)、9 (71.89)、8 (80.02)
CPP 70	対照	18	14	AGEDPHSFYFPGQFAFSK (100)	7 (63.08)
CPP 70	対照	18	14	LVHCPIETQVLR (106)	7 (53.93)
CPP 70	対照	18	16	AGEDPHSFYFPGQFAFSK (100)	5 (63.6)
CPP 70	対照	18	16	LVHCPIETQVLR (106)	5 (71.78)、5 (27.46)
CPP 70	対照	18	17	LVHCPIETQVLR (106)	5 (62.3)
CPP 70	対照	18	18	CLACIK (101)	4 (22.94)

【表９９】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 70	対照	18	18	LVHCPIETQVLR (106)	4 (55.27)、3 (63.94)
CPP 70	対照	18	19	AGEDPHSFYFPGQFAFSK (100)	4 (79.83)
CPP 70	対照	18	19	LVHCPIETQVLR (106)	4 (66.2)
CPP 70	対照	18	20	LGSEDKVLGR (105)	3 (55.64)
CPP 70	対照	18	20	LVHCPIETQVLR (106)	3 (28.91)
CPP 70	対照	18	21	GLQVALEEFHK (103)	3 (12)
CPP 70	対照	18	21	LVHCPIETQVLR (106)	2 (20.92)、3 (28.62)、3 (73.38)
CPP 70	対照	18	22	AGEDPHSFYFPGQFAFSK (100)	1 (83.35)
CPP 70	対照	18	22	CLACIK (101)	1 (17.29)
CPP 70	対照	18	22	LGSEDKVLGR (105)	1 (13.49)
CPP 70	対照	18	22	LVHCPIETQVLR (106)	1 (57.26)

【表１００】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 70	対照	18	23	LVHCPIETQVLR (106)	1 (34.36)
CPP 71	CAD	9	5	CFESFER (94)	14 (22.7)、13 (21.75)
CPP 71	CAD	9	5	VCTAELSCK (97)	13 (39.73)、16 (22.33)、15 (29.91)、15 (39.5)
CPP 71	CAD	9	5	VCTAELSCKGR (98)	14 (28.99)
CPP 71	CAD	9	6	VCTAELSCK (97)	7 (40.19)
CPP 71	CAD	10	12	CFESFER (94)	17 (32.12)
CPP 71	CAD	10	12	VCTAELSCK (97)	16 (28.35)、17 (23.39)
CPP 71	CAD	11	5	CFESFER (94)	17 (25.12)
CPP 71	CAD	11	5	VCTAELSCK (97)	18 (15.87)、16 (24.56)、17 (20.09)
CPP 71	CAD	13	13	DATCNCDYNCQHYMECCPDFK (95)	17 (39.29)
CPP 71	CAD	14	12	CFESFER (94)	15 (24.49)
CPP 71	対照	9	4	CFESFER (94)	13 (29.35)、9 (19.45)
CPP 71	対照	9	4	KAPPPSGASQTIK (96)	9 (33.47)
CPP 71	対照	9	4	VCTAELSCK (97)	13 (43.43)、15 (20.67)、14 (36.29)
CPP 71	対照	9	5	KAPPPSGASQTIK (96)	15 (13.52)
CPP 71	対照	9	5	VCTAELSCK (97)	14 (34.83)
CPP 71	対照	10	6	VCTAELSCK (97)	8 (31.85)
CPP 71	対照	11	5	CFESFER (94)	16 (17.37)、14 (19.46)
CPP 71	対照	11	5	VCTAELSCK (97)	15 (38.38)、16 (33.41)、17 (35.28)
CPP 71	対照	11	5	VCTAELSCKGR (98)	16 (29.07)
CPP 71	対照	12	5	CFESFER (94)	13 (26.36)
CPP 71	対照	12	5	VCTAELSCK (97)	13 (18.02)、14 (12.43)
CPP 72	対照	10	8	YFTLGESWLR (99)	9 (23.68)
CPP 73	対照	17	15	ELDLNSVLLK (259)	12 (17.3)、11 (15)
CPP 73	対照	17	15	HGTCAAQVDALNSQK (260)	12 (53.7)
CPP 73	対照	17	15	LGIKPSINYYQVADFK (261)	11 (48.75)

【表１０１】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 73	対照	17	16	DPPDYWTIHGLWPDK (258)	8 (23.94)
CPP 73	対照	17	17	ELDLNSVLLK (259)	8 (18.06)
CPP 74	CAD	17	20	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	5 (34.78)
CPP 74	CAD	17	20	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	5 (29.12)
CPP 74	CAD	17	21	RPDSLQHVLLPVLDRATCNR (242)	3 (26.89)
CPP 74	CAD	17	23	ATLGPAVRPLPWQR (234)	3 (24.85)
CPP 74	CAD	17	23	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	3 (41.61)、4 (54.97)、3 (34.84)
CPP 74	CAD	17	23	VDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (244)	4 (59.1)
CPP 74	CAD	17	23	VQVLLGAHSLSQPEPSKR (246)	4 (25.02)
CPP 74	CAD	17	24	ATLGPAVRPLPWQR (234)	2 (37.63)
CPP 74	CAD	17	24	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (236)	2 (113.27)
CPP 74	CAD	17	24	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	2 (38.24)、2 (61.44)
CPP 74	CAD	17	24	VASYAAWIDSVLA (243)	2 (18.56)
CPP 74	CAD	17	24	VDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (244)	2 (84.53)
CPP 74	CAD	17	24	VQVLLGAHSLSQPEPSKR (246)	2 (41.11)
CPP 74	CAD	17	25	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	2 (61.08)
CPP 74	CAD	17	25	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	2 (38.8)、2 (22.11)、2 (41.11)
CPP 74	CAD	17	25	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	2 (35.44)
CPP 74	CAD	17	26	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	2 (72.45)、2 (30.38)、3 (69.99)
CPP 74	CAD	17	26	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	3 (23.16)

【表１０２】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 74	CAD	17	26	LYDVLR (240)	3 (10.9)
CPP 74	CAD	17	27	DVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (237)	2 (27.09)
CPP 74	CAD	17	27	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	2 (17.16)、3 (24.13)
CPP 74	CAD	17	28	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	3 (46.85)
CPP 74	CAD	17	28	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	3 (37.6)、4 (25.8)、4 (47.41)、3 (22.44)
CPP 74	CAD	17	29	ATLGPAVRPLPWQR (234)	4 (11.34)
CPP 74	CAD	17	29	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	4 (37.2)、3 (43.29)
CPP 74	CAD	17	30	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	3 (36.72)、3 (31.3)、3 (25.68)
CPP 74	CAD	17	30	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	3 (37.11)、3 (64.04)
CPP 74	CAD	17	30	VQVLLGAHSLSQPEPSK (245)	3 (38.48)
CPP 74	CAD	18	17	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	8 (33.92)、8 (52.52)
CPP 74	CAD	18	18	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	6 (68.51)
CPP 74	CAD	18	18	DVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (237)	6 (28.22)
CPP 74	CAD	18	18	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	6 (37.93)、6 (42.27)
CPP 74	CAD	18	18	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	6 (51.27)、6 (52.36)
CPP 74	CAD	18	18	VASYAAWIDSVLA (243)	6 (10.91)
CPP 74	CAD	18	19	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	6 (71.07)
CPP 74	CAD	18	19	DVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (237)	6 (42.1)
CPP 74	CAD	18	19	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	6 (49.41)
CPP 74	CAD	18	19	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	6 (47.68)
CPP 74	CAD	18	21	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	5 (64.09)

【００８２】

【表１０３】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 74	CAD	18	21	DVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (237)	5 (37.19)
CPP 74	CAD	18	21	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	5 (55.75)
CPP 74	CAD	18	21	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	5 (39.41)
CPP 74	CAD	18	21	VASYAAWIDSVLA (243)	5 (30.18)
CPP 74	CAD	18	22	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	4 (43.12)
CPP 74	CAD	18	22	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	3 (55.75)
CPP 74	CAD	18	22	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	3 (47.22)
CPP 74	CAD	18	23	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	4 (49.12)、3 (48.34)
CPP 74	CAD	18	24	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	1 (48.94)、2 (25.87)、2 (32.17)、1 (39.81)
CPP 74	CAD	18	25	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	2 (41.11)

【表１０４】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 74	CAD	18	25	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	2 (42.74)、2 (57.82)
CPP 74	CAD	18	26	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	3 (68.12)
CPP 74	CAD	18	26	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	3 (29.41)、3 (59.5)
CPP 74	CAD	18	26	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	3 (30.6)
CPP 74	CAD	18	26	VASYAAWIDSVLA (243)	3 (22.3)
CPP 74	CAD	18	26	VQVLLGAHSLSQPEPSK (245)	3 (30.61)
CPP 74	CAD	18	27	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	4 (55.93)、3 (18.56)、3 (85.21)
CPP 74	CAD	18	27	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	3 (37.85)
CPP 74	CAD	18	27	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	4 (46.2)
CPP 74	CAD	18	28	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	4 (70.69)
CPP 74	CAD	18	28	DVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (237)	4 (33.73)、3 (30.55)

【表１０５】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 74	CAD	18	28	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	4 (38.92)、3 (44.27)
CPP 74	CAD	18	28	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	3 (58.63)
CPP 74	CAD	18	28	VASYAAWIDSVLA (243)	4 (12.02)
CPP 74	CAD	18	29	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	3 (53.83)
CPP 74	CAD	18	29	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (236)	3 (82.67)
CPP 74	CAD	18	29	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	3 (41.47)、3 (39.78)
CPP 74	CAD	18	29	VDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (244)	3 (96.78)、3 (62.45)
CPP 74	CAD	18	29	VQVLLGAHSLSQPEPSKR (246)	3 (65.8)
CPP 74	CAD	18	30	ATLGPAVRPLPWQR (234)	3 (29.54)
CPP 74	CAD	18	30	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	3 (35.26)
CPP 74	CAD	18	30	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (236)	3 (70.66)
CPP 74	CAD	18	30	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	3 (35.36)
CPP 74	CAD	18	30	VDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (244)	3 (87.32)
CPP 74	CAD	18	30	VQVLLGAHSLSQPEPSKR (246)	3 (28.11)
CPP 74	対照	16	18	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	6 (25.53)
CPP 74	対照	17	13	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	8 (28.79)
CPP 74	対照	17	13	VASYAAWIDSVLA (243)	10 (90.11)
CPP 74	対照	17	16	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	8 (21.23)
CPP 74	対照	17	16	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (236)	8 (44.64)

【表１０６】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 74	対照	17	16	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	8 (59.41)
CPP 74	対照	17	16	VDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (244)	8 (33.92)
CPP 74	対照	17	17	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	8 (68.48)、8 (29.52)
CPP 74	対照	17	17	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	8 (41.62)、8 (69.31)、8 (14.05)、7 (56.14)、8 (32.26)、8 (19.35)
CPP 74	対照	17	17	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	8 (38.02)、7 (19.57)、6 (29.99)、8 (53.68)、7 (46.3)、8 (41.91)
CPP 74	対照	17	17	VASYAAWIDSVLA (243)	8 (82.38)、8 (58.81)
CPP 74	対照	17	17	VDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (244)	8 (25.19)
CPP 74	対照	17	17	VQVLLGAHSLSQPEPSK (245)	8 (88.65)、8 (40.64)
CPP 74	対照	17	18	ATLGPAVRPLPWQR (234)	6 (46.84)
CPP 74	対照	17	18	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	6 (26.77)、6 (56.22)

【表１０７】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 74	対照	17	18	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR（236）	6（39.95）
CPP 74	対照	17	18	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR（238）	6（47.31）、6（19.26）
CPP 74	対照	17	18	LYDVLR（240）	6（5.68）
CPP 74	対照	17	18	RPDSLQHVLLPVLDR（241）	7（44.48）、6（22.57）、6（57.22）、6（22.89）、6（54.68）
CPP 74	対照	17	18	VASYAAWIDSVLA（243）	6（86.37）
CPP 74	対照	17	18	VQVLLGAHSLSQPEPSK（245）	6（48.08）
CPP 74	対照	17	18	VQVLLGAHSLSQPEPSKR（246）	6（50.18）
CPP 74	対照	17	19	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK（235）	6（35.65）
CPP 74	対照	17	19	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR（236）	6（33.95）
CPP 74	対照	17	19	DVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR（237）	6（21.38）
CPP 74	対照	17	19	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR（238）	6（40.13）、6（29.96）

