(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2010-513246
(P2010-513246A)
(43)公表日　平成22年4月30日(2010.4.30)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 45/00	***(2006.01)***	A61K 45/00		2G045
C12N 15/09	***(2006.01)***	C12N 15/00	ZNAA	4B024
A01K 67/027	***(2006.01)***	A01K 67/027		4C084
A61K 48/00	***(2006.01)***	A61K 48/00		4C086
A61K 31/7088	***(2006.01)***	A61K 31/7088		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 40 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-540777 (P2009-540777)
(86)(22)出願日　平成19年12月13日 (2007.12.13)
(85)翻訳文提出日　平成21年8月12日 (2009.8.12)
(86)国際出願番号　PCT/EP2007/063899
(87)国際公開番号　WO2008/071771
(87)国際公開日　平成20年6月19日 (2008.6.19)
(31)優先権主張番号　06126205.1
(32)優先日　平成18年12月15日 (2006.12.15)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　504389991
ノバルティス　アーゲー
スイス国　ツェーハー－４００２　バーゼル，リヒトシュトラーセ　３５
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100101454
弁理士　山田　卓二
(74)代理人　100067035
弁理士　岩崎　光隆
(74)代理人　100062144
弁理士　青山　葆
(74)代理人　100144923
弁理士　中川　将之

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＧＰＲ４の阻害

(57)【要約】
本発明は、新脈管形成を阻害する、例えば癌治療において腫瘍の成長を阻害する医薬の製造におけるＧＰＲ４阻害剤の使用に関するものである。好ましい態様において、上記阻害剤は、好ましくは２本鎖状のｓｉＲＮＡである。これに加えて、本発明は、さらにＧＰＲ４が不活化された非ヒト動物、例えばＧＰＲ４を欠くノックアウトマウス、および新脈管形成に関する実験モデルとして、また新脈管形成を調節する化合物をスクリーニングするための上記動物の使用を包含する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
新脈管形成阻害用医薬の製造を目的とする、ＧＰＲ４阻害剤の使用。
【請求項２】
新脈管形成の阻害が、癌、黄斑変性、乾癬、関節炎、多発性硬化症またはアテローム性動脈硬化症の処置を目的とする、請求項１記載の使用。
【請求項３】
阻害剤がｓｉＲＮＡである、請求項１または２記載の使用。
【請求項４】
ｓｉＲＮＡが２本鎖である、請求項３記載の使用。
【請求項５】
医薬が人間を処置するためのものであり、ｓｉＲＮＡの配列が、
センス：５'－ＧＣＧＣＴＧＴＧＴＣＣＴＡＴＣＴＣＡＡｄＴｄＴ－３'(配列番号１)
アンチセンス：５'－ＴＴＧＡＧＡＴＡＧＧＡＣＡＣＡＧＣＧＣｄＡｄＧ－３'(配列番号２)
である、請求項４記載の使用。
【請求項６】
医薬が人間を処置するためのものであり、ｓｉＲＮＡの配列が、
センス：５'－ＣＣＡＴＧＴＣＴＧＧＣＣＡＧＡＴＡＡＡｄＴｄＴ－３'(配列番号４)
アンチセンス：５'－ＴＴＴＡＴＣＴＧＧＣＣＡＧＡＣＡＴＧＧｄＣｄＧ－３'(配列番号５)
である、請求項４記載の使用。
【請求項７】
医薬が人間を処置するためのものであり、ｓｉＲＮＡの配列が、
センス：５'－ＣＡＴＡＡＧＡＣＣＧＣＡＡＴＴＣＴＡＡｄＴｄＴ－３'(配列番号７)
アンチセンス：５'－ＴＴＡＧＡＡＴＴＧＣＧＧＴＣＴＴＡＴＧｄＴｄＴ－３'(配列番号８)
である、請求項４記載の使用。
【請求項８】
請求項１～７記載の医薬で対象を処置する方法。
【請求項９】
配列番号１～２０の配列を含むｓｉＲＮＡ分子。
【請求項１０】
ＧＰＲ４をコードする遺伝子が欠失されている、非ヒト動物。
【請求項１１】
新脈管形成、癌、黄斑変性、乾癬、関節炎、多発性硬化症またはアテローム性動脈硬化症に関する実験モデルとしての、請求項１０記載の動物の使用。
【請求項１２】
新脈管形成、癌、黄斑変性、乾癬、関節炎、多発性硬化症またはアテローム性動脈硬化症を調節する化合物をスクリーニングするための、請求項１０記載の動物の使用。
【請求項１３】
癌(例えば固形腫瘍癌)、ＣＯＰＤ、関節炎(例えば慢性関節リウマチ)から選択される疾患に侵されているヒト患者を処置するための医薬の製造方法で使用されるＧＰＲ４(例えばヒトＧＰＲ４)の阻害剤を同定する方法であって、
(ａ)候補阻害剤をＧＰＲ４(例えば宿主細胞で発現されたヒトＧＰＲ４)と接触させ、
(ｂ)ＧＰＲ４機能の阻害を(例えばｐＨ依存的ｃＡＭＰ形成を測定することにより)観察し、
(ｃ)ｐＨ依存的ｃＡＭＰ形成の阻害を示す阻害剤を選択し、さらに
(ｄ)所望により、ＧＰＲ４機能阻害性を強化し、そして／または対象のヒト患者における上記阻害剤の毒性プロフィールを改善するように工程(ｃ)の阻害剤に構造的修飾を加えて

もよい
方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
１．発明の分野
本発明は、新脈管形成の阻害、例えば癌治療における腫瘍成長の阻害または関節炎の処置を目的とする医薬の製造におけるＧＰＲ４阻害剤の使用に関するものである。好ましい態様では、上記阻害剤はｓｉＲＮＡである。
【０００２】
本発明はまた、ＧＰＲ４が不活化されている非ヒト動物および新脈管形成についての実験モデルとして、および新脈管形成を調節する化合物をスクリーニングするための上記動物の使用に関するものである。
【背景技術】
【０００３】
２．発明の背景
ＧＰＲ４は、３種の密接に関連したＧタンパク質共役型受容体(ＧＰＣＲ)：ＧＰＲ４、ＯＧＲ１／ＧＰＲ６８およびＴＤＡＧ８／ＧＰＲ６５を含むタンパク質ファミリーに属する。我々は、ＯＧＲ１およびＧＰＲ４が細胞外プロトンを感知し、弱酸性ｐＨへ曝露されたときに細胞内第２メッセンジャーを刺激することを以前に示した[1]。同様に、ＴＤＡＧ８も、プロトン感受性受容体として同定されている[2、3]。これらの受容体の半最大活性化は、ｐＨ７．４前後の生理学的範囲で観察され、最高の活性はｐＨ６．８で観察される。遺伝子発現プロファイリング試験において、我々は、ＧＰＲ４ ｍＲＮＡの発現と内皮細胞に関するマーカー遺伝子の間に強い相関関係を見出した。以前の報告は、既に内皮細胞機能におけるＧＰＲ４の重要な役割について記載しているが、これらの発見は、推定されるリガンドスフィンゴシルホスホリルコリン(ＳＰＣ)に関連して見られたものである[4、5]。新脈管形成、すなわち新たな血管の形成は、癌の顕著な特徴であり、腫瘍を大きさ１～３ｍｍ[3]以上に成長させ得て、局所的浸潤および転移を促す。これは、血管新生増殖因子、例えばＶＥＧＦ(血管内皮増殖因子)の異所性発現および低酸素状態、グルコース欠乏、および酸化および機械的ストレスによる腫瘍微小環境の局所改変により誘導される[6]。最近、最初の抗ＶＥＧＦ療法が、結腸直腸癌の処置に是認され、新脈管形成が癌治療に関する重要な標的であるという概念が確認された。
【０００４】
腫瘍は、正常組織と比べて酸性のｐＨを有し得る[7]。低酸素状態に応答して、腫瘍細胞は、解糖速度を高めてエネルギーを生じることにより、細胞外空間を酸性化する[8、9]。腫瘍の常用的画像診断方法である、ＦｄＧ(フルオロデスオキシグルコース)ＰＥＴ(陽電子放射断層撮影)により観察され得るところによると、ほとんどの腫瘍は解糖を上方制御する。低酸素状態およびアシドーシスに順応することにより、腫瘍細胞は、正常細胞が耐容しない条件下でも生き残るため、この特徴は浸潤能と相関関係を示し得る。正常細胞は酸性微小環境に長時間曝露されると、壊死またはアポトーシスが起こる[11]。
【０００５】
細胞がどのように細胞外アシドーシスに順応し得るかについてはほとんど知られておらず、新脈管形成の調節における低酸素状態とアシドーシス間の相互作用についても完全に解明されているわけではない[12]。
【発明の概要】
【０００６】
３．発明の要旨
本発明者らは、内皮細胞におけるＧＰＲ４の発現を分析し、これらの細胞におけるｐＨ依存的ｃＡＭＰ形成を示している。本発明者らは、ＨＵＶＥＣ(ヒト臍静脈内皮細胞)において、ｃＡＭＰ応答がＧＰＲ４特異的ｓｉＲＮＡにより排除されることを立証しているが

、このことはＧＰＲ４がｐＨ感知に関与することを示すものである。これらの発見は、新脈管形成の制御に関する有望な新しい方法を示している。

【０００７】

生理機能におけるＧＰＲ４の役割についての理解をさらに深めるため、本発明者らはＧＰＲ４欠損マウスを作製した。驚くべきことに、これらの動物は、生存能力および繁殖力があり、重大な異常も示さないことから、ＧＰＲ４が発達中において不可欠ではないことがわかる。しかしながら、ＧＰＲ４欠損マウスは、増殖因子移植新脈管形成モデルに付されたとき、ｂＦＧＦ推進によるのではなく、ＶＥＧＦ推進による新脈管形成に対して顕著に低い応答を示す。さらに、異なる２つの正常位腫瘍モデルにおいて野生型マウスと比べるとＧＰＲ４欠損マウスでは腫瘍の成長が小さい。腫瘍成長の低下は、ＧＰＲ４欠損マウスにおいては血管構造の損傷およびＶＥＧＦＲ２レベルの低下と相関関係を示す。したがって、理論に縛られることを望まないが、本発明者らは、アシドーシスがＧＰＲ４を介して内皮細胞により感知され、このシグナルが病理学的新脈管形成を調節し得るという結論に達した。これらの発見は、新脈管形成の制御に関する有望な新しい方法を示している。

【０００８】

このため、本発明は、新脈管形成の阻害、例えば癌、黄斑変性、乾癬、関節炎、多発性硬化症またはアテローム性動脈硬化症の治療における腫瘍成長の阻害を目的とする医薬の製造についてのＧＰＲ４阻害剤の使用に関するものである。好ましい態様では、上記阻害剤は、好ましくは２本鎖のｓｉＲＮＡである。

【０００９】

特に好ましいのは、ヒトＧＰＲ４に対してターゲッティングされた２本鎖ｓｉＲＮＡ分子であり、上記２本鎖ｓｉＲＮＡ分子は以下の配列を有する：

センス：５'－ＧＣＧＣＴＧＴＧＴＣＣＴＡＴＣＴＣＡＡｄＴｄＴ－３'(配列番号１)および

アンチセンス：５'－ＴＴＧＡＧＡＴＡＧＧＡＣＡＣＡＧＣＧＣｄＡｄＧ－３'(配列番号２)または

センス：５'－ＣＣＡＴＧＴＣＴＧＧＣＣＡＧＡＴＡＡＡｄＴｄＴ－３'(配列番号４)および

アンチセンス：５'－ＴＴＴＡＴＣＴＧＧＣＣＡＧＡＣＡＴＧＧｄＣｄＧ－３'(配列番号５)、または

センス：５'－ＣＡＴＡＡＧＡＣＣＧＣＡＡＴＴＣＴＡＡｄＴｄＴ－３'(配列番号７)および

アンチセンス:５'－ＴＴＡＧＡＡＴＴＧＣＧＧＴＣＴＴＡＴＧｄＴｄＴ－３'(配列番号８)。

【００１０】

本発明はまた、本発明のＧＰＲ４阻害剤による患者の処置を包含する。

さらに本発明は、配列番号１～２０の配列を含むｓｉＲＮＡ分子を包含し、そのｓｉＲＮＡは例えばヒトおよびマウスでの使用に適している。さらに、本発明は、ＧＰＲ４を欠くヒト以外のノックアウト動物および新脈管形成、癌または関節炎に関する実験モデルとして、および新脈管形成、癌または関節炎を調節する化合物についてスクリーニングするための非ヒト動物の使用を包含する。

【００１１】

４．図面の簡単な説明

図１：ＧＰＲ４は、内皮細胞で高度発現される

ａ)様々なタイプの内皮細胞(濃灰色)、正常細胞(明灰色)および腫瘍細胞系(白色)におけるＧＰＲ４発現を、マイクロアレイ実験により測定した。ＧＰＲ４発現レベルのＭＡＳ５正規化値を示す(１サンプル当たりｎ＝２～３)。ＨＵＶＥＣは、Vectec(ＶＴ)またはPromocell(ＰＣ)からのものであった。ＨＰＡＥＣ：一次ヒト肺大動脈内皮細胞；ＨＭＶＥＣ：一次ヒト微小血管内皮細胞、ＤＵ１４５ヒト前立腺癌細胞；ヒーラヒト頸癌細胞。ｂ)幾つかのヒトおよびマウス内皮細胞におけるＲＴ－ＰＣＲによりＧＰＲ４の発現を確認し

たが、試験腫瘍細胞には存在しなかった。ＧＡＰＤＨを内部対照として使用した。ＭＳ１：マウス膵臓内皮細胞系、４Ｔ１：マウス乳房腫瘍細胞系、ＣＴ２６：マウス結腸腫瘍細胞系。

図２：ＧＰＲ４発現細胞は、ＧＰＲ４特異的ｓｉＲＮＡにより遮断され得る反応である、ｃＡＭＰ産生による細胞外酸性化に応答する。

細胞外ｐＨ変化に応じたｃＡＭＰの産生を、ａ)ＧＰＲ４により安定してトランスフェクションされたヒーラ細胞で評価した。ＨＵＶＥＣＳでのｂ～ｄ)において、ｂではアッセイウインドウを増やすためフォルスコリン(ＦＳＫ、アデニリルシクラーゼアゴニスト)を用いた。ｄ)対照ではなく、ＧＰＲ４特異的ｓｉＲＮＡが、ｐＨ依存的ｃＡＭＰ産生を阻害する(１点当たりｎ＝２～３測定値)。ＩＢＭＸ(ホスホジエステラーゼ阻害剤)を用いて、ｃＡＭＰを安定させた。

図３：ＧＰＲ４欠損マウスの作製

ａ)ＥＳ細胞での相同的組換えによるＧＰＲ４欠損マウスの作製に使用されるターゲッティング構築物および戦略。Ｐは、構築物の作製に使用されるプライマーを示す(「材料および方法」参照)。ｂ)パネルａに描いたプローブによる野生型およびＧＰＲ４欠損マウスからのＳａｃＩ消化ゲノムＤＮＡでのサザンブロット。ｃ)野生型およびＧＰＲ４欠損マウスの異なる臓器におけるＧＰＲ４についてのＲＴ－ＰＣＲ。クラスリン－２Ｋ(Ｃｌａｔｈｋ)を対照として使用した。ｄ)野生型またはＧＰＲ４欠損マウスから摘出した一次肺内皮細胞(肺ＥＣ)におけるＧＰＲ４についてのＲＴ－ＰＣＲ、ＧＡＰＤＨを対照として使用した。

図４：ＧＰＲ４欠損により、ＶＥＧＦ推進による新脈管形成に対する応答が損なわれるａ)成長因子を含有または不含有の寒天を含むテフロンチャンバーを、野生型またはＧＰＲ４欠損雌マウスの背中に埋め込んだ。４日後、埋込物を取り出し、チャンバー周囲に形成されている組織を秤量した。ｂ)内皮細胞特異的マーカーＴｉｅ２について、脈管質を定量する方法としてＥＬＩＳＡにより測定した。ｃ)種々の埋込物の物質的外観。ｄ)ｓｉＲＮＡと共に成長因子を含有または不含有の寒天を含むテフロンチャンバーを、野生型雌マウスの背中に埋め込んだ。３日後、埋込物を取り出し、チャンバー周囲に形成されている組織を秤量した。ｅ)Ｔｉｅ２マーカーの量を、成長因子およびｓｉＲＮＡを含むチャンバーにおいてＥＬＩＳＡにより測定した(１群あたりｎ＝６、＊Ｐ≦０.０５ＷＴ対ＧＰＲ４－ＫＯ；＊＊ＰＢＳと比較しＰ≦０.０５)。

図５：ＧＰＲ４－ＫＯマウスは、２つの異なる正常位腫瘍モデルにおいて腫瘍成長の低下を示す

ａ)同遺伝子型４Ｔ１乳房腫瘍細胞を、野生型およびＧＰＲ４欠損マウスの脂肪パッドに正常位移植した。腫瘍の成長をカリパスで経時的に測定した。ｂ)２１日後にマウスを殺し、４Ｔ１腫瘍重量を測定した(１群あたりｎ＝６マウス、＊Ｐ≦０.０５ＷＴ対ＧＰＲ４－ＫＯ)。ｃ)同遺伝子型ＣＴ２６結腸腫瘍細胞を、ＷＴおよびＧＰＲ４欠損マウスの盲端に正常位移植した。２０日後に動物を殺し、腫瘍重量を測定した。ｄ)結腸腫瘍の物質的外観。(１群あたりｎ＝８～１０、＊Ｐ≦０.０５ＷＴ対ＧＰＲ４－ＫＯ)。

