

(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2005-505757

(P2005-505757A)

(43) 公表日 平成17年2月24日(2005.2.24)

(51) Int. Cl.⁷

GO 1 N 33/53
 // CO 7 K 14/475
 C 1 2 N 15/09

F I

GO 1 N 33/53 Z N A D
 C 1 2 N 15/00 A
 CO 7 K 14/475

テーマコード (参考)

4 B O 2 4
 4 H O 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 146 頁)

(21) 出願番号 特願2003-528210 (P2003-528210)
 (86) (22) 出願日 平成14年9月18日 (2002. 9. 18)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年3月15日 (2004. 3. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/029500
 (87) 国際公開番号 W02003/024308
 (87) 国際公開日 平成15年3月27日 (2003. 3. 27)
 (31) 優先権主張番号 60/323, 305
 (32) 優先日 平成13年9月18日 (2001. 9. 18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501093088
 ファイブローゲン、インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 94080 カリフォル
 ニア州、サウス サン フランシスコ、ゲ
 ートウェイ ブールバード 225
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (72) 発明者 ウェイツ, スティーブン, エル.
 アメリカ合衆国 94619 カリフォル
 ニア州, オークランド, ベスト アベニュー
 2757

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結合組織増殖因子の分析方法

(57) 【要約】

本発明は、結合組織増殖因子 (CTGF) の検出および定量方法、ならびに種々のCTGF関連疾患および障害の診断および検出方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチド濃度の定量方法であって、

(a) 結合に好適な条件下において、サンプルを、CTGF N末端断片領域に特異的に結合する第1試薬と接触させること、

(b) 第1試薬を分離すること、および

(c) 第1試薬に結合しているポリペプチドの濃度を定量すること、

を含む、上記方法。

【請求項 2】

第1試薬が基板に結合されている、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

第1試薬が抗体またはその機能的フラグメントである、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

さらに、

(a) 結合に好適な条件下において、第1試薬に特異的に結合する試薬と、第1試薬によって結合されている領域とは異なるCTGFの領域に特異的に結合する試薬とからなる群から選択される第2試薬を添加すること、

(b) 未結合の第2試薬を除去すること、および

(c) 結合している第2試薬の量を定量すること、ここで、結合している第2試薬の量が、サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチド濃度に相当する、

20

を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

第2試薬が検出可能な標識に結合されている、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

検出可能な標識が、蛍光剤、放射性同位体、金属、および酵素複合体からなる群から選択される、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

第2試薬が、第1試薬によって結合されている領域とは異なるCTGF領域に特異的に結合し、さらに、第2試薬がCTGF N末端断片領域に特異的に結合する、請求項4に記載の方法。

30

【請求項 8】

第2試薬が第1試薬に特異的に結合し、さらに、第2試薬が、第1試薬に結合するCTGF N末端断片を含むポリペプチドと特異的に競合する、請求項4に記載の方法。

【請求項 9】

第2試薬が、第1試薬によって結合されている領域とは異なるCTGFの領域に特異的に結合するものであり、さらに、該第2試薬がCTGF C末端断片領域に特異的に結合する、請求項4に記載の方法。

【請求項 10】

第2試薬が抗体またはその機能的フラグメントである、請求項4に記載の方法。

【請求項 11】

第2試薬が、担体に結合しているかまたは結合していないヘパリンである、請求項9に記載の方法。

40

【請求項 12】

サンプルが哺乳動物から取得されたものである、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

哺乳動物がヒトである、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

サンプルが尿または血漿から選択されるものである、請求項1に記載の方法。

【請求項 15】

さらに、サンプル中にCTGF N末端断片を含むポリペプチド濃度をCTGF N末端断片の基準

50

濃度と比較することを含み、

サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチド濃度と基準のCTGF N末端断片の濃度の差がCTGF関連障害の存在を示すものである、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

CTGF関連障害が、腎繊維症、肝臓繊維症、心臓繊維症、炎症性関節病、癌、糖尿病、硬皮症、臓器移植、腹膜透析または心筋梗塞からなる群から選択されるものである、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

さらに、第2サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチド濃度を第1サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチド濃度と比較することを含み、

10

第1サンプルおよび第2サンプルが異なる時期に同一の供給源から取得されたものであり、かつ、第2サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチド濃度と第1サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチド濃度の差が、CTGF N末端断片を含むポリペプチド濃度の経時的变化を示すものである、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

CTGF関連障害の診断方法であって、

(a)被験体由来のサンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチド濃度を定量すること、および

(b)サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチド濃度を基準濃度と比較すること、ここで、サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチドの増加量または減少量がCTGF関連障害の存在を示すのである、

20

を含む、上記方法。

【請求項19】

CTGF関連障害の予測方法であって、

(a)被験体由来のサンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチド濃度を定量すること、および

(b)サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチド濃度を基準濃度と比較すること、ここで、サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチドの増加量または減少量がCTGF関連障害の存在を示すものである、

30

を含む、上記方法。

【請求項20】

被験体のCTGF関連障害の進行をモニターする方法であって、

(a)第1の時点で被験体から第1サンプルを取得すること、

(b)第2の時点で被験体から第2サンプルを取得すること、

(c)第1サンプルおよび第2サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチド濃度を定量すること、および

(d)第1サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチド濃度を、第2サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチドの濃度と比較すること、ここで、第1サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチド濃度と第2サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチド濃度の差がCTGF関連障害の進行を示すものである、

40

を含む、上記方法。

【請求項21】

サンプル中のCTGF C末端断片を含むポリペプチド濃度の定量方法であって、

(a)結合に好適な条件下において、サンプルを、C末端断片領域に特異的に結合する第1試薬と接触させること、

(b)第1試薬を分離すること、

(c)第1試薬によって結合されている領域とは異なるCTGF C末端断片領域に特異的に結合する第2試薬を添加すること、

(d)未結合の第2試薬の除去すること、および

(e)結合した第2試薬の量を測定すること、

50

を含む、前記方法。

【請求項 2 2】

サンプル中のCTGFを検出または定量するキットであって、

(a)CTGF上の領域に特異的に結合する第 1 試薬、および

(b)第 1 試薬によって結合されている領域とは異なるCTGF上の領域に特異的に結合する第 2 試薬、

を含む、上記キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2001年9月18日に提出された、米国仮特許出願第60/323,305号の利益を主張する。なお、前記出願は、その全体を引用によって本明細書に援用する。

【0002】

本発明は、結合組織増殖因子 (CTGF) の検出および定量、並びに種々のCTGF関連疾患および障害の診断および検出に関する。

【背景技術】

【0003】

結合組織増殖因子 (CTGF) は、繊維芽細胞および他の結合組織細胞または細胞間マトリックスを産生し得る他の細胞における分裂促進因子、走化性因子および細胞間マトリックス誘導因子である。CTGFポリペプチドおよび遺伝子配列は、ヒトを含む多数の種で同定されている (例えば、Ryseckら、(1991) Cell Growth Differ 2: 225-233; 2000年5月18日に公開された、国際公開番号W0 00/27868号、およびBradhamら、(1991) J Cell Biol 114: 1285-1294を参照されたい)。ヒトCTGFは、完全長のcDNAに関し、ほぼ130位のヌクレオチドに開始部位を、ほぼ1177位のヌクレオチドにTGA終止部位を持ち、ヌクレオチド1047個のオープンリーディングフレームによってコードされている、349残基からなるポリペプチドである (例えば、米国特許第5,408,040号、およびGenBank受託番号NP001892を参照されたい。)

CTGFは、病理学的に、皮膚および主な器官の繊維症および過剰癒着化、癌、全身性硬化症、血管形成、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化、糖尿病腎症および腎性高血圧症などの疾病をはじめとする、結合組織細胞の異常増殖および細胞間マトリックスの過剰沈着がある疾患に関与している (例えば、米国特許第5,408,040号、2001年3月8日に公開された、国際公開番号W0 01/15729号を参照されたい)。さらに、CTGF断片は、ある種の生物活性に関与している (例えば、2000年10月12日に公開された、国際公報第W0 00/35939号; 2000年6月22日に公開された、国際公報第W0 00/35936号; 米国特許第730 5,876号; Brigstockら、(1997) J Biol Chem 272: 20275-20282; およびBallら、(1998) Biol Reprod 59: 828-835を参照されたい)。

【0004】

CTGFおよびその様々な生物活性と疾患群に関する情報があるにもかかわらず、CTGF断片を区別・識別してCTGFを確実に検出する方法、定量的にCTGF濃度を検出する方法、および生体サンプル中のCTGF断片を検出する方法は得られていなかった。CTGFを検出する現行法は、例えば、ヘパリンを利用してCTGFポリペプチドを分離、濃縮するか、あるいは、CTGFの種々の断片が区別されないELISAアッセイが含まれている (例えば、Satoら、(2000) J Rheumatology 27: 149-153; Tamantiら、(1998) Biochem Biophys Res Commun 251: 748-752; およびRiserら、(2000) J Am Soc Nephrol 11: 25-38を参照されたい)。

【0005】

したがって、生体サンプル中のCTGFおよびCTGFの種々の形態 (例えば、CTGF断片) の濃度を検出、測定、定量するのに有用なアッセイ系が求められている。特に、CTGFと区別してCTGFの特定断片を選択的に同定する方法、および種々の疾患状態に関与している特定のCTGF断片を同定および定量し得る方法が求められている。

【発明の開示】

10

20

30

40

50

【発明が解決しようとする課題】**【0006】**

本明細書は、CTGFおよびCTGF断片の検出方法、CTGFおよびCTGF断片の濃度の定量方法、ならびに、CTGFが関連する種々の症状、疾患または障害の予後の診断、検出方法、およびCTGFが関連する種々の症状、疾患または障害の治療効果をモニターする方法を記載する。

【課題を解決するための手段】**【0007】**

一態様では、本発明は、CTGFを検出する方法を提供する。一実施形態では、本方法は、サンプル中のCTGF N末端断片の存在を検出することを含み、CTGF N末端断片がCTGF C末端断片およびCTGFと区別される。別の実施形態では、本方法は、サンプル中のCTGF C末端断片の存在を検出することを含み、CTGF C末端断片がCTGF N末端断片およびCTGFと区別される。さらなる実施形態では、本方法はサンプル中のCTGFの存在を検出することを含み、CTGFがCTGF N末端およびC末端断片と区別される。

10

【0008】

さらに、本発明は、CTGF濃度の定量方法を提供する。一態様では、本方法は、サンプル中のCTGF N末端断片の濃度を定量することを含み、CTGF N末端断片がCTGF C末端断片およびCTGFと区別される。別の態様では、本方法は、サンプル中のCTGF C末端断片の濃度を定量することを含み、CTGF C末端断片がCTGF N末端断片およびCTGFと区別される。さらなる態様では、本方法はサンプル中のCTGF濃度を定量することを含み、CTGFの濃度がCTGF N末端およびC末端断片の濃度と区別される。

20

【0009】

ある実施形態では、本方法は、サンプルをCTGF上の領域に特異的に結合する第1試薬と接触させることと、試薬を分離することと、結合しているCTGF濃度を定量することを含む。さらに、本方法は、第1試薬と特異的に結合する第2試薬または第1試薬により結合されている領域とは異なるCTGFの領域に特異的に結合する第2試薬から選択される第2試薬を添加することと、未結合の第2試薬を除去することと、結合している第2試薬の量を定量することをさらに含んでもよい。特定の実施形態では、第1試薬および第2試薬は、CTGF、CTGF N末端断片またはCTGF C末端断片の異なる領域に結合する抗CTGF抗体である。他の特定の実施形態では、第1試薬または第2試薬は、場合によっては担体に結合しているヘパリンである。

30

【0010】

さらに、本発明は、CTGF関連障害の診断方法を意図する。一実施形態では、本方法は、サンプルを取得することと、サンプル中のCTGF N末端断片の濃度を定量することと、その濃度をCTGF N末端断片の基準濃度と比較することを含み、ここで、サンプル中のCTGF N末端断片の増加量または減少量がCTGF関連障害の存在を示す。さらなる実施形態では、本方法は、サンプルを取得することと、サンプル中のCTGF C末端断片の濃度を定量することと、その濃度をCTGF C末端断片の基準濃度と比較することを含み、ここで、サンプル中のCTGF C末端断片の増加量または減少量がCTGF関連障害の存在を示す。別の実施形態では、本方法は、サンプルを取得することと、サンプル中のCTGF濃度を定量することと、その濃度をCTGFの基準濃度と比較することを含み、ここで、サンプル中のCTGFの増加量または減少量がCTGF関連障害の存在を示す。例えば、サンプル中のCTGF N末端断片の増加は、腎繊維症、肝臓繊維症、心臓繊維症、強皮症および炎症性関節疾患などの繊維症障害を示し得る。

40

【0011】

また、CTGF関連障害の予測方法を提供する。一態様では、本方法は、サンプルを取得することと、サンプル中のCTGF N末端断片、CTGF C末端断片またはCTGFの濃度を検出することと、その濃度を基準濃度と比較することを含み、ここで、検出された濃度と基準濃度の差がCTGF関連障害の予測を示す。例えば、基準と比較してサンプル中のCTGF N末端断片濃度の増加により、癌、糖尿病、臓器移植、腹膜透析または心筋梗塞などの疾患の予後不良が示され得る。

50

【0012】

また、CTGF関連障害の進行をモニターする方法を提供する。一実施形態では、本方法は、第1の時点で被験体から第1サンプルを取得することと、第2の時点で被験体から第2サンプルを取得することと、第1サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチドの濃度を第2サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチドの濃度と比較することを含み、第1サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチドの濃度と第2サンプル中のCTGF N末端断片を含むポリペプチドの濃度の差がCTGF関連障害の進行を示す。また、第1サンプルおよび第2サンプル中のCTGF C末端断片の濃度またはCTGFの濃度を比較する類似の方法を検討する。

【0013】

さらに、本発明は、CTGF関連障害の治療効果をモニターする方法に関する。種々の実施形態において、本方法は、CTGF関連障害があり、かつその障害の治療を受けている被験体からサンプルを取得することと、サンプル中のCTGF、CTGF N末端断片、またはCTGF C末端断片の濃度を定量することと、CTGF、CTGF N末端断片、またはCTGF C末端断片の濃度を基準濃度と比較することを含み、サンプル中で検出された濃度と基準濃度の差がCTGF関連障害の治療の治療効果を示す。さらなる態様では、基準濃度は、治療の開始の早期時点で、あるいは治療開始前に、同一被験体から得られたサンプル中のCTGF、CTGFのN末端断片、またはCTGFのC末端断片の定量によって得られる。

【0014】

上述の方法のいずれにおいても、サンプルは任意の供給源から取得することができる。一態様では、サンプルは哺乳動物から得られ、特定の一実施形態では、哺乳動物はヒトである。一実施形態では、サンプルは、尿または血漿などの体液であり得る。さらに、CTGFの検出または定量方法は、添加マーカーの検出および定量と組み合わせ、被験体の疾患の診断、予測などをさらに確認することができる。例えば、CTGF N末端断片の定量と組み合わせ尿中のアルブミン排出率を測定することにより、腎臓病をさらに確認することができる。

【0015】

さらに、本発明は、CTGFの濃度の存在を検出または定量する際に使用するキットを供給する。例えば、キットを用いて、CTGF関連障害を診断することができる。ある実施形態では、キットは、CTGF、CTGF N末端断片またはCTGF C末端断片と特異的に反応する少なくとも1種の第1試薬と、CTGF、CTGF N末端断片、CTGF C末端断片、または第1試薬と複合体を形成し得る、標識化された少なくとも1種の第2試薬を含む。ある特定の実施形態では、第1試薬および第2試薬は、CTGF、CTGFのN末端断片またはCTGFのC末端断片の異なる領域へ結合する抗CTGF抗体である。他の特定の実施形態では、第1試薬または第2試薬は、場合によっては担体に結合しているヘパリンである。特定の実施形態では、第2試薬は、第1試薬に結合するCTGF、CTGF N末端断片またはCTGF C末端断片と競合する。

【0016】

さらに、本発明は、CTGF、CTGF N末端断片、またはCTGF C末端断片の濃度に変化をもたらす化合物のスクリーニング方法を検討する。ある態様では、本方法は、サンプルを取得することと、サンプル中のCTGF、CTGF N末端断片またはCTGF C末端断片の第1の濃度を定量することと、サンプルを化合物と接触させることと、CTGF、CTGF N末端断片またはCTGF C末端断片の第2の濃度を測定することと、第1の濃度と第2の濃度とを比較することを含み、第1の濃度と第2の濃度の差がCTGF、CTGF N末端断片またはCTGF C末端断片の濃度に変化をもたらす化合物を示す。

【0017】

さらに、本発明は、CTGF関連障害の傾向を確認する方法に関する。ある態様では、本方法は、サンプルを取得することと、サンプル中のCTGF N末端断片、CTGF C末端断片またはCTGFの濃度を定量することと、サンプル中のN末端断片、C末端断片、またはCTGFの濃度を基準濃度と比較することとを含み、サンプル中のCTGFのN末端断片、CTGFのC末端断片、またはCTGFの増加量または減少量がCTGF関連障害の傾向を示す。

10

20

30

40

50

【0018】

さらに、本発明は、特定の障害がCTGFと関係しているかどうかを検出する方法、すなわち、CTGF関連障害を確認する方法に関する。ある実施形態では、本発明は、特定の障害がある被験体から第1サンプルを取得すること、サンプル中のCTGF N末端断片、CTGF C末端断片またはCTGFの濃度を定量することと、その濃度を非疾患の基準濃度と比較することを含み、第1サンプル中の濃度と非疾患の基準濃度の差がCTGF関連障害の存在を示す。障害は、CTGF N末端断片、CTGF C末端断片またはCTGFの濃度の増加と関連しているものがあり、あるいは、CTGF N末端断片、CTGF C末端断片またはCTGFの濃度の低下と関連しているものもあり得る。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0019】

本発明の構成要素および本方法について記載する前に、本発明は、記載されている特定の方法、プロトコル、細胞系、アッセイ、および試薬に限定されるものではなく、これらは変更が可能であることを理解されたい。また、本明細書で用いられている用語は、本発明の特定の実施形態に記載するものとし、添付の特許請求の範囲に記載されている本発明の範囲を限定するものではないことも理解されたい。

【0020】

本明細書および特許請求の範囲で用いられている、単数形(a、anおよびthe)には、特に明記しない限り、複数の言及が含まれることに注意されたい。したがって、例えば、「断片」という用語には複数のかかる断片が含まれ、「抗体」という用語には1種または複数の抗体、および当業者に周知の同等物等の用語が含まれる。

20

【0021】

特に断りのない限り、本明細書に用いられる技術的・科学的用語はすべて、本発明が属する当該技術分野の当業者によって理解されるのと同じの意味を有する。本明細書に記載されているものに類似する、または等しいすべての方法および物質は、本発明の実施または試験に用いることができるが、好ましい方法、装置および物質についてここに記載する。本明細書に引用されているすべての刊行物は、本発明と関連して用いられ得る刊行物中に報告されている方法、試薬およびツールを記載および明示する目的で、それら全体を引用により本明細書に援用する。しかし、本発明が先発明によるかかる開示に先行する資格がないということを認めていると解釈されるべきではない。

30

【0022】

本発明の実施は、特段の記載のない限り、当該技術分野内の化学、生化学、分子生物学、細胞生物学、遺伝学、免疫学および薬学の従来法を用いる。かかる技術は文献中で完全に説明されている。例えば、Gennaro (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Co.; Colowickら、Methods In Enzymology, Academic Press, Inc.; WeirおよびBlackwell (1986) Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV, Blackwell Scientific Publications; Maniatisら、(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Vols. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubelら、(1999) Short Protocols in Molecular Biology, 第4版, John Wiley & Sons; Reamら、(1998) Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, Academic Press; NewtonおよびGraham (1997) PCR (Introduction to Biotechniques Series), 第2版, Springer Verlag)を参照されたい。

40

【0023】

定義

「結合組織増殖因子」または「CTGF」は、天然物、合成物、半合成物、または組換え体は問わず、任意の種(特に哺乳類の種、例えば、ラット、ウサギ、ウシ、羊、ブタ、マウス、ウマ、および特にヒトの種)、ならびに任意の供給源由来の実質的に精製されたCTGFのアミノ酸配列を意味する。

【0024】

一態様において、「結合組織増殖因子」または「CTGF」は、CTGFのN末端断片の少なくとも

50

も一部分、およびCTGFのC末端断片の少なくとも一部分を含むポリペプチド配列を意味する。

【0025】

CTGFに関して用いられる「N末端断片」および「N断片」という用語は、CTGFポリペプチドまたは任意の変異体のアミノ末端部分、またはその断片に由来する配列を含むすべてのポリペプチドを意味する。CTGF N末端断片は、最初のメチオニン残基からシステイン非含有「ヒンジ」領域までのCTGFの全部または一部を含み得るか、あるいは含まない。さらに、CTGF N末端断片は、インシュリン増殖因子結合タンパク質モチーフおよび/またはvon Willebrand C型ドメインの全部または一部を含み得るか、あるいは含まない。さらに、CTGFのN末端断片は、システイン非含有領域の全部または一部を含み得るか、あるいは含まない。さらに、CTGFのN末端断片は、上に定義した任意の先のCTGF N末端断片内に含有されている任意の15個以上の隣接するアミノ酸であり得る。

10

【0026】

一態様では、CTGFの「N末端断片」または「N断片」は、ヒトCTGFのアミノ末端部分由来のポリペプチド配列を意味する。かかる断片は、配列番号2のアミノ酸残基1~アミノ酸残基約198の全領域、配列番号2のアミノ酸約23~アミノ酸約198の全領域を含み得る。ヒンジ領域内のN末端断片の境界は、配列番号2に定められた幾つかのプロテアーゼ切断部位のうちの一部(例えば、配列番号2の残基179と180の間、残基182と183の間、および残基188と189の間のキモトリプシン切断部位;配列番号2の残基183と184の間、および残基196と197の間のプラスミン切断部位;および配列番号2の残基169と170の間の骨形態形成タンパク質-1切断部位)によって、場合によっては定められ得る。さらに、ヒトCTGFのN末端断片は、配列番号2のアミノ酸27からアミノ酸97の領域、配列番号2のアミノ酸103からアミノ酸166の領域、または配列番号2のアミノ酸167からアミノ酸198の領域の全部または一部を含み得るか、あるいは含まない。さらに、ヒトCTGFのN末端断片は、上に定義した任意の前述のCTGF N末端断片内に含有されている任意の15個以上の隣接するアミノ酸であり得る。

20

【0027】

特定の実施形態では、本発明のCTGF N末端断片には、ヒトCTGF(配列番号2)の以下の領域、すなわち、アミノ酸残基23~アミノ酸残基96(エクソン2によってコードされている);アミノ酸残基27~アミノ酸残基97(IGF-BPモチーフ);アミノ酸残基97~アミノ酸残基180(エクソン3によってコードされている);アミノ酸残基103~アミノ酸残基166(VWCドメイン);対応するCTGFのC末端断片に含まれていないアミノ酸残基167~アミノ酸残基198(システイン非含有のヒンジ);アミノ酸残基23~アミノ酸残基180(エクソン2および3によってコードされている);アミノ酸残基27~アミノ酸残基166(IGF-BPドメインおよびVWCドメイン);およびアミノ酸残基23~アミノ酸残基198から選択される配列と、異なる種、特に、ラット、ウサギ、ウシ、ヒツジ、ブタ、マウス、ウマをはじめとする哺乳動物種由来のそのオーソロガス断片が含まれる。

30

【0028】

CTGFに関して用いられている「C末端断片」および「C断片」という用語は、CTGFポリペプチド、または任意の変異体、またはその断片のカルボキシ終末部由来の配列を含むすべてのポリペプチドを意味する。C末端断片は、このタンパク質のシステイン非含有のヒンジ領域から末端までのCTGFのすべてまたは一部を含み得るか、あるいは含まない。さらに、CTGF C末端断片は、トロンボスポンジン1型ドメインおよび/またはシステインノートモチーフの全部または一部を含み得るか、あるいは含まない。さらに、CTGFのC末端断片は、上に定義した任意の前述のCTGF C末端断片内に含有されている任意の15個以上の隣接アミノ酸であり得る。

40

【0029】

一態様では、「C末端断片」または「C断片」は、ヒトCTGFのカルボキシ末端部由来のポリペプチド配列を意味する。かかる断片は、配列番号2のアミノ酸残基181~アミノ酸残基349の全領域を含み得る。ヒンジ領域内のC末端断片の境界は、配列番号2に定められ

50

た幾つかのプロテアーゼ切断部位（例えば、上に定義されているキモトリプシン、プラスミンおよび骨形成タンパク質-1切断部位）のうちの一部位によって場合によっては定められ得る。さらに、ヒトCTGFのC末端断片は、配列番号2のアミノ酸201～アミノ酸242、配列番号2のアミノ酸247～アミノ酸349、配列番号2のアミノ酸248～アミノ酸349、または配列番号2のアミノ酸249～アミノ酸346の領域の全部または一部を含み得るか、あるいは含まない。さらに、ヒトCTGFのC末端断片は、上に定義した任意の前述のCTGF C末端断片内に含有された任意の15個以上の隣接アミノ酸であり得る。

【0030】

特定の実施形態では、本発明のCTGF C末端断片には、ヒトCTGF(配列番号2)の以下の領域、すなわち、アミノ酸残基181～アミノ酸残基251(エクソン4によってコードされている)；アミノ酸残基201～アミノ酸残基242(トロンボスポンジン1型モチーフ)；アミノ酸残基252～アミノ酸残基349(エクソン5によってコードされている)；アミノ酸残基249～アミノ酸残基346(システインノットドメイン)；対応するCTGFのN末端断片に含まれていないアミノ酸残基167～アミノ酸残基198(システイン非含有のヒンジ)の一部；アミノ酸残基181～アミノ酸残基348(エクソン2および3にコードされている)；アミノ酸残基201～アミノ酸残基346(TP1ドメインおよびCKドメイン)；アミノ酸残基247～アミノ酸残基348；ならびにアミノ酸残基248～アミノ酸残基348と、異なる種、特に、ラット、ウサギ、ウシ、ヒツジ、ブタ、マウス、ウマをはじめとする哺乳動物種由来のそのオーソログ断片が含まれる。

10

【0031】

CTGFの「システイン非含有領域」または「ヒンジ領域」という用語は、ヒトCTGF(配列番号2)のアミノ酸残基約167～アミノ酸残基約198由来の任意のポリペプチドと、異なる種、特に、ラット、ウサギ、ウシ、ヒツジ、ブタ、マウス、ウマをはじめとする哺乳動物種由来のそのオーソログ断片を意味する。

20

【0032】

本明細書で用いられている「アミノ酸配列」または「ポリペプチド」または「ポリペプチド類」という3種類の用語は、天然分子または合成分子の、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列、およびその断片を意味する。ポリペプチドまたはアミノ酸断片は、ポリペプチドの少なくとも1つの構造的および/または機能的特性を保持するポリペプチドのすべての部分である。CTGF断片には、CTGFの少なくとも1つの構造的または機能的特性を保持するCTGFポリペプチド配列のすべての部分が含まれる。「アミノ酸配列」が天然のタンパク質分子のポリペプチド配列を意味する場合、「アミノ酸配列」および同等の用語は、アミノ酸配列を当該タンパク質分子に関連している完全な元来の配列に限定することを意図するものではない。

30

【0033】

「核酸」または「ポリヌクレオチド」または「ポリヌクレオチド」という用語は、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド配列、またはポリヌクレオチド、あるいはそれらの任意の断片であり、かつ、天然起源または合成起源のDNAまたはRNAを意味する。前記DNAまたはRNAは、一本鎖または二本鎖であってよく、起源が天然または合成であるペプチド核酸(PNA)、または任意のDNA様物質もしくはRNA様物質に対するセンス鎖または非アンチセンス鎖を意味し得る。ポリヌクレオチド断片は、ポリヌクレオチドの少なくとも1種の構造的または機能的特性を保持するポリヌクレオチド配列のすべての部分である。ポリヌクレオチド断片は、可変長であり得る。例えば、60ヌクレオチド長より長い、少なくとも100ヌクレオチド長、少なくとも1000ヌクレオチド長、または少なくとも10,000ヌクレオチド長である。

40

【0034】

「改変」ポリヌクレオチドには、同一コードのポリヌクレオチドまたは機能的に同等のポリペプチドが得られる、欠失、挿入または異なるヌクレオチドの置換が生じているものが含まれる。この定義には、被験体ポリヌクレオチド配列の正常な染色体座以外の座を有する特定のオリゴヌクレオチドプローブにより、あるいは対立遺伝子に対する不適當または

50

予期されないハイブリダイゼーションの欠失を介して、容易に検出可能または不可能な多型性を示す配列が含まれる。

【0035】

「改変」ポリペプチドは、サイレント変化を生じ、機能的に同等のポリペプチドが得られるアミノ酸残基の欠失、挿入または置換を含有し得る。アミノ酸置換は、コードされたポリペプチドの生物学的活性または免疫学的活性が維持される限り、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性および/または両親媒性における類似性に基づいて慎重に調製することができる。例えば、負荷電アミノ酸にはアスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれ、正荷電アミノ酸にはリジンおよびアルギニンが含まれ、類似の親水性値を有する非荷電の極性の頭基部 (head group) をもつアミノ酸には、ロイシン、イソロイシン; バリン; グリシンおよびアラニン; アスパラギンおよびグルタミン、セリンおよびスレオニン; フェニルアラニンおよびチロシンが含まれ得る。

10

【0036】

ポリペプチドまたはアミノ酸「変異体」とは、特定のアミノ酸配列の1種または複数のアミノ酸によって改変されているアミノ酸配列である。ポリペプチド変異体は、保存的变化を有し得る。この場合、置換アミノ酸は、置き換えられたアミノ酸に類似した構造的または化学的特性を有している (例えば、ロイシンのイソロイシンによる置換)。また、変異体は非保存的变化を有していてもよい。この場合、置換アミノ酸は、置き換えられたアミノ酸の物性と異なる物性を有している (例えば、グリシンのトリプトファンによる置換)。また、類似のマイナーな変異体には、アミノ酸欠失または挿入、またはその両方が含まれていてもよい。好ましくは、アミノ酸変異体は、特定のポリペプチドのある種の構造的または機能的特性を保持する。アミノ酸残基が置換、挿入または欠失され得ることを判断するガイダンスは、例えば、当技術分野で周知のコンピュータプログラム (例えば、LASER GENEソフトウェア (DNASTAR Inc., Madison, WI)) を用いて確認することができる。

20

【0037】

ポリヌクレオチド変異体は、特定のポリヌクレオチド配列に対して好ましくは少なくとも約80%、さらに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%のポリヌクレオチド配列同一性を有する、特定のポリヌクレオチド配列の変異体である。遺伝コードの縮重により、任意の既知である天然遺伝子のポリヌクレオチド配列に対して最低限の相同性が多少ある、特定のタンパク質をコードする多数の変異体ポリヌクレオチド配列が得られることは当業者に理解されよう。したがって、本発明は、可能な限りのコドン選択に基づいた組み合わせを選択することによって作製され得るポリヌクレオチド配列の各変異体およびあらゆる変異体について検討する。これらの組み合わせは標準のコドントリプレット遺伝コードに従って作製されるが、かかるすべての変異体は具体的に記載されたものとして考慮されたい。

30

【0038】

「欠失」は、1種または複数のアミノ酸残基またはヌクレオチドが存在しなくなる、アミノ酸またはヌクレオチド配列の変化である。

【0039】

「挿入」または「添加」という用語は、天然の分子と比較して、1種または複数のアミノ酸残基またはヌクレオチドが添加された、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの配列の変化をそれぞれ意味する。

40

【0040】

本明細書で用いられている「機能的に同等な」という用語は、特定のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの少なくとも1種の機能的かつ/または構造的特性を保持するポリペプチドまたはポリヌクレオチドを意味する。「機能的に同等な」には、特定の機能の実行を作動させる改変を含み得る。「機能的に同等な」という用語は、分子の断片、突然変異体、ハイブリッド、変異体、類似体または化学的誘導体を含むものとする。

【0041】

「マイクロアレイ」という用語は、基板上に分子 (例えば核酸、アミノ酸、抗体など) が任

50

意に配列されたものを意味する。基板は、任意の好適な支持体(例えば、ビーズ、ガラス、紙、ニトロセルロース、ナイロン、または任意の適当な膜等)であり得る。基板には、任意の固定支持体または半固定支持体が含まれ、これに限定されるものではないが、膜、フィルタ、ウエハー、チップ、スライド、ファイバー、ビーズ(磁気ビーズまたは非磁気ビーズを含む)、ゲル、管材料、プレート、ポリマー、微粒子、毛細管などが挙げられる。基板は、コーティング用の表面を提供し、かつ/または核酸、アミノ酸等が結合可能な種々の表面形態(ウェル、ピン、溝、チャンネル、および孔など)を有し得る。

【0042】

「抗原性」とは、身体へ導入された場合に、物質が免疫反応と抗体産生を刺激する能力を意味する。抗原性の特性を示す作用物質を抗原と称する。抗原作用物質は、これに限定されるものではないが、例えば、タンパク質、リポタンパク質、多糖、核酸、細菌および細菌性成分、ならびにウイルスおよびウイルス性成分などの種々の高分子を含み得る。抗原性断片は、CTGFポリペプチド活性の少なくとも1種の生物学上または免疫学上の態様を保持するCTGFポリペプチドの断片、好ましくは、約5~15個のアミノ酸長の断片を意味する。

10

【0043】

「免疫原性」は、有機体内の免疫反応を誘導する能力に関する。免疫原性の特性を示す作用物質は、免疫原性を示すことを意味する。作用物質は、これに限定されるものではないが、例えば、タンパク質、リポタンパク質、多糖、核酸、細菌および細菌性成分、ならびにウイルスおよびウイルス性成分などの種々の高分子を含み得る。免疫原性作用物質は、かなりの高分子量(通常10kDaよりも大きい)であることが多い。免疫原性断片は、CTGFポリペプチド活性の少なくとも1種の生物学上または免疫学上の態様を保持するCTGFポリペプチドの断片、好ましくは、約5~15個のアミノ酸長の断片を意味する。

20

【0044】

「抗体」という用語は、細胞系または動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、シチメンチョウ、ヤギ、ウマ、ヒト)をはじめとする任意の供給源から得られた免疫グロブリンまたは抗体を意味する。また、抗体は、改変された細胞、またはトランスジェニック植物あるいは、宿主に非内因性の抗体を作らせるように操作させた動物から遺伝学的に得ることができる。抗体は任意のアイソタイプであってよく、IgA、IgD、IgE、IgG-1、IgG-2、IgG-3、IgG-4、またはIgMが挙げられる。さらに、「抗体」という用語には、エピトープの決定基と結合可能な、完全な分子およびその断片(Fab、F(ab')₂など)ならびにFv断片が含まれ、また、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体が含まれる。また、抗体は、1種または複数の特有の抗原に結合するキメラ抗体(例えば、二価抗体および三価抗体)を意味する。

30

【0045】

CTGFまたはCTGF断片と結合する抗体は、完全なポリペプチドを用いて、または免疫化抗原としての目的の小型ペプチドを含有する断片を用いて調製することができる。動物を免疫化するのに用いられるポリペプチドまたはオリゴペプチドは、RNAの翻訳によって得るか、あるいは化学的合成によって得ることができ、さらに所望ならば、担体タンパク質に結合させることができる。一般に用いられている、ペプチドに化学的に結合された担体には、例えば、ウシ血清アルブミン、チログロブリンおよびキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)が挙げられる。

40

【0046】

「障害」および「疾患」という用語は、包括的に用いられ、正常から逸脱した任意の疾患を意味する。

【0047】

本明細書に用いられる「CTGF関連障害」という語は、異常または不適当なCTGFの発現または活性に関連している症状および疾患を意味する。CTGFの異常発現は、細胞増殖性障害(例えば、内皮細胞増殖または遊走、腫瘍様増殖、一般的な組織癒痕化、および細胞間マトリックスの不適当な沈着を特徴とする種々の疾患によって生じるようなもの)に関連して

50

いる。

【0048】

CTGF関連障害には、これに限定されるものではないが、アテローム性動脈硬化、緑内障など；ならびに、急性リンパ芽球性白血病、皮膚線維腫、乳癌、乳癌線異形成、血管脂肪腫、血管平滑筋腫、癒着性癌、前立腺癌、卵巣癌、結腸直腸癌、膵癌、胃腸系癌、および肝臓癌、ならびに他の腫瘍増殖および転移をはじめとする癌などの疾患において中心的役割を果たす血管形成および他の増殖性プロセスに関する障害が含まれる。

【0049】

さらに、CTGF関連障害には、これに限定されるものではないが、器官(腎臓、肺、肝臓、眼、心臓、皮膚など)の慢性または急性繊維症をはじめとする、局所性または全身性の繊維症による過度の癒着化が含まれる。かかるCTGF障害は、例えば、心筋反応性繊維症または心筋梗塞またはうっ血性心不全の後の心臓再構築をはじめとする心臓繊維症；間質性肺線維症などをはじめとする肺障害；腹膜透析(例えば、連続的携行式腹膜灌流(CAPD))を含む透析に関連している繊維症；硬膜外繊維症；腎線維症；肺線維症；間質性線維症；皮膚線維症；および外科手術、化学療法、放射線処理、同種異系移植片拒絶反応、慢性および急性移植拒絶反応(例えば、腎臓、肝臓または他の器官)を含む急性または反復性外傷による繊維症などの種々の繊維症；閉塞性細気管支炎(例えば、肺移植後の閉塞性細気管支炎)；ならびに、例えば、疾患または傷が原因の炎症および感染などの障害が含まれる。

【0050】

さらに、CTGF関連障害には、これに限定されるものではないが、全身性硬化症、硬皮症、ケロイド、肥大化癒着、および他の皮膚疾患および皮膚症状をはじめとする、硬化症状；腹膜透析に随伴するアテローム性動脈硬化を含む、糖尿病に随伴するアテローム斑およびアテローム性動脈硬化に関する疾患などのアテローム性動脈硬化；動脈硬化症；慢性関節リウマチ、骨関節炎および他の関節炎症性疾患等をはじめとする関節炎；間質性線維症をはじめとする間質性疾患；クローン病；炎症性腸疾患；例えば、増殖性硝子体網膜症、糖尿病性非増殖性網膜症、増殖性糖尿病性網膜症をはじめとする網膜症、および黄斑変性(年齢に關係する疾患および若年性(スタガルト)疾患、および色素上皮剥離；糖尿病腎症、IgAが関連している腎症、毒性による腎症等をはじめとする腎症；ならびに、化学的毒性細管破壊と関連している疾患が含まれる。

【0051】

本明細書に記載されている「増殖性」プロセスおよび障害には、組織内細胞群の異常増殖が原因である細胞の連続的増殖によって特徴づけられる病理学的状態が含まれる。細胞群は必ずしも形質転換された細胞、腫瘍形成細胞、または悪性細胞でないが、同様に正常細胞が含まれ得る。例えば、CTGFは、動脈壁の内層中の増殖性病変を誘発することにより病理学的に影響を及ぼし、アテローム性動脈硬化が生じるか、あるいは新血管新生を刺激し得る。

【0052】

「癌」は、無制御の異常な細胞増殖を含む、組織のすべての自律的増殖を意味し、または、浸潤によって局所的に、かつ転移によって全身的に拡大する潜在的に無制限に増殖するすべての悪性腫瘍を意味する。また、癌は、癌によって特徴付けられるすべての異常状態を意味する。

【0053】

「線維症」という用語は、線維組織の異常プロセッシング、または類線維腫もしくは線維性変性を意味する。線維症は種々の損傷または疾患によって生じ得る。また、種々の器官の移植に關係する慢性移植拒絶反応により生じ得ることが多い。線維症は、一般には、細胞間マトリックス成分の異常な産生、集積または沈着が含まれ、例えば、コラーゲンとフィブロネクチンの過剰産生および沈着増加が挙げられる。その最も広い意味で本明細書に用いられている「線維症」は、細胞間マトリックスタンパク質のすべての過剰産生または沈着を意味する。線維症には多数の例があり、心臓のポンプ能力を損なう、心臓発作後の癒着組織の形成が挙げられる。糖尿病は、腎臓機能の進行性障害に至る、腎臓中の損傷 /

10

20

30

40

50

癒痕を引き起こす場合が多い。さらに外科手術の後では、癒痕組織が内臓間に生じ、拘縮、疼痛、場合によっては、不妊を引き起こし得る。心臓、腎臓、肝臓、眼および皮膚などの主な器官は、他の疾患に一般に関連している慢性癒痕になりやすい。過形成性癒痕(悪性でない組織塊状)は、やけどおよび他の外傷によって生じた線維症の共通形状である。さらに、多数の他の線維増殖性障害があり、硬皮症、ケロイドおよびアテローム性動脈硬化(前記疾患は一般的な組織癒痕にそれぞれ関係している)、皮膚の腫瘍様増殖、あるいは血液輸送能力が損なわれる血管の持続性癒痕が挙げられる。

【0054】

「サンプル」という用語は、その最も広い意味において本明細書で用いる。サンプルは任意の供給源、例えば、これに限定されるものではないが、唾液、血液、尿、血清、血漿、硝子体液、関節液、脳脊髄液、羊水および器官組織(例えば、パイオプシーを実施した組織)をはじめとする体液、分泌物、組織、細胞、または培養物中の細胞；染色体、細胞器官または細胞から単離された他の膜；ゲノムDNA、cDNA、RNA、mRNA等；ならびに、除去された細胞または組織、あるいはかかる細胞または組織のプロット(blots)またはインプリントに由来し得る。サンプルは、例えば、ヒト被験体、非ヒト哺乳類被験体等の任意の供給源に由来し得る。さらに、疾患の任意の動物モデルに由来したサンプルを検討する。サンプルは溶液形態であってもよく、あるいは、例えば、基板に固定または結合させることができる。サンプルは、CTGFまたはCTGF断片の存在について試験するのに好適である任意の物質、あるいはCTGFまたはその断片に結合する分子をスクリーニングするのに好適である任意の物質を意味し得る。かかるサンプルを取得方法は、当業者の技術レベルの範囲内である。

10

20

【0055】

「ハイブリダイゼーション」という用語は、核酸配列が塩基対によって相補的配列に結合する方法を意味する。ハイブリダイゼーション条件は、例えば、プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーション溶液中の塩またはホルムアミドの濃度によって、あるいはハイブリダイゼーション温度によって定めることができるが、それは当技術分野では周知である。ハイブリダイゼーションは、種々のストリンジェンシーな条件下で生じ得る。

【0056】

特に、塩濃度を低下させること、ホルムアミド濃度を高めること、あるいはハイブリダイゼーション温度を上昇させることにより、高ストリンジェンシーとすることができる。例えば、本発明の目的において、高ストリンジェンシーな条件下のハイブリダイゼーションは、約37 ~ 42 の約50%のホルムアミドにおいて、低ストリンジェンシーな条件下のハイブリダイゼーションは、約30 ~ 約35 の約35% ~ 25%のホルムアミドにおいて生じ得る。特に、一般に、ハイブリダイゼーションは、42、50%ホルムアミド、5×SSPE、0.3% SDS、および切断、変性させたサケ精子DNA 200/μg/mlの高ストリンジェンシー条件において生じる。

30

【0057】

特定のレベルのストリンジェンシーに対応する温度範囲は、当技術分野で知られている方法によって、例えば、対象の核酸のプリン対ピリミジンの比を算出し、それに応じて温度を調節することによりさらに狭めることができる。非特異的シグナルを除くには、例えば、室温または室温より高い温度(60を含む)において、最高0.1×SSCおよび0.5% SDSのストリンジェントを高めた条件下でプロットを連続して洗浄することができる。上記範囲および条件の変更は当技術分野で周知である。

40

【0058】

本発明の説明

本明細書では、CTGFの特定断片を検出することができ、さらには、CTGFまたは他のCTGF断片を独立して定量することができる知見について述べる。本発明は、生体サンプル中のCTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片の濃度を確実に検出、定量する方法を提供する。さらに、種々の疾患および症状、例えば、糖尿病；肝臓線維症、腎臓線維症および肺

