

(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2009-540281

(P2009-540281A)

(43) 公表日 平成21年11月19日(2009.11.19)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68		2 G O 4 5
GO 1 N 33/574	(2006.01)	GO 1 N 33/574	A	4 H O 4 5
CO 7 K 14/82	(2006.01)	CO 7 K 14/82	Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 83 頁)

(21) 出願番号 特願2009-513682 (P2009-513682) (86) (22) 出願日 平成19年6月5日 (2007.6.5) (85) 翻訳文提出日 平成21年2月4日 (2009.2.4) (86) 国際出願番号 PCT/EP2007/055537 (87) 国際公開番号 W02007/141280 (87) 国際公開日 平成19年12月13日 (2007.12.13) (31) 優先権主張番号 0611116.5 (32) 優先日 平成18年6月6日 (2006.6.6) (33) 優先権主張国 英国 (GB) (31) 優先権主張番号 60/811, 681 (32) 優先日 平成18年6月7日 (2006.6.7) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 508034613 オクフォード ゲノメ スシエンセス (ユーケー) エルティーディー 英国 オーエックス2 オジェービー オクフォードシレ オクフォード ブクトン コウルト シー/オー ジャメス & コウベル (74) 代理人 100097456 弁理士 石川 徹 (72) 発明者 クフリスチアン ロフルフ 英国 オーエックス1 4 4アールワイ オクフォードシレ オクフォード アビン グドン ミルトン パルク 86 トヘ フォルム オクフォード ゲノメ スシエンセス (ユーケー) エルティーディー 最終頁に続く
---	--

(54) 【発明の名称】 タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、結腸直腸癌のスクリーニング、診断及び予後のため、結腸直腸癌治療の有効性をモニターするため、並びに薬物開発のための方法及び組成物を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験体における結腸直腸癌の診断、被験体における結腸直腸癌の原因の識別、結腸直腸癌に罹患している被験体における療法のガイド、結腸直腸癌に罹患している被験体における再発リスクの評価、又は結腸直腸癌に罹患している被験体への1種以上の将来の臨床転帰の予後リスクの割当の方法であって：

(a)前記被験体から得られた1種以上の試料中のマーカーとして、配列番号:1-18により規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する可溶性ポリペプチドを検出するように構成されたアッセイを実行すること；及び

(b)前記アッセイ(群)の結果を、該被験体中の結腸直腸癌の存在若しくは非存在と、該被験体において使用される治療計画と、該被験体における再発リスクと、又は結腸直腸癌に罹患している該被験体の1種以上の臨床転帰の予後リスクと関連づけることを含む、前記方法。

10

【請求項 2】

前記工程(a)において検出される可溶性ポリペプチドが、配列番号:4、7、8、13及び15のいずれかひとつにより規定されたタンパク質に由来する、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記工程(b)が、該被験体における前記検出されたマーカーのレベルが対照レベルよりも高い場合を決定することを含み、前記決定が、該被験体における結腸直腸癌の存在を示すか、該被験体におけるより大きい再発リスクを示すか、又は該被験体に関する予後不良を示す、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 4】

被験体における結腸直腸癌の診断法である、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5】

前記マーカーが、表1の4列目に列記されたアミノ酸配列、すなわち配列番号:34-35、37-38、40-42、44、47-56、59-60、62、64-83、85-87、89-92、95-127、132-133、137-141、144-147、149、151-153、155-161、164-165、167-175、177-179、182-187、189-190、193-195、197-200、202、205-209、211、213-227、229-241、243のいずれかひとつを含む、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

【請求項 6】

30

前記マーカーが、表2の4列目に列記されたアミノ酸配列、すなわち配列番号:36、39-40、42-43、45-47、57-58、61、63、66、75、84、88、91、93-94、98、100、108、111、115、121、123-124、126、128-131、134-136、140、142-143、147-150、152-154、160-163、166、168、172、174-176、180-181、188、190-192、196、200-201、203-204、212、214、216、218、224、228、238-239、242、244-245のいずれかひとつを含む、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

【請求項 7】

前記マーカーが、表2の2及び3列目に列記されたpI及びMWにより特徴づけられるアイソフォームのタンパク質に由来する、請求項1～4及び6のいずれか1項記載の方法。

【請求項 8】

40

前記マーカー配列が、配列番号:1-18のいずれかひとつから選択された配列を有するタンパク質の細胞外部分に相当する配列と重複するか又は好ましくはその内部である(すなわち、配列番号:19、21、22、25、27、29、30及び32から選択された配列に相当する配列と重複するか又は好ましくはその内部である)、請求項1～7のいずれか1項記載の方法。

【請求項 9】

前記マーカー配列が、配列番号:4、7、8、13及び15のいずれかひとつから選択された配列を有するタンパク質の細胞外部分に相当する配列と重複するか又は好ましくはその内部である、請求項8記載の方法。

【請求項 10】

前記方法が、前記マーカーの2種以上を検出するように構成されたアッセイを実行する

50

ことを含む、請求項1～9のいずれか1項記載の方法。

【請求項 1 1】

前記マーカの2種以上が、少なくとも2種の異なるタンパク質に由来する、請求項10記載の方法。

【請求項 1 2】

前記方法が、前記マーカの3種以上を検出するように構成されたアッセイを実行することを含む、請求項1～9のいずれか1項記載の方法。

【請求項 1 3】

前記マーカの3種以上が、少なくとも3種の異なるタンパク質に由来する、請求項12記載の方法。

【請求項 1 4】

前記方法が、前記マーカの4種以上を検出するように構成されたアッセイを実行することを含む、請求項1～9のいずれか1項記載の方法。

【請求項 1 5】

前記マーカの4種以上が、少なくとも4種の異なるタンパク質に由来する、請求項14記載の方法。

【請求項 1 6】

前記方法が、前記マーカの5種以上を検出するように構成されたアッセイを実行することを含む、請求項1～9のいずれか1項記載の方法。

【請求項 1 7】

前記マーカの5種以上が、少なくとも5種の異なるタンパク質に由来する、請求項16記載の方法。

【請求項 1 8】

前記方法が、配列番号:1-18により規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する可溶性ポリペプチドに加え、1種以上の追加のマーカを検出するように構成された1種以上の追加のアッセイを実行することを含み、ここで前記関連づける工程は、前記アッセイ(群)の結果及び前記追加アッセイ(群)の結果を、該被験体における結腸直腸癌の存在若しくは非存在と、該被験体における再発リスクと、又は結腸直腸癌を罹患している該被験体の1種以上の臨床転帰の予後リスクと関連づけることを含む、請求項1～17のいずれか1項記載の方法。

【請求項 1 9】

前記可溶性ポリペプチドが、配列番号:4、7、8、13及び15のいずれかひとつにより規定されたタンパク質に由来する、請求項18記載の方法。

【請求項 2 0】

前記被験体が、ヒトである、請求項1～19のいずれか1項記載の方法。

【請求項 2 1】

前記アッセイ(群)の1つ以上が、イムノアッセイである、請求項1～19のいずれか1項記載の方法。

【請求項 2 2】

配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する可溶性ポリペプチドへ免疫特異的に結合することが可能である抗体、又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬。

【請求項 2 3】

前記可溶性ポリペプチドが、配列番号:4、7、8、13及び15のいずれかひとつにより規定されたタンパク質に由来する、請求項22記載の抗体。

【請求項 2 4】

請求項22記載の抗体、又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの親和性試薬を含む、キット。

【請求項 2 5】

請求項22記載の複数の個別の抗体、又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディ

10

20

30

40

50

ィなどの他の親和性試薬を含む、キット。

【請求項 26】

被験体における結腸直腸癌の診断、被験体における結腸直腸癌の原因の識別、結腸直腸癌に罹患している被験体における療法のガイド、結腸直腸癌に罹患している被験体における再発リスクの評価、又は結腸直腸癌に罹患している被験体への1種以上の将来の臨床転帰の予後リスクの割当のための、請求項22記載の抗体、又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬、又は請求項24若しくは25記載のキットの使用。

【請求項 27】

配列番号:1-18のいずれかひとつにより規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチドの存在又は非存在を同定する工程を含む、ヒト被験体から得られた生物学的試料中の結腸直腸癌細胞の存在又は非存在の同定方法。

10

【請求項 28】

前記可溶性ポリペプチドが、配列番号:4、7、8、13及び15のいずれかひとつにより規定されたタンパク質に由来する、請求項27記載の方法。

【請求項 29】

被験体における結腸直腸癌を検出、診断し、被験体における結腸直腸癌の原因を識別し、結腸直腸癌に罹患している被験体における療法をガイドし、結腸直腸癌に罹患している被験体における再発リスクを評価し、又は結腸直腸癌に罹患している被験体への1種以上の将来の臨床転帰の予後リスクを割当て方法であり；

20

(a)前記被験体由来の試験される試料を、配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する可溶性ポリペプチドへ特異的に結合することが可能である1種以上の抗体、又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬と接触させること；及び

(b)これにより、該試料中の配列番号:1-18のいずれかひとつに規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチドの存在を検出すること；を含む、前記方法。

【請求項 30】

前記可溶性ポリペプチドが、配列番号:4、7、8、13及び15のいずれかひとつにより規定されたタンパク質に由来する、請求項29記載の方法。

30

【請求項 31】

前記可溶性ポリペプチドの1種以上の存在が、患者における結腸直腸癌の存在を示す、請求項29又は30記載の患者における結腸直腸癌の検出法。

【請求項 32】

被験体における結腸直腸癌の存在を同定する方法であって、配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチドの存在又は量を決定するために、前記被験体の全身の走査を実行して、結腸直腸癌細胞、特に転移性結腸直腸癌細胞の局在化を決定する工程を含み、前記可溶性ポリペプチドの1種以上の存在又は量が、該被験体における結腸直腸癌の存在を示す、前記方法。

40

【請求項 33】

前記可溶性ポリペプチドが、配列番号:4、7、8、13及び15のいずれかひとつにより規定されたタンパク質に由来する、請求項32記載の方法。

【請求項 34】

前記被験体の全身の走査を参照することにより、結腸直腸癌細胞の局在化を決定することを含む、被験体における結腸直腸癌の存在の同定方法であって、この走査が、配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチドの存在又は量を示し、該可溶性ポリペプチドの1種以上の存在又は量が、該被験体における結腸直腸癌の存在を示す、前記方法。

【請求項 35】

50

前記可溶性ポリペプチドが、配列番号:4、7、8、13及び15のいずれかひとつにより規定されたタンパク質に由来する、請求項34記載の方法。

【請求項36】

標識された抗体、又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬が、前記可溶性ポリペプチドの1種以上の存在を決定するために使用される、請求項32～35のいずれか1項記載の方法。

【請求項37】

配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されるタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチドの検出及び/又は決定において使用するための1種以上の試薬を含む、診断キット。

【請求項38】

前記可溶性ポリペプチドが、配列番号:4、7、8、13及び15のいずれかひとつにより規定されたタンパク質に特に由来する、請求項37記載のキット。

【請求項39】

前記可溶性ポリペプチドの1種以上に対する1種以上の抗体、又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬の入った1個以上の容器を備える、請求項37又は38記載のキット。

【請求項40】

前記又は各々の抗体、又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬に対する標識された結合パートナー、並びに/又はその上に該又は各々の抗体、又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬が固定されている試薬ストリップなどの固相を更に含む、請求項39記載のキット。

【請求項41】

被験体における結腸直腸癌を検出、診断し、被験体における結腸直腸癌の原因を識別し、結腸直腸癌に罹患している被験体における療法をガイドし、結腸直腸癌に罹患している被験体における再発リスクを評価し、又は結腸直腸癌に罹患している被験体への1種以上の将来の臨床転帰の予後リスクを割当てする方法であり：

(a)試験される試料を、配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチド、又はそれらの1種以上の抗原性若しくは免疫原性断片と接触させること；及び

(b)1種以上の前記ポリペプチド、又はそれらの抗原性若しくは免疫原性断片と特異的に結合することが可能な被験体における抗体、又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬の存在を検出すること；を含む、前記方法。

【請求項42】

前記可溶性ポリペプチドが、配列番号:4、7、8、13及び15のいずれかひとつにより規定されたタンパク質に由来する、請求項41記載の方法。

【請求項43】

被験体における結腸直腸癌の検出、診断、被験体における結腸直腸癌の原因の識別、結腸直腸癌に罹患している被験体における療法のガイド、結腸直腸癌に罹患している被験体における再発リスクの評価、又は結腸直腸癌に罹患している被験体への1種以上の将来の臨床転帰の予後リスクの割当てにおいて使用するキットであり、このキットが、配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチド、及び/又はそれらの1種以上の抗原性若しくは免疫原性断片を備える、前記キット。

【請求項44】

前記可溶性ポリペプチドが、配列番号:4、7、8、13及び15のいずれかひとつにより規定されたタンパク質に由来する、請求項43記載のキット。

【請求項45】

前記配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されるタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチド、及び/又はそれらの1種以上の抗原性若しくは

10

20

30

40

50

免疫原性断片を含有する、ワクチン。

【請求項 4 6】

前記可溶性ポリペプチドが、配列番号:4、7、8、13及び15のいずれかひとつにより規定されたタンパク質に由来する、請求項45記載のワクチン。

【請求項 4 7】

前記配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されるタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチド、及び/又はそれらの1種以上の抗原性若しくは免疫原性断片、並びに1種以上の好適なアジュバントを含有する、免疫原性組成物。

【請求項 4 8】

前記可溶性ポリペプチドが、配列番号:4、7、8、13及び15のいずれかひとつにより規定されたタンパク質に由来する、請求項47記載の免疫原性組成物。

【請求項 4 9】

被験体における免疫応答を誘導する、請求項47又は48記載の組成物の使用。

【請求項 5 0】

免疫原性組成物、好ましくはワクチンの製造における、配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチド、及び/又はそれらの1種以上の抗原性若しくは免疫原性断片の使用。

【請求項 5 1】

前記可溶性ポリペプチドが、配列番号:4、7、8、13及び15のいずれかひとつにより規定されたタンパク質に由来する、請求項50記載の1種以上の可溶性ポリペプチドの使用。

【請求項 5 2】

被験体における結腸直腸癌の治療若しくは予防の、又は結腸直腸癌に対する被験体のワクチン接種の方法であり、配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチド、及び/又はそれらの1種以上の抗原性若しくは免疫原性断片の有効量を、好ましくはワクチンとして該被験体へ投与する工程を含む、前記方法。

【請求項 5 3】

前記可溶性ポリペプチドが、配列番号:4、7、8、13及び15のいずれかひとつにより規定されたタンパク質に由来する、請求項52記載の方法。

【請求項 5 4】

前記配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する可溶性ポリペプチドが、造影技術の使用に関連している方法により検出される、請求項1～21のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5 5】

前記造影技術が、標識されたアフィボディーの使用を伴う、請求項54記載の方法。

【請求項 5 6】

前記造影技術が、標識された抗体の使用を伴う、請求項54記載の方法。

【請求項 5 7】

前記可溶性ポリペプチドの1種以上の存在又は量を決定するために、配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチド又はそれらの1種以上の抗原性若しくは免疫原性断片に特異的に結合することが可能である、標識された抗体、又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬、又はそれらの誘導体及び類似体の使用により、免疫組織化学を実行して、組織切片中の結腸直腸癌細胞、特に転移性結腸直腸癌細胞の局在化を決定する工程を含む、被験体における結腸直腸癌の存在を同定する方法であって、該1種以上の可溶性ポリペプチドの存在又は量が、該被験体における結腸直腸癌の存在を示す、前記方法。

【請求項 5 8】

前記可溶性ポリペプチドが、配列番号:4、7、8、13及び15のいずれかひとつにより規定されたタンパク質に由来する、請求項57記載の方法。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(緒言)

本発明は、結腸直腸癌及び結腸直腸癌転移の診断及び予後マーカーとして有用である、ヒト結腸直腸癌のためのこれまで報告されていないマーカータンパク質の同定に関する。これらのタンパク質は、それに対する治療的抗体(又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)又は他の医薬的物質を製造することができる生物学的標的も形成することができる。

【背景技術】

10

【0002】

(発明の背景)

(結腸直腸癌)

結腸直腸癌(CRC)は、癌に関連した罹患と死亡の主要原因の一つであり、ほとんどの欧米の先進国において1年当たり推定50万人の死因である。これらの地域において、CRCは、3番目の最も一般的な悪性疾患である(米国及びEU諸国における1年当たりの新規症例の推定数は、約350,000/年である)。米国において結腸直腸癌の治療に関する推定された医療費は、80億ドルよりも多い。

【0003】

(結腸直腸癌診断)

20

今日、糞便潜血検査及び結腸鏡検査の高度に侵襲的手順が、結腸直腸癌のスクリーニング法及び診断法において最も頻用されている。他の診断道具には、軟性S状結腸鏡検査(結腸の約半分のみを観察が可能である)及び二重造影バリウム注腸(DCBE、X線像を得るため)がある。

【0004】

(結腸直腸癌病期)

CRCは、4種の区別できる病期を有し：米国立衛生研究所(NIH)によると、I期疾患の患者は、5年生存率>90%を有するが、転移性IV期疾患の患者は、<5%の生存率を有する。

【0005】

(結腸直腸癌治療)

30

一旦CRCと診断されたならば、正確な治療が選択される必要がある。手術は通常結腸直腸癌の主要な治療であるが、放射線及び化学療法が手術前に施されることが多い。可能性のある手術の副作用は、手術による出血、脚部血栓、及び手術時の近くの臓器の損傷を含む。

【0006】

現在、結腸直腸癌患者の60%は、自身の疾患を治療するために化学療法を受けているが；しかし、この治療形は、わずかな割合の集団に恩恵があるのみであり、他方で高い毒性リスクを伴い、従って患者選択基準をより良く規定する必要性が示されている。

【0007】

結腸直腸癌は、一次診断後平均18ヶ月以内に、30~40%の再発率を有する。全ての癌同様、より早期に検出されると治癒の可能性がより高く、特に病理学者は、大半のCRC腫瘍は、良性腺腫から一連の良く規定された病期で発達することを認めている。

40

【0008】

【表 1】

病期別結腸癌生存率

病期	生存率
I	93%
IIA	85%
IIB	72%
IIIA	83%
IIIB	64%
IIIC	44%
IV	8%

10

【0009】

(治療的挑戦)

結腸直腸癌治療の主な挑戦は、早期検出率を改善すること、疾患進行を追跡しかつ再発を確定するために使用することができる新規の非侵襲的マーカーを見つけること、並びに、特に5年生存が依然極めて不良であるより進行した疾患のための、改善されかつ毒性の低い療法を見つけることである。免疫療法及びターゲットキシンのような将来性のある新規アプローチにより攻撃することができる、例えば腫瘍細胞の表面上に発現されたもののような、癌細胞により特異的である標的を同定することには、大きな必要性が存在する。

20

【発明の概要】

【0010】

(発明の要旨)

本発明は、結腸直腸癌のスクリーニング、診断、予後及び療法のための、結腸直腸癌患者の層化のための、結腸直腸癌治療の有効性のモニタリングのための、並びに結腸直腸癌の治療用薬物開発のための方法及び組成物を提供する。

【0011】

本発明者らは、質量分析を使用し、結腸直腸組織試料から抽出された膜タンパク質のゲル電気泳動及びトリプシン分解により作製されたペプチドを同定する。ペプチド配列を、現存するタンパク質及びcDNAデータベースと比較し、対応する遺伝子配列を同定した。これらの膜タンパク質に関して、例えば血清中に可溶性型が存在し、その一部は本明細書において報告されており、その他のものは当該技術分野において公知である。これらの多くは、結腸直腸細胞膜に起源があり並びに潜在的に診断的及び/又は治療的価値があるタンパク質の新たなセットを表すことは、これまで報告されていない。

30

【0012】

従って、本発明の第一の態様は、少なくとも1種の結腸直腸癌マーカータンパク質(CRCMP)、例えば本明細書に開示されたCRCMPの1種以上又はそれらの任意の組合せを検出するために、例えば二次元電気泳動により血清試料を分析することを含む、結腸直腸癌の診断法を提供する。これらの方法は、療法の結果のスクリーニング、予後、モニタリング、薬物開発及び薬物治療のための新規標的の発見にも適している。

40

【0013】

特に、被験体における結腸直腸癌の診断、被験体における結腸直腸癌の原因の識別、結腸直腸癌に罹患している被験体における療法のガイド、結腸直腸癌に罹患している被験体における再発リスクの評価、又は結腸直腸癌に罹患している被験体への1種以上の将来の臨床転帰の予後リスクの割当の方法であって：

(a)前記被験体から得られた1種以上の試料中のマーカーとして、配列番号:1-18により規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する可溶性ポリペ

50

プチドを検出するように構成されたアッセイを実行すること；及び

(b)前記アッセイ(群)の結果を、被験体中の結腸直腸癌の存在若しくは非存在と、被験体において使用される治療計画と、被験体における再発リスクと、又は結腸直腸癌に罹患している被験体の1種以上の臨床転帰の予後リスクと関連づけること；を含む、前記方法が提供される。

【0014】

好適には、このような方法は、被験体において該検出されたマーカーのレベルが、対照レベルよりも高い場合を決定することを含み、前記決定は、被験体における結腸直腸癌の存在を示すか、被験体におけるより大きい再発リスクを示すか、又は被験体に関する予後不良を示す。好適には、前記検出されたマーカーのレベルが療法に反応して低下した場合、これは被験体が療法に反応していることを示す。特にこのような方法は、被験体における結腸直腸癌の診断法である。

10

癌の診断は、原発性癌及び再発の診断を包含している。

結腸直腸癌は、転移性結腸直腸癌を含む。

【0015】

好適には、本方法は、配列番号:1-18により規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する可溶性ポリペプチドに加え、1種以上の追加のマーカーを検出するように構成された1種以上の追加のアッセイを実行することを含み、ここで前記関連づける工程は、前記アッセイ(群)の結果及び前記追加アッセイ(群)の結果を、被験体における結腸直腸癌の存在若しくは非存在と、被験体における再発リスクと、又は結腸直腸癌を罹患している被験体の1種以上の臨床転帰の予後リスクと関連づけることを含む。

20

【0016】

好適には、本発明の方法において、被験体はヒトである。

ここでヒト被験体から得られた生物学的試料中の結腸直腸癌細胞の存在又は非存在を同定する方法も提供され、これは、配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチドの存在又は非存在を同定する工程を含む。

【0017】

可溶性ポリペプチドの存在は、典型的には、例えば、本明細書に開示されたような造影技術(例えば抗体又はアフィボディーなどの標識された親和性試薬の使用)を含む方法により、定性的又は定量的(例えば定量的)に決定されてよい。

30

【0018】

本明細書では、被験体における結腸直腸癌を検出、診断し、被験体における結腸直腸癌の原因を識別し、結腸直腸癌に罹患している被験体における療法をガイドし、結腸直腸癌に罹患している被験体における再発リスクを評価し、又は結腸直腸癌に罹患している被験体への1種以上の将来の臨床転帰の予後リスクを割当て方法であり：

(a)前記被験体由来の試験される試料を、配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する可溶性ポリペプチドへ特異的に結合することが可能である1種以上の抗体(又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)と接触させること；及び

40

(b)これにより、試料中の配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチドの存在を検出すること；を含む、前記方法も提供される。

このような方法において、前記可溶性ポリペプチドの1種以上存在は、患者における結腸直腸癌の存在を示すことができる。

【0019】

被験体における結腸直腸癌の存在を同定する方法であって、配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチドの存在又は量を決定するために、前記被験体の全身の走査を実行して、結腸直腸

50

癌細胞、特に転移性結腸直腸癌細胞の局在化を決定する工程を含み、前記可溶性ポリペプチドの1種以上の存在又は量が、被験体における結腸直腸癌の存在を示す、前記方法も提供される。

【0020】

前記被験体の全身の走査を参照することにより、結腸直腸癌細胞の局在化を決定することを含む、被験体における結腸直腸癌の存在の同定方法であって、この走査が、配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチドの存在又は量を示し、ここで前記可溶性ポリペプチドの1種以上の存在又は量が、被験体における結腸直腸癌の存在を示す、前記方法も提供される。

【0021】

本明細書では、被験体における結腸直腸癌を検出、診断し、被験体における結腸直腸癌の原因を識別し、結腸直腸癌に罹患している被験体における療法をガイドし、結腸直腸癌に罹患している被験体における再発リスクを評価し、又は結腸直腸癌に罹患している被験体への1種以上の将来の臨床転帰の予後リスクを割当て方法であり：

(a)試験される試料を、配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチド、又はそれらの1種以上の抗原性若しくは免疫原性断片と接触させること；及び

(b)前記ポリペプチドの1種以上、又はそれらの抗原性若しくは免疫原性断片と特異的に結合することが可能な被験体における抗体(又はアフィポディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)の存在を検出すること；を含む、前記方法も提供される。

【0022】

本発明の第二の態様は、(a)結腸直腸癌の発症又は発達を防止するため；(b)結腸直腸癌の進行を防止するため；又は、(c)結腸直腸癌の症状を改善するために、結腸直腸癌の患者におけるCRCMPの発現又は生物活性(又は両方)を調節する(例えばアップレギュレート若しくはダウンレギュレートする)又は補完する化合物の治療的有効量を患者へ投与することを含む、結腸直腸癌の治療法を提供する。

【0023】

本発明の第三の態様は、CRCMPの発現又は生物活性を調節する(例えばアップレギュレート若しくはダウンレギュレートする)化合物のスクリーニング法を提供する。

本発明の第四の態様は、CRCMP、例えば本明細書に開示されたCRCMPへ免疫特異的に結合することが可能なモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体、又はアフィポディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬を提供する。

【0024】

従って第五の態様において、本発明は、ヒト被験体における結腸直腸癌のスクリーニング及び/又は診断の方法を提供し、この方法は、前記ヒト被験体から得た生物学的試料中の本明細書の表1及び2に規定された1種以上のCRCMPの存在又は非存在を同定する工程を含む。

【0025】

第六の態様において、本発明は、ヒト被験体における結腸直腸癌の治療をモニタリング及び/又は評価する方法を提供し、これは前記ヒト被験体から得た生物学的試料中の本明細書の表1及び2に規定された1種以上のCRCMPの存在又は非存在を同定する工程を含む。

【0026】

第七の態様において、本発明は、ヒト被験体から得られた生物学的試料中の転移性結腸直腸癌細胞の存在又は非存在を同定する方法を提供し、これは本明細書の表1及び2に規定された1種以上のCRCMPの存在又は非存在を同定する工程を含む。

【0027】

第八の態様において、本発明は、ヒト被験体における結腸直腸癌治療をモニタリング及び/又は評価する方法を提供し、これは患者から得た生物学的試料中で、本明細書の表1及び2に規定された1種以上のCRCMPが増加/減少したかどうかを決定する工程を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 8 】

使用される生物学的試料は、血清試料又は組織試料、例えば結腸直腸組織などの、任意の給源に由来することができる。例えば転移性結腸直腸癌の証拠を探す場合、結腸直腸癌転移の主要部位、例えば肝臓、腹腔、骨盤、後腹膜及び肺などに注目する。

【 0 0 2 9 】

好ましくは、本発明の方法は、表1及び2に規定されたCRCMPの全ての存在又は非存在を調べることに基づくものではなく、むしろそれらの「クラスター」若しくは群に基づく。

本発明の他の態様は、以下及び本明細書の「特許請求の範囲」に記されている。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 0 】

【 図 1 - 5 】 実施例3及び4に説明された、CRCMP#19、CRCMP#6、CRCMP#22、CRCMP#10及びCRCMP#9のボックスプロットデータを示している。

【 図 6 】 実施例4に説明されたCRCMP#19及びCRCMP#9のROC曲線データを示している。

【 図 7 】 実施例3及び4に説明された、CRCMP#19、CRCMP#6、CRCMP#22、CRCMP#10及びCRCMP#9のボックスプロットデータを示している。

【 図 8 】 実施例4に説明されたCRCMP#19及びCRCMP#9のROC曲線データを示している。

【 図 9 】 実施例3及び4に説明された、CRCMP#19、CRCMP#6、CRCMP#22、CRCMP#10及びCRCMP#9のボックスプロットデータを示している。

【 図 1 0 (a) - (r) 】 本実施例において考察された、CRCMPの配列並びに質量のマッチ及びタンデムペプチド断片などを示している。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 3 1 】

(発明の詳細な記載)

以下に詳細に説明された本発明は、哺乳動物の被験体における結腸直腸癌の臨床スクリーニング、診断及び予後のための、特定の治療的処置に最も反応しそうな患者を同定するための、結腸直腸癌療法の結果をモニタリングするための、薬物スクリーニング及び薬物開発のための方法並びに組成物を提供する。本発明は、結腸直腸癌を治療又は予防するための、治療的組成物の哺乳動物の被験体への投与も包含している。哺乳動物の被験体は、非ヒト哺乳動物であってよいが、好ましくはヒト、より好ましくはヒト成人、すなわち少なくとも21歳(より好ましくは少なくとも35歳、少なくとも50歳、少なくとも60歳、少なくとも70歳、又は少なくとも80歳)のヒト被験体である。限定ではなく、開示の明確化のために、本発明は、結腸組織及び血清試料の分析に関して説明するものである。しかし当業者に理解されるように、以下に説明されたアッセイ及び技術は、別の体液(例えば尿又は唾液)、結腸直腸癌を有するリスクのある患者の組織試料(例えば結腸組織生検のような生検)又はそれらのホモジネートを含む、他の種類の患者試料に適用することができる。本発明の方法及び組成物は、生存している被験体のスクリーニング、診断及び予後に特に適しているが、例えば、同疾患を発症するリスクのある家族の一員を同定するために、被験体の剖検診断に使用されてもよい。

本明細書において使用される結腸組織は、結腸それ自身に加え、結腸の下側の層に隣接及び/又はその内部の組織を意味する。

【 0 0 3 2 】

(結腸直腸癌マーカータンパク質(CRCMP))

本発明のひとつの態様において、結腸直腸癌のスクリーニング又は診断のため、結腸直腸癌患者の予後を決定するため、又は結腸直腸癌療法の有効性をモニタリングするために、1種以上の結腸直腸癌マーカータンパク質(CRCMP)の発現を測定することを目的として、二次元電気泳動を使用して、被験体、好ましくは生存している被験体からの血清試料を分析する。

【 0 0 3 3 】

本明細書において使用される用語「結腸直腸癌マーカータンパク質」(CRCMP)とは、結腸直腸癌に関連していると考えられるタンパク質由来の可溶性ポリペプチドをいう。18種

10

20

30

40

50

のそのようなタンパク質を、それらの寄託番号を参照し、表1及び2に列記している。それらに由来する可溶性ポリペプチドは、表1及び2に示されたように、結腸直腸癌組織試料の1又は2D電気泳動により検出されている。表2は、2Dゲル分析によりゲル上の特徴として検出されたそのようなタンパク質を列記し、並びに表1は、1Dゲル分析によりゲル上の特徴として検出されたそのようなタンパク質を列記している。

【0034】

特に表1及び2の特徴のいくつかは、タンパク質に関する注釈付きデータベースである、SwissProtデータベース(オンライン上、<http://www.expasy.org>で入手可能)に登録されている。これらの登録に関して、SwissProtデータベースは、わかっている場合にはそれらのタンパク質の構造に関する情報を含み、かつこれは、これらのタンパク質の可溶性部分を作出する配列の定義を含んでいる。加えて膜タンパク質の可溶性型を推定するのに適した方法は、全てExpasyウェブサーバー(<http://www.expasy.org>)のトポロジー推測項を通じオンラインで入手可能である、Dense Alignment Surface法、HMMTOP法、TMPred法、TopPred法、TMHMM法、TMAP法、SOSUI法、PredictProtein法などの、多くのバイオインフォマティクスツールにより提供される、膜貫通ヘリックス及び細胞外ドメインを同定する一次構造解析を含むが、これらに限定されるものではない。

【0035】

本明細書に開示されたCRCMPは、本明細書に開示された技術の方法及び器具(一般に、結腸直腸の組織試料から抽出された膜タンパク質の1D及び2Dゲル電気泳動並びにトリプシン分解)により、結腸直腸の組織試料から抽出された、膜タンパク質、細胞表面タンパク質、分泌型タンパク質又はGPIアンカー型タンパク質の可溶性型として同定されている。ペプチド配列は、SWISS-PROT及びtrEMBLデータベース(スイス生命情報学研究所(SIB)及び欧州生命情報学研究所(EBI)が保持、<http://www.expasy.com/>で入手可能)並びにGenBankデータベース(米国立衛生研究所(NIH)が保持、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>で入手可能)、並びに同定された対応する遺伝子と比較された。表1及び表2の各タンパク質は、Swiss Prot、TrEMBL又はGenbank寄託番号により同定され、各配列は参照により本明細書に組み込まれている。下記実施例において説明されるようなタンデム質量分析及びデータベース検索により同定された、これらのCRCMPのトリプシン分解ペプチドの見かけの分子量及びアミノ酸配列(表2)及びCRCMP特徴(表1)も、これらの表に列記されている。

表3は、試料給源を基にしたCRCMPの特徴決定、予測及び既存の知識を更に提供している。

【0036】

本発明のタンパク質は、それらの断片、例えば抗原断片又は免疫原性断片及びそれらの誘導体として有用である。抗原性断片又は免疫原性断片は典型的には、長さ12アミノ酸以上、例えば20アミノ酸以上、例えば50又は100アミノ酸以上であろう。断片は、完全長タンパク質の95%以上、例えば90%以上の長さ、例えば完全長タンパク質の75%又は50%又は25%又は10%以上の長さであってよい。

【0037】

抗原性断片又は免疫原性断片は、患者において関連する免疫応答を誘起することが可能であろう。本発明のタンパク質をコードしているDNAは、それらの断片、例えばそれらの免疫原性断片などの、本発明のタンパク質の断片をコードしているDNAとしても有用である。本発明のタンパク質をコードしている核酸(例えばDNA)の断片は、完全長コード領域の95%以上、例えば90%以上、例えば完全長コード領域の75%又は50%又は25%又は10%以上であってよい。核酸(例えばDNA)の断片は、長さが36ヌクレオチド以上、例えば60ヌクレオチド以上、例えば150又は300ヌクレオチド以上であってよい。

【0038】

本発明のタンパク質の誘導体は、その中で1個以上(例えば、1~20個、例えば15個のアミノ酸、又はタンパク質の全長を基にしたアミノ酸数の最大20%、例えば最大10%若しくは5%若しくは1%)の欠失、挿入又は置換が行われている配列上の変種を含む。置換は典型的には、保存的置換であってよい。誘導体は典型的には、それらが誘導されるタンパク

質と本質的に同じ生物学的機能を有するであろう。誘導体は典型的には、それらが誘導されるタンパク質と同等の抗原性又は免疫原性であろう。

【0039】

ひとつの実施態様において、本発明において使用する可溶性ポリペプチドマーカ―は、表1の4列目(すなわちトリプシン分解ペプチドの列)に列記された1種以上(例えば1種)のアミノ酸配列を含む。別の実施態様において、本発明において使用する可溶性ポリペプチドは、表2の4列目(すなわちトリプシン分解ペプチドの列)に列記された1種以上(例えば1種)のアミノ酸配列を含む。

【0040】

可溶性ペプチドは典型的には、長さが少なくとも5個のアミノ酸、例えば長さが少なくとも6個のアミノ酸、例えば長さが少なくとも10個又は少なくとも12個又は少なくとも15個、例えば少なくとも20個のアミノ酸である。

10

【0041】

好適には、このマーカ―ポリペプチドは、表2の2及び3列目に列記されたpI及びMWにより特徴づけられるアイソフォームのタンパク質に由来する。アイソフォームは、決定されたpI及びMW値が記載された値のいずれかの側の10%、好適には5%の広がり(spread)以内に実験的に収まる場合、表2の2及び3列目に列記されたpI及びMWにより特徴づけられると依然考えられる。

【0042】

好適には、本マーカ―ポリペプチドは、免疫学的に検出可能であろう。

20

本明細書に開示されたある種のマーカ―ポリペプチドは、新規であり、かつ本発明の態様として特許請求されている。

【0043】

ひとつの実施態様において、好適にマーカ―ポリペプチドを検出することが意図されたアッセイは、2種以上の前記マーカ―を検出するように構成される。好適には、2種以上の前記マーカ―は、少なくとも2種の異なるタンパク質に由来する。

【0044】

別の実施態様において、好適にマーカ―ポリペプチドを検出することが意図されたアッセイは、3種以上の前記マーカ―を検出するように構成される。好適には、3種以上の前記マーカ―は、少なくとも3種の異なるタンパク質に由来する。

30

【0045】

別の実施態様において、好適にマーカ―ポリペプチドを検出することが意図されたアッセイは、前記マーカ―の4種以上を検出するように構成される。好適には、4種以上の前記マーカ―は、少なくとも4種の異なるタンパク質に由来する。

【0046】

別の実施態様において、好適にマーカ―ポリペプチドを検出することが意図されたアッセイは、前記マーカ―の5種以上を検出するように構成される。好適なことに、5種以上の前記マーカ―は、少なくとも5種の異なるタンパク質に由来する。

【0047】

【表 2】

表1：本発明のCRCMPの1Dゲルにより検出された特徴(実施例1参照)

CRCMP 番号	MW (kDa) 範囲	推定 MW (Da)	トリプシン分解ペプチドのアミノ酸配列 [配列番号]	寄託 番号
1	91 - 126	92219	AENPEPLVFGVK [37], DAYVFYAVAK [62], DEENTANSFLNYR [64], DEYGKPLSYPLEIHVK [65], DINDNRPTFLQSK [68], DNVEQAQASEVKPLR [70], EGLLYYNR [81], GDTRGWLK [104], HTEFEER [118], IDHVTGEIFSVAPLDR [119], TGAISLTR [202], VSEDVALGTK [220], WNDPGAQYSLVDK [227]	Q12864
2	47 - 54	35632	EAYEEPPEQLR [76], EGLIQWDK [80], EGSPTPQYSWK [82], EREEEDDYR [86], EREEEDDYRQEEQR [87], LLLTHTER [146], NYIHGELYK [165], SVTLPCYHTSTSSR [195], VTVDAISVETPQDVLR [222], YNILNQEQLAQPASGQPVSLK [240]	Q99795
5	69 - 153	87327	DRNHRPK [72], FGQIVNTLDK [92], IPIRWTAPEAIQYR [127], MIRNPNSLK [158], QLGLTEPR [170], TVAGYGRYSGK [209], VSDFGLSR [219], WTAPEAIQYR [229], YLADMNYVHR [237]	P29323
6	75 - 78	91938	FTTPGFDPSPYPAHAR [101], GDADSVLSLTFR [103], HPGFEATFFQLPR [117], IFQAGVSWGDGCAQR [122], SFVVTSVVAFPTDSK [189], VVMLPPR [223]	Q9Y5Y6
7	108	90138	TEDVEPQSVPLLAR [200], YPPLPVDK [241]	P18433
8	88 - 104	112927	ALLSDER [41], FLRPGHDPVR [95], GGASELQEDESFTLR [107], QPGLVMERALLSDER [171], REDVSGIASCVFTK [177], SAEDSFTGFVR [183], TLYFADTYLK [206], VFEMVEALQEHPR [213], VPPAERR [217], VSVAHFGSR [221], YGQGIFYLISPSEFER [234]	Q6P1M3
9	19	19171	IMFVDPSLTVR [126], NLSPDGQYVPR [161]	Q8TD06
10	130	116727	CSVPEGPFPGHLVDVR [60]	Q9UN66
12	42 - 43	34932	APEFSMQGLK [44], DTEITCSEER [73], EKPYDSK [83], EMGEMHR [85], GESLFHSK [106], KKRMAK [133], LAAKCLVMK [141], TQNDVDIADVAYYFEK [207], TQNDVDIADVAYYFEKDVK [208], YEKAEIK [233]	P16422
14	65 - 93	86705	EGHQSEGLR [79], LQEDGLSVWFQR [151], QETDYVLNNGFNPR [167], RKNLDLAAPTAEAAQR [178], RPELEEIFHQYSGEDR [179]	ENST00 0003227 65
17	62 - 72	55711	LNLWISR [147], QVVEAAQAPIQER [174], RSESVKSR [182]	O00515

