

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-41998

(P2010-41998A)

(43) 公開日 平成22年2月25日(2010.2.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	4 B O 6 3
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	4 C O 8 4
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	
審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 71 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-173539 (P2009-173539)	(71) 出願人	504412945
(22) 出願日	平成21年7月24日 (2009.7.24)		ザ ブライハム アンド ウイメンズ ホ
(62) 分割の表示	特願2004-502944 (P2004-502944)		スピタル, インコーポレイテッド
原出願日	平成15年5月9日 (2003.5.9)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(31) 優先権主張番号	60/379, 173		1 1 5 ボストン, フランシス ストリ
(32) 優先日	平成14年5月9日 (2002.5.9)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心血管疾患マーカーおよび治療標的としての I L 1 R L - 1

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 心血管症状の診断および処置のための方法および組成物を提供する。

【解決手段】 核酸分子の異常発現またはその発現産物によって特徴づけられる心血管症状を診断する方法であって、該方法は、以下： a) 該核酸分子、その発現産物、またはその発現産物のフラグメントに特異的に結合する薬剤を、被験体から得た生体試料と接触させる工程；および b) 結合した薬剤の量を測定し、そして該測定から該核酸分子の発現またはその発現産物の発現が異常であるか否かを決定して、異常発現が該症状を診断される工程、を包含し、ここで、該核酸分子が、特定の配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの核酸分子である、方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

明細書中に記載の診断方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、心血管症状の診断および処置のための方法および組成物に関する。より具体的には、本発明は、心肥大、心筋梗塞、卒中、動脈硬化、および心不全を含む心血管症状の処置に用いることができる単離された分子に関する。

10

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

心血管疾患は、治療法の著しい進歩にかかわらず、相変わらず先進国での罹患率および死亡率の唯一最も一般的な病因のままである。したがって、心筋梗塞および卒中等の心血管症状の予防および治療は、公衆衛生上の大きな問題の一領域である。現在、将来の心血管疾患にかかわる危険因子（リスクファクタ）がいくつか記載されており、ハイリスクの被験体の検出に幅広く臨床的に使われている。このようなスクリーニングテストとしては、全コレステロール値およびHDLコレステロール値の評価が挙げられる。しかし、リスクプロファイルが明らかに低程度から中程度である被験体で、数多くの心血管疾患が生じており、そのような患者を識別する能力には限界がある。さらに、蓄積されているデータによれば、異なる患者群間では、心血管疾患の危険性がある患者または心血管疾患を有すると知られている患者に対する一定の予防および治療上の処置の有益な効果の大きさが異なることが示唆される。しかし、この時点では、一定の治療が多かれ少なかれ有効であるか否かを判断する診断テストについて記述したデータが欠けている。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

(発明の要旨)

本発明は、心血管症状の診断および処置のための方法および組成物を提供する。より具体的には、心臓細胞が機械的に誘発された歪みを受けた場合にその細胞内で上方制御される遺伝子を同定した。これらの発見を鑑みて、心肥大、心筋梗塞、卒中、動脈硬化、および心不全等の心血管（血管含む）症状を処置するために本発明の分子が使用され得ると考えられる。

30

【0004】

また、これらの分子を上記の心血管（血管含む）症状のいずれかの診断に用いるための方法も提供する。

【0005】

さらに、上記症状を治療するための治療剤の調製に有用な組成物も提供する。

【0006】

40

したがって、いくつかの局面では、本発明はポリペプチド、該ポリペプチドをコードする単離された核酸、前述の機能的改変および改変体、前述の有用なフラグメントならびにそれらに関連した治療学および診断学を含む。

【0007】

本発明の一局面によれば、核酸分子の異常発現またはその発現産物（もしくはそれらの前述分子の固有のフラグメントのもの）によって特徴づけられる症状の診断方法が提供される。この方法は、上記核酸分子、その発現産物、またはその発現産物のフラグメントと特異的に結合する薬剤を、被験体から得た生物学的サンプルと接触させ、結合した薬剤の量を測定し、上記核酸分子の発現またはその発現産物の発現が異常であるか否かを決定し、異常発現を障害の診断に用い、ここで、上記核酸分子はインターロイキン1レセプター

50

様1 (Interleukin 1 Receptor-Like 1) (IL1RL-1、T1/ST2、ST2、およびFit-1としても知られており、配列番号1および2が可溶型、配列番号3および4が膜型である)である。以下、明細書全体にわたってこれらの用語IL1RL-1、T1/ST2、ST2、およびFit-1は、相互変換可能に使用される)。いくつかの実施形態では、上記疾患は、心筋梗塞、卒中、動脈硬化、および心不全からなる群から選択される心血管症状である。一実施形態では、上記疾患は心臓肥大である。別の実施形態では、上記疾患は心不全である。いくつかの実施形態では、生物学的サンプルとしては、生検サンプルおよび体液(例:血液/血清)が挙げられる。

【0008】

本発明のさらに別の局面に従って、核酸分子の異常発現またはその発現産物(もしくはその前述分子の固有のフラグメントのもの)によって特徴づけられる被験体での心血管症状の病期(stage)(例えば、回帰、進行、または発症)を決定する方法が提供される。本発明の方法は、患者から得た試料を、(i) IL1RL-1核酸分子(またはその固有のフラグメント)、(ii) IL1RL-1核酸によってコードされるポリペプチド、(iii) ポリペプチド由来ペプチド(またはその固有のフラグメントのもの)、および(iv) ポリペプチドまたはペプチド(もしくはその固有のフラグメント)に選択的に結合する抗体からなる群から選択されるパラメータについて、被験体での心血管症状の病期(例えば、回帰、進行、または発症)の決定として、モニタリングすることを含む。いくつかの実施形態では、上記試料は、前述の実施形態のいずれかに記載の体液または組織である。いくつかの実施形態では、モニタリングの工程は、上記試料を検出可能な薬剤と接触させる工程を含み、該薬剤は(a) ストリンジェントな条件下で(i)の核酸分子に選択的にハイブリダイズする単離核酸分子ハイブリダイズする単離された核酸分子と、(b) (ii)のポリペプチドまたは(iii)のペプチドに選択的に結合する抗体と、(c) (iv)の抗体に選択的に結合するポリペプチドまたはペプチドとからなる群から選択される。上記抗体、ポリペプチド、ペプチド、または核酸は放射性標識または酵素等の検出可能な標識によりラベルすることができる。さらなる実施形態では、上記方法はペプチドについて試料をモニタリング(アッセイ)することを含む。なおさらなる実施形態では、試料のモニタリングが長時間にわたって起こる。

【0009】

本発明の別の局面に従って、キットが提供される。このキットは、上記IL1RL-1単離核酸または該核酸の発現産物のいずれかと選択的に結合する薬剤を含むパッケージと、上記単離核酸または該核酸の発現産物のいずれかを上記薬剤の結合の測定値と比較するためのコントロールとを含む。ある実施形態では、上記コントロールは、測定値と比較するための所定の値である。いくつかの実施形態では、上記コントロールは上記単離核酸のいずれかの発現産物のエピトープを含む。

【0010】

本発明の一局面に従って、心血管症状を処置する方法が提供される。上記方法は、上記心血管症状の治療に有効な量で、そのような処置を必要とする被験体に対してIL1RL-1分子を投与することを含む。いくつかの実施形態では、上記心血管症状は、心筋梗塞、卒中、動脈硬化、および心不全からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、上記方法は、抗炎症薬剤、抗血栓症薬剤、抗血小板薬剤、線維素溶解薬剤、脂質還元薬剤、直接トロンビンインヒビター、糖蛋白IIb/IIIaレセプターインヒビター、細胞接着分子に結合して白血球がそのような分子に結合する能力を阻害する薬剤、カルシウムチャンネルブロッカー、 β アドレナリン作動性レセプターブロッカー、シクロオキシゲナーゼ2インヒビター、またはアンギオテンシン系インヒビターからなる群から選択される薬剤を共投与する工程をさらに含む。

【0011】

本発明の別の局面に従うと、心臓肥大を処置するための方法が提供される。この方法は、そのような処置を必要とする被験体に対して、上記被験体の心臓肥大を処置するのに有効な量で、IL1RL-1核酸分子またはその発現産物の発現を増加させる薬剤を投与す

10

20

30

40

50

ることを含む。

【0012】

本発明のさらなる局面に従うと、被験体での心血管症状発症の危険性を減少させるために該被験体を処置する方法が提供される。本方法は、IL1RL-1分子が異常値である被験体に対して、被験体が将来に心血管疾患を発症する危険性を減少させるのに有効な量で心血管疾患の危険性を減少させるための薬剤を投与する工程を含み、該薬剤は、抗炎症薬剤、抗血栓症薬剤、抗血小板薬剤、線維素溶解薬剤、脂質還元薬剤、直接トロンビンインヒビター、糖蛋白IIb/IIIaレセプターインヒビター、細胞接着分子に結合して白血球がそのような分子に結合する能力を阻害する薬剤、カルシウムチャンネルブロッカー、 β アドレナリン作動性レセプターブロッカー、シクロオキシゲナーゼ2インヒビター、またはアンギオテンシン系インヒビターである。特定の実施形態では、被験体は、さなければ、薬剤による処置を必要としている症状がない。

10

【0013】

本発明の一局面に従うと、心血管症状の処置に有用な候補薬剤を同定するための方法が提供される。この方法は、候補薬剤の不在下でIL1RL-1分子の第1の発現量を可能とする条件下で、心臓細胞または組織のIL1RL-1分子の発現を決定し、該心臓細胞または組織を候補薬剤と接触させ、さらに、IL1RL-1分子の試験発現量を検出することを含み、ここで、候補薬剤存在下での第1の発現量に対する試験発現量の減少は、心血管症状の処置に候補薬剤が有用であることを示す。重要な実施形態では、IL1RL-1分子は配列番号1～4のいずれかの分子である。いくつかの実施形態では、心血管症状が心臓肥大（例えば、不適応肥大）、心筋梗塞、卒中、動脈硬化、および心不全からなる群から選択される。

20

【0014】

本発明の別の局面に従うと、薬学的組成物が提供される。この組成物は、心血管症を処置する薬学的有効量のIL1RL-1単離核酸分子（配列番号1もしくは3）またはその発現産物（例えば、配列番号2または4）および薬学的に受容可能なキャリアとを含む。特定の実施形態では、上記心血管症状は、心肥大、心筋梗塞、卒中、動脈硬化および心不全からなる群から選択される。

【0015】

本発明のさらなる局面に従うと、心血管症状の処置に有用な薬物を調製する方法も提供される。この薬物は、好ましくは、前述の分子または組成物の少なくとも1つを有効量含む。

30

【0016】

本発明のなお別の局面に従うと、固相核酸分子アレイが提供される。このアレイは、一連の複数の核酸分子、それらの発現産物、またはそれらのフラグメント（核酸もしくはポリペプチド分子のいずれかのフラグメント）から本質的になるもので、少なくともIL1RL-1分子（その発現産物もしくはそのフラグメントを含む）を固体基板に固定する。いくつかの実施形態では、上記固相アレイは、さらに、少なくとも1つのコントロール核酸分子を含む。

【0017】

特定の実施形態では、固体基板はガラス、シリカ、アルミノケイ酸塩、ホウケイ酸塩、金属酸化物（例えばアルミナおよび酸化ニッケル）、種々の粘土、ニトロセルロースならびにナイロンからなる群から選択される材料である。好ましくは、上記基板はガラスである。いくつかの実施形態では、共有結合によって核酸分子を固体基板に固定する。

40

【0018】

本発明の別の局面に従うと、心血管症状の危険度を減らすために、薬剤による治療によって被験体が利益を得る可能性を評価する方法が提供される。重要な実施形態では、薬剤は、抗炎症薬剤、抗血栓症薬剤、抗血小板薬剤、線維素溶解薬剤、脂質還元薬剤、直接トロンビンインヒビター、糖蛋白IIb/IIIaレセプターインヒビター、細胞接着分子に結合して白血球がそのような分子に結合する能力を阻害する薬剤、カルシウムチャネ

50

ルブロッカー、 β アドレナリン作動性レセプターブロッカー、シクロオキシゲナーゼ2インヒビターおよびアンジオテンシン系インヒビターからなる群から選択される。上記方法は、被験体内のIL1RL-1分子のレベルを得て、該IL1RL-1分子レベルを、心血管症状の診断にとって特異的な所定の値と比較することを含む。所定の値と比較してIL1RL-1分子のレベルは、被検体が上記薬剤による処置から利益を得られるかどうかを示す。特定の実施形態で、心血管症状の診断にとって特異的な所定の値は、複数の所定マーカーレベル範囲であり、上記比較工程が前記所定マーカーレベル範囲のいずれが上記被験体レベルを低下させるかを決定することを含む。心血管症状は、心肥大、心筋梗塞、卒中、動脈硬化、および心不全からなる群から選択される症状である。

【0019】

本発明の別の局面では、心血管症状の結果を予測する方法が提供される。この方法は、被験体内のIL1RL-1分子のレベルを得て、該IL1RL-1分子のレベルと予測心血管症状の結果に特異的な所定の値とを比較することを含む。所定の値と比較してIL1RL-1分子のレベルは、被験体が良好／ポジティブな治療結果を有するかどうか、または被験体が有効でない／ネガティブな治療結果を有するかどうかを示す。いくつかの実施形態では、高レベルのIL1RL-1分子は、ネガティブな結果を示し、一方低濃度ではポジティブな結果が示されるかもしれない。特定の実施形態では、予測心血管症状の治療結果に特異的な所定の値は複数の所定マーカーレベル範囲であり、上記比較工程は記被験体レベルが上記所定マーカーレベル範囲のいずれで減少するかを検定することを含む。上記心血管症状は、心肥大、心筋梗塞、卒中、動脈硬化、および心不全からなる群から選択される症状であり得る。

【0020】

IL1RL-1分子の任意の配列が、本発明の局面および実施形態のいずれかで使用され得る。例えば、これは配列番号1および3に示されるヌクレオチド配列に加えて配列番号5および7に示されるヌクレオチド配列を含む。これは、さらに、配列番号2および4に示される予測アミノ酸配列に加えて、配列番号6および8に示される予測アミノ酸配列を含む。

【0021】

本発明のこれらの目的および他の目的は、本発明の詳細な説明と関連して、さらに詳細に記載される。

【0022】

本発明はまた、以下の項目を提供する。

(項目1)

核酸分子の異常発現またはその発現産物によって特徴づけられる心血管症状を診断する方法であって、該方法は、以下：

a) 該核酸分子、その発現産物、またはその発現産物のフラグメントに特異的に結合する薬剤を、被験体から得た生体試料と接触させる工程；および

b) 結合した薬剤の量を測定し、そして該測定から該核酸分子の発現またはその発現産物の発現が異常であるか否かを決定して、異常発現が該症状を診断される工程、
を包含し、ここで、該核酸分子が、配列番号1および配列番号3からなる群から選択される少なくとも1つの核酸分子である、方法。

(項目2)

上記症状が、心筋梗塞、卒中、動脈硬化、および心不全からなる群から選択される心血管症状である、項目1に記載の方法。

(項目3)

上記症状が、心臓肥大である、項目1に記載の方法。

(項目4)

上記薬剤が、高ストリンジェントな条件下で上記配列番号1または配列番号3の核酸分子にハイブリダイズする核酸分子である、項目1に記載の方法。

(項目5)

10

20

30

40

50

上記薬剤が、上記配列番号 1 または配列番号 3 の核酸分子の上記発現産物に結合する分子である、項目 1 に記載の方法。

(項目 6)

上記薬剤が抗体またはその抗原結合フラグメントである、項目 5 に記載の方法。

(項目 7)

核酸分子の異常発現またはその発現産物によって特徴づけられる被験体での心血管症状の病期を決定する方法であって、

患者から得た試料を、

(i) I L 1 R L - 1 核酸分子、

(i i) 該 I L 1 R L - 1 核酸にコードされるポリペプチド、

(i i i) 該ポリペプチドに由来するペプチド、および

(i v) 該ポリペプチドまたはペプチドに選択的に結合する抗体

からなる群から選択されるパラメータについて、該被験体での該心血管症状の病期の決定としてモニタリングする工程を包含する、方法。

(項目 8)

上記試料が体液または組織である、項目 7 に記載の方法。

(項目 9)

上記モニタリング工程が、

(a) ストリンジェントな条件下で上記 (i) の核酸分子に選択的にハイブリダイズする単離された核酸分子、

(b) 上記 (i i) のポリペプチドまたは上記 (i i i) のペプチドに選択的に結合する抗体、および

(c) 上記 (i v) の抗体に選択的に結合するポリペプチドまたはペプチド

からなる群から選択される検出可能な薬剤と上記試料を接触させる工程を包含する、項目 7 に記載の方法。

(項目 10)

上記抗体、上記ポリペプチド、上記ペプチド、または上記核酸が検出可能な標識で標識される、項目 9 に記載の方法。

(項目 11)

上記ペプチドについて上記試料をモニタリングする工程を包含する、項目 9 に記載の方法。

(項目 12)

単離 I L 1 R L - 1 核酸分子またはその発現産物に選択的に結合する薬剤と、該単離核酸またはその発現産物への該薬剤の結合の測定値と比較するための対照とを含有するパッケージを含む、キット。

(項目 13)

上記対照が、上記測定値と比較するための所定の値を有する、項目 12 に記載のキット。

(項目 14)

上記対照が、単離 I L 1 R L - 1 核酸分子の上記発現産物のエピトープを含む、項目 12 に記載のキット。

(項目 15)

上記薬剤が、上記単離 I L 1 R L - 1 核酸分子を増幅するための少なくとも 1 つのプライマー対を含み、該単離 I L 1 R L - 1 核酸分子が配列番号 1 または配列番号 3 として示される配列を有する、項目 12 に記載のキット。

(項目 16)

上記薬剤が、上記単離 I L 1 R L - 1 核酸分子の上記発現産物に結合する少なくとも 1 つの抗体を含み、上記単離 I L 1 R L - 1 核酸分子が配列番号 1 または配列番号 3 として示される配列を有する、項目 12 に記載のキット。

(項目 17)

心血管症状を処置する方法であって、

10

20

30

40

50

そのような処置を必要とする被験体に対して、該心血管症状を処置するのに有効な量で、I L 1 R L - 1 分子の発現を調節する薬剤を投与する工程を包含する、方法。

(項目 1 8)

抗炎症薬剤、抗血栓症薬剤、抗血小板薬剤、線維素溶解薬剤、脂質還元薬剤、直接トロンビンインヒビター、糖蛋白 I I b / I I I a レセプターインヒビター、細胞接着分子に結合して白血球がそのような分子に結合する能力を阻害する薬剤、カルシウムチャンネルブロッカー、β アドレナリン作動性レセプターブロッカー、サイクロオキシゲナーゼ 2 インヒビター、およびアンギオテンシン系インヒビターからなる群から選択される薬剤を共投与する工程をさらに包含する、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 1 9)

上記心血管症状が、心肥大、心筋梗塞、卒中、動脈硬化、および心不全からなる群から選択される、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 2 0)

上記発現を調節する薬剤が、I L 1 R L - 1 分子である、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 2 1)

被験体での心血管症状発症の危険性を減少させるために該被験体を処置する方法であって、

増加量 I L 1 R L - 1 分子を発現する被験体に対して、該被験体が将来に心血管障害を発症する危険性を減少させるのに有効な量で心血管障害患の危険性を減少させるための薬剤を投与する工程を包含し、

上記薬剤が抗炎症薬剤、抗血栓症薬剤、抗血小板薬剤、線維素溶解薬剤、脂質還元薬剤、直接トロンビンインヒビター、糖蛋白 I I b / I I I a レセプターインヒビター、細胞接着分子に結合して白血球がそのような分子に結合する能力を阻害する薬剤、カルシウムチャンネルブロッカー、β アドレナリン作動性レセプターブロッカー、サイクロオキシゲナーゼ 2 インヒビター、またはアンギオテンシン系インヒビター、あるいは I L 1 R L - 1 分子の発現を調節する薬剤である、方法。

(項目 2 2)

心血管症状の処置に有用な候補薬剤を同定する方法であって、

候補薬剤の不在下で I L 1 R L - 1 核酸分子の第 1 の発現量を可能とする条件下で、心筋細胞または心筋組織の I L 1 R L - 1 核酸分子の発現を測定する工程、

該心筋細胞または心筋組織を上記候補薬剤と接触させる工程、および

該 I L 1 R L - 1 核酸分子の試験発現量を検出する工程を包含し、

該候補薬剤の存在下での該第 1 の発現量に対する該試験発現量の増加または減少が、該候補薬剤が該心血管症状の処置に有用であることを示す、方法。

(項目 2 3)

上記心血管症状が、心肥大、心筋梗塞、卒中、動脈硬化、および心不全からなる群から選択される、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

心血管症状を処置するための薬学的有効量の単離 I L 1 R L - 1 核酸分子またはその発現産物を含む薬剤、および

薬学的に受容可能な担体、
を含有する、医薬組成物。

(項目 2 5)

上記薬剤が、上記単離 I L 1 R L - 1 核酸分子の発現産物である、項目 2 4 に記載の医薬組成物。

(項目 2 6)

上記心血管症状が、心肥大、心筋梗塞、卒中、動脈硬化、および心不全からなる群から選択されることを特徴とする項目 2 4 に記載の医薬組成物。

(項目 2 7)

心血管症状の危険度を減らすために、抗炎症薬剤、抗血栓症薬剤、抗血小板薬剤、線維素

10

20

30

40

50

溶解薬剤、脂質還元薬剤、直接トロンビンインヒビター、糖蛋白 I I b / I I I a レセプターインヒビター、細胞接着分子に結合して白血球がそのような分子に結合する能力を阻害する薬剤、カルシウムチャンネルブロッカー、 β アドレナリン作動性レセプターブロッカー、サイクロオキシゲナーゼ 2 インヒビター、およびアンギオテンシン系インヒビターからなる群から選択される薬剤による処置によって被験体が利益を得る可能性を評価する方法であって、該方法は、以下：

該被験体体内の I L 1 R L - 1 分子濃度を得る工程、および

該 I L 1 R L - 1 分子濃度と心血管症状の診断にとって特異的な所定の値とを比較する工程、

を包含し、ここで、該所定の値と比較した該 I L 1 R L - 1 分子量は、上記被験体がか上記薬剤による処置から利益を得るか否かを示す、方法。

10

(項目 2 8)

上記心血管症状の診断に特異的な所定の値が、複数の所定マーカー濃度範囲であり、かつ上記比較工程が、上記被験体レベルがどの該所定マーカー濃度範囲内であることを検定する工程を包含する、項目 2 7 に記載の方法。

(項目 2 9)

上記心血管症状が、心肥大、心筋梗塞、卒中、動脈硬化、および心不全からなる群から選択されることを特徴とする項目 2 7 に記載の方法。

(項目 3 0)

心血管症状の危険度を減少させるために被験体を処置する方法であって、異常値の I L 1 R L - 1 分子を発現する被験体に対して、該被験体が心血管症状を発症する危険度を減少させるのに有効な量で心血管症状の危険度を減少させるための薬剤を選択および投与する工程を包含し、該薬剤が、抗炎症薬剤、抗血栓症薬剤、抗血小板薬剤、線維素溶解薬剤、脂質還元薬剤、直接トロンビンインヒビター、糖蛋白 I I b / I I I a レセプターインヒビター、細胞接着分子に結合して白血球がそのような分子に結合する能力を阻害する薬剤、カルシウムチャンネルブロッカー、 β アドレナリン作動性レセプターブロッカー、サイクロオキシゲナーゼ 2 インヒビター、およびアンギオテンシン系インヒビターからなる群から選択される、方法。

20

(項目 3 1)

上記被験体が、他の点では上記薬剤による処置を必要としている症状を有さない、項目 3 0 に記載の方法。

30

(項目 3 2)

心血管症状の結果を予測する方法であって、該方法が、以下：

被験体内の I L 1 R L - 1 分子濃度を得る工程、および

該 I L 1 R L - 1 分子濃度と該心血管症状の結果を予測するために特異的な所定の値とを比較する工程、

を包含し、ここで、該所定の値と比較した該 I L 1 R L - 1 分子濃度が該心血管症状の該結果を示す、方法。

(項目 3 3)

上記心血管症状が、心肥大、心筋梗塞、卒中、動脈硬化、および心不全からなる群から選択される、項目 3 2 に記載の方法。

40

【図面の簡単な説明】

【0 0 2 3】

【図 1】図 1 は、一定の時間にわたる培養心筋細胞での F i t - 1 の発現に対する 8 % 周期的機械的歪みの効果をノーザンブロットによって示す。

【図 2】図 2 は、一定の時間にわたる培養心筋細胞での I L 1 R L - 1 の発現に対する 8 % 周期的機械的歪み、アンギオテンシンレセプター遮断薬 (b l o c k a g e)、アンギオテンシン I I、I L - 1 b、およびホルボールエステルの効果をノーザンブロットによって示す。

【図 3】図 3 は、一定の時間にわたる培養心筋細胞での I L 1 R L - 1 の発現に対する 8

50

%周期的機械的歪み、過酸化水素、およびT I R O Nの効果をノーザンブロットによって示す。

【図4】図4は、一定時間にわたる培養心筋細胞に対する8%周期的機械的歪みの間のI L 1 R L - 1発現誘導に対するアクチノマイシンDおよびシクロヘキサミドの効果をノーザンブロットによって示す。

【図5】図5は、一定時間にわたる培養心筋細胞でのI L 1 R L - 1の発現についての8%周期的機械的歪み単独の効果、8%周期的機械的歪みをI L - 1 bと組み合わせた場合の効果、ならびに歪みなしでのホルボールエステルの効果を、ノーザンブロットによって示す。

【図6】図6は、一定時間にわたる培養心筋細胞での液胞型A T Pアーゼの発現に対する8%周期的機械的歪みの効果をノーザンブロットによって示す。

【図7】図7は、本発明の特徴を具体化したキットを示す。

【図8】図8は、心筋細胞での機械的歪みによるmRNA誘導のT 2 / S T 2の初期経時変化（左側）および後期経時変化（右側）を示す。最大誘導が3時間目に生じて9時間維持され、15時間までに減少した。上側の図は、T 1 / S T 2 RNA、下側の図はエチジウムブロマイドである。No strは、歪みなしである。

【図9】図9は、1時間目および3時間目での機械的歪み（8%）、インターロイキン-1（10 ng / ml）およびホルボールエステル（PMA、200 nM）によるT 1 / S T 2のmRNA誘導を示す。PMA > 歪み > I L - 1。上側の図はT 1 / S T 2 mRNA、下側の図はエチジウムブロマイドである。

【図10】図10は、T 1 / S T 2が心筋細胞でのI L - 1 / I Lレセプターシグナルの間のNF-κB活性化によって誘導される遺伝子であり得ることを示す。コントロールアデノウィルスによる感染の存在下で、I L - 1および歪みがT 1 / S T 2 mRNAを誘導した（左側）。NF-κB DNA結合活性を減少させるI κBアデノウィルスの感染により（右側）、I L - 1によるT 1 / S T 2の誘導がブロックされた。T 1 / S T 2の歪み誘導は、I κBアデノウィルス感染により部分的にブロックされ、歪みによるT 1 / S T 2の誘導のための別の経路が示唆される。上側の図はT 1 / S T 2 mRNA、下側の図はエチジウムブロマイドである。

【図11】図11は、マウスでの心筋梗塞後のT 1 / S T 2タンパク質の発現を1日目（しかし感染後3日ではない）に免疫組織化学によって示す。40倍に拡大。

【図12-1】図12は、心筋梗塞後のヒト患者体循環でのS T 2タンパク質濃度のグラフ表示を示す。a：14日目および90日目と比較して、心筋梗塞後1日目でS T 2タンパク質が著しく増加した。b：心筋梗塞後1日目に有意に正の関係（ $p < 0.001$ ）が循環S T 2タンパク質とクレアチンキナーゼとの間に存在することが直線回帰分析によって示される。 $\log S T 2 = 0.454 (\log CK) - 1.07$ 。

【図12-2】図12は、心筋梗塞後のヒト患者体循環でのS T 2タンパク質濃度のグラフ表示を示す。c：心筋梗塞後1日目の循環S T 2タンパク質濃度と駆出分画との四分位点分析。低駆出分画は、高S T 2タンパク質濃度に関連している。

【図13】図13は、S T 2の基線値が高くなると30日間追跡調査を通じて死亡率が高いことを示している（ログランク（ $\log - rank$ ）。 $p = 0.0009$ ）。

【発明を実施するための形態】

【0024】

（配列の詳細な説明）

配列番号1は、ヒトI L 1 R L 1（可溶性）cDNAのヌクレオチド配列である。

【0025】

配列番号2は、ヒトI L 1 R L 1（可溶性）cDNA（配列番号1）の翻訳産物の予測アミノ酸配列である。

【0026】

配列番号3は、ヒトI L 1 R 1（膜）cDNAのヌクレオチド配列である。

【0027】

10

20

30

40

50

配列番号4は、ヒト I L 1 R L 1（膜）（配列番号3）の翻訳産物の予測アミノ酸配列である。

【0028】

配列番号5は、ラット F i t - 1 S c D N A のヌクレオチド配列である。

【0029】

配列番号6は、ラット F i t - 1 S c D N A（配列番号5）の翻訳産物の予測アミノ酸配列である。

【0030】

配列番号7は、ラット F i t - 1 M c D N A のヌクレオチド配列である。

【0031】

配列番号8は、ラット F i t - 1 M c D N A（配列番号7）の翻訳産物の予測アミノ酸配列である。

【0032】

（発明の詳細な説明）

本発明は、機械的に誘導された歪み変形を心臓細胞が受ける場合、該心臓細胞で上方制御される多数の遺伝子の発見を含む。この発見の観点から、本発明の分子が心臓肥大、心筋梗塞、卒中、動脈硬化、および／または心不全を含む心血管症状の処置に用いられ得ると考えられている。

