

(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2008-532536
(P2008-532536A)

(43) 公表日 平成20年8月21日(2008.8.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705	4 B O 6 3
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/00 G	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-501340 (P2008-501340)
 (86) (22) 出願日 平成18年3月17日 (2006.3.17)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年11月16日 (2007.11.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/ES2006/000136
 (87) 国際公開番号 W02006/097564
 (87) 国際公開日 平成18年9月21日 (2006.9.21)
 (31) 優先権主張番号 P200500623
 (32) 優先日 平成17年3月17日 (2005.3.17)
 (33) 優先権主張国 スペイン (ES)

(71) 出願人 506061716
 プロイェクト、デ、ピオメディシナ、シー
 マ、ソシエダッド、リミターダ
 PROYECTO DE BIOMEDI
 CINA CIMA, S. L.
 スペイン国ナバーラ、シスール、マヨール
 、カリエ、エトセサカン、28、オフィシ
 ナ、5、プランタ、バハ
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規の非タンパク分解起源の可溶性EPCRタンパク質およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、選択的スプライシング機構に由来する新規の可溶性EPCRに関し、より詳細には、配列番号1の配列の残基201~256または前記配列のフラグメントを含むポリペプチドに関する。本発明はまた、前記ポリペプチドを含む組み換え型または単離されたEPCRタンパク質、前記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、前記ポリペプチドを含むタンパク質をコードするmRNA、および疾患の検出におけるこれらの使用に関する。本発明はさらに、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターまたは宿主細胞、発現ベクターと前記細胞を含む発現系、前記ポリペプチドに対して特異的な単離された抗体、および生体試料における配列番号1の配列を含むEPCRタンパク質の選択的なインビトロ検出のための方法およびキットに関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256、または 201 と 256 との間の前記配列の残基のフラグメントを含むことを特徴とする、大血管およびガンにおける疾患プロセスのためのマーカーとして有用な、内皮プロテイン C 受容体に由来するポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号 1 の残基 213 ~ 227、229 ~ 242、212 ~ 226、227 ~ 241、242 ~ 256 を含むフラグメントであることを特徴とする、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256 から形成されるポリペプチドを含むことを特徴とする、単離された EPCR タンパク質。

【請求項 4】

配列番号 1 の配列を含むことを特徴とする、請求項 3 に記載の単離された EPCR タンパク質。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のポリペプチドを含むことを特徴とする組み換え型のタンパク質。

【請求項 6】

配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256 から形成されるポリペプチドまたは前記ポリペプチドのフラグメントをコードする配列を含むことを特徴とする、単離されたあるいは組み換え型のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

配列番号 2 に相当する cDNA 配列に由来することを特徴とする、請求項 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

前記ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはポリペプチド発現を調節する作動可能に結合された制御配列をさらに含むことを特徴とする、請求項 6 または 7 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 9】

配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256 によって形成されるポリペプチドまたは前記ポリペプチドのフラグメントをコードする配列を含むことを特徴とする DNA 構築物。

【請求項 10】

配列番号 2 に相当する cDNA 配列から得られるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項 9 に記載の DNA 構築物。

【請求項 11】

前記ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはポリペプチドの発現を調節する作動可能に結合された制御配列をさらに含むことを特徴とする、請求項 9 または 10 のいずれか一項に記載の DNA 構築物。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256 を含むポリペプチドまたは前記配列のフラグメントをコードする、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、または請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載の DNA 構築物を含むことを特徴とする発現ベクター。

【請求項 13】

請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、または請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載の DNA 構築物、または請求項 12 に記載の発現ベクターを含むことを特徴とする宿主細胞。

【請求項 14】

前記ポリヌクレオチドまたは DNA 構築物が、適切な制御配列に作動可能に結合されて

10

20

30

40

50

いることを特徴とする請求項 13 に記載の宿主細胞。

【請求項 15】

前記細胞が、原核細胞または真核生物細胞であることを特徴とする請求項 13 または 14 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 16】

前記細胞が、細菌大腸菌または酵母ピキアパストリス (*Pichia Pastoris*) であることを特徴とする請求項 15 に記載の宿主細胞。

【請求項 17】

請求項 12 に記載の発現ベクターと、請求項 13 ~ 16 のいずれか一項に記載の宿主細胞を含むことを特徴とする発現系。

10

【請求項 18】

前記タンパク質、ポリペプチド、またはフラグメントの発現を可能にする条件下で、請求項 13 ~ 16 のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養することを含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のタンパク質、ポリペプチド、または前記ポリペプチドのフラグメントを産生する方法。

【請求項 19】

配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256 を含むタンパク質、または前記配列の残基の少なくとも 9 アミノ酸のフラグメントをコードすることを特徴とする mRNA。

【請求項 20】

配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256 を含むポリペプチドまたは免疫原特性を有する前記配列の残基のフラグメントに対して特異的な抗体。

20

【請求項 21】

配列番号 1 の残基 201 ~ 256 の配列のフラグメントが、少なくとも 9 アミノ酸を有することを特徴とする、請求項 20 に記載の抗体。

【請求項 22】

配列が、残基 201 ~ 256、残基 213 ~ 227、229 ~ 242、212 ~ 226、227 ~ 241、242 ~ 256 (すべて配列番号 1 に関する) から選択される前記ポリペプチドのポリペプチドまたはフラグメントに対して特異的であることを特徴とする、請求項 20 に記載の抗体。

【請求項 23】

配列番号 1 に対して特異的であり、領域 201 ~ 256 に結合しない場合には領域 1 ~ 200 を認識しないことを特徴とする請求項 20 に記載の抗体。

30

【請求項 24】

モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 20 ~ 23 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 25】

請求項 1 に記載の配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256 を含む EPCR タンパク質、または前記配列の残基のフラグメントの、生体試料のインビトロでの選択的検出のための方法であって、

- 生体試料を得ること、
 - 配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256 を含む EPCR タンパク質または前記配列の残基のフラグメントの量を分析すること、
- を含むことを特徴とする方法。

40

【請求項 26】

前記生体試料が、尿、血漿、血清、組織、および間質液から選択されることを特徴とする請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記方法が、免疫学的方法、クロマトグラフィー法、および分光光度法から選択されることを特徴とする請求項 25 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

50

前記タンパク質の量が、血管損傷に関連する炎症性のプロセス、炎症、ガン、および凝固異常に関連する疾患から選択される疾患に関連することを特徴とする請求項 25 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

検出される EPCR タンパク質の量を、校正標準と比較することによって比較することを含むことを特徴とする請求項 25 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256 を含む EPCR タンパク質または前記配列の残基のフラグメントの検出および定量化のための試験キットであって、 a) 請求項 20 ~ 24 のいずれか一項に記載の特異的な抗体、

b) 生体試料中に存在する配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256 を含む EPCR タンパク質と、抗体 a) との間の反応を検出する試薬、を含むことを特徴とするキット。

【請求項 31】

産生される反応物の量を、配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256 を含む EPCR タンパク質の正常および異常なレベルと相関させるための標準も含むことを特徴とする請求項 30 に記載のキット。

【請求項 32】

配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256 を含む EPCR タンパク質または前記配列の残基のフラグメントに相当する mRNA を検出および定量化するための、配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256 を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用。

【請求項 33】

前記 EPCR タンパク質が、血管損傷に関連する炎症性の疾患、炎症、ガンおよび凝固異常に関連する疾患から選択される疾患に関連する量で存在することを特徴とする請求項 32 に記載のポリヌクレオチドの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[発明の背景]

最近記載されているプロテイン C システム (PC) のタンパク質は、内皮プロテイン C / 活性化プロテイン C 受容体 (EPCR) である (1、2)。EPCR は、内皮細胞の膜上に発現され、高親和性で PC および活性化プロテイン C (APC) と結合する ($K_d \sim 30 \text{ nM}$)。その生理学的使命は、内皮表面上の PC を濃縮し、これを トロンビン - トロンボモジュリン 複合体に提示し、それによって、PC の効率的な活性化を助けることである (3)。ヒト以外の霊長類に関して実施された研究では、モノクローナル抗体を用いて EPCR をブロックすることは、APC の生理学的産生を 90% 減少させることが実証されており、また、最近の研究では、EPCR の遺伝的欠陥が、静脈および動脈の血栓形成を患う素因になる可能性があることが示唆されている (4 ~ 7)。これらの事実は、凝固調節において、また血栓形成において、EPCR が果たす可能性がある重要な役割を実証する。さらに、EPCR は、PC の強力な抗炎症作用を担う分子の一つであるように思われる。

【0002】

EPCR と PC / APC の相互作用は、グラム陰性細菌による感染中に現れる凝血異常性および炎症性の反応の調節の際に、重要な役割を果たす可能性がある (8)。近年では、APC は、内皮細胞上の抗炎症および抗アポトーシス作用を有すること、また、この作用が現れるためには EPCR の存在が不可欠であることが実証されている (9、10)。

【0003】

EPCR は、約 46 kDa の糖タンパク質である。成熟タンパク質は、17 残基からなるシグナルペプチドの排除後の、221 アミノ酸からなる (11)。これは、3 つのイントロンによって分断された 4 つのエキソンによって形成される、染色体 20 (20q11

10

20

30

40

50

． 2) のロングアーム中に位置する遺伝子によってコードされる (1 2) 。エキソン I は、 5 ' 非翻訳領域およびシグナルペプチドをコードし、エキソン I V は、膜貫通ドメイン、 3 残基の細胞質内テール、および 3 ' 非翻訳領域をコードする。エキソン I I および I I I は、クラス I 主要組織適合遺伝子複合体の C D 1 スーパーファミリーに属するタンパク質のドメイン 1 および 2 との相同性を有する、 E P C R の細胞外領域の大部分をコードする。近年では、 E P C R が、ポケット (そこには、分子を安定させるリン脂質が収容される) を形成する、折り畳まれたシート (その上にはヘリックス構造を 2 つ有する) によって形成されるプラットフォームを、どのように有するかを示す三次元構造が、首尾よく結晶化され、分析されている (1 3) 。同様に、アラニンスキャニングによって、 P C / A P C との結合に關与する主要な残基 (カルシウムおよびマグネシウムイオンの存在下で、その G L A ドメインを介して結合する) が特定されている (1 4) 。