10

20

30

40

CRCMP 番号	MW (kDa) 範囲	推定 MW (Da)	トリプシン分解ペプチドのアミノ酸配列 [配列番号]	寄託 番号
18	79 - 96	82683	AVINSAGYK [53], CPTQFPLILWHPYAR [59], EELCKSIQR [78], FEEVLSK [90], FQELIFEDFAR [98], HEIEGTGLPQAQLLWR [114], HNLYR [116], KHNLYR [132], KYDYDSSSVR [137], KYDYDSSSVRK [138], KYDYDSSSVRKR [139], LGEYMEK [145], MESLRDLGLQQR [156], MGWMGEK [157], TDMDQIITSK [199], VEGPAFTDAIR [211], VQQVQPAMQAVIR [218], YDYDSSSVR [230], YDYDSSSVRK [231], YDYDSSSVRKR [232]	Q96TA1
19	19	19979	GWGDQLIWTQTYEEALYK [112], HLSPDGQYVPR [115], IMFVDPSLTVR [126], LPQTLR [149], LYAYEPADTALLDNMK [153]	O95994
20	118 - 128	154374	ATFAFSPEEQQAQR [51], AYPQYYR [55], FDTHEYRNESRR [89], FRPHQDANPEKPR [99], GHSPAFLQPQNGNSR [109], GYTIHWNGPAPR [113], IEEYEPVHSLEELQR [120], MDNYLLR [155], MPAMLTGLCQCGCTR [159], NSWQLTPR [164], SDEGESMPTFGKK [184]	Q9UHN6
22	71 - 126	83283	AAGSRDVS LAK [34], ADAAPDEK [35], AFVNCDENSR [40], ANLTNFPENGTFVFNIAQLSQDDSGR [42], AQYEGR [47], ASVDSGSSEEQGGSSR [50], DGSFVITGLR [66], DQADGSR [71], DVSLAKADAAPDEK [74], EEFVATTESTTETK [77], FSSYEK [100], GGCITLISSEGYVSSK [108], GSVTFHCALGPEVANVAK [111], IIEGEPNLK [123], ILLNPQDK [124], KYWCR [140], LSLLEPGNGTFTVILNQLTSR [152], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], QGHFYGETAAVYVAVEERK [169], QSSGENCDVVNTLGK [172], QSSGENCDVVNTLGKR [173], RAPAFEGR [175], TDISMDFENSR [198], VLDSGFR [214], VLDSGFREIENK [215], VPCHFPC [216], VYTVDLGR [224], YKCGLGINSR [236], YLCGAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNEESTIPR [238]	P01833
23	37	35964	DYEILFK [75], FFNVLTTNTDGK [91], IEFISTMEGYK [121], NLDGISHAPNAVK [160], SINGILFPGGSVDLR [190], YLESAGAR [239], YPVYGVQWHPEKAPYEWK [243]	Q92820
25	33-42	35463	AEVDLQGIK [38], ASSPQGFDVDR [48], ASSPQGFDVDRDAKK [49], ATFQAYQILIGK [52], AYLTLVR [54], CAQDCEDYFAER [56], DIEEAIEETSGDLQK [67], DLYDAGEGR [69], FQEKYQK [96], FQEKYQKSLSDMVR [97], GAGTDEETLIR [102], GDTSGNLKK [105], MGMTNEAAIEILSGR [110], LFDRSLESVDK [144], ILVSLLQANR [125], SDTSGDFR [186], SELSGNFEK [187], SLESVDK [193], SLSDMVR [194], TALALLDRPSEYAAR [197], WGTDELAFNEVLAK [225], WGTDELAFNEVLAKR [226]	P27216
26		29379	SDPVTNLNVR [185], TLVLLSATK [205]	Q14002

10

20

30

40

【表 3】

表2：2Dゲルにより検出されたCRCMP (実施例2参照)

CRCMP 番号	MW (Da)	pI	トリプシン分解ペプチドのアミノ酸配列 [配列番号]	寄託 番号
7	39716	5,07	TEDVEPQSVPLLAR [200]	P18433
7	40419	7,88	KFCIQQVGDMTNR [130], QAGSHSNSFR [166]	P18433
7	73852	6,31	QAGSHSNSFR [166]	P18433
9	11481	7,96	LYTYEPR [154], NLSPDGQYVPR [161], RPPQTLNR [180]	Q8TD06
9	12984	8,51	IMFVDPSLTNR [126], LYTYEPR [154], NLSPDGQYVPR [161], RPPQTLNR [180]	Q8TD06
9	13055	8,46	IMFVDPSLTNR [126], LYTYEPR [154], NLSPDGQYVPR [161], RPPQTLNR [180]	Q8TD06
9	13391	8,48	FIMLNLMHETTDK [94], IMFVDPSLTNR [126], LYTYEPR [154], NLSPDGQYVPR [161], RPPQTLNR [180], VFAQNEEQEMAQNK [212]	Q8TD06
9	14158	9,96	IMFVDPSLTNR [126]	Q8TD06
10	56273	5,09	AEYNVTITVTDLGTPR [39]	Q9UN66
17	NULL	NULL	DEDEDIQSILR [63], ELEIPPR [84], KELEIPPR [129], LNLWISR [147], LPDNTVK [148], LPSVEEAEPKPLPPASK [150], NLSSTTDDEAPR [162], QVVEAAQAPIQR [174], RATASEQPLAQEPASGGSPATTK [176], SLAPGMALGSGR [192], TLEDEEEQER [203]	O00515
18	NULL	NULL	AQIHMR [46], EVTDMNLNVINEGGIDK [88], FQELIFEDFAR [98], IVFSGNLFQHQEDSK [128], VQQVQPMQAVIR [218]	Q96TA1
18	NULL	NULL	FQELIFEDFAR [98], IVFSGNLFQHQEDSK [128], VQQVQPMQAVIR [218]	Q96TA1
19	12993	9,02	HLSPDGQYVPR [115], IMFVDPSLTNR [126]	O95994
19	13055	8,46	IMFVDPSLTNR [126], KVFAENK [136]	O95994
19	13391	8,48	IMFVDPSLTNR [126]	O95994
19	14158	9,96	HLSPDGQYVPR [115], IMFVDPSLTNR [126], KVFAENK [136], LPQTLNR [149], LYAYEPADTALLDNMK [153]	O95994
20	76700	5,76	FIGVEAGGTLELHGAR [93], TLNSSGLPFGSYTFEK [204]	Q9UHN6
22	58949	4,65	DGSFVSIVITGLR [66]	P01833
22	59920	4,74	AFVNCDENSR [40], APAFEGR [43], AQYEGR [47], DGSFVSIVITGLR [66], FSSYEK [100], IIEGEPNLK [123], ILLNPQDK [124], QGHFYGETAAVYVAVER [168], RAPAFEGR [175], YWCLWEGAQNGR [244]	P01833
22	64282	5,05	APAFEGR [43], DGSFVSIVITGLR [66], IIEGEPNLK [123], RAPAFEGR [175], VYTVDLGR [224]	P01833
22	72124	5,15	APAFEGR [43], DGSFVSIVITGLR [66], IIEGEPNLK [123], QGHFYGETAAVYVAVER [168], RAPAFEGR [175], TENAQKR [201], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224]	P01833
22	72683	5,03	AFVNCDENSR [40], ANLTNFPENGTFVVNIAQLSQDDSGR [42], APAFEGR [43], AQYEGR [47], CGLGINSR [57], CPLVDSEGWVK [58], DGSFVSIVITGLR [66], FSSYEK [100], IIEGEPNLK [123], ILLNPQDK [124], QGHFYGETAAVYVAVER [168], QSSGENCDVVNTLGK [172], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224], YWCLWEGAQNGR [244]	P01833
22	73988	4,96	AFVNCDENSR [40], APAFEGR [43], AQYEGR [47], CGLGINSR [57], DGSFVSIVITGLR [66], FSSYEK [100], IIEGEPNLK [123], ILLNPQDK [124], QGHFYGETAAVYVAVER [168], QSSGENCDVVNTLGK [172], RAPAFEGR [175], VYTVDLGR [224], YLCGAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNEESTIPR [238], YWCLWEGAQNGR [244]	P01833

10

20

30

40

CRCMP 番号	MW (Da)	pI	トリプシン分解ペプチドのアミノ酸配列 [配列番号]	寄託 番号
22	76022	5,63	AFVNCDENSR [40], APAFEGR [43], AQYEGR [47], CGLGINSR [57], DGSFSVVITGLR [66], FSSYEK [100], IIEGEPNLK [123], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], QSSGENCDVVNTLGK [172], RAPAFEGR [175], TENAQKR [201], VLDSGFR [214], VPCHFPCCK [216], VYTVDLGR [224], YWCLWEGAQNGR [244]	P01833
22	76452	5,02	AFVNCDENSR [40], APAFEGR [43], AQYEGR [47], CGLGINSR [57], CPLLDSEGWVK [58], DAGFYWCLTNGDTLWR [61], DGSFSVVITGLR [66], FSSYEK [100], IIEGEPNLK [123], ILLNPQDK [124], KYWCR [140], LDIQGTGQLLFSVVINQLR [142], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], QSSGENCDVVNTLGK [172], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224], YLCGAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNEESTIPR [238], YWCLWEGAQNGR [244]	P01833
22	76788	5,09	AFVNCDENSR [40], APAFEGR [43], AQYEGR [47], CGLGINSR [57], DGSFSVVITGLR [66], FSSYEK [100], IIEGEPNLK [123], ILLNPQDK [124], KYWCR [140], LDIQGTGQLLFSVVINQLR [142], LSLLEPGNGTFTVILNQLTSR [152], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], QSSGENCDVVNTLGK [172], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224], YLCGAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNEESTIPR [238]	P01833
22	76811	5,20	AFVNCDENSR [40], APAFEGR [43], AQYEGR [47], CGLGINSR [57], DGSFSVVITGLR [66], FSSYEK [100], IIEGEPNLK [123], ILLNPQDK [124], KYWCR [140], LDIQGTGQLLFSVVINQLR [142], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], RAPAFEGR [175], VYTVDLGR [224], YLCGAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNEESTIPR [238], YWCLWEGAQNGR [244]	P01833
22	76905	4,84	AFVNCDENSR [40], APAFEGR [43], AQYEGR [47], CGLGINSR [57], DGSFSVVITGLR [66], FSSYEK [100], IIEGEPNLK [123], ILLNPQDK [124], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224], YLCGAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNEESTIPR [238], YWCLWEGAQNGR [244]	P01833
22	77049	5,03	AFVNCDENSR [40], APAFEGR [43], CGLGINSR [57], DGSFSVVITGLR [66], FSSYEK [100], IIEGEPNLK [123], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], RAPAFEGR [175], VYTVDLGR [224]	P01833
22	77219	5,09	AFVNCDENSR [40], APAFEGR [43], CGLGINSR [57], DGSFSVVITGLR [66], IIEGEPNLK [123], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], RAPAFEGR [175], VYTVDLGR [224]	P01833
22	77291	5,63	AFVNCDENSR [40], ANLTNFPENGTFVFNIAQLSQDDSGR [42], APAFEGR [43], AQYEGR [47], CGLGINSR [57], DGSFSVVITGLR [66], FSSYEK [100], IIEGEPNLK [123], LFAEEK [143], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], QSSGENCDVVNTLGK [172], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224], YWCLWEGAQNGR [244]	P01833

10

20

30

40

CRCMP 番号	MW (Da)	pI	トリプシン分解ペプチドのアミノ酸配列 [配列番号]	寄託 番号
22	77900	4,80	AFVNCDENSR [40], ANLTNFPENGTFVFNIAQLSQDDSGR [42], APAFEGR [43], AQYEGR [47], CGLGINSR [57], DGSFSVVITGLR [66], FSSYEK [100], IIEGEPNLK [123], ILLNPQDK [124], KYWCR [140], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], QSSGENCDVVNTLGK [172], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224], YLCGAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNEESTIPR [238], YWCLWEGAQNGR [244]	P01833
22	77980	5,00	ADEGWYWCQVK [36], AFVNCDENSR [40], APAFEGR [43], AQYEGR [47], CGLGINSR [57], CPLLVDSQWVK [58], DGSFSVVITGLR [66], FSSYEK [100], GSVTFHCALGPEVANVAK [111], IIEGEPNLK [123], ILLNPQDK [124], KNADLQVLKPEPELVYEDLR [134], KYWCR [140], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], RAPAFEGR [175], TVTINCPFK [210], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224], YWCLWEGAQNGR [244]	P01833
22	79500	4,91	ADEGWYWCQVK [36], AFVNCDENSR [40], APAFEGR [43], AQYEGR [47], CGLGINSR [57], CPLLVDSQWVK [58], DGSFSVVITGLR [66], FSSYEK [100], GGCITLISSEGYVSSK [108], GSVTFHCALGPEVANVAK [111], IIEGEPNLK [123], ILLNPQDK [124], KNADLQVLKPEPELVYEDLR [134], KYWCR [140], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], QSSGENCDVVNTLGK [172], RAPAFEGR [175], TENAQKR [201], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224], YLCGAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNEESTIPR [238], YWCLWEGAQNGR [244]	P01833
22	79705	5,05	AFVNCDENSR [40], APAFEGR [43], AQYEGR [47], CGLGINSR [57], DGSFSVVITGLR [66], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224], YLCGAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNEESTIPR [238]	P01833
22	80272	5,97	AFVNCDENSR [40], APAFEGR [43], AQYEGR [47], CGLGINSR [57], DGSFSVVITGLR [66], FSSYEK [100], IIEGEPNLK [123], ILLNPQDK [124], LDIQGTGQLLFSVVINQLR [142], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224], YLCGAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNEESTIPR [238], YWCLWEGAQNGR [244]	P01833
22	80654	5,02	ANLTNFPENGTFVFNIAQLSQDDSGR [42], DGSFSVVITGLR [66], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224]	P01833
22	80735	5,78	AFVNCDENSR [40], APAFEGR [43], AQYEGR [47], CGLGINSR [57], DGSFSVVITGLR [66], FSSYEK [100], IIEGEPNLK [123], ILLNPQDK [124], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224], YLCGAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNEESTIPR [238], YWCLWEGAQNGR [244]	P01833

10

20

30

40

CRCMP 番号	MW (Da)	pI	トリプシン分解ペプチドのアミノ酸配列 [配列番号]	寄託 番号
22	83246	5,15	AFVNCDENSR [40], ANLTNFPENGTFVFNIAQLSQDDSGR [42], APAFEGR [43], AQYEGR [47], CGLGINSR [57], DGSFSVVITGLR [66], FSSYEK [100], IIEGEPNLK [123], ILLNPQDK [124], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224]	P01833
22	83366	4,72	AFVNCDENSR [40], ANLTNFPENGTFVFNIAQLSQDDSGR [42], APAFEGR [43], AQYEGR [47], CGLGINSR [57], DGSFSVVITGLR [66], FSSYEK [100], IIEGEPNLK [123], ILLNPQDK [124], KYWCR [140], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], QSSGENCDVVNTLGK [172], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224], YLCGAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNEESTIPR [238], YWCLWEGAQNGR [244]	P01833
22	83750	4,96	APAFEGR [43], AQYEGR [47], DGSFSVVITGLR [66], FSSYEK [100], IIEGEPNLK [123], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224]	P01833
22	83905	5,07	APAFEGR [43], AQYEGR [47], DGSFSVVITGLR [66], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224]	P01833
22	84555	5,07	DGSFSVVITGLR [66], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214]	P01833
22	84742	4,90	AFVNCDENSR [40], APAFEGR [43], AQYEGR [47], DGSFSVVITGLR [66], IIEGEPNLK [123], LDIQGTGQLLFSVVINQLR [142], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224]	P01833
22	86180	4,86	AFVNCDENSR [40], APAFEGR [43], AQYEGR [47], CGLGINSR [57], DGSFSVVITGLR [66], FSSYEK [100], IIEGEPNLK [123], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224]	P01833
22	90403	4,78	AFVNCDENSR [40], APAFEGR [43], AQYEGR [47], DGSFSVVITGLR [66], FSSYEK [100], IIEGEPNLK [123], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224]	P01833
22	91105	4,74	DGSFSVVITGLR [66], LDIQGTGQLLFSVVINQLR [142], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224]	P01833
22	92925	4,74	APAFEGR [43], DGSFSVVITGLR [66], QGHFYGETAAVYVAVEER [168], RAPAFEGR [175], VLDSGFR [214], VYTVDLGR [224]	P01833
23	32654	5,31	APYEWK [45], DYEILFK [75], FFNVLTNTDGGK [91], IEFISTMEGYK [121], KNNHHFK [135], NLDGISHAPNAVK [160], SINGILFPGGSVDLR [190], TAFYLAEFFVNEAR [196], WLSVK [228], YLESAGAR [239], YPVYGVQWHPEK [242], YYIAASYVK [245]	Q92820
23	32772	5,46	APYEWK [45], NLDGISHAPNAVK [160], TAFYLAEFFVNEAR [196], YLESAGAR [239], YPVYGVQWHPEK [242]	Q92820
23	33240	5,56	IEFISTMEGYK [121], SINGILFPGGSVDLR [190], TAFYLAEFFVNEAR [196]	Q92820

10

20

30

40

CRCMP 番号	MW (Da)	pI	トリプシン分解ペプチドのアミノ酸配列 [配列番号]	Acc. 番号
23	33503	5,50	APYEWK [45], DYEILFK [75], FFNVLTTNTDGK [91], IEFISTMEGYK [121], KFFNVLTNTNTDGK [131], KNNHHFK [135], NLDGISHAPNAVK [160], RSDYAK [181], SESEEEK [188], SINGILFPGGSVDLR [190], TAFYLAEFFVNEAR [196], WLSVK [228], YLESAGAR [239], YPVYGVQWHPEK [242], YYIAASYVK [245]	Q92820
23	34247	5,32	APYEWK [45], DYEILFK [75], FFNVLTTNTDGK [91], IEFISTMEGYK [121], KFFNVLTNTNTDGK [131], KNNHHFK [135], NLDGISHAPNAVK [160], NNHHFK [163], RSDYAK [181], SESEEEK [188], SINGILFPGGSVDLR [190], TAFYLAEFFVNEAR [196], WLSVK [228], YLESAGAR [239], YPVYGVQWHPEK [242], YYIAASYVK [245]	Q92820
23	34827	5,20	APYEWK [45], DYEILFK [75], FFNVLTTNTDGK [91], IEFISTMEGYK [121], KNNHHFK [135], NLDGISHAPNAVK [160], SINGILFPGGSVDLR [190], YLESAGAR [239], YPVYGVQWHPEK [242], YYIAASYVK [245]	Q92820
23	34996	5,01	APYEWK [45], DYEILFK [75], FFNVLTTNTDGK [91], IEFISTMEGYK [121], KNNHHFK [135], NLDGISHAPNAVK [160], NNHHFK [163], SINGILFPGGSVDLR [190], TAFYLAEFFVNEAR [196], YLESAGAR [239], YPVYGVQWHPEK [242], YYIAASYVK [245]	Q92820
23	35025	5,42	APYEWK [45], DYEILFK [75], IEFISTMEGYK [121], NLDGISHAPNAVK [160], SINGILFPGGSVDLR [190], SINGILFPGGSVDLRR [191], TAFYLAEFFVNEAR [196], YLESAGAR [239], YPVYGVQWHPEK [242]	Q92820

10

20

【 0 0 4 9 】

【 表 4 】

表3 : CRCMPカテゴリー

CRCMP 番号	膜貫通型	既知の 切断型アイソ フォーム	GPI アンカー型 細胞表面	分泌型 アイソ フォーム
1	I			
2	I			
5	I			
6	II			
7	I	あり		
8	不明	あり		
9				あり
10	I	あり		
12	I			
14			可能性あり	
17		あり		あり
18	不明	あり		
19		あり		あり
20	不明	あり		
22	I	あり		あり
23		あり		あり
25	不明			
26		あり	あり	

30

40

【 0 0 5 0 】

膜タンパク質には、いくつかの異なる示された分類を伴う多くの型がある。今日最も一

50

般的に使用されるもののひとつは、JS Singerにより示された分類法であり：I型タンパク質は疎水性残基の単独のTMストレッチを有し、TMドメインのNH₂-末端側のポリペプチド部分は、膜の外側に露出し、かつCOOH-末端部分は、細胞質側に露出している。これらのタンパク質は、Ia型(切断可能なシグナル配列)及びIb型(切断可能なシグナル配列を伴わない)に細分される。単独の膜貫通領域を伴うほとんどの真核細胞の膜タンパク質は、Ia型である。II型膜タンパク質は、これらは膜を1回のみ貫通する点がI型クラスに類似しているが、それらのアミノ末端は細胞の細胞質側に、及びカルボキシ末端は外側に有する。III型膜タンパク質は、1本のポリペプチド鎖に複数の膜貫通ドメインを有する。これらも、a及びbに細分され：IIIa型分子は、切断可能なシグナル配列を有するのに対し、IIIb型は、膜の外側表面に露出したそれらのアミノ末端を有するが、切断可能なシグナル配列は有さない。IIIa型タンパク質は、光合成反応中心のM及びLペプチドを含む。IIIb型タンパク質は、例えばシトクロームP450、大腸菌のリーダーペプチダーゼを含む。IV型タンパク質は、膜を複数回貫通する集成体を作成する複数の相同ドメインを有する。これらのドメインは、1本のポリペプチド鎖上に存在するか又は2本以上の個別の鎖であってよい。この命名法は、表3で使用する。

10

20

30

40

50

【0051】

表1及び2で言及した18種のタンパク質の配列は、図10(a)から(r)に列記している。質量マッチペプチド(Mass Match Peptide)に相当する配列部分は、太字で示している。タンデムペプチド(Tandem Peptide)に相当する配列部分は、二重下線で示している。全タンパク質の細胞外部分に相当する配列部分(複数)は、下線で示している(配列番号:19、21、22、25、27、29、30及び32)。本発明の好ましい可溶性ペプチド/CRCMPは、全タンパク質の細胞外部分と重複するか又は好ましくはその内部である配列を有する。

【0052】

市販の組換えタンパク質に相当する配列部分は、イタリックで示している(配列番号:20、23、24、26、28、31及び33)。これらは、例えば全タンパク質の細胞外部分と重複するか又は好ましくはその内部である場合に、本発明で使用する抗体を作製するために、容易に使用することができる。他の市販されていない全タンパク質の部分、又は他の本発明の可溶性ポリペプチドは、例えば好適なベクターを含む宿主細胞(細菌システム又は哺乳動物システム)におけるタンパク質の発現によるか、又は段階的ペプチド合成による、当業者に公知の従来の方法を用いて調製することができる。

【0053】

任意の所与のCRCMPに関して、結腸直腸癌でない被験体の血清の分析時に得られた検出レベルに対する、結腸直腸癌を有する被験体の血清の分析時に得られた検出レベルは、そのようなCRCMPが正常組織と疾患組織の間で差動的に発現されることを条件として、使用される特定の分析プロトコール及び検出技術に左右されるであろう。従って本発明は、診断技術分野において通常であるように、使用される分析プロトコール及び検出技術に従い、結腸直腸癌でない被験体において各CRCMPの基準範囲を各研究室で確立することを意図している。好ましくは、結腸直腸癌を有することがわかっている被験体由来の少なくとも1個の陽性対照血清試料、又は結腸直腸癌でないことがわかっている被験体由来の少なくとも1個の陰性対照血清試料(及びより好ましくは陽性及び陰性の両対照試料)が、分析される被験試料の各バッチに含まれる。

【0054】

アッセイにおいて、マーカーポリペプチドの存在を検出することが目的であってよい。或いは、マーカーポリペプチドのレベルを決定することが目的であってよい。アッセイデザインは、マーカーポリペプチドの検出が、そのポリペプチドの特定されたレベルの検出に関連づけることができるように、検出の好適な閾値を提供することができる。

【0055】

ひとつの実施態様において、タンパク質発現レベルは、(a)問題の特定の特徴と領域内で等しく；かつ、(b)識別可能なタンパク質の特徴を含まない；イメージの基部から得られたシグナルレベルと規定されるバックグラウンド値に対して決定される。

【0056】

CRCMPは、結腸直腸癌の検出、予後、診断、若しくはモニタリングのため、又は薬物開発のために使用することができる。本発明のひとつの実施態様において、被験体(例えば結腸直腸癌を有することが疑われる被験体)由来の血清は、表1及び2に規定されたようなCRCMPの1種以上を検出するために、2D電気泳動により分析される。結腸直腸癌を有さない1名若しくは複数の被験体由来の血清(例えば対照試料)、又は予め決定された基準範囲に対する、被験体の血清中の前記1種以上のCRCMPの減少した又は増加した存在量は、結腸直腸癌の存在又は非存在を示す。より詳細には、以下の「アッセイ測定戦略」と題する節に示される。

好ましい実施態様において、被験体由来の血清は、表1及び2に規定されたCRCMPのクラスターの定量的検出のために分析される。

10

【0057】

当業者には明白であるように、所与のCRCMPは、表1及び表2においてそのCRCMPに関して提供されたデータに従い説明することができる。CRCMPは、そのCRCMPについて記載されたペプチド配列を含むタンパク質である(好ましくはそのCRCMPについて記載されたペプチド配列の複数、より好ましくは全てを含む)。

【0058】

ひとつの実施態様において、被験体由来の血清は、表1及び2に規定された1種以上のCRCMPの定量的検出について分析され、ここで結腸直腸癌でない1名又は複数の被験体由来の血清(例えば、対照試料又は予め決定された基準範囲)に対する、被験体由来の血清中のCRCMP又はCRCMP類の存在量の変化は、結腸直腸癌の存在を示す。

20

好ましい実施態様において、被験体由来の血清は、表1及び2に規定されたCRCMPクラスターの定量的検出について分析される。

【0059】

各CRCMPに関して本発明は追加的に：(a)単離されたCRCMPを含む調製品；(b) CRCMPの1種以上の断片を含む調製品；及び、(c)前記CRCMPに、前記断片に、又は前記CRCMP及び前記断片の両方に結合する抗体、又はアフィニティー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬；を提供する。本明細書において使用されるCRCMPは、それが夾雑タンパク質を実質的に含まない調製品、すなわち、存在する総タンパク質の10%未満(好ましくは5%未満、より好ましくは1%未満)が夾雑タンパク質(群)である調製品中に存在する場合に、「単離されている」。夾雑タンパク質は、質量スペクトル分析により決定されたような、単離されたCRCMPのアミノ酸配列とは著しく異なるアミノ酸配列を有するタンパク質である。本明細書において使用される「著しく異なる」配列は、「参照プロトコール」に従い実行される質量スペクトル分析によりCRCMPから分離される夾雑タンパク質をもたらすものである。

30

【0060】

本発明のCRCMPは、実施例において本明細書に説明された技術、キナーゼアッセイ、酵素アッセイ、結合アッセイ及び他の機能アッセイ、イムノアッセイ、並びにウェスタンブロットを含むが、これらに限定されるものではない、当業者に公知の任意の方法によりアッセイすることができる。ひとつの実施態様において、CRCMPは、それらのMWにより、1-Dゲル上で分離され、ゲルの染色により可視化される。ひとつの実施態様において、CRCMPは、蛍光色素により染色され、蛍光スキャナーにより撮像される。Sypro Red(Molecular Probes, Inc., ユージーン、オレゴン州)は、この目的のための好適な色素である。好ましい蛍光色素は、1999年10月5日に出願された、米国特許出願第09/412,168号に開示されており、これはその全体が本明細書に引用として組み込まれている。

40

【0061】

或いは、CRCMPは、イムノアッセイにおいて検出することができる。ひとつの実施態様において、イムノアッセイは、試験される被験体由来の試料を、抗-CRCMP抗体(又はアフィニティー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)と、CRCMPが存在する場合に免疫特異的結合が生じ得るような条件下で接触させ、親和性試薬による免疫特異的

50

結合の量を検出又は測定することにより実行される。抗-CRCMP親和性試薬は、本明細書に示された方法及び技術により作製することができる。

【0062】

CRCMPは、それらの断片、例えばそれらの免疫原性断片又は抗原性断片の検出効力により検出することができる。断片は、長さが少なくとも10個のアミノ酸、より典型的には少なくとも20個のアミノ酸、例えば少なくとも50若しくは100個のアミノ酸、例えば少なくとも200若しくは500個のアミノ酸、例えば少なくとも800若しくは1000個のアミノ酸を有する。

【0063】

ひとつの実施態様において、組織切片中の抗体(又はアフィポディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)の結合を使用し、異常なCRCMP局在化又は1種以上のCRCMPの異常なレベルを検出することができる。具体的実施態様において、CRCMPに対する抗体(又はアフィポディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)を使用し、CRCMPのレベルについて患者組織(例えば血清試料)をアッセイすることができ、ここではCRCMPの異常なレベルは結腸直腸癌の指標である。本明細書において使用される「異常なレベル」とは、結腸直腸癌でない被験体のレベル又は参照レベルと比べ増加又は減少したレベルを意味する。

10

【0064】

ウェスタンブロット、放射免疫測定、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射線検定法、蛍光イムノアッセイ及びプロテインAイムノアッセイなどの技術を使用する競合及び非-競合アッセイシステムを含むが、これらに限定されない、任意の好適なイムノアッセイを、使用することができる。

20

【0065】

例えば、CRCMPは、二工程サンドイッチアッセイにより、液体試料(例えば血液、尿又は唾液)中で検出することができる。第一の工程において、捕獲試薬(例えば、抗-CRCMP抗体、又はアフィポディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)を使用し、CRCMPを捕獲する。この捕獲試薬は、任意に固相上に固定することができる。第二の工程において、直接的又は間接的に標識された検出試薬を使用し、捕獲されたCRCMPを検出する。ひとつの実施態様において、検出試薬は、レクチンである。CRCMPと同じコアタンパク質を有する他のアイソフォームに、又は親和性試薬により認識される抗原決定基を共有する他のタンパク質により、CRCMPに優先的に結合する任意のレクチンを、この目的のために使用することができる。好ましい実施態様において、選択されたレクチンは、該CRCMPと同じコアタンパク質を有する他のアイソフォームに、又は親和性試薬により認識される抗原決定基を共有する他のタンパク質により、CRCMPに、少なくとも2倍大きい親和性で、より好ましくは少なくとも5倍大きい親和性で、更により好ましくは少なくとも10倍大きい親和性で結合する。本説明を基に、所与のCRCMPの検出に適しているレクチンは、当該技術分野において周知の方法、例えばSumarらの「疾患関連糖型の指標としてのレクチン(Lectins as Indicators of Disease-Associated Glycoforms)」、Gabijs H-J & Gabijs S (編), 1993, Lectins and Glycobiologyの158-174頁の文献(これは全体が本明細書に引用として組込まれている)中の158-159頁の表Iに列挙された1種以上のレクチンを試験する際に、容易に同定され得る。別の実施態様において、検出試薬は、抗体(又はアフィポディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)、例えば他の翻訳後修飾を免疫特異的に検出する抗体、例えばリン酸化されたアミノ酸へ免疫特異的に結合する抗体である。このような抗体の例は、ホスホチロシンへ結合するもの(BD Transduction Laboratories, カタログ番号:P11230-050/P11230-150; P11120; P38820; P39020)、ホスホセリンへ結合するもの(Zymed Laboratories Inc., サウスサンフランシスコ, CA, カタログ番号61-8100)及びホスホトレオニンへ結合するもの(Zymed Laboratories Inc., サウスサンフランシスコ, CA, カタログ番号71-8200, 13-9200)を含む。

30

40

【0066】

50

望ましいならば、相補配列を含む、CRCMPコードしている遺伝子、関連遺伝子、又は関連核酸配列若しくは垂配列も、ハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用することができる。CRCMPをコードしているヌクレオチド、又は少なくとも8個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも12個のヌクレオチド、及び最も好ましくは少なくとも15個のヌクレオチドを含むそれらの垂配列を、ハイブリダイゼーションプローブとして使用することができる。ハイブリダイゼーションアッセイを、CRCMPをコードしている遺伝子の異常な発現に関連した状態、障害、若しくは病態の検出、予後、診断、若しくはモニタリングのために、又は結腸直腸癌を示唆する徴候若しくは症状を伴う被験体の鑑別診断のために、使用することができる。特にそのようなハイブリダイゼーションアッセイは、核酸を含む被験体の試料を、CRCMPをコードしているDNA若しくはRNAとハイブリダイズすることが可能である核酸プローブと、ハイブリダイゼーションが起こり得るような条件下で接触させること、並びに生じたハイブリダイゼーションを検出又は測定することを含む方法により、実行することができる。ヌクレオチドは、以下に説明するように、結腸直腸癌を有する被験体の治療に使用することができる。

【0067】

本発明は、キット、例えば、本発明の1種以上の可溶性ポリペプチドマーカの検出及び/又は決定において使用するための1種以上の試薬を含む診断キットも提供する。好適なそのようなキットは、抗-CRCMP抗体(又は例えばアフィニティー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)、すなわち本発明の可溶性ポリペプチドマーカへの免疫特異的結合が可能である親和性試薬又は例えば複数の個別のそのような親和性試薬を含む。都合に合わせて、標識された親和性試薬を、1種以上の前記可溶性ポリペプチドマーカの存在を決定するために利用してもよい。例えばキットは、1種以上の該可溶性ポリペプチドマーカに対する1種以上の親和性試薬の入った1個以上の容器を備えてよい。都合に合わせて、そのようなキットは、該若しくは各々の親和性試薬、及び/又はその上に該若しくは各々の親和性試薬が固定された固相(試薬ストリップなど)への標識された結合パートナーを更に含んでよい。加えてこのようなキットは、以下のひとつ以上を任意に含んでもよい：(1)診断、予後、治療モニタリング又はこれらの適用の任意の組合せに関して抗-CRCMP親和性試薬を使用するための説明書；(2)親和性試薬に対する標識された結合パートナー；(3)その上に抗-CRCMP親和性試薬が固定された固相(試薬ストリップなど)；及び、(4)診断的、予後的若しくは治療的使用又は任意のこれらの組合せに関して法的承認を示すラベル又は折り込み。親和性試薬に対する標識された結合パートナーが提供されない場合、抗-CRCMP親和性試薬自体を検出可能なマーカ、例えば化学発光、酵素的、蛍光又は放射性的部分で標識することができる。

【0068】

抗体(又は、アフィニティー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)及びキットを、被験体における結腸直腸癌の診断、被験体における結腸直腸癌の原因の識別、結腸直腸癌に罹患している被験体における療法のガイド、結腸直腸癌に罹患している被験体における再発リスクの評価、又は結腸直腸癌に罹患している被験体への1種以上の将来の臨床転帰の予後リスクの割当のために使用することができる。

【0069】

キットは、被験体における結腸直腸癌の検出、診断のため、被験体における結腸直腸癌の原因の識別のため、結腸直腸癌に罹患している被験体における療法のガイドのため、結腸直腸癌に罹患している被験体における再発リスクの評価のため、又は結腸直腸癌に罹患している被験体への1種以上の将来の臨床転帰の予後リスクの割当のためにも使用することができる。このキットは、配列番号:1-18に規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来した1種以上の可溶性ポリペプチド、及び/又は1種以上のそれらの抗原性若しくは免疫原性断片を含む。

【0070】

本発明はまた、CRCMPをコードしているRNAにハイブリダイズすることができる核酸プローブを含むキットを提供する。具体的実施態様において、キットは、1個以上の容器内に

10

20

30

40

50

、適切な反応条件下でポリメラーゼ連鎖反応法(例えば、Innisらの文献、1990、「PCR プロトコル(PCR Protocols)」, Academic Press社, サンディエゴ, CAを参照されたい)、リガーゼ連鎖反応(EP 320,308を参照されたい)、Q レプリカーゼの使用、環状プローブ反応、又は当該技術分野において公知のその他の方法などにより、CRCMPをコードしている核酸の少なくとも一部の増幅を開始することができるプライマー対(例えば、それぞれ6~30ヌクレオチド、より好ましくは10~30ヌクレオチド、及び更に好ましくは10~20ヌクレオチドのサイズ範囲のもの)を含む。

【0071】

複数のCRCMP、又は複数の各CRCMPをコードしている核酸の検出のためのキットも提供される。キットは、例えば標準又は対照として使用するための、予め決定された量の単離されたCRCMPタンパク質、又はCRCMPをコードしている核酸を任意に更に含むことができる。

10

【0072】

(臨床研究における使用)

本発明の診断法及び組成物は、例えば結腸直腸癌の療法のための薬物を評価するために、臨床研究をモニタリングするのを補助することができる。一つの実施態様において、候補分子は、結腸直腸癌がない被験体において認められるレベルまで結腸直腸癌を有する被験体におけるCRCMPレベルを回復するそれらの能力について、又は治療された被験体(例えばタキソール若しくはドキソルビシンによる治療後)において、CRCMPレベルを非結腸直腸癌値又はその近似で維持するそれらの能力について試験される。

【0073】

20

別の実施態様において、本発明の方法及び組成物を使用して、臨床研究用候補をスクリーニングし、結腸直腸癌を有する個体を同定する；次いで、そのような個体を研究から除外するか、又は治療若しくは解析のための別のコホートに配置することができる。所望の場合、これらの候補を同時にスクリーニングして、結腸直腸癌を有する個体を同定することができる；これらのスクリーニング手順は、当該技術分野において周知である。

【0074】

(本発明のタンパク質及び対応する核酸の作製)

本発明のDNAは、出発材料として市販のmRNAを使用するcDNAライブラリーからのcDNA断片としての単離、並びにそれらのヌクレオチド配列の決定及び同定により得ることができる。すなわち詳述すると、クローンは、Oharaらの方法(DNA Research, 第4巻, 53-59 (1997))に従い調製されたcDNAライブラリーから無作為に単離される。次にハイブリダイゼーションにより、二本鎖化されたクローン(反復して出現する)が除去され、次にインビトロ転写及び翻訳が実行される。それについて50kDa以上の生成物が確認されているクローンの両端のヌクレオチド配列が、決定される。

30

【0075】

更に、このようにして得られた末端ヌクレオチド配列をクエリーとして使用し、公知の遺伝子のデータベースを相同性について検索する。結果として、新規であることが明らかにされたクローンの全ヌクレオチド配列が決定される。前記スクリーニング法に加え、cDNAの5'及び3'末端配列が、ヒトゲノム配列に関連付けられる。その後未知の長鎖遺伝子が、これらの配列間の領域で確認され、そのcDNAの完全長が分析される。この方法において、公知の遺伝子に応じて通常のクローニング法では得ることができない未知の遺伝子を、系統的にクローニングすることができる。

40

【0076】

更に、本発明のDNAを含むヒト由来の遺伝子の全ての領域も、RACEなどのPCR法を使用して、調製することができるが、短い断片又は得られた配列から生じる人為的誤差を防ぐために十分に注意を払わなければならない。前述のように、本発明のDNAを有するクローンを得ることができる。

【0077】

本発明のDNAをクローニングする別的手段において、本発明のポリペプチド部分の好適なヌクレオチド配列を有する合成DNAプライマーが作出され、引き続き好適なライブラリ

50

ーを使用するPCR法により増幅される。或いは選択は、本発明のDNAの、好適なベクターに組み込まれかつ本発明のポリペプチドの一部又は全部の領域をコードしているDNA断片又は合成DNAにより標識されたDNAとのハイブリダイゼーションにより実行することができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、「分子生物学の最新プロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)」(Frederick M. Ausubelら編集、1987)に説明された方法により実行することができる。本発明のDNAは、それらが前述のような本発明のポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む限りは、任意のDNAであってよい。そのようなDNAは、結腸直腸組織に由来するcDNAライブラリー又は同様のものから同定されかつ単離されたcDNAであってよい。そのようなDNAは、合成DNAなどであってもよい。ライブラリー構築において使用するためのベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどのいずれかであってよい。更に前記細胞及び/又は組織から調製された総RNA画分又はmRNA画分を使用することにより、直接逆転写共役ポリメラーゼ連鎖反応(以後「RT-PCR法」と略す)で増幅を実行することができる。

10

20

30

40

50

【0078】

CRCMPのアミノ酸配列と実質的に同じアミノ酸配列からなる前記ポリペプチドをコードしているDNA、又は該アミノ酸配列の一部を構成している1個以上のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加によるCRCMPのアミノ酸配列に由来したアミノ酸配列からなる前記ポリペプチドをコードしているDNAは、例えば、部位特異的突然変異誘発法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法、及び当業者に公知のPCR法などの好適な組合せにより容易に作出することができる。加えてこの時点で、ポリペプチドに実質的に同等な生物活性を生じる可能性のある方法は、このポリペプチドを構成するアミノ酸の中での、相同なアミノ酸(例えば、極性及び無極性アミノ酸、疎水性及び親水性アミノ酸、正帯電した及び負帯電したアミノ酸、並びに芳香族アミノ酸)の置換である。更に実質的に同等の生物活性を維持するために、本発明のポリペプチドに含まれる機能ドメイン内のアミノ酸は、保存されることが好ましい。

【0079】

更に本発明のDNAの例は、CRCMPのアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を含むDNA、並びにこのDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズしかつCRCMPのアミノ酸配列からなるポリペプチドの機能と同等の生物活性(機能)を有するポリペプチド(タンパク質)をコードしているDNAを含む。そのような条件下で、CRCMPのアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を含むDNAにハイブリダイズすることが可能なそのようなDNAの例は、このDNAのヌクレオチド配列の全体と全体的な平均の相同性の程度、例えば約80%以上、好ましくは約90%以上、及びより好ましくは約95%以上を有するヌクレオチド配列を含むDNAである。ハイブリダイゼーションは、「分子生物学の最新プロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)」(Frederick M. Ausubelら編集、1987)に説明されたような当該技術分野において公知の方法又はそれらに準じた方法に従い実行することができる。ここで「ストリンジェントな条件」は、例えば約1×SSC、0.1%SDS、及び37の条件であり、よりストリンジェントな条件は、約0.5×SSC、0.1%SDS、及び42であり、更によりストリンジェントな条件は、約0.2×SSC、0.1%SDS、及び65である。よりストリンジェントなハイブリダイゼーション条件により、プローブ配列との高度な相同性を有するDNAの単離を期待することができる。前述のSSC、SDS、及び温度条件の組合せは、例示を目的として示している。前述のものに類似したストリンジェンシーは、当業者により、ハイブリダイゼーションストリンジェンシーの決定のために前記要因又は他の要因の好適な組合せ(例えば、プローブ濃度、プローブ長、及びハイブリダイゼーション反応時間)を用いて実現することができる。

【0080】

本発明のクローニングされたDNAは、直接使用するか、又は望ましいならば、目的に応じて制限酵素による消化後若しくはリンカーの付加後に使用することができる。DNAは、翻訳開始コドンとして5'末端側にATGを有し、かつ翻訳終結コドンとして3'末端側にTAA、TGA、又はTAGを有することができる。これらの翻訳開始及び翻訳終結コドンはまた、好適

