

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6419576号

(P6419576)

(45) 発行日 平成30年11月7日(2018.11.7)

(24) 登録日 平成30年10月19日(2018.10.19)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12 Z N A

C 1 2 Q 1/37 (2006.01)

C 1 2 Q 1/37

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

C 1 2 M 1/34 E

C O 7 K 14/745 (2006.01)

C O 7 K 14/745

C 1 2 N 9/50 (2006.01)

C 1 2 N 9/50

請求項の数 22 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2014-541350 (P2014-541350)  
 (86) (22) 出願日 平成24年11月9日(2012.11.9)  
 (65) 公表番号 特表2014-533115 (P2014-533115A)  
 (43) 公表日 平成26年12月11日(2014.12.11)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/064526  
 (87) 国際公開番号 W02013/071168  
 (87) 国際公開日 平成25年5月16日(2013.5.16)  
 審査請求日 平成27年11月6日(2015.11.6)  
 (31) 優先権主張番号 61/558,927  
 (32) 優先日 平成23年11月11日(2011.11.11)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 514116143  
 イムコア ジーティーアイ ダイアグノス  
 ティクス インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 ジョージア州 3007  
 1, ノークロス, ゲートウェイドライブ  
 3130  
 (74) 代理人 110001302  
 特許業務法人北青山インターナショナル  
 (72) 発明者 ヴィセンティン, ジャン パオロ  
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53  
 189, ウォーキシャー, イー サンセッ  
 トドライブ 1623, アパートメント  
 205

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテアーゼADAMTS13を切断するフォン・ヴィレブランド因子の検出用ポリペプチド基  
 体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

50乃至70アミノ酸長で、配列番号：7に記載のアミノ酸配列又は配列番号：7のア  
 ミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、トロンボスポンジ  
 ンI型モチーフを有するジスインテグリン様及びメタロペプチダーゼ メンバー13 (A  
 D A M T S 1 3) 用の単離したポリペプチド基質であって：

(i) 配列番号：7の位置4に対応するアミノ酸がリジン(K)であり；かつ

(i i) 配列番号：7の位置15に対応するアミノ酸がシステイン(C)であり；

前記ポリペプチド基質がADAMTS13切断活性の基質である

ことを特徴とするポリペプチド基質。

【請求項2】

56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、  
 69、70、71、72、73、74又は75アミノ酸長で、配列番号：1に記載のアミ  
 ノ酸配列又は配列番号：1のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸  
 配列を含む、ADAMTS13ポリペプチド基質であって：

(i) 配列番号：1の位置4に対応するアミノ酸がリジン(K)であり；

(i i) 配列番号：1の位置15に対応するアミノ酸がシステイン(C)であり；かつ

(i i i) 配列番号：1の位置34に対応するアミノ酸がグルタミン酸(E)であり；

前記ポリペプチド基質がADAMTS13切断活性の基質である

ことを特徴とするADAMTS13ポリペプチド基質。

10

20

## 【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質において、前記ポリペプチド基質の N 末端におけるアミノ酸がアスパラギン酸 ( D ) であることを特徴とする A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質。

## 【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載の A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質において、前記ポリペプチド基質の C 末端におけるアミノ酸がアルギニン ( R ) であることを特徴とする A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質。

## 【請求項 5】

請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項に記載の A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質において、前記ポリペプチドが、検出可能なラベルを含む合成ポリペプチドであることを特徴とする A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質。

10

## 【請求項 6】

請求項 5 に記載の A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質において、前記検出可能なラベルが蛍光色素分子と消光剤であることを特徴とする A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質。

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載の A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質において、前記蛍光色素分子の付着部位が、配列番号： 1 または配列番号： 7 の位置 1 5 に対応するアミノ酸にあり、及び / 又は、前記消光剤の付着部位が、配列番号： 1 または配列番号： 7 の位置 4 に対応するアミノ酸にあるか、あるいは、前記消光剤の付着部位が、配列番号： 1 または配列番号： 7 の位置 1 5 に対応するアミノ酸にあり、及び / 又は、前記蛍光色素分子の付着部位が、配列番号： 1 または配列番号： 7 の位置 4 に対応するアミノ酸にある、ことを特徴とする A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質。

20

## 【請求項 8】

請求項 1 及び 3 乃至 7 のいずれか 1 項に記載の A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質が、配列番号： 7 に記載の配列を含む、あるいはこの配列からなる、ことを特徴とする A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質。

## 【請求項 9】

請求項 2 乃至 7 のいずれか 1 項に記載の A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質が、配列番号： 1 に記載の配列を含む、あるいはこの配列からなる、ことを特徴とする A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質。

30

## 【請求項 10】

凍結乾燥ポリペプチド基質であって、

前記基質が、 5 6、 5 7、 5 8、 5 9、 6 0、 6 1、 6 2、 6 3、 6 4、 6 5、 6 6、 6 7、 6 8、 6 9、 7 0、 7 1、 7 2、 7 3、 7 4 又は 7 5 アミノ酸長であり、配列番号： 1 に記載のアミノ酸配列又は配列番号： 1 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで：

( i ) 配列番号： 1 の位置 4 に対応するアミノ酸がリジン ( K ) であり；

( i i ) 配列番号： 1 の位置 1 5 に対応するアミノ酸がシステイン ( C ) であり；かつ

( i i i ) 配列番号： 1 の位置 3 4 に対応するアミノ酸がグルタミン酸 ( E ) である基質であり、

40

または

前記基質が、 5 0 乃至 7 0 アミノ酸長であり、配列番号： 7 に記載のアミノ酸配列又は配列番号： 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで：

( i ) 配列番号： 7 の位置 4 に対応するアミノ酸がリジン ( K ) であり；かつ

( i i ) 配列番号： 7 の位置 1 5 に対応するアミノ酸がシステイン ( C ) である基質であり、

前記ポリペプチド基質が A D A M T S 1 3 切断活性の基質であることを特徴とする凍結乾燥ポリペプチド基質。

50

**【請求項 1 1】**

請求項 1 乃至 9 のいずれか 1 項に記載のトロンボスポンジン I 型モチーフを有するジスインテグリン様及びメタロペプチダーゼ メンバー 1 3 ( A D A M T S 1 3 ) 用の凍結乾燥ポリペプチド基質。

**【請求項 1 2】**

請求項 1 乃至 1 1 のいずれか 1 項に記載の A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質を切断する方法において、当該 A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質を A D A M T S 1 3 プロテアーゼに接触させるステップを具えることを特徴とする方法。

**【請求項 1 3】**

サンプル中の A D A M T S 1 3 活性を測定する方法において、請求項 1 乃至 1 1 のいずれか 1 項に記載の A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質を使用するステップを具えることを特徴とする方法。

10

**【請求項 1 4】**

請求項 1 3 に記載の方法において：

( a ) A D A M T S 1 3 を含む、又は含むと思われるサンプルを提供するステップと；  
( b ) 前記サンプルを、請求項 1 乃至 1 1 のいずれか 1 項に記載の A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質に接触させるステップと；  
( c ) 前記 A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質の断片化を測定するステップと；  
を具え、前記 A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質の断片化を、一またはそれ以上の対照及び / 又は校正器と選択的に比較して、A D A M T S 1 3 活性の測定を行うことを特徴とする方法。

20

**【請求項 1 5】**

請求項 1 4 に記載の方法において、前記 A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質の切断が、蛍光の変化をモニタすることによって測定されることを特徴とする方法。

**【請求項 1 6】**

請求項 1 4 に記載の方法において、前記 A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質がステップ ( b ) において溶液中にあることを特徴とする方法。

**【請求項 1 7】**

請求項 1 4 に記載の方法において、前記 A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質が固相サポートに付着することを特徴とする方法。

30

**【請求項 1 8】**

A D A M T S 1 3 プロテアーゼ活性の定量測定を行う方法において：

( a ) A D A M T S 1 3 を含む、又は含むと思われるサンプルを提供するステップと；  
( b ) 前記サンプルを、請求項 1 乃至 1 1 のいずれか 1 項に記載の A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質に接触させるステップと；  
( c ) 前記 A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質の断片化を測定するステップと；  
を具え、前記 A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質の断片化を、一またはそれ以上の対照及び / 又は校正器と選択的に比較して、A D A M T S 1 3 活性の測定を行うことを特徴とする方法。

**【請求項 1 9】**

請求項 1 8 に記載の方法において、前記 A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質がステップ ( b ) において溶液中にあることを特徴とする方法。

40

**【請求項 2 0】**

請求項 1 8 に記載の方法において、前記 A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質が固相サポートに付着することを特徴とする方法。

**【請求項 2 1】**

対象中の A D A M T S 1 3 活性をインビトロでテストするキットにおいて、請求項 1 乃至 1 1 のいずれか 1 項に記載の A D A M T S 1 3 ポリペプチド基質、既知の濃度の A D A M T S 1 3 活性を含む一またはそれ以上の校正器、及び / 又は A D A M T S 1 3 活性用の一またはそれ以上の陽性対照を具え、選択的に検体希釈剤及び / 又は基質バッファを伴う

50

ことを特徴とするキット。

【請求項 22】

サンプル中のADAMTS13活性を測定するための、請求項1乃至11のいずれか1項に記載のADAMTS13ポリペプチド基質の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願のクロスリファレンス]

本出願は、2011年11月11日に出願した米国暫定出願第61/558,927号 10  
の利益を請求する。この出願は全内容が引用により本明細書に組み込まれている。

【背景技術】

【0002】

フォン・ヴィレブランド因子(VWF)は、血液凝固系において抗血友病因子キャリアとしておよび血小板-血管壁メディエータとして機能すること、主に、血管損傷部位で循環する血小板の結合と付着を媒介することによる、止血の維持に極めて重要な大きな多重結合プラズマ糖たんぱく質である。この遺伝子の突然変異体あるいはこのたんぱく質の欠陥によって、フォン・ヴィレブランド病(VWD)が引き起こされる。

【0003】

VWFは、内皮細胞と巨核球によって発現する。これは、250-kDaのモノマーとして合成され、細胞間処理、グリコシル化、多量体化、成熟VWFマルチマーの形成につながるプロペプチド除去を経る。 20