50

線維症をはじめとする線維症；心筋梗塞；炎症性関節疾患；癌；全身性硬化症；血管形成；動脈硬化症、アテローム性動脈硬化；移植拒絶反応；糖尿病性網膜症をはじめとする種々の眼疾患；局所性および全身性強皮症；腎性高血圧症；ならびに腹膜透析などに関連している疾患等の進行の診断、予測および確定を本明細書に記載されている組成物と方法を用いて達成することもできる。

【0059】

結合組織増殖因子

結合組織増殖因子(CTGF)は、これまでに報告、開示されている(例えば、米国特許第5,408,040号；Bradhamら、(1991) J Cell Biology 114: 1285-1294を参照されたい。) CTGFは、分子量が約36~38kDaのモノマーのポリペプチドである。CTGFは、増殖因子(CTGF Cyr-61, nov)のCCNファミリーと呼ばれる、近年報告されたシステインに富む分泌タンパク質のファミリーの1種であり、異なるモジュールドメイン内に高度に保存されたシステイン残基の存在を特徴とする。これらのドメイン(各ドメインは離れたエクソンによってコードされている)は、種々の細胞間マトリックスタンパク質で確認される保存領域への相同性を示す。特に、CTGF内では、これらのモジュールは、インシュリン様増殖因子結合タンパク質のN末端のシステインに富んだ領域(エクソン2によってコードされている、CTGFのドメイン1)；オリゴマー化に関与している、フォンビルブランド因子C型ドメイン(エクソン3によってコードされている、CTGFのドメイン2)；細胞付着領域を含有し得、細胞間マトリックスおよび硫酸化複合糖質に結合することに関与していると考えられる、トロポスポンジンI型モチーフ、(エクソン4によってコードされている、CTGFのドメイン3)；ならびに、受容体結合に関与し得る、神経成長因子、トランスフォーミング成長因子(TGF- β)および血小板誘導増殖因子(PDGF)で確認されたものに類似しているC末端システインノットモチーフ(エクソン5によってコードされている、CTGFのドメイン4)との構造的類似点を有している(Bork (1993) FEBS Lett 327: 125-130)。

10

20

30

40

50

【0060】

CTGFの種々の断片は生物活性を示すことが明らかになっている(例えば、米国特許第5,876,730号；Brigstockら、(1997) J Biol Chem 272: 20275-20282；Ballら、(1998) Biol Reprod 59: 828-835；Steffenら、(1998) Growth Factors 15: 199-213；国際出願第W0 00/35939号；および国際出願第W0 00/35936を参照されたい)。また、妊娠血清、羊水および腹水由来などのヒト体液、ならびに、培養したウシ内皮細胞の馴化培地中のCTGF断片が検出されている(Yangら、(1998) J Clin Endocrinol Metab 83: 2593-2596；Boesら、(1999) Endocrinology 140: 1575-1580)。

【0061】

CTGFは、繊維芽細胞、他の結合組織細胞の増殖、走化性、遊走、付着および細胞間マトリックス形成を促進するように作用する。CTGFの異常発現または過剰産生が、主な器官の線維症、線維増殖性疾患および瘢痕をはじめとする繊維症障害を引き起こす経路において主要な機能を果たしていることが根拠として提示されている。CTGFは、例えば、結合組織細胞(例えば、繊維芽細胞、筋繊維芽細胞など)、血管内皮細胞、上皮細胞、ニューロン細胞、血管平滑筋細胞、およびさらに特定化された結合組織細胞(骨細胞、軟骨および他の支持骨格組織など)をはじめとする、種々の細胞タイプに影響を与える(例えば、MoussadおよびBrigstock (2000) Mol Genet Metab 71: 276-292を参照されたい)。

【0062】

本明細書は、ある状態において、CTGFのある種の断片の濃度が上昇するという知見に関する。特定の態様では、本発明は、ある状態において、CTGFのN末端断片がCTGFまたはCTGFのC末端断片に比べて容易に(例えば体液中などで)検出されることを示す。本発明は、CTGF断片が蓄積するいかなる特定の機序にも限定されるものではないが、N末端断片はタンパク分解を受けにくく、排除または除去されにくく、非特異的結合または吸着されにくいことから、安定性が高い可能性がある。従って、CTGFのN末端断片を検出することにより、このポリペプチドの機序および作用部位を解明するより細かい特異性と再現性が得られる。さらに、本明細書は、異常の濃度のCTGF(特にCTGFのN末端断片)が疾患の存在と疾患

の程度の双方に関係し得ることを明らかにするものである。したがって、本発明は、新規で優れた、CTGFおよびCTGF断片発現に関連するある種の疾患の診断、予測および治療モニタリング方法を提供する。

【0063】

従って、一態様において、本発明は、CTGFの検出(定性的または定量的)に、およびCTGF関連障害の予測、診断および治療のモニタリングにCTGFポリペプチドのN末端断片を使用することに関する。別の態様では、本発明は、CTGFの検出(定性的または定量的)に、およびCTGF関連障害の予測、診断および治療のモニタリングにCTGFポリペプチドのC末端断片を使用することに関する。CTGF、CTGFのN末端断片またはCTGFのC末端断片は、本発明によって提供される多数の方法で検出、確認、定量することができる。

10

【0064】

本発明は、ある実施形態において、CTGFのC末端とN末端断片は、目的の断片をコードするポリヌクレオチド配列を突然変異させ、天然では生じないアミノ酸配列を得ることにより構築することができる、CTGFの特定のC末端とN末端断片の変異体であることを検討する。アミノ酸改変は、異なる種のサブユニット(可変位置)において、または高度に保存された領域(定常領域)において異なる部位で作製することができる。かかる位置の部位は、一般に、最初に、保存的選択により(例えば、疎水性アミノ酸を異なる疎水性アミノ酸へ)置換し、次いで、遠位の選択により(例えば、疎水性アミノ酸を荷電アミノ酸へ)置換することによる系で改変することができる。さらには、標的部位に欠失または挿入を行うことができる。

20

【0065】

本明細書に記載されているポリペプチド、例えば、CTGFのN末端特異抗体またはCTGFのC末端特異抗体を産生するのに有用なポリペプチドは、当技術分野で知られている多数の方法のいずれかを用いて単離または生成し、CTGFアミノ酸配列の少なくとも一部の所望のN末端またはC末端断片を合成することができる。例えば、ペプチドは、固相法により合成し、樹脂から切り離し、分取高速液体クロマトグラフィーによって精製することができる。合成ペプチドの組成物は、例えば、アミノ酸分析、質量分析またはシーケンシングによって確認することができる。

【0066】

また、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて、CTGFおよびその断片のアミノ酸配列変異体を作製することができる。出発原料として少量の鋳型DNAを用いる場合、鋳型DNA中の対応する領域と配列中わずかに異なる1種または複数のプライマーによって所望のアミノ酸変異体を得ることができる。PCR増幅を行うと、プライマーによって特定化された位置がCTGFまたはその断片をコードするポリヌクレオチド鋳型とは異なるDNA断片産物が多数得られる。このDNA断片産物をプラスミド中の対応する領域に置換して、これにより所望のアミノ酸変異体を得ることができる。アミノ酸変異体を作製するさらなる技術としては、Wellsら(1985, Gene 34: 315)に記載されているカセット突然変異生成技術、および当技術分野で周知の他の突然変異生成技術(例えば、Maniatis, T. ら、(前掲); Ausubel, F. M. ら、(前掲)に一般に記載されている技術)が挙げられる。

30

【0067】

本発明の代替実施形態では、当技術分野で周知の化学的方法を用いて、本発明のCTGFポリペプチドのコード配列を全体として、または一部として合成することができる(Caruthersら、(1980) Nucleic Acids Symp Ser 7: 215-233; CreaおよびHorn (1980) Nucleic Acids Res 9: 2331; MatteucciおよびCaruthers (1980) Tetrahedron Letters 21: 719; ならびに、ChowおよびKempe (1981) Nucleic Acids Res 9: 2807-2817を参照されたい)。

40

【0068】

CTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片の検出

本発明は、サンプル中のCTGFポリペプチド(例えば、CTGF、CTGFのN末端断片、CTGFのC末端断片)の濃度を検出または定量する方法を提供する。提供する本方法は、ヒトのCTGFポリペプチドの検出および定量に限定されるものではないが、例えば、非ヒト哺乳動物CT

50

GFを検出または定量するなど、他の種由来のCTGFの検出に用いることができる(図16を参照されたい)。例えば、同一種または異種由来の内因性CTGFおよび外因性CTGFをはじめとするCTGFの検出および定量は、CTGF関連障害および他の種々の疾患の動物モデルにおいて有用であり得る。一態様においては、生体サンプル中のCTGFを検出する方法であって、サンプルを取得することと、サンプル中のCTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片に検出すること、を含む方法を提供する。別の態様においては、生体サンプル中のCTGFの濃度を定量する方法であって、サンプルを取得することと、サンプル中のCTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片の濃度を定量すること、を含む方法を提供する(例えば、図1Cを参照されたい)。

【0069】

一態様においては、本アッセイは、これらのポリペプチドに対して産生される抗体を用いて、CTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片を検出することに基づいている(例えば、図1Aを参照されたい)。また、本アッセイには、核酸ベースのアッセイ(一般には、ハイブリダイゼーションに基づいたアッセイ)、または当技術分野で既知の種々の他のすべてのアッセイも含まれ得る。好ましい実施形態では、本方法は、ポリペプチドに特異的な抗体によって結合される本発明のポリペプチド(例えば、CTGF、CTGFのN末端断片、CTGFのC末端断片)の能力、およびCTGFポリペプチドに結合する本発明のタンパク質に対して産生される抗体の能力によって特徴づけられる。また、本明細書では、当技術分野で標準的なCTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片を検出する別法を検討する。例えば、CTGFまたはCTGF断片と結合する、あるいは相互に作用する任意の作用物質、例えば、ヘパリン、CTGFまたはCTGF断片の受容体、または任意の他のCTGF結着剤を用いることができる。

10

20

【0070】

本発明によれば、種々の免疫測定技術を用いて、サンプル中のCTGFおよびCTGF断片の濃度を検出および定量することができる。一実施形態では、ELISAアッセイを用い、CTGFと異なるCTGF断片の濃度を確認および区別し、特定サンプル中のCTGFの量を異なるCTGF断片の量と比較することができる。ある種の実施形態においては、ELISAを用いて、培養細胞の馴化培地中、ならびに、血液、血清、血漿、腹膜流出液、尿、硝子体液、関節液、脳脊髄液、唾液、CTGFおよびCTGF断片の検出および定量が所望される他の生体サンプル中で確認されたCTGFおよびCTGF断片の濃度を検出、定量、比較することができる。

30

【0071】

ある種の態様では、CTGFまたはCTGF C末端断片の検出に比べると、CTGFのN末端断片を検出することにより、改善され感度が高まったCTGFの検出および定量を達成することができる。CTGFのN末端断片を使用すると疾患の程度が検出可能となり、CTGF関連障害の診断、予測および治療効果のモニタリングをより正確に行うことができる。

【0072】

さらに、本発明により提供される方法は、ポリペプチドのCCNファミリーの任意のメンバー(例えば、CTGF CYR61、Nov、Eim1/WISP-1、HICP/rCOP-1、CTGF-3/WISP-2、およびWISP-3)およびその断片を検出および定量するのに有用であり、かつ、CCNファミリーメンバーに関連している種々の疾患および障害の検出、診断、予測、および治療効果のモニタリングに有用である(例えば、Brigstock (1999) *Endocrine Reviews* 20: 189-206; および Per bal (2001) *Mol. Pathol.* 54:57-79を参照されたい)。

40

【0073】

抗体

本発明の好ましい実施形態において、CTGFまたはその断片の発現増加または減少あるいは活性増加または低下に関係している疾患および障害の検出、測定、診断、予測、モニタリング、および評価方法、ならびにその治療方法には、1種または複数のCTGFエピトープと特異的に反応する抗体を使用することが含まれる。

【0074】

好適な抗体を産生するのに用いられるポリペプチドは、種々の方法、例えば、合成ペプチ

50

ドの作製、CTGFの酵素による切断(例えば、キモトリプシン処理)、CTGFの化学的切断、CTGFまたはその断片の組換え発現、あるいはヒトまたは他の哺乳動物源からの単離によって作製することができる。したがって、CTGFを発現する細胞(例えば、MG-63細胞)、CTGFコード配列でトランスフェクトされた宿主細胞、精製されたCTGF、CTGFのC末端断片、CTGFのN末端断片、あるいはそのエピトープは、CTGFの所望の領域に特異的な抗体を産生するよう動物宿主中の免疫反応を誘導するための免疫原として用いることができる。組換え的に作製されるポリペプチドについては、好適な発現ベクターおよび系は、当業者に既知であり、例えば、Maniatisら、(前掲)およびAusubelら、(前掲)に記載されているように、真核生物および原核生物の発現系が含まれる。

【0075】

標的ポリペプチド(例えば、CTGFのN末端断片またはCTGFのC末端断片)を評価し、高免疫原性領域を決定することができる。分析法およびエピトープ選択は当技術分野で周知である(例えば、Ausubelら、(前掲)を参照されたい)。また、分析と選択は、例えば、LASERGE NE NAVIGATORソフトウェア(DNASTAR; Madison, WI)などの種々のソフトウェア・パッケージによって行うことができる。抗体産生を誘導するのに用いられるペプチドまたは断片は抗原に違いないが、必ずしも、生物学的活性である必要はない。好ましくは、抗原断片またはペプチドは少なくとも5個のアミノ酸長、少なくとも10個のアミノ酸長、最も好ましくは、少なくとも15個のアミノ酸長である。抗体を誘起する断片またはペプチドは、標的ポリペプチド(例えば、CTGFのN末端領域またはドメイン、CTGFのC末端領域またはドメイン)のアミノ酸配列の少なくとも一部と同一であることが望ましい。また、天然の標的ポリペプチドの配列の少なくとも一部を模倣するペプチドまたは断片は、他のタンパク質(例えば、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH))と融合していてもよく、抗体はこのキメラ分子に対して産生され得る。

【0076】

抗体の産生方法は当技術分野で既知である。例えば、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ニワトリ、シチメンチョウ、ヒト等をはじめとする種々の宿主は、標的ポリペプチドまたは任意の免疫原性断片またはそれらのペプチドの注射によって免疫化することができる。宿主の種に応じて、種々のアジュバントを用い、免疫応答を高めることができる。かかるアジュバントとしては、これに限定されるものではないが、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムなどの無機質ゲル、およびリゾレシチンなどの界面活性剤、プルロニックポリオール(pluronic polyol)、ポリアニオン(polyanions)、ペプチド、油性乳剤、ならびにKLHなどが挙げられる。ヒトに用いられるアジュバントには、アルミニウムヒドロゲル、BCG(カルメット・ゲラン桿菌(*Bacilli Calmette-Guerin*))およびコリネバクテリウム・パルブム(*Corynebacterium parvum*)が特に好ましい。

【0077】

モノクローナル抗体は、培養の連続継代細胞系によって抗体分子が産生される任意の技術を用いて調製することができる。モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれかの抗体を *in vivo* および *in vitro* で産生する技術は、当技術分野で周知である(例えば、Pound (1998) *Immunochemical Protocols*, Humana Press, Totowa NJ; Harlow および Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第2版, Academic Press; Schook (1987) *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc. を参照されたい)。さらに、単鎖抗体の産生と同様に、キメラ抗体の産生も当技術分野で周知である(例えば、Morrisonら、(1984) *Proc Natl Acad Sci* 81: 6851-6855; Neubergerら、(1984) *Nature* 312: 604-608; Takedaら、(1985) *Nature* 314: 452-454を参照されたい)。関連の特異性を有する抗体(しかし、明らかなイディオタイプ組成物の抗体)は、例えば、ランダムな組み合わせのイムノグロビンライブラリーからシャッフルされた鎖によって生成することができる(例えば、Burton (1991) *Proc Natl Acad Sci* 88: 11120-11123を参照されたい)。

【0078】

また、抗体は、リンパ球群において *in vivo* でその産生を誘導することにより、あるいは高特異的結合試薬の免疫グロブリンライブラリーまたはパネルのスクリーニングにより得ることができる(例えば、Orlandiら、(1989) Proc Natl Acad Sci 86: 3833-3837; WinterおよびMilstein (1991) Nature 349: 293-299を参照されたい)。また、標的ポリペプチドに対する特異的結合部位を含有する抗体断片を作製することもできる。かかる抗体断片としては、これに限定されるものではないが、 $F(ab')_2$ 断片(抗体分子をペプシンで消化することによって得ることができる)、およびFab断片($F(ab')_2$ 断片のジスルフィド架橋を還元することにより得ることができる)が挙げられる。あるいは、Fab発現ライブラリーを構築して、所望の特異性を有するモノクローナルFab断片の同定を迅速かつ容易に行うことができる(例えば、Huseら、(1989) Science 254: 1275-1281を参照されたい)。

10

【0079】

あるいは、抗体を産生可能なヒト体細胞(特にBリンパ球)は、ミエローマ細胞系との融合に好適である。Bリンパ球は、個体の末梢血、または生検を行った脾臓、扁桃腺、またはリンパ節由来のものを用いることができる。さらに、エプスタインバーウイルスによってヒトB細胞を直接不死化することができる(Coleら、(1995) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 7796)。

【0080】

ハイブリドーマを産生する融合法における使用に好適なミエローマ細胞系は好ましくは非抗体産生であり、高融合能力を持ち、所望のハイブリドーマの増殖をサポートするある種の選択培地でのミエローマ細胞系の増殖を不可とする酵素欠損を有する。本発明で可能性のある融合細胞系の産生に使用可能なミエローマ細胞系の例としては、P3X63Ag8、P3X63Ag8-653、NS1/1.Ag 4.1、Sp210-Ag14、F0、NS0/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG 1.7、S194/5XX 0 Bul(すべてマウス由来); R210.RCY3、Y3-Ag 1.2.3、IR983Fおよび4B210(すべてラット由来); U-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2、UC729-6(すべてヒト由来)が挙げられる(例えば、Goding(上掲), pp. 65-66; Campbell (1984) Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13 (BurdenおよびVon Knippenberg編集), Elsevier, Amsterdam, pp. 75-83を参照されたい)。

20

【0081】

また、本発明では、CTGFまたはその断片に対する「ヒト」または「ヒト化」抗体を用いることができる。ヒト化抗体は、親抗体(例えばマウス起源抗体)と同一または類似の結合特異性を有し、かつヒト特性が高められた抗体または抗体フラグメントである。ヒト化抗体は、例えば、鎖シャッフリングによって、またはファージディスプレイ技術を用いることによって取得することができる。例えば、CTGFまたはその断片に特異的な非ヒト抗体の重鎖または軽鎖の可変ドメインを含むポリペプチドを相補的なヒト(軽または重)鎖可変ドメインのレパートリーと組み合わせる。目的の抗原に特異的なハイブリッド対を選択する。次いで、選択した対のヒト鎖は、相補的なヒト可変ドメイン(重鎖または軽鎖)のレパートリーと組み合わせてもよく、ヒト化抗体ポリペプチド二量体を抗原への結合特異性について選択することができる。本発明の方法に使用可能なヒト化抗体の産生が説明されている技術は、例えば、米国特許第5,565,332号; 第5,585,089号; 第5,694,761号; および第5,693,762号に記載されている。さらに、トランスジェニックマウスでヒト抗体を産生することについて説明されている技術は、例えば米国特許第5,545,806号および第5,569,825号に記載されている。

30

40

【0082】

本明細書に記載されているようにして産生される抗体は、例えば、血液、血清、血漿、尿、硝子体液、関節液、脳脊髄液、唾液、特定組織のバイオプシー等、または他の生体サンプル、細胞培養サンプル、またはアッセイサンプル中のCTGFまたはその断片の同定に用いることができる。特定のポリペプチドの存在量は、例えば定量的画像分析によって検出することができる。あるいは、生体サンプルを用いて、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)などによって、標的ポリペプチドのmRNAを検出することができる。特に、この方法では、例えば組織サンプル由来の全mRNA、あるいは標的ポリペプチドまたはその断片をコー

50

ドする mRNA を DNA に逆転写し、次いで、特定のプライマー配列を用いた PCR によって増幅することができる。mRNA の定量は、例えば、一連の低い既知の濃度の模倣または突然変異体 cDNA 断片に対抗する、等量の患者サンプルを用いた競合反応によって検出することができる。

【 0 0 8 3 】

CTGF アッセイ

CTGF ポリペプチド、特に CTGF、CTGF ポリペプチドの N 末端断片、または CTGF ポリペプチドの C 末端断片を検出する好ましいアッセイは、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いて行う。サンプルから所望のタンパク質に特異的に結合する抗体を検出するには、あるいはサンプルから 1 種または複数の抗体に結合する所望のタンパク質を検出するには、種々のアッセイを利用することができる。具体的なアッセイは、Harlow および Lane (上掲) ; Burtis および Ashwood (1999) Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 第 3 版, W. B. Saunders, Philadelphia ; ならびに、Kaplan, Pesce および Kazmierczak (1996) Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation, 第 3 版, Mosby, St. Louis に詳細に記載されている。かかるアッセイの代表的な例としては、向流免疫電気泳動 (CIEP) アッセイ、ラジオイムノアッセイ、放射性免疫沈降法、酵素結合抗体免疫吸着アッセイ (ELISA)、ドットプロットアッセイ、阻害アッセイまたは競合アッセイ、サンドイッチアッセイ、イムノスティック (ディップスティック) アッセイ、同時アッセイ、免疫クロマトグラフアッセイ、免疫濾過アッセイ、ラテックスビーズ凝集アッセイ、免疫蛍光アッセイ、バイオセンサーアッセイ、および、微弱光検出アッセイが挙げられる (例えば、米国特許第 4, 376, 110 号および第 4, 486, 530 号 ; ならびに Goding (上掲) を参照されたい)。

10

20

【 0 0 8 4 】

蛍光抗体法 (FA 試験) は、タンパク質のうちの 1 タンパク質に結合可能な蛍光標識抗体 (例えば、CTGF の N 末端領域に対する抗体) を用いる。検出は、蛍光顕微鏡法および目視による検出によって実施され、定性結果を得ることができる。一実施形態では、本アッセイは組織サンプルまたは組織学的分野の診断に用いられる。

【 0 0 8 5 】

ラテックスビーズ凝集アッセイでは、抗体はラテックスビーズに結合する。次いで、ラテックスビーズに結合している抗体を抗体がサンプル中の所望のタンパク質に結合することができる条件下でサンプルと接触させる。定性的結果または定量的結果を検出することができる。

30

【 0 0 8 6 】

酵素免疫定量法 (EIA) としては、抗体を利用し、かつ CTGF を検出することが可能な多数の異なるアッセイが挙げられる。例えば、EIA 異種間接法は、CTGF に対する抗体を結合している固相と精製した親和性抗 IgG 免疫グロブリン製剤を用いる。次いで、抗体および免疫グロブリン製剤を抗体が結合可能な条件下 (条件は当技術分野で周知である) でサンプルと接触させる。かかるアッセイの結果は目視によって評価可能であるが、ELISA プレートリーダーなどの分光光度計を用いて検出し、定量的結果を得るのが好ましい。代替の固相 EIA フォーマットには、磁石によるアッセイ手順の間に移動可能なプラスチック被覆鉄金属ビーズが含まれている。さらに、別の代替法は微弱光検出免疫測定フォーマットである。この高感度フォーマットでは、適当に標識化された結合抗体によって生じる光放射を自動的に定量する。この反応は、微量定量プレートを用いて行なうのが好ましい。

40

【 0 0 8 7 】

代替の実施形態においては、EIA の酵素を介した検出を放射性トレーサーに替えて、当業者に周知の方法を用いて、ラジオイムノアッセイ (RIA) を行う。

【 0 0 8 8 】

また、酵素結合抗体免疫吸着アッセイ (ELISA) を行なうこともできる。一実施形態では、ELISA は、(1) 固相上に本発明の CTGF ポリペプチド (例えば、CTGF の N 末端断片、CTGF の C 末端断片) を被覆するステップと ; (2) 抗原抗体複合体の形成可能な条件下で、CTGF 抗体が含まれている可能性のあるサンプルを固相上に被覆された前記ポリペプチドとインキュベ

50

ートするステップと；(3)得られた固相へ結合している抗原抗体複合体によって捕捉される標識と結合している抗体(抗IgGなど)を添加するステップと；(4)捕捉された標識を測定し、サンプルがCTGF抗体を含んでいるか否かをそれから決定するステップを含む。

【0089】

捕捉抗体サンドイッチ酵素アッセイでは、所望のタンパク質は、固相(好ましくはポリスチレン微量定量プレート)に結合している抗体と標識抗体の間に結合させる。結果は、ELISAプレートリーダーなどの分光光度計を用いて測定するのが好ましい。系列アッセイフォーマットでは、試薬を段階的方法において捕捉抗体とインキュベートさせる。最初に、試験サンプルを捕捉抗体とインキュベートする。洗浄工程に続いて、標識抗体とのインキュベーションを行う。同時アッセイでは、系列アッセイで記載されている2回のインキュベーション期間を組み合わせる。この場合、1つのインキュベーション期間と洗浄工程が省かれる。

10

【0090】

固相が(ポリスチレン微量定量プレートである代わりに)ポリスチレン製へらまたはディップスティックであるという点を除けば、ディップスティック/イムノスティックフォーマットは本質的にはイムノアッセイである。試薬は同じであり、フォーマットは同時であっても系列であってもよい。

【0091】

クロマトグラフィーストリップテストフォーマットでは、クロマトグラフィーストリップ上で捕捉抗体および標識抗体を乾燥させる。前記ストリップは、一般には酢酸セルロースに結合されている高孔隙率のニトロセルロースまたはナイロンである。捕捉抗体は、通常、ストリップの一端にラインとしてスプレードライする。この末端には、ストリップと接している吸収材料がある。ストリップの他端には、膜へ吸収されないようにして標識抗体が置かれている。通常、抗体に結合している標識は、ラテックスビーズまたはコロイド金である。アッセイは、標識抗体の直前にサンプルをアプライすることにより開始することができる。

20

【0092】

免疫濾過/免疫濃度フォーマットは、抗原の抗体への結合を集中させかつ促進させるサンプル/試薬の方向性流動と大型の固相表面とを組み合わせる。好ましいフォーマットでは、試験サンプルを標識抗体と事前インキュベートし、次いで、ファイバーフィルタまたはニトロセルロース膜等の固相にアプライする。また、捕捉抗体で被覆したラテックスまたはガラスビーズで固相を事前に被覆しておくことができる。分析物の検出は、標準のイムノアッセイと同じである。サンプル/試薬の流動は、真空器または下層の吸収材料の吸上作用によって調節することができる。

30

【0093】

閾値バイオセンサーアッセイは、多数のサンプルのスクリーニングを実施することができる高感度の機器を低価格で装備したアッセイである。一実施形態では、かかるアッセイは、信号による位置付け可能な電位差センサーの使用が含まれ、この場合、反応には、捕捉抗体による所望のタンパク質の結合と、抗体とウレアーゼ結合抗体との架橋によるpH変化の検出が含まれる。結合に際し、pH変化は、電位へ変換することによって測定可能となる。このアッセイは、一般に、非常に少量の反応容量で生じ、かつ非常に高感度である。さらに、このアッセイの報告されている検出限界は、毎分1,000分子のウレアーゼであり得る。

40

【0094】

診断、予測、予防および治療の方法

本発明は、CTGF、CTGF N末端断片およびCTGF C末端断片の濃度の検出または測定に基づいた診断、予測、ならびに治療および効果のモニタリング方法を提供する。ある種の疾患では、CTGFのN末端断片は、CTGFまたはCTGFのC末端断片より安定しており、かかる状況において、サンプル中のCTGFおよびCTGF断片の濃度をより高感度にかつ正確に検出および定量するために用いることができる。

50

【0095】

一態様では、本発明は、CTGF関連障害の診断方法を提供する。一実施形態では、CTGF関連障害の診断方法は、サンプルを取得し、CTGF、CTGFのN末端断片またはCTGFのC末端断片のサンプル中の濃度を検出、定量することと；サンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度を、CTGFまたはCTGF断片の基準量の濃度と比較することを含み、サンプル中のCTGFまたはCTGF断片の増加量または減少量がCTGF関連障害の存在を示す。CTGFまたはCTGF断片の異常（例えば、増加または減少）濃度に関連している障害は、これに限定されるものではないが、増殖性障害ならびに細胞間マトリックス関連タンパク質の異常な発現および沈着に関連している障害が含まれる。かかる障害には、例えば、癌（乳癌、前立腺癌、卵巣癌、結腸直腸癌、膵臓癌および胃腸系癌など）；およびアテローム性動脈硬化、関節炎、糖尿病性網膜症などのような網膜症；糖尿病性腎症などの腎症；心臓線維症、肺線維症、肝臓線維症および腎線維症、ならびに慢性炎症および/または感染に関連している疾患が挙げられる。また、CTGF関連障害は、心筋梗塞、糖尿病、腹膜透析、慢性および急性移植拒絶反応、化学療法、放射線治療、ならびに外科手術などの疾患に関連している。さらなるCTGF関連障害については、前に記載されている。

10

【0096】

また、個体がCTGF関連障害になる傾向があるか否かについて確認する方法を提供する。一実施形態では、CTGF関連障害の傾向を確認する方法は、サンプルを取得し、CTGF、CTGFのN末端断片またはCTGFのC末端断片のサンプル中濃度を検出、定量することと；サンプル中のCTGFまたはCTGFの任意の断片の濃度を、CTGFまたはCTGF断片の基準量の濃度と比較することを含み、サンプル中のCTGFまたはCTGF断片の増加量または減少量が、CTGF関連障害の存在を示す。

20

【0097】

別の態様では、本発明は、CTGF関連障害の進行をモニターする方法であって、サンプルを取得することと；サンプル中のCTGF、CTGFのN末端断片またはCTGFのC末端断片の濃度を検出および定量することと；サンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度を、CTGFまたはCTGF断片の既知の基準量と、あるいは初期の時期もしくは以前の時期に、または疾患の進行中の初期段階に、同一個体または同一源から取得したサンプル中のCTGFまたはCTGF断片の第1の濃度と比較することを含み、サンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度と基準濃度または第1の濃度との差がCTGFに関連している障害の進行を示す、前記方法を提供する。

30

【0098】

別の態様では、本発明は、CTGF関連障害の経過の予測を検出する方法であって、サンプルを取得することと；サンプル中のCTGF、CTGFのN末端断片またはCTGFのC末端断片の濃度を検出および定量することと；サンプル中のCTGF、またはCTGF断片の濃度を、以前の時期に、または疾患の進行中の初期段階に得られた個体のサンプル中で測定された濃度と比較することを含み、一時期に得られたサンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度と、別の時期に得られたサンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度の差がCTGF関連障害の経過の決定要因である、前記方法を提供する。

【0099】

別の態様では、本発明は、CTGF関連障害の治療効果をモニターする方法であって、CTGF関連障害があり、その障害について治療を受けている被験体からサンプルを取得することと；サンプル中のCTGF、CTGFのN末端断片またはCTGFのC末端断片の濃度を検出および定量することと；サンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度をCTGFまたはCTGF断片の基準濃度と比較することを含み、サンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度と基準濃度の差がCTGF関連障害の治療効果を示す、前記方法を提供する。

40

【0100】

別の態様では、本発明は、CTGFに関連している障害の治療効果をモニターする方法であって、サンプルを取得することと；サンプル中のCTGF、CTGFのN末端断片またはCTGFのC末端断片の濃度を検出および定量することと；サンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度を、以前に個体から得られたサンプル中の濃度、あるいは経時的に、または疾患の進行中の初

50

期段階で取得した1種または複数のサンプル中の濃度と比較することを含み、一時期に得られたサンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度と別の時期に得られたサンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度の差がCTGF関連障害の治療効果を示す、前記方法を提供する。

【0101】

さらに別の態様では、CTGFまたはCTGF断片の濃度増加に関連している障害を確認する方法であって、特定の障害がある被験体から第1サンプルを取得することと；特定の障害のない被験体から第2サンプルを取得することと；第1サンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度を検出および定量することと；第2サンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度を検出および定量することと；第1サンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度を、第2サンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度と比較することを含み、第1サンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度増加が、CTGFの濃度および活性の上昇に関連している障害を示す、前記方法を提供する。

10

【0102】

さらに別の態様では、CTGFまたはCTGF断片の濃度低下に関連している障害を確認する方法であって、特定の障害がある被験体から第1サンプルを取得することと；特定の障害のない被験体から第2サンプルを取得することと；第1サンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度を検出および定量することと；第2サンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度を検出および定量することと；第1サンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度を第2サンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度と比較することを含み、第1サンプル中のCTGFまたはCTGF断片の濃度低下がCTGFの濃度および活性の低下に関連している障害を示す、前記方法を提供する。

20

【0103】

化合物のスクリーニングと同定

さらに、本発明は、CTGFまたはCTGF断片の発現、濃度または活性を低下または上昇させる化合物(例えば、CTGFのN末端断片、CTGFのC末端断片など)をスクリーニングおよび同定する方法を提供する。

【0104】

一態様では、CTGF断片の発現、濃度または活性を上昇させる化合物(例えば、CTGFのN末端断片、CTGFのC末端断片など)をスクリーニングする方法であって、サンプルを取得することと；サンプルを化合物と接触させることと；サンプル中のCTGFおよびCTGF断片の発現、濃度または活性を検出および測定することとを含み、上昇したCTGF断片の発現、濃度または活性が、CTGF断片の発現、濃度または活性を上昇させる活性を有する化合物を示す、前記方法を提供する。

30

【0105】

別の態様では、CTGF断片の発現、濃度または活性を低下させる化合物(例えば、CTGFのN末端断片、CTGFのC末端断片など)をスクリーニングする方法であって、サンプルを取得することと；サンプルを化合物と接触させることと；サンプル中のCTGFおよびCTGF断片の発現、濃度または活性を検出および測定することとを含み、低下したCTGF断片の発現、濃度または活性が、CTGF断片の発現、濃度または活性を低下させる活性を有する化合物を示す、前記方法を提供する。

【0106】

化合物は、当技術分野で周知の種々のスクリーニング法の任意の方法によって確認することができる。かかるスクリーニング法では、CTGFポリペプチドまたは化合物を溶液中に遊離させるか、固相担体に付着させるか、細胞表面上に載せるか、細胞間マトリックスに結合させるか、細胞内に位置させることができる。例えば、マイクロアレイに担持されている試験化合物は、当技術分野で利用可能な方法によって、調製、利用および分析することができる(例えば、Shalonら、(1995)、PCT出願第W095/35505号；Baldeschweilerら、(1995)、PCT出願第W095/251116号；Brennanら、(1995)、米国特許第5,474,796号；Hellerら、(1997)、米国特許第5,605,662号を参照されたい)。

40

【0107】

種々のアッセイおよびスクリーニング法を用いて、CTGFまたはCTGF断片(例えば、CTGFの

50

N末端断片、CTGFのC末端断片)の発現、濃度または活性を調節する(例えば、上昇または低減させる)小分子を同定することができる。また、これらの方法を提供することによりCTGFまたはCTGF断片の発現、濃度または活性と相互に作用する、あるいは影響を及ぼす抗体および他の化合物を同定することができ、従って、本方法において医薬品および治療法として用いることができる(例えば、Ennaら、(1998) Current Protocols in Pharmacology, John Wiley and Sonsを参照されたい)。アッセイにより、一般に、化合物のタンパク質または細胞標的への結合に関連する検出可能なシグナルが得られる。結合は、例えば、蛍光標識試薬、酵素複合体、および当技術分野で周知の他の検出可能な標識によって検出することができる。結果は、定性的または定量的であり得る。

【0108】

本明細書に記載されている任意の方法において、サンプルは、培養物中の細胞、または哺乳動物から、好ましくはヒト被験体から取得することができる。サンプルは、例えば、培養細胞の馴化培地から、または血液、尿、血清、血漿、硝子体液、関節液、脳脊髄液、唾液、羊水から取得することができ、あるいは、組織のバイオプシーから取得することができる。当技術分野で周知の種々の方法のうちいずれかの方法を用いて、CTGFまたはその断片の濃度を検出および定量することができる。かかる方法には、これに限定されるものではないが、CTGFのN末端断片またはC末端断片に対する抗体の使用；CTGFのN末端断片またはC末端断片の単離(例えば、質量分析、液体クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、ウェスタンブロット解析、他の従来化学分析などの使用による)；あるいは当業者に周知の任意の他の方法および手順が含まれる。ある態様においては、本方法は、CTGF内にあるCTGFのN末端領域/ドメインまたはCTGFのC末端領域/ドメインを検出することが含まれる。別の態様においては、本方法は、単離されており(例えば、切断されており)、かつCTGFのC末端領域またはCTGFとは区別可能なCTGFのN末端断片の濃度の測定すること、あるいは、単離されており(例えば、切断されており)、かつCTGFのN末端領域またはCTGFとは区別可能なCTGFのC末端断片の濃度の測定することを含む。

【0109】

当業者は、本明細書を参考に、本発明のこれら実施形態および他の実施形態を容易に理解するであろう。

実施例

【0110】

本発明は、さらに以下の実施例(本発明を単に例示するものである)を参照することによって理解されるであろう。これらの実施例は、特許請求の範囲に記載されている発明を説明するために単に提供されるものである。本発明は例示された実施形態によって範囲を限定されるものではなく、その実施形態は、単に、本発明の一態様を示すものである。機能的に同等なすべての方法は本発明の範囲内である。本明細書に記載されているものに加えて、本発明の種々の変更は、先の記載と添付の図面から当業者に明らかであろう。かかる変更は、添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれるものである。

【実施例1】

【0111】

組換えヒトCTGFの産生

組換えヒトCTGF(rhCTGF)を以下のようにして調製した。完全長のヒトCTGF cDNA(DB60R32)をGary Grotendorst博士(マイアミ医科大学)から入手した(Bradhamら、(1991) J Cell Biol 114:1285-1294)。オープンリーディングフレームのみを含むCTGF cDNAは、鋳型のDB60R32 DNAと、増幅産物のいずれか一端にBamHI制限酵素部位(下線部)が挿入される以下のプライマー(5'-gctccgcccgcagtgggatccatgaccgccc-3'(配列番号3)および5'-ggatccgga tcctcatgccatgtctccgta-3')(配列番号4))を用いたポリメラーゼ連鎖反応によって得られた。得られた増幅DNA断片をBamHIで消化し、アガロースゲル上で精製し、パキユロウイルス(ドナー)発現プラスミドpFastBac1(Invitrogen, Carlsbad Calif.)のBamHI部位へ直接サブクローン化した。pFastBac1/CTGF cDNAベクター構築物をバクミドDNAへ転換し、BAC-T0-BACパキユロウイルス発現系マニュアル(Invitrogen)の中で説明されているメーカーの

10

20

30

40

50

プロトコルに従って、組換えバキュロウイルスを作製した。Sf9昆虫細胞中の組換えバキュロウイルス増幅のタイターは、当技術分野で周知の標準法を用いて行った(MurphyおよびPiwnica-Worms, (1984) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2 (Ausubelら、編集) John Wiley & Sons, Inc.)。

【0112】

rhCTGFの発現および産生は以下のようにして行った。懸濁液増殖に適したHIGH FIVE昆虫細胞は、 1.0×10^6 個/mlの細胞密度までSF900II培地(Invitrogen)にて増殖させた。次いで、10:1の感染多重度にてCTGFを含有するバキュロウイルスで細胞を感染させた。感染後、細胞を40時間、27℃にてインキュベートした。次いで、細胞を遠心分離によって沈澱させ、CTGFを含有する調整培地を回収し、0.22µmフィルタにより濾過した。次いで、50mM トリス(pH7.2)で予め平衡化しておいた5mlのHi-Trapヘパリンカラム(Amersham Biosciences Corp., Piscataway N.J.)に調整培地を直接アプライした。次いで、350mM NaCl/50mM トリス(pH7.2)100mlでヘパリンカラムを洗浄し、結合されたCTGFを15カラム容量以上の350mM NaClから1200mM NaClの直線濃度勾配で溶出した。画分をCTGFの存在について、SDS-PAGEを用いて分析した。

10

【0113】

CTGFを含有する画分をプールし、50mMトリス(pH7.5)で1:4に希釈した。10カラム体積の50mMトリス(pH7.5)で予め平衡化しておいたカルボキシメチル(CM)イオン交換カラム(POROS CM column, PerSeptive Biosystems, Framingham, Mass.)にCTGFプールを充填した。次いで、350mM NaCl/50mMトリス(pH7.5)でCMカラムを洗浄し、結合されたCTGFを15カラム容量以上の350mM NaClから1200mM NaClの直線濃度勾配で溶出した。画分をCTGFの存在についてSDS-PAGEを用いて分析した。CTGFを含有する画分をプールし、CTGF原料として用いた。

20

【実施例2】

【0114】

CTGF N末端およびC末端断片の産生

CTGFのN末端断片およびC末端断片は以下のようにして調製した。上述のようにして調製および精製された組換えヒトCTGFは、キモトリプシン1単位当たりCTGF1.5mgを用いて、キモトリプシンピーズ(Sigma Chemical Co., St. Louis Mo.)による処理によって消化した。rhCTGFのキモトリプシン処理は、室温にて6時間進行させた。消化産物およびキモトリプシンピーズを遠心分離にかけ、キモトリプシンピーズを除去し、酵素によって切断されたrhCTGFを含有する上清を50mMトリス(pH7.5)で1:5に希釈した。希釈した上清をHi-Trapヘパリンカラムにかけた。CTGFのN末端断片が含まれているその流出液を回収した。350mM NaClでヘパリンカラムを洗浄し、結合されたCTGFのC末端断片と未消化のCTGFを上述のようにして350mMから1200mMのNaClの直線濃度勾配で溶出した。画分をCTGFのC末端断片の存在について、SDS-PAGEによって分析した。CTGFのC末端の確認された純度に従って、CTGFのC末端断片を含有する画分をプールした。

30

【0115】

ヘパリンカラム流出液(CTGFのN末端断片を含有)は、0.5M硫酸アンモニウム/50mMトリス(pH7.5)を含有するように調製した。次いで、0.5M硫酸アンモニウム/50mMトリス(pH7.5)で予め平衡化しておいた15mlフェニルセファローズHPカラム(Amersham Pharmacia Biotech)にこのCTGFのN末端断片を含有するサンプルを充填した。次いで、このフェニルセファローズHPカラムを15カラム体積の0.5M硫酸アンモニウム/50mMトリス(pH7.5)で洗浄した。結合されたCTGFのN末端断片を約15カラム体積以上の0.5M~0M硫酸アンモニウム/50mMトリス(pH7.5)の直線濃度勾配で溶出した。画分をCTGFのN末端断片の存在についてSDS-PAGEによって分析した。CTGFのN末端断片を含有する画分をプールした。CTGFのN末端断片を含有しているこのプールを濃縮し、バッファーをAmicon限外ろ過膜(YM10)を用いて50mMトリス、400mM NaCl(pH7.2)と交換した。

40

【実施例3】

【0116】

50

CTGFおよびCTGF断片に対する抗体の産生

モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体は、精製 rhCTGF に対して調製された。組換えヒト CTGF、CTGF の N 末端断片および CTGF の C 末端断片は、上述のようにして作製し精製した。ヒト CTGF または CTGF 断片に特異的なモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体は、標準法によって調製した。(例えば、Goding (上掲); および Schook (上掲) を参照されたい。)

ヒト CTGF のモノクローナル抗体は、一般に以下のように調製されている。健康な成体マウスに 50 ~ 100 μ g の CTGF、CTGF の N 末端断片または CTGF の C 末端断片を皮下注射し、免疫化する。6 ~ 10 週後、不完全フロイントアジュバントで処方された追加の抗原をマウスに追加免疫する。各追加抗原注射の約 1 週間後、ELISA 分析により検出して、免疫化したマウス血清を CTGF の抗体の存在について評価する。CTGF またはその断片に対して最も大きな抗体反応(すなわち、最高タイター)を起こしているマウスをハイブリドーマ産生用を選択する。ポリエチレングリコールを用い、当技術分野で周知の手順に従って、これらのマウスからの単離した脾臓細胞をマウス骨髄腫パートナー(例えば、P3X63Ag8-653)に融合させる。CTGF に対する反応性抗体を産生しているハイブリドーマを ELISA によって確認し、続いて、少なくとも 2 回限界希釈法を実施してクローン化した。

