

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6309669号
(P6309669)

(45) 発行日 平成30年4月11日(2018.4.11)

(24) 登録日 平成30年3月23日(2018.3.23)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006.01)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)

GO 1 N 33/53 Z N A D
C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21

請求項の数 12 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-81328 (P2017-81328)
(22) 出願日 平成29年4月17日(2017.4.17)
(62) 分割の表示 特願2014-165737 (P2014-165737)
の分割
原出願日 平成20年11月4日(2008.11.4)
(65) 公開番号 特開2017-181509 (P2017-181509A)
(43) 公開日 平成29年10月5日(2017.10.5)
審査請求日 平成29年5月15日(2017.5.15)
(31) 優先権主張番号 0721713.6
(32) 優先日 平成19年11月5日(2007.11.5)
(33) 優先権主張国 英国 (GB)
(31) 優先権主張番号 0722748.1
(32) 優先日 平成19年11月20日(2007.11.20)
(33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 503259129
ノルディック・バイオサイエンス・エー／エ
ス
N O R D I C B I O S C I E N C E A
／ S
デンマーク国、デーカー 2730 ヘル
レフ、ヘルレフ・ホーフエダガーデ 20
7
(74) 代理人 100099623
弁理士 奥山 尚一
(74) 代理人 100096769
弁理士 有原 幸一
(74) 代理人 100107319
弁理士 松島 鉄男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CVDリスク評価のための生化学マーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロテイナーゼによる III型コラーゲン の切断によって形成されるネオエピトープを含むペプチド断片の定量のためのバイオアッセイの方法であって、前記ペプチド断片を含む試料を、前記ネオエピトープに対する特異的結合親和性を有する免疫学的結合パートナーと接触させるステップと、前記試料中の前記免疫学的結合パートナーのペプチド断片への結合レベルを定量するステップとを含む、

前記免疫学的結合パートナーが、ネオエピトープ配列を含む未切断の III型コラーゲン には特異的に結合せず、かつ、

前記免疫学的結合パートナーが、 III型コラーゲンの以下の部分配列：

G * K N G E T G P Q G P P G P T G P G G D K G D T G P P G P Q G * L

の * で示される位置における III型コラーゲン の切断によって形成されるネオエピトープを含むペプチド断片に対する特異的結合親和性を有する、方法。

【請求項 2】

前記免疫学的結合パートナーが、ペプチドのN末端において III型コラーゲン の以下の配列：

K N G E T G

に対する特異的結合親和性を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記免疫学的結合パートナーが、特異的結合親和性を有するモノクローナル抗体または

10

20

モノクローナル抗体の断片である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記方法が、前記免疫学的結合パートナー及び競合物質が前記試料の存在下にてインキュベートされ、前記競合物質が試料中のペプチド断片と競合して前記免疫学的結合パートナーと結合する競合イムノアッセイとして行われる、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記競合物質が合成ペプチドである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記試料が、尿、血清、血液又は血漿の試料である、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記試料が患者由来試料であり、前記方法が、前記ペプチド断片の結合の定量レベルを、(a) 比較できる健常患者および/または (b) アテローム性動脈硬化病態の特徴を示す数値と比較するステップをさらに含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

ⅠⅠⅠ型コラーゲンのプロテイナーゼ切断によって形成される、C末端又はN末端ネオエピトープに対する免疫学的結合パートナーであって、ⅠⅠⅠ型コラーゲンの以下の部分配列：

G * K N G E T G P Q G P P G P T G P G G D K G D T G P P G P Q G * L

20

の*で示される位置におけるⅠⅠⅠ型コラーゲンの切断によって形成されるネオエピトープを含むペプチド断片に対する特異的結合親和性を有する、免疫学的結合パートナー。

【請求項 9】

前記免疫学的結合パートナーが、ペプチドのN末端におけるⅠⅠⅠ型コラーゲンの以下の配列：

K N G E T G

に対する特異的結合親和性を有する、請求項 8 に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 10】

モノクローナル抗体又はその結合断片である、請求項 8 または 9 に記載の免疫学的結合パートナー。

30

【請求項 11】

請求項 10 に記載のモノクローナル抗体を産生する細胞株。

【請求項 12】

請求項 8 ～ 10 のいずれか一項に記載の免疫学的結合パートナーと、前記免疫学的結合パートナーに結合する競合物質と、任意選択的に、1つ以上の洗浄試薬、緩衝液、停止試薬、酵素標識、標識酵素のための基質、校正基準、抗マウス抗体及びキットを用いてアッセイを行うための使用説明書とを含むイムノアッセイキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

本発明は、アテローム性動脈硬化の進展及びプラーク不安定性から生じる心血管事象のリスクを示す生化学マーカーを含む、心血管疾患の診断目的及び疾患の進展の予後に有益な生化学マーカーの検出のためのアッセイに関する。

【背景技術】

【0002】

世界的に、心血管疾患(CVD)は罹病及び死亡の主因である。現在、診断と患者の異なるリスク群への分類及び低リスク患者の診断を可能にする効果的且つ非侵襲的診断法はない。診断及び予後ツールは、主に、単純なマーカー、例えば、年齢、喫煙並びに種々の脂質及びリポ蛋白質濃度の多変量解析から成る。

【0003】

50

CVDは複数の臨床症候群を包括し、それは主に狭心症、心筋梗塞（冠動脈血栓）及び脳卒中である。通常、これらの症候群はすべて複雑なアテローム性動脈硬化の続発症である。

【0004】

アテローム性動脈硬化は小児期に内膜肥厚から始まり、動脈内膜における脂肪線条に進行し、これらの病変はそれぞれI型、II型と特徴付けられる。脂肪線条はアテローム性動脈硬化の進展における最も初期の肉眼で視認可能な病変であり、すべての人種及び社会のすべてのヒトに生じる。非病原性状態では内皮細胞（EC）は白血球との付着性相互作用に抵抗性である。しかし、アテローム発生時の炎症性サイトカイン及び動脈壁における蓄積酸化リポ蛋白質の作用は、大動脈ECの表面上における接着分子、例えば、細胞間接着分子（ICAM）-1及び血管細胞接着分子（VCAM）-1の発現を引き起こす。これは、白血球の捕捉及び内皮表面を貫通して血管壁の内膜部分への移動を許容する。プラークの発達は、置換やアポトーシスを起こす平滑筋細胞（SMC）の増加を伴い、これはマトリックス代謝回転の増加をもたらす。コラーゲン合成の障害は線維性被膜の脆弱性及びより破裂しやすい動脈硬化性プラークをもたらし得るが、大部分の研究者らは、蛋白質分解酵素、例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）及び他のプロテアーゼの作用が、プラークの破裂のリスクに重大に寄与すると考えている（Clarkson and Kaplan 509-28）。

10

【0005】

プラークは2つの異なるタイプ、「不安定」及び「安定」プラークに分けられる。しかし、詳細な組織学的分析及び分子的理解のために、より詳細な分類が用いられることが多い。プラークの発達には3つの主要な段階、すなわち、初期、脂肪線条、及び、複雑性/進行性プラークがある（Stary H.C.）。

20

【0006】

動脈硬化性プラークは動脈内膜内で発達し、その組成及び構造により分類され得る。この分類では病変を8つのタイプに分類する（Stary H.C.）。

I．脂肪滴に満ち、脂肪滴によって拡大されたマクロファージ（マクロファージ泡沫細胞）が内膜に増加する。

II．マクロファージ泡沫細胞が内膜SMC内で脂肪滴とともにプロテオグリカン層の深部に蓄積する。泡沫細胞層は脂肪線条として視認可能である。II型病変では、単球がヒトアテロームにおいて過剰発現する単球走化性蛋白質（主にMCP-1）によって内膜を貫通する。病変の初期タイプ（I型及びII型）は幼児期に始まり得、必ずしもプラークの破裂には至らない。更に、アテローム性動脈硬化の発達はIII型病変の形成後に終了し得、プラークの形成は予測可能ではない（Stary H.C.）。

30

III．III型病変は脂肪線条（II型）とアテローム（IV型）との中間病変として判定される。これらの病変は細胞外脂質のプールを含み、これにより、内膜の筋弾性層の通常密接に隣接しているSMC間の空間を拡張する。物質のプールは通常ここに存在するプロテオグリカン及びコラーゲン線維に取って代わり得るが、これはアテローム発生のこの段階においてほとんど影響なく生じる。

IV．アテロームはアテローム性動脈硬化の最初の臨床徴候である。脂質の蓄積細胞外プールによる動脈内膜におけるSMCの移動及び内膜構造の崩壊が、IV型病変の顕著な特徴である。脂質コアの形成は、このSMC移動の最終結果である。脂質コアの形成は壁肥厚の増大の説明となる。脂質コアは深部内膜の大きな明瞭な輪郭をした領域であり、この動脈壁部分の通常の構造要素が高密度の泡沫細胞残遺物、遊離脂肪滴、コレステロール結晶及びカルシウム粒子に置換されている。通常、この領域に存在するSMCは、アテローム性動脈硬化のこの段階において減少し、又は完全に消失する。残遺SMCは広範に分散し、伸長細胞体及び、多くの場合、異常に厚い基底膜を生成している。この段階では脂質コアを覆う層の発達が始まる。この層はコラーゲン/プロテオグリカンに富む細胞間マトリックス、脂肪滴を有する又は有しないSMC、マクロファージ及び泡沫細胞から成る。

40

V．IV型病変に対する応答は、線維性「被膜」を形成する修復線維組織マトリックスの

50

形成である。通常、これらの病変は脂質コア及び不規則に積み重なり合った修復組織の層から成る。血腫及び血栓形成のような事象がこれらのタイプの病変を更に複雑にし得る。致死的ではない場合、これらの病変合併症は病変に組み込まれ、コラーゲン及びプロテオグリカンから成る修復マトリックス組織の薄層に覆われる。細胞外マトリックス蛋白質であるコラーゲン及びプロテオグリカンの含量は被膜の形成時に動脈硬化性プラークにおいて増加する。

V I . 内皮の異常、例えば、亀裂、びらん、潰瘍、血腫、血栓、出血は、組み合わせられると、V I 型病変と命名されるより複雑な病変型となり得る。

V I I . 病変は石灰化病変と称される場合が多く、病変の50%超がミネラルから成る。石灰化に加え、これらの病変は大量の修復線維結合組織を含む。ここに閉じ込められたS M C がアポトーシスを受けて分解すると、その石灰化小器官は石灰化の一部になる。

V I I I . 線維性病変が石灰性病変に続く。線維性病変は完全にコラーゲンから成り脂質を含み得ない (S t a r y H . C .) 。

【0007】

心血管事象はプラークの破裂の結果である場合が多く、炎症及びプロテアーゼの放出が線維性被膜の肩領域を弱体化させ、プラークにおける脂肪質が壁在血栓を誘発する血液と接触することを許容する (C l a r k s o n a n d K a p l a n) 。マトリックス生成の減少と併せたプロテアーゼ活性の増大による線維性被膜の菲薄化がプラーク不安定性の顕著な特徴であると考えられ、破裂のリスクを高める。プラークの不安定性及びその破裂リスクは臨床的に興味深い分野である。不安定プラーク (V P) の定義は標準化されていないが、安定プラークと比べて3つの組織学的特徴の存在を明言する一般的な見解の一致がある。

1) 大きい脂質コア (総病変の40パーセント超)

2) 薄い線維性被膜 (65 ~ 150マイクロメートル)

3) 大量の急性炎症細胞

V P を定義するための主な基準には、活発な炎症 (単球、マクロファージ及びT細胞の存在) 、大きい脂質コアを有する薄い被膜、表在血小板凝集を伴う内皮の裸出、亀裂プラーク及び動脈の90%超の狭窄が含まれる。他の細かい基準には、表在石灰化結節、プラーク内出血、内皮機能障害及び外側の再構成が含まれる (S h i n , E d e l b e r g , a n d H o n g) 。

【0008】

プラーク合併症、不安定及び破裂は、医療処置及び/又は生活様式の変更によって抑制され得る。しかし、場合により、より侵襲的な方法、即ち、血管形成術又はバイパス手術が必要であり得る。

【0009】

現在、診断ツールは、依然として開発中である静止画像解析又はC V D リスクに関連する収縮期・拡張期血圧レベルのような低技術法に基づく。当該分野では高リスクにある患者をより良く同定し得る多変量解析の開発に多大な関心を向けてきた。そのようなモデルの1つがS C O R E モデル (S y s t e m a t i c C o r o n a r y R i s k E v a l u a t i o n モデル) である。1994年に、そして2003年に改訂されたのであるが、欧州アテローム性動脈硬化学会 (T h e E u r o p e a n A t h e r o s c l e r o s i s S o c i e t y) 、欧州心臓病学会 (T h e E u r o p e a n S o c i e t y o f C a r d i o l o g y) 及び欧州高血圧学会 (T h e E u r o p e a n S o c i e t y o f H y p e r t e n s i o n) は、冠動脈心疾患の予防に関する一組の推奨を公表した。このガイドラインは、無症状の患者におけるC V D リスクを評価するために、即ち、無症状の高リスク患者の同定のために開発された複数の評価法に基づく。S C O R E モデルは、性別、年齢、喫煙、収縮期血圧及び総コレステロール若しくはコレステロール / H D L 比をリスク因子として一体化している (G r a h a m e t a l .) 。

【0010】

より詳細な診断を行うためにはSCOREモデルは十分ではなく、撮像法が用いられる。従って、撮像法は主に高リスク群の患者又は研究期間中に用いられる。

【0011】

<撮像法>

現在、冠動脈造影法(CAG)は狭窄の程度を判定するための判断基準となる撮像法である。CAGは二次元にて血管腔を撮像するが、血管腔のみに限定され、血管壁を撮像しないため、CAGは安定プラークを有する動脈と不安定プラークを有する動脈とを識別することができない。CAGは患者が手術(血管形成術又はバイパス手術)を必要とするかを判定するために用いられる場合が多い。血管の狭窄箇所が進行したプラークであるかを判定するためには、他の手法、即ち、血管内冠動脈超音波(IVUS)又は血管顕微鏡法が必要である。

10

【0012】

IVUSはプラーク及び血管壁の二次元断面画像を提供し、血管壁及び形態及び石灰化の程度の特徴付けには良好であるが、病変における脂質を評価するには不向きな方法であると考えられている。しかし、IVUSは侵襲的であり、専門知識及び費用を必要とするため、その使用は広まっていない。血管顕微鏡法はアテローム性動脈硬化を理解・同定するのに有用なもう1つの方法である。血管顕微鏡法はプラーク表面の直接的可視化であり、プラークの色及び血栓を検出する能力を有する。しかし、血管顕微鏡法は侵襲的で技術的に困難であり、これまでプラークの拡張の程度を検出することができていない。現在多くの関心を引いているもう1つの撮像法は磁気共鳴画像法(MRI)である。MRIは非侵襲的であり、脳卒中の高リスクにある頸動脈プラークを同定することができる。一方、小さいプラークサイズ及び冠動脈の位置のため、MRIは冠動脈を撮像するのに最適な手法ではない。他の撮像法、即ち、エラストグラフィ、サーモグラフィ及び光干渉断層撮影が開発中である(Schaar et al.)。

20

【0013】

前述の撮像法はすべて開発中であり、単独ではいずれも不安定プラークを同定することができないが、破裂前に分子事象及びプラーク代謝回転を理解するのに有用なツールである。現在、早期においてCVDを診断する唯一の機会、問題となっている患者及びその患者の近親者の確立された冠動脈心疾患、末梢動脈疾患及び脳血管アテローム性動脈硬化症の一連のリスク因子を用いることである。

30

【0014】

<現在の生化学マーカー>

現在、アテローム性動脈硬化のリスク因子としていくつかの生化学マーカーが公知である。最近、血清中の生化学マーカー濃度の測定に多くの関心が向けられている。脂質、例えば、総コレステロール、低比重リポ蛋白コレステロール(LDL-C)及び高比重リポ蛋白コレステロール(HDL-C)並びに炎症マーカー、例えば、C反応性蛋白(CRP)、インターロイキン6(IL-6)、インターロイキン18(IL-18)、腫瘍壊死因子アルファ(TNF α)、CD40、CD40リガンド(CD40L)など。

【0015】

リポ蛋白の中で少なくとも2つの注目すべき進展があった。LDL粒子のサイズがアテローム性動脈硬化の進行を予測するに思われる。小さいLDL粒子の濃度上昇が大きい粒子の濃度上昇よりCVDリスクに関連する(Gardner, Fortmann, and Krauss)。

40

【0016】

HDL-Cのレベルはトリグリセリドに強く関連し、高レベルのトリグリセリドはCHDのより高いリスクと相関する。Jeppesen et al.(2003)によるコホート研究は、高TG/低HDL-CがIHD(虚血性心疾患)の最大のリスク因子であることを見出した(Jeppesen et al.)。

【0017】

脂質プロファイルはリスク因子の評価に重要であるが、プラーク代謝回転と関連する分

50

子事象の理解及び測定を可能としない。多くの生化学マーカーがCVDのリスク因子として示唆されているが、疾患の具体的な産物ではない。これらにはCRP及び骨ナトリウム利尿ペプチド(BNP)が含まれる(表1参照)。表1はCVDの公知のマーカーの一部を概述している。

【0018】

【表1】

マーカー	タイプ	説明
C反応性蛋白質(CRP)	炎症性	肝臓で産生され、炎症状態時に増加
妊娠関連血漿蛋白質(PAPP-A)	炎症性	酵素として作用する亜鉛結合蛋白質、具体的にはメタロペプチダーゼ
インターロイキン6(IL-6)	炎症性サイトカイン	心不全及び心筋梗塞においてレベルが上昇
インターロイキン8(IL-8)	炎症性サイトカイン	心筋梗塞において上昇
インターロイキン18	炎症性サイトカイン	心筋梗塞において上昇
TNF-α(腫瘍壊死因子)	サイトカイン	心不全の状況において濃度上昇
MCP-1	ケモカイン	単球を血液から初期アテローム性動脈硬化病変に動員
細胞間接着分子1(ICAM-1)	接着分子	心筋梗塞及び脳卒中において上昇
血管細胞接着分子1(VCAM-1)	接着分子	心筋梗塞及び脳卒中において上昇
脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)	神経ホルモン活性	正常な健全心臓の心房・心室において産生
リポ蛋白質関連ホスホリパーゼA2(Lp-PLA ₂)	ホスホリパーゼ	LDL関連Lp-PLA ₂ はアテローム生成促進作用を有する。
クレアチンホスホキナーゼ(phosphokinase)(CK-MB)	酵素	心筋梗塞の初期検出として有用
ミエロペルオキシダーゼ(MPO)	ヘム酵素	メタロプロテアーゼを活性化し、プラークの不安定化を促進
ミオグロブリン	ヘム蛋白質	組織壊死と同時に放出される。
CD40L	蛋白質	アテローム発生の初期段階からプラークの破裂まで放出される。脳卒中において上昇
トロポニンT(TnT)	蛋白質	リスク層別化のためのツール
心臓型脂肪酸結合蛋白質(H-FABP)	蛋白質	H-FABPは梗塞直後に心臓から放出される。
微量アルブミン尿(Microalbuminuria)	蛋白質	血管内皮機能障害のマーカー
低比重リポ蛋白質コレステロール(LDL-C)	リポ蛋白質	血中にコレステロールを輸送
高比重リポ蛋白質コレステロール(HDL-C)	リポ蛋白質	抗酸化及び抗炎症特性を保持
トリグリセリド	脂質	
PIIINP	プロコラーゲン	III型コラーゲン代謝回転のマーカー