【表１０８】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 74	対照	17	19	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	6 (37.27)、6 (28.52)、6 (44.75)
CPP 74	対照	17	19	VASYAAWIDSVLA (243)	6 (21.14)、6 (27.46)
CPP 74	対照	17	19	VDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (244)	6 (28.7)
CPP 74	対照	17	19	VQVLLGAHSLSQPEPSK (245)	6 (56.52)
CPP 74	対照	17	20	ATLGPAVRPLPWQR (234)	5 (54.58)
CPP 74	対照	17	20	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	5 (57.98)、5 (15.85)
CPP 74	対照	17	20	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (236)	5 (40.95)
CPP 74	対照	17	20	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	5 (34.37)、5 (74.3)、5 (36.45)
CPP 74	対照	17	20	VASYAAWIDSVLA (243)	5 (104.84)
CPP 74	対照	17	20	VDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (244)	5 (34.88)、5 (36.4)
CPP 74	対照	17	21	ATLGPAVRPLPWQR (234)	5 (34.75)
CPP 74	対照	17	21	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	5 (54.69)、5 (53.52)
CPP 74	対照	17	21	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	5 (54.4)、5 (58.19)、5 (30.35)、5 (36.72)、5 (41.81)
CPP 74	対照	17	21	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	5 (10.05)、4 (46.05)
CPP 74	対照	17	21	VASYAAWIDSVLA (243)	5 (56.49)
CPP 74	対照	17	21	VQVLLGAHSLSQPEPSK (245)	5 (62.82)
CPP 74	対照	17	22	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	3 (27.66)、4 (28.76)
CPP 74	対照	17	22	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (236)	4 (49.25)
CPP 74	対照	17	22	DVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (237)	3 (18.47)
CPP 74	対照	17	22	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	3 (62.56)、4 (76.16)、3 (54.05)、4 (50.26)、4 (14.41)

【表１０９】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 74	対照	17	22	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	3 (55.8)
CPP 74	対照	17	22	VASYAAWIDSVLA (243)	4 (39.3)
CPP 74	対照	17	22	VDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (244)	4 (16.98)、4 (41.97)
CPP 74	対照	17	22	VQVLLGAHSLSQPEPSK (245)	3 (24.07)、4 (7.35)
CPP 74	対照	17	23	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	3 (42.19)、4 (52.83)、4 (32.31)
CPP 74	対照	17	23	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (236)	3 (22.03)、4 (25.92)
CPP 74	対照	17	23	DVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (237)	3 (25.31)
CPP 74	対照	17	23	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	3 (56.87)、3 (43.55)、4 (37.23)
CPP 74	対照	17	23	LYDVLR (240)	4 (32.34)
CPP 74	対照	17	23	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	4 (25.74)、3 (73.79)、3 (58.84)、4 (10.38)、3 (16.69)、3 (80.33)、4 (77.72)、4 (60.88)
CPP 74	対照	17	23	VDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (244)	4 (23.77)、4 (49.17)
CPP 74	対照	17	23	VQVLLGAHSLSQPEPSK (245)	4 (73.55)、3 (78.56)
CPP 74	対照	17	24	ATLGPAVRPLPWQR (234)	2 (21.95)
CPP 74	対照	17	24	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (236)	2 (50.87)
CPP 74	対照	17	24	DVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (237)	2 (37.1)、2 (39.13)
CPP 74	対照	17	24	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	2 (54.57)、2 (44.45)
CPP 74	対照	17	24	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	3 (30.81)、2 (35)、1 (9.18)、2 (66.76)、3 (61.77)

【表１１０】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 74	対照	17	24	VASYAAWIDSVLA (243)	2 (102.33)
CPP 74	対照	17	24	VDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (244)	2 (37.38)
CPP 74	対照	17	24	VQVLLGAHSLSQPEPSK (245)	2 (26.39)、2 (53.01)
CPP 74	対照	17	24	VQVLLGAHSLSQPEPSKR (246)	2 (34.66)、2 (50.92)
CPP 74	対照	17	25	ATLGPAVRPLPWQR (234)	2 (29.28)、2 (64.76)
CPP 74	対照	17	25	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	2 (4.15)
CPP 74	対照	17	25	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (236)	1 (53.46)、1 (38.34)
CPP 74	対照	17	25	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	2 (45.37)、2 (88.74)
CPP 74	対照	17	25	VASYAAWIDSVLA (243)	2 (85.07)
CPP 74	対照	17	25	VDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (244)	2 (19.76)、2 (40.01)
CPP 74	対照	17	26	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	3 (62.31)
CPP 74	対照	17	26	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (236)	3 (22.75)、2 (51.73)
CPP 74	対照	17	26	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	1 (29.61)、1 (44.13)
CPP 74	対照	17	26	LYDVLR (240)	3 (44.81)
CPP 74	対照	17	26	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	3 (83.58)、3 (11.8)、1 (10.36)
CPP 74	対照	17	26	VASYAAWIDSVLA (243)	3 (79.99)、1 (64.42)
CPP 74	対照	17	26	VDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (244)	3 (35.37)
CPP 74	対照	17	26	VQVLLGAHSLSQPEPSK (245)	1 (64.02)
CPP 74	対照	17	27	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	3 (38.43)、4 (16.93)
CPP 74	対照	17	27	DVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (237)	3 (28.36)、4 (13.36)、3 (79.19)
CPP 74	対照	17	27	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	3 (36.85)、3 (40.7)、4 (54.49)、3 (41.91)、4 (53.15)

【表１１１】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 74	対照	17	27	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	3 (8.33)、4 (12.27)、3 (97.54)、4 (43.16)、3 (85.48)、3 (76.85)
CPP 74	対照	17	27	VASYAAWIDSVLA (243)	3 (34.13)、4 (44.1)、3 (8.36)
CPP 74	対照	17	27	VDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (244)	4 (26.38)
CPP 74	対照	17	27	VQVLLGAHSLSQPEPSK (245)	3 (31.67)、3 (18.39)、3 (96.24)、4 (82.27)
CPP 74	対照	17	27	VQVLLGAHSLSQPEPSKR (246)	4 (58.78)
CPP 74	対照	17	28	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	3 (57.38)
CPP 74	対照	17	28	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (236)	3 (91.83)、3 (40.22)
CPP 74	対照	17	28	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	3 (1.43)、3 (49.03)
CPP 74	対照	17	28	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	3 (33.46)、3 (87.08)
CPP 74	対照	17	28	VQVLLGAHSLSQPEPSK (245)	3 (61.51)
CPP 74	対照	17	29	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	3 (56.92)、3 (37.64)、4 (22.95)
CPP 74	対照	17	29	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (236)	3 (37.35)
CPP 74	対照	17	29	DVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (237)	3 (24.11)、3 (86.67)
CPP 74	対照	17	29	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	3 (10.48)、3 (49.66)、3 (46.65)、3 (32.96)
CPP 74	対照	17	29	LYDVLR (240)	3 (44.32)
CPP 74	対照	17	29	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	3 (34.03)、3 (11.95)、3 (23.85)、3 (72.22)、4 (78.64)
CPP 74	対照	17	29	VASYAAWIDSVLA (243)	3 (49.35)
CPP 74	対照	17	29	VDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (244)	3 (40.51)

【００８３】

【表１１２】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 74	対照	17	29	VQVLLGAHSLSQPEPSK (245)	3 (31.49)、3 (13.67)、3 (15.66)
CPP 74	対照	17	30	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	3 (39.09)、3 (41.14)
CPP 74	対照	17	30	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (236)	3 (47.13)、3 (55.74)
CPP 74	対照	17	30	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	3 (59.2)、3 (69.72)、3 (50.36)
CPP 74	対照	17	30	KKPGIYTR (239)	3 (56.48)
CPP 74	対照	17	30	LYDVLR (240)	3 (18.49)
CPP 74	対照	17	30	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	3 (53.6)、3 (54.07)、3 (57.68)、3 (86.34)
CPP 74	対照	17	30	VASYAAWIDSVLA (243)	3 (35.72)
CPP 74	対照	17	30	VDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (244)	3 (41.43)、3 (56.08)
CPP 74	対照	17	30	VQVLLGAHSLSQPEPSK (245)	3 (28.94)、3 (42.4)
CPP 74	対照	18	12	VASYAAWIDSVLA (243)	8 (18.41)
CPP 74	対照	18	17	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	8 (30.31)
CPP 74	対照	18	17	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	8 (37.1)
CPP 74	対照	18	17	VASYAAWIDSVLA (243)	8 (31.76)
CPP 74	対照	18	18	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	6 (57.89)
CPP 74	対照	18	18	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	6 (28.06)
CPP 74	対照	18	18	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	6 (39.93)
CPP 74	対照	18	18	VASYAAWIDSVLA (243)	6 (36.02)
CPP 74	対照	18	19	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (236)	6 (43.89)
CPP 74	対照	18	19	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	6 (27.28)

【表１１３】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 74	対照	18	20	ATLGPAVRPLPWQR (234)	5 (38.57)
CPP 74	対照	18	20	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (236)	5 (31.86)
CPP 74	対照	18	20	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	5 (33.51)
CPP 74	対照	18	21	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	5 (85.86)
CPP 74	対照	18	21	VASYAAWIDSVLA (243)	5 (27.66)
CPP 74	対照	18	22	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	4 (59.48)
CPP 74	対照	18	23	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (236)	4 (34.92)
CPP 74	対照	18	24	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	2 (49.9)
CPP 74	対照	18	24	VASYAAWIDSVLA (243)	2 (39.44)
CPP 74	対照	18	24	VDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (244)	2 (46.49)
CPP 74	対照	18	25	ATLGPAVRPLPWQR (234)	2 (51.01)
CPP 74	対照	18	25	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	2 (85.93)
CPP 74	対照	18	25	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	2 (43.7)
CPP 74	対照	18	28	DSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (236)	3 (68.91)
CPP 74	対照	18	28	VASYAAWIDSVLA (243)	3 (10.84)
CPP 74	対照	18	28	VDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGR (244)	3 (45.3)
CPP 74	対照	18	29	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	3 (38.14)
CPP 74	対照	18	29	GDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSR (238)	3 (23.08)
CPP 74	対照	18	29	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	3 (43.14)、3 (65.14)
CPP 74	対照	18	30	ATLGPAVRPLPWQR (234)	3 (31.35)

【表１１４】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 74	対照	18	30	AVPHPDSQPDTIDHDLLLLQLSEK (235)	3 (76.18)
CPP 74	対照	18	30	RPDSLQHVLLPVLDR (241)	3 (16.49)
CPP 75	対照	18	14	ATTVTGTPCQDWAAQEPHR (275)	10 (33.73)
CPP 75	対照	18	14	EPLDDYVNTQGASLFSVTK (276)	10 (64.04)
CPP 75	対照	18	14	HSIFTPETNPR (277)	10 (12.49)
CPP 76	CAD	10	20	VTNGAFTGEISPGMIK (255)	7 (26.73)
CPP 76	CAD	12	20	IIYGGSVTGATCK (250)	6 (51.28)
CPP 76	CAD	13	21	IIYGGSVTGATCK (250)	7 (30.79)
CPP 76	CAD	13	21	SNVSDAVAQSTR (252)	7 (15.75)
CPP 76	CAD	13	22	VPADTEVVCAPPTAYIDFAR (254)	6 (18.8)
CPP 76	CAD	13	22	VVLAYEPVWAIGTGK (256)	6 (22.05)、7 (51.74)
CPP 76	対照	10	20	IAVAAQNCYK (249)	7 (19.73)
CPP 76	対照	10	20	IIYGGSVTGATCK (250)	7 (38.69)
CPP 76	対照	10	20	VAHALAEGLGVIACIGEK (253)	7 (42.53)
CPP 76	対照	10	20	VVLAYEPVWAIGTGK (256)	7 (31.73)
CPP 76	対照	11	19	VVLAYEPVWAIGTGK (256)	9 (36.07)、8 (24.58)
CPP 76	対照	11	20	HVFGESDELIGQK (248)	7 (14.86)
CPP 76	対照	11	20	IAVAAQNCYK (249)	7 (11.31)
CPP 76	対照	11	20	IIYGGSVTGATCK (250)	8 (46.34)
CPP 76	対照	11	20	SNVSDAVAQSTR (252)	7 (51.79)
CPP 76	対照	11	20	VVLAYEPVWAIGTGK (256)	8 (38.73)
CPP 76	対照	12	20	DCGATWVVLGHSER (247)	7 (34.93)
CPP 76	対照	12	20	IIYGGSVTGATCK (250)	7 (42.74)
CPP 76	対照	12	20	RHVFGESDELIGQK (251)	7 (90.14)
CPP 76	対照	12	20	VAHALAEGLGVIACIGEK (253)	7 (43.47)
CPP 76	対照	12	20	VPADTEVVCAPPTAYIDFAR (254)	8 (48.56)、8 (49.97)、7 (47.69)