10

【 0 0 0 4 】

しかし、内皮細胞膜上に固定される E P C R に加えて、トロンピンなどの刺激によって誘導されるメタロプロテイナーゼによる E P C R の消化に少なくとも部分的に由来する、血漿可溶性 (s E P C R) が存在する (1 5 、 1 6) 。

【 0 0 0 5 】

論文 (1 5) 「 J . C l i n . I n v e s t . V o l . 1 0 0 」、 n o . 2 、 1 9 9 7 年 7 月、 4 1 1 ~ 4 1 8 は、血漿中に見られる E P C R の可溶性に關する。この論文には、血漿中の E P C R は、独特の種であるように思われ、精製されたタンパク質のアミノ末端フラグメントの配列決定では、血漿 E P C R の特有の配列が示され、これは、組換え s E P C R のアミノ末端配列と一致したことが記載されている。この論文には、前記可溶性 E P C R の起源は、他の受容体の場合と同様に、タンパク分解性の破断または選択的切断 - スプライシング機構である可能性があり、特に、ウシ E P C R のゲノム構造は、タンパク質をコードする選択的切断部位を含有する (ここでは、膜貫通ドメインが、エキソン I I I の後に位置しているイントロンによってコードされる配列によって置き換えられる) ことが記載されている (1 7) 。この文献は、選択的切断から得られる E P C R の形の可能性を証明するために、より多くの研究が必要であることを示している。

20

【 0 0 0 6 】

さらに、国際公開第 - 9 9 0 0 6 7 3 号には、ヒト血漿における s E P C R の単離および特徴づけに關し、 s E P C R が、タンパク質加水分解に由来する (ここでは、 E P C R の細胞外ドメインは遊離され、膜に結合した残りのタンパク質から離れる) 、あるいは、 m R N A の選択的切断 - スプライシング機構 (これは、 a l t s E P C R の配列を生じさせる) に由来する可能性があることが記載されている。本出願の図 1 は、タンパク分解起源の可溶性 E P C R (p s E P C R) と、選択的切断 - スプライシングによって得られる国際公開第 - 9 9 0 0 6 7 3 号に開示された E P C R (a l t s E P C R) と、本発明の新規の E P C R 目的物 (s E P C R v a r) との間の違いを見ることができる図を示す。

30

【 0 0 0 7 】

したがって、本出願によって、少なくとも、ヒト E P C R は、選択的切断 - スプライシング・プロセスを受け、前記選択的切断 - スプライシング機構から得られる可溶性の E P C R (s E P C R v a r) 中にのみ存在する特有のインサートを含む、可溶性の切断型 E P C R を生じる可能性があることが示される。前記 s E P C R v a r は、大血管における、またガンにおける疾患プロセスマーカーとして働く可能性がある。

40

【 0 0 0 8 】

A P C が、 s E P C R に結合する場合、その抗凝血特性を失うが、その酵素的能力は維持されるため、 s E P C R が、 A P C 特異性を変化させ、おそらく、これを基質 (現在は未知である) に方向付け、これが、 A P C に起因する抗炎症特性につながる可能性があると考えられる (1 8) 。 s E P C R は、膜上に存在する E P C R と、プロテイン C に対して競合し、このようにして A P C 産生を抑制する。 s E P C R は、プロテイナーゼ - 3 (P R 3) (1 9) 、好中球顆粒および M a c - 1 (C D 1 1 b / C D 1 8) 中に存在するプロテイナーゼ、好中球および単球の表面に存在する誘導性の発現のインテグリンを介し

50

て、活性化された好中球と相互作用することが可能であることも記載されている。P R 3 は、おそらく、膜結合型 T N F - アルファおよび I L - 1 ベータ前駆体に作用する組織破壊メカニズムに關与する。M a c - 1 は、細胞シグナル伝達および細胞間接着現象に介在し、内皮 I C A M - 1 などの接着分子と相互作用し、その理由で、炎症性プロセス中の好中球の補充において役割を果たす。P R 3 および M a c - 1 への s E P C R の結合は、おそらく、その活性を低下させるであろう。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明者らは、ヒトゲノム D N A (c D N A) から開始して、新規のタンパク質をクローニングし、発現させることを可能にした。前記タンパク質は、その配列の、他の既知の配列との分析および比較、ならびにその機能の特徴づけによって、選択的スプライシング・プロセスによって産生される可溶性の E P C R タンパク質の未知の形であることが示された。一方、前記タンパク質は、示差的な特徴として、現在知られている E P C R 形には存在しない、当初 E P C R 遺伝子 3 ' 非翻訳領域と考えられていた領域によってコードされるポリペプチドの領域を有する。

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

[発明の詳細な説明]

本発明は第一に、新規の可溶性の E P C R (これを、本発明者らは、可溶性の E P C R 変異体 (s E P C R v a r) と呼ぶ) に、より詳細には、配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256 を含む、内皮プロテイン C 受容体または前記配列の残基のフラグメントから得られるポリペプチドに關する。ある特定の実施形態では、前記フラグメントは、少なくとも 9 アミノ酸を有する。本発明の特定の実施形態によれば、前記フラグメントは、配列番号 1 の残基 213 ~ 227、229 ~ 242、212 ~ 226、227 ~ 241、242 ~ 256 を含むフラグメントから選択される。

20

【0011】

ある特定の実施形態では、前記フラグメントは免疫原特性を有し、これは特に、特異的抗体を産生するための手順で有用である。

【0012】

本発明はさらに、配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256 から形成されるポリペプチドを含む、単離されたあるいは組み換え型のタンパク質に關する。前記タンパク質は、E P C R タンパク質である。

30

【0013】

本発明の好ましい実施形態によれば、前記単離されたあるいは組み換え型の E P C R タンパク質は、配列番号 1 の配列を含む。

【0014】

本発明のさらなる目的は、配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256 から形成されるポリペプチドまたは前記配列の残基のフラグメントを含む組み換え型タンパク質である。

【0015】

本発明のさらなる目的は、配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256 によって形成されるポリペプチドまたは前記配列の残基のフラグメントをコードする配列を含むポリヌクレオチドである。ある特定の実施形態では、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 に相当する c D N A 配列に由来する。この c D N A は、m R N A から逆転写された D N A に關する。

40

【0016】

本発明の特定の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、D N A 構築物中に含有される可能性がある。したがって、本発明のさらなる目的は、配列番号 1 の配列の残基 201 ~ 256 を含むタンパク質またはポリペプチドまたは前記配列の残基のフラグメントをコードする D N A 構築物である。好ましくは、前記フラグメントは、少なくとも 9 アミノ酸を有する。前記構築物のある特定の実施形態では、これは、配列番号 2 に相当する c D

50

N A 配列に由来するポリヌクレオチドを含む。前記 D N A 構築物は、前記タンパク質またはポリペプチドに作動可能に結合される制御配列を組み込む可能性がある。核酸またはポリヌクレオチドに関して、「作動可能に結合される」は、あるヌクレオチド領域が、別のヌクレオチド配列と、機能的関係に置かれることを意味する。「制御配列」は、機能（例えばある種のコード配列の転写および翻訳など）を調節する、ある種の宿主細胞によって特に認識される発現シグナルである。プロモーター、発現エンハンサー、転写ターミネーター、リボソーム結合部位などは制御配列である。D N A 構築物を形成するための所望の配列のスプライシングは、適切な制限部位における切断およびスプライシングによって行うことができる。これらの結合部位が存在しない場合、アダプターまたはスパーサーとして合成のオリゴヌクレオチドを使用して、従来の遺伝子工学的方法によってこれらを産生

10

【 0 0 1 7 】

本発明のポリヌクレオチドまたは D N A 構築物は、しばしば実験室マニュアルに書き留められている従来の遺伝子工学的方法によって得ることができる。

【 0 0 1 8 】

本発明のポリヌクレオチドまたは構築物は、適切な発現ベクター中に挿入させることができる。したがって、本発明のさらなる目的は、前記ポリヌクレオチドまたは D N A 構築物を含む発現ベクターである。本発明の様々な実施形態における発現ベクターの選択は、前記発現ベクターが挿入されることとなる宿主細胞に依存する。例えば、本発明のポリヌクレオチドまたは D N A 構築物が挿入されるベクターは、プラスミドまたはウイルス（これらは、一旦宿主細胞中に導入された場合に、細胞のゲノムに組み込まれる可能性もあるし、組み込まれない可能性もある）である可能性がある。この発現ベクターはまた、従来方法によって得ることができる。

20

【 0 0 1 9 】

本発明のさらなる目的は、配列番号 1 の配列の残基 2 0 1 ~ 2 5 6 含むポリペプチドまたは前記配列の残基の少なくとも 9 アミノ酸を有するフラグメントをコードするポリヌクレオチドまたは D N A 構築物を含む、形質転換された宿主細胞である。本発明によれば、形質転換された宿主細胞は、原核生物細胞（例えば大腸菌）または真核生物（例えば酵母、特にピキアパストリス（*P i c h i a P a s t o r i s*）およびサッカロミセスセレビシエ（*S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e*））、昆虫細胞または哺乳類細胞株であり得る。

30

【 0 0 2 0 】

本発明のある特定の実施形態では、配列番号 2 を有する本発明のポリヌクレオチドは、本発明において開示される選択的切断およびスプライシングによって産生される新規の形の s E P C R (s E P C R v a r) に相当する、配列番号 1 の組み換え型の s E P C R タンパク質を産生するために、ピキアパストリス（*P i c h i a P a s t o r i s*）中に導入される。組み換え型タンパク質の産生に必要な D N A 構築物、発現ベクター、および形質転換された宿主細胞を産生するために使用される方法は、その精製のためのプロセスを含めて、後ほど詳述する。