【0004】

VWF多重結合サイズは、プラズマメタロペプチダーゼADAMTS13(トロンボスポンジンI型モチーフを有するジスインテグリン及びメタロペプチダーゼメンバー13、「切断プロテアーゼ」)によって調節される。これは、VWF A2ドメイン(AA1498-1665; UniProtKB/Swiss-Protデータベース; 登録: P04275、配列番号: 2)の単一部位において、Y1605とM1606の間を切断する。

【0005】

ADAMTS13は、バリウムとその他の金属イオンの存在下で活性化するプロテアーゼである。ADAMTS13は、完全多量体VWFをより小さいサイズのマルチマーと、分子量がより小さいポリペプチド又はペプチドに分解することが証明されている。このため、ADAMTS13プロテアーゼは、VWF-切断プロテアーゼ又は「ATSプロテアーゼ」と呼ばれている。血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)患者ではプロテアーゼの活性が減少することが証明されている。 30

【0006】

重度のプロテアーゼ欠乏は、遺伝的な、又は自己免疫機序によって生じるTTPを慢性的に再発する患者に見られる。

【0007】

これまでは、ADAMTS13の存在又は欠如を調べるアッセイは、患者からの血漿を、1.5モルの尿素を含むバッファに浮遊させたメンブレン表面の塩化バリウム存在下で、外因性多重結合vWFを用いてインキュベートするといった、面倒な技術を用いていた。より近年は、Kokame et al.によって代替の方法が開発された(Kokame, K., Y. Nobe, Y. Kokubo, A. Okayama, and T. Miyata. 2005. FRET-S-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. Br. J. Haematol. 129: 93-100. また、Wu JJ, Fujikawa K, McMullen BA, Chung Dw. Characterization of a core binding site for ADAMTS13 in the A2 50

domain of von Willebrand factor. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103: 18470-4 も参照)。Kokame の方法は、ADAMTS13 の活性にポリペプチド基体を使用しており、この基体 VWF の A2 ドメイン中の 73 アミノ酸残基であり、VWF73 と呼ばれる。FRET-S-VWF73 がこのドメイン内にあり、73 - アミノ酸ポリペプチド配列は、VWF の D1596 から R1668 の領域（明細書中の配列番号：6 を参照）に対応しており、A2pr(Nma) と A2pr(Dnp) で置換されている場合は、Q1599 と N1610 にそれぞれ対応する。配列番号：6 を用いていくつかのアッセイが開発されている。VWF73 ベースの ADAMTS13 アッセイは、臨床治療の改善に寄与する可能性がある。

【0008】

10

しかしながら、配列番号：6 のデノボ合成は困難であり、FRET-S-VWF73 基体は、UV スペクトル付近で機能する。したがって、生成された信号は、アッセイが同質である、すなわち、自己蛍光ノイズの主たる原因の一つである、血漿を洗浄することなく単一ステップで行われるということによって悪化することがある自己蛍光の大きな影響を受ける。自己蛍光の影響を受けやすいため、FRET-S-VWF73 基体をベースにしたアッセイは、ダスト微粒子に非常に反応して、潜在的に、複製力が弱く異常な結果となる。更に、FRET-S-VWF73 基体アッセイによると、通常、非線形校正曲線となり、ADAMTS13 活性が 10% 以下と、精度が低くなることもある。これは、0 - 10% の ADAMTS13 の溶解度は、医師が TTP 診断を確認し、治療的介入（血漿交換など）を監視して微調整するのに重要であるため、問題である。更に、配列番号：6 のポリペプチドを用いた ADAMTS13 活性アッセイは、感度が低いという問題がある。

20

【0009】

この結果、改善した ADAMTS13 ポリペプチド基体が、この分野で求められている。本発明は、この必要性に対する取り組みを探すものである。

【0010】

[発明の態様及び実施例]

第 1 の態様では、トロンボスポンジン I 型モチーフを有するディスインテグリン様及びメタロペプチダーゼ 13 (ADAMTS13) 用の単離されたポリペプチド基体が提供されている。これは、45 乃至 70 アミノ酸長であり、配列番号：2 に記載されているフォン・ヴィレブランド因子 A2 ドメイン配列の部分とほぼ同じであり、以下の一またはそれ以上の修飾を伴う：(i) 配列番号：2 の位置 1599 に対応するアミノ酸が Q から K に変異；(ii) 配列番号：2 の位置 1610 に対応するアミノ酸が N から C に変異；及び (iii) 配列番号：2 の Q1624 乃至 R1641 に対応するアミノ酸が欠如している。

30

【0011】

第 2 の態様では、アミノ酸長 50 乃至 75 で、配列番号：2 に記載されているフォン・ヴィレブランド因子 A2 ドメイン配列の部分とほぼ同じアミノ酸配列を有する ADAMTS13 ポリペプチド基体が提供されており、これは以下の一またはそれ以上の修飾を伴う：(i) 配列番号：2 の位置 1599 に対応するアミノ酸が Q から K に変異；(ii) 配列番号：2 の位置 1610 に対応するアミノ酸が N から C に変異；(iii) 配列番号：2 の位置 1629 に対応するアミノ酸が G から E に変異；及び (iv) 配列番号：2 の G1631 乃至 R1641 に対応するアミノ酸が欠如している。

40

【0012】

好ましくは、ポリペプチド基体の N 末端のアミノ酸が、配列番号：2 の D1596 に対応している。

【0013】

好ましくは、ポリペプチド基体の C 末端のアミノ酸が、配列番号：2 の R1668 に対応している。

【0014】

好ましくは、このポリペプチドが、検出可能なラベルを含む合成ポリペプチドである。

50

## 【 0 0 1 5 】

好ましくは、この検出可能なラベルが蛍光色素分子と消光剤である。

## 【 0 0 1 6 】

好ましくは、蛍光色素分子の付着部位が、配列番号：2の位置1610に対応するアミノ酸にある、及び/又は消光剤の付着部位が配列番号：2の位置1599に対応するアミノ酸にある、あるいは、消光剤の付着部位が配列番号：2の位置1610に対応するアミノ酸にある、及び/又は蛍光色素分子の付着位置が配列番号：2の位置1599に対応するアミノ酸にある。

## 【 0 0 1 7 】

好ましくは、ADAMTS13ポリペプチド基体が、配列番号：7に記載の配列を含む、あるいはこの配列からなる、あるいは、ほぼこの配列からなる。

10

## 【 0 0 1 8 】

好ましくは、ADAMTS13のポリペプチド基体が、配列番号：1に記載の配列を含む、あるいはこの配列からなる、あるいは、ほぼこの配列からなる。

## 【 0 0 1 9 】

好ましくは、ADAMTS13のポリペプチド基体が凍結乾燥されている。

## 【 0 0 2 0 】

更なる態様では、ADAMTS13ポリペプチド基体を切断する方法が提供されており、これは、ADAMTS13ポリペプチド基体をADAMTS13プロテアーゼに接触させるステップを具える。

20

## 【 0 0 2 1 】

更なる態様では、サンプル中のADAMTS13活性を測定する方法であって、ADAMTS13ポリペプチド基体の使用を具える方法が提供されている。

## 【 0 0 2 2 】

好ましくは、この方法は：(a)ADAMTS13を含む又は含むと疑われるサンプルを提供するステップと；(b)そのサンプルをADAMTS13ポリペプチド基体と接触させるステップと；及び(c)ADAMTS13ポリペプチド基体の断片化を測定するステップと；を具え、ADAMTS13ポリペプチド基体の断片化を選択的に、一またはそれ以上の対照及び/又は校正器と比較して、ADAMTS13活性の測定を行う。

## 【 0 0 2 3 】

好ましくは、ADAMTS13ポリペプチド基体の切断を、蛍光の変化をモニタすることで測定する。

30

## 【 0 0 2 4 】

好ましくは、ステップ(a)におけるサンプルが血漿サンプルである、あるいは、血漿サンプル由来のものである。

## 【 0 0 2 5 】

好ましくは、ADAMTS13ポリペプチド基体が、接触ステップ(b)の間に溶液中にある。好ましくは、ADAMTS13ポリペプチド基体が、プロテアーゼによる切断時に溶液中にある。好ましくは、ADAMTS13ポリペプチド基体が、ADAMTS13プロテアーゼによる切断時に溶液中にある。

40

## 【 0 0 2 6 】

好ましくは、ADAMTS13ポリペプチド基体が、接触ステップ(b)の間に固体サポートに付着する。好ましくは、ADAMTS13ポリペプチド基体が、プロテアーゼによる切断時に固体サポートに付着する。好ましくは、ADAMTS13ポリペプチド基体が、ADAMTS13プロテアーゼによる分解時に固体サポートに付着する。好ましくは、ADAMTS13ポリペプチド基体が、接触ステップ(b)の間にウエルに付着する。好ましくは、ADAMTS13ポリペプチド基体が、接触ステップ(b)の間に、マイクロウエルストリップの2又はそれ以上のウエルに付着する。好ましくは、ADAMTS13ポリペプチド基体が、接触ステップ(b)の間に、ビーズに付着する。

## 【 0 0 2 7 】

50

好ましくは、ステップ(d)が、ADAMTS13ポリペプチド基体の断片化の定量測定である。

【0028】

更なる態様では、対象中のADAMTS13活性のインビトロ試験用キットが提供されており、このキットは、ADAMTS13ポリペプチド基体、既知の濃度のADAMTS13活性を含む一またはそれ以上の校正器、及び/又は、ADAMTS13活性用の一またはそれ以上の陽性対照を含み、選択的に試料希釈剤及び/又は基体バッファを伴う。

【0029】

更なる態様では、サンプル中のADAMTS13プロテアーゼの活性を測定するためのADAMTS13ポリペプチド基体の使用を提供する。

10

【0030】

ここで述べるADAMTS13ポリペプチド基体は、いくつかの利点を有する。

【0031】

一例として、ポリペプチド基体は確実に合成できる。ポリペプチド基体を化学合成により合成する場合、組み換え合成及び73-mer合成に比較して、低いコストで生成できる。