【表１１５】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 76	対照	12	20	VVLAYEPVWAIGTGK (256)	8 (52.2)
CPP 76	対照	13	20	IAVAAQNCYK (249)	7 (25.36)
CPP 76	対照	13	20	VPADTEVVCAPPTAYIDFAR (254)	7 (54.71)
CPP 77	対照	17	21	GLQDEDGYR (280)	7 (16.42)
CPP 77	対照	17	21	LLATLCSAEVCQCAEGK (282)	7 (71.8)
CPP 77	対照	17	22	VGLSGMAIADVTLLSGFHALR (283)	5 (33.77)
CPP 77	対照	17	23	GLQDEDGYR (280)	5 (12.71)
CPP 77	対照	17	26	LLATLCSAEVCQCAEGK (282)	5 (52.11)
CPP 77	対照	17	27	ITQVLHFTK (281)	5 (35.34)
CPP 77	対照	18	20	AACAQLNDFLQEYGTQGCQV (279)	7 (66.99)
CPP 77	対照	18	20	ITQVLHFTK (281)	7 (30.36)
CPP 78	CAD	18	9	QGVNDNEEGFFSAR (225)	24 (42.67)
CPP 78	対照	3	14	QGVNDNEEGFFSAR (225)	24 (49.09)
CPP 78	対照	9	7	QGVNDNEEGFFSAR (225)	24 (24.86)
CPP 79	対照	3	15	FSGSLLGGK (257)	9 (12.33)
CPP 80	対照	17	18	YQIWTTVVDWIHPDLK (267)	8 (39.99)
CPP 80	対照	17	23	YQIWTTVVDWIHPDLK (267)	5 (38.12)
CPP 81	対照	14	18	ALAGCDFLTISPK (266)	18 (28.21)、16 (43.59)
CPP 82	対照	7	10	ILHCSCQACGK (268)	16 (62.37)、14 (43.38)
CPP 83	対照	7	17	LGKDAVEDLESVGK (273)	8 (22.77)
CPP 84	CAD	5	25	ELAPLFEELR (293)	7 (22.18)
CPP 84	対照	5	29	ELAPLFEELR (293)	7 (21.32)
CPP 84	対照	5	29	KLPSVEGLHAIVVSDR (294)	7 (44.4)
CPP 84	対照	6	22	ELAPLFEELR (293)	9 (19.29)
CPP 84	対照	6	22	SIICYYNTYQVVQFNR (295)	9 (49.81)
CPP 85	対照	2	7	GWTVIQNRQDGSVDFGR (298)	12 (35.32)
CPP 85	対照	3	7	GWTVIQNRQDGSVDFGR (298)	10 (63.56)
CPP 85	対照	3	7	QDGSVDFGR (299)	10 (34.24)
CPP 86	対照	5	13	ATFFSALH (300)	7 (23.16)
CPP 87	対照	10	3	QENCFNPGGGGCSEPR (296)	11 (25.48)
CPP 88	対照	16	30	THDICPSR (291)	7 (18.79)、2 (11.02)、4 (12.65)、5 (12.32)、5 (20.31)

【表１１６】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 89	対照	2	18	KSPQGYSQ (290)	8 (32.13)
CPP 90	対照	2	8	ATALSSIQSGIQQAR (287)	8 (40.17)
CPP 91	対照	13	9	KSAEILTNAK (289)	9 (35.47)
CPP 92	CAD	1	13	MKVTHLQVEK (292)	21 (25.16)、16 (42.09)、22 (35.13)、19 (40.07)
CPP 92	CAD	1	14	MKVTHLQVEK (292)	13 (20.62)
CPP 92	CAD	1	19	MKVTHLQVEK (292)	6 (43.73)
CPP 92	CAD	2	10	MKVTHLQVEK (292)	12 (32.81)、18 (37.62)
CPP 92	CAD	2	11	MKVTHLQVEK (292)	14 (38.45)、22 (34.69)
CPP 92	CAD	2	12	MKVTHLQVEK (292)	19 (39.24)
CPP 92	CAD	2	13	MKVTHLQVEK (292)	17 (21.99)、16 (31.24)、15 (16.71)、14 (24.15)、15 (14.42)、14 (11.42)
CPP 92	CAD	2	15	MKVTHLQVEK (292)	12 (40.4)、18 (32.74)、16 (25.74)、19 (37.97)、12 (29.27)、11 (33.72)
CPP 92	CAD	2	17	MKVTHLQVEK (292)	19 (26.48)
CPP 92	CAD	3	17	MKVTHLQVEK (292)	14 (34.98)、10 (38.71)
CPP 92	CAD	3	19	MKVTHLQVEK (292)	8 (31.35)
CPP 92	CAD	3	20	MKVTHLQVEK (292)	7 (32.89)
CPP 92	CAD	4	15	MKVTHLQVEK (292)	12 (33.38)
CPP 92	CAD	4	17	MKVTHLQVEK (292)	9 (17.65)、16 (26.1)、14 (22.21)
CPP 92	CAD	4	18	MKVTHLQVEK (292)	8 (44.45)
CPP 92	CAD	4	20	MKVTHLQVEK (292)	8 (29.54)

【表１１７】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 92	CAD	5	17	MKVTHLQVEK (292)	8 (36.24)
CPP 92	CAD	6	15	MKVTHLQVEK (292)	9 (18.21)
CPP 92	CAD	6	18	MKVTHLQVEK (292)	9 (45.34)
CPP 92	CAD	6	19	MKVTHLQVEK (292)	9 (22.92)
CPP 92	CAD	7	19	MKVTHLQVEK (292)	9 (50.62)、9 (38.94)
CPP 92	CAD	7	27	MKVTHLQVEK (292)	3 (25.69)
CPP 92	CAD	8	16	MKVTHLQVEK (292)	6 (30.85)
CPP 92	CAD	8	19	MKVTHLQVEK (292)	5 (19.54)、6 (35.01)
CPP 92	CAD	8	20	MKVTHLQVEK (292)	6 (26.77)
CPP 92	対照	1	19	MKVTHLQVEK (292)	8 (36.3)、7 (25.7)
CPP 92	対照	1	24	MKVTHLQVEK (292)	2 (19.66)、2 (23.52)
CPP 92	対照	2	11	MKVTHLQVEK (292)	8 (30.88)
CPP 92	対照	2	14	MKVTHLQVEK (292)	7 (48.02)
CPP 92	対照	2	17	MKVTHLQVEK (292)	8 (35.2)
CPP 92	対照	2	18	MKVTHLQVEK (292)	6 (28.85)、7 (32.01)、5 (22)
CPP 92	対照	2	22	MKVTHLQVEK (292)	3 (25.67)、2 (26.88)
CPP 92	対照	2	23	MKVTHLQVEK (292)	3 (30.81)
CPP 92	対照	3	18	MKVTHLQVEK (292)	6 (31.87)、5 (37.81)、7 (47.81)
CPP 92	対照	3	19	MKVTHLQVEK (292)	5 (17.22)
CPP 92	対照	3	20	MKVTHLQVEK (292)	6 (29.45)、4 (18.39)
CPP 92	対照	3	24	MKVTHLQVEK (292)	4 (23.85)
CPP 92	対照	4	16	MKVTHLQVEK (292)	6 (26.04)
CPP 92	対照	4	18	MKVTHLQVEK (292)	8 (29.13)、6 (35.45)、9 (41.55)
CPP 92	対照	4	19	MKVTHLQVEK (292)	9 (38.37)、8 (38.9)、7 (31.02)
CPP 92	対照	5	20	MKVTHLQVEK (292)	3 (30.5)
CPP 92	対照	5	21	MKVTHLQVEK (292)	3 (33.32)、5 (37.88)、4 (39.49)
CPP 92	対照	5	23	MKVTHLQVEK (292)	5 (30.41)

【００８４】

【表１１８】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 92	対照	5	24	MKVTHLQVEK (292)	1 (28.19)、2 (34.83)、2 (28.24)
CPP 92	対照	6	15	MKVTHLQVEK (292)	8 (18.63)
CPP 92	対照	6	17	MKVTHLQVEK (292)	10 (35.48)、11 (35.16)、10 (21.74)
CPP 92	対照	6	19	MKVTHLQVEK (292)	5 (24.58)、8 (35.98)、8 (32.49)、5 (37.55)
CPP 92	対照	6	21	MKVTHLQVEK (292)	5 (40.72)
CPP 92	対照	6	22	MKVTHLQVEK (292)	4 (37.58)、3 (35.01)
CPP 92	対照	6	23	MKVTHLQVEK (292)	5 (19.86)
CPP 92	対照	7	14	MKVTHLQVEK (292)	9 (24.48)、10 (20.06)
CPP 92	対照	7	16	MKVTHLQVEK (292)	13 (37.44)
CPP 92	対照	7	21	MKVTHLQVEK (292)	6 (24.5)、7 (25.72)
CPP 92	対照	7	22	MKVTHLQVEK (292)	4 (12.67)
CPP 92	対照	8	19	MKVTHLQVEK (292)	4 (24.62)、6 (33.49)、5 (32.92)、5 (36.56)
CPP 92	対照	8	21	MKVTHLQVEK (292)	6 (39.22)
CPP 92	対照	9	16	MKVTHLQVEK (292)	12 (22.38)、11 (30.58)、12 (42.04)、13 (48.15)
CPP 92	対照	9	17	MKVTHLQVEK (292)	11 (38.49)

【表１１９】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 92	対照	13	18	MKVTHLQVEK (292)	6 (14.64)、6 (38.86)、5 (35.78)
CPP 92	対照	17	18	MKVTHLQVEK (292)	8 (25.88)
CPP 93	対照	9	12	FSGSGAGTDFTLK (297)	14 (44.21)、13 (53.42)
CPP 94	対照	4	18	SSNAATISIGGSGELQR (126)	8 (24.01)、8 (13.1)
CPP 95	対照	3	23	LQQVLHAGSGPCLPHLLSR (127)	9 (45.47)
CPP 96	対照	2	15	RSCIECHLSAAGQAR (128)	12 (24.46)、11 (53.62)
CPP 96	対照	2	17	RSCIECHLSAAGQAR (128)	6 (41.8)
CPP 97	対照	3	19	SCIECHLSAAGQAR (131)	7 (28.44)
CPP 98	対照	2	11	VSNTQDASVSIVDYYEPR (130)	19 (37.5)、20 (28.55)
CPP 98	対照	2	12	VSNTQDASVSIVDYYEPR (130)	14 (42.03)、14 (81.5)、15 (34.59)
CPP 99	対照	4	17	TQRSLSAELEIPAVK (132)	8 (17.6)

【表１２０】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 100	対照	2	11	LKPYVAAQLDVLPETFTLGDK (133)	16 (23.92)
CPP 101	対照	12	13	MWQLEEKLTYSHLENIQR (134)	17 (43.15)
CPP 102	CAD	11	14	MELLGCQFIPK (135)	11 (30.01)
CPP 102	対照	10	15	MELLGCQFIPK (135)	8 (21.43)
CPP 102	対照	10	17	MELLGCQFIPK (135)	7 (21.86)
CPP 102	対照	10	26	MELLGCQFIPK (135)	1 (22.21)
CPP 103	対照	1	21	MKDTVQK (136)	8 (45.21)
CPP 103	対照	18	16	MKDTVQK (136)	10 (33.96)
CPP 104	対照	5	25	MDESKEGSIQGLEEMQVER (137)	3 (49.53)
CPP 105	対照	5	16	VGEAAHALGNTGHEIGR (138)	4 (26.42)、4 (55.2)
CPP 106	対照	4	7	EAPKVVEEQESR (139)	8 (21.73)
CPP 107	対照	4	7	AACAQLNDFLQEYGTQGCQV (142)	9 (75.89)
CPP 108	対照	11	18	HLVPGAPFLLQALVR (140)	7 (16.95)
CPP 109	CAD	2	11	TPIAAGHPSMNLLLR (141)	17 (42.06)、18 (44.31)
CPP 109	対照	3	14	TPIAAGHPSMNLLLR (141)	12 (38.44)、14 (30.97)、13 (39.65)

【表１２１】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 109	対照	4	23	TPIAAGHPSMNLLLR (141)	4 (38.75)
CPP 109	対照	4	25	TPIAAGHPSMNLLLR (141)	3 (33.55)
CPP 109	対照	6	13	TPIAAGHPSMNLLLR (141)	20 (44.04)
CPP 110	対照	5	28	ATEDAKPVKIK (143)	8 (19.02)
CPP 111	CAD	5	24	SALTRLASFAR (144)	5 (25.86)
CPP 111	対照	3	15	SALTRLASFAR (144)	16 (22.52)
CPP 111	対照	6	22	SALTRLASFAR (144)	7 (33.35)
CPP 111	対照	8	15	SALTRLASFAR (144)	12 (34.99)
CPP 112	対照	6	22	NSHTDSASMDK (145)	4 (32.15)
CPP 113	対照	5	17	NGIDIYSLTVDSR (146)	4 (26.07)
CPP 114	対照	6	22	IASMEIPNDDLK (147)	8 (23.52)
CPP 115	対照	11	25	TDIDVLITAIIK (148)	6 (28.32)
CPP 116	対照	13	16	TPDVSSALDK (149)	9 (25.44)、10 (19.27)、10 (49.73)、11 (30.45)、11 (32.86)、11 (18.19)
CPP 116	対照	13	16	TPDVSSALDKLK (150)	9 (6.19)、10 (53.49)、11 (40.21)、11 (24.57)
CPP 117	対照	4	8	IYDPVCGTDGNTYPNECVLCFENR (151)	8 (75.72)