表1：CVDにおける現在の生化学マーカーの選抜

【0019】

従って、心血管事象のマーカーとして一連の異なる生化学マーカーが示唆されている。Wang et al(2006)は、表1に示される、Framingham研究に参

10

20

30

40

50

加した3200人の患者における10個の異なる生化学マーカーを測定した。その結論は、10個の生化学マーカーの測定が標準的なリスク因子に加えて診断に適度に寄与するのみであるというものであった。10個の生化学マーカーの中でB型ナトリウム利尿ペプチドレベル、C反応性蛋白質レベル及び尿中アルブミン/クレアチニン比がマーカーと死亡/心血管事象との最大の相関を示した(Wang et al.)。

【0020】

<C反応性蛋白質>

C反応性蛋白質(CRP)は、異なる臨床状態、例えば、炎症、感染又は外傷に応答して肝臓によって産生される急性期血清蛋白質である(Gabay & Kushner 1999)。CRPの産生は罹患又は損傷組織から放出されるIL-6のようなサイトカインに誘発される。CRPの生理学的役割は未知であり、その炎症促進又は抗炎症作用に関する議論は進行中である。

10

【0021】

CRPがヒトにおけるCVDのリスク因子であるという証拠が蓄積している。Ridker et al. 2002による研究では、急性心筋梗塞、脳卒中、冠血行再建又はCVDによる死亡の発生について8年間追跡した28,000人の健常女性から成る大集団において、CRPはLDLコレステロールより優れた将来の心血管事象の予測因子であることが示された。他の多くの研究もベースラインのCRPレベルが心血管事象の独立したリスク因子を構成することを報告している(Thompson et al. 1995, Mendall et al. 1996, Kuller et al. 1996, Ridker et al. 1997, Tracy et al. 1997, Ridker et al. 2000)。

20

【0022】

循環CRPはアテローム性動脈硬化プロセスにおいて生じる全般的な炎症を反映するだけであって、疾患の発病における能動的な構成成分ではないと推測されている。しかし、また、一連の証拠はCRPがアテローム発生に役割を有するという見解を支持している。第一に、CRPを生じさせる慢性感染症もCVDの増大リスクと関連する(Leinonen & Saikku 2002)。第二に、本発明者らは異なるレベルのアテローム性動脈硬化病変においてCRPを同定した(Reynolds & Vance 1987, Hatanaka et al. 1995)。最後に、CRPはin vitroにてアテローム発生促進特性を有することが示されている：CRPは内皮細胞を活性化して接着分子を生成し得る(Pasceri et al. 2000)。また、CRPは内皮細胞におけるeNOSの生成を減少させ(Venugopal et al. 2002)、マクロファージによるLDLの取込みを増進し得る(Zwaka et al. 2001)。

30

【0023】

<脳性ナトリウム利尿ペプチド>

脳性(B型)ナトリウム利尿ペプチド(BNP)は、心室における心筋細胞の過度の伸張に応答して心室によって分泌されるペプチドホルモンである。T-proBNP(不活性N末端断片)は活性ホルモン(BNP)とともにproBNPの切断と同時に血流に放出される。BNP及びNT-proBNPは心血管事象の潜在的な生化学マーカーとして示唆されている(Wang et al.)。

40

【0024】

<ケモカイン>

ケモカインもCVDの潜在的マーカーである。ケモカインは炎症時に産生される低分子量サイトカインである。CVDに関連する1つの主要なケモカインは単球走化性蛋白質-1(MCP-1)である。MCP-1はアテローム性動脈硬化病変への単球の動員に初期の重要な役割を果たすように思われる。アテローム性動脈硬化のサルモデルを用いた研究では、MCP-1の血漿濃度はプラークサイズ及びプラーク合併症と高度に関連していた(Register et al.)。

50

【 0 0 2 5 】

< コレステロールを含む脂質 >

最近、血清中のコレステロール濃度の測定に多くの関心が向けられている（総コレステロール並びに低比重リポ蛋白コレステロール（LDL - C）及び高比重リポ蛋白コレステロール（HDL - C）の濃度）。リポ蛋白マーカーの中で少なくとも2つの注目すべき進展があった。第一に、LDL粒子サイズからアテローム性動脈硬化の進行の程度が予測されるように思われる。小LDL粒子の濃度上昇は、大粒子の濃度上昇よりCVDリスクに関連する（Gardner et al）。第二に、LDL粒子のオレイン酸コレステリル含量はCVDリスクの特に重要なマーカーになり得る。サルにおいて、オレイン酸コレステリルを有するリポ蛋白粒子コアの高濃度化は、より重度の冠動脈アテローム性硬化と強く且つ正に関連し（Rudel et al）、LDL及びHDLコレステロール濃度の寄与に相加的であった。実験動物におけるこれらの知見は、低比率のリノール酸コレステリル（逆に、高比率のオレイン酸コレステリル）を有する血漿リポ蛋白質が正常な対照と比べてCHD（冠動脈心疾患）の合併症を有する患者に典型であることを示した従前のヒト研究（Lawrie et al）によって更に支持される。

10

【 0 0 2 6 】

HDL - Cのレベルはトリグリセリドと強く関連し、高レベルのトリグリセリドはCHDのより高いリスクと相関する。Jeppesen et al)によるコホート研究は、高TG/低HDL - CがIHD（虚血性心疾患）の最大のリスク因子であることを見出した。

20

【 0 0 2 7 】

これらの脂質プロファイルはリスク因子の評価に重要であるが、ブランク代謝回転と関連する分子事象の理解及び測定を可能としない。多くの生化学マーカーがCVDのリスク因子として示唆されているが、これらは疾患の具体的な産物ではない。これらにはCRP及びApoEが含まれる。

【 0 0 2 8 】

< リポ蛋白質 >

CVDを予測するために最も一般的に用いられるバイオマーカーは、コレステロール濃度である（総コレステロール及びコレステロール/HDL比）。これらは他のリスク因子、例えば、血圧及びLDLレベルとともに用いられる。前述のSCOREモデルでは両方の因子が用いられる。LDLは血中にコレステロールを輸送し、酸化LDLの蓄積はアテローム性動脈硬化を促進し得るため、LDLレベルは重要である（Graham et al）。加えて、CHDとトリグリセリド（TG）レベルとの有意な関連が見出され、CHDの増大リスクはLDL - C及びHDL - Cレベルから独立して増大TGレベルと関連したが、コレステロールレベルはCVDの主要なリスク因子の1つであると見なされる（Jeppeson et al）。

30

【 0 0 2 9 】

< APO - E >

アポリポ蛋白質Eはカイロミクロン、VLDL及びHDLに見出される。アポリポ蛋白質Eは主に肝臓で合成されるが、他の多くの臓器、例えば、脳、脾臓、腎臓でも合成される（Siest et al, 1995）。ApoEは2つの受容体（LDL受容体及びApoE特異的カイロミクロンレムナント受容体）のリガンドとして作用することによってリポ蛋白代謝に重要な役割を果たす。ApoEとこれらの受容体との相互作用はコレステロールの代謝調節の基盤を付与する。apoE遺伝子座における遺伝子多型は3つの対立遺伝子（6つのapoE表現型を決定するε2, ε3及びε4）が大部分の集団に見出されることとなる。アイソフォームは112及び158位において1つのアミノ酸だけ互いに異なる。ApoE2は両方の残基においてシステインを有し、E4は両方の位置においてアルギニンを有する。ApoE3は112位においてシステインを、158位においてアルギニンを含む。対立遺伝子頻度は様々な集団において異なる。研究の中にはapoE多型とアテローム性動脈硬化との関連の可能性を評価したものがある。14の観察研究

40

50

のメタアナリシスでは $\epsilon 4$ 対立遺伝子が男女の間で冠動脈疾患と関連することを示した (Wilson et al. 1996)。更に、 $\epsilon 4$ 対立遺伝子は頸動脈アテローム性硬化と関連している (Terry et al. 1996, Cattin et al. 1997, Haraki et al. 2002)。

【0030】

ApoE は 299 アミノ酸長であり、リポ蛋白質、脂溶性ビタミン及びコレステロールをリンパ系へ、更には血液循環へ輸送する。ApoE は主に肝臓で合成される。現在、保存低比重リポ蛋白受容体遺伝子ファミリーに属する ApoE の哺乳動物受容体は 7 つある。

【0031】

< 更なる生化学マーカー >

微量アルブミン尿 (Microalbuminuria) (アルブミン/クレアチニンレベル) も潜在的な独立したマーカーである。尿中アルブミン排泄率は腎臓の変化のマーカーであり、クレアチニンの微量の上昇と比べてアテローム性動脈硬化を示し得る (Wang et al.)。

【0032】

プロコラーゲンマーカーの中で III 型コラーゲン代謝回転速度のマーカー (PIIINP) は高血圧の予後マーカーとして研究され、心筋梗塞と関連している。Satta et al. は腹部大動脈瘤 (AAA) と血中プロコラーゲン (PIIINP) の濃度との相関を検討した。彼らは、III 型コラーゲン代謝回転が AAA 患者において増加し、増進した合成、増進した分解又は両方の組合せによるものであり得ることを示した。同じ実験において、I 型プロコラーゲン (PICP) のカルボキシ末端プロペプチドが測定され、動脈瘤嚢に I 型コラーゲンの加速度的な合成はなかった。

【0033】

< プラークの蛋白質プロファイル >

ヒト動脈はより大きい若しくは弾性の動脈、中間若しくは筋性の動脈並びに小動脈に分けられ得る。血管壁は内弾性板及び外弾性板によって分離された内膜、中膜及び外膜から成る。内膜は結合組織、平滑筋細胞及び少数の分離マクロファージから成る。内膜の境界は内皮の管腔表面と内弾性板との間の層と定義され得る。

【0034】

動脈内膜は更に 2 つの層に分けられ得る。プロテオグリカン層と称される内層は豊富なプロテオグリカン、平滑筋細胞及びマクロファージから成る。下層、筋弾性層は豊富な平滑筋細胞及び弾性線維から成る。通常の状態では内膜の 2 つの層は光学顕微鏡によってどうにか視認可能であるが、内膜肥厚が生じると明確且つ著明である。中膜は動脈壁の筋部分であり、平滑筋細胞、エラスチン、コラーゲン原線維から成る。

【0035】

外膜、外層は高度に微小血管であり、コラーゲン、弾性線維、平滑筋細胞及びリンパ管を含む。

【0036】

ヒト動脈硬化性プラークは、線維状コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン及び SMC から成る線維性被膜に覆われた脂質に富むコアを特徴とする。プロテオグリカンヒアルロナンは、事象、例えば、脂質蓄積、血栓及び細胞増殖・移動を調節し、また、組織の物質特性に作用することによって病変発達に作用する可能性を有する細胞外マトリックスの主要な非線維状構成成分である (Wight 1995)。浸潤 ApoE 及び CRP も存在し、本発明者らは、アテローム性動脈硬化症の異なる段階において冠動脈の動脈硬化性プラークにおいて両方の局在を示した。?? 参照

【0037】

< ヒトにおける ApoE 及び CRP の分布 >

下記の表 2 はヒト体内の ApoE 及び CRP の分布を示す。

【0038】

10

20

30

40

50

【表 2】

蛋白質	発現部位
APOE	血液、血清、血漿、肝臓、唾液、単球、小脳、脳脊髄液、前頭皮質、海馬、側頭皮質
CRP	血液、腎臓、肝臓、腹水、血漿、血清

【0039】

下記の表3は、in vivo及び/又はin vitroにて示されるApoE及びCRPと蛋白質との公知の相互作用を示す。

10

【0040】

【表 3】

蛋白質	蛋白質との相互作用
ApoE	アルブミン、アミロイドベータ A4 蛋白質、マクログロブリン、微小管結合蛋白質タウ、LDL 受容体、カテプシン B、神経フィラメント 3、リン脂質輸送蛋白質、プリオン蛋白質、VLDL 受容体、スカベンジャー受容体クラス B
CRP	血清アミロイド P、補体因子 H、フィブロンネクチン 1、ヒストン 1、FcγRI、FcγRIIb、CD32、血小板糖蛋白質 VI、レプチン
	非蛋白質相互作用：カルシウム、コレステロール

20

【0041】

< ヒトにおけるコラーゲンの分布 >

コラーゲンはヒトの身体に広範に分布し、即ち、ヒトの身体における蛋白質の質量の約30%はコラーゲンから成る。表4に主要なコラーゲンタイプがその主要な組織分布とともに一覧されている。

【0042】

【表 4】

コラーゲンタイプ	組織分布
I	皮膚、骨、腱、靱帯、角膜
II	軟骨、硝子体
III	皮膚、血管、腸、子宮
IV	基底膜
V	骨、皮膚、角膜、胎盤
VI	骨、軟骨、角膜、皮膚、血管
VII	皮膚、膀胱、口腔粘膜、臍帯、羊膜
VIII	デスメ膜、血管、骨、脳、心臓、腎臓、皮膚、軟骨
XIII	内皮細胞、皮膚、眼、心臓、骨格筋
XIV	血管、骨、皮膚、軟骨、眼、神経、腱、子宮
XXI	血管、心臓、胃、腎臓、骨格筋、胎盤

30

40

【0043】

I型コラーゲンは最も豊富なコラーゲンであり、大部分の結合組織に見出される。I型コラーゲンは特に骨及び皮膚の構造に重要である。ヒトの身体におけるコラーゲンの主要含量は骨及び皮膚に分布し、主要なコラーゲン成分はI及びIII型コラーゲンである。III型コラーゲンは大動脈の主要構成成分であり、I型コラーゲンに富む組織にもより少ない量にて見出される。加えて、IV型コラーゲンは基底膜及び血管・神経周囲に見出される。V型コラーゲンの最も一般的な局在は、I及びIII型コラーゲンと関連して特徴的なコラーゲン原線維内である (Garrone et al)。

【0044】

50

一部のコラーゲンは限定された組織分布を有し、例えば、ⅠⅠ型はほとんど軟骨に見出される (Mayne R.)。

【0045】

コラーゲン原線維は2つ以上のコラーゲンタイプから成る場合が多い。例えば、Ⅰ型コラーゲン原線維は少量のⅠⅠⅠ、Ⅴ及びⅩⅠⅠ型を含む場合が多く、一方、軟骨のⅠⅠ型コラーゲン原線維はⅠⅩ及びⅩⅠ型も含む。

【0046】

<動脈におけるコラーゲン>

動脈には6つのタイプのコラーゲンが見出され (Ⅰ, ⅠⅠⅠ, ⅠⅤ, Ⅴ, ⅤⅠ及びⅤⅠⅠⅠ型)、Ⅰ及びⅠⅠⅠ型が最も豊富であり、コラーゲン含量の80~90%である。Ⅰ及びⅠⅠⅠ型は血管壁でも最も多い。Ⅰ及びⅠⅠⅠ型は動脈壁の3つのすべての層内に異なる量にて共分布しているように思われ、Ⅰ及びⅠⅠⅠ型コラーゲンの合成は内膜に位置している傾向にある (Mayne R)。

10

【0047】

<プラークにおけるコラーゲン及び他の構造蛋白質の代謝回転>

動脈硬化性プラークの発達の間、コラーゲンが線維性被膜に蓄積する (Stary H. C.)。Katsuda et al (1992) による研究では、Ⅰ, ⅠⅠⅠ及びⅠⅤ型コラーゲンがヒト大動脈組織における病変のすべての段階において肥厚内膜において見出された。ⅤⅠ型コラーゲンが内膜細胞の領域における基底膜に分布し、進展した病変では伸長SMC周囲にも検出された。Ⅰ及びⅠⅠⅠ型の従前の研究はアテローム硬化性動脈壁における同等の分布のエビデンスを提供している (Shekhonin et al)。McCullagh et al (1980) によれば、ⅠⅠⅠ型が正常なヒト大動脈中膜において最も多いコラーゲンである (抽出可能なコラーゲンの約70%)。Erikssen et al (2006) による最近の研究は、狭窄の程度に依存するヒト大動脈弁における総コラーゲン含量の減少を見出した。狭窄の分子機構は、アテローム性動脈硬化に類似すると考えられている。健常な大動脈弁では、コラーゲン含量は主にⅠ及びⅠⅠⅠ型である。狭窄の間、コラーゲンの総含量は減少し、それはおそらくⅠ型コラーゲンの代謝回転の増大によって生じる。Ⅰ型コラーゲンは総コラーゲンの約60~70%を占め、一方、ⅠⅠⅠ型コラーゲンの割合は健常弁及び石灰化弁において30~40%であった。

20

30

【0048】

Ⅴ型コラーゲンも、進展したアテローム性動脈硬化病変において増加し、大動脈中膜及びプラークの内皮下領域において、細胞外マトリックス全体にわたって分布する (McCullagh et al)。

【0049】

動脈硬化性プラークに見出される主なコラーゲンタイプは、Ⅰ及びⅠⅠⅠ型であるという見解の一致があるように思われ、それらが健常血管及びアテローム硬化性血管において同等に分布しているかは更に研究される必要がある。

【0050】

Katsuda et al (1992) による研究では、より進展した病変のアテロームの中心部にコラーゲンは検出されなかった。

40

【0051】

<エラスチン>

エラスチンは身体において最も安定な蛋白質の1つであり、その弾性及び弾力によって生じる大部分の結合組織に見出される。エラスチンは動脈壁の蛋白質含量を独占し、主要な細胞外マトリックス蛋白質である。

【0052】

エラスチンは弾性線維における主な構成成分であり、石灰化に関連する。血管石灰化は血管壁内の2つの異なる部位 (内膜及び中膜) において生じる。内膜石灰化は主に壊死性コア内にてアテローム性動脈硬化に関連する。石灰化弾性線維はプラークが最も破裂しや

50

すいブランク肩部を構成し、弾性線維の石灰化がブランク安定性に作用し得ることを示唆している (Bobryshev Y. V.)。アテローム性動脈硬化では、弾性線維の含量は脂質沈着とともに減少し、これはエラスチン分解酵素に対する感受性の亢進を生じさせる。これにより、コラーゲンとは対照的に、エラスチンの含量は、病変が発達するにつれて減少する。

【0053】

<ヒトにおけるエラスチンの分布>

表5はヒトの身体におけるエラスチンの分布を示す。

【0054】

【表5】

10

蛋白質	発現部位
エラスチン	大動脈及び他の血管、肺、皮膚線維芽細胞

【0055】

表6はin vivo及び/又はin vitroにて示されるエラスチンと蛋白質との公知の相互作用を示す。

【0056】

【表6】

20

蛋白質	蛋白質との相互作用
エラスチン	デコリン、エラスターゼ、フィブリリン、フィブリン、リゾチーム、リジロオキシダーゼ、ガレクチン、パイグリカン、ナイドジェン、フィコリン、プロテイナーゼ3