【0117】

あるいは、ヒト CTGF に対するヒトモノクローナル抗体を下記の方法により調製した。a) パキウイルスで産生された精製 rhCTGF、b) 全 rhCTGF のキモトリプシン切断によって得られた CTGF の N 末端断片および C 末端断片の半分、c) 種々の合成 CTGF ペプチドを含む、異なる CTGF 免疫原で HUMAB マウス (Medarex, Inc., Princeton N.J.) の複数の群を免疫化した。HUMAB マウス (Medarex) は、完全ヒト抗体の作製による、免疫原に応答する遺伝子組換えトランスジェニックマウスである。25 個の脾臓融合物から得られたハイブリドーマがスクリーニングされ、約 140 個のクローンとして選択されたモノクローナル抗体を産生する細胞系を特徴とする。各抗体群の親和性は RIA を用いて測定した。RIA では、全 rhCTGF を放射性ヨウ素化し、ウェル(固定化モノクローナル抗体を含み、未標識 CTGF の量を変えている)に加えた。

【実施例 4】

【0118】

抗体の特性

ヒト CTGF に対する抗体を産生するハイブリドーマは実施例 3 に記載されているようにして調製した。クローン化ハイブリドーマ細胞は、8mM L-グルタミン、1/2x 非必須アミノ酸、および 10% ウシ胎児血清を補充した、ダルベッコ改変イーグル培地 - 高グルコース/RPM I 1640(50:50)中で増殖させた。抗体調製のために増やした細胞を 37 $^{\circ}$ C、6% CO₂にて 4 ~ 9 日間、1.5% 低 IgG ウシ胎児血清を補充した同一培地で増殖させた。得られた馴化培地から細胞を取り除き、接線流濾過/濃縮系を用いて濃縮した。プロテイン A カラムに濃縮物を流し、結合モノクローナル抗体を 100mM のグリシン (pH3) で溶出させた。1M トリス (pH 8.0) で溶離液を中和し、PBS に透析した。

【0119】

得られた各モノクローナル抗体は、標準の結合および阻害実験 (Harlow および Lane (上掲); Burtis および Ashwood (上掲); ならびに、Kaplan, Pesce および Kazmierczak (上掲)、第 10 章 (Immunochemical Techniques) および 第 11 章 (Competitive Binding Assays)) によりマッピングし、抗体が結合している CTGF の特定領域を割り当てた。例えば、特に系列法で添加された場合、同一ドメインまたはエピトープ特異性の抗体は、同一ドメインまたはエピトープ特異性と異なるすべての抗体の結合をブロックする。モノクローナル抗体が結合している CTGF のエピトープのより正確なマッピングは、組換えによって発現された CTGF の特定断片を用いて ELISA 分析により行った。例えば、固定化した CTGF の組換えにより発現されたエクソン 2 に対して ELISA 分析を行い、CTGF の N 末端ドメインまたは領域を認識したモノクローナル抗体が同定された。CTGF の組換えにより発現されたドメイン(例えば、CTGF ポリヌクレオチド配列のエクソン 2、エクソン 3、エクソン 4 またはエクソ

10

20

30

40

50

ン5によってコードされているもの)にモノクローナル抗体をマッピングした。

【0120】

この方法によって、CTGFのN末端ドメインまたはN末端断片(例えば、N1、第1のN末端断片エピトープに特異性を有する抗体;およびN2、第2のN末端断片エピトープに特異性を有する抗体)を特異的に認識する抗体、CTGFのC末端ドメインまたはC末端断片(例えば、C末端断片エピトープC1、C2、C4、C5またはCK)が選択され、特徴づけられた(例えば、図1Aおよび図1Bを参照されたい)。

【実施例5】

【0121】

CTGFおよびCTGF断片のアッセイ

CTGFポリペプチドを検出し、かつ正確に定量化するためのイムノアッセイを開発した。特に、CTGF検出、定量するための方法(N-Cアッセイと称する)、CTGFのN末端断片検出、定量するための方法(N-Nアッセイと称する)、およびCTGFのC末端断片検出、定量するための方法(C-Cアッセイと称する)を開発した。図1Cに、異なるサンドイッチアッセイフォーマットを示す。

【0122】

CTGF

CTGFのN末端ドメイン(例えば、上述し、図1A中に示すN1およびN2)を認識した1種の抗体と、CTGFのC末端ドメイン(例えば、上述し、図1A中に示したC1~C5)を認識した第2抗体を用いて全CTGFを検出および定量した。このアッセイは、N-Cサンドイッチアッセイ(図1C)と称する。N末端ドメイン特異抗体(例えば、モノクローナル抗体(mAb)19、N2に結合する)はCTGFを捕捉するために用いられ、一方、C末端ドメイン特異抗体(例えば、mAb25、C4に結合する)は捕捉されたCTGFポリペプチドを検出するために用いられる。あるいは、CTGFの捕捉には、CTGFのC末端ドメインまたは場合によっては担体(例えばBSA)に結合しているヘパリンを認識する抗体を用いることができ、捕捉されたCTGFポリペプチドを検出するには、CTGFのN末端ドメインを認識する抗体を用いることができる。いずれの方法においても、2種類の試薬(1種はCTGFのN末端ドメインを認識するもの、他の1種はCTGFのC末端ドメインを認識するもの)を使用することにより、CTGFのN末端断片またはCTGFのC末端断片ではなく、CTGFを検出することができる(図2)。

【0123】

CTGFのN末端断片

CTGFのN末端ドメインを認識する2種類の抗体(例えば、上述および図1Aに示したN1およびN2)を用いてCTGFのN末端断片を検出および定量した。このアッセイはN-Nアッセイと称する(図1C)。N末端ドメイン特異抗体のうちの1種を捕捉抗体(例えばmAb19、N2に結合する)として用い、もう1種を検出抗体(例えばmAb6、N1に結合する)として用いた。CTGFがCTGFのN末端ドメイン(用いる抗体によって認識される)を含有しているので、N-NアッセイによりCTGFも検出された。

【0124】

サンプル中のCTGFのN末端断片の量を検出するのに、サンプル中のCTGFの濃度を検出し(N-Cアッセイを使用、上掲)、かつサンプル中のCTGFのN末端断片の濃度を検出した(N-Nアッセイを使用)。次いで、検出されたCTGFの量を検出されたN末端断片の量から差し引き、サンプル中に存在するCTGFのN末端の濃度を得た。特に明記しない限り、CTGFおよびCTGFのN末端断片の濃度を検出および定量する(図3)N-Nアッセイを用いて取得されたデータは、各サンプル中のCTGF N末端断片の濃度を示すように調整した(すなわち、N-Nアッセイを用いてサンプルにおいて得られた値からそのサンプル中のCTGF濃度を差し引いた)。あるいは、N-Nアッセイを実施する前に、ヘパリンアフィニティカラムを用いて、サンプルからCTGFを取り除くことができる。

【0125】

CTGFのC末端断片

CTGFのC末端断片は、CTGFのC末端ドメインを認識する2種類の抗体(例えば、上述の図

10

20

30

40

50

1 A に示した C1 および C4) を用いて、検出および定量した。このアッセイは C-C アッセイと称する (図 1 C)。C 末端ドメイン特異抗体のうち、1 種は捕捉抗体 (例えば mAb 25、C4 に結合する) として用い、他の 1 種は検出抗体 (例えば mAb51、C1 に結合する) として用いた。あるいは、CTGF の C 末端ドメインを捕捉するのに、担体 (例えば BSA) に結合されているヘパリンを用いることができる。CTGF が CTGF の C 末端ドメインを含有しているので、このアッセイは CTGF も検出した。

【0126】

従って、サンプル中の CTGF の C 末端断片の量を検出するのに、サンプル中の CTGF の濃度を検出し (N-C アッセイを使用)、サンプル中の CTGF の C 末端断片の濃度を検出した (C-C アッセイを使用)。次いで、検出された C 末端断片の量から検出された CTGF の量を差し引き、サンプル中に存在する C 末端断片の濃度を得た。特に明記しない限り、CTGF および CTGF の N 末端断片の濃度を検出および定量する (図 4) C-C アッセイを用いて取得されたデータは、各サンプル中の CTGF C 末端断片の濃度を示すように調整した (すなわち、C-C アッセイを用いてサンプルにおいて得られた値からそのサンプル中の CTGF 濃度を差し引いた)。あるいは、C-C アッセイを行う前に、N 末端断片特異試薬 (例えば抗体) を用いて、サンプルから CTGF を取り除くことができる。

10

【0127】

サンプル中の CTGF、CTGF の N 末端断片および CTGF の C 末端断片の濃度の定量は、記載した各 ELISA アッセイ (すなわち、CTGF を検出する N-C アッセイ; CTGF の N 末端断片と CTGF を検出する N-N アッセイ; および CTGF の C 末端断片と CTGF を検出する C-C アッセイ) によって得られた吸光度値を既知濃度の基準 CTGF を用いて得た値をもとに推定して決定した。データは二次非線形回帰 (SOFTMAX PRO software, Molecular Devices, Sunnyvale, Calif.) により分析し、標準曲線を作成し、吸光度がモルのベースの CTGF 濃度に相関している最良数式を得た。

20

【実施例 6】

【0128】

CTGF および CTGF 断片の検出および定量

低タンパク質のサンプル

CTGF アッセイの実施方法は上の実施例 5 に記載している。種々のサンプルまたはサンプルタイプ中の CTGF および CTGF 断片を検出および定量するため、これらの方法を改変することができる。例えば、低タンパク質のサンプル (例えば、尿、関節液、腹膜透析液、CSF 液体、唾液、細胞培養培地) 中のヒト CTGF および CTGF 断片を検出および定量するのに、抗ヒト CTGF モノクローナル抗体使用のサンドイッチ ELISA を開発した。ELISA アッセイは以下のようにセットアップした。最初に、CTGF の領域またはドメインを認識する捕捉抗体でマイクロタイタープレートのウェルを被覆した。ELISA での使用にあたり、捕捉抗体を 50mM 重炭酸ナトリウム (pH8.5) 中 10 μ g/ml の最終濃度まで希釈し、希釈した捕捉抗体溶液 50 マイクロリットルを 96 ウェル MAXISORB マイクロタイタープレート (Nalge Nunc International, Rochester N.Y.) の各ウェルに添加した。次いで、そのプレートをカバーし、2 ~ 8 で一晩保存し、抗体をプレートに結合させた。プレートから捕捉抗体溶液を除去し、次いで、各ウェル中の未結合部位を、0.05% アジ化ナトリウムを加えたカルシウムおよびマグネシウム非含有 PBS 中に 1% BSA を含有するブロッキングバッファー 150 μ l でブロックした。次いで、プレートをカバーし、1 ~ 14 日間 2 ~ 8 で保存した。CTGF 検出・定量アッセイに使用する直前に、ウェルからブロッキングバッファーを除去し、洗浄バッファー (0.1% トゥイーン 20 を含有するカルシウムおよびマグネシウム非含有 PBS) で各プレートのウェルを一回洗浄した。

30

40

【0129】

ELISA アッセイで使用する CTGF 標準溶液は以下のようにして調製した。上述のように調製した rhCTGF の凍結アリコート溶解させ、カルシウムおよびマグネシウム非含有 PBS、50mM トリス (pH7.8)、1mg/ml BSA、4mM MgCl₂、0.2mM ZnCl₂、0.05% アジ化ナトリウム、50 μ g/ml ヘパリンナトリウム、および 0.1% TRITON X-100 界面活性剤を含むヘパリンアッセイ

50

バッファー(0.45 μm、濾過済)で最終濃度1.1 μg/mlまで希釈した。rhCTGF標準保存液は、-70 °Cでアリコートを保存した。次いで、rhCTGF保存液を希釈調整して、ヘパリンアッセイバッファーに希釈されている0ng/ml ~ 15ng/mlの一連のrhCTGF基準濃度を得た。記載されているすべてのELISAアッセイにおいて、CTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片の濃度は、基準CTGFに対する比較に基づいて決定した。

【0130】

生体サンプルは、ヘパリンアッセイバッファー(一般には、希釈は特定のサンプルタイプに基づき、1:2~1:20の間である)で希釈し、希釈したサンプル50 μlを被覆しブロックしたマイクロタイタウェルに、2組または3組にてアプライした。

【0131】

捕捉されたCTGFまたはCTGF断片の検出には、CTGFに対するコーティング抗体または捕捉抗体とは異なるCTGFエピトープ特異性のビオチン化モノクローナル抗体を用いた。CTGF含有サンプルおよび基準CTGF、ならびにビオチン化抗CTGF抗体が、捕捉抗体を被覆したマイクロタイタープレート内で同時にインキュベートされるように、ビオチン化抗体をマイクロタイタープレートウェル内の上記サンプルおよび基準CTGFに添加した。検出に用いるモノクローナル抗体は、ビオチン:DNP試薬を用い、メーカー(Molecular Probes, Eugene, Oregon)によって記載されているプロトコルに従ってビオチン化した。ビオチン:mAbの比は、一般に5:1~12:1が許容可能であった。ビオチン化モノクローナル抗体(1000ng/ml)50マイクロリットルを上述のサンプルがすでに含まれている各ウェルに添加した。次いで、プレートをカバーし、100~130rpmで90分間、プレートローテーター上で2~8にてインキュベートした。

10

20

30

【0132】

その後、洗浄バッファーでプレートを3回洗浄した。次いで、CTGF標準曲線に対する所望のシグナル濃度の展開に基づき、各複合体ロットについて経験的に決定された濃度までアッセイバッファーで希釈(一般には1:10,000)されたストレプトアビジンアルカリフォスファターゼ複合体(Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove Pa.)50 μlでこのウェルをインキュベートした。プレートをカバーし、100~130rpmで90分間、プレートローテーター上で2~8にてインキュベートした。その後、上述のようにプレートを3回洗浄し、各ウェルにアルカリフォスファターゼ基質(Sigma Chemical Co.)の100 μlを添加した。発色させて、視覚的にモニターし、かつマイクロタイタープレートリーダーを用いてモニターした。基準およびサンプルの発色は最適シグナルレベルに達すると、各ウェルに4N水酸化ナトリウム50 μlを添加することによって、それ以上の発色を止めた。次いで、マイクロタイタープレートをマイクロプレートリーダーに置き、発色を波長405nmにおける吸光度ユニットの測定によって検出した。

【0133】

高タンパク質サンプル

高タンパク質を含有するサンプル(例えば、血液、血清、血漿等)中のCTGF濃度を測定する場合、上述および実施例5に記載しているCTGFアッセイに以下の変更を行なった。高タンパク質サンプル中のCTGFおよびCTGF断片を検出するこのアッセイで用いられる基準とサンプル内のタンパク質の濃度またはレベルの一貫性を得るため、CTGFを除去した10%ラット血清をヘパリンアッセイバッファーに補充した。

40

【0134】

以下のようにして、このアッセイで使用されるラット血清からCTGFを除去した。ラット血清を2%(v/v)ヘパリンアガロースビーズと一晚インキュベートし、ラット血清由来のCTGFおよびCTGFのC末端断片を除去した。CTGFのN末端断片がヘパリンに結合しないことから、CTGFのN末端断片はこの方法ではラット血清から除去されなかった。ヒトCTGFの検出に用いられるアッセイでラットCTGFのN末端断片が検出されないの、N末端断片(ヘパリンアガロース処理ラット血清中に存在したままである)は、後のCTGFアッセイの妨げにはならなかった。あるいは、CTGFおよびCTGF断片が除去された血清を調製するため、抗体アフィニティカムを用いて哺乳動物血清のCTGFおよびCTGF断片を除去してもよい。

50

【 0 1 3 5 】

上述のようにして調製されたCTGF基準溶液に、上に記載した、ヘパリンアガロースビーズで処理した10% (v/v)ラット血清を添加した。また、ヘパリンアッセイバッファーで希釈されたビオチン化抗CTGF抗体(検出に使用する)にヘパリンアガロースビーズで処理した10%ラット血清を添加した。高タンパク質含有サンプルをヘパリンアッセイバッファーで1:10に希釈し; 従って、このアッセイで用いられるすべての溶液(すなわち、基準CTGF、生体サンプル等)は、10% (v/v)の最終濃度で血清を含有していた。次いで、上述のサンドイッチELISAアッセイを用いて、希釈した高タンパク質含有サンプル中のCTGFおよびCTGF断片の濃度を検出および定量した。

【 実施例 7 】

【 0 1 3 6 】

CTGFアッセイの特異性

実施例 5 よび実施例 6 において上述したCTGF ELISAアッセイの特異性と信頼度を試験した。表 1 は、CTGF(N-Cアッセイ)、CTGFのN末端断片(N-Nアッセイ)およびCTGFのC末端断片(C-Cアッセイ)を検出および定量するために、上述のアッセイを用いて基準rhCTGFを用いて実施したELISAアッセイの結果を示す。

【 0 1 3 7 】

表 1 に示したアッセイの結果は、ELISAプレートリーダーによって測定した405nmの吸光度である。種々の濃度のrhCTGF(0~11ng/ml)を用いて、各CTGF ELISAアッセイの標準曲線を設定した。アッセイは各濃度のCTGFについて3組で実施し、ELISAアッセイにおける吸光度の統計学的平均値と変動係数(%CV)を表 1 に示した。

【 表 1 】

表 1 : CTGF の ELISA アッセイにおける代表的な基準曲線

CTGF 濃度	N-C アッセイ	%CV	N-N アッセイ	%CV	C-C アッセイ	%CV
0.0 ng/ml	0.383	4.6%	0.480	0.6%	0.299	1.9%
0.33 ng/ml	0.440	5.8%	0.579	3.4%	0.315	2.6%
1.1 ng/ml	0.611	0.5%	0.758	6.1%	0.379	3.6%
3.0 ng/ml	1.130	1.3%	1.217	5.6%	0.623	2.4%
6.6 ng/ml	1.975	1.1%	2.126	4.2%	1.193	3.0%
11.0 ng/ml	2.817	0.9%	3.109	5.0%	2.091	6.9%

【 0 1 3 8 】

アッセイは実施例 5 および実施例 6 の上述のプロトコルに従って行った。アッセイの特異性は、各アッセイで用いられる捕捉および標識(検出)抗体の選択によって調節した。結果から、この実施例で実施された、CTGF、CTGF N末端断片およびCTGF C末端断片に対するCTGF ELISAアッセイは、1ng/ml未満の濃度でCTGFポリペプチドを検出する感度を有していることが明らかになった。さらに、一定量のCTGFのアッセイにおける変動係数(CV)は、通常、約0~6%の範囲にあることがわかった。

【 0 1 3 9 】

各CTGF ELISAアッセイの特異性をさらに試験した。バキュロウイルス由来rhCTGFを上述のようにして産生および精製した。CTGFのN末端断片およびC末端断片は、実施例 2 で上述しているようにrhCTGFのキモトリプシン切断によって作製し、精製した。CTGF ELISAアッセイ(CTGF(N-Cアッセイ)、CTGFのN末端断片(N-Nアッセイ)およびCTGFのC末端断片(C-Cアッセイ)の検出および定量)は、これらのCTGFポリペプチドを用いて実施した。結果は、図 2 (N-Cアッセイ)、図 3 (N-Nアッセイ)、および図 4 (C-Cアッセイ)に示す。

【 0 1 4 0 】

10

20

30

40

50

上述および図2、図3および図4に示したように、記載した3種類のすべてのCTGFアッセイによりCTGF(図2、図3および図4中、黒塗り正方形)が検出された。CTGFアッセイは、CTGF(すなわち、CTGFのN末端ドメインおよびC末端ドメインの両方を含むCTGF)のみを検出する。CTGFアッセイは、CTGFのN末端断片(図2、図3および図4中の黒塗り三角形)、またはCTGFのC末端断片(図2、図3および図4中の黒塗り円)は検出しない。N末端ドメインアッセイは、CTGF(図3中、黒塗りの正方形)およびCTGFのN末端断片(図3中、黒塗りの三角形)の両方を検出するが、CTGFのC末端断片(図3中、黒塗りの円)は検出しない。C末端ドメインアッセイは、CTGF(図4中、黒塗りの正方形)およびCTGFのC末端断片(図4中、黒塗りの円)の両方を検出するが、CTGFのN末端断片(図4中、黒塗りの三角形)は検出しない。

10

【0141】

本発明のCTGFおよびCTGF断片アッセイは、CTGFポリペプチドに特異的であった。構造上関連のあるCCNファミリーメンバーNOVおよびCYR61(0.5mg/mlの高濃度を使用)は、記載したCTGFアッセイにより検出されなかった(データは示さず)。

【実施例8】

【0142】

ヘパリンの非存在または存在下におけるCTGF検出

CTGFは、CTGFのC末端領域に位置しているヘパリン結合ドメインによる、ヘパリン結合増殖因子である。種々の保存温度において、CTGFの安定性、検出および回収率をヘパリンの存在または非存在下で測定、評価した。ヘパリン(Porcine, Sigma Chemical Co.から入手; 最終濃度10pg/mlまで添加)の存在または非存在下のいずれかにおいて、アッセイバッファに組換えヒトCTGF(10ng/ml)を添加した。次いで、CTGF含有サンプルを-80、-20、4または25の温度で10日間インキュベートした。

20

【0143】

次いで、サンプル中に残存するCTGFの量を実施例5で上述したELISAアッセイによって検出した。ヘパリンの非存在または存在下におけるCTGF検出の結果を以下の表2に示す。

【表2】

表2: CTGF 検出におけるヘパリンの影響

温度	-80°C	-20°C	+4°C	+25°C
+ヘパリン	8.9 ng/ml	9.1 ng/ml	5.3 ng/ml	5.3 ng/ml
% 回収率	89 %	91 %	53 %	53 %
-ヘパリン	2.7 ng/ml	5.0 ng/ml	1.0 ng/ml	0.8 ng/ml
% 回収率	27 %	50 %	10 %	8 %

30

【0144】

表2に示すとおり、ヘパリンの非存在下では、-80でサンプルを保存した場合であっても、CTGFはほとんど検出されなかった。10日後、ヘパリンの非存在下における4または25のいずれかでは、サンプルに添加された約1ng/ml~10ng/mlのCTGFが検出された。このことは、特に、CTGFポリペプチドを氷点より高い温度でインキュベートした場合、CTGFポリペプチドは不安定であるか、あるいは恐らくは粘性であったことを示している。ヘパリンの存在下でCTGFをインキュベートした場合は、10日後、4または25のいずれかで検出可能なCTGF濃度は約5ng/mlであった。これは、アッセイバッファに添加されたCTGFの最初の量の約半分に相当し、ヘパリンの非存在下で得られた濃度の約5倍であった。ヘパリンを添加すると、試験したすべての温度においてCTGFの回収率が改善された。このことから、ヘパリンがCTGFに安定効果を示し、水溶液中のCTGF溶解度を維持し、あるいは、タンパク質分解、プラスチックへの吸着、または溶液中の他の高分子への結合からCTGFを保護することが明らかである。

40

50

【実施例 9】

【0145】

細胞培養馴化培地中のCTGFおよびCTGF断片の検出と安定性

MG-63細胞（ヒト骨肉腫細胞系）は、CTGFを産生、分泌することが知られている。さらに、TGFは、これらの細胞のCTGF発現を刺激する。MG-63細胞は、ATCC(CRL-1427)から取得した。10%ウシ胎児血清、グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび非必須アミノ酸を含有する最小必須培地(MEM)を入れた12ウェル組織培養プレート(1ウェル当たり27,000個)にこの細胞を接種した。48時間後、培地を除去し、ウシ胎児血清非含有の新しい培地とアスコルビン酸リン酸(30pg/ml)およびウシ血清アルブミン(1mg/ml)を含有する新しい培地に取り替えた。さらに24時間後、培地を、ヘパリン(10 μ g/ml)を含有し、TGF(5ng/ml)が添加または無添加である、新鮮な培地(ウシ胎児血清を含まず、アスコルビン酸リン酸(30pg/ml)およびウシ血清アルブミン(1mg/ml)を含有するMEM)と取り替えた。次いで、0、24、92および120時間後に馴化培地から細胞を収集し、CTGFおよびCTGF断片の濃度を分析した。MG-63細胞馴化培地中のCTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片の濃度の結果を下の表3に示す。

10

【表 3】

表3：細胞培養馴化培地中のCTGFおよびCTGF断片の濃度

ELISA +/- TGF β	24時間	92時間	120時間
CTGF (-TGF β)	40 ng/ml	55 ng/ml	35 ng/ml
CTGF (+TGF β)	150 ng/ml	33 ng/ml	26 ng/ml
N末端断片 (-TGF β)	157 ng/ml	>401 ng/ml	>498 ng/ml
N末端断片 (+TGF β)	181 ng/ml	>507 ng/ml	>534 ng/ml
C末端断片 (-TGF β)	7 ng/ml	検出されず	検出されず
C末端断片 (+TGF β)	検出されず	1 ng/ml	検出されず

20

30

【0146】

表3から明らかなように、24時間TGFで処理すると、MG-63細胞の馴化培地中で検出されるCTGFの濃度は40ng/mlから150ng/mlに増加していた。しかし、TGFで92時間または120時間処理すると、この細胞の馴化培地で検出されるCTGFの濃度は、24時間処理後に確認された濃度から著しく低下した。

【0147】

CTGFのC末端断片の濃度で同様の結果が確認された。TGFの存在下では、24時間後、この細胞の馴化培地中のCTGFのC末端断片濃度は、7ng/mlから検出不可能な濃度まで低下した。92時間または120時間、TGF処理した後では、馴化培地中のCTGFのC末端断片濃度は低いままであるか、あるいは検出不可能であった。従って、MG-63細胞の馴化培地中に存在するCTGFおよびCTGFのC末端断片の検出可能な濃度は、TGFによるCTGF発現の刺激にかかわらず、経時的に低下し、または検出不可能になった。

40

【0148】

一方、CTGFのN末端断片の検出および定量により、MG-63細胞の馴化培地中にCTGFのN末端断片が経時的に蓄積されたことが明らかになった。馴化培地中のN末端断片の蓄積は、CTGF発現のTGF刺激の有無にかかわらず確認された。TGFによる24時間の処理後に、CTGFの濃度が約4倍(未処理の細胞と比較して)に増加したという所見にもかかわらず、TGFで処理した細胞において、未刺激細胞と比較して、CTGFのN末端断片の濃度は、わずかな増加しか観察されなかった(TGF未処理の場合157ng/mlであるのに対し、TGF処理の

50

場合181ng/ml)。この特定の状態において、CTGFのN末端断片濃度のみの測定では、TGFでの24時間処理後のCTGF濃度の増加は全く示さなかった。従って、このような、CTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片の濃度を検出し区別し得ることによって、CTGFおよびその断片の存在と濃度、ならびに、異なる条件下におけるCTGFおよびCTGF断片の発現のすべての変化を検出する高感度で信頼性のある手段が得られる。

【0149】

これらの結果から、ある条件において、CTGFのN末端断片が経時的に蓄積され得ることが明らかである。N末端断片の蓄積(検出可能なCTGFの濃度の減少と一致している)は、CTGFのN末端断片が体液(例えば、細胞馴化培地、血液および尿)中で安定している(すなわち、タンパク質分解、クリアランス、除去、または吸着を受けにくい、あるいは耐性がある)ことを示している。従って、N末端断片をCTGF発現の検出可能で安定性のある指標として提供することができる。

10

【0150】

さらに、このデータは、ある条件において、CTGFおよびCTGFのC末端断片が分解、排出または組織除去によって喪失され得ることを示唆している。また、このデータは、CTGF発現の濃度およびCTGF切断、プロセッシング、除去、クリアランス等の程度または範囲の決定にあたって、細胞培養培地(ならびに他の生体液)中のCTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片を検出および区別することの価値と利点についても示唆している。

【実施例10】

【0151】

CTGFおよびCTGF断片のウェスタンブロット解析

MG-63細胞は、50g/mlのヘパリンナトリウム(Sigma Chemical Co.)を含有し、50pg/mlのウシ血清アルブミン(Sigma Chemical Co.)を含有および非含有するダルベッコ改変イーグル培地(CELLGRO培地; Mediatech, Hemdon VA)中で培養した。1、2、3および6日に、細胞から馴化培地を回収し、5分間1,200rpmで遠心分離にかけて細胞片を沈澱させ、上清を凍結保存した。

20

【0152】

CTGF濃度の分析は以下のようにして実施した。CTGFのN末端ドメインに対するモノクローナル抗体を用いた免疫沈降によってCTGFのN末端断片を馴化培地から単離した。免疫沈降は、1時間、10 μ g/mlの濃度のCTGFのN末端領域に特異的なモノクローナル抗体とMG-63細胞馴化培地をインキュベートすることによって行った。プロテインA(Sigma Chemical Co.)の2%(w/w)懸濁液を添加し、さらに1時間、このサンプルをインキュベートした。プロテインAのみ(いかなるCTGF特異抗体も含まれない)による沈降は、非特異的結合のコントロールとして用いた。免疫沈降物/プロテインA複合体は、150mM NaCl、1% TRITON X-100界面活性剤、1%デオキシコール酸ナトリウム塩、0.1% SDS、50mM トリス(pH7.5)、および2mM EDTAを含有するバッファーで2回洗浄した。次いで、沈澱したタンパク質の電気泳動による分離に備えて、このサンプルをトリスグリシンSDSサンプルバッファー(2 \times)(Invitrogen)で可溶化した。CTGFおよびCTGFのC末端断片は、ヘパリンセファロース沈澱によって馴化培地から単離した。ヘパリンセファロース(Amersham Pharmacia Biotech)による沈澱は、4にて2時間、細胞培養馴化培地を2%ヘパリンセファロース懸濁液(PBSで1:1(w/w))と混合することにより実施した。沈澱複合体をPBSで2回洗浄し、続いて、上述のようにして可溶化した。

30

40

【0153】

電気泳動(4~20%トリスグリシンSDS-PAGEゲル(Invitrogen))後、サンプルをウェスタンブロット解析のためにニトロセルロース膜(Invitrogen)上に移した。次いで、この膜を24.8mM TRISベース、2.7mM 塩化カリウム、137mM 塩化ナトリウム、0.05% トウイーン20(pH7.4)を含有する5%スキムミルクのバッファーでブロックした。

【0154】

MG-63細胞の馴化培地中のCTGFおよびCTGF断片をウェスタン解析によって検出し、その結果を図5A、図5Bおよび図5Cに示した。CTGF(図5A)およびCTGFのC末端断片(図5C)を

50

含有する膜(ヘパリンセファロースビーズにて沈殿させたもの)をCTGFのC末端ドメインを認識するモノクローナル抗体で探索し、続いて、西洋ワサビペルオキシダーゼ(Jackson Immuno Research)結合抗ヒトIgGにより検出した。CTGFのN末端断片(図5B)を含有する膜(抗CTGF抗体で免疫沈殿させたもの)を抗CTGFニワトリポリクローナル抗体で探索し、西洋ワサビペルオキシダーゼ(Zymed, South San Francisco CA)を結合させた抗ニワトリIgYウサギ抗体により検出した。ウェスタンブロット発色は、SUPERSIGNAL化学発光試薬(Pierce Chemical Co., Rockford IL)を用いて視覚化した。

【0155】

MG-63細胞の馴化培地中で確認されたCTGFおよびCTGF断片の濃度における相対的变化の定量は、上述したウェスタンブロットの濃度計測によって行った。CTGFおよびCTGF断片を示すウェスタンブロットの濃度計測の結果を下の表4に示す。 10

【表4】

表4：細胞培養馴化培地中のCTGFおよびCTGF断片の濃度における変化

	1日	2日	3日	6日
CTGF	1	1.17	1.99	0.43
N末端断片	1	0.4	3.03	2.35
C末端断片	1	1.08	0.53	0

20

【0156】

CTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片の検出および定量は、ウェスタンブロット解析によって示した。図5Aで明らかのように、CTGFはMG-63細胞の馴化培地中で蓄積されており、約3日で最大の濃度に達した。培養6日で、MG-63細胞の馴化培地中のCTGF濃度は培養第1日後に検出された濃度の半分以下であり、3日に検出された濃度(測定されたCTGFの最高濃度であった)のわずか約20%であった。これは、CTGFがMG-63細胞馴化培地において不安定であることを示唆している。CTGFのN末端断片の濃度によって、時間とともにMG-63細胞の馴化培地中に蓄積することが確認された(図5B)。CTGFのC末端断片の濃度は、MG-63細胞の馴化培地中に蓄積せず、むしろ、6日目の馴化培地では、CTGFのC末端断片をウェスタンブロット解析によって検出することができなかった(図5C)。 30

【0157】

これらの所見は、上の実施例9で示した、ELISAアッセイによって得られた結果と一致していた。CTGFおよびCTGFのC末端断片の検出可能な濃度におけるこの低下は、CTGFおよびCTGFのC末端断片がCTGFのN末端断片ほど安定しておらず、従って、特定の時刻に、サンプル中のCTGFの発現または濃度の信頼性ある指標を提供することができないことを示唆している。CTGFのN末端断片の蓄積は、CTGFのN末端断片が、生体液中(例えば、細胞培養馴化培地)のCTGFまたはCTGFのC末端断片よりも安定性がある(すなわち、タンパク質分解、クリアランス、除去、または吸着を受けにくい、耐性がある)ことを示唆している。従って、CTGFのN末端断片によって、ウェスタンブロット解析によって測定されるCTGF発現の検出可能で安定性のある指標が得られる。またこのデータは、CTGF発現の濃度およびCTGF切断、プロセッシング、除去、クリアランス等の程度または範囲を決定するにあたって、細胞培養培地(ならびに他の体液)中のCTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片を検出および区別することの価値と利点を明らかにしている。 40

【実施例11】

【0158】

尿に添加されたCTGFとCTGF断片の安定性

上の実施例8に記載した方法と類似の方法を用いて、10ng/mlのrhCTGFを添加した、健康な個体からのヒト尿サンプルについて、CTGFおよびCTGF断片の濃度の検出および定量することによって分析した。これらの実験では、CTGF検出および定量は、上の実施例5および実施例6に記載したCTGFのELISAアッセイを用いて行った。ヒト尿中のCTGF N末端断片の 50

規定濃度は、これまでに約1~2ng/mlであることが決定されている。

【0159】

図6は、尿サンプルへCTGFを添加した後、4にて0、1、2、3、4および5日間保存された尿中のCTGFおよびCTGFのN末端断片の濃度を示す。図6から明らかなように、CTGFのN末端断片のみ、4で3日間保存した後にCTGFを追加した尿中で検出された。3日後、これらの保存条件下の尿中でCTGFを実質的に検出することはできなかった。従って、CTGFのN末端断片を検出および定量することにより、尿に添加されたCTGFの元の量の検出および定量が改善され、より信頼性が高くなった。これらの結果は、尿中ではCTGFがN末端断片ほど安定していないことを示唆している。

【実施例12】

【0160】

尿中でのCTGFのタンパク質分解

尿においてCTGFの安定性が低く(CTGFのN末端断片と比較した場合)、または尿でCTGFを検出および定量することができないのは、ヒト尿においてCTGFが不安定であり、またタンパク質分解による可能性がある。このことを試験するため、上の実施例11に記載した実験と類似の実験をrhCTGFおよび種々のプロテアーゼ阻害剤を添加したヒト尿サンプルにおいて行った。この試験では、10ng/mlのrhCTGFを標準のヒト尿に添加し、次いで、これをプロテアーゼ阻害剤の存在または非存在下で1~7日間4にて保存した。これらの実験では、CTGFの検出および定量は、上述のCTGF ELISAアッセイを用いて行った。使用したプロテアーゼ阻害剤は、混合プロテアーゼ阻害剤(Sigma Chemical Co.、カタログ番号P-8340)、N-ヒドロキシ-2[[N'-(4-メトキシ-ベンゼンスルホニル)-N'(4-クロロベンジル)]アミノ]-アセトアミド(メタロプロテアーゼ阻害剤)、またはエチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)であった。尿におけるCTGFのタンパク質分解の結果を下の表5に示す。

【表5】

表5：尿におけるCTGFのタンパク質分解

	コントロール 尿	プロテアーゼ 阻害剤混合物	メタロプロ ティナーゼ 阻害剤	EDTA
N-C アッセイ (CTGF)				
1日	2.2 ng/ml	3.5 ng/ml	4.6 ng/ml	3.5 ng/ml
7日	0.0 ng/ml	0.0 ng/ml	0.5 ng/ml	0.0 ng/ml
N-N アッセイ (N末端およびCTGF)				
1日	10 ng/ml	12 ng/ml	14 ng/ml	12 ng/ml
7日	8 ng/ml	14 ng/ml	13 ng/ml	7 ng/ml

【0161】

上の表5は、1日または7日間の保存後、尿に添加されたCTGFの大部分が、添加したいずれのプロテアーゼ阻害剤の非存在下においても検出できなかったことを示す。プロテアーゼ阻害剤を含む場合、保存1日後に、プロテアーゼ阻害剤の非存在下での濃度に比べて、尿中のCTGFが高濃度で検出された。混合プロテアーゼ阻害剤、メタロプロティナーゼ阻害剤、および金属イオンキレート化剤のEDTAの存在下では、検出可能なCTGFの同程度の低下が認められた。これらのデータは、プロテアーゼが、4の保存中における標準のヒト尿中の検出可能なCTGFの分解、除去または消失に、少なくともある程度係わっていることを示唆している。また、これらの結果は、検出可能な濃度のCTGFは、プロテアーゼ阻害剤の添加によってサンプル中で維持されることを示唆している。

【0162】

一方、CTGFのN末端断片は、添加したプロテアーゼ阻害剤の存在または非存在下を問わず

10

20

30

40

50

、これらのサンプル中で容易に検出、定量された。さらに、CTGFのN末端断片の濃度は、尿に外因的に添加されたrhCTGFの量(10ng/ml)と一致していた。表5は、CTGFおよびCTGFのN末端断片の両方を検出するN-Nアッセイを用いて検出されたデータを示す。CTGFのN末端断片濃度は、標準の尿中の内因性CTGF(すなわち、CTGFのN末端断片)濃度(約1~2ng/ml)に基づいて外因的に追加した10ng/mlのrhCTGFより高かった。標準の尿では、CTGFおよびCTGFのC末端断片は検出不可能であったが、1~2ng/mlのCTGFのN末端断片は検出可能であった(データは示さず)。これらの結果は、CTGFがプロテアーゼ活性に高感度であり、また、尿中のCTGFを検出、定量する能力が少なくとも一部喪失していたのに対し、CTGFのN末端断片は、尿中のCTGFのN末端断片を検出、定量する能力によって測定されるので、プロテアーゼ分解に対して耐性があるように考えられることを示すものである。

10

【実施例13】

【0163】

腹膜透析患者のCTGF

腹膜透析患者のCTGFおよびCTGF断片の濃度について、不完全腎臓機能に対して腹膜透析を受けている患者の腹膜腔から回収された透析液体で測定した。透析液は、2ヶ月間またはそれより短い間腹膜透析を受けている患者の腹膜から(図7Aのサンプル番号1、2、3、6および7)、または50~100ヶ月間腹膜透析を受けている患者から(図7Aのサンプル番号4、5、8、9および10)採取した。5名の患者は1型糖尿病と診断されており、4名の患者は糸球体腎炎であり、1名の患者は腎多嚢胞病の結果透析していた。場合によっては、腹膜透析を受けている間に一時的な腹膜炎を起こした患者から腹膜透析液を取得した。サンプル番号4、8および10は、細菌性腹膜炎を以前に一度経験した患者由来のものであり、サンプル番号9は細菌性腹膜炎を以前に4回経験している患者由来のものであった。

20

【0164】

検出可能な濃度のCTGFのN末端断片が、試験したすべての透析液中で確認された(図7Aおよび図7B)。腹膜透析患者の透析液中に存在するCTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片の検出、定量および比較により、CTGFのN末端断片の最高濃度が明らかになった(CTGFおよびCTGFのC末端断片については、データは示さず)。

【実施例14】

【0165】

腎線維症被験体の血清中のCTGF

腎臓透析患者の尿中のCTGFの存在については、以前に試験されている(Riserら、(2000) J Am Soc Nephrol 11: 25-38; 国際特許出願WO 00/13706号)。CTGFを検出するため、これらの従来の研究では、いずれかのヘパリンセファロースを用いてCTGFを吸着し(したがって、その結果、CTGFのN末端断片がヘパリンセファロースビーズに吸着しないためN末端断片は検出されない)、また、CTGFの全体、N末端断片またはC末端断片が区別されないELISAがCTGFに用いられており、さらに、各種のCTGF(すなわち、CTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片)の検出に同等の感度は有してはいない。

30

【0166】

本研究では、腎線維症患者の血清中のCTGFおよびCTGF断片の濃度が検出された。正常なドナー患者からの血清と腎線維症患者からの血清をIntergen Company (Purchase, NY)から入手した。患者は、腎移植、化学的毒性またはIgAに関連している腎症の臨床症状に起因する異常腎臓機能と腎線維症を患っていた。

40

【0167】

図8から明らかなように、腎線維症患者の血清中のCTGFの濃度およびCTGFのC末端断片の濃度は、正常個体の血清で確認された濃度と本質的に同じであるか、あるいはわずかに下回っていた。正常個体の血清、または腎線維症患者の血清中のCTGFの濃度またはCTGFのC末端断片の濃度に対応するこれらの値は、約0~20ng/mlであった。しかし、腎線維症患者の血清からCTGFのN末端断片が容易に検出された。さらに、CTGFのN末端断片の濃度は、これら患者の血清中のCTGFの濃度およびCTGFのC末端断片の濃度よりも高かった。従って

50

、これら患者の血清中にあるCTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片の検出、定量および比較により、腎線維症と診断されている患者のCTGFのN末端断片に有意な上昇があることがあることが明らかになった。

【実施例15】

【0168】

臓器移植被験体の血清中のCTGF

臓器移植患者の血清中のCTGFおよびCTGF断片の濃度を試験した。機能器官移植(肝臓または腎臓)患者由来の血清、ならびに慢性の移植臓器拒絶がある患者由来の血清をIntergen Companyから入手した。機能器官移植患者は、患者の臨床検査とクレアチニンクリアランスの測定とに基づいて慢性拒否反応がある患者と区別されていた。慢性移植臓器拒絶は、移植後1年以上と判断された。

10

【0169】

図9から明らかなように、正常な臓器移植患者または臓器移植後の慢性拒否反応がある患者の血清中に存在するCTGFおよびCTGFのC末端断片の濃度は、正常個体(すなわち、臓器移植を受けていない個体)の血清で確認された濃度と本質的に同じであった。正常個体の血清、または臓器移植患者の血清中のCTGFおよびCTGFのC末端断片の濃度に対応する検出値は、CTGFおよびCTGFのC末端断片ともに約0~20ng/mlであった。

【0170】

一方、図9から明らかなように、臓器移植患者の血清中のCTGFのN末端断片が容易に検出された。さらに、正常な臓器移植患者および慢性の移植拒絶反応のある患者の血清中のCTGFのN末端断片濃度は、健康な非移植個体の血清で検出された濃度と比べて非常に高かった。肝移植個体または腎移植個体の血清中に高濃度のCTGFのN末端断片が検出された。これらの結果は、臓器移植患者の血清中のCTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片の濃度を検出、定量および比較した場合、臓器移植を受けた患者のCTGFのN末端断片は非移植個体よりも高濃度で存在することを明らかにしている。また、これらの結果から、さらに、CTGFのN末端断片の濃度は、正常な臓器移植において確認された濃度と比較した場合、臓器移植の慢性拒否反応と関連して上昇することが明らかになった。

20

【実施例16】

【0171】

心筋梗塞被験体の血清中のCTGF

心筋梗塞患者の血清中のCTGFおよびCTGF断片の濃度を試験した。正常なドナー個体由来の血清と心筋梗塞患者由来の血清はIntergen Companyから入手した。患者の心筋梗塞は、徴候的に診断されており、さらに、患者血清中のトロポニンI濃度の評価によって確認されていた。検査した10人の患者において、トロポニンI濃度の範囲は14.1~103ng/mlであった。使用したトロポニンI検査法は、対応する基準範囲が0.0~0.5ng/mlである、AXSYMイムノアッセイ系(Abbott Laboratories, Abbott Park IL)であった。