図６：

ａ)野生型マウスと比較した場合の、ＧＰＲ４欠損マウスで成長させたＣＴ２６腫瘍における血管の脆弱で破裂した外観の例(ＣＤ３１染色、バー＝５０μｍ)。ｂ)ＷＴまたはＧＰＲ４欠損マウス(１群あたりｎ＝４～５)で成長させた腫瘍の全領域においてＣＤ３１陽性血管を数えることにより、血管密度を評価した。ｃ)血管の長さ。ｄ)野生型対ＧＰＲ４欠損マウス(１群あたりｎ＝５；＊Ｐ＜０.００１)で成長させた腫瘍において増殖しているＫｉ６７－陽性細胞のパーセンテージ。

図７：ＧＰＲ４欠損は、他の内皮細胞マーカーではなく、ＶＥＧＦＲ２の下方制御をもたらす

ａ～ｂ)ＶＥＧＦＲ２ ８(ａ)およびＴｉｅ２(ｂ)発現を、ＥＬＩＳＡによりＷＴまたはＧＰＲ４欠損マウスの肺において測定した。ｃ)ＥｐｈＢ４およびＶＥ－カドヘリン発現を、ウエスタンブロットによりＷＴおよびＧＰＲ４欠損マウスの肺において測定した。チュ

ーブリンを同等のタンパク質負荷についての対照として使用した。(１群あたりｎ＝６、＊Ｐ＜０．０５)。ｄ)ＨＵＶＥＣ細胞を異なるｓｉＲＮＡでトランスフェクションし、ＶＥＧＦＲ２の表面発現を、トランスフェクションの４８時間後ＦＡＣＳ分析により評価した。

図８：ＧＰＲ４欠損マウスは、野生型マウスと比べて膝腫脹を顕著かつ大きく阻害する。

図９：ＧＰＲ４－／－およびＢａｌｂ／Ｃマウス(ｎ＝７／８)における短期タバコ煙曝露後の気管支肺胞洗浄液中の全細胞、マクロファージ、リンパ球および好中球の平均数。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．０００１。□＝Ｂａｌｂ／Ｃ模擬曝露マウス、■＝ＧＰＲ４－／－模擬曝露マウス、

【表１】

＝Ｂａｌｂ／Ｃ煙曝露マウス、

【表２】

＝ＧＰＲ４－／－煙曝露マウス。

図１０：ＧＰＲ４－／－およびＢａｌｂ／Ｃマウス(ｎ＝７／８)における中期タバコ煙曝露後の気管支肺胞洗浄液中の全細胞、マクロファージ、リンパ球および好中球の平均数。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．０００１。データは平均±ＳＥＭとして示されている。□＝Ｂａｌｂ／Ｃ模擬曝露マウス、■＝ＧＰＲ４－／－模擬曝露マウス、

【表３】

＝Ｂａｌｂ／Ｃ煙曝露マウス、

【表４】

＝ＧＰＲ４－／－煙曝露マウス。

図１１：ＧＰＲ４－／－およびＢａｌｂ／Ｃマウス(ｎ＝７／８)における中期タバコ煙曝露後の肺組織におけるＭＩＰ－２レベル。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．０００１。データは平均±ＳＥＭとして示されている。□＝Ｂａｌｂ／Ｃ模擬曝露マウス、■＝ＧＰＲ４－／－模擬曝露マウス、

【表５】

＝Ｂａｌｂ／Ｃ煙曝露マウス、

【表６】

＝ＧＰＲ４－／－煙曝露マウス。

図１２：卵アルブミン感作および卵アルブミン曝露後のＧＰＲ４－／－およびＢａｌｂ／Ｃマウス(ｎ＝７／８)における気道過敏症。個々の動物からの対数濃度－肺抵抗曲線の補間によりPC_{300}を計算した。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．０００１。データは平均±ＳＥＭとして示されている。

図１３：ＧＰＲ４－／－およびＢａｌｂ／Ｃマウス(ｎ＝７／８)における長期タバコ煙曝露後の気管支肺胞洗浄液中の全細胞、マクロファージ、リンパ球および好中球の平均数。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．０００１。データは平均±ＳＥＭとして示されている。□＝Ｂａｌｂ／Ｃ　ＰＢＳ曝露マウス、■＝ＧＰＲ４　ＰＢＳ－曝露マウス、

【表７】

＝Ｂａｌｂ／Ｃ卵アルブミン曝露マウス、

【表８】



＝ＧＰＲ４－／－卵アルブミン曝露マウス。

【図面の簡単な説明】

【００１２】

【図１】ＧＰＲ４は、内皮細胞で高度発現される

【図２】ＧＰＲ４発現細胞は、ＧＰＲ４特異的ｓｉＲＮＡにより遮断され得る反応である、ｃＡＭＰ産生による細胞外酸性化に応答する

【図３】ＧＰＲ４欠損マウスの作製

【図４】ＧＰＲ４欠損により、ＶＥＧＦ推進による新脈管形成に対する応答が損なわれる

【図５】ＧＰＲ４－ＫＯマウスは、２つの異なる正常位腫瘍モデルにおいて腫瘍成長の低下を示す

【図６】ａ)野生型マウスと比較した場合の、ＧＰＲ４欠損マウスで成長させたＣＴ２６腫瘍における血管の脆弱で破裂した外観の例(ＣＤ３１染色、バー＝５０μｍ)。ｂ)ＷＴまたはＧＰＲ４欠損マウス(１群あたりｎ＝４～５)で成長させた腫瘍の全領域においてＣＤ３１陽性血管を数えることにより、血管密度を評価した。ｃ)血管の長さ。ｄ)野生型対ＧＰＲ４欠損マウス(１群あたりｎ＝５；＊Ｐ＜０．００１)で成長させた腫瘍において増殖しているＫｉ６７－陽性細胞のパーセンテージ。

【図７】ＧＰＲ４欠損は、他の内皮細胞マーカーではなく、ＶＥＧＦＲ２の下方制御をもたらす

【図８】ＧＰＲ４欠損マウスは、野生型マウスと比べて膝腫脹を顕著かつ大きく阻害する

【図９】ＧＰＲ４－／－およびＢａｌｂ／Ｃマウス(ｎ＝７／８)における短期タバコ煙曝露後の気管支肺胞洗浄液中の全細胞、マクロファージ、リンパ球および好中球の平均数

【図１０】ＧＰＲ４－／－およびＢａｌｂ／Ｃマウス(ｎ＝７／８)における中期タバコ煙曝露後の気管支肺胞洗浄液中の全細胞、マクロファージ、リンパ球および好中球の平均数

【図１１】ＧＰＲ４－／－およびＢａｌｂ／Ｃマウス(ｎ＝７／８)における中期タバコ煙曝露後の肺組織におけるＭＩＰ－２レベル

【図１２】卵アルブミン感作および卵アルブミン曝露後のＧＰＲ４－／－およびＢａｌｂ／Ｃマウス(ｎ＝７／８)における気道過敏症

【図１３】ＧＰＲ４－／－およびＢａｌｂ／Ｃマウス(ｎ＝７／８)における長期タバコ煙曝露後の気管支肺胞洗浄液中の全細胞、マクロファージ、リンパ球および好中球の平均数

【発明を実施するための形態】

【００１３】

５．発明の詳細な説明

Ｇタンパク質共役型受容体ＧＰＲ４は、酸性ｐＨにより活性化されるが、その生理学的役割についてはほとんど知られていない。本発明者らは、ＧＰＲ４ ｍＲＮＡ発現と内皮マーカー遺伝子の驚くほど高い相関関係を観察した結果として、一次ヒト血管内皮細胞におけるＧＰＲ４の発現性および機能を立証している。このため本発明は、対象の処置または新脈管形成を阻害、例えば癌治療における腫瘍の成長、黄斑変性、乾癬、関節炎、多発性硬化症またはアテローム性動脈硬化症を阻害するための医薬の製造を目的とするＧＰＲ４阻害剤の使用に関するものである。好ましい態様では、上記阻害剤はｓｉＲＮＡである。また、驚くべきことに生存能および繁殖能があるＧＰＲ４欠損マウスも本発明の一部である。これらの動物は、増殖因子移植モデルにおいてｂＦＧＦではなく、ＶＥＧＦに著しく低い血管新生応答を示す。さらに、注入された腫瘍細胞の成長は、ＧＰＲ４を欠くマウスにおいて著しく低下している。腫瘍の組織学的分析は、腫瘍細胞増殖の低下、血管密度の低下、および血管形態の改変を示していた。さらに、ＧＰＲ４欠損の結果、観察される表現型について少なくとも一部考慮に入れるとしても、内皮細胞におけるＶＥＧＦＲ２レベルは低下する。これらのデータは、内皮細胞がＧＰＲ４を介して局所的組織アシドーシスを感知すること、およびこのシグナルがＶＥＧＦに対する完全な血管新生応答を発生させるのに要求されることから、例えば腫瘍、黄斑変性、乾癬、関節炎、多発性硬化症また

はアテローム性動脈硬化症の治療に関する標的を提供することを示している。さらに、本発明者らは、ＧＰＲ４欠損動物が関節炎に関する実験モデルとして有利に使用され得ることを発見した。

【００１４】

ＲＮＡｉは、動物および植物における配列特異的転写後遺伝子サイレンシングの過程である。それは、２本鎖であり、サイレンスする(標的)遺伝子と配列が相同である小さな干渉性ＲＮＡ分子(ｓｉＲＮＡ)を使用する。このため、標的遺伝子の転写により生成されたｍＲＮＡとｓｉＲＮＡ分子の配列特異的結合により、遺伝子発現の非常に特異的にターゲッティングされたノックダウンが可能となる。

【００１５】

本発明による「ｓｉＲＮＡ」または「小干渉性リボ核酸」は、次の特徴を含め、当業界で周知の意味を有する。ｓｉＲＮＡは、生理学的条件下で相補的領域に沿ってハイブリダイゼーションするリボヌクレオチドの２本鎖により構成される。鎖は通常別々のものである。２本鎖は細胞において別々の役割を有するため、一方の鎖は「アンチセンス」鎖と呼ばれ、「ガイド」配列としても知られており、機能的ＲＩＳＣ複合体で使用されることにより、開裂に関して正確なｍＲＮＡにそれを導く。この「アンチセンス」の使用は、それがＲＮＡ化合物に関するものであるため、本明細書の他の箇所で言及されているアンチセンス標的ＤＮＡ化合物とは異なる。他方の鎖は「アンチガイド」配列として知られており、それが標的配列と同じヌクレオチド配列を含むことから、センス鎖としても知られている。鎖は、ある種の態様では分子リンカーにより連結され得る。個々のリボヌクレオチドは、非修飾の天然に存するリボヌクレオチド、非修飾の天然に存するデオキシリボヌクレオチドであり得るか、または本明細書の他の箇所で記載しているとおり、それらは化学的に修飾または合成され得る。

【００１６】

好ましくは、ｓｉＲＮＡ分子は、遺伝子の下方制御を可能にするためにＧＰＲ４のコーディング配列の少なくとも一領域と実質的に同一である。好ましくは、ｓｉＲＮＡ分子とＧＰＲ４遺伝子の標的領域の配列間の同一性の度合いは、少なくとも６０％配列同一性、好ましくは少なくとも７５％配列同一性、好ましくは少なくとも８５％同一性、好ましくは少なくとも９０％同一性、好ましくは少なくとも９５％同一性、好ましくは少なくとも９７％同一性、そして最も好ましくは少なくとも９９％同一性である。

【００１７】

異なるアミノ酸／ポリペプチド／核酸配列間の同一性パーセンテージの計算は、次の要領で実施され得る。まず、ClustalX プログラム(ペアワイズパラメーター：ギャップオープニング１０.０、ギャップ伸長０.１、タンパク質マトリックスGonnet２５０、ＤＮＡマトリックスＩＵＢ；マルチプルパラメーター：ギャップオープニング１０.０、ギャップ伸長０.２、遅延分岐配列３０％、ＤＮＡトランジション重量０.５、マイナスマトリックス・オフ、タンパク質マトリックスgonnetシリーズ、ＤＮＡ重量ＩＵＢ；タンパク質ギャップパラメーター、残基特異的ペナルティ・オン、親水性ペナルティ・オン、親水性残基ＧＰＳＮＤＱＥＲＫ、ギャップ分離距離４、エンドギャップ分離オフ)により、マルチプルアラインメント(多重整列)を作製する。次いで、同一性パーセンテージを、(Ｎ／Ｔ)＊１００(式中、Ｎは、２配列が同一残基を共有する位置の数であり、Ｔは比較された位置の総数である)としてマルチプルアラインメントから計算する。あるいは、同一性パーセンテージは、(Ｎ／Ｓ)＊１００(式中、Ｓは、比較されている短い方の配列の長さである)として計算され得る。アミノ酸／ポリペプチド／核酸配列は、新たに合成され得るか、または天然アミノ酸／ポリペプチド／核酸配列、またはその誘導体であり得る。実質的に類似したヌクレオチド配列は、ストリンジェント条件下で本明細書に示した核酸配列またはそれらの相補体のいずれかとハイブリダイゼーションする配列によりコード化される。ストリンジェント条件とは、ヌクレオチドを、約４５℃で６×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム(ＳＳＣ)中においてフィルター結合ＤＮＡまたはＲＮＡとハイブリダイゼーションさせた後、約５～６５℃で０.２×ＳＳＣ／０.１％ＳＤＳ中において少なくとも１回洗

浄することを意味する。また、実質的に類似したポリペプチドは、本発明によるペプチド配列とは少なくとも１個、しかし５、１０、２０、５０または１００個未満のアミノ酸が異なり得る。遺伝コードの縮重故に、核酸配列が、それによりコード化されるタンパク質の配列に実質的に影響することなく、改変または変更され、その機能性変異型が提供され得ることは明らかである。適切なヌクレオチド変異型は、配列内の同一アミノ酸をコード化する異なるコドンの置換により改変された配列を有するものであり、すなわちサイレント変化をもたらす。他の適切な変異型は、相同的ヌクレオチド配列を有するが、それが置換するアミノ酸と似た生物物理特性を有する側鎖をもつアミノ酸をコード化する異なるコドンの置換により同類変化が加えられ、改変されている配列の全部または一部を含むものである。例えば、小さな非極性疎水性アミノ酸には、グリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリンおよびメチオニンがある。大きな非極性疎水性アミノ酸には、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンがある。極性中性アミノ酸には、セリン、トレオニン、システイン、アスパラギンおよびグルタミンがある。正に荷電した(塩基性)アミノ酸には、リシン、アルギニンおよびヒスチジンがあり、負に荷電した(酸性)アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸がある。

【００１８】

タンパク質またはＤＮＡ配列の正確なアラインメントは複雑な過程であり、多数の研究者により詳細に調査されてきた。特に重要なのは、配列の最適なマッチ間の歩み寄りおよび上記マッチを得るためのギャップの導入である。タンパク質の場合、マッチを評点する手段も重要である。ＰＡＭマトリックスのファミリー(例えばDayhoff, M. et al., 1978, Atlas of protein sequence and structure, Natl. Biomed. Res. Found.)およびＢＬＯＳＵＭマトリックスは、同類置換の性質および尤度を定量するもので、マルチプルアラインメントアルゴリズムで使用されるが、他の均等内容の適用可能なマトリックスも当業者には知られている。一般的なマルチプルアラインメントプログラムClustalW、およびそのウインドウズバージョンClustalX(Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680;Thompson et al., 1997, Nucleic Acids Research, 24, 4876-4882)は、タンパク質およびＤＮＡのマルチプルアラインメントを作製する有効な方法である。

【００１９】

自動作製アラインメントは、手動による整列を必要とすることが多く、訓練されたユーザーの試験中のタンパク質ファミリーに関する知識、例えば鍵となる保存部位に関する生物学的知識を活用することになる。上記の一アラインメント編集プログラムは、Align(http://www.gwdg.de/dhepper/download/;Hepperle, D., 2001:Multicolor Sequence Alignment Editor. Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, 16775シュテクリン、ドイツ国)であるが、他の例えばJalViewまたはCinemaも適切である。

【００２０】

タンパク質間の同一性パーセンテージの計算は、Clustalによるマルチプルアラインメントの作製中に行われる。しかしながら、アラインメントが手動により改良された場合、または２配列を慎重に比較するためには、これらの値を再計算する必要がある。アラインメント内のタンパク質配列の対についてこの値を計算するプログラムは、アミノ酸置換に関するモデルとして「類似度表」オプション(Ｐ)を用いるＰＨＹＬＩＰ系統発生パッケージ(Felsenstein； http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html)内のＰＲＯＴＤＩＳＴを含む。ＤＮＡ／ＲＮＡについては、ＰＨＹＬ１ＰのＤＮＡＤＩＳＴプログラム内に同一オプションが存在する。

【００２１】

本発明によるｄｓＲＮＡ分子は、標的遺伝子のｍＲＮＡの一領域と実質的に同一である２本鎖領域を含む。標的遺伝子の対応する配列と１００％の同一性をもつ領域が適切である。この状態を「完全に相補的」と称す。しかしながら、その領域はまた、標的遺伝子の対応領域と比べた場合、標的とされるｍＲＮＡの領域の長さによって、１、２または３個のミスマッチを含み得、それ自体完全に相補的ではない場合もあり得る。一態様において、本発明のＲＮＡ分子は、所与の一遺伝子を特異的にターゲッティングする。目的ｍＲＮ