な合成DNAアダプターを用いて追加することができる。

【0081】

これらが本発明の方法と共に使用される場合、CRCMPは、好ましくは単離された形で提供される。より好ましくはCRCMPポリペプチドは、少なくともある程度まで精製される。CRCMPポリペプチドは、実質的に純粋形、すなわち実質的程度他のタンパク質を含まない形で提供されてよい。CRCMPポリペプチドは、組換え法を用いて生成されるか、合成的に生成されるか、又はこれらの方法の組合せにより生成され得る。CRCMPは、当業者に公知の任意の方法により容易に調製することができ、これは、本発明のDNA又は本発明のDNAを含む遺伝子を含む発現ベクターの作出、この発現ベクターを使用し形質転換された形質転換体の培養、本発明のポリペプチド又はこのポリペプチドを含む組換えタンパク質の作出及び蓄積、その後の結果の収集に関連している。

10

【0082】

組換えCRCMPポリペプチドは、発現システムを含む遺伝子操作された宿主細胞から、当該技術分野において周知のプロセスにより調製することができる。従って本発明は、CRCMPポリペプチド又は核酸を含む発現システム、そのような発現システムにより遺伝子操作された宿主細胞、及び組換え技術によるCRCMPポリペプチドの生成にも関連している。組換えCRCMPポリペプチド生成に関して、宿主細胞は、核酸の発現システム又はその一部を組み込むように遺伝子操作することができる。このような組み込みは、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAD-デキストラン媒介型トランスフェクション、トランスフェクション、微量注入、陽イオン脂質-媒介型トランスフェクション、電気穿孔法、形質導入、搔爬導入(scrape loading)、弾道的導入又は感染などの、当該技術分野において周知の方法を用い行うことができる(例えば、Davisらの論文、Basic Methods in Molecular Biology, 1986、及びSambrookらの文献、1989、「分子クローニング、実験室マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, コールドスプリングハーバー, NY, 1989を参照されたい)。

20

【0083】

宿主細胞として、例えば大腸菌(*Escherichia*)、連鎖球菌(*Streptococci*)、ブドウ球菌(*Staphylococci*)、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)属の細菌、バチルス(*Bacillus*)属の細菌、酵母、アスペルギルス細胞、昆虫細胞、昆虫、及び動物細胞が使用される。本明細書において使用される大腸菌属の細菌の具体例は、大腸菌(*Escherichia coli*)K12及びDH1 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol.60, 160 (1968)), JM103(Nucleic Acids Research, Vol.9, 309 (1981)), JA221(Journal of Molecular Biology, Vol.120, 517 (1978))、及びHB101(Journal of Molecular Biology, Vol.41, 459 (1969))を含む。バチルス属の細菌としては、例えば、枯草菌(*Bacillus subtilis*)MI114(Gene, Vol.24, 255 (1983))及び207-21(Journal of Biochemistry, Vol.95,87(1984))が使用される。酵母としては、例えば、サッカロミセス・セレビシアエ(*Saccaromyces cerevisiae*)AH22、AH22R-、NA87-11A、DKD-5D、及び20B-12、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccaromyces pombe*)NCYC1913及びNCYC2036、並びにピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)が使用される。昆虫細胞として、例えば、ショウジョウバエ(*Drosophila*)S2及びヨトウガ(*Spodoptera*)Sf9細胞が使用される。動物細胞として、例えば、COS-7及びサルVero細胞、CHOチャイニーズハムスター細胞(以後CHO細胞と略す)、dhfr-遺伝子-欠損CHO細胞、マウスL細胞、マウスAtT-20細胞、マウス骨髄腫細胞、ラットGH3細胞、ヒトFL細胞、COS、HeLa、C127、3T3、HEK 293、BHK及びBowesメラノーマ細胞が使用される。

30

40

【0084】

組換えポリペプチドを作製するために、無細胞-翻訳システムも利用することができる(例えば、ウサギ網状赤血球溶解液、コムギ胚芽溶解液、SP6/T7インビトロT&T及びRTS 100大腸菌HY転写及び翻訳キット(Roche Diagnostics Ltd., ルイス, 英国)、並びにTNTクイック・カップル転写/翻訳システム(Promega UK, サウスハンプトン, 英国))。

【0085】

該発現ベクターは、当該技術分野において公知の方法に従い作出することができる。例

50

えば該ベクターは、(1)本発明のDNAを含むDNA断片又は本発明のDNAを含む遺伝子の切り出し、及び(2)好適な発現ベクター内のプロモーターの下流への該DNA断片のライゲーション：により作製することができる。多種多様な発現システム、例えば非限定的に、染色体システム、エピソームシステム及びウイルス由来のシステムなど、例えば、大腸菌由来のプラスミド(例えば、pBR322、pBR325、pUC18、及びpUC118)、枯草菌由来のプラスミド(例えば、pUB110、pTP5、及びpC194)、バクテリオファージ由来の、トランスポゾン由来の、酵母エピソーム由来の(例えば、pSH19及びpSH15)、挿入エレメント由来の、酵母染色体エレメント由来の、バキュロウイルス、SV40などのパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス及びレトロウイルスのようなウイルス由来のプラスミド、並びにそれらの組合せ由来のベクター、例えばプラスミド及びバクテリオファージ(ファージなど)の遺伝エレメント由来のもの、例えばコスミド及びファージミドなどを使用することができる。これらの発現システムは、発現を発生することに加え調節する制御領域を含んでよい。本発明において使用されるプロモーターは、遺伝子発現に使用される宿主に適している限りは、任意のプロモーターであってよい。例えば宿主が大腸菌である場合、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、pLプロモーター、lppプロモーターなどが好ましい。宿主が枯草菌である場合、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。宿主が酵母である場合、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。動物細胞が宿主として使用される場合、この場合に使用するためのプロモーターの例は、SRaプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、及びHSV-TKプロモーターを含む。一般に宿主においてポリペプチドを作出するために核酸を維持、伝播又は発現することができる任意のシステム又はベクターを、使用することができる。

10

20

30

40

50

【0086】

好適な核酸配列は、Sambrookらの文献(前掲)に記されたもののような、様々な周知かつ慣習的技術のいずれかにより、発現システムへ挿入することができる。翻訳されたタンパク質を小胞体内腔、周辺腔又は細胞外環境へ分泌させるために、好適な分泌シグナルをCRCMPポリペプチドへ組み込むことができる。これらのシグナルは、CRCMPポリペプチドに対し内在性であるか、またはこれらは異種シグナルであってよい。宿主細胞の形質転換は、当該技術分野において公知の方法に従い実行することができる。例えば、下記の文献を参照することができる：Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2110 (1972) ; Gene, Vol.17, 107 (1982) ; Molecular & General Genetics, Vol.168, 111 (1979) ; Methods in Enzymology, Vol.194, 182-187 (1991) ; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol.75, 1929 (1978) ; Cell Technology, 分冊第8巻, New Cell Technology, Experimental Protocol, 263-267 (1995)(Shujunsha発行) ; 及び、Virology, Vol.52, 456 (1973)。こうして得られた本発明のDNAを含む発現ベクター又は本発明のDNAを含む遺伝子により形質転換された形質転換体は、当該技術分野において公知の方法に従い培養することができる。例えば、宿主がエシェリキア属の細菌である場合、この細菌は一般に、約15 ~ 43 で、約3~24時間培養される。必要ならば、曝気又は攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属の細菌である場合、この細菌は一般に、約30 ~ 40 で、約6~24時間培養される。必要ならば、曝気又は攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体が培養される場合、培養は一般に、pH約5~8に調節された培地を用い、約20 ~ 35 で約24~72時間実行される。必要ならば、曝気又は攪拌を加えることもできる。宿主が動物細胞である形質転換体が培養される場合、この細胞は一般に、pH約6~8に調節された培地を用い、約30 ~ 40 で約15~60時間実行される。必要ならば、曝気又は攪拌を加えることもできる。

【0087】

CRCMPポリペプチドが、細胞-ベースのスクリーニングアッセイにおいて使用するために発現される場合、このポリペプチドは細胞表面で生成されることが好ましい。この事象において、これらの細胞は、スクリーニングアッセイにおいて使用する前に収集することができる。CRCMPポリペプチドが培地へ分泌されるならば、前記ポリペプチドを単離するために、この培地を回収することができる。細胞内に生成される場合、これらの細胞は、CR

CMPポリペプチドが回収される前に、最初に溶解されなければならない。

【0088】

CRCMPポリペプチドは、硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿、酸抽出、陰イオン又は陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロース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、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、分子篩クロマトグラフィー、遠心分離法、電気泳動法及びレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法により、組換え細胞培養物から又は他の生物学的給源から回収及び精製することができる。ひとつの実施態様において、これらの方法の組合せが使用される。別の実施態様において、高速液体クロマトグラフィーが使用される。更なる実施態様において、CRCMPポリペプチドへ特異的に結合する抗体(又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)を、前記ポリペプチドのCRCMPポリペプチドを含有する試料を枯渇するため又は前記ポリペプチドを精製するために、使用することができる。

10

【0089】

本発明のポリペプチド又はタンパク質を、例えば培養後に培養生成物から、分離及び精製するために、微生物体又は細胞を、公知の方法により収集し、これらは好適な緩衝液中に浮遊され、微生物体又は細胞は、例えば超音波、リゾチーム、及び/又は凍結-融解により破壊され、その後得られたものが、遠心分離又は濾過に供され、その後タンパク質の粗抽出物を得ることができる。この緩衝液は、尿素若しくは塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤、又はTriton X-100(商標)などの界面活性剤、を含んでもよい。タンパク質が培養液へ分泌される場合、微生物体又は細胞及び上清は、培養の完了後に公知の方法により分離され、その後上清が収集される。こうして得られた培養物上清又は抽出物中に含まれたタンパク質は、公知の分離法及び精製法の適当な組合せにより精製することができる。こうして得られた本発明のポリペプチド(タンパク質)は、公知の方法又はそれに準じた方法により塩に転換することができる。逆に本発明のポリペプチド(タンパク質)が塩の形で得られた場合、これらは公知の方法又はそれに準じた方法により遊離タンパク質又はペプチド又はその他の塩に転換することができる。更にトリプシン又はキモトリプシンなどの好適なタンパク質修飾酵素は、精製の前後に組換えにより生成されたタンパク質に作用し、その結果修飾が適宜加えられるか又はポリペプチドが部分的に除去される。本発明のポリペプチド(タンパク質)又はそれらの塩の存在は、様々な結合アッセイ、特異的抗体を使用する酵素イムノアッセイなどにより測定することができる。

20

30

【0090】

CRCMPポリペプチドが単離及び/又は精製時に変性した場合には、当該技術分野において周知の技術を使用し、CRCMPポリペプチドの未変性型又は活性型のコンホメーションを再生するためにリフォールディングすることができる。本発明の状況において、CRCMPポリペプチドは、非限定的に、血液試料又は組織試料、例えば結腸直腸の組織試料などの、任意の給源由来の生物学的試料から得ることができる。

【0091】

CRCMPポリペプチドは、「成熟タンパク質」の形であることができるか、又は融合タンパク質などの比較的大きいタンパク質の一部であることができる。これは、分泌配列又はリーダー配列、プレ-、プロ-若しくはプレプロ-タンパク質配列、又は例えば非限定的に複数のヒスチジン残基、FLAGタグ、HAタグ若しくはmycタグなどの親和性タグなどの精製を補助する配列を含む追加のアミノ酸配列を含むことが有利であることが多い。

40

【0092】

組換え生成時に安定性を提供することができる追加の配列も使用することができる。このような配列は、追加配列又はその一部として切断可能な配列を組み込むことにより、必要に応じ任意に除去することができる。従ってCRCMPポリペプチドは、他のポリペプチド又はタンパク質(例えばグルタチオンS-トランスフェラーゼ及びプロテインA)を含む他の部分に融合することができる。このような融合タンパク質は、好適なプロテアーゼを用い切断し、その後各タンパク質へ分離することができる。このような追加の配列及び親和性

50

タグは、当該技術分野において周知である。所望ならば前述のものに加え、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA追加シグナル、選択マーカー、及びSV40複製起点などの当該技術分野において公知の特徴を、発現ベクターに追加することができる。

【0093】

(結腸直腸癌の診断)

本発明に従い、結腸直腸癌を有することが疑われるか又はわかっている被験体から得た血清、血漿又は尿の被験試料を、診断又はモニタリングに使用することができる。ひとつの実施態様において、対照試料(結腸直腸癌でない1名又は複数の被験体から得た)又は予め決定された基準範囲と比べた被験試料中の1種以上のCRCMPの存在量の変化は、結腸直腸癌の存在を示し；この目的に適したCRCMPは、先に詳述したように、表1及び2に規定されている。別の実施態様において、対照試料又は予め決定された基準範囲と比べた被験試料中の1種以上のCRCMPの相対存在量は、結腸直腸癌の亜型(例えば、家族性又は散发性結腸直腸癌)を示す。更に別の実施態様において、対照試料又は予め決定された基準範囲に対する被験試料中の1種以上のCRCMPの相対存在量は、結腸直腸癌の程度又は重症度(例えば、転移の可能性)を示す。前述の方法のいずれかにおいて、本明細書の表1及び2に規定されている1種以上のCRCMPの検出は、1種以上の追加の結腸直腸癌の生体マーカーの検出と任意に組合せることができる。実施例において本明細書で説明された技術、キナーゼアッセイ、CRCMPを検出及び/又は可視化するイムノアッセイ(例えばウェスタンブロット、免疫沈降、それに続くドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動、免疫細胞化学検定など)を含むが、これらに限定されるものではない当該技術分野において好適な10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600 3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900 4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100 5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300 5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400 5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500 5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600 5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690 5700 5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800 5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890 5900 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100 6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200 6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290 6300 6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490 6500 6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600 6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700 6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800 6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890 6900 6910 6920 6930 6940 6950 6960 6970 6980 6990 7000 7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080 7090 7100 7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200 7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 7300 7310 7320 7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400 7410 7420 7430 7440 7450 7460 7470 7480 7490 7500 7510 7520 7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590 7600 7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680 7690 7700 7710 7720 7730 7740 7750 7760 7770 7780 7790 7800 7810 7820 7830 7840 7850 7860 7870 7880 7890 7900 7910 7920 7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000 8010 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080 8090 8100 8110 8120 8130 8140 8150 8160 8170 8180 8190 8200 8210 8220 8230 8240 8250 8260 8270 8280 8290 8300 8310 8320 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400 8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480 8490 8500 8510 8520 8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590 8600 8610 8620 8630 8640 8650 8660 8670 8680 8690 8700 8710 8720 8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790 8800 8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880 8890 8900 8910 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990 9000 9010 9020 9030 9040 9050 9060 9070 9080 9090 9100 9110 9120 9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 9200 9210 9220 9230 9240 9250 9260 9270 9280 9290 9300 9310 9320 9330 9340 9350 9360 9370 9380 9390 9400 9410 9420 9430 9440 9450 9460 9470 9480 9490 9500 9510 9520 9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590 9600 9610 9620 9630 9640 9650 9660 9670 9680 9690 9700 9710 9720 9730 9740 9750 9760 9770 9780 9790 9800 9810 9820 9830 9840 9850 9860 9870 9880 9890 9900 9910 9920 9930 9940 9950 9960 9970 9980 9990 10000 10010 10020 10030 10040 10050 10060 10070 10080 10090 10100 10110 10120 10130 10140 10150 10160 10170 10180 10190 10200 10210 10220 10230 10240 10250 10260 10270 10280 10290 10300 10310 10320 10330 10340 10350 10360 10370 10380 10390 10400 10410 10420 10430 10440 10450 10460 10470 10480 10490 10500 10510 10520 10530 10540 10550 10560 10570 10580 10590 10600 10610 10620 10630 10640 10650 10660 10670 10680 10690 10700 10710 10720 10730 10740 10750 10760 10770 10780 10790 10800 10810 10820 10830 10840 10850 10860 10870 10880 10890 10900 10910 10920 10930 10940 10950 10960 10970 10980 10990 11000 11010 11020 11030 11040 11050 11060 11070 11080 11090 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11200 11210 11220 11230 11240 11250 11260 11270 11280 11290 11300 11310 11320 11330 11340 11350 11360 11370 11380 11390 11400 11410 11420 11430 11440 11450 11460 11470 11480 11490 11500 11510 11520 11530 11540 11550 11560 11570 11580 11590 11600 11610 11620 11630 11640 11650 11660 11670 11680 11690 11700 11710 11720 11730 11740 11750 11760 11770 11780 11790 11800 11810 11820 11830 11840 11850 11860 11870 11880 11890 11900 11910 11920 11930 11940 11950 11960 11970 11980 11990 12000 12010 12020 12030 12040 12050 12060 12070 12080 12090 12100 12110 12120 12130 12140 12150 12160 12170 12180 12190 12200 12210 12220 12230 12240 12250 12260 12270 12280 12290 12300 12310 12320 12330 12340 12350 12360 12370 12380 12390 12400 12410 12420 12430 12440 12450 12460 12470 12480 12490 12500 12510 12520 12530 12540 12550 12560 12570 12580 12590 12600 12610 12620 12630 12640 12650 12660 12670 12680 12690 12700 12710 12720 12730 12740 12750 12760 12770 12780 12790 12800 12810 12820 12830 12840 12850 12860 12870 12880 12890 12900 12910 12920 12930 12940 12950 12960 12970 12980 12990 13000 13010 13020 13030 13040 13050 13060 13070 13080 13090 13100 13110 13120 13130 13140 13150 13160 13170 13180 13190 13200 13210 13220 13230 13240 13250 13260 13270 13280 13290 13300 13310 13320 13330 13340 13350 13360 13370 13380 13390 13400 13410 13420 13430 13440 13450 13460 13470 13480 13490 13500 13510 13520 13530 13540 13550 13560 13570 13580 13590 13600 13610 13620 13630 13640 13650 13660 13670 13680 13690 13700 13710 13720 13730 13740 13750 13760 13770 13780 13790 13800 13810 13820 13830 13840 13850 13860 13870 13880 13890 13900 13910 13920 13930 13940 13950 13960 13970 13980 13990 14000 14010 14020 14030 14040 14050 14060 14070 14080 14090 14100 14110 14120 14130 14140 14150 14160 14170 14180 14190 14200 14210 14220 14230 14240 14250 14260 14270 14280 14290 14300 14310 14320 14330 14340 14350 14360 14370 14380 14390 14400 14410 14420 14430 14440 14450 14460 14470 14480 14490 14500 14510 14520 14530 14540 14550 14560 14570 14580 14590 14600 14610 14620 14630 14640 14650 14660 14670 14680 14690 14700 14710 14720 14730 14740 14750 14760 14770 14780 14790 14800 14810 14820 14830 14840 14850 14860 14870 14880 14890 14900 14910 14920 14930 14940 14950 14960 14970 14980 14990 15000 15010 15020 15030 15040 15050 15060 15070 15080 15090 15100 15110 15120 15130 15140 15150 15160 15170 15180 15190 15200 15210 15220 15230 15240 15250 15260 15270 15280 15290 15300 15310 15320 15330 15340 15350 15360 15370 15380 15390 15400 15410 15420 15430 15440 15450 15460 15470 15480 15490 15500 15510 15520 15530 15540 15550 15560 15570 15580 15590 15600 15610 15620 15630 15640 15650 15660 15670 15680 15690 15700 15710 15720 15730 15740 15750 15760 15770 15780 15790 15800 15810 15820 15830 15840 15850 15860 15870 15880 15890 15900 15910 15920 15930 15940 15950 15960 15970 15980 15990 16000 16010 16020 16030 16040 16050 16060 16070 16080 16090 16100 16110 16120 16130 16140 16150 16160 16170 16180 16190 16200 16210 16220 16230 16240 16250 16260 16270 16280 16290 16300 16310 16320 16330 16340 16350 16360 16370 16380 16390 16400 16410 16420 16430 16440 16450 16460 16470 16480 16490 16500 16510 16520 16530 16540 16550 16560 16570 16580 16590 16600 16610 16620 16630 16640 16650 16660 16670 16680 16690 16700 16710 16720 16730 16740 16750 16760 16770 16780 16790 16800 16810 16820 16830 16840 16850 16860 16870 16880 16890 16900 16910 16920 16930 16940 16950 16960 16970 16980 16990 17000 17010 17020 17030 17040 17050 17060 17070 17080 17090 17100 17110 17120 17130 17140 17150 17160 17170 17180 17190 17200 17210 17220 17230 17240 17250 17260 17270 17280 17290 17300 17310 17320 17330 17340 17350 17360 17370 17380 17390 17400 17410 17420 17430 17440 17450 17460 17470 17480 17490 17500 17510 17520 17530 17540 17550 17560 17570 17580 17590 17600 17610 17620 17630 17640 17650 17660 17670 17680 17690 17700 17710 17720 17730 17740 17750 17760 17770 17780 17790 17800 17810 17820 17830 17840 17850 17860 17870 17880 17890 17900 17910 17920 17930 17940 17950 17960 17970 17980 17990 18000 18010 18020 18030 18040 18050 18060 18070 18080 18090 18100 18110 18120 18130 18140 18150 18160 18170 18180 18190 18200 18210 18220 18230 18240 18250 18260 18270 18280 18290 18300 18310 18320 18330 18340 18350 18360 18370 18380 18390 18400 18410 18420 18430 18440 18450 18460 18470 18480 18490 18500 18510 18520 18530 18540 18550 18560 18570 18580 18590 18600 18610 18620 18630 18640 18650 18660 18670 18680 18690 18700 18710 18720 18730 18740 18750 18760 18770 18780 18790 18800 18810 18820 18830 18840 18850 18860 18870 18880 18890 18900 18910 18920 18930 18940 18950 18960 18970 18980 18990 19000 19010 19020 19030 19040 19050 19060 19070 19080 19090 19100 19110 19120 19130 19140 19150 19160 19170 19180 19190 19200 19210 19220 19230 19240 19250 19260 19270 19280 19290 19300 19310 19320 19330 19340 19350 19360 19370 19380 19390 19400 19410 19420 19430 19440 19450 19460 19470 19480 19490 19500 19510 19520 19530 19540 19550 19560 19570 19580 19590 19600 19610 19620 19630 19640 19650 19660 19670 19680 19690 19700 19710 19720 19730 19740 19750 19760 19770 19780 19790 19800 19810 19820 19830 19840 19850 19860 19870 19880 19890 19900 19910 19920 19930 19940 19950 19960 19970 19980 19990 20000 20010 20020 20030 20040 20050 20060 20070 20080 20090 20100 20110 20120 20130 20140 20150 20160 20170 20180 20190 20200 20210 20220 20230 20240 20250 20260 20270 20280 20290 20300 20310 20320 20330 20340 20350 20360 20370 20380 20390 20400 20410 20420 20430 20440 20450 20460 20470 20480 20490 20500 20510 20520 20530 20540 20550 20560 20570 20580 20590 20600 20610 20620 20630 20640 20650 20660 20670 20680 20690 20700 20710 20720 20730 20740 20750 20760 20770 20780 20790 20800 20810 20820 20830 20840 20850 20860 20870 20880 20890 20900 20910 20920 20930 20940 20950 20960 20970 20980 20990 21000 21010 21020 21030 21040 21050 21060 21070 21080 21090 21100 21110 21120 21130 21140 21150 21160 21170 21180 21190 21200 21210 21220 21230 21240 21250 21260 21270 21280 21290 21300 21310 21320 21330 21340 21

は、引用により本明細書に組み込まれているUS2005/0148024に開示されたように、例えば関心対象の特定のポリペプチドのアミノ及び/又はカルボキシル末端での、特定のエピトープの喪失に対し「感受性」があるようにも構成することができる。その特許に開示されたように、BNP₇₇₋₁₀₈には結合せずにBNP₇₉₋₁₀₈のアミノ末端に結合し得る抗体を選択できる。BNP₃₋₁₀₈に結合し、かつ例えばアミノ及び/又はカルボキシル末端の特定のエピトープの喪失に「感受性」がある同様のアッセイも、その特許において開示されている。

【0096】

本発明のマーカーの検出及び分析に関して、多くの方法及び器具が、当業者に周知である。患者の被験試料中のポリペプチド又はタンパク質に関して、イムノアッセイの器具及び方法が使用されることが多い。例えば、米国特許第6,143,576号；第6,113,855号；第6,019,944号；第5,985,579号；第5,947,124号；第5,939,272号；第5,922,615号；第5,885,527号；第5,851,776号；第5,824,799号；第5,679,526号；第5,525,524号；及び、第5,480,792号を参照することとし、その各々の全ての表、図面及び「特許請求の範囲」を含む、内容全体は引用により本明細書に組み込まれている。これらの器具及び方法は、様々なサンドイッチ、競合、又は非競合アッセイフォーマットにおいて標識された分子を利用して、関心対象の被検体の存在又は量に関連しているシグナルを発生させることができる。加えてバイオセンサー及び光学イムノアッセイなどのある種の方法及び器具は、標識された分子を必要とせずに、被検体の存在又は量を決定するために使用することができる。例えば米国特許第5,631,171号；及び第5,955,377号を参照することとし、その各々の全ての表、図面及び「特許請求の範囲」を含む、内容全体は引用により本明細書に組み込まれている。当業者は、BeckmanのAccess、AbbottのAxSym、RocheのElecSys、Dade BehringのStratusシステムを含むが、これらに限定されるものではないロボット型装置も、本明細書に開示されたイムノアッセイを実行することが可能であるイムノアッセイ分析装置であることも認める。

【0097】

マーカーは、イムノアッセイを用い、最も好ましくはサンドイッチイムノアッセイを用いて分析されることが好ましいが、他の方法も当業者に周知である(例えば、マーカーRNAレベルの測定)。マーカーの存在又は量は一般に、各マーカーに特異的な抗体(又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)を用いて、及び特異的結合を検出して決定される。任意の好適なイムノアッセイ、例えば酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、放射線免疫測定(RIA)、競合的結合アッセイなどを利用することができる。親和性試薬のマーカーへの特異的免疫学的結合は、直接又は間接に検出することができる。直接標識は、親和性試薬に結合した蛍光タグ又は発光タグ、金属、色素、放射性核種などを含む。間接標識は、当該技術分野において周知の様々な酵素、例えばアルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼなどを含む。

【0098】

マーカーに特異的な固定された抗体(又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)の使用も、本発明により意図されている。これらの親和性試薬は、磁気粒子又はクロマトグラフィーマトリックス粒子、アッセイプレートの表面(マイクロタイターウェルなど)、固形基板材料又は膜の小片(プラスチック、ナイロン、紙など)など様々な固形支持体上に固定される。アッセイストリップは、固形支持体上のアレイ中の1種又は複数の親和性試薬のコーティングにより調製される。その後このストリップは、被験試料に浸漬され、次に洗浄及び検出工程を経て迅速に処理され、着色したスポットなどの測定可能なシグナルを発生する。

【0099】

マーカーの分離又は連続アッセイに適した器具は、ElecSys(Roche)、AxSym (Abbott)、Access(Beckman)、AD VIA(登録商標)CENTAUR(登録商標)(Bayer)イムノアッセイシステム、NICHOLS ADVANTAGE(登録商標)(Nichols Institute)イムノアッセイシステムなどの、臨床検査室用分析装置を含む。好ましい装置は、単独の試験装置を用い複数のマーカーの同時アッセイを行う。特に有用な物理的フォーマットは、複数の様々な被検体の検出のため

の複数の個別のアドレス可能な位置を有する表面を含む。このようなフォーマットは、タンパク質マイクロアレイ又は「タンパク質チップ」(例えば、Ng及びIlagの論文、J Cell Mol. Med. 6: 329-340 (2002)を参照されたい)及びある種のキャピラリー装置(例えば米国特許第6,019,944号を参照されたい)を含む。これらの実施態様において、各個別の表面位置は、各位置で検出するための1種以上の被検体(群)(例えばマーカー)を固定するための抗体を含んでよい。或いは表面は、表面の個別の位置に固定された1個以上の個別の粒子(例えばマイクロ粒子又はナノ粒子)を含んでよく、ここでマイクロ粒子は、検出のために1個の被検体(例えばマーカー)を固定する抗体を含む。

【0100】

本発明の好ましいアッセイ器具は、1種以上のアッセイのために、固相に複合された第一の抗体(又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)、及びシグナル発生要素に複合された第二の抗体(又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)を備えるであろう。このようなアッセイ器具は、1種以上の被検体のためのサンドイッチイムノアッセイを行うために構成される。これらのアッセイ器具は、好ましくは試料適用ゾーン、及び試料適用ゾーンから固相に複合された第一の抗体(又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)を含む第二の器具領域までの流れゾーンを更に備える。

10

【0101】

流路に沿った試料の流れは、受動的に(例えば、毛細管、流体静力学、又は一旦試料が適用されたならば更なる器具の操作を必要としない他の力による)、若しくは能動的に(例えば、機械的ポンプ、電気浸透ポンプにより発生した力、遠心力、増大した空気圧などの適用により)、又は能動及び受動駆動力の組合せにより、駆動されてよい。最も好ましくは、試料適用ゾーンに適用された試料は、流路に沿って、固相に複合した第一の抗体(又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)、及びシグナル発生要素に複合された第二の抗体(又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)の両方と接触するであろう(サンドイッチアッセイフォーマット)。血漿又は血清を血液から分離するためのフィルター、混合チャンバーなどの追加の要素は、技術者により必要ならば備えることができる。器具の例は、「イムノアッセイハンドブック(The Immunoassay Handbook)」、第2版の第41章、「臨床試験:Triage(登録商標)心臓システム(Near Patient Tests: Triage(R) Cardiac System)」、David Wild編、Nature Publishing Group, 2001に説明されており、この文献はその内容全体は引用により本明細書に組み込まれている。

20

30

【0102】

先に言及されたマーカーからなるパネルは、鑑別診断に関連した関連情報を提供するために構築することができる。そのようなパネルは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20又はそれ以上の個別のマーカーを使用し、構築されてよい。単独のマーカー又はより大きいマーカーのパネルを含むマーカーサブセットの分析が、当業者により実行され、様々な臨床的状況における臨床的感度又は特異性を最適化することができる。これらは、救急(ambulatory)、応急処置、救急集中治療、集中治療、経過観察ユニット、入院患者、外来患者、医院、医療診療所、及び健康診断の設定を含むが、これらに限定されるものではない。更に当業者は、臨床的感度及び特異性を最適化するために、単独のマーカー又はより大きいマーカーのパネルを含むマーカーサブセットを、前述の状況の各々における診断閾値の調節と組合せて使用することができる。アッセイの臨床的感度は、そのアッセイが正確に推定する疾患を伴うものの割合として規定され、並びにアッセイの特異性は、そのアッセイが正確に推定する疾患を伴わないものの割合として規定される(「Tietz臨床化学(Tietz Textbook of Clinical Chemistry)」、第2版、Carl Burtis及びEdward Ashwood編, W.B. Saunders and Company, 496頁)。

40

【0103】

マーカーの分析は、更に様々な物理的フォーマットで実行することができる。例えばマイクロタイタープレート又は自動化の使用は、多数の被験試料の処理を促進するために使

50

用することができる。或いは単独の試料フォーマットは、例えば救急搬送又は緊急救命室の状況のような、時機を得た形で即時の治療及び診断を促進するために開発されている。

【0104】

別の実施態様において、本発明は、マーカーの分析用のキットを提供する。そのようなキットは好ましくは、少なくとも1種の被験試料の分析のための器具及び試薬、並びにアッセイの実行に関する説明書を備える。任意にこのキットは、ある種の診断を採用又は除外するために、マーカーパネルに関して実行されたイムノアッセイから得られた情報を使用するための1種以上の手段を含むことができる。本明細書に開示された方法に適用可能な他の測定戦略は、クロマトグラフィー(例えばHPLC)、質量分析、受容体-ベースのアッセイ、及びそれらの組合せを含む。

【0105】

(CRCMPへの親和性試薬の作製)

当該技術分野に従い、3種の主な親和性試薬 - モノクローナル抗体、ファージディスプレイ抗体、及びアフイボディー、ドメイン抗体(dAb)、ナノボディ又はユニボディなどの小型分子 - が存在する。一般に抗体の使用が言及される本発明の適用においては、他の親和性試薬(例えばアフイボディー、ドメイン抗体、ナノボディ又はユニボディ)が利用されてよい。

【0106】

(CRCMPに対する抗体の産生)

本発明に従い、CRCMP、CRCMP類似体、CRCMP-関連タンパク質又は前述のいずれかの断片若しくは誘導体を免疫原として使用して、このような免疫原に免疫特異的に結合する抗体を産生してもよい。このような免疫原は、上記の方法を含む任意の便利な手段によって単離することができる。本明細書において使用される用語「抗体」とは、抗原又はエピトープへ特異的に結合することが可能である、ひとつ又は複数の免疫グロブリン遺伝子、又はそれらの断片に由来した、モデル化された、若しくは実質的にコードされたペプチド又はポリペプチドをいう。例えば、「基礎免疫学(Fundamental Immunology)」, 第3版, W.E. Paul編, Raven Press, N.Y. (1993); Wilsonの論文, (1994) J. Immunol. Methods 175:267-273; Yarmushの論文, (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97を参照されたい。用語「抗体」は、抗原へ結合する能力を保持している抗原-結合部位、すなわち「抗原結合部位」(例えば、断片、部分配列、相補性決定領域(CDR))を含み、これは(i)VL、VH、CL及びCH1ドメインからなる単価断片である、Fab断片; (ii)ヒンジ領域でジスルフィド結合により連結された2個のFab断片を含む二価断片である、F(ab')₂断片; (iii)VH及びCH1ドメインからなる、Fd断片; (iv)抗体の1本の腕のVL及びVHドメインからなる、Fv断片、(v)VHドメインかなる、dAb断片(Wardらの論文, (1989) Nature, 341:544-546); 並びに、(vi)単離された相補性決定領域(CDR); を含む。単鎖抗体も、用語「抗体」に含まれる。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体又はキメラ抗体、単鎖抗体、Fab断片及びF(ab')断片、Fab発現ライブラリーによって産生される断片、抗イディオタイプ(抗-Id)抗体、並びに上記のいずれかのエピトープ結合断片を含むが、これらに限定されない。本発明の免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子の任意のクラス(例えばIgG、IgE、IgM、IgD及びIgA)又はサブクラスであることができる。

【0107】

「特異的に結合」(又は「免疫特異的に結合」)という用語は、抗体がその意図された標的だけに結合することを示すことは意図されない。むしろ、抗体は、非標的分子に対するその親和性と比較したときに、その意図された標的に対するその親和性が約5倍より高い場合に、「特異的に結合する」。好ましくは、抗体の親和性は、非標的分子に対するその親和性よりも標的分子に対して少なくとも約5倍、好ましくは10倍、より好ましくは25倍、更により好ましくは50倍及び最も好ましくは100倍以上高い。好ましい実施態様において、抗体又はその他の結合剤と抗原との間の特異的結合は、少なくとも 10^6 M^{-1} の結合親和性を意味する。好ましい抗体は、少なくとも約 10^7 M^{-1} 、及び好ましくは約 10^8 M^{-1} ~ 約 10^{10}

10

20

30

40

50

9 M^{-1} 、約 10^9 M^{-1} ~ 約 10^{10} M^{-1} 、又は約 10^{10} M^{-1} ~ 約 10^{11} M^{-1} の間の親和性で結合する。

【0108】

親和性は、 $K_d = k_{off} / k_{on}$ として算出される(k_{off} は、解離速度定数であり、 k_{on} は、会合速度定数であり、及び K_d は平衡定数である)。親和性は、平衡時に、様々な濃度(c)での、標識されたりガンドの結合した画分(r)を測定することにより決定することができる。

データは、スキャッチャード式を使用してグラフで示してある： $r/c = K(n-r)$ ：

式中

r = 平衡時の結合したりガンドのモル数 / 受容体のモル数；

c = 平衡時の遊離リガンド濃度；

K = 平衡会合定数；及び

n = 受容体分子1個あたりのリガンド結合部位の数。

図式解法により、 r/c をY軸にプロットし、対して r をX軸にプロットし、こうしてスキャッチャードプロットを作製する。親和性は、この直線の負の勾配である。 k_{off} は、結合した標識リガンドを過剰な非標識リガンドとで競合させることによって決定することができる(例えば、米国特許第6,316,409号を参照されたい)。ターゲティング剤のその標的分子に対する親和性は、好ましくは少なくとも約 1×10^{-6} モル/リットルであり、より好ましくは少なくとも約 1×10^{-7} モル/リットル、更により好ましくは少なくとも約 1×10^{-8} モル/リットル、更により好ましくは少なくとも約 1×10^{-9} モル/リットル、及び最も好ましくは少なくとも約 1×10^{-10} モル/リットルである。スキャッチャード解析による抗体親和性測定は、当技術分野において周知である。例えば、van Erpらの論文、J. Immunoassay, 12 : 425-43, 1991 ; Nelson及びGriswoldの論文、Comput. Methods Programs Biomed. 27 : 65-8, 1988を参照されたい。

【0109】

ひとつの実施態様において、CRCMPをコードする遺伝子の遺伝子産物を認識する抗体を公に入手することができる。別の実施態様において、CRCMP、CRCMP類似体、CRCMP-関連ポリペプチド又は前述のいずれかの断片若しくは誘導体を認識する抗体を産生するために、当業者に公知の方法が使用される。当業者は、抗体の産生に、例えば、「抗体、実験マニュアル(Antibodies, A Laboratory Manual)」、Harlow及びDavid Lane編、Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、コールドスプリングハーバー、N.Y.に説明されたような、多くの手順を利用することができることを認めるであろう。当業者は、抗体を模倣している結合断片又はFab断片も、様々な手順により遺伝的情報から調製することができることも理解するであろう(「抗体操作：実践法(Antibody Engineering: A Practical Approach)」(Borrebæck, C. 編), 1995, Oxford University Press社, オックスフォード ; J. Immunol. 149, 3914-3920 (1992))。

【0110】

本発明の一つの実施態様において、CRCMPの特異的ドメインに対する抗体が産生される。具体的実施態様において、CRCMPの親水性断片が、抗体産生のための免疫原として使用される。

【0111】

抗体産生において、所望の抗体のスクリーニングは、当該技術分野において公知の技術、例えばELISA(酵素結合免疫吸着検定法)によって達成することができる。例えば、CRCMPの特異的ドメインを認識する抗体を選択するために、作製したハイブリドーマを、このようなドメインを含むCRCMP断片と結合する産物についてアッセイしてもよい。第1のCRCMP相同体に特異的に結合するが、第2のCRCMP相同体と特異的に結合しない(又は、より強く結合しない)抗体の選択のためには、第1のCRCMP相同体に対する陽性結合及び第2のCRCMP相同体に対する結合の欠如(又は、結合の減少)を基礎として選択することができる。同様に、CRCMPに特異的に結合するが、同じタンパク質の異なるアイソフォーム(CRCMPと同じコアペプチドを有する異なる糖型など)に特異的に結合しない(又は、より強く結合しない)抗体の選択のためには、CRCMPに対する陽性結合及び異なるアイソフォーム(例えば、異なる糖型)に対する結合の欠如(又は、結合の減少)を基礎として選択することができる。

従って、本発明は、CRCMPの異なるアイソフォーム又はアイソフォーム群(例えば、糖型)よりもCRCMPに対してより高い親和性(特に少なくとも2倍、特に更に少なくとも5倍、より詳しくは少なくとも10倍より高い親和性にて)で結合する抗体(特に、モノクローナル抗体)を提供する。

【0112】

本発明の方法に使用してもよいポリクローナル抗体は、免疫動物の血清に由来する抗体分子の不均一な集団である。分画されていない免疫血清を使用することもできる。当該技術分野において公知の様々な手順を使用して、CRCMP、CRCMPの断片、CRCMP-関連ポリペプチド、又はCRCMP-関連ポリペプチドの断片に対するポリクローナル抗体を産生してもよい。例えば、ひとつの方法は、例えば当該技術分野において周知の固相ペプチド合成法を用い、関心対象のポリペプチドを精製又は関心対象のポリペプチドを合成する。例えば、「タンパク質精製指針(Guide to Protein Purification)」、Murray P. Deutcher編、Meth. Enzymol. Vol 182 (1990) ; 「固相ペプチド合成(Solid Phase Peptide Synthesis)」、Greg B. Fields編、Meth. Enzymol. Vol 289 (1997) ; Kisoらの論文、Chem. Pharm. Bull. (東京) 38: 1192-99, 1990 ; Mostafaviらの論文、Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids, 1: 255-60, 1995 ; Fujiwaraらの論文、Chem. Pharm. Bull. (東京) 44: 1326-31, 1996を参照されたい。その後選択されたポリペプチドを使用し、ウサギ、マウス、ラットなどを含むが、これらに限定されない種々の宿主動物を注射することにより免疫し、ポリクローナル又はモノクローナル抗体の産生することができる。本明細書に記述した「好ましい技術」は、このような免疫化のために適した単離されたCRCMPを提供する。CRCMPをゲル電気泳動によって精製する場合、CRCMPは、ポリアクリルアミドゲルより前の抽出の有無にかかわらず、免疫に使用することができる。宿主種に応じて、完全又は不完全フロイントアジュバント(すなわち免疫賦活剤)、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチンなどの界面活性物質、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン、ジニトロフェノール、及びBCG(カルメット ゲラン菌)又はコリネバクテリウム・パルバム(*corynebacterium parvum*)などのアジュバントを含むが、これらに限定されない種々のアジュバントを使用して、免疫応答を増強してもよい。更なるアジュバントも当該技術分野において周知である。