30

【0172】

図10から明らかなように、心筋梗塞患者の血清中のCTGF濃度は、正常個体の血清中で検出された濃度よりもわずかに高かった。心筋梗塞被験体の血清中のCTGFのC末端断片濃度は、正常個体の血清で確認された濃度と本質的に同じであるか、わずかに低かった。しかし、CTGFのN末端断片は、心筋梗塞患者の血清中に容易に検出された。さらに、このCTGFのN末端断片濃度は、これら患者の血清中のCTGFおよびCTGFのC末端断片の濃度よりも上昇していた。従って、これら患者の血清中にあるCTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片の検出、定量および比較により、先の心筋梗塞の証拠がある患者のCTGFのN末端断片に有意な上昇があることがあることが明らかになった。

40

【実施例17】

【0173】

肝臓線維症被験体の血清中のCTGF

進行性肝臓線維症と診断された患者の血清中のCTGFおよびCTGF断片の濃度を試験した。正常なドナー患者由来の血清と肝臓線維症患者由来の血清は、Intergen Companyから入手し

50

た。図10から明らかのように、正常個体由来の血清に低濃度のCTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片が検出された。これらの結果から、正常血清では、CTGF、CTGF N末端断片およびCTGF C末端断片の濃度は、約0~20ng/mlの範囲にあることが明らかである。肝臓線維症患者の血清中のCTGFのC末端断片濃度は、正常個体の血清で確認された濃度と本質的に同じであった。

【0174】

しかし、進行性肝臓線維症患者の血清では、正常個体由来の血清中の濃度と比較すると、CTGFの濃度およびCTGFのN末端断片は上昇していた。これら患者の血清中のCTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片の濃度を検出、定量および比較することにより、肝臓線維症患者のCTGFのN末端断片が高濃度で存在することが明らかになった。

10

【実施例18】

【0175】

関節炎の関節液中のCTGF

関節炎の関節液中のCTGFおよびCTGF断片の濃度を検出した。正常ドナー個体由来の血清はIntergen Companyから入手した。炎症性関節疾患患者由来の関節液のサンプル(患者の膝から採取されたもの)は、Vital Products(Delray Beach FL)から入手した。図11から明らかのように、関節炎の関節液中のCTGFおよびCTGFのC末端断片の濃度は検出不可能であった。一方、CTGFのN末端断片を検出したところ、関節炎の関節液中のN末端断片濃度は、CTGFおよびCTGFのC末端断片よりも上昇していた。これら患者の関節液中のCTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片の濃度を検出、定量および比較することにより、炎症性関節疾患と診断された患者のCTGFのN末端断片が高濃度で存在することが明らかになった。

20

【実施例19】

【0176】

硝子体液中のCTGF

眼疾患と診断された患者の死体由来の硝子体液中のCTGFおよびCTGF断片の濃度を試験した。硝子体液はLions Eye Bank of Oregon(Portland OR)から購入した。臨床的に眼疾患であると診断された被験体および眼疾患ではない被験体から採取された硝子体液について実施されたCTGFアッセイの結果を図12Aに示す。眼疾患には、失明が誘発される1型糖尿病性網膜症、2型糖尿病の白内障および軽度の黄斑変性、および非糖尿病性両側白内障が含まれる。図12Aに示すように、臨床的に診断された眼疾患患者の硝子体液中のCTGF N末端断片濃度は、臨床的に眼疾患ではないと診断された患者の硝子体液中の濃度よりも上昇していた。

30

【0177】

CTGF断片発現の濃度について得られたデータは、サンプル中のCTGFの濃度に対する同一サンプル中のCTGFのN末端断片の濃度の比として、あるいはサンプル中のCTGFのC末端断片濃度に対する同一のサンプル中のCTGF濃度の比として表すことができる。硝子体液中のCTGFの濃度およびCTGFのN末端断片の濃度について得られたデータ(図12A)を用いて、数学的変換を行なった。上述のデータ(硝子体液由来のサンプル)を用いてCTGFに対するCTGFのN末端断片濃度の比を検出し、その結果を図12Bに示す(N末端断片/CTGF)。また、そのCTGFの濃度に対するCTGFのN末端断片の濃度の比から、CTGFのN末端断片の濃度を検出することにより、生体サンプル中のCTGF発現のより高感度で信頼性高い評価が得られるという証拠が示された。

40

【0178】

このデータをさらに分析して、正常被験体由来のサンプルと疾患被験体由来のサンプル間のCTGFおよびその断片の濃度について得られた値の統計学的有意差を決定した。T検定分析を図12に示したデータについて実施した。CTGFアッセイ(N-Cアッセイ)を用いた場合、正常硝子体液由来のサンプルから得られたCTGFの濃度と疾患硝子体液との差は、T検定(P=0.150)によって検出したところ統計学的に有意ではなかった。

【0179】

50

さらに、CTGFに対するウサギポリクローナル抗体を用いてCTGFのELISAアッセイを行なった。この抗体製剤は、CTGFで免疫化した(当技術分野で周知の標準法による)ウサギで産生した。従って、この抗体製剤は、CTGFポリペプチド内の複数のエピトープを認識する複数の抗体を含有している。このウサギポリクローナル抗体を利用したCTGFを検出および定量するELISAアッセイは、当技術分野で周知の方法を用いて実施した。CTGFに対するウサギポリクローナル抗体アッセイは、CTGF、CTGFのN末端断片またはCTGFのC末端断片を区別することができない。ウサギポリクローナル抗体を用いたELISAアッセイの結果を図12A(ウサギポリクローナル)に示す。CTGFに対するウサギポリクローナル抗体を利用してCTGF濃度について得られたデータの分析によれば、正常硝子体液由来のサンプル中の疾患硝子体液に対するCTGF濃度は、T検定($P=0.317$)によって検出した場合、統計学的に有意ではなかったことが明らかであった。これは、CTGF、CTGFのN末端断片またはCTGFのC末端断片を区別する本方法が、正常状態と疾患状態におけるCTGF濃度を確実に比較したことを示すものである。

10

【0180】

一方、CTGF N末端断片濃度を測定するアッセイで得られた値をT検定分析したところ、疾患個体に対し、正常個体由来のサンプル中の硝子体液に存在するCTGFのN末端断片の量に統計学的有意差があった($P=0.007$)。また、CTGFのN末端断片濃度のCTGF濃度に対するについて実施したT検定では、疾患個体に対して正常個体由来のサンプル中の硝子体液に存在するCTGFのN末端断片量に有意差があった($P=0.003$)。従って、CTGF濃度のみを検出および測定しても、正常状態と疾患状態におけるCTGF濃度を区別する統計学的に有意なデータは得られなかった。しかし、本発明に記載されているCTGFのN末端断片濃度の検出および測定では、正常状態と疾患状態におけるCTGFのN末端断片濃度を区別する統計学的に有意なデータが得られる。

20

【実施例20】

【0181】

癌患者の血清中のCTGF

癌患者血清中のCTGFおよびCTGF断片の濃度を検出した。正常ドナー患者由来の血清および癌患者由来の血清は、Intergen Companyから入手した。以下の癌マーカーの検出および定量はIntergen Companyによって実施された。

【0182】

CA 15-3は、腫瘍細胞から血流へ流れるムチン様細胞膜糖タンパク質である。CA 15-3は、乳癌患者の処置で用いられている血清癌抗原である。CA 15-3濃度は、ヘテロサンドイッチ磁気分離キットおよびBayer Diagnostics (Tarrytown NY)の試薬を用いて検出した。患者血清中で30U/ml以上の値が得られた場合、患者はCA 15-3陽性と考えられた。アッセイ標準基準範囲は0~30U/mlであった。CA 15-3患者はすべて女性であった。年齢範囲は45~88歳であり、CA 15-3濃度の範囲は32~1,292U/mlであった。これらのサンプルを「乳癌および卵巣癌」の癌サンプルと定めた(図13中のサンプル群CA15-3)。試験した全CA15-3陽性患者の3分の1は、CA15-3濃度が標準の臨床基準濃度30U/mlよりも10倍以上上昇していた。

30

【0183】

癌胚抗原(CEA)は、種々の悪性腫瘍で発見された、発現が高まっている細胞表面糖タンパク質のファミリーに属するものである。CEAは、胃腸管と乳癌をモニターするのに用いられる癌抗原である。CEA濃度をヘテロサンドイッチ磁気分離キットとBayer Diagnosticsの試薬を用いて検出した。患者血清中で5ng/mlを越える値が得られた場合、患者はCEA陽性であると考えられた。アッセイ標準基準範囲は0.1~4.9ng/mlであった。CEA陽性患者には、CEA濃度が5.5~2,950ng/mlであり、30~79歳の男性および女性が含まれていた。これらの患者サンプルは、「結腸直腸癌、GIおよび乳癌」の癌サンプルと定めた(図13中のサンプル群CEA)。試験した全CEA陽性患者の3分の1は、CEA濃度が標準の臨床基準範囲よりも10倍以上上昇していた。

40

【0184】

50

前立腺特異抗原(PSA)は、主として前立腺の腺房および腺管に並ぶ上皮細胞によって産生される糖タンパク質である。高濃度の血清PSAは前立腺病理学の重要なマーカーになっており、腫瘍マーカーとして前立腺癌の早期発見に用いられている。PSA濃度をヘテロサンドイッチ磁気分離キットとBayer Diagnosticsの試薬を用いて検出した。患者血清中で8.0 ng/mlを越える値が得られた場合、患者はPSA陽性であると考えられた。アッセイ標準基準範囲は0~4 ng/mlであった。PSA陽性患者は全員男性だった。年齢範囲は55~96歳であり、PSA濃度の範囲は8.3~1,919.0ng/mlであった。これらのサンプルを「前立腺」癌サンプルとして定めた(図13中のサンプル群PSA)。試験した全PSA陽性患者の3分の1は、PSA濃度が標準の臨床基準範囲よりも10倍以上上昇していた。

【0185】

CA 19-9は、シアリル化Lewis-A五炭糖エピトープ(ラクト-N-フコペンタオースII)を含む、腫瘍に関連するムチンである。CA19-9は膵臓、胃、胆嚢、結腸、卵巣および肺の腺癌によって産生され、循環流動に入る。CA 19-9濃度はBayer Diagnosticsによって検出した。これらのサンプルを「膵臓、GIおよび肝臓」癌サンプルと定めた(図13中のサンプル群CA19-9)。

【0186】

図13に示すように、ある種の癌マーカー濃度の高値により検出されるように(上述および図13で明らかのように)、CTGF N末端断片濃度は正常個体の血清中のCTGF N末端断片濃度と比較した場合、種々のタイプの癌の患者血清中で上昇していた。これら患者の血清中のCTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片の濃度を検出、定量および比較することにより、種々の形態の癌と診断された患者のCTGFのN末端断片が高濃度で存在することが明らかになった(CTGFおよびCTGFのC末端断片の濃度についてのデータは示さず)。

【実施例21】

【0187】

I型糖尿病被験体の尿中のCTGFのN末端断片

I型糖尿病と診断された被験体の尿中のCTGF N末端断片の濃度を上述のCTGF ELISAアッセイを用いて検出および定量した。I型糖尿病患者における腎臓細管の損傷程度を糖尿病腎症などの重度の腎臓病でよく用いられている指標である、患者の尿中のアルブミン(アルブミン尿)量を測定することにより判断した。患者は、20~200pg/分の尿タンパク(アルブミン)排出濃度の場合に陽性微量アルブミン尿試験結果を有すると判断された。マクロアルブミン尿は、尿タンパク(アルブミン)排出濃度が200µg/分を超えるものとして定義した。患者は、20µg/分より低い尿タンパク(アルブミン)排出濃度の場合にアルブミン尿については正常であると判断された。従って、I型糖尿病患者は、実施したアルブミン尿試験の結果に基づいて、正常、微量アルブミン尿または大量アルブミン尿として分類した。

【0188】

CTGFのN末端断片の濃度をI型糖尿病患者の尿中で測定し、尿クレアチニンの測定濃度と比較した。これらの個体のCTGFのN末端断片濃度について得られたデータは、図14Aに示すように、対数目盛に変換(数学的変換)した。結果は、クレアチニン1ミリグラム当たりのCTGFのN末端断片(ナノグラム)として示す。図14Aから明らかのように、アルブミン尿のないI型糖尿病患者の濃度と比較した場合、CTGFのN末端断片の濃度が上昇していることが微量アルブミン尿および大量アルブミン尿のあるI型糖尿病被験体由来の尿で検出された。CTGFまたはCTGFのC末端断片は、これらのサンプルでは検出されなかった(データは示さず)。クレアチニン(ミリグラム)当たりのCTGFのN末端断片の濃度(ナノグラム)は、大量アルブミン尿があると見なされた患者の尿で最も高かった。

【0189】

データを数学的変換した後に対数目盛にその結果を図示すると、尿中で測定されたN末端CTGF断片の濃度は、測定された群(すなわち、正常アルブミン尿、微量アルブミン尿または大量アルブミン尿のある患者)において、腎臓細管損傷(アルブミン尿濃度/クレアチニン濃度によって測定されたもの)と関連があったことが明らかであった(図14Aを参照

10

20

30

40

50

されたい)。

【0190】

また、I型糖尿病患者の尿中で測定されたCTGFのN末端断片濃度をこれら個体の尿へのアルブミン排出速度と比較した。尿中へのアルブミン排出速度(1分当たりのアルブミン(マイクログラム)として表される)の測定は、腎臓障害の程度または腎臓病の重篤度を示すため用いられることが多い。腎臓の障害が大きくなり、さらに腎臓の適切または正常な機能が損なわれた場合、アルブミンの尿中への排出速度は、正常な腎臓において確認された速度よりも速いことが確認されている。図14Bに示すように、上昇したCTGFのN末端断片濃度(クレアチニン(ミリグラム)当たりのCTGFのN末端断片(ナノグラム)として示す)は、I型糖尿病患者由来の尿において上昇したアルブミン排出速度と深く関係していた。図14B中の矢印は、正常個体のアルブミン排出率の最大限界を示す。

10

【実施例22】

【0191】

硬皮症患者の血漿中のCTGF

硬皮症は、皮膚、血管、骨格筋および内臓の繊維症変化、退行性変化および炎症性変化を特徴とする結合組織疾患である。小動脈壁を覆っている細胞の損傷と皮膚の硬質瘢痕様線維組織の異常沈着はこの疾患の特徴である。硬皮症患者は、この疾患の局所性病状または全身性病状を発症する可能性がある。局所的硬皮症では、手と顔の皮膚の領域が冒されることが多い。全身性硬皮症には、身体の器官、皮膚の広範な領域、またはその両方が含まれ得る。全身性硬皮症(全身性硬化症としても知られている)には2種類の主要な変種があり、局限性硬皮症および全身性硬皮症と呼ばれ、その両病状は進行性である。局限性硬皮症の影響は広範囲にわたる可能性があるが、内臓に影響を及ぼすことはほとんどない。全身性硬皮症は、皮膚、結合組織および他の器官に広範囲にわたって影響を及ぼし得る。罹患者は、胃腸、心臓、腎臓、または肺性の病変から死に至る可能性がある。

20

【0192】

全身性硬皮症個体または局限性硬皮症個体の血漿中のCTGFおよびCTGF断片の濃度を上述の方法を用いて測定し、正常個体の血漿で確認された濃度と比較した。正常個体と、全身性硬皮症個体または局限性硬皮症個体の間にCTGFのCTGFまたはC末端断片の濃度の有意差は確認されなかった。しかし、正常個体で確認された濃度と比較した場合、CTGFのN末端断片濃度における差が全身性硬皮症個体または局限性硬皮症個体の血漿において確認された。従って、これら個体の血漿中のCTGF、CTGFのN末端断片およびCTGFのC末端断片を検出、定量および比較することにより、全身性硬皮症個体または局限性硬皮症個体のCTGFのN末端断片の濃度が上昇していることが明らかになったが、全身性硬皮症または局限性硬皮症は、CTGFまたはCTGFのC末端断片の濃度を検出することによっては確認されなかった。

30

【実施例23】

【0193】

肺線維症中のCTGF

肺損傷は抗癌療法で認められる高頻度副作用である。高用量の電離放射線の適用によって、有害な肺炎および肺線維症が生じていると考えられる。放射線肺炎(最終的に肺線維症が起こる)は、照射の分野に限定されている、放射線による局所的サイトカイン産生により発症すると考えられる。放射線が放射線感受性細胞毒と組み合わせられた場合、結果として生じる線維症は、放射線処理単独で認められる症状よりも発症がより顕著であり、速いように思われる。肺炎から線維症への進行に随伴する特定の病態生理的变化は、完全には明らかにされていない。ここでは、これらの患者の肺機能の障害を測定し検出を行い、線維症の程度および進行を検出する。

40

【0194】

実験的証拠によると、CTGF発現は肺損傷後に上昇することが明らかである。例えば、CTGF濃度は、マウスにおいてブレオマイシン誘発肺線維症で上昇することが示された(Laskyら、(1998) Am J Physiol 275:L365-L371)。さらに、CTGF mRNA濃度は、肺線維症でなく、健康で禁煙コントロール中の患者由来のBAL液体中に存在するその濃度と比較した場合、

50

間質性肺線維症 (IPF) 患者由来の気管支肺胞洗浄 (BAL) 液体ではその10倍以上に増加し、ステージ I/II のサルコイドーシス患者では40倍以上に増加し、ステージ III/IV のサルコイドーシス患者では90倍以上に増加していた (Allenら、(1999) *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 693-700)。このため、血漿、唾液または肺洗浄液中のCTGFまたはCTGF断片の濃度の変化は、したがって、放射線治療を受けている患者に発症する肺病理学上の変化を診断する手段として有用である。従って、本発明の方法を用いて、かかる治療後にCTGFおよびCTGF断片の濃度をモニターすることにより、特定の治療後に発症し得る繊維症反応の診断における判断材料が得られる。

【実施例 2 4】

【0 1 9 5】

住血吸虫症中のCTGF

住血吸虫症の進行例は、肝臓に住血吸虫卵が存在することを特徴とする。未治療の患者では、住血吸虫卵に対する肉芽腫性の反応が生じた後、広汎性肝線維症および肝腫が進行する。門脈周囲の線維症では、脾腫、門脈拡張および門脈体静脈側枝の発達に伴う (Kardorffら、(1999) *Acta Tropica* 73: 153-164)。これらの変化は、線維症マーカー (例えば、カルボキシル末端プロコラーゲンIVペプチド (NC1) およびヒアルロン酸) の血中濃度の上昇と確実に関連している (Kardorffら、(1999) (上掲)、および Ricard-Blumら、(1999) *Am J Trop Med Hyg* 60:658-663)。

【0 1 9 6】

血漿、尿または組織バイオプシー中のCTGFまたはCTGF断片の濃度の変化は、住血吸虫症に罹患している個体で発症する肝臓病理学的変化の診断の手段として有用である。従って、本発明の方法を用いて、かかる個体のCTGFおよびCTGF断片の濃度をモニターすることにより、住血吸虫症の感染および進行後の肝臓における線維症反応を診断する判断材料が得られる。

【実施例 2 5】

【0 1 9 7】

炎症性障害および伝染性障害におけるCTGF

狭窄性細気管支炎 (肺移植患者では閉塞性細気管支炎とも称する) には、膜様細気管支および呼吸気管支の壁および隣接組織で主に発症し、生じた内腔狭窄を伴った炎症と線維症が含まれる。狭窄性細気管支炎は、肺および心肺移植の併発症であることが多いが、骨髄移植にも関係している。また、狭窄性細気管支炎は、毒物の吸入後、ある種の医薬品の摂取後の慢性関節リウマチと、まれな併発症として、アデノウイルス、インフルエンザA型、麻疹および小児肺炎マイコプラズマ感染にも関係している。現在、肺移植患者および他の患者における狭窄性細気管支炎の病理組織学的診断は、病変が斑状に分布しているので、広汎性線維症のある遅発性病変中の組織を採取する際に技術的困難が伴い、病変を確認しにくいという困難な問題がある。疾患の初期段階では、狭窄性細気管支炎はルーチンヘマトキシリンエオシン染色標本ではとらえ難く、かつ見逃しやすく、一方、進行段階では、肺の中の斑状の瘢痕を非特異的なものとして判断する場合、疾患を診断するのが同様に困難である。

【0 1 9 8】

繊維症反応に関連している炎症性疾患および感染症の他の例 (CTGFおよびCTGF断片の濃度の検出および定量がかかる疾患の診断および予測に有用である) には、以下のもの、すなわち、原発性胆汁性肝硬変症、主に女性が罹患し、門脈炎症線維症および終末線維症 (ultimately fibrosis) を伴う小型肝内胆管の慢性的進行性破壊を特徴とする自己免疫性疾患；特発性肺線維症、特発性肺線維症または膠原血管病に関連している間質性肺炎の発病にアデノウイルスが関与していることが最近特徴づけられている；および腎盂腎炎などの腎実質性感染、(すなわち、腎臓実質組織、および腎臓腎盂内層の炎症細菌感染によることが多い) 後天性 (出生後の) 腎瘢痕の先行条件であると考えられる；が含まれる。

【0 1 9 9】

血漿、尿または組織バイオプシー中のCTGFまたはCTGF断片の濃度の変化は、感染および炎

10

20

30

40

50

症の後で生じる組織中の繊維症反応の開始と進行を診断する手段として有用である。従って、本発明の方法を用いて、かかる個体中のCTGFおよびCTGF断片の濃度をモニターすることにより、種々の障害に関連している感染炎症後の繊維症反応の進行の診断材料とモニター方法が得られる。

【0200】

本明細書に示され、記載されたもの以外に、本発明の種々の変更は、先の記載からの当業者に明らかであろう。かかる変更は、添付の特許請求の範囲内にあるものとする。

【0201】

本明細書に引用された文献はすべて、それら全体を引用により本明細書に援用する。

【図面の簡単な説明】

【0202】

【図1A】図1A～Cは、本発明におけるCTGFのモジュール構造、特定のアッセイの説明、および本発明の典型的な試薬を示す図である。図1Aは、CTGFをコードするポリヌクレオチド転写物のエクソン構造、CTGFタンパク質のドメイン構造、およびCTGFのN末端またはC末端断片上のエピトープに特異的に結合する典型的な抗体試薬を示す図である。

【図1B】図1Bは、CTGFのN末端断片またはCTGFのC末端断片に特異的に結合する試薬の特異性を説明するウェスタンブロットを示す図である。

【図1C】図1Cは、本発明によって検討された種々の2重試薬「サンドイッチ」アッセイフォーマットと、各アッセイ中で使用可能な典型的な試薬を示す図である。

【図2】図2は、CTGFのN末端断片およびC末端断片と区別して、CTGFの濃度を検出するELISAアッセイ(N-Cサンドイッチアッセイ)の特異性を示すグラフである。

【図3】図3は、CTGFのC末端断片と区別して、CTGFとCTGFのN末端断片の濃度を検出するELISAアッセイ(N-Nサンドイッチアッセイ)の特異性を示すグラフである。

【図4】図4は、CTGFのN末端断片と区別して、CTGFおよびCTGFのC末端断片を検出するELISAアッセイ(C-Cサンドイッチアッセイ)の特異性を示すグラフである。

【図5】図5A、5Bおよび5Cは、ウェスタンブロット分析による細胞培養液上清中のCTGFおよびCTGF断片の濃度を示す図である。

【図6】図6は、正常なヒトの尿中で、CTGFのN末端断片がCTGFよりも安定性が高いことを示すグラフである。

【図7A】図7Aは、腹膜透析を受けている被験体から得た透析物中のCTGFのN末端断片の濃度を示すグラフである。患者は、1型糖尿病、糸球体腎炎または多嚢胞性繊維症と診断されていた。

【図7B】図7Bは、腹膜透析を受けている被験体から得た透析物中のCTGFのN末端断片の濃度を示すグラフである。患者は、1型糖尿病、糸球体腎炎または多嚢胞性繊維症と診断されていた。

【図8】図8は、正常な健康な個体のCTGFおよびCTGF断片の濃度と比較した、腎繊維症患者から得られた血清サンプル中のCTGFおよびCTGF断片の濃度を示すグラフである。繊維症の根本的原因是、移植拒絶反応、化学的毒性または自己免疫性繊維症と診断されていた。

【図9】図9は、臓器移植患者および慢性的移植臓器拒絶のある患者から得られた血清サンプル中のCTGFおよびCTGF断片の濃度を示すグラフである。

【図10】図10は、正常な健康な個体の血清中のCTGFおよびCTGF断片の濃度と比較した、心筋梗塞または進行性肝臓繊維症患者から得た血清中のCTGFおよびCTGF断片の濃度を示すグラフである。

【図11】図11は、正常血清中のCTGFおよびCTGF断片の濃度と比較した、炎症性関節疾患の個体から得られた関節液中のCTGFおよびCTGF断片の濃度を示すグラフである。

【図12】図12Aは、種々の眼疾患被験体から得られた硝子体液中のCTGFおよびCTGF断片の濃度を示すグラフである。図12Bは、種々の眼疾患被験体から得られた硝子体液中のCTGFおよびCTGF断片の濃度を示すグラフである。

【図13】図13は、種々の癌を患っている複数の個体から得られた血清サンプル中のCTGFのN末端断片の濃度を示すグラフである。

10

20

30

40

50

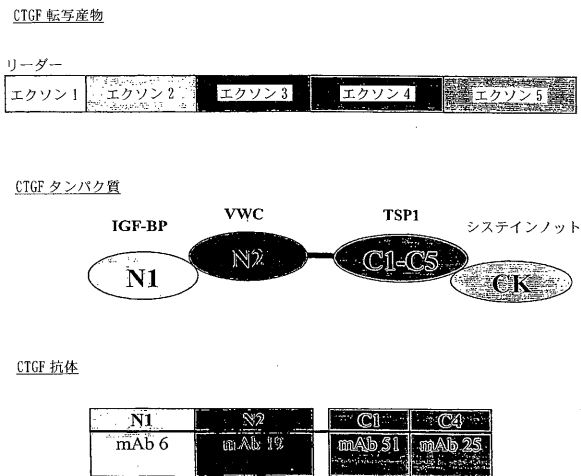
【図14】図14Aおよび14Bは1型糖尿病を患っている個体から得られた尿中のCTGFのN末端断片の濃度を示すグラフである。図14Aは、アルブミン尿症、ミクロアルブミン尿症またはマクロアルブミン尿症は伴わない1型糖尿病患者のCTGFのN末端断片の濃度を示す。図14Bは、1型糖尿病患者の尿中のCTGFのN末端断片の濃度と、尿中へのアルブミン排出速度の相関を示す。

【図15A】図15は、ヒトCTGFの核酸系列(配列番号1)およびアミノ酸配列(配列番号2)を示す。ドメインは枠で囲み、影をつけた。また、ドメインはIGF-BP(インシュリン様増殖因子結合タンパク質モチーフ)、VWC(von Willebrand C型ドメイン)、およびTSP1(トロンボスポンジン1型ドメイン)と同定された。さらに、隣接するエクソンに対して境界を示す。

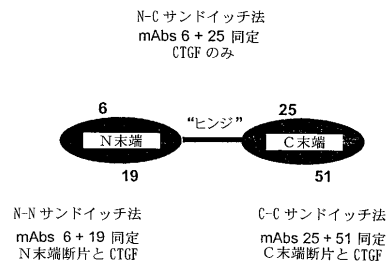
【図15B】図15Bは、図15Aの続きである。

【図16】図16は、ヒトCTGF(hCTGF; 配列番号2)およびオーソログスの雌牛(bCTGF)、ブタ(pCTGF)、ラット(rCTGF)およびマウス(FISP12)のCTGF配列のアミノ酸配列間の配列比較を示す。配列比較は、CLUSTALW多重配列整列プログラムを用いて作成した(v.1.74; Thompsonら、(1994) Nucleic Acids Res 22: 4673-4680)。

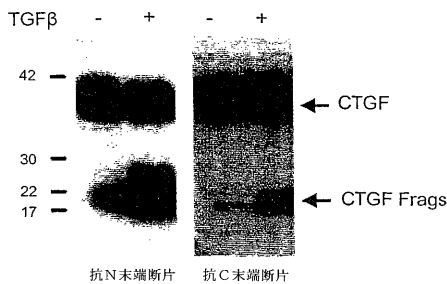
【図1A】



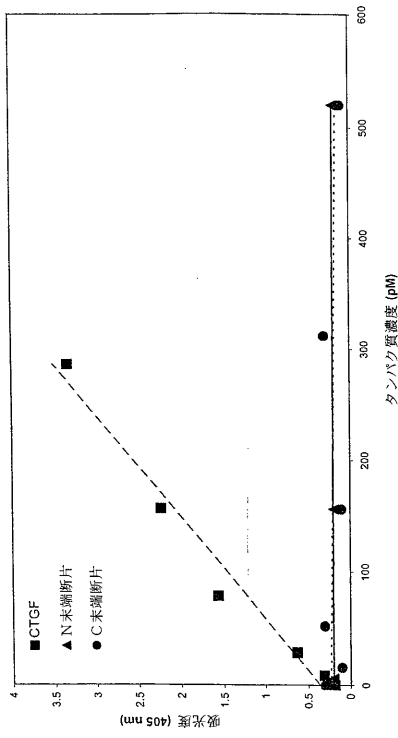
【図1C】



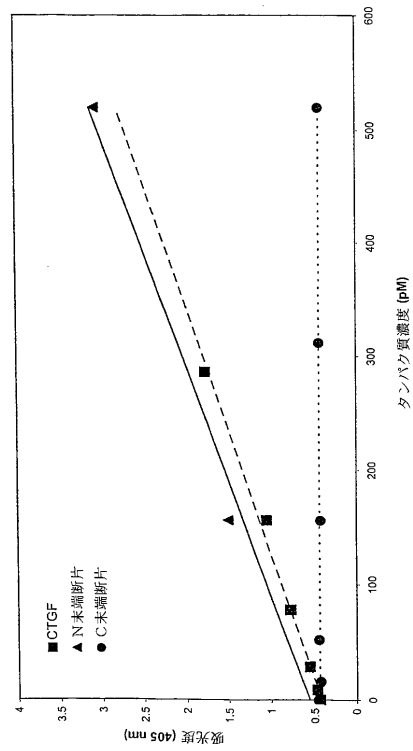
【図1B】



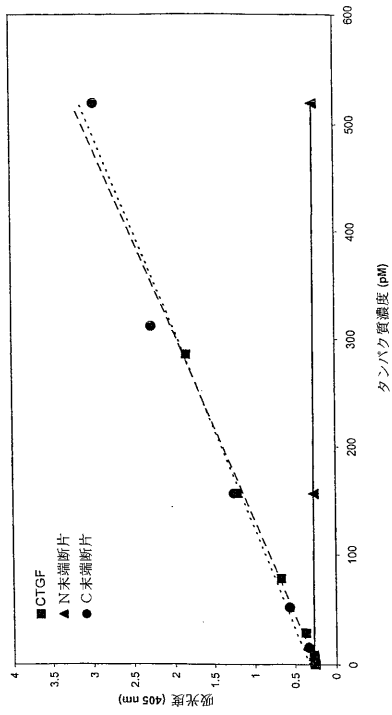
【 図 2 】



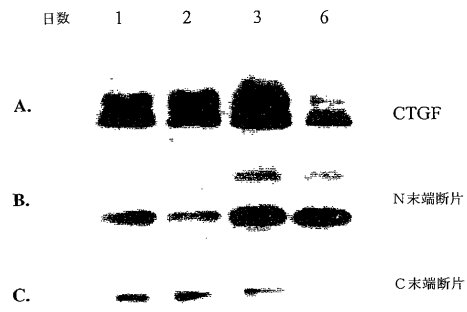
【 図 3 】



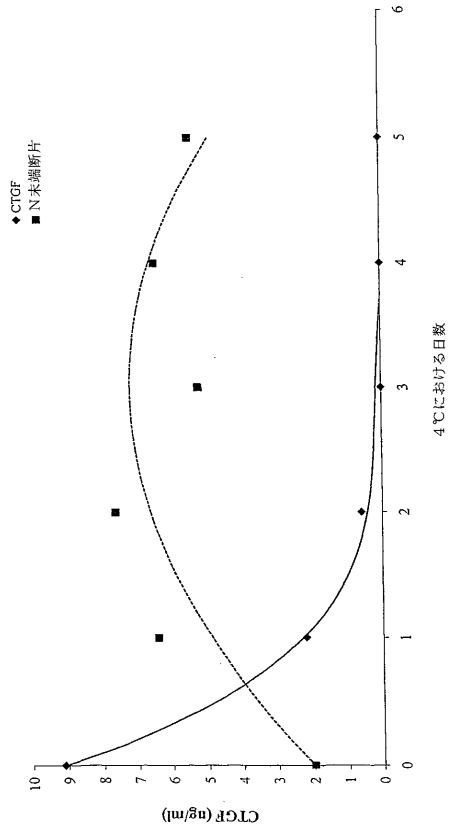
【 図 4 】



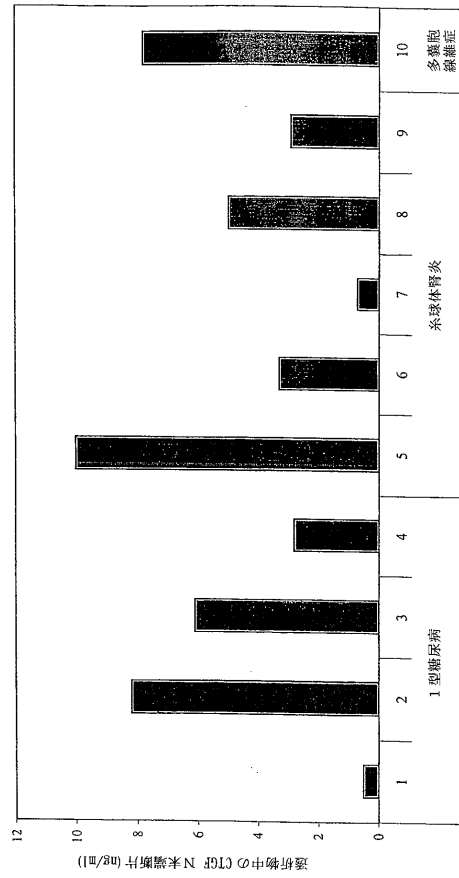
【 図 5 】



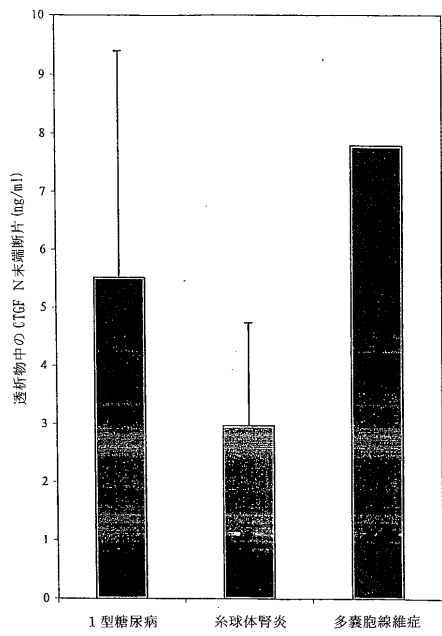
【 図 6 】



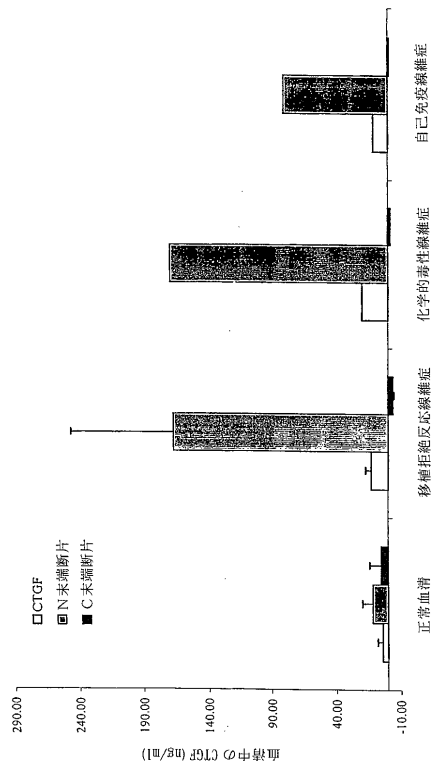
【 図 7 A 】



【 図 7 B 】



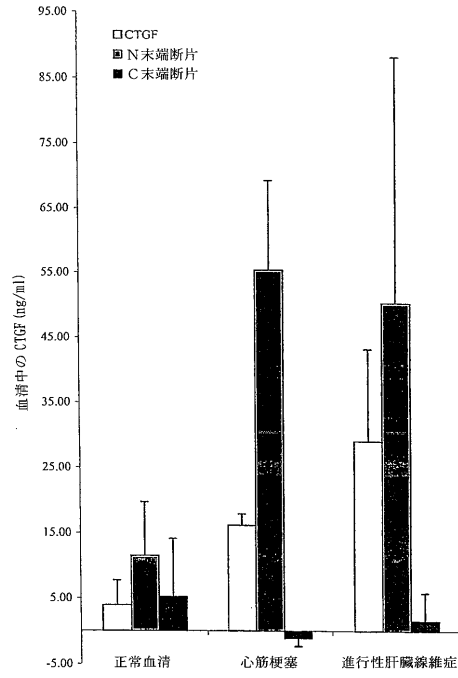
【 図 8 】



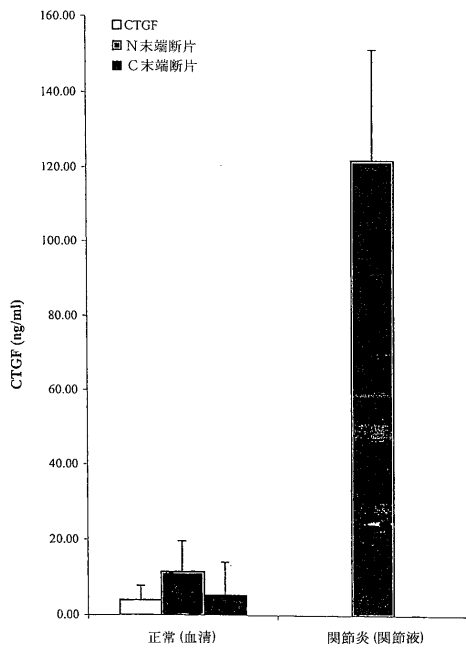
【 図 9 】



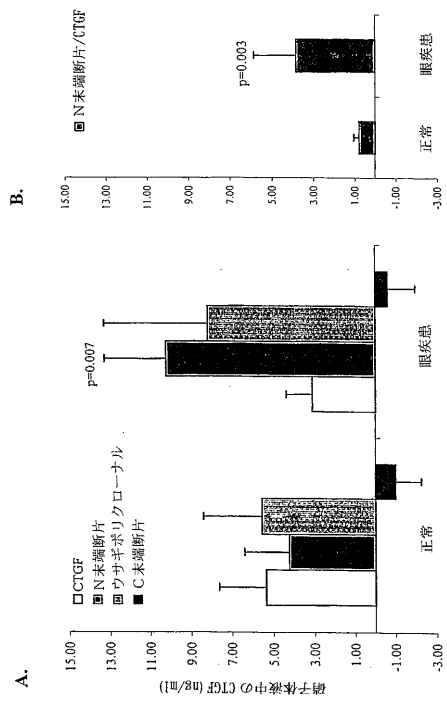
【 図 10 】



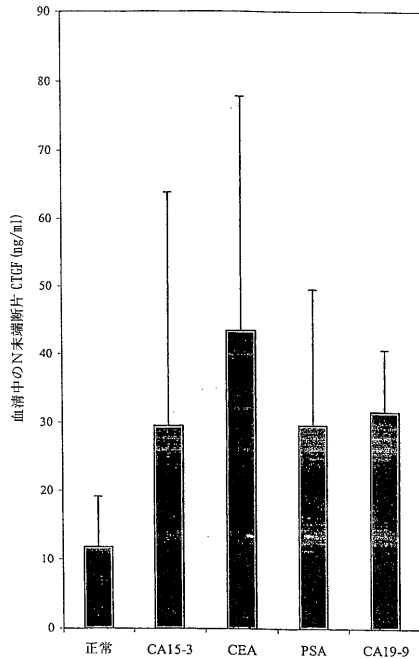
【 図 11 】



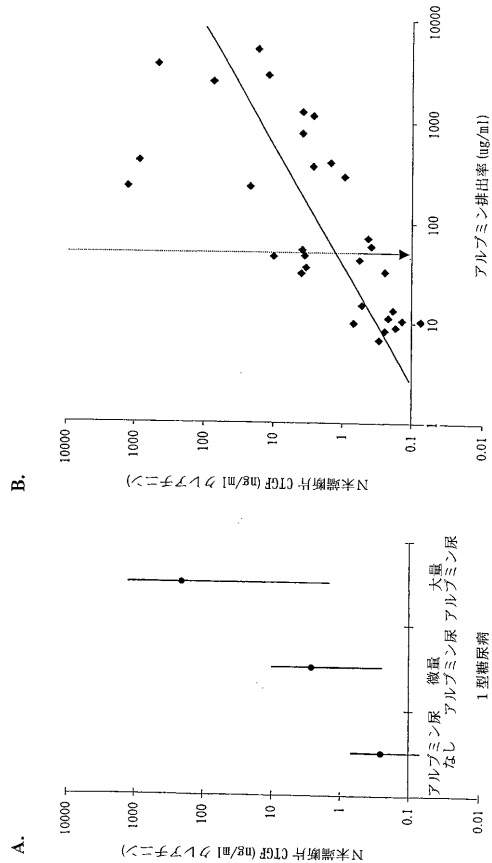
【 図 12 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 A 】

リーダ配列
 atg acc gcc gcc agt atg ggc ccc gtc cgc gtc gcc ttc gtg gtc
 Met Thr Ala Ala Ser Met Gly Pro Val Arg Val Ala Phe Val Val
 1 5 10 15

エクソン1 | エクソン2
 ctc ctc gcc ctc tgc agc cgg ccg gcc gtc ggc cag aac tgc agc ggg
 Leu Leu Ala Leu Cys Ser Arg Pro Ala Val Gly Gln Asn Cys Ser Gly
 20 25 30
 TGF-βF

ccg tgc cgg tgc ccg gac gag ccg gcg ccg cgc tgc ccg gcg gcc gtc
 Pro Cys Arg Cys Pro Asp Gly Ala Pro Arg Cys Pro Ala Gly Val
 インシュリン増殖因子結合蛋白モチーフ 45

agc ctc gtc ctg gac gcc tgc gcc tgc tgc cgc gtc tgc gcc aag cag
 Ser Leu Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Lys Gln
 50 55 60

ctg gcc gag ctg tgc acc gag cgc gac ccc tgc gac ccg cac aag gcc
 Leu Gly Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro Cys Asp Pro His Lys Gly
 65 70 75

ctc ttc tgt gac ttc gcc tcc ccg gcc aac cgc aag atc gcc gtc gtc
 Leu Phe Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val Cys
 80 85 90 95

エクソン2 | エクソン3
 acc gcc aaa gat ggt gct ccc tgc atc ttc ggt ggt acg gtc tac cgc
 Thr Ala Lys Asp Gly Ala Pro Cys Ile Phe Gly Gly Thr Val Tyr Arg
 100 105 110
 WWC

agc gga gag tcc ttc cag agc agc tgc aag tac cag tgc acg tgc ctg
 Ser Gly Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys Leu
 von Willebrand C型ドメイン 120 125

gac ggg cgg gtc gcc tgc atg ccc ctg tgc agc atg gac gtt cgt ctg
 Asp Gly Ala Val Gly Cys Met Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg Leu
 130 135 140

ccc agc cct gac tgc ccc ttc ccg agg agg gtc aag ctg ccc ggg aaa
 Pro Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly Lys
 145 150 155

システイン非含有「ヒンジ」領域
 tgc tgc gag gag tgg gtc tgc gac ccc aag gac caa acc gtc gtt
 Cys Cys Glu Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp Gln Thr Val Val
 160 165 175
 *BMP-1/mT11-1

【 図 1 5 B 】

エクソン3 | エクソン4
 ggg cct gcc ctc ggc gct tac cga ctg gaa gac acg ttt gcc cca gac
 Gly Pro Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro Asp
 キモトリプシン (CT) *180 CT* * (PM) プラスミン CT* 190

cca act atg att aga gcc aac tgc ctg gtc cag acc aca gag tgg agc
 Pro Thr Met Ile Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp Ser
 195 *PM 200 TSP1 205

gcc tgt tcc aag acc tgt ggg atg ggc atc tcc acc ccg gtt acc aat
 Ala Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr Asn
 トロンボスポンジンI型ドメイン 220

gac aac gcc tcc tgc agg cta gag aag cag agc cgc ctg tgc atg gtc
 Asp Asn Ala Ser Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met Val
 225 230 235

agg cct tgc gaa gct gac ctg gaa gag aac att aag aag gcc aaa aag
 Arg Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys Lys
 240 245
 システインノットモチーフ

tgc atc cgt act ccc aaa atc tcc aag cct atc aag ttt gag ctt tct
 Cys Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ser Lys Pro Ile Lys Phe Glu Leu Ser
 260 265 270

ggc tgc acc agc atg aag aca tac cga gct aaa ttc tgt gga gta tgt
 Gly Cys Thr Ser Met Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys Gly Val Cys
 275 280 285

acc gac gcc cga tgc tgc acc ccc cac aga acc acc acc ctg ccg gtc
 Thr Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro Val
 290 295 300

gag ttc aag tgc cct gac ggc gag gtc atg aag aac atg atg ttc
 Glu Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Val Met Lys Lys Asn Met Met Phe
 305 310 315

atc aag acc tgt gcc tgc cat tac aac tgt ccc gga gac aat gac atc
 Ile Lys Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp Asn Asp Ile
 320 325 330 335

ttt gaa tgc ctg tac tac agg aag atg tac gga gac atg gca tga
 Phe Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala
 340 345

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 March 2003 (27.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/024308 A2

- (51) International Patent Classification: **A61B**
- (21) International Application Number: PCT/US02/29500
- (22) International Filing Date:
18 September 2002 (18.09.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/323,305 18 September 2001 (18.09.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **FIBROGEN, INC.**, [US/US], 225 Gateway Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **WEITZ, Stephen, L.**, [US/US], 2757 Best Avenue, Oakland, CA 94619 (US).
USINGER, William, R., [US/US], 1056 Roderick Court, Lafayette, CA 94549 (US).
- (74) Agent: **TURNER, Christopher**, Intellectual Property Department, Fibrogen, Inc., 225 Gateway Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 03/024308 A2

(54) Title: METHODS OF ASSAYING CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTOR

(57) Abstract: The present invention relates to methods of detection and quantitation of connective tissue growth factor (CTGF), and diagnosis and detection of various CTGF-associated diseases and disorders.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

METHODS OF ASSAYING CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTOR

[0001] This application claims the benefit of U.S. Provisional Application Serial No. 60/323,305, filed on September 18, 2001, incorporated by reference herein in its entirety.