Ａをターゲッティングするだけのために、ｓｉＲＮＡ試薬は、標的ｍＲＮＡとの１００％相同性および細胞または生物体に存在する他の全遺伝子に対し少なくとも２つのミスマッチヌクレオチドを有し得る。特異的標的配列の発現を有効に阻害できるほどの十分な配列同一性をもつｓｉＲＮＡを解析および同定する方法は当業界では公知である。配列同一性は、当業界で公知の配列比較およびアラインメントアルゴリズム(GribskovおよびDevereux, Sequence Analysis Primer, Stockton Press, 1991、およびそこに引用されている参考文献参照)および例えばデフォルトパラメーターを用いるＢＥＳＴＦＩＴソフトウェアプログラム(例えばUniversity of Wisconsin Genetic Computing Group)で実行されるSmith-Watermanアルゴリズムによるヌクレオチド配列間の差異パーセントを計算することにより最適化され得る。

【００２２】

本発明によると、標的と相補的なｓｉＲＮＡの領域の長さは、１０～１００ヌクレオチド、１２～２５ヌクレオチド、１４～２２ヌクレオチドまたは１５、１６、１７または１８ヌクレオチドであり得る。対応する標的領域に対しミスマッチがある場合、相補領域の長さは、一般に幾分長めであることが要求される。好ましい態様では、阻害剤は、ｓｉＲＮＡ分子であり、約５ｂｐ～５０ｂｐ、さらに好ましくは１０ｂｐ～３５ｂｐ、さらに好ましくは１５ｂｐ～３０ｂｐ、さらに好ましくは１８ｂｐ～２５ｂｐを含む。最も好ましくは、ｓｉＲＮＡ分子は、２０ｂｐより多く、かつ２３ｂｐ未満を含む。

【００２３】

ｓｉＲＮＡはオーバーハング末端(標的と相補的である場合もない場合もあり得る)、または標的遺伝子ではなくそれ自体に相補的なさらなるヌクレオチドを有し得るため、ｓｉＲＮＡの別々の各鎖の全長は１０～１００ヌクレオチド、１５～４９ヌクレオチド、１７～３０ヌクレオチドまたは１９～２５ヌクレオチドであり得る。

【００２４】

「各鎖は４９ヌクレオチドまたはそれ未満である」という表現は、全ての修飾または非修飾ヌクレオチドを含むが、鎖の３'または５'端に付加され得る化学的部分は含まない、鎖中の連続したヌクレオチドの総数を意味する。鎖に挿入された短い化学的部分は計数されないが、２本の別々の鎖を連結するように設計された化学的リンカーは、連続したヌクレオチドを形成するとはみなされない。

【００２５】

「５'端または３'端の少なくとも一方における１～６ヌクレオチドオーバーハング」という表現は、生理学的条件下で２本の別々の鎖から生ずる相補的ｓｉＲＮＡの構造をいう。末端ヌクレオチドがｓｉＲＮＡの２本鎖領域の一部である場合、ｓｉＲＮＡは平滑末端であるとみなされる。１個またはそれ以上のヌクレオチドが末端で対を形成していない場合、オーバーハングが形成される。オーバーハングの長さは、オーバーハング状のヌクレオチドの数により測定される。オーバーハング状ヌクレオチドは、どちらかの鎖の５'端または３'端のいずれかにあり得る。

【００２６】

本発明によるｓｉＲＮＡは、高いインビボ安定性を示し、鎖の少なくとも一方に少なくとも１個の修飾ヌクレオチドを含むことにより経口送達に特に適したものとなり得る。すなわち、本発明によるｓｉＲＮＡは、少なくとも１個の修飾または非天然リボヌクレオチドを含む。多くの公知化学的修飾の長い説明は、ＰＣＴ特許出願公開ＷＯ２００３７０９１８号に示されている。送達に適切な修飾には化学的修飾が含まれ、以下のものから選択され得る：

ａ)３'キャップ；

ｂ)５'キャップ、

ｃ)修飾ヌクレオシド間連鎖；または

ｄ)修飾糖または塩基部分。

【００２７】

適切な修飾には、限定されるわけではないが、糖部分(すなわち、糖部分の２'位、例え

ば２'－Ｏ－(２－メトキシエチル)または２'－ＭＯＥ)(Martin et al.,Helv. Chim. Acta., 1995, 78, 486-504)すなわち、アルコキシアルコキシ基)または塩基部分(すなわち、異なるヌクレオチド鎖における別の特異的塩基との対合能力を維持する非天然または修飾塩基)に加えられる修飾がある。他の修飾には、例えばホスホロチオエート、キラルホスホロチオエートまたはホスホロジチオエートによるホスホエステル基(隣接リボヌクレオチドを連結する)の置換を含む、いわゆる「バックボーン」修飾があるが、これに限定されるわけではない。

【００２８】

本明細書において３'キャップまたは５'キャップと称されることもある末端修飾は、重要なものであり得る。キャップは、単に追加的ヌクレオチドを付加することにより構成され得て、例えば「Ｔ－Ｔ」はｓｉＲＮＡでの安定性を付与することが見出された。キャップは、当業者には公知のさらに複雑な化学作用により構成され得る。

【００２９】

適切なｓｉＲＮＡ分子の設計は複雑な過程であり、標的ｍＲＮＡ分子の配列を非常に注意深く解析する必要がある。ｓｉＲＮＡの設計方法の一例は、国際公開第２００５／０５９１３２号に説明されている。次いで、発明に向けたかなりの努力でもって、発明者らは、ＲＮＡ干渉を誘発するのに必要とされる親和力および安定性をもたらす、ヌクレオチド塩基のある種の組成を有するｓｉＲＮＡの特定配列を選択しなければならない。

【００３０】

本発明の好ましいｓｉＲＮＡは以下のものである：

センス:５'－ＧＣＧＣＴＧＴＧＴＣＣＴＡＴＣＴＣＡＡｄＴｄＴ－３'(配列番号１)
アンチセンス:５'－ＴＴＧＡＧＡＴＡＧＧＡＣＡＣＡＧＣＧＣｄＡｄＧ－３'(配列番号２)
標的(ヒト):ＧＣＧＣＴＧＴＧＴＣＣＴＡＴＣＴＣＡＡ(配列番号３)
センス:５'－ＣＣＡＴＧＴＣＴＧＧＣＣＡＧＡＴＡＡＡｄＴｄＴ－３'(配列番号４)
アンチセンス:５'－ＴＴＴＡＴＣＴＧＧＣＣＡＧＡＣＡＴＧＧｄＣｄＧ－３'(配列番号５)
標的(ヒト):ＣＣＡＴＧＴＣＴＧＧＣＣＡＧＡＴＡＡＡ(配列番号６)
センス:５'－ＣＡＴＡＡＧＡＣＣＧＣＡＡＴＴＣＴＡＡｄＴｄＴ－３'(配列番号７)
アンチセンス:５'－ＴＴＡＧＡＡＴＴＧＣＧＧＴＣＴＴＡＴＧｄＴｄＴ－３'(配列番号８)
標的(ヒト):ＣＡＴＡＡＧＡＣＣＧＣＡＡＴＴＣＴＡＡ(配列番号９)
センス:５'－ＧＧＡＧＧＴＡＧＧＡＣＴＡＡＣＡＡＴＡｄＴｄＴ－３'(配列番号１０)
アンチセンス:５'－ＴＡＴＴＧＴＴＡＧＴＣＣＴＡＣＣＴＣＣｄＣｄＴ－３'(配列番号１１)
標的(マウス):ＧＧＡＧＧＴＡＧＧＡＣＴＡＡＣＡＡＴＡ(配列番号１２)
センス:５'－ＧＧＧＴＣＴＧＡＡＧＧＧＧＧＡＡＣＡＡｄＴｄＴ－３'(配列番号１３)
アンチセンス:５'－ＴＴＧＴＴＣＣＣＣＣＴＴＣＡＧＡＣＣＣｄＴｄＧ－３'(配列番号１４)
標的(マウス):ＧＧＧＴＣＴＧＡＡＧＧＧＧＧＡＡＣＡＡ(配列番号１５)。

【００３１】

また、以下の配列を含むｓｉＲＮＡ分子も包含される：

ＴＴＧＡＧＡＴＡＧＧＡＣＡＣＡＧＣＧＣ(配列番号１６)
ＴＴＴＡＴＣＴＧＧＣＣＡＧＡＣＡＴＧＧ(配列番号１７)
ＴＴＡＧＡＡＴＴＧＣＧＧＴＣＴＴＡＴＧ(配列番号１８)
ＴＡＴＴＧＴＴＡＧＴＣＣＴＡＣＣＴＣＣ(配列番号１９)
ＴＴＧＴＴＣＣＣＣＣＴＴＣＡＧＡＣＣＣ(配列番号２０)

【００３２】

ｓｉＲＮＡ分子は、新たに合成されるか、または微生物により生産され得る。例えば、ｓｉＲＮＡ分子は、細菌、例えばエシェリキア・コリ(E. coli)により製造され得る。少

なくとも１個の修飾または非天然リボヌクレオチドを含むｓｉＲＮＡを含む、ｓｉＲＮＡの合成方法は、当業者には公知であり、容易に利用され得る。例えば、様々な合成化学作用がＰＣＴ特許出願公開第２００５０２１７４９号および第２００３７０９１８号に示されており、これらの両方について出典明示で援用する。この反応は、溶液中、または好ましくは固相で、またはポリマー支持試薬を用い、次いでＲＮＡｉを伝達し得るｓｉＲＮＡ分子が形成される条件下で合成されたＲＮＡ鎖を合わせることにより実施され得る。

【００３３】

ｓｉＮＡ(小干渉性核酸)は、ウラシル(ｓｉＲＮＡ)またはチミジン(ｓｉＤＮＡ)を含み得るものとする。従って、上記で示されているヌクレオチドＵおよびＴは相互交換され得る。しかしながら、ｓｉＲＮＡを使用する方が好ましい。

【００３４】

発明者らは、実施例に記載した方法によりこれらのｓｉＲＮＡ分子をそれぞれ試験し、これらの阻害剤が、新脈管形成を低減化させる、ＧＰＲ４発現の低下に有効であること、従って、これらの本発明ｓｉＲＮＡ分子が癌の治療、特に腫瘍成長の阻害に有効であることを立証した。

【００３５】

本発明により使用される遺伝子サイレンシング分子、すなわち阻害剤は、好ましくは核酸(例えばｓｉＲＮＡまたはアンチセンスまたはリボザイム)である。上記分子は、(必ずというわけではないが)処置されている対象の細胞のＤＮＡに組み込まれるものであり得る。未分化細胞は、遺伝子サイレンシング遺伝子によって安定して形質転換されることにより、遺伝子修飾娘細胞の生産を誘導し得る(この場合、例えば特異的転写因子、または遺伝子活性化因子での対象における発現の調節が要求され得る)。

【００３６】

遺伝子サイレンシング分子は、新たに合成され、標的細胞において(例えばＲＮＡ干渉による)遺伝子サイレンシングを誘導するのに十分な量で導入され得る。あるいは、上記分子は、微生物、例えばエシェリキア・コリ(E. coli)により生産され、次いで標的細胞において遺伝子サイレンシングを誘導するのに十分な量で導入され得る。

【００３７】

この分子は、遺伝子サイレンシング配列をコード化する核酸を含むベクターにより製造され得る。ベクターは、核酸の発現を制御および／促進し得るエレメントを含み得る。ベクターは、組換えベクターであり得る。ベクターは、例えばプラスミド、コスミド、ファージまたはウイルスＤＮＡを含み得る。ベクターの使用による遺伝子サイレンシング分子の合成に加えて、またはその代わりに、ベクターは、遺伝子サイレンシング配列で標的細胞を形質転換するための送達系として使用され得る。

【００３８】

組換えベクターはまた、他の機能性エレメントを含み得る。例えば、組換えベクターは、ベクターが標的細胞で自律複製するように設計され得る。この場合、核酸複製を誘導するエレメントが組換えベクターにおいて要求され得る。あるいは、組換えベクターは、ベクターおよび組換え核酸分子が標的細胞のゲノムに組み込まれるように設計され得る。この場合、ターゲッティングされた組込み(例えば相同的組換えによる)に有利な核酸配列が望ましい。組換えベクターはまた、クローニング過程における選択マーカーとして使用され得る遺伝子をコードするＤＮＡを有し得る。

【００３９】

組換えベクターはまた、必要に応じて核酸の発現を制御するためのプロモーターまたはレギュレーターまたはエンハンサーを含み得る。組織特異的プロモーター／エンハンサーエレメントは、特異的細胞型、例えば内皮細胞において核酸の発現を調節するのに使用され得る。プロモーターは、構成的または誘導性であり得る。

【００４０】

あるいは、遺伝子サイレンシング分子は、ベクターに組込まれた状態または組込まれていない状態で対象における標的細胞または組織に投与され得る。例えば、分子は、リポソ

ームまたはウイルス粒子(例えばレトロウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、レンチウイルスなど)内に組込まれ得る。

【００４１】

あるいは、「裸の」ｓｉＲＮＡまたはアンチセンス分子は、適切な手段、例えば直接エンドサイトーシスでの取り込みにより対象の細胞中に挿入され得る。

【００４２】

遺伝子サイレンシング分子はまた、トランスフェクション、感染、顕微注入、細胞融合、プロトプラストフュージョンまたはバリスティック導入により処置される対象の細胞に移入され得る。例えば、移入は、コーティング金粒子でのバリスティックトランスフェクション、ｓｉＮＡ分子を含むリポソーム、遺伝子サイレンシング配列を含むウイルス性ベクターまたは遺伝子サイレンシング分子の直接適用による直接核酸取り込み手段(例えばエンドサイトーシス)によるものであり得る。

【００４３】

本発明の好ましい実施態様では、ｓｉＮＡ分子は、標的細胞に(ベクターまたは「裸」で)送達され得、次いで確実に宿主細胞で複製されることにより、治療有効レベルに到達し得る。これに該当するとき、ｓｉＮＡは、好ましくはｓｉＮＡを細胞において転写させ得る発現カセットに組み込まれ、次いで(ＧＰＲ４をコードする内在性ｍＲＮＡの破壊を誘導することにより)翻訳を妨害する。

【００４４】

本発明のいずれかの態様による阻害剤は、単剤療法(例えばｓｉＲＮＡのみの使用)で使用され得る。しかしながら、阻害剤は、補助薬として、または他の例えば癌治療(例えば放射線療法、慣用的化学療法または他の発癌遺伝子サイレンシング戦略と連係的に)と組み合わせて使用され得るものとする。例えば、併用療法は、本発明による遺伝子サイレンシング分子および放射線療法のクールを含み得る。

【００４５】

本発明による阻害剤は、特に組成物が使用される方法によって異なる多数の形態を有する組成物内に含まれ得る。すなわち、例えば、組成物は、カプセル、液体、軟膏、クリーム、ゲル、ヒドロゲル、エーロゾル、スプレー、ミセル、経皮パッチ、リポソームの形態または例えば癌に罹患しているかまたは癌発症の危険があるヒトまたは動物に投与され得る他の適切な形態であり得る。本発明組成物の賦形剤は、当然それが投与される対象にとって耐容性良好であり、好ましくは標的部位へ阻害剤を送達させ得るものとするべきである。

【００４６】

本発明による阻害剤は、多数の方法で使用され得る。

例えば、全身投与が必要とされ得る場合、化合物は、例えば注射により血流中へ投与され得る組成物内に含有され得る。注射は、静脈内(ボーラスまたは注入)、皮下、筋肉内または標的組織への直接注射(例えば脳室内注射　－　脳での使用時)であり得る。阻害剤はまた、吸入により(例えば鼻腔内)または経口的に(適切な場合)投与され得る。

【００４７】

本発明の阻害剤はまた、徐放性または時限放出型装置内に組み込まれ得る。上記装置は、例えば腫瘍部位に挿入され得、分子は何週間または何カ月かにわたって放出され得る。上記装置は、通常頻繁な投与(例えば少なくとも毎日注射)を必要とする、本発明阻害剤による長期治療が必要とされるとき特に有利であり得る。

【００４８】

必要とされる阻害剤の量は、その生物活性および生物学的利用能により決定されるが、それらは投与方法、使用分子の物理化学的特性およびそれが単剤療法としてまたは併用療法のいずれで使用されているかにより異なるものとする。投与頻度はまた、上述の因子および特に処置されている対象内における阻害剤の半減期により影響される。