【0033】

その上、これらの分子を前述の心血管症状のいずれかの診断に用いる方法も提供される。

【0034】

さらに、前述の症状の処置のための治療製剤の調製に有用な組成物も提供される。

【0035】

本明細書で使用されるように「上方制御された（upregulated）」は、遺伝子および／またはそのコード化ポリペプチドの増加発現をいう。「増加発現（increased expression）」は、本発明の核酸（I L 1 R L - 1、配列番号1および3）のいずれかの、増加（すなわち、検出可能な範囲の）複製、転写、および／または翻訳をいう。ならぜら、これらのプロセスのいずれかの上方制御が上記遺伝子（核酸）によってコードされたポリペプチドの濃度／量の増加をもたらすからである。逆に、本明細書で用いられる場合、「下方制御（downregulation）」または「減少発現（decreased expression）」は、遺伝子および／またはそのコード化ポリペプチドの減少発現をいう。遺伝子発現の上方制御または下方制御は、当該分野で公知の任意の適した手段（例えば、それぞれ、核酸ハイブリダイゼーションまたは抗体検出方法）を用い、かつ対照群と比較して、上記遺伝子のmRNA量あるいは上記遺伝子にコードされたポリペプチドのタンパク質発現量の増加または減少をそれぞれ検出することによって、直接決定され得ることができる。

【0036】

本明細書で使用される場合、「心臓細胞（cardiac cell）」とは、心筋細胞（cardiomyocyte）をいう。

【0037】

本明細書で使用される場合、「分子（molecule）」とは、「核酸」および「ポリペプチド」の両方を包含する。

【0038】

本明細書で使用される場合、「発現（expression）」とは、核酸および／またはポリペプチドの発現をいう。

【0039】

本明細書で使用される場合、「被験体（subject）」とは、ほ乳動物またはヒト以外のほ乳動物である。すべての実施形態で、ヒト核酸、ポリオペプチドおよびヒト被験体が好ましい。本明細書の他のところで記載したヒトおよびラットの分子を用いて得られ

10

20

30

40

50

た結果は、他の相同配列を用いて入手し得る結果を予測するものと考えられる。

【0040】

一般に、相同体および対立遺伝子は、代表的に、本発明の特徴づけられたヒト配列に少なくとも80%のヌクレオチド同一性および／または少なくとも85%のアミノ酸同一性を共有する。別の例では、相同体および対立遺伝子は、特徴付けられたヒト配列に対して、代表的に少なくとも90%、95%、またはさらに99%のヌクレオチド同一性を共有し、さらに／または少なくとも95%、98%またはさらに99%のアミノ酸同一性を、それぞれ共有する。相同性は、種々の公的に入手可能な、NCBI (Bethesda Maryland) によって開発されたソフトウェアツールを用いて計算され得る。ツールとしては、Altschul SFら (J Mol Biol, 1990, 215: 403-410) (BLASTとしても公知である) の帰納的アルゴリズムが挙げられる。ペアワイズ (Pairwise) およびクラスタルW (Clustal W) アライメント (BLOSUM30マトリクスセッティング) ならびにKyte-Doolittleハイドロパシー分析が公的なもの (EMBL, Heidelberg, Germany) および市販のもの (例えば、MacVector配列分析用ソフトウェア、Oxford Molecular Group/Genetics Computer Group, Madison, WI, Accelrys, Inc., San Diego, CAから入手) を用いて得ることができる。前述核酸のワトソン-クリック相補体も、本発明によって包含される。

【0041】

関連遺伝子 (例えば、本明細書の他のところに記載した配列の相同体および対立遺伝子) のスクリーニングでは、プローブとともにストリンジェント条件を用いてサザンブロット法をおこなうことができる。本明細書で用いられるように、「ストリンジェント条件 (stringent conditions)」という用語は、当業者が精通しているパラメーターをいう。核酸では、ハイブリダイゼーション条件が、概ね低イオン強度およびDNAハイブリッド複合体の溶融温度 (T_m) 直下の温度 (概ね、上記ハイブリッドの T_m より3℃低い) 条件下でストリンジェントといわれている。より高いストリンジェンシーは、プローブ配列と標的とのあいだでより特異的な相関に役立つ。核酸のハイブリダイゼーションで用いられるストリンジェント条件は、当該技術分野で周知であり、またそのような方法をまとめた参考文献に見いだすことができる (例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989、またはCurrent Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York)。高ストリンジェント条件 (high stringency conditions) の例は、6xSSC中65℃でのハイブリダイゼーションである。高ストリンジェント条件の別の例は、ハイブリダイゼーション用緩衝液中65℃でのハイブリダイゼーションであり、該緩衝液は3.5xSSC、0.02% Ficoll、0.02% ポリビニルピロリドン、0.02% 牛血清アルブミン、2.5mM NaH_2PO_4 [pH7]、0.5% SDS、および2mM EDTAからなる (SSCは、0.015M塩化ナトリウム/0.15Mクエン酸ナトリウム、pH7; SDSはドデシル硫酸ナトリウム、およびEDTAはエチレンジアミン四酢酸) である。ハイブリダイゼーション後、DNAが移された膜を室温で2xSSCにより洗浄し、つぎに温度を68℃に上げて0.1xSSC/0.1xSDSにより洗浄する。別の例では、ハイブリダイゼーション水溶液を用いる代わりに、ホルムアミドハイブリダイゼーション溶液を用いる。したがって、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、例えば50%ホルムアミド溶液および42℃を用いて達成することができる。他の条件、試薬などもあり、類似の度合いのストリンジェンシーが得られると考えられる。当業者は、そのような条件に精通するであろう。そのため、当業者に対してここでは説明しない。しかし、当

業者は、本発明の I L 1 R L - 1 核酸の相同体と対立遺伝子とを明瞭に同定することが可能となるように条件を操作することが可能であることが理解されよう。当業者は、ごく普通に単離されるそのような分子を発現するための細胞およびライブラリーをスクリーニングする方法論にも精通しており、その後に関連する核酸分子の単離および塩基配列決定（シーケンシング）が続く。

【0042】

本明細書で全長ヒトおよびラット c D N A クローンについて教示することで、他のほ乳類の配列、例えば関連するヒトおよびラット核酸に対応する（マウス、牛、その他の）c D N A を、標準的なコロニーハイブリダイゼーション技術を用いて c D N A を単離できるか、または相同性検索を用いて、例えば本明細書の他のところに記載されたアルゴリズムまたは公知のアルゴリズムのいずれかにより G e n B a n k で、同定することができる。本発明の全ての態様において本発明の本質から逸脱することなく、例えば、マウス I L 1 R L - 1 相同体については G e n B a n k 受託番号 Y 0 7 5 1 9 . 1 および D 1 3 6 9 5 . 1 を持つ配列が本発明の相同のラット配列と置換可能に用いることができる。

【0043】

核酸に関して、「単離された (i s o l a t e d) 」という用語は、(i) 例えば、ポリメラーゼ鎖反応 (P C R) 等によって、インビトロで増幅された、(i i) クローニングによって組み換え技術的に生産された、(i i i) 切断およびゲル分離のようにして精製された、または (i v) 例えば、化学合成等により合成されたことを意味する。単離された核酸は、当該分野で周知の組み換え D N A 技術によって容易に操作される核酸である。したがって、5 ' および 3 ' 制限部位が既知であるか、もしくはポリメラーゼ鎖反応 (P C R) プライマー配列が開示されているベクターに含まれるヌクレオチド配列が、単離されていると見なされる。しかし、そのネイティブの宿主内で自然な状態で存在する核酸配列は、そのようには見なされない。単離された核酸は、実質的に精製されたものであってもよいが、そのような必要性はない。例えば、クローニングまたは発現ベクター内に単離された核酸は、それが宿っている細胞内の物質に対してわずかの比率を占めるのみであるという点で、純粋ではない。しかし、その用語が本明細書で使用されるように、そのような核酸は単離される。なぜなら、当業者に公知の標準的技術によって容易に操作されるからである。

【0044】

本発明によれば、上述のユニークフラグメントを含む、本発明の前述 I L 1 R L - 1 核酸のいずれかの発現は、異なる方法論を用いて決定することができる。本明細書で用いられるように、「ユニークフラグメント (u n i q u e f r a g m e n t) 」は、核酸に関して、よりより大きな核酸の「署名 (s i g n a t u r e) 」である。例えば、上記ユニークフラグメントは、上で定義された核酸の配列外にあるヒトゲノム内の分子に、その正確な配列が見いだせないことを確信するには十分な長さである。当業者は、ルーチンな方法手順を適用するだけでフラグメントがヒトゲノム内でユニークであるかどうかを決定することが可能である。しかし、ユニークフラグメントは、この出願の出願日において既に公表されたヌクレオチド配列から完全になるフラグメントを除外する。

【0045】

ユニークフラグメントは、サザンおよびノーザンブロット法でプローブとして用いて、そのような核酸を同定することができるか、もしくは P C R を用いるような増幅アッセイで 사용할 ことができる。当業者に知られているように、ヌクレオチド数が 2 0 0 、 2 5 0 、 3 0 0 、またはそれ以上の大きなプローブが、サザンおよびノーザンブロット法等の特定の用途にとって好ましく、一方、小さなフラグメントは、P C R 等の他の用途にとって好ましいであろう。ユニークフラグメントを使用して、抗体を産生、ポリペプチドフラグメントの結合を決定、またはイムノアッセイ成分を生成するための融合タンパク質を生成することができる。同様に、ユニークフラグメントは、抗体の調製、イムノアッセイ、または治療への応用等に有用な、例えば I L 1 R L - 1 ポリペプチドの非融合フラグメントの生産に用いることができる。ユニークフラグメントは、さらにアンチセンス分子とし

て用いて、前述の核酸およびポリペプチドの発現をそれぞれ阻害することもできる。

【0046】

当業者によって認められるように、ユニークフラグメントの大きさはその遺伝暗号内での不変性 (conservancy) に依存するだろう。したがって、配列番号1および3ならびに相補体のいくつかの領域は、ユニークであるより長いセグメントが必要となる一方で、他のものは短いセグメント、概ね12ないし32ヌクレオチド長 (例えば、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、および32塩基) 以上で、最大で、開示された配列の各々の全長のみを必要とするだろう。上記のように、この開示は各配列のありとあらゆるフラグメントを包含することを意図している。各配列について、第1のヌクレオチドで始まり、第2のヌクレオチド、その他、末端を含まずに最大で8ヌクレオチド、さらにヌクレオチド番号8、9、10等のどこからかで終わる (ただし、提供された配列は上記したようにユニークである)。例えば、実質的に配列番号1の領域の任意のセグメントはヌクレオチド1から始まりヌクレオチド1357で終わり、また配列番号3はヌクレオチド1から始まり、ヌクレオチド2058で終わり、またはその相補体、すなわち20以上のヌクレオチド長がユニークである。当業者は、既知のデータベース上の配列に対してこのフラグメントのヒトゲノム中の他の配列から目的とする配列を選択的に区別するユニークフラグメントの能力に概ね基づいて、そのような配列を選択する方法を熟知している。一般的には以上が必要なものではあるが、インビトロで確認的なハイブリダイゼーションおよび配列決定分析をおこなってもよい。

【0047】

いくつかの態様では、本発明は、ポリペプチドをコードする核酸分子に対して選択的に結合してポリペプチド活性を減少させるアンチセンスオリゴヌクレオチドを包含する。

【0048】

本明細書で用いられるように、「アンチセンス分子」、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」および「アンチセンス」は、生理的条件下で特定の遺伝子を持つDNAまたはその遺伝子のmRNA転写産物とハイブリダイズしてその遺伝子の転写および／またはそのmRNAの翻訳を阻害するオリゴリボヌクレオチド、オリゴデオキシリボヌクレオチド、修飾オリゴリボヌクレオチド、または修飾オリゴデオキシリボヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドを表現する。アンチセンス分子は、標的遺伝子または転写産物とハイブリダイズすることで、標的遺伝子の転写または翻訳を妨げるように設計される。アンチセンスオリゴヌクレオチドの正確な長さおよびその標的との相補性の度合いが選択された特異的標的 (該標的の配列および該配列が含まれる特定の塩基も包含される) に依存することを、当業者は認識する。生理的条件下でアンチセンスヌクレオチドが標的と選択的に結合するように、すなわち生理的条件下で標的細胞内の任意の他の配列よりも標的配列に対して実質的により多くハイブリダイズするように、構成および配置されることが好ましい。配列番号1および3または対立遺伝子のもしくは相同のゲノムのかつ／またはcDNA配列にもとづいて、本発明にもとづいて使用する多くの適当なアンチセンス分子のいずれかを当業者は容易に選択および合成することができる。十分に選択的かつ強力な阻害のために、そのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的に対して相補的である少なくとも10個、より好ましくは少なくとも15個の連続する塩基を含まなければならないが、場合によっては7塩基ほど短い長さの修飾オリゴヌクレオチドがアンチセンスオリゴヌクレオチドとして首尾良く使われている (Wagnerら, Nat. Med, 1995, 1 (11): 1116-1118; Nat. Biotech., 1996, 14: 840-844)。最も好ましくは、このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、20~30塩基の相補的配列を含む。

【0049】

遺伝子またはmRNA転写産物の任意の領域に対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドが選択される可能性があるが、好ましい実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドはN末端または5'上流部位に対応する (例えば、翻訳阻害、転写阻害、またはプ

ロモーター部位)。また、3'-非翻訳領域は、アンチセンスオリゴヌクレオチドによって標的化される可能性がある。mRNAスプライシング部位を標的化することも当該技術分野においておこなわれているが、他のmRNAスプライシングが起こる場合はあまり好ましくないと思われる。また、アンチセンスは、mRNAの二次構造が期待されない部位を、好ましくは標的とし(例えば、Sainioら, Cell Mol. Neurobiol. 14(5):439-457, 1994)、ここにタンパク質が結合するとは思われない。最後に、配列番号1および3はcDNA配列を開示しているが、当業者は前述の配列に対応するゲノムDNAを容易に誘導することができる。したがって、本発明は、配列番号1および3に対応するゲノムDNAに対して相補性を示すアンチセンスオリゴヌクレオチドも提供する。同様に、対立遺伝子または相同ヒトcDNAおよびゲノムDNAに対するアンチセンスは過度の実験なしに可能となる。

10

【0050】

本発明のオリゴヌクレオチドは、RNAi分子を含むものであってもよい。RNA干渉または「RNAi」の使用は、遺伝子発現を阻害するために二本鎖RNA(dsRNA)の使用を含む(例えばSui, G.ら, Proc Natl. Acad. Sci U. S. A. 99:5515-5520, 2002を参照)。本発明の実施形態でRNAi戦略を適用する方法は、当業者にわかるだろう。

【0051】

一組の実施形態で、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、「天然の(natural)」デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、またはそれらの任意の組み合わせから構成されるものであってもよい。したがって、天然の系のように、ヌクレオシド間ホスホジエステル結合を介して、1つの天然ヌクレオチドの5'末端と他の天然ヌクレオチドの3'末端とが共有結合することができる。これらのオリゴヌクレオチドは、手動で、または自動合成装置を用いておこなわれる既知の方法によって調製することができる。また、それらの生産を、ベクターを用いた組み換え技術によっておこなってもよい。

20

【0052】

しかし、好ましい実施形態では本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドもまた、「修飾(modified)」オリゴヌクレオチドを含むものであってもよい。すなわち、オリゴヌクレオチドをいくつかの方法で修飾することができ、該方法はそれらのオリゴヌクレオチドが標的にハイブリダイズするのを妨げるものではないが、それらの安定性または

30

【0053】

本明細書で用いられるように、「修飾オリゴヌクレオチド(modified oligonucleotide)」という用語は、(1)そのヌクレオチドの少なくとも2つが合成ヌクレオチド間結合を介して共有結合し(すなわち、1つのヌクレオチドの5'末端と他のヌクレオチドの3'末端とのあいだがホジホジエステル結合以外の結合をおこない)、および/または(2)核酸と通常結合しない化学基がオリゴヌクレオチドに共有結合しているオリゴヌクレオチドを表現する。好ましい合成ヌクレオシド間結合(synthetic internucleoside linkage)は、ホスホロチオネート、アルキルホスホネート、ホスホロジエチオエート、リン酸エステル、アルキルホスホノチオエート、ホスホルアミダイト、カルバメート、カルボネート、ホスフェートトリエステル、アセトアミド、カルボキシメチルエステル、およびペプチドである。

40

【0054】

「修飾されたオリゴヌクレオチド」という用語は、共有結合した塩基および/または糖を有するオリゴヌクレオチドも包含する。例えば、修飾オリゴヌクレオチドは、主鎖糖(backbone sugar)を持つオリゴヌクレオチドを含む。この糖は、3'位の水酸基以外および5'位のリン酸基以外の低分子量有機基に共有結合する。このように、修飾オリゴヌクレオチドは、2'-O-アルキル化されたりボース基を含むことが可能である。また、修飾オリゴヌクレオチドはリボースの代わりにアラビノース等の糖を含むものであってもよい。したがって、本発明は、生理的条件下で、薬学的に許容される担体と

50

ともに、配列番号2および／または4のポリペプチドをコードする核酸と相補的で、かつハイブリダイズ可能な修飾アンチセンス分子を含む製剤を意図する。

【0055】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを、医薬組成物の一部として投与してもよい。そのような医薬組成物として、標準的な生理学および／または薬学的に許容される公知の担体のいずれかと組み合わせたアンチセンスオリゴヌクレオチドを挙げることができる。上記組成物を滅菌して、患者への投与に適した重量または容量単位でアンチセンスオリゴヌクレオチドを治療上有効な量含ませなければならない。「薬学的に許容される (pharmacaceutically acceptable)」という用語は、活性成分の生物学的活性の効果を妨げない非毒性材料を意味する。「生理学的に許容される (physiologically acceptable)」という用語は、生物学的系（例えば細胞、細胞培養、組織または生物体）と適合性を持つ非毒性の材料を指す。担体の特徴は、投与経路に依存する。生理学および薬学的に許容される担体は、周知である希釈剤、フィラー、塩類、緩衝液、安定剤、可溶化剤、および他の材料を含む。

【0056】

また、本発明は、配列番号1および／または3に対応する核酸、フラグメント、およびその改変体によってコードされるタンパク質をコードする発現ベクターと、該発現ベクターを含む宿主細胞とを含む。実質的に、培地で増殖または維持することができ、かつ異種DNAまたはRNAによって形質転換しうる任意の細胞、すなわち原核細胞または真核細胞を用いて、本発明を実施することが可能である。例として、大腸菌 (Escherichia coli) 等の細菌細胞と、マウス、ハムスター、豚、ヒツジ、および霊長類等のほ乳類細胞とが挙げられる。それらは、多種多様な組織型であってもよく、例えばマスト細胞、線維芽細胞、卵母細胞、およびリンパ球が挙げられ、またそれらは初代細胞または細胞株であってもよい。具体例として、CHO細胞およびCOS細胞が挙げられる。無細胞転写系もまた、細胞の代わりに用いてもよい。

【0057】

本明細書で用いられるように、「ベクター (vector)」は、異なる遺伝子環境間の輸送のため、または宿主細胞での発現のため、所望の配列を制限および連結反応で挿入可能な多くの核酸のいずれであってもよい。ベクターは、概ねDNAから構成されるが、RNAベクターも利用可能である。ベクターとして、限定されるものではないが、プラスミド、ファージミド、およびウイルスゲノムが挙げられる。クローニングベクターは、宿主細胞で複製することが可能であり、また新規の組み換えベクターが宿主細胞で複製するその能力を保持するようにして該ベクターが測定可能な様式で切断され、かつ所望のDNA配列が連結される1つ以上のエンドヌクレアーゼ制限部位によって、さらに特徴づけられる。プラスミドの場合、所望の配列の複製が数多く生ずる可能性がある。なぜなら、プラスミドは、宿主細菌内でプラスミドのコピー数を増加させるか、もしくは宿主が細胞分裂によって増える前に該宿主細胞あたり1回だけ増える。ファージの場合、複製は溶菌相の間に能動的に、または溶原化相の間に受動的に起こる可能性がある。発現ベクターは、調節配列に作用自在に結合するようにして、またRNA転写産物として発現可能なようにして、所望のDNA配列が制限および連結反応によって挿入可能なベクターである。さらに、ベクターは、該ベクターによって形質転換またはトランスフェクションされた、もしくはされていない細胞の同定で用いるのに適当な1種類以上のマーカー配列を含むものであってもよい。マーカーとして、例えば、抗生物質または他の化合物に対する耐性または感受性のいずれかを高めるか減少させるタンパク質をコードする遺伝子、公知の標準的アッセイによって活性が検出される酵素（例えば、βガラクトシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）をコードする遺伝子、ならびに形質転換またはトランスフェクトされた細胞、宿主、コロニー、またはプラークの表現型（例えば、緑色蛍光タンパク質）に視覚的に影響を及ぼす遺伝子が挙げられる。好ましいベクターは、該ベクターが作用自在に結合するDNAセグメントに存在する構造遺伝子産物の発現と自律複製とを可能とするベクターである。

10

20

30

40

50

【0058】

本明細書で用いられるように、コード配列および調節配列は、該コード配列の発現または転写を調節配列の影響または制御下に置くようにして共有結合的に連結する場合、「作用自在に結合 (operably joined)」しているといえる。コード配列が機能タンパク質に翻訳されることを求められる場合、5'調節配列にあるプロモーターの誘導が、コード配列の転写をもたらす場合、および2つのDNA配列間の連結の性質が、(1) フレームシフト変異の導入をもたらし、(2) コード配列の転写を指示するプロモーター領域の能力を妨げ、もしくは(3) タンパク質に翻訳される対応RNA転写産物の能力を妨げる場合、2つのDNA配列が作用自在に結合しているといえる。したがって、結果として生ずる転写産物が所望のタンパク質またはポリペプチドに翻訳されるようにDNA配列の転写に作用する能力がプロモーター領域にある場合、プロモーター領域はコード配列に作用自在に結合するだろう。

10

【0059】

遺伝子発現のために必要とされる調節配列の的確な性質は、種または細胞型のあいだで変化する可能性があるが、一般に、必要に応じて、転写および翻訳の開始を伴う5'非転写および5'非翻訳配列(例えば、TATAボックス、キャッピング配列、およびCAT配列)を含むものとする。そのような5'非転写調節配列は、多くの場合、作用自在に結合した遺伝子の転写制御のためのプロモーター配列を含むプロモーター領域を含む。調節配列は、所望であれば、エンハンサー配列または上流アクチベーター配列も含むものであってもよい。本発明のベクターは任意に5'リーダーまたはシグナル配列を含むものであってもよい。適当なベクターの選択および設計は、当業者の能力および裁量の範囲内である。

20

【0060】

発現に必要な全てのエレメントを含む発現ベクターが市販され、かつ当業者に知られている(例えば、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を見よ)細胞の遺伝子操作は、ポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体をコードしている異種DNA(RNA)の細胞に導入することによっておこなう。その異種DNA(RNA)を転写エレメントの作用自在な制御下に置いて、宿主細胞での異種DNAの発現を可能とする。

30

【0061】

ほ乳類細胞でのmRNA発現にとって好ましい系は、G418耐性を付与する遺伝子等の選択マーカー(安定にトランスフェクションした細胞株の選択を容易にする)と、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)エンハンサープロモーター配列とを含むpcDNA3.1(Invitrogen, Carlsbad, Calif. から入手可能)等の系である。さらに、霊長類またはイヌの細胞株での発現に適したものは、pCEPAベクター(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)であり、該ベクターはエプスタインバーウイルス(EBV)複製開始点を含み、多コピー染色体外エレメントとしてプラスミドの維持を容易にする。さらに別の好ましい発現ベクターは、アデノウイルスであり、Stratford-Perricaudetによって記載されたE1およびE2タンパク質が欠損したものである(J. Clin. Invest. 90: 626-630, 1992)。

40

【0062】

本発明もいわゆる発現キットを含み、該発現キットによって当業者が所望の発現ベクターまたはベクターを準備することができる。そのような発現キットは、前述したコード配列の各々の少なくとも別々の部分を含む。必要とされる前述の配列が含まれる限り、必要に応じて他の構成エレメントを加えることができる。

【0063】

本発明が上記配列番号1および/または3、cDNA配列を含有する発現ベクターを宿主細胞および細胞株をトランスフェクションさせるための使用を含み、これらが原核細胞

50

(例えば、大腸菌)または真核生物(例えば、CHO細胞、CO細胞、酵母発現系、および昆虫細胞内での組換え型バキュロウイルス発現)であることがわかる。特に有用なものは、マウス、ハムスター、豚、ヒツジ、霊長類等のほ乳類細胞である。これらは、多種多様な組織型であってもよく、初代細胞および細胞株を含むことができる。具体例として、樹枝状細胞、U293細胞、末梢血白血球、骨髓幹細胞、および胚性幹細胞が挙げられる。

【0064】

本発明は、前述の核酸(配列番号1および3)によってコードされた単離ポリペプチド(タンパク質全体および部分タンパク質を含む)も提供するもので、該ポリペプチドには配列番号2および/または4のポリペプチドとそれらのユニークフラグメントが含まれる。そのようなポリペプチドは、単独もしくは融合タンパク質の一部として、イムノアッセイ等の成分として抗体産生に有用である。発現システムに適当な発現ベクターを構築し、この発現ベクターを発現系に導入し、さらに組み換えによって発現されたタンパク質を単離することで、ポリペプチドを、組織または細胞ホモジュネートを含む生体試料から単離することができ、またこのようなポリペプチドを種々の原核細胞発現系および真核細胞発現系で組み換え発現させることもできる。抗原ペプチド(例えば、免疫認識のために細胞の表面でMHC分子によって表されるもの)等の短いポリペプチドもまた、十分に確立されたペプチド合成法を用いて化学合成することができる。

【0065】

本発明で用いられるように、ポリペプチドに関して、「単離した(isolated)」という用語は、本発明の目的のいずれか1つのために操作または使用することができるように、その本来の環境から十分に精製されたかたちで分離したことを意味する。したがって、「単離された」は、(i)抗体の生成および/または抗体の単離の際の使用、(ii)アッセイでの試薬として使用、(iii)配列決定での使用、(iv)治療のための使用等にとって十分に純粋なことを意味する。

【0066】

一般に、前述のポリペプチドの各々に対するユニークフラグメントは、核酸と関連して上記のようなユニークフラグメントの特徴および性質を持つ。当業者に認められるように、ユニークフラグメントの大きさは、保存タンパク質ドメインの一部を該フラグメントが構成するかどうか等の要因に依存する。したがって、ポリペプチドのいくつかの領域はユニークとなるより長いセグメントを必要とし、他の領域は短いセグメントのみ、通常は5ないし12アミノ酸(例えば、5、6、7、8、9、10、11、および12アミノ酸長もしくはそれ以上で、各ポリペプチドの全長を最大とする整数が含まれる)を必要とする。

【0067】

ポリペプチドのユニークフラグメントは、好ましくはポリペプチドの別個の機能的能力を保持するフラグメントである。ポリペプチドのユニークフラグメントに保持される機能的能力として、抗体との相互作用、他のポリペプチドまたはそのフラグメントとの相互作用、他の分子との相互作用などが挙げられる。1つの重要な作用は、ポリペプチドを同定するための署名(signature)として作用する能力である。当業者は、ユニークなアミノ酸配列を選択する方法(ファミリーメンバーではないものから目的とする配列を選択的に区別するユニークフラグメントの能力にもとづく)を熟知している。概して、上記フラグメントの配列を既知のデータベースにあるものと比較するだけでよい。

【0068】

本発明は、上記ポリペプチドの改変体を含む。本明細書で用いられるように、ポリペプチドの「改変体」は天然(例えば「野生型(wild-type)」:(配列番号2および4のポリペプチドからなる群から選択されるアミノ酸配列を持つポリペプチド)ポリペプチドの一次アミノ酸配列に対する1つ以上の修飾を含むポリペプチドである。ポリペプチド変異体を作る修飾は、概ねポリペプチドをコードする核酸に対しておこなわれ、欠失、点突然変異、短縮、アミノ酸置換およびアミノ酸または非アミノ酸部分の付加が含まれ

、（１）ポリペプチドの活性を減少または除去、（２）ポリペプチドの特性（例えば、発現系でのタンパク質安定性またはタンパク質とリガンドとの結合の安定性）を強化、（３）ポリペプチドに対して新規の活性または特性を付与（例えば、抗原性エピトープの付加または検出可能な部位の付加）、または（４）ポリペプチドレセプターまたは他の分子に対して等価またはより良い結合を提供する。あるいは、開裂、リンカー分子の付加、検出可能な部位の付加（例えば、ビオチンおよび脂肪酸付加）によって、ポリペプチドに対して修飾を直接おこなうことができる。修飾はポリペプチドのアミノ酸配列のすべてまたは一部分を含む融合タンパク質も含む。当業者は、タンパク質高次構造に対するタンパク質配列変化の効果を予測するための方法に精通することで、公知の方法にもとづいて改変体ポリペプチドを「設計（design）」することができる。そのような方法の一例がDahiyatおよびMayo, Science 278:82-87, 1997に記載されており、それによってタンパク質を新たに（de novo）設計することができる。この方法を、公知のタンパク質に適用してポリペプチド配列の一部のみを変えることができる。DahiyatおよびMayoの計算方法を適用することで、前述のポリペプチドのいずれかの特定改変体を提案し、かつ試験することで、該改変体が所望の高次構造を保持するかどうかを判断する。

10

【0069】

改変体として、その生理学的な活性に無関係なポリペプチドの特徴を特異的に変えるために修飾されたポリペプチドを挙げることができる。例えば、システイン残基を置換または欠失して望ましくないジスルフィド結合を防ぐ。同様に、特定のアミノ酸を変えて、発現系でのプロテアーゼによるタンパク質分解を排除することでポリペプチドの発現を強化することができる（例えば、KEX2プロテアーゼ活性が存在する酵母発現系での二塩基アミノ酸残基）。

20

【0070】

ポリペプチドをコードする核酸の突然変異は、そのコード配列のアミノ酸リーディングフレームを保つことが好ましく、変異体ポリペプチドの発現に対して有害である二次構造（例えばヘアピンまたはループ）をハイブリダイズして形成しようとする核酸内の領域を作らないことが好ましい。

【0071】

突然変異は、アミノ酸置換を選択することによって、またはポリペプチドをコードする核酸内の選択された部位のランダム変異導入法によって、作ることができる。次に、変異体ポリペプチドを発現させて、どの突然変異が所望の特性を持つ変異体ポリペプチドを与えるかを決定するために1つ以上の活性について調べる。さらに、ポリペプチドアミノ酸配列に関してはサイレントではあるが、特定の宿主内の翻訳のための好ましいコドンを提供する変異体（または非変異体ポリペプチド）に対して、突然変異がおこなわれる。大腸菌（*Escherichia coli*）等の核酸の翻訳にとって好ましいコドンは、当業者にとっては周知である。さらに別の突然変異を遺伝子またはcDNAクローンの非コード配列に対しておこない、ポリペプチドの発現を強化することができる。