【0057】

<マトリックス構成成分としてのプロテオグリカン>

プロテオグリカン (PG) は、主に血管壁の細胞間マトリックスに局在する多糖蛋白質である (Salisbury and Wagner 1981)。PGは、結合領域を通じてコア蛋白質に共有結合したGAGと称される1つ以上の長い非分岐高ポリアニオン糖側鎖の存在を特徴とする高分子である。GAGの反復単位は、アミノ糖 (N - アセチル - グルコサミン (GlcNAc) 又はN - アセチル - ガラクトサミン (GalNAc)) 及びヘキサロン酸 (グルクロン酸 (glucouronic acid) (GlcA) 又はイズロン酸 (IdoA)) から成る。反復単位における糖の一方又は両方は1つ以上の硫酸基を含む (Rodriguez - Lee 2007)。GAG鎖に加え、大部分のコア蛋白質はN - 及び/又はO - 結合オリゴ糖を保有する。

30

【0058】

<PGの分類及び命名>

PGは高分子の極めて異質の群である。単一タイプのコア蛋白質は結合GAG鎖の数及びタイプの点で異なり得る。鎖長及び鎖に沿った硫酸化残基の構成も異なる。

【0059】

40

反復二糖単位構造によってGAGの4つの主なクラスが識別される。コンドロイチン硫酸 (CS) 及びデルマタン硫酸 (DS)、ヘパリン硫酸 (HS) 及びヘパリン、ヒアルロナン並びにケラチン硫酸 (KS)。

【0060】

ヒアルロナンはGAGの最も単純なものである。他のすべてと対照的に、ヒアルロナンは硫酸化糖を含まない。その二糖単位はすべて同一であり、その鎖長は膨大であり、ヒアルロナンはコア蛋白質に結合していない。

【0061】

KSは硫酸化ポリラクトサミン鎖である。KS - Iは元々角膜において説明され、コア蛋白質においてアスパラギン残基にN結合し、一方、KS - II又は軟骨KSはセリン又

50

はスレオニン残基にO結合している (Funderburgh 2000)。

【0062】

PGはいくつかのパラメータによって分類され得る。

結合GAG鎖 (CS/DS - 又はHS含有PG)

細胞に関する組織分布 (細胞外及び基底膜PG、細胞結合PG又は細胞内PG)

コア蛋白質相同性 (ヒアレクタン (hyal ectan)、小さなロイシンに富むPG (SLRP))

【0063】

コンドロイチン/デルマトン硫酸PG (パーシカン、アグリカン、ニューロカン及びプレビカン) はヒアルロナン結合プロテオグリカンのファミリーに属する。この遺伝子ファミリーは集合的にヒアレクタン (hyal ectan) と称される。各ファミリーメンバーは特徴的な分布を有し、アグリカンは軟骨において顕著であり、ニューロカン及びプレビカンは中枢神経系において顕著であり、パーシカンは血管壁を含む様々な軟組織に存在する。パーシカンの遺伝子及び蛋白質構造はドメインテンプレートに従う。アミノ末端球状末端 (G1) はGAGヒアルロナンに結合し、カルボキシ末端球状ドメイン (G3) は、2つの上皮増殖因子 (EGF) ドメイン及び補体調節領域に隣接するC型レクチンから成る蛋白質のセレクトリンファミリーに類似する。パーシカンコア蛋白質の中央領域は、パーシカンのCS結合領域を指定する2つの大きなエクソンにコードされる。エクソン7にコードされる領域は α GAGと称され、一方、エクソン8にコードされる領域は β GAGと称される。パーシカンの選択的スプライシングから4つのmRNA転写物が生じ、コア蛋白質の長さ及び結合GAGの数が異なるV0, V1, V2及びV3を生じさせる (Dours-Zimmermann and Zimmermann)。ヒトパーシカンにおける潜在的GAG結合部位の数は、V0では17~23、V1では12~15、V2では5~8、V3では0である (Wight 617-23)。

【0064】

デコリン及びバイグリカンは、3つのクラス (I, II及びIII) 及び異なるサブファミリーに分類される少なくとも9つのメンバーを含むSLRPファミリーのメンバーである。それらはすべて、強い蛋白質-蛋白質相互作用を成すロイシンに富むリピートを含む中央ドメインの強い存在を成すロイシンに富むリピートを含む中央ドメインの存在を特徴とする。デコリン及びバイグリカンはクラスIのメンバーであり、ファミリーの中で最も高い相同性を示し (約57%)、プロペプチドを有する唯一のSLRPである。プロペプチドは種にわたって高度に保存され、GAG鎖の合成に關与する最初の酵素であるキシロシルトランスフェラーゼの認識配列として機能し得る。

【0065】

パーシカン、デコリン及びバイグリカンは、哺乳動物動脈壁のマトリックスにおける主要なCS/DS PGである (Wight et al. 1986)。パーシカンV0コア蛋白質のサイズは370 kDaであり、36 kDaのデコリン及び38 kDaのバイグリカンよりほぼ10倍大きい。側鎖は広範なサイズを示すが、概して各々平均約40~90 kDaである。

【0066】

ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) は、細胞結合及び細胞周囲PGの5つの異なるクラスに分類され、哺乳動物細胞表面、基底膜及びECMのHSの少なくとも95%を占める。細胞結合HSPGは膜内在性シンデカン及び固着グリビカンを含む。細胞周囲HSPGは主にパールカン、アグリンを含む。これらのPGは、インテグリンを介した細胞膜との密接な関連のために細胞周囲型と称される (Whitelock and Iozzo)。

【0067】

パールカンは、ほぼすべての基底膜並びに間葉系臓器及び結合組織に発現するモジュラーHSPGであり、脊椎及び無脊椎動物に見出される最大の単鎖ポリペプチドの1つである。パールカンの5つのモジュール及びそのHS側鎖は、例えば、線維芽細胞増殖因子2

10

20

30

40

50

、血管内皮増殖因子（VEGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）及び他のマトリックス蛋白質との多数の分子相互作用に關与する。ヒトパルカンのコア蛋白質は約470kDaであり、多くのO結合オリゴ糖及び4本のHS側鎖とともに800kDaを超える分子量に達し得る（Knox and Whitelock）。

【0068】

<プロテオグリカンの分布>

プロテオグリカン（PG）はヒトの身体のほぼあらゆる部位に分布する高分子である。PGの構造及びサイズは極めて異なる。すべてのPGの基本構造はコア蛋白質及び少なくとも1つであるが、多くの場合、多くの炭水化物鎖、すなわちグリコサミノグリカン（GAG）を含む。PGは細胞内、細胞表面及び細胞外マトリックスに見出され得る。PGの構造多様性は多くの生物学的機能を示唆するものであり、表7を参照されたい。

【0069】

【表7】

プロテオグリカンファミリー	プロテオグリカン	分布	機能
ケラタン硫酸－小さいロイシンに富むPG	ルミカン	角膜	コラーゲン原線維の組織化及び成長。 角膜の透明性。 上皮細胞の移動及び組織の修復。
コンドロイチン硫酸	パーシカン	血管の平滑筋細胞 皮膚の上皮細胞 中枢及び末梢神経系の細胞	細胞の接着、移動及び増殖。
デルマタン硫酸 (小さいロイシンに富むPG)	デコリン	結合組織 動脈壁	マトリックスのアセンブリに役割を果たす。
	バイグリカン	細胞外マトリックス組織：骨、軟骨、腱、動脈	骨のミネラル化での役割。
ヘパラン硫酸	パルカン	血管の細胞外マトリックス	多くの細胞外マトリックス成分及び細胞表面分子に結合し、これを架橋する。
コンドロイチン硫酸－大きい凝集PG	アグリカン	軟骨 細胞外マトリックス	組織に圧縮荷重に耐える能力を付与する。

表7：上記の表7はPGの分布及び機能の概略を示す。

【0070】

<動脈におけるプロテオグリカン>

少なくとも5つのタイプのPGが動脈壁の細胞外マトリックスに存在する。ヒアルロナンと相互作用して大凝集体を形成するパーシカン；コラーゲン及びエラスチンのような原線維マトリックス構成成分と相互作用する、小さいロイシンに富むデコリン及びバイグリカン；基底層の構成成分であるヘパラン硫酸－パルカン並びにケラチン硫酸－ルミカン（Talus et al.）。

【0071】

パーシカンはアテローム性動脈硬化病変に蓄積するいくつかのECM分子の1つである。多くの研究が、パーシカンが明らかにLDLに結合することができることを示すが、概して、パーシカンは壊死性コアの脂質に富む中央部には検出されない（Evanko et al.）。

【0072】

10

20

30

40

50

ルミカンは大マクロファージに直接結合し、且つ大マクロファージの移動を増進することが示されている。従って、ルミカンは血管内膜における大マクロファージの挙動に影響を及ぼすとともに、進展したアテローム性動脈硬化病変の特徴を示す壊死性コアの形成を刺激し得る (Funderburgh et al. 1997)。

【0073】

バイグリカンは線維性被膜に見出される。パーシカン及びバイグリカンはLDLに対する親和性を有し、不溶性複合体を形成し、これはLDLの酸化を促進する。バイグリカンはリポ蛋白質を動脈壁に捕捉することによってアテローム性動脈硬化の発病に寄与し得る。動脈内膜のプロテオグリカン代謝の変化はアテローム性動脈硬化の初期病変を構成し、プロテオグリカンの蓄積はアテローム性動脈硬化の進行に基本的な役割を果たす (Kunz J.)。

【0074】

パールカンは、質量分析ベースの分析及び免疫組織化学によって内膜の細胞外マトリックスの中心成分の1つとしてヒト内膜過形成にて報告された。

【0075】

表8は、正常及びアテローム性動脈硬化血管におけるPGの免疫組織化学的染色でのいくつかのPGの分布を示す (Evanko et al.)。

【0076】

【表8】

PG 又は GAG	正常な血管		線維性コア				
	内皮細胞	SMC	内皮細胞	SMC	マクロファージ	線維性被膜	プラークコア
パールカン	+++	++	+++	+++	++	+	+++
デコリン	+	++	+	+	+++	+	+++
バイグリカン	-/+	++	++	+++	+	+++	-/+
パーシカン	-	++	-/+	+++	-	+++	-
ヒアルロナン	++	+	++	+++	+++	+++	+++

染色結果：-検出不能；-/+可変的に検出可能；+検出可能；++中程度；+++強度

【0077】

<マトリックス再構築におけるプロテオグリカンの関与>

非ヒト霊長類におけるアテローム性動脈硬化の進行の研究は、特定のPGの蓄積が病変の重症度及び細胞・増殖因子の分布により異なることを示し、アテローム性動脈硬化の進行時に異なるPGが異なる役割を果たすことを示唆した。異なるレベルの特定のPGは、線維性マトリックス構成成分、例えば、エラスチン及びコラーゲンの構造配置の変化への寄与によって組織の物質特性に直接作用し得る。

【0078】

パーシカン及びヒアルロナンは、マトリックスにおける同様の局在を示し、アテローム発生におけるその2つの間の凝集体形成を示唆する。早期病変におけるパーシカン及びヒアルロナンの著明な増加は、早期アテローム性動脈硬化病変、例えば、SMC及び白血球の増殖・移動に役割を果たすことを示唆し得る。更に、パーシカン及びヒアルロナンはヒト再狭窄病変の主要なマトリックス構成成分であり、in vitroにて血管損傷後の新たな内膜肥厚に寄与することが示されている。また、早期アテローム発生における大量のパーシカンは、パーシカンのコンドロイチン硫酸鎖へのリポ蛋白質の結合により、細胞外マトリックスに脂質の捕捉を増大させやすくし得る。この見解は、移植動脈疾患におけるパーシカンとアポ蛋白質(a)及びアポリポ蛋白質Eとの共局在によって支持される (

E v a n k o e t a l)。プラークからのパーシカンの喪失はマトリックス不安定をもたらし得る。

【 0 0 7 9 】

このことは、血管損傷後に認められるパーシカン遺伝子のアップレギュレーションから更に明らかである。この場合、パーシカンは、アテローム性動脈硬化のすべての段階、すなわち、早期の発達プラークの内膜のみならず、進展した病変にわたり、脂質で満たされた壊死性コアの境界及びプラーク - 血栓界面にても同定された (W i g h t a n d M e r r i l e e s 2 0 0 5)。これらの所見は脂質の蓄積、炎症及び血栓にパーシカンが関与していると見なす。更に、パーシカンは E C M のアセンブリ及び弾性線維原線維形成の調節に重要な役割を果たし、これは血管疾患時の E C M 再構築において基本的に重要である (W i g h t a n d M e r r i l e e s 2 0 0 5)。

10

【 0 0 8 0 】

動脈細胞生物学におけるパイグリカンの役割は不明瞭である。一部の免疫組織化学的研究は、ヒト再狭窄病変においてコラーゲン I 及び I I I 染色とのパイグリカンの関連を示している (E v a n k o e t a l .)。

【 0 0 8 1 】

マトリックス蛋白質としてのパイグリカンの重要性は、パイグリカン遺伝子のヌル変異に対してホモ接合性の B A L B / c A マウスの作製によって更に述べられ、この場合、パイグリカン欠損雄マウスの 5 0 % が大動脈破裂の結果として寿命の最初の 3 カ月以内に突然死した。この所見は、大動脈壁の構造・機能的・一体性にパイグリカンが不可欠であること、また、ヒトにおける大動脈解離・破裂の発病におけるパイグリカン遺伝子欠損の潜在的役割を示唆する (H e e g a a r d e t a l . 2 0 0 7)。

20

【 0 0 8 2 】

他の研究は、パイグリカンが霊長類動脈においてエラスチンと関連する主要な P G であることを示しており、これらの所見はヒト冠動脈疾患の所見に類似している (E v a n k o e t a l)。

【 0 0 8 3 】

デコリンはコラーゲンに結合し、且つコラーゲン原線維形成を調節することが示されている (B r o w n a n d V o g e l) (D a n i e l s o n e t a l .)。

【 0 0 8 4 】

30

< プロテアーゼのプロファイル >

プロテアーゼはペプチド結合を加水分解し、アテロームにおけるコラーゲン、プロテオグリカン及びエラスチンのような細胞外マトリックス蛋白質の分解に関与する。表 9 を参照されたい。動脈硬化性プラークには 3 つの主なタイプ (メタロプロテイナーゼ (即ち、M M P)、セリンプロテアーゼ及びシステインプロテアーゼ (即ち、カテプシン)) が見出される。カテプシン及び M M P は、すべての細胞外マトリックス蛋白質の分解に関与する。プラーク安定性にはマトリックスが不可欠であるため、プロテアーゼによる線維性被膜からのその除去はプラーク破裂を引き起こし得る (S t a r y H . C)。

【 0 0 8 5 】

表 9 に動脈硬化性プラークに見出される種々のプロテアーゼが一覧にされている。

40

【 0 0 8 6 】

【表 9】

プロテアーゼ	分解基質
カテプシン K	プロテオグリカン、エラスチン、コラーゲン
カテプシン S	プロテオグリカン、エラスチン、コラーゲン
カテプシン L	プロテオグリカン、I 型コラーゲン
カテプシン B	プロテオグリカン
MMP-1	I, II 及び III 型コラーゲン
MMP-2	プロテオグリカン、エラスチン
MMP-3	プロテオグリカン、III 型コラーゲン、エラスチン
MMP-8	プロテオグリカン、I, II 及び III 型コラーゲン
MMP-9	エラスチン、I 及び III 型コラーゲン
MMP-13	プロテオグリカン、I, II 及び III 型コラーゲン
MMP-18	I 型コラーゲン

表 9：動脈硬化性プラークにおいて検出されるプロテアーゼ

【 0 0 8 7 】

プラークにおける MMP 発現の主要源はマクロファージ及び SMC 活性に関連する疑いがある。プラークにおけるマクロファージは豊富な MMP - 1 , - 8 , - 9 及び - 13 を含み、*in situ*にてコラーゲン及びプロテオグリカン分解部位と共局在する (Kunz J.)。更に、自身のデータは動脈硬化性プラークにおける MMP - 8 及びカテプシン K の局在を示唆する。

【 0 0 8 8 】

<マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) >

MMP は、ECM の大部分の構成成分を分解することができるエンドペプチダーゼの大きな一群である。現在、25 超の MMP が同定されている。メタロプロテアーゼは、金属原子、典型的には亜鉛を含む活性部位を特徴とし、チモーゲンとして分泌される。特定の組織阻害物質 TIMP が MMP の活性を調節する。様々な MMP が動脈硬化性プラークに見出される。それらはほとんどの場合、SMC 及びマクロファージにおいてプラーク肩部内にて線維性被膜に接するマクロファージにあり、線維性被膜内に同定されることは稀である (Kunz J.)。]

【 0 0 8 9 】

MMP はその基質特異性によって異なる群に分類される。I , II , III 及び V 型コラーゲンのような線維状コラーゲン、更にプロテオグリカンも分解するコラゲナーゼ；プロテオグリカン、IV , V , VII 型コラーゲン及びエラスチンを分解するゼラチナーゼ；プロテオグリカン及びエラスチンに対して活性を示すストロメライシン (Rouiss M) 。これらの 3 つのサブグループは動脈硬化性プラークにおけるマトリックス再構築に関して特に興味深い。

【 0 0 9 0 】

<ゼラチナーゼ>

不溶性エラスチンは、ともに MMP のゼラチナーゼファミリーに属する MMP - 2 及び - 9 によって消化される。MMP - 9 は、動脈硬化性プラークのサイズ及び組成に作用する重要な役割を有する。不安定なヒト動脈硬化性プラーク及びプラークの脆弱領域では、MMP - 9 のより高い発現及び濃度が認められている。更に、MMP - 9 は、安定狭心症患者と比べて不安定狭心症患者においてより多く、冠動脈プラークにおいて細胞内に見出される (活発な合成を示す)。血中 MMP - 9 濃度は、冠動脈アテローム性動脈硬化と関連して上昇し、有害な心血管事象を予測する (Sundstrom and Vasan) 。Kuzuya et al (2006) による最近の研究は、MMP - 2 が線維性被膜における SMC の蓄積に関与し、これにより、プラーク不安定性を誘発することを示す。

【 0 0 9 1 】

< ストロメライシン >

MMP - 3 はストロメライシンプロテアーゼに属し、エラスチン及びプロテオグリカン
を分解することができる。Yamada et al (2002) による研究は、MMP
- 3 が女性における心筋梗塞の遺伝的リスクを予測する信頼できる手段であることが判明
し得ることを示す。

【0092】

< コラゲナーゼ >

MMP - 1 , - 8 及び - 13 はすべて動脈硬化性プラークにおいて同定され、プロテオ
グリカン及びI , I I 型コラーゲンを分解する。

【0093】

MMP - 1 , - 8 及び - 13 はコラゲナーゼであり、コラーゲンを2つの断片に切断し
、その断片はMMP - 2 , - 3 又は - 9 によって更に分解される。