【００４９】

投与される最適用量は、当業者により決定され得、使用されている特定阻害剤、製剤の

強度、投与方式、および癌の進行度および重症度により変動する。
対象の年齢、体重、性別、食事療法および投与時間を含む追加的因子は、処置されている特定対象により異なるため、投薬量の調節を必要とする。
【００５０】
阻害剤が核酸であるとき、慣用的分子生物学的技術(ベクター移入、リポソーム移入、バリスティック導入など)が、標的組織への阻害剤の送達に使用され得る。
【００５１】
公知手順、例えば製薬業界が慣用的に採用している手順(例えばインビボ実験、臨床試験など)を用いることにより、本発明による使用を目的とする特異的処方物および正確な治療法(例えば遺伝子サイレンシング分子の一日用量および投与頻度)を確立し得る。
【００５２】
一般的に、本発明阻害剤については、体重に基づいた０．０１μｇ／ｋｇ～０．５ｇ／ｋｇの一日用量が、使用する特異的阻害剤により変動するものとして、癌の治療に使用され得る。阻害剤がｓｉＲＮＡ分子であるとき、一日用量は、体重に基づいて１ｐｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ、さらに好ましくは約１０ｐｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇ、さらに好ましくは約５０ｐｇ／～１ｍｇ／ｋｇであり得る。
【００５３】
阻害剤(例えばｓｉＮＡ)が細胞に送達されるとき、一日用量は１回投与(例えば１日１回注射)として与えられ得る。
【００５４】
あるいは、阻害剤または癌の状態によっては、１日に２回またはそれ以上の回数での投与を必要とする場合もあり得る。一例として、本発明によるｓｉＮＡは、０．１ｍｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇ(すなわち７０ｋｇの体重を仮定して)の１日２回(または状態の重症度によってはそれ以上の回数)用量として投与され得る。処置を受けている患者は、起床時に初回用量、次いで夕方(２回服用体制の場合)に２回目の用量を服用し、またはその後３または４時間間隔で服用する。あるいは、徐放性装置を用いることにより、反復用量の投与を必要とせずに患者に最適な用量を供給し得る。
【００５５】
本発明による医薬は、ＧＰＲ４阻害剤の治療有効量および医薬上許容される賦形剤を含むべきである。
【００５６】
本明細書および請求の範囲では、全体を通して以下の定義を使用する。
「単離核酸配列」は、物質が、その本来の環境(例えばそれが天然に存する場合自然環境)から取り出されていることを意味する。例えば、生きている動物に存在する天然ポリヌクレオチドは単離されていないが、同じポリヌクレオチドでも、自然系における共存物質の一部または全部から分離されると、その後に自然系に再導入されたときでも、単離されたことになる。上記ポリヌクレオチドはベクターの一部であり得、そして／または上記ポリヌクレオチドは、組成物の一部であり得、さらに上記ベクターまたは組成物がその自然環境の一部ではないという点で単離されていることになる。
【００５７】
「核酸ベクター」は、細胞環境、例えば細胞ライゼートまたは全細胞へ曝露されると増殖および／または転写されるように設計された核酸配列である。「遺伝子治療ベクター」は、１つまたはそれ以上の遺伝子および／またはタンパク質の高い発現性を意図した、全細胞へのトランスフェクションのための機能的特徴をもつ核酸ベクターをいう。それぞれの場合において、上記ベクターは、通常、一般に細胞により認識される複製起点であって、細胞内でベクターを増殖させ得る「ベクター増殖配列」を含む。広範囲の核酸ベクターおよび遺伝子治療ベクターは当業者には馴染み深いものである。
【００５８】
本明細書で使用している「治療有効量」および「予防有効量」という表現は、病理学的過程の処置、予防または管理において治療上の利益をもたらす量をいう。治療上有効であ

る特定の量は、通常の医療従事者により容易に決定され得、当業界で公知の因子、例えば病理学的過程のタイプ、患者の病歴および年齢、病理学的過程の段階、および他の併用薬剤の投与によって変動し得る。例えば、「治療有効量」は、対象に投与されると癌の成長を阻害する本発明阻害剤の量である。

【００５９】

本明細書で使用している「医薬組成物」は、本発明治療剤の薬理学的有効量および医薬上許容される担体を含む。本明細書で使用している「薬理学的有効量」、「治療有効量」または単に「有効量」は、意図した薬理学的、治療的または予防的成果をもたらすのに有効な薬剤の量をいう。例えば、疾患または障害に関連した測定可能なパラメーターが少なくとも２５％低下している場合に所与の臨床処置が有効であるとみなすならば、その疾患または障害の処置に関する薬剤の治療有効量は、そのパラメーターの少なくとも２５％低下をもたらすのに必要な量である。

【００６０】

「医薬上許容される担体」の語は、治療剤を投与するための担体をいう。上記担体には、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、水、グリセリン、エタノールおよびそれらの組合わせがあるが、これらに限定されるわけではない。この語は、特に細胞培養培地を除外する。経口投与薬剤については、医薬上許容される担体には、医薬上許容される賦形剤、例えば、不活性希釈剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、甘味料、調味料、着色剤および保存剤があるが、これらに限定されるわけではない。適切な不活性希釈剤には、炭酸ナトリウムおよびカルシウム、リン酸ナトリウムおよびカルシウム、および乳糖があるが、これらに限定されるわけではなく、またトウモロコシ澱粉およびアルギン酸は適切な崩壊剤である。結合剤は澱粉およびゼラチンを含み得、滑沢剤が存在するとすれば、一般にステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクである。所望ならば、グリセリンモノステアレートまたはグリセリンジステアレートなどの材料で錠剤をコーティングすることにより、胃腸管での吸収を遅延させ得る。

【００６１】

本明細書で使用している「形質転換細胞」は、ベクターが導入された細胞であり、そこからｄｓＲＮＡ分子が発現され得る細胞である。トランスフェクションが一時的なものであろうと、安定したものであろうと、外側から供給される核酸、例えば本発明作用物質を含む細胞もまた、形質転換細胞であると考えられる。

【００６２】

本発明を実践する場合、分子生物学、微生物学および組換えＤＮＡにおける多くの慣用的技術が使用される。これらの技術は公知であり、例えば、Current Protocols in Molecular Biology、第Ｉ、IIおよびIII巻, 1997(F.M.Ausubel編)；Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第２版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク；DNA Cloning: A Practical Approach、第ＩおよびII巻, 1985(D.N.Glover編)；Oligonucleotide Synthesis, 1984(M.L.Gait編)；Nucleic Acid Hybridization, 1985(HamesおよびHiggins)；Transcription and Translation, 1984(HamesおよびHiggins編)；Animal Cell Culture, 1986(R.I.Freshney編)；Immobilized Cells and Enzymes, 1986(IRL Press);Perbal, 1984, A Practical Guide to Molecular Cloning;シリーズ, Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, 1987(J.H.MillerおよびM.P.Calos編、Cold Spring Harbor Laboratory)；およびMethods in Enzymology、第１５４巻および第１５５巻(それぞれWuおよびGrossman、およびWu編)で説明されている。

【００６３】

「対象」は、脊椎動物、哺乳類、家畜または人間であり得る。処置される対象はヒトであるのが好ましい。これに該当する場合、阻害剤はそれらがヒトの治療に最も適するように設計され得る。しかしながら、阻害剤はまた、獣医学的興味の対象である他の動物(例えばウマ、イヌまたはネコ)の処置にも使用され得るものとする。あるいは、対象は、例えば実験モデルの場合、マウスであり得る。さらに、別の実験モデルでは、上記対象は、

単細胞または培養細胞の集団であり得る。

【００６４】

本明細書でいう「医薬上許容される賦形剤」は、医薬組成物の製剤に有用である当業者に公知の生理学的賦形剤である。

好ましくは、医薬は、約０．１％(ｗ／ｗ)～９０％(ｗ／ｗ)、さらに好ましくは１％(ｗ／ｗ)～１０％(ｗ／ｗ)の割合で阻害剤を含有する。組成物の残りは賦形剤により構成され得る。

【００６５】

好ましい例において、医薬用賦形剤は液体であり、医薬組成物は溶液形態である。別の例では、医薬用賦形剤はゲルであり、組成物はクリームなどの形態である。

【００６６】

滅菌溶液または懸濁液である液体医薬組成物は、例えば筋肉内、鞘内、硬膜外、腹腔内、静脈内、皮下、大脳内または脳室内注射により使用され得る。阻害剤は、滅菌水、食塩水または他の適切な滅菌注射可能媒質を用いて投与時点で溶解または懸濁され得る滅菌固体組成物として製造され得る。賦形剤は、適切な場合、不活性結合剤、懸濁剤、滑沢剤、調味料、甘味料、保存剤、染料およびコーティング剤を含むものとする。

【００６７】

本発明阻害剤の好ましい使用は、癌、黄斑変性、乾癬、関節炎、多発性硬化症およびアテローム性動脈硬化症の処置であるが、上記本発明阻害剤は、新脈管形成それ自体の処置または新脈管形成が重要な役割を演じ得る疾患の処置でも使用され得る。上記疾患の例には、微生物、例えばニューモシスティス・カリニ(pneumocystis carinii)、クルーズ・トリパノソーマ(trypsanoma cruzi)、ブルース・トリパノソーマ(trypsanoma brucei)、クリチジア・フィスクラタ(crithidia fusiculata)による感染を含む疾患、および寄生虫疾患、例えば住血吸虫症およびマラリア、腫瘍(腫瘍浸潤および腫瘍転移)、および他の疾患、例えば異染性白質萎縮症、筋ジストロフィー、筋萎縮症および類似疾患、オステオポローシス、歯肉疾患、例えば歯肉炎および歯肉炎、パジェット病、悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症、例、腫瘍誘導性高カルシウム血症および代謝性骨疾患、変形性関節症、慢性関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症(アテローム性プラーク破綻および脱安定化を含む)、自己免疫疾患、呼吸器疾患および免疫介在性疾患(移植拒絶を含む)、内因性(非アレルギー性)喘息および外因性(アレルギー性)喘息の両方を含むあらゆるタイプまたは発生過程の喘息、軽症喘息、中等症喘息、重症喘息、気管支喘息、運動誘発性喘息、職業性喘息および細菌感染後に誘発される喘息、急性肺傷害(ＡＬＩ)、急性／成人呼吸窮迫症候群(ＡＲＤＳ)、慢性閉塞性肺、気道または肺疾患(ＣＯＰＤ、ＣＯＡＤまたはＣＯＬＤ)、例えば慢性気管支炎またはそれに伴う呼吸困難、気腫、ならびに特に他の薬物療法、特に他の吸入薬物療法の結果として起こる気道過敏症の増悪、好酸球増加症、特に気道の好酸球関連疾患(例えば肺組織の病的好酸性浸潤を伴う)、例えば気道および／または肺が侵される過好酸球増加症ならびに、例えばレフラー症候群、好酸球性肺炎、寄生虫(特に後生動物)インフェステーション(熱帯性好酸球増加症を含む)、気管支肺アスペルギルス症、結節性多発性動脈炎(チャーグ-ストラウス症候群を含む)、好酸球肉芽腫の結果として、または付随して起こる気道の好酸球関連疾患、および薬物反応により誘発される気道をおかす好酸球関連疾患があるが、これらに限定されるわけではない。癌以外に、特に適した疾患は、黄斑変性、乾癬、関節炎、多発性硬化症およびアテローム性動脈硬化症を含む新脈管形成／血管内皮関連疾患である。

【００６８】

「癌」の語は、例えばメラノーマ、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肺癌、悪性肝細胞癌、網膜芽細胞腫、星状細胞腫、神経膠芽細胞腫、白血病、神経芽細胞腫、頭部、頸部、乳房、膵臓、前立腺、腎臓、骨、精巣、卵巣の癌、中皮腫、子宮頚癌、胃腸の癌、リンパ腫、脳、結腸または膀胱癌を含む。最も好ましい例で、

【００６９】

さらなる好ましい態様において、上記の新脈管形成関連疾患は、慢性関節リウマチ、炎

症性腸疾患、変形性関節症、平滑筋腫、腺腫、脂肪腫、血管腫、線維腫、脈管閉塞、再狭窄、アテローム性動脈硬化症、前新生物病変、上皮内癌、口腔毛髪状白斑または乾癬であり、処置の対象であり得る。最も好ましい態様において、本発明化合物により処置される疾患は、乾癬、関節炎、多発性硬化症およびアテローム性動脈硬化症、特に慢性関節リウマチである。別の好ましい態様において、癌は、部分切除可能なものまたは可能でないものであり得る腫瘍を含む。さらに、癌は、転移性腫瘍または転移し得る可能性が高い腫瘍を必然的に伴い得る。

【００７０】

また、本発明の方法および組成物により処置され得る癌細胞には、膀胱、血液、骨、骨髄、脳、乳房、結腸、食道、胃腸、歯肉、頭部、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、頸部、卵巣、前立腺、皮膚、胃、精巣、舌または子宮からの細胞が含まれる。さらに、癌は、具体的には次の組織構造タイプを有し得るが、これらに限定されるわけではない：新生物、悪性；癌腫；癌腫、未分化；巨細胞癌および紡錘体細胞癌；小細胞癌；乳頭状癌；扁平上皮癌；リンパ上皮癌；基底細胞癌；毛質性上皮癌；移行上皮癌；乳頭状移行上皮癌；腺癌；ガストリノーマ、悪性；胆管癌；肝細胞癌；混合型肝細胞癌および胆管癌；索状腺癌；腺様のう胞癌；腺腫性ポリープ内腺癌；腺癌、家族性結腸ポリポーシス；固形癌；カルチノイド腫瘍、悪性；細気管支肺腺癌；乳頭状腺癌；嫌色素細胞癌；好酸性細胞癌；好酸性腺癌；好塩基性細胞癌；透明細胞腺癌；顆粒細胞癌；濾胞状腺癌；乳頭状および濾胞状腺癌；非被包性硬化癌；副腎皮質細胞癌；類内膜癌；皮膚付属器癌；アポクリン腺癌；皮脂腺癌；耳垢腺癌；粘液性類表皮癌；嚢胞腺癌；乳頭状嚢胞腺癌；乳頭状漿液性嚢胞腺癌；粘液嚢胞腺癌；粘液性腺癌；印環細胞癌；浸潤性腺管癌；髄様癌；小葉癌；炎症性乳癌；パジェット病、乳房；細葉細胞癌；腺扁平上皮癌；扁平上皮化生を伴う腺癌；胸腺腫、悪性；卵巣間質性腫瘍、悪性；莢膜細胞腫、悪性；顆粒膜細胞腫、悪性；男性ホルモン産生細胞腫、悪性；セルトーリ細胞癌；ライディヒ細胞腫、悪性；脂質細胞腫瘍、悪性；パラガングリオーマ、悪性；乳房外パラガングリオーマ、悪性；褐色細胞腫；悪性グロームス腫瘍；悪性黒色腫；メラニン欠乏性黒色腫；表在拡大型黒色腫；巨大色素性母斑における悪性黒色腫；類上皮細胞黒色腫；青色母斑、悪性；肉腫；線維肉腫；線維性組織球腫、悪性；粘液肉腫；脂肪肉腫；平滑筋肉腫；横紋筋肉腫；胎児性横紋筋肉腫；胞巣型横紋筋肉腫；間質性肉腫；混合腫瘍、悪性；ミュラー管混合腫瘍；腎芽細胞腫；肝芽細胞腫；癌肉腫；間葉腫、悪性；ブレンナー腫瘍、悪性；葉状腫瘍、悪性；滑膜肉腫；中皮腫、悪性；未分化胚細胞腫；胎生期癌；奇形腫、悪性；卵巣甲状腺腫、悪性；絨毛癌；中腎腫、悪性；血管肉腫；血管内皮腫、悪性；カポジ肉腫；血管周囲細胞腫、悪性；リンパ管肉腫；骨肉腫；傍骨性骨肉腫；軟骨肉腫；軟骨芽細胞腫、悪性；間葉性軟骨肉腫；骨の巨細胞腫瘍；ユーイング肉腫；歯原性腫瘍、悪性；エナメル上皮歯牙腫；エナメル上皮種、悪性；エナメル上皮線維肉腫；松果体腫、悪性；脊索腫；神経膠腫、悪性；脳室上衣腫；星状細胞腫；原形質性星状細胞腫；線維性星状細胞腫；星状芽細胞腫；神経膠芽細胞腫；乏突起膠腫；希突起膠芽細胞腫；原始神経外胚葉性腫瘍；小脳肉腫；神経節芽細胞腫；神経芽細胞腫；網膜芽細胞腫；嗅神経原性腫瘍；髄膜腫、悪性；神経線維肉腫；神経鞘腫、悪性；顆粒細胞腫瘍、悪性；悪性リンパ腫；ホジキン病；ホジキン傍肉芽腫；悪性リンパ腫、小リンパ球性；悪性リンパ腫、大細胞、びまん性；悪性リンパ腫、濾胞性；菌状息肉腫；他の特定非ホジキンリンパ種；悪性組織球増殖症；多発性骨髄腫；肥満細胞肉腫；免疫増殖性小腸疾患；白血病；リンパ性白血病；形質細胞性白血病；赤白血病；リンパ肉腫細胞白血病；骨髄性白血病；好塩基球性白血病；好酸球性白血病；単球性白血病；肥満細胞性白血病；骨髄巨核芽球性白血病；骨髄肉腫および毛様細胞性白血病。

【００７１】

さらに、実施例で説明されている本発明の別の態様において、本発明者らは、ＧＰＲ４ノックアウトマウスを提供している。ＧＰＲ４ノックアウトマウスは、ＧＰＲ４をコードする遺伝子が欠失されたヒト以外の哺乳類の好ましい一例であるに過ぎない。このため、特にノックアウトマウスについて言及していても、それは単なる典型例に過ぎないものとし、ＧＰＲ４をコードする遺伝子が欠失されたヒト以外の哺乳類についてもあてはまるも

のとする。ＧＰＲ４をコードする遺伝子が欠失された上記のヒト以外の哺乳類は、新脈管形成、癌または関節炎についての実験モデルとして、また新脈管形成、癌または関節炎を調節する化合物についてのスクリーニングにも使用され得る。

【００７２】

本明細書(添付の請求の範囲、要約および図面を含む)記載の特徴の全て、および／またはそこに開示された方法または工程の段階は全て、上記特徴および／または段階が少なくとも一部でも相互に両立し得ない場合の組み合わせを除き、何らかの組み合わせで上記態様のいずれかと組み合わされ得る。

【実施例】

【００７３】

６．実施例

材料および方法

バイオインフォマティクススクリーン

ほぼ排他的に内皮細胞で発現され、似た発現プロフィールを示すことが知られている７種のマーカー遺伝子(公式ヒト遺伝子記号：ＫＤＲ、ＴＩＥ１、ＴＥＫ、ＡＮＧＰＴ２、ＣＤＨ５、ＶＷＦ、ＰＴＰＲＢ)を参照として選択した。