【表１２２】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 118	対照	18	18	QLSAAAK (152)	6 (28.58)
CPP 119	対照	1	24	TNLESILSYPK (153)	7 (26.89)、7 (17.47)、6 (14.05)、6 (15.26)
CPP 120	対照	14	20	LSPLGEEMR (154)	15 (22.04)
CPP 120	対照	15	20	LSPLGEEMR (154)	11 (26.52)、11 (17.87)、8 (11.51)
CPP 120	対照	17	24	LSPLGEEMR (154)	6 (10.08)
CPP 120	対照	17	25	LSPLGEEMR (154)	6 (27.48)、6 (21.7)
CPP 121	対照	17	23	EQMSAKR (155)	4 (12.69)
CPP 122	対照	9	16	VTEPISAESGEQVER (156)	15 (31.19)
CPP 123	対照	4	7	LQAADTCPEVK (157)	8 (36.64)
CPP 124	対照	4	7	IPEPFPLPEDK (158)	13 (27.55)、12 (30.53)、13 (17.27)
CPP 125	対照	12	4	QETWENGESSLIMNK (159)	6 (42.8)
CPP 126	対照	6	15	SRQSVVTLQGSAVVANR (83)	12 (46.11)
CPP 126	対照	7	14	SRQSVVTLQGSAVVANR (83)	11 (39.45)、9 (16.09)
CPP 126	対照	8	12	SRQSVVTLQGSAVVANR (83)	7 (28.42)
CPP 126	対照	9	13	SRQSVVTLQGSAVVANR (83)	15 (40.53)
CPP 127	CAD	5	20	REIDVLQLVVDVDGNIVNEVK (160)	17 (6.65)
CPP 127	対照	4	19	REIDVLQLVVDVDGNIVNEVK (160)	10 (18.4)、10 (20.8)
CPP 128	対照	15	19	QTEDYCLASNK (161)	15 (27.31)
CPP 129	対照	4	23	AHGQESAIFNEVAPGYFSR (162)	12 (38.33)
CPP 129	対照	5	28	AHGQESAIFNEVAPGYFSR (162)	2 (74.49)
CPP 129	対照	5	29	AHGQESAIFNEVAPGYFSR (162)	7 (37.85)
CPP 130	対照	5	28	HVIQAVNTSPER (163)	3 (27.53)
CPP 131	対照	18	21	VEPLYELVTATDFAYSSTVR (164)	6 (15.64)
CPP 132	対照	18	25	GILNEIKDR (165)	3 (27.9)
CPP 133	対照	18	7	LCGGGIQER (166)	8 (17.37)
CPP 134	対照	13	12	SARLGHSRPVGYWK (167)	12 (21.86)
CPP 135	対照	11	23	YYYVCQYCPAGNNMNR (168)	2 (32.69)

【表１２３】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 136	対照	9	17	VQEAHLTEDQIFYFPK (169)	13 (43.26)
CPP 136	対照	10	18	VQEAHLTEDQIFYFPK (169)	8 (86.71)
CPP 137	対照	9	5	IWCSENTVKAASLIR (170)	9 (47.18)
CPP 138	対照	9	5	EAAQAIFPSMARALQK (171)	11 (51.13)
CPP 139	対照	1	9	AGFAGDDAPR (172)	9 (25.52)
CPP 139	対照	1	11	AGFAGDDAPR (172)	9 (28.84)
CPP 140	対照	15	5	ASFEELCSEYRK (84)	8 (59.6)
CPP 141	対照	8	12	LVFFAEDVGSNK (173)	8 (26.87)
CPP 142	対照	18	17	LALELEK (174)	9 (15.8)
CPP 143	対照	13	18	IENIDHLGFFIYR (123)	10 (63.35)
CPP 143	対照	13	18	LTAYLDLNLDK (124)	9 (18.36)
CPP 143	対照	13	18	NLLELLINIK (125)	11 (29.98)、9 (29.18)、10 (12.55)
CPP 144	対照	6	10	LYAQDADGCPIDIK (288)	12 (49.53)
CPP 145	対照	8	22	KAGLVIPPEK (301)	8 (14.28)
CPP 146	対照	8	16	SPGPNVAVNAK (121)	7 (37.03)
CPP 146	対照	8	16	YQLGSGEAR (122)	7 (26.76)
CPP 147	CAD	3	17	ILHSQVAGRLIIR (129)	9 (20.13)
CPP 147	CAD	4	24	ILHSQVAGRLIIR (129)	7 (22.55)
CPP 147	CAD	5	14	ILHSQVAGRLIIR (129)	12 (36.06)

【表１２４】

表３

タンパク質	プロテオーム	CEX	RP1	トリプシン配列（配列番号）	実験番号（Olav スコア）
CPP 147	CAD	5	26	ILHSQVAGRLIIR (129)	2 (32.65)
CPP 147	CAD	6	15	ILHSQVAGRLIIR (129)	16 (49.13)
CPP 147	CAD	6	16	ILHSQVAGRLIIR (129)	10 (26.61)
CPP 147	CAD	8	15	ILHSQVAGRLIIR (129)	19 (25.18)
CPP 147	CAD	11	13	ILHSQVAGRLIIR (129)	9 (20.9)
CPP 147	対照	1	15	ILHSQVAGRLIIR (129)	15 (28.1)
CPP 147	対照	3	18	ILHSQVAGRLIIR (129)	7 (47.61)
CPP 147	対照	3	23	ILHSQVAGRLIIR (129)	4 (36.34)
CPP 147	対照	4	15	ILHSQVAGRLIIR (129)	13 (34.21)
CPP 147	対照	4	25	ILHSQVAGRLIIR (129)	3 (49.76)
CPP 147	対照	5	21	ILHSQVAGRLIIR (129)	7 (35.61)
CPP 147	対照	5	22	ILHSQVAGRLIIR (129)	6 (22.54)
CPP 147	対照	5	27	ILHSQVAGRLIIR (129)	2 (35.63)
CPP 147	対照	6	14	ILHSQVAGRLIIR (129)	15 (51.44)
CPP 147	対照	7	10	ILHSQVAGRLIIR (129)	10 (39.14)
CPP 147	対照	8	12	ILHSQVAGRLIIR (129)	9 (50.36)、11 (26.36)
CPP 147	対照	10	12	ILHSQVAGRLIIR (129)	9 (46.07)
CPP 147	対照	10	14	ILHSQVAGRLIIR (129)	11 (27.41)
CPP 147	対照	15	10	ILHSQVAGRLIIR (129)	12 (52.7)
CPP 148	対照	2	17	CPNVHCLSPVHIPHLCCPR (82)	6 (22.97)

【００８５】

ＣＰＰ核酸

本発明の１つの局面は、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。

【００８６】

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れ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れ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。

【００８７】

別の好ましい局面では、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。

【００８８】

本発明の別の対象は、表３に列記したペプチド配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、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、標的結合部位またはジスルフィド結合部位のような、１個またはそれ以上のモチーフをコードする。

【００８９】

ＣＰＰ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ＣＰＰ（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ＣＰＰ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。

【００９０】

「ＣＰＰ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、ＣＰＰの生物活性を有するポリペプチドをコードする、ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ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。

【００９１】

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

【００９２】

前記したＣＰＰヌクレオチド配列に加えて、ＣＰＰ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ＣＰＰ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。

【００９３】

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ＣＰＰ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ＣＰＰ核酸に対する相同性に基づいて単離することができる。

【００９４】

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。

【００９５】

ＣＰＰ核酸の使用

ＣＰＰ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、ＣＰＰコード化核酸は薬学的な介在のための、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ＣＰＰ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ＣＰＰ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。

【００９６】

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ｉｉ）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。

【００９７】

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（リボプローブ）。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ー、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。

【００９８】

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。正常な遺伝子型に比較して、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。ＲＮ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。

【００９９】

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３９４ＤＮＡ／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。

【０１００】

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。

【０１０１】

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。

【０１０２】

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。さらに別の実例には、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、かかる構造特性は、例えばUrdea et al.,（Nucleic Acids Symp. Ser. 24:197－200、1991）または欧州特許第０２２５８０７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。

【０１０３】

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。

【０１０４】

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。

【０１０５】

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の）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の）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個またはそれ以上の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。

【０１０６】

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。

【０１０７】

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ＣＰＰ配列の天然発生アレル変異体に加えて、ＣＰＰ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ＣＰＰの機能的能力を変化させるかまたは変化させずに、コードされたＣＰＰ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。

【０１０８】

変異体のいくつかの型には１）１個もしくはそれ以上の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個もしくはそれ以上のアミノ酸残基が置換基を含むもの；または３）変異したＣＰＰ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、ＣＰＰ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ＣＰＰ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。

【０１０９】

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、ＣＰＰ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ＣＰＰ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。

【０１１０】

別の局面では、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、ＣＰＰをコードする核酸分子に関連する。別の局面では、本発明はＣＰＰ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ＣＰＰをコードする核酸分子に関連する。かかるＣＰＰはＣＰＰ３０－１４８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個またはそれ以上のＣＰＰ生物学的活性の本質的な欠如を表示する。

【０１１１】
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ＣＰＰ３０－１４８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個またはそれ以上の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、ＣＰＰ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、別の態様では、飽和変異誘発によるように、ＣＰＰ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ＣＰＰ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。ＣＰＰ３０－１４８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。

【０１１２】
本発明またはＣＰＰキメラまたは融合タンパク質をも提供する。ＣＰＰ「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ＣＰＰ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ＣＰＰまたはそのフラグメントを含む。好ましい態様では、ＣＰＰ融合タンパク質は少なくとも１つのＣＰＰの生物学的活性部分を含む。さらに別の好ましい態様では、ＣＰＰ融合タンパク質は少なくとも２つのＣＰＰの生物学的活性部分を含む。例えば１つの態様では、融合タンパク質は、ＣＰＰドメイン配列がＧＳＴ配列のＣ末端に融合されているＧＳＴ－ＣＰＰ融合タンパク質である。かかる融合タンパク質は組換えＣＰＰの精製を促進することができる。さらに別の態様では、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ＣＰＰである。なおさらに別の態様では、融合はＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰフラグメントをＩｇＧ　Ｆｃ部分に融合させることにより、２価のＣＰＰ結合部位を形成することができる。

【０１１３】
本発明のＣＰＰ融合タンパク質を、対象において抗ＣＰＰ抗体を製造するために、ＣＰＰまたはＣＰＰリガンドを精製するために、そしてスクリーニングアッセイにおいてＣＰＰモジュレーターを同定するために、免疫原として用いることができる。

【０１１４】
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ＣＰＰ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－Ｍｏｃまたはｔ－Ｂｏｃ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ＣＰＰ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、ＣＰＰのペプチジル部分を、その各々がＣＰＰの別個のフラグメントを含有するチオレドキシン融合タンパク質として発現することにより、ＣＰＰ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ＰＣＴ公開第ＷＯ９４／０２５０２参照（その開示は出典明示により本明細書の一部とする））。

【０１１５】

加えて、ＣＰＰコード化配列のフラグメントのライブラリーを用いて、ＣＰＰの変異体のスクリーニングおよび続く選択のためのＣＰＰ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つの態様では、分子あたり約１回のみニッキングを生じる条件下で、ＣＰＰコード化配列の二本鎖ＰＣＲフラグメントをヌクレアーゼで処理し、二本鎖ＤＮＡを変性し、ＤＮＡを再生して異なるニッキ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ＤＮＡを形成し、Ｓ１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ＣＰＰ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。

【０１１６】

ペプチドのアミノ酸配列における変化が機能的ＣＰＰ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ＣＰＰ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。

【０１１７】

ＣＰＰ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 Chemistrty 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。

【０１１８】

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元来の化学的ライゲージ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β－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β－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。

【０１１９】
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６１８４３４４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ミリモルとの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^{α}－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^{α}－Ｂｏｃアミノ酸（１．１ミリモル）をＨＢＴＵ（ＤＭＦ中０．５Ｍ）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ン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。

【０１２０】
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、ＤＩＥＡ６ミリモルの存在下、ＨＢＴＵ３.６ミリモルでN^{α}－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、ＤＩＥＡ６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ＨＢＴＵ２.７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％H_2O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。

