(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2008-520747
(P2008-520747A)
(43)公表日　平成20年6月19日(2008.6.19)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00	4C084
A61P 9/10	(2006.01)	A61P	9/10	4C086
A61P 9/12	(2006.01)	A61P	9/12	
A61P 7/02	(2006.01)	A61P	7/02	
A61P 25/28	(2006.01)	A61P	25/28	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 64 頁）　最終頁に続く

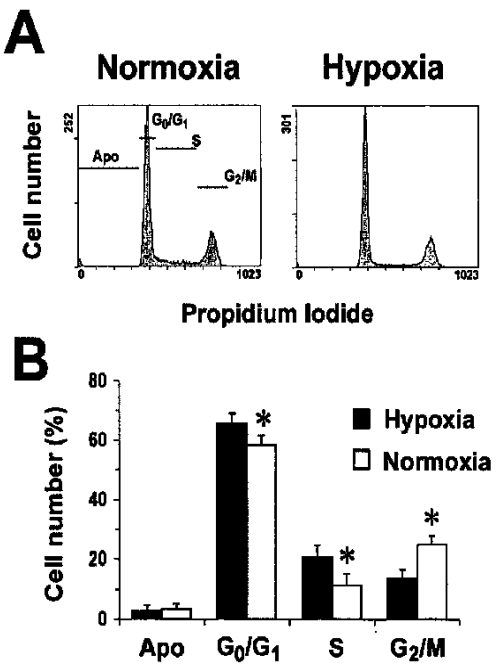
(21)出願番号　特願2007-543475 (P2007-543475)
(86)(22)出願日　平成17年11月22日 (2005.11.22)
(85)翻訳文提出日　平成19年7月23日 (2007.7.23)
(86)国際出願番号　PCT/US2005/042552
(87)国際公開番号　WO2006/055970
(87)国際公開日　平成18年5月26日 (2006.5.26)
(31)優先権主張番号　60/630,555
(32)優先日　平成16年11月22日 (2004.11.22)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　504043015
キング・ファーマシューティカルズ・リサーチ・アンド・デベロプメント・インコーポレイティッド
アメリカ合衆国　ノースカロライナ　２７５１３　カリー　センターグリーン・ウェイ　４０００　センターグリーン　２　スイート　３００
(74)代理人　100102668
弁理士　佐伯　憲生
(72)発明者　アンドリア　ピアー　ボリア
イタリア国　フェラーラ　イ－４４１００　ビア・デル・トゥルコ　１４

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アデノシンＡ３受容体アゴニストを用いたＨＩＦ－１が介在する疾患の促進的治療

(57)【要約】
本発明は、ＨＩＦ－１αの発現低下及び／又は減弱したＨＩＦ－１α活性を伴う病気や疾患（例えば、虚血関連疾患など）の治療、予防及び／又は管理のために、アデノシン受容体アゴニスト、好ましくはA_3受容体アゴニストを、単独で又は他の薬剤との組み合わせによる使用に関する。本発明の方法は、虚血又は低酸素によりもたらされる組織障害を低減する方法（例えば、実質的に組織障害を予防すること、組織保護を誘導することなど）に向けられる。本発明は、低酸素又はＨＩＦ－１αが関与する疾患の一つ又はそれ以上の症状を、Ａ３受容体アゴニストを単独で又は他の薬剤との組み合わせで投与することにより、治療し、予防し、及び／又は改善するための方法を提供する。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
治療を必要とする対象に、有効量のアデノシンＡ$_3$受容体アゴニストを投与することを含む、ＨＩＦ－１αの発現又は活性レベルの低下によって特徴付けられる虚血性疾患の治療方法。
【請求項２】
ＨＩＦ－１αの発現又は活性レベルが少なくとも１０％増大する、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
ＨＩＦ－１αの発現又は活性レベルが少なくとも３０％増大する、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
ＨＩＦ－１αの発現又は活性レベルが少なくとも６０％増大する、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
虚血性疾患が虚血性心血管疾患、肺高血圧症、又は妊娠疾患である、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
虚血性疾患が虚血性心血管疾患である、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
虚血性心血管疾患が、心筋虚血、脳虚血又は網膜虚血である、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
虚血性疾患が、心筋梗塞、狭心症、末梢性動脈病、深部静脈血栓症又は血管不全である、請求項５に記載の方法。
【請求項９】
虚血性疾患が妊娠疾患である、請求項５に記載の方法。
【請求項１０】
妊娠疾患が、子癇前症又は子宮内発育遅延である、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
虚血性疾患が、発作又は多梗塞性認知症である、請求項1に記載の方法。
【請求項１２】
虚血性疾患が末梢性動脈病である、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
末梢性動脈病が壊疽である、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
アデノシンＡ$_3$受容体アゴニストが、ＡＢ－ＭＥＣＡ（Ｎ^6－(４－アミノ－3－ヨードベンジル)－アデノシン－5‘－Ｎ－メチルウロナミド）、Ｎ^6－２－（４－アミノフェニル）エチル－アデノシン、ＩＢ－ＭＥＣＡ（Ｎ^6－（３－ヨードベンジル）－５’－Ｎ－メチルカルボキサミドアデノシン）、又は２－クロロ－ＩＢ－ＭＥＣＡである、請求項１に記載の方法。
【請求項１５】
有効量のアデノシンＡ$_3$受容体アゴニストを含む溶液中で臓器を貯蔵することを含む、哺乳動物由来の臓器を保存するための方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（１．　関連出願の相互参照）
本出願は、２００４年１１月２２日に出願された、米国仮出願番号第６０／６３０，５５５号の優先権を主張するものであり、その開示は、その全てを参照して本明細書に取り込む。

【０００２】
（２．　発明分野）
本発明は、ＨＩＦ－１αの発現低下及び／又は減弱したＨＩＦ－１α活性が伴う病気又は疾患（例えば、虚血関連疾患など）の治療、予防及び／又は管理のために、アデノシン受容体アゴニスト、好ましくはA_3受容体アゴニストを、単独か又は他の薬剤との組み合わせによる使用に関する。本発明の方法は、虚血又は低酸素状態によりもたらされる組織障害を低減する方法（例えば、実質的に組織障害を防御すること、組織保護を誘導することなど）に導く。本発明は、低酸素又はＨＩＦ－１αが関与する疾患の１つ又はそれ以上の症状を、A_3受容体アゴニストを単独か又は他の薬剤との組み合わせで投与することにより、治療し、予防し、及び／又は改善するための方法を提供する。

【背景技術】
【０００３】
（３．　発明の背景）
（３．１　アデノシン）
アデノシンは、最近は「根源的情報伝達分子」と呼ばれ（Linden 2001, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol, 41: 775-87）、発達に影響をもたらす可能性を持ち、あらゆる哺乳類の組織中に存在し、あらゆる哺乳類組織の生理的応答を調節している。アデノシンの作用は、酸素要求性が高く、酸素分圧が低い組織中、すなわち血管形成の速度よりも細胞増殖が高いような固形腫瘍の内側で、最も顕著である（Sitkovsky, 2004 Annu. Rev. Immunol. 22, 657-82; Fredholm, 2001, Pharmacol. Rev. 53, 527-552）。結果として、腫瘍は低酸素状態の局所領域を持ち、アデノシンは、高レベルに蓄積する（Hockel, 2001, J. Natl. Cancer Inst. 93, 266-76）。特に、アデノシンの顕著なレベルは、固形腫瘍の細胞外液に存在すると認識されており、このことからこのヌクレオシドが腫瘍の増殖に果たす役割が示唆されている。
【０００４】
アデノシンは、腫瘍の発達と関連する。上昇したアデノシン濃度は、腫瘍の塊の内側で報告されてきた。インビボで筋肉組織における腫瘍増殖を妨げ、インビトロで悪性腫瘍細胞の増殖や生存を低下させることは、抗腫瘍剤であることを示すと推測されてきた。しかしながら、アデノシンは、脳及び心臓において虚血性障害中に細胞保護剤として働くものとして知られている。アデノシンは、低酸素状態で放出されることが知られている。多くの研究が、アデノシンが虚血性障害から心臓の細胞を保護することを示している。
【０００５】
アデノシンは、たくさんの動物モデル及びヒトにおいて保護的役割をもつことが示されている（Am. J. Cardiol. 79(12A):44-48 (1997)）。例えば、心臓において、A_1及びA_3両受容体は、虚血に対する防御を表す（Am. J. Physiol., 273(42)H501-505 (1997)）。しかしながら、虚血に対して持続的な防御を表すのはA_3受容体である（PNAS 95:6995-6999 (1998)）。アデノシンが低酸素状態から腫瘍細胞を防御する能力があることは、本発明に先立って他者によって認識されたことはなかった。
【０００６】
アデノシンは、異なる集団のＧタンパク質ファミリーに連結した糖タンパク質である細胞表面受容体と相互作用する。今まで、４つのアデノシン受容体：A_1、A_{2A}、A_{2B}、A_3がクローン化され、性状解析されてきた。A_3受容体に選択的なアンタゴニストを、脳における抗炎症及び抗虚血剤として使用することが提案されてきた。最近、A_3アンタゴニストは、抗喘息薬、抗うつ薬、抗不整脈薬、腎臓保護剤、抗パーキンソン病薬、及び認知促進剤として開発中である。例えば、Ｍａｒｌｅｎｅ　Ｊａｃｏｂｓｏｎらの米国特許第５，６４６，１５６号では、選択的A_3アンタゴニストの使用により、好酸球の活性化を阻害する。
【０００７】
筋細胞を用いた最近の研究は、アデノシンA_3受容体が、虚血に対する長期的な防御に役割を果たすことを示してきた（Liang and Jacobson, PNAS, 1998, 95:6995-6999）。本

発明者らは、筋細胞に加え、腫瘍細胞を含む他の細胞種においても、アデノシンが保護作用を示すという仮説を立てているけれども、腫瘍細胞に対するアデノシンの保護効果を限定する努力はなされたことはない。

【０００８】

（３．２　ＨＩＦ－１の生物学）

低酸素誘導因子（ＨＩＦ）－１は、酸素恒常性の主たる制御因子として機能する転写因子である（Semenza, 2001, Trends Mol. Med. 7, 345-350.）。

【０００９】

ＨＩＦ－１は、誘導されて発現するＨＩＦ－１αサブユニットと定常的に発現するＨＩＦ－１βサブユニットからなるヘテロ二量体である（Epstein, 2001, Cell, 107, 43-54）。ＨＩＦ－１α及びＨＩＦ－１βｍＲＮＡは、正常酸素分圧及び低酸素条件下では、一定して発現される（Wiener, 1996 Biochem. Biophys. Res. Commun. 225,485-488）。ＨＩＦ－１の独特の特徴は、ＨＩＦ－１α発現の調節である：細胞内酸素濃度が低下するほど、発現が増大する（Cramer, 2003, Cell, 112, 645-657, Pugh, 2003, Nat. Med. 9, 677-84）。正常酸素分圧の間、ＨＩＦ－１αは、ユビキチンプロテアソーム系によってすばやく分解されるが、低酸素状況への曝露は、その分解を妨げる（Minchenko, 2002 J. Biol. Chem., 277, 6183-6187; Semenza, 2000, J. Appl. Physiol., 88, 1474-1480）。

【００１０】

ＨＩＦ－１が腫瘍の進展及び転移に貢献することを示す証拠の例数が増大している（Hopfl, 2004, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 286, R608-23; Welsh, 2003, Curr. Cancer Drug Targets. 3, 391-405）。免疫組織化学的解析は、ＨＩＦ－１αが、正常組織よりヒト腫瘍において高いレベルで存在することを示してきた（Zhong, 2000, Cancer Res. 60, 1541-5）。腫瘍の進展は、低酸素状態に対する適応に関係しており、腫瘍の酸素化と臨床転帰の間には逆相関がある（Pugh, 2003, Ann. Med. 35, 380-90; Semenza, 2000 J. Appl. Physiol., 88, 1474-1480）。特に、細胞内ＨＩＦ－１活性レベルは、ヌードマウスにおける腫瘍形成及び血管新生と相関がある（Chen, 2003, Am. J. Pathol. 162,1283-91）。ＨＩＦ－１発現を欠いている腫瘍細胞は、その増殖と血管形成において、顕著に機能低下している（Carmeliet, 1998, Nature 394, 485-90; Jiang, 1997, Cancer Res., 57, 5328-5335; Maxwell, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94, 8104-8109; Ryan, 1998 EMBO J. 17, 3005-3015）。それゆえ、ＨＩＦ－１αの発現及び活性は、腫瘍増殖及び進展に対し中心的役割をもつため、ＨＩＦ－１阻害は適切な抗腫瘍標的になる（Kung, 2000, Nat. Med. 6, 1335-40）。

【００１１】

ＨＩＦ－１αはまた、虚血性心血管疾患、肺高血圧症、及び妊娠疾患を含む他の疾患にも関係していることが示されてきた。

（４．　発明の要約）

【００１２】

特定の作用機構に縛られることを意図するものではないが、本発明は部分的に、アデノシンがA_3受容体を介してＨＩＦ－１αレベルを調節し、それゆえA_3受容体アゴニストを用いてこの経路を活性化することが、ＨＩＦ－１αの発現及び／又は活性が低下している疾患において有益な効果をもつであろう、という発明者の発見に基づいている。従って、本発明は、ＨＩＦ－１αの発現低下及び／又は減弱したＨＩＦ－１α活性が伴う病気又は疾患（例えば、虚血性心血管疾患など）のA_3受容体アゴニストを使用することによる治療、予防及び／又は管理のための方法に関する。本発明の方法は、A_1、A_{2A}又はA_{2B}受容体アゴニストとの組み合わせで使用されてもよい。特定の作用機構に縛られることを意図するものではないが、本発明のA_3受容体アゴニストが、ＨＩＦ－１α発現を上方調節し、これにより血管新生及び、ＨＩＦ－１α発現及び／又は活性の低レベルの結果としてもたらされる虚血性障害からの回復を、促進する。最も好ましい態様では、本発明の方法は、A_3受容体アゴニスト単独での使用による、ＨＩＦ－１αの低下した発現及び／又は減弱したＨＩＦ－１α活性に関連する病気又は疾患の治療、予防及び／又は管理に

関する。

【００１３】

本発明は、ＨＩＦ－１発現又は活性の調節により改善又は改良される、低酸素又は虚血に関係する組織障害を含む、ＨＩＦ－１が介在する疾患の治療のための方法を提供する。本発明の方法及び組成物により処置される適切な臨床条件は、脳、心臓、又は末梢循環の疾患による虚血を含む。本発明の１つの治療的目的は、ＨＩＦ－１α発現及び／又は活性を促進することによる虚血組織内の血管新生を促進することである。特定の作用機構に縛られることを意図するものではないが、そのような促進は、ＨＩＦ－１αの内因性ＨＩＦ－１βとの二量化、特異的ＤＮＡ配列に対する結合、及びこれに限定されないが、既知のＨＩＦ－１標的遺伝子である血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）をコードする遺伝子のような、血管新生に関係する低酸素誘導遺伝子の転写活性化をもたらすであろう。

【００１４】

別の態様では、本発明の方法は、その時点で低酸素状態でなくとも、例えば心臓発作などの虚血性の状況、を防ぐために、虚血性疾患の危険性のある患者における血管新生を誘導する予防的な方法を提供する。

【００１５】

本発明の方法は、治療に有効な量のＡ$_3$受容体アゴニスト、及び上記化合物の薬学的に許容可能な塩を、治療が必要な哺乳動物に投与することを含む、虚血又は低酸素の結果もたらされる組織障害を低減する方法（例えば、実質的に組織障害を予防すること、組織保護を誘導することなど）に導く。本発明の方法及び組成物から恩恵を受けうる虚血又は低酸素組織は、心臓、脳、肝、腎、肺、消化管、骨格筋、脾臓、すい臓、神経、骨髄、網膜組織、血管又は腸組織を含むが、それらに限定されるものではない。特に好ましい虚血性又は低酸素組織は、心臓の組織である。手術前後の心血管の虚血性傷害を避けるために化合物が投与されることは、特に好ましい。いくつかの態様では、本発明の化合物は予防的に投与される。本発明は、臓器移植の際に起こる虚血性又は低酸素の組織障害の管理を包含する。好ましくは、本発明の化合物は、心臓の外科手術又は心臓以外の外科手術の前、術中又は直後に投与される。

【００１６】

本発明の別の局面は、治療に有効な量のＡ$_3$受容体アゴニストの化合物を哺乳動物に投与すること含む、手術中（例えば、冠動脈バイパス術（ＣＡＢＧ）、血管手術、経皮経管冠動脈形成術（ＰＴＣＡ）又はあらゆる経皮経管冠動脈形成の診療行為（ＰＴＣＩ）、臓器移植、又は他の心臓以外の手術）に、心血管組織障害を減弱する方法（例えば、組織防御を含む、組織障害を実質的に防止すること）に向いている。