【００７４】

細胞系、一次細胞および様々なヒト組織により行われた１００を超えるマイクロアレイ実験(Affymetrix ＨＧ－Ｕ１３３Ａ)からのデータを、GeneSpring(Silicon Genetics(登録商標)により提供される遺伝子発現ソフトウェア)を用いて解析した。７マーカー遺伝子のそれぞれについて、ピアソン相関を用いることにより類似発現プロフィールをもつ全遺伝子を測定した。７マーカー遺伝子の少なくとも１つに対し０.７またはそれ以上の相関係数をもつ遺伝子のみ考慮に入れた。

【００７５】

ＲＮＡ抽出およびＲＴ－ＰＣＲ

QUIAGEN RNA-easyミニキットを用いて、全ＲＮＡを細胞から採取した。逆転写の前に、製造業者の手順(Amplification Grade DNaseI、Invitrogen、バーゼル、スイス国)に従って、ＲＮＡをデオキシリボヌクレアーゼＩで処理した。総容量３０μｌで逆転写を実施した。反応混合物は次のものを含んでいた：２μｇデオキシリボヌクレアーゼＩ処理ＲＮＡ２０μｌ、２μｌの１０×バッファーＲＴ、２μｌのｄＮＴＰ混合物(５ｍＭの各ｄＮＴＰ)、２μｌのオリゴ－ｄＴプライマー(１０μＭ)、１ｍｌのリボヌクレアーゼ阻害剤(１０Ｕ／μｌ)、１μｌのOmniscript逆転写酵素(QIAGEN、バーゼル、スイス国)、２μｌのリボヌクレアーゼ不含有水。混合物を３７℃で６０分間インキュベーションし、次いで反応物を９３℃で５分間熱不活化し、次いで氷上で急速冷却した。Hotstart Mastermixキット(QIAGEN、バーゼル、スイス国)を用いて、５ｍｌのｃＤＮＡでＰＣＲを実施した。増幅は次のプログラムによるものであった：９５℃で１５分間初回変性、次いで９４℃で１５秒、５０℃で３０秒および７２℃で３０秒の４５サイクル。最終サイクル後、ＡＢＩ７０００ソフトウェアを用いることにより、試験したもの全てについて溶解曲線分析を実施した。使用プライマーは、マウスＧＰＲ４－１４６６Ｆ(ＴＧＴＧＣＴＡＣＣＧＴＧＧＣＡＴＣＣＴ、配列番号２１)、マウスＧＰＲ４－１５８１Ｒ(ＡＡＡＧＣＡＣＡＣＣＡＧＣＡＣＡＡＴＧＧ、配列番号２２)、マウスＧＡＰＤＨ－Ｆ９６０(ＴＴＧＴＣＡＡＧＣＴＣＡＴＴＴＣＣＴＧＧＴＡＴＧ、配列番号２３)、マウスＧＡＰＤＨ－１０６２Ｒ(ＴＧＧＴＣＣＡＧＧＧＴＴＴＣＴＴＡＣＴＣＣＴＴ、配列番号２４)、ヒトＧＰＲ４－２３１９Ｆ(ＴＧＴＧＣＴＡＣＣＧＴＧＧＣＡＴＣＣＴ、配列番号２５)、ヒトＧＰＲ４－２４６９Ｒ(ＣＴＴＧＡＧＴＴＣＴＧＡＣＡＴＴＣＴＣＣＣＴＣＴＴ、配列番号２６)、ヒトＧＡＰＤＨ－１１１Ｆ(ＣＡＧＧＧＣＴＧＣＴＴＴＴＡＡＣＴＣＴＧＧＴＡ、配列番号２７)、ヒトＧＡＰＤＨ－２１１Ｒ(ＧＧＧＴＧＧＡＡＴＣＡＴＡＴＴＧＧＡＡＣＡＴＧ、配列番号２８)であった。

【００７６】

安定したヒーラ－ＧＰＲ４細胞の作製

安定したヒーラＧＰＲ４細胞系を作製するため、完全長ヒトＧＰＲ４を発現するｐｃＤＮＡ３．１(＋)／ｍｙｃ－Ｈｉｓベクター(Invitrogen、バーゼル、スイス国)をＰｖｕＩで線状化し、Effectene試薬(QIAGEN、バーゼル、スイス国)を用いてトランスフェクションした。受容体を発現する安定した細胞クローンを、Ｈｅｐｅｓ不含有で抗生物質Ｇ４１８(４００μｇ／ｍｌ)含有の培養培地ｐＨ７．４での選別後に単離した。１８日後、細胞をｐＨ７．９でさらに増殖させた。

【００７７】

細胞培養

ヒーラ－ＧＰＲ４安定細胞を、重炭酸緩衝ＤＭＥＭおよび１０ｍＭのＨｅｐｅｓ、１０％胎児ウシ血清および抗生物質を補ったハムＦ１２培地の１：１混合物、ｐＨ７．９中で成長させた。

【００７８】

ＨＵＶＥＣ細胞を、Promo Cell(BioConcept AG、アルシュビル、スイス国、Ｃ－１０２５１)から購入し、培地Ｃ－２２２１０＋サプリメントキットＣ－３９２１０(両方ともスイス国アルシュビルのPromocell／BioConcept AG から)および最終濃度５％の胎児ウシ血清(South American １０２７０－１０６、Gibco／Invitrogen、バーゼル、スイス国)において培養した。マウス肺内皮細胞を単離し、Reynolds et al.[13]により報告されたプロトコルに従うが、ただし、陽性選別を、ラット抗マウスＶＥ－カドヘリン(クローン１１Ｄ４．１)および抗ＣＤ３１(クローンＭＥＣ１３．３；両方とも、スイス国アルシュビルのBecton Dickinsonから)の１：１混合物で行うという修正を加えて培養した。

【００７９】

ｃＡＭＰ形成検定法

２４ウェルプレートで密集成長させた細胞培養物を、血清不含有ＤＭＥＭ培地中で４時間［^{3}Ｈ］アデニン(１００ＭＢｑ／ｍｌ；Amersham、チューリッヒ、スイス国)により標識した。次いで、細胞を、１３０ｍＭのＮａＣｌ、０．９ｍＭのNaH_2PO_4、５．４ｍＭのＫＣｌ、０．８ｍＭの$MgSO_4$、１．０ｍＭの$CaCl_2$、２５ｍＭのグルコース、２０ｍＭのＨｅｐｅｓを含む緩衝塩溶液中３７℃でインキュベーションした。全溶液のｐＨを室温で指示された値に調節した。ｃＡＭＰを蓄積させ得るように示された要領でホスホジエステラーゼ阻害剤イソブチルメチルキサンチン(ＩＢＭＸ、１ｍＭ)を加えた。フォルスコリン(ＦＳＫ)は、$G_{\square s}$刺激との相乗作用でアデニリルシクラーゼを活性化するため、これを用いることにより、アッセイウインドウを増加させた。インキュベーション時間は１５分であった。次いで、細胞を氷冷トリクロロ酢酸で抽出し、Salomon[14]により報告された方法に従ってバッチカラムクロマトグラフィーを用いることによりｃＡＭＰを遊離アデニンおよびＡＴＰから分離した。

【００８０】

ｓｉＲＮＡ

国際公開第２００５／０５９１３２号記載の我々が所有権をもつアルゴリズム(Novartis Nucleic Acid Scienceユニット、バーゼル、スイス国)を用いて、全ｓｉＲＮＡを設計し、QIAGENにより合成した。標準化ｍＲＮＡ融合構築物検定法を用いることにより、ヒトおよびマウスＧＰＲ４のそれぞれのターゲッティングにおける有効性について幾つかの異なるｓｉＲＮＡをスクリーニングした[15]。最も強力なｓｉＲＮＡをこの試験で使用した。凍結乾燥ｓｉＲＮＡを、使用前に供給されたハイブリダイゼーション緩衝液に再懸濁した。対照ｓｉＲＮＡ(ｓｉＣｔｒｌ)として、QIAGENからの非ターゲッティングｓｉＲＮＡを使用した。

【００８１】

ＨＵＶＥＣ細胞(継代３)を、製造業者の使用説明書に従ってHiperpefect(QIAGEN)でトランスフェクションし、３μｌのHiperfectトランスフェクション試薬を、２４ウェルにおける３００００細胞に使用したところ、最終ｓｉＲＮＡ濃度は１０ｎＭであった。トランスフェクションの４８時間後、QIAGEN RNeasyキットを用い、製造業者の使用説明書に従ってＲＮＡを採取した。

【００８２】
ｐＲＡＹ２－ＧＰＲ４ターゲッティングベクターの作製
ＫＯＤ ＨＩＦＩ ＤＮＡポリメラーゼ(Novagen)でのＳＶ１２９ゲノムＤＮＡからのポリメラーゼ連鎖反応(ＰＣＲ)により、相同性を有するアームを増幅した。マウスＧＰＲ４遺伝子(ｍＣＧ５０３５１．１)の配列に従って、プライマーを設計した。センスプライマーＣＴＧＧＣＣＡＴＡＣＴＧＧＣＣＧＧＡＴＧＴＧＧＣＴＣＡＧＴＴＧＴＴＡＣ(配列番号２９)およびアンチセンスプライマーＣＣＧＣＴＣＧＡＧＴＣＡＴＧＣＴＴＡＴＡＣＣＡＧＣＧＧＴＧＴＣＡＴＧＣＴＴＡＴ(配列番号３０、生成物サイズ２．０ｋｂ)を用いて５'アームを増幅した。センスプライマーＣＣＡＴＣＧＡＴＧＧＣＴＧＧＣＡＧＡＴＡＡＧＧＡＣＡＧＡＣＧ(配列番号３１)およびアンチセンスプライマーＡＴＡＡＧＡＡＴＧＣＧＧＣＣＧＣＡＧＣＣＴＣＴＴＣＡＧＴＧＡＣＴＡＴＣＣ(配列番号３２、生成物サイズ１．５ｋｂ)を用いて、３'アームを増幅した。生成した５'および３'アームを、ｐＲＡＹ２ベクター(Genbank受入番号Ｕ６３１２０)でクローン化した。全てのＰＣＲフラグメントおよび生成したベクターについて配列確認した。
【００８３】
ＧＰＲ４ノックアウトマウスの作製
Ｓｆｉｌ線状化ターゲッティングベクター(ｐＲＡＹ２－ＧＰＲ４)２０μｇを、１．５×１０^{7}ＢＡＬＢ／ｃ細胞に電気穿孔し[16]、次いで、それらを有糸分裂不活化マウス胚由来線維芽細胞で０．２ｍｇ／ｍｌのＧ４１８の存在下において培養した。ターゲッティングされた突然変異が、プライマーＰ１ ＴＧＡＴＡＴＴＧＣＴＧＡＡＧＡＧＣＴＴＧＧＣＧＧＣ(配列番号３３)(Ｎｅｏ遺伝子)およびＰ２ ＣＡＣＴＴＣＣＴＣＴＣＣＣＴＣＣＴＡＴＴＴＧ(配列番号３４)を用いるＰＣＲ、次いでプライマーＰ３ ＡＧＣＧＣＡＴＣＧＣＣＴＴＣＴＡＴＣＧＣＣ(配列番号３５)(Ｎｅｏ遺伝子)およびＰ４ ＣＣＡＧＣＡＣＴＧＴＡＡＧＡＣＣＴＴＣ(配列番号３６)でのネステッドＰＣＲにより同定された(図３)。ＳａｃＩ、ＢａｍＨＩ、ＥｃｏｒＶまたはＨｉｎｄIII消化ゲノムＤＮＡにおけるプライマーcgtgcttgttaagcgaatac(配列番号３７)およびagtcattccagaagcctaga(配列番号３８)からのＰＣＲ産物である外側５'プローブでのサザンブロット分析により、相同的組換えを効果的に確認した。ネオマイシンプローブ(ＢａｍＨＩ ＮｈｅＩ消化ｐＲＡＹ２ベクターからの１．２ｋｂフラグメント)は、単一組込み部位を示した。それに続いて、陽性ＥＳ細胞クローンをＣ５７ＢＬ／６未分化胚芽細胞に顕微注入し、偽妊娠養母マウスに再移植した。生まれた雄キメラをＢａｌｂ／ｃ雌と交雑し、生殖系列組込みを、毛の色、ＰＣＲおよびサザンブロットハイブリダイゼーションを用いて測定した。これらのＧＰＲ４ヘテロ接合マウスの交配は、メンデル比でホモ接合ＧＰＲ４ノックアウトマウスを得るのに有効であった。ＧＰＲ４転写物の欠如を、ＧＰＲ４欠失および野生型マウスからの心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓および精巣ｃＤＮＡについて評価した。マウスをCO_2吸入により安楽死させ、組織を迅速に取り出し、RNAlater(Ambion、ハンティントン、イギリス国)に貯蔵した。ＲＮＡを、Absolutely RNA RT-PCR miniprepキット(Stratagene、アムステルダム、オランダ国)で調製し、Omniscript キット(QIAGEN、バーゼル、スイス国)により逆転写した。ＧＰＲ４についてはプライマーＧＣＴＧＣＣＡＴＧＴＧＧＡＣＴＣＴＣＧＡ(配列番号３９)およびＣＡＧＧＡＡＧＧＣＧＡＴＧＣＴＧＡＴＡＴ(配列番号４０)および対照としてのクラスリン２Ｋについてはgctcacatgggaatgttcac(配列番号４１)およびatgttgtcaaagttgtcataag(配列番号４２)を用いて、マルチプレックスＰＣＲを実施した。マウスを食物および水へ無制限に接近できるようにし、手順は全てスイス国動物保護法に準拠して実施された。
【００８４】
動物
６～８週齢の雌Ｂａｌｂ／Ｃマウス(ＷＴまたはＧＰＲ４ ＫＯ)を、Novartis動物育種施設で飼育した。対照Ｂａｌｂ／Ｃマウスを、Charles River Laboratories(レゾンシン、フランス国)から入手した。マウスを耳標識により識別し、通常条件下において群(１ケージあたり５～６動物)で飼い、毎日観察した。５～１０匹のマウスを一処置群について

使用し、動物実験は全て、スイス国動物保護法を厳守して実施した。全ての動物実験を少なくとも２回実施した。

【００８５】

血管新生増殖因子埋め込みモデル

モデルについては、以前に報告されている[17]。簡単に述べると、ペルフルオロ－アルコキシ－テフロン製の多孔質組織チャンバー(Teflona-PFA、２１ｍｍ×８ｍｍ直径、５５０μｌ容量)に、０.８％寒天(BBLa Nr.11849、Becton Dickinson、メイラン、フランス国)および２０Ｕ／ｍｌヘパリン(Roche、バーゼル、スイス国)に３ｍｇ／ｍｌの組換えヒトＶＥＧＦ１６５[18]および０.３ｍｇ／ｍｌのｂＦＧＦ(Invitrogen、バーゼル、スイス国)を含有または不含有で、指示されたｓｉＲＮＡを補ったものを充填した。充填手順前に溶液を３９℃で維持した。３％イソフルラン(Forenea、Abbott AG、シャム、スイス国)吸入を用いて、マウスに麻酔をかけた。皮下埋め込みを行うため、インプラントトロカールを挿入できるように、尾の基部のところで皮膚に小さな切りこみを入れた。無菌条件下、小さな切りこみから動物の背部へチャンバーを埋め込んだ。皮膚の切りこみを創傷用クリップ(Autoclip ９ｍｍ Clay Adams)により閉じた。埋め込み後４日目、CO_2を用いて動物を殺した。ｓｉＲＮＡ実験については、ｓｉＲＮＡを、増殖因子と一緒に０.３ｍＭの最終濃度でチャンバーに加え、埋め込みの３日後に動物を殺した。チャンバーを摘出し、各埋込物周囲に形成された血管化線維組織を注意深く取り出し、秤量した。マウスの全般的状態を監視するのに体重を使用した。

【００８６】

脈管形成応答の定量化

埋込物周囲で成長した線維組織に、１ｍｌのＲＩＰＡ緩衝液(５０ｍＭのトリス－ＨＣｌ ｐＨ７.２、１２０ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ ｐＨ８.０、６ｍＭのＥＧＴＡ ｐＨ８.５、１％ＮＰ－４０、２０ｍＭのＮａＦ)を加えた後、２４０００ｒｐｍ(Ultra Turrax Ｔ２５)で３０秒間ホモジネートし、そこに１ｍＭの Pefabloc ＳＣプロテイナーゼ阻害剤(Roche、バーゼル、スイス国)および１ｍＭのバナジウム酸Ｎａを新たに加えた。ホモジネートを７０００ｒｐｍで３０分間遠心分離にかけ、０.４５μｍＧＨＰシリンジフィルター(Acrodisca GF、Gelman Sciences、アナーバー、ミシガン)を用いて上清を濾過することにより、脂肪混入を回避した。報告された要領でＥＬＩＳＡによりＴｉｅ２タンパク質レベルを測定するのにこのライゼートを用いた[19]。