FIELD OF THE INVENTION

[0002] The present invention relates to detection and quantification of connective tissue growth factor (CTGF), and diagnosis and detection of various CTGF-associated diseases and disorders.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] Connective tissue growth factor (CTGF) is a mitogenic, chemotactic, and extracellular matrix-inducing factor for fibroblasts and other connective tissue cells or other cells capable of producing extracellular matrix. CTGF polypeptides and gene sequences have been identified from a number of species including human. (See, *e.g.*, Ryseck et al. (1991) *Cell Growth Differ* 2:225-233; International Publication No. WO 00/27868, published 18 May 2000; and Bradham et al. (1991) *J Cell Biol* 114:1285-1294.) Human CTGF is a 349-residue polypeptide encoded by an open reading frame of 1047 nucleotides, with an initiation site at about nucleotide 130 and a TGA termination site at about nucleotide 1177, relative to the full-length cDNA. (See, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,408,040; and GenBank Accession Number NP001892.)

[0004] Pathologically, CTGF is involved in conditions where there is an overgrowth of connective tissue cells and over-deposition of extracellular matrix, including such diseases as fibrosis and excess scarring of the skin and major organs, cancer, systemic sclerosis, angiogenesis, arteriosclerosis, atherosclerosis, diabetic nephropathy, and renal hypertension. (See, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,408,040; International Publication No. WO 01/15729, published 8 March 2001.) Additionally, fragments of CTGF have been associated with certain biological activities. (See, *e.g.*, International Publication No. WO 00/35939, published 12 October 2000; International Publication No. WO 00/35936, published 22 June 2000; U.S. Patent No. 5,876,730; Brigstock et al. (1997) *J Biol Chem* 272:20275-20282; and Ball et al. (1998) *Biol Reprod* 59:828-835.)

[0005] Despite existing knowledge regarding CTGF and its various biological activities and disease associations, methods of reliably detecting CTGF as distinguished and distinct from fragments of CTGF, and of quantitatively determining the levels of CTGF and of fragments of CTGF in biological samples, have not been available. Current methods of

WO 03/024308

PCT/US02/29500

detecting CTGF have, for example, relied on heparin to isolate and concentrate CTGF polypeptides, or involved ELISA assays that did not distinguish between various fragments of CTGF. (See, e.g., Sato et al. (2000) *J Rheumatology* 27:149-153; Tamanti et al. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* 251:748-752; and Riser et al. (2000) *J Am Soc Nephrol* 11:25-38.)

[0006] Thus, there is a need for assay systems useful in detecting, measuring, and quantifying the levels of CTGF and of various forms of CTGF, such as fragments of CTGF, in biological samples. Specifically, there is a need for methods that selectively identify specific fragments of CTGF as distinguished from CTGF, and that allow for identification and quantitation of specific CTGF fragments implicated in various disease states.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0007] Described herein are methods of detecting CTGF and fragments of CTGF, methods of quantitating CTGF and CTGF fragment levels, and methods of diagnosing, determining the prognosis of, and monitoring the efficacy of treatments of various CTGF-associated conditions, diseases, or disorders.

[0008] In one aspect, the present invention provides methods for detecting CTGF. In one embodiment, the method comprises detecting the presence of CTGF N-terminal fragments in a sample, wherein CTGF N-terminal fragments are distinguished from CTGF C-terminal fragments and CTGF. In another embodiment, the method comprises detecting the presence of CTGF C-terminal fragments in a sample, wherein CTGF C-terminal fragments are distinguished from CTGF N-terminal fragments and CTGF. In a further embodiment, the method comprises detecting the presence of CTGF in a sample, wherein CTGF is distinguished from CTGF N-terminal and C-terminal fragments.

[0009] The invention further provides methods for quantitating levels of CTGF. In one aspect, the method comprises quantitating the level of CTGF N-terminal fragments in a sample, wherein CTGF N-terminal fragments are distinguished from CTGF C-terminal fragments and CTGF. In another aspect, the method comprises quantitating the level of CTGF C-terminal fragments in a sample, wherein CTGF C-terminal fragments are distinguished from CTGF N-terminal fragments and CTGF. In a further aspect, the method comprises quantitating the level of CTGF in a sample, wherein the level of CTGF is distinguished from the levels of CTGF N-terminal and C-terminal fragments.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

[0010] In some embodiments, the method comprises contacting a sample with a first reagent which specifically binds to a region on CTGF, isolating the reagent, and quantitating the level of CTGF bound. Additionally, the method may further comprise adding a second reagent selected from a second reagent that specifically binds the first reagent or a second reagent that specifically binds to a region of CTGF different from the region bound by the first reagent, removing unbound second reagent, and quantifying the amount of second reagent bound. In particular embodiments, the first and second reagents are anti-CTGF antibodies which bind to different regions of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, or C-terminal fragments of CTGF. In other specific embodiments, the first or second reagent is heparin optionally linked to a carrier.

[0011] The present invention also contemplates methods for diagnosing CTGF-associated disorders. In one embodiment, the method comprises obtaining a sample, quantitating the level of CTGF N-terminal fragments in the sample, and comparing that level to a standard level of CTGF N-terminal fragments, wherein an increased or decreased amount of CTGF N-terminal fragments in the sample is indicative of the presence of a CTGF-associated disorder. In an additional embodiment, the method comprises obtaining a sample, quantitating the level of CTGF C-terminal fragments in the sample, and comparing that level to a standard level of CTGF C-terminal fragments, wherein an increased or decreased amount of CTGF C-terminal fragments in the sample is indicative of the presence of a CTGF-associated disorder. In another embodiment, the method comprises obtaining a sample, quantitating the level of CTGF in the sample, and comparing that level to a standard level of CTGF, wherein an increased or decreased amount of CTGF in the sample is indicative of the presence of a CTGF-associated disorder. For example, an increase in CTGF N-terminal fragments in a sample may be indicative of a fibrotic disorder such as renal fibrosis, liver fibrosis, cardiac fibrosis, scleroderma, and inflammatory joint disease.

[0012] Methods for prognosis of a CTGF-associated disorder are also provided. In one aspect, the method comprises obtaining a sample, detecting the level of CTGF N-terminal fragments, or of CTGF C-terminal fragments, or of CTGF in the sample, and comparing that level to a standard level, wherein a difference between the level determined and the standard level is indicative of the prognosis of a CTGF-associated disorder. For example, a higher level of CTGF N-terminal fragments in a sample compared to a standard may be indicative of a poor prognosis in conditions such as cancer, diabetes, organ transplant, peritoneal dialysis, or myocardial infarction.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

[0013] Methods for monitoring the progression of a CTGF-associated disorder are also provided. In one embodiment, the method comprises obtaining a first sample from a subject at a first point in time, obtaining a second sample from the subject at a second point in time, comparing the level of CTGF N-terminal fragments in the first sample to the level of CTGF N-terminal fragments in the second sample, wherein a difference between the level of CTGF N-terminal fragments in the first sample and the level of CTGF N-terminal fragments in the second sample is indicative of the progression of a CTGF-associated disorder. Similar methods, wherein the levels of CTGF C-terminal fragments or the levels of CTGF in a first and second sample are compared, are also contemplated.

[0014] The present invention additionally relates to methods for monitoring the therapeutic efficacy of treatment of a CTGF-associated disorder. In various embodiments, the method comprises obtaining a sample from a subject having a CTGF-associated disorder and receiving treatment for that disorder; quantitating the levels of CTGF, or of CTGF N-terminal fragments, or of CTGF C-terminal fragments in the sample; and comparing the level of CTGF, or of CTGF N-terminal fragments, or of CTGF C-terminal fragments to a standard level, wherein a difference between the level determined in the sample and the standard level is indicative of the therapeutic efficacy of treatment of a CTGF-associated disorder. In a further aspect, the standard level is obtained through quantitation of CTGF, of N-terminal fragments of CTGF, or of C-terminal fragments of CTGF in a sample obtained from the same subject at an earlier point in or prior to the beginning of treatment.

[0015] In any of the foregoing methods, the sample may be obtained from any source. In one aspect, the sample is obtained from a mammal, and in one particular embodiment the mammal is a human. In one embodiment, the sample may be a body fluid such as urine or plasma. Further, the methods of detection or quantitation of CTGF can be combined with detection and quantitation of additional markers to further confirm diagnosis, prognosis, etc. of a subject's condition. For example, measuring albumin excretion rate in urine in combination with quantitating CTGF N-terminal fragments may provide further confirmation of kidney disease.

[0016] The invention further provides kits for use in detecting the presence of or quantitating the level of CTGF. The kits may be used, for example, to diagnose a CTGF-associated disorder. In certain embodiments, the kit comprises at least one first reagent specifically reactive with CTGF, with CTGF N-terminal fragments, or with CTGF C-terminal fragments, and at least one second reagent that is labeled and is capable of forming a complex with CTGF, with CTGF N-terminal fragments, or with CTGF C-terminal fragments, or with

WO 03/024308

PCT/US02/29500

the first reagent. In some specific embodiments, the first and second reagents are anti-CTGF antibodies which bind to different regions of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, or C-terminal fragments of CTGF. In other specific embodiments, the first or second reagent is heparin optionally linked to a carrier. In a particular embodiment, the second reagent competes with CTGF, with CTGF N-terminal fragments, or with CTGF C-terminal fragments for binding to the first reagent.

[0017] The invention further contemplates methods of screening for compounds that affect the level of CTGF, or of CTGF N-terminal fragments, or of CTGF C-terminal fragments. In certain aspects, the methods comprise obtaining a sample, quantitating a first level of CTGF, or of CTGF N-terminal fragments, or of CTGF C-terminal fragments in the sample, contacting the sample with a compound, measuring a second level of CTGF, or of CTGF N-terminal fragments, or of CTGF C-terminal fragments; and comparing the first and second levels, wherein a difference between the first level and the second level is indicative of a compound that affects the level of CTGF, or of CTGF N-terminal fragments, or of CTGF C-terminal fragments.

[0018] The present invention further relates to methods for identifying a predisposition to a CTGF-associated disorder. In certain aspects, the methods comprise obtaining a sample, quantitating the level of CTGF N-terminal fragments, CTGF C-terminal fragments, or CTGF in a sample, and comparing the level of N-terminal fragments, C-terminal fragments, or CTGF in the sample with a standard level, wherein an increased or decreased amount of N-terminal fragments of CTGF, C-terminal fragments of CTGF, or CTGF in the sample is indicative of a predisposition to a CTGF-associated disorder.

[0019] The present invention further relates to methods for determining whether a particular disorder has an association with CTGF, i.e., identifying a CTGF-associated disorder. In certain embodiments, the methods comprise obtaining a first sample from a subject having a particular disorder, quantitating the level of CTGF N-terminal fragments, or of CTGF C-terminal fragments, or of CTGF in the sample, and comparing that level to a standard non-disease level, wherein a difference between the level in the first sample and the standard non-disease level is indicative of the presence of a CTGF-associated disorder. The disorder can be one associated with increased levels of CTGF N-terminal fragments, CTGF C-terminal fragments, or CTGF; or one associated with decreased levels of CTGF N-terminal fragments, CTGF C-terminal fragments, or CTGF.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0020] Figures 1A, 1B, and 1C set forth the modular structure of CTGF, a description of particular assays, and exemplary reagents of the present invention. Figure 1A shows the exon structure of the polynucleotide transcript encoding CTGF, the domain structure of the CTGF protein, and exemplary antibody reagents that specifically bind to epitopes on the N-terminal or C-terminal fragment of CTGF. Figure 1B shows a Western blot demonstrating the specificity of reagents that specifically bind to the N-terminal fragment of CTGF or C-terminal fragment of CTGF. Figure 1C shows various dual-reagent "sandwich" assay formats contemplated by the present invention and exemplary reagents that can be used in each assay.

[0021] Figure 2 sets forth data showing the specificity of an ELISA assay detecting levels of CTGF (N-C sandwich assay), as distinguished from N-terminal fragments and C-terminal fragments of CTGF.

[0022] Figure 3 sets forth data showing the specificity of an ELISA assay detecting levels of CTGF and N-terminal fragments of CTGF (N-N sandwich assay), as distinguished from C-terminal fragments of CTGF.

[0023] Figure 4 sets forth data showing the specificity of an ELISA assay detecting CTGF and C-terminal fragments of CTGF (C-C sandwich assay), as distinguished from N-terminal fragments of CTGF.

[0024] Figures 5A, 5B, and 5C set forth data showing the levels of CTGF and fragments of CTGF in cell culture supernatants by western blot analysis.

[0025] Figure 6 sets forth results showing that N-terminal fragments of CTGF demonstrate greater stability in normal human urine than CTGF.

[0026] Figures 7A and 7B set forth data showing the levels of N-terminal fragments of CTGF in dialysate derived from subjects undergoing peritoneal dialysis. Patients were diagnosed with type 1 diabetes, glomerular nephritis, or polycystic fibrosis.

[0027] Figure 8 sets forth data showing the levels of CTGF and fragments of CTGF in serum samples derived from renal fibrosis patients compared to that in normal, healthy individuals. The underlying cause of fibrosis was diagnosed as transplant rejection, chemical toxicity, or autoimmune fibrosis.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

[0028] Figure 9 sets forth data showing the levels of CTGF and fragments of CTGF in serum samples derived from organ transplant patients and from patients with chronic organ transplant rejection.

[0029] Figure 10 sets forth data showing the levels of CTGF and fragments of CTGF in serum from patients with myocardial infarction or progressive liver fibrosis compared to that in normal, healthy individuals.

[0030] Figure 11 sets forth data showing the level of CTGF and fragments of CTGF in synovial fluid from individuals with inflammatory joint diseases compared to that in normal serum.

[0031] Figures 12A and 12B set forth data showing the level of CTGF and fragments of CTGF in vitreous fluid from subjects with various eye diseases.

[0032] Figure 13 sets forth data showing the levels of N-terminal fragments of CTGF in serum samples derived from individuals with various cancers.

[0033] Figures 14A and 14B set forth data showing the levels of N-terminal fragments of CTGF in urine from individuals with type 1 diabetes. Figure 12A shows levels of N-terminal fragments of CTGF in patients with type 1 diabetes having no albuminuria, microalbuminuria, or macroalbuminuria. Figure 12B shows a correlation between the level of N-terminal fragments of CTGF in urine and the rate of albumin excretion into urine in patients with type 1 diabetes.

[0034] Figure 15 shows a nucleic acid sequence (SEQ ID NO:1) and amino acid sequence (SEQ ID NO:2) of human CTGF. Domains are boxed and shaded, and are identified as follows: IGF-BP (Insulin-like Growth Factor Binding Protein motif), VWC (von Willebrand type C domain), and TSP1 (thrombospondin type 1 domain). Boundaries for neighboring exons are also shown.

[0035] Figure 16 shows an alignment between the amino acid sequence of human CTGF (hCTGF; SEQ ID NO:2) and orthologous cow (bCTGF), pig (pCTGF), rat (rCTGF), and mouse (FISP12) CTGF sequences. The alignment was made using the CLUSTALW multiple sequence alignment program (v. 1.74; Thompson et al. (1994) Nucleic Acids Res 22:4673-4680).

WO 03/024308

PCT/US02/29500

DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0036] Before the present compositions and methods are described, it is to be understood that the invention is not limited to the particular methodologies, protocols, cell lines, assays, and reagents described, as these may vary. It is also to be understood that the terminology used herein is intended to describe particular embodiments of the present invention, and is in no way intended to limit the scope of the present invention as set forth in the appended claims.

[0037] It must be noted that as used herein and in the appended claims, the singular forms "a," "an," and "the" include plural references unless context clearly dictates otherwise. Thus, for example, a reference to "a fragment" includes a plurality of such fragments, a reference to an "antibody" is a reference to one or more antibodies and to equivalents thereof known to those skilled in the art, and so forth.

[0038] Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods, devices, and materials are now described. All publications cited herein are incorporated herein by reference in their entirety for the purpose of describing and disclosing the methodologies, reagents, and tools reported in the publications which might be used in connection with the invention. Nothing herein is to be construed as an admission that the invention is not entitled to antedate such disclosure by virtue of prior invention.

[0039] The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional methods of chemistry, biochemistry, molecular biology, cell biology, genetics, immunology and pharmacology, within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., Gennaro (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Co.; Colowick et al., Methods In Enzymology, Academic Press, Inc.; Weir and Blackwell (1986) Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV, Blackwell Scientific Publications; Maniatis et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Vols. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel et al. (1999) Short Protocols in Molecular Biology, 4th edition, John Wiley & Sons; Ream et al. (1998) Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, Academic Press); Newton and Graham (1997) PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2nd ed., Springer Verlag).

WO 03/024308

PCT/US02/29500

DEFINITIONS

[0040] "Connective tissue growth factor" or "CTGF" refers to the amino acid sequences of substantially purified CTGF derived from any species, particularly a mammalian species, including rat, rabbit, bovine, ovine, porcine, murine, equine, and particularly human species, and from any source, whether natural, synthetic, semi-synthetic, or recombinant.

[0041] In one aspect, "connective tissue growth factor" or "CTGF" refers to a polypeptide sequence comprising at least a portion of the N-terminal fragment of CTGF and at least a portion of the C-terminal fragment of CTGF.

[0042] The terms "N-terminal fragment" and "N-fragment" used in reference to CTGF mean any polypeptide comprising sequences derived from the amino-terminal portion of a CTGF polypeptide, or to any variants, or fragments thereof. CTGF N-terminal fragments can include all, none, or portions of CTGF from the initial methionine residue through the cysteine-free "hinge" region. Further, CTGF N-terminal fragments can include all, none, or portions of the insulin growth factor-binding protein motif and/or the von Willebrand type C domain. N-terminal fragments of CTGF can also include all, none, or portions of the cysteine-free region. Further, N-terminal fragments of CTGF can be any fifteen or more contiguous amino acids contained within any preceding CTGF N-terminal fragment defined above.

[0043] In one aspect, "N-terminal fragment" or "N-fragment" of CTGF refers to polypeptide sequences derived from the amino-terminal portion of human CTGF. Such fragments can encompass the entire region from amino acid residue 1 to about amino acid residue 198 of SEQ ID NO:2, or from about amino acid 23 to about amino acid 198 of SEQ ID NO:2. The boundary of the N-terminal fragment within the hinge region may be optionally defined by one of several protease cleavage sites defined in SEQ ID NO:2, such as chymotrypsin cleavage sites between residues 179 and 180, between residues 182 and 183, and between residues 188 and 189 of SEQ ID NO:2; plasmin cleavage sites between residues 183 and 184, and between residues 196 and 197 of SEQ ID NO:2; and a bone morphogenetic protein-1 cleavage site between residues 169 and 170 of SEQ ID NO:2. Additionally, N-terminal fragments of human CTGF can include all, none, or portions of the region from amino acid 27 to amino acid 97 of SEQ ID NO:2, amino acid 103 to amino acid 166 of SEQ ID NO:2, or amino acid 167 to amino acid 198 of SEQ ID NO:2. Further, N-terminal fragments of human CTGF can be any fifteen or more contiguous amino acids contained within any preceding CTGF N-terminal fragment defined above.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

[0044] In specific embodiments, the CTGF N-terminal fragments of the present invention comprise sequences selected from the following regions of human CTGF (SEQ ID NO:2) and orthologous fragments thereof derived from a different species, particularly a mammalian species including rat, rabbit, bovine, ovine, porcine, murine, and equine: amino acid residue 23 to amino acid residue 96 (encoded by exon 2); amino acid residue 27 to amino acid residue 97 (IGF-BP motif); amino acid residue 97 to amino acid residue 180 (encoded by exon 3); amino acid residue 103 to amino acid residue 166 (VWC domain); amino acid residue 167 to amino acid residue 198 (cysteine-free hinge) not encompassed by a corresponding C-terminal fragment of CTGF; amino acid residue 23 to amino acid residue 180 (encoded by exons 2 and 3); amino acid residue 27 to amino acid residue 166 (IGF-BP and VWC domains); and amino acid residue 23 to amino acid residue 198.

[0045] The terms "C-terminal fragment" and "C-fragment" used in reference to CTGF mean any polypeptide comprising sequences derived from the carboxy-terminal portion of a CTGF polypeptide, or to any variants, or fragments thereof. C-terminal fragments can include all, none, or portions of CTGF from the cysteine-free hinge region to the end of the protein. Further, CTGF C-terminal fragments can include all, none, or portions of the Thrombospondin Type 1 domain and/or the Cysteine-Knot motif. Further, C-terminal fragments of CTGF can be any fifteen or more contiguous amino acids contained within any preceding CTGF C-terminal fragment defined above.

[0046] In one aspect, "C-terminal fragment" or "C-fragment" of CTGF refers to polypeptide sequences derived from the carboxy-terminal portion of human CTGF. Such fragments can encompass the entire region from amino acid residue 181 to about amino acid residue 349 of SEQ ID NO:2. The boundary of the C-terminal fragment within the hinge region may be optionally defined by one of several protease cleavage sites defined in SEQ ID NO:2, such as chymotrypsin, plasmin, and bone morphogenetic protein-1 cleavage sites defined above. Additionally, C-terminal fragments of human CTGF can include all, none, or portions of the region from amino acid 201 to amino acid 242 of SEQ ID NO:2, amino acid 247 to amino acid 349 of SEQ ID NO:2, amino acid 248 to amino acid 349 of SEQ ID NO:2, or amino acid 249 to amino acid 346 of SEQ ID NO:2. Further, C-terminal fragments of human CTGF can be any fifteen or more contiguous amino acids contained within any preceding CTGF C-terminal fragment defined above.

[0047] In specific embodiments, the CTGF C-terminal fragments of the present invention comprise sequences selected from the following regions of human CTGF (SEQ ID NO:2) and orthologous fragments thereof derived from a different species, particularly a

WO 03/024308

PCT/US02/29500

mammalian species including rat, rabbit, bovine, ovine, porcine, murine, and equine: amino acid residue 181 to amino acid residue 251 (encoded by exon 4); amino acid residue 201 to amino acid residue 242 (thrombospondin type 1 motif); amino acid residue 252 to amino acid residue 349 (encoded by exon 5); amino acid residue 249 to amino acid residue 346 (cysteine knot domain); a portion of amino acid residue 167 to amino acid residue 198 (cysteine-free hinge) not encompassed by a corresponding N-terminal fragment of CTGF; amino acid residue 181 to amino acid residue 348 (encoded by exons 2 and 3); amino acid residue 201 to amino acid residue 346 (TP1 and CK domains); amino acid residue 247 to amino acid residue 348; and amino acid residue 248 to amino acid residue 348.

[0048] The terms "cysteine-free region" or "hinge region" of CTGF refer to any polypeptide derived from about amino acid residue 167 to about amino acid residue 198 of human CTGF (SEQ ID NO:2) and orthologous fragments thereof derived from a different species, particularly a mammalian species including rat, rabbit, bovine, ovine, porcine, murine, and equine .

[0049] "Amino acid sequence" or "polypeptide" or "polypeptides," as these terms are used herein, refer to oligopeptide, peptide, polypeptide, or protein sequences, and fragments thereof, and to naturally occurring or synthetic molecules. Polypeptide or amino acid fragments are any portion of a polypeptide which retains at least one structural and/or functional characteristic of the polypeptide. CTGF fragments include any portion of a CTGF polypeptide sequence which retains at least one structural or functional characteristic of CTGF. Where "amino acid sequence" refers to the polypeptide sequence of a naturally occurring protein molecule, "amino acid sequence" and like terms are not meant to limit the amino acid sequence to the complete native sequence associated with the protein molecule in question.

[0050] The terms "nucleic acid" or "polynucleotide" or "polynucleotides" refer to oligonucleotides, nucleotide sequences, or polynucleotides, or any fragments thereof, and to DNA or RNA of natural or synthetic origin which may be single- or double-stranded and may represent the sense or antisense strand, to peptide nucleic acid (PNA), or to any DNA-like or RNA-like material, natural or synthetic in origin. Polynucleotide fragments are any portion of a polynucleotide sequence that retains at least one structural or functional characteristic of the polynucleotide. Polynucleotide fragments can be of variable length, for example, greater than 60 nucleotides in length, at least 100 nucleotides in length, at least 1000 nucleotides in length, or at least 10,000 nucleotides in length.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

[0051] "Altered" polynucleotides include those with deletions, insertions, or substitutions of different nucleotides resulting in a polynucleotide that encodes the same or a functionally equivalent polypeptide. Included within this definition are sequences displaying polymorphisms that may or may not be readily detectable using particular oligonucleotide probes or through deletion of improper or unexpected hybridization to alleles, with a locus other than the normal chromosomal locus for the subject polynucleotide sequence.

[0052] "Altered" polypeptides may contain deletions, insertions, or substitutions of amino acid residues which produce a silent change and result in a functionally equivalent polypeptide. Deliberate amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues as long as the biological or immunological activity of the encoded polypeptide is retained. For example, negatively charged amino acids may include aspartic acid and glutamic acid; positively charged amino acids may include lysine and arginine; and amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity values may include leucine, isoleucine, and valine, glycine and alanine, asparagine and glutamine, serine and threonine, and phenylalanine and tyrosine.

[0053] A polypeptide or amino acid "variant" is an amino acid sequence that is altered by one or more amino acids from a particular amino acid sequence. A polypeptide variant may have conservative changes, wherein a substituted amino acid has similar structural or chemical properties to the amino acid replaced, *e.g.*, replacement of leucine with isoleucine. A variant may also have non-conservative changes, in which the substituted amino acid has physical properties different from those of the replaced amino acid, *e.g.*, replacement of a glycine with a tryptophan. Analogous minor variations may also include amino acid deletions or insertions, or both. Preferably, amino acid variants retain certain structural or functional characteristics of a particular polypeptide. Guidance in determining which amino acid residues may be substituted, inserted, or deleted may be found, for example, using computer programs well known in the art, such as LASERGENE software (DNASTAR Inc., Madison, WI).

[0054] A polynucleotide variant is a variant of a particular polynucleotide sequence that preferably has at least about 80%, more preferably at least about 90%, and most preferably at least about 95% polynucleotide sequence similarity to the particular polynucleotide sequence. It will be appreciated by those skilled in the art that as a result of the degeneracy of the genetic code, a multitude of variant polynucleotide sequences encoding a particular protein, some bearing minimal homology to the polynucleotide sequences of any

WO 03/024308

PCT/US02/29500

known and naturally occurring gene, may be produced. Thus, the invention contemplates each and every possible variation of polynucleotide sequence that could be made by selecting combinations based on possible codon choices. These combinations are made in accordance with the standard codon triplet genetic code, and all such variations are to be considered as being specifically disclosed.

[0055] A "deletion" is a change in an amino acid or nucleotide sequence that results in the absence of one or more amino acid residues or nucleotides.

[0056] The terms "insertion" or "addition" refer to a change in a polypeptide or polynucleotide sequence resulting in the addition of one or more amino acid residues or nucleotides, respectively, as compared to the naturally occurring molecule.

[0057] The term "functional equivalent" as it is used herein refers to a polypeptide or polynucleotide that possesses at least one functional and/or structural characteristic of a particular polypeptide or polynucleotide. A functional equivalent may contain modifications that enable the performance of a specific function. The term "functional equivalent" is intended to include fragments, mutants, hybrids, variants, analogs, or chemical derivatives of a molecule.

[0058] The term "microarray" refers to any arrangement of molecules, *e.g.* nucleic acids, amino acids, antibodies, etc., on a substrate. The substrate can be any suitable support, *e.g.*, beads, glass, paper, nitrocellulose, nylon, or any appropriate membrane, etc. A substrate can be any rigid or semi-rigid support including, but not limited to, membranes, filters, wafers, chips, slides, fibers, beads, including magnetic or nonmagnetic beads, gels, tubing, plates, polymers, microparticles, capillaries, etc. The substrate can provide a surface for coating and/or can have a variety of surface forms, such as wells, pins, trenches, channels, and pores, to which the nucleic acids, amino acids, etc., may be bound.

[0059] "Antigenicity" relates to the ability of a substance to, when introduced into the body, stimulate the immune response and the production of an antibody. An agent displaying the property of antigenicity is referred to as being antigenic. Antigenic agents can include, but are not limited to, a variety of macromolecules such as, for example, proteins, lipoproteins, polysaccharides, nucleic acids, bacteria and bacterial components, and viruses and viral components. Antigenic fragments refer to fragments of CTGF polypeptide, preferably, fragments of about five to fifteen amino acids in length, that retain at least one biological or immunological aspect of CTGF polypeptide activity.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

[0060] "Immunogenicity" relates to the ability to evoke an immune response within an organism. An agent displaying the property of immunogenicity is referred to as being immunogenic. Agents can include, but are not limited to, a variety of macromolecules such as, for example, proteins, lipoproteins, polysaccharides, nucleic acids, bacteria and bacterial components, and viruses and viral components. Immunogenic agents often have a fairly high molecular weight (usually greater than 10 kDa). Immunogenic fragments refer to fragments of CTGF polypeptide, preferably, fragments of about five to fifteen amino acids in length, that retain at least one biological or immunological aspect of CTGF polypeptide activity.

[0061] The term "antibody" refers immunoglobulins or antibodies obtained from any source including a cell line, or an animal such as mouse, rat, rabbit, chicken, turkey, goat, horse, human, etc. Antibodies may also be obtained from genetically modified cells, or transgenic plants or animals engineered to make antibodies that are not endogenous to the host. An antibody may be of any isotype including IgA, IgD, IgE, IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-4, or IgM. Further, the term "antibody" includes intact molecules and fragments thereof, such as Fab, F(ab')₂, and Fv fragments, which are capable of binding the epitopic determinant, and includes polyclonal or monoclonal antibodies. Antibody can also refer to chimeric antibodies, e.g., bivalent and trivalent antibodies, that bind to one or more unique antigen(s).

[0062] Antibodies that bind CTGF or fragments of CTGF can be prepared using intact polypeptides or using fragments containing small peptides of interest as the immunizing antigen. The polypeptide or oligopeptide used to immunize an animal can be derived from the translation of RNA, or synthesized chemically, and can be conjugated to a carrier protein if desired. Commonly used carriers chemically coupled to peptides include, for example, bovine serum albumin, thyroglobulin, and keyhole limpet hemocyanin (KLH).

[0063] The terms "disorders" and "diseases" are used inclusively and refer to any condition deviating from normal.

[0064] The phrase "CTGF-associated disorders" as used herein refers to conditions and diseases associated with abnormal or inappropriate expression or activity of CTGF. Abnormal expression of CTGF has been associated with cell proliferative disorders, such as those caused by endothelial cell proliferation or migration, tumor-like growths, general tissue scarring, and various diseases characterized by inappropriate deposition of extracellular matrix.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

[0065] CTGF-associated disorders include, but are not limited to, disorders involving angiogenesis and other proliferative processes which play central roles in conditions such as atherosclerosis, glaucoma, etc.; and cancer, including acute lymphoblastic leukemia, dermatofibromas, breast cancer, breast carcinoma desmoplasia, angioliopoma, angioleiomyoma, desmoplastic cancers, and prostate, ovarian, colorectal, pancreas, gastrointestinal, and liver cancer, and other tumor growth and metastases.

[0066] Further, CTGF-associated disorders include, but are not limited to, excessive scarring resulting from localized or systemic fibrosis, including chronic or acute fibrosis of organs such as the kidney, lungs, liver, eyes, heart, skin, etc. Such CTGF disorders include various fibrotic disorders, such as, for example, cardiac fibrosis, including cardiac reactive fibrosis or cardiac remodeling following myocardial infarction or congestive heart failure; pulmonary disorders, including interstitial pulmonary fibrosis, etc.; fibrosis associated with dialysis including peritoneal dialysis, *e.g.*, continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD); peridural fibrosis; kidney fibrosis; pulmonary fibrosis; interstitial fibrosis; skin fibrosis; and fibrosis resulting from acute or repetitive traumas, including surgery, chemotherapy, radiation treatment, allograft rejection, chronic and acute transplant rejection (*e.g.*, kidney, liver, or other organ); bronchiolitis obliterans, *e.g.*, following lung transplant; and inflammation and infection, *e.g.*, due to disease or injury.

[0067] Additionally, CTGF-associated disorders include, but are not limited to, sclerotic conditions, including systemic sclerosis, scleroderma, keloids, hypertrophic scarring, and other dermatological diseases and conditions; atherosclerosis, such as conditions involving atherosclerotic plaques and atherosclerosis associated with diabetes, including atherosclerosis associated with peritoneal dialysis; arteriosclerosis; arthritis, including rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and other joint inflammatory conditions, etc.; interstitial diseases, including interstitial fibrosis; Crohn's disease; inflammatory bowel disease; retinopathies, including, for example, proliferative vitreoretinopathy, non-proliferative diabetic retinopathy, proliferative diabetic retinopathy, and macular degeneration (including age-related and juvenile (Stargardt's) disease, and pigment epithelial detachment); nephropathies, including diabetic nephropathy, IgA-associated nephropathy, nephropathy due to toxicity, etc.; and conditions associated with chemical toxicity tubule destruction.

[0068] The "proliferative" processes and disorders referred to herein include pathological states characterized by the continual multiplication of cells resulting in an overgrowth of a cell population within a tissue. The cell populations are not necessarily transformed, tumorigenic or malignant cells, but can include normal cells as well. For

WO 03/024308

PCT/US02/29500

example, CTGF may be involved pathologically by inducing a proliferative lesion in the intimal layer of an arterial wall, resulting in atherosclerosis, or by stimulating neovascularization.

[0069] "Cancer" refers to any autonomous growth of tissue, including uncontrolled, abnormal growth of cells, or to any malignant tumor of potentially unlimited growth that expands locally by invasion and systemically by metastasis. Cancer also refers to any abnormal state marked by a cancer.

[0070] The term "fibrosis" refers to abnormal processing of fibrous tissue, or fibroid or fibrous degeneration. Fibrosis can result from various injuries or diseases, and can often result from chronic transplant rejection relating to the transplantation of various organs. Fibrosis typically involves the abnormal production, accumulation, or deposition of extracellular matrix components, including overproduction and increased deposition of, for example, collagen and fibronectin. "Fibrosis" is used herein in its broadest sense referring to any excess production or deposition of extracellular matrix proteins. There are numerous examples of fibrosis, including the formation of scar tissue following a heart attack, which impairs the ability of the heart to pump. Diabetes frequently causes damage/scarring in the kidneys which leads to a progressive loss of kidney function. Even after surgery, scar tissue can form between internal organs causing contracture, pain, and in some cases, infertility. Major organs such as the heart, kidney, liver, eye, and skin are prone to chronic scarring, commonly associated with other diseases. Hypertrophic scars (non-malignant tissue bulk) are a common form of fibrosis caused by burns and other trauma. In addition, there are a number of other fibroproliferative disorders, including scleroderma, keloids, and atherosclerosis, which are associated respectively with general tissue scarring, tumor-like growths in the skin, or sustained scarring of blood vessels which impairs blood carrying ability.

[0071] The term "sample" is used herein in its broadest sense. Samples may be derived from any source, for example, from bodily fluids, secretions, tissues, cells, or cells in culture including, but not limited to, saliva, blood, urine, serum, plasma, vitreous, synovial fluid, cerebral spinal fluid, amniotic fluid, and organ tissue (*e.g.*, biopsied tissue); from chromosomes, organelles, or other membranes isolated from a cell; from genomic DNA, cDNA, RNA, mRNA, etc.; and from cleared cells or tissues, or blots or imprints from such cells or tissues. Samples may be derived from any source, such as, for example, a human subject, or a non-human mammalian subject, etc. Also contemplated are samples derived from any animal model of disease. A sample can be in solution or can be, for example, fixed or bound to a substrate. A sample can refer to any material suitable for testing for the

WO 03/024308

PCT/US02/29500

presence of CTGF or of fragments of CTGF or suitable for screening for molecules that bind to CTGF or to fragments thereof. Methods for obtaining such samples are within the level of skill in the art.

[0072] The term "hybridization" refers to the process by which a nucleic acid sequence binds to a complementary sequence through base pairing. Hybridization conditions can be defined by, for example, the concentrations of salt or formamide in the prehybridization and hybridization solutions, or by the hybridization temperature, and are well known in the art. Hybridization can occur under conditions of various stringency.

[0073] In particular, reducing the concentration of salt, increasing the concentration of formamide, or raising the hybridization temperature can increase stringency. For example, for purposes of the present invention, hybridization under high stringency conditions might occur in about 50% formamide at about 37°C to 42°C, and under reduced stringency conditions in about 35% to 25% formamide at about 30°C to 35°C. In particular, hybridization generally occurs in conditions of highest stringency at 42°C in 50% formamide, 5X SSPE, 0.3% SDS, and 200 µg/ml sheared and denatured salmon sperm DNA.

[0074] The temperature range corresponding to a particular level of stringency can be further narrowed by methods known in the art, for example, by calculating the purine to pyrimidine ratio of the nucleic acid of interest and adjusting the temperature accordingly. To remove nonspecific signals, blots can be sequentially washed, for example, at room temperature or up to and including 60°C, under increasingly stringent conditions of up to 0.1X SSC and 0.5% SDS. Variations on the above ranges and conditions are well known in the art.

INVENTION

[0075] Presented herein is the discovery that specific fragments of CTGF can be detected and, further, can be quantitated, independently of CTGF or of other CTGF fragments. The present invention provides methods of reliably detecting and quantitating the levels of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF in biological samples. Furthermore, diagnosis, prognosis, and determination of the progression of various diseases and conditions, for example, diabetes; fibrosis including liver, renal, and pulmonary fibrosis; myocardial infarction; inflammatory joint disease; cancer; systemic sclerosis; angiogenesis; arteriosclerosis, atherosclerosis; transplant rejection; various eye diseases including diabetic retinopathy; limited and diffuse scleroderma; renal hypertension; and

WO 03/024308

PCT/US02/29500

conditions associated with peritoneal dialysis, etc., can also be accomplished using the compositions and methods described herein.

Connective Tissue Growth Factor

[0076] Connective tissue growth factor (CTGF) has been reported and described previously. (See, e.g., U.S. Patent No. 5,408,040; Bradham et al. (1991) *J Cell Biology* 114:1285-1294.) CTGF is a monomeric polypeptide with a molecular weight of approximately 36 to 38 kDa. CTGF is a member of a recently described family of cysteine-rich secreted proteins called the CCN family of growth factors (CTGF, Cyr-61, nov), characterized by the presence of highly conserved cysteine residues within distinct modular domains. These domains, each of which is encoded by a separate exon, exhibit homology to conserved regions found in a variety of extracellular matrix proteins. Specifically, within CTGF, these modules have structural similarity to the N-terminal cysteine-rich regions of insulin-like growth factor binding proteins (domain 1 of CTGF, encoded by exon 2); the Von Willebrand Factor type C domain, implicated in oligomerization (domain 2 of CTGF, encoded by exon 3); a thrombospondin type 1 motif, which may contain a cell attachment region and is believed to be involved in binding to extracellular matrix and sulfated glycoconjugates (domain 3 of CTGF, encoded by exon 4); and a C-terminal cysteine knot motif similar to that found in nerve growth factor, transforming growth factor- β (TGF β), and platelet derived growth factor (PDGF), which may be involved in receptor binding (domain 4 of CTGF, encoded by exon 5). (Bork (1993) *FEBS Lett* 327:125-130.)

[0077] Various fragments of CTGF have been shown to exhibit biological activities. (See, e.g., U.S. Patent No. 5,876,730; Brigstock et al. (1997) *J Biol Chem* 272:20275-20282; Ball et al. (1998) *Biol Reprod* 59:828-835; Steffen et al. (1998) *Growth Factors* 15:199-213; International Application No. WO 00/35939; and International Application No. WO 00/35936.) Fragments of CTGF have also been detected in human biological fluids, such as those derived from pregnancy serum, amniotic fluids, and peritoneal fluids, as well as in the conditioned media of cultured bovine endothelial cells. (Yang et al. (1998) *J Clin Endocrinol Metab* 83:2593-2596); Boes et al. (1999) *Endocrinology* 140:1575-1580.)

[0078] CTGF acts to promote fibroblast and other connective tissue cell proliferation, chemotaxis, migration, adhesion, and extracellular matrix formation. Evidence suggests aberrant expression or overproduction of CTGF plays a major role in pathways that lead to fibrotic disorders, including fibrosis of major organs, fibroproliferative diseases, and scarring. CTGF produces effects on a variety of cell types, including, for example, connective tissue cells (e.g., fibroblasts, myofibroblasts, etc.), vascular endothelial cells,

WO 03/024308

PCT/US02/29500

epithelial cells, neuronal cells, vascular smooth muscle cells, and more specialized connective tissue cells, such as cells of bone, cartilage, and other supportive skeletal tissues. (See, *e.g.*, Moussad and Brigstock (2000) *Mol Genet Metab* 71:276-292.)

[0079] The present disclosure relates to the discovery that levels of certain fragments of CTGF are elevated in certain conditions. In a particular aspect, the present invention demonstrates that in certain conditions N-terminal fragments of CTGF are more readily detected, *e.g.*, in biological fluids, etc., than CTGF or C-terminal fragments of CTGF. Although the invention is not limited to any particular mechanism by which fragments of CTGF accumulate, the N-terminal fragments may be more stable because they are less prone to proteolytic degradation, less prone to clearance or elimination, and/or less prone to non-specific binding or adsorption. Accordingly, detection of N-terminal fragments of CTGF can provide finer specificity and reproducibility for elucidating the mechanisms and sites of action of this polypeptide. In addition, the present disclosure establishes that aberrant levels of CTGF, particularly N-terminal fragments of CTGF, can be associated with both the presence of disease and the severity of disease. Thus, the present invention provides novel and superior methods for diagnosis, prognosis, and therapeutic monitoring of certain diseases associated with CTGF and CTGF fragment expression.