【００１７】

本発明は、本発明の１つ又はそれ以上の化合物を、単独か又は他の治療薬及び／又は予防薬との組み合わせで用いることで、虚血性心臓病を治療する及び／又は予防することを包含する。特定の作用機構に限定することを意図するものではないが、虚血はしばしば心血管系の要求に比べて心血流の減少により引き起こされる。血流の減少は、さまざまな理由から生じ、典型的には動脈硬化の結果として起こる。本発明の方法は、心筋に対する障害、心臓の不整脈、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、及び突然心臓死を含む虚血関連の低下した血流、又は他の虚血関連組織又は臓器の障害を減弱するのに効果的である。虚血は、当業者に知られ、本明細書に開示されるあらゆる方法で評価されうる。虚血性障害の評価は、例えば、臓器の梗塞（傷跡）の大きさを測ることでなされてもよい。

【００１８】

本発明の化合物及び方法は、不十分な血管形成、又は血管に対する傷害に関連する疾患又は症状を治療するための血管新生や血管形成の増大に特に有用である。例えば、本発明のＡ$_3$受容体アゴニスト化合物は、手術、特に血管又は心臓の外科手術を受けた個体に、血管修復の速度を改善するために投与されうる。二つ目の例として、本発明のアゴニスト化合物は、非回復期創傷、すなわちレイノー病である個体のような、末梢血流が不十分な個体を治療するために用いられうる。こうして、別の態様で、本発明は、血管新生又は血

管形成を検出可能にまで増大させる薬剤の量を、血管新生又は血管形成を増大させるのに十分な量の薬剤を、個体に投与することを含む、不十分な血管新生又は血管形成に関連する症状又は疾患を有する個体を治療する方法を提供する。

【００１９】

A_3受容体アゴニストを含む本発明の方法と組成物は、当業者に知られ本明細書に開示される方法を用いて決定されるような、ＨＩＦ－１αの発現及び／又は活性のレベルが、標準的レベル又はバックグラウンドレベル以下に減少しているときに、特に有用である。

【００２０】

本明細書で用いられる、ＨＩＦ－１αの測定されたレベルの標準的なレベルへの「回復」は、サンプル又は対象のＨＩＦ－１α量又は濃度が、当該技術分野で公知又は将来開発されるＨＩＦ－１αを測定するための方法の何れかで検出される標準と比較して低く、本発明の方法が、そのレベルをバックグラウンド又は標準的レベルに戻すことができること、を意味する。そのような回復は、ＨＩＦ－１αレベルが、標準レベルの約１０％、約２０％、約４０％、約８０％、約２倍、約４倍、約１０倍、約２０倍、約５０倍、約１００倍、約２～２０倍、２～５０倍、２～１００倍、２０～５０倍、２０～１００倍とレベルに回復することを含むが、これらに限定されるものではない。本明細書で用いられる「約」という用語は、標準的数値のプラスマイナス１０％の変動レベルを意味する。

【００２１】

本発明の治療法は、ＨＩＦ－１αの減少した発現及び／又は減弱したＨＩＦ－１α活性に関連する病気又は疾患（例えば、虚血性心血管疾患など）の治療効果を、その治療の慣用的な方法と比較して、改善するために、治療有効量のA_3受容体アゴニストを、投与することを含む。

【００２２】

好ましくは、本発明の方法は、少なくとも１日、１週間、１ヶ月、２ヶ月、少なくとも４ヶ月、少なくとも６ヶ月の治療計画の内に、ＨＩＦ－１αレベルをバックグラウンドレベルに増大させる。最も好ましい態様では、本発明の方法は、ＨＩＦ－１αレベルの標準的レベルへの完全な回復をもたらす。本発明は、ＨＩＦ－１αレベルのバックグラウンドレベルの約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％以内のレベルへの回復を包含する。

【００２３】

好ましい特定の態様では、本発明は、本明細書に開示される治療的及び／又は予防的有効量のA_3アゴニスト化合物を投与することを含む、ＨＩＦ－１αの発現低下及び／又は減弱したＨＩＦ－１α活性が伴う病気又は疾患（例えば、虚血性疾患）の治療、予防及び／又は管理のための方法を包含する。

【００２４】

本発明のA_3受容体アゴニストは、単独か又は他の治療薬及び予防薬（A_1受容体アゴニストを含む）との組み合わせのいずれかで、その障害を有する又は危険性がある対象において、低酸素又は虚血関連の組織障害を減弱させるために、特に有用である。本発明は、本発明のA_3受容体アゴニストを用いることにより、ＨＩＦ－１αが介在する病気又は疾患の治療、予防及び／又は管理のための方法と組成物に関する。本発明の方法は、治療的及び／又は予防的有効量のA_3アゴニストを単独か又は他の、A_1、A_{2A}、及びA_{2B}アゴニストに限らないがそれらを含む、治療薬及び／又は予防薬との組み合わせで投与することを意図している。A_3受容体アゴニストは、これらに限定されないが、虚血性心血管疾患（例えば、心筋虚血、脳虚血、網膜虚血）、肺高血圧症、妊娠疾患（例えば、子癇前症、子宮内発育遅延）、他の血液供給が遮断される必要がある外科的手術、又は低下した血流を有する他のあらゆる疾患を含む、ＨＩＦ－１αが関わる病気又は疾患の治療に、特に有用である。特定の作用機構に限定することを意図するものではないが、本発明のアゴニストは、ＨＩＦ－１αのレベル及び／又は活性、若しくは血管新生を促進するＨＩＦ－１α関連活性を増大させることにより、治療的に有効である。ＨＩＦ－１αの過剰発現は、内因性のＨＩＦ－１βとの二量化、及びこれに限定されないが、血管内皮増殖因子

を含む血管新生に関わる低酸素誘導遺伝子の活性化をもたらす。

【００２５】

本発明は、本発明の方法において使用される、A_3受容体アゴニストである化合物を包含する。そのような化合物の例は、米国特許出願公開第２００４／０２０４４８１Ａ１号公報；同第２００４／０１９８６９３Ａ１号公報；同第２００４／０１９８６９３Ａ１号公報；同第２００４／０１１６３７６Ａ１号公報；同第２００４／０１０６５７２Ａ１号公報；同第２００３／０１６６６０５Ａ１号公報；同第２００３／０１４３２８２Ａ１号公報；同第２００３／００７８２３２Ａ１号公報；同第２００２／０１６５１９７号公報；同第２００２／０１１５６３５号公報及び米国特許第６，５８６，４１３号；同第６，４４８，２５３号；同第６，４０７，２３６号；同第６，３５８，９６４号；同第６，３２９，３４９号；同第６，２１１，１６５号；同第５，５７３，７７２号及び同第５，４４３，８３６号であり；これらの全ては、その全てを参照して本明細書に取り込む。

【００２６】

本発明は、低酸素誘導因子１α（ＨＩＦ－１α）の関わる病気又は疾患に関連する症状を予防し、治療し、又は改善するために、動物に、好ましくは哺乳動物に、そして最も好ましくはヒトに、１つ又はそれ以上の本発明の化合物を、投与することを含む治療法を包含する。

【００２７】

本発明はさらに、A_3受容体に結合し活性化する、治療的又は予防的に有効な量の化合物及び薬学的に許容可能な担体を含む、薬学的組成物を提供する。化合物は、アデノシンA_1アゴニスト及び１つ又はそれ以上の賦形剤をも含む薬剤で用いられる。

【００２８】

本発明は又、対象におけるＨＩＦ－１αの発現低下及び／又は減弱したＨＩＦ－１α活性に関連する病気又は疾患の予後を決定するための方法を包含する。好ましくは、対象はヒトであり、最も好ましくは、対象は以前に治療法を処置されていた者である。本発明は、対象が本発明の治療的及び／又は予防的方法の必要性があるかどうかを決定するために、対象の少なくともＨＩＦ－１αレベルを測定することを包含する。本発明は、対象から得られたサンプル中のＨＩＦ－１αレベルを測定し、測定されたレベルと標準的なレベルを比較することを包含する。ここで標準的なレベルと比較してＨＩＦ－１αの測定されたレベルの回復は、対象が病気又は疾患、例えば虚血性疾患などの進展の増大した危険性を有していることを意味する。

【００２９】

（4．１　定義）

本明細書で用いられる、「アデノシンA_3受容体アゴニスト」という用語は、アデノシンA_3受容体に対する親和性が、アデノシンA_1及びA_2受容体に対する親和性より、少なくとも１０倍、好ましくは、少なくとも５０倍高く、アデノシンA_3受容体に選択的な化合物を定義するために用いられる。特異的及び非特異的A_1，A_2，及びA_3受容体アゴニストは、当業者によく知られている。これらアゴニストの例は、例えば、１９９９ＲＢＩ（シグマ）及びトクリスカタログに見られる。適切なアゴニストの例は、ＡＢ－ＭＥＣＡ（A_3）、アデノシンアミン同種物（ＡＤＡＣ）（A_1）、Ｎ６－２－（４－アミノフェニル）エチル－アデノシン（ＡＰＮＥＡ）（A_3）、ＣＧＳ－２１６８０ＨＣｌ（A_{2A}）、２－クロロアデノシン（$A_1 > A_2$）、２－クロロシクロペンチルアデノシン（A_1）、Ｎ６－シクロヘキシルアデノシン（A_1）、Ｎ６－シクロペンチルアデノシン（A_1）、５‘－Ｎ－シクロプロピルカルボキサミドアデノシン（A_2）、ＤＰＭＡ（ＰＤ１２５，９４４）（A_{2A}）、ＥＮＢＡ（Ｓ－）（A_1）、５‘－Ｎ－エチルカルボキサミドアデノシン（ＮＥＣＡ）（A_{2B}）、ＩＢ－ＭＥＣＡ（A_3）、ＭＥＣＡ（$A_2 > A_1$）、１－メチルイソグアノシン（A_1）、メトリフジル（A_2）、２－フェニルアミノアデノシン（$A_2 > A_1$）、Ｎ６－フェニルアデノシン（$A_1 > A_2$）、Ｎ６－フェニルエチルアデノシン（$A_1 > A_2$）、Ｒ－ＰＩＡ（A_1）、Ｓ－ＰＩＡ（A_1）、Ｎ６－スルフォフェニルアデノシン（A_1）、及び２－クロロ－ＩＢ－ＭＥＣＡ（A_3）、に限ら

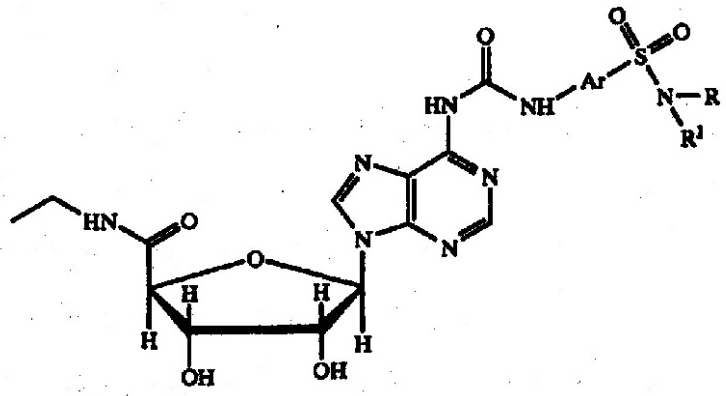
ないがこれらを含む。

【００３０】

Ａ$_3$受容体アゴニストの別の例は、以下の一般構造：

【００３１】

【化００１】



【００３２】

（式中、

Ａｒはアリル基であり；

ＲとＲ^{1}は、それぞれ独立して、Ｈ、アルキル、アリル、置換アルキル、置換アリル、ヘテロアリル、アルケニル、置換アルケニル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、アルキニル又は置換アルキニルであり、又はＲとＲ^{1}が一緒になって、脂環式及び芳香族構造の両方を含む置換又は非置換の炭素環又は複素環の縮合環系を形成してもよい）

で表される化合物、又は薬学的に許容可能なその塩である。

【００３３】

本明細書で用いられるように、Ａ$_3$受容体に対する親和性が、Ａ$_1$、Ａ$_{2A}$及びＡ$_{2B}$受容体に対する親和性より大きいならば、化合物はＡ$_3$受容体に対して選択性がある。好ましくは、Ａ$_1$／Ａ$_3$及びＡ$_2$／Ａ$_3$親和性の比率は、約５０より大きい、好ましくは５０～１００、より好ましくは、約１００より大きい。Ａ$_3$受容体の薬理は、種によって、特にげっ歯類のＡ$_3$とヒトのＡ$_3$受容体の間で異なるので、ヒトアデノシン受容体においてＡ$_3$化合物の選択性を決定することが重要である。それらが選択的であるかどうかに関して、同じことが、アデノシンＡ$_1$とＡ$_{2A}$受容体に対してもあてはまる。

【００３４】

本明細書で用いられるように、ＨＩＦ－１αの測定されたレベルの標準的なレベルへの「回復」は、サンプルや対象のＨＩＦ－１αの量又は濃度が、当該技術分野で公知又は将来開発されるＨＩＦ－１αを測定するための方法の何れかで検出される標準と比較して低く、本発明の方法が、そのレベルをバックグラウンド又は標準的レベルに戻すことができること、を意味する。そのような回復は、ＨＩＦ－１αレベルが、標準レベルの約１０％、約２０％、約４０％、約８０％、約２倍、約４倍、約１０倍、約２０倍、約５０倍、約１００倍、約２～２０倍、２～５０倍、２～１００倍、２０～５０倍、２０～１００倍のレベルに回復することを含むが、これらに限定されるものではない。本明細書で用いられる「約」という用語は、標準的数値のプラスマイナス１０％の変動レベルを意味する。

【００３５】

本明細書で用いられる「標準的レベル」又は「バックグラウンドレベル」という用語は、一人又はそれ以上の正常対象者、すなわち既往歴がなく、現在病気又は疾患に罹患していない対象者において決定されるような、ＨＩＦ－１αレベルのベースラインの量を意味する。例えば、ベースラインは、少なくとも一人の対象、及び好ましくは対象の平均（例えば、ｎ＝２～１００又はそれ以上）から得られる。ここで対象又は対象者たちは、病気又は疾患の履歴がなく、特にＨＩＦ－１αの関連する疾患の既往歴のない対象者である。

本発明においては、ＨＩＦ－１αレベルの測定は、ＨＩＦ－１αプローブ又はＨＩＦ－１α活性測定を用いて実行される（セクション６．３．３を参照されたい）。

【００３６】

本明細書で用いられる「低酸素」又は「虚血」は、組織の生理機能が危険に曝される、及び／又は１つ又はそれ以上の組織における血液供給が危険に曝される、あらゆる状況を意味する。これら二つの用語は、同義的に用いられてもよい。その状況はまた、１つ又はそれ以上の組織における酸素の分圧の減少を包含する。「低酸素」又は「虚血」という用語は、細胞、組織、又は臓器が、酸素欠乏又は減少した血流を経験するあらゆる状況を包含する。

【００３７】

本明細書で用いられる「治療する」、「治療すること」及び「治療」という用語は、１つ又はそれ以上の治療薬の投与によりもたらされる疾患の根絶、除去、調節、又は制御を意味する。ある特定の態様では、そのような用語は、１つ又はそれ以上の治療薬をそのような疾患をもつ対象に投与することによってもたらされる疾患を最小化すること、又は疾患の進行を遅くすることを意味する。

【００３８】

本明細書で用いられる「治療有効量」とは、疾患の拡大を遅らせる又は最小化するために十分な治療薬の量を意味する。治療有効量は又、例えば虚血性疾患などの病気又は疾患の治療又は管理に治療の有益性を提供する治療薬の量を意味する。さらには、本発明の治療薬に関して治療有効量は、治療薬単独、又は、疾患の治療又は管理に治療的な有益性を提供する他の治療法との組み合わせにおける量を意味する。本発明の化合物の量と関連して使用される場合には、本用語は、治療全体を改善し、望ましくない効果を減弱又は避け、若しくは他の治療薬との相互作用による治療的な有効性を促進する量を包含しうる。

【００３９】

本明細書で用いられる「予防薬」及び「複数の予防薬」という用語は、疾患の予防、又は疾患の再発若しくは拡大の防止において用いられるあらゆる薬剤を意味する。予防的に有効な量は、疾患の再発若しくは拡大、又はこれに限定されないが疾患にかかりやすい人を含む患者における疾患の発生、疾患の再発若しくは拡大、を予防するのに十分な予防薬の量を意味する。予防的に有効な量は又、疾患を防ぐ際に、予防効果を提供する予防薬の量を意味する。さらには、本発明の予防薬に関して予防的に有効な量は、予防薬単独、又は疾患の阻止に予防効果を提供する他の薬剤との組み合わせにおける予防薬の量を意味する。本発明の化合物の量と関連して使用される場合には、本用語は、予防全体を改善し、又は、それらに限定されるものではないが治療的な抗体のような他の予防薬との相互作用で予防的な有効性を促進する量を含有することができる。