【 0 0 2 1 】

本発明のある特定の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドまたは D N A 構築物を含む発現ベクターは、組成物中でのその使用、およびインビボでの遺伝子導入または治療のプロセスのために設計される。より具体的な実施形態では、この発現ベクターは、ウイルスベクターである。この目的に適したウイルスベクターとしては、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アルファウイルス、ヘルペスウイルス、コロナウイルス類縁体（*d e r i v a t i v e*）ベクターなどが挙げられる。

40

【 0 0 2 2 】

本発明のさらなる目的は、配列番号 1 の配列の残基 2 0 1 ~ 2 5 6 を含むポリペプチドまたは前記配列の残基のフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターと、前記ポリヌクレオチドまたは前記構築物で形質転換される宿主細胞を含む発現系であ

50

る。好ましくは、前記フラグメントは、少なくとも9アミノ酸を含む。

【0023】

本発明のさらなる目的は、配列番号1の残基201~256を含むタンパク質またはポリペプチド、または前記配列の残基の好ましくは少なくとも9アミノ酸を有するフラグメントを産生する方法であって、前記方法が、前記タンパク質、ポリペプチド、またはフラグメントの発現を可能にする条件で、本発明のポリヌクレオチドまたはDNA構築物を含む宿主細胞を培養することを含むことを特徴とする方法である。培養を最適化する条件は、使用される宿主細胞に依存する。所望により、この方法はまた、発現されたタンパク質またはポリペプチドを単離および精製するためのいくつかのステップを含む可能性がある。

10

【0024】

あるいは、本発明のタンパク質またはポリペプチドは、他の従来方法によって、例えば固相技術に関する化学合成、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による精製によって得ることができ、所望により、これらを、従来の技術、例えば配列決定および質量分析、アミノ酸分析、核磁気共鳴などによって分析することもできる。

【0025】

本発明のさらなる目的は、配列番号1の配列を含むタンパク質または前記配列の残基のフラグメントをコードするmRNAである。

【0026】

本発明のさらなる目的は、配列番号1の残基201~256を含むポリペプチドまたは前記配列の残基の免疫原特性を有するフラグメントに対する、特定の単離された抗体である。ある特定の実施形態では、前記フラグメントは、少なくとも9アミノ酸を有する。

20

【0027】

ある特定の実施形態では、前記抗体は、その配列が残基201~256、213~227、229~242、212~226、227~241、および242~256(すべて配列番号1に関する)から選択されるポリペプチドまたはフラグメントに対して特異的である。

【0028】

別の特定の実施形態では、前記抗体は、配列番号1に対して特異的であり、これが領域201~256に結合しない場合には領域1~200を認識しない。

30

【0029】

好ましい実施形態によれば、前記抗体は、モノクローナル抗体である。

【0030】

本発明のさらなる目的は、生体試料における、配列番号1の配列の残基201~256を含むEPCRタンパク質(例えば配列番号1の新規のEPCRタンパク質)、または前記配列の残基のフラグメントの選択的インビトロ検出のための方法であって、

- 生体試料を得ること、
 - 配列番号1の配列の残基201~256を含むEPCRタンパク質または前記配列の残基のフラグメントの量を分析すること、
- を含む方法である。

40

【0031】

前記生体試料は、生体材料を含む任意の試料である可能性がある。好ましい実施形態では、前記生体試料は、尿、血漿、血清、組織、または間質液試料である。

【0032】

前記方法は、例えば、質量分析、免疫アッセイ、化学アッセイ、液体クロマトグラフィー、および様々な間接的および直接的光度測定方法を含めた、任意の既知の方法であり得る。例えば、いくつかの分析法は、質量分析を使用するマーカーを定量化するために適用される可能性がある。一般的に言うと、マーカーは、例えば液体クロマトグラフィーまたは二次元ゲル電気泳動によって、生体試料から単離される。マーカーは、質量分析、例えば、液体クロマトグラフィー(LC-MS)を伴うタンデム質量分析、MALDI-T

50

OF-MS(「マトリクス支援レーザー脱離/イオン化質量分析・飛行時間型MS」)などによって定量化される。標的マーカーは、既知量の精製されたマーカー標準と比較することによって、あるいは、健康な対照から得られる同じタイプの生体試料中に存在する前記マーカーの量と比較することによって定量化することができる。

【0033】

本発明の別の実施形態では、この方法は、免疫アッセイであり得る。一般に、免疫アッセイには、1種または複数のマーカーリガンドが使用される。本発明で使用される「リガンド」は、標的マーカーに特異的に結合することが可能な任意の化合物または分子である。これらのリガンドは、別々に、あるいは組み合わせで使用することができる(例えば、抗体は、アプタマーと組み合わせで使用することができる)。

10

【0034】

本発明の一つの実施形態では、免疫アッセイは、均一(homogeneous)アッセイ、不均一(heterogeneous)アッセイ、酵素免疫測定法(EIA、ELISA)、競合アッセイ、免疫メトリックアッセイ(サンドイッチ)、濁度アッセイ、比濁アッセイ、または他の同様のアッセイである可能性がある。同様に、免疫アッセイは、手動で、あるいは自動分析器を用いて行われる可能性がある。

【0035】

本発明の方法では、前記タンパク質の量は、血管損傷に関連する炎症性疾患、炎症、凝固異常に関連する疾患、およびガンから選択される疾患に関連する。前記疾患はまた、狼瘡などの自己免疫性疾患、敗血症、ショック、子癇前症、糖尿病、移植のモニタリングの際の不安定狭心症、再狭窄、血管形成、および肝臓または腎臓病である可能性もある。

20

【0036】

本発明の方法によれば、検出されるEPCRタンパク質の量はまた、校正標準と比較することができる。

【0037】

本発明のさらなる目的は、配列番号1の配列の残基201~256を含むEPCRタンパク質、例えば、配列番号1の新規のEPCRタンパク質、または前記配列の残基の好ましくは少なくとも9アミノ酸のフラグメントの検出および定量化のための試験キットであって、

- a) 配列番号1の配列の残基201~256を含むポリペプチドまたは前記配列の残基のフラグメントに特異的な抗体、即ち、領域201~256に結合しない場合には領域1~200を認識しない配列番号1のタンパク質に特異的な抗体、
- b) 抗体a)と、生体試料中に存在する配列番号1の配列の残基201~256を含むEPCRタンパク質または前記配列の残基のフラグメントとの間の反応を検出する試薬、を含むキットである。

30

【0038】

好ましくは、このキットはまた、配列番号1の配列の残基201~256を含むEPCRタンパク質の正常および異常なレベルと、産生される反応物の量を相関させるための標準を含む。

【0039】

本発明のさらなる目的は、配列番号1の配列の残基201~256を含むEPCRタンパク質、例えば配列番号1の新規のEPCRタンパク質、または前記配列の残基のフラグメントに相当するmRNAの検出および定量化のための、配列番号1の配列の残基201~256を含むポリペプチドまたは前記配列の残基のフラグメント(好ましくは、前記フラグメントは、少なくとも9アミノ酸を有する)をコードするポリヌクレオチドの使用である。前記EPCRタンパク質は、血管損傷に関連する炎症性疾患、炎症、ガン、および凝固異常に関連する疾患から選択される疾患に関連する量で存在する。

40

【0040】

さらに、非タンパク分解起源の新規の可溶性のEPCRは、この形の可溶性のEPCR(sEPCRvar)の存在を、単独的かつ独占的に検出するのに選択的である分析方法

50

であって、他の形の可溶性のEPCRまたは膜EPCRが検出される方法と重複する前記方法を用いずに、特定の疾患を検出できるという利点を有する分析方法の開発のために役割を果たす可能性がある。

【0041】

[図面の簡単な説明]

図1は、RNAがプロセッシングされ、成熟したメッセンジャーRNA(mRNA)が産生される方式に依存する、異なるタイプのEPCRを示す図である。3つの別の形のmRNAが産生される可能性があり、これらは、続いて、3つの異なる形のタンパク質を産生することとなる：1：膜EPCR(mEPCR)として翻訳されるタンパク質とは異なる4つのエキソンを伴うmRNA。2．エキソンEx I、Ex II、およびEx IIIのみを含み、その後イントロン3およびこのイントロンの後の全配列が続く、国際公開第9900673号パンフレット中にエスモン(EsmoN)によって開示された可溶性のEPCR(altSEPC)として翻訳されることとなるmRNA。3．本発明に開示された新規の形の選択的切断およびスプライシングによって、エキソンEx I、Ex II、およびEx IIIを含むmRNAが産生されることとなるが、プロセッシング中に、エキソンEx IVは失われ、この理由から、膜貫通ドメインも細胞質のテールも転写されず、その場所では、エキソンIIIの後、3'非翻訳領域に位置する潜在性(cryptic)エキソンであるであろう配列が出現し、この場合、mRNAは、本発明の新規の可溶性EPCR形(sEPCr var)として翻訳される。可溶性EPCRはまた、おそらくメタロプロテアーゼ(まだ特徴づけられていない)から、タンパク分解活性によって産生することもできる。メタロプロテアーゼは、膜高さでEPCRを切断し、その結果、細胞外受容体の画分からなり、膜貫通ドメインおよび細胞質内テールを欠く、新規の可溶性のEPCR(sEPCR)が産生される。

10

20

【0042】

図2は、特異的なEPCR遺伝子プライマーを用いるHUVEC cDNAの増幅の後に得られるバンドパターンである：野生型EPCR cDNA(1221bp、矢印1)に相当するバンドに加えて、選択的切断-スプライシングによって産生された新規の変異体アイソフォームのcDNAに相当する新規の増幅断片が認められる(矢印2)。