【0094】

MMP - 8 は、ヒトアテロームには一般的に見出されないが動脈硬化性プラークにおい
て同定されている好中球によって発現される。MMP - 8 は、I 型コラーゲンを優先的に
選択し (Herman et al) 、MMP - 1 及び13 より3倍大きいI型コラーゲ
ンの分解活性を有するため、線維性被膜の分解に部分的に関与し得る。このことはTur
u et al (2006) によって支持され、この研究では、血漿中のMMP - 8 含量
は安定プラークを有する患者より不安定プラークを有する患者で著しく多い。

【0095】

MMP - 13 はバイグリカンに対する高特異性を有し、SLRPを切断することが報告
されている。特定の切断部位 (. . . G₁₇₇ / V₁₇₈) におけるMMP - 13 による
バイグリカンの分解はMonfort et al . (2005) によって従前に示され
、骨関節炎における軟骨分解の早期検出に重要な役割を果たすことが提案されている。

【0096】

< カテプシン >

ヒトシステインカテプシンは、カテプシンB , K , L 及びSを含む11のメンバーから
成り、主に細胞のエンドソーム/リソソームコンパートメント内に発現する。カテプシン
はプロテオグリカン、コラーゲン及びエラスチンの加水分解を触媒することができる。

【0097】

腹部大動脈瘤 (AAA) において、正常大動脈と比べて高レベルのカテプシンS , K 及
びLが見出された。正常ヒト血管SMCは免疫染色により検出可能なカテプシンKを含ま
ないが、動脈硬化性プラーク内の細胞は明らかに陽性である。カテプシンKは、破裂しや
すい領域、例えば、線維性被膜、プラーク肩部及びプラーク破裂の実際の部位に局在する
(Chapman et al) 。カテプシンSは動脈硬化性プラークにおいてエラスチ
ン分解の増大領域と共同在することが見出され、アテローム性動脈硬化の減少がカテプシ
ンS及びK欠損マウスにおいて認められる (Liu et al) 。

【0098】

カテプシンL及びKは、いくつかのプロテオグリカン及びI , I I 型コラーゲンを分解
し、カテプシンKは共有結合的に架橋された三重らせん内にて分解し、一方、カテプシン
Lは非らせんテロペプチド領域においてのみ切断する。カテプシンKは線維性被膜及びプ
ラーク肩部に局在する。正常動脈におけるカテプシンKの発現は極めて低い。早期ヒトア
テローム性動脈硬化病変は内膜及び中膜SMCにおけるカテプシンKの発現を示した。進
展した動脈硬化性プラークにおいて、カテプシンKは主に線維性被膜のマクロファージ及
びSMCに局在した (Lutgens et al) 。カテプシンK蛋白質レベルは、正
常動脈と比べてアテローム性動脈硬化病変において上昇したが、一方、カテプシンKのm
RNAレベルは、アテローム性動脈硬化血管及び正常動脈において同様であった。更に、
カテプシンKのmRNA及び蛋白質レベルは、早期アテローム性動脈硬化病変及び血栓を
含む病変と比べて、進展しているが安定したヒト動脈硬化性プラークにおいて最大である
ことが示された (Chapman et al) 。

10

20

30

40

50

【0099】

カテプシンSは、早期ヒトアテローム性動脈硬化病変及び脂肪線条において内膜及び中膜SMCにはんどのわずかに発現する。進展したヒト動脈硬化性プラークにおいて、カテプシンSは線維性被膜のマクロファージ及びSMCに局在した。血管自体及びプラーク微小血管の管腔の内側を覆うECも、カテプシンSを発現した。更に、カテプシンSのmRNA及び蛋白質レベルは、正常動脈と比べてヒトアテロームにおいて増大した(Lutgens et al)。カテプシンSはプロテオグリカン、エラスチン及びコラーゲンを分解することができる(Liu et al)。

【発明の概要】

【0100】

現在、CVDリスクの決定は、アテローム性動脈硬化進行の後期(線維性プラーク破裂の有意なリスクがある時点)において行われている。早期及び後期におけるアテローム性動脈硬化又はCVDリスクに関する情報を提供する診断又は予後アッセイの必要性がある。Katsuda et al(1992)の知見は、進展病変からのコラーゲンの除去の酵素機構があることを示唆し、実際に動脈硬化におけるネオエピトープの主要な役割を示唆している。

【0101】

本発明は、プロテイナーゼによる動脈硬化性プラークの蛋白質の切断によって形成されるネオエピトープを含むペプチド断片の定量のためのバイオアッセイの方法を提供し、該方法は、該ペプチド断片を含む試料を、該ネオエピトープに対する特異的結合親和性を有する免疫学的結合パートナーと接触させるステップと、該試料中の該免疫学的結合パートナーのペプチド断片への結合レベルを定量するステップとを含む。

【0102】

該アッセイの結果は、特定の患者における動脈硬化性プラークの破裂のリスクの程度又は患者の動脈硬化性プラークの不安定状態を示す指標を生成し得る。

【0103】

閾値を越える該指標の値を有する患者は、プラーク撮像法(上述の撮像法を含む)による更なる検査又はアテローム性動脈硬化の処置のための薬剤の処方又はアテローム性動脈硬化の外科的処置を推奨され得、そのようなフォローアップ検査又は処置は本発明の方法の一部を成し得る。

【0104】

動脈硬化性プラークの蛋白質は、ルミカン、バーシカン、パールカン、デコリン、バイグリカン、III型コラーゲン、CRP、ApoE及びエラスチンを含む。I型コラーゲンは動脈硬化性プラークの蛋白質であるとは見なされない。動脈硬化性プラークに存在し、身体の中の部位よりも高い程度に動脈硬化性プラークにおいてプロテアーゼに晒される蛋白質が特に興味深い。

【0105】

該免疫学的結合パートナーは、C末端ネオエピトープ又はN末端ネオエピトープを含むペプチド断片に対する特異的結合親和性を有し得る。

【0106】

プロテオグリカンアッセイ

該ペプチド断片は、プロテオグリカンバーシカン(配列番号1)、ルミカン(配列番号2)、パールカン(配列番号3)、バイグリカン(配列番号4)及びデコリン(配列番号5)の断片でよく、それらはすべて正常及びアテローム性動脈硬化血管において同定される。プロテオグリカンは、エラスチン及びコラーゲンとともに、動脈硬化性プラーク及びプラーク被膜を構成する主な蛋白質の一部である。プロテオグリカンの含量は、アテローム性動脈硬化の進行時に異なり、その結果、プロテオグリカンの潜在的ネオエピトープは病期及び疾患進行の良好なマーカーになる。特に、バーシカン及びルミカンは多くの他の臓器には豊富ではないため、これにより、それらはより特異的な生化学マーカー候補になる。

【 0 1 0 7 】

動脈硬化性プラークにおいて多くの異なるプロテアーゼが文献により報告されているように、複数の候補プロテアーゼがプラークにおけるプロテオグリカンの消化に関与し得る。おそらく、これは最終的にプラーク破裂に至る広範の複雑なプロセスの結果である。しかし、本発明者らの評価では、初期相は一定範囲のMMPから成り得、一方、後期はマトリックスのカテプシン分解により依存し得、病期に依存して異なるネオエピトーププロファイルとなる。本発明者らは、表4に一覧表示される酵素がルミカン、パーシカン、パイグリカン、パールカン及びデコリンを生じさせ、少なくとも以下の切断生成物を生じさせると判定した。

【 0 1 0 8 】

【表 10 A】

プロテアーゼ	バイグリカン	SEQ ID NO
MMP-3	K*SVPKEISPDTTLLDLQNNDISE*L	6
MMP-3	L*KSVPKEISPDTTLLDLQNNDISE*L	7
MMP-9	E*NSGFEPGAFDGLKLNLRRISEAK*L	8
MMP-9	G*LKSVPKEISPDTTLLDLQNNDISE*L	9
MMP-12	Y*LRRISEAKLTGIPKDLPET*L	10
MMP-13	G*LKSVPKEISPDTTLLDLQNNDISE*L	11
MMP-13	*LTGIPKDLPETLNLHLDHKNKIQAI*	12
ADAMTS4	K*RISEAKLTGIPKDLPETLNE*L	13
ADAMTS4	Q*AIELEDLLRYSK*L	14
ADAMTS4	Q*AIELEDLLRY*S	15
ADAMTS4	S*EAKLTGIPKDLPETLNE*L	16
ADAMTS4	-*LKAVPKEISPDTTLLDLQNNDISE*L	17
MMP-8	T*LLDLQNNDISELRKDD*F	18
MMP-8	A*IELEDLLRYS*K	19
カテプシン S	E*NSGFEPGAFDGLK*L	20
プロテアーゼ	デコリン	
MMP-12	M*IVIELGTNPLK*S	21
MMP-3	E*DEASGIGPEVPDDR*D	22
MMP-3	E*LHLDGKNKISRVDAA*S*L	23
MMP-3	L*VNNKISKVSPGAFTPL*V	24
MMP-3	A*LILVNNKISKVSPGAFTPLVKLER*L	25
MMP-9	F*SNPVQYWEIQPSTFR*C	26
カテプシン K	K*SSGIENGAFQGMK*K	27
カテプシン K	K*SSGIENGAFQGMKKLS*Y	28
ADAMTS1	N*KITEIKDGDGFK*N	29
ADAMTS1	Q*GLPPSLTELHLDGKNK*I	30
	バーシカン	
不明	K*LLASDAGLYR*C	31
不明	*LATVGELQAAWR*N	32

10

20

30

40

【表 10B】

不明	K*ETTVLVAQNGNIK*I	33
	ルミカン	
不明	-*SLEDLQLTHNK*I	34
不明	R*LKEDAVSAAFK*G	35
	パールカン	
不明	R*SIEYSPQLEDAGSR*E	36
不明	R*LEGDTLIIPR*V	37
ADAMTS4	E*VSEAVVEKLEPEYR*-	38
ADAMTS4	R*EVSEAVVEKLEPEYR*-	39
ADAMTS4	R*SIEYSPQLED*A	40

表 4：プロテアーゼによって生成されるペプチド-プロテオグリカンの切断生成物

*は切断部位を示す。

【0109】

従って、本発明の方法では、好ましくは、該ペプチド断片は、上記部分配列のいずれの配列にもおける記号「*」を付された部位におけるプロテアーゼによるパーシカン、ルミカン、パールカン、デコリン又はバイグリカンの切断によって形成されるネオエピトープを含む。

【0110】

更に、本発明の方法では、好ましくは、該ペプチド断片は、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカン及びバイグリカンの以下の部分配列のいずれの配列にもおける部位における 1 つ（又はそれ以上）のプロテアーゼによるプロテオグリカン（パーシカン、ルミカン、パールカン、デコリン及びバイグリカン）の切断によって形成されるネオエピトープを含み、或いは免疫学的結合パートナーは以下の配列の 1 つと特異的に反応する。

【0111】

10

20

30

【表 1 1】

配列	SEQ ID NO
SVPKEISPDTTLLDLQNNDISE	41
KSVPKEISPDTTLLDLQNNDISE	42
NSGFEPGAFDGLKLNLYLRISEAK	43
LKSVPKEISPDTTLLDLQNNDISE	44
LRISEAKLTGIPKDLPET	45
LKSVPKEISPDTTLLDLQNNDISE	46
LTGIPKDLPETLNELHLDHKNKIQAE	47
IVIELGTNPLK	48
LLASDAGLYR	49
LATVGELQAAWR	50
ETTVLVAQNNGNIK	51
SLEDLQLTHNK	52
LKEDAVSAAFK	53
SIEYSPQLEDAGSR	54
LEGDTLIIPR	55
RISEAKLTGIPKDLPETLNE	56
AIELEDLLRYSK	57
AIELEDLLRY	58
EAKLTGIPKDLPETLNE	59
LKAVPKEISPDTTLLDLQNNDISE	60
LLDLQNNDISELRKDD	61
IELEDLLRYS	62
NSGFEPGAFDGLK	63
DEASGIGPEVPDDR	64
LHLDGNKISRVDAAAS	65
VNNKISKVSPGAFTPL	66
LILVNNKISKVSPGAFTPLVKLER	67
SNPVQYWEIQPSTFR	68
SSGIENGAFQGMK	69
SSGIENGAFQGMKKLS	70
KITEIKDGDFK	71
GLPPSLTELHLDGNK	72
VSEAVVEKLEPEYR	73
EVSEAVVEKLEPEYR	74
SIEYSPQLEDASAKEFR	75

表 1 0 : プロテオグリカン切断のペプチド断片

【 0 1 1 2 】

好ましくは、該免疫学的結合パートナーは、切断されていない状態のパーシカン、ルミカン、デコリン、パールカン及びバイグリカンと反応しない。好ましくは、該免疫学的結合パートナーは、生成断片のそれぞれのC末端及びN末端を過ぎて延長している場合、上

10

20

30

40

50

記一覧の該配列と反応しない。

【 0 1 1 3 】

免疫学的結合パートナーは、パーシカン、ルミカン、デコリン、パールカン及びバイグリカントタイプの切断によって形成されるC末端又はN末端ネオエピトープと特異的に反応する免疫学的結合パートナーでもよい。

【 0 1 1 4 】

従って、好適な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのN末端において表 1 1 における以下の配列のいずれかの又はペプチドのC末端において表 1 2 における以下の配列と特異的に反応し得る。

【 0 1 1 5 】

【表 1 2】

	SEQ ID NO
バイグリカン	SVPKEI 76
	NSGFEP 77
	LKSVPK 78
	LRISEA 79
	GLKLN 80
	LKSVPK 81
	QCSDLG 82
	LTGIPK 83
	RISEAK 84
	AIELED 85
	EAKLTG 86
	LKAVPK 87
	LLDLQN 88
	IELEDL 89
	NSGFEP 90
デコリン	IVIELG 91
	NGLNQM 92
	DEASGI 93
	LHLDGN 94
	VNNKIS 95
	LILVNN 96
	SNPVQY 97
	SSGIEN 98
	KITEIK 99
	GLPPSL 100
パーシカン	LLASDA 101
	LATVGE 102
	ETTVLV 103
	SLTVVK 104
	ENQDAR 105
	NGFDQC 106
ルミカン	SLEDLQ 107
	LKEDAV 108
	HLQHNR 109
	LQHNRL 110
パールカン	SIEYSP 111
	LVNFTR 112
	VSEAVV 113
	EVSEAV 114
	SIEYSP 115

表 1 1 : プロテアーゼによって生成されるプロテオグリカンのペプチド断片のN末端配列

【 0 1 1 6 】

【表 1 3】

		SEQ ID NO
バイグリカン	NNDISE	116
	RISEAK	117
	LRKDDF	118
	KDLPET	119
	LNELHL	120
	YWEVQP	121
	KIQAIE	122
	PETLNE	123
	LLRYSK	124
	EDLLRY	125
デコリン	NNDISE	126
	ELRKDD	127
	DLLRYS	128
	AFDGLK	129
	GTNPLK	130
	SSGIEN	131
	EVPDDR	132
	RVDAAS	133
	GAFTPL	134
	LVKLER	135
バーシカン	QPSTFR	136
	AFQGMK	137
	GMKKLS	138
	KDGDFF	139
	HLDGNK	140
	CDVMYG	141
	NGFDQC	142
	QNGNIK	143
	IGQDYK	144
	QLTHNK	145
ルミカン	VSAAFK	146
	GLKSLE	147
	EDAGSR	148
パールカン	EFREVS	149
	VAQQDS	150
	LEPEYR	151
	SAKEFR	152

表 1 2 : プロテアーゼによって生成されるプロテオグリカンのペプチド断片の C 末端配列

【 0 1 1 7 】

同様にアッセイされ得るネオエピトープを決定する更なる切断部位は、プロテオグリカン又は他の動脈硬化性プラーク蛋白質を本明細書で述べられる任意の酵素と反応させ、
 そうして生成されるペプチドを単離して配列決定することによって同定され得る。

【 0 1 1 8 】

< コラーゲンアッセイ >

該ペプチド断片はⅢⅢⅢ型コラーゲンの（配列番号 1 5 3）、好ましくは、成熟ⅢⅢⅢ型コラーゲンの、即ち、ⅢⅢⅢ型コラーゲンプロペプチドの断片ではない断片でもよい。動脈硬化性プラークにおける主な蛋白質はⅠ、ⅢⅢⅢ型コラーゲン及びエラスチンであり、一方、プロテオグリカンはプラークのマトリックスにわずかに寄与するのみである。動脈硬化性プラークに見出される 3 つの主要な蛋白質中、Ⅰ及びⅢⅢⅢ型コラーゲンが優位であり、一方、エラスチンは動脈における蛋白質プロファイルを占めるが、プラークにおける主要な蛋白質成分ではない。Ⅰ型コラーゲンはヒトの身体全体にわたって豊富であり

、一方、ⅠⅠⅠ型はより限定された組織位置を有し、これにより、本発明者らの見解では生化学マーカーとしてより特異的な候補を構成する。

【 0 1 1 9 】

動脈硬化性プラークにおける多くの異なるプロテアーゼが文献により報告されているように、複数の候補プロテアーゼがプラークにおけるコラーゲンの消化に寄与し得る。おそらく、これは、最終的にプラーク破裂に至る広範の複雑なプロセスの結果である。しかし、本発明者らの評価では、初期相は一定範囲のMMPから成り得、一方、後期はマトリックスのカテプシンK分解により依存し得、疾患レベルに依存して異なるネオエピトーププロファイルとなる。本発明者らは、以下の表に一覧表示される酵素が少なくとも以下の切断部位においてⅠⅠⅠ型コラーゲンを切断すると判定した。