【００４０】

本明細書で用いられる「管理する」、「管理すること」及び「管理」という用語は、予防薬又は治療薬の投与から対象が受ける有益な効果であって疾患の治療につながらないものを意味する。ある特定の態様では、対象は、疾患の進展又は悪化を防ぐために疾患を「管理する」１つ又はそれ以上の予防薬又は治療薬を投与される。

【００４１】

本明細書で用いられる「予防する」、「予防している」及び「予防」という用語は、予防薬又は治療薬の投与により対象にもたらされる、疾患の１つ又はそれ以上の症状の再発若しくは発症の予防を意味する。

【００４２】

本明細書で用いられる、「組み合わせで」という用語は、１つ以上の予防薬及び／又は治療薬の使用を意味する。「組み合わせで」という用語の使用は、予防薬及び／又は治療薬が疾患に罹患した対象に投与される順番を制限しない。最初の予防薬又は治療薬は、２番目の予防薬又は治療薬の投与に前もって（例えば、１分、５分、１５分、３０分、４５分、１時間、２時間、４時間、６時間、１２時間、２４時間、４８時間、７２時間、９６時間、１週間、２週間、３週間、４週間、５週間、６週間、８週間又は１２週間前など）

、同時に、又は後に続いて（例えば、１分、５分、１５分、３０分、４５分、１時間、２時間、４時間、６時間、１２時間、２４時間、４８時間、７２時間、９６時間、１週間、２週間、３週間、４週間、５週間、６週間、８週間又は１２週間後など）、疾患に罹患した、罹患している、又は疾患に罹患しうる対象に投与されうる。予防薬又は治療薬は、他の方法で投与された場合に比べて増大した有益性を提供するために、本発明の薬剤が他の薬剤とともに作用し得る間隔を置いて又は作用した後に、対象に投与される。あらゆる付加的な予防薬又は治療薬は、他の付加的な予防薬又は治療薬とともにあらゆる順番で投与されうる。

【００４３】

（６．　発明の詳細な説明）

本発明は、A_3受容体アゴニストを単独か又はA_1受容体アゴニストとの組み合わせで使用することによる、ＨＩＦ－１αの低下した発現及び／又は減弱したＨＩＦ－１α活性に関連する病気又は疾患（例えば、虚血性心血管疾患）の治療、予防及び／又は管理の方法に関する。特定の作用機構に縛られることを意図するものではないが、本発明のA_3受容体アゴニストは、ＨＩＦ－１α発現を上方制御し、こうして血管新生並びに、低レベルのＨＩＦ－１α発現及び／又は活性の結果として起こる虚血性障害の回復、を促進する。最も好ましい態様では、本発明の方法は、A_3受容体アゴニストを単独で用いることで、ＨＩＦ－１αの発現低下及び／又は減弱したＨＩＦ－１α活性が伴う病気又は疾患の治療、予防、及び／又は管理に関する。

【００４４】

本発明の方法及び化合物は、不十分な血管形成又は血管傷害に関連する疾患又は症状を治療し、血管形成や血管新生を増大させるために、特に有用である。例えば、A_3受容体アゴニストは、外科手術、特に血管又は心臓手術を受けた個体に対し、血管修復の速度を向上させるために投与される。２番目の例において、A_3受容体アゴニストは、非治癒の創傷をもつ個体、すなわちレイノー病のような、末梢血流が不十分な個体を治療するために用いられる。こうして、別の態様では、本発明は、検出可能なほどに血管新生又は血管形成を増大させるA_3受容体アゴニストの量を個体に投与、つまり当該アゴニストを血管新生又は血管形成を増大させるのに十分な量で投与することを含む、不十分な血管新生又は血管形成に関連する症状又は疾患に罹患した個体を治療する方法を提供する。

【００４５】

本発明の方法及び組成物に用いられるA_3受容体アゴニストは、虚血の危険性がある哺乳動物の臓器の虚血を低減するために、特に有用である。本発明の方法は、哺乳動物に、選択的A_3受容体アゴニストを含む有効量の薬学的な組成物を投与することを包含する。虚血は、酸素化された血液の欠乏である。血液の欠乏は、例えば、血管の機能的な収縮又は閉塞によって引き起こされうる。これらに限定されるものではないが、心臓、脳、腎臓、及び小腸を含むいくつかの臓器は、虚血になる。本発明の方法は、１つ又はそれ以上の臓器における虚血を低減するために効果的である。

【００４６】

いくつかの態様では、本発明は、１つ又はそれ以上のA_3受容体アゴニストを単独か又はその他の治療薬及び／又は予防薬との組み合わせで用いることで、虚血性心臓病を治療し及び／又は予防することを包含する。特定の作用機構に縛られることを意図するものではないが、虚血はしばしば心筋の要求に対する心血流の相対的な減少によって引き起こされる。血流の減少は、さまざまな理由でもたらされ、一般的には動脈硬化の結果として引き起こされる。本発明の方法は、虚血関連性の低下した血流、又は心筋に対する障害、不整脈、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心疾患及び突然心臓死を含む、その他の虚血関連組織又は臓器障害を減弱することに有効である。虚血は、当業者に公知の方法の何れかで評価される。虚血性障害の評価は、例えば、臓器の梗塞（傷跡）の大きさを測定することによりなされてもよい。

【００４７】

本発明の方法は、そのような治療の必要性がある哺乳動物に治療有効量のA_3受容体ア

ゴニストである、上記化合物の薬学的に許容可能な塩を投与することを含む、虚血又は低酸素状態によりもたらされる組織障害（例えば、実質的に組織障害を予防すること、組織防御を誘導すること）を減少させる方法を導く。個々に又は集団として採取される好ましい虚血性又は低酸素組織は、虚血性又は低酸素状態の組織が、心臓、脳、肝臓、腎臓、肺、消化管、骨格筋、脾臓、すい臓、神経、脊髄、網膜組織、血管又は腸組織であるところの組織である。特に好ましい虚血性又は低酸素状態の組織は、心臓組織である。化合物が手術前後の心筋虚血性傷害を予防するために投与されることは、特に好ましい。好ましくは、A_3受容体アゴニストは、予防的に投与される。虚血性又は低酸素障害は、臓器移植の間に起こりうる。好ましくは、A_3受容体アゴニストは、心臓の手術又は心臓以外の手術の前、術中又は直後に投与される。

【００４８】

本発明の別の態様は、哺乳動物に治療有効量の本発明のA_3受容体アゴニストの化合物を投与することを含む、手術（例えば、冠動脈バイパス術（ＣＡＢＧ）、血管手術、経皮経管冠動脈形成術（ＰＴＣＡ）、又はあらゆる経皮経管冠動脈形成の診療行為（ＰＴＣＩ）、臓器移植、又は他の心臓以外の手術）での心筋組織障害を減弱する（例えば、実質的に組織障害を予防すること、組織の保護を誘導すること）方法を導く。

【００４９】

別の態様では、本発明は、有効量のアデノシンA_3受容体アゴニストを含む溶液中に臓器を貯蔵することを含む、哺乳動物由来の臓器を保存する方法に関する。例えば、有効量のA_3アゴニストは、１つ又はそれ以上の緩衝液系とともに臓器貯蔵溶液中に含まれてもよい。

【００５０】

A_3受容体アゴニストを含む、本発明の方法及び組成物は、当業者に知られる方法及び本明細書に開示される方法を用いて決定する場合に、ＨＩＦ－１αの発現及び／又は活性レベルが標準又はバックグラウンドレベルより減弱しているときに、特に有用である。

【００５１】

本明細書で用いられる、ＨＩＦ－１αの測定されたレベルの標準的なレベルへの「回復」は、サンプル又は対象のＨＩＦ－１α量又は濃度が、当該技術分野で公知又は将来開発されるＨＩＦ－１αを測定するための方法の何れかで検出される標準と比較して低く、本発明の方法が、そのレベルをバックグラウンド又は標準的レベルに戻すことができること、を意味する。そのような回復は、ＨＩＦ－１αレベルが、標準レベルの約１０％、約２０％、約４０％、約８０％、約２倍、約４倍、約１０倍、約２０倍、約５０倍、約１００倍、約２～２０倍、２～５０倍、２～１００倍、２０～５０倍、２０～１００倍のレベルに回復することを含むが、これらに限定されるものではない。本明細書で用いられる「約」という用語は、標準的数値のプラスマイナス１０％の変動レベルを意味する。

【００５２】

本明細書で用いられる「標準的レベル」又は「バックグラウンドレベル」という用語は、１つ又はそれ以上の正常対象者、すなわち既往歴がなく、現在病気又は疾患に罹患していない対象者において決定されるような、ＨＩＦ－１αレベルのベースラインの量を意味する。例えば、ベースラインは、少なくとも一人の対象、及び好ましくは対象の平均（例えば、ｎ＝２～１００又はそれ以上）から得られる、ここで対象又は対象者たちは、病気又は疾患の履歴がなく、特にＨＩＦ－１αの関連する疾患の既往歴のない対象者である。

【００５３】

本発明において、ＨＩＦ－１αレベルの測定は、ＨＩＦ－１αプローブ又はＨＩＦ－１α活性測定法（セクション５．３．４を参照されたい）を用いて実施される。本明細書で用いられる、本発明の方法におけるＨＩＦ－１αのレベル測定の参考は、ＨＩＦ－１αレベルのあらゆる代用物に関する。例えば、そのようなレベルは、これらに限定されるものではないが、対象由来のサンプル中のＨＩＦ－１α核酸又はアミノ酸配列の量を含んでもよい。ＨＩＦ－１αレベルは、ＨＩＦ－１αの全長タンパク質の量に対応してもよい。あるいは、ＨＩＦ－１αのレベルは、ＨＩＦ－１αタンパク質の断片、類似物、又は誘導体

の量に対応してもよい。ＨＩＦ－１αレベルは、ＨＩＦ－１αの全長又は断片に対応する核酸（又はそれに相補的な配列）の量を測定することにより決定される。より好ましい態様では、ＨＩＦ－１αをコードするｍＲＮＡの量が測定される。

【００５４】

本明細書で用いられる、ＨＩＦ－１αの量又は濃度を決定できるプローブは、これらに限定されないが、抗体、抗原、核酸、タンパク質又は小分子を含む。特定の態様では、プローブはＨＩＦ－１αタンパク質又はその断片である。別の態様では、プローブは、例えばモノクローナル抗体又はその結合断片のような、免疫学的に特異的にＨＩＦ－１αに結合する抗体である。

【００５５】

特定の態様では、ＨＩＦ－１αのレベルを測定することは、（ａ）アリコートに、ＨＩＦ－１αに対し免疫学的に特異的である抗体又はその断片を接触させること、及び（ｂ）抗体又はその断片とアリコート中のＨＩＦ－１αの少なくとも一種との間で結合が起こるかどうか、及びどの程度起こるかを検出すること、からなる上記の試験段階である、サンプルの少なくとも１つのアリコートを試験することを含む。別の特定の態様では、ＨＩＦ－１αのレベルを測定することは、（ａ）アリコートに、ＨＩＦ－１αｍＲＮＡにハイブリダイズする核酸プローブと接触させること、及び（ｂ）核酸プローブとアリコート中のＨＩＦ－１αｍＲＮＡの少なくとも一種との間でハイブリダイゼーションが起こるかどうか、及びどの程度起こるかを検出すること、からなる試験段階を含む、少なくとも１つのアリコートを試験することを含む。両方の態様では、ＨＩＦ－１αのレベルを測定することは、複合体形成量を定量することを含む。例えば、抗体又はその断片とアリコート中のＨＩＦ－１αの少なくとも一種の間の複合体形成量は、サンプルのアリコート中のＨＩＦ－１αの少なくとも一種の量と相関するであろう。

【００５６】

更なる特定の態様では、抗体又は他のプローブは、検出可能なマーカーで標識される。別の特定の態様では、検出可能なマーカーは、化学発光、酵素、蛍光、又は放射性の標識である。

【００５７】

本発明の治療方法は、伝統的な治療法に比べて、ＨＩＦ－１αの発現低下及び／又は減少したＨＩＦ－１α活性に関連する病気又は疾患（例えば、虚血性疾患）の治療効果を改善するために、本発明の治療に有効な量のＡ$_3$受容体アゴニストを投与することを含む。

【００５８】

好ましくは本発明の方法は、治療計画の少なくとも１日、１週間、１ヶ月、２ヶ月、少なくとも４ヶ月、少なくとも６ヶ月以内に、ＨＩＦ－１αレベルを標準的レベルに増大させる。最も好ましい態様では、本発明の方法は、ＨＩＦ－１αレベルのバックグラウンドレベルへの完全な回復をもたらす。本発明は、ＨＩＦ－１αレベルのバックグラウンドレベルの約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％以内のレベルへの回復を包含する。

【００５９】

好ましい特定の態様では、本発明は、本明細書に開示されるＡ$_3$受容体アゴニストの治療及び／又は予防に有効な量を投与することを含む、ＨＩＦ－１αの発現低下及び／又は減弱したＨＩＦ－１α活性に関連する病気又は疾患（例えば、虚血性疾患）の治療、予防、及び／又は管理の方法を包含する。

【００６０】

本発明の組成物及び方法に使用するＡ$_3$受容体アゴニストは、単独又はその他の治療薬及び予防薬（Ａ$_1$受容体アゴニストを含む）との組み合わせのいずれかで、そのような障害を有する又は危険性のある対象における低酸素又は虚血関連組織障害を減弱するために特に有用である。本発明は、本発明のＡ$_3$受容体アゴニストを用いることによる、ＨＩＦ－１αが介在する病気又は疾患の治療、予防、及び／又は管理のための方法及び組成物に関する。本発明の方法は、治療及び／又は予防に有効な量のＡ$_3$受容体アゴニストを、単

独か又は他の薬剤との組み合わせで投与することを意図する。本発明の組成物及び方法に用いるA$_3$受容体アゴニストは、これらに限定されないが、虚血性心血管疾患（例えば、心筋虚血、脳虚血、網膜虚血）、肺高血圧症、妊娠疾患（例えば、子癇前症、子宮内発育遅延）、血液供給が遮断される必要のあるあらゆる外科手術、又は低下した血流に関連するその他のあらゆる疾患を含む、ＨＩＦ－１α関連の病気又は疾患の治療に特に有効である。

【００６１】

特定の態様では、本発明の方法は、末梢性動脈病の治療に用いられうる。例えば、いくつかの態様では、末梢性動脈病は、壊疽、深部静脈血栓症又は血管不全である。

【００６２】

その他の特定の態様では、本発明の方法は、脳卒中又は多梗塞性の認知症のような低下した脳循環に関連する疾患を治療するために用いられる。

【００６３】

特定の作用機構に縛られることを意図するものではないが、本発明のアゴニストは、ＨＩＦ－１αのレベル及び／又は活性、若しくは血管新生を促進するＨＩＦ－１α関連活性を増大させることにより治療的に有効である。ＨＩＦ－１αの過剰発現は、内因性ＨＩＦ－１βとの二量体化、及びこれに限定されないが、血管内皮増殖因子を含む血管新生に関連する低酸素誘導性遺伝子の活性化をもたらす。

【００６４】

本発明は、本発明の方法に用いるA$_3$受容体アゴニストである化合物を包含する。そのような化合物の例は、米国特許出願公開第２００４／０２０４４８１Ａ１号公報、同第２００４／０１９８６９３Ａ１号公報、同第２００４／０１２１９７８Ａ１号公報、同第２００４／０１１６３７６Ａ１号公報、同第２００４／０１０６５７２Ａ１号公報、同第２００３／０１６６６０５Ａ１号公報、同第２００３／０１４３２８２Ａ１号公報、同第２００３／００７８２３２Ａ１号公報、同第２００２／０１６５１９７号公報、同第２００２／０１１５６３５号公報、及び米国特許第６，５８６，４１３号；同第６，４４８，２５３号；同第６，４０７，２３６号；同第６，３５８，９６４号；同第６，３２９，３４９号；同第６，２１１，１６５号；同第５，５７３，７７２号；及び同第５，４４３，８３６号；これら全てはその全てを参照して本明細書に取り込む。

【００６５】

本発明は、低酸素誘導因子１－α（ＨＩＦ－１α）と関係する病気又は疾患に関連する症状を予防し、治療し又は改善するために、動物、好ましくは哺乳動物、及び最も好ましくはヒトに、１つ又はそれ以上のA$_3$受容体アゴニストを投与することを含む、治療法を包含する。

【００６６】

本発明はさらに、治療又は予防に有効な量のA$_3$受容体アゴニスト及び薬学的に許容可能な担体を含む、薬学的組成物を提供する。化合物は、アデノシンA$_1$、A$_{2B}$、又はA$_{2A}$受容体アゴニスト及び１つ又はそれ以上の添加物をも含む薬剤において用いられる。