【0032】

更なる例として、既存のADAMTS13活性ベースのアッセイに比べて、より高い解像度、より高い感度、及びより高い精度で、リニア校正曲線を達成できる。

【0033】

20

更なる例として、ADAMTS13アッセイでは低い信号対ノイズ比が得られる。

【0034】

更なる例として、ADAMTS13アッセイではより迅速な反応時間(15分又はそれより少ない反応時間)に対して、FRET5-VWF73ベースのアッセイによる30分)が得られる。

【0035】

更なる例として、検出可能なラベルを使用した時に、最も広く使用した波長で励起と発光が生じ、検出をより簡単にする。

【0036】

更なる例として、アッセイのより高いダイナミックレンジが達成でき、その結果ADAMTS13を、既存の活性ベースのアッセイでは効率よく解像できない範囲である、約0-20%の活性範囲で正確に測定することができる。したがって、類似の臨床症候群を呈する溶血性尿毒症症候群(HUS)を含むその他の疾患からのTTP鑑別診断における改善がなされる。TTPの予後管理における改善も達成できる。

30

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】図1は、A2ドメイン(AA1498-1665)に亘るVWFの一部(AA1498-1668)のタンパク質配列を示す。

【図2】図2は、配列番号:1のアミノ酸配列を示す。

【図3】図3は、従来技術のFRET5-VWF73を用いて取得した一連の校正曲線を示す。

40

【図4】図4は、「GTI\_\_FRET4」配列番号:1と表す、出願人が合成した62アミノ酸長ポリペプチド配列を用いて取得した一連の校正曲線を示す。

【図5】図5は、「GTI\_\_FRET5」配列番号:7と表す、出願人が合成した55アミノ酸長ポリペプチド配列を用いて取得した一連の校正曲線を示す図であり、時間経過に伴う蛍光の変化を表す。

【0038】

定義

以下の説明において、多くの用語が広範囲にわたって使用されている。以下の定義により、本発明の理解が容易になる。本出願の範囲内で使用した技術用語と表現は、一般的に

50

、この分野の技術用語と表現に共通している意味を持つ。以下の用語のすべての定義は、本出願の全内容に適用される。用語「具える」は、他の要素又はステップを排除するものではなく、不定冠詞は複数の排除するものではない。所定の数値または範囲のコンテキストにおける用語「実質的に」、「約」、「およそ」、その他は、所定の値又は範囲の20%以内、10%以内、あるいは5%以内の値又は範囲を意味する。標準的な分析法の不正確さによって、分子量及びポリマ超は、およその値であると解される。このような値が「約」Xあるいは「およそ」Xと表現されている場合は、記載した値Xは±10%まで正確であると解される。

【0039】

ここで用いられているように、「核酸」又は「核酸分子」は、デオキシリボ核酸(DNA)や、リボ核酸(RNA)、オリゴヌクレオチド、増幅生成物、連鎖反応、切断、エンドヌクレアーゼ活性、ゲノムDNA、遺伝子組み換えベクトル、及び化学的合成分子のいずれかによって生じた断片といった、ポリヌクレオチドを意味する。核酸分子は、天然に存在するヌクレオチド、あるいは天然に存在するヌクレオチドの類似体(例えば、天然に存在するヌクレオチドの鏡状異性型)、又はこれらの組み合わせであるモノマーでできていてもよい。核酸は、単鎖又は二重鎖のいずれでもよい。

【0040】

用語「核酸分子の相補性」とは、基準となる核酸配列と比較して、相補的核酸配列及び逆の方向性を有する核酸分子を意味する。例えば、配列5'ATGCACGGG3'は、5'CCCCGTGCAT3'と相補である。

【0041】

用語「縮重核酸」は、ポリペプチドをエンコードする基準核酸分子と比較して、一またはそれ以上の縮重コドンを含むヌクレオチド配列を意味する。縮重コドンは、核酸の異なる三連塩基を含むが、同じアミノ酸残基をエンコードする(すなわち、GAUとGAC三連塩基は、各々Aspをエンコードする)。

【0042】

「単離した核酸分子」は、器官のゲノム核酸に一体化されていない核酸分子である。例えば、細胞のゲノム核酸から分離されている核酸分子は、単離した核酸分子である。単離した核酸分子のもう一つの例は、器官のゲノムに一体化されていない、化学的に合成した核酸分子である。特定の種から単離した核酸分子は、その種からのクロモソームの完全な核酸分子より小さい。

【0043】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合で結合したアミノ酸残基のポリマーであり、天然あるいは合成に生成される。10アミノ酸残基より少ないポリペプチドが、通常、「ペプチド」と呼ばれる。

【0044】

「タンパク質」は、一またはそれ以上のポリペプチド鎖を含む巨大分子である。タンパク質は、また端子化物群、経口検出部分及び/又はリンカなどの、非ペプチド成分を含んでいてもよい。これらの非ペプチド成分は、そのタンパク質が生成される細胞ごとにタンパク質に加えることができ、細胞のタイプで変化する。タンパク質は、ここでは、そのアミノ酸の骨格構造で規定され;非ペプチド成分は、一般的にアミノ酸配列を意味する場合、特定されないが、存在することがある。

【0045】

非宿主DNA分子によってエンコードされたペプチド又はポリペプチドは、「異種」ペプチド又は「異種」ポリペプチドである。

【0046】

「単離ポリペプチド」又は「単離ペプチド」は、基本的に、炭水化物、脂質、あるいは天然のポリペプチドに付着するその他のタンパク質性不純物、といった細胞成分のコンタミネートがない。通常は、単離ポリペプチド又は単離ペプチドの作成は、少なくとも純度80%、少なくとも純度90%、少なくとも純度95%、又は純度99%以上と、非常に

10

20

30

40

50

純化された形のポリペプチド又はペプチドを含む。特定のタンパク質作成が、単離したポリペプチド又はペプチドを含むことを示す一つの方法は、そのタンパク質作成の、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) - ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びそのゲルのクマシーブリリアントブルー染色の後に、単帯域が現れることによる。しかしながら、用語「単離した」は、ダイマーや、代替的にグリコシル化した又は誘導体といった、代替の物理的フォームにおける同じポリペプチド又はペプチドの存在を排除するものではない。上述した通り、用語「少なくとも純度80%」は、純度80%から純度100%までのすべての又は一部の数を含む。同じことが、「少なくとも純度90%」、「少なくとも純度95%」にも言える。上述した通り用語「純度95%より高い」とは、95.01%から100%の純度を意味し、その間の全数字又は部分的な数字を含む。

10

**【0047】**

用語「アミノ末端基」及び「カルボキシル末端基」は、ここでは、ポリペプチド又はペプチド内の位置を表示するのに用いられている。このコンテキストでは、これらの用語は、ポリペプチド又はペプチドの特定配列又は部分に関連して用いられており、近接位置又は関連位置を表示する。例えば、ポリペプチド又はペプチド内の基準配列に対してカルボキシル末端基に位置する所定の配列は、基準配列のカルボキシル末端基に近接して配置されているが、必ずしも完全なポリペプチド又はペプチドのカルボキシル末端基でなくともよい。

**【0048】**

用語「発現」は、遺伝子産物の整合性を意味する。例えば、構造遺伝子の場合、発現には構造遺伝子のmRNAへの転写と、mRNAの一またはそれ以上のポリペプチドへの翻訳を意味する。

20

**【0049】**

「検出可能なラベル」は、ポリペプチドに結合、付着、あるいは組み込こんで、診断に有用な分子を生成できる分子又は原子である。このラベルは、ポリペプチドに付着させたあるいは組み込んだ時に、ポリペプチドを検出可能にするあらゆるタイプのラベルであってもよい。検出可能なラベルは、一またはそれ以上の以下の特徴を有する：蛍光、色、放射線感受性、又は光感受性。検出可能なラベルの例には、キレータ、光活性剤、放射線アイソトープ、経口剤、常磁性イオン、あるいは蛍光共鳴エネルギー転写 (FRET) ドナー及び/又はアクセプタなどのその他のマーカー部分が挙げられる。

30

**【0050】**

用語「親和性タグ」は、ここでは、第2のポリペプチド又はペプチドに付着して第2のポリペプチド又はペプチドの精製又は検出を提供する、あるいは、第2のポリペプチド又はペプチドを基体に付着させる部位を提供する、ポリペプチド又はペプチドのセグメントを記載するのに使用されている。原理的には、抗体又はその他の特定結合剤が入手可能であるポリペプチド又はペプチドを親和性タグとして使用することができる。親和性タグは、ポリヒスチジン配列、タンパク質A (Nilsson et al., EMBO J. 4:1075 (1985); Nilsson et al., Methods Enzymol. 198:3 (1991))、グルタチオンS転移酵素 (Smith and Johnson, Gene 67:31 (1988))、Glu-Glu親和性タグ (Gruessenmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952 (1985))、物質P、FLAGペプチド (Hopp et al., Biotechnology 6:1204 (1988))、ストレプトタビジン結合ペプチド、あるいはその他の抗原エピトープ又は結合ドメインを含む。一般的に、Ford et al., Protein Expression and Purification 2:95 (1991)を参照。DNA分子コード化親和性タグは、業者 (例えば、Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) から入手可能である。

40

**【0051】**

ポリペプチド又はペプチドの配列又はポリヌクレオチド配列を記載するのにここで使用

50

している用語「ほぼ同様」は、対応する範囲にわたって二つの配列が少なくとも70%あるいは75%の同一性を共有していることを意味する。より好ましくは、同一性パーセンテージが少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも85%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも96%、97%、98%、あるいは99%の同一性である。同一性における差異は、第2の配列に比べて第1の配列における残基の追加、欠如、あるいは置換によるものであってもよい。この分野の当業者は、ポリペプチド又はペプチド配列又はポリヌクレオチド配列と基準配列との間の同一性パーセンテージを容易に計算するであろう。例えば、二つのポリヌクレオチド配列の同一性パーセンテージは、Devereux et al. によって書かれた、University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWCGC) から入手可能な、GAP コンピュータプログラム、バージョン6.0 (Nucleic Acids Res. 12:387, 1984) を使用して配列情報を比較することで決定することができる。GAP プログラムの典型的なデフォルトパラメータには：(1)ヌクレオチド用単項比較マトリックス(同一に対して値1、非同に対して値0を含む)と、Schwartz and Ayhoeff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979 に記載されている Gribskov and Burgess, Nucleic Acids Res. 14:6745, 1986 の重みづけ比較マトリックス；(2)各ギャップにつき3.0のペナルティと、各ギャップの各シンボルに付き追加の0.10ペナルティ；及び(3)エンドギャップについてはペナルティなし；が含まれる。配列比較の分野における当業者に知られている様々なプログラムを代替的に利用できる。