【０１２１】
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、６Ｍ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０．１Ｍリン酸塩バッファー（ｐＨ８．５）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。

【０１２２】

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）－ホスフィンを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。

【０１２３】

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ールで逆相ＨＰＬＣにより単離する。

【０１２４】

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、そしてクローン化およびＣＰＰ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ＣＰＰ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, Currennt 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個またはそれ以上のシグナル配列、複製起点、１個またはそれ以上のマーカー遺伝子、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個またはそれ以上の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。

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、ＣＰＰ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ＣＰＰを生成する。当業者により確認されているように、ＣＰＰ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ー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。

【０１２５】

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ろう。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シングを確実にするように選択することができる。特に興味深いのはキイ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。

【０１２６】

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。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個またはそれ以上の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適当であり、２：プラスミド起点は酵母に適当であり、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ＣＰＰの適切なプロセ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ＣＭＶ前初期プロモーター、ＨＳＶチミジンキナーゼプロモーター、初期および後期ＳＶ４０プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）のプロモーターのようなレトロウイルスＬＴＲ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。

【０１２７】

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有する。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有する。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。

【０１２８】

ＣＰＰ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当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、ＣＰＰをコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを、原核または真核細胞膜を通したＣＰＰ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ＣＰＰを直接的のみならず、異種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か、またはベクターに挿入されるＣＰＰコード化ＤＮＡ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、ｌｐｐ、または熱安定性エンテロトキシンＩＩ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ベロミセスａ因子リーダー、後者は米国特許第５０１０１８２号に記載）、または酸ホスファターゼリーダー、カンジダ・アルビカンスグルコアミラーゼリーダー（１９９０年４月４日に公開された欧州特許第３６２１７９号）、または１９９０年１１月１５日に公開されたＷＯ９０１１３６４６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、Calf.)のような商業用提供者から入手可能である。

【０１２９】

細菌系における発現

「ＢＬＵＥＳＣＲＩＰＴ」Phagemid（Stratagene）または「ｐＳＰＯＲＴ１」（Gibco BRL）のハイブリッドｌａｃＺ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、「ＢＬＵＥＳＣＲＩＰＴ」（ａ－ガラクトシダーゼ；Stratagene）またはｐＧＥＸ（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ＲＮＡポリメラーゼを結合し、そしてＣＰＰ遺伝子のコード化配列のｍＲＮＡ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ＲＮＡ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。実例には、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ｔａｔプロモーターはｔｒｐおよびｌａｃ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ＲＮＡ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ＣＰＰ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に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ＣＰＰ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ＣＰＰコード化配列がアミノ末端Ｍｅｔおよびベーター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ＢＬＵＥＳＣＲＩＰＴ（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；ＰＩＮベクター（Van Heeke & Schuster Ｊ Biol Chem 264:5503－5509 (1989)）；ＰＥＴ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。実例には、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。

【０１３０】

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・アルビ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、クルイベロミセス・フラギリスおよびクルイベロミセス・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・ポンベ、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、グリセロアルデヒド－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、ＡＤＨ２１ＧＡＰＤＨ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ＰＧＨ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７３６５７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ＡＤＥ２．ＨＩＳ４．ＬＥＵ２．ＴＲＰ１．およびＡＬＧ７；Ｇ４１８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ＣＵＰ１遺伝子が挙げられる。目的のＣＰＰをコードするＤＮＡからのＣＰＰ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、ＣＰＰ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。ＣＰＰの分泌のために、選択されたプラスミドにＣＰＰをコードするＤＮＡを、ＣＰＰの発現のために、プロモーターをコードするＤＮＡ、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－ＰＡＧＥによる分離およびクーマシーブルー色素でのゲルの染色の後に分析することができる。組換えＣＰＰ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。

【０１３１】

哺乳動物系における発現

哺乳動物細胞においてＣＰＰ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Ｅ１またはＥ３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ＰＣＴ／ＵＳ９７／０１０１９およびＰＣＴ／ＵＳ９７／１０１０４８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ＲＮＡポリメラーゼを結合し、そしてＣＰＰのコード化配列のｍＲＮＡへの下流（３’）転写の開始が可能である任意のＤＮＡ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２５－３０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ＴＡＴＡボックスを有する。ＴＡＴＡボックスはＲＮＡポリメラーゼＩＩに正確な部位でＲＮＡ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ＴＡＴＡボックスの上流１００から２００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。実例には、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（１９８９年７月５日公開のＵＫ２２１１５０４）、（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４０（ＳＶ４０）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ＣＰＰをコードするＤＮＡ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１０から３００ｂｐのＤＮＡ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（グロブリン、エラスターゼ、アルブミン、ａ－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。実例には、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実例には、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有する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有する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実例には、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。

【０１３２】

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サル細胞を、１０％ウシ胎仔血清および２ｍＭグルタミンを含有する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ＤＮＡ５０μｇを含有するＤＭＥ４ｍｌと置き換える。プレートを３７℃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℃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（１００μｇ／ｌ）を標準的な濃度で含有するＤＭＥを加える。次いで細胞を３７℃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インサートを含有するｐＣＤ（ＳＲα）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。

【０１３３】

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ープタグの上流に融合する。オートグラファ・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。ＣＰＰ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。ＣＰＰ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、ＣＰＰを発現するスポドプテラ・フルギペ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)）。ＣＰＰ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（ＩｇＧのＦｃ領域と同様）が挙げられる。ｐＶＬ１３９３（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、ＣＰＰコード化ＤＮＡまたはＣＰＰ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・フルギペルダ（「Ｓｆ９」）細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１７１１）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。Ｓｆ９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., BACULOVIRUS 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Ｓｆ９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ＣＰＰ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ＩｇＧタグ化（またはＦｃタグ化）ＣＰＰの精製を行うことができる。

【０１３４】

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に、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、ＣＰＰ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でよく、そして元来の配列ＣＰＰ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。

【０１３５】

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ＣＰＰ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ＣＰＰの性質に依存する。ＣＰＰ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、ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＤＥＡＥ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；ＩｇＧ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；ＣＰＰ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ＨＰＬＣ；クロマトフォーカシング；ＳＤＳ－ＰＡＧＥ；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ＣＰＰ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ＣＰＰ抗体カラムを用いてＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ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。

【０１３６】

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つの態様では、本発明の宿主細胞は、ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ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個またはそれ以上の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実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ＤＮＡであり、それによりトランスジェニック動物の１個またはそれ以上の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ＤＮＡ分子との間の相同組換えにより内因性遺伝子が変化している、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。

【０１３７】

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ＣＰＰ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。ＣＰＰ　ｃＤＮＡ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ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ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４８７００９９号、Wagner et al.,による米国特許第４８７３１９１号、ならびにHogan, B., Manipulating 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ＣＰＰ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ＣＰＰ ｍＲＮＡ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、ＣＰＰ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。

【０１３８】

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ＣＰＰ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、ＣＰＰ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。ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰをコードするヌクレオチド配列を有するｃＤＮＡ）。例えば、マウスＣＰＰ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。好ましい態様では、相同組換え時に内因性ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ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、ＣＰＰコード化配列の変化した部分はその５’および３’末端でＣＰＰ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、数キロ塩基のフランキングＤＮＡ（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ＣＰＰ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ＤＮＡ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ＤＮＡ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ＰＣＴ国際公開第ＷＯ９０／１１３５４号；Smithies et al.,による第ＷＯ９１／０１１４０号；Zijlstra et al.,による第ＷＯ９２／０９６８号ならびにBerns et al.,によるＷＯ９３／０４１６９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。

【０１３９】

別の態様では、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Ｐ１のｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼ系である。ｃｒｅ／ｌｏｘＰ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（0'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、そして他方はリ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。

【０１４０】

ＣＰＰ活性の評価

本発明はさらにＣＰＰの機能的フラグメントおよび変異体ならびにＣＰＰ配列の活性を試験する、またはそれを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ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰの機能を評価する方法は：（ａ）ＣＰＰ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；そして（ｂ）ＣＰＰ活性に適当な条件下で該ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ活性を観察することを含むことができる。別の実例では、ＣＰＰ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ＣＰＰ生物学的活性を観察する。

【０１４１】

ＣＰＰ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減少したレベルで循環すること；（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；（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標的分子との相互作用；そして、（７）特異的なタンパク質分解などの翻訳後プロセシングを受けること；が挙げられる。

【０１４２】

当分野で公知の任意の適当な方法によりＣＰＰ生物学的活性を検定することができる。例えば「抗ＣＰＰ抗体」および「ＣＰＰ抗体の使用」と題したセクションで記載するように、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」に記載するように血漿中の循環を検出することができる。ＣＰＰ標的分子との相互作用は、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に記載される、本明細書に記載の方法により検出され得る。

【０１４３】

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。

【０１４４】

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、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。

【０１４５】

特定のタンパク質分解は、試料ペプチドの分子量と既知の分子量のペプチドの分子量の比較により検出され得る。分子量は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ゲルクロマトグラフィー、または質量分析などの当技術分野で常套的ないくつかの方法により容易に比較される。好ましくは、被験ペプチドの分子量は質量分析により得られ、そして翻訳後修飾を有するペプチドの分子量を含むデータベースと比較する。例えば、データベースには、Ｇｅｎｐｅｐｔ、ＳＷＩＳＳＰＲＯＴ、ＥＭＢＬ、およびタンパク質配列データベースが含まれる。かかる技術は、さらに本明細書に詳述される。

【０１４６】

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。

【０１４７】

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。

【０１４８】

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回またはそれ以上の注射の後、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ーミコラート）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。

【０１４９】

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

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。

【０１５０】

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ールを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０．２ｍｇ／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., Chap42(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。

【０１５１】

モノクローナル抗体

あるいは、抗ＣＰＰ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宿主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)）。免疫剤は典型的にはＣＰＰ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を含む。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（「ＰＢＬ」）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個またはそれ以上の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（ＨＧＰＲＴ）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（ＨＡＴ）、ＨＧＰＲＴ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ＨＡＴ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（ＡＴＣＣ）, 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)）。

【０１５２】

ハイブリドーマ細胞を培養する培養培地（上清）を、ＣＰＰ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

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、または放射イムノアッセイ（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。

【０１５３】

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、そしてシークエ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髄腫細胞のような、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可変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。

【０１５４】

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合わさ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。

【０１５５】

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ヤ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。

【０１５６】

ＣＰＰペプチドキャリヤ

本発明はＣＰＰから誘導された免疫原、およびキャリヤと本発明のペプチドとの間の結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。キャリヤ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、得られた結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。キャリヤには、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、キャリヤは血清アルブミン、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、卵白アルブミンまたはフィブリノーゲンのようなタンパク質である。

【０１５７】

合成ペプチドをキャリヤ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., Gentetic 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ヤ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, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier、New York、1985), chapter 20と本質的に同一である。ペプチドをキャリヤ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－ヒドロキシサクシンイミドエステル（ＭＢＳ）である。所定のペプチドのタンパク質キャリヤ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、ＢＤＢ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一の配列とは明らかに異なる。α－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。キャリヤ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。

【０１５８】

好ましいキャリヤはタンパク質であり、そして好ましいタンパク質キャリヤ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（ｐＨ７．５）、０．１Ｍホウ酸ナトリウムバッファー（ｐＨ９．０）、または１．０Ｍ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ４．０）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、１０ｍＭリン酸ナトリウムバッファー（ｐＨ７．２）０．２５ｍｌ中ＫＬＭ　４ｍｇをＭＢＳ（ジメチルホルムアミドに溶解させる）０．７ｍｇ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５０ｍＭリン酸ナトリウムバッファー（ｐＨ６．０）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（ＯＤ２８０によりモニタリング）はおよそ８０％であると予測される。次いでＫＬＨ－ＭＢＳを選択したバッファー１ｍｌに溶解したペプチド５ｍｇ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－キャリヤ結合体が利用されると、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号等に開示されるように、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。

【０１５９】

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個またはそれ以上の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。

【０１６０】

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。

【０１６１】

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。

【０１６２】

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。

【０１６３】

ＣＰＰ抗体を機能的モジュレーター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。

【０１６４】
抗体フラグメントの使用もまた周知である；例えばＦａｂフラグメント：Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier、Amsterdam、1985)；およびＦｖ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。
【０１６５】
好ましくは、モノクローナル抗体、Ｆｖフラグメント、Ｆａｂ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ＣＰＰ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ＣＰＰに対する親和性を、プラスモン共鳴、ＥＬＩＳＡ、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ＢＩＡコア２０００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、ＥＬＩＳＡにより親和性を測定する。好ましくは、ＣＰＰ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；ならびに最も好ましくは、かかる解離定数は10^{-9}から10^{-11}モル濃度の範囲である。
【０１６６】
加えて、本発明の抗体はＣＰＰ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。
【０１６７】
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。
【０１６８】
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（Ster

nberger, 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）。

【０１６９】

本発明の抗体を用いるアッセイの１つの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ってよい。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、ポリメタアクリラート、ポリ（エチレンテレフタラート）、レーヨン、ナイロン、ポリ（ビニルブチラート）、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, “Immobillized Enzymes” Press, New York (1978)およびCuatrecasas, J. Bio. Chem., 245:3059 (1970)を参照のこと）。本発明のこの局面に従ってアッセイを実施するときに、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ＣＰＰ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デターミナントＥＬＩＳＡ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ＣＰＰに特異的な抗体でコーティングする。通常水性溶媒中のＣＰＰ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ＣＰＰを除去し、そして再度、通常水性溶媒中でＣＰＰ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ＣＰＰの量に関連する。