【００６７】

本発明は又、対象におけるＨＩＦ－１αの低発現及び／又は減弱したＨＩＦ－１α活性に関連する病気又は疾患の予後を決定するための方法を包含する。好ましくは、対象はヒトであり、最も好ましくは以前に治療計画を受けたことのある対象である。本発明は、対象が本発明の治療法及び／又は予防法を用いる必要性があるかどうかを決定するために、対象において少なくともＨＩＦ－１αのレベルを測定することを包含する。本発明は、対象から得られたサンプルにおける、ＨＩＦ－１αレベルを測定し、標準レベルと比較することを包含する。ここで、標準レベルと比較して測定されたＨＩＦ－１αレベルが減少していることは、対象に、例えば虚血性疾患などの病気又は疾患の進展の増大した危険性があることを意味している。

【００６８】

（６．１　予防及び治療方法）

本発明は、A_3受容体アゴニストを単独か又はA_1、A_{2B}又はA_{2A}受容体アゴニストとの組み合わせで使用することによる、ＨＩＦ－１αの低下した発現及び／又は減弱したＨＩＦ－１α活性に関連する病気又は疾患（例えば、虚血性心血管疾患）の治療、予防及び／又は管理の方法に関する。最も好ましい態様では、本発明の方法は、A_3受容体アゴニスト単独で使用することによる、ＨＩＦ－１αの低下した発現及び／又は減弱したＨＩＦ－１α活性に関連する病気又は疾患の治療、予防及び／又は管理の方法に関する。

【００６９】

本発明は、ＨＩＦ－１発現又は活性の調節により改良又は改善される、低酸素又は虚血に関係する組織障害を含む、ＨＩＦ－１が介在する疾患の治療のための方法を提供する。本発明の方法及び組成物で治療される適切な臨床状態は、脳、心臓、又は末梢循環の疾患のための虚血を含む。本発明の１つの治療的目標は、ＨＩＦ－１αの発現及び／又は活性を促進することにより虚血組織内の血管新生を促進することである。特定の作用機構に縛られることを意図するものではないが、そのような促進は、ＨＩＦ－１αの内因性ＨＩＦ－１βとの二量化、特異的DNA配列に対する結合、及びこれに限定されないが、ＨＩＦ－１標的遺伝子として知られる、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）をコードする遺伝子のような、血管新生に関係する低酸素誘導遺伝子の転写活性化をもたらすかもしれない。

【００７０】

本発明の方法は、そのような治療が必要な哺乳動物に、治療に有効な量のA_3受容体アゴニストや薬学的に許容可能なそれら化合物の塩を投与することを含む、虚血又は低酸素状態によりもたらされる組織障害を低減する方法（例えば、実質的に組織障害を予防すること、組織保護を誘導することなど）に導く。本発明の方法及び組成物によって利益が得られる好ましい虚血又は低酸素組織は、これらに限定されないが、心臓、脳、肝臓、腎臓、肺、消化管、骨格筋、脾臓、すい臓、神経、脊髄、網膜組織、血管、又は腸組織である。

【００７１】

本発明の別の局面は、哺乳動物に治療に有効な量の、本明細書に開示される化合物を投与することを含む、冠状動脈性心臓病（例えば、以前の心筋梗塞又は不安定狭心症）と診断された患者又は心筋梗塞のリスクが高い患者（例えば、年齢６５歳超で冠状動脈性心臓病のリスクを２つ又はそれ以上を有する）の心筋組織障害を減弱する慢性的な方法（例えば、実質的に組織障害を予防すること、組織保護を誘導すること）に導く。

【００７２】

本発明は、虚血性又は低酸素障害、心血管疾患、動脈硬化、不整脈、狭心症、心臓肥大、腎臓病、再狭窄、敗血症性ショック及びその他の炎症性疾患並びに脳虚血性疾患、の治療、予防及び／又は管理の方法及び組成物に関する。

【００７３】

本発明は、例えば、心臓が１つの身体から取り除かれ、他の体に移植されるような心臓移植と同様、心臓が体内から取り除かれ、その後同じ体内に移植されるような心臓手術中の、心臓組織に対する虚血性傷害及び／又は再かん流傷害を最小化するために、本発明の１つ又はそれ以上の化合物を投与することを包含する。そのような方法は、Ｌｅｕｎｇらの米国特許公開第２００３／０１６６６０５号に開示されており、その全てを参照して本明細書に取り込む。体内から心臓を取り除く前に、アデノシンA_3受容体アゴニストが、心臓防御をもたらす方法で患者に投与することができる。

【００７４】

別の態様では、本発明は、A_3受容体アゴニストを使用することによる、ＨＩＦ－１αの介在する病気又は疾患の治療、予防及び／又は管理の方法と組成物に関する。本発明の方法は、治療及び／又は予防に有効な量のA_3受容体アゴニストを単独か又は他の治療薬及び／又は予防薬との組み合わせで、投与することを意図する。A_3受容体アゴニストは、これらに限定されないが、虚血性心血管疾患（例えば、心筋虚血、脳虚血、網膜虚血）、肺高血圧症、妊娠疾患（例えば、子癇前症、子宮内発育遅延）、血液供給が遮断される必要のあるあらゆる外科手術、又は血流の低下に関連するその他のあらゆる疾患を含むＨ

ＩＦ－１αが関与する病気又は疾患の治療に、特に有用である。

【００７５】

本発明の組成物及び方法に用いられるＡ$_3$受容体アゴニストは、病気又は疾患の予防薬及び／又は治療薬として機能し、動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトに、病気又は疾患に関連する１つ又はそれ以上の症状を治療し、予防し、改善するために、投与されうる。対象は、好ましくは非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど）及び霊長類（例えば、カニクイザルのようなサルやヒト）のような哺乳動物である。好ましい態様では、対象は、ヒトである。本発明の化合物は、ＨＩＦ－１α発現又は活性の調節により改良又は改善される、低酸素状態又は虚血が関係する組織障害を含む、ＨＩＦ－１αが介在する疾患の治療、予防、及び管理に有用な、１つ又はそれ以上のその他の予防薬及び／又は治療薬との組み合わせで、投与される。

【００７６】

有効であることが要求されるＡ$_3$受容体アゴニスト（単独か又はＡ$_1$、Ａ$_{2A}$及びＡ$_{2B}$受容体アゴニストとの組み合わせで）は、もちろん、治療されている個々の哺乳動物で異なり、究極的には医療又は獣医の臨床医の裁量による。考慮されるべき要因は、治療される状況、投与経路、剤形の性質、哺乳動物の体重、体表面積、年齢及び一般的状況、及び投与される特定の化合物を含む。しかしながら、適切な効果的投与量は、患者の体重あたり、約０．１μｇ／ｋｇから約１００ｍｇ／ｋｇ、約０．１μｇ／ｋｇから約５００ｍｇ／ｋｇ、約０．１μｇ／ｋｇから約１ｇ／ｋｇ、約１００μｇ／ｋｇから約５００ｍｇ／ｋｇ、約１００μｇ／ｋｇから約１ｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇから約１００ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇから約５００ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇから約１ｇ／ｋｇの範囲にある。毎日の全投与量は、単一投与、複数投与として、例えば、１日あたり２～６回、又は選択期間に経静脈注入により、与えられる。上記の範囲の投与量の以上又は以下は、本発明の範囲内であり、所望される及び必要であれば、個々の患者に投与される。

【００７７】

本発明の方法及び組成物は、病気又は疾患で苦しむ又は苦しむことが予期される対象／患者に、本発明の１つ又はそれ以上の化合物を投与することを含む。

【００７８】

本発明は、本発明のＡ$_3$受容体アゴニストを使うことによる、ＨＩＦ－１αが介在する病気又は疾患の治療、予防、及び／又は管理のための方法及び組成物に関する。本発明の方法は、虚血状況に関連する細胞障害を減弱すること、及び虚血関連の細胞障害又は細胞死に関係する疾患の治療に対し、特に効果的である。そのような疾患は、これらに限定されないが、心筋梗塞に関連する心臓傷害と同様、虚血、緑内障及びその他の神経変性疾患を含む。そのような疾患は通常、アポトーシスによる細胞死によって特徴付けられるが、アポトーシス及び壊死が関与、又は関与していないかもしれない。

【００７９】

本発明の方法は、治療及び／又は予防に有効な量のＡ$_3$受容体アゴニストを単独か又は他の治療薬及び／又は予防薬との組み合わせで、投与することを意図する。Ａ$_3$受容体アゴニストを含む本発明のアゴニストは、これらに限定されないが、虚血性心血管疾患（例えば、心筋虚血、脳虚血、網膜虚血、心筋症、うっ血性心不全、冠動脈疾患、高血圧、虚血／再かん流、再狭窄及び血管狭窄）、肺高血圧症、妊娠疾患（例えば、子癇前症、子宮内発育遅延）、虚血；外科手術又は外傷、血液供給が遮断される必要のあるあらゆる外科手術が伴う虚血状況、又はその他のあらゆる血流低下に関連する疾患、を含む、ＨＩＦ－１αが関わる病気又は疾患の治療に対し、特に有効である。特定の作用機構に縛られることを意図するものではないが、本発明のアゴニストは、ＨＩＦ－１αレベル及び／又は活性、又は血管新生を促進するＨＩＦ－１α活性を増大させることにより、治療に有効である。ＨＩＦ－１αの過剰発現は、内因性ＨＩＦ－１βとの二量化、及びこれに限定されないが、血管内皮増殖因子を含む血管新生に関連する低酸素誘導遺伝子の活性化をもたらす。

【００８０】

A_3受容体アゴニストは、あらゆる虚血組織、例えば虚血性疾患の結果として血液が欠乏している組織など、を治療するために用いることができる。血液及び酸素の枯渇する組織は、虚血性の壊死又は不可逆性の組織障害をもつ梗塞を受ける。本発明のA_3受容体アゴニストは、そのような状況を減弱し、予防し、又は治療することに特に有効である。そのような組織は、例えば、筋肉、脳、腎臓及び肺を含む。虚血性疾患は、例えば、脳血管虚血、腎虚血、肺虚血、手足の虚血、虚血性心筋症及び心筋虚血を含む。

【００８１】

本発明は、１つ又はそれ以上のA_3受容体アゴニストの投与により、対象、好ましくはヒト対象の虚血性状況に関連した細胞障害を減弱するための治療方法を提供する。虚血性状況は、心不全により引き起こされるもの、又は組織又は臓器への血液供給の全体的な浪費をもたらすその他の状況、のような循環の阻害のために、又は脳大量出血又は局所的な血栓症の事象によるような血流の局所的阻害のために発生するかもしれない。あるいは、冠状動脈（心臓発作）の減少したかん流によりもたらされる結果として、障害が心筋組織に起こるかもしれない。A_3受容体アゴニストは、虚血性傷害に関連する細胞死を調節できる。

【００８２】

ある特定の態様では、本発明は、１つ又はそれ以上のA_3受容体アゴニストを用いる心虚血の治療に関する。心虚血は、心臓に向かう減少した血流により特徴付けられる状況である。それは通常、冠状動脈にあるプラークの集積の結果である。多くの場合、虚血は症状を伴わない（沈黙の虚血）。心虚血の少数の症状の発現は、心臓に対し少し長期の障害をもたらす傾向があるが、これらの症状の発現は時々いくらかの患者に重大な影響をもたらす；彼らは、異常な心臓リズム（不整脈）を起こし、それは卒倒（失神）又は心停止（心臓が血液を送液することの突然の不能）及び突然の心臓死をもたらす。重大な又は長期の症状の発現は、心臓発作の引き金となり得る。心虚血の少数の症状の発現を集積した影響は、心筋の弱体化（心筋症）を導くことになる。A_3受容体アゴニストは、これらに限定されないが、βブロッカー、カルシウムチャネルブロッカー及び亜硝酸を含む、心虚血の治療のための当該技術分野で公知のその他の治療又は予防方法と組み合わせられる。特定の作用機構に縛られることを意図するものではないが、心虚血は心臓が十分な酸素を得ることができないため、これらの薬剤は、例えば、心拍速度を遅らせることによって、血圧を低下させ、血管を弛緩させることにより、心臓の酸素要求性を減弱させる。使用されうるその他の薬剤は、狭い動脈内に形成される血液凝集の生成機会を減らすため、アスピリン及びその他の抗血小板薬を含む。

【００８３】

ある特定の態様では、本発明は、１つ又はそれ以上のA_3受容体アゴニストを用いる脳虚血の治療に関する。特定の作用機構に縛られることを意図するものではないが、脳虚血は、脳の１本又はそれ以上の血管に関わる血液及び酸素の流れの低下によりもたらされる。脳虚血において、個体は、局所神経障害の突然の進展を有する脳卒中、多くの場合、ある程度の脳障害を有する脳卒中に苦しむ。減弱した血流は、例えば、血栓又は塞栓、血管破裂、血圧の突然の低下、動脈硬化による血管内径の変化、外傷、動脈瘤、進行性の奇形、血管壁の変化した透過性、又は血液の増大した粘着性若しくはその他の性質のためであるかもしれない。減弱した血流は又、全身循環の障害及び重篤に長引いている低血圧のためであるかもしれない。脊髄の虚血性壊死は、脊椎の脳、胸部又は腰部のレベルに当てはまる感覚、運動の病候又はその両者をもたらすかもしれない。

【００８４】

別の特定の態様では、本発明は、１つ又はそれ以上のA_3受容体アゴニストを用い、虚血性心疾患の治療に関する。虚血性心疾患は、心筋の酸素供給及び需要の間の不均衡によりもたらされる。虚血性心疾患において、個体は、狭心症、急性心筋梗塞又は突然死に苦しむ。例えば、不均衡は、１つ又はそれ以上の大きな冠状動脈の動脈硬化の閉塞、塞栓症のような非アテローム性の冠状閉塞損傷、梅毒性大動脈炎に関連する冠状動脈口狭窄症、冠動脈攣縮、冠状循環の先天的異常、重篤な心筋肥大におけるような正常な供給能力を上

回る増大した心筋の酸素要求、貧血のような血液の酸素運搬能力の低下により、又は何らかの原因による高血圧のための不適切な心かん流圧の結果として、もたらされる。

【００８５】

本発明は、心虚血又は再かん流傷害によりもたらされる心血管組織障害を治療又は予防する方法を提供する。再かん流障害は、例えば、心臓バイパス手術の終了時又は心不全時、つまり、心臓が一旦血液を受け取ることを防止した後に再かん流を始める時に発生し、これらの方法は、再かん流傷害が予防され、治療され又は低減されるように、好ましくは再かん流の前又は直後に、本発明の化合物及び組成物を投与することを含む。本発明はまた、心臓発作、心血管疾患を予防及び／又は治療する方法を提供する。

【００８６】

本発明の方法及び組成物を用いて、治療され、予防され、及び／又は管理されうるその他の虚血性疾患は、心筋虚血、脳虚血、網膜虚血を含む。

【００８７】

特定の作用機構に縛られることを意図するものではないが、A_3受容体アゴニストは、アデノシンA_3受容体を活性化することにより虚血の前提条件の心保護効果を薬学的に模倣し、それゆえ虚血又は低酸素状態、若しくは虚血／再かん流、例えば、心血管疾患[例えば、動脈硬化、不整脈（例えば、虚血性不整脈、心筋梗塞のための不整脈、気絶心筋、心筋機能障害、血栓溶解後の不整脈など）、狭心症、心臓肥大、心筋梗塞、心不全（例えば、うっ血性心不全、急性心不全、心臓肥大など）、再狭窄、ショック（例えば、出血性ショック、エンドトキシンショックなど）]、腎臓病（例えば、糖尿病、糖尿病性腎症、虚血性急性腎不全など）、虚血や虚血再かん流に関連する臓器障害［（例えば、心筋虚血再かん流が関係する疾患、急性腎不全、又は冠動脈バイパス術（ＣＡＢＧ）のような外科手術により誘導される疾患、血管手術、臓器移植、心臓以外の外科手術、又は経皮経管冠動脈形成術（ＰＴＣＡ）］、脳血管疾患（例えば、虚血性発作、出血性発作など）、脳虚血性疾患（例えば、脳梗塞に関連する疾患、続発症として脳出血の後に起こる疾患、脳水腫）により引き起こされ、悪化する疾患の治療薬又は予防薬として有用である。本発明の化合物はまた、冠動脈バイパス術（ＣＡＢＧ）、血管手術、経皮経管冠動脈形成術（ＰＴＣＡ）、ＰＴＣＩ、臓器移植、又は心臓以外の外科手術時の心筋保護のための薬剤としても用いられる。

【００８８】

好ましくは、A_3受容体アゴニストは、冠動脈バイパス術（ＣＡＢＧ）、血管手術、経皮経管冠動脈形成術（ＰＴＣＡ）、臓器移植、又は心臓以外の外科手術の、術前、術中又は術後の心筋保護のための薬剤として用いられる。