【0113】

CRCMP、CRCMPの断片、CRCMP-関連ポリペプチド、又はCRCMP-関連ポリペプチドの断片に向けられられたモノクローナル抗体(mAb)の調製のためには、連続した培養における株化細胞によって抗体分子の産生を提供する任意の技術が使用されてよい。例えばハイブリドーマ技術は最初に、Kohler及びMilstein(1975, Nature, 256:495-497)によって開発され、並びにトリオーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborらの論文, 1983, Immunology Today, 4:72)及びヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBV-ハイブリドーマ技術(Coleらの文献, 1985, 「モノクローナル抗体及び癌治療(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)」, Alan R. Liss社, 77-96頁)を使用してよい。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及びそのいずれかのサブクラスを含む免疫グロブリンのクラスに由来するものであることができる。本発明のmAbを産生するハイブリドーマは、インビトロ又はインビボで培養してもよい。本発明の更なる実施態様において、モノクローナル抗体は、公知の技術を利用して無菌動物において産生することができる(PCT/US90/02545(引用により本明細書に組み込まれる))。

【0114】

モノクローナル抗体は、ヒトモノクローナル抗体及びキメラモノクローナル抗体(例えば、ヒト-マウスキメラ)を含むが、これらに限定されない。キメラ抗体は、異なる部分がヒト免疫グロブリン定常領域及びマウスmAb由来の可変領域を有するものなどの、異なる種由来である分子である(Cabillyらの米国特許第4,816,567号 ; Bossらの米国特許第4,816,397号を参照されたく、これらはその全体がその全体が引用により本明細書に組み込まれる。)。ヒト化抗体は、ひとつ以上の非ヒト種由来の相補性決定領域(CDR)及びヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する非ヒト種由来の抗体分子である。(例え

ば、Queen、米国特許第5,585,089号を参照されたく、これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる)。

【0115】

キメラモノクローナル抗体及びヒト化モノクローナル抗体は、当該技術分野において公知の組換えDNA技術によって、例えばPCT公開番号WO87/02671；欧州特許出願第184,187号；欧州特許出願第171,496号；欧州特許出願第173,494号；PCT公開番号WO86/01533；米国特許第4,816,567号；欧州特許出願第125,023号；Betterらの論文、1988、Science, 240：1041-1043；Liuらの論文、1987、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84：3439-3443；Liuらの論文、1987、J. Immunol. 139：3521-3526；Sunらの論文、1987、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84：214-218；Nishimuraらの論文、1987、Canc. Res. 47：999-1005；Woodらの論文、1985、Nature, 314：446-449；及びShawらの論文、1988、J. Natl. Cancer Inst. 80：1553-1559；Morrisonの論文、1985、Science, 229：1202-1207；Oiらの論文、1986、Bio/Techniques, 4：214；米国特許第5,225,539号；Jonesらの論文、1986、Nature, 321：552-525；Verhoeyanらの論文、(1988) Science, 239：1534；及びBeidlerらの論文、1988、J. Immunol. 141：4053-4060；に記述された方法を使用して産生することができる。

10

【0116】

完全ヒト抗体は、特にヒト被験者の治療的処置のために望ましい。このような抗体は、内因性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子を発現することができないが、ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを使用して産生することができる。トランスジェニックマウスは、選択された抗原、例えばCRCMPの全て又は一部を通常の様式で免疫される。この抗原に対するモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を使用して得ることができる。トランスジェニックマウスにより収容されたヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の間に再編成し、その後クラススイッチ及び体細胞突然変異を受ける。従って、このような技術を使用して、治療的に有用なIgG、IgA、IgM及びIgE抗体を産生することができる。ヒト抗体を産生するためのこの技術の概要については、Lonberg及びHuszarの論文(1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93)を参照されたい。ヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの技術並びにこのような抗体を産生するためのプロトコルの詳細な考察については、例えば米国特許第5,625,126号；米国特許第5,633,425号；米国特許第5,569,825号；米国特許第5,661,016号；及び米国特許第5,545,806号；を参照されたい。加えて、Abgenix, Inc.(フリーモント, CA)及びGenpharm(サンノゼ, CA)などの会社は、前述のものと類似の技術を使用して選択された抗原に対するヒト抗体を提供することに従事することができる。

20

30

【0117】

選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「誘導選択(guided selection)」と呼ばれる技術を使用して産生することができる。このアプローチでは、選択された非ヒトモノクローナル抗体、例えばマウス抗体を使用して、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択を誘導する(Jespersらの論文、(1994) Bio/technology 12：899-903)。

【0118】

また本発明の抗体は、選択された標的への結合に関してポリペプチドライブラリーを製作しスクリーニングするためファージディスプレイ法を使用して産生することができる。例えば、Cwirlaらの論文、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378-82, 1990；Devlinらの論文、Science 249, 404-6, 1990；Scott及びSmithの論文、Science 249, 386-88, 1990；並びに、Ladnerらの米国特許第5,571,698号を参照されたい。ファージディスプレイ法の基本的概念は、スクリーニングされるポリペプチドをコードしているDNAとそのポリペプチドの間の物理的関係の確立である。この物理的関係は、そのポリペプチドをコードしているファージゲノムを封入しているキャプシドの一部としてポリペプチドを呈示する、ファージ粒子により提供される。ポリペプチドとそれらの遺伝的物質の間の物理的関係の確立は、異なるポリペプチドを有する非常に多数のファージの同時大量スクリーニングを可能にする。標的への親和性を伴うポリペプチドを呈示するファージはその標的へ結合し、これらのファージは、標的への親和性スクリーニングにより濃縮される。これらのファ

40

50

ージにより呈示されるポリペプチドの同一性は、それらの各ゲノムにより決定することができる。これらの方法を用い、次に所望の標的に対する結合親和性を有すると同定されたポリペプチドは、通常的手段により大量に合成することができる。例えば、米国特許第6,057,098号を参照することとし、全ての表、図面及び「特許請求の範囲」を含む、その全体は引用により本明細書に組み込まれる。特に、このようなファージは、レパートリー又はコンビナトリアル抗体ライブラリー(例えば、ヒト又はマウス)から発現される抗原結合ドメインを呈示するために利用することができる。関心対象の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて、例えば標識抗原、又は固体表面若しくはビーズに結合若しくは捕獲された抗原を使用して選択又は同定することができる。これらの方法に使用されるファージは、典型的にはファージ遺伝子III又は遺伝子VIIIタンパク質のいずれかに組換えで融合されたFab、Fv又はジスルフィド安定化されたFv抗体ドメインと共にファージから発現されるfd及びM13結合ドメインを含む繊維状ファージである。本発明の抗体を作製するために使用することができるファージディスプレイ法は、Brinkmanらの論文、J. Immunol. Methods, 182:41-50(1995); Amesらの論文、J. Immunol. Methods, 184:177-186(1995); Kettleboroughらの論文、Eur. J. Immunol. 24:952-958(1994); Persicらの論文、Gene, 187:9-18(1997); Burtonらの論文、Advances in Immunology, 57:191-280 (1994); PCT出願番号PCT/GB91/01134; PCT公開WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; 及び米国特許第5,698,426号; 第5,223,409号; 第5,403,484号; 第5,580,717号; 第5,427,908号; 第5,750,753号; 第5,821,047号; 第5,571,698号; 第5,427,908号; 第5,516,637号; 第5,780,225号; 第5,658,727号; 第5,733,743号及び第5,969,108号; (それぞれ、その全体が引用により本明細書に組み込まれる)に開示したものを含む。

【0119】

上記の文献に記載されているように、ファージ選択の後、ファージ由来の抗体コード領域を単離して、ヒト抗体を含む抗体全体又はその他の所望の抗原結合断片を産生するために使用すること、及び哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母及び細菌を含む任意の所望の宿主において、例えば以下に詳細に記述したように発現させることができる。また、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂断片を組換えで産生する技術も、PCT公開WO92/22324; Mullinaxらの論文、BioTechniques, 12(6):864-869 (1992); 及び、Sawaiらの論文、AJRI 34:26-34 (1995); 及びBetterらの論文、Science, 240:1041-1043(1988)(前記参照は、これらの全体が引用により組み込まれる)に開示されたものなどの当該技術分野において公知の方法を使用して利用することができる。

【0120】

単鎖Fvs及び抗体を産生するために使用することができる適切な技術の例には、米国特許第4,946,778号及び第5,258,498号; Hustonらの論文、Methods in Enzymology, 203:46-88(1991); Shuらの論文、PNAS 90:7995-7999(1993); 及びSkerraらの論文、Science, 240:1038-1040(1988); に記述されたものを含む。

【0121】

本発明は、当該技術分野において公知の方法によって行うことができる二重特異性抗体の使用を更に提供する。完全長二重特異性抗体の従来の産生は、ふたつの鎖が異なる特異性を有するふたつの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づいている(Milsteinらの論文, 1983, Nature, 305:537-539)。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のランダムな組合せのため、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10個の異なる抗体分子の潜在的混合物を生じ、そのうちのひとつのみが正確に二重特異性構造を有する。通常アフィニティークロマトグラフィー工程によってなされる正確な分子の精製は、むしろ扱いにくく、産物収率は低い。同様の手法は、1993年5月13日に公開されたWO93/08829に、及びTrauneckerらの論文、1991、EMBO J. 10:3655-3659に開示されている。

【0122】

異なるアプローチ及びより好ましいアプローチに従って、所望の結合特異性をもつ抗体可変ドメイン(抗体-抗原結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合させる。融

合は、好ましくは少なくともヒンジ、CH2及びCH3領域の部分を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。融合物の少なくともひとつに存在する軽鎖結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域(CH1)を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物、及び所望の場合、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別々の発現ベクターに挿入し、適切な宿主生物に同時トランスフェクトする。これは、構築に使用した不均等な比率の3つのポリペプチド鎖が最適収量をもたらす実施態様において、3つのポリペプチド断片の相互の比率を調節する際に優れた柔軟性をもたらす。しかし、少なくともふたつのポリペプチド鎖の同等の比率の発現により高収率を生じるときか、又は比率が特に意味を持たないときは、ふたつ又は3つ全てのポリペプチド鎖のコード配列をひとつの発現ベクターに挿入することができる。

10

【0123】

このアプローチの好ましい実施態様において、二重特異性抗体は、一方の腕の第1の結合特異性をもつハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方の腕のハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第2の結合特異性を提供する)とで構成される。二重特異性分子の半分のみ免疫グロブリン軽鎖が存在することは、容易な分離方法を提供するので、この非対称構造が所望の二重特異性化合物の望まれない免疫グロブリン鎖状結合からの分離を容易にすることが判明した。このアプローチは、1994年3月3日公開されたWO94/04690に開示されている。二重特異性抗体の産生に関する詳細については、例えば、Sureshらの論文、*Methods in Enzymology*, 1986 121:210を参照されたい。

20

【0124】

本発明は、抗-CRCMP免疫グロブリン分子の機能的に活性な断片、誘導体又は類似体を提供する。機能的に活性とは、断片、誘導体又は類似体が、断片、誘導体又は類似体が誘導される抗体によって認識される同じ抗原を認識する抗抗イディオタイプ抗体(すなわち、三次抗体)を誘発することができることを意味する。具体的には、好ましい実施態様において、免疫グロブリン分子のイディオタイプの抗原性をフレームワーク及びC末端であるCDR配列から抗原を特異的に認識するCDR配列までの欠失によって増強してもよい。どのCDR配列が抗原に結合するかを決定するために、CDR配列を含む合成ペプチドは、当該技術分野において公知の任意の適切な結合アッセイ法による抗原との結合アッセイ法に使用することができる。

30

【0125】

本発明は、限定されないが、 $F(ab')_2$ 断片及びFab断片などの抗体断片を提供する。特異的エピトープを認識する抗体断片は、公知の技術によって産生してもよい。 $F(ab')_2$ 断片は、可変領域、軽鎖定常領域及び重鎖CH1ドメインからなり、抗体分子のペプシン消化によって産生される。Fab断片は、 $F(ab')_2$ 断片のジスルフィド架橋を還元させることによって産生される。また本発明は、本発明の抗体の重鎖と軽鎖との二量体又はFv若しくは単鎖抗体(SCA)などの任意のその最小断片(例えば、米国特許第4,946,778号; Birdの論文、1988、*Science*, 242:423-42; Hustonらの論文、1988、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883; 及びWardらの論文、1989、*Nature*, 334:544-54に記載されたとおり)又は本発明の抗体と同じ特異性をもつ任意のその他の分子を提供する。単鎖抗体は、アミノ酸ブリッジを介してFv領域の重鎖断片及び軽鎖断片を連結して一本鎖ポリペプチドを生ずることによって形成される。大腸菌における機能的Fv断片の集成のための技術を使用してもよい(Skerraらの論文、1988、*Science*, 242:1038-1041)。

40

【0126】

その他の実施態様において、本発明は、本発明の免疫グロブリンの融合タンパク質(又はその機能的に活性な断片)、例えば免疫グロブリンがN末端又はC末端のいずれかにて共有結合(例えば、ペプチド結合)を介してその免疫グロブリンでない別のタンパク質のアミノ酸配列(又はその一部、好ましくはタンパク質の少なくとも10、20又は50アミノ酸部分)に融合されている融合タンパク質を提供する。好ましくは、免疫グロブリン又はその断片は、定常ドメインのN末端にて他のタンパク質に共有結合で連結されている。前述のように、このような融合タンパク質は、精製を容易にし、インビボでの半減期を増大し、及び

50

免疫系に対する上皮関門を越えた抗原の送達を増強し得る。

【0127】

本発明の免疫グロブリンは、すなわち免疫特異性結合を障害しない程度 of このよう な 共有結合の長さの分子の任意の型の共有結合のいずれかによって修飾されている類似体及び誘導体を含む。例えば、限定を目的とするものではないが、免疫グロブリンの誘導体及び類似体は、例えばグリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク分解性切断、細胞リガンド若しくはその他のタンパク質に対する結合などによって更に修飾されたものを含む。任意の多数の化学的修飾を、特異的 化学開裂、アセチル化、ホルミル化などを含むが、これらに限定されない公知技術によって行ってもよい。加えて、類似体又は誘導体は、ひとつ以上の非古典的アミノ酸を含んでいてもよい。

10

【0128】

前述の抗体は、CRCMPの局在化及び活性に関連した技術分野において公知の方法において、例えばこれらのタンパク質を造影するために、適切な生理学的試料におけるこれらのレベルを測定するために、診断法などに使用することができる。

【0129】

(CRCMPに対するアフィボディーの産生)

アフィボディー分子は、ブドウ球菌プロテインAのIgG-結合ドメインのひとつに由来する58アミノ酸残基タンパク質ドメインに基づいた親和性タンパク質の新たな種類を表す。この3つのヘリックスバンドルドメインはコンビナトリアルファージミドライブラリーの構築のための足場として使用されてきており、これからファージディスプレイ技術を使用して所望の分子を標的化するアフィボディー変異体を選択することができる(Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PAの論文, 「 α -ヘリカル細菌受容体ドメインのコンビナトリアルライブラリーから選択された結合タンパク質(Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain)」, Nat Biotechnol 1997 ; 15:772-7 ; Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PAの論文, 「ヒト免疫グロブリンA(IgA) - タンパク質Aのコンビナトリアル操作からの特異的リガンド(Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A)」, Eur J Biochem 2002 ; 269:2647-55)。これらの低分子量(6kDa)と組合せでのアフィボディー分子の単純な強い構造は、多種多様な適用、例えば検出試薬としての適用にそれらを適合化させ(Ronmark J, Hansson M, Nguyen Tらの論文, 「大腸菌で産生されたアフィボディー-Fcキメラの構築及び特徴づけ(Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in Escherichia coli)」, J Immunol Methods 2002 ; 261:199-211)、及び受容体相互作用を阻害する(Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PAの論文, 「コンビナトリアルタンパク質操作によって開発されたCD28結合アフィボディーによる、CD28-CD80共刺激の阻害(Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding affibody ligand developed by combinatorial protein engineering)」, Protein Eng 2003 ; 16:691-7)。アフィボディーに関するさらなる詳細及びその産生方法は、その全体が本明細書に引用により組み込まれる米国特許第5831012号を参照することによって得られるであろう。

20

30

40

また、標識されたアフィボディーは、アイソフォームの存在量を決定するための造影用途に有用であろう。

【0130】

(CRCMPに対するドメイン抗体の産生)

ドメイン抗体(dAb)は、ヒト抗体の重(V_H)鎖又は軽(V_L)鎖の可変領域に対応する抗体のうち of の最も小さな機能的結合単位である。ドメイン抗体は、およそ13kDaの分子量を有する。Domantisは、完全ヒト V_H 及び V_L dAbの一連の大きく、かつ高度に機能的なライブラリー(それぞれのライブラリーにおける10,000,000,000を超える異なる配列)を開発して、これらのライブラリーを治療標的に対して特異的なdAbを選択するために使用する。多くの普通抗体とは対照的に、ドメイン抗体は、細菌、酵母及び哺乳動物細胞系において十分に

50

発現される。ドメイン抗体に関する更なる詳細及びその産生方法は、米国特許第6,291,158号；第6,582,915号；第6,593,081号；第6,172,197号；第6,696,245号；米国特許出願第2004/0110941号；欧州特許出願第1433846号、並びに欧州特許第0368684号及び第0616640号；WO 05/035572、WO 04/101790、WO 04/081026、WO 04/058821、WO 04/003019及びWO 03/002609(これらのそれぞれは、その全体が本明細書に引用により組み込まれる)を参照することによって得られるであろう。

【0131】

(CRCMPに対するナノボディの産生)

ナノボディは、天然の重鎖抗体の独自の構造的及び機能的特性を有する、抗体-由来の治療的タンパク質である。これらの重鎖抗体は、単独の可変ドメイン(VHH)及びふたつの定常ドメイン(C_H2及びC_H3)を含む。重要なことに、クローニングされかつ単離されたVHHドメインは、当初の重鎖抗体の完全な抗原結合能を収容する全く安定したポリペプチドである。ナノボディは、ヒト抗体のVHドメインと高い相同性を有し、かつ活性を喪失することなく更にヒト化することができる。重要なことに、ナノボディは、免疫原性の潜在能が低く、このことはナノボディリード化合物による霊長類の研究において確認された。

【0132】

ナノボディは、通常の抗体の利点を小型分子型薬物の重要な特徴と組み合わせている。通常の抗体同様、ナノボディは、高い標的特異性、それらの標的への高い親和性及び低い固有の毒性を示す。しかし小型分子型薬物同様、これらは酵素を阻害しかつ容易に受容体クレフトに接近する。更にナノボディは、極めて安定しており、注射以外の手段で投与することができ(例えばその内容全体は引用により本明細書に組み込まれている、WO 04/041867を参照のこと)、製造が容易である。ナノボディの他の利点は、それらのサイズが小さい結果として通常でないか又は隠されたエピトープを認識すること、それらの独自の3-次元性のために高親和性及び選択性を伴いタンパク質標的の溝又は活性部位に結合すること、薬物フォーマットの柔軟性、半減期のあつらえ及び薬物発見の速度である。

【0133】

ナノボディは、単独の遺伝子によりコードされ、並びに例えば大腸菌(例えばその内容全体は引用により本明細書に組み込まれている、米国特許第6,765,087号を参照されたい)、糸状菌(例えばアスペルギルス又はトリコデルマ)及び酵母(例えば、サッカロミセス、クルイベロマイセス、ハンセヌラ又はピチアなど)(例えばその内容全体は引用により本明細書に組み込まれている、米国特許第6,838,254号を参照されたい)などの、ほぼ全ての原核宿主及び真核宿主において効率的に産生される。産生プロセスは、拡大縮小可能であり、数Kg量のナノボディが生産されている。ナノボディは通常の抗体と比べ優れた安定性を示すので、これらは長期保存しそのまま使用することができる液剤として製剤することができる。

【0134】

ナノクローン法(例えばその内容全体は引用により本明細書に組み込まれている、WO 06/079372を参照されたい)は、B-細胞の自動式ハイスループット選択を基にした、所望の標的に対するナノボディを作製する特許で保護された方法である。

【0135】

(CRCMPに対するユニボディの産生)

ユニボディは、現在の小型抗体フォーマットよりもより長い治療ウィンドウが予測される、安定した、より小さい抗体フォーマットを作製する、新規の特許で保護された抗体技術である。IgG4抗体は、不活性であると考えられ、従って免疫系と相互作用しない。Genmabは、完全ヒトIgG4抗体のヒンジ領域を取り除くことにより、完全ヒトIgG4抗体を修飾した。完全サイズのIgG4抗体とは異なり、この半分の分子断片は、非常に安定しており、ユニボディと称された。IgG4分子の二分は、疾患標的に結合することができるユニボディ上のひとつの領域のみを残し、その結果ユニボディは、標的細胞上のただ一つの部位に一価で結合する。この一価の結合は、二価の抗体が行うように癌細胞の増殖を刺激せず、通常の抗体が治療することができない一部の癌型の治療の扉を開く。

【0136】

ユニボディは、通常のIgG4抗体のサイズのほぼ半分である。この小さいサイズは、一部の癌型の治療において大きい利点であり、この分子の大きい固形腫瘍上のより良い分布及び有効性増大の可能性をもたらす。

Fabは典型的には、長い半減期を有さない。しかしユニボディは、前臨床試験において、全IgG4抗体と同等の速度でクリアランスされ、かつ全抗体及び抗体断片と同様に結合することができた。他の抗体は、標的化された細胞を死滅することにより主に作用するが、ユニボディは、細胞を単に阻害又は沈黙させるのみである。

【0137】

(親和性試薬の発現)

10

(抗体の発現)

本発明の抗体は、抗体の合成のための当該技術分野において公知の任意の方法により、特に、化学合成によるか、又は組換え発現により産生することができ、好ましくは組換え発現技術によって産生される。

抗体又はそれらの断片、誘導体若しくは類似体の組換え発現には、抗体をコードする核酸の構築が必要である。抗体のヌクレオチド配列が公知である場合、抗体をコードする核酸は、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドから集成してもよく(例えば、Kutmeierらの論文, 1994, BioTechniques, 17: 242に記載されているように)、これには、簡単には、抗体をコードする配列の部分を含む重複するオリゴヌクレオチドの合成、これらのオリゴヌクレオチドのアニーリング及びライゲーション、次いでPCRによる結合されたオリゴヌクレオチドの増幅を含む。

20

【0138】

或いは、抗体をコードする核酸は、抗体をクローニングすることによって得てもよい。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンが入手不可能であるが、抗体分子の配列が公知である場合、抗体をコードする核酸は、配列の3'及び5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するPCR増幅によって、又は特定の遺伝子配列に対して特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用してクローニングすることによって、適切な供与源(例えば、抗体cDNAライブラリー又は抗体を発現する任意の組織又は細胞から作製したcDNAライブラリー)から得てもよい。

【0139】

30

特定の抗原を特異的に認識する抗体分子(又は、このような抗体をコードする核酸をクローニングするためのcDNAライブラリーのための供与源)が入手不可能である場合、特定の抗原に特異的な抗体を、当該技術分野において公知の任意の方法によって、例えばウサギなどの動物を免疫して、ポリクローナル抗体を産生することによって、又はより好ましくはモノクローナル抗体を産生することによって産生してもよい。或いは、特異的な抗原に結合するFab断片のクローンについてFab発現ライブラリーをスクリーニングすることによって(例えば、Huseらの論文, 1989, Science, 246: 1275-1281に記載されたように)、又は抗体ライブラリーをスクリーニングすることによって(例えば、Clacksonらの論文, 1991, 352: 624 Nature; Haneらの論文, 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4937; を参照されたい)、少なくとも抗体のFab部分をコードするクローンを得てもよい。

40

【0140】

一旦、少なくとも抗体分子の変域ドメインをコードする核酸が得られたら、これを抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含むベクターに導入してもよい(例えば、PCT公開WO 86/05807、PCT公開WO 89/01036; 及び米国特許第5,122,464号; を参照されたい)。完全な抗体分子の発現を可能にする核酸を同時発現するための完全な軽鎖又は重鎖を含むベクターも利用できる。次いで、抗体をコードする核酸を使用して、スルフヒドリル基を含まないアミノ酸残基との鎖内ジスルフィド結合に関与するひとつ以上の可変領域システイン残基を置換する(又は欠失させる)ために必要なヌクレオチド置換(群)又は欠失(群)を導入することができる。このような修飾は、ヌクレオチド配列の特異的な突然変異又は欠失の導入のための当該技術分野において公知の任意の方法、例えば化学的突然

50

変異誘発、インビトロ部位特異的突然変異誘発(Hutchinsonらの論文, 1978, J. Biol. Chem. 253: 6551)、PCTに基づいた方法などによって行うことができるが、これらに限定されない。

【0141】

加えて、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来遺伝子を適切な生物活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライシングすることにより、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術(Morrisonらの論文, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855; Neubergerらの論文, 1984, Nature, 312: 604-608; Takedaらの論文, 1985, Nature, 314: 452-454)を使用することができる。上記したように、キメラ抗体は、マウスmAbに由来する可変領域及びヒト抗体定常領域を有する分子、例えばヒト化抗体などの異なる部分が異なる動物種に由来する分子である。

10

【0142】

一旦、本発明の抗体分子をコードする核酸が得られたら、抗体分子の産生のためのベクターを、当該技術分野において周知の技術を使用する組換えDNA技術によって産生してもよい。従って、抗体分子配列を含む核酸を発現することにより本発明のタンパク質を調製するための方法が本明細書に記述される。当業者に周知の方法を使用して、抗体分子コード配列並びに適切な転写及び翻訳調節シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、例えばインビトロ組換えDNA技術、合成技術及びインビボ遺伝子組換えを含む。例えば、Sambrookらの文献、(1990、「分子クローニング、実験室マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, コールドスプリングハーバー, NY)及びAusubelらの文献、(eds., 1998、「分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)」, John Wiley & Sons, NY)に記述された技術を参照されたい。

20

【0143】

発現ベクターを従来技術によって宿主細胞に移し、次いで該トランスフェクト細胞を従来技術によって培養して、本発明の抗体を産生する。

本発明の組換え抗体を発現するために使用される宿主細胞は、大腸菌などの細菌細胞、又は好ましくは、特に組換え抗体分子全体の発現のためには真核細胞のいずれであってもよい。特に、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間初期遺伝子プロモーターエレメントなどのベクターと併用するチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)などの哺乳動物細胞は、抗体のための有効な発現系である(Foeckingらの論文, 1986, 45: 101 Gene; Cockettらの論文, 1990 Bio/Technology 8: 2)。

30

【0144】

種々の宿主-発現ベクター系を、本発明の抗体分子を発現させるために利用してもよい。このような宿主-発現系は、関心対象のコード配列を産生し、その後精製され得る媒体を表すだけでなく、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換されたか、又はトランスフェクトされたときに、本発明の抗体分子をインサイチューで発現し得る細胞も表してもよい。これらには、抗体コード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA若しくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌(例えば、大腸菌、枯草菌)などの微生物; 抗体コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母(例えば、サッカロミセス、ピチア); 抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)を感染させた昆虫細胞系; 組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV; タバコモザイクウイルス、TMV)を感染させたか、若しくは抗体コード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換された植物細胞系; 又は、哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター(例えば、メタロチオネインプロモーター)、又は哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター(例えばアデノウイルス後期プロモーター; ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)を含む組換え発現構築物を収容する哺乳動物細胞系(例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3細胞); を含むが、これらに限定されない。

40

【0145】

50

細菌系では、発現される抗体分子について意図される用途に応じて、多数の発現ベクターを都合よく選択してもよい。例えば、大量のこのようなタンパク質が産生されるときは、抗体分子を含む医薬組成物の産生のために、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を指揮するベクターが望ましいであろう。このようなベクターには、融合タンパク質が産生されるように抗体コード配列が個々にベクター内にlac Zコード領域とインフレームで結合され得る大腸菌発現ベクターpUR278(Rutherらの論文、1983、EMBO J. 2 : 1791) ; pINベクター(Inouye及びInouyeの論文、1985、Nucleic Acids Res. 13 : 3101-3109 ; Van Heeke及びSchusterの論文、1989、J. Biol. Chem. 24 : 5503-5509) ; などを含むが、これらに限定されない。また、pGEXベクターを使用して、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させてもよい。一般に、このような融合タンパク質は、可溶性であり、マトリックスグルタチオン-アガロースビーズへの吸着及び結合、続く遊離グルタチオンの存在下における溶出により、溶解した細胞から容易に精製することができる。pGEXベクターは、クローン化された標的遺伝子産物がGST部分から放出できるように、トロンピン又はXa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計される。

10

20

30

40

50

【0146】

昆虫系では、外来遺伝子を発現するためにベクターとしてキンウワバ(*Autographa californica*)核多角体病ウイルス(AcNPV)を使用する。このウイルスは、スポドプテラ・フルギベルダ(*Spodoptera frugiperda*)細胞内で成長する。抗体コード配列は、ウイルスの非必須領域(例えば、ポリヘドリン遺伝子)に個々にクローニングしても、AcNPVプロモーター(例えばポリヘドリン・プロモーター)の制御下に置いてもよい。哺乳動物宿主細胞では、多数のウイルスに基づいた発現系(例えば、アデノウイルス発現系)を利用してもよい。

【0147】

上で議論したように、挿入配列の発現を調節するか、又は所望の特異的様式で遺伝子産物を修飾し、プロセッシングする宿主細胞株を、選択してもよい。タンパク質産物のこのような修飾(例えば、グリコシル化)及びプロセッシング(例えば、切断)は、タンパク質の機能に重要であろう。

組換え抗体の長期多収の産生のためには、安定な発現が好ましい。例えば、関心対象の抗体を安定に発現する株化細胞は、抗体のヌクレオチド配列と選択可能なマーカー(例えば、ネオマイシン又はハイグロマイシン)のヌクレオチド配列とを含む発現ベクターで細胞をトランスフェクトし、選択可能なマーカーの発現について選択することによって産生することができる。このような操作された株化細胞は、特に抗体分子と直接又は間接に相互作用する化合物のスクリーニング及び評価に有用であろう。

【0148】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増加することができる(総説については、Bebbington及びHentschelの文献、「DNAクローニングにおける哺乳動物細胞内のクローニングされた遺伝子の発現のための遺伝子増幅に基づくベクターの使用(The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning)」、第3巻(Academic Press ニューヨーク、1987)を参照されたい)。抗体を発現するベクター系のマーカーが増幅可能なときは、宿主細胞の培養に存在する阻害剤のレベルを高め、マーカー遺伝子のコピー数を増加させる。増幅された領域は抗体遺伝子と関連しているので、抗体の産生も増加する(Crouseらの論文、1983、Mol. Cell Biol. 3 : 257)。

【0149】

宿主細胞には、第1のベクターが重鎖由来ポリペプチドをコードし、第2のベクターが軽鎖由来ポリペプチドをコードする本発明のふたつの発現ベクターを同時トランスフェクトしてもよい。ふたつのベクターは、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの同等の発現を可能にする同一の選択可能なマーカーを含んでいてもよい。或いは、重鎖及び軽鎖両ポリペプチドをコードする単一のベクターを使用してもよい。このような状況において、有毒な過剰の遊離重鎖を避けるために、軽鎖を重鎖の前に置くべきである(Proudfootの論文、1986、Natu

re, 322 : 52 ; Kohlerの論文、1980、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 2197)。重鎖及び軽鎖のコード配列には、cDNA又はゲノムDNAを含んでいてもよい。

【 0 1 5 0 】

一旦本発明の抗体分子が組換え発現されたならば、これを、抗体分子の精製のための当該技術分野において公知の任意の方法によって、例えばクロマトグラフィー(例えば、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインA又は特異的抗原との親和性クロマトグラフィー、及びサイズカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、差動的溶解度を含む標準的方法によって、又はタンパク質の精製のためのその他の任意の標準的技術によって精製してもよい。

【 0 1 5 1 】

或いは、任意の融合タンパク質を、発現される融合タンパク質に対して特異的な抗体を利用することによって容易に精製してもよい。例えば、Janknechtらの論文によって記述される系により、ヒト株化細胞において発現された非変性融合タンパク質の容易な精製が可能になる(Janknechtらの論文、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 8972-897)。この系では、遺伝子のオープンリーディングフレームが6ヒスチジン残基からなるアミノ末端タグに対して翻訳可能的に融合されるように、関心対象の遺伝子をワクシニア組換えプラスミドにサブクローニングする。タグは、融合タンパク質に対するマトリックス結合ドメインとして役立つ。組換えワクシニアウイルスを感染させた細胞からの抽出物を Ni^{2+} ニトリロ酢酸-アガロースカラムに添加して、ヒスチジンにタグを付けたタンパク質を、イミダゾール含有緩衝液で選択的に溶出させる。

【 0 1 5 2 】

次いで、これらの方法によって産生された抗体を、最初に関心対象の精製されたポリペプチドとの親和性及び特異性についてスクリーニングして、必要であれば、結合から除外されることが望まれるポリペプチドとの抗体の親和性及び特異性の結果と比較することによって選択してもよい。スクリーニング法には、マイクロタイタープレートの別々のウェルにおける精製ポリペプチドの固定化を含むことができる。次いで、可能性のある抗体又は抗体群を含む溶液をそれぞれのマイクロタイターのウェルに置き、約30分間～2時間インキュベートする。次いで、マイクロタイターのウェルを洗浄し、標識された二次抗体(例えば、生じた抗体がマウス抗体である場合、アルカリホスファターゼに複合した抗マウス抗体)をウェルに添加し、約30分間インキュベートし、その後洗浄する。基質をウェルに添加すると、固定されたポリペプチド(群)に対する抗体が存在する場合、呈色反応が現れる。

【 0 1 5 3 】

次いで、こうして同定された抗体を、選択したアッセイデザインでの親和性及び特異性について更に解析してもよい。標的タンパク質に関するイムノアッセイ法の開発では、精製した標的タンパク質は、選択された抗体を使用するイムノアッセイ法の感受性及び特異性を判断するための標準としての役割を果たす。種々の抗体の結合親和性は異なっていることがあるため、ある特定の抗体対(例えば、サンドイッチアッセイ法において)は、互いに例えば立体的に干渉する可能性があり、抗体のアッセイ性能は、抗体の絶対的な親和性及び特異性よりも重要な尺度となるであろう。

【 0 1 5 4 】

当業者であれば、多くのアプローチを抗体又は結合断片を産生し、並びに種々のポリペプチドに対する親和性及び特異性についてスクリーニング及び選択する際に採用することができることを認識するが、これらのアプローチは、本発明の範囲を変更しないであろう。

治療的用途に関して、抗体(特に、モノクローナル抗体)は、適切には、ヒト抗体又はヒト化された動物(例えば、マウス)抗体であってもよい。動物抗体は、免疫原としてヒトタンパク質(例えば、CRCMP)を使用して動物において生じさせてもよい。ヒト化は、典型的にはヒトフレームワーク領域内に、これにより同定されるCDRを移植することを含む。通常、鎖の高次構造を最適化するためにいくつかのその後のレトロ突然変異が必要とされる

10

20

30

40

50

。このような方法は、当業者に公知である。

【0155】

(アフィボディーの発現)

アフィボディーの構築は、他に記述されており(Ronnmark J, Gronlund H, Uhle ´ n, M., Nygren P.Aの論文, 「ヒト免疫グロブリンA(IgA) - タンパク質Aのコンビナトリアル操作からの特異的リガンド(Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A)」, 2002, Eur. J. Biochem. 269, 2647-2655.)、アフィボディーファージディスプレイライブラリーの構築を含む(Nord, K., Nilsson, J., Nilsson, B., Uhle ´ n, M. & Nygren, P.Aの論文, 「a-ヘリカル細菌受容体ドメインのコンビナトリアルライブラリー(A combinatorial library of an a-helical bacterial receptor domain)」, 1995, Protein Eng. 8, 601-608. Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhle ´ n, M. & Nygren, P.Aの論文, 「a-ヘリカル細菌受容体ドメインのコンビナトリアルライブラリーから選択された結合タンパク質(Binding proteins selected from combinatorial libraries of an a-helical bacterial receptor domain)」, 1997, Nat. Biotechnol.15, 772-777.)。

10

【0156】

また、バイオセンサー結合研究を使用する最適なアフィボディー変異体を調査するためのバイオセンサー解析も、他に記述されている(Ronnmark J, Gronlund H, Uhle ´ n, M., Nygren P.A, 「ヒト免疫グロブリンA(IgA) - タンパク質Aのコンビナトリアル操作からの特異的リガンド(Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A)」, 2002, Eur. J. Biochem. 269, 2647-2655.)。

20

【0157】

(複合された親和性試薬)

好ましい実施態様において、抗体又はそれらの断片などの抗-CRCMP親和性試薬は、診断的又は治療的部分に複合される。これらの抗体は、診断のために、又は所与の治療計画の有効性を決定するために使用することができる。検出は、検出可能な物質に対する抗体を結合することによって容易にすることができる。検出可能な物質の例には、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光材料、生物発光材料、放射性核種、ポジトロン放射金属(ポジトロン放出断層撮影での使用)及び非放射性常磁性金属イオンを含む。一般に、本発明に従った診断法として使用するために抗体に複合することができる金属イオンについての米国特許第4,741,900号を参照されたい。適切な酵素には、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ又はアセチルコリンエステラーゼを含み；適切な補欠分子族には、ストレプトアビジン、アビジン及びビオチンを含み；適切な蛍光物質には、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ネート、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、ダンシルクロリド及びフィコエリトリンを含み；適切な発光材料には、ルミノールを含み；適切な生物発光の材料には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン及びエクオリンを含み；並びに、適切な放射性核種には、¹²⁵I、¹³¹I、¹¹¹In及び⁹⁹Tcを含む。また、⁶⁸Gaも使用され得る。

30

【0158】

抗-CRCMP抗体又はそれらの断片は、所与の生物反応を修飾するために治療薬又は薬物部分に複合させることができる。治療薬部分又は薬物部分は、古典的な化学治療薬に限定されるものとして解釈されない。例えば、薬物部分は、所望の生物活性を有するタンパク質又はポリペプチドであってもよい。このようなタンパク質には、例えば、アブリン、リシンA、プソイドモナス外毒素若しくはジフテリア毒素などの毒素；腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲンアクチベータ、血栓薬又は抗血管新生薬剤、例えばアンジオスタチン若しくはエンドスタチンなどのタンパク質；又はリンホカイン、インターロイキン1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン6(IL-6)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、神経成長因子(NGF)若しくはその他の成長因子などの生体応答調節因子；を含んでいてもよい。

40

50

【 0 1 5 9 】

このような治療的部分を抗体に複合するための技術は周知であり、例えばArnonらの文献、「モノクローナル抗体及び癌治療(Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy)」における「癌治療における薬物の免疫ターゲティングのためのモノクローナル抗体(Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy)」、Reisfeldらの文献、(編)、pp. 243-56(Alan R. Liss社、1985)；Hellstromらの文献、「制御放出性薬物送達(Controlled Drug Delivery)」における「薬物送達のための抗体(Antibodies For Drug Delivery)」(第2版)、Robinsonらの文献、(編)、pp. 623-53(Marcel Dekker社 1987)；Thorpe、「モノクローナル抗体'84:生物学的及び臨床的適用(Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications)」における「癌療法における細胞障害薬の抗体担体：総説(Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review)」、Pincheraらの文献、(編)、pp. 475-506(1985)；「癌検出及び療法のためのモノクローナル抗体(Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy)」における「癌療法における放射標識された抗体の治療的使用の解析、結果及び将来の期待(Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy)」、Baldwinらの文献、(編)、pp. 303-16(Academic Press 1985)；及び、Thorpeらの論文、「抗体-毒素複合体の調製及び細胞障害特性(The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates)」、Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982)を参照されたい。これらの論文は、その全体が本明細書に組み込まれている。

10

【 0 1 6 0 】

20

或いは、Segalによって米国特許第4,676,980号に開示されたように、抗体を第二の抗体に複合させて、抗体ヘテロ結合を形態することもできる。

抗体は、これに複合された治療的部分の有無にかかわらず、単独で、又は細胞障害性因子(群)及び/若しくはサイトカイン(群)と組合せて投与される治療薬として使用することができる。

【 0 1 6 1 】

(マーカーパネルの同定)

本発明に従い、診断、予後、及び/又は好適な治療計画の決定に有用な、1種以上のマーカーを同定する方法及びシステムが提供される。当業者は、マーカーの一変量解析を行うことができ、複数のマーカーの一変量解析のデータを組合せて、いわゆる「n-of-m」法(例えば合計mマーカー(例えば3)中のnマーカー(例えば2)がある判定基準に合致する場合、この試験は陽性とみなされる)、多重線形回帰、相互作用項の決定、段階的回帰などを含む、様々な方法で、異なる病態を識別するためのマーカーパネルを形成することができることも認めるであろう。

30

【 0 1 6 2 】

そのような目的に有用なマーカーの同定に適した方法は、2002年12月24日に出願された米国特許仮出願第60/436,392号、2003年12月23日に出願されたPCT出願US03/41426、2002年12月27日に出願された米国特許出願第10/331,127号、及びPCT出願US03/41453に詳細に開示されており、これらは各々、表、図面及び「特許請求の範囲」を全て含むその内容全体が引用により本明細書に組み込まれている。下記の考察は、本発明のパネルを提供するために使用することができる方法の例示的考察を提供する。