#### 【0052】

ここで用いられているように、用語「少なくとも70%同一」又は「少なくとも70%の同一性」とは、ポリペプチド又はペプチド配列、又はポリヌクレオチド配列が、基準配列と70%-100%の配列同一性を共有していることを意味する。この同一性の範囲は、すべての整数(例えば、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、)93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%)又、列挙した範囲、したがってこの明細書の一部を形成している数に受け入れられる端数(例えば、72.15%、87.27%、92.83%、98.11%有効桁数2桁)を含む。例えば、基準配列と85%の同一性を共有している200の残基を伴うアミノ酸配列は、170の同一残基と30の非同残基を有するであろう。同様に、235残基を伴うアミノ酸配列は、基準配列に同一である200の残基を有しており、したがって、この舞の酸配列は基準配列に対して85.11%同一である。同様に、用語「少なくとも80%」、「少なくとも90%」、「少なくとも95%」及び「少なくとも99%」などは、列挙した範囲内の整数又は端数のすべてを含む。ここで使用されているように、用語「95%以上同一」又は「95%の以上の同一性」とは、配列が基準配列と95.01%-100%の配列同一性を共有していることを意味する。この配列は包括的である。同一性における差異は、第2の配列に比べて第1の配列における残基の追加、欠如、あるいは置換によるものであってもよい。

#### 【0053】

ここで使用されている用語「サンプル」は、対象の血液、血漿、あるいは組織など、体液を含む。このサンプルは、ヒト対象など、ADAMTS 13に関連する疾患があると疑われるヒトから取得できる又は取得可能である。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0054】

一実施例はADAMTS 13ポリペプチド基体に関する。好ましくは、ADAMTS 13ポリペプチド基体は、45乃至72アミノ酸長、あるいは45乃至70アミノ酸長、あるいは50乃至75アミノ酸長といった、45乃至75アミノ酸長である。より好ましく

は、A D A M T S 1 3 ポリペプチド基体は、4 5 乃至 6 5 アミノ酸長、5 0 乃至 6 5 アミノ酸長、5 0 乃至 6 0 アミノ酸長、5 1 乃至 5 9 アミノ酸長、5 2 乃至 5 8 アミノ酸長、5 3 乃至 5 7 アミノ酸長、5 4 乃至 5 6 アミノ酸長、5 0 乃至 7 0 アミノ酸長、5 5 乃至 7 0 アミノ酸長、5 5 乃至 6 5 アミノ酸長、6 0 乃至 6 5 アミノ酸長、6 1 乃至 6 4 アミノ酸長、又は 6 1 乃至 6 3 アミノ酸長、である。一の実施例では、A D A M T S 1 3 ポリペプチド基体が 5 5 乃至 6 2 アミノ酸長である。一実施例では、A D A M T S 1 3 ポリペプチド基体が 5 5 アミノ酸長である。一の実施例では、A D A M T S 1 3 ポリペプチド基体が 6 2 アミノ酸長である。一実施例では、A D A M T S 1 3 ポリペプチド基体が、4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、5 9、6 0、6 1、6 2、6 3、6 4、6 5、6 6、6 7、6 8、6 9、7 0、7 1、7 2、7 3、7 4 又は 7 5 アミノ酸長であり、ここに記載した特徴を有する。

10

**【 0 0 5 5 】**

A D A M T S 1 3 ポリペプチド基体は、V W F A 2 ドメインの部分に亘る単離したキメラ又は突然変異アミノ酸構造である。

**【 0 0 5 6 】**

一の態様では、単離したポリペプチド基体は、4 5 乃至 7 0 アミノ酸長であり、配列番号：2 に記載の V W F A 2 ドメイン配列の部分に実質的に類似したアミノ酸配列を有しており、以下の修飾の一またはそれ以上を伴う：( i ) 配列番号：2 の位置 1 5 9 9 に対応するアミノ酸が Q から K に変異している；( 2 ) 配列番号：2 の位置 1 6 1 0 に対応するアミノ酸が N から C に変異している；及び ( i i i ) 配列番号：2 の Q 1 6 2 4 から I 1 6 4 2 に対応するアミノ酸が欠如している。

20

**【 0 0 5 7 】**

別の態様では、単離したポリペプチド基体は、5 0 乃至 7 5 アミノ酸長であり、配列番号：2 に記載の V W F A 2 ドメイン配列の部分に実質的に類似したアミノ酸配列を有しており、以下の修飾の一またはそれ以上を伴う：( i ) 配列番号：2 の位置 1 5 9 9 に対応するアミノ酸が Q から K に変異している；( 2 ) 配列番号：2 の位置 1 6 1 0 に対応するアミノ酸が N から C に変異している；及び ( i i i ) 配列番号：2 の位置 1 6 2 9 に対応するアミノ酸が G から E に変異している；及び ( i v ) 配列番号：2 の G 1 6 3 1 乃至 R 1 6 4 1 に対応するアミノ酸が欠如している。

**【 0 0 5 8 】**

30

好ましくは、このポリペプチド基体の N 末端のアミノ酸が、配列番号：2 の D 1 5 9 6 に対応する。好ましくは、このポリペプチドの C 末端のアミノ酸が配列番号：2 の R 1 6 6 8 に対応する。好ましくは、このポリペプチド基体の N 末端のアミノ酸が、配列番号：2 の D 1 5 9 6 に対応し、このポリペプチド基体の C 末端のアミノ酸が、配列番号：2 の R 1 6 6 8 に対応する。

**【 0 0 5 9 】**

配列番号：2 は、ホモサピエンス由来の V W F の A 2 ドメインの断片；受け入れ番号 P 0 4 2 7 5 - 1 ( U n i P r o t K B / S w i s s - P r o ) ; U P I 0 0 0 1 B B E 4 2 F ( U n i P a r e ) ; I P I 0 0 0 2 3 0 1 4 . 2 ( I n t e r n a t i o n a l P r o t e i n I n d e x ) に対応する。

40

**【 0 0 6 0 】**

一実施例では、A D A M T S 1 3 ポリペプチド基体が、配列番号：7 又は配列番号：1 に記載の配列、又は、これらに実質的に同一である配列を含む、これらの配列からなる、あるいは実質的にこれらの配列からなる。これらの配列のイソマーも意図されている。更なる実施例では、A D A M T S 1 3 ポリペプチド基体が、そのポリペプチド基体の N 末端、又は C 末端、あるいは N 末端と C 末端に、一またはそれ以上の更なるアミノ酸を含むものでもよい。

**【 0 0 6 1 】**

配列番号：1 又は配列番号：7 のポリペプチド基体の分解産物も開示されており、特にこれらの分解産物は、A D A M T S 1 3 を伴う以下の断片を生成する。特に、C 末端断片

50

が開示されている。したがって、更なる態様では、トロンボスポンジン I 型モチーフを有するディスインテグリン様及びメタロペプチダーゼ 13 (ADAMTS13) 用の単離したポリペプチドが提供されており、これは少なくとも 52 アミノ酸長で、配列番号：2 に記載されたフォン・ヴィレブランド因子 A2 ドメイン配列の部分と実質的に同じであり、以下の一またはそれ以上の修飾を伴う、アミノ酸配列を有する：(i) 配列番号：2 の位置 1610 に対応するアミノ酸が N から C に変異している；及び (ii) 配列番号：2 の Q1624 から R1641 に対応するアミノ酸が欠如している。好ましくは、このポリペプチド基体の N 末端のアミノ酸が、配列番号：2 の M1606 に対応する。好ましくは、このポリペプチド基体の C 末端のアミノ酸が、配列番号：2 の R1668 に対応する。好ましくは、このポリペプチドは、合成ポリペプチドであり、検出可能なラベルの少なくとも一部分を含む。好ましくは、検出可能なラベルの少なくとも一部分が、蛍光又は消光剤である。好ましくは、蛍光色素分子又は消光剤の付着部位が、配列番号：2 の位置 1610 に対応するアミノ酸である。別の態様では、トロンボスポンジン I 型モチーフを有するディスインテグリン様及びメタロペプチダーゼ 13 (ADAMTS13) 用の単離したポリペプチド基体が提供されており、これは、45 アミノ酸長であるか、あるいは少なくとも 45 アミノ酸長であり、配列番号：2 に記載のフォン・ヴィレブランド因子 (VWF) A2 ドメイン配列の部分と実質的に同じであり、以下の一またはそれ以上の修飾を伴う、アミノ酸配列を有する：(i) 配列番号：2 の位置 1610 に対応するアミノ酸が N から C に変異している；及び (ii) 配列番号：2 の位置 1629 に対応するアミノ酸が G から E に変異している；及び (iii) 配列番号：2 の G1631 から R1641 に対応するアミノ酸が欠如している。好ましくは、このポリペプチド基体の N 末端のアミノ酸が、配列番号：2 の M1606 に対応する。好ましくは、このポリペプチド基体の C 末端のアミノ酸は、配列番号：2 の R1668 に対応する。好ましくは、このポリペプチドは、合成ポリペプチドであり、検出可能なラベルの少なくとも一部分を含む。好ましくは、検出可能なラベルの少なくとも一部分が、蛍光又は消光剤である。好ましくは、蛍光色素分子又は消光剤の付着部位が、配列番号：2 の位置 1610 に対応するアミノ酸である。

