

(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2011-503207

(P2011-503207A)

(43) 公表日 平成23年1月27日(2011.1.27)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 38/43 (2006.01)	A 61 K 37/48	Z N A 4 B 0 2 4
A61K 35/12 (2006.01)	A 61 K 35/12	4 C 0 7 6
A61K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00	4 C 0 8 4
A61P 9/10 (2006.01)	A 61 P 9/10	4 C 0 8 7
A61P 9/04 (2006.01)	A 61 P 9/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 80 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-534249 (P2010-534249)	(71) 出願人	510137032 サン ディエゴ ステート ユニバーシティ リサーチ ファウンデーション アメリカ合衆国 92182-1998 カリフォルニア州, サン ディエゴ, カン パニーレ ドライブ 5250
(86) (22) 出願日	平成20年11月14日 (2008.11.14)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成22年7月14日 (2010.7.14)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(86) 國際出願番号	PCT/US2008/083693	(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(87) 國際公開番号	W02009/065080	(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(87) 國際公開日	平成21年5月22日 (2009.5.22)		
(31) 優先権主張番号	60/988,753		
(32) 優先日	平成19年11月16日 (2007.11.16)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	61/091,698		
(32) 優先日	平成20年8月25日 (2008.8.25)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】循環系細胞におけるPIM-1活性を操作するための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、セリン/トレオニンキナーゼPIM-1をコードする核酸を含む組成物(例えば医薬組成物)ならびにそれらの製造方法および使用方法、例えば細胞増殖を誘導し、低酸素症および細胞アポトーシスから心臓細胞を保護する方法を提供する。本発明は、PIM-1をコードする核酸を含む組成物(例えば医薬組成物)、および心臓幹細胞の再生能を高める方法を提供する。

【選択図】 図21



Figure 21

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

血管系細胞または組織のPIM活性を増強する必要のある患者を同定するステップと、該組織中の細胞の機能特性を改変するために該患者の血管系細胞または組織におけるPIMレベルを増強するステップとを含む方法。

【請求項 2】

患者が心臓損傷を経験しており、PIMレベルの増強が心臓の再生を促進して該損傷を修復する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

増強ステップが、血管系組織におけるPIMの内因性産生を増強するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 4】

増強ステップが、患者に外因性PIMを投与するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。
。

【請求項 5】

外因性PIMが、細胞送達部分に結合したPIM酵素を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

細胞送達部分が、PIM酵素に結合された転移ドメインである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

増強ステップが、PIMレベルの増強をもたらす細胞を患者に投与するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 8】

投与される細胞が、幹細胞または血管系前駆細胞である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

投与される細胞が、非PIMプロモーター、心臓特異的プロモーター、心臓細胞もしくは幹細胞において活性なプロモーターまたはPIMプロモーターに機能的に連結されたPIMコードポリヌクレオチドを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

プロモーターが、-ミオシン重鎖プロモーター、心臓トロポニントプロモーターもしくはMLC-2vプロモーターであるか、または-ミオシン重鎖プロモーター、心臓トロポニントプロモーターもしくはMLC-2vプロモーターを含む、請求項 9 に記載の方法。 30

【請求項 11】

増強ステップが、細胞を患者の血管組織に投与するステップと、投与された細胞から増強レベルのPIMを発現させるステップとを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

血管系疾患または損傷の治療のための、PIM酵素送達物質またはPIM酵素増強物質。

【請求項 13】

細胞送達剤に連結したPIM酵素を含む、請求項 1 2 に記載の物質。

【請求項 14】

ヒトまたは動物に導入するための、PIM産生の増強を可能にするように改変された細胞を含む、請求項 1 2 に記載の物質。 40

【請求項 15】

細胞が前駆細胞または幹細胞であり、改変が、非PIMプロモーター、心臓特異的プロモーター、心臓細胞もしくは幹細胞において活性なプロモーターまたはPIMプロモーターの制御下にあるPIMコードポリヌクレオチドを含む、請求項 1 4 に記載の物質。

【請求項 16】

プロモーターが、-ミオシン重鎖プロモーター、心臓トロポニントプロモーターもしくはMLC-2vプロモーターであるか、または-ミオシン重鎖プロモーター、心臓トロポニントプロモーターもしくはMLC-2vプロモーターを含む、請求項 1 5 に記載の物質。

【請求項 17】

10

30

40

50

内因性PIM発現の誘導因子を含む、請求項11に記載の物質。

【請求項18】

血管系疾患または損傷を治療するための医薬の製造における、PIM送達物質またはPIM増強物質の使用。

【請求項19】

非PIMプロモーター、心臓特異的プロモーター、心臓細胞もしくは幹細胞において活性なプロモーターまたはPIMプロモーターに機能的に連結されたPIMコードポリヌクレオチド配列を含む血管系細胞または血管系細胞に分化し得る細胞を含む組成物。

【請求項20】

プロモーターが、-ミオシン重鎖プロモーター、心臓トロポニンTプロモーターもしくはMLC-2vプロモーターであるか、または-ミオシン重鎖プロモーター、心臓トロポニンTプロモーターもしくはMLC-2vプロモーターを含む、請求項19に記載の組成物。

【請求項21】

細胞が幹細胞もしくは心臓前駆細胞であるか、または細胞が筋細胞もしくは心臓細胞に分化し得る、請求項19に記載の組成物。

【請求項22】

細胞が間葉系幹細胞である、請求項19に記載の組成物。

【請求項23】

プロモーターが誘導性プロモーターである、請求項19に記載の組成物。

【請求項24】

疾患のあるまたは損傷した心臓組織内のPIMレベルを増強するステップを含む、心臓疾患または損傷を治療する方法。

【請求項25】

心臓疾患または損傷が、虚血損傷、低酸素損傷、心筋梗塞、外傷性心臓損傷、心臓肥大、過圧損傷、鬱血性心不全、アポトーシス誘導性損傷または疾患、細菌感染、ウイルス感染、および前記のいずれかのリスクの増強をもたらす症状を含む、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

心筋への投与のために製剤化される医薬組成物であつて：

(i)(a) Pim-1コード核酸；

(b) 発現構築物または発現ビヒクル中に挿入されたPim-1コード核酸、またはプロモーターに機能的に連結されたネイキッドPim-1コード核酸；

(c) 発現構築物または発現ビヒクルが、ベクター、プラスミド、組換えウイルスもしくは人工染色体を含むか、またはベクター、プラスミド、組換えウイルスもしくは人工染色体からなる、(b)の医薬組成物；

(d) 発現構築物または発現ビヒクルが、組換えアデノ関連ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、もしくはレンチウイルスベクターを含むか、または組換えアデノ関連ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、もしくはレンチウイルスベクターからなる、(c)の医薬組成物；

(e) 発現構築物または発現ビヒクルが、免疫不全ウイルス由来ベクターを含むか、または免疫不全ウイルス由来ベクターからなる、(d)の医薬組成物；

(f) 免疫不全ウイルス由来ベクターが、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来ベクターを含むか、またはヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来ベクターからなる、(e)の医薬組成物；あるいは

(g) ヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来ベクターが、ヒト免疫不全ウイルス-1(HIV-1)由来ベクターを含むか、またはヒト免疫不全ウイルス-1(HIV-1)由来ベクターからなる、(f)の医薬組成物；

(h) Pim-1コード核酸がプロモーターに機能的に連結されている、(a)～(g)のいずれかの医薬組成物；

(i) プロモーターが、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターである、(h)の医

10

20

30

40

50

薬組成物；あるいは

- (j) プロモーターが、心臓細胞(筋細胞)中で構成的または誘導的に活性である、(i)の医薬組成物；および、
(ii) 製薬上許容される賦形剤
を含む、前記医薬組成物。

【請求項 27】

請求項 26 に記載の医薬化合物を含むリポソーム。

【請求項 28】

請求項 26 に記載の医薬化合物を含むナノ粒子。

【請求項 29】

以下そのための医薬の製造のための請求項 26 に記載の医薬化合物、請求項 27 に記載のリポソーム、または請求項 28 に記載のナノ粒子の使用：

(a) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官においてPim-1キナーゼ活性を増加させることによる、細胞、組織および/または器官の低酸素症、低酸素血症または無酸素症の後の、あるいは圧過負荷誘発性肥大または圧過負荷誘発性心不全の後の、心臓または血管の細胞、組織もしくは器官における細胞アポトーシスおよび/または損傷の改善、治療または予防；

(b) 低酸素症、低酸素血症または無酸素症が、梗塞、外傷、手術、再移植、移植または毒物によって引き起こされる、(a)の使用；

(c) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官における細胞脱分化および/または幹細胞マーカーの再発現の誘導；

(d) 細胞、組織または器官においてPim-1を過剰発現または発現させることによる、生着した、または移植された細胞、組織または器官の保持の増強；

(e) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官における、bcl-2、bcl-XLの発現および/またはBadタンパク質のリン酸化の増加；

(f) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官における、虚血/再灌流損傷の改善、治療または予防；

(g) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官が、心臓細胞(筋細胞)、心臓組織もしくは心臓、または腎臓、肝臓、脾臓、臍臓、皮膚、粘膜、目、脳、肺、神経、知覚神経、末梢神経、脊髄、血管、内皮、筋肉、平滑筋、骨格筋、心筋または骨もしくは骨髄であるか、あるいは心臓細胞(筋細胞)、心臓組織もしくは心臓、または腎臓、肝臓、脾臓、臍臓、皮膚、粘膜、目、脳、肺、神経、知覚神経、末梢神経、脊髄、血管、内皮、筋肉、平滑筋、骨格筋、心筋または骨もしくは骨髄に含まれる、(a)～(f)のいずれかの使用；

(h) 幹細胞または多能性細胞の再生能を増強し、および/または増殖を誘導するための、幹細胞または多能性細胞におけるPim-1の過剰発現または発現；

(i) 心臓細胞(筋細胞)または心臓組織におけるBcl-XLの発現を増加させて、心臓保護的抗アポトーシスシグナル伝達を誘導し、および/または心筋生存シグナル伝達を増加させるための、心臓細胞(筋細胞)または心臓組織におけるPim-1の過剰発現または発現；

(j) 細胞が、幹細胞、成体幹細胞、造血幹細胞、脂肪由来幹細胞、間葉系幹細胞、c-kit⁺幹細胞、ヒト幹細胞、自己または同種幹細胞、胚細胞、組織特異的常在幹細胞、同種または自己細胞、前駆細胞、胎盤および/または臍帯血細胞、Sca-1+細胞、またはCD34+細胞である、(a)～(i)のいずれかの使用；あるいは

(k) 使用が、細胞、組織および/または器官の低酸素症、低酸素血症または無酸素症の後の、または圧過負荷誘発性肥大もしくは圧過負荷誘発性心不全の後の、または肥大心筋、加齢心筋、不全心筋、虚血心筋、再構築心筋、炎症、感染、慢性的ストレス、疾患、糖尿病もしくはアルコール依存症、および/または酸化的損傷によって損傷を受けた心筋による、心臓または血管の細胞、組織もしくは器官における細胞アポトーシスおよび/または損傷の改善、治療または予防のためである、(a)～(j)のいずれかの使用。

【請求項 30】

心臓または血管の細胞、組織もしくは器官において、PIM-1核酸またはPim-1キナーゼ活

10

20

30

40

50

性を誘導、アップレギュレートまたは挿入する方法であって、以下：

- (a) (i) Pim-1コード核酸を提供し、該Pim-1コード核酸を心臓または血管の細胞、組織もしくは器官に挿入し、(ii) Pim-1キナーゼを発現および/または分泌する細胞を提供し、(iii) Pim-1キナーゼまたはPIM-1発現核酸を、心臓または血管の細胞、組織もしくは器官に投与し、または(iv) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官においてPIM-1核酸またはPim-1キナーゼ活性を誘導またはアップレギュレートする化合物を提供するステップ；
- (b) Pim-1コード核酸が、Pim-1コードメッセージ(Pim-1コードmRNA)もしくはPIM-1遺伝子を含むか、またはPim-1コードメッセージ(Pim-1コードmRNA)もしくはPIM-1遺伝子からなる、(a)の方法；
- (c) Pim-1コード核酸が、ヒトPim-1コード核酸、もしくはヒトPim-1コードメッセージ(mRNA)、もしくはヒトPIM-1遺伝子、もしくはヒトPIM-1遺伝子座を含むか、またはヒトPim-1コード核酸、もしくはヒトPim-1コードメッセージ(mRNA)、もしくはヒトPIM-1遺伝子、もしくはヒトPIM-1遺伝子座からなる、(a)または(b)の方法；
- (d) 細胞が、ヒト細胞、幹細胞、成体幹細胞、造血幹細胞、脂肪由来幹細胞、間葉系幹細胞、c-kit⁺幹細胞、ヒト幹細胞、自己または同種幹細胞、胚細胞、組織特異的常在幹細胞、同種または自己細胞、前駆細胞、胎盤および/または臍帯血細胞、Sca-1+細胞、またはCD34+細胞である、(a)～(c)のいずれかの方法；
- (e) Pim-1コード核酸を、ex vivoまたはin vivoで心臓または血管の細胞、組織もしくは器官に挿入する、(a)～(d)のいずれかの方法；
- (f) Pim-1コード核酸を、発現構築物または発現ビヒクルに挿入する、(a)～(e)のいずれかの方法；
- (g) 発現構築物または発現ビヒクルが、ベクター、プラスミド、組換えウイルスもしくは人工染色体を含むか、またはベクター、プラスミド、組換えウイルスもしくは人工染色体からなる、(f)のいずれかの方法；
- (h) 発現構築物または発現ビヒクルが、組換えアデノ関連ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、もしくはレンチウイルスベクターを含むか、または組換えアデノ関連ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、もしくはレンチウイルスベクターからなる、(g)のいずれかの方法；
- (i) 発現構築物または発現ビヒクルが、免疫不全ウイルス由来ベクターを含むか、または免疫不全ウイルス由来ベクターからなる、(h)のいずれかの方法；
- (j) 免疫不全ウイルス由来ベクターが、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来ベクターを含むか、またはヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来ベクターからなる、(i)のいずれかの方法；
- (k) ヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来ベクターが、ヒト免疫不全ウイルス-1(HIV-1)由来ベクターを含むか、またはヒト免疫不全ウイルス-1(HIV-1)由来ベクターからなる、(j)のいずれかの方法；
- (l) Pim-1コード核酸を、野生型(正常)レベルのPIM-1タンパク質を発現しない細胞に挿入する、(a)～(k)のいずれかの方法；
- (m) Pim-1コード核酸を、野生型(正常)レベルのPIM-1タンパク質コードメッセージ(mRNA)を発現しない細胞に挿入する、(l)の方法；
- (n) Pim-1コード核酸を、野生型(正常)PIM-1遺伝子またはゲノムPim-1コード核酸を含まない細胞に挿入する、(m)の方法；
- (o) Pim-1コード核酸を、ex vivoで心臓または血管の細胞、組織もしくは器官に挿入し、該心臓または血管の細胞、組織もしくは器官を、それが必要な個体に移植する、(a)～(n)のいずれかの方法；
- (p) Pim-1コード核酸を、ex vivoで心臓細胞、心臓もしくは血管の組織または心臓もしくは血管の器官あるいは筋細胞に挿入し、該細胞を、それを必要とする心臓または血管の細胞、組織もしくは器官あるいは心筋(心臓)に移植する、(a)～(o)のいずれかの方法；
- (q) Pim-1コード核酸を、in vivoでそれを必要とする個体の心臓または血管の細胞、組織もしくは器官に挿入する、(a)～(n)のいずれかの方法；
- (r) Pim-1コード核酸を、in vivoで心臓または血管の細胞、組織もしくは器官または心臓

10

20

30

40

50

細胞もしくは筋細胞または心臓に挿入する、(q)の方法；

(s) 個体が、鬱血性心不全を有するか、または心筋梗塞、もしくは心筋損傷を有していたことがある、(r)の方法；

(t) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官が、心臓細胞(筋細胞)、心臓組織もしくは心臓、または腎臓、肝臓、脾臓、臍臓、皮膚、粘膜、目、脳、肺、神経、知覚神経、末梢神経、脊髄、血管、内皮、筋肉、平滑筋、骨格筋、心筋または骨もしくは骨髄であるか、あるいは心臓細胞(筋細胞)、心臓組織もしくは心臓、または腎臓、肝臓、脾臓、臍臓、皮膚、粘膜、目、脳、肺、神経、知覚神経、末梢神経、脊髄、血管、内皮、筋肉、平滑筋、骨格筋、心筋または骨もしくは骨髄に含まれる、(a)～(s)のいずれかの方法；

(u) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官においてPIM-1核酸またはPim-1キナーゼ活性を誘導またはアップレギュレートする化合物が、生存および/または増殖シグナル伝達に関するインターロイキン、サイトカインおよび/またはパラクリン因子；AKTセリン/トレオニンキナーゼのアップレギュレーター；インスリン様成長因子-1(IGF-1)；インスリン；白血病抑制因子(LIF)；顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)；または表皮成長因子(EGF)を含む、(a)の方法；

(v) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官におけるPim-1活性が、該細胞集団に外因性Pim-1キナーゼを投与することによって増加する、(a)～(u)のいずれかの方法；

(w) Pim-1活性が、細胞集団を、外因性PIM-1遺伝子を発現するトランスフェクト細胞と接触させることによって増加する、(v)の方法；

(x) 細胞集団が幹細胞を含む、(v)の方法；または

(y) Pim-1キナーゼ活性が、請求項1に記載の医薬化合物、請求項2に記載のリポソーム、もしくは請求項3に記載のナノ粒子またはこれらのいずれかの組み合わせを投与することにより、心臓または血管の細胞、組織もしくは器官において増加および/またはアップレギュレートされる、(a)～(y)のいずれかの方法

を含む、上記方法。

【請求項31】

請求項26に記載の医薬化合物、請求項27に記載のリポソーム、もしくは請求項28に記載のナノ粒子、またはこれらの任意の組み合わせをそれを必要とする個体に投与するステップを含む、疾患または症状を治療、予防または改善する方法であって、該疾患または症状の治療、予防および/または改善が、以下：

(a) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官においてPim-1キナーゼ活性を増加またはアップレギュレートさせることによる、細胞、組織および/または器官の低酸素症、低酸素血症または無酸素症の後の、または圧過負荷誘発性肥大もしくは圧過負荷誘発性心不全の後の、または肥大心筋、加齢心筋、不全心筋、虚血心筋、再構築心筋、炎症、感染、慢性的なストレス、疾患、糖尿病もしくはアルコール依存症、および/または酸化的損傷によって損傷を受けた心筋による、心臓または血管の細胞、組織もしくは器官における細胞アポトーシスおよび/または損傷の改善、治療または予防；

(b) 細胞アポトーシスおよび/もしくは損傷、または低酸素症、低酸素血症もしくは無酸素症が、梗塞、外傷、手術、再移植、移植もしくは毒素によって、または炎症、感染、慢性的なストレス、糖尿病もしくはアルコール依存症、および/または酸化的損傷によって引き起こされる、(a)の方法；

(c) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官において細胞脱分化および/または幹細胞マーカーの再発現を誘導するステップ；

(d) 生着したまたは移植された細胞、組織または器官においてPim-1を過剰発現または発現させることにより、該細胞、組織または器官の保持を増強するステップ；

(e) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官において、bcl-2、bcl-XLの発現および/またはBadタンパク質のリン酸化を増加させるステップ；

(f) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官における虚血/再灌流損傷の改善、治療または予防；

(g) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官が、心臓細胞(筋細胞)、心臓組織もしくは

10

20

30

40

50

心臓、または腎臓、肝臓、脾臓、膵臓、皮膚、粘膜、目、脳、肺、神経、知覚神経、末梢神経、脊髄、血管、内皮、筋肉、平滑筋、骨格筋、心筋または骨もしくは骨髄であるか、あるいは心臓細胞(筋細胞)、心臓組織もしくは心臓、または腎臓、肝臓、脾臓、膵臓、皮膚、粘膜、目、脳、肺、神経、知覚神経、末梢神経、脊髄、血管、内皮、筋肉、平滑筋、骨格筋、心筋または骨もしくは骨髄に含まれる、(a)~(f)のいずれかの方法；

(h) 幹細胞または多能性細胞の再生能を増強し、および/または増殖を誘導するために、幹細胞または多能性細胞においてPim-1を過剰発現または発現させるステップ；あるいは(i) 心臓細胞(筋細胞)または心臓組織におけるBcl-XLの発現を増加させて、心臓保護的抗アポトーシスシグナル伝達を誘導し、および/または心筋生存シグナル伝達を増加させるために、心臓細胞(筋細胞)または心臓組織においてPim-1を過剰発現または発現させるステップ；

(j) 細胞が、幹細胞、成体幹細胞、造血幹細胞、脂肪由来幹細胞、間葉系幹細胞、c-kit⁺幹細胞、ヒト幹細胞、自己または同種幹細胞、胚細胞、組織特異的常在幹細胞、同種または自己細胞、前駆細胞、胎盤および/または臍帯血細胞、Sca-1+細胞、またはCD34+細胞である、(a)~(i)のいずれかの方法

を含む、上記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

EFS-WEBにより提出した配列表への言及

MPEP第1730章II.B.2(a)(C)において承認および説明されているUSPTO EFS-WEB serverによる以下の配列表の電子的提出の内容は全て、参照によりそのまま本明細書に組み入れられる。この配列表は、以下のとおり電子的に提出されたテキストファイル上で確認される：

ファイル名	作成日	サイズ(バイト)
475442002940Seqlist.txt	2008年11月10日	10,066バイト

【0002】

連邦政府の資金提供

本発明の一部は、連邦政府から得た資金を利用し、一つ以上の以下の補助金交付番号第5R01HL067245号、第1R01HL091102号、第1P01HL085577号および第1P01AG023071号(全て米国国立衛生研究所による)の下で創作された。従って、連邦政府は本発明に特定の権利を有する。

【0003】

技術分野

本発明は、一般的に、細胞生物学および分子生物学、心臓疾患または心臓損傷の治療または予防、ならびに再生医療に関する。セリン/トレオニンキナーゼPIM-1をコードする核酸(および関連のPIM酵素)を含む組成物(例えば医薬組成物)、ならびに心臓または血管系の細胞もしくは組織におけるPIM利用性の改変あるいはPIM利用性(心臓または血管の組織もしくは環境における幹細胞、前駆細胞、または成体細胞の分化、移植、生存、および機能の誘導または増強など)に関する医学的用途および医学的方法が開示される。また、PIMをコードする核酸を含む組成物、ならびに血管または心臓の環境において幹細胞および前駆細胞の再生能を高める方法も開示される。

【背景技術】

【0004】

背景

10

20

30

40

50

細胞内分子シグナル伝達ネットワークは、標的基質をリン酸化して成長および生存の重大な側面を調節するキナーゼを介してコミュニケーションを取っている。癌原性セリン/トレオニンキナーゼであるPIM-1は、最初はモロニーマウス白血病ウイルスのプロウイルス組込部位として発見された。PIM-1は、前立腺癌においてアップレギュレートされる。この遺伝子は、胎児の造血中に肝臓および脾臓において高発現し、主にBリンパ細胞および骨髄細胞系において発現する。

【0005】

PIM-1は、分子量が34Daと44kDaの2つのアイソフォームで存在する。34kDaのアイソフォームは細胞質性で核局在化しているが、44kDaアイソフォームは膜結合していることが最近発見された。PIM-1は、最小限の標的基質認識配列要件と自己リン酸化能に基づく比較的乱交雜性のキナーゼであり得る。2つのさらなるファミリーメンバー、PIM-2とPIM-3は、PIM-1と機能的重複を示し得る。

10

【0006】

PIM-1発現の誘導は、LIF、GM-CSF、EGFなどのサイトカインおよび成長因子、ならびに大部分のインターロイキンによって媒介され、造血細胞の増殖および生存におけるPIM-1の役割と一致している。PIM-1は、多数の標的基質のリン酸化を通じて増殖作用を媒介し、細胞周期移行ならびに多数の標的のリン酸化を介した保護作用をもたらす。PIM-1発現の誘導は、造血細胞中のAKT(セリン/トレオニンキナーゼ)と関連している。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

要約

本発明は、セリン/トレオニンキナーゼPIMをコードする核酸を含む組成物(例えば医薬組成物)、ならびにその製造および使用方法(例えば心臓または血管の細胞増殖を誘導し、心臓または血管の細胞を低酸素症および細胞アポトーシスから保護する方法)を提供する。1つの態様において、本発明の組成物および方法は、PIM-1を発現して(例えば、PIMキナーゼ発現および/または活性をアップレギュレートすることにより)心筋細胞を肥大から保護し、梗塞によって誘導される心筋アポトーシスを抑制し、梗塞サイズを減少させるために用いられる。別の実施形態において、本発明の組成物および方法は、PIMを発現して心臓または血管の細胞脱分化および幹細胞マーカーの再発現を誘導するために用いられ、また1つの態様においては、PIMを過剰発現して幹細胞の再生能(例えば心筋梗塞後(MI後)の心臓に生着する幹細胞能)を増強するために用いられる。

30

【0008】

本明細書の開示の1つの態様は、血管系組織におけるPIM活性を増強する必要のある患者を同定するステップと、該組織中の細胞の機能特性を改変するために該患者の血管系組織におけるPIMレベルを増強するステップとを含む方法に関する。1つの実施形態において、上記の患者が心臓損傷を経験しており、PIMレベルの増強が心臓の再生を促進して上記の外傷を修復する。上記の増強ステップは、血管系組織におけるPIMの内因性産生を増強するステップを有利に含み得る。別法として、増強ステップは、上記の患者に外因性PIMを投与するステップを含み得る。上記の外因性PIMは、PIM-1、例えば、またはPIM-1と同一の機能を共有する別の物質を含んでいてよく、また細胞送達部分(例えばPIM酵素に結合された転移ドメイン)に結合したPIM酵素を含み得る。さらに別の実施形態において、上記の増強ステップは、PIMレベルの増強をもたらす細胞を患者に投与するステップを含む。例として、上記の投与される細胞は、幹細胞または血管系前駆細胞であってよい。有利には、上記の投与される細胞は、非PIMプロモーターに機能的に連結されたPIMコードポリヌクレオチドを含む。

40

【0009】

1つの実施形態において、上記の増強ステップは、細胞を患者の血管組織に投与するステップと、投与された細胞から増強レベルのPIMを発現させるステップとを含む。

【0010】

50

異なる実施形態は、血管系疾患または損傷の治療のためのPIM送達物質またはPIM増強物質を含む。この物質は、例えば、細胞送達剤と結合したPIM酵素、またはヒトまたは動物に導入するための、PIM産生の増強を可能にするように改変された細胞であってよい。場合によっては、上記の細胞は前駆細胞または幹細胞であり、上記の改変は、非PIMプロモーターの制御下にあるPIMコードポリヌクレオチドを含む。有利には、上記のプロモーターは、心臓特異的プロモーター、誘導性プロモーター、内因性プロモーター、外因性プロモーター、または構成的プロモーターであり得る。あるいは、PIMエンハンサーは内因性PIM発現の誘導因子であってよい。

【0011】

さらに別の実施形態は、血管系疾患または損傷を治療するための医薬の製造における、PIM送達物質またはPIM増強物質の使用である。

【0012】

さらに別の実施形態は、非PIMプロモーターに機能的に連結されたPIMコードポリヌクレオチド配列を含む血管系細胞または血管系細胞に分化し得る細胞を含む組成物である。上記の細胞は、例えば、幹細胞または心臓前駆細胞であり得る。考えられる様々な種類の幹細胞としては、間葉系幹細胞、心臓幹細胞、脂肪由来幹細胞、胚幹細胞、および造血幹細胞が挙げられる。有利には、上記のプロモーターは、誘導性プロモーターまたは心臓特異的プロモーターである。

【0013】

さらに別の実施形態は、疾患のあるまたは損傷した心臓組織内のPIMレベルを増強するステップを含む、心臓疾患または損傷を治療する方法である。上記の心臓疾患または損傷は、虚血損傷、低酸素損傷、心筋梗塞、外傷性心臓損傷、心臓肥大、過圧損傷、鬱血性心不全、アポトーシス誘導性損傷または疾患、細菌感染、ウイルス感染、および上記のいずれかのリスクの増強をもたらす症状を含み得る。

【0014】

別の実施形態は、

心筋への投与のために製剤化される医薬組成物であって：

(i)(a) PIM-1コード核酸；

(b) 発現構築物または発現ビヒクル中に挿入されたPIM-1コード核酸、またはプロモーターに機能的に連結されたネイキッド(裸の)(naked)PIM-1コード核酸；

(c) 発現構築物または発現ビヒクルが、ベクター、プラスミド、組換えウイルスもしくは人工染色体を含む、またはベクター、プラスミド、組換えウイルスもしくは人工染色体からなる、(b)の医薬組成物；

(d) 発現構築物または発現ビヒクルが、組換えアデノ関連ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、もしくはレンチウイルスベクターを含む、または組換えアデノ関連ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、もしくはレンチウイルスベクターからなる、(c)の医薬組成物；

(e) 発現構築物または発現ビヒクルが、免疫不全ウイルス由来ベクターを含む、または免疫不全ウイルス由来ベクターからなる、(d)の医薬組成物；

(f) 免疫不全ウイルス由来ベクターが、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来ベクターを含む、またはヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来ベクターからなる、(e)の医薬組成物；

(g) ヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来ベクターが、ヒト免疫不全ウイルス-1(HIV-1)由来ベクターを含む、またはヒト免疫不全ウイルス-1(HIV-1)由来ベクターからなる、(f)の医薬組成物；

(h) PIM-1コード核酸がプロモーターに機能的に連結されている、(a)～(g)のいずれかの医薬組成物；

(i) プロモーターが、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターである、(h)の医薬組成物；あるいは

(j) プロモーターが、心臓細胞(筋細胞)中で構成的または誘導的に活性である、(i)の医薬組成物；および、

10

20

30

40

50

(ii) 製薬上許容される賦形剤

を含む、上記医薬組成物を提供する。

【0015】

また、本発明の医薬化合物を含むリポソーム、および/または本発明の医薬化合物を含むナノ粒子も考えられる。

【0016】

さらに他の実施形態は、以下のための医薬の製造のための本発明の医薬化合物、本発明のリポソーム、または本発明のナノ粒子の使用：

(a) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官においてPIM-1キナーゼ活性を増加させることによる、細胞、組織および/または器官の低酸素症、低酸素血症または無酸素症の後の、あるいは圧過負荷誘発性肥大または圧過負荷誘発性心不全の後の、心臓または血管の細胞、組織もしくは器官における細胞アポトーシスおよび/または損傷の改善、治療または予防；

(b) 低酸素症、低酸素血症または無酸素症が、梗塞、外傷、手術、再移植、移植または毒物によって引き起こされる、(a)の使用；

(c) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官における細胞脱分化および/または幹細胞マーカーの再発現の誘導；

(d) 細胞、組織または器官においてPIM-1を過剰発現または発現させることによる、生着した、または移植された細胞、組織または器官の保持の増強；

(e) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官における、bcl-2、bcl-XLの発現および/またはBadタンパク質のリン酸化の増加；

(f) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官における、虚血/再灌流損傷の改善、治療または予防；

(g) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官が、心臓細胞(筋細胞)、心臓組織もしくは心臓または他の器官である、あるいは心臓細胞(筋細胞)、心臓組織もしくは心臓または他の器官に含まれている、(a)～(f)のいずれかの使用；

(h) 幹細胞または多能性細胞の再生能を増強し、および/または増殖を誘導するための、幹細胞または多能性細胞におけるPIM-1の過剰発現または発現；

(i) 心臓細胞(筋細胞)または心臓組織におけるBcl-XLの発現を増加させて、心臓保護的抗アポトーシスシグナル伝達を誘導し、および/または心筋生存シグナル伝達を増加させるための、心臓細胞(筋細胞)または心臓組織におけるPIM-1の過剰発現または発現；

(j) 細胞が、幹細胞、成体幹細胞、造血幹細胞、脂肪由来幹細胞、間葉系幹細胞、c-kit+幹細胞、ヒト幹細胞、自己または同種幹細胞、胚細胞、組織特異的常在幹細胞、同種または自己細胞、前駆細胞、胎盤および/または臍帯血細胞、Sca-1+細胞、またはCD34+細胞である、(a)～(i)のいずれかの使用；あるいは

(k) 上記の使用が、細胞、組織および/または器官の低酸素症、低酸素血症または無酸素症の後の、または圧過負荷誘発性肥大もしくは圧過負荷誘発性心不全の後の、または肥大心筋、加齢心筋、不全心筋、虚血心筋、再構築心筋、炎症、感染、慢性的ストレス、疾患、糖尿病もしくはアルコール依存症、および/または酸化的損傷によって損傷を受けた心筋による、心臓または血管の細胞、組織もしくは器官における細胞アポトーシスおよび/または損傷の改善、治療または予防のためである、(a)～(j)のいずれかの使用を含む。

【0017】

また、心臓または血管の細胞、組織もしくは器官においてPIM-1核酸またはPIM-1キナーゼ活性を誘導、アップレギュレートまたは挿入する方法であって、以下：

(a) (i)PIM-1コード核酸を提供し、該PIM-1コード核酸を心臓または血管の細胞、組織もしくは器官に挿入し、(ii)PIM-1キナーゼを発現および/または分泌する細胞を提供し、(iii)Pim-1キナーゼまたはPIM-1発現核酸を、心臓または血管の細胞、組織もしくは器官に投与し、または(iv)心臓または血管の細胞、組織もしくは器官においてPIM-1核酸またはPim-1キナーゼ活性を誘導またはアップレギュレートする化合物を提供するステップ；

(b) Pim-1コード核酸が、PIM-1コードメッセージ(PIM-1コードmRNA)もしくはPIM-1遺伝子

10

20

30

40

50

を含む、またはPIM-1コードメッセージ(PIM-1コードmRNA)もしくはPIM-1遺伝子からなる、(a)の方法；

(c) PIM-1コード核酸が、ヒトPIM-1コード核酸、もしくはヒトPIM-1コードメッセージ(mRNA)、もしくはヒトPIM-1遺伝子、もしくはヒトPIM-1遺伝子座を含む、またはヒトPIM-1コード核酸、もしくはヒトPIM-1コードメッセージ(mRNA)、もしくはヒトPIM-1遺伝子、もしくはヒトPIM-1遺伝子座からなる、(a)または(b)の方法；