40

【 0 1 6 3 】

マーカーパネルの開発において、ある種のマーカーの存在又はレベルを試験することにより、多くの可能性のあるマーカーに関するデータを、被験体群から得ることができる。被験体群は、ふたつのセットに分けられる。第一のセットは、疾患、転帰を有することが確認されている被験体、又はより一般的には第一の状態である被験体を含む。例えばこの患者の第一のセットは、結腸直腸癌の結果死亡した結腸直腸癌と診断された患者であってよい。以後、この第一のセットの被験体は、「罹患」と称す。

【 0 1 6 4 】

被験体の第二のセットは、単純に、第一のセットに収まらないものである。この第二の

50

セットの被験体は、以後「非罹患」と称す。第一のセット及び第二のセットは各々、ほぼ等しい数の被験体を有することが好ましい。このセットは、正常患者、及び/又は結腸直腸癌の別の原因に罹患している患者、及び/又は関心対象の特定のエンドポイントまで生存した患者であってよい。

【0165】

これらのセットの被験体から得られたデータは、好ましくは、複数のマーカーのレベルを含む。好ましくは、同じマーカーのセットに関するデータが各患者から入手可能である。このマーカーのセットは、特定の疾患又は状態の検出に関連することが疑われる全ての候補マーカーを含んでよい。実際に関連性がわかっている必要はない。本明細書に開示された方法及びシステムの実施態様を使用し、どの候補マーカーが疾患又は状態の診断に最も関連があるかを決定してよい。これら被験体のふたつのセットの各マーカーのレベルは、例えばガウス分布など、広範に分布されてよい。しかし分布のフィッティング(distribution fit)は不要である。

10

【0166】

前述のように、単独のマーカーは、予測的様式で被験体を第一群及び第二群に収まることを決定的に同定することができないことが多い。例えば罹患被験体及び非罹患被験体の分布において重複する領域内に収まるマーカーレベルを有する患者が測定される場合、この試験結果は、患者の診断には無用である。人工的カットオフ値を使用し、疾患又は状態を検出するために陽性と陰性の試験結果の間を識別することができる。どのカットオフ値が選択されるかは関係なく、診断道具としての単独のマーカーの有効性は影響を受けない。カットオフ値の変化は単に、単独のマーカーの使用から生じる偽陽性数と偽陰性数の間のトレードオフである。そのような重複を有する試験の有効性は、ROC(受信者動作特性)曲線を用いて表されることが多い。ROC曲線は、当業者に周知である。

20

【0167】

ROC曲線の横軸は、偽陽性率と共に増加する(1-特異度)を表す。この曲線の縦軸は、真陽性率と共に増加する感度を表す。従って選択された特定のカットオフ値に関して、(1-特異度)の値が決定され、対応する感度を得ることができる。ROC曲線下面積は、測定されたマーカーレベルが疾患又は状態を正しく同定することができる確率の測定値である。従ってROC曲線下面積を使用し、試験の有効性を決定することができる。

【0168】

前述のように、単独のマーカーレベルの測定は有用性が限定されることがあり、例えばこれは、炎症のために非特異的に増加することがある。追加マーカーの測定は、追加情報を提供するが、ふたつの潜在的に無関係の測定値のレベルを適切に組合せることは難しい。本発明の実施態様の方法及びシステムにおいて、罹患患者及び非罹患患者のセットに関する様々なマーカーレベルに関連しているデータは、有用なパネル応答を提供するマーカーパネルの開発に使用することができる。このデータは、Microsoft Access、Oracle、他のSQLデータベースなどのデータベースに又は単純にデータファイルに提供することができる。このデータベース又はデータファイルは、例えば氏名又は番号などの患者の識別子、存在する様々なマーカーのレベル、及び患者が罹患又は非罹患であるかどうかを含んでよい。

30

40

【0169】

次に人工的カットオフ領域は、最初に各マーカーに関して選択することができる。このカットオフ領域の位置は、最初に任意の点で選択することができるが、この選択は、以下に説明された最適化プロセスに影響を及ぼし得る。これに関して、疑われる最適位置近傍の選択は、最適化ツールのより迅速な収束を促進することができる。好ましい方法において、カットオフ領域は最初に、ふたつの患者セットの重複領域のほぼ中心に中心が置かれる。ひとつの実施態様において、カットオフ領域は、単純にカットオフ点であってよい。別の実施態様において、カットオフ領域は、0よりも大きいレンジス(length)を有してよい。これに関してカットオフ領域は、中心値及びレンジスの大きさにより規定されてよい。実際に、カットオフ領域の限界の最初の選択は、被験体の各セットの予め選択されたパ

50

ーセンタイル値に従い決定されてよい。例えば罹患患者の予め選択されたパーセンタイル値を上回る点は、カットオフ範囲の右(上)端として使用することができる。

【0170】

その後各患者の各マーカー値を、インジケータ(indicator)にマッピングすることができる。このインジケータは、カットオフ領域よりも小さいひとつの値及びカットオフ領域よりも大きい別の値に割り当てられる。例えばマーカーが一般に非罹患患者についてより低い値及び罹患患者についてより高い値を有する場合、ゼロインジケータが、特定のマーカーの低い値に割り当てられ、これは陽性診断の低い尤度の可能性を示す。別の実施態様において、インジケータは、多項式(polynominal)を基に算出されてよい。この多項式の係数は、罹患被験体と非罹患被験体の間のマーカー値の分布を基に決定されてよい。

10

【0171】

様々なマーカーの相対的重要性は、重み因子により示されてよい。重み因子は、最初に各マーカーの係数として割り当てられる。カットオフ領域のように、重み因子の最初の選択は、任意の許容できる値で選択されてよいが、この選択は、最適化プロセスに影響を及ぼし得る。これに関して、最適であると思われる位置近傍の選択は、最適化ツールのより迅速な収束を促進することができる。好ましい方法において、許容し得る重み係数は、0~1の範囲であってよく、各マーカーに関する初期重み係数は、0.5と割り当てられる。好ましい実施態様において、各マーカーに関する初期重み係数は、マーカーそれ自身の有効性と関連付けられる。例えば、ROC曲線は、単独のマーカーに関して作製されてよく、ROC曲線下面積は、そのマーカーの初期重み係数として使用されてよい。

20

【0172】

次にパネル応答を、ふたつのセットの各々の各被験体について計算することができる。パネル応答は、各マーカーレベルがマッピングされるインジケータ及び各マーカーの重み係数の関数である。好ましい実施態様において、各被験体(j)のパネル応答(R)は、以下のように表される：

【数1】

$$R_j = \sum w_i I_{ij}$$

30

(式中、iはマーカー指標であり、jは被験体指標であり、 w_i はマーカーiの重み係数であり、 I_{ij} はマーカーiのマーカーレベルが被験体jについてマッピングされるインジケータ値であり、 \sum は、全候補マーカーiの総和である。)。このパネル応答値は、「パネルインデックス」と称され得る。

【0173】

マーカー値よりもむしろインジケータ値を使用する利点のひとつは、並外れて高い又は低いマーカーレベルが、その特定のマーカーに関する罹患又は非罹患の診断の確率を変更しないことである。典型的には、あるレベルを上回るマーカー値は、一般にある状態を示す。そのレベルを上回るマーカー値は、同じ確実度でその状態を示す。従って並外れて高いマーカー値は、その状態の並外れて高い確率を示さないことがある。カットオフ領域の片側で一定であるインジケータの使用は、この懸念を排除する。

40

【0174】

パネル応答は、マーカーレベル並びに例えば患者の人種及び性別などの他の要因を含む、いくつかのパラメータの一般関数であることもできる。パネル応答に寄与する他の要因は、経時的な特定のマーカー値の勾配を含み得る。例えば患者は、特定のマーカーについて、最初の来院時に測定されてよい。同じマーカーが、時間経過後再度測定され、その変化レベルは、パネル応答において反映される。更に追加マーカーは、別のマーカーに由来してよく、これはパネル応答の値に貢献してよい。例えばふたつのマーカー値の比は、パ

50

ネル応答の計算における因子であることがある。

【0175】

各被験体のセットにおける各被験体に関するパネル応答を得、各セットに関するパネル応答の分布を、ここで解析することができる。有効パネルの選択を促進するために、目的関数を規定することができる。目的関数は一般に、例えば罹患被験体セットのパネル応答と非罹患被験体のパネル応答の重複により表されるので、これはパネルの有効性の指標である。この様式において、目的関数は、例えば重複を最小化することにより、パネルの有効性を最大化するように、最適化される。

【0176】

好ましい実施態様において、被験体のふたつのセットのパネル応答を表すROC曲線を使用し、目的関数を規定することができる。例えば目的関数は、ROC曲線下面積を反映することができる。曲線下面積を最大化することにより、マーカ-のパネルの有効性を最大化することができる。別の実施態様において、ROC曲線の別の特徴を用い、目的関数を規定することができる。例えばROC曲線の勾配が1と等しい点は、有用な特徴である。別の実施態様において、感度及び特異度の積が最大である点は、時には「屈曲点(knee)」と称され、これを使用することができる。ある実施態様において、屈曲点での感度は最大化される。更なる実施態様において、予め決定された特異度レベルでの感度を、目的関数の規定に使用してよい。別の実施態様は、予め決定された感度レベルでの特異度を使用してよい。更に別の実施態様においては、2種以上のこれらのROC曲線の特徴の組合せを使用してよい。

10

20

【0177】

パネルのマーカ-のひとつは、診断される疾患又は状態に特異的であることが可能である。そのようなマーカ-がある閾値を上回り又は下回り存在する場合は、このパネル応答は「陽性」試験結果に回帰するよう設定されてよい。しかし閾値が満足されない場合、このマーカ-レベルは、目的関数への可能性のある寄与因子として使用されることはない。

【0178】

最適化アルゴリズムを使用し、目的関数を最大化又は最小化することができる。最適化アルゴリズムは、当業者に周知であり、Simplex法及び他の条件付き最適化法を含む、通常利用可能ないくつかの最小化又は最大化関数を含む。当業者には、一部の最小化関数は、局所的な最小点よりも、大域的な最小点を検索する点で他のものよりも優れていることが理解される。最適化プロセスにおいて、ひとつのマーカ-につき少なくともふたつの自由度を提供するために、各マーカ-に関するカットオフ領域の位置及びサイズは、変動させることができる。このような可変パラメータは、本明細書において独立変数と称される。好ましい実施態様において、各マーカ-の重み係数も、最適化アルゴリズムの反復にわたり変動することができる。様々な実施態様において、これらのパラメータの順列(permutation)は、独立変数として使用されてよい。

30

【0179】

前述のパラメータに加え、各マーカ-の向き(sense)も、独立変数として使用してよい。例えば多くの場合において、ある種のマーカ-についてより高いレベルが、罹患状態又は非罹患状態を一般的に示すかどうかは不明であることがある。このような場合、最適化プロセスを両側で検索することが有用であることがある。実際にこれはいくつかの方法で実現されてよい。例えばひとつの実施態様において、この向きは、最適化プロセスにより正と負の間で入れ替えることができる、真に個別の独立変数であってよい。或いはこの向きは、重み係数を負とすることにより実行されてよい。

40

【0180】

最適化アルゴリズムは、更にある種の制約を伴い提供されてよい。例えば得られるROC曲線は、特定の値よりも大きい曲線下面積を提供するように制約されてよい。曲線下面積0.5を有するROC曲線は、完全な無秩序を示すのに対し、曲線下面積1.0は、ふたつのセットの完全な分離を反映している。従って特に目的関数が曲線下面積を組み込まない場合に、0.75のような最小許容値を制約として使用することができる。他の制約は、特定のマー

50

カーの重み係数に対する限定を含んでよい。追加の制約は、1.0などの特定の値に、全重み係数の総和を限定してよい。

【0181】

最適化アルゴリズムの反復は、一般に、目的関数を最小化又は最大化しながら、これらの制約を満足するように独立パラメータを変動する。最適化プロセスにおいて反復の回数は、制限されてよい。更に最適化プロセスは、2連続反復の間の目的関数の差異が予め決定された閾値を下回った時点で終結されてよく、これは最適化アルゴリズムが、局所的最小又は最大の領域に到達したことを示す。

【0182】

従って最適化プロセスは、各マーカーの重み係数及びマーカー値のインジケータへのマッピングのためのカットオフ領域を含む、マーカーのパネルを提供することができる。その後ある種のマーカーを変更し、更にはパネルから排除することができ、このプロセスは、満足できる結果が得られるまで繰り返される。パネルの各マーカーの有効寄与を決定し、マーカーの相対的重要性を同定することができる。ひとつの実施態様において、最適化プロセスから得られる重み係数を使用し、各マーカーの相対的重要性を決定することができる。最低係数を伴うマーカーは、排除されるか又は交換されてよい。

【0183】

場合によっては、より低い重み係数は、低い重要性の指標ではないことがある。同様により高い重み係数は、高い重要性の指標ではないことがある。例えば最適化プロセスは、関連マーカーが診断と無関係である場合に、高い係数を生じることがある。この場合、この係数をより低くする利点は存在しないであろう。この係数の変動は、目的関数の値に影響を及ぼさないであろう。

【0184】

(マーカーパネルの評価)

試験精度を決定するために、前記方法による比較のために2種以上の群への被験体の選択をもたらす「既に確立した標準基準(gold standard)」の試験判定基準を選択することができる。結腸直腸癌症例において、この既に確立した標準基準は、癌胎児性抗原(CEA)試験であってよい。これは、この既に確立した標準基準に対する陰性のものが結腸直腸癌ではないことを暗示する。或いは、確認された結腸直腸癌被験体の最初の比較は、正常な健康対照被験体との比較であってよい。予後の場合、死亡率は、一般的試験判定基準である。

【0185】

診断及び/又は予後試験の感度及び特異度は、その試験の解析の「品質」そのもの以外に左右され、これらは異常な結果を構成するものの定義にも左右される。実際、受信者動作特性曲線又は「ROC曲線」は、典型的には、変量を「正常」集団及び「罹患」集団におけるその相対頻度に対しプロットすることにより計算される。任意の特定のマーカーに関して、疾患を伴う又は伴わない被験体に関するマーカーレベルの分布は、重複する可能性がある。このような条件下で、試験は精度100%で正常を罹患から絶対的に識別することはなく、重複領域は、その試験が正常を罹患から識別することができないことを示している。閾値が選択され、その値を上回る(又はマーカーがその疾患によりどのように変化するかによっては、それを下回る)と、その試験は異常であるとみなし、その値を下回ると、その試験は正常であるとみなす。ROC曲線下面積では、得られた(perceived)測定値は、状態の正確な同定をもたらす確率の測定値である。ROC曲線は、試験結果が必ずしも正確な数値をもたらさない場合であっても、使用することができる。結果を階層化することができる限りは、ROC曲線を作製することができる。例えば「罹患」試料に対する試験結果は、程度に応じ階層化してよい(1 = 低、2 = 正常、及び3 = 高と称す)。この階層化は、「正常」集団の結果に対して関連づけることができ、ROC曲線が作製される。これらの方法は、当該技術分野において周知である。例えば、Hanleyらの論文、Radiology 143: 29-36 (1982)を参照されたい。

【0186】

10

20

30

40

50

試験精度の測定は、Fischerらの論文、Intensive Care Med. 29: 1043-51, 2003に説明されたように得ることができ、所与のマーカ―又はマーカ―パネルの有効性を決定するために使用することができる。これらの測定は、感度及び特異度、予測値、尤度比、診断オッズ比、並びにROC曲線面積を含む。前述のように、好ましい試験及びアッセイは、これらの様々な測定に関する下記の結果の1つ以上を示す：

・少なくとも75%特異度と組合せた、少なくとも75%の感度；

・少なくとも0.6、より好ましくは0.7、更により好ましくは少なくとも0.8、なお更により好ましくは少なくとも0.9、最も好ましくは少なくとも0.95のROC曲線面積；及び/又は【0187】

・少なくとも約70%の特異度、より好ましくは少なくとも約80%の特異度、なお更により好ましくは少なくとも約85%の特異度、更により好ましくは少なくとも約90%の特異度、最も好ましくは少なくとも約95%の特異度と組合せた、少なくとも約70%の感度、より好ましくは少なくとも約80%の感度、なお更により好ましくは少なくとも約85%の感度、更により好ましくは少なくとも約90%の感度、最も好ましくは少なくとも約95%の感度。特に好ましい実施態様において、感度及び特異度の両方は、少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約80%、なお更により好ましくは少なくとも約85%、更により好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%である。この文脈において用語「約」は、所与の測定値の+/-5%を意味する；及び/又は【0188】

・少なくとも約1.5以上又は約0.67以下、より好ましくは少なくとも約2以上又は約0.5以下、更により好ましくは少なくとも約5以上又は約0.2以下、なお更により好ましくは少なくとも約10以上又は約0.1以下、最も好ましくは少なくとも約20以上又は約0.05以下の陽性尤度比及び/又は陰性尤度比。この文脈において用語「約」は、所与の測定値の+/-5%を意味する。陽性尤度比の場合、1の値は、陽性結果が、「罹患」及び「対照」両群の被験体間で等しく起こりうることを示し；1よりも大きい値は、陽性結果が、罹患群においてより起こりうることを示し；並びに、1未満の値は、陽性結果が、対照群においてより起こりうることを示す。陰性尤度比の場合、1の値は、陰性結果が、「罹患」及び「対照」両群の被験体間で等しく起こりうることを示し；1よりも大きい値は、陰性結果が、試験群においてより起こりうることを示し；並びに、1未満の値は、陰性結果が、対照群においてより起こりうることを示す；及び/又は【0189】

・少なくとも約2以上又は約0.5以下、より好ましくは少なくとも約3以上又は約0.33以下、更により好ましくは少なくとも約4以上又は約0.25以下、なお更により好ましくは少なくとも約5以上又は約0.2以下、最も好ましくは少なくとも約10以上又は約0.1以下のオッズ比。この文脈において用語「約」は、所与の測定値の+/-5%を意味する。オッズ比の場合、1の値は、陽性結果が、「罹患」及び「対照」両群の被験体間で等しく起こりうることを示し；1よりも大きい値は、陽性結果が、罹患群においてより起こりうることを示し；並びに、1未満の値は、陽性結果が、対照群においてより起こりうることを示す；及び/又は【0190】

・少なくとも約1.1以上又は約0.91以下、より好ましくは少なくとも約1.25以上又は約0.8以下、更により好ましくは少なくとも約1.5以上又は約0.67以下、なお更により好ましくは少なくとも約2以上又は約0.5以下、最も好ましくは少なくとも約2.5以上又は約0.4以下のハザード比。この文脈において用語「約」は、所与の測定値の+/-5%を意味する。ハザード比の場合、1の値は、エンドポイント(例えば死亡)の相対リスクが、「罹患」及び「対照」両群において等しいことを示し；1よりも大きい値は、そのリスクが、罹患群においてより大きいことを示し；並びに、1未満の値は、そのリスクが、対照群においてより大きいことを示す。【0191】

一旦複数のマーカ―がマーカ―パネルにおける使用に関して確定されたならば、そのよ

うなパネルは、個人を、例えば診断目的、予後目的及び/又は治療目的で評価するために使用することができる。ある実施態様において、個々のマーカーの濃度は、1つ以上の特定の診断、予後及び/又は治療計画に組み込むか又は除外するために、予め選択されているレベル(「閾値」)と各々比較することができる。これらの実施態様において、被験体の選択されたマーカーレベルの各々の相関は、特定の診断の指標である関心対象の各マーカーの閾値との比較を含むことができる。同様に、被験体のマーカーレベルの各マーカーの予後閾値との相関により、被験体が将来1種以上の有害な転帰に冒される確率を決定することができる。

【0192】

別の実施態様において、パネル内の1種以上のマーカーに関する特定の閾値は、被験体から得られたマーカーレベルのプロファイルが、特定の診断又は予後に相関するかどうかの決定には頼らない。むしろ本発明はマーカーの全プロファイルの評価を利用し、単独の結果値(例えば数値スコア又はリスク率のいずれかとして表される「パネル応答」値)を提供することができる。このような実施態様において、マーカーのあるサブセットにおける増加、減少又は他の変化(例えば経時的勾配)は、一人の患者の特定の状態又は将来の転帰を示すのに十分であることができるのに対し、マーカーの異なるサブセットにおける増加、減少又は他の変化は、別の患者の同じ又は異なる状態又は転帰を示すのに十分であることができる。

【0193】

様々な実施態様において、1種以上のマーカーの複数の決定を行うことができ、これらのマーカーの時間的变化は、1種以上の特定の診断及び/又は予後を組み込むか又は除外するために使用することができる。例えば1種以上のマーカーは、最初の時点で決定され、第二の時点で再度決定されてよく、経時的マーカーレベル(群)の変化(又はそれらの欠如)が決定される。そのような実施態様において、最初の時点から第二の時点までのマーカーの増加は、特定の予後、特定の診断などの指標であることができる。同様に、最初の時点から第二の時点までのマーカーの減少は、特定の予後、特定の診断などの指標であることができる。このようなパネルにおいて、マーカーは、互いに呼応する変化は不要である。1種以上のマーカーの時間的变化も、マーカーパネルの識別力を増加するために、単独の時点のマーカーレベルと一緒に使用することができる。更に別の代替において、「パネル応答」をマーカーとして処理することができ、及びパネル応答の時間的变化は、特定の予後、診断などの指標であることができる。

【0194】

本明細書において詳細に説明されるように、複数のマーカーを組合せ、個別にマーカーから得られたものと比較して、解析の予測値を増大させることが好ましい。このようなパネルは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20種以上の又は個別のマーカーを含んでよい。当業者は、診断マーカー、鑑別診断マーカー、予後マーカー、発症時点マーカーなどを、単独のアッセイ又は器具と組み合わせることができることも理解するであろう。例えば、ひとつの器具又は装置により測定されるあるマーカー類を使用し、予後を提供することができるのに対し、この器具又は装置により測定されるマーカー類の異なるセットは、特定の療法を組み入れ及び/又は除外することができ；これらのマーカーセットの各々は、独自のマーカーを含むか、又は他方のセットの一方若しくは両方と重複するマーカーを含むことができる。マーカーは通常、複数の目的のために、例えば解析パラメータ(例えば異なる中間点、線形範囲ウィンドウ及び/又は重み因子)の異なるセットを、異なる目的(群)用のマーカー(群)に適用することにより使用されてもよい。

【0195】

本明細書において例示的パネルが説明されているが、臨床的に有用な結果を提供しつつ、1種以上のマーカーを、これらの例示的パネルから交換、追加又は差し引いてよい。パネルは、関心対象の条件の特異的マーカー及び/又は非-特異的マーカー(例えば関心対象の状態のために増加又は減少したが、他の状態においても増加するマーカー)の両方を含むことができる。ある種のマーカーは、本明細書に説明された方法において個別に限定す

ることはできないが、変化の特定の「フィンガープリント」パターンは、病態の特異的インジケータとして事実上作用することができる。前述のように、その変化のパターンは、単独の試料から得ることができるか、又は任意にそのパネルの1以上のメンバーの時間的变化(パネル応答値の時間的变化)とみなすことができる。

【0196】

(治療計画との併用)

全ての具体的な非特異的症状の潜在的原因は、状態の巨大で多様なセットであるので、これらの潜在的原因に関する好適な治療は、同様に巨大で多様であり得る。しかし一旦診断が得られたならば、臨床医は、診断に適合する治療計画を容易に選択することができる。当業者は、本明細書に説明された診断法に関連して考察された多くの疾患に関する適した治療を知っている。例えば、「メルクマニュアル診断及び治療(Merck Manual of Diagnosis and Therapy)」、17版、Merck Research Laboratories, ホワイトハウスステーション, NJ, 1999を参照されたい。

10

【0197】

加えて本明細書に説明された方法及び組成物は、予後情報を提供することができるので、本発明のパネル及びマーカーを使用し、治療コースをモニタリングすることができる。例えば改善された又は悪化した予後の状態は、特定の治療が有効又は無効であることを示し得る。用語「テラノスティック(theranostic)」を使用し、特定の個人について得られた試験結果を基にその個人に関する診断療法をあつらえるプロセスを説明する。テラノスティックは、疾患の存在を同定することのみに関係する従来の診断よりも優れている。テラノスティックは、疾患の予測リスク、疾患の診断、リスクに関する患者の階層化、及び治療反応のモニタリングの1種以上を含むことができる。本発明の診断的及び/又は予後の方法は、有利なことに療法計画に組み込まれ、その結果個人が受けた治療の特徴は、少なくとも一部、本方法の結果により導かれ、これにより個人の治療計画を個別化しかつ最適化することができる。

20

【0198】

(結腸直腸癌の治療及び予防)

結腸直腸癌は、結腸直腸癌を有する疑いがあるか、又は結腸直腸癌を有する、若しくは結腸直腸癌を発病するリスクがあることが既知である被験体に対して、結腸直腸癌を有する被験体の血清において、結腸直腸癌がない被験体の血清と比較して差動的に存在する1種以上のCRCMPのレベル又は活性(すなわち機能)を調節する(すなわち増大又は減少させる)化合物を投与することによって治療又は予防することができる。一つの実施態様において、結腸直腸癌は、結腸直腸癌を有する疑いがあるか、又は結腸直腸癌を有する、若しくは結腸直腸癌を発病するリスクがあることが既知である被験体に対して、結腸直腸癌を有する被験体の血清において減少された1種以上のCRCMPのレベル又は活性(すなわち機能)をアップレギュレートする(すなわち増大させる)化合物を投与することによって治療又は予防することができる。別の実施態様において、結腸直腸癌を有する被験体の血清において増大された1種以上のCRCMPのレベル又は活性(すなわち機能)をダウンレギュレートする化合物が投与される。そのような化合物の例には：CRCMP、CRCMP断片及びCRCMP-関連ポリペプチド；CRCMP、CRCMP断片及びCRCMP-関連ポリペプチドをコードしている核酸(例えば遺伝子治療における使用のため)；並びに、酵素活性を有するそれらのCRCMP又はCRCMP-関連ポリペプチドについて、その酵素活性を調節することがわかっている化合物又は分子；を含むが、これらに限定されない。使用することができるその他の化合物、例えばCRCMPアゴニストは、インビトロでのアッセイ法を使用して同定することができる。

30

40

【0199】

また、結腸直腸癌は、結腸直腸癌を有する疑いがあるか、又はそれを有する若しくは結腸直腸癌を発病するリスクがあることが既知である被験体に対して、結腸直腸癌を有する被験体の血清において増大された1種以上のCRCMPのレベル又は活性をダウンレギュレートする化合物の投与によって治療又は予防される。別の実施態様において、結腸直腸癌を有する被験体の血清において減少された1種以上のCRCMPのレベル又は活性をアップレギュレ

50

ートする化合物が投与される。このような化合物の例には、CRCMPアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、CRCMPに対する抗体(又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)、CRCMPの酵素活性を阻害する化合物を含むが、これらに限定されない。その他の有用な化合物、例えばCRCMPアンタゴニスト及び小型分子CRCMPアンタゴニストは、インビトロアッセイ法を使用して同定することができる。

【0200】

好ましい実施態様において、療法又は予防法は、個々の被験体の必要に合わせられる。従って具体的実施態様において、1種以上のCRCMPのレベル又は機能を促進する化合物は、結腸直腸癌を有する疑いがあるか、又はそれを有することが既知であり、前記1種以上のCRCMPのレベル又は機能を欠くか、又は対照又は正常基準範囲に対して相対的に減少している被験体に、治療的又は予防的に投与される。更なる実施態様において、1種以上のCRCMPのレベル又は機能を促進する化合物は、結腸直腸癌を有する疑いがあるか、又はそれを有することが既知であり、前記1種以上のCRCMPのレベル又は機能が対照又は基準範囲に対して相対的に増大している被験体に、治療的又は予防的に投与される。更なる実施態様において、1種以上のCRCMPのレベル又は機能を減少させる化合物は、結腸直腸癌を有する疑いがあるか、又はそれを有することが既知であり、前記1種以上のCRCMPのレベル又は機能が対照又は基準範囲に対して相対的に増大している被験体に、治療的又は予防的に投与される。更なる実施態様において、1種以上のCRCMPのレベル又は機能を減少させる化合物は、結腸直腸癌を有する疑いがあるか、又はそれを有することが既知であり、前記1種以上のCRCMPのレベル又は機能が対照又は基準範囲に対して相対的に減少している被験体に、治療的又は予防的に投与される。このような化合物の投与によるCRCMPの機能又はレベルの変化は、例えば試料(例えば、血液若しくは尿)を得ること、及び前記CRCMPのレベル若しくは活性、又は前記CRCMPをコードするmRNAのレベル、又は前述の任意の組み合わせをインビトロでアッセイすることによって容易に検出することができる。このようなアッセイ法は、本明細書に記述したように、化合物の投与の前後に行うことができる。

【0201】

本発明の化合物は、CRCMPプロフィールを正常の方向へ回復させる任意の化合物、例えば小型有機分子、タンパク質、ペプチド、抗体(又はアフィボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)、核酸など含むが、これらに限定されない。本発明の化合物は、任意の他の化合物と組合せて投与されてもよい。

【0202】

(結腸直腸癌の免疫療法及び予防)

CRCMPは、結腸直腸癌を引き起こし、維持するか又は転移につながるタンパク質に対する免疫応答を生じる免疫原性組成物(適切には、ワクチン)において有用であることができる。従って配列番号:1-18により規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチド及び/又はそれらの1種以上の抗原性若しくは免疫原性断片を含むワクチンが、本発明に従い提供される。また、配列番号:1-18により規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチド及び/又はそれらの1種以上の抗原性若しくは免疫原性断片、及び1種以上の好適なアジュバントを含む免疫原性組成物が提供される。このような組成物は、被験体、例えばヒトにおける免疫応答の誘起に有用である。また、免疫原性組成物、好ましくはワクチンの調製における、配列番号:1-18により規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチド及び/又はそれらの1種以上の抗原性若しくは免疫原性断片の使用が提供される。また、被験体における結腸直腸癌を治療若しくは予防する方法、又は結腸直腸癌に対し被験体をワクチン接種する方法が提供され、これは、配列番号:1-18により規定されたタンパク質からなるリストから選択されたタンパク質に由来する1種以上の可溶性ポリペプチド及び/又はそれらの1種以上の抗原性若しくは免疫原性断片の有効量を、好ましくはワクチンとして、被験体へ投与する工程を含む。

【0203】

好適な免疫原性断片は、長さが少なくとも10個のアミノ酸、例えば長さが少なくとも12個のアミノ酸、好適には長さが少なくとも15個のアミノ酸である。

好適なアジュバントは、当業者に周知である(「ワクチン設計-サブユニット及びアジュバントアプローチ(Vaccine design-the subunit and adjuvant aproach) (1995) Plenum Pressを参照されたい)。

【0204】

(造影技術によるCRCMP存在量の決定)

造影技術によるCRCMPの存在量を決定することの利点は、そのような方法は非侵襲的であり(試薬投与を不要にする)及び被験体から試料を採取する必要がないことである。

好適な造影技術は、ポジトロン放出断層撮影(PET)及び単光子放出コンピュータ断層撮影(SPECT)を含む。このような技術を使用するCRCMPの可視化は、適切なラベル、例えば¹⁸F、¹¹C又は¹²³Iなどの放射性トレーサの取込み又は結合が必要である(例えば、本技術の更なる詳細について、NeuroRx-The Journal of the American Society for Experimental Neuro Therapeutics (2005) 2(2), 348-360及び同上のページ361-371を参照されたい)。放射性トレーサ又は他の標識は、適切に標識された特異的リガンドの被験体に対する投与によって(例えば、注射によって)、CRCMPへ取り込むことができる。或いはこれらは、被験体に(例えば、注射によって)投与してもよいCRCMPに特異的な結合親和性試薬(抗体、アフイボディー、ナノボディ、ユニボディなど)へ取り込むことができる。造影のためのアフイボディーの使用に関する考察については、例えばOrlova A、Magnusson M、Eriksson TL、Nilsson M、Larsson B、Hoiden-Guthenberg I、Widstrom C、Carlsson J、Tolmachev V、Stahl S、Nilsson FY、「ピコモル親和性HER2結合アフイボディー分子を使用する腫瘍造影(Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding affibody molecule)」、Cancer Res.2006年4月15日;66(8):4339-48を参照されたい。

【0205】

(免疫組織化学を使用する結腸直腸癌の診断及び治療)

免疫組織化学は、優れた検出技術であり、従って結腸直腸癌の診断及び治療において非常に有用である。免疫組織化学は、蛍光色素、酵素、放射性元素又はコロイド金などのマーカーにより可視化される抗原-抗体相互作用による特異的試薬として、CRCMPへ特異的に結合する標識された抗体(又はアフイボディー、ナノボディ若しくはユニボディなどの他の親和性試薬)、それらの誘導体及び類似体の使用により、組織切片中のCRCMP抗原の局在化を通じて、結腸直腸癌を検出、診断、又はモニターするために使用されてよい。

【0206】

モノクローナル抗体技術の進歩は、ヒト新生物の最新の高精度顕微鏡診断における免疫組織化学の立場を確証する上で重大な意味を有する。免疫組織化学による散在性の新生物性に形質転換された細胞の同定は、癌の侵襲及び転移、更には増大した悪性度に対する免疫表現型に関連した腫瘍細胞の進展の明確な像をもたらす。将来の抗新生物治療のアプローチは、各個々の患者の新生物疾患に関連した特定の免疫表現型パターンに特異的な、様々な個人化された免疫療法を含むであろう。更なる考察に関しては、例えば、Bodey Bの文献、「新生物の診断及び療法における免疫組織化学の重要性(The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms)」、Expert Opin Biol Ther. 2002 Apr;2(4):371-93を参照されたい。

【0207】

本発明の各態様の好ましい特徴は、変更すべき所は変更し、他の態様の各々についてもあてはまる。本明細書において言及した先行技術の文献は、法律的に許される最大程度で組み込まれる。

【実施例】

【0208】

(実施例1: 結腸直腸癌組織試料において発現される膜タンパク質の同定)

下記参照プロトコールを使用し、結腸直腸癌組織試料から抽出された膜タンパク質を、1Dゲルから抽出し、分析した。

10

20

30

40

50

(1.1 材料及び方法)

(1.1.1 - 細胞膜分画)

結腸直腸腺癌上皮から回収した細胞を溶解し、1000Gでの遠心分離に供した。上清を収集し、これを引き続き3000Gで遠心した。再度上清を収集し、次に100000Gで遠心した。

得られたペレットを回収し、15-60%ショ糖勾配上に配置した。

【0209】

ウェスタンブロットを用い、細胞内マーカーを同定し、細胞膜画分をプールした。

プールした溶液を、直接1Dゲルに泳動するか(下記1.1.4項参照)、又は以下に説明するように、ヘパリン結合画分及びヌクレオチド結合画分に更に分画した。

【0210】

(1.1.2 - 細胞膜ヘパリン-結合画分)

前記1aからプールした溶液を、ヘパリンカラムに装加し、カラムから溶出し、1Dゲル上を流した(下記1d項参照)。

【0211】

(1.1.3 - 細胞膜(plasma)ヌクレオチド-結合画分)

前記1.1.1からプールした溶液を、Cibacrom Blue 3GAカラムに装加し、カラムから溶出し、1Dゲル上を流した(下記1.1.4項参照)。

【0212】

(1.1.4 - 1Dゲル技術)

タンパク質又は膜のペレットを、1D試料緩衝液中に可溶化した(1~2 µg/µl)。次にこの試料緩衝液及びタンパク質混合液を、95 °Cで3分間加熱した。

その全体は引用により本明細書に組み込まれている、Ausubel F.M.らの編集した文献、1989, 「分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)」, Vol. II, Green Publishing Associates社, 及びJohn Wiley & Sons社, ニューヨーク, 10.2項に説明された手順に従い、9-16%アクリルアミド勾配ゲルを、濃縮用ゲル及び濃縮用櫛と共に成形した。

【0213】

界面活性剤から得られたタンパク質混合物30~50 µg及び分子量標準(66、45、31、21、14kDa)を、10 µlのピペットチップを用い、濃縮用ゲルのウェルに添加し、試料を40mAで5時間流した。

その後プレートをこじ開け、ゲルを固定液(10%酢酸、40%エタノール、50%水)のトレイに配置し、一晚振盪した。これに続きゲルをプライマー溶液(7.5%酢酸(75ml)、0.05% SDS(10% 5ml))中で振盪し、30分間プライミング(prime)した。次にゲルを、蛍光色素(7.5%酢酸、0.06%OGSインハウス色素(600 µl))と共に、3時間振盪しながらインキュベーションした。Sypro Red(Molecular Probes, Inc., ユージーン, OR)は、この目的に適した色素である。好ましい蛍光色素は、1999年10月5日に出願された米国特許出願第09/412,168号に開示されており、これはその内容全体は引用により本明細書に組み込まれている。

【0214】

コンピュータ可読出力を、Apollo 3スキャナー(Oxford Glycosciences社、オックスフォード、英国)で蛍光染色したゲルをイメージングすることにより作製した。このスキャナーは、それらの各内容は引用により本明細書に組み込まれている、WO 96/36882、及びP h.D. David A. Basijiの学位論文「内部反射光及び相-感受性検出を使用するハイスループット蛍光スキャナーの開発(全内部反射、電気泳動)(Development of a High-throughput Fluorescence Scanner Employing Internal Reflection Optics and Phase-sensitive Detection(Total Internal Reflection, Electrophoresis))」、ワシントン大学、(1997)、Dissertation Abstracts International, 58/12-B巻6686頁に開示されたスキャナーから開発されている。この装置の最新の実施態様は、下記の改善点を含む: ゲルは、精密な送りネジ駆動システム上でスキャナーを通り運搬される。これは、Basijiの学位論文において定義されたベルト駆動システム上のガラスプレート上に好ましくは配置され、撮像光学を通りゲルを正確に運搬する再現可能な手段を提供する。

10

20

30

40

50

【0215】

ゲルは、既知の位置でガラスプレートを堅く保持する3種のアラインメントストップでスキャナへ固定される。これを、前述の正確な運搬システム、及びゲルがガラスプレートに結合するという事実と組合せて行うことにより、ゲルの絶対位置を予測しかつ記録することができる。このことは、ゲル上の各特徴の正確な座標を、切り出しのためのカットングロボットに伝達することを確実にする。このカットングロボットは、位置の正確さを保つために、ガラスプレートと同一の取付位置を有する。

【0216】

その場にゲルを保持するキャリヤは、複合蛍光マーカー(M1、M2、M3と命名されている)を有し、該マーカーはイメージの外形を補正するのに使用され、かつ走査が正確に行われたことを保証する品質管理特徴である。

10

【0217】

システムの光学部品は倒置される。レーザー、鏡、導波管及び他の光学部品は、この時走査されるガラスプレート上にある。Basijiの学位論文の実施態様では、これらは下側にある。従ってガラスプレートは、走査ゲル側を下側にした上に取付られ、その結果ガラスプレートを通る光路が維持される。これを行うことにより、ガラスプレートから引き離れ得る全てのゲル粒子が、光学系へよりもむしろ装置の底へ降下するであろう。

【0218】

ゲルの走査において、ゲルを染色から取り出し、水ですすぎ、簡単に空気乾燥させ、Apollo 3でイメージングした。イメージングの後、ゲルを、少量の染色液を含むポリエチレンバッグに密閉し、次いで4 で保存した。

20

見かけの分子量を、試料と平行して泳動した既知の分子量マーカーセットから内挿することにより算出した。

【0219】

(1.1.5 - 選択されたタンパク質の回収及び分析)

タンパク質は、米国特許第6,064,754号(引用により本明細書に組み込まれている)、5.4及び5.6、5.7、5.8節に開示されたプロセスにより、1D-電気泳動に適用可能なように、以下のようにロボットカッターを改変し、ゲルからロボットを使用し切り出した：カッターは、レーンの上端から開始し、レーンの左端から直径1.7mmのゲルディスクを切り出す。次にカッターは、右側に2mm移動し、0.7mm下がり、更なるディスクを切り出す。その後これを繰り返す。次にカッターは、最初のゲル切断の真下、しかし2.2mm下側にずれた(offset)位置に戻り、三本の対角切断(three diagonal cut)パターンが繰り返される。これがゲルの全長について継続される。

30

【0220】

注意：レーンが、著しく広く見える場合は、横向きに補正を行い、すなわち、先のゲル切断の真下の位置に戻る代わりに、切断は、左(レーンの左)及び/又は右(レーンの右)にわずかにずらすことができる。ゲル断片中に含まれたタンパク質は、処理し、トリプシン分解ペプチドを産生した；これらのペプチドの部分的アミノ酸配列は、W098/53323及び1998年6月15日に出版された出願09/094,996号に開示された質量分析により決定した。

【0221】

40

タンパク質は、処理し、トリプシン分解ペプチドを産生した。トリプシン処理ペプチドを、PerSeptive Biosystems Voyager-DETM STRマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析計を使用する質量分析によって解析し、選択されたトリプシン処理ペプチドを、ナノフロー(登録商標)エレクトロスプレーZスプレー源を装備した4重極飛行時間型(Q-TOF)質量分析計(Micromass社、アルトリンカム、英国)を使用するタンデム型質量分析(MS/MS)によって解析した。CRCMPの部分的アミノ酸配列決定及び同定のためには、トリプシン処理ペプチドの解釈されてないタンデム質量スペクトルを、SEQUEST検索プログラムバージョンv.C.1(Engらの論文, 1994、J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5: 976-989)を使用して検索した。データベースによる同定のための基準には：トリプシンの切断特異性；データベースから返されたペプチドにおける、a、b及びyイオンセットの検