#### 【0062】

ここに記載したポリペプチド基体をコード化する単離したヌクレオチド配列も開示されている。更に、VWF 遺伝子の機能断片が開示されている。この開示のコンテキストにおいて、VWF 遺伝子の「機能断片」又は「断片」は、ここに記載されているドメイン、又は、少なくとも ADAMTS13 切断活性の基体として ADAMTS13 と特異的に相互作用するドメインである VWF ポリペプチドの部分をコードする核酸分子である。VWF 遺伝子の機能断片は、機能断片が対応する VWF の部分の各連続アミノ酸残基を含むポリペプチドをコード化する必要はない。換言すれば、機能断片が ADAMTS13 切断活性の基体である限り、VWF の機能断片は、天然 VWF の部分に整列でき、そして、挿入、欠失あるいは置換のうちの一またはそれ以上を含むことができる。

#### 【0063】

VWF は、血液凝固システムにおいて抗血友病因子キャリアと血小板 - 血管壁伝達物質の両方として機能すること、主に、血管損傷部位における血漿のテザーリング及び付着を媒介することによって、止血維持に重要な、大きい多重結合血漿糖たんぱく質である。この遺伝子またはこのたんぱく質の欠陥は、フォン・ヴィレブランド病 (VWD) となる。

#### 【0064】

VWF は、上皮細胞と巨核球によって発現する。これは、細胞間処理を行う 250 - kDa のモノマ、グリコシル化、多量体化、及び、成熟した VWF マルチマーの形成を引き起こすプロペプチドの除去によって合成される。

#### 【0065】

VWF 多重結合サイズは、血漿メタロペプチダーゼ ADAMTS13 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif, member 13) によって調整される。これは、VWF A2 ドメインの単一部位 (AA1498 - 1665; UniPro

10

20

30

40

50

t K B / S w i s s - P r o d a t a b a s e ; A c c e s s i o n : P 0 4 2 7 5 ;  
F i g . 1 ) において、Y 1 6 0 5 と M 1 6 0 6 の間を切断する ( 図 2 ) 。

【 0 0 6 6 】

ここに述べたように、「G T I \_ F R E T 5 」配列番号：7 と表す、合成 5 5 アミノ酸 ( A A ) 長ポリペプチド配列が開示されており、選択的に、消光剤と、A D A M T S 1 3 によって認識され切断すると、蛍光を放射する蛍光色素分子などの検出可能なラベルの挿入により修飾される。「G T I \_ F R E T 4 」配列番号：1 と表す、合成 6 2 アミノ酸 ( A A ) 長のポリペプチド配列も開示されており、選択的に、消光剤と、A D A M T S 1 3 によって認識され切断すると、蛍光を放射する蛍光色素分子などの検出可能なラベルの挿入により修飾される。

10

【 0 0 6 7 】

好ましくは、このポリペプチドは、この分野で知られている化学合成技術を用いて作成される。この合成は固相あるいは液相ペプチド合成を利用することができる。アミノ酸残基の修飾が必要な場合は、修飾したアミノ酸を適宜ペプチドシンセサイザに導入できる。

【 0 0 6 8 】

遺伝子組み換えプロセスによってもポリペプチド基体を作成することができる。遺伝子組み換えプロセスによるポリペプチドの作成は、S a m b r o o k , J . , E . F . F r i t s c h 及び T . M a n i a t i s ( 1 9 8 9 , M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y . ) が記載した方法など、この分野の当業者によく知られている方法で行うことができる。

20

【 0 0 6 9 】

好ましくは、ポリペプチドは、凍結乾燥ポリペプチドであってもよい。凍結乾燥は、米国特許第 5 , 5 5 6 , 7 7 1 号に記載されており、ここに引用されている方法など、この分野の当業者に知られているプロセスに従って行うことができる。

【 0 0 7 0 】

対象における A D A M T S 1 3 の活性は、A D A M T S 1 3 用のポリペプチド基体を用いて測定することができる。例えば、このポリペプチド基体を、血漿などの対象からのサンプルに接触させ、結果物であるポリペプチド基体のポリペプチド断片を分析する。S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動の使用を含め、この分野の様々な方法を用いて、結果物であるポリペプチド断片を分析できる。タンパク質を、クマシー・ブルー又は銀染色などを用いて染色し、作成した断片を分析する。代替的に、S D S - P A G E に続いて、ウェスタンブロット法を行うようにしてもよい。好ましくは、その結果を対照サンプル及び / 又は校正サンプルと比較する。対照サンプルは、A D A M T S 1 3 の「正常」活性を有することが知られている対象から抽出して、異常な活性の診断を行うことができる。

30

【 0 0 7 1 】

検出可能なラベルは、ポリペプチドのアミノ酸残基に直接付着させてもよいが、検出可能なラベルを、例えば、ポリペプチドのアミノ酸残基に付着している ( 例えば、共有結合を介したリンク又は間接的なリンクによって ) キレート基に複合させることによって、間接的に付着させることもできる。特定の実施例では、「検出可能なラベル」は、ポリペプチド基体が切断したら、実質的に検出可能な信号を放出するものであれば、どのようなタイプのラベルでもよい。このように、検出可能なラベルは、蛍光共鳴エネルギー転移 ( F R E T ) ドナー及び / 又はアクセプタを具備していてもよい。一実施例では、ポリペプチド基体が、少なくとも一の消光剤と少なくとも一の蛍光色素分子を組み入れる又は挿入することによって修飾されており、A D A M T S 1 3 によって認識され切断した時に、蛍光を発する。好ましくは、基体が合成ポリペプチド ( 遺伝子組み換えポリペプチドと対照的に ) である。これによって、消光剤と蛍光色素分子を直接組み込むことができるからである。非切断基体では、消光剤と蛍光色素分子との間の蛍光共鳴エネルギーの転移によって、蛍光が小さく ( 例えば、実質的に蛍光がない ) なる。A D A M T S 1 3 による基体の切断が生じると、消光剤と蛍光色素分子が分離し、その結果蛍光が検出可能に大きくなり、測

40

50

定できる。

【0072】

したがって、一実施例では、ポリペプチド基体が検出可能なラベル具えており、ポリペプチド基体の断片化を行って直接測定できるようにする。一の実施例では、検出可能なベルが蛍光色素分子と消光剤であり、断片化が生じると蛍光色素分子の消光が小さくなる。したがって、ADAMTS 13ポリペプチド基体の断片化によって、蛍光信号が増加する。基体が切断されるときに蛍光の読みによって、基体の切断が検出される。本発明のこの実施例によれば、当業者はポリペプチド基体が、化学合成技術によって合成する必要があることを認識するであろう。なぜなら、遺伝子組み換えのアプローチは通常、検出可能なラベルの組み入れを行わないからである。

10

【0073】

蛍光色素分子と消光剤の付着部位は、通常、ポリペプチド基体の中にある。好ましくは、蛍光色素分子と消光剤が互いに分離されており、ポリペプチド基体が無傷である場合蛍光色素分子からの蛍光がほぼ消光され、ポリペプチド基体が分離すると蛍光色素分子からの蛍光が消光されないようにする。一実施例では、蛍光色素分子と消光剤が8、9、10、11又は12のアミノ酸によって、好ましくは、蛍光色素分子と消光剤が9、10、又は11のアミノ酸によって、より好ましくは、蛍光色素分子と消光剤が10のアミノ酸によって分離される。一実施例では、蛍光色素分子の付着部位が、配列番号：2の位置1610に対応するアミノ酸であり、及び/又は、消光剤の付着位置が、配列番号：2の位置1599に対応するアミノ酸である。蛍光色素分子と消光剤の位置が逆になって、消光剤の付着部位が、配列番号：2の位置1610に対応するアミノ酸であり、及び/又は、蛍光色素分子の付着位置が、配列番号：2の位置1599に対応するアミノ酸であることも意図している。

20

【0074】

もう一つの態様はサンプル中のADAMTS 13の活性を測定する方法に関するものであり、上述のポリペプチド基体を、対称由来のサンプルと接触させ、断片化生成物を分析するステップを具える。

【0075】

対象中のADAMTS 13の活性（例えば、ADAMTS 13の活性の疾患又は欠陥）したがって、TTPの存在又はTTP体質をインビトロで試験するあるいは、TTPの決定的な診断とTTPとHUSの間の区別を行う、キット又は診断用組成物が開示されている。その他の疾患状態あるいは条件ADAMTS 13活性レベルの穏やかなあるいはゆっくりとした下降も、その他の疾患状態あるいは条件（例えば、Kokame et al . Blood (2004) 103, 607; 及びKokame et al . Br . J . Haematol (2005) 129, 93)に関連している。このキット又は組成物は、ここに述べたADAMTS 13のポリペプチド基体を具える。通常は、キットは、一またはそれ以上の陽性対照、及び/又は一またはそれ以上のキャリブレーションを具える。典型的には、キットも、検体希釈剤及び/又は基体バッファ（例えば、提供されたポリペプチド基体のインビトロでの試験に適している）5.8乃至6.7のpH範囲にpHが対応するバッファ溶液を含む。指示書セットを提供することもできる。対象中のADAMTS 13活性のインビトロでの試験を行う方法は、この分野で知られている（例えば、Miyata, T. K. Kokame, F. Banno, Y. Shin, and M. Akiyama, 2007. ADAMTS 13 assays and ADAMTS 13-deficient mice. Curr. Opin. Hematol. 14: 277-283 参照）。多くの売主が、ADAMTS 13の活性を検出し及び/又は決定するキットを販売している（例えば、FRET-S-VWF73 (Peptides International, USA. Cat# SFR-3224-s) TECHNOZYME (R) ADAMTS 13 INHELISA (Kordia, Netherlands, Cat# TC 5450401), Human ADAMTS 13 ELISA Kit 及び固定化したADAMTS 13抗体アガロース（両社とも、Bethyl Laboratories

30

40

50

es, USA. Cat#s E88-500 and S300-391から入手可能)、及びIMUBIND(R)ADAMTS13 ELISA(American Diagnostica, GmbH, Germany, Cat# 813参照)。凝固試験及び凝固アッセイの一般的性能を調べるための血液検体を回収、搬送及び処理する方法は、この分野で知られている(例えば、Approved Guideline H21-A4 NCCLS, Volume 23, Number 35, December 2003; Br. J. Haematol. 129:93-100 and Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103:18470-4参照)。キットは、二価の金属イオンなど、ADAMTS13の活性化剤を具えていてもよい。