【0043】

図3は、どちらも緑色蛍光タンパク質と融合させた、野生型EPCR(パネルA)を用いて、あるいはアイソフォーム(パネルB)を用いて形質移入されたCOS-7細胞である。パネルAは、野生型タンパク質が、細胞膜(矢印)上に蓄積する傾向があることを示すのに対して、アイソフォーム3を用いた場合、この局在化パターンは認められない(パネルB)。

30

【0044】

図4は、ピキアパストリス(Pichia Pastoris)におけるsEPCr var発現を説明する図である。本明細書に示すように、sEPCr varは、安定に形質転換されたP.パストリス(P. pastoris)細胞の上清から精製された。パネルA：SDS-PAGEによって分離され、GELCODE Blue染料を使用して検出された様々なタンパク質を示す。ストリート St：発現される各バンドの分子量をkDaで示す、分子量マーカー、ストリート 1：組み換え型のsEPCR。約42kDaのブロードなバンド(タンパク質の強いグリコシル化に起因する)が観察される。ストリート 2：sEPCr var。47kDaのブロードなバンド(タンパク質の強いグリコシル化に起因する)が観察される。パネルB：モノクローナル抗-EPCR抗体を用いるウェスタンブロットによって検出されるタンパク質、ストリート St：発現される各バンドの分子量をkDaで示す、分子量マーカー、ストリート 1：ブランク、ストリート 2：sEPCr var。約47kDaのブロードなバンド(様々なタンパク質のグリコシル化に起因し、35から60kDaまでの間に広がる)が観察される。

40

【0045】

図5は、異なる組織および腫瘍由来のcDNAからのEPCR遺伝子の増幅である。パ

50

ネルA) 1:分子量マーカー、2:心臓、3:肝臓、4:腎臓、5:膵臓、6:肺、7:胎盤。パネルB) 1:分子量マーカー、2:骨格筋、3:脳、4:胸腺、5:小腸、6:脾臓。パネルC) 1:マーカー、2:前立腺、3:睾丸、4:卵巣、5:大腸。パネルD) は、肺腫瘍の腫瘍株: 2:H 446、3:H 510、4:H 1264、5:H 549、6:H 441、7:HTB 51、8:H 676、9:H 727、10:H 720、11:H 385、12:H 1299からのサンプルである。分子量マーカーを含有するストリートは、図中に略語St(「standard(標準)」より)で示す。マーカーの下方のバンドは、100bpサイズに相当し、各新しいバンドは、その前のバンドに対して100bpの増分(100bp、200bp、300bp・・・)に相当する。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0046】

内皮細胞cDNAからのEPCR cDNAの増幅

HUVEC細胞を、ヒトの臍帯静脈から得て、標準の手順に従って培養し(ジャッフェEA(Jaffe EA)、ナフマンRL(Nachman RL)、ベッカーCG(Becker CG)、ミニックCR(Minick CR)「Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphology and immunologic criteria.」、「J Clin Invest.」、1973年11月、52(11):2745~56)、全RNAを、(ペレス-ルイスA(Perez-Ruiz A)、モンテスR(Montes R)、ベラスコF(Velasco F)、ロペス-ペドレラC(Lopez-Pedraza C)、アントニオパラモJ(Antonio Paramo J)、オルベJ(Orbe J)、ハーミダJ(Hermida J)、ローシャE(Rocha E)、「Regulation by nitric oxide of endotoxin-induced tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 in endothelial cells.」、「Thromb Haemost.」、2002年12月、88(6):1060~5)に記載される通り、標準の技術に従って抽出した。得られたRNAは、転写酵素を用いて37℃で60分間インキュベートし、cDNAに逆転写させ、それに続いて酵素失活のために65℃で5分間インキュベートした。これを行うために、120単位(U)のM-MuLV逆転写酵素(ギブコBRL(Gibco BRL))を、RNA1μgに加え、10μLの最終体積にした。これは、4μLの逆転写酵素緩衝液、2mmol/Lのデオキシヌクレオチド(dNTP、インビトロジェン(Invitrogen))、0.3μg/mLのランダムヘキサマー(ギブコBRL(Gibco BRL))、0.5mmol/Lのジチオトレイトール(dithiothreitol)、および35UのRnase阻害剤(ヒト胎盤由来のRNAsin 48,000U/mL、RNAガード、GEヘルスケアバイオサイエンス(GE Healthcare Bio-Science))を含有していた。

20

30

【0047】

EPCR遺伝子の発現を、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって分析した。使用されるプライマー(ジェンセット(Genset)、フランス)は、配列番号3の配列に相当する5'プライマー、および配列番号4の配列に相当する3'プライマーであった。

40

【0048】

PCRは、25μLの体積で行われた。1μgのRNAの逆転写によってあらかじめ得られた一定量のcDNAが使用され、それに、1Uのtaq DNAポリメラーゼ(ロシュ(Roche))、2.5μLの反応緩衝液(ロシュ(Roche))、0.5μLの各プライマー(10μmol/L溶液から)、0.25μLのデオキシヌクレオチド(dNTP、GEヘルスケアバイオサイエンス(GE Healthcare Bio-Science))、および0.25μLの1mg/mL BSAが加えられた。この反応

50

混合物を、水で25 μ Lに調節した。増幅サイクルは、94 で30秒の変性相と、別のアニーリングと、72 で3.5分の伸張相からなる。このサイクルを5回繰り返し、その後、同じ変性相と、別のアニーリングと、68 で3分の伸張相の32サイクルを実施する。最終の伸張期間として、混合物を5分間68 に維持して、増幅を終結させた。PCR増幅されたセグメントは、1221塩基対(bp)の長さを有する。EPCR遺伝子がこれらの条件で増幅された場合、さらなるバンドが、約850塩基対の高さで出現する(図2)。

【0049】

増幅されたEPCRのさらなるバンドの配列決定

バンド2は、鋳型として図2の850bpバンドから開始すること以外は、同じ増幅条件を使用して増幅した。アガロースゲル電気泳動の後、製造業者の指示書に従って市販のキット(QIAquick Gel Extraction Kit)を使用して、増幅産物を精製した。このようにして精製された産物を、配列決定反応(ABIプリズム(ABI Prism)(登録商標)、BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit)のための鋳型として使用した。配列番号5および配列番号6の配列に相当するプライマーを使用して、2つの配列決定反応(1つは5' - 3'方向、もう1つは逆方向)を実施した。

【0050】

反応の結果は、自動シーケンサー、ABI Prism 377 DNA Sequencerで分析した。結論としては、新規のバンドは、配列番号7の配列によって定義されるフラグメントに相当する。

【0051】

その配列が配列番号2であるこのフラグメントの中央部分は、エキソン4および3'非翻訳領域の部分を欠く新規のEPCRのcDNAに相当する。このcDNAの起源は、おそらく、EPCR RNAの選択的切断 - スプライシング現象である。

【0052】

この新規のcDNAは、アミノ酸の配列が配列番号1であるポリペプチドをコードする。前記配列の残基1~17は、シグナルペプチドに相当し、残基18~200は、EPCRの共通の細胞外ドメインに相当し、残基201~256は、この新規の形のEPCRの新規の示差的なドメインに相当し、EPCRの膜貫通ドメインに代わるものである。この新規のドメインは、膜貫通ドメインであるための基準を満たさない。

【0053】

緑色蛍光タンパク質と融合させたEPCRおよびsEPCR varの哺乳類細胞における発現

EPCRアイソフォームの細胞内の局在化を研究するために、そのcDNAを、pcDNA3.1/CT-GFP-TOPOベクター中にクローニングし、それを緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現させた。このようにして調製されるベクターを使用して、Lipofectamine 2000(インビトロジェン(Invitrogen))を使用する培養で、哺乳類COS-7細胞を一過的に形質転換させた。対照として、同じベクターを使用し、ここでは野生型EPCRのcDNAをクローニングし、緑色蛍光タンパク質と融合させた。野生型EPCRおよびアイソフォームの細胞内局在化を、蛍光顕微鏡検査によって検出した。図3に示しているように、野生型EPCRは、主に細胞膜上に局在化する(ここでは緑色蛍光が認められる)が、sEPCR varアイソフォームは、本発明者らの仮定と一致して、細胞膜上には局在化しない。

【0054】

EPCRアイソフォームのクローニング、発現、精製、および特徴付け
クローニングおよび発現

同定されたEPCR変異体(EPCR var)を発現させるために、sEPCR var配列を、cDNA鋳型として内皮細胞を使用して、イニシエーター

5' - agcttg gcatatcgattagccaagacgcctcagatg -

3' および

5' - a g c t a t c g t a g c g g c c g c c t a c c c t a t t a t a t c a g c -
3'