【００８９】

好ましくは、A_3受容体アゴニストは、進行中の心臓の（急性冠症候群、例えば、心筋梗塞又は不安定狭心症）又は脳の虚血性症状の発現（例えば、脳卒中）を呈している患者の心筋保護のための薬剤として用いられうる。

【００９０】

好ましくは、A_3受容体アゴニストは、冠状動脈性心臓病（例えば、以前の心筋梗塞又は不安定狭心症）と診断された患者、又は心筋梗塞（例えば、６５歳より高齢で、冠状動脈性心臓病のリスクファクターを２つかそれ以上もつ）の危険性が高い患者の慢性的な心筋保護のための薬剤として用いられうる。従って、A_3受容体アゴニストは、死亡率を減少させる。

【００９１】

（６．１．１　組み合わせ療法）

本発明は、治療又は予防される特定の病気又は疾患の治療及び／又は予防のために慣用的に使用される１つ又はそれ以上の他の治療法と組み合わせて、本発明の１つ又はそれ以上の化合物を投与する組み合わせ療法を包含する。

【００９２】

本発明の方法及び組成物に使用され得る予防的及び治療的化合物は、これらに限定され

ないが、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質（これらに限定されないが、翻訳後修飾されたタンパク質、抗体などを含む）を含むタンパク質性の分子；小分子（１０００ダルトン未満）、無機又は有機化合物；これらに限定されないが、二重鎖若しくは一重鎖のＤＮＡ、二重鎖又は一重鎖ＲＮＡ、更に三重らせんの核酸分子を含む核酸分子を含むが、これらに限定されるものではない。予防的及び治療的化合物は、あらゆる既知の生物（これらに限定されないが、動物、植物、バクテリア、カビ、及び原生生物又はウィルスを含む）、又は合成分子ライブラリーに由来しうる。ある態様では、本発明の１つ又はそれ以上の化合物は、哺乳動物、好ましくはヒトに、疾患の治療に有用な１つ又はそれ以上の他の治療薬と同時に投与される。「同時に」という用語は、予防薬又は治療薬と全く同時に投与することに限定されるものではなく、むしろ本発明の化合物及び他の薬剤は、連続して、及び他の方法で投与された場合に比べて増大した利益を提供するために、本発明の化合物が他の薬剤とともに作用しうるような時間間隔内に対象に投与される。例えば、各々の予防薬又は治療薬は、同時に又は異なる時点でいかなる順に連続して投与されてもよい；しかしながら、もし同時に投与されなければ、望ましい治療効果又は予防効果を提供するために十分に近い時間で投与されるべきである。各々の治療薬は、適当な形態の何れかで、適切な経路の何れかで、別々に投与されうる。

【００９３】

様々な態様では、予防薬又は治療薬は、1時間以内の間隔で、約1時間間隔で、約1時間～約2時間間隔で、約２時間～約３時間間隔で、約３時間～約４時間間隔で、約４時間～約５時間間隔で、約５時間～約６時間間隔で、約６時間～約７時間間隔で、約７時間～約８時間間隔で、約８時間～約９時間間隔で、約９時間～約１０時間間隔で、約１０時間～約１１時間間隔で、約１１時間～約１２時間間隔で、２４時間以内の間隔で、又は４８時間以内の間隔で、投与される。好ましい態様では、２つ又はそれ以上の組成物は、同一の患者診察時に投与される。

【００９４】

本明細書に提供される投与量及び投与頻度は、治療効果及び予防効果という用語に包含される。用量及び頻度はさらに、投与された特異的な治療薬又は予防薬、疾患の重篤度及び型、投与経路、更に年齢、体重、応答、及び患者の過去の医学的履歴、に依存した各々の患者に特異的な要因に従って一般的に変わるであろう。適切な計画は、そのような要因を考慮することにより、例えば、文献に報告された及びＰｈｙｓｉｃｉａｎ‘ｓ Ｄｅｓｋ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ（第５８版、２００４）において推奨された用量に従って、当業者により選択されることができる。

【００９５】

本発明は、米国特許第６，２９４，５７９Ｂ１号；第６，４３６，６５４号；第６，２２，０１８号；第６，５６２，７９９号；第５，９８５，９４７号；第６，５４４，９５０号；Ｌａｚａｒｕｓらの「環境の健康予想（Enviromental Health Perspectives）」１０２巻、第4号、６４８－６５４頁（１９９４）に開示されるような虚血状況の治療のための、現在知られるあらゆる方法（又は将来開発されるあらゆる方法）との組み合わせ療法を包含し、その全てを参照して本明細書に取り込む。虚血に対する現在の治療は、行動変化、薬物療法、及び／又は外科手術の診療を包含する。

【００９６】

本発明は、本発明の方法及び組成物において、疾患又は症状が心臓組織の虚血又は低酸素状態に関わるとき、これらに限定されないが、βブロッカー（例えば、アセブトロール、アテノロール、ボピンドロール、ラベトロール、メピンドロール、ナドロール、オキシプレノール、ピンドロール、プロプラノロール、ソタロール）、カルシウムチャネル阻害剤（例えば、アムロジピン、ニフェジピン、ニソルジピン、ニトレンジピン、ベラパミル）、カリウムチャネル開口剤、アデノシン、アデノシンアゴニスト、1型ナトリウム－水素交換体（ＮＨＥ－１）阻害剤、ＡＣＥ阻害剤（例えば、カプトプリル、エナラプリル）、硝酸エステル（例えば、硝酸イソソルビド、５－硝酸イソソルビド、グリセリン硝酸エステル）、利尿剤（例えば、ヒドロクロロチアジド、インダパミド、ピレタニド、キシパ

ミド）、グリコシド（例えば、ジゴキシン、メチルジゴキシン）、血栓溶解剤（たとえば、ｔＰＡ）、血小板阻害剤（例えば、レオプロ）、アスピリン、ジピリダモール、塩化カリウム、クロニジン、プラゾシン、ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ阻害剤（例えば、ジクロロ酢酸）、ピルビン酸脱水素酵素複合体活性化因子、ビグアナイド（例えば、メトフォルミン）、又は他のアデノシンＡ$_3$受容体アゴニストを含む、その他の心臓血管の薬剤及びそれらの塩（例えば、心血管効果をもつ薬剤）の使用を包含する。その他の心臓血管薬剤は、アンジオテンシンＩＩ（ＡＩＩ）受容体アンタゴニスト、Ｃ５ａ阻害剤、可溶性補体1型受容体（ｓＣＲ１）又は類縁体、部分的脂肪酸酸化（ＰＦＯＸ）阻害剤（特異的に、ラノラジン）、アセチルＣｏＡカルボキシラーゼ活性化因子、マロニルＣｏＡ脱炭酸酵素阻害剤、５‘ＡＭＰ活性化タンパク質キナーゼ（ＡＭＰＫ）阻害剤、アデノシンヌクレオシド阻害剤、抗アポトーシス剤（例えば、カスパーゼ阻害剤）、モノリン酸化リピドＡ又は類縁体、一酸化窒素合成酵素活性化剤／阻害剤、タンパク質キナーゼＣ活性化剤（特異的に、タンパク質キナーゼＥ）、タンパク質キナーゼデルタ阻害剤、ポリ（ＡＤＰリボース）合成酵素（ＰＡＲＳ、ＰＡＲＰ）阻害剤、メトフォルミン（糖新生阻害剤、インスリン感受性物質）、エンドセリン変換酵素（ＥＣＥ）阻害剤、エンドセリンＥＴＡ受容体アンタゴニスト、（トロンビン活性化線溶阻害剤）ＴＡＦＩ阻害剤及びＮａ／Ｃａ交換体修飾因子を包含する。

【００９７】

本発明の組成物及び方法は、抗生物質、抗ウィルス性物質、治療促進剤、抗炎症剤、免疫抑制剤、成長因子、抗代謝物、細胞接着分子（ＣＡＭｓ）、抗体、血管成長薬剤、動脈硬化／鎮痛剤、ＲＧＤペプチドを含む化合物、ヘパリン、ラパマイシン、抗トロンビン化合物、血小板受容体アンタゴニスト、抗トロンビン抗体、抗血小板受容体抗体、アスピリン、プロスタグランジン阻害剤、血小板阻害剤、アンチセンスＤＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、コレステロール低下剤、血管弛緩剤、又は内因性血管作動性機構を阻害する薬剤のような、その他の治療有効成分を任意に含むことができる。その他の有効薬剤の例は、抗炎症剤、抗血小板又は線維素溶解剤、抗新生物物質、抗アレルギー薬、抗拒絶薬、抗微生物又は抗バクテリア又は抗ウィルス薬、ホルモン、血管作動性物質、抗侵入因子、リンフォカイン、放射性物質又は遺伝子治療薬を含む。

【００９８】

（６．２　投与の組成物及び方法）

本発明は、本発明の化合物を含む方法及び薬学的組成物を提供する。本発明はまた、対象に本発明の有効量の化合物を投与することにより、疾患に関連する１つ又はそれ以上の症状、疾患又は病気の治療、予防及び改善する方法を提供する。特定の態様では、対象は、動物、好ましくは非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど）及び霊長類（例えば、カニクイザルのようなサルやヒト）のような哺乳動物である。好ましい態様では、対象はヒトである。

【００９９】

本発明の組成物は、薬学的組成物の製造において有用なバルク薬剤組成（例えば、不純な又は未滅菌の組成物）、及び、単位用量型の調製に用いられうる薬学的組成物（すなわち、対象又は患者に投与するために適切な組成物）を含む。そのような組成物は、本明細書に開示される予防又は治療に有効な量の予防薬及び／又は治療薬、又はそれら薬剤と薬学的に許容可能な担体の組み合わせを含む。好ましくは、本発明の組成物は、予防又は治療に有効な量の本発明の化合物及び薬学的に許容可能な担体を含む。

【０１００】

特定の態様では、薬学的組成物は、治療又は予防に有効な量のＡ$_3$受容体アゴニスト及び薬学的に許容可能な担体を含む。別の特定の態様では、薬学的組成物は、治療又は予防に有効な量のＡ$_3$受容体アゴニスト及び薬学的に許容可能な担体、さらに任意に、１つ又はそれ以上のさらなる治療薬又は予防薬を含む。

【０１０１】

特定の態様では、「薬学的に許容可能」という用語は、連邦又は州政府の規制当局によ

り承認された、又は米国でリスト化された薬局方、又は他の一般的に認識されている、動物、より特定的にヒトに利用されるための薬局方を意味する。「担体」という用語は、希釈剤、アジュバント（例えば、フロイントアジュバント（完全及び非完全））、添加物、又は治療薬が投与される際の賦形剤、を意味する。そのような薬学的担体は、水及びピーナッツオイル、大豆油、ミネラルオイル、セサミオイルなどのような、石油、動物、野菜又は合成起源のものを含む油のような、滅菌された液体でありうる。水は、薬学的な組成物が経静脈的に投与される際に、好ましい担体である。生理食塩水及び水性デキストロース及びグリセロール溶液はまた、液体担体、特に注入可能な溶液として用いることができる。適切な薬学的添加物は、でんぷん、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、胡粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノールなどを含む。組成物はまた、所望により、少量の湿っている若しくは乳化された薬剤、又はｐＨ緩衝液剤を含むことができる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳液、錠剤、ピル、カプセル、粉末、持続的な放出剤などの形態を取ることができる。

【０１０２】

一般的に、本発明の組成物の成分は、例えば、アンプル、活性薬の量を示す小袋のような密封された容器中に凍結乾燥された粉末又は無水濃縮物として、別々に又は単位用量の形態に一緒に混ぜて、供給される。組成物が注入により投与される場合には、滅菌された薬学的グレードの水又は生理食塩水を含む注入瓶で投薬できる。組成物が注射により投与される場合では、注射のための滅菌水又は生理食塩水のアンプルが、投与前に成分が混合されるように、提供される。

【０１０３】

本発明の組成物は、中性又は塩の形で製剤化されうる。薬学的に許容可能な塩は、塩酸、リン酸、酢酸、しゅう酸、酒石酸などに由来するような陰イオンで形成されるものと、ナトリウム、カリウム、アンモニア、カルシウム、水酸化鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、２－エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するもののような陽イオンで形成されるものを含むが、これらに限定されるものではない。

【０１０４】

上記の化合物は、好ましくは、投与方法のための許容可能な担体とともに、活性化合物すなわちアデノシンA_3受容体アゴニストを含む剤形で投与される。適切な薬学的に許容可能な担体は、当業者に知られている。組成物は、任意に、他の治療に有効な薬剤を含みうる。他の任意の成分は、抗ウィルス薬、抗菌薬、抗炎症薬、鎮痛薬及び免疫抑制薬を含む。担体は、剤形の他の成分と適合するという意味において、薬学的に許容可能であり、その受容者に対して有害でないものでなければならない。

【０１０５】

本発明の化合物、例えば、高親和性アデノシンA_3受容体アゴニストは、水、生理食塩水、水性デキストロース及び関連の糖溶液、アルコール（例えば、エタノール、イソプロピルアルコール、又はヘキサデシルアルコール）、グリコール（例えば、プロピレングリコール、又はポリエチレングリコール）、グリセロールケタール（例えば、２，２－ジメチル１，３－ジオキサン－４－メタノール）、エーテル（例えば、ポリ（エチレングリコール）４００）、油、脂肪酸、脂肪酸エステル又はグリセリド、又は薬学的に許容可能な界面活性剤（例えば、石鹸又は洗剤）の添加された又はされていないアセチル化脂肪酸グリセリド、懸濁剤（ペクチン、カーボマー、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、又はカルボキシメチルセルロースのような）又は乳化剤、並びにその他の薬学的な添加物及びアジュバントを含む、滅菌された液体又は液体の混合物のような、薬学的担体又は生理学的に許容可能な希釈液中で投薬することができる。

【０１０６】

剤形は、経口、直腸、局所又は非経口（皮下、筋肉内、及び経静脈を含む）投与に適した担体を含むことができる。好ましい担体は、経口又は非経口投与に適したものである。

【０１０７】
非経口投与に適した剤形は、好ましくはレシピエントの血液と等張である、活性化合物の滅菌された水性調合剤を便宜的に含む。こうしてそのような剤形は、便宜的に、蒸留水、蒸留水又は生理食塩水の５％デキストロース溶液を含む。有益な剤形はまた、適当な溶液で希釈されたときに上記の非経口投与に適した溶液を与える化合物を含む濃縮された溶液又は固体を含む。
【０１０８】
非経口投与に適した剤形は、水性又は非水性の溶液、等張の滅菌注射溶液（抗酸化剤、緩衝液、静菌剤及び対象のレシピエントの血液と等張の剤形を提供する溶質を含む）、及び水性又は非水性の滅菌懸濁液（懸濁剤、可溶化剤、濃化剤、安定化剤及び防腐剤を含んでもよい）を含むが、これらに限定されるものではない。
【０１０９】
非経口投与の剤形は、一般的には、溶液中の有効成分の重さで、約０．５％～約２５％まで含むであろう。適切な防腐剤及び緩衝液は、そのような剤形で用いられる。注入部位の刺激を最小化又は除外するために、そのような組成物は、約１２～約１７までの親水－親油性バランス（ＨＬＢ）を有する、１つ又はそれ以上の非イオン性界面活性剤を含んでもよい。このような剤形の海面活性剤の量は、約５～約１５％重量の範囲である。適当な界面活性剤は、モノオレイン酸ソルビタン及びプロピレンオキシドとプロピレングリコールの縮合により形成される疎水性塩基とエチレンオキシドとの高分子量付加物のような、ポリエチレンソルビタン脂肪酸エステルを含む。非経口の剤形は、アンプルやバイアルのような、単位用量又は多用量の密封された容器に存在させ、注入のために、使用の直前に、例えば、水のような、滅菌された液体担体の添加だけを必要とする凍結乾燥（凍結乾燥された）状況で、貯蔵することができる。一時的な注入溶液及び懸濁液は、すでに開示されている種類の、滅菌された粉末、顆粒及び錠剤から調製することができる。
【０１１０】
本発明の化合物、例えば、高親和性のアデノシンA_3受容体アゴニストは、注入可能な剤形に作られうる。注入可能な組成物のための効果的な薬学的担体の必要条件は、当業者によく知られている。「Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa., Banker and Chalmers, eds., pages 238-250 (1982)」及び「ASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 4th ed., pages 622-630 (1986)」を参照されたい；その全てを参照してこの明細書に取り込む。
【０１１１】
腸内投与のために、化合物は、カプセル、薬包、錠剤又は薬用キャンデー（トローチ剤）のような個々の単位で、不活性な担体に挿入することができ、それぞれがあらかじめ決定された量の活性化合物を、粉末又は顆粒として；又は、例えば、シロップ、エリクシール、乳液又は吸入のような、水性の液体又は非水性の液体での懸濁液又は溶液として含んでいる。適切な担体は、でんぷん又は糖であり、潤滑剤、香味、結合剤及び他の同質の物質を含んでもよい。
【０１１２】
経口投与のために適した剤形は、（a）水、生理食塩水又はオレンジジュースのような、希釈剤に有効量の化合物を溶かしたような液体の溶液；（b）カプセル、薬包、錠剤、薬用キャンデー及びトローチであって、各々は固体又は顆粒として、あらかじめ決められた量の有効成分を含む；（c）粉末；（d）適当な液体中の懸濁液；及び（e）適切な乳化剤、からなる。液体の剤形は、水、及び例えば、エタノール、ベンジルアルコール及びポリエチレンアルコールなどのアルコールのような、希釈剤を含んでもよく、追加の薬学的に許容の界面活性剤、懸濁剤又は乳化剤を添加しても添加しなくてもよい。カプセル型は、例えば、界面活性剤、潤滑剤、及びラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、及びコーンスターチのような、不活性な充填剤などを含む、通常の硬い又はやわらかいからで覆われたゼラチンタイプでありうる。
【０１１３】