30

【0072】

当業者は、前述のポリペプチドの機能的に等価な改変体（すなわち、各ポリペプチドの機能的能力を保持する改変体）を提供するために、前述のポリペプチドのいずれかにおいて保存的アミノ酸置換がなされ得ることを認識している。本明細書中で使用する場合、「保存的アミノ酸置換」は、そのポリペプチドの三次構造および／または活性を有意に変更しないアミノ酸置換をいう。改変体は、当業者に知られているポリペプチド配列を変える方法によって調製することができる、そのような方法をコンパイルする参考文献に見いだされるものを含むことができる（例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, ら編, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989、またはCurrent Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel, ら, ed

40

50

s., John Wiley & Sons, Inc., New York)。アミノ酸の保存的置換は、a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; および (g) E, D からなる群の範囲内のアミノ酸間でおこなわれる置換を含む。

【0073】

概して各々のポリペプチドの機能的に等価な改変体（すなわち、天然の（「野生型の」）ポリペプチドの機能を保持する、ポリペプチドの改変体）を発生するポリペプチドのアミノ酸配列での保存的アミノ酸置換は、本発明によって企図されている。各ポリペプチドの機能的に等価な改変体を生成するためのポリペプチドのアミノ酸配列における保存的アミノ酸置換は、ポリペプチドをコードしている核酸の変性によってなされる。そのような置換は、当業者に知られている種々の方法によって行うことができる。例えば、アミノ酸置換を、PCR 定向突然変異、Kunkel の方法（Kunkel, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 82: 488-492, 1985）による部位特異的突然変異誘発によって、またはポリペプチドをコードする遺伝子の化学合成によって、行うことが可能である。ポリペプチドの機能的に等価なフラグメントの活性は、変性ポリペプチドをコードする遺伝子を細菌またはほ乳類の発現ベクターにクローニングし、該ベクターを適当な宿主細胞に導入し、変性ポリペプチドを発現させ、さらに本明細書に記載したようにポリペプチドの機能的な能力を試験することによって、試験することができる。

【0074】

本明細書に記載されているように、本発明は多くの用途を持ち、そのいくつかが本明細書の他の場所に記載されている。第一に、本発明はポリペプチドの単離を可能とする。単離分子を得るために、当業者に周知の種々の方法論を利用することができる。ポリペプチドは、クロマトグラフィ手段または免疫認識によって、自然にポリペプチドを生成する細胞から精製することが可能である。あるいは発現ベクターを細胞に導入して、上記ポリペプチドを産生させてもよい。別の方法では、mRNA 転写産物を細胞にマイクロインジェクションするか、さもなければ細胞に導入して、コードされたポリペプチドを生成させる。網状赤血球溶菌液系のような無細胞抽出物でも mRNA の翻訳を用いてポリペプチドの生成をおこなうことも可能である。また、ポリペプチドの単離についての公知の方法を当業者は容易にフォローすることもできる。これらは、限定されるものではないが、免疫クロマトグラフィー、HPLC、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフ法、および免疫親和性クロマトグラフィーが挙げられる。

【0075】

本発明は、特定の実施形態で、ポリペプチドに由来する「優性ネガティブ (dominant negative)」ポリペプチドも提供する。優性ネガティブポリペプチドは、タンパク質の不活性変異体であり、細胞機構 (cellular machinery) との相互作用に由来する活性タンパク質を置換、または該活性タンパク質と競合することで、活性タンパク質の効果を減少させる。例えば、リガンドを結合するが、リガンドの結合に反応してシグナルを送らない優性ネガティブレセプタは、リガンド発現の生物学的効果を減らすことができる。同様に、通常標的タンパク質と相互作用するが、標的タンパク質をリン酸化しない優性ネガティブ触媒不活性キナーゼは、細胞のシグナルに反応して標的タンパク質のリン酸エステル化を減らすことができる。同様に、遺伝子の調節領域プロモーター部位と結合するが、遺伝子転写を増加させない優性ネガティブ転写因子は、転写を増加させることなくプロモーター結合部位を占めることによって通常の転写因子の効果を減らすことができる。

【0076】

細胞内で優性ネガティブポリペプチドが発現することで、活性タンパク質の機能減少がもたらされる。当業者は、タンパク質の優性ネガティブ変異体の可能性 (ポテンシャル) を評価することができ、優性ネガティブ変異体ポリペプチドを1種類以上作り出すために、標準の突然変異誘発技術を用いることができる。例えば、米国特許第 5, 580, 723 号および Sambrook ら, Molecular Cloning: A Labor

atory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照せよ。つぎに、当業者は、選択された活性の減少および／またはそのような活性の保持について、突然変異を誘発したポリペプチドの集団を試験することができる。タンパク質の優性ネガティブ変異体を生成および試験するための他の類似の方法は当業者にとっては明らかである。

【0077】

本発明のcDNAの単離はまた、前述のcDNAのいずれかの異常発現によって特徴づけられる疾患を専門家が診断することを可能にする。これらの方法は、同定された核酸の各々、およびまたはそれに由来するポリペプチドの発現を決定することを含む。先の状況では、そのような決定は任意の標準的核酸決定アッセイを介して実施することができ、そのようなアッセイとして、ポリメラーゼ鎖反応、または以下に説明するように標識ハイブリダイゼーションプローブによるアッセイが挙げられる。後の状況では、そのような決定は、例えば、分泌されたタンパク質と結合する抗体を使用する任意の標準的免疫学的アッセイを介して実施することができる。

【0078】

本発明はまた、単離ペプチド結合剤も含むもので、例えば、該結合剤は本発明のポリペプチドのいずれか（例えば配列番号2または4）を持つ抗体または抗体フラグメント（「結合ポリペプチド」(binding polypeptides)）である。抗体として、従来の方法論にもとづいて調製されるポリクローン抗体およびモノクローン抗体が含まれる。

【0079】

注目すべきことは、当業者に周知のように、抗体分子の小さな部分（パルトープ）のみがエピトープに対する抗体の結合に関わっていることである（一般に、Clark, W. R. (1986) The Experimental Foundations of Modern Immunology Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 7th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford)を参照せよ)。例えばpFc'およびFc領域は、相補体カスケードのエフェクターであるけれども、抗体結合には関わらない。pFc'が酵素的に開裂されるか、もしくはpFc'領域なしで産生される抗体(F(ab')₂フラグメントと呼ぶ)は、インタクトな抗体の抗原結合部位の両方を保持する。同様に、Fcが酵素的に開裂されるか、もしくはFc領域なしで産生される抗体(Fabフラグメントと呼ぶ)は、インタクトな抗体の抗原結合部位の一方を保持する。さらに進めて、Fabフラグメントは、共有結合した抗体軽鎖とFdで示す抗体重鎖の一部とからなる。Fdフラグメントは、抗体特異性の主要な決定因子（単一Fdフラグメントが抗体の特異性を変えることなしに最大で10個の異なる軽鎖と結合している可能性がある）であり、またFdフラグメントは分離した状態でエピトープ結合能を保持する。

【0080】

当業者に周知のように、抗体の抗原結合部位の範囲内で、相補性決定領域(CDR)が存在する。この領域は、抗原とフレームワーク領域(FR)のエピトープとが直接相互作用し、パルトープの三次構造を維持する（一般にClark, 1986; Roitt, 1991を参照せよ）。IgG免疫グロブリンの重鎖Fdフラグメントおよび軽鎖の両方で、4つのフレームワーク領域(FR1ないしFR4)が、3つの相補性決定領域(CDR1ないしCDR3)によってそれぞれ分離される。CDR、特にCDR3領域、より具体的には重鎖CDR4が、抗体特異性に大きく関わっている。

【0081】

ほ乳類の抗体の非CDR領域が同種または異種抗体の同様の領域と置き換えることが可能であり、その一方でその抗体のエピトープ特異性が保持されることは、当該技術分野で現在十分に確立されている。これは、「ヒト化(humanized)」抗体の開発および使用で最も明らかに現されており、該ヒト化抗体では非ヒトCDRがヒトFRおよび

／または F c / p F c ' と共有結合することで、機能的抗体を産生する。例えば、例えば、米国特許第 4, 816, 567 号、第 5, 225, 539 号、第 5, 585, 089 号、第 5, 693, 762、および第 5, 859, 205 号を参照せよ。したがって、例えば、PCT 国際公開番号 WO 92 / 04381 は、ネズミ F R 領域の少なくとも一部分がヒト起源の F R 領域によって置き換えられたネズミのヒト化 R S V 抗体の生産および使用を教示している。そのような抗体として、抗原結合能を持つインタクトな抗体のフラグメントが挙げられ、該抗体はしばしば「キメラ (chimeric)」抗体と呼ばれる。

【0082】

このように、当業者に明らかなように、本発明は F (a b ')₂、F a b、F v および F d フラグメント；F R および／または C D R 1 および／または C D R 2 および／または軽鎖 C D R 3 領域が相同ヒトまたは非ヒト配列によって置換されているキメラ抗体；F R および／または C D R 1 および／または C D R 2 および／または軽鎖 C D R 3 領域が相同ヒトまたは非ヒト配列によって置換されているキメラ F (a b ')₂ フラグメント抗体；F R および／または C D R 1 および／または C D R 2 および／または軽鎖 C D R 3 領域が相同ヒトまたは非ヒト配列によって置換されているキメラ F a b フラグメント抗体；F R および／または C D R 1 および／または C D R 2 および／または軽鎖 C D R 3 領域が相同ヒトまたは非ヒト配列によって置換されているキメラ F d フラグメント抗体も提供する。本発明は、いわゆる単一鎖抗体も含む。

【0083】

このように、本発明は、本発明のポリペプチド（例えば、配列番号 2 または 4、もしくはその細胞外部位）と特異的に結合する多数のサイズおよび種類からなるポリペプチドと、該ポリペプチドとその結合相手との両方からなる複合体とを含む。これらのポリペプチドは、抗体技術以外のソースに由来するものであってもよい提示ライブラリーまたはファージ提示ライブラリーのように、溶液状、固定した形態で、容易に調製することができる変性ペプチドライブラリーによって、提供することができる。コンビナトリアルライブラリーもまた、1 つ以上のアミノ酸を含むペプチドから合成したものとすることができる。さらに、ライブラリーは、ペプチドおよび非ペプチド合成部分から合成したものとすることができる。

【0084】

本発明はさらに、ポリペプチドまたはポリペプチドフラグメント依存細胞機能のレベルで活性である薬剤または薬剤用鉛化合物を同定する効率的な方法を提供する。特に、そのような機能は、他ポリペプチドまたはフラグメントとの相互作用を含む。通常、本発明のスクリーニング方法は、本発明のポリペプチドの活性を妨げる化合物についてアッセイすることを含むが、そのような活性を高める化合物も該スクリーニング方法を用いてアッセイすることができる。このような方法は、自動化された高スループットの化合物スクリーニングに適用可能である。標的の指標として、そのようなポリペプチドによって調節された細胞プロセス（例えば発現機械的歪み下での細胞内の過剰発現）を含む。

【0085】

候補（薬理的）薬剤に対する多種多様なアッセイが提供されている。これらのアッセイとして、インビトロタンパク質ーリガンド結合アッセイ、電気泳動度シフトアッセイ、イムノアッセイ、ならびに細胞系アッセイ（例えば、2 または 3 ハイブリッドアッセイおよび発現アッセイ）などが挙げられる。トランスフェクトした核酸は、例えばコンビナトリアルペプチドライブラリーまたは c D N A ライブラリーをコードすることができる。そのようなアッセイにとって便利な試薬は、例えば G A L 4 融合タンパク質が公知である。典型的な細胞系アッセイとして、G A L 4 D N A 結合ドメインに融合した本発明のポリペプチドをコードする核酸と、1 つ以上の G A L 4 結合部位等の遺伝子発現調節領域に作用自在に結合したレポーター遺伝子をコードする核酸とを細胞にトランスフェクションさせることを含む。レポーター融合ポリペプチドが薬剤と結合する場合、レポーター遺伝子転写の活性化が起こり、例えばレポーター遺伝子の転写を可能にする。つぎに、ポリペプチド媒介細胞機能を調整する薬剤は、レポーター遺伝子の発現の変化を通して検出される。

レポーター遺伝子の発現の変化を決定する方法は、公知である。

【0086】

上記方法で用いられるポリペプチドフラグメントは、トランスフェクトした核酸によって生産されない場合、単離ポリペプチドとしてアッセイ混合物に加えられる。ポリペプチドは、好ましくは遺伝子組み換えによって作られるが、そのようなポリペプチドは生物学的抽出物から単離することが可能である。遺伝子組み換えによって生成されたポリペプチドとして、本発明のタンパク質と別のポリペプチドとの融合を含むキメラタンパク質が挙げられる。上記の別のポリペプチドは、例えばタンパク質間結合を提供または促進することが可能なポリペプチド（例えば、G A L 4）、アッセイ条件下で本発明のポリペプチドの安定性を高めることが可能なポリペプチド、または検出可能な部位を提供することが可能なポリペプチド（例えば緑色蛍光タンパク質またはF l a g エピトープ）である。

10

【0087】

アッセイ混合物は、本発明のポリペプチドと相互に作用することができる天然の細胞内または細胞外結合標的から構成される。天然ポリペプチド結合標的を用いる一方で、アッセイで測定可能なポリペプチドフラグメントに対して、部分または類似体が結合親和性および結合活性を与える限り、該ポリペプチド結合標的の部分（例えば、ペプチドまたは核酸フラグメント）あるいは類似体（すなわち、アッセイの目的のために天然結合標的のポリペプチド結合特性を模倣した薬剤）を用いることが好ましい。

【0088】

アッセイ混合物はまた、候補薬剤を含む。一般的に、複数のアッセイ混合物は、さまざまな濃度に対して異なる応答を得るために異なる薬剤濃度に応じて調製される。一般に、これらの濃度の一つが負の対照として用いられる（すなわち、薬剤の濃度を0としたり、または薬剤の濃度をアッセイ検出限界未満とする）。候補薬剤は、一般的に有機化合物ではあるが、数多くの化学的分類を包含する。好ましくは、候補薬剤は小さな有機化合物である。すなわち、これらの化合物は、分子量が約50を上回るが約2500未満、好ましくは約1000未満、より好ましくは約500未満である。候補薬剤は、ポリペプチドおよび／または核酸による構造上の相互作用のために必要な官能基を含み、概して、少なくともアミン、カルボニル、水酸基、またはカルボキシ基、好ましくは少なくとも2つの官能基ならびにより好ましくは少なくとも3つの官能基を含む。候補薬剤は、上記官能基を1つ以上持つ環状炭素もしくはヘテロ環状構造および／または芳香族もしくは多環芳香族構造を含むことができる。また、候補薬剤は、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロール、イソプレノイド、プリン、ピリミジン、それらの誘導体または構造類似体、あるいはそれらの組み合わせである。薬剤が核酸である場合、薬剤は一般にDNAまたはRNA分子ではあるが、本明細書で定めたような修飾核酸も考察する。

20

30

【0089】

候補薬剤は、合成または天然の化合物のライブラリを含む多種多様なソースから得られる。例えば、多種多様な有機化合物および生体分子をランダムかつ直接的に合成するために、数多くの手段が利用可能であり、ランダム化オリゴヌクレオチド、合成有機組合せライブラリー、およびランダムペプチドのファージ提示ライブラリー等が含まれる。あるいは、細菌、菌類、植物、および動物抽出物のかたちとなった天然化合物のライブラリーを、従来の化学的、物理的、および生化学的手段を介して修飾することができる。さらに、既知の（薬理的）薬剤を、アシル化、アルキル化、エステル化、アミジン化等の直接またはランダムな化学的修飾に供して、薬剤の構造的類似対を生産してもよい。

40

【0090】

種々の他の試薬も、混合物に含ませることができる。それらは、例えば、塩類、緩衝液、中性タンパク質（例えば、アルブミン）、および界面活性剤等の試薬を含み、最適なタンパク質-タンパク質および／またはタンパク質-核酸結合を促進するのに使うことが可能である。そのような試薬は、反応構成要素の非特異的またはバックグラウンド相互作用を減少させるものであってもよい。アッセイの効率を改善する他の試薬、例えばプロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ抑制剤、および抗菌薬剤も用いることが可能である。

50

【0091】

前述のアッセイ材料の混合物を、候補薬が存在する場合ではあるが、本発明の選択されたポリペプチドが特異的に細胞結合標的、その一部分、もしくはその類似体に結合する条件下で、インキュベートする。構成要素添加の順番、インキュベーション温度、インキュベーション時間、および他のアッセイパラメータを容易に決定することが可能である。そのような実験法は、単にアッセイパラメータ（アッセイの基本的な組成でない）の最適化を単に含むだけである。インキュベーション温度は、概して4℃ないし40℃である。インキュベーション時間は、急速かつI高スループットスクリーニングを容易にするために望ましくは最小化されており、概して0.1ないし10時間である。

【0092】

インキュベーションの後、ポリペプチドと一つ以上の結合標的との間の特異的結合の有無は、ユーザが利用できる便利な方法のいずれによっても検出される。無細胞結合型アッセイでは、分離工程をしばしば用いて、結合構成要素を未結合構成要素から分離する。分離工程を、種々の方法で達成することが可能である。都合の良いことに、構成要素のうちの少なくとも1つは固体基板上で固定され、そこから未結合構成要素は容易に分離可能である。固体基板を多種多様な材料かつ多種多様な形状（例えば、マイクロタイターのプレート、マイクロボード、計量棒、および樹脂粒子）で作ることができる。好ましくは、シグナル対ノイズ比を最大にするために基板を選択し、主にバックグラウンド結合を最小限にするとともに、分離を容易にし、かつコストを軽減する。

【0093】

分離は、例えば、容器からビーズまたは計量棒を取り除き、マイクロタイタープレート等の容器を空に、もしくは希釈し、ビーズ、粒子、クロマトグラフィカラム、もしくはフィルターを洗浄溶液または溶媒ですすぐことによって、おこなうことが可能である。分離工程は、好ましくはすすぎまたは洗浄を複数回行うことを含む。例えば、固体基板がマイクロタイタープレートである場合、ウェルを洗浄液で数回洗ってもよい。この際、洗浄液は概して、塩類、緩衝液、界面活性剤、非特異的タンパク質等、特異的結合に加わらないインキュベーション混合物の構成要素を含む。固体基板が磁気ビーズである場合、ビーズを1回以上、洗浄液で洗浄し、磁気を用いて単離する。

【0094】

検出は、2-または3-ハイブリッドスクリーニング等の細胞系アッセイにとって便利な方法でおこなってもよい。標的分子に相互作用するポリペプチドのレポーター遺伝子転写アッセイから得た転写産物は、概ね直接的または間接的に検出可能な産物（例えばβガラクトシダーゼ活性またはルシフェラーゼ活性）をコードする。無細胞結合アッセイにとって、構成要素の1つは、通常、検出可能な標識を含むか、もしくはそれに結合している。種々の標識を用いることができ、例えば直接的な検出（例えば、放射活性、ルミネッセンス、光学密度、または電子密度）、あるいは間接的な検出（例えば、FLAG等のエピトプタグ、西洋わさびペルオキシダーゼ等の酵素タグ）を付与する標識である。標識は、ポリペプチドの結合相手に結合、または該結合相手の構造中に取り込まれることが可能である。

【0095】

標識を検出するために、標識の性質および他のアッセイ構成要素の性質に応じて、種々の方法を用いることができる。例えば、標識は固体基板に結合した状態で、または該固体基板から分離した後に検出してもよい。標識は、光学密度もしくは電子密度、放射線放射、または非放射性エネルギー移動等を介して直接結合することが可能であり、あるいは抗体複合体、ストレプトアビジン-ビオチン複合体等によって間接的に検出することも可能である。標識の検出方法は当業者に周知である。

【0096】

本発明は、ポリペプチド特異的結合剤、そのような結合剤を同定かつ製造する方法、および診断、治療、もしくは医薬開発でのそれらの用途を提供する。例えば、ポリペプチド特異的薬物は、種々の診断および治療への応用、特に疾患または疾患予後が変性ポリペ

10

20

30

40

50

チドに関連しているような診断および治療への応用に有用である。新規のポリペプチド特異的結合剤として、ポリペプチドに特有の抗体（細胞表面レセプター）、ならびに2ハイブリッドスクリーニング等のアッセイによって同定された他の天然細胞内および細胞外結合剤、ならびに化学ライブラリー等のスクリーニングで同定された非天然細胞内および細胞外結合剤が挙げられる。

【0097】

一般に、特定の分子と結合しているポリペプチドの特異性は、結合平衡定数によって測定される。好ましくはポリペプチドを選択的に結合することができる標的は、少なくとも約より望ましくは少なくとも約 10^7 M^{-1} 、より好ましくは少なくとも 10^8 M^{-1} 、最も好ましくは少なくとも約 10^9 M^{-1} の結合平衡定数を持つ。多種多様な細胞系アッセイおよび無細胞アッセイは、ポリペプチド特異的結合を示すために用いてもよい。細胞系アッセイとして、1、2、および3ハイブリッドスクリーニングが挙げられ、該アッセイではポリペプチド転写の阻害または増大等が生ずる。無細胞アッセイとして、タンパク質結合アッセイ、イムノアッセイ等が挙げられる。本発明のポリペプチドに結合する薬剤のスクリーニングに有用な他のアッセイとして、蛍光共振エネルギー移動（FRET）および電気泳動度シフト分析（EMSA）が挙げられる。

【0098】

本発明のさらに別の態様によれば、核酸分子の異常発現、その発現産物、またはその発現産物のフラグメントによって特徴づけられる疾患を診断する方法が提供される。この方法は、被験体から単離した生体試料を、上記核酸分子、その発現産物、またはその発現産物のフラグメントに特異的に結合する薬剤と接触させ、薬剤と核酸分子または発現産物との間の相互作用を疾患の決定として決定し、上記核酸分子は、IL1RL-1核酸（配列番号1）である。いくつかの実施形態では、上記疾患は、心筋梗塞、卒中、動脈硬化、および心不全からなる群から選択された心血管症状である。一実施形態では、疾患は心臓肥大である。別の実施形態では、疾患は心筋梗塞である。一実施形態では、疾患は心不全である。

【0099】

分子が核酸分子である場合には、そのような決定を任意の標準核酸決定アッセイを介して実施することができ、該アッセイとして、ポリメラーゼ連鎖反応、または本明細書で例示したような標識ハイブリダイゼーションプローブによるアッセイが挙げられる。分子が核酸分子の発現産物または核酸分子の発現産物のフラグメントの場合、そのような決定を、例えば、任意のポリペプチド発現産物に結合する抗体を用いて、任意の免疫学的アッセイを介して実施することができる。

【0100】

「異常発現（aberrant expression）」は、対照（すなわち、健康または「正常（normal）」の被験体で同一分子の発現）と比較した場合の前述IL1RL-1分子（すなわち、核酸および／またはポリペプチド）のいずれかの発現減少（過少発現）または発現増加（過剰発現）をいう。本明細書で用いられるように、「健康な被験体（healthy subject）」とは、将来、心血管症状（先の議論およびHarrison's Principles of Experimental Medicine, 13th Edition, McGraw-Hill, Inc., N.Y.（以下、「ハリソン（Harrison's）」とする）を参照せよ）を発症する危険性がない被験体をいう。健康な被験体も、そのほかの点では疾患の症状を示さない。言い換えれば、そのような被験体は、医学専門家が検査すれば、健康であり、かつ心血管疾患の症状または心血管疾患を呈する危険がないと特徴づけられる。

【0101】

疾患が心肥大、心筋梗塞、卒中、動脈硬化、および心不全からなる群から選択される心血管症状である場合、対照（例えば、健康な被験体）と比較した場合の上記分子のいずれかの発現減少は、疾患の存在を示すか、もしくは将来、そのような疾患を発症する危険性を示す。

10

20

30

40

50

【0102】

本発明は、本発明の核酸または本発明の発現産物のレベルを測定するのに用いることが可能な新規キットも提供する。

【0103】

一実施形態では、キットは、単離された I L 1 R L - 1 核酸またはその発現産物に選択的に結合する薬剤と、前述の単離された核酸またはその発現産物のいずれかと上記薬剤との結合の測定値を比較するための対照とを含むパッケージングを有する。キットは、一般に、以下の主要な要素から構成される。すなわち、パッケージング、本発明の薬剤、対照薬剤、および取扱説明書である。パッケージングは、本発明の薬剤が入った 1 本のバイアル（または多数のバイアル）、対照薬剤を含む 1 本のバイアル（または多数のバイアル）、および取扱説明書を保持する箱状構造のものであってもよい。当業者は、容易にパッケージングを変更して個々のニーズに応えることができる。いくつかの実施形態では、対照は測定値と比較するための所定の値である。特定の実施形態では、対照は前述の単離された核酸のいずれかの発現産物のエピトープを含む。

【0104】

核酸検出の場合、本発明の核酸分子を増幅させるためのプライマーの対を含むことができる。好ましいキットは、既知量の核酸プローブ、エピトープ（I L 1 R L - 1 発現産物等）または抗エピトープ抗体、さらに取扱説明書もしくは他の印刷物を含む。特定の実施形態では、印刷物はアッセイの結果にもとづいて心血管症状の発症の危険性を特徴づけることができる。試薬を所定量、容器に梱包し得、そして／あるいはウェルにコートしてもよい。さらに、キットは標識免疫試薬（例えば、標識抗 I g G 抗体）等の標準材料等を含むものであってもよい。一つのキットは、本発明の前述タンパク質のいずれかをコートしたポリスチレン製マイクロタイタープレートと、標識抗ヒト I g G 抗体を含む容器とがパッケージングされたものである。プレートのウェルを例えば生物学的流体と接触させ、洗浄し、その後、抗 I g G 抗体と接触させる。その後、標識を検出する。本発明の特徴を具体化し、かつ参照符号 11 で概略示されたキットを、図 7 に図示する。キット 11 は、以下の主要な要素から構成される。すなわち、パッケージング 15、本発明の薬剤 17、対照薬剤 19、および取扱説明書 21 である。パッケージング 15 は、本発明の薬剤 17 が入った 1 本のバイアル（または多数のバイアル）、対照薬剤 19 を含む 1 本のバイアル（または多数のバイアル）、および取扱説明書 21 を保持する箱状構造のものであってもよい。当業者は、容易にパッケージング 15 に変更を加えて個々のニーズに応えることができる。

【0105】

好ましい実施形態では、本発明は新規キットまたはアッセイを提供する。これらは、本発明にもとづいて選択された所定の値に対して、特異的であり、かつ適当な感度を持つ。したがって、好ましいキットは、例えば、異なるカットオフ、特定のカットオフで異なる感度、さらにアッセイの結果にもとづいて危険度の特徴づけるための取扱説明書もしくは他の印刷物を含むことによって、現在市販されているのとは異なる。

【0106】

本発明は、被験体が心血管症状の危険度を減らすために薬剤による治療から利益を得る可能性を評価する方法も含む。いくつかの実施形態では、薬剤は抗炎症薬剤、抗血栓症薬剤、抗血小板薬剤、線維素溶解薬剤、脂質還元薬剤、直接トロンビンインヒビター、糖蛋白 I I b / I I I a レセプターインヒビター、細胞接着分子に結合して白血球がそのような分子に結合する能力を阻害する薬剤、カルシウムチャンネルブロッカー、βアドレナリン作動性レセプターブロッカー、サイクロオキシゲナーゼ 2 インヒビター、およびアンギオテンシン系インヒビターからなる群から選択される薬剤である。上記方法は、被験体内の I L 1 R L - 1 分子レベルを得て、心血管症状の診断に特異的な所定の値と I L 1 R L - 1 分子レベルを比較することを含む。所定値に対する比較での I L 1 R L - 1 分子レベルは、被検者が前記作用剤での治療から利益を得るかどうかを表す。特定の実施形態で、心血管症状の診断に特異的な所定の値は複数の所定マーカーレベル範囲であり、前記比

較の工程は上記被験体レベルが上記所定マーカーレベル範囲のいずれで減少するかを決定することを含む。上記心血管症状は、心肥大、心筋梗塞、卒中、動脈硬化、および心不全からなる群から選択される症状であり得る。

【0107】

所定の値は、種々の形状をなすことができる。それは、単一カットオフ値（例えば中央値または平均）をとることができる。それを、比較群（例えば1つの特定の群での危険度がもう一つの特定の群での危険度の倍である）にもとづいて確立することができる。それは、例えば、試験集団が等しく（または不均等に）複数の群に分かれ、例えば、低危険度群、中程度危険度群、および高危険度群、または4分円（quadrants）にして、最も危険度の低い被験体である最低4分円（lowest quadrant）および最も危険度の高い被験体である最高4分円（highest quadrant）という範囲とすることができる。

10

【0108】

所定の値は、選択される特定の集団に依存することができる。例えば、明らかに健康な集団（検出可能な疾患無しおよび心血管疾患の既往歴無し）は、喫煙集団または心血管疾患を以前に罹患したメンバーからなる集団とは異なる、全身性炎症のマーカーの「正常（normal）」範囲を持つ。したがって、選択される所定の値は、被検者が該当するカテゴリーを考慮に入れ得る。適当な範囲およびカテゴリーは、当業者によって、慣用的にすぎない実験法で選択できるものである。

【0109】

上記のように、本発明は、被験体が将来の心血管疾患の危険度を減らすために薬剤による治療から利益を得る可能性を評価する方法を提供する。この方法は、患者の治療のために、さらに新規治療法の臨床開発のために重要な関連を持っている。内科医は、患者に予想される正味の利益にもとづいて、患者の治療のために、最適治療計画を選択する。正味の利益は、危険度と利益との比に由来する。本発明は、介入により利益をいっそう得そうである被験体の選択を可能とし、それによって内科医が最適治療計画を選択するのを助ける。このことは、予想される利益の可能性が増加したより高い危険度プロフィールの薬物を使用することを含むかもしれない。同様に、臨床医学研究者は正味の利益を得る高い可能性を持つ集団を臨床試験のために選択することを望む。本発明は、臨床医学研究者がそのような被験体を選択するのを助けることができる。臨床医学研究者が現在臨床試験の入力基準を決定するために本発明を使用すると予想される。