【０１７０】

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。

【０１７１】

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ＣＰＰ抗体（例えばモノクローナル抗体）を用いてＣＰＰを単離することができる。例えば抗ＣＰＰ抗体は細胞からの天然のＣＰＰ、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ＣＰＰ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ＣＰＰの検出を助けるために、またはＣＰＰの発現の存在度およびパターンを評価するために、抗ＣＰＰ抗体を用いてＣＰＰを単離することができる。抗ＣＰＰ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。

【０１７２】

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シングが提供される。

【０１７３】

これらの方法は：コンビナトリアル、生化学的分離およびＣＰＰ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ＣＰＰ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個またはそれ以上のシグナルの同時伝達が可能になる。

【０１７４】
質量分析によるＣＰＰ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。
【０１７５】
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（ＦＡＢ）、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（ＥＳＩ）およびマトリックス支援レーザー脱離／イオン化（ＭＡＬＤＩ）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（ＴＯＦ）、イオントラップ（ＩＴＭＳ）、フーリエ変換イオンサイクロトロン（ＦＴＭＳ）、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ＭＳに関しては米国特許第５５７２０２５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用することができる。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。
【０１７６】
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５６４００１０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ＦＴＭＳ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。
【０１７７】
ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦに関しては、乾燥液滴（Karasand 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）、結晶粉砕（Xiang et al., Rapid Coumm. 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 Coumm. 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。
【０１７８】
ＭＡＬＤＩ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（ＬＤＩＭＳ）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。

【０１７９】

ＴＯＦ質量分析におけるイオン検出を典型的には電子倍増管（ＥＭＰ）またはマイクロチャネルプレート（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。

【０１８０】

好ましい局面では、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。

【０１８１】

好ましい局面では、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。

【０１８２】

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にアクセスできる（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クエンシングの方法は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。

【０１８３】

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。

【０１８４】

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。

【０１８５】

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。

【０１８６】

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。

【０１８７】

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シング事象がある。

【０１８８】

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イ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。

【０１８９】

質量分析器により１個またはそれ以上のＣＰＰ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個またはそれ以上のＣＰＰ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。

【０１９０】

診断および予後診断用途

本明細書で記載する核酸分子、タンパク質、タンパク質相同体、および抗体を１個またはそれ以上の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、薬物スクリーニ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方法において。

本発明はさらに記載するようなＣＰＰ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。ＣＰＰおよびＣＰＰ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。

【０１９１】

本発明は２個またはそれ以上の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。

【０１９２】

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ＣＰＰ）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。

【０１９３】

ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰポリペプチドの特徴と比較すること；の工程を含む生物学的試料中のＣＰＰを検出する方法を提供する。

【０１９４】

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）ＣＰＰ ｍＲＮＡまたはＣＰＰコード化遺伝子における遺伝的変化を検出し、そしてＣＰＰ活性を調整することができる。加えて、ＣＰＰを用いて天然発生ＣＰＰ標的分子をスクリーニングし、そしてＣＰＰ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ＣＰＰ抗体を用いてＣＰＰを検出および単離し、ＣＰＰの生物学的利用率を調節し、そしてＣＰＰ活性を調整することができる。

【０１９５】

したがって本発明の１つの態様は本発明の分子（例えばＣＰＰ、ＣＰＰ核酸、ＣＰＰモジュレーター、または抗体）を用いて、例えば前記のいずれかのＣＰＰ活性が示される障害を診断、および／または予測する使用方法に関係する。別の態様では、本発明は、本発明の分子を、例えば、前記の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／または予測に用いる使用方法に関係する。

【０１９６】

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ＣＰＰ核酸にハイブリダイズするポリヌクレオチド；またはｉｉ）ＣＰＰ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ｍＲＮＡ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、ＣＰＰ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ＣＰＰ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、ここで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。

【０１９７】

特定の態様では、検出はアンカーＰＣＲまたはＲＡＣＥ　ＰＣＲのようなポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）（例えば米国特許第４６８３１９５号および第４６８３２０２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（ＬＣＲ）（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ＣＰＰ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）。

【０１９８】

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ＣＰＰまたはＣＰＰをコードするＣＰＰ　ＲＮＡ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ＣＰＰ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ＣＰＰまたは該ＣＰＰ　ＲＮＡ種の量の増加は、該哺乳動物でＣＰＰ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ＣＰＰまたは該ＣＰＰ　ＲＮＡ種の量の減少は、該哺乳動物でＣＰＰ発現レベルが低下していることを示す。

【０１９９】

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つの局面は、それにより個体が異常なＣＰＰ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、または障害を発症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ＣＰＰおよび／または核酸発現ならびにＣＰＰ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ＣＰＰ、核酸発現または活性が関連する障害を発症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ＣＰＰ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、ＣＰＰ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。

【０２００】

「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ＣＰＰ　ｍＲＮＡ、タンパク質またはゲノムＤＮＡ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、ＣＰＰ　ｍＲＮＡ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。ＣＰＰの検出のためのインビトロ技術は、質量分析、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ウェスタンブロット、免疫沈澱および免疫蛍光を含む。ＣＰＰコード化ゲノムＤＮＡの検出のためのインビトロ技術はサザンハイブリダイゼーション

を含む。さらにＣＰＰの検出のためのインビボ技術には標識抗ＣＰＰ抗体を個体に導入することを含む。

【０２０１】

好ましい態様では、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ＣＰＰの１つをコードする遺伝子の変異；または（ｉｉ）ＣＰＰ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）ＣＰＰコード化遺伝子からの１個またはそれ以上のヌクレオチドの欠失、（ｉｉ）１個またはそれ以上のヌクレオチドの遺伝子への付加、（ｉｉｉ）遺伝子の１個またはそれ以上の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ＣＰＰ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。

【０２０２】

さらに別の実例的な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ＣＰＰ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個またはそれ以上の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ＣＰＰ核酸のメチル化パターンの異常を検出することができきる。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、ＣＰＰ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。

【０２０３】

さらに別の態様では、ＣＰＰ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、ＣＰＰ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）ＣＰＰ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シークエ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個またはそれ以上のＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰと相対してＣＰＰ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ＣＰＰ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、ＣＰＰ標的タンパク質およびＣＰＰ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ＣＰＰ標的タンパク質の野生型形態に相対して、ＣＰＰに関して高いまたは低い結合親和性を有するＣＰＰ標的タンパク質変異体を検出することもできる。

【０２０４】

実例的な態様では、本明細書にて記載するような、ＧＳＴ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。

【０２０５】

別の態様では、方法はさらに生物学的試料中のＣＰＰ、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡのレベルを測定し、そして対照試料中のＣＰＰ、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡのレベル

を被験試料中で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ＣＰＰ、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡ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係する。本発明はまた生物学的試料中のＣＰＰ、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡ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ＣＰＰ、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡ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ＣＰＰの量を決定するための手段；および試料中のＣＰＰ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ＣＰＰ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。

【０２０６】

「薬物スクリーニングアッセイ」

本発明はＣＰＰ発現またはＣＰＰ生物学的活性を増強または阻害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、ペプチド模倣体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。

【０２０７】

本発明を例えばＣＰＰモジュレーターまたは薬剤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とき、少なくとも１つのＣＰＰ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。本発明のこの局面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。

【０２０８】

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ＣＰＰ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障害剤としてさらに試験するために選択することができる。

【０２０９】

別の局面では、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ＣＰＰ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障害剤としてさらに試験するために選択することができる。

【０２１０】

ＣＰＰ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。

【０２１１】

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、ＣＰＰ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。あるいは、特定の態様では、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。

【０２１２】

別の態様では、アッセイは、ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ活性を調整する能力の決定を、ＣＰＰ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。

【０２１３】

１つの態様では、本発明は、ＣＰＰ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。別の態様では、本発明はＣＰＰ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；デコンボ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））。

【０２１４】

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。

【０２１５】

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５２２３４０９号）、胞子（Ladner 米国特許第’４０９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。

【０２１６】

ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ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。

【０２１７】

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（ＬＡＰＳ）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。

【０２１８】

好ましい態様では、アッセイは：ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ発現細胞の生物学的活性を調整する能力（例えば前記で論じたように、ＣＰＰ標的分子との相互作用）を決定することを含む。

【０２１９】

別の好ましい態様では、アッセイは、ＣＰＰまたは生物学的に活性なその部分に応答する細胞をＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ応答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。

【０２２０】

別の態様では、アッセイは、ＣＰＰ標的分子（すなわちＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰがＣＰＰ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ＣＰＰ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。

【０２２１】

ＣＰＰがＣＰＰ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。好ましい態様では、アッセイは、ＣＰＰまたは生物学的に活性なその部分を該ＣＰＰ（例えばＣＰＰ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ＣＰＰを被験化合物と接触させ、そして被験化合物がＣＰＰ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ＣＰＰ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ＣＰＰ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。ＣＰＰがＣＰＰ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（ＢＩＡ）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）。「ＢＩＡ」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）。表面プラスモン共鳴（ＳＰＲ）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。

【０２２２】

別の態様では、アッセイは、ＣＰＰ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ＣＰＰ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。好ましい態様では、ＣＰＰがＣＰＰ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ＣＰＰ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ｃＡＭＰ、ＳＴＡＴ３、Ａｋｔ、細胞内Ｃａ２＋、ジアシルグリセロール、ＩＰ３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。

【０２２３】

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ＣＰＰもしくは生物学的に活性なその部分またはＣＰＰ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、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）ジメチルアミニオ］－１－プロパン（ＣＨＡＰＳ）、スルホン酸３－［（３－コルアミドプロピル）ジメチルアミニオ］－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。

【０２２４】

本発明の前記のアッセイ方法の１つ以上の態様で、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ＣＰＰ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ＣＰＰへの結合または候補化合物の存在下および不在下でのＣＰＰ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ＣＰＰ結合または活性のレベルを決定することができる。

【０２２５】

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結合体を利用してＣＰＰまたはＣＰＰ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ＣＰＰ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、ＣＰＰまたは標的分子と反応するが、ＣＰＰ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ＣＰＰ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、ＣＰＰ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ＣＰＰ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。

【０２２６】

別の態様では、細胞を候補化合物と接触させ、そして細胞中のＣＰＰ ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現を決定する方法でＣＰＰ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ＣＰＰ 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ＣＰＰ 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ＣＰＰ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、ＣＰＰ 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ＣＰＰ 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、ＣＰＰ 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ＣＰＰ 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ＣＰＰ 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ＣＰＰ 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。

【０２２７】

本発明のさらに別の局面では、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ＣＰＰ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 ＷＯ９４／１０３００（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）、ＣＰＰと結合または相互作用し（「ＣＰＰ結合タンパク質」または「ＣＰＰ－ｂｐ」）、そしてＣＰＰ活性に関与するその他のタンパク質を同定することができる。かかるＣＰＰ結合タンパク質はまたＣＰＰまたはＣＰＰ標的により、例えばＣＰＰ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。

【０２２８】

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、ＣＰＰ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ＣＰＰ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するようになる。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な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ＣＰＰ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。

【０２２９】

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関係する。したがって、１つの態様では、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。

【０２３０】

したがって、適切な動物モデルにおいて本明細書で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、本明細書で記載したように同定された薬剤（例えばＣＰＰ調整剤またはＣＰＰ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、本明細書で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関係する。

【０２３１】

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ＣＰＰ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ＣＰＰ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。別の実例的な態様では、本発明は、ＣＰＰ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ＣＰＰ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。

【０２３２】

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。インビボスクリーニングアッセイをヒト以外の動物で実施して、心臓血管障害において役割を果たし得る有効なＣＰＰモジュレーターを見出す。心臓血管障害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。

【０２３３】

心臓血管障害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障害モデルには、ａｐｏＢまたはａｐｏＲ欠損ブタ（Rapacz, et al., 1986、Science 234:1573－1577）およびWatanabe 遺伝性高脂血漿（ＷＨＨＬ）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。

【０２３４】

当分野で示されているように（Ferns, G.A.A. et al., (1991) Science, 253:1129－1132）、再狭窄のラット頚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。左外頚動脈を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、そして総頚動脈を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：クレモホールＥＬ：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、そして頚動脈を単離し、１０％緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。頚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。頚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。