【0076】

10

ポリペプチド基体は、基体のN末端及び/又はC末端に付着したタグ配列を有していてもよい。タグ配列は、分離生成物の検出、定量化、あるいは切断に使用できる。また、タグ配列は、ポリペプチド基体を固相に固定するのに有用である。従って、本発明は、このようなタグ配列を用いて固相に固定化したポリペプチド基体にも及ぶ。タグ配列には、限定するものではないが、タンパク質(例えば、グルタチオン転移酵素、ルシフェラーゼ、  
-ガラクトシダーゼ)、ペプチド(例えば、His タグ)、結合剤(例えば、カルボジイミド試薬)、様々な種類のラベル(例えば、放射性ラベル、発色団、及び酵素)が挙げられる。

【0077】

更なる実施例では、本発明は、上述した診断用組成物又はキットを製造するためのポリペプチド基体の使用に関する。

20

【0078】

本開示は、更に、以下の実施例に記載されており、本発明をさらに詳細に説明する。これらの実施例は、本発明を実行するのに現に意図している好ましいモードで書かれており、本発明を説明するためのものであって、限定するものではない。

【実施例】

【0079】

実施例1: ADAMTS13基体としての、配列番号: 1のポリペプチド基体(GTI\_\_FRET4)の評価

【0080】

30

目的:

この実験の目的は、第2世代のADAMTS13アッセイにおけるADAMTS13基体として使用する、配列番号: 1(GTI\_\_FRET4; 62AA; MW7855.9; ポリペプチド純度95.5%)のポリペプチドを評価することであった。

【0081】

手順の概要:

実施例の手順は、Kokame, K., Y. Nobe, Y. Kokubo, A. Okayama, and T. Miyata. 2005, FRET S-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. Br. J. Haematol. 129:93-100に記載されている手順のとおり行ったが、この文献に記載されている73アミノ酸基体に代えて、配列番号: 1を用いた。FRET S-VWF73溶液を、25%のジメチルスルフォオキシド/水に溶かして、100µMのストック溶液を作成した。GTI\_\_FRET4配列番号: 1を、100%のDMSOに溶かした。両基体を、ATS-13基体バッファ(Gen-Probe GTI Diagnostics, Inc., U.S.A., Cat# ATS-13)を用いて、等濃度に希釈した。

40

【0082】

血漿サンプルを、ATS-13方向挿入に従って、ATS-13検体希釈剤(Gen-Probe GTI Diagnostics, Inc., U.S.A., Cat# ATS-13)を用いて希釈した。希釈した血漿サンプルを、希釈した基体と混合して、0

50

、5、10、15、20、30、45分後に、BioTek FLX800を用いて、各基体について適宜の励起及び発光波長で、蛍光を読み取った。蛍光値を表1に示す。

#### 【0083】

配列番号：1ポリペプチド基体中の蛍光色素分子 - 消光剤対は、FAM - 5 / TQ\_\_2 (登録商標) (Ex 485 ± 20 ; Em 528 ± 20 ; AAT Bioquest, Inc. Sunnyvale, CA USA) である。Kokameに記載されているFRET S - VWF 73の蛍光色素分子と消光剤対 (Nma / Dnp) を、GTI\_\_FRET 4配列番号：1において、それぞれFAM - 5とTQ\_\_2で置換した。更に、配列番号：1ポリペプチド中で、蛍光色素分子 (FAM - 5) と消光剤 (TQ\_\_2) の位置を、FRET S - VWF 73構成の蛍光色素分子と消光剤の位置に対して交換した。したがって、GTI\_\_FRET 4配列番号：1については、蛍光色素分子 (FAM - 5) の付着が、位置15においてアスパラジンをシスチンで置換することによって生じる。消光剤 (TQ\_\_2) は、位置4において、グルタミンをリシンで置換することによって付着した (図2及び表4)。

#### 【0084】

結果：

この実験の結果は、配列番号：1ポリペプチド基体を使用することによって、従来技術のFRET S - VWF 73基体を用いた場合と比べて、より大きなダイナミックレンジが得られることを示している。この実験では、30分経過時点で、FRET S - VWF 73基体の約1500乃至2000RFUの差異にくらべて、校正器A (ADAMTS 13活性0%と同等) と校正器E (ADAMTS 13活性100%と同等) との間に約34,000相対蛍光単位 (RFU) の差異があった。すべての時点における蛍光の変化について表1、図3及び図4を参照。

#### 【0085】

校正曲線によると、ポリノミナル傾向のラインを要する校正曲線 (図3) ができるFRET S - VWF 73アッセイに比べて直線傾向のラインとなった (図4)。配列番号：1ポリペプチド基体の校正曲線は、45分経過するまで、直線でありつづけた。

#### 【0086】

各時点で校正曲線から観察された直線傾向ラインを用いて、正常%活性 (%N) (表2参照) を計算する。30分経過時に、%NのADAMTS 13活性を各サンプルプラトーについて計算したところ、15分後のFRET S - VWF 73に比較できる結果を示している。

#### 【0087】

実施例2：

配列番号：1ポリペプチド基体 (GTI\_\_FRET 4) と、従来技術のFRET S - VWF 73ポリペプチド基体 (Peptides International; Louisville, KY) との直接比較

#### 【0088】

目的：

この実験の目的は、配列番号：1ポリペプチド基体をFRET S - VWF 73 (配列番号：6) と比較することである。

#### 【0089】

手順の概要

この実験では、以前の実験で測定した基体濃度と蛍光読取設定値を用いた。試験を行った検体 (表3に列挙) は、ATS - 13 (Gen - Probe GTI Diagnostics, Inc., USA, Cat# ATS - 13) 用に調整した成熟サンプルのパネルを含む。これは、正常な又は欠陥のあるADAMTS 13活性レベルのサンプルを含む。更に、6つのFactor Assay Control血漿を使用した (2 - FACT、2A - FACT及び2B - FACT、George King Biomedical Inc., Kansas, USA)。配列番号：1基体と従来技術のFRET S - V

WF 73のアッセイを、実施例1で述べた手順におおよそしたがって、実行した。基体は、そのアッセイで使用した配列番号：1のポリペプチド基体のモル量が、従来技術で使用したFRET S - VWF 73のモル量に同様になるように調整した、基体の初期テストに用いた条件に従って調整した。ELISAアッセイは、0、5、10、15、20、30、45分で読み取る。

【0090】

結果：

これらの実験結果により、配列番号：1ポリペプチド基体が、FRET S - VWF 73基体に比べてより大きいダイナミックレンジを提供することが確認された。30分経過時点で、FRET S - VWF 73で観察された2500RFUに比べて、校正器AとEの差異が、約35000RFUである（図3 - 4）。より大きいダイナミックレンジによって、ADAMTS 13活性が低いサンプルにより良好な感度が提供される。更に、FRET S - VWF 73基体と同じ濃度で使用する場合、反応時間がより速くなる。%N活性値の一致が、15分経過後の読みで観察された（表2）。校正曲線は、リニアであり、ユーザへの複雑な分析結果を取り除く。

【0091】

実施例3：配列番号：7ポリペプチド基体（GTI\_\_FRET 5）の切断についての評価

【0092】

この実験の目的は、配列番号：7ポリペプチド基体を、配列番号：1ポリペプチド基体と比較することである。

【0093】

手順の概要

ADAMTS 13による切断性についての基体のテストを、ほぼ実施例1に述べたとおり、測定した。

【0094】

結果：

時間に伴う蛍光の変化を図5に示し、配列番号：7ポリペプチド基体の切断が生じることを示す。

【0095】

実施例4：配列番号：7ポリペプチド基体の溶解性評価とアッセイ分析。

【0096】

この実験の目的は、配列番号：7ポリペプチド基体の溶解性を評価し、その性能を、配列番号：1ポリペプチド基体と比較することである。

【0097】

上述した通り、250  $\mu$ Lの希釈標準溶液を作成した。この溶液を、強くボルテックスして、溶液中に見えるようにする。溶液を、~12,000gで約2分遠心分離にかける。遠心分離後、試験管の底に極小のピンクの沈殿物がみられる。このことは、少なくともいくらかの量の材料が沈殿することを示している。別の試験管を上述の通り準備して、基体バッファに代えて水をいれた。この試験管も遠心分離に掛けた。再び、ピンクの沈殿物が試験管の底に観察された。水溶液中で観察された沈殿物は、基体バッファ溶液中に見られた沈殿物より目に見えて大きい。このことは、ポリペプチドが、バッファより水に溶けにくいことを示唆している。

【0098】

この実験の目的は、配列番号7GTI\_\_FRET 5ポリペプチド基体を、GTI\_\_FRET 4（配列番号：1）と比較することである。ADAMTS 13による切断性についての基体の試験を、実施例1に記載したものとほぼ同様に行ったが、FRET S - VWF 73に代えてGTI\_\_FRET 5を用いた。

【0099】

このアッセイは、0、5、10、15、20、30、45、60、及び90分で読み取る。

## 【 0 1 0 0 】

結果：

この実験データは、配列番号：7ポリペプチド基体は、作成した希釈標準溶液に完全には溶解しないことを示している。しかし、結果として取得した校正曲線は、リニアであり（図5参照）、基体の切断が生じる。配列番号：1ポリペプチド基体又は配列番号：7ポリペプチド基体を用いて、基体の追加後30分で観察された活性の比較を表5に示す。配列番号：7ポリペプチド基体の校正曲線は、60分を通じて直線的に上がり続けている。

## 【 0 1 0 1 】

本明細書に記載した刊行物は、本出願の出願日以前に開示された関連情報を提供している。本明細書の記載は、発明者らがこの開示に先立って権利を与えられないとの証明であると解釈すべきでない。本明細書に記載したすべての刊行物は、引用により組み込まれている。この開示の様々な変形及び変更は、本発明の範囲と精神から離れることなくこの分野の当業者には自明である。本発明は、特定の好ましい実施例に関連して記載されているが、特許を請求する本発明が、これらの特定の実施例に不当に制限されると解すべきではない。実際、上述した本発明を実行するモードの当業者には明らかな様々な変形が、特許請求の範囲内であること意図している。