20

30

【0110】

本発明は、心血管症状を治療する方法も含む。いくつかの実施形態で、この方法はそのような治療を必要とする被験体に対して心血管症状を治療するのに有効な量のIL1RL-1分子を投与することを含む。特定の実施形態で、上記方法は、そのような治療を必要とする被験体に対して、前述のIL1RL-1分子のいずれかの発現を調節する薬剤を投与することを含む。「発現を調節する薬剤（agent that modulates expression）」としては、上記心血管症状の治療に有効な量の本明細書に記載したIL1RL-1分子のいずれか、それらの分子の発現を増加させる薬剤、同様に前述のIL1RL-1分子のいずれかの発現を減少させる薬剤が挙げられる。

40

【0111】

本明細書で用いられるように、核酸またはポリペプチドの「発現を減少させる薬剤」は公知であり、アンチセンス核酸、核酸によってコードされるポリペプチドを結合する抗体、およびそのような分子の発現を低下させる他の薬剤のことをいう。分子の発現を減少させる（および本明細書に記載されるように、その活性を減少させる）任意の薬剤が本発明にもとづいて有用である。

【0112】

特定の実施形態では、分子は、核酸（アンチセンス）である。いくつかの実施形態で、核酸は心筋細胞内で核酸分子の発現を導く遺伝子発現配列に作用自在に連結する。「遺伝子発現配列（gene expression sequence）」は、任意の調節ヌ

50

クレオチド配列（例えばプロモーター配列またはプロモーターとエンハンサーとの組み合わせ）であり、作用自在に結合している核酸の効果的な転写および翻訳を容易にする。遺伝子発現配列は、例えば、ほ乳類またはウイルスプロモーター（例えば構成または誘導プロモーター）である可能性がある。ほ乳類の構成プロモーターとしては、限定されるものではないが、以下の遺伝子のためのプロモーターが挙げられる。すなわち、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（H P T R）、アデノシンデアミナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、 α -アクチンプロモーター、および他の構成プロモーターである。真核細胞で構成的に機能する典型的なウイルスプロモーターとして、例えば、シミアンウイルス、乳頭腫ウイルス、アデノウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（H I V）、ラウス肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、マローニー白血病ウイルス、および他のレトロウイルスの長い末端反復配列（L T R）、ならびに単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーター由来のプロモーターが挙げられる。他の構成プロモーターは、当業者に公知である。本発明の遺伝子発現配列として有効なプロモーターはまた、誘導プロモーターを含む。誘導プロモーターは、誘導薬剤の存在下で活性化される。例えば、メタロチオネインプロモーターは、活性化されて、特定の金属イオンの存在下で転写および翻訳を増加させる。他の誘導プロモーターは、当業者に公知である。

【0113】

一般に、遺伝子発現配列は、必要に応じて、T A T Aボックス、キャップ配列、C A A T配列などの、転写および翻訳の開始にそれぞれ関与する5'非転写配列および5'非翻訳配列を含むべきである。特に、そのような5'非転写配列は作用自在に結合した核酸の転写制御のためのプロモーター配列を含むプロモーター領域を含む。遺伝子発現配列は、任意に、必要に応じてエンハンサー配列または上流アクチベーター配列を含む。

【0114】

好ましくは、本発明のI L 1 R L-1の核酸分子のいずれかが、心筋細胞および／または血管内皮細胞（平滑筋細胞を含む）等の細胞内の核酸分子発現を可能とする遺伝子発現配列に結合している。より好ましくは、上記遺伝子発現配列は、心筋細胞内の核酸分子発現を可能とする一方で、神経細胞、線維芽細胞、および造血起源の細胞からなる群から選択される細胞内の分子の発現を可能とさせない。心筋細胞内での核酸分子発現を可能とさせる配列は、そのような細胞型で選択的に活性である配列であり、それによって細胞内の核酸分子が発現する。例えば、心臓ミオシン重鎖遺伝子プロモーターを用いて、心筋細胞内で本発明の前述核酸分子のいずれかを発現させることができる。当業者は、心筋細胞内で核酸分子を発現させることが可能な代わりとなるプロモーターを容易に同定することが可能である。

【0115】

核酸配列および遺伝子発現配列は、これらが遺伝子発現配列の影響下または制御下で、核酸コード配列の転写および／または翻訳を起こすように共有結合される場合に、「作用自在に連結する」といわれる。もし核酸配列が機能タンパク質に翻訳されることが要求されると、5'遺伝子発現配列でのプロモーターの誘導が核酸配列の転写をもたらす場合、および2つのDNA配列間の結合（l i n k a g e）の性質が、（1）フレームシフト突然変異を誘導せず、（2）核酸配列の転写を導くプロモーター領域の能力を妨げず、および／または（3）タンパク質に翻訳される対応RNA転写産物の能力を妨げることがない場合、2つのDNA配列が作用自在に結合するといわれる。したがって、このように、遺伝子発現配列は、遺伝子発現配列がその核酸配列の転写を生じることができる場合、核酸配列に作用自在に結合しており、結果として生じる転写産物が所望のタンパク質またはポリペプチドに翻訳される可能性がある。

【0116】

本発明の分子は、単独またはベクターに結合して、本発明の好ましい細胞型へ送達され得る。最も広い意味で、「ベクター（v e c t o r）」は、（1）分子を標的細胞へ送達すること、および／または（2）標的細胞によって分子を取り込むことを、促進させる能力のある任意のビヒクルである。好ましくは、ベクターは分子を標的細胞に輸送する。こ

の際、ベクターが不在の場合に生ずる分解の程度と比較して分解が減少する。任意に、「標的化リガンド (targeting ligand)」は、ベクターに結合して選択的にベクターを細胞へ送達し得るもので、該細胞は標的化リガンドの同種レセプターをその表面に発現する。このように、ベクター (核酸またはタンパク質を含む) を、例えば、心筋層の心筋細胞に選択的に送達することができる。標的化のための方法論としては、複合体 (conjugate)、例えば Priest の米国特許第 5, 391, 723 号に記載されたものが含まれる。周知の標的化ビヒクルの別の例は、リボソームである。リボソームは、Gibco BRL (Life Technologies Inc., Rockville, Md.) から市販されている。標的化リボソームを作るための多くの方法が公開されている。好ましくは、本発明の分子は、心筋細胞および／または血管内皮細胞への送達のために標的化される。

10

【0117】

一般に、本発明で有用なベクターとして、限定されるものではないが、本発明の核酸配列および本発明の核酸配列に結合しうる追加の核酸フラグメント (例えば、エンハンサーおよびプロモーター) を挿入または取り込ませることによって操作されたプラスミド、ファージミド、ウイルス、ウイルスもしくはバクテリア由来のビヒクルが挙げられる。ウイルスベクターは、ベクターの好ましい型であり、限定されるものではないが、以下のウイルス由来の核酸配列が挙げられる。すなわち、アデノウイルス；アデノ随伴ウイルス；レトロウイルス (例えばマローニーマウス白血病ウイルス)；ハービーマウス肉腫ウイルス；マウス乳癌ウイルス；ラウス肉腫ウイルス；SV40-型ウイルス；ポリオーマウイルス；エプスタインバーウイルス；乳頭腫ウイルス；ヘルペスウイルス；ワクシニアウイルス；ポリオウイルス；およびレトロウイルスのような RNA ウイルスが挙げられる。当業者は名付けられてはいないが当該分野で公知である他のベクターを容易に用いることができる。

20

【0118】

特定の用途にとって特に好ましいウイルスは、アデノ随伴ウイルス (二本鎖 DNA ウイルス) である。アデノ随伴ウイルスは、広範囲にわたる細胞型および種に感染することが可能であり、遺伝子操作によって複製欠損となり得、すなわち所望のタンパク質の合成を指向することが可能ではあるが、感染粒子を製造することはできない。さらに利点を有し、例えば熱および脂質溶媒安定性、造血細胞を含む多様な系統の細胞での高い形質導入頻度、およびさらに重感染阻害の欠如であり、形質導入を多重連続的 (multiple series of transductions) に起こなうことが可能となる。報告によれば、部位特異的なやり方でヒトの細胞 DNA にアデノ随伴ウイルスを組み込むことができる。それによって、挿入突然変異生成の可能性および挿入された遺伝子発現の変動性を最小化する。加えて、野生型のアデノ随伴ウイルス感染は選択圧がない状態で、100 回を超える継代組織培養の後におこない、アデノ随伴ウイルスゲノム一体化 (integration) が比較的安定したイベントであることを示唆する。アデノ随伴ウイルスは、また、染色体外の様式で機能することができる。

30

【0119】

一般に、他の好ましいウイルスベクターは、必須ではない遺伝子が、目的とする遺伝子と置き換えられた非細胞変性真核生物ウイルスにもとづいている。非細胞変性ウイルスは、レトロウイルスを含むもので、その生活環は、後に続く宿主細胞 DNA へのプロウイルス組み込みによるゲノムウイルス RNA の DNA への逆転写を含む。アデノウイルスおよびレトロウイルスは、ヒトの遺伝子療法の試験にとって好ましいものと考えられている。一般に、レトロウイルスは複製欠損 (replication-deficient) である。そのような遺伝的に改変されたレトロウイルス発現ベクターは、インビボでの高効率遺伝子形質導入に対する一般的な有用性を持っている。複製欠損レトロウイルスを生産するための標準的なプロトコル (外因性遺伝物質をプラスミドに取り込み、プラスミドによるパッケージング細胞系統のトランスフェクション、該パッケージング細胞系統による組み換え体レトロウイルスの産生、組織培養培地からのウイルス粒子回収、およびウイル

40

50

ス粒子による標的細胞への感染という工程を含む)は、Kriegler, M., 「Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual,」 W. H. Freeman C. O., New York (1990) および Murry, E. J. Ed. 「Methods in Molecular Biology,」 vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey (1991) に提供される。

【0120】

別の好ましいレトロウイルスベクターは、Nabel, E. G. ら, Science, 1990, 249: 1285-1288 で述べられるように、マローニーマウス白血病ウイルスに由来するベクターである。これらのベクターは、報告によれば中膜 (media) を含む動脈性壁の3枚の層全てに対する遺伝子の送達に効果的であった。他の好ましいベクターは、Flugelman ら, Circulation, 1992, 85: 1110-1117 に開示されている。本発明の分子を送達するのに有用な別のベクターは、Mulligan 他の特許第5,674,722号に記載されている。

【0121】

前述のベクターに加えて、本発明の分子を心筋細胞および／または血管内皮細胞等の細胞へ送達し、それによる取り込みを促進するために、他の送達方法を用いることが可能である。

【0122】

そのような本発明の好ましい送達方法は、コロイド分散系である。コロイド分散系として、水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリポソームを含む脂質をベースとした系が挙げられる。本発明の好ましいコロイド系は、リポソームである。リポソームは、インビボでまたはインビトロで送達ベクターとして有用である人工膜ベシクルである。寸法が0.2~4.0 μm である大きな単層のベシクル (LUV) は、大きな巨大分子を封入することができることが示されている。RNA、DNA、およびインタクトなビリオンを、水性の内部のなかでカプセル化することができ、生物学的に活性のある状態で、細胞に送達することができる (Fraleigh ら, Trends Biochem. Sci., 1981, 6: 77)。リポソームが効率のよい遺伝子導入ベクターであるために、以下の特徴が1つ以上なければならない。すなわち、(1) 生物活性を保持した高効率での目的の遺伝子のカプセル化、(2) 非標的細胞と比較した場合の標的細胞に対する優先的かつ実質的な結合、(3) 高効率での標的細胞の細胞質に対するベシクルの水溶性含有物の送達、および (4) 遺伝子情報の正確かつ効果的発現である。

【0123】

リポソームは、リポソームを特定のリガンド (例えば、モノクローナル抗体、糖、糖脂質、またはタンパク質) と結合して、特定の組織 (例えば、心筋層または血管の細胞壁) を標的とするものであってもよい。リポソームを血管壁に標的化させるのに有用であり得るリガンドとして、限定されるものではないが、日本血球凝集ウイルスのウイルス外殻タンパク質が挙げられる。さらに、ベクターは、核酸標的化ペプチドを結合され得、これは、宿主細胞の核に核酸を方向付ける。

【0124】

リポソームは、Gibco BRL から、例えば LIPOFECTINTM および LIPOFECTACETM として市販されており、これらはカチオン性の脂質 (例えば N-[1-(2,3-ジオレイルオキ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウム塩酸塩 (DOTMA) およびジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (DDAB)) から形成される。リポソームの製造方法は当該分野において周知であり、多くの刊行物に記載されている。また、リポソームは、Gregoriadis, G. によって、Trends in Biotechnology, V. 3, p. 235-241 (1985) に概説されている。巨大分子の細胞内送達のための新規リポソーム (核酸を含む) はまた、PCT 国際出願番号 PCT/US 96/07572 (公開番号 WO 96/40060, 発明の名称「Intracellular Delivery of Macrom

olecules」)に記載されている。

【0125】

1つの具体的な実施形態で、好ましいビヒクルは、ほ乳類のレシピエントへの移植にふさわしい生物学的適合性の微粒子または移植組織である。この方法にもとづいて有用な典型的な生分解性移植組織は、PCT国際出願番号PCT/US95/03307（公開番号WO 95/24929，発明の名称「Polymeric Gene Delivery System」，米国特許出願番号213,668号、1994年3月15日付出版願に対して優先権主張）に記載される。PCT/US95/03307は、適当なプロモーターによる制御下で、外因性遺伝子を含むための、生物学的適合性のある好ましくは生分解性の重合マトリックスを記載している。重合マトリックスは、患者において外因性遺伝子の徐放を達成するのに用いられる。本発明によれば、本明細書に記載される核酸を、PCT/US95/03307に開示された生体適合性、好ましくは生分解性の重合マトリックスにカプセル化または分散する。重合マトリックスは、好ましくはマイクロスフェア（核酸が固形の重合マトリックス全体にわたって分散）またはマイクロカプセル（核酸が重合殻のコアに保存される）のような微粒子の形態である。本発明の核酸を含有するための重合マトリックスの別の形態としては、膜、コーティング、ゲル、インプラント、およびステントが挙げられる。重合マトリックスデバイスの大きさおよび組成は、マトリックスデバイスがインプラントされる組織における好ましい放出カイネティックをもたらすように、選択される。さらに、重合マトリックスデバイスの大きさは、使用する送達方法にもとづいて選択され、一般に組織への注射、またはエアゾルによる懸濁液の鼻および／または肺領域への投与である。重合マトリックス組成は、好ましい分解率を持つように、かつ生体粘着性（生粘着性）を持つ材料により形成され、デバイスが血管の表面に投与される場合、移動の効果がさらに高まるように両方で、選択される。上記マトリックスの組成もまた、分解しないように、しかしむしろ、長時間にわたり拡散によって放出するように、選択される。

【0126】

非生分解性重合マトリックスおよび生分解性重合マトリックスはともに本発明の核酸を被験体に送達する際に用いることができる。生分解性マトリックスが好ましい。そのようなポリマーは天然ポリマーであっても合成ポリマーであってもよい。合成ポリマーが好ましい。ポリマーは放出が必要とされる時間（通常は数時間から1年以上のオーダー）にもとづいて選択される。一般に、数時間から3～12ヶ月間に至る範囲の期間にわたって放出されることが最も望ましい。ポリマーは、任意に、その重量の約90%までの水を吸収することができ、さらに任意に、多価イオンまたは他のポリマーと架橋形成するヒドロゲルの形となっている。

【0127】

一般に、本発明の核酸は、拡散によって、より好ましくは重合マトリックスの分解によって、生分解性インプラントを用いて送達される。生分解性送達系の形成に用いることができる典型的な合成ポリマーとして、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルケン、ポリアルキレングリコール、ポリアルキレン酸化物、ポリアルキレン テトラフタレート、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハロゲン化物、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタン、およびそのコポリマー、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、アクリル酸エステルまたはメタクリル酸エステルのポリマー、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、セルロースアセテート、セルロースプロピオネート、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートフタレート、カルボキシアルキルセルロース、セルローストリアセテート、セルローススルフェートナトリウム塩、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（エチルメタクリレート）、ポリ（ブチルメタクリレート）、ポリ（イソブチルメタクリレート）、ポリ（ヘキシルメタクリレート）、ポリ（イソデシルメタクリレート）、ポリ（ラウリルメタクリレート）、

ポリ（フェニルメタクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）、ポリ（オクタデシルアクリレート）、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（エチレンオキシド）、ポリ（エチレンテレフタレート）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリビニルアセテート、ポリビニルクロリド、ポリスチレン、およびポリビニルピロリドンが挙げられる。

【0128】

非生分解性ポリマーの例として、エチレンビニルアセテート、ポリ（メタ）アクリル酸、ポリアミド、コポリマー、およびそれらの混合物が挙げられる。

【0129】

生分解性ポリマーの例として、乳酸およびグリコール酸のポリマー、ポリ無水物、ポリ（オルト）エステル、ポリウレタン、ポリ（ブチル酸（butyric acid））、ポリ（吉草酸）、およびポリ（ラクチドコカプロラクトン）、ならびにアルギン酸塩およびデキストランおよびセルロースを含む他のポリサッカリドなどの天然ポリマー、コラーゲン、それらの化学的誘導体（置換、化学基の付加、例えば、アルキル、アルキレン、水酸化、酸化、ならびに当業者によって慣用的に作られた他の修飾）、アルブミンおよび他の親水性タンパク質、ゼインおよび他プロラミンおよび疎水性タンパク質、コポリマー、およびそれらの混合物が挙げられる。一般に、これらの材料は、表面またはバルクの浸食によって、酵素的加水分解またはインビボで水にさらすことで、分解する。

【0130】

特に目的とする生粘着性ポリマーとして、H. S. Sawhney, C. P. Pathak および J. A. Hubbell in *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587 に記載された生分解性ヒドロゲル（本明細書ではこの文献の教示を援用する）、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルチン、ポリ無水物、ポリアクリル酸、アルギン酸塩、キトサン、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（エチルメタクリレート）、ポリ（ブチルメタクリレート）、ポリ（イソブチルメタクリレート）、ポリ（ヘキシルメタクリレート）、ポリ（イソデシルメタクリレート）、ポリ（ラウリルメタクリレート）、ポリ（フェニルメタクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）、およびポリ（オクタデシルアクリレート）が挙げられる。したがって、本発明は、薬剤として使用するために本発明の上記分子の組成物、該薬剤を調製するための方法、ならびにインビボでの薬剤の徐放のための方法を提供する。

【0131】

圧縮薬剤も、本発明のベクターと組み合わせて使うことができる。本明細書で用いられるように「圧縮薬剤（compact ion agent）」は、核酸の負電荷の効力を消して、核酸を細顆粒にすることを可能とする核酸の圧縮ができるようにする薬剤（例えばヒストン）のことをいう。核酸の圧縮は、標的細胞による核酸の取り込みを容易にする。圧縮薬剤は、例えば、細胞によってより効率的に取り込まれる形態で本発明の単離された核酸を送達するために単独で使用されるか、またはより好ましくは、上記ベクターの1つ以上とともに使用され得る。

【0132】

本発明の核酸の標的細胞による取り込みを促進するために用いることができる他の典型的な組成物として、リン酸カルシウムおよび他の細胞内輸送の化学伝達物質、マイクロインジェクション組成物、エレクトロポレーション、および相同組み換え組成物（例えば、核酸を標的の細胞の染色体の予め選択された位置に入れる）が挙げられる。

【0133】

本発明にもとづく細胞内への分子の「取り込みを促進（facilitate uptake）」は、分子の性質に応じて、以下のような意味がある。単離核酸について、細胞膜を介し、かつ細胞核の中に核酸を入れることを記載することを意味しており、「核酸トランスジーン（transgene）」は、細胞機構を利用して核酸によってコードされた機能ポリペプチドを生産する。「核酸トランスジーン」は、関連ベクターの有無にかか

わらず本発明の核酸の全てを記載することを意味している。ポリペプチドについて、該ポリペプチドが細胞膜を介し、かつ細胞質に入り込み、必要に応じて、細胞質機構を利用することでポリペプチドの機能的改変がおこなえる（例えば、活性な形態へ）ことが記載されることを意味している。

【0134】

核酸が宿主細胞にインビトロまたはインビボで導入されるか否かに依存して、細胞に本発明の核酸を導入するために種々の技術を用いることが可能である。そのような技術として、核酸-CaPO₄沈降物、DEAEに関連した核酸のトランスフェクション、目的とする核酸を含むレトロウイルスによるトランスフェクション、リボソーム媒介トランスフェクションなどが挙げられる。特定の用途のために、特定の細胞に核酸を標的化させることが好ましい。そのような例で、本発明の核酸を細胞に送達させるために使われるビヒクル（例えば、リボソーム、レトロウイルス、または他のウイルス）がそれに結合した標的分子を有し得る。例えば、標的細胞上の表面膜タンパク質または標的細胞上のレセプターに対するリガンドに対して特異的な抗体のような分子は、核酸送達ビヒクルに結合または取り込まれ得る。例えば、リボソームが本発明の核酸を送達するために使用される場合、エンドサイトーシスに伴う表面膜タンパク質と結合するタンパク質は標的化のため、および／または取り込みを容易にするためにリボソーム剤形に組み込まれ得る。そのようなタンパク質として、特定の細胞型向性のカプシドタンパク質またはそのフラグメント、周期の際に内在化を受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在を標的として、細胞内半減期を強化するタンパク質などが挙げられる。重合送達系も、当業者に公知のように、細胞に核酸を成功裏に送達させるために使われている。そのような系は、核酸を経口投与することが可能である。

【0135】

本発明はまた、診断のための方法ならびに血管障害および心血管障害の治療法を提供する。そのような障害として、心筋梗塞、卒中、動脈硬化、心不全、および心臓肥大が挙げられる。

【0136】

本発明の方法は、前述の症状のいずれかの急性および予防的治療の両方に有用である。本明細書で用いられるように、急性の治療は、特定の症状を持つ被験体の治療をいう。予防療法は、症状を持つという危険にさらされているが、現在のところその症状の症候を有せず、あるいは経験していない被験体の治療を参照する。

【0137】

最も広義な意味で、用語「治療（treatment）」または、「治療すること（to treat）」という用語は、急性および予防的な治療の両方をいう。治療を必要とする被験体が症状を経験している（または特定の症状を有するか、持ち続けている）場合、症状を治療することは、症状に起因している症候または一つ以上の症候を改善するか、減らすか、除去することをいう。いくつかの好ましい実施形態で、症状を治療することは、症状に伴う症候の特定の症候または特定のサブセットを改善するか、減らすか、除去することをいう。治療を必要とする被験体が症状を呈することの危険にさらされている場合、被験体を治療することは症状を持っている被験体の危険度を減らすことを意味する。

【0138】

卒中（また、本明細書中で、虚血性の卒中および／または脳血管虚血と称する）は、しばしば先進国の中の第3の最も頻度が高い死因、虚血性心疾患およびガンに続くものとしていわれている。卒中は、毎年米国で約300,000人の死因となっており、病院入院と長期にわたる能力障害との主要な原因である。従って、卒中とそれに付随する社会での重荷との社会経済的影響は、実際に計れない。

【0139】

「卒中（stroke）」は、少なくとも24時間持続している症候で、脳機能の局所または全体的な障害の急速に進行している臨床徴候として、世界保健機関によって定義される。脈管の起始の効果以外の明瞭な原因がない所で、卒中はまた、死に関係する。

【0140】

卒中は、代表的に、脳にまたは脳の範囲内で血管の妨害物または閉鎖に起因する。完全閉塞で、脳循環が停止して、ニューロン電氣的活性が数秒以内に停止する。エネルギー状態とイオンホメオスターシスとの悪化の後2、3分以内で、高エネルギーリン酸塩の枯渇、膜イオンポンプ障害、細胞のカリウムの外向き流束、塩化ナトリウムおよび水の流入、ならびに膜脱分極が起こる。閉鎖が5ないし10分間持続する場合、不可逆的な損傷が起こる。しかし不完全な虚血で、治療結果を評価するのは困難であり、主に残留性パーフュージョンと酸素の利用性との依存する。脳の血管の血栓性閉塞の後、虚血がほとんど完全ではない。副行の血流量と局所パーフュージョン圧とに従い、残留性の若干のパーフュージョンは、通常虚血性の領域に残存する。

10

【0141】

脳血流量は、自己調節によって90から60 mmHgまで平均動脈圧の低下を補償することができる。この現象は、下流の抵抗性血管の拡張を含む。低レベルの自己調節（約60 mmHg）を下回ると、血管拡張は不適切となって脳血流量は減少する。しかし、脳は脳血流量の低下を補償することができるパーフュージョン予備を持っている。標準状態の下で血液によって送達される酸素の約35%だけが抽出されるので、この予備が存在する。したがって、その酸素正常状態と炭酸正常状態とが存在するならば、増加する酸素抽出を起こすことができる。遠位血圧がほぼ30 mmHg以下に落ちると、2つの代償性メカニズム（自己調節とパーフュージョン予備）は酸素輸送の障害を予防するには不十分である。

20

【0142】

血流量が23 ml / 100 g / 分の虚血性閾値未満で低下するにつれて、組織低酸素の症候が発現する。高度の虚血は、致死に至る可能性がある。虚血が中等度である場合、「境界域（penumbra）」となる。神経学的前後関係では、境界域は中等度の虚血とニューロン機能の麻痺とを持つ脳組織の領域を示し、十分なパーフュージョンが回復することで可逆的である。境界域は、梗塞が発現した高度の虚血の中核を囲んでいる付随的に注がれた組織の領域を形成する。換言すれば、境界域が保存可能であることから、本質的に生死の間の状態にある組織域である。

【0143】

虚血性のイベントが脈管系の中のどこにでも起こりうるが、内頸動脈の起点と頸動脈分岐とは脳血管の血栓性閉塞が最も頻繁に生ずる場所であり、脳虚血をもたらす。狭窄または血栓症のための減った血流量の症候は、中大脳動脈疾患に起因するものと類似している。眼動脈を通る血流が、一過性黒内障または一時的な一眼失明を発生するほど十分な影響をしばしば受ける。高度の両側性内の頸動脈狭窄は、脳の半球状の低灌流を生ずる可能性がある。これは、急性虚血性の半球に同側急性の頭痛を伴って現れる。閉鎖または血流量の減少によって、前交通動脈に遠位の1つの前大脳動脈の虚血が生ずる結果、対側下肢において運動性および皮質知覚の症候が発生するが、近位の腕ではまれである。閉鎖の他の現れまたは前大脳動脈のパフュージョン不足（underperfusion）は、傍矢状前頭葉傷害に起因する歩行運動失調と時々尿失禁を含む。減少した自発語として現れる言語障害は、精神運動活性の全身性低下を伴い得る。

30

40

【0144】

大部分の虚血性の卒中は、中大脳動脈のテリトリーの全てまたは一部分に関係し、心臓または頭蓋外頸動脈からの塞栓により、大部分の症例が説明される。塞栓は、中大脳動脈の大通り（main stem）をふさぐ可能性があるが、よりしばしば上枝または下枝の遠心閉塞を発生する可能性がある。上枝の閉鎖は、顔および腕において最も大きい衰弱および感覚性損失を生ずる。その貫通性分岐に遠位の後大脳動脈の閉鎖は、視覚の完全な対側の損失を生ずる。読むこと（失読症）および計算すること（計算力障害）のむずかしさは、優位後大脳動脈の虚血をもたらす可能性がある。後大脳動脈の近位閉鎖はカラミック（calamitic）および辺縁構成に貫通性分岐の虚血を生じる。臨床結果は欠損の側の頭痛（視床痛）に慢性的に変化する可能性がある片側感覚障害である。

50

【0145】

卒中の被験体は、経験した症状および／または介入および非介入の診断ツール（例えばCTおよびMRIイメージング）を含む身体検査によって診断される。本発明の方法は、卒中被験体のさまざまな臨床提示の治療のために有利である。卒中の被験体は、以下の症候の一つ以上を呈する可能性がある。すなわち、麻痺、衰弱、知覚および／または視覚の減少、しびれ感、うずくこと、失語（例えば、話すことができないことまたは不明瞭言語、読込みまたは書込みが困難）、失認（すなわち感覚性刺激を認識するか、同定することができないこと）、記憶喪失、共調運動問題点、無気力、眠気または意識喪失、膀胱または腸管理の欠如、および認識低下（例えば、痴呆、限られた注意の範囲、集中することができないこと）。医学画像技術を使用して、梗塞を有する被験体または脳に出血を有する被験体のような卒中を有する被験体を同定することが可能であり得る。

10

【0146】

本発明の重要な実施形態は、虚血性卒中の異常に上がる危険度をもつ被験者の治療である。本明細書で用いられるように、虚血性の卒中の異常に上がる危険度を持っている被験体は、従来の医療（以前の議論を参照せよ）によって決定されるカテゴリーである。そのような被験体は、また、危険因子が卒中であることを知っているか、脳血管イベントの危険度増加を持ちながら従来の医療で同定され得る。例えば、このカテゴリーは、選択的な血管手術を受けている被験体を含む。代表的に、心臓病に伴う危険因子は、卒中に伴う危険因子と同じである。一次性の危険因子として、緊張亢進、コレステロール過剰血、および喫煙が挙げられる。心房細動またはその最近の心筋梗塞もまた、重要な危険因子である。加えて、本発明によれば、IL1RL-1の核酸分子またはその発現産物の改変発現量もまた、重要な危険因子である。

20

【0147】

本明細書で用いられるように、虚血性の卒中の異常に上がる危険度も持っている被験体は、塞栓の放出、血圧の低下または脳への血流量の減少の危険にさらす外科手術または診断手順（例えば頸動脈内膜摘除、脳血管撮影、血管が圧縮されるかまたは閉塞する神経外科的手順、心臓カテーテル法、血管形成（バルーン血管形成術、冠状動脈バイパス手術または同様の手順を含む））を受けている被験体を含む。虚血性の卒中の異常に上がる危険度も持っている被験体は、脳（例えば心房細動、心室頻拍、拡張型心筋症、および抗凝固療法を必要としている他の心臓症状）に、減少した血流量に至る可能性がある任意の心臓管症状でも持っている被験体を含む。虚血性の卒中の異常に上がる危険度も有する被験体としては、動脈症または脳血管炎（例えば、狼瘡、血管の先天性疾患（例えば、CADASIL症候群）、または、偏頭痛（特に長期のエピソード）によって引き起こされるもの）を含む症状を有する被験体が挙げられる。