10

【 0 1 2 0 】

【表 1 4 A】

プロテアーゼ	ネオエピトープ	SEQ ID NO
MMP-1	A*GIPGAPGLMGARGPPGPA*G	154
MMP-1	K*GDPGPPGIPGRNGDPGI*P	155
MMP-1	G*LAGPPGMPGPRGSPGPQG*V	156
MMP-1	G*ERGLPGPPGIKGPAGIPGF*P	157
MMP-1	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPR*G	158
MMP-1	G*IKGHRGFPGNPGAPGSPGPAG*Q	159
MMP-1	A*RGLAGPPGMPGPRGSPGPQGV*K	160
MMP-1	I*TGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQG*V	161
MMP-1	I*TGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQGV*K	162
MMP-1	G*ITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQG*V	163
MMP-1	G*VKGESGKPGANGLSGERGPPGPQG*L	164
MMP-1	G*SRGAPGPQGPRGDKGETGERGAAG*I	165
MMP-1	P*KGDAGQPGEKGSPPGAPGPLG*I	166
MMP-1	G*ITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQGV*K	167
MMP-1	G*LRGAGPPGPEGGKGAAGPPGPPGAAGTPG*L	168
MMP-1	G*HAGAQQGPPGPPGINGSPPGKGEMGPAGIPGAPG*L	169
MMP-1	A*GKSGDRGESGPAGPAGAPGAGSRGAPGPQGPRGDK GETGERGAAG*I	170
MMP-1	G*LQGLPGTGGPPGENGKPGEPGPKGDAGAPGPGK GDAGAPGERGPPG*L	171
MMP-3	G*ERGLPGPPGIKGPAGIPGF*P	172
MMP-3	A*VGGLAGYPGPAGPPGPPGPPGT*S	173
MMP-3	K*DGTSGHPPGPIGPPGPRGNRGER*G	174
MMP-3	A*VGGLAGYPGPAGPPGPPGPPGTSGHPG*S	175
MMP-3	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQG*V	176
MMP-3	A*PGAPGGKGDAGAPGERGPPGLAGAPGLRG*G	177
MMP-3	A*VGGLAGYPGPAGPPGPPGPPGTSGHPGSPG*S	178
MMP-2	A*IGSPGPAGPRGPVGPSPGPPG*K	179
MMP-3 及び-8	G*AIGSPGPAGPRGPVGPSPGPPG*K	180
MMP-8	P*AGQQGAIGSPGPA*G	181
MMP-8	G*GPPGVAGPPGSGSPAGPP*G	182
MMP-8	L*AGPPGMPGPRGSPGPQG*V	183
MMP-8	G*LSGERGPPGPQGLPGLA*G	184
MMP-8	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQG*V	185
MMP-8	G*LAGPPGMPGPRGSPGPQGV*K	186
MMP-8	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGV*K	187
MMP-8	G*PQGPPGKNGETGPQGPPGP*T	188
MMP-8	G*VKGERGSPGGPGAAGFPGAR*G	189
MMP-8	A*RGLAGPPGMPGPRGSPGPQG*V	190
MMP-8	N*GLSGERGPPGPQGLPGLAGTA*G	191
MMP-8	A*VGGLAGYPGPAGPPGPPGPPGT*S	192
MMP-8	G*SPGGKGEMGPAGIPGAPGLMGA*R	193
MMP-8	T*GARGLAGPPGMPGPRGSPGPQG*V	194
MMP-8	V*KGESGKPGANGLSGERGPPGPQG*L	195
MMP-8	G*VKGERGSPGGPGAAGFPGARGLPGPPGSNGNP GPPGPSGSPKDGPPGPAG*N	196
MMP-8	G*SPGAQQGPPGAPGLGIAGITGARGLAGPPG*M	197
MMP-8	R*GAPGEKGEPPGVAGPPGSGSPAGPPGPQ*G	198
MMP-8	R*GAPGEKGEPPGVAGPPGSGSPAGPPGPQ*G	199
MMP-8	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQG*V	200

10

20

30

40

【表 1 4 B】

MMP-9	G*IKGPAGIPGFP*G	201
MMP-9	G*QPGVMGFPGPK*G	202
MMP-9	G*IKGPAGIPGFP*G	203
MMP-9	G*IKGPAGIPGFP*G	204
MMP-9	I*PGAPGLMGARGPPG*G	205
MMP-9	G*ERGLPGPPGIKGPAGIP*G	206
MMP-9	G*IPGAPGLMGARGPPG*G	207
MMP-9	G*FRGPAGPNGIPGEKGPAG*E	208
MMP-9	P*GIPGQPGSPGSPGPPGIC*E	209
MMP-9	G*ERGLPGPPGIKGPAGIPGF*P	210
MMP-9	A*VGGLAGYPGPAGPPGPPG*G	211
MMP-9	G*VKGERGSPGGPGAAGFPGARG*L	212
MMP-9	G*DAGAPGAPGGKGDAGAPGERGPPG*L	213
MMP-9	Q*GPPGPTGPGGDKGDTGPPGPQGL*Q	214
MMP-9	G*INGSPGGKGEMGPAGIPGAPGLM*G	215
MMP-9	Q*GPPGEPGQAGPSGPPGPPGAIGPS*G	216
MMP-9	P*GPPGINGSPPGGKGEMGPAGIPGAP*G	217
MMP-9	R*GLPGPPGSGNNGPPGSPGSGDKGPPG*G	218
MMP-9	G*KNGETGPQGPPTGPGGDKGDTGPPGPQGL*L	219
MMP-9	G*LPGIAGPRGSPGERGETGPPGPAGFPGAP*Q	220
MMP-9	G*INGSPGGKGEMGPAGIPGAPGLMGARGPPG*G	221
MMP-9	P*GINGSPGGKGEMGPAGIPGAPGLMGARGPPG*G	222
MMP-9	P*PGENGKPGEPGPKGDAGAPGAPGGKGDAGAPGERG PPG*L	223
MMP-9	G*LKGENGLPGENGAPGPMGPRGAPGERGRPLPGAAG *A	224
MMP-9	G*NTGAPGSPGVSGPKGDAGQPGKEKSPGAQGP*G	225
MMP-9	G*LMGARGPPGPAGANGAPGLRGGAGEPGKNGAKGEP GPRG*E	226
MMP-9	G*LRGGAGPPGPEGGKGAAGPPGPPGAAGTPGLQGM*P GERGGLGSPGPK*G	227
MMP-8 及び-9	G*QQGAIGSPGPAGPRGPVGPSPGPPG*K	228
MMP-9	K*GDPGPPGIPGRNGDPGIPGQPG*S	229
MMP-9	G*LRGGAGPPGPEGGKGAAGPPGPPG*G	230
MMP-9	G*KNGETGPQGPPTGPGGDKGDTGPPGPQGL*L	231
MMP-9	G*YQGPGEPPGQAGPSGPPGPPG*G	232
MMP-9	G*VAGPPGGSGPAGPPGPQGL*V	233
MMP-8, -9 及び -13	G*DKGEPGGPGADGVPGKDGPRGPTGPIGPPGPAG*Q	234
ADAMTS-5	Q*GHAGAQQPPGPPGIN*G	235
カテプシン K	A*GERGAPGPA*G	236
カテプシン K	A*GIPGFPGMK*G	237
カテプシン K	F*PGMKGHRGFD*G	238
カテプシン K	G*FPGARGLP*G	239
カテプシン K	A*GFPGARGLP*G	240
カテプシン K	P*PGPPGPPGTSGHP*G	241
カテプシン K	G*FPGMKGHRGFD*G	242
カテプシン K	Q*PGDKGEGGAPGLPI*G	243
カテプシン K	R*GDKGETGERGAAGIK*G	244
カテプシン K	D*GRNGEKGETGAPGLK*G	245
カテプシン K	A*GQPGDKGEGGAPGLPI*G	246

10

20

30

40

【表 1 4 C】

カテブシン K	G*GPPGENGKPGEPGPKGD*A	247
カテブシン K	A*GIPGFPGMKGHRGFD*G	248
カテブシン K	R*GGAGEPGKNGAKGEPGR*G	249
カテブシン K	K*GERGSPGGPGAAGFPGARGLPGPP*G	250
カテブシン K	I*PGVPGA KGEDGKDGSPGEPGANGLP*G	251
カテブシン K	G*AAGFPGARGLPGPPGSGNNGPPGPS*G	252
カテブシン K	R*PGPPGPSGPRGQPGVMGFPGPKGN*D	253
カテブシン K	Q*GPPGPPGINGSPPGKGEMGPAGIPGAP*G	254
カテブシン K	A*GKDGESGRPRGERGLPGPPGIK*G	255
カテブシン K	A*GARGNDGARGSDGQPGPPGPPGTAGFPG*S	256
カテブシン K	S*PGVSGPKGDAGQPGEKGSPPGAQGGPPGAPG*P	257
カテブシン K	R*GSDGQPGPPGPPGTAGFPGSPGAKGEVGPA*G	258
カテブシン K	Q*GPPGPPGINGSPPGKGEMGPAGIPGAPGLM*G	259
カテブシン K	A*GPPGPPGPPGTSGHPGSPGSPGYQGGPPGEPG*Q	260
カテブシン K	F*PGAPGQNGEPGGKGERGAPGEKGEPPGVA*G	261
カテブシン K	A*GFPGAPGQNGEPGGKGERGAPGEKGEPPG*V	262
カテブシン K	A*GARGNDGARGSDGQPGPPGPPGTAGFPGSPGAKGEV GPA*G	263
カテブシン K	R*GAAGEPGRDGVPGGPGMRGMPGSPGGPGSDGKPGP PGSQGESGRPGPPGPS*G	264
カテブシン S	G*IAGITGARGL*A	265
カテブシン S	AGPPGPPGAAGTPGLQGM	266
カテブシン S	N*GLSGERGPPGPQGLPG*L	267
カテブシン S	M*GARGPPGPAGANGAPGLR*G	268
カテブシン S	N*GLSGERGPPGPQGLPLA*G	269
カテブシン S	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPRG*S	270
カテブシン S	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQG*V	271
カテブシン S	R*GGAGPPGPEGGKGAAGPPGPPGAAGTPGLQ*G	272
カテブシン S	S*GPKGDAGQPGEKGSPPGAQGGPPGAPGLG*I	273
カテブシン S	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQGVK*G	274
カテブシン S	A*VGGLAGYPGPAGPPGPPGPPGTSGHPGSPGSPGYQ* G	275
カテブシン S	E*PGPQGHAGAQQPPGPPGINGSPPGKGEMGPAGIPGA PG*L	276
ADAMTS1	I*PGFPGMKGHR*G	277
ADAMTS1	R*GSPGGPGAAGFPGAR*G	278
ADAMTS1	K*GPAGIPGFPGMKGHR*G	279
ADAMTS1	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQ*G	280
ADAMTS1	A*GITGARGLAGPPGMPGPR*G	281
ADAMTS1	L*GIAGITGARGLAGPPGMPGPR*G	282
ADAMTS1	T*GARGLAGPPGMPGPRGSPGPQ*G	283
ADAMTS1	Q*GPPGPPGINGSPPGKGEMGPAG*I	284
ADAMTS1	L*PGPPGIKGPAGIPGFPGMKGHR*G	285
ADAMTS1	A*GITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQ*G	286
ADAMTS1	T*GARGLAGPPGMPGPRGSPGPQGVK*G	287
ADAMTS1	R*GLPGPPGIKGPAGIPGFPGMKGHR*G	288
ADAMTS1	G*RPGLPGAAGARGNDGARGSDGQPGPPG*P	289
ADAMTS1	N*GAPGPMGPRGAPGERGRPLPGAAGAR*G	290
ADAMTS1	A*GSRGAPGPQGPGRGDKGETGERGAAGIK*G	291
ADAMTS1	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGVKGESGKPGAN*G	292
ADAMTS1	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGVKGESGKPGANGL*S	293

10

20

30

40

【表 1 4 D】

ADAMTS1	P*GPPGSNGNPGPPGPSGSPGKDGPPGPAGNTGAPGS* P	294
ADAMTS1	T*GARGLAGPPGMPGPRGSPGPQGVKGESGKPGAN*G	295
ADAMTS1	R*GAPGEKGEAGPPGVAGPPGSGPAGPPGPQGVKGE R*G	296
ADAMTS1	G*GPPGVAGPPGSGPAGPPGPQGVKGERGSPGGPGA AGF*P	297
ADAMTS1	K*SGDRGESGPAGPAGPAGSRGAPGPQGPGRGDKGE TGERGAAGIK*G	298
ADAMTS4	I*PGFPGMKGHR*G	299
ADAMTS4	R*GLAGPPGMPGPR*G	300
ADAMTS4	G*PQGLQGLPGTGGPP*G	301
ADAMTS4	K*GPAGIPGFPGMKGHR*G	302
ADAMTS4	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQG*V	303
ADAMTS4	G*GPPGENGKPGEPGPKGDAGAP*G	304
ADAMTS4	A*PGFRGPAGPNGIPGEKGPAGER*G	305
ADAMTS4	E*KGSPGAQGPAGPGLGIAGITGAR*G	306
ADAMTS4	L*PGPPGIKGPAGIPGFPGMKGHR*G	307
ADAMTS4	R*GAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGER*G	308
ADAMTS4	R*GLPGLPGIPKGPAGIPGFPGMKGHR*G	309
ADAMTS4	R*GPVGPSPGPPGKDGTSHPGPIGPPGPR*G	310
ADAMTS4	A*PGPQGPGRGDKGETGERGAAGIKGHR*G	311
ADAMTS4	R*GAPGPQGPGRGDKGETGERGAAGIKGHR*G	312
ADAMTS4	R*GFPNGPAGPSPGPAGQQGAIGSPGPAGPR*G	313
ADAMTS4	L*PGPPGIKGPAGIPGFPGMKGHRGFDGR*N	314
ADAMTS4	D*AGQPGEKGSPPGAQGPAGPGLGIAGITGAR*G	315
ADAMTS4	R*GPTGPIGPPGPAGQPGDKGEGGAPGLPGIAGPR*G	316
ADAMTS4	K*GDAGQPGEKGSPPGAQGPAGPGLGIAGITGAR*G	317
ADAMTS4	R*NGEKGETGAPGLKGENLPGENGAPGPMGPR*G	318
ADAMTS4	A*PGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGPAGPRGA*A	319
ADAMTS4	R*GAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGPAGPR*G	320
ADAMTS4	R*GSPGERGETGPPGPAGFPAGQNGEPGGKGER*G	321
ADAMTS4	G*HAGAQQPPGPPGINGSPPGGKGEMGPAGIPGAPGLMG* A	322
ADAMTS4	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGVKGESGKPGANGLSGE R*G	323
ADAMTS8	L*GIAGITGARGL*A	324
ADAMTS8	I*PGFPGMKGHR*G	325
ADAMTS8	R*GLAGPPGMPGPR*G	326
ADAMTS8	Q*GPPGAPGPLGIAGITGAR*G	327
ADAMTS8	A*GITGARGLAGPPGMPGPR*G	328
ADAMTS8	A*GIPGAPGLMGARGPPGPAGAN*G	329
ADAMTS8	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGVKG*E	330
ADAMTS8	K*GSPGAQGPAGPGLGIAGITGAR*G	331
ADAMTS8	L*PGPPGIKGPAGIPGFPGMKGHR*G	332
ADAMTS8	K*DGTSGHPGPIGPPGPRGNRGER*G	333
ADAMTS8	A*GITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQG*G	334
ADAMTS8	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGVKGESG*K	335
ADAMTS8	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGVKGESGKPGAN*G	336
ADAMTS8	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGVKGESGKPGANGL*S	337
ADAMTS8	P*GPPGSNGNPGPPGPSGSPGKDGPPGPAGNTGAPGS* P	338
ADAMTS8	R*GAPGEKGEAGPPGVAGPPGSGPAGPPGPQGVKGE R*G	339

10

20

30

40

【表 1 4 E】

ADAMTS8	K*SGDRGESGPAGPAGAPGPAGSRGAPGPQGPRGDKGE TGERGA*A	340
ADAMTS8	R*GAPGEKGEGGPPGVAGPPGGSGPAGPPGPQGVKGE RGSPGGPGAAGFPGAR*G	341
MMP9	*AIGPSG*	342
不明	-AGGFAP*	781

【0 1 2 1】

10

従って、本発明の方法では、好ましくは、該ペプチド断片は、ⅠⅠⅠ型コラーゲンの上記部分配列のいずれの配列にもおける記号「*」を付された部位におけるプロテアーゼによるⅠⅠⅠ型コラーゲンの切断によって形成されるネオエピトープを含む。

【0 1 2 2】

更に、本発明の方法では、好ましくは、該ペプチド断片は、*間におけるⅠⅠⅠ型コラーゲンの上記部分配列のいずれの配列にもおける部位における1つ（又はそれ以上）のプロテアーゼによるⅠⅠⅠ型コラーゲンの切断によって形成されるネオエピトープを含み、または免疫学的結合パートナーは上記表のエントリーにおける*間に伸長する配列と特異的に反応する。

【0 1 2 3】

20

好ましくは、該免疫学的結合パートナーは、切断されていない状態のⅠⅠⅠ型コラーゲンと反応しない。好ましくは、該免疫学的結合パートナーは、それぞれの切断部位を過ぎて延長している場合、上記一覧の該配列と反応しない。

【0 1 2 4】

免疫学的結合パートナーは、ⅠⅠⅠ型コラーゲンの切断によって形成されるC末端又はN末端ネオエピトープと特異的に反応する免疫学的結合パートナーでよい。

【0 1 2 5】

従って、好適な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのN末端において以下の配列（各配列の後に配列番号）又はペプチドのC末端において以下の配列と特異的に反応し得る。

【0 1 2 6】

30

【表 15】

GIPGAP 343	GDPGPP 408	LAGPPG 470	ERGLPG 534	IAGITG 598
IKGHRG 344	RGLAGP 409	TGARGL 471		ITGARG 599
VKGESG 345	SRGAPG 410	KGDAGQ 472	ITGARG 535	LRGGAG 600
HAGAQQ 346	GKSGDR 411	LQGLPG 473	ERGLPG 536	KDGTSG 763
DGTSGH 347	VGGLAG 412	IAGITG 474	PGAPGG 537	VGGLAG 601
IGSPGP 348	AIGSPG 413	AGQQGA 475	GPPGVA 538	AGPPGM 602
LSGERG 349	GLAGPP 414	LAGPPG 476	GLAGPP 539	PQGPPG 603
VKGERG 350	RGLAGP 415	GLSGER 477	VGGLAG 540	SPGGKG 604
GARGLA 351	KGESGK 416	VKGERG 478	SPGAQG 541	GAPGEK 605
GAPGEK 352	IAGITG 417	IKGPAG 479	QPGVMG 542	IKGPAG 606
IKGPAG 353	PGAPGL 418	ERGLPG 480	IPGAPG 543	FRGPAG 607
GIPGQP 354	ERGLPG 419	VGGLAG 481	VKGERG 544	DAGAPG 608
GPPGPT 355	INGSPG 420	GPPGEP 482	GPPGIN 545	GLPGPP 609
KNGETG 356	LPGIAG 421	INGSPG 483	GINGSP 546	PGENGK 610
LKGENG 357	NTGAPG 422	LMGARG 484	LRGGAG 547	QQGAIG 611
GDPGPP 358	LRGGAG 423	KNGETG 485	YQGPPG 548	VAGPPG 612
DKGEPG 359	GHAGAQ 424	GERGAP 486	GIPGFP 549	PGMKGH 613
FPGARG 360	GFPGAR 425	PGPPGP 487	FPGMKG 550	PGDKGE 614
GDKGET 361	GRNGEK 426	GQPGDK 488	GPPGEN 551	
GGAGEP 362	GERGSP 427	PGVPGA 489	AAGFPG 552	
GPPGPP 363	GKDGES 428	GARGND 490	PGVSGP 553	GSDGQP 615
		PGAPGQ 491	GFPGAP 554	GARGND 616
GAAGEP 365	IAGITG 429	GPPGPP 492	GLSGER 555	GARGPP 617
GLSGER 366		IAGITG 493	GGAGPP 556	GPKGDA 618
IAGITG 367	GPKGDA 430		VGGLAG 557	PGPQGH 619
PGFPGM 368	GSPGGP 431	GPAGIP 494	GLAGPP 558	
GIAGIT 369		GPPGPP 495	PGPPGI 559	GITGAR 620
GARGLA 370	GLPGPP 432	RPGLPG 496	GAPGPM 560	GSRGAP 621
GLAGPP 371		GPPGSN 497	GARGLA 561	GAPGEK 622
GPPGVA 372	SGDRGE 433	PGFPGM 498	GLAGPP 562	PQGLQG 623
GPAGIP 373	GLAGPP 434	GPPGEN 499	PGFRGP 563	KGSPGA 624
PGPPGI 374	GAPGFR 435	GLPGPP 500	GPVGPS 564	PGPQGP 625
GAPGPQ 375	GFPGNP 436	PGPPGI 501	AGQPGE 565	GPTGPI 626
GDAGQP 376	NGEKGE 437	PGFRGP 502	GAPGFR 566	GSPGER 627
HAGAQQ 377	GLAGPP 438	GIAGIT 503	PGFPGM 567	
GPPGAP 378	GITGAR 439	GIPGAP 504	GLAGPP 568	GSPGAQ 628
	DGTSGH 440	GITGAR 505		GLAGPP 629
GLAGPP 379	GPPGSN 441	GAPGEK 506	SGDRGE 569	GAPGEK 630
AIGPSG 380				