(d) 細胞が、ヒト細胞、幹細胞、成体幹細胞、造血幹細胞、脂肪由来幹細胞、間葉系幹細胞、c-kit⁺幹細胞、ヒト幹細胞、自己または同種幹細胞、胚細胞、組織特異的常在幹細胞、同種または自己細胞、前駆細胞、胎盤および/または臍帯血細胞、Sca-1+細胞、またはCD34+細胞である、(a)～(c)のいずれかの方法；

(e) PIM-1コード核酸を、ex vivoまたはin vivoで心臓または血管の細胞、組織もしくは器官に挿入する、(a)～(d)のいずれかの方法；

(f) PIM-1コード核酸を、発現構築物または発現ビヒクルに挿入する、(a)～(e)のいずれかの方法；

(g) 発現構築物または発現ビヒクルが、ベクター、プラスミド、組換えウイルスもしくは人工染色体を含む、またはベクター、プラスミド、組換えウイルスもしくは人工染色体からなる、(f)のいずれかの方法；

(h) 発現構築物または発現ビヒクルが、組換えアデノ関連ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、もしくはレンチウイルスベクターを含む、または組換えアデノ関連ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、もしくはレンチウイルスベクターからなる、(g)のいずれかの方法；

(i) 発現構築物または発現ビヒクルが、免疫不全ウイルス由来ベクターを含む、または免疫不全ウイルス由来ベクターからなる、(h)のいずれかの方法；

(j) 免疫不全ウイルス由来ベクターが、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来ベクターを含む、またはヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来ベクターからなる、(i)のいずれかの方法；

(k) ヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来ベクターが、ヒト免疫不全ウイルス-1(HIV-1)由来ベクターを含む、またはヒト免疫不全ウイルス-1(HIV-1)由来ベクターからなる、(j)のいずれかの方法；

(l) PIM-1コード核酸を、野生型(正常)レベルのPIM-1タンパク質を発現しない細胞に挿入する、(a)～(k)のいずれかの方法；

(m) PIM-1コード核酸を、野生型(正常)レベルのPIM-1タンパク質コードメッセージ(mRNA)を発現しない細胞に挿入する、(l)の方法；

(n) PIM-1コード核酸を、野生型(正常)PIM-1遺伝子またはゲノムPIM-1コード核酸を含まない細胞に挿入する、(m)の方法；

(o) PIM-1コード核酸を、ex vivoで心臓または血管の細胞、組織もしくは器官に挿入し、該心臓または血管の細胞、組織もしくは器官を、それが必要な個体に移植する、(a)～(n)のいずれかの方法；

(p) PIM-1コード核酸を、ex vivoで心臓細胞、心臓もしくは血管の組織または心臓もしくは血管の器官あるいは筋細胞に挿入し、該細胞を、それを必要とする心臓または血管の細胞、組織もしくは器官あるいは心筋(心臓)に移植する、(a)～(o)のいずれかの方法；

(q) PIM-1コード核酸を、in vivoでそれを必要とする個体の心臓または血管の細胞、組織もしくは器官に挿入する、(a)～(n)のいずれかの方法；

(r) PIM-1コード核酸を、in vivoで心臓または血管の細胞、組織もしくは器官または心臓細胞もしくは筋細胞または心臓に挿入する、(q)の方法；

(s) 個体が、鬱血性心不全を有する、または心筋梗塞、もしくは心筋損傷を有していたことがある、(r)の方法；

(t) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官が、心臓細胞(筋細胞)、心臓組織もしくは心臓または他の器官である、あるいは心臓細胞(筋細胞)、心臓組織もしくは心臓または他の器官に含まれている、(a)～(s)のいずれかの方法；

(u) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官においてPIM-1核酸またはPIM-1キナーゼ活

10

20

30

40

50

性を誘導またはアップレギュレートする化合物が、生存および/または増殖シグナル伝達に関するインターロイキン、サイトカインおよび/またはパラクリン因子；AKTセリン/トレオニンキナーゼのアップレギュレーター；インスリン様成長因子-1(IGF-1)；インスリン；白血病抑制因子(LIF)；顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)；または表皮成長因子(EGF)を含む、(a)の方法；

(v) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官におけるPIM-1活性が、該細胞集団に外因性PIM-1キナーゼを投与することによって増加する、(a)～(u)のいずれかの方法；

(w) PIM-1活性が、細胞集団を、外因性PIM-1遺伝子を発現するトランスフェクト細胞と接触させることによって増加する、(v)の方法；

(x) 細胞集団が幹細胞を含む、(v)の方法；または

(y) PIM-1キナーゼ活性が、本発明の医薬化合物、本発明のリポソーム、もしくは本発明のナノ粒子またはこれらのいずれかの組み合わせを投与することにより、心臓または血管の細胞、組織もしくは器官において増加および/またはアップレギュレートされる、(a)～(y)のいずれかの方法

を含む、上記方法も含まれる。

【 0 0 1 8 】

さらに他の態様は、本発明の医薬化合物、本発明のリポソーム、もしくは本発明のナノ粒子、またはこれらの任意の組み合わせをそれを必要とする個体に投与するステップを含む、疾患または症状を治療、予防または改善する方法であって、該疾患または症状の治療、予防および/または改善が、以下：

(a) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官においてPIM-1キナーゼ活性を増加またはアップレギュレートさせることによる、細胞、組織および/または器官の低酸素症、低酸素血症または無酸素症の後の、または圧過負荷誘発性肥大もしくは圧過負荷誘発性心不全の後の、または肥大心筋、加齢心筋、不全心筋、虚血心筋、再構築心筋、炎症、感染、慢性的なストレス、疾患、糖尿病もしくはアルコール依存症、および/または酸化的な損傷によって損傷を受けた心筋による、心臓または血管の細胞、組織もしくは器官における細胞アポトーシスおよび/または損傷の改善、治療または予防；

(b) 細胞アポトーシスおよび/もしくは損傷、または低酸素症、低酸素血症もしくは無酸素症が、梗塞、外傷、手術、再移植、移植もしくは毒素によって、または炎症、感染、慢性的なストレス、糖尿病もしくはアルコール依存症、および/または酸化的な損傷によって引き起こされる、(a)の方法；

(c) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官において細胞脱分化および/または幹細胞マーカーの再発現を誘導するステップ；

(d) 生着したまたは移植された細胞、組織または器官においてPim-1を過剰発現または発現させることにより、該細胞、組織または器官の保持を増強するステップ；

(e) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官において、bcl-2、bcl-XLの発現および/またはBadタンパク質のリン酸化を増加させるステップ；

(f) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官における虚血/再灌流損傷の改善、治療または予防；

(g) 心臓または血管の細胞、組織もしくは器官が、心臓細胞(筋細胞)、心臓組織もしくは心臓または他の器官である、あるいは心臓細胞(筋細胞)、心臓組織もしくは心臓または他の器官に含まれている、(a)～(f)のいずれかの方法；

(h) 幹細胞または多能性細胞の再生能を増強し、および/または増殖を誘導するため、幹細胞または多能性細胞においてPIM-1を過剰発現または発現させるステップ；あるいは

(i) 心臓細胞(筋細胞)または心臓組織におけるBcl-XLの発現を増加させて、心臓保護的アポトーシスシグナル伝達を誘導し、および/または心筋生存シグナル伝達を増加させるために、心臓細胞(筋細胞)または心臓組織においてPIM-1を過剰発現または発現させるステップ；

(j) 細胞が、幹細胞、成体幹細胞、造血幹細胞、脂肪由来幹細胞、間葉系幹細胞、c-kit⁺幹細胞、ヒト幹細胞、自己または同種幹細胞、胚細胞、組織特異的常在幹細胞、同種また

10

20

30

40

50

は自己細胞、前駆細胞、胎盤および/または臍帯血細胞、Sca-1+細胞、またはCD34+細胞である、(a)~(i)のいずれかの方法を含む、上記方法を含む。

【0019】

本発明の1つ以上の実施形態の詳細は、添付の図面および以下の説明に記載されている。本発明の他の特徴、目的および利点は、この説明および図面から、また請求項から明らかであろう。

【0020】

本明細書中で引用する全ての刊行物、特許、特許出願、GenBank配列およびATCC寄託は、参照により本明細書に明示的に組み入れられる。

10

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1は、以下の実施例2に詳細に記載されるとおり、心臓保護的刺激がPim-1発現を誘導することを示す免疫プロットを示す。

【図2】図2は、以下の実施例2に詳細に記載されるとおり、生存心筋中で心筋症の刺激がPim-1の発現を誘導することを示す共焦点顕微鏡写真を示す。上列の顕微鏡写真には広視野写真が示されており、下列の顕微鏡写真には、細胞の詳細を明らかにするために選択領域が高倍率で示されている。

【図3】図3は、以下の実施例2に詳細に記載されるとおり、虚血/再灌流損傷においてPim-1が血行動態機能を維持することを示すデータを図示する。

20

【図4】図4は、以下の実施例2に詳細に記載されるとおり、Pim-1発現が、出生後の心臓で最も高く、加齢に伴って減少することを示す免疫プロットを示す。

【図5】図5は、以下の実施例2に詳細に記載されるとおり、組換えアデノウイルスベクターに由来する、心筋細胞におけるPim-1発現を示す免疫プロットを示す。

【図6】図6は、以下の実施例2に詳細に記載されるとおり、心筋細胞中でPim-1がアポトーシスを抑制する方法を示す。図6は、非感染細胞(NI)またはGFP発現細胞はドキソルビシン処理の後に同等のTUNEL標識を示すが、Pimwt発現細胞はTUNEL陽性核の顕著な減少を示す($p<0.05$)ことを図で要約する。図6は定量的結果を示す。

【図7】図7は、以下の実施例2に詳細に記載されるとおり、心筋細胞中でPim-1がアポトーシスを抑制する方法を示す。図7は、DN構築物を発現する細胞が、TUNEL標識の増強を示すことを示す顕微鏡写真を示す。図7のパネルは、GFPのみ、GFP-Pim-wtおよびGFP-Pim-DNのサンプル中でファロイジン(赤)によって明らかにされるアクチンフィラメントと共にGFP蛍光(緑色)オーバーレイを示す感染心筋細胞の代表的領域を示す。

30

【図8】図8Aおよび8Bは、以下の実施例2に詳細に記載されるとおり、心筋においてAktの核蓄積がPim-1キナーゼの発現を誘導することを示す。6月齢の正常マウス(NTG)および心臓特異的核標的Aktを発現するトランスジェニックマウスから得た切片の免疫プロット(図8A)および共焦点顕微鏡検査(図8B)。スキャン画像中の、分かれたグレースケール画像は、それぞれ緑色、赤色、および青色のオーバーレイ色に相当するpim-1、アクチン、および核に対応する。

【図9】図9は、以下の実施例2に詳細に記載されるとおり、Aktの核蓄積がPim-1発現を誘導することを示す。図9(A)は、myc-tag抗体(Tag)で検出される核標的 - ガラクトシダーゼ(B-gal)、Akt野生型(Akt wt)、または核標的Akt(Akt-nuc)を発現するアデノウイルスに感染した培養心筋細胞の共焦点顕微鏡検査を示す。図9(B)は、核標的Akt(Akt-nuc)をコードするアデノウイルスに感染した心筋細胞におけるPim-1発現の増加を示す免疫プロットプロットを示す。

40

【図10】図10は、以下の実施例2に詳細に記載されるとおり、心筋細胞において、ドミナントネガティブPim-1の発現がAkt蓄積を促進することを示す免疫プロットプロットを示す。免疫プロットは、野生型(wt)またはドミナントネガティブ(DN)型のいずれかのPim-1を発現するアデノウイルスによる新生児ラット心筋細胞の感染を示す。

【図11】図11は、以下の実施例2に詳細に記載されるとおり、Pim-1トランスジェニック

50

マウスの創始系統およびタンパク質発現を特徴づけるデータを示す。図11の左のパネルは、Pim-1トランスジェニックマウスから得たゲノムDNAサンプルのPCRを示し、また図11の右のパネルは、心臓溶解物の免疫プロットを示す。

【図12】図12は、以下の実施例3に詳細に記載されるとおり、心筋におけるPim-1の不活性化が、アボトーシスと線維症を増加させることを示すデータを図示する。図12aと図12bは、2週間間隔で測定した、NTG動物およびPim-DN動物の後壁径(12a)および前壁径(12b)(それぞれPWDおよびAWD)の心エコー測定を図示する。図12cは、10週齢と22週齢のNTG動物およびPim-DN動物の、心臓重量の体重に対する比を図示する。図12dは、17～22週齢のNTGおよびPim-DNトランスジェニックにおける、1mm²当たりのTUNEL陽性筋細胞の数を表すヒストグラムデータを図示する。

【図13】図13は、以下の実施例3に詳細に記載されるとおり、エンドセリン1で処理した、また未処理の、非感染の対照、EGFP、およびPim-wtに感染した新生児ラット心筋細胞培養物から得た個々の細胞表面積の測定を示す。

【図14】図14は、以下の実施例3に詳細に記載されるとおり、Pim-wtトランスジェニック動物が、圧過負荷誘発性肥大に対して抵抗性であることを示すデータを図示する。図14a～14fは、NTGおよびPim-wt shamおよびTAC結紉の心臓の、前壁径(AWD、14d、14a)、後壁径(PWD、14d、14b)、拡張終期径(EDD、14c)、収縮末期径(ESD、14d)、短縮率パーセント(FS、14e)、および駆出率(EF、14f)についての週1回の心エコー評価を表す折れ線グラフを示す。

【図15】図15は、以下の実施例3に詳細に記載されるとおり、Pim-1が心臓機能を強化することを示すデータを図示する。図15a、図15bおよび図1cは、偽手術(sham)またはTAC手術の4週間後と10週間後の、NTGとPim-wtの心臓のin vivo血行動態評価を示す。

【図16】図16は、以下の実施例3に詳細に記載されるとおり、Pim-1が梗塞損傷を防ぐことを示すデータを図示する。図16aは、MIの7日後の梗塞サイズを、Pim-KOの心臓における左心室自由壁のパーセントとして表すヒストグラムを図示する。図16bは、MIの7日後の、Pim-KOの心臓における1mm²当たりのTUNEL陽性筋細胞の数を示すデータを図示する。図16cは、MIの5日後の、NTGマウスとPim-KOマウスのin vivo血行動態測定を図示する。図16eは、Pim-KOの心臓およびNTG対照心臓における梗塞の7日後の、生存タンパク質レベルの免疫プロット定量を図示する。図16fは、梗塞の10日後の梗塞サイズ測定を図示する。図16gは、MIの10日後の、LVにおけるTUNEL標識されたCM/m²の数を図示する。

【図17】図17は、以下の実施例4に詳細に記載されるとおり、Pim-1操作されたCSCの増殖速度の増加を示すデータを示す。図17Aは、対照、CGW、およびCGW-Pim-wt形質導入CPCのトリパンブルーアッセイを用いた細胞成長評価を示す。図17Bは、対照、CGW、CGW-Pim-wt形質導入CPCのMTTアッセイを示す。図17Cは、10 μMのクエルセタゲンチン(特異的Pim-1活性阻害剤)で処理した、または未処理のPim-1発現CPCの増殖速度を示す。

【図18】図18は、以下の実施例4に詳細に記載されるとおり、Pim-1発現CPCの心筋内注射が心臓機能を改善することを示すデータを図示する。図18A～Cは、偽手術(sham)()、PBS注射(黒丸)、CGW()、およびCGW-Pim-WT()の心臓前駆細胞におけるAWD(図18A)、EF(図18B)、およびFS(図18C)の心電図評価を図示する。図18D～Fは、PBS、eGFP、およびPim-1発現CPCの心筋内注射の12週間後的心臓機能を評価するために用いた、左心室発生圧(LVDP)(図18D)、左心室拡張終期圧(LVEDP)(図18E)、およびdP/dT最大および最小(図18F)のin vivo血行動態測定を図示する。

【図19】図19は、以下の実施例4に詳細に記載されるとおり、梗塞した心臓組織中のCGW-Pim-wt CPC型の筋細胞および血管系が、梗塞領域を減少させることを示すデータを図示し、またCPC注射の12週間後の梗塞領域の定量を示す。

【図20】図20は、以下の実施例4に詳細に記載されるとおり、心筋内注射の32週間後に、CGW-Pim-wt発現CPCによって長期間の心臓の機能的回復が得られることを図示する。図20A～Cは、CPC移植の32週間後の、偽手術(sham)()、PBS注射(黒丸)、CGW()、およびCGW-Pim-WT()の心臓前駆細胞におけるFS(図20A)、EF(図20B)、およびAWD(図20C)の心電図評価を示す。

【図21】図21は、以下の実施例4に詳細に記載されるとおり、本発明の例示的レンチウイルス構築物を示す。上記の様々な図中の参照記号は、エレメントを示す。

【発明を実施するための形態】

【0022】

詳細な説明

本開示は、PIM-1、そのアイソフォーム、および同等のまたは重複する標的および基質を有する他のPIM酵素の新たな役割の知見を包含する。具体的には、これらの酵素は、心臓のおよび他の循環系の保護、生存、修復、再生、および回復における役割、さらに循環系組織に導入された幹細胞、前駆細胞、または分化した細胞の移植、分化、機能、および生存における役割を有する。これらの知見は、損傷した心臓の修復ならびに、機能的心臓組織に分化する、移植された幹細胞または前駆細胞の移植、拡張、および生存を含む新たな心臓治療の基礎を形成する。本発明の以前は、PIM活性の増強が、心臓組織、心臓細胞における、または他の循環系細胞もしくは組織における任意の予防的または治療的有用性を有することは知られていなかった。

【0023】

本発明者らは、循環系組織中のPIM活性の増強によって、循環系疾患または損傷を、軽減し、抑制し、予防し、または食い止めることが可能であり、またその損傷した循環系組織を、置換し、修復し、または再生し得ることを示す。PIM活性を増強し得る方法は、以下により詳細に記載されるが、例えば、内因性PIM産生のアップレギュレーション、組織または細胞へのPIM活性を有する物質の直接導入、ヒトまたは動物の既存細胞へのPIMコードポリヌクレオチド物質の導入、被験体から細胞を取り出し、それらの細胞が増強されたレベルのPIMを発現するように改変した後、被験体の細胞へ再導入すること、増強されたレベルのPIMを産生するように操作された外因性細胞（例えば、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、または心臓特異的プロモーターなどの非PIMプロモーターの制御下にあるPIMコードポリヌクレオチドを含む幹細胞または前駆細胞）を被験体に導入することが挙げられる。

【0024】

「PIM」という用語は、本明細書中で、多様なPIM酵素（例えばPIM-1、PIM-2、およびPIM-3）を包含し、これらの任意のアイソフォームをさらに包含するセリンまたはトレオニンキナーゼを指すために用いられる。例えば、上記のセリン/トレオニンキナーゼPIM-1は、2つのアイソフォームで存在することが知られており、本明細書におけるPIMおよびPIM-1との記載は、他に特定されない限り、両方のアイソフォームを包含することを意図する。さらに、特定の細胞、構築物、ポリヌクレオチド、技術、用途、および方法は、PIM-1のような1つの特定のPIMに関連して記載されているが、このような記載は例示的であり、同様の活性を有する他のPIM酵素も含むものとして理解されなければならない。

【0025】

「PIM活性」および「PIMキナーゼ活性」という用語は、PIM酵素の酵素的活性または生理学的活性（例えばPIM-1の活性）を指し、同様の活性を有する他の物質の使用を包含する。本明細書中で記載される知見は、細胞中の特定のキナーゼ活性を増強することによる生細胞の特徴の改変に関する。当然ながら、周知のとおり、生理学的に有効なレベルの酵素的活性（この場合は、PIM-1標的用のキナーゼ活性）を維持しながら保存的アミノ酸置換、架橋、異種間ドメイン置換、切断などを有する酵素変異体が存在し、または容易に構築することができる。本知見は、特定のキナーゼのみに注目するものではなく、血管系細胞および組織におけるPIMキナーゼ活性の全く新たな役割の知見を含む。このように、本明細書中で考察される結果は、それを達成する厳密な手順とは関係なく、PIMキナーゼ活性の改変に由来する。

【0026】

「血管系」という用語は、本明細書中で、血管および心臓、ならびにこれらを構成する全ての組織および細胞（例えば、心臓の平滑筋、心筋細胞、心筋芽細胞、血管壁、内皮、血管平滑筋、血管結合組織、ならびに他の公知の血管系の細胞および組織）を指すために

10

20

30

40

50

用いられる。

【0027】

「幹細胞」という用語は、血管系細胞に分化し得る、分化全能性細胞、多能性細胞、および多分化能細胞（例えば心臓細胞）を包含するように広く用いられる。「前駆細胞」は、多分化能幹細胞と多少重複し、少なくとも部分的に分化しているが、少なくとも1種の血管系細胞に分化する能力を有する点において多分化能または分化単能の細胞を包含する。

【0028】

「治療する」および「治療」という用語は、予防的治療および治療的治療の両方を包含するように広く用いられる。同様に、循環系組織の疾患または損傷と記載する場合、これらの用語は、完全に発症した疾患または損傷、ならびに初期のまたは切迫した疾患または損傷を包含するように広く用いられる。従って、特定の症状の危険性がある、または特定の症状を発症し始めている患者は、本明細書中で開示される方法を用いて当該症状の発症または進行の危険性を低下させた場合、また既に発症した症状を食い止め、抑制し、治し、また改善した場合、また症状の発症率を抑制しまたは遅らせた場合に、その症状を「治療された」と考えられる。

【0029】

被治療体は、患者、個体、被験体、ヒト、または動物など様々に呼ばれる。1つのカテゴリーに対して有用であると確認された治療は他のカテゴリーに対しても有用であり、特定の用語（「ヒト」以外）の選択は、限定を意図するものではなく、むしろ代替的表現の使用にすぎない。

【0030】

本開示は、PIMセリン/トレオニンキナーゼ（例えばPIM-1）をコードする核酸を含む医薬組成物などの組成物、ならびにそれらの製造および使用方法（例えば、心臓または血管の細胞増殖を誘導し、心臓または血管の細胞を低酸素症および細胞アポトーシスから保護する方法）を包含する。1つの態様において、本発明の組成物および方法は、PIM-1を発現させて心筋細胞を肥大から保護し、また梗塞によって誘導される心筋アポトーシスを抑制して梗塞サイズを減少させるために用いられる。別の実施形態において、本発明の組成物および方法は、PIM-1を発現させて心臓または血管の細胞脱分化および幹細胞マーカーの再発現を誘導するために用いられ、また1つの態様において、PIM-1を過剰発現させて幹細胞の再生能（例えば、心筋梗塞後（MI後）の心臓に生着する幹細胞能）を増強するために用いられる。別の実施形態において、本発明の組成物および方法は、PIM-1を発現させてBcl-XLの発現を増加させ、心臓保護的抗アポトーシスシグナル伝達を誘導し、これにより心筋生存シグナル伝達を増加させるために用いられる。

【0031】

また、セリン/トレオニンキナーゼPIM-1をコードする核酸を含む医薬組成物などの組成物、および細胞または組織の損傷（例えば心筋細胞死）を予防もしくは抑制する、または虚血もしくは再灌流に関連する損傷を抑制する方法（例えば、虚血（例えば、炎症反応および酸化ストレスを活性化させることによって虚血損傷を悪化させ得る再灌流の後の虚血）によって引き起こされる不可逆的な細胞および組織の損傷ならびに細胞死の予防または抑制）も開示される。

【0032】

本開示はさらに、セリン/トレオニンキナーゼPIM-1をコードする核酸を含む医薬組成物などの組成物、ならびに心臓または血管の細胞増殖および生存を調節する方法を提供する。

【0033】

発明者らは、ヒトとマウスの心筋サンプルを用いて、ヒトの心筋細胞とマウスの心筋細胞のいずれもが、心不全においてPIM-1の発現の上昇を示す（この場合、上昇したPIM-1は、大部分が核に局在化している）ことを実証した。発明者らはまた、マウスの心筋において、急性心筋症への曝露も、核および核周辺に分布したPIM-1の発現を誘導することも示

10

20

30

40

50

した。

【0034】

出生後マウスの心筋におけるPIM-1の発現は加齢に伴って減少し、AKT活性化および特に核標的AKTを伴う心臓保護的刺激は、PIM-1の発現を増加させる。発明者らは、心筋細胞アポトーシスが、bcl-2、bcl-XLの発現の増加およびBad^{S112}のリン酸化を介してPIM-1によって抑制されることを示す。虚血/再灌流損傷は、PIM-1ノックアウトマウスにおいて増強される。PIM-1発現または活性の喪失は、心臓保護効果を伴わないAKT発現の増加をもたらすため、PIM-1は、心筋におけるAKTの下流の生存シグナル伝達の重要な側面である。

【0035】

治療および医療用途

循環組織内でPIM活性を増強させるための詳細な戦略を以下に提供する。PIM活性を増加させる方法が何であるか、発明者らは、心臓および他の循環系組織において、PIM活性の増強が、多くの有益な効果を有することを見出した。

【0036】

最初に、医療提供者は、患者選択ステップを実施したいと考えるかもしれない。このステップは、例えば、患者が1種以上の多様な治療を必要とするか否かを評価するステップ、またはかかる治療を必要とする患者を同定するステップを含み得る。2つの重要な必要性カテゴリーは、いくらか検討に値する

第1に、本明細書中で検討される組成物、方法、または技術を用いて治療し得る、公知の心臓または他の循環組織の疾患もしくは損傷などの容易に診断可能な既存の症状を有する個体がある。それらの場合、当該疾患または損傷の診断もしくは同定は、特定の治療を必要とする個体の診断、選択、または同定を構成するであろう。

【0037】

第2に、より予防的な治療、例えば、PIMによって発揮される強力な心臓保護特性を利用した治療を必要とする個体がある。場合によっては、同定は、認識されなければ進行するであろう初期段階の疾患または損傷、例えば、アポトーシスを有するかまたは開始するであろう損傷または他の因子、あるいは特定の症状の発症リスクを高める症状または因子を認識することによって行うことができる。それらの個体の同定は、疾患もしくは損傷の発症を防ぐために、またはその発症を遅らせるために望ましい場合がある。

【0038】

これらの2つの選択肢の中間にあるのは、進行する可能性が高い既存の疾患または損傷を有する個体である。それらの個体の同定および治療も検討される。

【0039】

心臓組織中のPIM活性の増強を通じた治療に適する1つの顕著な症状は、心筋梗塞または他の虚血損傷である。虚血損傷のリスクが高いと同定され得る場合、場合、予防的治療が望ましい。しかし、多くの場合、患者は損傷が生じた後に治療される。治療は、損傷の後、実施可能な限り早く始めなければならない。

【0040】

同様に、PIM活性の増強は、血管、心臓、または他の循環系の細胞もしくは組織におけるPIM活性を増強するように被験体を治療することによって、多数の他の症状を治療するため、また望ましい生理学的効果を創出するために用いることができる。これらは、心臓肥大の予防、縮小、または反転を含み、例えば、限定するものではないが、不適応性肥大再構築；心臓細胞の生存の促進およびそれらの細胞のアポトーシスの抑制；心臓収縮性の増強；心臓駆出率の改善；血管の成長および修復の増強；ならびに幹細胞および前駆細胞の、心臓組織もしくは血管組織への分化の促進が挙げられる。

【0041】

別の態様において、本明細書中で検討される方法としては、限定するものではないが、心臓アポトーシスの抑制；心臓線維症の抑制；心臓再構築の抑制；心臓肥大の抑制；損傷した心臓の駆出率の維持または喪失の減少；収縮機能の維持の増強；心臓壞死の減少；虚

10

20

30

40

50

血損傷後の病変サイズの減少；ならびに心臓の細胞充実性の増加および筋細胞量の減少が挙げられる。これらの方法は全て、予防的に(予防しなければ発症する可能性が高い特定の症状を予防したまでは減少させるために)および治療的に(症状の進行を遅らせる治療など、既に存在している症状を治療するために)行うことができる。

【0042】

別の観点から、PIM活性の増強による治療につながる可能性がある症状としては、例えば、(限定するものではないが)先天性の心臓症状；心臓組織への任意の種類の虚血損傷；梗塞に由来する損傷；心臓再灌流損傷；外傷性心臓損傷；鬱血性心不全損傷；およびウイルス、細菌、および寄生性病原体などの病原体による心臓の感染に関連した損傷が挙げられる。

10

【0043】

PIM治療が望ましい症状を有する個体を同定することに加えて、上記の個体を治療する方法は、血管組織または心臓組織などの標的組織中のPIM活性のレベルを増加させるステップを含み得る。このステップは、本明細書中で開示される様々な方法で行うことができる。例として、限定するものではないが、内因性PIM発現をアップレギュレートする因子または薬を患者に全身的または局所的に投与するステップ；好ましくは連結された形質導入ドメイン、リポソーム、抗体などのような送達モダリティーと組み合わせて、PIMタンパク質を投与するステップ；PIMコードポリヌクレオチドを患者に投与するステップ(例えばネイキッドDNA投与、ウイルスベクター、リポソーム、または他の送達モダリティーに入ったポリヌクレオチドの投与)；DNAを送達するための、被験体の細胞のエレクトロポレーション；PIMの発現を増強するように改変された自己細胞(例えば、心筋細胞、心臓前駆細胞、心臓幹細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞、脂肪由来幹細胞など)を被験体に(例えば心臓に)投与するステップが挙げられる。

20

【0044】

例えば心臓症状を治療するために細胞をヒト患者に投与する場合、細胞の数は、心臓の機能もしくは構造を強化するため、または標的的症状を治療するために有効な任意の量であつてよい。例示的には、非限定的な量として 10^5 ～ 10^{10} 個の細胞が挙げられ、さらに典型的には 10^6 ～ 10^9 個の細胞が挙げられる。

【0045】

例示的には、成人の心臓に投与されるPIMタンパク質の非限定的な量は、例えば、純粋なPIMタンパク質として計算して約 10^{-4} g～約 10^{-10} gであり得る。例示的には、DNAの非限定的な量として、体重1kg当たり約0.05～500μg、または0.5～50μgが挙げられ、ウイルス粒子の場合、少なくとも1ミリリットル当たり物理的粒子が約 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{16} 、または 10^{17} 個の力値で製剤化される。1つの態様において、上記のPIM-1コード核酸は、約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150マイクロリットル(μl)またはそれ以上の注射で投与される。用量および投与レジメンは、当技術分野で公知の慣習的な範囲測定技術によって決定することができる。例えば、別の実施形態では、約 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{16} または 10^{17} 個のウイルス(例えばレンチウイルス)粒子が、1回または複数回の用量で個体(例えばヒト患者)に送達される。

30

【0046】

他の実施形態において、心臓内への1回投与(例えば1回用量)は、約0.1μl～1.0μl、10μlまたは約100μlまでの本発明の医薬組成物を含む。別法として、約0.5ngまたは1.0ng～約10μg、100μg～1000μgの用量範囲のPIM-1発現核酸を投与する(発現構築物として、または1つの実施形態のとおり、ネイキッドDNAとしての量を注射する)。

40

【0047】

PIM配列

一部の実施形態は、PIM-コード配列(例えばPIM-1発現メッセージまたはPIM-1遺伝子)を含む核酸構築物を包含する。1つの態様において、本発明の実施に用いるPIM-発現核酸としては、PIM-1ゲノム配列、またはそのコード配列または非コード配列(例えば、アント

50

ロン、5'または3'非コード配列などを含む)を含む断片が挙げられる。また、PIM-コードmRNA配列も含まれる。

【0048】

1つの態様において、PIM-1を発現させる、またはPIM-1を誘導もしくはアップレギュレートする組成物は、核酸(例えばベクター、組換えウイルスなど)であり、組換えPIM-1は、in vitro、ex vivoおよび/またはin vivoにおいて、細胞中で発現される。

【0049】

1つの態様において、PIM-1発現核酸は、Genbank受託番号第AAA36447号(例えば、Domen (1987) Oncogene Res. 1 (1):103-112も参照)、配列番号1のようなヒトPIM-1をコードする。

10

【0050】

別の態様において、PIM-1発現核酸は、ヒトPIM-1キナーゼの44kDaアイソフォームをコードする。例えば、Genbank受託番号第AY87461号(例えば、Xie (2006) Oncogene 25 (1), 70-78も参照)、配列番号2を参照されたい。

【0051】

他の態様において、PIM-1発現核酸は、ヒトPIM-1キナーゼメッセージ(mRNA)を含む。例えば、Genbank受託番号第NM_002648号(例えば、Zhang (2007) Mol. Cancer Res. 5 (9), 909-922も参照)、配列番号3を参照されたい。

【0052】

また、PIM-2(配列番号4)およびPIM-3(配列番号5)のヒトDNA配列も開示される。

20

【0053】

別の実施形態において、本発明の核酸は、転写調節配列、例えば、プロモーターおよび/またはエンハンサー(例えば、Pim-1の発現を駆動する(例えば調節する)心臓特異的プロモーター)に機能的に連結される。本発明を実施するために用いるプロモーターおよびエンハンサーは、任意の種類および/または起源であってよく、1つの実施形態において、Pim-1構築物の投与を受ける種に特異的なプロモーターが用いられる。例えば、ヒトはヒトプロモーターを受けることが可能であり、マウスはマウスプロモーターを受ける等である。他の実施形態において、異種に由来するプロモーターを使用することができる。例えば、哺乳動物または脊椎動物は、他の哺乳動物または脊椎動物に由来するプロモーターを受け、あるいは適切な種および/または細胞型において活性なウイルスプロモーターもしくは合成プロモーターを使用することもできる。これらのプロモーターは、例えば、-ミオシン重鎖プロモーター、心臓トロポニンTプロモーター、MLC-2vプロモーター、および心臓組織中では発現を駆動するが、他の組織中では著しい発現は駆動しない他の任意のプロモーターを含み得る。1つの実施形態において、始原細胞または幹細胞(例えば心筋幹細胞)中で活性なプロモーターおよびエンハンサーは、Pim-1の駆動発現に機能的に連結することができる。