を用いる（これらは、それぞれ5'および3'末端にClaIおよび別のNotI制限部位を付加されている）ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、そのシグナルペプチドを伴わずに増幅させた（残基17～256）。こうした修飾により、サッカロミセスレビシエの因子分泌シグナルの後の、pPICZ C（インビトロジェン（Invitrogen））プラスミドのClaIおよびNotI部位に、sEPCR var変異体配列を結合することが可能になり、酵母から細胞外培地への多くのタンパク質の効率的な分泌が可能になった。クローニングプロセスにより、セリン残基および別のイソロイシン残基が、sEPCR varのアミノ末端に加えられた。直接的配列決定を使用して、挿入配列およびベクターが適切であることが確認されることが確認された。あらかじめ調製された発現ベクターを用いて、PmeI制限酵素を用いるそれらの直鎖化の後、ピキアパストリス（*Pichia Pastoris*）細胞を、化学的方法を使用して形質転換させ（Easy Comp、インビトロジェン（Invitrogen））、その結果、メタノール反応内因性プロモーターにおける、sEPCR varコード配列の相同的組換えによる組込みが示された。ゼオシンの存在下で形質転換産物を培養し、sEPCR varコード配列を含有する、言い換えるとゼオシン抵抗性遺伝子を含有するベクターで形質転換されたP.パストリス（*P. Pastoris*）コロニーを選択した。簡単に言うと、形質転換された酵母を、1%（v/v）のグリセロール（BMGY）が補充された4mlのBMGY培地 [1%（w/v）の酵母抽出物、2%（w/v）のペプトン、100mMリン酸カリウム（pH6,0）、硫酸アンモニウムを含む酵母窒素源1.34%（w/v）、 4×10^{-5} %（w/v）のビオチン] 中で培養し、撪拌しながら約18時間28～30℃でインキュベートした。細胞は、室温で5分間、2,000gで遠心分離することによって収集した。上清を捨て、18時間、1%メタノールを用いて、sEPCR var発現を誘導した。これを行うために、細胞を、0.5%（w/v）メタノールが補充された3mlのMBYに再懸濁し、勢いよく撪拌しながら、約28～30℃で18時間インキュベートした。誘導後、条件培地からのサンプルを、12% NuPAGE Bis-Trisゲル（インビトロジェン（Invitrogen）、カリフォルニア州カールズバッド（Carlsbad, CA））にローディングし、RCR-2モノクローナル抗体（フクドメケンジ（Kenji Fukudome）博士、佐賀大学（Saga University）、日本（Japan）によって快く提供された）を使用するウェスタンブロットによってsEPCR varを検出した（図4）。大規模産生については、最も高濃度のsEPCR varを分泌したコロニーを選択した。その高いsEPCR var産生能力に起因して選択されたコロニーにおいて、そのメタノール代謝（新陳代謝が早いものまたは遅いもの）を研究し、これによって、最も適切なコロニーのための最適発現条件が確立された。一旦培養条件およびメタノール誘導が最適化されたら、大量のsEPCR varを産生するために規模を増大した。

【0055】

精製

P.パストリス（*P. Pastoris*）培養上清を濃縮し、NaClを含まない20mM Tris-HCl（pH7.6）に対して透析した後、2つの連続する精製ステップ：イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過を実施した。イオン交換精製では、Resource Qカラム（GEヘルスケアバイオサイエンス（GE Healthcare Bio-Science））を使用し、溶出は、20カラム分に匹敵する体積の、0.0～300mMのNaClグラジエントを用いて実施した。sEPCR varを含有する溶出分画を合わせ、遠心限外濾過によって濃縮し、その後、Superdex 75-HR10/30カラム（GEヘルスケアバイオサイエンス（GE Healthcare Bio-Science））にかけてゲル濾過を実施した。精製されたタンパク質の濃度を、BCA総タンパク質アッセイ（ピエール（Pierre）、イリノイ州ロックフ

10

20

30

40

50

オード (Rockford, IL)) および BSA 標準を使用して決定した。精製された sEPCR var を検出するために、サンプルを、12% NuPAGE Bis-Tris ゲル (インビトロジェン (Invitrogen)、カリフォルニア州カールズバッド (Carlsbad, CA)) にローディングし、還元条件下で電気泳動を実施し、続いて、クマシーブルーで染色した。電気泳動ゲルをエレクトロブロットティングにかけ、RCR-2モノクローナル抗体を用いて sEPCR var を検出した。sEPCR var の分子量を評価するために、各ゲル電気泳動には分子量標準を含ませた。

【0056】

新規の可溶性 EPCR 変異体の活性を特徴づけるための生化学的分析

PC に対する sEPCR var の親和性

培養された内皮細胞における APC の産生。使用される細胞株は、EA.hy926 (トロンボモジュリンおよび EPCR を発現する能力を保持している、形質転換されたヒトの内皮細胞株) であった (スターズ-クロサワ DJ (Stearns-Kurosawa DJ)、クロサワ S (Kurosawa S)、モリカ JS (Mollica JS)、フェレル GL (Ferrell GL)、エスモン CT (Esmon CT)、「The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex.」Proc Natl Acad Sci U S A.」1996年、93:10212~6)。96 ウェルプレート上の 5×10^4 細胞/ウェルを、0.02 U/ml のトロンビン (0.17 nM) (ERL、イギリス、スウォンジー (Swansea, United Kingdom)) と共にインキュベートし、150 mM NaCl、5 mM CaCl_2 、0.6 mM MgCl_2 、1% BSA、0.001% Tween-20 および 0.02% NaN_3 を補充された、20 mM トリス緩衝液 (pH 7.4) 中で、PC (バクスター (Baxter)、米国イリノイ州ディアフィールド (Deerfield, IL, USA)) の濃度を 50 nM と 1,000 nM との間で変化させ、室温にて 45 分後、トロンビンを阻害するために、レピルジン (シェーリング AG (Schering AG)、ドイツ、ベルリン (Berlin, Germany)) を、0.2 μl の最終濃度で加え、3~4 分後に、APC によるそのタンパク質加水分解をモニタリングする目的で、発色基質 S-2366 (クロモジェニックス (Chromogenix)、イタリア、ミラノ (Milan, Italy)) を 0.4 mM の最終濃度で加えた。405 nm での吸光度の上昇を、マイクロプレートリーダー (iEMS Reader、ラボシステムズ (Lab systems)、フィンランド (Finland)) で動力学的に記録した。ミハエリス・メンテンの式に対する曲線データの調整を、これらの条件での PC 活性化 K_m 値を算出する Enzfitter プログラム (バイオソフト (Biosoft)、イギリス、ケンブリッジ (Cambridge, United Kingdom)) を使用して実施した。

【0057】

sEPCR var の阻害効果を研究するために、2 $\mu\text{mol/L}$ を、トロンビンおよび PC と同時に加えた。このようにして、PC 活性化に対する sEPCR var の効果を分析し、PC に対するその親和性を反映する、sEPCR が活性化に対して有する効果と比較することができた。

【0058】

表 1 は、sEPCR および sEPCR var の存在下または非存在下での、培養された内皮細胞の表面上の、トロンビンによるプロテイン C 活性化の生化学的特性を示す。

【0059】

表 1

【0059】

表 1

10

20

30

40

【表 1】

	K _m (nM)	V _{max} (AU/秒)
PC単独	49	0.0054
PC+2 μmol/L sEPCR	881	0.008
PC+2 μmol/L sEPCRvar	698	0.007

【0060】

10

PCに対するsEPCRおよびsEPCRvarの親和性

活性化部分トロンボプラスチン時間の決定。健康な対象からの5血漿の混合物を使用し、ダイアグノスティカ・スタゴ・ベーリンガーマンハイム (Diagnostica Stago Boehringer Mannheim) STA Compact装置 (ロシュ (Roche))、およびパトロンチン (Pathromtin) 試薬 (デイドベリング (Dade Behring)、米国 (USA)) を使用して、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を決定した。周知のように、正常な血漿の混合物中のAPCの存在は、APTTを延長させる。使用される実験条件では、APCが存在しない場合のAPTTは、 33.1 ± 0.4 s (平均 \pm SD)であったのに対して、APCが1 nmol/Lの最終濃度で加えられた場合、APTTは、 43.9 ± 0.4 sに延長された。sEPCRが加えられた場合、APCの効果は低下し、1 mmol/LのsEPCRが存在する場合には、APTTは、 37.2 ± 0.2 sであった。APCの抗凝血効果に対するsEPCRのこの阻害効果は、用量依存的である。正常な血漿の混合物に加えられたsEPCRは、APTTに対する直接的な効果を有しなかった (sEPCRが存在する場合の 33.9 ± 0.4 sと比較して、sEPCRが存在しない場合には 33.1 ± 0.4 s)。すべての実験を4回繰り返した。sEPCRではなく、同じ濃度のsEPCRvarが加えられた場合、結果は、sEPCRを用いて得られるものと重ねることができ、sEPCRと同様に、sEPCRvarもAPCと結合することが実証された。

20

【0061】

30

表2は、APC抗凝血作用に対するsEPCRおよびsEPCRvarの効果を示す。それに1 nmol/LのAPCおよび様々な濃度のsEPCRが加えられた、正常な血漿の混合物の血液凝固時間 (APTT)。4つの実験の平均 \pm SDを示す。APCが存在しない場合のAPTTは、 33.1 ± 0.4 秒であった。

【0062】

表2

【表 2】

1 nmol/LのAPCを用いるAPTT (秒)	
sEPCR (nmol/L)	
0	43.9 ± 0.4
10	41.8 ± 0.6
50	41.8 ± 0.2
100	40.5 ± 0.6
250	39.9 ± 0.3
500	39.5 ± 0.2
1000	38.2 ± 0.2
sEPCRvar (nmol/L)	
0	43.9 ± 0.4
10	41.7 ± 0.3
50	41.8 ± 0.9
100	41 ± 0.5
250	39.7 ± 0.2
500	39.4 ± 0.9
1000	37.9 ± 0.3

10

20

【0063】

様々な組織および腫瘍株におけるsEPCRvarの発現分析

sEPCRvarが発現される組織を同定するために、EPCRおよびsEPCRvarに相当するcDNAの同時増幅を可能にするプライマーを使用するPCRによって、様々なヒト組織のcDNAライブラリ(Multiple tissue cDNA(MTC)パネルIおよびII、バイオサイエンス(Bioscience)、米国(USA))を研究した。使用されるプライマー(ジェンセット(Genset、フランス)は、以下の通りであった:

プライマー5': 5'-GCAGTATGTGCAGAAACATATTTCCGC-3'および

プライマー3': 5'-CATCCCAAGTCTGACACACCTGGAAGT-3'