10

20

30

【表 16】

GPPGPA 381	NGDPGI 442	SPGPQG 507	AGIPGF 570	GMPGPR 631
SPGPAG 382	PGPQGV 443	PPGPQG 508	ERGAAG 571	PGPLGI 632
AAGTPG 383	IPGAPG 444	ERGPPG 509	PGPPGT 572	GNRGER 633
TSHPG 384	SPGPQG 445	APGLRG 510	HPGSPG 573	PSGPPG 634
PSGPPG 385	GSPGPA 446	GPAGPP 511	SPGPQG 574	GLPGLA 635
	QGPPGP 447	SPGPQG 512	GLAGTA 575	PGPPGT 636
PGLMGA 386		LAGPPG 513	GPPGPQ 576	GPPGPQ 637
SPGPQG 387	IPGFPG 448	FPGPKG 514	GFPGMK 577	FPGMKG 638
	GPAGIP 449	PPGPAG 515	EKGPA 578	GPPGIC 640
PPGPPG 388	FPGARG 450		PGPQGL 579	GAPGLM 641
GAIGPS 389	GIPGAP 451		FPGAPG 580	
PPGPAG 390	ERGPPG 452	LPGAAG 516	APGPLG 581	EPGPRG 642
SPGPKG 391	PSGPPG 453	IPGQPG 517		
PPGPAG 392	GPPGIN 454	GAPGPA 518	GFPGMK 582	GHRGFD 643
LPGPPG 393	GTSGHP 455	GHRGFD 519	PGLPGI 583	GAAGIK 644
GAPGLK 394	GLPGIA 456	PGPKG 520	GHRGFD 584	GEPGPR 645
GLPGPP 395	GANGLP 457	GPPGPS 521	PGPKG 585	GIPGAP 646
GPPGIK 396	TAGFPG 458	PPGAPG 522	GEVGPA 586	GAPGLM 647
GPPGVA 397	EGGPPG 459	GEVGPA 523	GPPGPS 587	TGARGL 648
TPGLQG 398	PQGLPG 460	GAPGLR 524	GLPGLA 588	MPGPRG 649
GTPGLQ 399	APGPLG 461	GPQGVK 525	GSPGYQ 589	GMKGHR 650
GFPGAR 400	GSPGPQ 462	GMPGPR 526	EMGPAG 590	GPQGVK 651
QGPAG 401	GAAGAR 463	GAAGIK 527	GKPGAN 591	PGANGL 652
TGAPGS 402	GVKGER 464	PGAAGF 528	GMPGPR 592	GTGGPP 653
SPGPQG 403	GDAGAP 465	GPAGER 529	GITGAR 593	GPPGPR 654
GPAGPR 404	RGFDGR 466	GIAGPR 530	AGPRGA 594	GGKGER 655
APGLMG 405	GLSGER 467	TGARGL 531	GPAGAN 595	PQGVKG 656
GNRGER 406	GSPGPQ 468	VKGESG 532	GKPGAN 596	PGANGL 657
TGAPGS 407	GVKGER 469	TGERGA 533	GFPGAR 597	

10

20

【0128】

同様にアッセイされ得るネオエピトープを決定する更なる切断部位は、III型コラーゲン又は他の動脈硬化性プラーク蛋白質を本明細書で述べられる任意の酵素と反応させ、そうして生成されるペプチドを単離して配列決定することによって同定され得る。

30

【0129】

<CRP及びApoEアッセイ>

該ペプチド断片はCRP（配列番号658）又はApoE（配列番号659）の断片でもよい。好ましくは、ApoEでは、選択断片はApoEのすべての同定アイソタイプ、 $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 及び $\epsilon 4$ において生じる。

【0130】

CRP及びApoEがヒトの身体全体にわたって豊富であるとしても、アテローム性動脈硬化組織におけるその局在により、それらは局所プロテアーゼの作用に晒される。これにより、これらの分子は生化学マーカーとして良好且つ特異的な候補である。

【0131】

40

動脈硬化性プラークにおける多くの異なるプロテアーゼが文献により報告されているように、複数の候補プロテアーゼがプラークにおけるCRP及びApoEの消化に寄与し得る。おそらく、これは、最終的にプラーク破裂に至る広範の複雑なプロセスの結果である。しかし、初期相は一定範囲のMMPから成り得、一方、後期はマトリックスのカテプシンK分解により依存し得、疾患レベルに依存して異なるネオエピトーププロファイルとなる。本発明者らは、純粋天然蛋白質の一定範囲の*in vitro*切断を通じて、以下の表に一覧表示される酵素が少なくとも以下の切断部位（*を付す）においてCRP及びApoEを切断すると判定した。

【0132】

【表 17】

表 13：特異的プロテアーゼによって生成されるCRP及びApoE断片

プロテアーゼ／蛋白質	ネオエピトープ	SEQ ID NO
APOE + MMP3	A*KVEQAVETEPEPELR*Q	660
APOE + MMP9	A*KVEQAVETEPEPELR*Q	661
APOE + MMP1	V*AEVRAKLEEQAQQI*R	662
APOE + MMP3	A*KVEQAVETEPEPELR*Q	663
APOE + MMP3	A*MLGQSTEELRV*R (M 酸化)	664
APOE + ADAMTS1	E*QAVETEPEPELR*Q	665
APOE + ADAMTS1	R*QQTEWQSGQRWE*L	666
APOE + ADAMTS1	L*AVYQAGAREGAERGLS*A	667
APOE + ADAMTS1	R*AKLEEQAQQIR*L	668
APOE + ADAMTS1	A*KLEEQAQQIRLQ*A	669
APOE + カテプシン K	A*KVEQAVETEPEPELR*Q	670
APOE + カテプシン K	K*VEQAVETEPEPELR*Q	671
APOE + カテプシン K	E*QAVETEPEPELR*Q	672
APOE + カテプシン K	D*EVKEQVAEVRACLE*E	673
プロテアーゼ／蛋白質	ネオエピトープ	
CRP + カテプシン K	K*ESDTSYVSLKAPLT*K	674
CRP + カテプシン K	G*GNFEGSQSLVGDIG*N	675
CRP + MMP9	A*LKYEVQGEVFTKPQ*L	676
CRP + MMP9	G*IVEFWVDGKPRV*R	677
CRP + MMP1/MMP3	R*KAFVFPKE*S	678
CRP + MMP3	K*YEVQGEVFTKPQLWP*-	679
CRP + MMP3	D*SFGGNFEGSQS*L	680
CRP + MMP3	D*FVLSPDEINT*I	681
CRP + MMP3	S*LKKGYTVGAEA*S	682
CRP + MMP3	A*FGQTDMSRKA*F	683
CRP + MMP3	S*LKKGYTVGAEAS*I	684
CRP + MMP3	G*EVFTKPQLWP*-	685
CRP + MMP3	S*IILGQEQDSFGGN*F	686
CRP + MMP3	K*YEVQGEVFTKPQ*L	687

【0133】

従って、本発明の方法では、好ましくは、該ペプチド断片は、CRP及びApoEの以下の部分配列のいずれの配列にもおける記号「*」が付された部位におけるプロテアーゼによるCRP及びApoEの切断によって形成されるネオエピトープを含み、または免疫学的結合パートナーは以下の配列の1つにおける*間に画定される配列と特異的に反応する。

【0134】

10

20

30

【表 18】

表 14 : CRP 及び ApoE の切断断片

ApoE 断片	
A*KVEQAVETEPEPELR*Q	
A*KVEQAVETEPEPELR*Q	
V*AEVRAKLEEQAAQ*IR	
A*KVEQAVETEPEPELR*Q	
A*MLGQSTEELRV*R (M 酸化)	
E*QAVETEPEPELR*Q	
R*QQTEWQSGQRWE*L	10
L*AVYQAGAREGAERGLS*A	
R*AKLEEQAAQ*IR	
A*KLEEQAAQ*IRLQ*A	
A*KVEQAVETEPEPELR*Q	
K*VEQAVETEPEPELR*Q	
E*QAVETEPEPELR*Q	
D*EVKEQVAEVRACLE*E	
CRP 断片	
K*ESDTSYVSLKAPLT*K	
G*GNFEGSQSLVGDIG*N	20
A*LKYEVQGEVFTKPQ*L	
G*IVEFWVDGKPRV*R	
R*KAFVFPKE*S	
K*YEVQGEVFTKPQLWP*-	
D*SFGGNFEGSQS*L	
D*FVLSPDEINT*I	
S*LKKGYTVGAEA*S	
A*FGQTDMSRKA*F	
S*LKKGYTVGAEA*S	
G*EVFTKPQLWP*-	
S*IILGQEQDSFSGGN*F	
K*YEVQGEVFTKPQ*L	30

【0135】

従って、好適な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのN末端において以下の配列又はペプチドのC末端において以下の配列と特異的に反応し得る。

【0136】

【表 19】

APOE	SEQ ID NO	CRP	SEQ ID NO
KVEQAV	688	AFVFPK	699
AEVRAK	689	YEVQGE	700
MLGQST	690	KAFVFP	701
QAVETE	691	SFGGNF	702
QQTEWQ	692	FVLSPD	703
AVYQAG	693	LKKGYT	704
AKLEEQ	694	FGQTDM	705
KLEEQA	695	LKKGYT	706
VEQAVE	696	IILGQE	707
QAVETE	697	YEVQGE	708
EVKEQV	698	LKYEYVQ	709
		IVEFWV	710
		ESDTSY	711
		GNFEYS	712

10

【0137】

【表 20】

APOE		CRP	
TEPEPE	714	KAFVFPK	725
EQAQQI	715	AFVFPK	726
TEELRV	716	KPQLWP	727
PEPELR	717	FVFPKE	728
SGQRWE	718	PDEINT	729
EGAERG	719	DMSRKA	730
QAQQIR	720	VGAEAS	731
QQIRLQ	721	KPQLWP	732
EPEPEL	722	DSFGGN	733
PEPELR	723	VFTKPQ	734
EVRACL	724		

20

30

【0138】

同様にアッセイされ得るネオエピトープを決定する更なる切断部位は、CRP及びApoEまたは他の動脈硬化性プラーク蛋白質を本明細書で述べられる任意の酵素と反応させ、そうして生成されるペプチドを単離して配列決定することによって同定され得る。

【0139】

<エラスチンアッセイ>

該ペプチドはエラスチン（配列番号735）の断片でもよい。エラスチンはヒトの身体全体にわたって豊富であるとしても、アテローム性動脈硬化組織におけるその局在はそれを局所プロテアーゼの作用に晒させ、そのためにこれらの分子は動脈硬化性プラーク代謝回転の生化学マーカーとして良好且つ特異的な候補である。

40

【0140】

動脈硬化性プラークにおける多くの異なるプロテアーゼが文献により報告されているように、複数の候補プロテアーゼがプラークにおけるエラスチンの消化に寄与し得る。おそらく、これは、最終的にプラーク破裂に至る広範の複雑なプロセスの結果である。しかし、初期相は一定範囲のMMPから成り得、一方、後期はマトリックスのカテプシンK分解により依存し得、疾患レベルに依存して異なるネオエピトーププロファイルとなる。本発明者らは、純粋天然蛋白質の一定範囲の*in vitro*切断を通じて、以下の表に一覧表示される酵素が少なくとも以下の切断部位（*を付す）においてエラスチンを切断すると判定した。

50

【 0 1 4 1 】

【表 2 1】

表 1 5 : 特異的なプロテアーゼによって生成されるエラスチン断片

プロテアーゼ／蛋白質	ネオエピトープ	SEQ ID NO
ADAMTS4	A*RPGVGVGGIPTYGVGAGG*F	736
カテプシン K	G*LPYTTGKLPYGYGPG*G	737
カテプシン S	G*VAPGVGVAPGVGVAPGIGPGGVA*A	738
カテプシン S	G*GAGVPGVPGAIPGIGGIAGVG*T	739
ADAMTS4	G*GAGVPGVPGAIPGIGGIAGVG*T	740
カテプシン K	G*VGISPEAQAAAAAK*A	741
ADAMTS1	G*VGISPEAQAAAAAK*A	742

10

【 0 1 4 2 】

従って、本発明の方法では、好ましくは、該ペプチド断片は、エラスチンの以下の部分配列のいずれの配列にもおける記号「*」が付された部位におけるプロテアーゼによるエラスチンの切断によって形成されるネオエピトープを含み、或いは免疫学的結合パートナーは以下の配列の1つにおける*間に画定される配列と特異的に反応する。

【 0 1 4 3 】

【表 2 2】

表 1 6 : エラスチンの切断断片

エラスチン断片
A*RPGVGVGGIPTYGVGAGG*F
G*LPYTTGKLPYGYGPG*G
G*VAPGVGVAPGVGVAPGIGPGGVA*A
G*GAGVPGVPGAIPGIGGIAGVG*T
G*GAGVPGVPGAIPGIGGIAGVG*T
G*VGISPEAQAAAAAK*A
G*VGISPEAQAAAAAK*A
A*RPGVGVGGIPTYGVGAGG*F
G*LPYTTGKLPYGYGPG*G

20

30

【 0 1 4 4 】

従って、好適な免疫学的結合パートナーは、ペプチドのN末端において以下の配列又はペプチドのC末端において以下の配列と特異的に反応し得る。

【 0 1 4 5 】

【表 2 3】

エラスチン	SEQ ID NO
RPGVGV	743
LPYTTG	744
VAPGVG	745
GAGVPG	746
VGISPE	747
RPGVGV	748
LPYTTG	749

40

【 0 1 4 6 】

【表 2 4】

エラスチン	SEQ ID NO
GVGAGG	750
YGYGPG	751
GPGGVA	752
GIAGVG	753

10

【0147】

同様にアッセイされ得るネオエピトープを決定する更なる切断部位は、エラスチン又は他の動脈硬化性プラーク蛋白質を本明細書で述べられる任意の酵素と反応させ、そうして生成されるペプチドを単離して配列決定することによって同定され得る。

【0148】

上述の2つ以上のペプチドのアッセイは別個に行われ、それらの結果は組み合わせられ得、又は上述の2つ以上のペプチドはともに測定され得る。

【0149】

本発明によるアッセイの結果は、診断又は予後値の総合指数を形成するために1つ以上の他の測定バイオマーカーと組み合わせられ得る。

20

【0150】

本明細書で用いられる「免疫学的結合パートナー」という用語は、ポリクローナル及びモノクローナル抗体、更に抗体の特異的な結合断片、例えば、Fab又はF(ab')₂も含む。従って、該免疫学的結合パートナーはモノクローナル抗体又は特異的結合親和性を有するモノクローナル抗体の断片でよい。

【0151】

本明細書で用いられる「蛋白質」という用語は、リポ蛋白質及びプロテオグリカン並びに他の蛋白（または非蛋白）の天然複合体を含む。

【0152】

一般的に、本発明に従って不均一及び均一フォーマット、サンドイッチアッセイ、競合アッセイ、酵素結合アッセイ、放射免疫アッセイなどを含むあらゆる既知のイムノアッセイフォーマットが用いられ得る。従って、任意に、該方法は、該免疫学的結合パートナー及び競合物質が該試料の存在下にてインキュベートされ、競合物質が免疫学的結合パートナーと結合するために試料中のペプチド断片と競合する競合イムノアッセイとして行われる。

30

【0153】

該競合物質は、該ネオエピトープを示すためにネオエピトープが属する蛋白質の切断によって形成される合成ペプチド又は精製天然ペプチドでもよい。従って、ペプチドは、バーシカン、ルミカン、パールカン、デコリン、パイグリカン、III型コラーゲン、Ap
oE、CRP又はエラスチンに由来し得る。

40

【0154】

1つの好適な方法は、任意のこれらの蛋白質の断片のネオエピトープ若しくは動脈硬化性プラークに由来する他の蛋白質由来のペプチド断片上のネオエピトープに結合するモノクローナル抗体、又はその抗体結合断片を用いた競合イムノアッセイでよい。マイクロタイタープレートの固体表面上に被覆された、適切に選択された合成ペプチドは、モノクローナル抗体又は結合断片への結合について試料と競合し得る。或いは、モノクローナル抗体又は結合断片によって認識されるネオエピトープを保有する1つ以上のこれらの蛋白質由来の精製天然断片が、固体表面上に用いられ得る。更に別の代替例は、モノクローナル抗体又は結合断片を固体表面上に固定化し、次に、試料を、シグナル分子、例えば、西洋

50

ワサビペルオキシダーゼ又はビオチンに適切に結合した合成ペプチドと共にインキュベートすることである。試料は尿、血清、血液、血漿又は他の、例えば、動脈硬化性プラーク生検の試料でもよい。

【 0 1 5 5 】

一部の好ましい方法では、試料は患者由来の試料であり、方法は、該ペプチド断片の該結合の定量レベルを、(a) 比較できる健常患者及び/又は(b) アテローム性動脈硬化病態の特徴を示す数値と比較するステップと、任意に、高レベルの測定ペプチド(通常、高レベルの結合によって示される) をより重症度の該病態と関連付けるステップとを更に含む。

【 0 1 5 6 】

本発明の一態様は、上述のネオエピトープを認識するモノクローナル抗体の開発に関する。これは、当該蛋白質分子のアミノ酸配列に由来する合成ペプチド(上記一覧表示された配列又はそこで終止する配列を含む) でマウスを免疫化し、選択マウス由来脾臓細胞を骨髓腫細胞に融合し、関連合成ペプチド上のネオエピトープへの結合についてモノクローナル抗体を試験することによって達成され得る。ネオエピトープに対する特異性は、合成ペプチドとの反応性及び(C末端ネオエピトープに対する) C末端延長形態の免疫ペプチド若しくは(N末端ネオエピトープに対する) N末端延長形態の免疫ペプチドとの反応性の欠如を必要とすることによって確実にされ得る。天然蛋白質に対する結合能の欠如を確定するために、ネオエピトープに対する抗体も評価され得る。或いは、ネオエピトープに対する特異性は、抗体の反応性が末端アミノ酸の1つに共有結合したビオチン又は他の官能基の存在が負に依存するよう求めることによって確実にされ得る。