30

【0054】

核酸送達-遺伝子治療ビヒクル

1つの態様において、本開示は、ex vivoまたはin vitro遺伝子治療ビヒクルとして使用するための、あるいは本発明の方法を実施するための心臓組織、心臓または血管の細胞、組織もしくは器官におけるPIM-1の発現のための、また研究、薬の発見または移植のための、PIM-コード配列(例えば、PIM-1コードメッセージもしくはPIM-1a遺伝子)を含む構築物または発現ビヒクル、例えば発現カセット、ベクター、ウイルス(例えば、レンチウイルス発現ベクター、例えば配列番号4参照)などを提供する。

40

【0055】

1つの態様において、本発明の実施に用いる発現ビヒクルは、PIMタンパク質(またはその機能的部分配列)をコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含み得る。例えば、本発明は、転写調節エレメント(例えばプロモーター)に機能的に連結されたPIM-1タンパク質をコードする核酸を含む発現カセットを提供する。

【0056】

50

1つの態様において、本発明の実施に用いる発現ビヒクルは、PIM-1コード配列（例えば、PIM-1遺伝子またはその任意の機能的部分）を個体の心臓組織または細胞に送達するように設計される。本発明の実施に用いる発現ビヒクル（例えばベクター）は、非ウイルスベクターもしくはウイルスベクターまたはそれらの組み合わせであってよい。本発明は、当技術分野で公知の任意のウイルスベクターまたはウイルス送達系（例えば、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルス(AAV)ベクター、ヘルペスウイルスベクター（例えば単純ヘルペスウイルス(HSV)ベースのベクター）、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターおよびバキュロウイルスベクター）を使用し得る。

【0057】

本発明の1つの態様において、発現ビヒクル（例えばベクターまたはウイルス）は、完全長PIM-1遺伝子またはメッセージ（例えばcDNA）を収容することができる。1つの態様において、本発明は、完全長ヒトPIM-1をコードするヌクレオチド配列を、*in vitro*、*ex vivo*および/または*in vivo*で送達し得るレトロウイルス（例えばレンチウイルス）ベクターを提供する。例示的には、本発明の実施に使用し得るレンチウイルス発現ベクター骨格（「ペイロード」を含まない、例えばPIM-1配列を含まない）は、配列番号4に示される。

【0058】

1つの実施形態において、本発明の実施に用いるレンチウイルスベクターは、1つ以上のウイルスアクセサリー（または補助）遺伝子を欠損した、「最小限の」レンチウイルス產生系である。例示的には、本発明において用いるレンチウイルスベクターは、それらが複製欠損および自己不活性化(SIN)レンチウイルスベクターであるという点で、増強された安全プロファイルを有し得る。本発明の実施に使用し得るレンチウイルスベクターおよび產生系としては、例えば、米国特許第6,277,633号、第6,312,682号、第6,312,683号、第6,521,457号、第6,669,936号、第6,924,123号、第7,056,699号、および第7,198,784号に記載のものが挙げられ、これらの任意の組み合わせは、本発明の実施に使用し得る例示的なベクターである。別の実施形態において、非組み込みレンチウイルスベクターを本発明の実施に使用することができる。例えば、本発明の実施に使用し得る非組み込みレンチウイルスベクターおよび產生系としては、米国特許第6,808,923号に記載のものが挙げられる。

【0059】

上記の発現ビヒクルは、当技術分野で公知の任意のビヒクル、例えば、Manningらによる米国特許出願公開番号第20020194630号に記載される組換えアデノ関連ウイルスベクター；または、例えば、Dullら（1998）*J. Virol.* 72:8463-8471に記載のレンチウイルス遺伝子治療ベクター；または、例えば、米国特許出願番号第20030003582号に記載のウイルスベクター粒子（例えば、改変プロウイルスRNAゲノムを有する改変レトロウイルス）；または、例えば、目において使用するための組換えアデノ関連ウイルスベクターを記載している米国特許第6,943,153号に記載されるアデノ関連ウイルスベクター；または米国特許第7,198,950号、第7,160,727号、第7,122,181号（加齢黄斑変性症を有する個体の眼内血管新生を抑制するためのレトロウイルスの使用が記載されている）もしくは第6,555,107号に記載のレトロウイルスベクターもしくはレンチウイルスベクターから設計することができる。

【0060】

本発明を実施するために任意のウイルスベクターを使用することができる、遺伝子治療にウイルスベクターを用いるという概念は周知である。例えば、VermaとSomia（1997）*Nature* 389:239-242、およびレトロウイルスの詳細なリストが載っているCoffinら（“*Retroviruses*” 1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press編：JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 758-763）を参照されたい。上記のレトロウイルスファミリーに属する任意のレンチウイルスを、分化した細胞と分化していない細胞の両方をPIM-1コード核酸で感染させるために用いることができる。例えば、Lewisら（1992）*EMBO J.* 3053-3058を参照されたい。

【0061】

「靈長類」および/または「非靈長類」に属するレンチウイルスグループに属するウイ

10

20

30

40

50

ルスを用いることができる。例えば、任意の靈長類レンチウイルス（例えばヒト後天性免疫不全症候群(AIDS)の原因病原体であるヒト免疫不全ウイルス(HIV)、およびサル免疫不全ウイルス(SIV)）または、非靈長類レンチウイルスグループメンバー（例えば、ビスナ/マエディウイルス(VMV)のような「スローウイルス」、ならびに関連ヤギ関節炎脳炎ウイルス(CAEV)、ウマ伝染性貧血ウイルス(EIAV)および/またはネコ免疫不全ウイルス(FIV)もしくはウシ免疫不全ウイルス(BIV)など）を使用することができる。

【0062】

別の実施形態において、本発明の実施に用いるレンチウイルスベクターは、偽型レンチウイルスベクターである。1つの態様において、本発明の実施に用いるシュードタイプ10は、ウイルスゲノムのenv遺伝子の少なくとも一部に異種env遺伝子（例えば別のウイルスに由来するenv遺伝子）を組み込み、またはウイルスゲノムのenv遺伝子の一部を異種env遺伝子で置換し、またはウイルスゲノムのenv遺伝子の全部を異種env遺伝子で置き換える。別の実施形態において、本発明のレンチウイルスベクターは、VSV-Gでシュードタイプされる。別の実施形態において、本発明のレンチウイルスベクターは、Rabies-Gでシュードタイプされる。

【0063】

本発明の実施に用いるレンチウイルスベクターは、安全目的を強化するためにコドン最適化することができる。異なる細胞は、その特有のコドン用途において相違する。このコドンバイアスは、細胞型の特定のtRNAの相対存在量におけるバイアスに対応する。配列中のコドンが対応するtRNAの相対存在量と一致するよう調整するようにこれらのコドンを変更することにより、発現を増加させることができるとなる。同様のトークンにより、対応するtRNAが特定の細胞型においては希少であることが知られているコドンを意図的に選択することによって、発現を低下させることができる。このようにして、さらなる程度の翻訳制御が可能となる。HIVおよび他のレンチウイルスを含む多くのウイルスが、多数の希少コドンを使用し、これらを一般的な哺乳動物コドンに対応するように変化させることにより、哺乳動物生産細胞におけるパッケージング成分の発現の増加を達成し得る。哺乳動物細胞ならびに他の様々な生物のコドン用途表は、当業者に公知である。コドン最適化は、多くの他の利点を有する。生産細胞/パッケージング細胞中のウイルス粒子の組み立てに必要とされるウイルス粒子のパッケージング成分をコードするヌクレオチド配列中の改変によって、上記の配列は、それらからRNA不安定配列(INS)を除去する。同時に、パッケージング成分用のアミノ酸配列コード配列は、その該配列によってコードされるウイルス成分が同じままであるか、または少なくともパッケージング成分の機能が低下しない程度に十分に類似するように保持される。コドン最適化は、排出のためのRev/RRE要求も克服し、最適化配列Revを独立させる。またコドン最適化は、ベクター系内での異なる構築物間の（例えば、gag-polおよびenvのオープンリーディングフレーム中の重複領域間の）相同組換えも減少させる。従って、コドン最適化の全体的な効果は、ウイルス力価の顕著な増加と安全性の向上である。コドン最適化gag-pol配列のための戦略は、任意のレトロウイルスに関して使用し得る。

【0064】

本発明の実施に用いるベクター、組換えウイルス、および他の発現系は、細胞に感染し、トランスフェクトし、一時的にまたは永久的に形質導入し得る任意の核酸を含んでいてよい。1つの態様において、本発明の実施に用いるベクターは、ネイキッド核酸、タンパク質もしくは脂質と複合した核酸であってよい。1つの態様において、本発明の実施に用いるベクターは、ウイルスもしくは細菌の核酸および/またはタンパク質、および/または膜（例えば細胞膜、ウイルス脂質エンベロープ等）を含む。1つの態様において、本発明の実施に用いる発現系は、DNAの断片を付加して複製し得るレプリコン（例えばRNAレプリコン、バクテリオファージ）を含む。1つの態様において、本発明の実施に用いる発現系としては、限定するものではないが、RNA、自律的自己複製環状または線状DNAもしくはRNA（例えばプラスミド、ウイルスなど、例えば米国特許第5,217,879号を参照）が挙げられ、発現プラスミドと非発現プラスミドの両方を含む。

10

20

30

40

50

【0065】

1つの態様において、本発明の実施に用いる組換え微生物または組換え細胞培養は、宿主染色体に組み込まれた染色体外環状核酸および/または染色体外線状核酸(DNAもしくはRNA)の両方(またはいずれか)を含む「発現ベクター」を含み得る。1つの態様において、ベクターが宿主細胞によって維持される場合、このベクターは、自律的構造としての有糸分裂の間に上記の細胞によって安定的に複製されてもよいし、または宿主のゲノム内に組み込まれてもよい。

【0066】

1つの態様において、本発明の実施に用いる発現系は、非制限的な基盤上で市販の、公的に入手可能な任意のプラスミドを含むことが可能であり、または公開された手順に従って入手可能なプラスミドから構築することができる。本発明の実施に使用し得るプラスミドは、当業者に周知である。

10

【0067】

別の態様において、本発明を作製または実施するために用いるベクターは、任意の数の、当技術分野で公知の好適なベクター、例えばコスミド、YAC(酵母人工染色体)、メガYAC、BAC(細菌人工染色体)、PAC(P1人工染色体)、MAC(哺乳動物人工染色体)、全染色体、または小さな全ゲノムから選択することができる。このベクターはまた、プラスミド、ウイルス粒子、またはファージの形であってよい。他のベクターとしては、染色体DNA配列、非染色体DNA配列および合成DNA配列、SV40誘導体、細菌プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドとファージDNAの組み合わせに由来するベクター、ワクシニアなどのウイルスDNA、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、および仮性狂犬病が挙げられる。原核生物宿主および真核生物宿主と共に用いる様々なクローニングベクターおよび発現ベクターは、例えば、Sambrookによって記載される。使用し得る細菌ベクターとしては、公知のクローニングベクターの遺伝因子を含む市販のプラスミドが挙げられる。

20

【0068】

医薬組成物

本発明は、医薬組成物などの組成物、およびPIMを発現させる(例えば、心筋細胞を肥大からを保護し、梗塞によって誘導される心筋アポトーシスを抑制し、また梗塞サイズを減少させるためPIM-1または他の機能的に同等なキナーゼを発現させる)方法を提供する。(機能的同等性は、同じ基質に作用して同じ産物を産生する能力に基づいて存在すると考えられ、また同一の動態を必要としない。)別の実施形態において、本発明の医薬組成物は、心臓または血管の細胞脱分化および幹細胞マーカーの再発現を誘導するためにPIM-1を発現させ、また1つの態様においては、幹細胞の再生能(例えば心筋梗塞後(MI後)に心臓に生着する幹細胞能)を増強するためPIM-1を過剰発現するために用いられる。

30

【0069】

1つの態様において、PIM-1を発現させる、またはPIM-1を誘導もしくはアップレギュレートする組成物は、核酸(例えばベクター、組換えウイルスなど)であり、組換えPIM-1は、*in vitro*、*ex vivo*および/または*in vivo*において、細胞中で発現される。

40

【0070】

別の実施形態において、本医薬組成物の使用および本発明の方法の実施の際、心臓または心臓もしくは血管の細胞、組織もしくは器官においてPIM核酸またはPIMキナーゼ活性を誘導またはアップレギュレートする化合物を投与する。例えば、本医薬組成物の使用および本発明の方法の実施において投与し得る化合物は、生存および/または増殖シグナル伝達に関与するインターロイキン、サイトカインおよび/またはパラクリン因子、AKTセリン/トレオニンキナーゼのアップレギュレーター、インスリン様成長因子-1(IGF-1)、インスリン、白血病抑制因子(LIF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、または表皮成長因子(EGF)を含み得る。オカダ酸およびSV40 small T抗原は、タンパク質ホスファターゼ2AによるPIM-1の負の調節を阻害または遮断するため、PIM-1レベルを増加させるために用いることができる。Majら, *Oncogene* 26(35):5145-53 (2007)を参照されたい。

50

【0071】

別の実施形態において、PIMを発現し、またはPIMを誘導またはアップレギュレートする本発明の組成物は、製薬上許容される担体と共に製剤化される。別の実施形態において、本発明の医薬組成物は、非経口的に、局所的に、経口的にまたは局所投与によって（例えばエアロゾルによって）または経皮的に投与することができる。本医薬組成物は、任意の方法で製剤化することが可能であり、また症状もしくは疾患、および病気の程度、各患者の通常の病状、結果として得られる好ましい投与方法などに応じた様々な単位用量形態で投与し得る。製剤化および投与の技術の詳細は、科学文献および特許文献中に十分に記載されている。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Co, Easton PA ("Remington's")の最新版を参照されたい。

10

【0072】

本発明の治療薬は、単独で、または医薬製剤(組成物)の成分として投与し得る。この化合物は、ヒトまたは動物の医学において使用するための、任意の好都合な方法での投与のために製剤化することができる。湿潤剤、乳化剤および滑沢剤（例えばラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウム）ならびに着色剤、離型剤、コーティング剤、甘味料、香味剤および香料、保存剤および抗酸化剤もまた、本組成物に含まれ得る。

【0073】

PIMを発現し、またはPIMを誘導またはアップレギュレートする本発明の組成物の製剤としては、全身投与、直接局所の血管または心臓への投与、またあるいは経口/経鼻、局所、非経口、直腸、および/または腔内投与に適した製剤が挙げられる。この製剤は、単位用量形態に好都合に含まれ得、また薬学の当技術分野で公知の任意の方法で調製することができる。担体物質と組み合わせて単一用量形態を製造することができる活性成分の量は、治療を受ける宿主、投与の個別の方針によって異なるであろう。担体物質と組み合わせて単一用量形態を製造することができる活性成分の量は、通常、治療効果をもたらす化合物の量であろう。

20

【0074】

本発明の医薬製剤は、1つ以上の希釈剤、乳化剤、保存剤、緩衝剤、賦形剤等を含んでよく、液剤、粉剤、乳剤、凍結乾燥粉剤、噴霧剤、クリーム剤、ローション剤、徐放剤、錠剤、丸剤、ゲル剤、パッチ上、移植片中等の形態で提供され得る。

30

【0075】

経口投与用の医薬製剤は、当業者に周知の製薬上許容される担体を用いて、適切かつ好適な用量で製剤化することができる。このような担体は、上記の医薬が、患者の摂取に適した、錠剤、丸剤、粉剤、糖衣剤、カプセル剤、液剤、トローチ剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤等の単位用量形態で製剤化され得るようにする。経口用の医薬製剤は、固体賦形剤として製剤化することができる、所望により、錠剤または糖衣剤の核を得るために、好適な付加化合物を加えた後、結果として得られる混合物を粉碎し、また顆粒混合物を加工する場合がある。好適な固体賦形剤は、炭水化物またはタンパク質の充填剤であり、例えば、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールなどの糖、トウモロコシ、コムギ、コメ、ジャガイモまたは他の植物から得たデンプン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはカルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース、ならびにアラビアガムおよびトラガカントガムなどのガム、ならびにタンパク質（例えばゼラチンおよびコラーゲン）が挙げられる。崩壊剤または可溶化剤、例えば架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸またはそれらの塩（例えばアルギン酸ナトリウム）などを加えてよい。

40

【0076】

糖衣剤核は、濃縮糖溶液のような適切なコーティングを施され、この溶液は、アラビアガム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポルゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカーレーション、および適切な有機溶媒または溶媒混合物をさらに含み得る。製品の識別のためまたは活性化合物の量(すなわち用量)を特徴づけるために、染料または色素を錠剤または糖衣剤のコーティングに加えてよい。本発明の医薬製剤

50

は、例えばゼラチンで作製されたプッシュフィットカプセル剤、ならびにゼラチンおよびグリセロールまたはソルビトールなどのコーティングとで作製された軟密閉カプセル剤を使用して経口的に用いることもできる。プッシュフィットカプセル剤は、ラクトースまたはデンプンなどの充填剤または結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、および場合により安定剤と混合した活性剤を含み得る。軟カプセル剤において、活性剤は、脂肪油、液体パラフィン、または液体ポリエチレングリコールなどの好適な液体中に、安定剤と共に、または安定剤を伴わずに溶解または懸濁され得る。

【0077】

水性懸濁剤は、水性懸濁剤の製造に適した賦形剤と混合して活性剤(例えば、本発明のキメラポリペプチドまたはペプチド模倣薬)を含み得る。このような賦形剤としては、懸濁化剤(カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントガムおよびアカシアガムなど)、および分散剤または潤滑剤(天然のリン脂質(例えばレシチン)、アルキレンオキシドと脂肪酸の縮合物(例えばステアリン酸ポリエチレン)、エチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールの縮合物(例えば、ヘプタデカエチレンオキシエタノール)、エチレンオキシドと脂肪酸由来の部分エステルおよびヘキシトールとの縮合物(例えば、ポリエチレンソルビトールモノオレート)、またはエチレンオキシドと脂肪酸由来の部分エステルおよび無水ヘキシトールとの縮合物(例えば、ポリエチレンソルビタンモノオレート)など)が挙げられる。この水性懸濁剤は、1つ以上の保存剤(例えばp-ヒドロキシ安息香酸エチルまたはp-ヒドロキシ安息香酸n-プロピル)、1つ以上の着色剤、1つ以上の香味剤および1つ以上の甘味料(例えばスクロース、アスパルテームまたはサッカリン)も含み得る。製剤は浸透圧で調整し得る。

【0078】

油性医薬は、PIMを発現し、またはPIMを誘導またはアップレギュレートする本発明の組成物を送達するために使用し得る。油性懸濁剤は、植物性油(例えば、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油もしくはココナッツ油、または液体パラフィンのような鉱物油、あるいはこれらの混合物)に活性剤を入れて懸濁することによって製剤化することができる。例えば、経口投与される疎水性医薬化合物のバイオアベイラビリティを増加させ、個体間および個体内の変動性を減少させるための精油または精油成分の使用について記載している米国特許第5,716,928号を参照されたい。(米国特許第5,858,401号も参照のこと)。上記の油性懸濁剤は、増粘剤(蜜ろう、固体パラフィンまたはセチルアルコールなど)を含み得る。口当たりの良い経口剤を提供するために甘味料(グリセロール、ソルビトールまたはスクロースなど)を加えてよい。これらの製剤は、アスコルビン酸などの抗酸化剤の添加によって保存することができる。注射可能な油性ビヒクルの例として、Minto (1997) J. Pharmacol. Exp. Ther. 281:93-102を参照されたい。本発明の医薬製剤は、水中油型乳剤の形態であってもよい。この製剤の油相は、上記の植物性油もしくは鉱物油、またはこれらの混合物であり得る。好適な乳化剤としては、天然ガム(アカシアガムおよびトラガカントガムなど)、天然リン脂質(ダイズレシチン、脂肪酸および無水ヘキシトール由来のエステルまたは部分エステル(例えばモノオレイン酸ソルビタン)およびこれらの部分エステルとエチレンオキシドとの縮合物(例えばモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン)など)が挙げられる。本乳剤は、シロップ剤およびエリキシル剤の製剤として甘味料と香味剤も含み得る。かかる製剤は、粘滑剤、保存剤、または着色剤も含み得る。

【0079】

本発明の実施において、上記の医薬化合物は、鼻腔内、眼内および膣内経路によって、坐剤、吹送、粉剤およびエアロゾル製剤など(例えばステロイド吸入剤、Rohatagi (1995) J. Clin. Pharmacol. 35:1187-1193; Tjwa (1995) Ann. Allergy Asthma Immunol. 75:107-111参照)で投与することもできる。坐薬製剤は、上記の薬を、好適な非刺激性賦形剤(常温では固体だが体温では液体であるため体内で溶けて薬を放出する)と混合することによって調製し得る。このような物質は、ココアバターとポリエチレングリコールである。

10

20

30

40

50

【0080】

本発明の実施において、上記の医薬化合物は、アプリケータースティック、液剤、懸濁剤、乳剤、ゲル剤、クリーム剤、軟膏、ペースト剤、ゼリー剤、塗剤、粉剤、およびエアロゾル剤として製剤化し、経皮的に局所経路で送達することができる。

【0081】

本発明の実施において、上記の医薬化合物は、体内で徐放させるミクロスフェアとして送達し得る。例えば、ミクロスフェアは、皮下に徐放する薬の皮内注射によって (Rao (1995) *J. Biomater Sci. Polym. Ed.* 7:623-645 参照)、生分解性で注射可能なゲル製剤として (例えば、Gao (1995) *Pharm. Res.* 12:857-863 (1995) 参照)、または経口投与用のミクロスフェアとして (例えば、Eyles (1997) *J. Pharm. Pharmacol.* 49:669-674 参照) 10 投与することができる。

10

【0082】

本発明の実施において、上記の医薬化合物は、例えば静脈内(IV)投与または体腔または心臓内腔への投与によって、非経口的に投与することができる。心臓組織内で幹細胞またはウイルス構築物をインキュベートする間に心臓からの血流を一時的に遮断するカテーテル、ならびに心臓全体または心臓の一部の循環を隔離して導入された薬剤 (例えば、幹細胞、構築物、ネイキッドDNA、PIMタンパク質、ウイルスまたは他のベクター) の心臓中の滞留時間を増加させる周知の型の再循環システムを使用することができる。これらの製剤は、製薬上許容される担体に溶解した活性剤溶液を含み得る。使用できる許容可能なビヒクルおよび溶媒は、水、リンガー溶液、等張塩化ナトリウムである。さらに、溶媒または懸濁媒質として滅菌固定油を使用することができる。この目的のため、合成モノグリセリドまたは合成ジグリセリドなどの任意の無菌固定油を使用し得る。さらに、注射可能剤の調製においては、オレイン酸のような脂肪酸を同じように使用することができる。これらの溶液は、無菌で、通常は望ましくない物質を含まない。上記の製剤は、慣習的な周知の滅菌技術によって滅菌される。この製剤は、生理学的条件に近づけるために必要とされる製薬上許容される補助物質 (pH調整剤およびpH緩衝剤、毒性調整剤 (例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなど)) を含み得る。これらの製剤における活性剤の濃度は広範囲に変化させることができ、選択される投与様式および患者のニーズに応じて、主に液量、粘度、体重などに基づいて選択される。IV投与については、上記の製剤は、滅菌注射可能水性または油性懸濁剤などの滅菌注射可能製剤であってよい。この懸濁剤は、好適な分散剤または湿润剤および懸濁化剤を用いて製剤化することができる。また上記の滅菌注射可能製剤は、1,3-ブタンジオール溶液のような無毒の非経口的に許容可能な希釈剤または溶媒に入った懸濁剤であってよい。上記の投与は、ボーラス注入または持続注入(例えば、特定期間中の血管への実質的に中断されない導入)によって行うことができる。

20

【0083】

本発明の医薬化合物および製剤は、凍結乾燥することができる。本発明は、本発明の医薬とバルク剤 (例えば、マンニトール、トレハロース、ラフィノースおよびスクロースまたはこれらの混合物) とを含む溶液を凍結乾燥させることによって作製し得る、本発明の組成物を含む安定な凍結乾燥製剤を提供する。安定な凍結乾燥製剤の製造方法は、約2.5mg/mLのタンパク質、約15mg/mLのスクロース、約19mg/mLのNaCl、および5.5超~6.5未満のpHを有するクエン酸ナトリウム緩衝剤の溶液を凍結乾燥させるステップを含み得る。例えば、米国特許出願番号第20040028670号を参照されたい。

30

【0084】

本発明の組成物および製剤は、リポソームの使用によって送達することができる (以下の考察も参照のこと)。リポソームを用いることにより、特にそのリポソーム表面が標的細胞に特異的なリガンドを有するか、そうでなければ特定の器官に選択的に向けられている場合、*in vivo*における心臓または循環系の他の部分の標的細胞への活性剤の送達に集中することができる。例えば、米国特許第6,063,400号; 第6,007,839号; Al-Muhammed (1996) *J. Microencapsul.* 13:293-306; Chonn (1995) *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:698-70

40

50

8 ; Ostro (1989) Am. J. Hosp. Pharm. 46:1576-1587を参照されたい。

【0085】

本発明の製剤は、予防的治療および/または治療的治療のために投与することができる。治療的適用において、組成物は、症状、感染または疾患およびその合併症の臨床症状を治療し、軽減または部分的に停止するのに十分な量(治療的有効量)で、症状、感染または疾患を既に患っている被験体に投与される。例えば、別の実施形態において、本発明の医薬組成物は、心筋梗塞(MI後)の心臓への悪影響を治療、予防および/または改善し、心筋細胞を肥大から保護し、梗塞によって誘導される心筋アポトーシスを抑制し、梗塞サイズを減少させるのに十分な量で投与される。別の実施形態において、本発明の医薬組成物は、PIM-1を発現させて幹細胞マーカーの細胞脱分化および再発現を誘導するために用いられ、また1つの態様において、PIM-1を過剰発現させて幹細胞の再生能(例えばMI後の心臓に生着する幹細胞能)を増強するために用いられる。

10

【0086】

これを達成するために十分な医薬組成物の量は、「治療的有効用量」と定義される。この用途に有効な用量スケジュールおよび量、すなわち「投薬レジメン」は、例えば疾患または症状の段階、疾患または症状の重症度、患者の健康の一般的な状態、患者の身体状況、齢などの様々な要因によって決まるであろう。患者の用量レジメンの計算に際して、投与様式も考慮される。

20

【0087】

用量レジメンは、当業者に周知の薬物動態パラメーター、すなわち活性剤の吸収率、バイオアベイラビリティ、代謝、クリアランスなども考慮に入れる(例えば、Hidalgo-Aragon (1996) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 58:611-617 ; Groning (1996) Pharmazie 51:337-341 ; Fotherby (1996) Contraception 54:59-69 ; Johnson (1995) J. Pharm. Sci. 84:1144-1146 ; Rohatagi (1995) Pharmazie 50:610-613 ; Brophy (1983) Eur. J. Clin. Pharmacol. 24:103-108 ; 最新版Remington's(上記参照)を参照)。現在の技術水準によって、臨床医は各患者の用量レジメン、活性剤および治療対象の疾患または症状を決定することができる。医薬として用いられる同様の組成物のために提供されるガイドラインを、用量レジメン(すなわち投与の用量スケジュールおよび用量レベル)を決定するためのガイダンスとして使用して、本発明の方法を正しく適切に実施することができる。

30

【0088】

患者が必要とする、また患者が耐えられる用量および頻度に応じて、製剤の単回投与または複数回投与を行うことができる。上記の製剤は、本明細書中に記載の症状、疾患または病徴を有効に治療、予防または改善するのに十分な量の活性剤を与えなければならない。非経口的または非-経口的に投与可能な製剤の製造方法は、当業者に公知または明らかであり、Remington'sのような出版物にさらに詳細に記載されている。

30

【0089】

本発明の方法は、他の薬または医薬(例えば、心臓発作、鬱血性心不全および関連の病徴または症状を治療するための組成物)との同時投与をさらに含み得る。例えば、本発明の方法および/または組成物ならびに製剤は、抗生物質(例えば、特にグラム陰性細菌に対して有効な抗菌性もしくは静菌性のペプチドまたはタンパク質)、フルイド(fluids)、サイトカイン、免疫調節剤、抗炎症剤、補体活性化剤(例えばコラーゲン様ドメインまたはフィブリノーゲン様ドメイン(例えばフィコリン)、炭水化物結合ドメインなどを含むペプチドまたはタンパク質)、およびこれらの組み合わせと同時製剤化および/または同時投与することができる。

40

【0090】

ナノ粒子およびリポソーム

また本発明は、例えばポリペプチド(例えば心臓または血管の幹細胞の表面ポリペプチド(心臓細胞(例えば筋細胞)の細胞表面ポリペプチドなど))のような生物学的分子をはじめとする特定の分子を標的とする、本発明のPIM-1発現化合物を含むナノ粒子およびリポソーム膜も提供する。別の実施形態において、本発明は、疾患のあるおよび/または損

50

傷した心臓細胞または幹細胞（任意の多能性細胞など）を標的とするナノ粒子およびリポソーム膜を提供する。

【0091】

別の実施形態において、本発明は、（本発明の化合物を含むことに加えて）、分子（例えば、疾患のあるおよび/または損傷した心臓細胞または幹細胞を選択的に標的とするペプチドまたは抗体）を含むナノ粒子およびリポソーム膜を提供する。別の実施形態において、本発明は、例えば疾患のあるおよび/または損傷した心臓細胞または幹細胞などの細胞上の受容体を標的とするためにインターロイキン受容体および/または他の受容体を用いるナノ粒子およびリポソーム膜を提供する。例えば米国特許出願第20060239968号を参照されたい。

10

【0092】

このため、1つの態様において、本発明の組成物は、幹細胞または心臓細胞（例えば筋細胞）を特異的に標的化する。

【0093】

また本発明は、異なる作用様式または異なる薬物動態を有する2つの異なる治療薬（その少なくとも1つが本発明の組成物を含む）の連続送達を可能にするナノセルも提供する。ナノセルは、第1の薬剤を有するナノコアを、第2の薬剤を含有する脂質小胞の内部に封入することによって形成される。例えば、Senguptaら、米国特許公開番号第20050266067号を参照されたい。外側の脂質コンパートメント中の薬剤が最初に放出され、ナノコア中の薬剤が放出される前にその効果を与える。上記のナノセル送達系は、本明細書に記載の任意の疾患または症状（例えば鬱血性心不全または心臓発作（心筋梗塞）など）に罹患している患者に送達するための任意の医薬組成物中に製剤化し得る。例えば、心筋梗塞の治療において、抗体および/または血管新生剤をナノセルの外側の脂質小胞に含めて、本発明の組成物をナノコアにロードすることができる。この配置は、上記の抗体および/または血管新生剤を最初に放出させて、損傷した組織に送達することを可能とする。

20

【0094】

または本発明は、例えばParkら、米国特許公開番号第20070082042号に記載のような経皮吸収のための、本発明の化合物を含む多層リポソームも提供する。上記の多層リポソームは、本発明の組成物を封入するため、粒子サイズが約200～5000nmまでのスクアラン、ステロール、セラミド、中性の脂質または油、脂肪酸およびレシチンを含む油相成分の混合物を用いて調製することができる。

30

【0095】

本発明の多層リポソームは、安定性を高めるため、防腐剤、抗酸化剤、安定剤、増粘剤などをさらに含み得る。合成防腐剤および天然防腐剤は、例えば0.01%～20%の量で使用することができる。抗酸化剤（例えばBHT、エリソルベート（erysorbate）、トコフェロール、アスタキサンチン、植物フラボノイドおよびこれらの誘導体、または植物由来の抗酸化物質）を使用し得る。リポソーム構造を安定化させるために、安定剤（例えばポリオールおよび糖）を使用することができる。例示的には、ポリオールとして、ブチレングリコール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコールおよびエチルカルビトールが挙げられ、糖の例は、トレハロース、スクロース、マンニトール、ソルビトール及びキトサン、または単糖もしくはオリゴ糖、あるいは高分子量デンプンである。構築されたリポソームの水中での分散安定性を高めるため、増粘剤（例えば、天然増粘剤もしくはアクリルアミド、または合成ポリマー増粘剤）を使用することができる。例示的には、増粘剤として、天然ポリマー（アカシアガム、キサンタンガム、ゲランガム、ローカストビーンガムおよびデンプンなど）、セルロース誘導体（ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースなど）、合成ポリマー（ポリアクリル酸、ポリアクリルアミドもしくはポリビニルピロリドンおよびポリビニルアルコール、ならびにこれらのコポリマーなど）または架橋物質が挙げられる。

40

【0096】

50

リポソームは、例えばParkら、米国特許公開番号第20070042031号に記載されるような任意の方法（第1の容器に水溶液を提供するステップ；第2の容器に有機脂質溶液を提供するステップ（ここで水溶液と有機脂質溶液のいずれか1つが治療的製品を含む）；第1混合領域内で水溶液と該有機脂質溶液とを混合してリポソーム溶液を生成するステップ（ここで、実質的に、即時的に治療的製品を封入するリポソームを製造するように有機脂質溶液を該水溶液と混合する）；およびその直後にリポソーム溶液を緩衝剤溶液と混合して希釈されたリポソーム溶液を生成するステップを含む、治療的製品を封入することによるリポソームの製造方法など）を用いて作製することができる。

【0097】

また本発明は、例えば米国特許公開番号第20070077286号に記載されるような、本発明の組成物を薬物含有ナノ粒子（例えば二次ナノ粒子）として送達するための、本発明の化合物を含むナノ粒子も提供する。1つの実施形態において、本発明は、二価もしくは三価の金属塩と共に作用する、本発明の脂溶性薬または脂溶化した水溶性薬を含むナノ粒子を提供する。