50

出、並びにカルバミドメチル化を考慮した全てのシステイン残基での質量の増加を含んだ。検索したデータベースは、国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)によって保持される非冗長データベースのタンパク質の登録で構築されるデータベースであり、これはhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/でアクセス可能である。SEQUESTプログラムを使用するスペクトル-スペクトル相関を介したタンパク質の同定に続いて、MALDI-TOF質量スペクトルにおいて検出された質量を、同定されたタンパク質内にあるトリプシン分解ペプチドに割り当てた。SEQUESTプログラムを使用するトリプシン分解ペプチドの未解釈のMS/MSスペクトルでの検索を介してもアミノ酸配列が同定できない場合には、ペプチドのタンデム質量スペクトルを当該技術分野において公知の方法を使用して手動で解釈した(ペプチドイオンの低エネルギーによる断片化の質量スペクトルを解釈する場合には、Gaskellらの文献、1992, Rapid Commun Mass Spectrom. 6: 658-662を参照されたい)。

10

【0222】

(1.1.6 - 結腸直腸癌関連タンパク質の識別)

CRCMPを同定する方法では、上記の質量分析によって実験的に得られた天然に存在するヒトタンパク質のペプチド配列を使用して、公開されたヒトゲノム配列においてコードされたエキソンを同定し組織化する。

【0223】

ヒトゲノムの化学配列を明らかにすることにおける最近の劇的な進歩により、この莫大な課題が完成間近になった(Venter, J.C.らの論文,(2001)「ヒトゲノムの配列(The sequence of the human genome.)」Science, 16: 1304-51; International Human Genome Sequencing Consortium.の論文(2001)「ヒトゲノムの一次塩基配列決定及び解析(Initial sequencing and analysis of the human genome.)」Nature 409: 860-921)。この配列情報は、我々が、分子進化、比較ゲノム科学、病理メカニズム及び分子医薬を含む多くの生物学的過程を理解する上で、実質的な衝撃を有することにはほぼ疑いがない。ヒトゲノムの配列に固有の完全な医学的価値が実現されるためには、ゲノムが「組織化」され、注釈付けされる必要がある。これは、少なくとも以下の3つのことを意味する。(i)ゲノムの個々の部分の配列を、それぞれの染色体の明瞭で連続的な配列に構築すること。(ii)遺伝子を含むそれぞれの染色体の領域の明白な同定。(iii)遺伝子の微細構造及びそのmRNAとタンパク質産物の特性の決定。「遺伝子」の定義は、ますます複雑な問題である一方で(H Pearsonの文献:「遺伝子とは何か(What is a gene?)」Nature, (2006)24: 399-401)、薬物発見及び薬物開発の現在の関心事は、機能的な発現タンパク質をコードするこれらの遺伝子の目録である。これらの遺伝子のサブセットは、全てとまではいかないがほとんどの病態の分子基盤に関与している。従って製薬産業にとって重要な現在の目標は、ヒトゲノムにおいて全てのこのような遺伝子を同定し、これらの微細構造を記述することである。

20

30

【0224】

(OGAP(登録商標)データベースを形成するための、ペプチド質量、ペプチドの特徴、EST及び公共ドメインゲノム配列データの処理並びに統合)

別々の遺伝学的単位(エキソン、転写物及び遺伝子)を以下の一連の工程を使用して同定した:

1. Ensembl及び種々の遺伝子予測プログラムから利用できる遺伝子同定を組合せることにより、ヒトゲノムに位置づけるトリプシン処理ペプチドを含む「仮想トランスクリプトーム」を作製する。また、これには、遺伝子同定におけるSNPデータ(dbSNPから)及び全ての選択的スプライシングを組み込む。また、公知の混入物を仮想トランスクリプトームに付加する。

40

【0225】

2. OGeS質量分析データベースの全てのタンデムスペクトルを、仮想トランスクリプトームのひとつに対して位置づけることができるペプチドを産生するように解釈する。一連の自動化されたスペクトル解釈アルゴリズムを使用してペプチド同定を行う。

3. 典型的には20ppmという質量分析計の質量精度に基づいた寛容性を使用して、タンデムペプチドによってヒットした転写物由来の全てのペプチドを検索することにより、OGeS

50

質量分析データベースの全ての質量がマッチしたペプチドのセットを作製する。

【0226】

4. 全てのタンデムペプチド及び質量がマッチしたペプチドを、「タンパク質クラスター」の形態で組合せる。これは、共通のペプチドヒット数に基づいて配列をクラスターにグループ化する再帰的過程を使用してなされる。生物学的配列は、それらがひとつ以上のタンデムペプチド又は質量がマッチしたペプチドを共有する場合に、同じクラスターに属するとみなされる。

5. 誤って同定したペプチドを除外するための初期のフィルタリング後に次いで、生じたクラスターをヒトゲノムに対して位置づける。

【0227】

6. 次いで、タンパク質クラスターを、その近接度及びタンパク質クラスター内のそれぞれのペプチドの同時観察を使用して、予備的遺伝子境界線を定義する領域に集約させる。近接度は、同じ染色体の同じ鎖上の80,000ヌクレオチド内に存在するペプチドとして定義される。クラスター観察スコアリング及びゲノムに対する複数マッピングに基づいた種々の排除則を使用して出力結果を洗練する。生じる「確認された遺伝子」が、それぞれのクラスターにおける質量分析によって観察されるペプチド及び質量を最もよく説明するものである。また、遺伝子の公称座標がこの段階の出力結果である。

【0228】

7. それぞれの確認された遺伝子の転写物の最もよいセットを、タンパク質クラスター、ペプチド、EST、候補エキソン及び元のタンパク質スポットの分子量から作製する。

8. それぞれの同定された転写物を、観察されたペプチドを提供する試料と関連させる。

9. データを考察し、マイニングするためのアプリケーションの使用。工程1~8の結果は、それぞれが多数のエキソン及びひとつ又は複数の転写物からなる遺伝子を含むデータベースである。この組み込まれたゲノム/プロテオームデータを表示し、及び検索するためのアプリケーションを書いた。Ensemblと同じGolden経路座標系に位置づけられた任意の特徴(OMIM疾患座、InterProその他)を、位置及び微細構造の一致によって、これらの遺伝子に相互参照することができるであろう。

【0229】

(結果)

本方法を使用して、およそ1,000,000個のペプチド配列を作製して、タンパク質をコードする遺伝子及びそれらのエキソンを同定し、結果として膀胱癌で506遺伝子、乳癌で4,713遺伝子、パーキットリンパ腫で767遺伝子、子宮頸癌で1,372遺伝子、結腸直腸癌で949遺伝子、肝細胞癌で1,783遺伝子、CLLで2,425遺伝子、肺癌で978遺伝子、メラノーマで1,764遺伝子、卵巣癌で1,033遺伝子、膵臓癌で2,961遺伝子、及び前立腺癌で3,308遺伝子を含む、67の異なる組織及び57の疾患にわたる18083個の遺伝子のタンパク質配列を同定し、これらは結腸直腸癌試料から単離及び同定されたタンパク質のリストに示した。実験的に決定された配列とOGAP(登録商標)データベースの配列とを比較後、表に列記されたCRCM PIは、結腸直腸癌に対して高度に特異的であり、予後及び診断性質を示すことが示された。

【0230】

(1.2 結果)

これらの実験は、表1に列記されたように、18種の異なる遺伝子に対応する、結腸直腸癌に関連した特徴を同定した。前述の分画プロトコールに従い各特徴の給源を、下記表4に詳述する。

【0231】

10

20

30

40

【表 5】

表4：1Dゲルにより検出された特徴の起源

CRCMP 番号	細胞膜画分1D	細胞膜 ヘパリン 結合画分	細胞膜 ヌクレオチド 結合画分
1	√		√
2	√		√
5			√
6	√		
7	√		
8		√	
9	√		
10	√		
12		√	√
14		√	
17	√		√
18	√	√	√
19	√		
20	√		
22	√	√	√
23			√
25	√	√	√
26	√		

10

20

【0232】

(実施例2：結腸直腸癌組織試料中で発現された膜タンパク質の可溶性型の同定)

30

下記の例証的かつ非限定的手順を使用し、血清を等電点電気泳動、それに続くSDS-PAGEにより分析し、先の実施例1において同定されたその特徴に相当するタンパク質を、それらの循環型で特徴づけた。

【0233】

(2.1 材料及び方法)

(2.1.1 試料調製)

それぞれの血清試料について受け取り次第、タンパク質濃度アッセイ(Pierce BCA Cat# 23225)を行った。タンパク質分離の前に、関心対象のタンパク質の解析を妨げる、又は限定するかもしれないタンパク質を除去することによってタンパク質の分離の質を高め単純化し、解析を容易にするために、それぞれの試料には、一定のタンパク質の選択的除去のための処理を行った。1999年6月1日に出願された国際特許出願第PCT/GB99/01742を参照されたく、その全体は、特に3及び6ページに関して、引用により組み込まれる。

40

【0234】

血清からのアルブミン、ハプトグロビン、トランスフェリン及び免疫グロブリンG(IgG)の除去(「血清枯濁」)をアフィニティークロマトグラフィー精製工程によって行い、試料をアルブミン、ハプトグロビン、及びトランスフェリンの選択的除去のための固定化した抗体、並びに免疫グロブリンGの選択的除去のためのプロテインGを含む、一連の>Hi-Tra pカラムに通した。直列型に組み立てた2本のアフィニティークラムは、抗体をHi-Trapカラムに含まれるプロテインG-セファロースに結合させることによって調製した(プロテインG-セファロースHi-Trapカラム(1ml)Pharmacia Cat. No. 17-0404-01)。これは、カラム

50

に以下の溶液を続けて循環させることにより行った：(1)ダルベッコリン酸緩衝食塩水(Gibco BRL Cat. No. 14190-094)；(2)濃縮抗体溶液；(3)200mM炭酸ナトリウム緩衝液、pH8.35；(4)架橋溶液(200mM炭酸ナトリウム緩衝液、pH8.35、20mMジメチルピメリミダート)；及び、(5)500mMエタノールアミン、500mM NaCl。次いで、第3の(誘導体化していない)プロテインG Hi-Trapカラムを直列型に組み立てたカラムの下端に取り付けた。

【0235】

該クロマトグラフィーの手順は、7回までの一連の実行を続けて行うことができるように、Akta Fast Protein Liquid Chromatography(FPLC)システムを使用して自動化した。試料を、一連の3本のHi-Trapカラムを通し、そこで、アフィニティークロマトグラフィー媒体が選択的に上記タンパク質に結合し、これにより試料から除去される。カラムへの添加や洗浄段階の間にカラムを通して溶出した非吸着物質の画分(「素通り画分」)及びImmunopure Gentle Ag/Ab Elution Buffer(Pierce Cat. No. 21013)での段階溶出により溶出した結合タンパク質の画分(吸着/溶出画分)(典型的には1チューブあたり3ml)を回収した。非吸着物質を含む溶出液を画分で回収し、これをプールし、遠心限外濾過により脱塩/濃縮し、2D PAGEによる更なる解析まで貯蔵した。

【0236】

およそ300 µgの総タンパク質を含む、枯渇した血清量を分注し、等量の10%(w/v)SDS(Fluka 71729)、2.3%(w/v)ジチオスレイトール(BDH 443852A)を添加した。試料を95℃で5分間加熱し、次いで20℃まで冷却した。次いで、125 µlの以下の緩衝液を試料に添加した：

8M尿素(BDH 452043w)

4% CHAPS(Sigma C3023)

65mM ジチオスレイトール(DTT)

2%(v/v)レゾライト(Resolytes) 3.5-10(BDH 44338 2×)

この混合物を激しく攪拌し、13,000rpmで5分間15℃にて遠心分離し、上清を後述するように等電点電気泳動によって分離した。

【0237】

(2.1.2 等電点電気泳動)

等電点電気泳動(IEF)は、製造業者の説明書に記述される手順に従ってイモビライン7ドライストリップキット(Pharmacia BioTech社)を使用して行った。イモビライン7ドライストリップキット、Pharmacia社、# 18-1038-63、エディションABに関する説明書を参照されたい(その全体が、引用により本明細書に組み込まれる)。固定化pH勾配(IPG)ストリップ(18cm、直線勾配でないpH3-10ストリップ；Pharmacia Cat. # 17-1235-01)を、イモビラインドライストリップユーザーズマニュアルに記載されているように8M尿素、2%(w/v)CHAPS、10mM DTT、2%(v/v)レゾライト3.5-10の溶液中で20℃にて一晩再水和させた。IEFについては、50 µlの上清(上記のように調製した)をストリップの塩基側末端に置かれたカップ充填ユニットでストリップに充填した。次いで、充填したゲルを鉱油(Pharmacia 17-3335-01)で覆い、すぐに電圧を、Pharmacia EPS3500XL電力供給装置(Cat 19-3500-01)を使用して、以下のプロフィールに従ってストリップにかけた：

初期電圧=300V、2時間

3時間にわたって300Vから3500Vまでの直線傾斜

3500Vにて19時間保持

この過程の全段階について、電流の上限を12本のゲルで10mAに設定し、ワット数の上限を5Wとした。温度は、操作の全体において20℃に保った。

【0238】

(2.1.3 ゲル平衡化及びSDS-PAGE)

最終的な19時間の工程の後、ストリップをすぐに取り出し、以下の組成の第1の溶液：6M尿素；2%(w/v)DTT；2%(w/v)SDS；30%(v/v)グリセロール(Fluka 49767)；0.05M Tris/HCl、pH6.8(Sigma Cat T-1503)；中に20℃にて10分間浸漬した。ストリップを第1の溶液から取り出して、以下の組成の第2の溶液：6M尿素；2%(w/v)ヨードアセトアミド(Sigma

10

20

30

40

50

I-6125) ; 2% (w/v) SDS ; 30% (v/v) グリセロール ; 0.05M Tris/HCl、pH6.8 ; 中に20 にて10分間浸漬した。第2の溶液からの除去の後、ストリップを以下に明記したような修飾を伴うHochstrasserらの1988年、分析生化学 (Analytical Biochemistry) 173 : 412-423に従って、SDS-PAGEの支持ゲル上に装加した (その全体が、引用により本明細書に組み込まれる)。

【 0 2 3 9 】

(2.1.4 支持ゲルの調製)

ゲルは、以下の寸法のふたつのガラス板の間で成形した : 幅23cm x 長さ24cm (裏板) ; 幅23cm x 長さ24cmで中央19cmに深さ2cmの切れ込みを持つ (前板)。SDS-PAGEゲルの共有結合を促進するために、裏板を -メタクリル-オキシプロピルトリメトキシシラン (BindSilaneJ ; Pharmacia Cat. #17-1330-01) の0.4%エタノール溶液で処理した。前板を (RepelSilaneJ Pharmacia Cat. #17-1332-01) で処理してゲルの接着を減少させた。過剰な試薬を水で洗浄することによって除去し、プレートを乾燥させた。この段階で、ゲルの識別として、及びプレートのコートした表面を同定するためのマーカーとして、接着性のバーコードをゲルマトリックスと接触しないような位置の裏板に貼った。

10

【 0 2 4 0 】

乾燥プレートを、13個のゲルサンドイッチを収納できる成形箱で組み立てた。それぞれのサンドイッチの前板及び裏板は、厚さ1mm、幅2.5cmのスペーサーによって間隔を空けた。サンドイッチには、ゲル重合後のサンドイッチの分離を容易にするために、アセテートシートを挟んだ。次いで、Hochstrasserら、前掲の方法に従って成形を行った。

20

【 0 2 4 1 】

9~16%の直線的ポリアクリルアミド勾配は、アンジェリケ勾配成形システム (Large Scale Biology) を使用して、前板の切れ込みレベルの2cm下の点に及ぶように成形した。保存液は、以下の通りであった。アクリルアミド (40%の水溶液) は、Serva社からのものであった (Cat. #10677)。架橋剤は、PDA (BioRad 161-0202) であり、最初の総モノマー含量の2.6% (w/w) の濃度であった。ゲル緩衝液は、0.375M Tris/HCl、pH8.8であった。重合触媒は、0.05% (v/v) TEMED (BioRad 161-0801) であり、開始剤は、0.1% (w/v) APS (BioRad 161-0700) であった。SDSは、ゲルには含まず、濃縮用ゲルを使用しなかった。成形ゲルを、一晚20 にて重合させ、次いで、それぞれ6mlのゲル緩衝液と共に密封したポリエチレンバッグ中で4 にて貯蔵し、4週以内に使用した。

30

【 0 2 4 2 】

(2.1.5 SDS-PAGE)

0.5% (w/v) アガロース (Fluka Cat 05075) の溶液を泳動用緩衝液 (0.025M Tris、0.198M グリシン (Fluka 50050)、1% (w/v) SDS、微量のプロムフェノールブルーを補った) で調製した。アガロース懸濁液を攪拌しながら70 まで、アガロースが溶解するまで加熱した。支持された二次元目のゲルの上部をアガロース溶液で満たし、平衡化したストリップをアガロース中に置き、ゲルが二次元目のゲルと密接に接触するまで、パレットナイフで穏やかにたたいた。ゲルを、Amessらの文献、1995、Electrophoresis, 16 : 1255-1267 (その全体が引用により本明細書に組み込まれる) によって記述されているように、二次元目の泳動用タンクに置いた。タンクを、緩衝液のレベルがポリアクリルアミドを含んだ二次元目ゲルの領域の上部より高くなるまで (上記の) 泳動用緩衝液で満たし、そうすることにより、活性なゲル領域の効率的な冷却を行った。泳動用緩衝液を、ゲルで形成された上部緩衝液コンパートメントに添加し、次いで、Consort E-833電力供給装置を使用して直ちに電圧をゲルにかけた。一時間、ゲルを20mA / ゲルにて泳動した。ワット数の上限を150Wに設定し、6枚のゲルを含むタンクの場合、電圧の上限を600Vに設定した。1時間後、次いでゲルを40mA / ゲルにて、以前と同じボルト及びワット数の上限で、プロムフェノールブルーの線がゲルの下端から0.5cmのところまで泳動した。緩衝液の温度は、操作の間中16 に保った。

40

【 0 2 4 3 】

(2.1.6 染色)

50

電気泳動操作が完了したら、ゲルを固定のためにタンクから直ちに取り出した。ゲルカセットの上部プレートを慎重に除去し、ゲルを床板に結合したままにした。次いで、そのゲルが付着したままの床板を12枚のゲルを収容することができる染色装置内に置いた。ゲルを40% (v/v) エタノール (BDH 28719)、10% (v/v) 酢酸 (BDH 100016X)、50% (v/v) 水 (MilliQ-Millipore社) の固定液に完全に浸漬し、これをゲル全体にわたって連続的に循環させた。一晚保温の後、固定液をタンクから排出し、ゲルを7.5% (v/v) 酢酸、0.05% (w/v) SDS、92.5% (v/v) 水中での30分間の液浸によってプライムした。次いで、プライミング溶液を排出し、ゲルを4時間Sypro Red (Molecular Probes社、ユージーン、OR) の染色液に完全に液浸することによって染色した。この目的のために使用することができる代替の色素は、1999年10月5日に出願の米国特許出願第09/412168号に記述されており、その全体は引用により本明細書に組み込まれる。

10

【0244】

(2.1.7 ゲルのイメージング)

コンピュータ可読出力を、Apollo 2スキャナー (Oxford Glycosciences社、オックスフォード、英国) で蛍光染色したゲルをイメージングすることにより作製した。このスキャナーは4つの複合蛍光マーカー (M1、M2、M3、M4と命名されている) をもつゲルキャリアを有し、該マーカーはイメージの外形を補正するのに使用され、かつ走査が正確に行われたことを保証する品質管理特徴である。

走査のためには、ゲルを染色から取り出し、水ですすぎ、簡単に空気乾燥させ、Apollo 2でイメージングした。イメージングの後、ゲルを、少量の染色液を含むポリエチレンバッグに密閉し、次いで4 で保存した。

20

【0245】

(2.1.8 データのデジタル解析)

データは、より詳細に以下に記載したとおり、米国特許第6,064,654号 (国際公開第98/23950号として公開した) の5.4節及び5.5節 (引用により本明細書に組み込まれる) に記載されているように処理した。

スキャナーからの出力は、最初にMELANIE 7 II 2D PAGE解析プログラム (リリース2.2、1997、BioRad Laboratory社、ハーキュリーズ、カリフォルニア、Cat. #170-7566) で処理して、位置決め点M1、M2、M3及びM4を自動検出し；イメージを自動トリミングし (すなわち、ゲルの境界の外側に存在する走査イメージの領域、例えば参照フレームから生じるシグナルを除去し)；粉塵による人為的結果をフィルターで除き；特徴を検出及び定量化し；及びGIF形式のイメージファイルを作製する。特徴は、以下のパラメータを使用して検出した：

30

平滑度 = 2

ラプラシアン閾値 50

部分閾値 1

彩度 = 100

とがり度 = 0

最小周囲長 = 10

【0246】

(2.1.9 等電点及び分子量値の割り当て)

ランドマーク同定を使用してイメージで検出された特徴の等電点及び分子量を決定した。16個のランドマーク特徴を、標準的な血清イメージにおいて同定した。

可能な限り多くのこれらのランドマークを、それぞれのゲルイメージデータセットにおいて同定した。次いで、試験ゲルのそれぞれの特徴には、ふたつの最も近いランドマークに一次補間又は補外 (MELANIE 7-IIソフトウェアを使用する) することにより等電点値を割り当て、ふたつの最も近いランドマークに一次補間又は補外 (MELANIE 7-IIソフトウェアを使用する) することにより分子量値を割り当てた。

40

【0247】

(2.1.10 主要マスターイメージとのマッチング)

50

イメージを、粉塵などの著しい人為的結果を除去するために、タンパク質特徴が不鮮明になるなどの著しい異常のあるイメージ、又は試料の添加量が少なすぎて、若しくは全体のイメージ強度が小さすぎて最も強い特徴以外を同定できないようなイメージ、又は解像度が不十分すぎて特徴の正確な検出ができないようなイメージを排除するために編集した。次いで、イメージを全部の試料セットからの一つの共通のイメージと対にすることによって比較した。この共通のイメージである「主要マスターイメージ」を、タンパク質添加量(最大特徴検出と一致する最大添加量)、十分に分離されたミオグロビン領域(ミオグロビンを内部標準として使用した)及び一般的な画質に基づいて選択した。加えて、主要マスターイメージを、解析に含まれる全てのイメージの一般的な代表と思われるイメージであるように選択した。(主要マスターゲルを、試験ゲルの代表であると判断することによってこの過程は、以下に記述した方法で再チェックされ、主要マスターゲルが代表的ではないと見なされた場合には、これを排除して、代表的な主要マスターゲルが見いだされるまで本過程を繰り返した。)

10

後述するように、残りの試験ゲルのそれぞれを、主要マスターイメージと個々にマッチさせ、共通のタンパク質の特徴を主要マスターイメージと個々の試験対象ゲルイメージとの間で対にした。

【0248】

(2.1.11 試料間のクロスマッチング)

それぞれの試験ゲルの形状を以下のようにタンパク質の特徴のパターンと主要マスターのパターンとの間で最大にマッチするように調整した。それぞれの試験ゲルのイメージを、多分解能ワーピング法を使用して主要マスターイメージの形状に個々に変形した。この手順では、試料間の電気泳動分離過程の物理的パラメータの小さな変化によってもたらされる歪みについてイメージ形状を修正する。観察される変化は、見いだされた歪みが単に形状の歪みではなく、むしろ平滑な流れであるが、局所的及び全体的規模で変化があるようなものである。

20

【0249】

多分解能モデリングの基本的原理は、平滑なシグナルが、「スケールスペース」を介した進化としてモデル化され得ることであり、連続的でより微細なスケールでの詳細が低分解近似値に付加して高分解能シグナルが得られる。このタイプのモデルは、(参照イメージ上のそれぞれの画素位置にて定義される)ベクトルの流動領域に適用され、任意の滑らかさの流動を、比較的自由度をもたせずにモデル化することができる。それぞれのイメージを初期イメージに由来するスタック又はピラミッドのイメージにまで減少させるが、あらゆるレベルでそれぞれの方向のふたつの要素(ガウシアンピラミッド)によって分解能を平滑化させて減少させ、対応する異なったイメージも各レベルで計算して、平滑化イメージとその先祖との間の相違(ラプラシアンピラミッド)を表す。従って、ラプラシアンイメージは、異なるスケールでイメージの詳細を表す。

30

【0250】

任意のふたつの所与のイメージ間の歪みを見積もるために、ピラミッドにおいてレベル7で(すなわち、7回の連続した分解能の減少後に)計算を行った。ラプラシアンイメージを、両方向の隣接するグリッド位置間で50%重複して16×16ピクセルの格子に分割し、参照及び試験イメージについて対応する格子正方形間の交差相関を計算した。次いで、相関マトリックスの最大の位置まで歪み変位を与えた。全ての歪みが特定のレベルにて算出された後で、これらをピラミッドの次のレベルに組み込んで、試験イメージに適用し、次いで該変位に対する更なる補正を次のスケールで算出した。

40

【0251】

ワーピング処理により、主要マスターイメージとその他の試料のイメージとの間における共通の特徴に優れた整列をもたらした。MELANIE7 II 2D PAGE解析プログラムを使用して、主要マスターイメージとその他のイメージのそれぞれとの間で、およそ500~700のマッチした特徴対を算出して記録した。このプログラム精度は、上記の様式でイメージを整列することによって有意に増強された。なお更に精度を改善するために、全ての対を、最

50

最終的にMelView相互作用編集プログラムにおいて目で試験し、残った識別できるほどに誤った対を除去した。このような識別できるほどに誤った対の数が、(同じ生体試料の繰り返し解析によって測定される)技術の全体の再現性を上回った場合、主要マスターゲルであると選択されたゲルは、主要マスターゲルとして使用するための試験ゲルの代表には不十分と判断した。その場合、主要マスターゲルとして選ばれたゲルを却下して、異なるゲルを主要マスターゲルとして選択し、この過程を繰り返した。

次いで、全てのイメージは、一緒に加算して複合マスターイメージを作製し、全ての成分イメージの全てのゲルの特徴の位置及び形状を後述するようにこの複合マスターに重ね合わせた。

【0252】

一旦全ての初期対が計算され、修正され、保存されると、二番目の工程が行われ、それにより、元の(歪んでいない)イメージを主要マスターの形状に二度目に変形して、この時には、対となったゲル特徴の重心によって定義される多数の連結点の平滑な補間によって計算される流れ場を使用した。従って、複合マスターイメージは、主要マスターイメージをその特徴の記述子で初期化することによって作製した。それぞれのイメージを主要マスター形状に変形させたので、これをデジタル的に一画素ずつ複合マスターイメージにたし合わせて、上で概説した手順で対にならなかった特徴を同様に複合マスターイメージの記述に加算し、これらの重心を、流れ場補正を使用してマスター形状に合わせた。

【0253】

処理の最終段階を複合マスターイメージ及びその特徴の記述子に適用すると、これは、この時点で共通の形状に変形された研究の全てのイメージの全ての特徴を表す。特徴をこれらの間の重複の程度に従って、関連したセット又は「クラスター」と一緒にグループ化した。次いで、それぞれのクラスターには、特有に同定できるインデックスである分子クラスターインデックス(MCI)を与えた。

MCIは、異なるイメージ上のマッチした特徴のセットを同定する。従って、MCIは、異なる試料における2D分離で同等の位置で溶出するタンパク質又はタンパク質群を表する。

【0254】

(2.1.12 プロフィールの構築)

最終複合マスターイメージに対する試験の全ての成分ゲルのマッチングの後に、それぞれの特徴の強度を測定して、保存した。この解析の最終結末は、それぞれの同定された特徴について：1)複合マスターイメージ(MCI)の中の対応する特徴に関連した特有の識別コード、2)ゲル内の特徴のx、y座標、3)タンパク質アイソフォームの等電点(pI)、4)タンパク質アイソフォームの見かけの分子量(MW)、5)シグナルの値、6)それぞれの前述の測定についての標準偏差、及び7)この特徴がマッチしたマスターゲルに対してそれぞれの特徴のMCIに関連づける方法、を含むデジタルプロフィールを作り出した。実験室情報管理システム(LIMS)により、このMCIプロフィールによってこれを作製した実際の保存されたゲルを突き止めることができ、その結果、ゲルプロファイルデータベースのコンピュータ解析によって同定されるタンパク質を検索することができる。また、LIMSにより、プロフィールを元の試料又は患者にまでさかのぼることも可能となった。

【0255】

(2.1.13 選択したタンパク質の回収及び解析)

タンパク質アイソフォームを、ロボットを使用して切り出して、処理し、トリプシン分解ペプチドを産生した。トリプシン処理ペプチドを、PerSeptive BioSystems Voyager-DETM STRマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析計を使用する質量分析によって解析し、選択されたトリプシン処理ペプチドを、ナノフロー(登録商標)エレクトロスプレー Zスプレー源を装備した4重極飛行時間型(Q-TOF)質量分析計(Micromass社、アルトリンカム、英国)を使用するタンデム型質量分析(MS/MS)によって解析した。タンパク質アイソフォームの部分的アミノ酸配列及び同定のためには、トリプシン処理ペプチドの解釈されてないタンデム質量スペクトルをSEQUEST検索プログラムバージョンv.C.1(Engらの文献、1994、J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5: 976-989)を使用して検

10

20

30

40

50

索した。データベースによる同定のための基準には：トリプシンの切断特異性；データベースから返されたペプチドにおける、a、b及びyイオンセットの検出、並びにカルバミドメチル化を考慮した全てのシステイン残基での質量の増加を含んだ。検索したデータベースは、国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)によって保持される非冗長データベースのタンパク質の登録で構築されるデータベースであり、これは<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>でアクセス可能である。SEQUESTプログラムを使用するスペクトル-スペクトル相関を介したタンパク質の同定に続いて、MALDI-TOF質量スペクトルにおいて検出された質量を、同定されたタンパク質内にあるトリプシン分解ペプチドに割り当てた。SEQUESTプログラムを使用するトリプシン分解ペプチドの未解釈のMS/MSスペクトルでの検索を介してもアミノ酸配列が同定できない場合には、ペプチドのタンデム質量スペクトルを当該技術分野において公知の方法を使用して手動で解釈した(ペプチドイオンの低エネルギーによる断片化の質量スペクトルを解釈する場合には、Gaskellらの文献、1992, Rapid Commun Mass Spectrom. 6: 658-662を参照されたい)。

10

【0256】

(2.1.14 結腸直腸癌に関連したタンパク質の識別)

実施例1の1.1.6節に説明されたプロセスを使用し、実験試料中の結腸直腸癌に関連したタンパク質を識別した。

(2.2 結果)

これらの実験は、表2に列記されたCRCMPを同定した。

【0257】

(実施例3：サンドイッチELISAにおける結腸直腸癌マーカータンパク質の評価)

下記参照プロトコルを使用し、表1及び2に列記された結腸直腸癌マーカータンパク質(CRCMP)を、サンドイッチELISAにおいて評価した。

【0258】

(3.1 材料及び方法)

サンドイッチELISAのための抗体は、Biositeで開発した。ビオチン化された抗体(一次抗体)を、アッセイ緩衝液(10mM トリス, 150mM NaCl, 1% BSA)に2 µg/mlとなるよう希釈し、384ウェルのニュートラアビジンでコートされたプレート(Pierce Chemical Company, ロックフォード, IL)に添加し、室温で1時間インキュベーションした。次にウェルを、洗浄用緩衝液(20mM ホウ酸塩, 150mM NaCl, 0.2% Tween 20)で洗浄した。試料及び標準を添加し、室温で1時間インキュベーションした。ウェルを再度洗浄した。フルオレセインに複合した抗体(二次抗体)を、アッセイ緩衝液へ2 µg/mlとなるよう希釈し、その後プレートへ添加し、室温で1時間インキュベーションした。ウェルを再度洗浄した。アルカリホスファターゼに複合した抗-フルオレセイン抗体を、アッセイ緩衝液へ1/2338希釈し、添加し、室温で1時間インキュベーションした。その後最終洗浄を行った。最終的に基質(Promega Attophos Product#S1011, Promega Corporation, マジソン, WI)を添加し、プレートを迅速に読み取った。全ての添加は、10 µl/ウェルであった。プレートは、各添加の間に3回洗浄し、最終洗浄は、基質添加前に9回行った。標準を、特異的抗原を正常血清の患者プールにスパイクすることにより調製した。読み取りは、Tecan Spectrafluor plus (Tecan Inc, マンドルフ, スイス)を用い、励起フィルター430nm及び放出フィルター570nmで、6回の読みサイクルについてキネティックモードで行った。RFU/秒の勾配を決定した。

30

40

最終のBox及びROC結果を、Analyse-it General+Clinical Laboratory 1.73 (Analyse-it Software Ltd., リーズ, 英国)を用いて解析した。

【0259】

(3.2 結果)

これらの実験は、特に関心のあるCRCMPを同定し、これはCRCMP#19(配列番号:13)、CRCMP#9(配列番号:7)、CRCMP#6(配列番号:4)、CRCMP#22(配列番号:15)及びCRCMP#10(配列番号:8)を含むが、これらに限定されるものではない。

【0260】

50

図1-4は、各々、CRCMP#19、CRCMP#6、CRCMP#22及びCRCMP#10に関するボックスプロットデータを示す。図3では縦軸がシグナル反応であること以外、これらの図の縦軸は、CRCMP濃度(ng/ml)である。これらのデータは全て、正常試料と比べ、結腸直腸癌試料中のCRCMPのより高い濃度を示し、そのp値は有意性があり、これによりCRCMP#19、CRCMP#6、CRCMP#22及びCRCMP#10は、結腸直腸癌と正常の間を良好に識別し、これらは良好な結腸直腸癌マーカーである可能性があることを示している。

【0261】

図5は、CRCMP#9のボックスプロットデータを示す。この図の縦軸は、CRCMP#9濃度(ng/ml)である。これらのデータは、正常試料と比べ、結腸直腸癌試料中のCRCMP#9濃度は減少し、そのp値はほぼ有意性があることを示し、これによりCRCMP#9は、結腸直腸癌と正常の間を良好に識別し、これは良好な結腸直腸癌マーカーである可能性があることを示している。

【0262】

(実施例4：Luminex技術を使用する多重アッセイにおける結腸直腸癌マーカータンパク質の評価)

下記参照プロトコルを使用し、表1及び2に列記された結腸直腸癌マーカータンパク質(CRCMP)を、Luminex技術を用いる多重アッセイにおいて評価した。

(4.1 材料及び方法)

各一次抗体を、独自のLuminex磁気ミクロスフェア(Mug beads, Luminex Corporation, オースチン, TX)に複合させた。Magビーズカクテル(50 µl)を、96ブラックウェル丸底Costarプレート(Corning Incorporated, コーニング, NY)に添加した。96ウェル磁気リングスタンドを使用し、Magビーズを、1分間かけて沈降させ、洗浄/アッセイ用緩衝液(1%BSA及び0.02% Tween 20を含む、PBS)で洗浄した。試料又は標準50 µlを、追加の洗浄/アッセイ用緩衝液50 µlと共に添加し、振盪機上、室温で1時間インキュベーションした。プレートを、磁気リングスタンド上に配置し、1分間静置した。その後Magビーズを、再度洗浄した。次にビオチン標識された抗体を、1個のウェルにつき50 µl、洗浄/アッセイ用緩衝液50 µlと共に添加し、振盪機上、室温で1時間インキュベーションした。このプレートを再度、磁気スタンド上に配置し、Magビーズを洗浄した。ストレプトアビジン-RPE(Prozyme, サンリアンドロ, CA, Phycolin, Code#PJ31S)を、洗浄/アッセイ用緩衝液中1 µg/mlに希釈し、その50 µlを各ウェルに、追加の洗浄/アッセイ用緩衝液50 µlと共に添加し、振盪機上で室温で1時間インキュベーションした。最終洗浄を行い、ビーズを、100 µlの洗浄/アッセイ用緩衝液で再懸濁し、その後各ウェルを、Xponentソフトウェア3.0を用い、Luminex 200リーダーで読み取った。全ての試薬の希釈は、洗浄/アッセイ用緩衝液中で行った。ビオチン-抗体は、各アッセイについて最適濃度へ変更した。添加した最初のMagビーズの量は、各アッセイにつき約50,000であった。磁気ビーズは、各洗浄前の時点で、1分間沈降させた。各洗浄工程は、100 µlの洗浄/アッセイ用緩衝液で3回洗浄した。アッセイ標準曲線を、正常ドナー患者血清プールにおいて作製した。Luminexリーダー及びMagビーズは、製造業者の指針に従い使用しかつ調製した。標準曲線は、5パラメータ対数-ロジスティックフィッティングを用いて計算し、各試料の濃度を、この曲線へのフィッティングから決定した。

最終Box及びROCの結果は、Analyse-it General+Clinical Laboratory 1.73 (Analyse-it Software Ltd., リーズ 英国)を使用し、解析した。

【0263】

(4.2 結果)

61の正常試料及び65の結腸直腸癌試料を使用する実験は、CRCMP#19(配列番号:13)及びCRCMP#9(配列番号:7)を含むが、これらに限定されるものではない、上記実施例3において同定された関心対象のCRCMPのいくつかについて更なる証拠を生じた。図6は、CRCMP#19に関するROC曲線データを示し、図7は、CRCMP#19に関するボックスプロットデータを示す。図8は、CRCMP#9に関するROC曲線データを示し、図9は、CRCMP#9に関するボックスプロットデータを示す。

【 0 2 6 4 】

ROC曲線は、1-特異度(偽陽性)に対する感度(真陽性)をプロットする。ROC曲線下面積は、測定されたマーカーレベルが、疾患又は状態のアイデンティフィケーションを補正することができる確率の測定である。0.5よりも大きい面積は、そのマーカーは疾患と正常を識別することができることを示す。これは、図6及び図8に示されたデータの場合であり、従ってCRCMP#19及びCRCMP#9は両方とも、結腸直腸癌と正常を識別するための良好なマーカーの可能性がある。CRCMP#9は特に、高い曲線下面積及び非常に低いp値を有し、これはこれが特に良好な結腸直腸癌のマーカーであり得ることを示している。

【 0 2 6 5 】

図7及び図9のボックスプロットの縦軸は、CRCMP濃度(ng/ml)である。図7は、結腸直腸癌試料において正常試料よりもより高いCRCMP#19濃度を示すのに対し、図9は、結腸直腸癌試料において正常試料よりもより低いCRCMP#9濃度を示す。CRCMP#19及びCRCMP#9は両方とも、結腸直腸癌と正常の間の良好な識別を示し、これらが良好な結腸直腸癌のマーカーであり得ることを示している。

10

【 0 2 6 6 】

特許及び特許出願を含む、本出願を通じて引用された全ての参照は、可能な限り最大に引用により本明細書に組み込まれる。

明細書及び特許請求の範囲の全体にわたって、状況が他に必要としない限り、語「含む(comprise)」並びに「含む(comprises)」及び「含むこと(comprising)」などのバリエーションは、明示された整数、工程、整数群又は工程の群を意味するが、任意のその他の整数、工程、整数の群又は工程群を除外しないことが理解されるであろう。

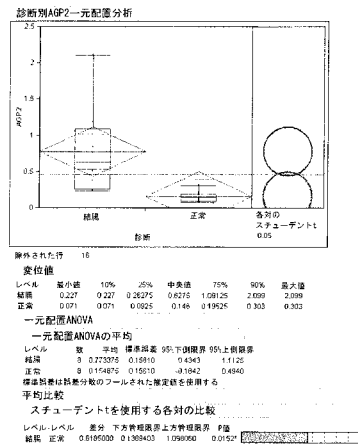
20

【 0 2 6 7 】

本説明及び特許請求の範囲を一部形作る出願は、後続のあらゆる出願に関する優先権の基礎として使用され得る。そのような後続の出願の特許請求の範囲は、任意の特徴又は本明細書に説明された特徴の組合せに関連することができる。これらは、生成物、組成物、プロセス、又は使用の特許請求の形をとることができ、かつ例示として非限定的に、「特許請求の範囲」を含んでよい。