【００８７】

正常位腫瘍モデル

４Ｔ１マウス乳癌細胞系を、ＡＴＣＣ(LGC Promochem、モルシャン、フランス国)から入手し、ＤＭＥＭ高グルコース＋１％グルタミン＋１０％ＦＣＳ中で成長させた。ＣＴ２６細胞をＡＴＣＣから入手し、ＭＥＭ＋１０％ＦＣＳ＋１％ピルビン酸ナトリウム＋１％グルタミン＋１％非必須アミノ酸＋２％ビタミン中で成長させた。軽いイソフルラン麻酔下、２０μＬの４Ｔ１細胞懸濁液(ＰＢＳ中５×１０^{7}細胞／ｍｌ)を、第４乳腺の脂肪パッド下に注射し、マウス１匹あたり１０^{6}細胞の総接種量を与えた。

【００８８】

ＣＴ２６腫瘍モデルについては、細胞接種を無菌条件下、ＯＨＣ帯で実施した。手術前に、ケタミン(１００ｍｇ／ｋｇ)およびキシラジン(５ｍｇ／ｋｇ)の新たに調製した混合物の単一皮下注射によりマウスに麻酔をかけた。その腹部(皮膚および筋肉)を、白線(長さ０.５～１ｃｍ)に沿って外科用ハサミで切開した。ニュートラル鉗子で、動物の盲腸を突きとめ、腹部から徐々に引っ張り出した。３０ゲージの針(Becton-Dickinson、３２０８３４)により、ＣＴ２６細胞懸濁液(ＨＢＳＳ中１０^{6}細胞／ｍｌ)１０ｍｌを、拡大鏡の助けを借りて粘膜下層へ注射することにより、マウス１匹につき１×１０^{5}細胞の総接種量を与えた。最後に、盲腸を腹部へ戻し、筋肉を縫合し(Dexon、９１０４－１１)、傷口を３つのAutoclips(登録商標)(Clay-Adams４２７６３１)で閉じた。動物を最後に３７℃の電気パッドへ移すことにより、麻酔から回復させた。腫瘍移植の１９～２１日後、動物を殺した。マウスの全般的状態を監視するのに体重を使用した。

【００８９】
免疫蛍光および血管数
ＣＴ２６正常位腫瘍の８ｍｍ凍結切片を、アセトンにより固定し、１０％正常ヤギ血清(ＮＧＳ)により遮断し、室温で２時間、ＰＢＳ／０.５％ＮＧＳ／０.０５％トリトンＸ－１００中で１：２００に希釈した一次抗体とインキュベーションした。切片をＰＢＳで３回洗浄し、ＰＢＳ／０.５％ＮＧＳ／０.０５％トリトンＸ－１００中で１：４００に希釈した２次抗体とインキュベーションした。室温で１時間インキュベーション後、切片をＰＢＳで洗浄し、Mowiolに載せた。使用抗体は、ラット抗マウスＣＤ３１(クローンＭＥＣ１３.３、BD PharMingen、サンディエゴ、カリフォルニア)およびウサギ抗マウスＫｉ６７(Neomarkers、フレモント、カリフォルニア)であった。２次抗体は、ヤギ抗ウサギＡＬＥＸＡ蛍光体５６８およびヤギ抗ラットＡＬＥＸＡ蛍光体４８８(両方ともMolecular Probesから、Invitrogen、バーゼル、スイス国)であった。Ｋｉ６７染色を用いて、ＣＴ２６腫瘍における増殖性細胞の量を定量化した。Zeiss Axioplan 顕微鏡(２０×レンズ)を用いて、６～８枚の典型的画像を、各腫瘍(１群につきｎ＝６)から撮影した。Microsoft プログラムを用いることにより、総面積の増殖性細胞のカバレッジパーセントを計算した。
【００９０】
血管密度を測定するため、上記要領で血管をＣＤ３１について染色し、腫瘍片全体にわたって手作業で計数した。腫瘍全体を包含する画像を、Zeiss Axioplan顕微鏡により１０×倍率で撮影した。Openlab 3.1.5ソフトウェア(Improvision、レキシントン、マサチューセッツ)を用いて、計数した領域の面積を測定した。１群当たり６つの完全な腫瘍が計数された。
【００９１】
ＦＡＣＳ分析
非トランスフェクションおよびトランスフェクションＨＵＶＥＣ細胞を、ＶＥＧＦＲ２レベルについてＦＡＣＳにより分析した。簡単に述べると、細胞をトリプシン処理し、ＰＢＳ＋１０％ＦＣＳで洗浄し、氷上で１０分間インキュベーションした後、ＲＰＥ－コンジュゲートマウス抗ヒトＶＥＧＦＲ２ ｍＡｂ(１ｍｇ／１０^{6}細胞；R & D Systems、アビンドン、イギリス国)を加えた。ＲＰＥ標識イソ型マウスＩｇＧ１をＦＡＣＳ対照として使用した(R & D Systems、アビンドン、イギリス国)。Cell Quest ソフトウェア(Becton-Dickinson、アルシュビル、スイス国)を用いて、ＦＡＣＳ分析をFACScaliburで実施した。
【００９２】
ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ウエスタンーブロット、ＥＬＩＳＡ
全タンパク質を、プロテアーゼ阻害剤(Complete、Roche Diagnostics、スイス国)を補ったＲＩＰＡ緩衝液により組織から抽出した。タンパク質を８％ＳＤＳ－ＰＡＧＥで分解し、次いでＰＶＤＦ膜にブロッティングし、種々の抗体(ラット抗マウスＶＥ－カドヘリンｍＡｂ、クローン１１Ｄ４.１、Becton Dickinson、アルシュビル、スイス国；ヤギ抗マウスＥｐｈＢ４、R & D systems、アビンドン、イギリス国；ウサギ抗マウスチューブリン、Spring Biosciences、フレモント(Freemoiont)、カリフォルニア)によりプローブした。ＨＲＰ－標識２次抗体およびＥＣＬ－プラス化学発光試薬(Amersham Biosciences、ウプサラ、スウェーデン国)で検出を行った。報告された要領[19]でＴｉｅ２ ＥＬＩＳＡを用いて、Ｔｉｅ２受容体のレベルを測定した。市販のＥＬＩＳＡキット(R & D systems、アビンドン、イギリス国)を用いてマウスＶＥＧＦＲ２レベルを測定した。
【００９３】
結果
ＧＰＲ４は内皮細胞で発現される
ヒトに由来する様々な細胞型および組織のＤＮＡマイクロアレイを用いて得られた遺伝子発現データの解析は、ＧＰＲ４の発現が、内皮細胞特有の一連のマーカー遺伝子の発現と相関関係をなすことを示していた(図示せず)。我々は、伸長ＤＮＡマイクロアレイ分析(図１ａ)およびヒトおよびマウス内皮細胞でのＲＴ－ＰＣＲ(図１ｂ～ｃ)により内皮細胞

におけるＧＰＲ４の特異的な発現を確認することができた。

【００９４】

ＧＰＲ４は、内皮細胞において機能的プロトン感受性受容体として作用する

ＧＰＲ４が内皮細胞での機能的ｐＨセンサーであることを立証するため、我々は、ＨＵＶＥＣ(１次ヒト臍静脈内皮細胞)を弱い細胞外アシドーシスに曝露し、ｃＡＭＰ生産を測定した。組換えＧＰＲ４でトランスフェクションしたヒーラ細胞を、対照として用いた(図２ａ)。ＨＵＶＥＣは、弱いが明らかに顕著な応答を示し、この応答は、フォルスコリンの添加により強く増幅され得た(図２ｂ、ｃ)。最大応答はｐＨ６．８前後で観察され、全てのＧＰＲ４発現性細胞においてｐＨ７．９では顕著なｃＡＭＰ生産が無く、我々の以前の結果と一致していた[1]。ＧＰＲ４がこの高いｃＡＭＰ生産に関与するｐＨセンサーであることを立証するため、我々は、ＨＵＶＥＣを、細胞外アシドーシスに曝露する４８時間前にｓｉＲＮＡでトランスフェクションした。ＧＰＲ４－特異的ｓｉＲＮＡは、ｐＨ依存的ｃＡＭＰ増加を排除し得、対照ｓｉＲＮＡは何ら影響を及ぼさなかった(図２ｄ)。またアシドーシスに対する応答は、ＧＰＲ４受容体の特異的低分子量拮抗物質により阻害され得た(データは示さず)。

【００９５】

ＧＰＲ４欠損マウスは、生存能および繁殖能を有する

ＧＰＲ４の機能に関してさらに理解を深めるため、受容体のコーディング配列をネオマイシン耐性カセットで置換することにより、ＧＰＲ４欠損マウスを作製した(図３ａ)。ＧＰＲ４遺伝子の正確なターゲッティングを、サザンブロッティングにより確認した(図３ｂ)。また、幾つかの臓器ならびに野生型およびＧＰＲ４欠損マウスの両方から単離した一次肺内皮細胞でのＲＴ－ＰＣＲによりＧＰＲ４ ｍＲＮＡの発現を測定した。予想通り、ＧＰＲ４ ｍＲＮＡは、ＧＰＲ４欠損マウスからの全ての組織には存在しなかったが、野生型対照には存在していた(図３ｃ)。図３ｄは、野生型マウスの肺から単離された一次内皮細胞におけるＧＰＲ４発現を示しており、さらにＧＰＲ４は内皮細胞では発現されるが、ＧＰＲ４欠損マウスからの細胞では発現されないことが確認された。ＧＰＲ４欠損マウスは、生存能および繁殖能があり、それらの野生型同腹子と比べて著しい異常性も示さないことから、ＧＰＲ４が発達中において不可欠なものではないことを立証している。さらに、年齢および性別がマッチする野生型動物と比較したとき、ＧＰＲ４欠損マウスについては明白と言える顕著な組織病理学的差異が無かった。特に、心臓血管系は正常であると思われた。肺、卵巣および精巣についてＧＰＲ４欠損マウスと野生型マウスを比較したとき臓器重量の僅かな差異は認められた。しかしながら、確証的な組織病理学的発見が無いことを考慮に入れると、これらの臓器の重量変化は偶発的なものであり得る。

【００９６】

ＧＰＲ４欠損マウスでのＶＥＧＦ推進による新脈管形成の低下

ＧＰＲ４が病気に伴う新脈管形成において一定の役割を演じるか否かを調べるため、ＧＰＲ４欠損マウスを増殖因子移植血管新生モデルに付した[17,19]。この目的については、よく知られた血管新生因子であるＶＥＧＦまたはｂＦＧＦ(塩基性線維芽細胞増殖因子)、またはベースライン対照としてＰＢＳを含むテフロン製チャンバーをマウスに埋め込んだ。血管新生因子の添加により、埋め込まれたチャンバー周囲において新しい明確な血管化組織の形成が誘発される。図４ａ～ｃに示されているとおり、ＧＰＲ４欠損マウスは、ＶＥＧＦに対し血管新生応答を示し得なかったが、ｂＦＧＦに対する応答は野生型対照で観察されたものと類似していた。この驚くべき効果を確認するため、我々は、ＧＰＲ４特異的ｓｉＲＮＡを、種々の増殖因子と一緒に埋め込みチャンバーに添加した。このタイプのｓｉＲＮＡの局所送達を先に用いて、血管新生標的を下方制御した(E.B投稿準備中；[20])。以前の実験と一致するところでは、２つの独立したＧＰＲ４特異的ｓｉＲＮＡは、ＶＥＧＦの血管新生効果を排除したが、ｂＦＧＦと組み合わせた場合には何ら効果を示さなかった(図４ｄ)。類似した効果はＶＥＧＦＲ２に特異的なｓｉＲＮＡについても観察され、対照ｓｉＲＮＡの場合はいずれの増殖因子についても効果を示さなかった。

【００９７】

ＧＰＲ４欠損マウスにおける腫瘍成長の縮小

新たな脈管形成は腫瘍にとって非常に重要であるため、次に我々は宿主におけるＧＰＲ４の欠如が腫瘍成長に影響を及ぼすか否かを調べた。同遺伝子型の４Ｔ１乳房腫瘍細胞を、ＧＰＲ４欠損または野生型雌マウスの脂肪パッドに移植した。腫瘍の成長を、カリパス測定により３週間にわたって監視し、実験の最後に腫瘍を秤量した。図５ａおよび５ｂで示すとおり、腫瘍は、野生型対照と比べてＧＰＲ４欠損マウスでは著しく小さかった。同遺伝子型ＣＴ２６結腸腫瘍細胞の注入を第２の腫瘍モデルとして使用した。細胞をマウスの盲腸に正常位移植し、２０日後に腫瘍重量を測定した。このモデルでは、野生型対照と比べた場合のＧＰＲ４欠損マウスでの腫瘍成長の低下がさらに明白であった(図５ｃ、ｄ)。

【００９８】

ＧＰＲ４欠損マウスで成長した腫瘍における血管分布の低減化および細胞増殖の低下

ＣＴ２６腫瘍をさらに詳細に組織分析した(図６ａ～６ｄ)。腫瘍片を内皮共通マーカーであるＣＤ３１について染色したとき、我々は、内皮細胞が脆く破壊されて見え、血管が正しい形状を呈していないことに気づいた(図６ａ)。ＣＤ３１染色管腔を定量化したとき、我々は、ＣＰＲ４欠損マウスで成長させた腫瘍における血管密度の低下を観察した。不運なことに、管腔の高い変動性および形態学的差異故に、この差異は統計的有意に到達しなかった(Ｐ＝０．１１；図６ｂ)。核増殖抗原Ｋｉ６７についての染色は、野生型対照と比べてＧＰＲ４欠損マウスで成長させた腫瘍では増殖している細胞が極めて著しく低減化していることを明らかにした(図６ｃ)。対照的に、我々は、野生型およびＧＰＲ４欠損マウスでの腫瘍成長間におけるアポトーシス(活性化カスパーゼ３)または平滑筋細胞／周辺細胞(平滑筋アクチン、デスミン、ＮＧ２)についての染色での差異を認めなかった(データは示さず)。

【００９９】

ＧＰＲ４欠損はＶＥＧＦＲ２レベルの減少をもたらす

ＧＰＲ４欠損マウスがＶＥＧＦ推進による新脈管形成に対して特異的に抵抗力がある理由を解明する試みにおいて、我々は、野生型およびＧＰＲ４欠損マウスにおける内皮細胞でのＶＥＧＦについての主たるシグナリング受容体である、ＶＥＧＦＲ２の発現を調べた。興味深いことに、我々は、ＧＰＲ４欠損マウスの肺および腎臓においてＶＥＧＦＲ２レベルの減少を見出した(図７ａおよびデータは示さず)。他の内皮細胞マーカー、例えばＴｉｅ２、ＶＥ－カドヘリンおよびＥｐｈＢ４のレベルが、野生型およびＧＰＲ４欠損マウス間では類似しているため(図７ｂ、ｃ)、この差異は内皮細胞数の差異に起因するものではなかった。さらに、ＧＰＲ４特異的ｓｉＲＮＡをＨＵＶＥＣへトランスフェクションしたとき、ＶＥＧＦＲ２表面レベルの低下がＦＡＣＳ分析により測定されたが、これは対照ｓｉＲＮＡによりトランスフェクションしたＨＵＶＥＣでは見られなかったことである(図７ｄ)。したがって、我々は、ＧＰＲ４欠損内皮細胞のＶＥＧＦに対する血管新生応答の低下は、少なくとも一つにはＶＥＧＦＲ２の発現の減少に起因しているという結論に達した。

【０１００】

マウス抗原誘導関節炎モデル

雌ＧＰＲ４野生型およびＧＰＲ４欠損マウスを、２１および１４日前に完全フロイントアジュバント(１ｍｇ／ｍｌ ｍＢＳＡ含有０．１ｍｌ)で１：１ホモジネートしたメチル化ウシ血清アルブミン(ｍＢＳＡ － Fluka Chemie AG)に対し背部の２部位で感作(i.d.)した。０日目、右膝に５％グルコース溶液中の１０ｍｇ／ｍｌ ｍＢＳＡ １０ｍｌを投与し(抗原注入膝)、左膝には５％グルコース溶液のみ１０μｌを与えた(賦形剤注入膝)。次いで、関節内注射直後、および２、４および７日目に再度カリパスを用いて左および右膝の直径を測定した。右膝腫脹を左膝腫脹の比として計算し、Ｒ／Ｌ膝腫脹比を時間に対してプロットすることにより、対照および処置群についての曲線下面積(ＡＵＣ)グラフを得た。Excelスプレッドシートを用いて、個々の処置群ＡＵＣの阻害パーセンテージを、対照群ＡＵＣ(０％阻害)に対して計算した。７日目、マウスをCO_2吸入により殺し、右

および左膝を取り出し、組織学的分析にかけた。Histodurプラスチック埋封方法(Leica AG、ドイツ国)を用いて、膝を非脱灰組織研究用に処理した。対照および関節炎膝の両方からの薄片(５μｍ)を、ＲＭ２１６５回転ミクロトーム(Leica AG、ドイツ国)で切断した。標準プロトコルに従って、ギムザ染色後、各動物から左膝／右膝対として番号コード化し、盲検方式で読み取った。

【０１０１】

ＧＰＲ４欠損マウスにおける関節炎の重症度の低下

新脈管形成は、滑膜パンヌスの成長を制御することにより炎症性関節炎においてある重要な役割を演じる。増殖しているパンヌス組織は、主として滑膜線維芽細胞により構成され、マクロファージは、軟骨および肋軟骨下骨の破壊に関与する。固形腫瘍成長と類似した方法で、侵襲中のパンヌス組織は、十分な血液供給が無ければある一定の点を超えては進行することができない。新脈管形成阻害剤は関節炎モデルにおいて有効である。