30

【0148】

卒中の治療は、卒中を経験した患者のために、またはその治療を予防療法としておこなうことができる。短期予防療法は、手順の結果として起こる任意の虚血性のイベントに起因する外傷を減らすために、塞栓放出、血圧の低下または、脳に対する血流量の減少させる危険を有する外科的手順または診断手順を有する被験体のために必要である。より長期にわたる、または慢性的な予防療法は、脳に対する減少した血流量に至る可能性がある心臓症状または直接脳血管系に影響が及ぶ状態を有する被験体のために必要である。予防であるならば、治療は、先に述べたように、虚血性の卒中の異常に上がる危険度を持っている被験体に対しておこなう。被験体が卒中を経験した場合、治療は急性の治療を含むことができる。卒中被験体の急性の治療は、症状の症候発現または開始48時間以内、好ましくは24時間以内、より好ましくは12時間以内、さらに好ましくは6時間以内、より好ましくは症状の症候発現の3時間以内での本発明の薬剤投与を意味する。

40

【0149】

高コレステロール血および／または高トリグリセリド血症の被験体を定義することの基準は、周知である（例えば、「ハリソン」参照）。高コレステロール血被験体および高トリグリセリド血症被験体は、未熟な冠状心疾患の増加する発病率と関係している。高コレ

50

ステロール血被験体は、 $>160\text{ mg/dL}$ または $>130\text{ mg/dL}$ のLDL量と少なくとも2つの危険因子とを有しており、該危険因子として、男性の性、未熟な冠状心疾患の家族歴、タバコ喫煙（1日の10本より多く）、高血圧、低HDL（ $<35\text{ mg/dL}$ ）、真性糖尿病、高インスリン血症、腹の肥満、高いリポプロテイン（a）、脳血管障害または閉塞性末梢血管疾患の経歴が挙げられる。高トリグリセリド血症の被験体は、 $>250\text{ mg/dL}$ のトリグリセリド（TG）量を有する。したがって、高脂肪血被験体は、コレステロールおよびトリグリセリドの量が先に述べたように高コレステロール血で高トリグリセリド血症の被験体に設定される限度に等しいか、上回るものとして定義される。「心筋梗塞（myocardial infarction）」は、心臓組織の不適切なパーフュージョンから生じている壊死巣である。心筋梗塞は、アテローム硬化によってすでに狭くなった冠状動脈の血栓性閉塞に続く冠動脈血流量の突然の減少で、一般に起こる。通常、アテローム性動脈硬化性プラークが亀裂を生じるか、破裂するか、潰瘍化するとき、梗塞形成が起こり、壁在性血栓が形成され、冠動脈閉塞に至る。

【0150】

本発明の方法によれば、被験体に心筋梗塞の診断を実施することで、被験体が治療する必要があるかどうかを判断する。当該分野で公知である多くの臨床検査は、例えば、Harrisonに記載がある。通常、検査は主に以下の4つのカテゴリーに分けられる：

（1）非特異性組織壊死および炎症の指標、（2）心電図、（3）血清酵素の変性（例えば、クレアチンホスホキナーゼの量）、および（4）心臓の撮像。当業者は、被検者が心筋梗塞の危険性があるか、心筋梗塞を患っているか、あるいは過去に心筋梗塞を患った経験があるかを決定するために、容易に前述の検査のいずれかを適用することができる。さらに、本発明によれば、IL1RL-1核酸分子の発現の増加量またはその発現産物もまた重要な危険因子とみなされている。危険因子を明確に同定される被験体は、本発明の治療法の恩恵を受ける。

【0151】

本発明によれば、この方法は心筋梗塞をもつ被験体に前述のIL1RL-1つの分子のいずれかを被験体の心血管疾患を治療するのに効果的な量を投与することを含む。「心筋梗塞を持つ」ということは、被験体の心筋梗塞が進行しつつあること、現時点で心筋梗塞を患っていること、または過去に心筋梗塞を患った経験があることを意味する。即時に分子を投与することは、心筋細胞（大部分は梗塞に影響を受ける細胞）のアポトーシスの細胞死を阻害することによって、梗塞前後の被験体には非常に有益であると考えられている。心筋梗塞のエピソードからの14日までの投与もまた被験体に有益である場合があるが、「即時の」という意味は、心筋梗塞以前（診断が間に合う場合）または心筋梗塞後48時間以内に投与が行われるということの意味する。

【0152】

本発明の別の重要な実施形態は、動脈硬化から生じる虚血性傷害の治療である。動脈硬化とは、動脈性壁の肥大化および硬化を表すために用いられる用語である。米国およびほとんどの西洋化社会では、動脈硬化が大多数の死の原因であると考えられている。アテローム硬化は、動脈硬化の1種であり、ほとんどの冠動脈疾患、大動脈瘤と下肢の動脈性疾患（末梢の脈管の動脈症を含む）ならびに脳血管障害への関与の原因であると考えられている。アテローム硬化は、米国の主要な死因となっている。

【0153】

正常な動脈は、内皮細胞、血管内膜の単層だけによって内側が覆われている。血管内膜は単細胞型（平滑筋細胞）のみを含む中膜を覆っている。動脈の最も外部の層には、外膜がある。年齢を重ねることによる、内膜の厚みが継続的に肥大することがあり、中膜からの一部の移行と平滑筋細胞が増殖することを生じると考えられる。種々の外傷または治療（例えば、バルーン式拡張手順により血管壁に外傷が生じる際に生じる）の結果として、内膜の厚みが増加する。本発明は、動脈硬化症の状態から生じる虚血性傷害を治療することと関連して使われる。本明細書で用いられる動脈硬化症状態とは、典型的なアテローム硬化、促進型のアテローム硬化、アテローム硬化病変と、糖尿病の血管合併症を含む望ま

しくない内皮および／または脈管平滑筋細胞増殖によって特徴づけられる他のいかなる動脈硬化症状状態の意味も含む。

【0154】

本発明の別の重要な実施形態は、心不全の治療である。心不全は、損なわれた心臓のポンプという共通点によって連結される多様な病因の臨床症候群であり、組織を代謝させる必要と釣り合った血液を汲み出すか、または上昇した充満圧により血液を汲み出す心臓の障害によって特徴づけられる。

【0155】

本発明の重要な別の実施形態は、心臓肥大の治療である。この状態は、典型的な左心室の肥大（通常明らかな原因の兆候がみられない非拡張型の心室）によって特徴づけられる。診断の現法は、心電図と心エコー図を含む。しかしながら、多くの患者は、無症候性であり、既知の患者が患っている疾病の類縁である可能性がある。残念なことに、疾患の第1の発現は、身体的運動中または運動後後の小児および若年成人にしばしば起こる突然死である。

【0156】

心血管障害の危険性を減らすための薬剤、または心血管疾患の治療に使われる薬剤には、抗炎症薬剤、抗血栓症薬剤、抗血小板薬剤、線維素溶解薬剤、脂質還元薬剤、直接トロンビンインヒビター、糖蛋白ⅠⅡb／ⅠⅢaレセプターインヒビター、細胞接着分子と結合し、それらの分子に付着するために白血球の能力を阻害する薬剤（例えば抗細胞接着分子抗体）、カルシウムチャンネルブロッカー、βアドレナリン作動性レセプターブロッカー、シクロオキシゲナーゼ2インヒビター、アンギオテンシン系インヒビターおよび／またはそれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択されるものが含まれる。1つの好ましい薬剤は、アスピリンである。

【0157】

本発明の治療薬の投与方法および投与量は、治療を受ける特定の状態、治療を受けている被験体の年齢および健康状態、治療期間、併用療法（ある場合）の性質、投与の特定の経路などおよび衛生開業医の知識と専門の範囲の要素によって変化する。

【0158】

本明細書に記載するように、本発明の薬剤を、前述の心血管障害の任意のものを治療するために有効な量で投与する。一般に、有効量は、被験体の所望の組織で有益な変化を引き起こすことができる任意の量である。好ましくは、有効量は、全体的にみて症状または状態の軽減、緩和、また除去等の特定の症状での有利な表現型の変化を引き起こすのに十分な量である。

【0159】

一般に、有効量は、単独でまたはさらなる投与量とともに、所望の応答を生成する製剤のその量である。これは、一時的に症状の進行を遅くすることのみを含むことが可能であるが、より好ましくは、永続的に症状の進行を停止することか、症状の発症を遅くすることか、または症状が発症するのを予防することを含む。これを通常の方法によってモニタリングすることができる。一般に、活性化合物の投与量は、1日当たり約0.01mg/kgから1日当たり1000mg/kgである。50～500mg/kgの範囲の投与量が適しており、好ましくは経口で、かつ1日当たり1回または複数回の投与であることが期待される。

【0160】

当然、そのような量は、治療すべき特定の症状、症状の重度、年齢、身体条件、大きさ、および体重を含む被験患者パラメータ、治療の継続期間、併用する療法（もしあれば）の性質、投与の特定の経路、ならびに健康上の開業医の知識および技術内の同様の因子に依存する。より低い投与量は、静脈内投与等の投与の特定の形態に起因する。被験体での応答が初期投与量で不十分である場合は、より高い投与量（または異なるより局在化された送達経路による効果的により高い投与量）を患者の耐薬性が許容される程度で用いることが可能である。1日当たり複数回の投与量を考慮して、適当な化合物の全身量を達成す

る。最大投与量、すなわち、適切な医学的判断に従った最も高く安全な投与量を用いることが一般に好ましい。しかし、当業者には、患者が医学的理由、心理的理由、または実質的に任意の他の理由からより低い投与量または許容される投与量を主張することが理解される。

【0161】

薬学的に許容される担体と本発明の薬剤を任意で組み合わせて、製剤を調製することが可能である。用語「薬学的に許容される担体 (pharmaceutically acceptable carrier)」とは、本明細書で使用する場合、1つ以上の適する固体または液体賦形剤、希釈剤、または被包物質を意味し、これらはヒトへの投与に適している。用語「担体 (carrier)」とは、天然または合成の有機または無機成分を表し、それとともに活性成分を組み合わせて、適用を容易にする。医薬組成物の成分を、所望の薬学的効果を実質的に損なう相互作用がないような方法で、本発明の分子とかつ互いに混合することもできる。複数の態様では、製剤は、疾患を治療するのに有効な量で本発明の薬剤を含む。

【0162】

製剤は、適当な緩衝剤を含有することが可能であり、該緩衝剤としては、酢酸塩、クエン酸塩、ホウ酸塩、またはリン酸塩が挙げられる。医薬組成物も、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、パラベン、またはチメロサル等の任意で適当な防腐剤を含有することが可能である。

【0163】

種々の投与経路が利用できる。選択される特定の形態は、当然、選択される特定の薬剤、治療すべき症状の重度、および治療効果に求められる投与量に依存する。一般的に言って、医学的に許容される投与の任意の形態を用いて本発明の方法を実行することが可能であり、該形態は、臨床的に許容できない逆効果を引き起こすことなく活性化化合物の有効量を生成する任意の形態を意味する。そのような投与形態としては、経口、直腸、局所的、経鼻、皮内、経皮、または腸管外経路が挙げられる。用語「腸管外 (parenteral)」は、皮下、静脈内、筋肉内、または注入を含む。静脈内または筋肉内経路は、特に長期の療法および予防には適当ではない。一例として、様々な異なる方法でかつ錠剤、カプセル剤、散剤、坐剤、注射、および鼻内噴霧を含む様々な投与形態に対して、偏頭痛を有する被験体の急性治療用の医薬組成物を配合することが可能である。

【0164】

製剤を単位剤形で簡便に提供することが可能であり、かつ薬学技術で周知の方法の任意のものによって調製することが可能である。全ての方法は、1つ以上の付属的な成分を構成する担体に、活性剤を会合させる工程を含む。一般に、液体担体、精巧に分割される固体担体、または両方に、活性化化合物を均一かつ完全に会合させ、その後必要であれば生成物を形作ることによって、該組成物を調製する。

【0165】

それぞれが所定量の活性化化合物を含有するカプセル剤、錠剤、菱形等の異なる単位として経口投与に適した組成物を提供することが可能である。他の組成物としては、シロップ、エリキシル、またはエマルジョン等の水溶液状または非水溶液状の懸濁剤が挙げられる。

【0166】

非経口投与に適した組成物は、本発明の薬剤の無菌水性製剤を簡便に含み、これは、好ましくは、レシピエントの血液と等張である。適当な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を用いた既知の方法にしたがって、この水性製剤を配合することが可能である。無菌注射可能製剤は、例えば1, 3-ブタンジオールでの溶液として、非毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶剤中の無菌注射可能溶液または懸濁液でもあり得る。許容されるもののうち、使用することが可能な運搬体 (vehicle) および溶剤は、水、Ringer 溶液、および等張性塩化ナトリウム溶液である。さらに無菌固定油が、従来、溶剤または懸濁媒質として使用される。この目的のために、任意の刺激の弱い固定油を用いることが

可能であり、合成モノグリセリドまたはジグリセリドが挙げられる。さらに、注射可能製剤で、オレイン酸等の脂肪酸を用いることが可能である。経口、皮下、静脈内、筋肉内等の投与に適した配合物は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PAで見出すことができる。

【0167】

他の送達系としては、徐放性、遅延放出性、または持続放出性送達系が挙げられ得る。そのような系は、本発明の薬剤の反復投与を避けることができ、被験体および医師にとって簡便性を増加させる。多くの種類の放出送達系が利用でき、当技術で既知である。それらは、ポリ（ラクチド-グリコライド）、コポリオキサラート類、ポリカプロラクトン類、ポリエステルアミド類、ポリオルトエステル類、ポリヒドロキシ酪酸、およびポリ無水物類等の高分子ベース系を含む。薬剤を含有する前述の高分子のマイクロカプセルは、例えば米国特許第5,075,109号に記載されている。送達系は、非高分子系も含むことができる。すなわち、コレステロール、コレステロールエステル、および脂肪酸または中性脂肪（モノグリセリド、ジグリセリド、およびトリグリセリド等）等のステロールを含む脂質、ヒドロゲル放出系、シラスチック系、ペプチドベース系、ワックスコーティング、従来の結合剤と賦形剤を用いた圧縮錠剤、部分的融合インプラント等である。特定の例としては、限定はされないが、以下：（a）本発明の薬剤が米国特許第4,452,775号、第4,675,189号、および第5,736,152号に記載されるもの等のマトリックス内の形態で含有される腐食系、および（b）活性成分が米国特許第3,854,480号、第5,133,974号、および第5,407,686号に記載されるもの等の高分子からの制御された速度で浸透する拡散系とが挙げられる。さらに、ポンプベース金物類送達系を用いることができ、そのいくつかは、移植に適応される。

【0168】

長期間持続放出性インプラントの使用も望ましい。本明細書で使用するように、長期間放出とは、インプラントを構築および配置して、少なくとも30日間、好ましくは60日間、治療レベルの活性成分を送達することを意味する。長期間持続放出性インプラントは当業者には周知であり、上述の放出系のいくつかを含む。特定の例としては、限定はされないが、米国特許第4,748,024号およびカナダ特許番号第1330939号に記載される長期間持続放出性インプラントが挙げられる。

【0169】

本発明は、有効量で投与されたとき、本発明の分子とともに協調的、相加的、または相乗的に作用して、（i）心臓細胞抗アポトーシス活性を調節することと、（ii）本発明の分子の心臓細胞抗アポトーシス活性が含まれる任意の症状を治療することとができる本発明のIL1RL-1分子以外の薬剤（核酸およびポリペプチドおよび／またはそのフラグメント）の投与も含み、いくつかの実施形態では、共投与も含む。本発明の分子以外の薬剤としては、抗炎症薬剤、抗血栓症薬剤、抗凝固薬剤、抗血小板薬剤、線維素溶解薬剤、脂質還元薬剤、直接トロンビンインヒビター、糖蛋白IIb/IIIaレセプターインヒビター、細胞接着分子に結合して白血球がそのような分子に結合する能力を阻害する薬剤、カルシウムチャンネルブロッカー、 β アドレナリン作動性レセプターブロッカー、サイクロオキシゲナーゼ2インヒビター、アンジオテンシン系インヒビター、抗高血圧剤、および／またはその組み合わせが挙げられる。

【0170】

「抗炎症（Anti-inflammatory）」薬剤としては、Alc lofen ac、Alc lo met as one Di prop i on ate、Al gest one Ac et on ide、Al pha Amy lase、Am ci na fal、Am ci na fi de、Am fen ac So di um、Am ip ri lo se Hy dro ch lo ri de、Ana kin ra、An i ro lac、An i tra za fen、A pa zo ne、Bal sa la za ide Di so di um、Ben da za c、Ben ox a pro fen、Ben zy da mi ne Hy dro ch lo ri de、Brom el ai

ns、Broperamole、Budesonide、Carprofen、Cicloprofen、Cintazone、Cliprofen、Clobetasol Propionate、Clobetasone Butyrate、Clopirac、Cloticasone Propionate、Cormethasone Acetate、Cortodoxone、Deflazacort、Desonide、Desoximetasone、Dexamethasone Dipropionate、Diclofenac Potassium、Diclofenac Sodium、Diflorasone Diacetate、Diflumidone Sodium、Diflunisal、Difluprednate、Diftalone、Dimethyl Sulfoxide、Drocinonide、Endrysone、Enlimomab、Enolicam Sodium、Epirizole、Etodolac、Etofenamate、Felbinac、Fenamole、Fenbufen、Fenclofenac、Fenclorac、Fendosal、Fenpipalone、Fentiazac、Flazalone、Fluazacort、Flufenamic Acid、Flumizole、Flunisolide Acetate、Flunixin、Flunixin Meglumine、Fluocortin Butyl、Fluorometholone Acetate、Fluquazone、Flurbiprofen、Fluretofen、Fluticasone Propionate、Furaprofen、Furobufen、Halcinonide、Halobetasol Propionate、Halopredone Acetate、Ibuprofen、Ibuprofen Aluminum、Ibuprofen Piconol、Ilonidap、Indomethacin、Indomethacin Sodium、Indoprofen、Indoxole、Intrazole、Isoflupredone Acetate、Isoxepac、Isoxicam、Ketoprofen、Lofemizole Hydrochloride、Lornoxicam; Loteprednol Etabonate、Meclofenamate Sodium、Meclofenamic Acid、Mecloflorisone Dibutyrate、Mefenamic Acid、Mesalamine、Meseclazone、Methylprednisolone Sulfate、Morniflumate、Nabumetone、Naproxen、Naproxen Sodium、Naproxol、Nimazone、Olsalazine Sodium、Orgotein、Orpanoxin、Oxaprozin、Oxyphenbutazone、Paranyline Hydrochloride、Pentosan Polysulfate Sodium、Phenbutazone Sodium Glycerate、Pirfenidone、Piroxicam、Piroxicam Cinnamate、Piroxicam Olamine、Pirprofen、Prednazate、Prifelone、Prodolic Acid、Proquazone、Proxazole、Proxazole Citrate、Rimexolone、Romazarit、Salcolex、Salnacedin、Salsalate、Salicylates、Sanguinarium Chloride、Secclazone、Sermetacin、Sudoxicam、Sulindac、Suprofen、Talmetacin、Talnilflumate、Talosalate、Tebufelone、Tenidap、Tenidap Sodium、Tenoxicam、Tesicam、Tesimide、Tetrydamine、Tiopinac、Tixocortol Pivalate、Tolmetin、Tolmetin Sodium、Triclonide、Triflumidate、Zidometacin、Glucocorticoids、および Zomepirac Sodium が挙げられる。1つの好ましい抗炎症薬剤はアルピリンである。

【0171】

「抗血栓症 (anti-thrombotic)」および／または「線維素溶解薬剤 (fibrinolytic)」薬剤としては、プラスミノゲン (プレカリクレイン、キニノーゲン、Factor XII および XIIa、プラスミノゲンプロアクチベーター、ならびに組織プラスミノゲンアクチベーター [TPA] の相互作用を介して、プラスミンに対して)、Streptokinase、Urokinase、Anisoylated Plasminogen-Streptokinase Activator Complex、Pro-Urokinase、(Pro-UK)、rTPA (alteplase または activase; 「r」は組み換えを表す)、rPro-UK、Abbokinase、Eminase、Streptase Anagrelide Hydrochloride、Bivalirudin、Dalteparin Sodium、Danaparoid Sodium、Dazoxiben Hydrochloride、Efegatran Sulfate、Enoxaparin Sodium、Ifetroban、Ifetroban Sodium、Tinzaparin Sodium、Retaplastase、Trifluenagrel、Warfarin、および Dextran が挙げられる。

10

【0172】

「抗血小板 (anti-platelet)」薬剤としては、Clopidogrel、Sulfapyrazone、Aspirin、Dipyridamole、Clofibrate、Pyridinol Carbamate、PGE、Glucagon、Antiserotonin 薬剤、Caffeine、Theophyllin Pentoxifyllin、Ticlopidine、および Anagrelide が挙げられる。

20

【0173】

「脂質還元 (lipid reducing)」薬剤としては、gemfibrozil、cholestyramine、colestipol、nicotinic acid、probucol lovastatin、fluvastatin、simvastatin、atorvastatin、pravastatin、および cirivastatin が挙げられる。

【0174】

「直接トロンビンインヒビター (Direct thrombin inhibitor)」としては、hirudin、hirugen、hirulog、agatroban、PPACK、および thrombin aptamers が挙げられる。

30

【0175】

「糖蛋白 IIb/IIIa レセプターインヒビター (Glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor)」は、抗体および非抗体両方を包含し、限定はされないが ReoPro (abciximab)、lamiﬁban、および tirofiban が挙げられる。

【0176】

「カルシウムチャンネルブロッカー (Calcium channel blocker)」は、高血圧、狭心症、および不整脈等の重度の心血管疾患を含む種々の疾患の制御で重要な治療値を有する化合物の化学的に多様なクラスである (Fleckenstein, Cir. Res. v. 52, (suppl. 1), p. 13-16 (1983); Fleckenstein, Experimental Facts and Therapeutic Prospects, John Wiley, New York (1983); McCall, D., Curr Pract Cardiol, v. 10, p. 1-11 (1985))。カルシウムチャンネルブロッカーは、細胞カルシウムチャンネルを調節することによって細胞へカルシウムが入ることを予防または遅くする薬剤の異種の群である (Remington, The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Edition, Mack Publishing Company, Eaton, Pa., p. 963 (1995))。現在

40

50

利用でき、かつ本発明によって有用なカルシウムチャンネルブロッカーの大部分は、薬剤の3つの主要な化学的群、すなわちニフェジピン等のジヒドロピリジン類、ベラパミル等のフェニルアルキルアミン、およびジルチアゼム等のベンゾチアゼピンのうちの1つに属している。本発明のによって有用な他のカルシウムチャンネルブロッカーとしては、限定はされないが、amrinone、amlodipine、bencyclane、felodipine、fendiline、flunarizine、isradipine、nicardipine、nimodipine、perhexilene、gallopamil、tiapamil、およびtiapamil類似物（1993RO-11-2933等）、phenytoin、barbiturates、ならびにペプチドdynorphin、omega-conotoxin、およびomega-agatoxin等、ならびに／または薬学的に許容されるその塩が挙げられる。

10

【0177】

「βアドレナリン作動性レセプター遮断剤（beta-adrenergic receptor blocking agent）」は、狭心症、高血圧、および不整脈でのカテコールアミンの心血管効果と拮抗する薬剤のクラスである。βアドレナリン作動性レセプターブロッカーとしては、限定はされないが、atenolol、acebutolol、alprenolol、befunolol、betaxolol、bunitrolol、carteolol、celiprolol、hedroxalol、indenolol、labetalol、levobunolol、mepindolol、methypranolol、metindolol、metoprolol、metrizoranolol、oxprenolol、pindolol、propranolol、practolol、practolol、sotalolnadolol、tiprenolol、tomalolol、timolol、bupranolol、penbutolol、trimepranolol、2-（3-（1，1-ジメチルエチル）-アミノ-2-ヒドロキシプロポキシ）-3-ピリジンカルボニトリルHCl、1-ブチルアミノ-3-（2，5-ジクロロフェノキシ）-2-プロパノール、1-イソプロピルアミノ-3-（4-（2-シクロプロピルメトキエチル）フェノキシ）-2-プロパノール、3-イソプロピルアミノ-1-（7-メチルインダン-4-イロキシ）-2-ブタノール、2-（3-ブチルアミノ-2-ヒドロキシ-プロピルチオ）-4-（5-カルバモイル-2-チエニル）チアゾール、7-（2-ヒドロキシ-3-ブチルアミノプロキシ）フタリドが挙げられる。異性混合物としてあるいはそれらそれぞれの左旋性または右旋性形態で上記に明らかにした化合物を用いることができる。

20

30

【0178】

サイクロオキシゲナーゼ2（COX-2）は、サイクロオキシゲナーゼの近年同定された形態である。「サイクロオキシゲナーゼ（cyclooxygenase）」は、アラキドン酸から様々なプロスタグランジンおよびトロンボキサンを精製する大部分の組織に存在する酵素複合体である。非ステロイド性抗炎症性薬剤は、それらの抗炎症性、鎮痛性、および解熱性活性の大部分を示し、かつホルモン誘導子宮収縮およびサイクロオキシゲナーゼ（プロスタグランジンG/Hシンターゼおよび／またはプロスタグランジン-エンドペルオキシドシンターゼとしても知られる）の阻害を介した癌成長の特定の型を阻害する。初めにサイクロオキシゲナーゼの一形態のみ、すなわち「構成性酵素（constitutive enzyme）」またはサイクロオキシゲナーゼ1（COX-1）が知られていた。それは最初に、ウシ精嚢内で同定された。

40

【0179】

初めにニワトリ、マウス、およびヒト供給源から、サイクロオキシゲナーゼ2（COX-2）をクローニング、シーケンシング、および特徴づけた（例えば、米国特許第5,543,297号、Cromlishらに1996年8月6日発行され、Merck Frost Canada, Inc., Kirkland, CAに譲渡、表題「Human cyclooxygenase-2 cDNA and assays for evaluating cyclooxygenase-2 activity」を参照せよ

50

）。この酵素は、COX-1とは異なる。COX-2は、マイトジェン、エンドトキシン、ホルモン、サイトカイン、および成長因子等の多数の因子によって、急速かつ容易に誘導可能である。プロスタグランジンが生理学的役割および病理学的役割の両方を有するので、構成性酵素であるCOX-1は、プロスタグランジンの内在性の基礎遊離の大部分を担っており、そのため、消化管完全性および腎血流量の維持等のその生理学的機能は重要である。対照的に、誘導性形態であるCOX-2は、プロスタグランジンの病理学的効果を主に担っており、この場合該酵素の迅速な誘導は、炎症性因子、ホルモン、成長因子、成長因子等の因子に応答して生じると考えられる。したがって、COX-2の選択的インヒビターは、従来の非ステロイド性抗炎症性薬剤と類似の抗炎症性、解熱性、および鎮痛性特性を有し、さらにホルモン誘導子宮収縮を阻害し、かつ潜在的抗癌効果も有するが、副作用は少ないと考えられる。特に、そのようなCOX-2インヒビターは、消化管毒性に対する潜在能力の減少、腎臓副作用の潜在能力の減少、出血時間への効果の減少、および恐らくアスピリン感受性喘息被験体で喘息発作を誘導する潜在能力の減少を有すると考えられるので、本発明によって有用である。

10

【0180】

多数の選択的「COX-2インヒビター (COX-2 inhibitor)」が当該分野で公知である。これらには、限定はされないが、米国特許第5,474,995号「Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors」、米国特許第5,521,213号「Diaryl bicyclic heterocycles as inhibitors of cyclooxygenase-2」、米国特許第5,536,752号「Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors」、米国特許第5,550,142号「Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors」、米国特許第5,552,422号「Aryl substituted 5,5 fused aromatic nitrogen compounds as anti-inflammatory agents」、米国特許第5,604,253号「N-Benzyl indol-3-yl propanoic acid derivatives as cyclooxygenase inhibitors」、米国特許第5,604,260号「5-Methanesulfonamido-1-indanones as an inhibitor of cyclooxygenase-2」、米国特許第5,639,780号「N-Benzyl indol-3-yl butanoic acid derivatives as cyclooxygenase inhibitors」、米国特許第5,677,318号「Diphenyl-1,2-3-thiadiazoles as anti-inflammatory agents」、米国特許第5,691,374号「Diaryl-5-oxygenated-2-(5H)-furanones as COX-2 inhibitors」、米国特許第5,698,584号「3,4-Diaryl-2-hidroキシ-2,5-dihydrofurans as prodrugs to COX-2 inhibitors」、米国特許第5,710,140号「Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors」、米国特許第5,733,909号「Diphenyl stilbenes as prodrugs to COX-2 inhibitors」、米国特許第5,789,413号「Alkylated styrenes as prodrugs to COX-2 inhibitors」、米国特許第5,817,700号「Bisaryl cyclobutenes derivatives as cyclooxygenase inhibitors」、米国特許第5,849,943号「Stilbene derivatives useful as cyclooxygenase-2 inhibitors」、米国特許第5,861,419号「Substituted pyridines as selective cyclooxygenase-2 inhibitors」、米国特許第5,922,742号「Pyridinyl-2-cyclopenten-1-ones as sele

20

30

40

50

ctive cyclooxygenase-2 inhibitors」、米国特許第5,925,631号「Alkylated styrenes as prodrug to COX-2 inhibitors」に記載されるに記載されるCOX-2インヒビターが含まれ、それら全てが通常は、Merck Frosst Canada, Inc. (Kirkland, CAまたはMerck & Co., Inc. (Rahway, NJ)に譲渡されている。付加的なCOX-2インヒビターは、米国特許第5,643,933号にも記載されており、G. D. Searle & Co. (Skokie, IL)に譲渡される。表題は、「Substituted sulfonyl phenylheterocycles as cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase inhibitors.」である。

10

【0181】

多数の上記に明らかにしたCOX-2インヒビターは、選択的COX-2インヒビターのプロドラッグであり、活性および選択的COX-2インヒビターに対して、インビポでの変換によってその作用を発しする。上記に明らかにしたCOX-2インヒビタープロドラッグから形成された活性および選択的COX-2インヒビターは、1995年1月5日公表WO 95/00501、1995年7月13日公開WO 95/18799、および1995年12月12日発行米国特許第5,474,995号に詳細に記載されている。米国特許第5,543,297号、表題「Human cyclooxygenase-2 cDNA and assays for evaluating cyclooxygenase-2 activity」の教示を考慮して、当業者は、薬剤が選択的COX-2インヒビターであるかまたはCOX-2インヒビターの前駆体であるかを決定することができ、そのため、本発明の一部である。