錠剤型は、ラクトース、スクロース、マンニトール、コーンスターチ、じゃがいもでんぷん、アルギン酸、微結晶セルロース、アカシア、ゼラチン、グアールガム、コロイド状の二酸化シリコン、クロスカルメロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、及び他の添加物、着色剤、希釈剤、緩衝液剤、崩壊剤、加湿剤、防腐剤、香料及び薬学的に適合する担体のうち、１つ又はそれ以上を含むことができる。薬用キャンデー（トローチ剤）が、当該技術分野で公知の担体に加えて、香料の有効成分、通常サクロース及びアカシア又はトラガカント、更にゼラチン及びグリセリン、又はスクロース及びアカシアのような不活性な基材中の有効成分を含むトローチ、乳液、ゲル及び同類の含有物、を包含することができる。

【０１１４】

錠剤は、任意に１つ又はそれ以上の補助的な成分と共に、圧縮又は鋳型法により製造される。圧縮された錠剤は、例えば、粉末又は顆粒などの自由流動の型の中に活性な化合物を、任意に、例えば結合剤、潤滑油、不活性な希釈剤、界面活性剤又は分散剤、などの補助的な成分と混合して、適切な機械の中で圧縮することにより調製することができる。鋳型法の錠剤は、適切な担体の何れかと共に、粉末状の活性化合物の混合物を適切な機械の中で鋳型に入れ、製造することができる。

【０１１５】

シロップ又は懸濁液は、糖の濃縮された水性溶液（例えば、スクロースに補助的な成分の何れかが加えられてもよい）に活性化合物を添加することにより製造される。このような補助的な成分は、香料、糖の結晶化を遅らせる薬剤、又は、例えばグリセロール又はソルビトールなどの多価アルコールのような、その他の成分の何れかの溶解性を高める薬剤を含んでいてもよい。

【０１１６】

化合物はまた、調剤技術分野において公知の慣用的な方法により調製される、溶液、軟膏、クリーム、ゲル、ローション、又はポリマー素材（例えば、プルロニックＴＭ、ＢＡＳＦ）の局所的な適用により、局部に投与することができる。溶液、軟膏、クリーム、ゲル、ローション、又はポリマー基材及び有効成分に加えて、そのような局所投与の剤形はまた、防腐剤、香料、及び更なる活性な薬剤を含んでもよい。高親和性のアデノシンA_3受容体アゴニストのための局所投与の剤形は、調剤技術分野において公知の慣用的な方法により調製される軟膏、クリーム、ゲル、及びローションを含む。そのような局所投与の剤形は又、さらに防腐剤、香料、及び更なる活性な薬剤を含んでもよい。

【０１１７】

非経口の剤形に用いられうる油は、石油、動物、野菜及び合成の油を含む。油の特別な例は、ピーナッツ、大豆、セサミ、綿実、コーン、オリーブ、石油及び鉱物を含む。非経口の剤形に用いられる適切な脂肪酸は、オレイン酸、ステアリン酸、及びイソステアリン酸を含む。オレイン酸エチル及びミリスチン酸イソプロピルは、適切な脂肪酸エステルの例である。非経口の剤形に用いられる適切なセッケンは、脂肪族アルカリ金属、アンモニウム及びトリエタノールアミン塩を含み、適切な界面活性剤は、（ａ）例えば、ハロゲン化ジメチルジアルキルアンモニウム及びハロゲン化アルキルピリジニウムのような、陽イオン性界面活性剤、（ｂ）例えば、アルキル、アリル及びオレフィン硫酸エステル、アルキル、オレフィン、エーテル及び硫酸モノグリセリド、及びスルホコハク酸、のような陰イオン性界面活性剤、（ｃ）例えば、脂肪族アミンオキシド、脂肪酸アルカノールアミド、及びポリオキシエチレンポリプロピレン・コポリマーのような、非イオン性界面活性剤、（ｄ）例えば、アルキル－β－アミノプロピオン酸及び２－アルキルイミダゾリン４級アンモニウム塩のような、両性界面活性剤、及び（ｅ）それらの混合物を含む。

【０１１８】

さらに、例えば、高親和性アデノシンA_3受容体アゴニストなどの、本発明の化合物は、乳化基材又は水溶性基材のような、様々な基材と混合することにより、座薬を製造することができる。膣内投与に適した剤形は、有効成分に加えて、当該技術分野で公知の適当な担体を含む、ペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、泡、又はスプレーの

剤形として提示されてもよい。

【０１１９】

直腸投与のための剤形は、例えば、ココアバター又はＷｉｔｅｐｓｏｌ Ｓ５５（登録商標）（Dynamite Nobel Chemical, Germany）のような、座薬の基材のための慣用的な担体を有する座薬として提示されてもよい。

【０１２０】

剤形は、便宜的に単位用量の形で提示され、調剤技術分野で公知の方法の何れかにより調製されてもよい。全ての方法は、１つ又はそれ以上の補助的な成分を構成する担体と活性化合物を組み合わせる工程を含む。一般的に、剤形は、液体の担体又は微細の固形の担体と活性化合物を均一に親密に組み合わせることにより、その後、必要であれば、その生成物を所望の単位用量形態に形成することにより調製される。

【０１２１】

前述の成分に加えて、本発明の剤形は、更に１つ又はそれ以上の細胞障害性薬剤、そして例えば、希釈剤、緩衝液、香料、結合剤、界面活性剤、濃化剤、潤滑剤、懸濁剤、防腐剤（抗酸化剤を含む）などの薬剤の技術分野で用いられる、１つ又はそれ以上の任意の補助的な成分を更に含んでいてもよい。

【０１２２】

様々な送達システム、例えば、リポソーム、ミクロ粒子、マイクロカプセルへの封入などのシステムが、本発明の化合物を含む組成物を投与するために用いられる。

【０１２３】

幾つかの態様では、本発明の化合物は、本発明の化合物を標的へ送達するためにリポソーム内に製剤化される。リポソームは、水相を内封する同心円状に並べられたリン脂質二重層を含む小胞である。リポソームは一般的に、様々な型の脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤を含む。リポソームの構成成分は、生物学的な膜の脂質の整列と同様に、二重層構造に整列される。リポソームは特に、部分的に、生物適合性、低い免疫原性及び低い毒性のために好ましい送達小胞である。リポソームの調製法は、当該技術分野で公知であり、本発明内に包含される。例えば、「Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688；Hwang et al., 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4」；米国特許第４，４８５，０４５号及び同第４，５４４，５４５号を参照されたい。それらの全てを参照して本明細書に取り込む。

【０１２４】

本発明はまた、長期の血清半減期、すなわち米国特許第５，０１３，５５６号に開示されるように、促進された循環時間、を有するリポソームの調製方法を包含する。本発明の方法で用いられる好ましいリポソームは、循環からすぐには消失しない、すなわち単核食細胞系（ＭＰＳ）に取り込まれない。本発明は、当業者に知られている一般的な方法を用いて調製される、無菌的に安定化されたリポソームを包含する。特定の作用機構に限定することを意図するものではないが、無菌的に安定化されたリポソームは、リポソームと血清タンパク質との望ましくない反応を減弱させ、血清成分とのオプソニン化を減弱させ、そしてＭＰＳによる認識を低下させる、嵩高く、高度に柔軟性がある親水性領域をもつ脂質成分を含む。無菌滅菌的に安定化されたリポソームは、好ましくは、ポリエチレングリコールを用いて調製される。リポソーム及び無菌的に安定化されたリポソームの調製のために、例えば、「Bendas et al., 2001 BioDrugs, 15(4): 215-224」；「Allen et al., 1987 FEBS Lett. 223: 42-6」；「Klibanov et al., 1990 FEBS Lett., 268: 235-7」；「Blum et al., 1990, Biochim. Biophys. Acta., 1029: 91-7」；「Torchilin .et al., 1996, J. Liposome Res. 6: 99-116」；「Litzinger et al., 1994, Biochim. Biophys. Acta, 1190: 99-107」；「Maruyama et al., 1991, Chem. Pharm. Bull., 39: 1620-2」；「Klibanov et al., 1991, Biochim Biophys Acta, 1062; 142-8；Allen et al., 1994, Adv. Drug Deliv. Rev, 13: 285-309」を参照されたい；それらの全てを参照して本明細書に取り込む。本発明はまた、標的化される特異的な臓器に応用されるリポソームを包含する。例えば、米国特許第４，５４４，５４５号を参照されたい。特に本発明の組成物

及び方法に用いられる有用なリポソームは、フォスファチジルコリン、コレステロール、及びＰＥＧ誘導化フォスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）を含む脂質組成物を用いて、逆相蒸発乾燥法により生成される。リポソームは、望ましい径を有するリポソームを産生するために、決められた孔の大きさをもつフィルターを通して押し出される。いくつかの態様では、本発明の抗体の断片、例えばＦ(ａｂ’)は、すでに開示されている方法を用いてリポソームに結合させることができる。例えば、「Martin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 286-288」を参照されたい。それらの全てを参照して本明細書に取り込む。

【０１２５】

患者に投与するためのリポソームやミクロスフィアを調製する方法は、当業者によく知られている。米国特許第４，７８９，７３４号は、その内容は全てを参照して本明細書に取り込むが、生物学的な物質をリポソーム内に封入するための方法を記述している。この方法では、特に素材は水性溶液に溶かされ、適当なリン脂質及び脂質を、必要なら界面活性剤と共に加えて、その素材は必要に応じて透析し、超音波処理する。公知の方法の総説は、「G. Gregoriadis, Chapter 14, "Liposomes," Drug Carriers in Biology and Medicine, pp. 287-341 (Academic Press, 1979)」により提供され、その全てを参照して本明細書に取り込む。

【０１２６】

ポリマーやタンパク質から形成されるミクロスフィアは当業者によく知られ、胃腸管を介して血流に直接通過するために適合化させることができる。あるいは、化合物はミクロスフィア又はミクロスフィアの混合物に取り込まれ、数日から数ヶ月の範囲の期間を超える徐放のために埋め込むことができる。例えば、米国特許第４，９０６，４７４号、第４，９２５，６７３号及び第３，６２５，２１４号を参照されたい、そして、それらの全てを参照して本明細書に取り込む。

【０１２７】

好ましい微粒子は、ポリグリコライド、ポリラクチド及びそれらのコポリマーのような生分解性のポリマーから調製されたものである。当業者は、薬剤の望ましい放出速度及び望ましい用量を含む様々な要因に従って、適切な担体システムを容易に決定することができる。

【０１２８】

別の態様では、組成物は小胞内、特にリポソーム内に送達されうる（「Langer, Science 249:1527-1533 (1990)」；「Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler(eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989)」；「Lopez-Berestein, ibid., pp. 3 17-327」を参照されたい、一般に同書を参照されたい）。

【０１２９】

別の態様では、組成物は、制御された放出又は徐放システムで送達することができる。当業者に公知の技術の何れかが、１つ又はそれ以上の本発明の化合物を含む徐放性製剤を生成するために用いることができる。例えば、米国特許第４，５２６，９３８号；ＰＣＴ国際公開第９１／０５５４８号公報；ＰＣＴ国際公開第９６／２０６９８号公報；「Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotheraphy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189」、「Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397」；「Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854」；及び「Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760」を参照されたい。それらの各々を、その全てを参照して本明細書に取り込む。一態様では、ポンプが制御放出系に用いることができる（「Langer, supra; Sefton, 1987, CRC C

rit. Ref. Biomed Eng. 14:20」；「Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507」；及び「Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med 321:574」を参照されたい）。別の態様では、ポリマー素材が、化合物の制御された放出を達成するために用いられる（例えば、「Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida. (1974)」；「Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984)」；「Ranger and Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61」；「Levy et al., 1985, Science 228:190」；「During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351；Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105」；米国特許第５，６７９，３７７号；米国特許第５，９１６，５９７号；米国特許第５，９１２，０１５号；米国特許第５，９８９，４６３号；米国特許第５，１２８．３２６号；ＰＣＴ国際公開第９９／１５１５４号公報;ＰＣＴ国際公開第９９／２０２５３号公報も参照されたい）。持続的な放出の製剤に用いられるポリマーの例は、これらに限定されないが、ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（エチレン－ｃｏ－ビニルアセテート）、ポリ（メタクリル酸）、ポリグリコライド（ＰＬＧ）、ポリ無水物、ポリ（Ｎ－ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリアクリルアミド、ポリ（エチレングリコール）、ポリラクチド（ＰＬＡ）、ポリ（ラクチド－ｃｏ－グリコライド）（ＰＬＧＡ）、及びポリオルトエステルを含む。更なる別の態様では、制御された放出系は治療標的（例えば肺）の近傍に置かれ、これによって、全身投与量の一部しか必要としない（例えば、「Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)」を参照されたい）。別の態様では、制御された放出埋め込み体として有用なポリマー構成成分は、Ｄｕｎｎら（米国特許第５，９４５，１５５号を参照されたい）に従って用いられる。この特定の方法は、ポリマー系から生物活性物質のｉｎ　ｓｉｔｕ制御された放出の治療効果に基づいている。埋め込みは、一般に、治療的な処置が必要な患者の体内のどこにでも存在させることができる。別の態様では、薬物送達システムとして用いられる患者体内の非ポリマーの埋め込みによって、非ポリマーの持続的な送達システムが用いられる。体内に埋め込まれるとき、埋め込みの有機溶剤は、組成物から周囲の組織液へ消散し、分散し、又は浸出するであろう。そして非ポリマー物質は、徐々に凝固又は沈殿して、固体の微小孔のあるマトリクスを形成するであろう（米国特許第５，８８８，５３３号を参照されたい）。

【０１３０】

制御された放出系は、Ｌａｎｇｅｒによる総説において議論されている（1990, Science 249:1527-1533）。当業者で公知の技術の何れかは、本発明の１つ又はそれ以上の治療薬を含む、持続的な放出製剤を生産するために使用される。例えば、米国特許第４，５２６，９３８号；国際公開第９１／０５５４８号公報及び第９６／２０６９８号公報；「Ning et al., 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-189」；「Song et al., 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397」；「Cleek et al., 1997, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854」；及び「Lam et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760」を参照されたい。それらの各々は、その全てを参照して本明細書に取り込む。

【０１３１】

本発明の化合物を投与する方法は、これらに限定されないが、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、及び皮下）、硬膜外及び粘膜投与（例えば、鼻内及び口腔経路）を含む。特定の態様では、本発明の化合物は、筋肉内、静脈内又は皮下に投与される。組成物は、便宜的な経路の何れか、例えば、注射又は一度の注入により、上皮又は皮膚と粘膜の内層（例えば、口腔粘膜、直腸、及び腸管粘膜など）を通した吸収により、投与され、そしてその他の生物学的に活性な薬剤と共に投与されてもよい。投与は、全身的又は局所的でありうる。加えて、肺投与はまた、例えば、吸入器又は噴霧器の使用により、及びエアロゾル化試薬を用いた製剤化により、用いることができる。例えば、米国特許第６，０１９，９６８号；同第５，９８５，２０号；同第５，９８５，３０９号；同第５

，９３４，２７２号；同第５，８７４，０６４号；同第５，８５５，９１３号；同第５，２９０，５４０号及び同第４，８８０，０７８号；及びＰＣＴ国際公開第９２／１９２４４号公報；同第９７／３２５７２号公報；同第９７／４４０１３号公報；同第９８／３１３４６号公報；及び同第９９／６６９０３号公報を参照されたい。それらの各々を、その全てを参照して本明細書に取り込む。