10

【0098】

遺伝子治療送達の方法

本発明のPIM-1発現核酸組成物は、PIM-1コード核酸を送達するex vivo遺伝子治療またはin vivo遺伝子治療のために送達され得る。1つの態様において、本発明のPIM-1発現核酸組成物（例えば高レベルのヒトPIM-1タンパク質を発現する非複製ウイルス構築物）は、ex vivo伝子治療またはin vivo遺伝子治療のために送達される。

20

【0099】

本発明のPIM-1発現核酸組成物は、多様な心臓または血管の細胞に送達されて発現し、細胞増殖を誘導し、および/または心臓もしくは血管の細胞を低酸素症および細胞アポトーシスから保護することができる。このように（本発明の組成物および方法を実施することによって）発現されたPIM-1は、心筋細胞を肥大から保護し、心筋梗塞（例えば心臓発作）によって誘導される細胞死を抑制し、羅患した筋肉の量を減少させることができる。さらに、心臓または血管の細胞における（例えば心臓細胞における）（本発明の組成物および方法を実施することによる）PIM-1の過剰発現は、細胞の復帰突然変異を引き起こし、心臓または血管の細胞が幹細胞様になり、幹細胞マーカー（心臓の幹細胞マーカーなど）の再発現で終わる。

30

【0100】

1つの態様において、（本発明の組成物および方法を実施することによる）PIM-1の過剰発現は、幹細胞の再生能および障害を受けたまたは損傷した器官（例えば、心臓発作後の損傷を受けた心臓）を修復する幹細胞の能力を強化する。1つの態様において、本発明は、成人への再導入の前に培養幹細胞を使用する制御系を用いてPIM-1を過剰発現させて、損傷後の器官を修復する上記の培養幹細胞の能力を強化するための組成物および方法を提供する。

【0101】

本発明は、低酸素によって損傷した多数の組織を修復するための臨床治療用のPIM-1の使用、またはPIM-1発現の制御を可能とする条件付き制御因子の使用を通じた他の方法を提供する。例えば、PIM-1発現核酸送達ビヒクル（例えばベクターまたは組換えウイルスなどの発現構築物）は、上記の器官（例えば心臓）に直接注射して、その器官を直接損傷から保護することができる。その後上記のタンパク質の発現は、経口処方薬（このための製剤は上述されている）を通して活性化させ得る。

40

【0102】

1つの実施形態において、本発明の実施に用いる（例えばPIM-1発現細胞を作製するために用いる）ベクターは、2シストロン性である。1つの実施形態において、PIM-1発現を駆動するためにMND（すなわち、骨髄増殖性肉腫ウイルスLTR-ネガティブコントロール領域欠失）プロモーターが用いられる。1つの実施形態において、レポーター（例えば、ウイルス内部リポソーム侵入部位（vIRES）の外で駆動され得る強化緑色蛍光タンパク質（eGFP）レポ

50

ーター)も用いられる。別の実施形態において、構築物は全て第三世代自己不活性化(SIN)レンチウイルスベクターであり、導入遺伝子の長期発現を確保するための幾つかのエレメントを含む。例えば、MNDプロモーターは導入遺伝子の高発現を可能とするが、LTRは、繰り返し継代後の長期発現を可能とする。別の実施形態において、上記のベクターは、(I FN)-足場付着領域(SAR)エレメント(メチル化を抑制し導入遺伝子を発現抑制から保護することによってベクターを転写的に活性に保持するのに重要であることが示されている)も含む。

【0103】

別の実施形態において、治療の第二過程として、PIM-1発現核酸送達ビヒクル(例えば、ベクターまたは組換えウイルスなどの発現構築物)は、患者の損傷した心臓または他の器官から抽出した成体幹細胞の培養中の増殖を増強するために用いることができる。別の実施形態において、血、脂肪、または骨髄由来の幹細胞も使用し得る。PIM-1発現は、培地への薬の添加を通して活性化することができる。何日か培養した後、薬の除去によってPIM-1の発現を止めることができ、1つの態様においては、培養中で產生された増加数の細胞が障害を受けた領域に再導入され、修復プロセスに寄与する。

10

【0104】

本発明は、当技術分野で公知の任意の非ウイルス送達または非ウイルスベクター系(例えば、脂質媒介トランスフェクション、リポソーム、免疫リポソーム、リポフェクチン、カチオン性顔面両親媒性物質(CFA)およびこれらの組み合わせなど)の使用を組み入れることができる。

20

【0105】

1つの態様において、本発明の実施に用いる発現ビヒクル(例えばベクターまたは組換えウイルス)は、心筋に直接注射される。1つの態様において、PIM-1コード核酸は、直接注射によって個体に投与される。このため、1つの実施形態において、本発明は、本発明の実施に用いる発現ビヒクル(例えばベクターまたは組換えウイルス)を含む滅菌注射可能製剤を提供する。

【0106】

別の実施形態において、上記の発現構築物への標的細胞(例えば、筋細胞または幹細胞)の曝露を確実にするために、複合投与し、多数の経路(例えば心筋に直接および静脈内)を用いることが適切な場合がある。所望の効果を達成するため、この発現構築物の複合投与が必要とされる場合もある。

30

【0107】

本発明の1つの特定の実施形態は、PIM-1発現を増強するための任意の起源の幹細胞または任意の多能性細胞のex vivo修飾、その後のヒトもしくは他の哺乳動物宿主、または任意の脊椎動物への幹細胞の投与である。上記の幹細胞は、直接的または局所的に(例えば、心臓損傷または心不全のための既存の幹細胞治療と同じ方法で心臓組織へ)投与することができる。別法として、全身投与も検討される。上記の幹細胞は、自己幹細胞または異種幹細胞であってよい。これらは、胚源由来または幼い生物もしくは成体生物由来であり得る。PIM-1発現の増強は、例えば、幹細胞における既存の染色体PIM-1-コード配列の発現のアップレギュレーションの結果であってよく、あるいはPIM-1を機能的にコードする外因性ポリヌクレオチドの挿入の結果であってよい。本明細書の他の文脈中で論じられるとおり、かかる幹細胞中のPIM-1-コードインサートは、有利には、誘導性発現制御の下にあり得る。さらに、公知の種類の「自殺配列」の使用。

40

【0108】

別の実施形態において、1つ以上の「自殺配列」も、本発明の核酸構築物とは別に、または本発明の核酸構築物と併用して(例えば同じ核酸構築物(例えばベクター、組換えウイルスなど)に組み込んで)投与される。例えば、Marktel Sら、Immunologic potential of donor lymphocytes expressing a suicide gene for early immune reconstitution after hematopoietic T-cell-depleted stem cell transplantation. Blood 101:1290-1298(2003)を参照されたい。本発明の実施に用いる自殺配列は、公知の種類であってよく、

50

例えば、アポトーシスを誘導するか、そうでなければ細胞死を引き起こす（例えば、1つの態様において、外因性トリガー化合物を投与するかまたは別の種類のトリガーへ曝露（例えば、限定するものではないが、光または他の電磁波への曝露）するとアポトーシスを誘導するか、そうでなければ細胞死を引き起こす）配列であってよい。

【0109】

1つの態様において、本発明のPIM-1コード核酸を含有する発現構築物またはビヒクルは、体重1kg当たり約0.05～500μg、または0.5～50μgの有効量で製剤化され、単一用量または分割用量で投与することができる。しかし、実際に投与される本発明のPIM-1コード核酸、または他の活性成分（例えば、PIM-1を誘導またはアップレギュレートする薬剤）の量は、治療対象の症状、個々の患者の齢および体重、ならびにその患者の病徴の重症度などの様々な関連因子を考慮して決定すべきであることを理解しなければならず、このため、決して上記の量が本発明の範囲を限定するように意図されてはならない。

10

【0110】

1つの態様において、本発明のPIM-1コード核酸を含有する発現構築物またはビヒクルは、少なくとも1ミリリットル当たり物理的粒子が約 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{16} 、または 10^{17} 個の力値で製剤化される。1つの態様において、上記のPIM-1コード核酸は、約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150マイクロリットル（μl）またはそれ以上の注射で投与される。用量および投与レジメンは、当技術分野で公知の慣習的な範囲測定技術によって決定することができる。例えば、別の実施形態では、約 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{16} または 10^{17} 個のウイルス（例えばレンチウイルス）粒子が、1回または複数回の用量で個体（例えばヒト患者）に送達される。

20

【0111】

他の実施形態において、心臓内への1回投与（例えば1回用量）は、約0.1μl～1.0μl、10μlまたは約100μlまでの本発明の医薬組成物を含む。別法として、約0.5ngまたは1.0ng～約10μg、100μg～1000μgの用量範囲のPIM-1発現核酸を投与する（発現構築物として、または1つの実施形態のとおり、ネイキッドDNAとしての量を注射する）。用量および投与経路の任意の必要な変動は、当業者が当技術分野で公知の通常の技術を用いて決定することができる。

30

【0112】

1つの実施形態において、PIM-1発現核酸は、製薬上許容される担体（生理食塩水など）を含む注射可能製剤の形態のウイルスストックを用いてin vivoで直接心臓へ送達される。上記の注射可能製剤中のベクターの最終力値は、ウイルス粒子約 10^8 ～ 10^{14} 個、または約 10^{10} ～ 10^{12} 個の範囲であってよい。これらの範囲は、遺伝子導入に有効であり得る。

【0113】

1つの態様において、PIM-1発現核酸（例えばベクター、導入遺伝子）構築物は、直接冠動脈内注射（例えば蛍光透視誘導の下で標準的な経皮的カテーテルに基づく方法を使用する）によって心筋に送達される。別法として、PIM-1発現核酸（例えばベクター、導入遺伝子）構築物は器官および組織（例えば心臓）に送達され、例えば脂質媒介遺伝子導入を用いて、両冠動脈および/または末梢動脈に直接送達される。

40

【0114】

直接冠動脈内注射、または両冠動脈および/または末梢動脈への直接送達などのこれらの態様は、PIM-1発現核酸（例えばベクター、導入遺伝子）が十分に有効であることを可能とする程度に発現されるのに十分な量であり得る。例えば、注射されるPIM-1発現核酸（例えばベクター、導入遺伝子）の量は、ウイルス粒子約 10^8 ～ 10^{14} 個、または約 10^{10} ～ 10^{12} 個の範囲であり得る。この注射は、冠動脈の内腔に深く（例えば動脈内腔の中に1cm）行うことが可能であり、側副血管の成長は個々の患者で大きく異なるため、両冠動脈動脈に行うことができる。上記の物質を、冠動脈カテーテルにより冠動脈の内腔に直接注射することによって、PIM-1発現核酸（例えばベクター、導入遺伝子）をかなり効果的に標的とし、また注射中の組換えベクターの近位大動脈への喪失を最小限にすることが可能となる。任意

50

の様々な冠動脈カテーテル、またはStack灌流カテーテルなどを使用し得る。例えば、米国特許出願公開番号第20040132190号を参照されたい。

【0115】

1つの態様において、本発明は、治療的PIM-1核酸を、血流低下に伴う酸素欠乏（すなわち冠動脈疾患および心臓発作に由来する虚血）を認識して応答する遺伝子「センサー」と組み合わせる。酸素が減少するとすぐにこのセンサーが治療的遺伝子のスイッチを入れ、これにより心臓を保護する。心臓疾患有する患者に対する可能性に加えて、本発明のこの態様は、脳卒中、ショック状態、外傷および敗血症などの循環系組織が血液供給の喪失を起こしやすい任意の症状に有用である。

【0116】

直接PIM送達

細胞および核酸のアプローチに加えて、PIMタンパク質を罹患した心臓または他の循環組織に直接送達することもできる。PIMは細胞内で作用するため、PIMの細胞内送達を容易にする送達戦略を利用することが好ましい。

【0117】

使用し得る1つの技術は、標的細胞に取り込まれ、または標的細胞と融合するビヒクルに入ったPIMを提供する。こうして、細胞へのポリヌクレオチド送達に関連して上記により詳細に記載されるように、PIMをリポソームまたは他の小胞に封入し得る。

【0118】

別法として、PIMを形質導入ドメイン（TATタンパク質など）に連結することができる。いくつかの実施形態において、PIM酵素は、細胞によるPIMの取り込みをさらに促進するため、形質導入部分（例えば合成または非合成ペプチド形質導入ドメイン（PTD）、細胞侵入ペプチド（CPP）、カチオン性ポリマー、抗体、コレステロールまたはコレステロール誘導体、ビタミンE化合物、トコール、トコトリエノール、トコフェロール、グルコース、受容体リガンドなど）に機能的に連結し得る。

【0119】

多数のタンパク質形質導入ドメイン/ペプチドが当技術分野で公知であり、形質導入ドメイン（例えばカーゴ分子）に連結した異種分子取り込みを促進する。このようなペプチド形質導入ドメイン（PTD）は、マクロピノサイトーシスと呼ばれる過程を通して取り込みを促進する。マクロピノサイトーシスは、全ての細胞が行うエンドサイトーシスの非選択型である。

【0120】

例示的には、ペプチド形質導入ドメイン（PTD）は、ショウジョウバエ（*Drosophila*）のホメオタンパク質であるアンテナペディア転写タンパク質（AntHD）（Joliotら, *New Biol.* 3: 1121-34, 1991; Joliotら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:1864-8, 1991; Le Rouxら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:9120-4, 1993）、単純ヘルペスウイルス構造タンパク質VP22（ElliottおよびO'Hare, *Cell* 88:223-33, 1997）、HIV-1転写活性TATタンパク質（GreenおよびLoewenstein, *Cell* 55:1179-1188, 1988; FrankelおよびPabo, *Cell* 55:1189-193, 1988）、またつい最近ではプリオントンタンパク質のカチオン性N末端ドメインから得られる。好ましくは、上記のペプチド形質導入ドメインは、それが融合した生体分子の受容体非依存的な取り込みを増加させ、広範囲の細胞種の形質導入を可能とし、最小限の毒性または非毒性を呈する（Nagaharaら, *Nat. Med.* 4:1449-52, 1998）。ペプチド形質導入ドメインは、DNA（Abu-Amer、上記）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（Astriab-Fisherら, *Pharm. Res.*, 19:744-54, 2002）、小分子（Polyakovaら, *Bioconjug. Chem.* 11:762-71, 2000）また無機の40ナノメートルの鉄粒子でさえも（Doddら, *J. Immunol. Methods* 256:89-105, 2001; Wunderbaldingerら, *Bioconjug. Chem.* 13:264-8, 2002; Lewinら, *Nat. Biotechnol.* 18:410-4, 2000; Josephsonら, *Bioconjug. Chem.* 10:186-91, 1999）取り込みを促進することが示されている。

【0121】

このような細胞間送達タンパク質との融合タンパク質は、公知の分子生物学技術を用い

10

20

30

40

50

て容易に構築することができる。

【0122】

さらに、PIM分子をコードするポリヌクレオチドはいずれも、*in vivo*または*in vitro*におけるこれらのポリヌクレオチドの標的細胞への形質導入を促進するため、上述のドメインに連結し得る。

【0123】

キットおよびライブライマー

本発明は、本発明のPIMを発現させる、またはPIMを誘導もしくはアップレギュレートする組成物および/または核酸（例えば、ベクター、組換えウイルスなど）、トランスフェクト剤、形質導入剤、心臓または血管の細胞および/または細胞株、使用説明書(本発明の方法に関する)、またはこれらの任意の組み合わせを含む、本発明の組成物を含むキットおよび本発明の方法を提供する。キット、細胞、ベクターなどは、それ自体、本明細書で提供される。

10

【0124】

本発明は、以下の実施例に関連してさらに説明されるが、本発明はかかる実施例に限定されないと理解されるべきである。

【実施例】

【0125】

実施例1:PIM-1をアップレギュレートすることによる治療効果の実証

この実施例は、セリン/トレオニンキナーゼPIM-1をコードする核酸を含む本発明の組成物および本発明の方法が、細胞増殖を誘導し、細胞を低酸素症および細胞アポトーシスから保護し；PIM-1キナーゼを発現させて心筋細胞を肥大から保護し、および/または梗塞によって誘導される心筋アポトーシスを抑制し、梗塞サイズを減少させ；PIM-1を発現させて幹細胞マーカーの細胞脱分化および再発現を誘導し；またPIM-1を過剰発現させて幹細胞の再生能（例えば心筋梗塞後(MI後)の心臓に生着する幹細胞能）を増強するために有効であることを示す。これらのデータは、本明細書中に記載の組成物および方法の使用において、心筋梗塞、圧過負荷誘発性肥大、および心不全に起因する虚血/再灌流損傷中に誘導されるアポトーシス刺激に対する防御としてのPIM-1の機能を示す。

20

【0126】

結果

PIM-1はヒト心筋中で発現され、不全においてアップレギュレートされる

30

正常ヒト心臓および不全ヒト心臓のサンプルの免疫組織化学は、正常成人の心筋において、PIM-1発現が細胞質全体に分布していることを示す。対照的に、不全ヒト心臓サンプルにおいては、PIM-1は大部分が核性となる。ヒト心臓溶解物の免疫プロットティングは、正常対照と比較した場合、不全ヒト心筋においてはPIM-1発現が2.65倍増加することを示す。類似のパターンがトロボモジュリン過剰発現トランスジェニック(TOT)マウス、DCMモデルにおいて見られる。PIM-1は、6月齢の野生型(NTG)マウスにおいて低レベルで発現したが、TOTマウスにおける発現は5.9倍増加し、大部分が核性であった。

【0127】

マウス心筋中で発現するPIM-1は、発生的に調節される

40

生後様々な時点のマウスから得た心筋溶解物の免疫プロット分析は、加齢に伴うPIM-1発現の低下を示す。新生児の心臓サンプルは、30週齢のマウスより6.3倍多いPIM-1を示す。出生後発現レベルは低下するが、8週齢まで著しく上昇し続け、そこで30週齢の心臓と同程度となる。様々な発達時点のマウスの心臓の共焦点顕微鏡検査は、PIM-1の発現が、新生児では主に核性であり、成体早期に次第に細胞質性となり、30週齢の成体では実質的に消失することを示す。このことは、PIM-1について細胞内分画を行った心筋の免疫プロットティングによって裏付けられる。PIM-1発現は、30週齢のマウスの心筋と比較した場合、それぞれ、新生児の心臓においては10.5倍より核性であって5.0倍細胞質性でなく、8週齢の心臓においては5.2倍より核性であって4.6倍細胞質性でない。

【0128】

50

PIM-1はin vivoで心臓保護効果を示す

これらのデータは、当技術分野で認められた動物モデルを用いて、in vivoでのPIM-1の発現が心臓保護効果を有することを示す。PIM-1の局在化および発現は、偽手術(sham)、または梗塞(MI)もしくは圧過負荷(TAC)に起因する心筋症損傷の4日後に処理した、3月齢の正常マウスから得た心臓において検証した。圧過負荷肥大を誘発するためのTAC結紮の4日後、主要血管の周囲の心筋細胞においてPIM-1の免疫活性が核周囲で著しく増加していることが観察された。同様に、核周囲でのPIM-1の免疫活性は、境界域の心筋細胞中では増加するが、遠隔心筋の正常領域中では影響を受けない。PIM-1陽性の境界域の心筋細胞は、「末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介dUTP-ビオチンニック末端標識」(TUNEL)標識に陰性であって、心臓保護的抗アポトーシスシグナル伝達を示すBcl-XL発現の増加を示し、心筋生存シグナル伝達におけるPIM-1の役割を実証し、また本発明の組成物および方法が、PIM-1キナーゼ発現および/または活性を発現させおよび/またはアップレギュレートすることによって心筋生存シグナル伝達において有効であり得ることも実証する。

10

【0129】

PIM-1の保護的役割は、齢と性別が一致する対照と共にex vivo虚血/再灌流損傷に供した、遺伝子欠失でPIM-1を欠損したマウスの心臓を用いて確認した。PIM-1ノックアウトマウスの心臓は、45分間の再灌流後、左心室発生圧によって測定されるとおり、機能的回復の統計的に顕著な低下を示した。ex vivo虚血に供した心臓から得たパラフィン埋め込み片のTUNEL染色は、PIM-1ノックアウトマウスのTUNEL陽性心筋細胞数が、野生型対照に対して2.4倍増加していることを明らかにする。

20

【0130】

PIM-1は、in vitroで抗アポトーシスタンパク質発現を誘導し、心筋細胞を保護する。以前に記載された(参考文献10)野生型34kDaPIM-1(PIM-wt)またはキナーゼデッド(K67M)変異型(PIM-DN)のGFPタグ化cDNAを用いて組換えアデノウイルスを作製し、新生児ラット心筋細胞培養物の感染に用いた。GFP-PIM-wtまたはGFP-PIM-DNを発現する培養物から得た溶解物の免疫プロットティングは、GFP抗体またはPIM-1抗体のいずれかによって認識される64kDaのGFP-PIM-1融合タンパク質を蓄積する。GFP-PIM-wtを過剰発現する心筋細胞は、EGFP感染対照と比較してTUNEL標識の統計的に顕著な減少を示す。これに対して、GFP-PIM-DNの過剰発現は、アポトーシス心筋細胞の30.8%の増加を誘導した(*p<0.05)。培養心筋細胞は、GFP-PIM-wtの過剰発現によって、ドキソルビシンまたはデオキシグルコースを用いたアポトーシス攻撃から保護されたが(両群について**p<0.01)、GFP-PIM-DNの過剰発現はアポトーシスの影響を悪化させた(それぞれ**p<0.01、および*p<0.05)。これらの結果と一致して、GFP-PIM-DNは、カスパーゼ3切断の3.6倍の増加および切断ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)の80%の増加を誘導した。これに対して、GFP-PIM-wtは、対照と比較した場合、bcl-XLおよびbcl-2の発現の顕著な増加をもたらした(それぞれ2.2倍および25.4倍)(*p<0.01)。GFP-PIM-wtは、非感染の対照に対して、Badのセリン112残基(S112)におけるリン酸化も16.7倍増加させたが、全Badのレベルは変化しないままであった(*p<0.01)。

30

【0131】

40

PIM-1は心臓保護的刺激によって誘導される

これらのデータは、本発明の組成物および方法が、PIM-1の発現を増加させて心臓保護効果を与える(例えは心筋梗塞後)ために使用し得ることを示す。新生児ラット心筋細胞培養物を、アッセイの2時間前に心臓保護剤(白血病抑制因子(LIF)、インスリン様成長因子(IGF-1)、デキサメタゾン、およびPMAなど)で処理すると、共焦点顕微鏡検査によって可視化されるとおり、対照細胞と比較してPIM-1の免疫反応性が誘導された。PIM-1の免疫反応性は、フェニレフリン、エンドセリン1、フォルスコリン、またはエストラジオールによっては誘導されなかった(図4A)。LIF、IGF、PMA、およびデキサメタゾンは、PIM-1発現をそれぞれ2.8、2.7、2.3、および2.0倍誘導した(*p<0.05、**p<0.01)。アデニル酸シクラーゼ活性剤であるフォルスコリンは、対照培養物に対してPIM-1発現を45%低下させ

50

た(**p<0.01)。

【0132】

PIM-1発現のIGF-1誘導はAKT依存性である

IGF-1処理に応答するPIM-1発現は、PI3キナーゼ阻害剤であるウォルトマンニンの存在下で著しく低下し、またはAKT(AKT-DN)をそれぞれ4.0倍および9.1倍不活性化させる(**p<0.001)。核標的AKT(参考文献12)の過剰発現が、培養心筋細胞中のPIM-1発現を非感染の対照と比較して2.1倍増加させるという、IGF刺激後の結果として生じるAKTの核蓄積の役割(参考文献11)が確認された(*p<0.05)。対照的に、野生型AKT(AKT-wt)の過剰発現は、PIM-1の発現を非感染の対照に対して1.4倍低下させた(*p<0.05)。培養心筋細胞の共焦点顕微鏡写真は、核標的AKTの発現が、PIM-1の核局在化の増加を誘導することを示す(図5C)。In vitroの結果と一致して、6月齢の心臓特異的核標的AKTトランスジェニックから得た心臓の免疫組織化学は、対照と比較してPIM-1の免疫活性および核局在化の増加を示し、代表的な免疫プロットは、PIM-1発現の増加を裏付ける。

10

【0133】

PIM-1とAKTはフィードバック関係を示す

AKTの発現およびリン酸化(S⁴⁷³)は、培養心筋細胞におけるGFP-PIM-DNの過剰発現に応答して増加する(図6A)。これに匹敵するホスホAKT⁴⁷³の増加の所見が、2月齢のPIM-KOマウスから得た免疫標識された心筋片の共焦点顕微鏡検査で観察された。PIM-KOマウスから得た全心臓溶解物の免疫プロットにおけるホスホAKT⁴⁷³と全AKTの増加は免疫染色と相関しており、Aktの発現および活性の調節が、部分的にはPIM-1レベルに依存していることを示している。

20

【0134】

考察

これらのデータは、当技術分野で認められた動物モデルを用いて、本発明の組成物および方法が、例えば心筋梗塞後に、PIM-1の発現を増加させて心臓保護効果(心筋保護効果)を与えるために使用し得ることを示す。心臓保護の分子調節は、心筋損傷および心不全の治療における治療的介入戦略のための極めて重要な研究手方法として耐えうる。本明細書中に示されるデータで実証されるとおり、本発明の心臓保護におけるPIM-1の中心的役割の発見で、心筋細胞生存の調節およびAKT媒介効果について意味深いシグナル伝達の新たな側面が明らかにされた。総合すれば、本明細書に示されるデータは、心筋におけるPIM-1発現および保護効果の最初の証拠を提供し、PIM-1とAKTの相互フィードバック機構を示す。造血系において先に実証されているAKTとPIM-1の共依存相互関係(参考文献7)は、両分子が協調して作用することを示す。

30

【0135】

PIM-1は、虚血/再灌流損傷中に誘導されるアポトーシス刺激に対する防御として機能する

PIM-1は、心筋に関する研究においては、以前は研究されていなかった。例えば参考文献1(下記参照)で概説されるとおり、非心臓細胞においては、PIM-1は増殖および細胞生存のシグナル伝達の重要な調節因子として示されていた。本発明の組成物および方法を用いて、PIM-1は、心筋梗塞、圧過負荷誘発性肥大、および心不全に起因する虚血/再灌流損傷中に誘導されるアポトーシス刺激に対する防御として機能する。PIM-1レベルは発生的にダウンレギュレートされるが、TAC結紮によって誘導された圧過負荷および心筋梗塞による心臓損傷後、心筋細胞において発現が再現する。PIM-1は、心臓損傷の後に発現する「前初期応答」遺伝子プロファイル(参考文献13)に関与するいくつかの癌原遺伝子(c-fos、c-myc(参考文献14)、RafおよびRasなど)の1つである。PIM-1は、他の組織中でc-Myb依存性細胞増殖の活性化においてc-mycと協力することが示されており(参考文献15~17)、癌遺伝子間の相乗効果が、損傷に対する応答における心筋の維持に役立ち得ることを唆している。

40

【0136】

PIM-1は細胞内抗アポトーシスシグナル伝達を増強する

その増殖効果に加えて、これらのデータは、PIM-1が細胞内抗アポトーシスシグナル伝

50

達を増強することも示す。非心臓細胞における知見(参考文献17、18、19)と一致して、アデノウイルスによるPIM-1の過剰発現は、新生児ラット心筋細胞を、ドキソルビシンおよびデオキシグルコースで誘導したアポトーシスから、*bcl-2*および*Bcl-XL*の発現の誘導ならびに*Bad*のリン酸化の誘導を通して保護する(図3)。*mdm2*発現、リン酸化およびp53分解の誘導はPIM-1によって媒介され(参考文献17)、AKTはp53依存性機構を通じてドキソルビシン誘導性アポトーシスを防御するため(参考文献20)、PIM-1はAKT誘導性p53抑制の下流エフェクターとしての役割を果たすこともできる。さらに、PIM-1の不活性化は、心筋細胞に関してアポトーシスシグナル伝達を誘導し、ドキソルビシン誘導性アポトーシスを悪化させた。他の細胞に関して見出されているとおり(参考文献18)、PIM-1の不活性化は、活性酸素種の生成およびミトコンドリア孔透過性の増加を通してアポトーシス活性も増加させ得る。

10

【0137】

いくつかの周知の心臓保護因子(LIF、PKC活性化因子PMA、グルココルチコイドデキサメタゾン、およびIGF-1など)は、PIM-1発現を著しく増加させ(図4)、T細胞(参考文献21)ならびにgp130受容体リガンド(IL-6およびLIF(参考文献22、参考文献1において概説される)など)のPMA処理によるPIM-1の誘導を示す公開された報告と一致していた。これらのリガンドおよびその同族受容体は、不全心臓(参考文献23、24、25、26)において、ならびに心筋の発生および肥大(参考文献27)の間に増加する。他の誘導性刺激に関して、PMA媒介性PKC活性化は心臓保護性であり(参考文献28-30)、関連する知見は、PIM-1が、T細胞におけるPMA処理によって急速に誘導されることを示す(参考文献21)。IGF-1は、心筋生存シグナル伝達(参考文献40-42)と幹細胞増殖(参考文献43)を媒介するが、発明者らは、IGFによるPIM-1誘導についての先の公開された実証を見出すことはできなかった。結果は、IGF-1誘導性PIM-1発現がAKT依存性であり、*in vitro*および*in vivo*で核標的AKT発現がPIM-1発現の顕著な増加を誘導することを示す。反対に、PIM-1ヌル動物において、PIM-1発現の不活性化または除去は、AKTの発現および活性化を誘導したが、AKTの活性化の増加は、虚血/再灌流損傷後の回復を強化すること、またはアポトーシスを減少させることはできない。

20

【0138】

これらの結果は、PIM-1が、比較的十分に立証された心臓保護に関する心筋中のAKTシグナル伝達の下流の心臓保護の重要なメディエーターであることを示す。成長因子またはサイトカイン受容体の活性化の後、AKTがリン酸化されて立体構造変化をもたらし、この立体構造変化がAKTを膜から放出し細胞質ゾルを通過させて最終的に核に到達させ、核でAKTは標的遺伝子の転写に影響を与えて(参考文献31)心臓保護活性をもたらす(参考文献12)。最近の研究は、PIM-1とAKTが類似の基質特異性を共有し(参考文献3)、また広く利用されているPI3K阻害剤のLY294002TMがPIM-1に結合して活性を阻害することを示す(参考文献32)。このため、LY294002TMの使用に関する以前の研究は、心筋におけるAKT依存性PIM-1シグナル伝達に関して再解釈を必要とする。

30

【0139】

心臓保護効果は、出生後/幼若心筋および病理学的に攻撃された心臓の両方における高められた発現とともに、PIM-1を、典型的には若い心筋と関連している表現型の特徴の促進と関係付ける。実際、新生児心筋のサイトカイン発現プロファイルは、AKT-nucトランスジェニック心臓によって示されるサイトカイン発現プロファイルと顕著な類似性を共有する。以前にAkt-nuc(参考文献11、12、33)に帰せられていた有益な効果(下記の参考文献を参照)の多くは、少なくとも一部は、PIM-1発現の誘導によるものであり得ると考えられる。

40

【0140】

方法

新生児ラット心筋細胞培養物の感染および処理

新生児ラット心筋細胞培養物を、以前に記載されたとおりに調製した(参考文献12)。処理に供する細胞を、2%血清を含む培地中に一晩置いた後適当な薬剤で処理し、以前に

50

記載された時点後に回収または固定した。心筋細胞をアデノウイルスで2時間感染させ、PBS中で洗浄し、その後2%FBSおよび50 μg/mlのpen/strep、ならびに100 μMのグルタミンを含むM199を再供給した。

【0141】

核と細胞質の抽出

心臓をPBS中で洗浄し、2m μlの0.57M STEAKM(0.57Mスクロース、25mM KCL、5%MgCl₂、1mM DTT、0.5mM PMSF、500 μlのプロテアーゼ阻害剤および50 μlのホスファターゼ阻害剤)に移し、ポリトロンを用いて氷中で均質化し、1000xgで10分間遠心分離した。

【0142】

ペレットを1.5m Lの0.57M STEAKMTM中で再懸濁し、緊密に適合する乳棒で均質化して10、4にて1000xgで10分間遠心分離した。上清は細胞質画分に回収された。

【0143】

ペレットを、750 μlの、0.5% TRITON-XTMを含む0.57M STEAKMTM中に再懸濁し、4にて1000xgで10分間遠心分離した。上清は膜画分に回収された。

【0144】

ペレットを、300 μlの2.3M STEAKMTM(2.3Mスクロース、25mM KCL、5%MgCl₂、1mM DTT、0.5mM PMSF、500 μlのプロテアーゼ阻害剤および50 μlのホスファターゼ阻害剤)中に再懸濁した。2倍量の0.57M STEAKMTMを加え、ペレットを穏やかに混合した。

【0145】

超遠心管の底に2.7M STEAKMTM(2.7Mスクロース、25mM KCL、5%MgCl₂、1mM DTT、0.5mM PMSF、500 μlのプロテアーゼ阻害剤および50 μlのホスファターゼ阻害剤)の層を作り、その後2.4M STEAKMTM(2.4Mスクロース、25mM KCL、5%MgCl₂、1mM DTT、0.5mM PMSF、500 μlのプロテアーゼ阻害剤および50 μlのホスファターゼ阻害剤)の層を作った。ホモジネート層を加えた。この3層を4にて112,000xgで1時間遠心分離した。2.7M STEAKMTMと2.4M STEAKMTMの間の白い界面は核画分に回収された。5倍量の0.57 STEAKMTMを加え、ペレットを4にて2000xgで20分間遠心分離した。このペレットを、ホスファターゼ阻害剤とプロテアーゼ阻害剤を含むサンプルバッファー中に再懸濁した。