20

【0182】

「アンギオテンシン系インヒビター」は、アンギオテンシンIIの機能、合成、または異化作用を干渉する薬剤である。これらの薬剤としては、限定はされないが、アンギオテンシン変換酵素(ACE)インヒビター、アンギオテンシンIIアンタゴニスト、アンギオテンシンIIレセプターアンタゴニスト、アンギオテンシンIIの異化作用を活性化する薬剤、および最終的にアンギオテンシンIIが由来するアンギオテンシンIの合成を妨げる薬剤が挙げられる。レニン-アンギオテンシン系は、血行動態ならびに水分および電解質均衡の調節に関与する。血圧、腎臓灌流圧、または血漿での Na^+ の濃度を低下させる因子は、該系を活性化させる傾向がある一方で、これらのパラメータを増加させる因子は、その機能を抑制する傾向がある。

30

【0183】

アンギオテンシンIおよびアンギオテンシンIIは、酵素レニン-アンギオテンシン経路によって合成される。酵素レニンが血漿に中の偽性グロブリンであるアンギオテンシノゲンに作用して、デカペプチドアンギオテンシンIを生成するとき、合成経路が開始される。アンギオテンシンIは、アンギオテンシン変換酵素(ACE)によって、アンギオテンシンII(アンギオテンシン-[1-8]オクタペプチド)に変換される。後者は、様々なほ乳類種、例えばヒトでの高血圧の様々な形態で原因因子として結び付けられている活性昇圧物質である。

40

【0184】

アンギオテンシン(レニン-アンギオテンシン)系インヒビターは、アンギオテンシノゲンまたはアンギオテンシンIからのアンギオテンシンIIの生成に干渉するか、あるいはアンギオテンシンIIの活性に干渉するよう作用する化合物である。そのようなインヒビターは、当業者には周知であり、レニンおよびACEを含むアンギオテンシンIIの最終的生成に関与する酵素を阻害するよう作用する化合物を含む。それらは、アンギオテンシンIIが生成されたらアンギオテンシンIIの活性に干渉する化合物も含む。そのような化合物のクラスの例としては、抗体(例えば、レニンに対する)、アミノ酸およびその類似体(より大きな分子に結合するものを含む)、ペプチド(アンギオテンシンおよびアンギオテンシンIのペプチド類似体を含む)、プロレニン関連類似体等が挙げられる。最

50

も効力のあるかつ有用なレニン-アンギオテンシン系インヒビターは、レニンインヒビター、ACEインヒビター、およびアンギオテンシンIIアンタゴニストである。本発明の好ましい実施形態では、レニン-アンギオテンシン系インヒビターは、レニンインヒビター、ACEインヒビター、およびアンギオテンシンIIアンタゴニストである。

【0185】

「アンギオテンシンIIアンタゴニスト」は、アンギオテンシンIIレセプターに結合して、その活性に干渉することによって、アンギオテンシンIIの活性を干渉する化合物である。アンギオテンシンIIアンタゴニストは、周知であり、ペプチド化合物および非ペプチド化合物を含む。大部分のアンギオテンシンIIアンタゴニストは、わずかに修飾された同属種であり、この際アゴニスト活性は、他のいくつかのアミノ酸での位置8中のフェニルアラニンの置換によって減衰する。安定性は、インビボでの変性を遅くする他の置換によって高められうる。アンギオテンシンIIアンタゴニストの例としては、ペプチド化合物（例えば、saralasin、 $[(\text{Sar}^1)(\text{Val}^5)(\text{Ala}^8)]$ アンギオテンシン-(1-8)オクタペプチド、および関連類似体）、N置換イミダゾール-2-オン（米国特許第5,087,634号）、2-N-ブチル-4-クロロ-1-(2-クロロベンジル)、イミダゾール-5-酢酸を含むイミダゾールアセテート誘導体（Longら, J. Pharmacol. Exp. Ther. 247(1), 1-7(1988)を参照せよ）、4,5,6,7-テトラヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-6-カルボキシル酸および類似誘導体（米国特許第4,816,463号）、N2-テトラゾール- β -グルクロニド類似体（米国特許第5,085,992号）、置換ピロール類、ピラゾール類、およびトリアゾール類（米国特許第5,081,127号）、1,3-イミダゾール等のフェノールおよび複素環式誘導体（米国特許第5,073,566号）、イミダゾール縮合7員環複素環（米国特許第5,064,825号）、ペプチド（例えば、米国特許第4,772,684号）、アンギオテンシンIIに対する抗体（例えば、米国特許第4,302,386号）、ならびにビフェニルメチル置換イミダゾール等のアラルキルイミダゾール化合物（例えば、欧州番号第253,310号、1998年1月20日）、ES8891（N-モルホリノアセチル-(1-ナフチル)-L-アラニル-(4,チアゾリル)-L-アラニル(35,45)-4-アミノ-3-ヒドロキシ-5-シクロヘキサペンタノイル-N-ヘキシルアミド, Sankyo Company, Ltd., Tokyo, Japan）、SKF108566（E- α -2-[2-ブチル-1-(カルボキシフェニル)メチル]1H-イミダゾール-5-イル[メチルアミン]-2-チオフエンプロパン酸, Smith Kline Beecham Pharmaceuticals, PA）、Losartan（DUP753/MK954, DuPont Merck Pharmaceutical Company）、Remikirin（RO42-5892, F. Hoffman LaRoche AG）、A₂アゴニスト（Marion Merrell Dow）、ならびに特定の非ペプチド複素環（G. D. Searle and Company）が挙げられる。

【0186】

「アンギオテンシン変換酵素（アンギオテンシン変換酵素）」（ACE）は、アンギオテンシンIIへのアンギオテンシンIの変換を触媒する酵素である。ACEインヒビターとしては、アミノ酸およびその誘導体、ジペプチドおよびトリペプチドを含むペプチド、ならびにACEに対する抗体であって、ACEの活性を阻害して、それによって昇圧物質アンギオテンシンIIの形成を減少または除去することによって、レニン-アンギオテンシン系を妨害するものが挙げられる。ACEインヒビターは、高血圧、うっ血性心不全、心筋梗塞、および腎疾患を処置するために医学的に用いられている。ACEインヒビターとして有用であることが既知の化合物のクラスとしては、アシルメルカプトおよびメルカプトアルカノイルプロリン（例えば、カプトプリル（米国特許第4,105,776号）およびゾフェノプリル（米国特許第4,316,906号））、カルボキシアルキルジペプチド（例えば、エナラプリル（米国特許第4,374,829号）、リジノプリル（米国特許第4,374,829号）、キナプリル（米国特許第4,344,949号）、ラ

10

20

30

40

50

ミプリル（米国特許第4, 587, 258号）、およびペリンドプリル（米国特許第4, 508, 729号）、カルボキシアルキルジペプチド模倣体（例えば、シラザプリル（米国特許第4, 512, 924号）およびベナザプリル（benazapril）（米国特許第4, 410, 520号））、ホスフィニルアルカノイルプロリン（例えば、ホシノプリル（米国特許第4, 337, 201号）およびトランドロプリル（trandolopril））が挙げられる。

【0187】

「レニンインヒビター」は、レニンの活性を妨害する化合物である。レニンインヒビターとしては、アミノ酸およびその誘導体、ペプチドおよびその誘導体、ならびにレニンに対する抗体が挙げられる。米国特許の主題であるレニンインヒビターの例としては次のとおりである：ペプチドの尿素誘導体（米国特許第5, 116, 835号）；非ペプチド結合によって連結されたアミノ酸（米国特許第5, 114, 937号）；ジペプチド誘導体およびトリペプチド誘導体（米国特許第5, 106, 835号）；アミノ酸およびその誘導体（米国特許第5, 104, 869号および第5, 095, 119号）；ジオールスルホンアミドおよびスルフィニル（米国特許第5, 098, 924号）；修飾ペプチド（米国特許第5, 095, 006号）；ペプチジルβ-アミノアシルアミノジオールカルバメート（米国特許第5, 089, 471号）；ピロールイミダゾロン（米国特許第5, 075, 451号）、フッ素および塩素スタチン（statine）またはスタトン（statone）含有ペプチド（米国特許第5, 066, 643号）；ペプチジルアミノジオール（米国特許第5, 063, 208号および第4, 845, 079号）；N-モルホリノ誘導体（米国特許第5, 055, 466号）；ペプスタチン誘導体（米国特許第4, 980, 283号）；N-複素環式アルコール（米国特許第4, 885, 292号）；レニンに対するモノクローナル抗体（米国特許第4, 780, 401号）；ならびに種々の他のペプチドおよびそのアナログ（米国特許第5, 071, 837号、同第5, 064, 965号、同第5, 063, 207号、同第5, 036, 054号、同第5, 036, 053号、同第5, 034, 512号、および同第4, 894, 437号）である。

【0188】

細胞接着分子に結合して白血球がそのような分子に結合する能力を阻害する薬剤としては、ポリペプチド薬剤が挙げられる。そのようなポリペプチドとしては、従来の方法論に従って調製されるポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が挙げられる。そのような抗体は、当該分野ですでに既知であり、抗ICAM1抗体および上記に記載されるような他の抗体を包含する。

【0189】

抗凝固薬剤としては、限定はされないが、アネクロド；抗凝血性クエン酸塩ブドウ糖溶液；抗凝固性クエン酸塩リン酸塩ブドウ糖アデニン溶液；抗凝血性クエン酸塩リン酸塩ブドウ糖溶液；抗凝固性ヘパリン溶液；抗凝固性クエン酸ナトリウム溶液；アルデパリン（ardeparin）ナトリウム；ビバリルジン（bivalirudin）；プロムインジオン；ダルテパリン（dalteparin）ナトリウム；デシルジン（Desirudin）；ジクマロール；ヘパリンカルシウム；ヘパリンナトリウム；リアポレート（lyapolate）ナトリウム；ナファモスタットメシレート（Nafamostat Mesylate）；フェンプロクモモン；チンザパリン（tinzaparin）ナトリウム；およびワルファリンナトリウムが挙げられる。

【0190】

ヘパリンは、発達中の卒中の症状を安定化させることが可能であるが、抗凝固剤は、急性完全卒中では役に立たず（かつ恐らく危険である）、脳または他の器官への出血の可能性が増加するので、高血圧では禁忌である。タイミングが議論されているが、抗凝固剤は、再発性心臓性塞栓を予防するために開始することが可能である。組織プラスミノゲンアクチベーターおよびストレプトキナーゼを含む血餅溶解薬剤は、急性卒中の非常に初期の処置について評価されている。ニモジピンは、近年、虚血性卒中後の生存および臨床治療結果を改善することが判明している。

10

20

30

40

50

【0191】

アスピリン以外では、チクロピジンが、卒中処置に有益であることが判明している別の抗血小板薬剤である。動脈内膜切除は、徴候のある内頸動脈の70～99%の狭窄を有する患者で示され得る。しかし、大部分の専門家は、頸動脈の動脈内膜切除が、基底椎骨系に関するTIAを有する患者、過去の卒中に由来する著しい障害を有する患者、または卒中が発達中の患者では示されないことに同意している。

【0192】

HMG-CoA (3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoA) レダクターゼは、コレステロール生合成での律速反応を触媒するミクロソーム酵素である (HMG-CoA 6メバロネート)。HMG-CoA レダクターゼインヒビターは、HMG-CoA レダクターゼを阻害し、その結果、コレステロールの合成を阻害する。多数のHMG-CoA レダクターゼインヒビターが、高コレステロール血症を有する被験体を処置するために用いられている。より近年には、HMG-CoA レダクターゼインヒビターは、卒中の処置で有益であることが判明している (Endres M, ら, Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 8880-5)。

【0193】

本発明の薬剤と共投与するために有用なHMG-CoA レダクターゼインヒビターとしては、限定はされないが、シンバスタチン (米国特許第4, 444, 784号) ; ロバスタチン (米国特許第4, 231, 938号) ; プラバスタチンナトリウム (米国特許第4, 346, 227号) ; フルバスタチン (fluvastatin) (米国特許第4, 739, 073号) ; アトルバスタチン (atorvastatin) (米国特許第5, 273, 995号) ; セリバスタチン (cerivastatin) ; ならびに米国特許第5, 622, 985号 ; 米国特許第5, 135, 935号 ; 米国特許第5, 356, 896号 ; 米国特許第4, 920, 109号 ; 米国特許第5, 286, 895号 ; 米国特許第5, 262, 435号 ; 米国特許第5, 260, 332号 ; 米国特許第5, 317, 031号 ; 米国特許第5, 283, 256号 ; 米国特許第5, 256, 689号 ; 米国特許第5, 182, 298号 ; 米国特許第5, 369, 125号 ; 米国特許第5, 302, 604号 ; 米国特許第5, 166, 171号 ; 米国特許第5, 202, 327号 ; 米国特許第5, 276, 021号 ; 米国特許第5, 196, 440号 ; 米国特許第5, 091, 386号 ; 米国特許第5, 091, 378号 ; 米国特許第4, 904, 646号 ; 米国特許第5, 385, 932号 ; 米国特許第5, 250, 435号 ; 米国特許第5, 132, 312号 ; 米国特許第5, 130, 306号 ; 米国特許第5, 116, 870号 ; 米国特許第5, 112, 857号 ; 米国特許第5, 102, 911号 ; 米国特許第5, 098, 931号 ; 米国特許第5, 081, 136号 ; 米国特許第5, 025, 000号 ; 米国特許第5, 021, 453号 ; 米国特許第5, 017, 716号 ; 米国特許第5, 001, 144号 ; 米国特許第5, 001, 128号 ; 米国特許第4, 997, 837号 ; 米国特許第4, 996, 234号 ; 米国特許第4, 994, 494号 ; 米国特許第4, 992, 429号 ; 米国特許第4, 970, 231号 ; 米国特許第4, 968, 693号 ; 米国特許第4, 963, 538号 ; 米国特許第4, 957, 940号 ; 米国特許第4, 950, 675号 ; 米国特許第4, 946, 864号 ; 米国特許第4, 946, 860号 ; 米国特許第4, 940, 800号 ; 米国特許第4, 940, 727号 ; 米国特許第4, 939, 143号 ; 米国特許第4, 929, 620号 ; 米国特許第4, 923, 861号 ; 米国特許第4, 906, 657号 ; 米国特許第4, 906, 624号 ; および米国特許第4, 897, 402号に記載される多数の他のものが挙げられ、それらの特許の開示は、本明細書中に参考として援用される。

【0194】

一酸化窒素 (NO) は、心血管系、神経系、および免疫系で多くの生理学的役割を有するメッセンジャー分子として認識されている (Griffith, T M ら, J Am Coll Cardiol, 1988, 12: 797-806)。それは、血管弛緩、神経伝達、および病原体抑制を媒介する。NOは、NOシンターゼによって、L-アルギニ

ンのグアニジノ窒素から産生される (Moncada, S および Higgs, E A, Eur J Clin Invest, 1991, 21: 361-374)。内皮細胞一酸化窒素シンターゼをアップレギュレートする薬剤としては、限定はされないが、L-アルギニン、rho GTPase 機能インヒビター (国際出願 WO 99/47153 を参照のこと、その開示は本明細書中に参考として援用される)、およびアクチン細胞骨格構成を破壊する薬剤 (国際出願 WO 00/03746 を参照のこと、その開示は参照により本明細書に組み込まれるものとする) が挙げられる。

【0195】

「共投与 (Co-administering)」とは、本明細書で使用する場合、本発明の2つ以上の化合物 (例えば、IL1RL-1 核酸および/またはポリペプチド、ならびに例えば心血管状態の処置で有益であることが既知の薬剤 (例えば、抗凝固薬剤)) を、単一組成物での混合物として、またはこれらの化合物が相加的効果または相乗的効果さえも発揮することが可能な、すなわち心血管状態での心筋細胞死を減少させるに十分近い時間で連続的に、同時に投与することをいう。

【0196】

本発明は、固相核酸分子アレイも包含する。このアレイは、核酸分子、それらの発現産物、またはそのフラグメント (核酸またはポリペプチド分子のいずれかのフラグメント) のセットから本質的になり、このセットは、固体基板に固定された、IL1RL-1 核酸分子および少なくとも1つのコントロール核酸分子を含む。好ましい実施形態では、核酸分子のセットは、最大数100の異なる核酸分子を含む。重要な実施形態では、核酸分子のセットは、最大数10の異なる核酸分子を含む。

【0197】

本発明によれば、マイクロアレイ技術の標準的ハイブリダイゼーション技術を用いて、核酸発現のパターンを評価し、核酸発現を同定する。他の名前によっても知られているマイクロアレイ技術としては、DNAチップ技術、遺伝子チップ技術、および固相核酸アレイ技術が挙げられ、当業者には周知であり、限定はされないが、固定基板上で、同定した核酸プローブ (例えば、IL1RL-1 等の本明細書で別に記載される分子) のアレイを得ること、レポーター分子 (例えば、フルオレセイン、Cy3-dUTP、またはCy5-dUTP等の放射性タグ、化学発光タグ、または蛍光タグ) で標的分子を標識すること、標的核酸をプローブにハイブリダイズさせること、ならびに標的-プローブハイブリダイゼーションを評価することに基づく。標的配列と完全に一致する核酸配列を有するプローブによって、一般に、あまり完全ではない一致を有するプローブより強力なレポーター分子シグナルの検出を生じる。核酸マイクロアレイ技術で利用される多くの構成要素および技術は、Nature Genetics, 第21巻, 1999年1月に提示されており、その全内容が本明細書中に参考として援用される。

【0198】

本発明によれば、マイクロアレイ基板としては、限定はされないが、ガラス、シリカ、アルミノシリケート、ホウシリケート、金属酸化物 (例えば、アルミナおよび酸化ニッケル)、種々の粘土、ニトロセルロース、またはナイロンを挙げることが可能である。全ての実施形態で、ガラス基板が好ましい。本発明によれば、プローブは、限定はされないが、DNA、ゲノムDNA、cDNA、およびオリゴヌクレオチドを含む核酸の群から選択され、天然でも合成でもよい。オリゴヌクレオチドプローブは、好ましくは、20マー~25マーのオリゴヌクレオチドであり、DNA/cDNAプローブは好ましくは500~5000塩基長であるが、他の長さを用いることも可能である。適切なプローブ長さは、当業者によって、当該分野で公知の手順に従って決定され得る。一実施形態では、好ましいプローブは、配列番号1および/または3で示される2以上の核酸分子のセットである。プローブを精製して、ゲル濾過または沈降等の当業者に公知の標準的方法を用いて夾雑物を除去することが可能である。

【0199】

一実施形態では、マイクロアレイ基板を化合物で被覆して、該基板上でのプローブの合

10

20

30

40

50

成を高めることが可能である。このような化合物としては、限定はされないが、オリゴエチレングリコールが挙げられる。別の実施形態では、基板上の結合剤または結合基を用いて、第1のヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドをこの基板に共有結合させることができる。これらの結合剤または結合基としては、限定はされないが、アミノ基、ヒドロキシ基、プロモ基、およびカルボキシ基が挙げられ得る。好ましくは、一価の位置が鎖結合によって占められ、残りの位置がこの反応基に結合する、アルキレン二価基またはフェニレン二価基等のヒドロカルビル基を介してこれらの反応基を基板に結合させる。これらのヒドロカルビル基は、約10個までの炭素原子、好ましくは約6個までの炭素原子を含むことが可能である。主鎖内に2~4個の炭素原子を含有するアルキレン基が通常好ましい。このプロセスに関するこれらの詳細およびさらなる詳細は、例えば米国特許第4,458,066号に開示されており、これはその全体が本明細書中に参考として援用される。

10

【0200】

一実施形態では、光指向性化学合成、光化学的脱保護、または基板へのヌクレオチド前駆体の送達およびその後のプローブ生成等の方法を用いて、所定のグリッドパターンで、基板上でプローブを直接合成する。

【0201】

別の実施形態では、基板へのプローブの結合を高める化合物で基板を被覆することが可能である。そのような化合物としては、限定はされないが、ポリリジン、アミノシラン、アミノ反応性シラン (Nature Genetics, 第21巻, 1999年1月)、またはクロムが挙げられる。この実施形態では、接触印刷様式または非接触様式 (例えば、インクジェットまたは圧電送達) でプローブを基板に塗布するためのコンピューター制御ロボットを用いて、正確な所定の体積およびグリッドパターンで、事前合成プローブを基板に塗布する。限定はされないが、UV照射および熱を含む方法を用いて、プローブを基板に共有結合させることが可能である。

20

【0202】

標的は、限定はされないが、DNA、ゲノムDNA、cDNA、RNA、mRNAを含む群から選択される核酸であり、天然でも合成でもよい。全ての実施形態で、心血管状態を発症または有すると疑われる被験体から得た核酸分子が好ましい。本発明の特定の実施形態では、1つ以上のコントロール核酸分子を基板に結合させる。好ましくは、コントロール核酸分子によって、限定はされないが核酸の品質および結合特性；試薬の品質および有効性；ハイブリダイゼーションの成功；ならびに分析閾値および成功を含む因子の決定が可能になる。コントロール核酸としては、限定はされないが、ハウスキーピング遺伝子等の遺伝子の発現産物またはそのフラグメントを挙げることが可能である。

30

【0203】

心血管疾患マーカーのセットを選択するために、好ましくは、例えば遺伝子発現のマイクロアレイ分析によって生じた発現データを分析して、患者の異なるカテゴリー (患者の各カテゴリーは、異なる心血管障害である) においてどの遺伝子が有意に差次的に発現するかを決定する。Permaxコンピューターソフトウェアを用いて遺伝子発現の有意性を決定することができるが、発現の有意差を識別することができる任意の標準統計学的パッケージを用いることも可能である。Permaxは、データの大きいアレイについて、順列2試料t検定を実行する。観察の高次元ベクトルに対して、Permaxソフトウェアは、各属性についてt統計を算出し、最大総合的属性および最小総合的属性の順列分布を用いて有意性を評価する。主な使用は、2つの群 (例えば、コントロール健常被験体および特定の心血管障害を有する被験体) 間で最も異なる属性 (遺伝子) を決定して、t統計値を用いて「最も異なる (most different)」およびそれらの有意レベルを測定することである。

40

【0204】

タンパク質測定方法を用いて、心血管疾患核酸分子の発現を測定して、例えば、配列番号1および/または3にコードされるポリペプチドの発現をそれぞれ決定することによって、配列番号2および/または4の発現を決定することもできる。タンパク質を特異的か

50

つ定量的に測定する好ましい方法としては、限定はされないが、表面活性化レーザー脱着イオン化 (surface enhanced laser desorption ionization) (SELDI; 例えば、Ciphergen ProteinChip System) 等の質量分析ベース方法、非質量分析ベース方法、2次元ゲル電気泳動等のおよび免疫組織化学ベース方法が挙げられる。

【0205】

当業者に公知の手順を介して、SELDI方法論を用いて、微視的量の腫瘍タンパク質を気化させること、および個々のタンパク質の「指紋 (fingerprint)」を作製することを可能にし、それによって、単一試料中の多くのタンパク質の存在量の同時測定が可能になる。好ましくは、SELDIベースのアッセイを用いて、心血管状態、なら
10
びにそのような状態の病期 (stage) を特徴づけることを可能にする。そのようなアッセイとしては、限定はされないが、好ましくは以下の例が挙げられる。RNAマイクロアレイによって発見された遺伝子産物を、SELDIタンパク質ディスクへの特異的 (抗体媒介) 捕獲によって選択的に測定することが可能である (例えば、選択的SELDI)。タンパク質スクリーニング (例えば、2-Dゲルを用いて) によって発見された遺伝子産物を、配列番号1および/または3由来の目的の特定マーカーを可視化するために最適化された「全タンパク質SELDI (total protein SELDI)」によって分解することができる。配列番号1および/または3間から得た複数のマーカーのSELDI測定からの腫瘍分類の予測モデルをSELDI戦略用に用いることが可能である。
20

【0206】

前述のマイクロアレイ法の任意のものを使用して、心血管疾患核酸の発現を決定することを、当業者に公知の慣用方法を用いておこない、タンパク質測定方法によって決定された発現は、心血管疾患患者用の処置戦略を選択するための予測方法として用いられるマーカーの所定レベルに相関する可能性がある。

【0207】

本発明は、以下の実施例を参照してより完全に理解される。しかし、これらの実施例は、本発明の実施形態を説明することを意図するのみであり、本発明の範囲を制限することを意味するものではない。

【実施例】

30

【0208】

(実施例1)

(実験プロトコール: 材料および方法)

(機械的歪みデバイス)

機械的に過負荷状態である心筋細胞の実験は、一般に、心臓周期を制御することなく細胞を引き伸ばすことによっておこなわれており、このアプローチは、収縮対弛緩での機械的過負荷間の区別が可能ではない。本研究では、本発明者らは、精密に制御された機械的歪みおよび培養心筋細胞での電氣的ペーシングによって、とりわけどのように心筋細胞機械的伝達が心臓周期によって調節されるかを調査し、かつそのような調節に参与する遺伝子を同定することが可能になるユニークな実験システムを設計および構築した。
40

【0209】

ペーシング歪みデバイス。機械的刺激へのアプローチでは、シリコンエラストマー膜の下面と接触して、空間的等方性二軸歪みプロファイルをこの膜に適用する複数のプラテンを持つ装置を用いた (Schaffer J Lら, J Orthop Res, 1993, 12: 709-719; ならびに1999年7月16日出願の米国仮特許出願、表題「AN APPARATUS FOR STUDYING MYOCARDIAL MECHANICAL OVERLOAD HYPERTROPHY AND USES THEREFOR」、Richard T. Lee、担当代理人整理番号第100038, 130号およびエクスプレスメール番号EL110243781US)。ステッパーモーターを用いて各プラテンの配置を制御することによって、異なる大きさの歪みで6つの個
50

別の78mm膜を1度に引き伸ばすことができる。測定したグリーン歪みは、1～14%の歪みで約±0.25%までの正確さである(Cheng GC,ら, Circ Res, 1997, 80:28-36; Brown TD, J Biomechanics, 2000, 33:3-14)。この試験全体にわたって、8%二軸歪みを用いた。

【0210】

心臓周期に対する機械的歪みのタイミングを制御するために、コンピューターは、各皿を電氣的にペーシングし、機械的歪みおよび電気インパルス間の位相と、電気インパルス持続期間と、インパルスの電圧とを制御した。さらに、電気インパルスは、交流極性を持ち、電極でのpH勾配等の電気化学的作用を最小にした。2つの出力をそれぞれ、各皿中の単一セットの電極に接続した。皿毎に約500オームの抵抗と並行して皿をペーシングした。

10

【0211】

2つの電源によって、正および負の電圧源を供給した(6545A, Hewlett Packard Company, Palo Alto, CA)。制御回路を二部分に分割した：高電圧回路および低電圧またはデジタルシグナル回路。高電圧回路は、入力シグナルにもとづいて、出力を切り換えるゲートであった。低電圧回路は、コンピューターからの2つの制御シグナルを受信し、かつ加減抵抗器からのパルス幅を受け、該加減抵抗器は、正および負の電圧ゲート両方を制御した。低電圧回路は、0～120V DC振幅および2～37ms持続期間の間の電圧パルスを実行可能にした。光によって、パルスの連続的モニタリングが与えられ、回路のタイミングおよびキャリブレーションをオシロスコープによって確認した。

20

【0212】

各皿に対する電極は、皿の内面の基台にある、すなわち変形可能な膜の真上にある2つのアーク状AgCl₂線電極であった。電極は、予め作製され、エタノール消毒され、各実験の直前に皿に設置して、銀からの潜在的毒性を最小にした。この方法を用いて、24時間実験で細胞死も剥離も観察されなかった。各アークは、120度であった。本発明者らは、二次元有限要素分析を実行して、この配置を有するポテンシャル場の均一性を評価した。これらの計算値によって、{2乗平均} = 29%のポテンシャル場での空間的変動を評価する。したがって、このシステムによって、電圧場での比較的小さい変動を持つ高度に均一な二軸機械的歪みを与えられる。

30

【0213】

機械的刺激プロトコル。本発明者らは、「収縮期相」中に与えた歪みに対する電氣的刺激による心臓周期の三分の一の間のみ、および「弛緩期相」中で与えた歪みに対する弛緩期相での心臓周期の三分の一の間のみそれぞれで、歪みを与えた。この研究に用いた条件は、(1)コントロール；(2)歪み(ペーシングなし)；(3)ペーシング(歪みなし)；(4)収縮期相中に与えた歪み；および(5)弛緩期相中に与えた歪みであった。

【0214】

1日齢Sprague-Dawleyラット由来の新生児ラット心室筋細胞(NRVM)を従来記載の方法(Springhorn JP, およびClaycomb WC., Biochem J, 1989; 258:73-78; Arstall M 他, J Mol Cell Cardiol, 1998, 30:1019-25)によって単離した。7%FCSを含有するDMEM中で、2,000,000細胞/皿の密度で被覆膜皿にNRVMをプレートして、24時間インキュベートした。およそのコンフルエンスは、85～90%であった。その後、ハンクス平衡塩溶液(HBSS、138mM NaCl、5.3mM KCl、4.0mM NaHCO₃、1.3mM CaCl₂、0.5mM MgCl₂、0.4mM MgSO₄、0.4mM KH₂PO₄、0.3mM Na₂HPO₄、5.6mMグルコース; Life Technologies, Inc., Rockville, MD) 10mlで2回洗浄して、0.2%FCS含有DMEMを26ml用いて48～72時間インキュベートすることによって、NRVMを静止状態にした。

40

50

【0215】

これらの細胞培養条件では、細胞は、40～60拍動／分で拍動する。この速度では、本発明者らは、70拍動／分の速度でペーシングすると、無視できる程度の競合を観察した。本発明者らは、施行捕獲実験 (trial capture experiment) を実行した。各皿上の9つの位置をサンプリングした。捕獲効率は、全ての位置で類似であり、最大捕獲は、60Vでかつ10msのパルス幅を超えて生じた。したがって、1.2Hz (70拍動／分) の速度で10msのインパルス持続時間を持つ70Vの電圧を選択した。これらの条件下では、本発明者らは、部分的細胞剥離を観察しなかった。