[0080] Accordingly, in one aspect, the present invention relates to use of N-terminal fragments of a CTGF polypeptide for detection (qualitative or quantitative) of CTGF and for prognosis, diagnosis, and therapeutic monitoring of CTGF-associated disorders. In another aspect, the present invention relates to use of C-terminal fragments of a CTGF polypeptide for detection (qualitative or quantitative) of CTGF and for prognosis, diagnosis, and therapeutic monitoring of CTGF-associated disorders. CTGF, N-terminal fragments of CTGF, or C-terminal fragments of CTGF can be detected, identified, and quantified in any number of ways as provided by the present invention.

[0081] The present invention contemplates that, in some embodiments, the C-terminal and N-terminal fragments of CTGF are variants of specific C-terminal and N-terminal fragments of CTGF, which may be constructed by mutating the polynucleotide sequences encoding the fragment of interest to give an amino acid sequence that does not occur in nature. Amino acid alterations can be made at sites that differ in subunits from different species (variable positions) or in highly conserved regions (constant regions). Sites at such locations will typically be modified in series, *e.g.*, by substituting first with conservative choices (*e.g.*, hydrophobic amino acid to a different hydrophobic amino acid) and then with more distant choices (*e.g.*,

WO 03/024308

PCT/US02/29500

hydrophobic amino acid to a charged amino acid), and then deletions or insertions may be made at the target site.

[0082] The polypeptides described herein, for example, those useful in generating CTGF N-terminal or CTGF C-terminal specific antibodies, can be isolated or produced using any of the numerous methods known in the art to synthesize the desired N-terminal or C-terminal fragments of CTGF amino acid sequence at least in part. For example, peptides can be synthesized by solid phase techniques, cleaved from the resin, and purified by preparative high performance liquid chromatography. The composition of the synthetic peptides may be confirmed, for example, by amino acid analysis, mass spectrometry, or sequencing.

[0083] Polymerase chain reaction (PCR) may also be used to create amino acid sequence variants of CTGF and fragments thereof. When small amounts of template DNA are used as starting material, a primer or primers that differ slightly in sequence from the corresponding region in the template DNA can generate the desired amino acid variant. PCR amplification results in a population of product DNA fragments that differ from the polynucleotide template encoding the CTGF or fragment thereof at the position specified by the primer. The product DNA fragments replace the corresponding region in the plasmid and this gives the desired amino acid variant. Further techniques for generating amino acid variants include the cassette mutagenesis technique described in Wells et al. (1985, *Gene* 34:315) and other mutagenesis techniques well known in the art, such as, for example, the techniques described generally in Maniatis, T. et al., *supra*; and Ausubel, F.M. et al., *supra*.

[0084] In an alternate embodiment of the invention, the coding sequence of the CTGF polypeptide of the invention can be synthesized in whole or in part, using chemical methods well known in the art. (See, for example, Caruthers et al. (1980) *Nucleic Acids Symp Ser* 7:215-233; Crea and Horn (1980) *Nucleic Acids Res* 9:2331; Matteucci and Caruthers (1980) *Tetrahedron Letters* 21:719; and, Chow and Kempe (1981) *Nucleic Acids Res* 9:2807-2817.)

Detection of CTGF, N-terminal Fragments of CTGF, and C-terminal Fragments of CTGF

[0085] The present invention provides methods for detecting and/or quantitating levels of CTGF polypeptides (e.g., CTGF, N-terminal fragments of CTGF, C-terminal fragments of CTGF) in a sample. The methods provided are not limited to the detection and quantitation of human CTGF polypeptides, but can be used for the detection of CTGF from other species, such as, for example, detecting and quantitating non-human mammalian CTGF. (See, Figure 16.) For instance, detection and quantitation CTGF, including endogenous

WO 03/024308

PCT/US02/29500

CTGF and exogenous CTGF from the same or a different species, may be useful in animal models of CTGF-associated disorders and other various diseases. In one aspect, a method for detecting CTGF in a biological sample is provided, the method involving obtaining a sample and detecting in the sample CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF. In another aspect, a method for quantitating the levels of CTGF in a biological sample is provided, the method comprising obtaining a sample and quantitating in the sample the levels of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF. (See, *e.g.*, Figure 1C.)

[0086] In one aspect, the assays are based on the detection of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF, using antibodies produced against these polypeptides. (See, *e.g.*, Figure 1A.) The assays may also include nucleic acid-based assays (typically based upon hybridization), or any other of the various assaying techniques known in the art. In a preferred embodiment, the present methods are characterized by the ability of the polypeptides (*e.g.*, CTGF, N-terminal fragments of CTGF, C-terminal fragments of CTGF) of the present invention to be bound by antibodies specific for the polypeptides, and the ability of antibodies produced against the proteins of the present invention to bind to CTGF polypeptides. Other methods of detecting CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF standard in the art are contemplated herein. For example, any agent that binds to or interacts with CTGF or with fragments of CTGF could be used, such as heparin, a receptor to CTGF or to fragments of CTGF, or any other CTGF binding agent.

[0087] According to the present invention, various immunoassay techniques can be used to detect and quantitate the levels of CTGF and of CTGF fragments in a sample. In one embodiment, an ELISA assay is used to identify and distinguish the levels of CTGF and of different CTGF fragments and to compare the amount of CTGF to that of different CTGF fragments within a particular sample. In certain embodiments, the ELISA can be used to detect, quantitate, and compare levels of CTGF and of CTGF fragments found in conditioned media from cultured cells, as well as in blood, serum, plasma, peritoneal effluent, urine, vitreous, synovial fluid, cerebral spinal fluid, saliva, and other biological samples in which detection and quantitation of CTGF and of fragments of CTGF would be desired.

[0088] In certain aspects, improved and more sensitive detection and quantitation of CTGF is achieved by detecting N-terminal fragments of CTGF as compared to detecting C-terminal fragments of CTGF or CTGF. The use of N-terminal fragments of CTGF allows for detection of disease severity that permits more accurate diagnosis, prognosis, and monitoring of therapeutic efficacies of CTGF-associated disorders.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

[0089] The methods provided by the present invention are also useful for the detection and quantitation of any of the members of the CCN family of polypeptides (such as, for example, CTGF, CYR61, Nov, Elm1/WISP-1, HICP/rCOP-1, CTGF-3/WISP-2, and WISP-3) and fragments thereof, and in the detection, diagnosis, prognosis, and monitoring of therapeutic efficacy of various diseases and disorders associated with CCN family members. (See, e.g., Brigstock (1999) *Endocrine Reviews* 20:189-206; and Perbal (2001) *Mol. Pathol.* 54:57-79.)

Antibodies

[0090] In preferred embodiments of the present invention, methods for detection, measurement, diagnosis, prognosis, monitoring, and evaluation of diseases and disorders, and therapeutic treatments thereof, associated with increased or decreased expression or activity of CTGF or fragments thereof involve the use of antibodies which specifically react with a CTGF epitope or epitopes.

[0091] Polypeptides used to generate suitable antibodies can be generated in a variety of ways, for example, by generation of synthetic peptides, by enzymatic cleavage of CTGF (e.g., by chymotrypsin treatment), by chemical cleavage of CTGF, by recombinant expression of CTGF or fragments thereof, or by isolation from a human or other mammalian source. Thus, cells that express CTGF (such as MG-63 cells), host cells transfected with CTGF coding sequences, purified CTGF, C-terminal fragments of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, or epitopes therein may be used as immunogens to elicit an immune response in animal hosts for the generation of antibodies specific for the desired region of CTGF. For recombinantly produced polypeptides, suitable expression vectors and systems are known to those of skill in the art and include eukaryotic and prokaryotic expression systems, as described, for example, in Maniatis et al., *supra*, and Ausubel et al., *supra*.

[0092] Target polypeptides, such as, for example, N-terminal fragments of CTGF or C-terminal fragments of CTGF, can be evaluated to determine regions of high immunogenicity. Methods of analysis and epitope selection are well-known in the art. (See, e.g., Ausubel et al., *supra*) Analysis and selection can also be accomplished, for example, by various software packages, such as LASERGENE NAVIGATOR software. (DNASTAR; Madison, WI.) The peptides or fragments used to induce antibody production should be antigenic, but need not necessarily be biologically active. Preferably, an antigenic fragment or peptide is at least five amino acids in length, more preferably, at least ten amino acids in length, and most preferably, at least fifteen amino acids in length. It is preferable that the

WO 03/024308

PCT/US02/29500

antibody-inducing fragment or peptide is identical to at least a portion of the amino acid sequence of the target polypeptide, e.g., N-terminal regions or domains of CTGF or C-terminal regions or domains of CTGF. A peptide or fragment that mimics at least a portion of the sequence of the naturally occurring target polypeptide can also be fused with another protein, e.g., keyhole limpet hemocyanin (KLH), and antibodies can be produced against the chimeric molecule.

[0093] Methods for the production of antibodies are well known in the art. For example, various hosts, including goats, rabbits, rats, mice, chickens, turkeys, humans, and others, may be immunized by injection with the target polypeptide or any immunogenic fragment or peptide thereof. Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's adjuvant, mineral gels such as aluminum hydroxide, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, and KLH. Among adjuvants used in humans, aluminum hydrogels, BCG (bacilli Calmette-Guerin) and *Corynebacterium parvum* are especially preferable.

[0094] Monoclonal antibodies may be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. Techniques for *in vivo* and *in vitro* production of either monoclonal or polyclonal antibodies are well known in the art. (See, e.g., Pound (1998) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJ; Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2nd Edition, Academic Press; Schook (1987) Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc.) The production of chimeric antibodies is also well known in the art, as is the production of single-chain antibodies. (See, e.g., Morrison et al. (1984) Proc Natl Acad Sci 81:6851-6855; Neuberger et al. (1984) Nature 312:604-608; Takeda et al. (1985) Nature 314:452-454.) Antibodies with related specificity, but of distinct idiotypic composition, may be generated, for example, by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries. (See, e.g., Burton (1991) Proc Natl Acad Sci 88:11120-11123.)

[0095] Antibodies may also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents. (See, e.g., Orlandi et al. (1989) Proc Natl Acad Sci 86:3833-3837; Winter and Milstein (1991) Nature 349:293-299.) Antibody fragments that contain specific binding sites for the target polypeptide may also be generated. Such antibody fragments include, but are not limited to, F(ab)₂ fragments, which can be produced by pepsin digestion of the

WO 03/024308

PCT/US02/29500

antibody molecule, and Fab fragments, which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab)₂ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity. (See, *e.g.*, Huse et al. (1989) *Science* 254:1275-1281.)

[0096] Alternatively, human somatic cells capable of producing antibody, specifically B lymphocytes, are suitable for fusion with myeloma cell lines. B lymphocytes from peripheral blood, or from biopsied spleens, tonsils, or lymph nodes of an individual may be used. In addition, human B cells may be directly immortalized by the Epstein-Barr virus. (Cole et al. (1995) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96.)

[0097] Myeloma cell lines suited for use in hybridoma-producing fusion procedures preferably are non-antibody-producing, have high fusion efficiency, and enzyme deficiencies that render them incapable of growing in certain selective media which support the growth of the desired hybridomas. Examples of myeloma cell lines that may be used for the production of fused cell lines that may be in the present invention include P3X63Ag8, P3X63Ag8-653, NS1/I.Ag 4.1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7, S194/5XX0 Bal, all derived from mice; R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F and 4B210, all derived from rats; and U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2, UC729-6, all derived from humans. (See, *e.g.*, Goding, *supra*, pp. 65-66; Campbell (1984) Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13 (Burden and Von Knippenberg, eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 75-83)

[0098] In the present invention, "human" or "humanized" antibodies directed to CTGF or to fragments thereof can also be used. Humanized antibodies are antibodies, or antibody fragments, that have the same or similar binding specificity as a parent antibody, (*e.g.*, of mouse origin) and increased human characteristics. Humanized antibodies may be obtained, for example, by chain shuffling or by using phage display technology. For example, a polypeptide comprising a heavy or light chain variable domain of a non-human antibody specific for CTGF or fragments thereof is combined with a repertoire of human complementary (light or heavy) chain variable domains. Hybrid pairings specific for the antigen of interest are selected. Human chains from the selected pairings may then be combined with a repertoire of human complementary variable domains (heavy or light) and humanized antibody polypeptide dimers can be selected for binding specificity for an antigen. Techniques described for generation of humanized antibodies that can be used in the method of the present invention are disclosed in, for example, U.S. Patent Nos. 5,565,332; 5,585,089;

WO 03/024308

PCT/US02/29500

5,694,761; and 5,693,762. Furthermore, techniques described for the production of human antibodies in transgenic mice are described in, for example, U.S. Patent Nos. 5,545,806 and 5,569,825.

[0099] Antibodies produced as described herein can be used to identify CTGF or fragments thereof in, *e.g.*, blood, serum, plasma, urine, vitreous, synovial fluid, cerebral spinal fluid, saliva, biopsies from specific tissues, etc., or other biological samples, cell culture samples, or assay samples. The amount of a particular polypeptide present could be determined, for example, by quantitative image analysis. Alternatively, the mRNA of the target polypeptide could be determined, such as by reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR) using a biological sample. In particular, in this method, mRNA from, for example, a tissue sample in total, or that encodes the target polypeptide or fragments thereof, could be reverse transcribed to DNA and then amplified through PCR using specific primer sequences. Quantitation of mRNA could be determined, for example, by a competition reaction using equal volumes of the patient sample run against a series of decreasing known concentrations, *e.g.*, of a mimic or mutant cDNA fragment.

CTGF Assays

[00100] Preferred assays for detecting CTGF polypeptides, particularly CTGF, N-terminal fragments of CTGF polypeptides, or C-terminal fragments of CTGF polypeptides, are performed using monoclonal or polyclonal antibodies. A variety of assays can be utilized in order to detect antibodies that specifically bind to the desired protein from a sample, or to detect the desired protein bound to one or more antibodies from the sample. Exemplary assays are described in detail in Harlow and Lane, *supra*; Burtis and Ashwood (1999) Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd edition, W.B. Saunders, Philadelphia; and Kaplan, Pesce, and Kazmierczak (1996) Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation, 3rd edition, Mosby, St. Louis. Representative examples of such assays include: countercurrent immunoelectrophoresis (CIEP) assays, radioimmunoassays, radioimmunoprecipitations, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), dot blot assays, inhibition or competition assays, sandwich assays, immunostick (dip-stick) assays, simultaneous assays, immunochromatographic assays, immunofiltration assays, latex bead agglutination assays, immunofluorescent assays, biosensor assays, and low-light detection assays (see, *e.g.*, U.S. Patent. Nos. 4,376,110 and 4,486,530; also see, Goding, *supra*).

[00101] A fluorescent antibody test (FA-test) uses a fluorescently labeled antibody (*e.g.*, antibody directed to the N-terminal region of CTGF) able to bind to one of the proteins. Detection can be accomplished using fluorescence microscopy and visual determinations,

WO 03/024308

PCT/US02/29500

yielding a qualitative result. In one embodiment, this assay is used for the examination of tissue samples or histological sections.

[00102] In latex bead agglutination assays, antibodies are conjugated to latex beads. The antibodies conjugated to the latex beads are then contacted with a sample under conditions permitting the antibodies to bind to desired proteins in the sample. Qualitative or quantitative result can be determined.

[00103] Enzyme immunoassays (EIA) include a number of different assays able to utilize the antibodies and detect CTGF. For example, a heterogeneous indirect EIA uses a solid phase coupled with an antibody to CTGF and an affinity purified, anti-IgG immunoglobulin preparation. Preferably, the solid phase is a polystyrene microtiter plate. The antibodies and immunoglobulin preparation are then contacted with the sample under conditions permitting antibody binding, which conditions are well known in the art. The results of such an assay can be assessed visually, but are preferably determined using a spectrophotometer, such as an ELISA plate reader, to yield a quantitative result. An alternative solid phase EIA format includes plastic-coated ferrous metal beads able to be moved during the procedures of the assay by means of a magnet. Yet another alternative is a low-light detection immunoassay format. In this highly sensitive format, the light emission produced by appropriately labeled bound antibodies are quantitated automatically. Preferably, the reaction is performed using microtiter plates.

[00104] In an alternative embodiment, a radioactive tracer is substituted for the enzyme-mediated detection in an EIA to produce a radioimmunoassay (RIA), using methods known to one of skill in the art.

[00105] Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) can also be performed. In one embodiment, the ELISA comprises the following steps: (1) coating a CTGF polypeptide (e.g., N-terminal fragment of CTGF, C-terminal fragment of CTGF) of the present invention onto a solid phase; (2) incubating a sample suspected of containing CTGF antibodies with the polypeptide coated onto the solid phase under conditions that allow the formation of an antigen-antibody complex; (3) adding an anti-antibody (such as anti-IgG) conjugated with a label to be captured by the resulting antigen-antibody complex bound to the solid phase; and, (4) measuring the captured label and determining therefrom whether the sample has CTGF antibodies.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

[00106] In a capture-antibody sandwich enzyme assay, the desired protein is bound between an antibody attached to a solid phase, preferably a polystyrene microtiter plate, and a labeled antibody. Preferably, the results are measured using a spectrophotometer, such as an ELISA plate reader. In a sequential assay format, reagents are allowed to incubate with the capture antibody in a stepwise fashion. The test sample is first incubated with the capture antibody. Following a wash step, incubation with the labeled antibody occurs. In a simultaneous assay, the two incubation periods described in the sequential assay are combined. This eliminates one incubation period plus a wash step.

[00107] A dipstick/immunostick format is essentially an immunoassay except that the solid phase, instead of being a polystyrene microtiter plate, is a polystyrene paddle or dipstick. Reagents are the same and the format can either be simultaneous or sequential.

[00108] In a chromatographic strip test format, a capture antibody and a labeled antibody are dried onto a chromatographic strip, which is typically nitrocellulose or nylon of high porosity bonded to cellulose acetate. The capture antibody is usually spray dried as a line at one end of the strip. At this end there is an absorbent material that is in contact with the strip. At the other end of the strip the labeled antibody is deposited in a manner that prevents it from being absorbed into the membrane. Usually, the label attached to the antibody is a latex bead or colloidal gold. The assay may be initiated by applying the sample immediately in front of the labeled antibody.

[00109] Immuno-filtration/immuno-concentration formats combine a large solid phase surface with directional flow of sample/reagents, which concentrates and accelerates the binding of antigen to antibody. In a preferred format, the test sample is pre-incubated with a labeled antibody then applied to a solid phase such as fiber filters or nitrocellulose membranes or the like. The solid phase can also be pre-coated with latex or glass beads coated with capture antibody. Detection of analyte is the same as standard immunoassay. The flow of sample/reagents can be modulated by either vacuum or the wicking action of an underlying absorbent material.

[00110] A threshold biosensor assay is a sensitive, instrumented assay amenable to screening large numbers of samples at low cost. In one embodiment, such an assay comprises the use of light addressable potentiometric sensors wherein the reaction involves the detection of a pH change due to binding of the desired protein by capture antibodies, bridging antibodies and urease-conjugated antibodies. Upon binding, a pH change is effected that is measurable by translation into electrical potential. The assay typically occurs in a very small

WO 03/024308

PCT/US02/29500

reaction volume, and is very sensitive. Moreover, the reported detection limit of the assay can be 1,000 molecules of urease per minute.

Methods of Diagnosis, Prognosis, Prevention, and Treatment

[00111] The present invention provides for methods of diagnosing, prognosing, and monitoring therapeutic treatment and efficacy based on detecting and/or measuring the levels of CTGF, CTGF N-terminal fragments, and CTGF C-terminal fragments. In certain conditions, N-terminal fragments of CTGF are more stable than CTGF or C-terminal fragments of CTGF and, in such circumstances, can be used to provide more sensitive and accurate detection and quantitation of CTGF and CTGF fragment levels in a sample.

[00112] In one aspect, the invention provides a method for diagnosing a CTGF-associated disorder. In one embodiment, the method for diagnosing a CTGF-associated disorder involves obtaining a sample and detecting and quantitating in the sample the levels of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, or C-terminal fragments of CTGF; comparing the levels of CTGF or of any fragments of CTGF in the sample to that of a standard amount of CTGF or of fragments of CTGF, wherein an increased or decreased amount of CTGF or of fragments of CTGF in the sample is indicative of the presence of a CTGF-associated disorder. Disorders associated with aberrant (*e.g.*, increased or decreased) levels of CTGF or of fragments of CTGF include, but are not limited to, proliferative disorders and disorders associated with altered expression and deposition of extracellular matrix-associated proteins. Such disorders include, for example, cancers such as breast, prostate, ovarian, colorectal, pancreatic, and gastrointestinal cancer; and atherosclerosis, arthritis, retinopathies such as diabetic retinopathy; nephropathies such as diabetic nephropathy; cardiac, pulmonary, liver, and kidney fibrosis, and diseases associated with chronic inflammation and/or infection. CTGF-associated disorders are also associated with conditions such as myocardial infarction, diabetes, peritoneal dialysis, chronic and acute transplant rejection, chemotherapy, radiation therapy, and surgery. Additional CTGF-associated disorders are described *supra*.

[00113] Methods are also provided for identifying whether or not an individual has a predisposition to develop a CTGF-associated disorder. In one embodiment, the method for identifying a predisposition to a CTGF-associated disorder involves obtaining a sample and detecting and quantitating in the sample the levels of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, or C-terminal fragments of CTGF; comparing the levels of CTGF or of any fragments of CTGF in the sample to that of a standard amount of CTGF or of fragments of CTGF, wherein an increased or decreased amount of CTGF or of fragments of CTGF in the sample is indicative of the presence of a CTGF-associated disorder.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

[00114] In another aspect, the invention provides a method for monitoring the progression of a CTGF-associated disorder, the method comprising obtaining a sample; detecting and quantitating the level of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, or C-terminal fragments of CTGF in the sample; and comparing the levels of CTGF or of fragments of CTGF in the sample with a known standard amount of CTGF or of fragments of CTGF, or with a first level of CTGF or fragments of CTGF in a sample obtained from the same individual or source at an earlier or previous time, or at an earlier stage in the progression of a disease, wherein a difference between the level of CTGF or fragments of CTGF in the sample and the standard or first level is indicative of the progression of a CTGF-associated disorder.

[00115] In another aspect, the invention provides a method for determining the prognosis of the course of a CTGF-associated disorder, the method comprising obtaining a sample; detecting and quantitating the levels of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, or C-terminal fragments of CTGF in the sample; and comparing the level of CTGF or of fragments of CTGF in the sample with that measured in a sample from the individual obtained at a previous time, or at an earlier stage in the progression of a disease, wherein a difference between the level of CTGF or of fragments of CTGF in the sample taken at one time and the level of CTGF or of fragments of CTGF in the sample taken at another time is determinant of the prognosis of the course of a CTGF-associated disorder.

[00116] In another aspect, the invention provides a method for monitoring the therapeutic efficacy of treatment of a CTGF-associated disorder, the method involving obtaining a sample from a subject having a CTGF-associated disorder and receiving treatment for that disorder; detecting and quantitating the levels of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, or C-terminal fragments of CTGF in the sample; and comparing the level of CTGF or of fragments of CTGF in the sample with a standard level of CTGF or of fragments of CTGF, wherein a difference between the level of CTGF or of fragments of CTGF in the sample and the standard level is indicative of the therapeutic efficacy of treatment of a CTGF-associated disorder.

[00117] In another aspect, the invention provides a method for monitoring the therapeutic efficacy of treatment of a CTGF-associated disorder, the method comprising obtaining a sample; detecting and quantitating the levels of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, or C-terminal fragments of CTGF in the sample; and comparing the level of CTGF or of fragments of CTGF in the sample with that in a sample taken from the individual at a previous time, or in a sample or samples obtained sequentially over time, or at an earlier stage

WO 03/024308

PCT/US02/29500

in the progression of a disease, wherein a difference between the level of CTGF or of fragments of CTGF in the sample taken at one time and the level of CTGF or of fragments of CTGF in the sample taken at another time are indicative of the therapeutic efficacy of treatment of a CTGF-associated disorder.

[00118] In yet another aspect, a method for identifying a disorder associated with increased levels of CTGF or of fragments of CTGF is provided, the method involving obtaining a first sample from a subject having a particular disorder; obtaining a second sample from a subject without a particular disorder; detecting and quantitating the levels of CTGF or of fragments of CTGF in the first sample; detecting and quantitating the level of CTGF or of fragments of CTGF in the second sample; and comparing the level of CTGF or of fragments of CTGF in the first sample with the level of CTGF or of fragments of CTGF in the second sample, wherein an increased level of CTGF or of fragments of CTGF in the first sample is indicative of a disorder associated with increased levels and activity of CTGF.

[00119] In yet another aspect, a method for identifying a disorder associated with decreased levels of CTGF or of fragments of CTGF is provided, the method involving obtaining a first sample from a subject having a particular disorder; obtaining a second sample from a subject without a particular disorder; detecting and quantitating the level of CTGF or of fragments of CTGF in the first sample; detecting and quantitating the level of CTGF or of fragments of CTGF in the second sample; and comparing the level of CTGF or of fragments of CTGF in the first sample with the level of CTGF or of fragments of CTGF in the second sample, wherein a reduced level of CTGF or of fragments of CTGF in the first sample is indicative of a disorder associated with reduced levels and activity of CTGF.

Compound Screening and Identification

[00120] The present invention further provides methods of screening for and identifying compounds that decrease or increase the expression, levels, or activity of CTGF or fragments of CTGF (*e.g.*, N-terminal fragments of CTGF, C-terminal fragments of CTGF, etc.).

[00121] In one aspect, a method of screening for compounds that increase the expression, level, or activities of CTGF fragments (*e.g.*, N-terminal fragments of CTGF, C-terminal fragments of CTGF, etc.) is provided, the method involving obtaining a sample; contacting the sample with a compound; and detecting and measuring CTGF and CTGF fragment expression, level, or activity in the sample, wherein increased CTGF fragment

WO 03/024308

PCT/US02/29500

expression, level, or activity is indicative of a compound having activity that increases CTGF fragment expression, levels, or activity.

[00122] In another aspect, a method of screening for compounds that decrease the expression, level, or activities of CTGF fragments (*e.g.*, N-terminal fragments of CTGF, C-terminal fragments of CTGF) is provided, the method involving obtaining a sample; contacting the sample with a compound; and detecting and measuring CTGF and CTGF fragment expression, levels, or activity in the sample, wherein decreased CTGF fragment expression, level, or activity is indicative of a compound having activity that decreases CTGF fragment expression, levels, or activity.

[00123] Compounds can be identified by any of a variety of screening techniques known in the art. Such screening methods may allow for CTGF polypeptides or the compounds to be free in solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, associated with extracellular matrix, or located intra-cellularly. For example, microarrays carrying test compounds can be prepared, used, and analyzed using methods available in the art. (See, *e.g.*, Shalon et al. (1995) PCT Application No. WO95/35505; Baldeschweiler et al. (1995) PCT Application No. WO95/251116; Brennan et al. (1995) U.S. Patent No. 5,474,796; Heller et al. (1997) U.S. Patent No. 5,605,662.)

[00124] Various assays and screening techniques can be used to identify small molecules that modulate (*e.g.*, increase or decrease) the expression, level, or activity of CTGF or fragments of CTGF (*e.g.*, N-terminal fragments of CTGF, C-terminal fragments of CTGF). These methods can also serve to identify antibodies and other compounds that interact with or affect the expression, level, or activity of CTGF or fragments of CTGF, and can therefore be used as drugs and therapeutics in the present methods. (See, *e.g.*, Enna et al. (1998) Current Protocols in Pharmacology, John Wiley and Sons.) Assays will typically provide for detectable signals associated with the binding of the compound to a protein or cellular target. Binding can be detected by, for example, fluorophores, enzyme conjugates, and other detectable labels well known in the art. The results may be qualitative or quantitative.

[00125] In any of the methods described herein, samples may be obtained from cells in culture, or from a mammal, preferably from a human subject. Samples may be obtained, for example, from conditioned media of cultured cells, or from blood, urine, serum, plasma, vitreous, synovial fluid, cerebral spinal fluid, saliva, amniotic fluid, or obtained from biopsy of tissue. Any one of a variety of methods known in the art can be used to detect and quantitate the levels of CTGF or of fragments thereof. Such methods include, but are not

WO 03/024308

PCT/US02/29500

limited to, for example, the use of antibodies directed to N-terminal fragments or C-terminal fragments of CTGF; isolation of N-terminal fragments or C-terminal fragments of CTGF (e.g., using mass spectrometry, liquid chromatography, polyacrylamide gel electrophoresis, western blot analysis, or other conventional chemical analyses, etc.); or any other of the methods and procedures known to one of skill in the art. In certain aspects, the methods involve detection of N-terminal regions/domains of CTGF or C-terminal regions/domains of CTGF included within CTGF. In another aspect, the methods comprise measuring the level of N-terminal fragments of CTGF which have been separated (e.g., cleaved) and are distinct from C-terminal regions of CTGF or from CTGF, or measuring the level of C-terminal fragments of CTGF which have been separated (e.g., cleaved) and are distinct from N-terminal regions of CTGF or from CTGF.

[00126] These and other embodiments of the present invention will readily occur to those of ordinary skill in the art in view of the disclosure herein.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

EXAMPLES

[00127] The invention will be further understood by reference to the following examples, which are intended to be purely exemplary of the invention. These examples are provided solely to illustrate the claimed invention. The present invention is not limited in scope by the exemplified embodiments, which are intended as illustrations of single aspects of the invention only. Any methods which are functionally equivalent are within the scope of the invention. Various modifications of the invention in addition to those described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and accompanying figures. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

Example 1: Production of recombinant human CTGF

[00128] Recombinant human CTGF (rhCTGF) was prepared as follows. A full-length human CTGF cDNA (DB60R32) was obtained from Dr. Gary Grotendorst (University of Miami Medical School). (Bradham et al. (1991) J Cell Biol 114:1285-1294.) A CTGF cDNA comprising only the open reading frame was generated by the polymerase chain reaction using DB60R32 DNA as template and the following primers (5'-gtctcgcccgccagtgggcatgaccgccgcc-3' (SEQ ID NO:3) and 5'-ggatccggatcctcatgccatgtctccgta-3') (SEQ ID NO:4), which added BamHI restriction enzyme sites (underlined) to either end of the amplified product. The resulting amplified DNA fragment was digested with BamHI, purified on an agarose gel, and subcloned directly into the BamHI site of the baculovirus (donor) expression plasmid pFastBac1 (Invitrogen, Carlsbad CA). The pFastBac1/CTGF cDNA vector construct was transposed into bacmid DNA and recombinant baculovirus was generated by following the manufacturer's protocol outlined in the BAC-TO-BAC Baculovirus Expression System manual (Invitrogen). Expansion of recombinant baculovirus titers in Sf9 insect cells was performed using standard procedures known in the art. (Murphy and Pivnicka-Worms, (1984) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2 (Ausubel et al., Eds.) John Wiley & Sons, Inc.)

[00129] Expression and production of rhCTGF was performed as follows. HIGH FIVE insect cells, adapted to suspension growth, were grown in SF900II medium (Invitrogen) to a cell density of 1.0×10^6 cells/ml. The cells were then infected with baculovirus containing CTGF at a multiplicity of infection of 10:1. Following infection, the cells were incubated at 27°C for 40 hours. The cells were then pelleted by centrifugation, and the CTGF-containing conditioned medium was collected and filtered through a 0.22 µm filter. The conditioned medium was then directly applied to a 5 ml Hi-Trap heparin column

WO 03/024308

PCT/US02/29500

(Amersham Biosciences Corp., Piscataway NJ), which had been pre-equilibrated with 50 mM Tris, pH 7.2. The heparin column was then washed with 100 ml of 350 mM NaCl/50 mM Tris, pH 7.2, and bound CTGF was eluted with a linear gradient of 350 mM NaCl to 1200 mM NaCl over 15 column volumes. Fractions were analyzed for the presence of CTGF by SDS-PAGE.

[00130] Fractions containing CTGF were pooled and diluted 1:4 with 50 mM Tris, pH 7.5. The CTGF pool was loaded over a carboxy methyl (CM) ion exchange column (POROS CM column, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA), which had been pre-equilibrated with 10 column volumes of 50 mM Tris, pH 7.5. The CM column was washed with 350 mM NaCl/50 mM Tris, pH 7.5, and bound CTGF was eluted with a linear gradient of 350 mM NaCl to 1200 mM NaCl over 15 column volumes. The fractions were analyzed for the presence of CTGF by SDS-PAGE. Fractions containing CTGF were pooled and used as CTGF material.

Example 2: CTGF N-terminal and C-terminal fragment production

[00131] N-terminal fragments and C-terminal fragments of CTGF were prepared as follows. Recombinant human CTGF, prepared and purified as described above, was digested by treatment with chymotrypsin beads (Sigma Chemical Co., St. Louis MO), using 1.5 mg of CTGF per unit of chymotrypsin. Chymotrypsin treatment of rhCTGF was allowed to proceed at room temperature for 6 hours. The digested product and chymotrypsin beads were centrifuged, the chymotrypsin beads were discarded, and the supernatant, containing enzymatically cleaved rhCTGF, was diluted 1:5 with 50 mM Tris, pH 7.5. The diluted supernatant was applied to a Hi-Trap heparin column. The flow-through was collected, and contained N-terminal fragments of CTGF. The heparin column was washed with 350 mM NaCl, and bound C-terminal fragments of CTGF and undigested CTGF were eluted with a linear gradient of 350 mM to 1200 mM NaCl, as described above. The fractions were analyzed for the presence of C-terminal fragments of CTGF by SDS-PAGE. Fractions containing C-terminal fragments of CTGF were pooled according to the observed purity of C-terminal CTGF.

[00132] The heparin column flow-through, which contained N-terminal fragments of CTGF, was adjusted to contain 0.5 M ammonium sulfate /50 mM Tris, pH 7.5. The sample containing N-terminal fragments of CTGF was then loaded onto a 15 ml phenyl sepharose HP column (Amersham Pharmacia Biotech), which had been pre-equilibrated with 0.5 M ammonium sulfate /50 mM Tris, pH 7.5. The phenyl sepharose HP column was then washed with 15 column volumes of 0.5 M ammonium sulfate/ 50 mM Tris, pH 7.5. Bound

WO 03/024308

PCT/US02/29500

N-terminal fragments of CTGF were eluted with a linear gradient of 0.5 M to 0 M ammonium sulfate /50 mM Tris, pH 7.5, over approximately 15 column volumes. Fractions were analyzed for the presence of N-terminal fragments of CTGF by SDS-PAGE. Fractions containing N-terminal fragments of CTGF were pooled. This pool, containing N-terminal fragments of CTGF, was concentrated and the buffer exchanged with 50 mM Tris, 400 mM NaCl, pH 7.2, using Amicon ultrafiltration, YM10 membrane.

Example 3: Production of antibodies against CTGF and fragments of CTGF

[00133] Monoclonal and polyclonal antibodies were prepared against purified rhCTGF. Recombinant human CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF were produced and purified as described above. Monoclonal and polyclonal antibodies specific to human CTGF or fragments of CTGF were made by standard methods. (See, e.g., Goding, *supra*; and Schook, *supra*.)

[00134] Monoclonal antibodies to human CTGF are generally prepared as follows. Healthy adult mice are immunized subcutaneously with 50 to 100 µg of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, or C-terminal fragments of CTGF. After six to ten weeks, mice are boosted with additional antigen formulated in incomplete Freund's adjuvant. Approximately one week after each booster injection, the serum from immunized mice is evaluated for the presence of antibodies to CTGF, as determined by ELISA analysis. Mice producing the greatest antibody responses (i.e., highest titer) to CTGF or fragments thereof are chosen for the production of hybridomas. Isolated spleen cells from these mice are fused to a mouse myeloma partner, such as, for example, P3X63Ag8-653, using polyethylene glycol, following procedures well known in the art. Hybridomas producing antibody reactive to CTGF are identified by ELISA and subsequently cloned by limiting dilution at least two times.

[00135] Alternatively, human monoclonal antibodies to human CTGF were made by the following method. Cohorts of HUMAB mice (Medarex, Inc., Princeton NJ) were immunized with different CTGF immunogens including a) purified rhCTGF produced in baculovirus, b) N- and C-terminal fragment halves of CTGF generated by chymotrypsin cleavage of whole rhCTGF, and c) various synthetic CTGF peptides. HUMAB mice (Medarex) are genetically engineered transgenic mice that respond to immunogens by making fully human antibodies. Hybridomas generated from 25 splenic fusions were screened and approximately 140 clonally selected monoclonal antibody-producing cell lines were characterized. The affinity of each antibody population was measured using RIA, wherein whole rhCTGF was radio-iodinated and added to wells containing immobilized monoclonal antibody and varying quantities of unlabelled CTGF.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

Example 4: Characterization of antibodies

[00136] Hybridomas producing antibodies to human CTGF were prepared as described in Example 3. Cloned hybridoma cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose/RPMI 1640 (50:50) with 8 mM L-Glutamine, ½ x Nonessential Amino Acids, and 10% Fetal Bovine Serum. Cells expanded for antibody preparation were grown in the same media with 1.5% Low IgG Fetal Bovine Serum for 4-9 days at 37°C and 6% CO₂. The resulting conditioned media was cleared of cells and concentrated using a tangential flow filtering/concentrating system. The concentrate was passed over a protein-A column and bound monoclonal antibodies eluted with 100 mM glycine, pH 3. The eluate was neutralized with 1 M Tris, pH 8.0, and dialyzed against PBS.

[00137] Each resulting monoclonal antibody obtained was mapped and assigned to specific regions of CTGF to which it bound, using standard binding and blocking experiments. (Harlow and Lane, *supra*; Burtis and Ashwood, *supra*; and Kaplan, Pesce, and Kazmierczak, *supra*, Chapter 10 (Immunochemical Techniques) and Chapter 11 (Competitive Binding Assays).) For example, antibodies of the same domain or epitope specificity would block binding of any other antibody of the same domain or epitope specificity, particularly if added in a sequential manner. More refined mapping of the epitopes on CTGF to which the monoclonal antibodies bound was performed by ELISA analysis using specific fragments of recombinantly expressed CTGF. For example, monoclonal antibodies which recognized N-terminal domains or regions of CTGF were identified by ELISA analysis against immobilized recombinantly expressed exon 2 of CTGF. Monoclonal antibodies were mapped to recombinantly expressed domains of CTGF, such as those encoded by exon 2, exon 3, exon 4, or exon 5 of CTGF polynucleotide sequence.

[00138] In this manner, antibodies that specifically recognize N-terminal domains or N-terminal fragments of CTGF (*e.g.*, N1, an antibody having specificity for a first N-terminal fragment epitope or epitopes; and N2, an antibody having specificity for a second N-terminal fragment epitope or epitopes), or C-terminal domains or C-terminal fragments of CTGF (*e.g.*, C-terminal fragment epitopes C1, C2, C4, C5, or CK) were selected and characterized. (See, *e.g.*, Figures 1A and 1B.)

Example 5: Assay for CTGF and fragments of CTGF

[00139] Immunoassays were developed to detect and accurately quantitate CTGF polypeptides. Specifically, methods were developed to detect and quantitate CTGF (referred to as the N-C assay), N-terminal fragments of CTGF (referred to as the N-N assay), and

WO 03/024308

PCT/US02/29500

C-terminal fragments of CTGF (referred to as the C-C assay). Figure 1C illustrates the different sandwich assay formats.

CTGF

[00140] Whole CTGF was detected and quantitated using one antibody that recognized an N-terminal domain of CTGF (*e.g.*, N1 and N2 as described above and shown in Figure 1A) and a second antibody that recognized a C-terminal domain of CTGF (*e.g.*, C1-C5 as described above and shown in Figure 1A). This assay is referred to as the N-C sandwich assay (Figure 1C). The N-terminal domain specific antibody (*e.g.*, monoclonal antibody (mAb) 19, which binds to N2) was used to capture CTGF, while the C-terminal domain specific antibody (*e.g.*, mAb 25, which binds to C4) was used to detect the captured CTGF polypeptide. Alternatively, an antibody that recognizes a C-terminal domain of CTGF or heparin optionally linked to a carrier, *e.g.*, BSA, could be used to capture CTGF, and an antibody that recognizes an N-terminal domain of CTGF could be used to detect the captured CTGF polypeptide. In either method, the use of two reagents, one that recognizes an N-terminal domain of CTGF and the other that recognizes a C-terminal domain of CTGF, allowed for the detection of CTGF, but not of N-terminal fragments of CTGF or C-terminal fragments of CTGF (Figure 2).

N-terminal fragments of CTGF

[00141] N-terminal fragments of CTGF were detected and quantitated using two antibodies that recognize N-terminal domains of CTGF (*e.g.*, N1 and N2 as described above and shown in Figure 1A). This assay is referred to as the N-N assay (Figure 1C). One of the N-terminal domain specific antibodies served as a capture antibody (*e.g.*, mAb 19, which binds to N2), while the other served as a detection antibody (*e.g.*, mAb 6, which binds to N1). CTGF was also detected using the N-N assay, as CTGF contains N-terminal domains of CTGF, which are recognized by the antibodies employed.

[00142] To determine the amount of N-terminal fragments of CTGF in a sample, the level of CTGF in the sample was determined (using the N-C assay, *supra*), and the level of N-terminal fragments of CTGF in the sample was determined (using the N-N assay). The amount of CTGF determined was then subtracted from the amount of N-terminal fragments determined, resulting in the level of N-terminal fragments of CTGF present in the sample. Unless otherwise indicated, data obtained using the N-N assay, which detected and quantitated the levels of both CTGF and N-terminal fragments of CTGF (Figure 3), have been adjusted to show the specific levels of N-terminal fragments of CTGF in each sample (*i.e.*, the levels of CTGF in a sample have been subtracted from the values obtained in that sample

WO 03/024308

PCT/US02/29500

using the N-N assay). Alternatively, samples can be cleared of CTGF using a heparin affinity column prior to conducting the N-N assay.

C-terminal fragments of CTGF

[00143] C-terminal fragments of CTGF were detected and quantitated using two antibodies that recognize C-terminal domains of CTGF (*e.g.*, C1 and C4 as described above and shown in Figure 1A). This assay is referred to as the C-C assay (Figure 1C). One of the C-terminal domain specific antibodies served as a capture antibody (*e.g.*, mAb 25, which binds to C4), while the other served as a detection antibody (*e.g.*, mAb 51, which binds to C1). Alternatively, heparin linked to a carrier, *e.g.*, BSA, could be used to capture C-terminal domains of CTGF. CTGF was also detected in this assay, as CTGF contains C-terminal domains of CTGF.

[00144] To determine the amount of C-terminal fragments of CTGF in a sample, therefore, the level of CTGF in the sample was determined (using the N-C assay), and the level of C-terminal fragments of CTGF in the sample was determined (using the C-C assay). The amount of CTGF determined was then subtracted from the amount of C-terminal fragments determined, resulting in the level of C-terminal fragment present in the sample. Unless otherwise indicated, data obtained using the C-C assay, which detected and quantitated the levels of both CTGF and C-terminal fragments of CTGF (Figure 4), have been adjusted to show the specific levels of C-terminal fragments of CTGF in each sample (*i.e.*, the levels of CTGF in a sample have been subtracted from the values obtained in that sample using the C-C assay). Alternatively, samples can be cleared of CTGF using an N-terminal fragment specific reagent, *e.g.*, an antibody, prior to conducting the C-C assay.

[00145] Quantitation of the levels of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF in samples were determined by extrapolating the absorbance values obtained with each ELISA assay described (*i.e.*, N-C assay, detecting CTGF; N-N assay, detecting CTGF plus N-terminal fragments of CTGF; and, C-C assay, detecting CTGF plus C-terminal fragments of CTGF) to that obtained using CTGF standards of known concentrations. The data were analyzed by quadratic non-linear regression (SOFTMAX PRO software, Molecular Devices, Sunnyvale, CA), providing a best-fit equation describing the standard curve and relating absorbance to CTGF concentration on a molar basis.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

Example 6: CTGF and CTGF fragment detection and quantitation**[00146]** Low-protein samples

Procedures for performing CTGF assays were described above in Example 5. Modifications to these methods could be made for detecting and quantitating CTGF and fragments of CTGF in various samples or sample types. For example, to detect and quantitate human CTGF and fragments of CTGF in low-protein samples (e.g., urine, synovial fluids, peritoneal dialysis fluids, CSF fluid, saliva, cell culture media), a sandwich ELISA using anti-human CTGF monoclonal antibodies was developed. The ELISA assay was set up as follows. The wells of a microtiter plate were first coated with a capture antibody which recognizes a region or domain of CTGF. For use in the ELISA, the capture antibody was diluted to a final concentration of 10 µg/ml in 50 mM sodium bicarbonate, pH 8.5, and fifty microliters of the diluted capture antibody solution was added to each well of a 96-well MAXISORB microtiter plate (Nalge Nunc International, Rochester NY). The plate was then covered and stored at 2 to 8°C overnight to allow antibody binding to the plate. The capture antibody solution was removed from the plates, and the unbound sites in each well were then blocked with 150 µl of blocking buffer, containing 1% BSA in calcium-free and magnesium-free PBS with 0.05% sodium azide. The plate was then covered and stored at 2 to 8°C for 1 to 14 days. Immediately prior to use in a CTGF detection and quantitation assay, the blocking buffer was removed from the wells, and the wells of each plate were washed once with wash buffer (calcium-free and magnesium-free PBS containing 0.1% Tween 20).