30

【0064】

PCRは、25 μLの体積で実施した。cDNAのアリコットを使用し、これに、1 Uのtaq DNAポリメラーゼ(ロシュ(Roche))、2.5 μLの反応緩衝液(ロシュ(Roche))、0.5 μLの各プライマー(10 μmol/L溶液から)、0.25 μLのデオキシヌクレオチド(dNTP、GEヘルスケアバイオサイエンス(GE Healthcare Bio-Science))、および0.25 μLの1 mg/mL BSAを加えた。反応混合物を、水で25 μLに調節した。増幅サイクルは、94で30秒の変性段階、56で1分の別のアニーリング段階、72で1.5分の伸張からなる。このサイクルを35回繰り返す。最終の伸張期間として72で5分間混合物を維持して、増幅を終結させた。増幅されたEPCRのcDNAセグメントは、578 bp長であったのに対し、sEPCRvarのcDNAセグメントは、189 bpであった(図5)。sEPCRvar形は、脾臓、心臓、肝臓、腎臓、肺、胎盤、胸腺、小腸、脾臓、および大腸に多量に発現された。sEPCRvar形は、いくつかの腫瘍株に、特にH 549、H 441、およびH 720に多量に発現された。いくつかの腫瘍株、特にH 446およびH 676は、まだ同定されていない別の形(これは、その電気泳動移動度によれば、1000 bpを有する)をさらに発現した。

40

【0065】

抗体産生

50

免疫化

生後少なくとも1ヵ月のBALB/C雄を、以下のパターンに従って、sEPCRV arで免疫化させた：フロイント・アジュバントまたは別のアジュバント中の10 μ gと200 μ gの間の量の免疫原を用いる、少なくとも2週間間隔での3回の皮下、皮内、または腹腔内の免疫化、あるいはこれらの組み合わせ、3回目の免疫化の2週間後、2日間隔で、同じ量の免疫原（ただし、生理食塩水血清（saline serum）中）を使用して、2回の新規の追加免疫を投与した。他の動物も、配列番号1のペプチド213~227、229~242、212~226、227~241、および242~256の混合物を用いて免疫化させた。これらのペプチドは、カイト J. (Kyte J.)、ドリトル R. F. (Doolittle R. F.) のアルゴリズム（「J. Mol. Biol.」、1982年、157:105~132）に従うProt scaleプログラムによると非常に親水性であることから選択された。

【0066】

融合

最後の追加免疫投与の2日後に、ハイブリドーマを産生した。ポリエチレングリコール1500または4000の存在下で、動物の脾細胞を骨髄腫細胞（SP2/O-Ag14、P3X63-Ag8.6.5.3、P3-NS-1-Ag4-1、その他）と融合させることからなる技術を用いた。この薬剤は、膜融合を可能にし、その結果、様々な細胞型との間のハイブリッドが産生されることとなる。動物Bリンパ球と骨髄腫細胞との間のハイブリッドは、新規の細胞型、ハイブリドーマを形成し、これは、抗体を産生し、また、培養中に無限に増殖する。これらのハイブリドーマを選択し、残りのハイブリッドを排除するために、細胞培養物にHAT培地を加えた。HATは、アミノプテリン、すなわちグアノシンの新規の合成経路（新生経路）の阻害剤を含有する。骨髄腫細胞は、核酸合成サルベージ経路に必要な機能性のHPR T酵素を欠いているので、唯一の利用可能な経路（新生経路）が、アミノプテリンでブロックされる場合、これらは、核酸を合成することができない。したがって、培養の2週間後、培養中で生き残る唯一の細胞は、脾細胞-骨髄腫ハイブリッドである。脾細胞は、ハイブリッドに代替の経路によるグアノシン合成能力を付与し、骨髄腫細胞に、インビトロの培養において際限なく培養される能力を付与する。

【0067】

抗sEPCRV arおよび抗sEPCR抗体を産生するハイブリドーマの検出

HAT培地中の細胞を、少なくとも10の96ウェル培養マイクロプレートに分配する。融合の9日後と14日後との間に、コロニーのサイズは、上清中の抗体の存在を分析するのに十分となる。目的の抗体、すなわちsEPCRV arに対する抗体を分泌するハイブリドーマを選択するために、クローンを含有する5枚のマイクロプレートのすべてのウェルから上清のサンプルを取り出し、これをイムノアッセイにかけた。ELISAおよびウェスタンブロットアッセイを実施した。ELISAについては、プレートを、sEPCRV ar（0.3 μ g/ウェル）で被覆し、4 での15時間のインキュベーション、および適切なタンパク質による対応するブロッキングの後、培養上清を加え、相応な洗浄を実施し、次いで、二次マウス抗免疫グロブリン抗体を加える。このようにして、ウェルの洗浄およびペルオキシダーゼおよびo-フェニレンジアミンを用いる発色の後、着色または吸光度（492nm）の上昇が検出されたウェルは、sEPCRV ar抗体を分泌するハイブリドーマのクローンを含有する可能性がある。ウェスタンブロットについては、組み換え型タンパク質および/またはsEPCRV arタンパク質を発現する組織または細胞抽出物を、ポリアクリルアミドゲルで泳動した。これを、上清中の特異的抗体の存在を証明するために、格子型（grille-type）装置によって独立した領域に分けられたニトロセルロースまたはPVD F膜にトランスファーした。ブロッキングおよび特異的抗体とのインキュベーションを行った後、これを3回洗浄し、ペルオキシダーゼ酵素に結合した二次抗体と共にインキュベートした。発色は、酵素によって形質転換される際、特異的な抗体に結合された場所で光を産生する基質を使用して実施した。発光バンドが、予測分子量を有するタンパク質に相当する場合、その上清が由来するウェルからの抗体産

10

20

30

40

50

生細胞を増殖させ、液体窒素中に凍結させることとなる。

【0068】

sEPCR var は、全 sEPCR 部分を含有するので、sEPCR var に対して陽性であるハイブリドーマの、組み換え型 EPCR の細胞外領域との反応性が分析されることとなる。このようにして、sEPCR var の特定の領域に対する抗体を産生するハイブリドーマを選択することができる。

【0069】

ハイブリドーマの単クローン性

抗 sEPCR var 抗体を分泌する各細胞培養物がモノクローナルであることを確認するために、クローニングまたは限界希釈技術が適用される。第1のウェスタンブロットまたは ELISA 試験で陽性であった最初の培養物からの、あるいは幹細胞からの、単離された細胞を、新しい培養マイクロプレート上で増殖させる。1種または複数の細胞から生じている新規のコロニーが、一旦十分なサイズを獲得したら、これから再び上清を取り出し、これを新規の ELISA またはウェスタンブロットにかけることになる。再び陽性であったコロニーを限界希釈にかけ、このプロセスを、第3の限界希釈の後に分析された上清の100%が、sEPCR var に対する抗体を含有するようになるまで繰り返した。

【0070】

抗体精製

より大きな抗体濃度を達成するために、ハイブリドーマを特別な条件で培養した後 (インテグラバイオサイエンス (Integra Biosciences) からの CELL line システムを備えた培養ビン、またはベクトンディッキンソン (Becton Dickinson) からの CELL line システム)、IgG を含有する上清を、以下の方法のうちの一つまたは複数を用いる液体クロマトグラフィーによる精製にかけることとなる: AKTA FPLC 装置、GEヘルスケアバイオサイエンス (GE Healthcare Bio-Science) を使用する、免疫親和性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー (プロテイン A / プロテイン G / プロテイン L、固定化金属、バイオアフィニティ)、陽イオン交換、ヒドロキシアパタイト、疎水的相互作用、ゲル濾過、など。

【0071】

[参考文献]

1. Bangalore N, Drohan WN, Orthner CL. High affinity binding sites for activated protein C and protein C on cultured human umbilical vein endothelial cells. Independent of protein S and distinct from known ligands. *Thromb Haemost* 1994; 72: 465-74.
2. Fukudome K, Esmon CT. Identification, cloning and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 26486-91.
3. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 10212-6.
4. Taylor FB Jr, Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood* 2001; 97: 1685-8.
5. Biguzzi E, Merati G, Liaw PC, Bucciarelli P, Oganessian N, Qu D, Gu JM, Fetiveau R, Esmon CT, msnucci PM, Faioni EM. A 23bp insertion in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene impairs EPCR function. *Thromb Haemost* 2001; 86: 945-8.
6. Saposnik B, Reny JL, Gaussem P, Emmerich J, Aiach M, Gandrille S: A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candi

10

20

30

40

50

date risk factor for thrombosis. *Blood* 2004; 103: 1311-1318.

7. Uitte de Willige S, Van Marion V, Rosendaal FR, Vos HL, de Visser MCH, Bertin a RM.

Haplotypes of the EPCR gene, plasma sEPCR levels and the risk of deep venous thrombosis. *J. Thromb Haemost.* 2004; 2: 1305-10.

8. Taylor FB Jr, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Ferrell G, Chang AC, Laszik Z, Kosanke S, Peer. G, Esmon CT: The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against *Escherichia coli* sepsis. *Blood* 2000; 95: 1680-6.

9. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile

of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem.* 2001; 276: 1199-203.

10. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. Activation of endothelial

cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 2002; 296: 1880-2.

11. Fukudome K, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, He X, Rezaie AR, Esmon CT.

The endothelial cell protein C receptor. Cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor. *J Biol Chem* 1996; 271: 17491-8.

12. Simmonds, R E, Lane, DA. Structural and functional implications of the intron/exon organisation of the human endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR) gene: comparison with the structure of CD1/major histocompatibility complex alpha-1 and alpha-2 domains. *Blood* 1999; 94: 632-41.

13. Oganessian V, Oganessian N, Terzyan S, Qu D, Dauter Z, Esmon NL, Esmon CT. The crystal structure of the endothelial protein C receptor and a bound phospholipid. *J Biol Chem* 2002; 277: 24851-4.

14. Liaw PC, Mather T, Oganessian N, Ferrell GL, and Esmon CT. Identification of the protein C/activated protein C binding sites on the endothelial cell protein C receptor. Implications for a novel mode of ligand recognition by a major histocompatibility complex class 1-type receptor. *J Biol Chem* 2001; 276: 8364-70.

15. Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, Hidari N, Esmon CT. Identification of functional endothelial protein C receptor in human plasma. *J Clin Invest* 1997; 100: 411-8.

16. Xu J, Qu D, Esmon NL, Esmon CT. Metalloproteolytic release of endothelial cell protein C receptor. *J Biol Chem* 1999; 275: 603844.

17. Fukudome K, Esmon CT. Molecular cloning and expression of murine and bovine endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR). The structural and functional conservation in human, bovine, and murine EPCR. *J Biol Chem.* 1995; 270:5571-7.

18. Liaw PCY, Neuenschwander PF, Smirnov M, Esmon CT. (2000) Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C modulates protein C and activated protein C function. *J Biol Chem.* 2000; 275:5447-52.

19. Kurosawa S, Esmon CT, Stearns-Kurosawa DJ. The soluble endothelial protein C receptor binds to activated neutrophils: involvement of proteinase-3 and CD11b/CD18. *J Immunol* 2000; 165: 4697-4703.

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 2 】

【図 1】図 1 は、RNA がプロセッシングされ、成熟したメッセンジャー RNA (mRNA) が産生される方式に依存する、異なるタイプの EPCR を示す図である。3 つの別の形の mRNA が産生される可能性があり、これらは、続いて、3 つの異なる形のタンパク

10

20

30

40

50

質を産生することとなる：1：膜EPCR (mEPCR)として翻訳されるタンパク質とは異なる4つのエキソンを伴うmRNA。2：エキソンEx I、Ex II、およびEx IIIのみを含み、その後イントロン3およびこのイントロンの後の全配列が続く、国際公開第9900673号パンフレット中にEsmon (Esmon)によって開示された可溶性のEPCR (altsEPC)として翻訳されることとなるmRNA。3：本発明に開示された新規の形の選択的切断およびスプライシングによって、エキソンEx I、Ex II、およびEx IIIを含むmRNAが産生されることとなるが、プロセッシング中に、エキソンEx IVは失われ、この理由から、膜貫通ドメインも細胞質のテールも転写されず、その場所では、エキソンIIIの後、3'非翻訳領域に位置する潜在性(cryptic)エキソンであるであろう配列が出現し、この場合、mRNAは、本発明の新規の可溶性EPCR形(sEPCR var)として翻訳される。可溶性EPCRはまた、おそらくメタロプロテアーゼ(まだ特徴づけられていない)から、タンパク分解活性によって産生することもできる。メタロプロテアーゼは、膜高さでEPCRを切断し、その結果、細胞外受容体の画分からなり、膜貫通ドメインおよび細胞質内テールを欠く、新規の可溶性のEPCR (sEPCR)が産生される。

【図2】図2は、特異的なEPCR遺伝子プライマーを用いるHUVEC cDNAの増幅の後に得られるバンドパターンである：野生型EPCR cDNA (1221bp、矢印1)に相当するバンドに加えて、選択的切断-スプライシングによって産生された新規の変異体アイソフォームのcDNAに相当する新規の増幅断片が認められる(矢印2)。

【図3】図3は、どちらも緑色蛍光タンパク質と融合させた、野生型EPCR (パネルA)を用いて、あるいはアイソフォーム(パネルB)を用いて形質移入されたCOS-7細胞である。パネルAは、野生型タンパク質が、細胞膜(矢印)上に蓄積する傾向があることを示すのに対して、アイソフォーム3を用いた場合、この局在化パターンは認められない(パネルB)。

【図4】図4は、ピキアパストリス(Pichia Pastoris)におけるsEPCR var発現を説明する図である。本明細書に示すように、sEPCR varは、安定に形質転換されたP.パストリス(P. pastoris)細胞の上清から精製された。パネルA：SDS-PAGEによって分離され、GELCODE Blue染料を使用して検出された様々なタンパク質を示す。ストリート St：発現される各バンドの分子量をkDaで示す、分子量マーカー、ストリート 1：組み換え型のsEPCR。約42kDaのブロードなバンド(タンパク質の強いグリコシル化に起因する)が観察される。Street 2：sEPCR var。47kDaのブロードなバンド(タンパク質の強いグリコシル化に起因する)が観察される。パネルB：モノクローナル抗-EPCR抗体を用いるウェスタンブロットによって検出されるタンパク質、ストリート St：発現される各バンドの分子量をkDaで示す、分子量マーカー、ストリート 1：ブランク、ストリート 2：sEPCR var。約47kDaのブロードなバンド(様々なタンパク質のグリコシル化に起因し、35から60kDaまでの間に広がる)が観察される。

【図5】図5は、異なる組織および腫瘍由来のcDNAからのEPCR遺伝子の増幅である。パネルA)1：分子量マーカー、2：心臓、3：肝臓、4：腎臓、5：膵臓、6：肺、7：胎盤。パネルB)1：分子量マーカー、2：骨格筋、3：脳、4：胸腺、5：小腸、6：脾臓。パネルC)1：マーカー、2：前立腺、3：睾丸、4：卵巣、5：大腸。パネルD)は、肺腫瘍の腫瘍株：2：H 446、3：H 510、4：H 1264、5：H 549、6：H 441、7：HTB 51、8：H 676、9：H 727、10：H 720、11：H 385、12：H 1299からのサンプルである。分子量マーカーを含有するストリートは、図中に略語St(「standard(標準)」より)で示す。マーカーの下方のバンドは、100bpサイズに相当し、各新しいバンドは、その前のバンドに対して100bpの増分(100bp、200bp、300bp・・・)に相当する。

10

20

30

40

【 図 1 】

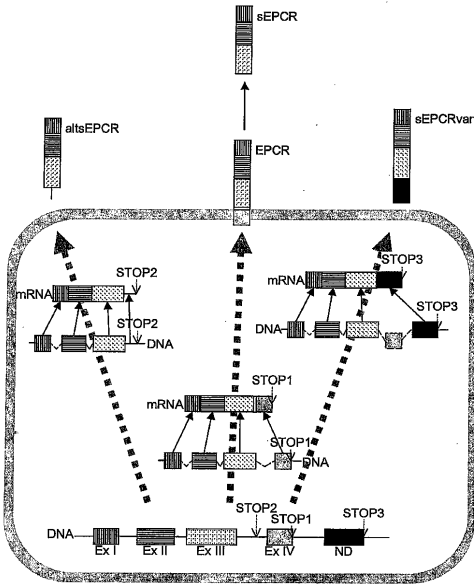


Figura 1

【 図 2 】

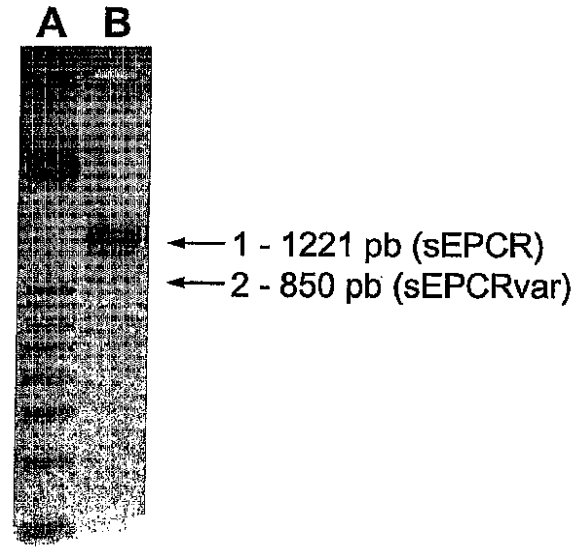


Figura 2

【 図 3 】

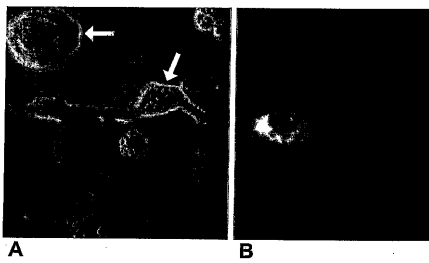


Figura 3

【 図 4 】

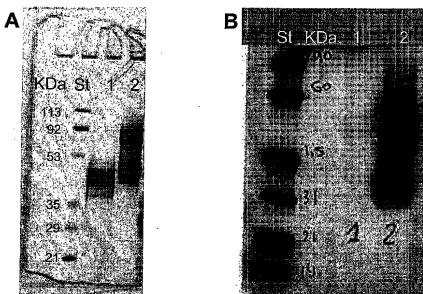


Figura 4

【 図 5 】

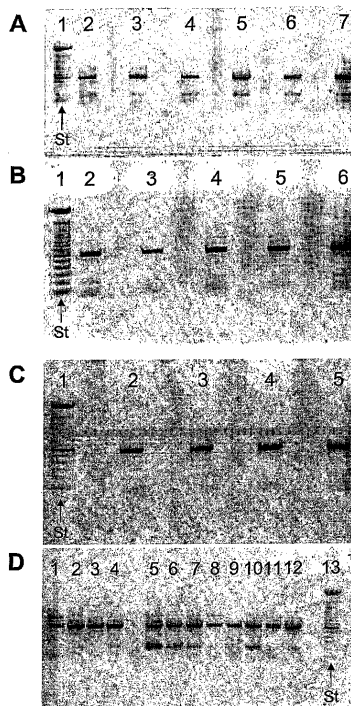


Figura 5

【配列表】

2008532536000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成19年11月22日(2007.11.22)