【0216】

転写プロファイリング。無血清培地でフィブロネクチン被覆膜上で48時間培養したラット新生児心筋細胞を用いて、DNAマイクロアレイ実験を実行した。30分の期間にわたって収縮期中のみで与えた8%歪みで細胞を変形させ、その後の歪み条件およびペーシング条件なしで6時間後RNAを調製した。この時間点は、遺伝子テネイシン (心筋細胞に対する正のコントロール) がこの時間点で誘導されるかを実証する先行試験にもとづいた。Affymatrix GeneChip RGU34A (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA.) を用いて、DNAマイクロアレイハイブリダイゼーション実験を実行した。Affymatrixソフトウェアを用いて、データを分析した。

【0217】

ノーザン分析。GenBank配列を用いたPCRによって、差次的に発現する遺伝子に対するcDNAクローンを得た。各クローンを5'および3'末端両方からシーケンシングして、アイデンティティを確認した。NRVMの3つの異なる供給源を用いた少なくとも3つの独立した実験で、ノーザンブロットハイブリダイゼーション分析によって、DNAマイクロアレイでの正のエレメントを確認した。チオシアン酸グアニジウムおよびフェノールクロロホルム法 (Chomczynski, ら, Anal. Biochem., 1987, 162:156-159) によって、全RNAを単離した。ノーザンブロットイングのために、1.0%アガロース-ホルムアルデヒドゲル (2.0mol/l) にRNA 15μgを添加して、ナイロン膜 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Piscataway, NJ) に移し、UV Stratalink (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) を用いてUV架橋した。各プローブを、ExpressHyb溶液 (Clontech Labs., Inc., Palo Alto, CA) に68℃で1時間ハイブリダイズした。2xSSC 0.05% SDS溶液で該膜を30～40分間室温で3度洗浄し、40分間50℃で連続振とうしながら0.1xSSC 0.1% SDS溶液で洗浄した。該膜を-80℃でフィルムにさらして、Optimas 5.0ソフトウェア (Optimas Co./Media Cybernetics, Silver Springs, MD) を用いて、X線写真を走査および分析した。膜上のエチジウム染色28Sリボソームサブユニットに濃度測定ユニットを規格化した。

【0218】

結果。図1は、培養新生児心筋細胞での8%周期的機械的歪みによるIL1RL-1mRNA発現誘導の経時変化 (初期 (左側)、後期 (右側)) を示す。最大誘導が3時間目に生じて15時間維持される。

【0219】

図2は、培養新生児ラット心筋細胞内のIL1RL-1mRNA発現の誘導への3時間での8%機械的歪み、アンギオテンシンレセプター阻害 (ARB、CP-19116、100nM)、アンギオテンシンII (Ang II、50nM)、インターロイキン-1β (IL-1β、10ng/ml)、およびホルボールエステル (PMA、200nM) の効果を示す。歪みによるIL1RL-1mRNA発現の誘導は、アンギオテンシンレセプター阻害によって阻害されなかった。さらに、アンギオテンシンIIでの処理は、IL1RL-1mRNA発現を誘導しなかった。IL-1βおよびPMA両方での処理は、機

機械的歪みの不在下での I L 1 R L - 1 m R N A 発現の誘導に関連していた。

【0220】

図3は、I L 1 R L - 1 m R N A 発現の誘導への8%機械的歪み、過酸化水素 (H_2O_2 、100 μM)、および酸化防止剤 T I R O N (10 mM) の効果を示す。機械的歪みの不在下で H_2O_2 によって誘導され、かつ T I R O N によって阻害される機械的に誘導されるテネイシン-C 遺伝子の m R N A 発現とは異なり、 H_2O_2 は、歪みの不在下では I L 1 R L - 1 を誘導せず、歪みに誘導される I L 1 R L - 1 の誘導を阻害する。T I R O N は、歪みの不在および存在下で、I L 1 R L - 1 の m R N A 発現をわずかに減衰させた。

【0221】

図4は、8%機械的歪みによる I L 1 R L - 1 m R N A 発現の誘導へのアクチノマイシン D (5 $\mu g/ml$ 、左側) およびシクロヘキサミド (10 $\mu g/ml$ 、右側) の効果を示す。アクチノマイシン D およびシクロヘキサミドを機械的歪み中に適用した。アクチノマイシン D は、2時間目および4時間目両方で I L 1 R L - 1 m R N A 発現の誘導を阻害し、歪みに応答した I L 1 R L - 1 の誘導は、I L 1 R L - 1 の増加転写が原因であることが示唆された。タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキサミドは、歪みに応答した I L 1 R L - 1 m R N A 発現の誘導を阻害し、新規タンパク質合成が I L 1 R L - 1 m R N A 発現の誘導に必要であることが示唆された。

【0222】

図5は、培養新生児心筋細胞での I L 1 R L - 1 m R N A 発現への8%機械的歪み単独の効果、8%機械的歪みをインターロイキン-1 β (I L - 1 β 、10 ng/ml) と組み合わせた場合の効果、および歪み不在下でのホルボールエステル (PMA、100 ng/ml) の効果を示す。I L - 1 β および機械的歪み単独の両方は、I L 1 R L - 1 m R N A 発現を誘導したが、I L - 1 β の存在下での機械的歪みによる I L 1 R L - 1 の誘導がさらには増加せず、機械的歪みおよび I L - 1 β は、相乗効果的または加法的様式では I L 1 R L - 1 誘導へ作用しないことが示唆された。I L 1 R L - 1 m R N A 発現の最も強力な誘導は、PMAを用いた場合に見られた。I L 1 R L - 1 m R N A 発現の誘導に対する順位効果 (rank order potency) は、PMA > 歪み > I L - 1 β である。

【0223】

図6は、0、1、3、6、9時間、新生児ラット心筋細胞を8%歪みにさらしたことを示す。R N e a s y キットを用いて全 R N A を単離した。1%アガロース-ホルムアルデヒドゲル上で全 R N A 5 μg を大きさ毎に分離して、ナイロン膜に移した。UV 光での架橋後、V-A T P a s e B サブユニットに特異的な ^{32}P 標識プローブに膜をハイブリダイズさせた。その後、増感紙を用いて該膜を X 線フィルムに3時間-80°Cでさらした。

【0224】

(実施例2)

(概要：)

サイトカインおよび心外傷。ストレス活性化サイトカインは、心外傷および病態生理学的症状の多くの形態に関与しており、最も特徴的なものは、腫瘍壊死因子- α 、インターロイキン-1、およびインターロイキン-6である。これらの分子は、正常心臓で構成的には発現しないが、虚血および再灌流の間または血行力学的過負荷で急速に誘導され、それらがストレス、外傷、または成長刺激への初期心筋応答に重要な役割を果たしていることが示唆される (Mann DL, Cytokine and Growth Factor Reviews. 1996; 7: 341-354; St. John Sutton MG, ら Circulation. 2000; 101: 2981-2988)。しかし、サイトカインは、虚血性心臓疾患および心不全を含む病的な心筋症状で安定に発現することも判明しており、芳しくない予後に関連している (Pulkki KJ, ら Annals of Medicine. 1997; 29: 339-343; Kubota T, ら, Proc Natl Acad. Sci. 1998; 95: 6930-6935;

10

20

30

40

50

Aukrust P, ら Am J Cardiol 1999; 83: 376-382; MacGowan GA, ら Am J Cardiol 1997; 79: 1128-1132; Roig E, ら Am J Cardiol 1998; 688-690; Tsutomoto T, ら J Am Coll Cardiol 1998; 31: 391-398; Prabhu SD, ら Circulation. 2000; 101: 2103-2109; Murray DR, ら Annu Rev Immunol. 2000; 18: 451-494)。

【0225】

インターロイキンレセプターを介したインターロイキン-1シグナル伝達は、多くの異なる系内の炎症性サイトカインシグナル伝達での初期事象である (Trehu EG, ら Clin Cancer Res. 1996; 8: 1341-51)。心外傷では、インターロイキン-6は、インターロイキン-1、腫瘍壊死因子- α 、またはリポ多糖での刺激に付随して心筋細胞によって産生され、虚血性心筋の再灌流の間、虚血後のリンパ液で検出されている (Gwechenberger M, ら Circulation 1999; 99: 546-551)。近年認識されていることは、インターロイキン-1シグナル伝達に付随する心臓疾患での反作用的な抗炎症性サイトカインの潜在的発現である。インターロイキン-4およびインターロイキン-10は、腫瘍壊死因子- α の合成を抑制し、腫瘍壊死因子に対するリガンドシンク (ligand sink) である可溶性腫瘍壊死因子レセプターの放出を高めることができる (Joyce DA, ら Eur. J. Immunol. 11: 2699-705)。インターロイキン-10は、心不全患者で増加し (Yamaoka M, ら Jpn Circ J 1999; 63: 951-956)、拡張型心筋症患者で、腫瘍壊死因子- α 血清量が増加するとき、インターロイキン-10血清量が増加する (Ohtsuka T, ら J Am Coll Cardiol. 2001; 37: 412-417)。

【0226】

T1/ST2 (IL1RL-1)：新規機械的誘導レセプター。本発明者らは、心臓での新規な潜在的ストレス活性化シグナル伝達経路、すなわちインターロイキン-1ファミリーメンバー遺伝子T1/ST2の誘導の調節を同定した。いずれの細胞型でもT1/ST2の誘導、シグナル伝達、および機能についてはほとんど知られておらず、T1/ST2は、別個の調査領域で、2つの無関係と思われる機能を有することが判明した。これらのうち1つは、成長調節であり、他方は、免疫変調である。代償性肥大成長および免疫/炎症性変調は、心血管疾患の病態生理学に関与している。

【0227】

成長。初めに、T1/ST2遺伝子が静止状態のマウス3T3線維芽細胞の血清刺激後のその誘導によって同定され、T1/ST2遺伝子が成長調節に関与していることが示唆された (Tominaga S, ら FEBS Letters 1989; 258: 301-304)。後に、同グループは、完全長インターロイキン-1レセプターに相同な膜貫通および細胞質ドメインからなるより長い転写産物を同定した (Yanagisawa K, ら FEBS Letters. 1993; 318: 83-87)。

【0228】

免疫。T1/ST2はTヘルパー2では発現するが、Tヘルパー1では発現せず、該Tヘルパー2および1は、適応免疫系の細胞であり、インターロイキン-4、インターロイキン-5、およびインターロイキン-10を産生する (Yanagisawa KI, ら J. Biochem. 1997; 121: 95-103; Coyne AJ, ら J Exp Med. 1999; 190: 895-902)。Tヘルパー2細胞は、感染に対する有益な応答を媒介するが、アレルギーおよび喘息の発症では有害である。T1/ST2の発現とTヘルパー2細胞でのインターロイキン-4産生との間には強い相関がある (Coyne AJ, ら J Exp Med. 1999; 190: 895-902)。T1/ST2は、Tヘルパー2への分化およびTヘルパー2の活性化に決定的な役割を果たしているが、Tヘルパー1細胞には果たしていない (O'Neill LAJ, ら I

10

20

30

40

50

mmunology Today. 2000; 21: 206-209)。

【0229】

T1/S T2シグナル伝達の阻害は、肺での好酸球炎症性応答のTヘルパー2媒介誘導を減衰させ、Tヘルパー1細胞からのインターフェロン- γ 分泌を改変することなしにTヘルパー2細胞からのサイトカイン分泌を阻害した(Coyle AJ, ら J Exp Med. 1999; 190: 895-902)。これらの試験によって、T1/S T2の発現は、インターロイキン-4、インターロイキン-5、およびインターロイキン-10の発現に有利に、サイトカインプロファイルを変化させることができることが示される。近年、インターロイキン-10は、心外傷の状況で抗炎症性効果を有することが判明した(Ohtsuka T, ら J Am Coll Cardiol 2001; 37: 412-417)。同様に、T1/S T2発現が欠如すると、心筋外傷後には有害であり得るインターフェロン- γ 発現への移行が生じる可能性がある。

10

【0230】

まとめると、虚血/再灌流への炎症性応答でのサイトカインの役割の臨床的認識と相まって、成長応答および免疫機能へのT1/S T2の関与によって、T1/S T2活性化は、心筋成長および再構築(リモデリング)に寄与する成長活性化またはストレス活性化シグナル伝達経路であることが示唆される。

【0231】

T1/S T2ヌル(null)マウスの表現型。(Townsend MJ, ら J Exp Med. 2000; 191. 1069-1075)。T1/S T2ヌル(null)マウスでのT1/S T2の欠如は、免疫チャレンジ(challenge)の不在下で該マウスの基礎免疫機能を損なうことはない。しかし、T1/S T2ヌル(null)マウスは、IL-4, IL-5、およびIL-10を生成するがIFN- γ (Th1サイトカイン)を生成せず、かつ肺での好酸球湿潤中のTヘルパー2炎症性応答(Th2応答)を生成する能力障害を有する。

20

【0232】

本発明者らは、心筋細胞でのT1/S T2の誘導と、筋細胞シグナル伝達経路の前後関係(context)内の生/死シグナル伝達へのその関与との試験を始めた。下記に提示する予備試験では、T1/S T2は、インターロイキン-1および機械的歪みに応答して、心筋細胞で誘導されることおよびインターロイキン-1によるT1/S T2の誘導はNF- κ B活性化に依存することが示される。T1/S T2 mRNAも、インターロイキン-1に応答してヒト成人脈管平滑筋細胞で誘導される。T1/S T2タンパク質は、インビボと、不安定なプラークを有する患者由来のヒト大動脈組織とでの心筋虚血後早期にマウス心臓で発現する。

30

【0233】

(結果：)

インビトロ試験。以下の試験によって、NF- κ Bの活性化を介していると考えられる機械的歪みおよびインターロイキン-1によるT1/S T2の誘導を実証する。より豊富な転写産物は可溶性アイソフォームであったが、T1/S T2の両転写産物(すなわち、IL1RL-1S可溶性転写産物およびIL1RL-1M膜転写産物)を心筋細胞での歪みによって誘導する。培養新生児心筋細胞での機械的歪みによって、T1/S T2 mRNAを誘導する(図8)。

40

【0234】

培養新生児心筋細胞での機械的歪みによってT1/S T2 mRNAを誘導する。先行して記載されるように、新生児ラット心室筋細胞をコラゲナー消化によって単離し、培地13ml中で、3,500,000細胞/皿の密度でフィブロネクチン被覆シリコン膜皿に播種した(Yamamoto K, ら J Biol Chem. 1999; 274: 21840-21846)。この技術によって、95%以上の筋細胞を有する培養物が生成される。先行して記載されるように、均一な二軸周期的歪みを与える装置を用いて、機械的歪みを適用した(Yamamoto K, ら J Biol Chem. 1999; 2

50

74:21840-21846)。RNAを抽出し(Qiagen)、ラットT1/ST2に特異的な³²P標識600bp PCRフラグメントをプローブとして用いてノーザンブロッティングを実行した。最大誘導は、3時間目に生じて、9時間維持され、15時間までに減少する。

【0235】

インターロイキン-1 β および機械的歪み両方はそれぞれ、心筋細胞でT1/ST2 RNAを誘導する(図9)。インターロイキン-1および歪みによるT1/ST2の誘導を示す。本発明者らは、インターロイキン-1 β の存在下での機械的歪みによるT1/ST2の誘導はさらには増加せず、インターロイキン-1は、T1/ST2の誘導への機械的歪みの効果に対して筋細胞を感作させない(逆もまた同じ)ことが示唆されることも見出した。1時間の時間点は、歪みによる誘導が3時間目に飽和するため、インターロイキン-1 β の加法的効果を遮蔽するという事象に含まれた。1時間目および3時間目でのホルボールエステル(PMA)の効果を2つの右側の帯に示す。T1/ST2 mRNA発現に対する順位効果(rank order potency)は、PMA>歪み>インターロイキン-1 β である。インターロイキン-1 β は、NF- κ Bを介してシグナル伝達し、PMAはPKCを介するので、これらの結果によって、NF- κ BおよびPKC両方の活性化はT1/ST2の誘導に関与することが示唆される。

【0236】

T1/ST2は、インターロイキン-1/インターロイキン-1レセプターシグナル伝達を介した心筋細胞でのNF- κ B標的遺伝子の可能性がある(図10)。本発明者らが先行して報告した(Yamamoto K,ら J Biol Chem. 1999; 274:21840-21846)ことは、心筋細胞の機械的歪みは、NF- κ Bを活性化するということである。T1/ST2 RNAのインターロイキン-1 β および歪みの誘導でのNF- κ Bの役割を調査するために、本発明者らは、NF- κ B DNA結合活性を減少させるI κ B α を過剰発現させた。I κ B α 過剰発現アデノウイルスベクターまたは β -ガラクトシダーゼ対照ベクターに培養心筋細胞を感染させ、8%周期的機械的歪みまたはインターロイキン-1(10 ng/ml)に4時間さらした。³²P標識IL1RL-1 cDNAプローブを用いたノーザンブロッティングによってRNAを分析した。I κ B α の異所性発現は、 β -ガラクトシダーゼ対照ベクターで処理した細胞でのT1/ST2誘導と比べて、T1/ST2-1 mRNAのインターロイキン-1 β 誘導を阻害し、T1/ST2 mRNA発現の歪み誘導を部分的に阻害した。これらの結果によって、T1/ST2は、インターロイキン-1/インターロイキン-1レセプターシグナル伝達を介した初期NF- κ B標的遺伝子であることが示唆される。対照的に、NF- κ B活性化とともに経路は、機械的歪みによるT1/ST2 RNAの誘導に関与する可能性がある。T1/ST2 mRNAも、ヒト成人脈管平滑筋細胞でインターロイキン-1によって誘導されるが、PMAまたは腫瘍壊死因子(TNF)によっては誘導されない。

【0237】

上記に示した結果に加えて、本発明者らは、T1/ST2は、インターロイキン-1によるNF- κ Bに付随して誘導され、NF- κ Bは、心筋細胞生存に関連することを明らかにした。さらに、インビトロ試験を実行して、T1/ST2活性化が細胞成長および生存に関連することを確認する。

【0238】

(インビボ試験)

(材料および方法)

マウスでの実験的心筋梗塞。マウスに関する実験手順は、Harvard Medical School Standing Committee on Animalsによって認証された。先行して記載されるように冠動脈連結反応によって、実験的心筋梗塞をマウスで構築した(13)。冠動脈連結反応後1日および3日で心臓をマウスから採集して、その後Z-Fix(Anatech LTD)を用いて該心臓を灌流固定した。その後、Z-Fix中で心臓を一晩4℃で浸漬固定した。段階的エタノール溶液での脱水後

、Histo-Clear (National Diagnostics) およびパラフィン包埋に心臓を入れた。5ミクロン組織切片を脱パラフィン処理し、再水和して、3%過酸化水素でインキュベートして、水ですすいだ後、リン酸緩衝食塩水ですすいだ。切片を阻害して、1:50抗マウスST2一次抗体 (Morwell Diagnostic) および1:100抗ラットHRP結合二次抗体 (Vector Laboratories) でインキュベートした。ヘマトキシリンおよびエオシンでスライドを対比染色した。

【0239】

(ST2に対する患者試験およびELISA)

HEART試験。Healing and Early Afterload Reducing Therapy (HEART) 試験は、米国およびカナダ内の36の施設から急性心筋梗塞 (MI) である352人の患者を登録した無作為化二重盲検プラセボ対照試験であった。24時間以内にMIを経験した21歳を超える男性および女性が有資格者であった。包含および除外基準、ならびに試験設計の詳細については先行して記載されている (Pfeffer M. A., ら, Circulation, 1997, 95: 2643-2651; Greaves S. C., ら, Am. J. Cardiol, 1997, 80: 442-448; Solomon S. D., ら, Ann. Intern. Med., 2001, 134: 451-458; Aikawa Y., ら, Am. Heart J, 2001, 141: 234-242)。69人の無作為に選ばれた患者由来の心筋梗塞後1日、14日、および90日目から得た連続血液試料がこの試験に利用可能であった。先行して記載される二重モノクローナルサンドイッチELISAアッセイを用いて、可溶性T1/ST2をアッセイした (Kuroiwa K., ら, Hybridoma, 2000, 19: 151-159)。該アッセイは、市販されている (MBL International, Watertown, MA)。

【0240】

PRAISE試験。Prospective Randomized Amlodipine Survival Trial (PRAISE) 試験は、冠動脈疾患が原因の心不全を有する患者でのアムロジピンの予測的大規模試験であった。この試験結果では、重度の心不全でのアムロジピンによる利益はなかった。療法前のこの試験を始めた時点で血液試料を抽出し、その後試験の途中で2度抽出した。可溶性T1/ST2を上述のようにアッセイした。心不全に対する重要な現行の血液試験のうちの1つは、脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP) である。本発明者らは、心不全患者でのT1/ST2量が変化するかについて、かつこれらの患者でT1/ST2量がBNP量に相関するかについて試験した。

【0241】

統計。示される各インビトロ実験を最少で3度実行した。値は、平均±標準誤差である。一元配置ANOVAまたは反復測定ANOVAによって、適当であれば事後ボンフェローニ多重比較 (post hoc Bonferroni multiple comparison) 分析を用いてデータを分析した。非正規パラメータ分布によるログ変換値を用いて、血清値に関して回帰曲線を実行した。P値<0.05は統計的に有意であると考えられた。

【0242】

(結果:)

マウス内の心筋梗塞でのT1/ST2タンパク質のインビボ発現。外傷心筋でのT1/ST2の発現を評価するために、冠動脈連結反応を介して、マウスに実験的心筋梗塞を施した。図11は、心筋梗塞後1日および3日目のマウス心臓での免疫組織化学を用いたT1/ST2のタンパク質発現を示す。左心室の全ての領域、すなわち正常、梗塞、および境界地帯で、ポジティブ染色が心筋梗塞後 (MI後) 1日目に見られたが、心筋梗塞後3日目には見られなかった。T1/ST2に対する染色は、1日および3日目偽手術対照では観察されなかった。これらの結果によって、T1/ST2タンパク質は、3日目に見られる梗塞および境界地帯へのマクロファージの遊走前の梗塞後再構築 (リモデリング) の

早期位相中の急性外傷に応答して発現することが示唆される。これらの試験に用いたモノクローナル抗体は、T 1 / S T 2 の可溶性および膜型間の識別はしない。

【0243】

可溶性 T 1 / S T 2 は、心筋梗塞後 1 日目の患者の体循環で増加する。可溶性 T 1 / S T 2 は、心筋細胞で高度に誘導され、T 1 / S T 2 タンパク質は、実験的心筋梗塞後のマウス心筋で高度に発現するので、本発明者らは、可溶性 T 1 / S T 2 が心筋梗塞後の患者の体循環で増加すると仮定した。

【0244】

方法および結果：二重モノクローナルサンドイッチ E L I S A アッセイを用いて、本発明者らは、心筋梗塞当日（1 日目）と、心筋梗塞後 14 日および 90 日目とで H E A R T 試験の 69 人の参加者から得た血液試料をアッセイした。図 12 a に示すように、全身性 T 1 / S T 2 タンパク質は、14 日目（平均±標準誤差 0.98±0.06 ng/ml；範囲 0.25 から 3.42 ng/ml）および 90 日目（平均±標準誤差 0.79±0.07 ng/ml；範囲 0.02 から 3.53 ng/ml；14 日目対 90 日目 P = N S）と比べて、心筋梗塞後 1 日目で有意に増加した（平均±標準誤差 3.8±0.4 ng/ml、 $p < 0.001$ ；範囲 0.32 から 17.42 ng/ml）。90 日目の平均値は、健康な対照に対する公表平均値と類似であった（K u r o i w a K. , ら, H y b r i d o m a, 2000, 19:151-159）。全身性 T 1 / S T 2 タンパク質量は、図 12 b に示すピーククレアチンキナーゼ量（ $r = 0.41$ 、 $p < 0.001$ ）と正に相関していた。高全身性 S T 2 タンパク質量も、図 12 c の四分位点分析（ $p = 0.03$ ）に示すように、心筋梗塞後 1 日目の低駆出率に関連していた。

【0245】

結論：これらの結果によって、心筋外傷の程度と心筋梗塞の臨床状況での体循環への可溶性 T 1 / S T 2 の合成および分泌との間の協調した調節が示唆される。

【0246】

可溶性 T 1 / S T 2 は、重度の慢性心不全患者の体循環で増加する。この試験によって、重度の慢性心不全患者の血清中の可溶性 T 1 / S T 2 量が、心不全で増加する神経ホルモンである B N P、P r o A N P、およびノルエピネフリンの量に関連するという仮定を試験した。

【0247】

方法および結果：P r o s p e c t i v e R a n d o m i z e d A m l o d i p i n e S u r v i v a l E v a l u a t i o n 2 試験（P R A I S E - 2）心不全試験（New York Heart Association 機能クラス I I I または I V、終点：死亡率または移植）の神経ホルモン補試験から得た血清試料、臨床変数、および神経ホルモン量を用いた。P R A I S E - 2 試験は、非虚血性病因のうっ血性心不全患者の生存へのアムロジピン 10 mg/日の効果を評価する複数の試験機関にまたがった無作為化二重盲検比較群プラセボ対照試験であった。試験は、米国およびカナダの 240 の拠点から採用した患者からなっていた。神経ホルモン補試験は、主試験に参加している 26 の施設から採用した 181 人の患者からなっていた。主 P R A I S E - 2 および神経ホルモン補試験両方は、参加機関の倫理調査委員会によって認証された。患者は、年齢が少なくとも 18 歳であり、非虚血性病因の心不全であり、症状が休止状態かまたは最小程度（New York Heart Association 機能クラス I I I または I V）であり、かつ 30% より低い左心室駆出率を持つ場合に有資格者であった。全ての患者は、少なくとも 3 ヶ月間 A C E 阻害剤およびジゴキシンでの治療中であった。患者は、最近または遠い過去に狭心症の病歴を有していた場合は除外された。

【0248】

T 1 / S T 2、神経ホルモン、および酸化ストレスの測定に対するアッセイ。基線および 2 週目で血液試料を評価した（表 1）。サンドイッチ二重モノクローナル抗体 E L I S A 法（Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Nagoya, Japan）を用いて、製造元の指示にしたがって可溶性 T

1 / S T 2 を測定した。要約すると、抗ヒト T 1 / S T 2 抗体で被覆したマイクロウエルで、血清試料または標準物質をインキュベートした。洗浄後、ペルオキシダーゼ結合抗ヒト T 1 / S T 2 抗体をマイクロウエルに添加して、インキュベートした。さらに洗浄した後、ペルオキシダーゼ基質を添加して、450 nm での光学密度を測定した。循環カテコールアミン（ノルエピネフリン、エピネフリン、ドーパミン）、アンギオテンシン I I、ナトリウム利尿ペプチド（プロ心房ナトリウム利尿ペプチド（P r o - A N P）、脳ナトリウム利尿ペプチド（B N P））、および酸化ストレス指標（マロンジアルデヒド、アドレノルチン）を先行して記載されるように測定した（D h a l l i a K S, ら, M o l C e l l B i o c h e m, 1989; 87: 85-92; M o e G W, ら, A m H e a r t J, 2000; 139: 587-95）。試験登録時に入手した162人の患者由来および試験登録後2週間目で入手した同患者のうち135人由来の試料に関して T 1 / S T 2 血清測定を実行した。基線 T 1 / S T 2 量は、基線 B N P 量（ $r = 0.3511$ 、 $p < 0.0001$ ）、基線 P r o A N P 量（ $r = 0.3598$ 、 $p < 0.0001$ ）、および基線ノルエピネフリン量（ $r = 0.3854$ 、 $p < 0.0001$ ）に相関していた（表2）。T 1 / S T 2 での変化（2週間目の T 1 / S T 2 量 - 試験登録時の T 1 / S T 2 量）は、基線 B N P（ $p < 0.0001$ ）および基線 P r o A N P（ $p < 0.0001$ ）であるように、死亡率または移植の一変量の予測子として有意であった（ $p = 0.048$ ）（表3）。B N P および P r o A N P を含む多変量モデルでは、T 1 / S T 2 での変化は、B N P および P r o A N P から独立した死亡率または移植の独立予測子として依然として有意であった（表4）。

【0249】

（表1 基線特性）

【0250】

【表1】

A. 全患者				
	N	平均	第5百分位	第95百分位
基線 ST2 (ng/mL)	161	0.24	0.16	0.70
基線 BNP (pmol/L)	162	56.0	3.70	264.30
基線 ProANP (pg/L)	162	1778.50	531.00	5615.00
ノルエピネフリン (pg/mL)	158	401.58	165.90	1095.00
ドーパミン (pg/mL)	158	39.05	4.22	398.40
エピネフリン (pg/mL)	158	54.92	11.64	139.90
アンギオテンシン II (pg/mL)	157	22.80	7.00	67.30
アドレノルチン (ng/mL)	156	22.84	4.31	369.31
クレアチニン (mmol/L)	158	1.10	0.80	1.90
年齢(年)	157	59.9	32.5	78.2
ボディマス指数 (kg/mm2)	157	27.5	20.4	39.7
LV駆出率	158	22.0	11.0	30.0

B. 基線および2週間目の血液試料での患者				
	N	平均	第5百分位	第95百分位
基線 ST2 (ng/mL)	135	0.24	0.16	0.81
基線 BNP (pmol/L)	135	54.90	3.30	264.30
基線 ProANP (pg/L)	135	1788.00	488.00	4788.00
ノルエピネフリン (pg/mL)	130	395.05	171.70	1118.00
ドーパミン (pg/mL)	130	64.02	4.32	405.50
エピネフリン (pg/mL)	130	56.07	12.24	134.80
アンギオテンシン II (pg/mL)	131	21.70	7.00	58.30
アドレノルチン (ng/mL)	130	24.41	4.43	369.31
クレアチニン (mmol/L)	135	1.10	0.80	2.00
年齢(年)	134	60.5	34.4	78.2
ボディマス指数 (kg/mm2)	134	27.4	20.5	39.7
LV駆出率	135	22.0	11.0	30.0