【 0 1 5 7 】

本発明は、上記に示される部分配列のいずれか1つの部分配列における末端部位におけるプロテアーゼによる該蛋白質の切断によって形成されるネオエピトープと特異的に免疫反応する免疫学的結合パートナーを含み、例えば、モノクローナル抗体又はその結合断片でもよい。

【 0 1 5 8 】

本発明は、上記に示される部分配列のいずれか1つの部分配列における配列の末端部位における動脈硬化性プラーク蛋白質の切断によって形成されるC末端又はN末端ネオエピトープに対するモノクローナル抗体を産生する細胞株を含む。

【 0 1 5 9 】

本発明は、上記に示されるこれらの蛋白質の部分配列のいずれか1つの部分配列における該蛋白質の切断によって形成されるC末端又はN末端ネオエピトープを含むペプチドを更に提供する。そのようなペプチドはイムノアッセイで用いるために、該ペプチドに対する免疫反応を生じさせるためにハプテンとして担体にコンジュゲートされ、又は固体表面に固定化され、又は検出可能なマーカーにコンジュゲートされ得る。

【 0 1 6 0 】

本発明は、上記に示される部分配列のいずれか1つの部分配列における該蛋白質の切断によって形成されるC末端又はN末端ネオエピトープを含むペプチドをコードする単離核酸分子を更に含む。

【 0 1 6 1 】

本発明は、発現シグナルと、上記に示される部分配列のいずれか1つの部分配列における該蛋白質の切断によって形成されるC末端又はN末端ネオエピトープを含むペプチドの発現をコードするコード配列とを含む核酸配列を含むベクターを更に含み、そのようなベクターで形質転換され、該ペプチドを発現する宿主細胞を更に含む。

【 0 1 6 2 】

本発明の更に別の態様は、上述の方法を実施するために好都合に用いられ得るキットに関する。そのようなキットは、(1) 合成ペプチドで被覆されたマイクロタイタープレートと、(2) 該合成ペプチドと反応する本発明のモノクローナル抗体若しくは抗体結合断片と、(3) 標識抗マウスIgG免疫グロブリンとを含み得る。或いは、そのようなキッ

10

20

30

40

50

トは、(1)精製天然蛋白質断片で被覆されたマイクロタイタープレートと、(2)該蛋白質のいずれか1つの断片上のネオエピトープを認識し、該精製断片と反応するモノクローナル抗体と、(3)標識抗マウスIgG免疫グロブリンとを含み得る。或いは、そのようなキットは、(1)ストレプトアビジンで被覆されたマイクロタイタープレートと、(2)ビオチンに結合した合成ペプチドと、(3)該蛋白質断片上のネオエピトープを認識し、該合成ペプチドと反応するモノクローナル抗体と、(4)標識抗マウスIgG免疫グロブリンとを含み得る。更に別の代替例は、(1)ストレプトアビジンで被覆されたマイクロタイタープレートと、(2)ビオチンに結合した合成ペプチドと、(3)該蛋白質断片上のネオエピトープを認識し(該合成ペプチドと反応し)、西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートしたモノクローナル抗体とを含むキットでよい。

10

【0163】

従って、本発明は、本明細書で述べられる免疫学的結合パートナー並びに該免疫学的結合パートナーに結合する競合物質、並びに、任意に、1つ以上の洗浄試薬、緩衝液、停止試薬、酵素標識、標識酵素のための基質、校正基準、抗マウス抗体及び該イムノアッセイを行うための使用説明書を含むイムノアッセイキットを含む。

【0164】

本明細書で述べられるアッセイは患者におけるアテローム性動脈硬化症の診断に有用である。加えて、検査は疾患の進行の評価及び治療に対する応答のモニタリングに有用である。本発明の免疫学的結合パートナーは、本明細書で述べられる動脈硬化性プラーク蛋白質の切断産物の存在又は位置を示すために免疫染色でも用いられ得る。

20

【0165】

本発明は、添付図面を参照して更に説明され、例示される。

【図面の簡単な説明】

【0166】

【図1】III型病変を含む大動脈試料に対してモノクローナルマウス抗体を用いたバイグリカン染色(それぞれ2, 4, 4及び10倍)を示す図である。

【図2】III型病変を含む大動脈試料に対してモノクローナルマウス抗体を用いたカテプシンK染色(それぞれ2, 4, 10及び10倍)を示す図である。

【図3】V型病変を含む大動脈試料に対してモノクローナルマウス抗体を用いたバイグリカン染色(それぞれ2, 4, 10及び10倍)を示す図である。

30

【図4】V型病変を含む大動脈試料に対してモノクローナルマウス抗体を用いたカテプシンK染色(それぞれ2, 4, 10及び10倍)を示す図である。

【図5】プロテアーゼ：MMP2、MMP3、MMP8、カテプシンK、カテプシンS、カテプシンB及びカテプシンLによって生じるバイグリカンの切断産物を示す図である。M = 着色マーカー(Rainbow marker)、-enz = 酵素消化なし、実施例2においてゲル上で泳動。

【図6】実施例4において得られた競合試験結果を示す図である。

【図7】実施例4において得られた競合試験結果を示す図である。

【図8】実施例4において得られた競合試験結果を示す図である。

【図9】実施例6において得られた競合試験結果を示す図である。

40

【図10】実施例7において得られた競合試験結果を示す図である。

【図11】実施例7において得られた競合試験結果を示す図である。

【実施例1】

【0167】

プロテオグリカン及びプロテアーゼの局在の分析のため、左冠動脈下行枝(LAD)由来のヒト動脈試料の免疫組織化学染色を行った。以下、カテプシンKプロテアーゼ及びバイグリカンの共局在が示される。

【0168】

図1及び2に見られる免疫組織化学染色はバイグリカン及びカテプシンKの共局在を明らかにした。これは、バイグリカンがカテプシンKの好ましい基質であることを示唆し得

50

る。動脈硬化性プラークが形成された大動脈試料に対して同じ免疫組織化学染色を行い、この結果として正常な大動脈構造はマクロファージ泡沫細胞浸潤及び石灰化に置き換えられた。これらの免疫染色を図3及び4にまとめる。

【0169】

バイグリカン及びカテプシンKの免疫組織化学染色は進行性アテローム性動脈硬化病変に共同在することが示された。これらの結果はともにバイグリカンにおける特異的なカテプシンK切断部位の仮説を生じさせ、アテローム性動脈硬化病変におけるネオエピトープ生成の増加をもたらす。この仮説を試験するため、本発明者らはバイグリカン異なるプロテアーゼで切断した。

【実施例2】

10

【0170】

分解断片の評価のためのバイグリカンの分解。ウシ関節軟骨由来のバイグリカン(B8041-Sigma-Aldrich社)をプロテアーゼ(MMP2、MMP3、MMP8、カテプシンK、カテプシンS、カテプシンB及びカテプシンL)によって切断した。上述のプロテアーゼの酵素切断によって生じたプロテオグリカンの断片を10%のNuPage(登録商標)Bis-Trisゲル上に分離し、その後、「Silver Express」-銀染色キット(Invitrogen社カタログ番号LC6100、ロット番号341099)によって銀染色した。蛋白質分解で得られたバイグリカンの分離及び銀染色の結果を図5に示す。

【実施例3】

20

【0171】

オボアルブミンにコンジュゲートしたIII型コラーゲン由来ペプチドでマウスを免疫化した。ビオチンにコンジュゲートしたスクリーニングペプチド配列との反応性について血清をスクリーニングした。モノクローナル抗体分泌クローンを作製し、スクリーニング配列を用いてスクリーニングした。III型コラーゲン由来の隣接配列で連続する標的ペプチドの伸長バージョン(除外ペプチド)との反応性の欠如及びナンセンスペプチドとの反応性の欠如についてクローンを調べた。

【0172】

標的配列、免疫原、スクリーニング配列及び除外配列は以下の通りであった。

【0173】

30

【表 2 5】

No:	標的配列	免疫原	スクリーニング配列	除外配列	マウス No.
NB51	KNGETG 356	KNGETGPQGPGGC-OVA	KNGETGPQGP-P G-K-ビオチン	KDGETGAAGPPGK- ビオチン KDGEAGAQQPPGK- ビオチン PGKNGETPGPQ-GP -K-ビオチン	278; 279; 289; 345; 346; 347
NB26	IAGITG 429	IAGITGARGLGGC-K LH	IAGITGARGL-AG- K-ビオチン IAGLTGARGL-AG- K-ビオチン)	LGIAGITGARGL-AG- K-ビオチン	146; 147; 148; 149; 156; 157;
NB52	IAGITG	IAGITGARGLGGC-O VA	IAGITGARGL-AG- K-ビオチン IAGLTGARGL-AG- K-ビオチン	LGIAGITGARGL-AG- K-ビオチン	348; 349; 357; 358; 359;
NB27	KDGTSG 763	KDGTSGHPGPGGC- OVA	KDGTSGHPGP-IG -K-ビオチン KDGSSGHPGP-IG -K-ビオチン	PGKDGTSGHP-GP- K-ビオチン	158; 159; 167; 168; 169; 178;
NB67	APGPLG 581	OVA-CGG-GPPGAP GPLG	ビオチン -AQ-GPPGAPGPL G ビオチン -AQ-GPPGSPGPL G	ビオチン -DD-GPSGAEGPPG ビオチン -GP-PGAPGPLGIA	167; 168; 169; 178; 179; 189;
NB68	NTGAPG 422	NTGAPGSPGV-CGG -OVA	NTGAPGSPGVSG -K-ビオチン NSGSPGNPGVAG -K-ビオチン	AGNTGAPGSP-GV- ビオチン	234; 235; 236; 237; 238; 239;
NB69	AIGPSG 380	AIGPSGPAGK-GGC- OVA (808680)	AIGPSGPAGKDG- K-ビオチン AIGPAGPAGKDG- K-ビオチン	PGAIGPSGPAG-KD -ビオチン	245; 246; 247; 248; 249; 256;
NB57	AGGFAP 781	KLH-CGG-EKAGGF A P	ビオチン -CG-EKAGGFAP ビオチン -CG-EKSGGFSP	ビオチン -GG-EKAGGFAPYY	1; 2; 3; 4; 5; 6;

【実施例 4】

【0174】

< I I I 型コラーゲンネオエピトープモノクローナル抗体のヒト尿との反応性 >

免疫ペプチドを競合物質として用いて競合アッセイ形式にて実施例 3 からの選択モノクローナル抗体クローンのヒト尿との反応性を判定した。典型的な手順では、96 ウェルストレプトアビジン被覆プレートを振盪しながら 20 で PBS - BTE 中 10 ng / mL ビオチンペプチドで 30 分間コートし、5 倍洗浄緩衝液で洗浄した。20 μl の希釈試料（尿又はペプチド溶液）を加えた。下記に詳述する 100 μL の未精製抗体溶液（細胞培養液由来の上清）を加えた。プレートを 300 rpm で振盪しながら 20 で 1 時間インキュベートし、次に、5 倍洗浄緩衝液で洗浄した。100 μL の二次抗体 - POD (1 : 5000) を加え、300 rpm で振盪しながら 20 で 1 時間インキュベートし、その後、5 倍洗浄緩衝液で洗浄した。100 μL の TMB を加え、300 rpm で振盪しながら暗室で 15 分間インキュベートし、その後、停止液 100 μL を加えた。ELISA リーダー上で 650 nm を対照として 450 nm にてプレートを読み取った。従って、抗体に対するプレート上のペプチドと溶液中のペプチドとの間の競合が生じ、ペルオキシダーゼ発色反応によりプレート結合抗体を定量した。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 5 】

図 6 に 4 つの異なるクローンの結果が認められる。抗体が各々尿中の関連する配列を検出することがわかる。

【 0 1 7 6 】

免疫ペプチドと MMP 9 によって *in vitro* にて切断された天然 III 型コラーゲンとの間の抗体結合の競合を試験するため、1 つの選択クローンに対して更なる競合試験を行った。切断コラーゲン、ペプチド K N G E T G 及びその配列の伸長バージョンの結果を図 7 に示す。抗体が免疫ペプチド配列及び酵素切断コラーゲンに結合するが、伸長配列には結合しないことがわかる。

【 0 1 7 7 】

図 8 に同じクローンに関する更なる競合試験が認められ、この場合、競合物質はそれぞれ、ペプチド K N G E T G、ヒト血清、ラット血清、F C S (ウシ胎仔血清) 及び動脈硬化性プラーク抽出物であった。抗体がペプチド、プラーク抽出物及びヒト血清と反応するが、ラット血清又は F C S とは反応しないことがわかる。

【 実施例 5 】

【 0 1 7 8 】

< デコリン、パイグリカン及びパーシカン配列に対する抗血清の産生 >

抗血清を産生させ、実施例 3 のようにモノクローナル抗体を得たが、以下の免疫原、スクリーニング配列及び除外配列を用いた。

【 0 1 7 9 】

【 表 2 6 】

No:	エпитープ	標的配列	免疫原	スクリーニング配列	除外配列	マウス No.
NB62	Decorin-176N	IVIELG 91	IVIELGTNPL-GGC-KLH	IVIELGTNPL-KS-K- -ビオチン LVIELGGNPL-KN- K-ビオチン IVVELGGNPL-TN- K-Biotin	QMIVIELGTNPLK-K- -ビオチン NVLVIELGGNPL-K- -ビオチン	7;8;9; 10;12; 13
NB63	Biglycan-108 C	NNDISE 116	OVA-CGG-LDLQNNDIS E	ビオチン -TL-LDLQNNDISE	ビオチン -LDLQNNDISELR	14;15; 16;17; 18;19
NB64	Versican-87N	QNGNIK 143	QNGNIKIGQD-GGC-KLH	QNGNIKIGQD-YK- -ビオチン QDGNIKIGQD-YK- -ビオチン	VAQNGNIKIGQD-K- -ビオチン VAQDGNIKIGQD-K- -ビオチン	23;24 25;26; 27;28;

【 実施例 6 】

【 0 1 8 0 】

< デコリンネオエピトープモノクローナル抗体のヒト尿との反応性 >

1 つの抗デコリン未精製モノクローナル抗体 (N B 6 2) を用いて概して実施例 5 のように競合 E L I S A を行った。

【 0 1 8 1 】

図 9 に結果を示す。これに対して抗体が産生され、選択されたペプチド配列及び尿に対する反応が認められるが、無関連ペプチド配列に対する反応は認められない。

【 実施例 7 】

【 0 1 8 2 】

< パーシカンネオエピトープモノクローナル抗体のヒト尿との反応性 >

配列に対する 2 つの抗パーシカン未精製モノクローナル抗体 (N B 6 4) を用いて概して実施例 5 のように競合 E L I S A を行った。

【 0 1 8 3 】

それぞれのクローンの結果を図 1 0 及び 1 1 に示す。それぞれの場合、これに対して抗

10

20

30

40

50

体が産生され、選択されたペプチド配列及び尿に対する反応が認められるが、無関連ペプチド配列 N B 1 8 に対する反応は認められない。

【 0 1 8 4 】

本明細書では、特に明示されない限り、条件の 1 つのみが満たされることを要求する演算子「排他的 or」と対照的に、「又は」という語は言及条件の一方又は両方が満たされる場合に真値を返す演算子の意味で用いられる。「含む (c o m p r i s i n g) 」という語は「～から成る」を意味するというよりも「含む (i n c l u d i n g) 」という意味で用いられる。上記に認められた従来の教示はすべて参照して本明細書に組み込まれる。

【 0 1 8 5 】

[参考文献リスト]

【表 2 7 A】

Reference List

Bobryshev YV. Calcification of elastic fibers in human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 2005;180:293-303.

Brown, D. C. and K. G. Vogel. "Characteristics of the in vitro interaction of a small proteoglycan (PG II) of bovine tendon with type I collagen." *Matrix*. 9.6 (1989): 468-78.

10

Cattin L, Fisicaro M, Tonizzo M, Valenti M, Danek GM, Fonda M, Da Col PG, Casagrande S, Pincetri E, Bovenzi M, and Baralle F. Polymorphism of the apolipoprotein E gene and early carotid atherosclerosis defined by ultrasonography in asymptomatic adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Jan;17(1):91-4.

Chapman HA, Riese RJ, Shi GP. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu.Rev.Physiol* 1997;59:63-88.

20

Clarkson TB, Kaplan JR. Stage of Reproductive Life, Atherosclerosis Progression and Estrogen Effects on Coronary Artery Atherosclerosis, In: Lobo RA, editor. *Treatment of the Postmenopausal Woman: Basic and Clinical Aspects*, 3 ed. San Diego: Elsevier; 2007. p. 509-28.

Danielson, K. G., et al. "Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility." *J.Cell Biol*. 136.3 (1997): 729-43.

30

Dours-Zimmermann, M. T. and D. R. Zimmermann. "A novel glycosaminoglycan attachment domain identified in two alternative splice variants of human versican." *J.Biol.Chem*. 269.52 (1994): 32992-98.

Eriksen HA, Satta J, Risteli J, Veijola M, Vare P, Soini Y. Type I and type III collagen synthesis and composition in the valve matrix in aortic valve stenosis. *Atherosclerosis* 2006;189:91-98.

40

【表 2 7 B】

Evanko, S. P., et al. "Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta." *Am.J.Pathol.* 152.2 (1998): 533-46.

Funderburgh, J. L. "Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function." *Glycobiology* 10.10 (2000): 951-58.

Funderburgh, J. L., et al. "Macrophage receptors for lumican. A corneal keratan sulfate proteoglycan." *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 38.6 (1997): 1159-67.

10

Gabay C and Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999 Feb 11;340(6):448-54.

Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *JAMA* 1996;276:875-81.

20

Garrone R, Lethias C, Le Guellec D. Distribution of minor collagens during skin development. *Microsc.Res Tech.* 1997;38:407-12.

Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary. *Atherosclerosis* 2007;194:1-45.

Haraki T, Takegoshi T, Kitoh C, Wakasugi T, Saga T, Hirai JI, Aoyama T, Inazu A and Mabuchi H, Carotid artery intima-media thickness and brachial artery flow-mediated vasodilation in asymptomatic Japanese male subjects amongst apolipoprotein E phenotypes. *J Intern Med.* 2002 Aug;252(2):114-20.

30

Hatanaka K, Li XA, Masuda K, Yutani C and Yamamoto A, Immunohistochemical localization of C-reactive protein-binding sites in human atherosclerotic aortic lesions by a modified streptavidin-biotin-staining method. *Pathol Int.* 1995 Sep;45(9):635-41.