## 【表1】

表1

配列番号:1ペプチド基体を用いて観察した蛍光の変化

各時点(X分-0分読取)における蛍光値の増加						
サンプル ID	15 分	30 分	45 分	60 分	75 分	90 分
キャリブレータA	676	843	921	1,166	1,013	959
キャリブレータB	1,765	3,000	4,164	5,358	6,468	7,581
キャリブレータC	6,178	11,701	16,807	21,705	26,685	32,209
キャリブレータD	10,887	20,626	29,206	37,289	44,543	53,613
キャリブレータE	18,718	35,085	49,418	61,068	70,603	82,999
陽性対照 高	9,146	17,281	24,859	31,857	39,838	47,473
陽性対照 低	2,182	3,902	5,511	7,169	8,789	10,370
VF	1,292	2,436	3,552	4,690	5,784	7,260
UAMS041609	3,876	7,931	11,692	15,886	19,867	24,709
MON110707	17,881	33,432	46,848	58,747	68,370	78,371

## 【表 2】

表2

配列番号: 1 ペプチド基体を用いて各時点について取得した  
直性蛍光ラインで計算した%N活性

	FRETS-VWF73 基体に 基づく割当/期待正常% ADAMTS13活性値	GFI_FRET4 基体を用いて計算した正常%ADAMTS13値					
		15 分	30 分	45 分	60 分	75 分	90 分
インキュベーション時間	30 分						
サンプルID							
キャリブプレートA	0	1	1	0	0	0	0
キャリブプレートB	9	7	7	7	7	6	6
キャリブプレートC	34	32	33	33	34	35	36
キャリブプレートD	55	58	59	59	60	61	62
キャリブプレートE	102	101	101	100	100	98	98
陽性対照 高	36-54	48	49	50	51	54	55
陽性対照 低	6-17	10	10	10	10	10	9
VF	~20	5	6	6	6	5	6
UAMS041609	~35	19	22	23	24	26	27
MON110707	~90-100	97	96	95	96	95	92

10

20

【表 3】

表3  
実施例に用いた材料

材料	製造者 (Cat. No.) 又は関連データ	Lot No.
ATS-13 キャリブレーション/対照 基体バッファ (SBA)	GTI	CA-CE020410, PCH020410, PCL020410
検体希釈液 (SDA)	GTI	SBA011810
基体 (SA)	GTI	SDA011810
プレート	GTI	SA112509
DMSO	Sigma (D8418)	ATS-011410
正常プール血漿	GTI	038K07101
ATS-13 成熟 サンプル 1-5	GTI	NPP032206
A-FACT 血漿	George King BioMedical (A-FACT)	020910-ATS
A-FACT 血漿	George King BioMedical (A-FACT)	1284
B-FACT 血漿	George King BioMedical (B-FACT)	900
B-FACT 血漿	George King BioMedical (B-FACT)	1114
FACT 血漿	George King BioMedical (FACT)	1266
FACT 血漿	George King BioMedical (FACT)	1223
VF	04/09/01	222e1
BCM2	07/22/08	03/08/10
UAMS041609	04/16/09	07/22/08
ATS AC 及び AB CNTL	05/14/209	04/16/09
		2051008

10

20

30

【表 4】

表4  
アミノ酸配列

配列番号:	Sequence. N-terminus to C-Terminus.	note
1	DREKAPNLVYMTGCPASDEIKRLPGDIQVVPFIEVIGWPNAPILIQDFETLP REAPDLVLQR	GTI_FRET4
2	MIPARFAGVLLALALILPGTLCAEGTRGRSSTARCSLFGSDFVNTFDGSMYS FAGYCSYLLAGGCQKRSFSIIIGDFQNGKRVLSVYLGEFFDIHLFVNGTVTQ GDQRVSMPLYASKGLYLETEAGYYKLSGEAYGFVARIDGSGNFQVLLSDRYFN KTCGLCGNFNIFAEDDFMTQEGTLTSDPYDFANSWALSSGEQWCERASPPSS SCNISSGEMQKGLWEQCQLLKSTSVFARCHPLVDPEPFVALCEKTLCECAGG LECACPALLEYARTCAQEGMVLYGWDTHSACSPVCPAGMEYRQCVSPCARTC QSLHINEMCQERCVDGCSCPEGQLLDEGLCVESTPCVHSGKRYPPGTSLS RDCNTCICRNSQWICSNEECPGECCLVTGQSHFKSFDNRYFTFSGICQYLLAR DCQDHSFSIIVETVQCADDRDAVCTRSTVTRLPLHLNSLVKLKHGAGVAMDG QDVQLPLLKGDRLRIQHTVTASVRLSYGEDLQMDWDGRGRLLVKLSPVYAGKT CGLCGNYNGNQDDFLTPSGLAEPRVEDFGNAWKLHGDCQDLQKHSDPCAL NPRMTRFSEEACAVLTSPTFEACHRAVSPLPYLRNCRYDVCSCSDGRECLCG ALASYAAACAGRGRVAVWREPGRCELNCPKGQVYLQCGTPCNLTCSRSLSPD EECNEACLEGCFPPGLYMDERGDVCPKAQCPCYYDGEIFQPEDIFSDHHTM CYCEDGFMHCTMSGVPGSLLPDAVLSSPLSHRSKRSLSCRPPMVKLVCADN LRAEGLECTKTCQNYDLECMSMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQ GKEYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYL FPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIEL FDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYIIILLGKALSVDWRHLSISVVLKQTY QEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLD SSPATCHNNIMKQTMVDSSCRILTSDFVQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSC SIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHGVVTVRTATLCPQSCEERNLRENGYECEW RYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDC PVCEVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCEACQEPGGLVVPPT DAPVSPTTLYVEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFV VDMMERLRISQKWVRVAVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSELRRIASQVKYAGS QVASTSEVLKYTLFQIFSKIDRPEASRITLLMASQEPQMRNRFVRYVQGL KKKKVIVIPVGIGPHANLKQIRLIEKQAPENKAFVLSSVDELEQQRDEIVSY LCDLAPEAPPPTLPPDMAQVTVGPGLLGVSTLGPKRNSMVLDVAFVLEGS DKIGEADFNRSKEFMEEVIQRMDVGQDSIHVTVLQYSYMTVEYYPFSEAQSKGD	1-22 Signal Peptide; 23-763 von willebrand antigen II; 764-2813 vwf.

10

20

30

40

表4は次頁につづく

10  
20  
30

表4は次頁につづく

配列番号:	Sequence. N-terminus to C-Terminus.	note
3	<p>MHQRHPRARCPLCVAGILACGFLGCGWGPSHFQQSCLQALEPQAVSSYLSP</p> <p>GAPLKGRPPSPGFGQRQRQRRAAGGILHLELLVAVGPDVFAQHQEDTERYV</p> <p>LTNLNIGAELLRDPSLGAQFRVHLVKMVILTEPEGAPNITANLTSSLLSVCG</p> <p>WSQTINPEDDDTPGHADLVLYITRFDLELPDGNRQVRGVTQLGGACSPWSC</p> <p>LITEDTGFDLGVTIAHEIGHSFGLHGDGAPGSGCGPSGHVMASDGAAPRAGL</p> <p>AWSPCSRRLQLLSLLSAGRARCVDPPRPQPGSAGHPPDAQPGLYYSANEQCR</p> <p>VAFGPKAVACTFAREHLDMCQALSCHTDPLDQSSCSRLLVPLLDGTECGVEK</p> <p>WCSKGRCSRSLVELTPIAAVHGRWSSWGPRSPCSRSCGGGVVTRRRQCNNPRP</p> <p>AFGGRACVGADLQAEMCNTQACEKTQLEFMSQQCARTDGQPLRSSPGGASFY</p> <p>HWGAAVPHSQGDALCRHMCRAIGESFIMKRGDSFLDGTRCMPSPGREDGTLS</p> <p>LCVSGSCRTFGCDGRMDSQQVWDRQVCGGDNSTCSPRKGSFTAGRAREYVT</p> <p>FLTVTPNLTSVYIANHRPLFTHLAVRIGGRYVAVGKMSISPNTTYPSSLEDG</p> <p>RVEYRVALTEDRLPRLEEIRIWGPLQEDADIQVYRRYGEEYGNLTRPDITFT</p> <p>YFQPKPRQAWVWAAVRGPCSVSCGAGLRWVNYSCLDQARKELVETVQCQGSQ</p> <p>QPPAWPEACVLEPCPPYWAVGDFGPCSASCGGLRERPVRCVEAQGSLLKTL</p> <p>PPARCRAGAQQPAVALETCNPQPCPARWEVSEPSSCTSAGGAGLALENETCV</p> <p>PGADGLEAPVTEGPGSVDEKLPAPFPCVGMSCPPGWGHLDATSAGEKAPSPW</p> <p>GSIRTGAQAAHVWTPAAGSCSVSCGRGLMELRFLCMDALRVPVQEELCGLA</p> <p>SKPGSRREVCQAVPCPARWQYKLAACSVSCGRGVVRRILYCARAHGEDDGEE</p> <p>IILLDTQCQGLPRPEPQEACSLPCPPRWKVMISLGPCSASCGLTARRSVACV</p> <p>QLDQGDQDEVDEAACAALVRPEASVPCLIADCTYRWHVGTWMECSVSCGDGI</p> <p>QRRRDTCLGPPQAQAPVPADFCQHLPKPVTVRGWAGPCVGQGTPLVPHEEA</p> <p>AAPGRTTATPAGASLEWSQARGLLFSPAPQPRLLPGPQENSQSSACGRQH</p> <p>LEPTGTIDMRGPGQADCAVAIGRPLGEVVTLRVLESSLNCSAGDMLLLWGRL</p> <p>TWRKMCRKLLDMTFSSKTNLTVVRQRCGRPGGVLLRYGSQ LAPETFYRECD</p> <p>MQLFGPWGEIVSPSLSPATSNAGGCRLFINVAPHARIAIHALATNMGAGTEG</p> <p>ANASYILIRDTHSLRTTAFHGQQVLYWESESSQAEMEFSEGFLKAQASLRGQ</p> <p>YWTLQSWVPQMDDPQSWKGKEGT</p>	<p>ADAMTS13</p> <p>Isoform 1.</p> <p>1-29 signal</p> <p>Peptide;</p> <p>30-74</p> <p>propeptide;</p> <p>75-1427</p> <p>ADAMTS13</p> <p>chain.</p>