【０１３２】

一態様では、粒子が経静脈的に送達されて、生長している腫瘍の周りの毛細血管床にトラップされるような大きさをもつ、リポソーム又は微粒子内に存在させ、化合物を経静脈的に投与する。この態様における適切な粒子サイズは、例えば、ＤａｕｎｏＸｏｍｅ(登録商標)という名称で市販されているリポソームで現在用いられているようなものであり、その径は約２００～５００μｍと考えられている。その後、化合物は、腫瘍の部位で局所的に、時間をかけて放出される。

【０１３３】

別の態様では、腫瘍が外科的に取り除かれる部位に適用される組織被覆、好ましくはポリマーの組織被覆、より好ましくは生分解性の組織被覆内に存在させ、化合物は投与される。適切なポリマー素材は、例えば、Ｈｕｂｂｅｌｌらの米国特許第５，４１０，０１６号に開示され、その内容は、参照して本明細書に取り込む。

【０１３４】

アデノシンA_3アゴニストと組み合わせたポリマーのバリアは、更にその他の血管新生剤と組み合わせてもよい。

【０１３５】

疾患に関連する１つ又はそれ以上の症状の治療、予防又は改善において効果的であろう本発明の組成物の量は、標準的な臨床技術によって決定されうる。製剤に用いられる正確な投与量はまた、投与経路及び状況の重篤度に依存するであろう、また開業医及び各々の患者の状況を判断して決められるべきである。有効量は、インビトロ又は動物モデル試験システムに由来する用量応答曲線から外挿されうる。

【０１３６】

特定の態様では、本発明の薬学的組成物を処置が必要な領域に局所的に投与することが望ましい；これは、これらに限定されないが、例えば、局所的な注射により、注入により、又は埋め込み方法により、達成することができ、この埋め込みは、シアラスチック（sialastic）膜のような膜又は線維を含む、孔の開いた、孔の開いていない、又はゼラチン素材からなる。

【０１３７】

対象を治療及び予防に有効な量の本発明の化合物で処置することは、単回処置を含み、好ましくは連続的な処置を含む。好ましい実施例において、対象は、本発明の化合物を、患者の体重当たり約０．１μｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ、約０．１μｇ／ｋｇ～約５００ｍｇ／ｋｇ、約０．１μｇ／ｋｇ～約１ｇ／ｋｇ、約１００μｇ／ｋｇ～約５００ｍｇ／ｋｇ、約１００μｇ／ｋｇ～約１ｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約５００ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１ｇ／ｋｇで、週に１回投与で、約１～１０週間、好ましくは約２～８週間、より好ましくは約３～７週間、及び更により好ましくは、約４，５又は６週間の範囲で処置される。その他の態様では、本発明の薬学的組成物は、１日に一度、１日に二度、又は１日に三度、投与される。その他の態様では、薬学的組成物は、週に一度、週に二度、二週間に一度、月に一度、六週間に一度、二ヶ月に一度、年に二度又は年に一度で、投与される。処置に用いられる化合物の有効な投与量は、特定の処置の工程で、増加させたり、減少させたりすることも、評価されるであろう。アデノシンA_3受容体のアゴニストとして効果的であることが要求される化合物の量は、もちろん、選択された活性部位、処置される個々の哺乳動物、で異なり、最終的には、医学又は獣医学の開業医の裁量にゆだねられる。考慮されるべき要因は、活性物質の結合親和性、投与経路、製剤の性質、哺乳動物の体重、表面積、年齢及び一般的状況、及び投与される特定の化合物を含む。

【０１３８】
毎日の投与の総量は、単回投与量、多数回投与量、例えば１日に２～６回、又は選択された期間の静脈内注射として与えられる。上記範囲より高い又はより低い投与量は、本発明の範囲内であり、所望され必要なら、個々の患者に投与されうる。
【０１３９】
本発明はまた、本発明の化合物が、アンプルや、抗体の量を示唆する小包のような密封された容器にパックされることを提供する。一態様では、本発明の化合物は、密封してシールした容器に、乾燥滅菌された凍結乾燥粉末又は水を含まない濃縮物として、供給され、例えば、対象に投与する適切な濃度に水又は生理食塩水で再構成される。好ましくは、本発明の化合物は、密封してシールした容器内に、乾燥滅菌された凍結乾燥粉末として、少なくとも５ｍｇ、より好ましくは少なくとも１０ｍｇ、少なくとも１５ｍｇ、少なくとも２５ｍｇ、少なくとも３５ｍｇ、少なくとも４５ｍｇ、少なくとも５０ｍｇ、又は少なくとも７５ｍｇの単位用量で、供給される。本発明の凍結乾燥化合物は、もとの容器で、２から８℃の間で貯蔵されるべきで、化合物は、再構成された後、１２時間以内、好ましくは６時間以内、５時間以内、３時間以内、又は１時間以内に投与されるべきである。別の態様では、本発明の化合物は、化合物の量と濃度を示している密封してシールした容器内に、液体の形で供給される。好ましくは、化合物の液体の形態は、密封してシールした容器内に少なくとも１ｍｇ／ｍｌ、より好ましくは少なくとも２．５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも８ｍｇ／ｍｌ、少なくとも１０ｍｇ／ｍｌ、少なくとも１５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも２５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも５０ｍｇ／ｍｌ、少なくとも１００ｍｇ／ｍｌ、少なくとも１５０ｍｇ／ｍｌ、少なくとも２００ｍｇ／ｍｌの化合物で供給される。
【０１４０】
剤形は、便宜的に単位用量形態で表され、薬局の技術分野で公知の方法の何れかで調製される。全ての方法は、１つ又はそれ以上の補助的な成分を構成する担体と活性化合物を組み合わせる工程を含む。一般的に、剤形は、液体の担体又は微細の固形の担体と活性化合物を均一に親密に組み合わせることにより、その後、必要であれば、その生成物を所望の単位用量形態に形成することにより調製される。
【０１４１】
前述の成分に加えて、剤形はさらに、１つ又はそれ以上の任意の薬剤の技術分野で用いられる補助的な成分、例えば、希釈剤、緩衝液、香料、結合剤、界面活性化試薬、濃化剤、潤滑剤、懸濁剤、防腐剤（抗酸化剤を含む）などを含むことができる。
【０１４２】
剤形は、経口、直腸、局所，又は非経口（皮下、筋肉内及び静脈内を含む）投与に適切な剤形を含むが、これらに限定されるものではない。好ましくは、経口又は非経口に適した剤形である。
【０１４３】
本明細書に記載される薬学的に許容可能な担体は、例えば、媒体、アジュバント、賦形剤又は希釈剤であり、当業者によく知られており、一般に容易に入手可能である。薬学的に許容可能な担体は、活性化合物に対し化学的に不活性であり、使用する条件において、有害な副作用又は毒性を有しないものであることがより好まれる。
【０１４４】
担体の選択は、特定の活性な薬剤により、更に組成物を投与するために用いられる特定の方法により、一部決定されるであろう。従って、本発明の薬学的組成物の様々な適切な製剤がある。経口、エアロゾル、非経口、皮下、経静脈、経動脈、筋肉内、腹腔内、髄腔内、直腸、及び膣内投与のための以下の製剤は、単なる例示であり、限定されるものではない。
【０１４５】
本発明の化合物、例えば、高親和性アデノシンA_3受容体アンタゴニストは、単独か又は他の適切な組成物との組み合わせで、吸入により投与されるエアロゾル製剤に製造され

る。これらのエアロゾル製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などのような、加圧可能な加圧ガス中に置かれる。それらはまた、噴霧器又は霧吹きのような、非圧縮的調製のための調剤として製剤化することができる。

【０１４６】

（６．３　治療的／予防的利用の特徴及び実証）

薬学的組成物のいくつかの態様では、本発明の予防薬又は治療薬は、ヒトに使用する前に所望の治療活性のために、好ましくは、インビトロ、例えば、細胞培養系で、そしてその後インビボ、例えば、げっ歯類の動物モデル系のような動物モデル生物において、試験される。予防薬及び／又は治療薬の組み合わせは、ヒトに用いる前に、適切な動物モデル系で試験される。このような動物モデル系は、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ブタ、イヌ、ウサギなどを含むが、これらに限定されるものではない。当該技術分野でよく知られる動物系の何れかが、使用される。本発明の特定の態様では、予防薬及び／又は治療薬の組み合わせが、マウスモデル系において試験される。そのようなモデル系は、当該技術分野の技術者によく知られ、広く使用されている。予防薬及び／又は治療薬は、繰り返し投与される。手順のいくつかの局面では、予防薬及び／又は治療薬の投与の一時的な計画のように変化してもよく、そしてそのような薬剤が別々に又は混合剤として投与される。

【０１４７】

本発明の予防薬及び／又は治療薬が動物モデルで試験されると、それらの効力を確立するために臨床治験において試験されうる。臨床治験を確立することは、当業者に知られる一般的な方法論に従って実施され、本発明の組成物の毒性プロフィールと同様に最適な投与量と投与経路が通常行われる実験によって確立される。

【０１４８】

本発明の予防的及び／又は治療的手順の毒性及び有効性は、例えば、LD_{50}値（集団の５０％が死亡する用量）やED_{50}値（集団の５０％に治療的に有効な用量）を決定するための、細胞培養又は実験動物における標準的な薬学的手順により決定することができる。毒性と治療効果の間の用量比率は、治療指数及びLD_{50}値／ED_{50}値比として表現される。大きな治療指数を表す予防薬及び／又は治療薬は、より好ましい。毒性副作用を示す予防薬及び／又は治療薬が用いられうる場合、非感染細胞への可能性ある障害を最小化し、それにより副作用を減弱するために、そのような薬剤で疾患に冒された組織の部位を標的とする送達系をデザインすることに注意が払われなければならない。

【０１４９】

細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータは、ヒトに使用するための予防薬及び／又は治療薬の投与量の範囲で製剤化することに用いられる。そのような薬剤の投与量は、好ましくは、毒性が殆どなく又は全くなく、ED_{50}値を含む循環濃度の範囲内にある。投与量は、用いられる用量形態及び使用される投与経路に依存して、この範囲内で変わりうる。本発明の方法に用いられるいかなる薬剤にとっての治療有効量は、最初に細胞培養アッセイから評価される。投与量は、細胞培養において決定されたIC_{50}値（すなわち、症状の最大の半分の阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む、循環する血漿中濃度範囲を達成するように動物モデルにおいて製剤化される。そのような情報は、ヒトにおいて有用な投与量をより正確に決定するために用いられる。血漿中レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィにより測定される。

【０１５０】

本発明に従って用いる治療の抗虚血性の活性はまた、虚血研究のための様々な実験動物モデルを使うことにより決定することができる。最も顕著には、首の頸動脈の一過的な閉塞により生み出される全体虚血のスナネズミモデル（例えば、「Kirino et al., 1982, Brain Res. 239:57-69」を参照されたい）、ラットの虚血のための４血管の閉塞モデル（Pulsinelli et al., 1979, Stroke 10:267-272）、局所虚血のＭＣＡＯ微小フィラメント（Tamura et al., 1981, Journal Cereb. Blood Flow Metab. 1:53）などの、全体及び局部両方の脳虚血の症状を模倣する動物モデルが確立されてきた。それらの全てを参照して

、本明細書に取り込む。

【０１５１】

本発明の手順及び組成物は、ヒトに用いる前に、望まれる治療的又は予防的活性のために、好ましくは、インビトロで、その後インビボで、試験される。治療薬及び方法は、腫瘍又は悪性腫瘍細胞株を用いて選択される。治療に用いる化合物は、ヒトに試験される前に、これらに限定されるものではないが、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギ、ハムスターなど、例えば、上記の動物モデルを含む適切な動物モデル系において試験される。化合物はその後、適切な臨床治験に用いることができる。

【０１５２】

外科手術時の心筋保護、進行性の心臓又は脳虚血イベントを有する患者の心筋保護、又は冠状動脈心疾患と診断された及び冠状動脈心疾患、つまり心不全の危険性がある患者の慢性的な心臓保護のためのA_3受容体アゴニストの治療的利用は、慣用的な前臨床心臓保護アッセイ（例えば、「Klein et al., 1995, Circulation 92:912-917」におけるインビボアッセイ；「Scholz et al., 1995, Cardiovascular Research 29:260-268」における単離心臓アッセイ；「Yasutake et al., 1994, Am. J. Physiol., 36:H2430-H2440」における抗不整脈アッセイ；「Kolke et al., 1996, J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 112: 765-775」におけるＮＭＲアッセイ；を参照されたい）のような、当業者に知られる標準的なアッセイを用いて決定される。そして、それらの全てを参照して、本明細書に取り込む。そのようなアッセイはまた、本発明の化合物の活性が他の既知の化合物の活性と比較できる方法を提供する。これらの比較の結果は、このような疾患の治療のために、ヒトを含む、哺乳動物の投与量レベルを決定するために有用である。

【０１５３】

虚血発作の結果としての心臓組織障害を避けるための、A_3受容体アゴニストの治療的効果は、Ｌｉｕらにより開示される方法（「Cardiovasc. Res., 28:1057-1061, 1994」；その全てを参照して、本明細書に取り込む）のようなインビトロアッセイにおいて証明されうる。梗塞された心筋の減少によって示されるような心臓保護は、心筋虚血の前提条件のインビトロモデルとして単離され、逆行的にかん流されたウサギの心臓に、アデノシン受容体アゴニストを用いて薬学的に誘導することができる。虚血発作の結果の心臓組織障害を予防することの、A_3受容体アゴニストの治療効果はまた、Ｌｉｕらにより示された方法（「Circulation, Vol. 84:350-356, 1991」；その全てを参照して、本明細書に取り込む）を用いてインビボで証明されうる。そのインビボアッセイは、生理食塩水溶液を受ける対照の集団と比較してテスト化合物の心臓保護を試験する。梗塞された心筋の減少により示されるような心臓保護は、心筋虚血の前提条件のｉｎ　ｓｉｔｕモデル（「Liu et al., Circulation 84:350-356, 1991」；その全てを参照して、本明細書に取り込む）として検討される、無傷の、麻酔されたウサギに経静脈的に投与されたアデノシン受容体アゴニストを用いて、薬学的に誘導される。そのインビボアッセイは、化合物が薬学的に心臓保護を誘導するをかどうか、すなわち、無傷で麻酔されたウサギに非経口投与した場合、心筋の梗塞の大きさを減弱させるのを誘導するかどうか、試験する。本発明の化合物の効果は、ｉｎ　ｓｉｔｕで検討された無傷の麻酔されたウサギにおいて薬学的に心臓保護を誘導することを示してきた、A_3受容体アゴニスト、N^6－１－（フェニル－２Ｒ－イソプロピル）アデノシン（ＰＩＡ）を用いた虚血前提条件と比較される。

【０１５４】

A_3受容体アゴニストは、科学的文献に報告された手法を用いることで、非心臓組織、例えば、脳又は肝臓における虚血傷害を減弱又は予防することへの使用を試験される。そのような試験でのA_3受容体アゴニストは、好ましい投与経路と投与媒体で、虚血症状の発現前、発現時、発現後（再かん流の期間）のいずれか好ましい投与時間に、投与される。本発明の虚血性脳障害を減弱する便益は、例えば、Ｐａｒｋらの方法を使って哺乳動物において証明されうる（「Ann. Neurol. 1988 ;24:543-551」；「Nakayama et al. Neurology 1988, 38:1667-1673」；「Memezawa et al. Stroke 1992, 23:552-559」；「Folbergrova et al., Proc. Natl. Acad. Sci 1995, 92:5057-5059」；及び「Gotti et al. Bra

in Res. 1990, 522:290-307」；それらの全てを参照して、本明細書に取り込む）。

【０１５５】

（６．３．１　アデノシン受容体に基づくアッセイ）

アデノシンA$_3$アゴニストとしての本発明の化合物の活性及び選択性は、本明細書に開示される又は当業者に公知のあらゆるアッセイを用いて、通常の実験を越えることなく、容易に決定される。A$_1$及びA$_{2A}$受容体は、ヒトとげっ歯類で同様の薬理学効果を示すので、ラット由来の内因性受容体は、A$_1$及びA$_{2A}$結合アッセイのために用いられる。