40

Heegaard AM, Corsi A, Danielsen CC, Nielsen KL, Jorgensen HL, Riminucci M, Young MF and Bianco P, Biglycan deficiency causes spontaneous aortic

【表 2 7 C】

- dissection and rupture in mice. *Circulation*. 2007 May 29;115(21):2731-8.
Epub 2007 May 14.
- Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB et al. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation* 2001;104:1899-904. 10
- Jeppesen J, Hein HO, Suadicani P, Gyntelberg F. High triglycerides/low high-density lipoprotein cholesterol, ischemic electrocardiogram changes, and risk of ischemic heart disease. *Am Heart J* 2003;145:103-08.
- Lawrie TD, Mcalpine SG, Rifkind BM, Robinson JF. Serum fatty-acid patterns in coronary-artery disease. *Lancet* 1961;1:421-24.
- Katsuda S, Okada Y, Minamoto T, Oda Y, Matsui Y, Nakanishi I. Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arterioscler.Thromb.* 1992;12:494-502. 20
- Knox, S. M. and J. M. Whitelock. "Perlecan: how does one molecule do so many things?" *Cell Mol.Life Sci.* 63.21 (2006): 2435-45.
- Kuller LH, Tracy RP, Shaten J and Meilahn EN, Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol.* 1996 Sep 15;144(6):537-47.
- Kunz J. Matrix metalloproteinases and atherogenesis in dependence of age. *Gerontology.* 2007;53:63-73. 30
- Kuzuya M, Nakamura K, Sasaki T, Cheng XW, Itohara S, Iguchi A. Effect of MMP-2 deficiency on atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2006;26:1120-25.
- Leinonen M and Saikku P, Evidence for infectious agents in cardiovascular disease and atherosclerosis. *Lancet Infect Dis.* 2002 Jan;2(1):11-7.
- Liu J, Sukhova GK, Sun JS, Xu WH, Libby P, Shi GP. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2004;24:1359-66. 40

【表 2 7 D】

Lutgens, S. P., et al. "Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease." *FASEB J.* 21.12 (2007): 3029-41.

Mayne R. Collagenous proteins of blood vessels. *Arteriosclerosis.* 1986;6:585-93.

McCullagh KG, Duance VC, Bishop KA. The distribution of collagen types I, III and V (AB) in normal and atherosclerotic human aorta. *J Pathol* 1980;130:45-55.

10

Mendall MA, Patel P, Ballam L, Strachan D and Northfield TC. C reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors: a population based cross sectional study., *BMJ.* 1996 Apr 27;312(7038):1061-5.

Monfort J, Nacher M, Montell E, Vila J, Verges J and Benito P, Chondroitin sulfate and hyaluronic acid (500-730 kda) inhibit stromelysin-1 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes. *Drugs Exp Clin Res.* 2005;31(2):71-6.

20

Pasceri V, Willerson JT and Yeh ET, Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation.* 2000 Oct 31;102(18):2165-8.

Register TC, Cann JA, Kaplan JR, Williams JK, Adams MR, Morgan TM *et al.* Effects of soy isoflavones and conjugated equine estrogens on inflammatory markers in atherosclerotic, ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1734-40.

30

Reynolds GD and Vance RP. C-reactive protein immunohistochemical localization in normal and atherosclerotic human aortas. *Arch Pathol Lab Med.* 1987 Mar;111(3):265-9.

Ridker PM, Intrinsic fibrinolytic capacity and systemic inflammation: novel risk factors for arterial thrombotic disease. *Haemostasis.* 1997;27 Suppl 1:2-11.

Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE and Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000 Mar 23;342(12):836-43.

40

【表 2 7 E】

Rodriguez-Lee M, Bondjers G and Camejo G, Fatty acid-induced atherogenic changes in extracellular matrix proteoglycans. *Curr Opin Lipidol.* 2007 Oct;18(5):546-53

Rouis M. Matrix metalloproteinases: a potential therapeutic target in atherosclerosis. *Curr Drug Targets. Cardiovasc Haematol Disord.* 2005;5:541-48.

10

Rudel LL, Haines J, Sawyer JK, Shah R, Wilson MS, Carr TP. Hepatic origin of cholesteryl oleate in coronary artery atherosclerosis in African green monkeys. Enrichment by dietary monounsaturated fat. *J Clin Invest* 1997;100:74-83.

Salisbury BG and Wagner, WDJ *Biol Chem.* 1981 Aug 10;256(15):8050-7, 'Isolation and preliminary characterization of proteoglycans dissociatively extracted from human aorta'.

Satta J, Juvonen T, Haukipuro K, Juvonen M, Kairaluoma MI. Increased turnover of collagen in abdominal aortic aneurysms, demonstrated by measuring the concentration of the aminoterminal propeptide of type III procollagen in peripheral and aortal blood samples. *J Vasc. Surg.* 1995;22:155-60.

20

Schaar JA, Mastik F, Regar E, den Uil CA, Gijssen FJ, Wentzel JJ *et al.* Current diagnostic modalities for vulnerable plaque detection. *Curr Pharm Des.* 2007;13:995-1001.

Siest G, Pillot T, Regis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J, Galteau MM and Visvikis S, Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem.* 1995 Aug;41(8 Pt 1):1068-86.

30

Shin, J., J. E. Edelberg, and M. K. Hong. "Vulnerable atherosclerotic plaque: clinical implications." *Curr. Vasc. Pharmacol.* 1.2 (2003): 183-204.

Shekhonin BV, Domogatsky SP, Muzykantov VR, Idelson GL, Rukosuev VS. Distribution of type I, III, IV and V collagen in normal and atherosclerotic human arterial wall: immunomorphological characteristics. *Coll. Relat Res* 1985;5:355-68.

40

【表 2 7 F】

Stary HC. Composition and classification of human atherosclerotic lesions.
Virchows Arch A.Pathol Anat.Histopathol. 1992;421:277-90.

Sundstrom J, Vasan RS. Circulating biomarkers of extracellular matrix remodeling and risk of atherosclerotic events. Curr Opin Lipidol. 2006;17:45-53.

Talusan, P., et al. "Analysis of intimal proteoglycans in atherosclerosis-prone and atherosclerosis-resistant human arteries by mass spectrometry." Mol.Cell Proteomics. 4.9 (2005): 1350-57.

10

Thompson D, Banks RE, Forbes MA, Storr M, Higginson J, Raynes J, Illingworth JM, Perren TJ, Selby PJ and Whicher JT, The acute phase protein response in patients receiving subcutaneous IL-6. Clin Exp Immunol. 1995 Oct;102(1):217-23.

Terry JG, Howard G, Mercuri M, Bond MG and Crouse JR 3rd. Apolipoprotein E polymorphism is associated with segment-specific extracranial carotid artery intima-media thickening., Stroke. 1996 Oct;27(10):1755-9.

20

Tracy RP, Lemaitre RN, Psaty BM, Ives DG, Evans RW, Cushman M, Meilahn EN and Kuller LH, Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly. Results from the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997 Jun;17(6):1121-7.

Turu MM, Krupinski J, Catena E, Rosell A, Montaner J, Rubio F et al. Intraplaque MMP-8 levels are increased in asymptomatic patients with carotid plaque progression on ultrasound. Atherosclerosis 2006;187:161-69.

30

Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P and Jialal I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells., Circulation. 2002 Sep 17;106(12):1439-41.

Wang TJ, Gona P, Larson MG, Tofler GH, Levy D, Newton-Cheh C et al. Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. N Engl J Med 2006;355:2631-39.

40

【表 2 7 G】

Whitelock, J. M. and R. V. Iozzo. "Heparan sulfate: a complex polymer charged with biological activity." *Chem.Rev.* 105.7 (2005): 2745-64.

Wight, T. N. "The extracellular matrix and atherosclerosis." *Curr.Opin.Lipidol.* 6.5 (1995): 326-34.

Wight, T. N., et al. "Vascular cell proteoglycans: evidence for metabolic modulation." *Ciba Found.Symp.* 124 (1986): 241-59.

10

Wight TN, Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology.*Curr Opin Cell Biol.* 2002 Oct;14(5):617-23.

Wight TN and Merrilees MJ, Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ Res.* 2004 May 14;94(9):1158-67.

Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG and Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 Oct;16(10):1250-5.

20

Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H et al. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 2002;347:1916-23.

Zwaka TP, Hombach V and Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis., *Circulation.* 2001 Mar 6;103(9):1194-7.

30

【図 1】

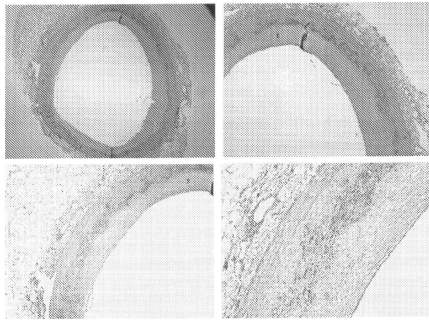


Figure 1

【図 2】

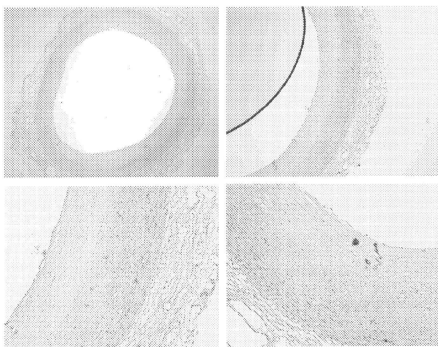


Figure 2

【図 3】

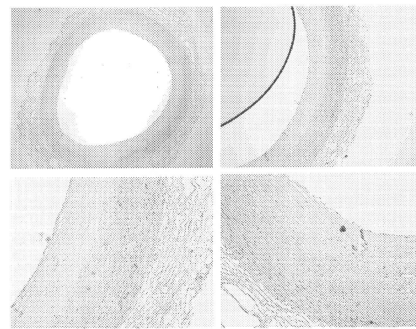


Figure 3

【図 4】

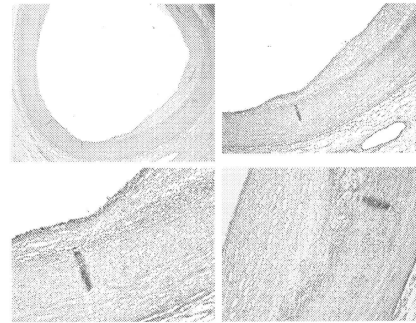


Figure 4

【図 5】

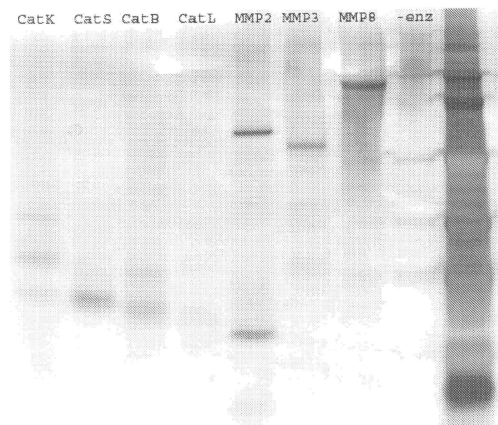


Figure 5

【図 6】

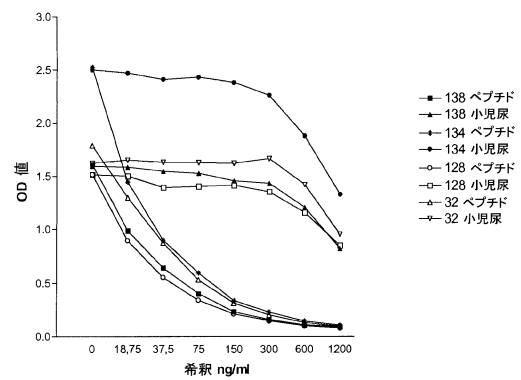


Figure 6

【図 7】

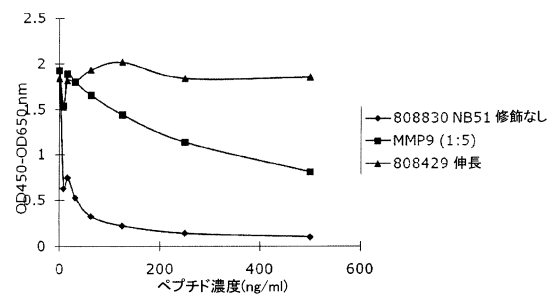


Figure 7

【図 8】

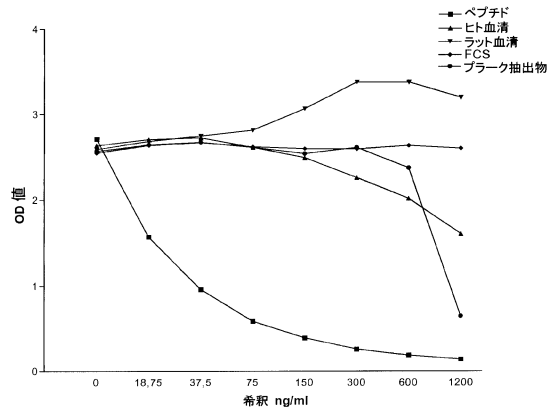


Figure 8

【図 10】

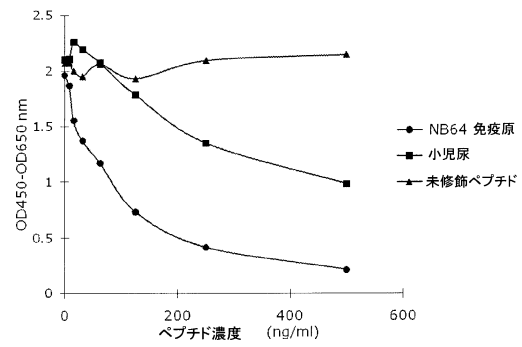


Fig 10

【図 9】

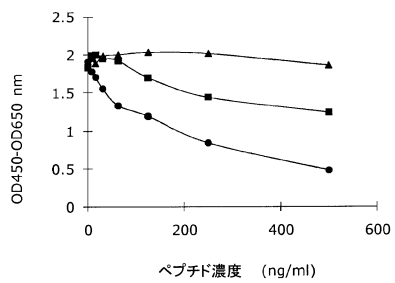


Figure 9

【図 11】

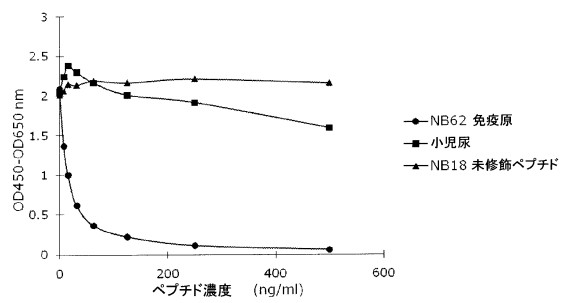


Fig 11

【配列表】

0006309669000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/10
C 0 7 K 14/47 (2006.01)		C 0 7 K 14/47
C 0 7 K 14/78 (2006.01)		C 0 7 K 14/78
C 0 7 K 14/775 (2006.01)		C 0 7 K 14/775
C 0 7 K 16/18 (2006.01)		C 0 7 K 16/18
C 0 7 K 17/00 (2006.01)		C 0 7 K 17/00
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P 21/08

(31)優先権主張番号 0802814.4

(32)優先日 平成20年2月15日(2008.2.15)

(33)優先権主張国 英国(GB)

(74)代理人 100180231

弁理士 水島 亜希子

(72)発明者 カルスダル, モルテン

デンマーク国, 2 1 0 0 コペンハーゲン オー, ホルスタインスガーデ 2 1 , 3 . t h

(72)発明者 クヴィスト, ペール

デンマーク国, 2 9 3 0 クランペンボー, タールベク・ストランヴァイ 1 0 3 G

(72)発明者 バラスクク, ナターシャ

デンマーク国, 2 1 0 0 コペンハーゲン オー, ヘルニンガーデ 2 1 , 3 . t v

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 特表2003-502672(JP, A)

特表平9-509736(JP, A)

特開2000-55915(JP, A)

特開2001-264329(JP, A)

国際公開第99/061477(WO, A2)

MOLLOY KJ et al., CIRCULATION, 2004年, 110, 337-343

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

C 0 7 K 1 4 / 4 7 - 1 4 / 7 8

C 1 2 N 1 / 1 5 - 1 / 2 1

专利名称(译)	CVD风险评估的生化标志物		
公开(公告)号	JP6309669B2	公开(公告)日	2018-04-11
申请号	JP2017081328	申请日	2017-04-17
申请(专利权)人(译)	北欧生物科学ER / ES		
当前申请(专利权)人(译)	北欧生物科学ER / ES		
[标]发明人	カルスダルモルテン クヴィストペール バラスクナターシャ		
发明人	カルスダル,モルテン クヴィスト,ペール バラスク,ナターシャ		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/47 C07K14/78 C07K14/775 C07K16/18 C07K17/00 C12P21/08		
CPC分类号	G01N33/6878 C07K14/77 C07K14/775 C07K14/78 C12Q1/37 G01N33/542 G01N33/577 G01N33/6893 G01N2800/32 G01N2800/50 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/47 C07K14/78 C07K14/775 C07K16/18 C07K17/00 C12P21/08 G01N33/53.DZN.A		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/BA20 4H045/BA60 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2007021713 2007-11-05 GB 2007022748 2007-11-20 GB 2008002814 2008-02-15 GB		
其他公开文献	JP2017181509A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种用于定量包含通过蛋白酶切割动脉粥样硬化斑块的蛋白质而形成的新表位的肽片段的生物测定法，其中所述蛋白质是核心蛋白聚糖，并且所述方法包括使样品例如尿液或血清与抗体反应与新表位结合，并测定所述免疫结合配偶体与所述样品中肽片段的结合水平。该测定可预测心血管疾病事件的风险。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6309669号 (P6309669)
(45) 発行日 平成30年4月11日 (2018. 4. 11)	(24) 登録日 平成30年3月23日 (2018. 3. 23)	
(51) Int. Cl. F I GO 1 N 33/53 (2006. 01) GO 1 N 33/53 Z N A D C 1 2 N 15/09 (2006. 01) C 1 2 N 15/00 A C 1 2 N 1/15 (2006. 01) C 1 2 N 1/15 C 1 2 N 1/19 (2006. 01) C 1 2 N 1/19 C 1 2 N 1/21 (2006. 01) C 1 2 N 1/21		
請求項の数 12 (全 55 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2017-81328 (P2017-81328)	(73) 特許権者 503259129	
(22) 出願日 平成29年4月17日 (2017. 4. 17)	ノルディック・バイオサイエンス・エー／エス	
(62) 分割の表示 特願2014-165737 (P2014-165737) の分割	NORDIC BIOSCIENCE A / S	
原出願日 平成20年11月4日 (2008. 11. 4)	デンマーク国、ゲーカーー 2 7 3 0 ヘル	
(65) 公開番号 特願2017-181509 (P2017-181509A)	レフ、ヘルレフ・ホーフエデガーダ 2 0 7	
(43) 公開日 平成29年10月5日 (2017. 10. 5)	(74) 代理人 10009623	
審査請求日 平成29年5月15日 (2017. 5. 15)	弁理士 奥山 尚一	
(31) 優先権主張番号 0721713. 6	(74) 代理人 100096769	
(32) 優先日 平成19年11月5日 (2007. 11. 5)	弁理士 有原 幸一	
(33) 優先権主張国 英国 (GB)	(74) 代理人 100107319	
(31) 優先権主張番号 0722748. 1	弁理士 松島 鉄男	
(32) 優先日 平成19年11月20日 (2007. 11. 20)		
(33) 優先権主張国 英国 (GB)		
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 CVDリスク評価のための生化学マーカー		