10

20

30

表4は次頁につづく

配列番号:	Sequence. N-terminus to C-Terminus.	note
4	<p>MHQRHPRARCPPLCVAGILACGFLLCWGSPSHFQQSCLQALEPQAVSSYLSP  GAPLKGRPPSPGFQRQRQRQRRRAAGGILHLELLVAVGPDVFAQHQEDTERYV  LTNLNIGAELLRDP SLGAQFRVHLVKMVILTEPEGAPNITANLTSSLLSVCG  WSQTINPEDDTPGHADLVLYITRFDLELPDGNRQVRGVTQLGGACSPWSC  LITEDTGFDLGVTIAHEIGHSFGLHGDGAPGSGCGPSGHVMSDGAAPRAGL  AWSPCSRRLQLSLLSAGRARCVDPPRPQPGSAGHPPDAQPGLYYSANEQCR  VAFGPKAVACTFAREHLDMCQALSCHTDPLDQSSCSRLLVPLLDGTECGVEK  WCSKGRCSRSLVELTPIAAVHGRWSSWGPRSPCSRSCGGGVVTRRRQCNNPRP  AFGGRACVGADLQAEMCNTQACEKTQLEFMSQQCARTDQGPLRSSPGGASFY  HWGAAPHSGQDALCRHMCRAIGESFIMKRGDSFLDGTTCMPSPGPREDGTLS  LCVSGSCRTFGCDGRMDSQQVWDRQCVC GDNSTCSPRKSFTAGRAREYVT  FLTVPNLTSVYIANHRPLFTHLAVRIGGRYV VAGKMSISPNTTYP SLEDG  RVEYRVALTEDRLRLEEIRIWGPLQEDADIQVYRRYGE EYGNLTRPDITFT  YFQPKPRQAWVWA AVRGPCSVSCGAGLRWVNY SCLDQARKELVETVQCQGSQ  QPPAWPEACVLEPCPPYWA VGDGFGPC SASCGGLRERPVRCVEAQGSLLKTL  PPARCAGAAQPAVALETCNPQPCPARWEVSEPS SCTSAGGAGLALENETCV  PGADGLEAPVTEGPGSVDEKLPAPEPCVGMSCPPGWGHL DATSAGEKAPSPW  GSIRTGAQAAHVWTPAAGSCSVSCGRGLMELRFLC MDSALRVPVQEELCGLA  SKPGSRREVCQAVPCPARWQYKLAACSVSCGRGVVRRILYCARAHGEDDGEE  ILLDTQCQGLPRPEPQEACSL EPCPPRWKVM SLGPCSASCGLGTARRSVACV  QLDQGDQVEVDEAACAALVRPEASVPCLIADCTYRWHVGTWMECSVSCGDGI  QRRRDTCLGPQAQAPVPADFCQHLPKPVTVRGCWAGPCVQGACGRQHLEPT  GTIDMRGPGQADCAVAIGRPLGEVVTLRVLESSLNCSAGDMLLLWGRLTWRK  MCRKLLDMTFSSKTNTLVVRQRCGRPGGVLLRYGSQ LAPETFYRECDMQLF  GPWGEIVSPSLSPATSNAGGCRLFINVAPHARIAIHALATNMGAGTEGANAS  YILIRDTHSLRTTAFHGQQVLYWESESSQAEMEFSEGFLKAQASLRGQYWTL  QSWVPEMQDPQSWKKEGT</p>	<p>ADAMTS13  Isoform 2.</p>

10

20

30

表4は次頁につづく

配列番号:	Sequence. N-terminus to C-Terminus.	note
5	<p>MHQRHPRARCPPLCVAGILACGFLLCWGPSHFQQSCLQALEPQAVSSYLSP  GAPLKGRPPSPGFQRQRQRQRRAGGILHLELLVAVGPDVFAQHQEDTERYV  LTNLNIGAELLRRDPSLGAQFRVHLVKMVILTEPEGAPNITANLTSSLLSVCG  WSQTINPEDDTPGHADLVLYITRFDLELPDGNRQVRGVTLGGACSPWSC  LITEDTGFDLGVTTIAHEIGHSFGLHGDGAPGSGCGPSGHVMASDGAAPRAGL  AWSPCSRRLQLLSLLSANEQCRVAFGPKAVACTFAREHLDMCQALSCHTDPLD  QSSCSRLLVPLLDGTECGVEKWCSKGRCSRSLVELTPIAAVHGRWSSWGPRSP  CSRSCGGGVVTRRRQCNNPRPAFGGRACVGADLQAEMCNTQACEKTQLEFMS  QQCARTDQGPIRSSPGGASFYHWGAAPHSQGDALCRHMCRAIGESFIMKRG  DSFLDGTRCMPSPGPREDGTLSLCVSGSCRTFGCDGRMDSQQVWDRCQVCGGD  NSTCSPRKGSTAGRARAYVTFITVTPNLTSVYIANHRPLFTHLAVRIGGRY  VVAGKMSISPNTTYPSSLEDGRVEYRVALTEDRLPRLEEIRIWGPLQEDADI  QVYRRYGEEYGNLTRPDITFTYFQPKPRQAWVWAAVRGPCSVSCGAGLRWVN  YSCLDQARKELVETVQCQGSQQPPAWPEACVLEPCPPYAVGDFGPCSASCG  GGLRERPVRCEAQGSLLKTLPPARCRAQAQPAVALETCPNPPCPARWEVS  EPSSCTSAGGAGLALENETCVPGADGLEAPVTEGPGSVDEKLPAPEPCVGM  CPPGWGHLDATSAGEKAPSPWGSIRTGAQAAHVWTPAAGSCSVSCGRGLMEL  RFLCMDALRVFVQEELCGLASKPGSRREVCQAVPCPARWQYKLAACSVSCG  RGVVRRIILYCARAHGEDDGEIILLDTQCQGLPRPEPQEACSLPCPPRWKVM  SLGPCSASCGLTARRSVACVQLDQGGQDVEVDEAACAALVRPEASVPCLIAD  CTYRWHVGTWMECSVSCGDGIQRRRDTCLGPQAQAPVPADFCQHLPKPVTVR  GCWAGPCVGQACGRQHLEPTGTIDMRGPGQADCAVAIGRPLGEVVTLRVLE  SSLNCSAGDMLLLWGRLTWRKMCRKLLDMTFSSKTNLTLVVRQRCGRPGGGVL  LRYGSQLAPETFYRECDMLFGPWGEIVSPSLSPATSNAGGCRLFINVAPHA  RIAIHALATNMGAGTEGANASYILIRDTHSLRTTAFHGQQVLYWESESSQAE  MEFSEGFLKAQASLRGQYWTLSWVPEMQDPQSWKGKEGT</p>	<p>ADAMTS13  Isoform 3.</p>
6	<p>DREQAPNLVYMTGNPASDEIKRLPGDIQVVPFIGVGPANVQELERIGWPNA  PILIQDFETLPREAPDLVLQR</p>	FRETS-VWF73
7	<p>DREKAPNLVYMTGCPASDEIKRLPGDIIGWPNA  PILIQDFETLPREAPDLV  LQR</p>	GTI_FRET5

10

20

30

【表 5】

表5

基体追加後30分の時点における配列番号:1ポリペプチド基体と  
配列番号:7を用いて取得した活性の比較

正常% ADAMTS13 活性: インキュベーション時間 30 分		
サンプル ID	GTI_FRET5 基体	GTI_FRET4 基体
キャリブレーションA	3	4
キャリブレーションB	8	9
キャリブレーションC	30	29
キャリブレーションD	64	61
キャリブレーションE	108	110
陽性対照 高	46	50
陽性対照 低	13	14
90 (ATS13-1)	65	92
72 (ATS13-2)	52	72
50 (ATS13-3)	40	47
22 (ATS13-4)	18	21
5 (ATS13-5)	6	7
UAMS041609	14	31
BCM2	22	19
VF040901	10	10
CNTL	<キャリブレーションA	<キャリブレーションA
NPP032206	84	>キャリブレーションE
NPP032206 HI	12	9
NPP032206 mixed	<キャリブレーションA	57
BCM2 HI	15	12
BCM2 mixed	37	51
CNTL HI	<キャリブレーションA	<キャリブレーションA
CNTL mixed	<キャリブレーションA	4
NPP032206 at 37C	77	106
A-FACT lot 1284	<キャリブレーションA	10
A-FACT lot 900	<キャリブレーションA	10
B-FACT lot 1114	28	45
B-FACT lot 1266	23	46
FACT lot 1223	82	107
FACT lot 222e1	85	111

10

20

30



【配列表】

0006419576000001.app

---

フロントページの続き

- (72)発明者 チャンス, シュゼット シー .  
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53076, リッチフィールド, ホーリーヒルロード 3207
- (72)発明者 ウィトシク, エリザベス  
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53213, ウォーワトサ, エヌ 63番 ストリート 1308

審査官 福澤 洋光

- (56)参考文献 Koichi Kokame, FRET-S-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay, British Journal of Haematology, 2005年, Vol.129, Pages 93-100  
Kannayakanahalli M. Dayananda, Escherichia coli-derived von Willebrand factor-A2 domain fluorescence/Forster resonance energy transfer proteins that quantify ADAMTS13 activity, Analytical Biochemistry, 2010年12月10日, Vol.410, Pages 206-213

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 15/90  
C07K 1/00 - 19/00  
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
UniProt/GeneSeq  
PubMed