【0146】

免疫プロッティング

感染心筋細胞を、感染の24時間後にSDS変性サンプルバッファー中で回収し、超音波処理して10分間煮沸し、Bradfordアッセイを用いて定量した。乳鉢と乳棒で粉碎した急速冷凍心臓からマウス全心臓溶解物を作製し、その後SDS変性サンプルバッファー中に再懸濁し、超音波処理して10分間煮沸し、Bradfordアッセイを用いて定量した。各サンプルの約50 μgを4~15%勾配ビスアクリルアミドトリスグリシングル(Bis-Acrylamide Tris Glycine gel)上にロードし、PVDFに転写した。プロットを、3%BSA中で1時間ブロックし、プロッキング溶液中に希釈した一次抗体(PIM-1(Cell Signaling Technology)、c-jun(Cell Signaling Technology)、HISTONE3TM(Cell Signaling Technology)、GFP(Molecular Probes)、bcl-2(Santa Cruz)、bcl-XL(Cell Signaling Technology)、ホスホ-BADS112TM(Biosource)、AKT(Cell Signaling Technology)、GAPDH(Research Diagnostics Inc.)、ホスホ-AKTS473TM(Cell Signaling Technology)、全PARP(Biosource)、切断PARP(Biosource)、および切断カスパーゼ3(Cell Signaling Technologies))を用いて、4で一晩プローブした。プロットをTBS-0.5%Tween中で3回洗浄し、プロッキング溶液中に1:5000希釈した蛍光ホスファターゼまたはアルカリホスファターゼ結合二次抗体を用いて室温で1時間プローブし、その後TBS-0.5%Tween中で3回洗浄した。TYPHOON 9410 IMAGERTM(GE Healthcare)を用いてプロットをスキャンし、IMAGEQUANT 5.2TMソフトウェア(GE Healthcare)を用いて定量した。定量は全て、ローディングコントロールに対する標準化に基づく。

【0147】

アデノウイルス構築物

以前に記載のとおりにAKT-nucアデノウイルスおよびAKT野生型アデノウイルスを調製した(参考文献12参照)。PIM-wtアデノウイルスおよびPIM-DNアデノウイルスは、以前に記

10

20

30

40

50

載されたpEGFP-N1 PIM-1プラスミドおよびpEGFP-N1PIM-DNTMプラスミド(参考文献10)から得たNheI/SmaI断片を、pDC3151oTM(Microbix)アデノウイルスシャトルベクター中にサブクローニングすることによって調製した(参考文献32)。配列確認シャトルベクターをゲノムpBHGlo x E1,3Creと共に293iTM細胞(Microbix)中に同時トランスフェクトして、上記のアデノウイルスを作製した。実験で使用するため、精製したブラークを単離して拡張した。

【0148】

免疫組織化学

以前に記載のとおりに心臓を固定して埋め込み、心筋細胞を固定して透過処理した(参考文献12)。10%ウマ血清を含むPBS中に1:25希釈した上記の抗体を用いて、培養新生児ラット心筋細胞の染色を4^oで一晩行った。スライドをPBS中で洗浄し、蛍光結合二次抗体(1:100)を用いて室温で1時間プロープし、テキサスレッドファロイジン(1:50 Molecular Probes)でプロープしてアクチンフィラメントを同定した。スライドをPBS中で3回洗浄し、TOPRO-3TM(1:5000 Molecular Probes)で30分間染色して核を同定し、1回洗浄して、VECTORSHIELDTM(Vectra Labs)を用いてカバースリップした。パラフィン埋め込みサンプルを4 μ mに切断し、標準的な一連のキシレンおよび段階的エタノールステップ(水まで)を通して脱パラフィンした。10mMクエン酸塩(pH6.0)中で抗原回復を行った。PIM-1とホスホ-AKTのシグナルを、両抗体の1:500の一次濃縮液および1:3000の二次濃縮液を含むTYRAMID E AMPLIFICATION KITTM(Perkin Elmer)を用いて増幅した。増幅過程の後にスライドを洗浄し、TOPRO-3(Molecular Probes)で染色して核を同定し、洗浄して、VECTORSHIELDTM(Vectra Labs)でカバースリップした。Leica LCS共焦点顕微鏡上で、染色したスライドの共焦点イメージングを行った。比較のため、各実験においてスライドは全てあらゆる点で等しく処理し、同一の設定を用いてスキャンした。

10

20

20

30

【0149】

アポトーシスのドキソルビシンおよびデオキシグルコース誘導

先に記載のとおり、心筋細胞をGFPウイルス、PIM-wtウイルス、およびPIM-DNウイルスで感染させた。感染の24時間後、細胞を1 μ Mのドキソルビシンまたは1mMのデオキシグルコースで16時間処理し、その後製造者の使用説明書によりIN SITU CELL DEATH DETECTION KITTM、TMR red(Roche Applied Science)を用いてTUNEL用に標識化した。Nikon DIAPHOT 420TM蛍光顕微鏡上で、各処理について感染したTUNEL陽性細胞の数を計数した。

【0150】

心筋梗塞と横断大動脈狭窄

マウスを麻酔下に置き、胸壁を外科的に切開した。急性虚血事象を誘発するため、左下行枝(LAD)の位置を確認し、8-0ナイロン縫合糸を用いて結紮した。圧過負荷を誘発するため、27ゲージの針をガイドとして用いて、大動脈を8-0プロレンで縛った。偽手術(sham)動物を、LADまたは大動脈が結紮されていない点を除いてあらゆる点で等しく処理した。動物心臓を上記のとおりに回収し、パラフィンに埋め込んだ。

【0151】

Ex Vivo虚血/再灌流

以前に記載のとおりにex vivo虚血/再灌流を行った(参考文献34)。各実験群から得た4つの心臓から得た切片を切断し、キットの指示書に従ってTUNEL標識(IN SITU CELL DEATH DETECTION KITTM、TMR red(Roche Applied Science))を用いて細胞死について分析した。

40

【0152】

統計的分析

Student Tテスト、および必要に応じて分散分析(ANOVA)を用いて統計的分析を行った。0.05未満のP値を有意と考えた。

【0153】

実施例1の参考文献:

1. Wang, Z. et al. PIM-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis. *J Vet Sci* 2, 167-79 (2001).
2. Xie, Y. et al. The 44 kDa PIM-1 kinase directly interacts with tyrosine kinase Etk/BMX and protects human prostate cancer cells from apoptosis induced by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* (2005).
3. Bullock, A.N., Debreczeni, J., Amos, A., Knapp, S. & Turk, B.E. Structure and substrate specificity of the PIM-1 kinase. *J. Biol. Chem.*, M510711200 (2005).
4. Palaty, C.K. et al. Identification of the autophosphorylation sites of the *Xenopus laevis* PIM-1 proto-oncogene-encoded protein kinase. *J Biol Chem* 272, 10514-21 (1997).
5. Bachmann, M. & Moroy, T. The serine/threonine kinase PIM-1. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 726-30 (2005).
6. Aho, T.L. et al. PIM-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. *FEBS Lett* 571, 43-9 (2004).
7. Hammerman, P.S., Fox, C.J., Birnbaum, M.J. & Thompson, C.B. PIM and Akt oncogenes are independent regulators of hematopoietic cell growth and survival. *Blood* 105, 4477-83 (2005).
8. Krumenacker, J.S., Narang, V.S., Buckley, D.J. & Buckley, A.R. Prolactin signaling to PIM-1 expression: a role for phosphatidylinositol 3-kinase. *J Neuroimmunol* 113, 249-59 (2001).
9. Krishnan, N., Pan, H., Buckley, D.J. & Buckley, A. Prolactin-regulated PIM-1

10

20

- transcription: identification of critical promoter elements and Akt signaling. *Endocrine* 20, 123-30 (2003).
10. Bhattacharya, N. et al. PIM-1 associates with protein complexes necessary for mitosis. *Chromosoma* 111, 80-95 (2002).
11. Camper-Kirby, D. et al. Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males. *Circ Res* 88, 1020-7 (2001).
12. Shiraishi, I. et al. Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes. *Circ Res* 94, 884-91 (2004).
13. Sugden, P.H. & Clerk, A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med* 76, 725-46 (1998).
14. Izumo, S., Nadal-Ginard, B. & Mahdavi, V. Protooncogene Induction and Reprogramming of Cardiac Gene Expression Produced by Pressure Overload. *PNAS* 85, 339-343 (1988).
15. Katakami, N. et al. Role of PIM-1 in smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* 279, 54742-9 (2004).
16. Hoefnagel, J.J. et al. Distinct types of primary cutaneous large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Blood* (2004).
17. Ionov, Y. et al. PIM-1 protein kinase is nuclear in Burkitt's lymphoma: nuclear localization is necessary for its biologic effects. *Anticancer Res* 23, 167-78 (2003).
18. Lilly, M., Sandholm, J., Cooper, J.J., Koskinen, P.J. & Kraft, A. The PIM-1 serine kinase prolongs survival and inhibits apoptosis-related mitochondrial dysfunction in part through a bcl-2-dependent pathway. *Oncogene* 18, 4022-31 (1999).
19. Macdonald, A. et al. PIM kinases phosphorylate multiple sites on Bad and promote 14-3-3 binding and dissociation from Bcl-XL. *BMC Cell Biol* 7, 1 (2006).
20. Fujiwara, Y. et al. Inhibition of the PI3 kinase/Akt pathway enhances doxorubicin-induced apoptotic cell death in tumor cells in a p53-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 340, 560-6 (2006).
21. Wingett, D., Long, A., Kelleher, D. & Magnuson, N.S. PIM-1 proto-oncogene expression in anti-CD3-mediated T cell activation is associated with protein kinase C activation and is independent of Raf-1. *J Immunol* 156, 549-57 (1996).
22. Rahman, Z., Yoshikawa, H., Nakajima, Y. & Tasaka, K. Down-regulation of PIM-1 and Bcl-2 is accompanied with apoptosis of interleukin-6-depleted mouse B-cell hybridoma 7TD1 cells. *Immunol Lett* 75, 199-208 (2001).
23. Eiken, H.G. et al. Myocardial gene expression of leukaemia inhibitory factor, interleukin-6 and glycoprotein 130 in end-stage human heart failure. *Eur J Clin Invest* 31, 389-97 (2001).
24. Hirota, H. et al. Circulating interleukin-6 family cytokines and their receptors in patients with congestive heart failure. *Heart Vessels* 19, 237-41 (2004).
25. Jougasaki, M. et al. Leukemia inhibitory factor is augmented in the heart in experimental heart failure. *Eur J Heart Fail* 5, 137-45 (2003).
26. Sheng, Z. et al. Cardiotrophin 1 (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. Divergence from downstream CT-1 signals for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 272, 5783-91 (1997).
27. Wollert, K.C. & Chien, K.R. Cardiotrophin-1 and the role of gp130-dependent signaling pathways in cardiac growth and development. *J Mol Med* 75, 492-501 (1997).
28. Sato, T., O'Rourke, B. & Marban, E. Modulation of mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels by protein kinase C. *Circ Res* 83, 110-4 (1998).
29. Sato, T., Saito, T., Saegusa, N. & Nakaya, H. Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation* 111, 198-203 (2005).
30. Philipp, S. et al. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc Res* 70, 308-14 (2006).

31. Pekarsky, Y. et al. *Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3028-33 (2000).
32. Jacobs, M.D. et al. *PIM-1 Ligand-bound Structures Reveal the Mechanism of Serine/Threonine Kinase Inhibition by LY294002*. *J. Biol. Chem.* 280, 13728-13734 (2005).
33. Rota, M. et al. *Nuclear targeting of Akt enhances ventricular function and myocyte contractility*. *Circ Res* 97, 1332-41 (2005).
34. Kato, T. et al. *Atrial natriuretic peptide promotes cardiomyocyte survival by cGMP-dependent nuclear accumulation of zyxin and Akt*. *J Clin Invest* 115, 2716-2730 (2005).

10

【0154】

実施例2:PIM-1のアップレギュレートによる治療効果の実証

この実施例もまた、セリン/トレオニンキナーゼPIM-1をコードする核酸を含む本発明の組成物、および本発明の方法が、細胞増殖を誘導し、低酸素症および細胞アポトーシスから細胞を保護し、またPIM-1キナーゼを発現させて心筋細胞を肥大から保護し、および/または梗塞によって誘導される心筋アポトーシスを抑制し、梗塞サイズを減少させるために有効であることを実証する。

【0155】

比較的最近まで、定説では、心筋細胞はプログラムされた細胞死を受けることはほとんどなく、加齢の影響を受けにくく、再生することができないと考えられていた。ここ10年間の心臓血管研究は、心筋細胞生物学の見識において大きなパラダイムシフトをもたらした。心筋の新たな概念は、生物の一生を通して存続するしっかりと固定された収縮細胞という以前の概念とは懸け離れている。それどころか、心筋細胞は、体内の多くの他の細胞種と同じように、誕生、生存、死、および(さらによく論議されるように)再生の持続する過程によって特徴付けられる有限の寿命を有する。その結果、この新たな展望は、生存および心筋細胞のライフサイクルを調節する分子機構の研究を再び活性化させた(参考文献1)。

20

【0156】

細胞の増殖と生存は、部分的には、タンパク質キナーゼC(PKC)、Akt/PKB、およびPIM-1などのキナーゼの活性化をもたらすシグナル伝達カスケードの作用によって調節される。心臓血管系に関する膨大な研究は、PKCとAkt/PKBがいずれも心筋細胞機能を維持する基本的な柱であると立証した。対照的に、PIM-1の心臓血管での役割、ならびにこのキナーゼが心筋細胞構造および/または機能に及ぼす影響は、実質的に存在しない。この心臓関連の知見の不足にもかかわらず、造血細胞および発癌細胞の公表された研究は、PIM-1媒介性シグナル伝達の影響が、PKCまたはAkt/PKBに帰せられる影響のように顕著で広範囲に及ぶことを示唆している。これらのキナーゼ間の類似性は容易に明らかである:1)標的基質中のセリン/トレオニン残基のリン酸化、2)細胞生存および/または増殖の調節、および3)興味深い核内蓄積の傾向(参考文献2-4)。PIM-1とAkt/PKBとの間には、類似の標的基質特異性、Akt活性化によるPIM-1発現の協調的な調節、PI3-K阻害剤LY294002を用いた処理による活性化の鈍化などのさらなる関連性がある(参考文献5-7)。まとめると、この証拠は、PIM-1を心筋シグナル伝達における重要な役割と関係づけ、また心筋細胞におけるPIM-1発現および機能を実証する裏付けとなる知見が本明細書中に示される。

30

【0157】

PIM-1は、最初は癌原遺伝子として同定され、その後高度に保存されたセリン/トレオニンキナーゼであることが見出された。他のセリン/トレオニンキナーゼ(例えばAkt、MAPK、PKAまたはPKC)と異なり、PIM-1のホスホトランスフェラーゼ活性は、上流キナーゼによっては調節されず、新生翻訳型で活性である。このように、PIM-1活性は、遺伝子転写、mRNA翻訳、およびタンパク質分解の協調制御によって調節される。PIM-1のための標的リン酸化コンセンサス配列は、転写、細胞成長、増殖、および生存を媒介するタンパク質に見られる。PIM-1過剰発現はそれだけでは発癌性は高くないが、変異原に曝されると細胞を

40

50

変形しやすくさせる(参考文献8、9)。一般的に、PIM-1のアップレギュレーションは細胞生存を増強するのに対し、PIM-1の喪失はアポトーシス細胞死を増加させる。ドミナントネガティブキナーゼデッド変異体構築物を用いた実験によって裏付けられるとおり、PIM-1の保護効果はキナーゼ活性に依存する(参考文献10、11)。PIM-1活性が細胞死を増加させるというたま例外は、PIM-1が研究された細胞のバックグラウンドの差異によって生じると考えられる。またPIM-1発現の増加も、細胞の分化(参考文献4、12、13)ならびに増殖(参考文献14、15)を伴う。心筋を用いた研究は、出生後の発達および加齢の間のPIM-1発現における変化を実証し、本発明の研究の基礎を形成する。

【0158】

PIM-1発現は、その多くが心臓保護的シグナル伝達に関連する様々なホルモン、サイトカインおよびマイトジエンによって刺激される(参考文献16、17)。これらの複数の誘導性刺激は、一般に認められた心筋中の生存キナーゼであるAkt/PKBをもたらす。しかし、Akt媒介性効果のPIM-1媒介性シグナル伝達との関連性は見落とされていた。実際、PIM-1の発現はAktの活性化によって増加し(参考文献18)、PI3-K活性を遮断するためにLY294002を用いた研究もまた、不注意でPim-1キナーゼ活性を阻害していた(参考文献5)。PIM-1とAktの明らかな類似点にもかかわらず、これらのキナーゼは、細胞の成長および生存の調節においてはっきりと異なる効果を示す(参考文献6)。PIM-1は、PIM-2およびPIM-3と名付けられた、大きく重複する機能を有する2つの関連ファミリーメンバーと相同性を共有する。PIMファミリーメンバーとAktのシグナルトランスダクションの類似点は、非筋細胞について現在行われている研究の主要な焦点である。

10

20

30

40

【0159】

PIM-1媒介性シグナル伝達の独自の態様は、ノックアウトマウス系を過剰発現アプローチと併用してAktとの重複から解明されるのを待っており、これにより心筋の生存および増殖の調節に関する新たな見識を提供する。造血細胞を用いたこのような研究は、PIMとAktが重複する重要な成分であるが、成長および生存の増強に関する非依存的なシグナル伝達経路であることを明らかにした(参考文献6、7)。PIM-1の欠失または全PIMキナーゼのトリプルノックアウト欠失で操作されたマウス系は、重度の表現型の影響を受けることなく生存可能である(参考文献19)。しかし発明者らは、PIM-1ノックアウトマウス系において、虚血再灌流損傷の後、心臓特異的な影響を見出した。このデータは、心筋症攻撃への応答および心筋症攻撃からの保護におけるPIM-1の役割を実証する。

30

40

【0160】

PIM-1シグナルトランスダクションの原理は、主にこのキナーゼが最初に同定された造血細胞および発癌細胞の研究に基づいている。PIM-1は、STATという頭字語で知られる「転写シグナルトランスデューサーおよび転写活性化因子 (Signal Transducers and Activators of Transcription)」を通じて機能する多数のサイトカインの下流エフェクターである。STAT3とSTAT5はいずれもPIM-1プロモーターに直接結合して発現を誘導する(参考文献20)。PIM-1発現は、Jak/STAT経路のネガティブフィードバックループ調節制御によって、サイトカインシグナル伝達抑制因子 (Suppressors Of Cytokine Signaling、SOCSとしても公知)との相互作用を通じて抑制される(参考文献17)。またPIM-1タンパク質の安定性も、セリン/トレオニンホスファターゼPP2aの作用を通じて低下する(参考文献21)。心筋におけるSTAT、SOCS、およびPP2aシグナル伝達の中心的役割(参考文献22-24)は、PIM-1を、心筋細胞における生物学的効果を媒介する興味深い候補エフェクター分子として意味づける。

50

【0161】

PIM-1キナーゼの標的分子のリストは、毎年新たなメンバーを集め続けており、これらの多くは細胞周期の進行とアポトーシスを調節する。血管平滑筋細胞におけるPIM-1による細胞周期増殖の調節は、心臓血管系でのPIM-1の役割を裏付ける(参考文献14)。この提言に関して、アポトーシス促進性のBadタンパク質をリン酸化によって不活性化させ、Bcl-2の活性を増強するPIM-1の能力(参考文献7、25、26)は、心筋細胞生存シグナル伝達(参考文献27、28)の先の研究を思い出させる。ミトコンドリアの完全性を維持することによ

50

ってアポトーシス細胞死を抑制するPIM-1の能力は、Specific Aim 4において研究されるこの提言の前提である。自食作用によるミトコンドリアおよび他の細胞内オルガネラの除去/再利用は、部分的にはAKT依存性シグナル伝達(以下の参考文献29で概説される)によって調節される。

【0162】

最近の進展は、増殖および生存のシグナル伝達におけるPIMキナーゼの中心的役割を裏付ける。サイトカイン応答性gp130シグナル伝達カスケードは、PIMキナーゼ活性化の直ぐ上流に位置するが(参考文献30、31)、広範囲に及ぶ心臓血管系の研究は、報告されている保護効果に対するPIMの寄与を未だに探求してしていない。さらに、PIM媒介性効果とAkt媒介性効果との交錯は、心臓血管系におけるAktの中心的役割とともに立証されている(参考文献5-7)(以下の参考文献32および33に概説される)が、心筋シグナル伝達におけるPIMキナーゼの寄与は実質的に未知のままである。Specific Aim 3は、心筋におけるAktとPIMの関係を解明するために計画される。結果は、PIMが心筋における増殖および生存の中心的な調節因子であることを示している。

10

【0163】

C. PIM-1は心臓保護的刺激に曝露された心筋細胞中で発現する

PIM-1は、心臓保護的刺激に曝露された心筋細胞中で発現する。Aktとは異なり、PIM-1は構成的に活性であり、タンパク質の産生/分解速度によって調節される。培養細胞ならびに正常心筋の両方において、基底条件下の心筋細胞中で構成的な低レベルのPIM-1産生を検出することができる。発明者らは、新生児ラット心筋細胞を培養し、これらをIGF-1、PMA、デキサメタゾン、LIF、フェニルエフェドリン、エンドセリン1、エストラジオール、およびフォルスコリンで処理した後、PIM-1タンパク質レベルについてアッセイした。2時間を通して、最初の4つの因子はPIM-1の発現を顕著に増加させたが、他の因子では増加はほとんどまたは全く見られなかった。

20

【0164】

図1は、心臓保護的刺激がPIM-1発現を誘導することを示す免疫プロットを示す。前述のとおり、培養新生児ラット心筋細胞を、Pim-1タンパク質レベルを増加させるために様々な因子で処理した。各レーンは、IGF-1、PMA、デキサメタゾン、およびフォルスコリンを含む。IGF-1、PMAおよびデキサメタゾンに応答した誘導は明らかであるが、フォルスコリンは識別可能な効果を有さない。同様に、今回の曝露系(2時間)において、フェニレフリン、エンドセリン1、またはエストラジオールなどの他の刺激は、Pim-1タンパク質発現を顕著に増加させることはなかった。

30

【0165】

心筋細胞において、PIM-1は心筋症損傷に応答して誘導される。冠動脈閉塞または横断大動脈狭窄(TAC)に起因する圧過負荷のいずれかによる梗塞に供されたマウスの心臓における心筋症攻撃の後、処置の4日後に、低レベルのPIM-1発現が顕著に増加する。これに対して、PIM-1は、遺伝子操作マウスモデル(トロポモジュリン過剰発現トランスジェニック(参考文献34))から選択された慢性心不全の心筋細胞の核内に集中する。全ての場合において、PIM-1タンパク質レベルは、偽手術(sham)を受けた対照マウスと比較して上昇している。これらの環境下でのPIM-1の上昇は、恐らく攻撃を受けた心筋内のパラクリンサイトカインシグナル伝達によって媒介されている。

40

【0166】

図2は、生存心筋中で心筋症刺激がPIM-1発現を誘導することを示す共焦点顕微鏡写真を示す。共焦点顕微鏡写真は、偽手術を受けた対照(Sham)と比較した、4日後の圧過負荷(TAC)後の境界域(MI)または近接血管系における梗塞の4日後に誘導される急性心筋損傷に応答したPim-1タンパク質発現の誘導を示す。急性損傷モデルはいずれも核周辺部におけるPim-1の蓄積を示すが、慢性拡張型心筋症の遺伝子操作トランスジェニックモデルは、選択核内のPim-1の蓄積を示す(TOT)。切片を、Pim-1に対する抗体(緑色)、アクチンフィラメントを修飾するファロイシン(赤色)、および核用のTOPRO色素(青色)で標識化した。選択領域の広視野写真(上列)は、細胞の細部を明らかにするためさらに高倍率で示される(下

50

列)。

【0167】

PIM-1シグナル伝達の喪失は、虚血/再灌流損傷後の機能的回復を損なう。参考文献19に記載のとおりに作出される、PIM-1を欠損した、またはPIM-1、2、および3を欠損したトリプルノックアウトの遺伝子操作マウス系は、発明者らのコロニーにおいて確立されている。これらのマウスから得た心臓を、虚血/再灌流損傷を引き起こすex vivo処理に供した(参考文献35)。PIM-ノックアウト系の機能的回復は、齢、血統および性別が一致する対照の心臓と比較して著しく損なわれた。トリプルノックアウト系の血行動態回復は單一アイソフォームPIM-1ノックアウト系の血行動態回復と同等であり、PIM-1アイソフォームが、虚血再灌流攻撃に応答する保護的シグナル伝達を媒介するPIMファミリーの重要なメンバーであることを示していた。

10

【0168】

図3は、虚血/再灌流損傷においてPIM-1が血行動態機能を維持することを示すデータを図示する。以前に記載のとおり、マウス正常(FVB、緑色すなわち上段)ならびにPim-1を欠損した遺伝子操作系(PIM-1 ko、ピンク色すなわち下段)またはPim-1、2、および3を欠損した遺伝子操作系(PIM 1,2,3 ko、青色すなわち中段)から摘出した心臓を虚血再灌流攻撃に供し、機能の血行動態回復を評価した(参考文献32)。Pimノックアウトマウス系は顕著な機能障害を示す(再灌流から1時間過ぎた後の時点でp<0.01)。

20

【0169】

PIM-1発現は、出生後の成長中に発生的に調節される。出生後の発達におけるPIM-1の上昇は、出生後の心臓においてPIM-1が心筋細胞の成長および増殖を促進するという発明者の観察結果と一致している。さらに発明者らは、成体心臓の心臓前駆細胞におけるPIM-1発現が、c-kitおよびSca-1幹細胞マーカーと一致していることも観察した。幹細胞集団におけるPIM-1発現の相関関係は、PIM-1が増殖および生存に関与することを示す造血細胞生物学の観察結果と一致するであろう(参考文献6、19)。

20

【0170】

図4は、PIM-1発現が、出生後の心臓で最も高く、加齢に伴って減少することを示す免疫プロットを示す。免疫プロットは、示される生後週齢におけるPim-1タンパク質発現を示している。データは、1週齢未満、および2、3、4、5、8、12、19および39週齢から得たサンプルを含む。アクチンは、レーン間の同等のタンパク質サンプル濃度を確認するためのローディングコントロールとして示されている。

30

【0171】

PIM-1は、組換えアデノウイルスベクターによって発現される。PIM-1またはドミナントネガティブPIM-1欠損キナーゼ活性の過剰発現は、アデノウイルスベクターの作出によって達成された。発明者らは、抗PIM-1抗体を要さずにその発現を追跡調査するため、GFP蛍光タグを用いてこれらの構築物を操作し、外因性タンパク質発現を直接可視化することを可能とした。これらの構築物は、心筋細胞におけるPIM-1蓄積の影響を理解するために役立った。

【0172】

図5は、組換えアデノウイルスベクターに由来する、心筋細胞におけるPIM-1発現を示す免疫プロットを示す。心筋細胞を、GFPタグした野生型Pim-1の構築物(GFP-Pimwt)またはキナーゼデッド(GFP-PimDN)型(およびGFPのみ)で感染させた(または感染させなかった、「非感染」対照に留意)。GFP融合構築物(~65kDa)の見掛けの移動度は、ネイティブPim-1(約33kDa)と異なる。恐らく代償的機構として、GFP-PimDNの過剰発現によってネイティブPim-1の誘導が引き起こされることに留意されたい。溶解物間の同等のローディングを示すため、GAPDHが示される。

40

【0173】

PIM-1過剰発現は、ドキソルビシンによるアポトーシス攻撃を防御する。TUNEL標識によって測定されるとおり、培養心筋細胞におけるPIM-1の過剰発現は、ドキソルビシンへの曝露に起因するアポトーシスを抑制する。ドキソルビシンによるアポトーシス刺激の前に

50

、新生児ラット心筋細胞培養物を、GFP、PIM-1野生型(PIMwt)、またはPIM-1ドミナントネガティブ(DN)を発現する組換えアデノウイルスで一晩感染させた。図1について、非感染細胞(NI)またはGFP-発現細胞はドキソルビシン処理後に同等のTUNEL標識を示すが、PIMwt発現細胞はTUNEL陽性核の顕著な減少を示す($p<0.05$)。DN構築物を発現する細胞はTUNEL標識の増強を示す。対照的に、変異型キナーゼデッドPIM-1構築物は、PIM-1野生型より低いタンパク質レベルで蓄積するが、GFPを発現する対照細胞と比較してアポトーシスを顕著に増加させる。

【0174】

図6と図7は、心筋細胞中でPIM-1がアポトーシスを抑制する方法を示す。ドキソルビシンによるアポトーシス刺激の前に、新生児ラット心筋細胞培養物を、GFP、Pim-1野生型(Pimwt)、またはPIM-1ドミナントネガティブ(DN)を発現する組換えアデノウイルスで一晩感染させた。図6に図で要約されるとおり、非感染細胞(NI)またはGFP発現細胞はドキソルビシン処理後に同等のTUNEL標識を示すが、Pimwt発現細胞はTUNEL陽性核の顕著な減少を示す($p<0.05$)。図7は、DN構築物を発現する細胞が、TUNEL標識の増強を示すことを示す顕微鏡写真を示す。図6は定量的結果を示すが、図7のパネルは、GFPのみ、GFP-Pim-wtおよびGFP-Pim-DNのサンプル中でファロイジン(赤)によって明らかにされるアクチンフィラメントと共にGFP蛍光(緑色)オーバーレイを示す感染心筋細胞の代表的領域を示す。

10

【0175】

PIM-1過剰発現は、Bcl-2ファミリーメンバーならびにMdm2を含むカスケードを介した抗アポトーシスシグナル伝達を促進する。図8Aに示されるとおり、PIM-1の過剰発現は、いずれもミトコンドリアの完全性を維持することによって内因性アポトーシスシグナル伝達に拮抗するBcl-2ファミリーメンバーおよびBcl-XLファミリーメンバーの蓄積を増加させる。PIM-1によって誘導される生存を促進させるさらなるシグナル伝達は、Mdm2の蓄積とBadのリン酸化を包含する。Mdm2はp53依存性細胞死に拮抗し(参考文献36)、またBadのリン酸化は、このタンパク質のアポトーシス促進作用を抑制する(参考文献26)。このように、PIM-1は、Bcl-2ファミリーメンバーの抗アポトーシス作用を促進し、またMdm2を増強することによって細胞生存に影響を与える。

20

【0176】

PIM-1発現は、活性化Aktの核蓄積によって誘導される。AktキナーゼによるPIM-1プロモーター活性の誘導は、PIM-1発現がAkt活性化の下流に位置することを示す(参考文献18)。この観察結果は、現在は、核標的AKTを発現するトランスジェニックマウス心臓(図8Bに示されるとおり)ならびに核標的AKTを発現するアデノウイルスベクターで感染させた培養心筋細胞の両方で確認されている。

30

【0177】

手短に言えば、図8Aおよび8Bは、心筋においてAktの核蓄積がPim-1キナーゼの発現を誘導することを示す。6月齢の正常マウス(NTG)および心臓特異的核標的AKTを発現するトランスジェニックマウスから得た切片の免疫プロット(図8A)および共焦点顕微鏡検査(図8B)(参考文献38)。スキャン画像中の、分かれたグレースケール画像は、それぞれ緑色、赤色、および青色のオーバーレイ色に相当するpim-1、アクチン、および核に対応する。

40

【0178】

Aktの核蓄積は、免疫蛍光分析ならびに免疫プロット分析のいずれによっても検出し得るPIM-1発現の増加を促進する。この結果は、Akt活性化の抑制がPIM-1レベルの低下もたらすと考えられるため、心筋における生存シグナル伝達について意味深い。さらに、Aktの抑制に伝統的に用いられてきたLY294002による薬理学的処理もまた、Pim-1キナーゼ活性を抑制する(参考文献5)。これらの知見は、以前はAkt活性化に帰せられていた保護効果が、部分的には、PIM-1キナーゼの作用に起因し得るという強力な状況証拠を提供する。今まで心筋シグナル伝達におけるPIM-1の役割は見落とされていたため、細胞の生存および成長に関連する心臓Akt生物学の重要な側面は、再評価する必要がある。

【0179】

図9は、Aktの核蓄積がPIM-1発現を誘導することを示す。図9(A)は、myc-tag抗体(Tag)

50

で検出される核標的 - ガラクトシダーゼ(B-gal)、Akt野生型(Akt wt)、または核標的AKT(Akt-nuc)を発現するアデノウイルスに感染した培養心筋細胞の共焦点顕微鏡検査を示す。アデノウイルスによってコードされるタンパク質は、オーバーレイ中で緑色である。核標的AKTはPim-1の核内蓄積を促進する(オーバーレイ中に青色で示される)。ファロイジンはアクチンフィラメントを示す(オーバーレイ中で赤色)。図9(B)は、核標的AKT(Akt-nuc)をコードするアデノウイルスに感染した心筋細胞におけるPIM-1発現の増加を示す免疫プロットプロットを示す。GAPDHは、サンプル間の同等のローディングを示すために示される。

【0180】

PIM-1活性の喪失は、Aktの代償的上昇をもたらす。以前に実証された、機能的効果および機能的クロストークに関するPIM-1とAktの重複は、心筋生物学におけるPIM-1キナーゼの役割を決定するためのさらなる研究を必要とする。野生型またはドミナントネガティブ型のいずれかのPIM-1を発現するアデノウイルスを用いた実験は、PIM-1シグナル伝達の喪失が、Aktタンパク質の発現および活性の上昇をもたらすことを示す。同様に、PIM-1ノックアウト系の免疫プロット評価は、ホスホAkt⁴⁷³ならびに全Aktのタンパク質のレベルの増加を示す(データなし)。このAkt発現の誘導の理由は、下流のPIM-1活性の喪失を埋め合わせるための代償的シグナル伝達にあり得る。図10に示されるとおり、ドミナントネガティブPIM-1は細胞死を増強し得るため、発明者らのデータは、PIM-1がAktカスケードにおいて生存シグナル伝達の特定の側面を媒介するという結論と一致する。

【0181】

手短に言えば、図10は、心筋細胞において、ドミナントネガティブPIM-1の発現がAkt蓄積を促進することを示す免疫プロットプロットを示す。免疫プロットは、野生型(wt)またはドミナントネガティブ(DN)型のいずれかのPIM-1を発現するアデノウイルスによる新生児ラット心筋細胞の感染を示す。ホスホAkt⁴⁷³ならびに全Aktのタンパク質のレベルは、DN Pim-1を発現する細胞から調製した溶解物中で上昇する。2つの別々の一連の実験結果は、非感染細胞の対照(NI)、GFP発現細胞(GFP)、およびサンプル間のタンパク質ローディングのばらつきを標準化するためのGAPDHローディングコントロールによって示される。

【0182】

図11は、PIM-1トランスジェニックマウスの創始系統およびタンパク質発現を特徴づけるデータを示す。ゲノムDNAサンプルのPCR(図11左)および心臓溶解物の免疫プロット(図11右)。心臓特異的Pim-1野生型(wt)ならびにドミナントネガティブ(DN)導入遺伝子の垂直感染の確認は、F1世代から得たサンプル中で確認された。Pim-1 wtトランスジェニック系から得た心臓溶解物の免疫プロットは、約60kDaに一致する移動度を有するPim-1とGFPの蓄積を示し(GFPタグを有するPim-1による)、これらの6週齢マウスの心臓における実質的な導入遺伝子発現を示す。GAPDHは、レーン間の同等のサンプルのローディングを示すために示される。

【0183】

実施例2で引用された参考文献：

- 1) Sussman MA and Anversa P. Myocardial aging and senescence: where have the stem cells gone? *Ann. Rev. Physiol.* 2004; 66: 29-48.
- 2) Bachmann M and Moroy T. The serine/threonine kinase PIM-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37: 726-730.
- 3) Neri LM, Borgatti P, Capitani S, Martelli AM. The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1584:73-80.