【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】

2008532536000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 2006/000136

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
see extra sheet 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) C07K, G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CIBEPAT, EPODOC, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, EBI (UniProt, aaGeneSeq, Euro Patents, Japan Patents, US Patents, PDB, EMBL All, naGeneSeq)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004048938 A2 (PROTEIN DESING LABS, INC.) 10.06.2004, Example 2, SEQ ID NO: 5669 (Tables 4A, 9A and 10A) & GSN data base; 26.08.2004; [online]; accesión number ADQ22849; Human soft tissue sarcoma- upregulated DNA - SEQ ID 5669; 1919 bp.	1-33
Y	WO 9900673 A1 (OKLAHOMA MEDICAL RESEARCH) 07.01.1999; page 18, lines 8-12; examples; claims 1-4, 8, 14.	1-33
Y	EMBL data base; 08.11.2002; [online]; NATIONAL CANCER INSTITUTE, CANCER GENOME ANATOMY PROJECT; accession number CA432641.	1-33
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"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 documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 07 September 2006 (07.09.2006)	Date of mailing of the international search report (25-09-2006)	
Name and mailing address of the ISA/ O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Facsimile No. 34 91 3495304	Authorized officer B. Pérez Esteban Telephone No. + 34 91 3498484	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2006/000136

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5695993 A (FUKUDOME, K. & ESMON, C.T.) 09.12.1997; column 1, lines 61-67; column 3, lines 43-64; column 6, lines 24-66; column 8, lines 37-57; column 10, line 30 - column 11, line 41; column 13, lines 41-44; column 17, line 10 - column 18, line 11; claims 1-4, 6, 8-10.	1-33
Y	WO 0229015 A1 (OKLAHOMA MEDICAL RESEARCH FOUNDATION [US/US]) 11.04.2002; examples 1, 2; claims 6-18.	1-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ES 2006/000136

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004048938 A	10.06.2004	AU 2003298786 A	18.06.2004
		US 20040253606 A	16.12.2004
WO 9900673 A	07.01.1999	US 5804392 A	08.09.1998
		CA 2427749 A	07.01.1999
		CA 2294647 A	07.01.1999
		AU 8269498 A	19.01.1999
		EP 0991946 A	12.04.2000
		JP 2001508876 T	03.07.2001
		JP 3553616 B	11.08.2004
		AU 748199 B	30.05.2002
		JP 2002193998 A	10.07.2002
		AT 240523 T	15.05.2003
		DE 69814634 D	18.06.2003
		DK 991946 T	08.09.2003
		PT 991946 T	30.09.2003
		JP 2003301000 A	21.10.2003
ES 2198727 T	01.02.2004		
DE 69814634 T	25.03.2004		
US 5695993 A	09.12.1997	WO 9605303 A	22.02.1996
		CA 2199821 A	22.02.1996
		AU 3272395 A	07.03.1996
		EP 0777731 A	11.06.1997
		US 5852171 A	22.12.1998
		AU 707349 B	08.07.1999
		US 6399064 B	04.06.2002
		AT 258983 T	15.02.2004
		DE 69532529 D	11.03.2004
US 7063843 B	20.06.2006		
WO 0229015 A	11.04.2002	AU 9648301 A	15.04.2002
		EP 1322749 A	02.07.2003
		US 2004014138 A	22.01.2004
		US 6989241 B	24.01.2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2006/000136

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES 2006/000136

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD		
Ver hoja adicional De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.		
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA		
Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación) C07K, G01N		
Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda		
Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) CIBEPAT, EPODOC, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, EBI (UniProt, aaGeneSeq, Euro Patents, Japan Patents, US Patents, PDB, EMBL All, naGeneSeq)		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	WO 2004048938 A2 (PROTEIN DESING LABS, INC.) 10.06.2004, Ejemplo 2, SEQ ID NO: 5669 (Tablas 4A, 9A y 10A) & base de datos GSN; 26.08.2004; [en línea]; número de acceso ADQ22849; Human soft tissue sarcoma- upregulated DNA - SEQ ID 5669; 1919 bp.	1-33
Y	WO 9900673 A1 (OKLAHOMA MEDICAL RESEARCH) 07.01.1999; página 18, líneas 8-12; ejemplos; reivindicaciones 1-4, 8, 14.	1-33
Y	Base de datos EMBL; 08.11.2002; [en línea]; NATIONAL CANCER INSTITUTE, CANCER GENOME ANATOMY PROJECT; número de acceso CA432641.	1-33
<input checked="" type="checkbox"/> En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos		<input checked="" type="checkbox"/> Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo
* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 07 Septiembre 2006 (07.09.2006)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 25 septiembre 2006 (25-09-2006)	
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado B. Pérez Esteban Nº de teléfono + 34 91 3498484	

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (Abril 2005)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2006/000136

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
Y	US 5695993 A (FUKUDOME, K. & ESMON, C.T.) 09.12.1997; column 1, líneas 61-67; column 3, líneas 43-64; column 6, líneas 24-66; column 8, líneas 37-57; column 10, línea 30 - column 11, línea 41; column 13, líneas 41-44; column 17, línea 10 - column 18, línea 11; reivindicaciones 1-4, 6, 8-10.	1-33
Y	WO 0229015 A1 (OKLAHOMA MEDICAL RESEARCH FOUNDATION [US/US]) 11.04.2002; ejemplos 1, 2; reivindicaciones 6-18.	1-33

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2006/000136

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 2004048938 A	10.06.2004	AU 2003298786 A US 20040253606 A	18.06.2004 16.12.2004
WO 9900673 A	07.01.1999	US 5804392 A CA 2427749 A CA 2294647 A AU 8269498 A EP 0991946 A JP 2001508876 T JP 3553616 B AU 748199 B JP 2002193998 A AT 240523 T DE 69814634 D DK 991946 T PT 991946 T JP 2003301000 A ES 2198727 T DE 69814634 T	08.09.1998 07.01.1999 07.01.1999 19.01.1999 12.04.2000 03.07.2001 11.08.2004 30.05.2002 10.07.2002 15.05.2003 18.06.2003 08.09.2003 30.09.2003 21.10.2003 01.02.2004 25.03.2004
US 5695993 A	09.12.1997	WO 9605303 A CA 2199821 A AU 3272395 A EP 0777731 A US 5852171 A AU 707349 B US 6399064 B AT 258983 T DE 69532529 D US 7063843 B	22.02.1996 22.02.1996 07.03.1996 11.06.1997 22.12.1998 08.07.1999 04.06.2002 15.02.2004 11.03.2004 20.06.2006
WO 0229015 A	11.04.2002	AU 9648301 A EP 1322749 A US 2004014138 A US 6989241 B	15.04.2002 02.07.2003 22.01.2004 24.01.2006

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2006/000136

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

*C07K 14/705 (2006.01)**C07K 16/28 (2006.01)**G01N 33/577 (2006.01)*

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	V
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	B

(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, IS, IT, LT, LU, LV, 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, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(74)代理人 100146259

弁理士 橋本 諭志

(72)発明者 ホセ・エルミダ・サントス

スペイン、エ - 3 1 0 0 8 パンプローナ(ナバーラ)、アベニダ・ピオ12、55番、フンダシオン・パラ・ラ・インベスティガシオン・メディカ・アプリカダ・フィマ

(72)発明者 ラモン・モンテス・ディアス

スペイン、エ - 3 1 0 0 8 パンプローナ(ナバーラ)、アベニダ・ピオ12、55番、フンダシオン・パラ・ラ・インベスティガシオン・メディカ・アプリカダ・フィマ

(72)発明者 エバ・モリナ・ブエイ

スペイン、エ - 3 1 0 0 8 パンプローナ(ナバーラ)、アベニダ・ピオ12、55番、フンダシオン・パラ・ラ・インベスティガシオン・メディカ・アプリカダ・フィマ

(72)発明者 エドゥアルド・マルティネス・アンソ

スペイン、エ - 3 1 0 0 8 パンプローナ(ナバーラ)、アベニダ・ピオ12、55番、フンダシオン・パラ・ラ・インベスティガシオン・メディカ・アプリカダ・フィマ

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA41 BA63 CA04 CA12 DA06 DA12 EA04 GA11 HA14

HA15

4B063 QA01 QQ08 QQ53 QR08 QR62 QS25 QS34

4B064 AG20 AG27 CA02 CA06 CA19 CC24 CE07 CE11 CE12

4B065 AA26X AA77X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA46

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 DA50 DA76 EA50 FA74 GA22

GA23

专利名称(译)	新型非蛋白水解来源的可溶性EPCR蛋白及其用途		
公开(公告)号	JP2008532536A	公开(公告)日	2008-08-21
申请号	JP2008501340	申请日	2006-03-17
申请(专利权)人(译)	Puroiekuto, 德, Biomedishina, 西玛, Soshiedaddo, LTDA		
[标]发明人	ホセエルミダサントス ラモンモンテスディアス エバモリナブエイ エドゥアルドマルティネスアンソ		
发明人	ホセ・エルミダ・サントス ラモン・モンテス・ディアス エバ・モリナ・ブエイ エドゥアルド・マルティネス・アンソ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/00 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	C07K14/705 C07K16/28 C12N9/6464 C12Y304/21069		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/705 C07K16/28 C12N1/00.G C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/53.V G01N33/574.B		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE07 4B064/CE11 4B064/CE12 4B065/AA26X 4B065/AA77X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA22 4H045/GA23		
代理人(译)	田中, 三夫 山崎 宏 櫻井洋子		
优先权	2005000623 2005-03-17 ES		
其他公开文献	JP2008532536A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及衍生自可变剪接机制的新型可溶性EPCR, 更具体地涉及包含SEQ ID NO: 1序列的残基201至256或所述序列片段的多肽。本发明还提供了重组或分离的EPCR蛋白, 其包含所述多肽, 编码所述多肽的分离的多核苷酸, 编码包含所述多肽的蛋白质的mRNA, 以及这些在检测疾病中的蛋白质。关于使用本发明进一步提供了包含所述多核苷酸的表达载体或宿主细胞, 包含所述细胞的表达载体和表达系统, 对所述多肽特异的分离的抗体, 以及生物样品中的SEQ ID NO: 1的序列。用于选择性体外检测EPCR蛋白的方法和试剂盒包括

【表1】

	K _m (nM)	V _{max} (AU/秒)
PC单独	49	0.0054
PC+2 μmol/L sEPCR	881	0.008
PC+2 μmol/L sEPCR var	698	0.007