（表2 臨床変数および神経ホルモンに対する S T 2 の関連：スピアマンの相関（S p e a r m a n C o r r e l a t i o n））

【0251】

【表 2】

			基線ST2	ST2での変化	
基線	BNP (pmol/L)	R	0.3511	-0.11327	
		p 値	<0.0001	0.1843	
		N	161	139	
基線	ProANP (pmol/L)	R	0.35979	-0.10967	
		p 値	<0.0001	0.1987	
		N	161	139	
BNPでの変化 *	(pmol/L)	R	-0.10184	0.21497	10
		p 値	0.2329	0.0110	
		N	139	139	
ProANPでの変化 *	(pmol/L)	R	0.05584	0.28847	
		p 値	0.5138	0.0006	
		N	139	139	
ノルエピネフリン	(pg/ml)	R	0.38535	-0.25253	
		p 値	<0.0001	0.0032	
		N	156	134	
ドーパミン	(pg/mL)	R	0.07879	0.22127	20
		p 値	0.3283	0.0102	
		N	156	134	
エピネフリン	(pg/mL)	R	0.08043	-0.12110	
		p 値	0.3182	0.1634	
		N	156	134	
アンギオテンシン II	(pg/mL)	R	0.00374	-0.00725	
		p 値	0.9630	0.9335	
		N	156	135	
アドレノルチン	(ng/mL)	R	0.00544	-0.10422	30
		p 値	0.9464	0.2308	
		N	155	134	
クレアチニン(ユニット)		R	0.16567	0.02513	
		p 値	0.0388	0.7724	
		N	156	135	
LV駆出率		R	-0.08006	0.03651	
		p 値	0.3205	0.6742	
		N	156	135	
年齢(年)		R	-0.11768	0.19260	40
		p 値	0.1447	0.0274	
		N	155	134	
ボディマス指数(ユニット)		R	0.04561	-0.05410	
		p 値	0.5731	0.5347	
		N	155	134	

R (スピアマンの相関係数 (Spearman correlation coefficient)) ; N (試料番号)。基線 (登録時の値) ; * 変化 (2週間目の値 - 試験登録時の値)。

【0252】

(表3 死亡率および移植(終点)の一変量の予測子)

【 0 2 5 3 】

【 表 3 】

変数	オッズ比	95%信頼区間	p- 値
基線ST2、0. 1ng/mL当たり	1.114	0.961-1.300	0.1509
基線BNP、10pmol/L当たり	1.106	1.060-1.161	<0.0001
基線ProANP、10pg/L当たり	1.007	1.005-1.010	<0.0001
ST2での変化*、0. 1ng/mLの変化当たり	1.320	1.042-1.827	0.0482
BNPでの変化*、10pmol/Lの変化当たり	1.033	0.966-1.110	0.3401
ProANPでの変化*、10pg/L変化当たり	1.003	0.997-1.009	0.3413
ノルエピネフリン、1pg/mL当たり	1.001	1.000-1.002	0.0562
ドーパミン、10pg/mL当たり	1.029	1.006-1.059	0.0433
エピネフリン、1pg/mL当たり	0.999	0.995-1.001	0.6645
アンギオテンシンII、1pg/mL当たり	0.997	0.977-1.017	0.7921
アドレノルチン、10ng/mL当たり	0.985	0.943-1.017	0.4167
クレアチニン、1mmol/mL当たり	2.487	0.997-6.417	0.0526
LV駆出率	0.952	0.897-1.007	0.0906
人種	1.947	0.946-4.192	0.0776
性別	1.225	0.576-2.728	0.6061
年齢	1.435	1.099-1.914	0.0104
病因	1.543	0.744-3.336	0.2543
ボディマス指数、1kg/mm ² 当たり	0.972	0.919-1.021	0.2876

10

20

基線（試験登録時の値）；* 変化（2週間目の値－試験登録時の値）。

【 0 2 5 4 】

（表4 死亡率および移植（終点）の多変量の予測子：ST2の予測値）

【 0 2 5 5 】

【 表 4 】

変数	p
基線ST2および基線BNP	
基線	0.0003
基線ドーパミン	0.0906
基線	0.6368
基線ST2および基線ProANP	
基線	<0.0001
基線ドーパミン	0.0944
基線	0.3306
ST2での変化*および基線BNP	
基線 BNP	0.0001
ST2での変化	0.0392
ST2での変化*および基線ProANP	
基線 ProANP	<0.0001
ST2での変化	0.0274

30

40

基線（試験登録時の値）；* 変化（2週間目の値－試験登録時の値）。

【 0 2 5 6 】

（実施例3）

50

(方法)

試験集団。心筋梗塞での血栓崩壊 (TIMI) 14 試験は、1997 年 3 月～1998 年 7 月におこなわれた ST セグメント増加 MI を有する患者に対する組み合わせ再灌流療法の無作為化非盲検用量範囲探索 (dose-ranging) 試験であった。特に、この試験は、4 つの異なる血栓崩壊の組み合わせ (すなわちアブシキシマブ単独、アルテプラゼ単独、アルテプラゼの減少用量とともにアブシキシマブ、およびストレプトキナーゼの減少用量とともにアブシキシマブ) を比較する血管造影試験であった (Antman EM ら, Circulation, 1999; 99: 2720-32; Antman EM ら, Eur Heart J, 2000; 21: 1944-53)。ENTIRE-TIMI 23 試験は、全量のテネクテプラゼ (tenecteplase) およびアブシキシマブに加えた半分量のテネクテプラゼ (tenecteplase) を含む薬理学的再灌流の様々な形態を用いた補助的抗トロンビン療法としてエノキサパリン (enoxaparin) を評価する、2000 年 2 月～2001 年 9 月におこなわれた非盲検用量範囲探索 (dose-ranging) の複数の試験機関にまたがった試験であった (Antman EM ら, Circulation, 2002; 105: 1642-9)。両試験では、患者は、6 時間 (ENTIRE) または 12 時間 (TIMI 14) 以内に少なくとも 30 分間の虚血性不快感に適格な症状発生を有し、かつ 2 つの隣接する前胸部心電図誘導 (lead) で少なくとも 0.1 mV ST セグメント増加を示した場合、包含されるに値した。両試験に対する除外基準としては、出血危険性の増加、重度の腎不全、および心臓性ショックが挙げられた。

10

20

【0257】

実験室分析。TIMI 14 での登録後の、基線、1 時間、3 時間、12 時間、および 24 時間目で採取した血清試料を評価した。ENTIRE 試験から得た血清試料は、基線のみで利用可能であった。試料採取の 60 分以内で血清を単離して、試料が -70℃ で維持される TIMI Biomarker Core Lab (Boston, MA) に輸送するまで -20℃ またはそれより低温度で保存した。サンドイッチ二重モノクローナル抗体 ELISA 法 (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Nagoya, Japan) を用いて、可溶性 ST2 を測定した。抗ヒト ST2 抗体で被覆したマイクロウエルで、血清試料または標準物質をインキュベートした。洗浄後、ペルオキシダーゼ結合抗ヒト ST2 抗体をマイクロウエルに添加して、インキュベートした。再度洗浄した後、ペルオキシダーゼ基質を添加して、450 nm での光学密度を測定した。高感度 C 反応性タンパク質 (hs-CRP, Dade-Behring Inc, Deerfield, IL)、クレアチンキナーゼ MB イソ酵素 (CK-MB)、B 型ナトリウム利尿ペプチド (SHIONORIA BNP, Shionogi, Osaka, Japan)、および心臓トロポニン I (ACS: 180, Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY) を以前に記載された方法を用いて測定した (Morrow DA ら, J Am Coll Cardiol, 1998; 31: 1460-5; Morrow DA ら, Clin Chem, 2000; 46: 453-460)。最初の 24 時間で 3 時間目、かつ 6 から 8 時間の間隔で、入院時の拠点で局所的にクレアチンキナーゼイソ酵素量を測定した。試料の利用可能性に起因して、ENTIRE-TIMI 23 から得た試料では、BNP 量を測定したが、TIMI 14 では測定しなかった。

30

40

【0258】

統計学的分析。患者を、試験への登録時での彼らの ST2 血清量を基礎として、四分位に分割した。平均および第 25～75 百分位を用いて、ST2 量を記載する。連続変数に対してクラスカルワリス検定 (Kruskal-Wallis test) を、かつカテゴリ変数に対して χ^2 検定を用いて、基線臨床特性および ST2 の四分位間の関連を分析した。非母数 (スピアマンの (Spearman's)) 相関係数を用いて、ST2 および他の連続基線変数間の相関を試験した。臨床試験結果との関連を評価するために、ウイルコクソンの順位和検定 (Wilcoxon rank-sum test) を用い

50

て、試験終点を満たした患者と満たさなかった患者との間でST2を比較した。ST増加心筋梗塞（STEMI）での死亡率の確立された予測子に対する期間を含むロジスティック回帰を用いて、治療結果とのST2の関連の多変量分析を実行した（Morrow, DAら, Circulation 2000; October 24; 102(17): 2031-7）。述べたところ以外では、提示する結果は、組み合わせたTIMI 14およびENTIRE-TIMI 23試験集団に対するものである。

【0259】

（結果）

基線ST2および臨床変数。性別、年齢、体重、および冠動脈疾患の程度を含む大部分の基線臨床特性は、基線ST2量と関連しなかった（表5）。この集団での患者は、過去の病歴をほとんど持たないか、または心不全の臨床的根拠をほとんど示さなかった。興味深いことに、ST2量（ $p < 0.0001$ ）および収縮期血圧と正に相関する心拍数によって、ST量（ $p = 0.05$ ）との適度な相関が示され、ST2が生体力学的ストレス下で心筋細胞によって分泌されるという理論に整合している。生物マーカー心臓トロポニンI、BNP、およびCRPは、それら全てが心筋梗塞後の治療結果を予測することが判明（de Lemos JAら, N Engl J Med 2001; 345: 1014-21; Antman EMら, N Engl J Med 1996; 335: 1342-9; Morrow DAら, J Am Coll Cardiol 1998; 31: 1460-5）しており、四分位点分析によってST2に相関し、心臓トロポニンIおよびCRPは、統計学的に有意であった。これらの生物マーカーを連続変数として評価したとき、定量的に弱い相関が観察された（表6）。

【0260】

（表5 ST2（ng/mL）の四分位に従った基線臨床特性）

【0261】

10

20

【表 5】

	四分位 1	四分位 2	四分位 3	四分位 4	pトレンド	p Q4 対 Q1
範囲 , ng/mL n	0.085 – 0.179 204	0.180 – 0.235 202	0.236 – 0.346 202	0.347 – 6.88 202		
無作為化に対する時間CP (時間)	2.8 ± 1.6	3.1 ± 1.5	3.2 ± 1.4	4.0 ± 1.9	<0.0001	<0.0001
年齢(年)	58 ± 10	58 ± 10	58 ± 11	58 ± 10	0.9	1.0
男性	74%	77%	85%	81%	0.03	0.09
白人	88%	89%	90%	88%	0.9	1.0
過去の病歴						
高血圧	25%	24%	36%	33%	0.02	0.09
うっ血性心不全	0%	0%	1.5%	1.0%	0.1	0.2
狭心症	26%	24%	26%	32%	0.3	0.2
糖尿病	14%	14%	15%	16%	0.9	0.5
CADの家系	73%	73%	73%	73%	0.2	0.08
高コレステロール血症	22%	21%	21%	29%	0.2	0.1
喫煙状況: 現在の喫煙者	57%	48%	49%	48%	0.2	0.06
身体的所見						
体重kg	83 ± 16	81 ± 15	82 ± 14	83 ± 15	0.4	0.8
収縮期 BP (mm Hg)	139 ± 21	138 ± 22	141 ± 23	143 ± 22	0.1	0.05
HR (BPM)	71 ± 17	75 ± 17	72 ± 16	80 ± 17	0.001	<0.0001
キリップ(Killip) クラスII～IV	2.0 %	1.5 %	3.6%	4.5%	0.3	0.2
診断試験						
cTnI > 0.1 ng/ml*	61%	69%	77%	84%	0.001	<0.0001
BNP > 80 pg/ml*	1.8%	5.4%	7.2%	14.4%	0.003	0.001
CRP > 1.5 ng/ml	2.1%	8.8%	8.1%	11.4%	0.006	<0.0001
クレアチニン mg/dL	1.0 ± 0.21	1.0 ± 0.20	1.0 ± 0.25	1.1 ± 0.28	0.1	0.03
程度 CAD (50% 狭窄症)					0.3	0.2
1 脈管	48%	55%	45%	50%		
2 脈管	38%	28%	34%	30%		
3 脈管	15%	18%	20%	20%		
EF (%)**	58 ± 15	58 ± 15	57 ± 15	57 ± 15	1.0	0.9

C P = 胸痛 ; H R = 心拍数 ; c T n I = 心臓トロポニン I ; B N P = B 型ナトリウム利尿ペプチド ; C R P = C 反応性タンパク質 ; C A D = 冠動脈疾患 ; E F = 駆出率。 * E N T I R E - T I M E 2 3 集団のみで測定 ; * * (N = 4 6 9) 以外で N = 4 4 8

(表 6 S T 2 および連続変数間の相関)

【 0 2 6 2 】

【表 6】

変数	スピアマンの相関係数(Spearman's rho)	P値
無作為化に対する時間CP	0.29	<0.0001
年齢	-0.003	0.9
体重(kg)	0.01	0.8
CKMBピーク	0.08	0.02
cTnI*	0.26	<0.0001
CRP	0.10	0.007
BNP*	0.068	0.15
クレアチニン	0.09	0.01
LVEF**	-0.005	0.9

C P = 胸痛 ; C K M B = クレアチンキナーゼの M B イソ酵素 ; c T n I = 心臓トロポニン

I ; B N P = B 型ナトリウム利尿ペプチド ; C R P = C 反応性タンパク質 ; C A D = 冠動脈疾患 ; E F = 駆出率。 * E N T I R E - T I M E 2 3 集団のみで測定 ; * * (N = 4 6 9) 以外で N = 4 4 8

S T 2 および臨床試験結果。 8 1 0 人の患者の組み合わせたコホートに対して、基線 S T 2 は、 3 0 日目の臨床試験結果と有意に関連していた (表 7)。特に、 S T 2 量は、登録後 3 0 日目までに、その後死亡した患者 ($p = 0.0001$)、あるいは新規 C H F を発症するかまたは C H F が悪化している患者 ($p = 0.009$) 間の診察時で有意により高かった。 S T 2 の平均増加基線量での二分は、 3 0 日間の追跡調査を通じて高くなった死亡率を示していた (ログランク ($\log - \text{rank}$)、 $p = 0.0009$ 、図 1 3)。さらに、 S T 2 の四分位点分析では、死亡 ($p = 0.001$) および死亡または C H F の複合 ($p = 0.001$) 両方の危険性は、 S T 2 のより高い量とともに段階的に階段状様式で増加した。 S T 2 と臨床事象との間のこの関連は、 2 つの個々の試験 (T I M I 1 4 および E N T I R E - T I M E 2 3) 間で一様であった。

【 0 2 6 3 】

(表 7 基線 S T 2 濃度 (ng / ml) および治療結果間の関連)

【 0 2 6 4 】

【表 7】

治療結果(30日目)	n	平均 [25,75]	p 値
死亡	28	0.379 [0.267, 0.611]	0.0001
生存	782	0.233 [0.178, 0.340]	
MI	29	0.213 [0.171, 0.259]	0.11
MI無し	781	0.237 [0.181, 0.348]	
CHF	21	0.287 [0.237, 0.470]	0.009
CHF無し	789	0.233 [0.178, 0.345]	
死亡/CHF	47	0.317 [0.246, 0.590]	<0.0001
死亡無し/CHF	763	0.231 [0.177, 0.339]	

M I = 心筋梗塞 ; C H F = うっ血性心不全

S T 2 血清量の評価。四分位点分析した基線 S T 2 量は、無作為化に対する時間に有意に関連していた (表 5 および 6)。 S T 2 量は、冠動脈閉塞後 1 日目に増加して、次の 1 4 日間で正常に戻ることが予期された (6)。 T I M I 1 4 患者のうち、 2 2 8 人の患者での血清 S T 2 の連続測定の分析によって、時間とともに増加することが明らかになり、大部分の患者が 1 2 時間目にピーク S T 2 量に達したが、少数の患者は、この時間点を過ぎても増加し続ける S T 2 血清量を有することが明らかになった。

【 0 2 6 5 】

多変量分析。年齢、心拍数、収縮期血圧、心筋梗塞位置、キリップ ($K i l l i p$) クラス、および胸痛の発症からの時間を含む S T E M I での確立された臨床予測子に対する制御後、 S T 2 の増加量は、依然として 3 0 日目での死亡の独立した予測子であった ($O R 1.77$; $95\% C I 1.01 \sim 3.12$ 、 $p = 0.047$)。 B N P を臨床モデルに付加すると、この関連は有意ではなくなった (評価は E N T I R E に限定した)。より後期の時間点 (T I M I 1 4 での 3 時間および 1 2 時間目) で確認された S T 2 の予測能力も評価し、 S T 2 と死亡率危険性との間のより強い関連が明らかになった。

【 0 2 6 6 】

したがって、血清可溶性 T 1 / S T 2 は、神経ホルモン活性化と匹敵する重度の心不全に対する新規な生物マーカーである。重度の慢性 N Y H A クラス I I I ~ I V 心不全の患者では、 T 1 / S T 2 量での変化は、死亡率または移植の終点の独立した予測子である。

【 0 2 6 7 】

この試験では、本発明者らは、急性心筋梗塞でのインターロイキン-1 ファミリーの近

年同定されたレセプターの血清測定の潜在的役割を考察した。細胞が生体力学的に過負荷であるとき、このレセプターの可溶型は、心筋細胞によって急速に分泌される。これによって、心筋梗塞の場合のように、心筋が急激に過負荷になる状態で該レセプターが役割を果たすことが示唆される。これを考察するために、本発明者らは、急性心筋梗塞患者のコホートでの診察時に血清ST2量を測定した。その結果によって、これらの患者での診察時のST2量が院内および30日目死亡率に関連することが示される。さらに、多変量分析によって、ST2量は、重要な臨床因子に対する制御後の治療結果に独立して関連することが示された。

【0268】

したがって、これらのデータの有意性を二倍にする。最も重要なこととして、これらのデータによって、宿主防御およびT細胞分化に参与するインターロイキンレセプターファミリー (Sims JE. IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family. *Curr Opin Immunol*. 2002; 14: 117-22) は、急性心筋梗塞の初期事象に参与し得ることが示唆される。これらのデータは、心筋梗塞患者の予後を改良するための潜在的新規標的としてのこのレセプターを含意する。二次的には、ST2は、急性心筋梗塞患者での予後情報を提供する新規な生物マーカーを表す。したがって、ST2と心筋過負荷の別の状態である非虚血性うっ血性心不全の患者間の死亡率との間の関連を実証する本発明者らの先行研究が拡張される (Weinberg EO, Shimp M, Hurwitz S, Tominaga S, Rouleau JL, Lee RT. Identification of serum soluble ST2 receptor as a novel heart failure biomarker. *Circulation*. 2003; 107: 721-6)。

【0269】

除外はしないが、ST2および心筋梗塞後の治療結果の関係は単に、CRP等の炎症性マーカーおよび心筋梗塞の危険性での慢性増加の関連の反映であるということはない。BNPのようにST2は、心筋細胞自体に合成され得、明らかな虚血性疾患を有さない患者から得たデータによって、冠動脈疾患の非存在下でST2が予後を予測することが示唆される。さらに、予備データによって、安定した冠動脈疾患を有する外来患者でのST2量は、CRP量に関連しないことが示唆される。本発明者らのデータを強力な臨床モデル (REF TIMI Risk Score) に付加するとき、該データが危険性評価に対するST2補足値を裏づける一方で、ST2によって、ENTIRE-TIMI 23に限定したより小さいデータセットでのBNPに追加情報が与えられなかった。他の利用可能な生物マーカーと組み合わせたST2の予測値もありうる。

【0270】

ST2は、機械的過負荷心筋細胞によって分泌され得るが、多くの細胞がST2を分泌し得る。したがって、血清ST2での増加は、急性心筋梗塞に完全に特異的ではない可能性がある。非虚血性心不全 (Weinberg EO, Shimp M, Hurwitz S, Tominaga S, Rouleau JL, Lee RT. Identification of serum soluble ST2 receptor as a novel heart failure biomarker. *Circulation*. 2003; 107: 721-6) に加えて、喘息 (Oshikawa K, Kuroiwa K, Tago K, Iwahana H, Yanagisawa K, Ohno S, Tominaga SI, Sugiyama Y. Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164: 277-81)、または全身性エリテマトーデス等の自己免疫疾患 (Kuroiwa K, Arai T, Okazaki H, Minota S, Tominaga S. Identification of human ST2 protein in the

sera of patients with autoimmune diseases. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 284: 1104-8) の患者もまた、増加血清 ST 2 量を有し得る。したがって、そのような被験体での急性心筋梗塞の初期診断での ST 2 測定の有用性は疑問の余地がない。

【0271】

しかし、ST 2 は、依然として MI 患者での治療に対する潜在的な標的である。これらのデータによって、どのようにゲノム技術が通常の疾患での新規な潜在的病態生理学的経路を明らかにし得るかについて実証する。初めに、インターロイキン-1 ファミリーの試験を通じて ST 2 を同定したが、心筋疾患でのその役割は、近年に DNA マイクロアレイを用いたゲノム試験によって示唆されたのみであった。DNA マイクロアレイを用いた試験によって、潜在的新規疾患経路の同定が可能になるが、これは、該経路の役割を理解する上での初期の工程のみである。ST 2 量は治療結果を予測するので、上記データによって、急性心筋梗塞への ST 2 の役割が裏づけられる。心筋梗塞での ST 2 の機能の試験が可能である。さらに、可溶性および膜 ST 2 レセプターに対するリガンドを同定することは、膜および可溶性レセプターの潜在的に競合する役割をさらに理解するために役立ち得る。

10

【0272】

記載した結果によって、T 1 / ST 2 が心臓発作および／または心不全中に分泌され、容易に測定され得、それによって、本発明の断定した利用性を裏付けることが立証される。

20

【0273】

(等価物)

当業者は、慣用的実験法に過ぎない方法を用いて、本明細書に記載した本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を認識するか、または確認し得る。そのような等価物を特許請求の範囲に包括することが意図される。

【0274】

本明細書中に記載した全ての参考文献は、その全体が参考として援用される。

【図 1】

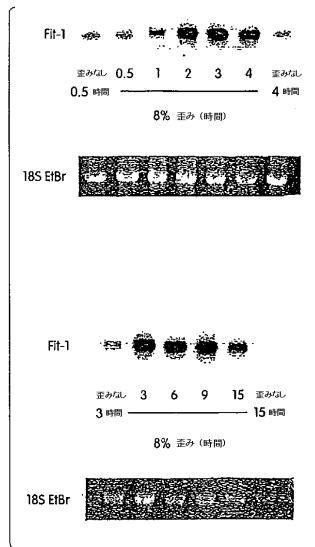


Fig. 1

【図 2】

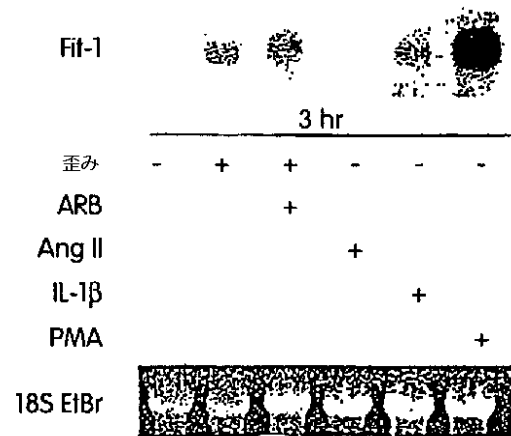


Fig. 2

【図 3】

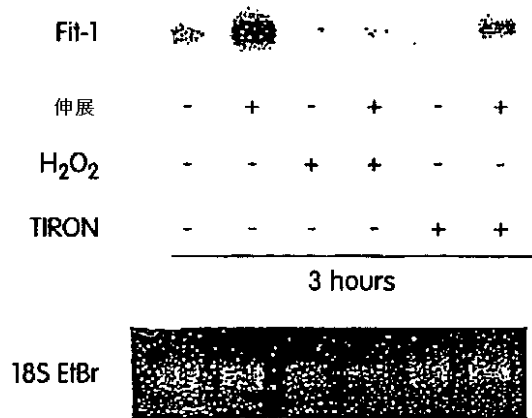


Fig. 3

【図 4】

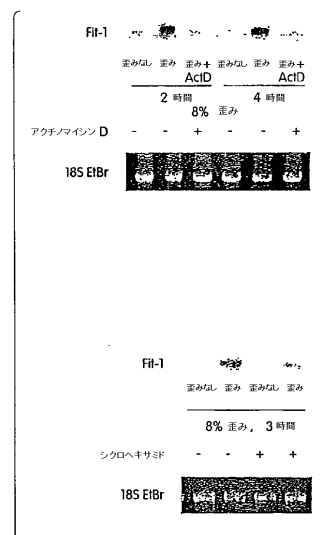


Fig. 4

【図 5】

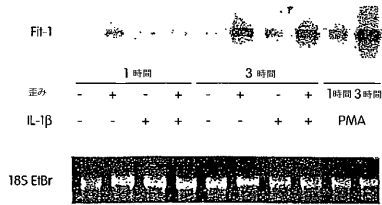


Fig. 5

【図 6】

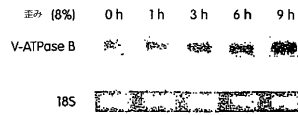


Fig. 6

【図 7】

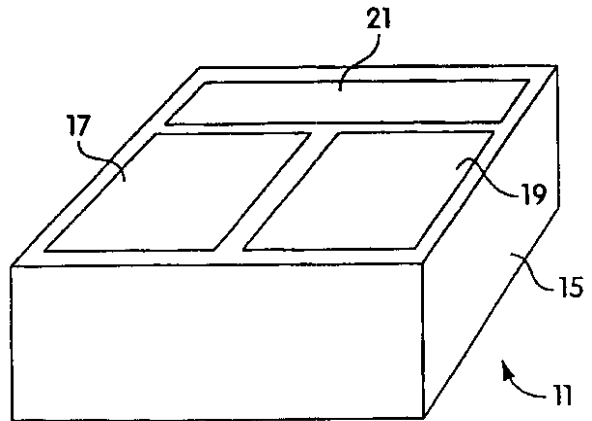


Fig. 7

【図 8】

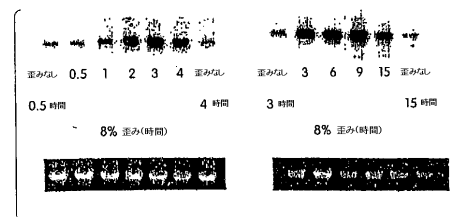


Fig. 8

【図 9】

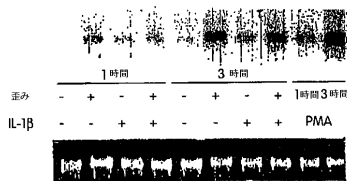


Fig. 9

【図 11】

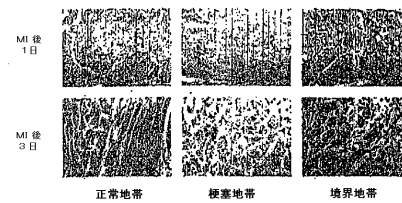


Fig. 11

【図 10】

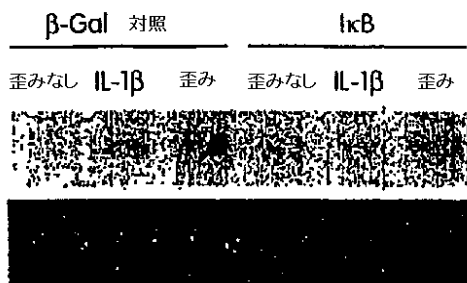


Fig. 10

【図 12-1】

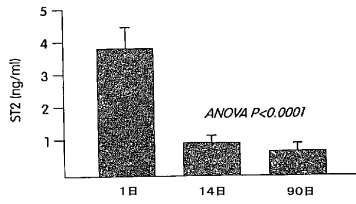


Fig. 12A

【図 12-2】

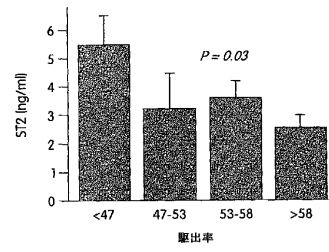


Fig. 12C

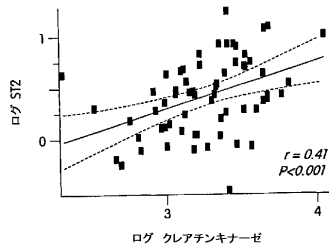


Fig. 12B

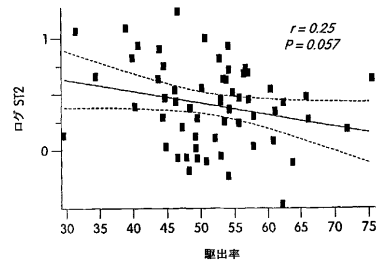


Fig. 12D

【図 13】

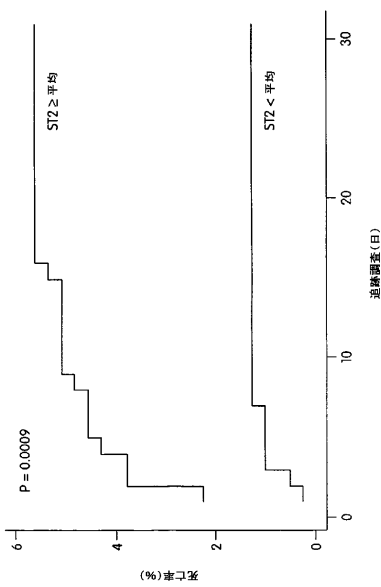


Fig. 13

【配列表】

2010041998000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード (参考)
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/53		M
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/53		D
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	G 0 1 N	33/50		Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N	33/15		Z
	A 6 1 K	37/02		
	C 1 2 N	15/00		A

(72)発明者 リチャード ティー. リー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 9 3, ウェストン, カントリー ドライブ 4
 Fターム(参考) 2G045 AA25 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA26 CA12 HA14 HA17
 4B063 QA19 QQ08 QQ42 QQ53 QR32 QR36 QR55 QR77 QS34 QX01
 4C084 AA01 AA17 AA20 BA01 BA22 BA23 MA02 NA05 NA14 ZA362
 ZA372 ZA392 ZA452 ZC751