- 4) Wang Z, Bhattacharya N, Weaver M, Petersen K, Meyer M, Gapter L and Magnuson NS. PIM-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation, and tumorigenesis. *J Vet Sci.* 2001; 2: 167-179.
- 5) Jacobs MD, Black J, Futer O, Swenson L, Hare B, Fleming M and Saxena K. PIM-1 ligand-bound structures reveal the mechanism of serine/threonine kinase inhibition by LY294002. *J Biol Chem.* 2005; 280: 13728-13734.
- 6) Hammerman PS, Fox CJ, Birnbaum MJ, Thompson CB. PIM and Akt oncogenes are independent regulators of hematopoietic cell growth and survival. *Blood.* 2005; 105:4477-83.
- 7) Fox CJ, Hammermann, Cinalli RM, Master SR, Chodosh LA and Thompson CB. The serine/threonine kinase PIM-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor. *Genes & Dev.* 2003; 17: 1841-1854. 10
- 8) Bachmann M, Hennemann H, Xing PX, Hoffmann I and Moroy T. The oncogenic serine/threonine kinase PIM-1 phosphorylates and inhibits the activity of Cdc25C-associated kinase 1 (C-TAK1). *J Biol Chem.* 2004; 279: 48319-48328.
- 9) Roh M, Gary B, Song C, Said-Al-Naief N, Tousson A, Kraft, Eltoun I-E and Abdulkadir SA. Overexpression of the oncogenic kinase PIM-1 leads to genomic instability. *Cancer Res.* 2003; 63: 8079-8084.
- 10) Lilly M, Sandholm J, Cooper JJ, Kosikinen PJ and Kraft A. The PIM-1 serine kinase prolongs survival and inhibits apoptosis-related mitochondrial dysfunction in part through a bcl-2-dependent pathway. *Oncogene* 1999; 18: 4022-4031. 20
- 11) Kim KT, Baird K, Ahn JY, Meltzer P, Lilly M, Levis M and Small D. PIM-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated survival. *Blood* 2005; 105: 1759-1767.
- 12) Zippo A, De Robertis A, Bardelli M, Galvagni F, Oliviero S. Identification of Flk-1 target genes in vasculogenesis: PIM-1 is required for endothelial and mural cell differentiation in vitro. *Blood.* 2004; 103:4536-44.
- 13) Aho TL, Lund RJ, Ylikoski EK, Matikainen S, Lahesmaa R, Koskinen PJ. Expression of human PIM family genes is selectively up-regulated by cytokines promoting T helper type 1, but not T helper type 2, cell differentiation. *Immunology.* 2005; 116: 82-8.
- 14) Katakami N, Kaneto H, Hao H, Umayahara Y, Fujitani Y, Sakamoto K, Gorogawa, S, Yasuda T, Kawamori D, Kajimoto Y, Matsuhisa M, Yutani C, Hori M and Yamasaki Y. Role of PIM-1 in smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem.* 2004; 279: 54742-54749. 30
- 15) Bhattacharya N, Wang Z, Davitt C, McKenzie IFC, Xing P-X and Magnuson NS. PIM-1 associates with protein complexes necessary for mitosis. *Chromosoma* 2002; 111: 80-95.
- 16) White E. The PIMs and outs of survival signaling: role for the PIM-1 protein kinase in the suppression of apoptosis by cytokines. *Gene & Dev.* 2003; 17: 1813-1816.
- 17) Chen XP, Losman JA, Cowan S, Donahue E, Fay, S, Vuong BQ, Nawjin MC, Capece D, Cohan VL and Rothman P. PIM serine/threonine kinases regulate the stability of Socs-1 protein. *Proc Nat Acad Sci.* 2002; 99: 2175-2180.
- 18) Krishnan N, Pan H, Buckley DJ, Buckley A. Prolactin-regulated PIM-1 transcription: identification of critical promoter elements and Akt signaling. *Endocrine* 2003; 20:123-30. 40

- 19) Mikkers H, Nawijn M, Allen J, Brouwers C, Verhoeven E, Jonkers J and Berns A. Mice deficient for all PIM kinases display reduced body size and impaired responses to hematopoietic growth factors. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 6104-6115.
- 20) Losman JA, Chen XP, Vuong BQ, Fay S, Rothman PB. Protein phosphatase 2A regulates the stability of PIM protein kinases. *J Biol Chem.* 2003; 278: 4800-4805.
- 21) Peltola KJ, Paukku K, Aho TLT, Ruuska M, Silvennoinen O and Koskinen PJ. PIM-1 kinase inhibits STAT-5-dependent transcription via its interactions with SOCS1 and SOCS3. *Blood.* 2004; 103: 3744-3750.
- 22) Kunisada K, Négoro S, Tone E, Funamoto M, Osugi T, Yamada S, Okabe M, Kishimoto T and Yamauchi-Takahara K. Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 315-9. 10
- 23) Yasukawa H, Yajima T, Duplain H, Iwatate M, Kido M, Hoshijima M, Weitzman MD, Nakamura T, Woodard S, Xiong D, Yoshimura A, Chien KR, Knowlton KU. The suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) is a novel therapeutic target for enterovirus-induced cardiac injury. *J Clin Invest.* 2003; 111: 469-78.
- 24) Brewis N, Ohst K, Fields K, Rapacciuolo A, Chou D, Bloor C, Dillmann W, Rockman H, Walter G. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a mutant A subunit of protein phosphatase 2A. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279: H1307-18.
- 25) Yan B, Zemskova M, Holder S, Chin V, Kraft A, Koskinen PJ and Lilly M. The PIM-2 kinase phosphorylates BAD on Serine 112 and reverses BAD-induced cell death. *J Biol Chem.* 2003; 278: 45358-45367. 20
- 26) Aho TLT, Sandholm J, Peltola KJ, Mankonen HP, Lilly M and Koskinen PJ. PIM-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. *FEBS Lett.* 2004; 571: 43-49.
- 27) Uchiyama T, Engelman RM, Maulik N, Das DK. Role of Akt signaling in mitochondrial survival pathway triggered by hypoxic preconditioning. *Circulation.* 2004; 109: 3042-3049.
- 28) Kato K, Yin H, Agata J, Yoshida H, Chao L, Chao J. Adrenomedullin gene delivery attenuates myocardial infarction and apoptosis after ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285: H1506-14. 30
- 29) Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6: 439-48.
- 30) Shirogane T, Fukada T, Muller JM, Shima DT, Hibi M, Hirano T. Synergistic roles for PIM-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity* 1999; 11: 709-19.
- 31) Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 2000; 19: 2548-56.
- 32) Matsui T and Rosenzweig A. Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt. *J Mol Cell Cardiol.* 2005; 38: 63-71. 40
- 33) Latronico MV, Costinean S, Lavitrano ML, Peschle C, Condorelli G. Regulation of cell size and contractile function by AKT in cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1015: 250-60.

- 34) Sussman MA, Welch S, Cambon N, Klevitsky R, Hewett T, Price RL, Witt SA and Kimball TR. Myofibril degeneration caused by tropomodulin overexpression in juvenile mice leads to dilated cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 1998; 101, 51-61.
- 35) Morrison LE, Whittaker RJ, Klepper RE, Wawrousek EF, Glembotski CC. Roles for alphaB-crystallin and HSPB2 in protecting the myocardium from ischemia-reperfusion-induced damage in a KO mouse model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286: H847-55.
- 36) Yang Y, Li CC, Weissman AM. Regulating the p53 system through ubiquitination. *Oncogene.* 2004; 23: 2096-106.
- 37) Shioi T, McMullen JR, Kang PM, Douglas PS, Obata T, Franke TF, Cantley LC, Izumo S. Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 2799-2809. 10
- 38) Matsui T, Li L, Wu JC, Cook SA, Nagoshi T, Picard MH, Liao R, Rosenzweig A. Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *J Biol Chem.* 2002; 277: 22896-22901.
- 39) Condorelli G, Drusco A, Stassi G, Bellacosa A, Roncarati R, Iaccarino G, Russo MA, Gu Y, Dalton N, Chung C, Latronico MV, Napoli C, Sadoshima J, Croce CM, Ross J, Jr. Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 12333-12338.
- 40) Shiojima I, Yefremashvili M, Luo Z, Kureishi Y, Takahashi A, Tao J, Rosenzweig A, Kahn CR, Abel ED, Walsh K. Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *J Biol Chem.* 2002; 277: 37670-37677. 20
- 41) Shiraishi I, Melendez J, Ahn Y, Welch S, Schaefer E, Walsh K, Rosenzweig A, Kajstura J, Leri A, Anversa P and Sussman MA. Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes. *Circ Res.* 2004; 94: 884-891.
- 42) Camper-Kirby D, Welch S, Walker A, Setchell KDR, Schaefer E, Kajstura J, Anversa P and Sussman MA. Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males. *Circ. Res.* 2001; 88: 1020-1027.
- 43) Welch S, Plank D, Witt S, Glascock B, Chimenti S, Andreoli AM, Limana F, Leri A, Kajstura J, Anversa P and Sussman MA. Cardiac-specific IGF-1 expression attenuates dilated cardiomyopathy in Tropomodulin Overexpressing Transgenic mice. *Circ Res.* 2002; 90: 649-656. 30
- 44) Kato T, Muraski J, Chen Y, Tsujita Y, Wall J, Glembotski CC, Schaefer E, Beckerle M and Sussman MA. Atrial natriuretic peptide promotes cardiomyocyte survival by cGMP-dependent nuclear accumulation of zyxin and Akt. *J Clin Invest* 2005; in press.
- 45) Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest.* 2004; 114: 1299-1307.
- 46) Peng XD, Xu PZ, Chen ML, Hahn-Windgassen A, Skeen J, Jacobs J, Sundararajan D, Chen WS, Crawford SE, Coleman KG, Hay N. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev.* 2003; 17: 1352-1365.
- 47) Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem.* 2001; 276: 38349-52. 40

- 48) Grunweller A, Gillen C, Erdmann VA and Kurreck J. Cellular uptake and localization of a Cy-3-labeled siRNA specific for the serine/threonine kinase PIM-1. *Oligonucleotides*. 2003; 13: 345-352.
- 49) Sussman MA, Welch S, Gude N, Khoury PR, Daniels SR, Kirkpatrick D, Walsh RA, Price RL, Lim HW and Molkentin JD. Pathogenesis of dilated cardiomyopathy: molecular, structural, and population analyses in Tropomodulin Overexpressing Transgenics. *Am. J. Pathol.* 2005; 155: 2101-2113.
- 50) Tsujita Y, Kato T and Sussman MA. Evaluation of Left Ventricular Function in Cardiomyopathic Mice by Tissue Doppler and Color M-mode Doppler Echocardiography. *Echocardiography* 2005; 22: 245-253.
- 51) Sussman MA, Welch S, Cambon N, Klevitsky R, Hewett T, Price RL, Witt SA and Kimball TR. Myofibril degeneration caused by tropomodulin overexpression in juvenile mice leads to dilated cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 1998, 101, 51-61.
- 52) Sanbe A, Gulick J, Hanks MC, Liang Q, Osinska H, and Robbins J. Reengineering inducible cardiac-specific transgenesis with an attenuated myosin heavy chain promoter. *Circ Res.* 2003; 92: 609-616.
- 53) Sohal DS, Nghiem M, Crackower MA, Witt SA, Kimball TR, Tymitz KM, Penninger JM, and Molkentin JD. Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ Res.* 2001; 89: 20-25.
- 54) Schiekofer S, Shiojima I, Sato K and Walsh K. Microarray cDNA profiles of acute and chronic Akt1 activation in transgenic mouse hearts reveal gene expression profiles associated with compensatory hypertrophy and failure. *Circulation* 2003; 108 (supplement); IV-77.
- 55) Jin ZQ, Goetzl EJ and Karliner JS. Sphingosine kinase activation mediates ischemic preconditioning in murine heart. *Circulation* 110 2004; 110: 1980-1989.
- 56) Karliner JS, Honbo N, Summers K, Gray MO and Goetzl EL. The lysophospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid enhance survival dueing hypoxia in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2001; 33: 1713-1717.
- 57) Karliner JS. Mechanisms of cardioprotection by lysophospholipids. *J Cell Biochem* 2004; 92: 1095-1103.
- 58) Liang Q, Wiese RJ, Bueno OF, Dai YS, Markham BE, Molkentin JD. The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol.* 2001; 21: 7460-7469.
- 59) Gao T, Furnari F, Newton AC. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell.* 2005; 18:13-24.
- 60) Wang Z, Bhattacharya N, Mixter PF, Wei W, Sedivy J, Magnuson NS. Phosphorylation of the cell cycle inhibitor p21Cip1/WAF1 by PIM-1 kinase. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1593: 45-55.
- 61) Gottlieb RA, Gruol DL, Zhu JY, Engler RL. Preconditioning rabbit cardiomyocytes: role of pH, vacuolar proton ATPase, and apoptosis. *J Clin Invest.* 1996; 97:2391-2398.
- 62) Karwatowska-Prokopczuk E, Nordberg JA, Li HL, Engler RL, Gottlieb RA. Effect of vacuolar proton ATPase on pH_i, Ca²⁺, and apoptosis in neonatal cardiomyocytes during metabolic inhibition/recovery. *Circ Res.* 1998; 82: 1139-44.

10

20

30

40

- 63) Plank DM, Sussman MA. Impaired intracellular Ca^{2+} dynamics in live cardiomyocytes revealed by rapid line scan confocal microscopy. *Microsc Microanal*. 2005; 11: 235-43.
- 64) Plank DM, Yatani A, Ritsu H, Witt S, Glascock B, Lalli MJ, Periasamy M, Fiset C, Benkusky N, Valdivia HH, Sussman MA. Calcium dynamics in the failing heart: restoration by beta-adrenergic receptor blockade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285: H305-15.
- 65) Zorov BZ, Filburn CR, Klotz L-O, Zwier JL and Sollott SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med*. 2000; 192: 1001-1014. 10
- 66) Sayen MR, Gustafsson AB, Sussman MA, Molkentin JD and Gottlieb RA. Calcineurin transgenic mice have mitochondrial dysfunction and elevated superoxide production. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285: C1001-C1010.
- 67) Clarke SJ, McStay GP and Halestrap AP. Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem*. 2002; 277: 34793-34799.
- 68) Yuan H, Williams SD, Adachi S, Oltersdorf T and Gottlieb RA. Cytochrome c dissociation and release from mitochondria by truncated Bid and ceramide. *Mitochondrion* 2003; 2: 237-244. 20
- 69) Gustafsson AB, Tsai JG, Logue SE, Crow MT and Gottlieb RA. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain protects against cell death by interfering with Bax activation. *J Biol Chem*. 2004; 279: 21233-21338.

【 0 1 8 4 】

実施例3：Pim-1キナーゼは心筋肥大面に拮抗し、病理学的圧過負荷を代償する

以下のデータは、Pim-1キナーゼが心筋においてAKTの下流で強力な心臓保護効果を与えること、またPIM-1が心臓肥大に関与することを示す。トランスジェニックマウスにおいて、Pim-1(Pim-wt)またはPim-1のドミナントネガティブ変異型(Pim-DN)の心臓特異的発現を、これらのPim-1構築物のアデノウイルス媒介性過剰発現と共に用いて、肥大におけるPim-1の役割を明らかにした。Pim-1のトランスジェニック過剰発現は、攻撃後の血行動態機能の改善、アポトーシスの低下、抗肥大性タンパク質の増加、筋細胞サイズの縮小、肥大性シグナル伝達の抑制によって証明されるとおり、野生型対照と比較してマウスを圧過負荷誘発性肥大から保護する。同様に、新生児ラット心筋細胞培養物におけるPim-1の過剰発現は、エンドセリン1によって誘発される肥大を抑制する。細胞レベルでは、肥大性攻撃の後に、Pim-wtマウスの心臓が、野生型対照と比較して、筋細胞へのBrdUの組み込みの強化ならびに過形成の表現型を示す。これに対して、Pim-DNのトランスジェニック過剰発現は、アポトーシスの増加、線維症の増加および心臓機能の大幅な低下によって特徴付けられる拡張型心筋症を引き起こす。さらに、Pim-DNの過剰発現は、単離された筋細胞における Ca^{2+} 過渡電流の振幅の低下および細胞短縮のパーセントの減少によって証明されるとおり、収縮性の低下をもたらす。これらのデータは、分子、細胞、および器官レベルでの衝撃応答による肥大の調節におけるPim-1の中心的役割を裏付ける。 30 40

【 0 1 8 5 】

心臓特異的Pim-1遺伝子組換え

ヒトPIM-1の野生型(Pim-wt)およびドミナントネガティブタンパク質として機能するキナーゼデッド変異型(Pim-DN)（参考文献16）を、心臓特異的ミオシン重鎖プロモーターの制御下でGFPに融合させた。これらの構築物を用いて作出したマウス系のPCRは、導入遺伝子のゲノムへの組み込みを示す。トランスジェニックサンプルから得た全心臓溶解物の免 50

疫プロットは、Pim-1抗体とGFP抗体の両方によって認識される64kDaのGFP-Pim-1融合タンパク質を明らかにした。GATA-1転写を活性化させるPim-1の能力を利用して、Pim-DN構築物の正真正銘の抑制性機能が立証された(Magnuson、未公開データ)。C2C12筋芽細胞において、Pim-wtは転写因子GATA-1をリン酸化し、GATA-1ルシフェラーゼレポーター発現を誘導して、同時にGATA-1活性を抑制するPim-DNの滴定を増加させる。Pim-1がp21をリン酸化することを示した以前の研究(参考文献29)に基づき、GFP-Pim-1-wt、GFP-Pim-1-DNトランスジェニックマウスおよび非トランスジェニック(NTG)マウスから調製した全心臓溶解物を用いて、in-vitroキナーゼアッセイで発明者らのPim-wt構築物の活性を確認した。全心臓溶解物からGFP-Pim-1タンパク質(wtまたはKD)を免疫沈降させ、[-32P]ATPの存在下で、基質としてのGST-p21と共にインキュベートした。サンプルをSDS-PAGE上で解像し、³²P標識されたタンパク質をオートラジオグラフィーによって検出した。Pim-wt過剰発現はp21をリン酸化するが、この活性はPim-DN構築物中では消失した。

10

20

30

40

50

【0186】

Pim-1不活性化は心筋細胞アポトーシスと線維症を増加させる

Pim-1の遺伝子欠失を用いて作出したマウス(Pim-1 KO)から得た心臓は、NTG(非トランスジェニック)対照と比較して、筋細胞中のアポトーシスの増加を示すが、明らかな心筋症再構築の証拠は示さない(参考文献12)。これに対して、Pim-DN過剰発現マウスは、3~4月齢で始まる進行性の壁菲薄化によって特徴付けられる心筋症を患う。図12は、野生型NTGマウスの特徴を、活性PIM-1欠損マウスの特徴と比較する。図12aでは、長時間にわたる後壁径の心エコー測定が、PIM-DNマウスが進行性の菲薄化を有することを示す。これは図12bの前壁径にも見られる。図12cに示されるとおり、PIM-DNマウスでは、生後10週と22週における心臓：体重の比も顕著に増加する。In vitroでPim-DN過剰発現は心筋細胞アポトーシスを誘導する(参考文献12)ため、Pim-DN動物の心筋中のアポトーシス筋細胞の評価は、TUNEL染色によって行った。Pim-DN動物は、齢が一致する対照と比較して、mm²当たりのアポトーシス心筋細胞の2倍の増加を示し(図12d、それぞれ1.2/mm²および2.4/mm²、**p<0.01)左心室において線維症およびコラーゲン沈着の増加をもたらす。さらに、Pim-DN動物において壊死の量を定量し(**p<.01)、基底レベルで顕著に増加していることを見出した。

20

30

40

50

【0187】

手短に言えば、図12は、心筋におけるPim-1の不活性化が、アポトーシスと線維症を増加させることを示すデータを図示する。図12aと図12bは、2週間間隔で測定した、NTG動物(n=5)およびPim-DN動物(n=7)の後壁径(12a)および前壁径(12b)(それぞれPWDおよびAWD)の心エコー測定を図示する(*p<0.05、**p<0.01)。図12cは、10週齢と22週齢のNTG動物およびPim-DN動物(n=6、**p<0.01)の、心臓重量の体重に対する比を図示する。図12dは、17~22週齢のNTGおよびPim-DNトランスジェニック(n=3、**p<0.01)における、mm²当たりのTUNEL陽性筋細胞の数を表すヒストグラムデータを図示する。

30

40

【0188】

Pim-DN心臓は心臓機能の低下を示す

心エコー分析により、Pim-DNマウスの心臓は、17週齢(*p<0.05)から27週齢(*p<0.05、**p<0.01)まで、付随する短縮率および駆出率の低下(それぞれ36.6%および74.2%)を伴う進行性拡張を示す。NTGとPim-DNの両方の心臓上で行った形態計測分析は、Pim-DNの心臓が顕著に拡張したことをさらに裏付けた。In vivo血行動態評価は、±dP/dtの低下、左心室拡張終期圧(LVEDP)の増大、および左心室発生圧(LVDP)の低下を伴って血行動態が損なわれたことを実証した。機構的に、Pim-DN筋細胞は、NTG筋細胞に対して、細胞短縮パーセントの低下を伴うCa²⁺過渡電流の振幅の低下を示した。さらに、Ca²⁺過渡電流減衰の時定数()は、Pim-DN筋細胞においてより大きかった。これらの結果は、Pim-DN筋細胞の収縮機能の低下が、少なくとも部分的には、筋小胞体からのCa²⁺放出の減少と再取り込みの減速によって媒介されることを示す。このように、心筋におけるPim-DNによるPim-1の不活性化は、心臓機能にネガティブな影響を与える。

50

【0189】

In vitroでPIM-1の過剰発現は肥大を抑制する

損傷した心筋におけるPim-1の誘導は、心筋細胞中で起こる保護的生存応答（参考文献12）（例えばPim-1が心房性ナトリウム利尿ペプチドを発現する細胞に共局在化している梗塞境界域における保護的生存応答）であると考えられる。心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）は、抗肥大性および心臓保護性のいずれでもある（参考文献24）ため、これらのタンパク質の一致は、肥大性シグナル伝達の緩和においてPim-1蓄積が果たす役割の評価を促す。

【0190】

最初に、EGFP-Pim-wtまたはEGFPタンパク質をコードするアデノウイルスで感染させた新生児ラット心筋細胞（NRCM）を用いて、Pim-wt過剰発現が心筋細胞肥大に及ぼす影響を検証し、その後エンドセリン1（ET-1）を用いて24時間刺激した。図13は、エンドセリン1で処理した、また未処理の、非感染の対照、EGFP、およびPim-wt感染新生児ラット心筋細胞培養物から得た個々の細胞表面積の測定を示す。図13に示されるように、細胞表面積測定によって評価されるとおり、Pim-wt過剰発現は、ET-1で処理した対照とEGFP感染筋細胞に見られる細胞サイズの増加と比較して、ET-1誘発性肥大を抑制する（*p<0.05、**p<0.01）。未処理の培養物の肥大特性の分子プロファイリングは、Pim-wt発現が、EGFP感染対照と比較して、心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）のmRNAレベルを60.6%低下させ、またB型ナトリウム利尿ペプチド（BNP）のmRNAレベルを39.8%低下させるが、骨格アクチンのレベルは89%増加させることを示す。しかし、ET-1で処理すると、Pim-wt培養物は、ET-1処理したEGFP対照に対してANPレベルの2.5倍の増加とミオシン重鎖レベルの10.2倍の低下を示す。残念なことに、Pim-DNタンパク質を過剰発現する培養心筋細胞は、高レベルのTUNEL陽性細胞によって証明されるとおり、感染およびET-1を用いた処理に必要な時間経過の後に生存率の低下を示す。Pim-DNタンパク質を過剰発現する心筋細胞をかき集め始めてプレートから外すと、これらの形態は大きく変化し、これによって細胞サイズの正確な評価を妨げる（参考文献12）。しかし、Pim-DNが肥大に及ぼす影響は、特異的Pim-1活性阻害剤であるクエルセタゲチンを用いて見ることができる。PIM-1を発現するNRCM培養物を、ET-1とのインキュベーションおよび細胞サイズ評価の48時間前に、10nMのクエルセタゲチンを用いて、あるいは用いずに1時間処理した。クエルセタゲチンとET-1で処理した細胞は、Pim-1活性が阻害剤によって鈍化されていないET-1刺激された細胞と比較して、著しく大きな表面を有していた。まとめると、これらの結果は、この細胞培養系における通常の生理学的誘導をはるかに上回るレベルではあるが、Pim-1が過剰発現される場合の抗肥大的役割を裏付ける。

【0191】

手短に言えば、図13は、Pim-1過剰発現が、エンドセリン1誘発性肥大から心筋細胞を保護することを示すデータを図示する。エンドセリン1（ET-1）で処理した、また未処理の、非感染の対照、EGFP、およびPim-wt感染新生児ラット心筋細胞培養物から得た個々の細胞表面積の測定（n=4、*p<0.05、**p<0.01）。

【0192】

Pim-1過剰発現は圧過負荷肥大によって誘導される再構築を抑制する

In vivoでPim-1過剰発現が肥大に及ぼす影響を、圧過負荷を誘導するための横断大動脈狭窄（TAC）に供したPim-wtマウスを用いて、齢と性別が一致するNTG対照と比較して評価した。図14a～14fについて、NTGおよびPim-wt shamおよびTAC結紮の心臓の、前壁径（AWD、14d、14a）、後壁径（PWD、14d、14b）、拡張終期径（EDD、c）、収縮末期径（ESD、14d）、短縮率パーセント（FS、14e）、および駆出率（EF、14f）についての週1回の心エコー評価を表す折れ線グラフを作成した（NTG sham n=6、Pim-wt sham n=6、NTG TAC n=9、Pim-wt TAC n=9；*p<0.05、**p<0.01）（図14a～14b、*p<0.05、**p<0.01）。

【0193】

結果は、対照NTG心臓のTACが、前壁および後壁の肥厚によって証明されるとおり、攻撃の2週間後に再構築を引き起こすことを示す。これに対し、Pim-wt動物は、攻撃の14週間後まで壁厚の顕著な増加を示さない（図14a～14b）。同様に、NTG対照は、結紮後8週間以内

10

20

30

40

50

に拡張終期径(EDD)で測定される左心室腔拡大を示し、また収縮末期径(ESD)は4週間以内にしく増加する。同じ期間を通して、Pim-wtトランスジェニックにおいてはEDDまたはESDパラメーターはいずれも顕著な変化を示さない(図14c～14d、**p<0.01 vs. 偽手術(sham)、\$p<0.01 vs. Pim-wt TAC)。さらに、攻撃後、NTG対照は短縮率(FS)および駆出率の両方の著しい低下を示すが、Pim-wtの心臓では心筋機能が維持される(図14e～14f；**p<0.01 vs. Pim-wt TAC)。興味深いことに、NTG動物では心臓機能の低下が見られるが、早期肥大および心不全への進行の期間中の圧過負荷に応答して、Pim-1タンパク質が穏やかに上昇する。PIM-1発現の内因性レベルは、適応性肥大の間初期に増加しその直後に低下するが、後期肥大の間(TACの9週間後)、Pim-1は血管系内の核に局在化しているように見える。これらの観察結果は、Pim-1がストレスに応答して誘導されるという結論を裏付ける。

10

【0194】

手短に言えば、図14は、Pim-wtトランスジェニック動物が、圧過負荷誘発性肥大に抵抗性であることを示すデータを図示する。図14a～fの折れ線グラフは、NTGおよびPim-wt shamおよびTAC結紮の心臓の、前壁径(AWD、d、a)、後壁径(PWD、d、b)、拡張終期径(EDD、c)、収縮末期径(ESD、d)、短縮率パーセント(FS、e)、および駆出率(EF、f)の週1回の心エコー評価を表す(NTG sham n=6、Pim-wt sham n=6、NTG TAC n=9、Pim-wt TAC n=9；*p<0.05、**p<0.01)。

【0195】

Pim-wt心臓はTAC誘発性肥大に対して抵抗性である

NTGマウスは、TAC攻撃後、心臓サイズの顕著な増加を示し、Pim-wtトランスジェニックマウスと比較して著しく速い速度で死ぬ。肥大の分子mRNAマーカー(ANP、BNP、骨格アクチン(SKA)、ミオシン重鎖(-MHC)およびc-fosなど)は、偽手術(sham)と比較して、NTGのTAC攻撃された心臓において顕著に増加する。これに対して、分子肥大マーカーは、Pim-wtの心臓が基底条件下でより多くのc-fos mRNAを発現しても、TAC攻撃に供されたPim-wtマウスの心臓において著しく増加することはない。切片のTUNEL標識によってアポトーシス筋細胞を定量すると、NTGのTAC攻撃された心臓中では、偽手術(sham)と比較して3.72倍増加(それぞれ $3.2/\text{mm}^2$ と $0.86/\text{mm}^2$)したことが明らかになるが、Pim-wt動物ではTUNEL陽性細胞の顕著な増加は示されない($1.31/\text{mm}^2$ 対 $1.05/\text{mm}^2$)。心筋生存率の改善と一致して、Pim-wtのTAC攻撃された心臓は、NTGのTAC攻撃された対応物と比較して、血管周囲線維症の減少ならびに壊死の減少を示す。さらに、Pim-wtのTAC結紮された心臓は、NTGの対応物と比較して、Bcl-xL、Bcl-2などの抗アポトーシスタンパク質のレベルを著しく増加させ、Badのリン酸化を増加させた。これらのデータは、Pim-1過剰発現によって与えられる保護が、部分的には生存シグナル伝達の増加によるものであるという見解を裏付ける。

20

【0196】

Pim-wtの心臓はTAC結紮に応答して収縮機能の増加を示す

TAC結紮の後、Pim-wtの心臓において線維症の減少が見られ、Pim-1過剰発現が収縮機能を維持することを示唆している。TAC攻撃後4週間と10週間で実施したin vivo血行動態測定によって評価されたPim-wtとNTG対照を用いて、Pim-1過剰発現が心臓収縮性に及ぼす作用を検証した。図15a～cは、偽手術(sham)またはTAC手術(それぞれ14週齢と20週齢)の4週間後と10週間後(それぞれ黒棒と灰色棒)の、NTGおよびPim-wtの心臓のin vivo血行動態評価を示す。図15aは $\pm dP/dt$ 測定を示し、図15bは左心室発生圧(LVDP)を示し、図15cは左心室拡張終期圧(LVEDP)を示す。両方の時点において、NTGのTAC攻撃された心臓では収縮機能が低下しているが、Pim-wtの心臓は、TAC攻撃後に、偽手術(sham)したNTG対照と比較して優れた機能を有する(+dP/dtは若干減少し、また-dP/dtに著しい変化はない)。4週と10週のdP/dtの評価の比較は、Pim-wtのTAC攻撃された心臓の能力が比較的改善されているにもかかわらず、NTGとPim-wtの両方のTAC攻撃された心臓の機能が著しく低下していることを示す。測定は、TACの4週間後と10週間後のNTGの心臓における左心室発生圧(LVDP)と左心室拡張終期圧(LVEDP)の増加を明らかにするが、Pim-wtの心臓は、LVDPの相対的な維持(図15b、Pim-wtは19.75%増加、**p<0.01)と、LVEDPの無変化(図15c **p<0.01、\$\$p<0.01 vs. NTG TAC)を示す。4週と10週の時点で、 $\pm dP/dt$ とLVDPに反映される血行動態

30

40

50

機能は、NTGと比較して、Pim-wtの心臓で改善されている(図15a～図15b、p<0.05、p<0.01)。

【0197】

手短に言えば、図15は、Pim-1が心臓機能を強化することを示すデータを図示する。図15a～cは、偽手術(sham)またはTAC手術(それぞれ14週齢と20週齢)の4週間後と10週間後(それぞれ黒棒と灰色棒)の、NTGとPim-wtの心臓のin vivo血行動態評価である。±dP/dt測定(図15a)、左心室発生圧(LVDP、b)、左心室拡張終期圧(LVEDP、図15c)。4週の動物については、NTG sham n=4、NTG TAC n=3、Pim-wt sham n=4、Pim-wt TAC n=4。10週の動物については、NTG sham n=5、NTG TAC n=10、Pim-wt sham n=14、Pim-wt TAC n=7(*p<0.05、**p<0.01 vs. sham、##p<0.01 vs. TAC後4週、\$p<0.05、\$\$p<0.01 vs. NTG TAC、p<0.05、p<0.01 vs. NTG sham)。