[00147] CTGF standard solutions for use in the ELISA assays were prepared as follows. A frozen aliquot of rhCTGF, prepared as described above, was thawed and diluted to a final concentration of 1.1 µg/ml in heparin assay buffer (0.45 µm filtered), which contained calcium-free and magnesium-free PBS, 50 mM Tris (pH 7.8), 1 mg/ml BSA, 4 mM MgCl₂, 0.2 mM ZnCl₂, 0.05% sodium azide, 50 µg/ml sodium heparin, and 0.1% TRITON X-100 detergent. The rhCTGF standard stock solution was stored aliquoted at -70°C. Dilutions of the rhCTGF stock solution were then prepared to obtain a range of rhCTGF standard concentrations from 0 ng/ml to 15 ng/ml, diluted in heparin assay buffer. In all ELISA assays described, levels of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF were determined based on comparison to a CTGF standard.

[00148] Biological samples were diluted in heparin assay buffer (typically, dilutions were between 1:2 and 1:20, depending on the particular sample type), and 50 µl of the diluted samples were applied to the coated and blocked microtiter wells, in duplicate or triplicate.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

[00149] For detection of captured CTGF or of fragments of CTGF, a biotinylated monoclonal antibody of a different CTGF epitope specificity from the coating or capture antibody to CTGF was employed. The biotinylated antibody was added to the above samples and CTGF standards within the microtiter plate wells, such that the CTGF-containing samples and CTGF standards, and the biotinylated anti-CTGF antibody, were incubated concurrently in the capture antibody-coated microtiter plate. Monoclonal antibodies used for detection were biotinylated using biotin:DNP reagent, following the protocol as described by the manufacturer (Molecular Probes, Eugene, OR). A biotin:mAb ratio of 5:1 to 12:1 was typically acceptable. Fifty microliters of biotinylated monoclonal antibody (1000 ng/ml) were added to each well, which already contained samples as described above. The plate was then covered and incubated at 2 to 8°C on a plate rotator for 90 minutes at 100 to 130 rpm.

[00150] Afterward, the plates were washed three times with wash buffer. The wells were then incubated with 50 µl of streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove PA), which was diluted in assay buffer (typically 1:10,000) to a concentration empirically determined for each conjugate lot, based on development of a desired level of signal for the CTGF standard curve. The plate was covered and incubated at 2 to 8°C on a plate rotator for 90 minutes at 100 to 130 rpm. Afterward, the plate was washed three times as described above, and 100 µl of alkaline phosphatase substrate (Sigma Chemical Co.) was added to each well. Color development was monitored visually and with a microtiter plate reader. Once the standard and sample color development reached optimal signal levels, further color development was stopped by the addition of 50 µl of 4 N sodium hydroxide to each well. The microtiter plate was then placed in a microplate reader, and the color development determined by measurement of absorbance units at a wavelength of 405 nm.

High-protein samples

[00151] The following modifications to the CTGF assays described above and in Example 5 were performed when measuring CTGF levels in high protein-containing samples (e.g., blood, serum, plasma, etc.). In order to provide consistency in the concentration or levels of proteins within the standards and samples used in this assay detecting CTGF and CTGF fragments in high-protein samples, heparin assay buffer was supplemented with 10% rat serum in which CTGF was removed.

[00152] CTGF was removed from rat serum for use in this assay as follows. Rat serum was incubated overnight with 2% (v/v) heparin-agarose beads, which removed CTGF

WO 03/024308

PCT/US02/29500

and C-terminal fragments of CTGF from the rat serum. N-terminal fragments of CTGF were not removed from rat serum by this method due to the fact that N-terminal fragments of CTGF do not bind to heparin. The N-terminal fragments, which remained present in the heparin-agarose treated rat serum, did not interfere with the subsequent CTGF assay, as the assays used for detecting human CTGF did not detect N-terminal fragments of rat CTGF. Alternatively, an antibody affinity column may be used to remove CTGF and fragments of CTGF from mammalian serum in order to create serum in which CTGF and fragments of CTGF were removed.

[00153] CTGF standard solutions, prepared as described above, were spiked with 10% (v/v) of the rat serum treated with heparin-agarose beads, as described above. The biotinylated anti-CTGF antibodies (used for detection), diluted in heparin assay buffer, were also spiked with 10% of the rat serum treated with heparin-agarose beads. High-protein containing samples were diluted 1:10 with heparin assay buffer; therefore, all solutions (i.e., CTGF standards, biological samples, etc.) used in the assay contained serum at a final concentration of 10% (v/v). Sandwich ELISA assays described above were then used to detect and quantitate the levels of CTGF and of CTGF fragments in the diluted high-protein containing samples.

Example 7: CTGF assay specificity

[00154] The specificity and reliability of the CTGF ELISA assays described above in Example 5 and Example 6 were examined. Table 1 shows the results of ELISA assays performed with rhCTGF standard using the assays described above for detecting and quantitating CTGF (the N-C assay), N-terminal fragments of CTGF (the N-N assay), and C-terminal fragments of CTGF (the C-C assay).

[00155] Assay results presented in Table 1 are absorbances at 405 nm as measured by an ELISA plate reader. Various concentrations of rhCTGF (0 to 11 ng/ml) were used to establish standard curves for each CTGF ELISA assay. The assays were performed in triplicate for each concentration of CTGF, and the statistical mean and coefficient of variation (% CV) of the absorbances for the ELISA assays are included in Table 1.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

Table 1: Representative Standard Curves for CTGF ELISA Assays

CTGF Concentration	N-C Assay	%CV	N-N Assay	%CV	C-C Assay	%CV
0.0 ng/ml	0.383	4.6%	0.480	0.6%	0.299	1.9%
0.33 ng/ml	0.440	5.8%	0.579	3.4%	0.315	2.6%
1.1 ng/ml	0.611	0.5%	0.758	6.1%	0.379	3.6%
3.0 ng/ml	1.130	1.3%	1.217	5.6%	0.623	2.4%
6.6 ng/ml	1.975	1.1%	2.126	4.2%	1.193	3.0%
11.0 ng/ml	2.817	0.9%	3.109	5.0%	2.091	6.9%

[00156] The assays were performed according to the protocols described above in Example 5 and Example 6. Assay specificity was controlled by choice of the capture and labeled (detection) antibody used in each assay. The results showed that the CTGF ELISA assays, for CTGF, CTGF N-terminal fragments, and CTGF C-terminal fragments, as performed in this example, had the sensitivity to detect CTGF polypeptides at concentrations below 1 ng/ml. Additionally, the coefficient of variance (CV) of the assays at a given amount of CTGF was found to be normally in the range of approximately 0 to 6%.

[00157] The specificity of each CTGF ELISA assay was examined further. Baculovirus-derived rhCTGF was produced and purified as described above. N-terminal fragments and C-terminal fragments of CTGF were generated by chymotrypsin cleavage of rhCTGF and purified as described above in Example 2. CTGF ELISA assays, which detect and quantitate CTGF (the N-C assay), N-terminal fragments of CTGF (the N-N assay), and C-terminal fragments of CTGF (the C-C assay), were performed using these CTGF polypeptides. The results are shown in Figure 2 (N-C assay), Figure 3 (N-N assay), and Figure 4 (C-C assay).

[00158] As indicated above and as shown in Figures 2, 3, and 4, all three CTGF assays described detected CTGF (solid squares in Figures 2, 3, and 4). The CTGF assay only detects CTGF (i.e., containing both N-terminal domains and C-terminal domains of CTGF). The CTGF assay does not detect N-terminal fragments of CTGF (solid triangles in Figures 2, 3, and 4) or C-terminal fragments of CTGF (solid circles in Figures 2, 3, and 4). The N-terminal domain assay detects both CTGF (solid squares in Figure 3) and N-terminal fragments of CTGF (solid triangles in Figure 3), but does not detect C-terminal fragments of CTGF (solid circles in Figure 3). The C-terminal domain assay detects both CTGF (solid squares in Figure 4) and C-terminal fragments of CTGF (solid circles in Figure 4), but does not detect N-terminal fragments of CTGF (solid triangles in Figure 4).

WO 03/024308

PCT/US02/29500

[00159] The CTGF and CTGF fragment assays of the present invention were specific to CTGF polypeptides. The structurally related CCN family members NOV and CYR61 (using concentrations as high as 0.5 mg/ml) were not detected using the CTGF assays as described (data not shown).

Example 8: CTGF detection in the absence or presence of heparin

[00160] CTGF is a heparin-binding growth factor, by virtue of heparin binding domains located in the C-terminal region of CTGF. CTGF stability, detection, and recovery were measured and assessed in the presence and absence of heparin at various storage temperatures. Recombinant human CTGF (10 ng/ml) was added to assay buffer, either in the presence or absence of heparin (from Porcine, Sigma Chemical Co.; added to a final concentration of 10 µg/ml). The CTGF-containing samples were then incubated for ten days at the following temperatures: -80°C, -20°C, 4°C, or 25°C.

[00161] The amount of CTGF remaining in the sample was then determined by ELISA assay as described above in Example 5. The results of CTGF detection in the absence or presence of heparin are shown below in Table 2.

Table 2: The Effect of Heparin on CTGF Detection

Temperature	-80°C	-20°C	+4°C	+25°C
+ heparin	8.9 ng/ml	9.1 ng/ml	5.3 ng/ml	5.3 ng/ml
% recovery	89 %	91 %	53 %	53 %
- heparin	2.7 ng/ml	5.0 ng/ml	1.0 ng/ml	0.8 ng/ml
% recovery	27 %	50 %	10 %	8 %

[00162] As indicated in Table 2, in the absence of heparin, little CTGF was detected, even when the samples were stored at -80°C. After ten days at either 4°C or 25°C in the absence of heparin, approximately 1 ng/ml of the original 10 ng/ml CTGF added to the sample was detected. This indicated that CTGF polypeptide was unstable or perhaps sticky, especially when incubated at temperatures above freezing. When CTGF was incubated in the presence of heparin, detectable CTGF levels after ten days at either 4°C or 25°C were approximately 5 ng/ml, which corresponded to approximately half of the original amount of CTGF added to the assay buffer, and about five-times the level obtained in the absence of heparin. The addition of heparin improved the recovery of CTGF at all temperatures examined. This suggested that heparin provided a stabilizing effect on CTGF, maintained

WO 03/024308

PCT/US02/29500

CTGF solubility in aqueous solutions, or protected CTGF from proteolysis, adsorption to plastic, or binding to other macromolecules in solution.

Example 9: Detection and stability of CTGF and CTGF fragments in cell culture conditioned media

[00163] MG-63 cells, a human osteosarcoma cell line, are known to produce and secrete CTGF. Additionally, TGF β stimulates CTGF expression in these cells. MG-63 cells were obtained from ATCC (CRL-1427). The cells were plated in 12-well tissue culture plates (27,000 cells per well) in Minimal Essential Medium (MEM) containing 10% fetal bovine serum, glutamine, penicillin, streptomycin, and non-essential amino acids. After 48 hrs, the media was removed and replaced with fresh media lacking fetal bovine serum and containing ascorbate phosphate (30 μ g/ml) and bovine serum albumin (1 mg/ml). After an additional 24 hrs, the media was replaced with fresh media (MEM lacking fetal bovine serum and containing ascorbate phosphate (30 μ g/ml) and bovine serum albumin (1 mg/ml)), containing heparin (10 μ g/ml), with or without TGF β (5 ng/ml). Conditioned media was then harvested from the cells after 0, 24, 92, and 120 hrs and analyzed for CTGF and CTGF fragment levels. Results of the levels of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF in MG-63 cell conditioned media are shown in Table 3 below.

Table 3: CTGF and CTGF Fragment Levels in Cell Culture Conditioned Media

ELISA +/- TGF β	24 hours	92 hours	120 hours
CTGF (-TGF β)	40 ng/ml	55 ng/ml	35 ng/ml
CTGF (+TGF β)	150 ng/ml	33 ng/ml	26 ng/ml
N-terminal fragments (-TGF β)	157 ng/ml	>401 ng/ml	>498 ng/ml
N-terminal fragments (+TGF β)	181 ng/ml	>507 ng/ml	>534 ng/ml
C-terminal fragments (-TGF β)	7 ng/ml	Non detected	Non detected
C-terminal fragments (+TGF β)	Non detected	1 ng/ml	Non detected

[00164] As shown in Table 3, after 24 hrs of TGF β treatment, the levels of CTGF detected in the conditioned media of MG-63 cells increased from 40 ng/ml to 150 ng/ml. Following 92 or 120 hrs of TGF β treatment, however, the levels of CTGF detected in the conditioned media of the cells was greatly reduced from that observed after 24 hrs of treatment.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

[00165] Similar results were observed for the levels of C-terminal fragments of CTGF. After 24 hrs in the presence of TGF β , the levels of C-terminal fragments of CTGF in the conditioned media of the cells decreased from 7 ng/ml to levels that were undetectable. Following 92 or 120 hrs of TGF β treatment, the levels of C-terminal fragments of CTGF in the conditioned media remained low or undetectable. Therefore, over time, the detectable levels of CTGF and C-terminal fragments of CTGF in the conditioned media of MG-63 cells declined, or became undetectable, despite stimulation of CTGF expression with TGF β .

[00166] In contrast, detection and quantitation of N-terminal fragments of CTGF showed that N-terminal fragments of CTGF accumulated in the conditioned media of MG-63 cells over time. The accumulation of N-terminal fragments in the conditioned media was seen both in the presence or absence of TGF β stimulation of CTGF expression. In spite of the observations that the levels of CTGF increased approximately 4-fold following a 24 hr TGF β treatment (compared to non-treated cells), only a slight increase in the levels of N-terminal fragments of CTGF was observed in cells treated with TGF β compared to non-stimulated cells (compare 157 ng/ml with no TGF β treatment to 181 ng/ml with TGF β treatment). In this particular situation, measurement of the levels of N-terminal fragments of CTGF alone would not have indicated any increase in CTGF levels following a 24 hr treatment with TGF β . The ability to detect and distinguish the levels of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF, therefore, allowed for a sensitive and reliable means to determine the presence and levels of CTGF and fragments thereof, as well as any changes in the expression of CTGF and CTGF fragments under different conditions.

[00167] These results indicated that in certain conditions, N-terminal fragments of CTGF could accumulate over time. Accumulation of N-terminal fragments, which coincided with the decline in detectable levels of CTGF, suggested that N-terminal fragments of CTGF are stable (i.e., less susceptible or resistant to proteolysis, clearance, elimination, or adsorption) in biological fluids, such as cell conditioned media, blood, and urine; and therefore, can provide a detectable and stable indicator of CTGF expression.

[00168] Additionally, this data suggested that, in certain conditions, CTGF and C-terminal fragments of CTGF could be lost by degradation, excretion, or tissue removal. This data also showed the value and benefit of detecting and distinguishing CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF in cell culture media (as well as in other biological fluids) in determining the levels of CTGF expression and the degree or extent of CTGF cleavage, processing, elimination, clearance, etc.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

Example 10: Western blot analysis of CTGF and CTGF fragments

[00169] MG-63 cells were cultured in Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (CELLGRO culture medium; Mediatech, Herndon VA) containing 50 µg/ml sodium heparin (Sigma Chemical Co.), 50 µg/ml bovine serum albumin (Sigma Chemical Co.), and without serum. At day one, two, three, and six, conditioned media from the cells were collected, centrifuged at 1200 rpm for 5 min to pellet cell debris, and the supernatants stored frozen.

[00170] Analysis of CTGF levels was carried out as follows. N-terminal fragments of CTGF were isolated from the conditioned media by immunoprecipitation with a monoclonal antibody directed against N-terminal domains of CTGF. Immunoprecipitations were performed by incubating the MG-63 cell conditioned media with a monoclonal antibody specific to N-terminal regions of CTGF at a concentration of 10 µg/ml for 1 hour. A 2% (w/w) suspension of protein-A (Sigma Chemical Co.) was added and the sample was incubated for an additional 1 hour. Precipitation with protein-A alone, without the inclusion of any CTGF-specific antibody, was used as a control for non-specific binding. The immunoprecipitation/protein-A complexes were washed twice with buffer containing 150 mM NaCl, 1% TRITON X-100 detergent, 1% deoxycholic acid sodium salt, 0.1% SDS, 50 mM Tris (pH 7.5), and 2 mM EDTA. The samples were then solubilized with Tris-Glycine SDS sample buffer (2X) (Invitrogen) in preparation for electrophoretic separation of precipitated proteins. CTGF and C-terminal fragments of CTGF were isolated from the conditioned media by heparin-sepharose precipitation. Precipitations with heparin-sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) were carried out by mixing cell culture conditioned media with 2 % heparin-sepharose suspension (1:1 (w/w) with PBS) for 2 hours at 4°C. The precipitation complexes were washed twice with PBS, and subsequently solubilized as described above.

[00171] Following electrophoresis (4-20% Tris-Glycine SDS-PAGE gels (Invitrogen)), the samples were transferred onto nitrocellulose membranes (Invitrogen) for western blot analysis. The membranes were then blocked with 5% skim milk in buffer containing 24.8 mM TRIS base, 2.7 mM potassium chloride, 137 mM sodium chloride, 0.05% Tween 20, pH 7.4.

[00172] CTGF and fragments of CTGF in the conditioned media of MG-63 cells were detected by western blot analysis, the results of which are shown in Figures 5A, 5B, and 5C. Membranes containing CTGF (Figure 5A) and C-terminal fragments of CTGF (Figure 5C),

WO 03/024308

PCT/US02/29500

which had been precipitated with heparin-sepharose beads, were probed with a monoclonal antibody which recognizes C-terminal domains of CTGF, followed by detection with anti-human IgG conjugated with horse radish peroxidase (Jackson ImmunoResearch). Membranes containing N-terminal fragments of CTGF (Figure 5B), which had been immunoprecipitated with anti-CTGF antibodies, were probed with anti-CTGF chicken polyclonal antibody, and detected with rabbit anti-chicken IgY conjugated with horse radish peroxidase (Zymed, South San Francisco CA). Western blot development was visualized using SUPERSIGNAL chemiluminescent reagent (Pierce Chemical Co., Rockford IL).

[00173] Quantitation of the relative changes in the levels of CTGF and fragments of CTGF observed in the conditioned media of MG-63 cells was performed by densitometry of western blots described above. The results of densitometry of the western blot showing CTGF and CTGF fragments are shown in Table 4 below.

Table 4: Changes in CTGF and CTGF Fragment Levels in Cell Culture Conditioned Media

	Day 1	Day 2	Day 3	Day 6
CTGF	1	1.17	1.99	0.43
N-terminal fragment	1	0.4	3.03	2.35
C-terminal fragment	1	1.08	0.53	0

[00174] Detection and quantitation of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF were demonstrated by western blot analysis. As shown in Figure 5A, CTGF accumulated in the conditioned media of MG-63 cells, reaching a maximum level at approximately day three. At day six of culture, the levels of CTGF in the conditioned media of MG-63 cells were less than half of that determined after the first day of culture, and were only about 20% of the levels determined at day three, which had the highest levels of CTGF measured. This suggested that CTGF was unstable in MG-63 cell conditioned media. The level of N-terminal fragments of CTGF was observed to accumulate in the conditioned media of MG-63 cells with time (Figure 5B). The levels of C-terminal fragments of CTGF did not accumulate in the conditioned media of MG-63 cells; rather, in day six conditioned media, C-terminal fragments of CTGF were undetectable by western blot analysis (Figure 5C).

[00175] These observations were consistent with the results obtained by ELISA assay, shown above in Example 9. The decline in detectable levels of CTGF and C-terminal fragments of CTGF suggested that CTGF and C-terminal fragments of CTGF were less stable than N-terminal fragments of CTGF, and therefore may not provide a reliable indicator of

WO 03/024308

PCT/US02/29500

CTGF expression or levels in a sample at particular times. Accumulation of N-terminal fragments of CTGF suggested that N-terminal fragments of CTGF are more stable (i.e., less susceptible or resistant to proteolysis, clearance, elimination, or adsorption) than CTGF or C-terminal fragments of CTGF in biological fluids, such as, for example, cell culture conditioned media. Therefore, N-terminal fragments of CTGF provided a detectable and stable indicator of CTGF expression as measured by western blot analysis. The data also showed the value and benefit of detecting and distinguishing CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF in cell culture media (as well as in other biological fluids) in determining the levels of CTGF expression and the degree or extent of CTGF cleavage, processing, elimination, clearance, etc.

Example 11: Stability of CTGF and CTGF fragments added to urine

[00176] Using methods similar to those described above in Example 8, human urine samples from healthy individuals, to which 10 ng/ml rhCTGF was added, were analyzed by detecting and quantitating the levels of CTGF and of CTGF fragments. For these experiments, CTGF detection and quantitation were performed using the CTGF ELISA assays as described above in Example 5 and Example 6. The normal concentration of N-terminal fragments of CTGF in human urine was previously determined to be approximately 1 to 2 ng/ml.

[00177] Figure 6 shows levels of CTGF and N-terminal fragments of CTGF in urine stored at 4°C for zero, one, two, three, four, and five days following the addition of CTGF to urine samples. As shown in Figure 6, only N-terminal fragments of CTGF were detected in CTGF-supplemented urine after three days of storage at 4°C. After three days, CTGF was virtually undetectable in urine under these storage conditions. Therefore, detection and quantitation of N-terminal fragments of CTGF provided improved and more reliable detection and quantitation of the original amount of CTGF that was added to the urine. These results indicated that CTGF was less stable than N-terminal fragments in urine.

Example 12: CTGF proteolysis in urine

[00178] The lower stability of CTGF (compared to N-terminal fragments of CTGF) in urine, or lack of the ability to detect and quantitate CTGF in urine, may have been due to instability and proteolysis of CTGF in human urine. To examine this, experiments similar to those described above in Example 11 were performed on human urine samples to which rhCTGF and various protease inhibitors were added. In this study, 10 ng/ml rhCTGF was added to normal human urine, which was then stored at 4°C for one to seven days in the

WO 03/024308

PCT/US02/29500

presence or absence of protease inhibitors. For these experiments, CTGF detection and quantitation was performed using the CTGF ELISA assays as described above. The protease inhibitors used were a protease inhibitor cocktail (Sigma Chemical Co., catalog no. P-8340), N-hydroxy-2[[N'-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-N'(4-chlorobenzyl)]amino]-acetamide (a metalloprotease inhibitor), or ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA). Results of CTGF proteolysis in urine are shown in Table 5 below.

Table 5: CTGF Proteolysis in Urine

	Control Urine	Protease Inhibitor Mixture	Metallo-proteinase inhibitor	EDTA
N-C Assay (CTGF)				
1 day	2.2 ng/ml	3.5 ng/ml	4.6 ng/ml	3.5 ng/ml
7 days	0.0 ng/ml	0.0 ng/ml	0.5 ng/ml	0.0 ng/ml
N-N Assay (N-terminal and CTGF)				
1 day	10 ng/ml	12 ng/ml	14 ng/ml	12 ng/ml
7 days	8 ng/ml	14 ng/ml	13 ng/ml	7 ng/ml

[00179] Table 5 above shows that after one day or seven days of storage, the majority of CTGF added to urine was undetectable in the absence of any added protease inhibitors. The inclusion of protease inhibitors resulted in higher levels of detectable CTGF in urine after one day of storage, compared to that in the absence of protease inhibitors. A similar extent of reduction in the loss of detectable CTGF occurred with a mixture of protease inhibitors, a metallo-proteinase inhibitor, as well as with EDTA, a metal ion chelator. These data indicated that proteases are responsible, at least in part, for the degradation, elimination, or loss of detectable CTGF in normal human urine during storage at 4°C. These results also suggested that detectable levels of CTGF were maintained in samples by the addition of protease inhibitors.

[00180] In contrast, N-terminal fragments of CTGF were readily detected and quantitated in these samples, either in the presence or absence of added protease inhibitors. Additionally, levels of N-terminal fragments of CTGF were consistent with the amount of rhCTGF exogenously added to the urine (10 ng/ml). Table 5 shows data determined using the N-N assay, which detects both CTGF and N-terminal fragments of CTGF. The levels of N-terminal fragments of CTGF were higher than the exogenously added 10 ng/ml rhCTGF due to endogenous levels of CTGF (i.e., N-terminal fragments of CTGF) in normal urine, which are approximately 1 to 2 ng/ml. In normal urine, CTGF and C-terminal fragments of

WO 03/024308

PCT/US02/29500

CTGF were not detectable, whereas 1 to 2 ng/ml of N-terminal fragments of CTGF were detectable (data not shown). These results indicated that while CTGF was sensitive to protease activity, adding, at least in part, to the inability to detect and quantitate CTGF in urine, N-terminal fragments of CTGF appeared to be resistant to protease degradation, as measured by the ability to detect and quantitate N-terminal fragments of CTGF in urine.

Example 13: CTGF in peritoneal dialysis patients

[00181] The levels of CTGF and fragments of CTGF in peritoneal dialysis patients were measured in dialysis fluids recovered from the peritoneal cavity of patients undergoing peritoneal dialysis for defective kidney function. Dialysis fluids were obtained and removed from the peritoneum of patients who had been undergoing peritoneal dialysis for 2 months or less (sample numbers 1, 2, 3, 6, and 7 in Figure 7A), or from patients who had been undergoing peritoneal dialysis for 50 to 100 months (sample numbers 4, 5, 8, 9, and 10 in Figure 7A). Five patients were diagnosed with type 1 diabetes, four patients had glomerular nephritis, and one patient was on dialysis as a result of polycystic kidney disease. In some cases, the peritoneal dialysis fluid was obtained from patients who had developed transient peritonitis while undergoing peritoneal dialysis. Sample numbers 4, 8, and 10 were from patients who had experienced bacterial peritonitis once previously, while sample number 9 was a patient who had experienced bacterial peritonitis four times previously.

[00182] Detectable levels of N-terminal fragments of CTGF were found in all dialysis fluids examined (Figures 7A and 7B). The detection, quantitation, and comparison of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF in the dialysate of peritoneal dialysis patients revealed highest levels of N-terminal fragments of CTGF (data not shown for CTGF and C-terminal fragments of CTGF).

Example 14: CTGF in serum of renal fibrosis subjects

[00183] The presence of CTGF in the urine of kidney dialysis patients has been previously examined (Riser et al. (2000) *J Am Soc Nephrol* 11:25-38; International Patent Application WO 00/13706). To detect CTGF, these previous studies employed either heparin-sepharose to adsorb CTGF (thus resulting in the absence of N-terminal fragment detection due to N-terminal fragments of CTGF not adsorbing to heparin-sepharose beads), used an ELISA to CTGF that would not distinguish whole, N-terminal fragments, or C-terminal fragments of CTGF, and may not have possessed equal sensitivity of detection of each of the CTGF species (i.e., CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF).

WO 03/024308

PCT/US02/29500

[00184] In the present study, the levels of CTGF and fragments of CTGF in the serum of renal fibrosis patients were determined. Serum from normal donor patients and from renal fibrosis patients was obtained from Intergen Company (Purchase, NY). Patients had abnormal kidney functions and renal fibrosis resulting from the clinical manifestation of kidney transplant, chemical toxicity, or IgA-associated nephropathy.

[00185] As shown in Figure 8, the levels of CTGF and C-terminal fragments of CTGF in the serum of renal fibrosis patients were essentially the same as or slightly lower than those found in the serum of normal individuals. These values, corresponding to the levels of CTGF or C-terminal fragments of CTGF in the serum of normal individuals or in renal fibrosis patients, were approximately 0-20 ng/ml. N-terminal fragments of CTGF, however, were readily detected in the serum of renal fibrosis patients. Additionally, the levels of N-terminal fragments of CTGF were elevated above that of CTGF and C-terminal fragments of CTGF in the serum of these patients. Therefore, the detection, quantitation, and comparison of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF in the serum of these patients revealed significant elevations of N-terminal fragments of CTGF in patients diagnosed with renal fibrosis.

Example 15: CTGF in serum of organ transplant subjects

[00186] The levels of CTGF and fragments of CTGF in the serum of organ transplantation patients were examined. Serum from patients with functional organ transplants (either liver or kidney) as well as serum from patients with chronic organ transplant rejection was obtained from Intergen Company. Patients with functional organ transplants were distinguished from those undergoing chronic rejection based on clinical examination of the patient plus measurements of creatinine clearance. Chronic organ transplant rejection was assessed greater than one year post-transplantation.

[00187] As shown in Figure 9, the levels of CTGF and C-terminal fragments of CTGF in the serum of patients with normal organ transplants or patients with chronic rejection following organ transplantation were essentially the same as that found in the serum of normal individuals (i.e., individuals who have not undergone organ transplantation). The values determined, corresponding to the levels of CTGF and C-terminal fragments of CTGF in the serum of normal individuals or in organ transplantation patients, were approximately 0 to 20 ng/ml for both CTGF and C-terminal fragments of CTGF.

[00188] In contrast, N-terminal fragments of CTGF were readily detected in the serum of organ transplant patients, as shown in Figure 9. Additionally, the levels of

WO 03/024308

PCT/US02/29500

N-terminal fragments of CTGF were greatly elevated in the serum of patients with both normal organ transplantation and chronic transplant rejection, compared to that detected in the serum of healthy non-transplant individuals. Elevated levels of N-terminal fragments of CTGF were detected in the serum of individuals with liver transplants or kidney transplants. These results indicated that detection, quantitation, and comparison of the levels of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF in the serum of organ transplant patients revealed the presence of elevated levels of N-terminal fragments of CTGF in patients having undergone organ transplant compared to non-transplant individuals. Additionally, the results showed that levels of N-terminal fragments of CTGF were further elevated in association with chronic rejection of organ transplants as compared to levels observed in normal organ transplants.

Example 16: CTGF in serum of myocardial infarct subjects

[00189] The levels of CTGF and fragments of CTGF in the serum of myocardial infarct patients were examined. Serum from normal donor individuals and from myocardial infarct patients was obtained from Intergen Company. Myocardial infarction in patients was diagnosed symptomatically and further confirmed by assessment of troponin I levels in patient serum. In the ten patients examined, troponin I levels ranged from 14.1 to 103 ng/ml. The troponin I test method used was the AXSYM immunoassay system (Abbott Laboratories, Abbott Park IL), with a corresponding reference range of 0.0 to 0.5 ng/ml.

[00190] As shown in Figure 10, the levels of CTGF in the serum of myocardial infarct patients were only slightly above those determined in the serum of normal individuals. The levels of C-terminal fragments of CTGF in the serum of myocardial infarct subjects were essentially the same as or slightly lower than those found in the serum of normal individuals. N-terminal fragments of CTGF, however, were readily detected in the serum of myocardial infarct patients. Additionally, the levels of N-terminal fragments of CTGF were elevated above that of CTGF and C-terminal fragments of CTGF in the serum of these patients. Therefore, the detection, quantitation, and comparison of the levels of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF in the serum of these patients revealed significant elevations of N-terminal fragments of CTGF in patients with evidence of a recent myocardial infarction.

Example 17: CTGF in serum of liver fibrosis subjects

[00191] The levels of CTGF and fragments of CTGF in the serum of patients diagnosed with progressive liver fibrosis were examined. Serum from normal donor patients and from liver fibrosis patients was obtained from Intergen Company. As shown in

WO 03/024308

PCT/US02/29500

Figure 10, low levels of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF were detected in the serum obtained from normal individuals. These results indicated that in normal serum, the levels of CTGF, CTGF N-terminal fragments, and CTGF C-terminal fragments are in the range of approximately 0 to 20 ng/ml. The levels of C-terminal fragments of CTGF in the serum of patients with liver fibrosis were essentially the same as those found in the serum of normal individuals.

[00192] However, in the serum of patients with progressive liver fibrosis, the levels of CTGF and N-terminal fragments of CTGF were elevated compared to those in serum from normal individuals. Detection, quantitation, and comparison of the levels of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF in the serum of these patients revealed the presence of elevated levels of N-terminal fragments of CTGF in patients with liver fibrosis.

Example 18: CTGF in arthritic synovial fluid

[00193] The levels of CTGF and fragments of CTGF in arthritic synovial fluids were determined. Serum from normal donor individuals was obtained from Intergen Company. Samples of synovial fluids from patients with inflammatory joint diseases, taken from patient knees, were obtained from Vital Products (Delray Beach FL). Levels of CTGF and C-terminal fragments of CTGF in arthritic synovial fluid were not detectable, as shown in Figure 11. In contrast, N-terminal fragments of CTGF were detected, and the levels of N-terminal fragments were elevated (compared to CTGF and C-terminal fragments of CTGF) in arthritic synovial fluid. Detection, quantitation, and comparison of the levels of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF in the synovial fluid of these patients revealed the presence of elevated levels of N-terminal fragments of CTGF in patients diagnosed with inflammatory joint disease.

Example 19: CTGF in vitreous fluid

[00194] The levels of CTGF and fragments of CTGF in vitreous fluid from post-mortem patients diagnosed with eye disease were examined. Vitreous fluid was purchased from the Lions Eye Bank of Oregon (Portland OR). Figure 12A shows the results of CTGF assays performed on vitreous fluid drawn from subjects with and without clinically diagnosed eye disease. Eye diseases included type 1 diabetic retinopathy-induced blindness, type 2 diabetes with cataracts and mild macular degeneration, and non-diabetic bilateral cataracts. As shown in Figure 12A, CTGF N-terminal fragment levels were elevated in vitreous fluid of patients with clinically diagnosed eye disease compared to those in the vitreous fluid of patients without clinically diagnosed eye disease.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

[00195] Data obtained for the levels of CTGF fragment expression can be presented as a ratio of the level of N-terminal fragments of CTGF in a sample to that of CTGF in the same sample, or as a ratio of the level of C-terminal fragments of CTGF in a sample to that of CTGF in the same sample. Mathematical transformation was performed using the data obtained for the levels of CTGF and N-terminal fragments of CTGF in vitreous fluids (Figure 12A). The ratio of the levels of N-terminal fragments of CTGF to CTGF was determined, using the data described above (samples from vitreous fluids), the results of which are shown in Figure 12B (N-terminal fragment/CTGF). The ratio of the levels of N-terminal fragments of CTGF to that of CTGF showed further evidence that determining the levels of N-terminal fragments of CTGF provided a more sensitive and reliable assessment of CTGF expression in biological samples.

[00196] The data were analyzed further to determine statistical significance of the values obtained for the levels of CTGF and fragments thereof between samples from normal versus diseased subjects. A T-test analysis was performed on the data shown in Figure 12. Using the CTGF assay (N-C assay), the difference in the levels of CTGF obtained in samples from normal compared to disease vitreous fluid was not statistically significant, as determined by T-test ($P = 0.150$).

[00197] Additionally, an ELISA assay for CTGF using a rabbit polyclonal antibody to CTGF was also performed. This antibody preparation was produced in rabbits immunized with CTGF (using standard procedures known in the art), and therefore contains multiple antibodies recognizing multiple epitopes within the CTGF polypeptide. The ELISA assay to detect and quantitate CTGF using this rabbit polyclonal antibody was performed using procedures known in the art. The rabbit polyclonal antibody assay to CTGF cannot distinguish CTGF, N-terminal fragments of CTGF, or C-terminal fragments of CTGF. Results of the ELISA assay using a rabbit polyclonal antibody are shown in Figure 12A (Rabbit Polyclonal). Analysis of the data obtained for CTGF levels using the rabbit polyclonal antibody to CTGF indicated that the levels of CTGF in samples from normal compared to disease vitreous fluid were not statistically significant, as determined by T-test ($P = 0.317$). This indicated that the present methods that distinguish CTGF, N-terminal fragments of CTGF, or C-terminal fragments of CTGF, did not reliably compare CTGF levels in normal versus diseased states.

[00198] In contrast, T-test analysis of the values obtained with an assay measuring the levels of CTGF N-terminal fragments showed a statistically significant difference in the

WO 03/024308

PCT/US02/29500

amount of N-terminal fragments of CTGF in vitreous fluid in samples from normal compared to diseased individuals ($P = 0.007$). A T-test performed on the ratio of the levels of N-terminal fragments of CTGF to that of CTGF also indicated a significant difference in the amount of N-terminal fragments of CTGF in vitreous fluid in samples from normal compared to diseased individuals ($P = 0.003$). Therefore, detecting and measuring the levels of CTGF alone did not provide statistically significant data distinguishing the levels of CTGF in normal versus diseased conditions. Detecting and measuring the levels of N-terminal fragments of CTGF, as described in the present invention, however, did provide statistically significant data distinguishing the levels of N-terminal fragments of CTGF in normal versus diseased conditions.

Example 20: CTGF in serum of cancer patients

[00199] The levels of CTGF and fragments of CTGF in the serum of cancer patients were determined. Serum from normal donor patients and from cancer patients was obtained from InterGen Company. Detection and quantitation of the following cancer markers were performed by InterGen Company.

[00200] CA 15-3 is a mucin-like membrane glycoprotein that is shed from tumor cells into the bloodstream. CA 15-3 is a serum cancer antigen that has been used in the management of patients with breast cancer. CA 15-3 levels were determined using a heterogenous sandwich magnetic separation kit and reagents from Bayer Diagnostics (Tarrytown NY). Patients were considered positive for CA 15-3 if values greater than 30 U/ml were obtained in their serum. Assay standard reference range was 0 to 30 U/ml. All CA 15-3 patients were female. Ages ranged from 45 to 88 years old, and CA 15-3 levels ranged from 32 to 1,292 U/ml. These samples were defined as 'breast and ovarian' cancer samples (sample group CA15-3 in Figure 13). One third of all CA 15-3 positive patients tested had CA 15-3 levels greater than 10-fold above the standard clinical reference level of 30 U/ml.

[00201] Carcinoembryonic antigen (CEA) belongs to a family of cell-surface glycoproteins with increased expression found in a variety of malignancies. CEA is a cancer antigen used in monitoring gastrointestinal tract and breast cancers. CEA levels were determined using a heterogenous sandwich magnetic separation kit and reagents from Bayer Diagnostics. Patients were considered positive for CEA if values greater than 5 ng/ml were obtained in their serum. Assay standard reference range was from 0.1 to 4.9 ng/ml. CEA positive patients included both male and female, from 30 to 79 years of age, with CEA levels between 5.5 to 2,950 ng/ml. These patient samples were defined as 'colorectal, GI, and

WO 03/024308

PCT/US02/29500

breast' cancer samples (sample group CEA in Figure 13). One third of all CEA positive patients tested had CEA levels greater than 10-fold above the standard clinical reference range.

[00202] Prostate specific antigen (PSA) is a glycoprotein produced primarily by epithelial cells that line the acini and ducts of the prostate gland. Elevated serum PSA levels have become an important marker of prostate pathologies, and are used as a tumor marker for early detection of prostate cancer. PSA levels were determined using a heterogenous sandwich magnetic separation kit and reagents from Bayer Diagnostics. Patients were considered positive for PSA if values greater than 8.0 ng/ml were obtained in their serum. Assay standard reference range was from 0 to 4 ng/ml. All PSA positive patients were male. Ages ranged from 55 to 96 years old, and PSA levels ranged from 8.3 to 1,919.0 ng/ml. These samples were defined as 'prostate' cancer samples (sample group PSA in Figure 13). One third of all PSA positive patients tested had PSA levels greater than 10-fold above the standard clinical reference range.

[00203] CA 19-9 is a tumor related mucin that contains the sialylated Lewis-A pentasaccharide epitope, lacto-N-fucopentaose II. CA 19-9 is produced by adenocarcinomas of the pancreas, stomach, gall bladder, colon, ovary, and lung, and is shed into the circulation. CA 19-9 levels were determined by Bayer Diagnostics. These samples were defined as 'pancreas, GI, and liver' cancer samples (sample group CA19-9 in Figure 13).

[00204] As shown in Figure 13, CTGF N-terminal fragment levels were elevated in the serum of cancer patients with various types of cancers as determined by elevated levels of certain cancer markers (as described above and shown in Figure 13), as compared to CTGF N-terminal fragment levels in the serum of normal individuals. Detection, quantitation, and comparison of the levels of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF in the serum of these patients revealed the presence of elevated levels of N-terminal fragments of CTGF in patients diagnosed with various forms of cancer (data not shown for the levels of CTGF and C-terminal fragments of CTGF).

Example 21: N-terminal fragments of CTGF in urine of Type I diabetes subjects

[00205] The levels of N-terminal fragments of CTGF in the urine of subjects diagnosed with type I diabetes were detected and quantitated using the CTGF ELISA assay described above. The extent of kidney tubular damage in patients with type I diabetes was assessed by measuring the amount of albumin in their urine (albuminuria), an often-used indicator of advanced kidney disease such as diabetic nephropathy. Patients were considered

WO 03/024308

PCT/US02/29500

to have a positive microalbuminuria test result with urine protein (albumin) excretion levels of 20 to 200 µg/minute. Macroalbuminuria was defined as urine protein (albumin) excretion levels in excess of 200 µg/minute. Patients were considered to be normal for albuminuria with urine protein (albumin) excretion levels of less than 20 µg/minute. Type I diabetic patients were therefore categorized as normal, microalbuminuria, or macroalbuminuria, based on the results of the albuminuria tests performed.

[00206] The levels of N-terminal fragments of CTGF were measured in the urine of patients with type I diabetes, and compared to the measured levels of urine creatinine. The data obtained for the levels of N-terminal fragments of CTGF in these individuals was converted (mathematical transformation) to logarithmic scale, as shown in Figure 14A. The results are presented as nanograms of N-terminal fragments of CTGF per milligram of creatinine. As shown in Figure 14A, elevated levels of N-terminal fragments of CTGF were detected in the urine from type I diabetes subjects with microalbuminuria and macroalbuminuria, as compared to that of type I diabetes patients with no albuminuria. CTGF or C-terminal fragments of CTGF were not detected in these samples (data not shown). The levels of N-terminal fragments of CTGF (nanograms) per milligram creatinine were highest in the urine of patients characterized as having macroalbuminuria.

[00207] Graphing the results on logarithmic scale following mathematical transformation of the data revealed that the levels of N-terminal CTGF fragments measured in urine correlated with the extent of kidney tubular damage (as measured by albuminuria/creatinine levels) in the groups measured (i.e., patients with normal albuminuria, microalbuminuria, or macroalbuminuria). (See Figure 14A)

[00208] The levels of N-terminal fragments of CTGF measured in the urine of type I diabetes patients were also compared to the rate of albumin excretion into the urine of these individuals. Measurement of the rate of albumin excretion (presented as micrograms albumin per minute) into urine is often used to indicate the extent of kidney damage or severity of kidney disease. As kidney damage increases, and proper or normal functions of the kidney are further impaired, a higher rate of albumin excretion into the urine is observed, compared to that observed in normal kidney. As shown in Figure 14B, increased levels of N-terminal fragments of CTGF (presented as nanograms of N-terminal fragments of CTGF per milligram creatinine) correlated well with increased rates of albumin excretion in urine from type I diabetes patients. The arrow in Figure 14B indicates the uppermost limit of albumin excretion rate in normal individuals.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

Example 22: CTGF in plasma of scleroderma patients

[00209] Scleroderma is a connective tissue disease characterized by fibrotic, degenerative, and inflammatory changes in the skin, blood vessels, skeletal muscles, and internal organs. Damage to the cells lining the walls of small arteries and an abnormal build-up of tough scar-like fibrous tissue in the skin are hallmarks of the disease. Patients with scleroderma may develop either a localized or systemic form of the disease. In localized scleroderma, areas on the skin of the hands and face are most often affected. In systemic scleroderma, the organs of the body, widespread areas of the skin, or both, may be involved. Systemic scleroderma, also known as systemic sclerosis, has two primary variants, called limited and diffuse scleroderma, both forms of which are progressive. The effects of limited scleroderma can be widespread, but most often the internal organs are not affected. Diffuse scleroderma can affect wide areas of the skin, connective tissue, and other organs. Death of affected individuals may occur from gastrointestinal, cardiac, kidney, or pulmonary involvement.