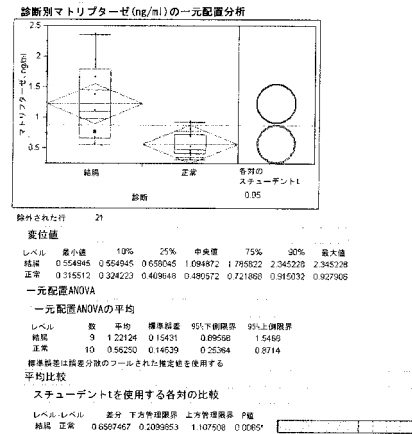
【図 1】

図1: GRMP#19のボックスプロットデータ



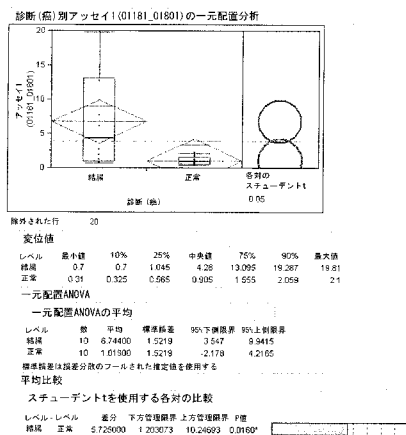
【図 2】

図2: CRCMP#6のボックスプロットデータ



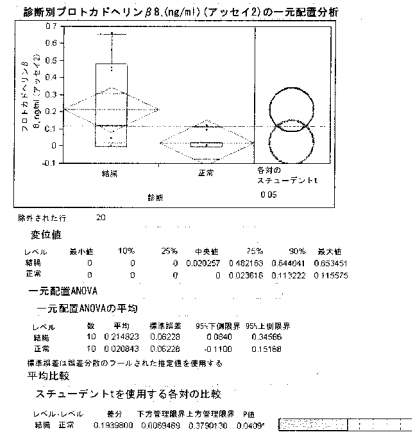
【図 3】

図3: CRCMP#22のボックスプロットデータ



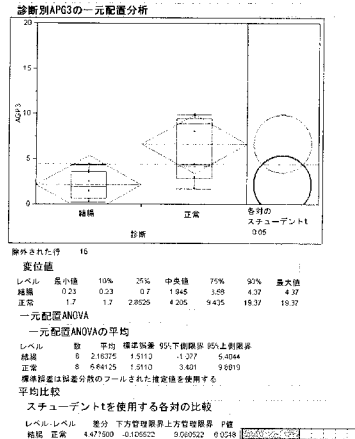
【図 4】

図4: CRCMP#10のボックスプロットデータ



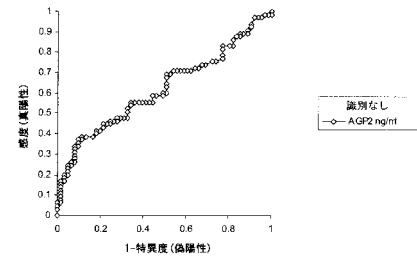
【図 5】

図5: CRCMP#9のボックスプロットデータ



【図 6】

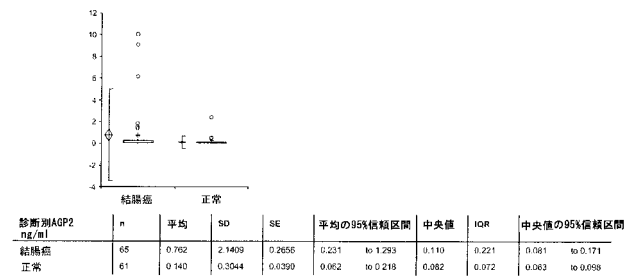
図6: CRCMP#19のROC曲線データ



曲線	面積	SE	p	面積の95%信頼区間	結論対
AGP2 ng/ml	0.621	0.0501	0.0079	0.523 to 0.719	正常 = 結腸癌

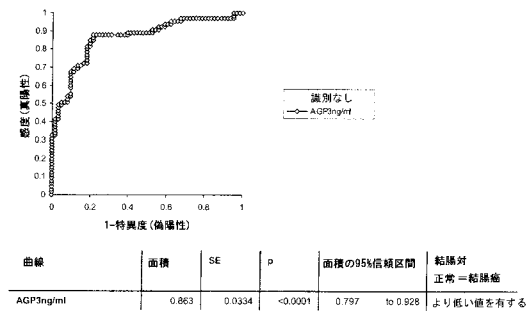
【図 7】

図7: CRCMP#19のボックスプロットデータ



【図 8】

図8: CRCMP#9のROC曲線データ



【図 9】

図9: CRCMP#9のボックスプロットデータ

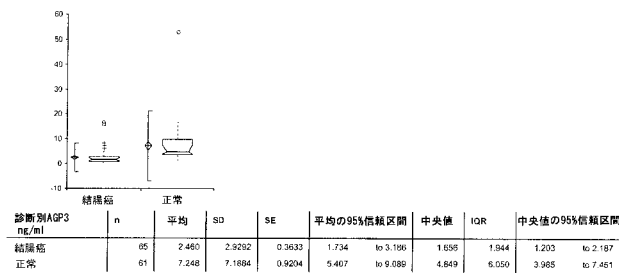


図10(a):

CRCMP #1

ペプチド結核: 1D-GE CRC

SP: Q12864 (配列番号:1)

MILQAHLSLCLMLY;ATGYCQEGKFSGLKPMFTSIVEGQEPFQIIFQKAPPAVTFELTGETDNIFVIERE
 GLLYNRALDRSTHNLQVAALDANGIIVEGVPVITIKVKDINDNRPTFLQSKYEGSVRQNSRPGKPFYVATDLODPATNQ
 "BLDDPATPNQGLYVQIQLPMINVMYFQINNF"TGALSLTREGSQELNPAKNSFYNLVIEVKMGQGSSENSFS
 DTTSDVITVTENIKWAKPKPVENVSTDPHPKITOVWNDPGAQYSLVDKFKLPRFPFSDQEDIVVTQPLOR
 SEKDAVVEYAVAKDEYKGLPSYPLEIHVKVKDINDNPETCSPTVFEVQNERLGNISITLCAHORENTANS
 FLNLYRIVEQCPKLEMDGLFLIQTACMLQAKGSLKQDTPQYNLTIEVSKDKFKTLQFVQINVIDINDQIPIFE
 KSDIQLCLADPDMIGSTTLTIGATDADPEPTGSSKILYHIKGDSEGRIGVDDPHTNTGVYIIRKPLDFETAA
 YSNLYRVAENPEPLVGVKYNASSFAKFTIVTDVNEAPQESQHVQAKVSEDAIGTKVGNVTAKDPEGLDIEYSLRGD
 SLSDGTRGWLKIDHVTGSEIFSVAPLDREAGSPYRVQVATVQCCSLSSYSEFHLNDVDNPNPELAKDYTOLE
 FCHPLSAPGSLTFATDDDNHFRGPHFTTSLGCSLQNDWEVSKINGTHARLSTHTFEFERVYVLTIRINDGCG
 RPFIEGIVSLVETPCSCVEGSCFRPAGHQTGIFVGMVGLLTTTLVIGITLAVVFIRIKRDKGKDNVESAGAS
 EVKPLRS

質量マッチペプチド(太字):

AENPEPLVGVK [37]
 DEENTANSFLNYR [64]
 DEYKGLPSYPLEIHVK [65]
 DINDNRPTFLQSK [66]
 DNVESAGASVVKPLR [70]
 EGLLYNR [81]
 GDRGWLK [104]
 HTEFEER [118]
 IDHVTGSEIFSVAPLDR [119]
 TGALSLR [202]
 WNDPGAQYSLVDK [227]

タンデムペプチド (二重下線):

AENPEPLVGVK [37]
 AAVVFYAVAK [62]
 DEENTANSFLNYR [64]
 DNVESAGASVVKPLR [70]
 VSDVALQTK [220]
 WNDPGAQYSLVDK [227]

細胞外ドメイン(下線)(配列番号:19)

QEGKFSGLKPMFTSIVEGQEPFQIIFQKAPPAVTFELTGETDNIFVIEREGLLYNRALDRST
 RSTHNLQVAALDANGIIVEGVPVITIKVKDINDNRPTFLQSKYEGSVRQNSRPGKPFYVATDLODPATNQ
 LPTGVICAPMINDNMVTFQINNF"TGALSLTREGSQELNPAKNSFYNLVIEVKMGQGSSENSFS
 N"XKAPKPVENVSTDPHPKITOVWNDPGAQYSLVDKFKLPRFPFSDQEDIVVTQPLORSEKDAVVEYAVAK
 YAKDEYKGLPSYPLEIHVKVKDINDNPETCSPTVFEVQNERLGNISITLCAHORENTANSFLNLYRIVEQ
 TPKLPMGDLFLIQTACMLQAKGSLKQDTPQYNLTIEVSKDKFKTLQFVQINVIDINDQIPIFEKSDYGNLT
 LAEDTNGSTLTIGATDADPEPTGSSKILYHIKGDSEGRIGVDDPHTNTGVYIIRKPLDFETAAVSNIVK
 AENPEPLVGVKYNASSFAKFTIVTDVNEAPQESQHVQAKVSEDAIGTKVGNVTAKDPEGLDIEYSLRGD
 RGWLKIDHVTGSEIFSVAPLDREAGSPYRVQVATVQCCSLSSYSEFHLNDVDNPNPELAKDYTOLEFCHPL
 SAPGSLTFATDDDNHFRGPHFTTSLGCSLQNDWEVSKINGTHARLSTHTFEFERVYVLTIRINDGCGRPF
 EGIVSLVETPCSCVEGSCFRPAGHQTGIFVGMVGLLTTTLVIGITLAVVFIRIKRDKGKDNVESAGAS
 EVKPLRS

組換えタンパク質(イタリック)(配列番号:20)

EGKFSGLKPMFTSIVEGQEPFQIIFQKAPPAVTFELTGETDNIFVIEREGLLYNRALDRST
 RSTHNLQVAALDANGIIVEGVPVITIKVKDINDNRPTFLQSKY

【図 10 (b)】

図10(b):

CRCMP #2

ペプチド給源:1D-GE CRC

SP: Q99795 (配列番号:2)

MVGKMPVLWTLCAVRVTVDAISVETPDVLRASQQKSVTLPTCTYHTSTSSREGLIQWQKLLTHTERVVIWPFSS
 NKNYINGELYKHRSVISXNAEQSDASITIDQLTMADNGTYECSVLSMSDLEGNTKSRVRLVLVPPSKPECGIEG
 PTIGNNIQLTQCSKEGSPFTQYSWKRYNINLNOEQPLAQFASGQPVSLKNIISTDTSGYIYCTSSNEEGTQPCNIT
 VAVRSFMSVALVVGIAVGVAALLITIGIYYCCCRCKDMDTDPKDAFPNRKAYEEPPQQLRLSLRREEDD
 YRQEQRSGTGRSPDHLQ

質量マッチペプチド(太字):

EAYEEPPQLK [176]
 EGIQWDR [86]
 EGSPTQYSWK [82]
 EREEDDYR [86]
 EREEDDYRQEEQR [87]
 LLLCHTER [146]
 NYIHGELYK [165]
 SVTLPTCTYHTSTSSR [195]
 YNINLNOEQPLAQFASGQPVSLK [240]

タンデムペプチド (二重下線):

EAYEEPPQLR [176]
 LLLCHTER [146]
 VYVDAISVETPDQVLR [222]

細胞外ドメイン(下線)(配列番号:21)

ISVETPDVLRASQKSVTLPTCTYHTSTSSREGLIQWQKLLTHTERVVIWPFSSKXNY:HGSLYKH
 RVSISNNAEQSDASITIDQLTMADNGTYECSVLSMSDLEGNTKSRVRLVLVPPSKPECGIEGPTIGNNIQLT
 QCSKEGSPFTQYSWKRYNINLNOEQPLAQFASGQPVSLKNIISTDTSGYIYCTSSNEEGTQPCNITVAVRSFMSVAV

【図 10 (c)】

図10(c):

CRCMP #5

ペプチド給源:1D-GE CRC

SP: P29323 (配列番号:3)

MALRLGAALLLLPLAAVEETLMDSTTATAELGNMWHPPSGWEEVSGYDENMMTIRTYQVCNVFESSQNNWLRT
 KFIIRRGAAHRIHVEMKFSVRDCSSIFSVPGSCKETFNLYYEADFSATKTFNNMMENPWVKVDTTAADESFSQV
 DGGRVWKINTEVRSFGPVSRSQGYIAFDYGGCNSLIAVRVYFKPCRIIQSGAIFQETLSGAESTSLVAARGS
 CTANAEVVDVPIKLYCNGDGELVPIGRCMCKAGFAVENGTVCRCGPGSTFKANQGDCACTHCPINSRHTTSEGA
 THCVCRNGYTRADIDPLDMRCTTIFSAEQAVISSVNETSIMLEWTFPRUSGGHEDLVYN:ICKSCGSGRGACTRC
 GNVQYAPFQGLSTFPRYISDLIAHTQYTFEIQAVNGVTDQSPSPDPAEVIITWVAAPSXVIMHQSUTVD
 SITLWSQFQDQNGVITDKLQHYTGRSEYNTATKSPFTNTVYQGLKAGA:YVQYKAKTVAGYGRYSQKXYE
 QVTEARYQTSIQEKLPLIIGSSANGIWF:IANVVIIVNCRNGFERADSEYTNKQHYTSGHMTFGMKIYIDPF
 TYSDPHEAVREPAKEIDTSCVKISQVIGAGEFGEVCSGHLKLPCKREIFVAIKTLKSGYTKQRORDELSEASIMG
 QDFHPNVHLEGVTKSPVMITTFMENGSI.DSFLRQNDQFTYIQLVGLRGLAAGMKYLAADMYVHRDLAAR
 NILVNSNLVCKVSDFGLSRLEDDUTSDPTTTSALGGIIPIRIPWTAPEAIQYRKFTSASDVMSYGIIVMWEVSYGER
 FYWDMTNGQVINALQDYRLPPMDCFSALHQLMDCWQKDRNHRPKFGQIVNTLDKMIKRNPNSLKMAPLSSGI
 NIPLLDRTI.PDYTSFNTVDEWLEAIKMQYKESFANAGTSDFDVVSQMMEDI.LRVGVTLAGHQKKILNSIQVNR
 AQMQIQSVSQPLARRPRATGRTRKQCPRODTNKTCSNDGKKKMGKKKTDPGRGREIQGIFFEKDSHKESND
 CSCGG

質量マッチペプチド(太字):

DNHRPK [72]
 IPIRIPWTAPEAIQYR [127]
 MIRNPNSLK [158]
 QGLQTEPR [170]
 TVACGYRYSQK [209]
 VSDUFGLSR [219]
 WTAFGAIOYR [229]
 YLAADMYVHR [237]

タンデムペプチド (二重下線):

FGQIVNTLDR [92]
 WTAFGAIOYR [229]

細胞外ドメイン(下線)(配列番号:22)

VEETLMDSTTATAELGNMWHPPSGWEEVSGYDENMMYIHTTYQVCNVFESSQNNWLRTKFIIRRGAAH
 RTHYEMKFSVRDCSSIFSVPGSCKETFNLYYEADFSATKTFNNMMENPWVKVDTTAADESFSQV
 DGGRVWKINTEVRSFGPVSRSQGYIAFDYGGCNSLIAVRVYFKPCRIIQSGAIFQETLSGAESTSLVAARGS
 VDVP:IKLYCNGDGELVPIGRCMCKAGFAVENGTVCRCGPGSTFKANQGDCACTHCPINSRHTTSEGA
 NGYTRACDPLDMRCTTIFSAEQAVISSVNETSIMLEWTFPRUSGGHEDLVYN:ICKSCGSGRGACTRCGDNVQ
 YAPRQGLTPEPRIYISDLIAHTQYTFEIQAVNGVTDQSPSPDPAEVIITWVAAPSXVIMHQSUTVD
 SWSQFQDQNGVITDKLQHYTGRSEYNTATKSPFTNTVYQGLKAGAIYVQYKAKTVAGYGRYSQKXYE
 TEARYQTSIQEKLPL

組織タンパク質(イタリック)(配列番号:23,24)

CTANAEVVDVPIKLYCNGDGELVPIGRCMCKAGFAVENGTVCRCGPGSTFKANQGDCACTHCP
 NSRHTTSEGA
 THCVCRNGYTRADIDPLDMRCTTIF
 GTERADSEYTNKQHYTGRSEYNTATKSPFTNTVYQGLKAGAIYVQYKAKTVAGYGRYSQKXYE
 VCSGHLKLPCKREIFVAIKTLKSGYTEKQRORDELSEAS:MQDFDPNPNVHLEGVTKSPVMITTFMENGSI.D
 SFLRQNDQFTYIQLVGLRGLAAGMKYLAADMYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFGLSRLEDDUTSDPTTTS
 ALGGKILPIRWTAPEAIQYRKFTSASDVMSYGIIVMWEVSYGERFYWDMTNGQVINALQDYRLPPMDCFSALH
 QLMDCWQKDRNHRPKFGQIVNTLDKMIKRNPNSLKMAPLSSGINPLLDRTI.PDYTSFNTVDEWLEAIKMQY
 KESFANAGTSDFDVVSQMMEDI.LRVGVTLAGHQKKILNSIQVNRAGNQIQSVSQPLARRPRATGRTRKQCP
 RDTNKTCSNDGKKKMGKKKTDPGRGREIQGIFFEKDSHKESNDSCSGG

【図 10 (d)】

図10(d):

CRCMP #6

ペプチド給源:1D-GE CRC

SP: Q9Y5Y6 (配列番号:4)

MGSBRARKGGGPKDFGAGLKYNRSHEKXVNGLEGEVEFLPVNNVKKVEKHGPGORVVVLAAILGLLILVIGTGFI
 VWHQLQYRDVVRVVKVETNGYKRIITNENFVDAYENSNSTEVSLSKSVKQALKLLYSQVPTFGYHMKESAYTAFSRGS
 VIAYYWSSEFIPOHLVEAEERVAEERVVMPPRANSLKSEVVTSVVAFPTDSKTQVQRTQDNCSSPGLHARGVRI
 NR:ETTGFPSQSYPAHARKQALRGDAEGLSLSTERSFOLASCDEGSDIVTVYNTLSPMEPHALVQLCGTYPPS
 IHLTFHSSQNVLLITLITWTERHFGFEATTFQLPRMSSCGGLAKAKAGTENSPIYRGVYFPNIDCTHNIIEVPMW
 QHYVIRNFVYLLRVSVPASTCPADIVHSEKICGGRSQGVTSNENKILVARSQSDQYDUGFAEYLSYDSD
 DPCPGSTCTRTSGCERELRCDGNADCTDHSDEINCSQDACHQFTCKNKFCKPLFWDCSVNDGNSDEQCSGC
 PAQTFRCNSKCLSKSQCKSGKDDCGDSDSDASCPKXNVVUTCTRTYRCINGLCLSKGNPRCKGKREDCSDGDEK
 DCDGCLSGSEQARVVGTOADGEGWPHQVSLHALGQHICGASLISPNWIVSAAHQYIDRCFRYSDDQTWAF
 JGLUIDQSGSFAFGVQERRLRK:SHPFENDETFOYDIALLLEKPAEYSSMVRPCLPOASHVFPAGKAIWTVGS
 GHQYQGTGALILQKGEIRY:NOVTEKXLLPQITPRMMCXVGLISGGVDSQGDSSGGPILSSVADRCIFQAGVVS
 HGDGCAQRIRKPGVYTRLPLFRJWIKENTGV

質量マッチペプチド(太字):

ETTRGTPDSYPAHAR [101]
 HFGFEATTFQLPR [117]
 IFQASVSWGQGCAGR [122]
 SFVVTSVVAFPTDSK [189]
 VVMLEPR [223]

タンデムペプチド (二重下線):

ETTRGTPDSYPAHAR [101]
 GDAOSVLSLTFR [103]
 SFVVTSVVAFPTDSK [189]

細胞外ドメイン(下線)(配列番号:25)

WHQLQYRDVVRVVKVETNGYKRIITNENFVDAYENSNSTEVSLSKSVKQALKLLYSQVFPGLPYHKESA
 VTAFSGESVIAYWSSEFIPOHLVEAEERVAEERVVMPPRANSLKSEVVTSVVAFPTDSKTQVQRTQDNCSSCF
 GLIHAKGVLSMRETTPGFPUSFFFAHARCQWALRGDADSVLSITFRSFOASCDEGSDIVTVYNTLSPMEPHAL
 VQLCGTYPPSIVHFNSSQNVLLITLITWTERHFGFEATTFQLPRMSSCGGLAKAKAGTENSPIYRGVYFPNIDCT
 HNIIEVPMWQHYVIRNFVYLLRVSVPASTCPADIVHSEKICGGRSQGVTSNENKILVARSQSDQYDUGFAEYLSY
 DSDPCPGSTCTRTSGCERELRCDGNADCTDHSDEINCSQDACHQFTCKNKFCKPLFWDCSVNDGNSDEQCSGC
 PAQTFRCNSKCLSKSQCKSGKDDCGDSDSDASCPKXNVVUTCTRTYRCINGLCLSKGNPRCKGKREDCSDGDEK
 DCDGCLSGSEQARVVGTOADGEGWPHQVSLHALGQHICGASLISPNWIVSAAHQYIDRCFRYSDDQTWAF
 JGLUIDQSGSFAFGVQERRLRK:SHPFENDETFOYDIALLLEKPAEYSSMVRPCLPOASHVFPAGKAIWTVGS
 GHQYQGTGALILQKGEIRY:NOVTEKXLLPQITPRMMCXVGLISGGVDSQGDSSGGPILSSVADRCIFQAGVVS
 HGDGCAQRIRKPGVYTRLPLFRJWIKENTGV

組織タンパク質(イタリック)(配列番号:26)

ETTRGTPDSYPAHAR [101]
 GDAOSVLSLTFR [103]
 SFVVTSVVAFPTDSK [189]

【図 10 (e)】

図10(e):

CRCMP #7

ペプチド給源:1D-GE CRC

SP: P18433 (配列番号:5)

MDSWFLVLLGSGGLCVSANNATTVPASVGTIRLINSSTAEPVKEEAKTSNFTSSLSVAPTFSPNITLGPTY
 LITVNSSDSDNGITRTASTNSGITTSPKGTWLPDNGQFTDARTEPWEGNSSTAATTPETFPFSDTEPIAVWVAL
 SLLLVIVFIIIVLWMLRFPKKYQAGSHSSKQAGHSSNFRALNSGRTEDEVEPQSVPLLARSPSTNRKATYPLPVDK
 LEEB:NRMRADQNKILFREEFNALPACP:QA:CDAAAGREKRNKRN:YNIPLYDHSRVILTPVEGPDSDYINASF
 :NGYQEKYKFFAAQCPKERTVNDPWRMIRNQNTATIVM:YMLKRECKECKCAQYWPQGCQTYGNIRSVSDVTVL
 VDYVWRKQIQOQVDMTKNFORLITQPHPTSWPQSPFFPFIOMKSLKVKACQNFQJAGATVWMSAGVGRG
 TEVVIDAMLDMMHTEKRVKYDVGVSRIQAQCGMVTQMDQYVYIYQALLHEYLIGYOTLEVEYLSYLHQYKNI
 PGTSNNGILEEFPKALTSIKIQNDKMRKTNLPANMKNRVLQIIPYEENRVLIVKRGKEENTDYINASFQDVGKRG
 DSYIASQGP:LHTIEDTFWRMIRNFWSKCSIVMLTELEBRQCKCAQYWPQGDVLSYGOITVELEKKEEBCESYTVRD
 LLVNTNRNRSKRTQPHFHGWPEVGI.PSDGKMISIIAAVQKQOQSSDGLVITVICSAGAGRTGFCALSTVLE
 RVKAREGILUVQPTVKSILQRPBHMVQTLQEQYFCYKVVQVEYIDAFSDYANFK

質量マッチペプチド(太字):

TEDEVEPQSVPLLAR [200]
 YPLPVDK [241]

タンデムペプチド (二重下線):

TEDEVEPQSVPLLAR [200]

細胞外ドメイン(下線)(配列番号:27)

NNATTVPASVGTIRLINSSTAEPVKEEAKTSNFTSSLSVAPTFSPNITLGPTYLTVNSSDSD
 NGITRTASTNSGITTSPKGTWLPDNGQFTDARTEPWEGNSSTAATTPETFPFSDTEPIAVWVAL

ペプチド給源:2D-GE

SP: P18433 (配列番号:5)

MDSWFLVLLGSGGLCVSANNATTVPASVGTIRLINSSTAEPVKEEAKTSNFTSSLSVAPTFSPNITLGPTY
 LITVNSSDSDNGITRTASTNSGITTSPKGTWLPDNGQFTDARTEPWEGNSSTAATTPETFPFSDTEPIAVWVAL
 SLLLVIVFIIIVLWMLRFPKKYQAGSHSSKQAGHSSNFRALNSGRTEDEVEPQSVPLLARSPSTNRKATYPLPVDK
 LEEB:NRMRADQNKILFREEFNALPACP:QA:CDAAAGREKRNKRN:YNIPLYDHSRVILTPVEGPDSDYINASF
 :NGYQEKYKFFAAQCPKERTVNDPWRMIRNQNTATIVM:YMLKRECKECKCAQYWPQGCQTYGNIRSVSDVTVL
 VDYVWRKQIQOQVDMTKNFORLITQPHPTSWPQSPFFPFIOMKSLKVKACQNFQJAGATVWMSAGVGRG
 TEVVIDAMLDMMHTEKRVKYDVGVSRIQAQCGMVTQMDQYVYIYQALLHEYLIGYOTLEVEYLSYLHQYKNI
 PGTSNNGILEEFPKALTSIKIQNDKMRKTNLPANMKNRVLQIIPYEENRVLIVKRGKEENTDYINASFQDVGKRG
 DSYIASQGP:LHTIEDTFWRMIRNFWSKCSIVMLTELEBRQCKCAQYWPQGDVLSYGOITVELEKKEEBCESYTVRD
 LLVNTNRNRSKRTQPHFHGWPEVGI.PSDGKMISIIAAVQKQOQSSDGLVITVICSAGAGRTGFCALSTVLE
 RVKAREGILUVQPTVKSILQRPBHMVQTLQEQYFCYKVVQVEYIDAFSDYANFK

質量マッチペプチド(太字):

QAGSHSSNFR [166]

タンデムペプチド (二重下線):

KFCIQQGWMTNR [130]
 TEDEVEPQSVPLLAR [200]
 QAGSHSSNFR [166]

細胞外ドメイン(下線)(配列番号:27)

NNATTVPASVGTIRLINSSTAEPVKEEAKTSNFTSSLSVAPTFSPNITLGPTYLTVNSSDSD
 NGITRTASTNSGITTSPKGTWLPDNGQFTDARTEPWEGNSSTAATTPETFPFSDTEPIAVWVAL

【図 10 (f)】

図10(f)：

CRCMP #8

ペプチド給源：1D-GE CRC

SP: Q6P1M3 (配列番号: 6)

MRRLFLRPGHDPVRAERLKRDLFGFNKTVGHFFPHFSPALGYSPSLRLAIGTRSGAIKLYGAPGVFMGLHQENNA
VTQTHLPGQCQLVTLLDDNSLHLWSLKVKGASELQDESEFTLRQPPGAAPSATQITVVLPHSSCELLYLQTES
GNVPVVLPAFRALEKURTISSDAVLQRLPEEARHRRVFEMVEALQEHPRQPNQILIGYSGRLVVIWDLQGSRVLY
HFLSSQQLNINWQRUGRLLVSCSDGYSQWPPVSSAQQPSPLRSLVPIYGPFPCKAITRILWLTTAGLQFLPTIF
QGGMPRASYGDRHICISVIGHGQQTAFQFTSRVIGTIVLTDPAATFDDDPVALVVLADEELVVIDLQTAGWPPVQ
LPLASLHCSAITCSIHVSNLPLKLWERIIAAGSRQNAHFTMERFIDGGTSLTPAPQQRDLLTGHDGTVRFW
DASGVCLURLLYKLSTVRVLTDTDPNEMFSAQSDSWPFLRWGSGFPDYSDDPLGQKIFPLCKIGYTLAVAGTA
GQVVLKLLSDSAARDQAVQVQVADLLQDDQGEYIMWGHRLRLARSGPVREBPGQBPVLYOCQPPAVVTSIALHSEN
RLVAFQTSHGQFLFHQQRQVTVKCTLHPSSDQLALEGPLSRVKSLLKSLKQSFRRMRRSRVSSRXHAPAGPPGF
AQEGSAKAEKFGQLQNMELAPVQRKIEARSAEDSFTGFEVRLVFADTYLKQSSRHCPSLWAGTNGSTIYAPSLRVP
PAERRMDQVRAEQAKEIQLMHRAPVVGILVLDGHSVPLPEFLEVAHCDLSKSPOMOGSHQLLVSSREQKVFCTLP
XVSAKILKILTALESGSRVRRVSVAHFGSRRRARDYGEHLAVITNLGDIQVVSILPLKQVRYYSICIRREDVSGIAS
CVITVYQSGFYLLSPSEFERFSLSTKWLVRPCLVDASATKMHIRPGNGAGPKKAFSARNSGTQSGDEERQPGVLV
MERALLSDERLITGVHIEFPFWGAASAAAEQSEWLSVQNAAR

質量マッチペプチド(太字)：

ALLSDER [41]
FLRPGHDPVA [35]
GASELQDESEFTLR [107]
QFGLVKERALLSDER [171]
REDVSGIASCVFTR [177]
SAEDSFTGFVR [163]
VFEMVEALQEHPR [213]
VPPAEFR [211]
VSVAHFGSR [221]
YQGGFYLLSPSEFER [234]

タンデムペプチド (二重下線)：

GASELQDESEFTLR [107]
TLYFADTYLK [206]
SAEDSFTGFVR [183]
YQGGFYLLSPSEFER [235]

組換えタンパク質(イタリック)(配列番号:28)

SLKVKGASELQDESEFTLRGPPGAAPSATQITVVLPHSSCELLYLQTESGNVPVVLPAFRALEO
RTISSDAVLQRLPEEARHRRVFEMVEALQEHPR

【図 10 (h) - 1】

ペプチド給源：2D-GE

SP: Q9UN66 (配列番号: 8)

MDASGKLCRCRQVLYSPFLILGLSLAGAAPPSYSVVEETEGSSFTVNLAKDLGLEQREFSRGRVYVSRGNKLH
LQLNQETADLLNEKLDREDCGHTEPCVLRFOVLLESPEFFEQAELOVIDINDHSPVFLDKQMLVKVSESSPPG
TAFPLKNAEDLDIGQNNIENYISPNYSFRVLTTRKRSQGRKYFELVLDALDREEEAEILRTITLALDGGSPPPRG
TAQVYIEVVDWMDNAPFCQFPRVYVIOSEBSEISFLVWKVYSATDVTCVNGETSYSLFOASDEISKTKVQZLTC
EIRKKQLDPEKPGQSYVNIEARDAAGSGSKCTVLIQVIDNDHAPVYMSAFTSPPEKAFETVVALFVSVDL
SGENKIKSCSQEDLPFLKSSVGNFYTLTCTFLDRESRAEYNYITVTDLGTPRLTTHLMTVLSVDVNDNAP
AFQTSYTYLFVRENNSPALHIGSVSATDRDSGTNAQVITYSLPPQDPHLPLASLVSINTNDGHLFALRSLDYEA
QAFEFRVGASDRGSPALSSSEALVRVVLVDANDNSPFVLYPLQNGSAPCTELVPRAAFPGYLVTKVAVVDGSGON
AWLSYQLIKATEPGLFGVWANHGEVRTARILISPRDAAKQRLVVLVKDNGEPPCSATATLHLLVDGFSQPYPLP
SAAPACQQAQDSFTVLDVVAIASVSSILFVSLIEFAVLICRRSRAASVGRCSVSPGPFPHLVDVRGTSLSQNY
QYEVCLAGSGGTNEFQFLKPLVLPNIQCHSFGPEMEQNSNFRNGCFGLQLK

質量マッチペプチド(太字)：

タンデムペプチド (二重下線)：

AEYNYITVTDLGTR [39]

細胞外ドメイン(下線)(配列番号:29)

AEPRSYSVVEETEGSSFTVNLAKDLGLEQREFSRAGRVVSRGNKLHLQLNQETADLLNEKLDRE
DLCGHTEPCVLRFOVLLESPEFFEQAELOVIDINDHSPVFLDKQMLVKVSESSPEGTAFPLKNAEDLDIGQNNI
ENYISPNYSFRVLTTRKRSQGRKYFELVLDALDREEEAEILRTITLALDGGSPPPASGTAVYIEVVDNDNAP
FCQFPRVYQISDESPISFLVWKVYSATDVTCVNGETSYSLFOASDEISKTKVQZLTCIRKKQLDPEKPGQSY
EYNIIEARDAAGSGSKCTVLIQVIDNDHAPVYMSAFTSPPEKAFETVVALFVSVDLDSGENKIKSCSQED
PFLKSSVGNFYTLTCTFLDRESRAEYNYITVTDLGTPRLTTHLMTVLSVDVNDNAPAFCTQTSYTLFVREN
NSFALHIGSVSATDRDSGTNAQVITYSLPPQDPHLPLASLVSINTNDGHLFALRSLDYEAQAFEFRVGASDRG
SPALSSSEALVRVVLVDANDNSPFVLYPLQNGSAPCTELVPRAAFPGYLVTKVAVVDGSGQNAWLSYQLIKATE
PGLFGVWANHGEVRTARILLSERDAAKQRLVVLVKDNGEPPCSATATLHLLVDGFSQPYPLPPEAAPACQQAQDS
LTVYIL

【図 10 (g)】

図10(g)：

CRCMP #9

ペプチド給源：1D-GE CRC

SP: Q8TD06 (配列番号:7)

MMILHSAIGLCLLLVTVSSNIAIAIKKKEKRPQTLSRGWDDITWVQTYEGLFYAQSKKPLMWVHHLEDCQYSQ
ALKKYFAQNEEIIQEMAQNKIFIMLNLMHETTDKRLSPDGGQYVPRIMFVDPSLTVRAADIAGKYSNRLITYEPRDLPL
LIENMKKALRLIQSEL

質量マッチペプチド(太字)：

IMFVDPSLTVR [126]
NLSPDGGYVPR [161]

タンデムペプチド (二重下線)：

IMFVDPSLTVR [126]

ペプチド給源：2D-GE

SP: Q8TD06 (配列番号: 7)

MMILHSAIGLCLLLVTVSSNIAIAIKKKEKRPQTLSRGWDDITWVQTYEGLFYAQSKKPLMWVHHLEDCQYSQ
ALKKYFAQNEEIIQEMAQNKIFIMLNLMHETTDKRLSPDGGQYVPRIMFVDPSLTVRAADIAGKYSNRLITYEPRDLPL
LIENMKKALRLIQSEL

質量マッチペプチド(太字)：

FIMLNLMHETTDK [94]
IMFVDPSLTVR [126]
LYTYEPR [154]
NLSPDGGYVPR [161]
RPQTSR [180]
VFAQNEEIIQEMAQNK [212]

タンデムペプチド (二重下線)：

IMFVDPSLTVR [126]
NLSPDGGYVPR [161]

【図 10 (h) - 2】

図10(h) 続き

ペプチド給源：2D-GE

SP: Q9UN66 (配列番号: 8)

MDASGKLCRCRQVLYSPFLILGLSLAGAAPPSYSVVEETEGSSFTVNLAKDLGLEQREFSRGRVYVSRGNKLH
LQLNQETADLLNEKLDREDCGHTEPCVLRFOVLLESPEFFEQAELOVIDINDHSPVFLDKQMLVKVSESSPPG
TAFPLKNAEDLDIGQNNIENYISPNYSFRVLTTRKRSQGRKYFELVLDALDREEEAEILRTITLALDGGSPPPRG
TAQVYIEVVDWMDNAPFCQFPRVYVIOSEBSEISFLVWKVYSATDVTCVNGETSYSLFOASDEISKTKVQZLTC
EIRKKQLDPEKPGQSYVNIEARDAAGSGSKCTVLIQVIDNDHAPVYMSAFTSPPEKAFETVVALFVSVDL
SGENKIKSCSQEDLPFLKSSVGNFYTLTCTFLDRESRAEYNYITVTDLGTPRLTTHLMTVLSVDVNDNAP
AFQTSYTYLFVRENNSPALHIGSVSATDRDSGTNAQVITYSLPPQDPHLPLASLVSINTNDGHLFALRSLDYEA
QAFEFRVGASDRGSPALSSSEALVRVVLVDANDNSPFVLYPLQNGSAPCTELVPRAAFPGYLVTKVAVVDGSGON
AWLSYQLIKATEPGLFGVWANHGEVRTARILISPRDAAKQRLVVLVKDNGEPPCSATATLHLLVDGFSQPYPLP
SAAPACQQAQDSFTVLDVVAIASVSSILFVSLIEFAVLICRRSRAASVGRCSVSPGPFPHLVDVRGTSLSQNY
QYEVCLAGSGGTNEFQFLKPLVLPNIQCHSFGPEMEQNSNFRNGCFGLQLK

質量マッチペプチド(太字)：

タンデムペプチド (二重下線)：

AEYNYITVTDLGTR [39]

細胞外ドメイン(下線)(配列番号:29)

AEPRSYSVVEETEGSSFTVNLAKDLGLEQREFSRAGRVVSRGNKLHLQLNQETADLLNEKLDRE
DLCGHTEPCVLRFOVLLESPEFFEQAELOVIDINDHSPVFLDKQMLVKVSESSPEGTAFPLKNAEDLDIGQNNI
ENYISPNYSFRVLTTRKRSQGRKYFELVLDALDREEEAEILRTITLALDGGSPPPASGTAVYIEVVDNDNAP
FCQFPRVYQISDESPISFLVWKVYSATDVTCVNGETSYSLFOASDEISKTKVQZLTCIRKKQLDPEKPGQSY
EYNIIEARDAAGSGSKCTVLIQVIDNDHAPVYMSAFTSPPEKAFETVVALFVSVDLDSGENKIKSCSQED
PFLKSSVGNFYTLTCTFLDRESRAEYNYITVTDLGTPRLTTHLMTVLSVDVNDNAPAFCTQTSYTLFVREN
NSFALHIGSVSATDRDSGTNAQVITYSLPPQDPHLPLASLVSINTNDGHLFALRSLDYEAQAFEFRVGASDRG
SPALSSSEALVRVVLVDANDNSPFVLYPLQNGSAPCTELVPRAAFPGYLVTKVAVVDGSGQNAWLSYQLIKATE
PGLFGVWANHGEVRTARILLSERDAAKQRLVVLVKDNGEPPCSATATLHLLVDGFSQPYPLPPEAAPACQQAQDS
LTVYIL

【図 10 (i)】

図10(i):

CRCMP #12

ペプチド給源: 1D-GE CRC

SP: P16422 (配列番号: 9)

MAPPQVLAFGLLLAAATATPAAAEFCYGENYKLVNCFVNNRQCQCTSVGAQNTVICSYLAAKCLVMKAEKMG
SKLGRRAKPEGALQNNGLYDPDCDESGLEFKACQNGTSMCWCVNTAQVRRTRDKDTEITCSERVRTYWIILKRL
KAPREKPKVDSKSLATALQKEITTRYQLDPKFITSILYENNVITIDLQVNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDKVKGSL
FHSSKNDLTVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEKAFEFMSQGLKAGVIAVIVVVVIAVVASGVVLVISPKEKMAKYEKA
EIKEMGEMHRLNA

質量マッチペプチド(太字):

AFEFMSQGLK [44]
DTEITCSER [73]
EKPYDSK [83]
EMCEMHR [95]
GESLFHSK [106]
KKRMAR [133]
LAAKCLVMK [141]
TQNDVDIADVAYYFEK [207]
TQNDVDIADVAYYFEKDVK [208]
YEKAEIK [233]

タンデムペプチド (二重下線):

AFEFMSQGLK [44]
TQNDVDIADVAYYFEK [207]

細胞外ドメイン(下線)(配列番号:30)

QFECVCENYKLVNCFVNNRQCQCTSVGAQNTVICSKLAACKLVMAEDMNGSKLGRARKEPGATQ
NNDGLYDPDCDESGLEFKACQNGTSMCWCVNTAQVRRTRDKDTEITCSERVRTYWIILKMKAREKPYDSKSLR
TAQKEITTRYQLDPKFITSILYENNVITIDLQVNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDKVKGESLFHSKNDLTVNG
EQLDLPQGTLLIYYVDEKAFEFMSQGLK

【図 10 (k)】

図10(k):

CRCMP #17

ペプチド給源: 1D-GE CRC

SP: O00515 (配列番号: 11)

MAVSRKDWASLSLARQRTLEDEEEQEERERRRRHRLNLSSTTDDAEAPRLSQNGDRQASASERLPSVEEAZVFKPLP
FASKDEDEDIQSILRLTRQERRRQRQVVEAAQAQPIQERLEAEGRNLSLSPVQATQKPLVSFKLELDIFPRRLSREQ
RQWFWLEESLVGSEPERERKKVVEKSPLEKSSMFKTAPEKSLVSDKTSISBKVLADEKTSLSERIAVSEKRN
SSEKKSVLEKTSVSEKSLAPSGMALGSGRRLVSEKASIFEKALASEKSPADAKPAKRAATASQFLAQEPASG
SPATTKEQRGALPGKNLPSIAKQASDPPTVASRLPPVTIQVKIPSEKERRADMSSPTQRTYSSSLKRSSPRTIS
FRMKPKKENSETTLTRSASMKLPDNTVKLGKLERVHTAIPRSESVKSRGLPCTELFVAPVGVASKRHLFEKELA
GQSRAPFASSSRKENLRLSGVVTSENLNWLISRITQESGDQDPQEAQKASSATERTQWQCKSDSSLDAEV

質量マッチペプチド(太字):

NLNWLISR [147]
QVVEAAQAQPIQER [174]
RSESVKSR [182]

タンデムペプチド (二重下線):

QVVEAAQAQPIQER [174]

ペプチド給源: 2D-GE

SP: O00515 (配列番号: 11)