【0198】

Pim-wtの心臓における収縮機能の維持の基本メカニズムは、TAC攻撃された動物の細胞応答にある可能性がある。BrdUを10日間注射したNTG群とPim-wt群を用いて、TAC攻撃後のDNA合成の刺激と予測される細胞増殖を評価した。Pim-wtの心臓は、TAC攻撃後にNTG対照と比較して67%多いBrdU+筋細胞を有する。TAC後の、Pim-wtの心臓中のBrdU+細胞の大部分は2倍体であり、BrdU+細胞の増加は新たな筋細胞の形成に起因し既存の細胞中のDNA合成は増強しない、という前提を裏付けている。収縮性の改善と一致して、発明者らは、Pim-wtの心臓はSERCA2aレベルの増加(参考文献12)に加えてリン酸化ホスホランバン(PLB)のレベルの増加も示すが、Pim-DN動物はNTG対照動物と比較してホスホPLBの顕著な低下を示すことを示す。これらの結果は、心臓機能の低下にもかかわらず、Pim-1の過剰発現は、SERCA2aの上昇とリン酸化PLBを介した収縮性の増加を通じて心臓が機能を維持することを可能にする、という結論を裏付ける。

【0199】

Pim-1は心筋の細胞充実性を増大させる

心筋のPim-1過剰発現によって生じる筋細胞の量と細胞充実性を、筋細胞体積分布の定量によって評価した。結果は、Pim-wtの心臓が、NTG対照と比較して、これらの心臓中の平均筋細胞サイズの低下にも反映される小筋細胞のパーセントの増加を有し、Pim-wtにおいて、NTGと比較して筋細胞が約33%多い過形成の表現型をもたらすことを示す。さらに、単離されたPim-DN筋細胞は、NTG筋細胞より11%大きく、トランスジェニック心臓においてPim-1活性の低下がより大きな筋細胞の形成を引き起こす逆効果を示している。

【0200】

In vivoおよびin vitroにおける肥大の抑制は、Pim-1が、Aktを介した肥大の再構築の鈍化に寄与することを示す。Pim-1は、急性の損傷または障害の近くの局在化領域においてのみアップレギュレートされ、末期不全への移行が始まるまでは、心筋全体にわたって増加することはない。このように、Pim-1は、応答シグナル伝達の初期段階の鈍的不適応性肥大再構築に対する生存応答および保護応答としての役割を果たす可能性が高い。これに対して、後期代償不全において起こるPim-1の上昇は、末期不全の後遺症によって有益な効果が覆される可能性があるにもかかわらず、恐らく機能を維持するための最終的な努力を表している。適応性肥大から不適応性肥大への移行中の内因性PIM-1の差次的発現は、Pim-1が心臓保護を与える機構を表す可能性がある。

【0201】

TAC攻撃後、核AKTは代償性再構築を遅らせたけれども克服することはなかったが(参考文献9)、Pim-wtトランスジェニックの心臓は、アポトーシスの増加、肥大性シグナル伝達マーカーの変化または機能の低下を伴うことなく(例えば図15参照)心筋肥大の持続的な鈍化を示す(例えば図14参照)。さらに、14週齢および20週齢において、Pim-wtトランスジェニックの心臓は、NTG対応物より機能的に顕著に優れて機能している(例えば図15参照)。この圧過負荷に対する著しい回復力の潜在的な理由は、部分的には、Pim-1が媒介する筋小胞体Ca²⁺ATPアーゼ2a(SERCA2a)(参考文献12)とホスホランバン(PLB)の発現の誘導と関係がある。心筋におけるPim-DNの過剰発現は、拡張型心筋症を伴う筋細胞アポトーシ

10

20

30

40

50

スを増加させる(例えば図12d参照)が、Pim-1の遺伝子欠失もまた、拡張型心筋症が観察されないにもかかわらずアポトーシスの増加をもたらす(参考文献12)。Pim-DN過剰発現の心筋症の帰結は、Pim-1ノックアウト系において起こるPim-2の代償的アップレギュレーションが心筋症に変化がないことの説明に役立ち得たため、このキナーゼが心筋細胞の生存能力に重大な意味を持つことを示唆する(参考文献12)。またこれらの知見は、in vitroでPim-1のドミナントネガティブ型がPARPおよびカスパー-ゼ3の切断を誘導し、心筋細胞アポトーシスを増加させることを示す発明者らの以前の研究とも一致する(参考文献12)。さらに、肥大に及ぼす影響について、TAC攻撃の1週間後の前壁の壁厚の増加によって証明されるとおり、Pim-DNは肥大性応答を開始することができるように見える(データなし)。

【0202】

10

病理学的に攻撃された心筋におけるPIM-1の過剰発現は、アポトーシスの低下、抗アポトシスタンパク質の発現の増加、および線維症と壞死の減少などの多くの有益な効果をもたらす。またPim-1は、小筋細胞のパーセントも増加させ、筋細胞数の全体的な増加が心筋を構成している。その結果、PIM-1過剰発現は、小細胞の細胞数の増加と細胞死の減少によって、TAC攻撃に抵抗する能力の増加をもたらす。

【0203】

Pim-1の遺伝子除去は、梗塞損傷を増加させる。Pim-KO動物におけるMI(心筋梗塞)の後、Pim-1の保護効果を評価した。Pim-KOの心臓において、左心室自由壁の梗塞サイズは、野生型対照と比較して22.7%増加する(図5a)。Pim-KOマウスは、野生型対照と比較して、左心室にTUNEL陽性筋細胞の微量だが顕著な増加を有し(表S2、\$p<0.01)、この差がMIの後に、野生型サンプルと比較してTUNEL陽性筋細胞が4.0倍増加するまで増悪する(図5b **p<0.01)。通常条件下では、Pim-KOと野生型対照とで血行動態特性は同程度だが(図S5)、梗塞後は、Pim-KOマウスの心室発生圧は低下し、野生型については拡張終期圧が増加する(図5c)。さらに、Pim-KOの心臓における梗塞後、左心室自由壁と中隔の両方において拡張壁応力が顕著に増加する(図S5、**p<0.01)。Pim-KOマウスが、MI後の炎症反応を低下させた可能性があるリンパ球増殖および造血細胞分化の低下を有することが認められたが、MI後の循環c-kit+細胞数またはMIの前もしくは後のc-kit+/sca-1+骨髄細胞数に顕著な差異は見出されなかった(図S5)。同様に、CD45染色によって示されるMI後の炎症細胞動員は、Pim-KOの心臓と対照とで同等である(図S5)。

20

【0204】

30

Pim-KOの心臓は保護的シグナル伝達の改変を示す

Pim-1は、最小限の標的基質認識配列要件(参考文献16)と自己リン酸化能力(参考文献17)に基づく比較的乱交雜なキナーゼであり得るため、Pim-1-媒介性心臓保護に関する分子メカニズムを検証した。

【0205】

40

Pim-1-KOの心臓サンプルは、野生型サンプルと比較して、ホスホAKT^{T308}(90.72%)、ホスホAKT^{S473}(2.76倍)、全AKT(2.10倍)、ホスホSTAT3^{Y705}(2.61倍)、全STAT3(68.6%)およびPim-2(4.6倍)の増加を有する。しかし、野生型対照と比較して、bcl-2、Bcl-XL、ホスホ-BAD^{S112}、またはPim-3の発現の増加は見られなかった(図16d)。MIの7日後にこれらの生存シグナル伝達分子も検証し、ここでPim-KOマウスは、偽手術(sham)した対照と比較して、Pim-3発現は2.57倍の増加を示すが、bcl-X_L(2.1倍)、ホスホBAD^{S112}(75.9%)、ホスホAKT^{T308}(92.55%)、ホスホAKT^{S473}(2.24倍)、全AKT(73.66%)、ホスホSTAT3^{Y705}(2.72倍)、全STAT3(2.0倍)は低下を示し、bcl-2またはPim-2の発現は顕著な変化を示さない(図5e)。これに対して、野生型の心臓サンプルは、偽手術(sham)と比較して、bcl-XL(57.0%)、ホスホBAD^{S112}(64.58%)、ホスホAKT^{T308}(98.32%)、ホスホAKT^{S473}(2.81倍)、全AKT(2.26倍)、ホスホSTAT3^{Y705}(3.43倍)、全STAT3(2.02倍)の顕著な増加を示し、Pim-2またはPim-3の発現の変化は示さない(図16e)。このように、MI後に、Pim-KOの心臓は、NTGの心臓と比較してPim-2およびPim-3の顕著な増加を示すが、他の生存シグナル伝達分子の著しい低下が見られる(図16e)。

【0206】

50

手短に言えば、図16は、Pim-1が梗塞損傷を防御することを示すデータを図示する。図16aは、MIの7日後の梗塞サイズを、Pim-KOの心臓における左心室自由壁のパーセントとして表すヒストグラムを図示する(*p<0.05 v NTG MI)。図16bは、MIの7日後の、Pim-KOの心臓におけるmm²当たりのTUNEL陽性筋細胞の数を示すデータを図示する(**p<0.01)。図16cは、MIの5日後の、NTGマウスとPim-KOマウスのin vivo血行動態測定を図示する(*p<0.05)。左心室発生圧(LVDP)、左心室拡張終期圧(LVEDP)、および圧力の±変化の時間変動。図16dは、梗塞の7日後の、Pim-KOおよびNTG対照の心臓における生存タンパク質レベルの免疫プロット定量を図示する(*p<0.05 vs. 偽手術(sham)、#p<0.01 vs. 偽手術(sham)、\$p<0.01 vs. NTG MI)。図16eは、梗塞の10日後の梗塞サイズ測定を図示する(n=3、**p<0.01)。図16fは、MIの10日後の、LV(左心室)におけるTUNEL標識されたCM(心筋細胞)/m²の数を図示する。

10

【0207】

材料および方法

トランスジェニック動物の作出と動物の使用

Pim-wtとPim-DNのcDNA断片(参考文献16)を、遺伝子組換えのために-MHCプラスミドにサブクローン化した。先の刊行物は、TAC結紮とエコーの方法(参考文献9)、ならびにHW(心臓重量):BW(体重)比の測定および血行動態について記載している(参考文献12)。オンラインの付録でさらなる詳細が提供される。動物研究は全て、機関内動物管理使用委員会(Institutional Animal Use and Care Committee)によって承認された。

20

【0208】

共焦点顕微鏡検査、免疫プロッティングおよびアッセイ

In vitroキナーゼアッセイにおいて、心臓溶解物から免疫沈降したGFP-Pim-1タンパク質を、基質としてのGST-p21と共に用いた。ルシフェラーゼアッセイに関して、指示プラスミドとpGATA-Lucレポーター構築物でトランスフェクトしたC2C12細胞を、GATA依存性ルシフェラーゼ活性について分析した。以下に挙げられる参考文献26に記載のとおりに免疫蛍光顕微鏡法を行い、以下に挙げられる参考文献24に記載のとおりに免疫プロッティングを行い、以下に挙げられる参考文献9に記載のとおりに定量RT-PCRとTUNEL(「末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介性dUTP-ビオチンニック末端標識」(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling))染色を行った。

30

【0209】

In vitro細胞培養および分析

新生児ラット心筋細胞培養物を、以前に記載のとおりに調製した(参考文献10)。以下に挙げられる参考文献12、22、25に先に記載されるとおりに、成体筋細胞単離、体積計算、細胞短縮およびCa²⁺過渡電流実験を行った。

【0210】

図の説明

実施例3の参考文献:

1. Neri, L. M., Borgatti, P., Capitani, S. & Martelli, A. M. (2002) The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. *Biochim Biophys Acta* 1584, 73-80.
2. Sugden, P. H. (2003) Ras, Akt, and mechanotransduction in the cardiac myocyte. *Circ Res* 93, 1179-92.
3. McGowan, B. S., Ciccimaro, E. F., Chan, T. O. & Feldman, A. M. (2003) The balance between pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways in the failing myocardium. *Cardiovasc Toxicol* 3, 191-206.
4. Kumar, D., Lou, H. & Singal, P. K. (2002) Oxidative stress and apoptosis in heart dysfunction. *Herz* 27, 662-8.
5. Hardt, S. E. & Sadoshima, J. (2002) Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ Res* 90, 1055-63.
6. Sussman, M. A. & Anversa, P. (2004) Myocardial aging and senescence: where have the stem cells gone? *Annu Rev Physiol* 66, 29-48.
7. Latronico, M. V., Costinean, S., Lavitrano, M. L., Peschle, C. & Condorelli, G. (2004) Regulation of cell size and contractile function by AKT in cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1015, 250-60.
8. Condorelli, G., et al. (2002) Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 12333-8.

9. Tsujita, Y., et al. (2006) Nuclear targeting of Akt antagonizes aspects of cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11946-51.
10. Shiraishi, I., et al. Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes. (2004) *Circ Res* 94, 884-91.
11. Gude, N., et al. (2006) Akt promotes increased cardiomyocyte cycling and expansion of the cardiac progenitor cell population. *Circ Res* 99, 381-8.
12. Muraski J., et al. (2007) Pim-1 regulates cardiomyocyte survival downstream of Akt. *Nature Medicine* 13, 12, 1467-75.
13. Hammerman, P. S., Fox, C. J., Birnbaum, M. J. & Thompson, C. B. (2005) Pim and Akt oncogenes are independent regulators of hematopoietic cell growth and survival. *Blood* 105, 4477-83.
14. Fox, C. J., et al. (2003) The serine/threonine kinase Pim-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor. *Genes Dev* 17, 1841-54.
15. Wang, Z., et al. (2001) Pim-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis. *J Vet Sci* 2, 167-79.
16. Bhattacharya, N., et al. (2002) Pim-1 associates with protein complexes necessary for mitosis. *Chromosoma* 111, 80-95.
17. Takizawa, T., et al. (1999) Transcription of the SERCA2 gene is decreased in pressure-overloaded hearts: A study using in vivo direct gene transfer into living myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 31, 2167-74.
18. Prasad, A. M., et al. (2007) Phenylephrine hypertrophy, Ca²⁺-ATPase (SERCA2), and Ca²⁺ signaling in neonatal rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C2269-75.
19. Asahi, M., et al. (2004) Cardiac-specific overexpression of sarcolipin inhibits sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA2a) activity and impairs cardiac function in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9199-204.
20. Suarez, J., et al. (2004) oxycycline inducible expression of SERCA2a improves calcium handling and reverts cardiac dysfunction in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H2164-72.
21. Kim, Y. K., et al. (2003) Mechanism of Enhanced Cardiac Function in Mice with Hypertrophy Induced by Overexpressed Akt. *J Biol Chem* 278, 47622-8.
22. Rota, M., et al. (2005) Nuclear targeting of Akt enhances ventricular function and myocyte contractility. *Circ Res* 97, 1332-41.
23. Seimi, S. K., et al. (2004) Glycogen synthase kinase-3beta is involved in the process of myocardial hypertrophy stimulated by insulin-like growth factor-1. *Circ J* 68, 247-53.
24. Kato, T., et al. (2005) ANP Promotes Cardiomyocyte Survival by cGMP-dependent Nuclear Accumulation of Zyxin and Akt. *J Clin Invest* 115, 2716-2730.
25. Kajstura, J., et al. (1995) The cellular basis of pacing-induced dilated cardiomyopathy. Myocyte cell loss and myocyte cellular reactive hypertrophy. *Circulation* 92, 2306-17.
26. Fransioli, J., et al. (2008) Evolution of The c-kit Positive Cell Response to Pathological Challenge in the Myocardium. *Stem Cells* 10.1634, 2007-0751.
27. Hoshijima, M., et al. (2002) Chronic suppression of heart-failure progression by a pseudophosphorylated mutant of phospholamban via in vivo cardiac rAAV gene delivery. *Nature Medicine* 8, 864-871.
28. Zhang Y., Wang, Z., Li, X., Magnuson N., (2008) Pim kinase-dependent inhibition of c-Myc degradation. *Oncogene*, 1-11.
29. Zhang Y., Wang, Z., Magnuson N., (2007) Pim-1 kinase-dependent phosphorylation of p21Cip1/WAF1 regulates its stability and cellular localization in H1299 cells. *Mol. Cancer Research* 5, 909-922.
- 【 0 2 1 1 】
- 実施例4：Pim-1操作された心臓幹(前駆)細胞
- Pim-1は心臓前駆細胞の増殖を増加させる
- CGW-Pim-wt CPC(心臓前駆細胞)の成長速度を評価するため、6日間の時間経過にわたるトリパンブルー排除によって生存細胞の数を測定した(図17A)。6日目には、CGW-Pim-wt CPCは、CGW($p < .05$)および未処理($p < .001$)のCPCを著しく超えて拡張し続けていた。またCGW-Pim-wt CPCは、MTTアッセイによって測定されるとおり、1日目($p < .001$)および3日目($p < .001$)にCGW CPCを上回る代謝速度の増加も示した(図17B)。特異的Pim-1活性阻害剤である

クエルセタゲンチンを用いて、CGW-Pim-wt CPCが獲得する成長優位性がPIM-1の過剰発現に起因することを確認した。このPim-1阻害剤を培地に添加すると、2日目および3日目に($p<.001$)、未処理のCGW-Pim-wt CPCと比較してCGW-Pim-wt CPCの成長速度を著しく低下させた(図17C)。

【 0 2 1 2 】

手短に言えば、図17は、Pim-1操作されたCSCの増殖速度の増加を示すデータを示す；図17Aは、対照、CGW、およびCGW-Pim-wt形質導入CPCのトリパンブルーアッセイを用いた細胞成長評価を示す；図17Bは、対照、CGW、CGW-Pim-wt形質導入CPCのMTTアッセイを示す(平均 \pm SEM、 $n=3$)；図17Cは、 $10 \mu M$ のクエルセタゲンチン(特異的Pim-1活性阻害剤)で処理した、または未処理のPIM-1発現CPCの増殖速度を示す(平均 \pm SEM、 $n=3$) * $p<.05$ 、** $p<.01$ 、*** $p<.001$ 。

10

【 0 2 1 3 】

Pim-1過剰発現CPCは心筋梗塞後の心臓機能を改善する

以前の研究は、Pim-1トランスジェニックマウスが、病理学的攻撃に対して顕著な回復力を生じさせることを示していた。Pim-1改変CPCも梗塞損傷に対して実質的な抵抗性を与えるか否かを試験するため、12週齢の雌のFVBマウスに心筋梗塞を与え、境界域の周囲にCGW CPCまたはCGW-Pim-wt CPCを心筋内注射した($n=15-20$ /群)。2週間の時点の心エコー測定は、CGW-Pim-wt CPCの注射を受けたマウスの前壁径(AWD)が、生理食塩水($p<.001$)およびCGW CPC($p<.01$)を注射されたマウスの前壁径と比較して厚いことを示した(図18A)。Pim-1改変CPCの心筋内注射が、病理学的攻撃後に機能的改善の長期間の増加をもたらすかどうかを決定するため、梗塞後12週間マウスを追跡調査した。梗塞後6週間の時点で、CGW-Pim-wt CPCの注射を受けたマウスが駆出率(EF)と短縮率(FS)を維持し(図18B、C)、CGW CPCの注射を受けたマウスを上回って統計的に改善された。7週間目までに、CGW CPCは心臓機能(FSとEF)を維持することができず、生理食塩水の注射を受けた動物と統計的に異ならなかった。12週間の時点で、心エコーは、CGW-Pim-wt CPCの注射を受けた動物がEFとFSを維持し続けており、これにより対照CPCの注射を受けた動物のEFとFSはそれぞれ2倍と1.6倍低下したことを再び示した(図18B、C)。DP(図18D)、Ped(図18E)、および $\pm dp/dt$ の変化(図18F)の血行動態測定は、CGW-Pim-wt CPCの注射を受けたマウスでは、CGW CPCの注射を受けた動物および生理食塩水の注射を受けた動物を上回って、心臓機能が著しく強化されていることを裏付けた。

20

【 0 2 1 4 】

手短に言えば、図18は、PIM-1発現CPCの心筋内注射が心臓機能を改善することを示すデータを図示する。図18A～Cは、CPC移植の12週間後の、偽手術(sham)()、PBS注射(黒丸)、CGW()、およびCGW-Pim-WT()の心臓前駆細胞におけるAWD(図18A)、EF(図18B)、およびFS(図18C)の心電図評価を図示する。心エコー測定は、各群につき $n=9$ の動物を表す。図18D～Fは、PBS、eGFP、およびPIM-1発現CPCの心筋内注射の12週間後の心臓機能を評価するために用いた、左心室発生圧(LVDP)(図18D)、左心室拡張終期圧(LVEDP)(図18E)、およびdP/dT最大および最小(図18F)のin vivo血行動態測定を図示する($n=5$)。心エコーとin-vivo血行動態測定について、Tukey's post-hocテストを用いてANOVA統計テストを行った。結果は平均 \pm SEMとして表される。

30

【 0 2 1 5 】

Pim-1改変CPCの注射は梗塞サイズの減少をもたらす

左心室自由壁領域(LVFW)全体のトロポミオシンの定量は、Pim-1改変CPCを注射されたマウスの梗塞領域が著しく2倍低下したことを示した($p=.02$)(図3B)。図19は、梗塞した心臓組織中のCGW-Pim-wt CPC型の筋細胞および血管系が、梗塞領域を減少させることを示すデータを図示する；またCPC注射の12週間後の梗塞領域の定量を示す。結果は平均 \pm SEMとして表される($n=3$ 動物、* $p<.02$)。

40

【 0 2 1 6 】

長期間の心臓の機能的改善はPim-1改変CPCによってのみ与えられる

発明者らの以前の研究を広げる努力の中で、発明者らは、最初の実験を繰り返し、PBS

50

、CGW、およびCGW-Pim-wt CPCを注射したマウスを、32週間にわたり心エコーと血行動態評価によってモニターした。3日目には、全マウス群のFS(図20A)とEF(図20B)が低下しており、生理食塩水対照群と統計的に異ならなかった。以前見られたとおり、CGW CPCの注射を受けたマウスは、1週間目に初期の早期改善が見られ、6週間目に心不全が発症し、8週間目までに生理食塩水対照群に対して統計的に有意でなくなった。しかし、Pim-1改変CPCの注射を受けたマウスは、1週間目にFSとEFが増加し、それが32週間を通してずっと維持された(図20A、B)。

【 0 2 1 7 】

手短に言えば、図20は、心筋内注射の32週間後に、CGW-Pim-wt発現CPCによって長期間の心臓の機能的回復が得られることを図示する：図20A～Cは、CPC移植の32週間後の、偽手術(sham)()、PBS注射(黒丸)、CGW()、およびCGW-Pim-WT()の心臓前駆細胞におけるFS(図20A)、EF(図20B)、およびAWD(図20C)の心電図評価を示す。心エコー測定は、各群につきn=7動物を表す。

【 0 2 1 8 】

本発明の例示的2シストロン性ベクター

ベクターは、MNDプロモーターがPIM-1発現を駆動し、レポーター(強化緑色蛍光タンパク質(eGFP))がウイルス内部リボソーム侵入部位(vIRES)の外で駆動される2シストロン性である。構築物は全て第3世代自己不活性化(SIN)レンチウイルスベクターであり、導入遺伝子の長期発現を確保するための幾つかのエレメントを組み込んでいる。MND(MND、骨髄増殖肉腫ウイルスLTRネガティブコントロール領域欠失)プロモーターは導入遺伝子の高発現を可能とするが、LTRは、繰り返し継代後の長期発現を可能とする。上記のベクターは、(IFN)-α-足場付着領域(SAR)エレメントも含む。このSARエレメントは、メチル化を抑制し導入遺伝子を発現抑制から保護することによってベクターを転写的に活性に保持するのに重要であることが示されている。

【 0 2 1 9 】

CPCにおけるPim-1の長期過剰発現による潜在的な心筋の利益を究明するため、ヒトPIM-1遺伝子、CGW-Pim-wt、ならびにコントロールベクター、CGWを送達する2シストロン性レンチウイルスベクターを設計した(図S1A)。Pim-1遺伝子の発現は骨髄増殖肉腫ウイルスLTRネガティブコントロール領域欠失(MND)プロモーターを通して制御されるが、eGFPレポーターはウイルス内部リボソーム侵入部位(vIRES)の外で駆動される。

【 0 2 2 0 】

図21は、例えば心臓前駆細胞における遺伝子発現(例えばc-kit+心臓前駆細胞(CPC)における遺伝子発現)のための、本発明の例示的レンチウイルス構築物を示す。図は、CGW(GFP対照)およびCGW-Pim-wtと名付けられた自己不活性化(SIN)レンチウイルスベクターを示す。これらは、PIM-1遺伝子はMNDプロモーターの外で駆動されるが、eGFPレポーターは内部リボソーム侵入部位の外で駆動されるように設計された。

【 0 2 2 1 】

以下の配列は、本発明を実施するため(例えば、ヒト細胞(例えば幹細胞または心臓細胞もしくは筋細胞)などの細胞中でPIM-1を発現するため)の例示的レンチウイルスベクター骨格である。

【 0 2 2 2 】

10

20

30

40

gacggatcgggagatctccgatcccctatggtcgactctcagtacaatctgcgtatgcgcata
tgtgtggaggcgctgagtagtgcgcgagcaaaattaaagctacaacaaggcaaggctgacc
gtttaggcgtttgcgctgcgtacggccagatatacgcttgcacattgattactgactat
ttatgtcatagccatataatggagttccgcgttacataacttacggtaatggccgc
gtcaataatgacgtatgtccatagtaacgccaataggactttccattgacgtcaat
gtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgac
ggactttcctacttggcagtiacatctacgtattgtcatcgctattaccat
ggacttccacccattgacgtcaatggagtttgtttggcac
gtttgactcacgggattccaagtctccacccattgacgtcaatggagtttgtttgg
cacaaaatcaacggacittccaaaatgtcgt

ccacatagcagaacttaaaagtgtcatattggaaaacgttctggggcgaaaactctcaaggatcttaccgcgtttagatccagttcg
atgttaacccactcgaccccactgatctcagcatctttactttcaccagcggttctgggttagacaaaacaggaaggcaaaatgcccga
aaaaagggaataaggcgacacggaaatgtgaataactcatactttccctttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagc
ggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaatagggttccgcgcacattcccgaaaagtgccacctgacg (配列番号4)

【0223】

実施例5：本発明の実施に用いる例示的PIM配列

本発明は、PIM発現核酸およびPIMポリペプチドの使用を含む組成物および方法を提供する。

10

【0224】

例えば、1つの実施形態において、本発明の組成物および方法を実施するためにヒトPIM-1タンパク質が用いられる。使用し得る例示的ヒトPIM-1タンパク質は、Genbank受託番号第AAA36447号(例えばDomen (1987) Oncogene Res. 1 (1):103-112も参照)(配列番号5)：

```
1 mllskinsla hlraapcndl hatklapgke keplesqyqv gp11gsgggf svysgirvsd
61 nlpvaikhve kdriisdwgel pngtrvpmev v11kkvssgf sgvir1ldwf expdsfv1l1
121 erpepvqdlf dfitergalq eelarsffwq vleavrhcgn cgvlhrdikd enilidlnrg
181 elklidfgsg allkdtvytd fdgtrvyspp ewiryhryhg rsaavwslgi llydmvcgdi
241 pfefhdeeiir gqvffrqrvs secqghlirwc lalrpsdrpt feei1qnhpwm qdv1lpqeta
301 eihlhslspg psk (配列番号5)
```

20

である。

【0225】

1つの実施形態において、本発明の組成物および方法を実施するためにヒトPIM-1タンパク質アイソフォームが用いられる。使用し得る例示的ヒトPIM-1タンパク質アイソフォームはヒトpim-1キナーゼ44kDaアイソフォームであり、例えばGenbank受託番号第AAV87461号を参照(例えばXie (2006) Oncogene 25 (1), 70-78も参照)(配列番号6)：

```
1 mphepheplt ppfsalpdpa gapsrrqsrq rpqlssdps afrasrshsr natrshshsh
61 sprhslrhsp gsgscgsssg hrpcadilev gmlskinsl ahlraapcnd lhatklapgk
121 ekeplesqyq vgpllgsggf gsvysgirvs dnlpvaikhv ekdrisdwge lpngtrvpme
181 vvlkkvssg fsgvirldw ferpdsfvli lerxepvqdl fdfitergal qeelarsffw
241 qvleavrhcgn cgvlhrdik denilidlnr gelklidfgs gallkdtvyt dfdgtrvysp
301 pewiryhryh grsaavwslg illydmvcgdi ipfehdeeiir rgqvffrqrvs ssecqghlirw
361 clalrpsdrp tfeei1qnhpwm qdv1lpqeta eihlhslsp gpsk (配列番号6)
```

30

【0226】

1つの実施形態において、本発明の組成物および方法を実施するためにヒトPIM-1メッセージ(mRNA)が用いられる。使用し得る例示的ヒトPIM-1メッセージは、Genbank受託番号第NM_002648号(例えば、Zhang (2007) Mol. Cancer Res. 5 (9), 909-922も参照)(配列番号7)：

40

1 cccgagagga gtcgggtggca gcggcggcg cgccgaccggc agcagcagca gcagcagcag
 61 cagcaaccac tagcctcctg ccccgcgcg ctgcgcacg agccccacga gcccgtcacc
 121 ccgcgttct cagcgctgcc cgaccccgct ggccgcgcct cccgcgcgc gtcggcag
 181 cgccctcagt tgtccctccga ctgcgcctcg gcctcccgcg ccagccgcag ccacagccgc
 241 aacgccaccc gcagccacag ccacagccac agccccaggc atagccttcg gcaagcccc
 301 ggctccggct cctgcggcag ctccctctggg caccgtccct ggcgcacat cctggaggtt
 361 gggatgtct tgcctccaaat caactcgctt gcccacctgc ggcgcgcgc ctgcaacgc
 421 ctgcacgcca ccaagctggc gcccggcaag gagaaggagc ccctggagtc gcagtaccag
 481 gtggggccgc tactgggcag cggcggttc ggctcggtct actcaggcat cccgcgtc
 541 gacaacttgc cggtgccat caaacacgtg gagaaggacc ggatttccga ctggggagag
 601 ctgcctaattgc gcaactcgagt gcccattggaa gtggctctgc tgaagaaggt gagctcggt
 661 ttctccggcg tcattaggct cctggactgg ttcgagaggc ccgacagttt cgtcctgatc
 721 ctggagagggc cccgagccgt gcaagatctc ttcgacttca tcacggaaag gggagccctg
 781 caagaggagc tggcccgcaag cttttctgg cagggtctgg aggccgtgcg gcaactgcac
 841 aactgcgggg tgctccaccg cgacatcaag gacaaaaaca tccttatcga cctcaatcgc
 901 ggcgagctca agctcatcga cttcggtcg gggcgctgc tcaaggacac cgtctacacg
 961 gacttcgatg ggaccccgagt gtatagccct ccagagtgg tccgctacca tcgctaccat
 1021 ggcaggtcgg cggcagtctg gtccctgggg atcctgtgt atgatatggt gtgtggagat
 1081 attccttcg agcatgacga agagatcatc agggggcagg ttttcttcag gcagagggtc
 1141 tcttcagaat gtcagcatct cattagatgg tgcttggccc tgagaccatc agataggcca
 1201 accttcgaag aaatccagaa ccatccatgg atgcaagatg ttctctgc ccagaaaact
 1261 gctgagatcc acotccacag cctgtcgccg gggcccagca aatagcagcc tttctggcag
 1321 gtcctccct ctcttgcag atgcccggagg gagggggaaagc ttctgtctcc agcttccga
 1381 gtaccagtga cactgtctgc caagcaggac agtgcgttgc acaggaacaa catttacaac
 1441 tcattccaga tcccaggccc ctggaggctg cttcccaaca gtggggaaaga gtgactctcc
 1501 aggggtccta ggctcaact cttccatag atactcttt cttctcatag gtgtccagca
 1561 ttgctggact ctgaaatatc cgggggtgg ggggtgggg tgggtcagaa ccctgccc
 1621 gaactgtttt cttcatcatg agttctgtcg aatgcccgcga tgggtcaggt aggggggaaa
 1681 cagggtggga tgggatagga ctagcaccat tttaaatccc tgcacccatc tccgactctt
 1741 tctgagtgcc ttctgtgggg actccggctg tgctggaga aataacttgc cttgcctctt
 1801 ttacctgtcg cttctccaaa aatctgcctg gttttgttc cctattttc tctctgtcc
 1861 tccctcacc cctccttcat atgaaagggtg ccatggaaaga ggctacaggg ccaaacgc
 1921 agccacctgc cttttttct gcctcctta gtaaaactcc gagtgaactg gtcttc
 1981 ttgggtttta cttaactgtt tcaaagccaa gacccacac acacaaaaaa tgcacaaaca
 2041 atgcaatcaa cagaaaaagct gtaaatgtgt gtacagttgg catggtagta tacaaaaaaga
 2101 ttgttagtgg a tctaattttt aagaaatttt gccttaagt tattttaccc gtttttgg
 2161 cttgtttga aagatgcgc a ttctaacctg gaggtcaatg ttatgtat ttttattat
 2221 ttatgtgtt cccttcctat tccaagcttc catacgctgt gcccgtt tcttc
 2281 ttcttccttc tgacttgggg accttttggg ggagggtgc gacgcttgc ctgtttgtgg
 2341 ggtgacggga ctcaaggcgcc acagtgcgc agctccctgg cttctgtgg gcccctc
 2401 tacttaccca ggtgggtccc ggctctgtgg tgatgggg a gggcattgc tgactgtgt
 2461 tataggataa ttatgaaaag cagttctgg a tgggtgcct tccagatcct ctctgggg
 2521 gtgttttgcag cagcaggttag cctgcgtgggtt ttatctgagt gaaatactgt acaggggaat
 2581 aaaagagatc ttatttttt ttttatactt ggctttttt gaataaaaaac cttttgtctt
 2641 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa (配列番号7)