【０２３５】

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障害の進行および／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ィールを提供する（McCarthy, Medicinal Res. Revs., 13:139－159(1993)）。^{14}Ｃ－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。

【０２３６】

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）（ｐＨ６．５）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”×外径０．０３７”）でカニューレ挿入する。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、０．２５ｍｌ／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（５ｍＭ非放射性標識タウロコール酸を伴う０．０５ｍＣｉ／ｍｌの^{14}Ｃ－タウロコール酸）２．０ｍｌを３ｍｌ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０．２５ｍｌ／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ＰＢＳ２０ｍｌ（３０ｍｌシリンジ使用）で洗い流し、そして次にループを温ＰＢＳで０．２５ｍｌ／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。

【０２３７】

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。

【０２３８】

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。

【０２３９】

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６－１２ｋｇ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；１ｍｇ／ｋｇ、胃内投与；２ｍｇ／ｋｇ、胃内投与；４ｍｇ／ｋｇ、胃内投与；２ｍｇ／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。

【０２４０】

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 SST, Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, N.J.）に血液を収集する。血液を２０００ｒｐｍ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ＣＩＩ）（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アリコートを各ウェルに加え、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。

【０２４１】

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一の手順を用いて検定する。

【０２４２】

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（Sigma３３９－１１）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。

【０２４３】

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（Ｃ５７８ＢＬ／ＫｓＪ－ｄｂ／ｄｂ　Ｊｃｌ）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局面を、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。

【０２４４】

動物を各４匹の動物の２０の群に分ける。動物の体重は５２±５ｇ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（ムタラトース－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と見なす。有効な抗心臓血管障害剤であるトログリタゾンは１０ｍｇ／ｋｇ体重でグルコースレベル低下に到る（２５±２％）。

【０２４５】

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。スダン－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。

【０２４６】

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。

【０２４７】

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。

【０２４８】

ＣＰＰまたはＣＰＰ生物学的活性を検出または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当な医薬組成物に組込むことができる。ＣＰＰペプチドが、具体的に想定される。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。

【０２４９】

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。

【０２５０】

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 ＥＬ（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、組成物は無菌でならなければならず、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ず、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、チメロサー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。

【０２５１】

活性化合物がタンパク質、例えば抗ＣＰＰ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合物を組込み、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、活性化合物を基本の分散媒および前記で列挙したも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。

【０２５２】

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、活性化合物を賦形剤と共に組込み、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で用いる。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合物を処方する。最も好ましくは、活性化合物を静脈内注射により対象に送達する。

【０２５３】

１つの態様では、活性化合物を、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。

【０２５４】

別の態様では、活性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。

【０２５５】

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。

【０２５６】

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。

【０２５７】

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。

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。

【０２５８】

心臓血管障害治療

本発明のＣＰＰモジュレーターおよびＣＰＰ関連組成物を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つの局面では、本発明はＣＰＰの抗体、抗体フラグメント、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ＣＰＰ関連組成物、ＣＰＰモジュレーター、抗ＣＰＰ抗体、または抗ＣＰＰ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ＣＰＰ関連組成物と組合せて有利に用いることができる。

【０２５９】

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；ｂｃｌ－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（ｔｋ）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。

【０２６０】

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ＩＩｂ／ＩＩＩａインテグリンの阻害剤；組織因子阻害剤；および抗トロンビン剤が挙げられる。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（ＩＩ群剤）、抗細動性剤（ＩＩＩ群剤）カルシウムチャネル剤（ＩＶ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（ＩＩＩ）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、またはアセブ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（ＩＩ）またはＮ－アセチルプロカインアミドである。ＩＶ群剤にはベラパミル、ジルチアゼムおよびベプリジル、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。

【０２６１】

うっ血性心不全治療剤にはEmbrel（商標）（Immunex Corp.；Seattle, Wash.）、ＴＢＣ１１２５１のようなＴＮＦ阻害剤またはNatrecor（ネシリチド；Scios, Inc.）のようなＡＣＥ（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ｒｈＶＥＧＦのような組換えＶＥＧＦアイソフォーム；ＶＥＧＦの１２１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ＶＥＧＦ－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ＦＧＦ－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ＦＧＦ－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ＣＰＰ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；硝酸イソソルビド；ジルチアゼム；およびイスラジピン（Nayler(Ed.) Calcium Antagonists pages157－260 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。

【０２６２】

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。

【０２６３】

実施例

実施例１：

疾患および対照集団におけるＣＰＰレベルの特徴付け

心臓血管障害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：

【０２６４】

工程１：ＨＳＡ／ＩｇＧ枯渇

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。

濾液を各々３００ｍｌＨＳＡ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　ＰＯ４バッファー（ｐＨ７．１）、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ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。

【０２６５】

工程２：ゲル濾過／逆相捕捉工程

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　ＰＯ４バッファー（ｐＨ７．４）、０．１Ｍ　ＮａＣｌ、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　ＰＬＲＰＳ（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　ＰＬＲＰＳ　１００オングストローム（Polymer Labs, UK）に適応させた。ＰＬＲＰＳ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ＳＤＳ－ＰＡＧＥ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％ＴＦＡ、８０％ＣＨ３ＣＮ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ＰＬＲＰＳ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。

【０２６６】

工程３：カチオン交換

工程２からの試料（１４７ｍｌ）を解凍し、そして等量のカチオン交換バッファーＡ（Ｇｌｙ／ＨＣｌ　バッファー５０ｍＭ，ｐＨ２．７、尿素８Ｍ）と混合した。

試料を１００ｍｌ　Source　１５Ｓカラム（Amersham, Upsala, Sweden）、内径３５ｍｍ、長さ１００ｍｍ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１０ｍｌ／分であった。

タンパク質およびペプチドを１００％バッファーＡから１００％バッファーＢ（１ＭＮａＣｌ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（７５ｍＭ　ＮａＣｌ）３カラム容量
１０％Ｂ（１００ｍＭ　ＮａＣｌ）３カラム容量
１７．５％Ｂ（１７５ｍＭ　ＮａＣｌ）３カラム容量
２２．５％Ｂ（２２５ｍＭ　ＮａＣｌ）２カラム容量
２７．５％Ｂ（２７５ｍＭ　ＮａＣｌ）２カラム容量
１００％Ｂ（１Ｍ　ＮａＣｌ）２カラム容量

ピークに基づいて４５から６０分画を収集した。７回実行した。７回実行を達成した後、１８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－２０度に維持した。

【０２６７】

工程４：還元／アルキル化および逆相ＨＰＬＣ分別１

濃縮トリスＨＣｌでｐＨを８．５に調整した後、１８個のカチオン交換分画の各々をジチオスレイトール（ＤＴＥ、３０ｍＭ　３７℃で３時間）で還元し、そしてヨードアセタミド（１２０ｍＭ、暗中２５℃で１時間）でアルキル化した。後者の反応をＤＴＥ（３０ｍＭ）の添加で停止させ、続いて酸性にした（ＴＦＡ、０．１％）。次いで分画をUptisphere　Ｃ８、５μｍ、３００オングストロームカラム（Interchim, French）内径２１ｍｍ、長さ１５０ｍｍに注入した、流速１０ｍｌ／分で注入を実施した。

水中０．１％ＴＦＡ（溶液Ａ）でＣ８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１００％Ａから１００％Ｂ（水中０．１％ＴＦＡ、８０％ＣＨ３ＣＮ）までの二相性グラジエントを用いて６０分で溶出した。流速は２０ｍｌ／分であった。４０ｍｌの３０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２８０ｎｍで測定した光学密度（ＯＤ）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１０％グリセロール５００μｌ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－２０℃を維持した。

【０２６８】

工程５：逆相ＨＰＬＣ分別２

工程４からの乾燥した試料を溶液Ａ（水中０．０３％ＴＦＡ）１ｍｌに再懸濁し、そしてVydac　ＬＣＭＳ　Ｃ４カラム、５マイクロメーター、３００オングストローム（Vydac

，USA）内径４．６ｍｍ、長さ１５０ｍｍに注入した。流速は０．８ｍｌ／分であった。

溶液ＡでＣ４カラムを平衡にし、そして洗浄し、そして逆相ＨＰＬＣ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。ＣＨ３ＣＮ濃度範囲ＲＰ１分画相当溶媒濃度±５％で１６個の異なるグラジエントを用いた。３０％ＣＨ３ＣＮに等しいかまたはそれ以上の溶媒濃度でＲＰ１で溶出されたタンパク質に関して、ＲＰ２グラジエントに関する出発溶出条件を、ＣＨ３ＣＮパーセンテージ、ＲＰ１溶出濃度マイナス３０％で設定した。２４個の溶出された分画をディープ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。

【０２６９】

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をＭＡＬＤＩマトリックスと混合し、そして質量較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ン酸（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。

【０２７０】

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０．８ｍｌから約５０μｌまで濃縮し、そして次におよそ２００μｌに再溶解し、そしてウェルあたり約５０μｌ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２８０ｎｍ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較正標準と一緒に、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。

【０２７１】

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。

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照文献）。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リンＡの使用を開示している。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、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。

【０２７２】

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Ｇｌａ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スペクトル同定の間に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。

【０２７３】

最後に、表３に列挙したトリプシンペプチドは、タンデム質量分析により、冠動脈疾患試料で低レベルで観察された。トリプシンペプチドの存在は、それらのペプチド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減少した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ＣＰＰ３０－１４８を含む。上記のペプチド配列は、ＭＡＬＤＩ質量分析により観察されるものと同様に、本発明のＣＰＰポリペプチド、ＣＰＰ３０－１４８を定める。

【０２７４】

本発明によるタンパク質分離および同定の方法は、極めて高感度である。Microprot（商標）法は、数百のｐＭ範囲の血漿濃度で非常に低量のタンパク質を検出することができる。その精度を、本発明に記載の方法を実行しながら確認した。特に、アテローム性動脈硬化症およびＣＡＤにおける役割がよく特性化されたタンパク質が、ＣＡＤおよび対照試料で異なって検出された（上記）。

【０２７５】

実施例２：

ＣＰＰの化学合成

この実施例では、本発明のＣＰＰ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ＣＰＰを、結合されるフラグメントのＮ末端でＣｙｓ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ＨＰＬＣ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ＨＰＬＣ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ＨＰＬＣ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。

【０２７６】

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Hackeng B 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Ｌｅｕ－ＰＡＭ樹脂に結合させる。第１の場合、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。従来のN^{α}またはS^{β}保護を有するＣｙｓの代わりに、Ｂｏｃ－チオプロリン（Ｂｏｃ－ＳＰｒ、すなわちＢｏｃ－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Ｃｙｓ残基のN^{α}を保護する（例えばBrik et al., J. Org. Chem., 65:3829－3835(2000)）。

【０２７７】

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Ｂｏｃ化学鎖伸長のための、インサイチュ中和／２－（１Ｈ－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（ＨＢＴＵ）活性化プロトコールを用いて、Applied Biosystemsの特別修正された４３３Ａ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ＴＦＡで１から２分間処理、１分間のＤＭＦフロー洗浄、過剰のＤＩＥＡの存在下、予め活性化したＢｏｃ－アミノ酸２.０ミリモルとの１０分間の結合時間、および２回目のＤＭＦフロー洗浄によるN^{α}－Ｂｏｃ－除去からなる。Ｎα－Ｂｏｃ－アミノ酸（２ミリモル）を過剰のＤＩＥＡ（６ミリモル）の存在下、ＨＢＴＵ１.８ミリモル（ＤＭＦ中０.５Ｍ）で３分間予め活性化する。Ｇｌｎ残基の結合の後、ＴＦＡを用いる脱保護の前および後にジクロロメタンフロー洗浄を用いて、起こり得る高温（ＴＦＡ／ＤＭＦ）－触媒ピロリドンカルボン酸形成を防御する。側鎖保護アミノ酸はＢｏｃ－Ａｒｇ（ｐ－トルエンスルホニル）－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$Boc-Leu-O-CH_2-Pam$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$Boc-Xas-S-CH_2-CO-Leu-Pam$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。

【０２７８】

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。バッファーＡ（H_2O／０.１％トリフルオロ酢酸）中バッファー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（Brueker, 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。

【０２７９】

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。

【０２８０】

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、反応のこの点で、CH_3-O-NH_2．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％CH_3CN、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。

【０２８１】

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（ｐＨ８.６）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。一晩穏やかに攪拌した後、タンパク質溶液を前記のようにＲＰ－ＨＰＬＣにより精製する。

【０２８２】

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。

【０２８３】

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を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 Elsvier, New York, Section21－2（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。

【０２８４】

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。

【０２８５】

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。

【配列表】

2008500952000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成18年2月24日(2006.2.24)