MAVSRKDWASLSLARQRTLEDEEEQEERERRRRHRLNLSSTTDDAEAPRLSQNGDRQASASERLPSVEEAZVFKPLP
FASKDEDEDIQSILRLTRQERRRQRQVVEAAQAQPIQERLEAEGRNLSLSPVQATQKPLVSFKLELDIFPRRLSREQ
RQWFWLEESLVGSEPERERKKVVEKSPLEKSSMFKTAPEKSLVSDKTSISBKVLADEKTSLSERIAVSEKRN
SSEKKSVLEKTSVSEKSLAPSGMALGSGRRLVSEKASIFEKALASEKSPADAKPAKRAATASQFLAQEPASG
SPATTKEQRGALPGKNLPSIAKQASDPPTVASRLPPVTIQVKIPSEKERRADMSSPTQRTYSSSLKRSSPRTIS
FRMKPKKENSETTLTRSASMKLPDNTVKLGKLERVHTAIPRSESVKSRGLPCTELFVAPVGVASKRHLFEKELA
GQSRAPFASSSRKENLRLSGVVTSENLNWLISRITQESGDQDPQEAQKASSATERTQWQCKSDSSLDAEV

質量マッチペプチド(太字):

DEDEDIQSILR [63]
ELEIFPR [84]
KELEIFPR [129]
NLNWLISR [147]
LPDNTVK [148]
LPSVEEAZVFKPLPPASK [150]
NLSSTTDDAEAPR [162]
QVVEAAQAQPIQER [174]
RATASEQPLAQEPASGSPATTK [176]
SLAPGMAIGSGR [192]
TLEDEEEQEER [203]

タンデムペプチド (二重下線):

DEDEDIQSILR [63]
NLSSTTDDAEAPR [162]
QVVEAAQAQPIQER [174]

【図 10 (j)】

図10(j):

CRCMP #14

ペプチド給源: 1D-GE CRC

ENST00000322765 (配列番号: 10)

MLCSRRRRRCRPFPEPPVAAQVAQVAAPVALPSPPTFSDGGTKRPGRLALKKMGITFDEEDVRAMLGSRRLKIR
SRTWKHERLYRLOEDGLSVHEQRRTPRAPSQHIFFWQHEAVEEGHQSEGLRRFGGAFABASCLTIAFKKGRKNL
DLAAPTAEBAQRHVRASYLRAQCSLACCCYFLSTHTWHSYLHPADSNQDSKMSFKELSKLMMVNDNDMWAY
LGFKECDHSNADRLEGAE:BEFLRRLKKRPELEELIFHQYSGEDRVLSAPELLEFLEDDQGEAGTLARAQOIQITY
ELNETAKQHEMLTLDGFMVLLSPGGAALDNTHTCFVQDMNQFLAHYF1SSSHNTYLTDSQIGGPSSTEAYVRAT
AQGCRCVELDCWEGPGGEPVITYHGHITLSKILFRDVVQAVRDHATLSPYVILSIENHCGLSQQAAMARHLCTI
LGDMILVTQALDSFNPEELPSPEQLKGRVLYVKGFLPAARSEDGRLASDREBEEDDEFEFSEVBAARQRRLHHA
PNAQPCQVSSLSERKAKKILREAGNSFVHHARQLTRVVFELGRNSANYSFQUMWNGGQQLVALAFQTTCEH
DLNAGRFLVHQCGYVLKPACLRQPDSTFDPEYPSPPRTTLSIGVLTAQQLFKLNAEKPHSIVDELYRTEHGV
ADCACTQETDYLNNGFNPRNGQTLDQFLRAPELALVRFVVDYDACSFNDFVQQTLPPLSSSLQGYRHHILLSKD
CASLSPATLPIQIR:QSS

質量マッチペプチド(太字):

ZHQSEGLR [79]
QETDYLNNGFNER [167]
RKNLDLAAPTAEBAQR [178]
RPELEELIFHQYSGEDR [179]

タンデムペプチド (二重下線):

LOEDGLSVWQRR [151]
QETDYLNNGFNPR [167]

【図 10 (l) - 1】

図10(l):

CRCMP #18

ペプチド給源: 1D-GE CRC

SP: Q96TA1 (配列番号: 12)

MGMWGEKTKGKILTEPIQFYEDQYGVALFNMSHREIECTGLPQAQLLWRKVFPLDERIVFSGNLFHQHEDSKKWRNR
FSLVFNHYGVGVLENKAAAYERQVFPFRAVINSAGYKILTSVDQYIELIGNSLPGTTAKSGSAPILKCPQTQPLILW
HFFYARFYVYVWMTAEQDQWQAVLDQIRHCNAGIFEDSGVSPATLDAIRMYRQSKELVGTWMLCONEVOILS
NZWFERLQPELRAILQPELKKRQBERQRWQIQISDAVYHMYEAKARLEELSLVQGVQVQAMQAVIRLQMDQI
TSKSHLASKIRAFILPSAEVGVNRNVOPYIPSLDALMVPYTSQGGTTEVRDVEFEKVTDMNINAVNGGIDKLEBY
MEZLSRLAYHPLRKQSCYEPHMESSLRLDGLQQRFDVSSTSVTKQRAQIHMRQMDNAVYTFETLHQELIGKGPKE
ELCKSIQRVLEFRVKKYVDSSSVKRRFFREALLOISIPFLKKLAPTKSKELPRFOELLIFEDFARFILVENTYK
EVLQITVMKDIQAVKEAAVQRKHNLYRDSMVMMHNSFNLHLAEAGAPIDWGEFYSNNGGGGSFSPSTFKSATLS
EKRRRAKQVVSVDQREKVLPEASPESPFPASPQGVTEIRGLLAQGLRPESPFPAGPLLNGAFAGESPQPKAAP
EASSPFASPLQHLLPGKAYDLGPPKFSQGTGEQVSSPSGSHPALATTTEDSAGVQTEF

質量マッチペプチド(太字):

AVINSAGYK [53]
CPQTQPLILWHFYAR [59]
EELCKSIQR [78]
FOELLIFEDFAR [98]
HEICTGLPQAQLLWR [114]
HNLYR [116]
KHNLYR [132]
KYDVSSSVR [137]
KYDVSSSVRK [138]
KYDVSSSVKRR [139]
MESLRLDGLQQR [156]
MGMWGEK [157]
TQMDQITSK [199]
VQVQVQAMQAVIR [218]
YDVSSSVRK [234]
YDVSSSVKRR [232]

タンデムペプチド (二重下線):

FEELVSR [90]
FOELLIFEDFAR [98]
LGRYMEK [145]
TQMDQITSK [199]
VEGPAFTDAIR [211]
YDVSSSVR [230]

【図 10 (1) - 2】

図10(1) 続き

ペプチド給源: 2D-GE

SP: Q96TA1 (配列番号: 12)

MGWGEKTKI1ITEFLQFYLDQYGSVALENSMRHELEGTGLPQAGLLMRKVPDERIVFSGNLPQHGEDSKKWRNR
PSLVPHNIGVLVLYENKAAAYRQVPPRAVNASAGYKILTSVDQYLETIGNSLPOTTAQSSAPFLKGPQCPILM
HPYARHYFCMKTAEAGQKMQAVLQOCIRHCNNGIPRDSKVGGPFTDAIRMYRQSKFLYGCWENLCCNEVDILS
NLVMSRIGPELKAELGPRLLKGPQERCRQWQIQLSDAVYHMYVEQAKARFEFVLSKVQVQVPAMQAVIRITOMQOII
TSKRLASKIRAFILPKAEVCVRNHVQYIPSLLEALMVPTSQGTETVROVFFKEVTDMNLNVINEGGIDKLGEY
MEKLSRLAYHPLKMQSCYSKMESRLDGLQQRFDVSVTSFVKORAQIHMRQMDNAVYTFETLLHQRIGKGPTE
ELCKSIQRVLERVLKKYDYDSSSVKRFTEALLQISIFPLKKLAPTCKSELPFQELIFEDFARFLLVNTYK
EUVLTQVMKIDLQAVKEAAVQRKHNIYRDSMMVHNSDPNLHLAEAGAPIDWGBEYSNSGGGSPSPSPSPASUS
FKRRAKQVSVVQDEEVGLFTEASPESEPPASPDGVTETRGLLAQGLRPESPPFAGPLINGAPAGESPQFRAAP
EASSPEASFLQHLPLPKAVDLOCFKPSDQETGEQVSSPSSHPAHTTTTCSAGVQTEF

質量マッചペプチド(太字):

AQIHMR [46]
EVTDMNLNVINEGGIDK [86]
PQELIFEDFAR [98]
IVFSGNLPQHGEDSK [128]
VQVQPMANQAVIR [218]

タンデムペプチド (二重下線):

PQELIFEDFAR [98]

【図 10 (n) - 1】

図10(n):

CRCMP #20

ペプチド給源: 1D-GE CRC

SP: Q9UHN6 (配列番号: 14)

MYATDSRGHSPAPLQPNQNSRHPSGYVPGKVVPLRPFPKQASAKFTSIRREDRA~~ATFAFSPBEEQQAQRESQK~~
QKRHKNTFICFAITSFSPFIALAIILGLSSKYAPDENCPOQNPRLNWDPGQDSAKQVVIKEDMLRLTSDATVH
SIVIQDGGLLVFGDMKDGSRNITLRTHYILIQDGGALHIGAERCRYKSKATITLYGKSDGEGSMPTFGKKEFIGE
AGCTLELHIGARKASWTLIARTLNSSCLPFGSYTFEKDFPSGLNVAVIQDQAKILERSRFDTHEYRNESRRLLQEF
LRPOQPGRIVAIAVGDSAAKSLQGTIQHICERLGSLLQGLGYRQAWALVGVIDGGSTSCNLSVRNYENHSSGG
KALAGRRPTVTDGCRFSVTAYSEIKGVSSGFVRVVDGVKLNLLDDYSSWKPQDQIVVASDINSNYQAEPTL
LPCSCSHPOVVRKEPTQPLHMGITLDGVMAAEVLTIRNLIQGEVEDDCAENQCQFFDIDTPOGHMCMN
PFSVHLGYVFLKHMGGQGMKRYVYVPHQGDVDYKGGVRSACPDVGLSIHHSFRCITVHGTYGLLLKDTIGEDT
LGHCFEFLDGLIQRNTLFHNLGLJLTKPTGLPTDRNNSMCTTMRDKVFNGYIPVPATDCMAVSTFWIAHPNNLI
NNAAGSQDAGIWLFLHKEPTGESSGLLAKPELTPGIFYNNRVSNSFKAGLFIKGVKTTNSAADPREYLC
LDNSARFRPHQDANPEKPRVAALIDRLIAFKNNNDGAWVRGGDILVQNSAFADNGILGLTASDGSFSPSDEGSSOE
VSESLVGESNNYGFQGGQNNKYVGTGGIDQKPRILPARKTFPIRGEQIYDGPILHTRSTFKKYVETPDYSSAIG
FLHNSWQITFRNNISLVKICPHYSINWFFKOPQWFEDCEMCDGDRNSIFHDIDGVTGYDAVYVCPMDNYLIRH
PSCVNVSKNNAVICSGTYAQVYVQTNSTQNLKMTITDREYPSNFMWLCQINGKAAFPQYQVPMLEKGYTIHNG
PARPTTFLVYNFNKDWIRVGI:CYPSNTSPQVTFGLYQRQNGSLKILEYEPVHISLEELQKQSERKFPDST
GLLFLYLKAKSHRHCHSYCSSQGERVYQAATDSKDISNCMAKAYPQYRKPSVVKRMPAMLTGLQGGCOTQV
VFTSDPHKSYLPVQFQSPDKAETQRGDPVSIVNGTDTTFRSAGVILLVVDPCSVFPRLTEKTVFPLADVSRLEE
YLKTIPIFPRSIVLLSTRGELKQNLISHLLVPLGLAKFAHLYDKGSTIFLGPSCNFKPSWTKLFTSPAGGLGVLE
QFIPILQDEYGCPRATTYRRRDLLELLKQASKAH

質量マッചペプチド(太字):

ATFAFSPBEEQQAQR [51]
AYPQYR [55]
FDPMHVRNSRR [89]
FRPHQDANPEKPR [99]
GHSAPLQPNQNSR [109]
GYTIHNGAPAPR [133]
IFEVFPVHSLELQR [120]
MDNYLLR [155]
HEAKLGLQGGCOTR [159]
NSRQITPR [164]
SDEGSMPTFOKK [164]

タンデムペプチド (二重下線):

ATFAFSPBEEQQAQR [51]
GHSAPLQPNQNSR [109]

【図 10 (m)】

図10(m):

CRCMP #19

ペプチド給源: 1D-GE CRC

SP: Q95994 (配列番号: 13)

MEKIPVSAFLLVALSYTLARDTTVKGAKKOTKDSRPKL~~PQTLSRGWGDQLIWTQTYEALYKSKTSNKPIMII~~
HHLDECPHSQALKKVFPAENKEIQKLAEQFVLLNLVYETTDKHLSPDGGQYVPRIMFVDPSSLTVRADITGRYSNRLY
AYEPADTALLLDNMKALKLLKTEL

質量マッചペプチド(太字):

CWGDQLIWTQTYEALYK [112]
HLSPDGGYVPR [115]
IMFVDPSSLTVR [126]
LPQTLER [149]
LYAYEPADTALLLDNMK [153]

タンデムペプチド (二重下線):

HLSPDGGYVPR [115]
IMFVDPSSLTVR [126]

組換えタンパク質(イタリック) (配列番号:31)

RDTTVKPGAKKOTKDSRPKL~~PQTLSRGWGDQLIWTQTYEALYKSKTSNKPIMII~~HHLDECPHSQA
LKKVFPAENKEIQKLAEQFVLLNLV

ペプチド給源: 2D-GE

SP: Q95994 (配列番号: 13)

MEKIPVSAFLLVALSYTLARDTTVKGAKKOTKDSRPKL~~PQTLSRGWGDQLIWTQTYEALYKSKTSNKPIMII~~
HHLDECPHSQALKKVFPAENKEIQKLAEQFVLLNLVYETTDKHLSPDGGQYVPRIMFVDPSSLTVRADITGRYSNRLY
AYEPADTALLLDNMKALKLLKTEL

質量マッചペプチド(太字):

HLSPDGGYVPR [115]
IMFVDPSSLTVR [126]
KVFENK [136]
LPQTLER [149]
LYAYEPADTALLLDNMK [153]

タンデムペプチド (二重下線):

HLSPDGGYVPR [115]
IMFVDPSSLTVR [126]
LYAYEPADTALLLDNMK [153]

組換えタンパク質(イタリック) (配列番号:31)

RDTTVKPGAKKOTKDSRPKL~~PQTLSRGWGDQLIWTQTYEALYKSKTSNKPIMII~~HHLDECPHSQA
LKKVFPAENKEIQKLAEQFVLLNLV

【図 10 (n) - 2】

図10(n) 続き

ペプチド給源: 2D-GE

SP: Q9UHN6 (配列番号: 14)

MYATDSRGHSPAPLQPNQNSRHPSGYVPGKVVPLRPFPKQASAKFTSIRREDRA~~ATFAFSPBEEQQAQRESQK~~
QKRHKNTFICFAITSFSPFIALAIILGLSSKYAPDENCPOQNPRLNWDPGQDSAKQVVIKEDMLRLTSDATVH
SIVIQDGGLLVFGDMKDGSRNITLRTHYILIQDGGALHIGAERCRYKSKATITLYGKSDGEGSMPTFGKKEFIGE
AGCTLELHIGARKASWTLIARTLNSSCLPFGSYTFEKDFPSGLNVAVIQDQAKILERSRFDTHEYRNESRRLLQEF
LRPOQPGRIVAIAVGDSAAKSLQGTIQHICERLGSLLQGLGYRQAWALVGVIDGGSTSCNLSVRNYENHSSGG
KALAGRRPTVTDGCRFSVTAYSEIKGVSSGFVRVVDGVKLNLLDDYSSWKPQDQIVVASDINSNYQAEPTL
LPCSCSHPOVVRKEPTQPLHMGITLDGVMAAEVLTIRNLIQGEVEDDCAENQCQFFDIDTPOGHMCMN
PFSVHLGYVFLKHMGGQGMKRYVYVPHQGDVDYKGGVRSACPDVGLSIHHSFRCITVHGTYGLLLKDTIGEDT
LGHCFEFLDGLIQRNTLFHNLGLJLTKPTGLPTDRNNSMCTTMRDKVFNGYIPVPATDCMAVSTFWIAHPNNLI
NNAAGSQDAGIWLFLHKEPTGESSGLLAKPELTPGIFYNNRVSNSFKAGLFIKGVKTTNSAADPREYLC
LDNSARFRPHQDANPEKPRVAALIDRLIAFKNNNDGAWVRGGDILVQNSAFADNGILGLTASDGSFSPSDEGSSOE
VSESLVGESNNYGFQGGQNNKYVGTGGIDQKPRILPARKTFPIRGEQIYDGPILHTRSTFKKYVETPDYSSAIG
FLHNSWQITFRNNISLVKICPHYSINWFFKOPQWFEDCEMCDGDRNSIFHDIDGVTGYDAVYVCPMDNYLIRH
PSCVNVSKNNAVICSGTYAQVYVQTNSTQNLKMTITDREYPSNFMWLCQINGKAAFPQYQVPMLEKGYTIHNG
PARPTTFLVYNFNKDWIRVGI:CYPSNTSPQVTFGLYQRQNGSLKILEYEPVHISLEELQKQSERKFPDST
GLLFLYLKAKSHRHCHSYCSSQGERVYQAATDSKDISNCMAKAYPQYRKPSVVKRMPAMLTGLQGGCOTQV
VFTSDPHKSYLPVQFQSPDKAETQRGDPVSIVNGTDTTFRSAGVILLVVDPCSVFPRLTEKTVFPLADVSRLEE
YLKTIPIFPRSIVLLSTRGELKQNLISHLLVPLGLAKFAHLYDKGSTIFLGPSCNFKPSWTKLFTSPAGGLGVLE
QFIPILQDEYGCPRATTYRRRDLLELLKQASKAH

質量マッചペプチド(太字):

TUNSSGLPFGSYTFEK [204]

タンデムペプチド (二重下線):

ETGVFAGGTLELHGAR [93]

【図 10 (o) - 1】

図10(o) :

CRCMP #22

ペプチド給源: 1D-GE CRC

SP: P01833 (配列番号:15)

MLLFVLCLLAVFPAISTKSPIFGPEEVNSVEGNSVITCYYPPTSVNRHTKYYWCRQARGGCITLISSEGYVSSKYAGRANLTF
FFENGTFVFNIAQLSQDDSGRYKCGLGINSRGLSFDVSLVSGGPGLLNDCTVYTVDLGRVTV
NCPFKTENAQRRKSLYKQIGLYPVLVIDSSGYVNPYTRIRLDIQGTGQLLFSVVINQLRLSDAGQYLCAQDDSGNSNKN
ADQLVKLPPELVEYDLRGSVTFHCALGPEVANVAKFLCRQSSGENCDVVNTLGKRAPAFEGRILLNPQDKGDS
SPSVVITGLRKREDAGRYLCAHSDGQLQEGSPFAQWLFVNEESTIPRSPTVVKGVAGGSVAVLCPYNRKESKSIKYW
LWEGAQNGRCPLLVDSGHWKQYEGRISLLEPGNGTFVILNQLTSRDAQGYWCLTNGDTLWRCTVEIFPIIEGEPNLK
VPGNVTAVLGETLKVPCHFPCKFSSYEKWMCKWNNTCQALPSQDEGSPFAFVNCDENSR
LVSTILNLTALSGNRGCVQGHFYGETAAVYVAVEERKAAGSRDVSIAKADAAPDEKVLDSGFREIENKAJQ
DPLFAEEKAVADTRDQADGSRASVDSGSESGGSSRALVSTLVPGLVLAVGAVAVGVARHRKKNVDRVSR
SYTDTISMSDFENSREFGANDNKGASSTIQEISLGGREEFVATTESTETETKPKKAKRSSREAEAMAYKDFLLQS
STVAEAQDGPQEA

質量マッペプチド(太字):

AAGSRUVSLAK [34]
ADAAPDEK [35]
AFVNCDENSR [40]
ANLTFPENGTFVFNIAQLSQDDSGR [42]
AQYGR [47]
ASVDSGSSGFGSSSR [50]
DGSFVVITGLR [66]
DQADGSR [71]
DVSIAKADAAPDEK [74]
EEFVATTESTETETK [77]
FSSYEK [100]
GGCITLISSEGYVSSK [108]
GSVTFHCALGPEVANVAK [111]
IEEGPNLK [123]
ILLNPQDK [124]
KYWCR [140]
QSHFYGETAAVYVAVEER [168]
QGHFYGETAAVYVAVEERK [169]
QSSGENCDVVNTLGR [172]
QSSGENCDVVNTLGR [173]
RAPAFEGR [175]
TDISMSDFENS [198]
VLDGSR [214]
VLDGSRPIENK [215]
VPCHFPCK [216]
VYTVDLGR [224]
YKCGLGINSR [236]

タンデムペプチド (二重下線):

ASVDSGSSGFGSSSR [50]
DGSFVVITGLR [66]
EEFVATTESTETETK [77]
ILLNPQDK [124]
LSLLEPGNGTFVILNQLTSR [152]
RAPAFEGR [175]
TDISMSDFENS [198]
VYTVDLGR [224]
YLCAHSDGQLQEGSPFAQWLFVNEESTIPR [238]

【図 10 (o) - 3】

図10(o) 続き

タンデムペプチド (二重下線):

AFVNCDENSR [40]
DAGFYWCLTNGDTLWR [61]
DGSFVVITGLR [66]
IEEGPNLK [123]
ILLNPQDK [124]
LDIQGTGQLLFSVVINQLR [142]
LSLLEPGNGTFVILNQLTSR [152]
QSSGENCDVVNTLGR [172]
VYTVDLGR [224]
YLCAHSDGQLQEGSPFAQWLFVNEESTIPR [238]

細胞外ドメイン(下線)(配列番号:32)

KSPIFGPEEVNSVEGNSVITCYYPPTSVNRHTKYYWCRQARGGCITLISSEGYVSSKYAGRANLTF
FFENGTFVFNIAQLSQDDSGRYKCGLGINSRGLSFDVSLVSGGPGLLNDCTVYTVDLGRVTV
NCPFKTENAQRRKSLYKQIGLYPVLVIDSSGYVNPYTRIRLDIQGTGQLLFSVVINQLRLSDAGQYLCAQDDSGNSNKN
ADQLVKLPPELVEYDLRGSVTFHCALGPEVANVAKFLCRQSSGENCDVVNTLGKRAPAFEGRILLNPQDKGDS
SPSVVITGLRKREDAGRYLCAHSDGQLQEGSPFAQWLFVNEESTIPRSPTVVKGVAGGSVAVLCPYNRKESKSIKYW
LWEGAQNGRCPLLVDSGHWKQYEGRISLLEPGNGTFVILNQLTSRDAQGYWCLTNGDTLWRCTVEIFPIIEGEPNLK
VPGNVTAVLGETLKVPCHFPCKFSSYEKWMCKWNNTCQALPSQDEGSPFAFVNCDENSR
LVSTILNLTALSGNRGCVQGHFYGETAAVYVAVEERKAAGSRDVSIAKADAAPDEKVLDSGFREIENKAJQ
DPLFAEEKAVADTRDQADGSRASVDSGSESGGSSRALVSTLVPGLVLAVGAVAVGVARHRKKNVDRVSR
SYTDTISMSDFENSREFGANDNKGASSTIQEISLGGREEFVATTESTETETKPKKAKRSSREAEAMAYKDFLLQS
STVAEAQDGPQEA

組換えタンパク質(イタリック) (配列番号:33)

KSPIFGPEEVNSVEGNSVITCYYPPTSVNRHTKYYWCRQARGGCITLISSEGYVSSKYAGRANLTF
FFENGTFVFNIAQLSQDDSGRYKCGLGINSRGLSFDVSLVSGGPGLLNDCTVYTVDLGRVTV

【図 10 (o) - 2】

図10(o) 続き

細胞外ドメイン(下線)(配列番号:32)

KSPIFGPEEVNSVEGNSVITCYYPPTSVNRHTKYYWCRQARGGCITLISSEGYVSSKYAGRANL
TFFFENGTFVFNIAQLSQDDSGRYKCGLGINSRGLSFDVSLVSGGPGLLNDCTVYTVDLGRVTV
NCPFKTENAQRRKSLYKQIGLYPVLVIDSSGYVNPYTRIRLDIQGTGQLLFSVVINQLRLSDAGQYLCAQDDSGNSNKN
ADQLVKLPPELVEYDLRGSVTFHCALGPEVANVAKFLCRQSSGENCDVVNTLGKRAPAFEGRILLNPQDKGDS
SPSVVITGLRKREDAGRYLCAHSDGQLQEGSPFAQWLFVNEESTIPRSPTVVKGVAGGSVAVLCPYNRKESKSIKYW
LWEGAQNGRCPLLVDSGHWKQYEGRISLLEPGNGTFVILNQLTSRDAQGYWCLTNGDTLWRCTVEIFPIIEGEPNLK
VPGNVTAVLGETLKVPCHFPCKFSSYEKWMCKWNNTCQALPSQDEGSPFAFVNCDENSR
LVSTILNLTALSGNRGCVQGHFYGETAAVYVAVEERKAAGSRDVSIAKADAAPDEKVLDSGFREIENKAJQ
DPLFAEEKAVADTRDQADGSRASVDSGSESGGSSRALVSTLVPGLVLAVGAVAVGVARHRKKNVDRVSR
SYTDTISMSDFENSREFGANDNKGASSTIQEISLGGREEFVATTESTETETKPKKAKRSSREAEAMAYKDFLLQS
STVAEAQDGPQEA

組換えタンパク質(イタリック) (配列番号:33)

KSPIFGPEEVNSVEGNSVITCYYPPTSVNRHTKYYWCRQARGGCITLISSEGYVSSKYAGRANLTF
FFENGTFVFNIAQLSQDDSGRYKCGLGINSRGLSFDVSLVSGGPGLLNDCTVYTVDLGRVTV

ペプチド給源: 2D-GE

SP: P01833 (配列番号:15)

MLLFVLCLLAVFPAISTKSPIFGPEEVNSVEGNSVITCYYPPTSVNRHTKYYWCRQARGGCITLISSEGYVSS
KYAGRANLTFPENGTFVFNIAQLSQDDSGRYKCGLGINSRGLSFDVSLVSGGPGLLNDCTVYTVDLGRVTV
NCPFKTENAQRRKSLYKQIGLYPVLVIDSSGYVNPYTRIRLDIQGTGQLLFSVVINQLRLSDAGQYLCAQDDSGNSNKN
ADQLVKLPPELVEYDLRGSVTFHCALGPEVANVAKFLCRQSSGENCDVVNTLGKRAPAFEGRILLNPQDKGDS
SPSVVITGLRKREDAGRYLCAHSDGQLQEGSPFAQWLFVNEESTIPRSPTVVKGVAGGSVAVLCPYNRKESKSIKYW
LWEGAQNGRCPLLVDSGHWKQYEGRISLLEPGNGTFVILNQLTSRDAQGYWCLTNGDTLWRCTVEIFPIIEGEPNLK
VPGNVTAVLGETLKVPCHFPCKFSSYEKWMCKWNNTCQALPSQDEGSPFAFVNCDENSR
LVSTILNLTALSGNRGCVQGHFYGETAAVYVAVEERKAAGSRDVSIAKADAAPDEKVLDSGFREIENKAJQ
DPLFAEEKAVADTRDQADGSRASVDSGSESGGSSRALVSTLVPGLVLAVGAVAVGVARHRKKNVDRVSR
SYTDTISMSDFENSREFGANDNKGASSTIQEISLGGREEFVATTESTETETKPKKAKRSSREAEAMAYKDFLLQS
STVAEAQDGPQEA

質量マッペプチド(太字):

ADEGWYWCVK [36]
AFVNCDENSR [40]
ANLTFPENGTFVFNIAQLSQDDSGR [42]
APAFEGR [43]
AQYGR [47]
CGLGINSR [57]
CPLVDSGHWK [58]
DGSFVVITGLR [66]
FSSYEK [100]
GGCITLISSEGYVSSK [108]
GSVTFHCALGPEVANVAK [111]
IEEGPNLK [123]
ILLNPQDK [124]
KNADQLVKLPPELVEYDLR [134]
KYWCR [140]
LFAEEK [143]
QSHFYGETAAVYVAVEER [168]
QGHFYGETAAVYVAVEERK [169]
QSSGENCDVVNTLGR [172]
RAPAFEGR [175]
TDISMSDFENS [198]
VLDGSR [214]
VLDGSRPIENK [215]
VPCHFPCK [216]
VYTVDLGR [224]
YKCGLGINSR [236]

【図 10 (p) - 1】

図10(p) :

CRCMP #23

ペプチド給源: 1D-GE CRC

SP: Q92820 (配列番号:16)

MASPGCLLCVLGILLCAASLELSRPHGDTAKKPIIGLMQKCRKNVKNYGRYYIAASYVKYLEASAGRWVPEVR
LDLCEKDYIELFKSINGILFPGGSVDLRSDYAKVAKIFYNLSQSPDDGYFPVWGTCLOFEELSLLISGECLL
TATDTVDVAKPKNTCGLISRMQNFPTKILLSLAVEPLTANFHNLSLVKNITWNEKLKKEFNVLTTNTDQK
EISTMEGYKYVYGVQWHPEKAPYEWKNLGISHAPNAVKAFYLAEFYVNEARKNNHHFKSESEEEKALITQF
SPIYGNISSFQCCYIFD

質量マッペプチド(太字):

NLOGISHAPNAVK [160]
SINGILFPGGSVDLR [190]
YLEASAGR [239]
YPVYGVQWHPEKAPYEWK [243]

タンデムペプチド (二重下線):

DYIELFK [75]
FFNVLTTNTDGR [91]
EFTISTMEGYK [121]
SINGILFPGGSVDLR [190]
YLEASAGR [239]

ペプチド給源: 2D-GE

SP: Q92820 (配列番号:16)

MASPGCLLCVLGILLCAASLELSRPHGDTAKKPIIGLMQKCRKNVKNYGRYYIAASYVKYLEASAGRWVPEVR
LDLCEKDYIELFKSINGILFPGGSVDLRSDYAKVAKIFYNLSQSPDDGYFPVWGTCLOFEELSLLISGECLL
TATDTVDVAKPKNTCGLISRMQNFPTKILLSLAVEPLTANFHNLSLVKNITWNEKLKKEFNVLTTNTDQK
EISTMEGYKYVYGVQWHPEKAPYEWKNLGISHAPNAVKAFYLAEFYVNEARKNNHHFKSESEEEKALITQF
SPIYGNISSFQCCYIFD

【図 10 (p) - 2】

図10(p) 続き

質量マッチペプチド(太字):

APYEWK [45]
DYEILFK [75]
FNNVLTNTDQK [91]
-SPFSTMEGYK [121]
KFFNVLTWDDK [131]
KNNHFEK [135]
NLGGISHAPNAVK [160]
NNHFEK [163]
RSDYAK [181]
SESEEEK [188]
SINGILFPGGSVDLR [190]
SINGILFPGGSVDLR [191]
TAFYLAEFFVNEAR [196]
WSISVK [228]
YLESAGAR [239]
YFVYGVQWHEEK [242]
YYIAASTVK [245]

タンデムペプチド (二重下線):

FENVJTTTUGK [91]
IEFISMEGVK [121]
NLGGISHAPNAVK [160]
SINGILFPGGSVDLR [190]
TAFYLAEFFVNEAR [196]
YLESAGAR [239]
YFVYGVQWHEEK [242]

【図 10 (q)】

図10(q):

CRCMP #25

ペプチド結源: 1D-GE CRC

SP: P27216 (配列番号: 17)

GRRHAFASSPQGFDVDRDAKKINRACKGMGTNEAAIEILSGRTSDRRQQTQKRYKATYKGFEEVLKSELSGNF
ECTALALDRFSEIYARDLQRAKKGGLGDESVDIEFLCTRINREIIAREAYQRLLFORSLESVDVKGDTSGNLKK
ILVSLQANRHEGDDVDVRLDAGQGADLIDHGEGRMGDELAFTNEVLAKRSYKQLRATFYVALLGKDTFEATPE
ETSSGDERAYLTLVRCAQDCEDYFASRLYKSMWGAGTDEETLIRLYVVTAEVDLOGIKAKPQEKYQKSLSDMVRS
DTSSGDERKLLVALLH

質量マッチペプチド(太字):

AEVDLQGIK [38]
ASSPQGFDVDR [48]
ASSPQGFDVDRDAKK [49]
AYLTLVR [54]
DLYDAGEGR [69]
FQEKYQK [96]
FQEKYQKSLSDMVR [97]
GAGTDEETLIR [102]
GDTSGNLKK [105]
GMGTNEAAIEILSGR [110]
LFORSLESVDK [144]
ILVSLQANR [125]
SDTSSGDER [186]
SELSGVK [187]
SLSDMVR [194]
TALALLORPSEYAAAR [197]
WGTDLAFNEVLAK [225]
WGTDLAFNEVLAKR [226]

タンデムペプチド (二重下線):

AEVDLQGIK [38]
ASSPQGFDVDR [48]
ATPQAYQILIGK [52]
CAQDCEDYFASR [56]
DIEEAIEEETSGDLQK [67]
DLYDAGEGR [69]
GAGTDEETLIR [102]
GMGTNEAAIEILSGR [110]
ILVSLQANR [125]
SDTSSGDER [186]
SELSGVK [187]
TALALLORPSEYAAAR [197]
WGTDLAFNEVLAK [225]

【図 10 (r)】

図10(r):

CRCMP #26

ペプチド結源: 1D-GE CRC

SP: Q14002 (配列番号: 18)

MGSPSACPFYVCTPWQGIILDTASLLTFNNLNSAQTNDVVPFNVASGKEVLLVWHFSSQNLUCYNHWYKGERVHA
NYRIICGVNMIQDENAFGFAHNGRETYPNGKILLQWTHINDACFTLAVIKENLVNEEVTRQFVVFSEPFKFSI
PSNNENPVSNKIDIVLTCPEPTONTTYLWVXQSLVSPRIJLSTGNHTLVLLSATKKNDIGPYECEIQNFVGAS
RSDPVTILNVRYFSVQASSPDLASGTAVISIMIGVLAGMALL

質量マッチペプチド(太字):

SDPVTILNVR [185]

タンデムペプチド (二重下線):

TLVLLSATK [205]

【手続補正書】
【提出日】平成21年4月3日(2009.4.3)
【手続補正1】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図10(h) - 1
【補正方法】変更
【補正の内容】
【図10(h) - 1】

図10(h):

CRCMP #10

ペプチド給源:1D-GE CRC

SP: Q9UN66 (配列番号: 8)

MEASGKLICRQRQVLFSFLLLGLSLAGAAEPRSYSVVEETEGSSFVTNLAKDLGLEQREFSRRGVRVVSrgnKLH
LQLNQETADLLLNEKLDREDLGHTTEPCVLRFOVLLESPPFEFFQAELOVIDINDHSPVFLDKQMLVKVSESSPPG
TAFPLKNAEDLDIGQNNIENYIISPNSYFRVLTRKRSDGRKYPELVLDNALDREEEAE LR LTLTALDGGSPPRSG
TAQVYIEVVDVNDNAPEFQQPFYRVQISEDSPISFLVVKVSATDVD TG VNGEISYSLFQASDEISKTFKVDFTLG
EIRLKKQLDFEKFQSYEVNIEARDAGGFSGKCTVLIQVIDVNDHAEVTMSAFTSPIPENAPETVVALFSVSDLD
SGENGKISCSIQEDLPFLLKSSVGNFYTLTETPLDRESRAEYNVTITVTDLGTPRLTTHLNMTVLVSDVNDNAP
AFTQTSYTLFVRENNSPALHIGSVSATDRDSGTNAQVTYSLLPPQDPHLPLASLVSINTDNGHLFALRSLDYEAL
QAFEFVRVGASDRGSPALSSEALVRVLVLDANDNSPFVLYPLQNGSAPCTELVPRAAEPGYLVTKVVAVDGDSGQN
AWLSYQLLKATEPGLFGVWAHNGEVRTARLLSERDAKQRLVVLVKDNGEPPCSATATLHLLLVDGFSQPYLPLP
EAAPAQGGADSLTVYLVVALASVSSLFVSVLLFVAVLLCRRSRAASVGRCSVPEGPFPGHLVDVVRGTGSLSQNY
QYEVCLAGSGTNEFQFLKPVL PNIQGHSGPEMEQNSNFRNGFGFSLQLK

質量マッチペプチド(太字):

タンデムペプチド (二重下線):

CSVPEGPFPGHLVDVR [60]

細胞外ドメイン(下線)(配列番号:29)

AEPRSYSVVEETEGSSFVTNLAKDLGLEQREFSRRGVRVVSrgnKLH LQLNQETADLLLNEKLDRE
DLGHTTEPCVLRFOVLLESPPFEFFQAELOVIDINDHSPVFLDKQMLVKVSESSPPGTAFPLKNAEDLDIGQNNI
ENYIISPNSYFRVLTRKRSDGRKYPELVLDNALDREEEAE LR LTLTALDGGSPPRSGTAQVYIEVVDVNDNAPE
FQQPFYRVQISEDSPISFLVVKVSATDVD TG VNGEISYSLFQASDEISKTFKVDFTLG EIRLKKQLDFEKFQSY
EVNIEARDAGGFSGKCTVLIQVIDVNDHAEVTMSAFTSPIPENAPETVVALFSVSDLD SGENGKISCSIQEDL
PFLLKSSVGNFYTLTETPLDRESRAEYNVTITVTDLGTPRLTTHLNMTVLVSDVNDNAP AFTQTSYTLFVREN
NSPALHIGSVSATDRDSGTNAQVTYSLLPPQDPHLPLASLVSINTDNGHLFALRSLDYEALQAFEFVRVGASDRG
SPALSSEALVRVLVLDANDNSPFVLYPLQNGSAPCTELVPRAAEPGYLVTKVVAVDGDSGQNAWLSYQLLKATE
PGLFGVWAHNGEVRTARLLSERDAKQRLVVLVKDNGEPPCSATATLHLLLVDGFSQPYLPLPEAAPAQGGADS
LTVYL

【手続補正2】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】

2009540281000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/055537

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/574 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
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, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 03/020934 A (DIADEXUS INC [US]; SUN YONGMING [US]; LIU CHENGHUA [US]; GHOSH MALAVIK) 13 March 2003 (2003-03-13)</p> <p>page 6 page 18 - page 19 pages 95-100 sequence 131 claims 1-17 examples 5,7-11</p> <p>----- -/-</p>	<p>1,3-8, 10-18, 20-22, 24-27, 29,31, 32,34, 36,37, 39-41, 43,45, 47,49, 50,52, 54-57</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier 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.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 October 2007

Date of mailing of the international search report

15/05/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bayer, Martin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/055537

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	REYMOND M A ET AL: "Expression and functional proteomics studies in colorectal cancer" PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE, GUSTAV FISCHER, STUTTGART, DE, vol. 200, no. 2, 30 April 2004 (2004-04-30), pages 119-127, XP004959031 ISSN: 0344-0338 the whole document	1,3-8, 10-18, 20-22, 24-27, 29,31, 32,34, 36,37, 39-41, 43,45, 47,49, 50,52, 54-57
Y	WO 98/42736 A (PROTEOME SCIENCES PLC [GB]; HOCHSTRASSER DENIS FRANCOIS [CH]; REYMOND) 1 October 1998 (1998-10-01) the whole document	1,3-8, 10-18, 20-22, 24-27, 29,31, 32,34, 36,37, 39-41, 43,45, 47,49, 50,52, 54-57
Y	REYMOND M A ET AL: "STANDARDIZED CHARACTERIZATION OF GENE EXPRESSION IN HUMAN COLORECTAL EPITHELIUM BY TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS" ELECTROPHORESIS, WILEY-VCH VERLAG, WEINHEIM, DE, vol. 18, no. 15, December 1997 (1997-12), pages 2842-2848, XP002071492 ISSN: 0173-0835 the whole document	1,3-8, 10-18, 20-22, 24-27, 29,31, 32,34, 36,37, 39-41, 43,45, 47,49, 50,52, 54-57

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2007/055537

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

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

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claim 52 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

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

see additional sheet(s)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/EP2007 /055537

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, 3-8, 10-18, 20-22, 24-27, 29, 31-32, 34, 36-37, 39-41, 43, 45, 47, 49-50, 52 and 54-57 (all partially)

The claims concern methods and means using SEQ ID NO 1 and peptides derived therefrom as marker for investigating colorectal cancer.

Inventions 2-18: Claims 1-58 (partially)

The claims concern methods and means using SEQ ID NOs 2-18 and peptides derived therefrom as markers for investigating colorectal cancer.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/055537

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03020934	A	13-03-2003	NONE
WO 9842736	A	01-10-1998	AT 259504 T 15-02-2004
		AU 740707 B2 15-11-2001	
		AU 6739698 A 20-10-1998	
		AU 726738 B2 16-11-2000	
		AU 6739998 A 20-10-1998	
		CA 2283640 A1 01-10-1998	
		CA 2284272 A1 01-10-1998	
		DE 69821604 D1 18-03-2004	
		DE 69821604 T2 05-01-2005	
		DK 970377 T3 14-06-2004	
		EP 0971951 A1 19-01-2000	
		EP 0970377 A1 12-01-2000	
		ES 2217541 T3 01-11-2004	
		WO 9843091 A1 01-10-1998	
		JP 2001526644 T 18-12-2001	
		JP 2001521631 T 06-11-2001	
		PT 970377 T 30-06-2004	
		US 2002150569 A1 17-10-2002	

フロントページの続き

(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, MT, 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, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 2G045 AA26 DA36 FB03

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA22 DA50 DA86 EA20 EA50