10

20

30

40

50

である。

【0227】

1つの実施形態において、本発明の組成物および方法を実施するためにヒトPIM-1遺伝子が用いられる。使用し得る例示的ヒトPIM-1遺伝子は(配列番号8)：

LOCUS NC_000023 5826 bp DNA linear CON 03-MAR-2008
 DEFINITION Homo sapiens chromosome X, reference assembly, complete sequence.
 ACCESSION NC_000023 REGION: complement(48655403..48661228)
 VERSION NC_000023.9 GI:89161218
 PROJECT GenomeProject:168
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM Homo sapiens
 REFERENCE 1 (bases 1 to 5826)
 AUTHORS International Human Genome Sequencing Consortium.
 TITLE Finishing the euchromatic sequence of the human genome
 JOURNAL Nature 431 (7011), 931-945 (2004)
 PUBMED 15496913

1 cgccgcggc gaatctaac gctgcggcgt ctgcgggcgc ttccgggcca ccagtttctc
 61 tgcgtttccac cctggcgccc cccagccctg gtcgtccccc cgggggttcca
 121 cggccctcgcc gcttagccggg ttcaatctgcg cagccgcacc tccatgttga
 181 ccaaggctct acaggggccct cccggccccc cccgggacc cccggccgg ccaggtgagt
 241 acatcttccc ctactcaac cagacgggggt gggctggaaat gatgggttgc agccgggggg
 301 gagggagtcg tggctggcgt cagcacgcgc ccaccctgac ttccctcgect cccgcctgcgt
 361 aggaggcaag gatcggaaag cgttcgaggc cgagttatcgat ctcggccccc tcctgggtaa
 421 ggggggcttt ggcaccgtct tcgcaggaca cccgcctcaca gatcgactcc aggtatccgt
 481 catgagggtc ttgggagggc caggtgcgtg tggcgggggc ggggggtctg gccctggaaat
 541 gtcgggttgcg cggaggatga gcttcagag tttgttagagg accagggtgtg tttgtgtgt
 601 tgcgtccgtgc cgtgtcccgag gatgtggccct gcagttgtgtg tagagggcca ggtgtgtgt
 661 cgtgcgcgtg tttgtgtcg tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 721 agattcccgga gttttttttt cccgggggtcc aggtttgttgc tttttttttt tttttttttt
 781 tagatgttgcg tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 841 ggacccttgtt acagagttgg ggtgtcgtag agctaaatag gaagattgtg ggcotgggg
 901 atcaggaaat ctagaactca ggacttggag tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 961 cccagggttca aggaagggtgg gagagataaa tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 1021 gacgccttgc tacgggttct tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 1081 ggttagatggg ggaataactgg aggttggcag aagggtttaga tttttttttt tttttttttt
 1141 acctgttgcg tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 1201 aatcggttgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 1261 actccatcac tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 1321 ctgttaacagt gagaataactg ccaggccatt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 1381 attcacccca tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 1441 cttccaaaca tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 1501 gtcactgtttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 1561 atcagggggg gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 1621 aactgtttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 1681 atttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 1741 agggctctac tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 1801 ggcagttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 1861 agtctccctc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 1921 cgttcttgcg tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 1981 ggcacacaacc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 2041 ggcaggccgg tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 2101 gtcgggatgg tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 2161 gagacggggatgg tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 2221 cagccctccac tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 2281 tacaggccacc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 2341 ccatgttggc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 2401 caaaatgttgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt

10

20

30

40

2461 tagagacggg gtttctccat gttggtcagg ctgggtctcgaa
 2521 tgcccgctc ggcctcccaa agtgcgtggg ttacaggcgt
 2581 atttaggcctt ttatttggct gtttcttaggt gcttgggtat
 2641 cactaagtcc ttttgtgcta ggtcccttgc aataaaatcac
 2701 gtatattgac caccactat atgacagaca taattctaga
 2761 aagtatttag agtcattt gtgcctaggc otttttact
 2821 caaatattta ttcagcccta ctctgttagc agccactgtt
 2881 gtgaacaaaaa caaaccatc cacaataagt gtttatttag
 2941 ccatgttatt aagtgcgtc atctgttta catttattga
 3001 tctaattctgg gatatgtcag ggaacaaaac aaaacacata
 3061 gaaaggccttc agttgataac cagattttt ttttatttt
 3121 gctggagtgc agtgggtgtc ttttactgc aacctctgcc
 3181 cccaccttag cttcccaagt agtcggact acagggtcatt
 3241 tttgtgtttt tgccatttt cccaggtcga tottgaactc
 3301 cacatcagcc tcccaaagtg ctgggattgc agggatgago
 3361 cttcggtta ttcaaatgtt tattgtatctc cgacatgcga
 3421 tggtttcacc ctctcaatcg ctgtgtgagt ttgtgttctt
 3481 aggaaagtga gttgtttagc gacacactgt cagggaaaagg
 3541 taaaaaggcct cagagctgtt gcccgtacat ctgttctttt
 3601 caccctgtgcc cccagtcaga ctcaagtccaca tggccactcg
 3661 gtgggtggcag tggtgtggca ccctggcgtg atccgcctgc
 3721 gagggttca tggtgttctc cggagggcgt ttggccggcc
 3781 acagagaagg gcccacttgg tgaaggccca agccgtgtc
 3841 gccatccagc atgccttgc cctgtggagg ttttgcattgt
 3901 ctgatagacc tacggcgtgg ctgtgcctaa ctcattgtt
 3961 catgtatgaa ctcacactga ctttgcattgtt aaggcttc
 4021 gtttttactt gatggccttgc tgacccttgg cttccagttgg
 4081 gacccatact gcatattata agatgtatcga ttgtcaatc
 4141 ctctgataaa gtcctatctt taatgggtgtt ctaaccttat
 4201 aggggtatcc gttaccatcc tgtagtatttcttcttgc
 4261 agtgcgttta ttctgttgc gggactctgt tattttatgt
 4321 actctgtttt tattttatgtt gcttgcatttgc
 4381 gggttggaga agggcatcat gagattgttgc ttttgcatttgc
 4441 aagggtgtac agccccccag agtggatctc ttttgcatttgc
 4501 tggctggtca ctgggcattcc tcctctatcga catgggtgt
 4561 ggaccaggag attcttggaa ctgagctcca cttcccaagcc
 4621 ctcaactgacc ccagcccaaga agactccatc ctttcagg
 4681 gctaattcttc cttcttgc ttttgcatttgc
 4741 tggcccccac acctttcttc ctttgcatttgc
 4801 aacacccaggc cgaggatgtt ccccttcaacc cttcccaagg
 4861 ggtctttgtt acccttaaggc tggccctggcc tggccctggcc
 4921 tcccatggcc atgtcacagg gatagatggc cattttgttgc
 4981 ccagtcatca aagtccatgg ttttgcatttgc
 5041 taaaacaaatg ctggccatgtt cccttcccaa ttttgcatttgc
 5101 gtgggtccctg attcttggagg gggacttctt ttttgcatttgc
 5161 tggtaagtttt gttcccatc tgagccccgg gacttcttgc
 5221 attggcacctt ctttgcatttgc
 5281 tgctttctt ctttgcatttgc
 5341 tagggtccca agtgcgttcc ttttgcatttgc
 5401 ggaggtaatg ccccttgcatttgc
 5461 ggacccatcc ttttgcatttgc
 5521 atttgggaag gaaatggaaat ttttgcatttgc
 5581 atggttttt gggggatggg ttttgcatttgc
 5641 tccctccaaat ttttgcatttgc
 5701 aaatgtaaat aatcactat ttttgcatttgc
 5761 ctgcctggat ttttgcatttgc
 5821 tcagaa (配列番号8)

である。

【 0 2 2 8 】

1つの実施形態において、使用し得る例示的ヒトPIM-1ポリペプチドおよびメッセージは

(配列番号9) MLLSKFGSLAHLCGPGGVDHLPVKILQPAKADKESFEKAYQVGA

(配列番号10)

VLGSGGGTGYAGSRIADGLPVAVKHVVKERVTEW GSLGGATV PLEVLLRKVGAAGG
ARGVIRLLDWFERPDGFLLVLERPEPAQDLFDIFTERGALDEPLARRFFAQVLA A VRH

10

20

30

40

CHSCGVVHVDIKDENLLVDLRGELKLIDFGSGALLKDTVYTDGTRVYSPPEWIRY
HRYHGRSATVWSLGVLLYDMVCGDIPFEQDEEILRGRLLFRRRVSPECQQLIRWCLSL
RPSEPSLDQIAAHPPWMLGADGGAPESCDRLCLDPDDVASTTSSSESL"

(配列番号11)

10

20

30

40

(配列番号12)

Agcgtcgaaattatgcgttgcacaaatcaactcgctggcccacctcgccgcgcgcgcctgcaacgcacctgcacgccaccaagctggcgccggcaaggagaaggaggccccctggagtcgcagtaccaggctggccgcacttggcagcggggcttcggctcggtctactcaggcaatcccggtcccgacaacttgcgggtggccatcaaacacgtggagaaggaccggattccgacttgggagagctgcctaattggcaatcgagtgcccatggaaagtggtcctgtgaagaaggtagctcggtttctccggcgtcattaggctctggactgggtcgagaggcccgacagtttcgtcctgtatcctggagaggcccggccgggtcaagatcttcgacttcatcagggaaaggggagccctgcaagaggagctggcccgagcttcgttcgtggcaggtgtggaggccgtgcggcactggccacaacttgcgggtgcctccaccgcgacatcaaggacgaaaacatccatgcacccatcaatcgccggcagatcaagatcatcgacttcgtgggtcggtggggcgtgtcaaggacaccgtctacacggacttcgtatgggacccgagtgatagccctccagagtggatccgcgtaccatcgatccgtaccatggcagggtggcggcagtttcgtggatccctgggtatgtatgtatgggtgtggagatattccatcgagcatgacgaagagatcatcagggccagggttttcgttcaggcagagggtcttcagaatgtcagcatctcattagatggcgttgcgtccatcgagaccatcagataggccaaaccttcgaagaaatccagaaccatccatggatgcaagatgttcctgtcccgccaggaaactgctgagatccacccatccacagcgtcgccggggccagcagccgtcgccggggccagcaaacaattggtaccgcggccccgg

10

(配列番号13)

atgtctt	tgtccaaaat	caactcgctt	gcccacatgc	gcccgcgcgc	ctgcacacac	
421	ctgcacgcca	ccaagctggc	gcccggcaag	gagaaggagc	ccctggagtc	gcagtagccag
481	gtggggcccg	tactgggcag	cgccggcttc	ggctcggtct	actcaggcat	ccgcgtctcc
541	gacaacttgc	cggtggccat	caaacacgtg	gagaaggacc	ggatttccga	ctggggagag
601	ctgcctaatt	gcactcgagt	gcccattggaa	gtggtcctgc	tgaagaaggt	gagctcggggt
661	ttctccggcg	tcatttaggct	cctggactgg	ttcgagaggg	ccgacagttt	cgttctgtatc
721	ctggagagggc	ccgagccggt	gcaagatctc	ttcgacttca	tcacggaaag	gggagccctg
781	caagaggaggc	tggcccgca	cttcttctgg	cagggtctgg	aggccgtcg	gcactgcac
841	aactgcgggg	tgctccaccg	cgacatcaag	gacaaaaaca	tccttatcga	cctcaatcgc
901	ggcgagacta	agctcatcga	cttcgggtcg	ggggcgctgc	tcaaggacac	cgtctacacag
961	gacttcgatg	ggaccccgagt	gtatagccct	ccagagtgg	tccgctacca	tcgctaccat
1021	ggcagggtcg	cggcagtctg	gtccctgggg	atcctgttgt	atgatatgg	gtgtggagat
1081	attccttgc	agcatgacga	agagatcatc	gggggcagg	ttttcttcag	gcagaggggt
1141	tcttcagaat	gtcagcatct	cattagatgg	tgcttgcccc	tgagaccatc	agataggcc
1201	accttcgaa	aaatcccgaa	ccatccatgg	atgcaagatg	ttctcctgccc	ccaggaaact
1261	gtcgagatcc	acctccacag	cctgtcgccg	gggcccagca	aatag	

20

(配列番号14)

100 a tgctcctgtc caagatcaac
121 tccctggccc acctgcgcgc cgcccccgc aacgacccgtc acgcccaccaa gctggcgccg
181 ggcaaagaga aggagccctt ggatcgccag taccagggtgg gcccgtgtt gggcagcggg
241 ggcttcggct cggctactc tggccatccgc gtcggccgaca acttgcgggt ggccattaa
301 cacgtggaga aggacccgtat ttccgattgg ggagaactgc ccaatggcac ccgagtgc
361 atgaaagtgg tccctgttcaa gaagggtgagc tcggacttct cggcgctcat tagacttctg
421 gactggttcg agaggcccga tagtttcgtg ctgatcctgg agaggcccga accgggtgcaa
481 gaccttttcg actttatcac cgaacgagga gcccatacagg aggacccgtc ccgaggattc
541 ttctggcagg tgctggaggc cgtgcggcat tgccacaact gcggggttct ccacccggac
601 atcaaggacg agaacatctt aatcgacctg agcccgccgaa aatcaaact catcgactt
661 gggtcgggggg cgctgctcaa ggacacagtc tacacggact ttgatgggac ccgagtgtac
721 agtccctccag agtggattcg ctaccatcgc taccacggca ggtcggcagc tgcgtggcc
781 cttggatcc tgctctatga catggctcgc ggagatattc cgtttggca cgatgaagag
841 atcatcaagg gccaagttt cttcaggcaa actgtcttctt cagagtgtca gcacccattt
901 aaatgggtgcc tgcgtccctgag accatcgat cggcccttctt ttgaagaaat ccggaaaccat

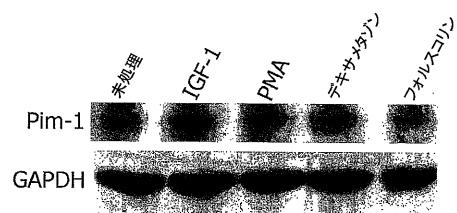
40

961 ccatggatgc agggtgacct cctgccccag gcagcttctg agatccatct gcacagtctg
1021 tcaccqqqqt ccagcaagta a

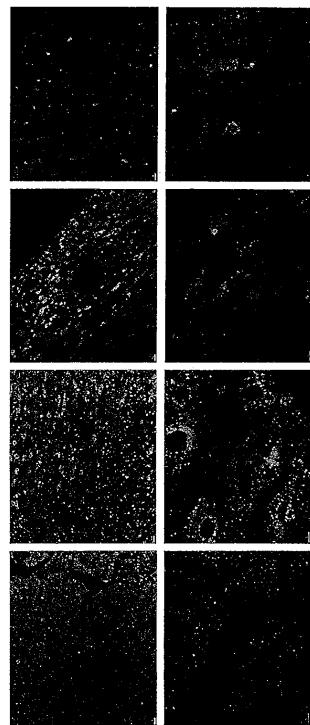
【0229】

本発明は様々な変更および改変形態の影響を受けやすいが、その具体例は図中の例によって示されており、本明細書中に詳細に記載される。しかし、本発明は開示される特定の形態または方法に限定されるものではなく、反対に、本発明は、添付の特許請求の範囲の精神および範囲に含まれる全ての変更物、均等物および改変物に及ぶものであることが理解されるべきである。

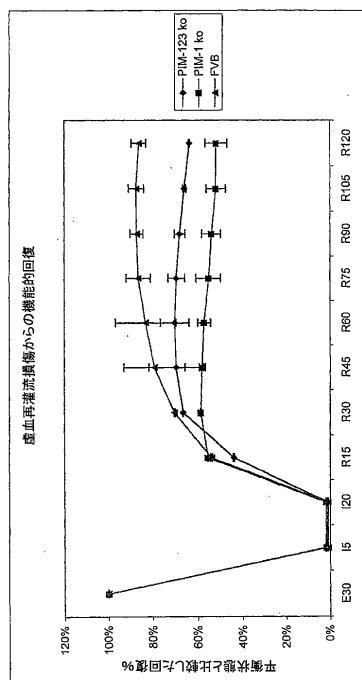
【図1】



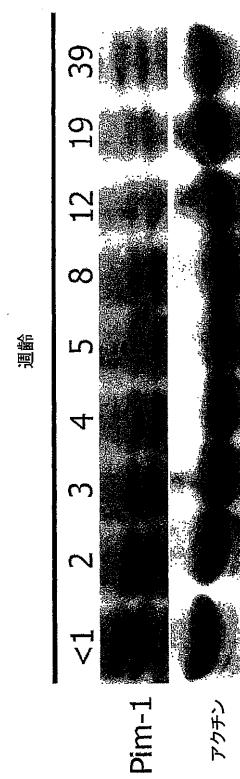
【図2】



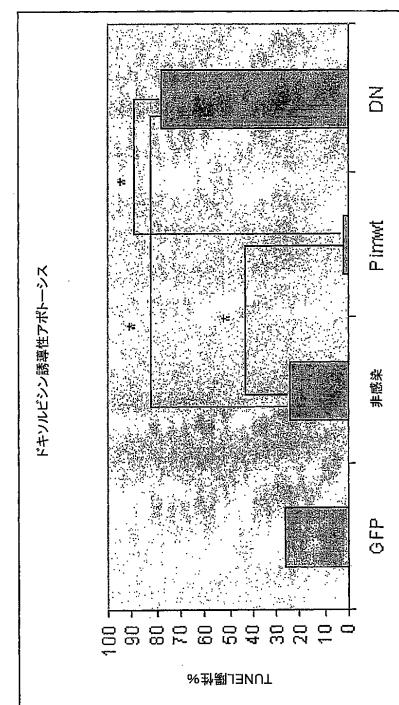
【図3】



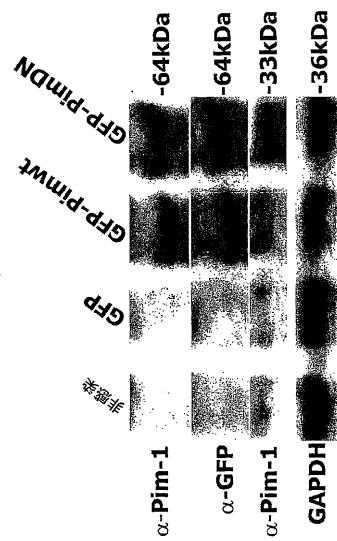
【図4】



【図6】



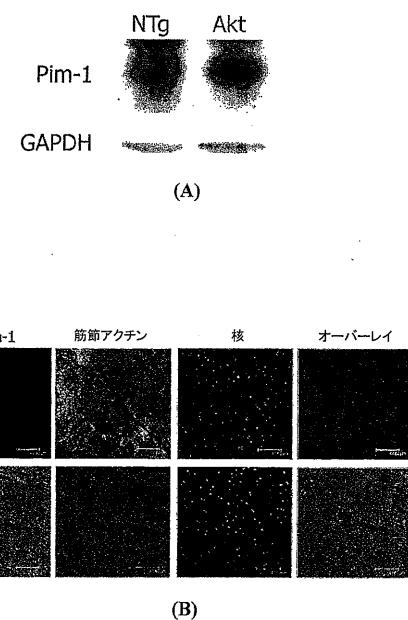
【図5】



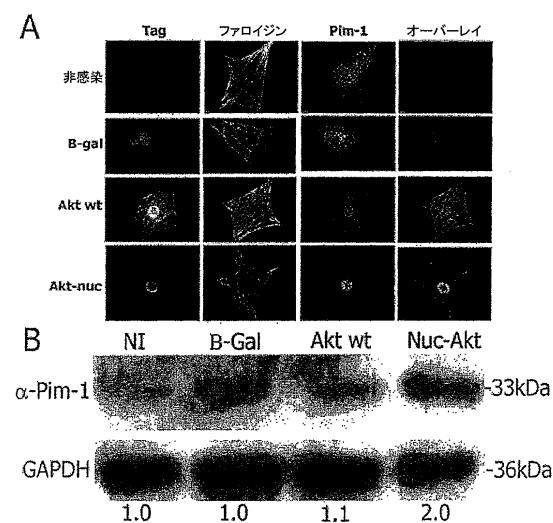
【図7】



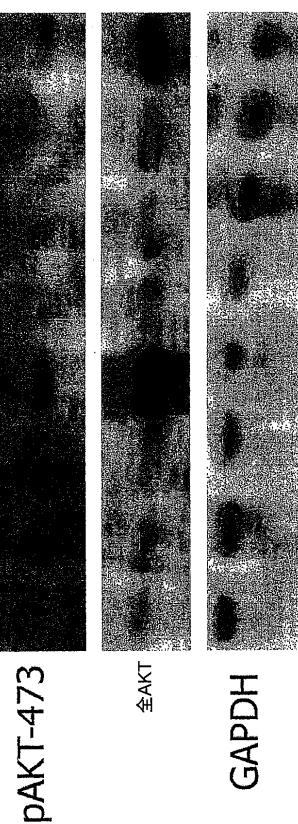
【図8】



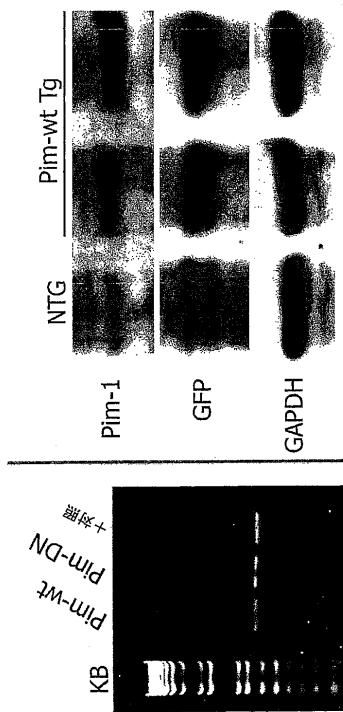
【図9】



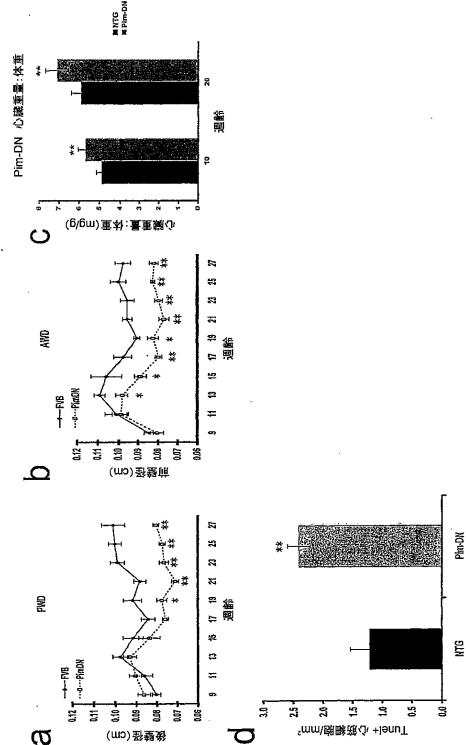
【図10】



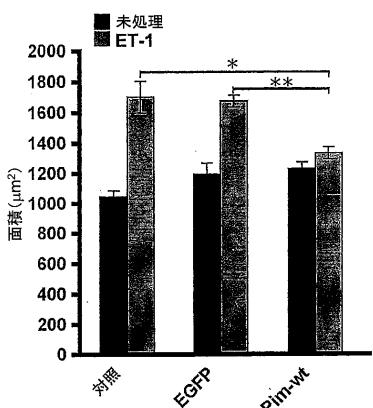
【図11】



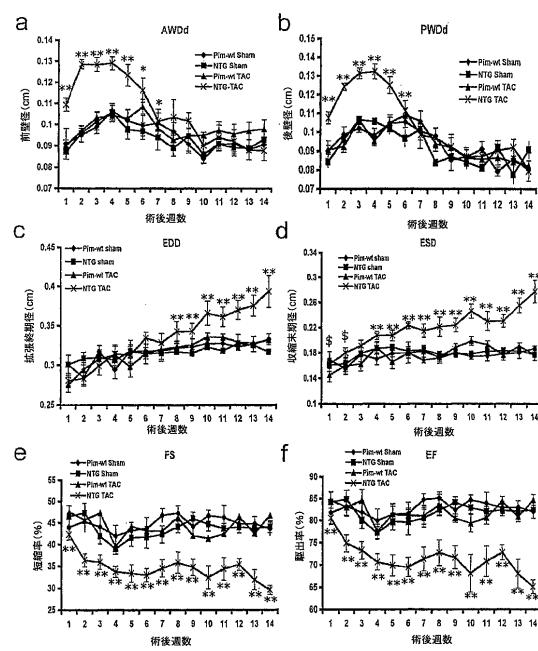
【図12】



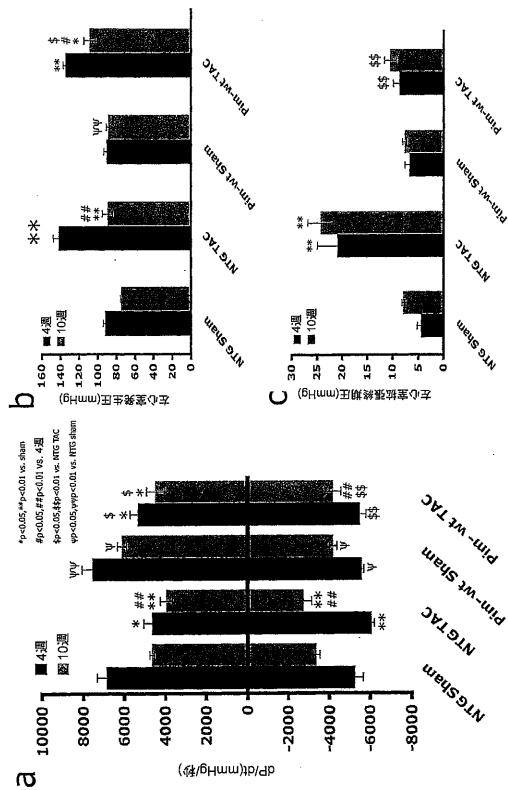
【図13】



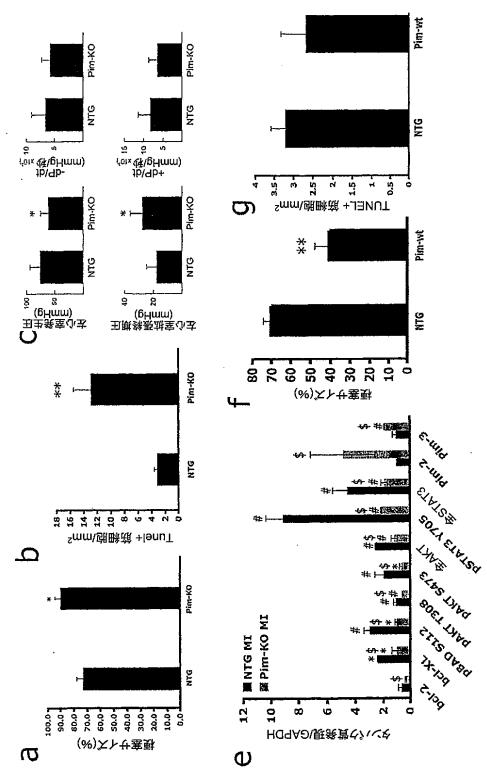
【図14】



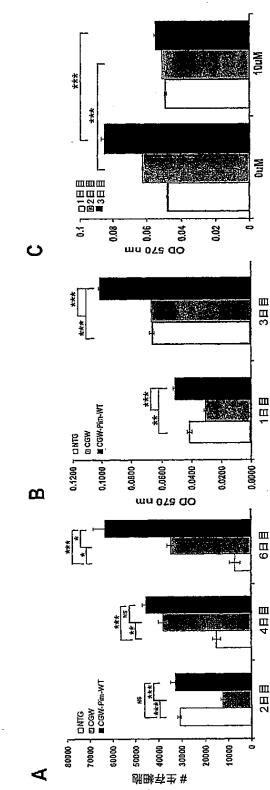
【図15】



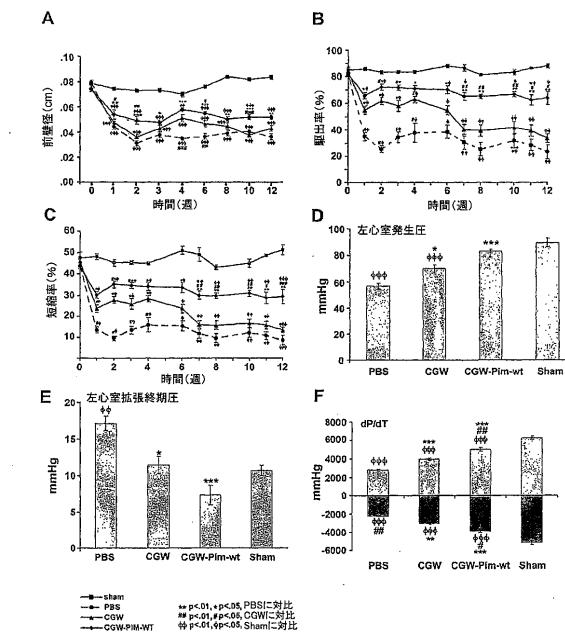
【図16】



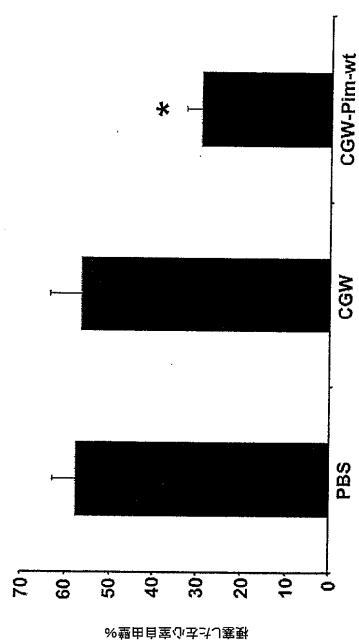
【図17】



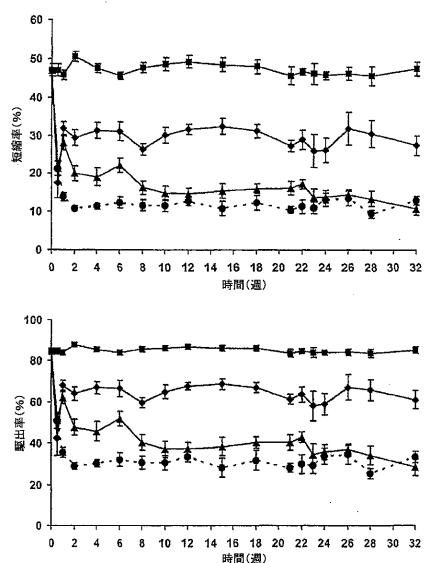
【図18】



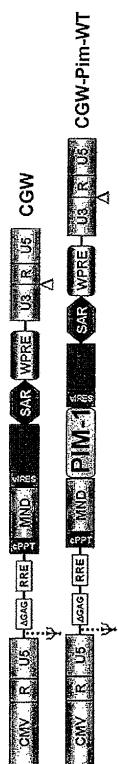
【図 19】



【図 20】



【図 21】



【配列表】

2011503207000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/US2008/083693 10.02.2009															
		PCT/US2008/083693															
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 5/08 (2008.04) USPC - 435/366 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>																	
<p>B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C12N 5/02, C12N 5/08 (2008.04) USPC - 435/366, 435/404</p>																	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Search																	
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US 2005/0054092 A1 (XU et al) 10 March 2005 (10.03.2005) entire document</td> <td>1-25</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2006/125321 A1 (COLES et al) 30 November 2006 (30.11.2006) entire document</td> <td>1-25</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>EP 0 934 422 B1 (HAMMOND et al) 06 December 2006 (08.12.2006) entire document</td> <td>4-6, 12-23</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 6,867,348 B1 (ZHANG et al) 15 March 2005 (15.03.2005) entire document</td> <td>1-29</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	US 2005/0054092 A1 (XU et al) 10 March 2005 (10.03.2005) entire document	1-25	Y	WO 2006/125321 A1 (COLES et al) 30 November 2006 (30.11.2006) entire document	1-25	Y	EP 0 934 422 B1 (HAMMOND et al) 06 December 2006 (08.12.2006) entire document	4-6, 12-23	A	US 6,867,348 B1 (ZHANG et al) 15 March 2005 (15.03.2005) entire document	1-29
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
Y	US 2005/0054092 A1 (XU et al) 10 March 2005 (10.03.2005) entire document	1-25															
Y	WO 2006/125321 A1 (COLES et al) 30 November 2006 (30.11.2006) entire document	1-25															
Y	EP 0 934 422 B1 (HAMMOND et al) 06 December 2006 (08.12.2006) entire document	4-6, 12-23															
A	US 6,867,348 B1 (ZHANG et al) 15 March 2005 (15.03.2005) entire document	1-29															
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>																	
* 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 application or patent 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																	
Date of the actual completion of the international search 06 January 2009		Date of mailing of the international search report 10 FEB 2009															
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2008/083693 10.02.2009

PCT/US2008/083693

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. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. 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:

3. Claims Nos.: 30 and 31 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:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying 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 report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. 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.:

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.

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 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 9/51	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

(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,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,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,AO,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,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ムラスキ,ジョン,エー.,ジュニア

アメリカ合衆国 92182 カリフォルニア州,サンディエゴ,カンパニーレ ドライブ 5
250

(72)発明者 サスマン,マーク,エー.

アメリカ合衆国 92130 カリフォルニア州,サンディエゴ,アズーロ コート 1273
0

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA10 CA02 DA02 EA04 FA02 HA17
4C076 AA19 AA65 CC11 CC26
4C084 AA13 DC28 MA02 MA24 MA37 NA14 ZA361 ZA371 ZA391 ZB211
ZB331 ZB351
4C087 AA01 AA02 BB65 BC83 CA12 MA24 MA37 NA10 ZA36 ZA37
ZA39 ZB21 ZB33 ZB35