【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】

2008500952000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成18年12月6日(2006.12.6)

【手続補正１】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】０００５

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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、運動不足、肥満、およびストレス。

【手続補正２】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】０００６

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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、障害を発症させるリスクは低下する。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

臓血管障害を発症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。酸素要求および心筋運動の低下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。

【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１３】
本発明は、冠動脈疾患（ＣＡＤ）を有する個体から得られた血漿において低レベルで存在する「心臓血管障害血漿ポリペプチド」（ＣＰＰ）、ＣＰＰのフラグメントおよび翻訳後修飾された種を開示する。したがって、本発明のＣＰＰは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障害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、そして容易に検出可能であり、かつ心臓血管障害の薬物開発、診断および予防に有用である。

【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００９９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００９９】
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３９４ＤＮＡ／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ヌクレオチドの範囲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。

【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】０１０６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１０６】
本明細書で提供する任意のポリヌクレオ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。
【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１１４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１１４】
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ＣＰＰ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－Ｍｏｃまたはｔ－Ｂｏｃ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ＣＰＰ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、ＣＰＰ生物学活性で、これらのペプチジルフラグメントの同定試験することができる。実施態様において、ＣＰＰのペプチジル部分、例えば、ＣＰＰ標的結合領域を、その各々がＣＰＰの別個のフラグメントを含有するチオレドキシン融合タンパク質として発現することにより、ＣＰＰ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ＰＣＴ公開第ＷＯ９４／０２５０２参照（その開示は出典明示により本明細書の一部とする））。
【手続補正７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１２１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１２１】
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ア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、６Ｍ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０．１Ｍリン酸塩バッファー（ｐＨ８．５）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。

【手続補正８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１４２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１４２】
当分野で公知の任意の適当な方法によりＣＰＰ生物学的活性を検定することができる。例えば「抗ＣＰＰ抗体」および「ＣＰＰ抗体の使用」と題したセクションで記載するように、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」に記載するように血漿中の循環を検出することができる。ＣＰＰ標的分子と結合または相互作用するＣＰＰ能測定は、当分野で一般的である、結合の直接または間接的測定方法により達成される。このような方法は、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に記載される、本明細書に記載の方法により検出され得る。

【手続補正９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１５７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１５７】
合成ペプチドをキャリヤ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., Gentetic 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ヤ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, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier、New York、1985), chapter 20と本質的に同一である。ペプチドをキャリヤ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－ジアゾベンジジン（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－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ）である。所定のペプチドのタンパク質キャリヤ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、ＢＤＢ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一の配列とは明らかに異なる。α－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。キャリヤ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。

【手続補正１０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１７４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１７４】
質量分析によるＣＰＰ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イオン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。

【手続補正１１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１７９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１７９】
ＴＯＦ質量分析におけるイオン検出を典型的には電子倍増管（ＥＭＰ）またはマイクロチャネルプレート（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のものより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。

【手続補正１２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１９６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１９６】
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ＣＰＰ核酸にハイブリダイズするポリヌクレオチド；またはｉｉ）ＣＰＰ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ＲＮＡ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、ＣＰＰ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ＣＰＰ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、ここで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。
【手続補正１３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２００
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２００】
「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ＣＰＰ ｍＲＮＡ、タンパク質またはゲノムＤＮＡ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、特に血漿のような生物学的液体である。例えば、ＣＰＰ ｍＲＮＡ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。ＣＰＰの検出のためのインビトロ技術は、質量分析、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ウェスタンブロット、免疫沈澱および免疫蛍光を含む。ＣＰＰコード化ゲノムＤＮＡの検出のためのインビトロ技術はサザンハイブリダイゼーションを含む。さらにＣＰＰの検出のためのインビボ技術には標識抗ＣＰＰ抗体を個体に導入することを含む。
【手続補正１４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２０２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２０２】
さらに別の実例的な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ＣＰＰ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個またはそれ以上の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ＣＰＰ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、ＣＰＰ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。
【手続補正１５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２０６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２０６】
「薬物スクリーニングアッセイ」
本発明はＣＰＰ発現またはＣＰＰ生物学的活性を増強または阻害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、ペプチド模倣体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から得ることができる。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。
【手続補正１６】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２４４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２４４】
動物を各４匹の動物の２０の群に分ける。動物の体重は５２±５ｇ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群に経口投与し、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時間後におよび４８時間後に投与する。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（ムタラトース－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と見なす。有効な抗心臓血管障害剤であるトログリタゾンは１０ｍｇ／ｋｇ体重でグルコースレベル低下に到る（２５±２％）。
【手続補正１７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２４９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２４９】
本発明の医薬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。
【手続補正１８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２８１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２８１】
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（ｐＨ８.６）中に溶解することによる空気酸化により完全長ペプチドのリフォールディングを行う。一晩穏やかに攪拌した後、タンパク質溶液を

前記のようにＲＰ－ＨＰＬＣにより精製する。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/007842

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/47 A61K38/47 C12N15/56 C12Q1/34 G01N33/573

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 C07K C12N C12Q 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, Sequence Search, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/12781 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ; ROSEN CRAIG A (US); BIRSE CHARLES E (US)) 22 February 2001 (2001-02-22) *INVENTION 1* page 151, line 16 - page 154, line 8; sequence 30 page 7, line 26 - page 11, line 10	1-13, 16-18
X	US 2003/096756 A1 (AVERBACK PAUL) 22 May 2003 (2003-05-22) *INVENTION 1* paragraph '0059! paragraph '0066! paragraph '0023!	1-13, 16-18

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] 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	Date of mailing of the international search report
25 November 2004	15.03.05

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
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	Petri, B

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/007842

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 837 841 A (BANDMAN OLGA ET AL) 17 November 1998 (1998-11-17) *INVENTION 1* column 5, line 39 - line 46 column 14, line 63 - column 15, line 6	8-10
A	PATARD LOUIS ET AL: "An insight into the role of human pancreatic lithostathine." JOP 'ELECTRONIC RESOURCE! : JOURNAL OF THE PANCREAS. MAR 2003, vol. 4, no. 2, March 2003 (2003-03), pages 92-103, XP001203943 ISSN: 1590-8577 *INVENTION 1*	
A	NOJI YOSHIHIRO ET AL: "Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in premature coronary atherosclerosis" CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE, vol. 39, no. 5, May 2001 (2001-05), pages 380-384, XP009040349 ISSN: 1434-6621	
A	DUGI KLAUS A ET AL: "Low hepatic lipase activity is a novel risk factor for coronary artery disease" CIRCULATION, vol. 104, no. 25, 18 December 2001 (2001-12-18), pages 3057-3062, XP002307402 ISSN: 0009-7322	
A	DZIELINSKA ZOFIA ET AL: "Decreased plasma concentration of a novel anti-inflammatory protein-adiponectin-in hypertensive men with coronary artery disease." THROMBOSIS RESEARCH, vol. 110, no. 5-6, 15 June 2003 (2003-06-15), pages 365-369, XP002307403 ISSN: 0049-3848	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2004/007842

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. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claim 18 is directed to a diagnostic method practised on 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. [X] 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.:

1-13, 16-18 (in 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/EP2004/007842

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

Invention 1: Claims 1-13, 16-18 (in part)

Methods and compounds relating to cardiovascular disorder plasma polypeptide (CCP) 30.

Invention 2-56: Claims 1-13, 16-18 (in part)

As Invention 1, however relating to CCP 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 40, 41, 42, ... , 58, 59, 63, 64, 70, 73, 74, ... , 92, 93, 144, 145, ... 147, 148, respectively.

Invention 57: Claims 1-18 (in part)

Methods and compounds relating to cardiovascular disorder plasma polypeptide (CCP) 35.

Invention 58-119: Claims 1-18 (in part)

As Invention 57, however relating to CCP 39, 41, 60, 61, 62, 65, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 94, 95, ... 142, 143, respectively

---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2004/007842

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0112781 A	22-02-2001	AU 7058000 A	13-03-2001
		CA 2385487 A1	22-02-2001
		EP 1208191 A1	29-05-2002
		JP 2003507033 T	25-02-2003
		WO 0112781 A1	22-02-2001
		US 2003203361 A1	30-10-2003
US 2003096756 A1	22-05-2003	BR 0211199 A	26-10-2004
		BR 0211200 A	28-09-2004
		WO 03008443 A2	30-01-2003
		WO 03008444 A2	30-01-2003
		CA 2453965 A1	30-01-2003
		CA 2453967 A1	30-01-2003
		EP 1417227 A2	12-05-2004
		EP 1417228 A2	12-05-2004
		US 2003109437 A1	12-06-2003
		AU 2002342463 A1	10-06-2003
		BR 0213786 A	09-11-2004
		WO 03044053 A2	30-05-2003
		CA 2467053 A1	30-05-2003
		EP 1442058 A2	04-08-2004
		US 2003166569 A1	04-09-2003
		US 2005032704 A1	10-02-2005
US 5837841 A	17-11-1998	AU 4750097 A	11-05-1998
		WO 9816640 A1	23-04-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2004)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
G01N 27/62	***(2006.01)***	G01N	27/62	V
G01N 33/15	***(2006.01)***	G01N	33/15	Z
G01N 33/50	***(2006.01)***	G01N	33/50	Z
G01N 33/53	***(2006.01)***	G01N	33/53	D

(31)優先権主張番号 60/487,391
(32)優先日 平成15年7月15日(2003.7.15)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,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）
１．レーザーディスク

(72)発明者 ナッシマ・ベデール
スイス、ツェーハー－１２１７メラン、プレ－ドゥ－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－１２１７メラン、プレ－ドゥ－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－１２１７メラン、プレ－ドゥ－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－１２１７メラン、プレ－ドゥ－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－１２１７メラン、プレ－ドゥ－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－１２１７メラン、プレ－ドゥ－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 キース・ローズ
スイス、ツェーハー－１２１７メラン、プレ・ドゥ・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 セドリック・ソドレ
スイス、ツェーハー－１２１７メラン、プレ・ドゥ・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 DA03 DA04 DA05 DA16 EA04 FA12 GA02 GA03 GA05
GA06 GA09 HA01 JA08 KA01 LA07 LA08
2G045 AA40 DA36 FB01 FB03
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA14 BA15 BA16 BA17 CA42 DA86

EA50

专利名称(译)	分泌的多肽物种因心血管疾病而减少		
公开(公告)号	JP2008500952A	公开(公告)日	2008-01-17
申请号	JP2006519874	申请日	2004-07-15
[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 ナッシマベデール 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 キースローズ セドリックソドレ		
发明人	ギレーヌ·アルグー-ピュイ ナッシマ·ベデール 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 キース·ローズ セドリック·ソドレ		
IPC分类号	C07K14/47 C07K19/00 C07K16/18 C07K7/06 C07K7/08 G01N27/62 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12N15/56 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6893 C07K14/47 G01N2800/32 G01N2800/52		
FI分类号	C07K14/47.ZNA C07K19/00 C07K16/18 C07K7/06 C07K7/08 G01N27/62.V G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA03 2G041/DA04 2G041/DA05 2G041/DA16 2G041/EA04 2G041/FA12 2G041/GA02 2G041/GA03 2G041/GA05 2G041/GA06 2G041/GA09 2G041/HA01 2G041/JA08 2G041/KA01 2G041/LA07 2G041/LA08 2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/CA42 4H045/DA86 4H045/EA50		
优先权	60/487351 2003-07-15 US 60/487290 2003-07-15 US 60/487288 2003-07-15 US 60/487391 2003-07-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了人分泌多肽，其在心血管疾病患者的血浆中以降低的水平循环。本发明还提供了使用多肽进行诊断，预后和药物开发的方法，编码它们的多核苷酸和包含对这些多肽特异的抗体的组合物。

【表１】

表１

タンパク質	受託番号	タンパク質型	アミノ酸
CPP 30	P48304	親	23-166
CPP 31	P07339	親	19-412
CPP 32	P16562	親	22-243
CPP 33	P18065	親	40-328
CPP 34	P02774	親	17-474
CPP 35	P00734	フラグメント	199-622
CPP 36	Q9H4G4	イソ型	1-154
CPP 37	Q9H4G4	イソ型	1-154
CPP 38	Q9H4G4	イソ型	1-154
CPP 39	P02751	フラグメント	32-440
CPP 40	P78417	親	1-241
CPP 41	Q03591	変異体 (YIV＞HIL 157-159)	19-330
CPP 42	P05451	親	23-166
CPP 43	P17931	親	1-249
CPP 44	P81605	親	20-49
CPP 45	Q9BZ98	親	1-90
CPP 46	P81534	親	23-67
CPP 47	P09211	親	1-209
CPP 48	WO2001750670の配列番号：37638	親	1-792
CPP 49	P07602	親	405-486
CPP 50	O95885	親	1-376