[00210] The levels of CTGF and fragments of CTGF were measured in the plasma of individuals with diffuse or with limited scleroderma, using methods described above, and compared to that seen in the plasma of normal individuals. No significant differences in the levels of CTGF or C-terminal fragments of CTGF were observed between normal individuals and individuals with diffuse or limited scleroderma. However, a difference in the levels of N-terminal fragments of CTGF was seen in the plasma of individuals with either diffuse or limited scleroderma, compared to that observed in normal individuals. Therefore, the detection, quantitation, and comparison of CTGF, N-terminal fragments of CTGF, and C-terminal fragments of CTGF in the plasma of these individuals revealed elevations in the levels of N-terminal fragments of CTGF in individuals with diffuse or limited scleroderma, which was not observed by determining the levels of CTGF or of C-terminal fragments of CTGF.

Example 23: CTGF in pulmonary fibrosis

[00211] Lung injury is a frequent side effect observed in anticancer therapy. Application of high doses of ionizing radiation is considered to cause deleterious pneumonitis and pulmonary fibrosis. Radiation pneumonitis, which ultimately leads to pulmonary fibrosis, is thought to be caused by radiation-induced local cytokine production confined to the field of irradiation. When radiation is combined with radio-sensitizing cytotoxic drugs, the ensuing fibrosis appears to be more pronounced and more rapid in onset than that observed with radiation treatment alone. The specific pathophysiologic changes associated

WO 03/024308

PCT/US02/29500

with the progression from pneumonitis to fibrosis have not been fully defined. Measuring and determining loss of lung function in these patients is currently employed to determine the extent and progression of fibrosis.

[00212] Experimental evidence indicates that CTGF expression is elevated following lung injury. For example, CTGF levels have been shown to be elevated in bleomycin-induced lung fibrosis in mice. (Lasky et al. (1998) *Am J Physiol* 275:L365-L371.) Additionally, CTGF mRNA levels were increased by more than 10-fold in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from patients with interstitial pulmonary fibrosis (IPF), by more than 40-fold in stage I/II sarcoidosis patients, and by more than 90-fold in stage III/IV sarcoidosis patients, compared to that present in BAL fluid from healthy, non-smoking control patients without lung fibrosis. (Allen et al. (1999) *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:693-700.) Therefore, it would be expected that CTGF and fragments of CTGF would be elevated in plasma and BAL fluid from patients having undergone radiation exposure either with or without combination therapy involving radio-sensitizing cytotoxic drugs. Changes in the levels of CTGF or fragments of CTGF in plasma, sputum, or lung lavage would thus serve as a diagnostic measure of changes in lung pathology occurring in patients undergoing radiation therapy. Therefore, monitoring the levels of CTGF and fragments of CTGF following such therapeutic treatments, using methods of the present invention, would provide a diagnostic predictor of a fibrotic response which would occur following specific therapies.

Example 24: CTGF in schistosomiasis

[00213] Advanced cases of schistosomiasis are characterized by the presence of schistosomal eggs in the liver. In untreated patients, a granulomatous response to the eggs is followed by the development of extensive hepatic fibrosis and hepatomegaly. Periportal fibrosis is accompanied by splenomegaly, portal vein dilatation, and the development of portosystemic collaterals. (Kardorff et al. (1999) *Acta Tropica* 73:153-164.) These changes are positively correlated with an increase in serum levels of fibrosis markers, such as carboxyterminal procollagen IV peptide (NC1) and hyaluronan. (Kardorff et al. (1999) *supra*, and Ricard-Blum et al. (1999) *Am J Trop Med Hyg* 60:658-663.)

[00214] Changes in the levels of CTGF or fragments of CTGF in plasma, urine, or tissue biopsies would serve as a diagnostic measure of changes in liver pathology occurring in individuals affected with schistosomiasis. Therefore, monitoring the levels of CTGF and fragments of CTGF in such individuals, using methods of the present invention, would

WO 03/024308

PCT/US02/29500

provide a diagnostic predictor of a fibrotic response in the liver following infection and progression of schistosomiasis.

Example 25: CTGF in inflammatory and infectious disorders

[00215] Constrictive bronchiolitis, also described as obliterative bronchiolitis in lung transplant patients, involves inflammation and fibrosis occurring predominantly in the walls and contiguous tissues of membranous and respiratory bronchioles with resultant narrowing of their lumens. Constrictive bronchiolitis is most often a complication of lung and heart-lung transplantation, but is also associated with bone marrow transplantation. Constrictive bronchiolitis is also associated with rheumatoid arthritis, after inhalation of toxic agents, after ingestion of certain drugs, and as a rare complication of adenovirus, influenza type A, measles, and *Mycoplasma pneumoniae* infections in children. Currently, histopathogenic diagnosis of constrictive bronchiolitis in lung transplant and other patients has been difficult to make, due to the patchy distribution of lesions, the technical difficulty in obtaining tissue in late lesions with extensive fibrosis, and the failure to recognize lesions. In early stages of the disease, constrictive bronchiolitis may be subtle and easily missed in routine hematoxylin-eosin-stained specimens, while in advanced stages, the disease may be equally difficult to diagnose if the patchy scarring in the lung is interpreted as nonspecific.

[00216] Other examples of inflammatory and infectious diseases associated with a fibrotic response, wherein detecting and quantitating the levels of CTGF and fragments of CTGF would be useful in the diagnosis and prognosis of such diseases, include the following: primary biliary cirrhosis, an autoimmune disease that predominantly affects women and is characterized by chronic progressive destruction of small intrahepatic bile ducts with portal inflammation and ultimately fibrosis; idiopathic pulmonary fibrosis, recently characterized as having adenovirus involvement in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis or interstitial pneumonia associated with collagen vascular disease; and renal parenchymal infection, such as pyelonephritis (i.e., inflammation of the parenchyma of the kidney and the lining of the renal pelvis of the kidney, often due to bacterial infection), believed to be a prerequisite for acquired (postnatal) renal scarring.

[00217] Changes in the levels of CTGF or fragments of CTGF in plasma, urine, or tissue biopsies would serve as a diagnostic measure of the initiation and progression of a fibrotic response in tissues occurring following infection and inflammation. Therefore, monitoring the levels of CTGF and fragments of CTGF in such individuals, using methods of the present invention, would provide a diagnostic predictor and a method of monitoring the

WO 03/024308

PCT/US02/29500

progression of a fibrotic response following infection inflammation associated with a variety of disorders.

[00218] Various modifications of the invention, in addition to those shown and described herein, will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

[00219] All references cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

We claim:

1. A method for quantitating the level of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment in a sample, the method comprising:
 - (a) contacting a sample with a first reagent that specifically binds to a CTGF N-terminal fragment region under conditions suitable for binding;
 - (b) isolating the first reagent; and
 - (c) quantitating the level of polypeptide bound to the first reagent.
2. The method of claim 1, wherein the first reagent is bound to a substrate.
3. The method of claim 1, wherein the first reagent is an antibody or functional fragment thereof.
4. The method of claim 1, the method further comprising:
 - (a) adding a second reagent selected from the group consisting of a reagent that specifically binds to the first reagent and a reagent that specifically binds to a CTGF region different from the region bound by the first reagent, under conditions suitable for binding;
 - (b) removing unbound second reagent; and
 - (c) quantitating the amount of bound second reagent, wherein the amount of bound second reagent corresponds to the level of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment in the sample.
5. The method of claim 4, wherein the second reagent is attached to a detectable label.
6. The method of claim 5, wherein the detectable label is selected from the group consisting of fluorophores, radioactive isotopes, metals, and enzyme conjugates.
7. The method of claim 4, wherein the second reagent specifically binds to a CTGF region different from the region bound by the first reagent, and further wherein the second reagent specifically binds to a CTGF N-terminal fragment region.
8. The method of claim 4, wherein the second reagent specifically binds to the first reagent, and further wherein the second reagent specifically competes with polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment for binding to the first reagent.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

9. The method of claim 4, wherein the second reagent specifically binds to a CTGF region different from the region bound by the first reagent, and further wherein the second reagent specifically binds to a CTGF C-terminal fragment region.
10. The method of claim 4, wherein the second reagent is an antibody or functional fragment thereof.
11. The method of claim 9, wherein the second reagent is heparin optionally linked to a carrier.
12. The method of claim 1, wherein the sample is obtained from a mammal.
13. The method of claim 12, wherein the mammal is a human.
14. The method of claim 1, wherein the sample is selected from urine or plasma.
15. The method of claim 1, further comprising comparing the level of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment in the sample to a standard level of CTGF N-terminal fragment, wherein a difference between the level of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment in the sample and the level of CTGF N-terminal fragment in the standard is indicative of the presence of a CTGF-associated disorder.
16. The method of claim 15, wherein the CTGF-associated disorder is selected from the group consisting of renal fibrosis, liver fibrosis, cardiac fibrosis, inflammatory joint disease, cancer, diabetes, scleroderma, organ transplant, peritoneal dialysis, or myocardial infarction.
17. The method of claim 1, the method further comprising comparing the level of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment in a second sample to the level of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment in a first sample, wherein the first sample and second sample are obtained from the same source at different periods of time, and a difference between the level of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment in the second sample and the level of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment in the first sample is indicative of a change in the level of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment over time.
18. A method for diagnosing a CTGF-associated disorder, the method comprising:
 - (a) quantitating the level of polypeptide comprising CTGF N-terminal

WO 03/024308

PCT/US02/29500

- fragment in a sample from a subject; and
- (b) comparing the level of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment in the sample with a standard level, wherein an increased or decreased amount of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment in the sample is indicative of the presence of a CTGF-associated disorder.
19. A method for prognosis of a CTGF-associated disorder, the method comprising:
- (a) quantitating the level of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment in a sample from a subject; and
- (b) comparing the level of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment in the sample with a standard level, wherein an increased or decreased amount of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment in the sample is indicative of the presence of a CTGF-associated disorder.
20. A method for monitoring the progression of a CTGF-associated disorder in a subject, the method comprising:
- (a) obtaining a first sample from the subject at a first point in time;
- (b) obtaining a second sample from the subject at a second point in time;
- (c) quantitating the level of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment in the first and second samples; and
- (d) comparing the level of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment in the first sample to the level of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment in the second sample, wherein a difference between the level of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment in the first sample and the level of polypeptide comprising CTGF N-terminal fragment in the second sample is indicative of the progression of a CTGF-associated disorder.
21. A method for quantitating the level of polypeptide comprising CTGF C-terminal fragment in a sample, the method comprising
- (a) contacting a sample with a first reagent which specifically binds to a C-terminal fragment region under conditions suitable for binding;
- (b) isolating the first reagent;
- (c) adding a second reagent which binds specifically to a CTGF C-terminal fragment region different from the region bound by the first reagent;
- (d) removing unbound second reagent; and
- (e) measuring the amount of bound second reagent.

WO 03/024308

PCT/US02/29500

22. A kit for detecting or quantitating CTGF in a sample, the kit comprising
- (a) a first reagent which binds specifically to a region on CTGF; and
 - (b) a second reagent which binds specifically to a region on CTGF different from the region bound by the first reagent.

WO 03/024308

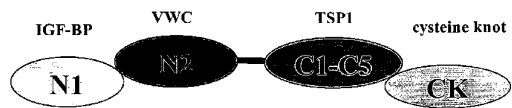
PCT/US02/29500

A.

CTGF TRANSCRIPT



CTGF PROTEIN



CTGF ANTIBODIES

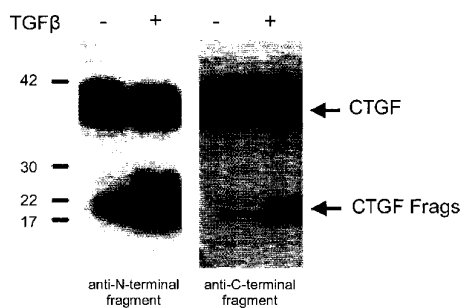


Figure 1

WO 03/024308

PCT/US02/29500

B.



C.

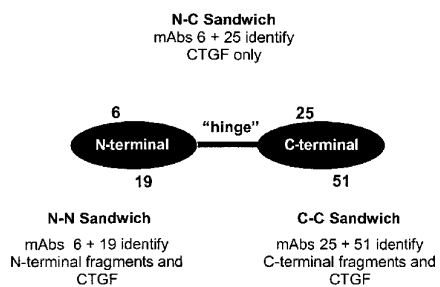


Figure 1 (cont.)

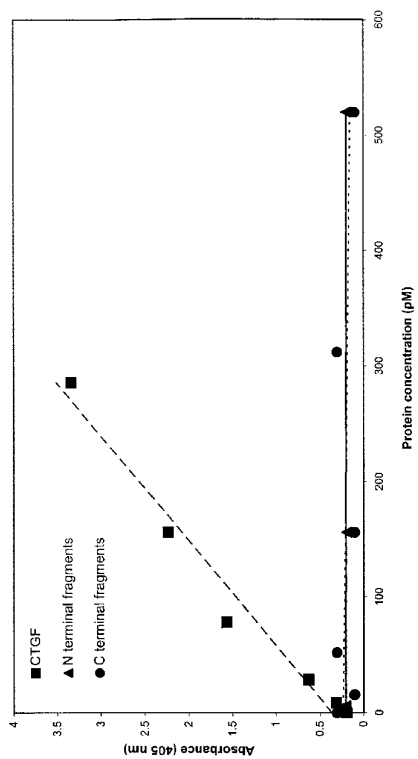


Figure 2

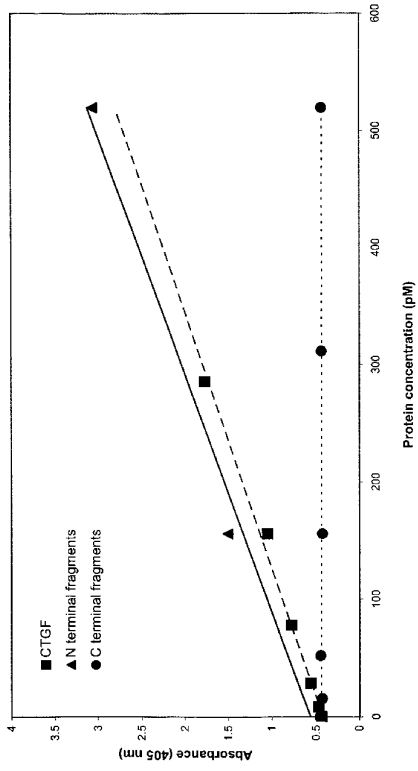


Figure 3

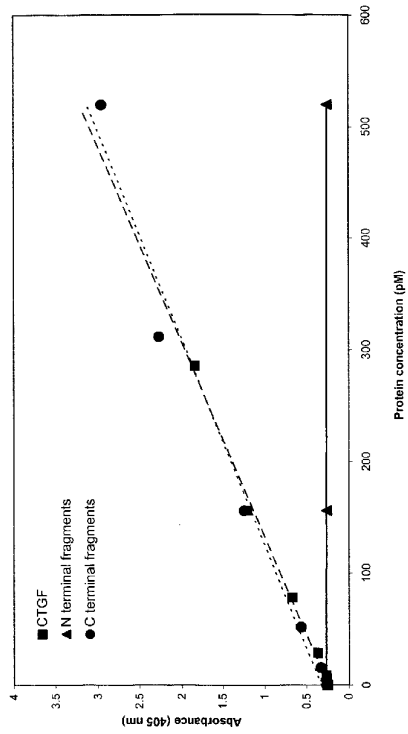


Figure 4

WO 03/024308

PCT/US02/29500

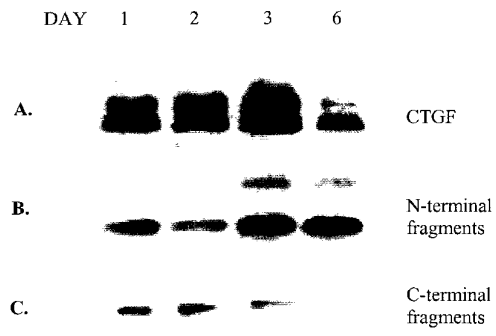


Figure 5

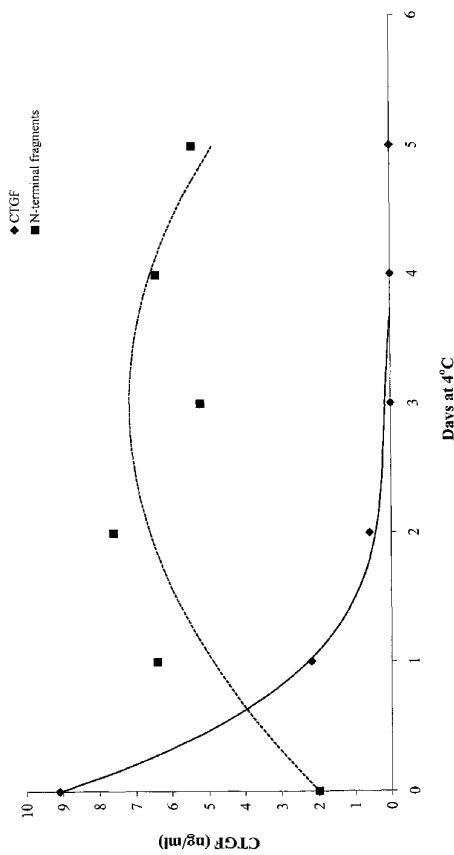


Figure 6

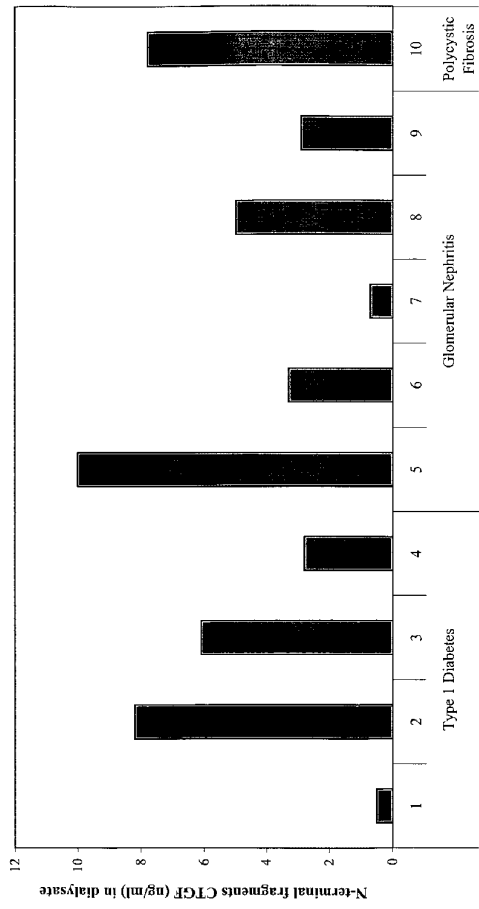


Figure 7A

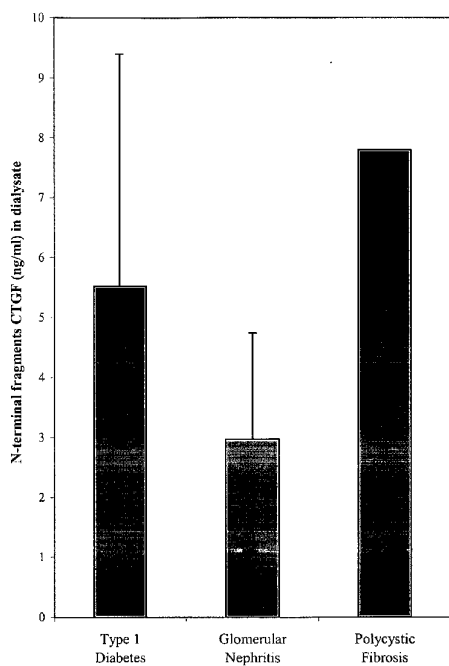


Figure 7B

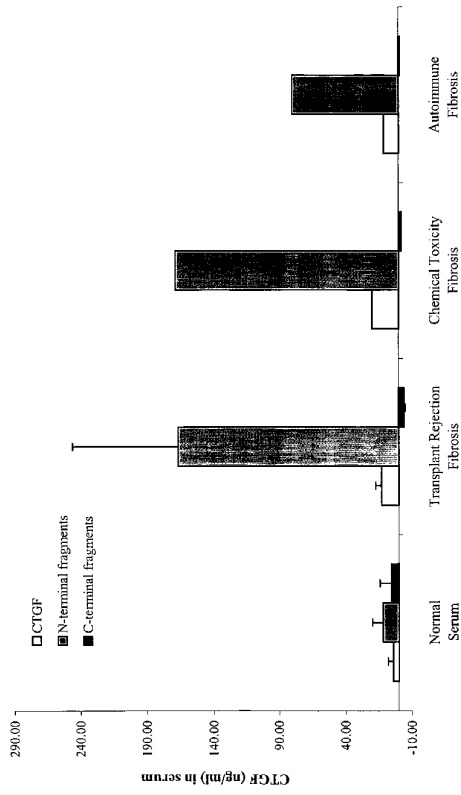


Figure 8

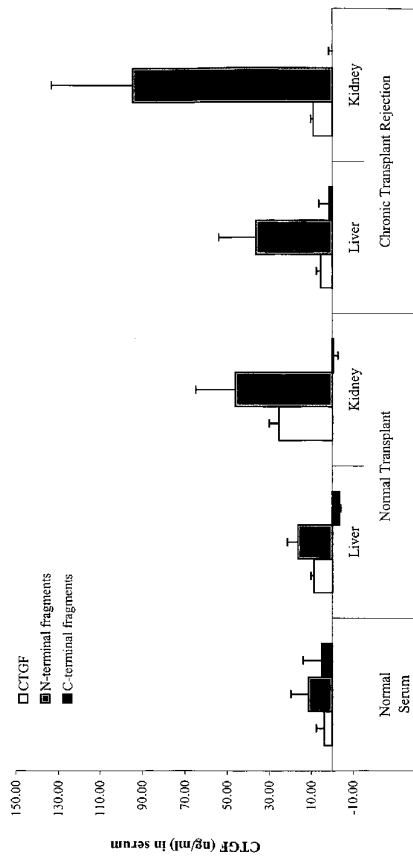


Figure 9

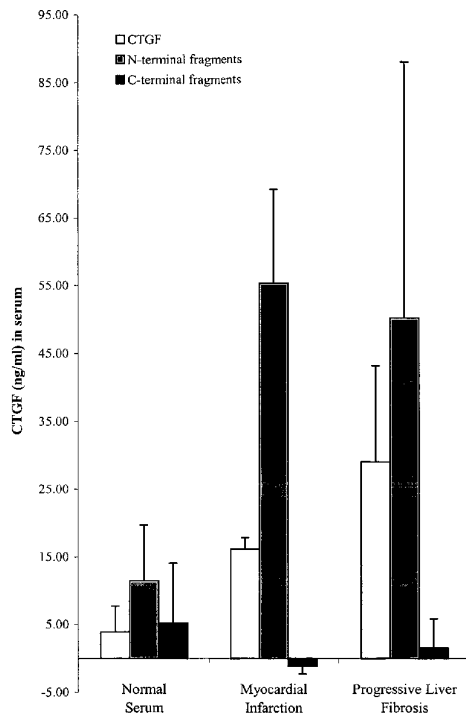


Figure 10

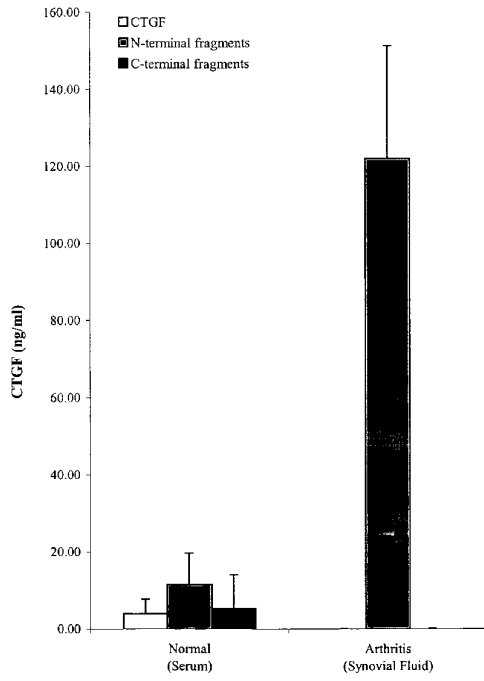


Figure 11

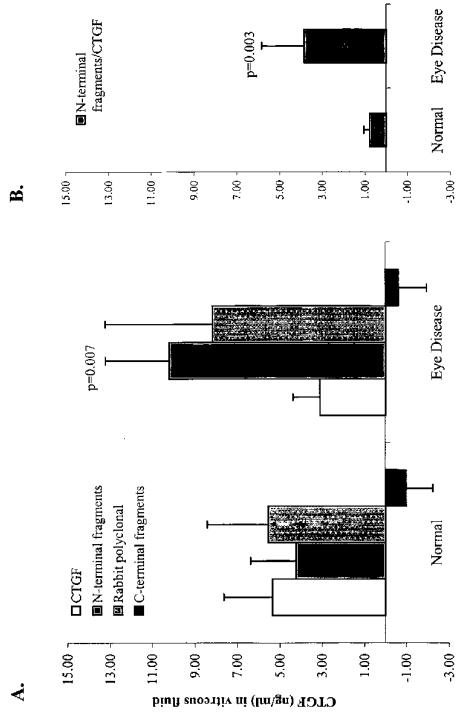


Figure 12

WO 03/024308

PCT/US02/29500

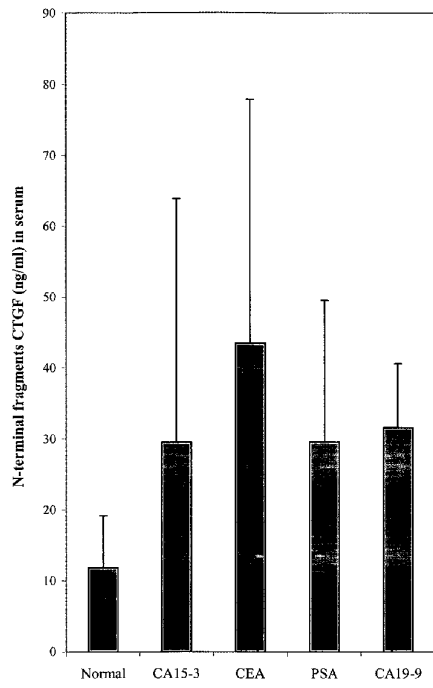


Figure 13

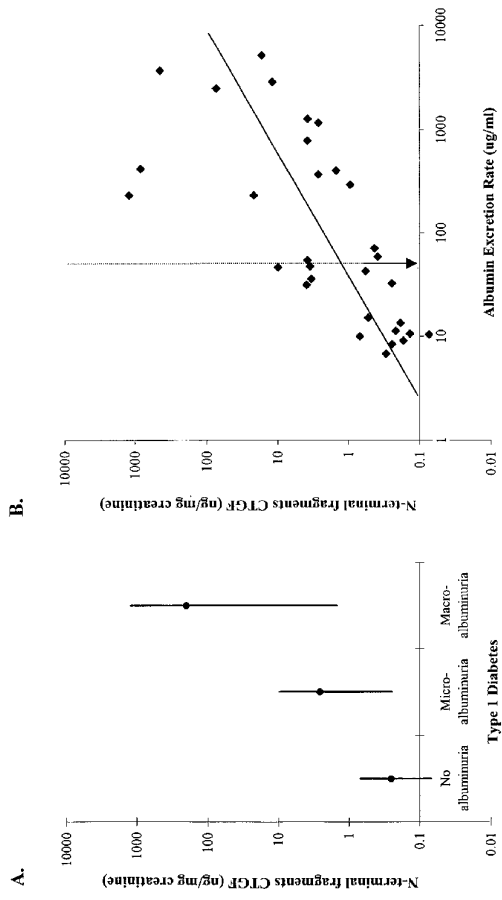


Figure 14

WO 03/024308

PCT/US02/29500

```

                                exon3 | exon4
ggg cct gcc ctc gcg gct tac cga ctg gaa gac acg ttt ggc cca gac   573
Gly Pro Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro Asp
Chymotrypsin(CT)*180      CT*  *(PM)Plasmin      CT*  190

cca act atg att aga gcc aac tgc ctg gtc cag acc aca gag tgg agc   621
Pro Thr Met Ile Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp Ser
195      *PM      200  TSP1      205

gcc tgt tcc aag acc tgt ggg atg ggc atc tcc acc cgg gtt acc aat   669
Ala Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr Asn
Thrombospondin type 1 Domain      220

gac aac gcc tcc tgc agg cta gag aag cag agc cgc ctg tgc atg gtc   717
Asp Asn Ala Ser Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met Val
225      230      235

                                exon4 | exon5
agg cct tgc gaa gct gac ctg gaa gag aac att aag aag ggc aaa aag   765
Arg Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys Lys
240      245      Cystine-knot Motif

tgc atc cgt act ccc aaa atc tcc aag cct atc aag ttt gag ctt tct   813
Cys Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ser Lys Pro Ile Lys Phe Glu Leu Ser
260      265      270

gcc tgc acc agc atg aag aca tac cga gct aaa ttc tgt gga gta tgt   861
Gly Cys Thr Ser Met Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys Gly Val Cys
275      280      285

acc gac ggc cga tgc tgc acc ccc cac aga acc acc acc ctg cgg gtc   909
Thr Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro Val
290      295      300

gag ttc aag tgc cct gac ggc gag gtc atg aag aag aac atg atg ttc   957
Glu Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Val Met Lys Lys Asn Met Met Phe
305      310      315

atc aag acc tgt gcc tgc cat tac aac tgt ccc gga gac aat gac atc   100:
Ile Lys Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp Asn Asp Ile
320      325      330      335

ttt gaa tgg ctg tac tac agg aag atg tac gga gac atg gca tga     105:
Phe Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala
340      345

```

Figure 15 (cont.)

WO 03/024308

PCT/US02/29500

SEQUENCE LISTING

<110> Weitz, Stephen L
 Usinger, William R

<120> METHODS OF ASSAYING CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTOR

<130> FP0812 PCT

<150> US 60/323,305
 <151> 2001-09-18

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 1050
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 atgaccgccc ccagtatggg ccccgctcgc gtcgccttcg tggctcctct cgcctctcgc 60
 agccggccgg ccgctggcca gaactgcagc gggccgtgcc ggtgcccgga cgagccggcg 120
 ccgcgctgcc cggcgggctg ggcctctgtg ctggacggct gggctgctg ccgcgtctgc 180
 gccaagcagc tggcgagcct gtgcaccgag cgcgacctc gcgacctgca caaggccctc 240
 ttctgtgact tcggctcccc ggccaaccgc aagatcggcg tgtgcaccgc caaagatggt 300
 gctccctgca tcttcggtag tacggtgtac cgcagcggag agtccttcca gagcagctgc 360
 aagtaccagt gcacgtgcct ggacggggcg gtgggctgca tgcctctgtg cagcatggac 420
 gttcgtctgc ccagccctga ctgccccttc ccgaggaggg tcaagctgcc cgggaaatgc 480
 tgcgaggagt ggggtgtgta ctagcccaag gaccaaaccg tggttgggcc tgcctctcgc 540
 gcttaccgac tggagacac gtttggccca gacccaacta tgattagagc caactgcctg 600
 gtccagacca cagagtggag cgcctgttcc aagacctgtg ggatgggcat ctccaccggg 660
 gttaccaatg acaacgcctc ctgcaggcta gagaagcaga gccgcctgtg catggtcagg 720
 ccttgcgaag ctgacctgga agagaacatt aagaaggcca aaaagtgcac ccgtactccc 780
 aaaatctcca agcctatcaa gtttgagctt tctggetgca ccagcatgaa gacataccga 840
 gctaaattct gtggagtatg taccgacggc cgatgctgca cccccacag aaccaccacc 900
 ctgcgggtgg agttcaagtg ccctgacggc gaggtcatga agaagaacat gatgttcac 960
 aagacctgtg cctgccatta caactgtccc ggagacaatg acatctttga atcgctgtac 1020
 tacaggaaga tgtaccgaga catggcatga 1050

<210> 2
 <211> 349

WO 03/024308

PCT/US02/29500

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Thr Ala Ala Ser Met Gly Pro Val Arg Val Ala Phe Val Val Leu
 1          5          10          15

Leu Ala Leu Cys Ser Arg Pro Ala Val Gly Gln Asn Cys Ser Gly Pro
 20          25          30

Cys Arg Cys Pro Asp Glu Pro Ala Pro Arg Cys Pro Ala Gly Val Ser
 35          40          45

Leu Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Lys Gln Leu
 50          55          60

Gly Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro Cys Asp Pro His Lys Gly Leu
 65          70          75          80

Phe Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val Cys Thr
 85          90          95

Ala Lys Asp Gly Ala Pro Cys Ile Phe Gly Gly Thr Val Tyr Arg Ser
100          105          110

Gly Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys Leu Asp
115          120          125

Gly Ala Val Gly Cys Met Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg Leu Pro
130          135          140

Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys
145          150          155          160

Cys Glu Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp Gln Thr Val Val Gly
165          170          175

Pro Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro
180          185          190

Thr Met Ile Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp Ser Ala
195          200          205

Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp
210          215          220

```

WO 03/024308

PCT/US02/29500

Asn Ala Ser Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met Val Arg
225 230 235 240

Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys Lys Cys
245 250 255

Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ser Lys Pro Ile Lys Phe Glu Leu Ser Gly
260 265 270

Cys Thr Ser Met Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys Gly Val Cys Thr
275 280 285

Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro Val Glu
290 295 300

Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Val Met Lys Lys Asn Met Met Phe Ile
305 310 315 320

Lys Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp Asn Asp Ile Phe
325 330 335

Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala
340 345

<210> 3
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
gctccgcccg cagtgggata catgaccgcc gcc 33

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
ggatccggat cctcatgccca tgtctccgta 30

<210> 5
<211> 349
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 5
Met Ser Ala Thr Gly Leu Gly Pro Val Arg Cys Ala Phe Val Leu Leu
1 5 10 15

WO 03/024308

PCT/US02/29500

Leu Ala Leu Cys Ser Arg Pro Ala Ser Ser Gln Asp Cys Ser Ala Pro
 20 25 30
 Cys Gln Cys Pro Ala Gly Pro Ala Pro Arg Cys Pro Ala Gly Val Ser
 35 40 45
 Leu Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Lys Gln Leu
 50 55 60
 Ser Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro Cys Asp Pro His Lys Gly Leu
 65 70 75 80
 Phe Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val Cys Thr
 85 90 95
 Ala Lys Asp Gly Ala Pro Cys Val Phe Gly Gly Thr Val Tyr Gln Ser
 100 105 110
 Gly Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys Leu Asp
 115 120 125
 Gly Ser Val Gly Cys Val Pro Leu Cys Ser Val Asp Val Arg Leu Pro
 130 135 140
 Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys
 145 150 155 160
 Cys Glu Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Glu His Thr Val Val Gly
 165 170 175
 Pro Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Pro Glu Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro
 180 185 190
 Thr Met Ile Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp Ser Ala
 195 200 205
 Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp
 210 215 220
 Asn Ala Phe Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met Val Arg
 225 230 235 240
 Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys Lys Cys
 245 250 255
 Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ser Lys Pro Ile Lys Phe Glu Leu Ser Gly

WO 03/024308

PCT/US02/29500

260 265 270

Cys Thr Ser Met Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys Gly Val Cys Thr
275 280 285

Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro Val Glu
290 295 300

Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Val Met Lys Lys Ser Met Met Phe Ile
305 310 315 320

Lys Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp Asn Asp Ile Phe
325 330 335

Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala
340 345

<210> 6
<211> 349
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 6

Met Ser Ala Thr Gly Leu Ser Pro Val Arg Cys Ala Phe Val Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Ser Arg Pro Ala Ser Gly Gln Asp Cys Ser Gly Gln
20 25 30

Cys Gln Cys Ala Ala Gly Lys Arg Arg Ala Cys Pro Ala Gly Val Ser
35 40 45

Leu Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys Arg Leu Cys Ala Lys Gln Leu
50 55 60

Gly Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro Cys Asp Pro His Lys Gly Leu
65 70 75 80

Phe Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val Cys Thr
85 90 95

Ala Lys Asp Gly Ala Pro Cys Val Phe Gly Gly Thr Val Tyr Arg Ser
100 105 110

Gly Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys Leu Asp
115 120 125

WO 03/024308

PCT/US02/29500

Gly Ala Val Gly Cys Val Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg Leu Pro
 130 135 140
 Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys
 145 150 155 160
 Cys Glu Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp His Thr Val Val Gly
 165 170 175
 Pro Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro
 180 185 190
 Thr Met Met Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp Ser Ala
 195 200 205
 Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp
 210 215 220
 Asn Ala Phe Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met Val Arg
 225 230 235 240
 Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys Lys Cys
 245 250 255
 Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ser Lys Pro Val Lys Phe Glu Leu Ser Gly
 260 265 270
 Cys Thr Ser Val Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys Gly Val Cys Thr
 275 280 285
 Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro Val Glu
 290 295 300
 Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Val Met Lys Lys Ser Met Met Phe Ile
 305 310 315 320
 Lys Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp Asn Asp Ile Phe
 325 330 335
 Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala
 340 345

<210> 7
 <211> 347
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

WO 03/024308

PCT/US02/29500

<400> 7

```

Met Leu Ala Ser Val Ala Gly Pro Val Ser Leu Ala Leu Val Leu Leu
1      5      10      15

Leu Cys Thr Arg Pro Ala Thr Gly Gln Asp Cys Ser Ala Gln Cys Gln
20      25      30

Cys Ala Ala Glu Ala Ala Pro Arg Cys Pro Ala Gly Val Ser Leu Val
35      40      45

Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Lys Gln Leu Gly Glu
50      55      60

Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro Cys Asp Pro His Lys Gly Leu Phe Cys
65      70      75      80

Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val Cys Thr Ala Lys
85      90      95

Asp Gly Ala Pro Cys Val Phe Gly Gly Ser Val Tyr Arg Ser Gly Glu
100     105     110

Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys Leu Asp Gly Ala
115     120     125

Val Gly Cys Val Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg Leu Pro Ser Pro
130     135     140

Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys Cys Glu
145     150     155     160

Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp Arg Thr Val Val Gly Pro Ala
165     170     175

Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro Thr Met
180     185     190

Met Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp Ser Ala Cys Ser
195     200     205

Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp Asn Thr
210     215     220

Phe Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys
225     230     235     240

```

7

WO 03/024308

PCT/US02/29500

Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys Lys Cys Ile Arg
245 250 255

Thr Pro Lys Ile Ala Lys Pro Val Lys Phe Glu Leu Ser Gly Cys Thr
260 265 270

Ser Val Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys Gly Val Cys Thr Asp Gly
275 280 285

Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro Val Glu Phe Lys
290 295 300

Cys Pro Asp Gly Glu Ile Met Lys Lys Asn Met Met Phe Ile Lys Thr
305 310 315 320

Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp Asn Asp Ile Phe Glu Ser
325 330 335

Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala
340 345

<210> 8
<211> 348
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8

Met Leu Ala Ser Val Ala Gly Pro Ile Ser Leu Ala Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

Ala Leu Cys Thr Arg Pro Ala Thr Gly Gln Asp Cys Ser Ala Gln Cys
20 25 30

Gln Cys Ala Ala Glu Ala Ala Pro His Cys Pro Ala Gly Val Ser Leu
35 40 45

Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Lys Gln Leu Gly
50 55 60

Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro Cys Asp Pro His Lys Gly Leu Phe
65 70 75 80

Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val Cys Thr Ala
85 90 95

WO 03/024308

PCT/US02/29500

Lys Asp Gly Ala Pro Cys Val Phe Gly Gly Ser Val Tyr Arg Ser Gly
 100 105 110
 Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys Leu Asp Gly
 115 120 125
 Ala Val Gly Cys Val Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg Leu Pro Ser
 130 135 140
 Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys Cys
 145 150 155 160
 Lys Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp Arg Thr Ala Val Gly Pro
 165 170 175
 Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro Thr
 180 185 190
 Met Met Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp Ser Ala Cys
 195 200 205
 Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp Asn
 210 215 220
 Thr Phe Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met Val Arg Pro
 225 230 235 240
 Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys Lys Cys Ile
 245 250 255
 Arg Thr Pro Lys Ile Ala Lys Pro Val Lys Phe Glu Leu Ser Gly Cys
 260 265 270
 Thr Ser Val Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys Gly Val Cys Thr Asp
 275 280 285
 Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro Val Glu Phe
 290 295 300
 Lys Cys Pro Asp Gly Glu Ile Met Lys Lys Asn Met Met Phe Ile Lys
 305 310 315 320
 Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp Asn Asp Ile Phe Glu
 325 330 335
 Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala

WO 03/024308

PCT/US02/29500

340

345

【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 March 2003 (27.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/024308 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/53, 33/537, 33/566, 33/543
- (21) International Application Number: PCT/US02/29500
- (22) International Filing Date: 18 September 2002 (18.09.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/323,305 18 September 2001 (18.09.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): FIBROGEN, INC. [US/US]; 225 Gateway Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): WEITZ, Stephen, L. [US/US]; 2757 Best Avenue, Oakland, CA 94619 (US).
USINGER, William, R. [US/US]; 1056 Roderick Court, Lafayette, CA 94549 (US).
- (74) Agent: TURNER, Christopher; Intellectual Property Department, Fibrogen, Inc., 225 Gateway Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UJ, TM); European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 21 August 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

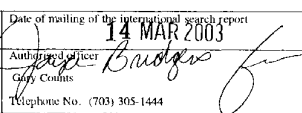


WO 03/024308 A3

(54) Title: METHODS OF ASSAYING CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTOR

(57) Abstract: The present invention relates to methods of detection and quantitation of connective tissue growth factor (CTGF), and diagnosis and detection of various CTGF-associated diseases and disorders.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/29500
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : G01N 33/53, 33/537, 33/566, 33/543 US CL : 435/7.1, 975, 7.92; 436/501, 518 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) U.S. : 435/7.1, 975, 7.92; 436/501, 518		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,408,040 A (GROTENDORST et al) 18 April 1995 (18.04.1995), column 2, lines 25-52, column 5, lines 30-44; column 6, lines 23-37	1-22
Y	KOHLER et al. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 07 August 1975. Vol. 256, pages 495-497, whole document.	1-22
Y	TAMATANI et al. Establishment of the enzyme-linked immunosorbent assay for Connective Tissue Growth Factor (CTGF) and its detection in the sera of biliary atresia. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1998, Vol. 251, pages 748-752, whole document.	1-22
Y	US 5,420,016 A (BOGUSLASKI et al) 30 May 1995 (30.05.1995), column 7, lines 8-15.	22
A	US 5,876,730 A (BRIGSTOCK et al) 02 March 1999 (02.03.1999), whole document.	1-22
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	*-*
B	earlier application or patent published on or after the international filing date	*X*
L	document which may throw doubts on priority claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y*
O	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z*
P	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*A*
Date of the actual completion of the international search 03 December 2002 (03.12.2002)		Date of mailing of the international search report 14 MAR 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer  City Credits Telephone No. (703) 305-1444

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ユージンガー, ウィリアム, アール.

アメリカ合衆国 9 4 5 4 9 カリフォルニア州, ラファイエット, ロデリック コート 1 0 5
6

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA41 BA80 CA04 DA02 EA02

4H045 AA30 BA10 CA40 DA01 DA76 EA50 EA51 FA72 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005505757A5	公开(公告)日	2006-01-05
申请号	JP2003528210	申请日	2002-09-18
[标]申请(专利权)人(译)	菲布罗根有限公司		
申请(专利权)人(译)	五低创公司		
[标]发明人	ウェイツステーブンエル ユージンガーウィリアムアール		
发明人	ウェイツ,ステイーブン,エル. ユージンガー,ウィリアム,アール.		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C07K14/475		
CPC分类号	G01N33/6887 G01N33/74		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D C12N15/00.A C07K14/475		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/323305 2001-09-18 US		
其他公开文献	JP4226471B2 JP2005505757A		

摘要(译)

本发明涉及检测和定量结缔组织生长因子 (CTGF) 的方法，以及诊断和检测各种CTGF相关疾病和病症的方法。