ＧＰＲ４欠損マウスでは、図８に示された通り野生型マウスと比べて膝腫脹が明らかに顕著に阻害されており、５８．７％の腫脹ＡＵＣ［０～７日］の低下を示した。

【０１０２】

ＧＰＲ４およびＣＯＰＤ

方法

動物の擁護および福祉の主張

Ｂａｌｂ／ＣおよびＧＰＲ４－／－マウス(雄および雌)(２０～２８ｇ)(Charles River、マーゲート、イギリス国)を、１２時間明サイクルおよび１時間に１５～２０換気で、一定温度(２１±２℃)および湿度(５５±１５％)で維持した部屋に収容した。動物には、食物、ＲＭＩ３ペレット(SDS UK Ltd.)および水を制約なしに与えた。本明細書記載の試験は、イギリス国内務省により公布されたプロジェクト認可書の下で実施され、プロトコルは、Novartis Institutes for BioMedical Research(ホーシャム)での地方倫理検討プロセスにより是認されたものである。

【０１０３】

タバコ煙曝露

マウスを７リットルのパースペックスチャンバーに入れ、タバコの煙を６０秒ごとに送りこみ、残りの時間は新鮮な空気を注ぎ込んだ。１Ｒ３Ｆ Research Cigarettes(University of Kentucky、ルイスビル、ケンタッキー)を用いて、煙を発生させ、蠕道ポンプを介してチャンバーに引き入れた。模擬的な年齢および性別を一致させた対照動物を、同じ持続時間(１曝露期間につき約５５分間)で同様にして空気のみに曝露した。

【０１０４】

短期タバコ煙曝露

動物を連続３日間１曝露期間につき５本のタバコに曝露した。タバコ煙曝露後、過剰量の致命的麻酔薬(ペントバルビトンナトリウム塩２００ｍｇ腹腔内)で動物を殺し、全採血をした。マウスを最終曝露の３時間、２４時間、４８時間、７２時間、９６時間および１０日後に選別した。模擬曝露対照マウスについても各時点で選別した。

【０１０５】

中期タバコ煙曝露

簡単に述べると、マウスを上記と同様２週間１曝露期間につき５本のタバコに曝露した。最終曝露の２４時間、４８時間、３日、１週間および２週間後に、過剰量の致命的麻酔薬(ペントバルビトンナトリウム塩２００ｍｇ腹腔内)で動物を殺し、全採血をした。模擬曝露対照マウスについても各時点で選別した。

【０１０６】

卵アルブミン曝露

０日目に０．２ｍｌの水酸化アルミニウムゲル中に卵アルブミン１０μｇを含む腹腔内注射でマウスを感作した。１４日目、マウスに同抗原／水酸化アルミニウムゲル混合物の腹腔内ブースター注射を行った。第２感作の７日後、マウスをエーロゾル化卵アルブミン(ＰＢＳ中５０ｍｇ／ｍｌ)またはＰＢＳエーロゾルに曝露した。動物を、１日２回各曝露

に６時間の間隔をおいて２０分間アレルゲンに曝露した。動物を連続３日間卵アルブミンまたはＰＢＳに曝露し、合計６回の攻撃を行った。最終エーロゾル攻撃の１８～２０時間後、マウスをメタコリンおよび気管支肺胞洗浄液に対する気管支過敏性の評価用に準備し、肺組織を集めた。

【０１０７】

気管支過敏性の測定

アレルゲン曝露の１８～２０時間後、動物に麻酔をかけ、Portexカニューレ(１．３ｍｍカニューレを１．７ｍｍカニューレに挿入、長さ１５ｍｍ)で気管切開をし、２５０μｌの１回換気量により２５０拍／分の速度で換気した。フロートランスデューサーに連結した呼吸気流計(Buxco、イギリス国)で気流を監視した。経肺圧を、圧力変換器(Buxco、イギリス国)に連結した食道カテーテルにより評価した。Microsoft コンピューターに連結した増幅器インターフェースユニットを用いて、変換器からのシグナルをディジタル化し、Buxco XAソフトウェアで分析した。Buxco XAソフトウェアは、気流からの肺抵抗(R_L)および経肺圧測定値を瞬時に計算するようにプログラム化されていた。安定したベースラインR_LをＰＢＳに応じて記録した。次いで、Aeronebマイクロポンプネブライザー(Aerogen、アイルランド国)を用いて増加用量の臭化メタコリン(Ｍｃｈ)エーロゾル(０．３５、０．７、１．５、３、６、１２．５、２５ｍｇ／ｍｌ)を１０秒間投与し、R_Lを５分間記録した。ベンチレーターからの流出を手動で遮断することにより、気道を１回換気量の２倍まで過膨張させて、ＭＣｈの各用量を１０分間隔で分散させた。後続のＭＣｈ曝露前に一定量歴を確実にするために過膨張させた。５分間の間における平均R_L値を、ＰＢＳエーロゾル後におけるベースラインからの変化パーセンテージとして表した。ＰＢＳベースラインを超えてR_Lを３００％増加させるのに必要とされるＭＣｈの濃度(PC_{300})を、個々の動物からの対数濃度－肺抵抗曲線の補外により計算し、ｌｏｇ PC_{3000}を気管支過敏性の尺度として用いた。

【０１０８】

気管支肺胞洗浄(ＢＡＬ)液炎症

実施した全実験では、気管に挿入したバタフライカニューレを用い、滅菌ＰＢＳの３×０．４ｍＬアリコートを肺に点滴注入することにより、肺を洗浄した。洗浄液を４℃、１５００ｒｅｖ／分で１５分間遠心分離にかけた。上清をアリコートに分け、サイトカインおよびケモカイン検定法に－８０℃で貯蔵した。残りの細胞ペレットを、０．５ｍｌのメチルバイオレット溶液に再懸濁した。血球計算法により、全細胞数計算を実施した。Hema－Gurr染色サイトスピン(３００細胞／試料)(Merck、プール、イギリス国)での標準形態学的基準を用いて、細胞分画を実施した。各試料についての細胞総数と各白血球部分集団のパーセンテージを掛けることにより、白血球数を測定し、ＢＡＬ細胞についての細胞／ｍＬとして表した。

【０１０９】

肺組織の収集およびホモジネート化

ＢＡＬ手順後、肺を胸腔から摘出し、液体窒素中で急速冷凍した。全肺試料を－８０℃で貯蔵した。ＲＩＰＡ緩衝液(５０ｍＭのトリス－ＨＣｌｐＨ７．４、１５０ｍＭのＮａＣｌ、０．１％ＳＤＳ、１％ＮＰ４０、０．５％デオキシコール酸、緩衝液１０ｍｌにつき１錠の完全ミニカクテル阻害剤(Roche))を含む、電動組織粉砕機を用いて、冷凍肺組織をホモジネート化した。全試料を氷上に保ち、溶液が澄明になるまでホモジネート化した。次いで、試料を１０分間１３０００ＲＰＭでの遠心分離にかけ、肺ホモジネートのアリコートを－８０℃で貯蔵した。

【０１１０】

ＥＬＩＳＡによる組織サイトカイン分析

R&D Systems(アビンドン、イギリス国)からのＥＬＩＳＡデュオセットを用いてＭＩＰ－２を測定した。ＢＣＡタンパク質検定キット(Pierce、ノーサンバーランド、イギリス国)を用いて、組織ホモジネートタンパク質レベルを測定し、ケモカイン値を個々の試料についてのレベルに対して正規化した。

【０１１１】
統計的分析
データは全て平均＋平均の標準誤差(ＳＥＭ)として示した。スチューデントのｔ検定を用いて、全煙曝露動物と時間を一致させたそれらの空気曝露対照を比較した。卵アルブミン曝露動物を、それらのＰＢＳ曝露対照と比較した。
【０１１２】
結果
ＧＰＲ４－／－マウスに対する短期タバコ煙曝露の影響
短期タバコ煙曝露後、動物を様々な時点で殺し、ＢＡＬを実施した。ＢＡＬ液での好中球増加は、模擬対照と比べると、煙曝露したＧＰＲ４－／－およびＢａｌｂ／Ｃマウスの両方で３時間早く観察された。ＢＡＬ液好中球は、煙曝露ＧＰＲ４－／－およびＢａｌｂ／Ｃマウスの両方において２４時間でピークに達した。煙曝露の４８時間後、好中球数は、ＧＰＲ４－／－およびＢａｌｂ／Ｃ煙曝露マウスの両方で分解し始めた。煙曝露の７２時間後に観察されたところによると、好中球融解は、煙曝露Ｂａｌｂ／ＣマウスとＧＰＲ４－／－マウスでの方が高くなっていた(５．１０×１０^{4}±１．３１対１５．２４×１０^{4}±３．４３細胞／ｍｌ；ｐ＜０．０５)(図９)。
【０１１３】
ＧＰＲ４－／－マウスに対する中期タバコ煙曝露の影響
中期タバコ煙曝露後、好中球は、模擬対照と比べるとＢａｌｂ／Ｃ煙曝露マウスおよびＧＰＲ４－／－煙曝露マウスからのＢＡＬ液で増加していた。２４時間および３日目に、Ｂａｌｂ／ＣマウスとＧＰＲ４－／－マウスでは好中球の数が著しく減少していた(図１０)。興味深いことに、リンパ球の数もＧＰＲ４－／－およびＢａｌｂ／Ｃマウスの両方でタバコ曝露後に増加していた。しかしながら、ＧＰＲ４－／－ＢＡＬ液におけるリンパ球数は、Ｂａｌｂ／Ｃマウスと比べて煙曝露後１週目(１０．４２×１０^{4}±２．０８対３．５７×１０^{4}±０．５７細胞／ｍｌ；ｐ＜０．０１)および２週目(２．７６×１０^{4}±０．３１対０．９７×１０^{4}±０．２細胞／ｍｌ；ｐ＜０．０１)で著しく低下した。ＢＡＬ液中のマクロファージの数は煙曝露後に増加したが、ＧＰＲ４－／－およびＢａｌｂ／Ｃマウス間で差異は全く観察されなかった。
【０１１４】
ＭＩＰ－２は、Ｂａｌｂ／ＣマウスとＧＰＲ４－／－マウスでは煙曝露後２４時間で著しく低下していた(４２．７±３．０対１９４．９±５０．１ｐｇ／ｍｌ；ｐ＜０．０１)。驚くべきことに、ＭＩＰ－２レベルは、煙曝露Ｂａｌｂ／ＣマウスとＧＰＲ４－／－マウスでは煙曝露後２週間目で著しく高くなっていた(５３．３±１５．４対２２．６±１．９ｐｇ／ｍｌ；ｐ＜０．０５)(図１１)。
【０１１５】
感作ＧＰＲ４－／－マウスにおける卵アルブミン曝露後の気道過敏性
卵アルブミン曝露の２４時間後、気道過敏性をメタコリン攻撃により評価した。動物を増加量のメタコリンに曝露し、肺機能の変化を測定した。ＰＢＳ曝露ＧＰＲ４－／－マウスおよびＢａｌｂ／Ｃ　ＰＢＳ曝露マウス間で比較したところ気道過敏性での差異は全く観察されなかった(図１２)。興味深いことに、卵アルブミンに曝露したＧＰＲ４－／－マウスは、卵アルブミン曝露Ｂａｌｂ／ＣマウスとＧＰＲ４－／－マウスと比べてメタコリンに対する応答性が著しく低かった(PC_{300}－１．０２±０．０７対－０．６１±０．０９－ｌｏｇ ｍｇ／ｍｌメタコリン；ｐ＜０．０１)。
【０１１６】
卵アルブミン曝露後、ＰＢＳ曝露マウス対照の場合と比べてＢａｌｂ／ＣおよびＧＰＲ４－／－卵アルブミン曝露マウスの両方ではマクロファージ、好酸球およびリンパ球が著しく増加していた。Ｂａｌｂ／Ｃ卵アルブミン曝露およびＧＰＲ４－／－卵アルブミン曝露マウス間でマクロファージ、好酸球またはリンパ球に差異は全く観察されなかった(図１３)。
【０１１７】

要約

現在までに実施された実験では、ＧＰＲ４遺伝子欠失が、短期、中期および長期タバコ煙曝露後のＢＡＬ液において好中球の融解を促進することが立証された。さらに、ＧＰＲ４欠損はまた、卵アルブミン誘発気道過敏性を減ずることが立証された。

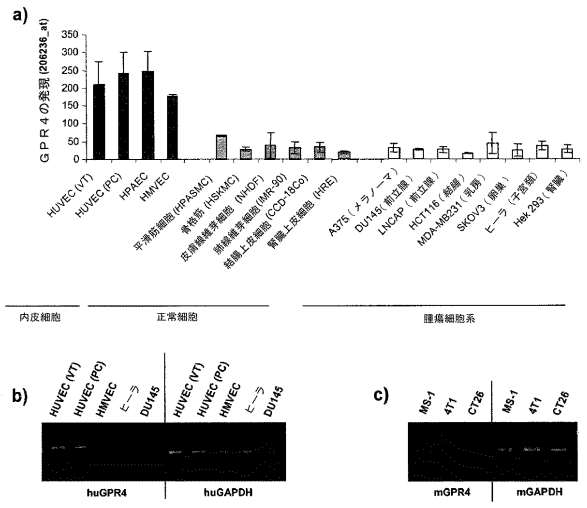
【０１１８】

７．参考文献情報

1. Ludwig, M. G. et al. Proton-sensing G-protein-coupled receptors, Nature 425, 93-8(2003)。
2. Ishii, S., Kihara, Y. & Shimizu, T. Identification of T cell death-associated gene 8 (TDAG8) as a novel acid sensing G-protein-coupled receptor, J Biol Chem 280, 9083-7(2005)。
3. Wang, J. Q. et al. TDAG8 is a proton-sensing and psychosine-sensitive G-protein-coupled receptor, J Biol Chem 279, 45626-33(2004)。
4. Kim, K. S. et al. GPR4 plays a critical role in endothelial cell function and mediates the effects of sphingosylphosphorylcholine, Faseb J, 19, 819-21(2005)。
5. Lum, H. et al. Inflammatory stress increases receptor for lysophosphatidylcholine in human microvascular endothelial cells, Am J Physiol Heart Circ Physiol , 285, H1786-9(2003)。
6. Bergers, G. & Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch, Nat Rev Cancer 3, 401-10(2003)。
7. Griffiths, J. R. Are cancer cells acidic?, Br J Cancer, 64, 425-7(1991)。
8. Gatenby, R. A. The potential role of transformation-induced metabolic changes in tumor-host interaction, Cancer Res 55, 4151-6(1995)。
9. Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis?, Nat Rev Cancer 4, 891-9(2004)。
10. Gambhir, S. S. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. Nat Rev Cancer 2, 683-93(2002)。
11. Park, H. J., Lyons, J. C., Ohtsubo, T. & Song, C. W. Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity, Br J Cancer 80, 1892-7(1999)。
12. Pouyssegur, J., Dayan, F. & Mazure, N. M. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression, Nature 441, 437-43(2006)。
13. Reynolds, L. E. & Hodivala-Dilke, K. M. Primary mouse endothelial cell culture for assays of angiogenesis, Methods Mol Med 120, 503-9(2006)。
14. Salomon, Y. Adenylate cyclase assay, Adv Cyclic Nucleotide Res 10, 35-55(1979)。
15. Husken, D. et al. mRNA fusion constructs serve in a general cell-based assay to profile oligonucleotide activity, Nucleic Acids Res 31, e102(2003)。
16. Gassmann, M. et al. Redistribution of GABAB(1) protein and atypical GABAB responses in GABAB(2)-deficient mice, J Neurosci 24, 6086-97(2004)。
17. Wood, J. et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid, J Pharmacol Exp Ther 302, 1055-61(2002)。
18. Siemeister, G. et al. Expression of biologically active isoforms of the tumor angiogenesis factor VEGF in Escherichia coli, Biochem Biophys Res Commun 222, 249-55(1996)。
19. Ehrbar, M. et al. Cell-demanded liberation of VEGF121 from fibrin implants induces local and controlled blood vessel growth, Circ Res 94, 1124-32(2004)。
20. Chae, S. S., Paik, J. H., Furneaux, H. & Hla, T. Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference, J Clin Invest 114, 1082-9(2004)。

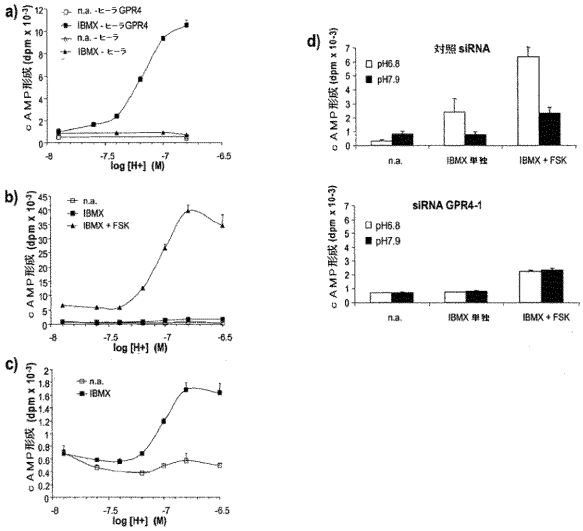
【図１】

Figure 1



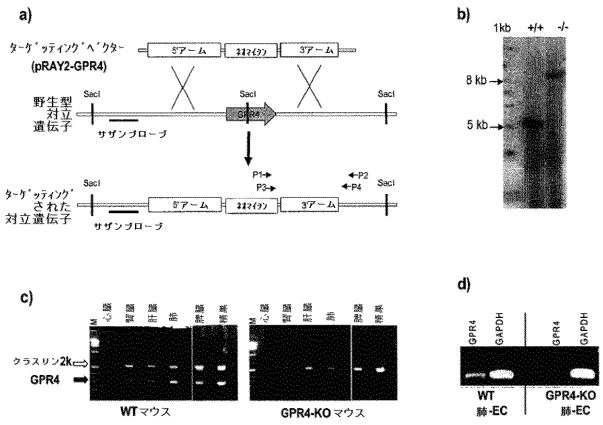
【図２】

Figure 2



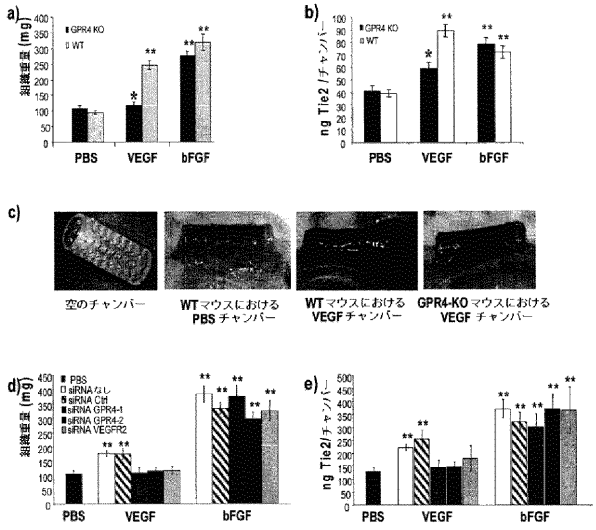
【図３】

Figure 3:



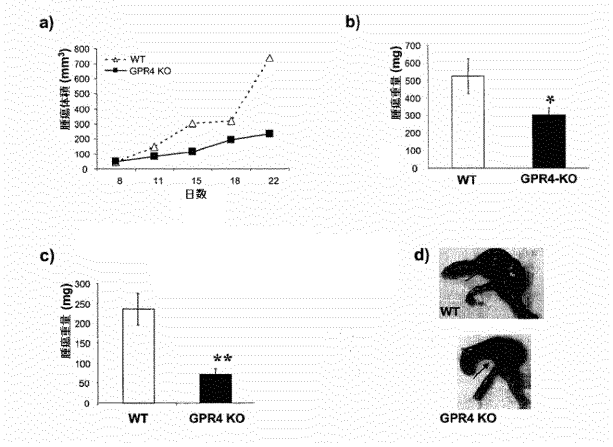
【図４】

Figure 4:



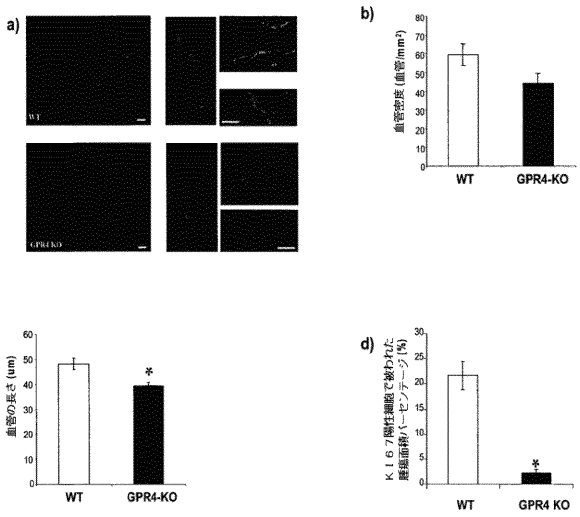
【図５】

Figure 5:



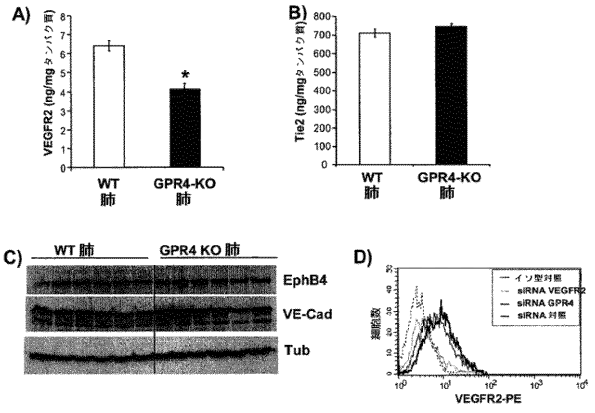
【図６】

Figure 6:



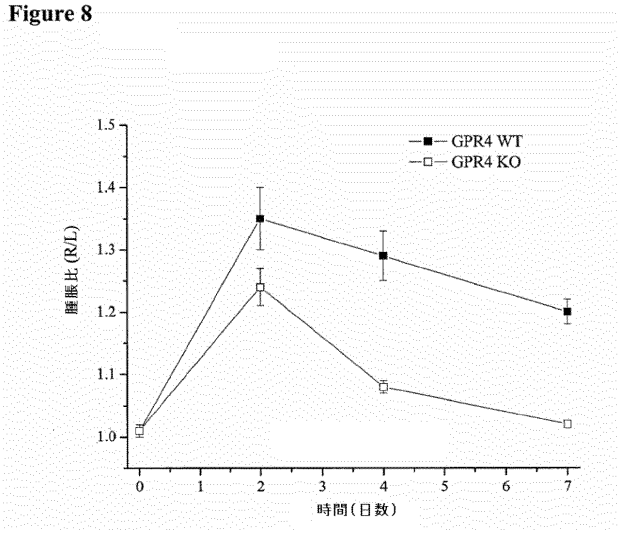
【図７】

Figure 7:



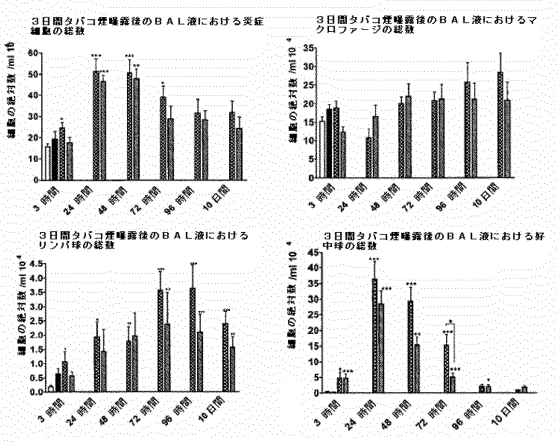
【図８】

Figure 8



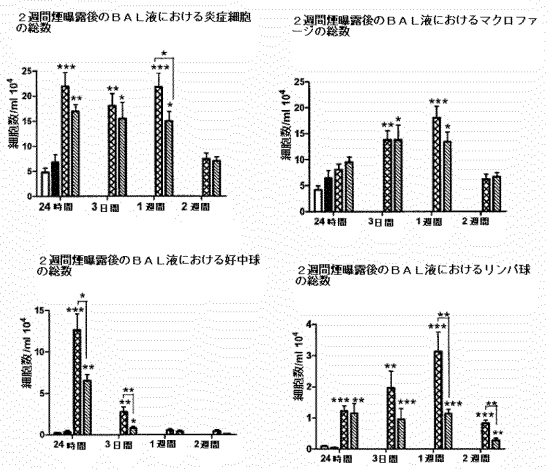
【図９】

Figure 9:



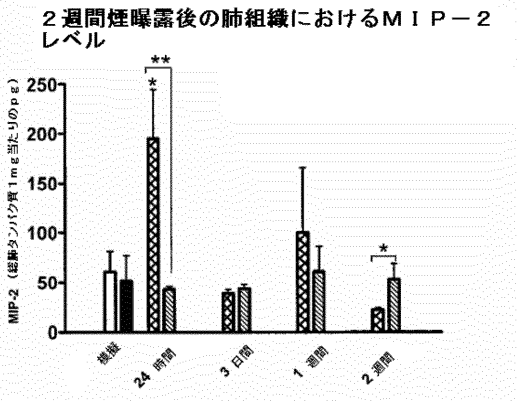
【図１０】

Figure 10:



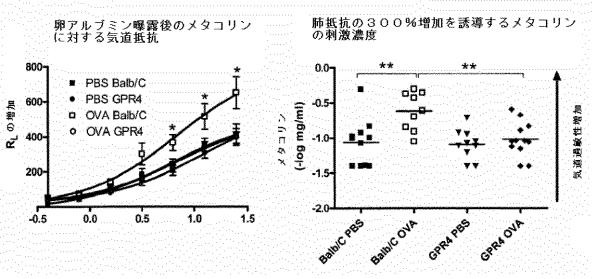
【図１１】

Figure 11:



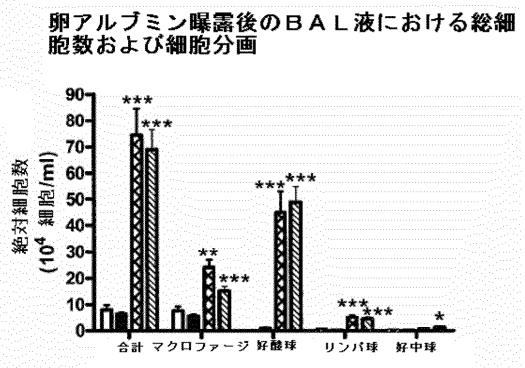
【図１２】

Figure 12:



【図１３】

Figure 13:



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/063899

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/11 A61K48/00 A01K67/027

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/112823 A (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS PHARMA GMBH [AT]; BAUMGARTEN BIRGIT [DE]; J) 29 December 2004 (2004-12-29) page 5, last paragraph - page 6, paragraph 2 page 40 - page 56; examples 8-25 claims 1-15 -/--	1-5,8,9

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 April 2008	17/07/2008

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Dumont, Elisabeth

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/063899

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM KWAN-SIK ET AL: "GPR4 plays a critical role in endothelial cell function and mediates the effects of sphingosylphosphorylcholine." THE FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY MAY 2005, vol. 19, no. 7, May 2005 (2005-05), pages 819-821, XP002420334 ISSN: 1530-6860 The whole document, in particular page 819, column 2, paragraph 1 page 821, 'Conclusions'	1-5,8,9
X	WO 03/033661 A2 (MILLENNIUM PHARM INC [US]; LOGAN THOMAS JOSEPH [US]; GALVIN KATHERINE) 24 April 2003 (2003-04-24) page 2, line 11 - page 9, line 5 claims 1-6	1-5,8,9
X	XU Y. ET AL: "GPR4 PLAYS A CRITICAL ROLE IN THE SURVIVAL, PROLIFERATION, AND DIFFERENTIATION OF ENDOTHELIAL CELLS (Abstract 5)" CLEVELAND CLINIC JOURNAL OF MEDICINE, ABSTRACTS FROM THE FIRST ANNUAL ATHEROTHROMBOSIS SUMMIT (17-19 SEPTEMBER 2003) CLEVELAND, OHIO, [Online] vol. 70, no. E-SUPPLEMENT1, September 2003 (2003-09), pages ES-1-ES-7, XP002420345 Retrieved from the Internet: URL:http://www.ccjm.org/PDFFILES/ATSummitabstracts.pdf#Abstract4and5> [retrieved on 2007-02-15] abstract	1-5,8,9
X	SEUWEN KLAUS ET AL: "REVIEW - RECEPTORS FOR PROTONS OR LIPID MESSENGERS OR BOTH?" JOURNAL OF RECEPTOR AND SIGNAL TRANSDUCTION RESEARCH, MARCEL DEKKER, NEW YORK, NY, US, vol. 26, no. 5-6, September 2006 (2006-09), pages 599-610, XP009078956 ISSN: 1079-9893 the whole document	1-5,8,9
X	WO 03/096025 A (BAYER AG [DE]; GOLZ STEFAN [DE]; BRUEGGEMEIER ULF [DE]; SUMMER HOLGER) 20 November 2003 (2003-11-20) page 38 page 55 - page 56	1-5,8,9

-/—

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/063899

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/059132 A (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS PHARMA GMBH [AT]; HALL JONATHAN [CH]; HUESK) 30 June 2005 (2005-06-30) cited in the application the whole document	1-5,8,9

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2007/063899

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

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

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

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

2. [X] Claims Nos.: –
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [X] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-4, 8, 9 (partially), 5 (completely)

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2007 /063899

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-4, 8, 9 (partially), claim 5 (completely)

Subject-matter relating to an siRNA molecule comprising the sequence of SEQ ID NO: 1 (sense) or 2 (antisense), its use in treatment or for the manufacture of a medicament for the inhibition of angiogenesis

---

2. claims: 1-4, 8, 9 (partially), claim 6 (completely)

As invention 1, with an siRNA molecule comprising the sequence of SEQ ID NO: 4 (sense) or 5 (antisense)

---

3. claims: 1-4, 8, 9 (partially), claim 7 (completely)

As invention 1, with an siRNA molecule comprising the sequence of SEQ ID NO: 7 (sense) or 8 (antisense)

---

4. claims: 1-4, 8, 9 (partially)

As invention 1, with an siRNA molecule comprising the sequence of SEQ ID NO: 10 (sense) or 11 (antisense)

---

5. claims: 1-4, 8, 9 (partially)

As invention 1, with an siRNA molecule comprising the sequence of SEQ ID NO: 13 (sense) or 14 (antisense)

---

6. claims: 1-4, 8, 9 (partially)

As invention 1, with an siRNA molecule comprising the sequence of SEQ ID NO: 16

---

7. claims: 1-4, 8, 9 (partially)

As invention 1, with an siRNA molecule comprising the sequence of SEQ ID NO: 17

---

8. claims: 1-4, 8, 9 (partially)

As invention 1, with an siRNA molecule comprising the sequence of SEQ ID NO: 18

---

9. claims: 1-4, 8, 9 (partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

As invention 1, with an siRNA molecule comprising the sequence of SEQ ID NO: 19

---

10. claims: 1-4, 8, 9 (partially)

As invention 1, with an siRNA molecule comprising the sequence of SEQ ID NO: 20

---

11. claims: 10-12

Subject-matter relating to a non human animal wherein the gene coding for GPR4 has been deleted; its use as an experimental model for angiogenesis and in screening

---

12. claim: 13

Subject-matter relating to a method for identifying an inhibitor of GPR4

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claim 8 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: -

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

---

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: -

The present claims 1, 2 and 8 encompass compounds defined only by their desired function (GPR4 inhibition), contrary to the requirements of clarity of Article 6 PCT, because the result-to-be-achieved type of definition does not allow the scope of the claim to be ascertained. The fact that any compound could be screened does not overcome this objection, as the skilled person would not have knowledge beforehand as to whether it would fall within the scope claimed, except for the siRNA molecules disclosed in the description, see pages 12 and 13. Undue experimentation would be required to screen compounds randomly. This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search for claims 1, 2 and 8.

The search of claims 1, 2 and 8 was consequently restricted to the use of siRNA according to invention 1.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2)PCT declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2007/063899

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004112823 A	29-12-2004	AU 2004248913 A1	29-12-2004
		BR PI0411668 A	08-08-2006
		CA 2528599 A1	29-12-2004
		EP 1638593 A1	29-03-2006
		JP 2007526744 T	20-09-2007
		MX PA05013721 A	08-03-2006
WO 03033661 A2	24-04-2003	AU 2002343523 A1	28-04-2003
		EP 1435975 A2	14-07-2004
WO 03096025 A	20-11-2003	AU 2003240589 A1	11-11-2003
WO 2005059132 A	30-06-2005	AU 2004298527 A1	30-06-2005
		BR PI0417489 A	22-05-2007
		CA 2545675 A1	30-06-2005
		CN 1890370 A	03-01-2007
		EP 1694843 A1	30-08-2006
		JP 2007523632 T	23-08-2007
		KR 20060126499 A	07-12-2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 35/00		
Ａ６１Ｐ 17/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 17/06		
Ａ６１Ｐ 19/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 19/02		
Ａ６１Ｐ 25/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 25/00	１０１	
Ａ６１Ｐ 9/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 9/10		
Ｇ０１Ｎ 33/50	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/15	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．テフロン
２．ウィンドウズ

(72)発明者 クラウス・ゾイヴェン
フランス、エフ－６８７３０ミシェルバシュ・ル・バ、リュ・デ・リラ１１番
(72)発明者 エリック・ビリー
フランス、エフ－６８９２０ヴィンツェンハイム、リュ・デュ・ヴィニョーブル８番
(72)発明者 トマ・シュプリ
フランス、エフ－６８４４０ツィンマースハイム、ルート・ドゥ・ミュルーズ１番
(72)発明者 ロレンツァ・ヴィダー
スイス、ツェーハー－４０５２バーゼル、ゼフォーゲルシュトラーセ７６番
(72)発明者 ジャネット・ドーソン・キング
スイス、ツェーハー－４４３１ベンヴィル、ネーベンマットシュトラーセ１１番
(72)発明者 マリー－ガブリエル・ルートヴィッヒ
フランス、エフ－６８７３０ミシェルバシュ・ル・バ、リュ・デ・メルレ８番
(72)発明者 マティアス・ミューラー
スイス、ツェーハー－４１２５リーヘン、シェーファーシュトラーセ８アー番
(72)発明者 プニータ・ナス
英国アールエイチ１２・５エイビー、サセックス、ホーシャム、ウィンブルハースト・ロード、ノバルティス・ホーシャム・リサーチ・センター
(72)発明者 キャロル・エリザベス・ジョーンズ
英国アールエイチ１２・５エイビー、サセックス、ホーシャム、ウィンブルハースト・ロード、ノバルティス・ホーシャム・リサーチ・センター

Ｆターム(参考) 2G045 DA14
4B024 AA01 CA11 HA17
4C084 AA13 AA17 ZA022 ZA452 ZA892 ZA962 ZB262
4C086 AA01 AA02 EA16 NA14 ZA45 ZA89 ZA96 ZB26 ZC01