【０１５６】

典型的なラットA$_1$及びA$_{2A}$アデノシン受容体結合アッセイは、次の工程を含む。膜の調製：雄性Ｗｉｓｔｅｒラット（２００～２５０ｇ）は断首され、全脳（ｍｉｎｕｇ脳幹、線条体及び小脳）は氷上で解剖された。脳組織は、２０倍容量の５０ｍＭのＴｒｉｓ・ＨＣｌ（ｐＨ７．４）中で、ポリトロン（セッティング５）で粉砕することができる。ホモジネートは、その後、４８，０００ｇで１０分間遠心分離され、生成したペレットは、２ＩＵ／ｍｌの４型アデノシンデアミナーゼ（Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA）を含むＴｒｉｓ・ＨＣｌ中に再縣濁される。３７℃で３０分間のインキュベーション後、膜は遠心分離され、ペレットは－７０℃で貯蔵される。線条体組織は、１０ｍＭのＭｇＣｌ$_2$を含む２５倍容量の５０ｍＭのＴｒｉｓ・ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ７．４）中で、ポリトロンでホモジナイズされる。その後、ホモジネートは、４℃で４８，０００ｇで１０分間遠心分離され、２ＩＵ／ｍｌのアデノシンデアミナーゼを含むＴｒｉｓ・ＨＣｌ緩衝液中に再縣濁される。３７℃で３０分間のインキュベーション後、膜は遠心分離され、ペレットは－７０℃で貯蔵された。放射性リガンド結合アッセイは、以下の工程を含む：［^{3}Ｈ］－ＤＰＣＰＸ（１，３－ジプロピル－８－シクロペンチルキサンチン）のラット脳の膜に対する結合は、本質的にＢｒｕｎｓらによって以前記載された方法（「1980, Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 5547-5551」；その全てを参照して、本明細書に取り込む）に従って実施される。置換実験は、１ｎＭの［^{3}Ｈ］－ＤＰＣＰＸ、１００μｌのラット脳希釈膜（アッセイ当たり１００μｇタンパク質）及び少なくとも６～８ケースの異なる濃度の検討化合物を含む、０．２５ｍｌの緩衝液中で実施される。非特異的結合は、１０μＭのＣＨＡ（Ｎ^{6}シクロヘキシルアデノシン）の存在下に測定され、これは常に全結合の１０％以下である。インキュベーション時間は、一般的には２５℃で１２０分である。

【０１５７】

放射性リガンドの結合アッセイは、以下の工程を含む：［^{3}Ｈ］－ＳＣＨ５８２６１（５－アミノ－７－（２－フェニルエチル）－２－（２－フリル）－ピラゾロ［４，３－ｅ］－１，２，４－トリアゾロ［１，５－ｃ］ピリミジン）のラット線条体膜（アッセイ当たり１００μｇタンパク質）への結合は、Ｚｏｃｃｈｉらの記載の方法（「1996, J. Pharm. and Exper. Ther. 276:398-404」；その全てを参照して、本明細書に取り込む）に従って実施される。競合実験において、少なくとも６～８ケースの異なる濃度の検討化合物が用いられるべきである。非特異的結合は、５０μＭのＮＥＣＡ（５‘－（Ｎ－エチルカルボキサミド）アデノシン）の存在下に測定される。インキュベーション時間は、一般的に２５℃で６０分である。結合及びフリーの放射活性は、ブランデル社製セルハーベスター（Gaithersburg, Md., USA）を用い、ワットマンＧＦ／Ｂのグラスファイバーろ紙を通して、アッセイ混合物をろ過することにより分離される。インキュベーション混合物は、３ｍｌの氷冷培養緩衝液で希釈され、すばやく真空ろ過され、そしてろ紙は３ｍｌのインキュベーション緩衝液で３回洗浄される。放射活性を結合したろ紙は、例えば、液体シンチレーションスペクトロメトリーにより、測定される。タンパク質濃度は、例えば、バイオラド（Bao-Rad）の方法（「Bradford, 1976, Anal. Biochem. 72:248」；その全てを参照して、本明細書に取り込む）に従って、ウシアルブミンを参照標準として用いることで、測定される。

【０１５８】

ヒトクローン化A$_3$アデノシン受容体結合アッセイの一般的なアッセイは、以下の工程

を含む：結合アッセイは、サルバトールらの記載された方法（「1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:10365-10369」；その全てを参照して、本明細書に取り込む）に従って実行される。飽和検討において、ヒト組み換えA_3アデノシン受容体（Research Biochemical International, Natick, Mass., USA）でトランスフェクトされたＨＥＫ－２９３細胞由来の膜（８ｍｇタンパク質／ｍｌ）のアリコートは、０．１～５ｎＭの範囲の１０～１２ケースの異なる濃度の［^{125}Ｉ］ＡＢ－ＭＥＣＡとインキュベーションさせる。競合実験は、試験管に、０．３ｎＭ［^{125}Ｉ］ＡＢ－ＭＥＣＡ、５０ｍＭのＴｒｉｓＨＣｌ緩衝液、１０ｍＭの$MgCl_2$、ｐＨ７．４、２０μｌの希釈された膜（１２．４ｍｇタンパク質／ｍｌ）及び少なくとも６～８ケースの異なる濃度の検討リガンドを含む最終容量１００μｌ中で、２つ組で実施される。インキュベーション時間は、以前の時間経過実験の結果に従って、３７℃で６０分であった。結合及びフリーの放射活性は、ブランデル社製セルハーベスターを用い、ワットマンＧＦ／Ｂのグラスファイバーろ紙を通して、アッセイ混合物をろ過することにより、分離される。非特異的結合は、５０μＭのＲ－ＰＩＡの存在下での結合として決定され、全結合の約３０％であった。インキュベーション混合物は、３ｍｌの氷冷培養緩衝液で希釈され、すばやく真空ろ過され、そしてろ紙は３ｍｌの培養緩衝液で３回洗浄された。放射活性を結合したろ紙は、ベックマンガンマ５５００Ｂのガンマカウンターで計数された。タンパク質濃度は、バイオラドの方法に従い、ウシアルブミンを参照標準として測定される。

【０１５９】

データ解析は、次のように実施される：結合阻害定数、Ｋｉの値は、IC_{50}の値からＣｈｅｎｇ＆Ｐｒｕｓｏｆｆの式（Cheng and Prusoff, 1973, Biochem. Pharmacol. 22:3099-3108）、$Ki = IC_{50} / (1 + [C^*]I / K_D^*)$、ここで[Ｃ＊]は、放射性リガンドの濃度であり、$K_D$はその解離定数である、に従って計算される。重み付けされた非線形最小二乗法曲線外挿プログラムＬＩＧＡＮＤ（Munson and Rodbard, 1990, Anal. Biochem. 107:220-239）は、飽和や阻害実験のコンピュータ解析に用いられる。データは、一般的には、幾何平均で表され、９５％又は９９％信頼区間をカッコ内に付記する。

【０１６０】

（６．３．２　虚血を測定するためのアッセイ）

本発明は、虚血関連の細胞障害の治療又は予防における本発明の化合物の有効性を測定するために有用なインビトロ及びインビボに基づくアッセイを包含する。虚血関連の細胞障害を測定するための当該技術分野で公知のあらゆる方法が、本発明に内包される。虚血性の細胞障害、壊死の細胞死、アポトーシス細胞死、を測定するための当該技術分野で公知のあらゆる方法は、本発明の方法に従って用いられる。

【０１６１】

本発明のアゴニストの有効性がインビトロのアッセイで評価されると、それらはさらに虚血のインビボモデルにおいて評価される。このセクションは、この目的のための典型的なモデルを述べる。当業者は、その他のモデルが以下に述べるモデルに置き換わることができることを正しく評価するであろう。

【０１６２】

中枢神経系における神経の虚血を生成する様々なインビボモデルが、記載されてきた。典型的なモデルは、スナネズミの頚動脈の一過的な閉塞により生み出される２血管閉塞の全体虚血のモデル（Kirino, 1982, Brain Res. 239:57-69）、ラットの４血管閉塞の全体虚血のモデル（Pulsinelli, et al., 1979, Stroke 10:267-272）及びラット中脳動脈閉塞（ＭＣＡＯ）の局所虚血のモデル（Tamura et al., 1981, J Cereb. Blood Flow Metab. 1:53）を含む。上に記載の文献の全ては、その全てを参照して、本明細書に取り込む。

【０１６３】

モンゴリアンスナネズミは、脳虚血及び梗塞のモデルとして用いられてきた（Kirino, 1982, Brain Res. 239:57-69）。スナネズミは、頸動脈と脊椎脳底の間のつながりが欠如しており、そのため首の共通の頚動脈の閉塞により、容易に脳虚血を生み出すことができる。５分以内の一過的な両側の頚動脈閉塞を受けたスナネズミの脳は、海馬のＣＡ１領域

に典型的な虚血傷害を生み出す。脳へのあらゆる血流は、固定された時間、一般的には５～１０分間止められるため、臨床的な比較のために、このモデルで生み出される虚血は、心筋梗塞により生み出される虚血になぞらえられてきた。

【０１６４】

種間の、特に続発症におけるいくつかの違いが、注目されてきたけれども、スナネズミは、ヒトを含む、その他の哺乳動物に見られるような、虚血によりもたらされる同種の選択的な領域の障害を示す。特に、海馬のＣＡ１領域に観察される特徴的な二次障害は、ヒトを含む他の哺乳動物で見られるものと同様である。この領域の神経、特に錐体神経は、虚血傷害の後４日目までの間、神経死を遅らせることを示す。

【０１６５】

ラットのモデルは、一過的な閉塞を生み出すための手法を包含し、麻酔されていない状態で起こる、典型的には５～３０分の一過的な虚血性症状の発現を含む、心筋梗塞に続いて起こるヒト脳の状況を模倣する虚血を生み出す。多くのラットでは、虚血性症状の発現は、一般的な発作に付随して起こらず、発作を有する動物は、この検討から除外される。閉塞の手法は、動物を容易にモニターし、維持し、及び解析することを可能にした（Pulsinelli et al.,1979, Stroke 10:267-272）。

【０１６６】

選択的なＮ型カルシウムチャネル阻害剤、ＳＮＸ－１１１は、ラットの４血管閉塞の虚血モデル及び一過的な中脳動脈閉塞の局所的虚血モデルの両方において、神経保護的であることが証明されてきた（Buchan, et al., 1994 J Cereb. Blood Flow Metab. 14(6):903-910.）。

【０１６７】

ネコ、イヌ、霊長類、スナネズミ及びラットで確立されてきた、局所的な脳梗塞を有する動物の脳卒中モデルは、臨床経験に直接関連すると考えられている。ラットにおいてよく用いられる局所的な虚血モデルは、まさにＴａｍｕｒａと彼の共同研究者によって開発された中脳動脈閉塞（ＭＣＡＯ）モデルである（「Hsu et al., 1990, Cerebral Ischemia and Resuscitation 3:47-59」；その全てを参照して、本明細書に取り込む）。つまり、３１０～３４０ｇの雄性Ｗｉｓｔｅｒラットは、３～３．５％のハロタンで麻酔され、経口的に挿管された。外経約２８ｍｍのナイロンの単一フィラメントの釣り糸又はシリコンラバーで被覆されたナイロンの釣り糸は、Ｈｓｕらにより１９９０年に記載されたような、外部頚動脈から挿入され、中脳動脈を閉塞させるように用いられる。ＭＣＡＯモデルは、頭骸骨切除術を必要としない、そして簡単な再かん流を可能にするが、しかしながら、温度は中脳動脈（ＭＣＡ）の閉塞のため局所的な虚血障害に影響を及ぼしうるが、この複雑さは麻酔及び／又は覚醒動物の冷却によって回避することが可能である。

【０１６８】

心筋梗塞の動物モデルは、当該技術分野でよく知られている。数々のモデルの何れかが、本明細書で同定された化合物の有効性を評価するために用いられる。例えば、ウサギ又は犬におけるｉｎ　ｓｉｔｕ冠動脈閉塞と続いて起こる再かん流は、化合物を評価するために用いられる。ここに於ける心臓への障害の程度は、磁場共鳴画像化のような多くの方法の何れかによって測定できる（例えば、「Kim et al., 1999, Circulation 100(2) 185-192」；「Pislaru et al., 1999, Circulation 99(5): 690-696」；「Schwartz, 1999 Am. J. Cardiol. 81(6A): 14D-20D」を参照されたい；それらの各々は、その全てを参照して、本明細書に取り込む）。

【０１６９】

ＣＯＰＤ及び喘息に関する動物モデルは、当該技術分野でよく知られ、本発明のアンタゴニスト化合物の有効性を評価するために、本明細書に包含される。例えば、「Steiger et al., 1995, J. Am. Respir. Cell Mol. Biol., 12:307-14」及び米国特許第６，０８３，９７３号；「Temann et al., 1997, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 16:471-8」；「Szelenyi and Marx, 2001, Arzneimittelforschung 51:1004-14」を参照されたい；それらの全ては、その全てを参照して、本明細書に取り込む。

【０１７０】
（６．３．３　ＨＩＦ－１αレベルを測定及び決定するための方法）
本発明は、ＨＩＦ－１α発現の定量的及び定性的局面を評価するための方法を包含する。当該技術分野で公知の手法、例えば、定量的又は半定量的ＲＴ－ＰＣＲ若しくはノーザンブロットは、ＨＩＦ－１αの発現レベルを測定するために用いられる。ＨＩＦ－１α遺伝子又は遺伝子産生物発現の定性的及び定量的の両局面を記載する方法は、以下の実施例に詳細に述べる。ＨＩＦ－１α遺伝子発現レベルの測定は、自然に起こるＨＩＦ－１α転写物及びその変異体、更に非自然的に起こるその変異体を測定することを含むことができる。しかしながら、対象における病気又は疾患の診断及び／又は予後のためには、ＨＩＦ－１α遺伝子産生物は、好ましくは、自然に起こるＨＩＦ－１α遺伝子産生物又はその変異体である。こうして、本発明は対象におけるＨＩＦ－１α遺伝子の発現を測定する方法に関する。
【０１７１】
ＨＩＦ－１αレベルを検出及び／又は定量化するための当該技術分野で知られる方法の何れかは、本発明の方法及びキットで使用することができる。その多くは本明細書に例示される。特に好ましいのは、ＨＩＦ－１α活性又はＨＩＦ－１α関連の活性を検出及び／又は定量化するための当該技術分野で公知の、例えば、ＨＩＦ－１α経路において下流のエフェクター分子のリン酸化する方法である。いくつかの態様では、本発明は、ＨＩＦ－１α活性、又はこれに限定されないが、ＨＩＦ－１αシグナル伝達カスケードの１つ又はそれ以上の下流のエフェクターの活性を測定することを含む、ＨＩＦ－１α関連活性を測定すること、を包含する。ＨＩＦ－１α活性又はＨＩＦ－１α関連の活性を測定することは、本明細書に開示される方法の何れか、又は当業者に知られる標準的な方法の何れかを用いて行われる。
【０１７２】
その他の態様では、本発明は、本明細書に開示される方法の何れか、又は当業者に知られる標準的な方法の何れかを用いて行われる、対象から得られたサンプル中のＨＩＦ－１αをコードする核酸の定量を包含する。
【０１７３】
更に他の態様では、本発明は、病気又は疾患を有する対象由来のサンプルにおいて、ＨＩＦ－１αタンパク質の定量化を包含する。ＨＩＦ－１αタンパク質の検出及び定量のための当該技術分野で公知の方法が、本発明の中に包含されている。
【０１７４】
（６．３．３．１　核酸分子の検出）
本発明の方法及びキットは、対象から得られたサンプルにおけるＨＩＦ－１αをコードする核酸配列の検出及び／又は定量を包含する。ある態様では、本発明は、病気又は疾患に罹患した対象から得られたサンプルにおいて、特異的なＨＩＦ－１αの核酸配列を増幅する方法、そしてそれを検出及び／又は定量するための方法を提供する。ＨＩＦ－１αをコードする核酸は、当該技術分野でよく知られている。例えば、「Wang et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 5510-4」；及び国際公開第９６／３９４２６号公報を参照されたい。それらの全ては、その全てを参照して、本明細書に取り込む。
【０１７５】
本発明の方法及びキットは、米国特許第５，５２５，４６２号；第６，５２８，６３２号；第６，３４４，３１７号；第６，１１４，１１７号；第６，１２７，１２０号；第６，４４８，００１号に記載されるような当業者に知られる核酸増幅又は検出方法の何れかを使用してもよい。これらの全てを参照して、本明細書に取り込む。
【０１７６】
いくつかの態様では、ＨＩＦ－１αをコードする核酸は、当業者に知られる方法を用いて、ＰＣＲ増幅により、増幅される。しかしながら、当業者は、病気又は疾病に罹患した対象から得られたサンプルにおける標的配列（すなわち、ＨＩＦ－１αをコードする核酸配列）の増幅は、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、ＱＰ－レプリカーゼ増幅、転写増幅、及

び自立した配列複製のような、それぞれが十分な増幅をもたらす、公知の手法の何れかによって達成することができる。ＰＣＲプロセスは、当該技術分野でよく知られており、よって本明細書には詳細に記載しない。ＰＣＲ法及びプロトコールの総説として、例えば、「Innis et al., eds., PCR Protocols, A Guide to Methods and Application, Academic Press, Inc., San Diego, Calif. 1990」を参照されたい。これの全てを参照して、本明細書に取り込む。また、米国特許第４，６８３，２０２号も参照されたい；これの全てを参照して、本明細書に取り込む。ＰＣＲ試薬及び手順は、ロシュモレキュラーシステムズ（Rosche Molecular Systems）のような市販業者からも入手可能である。

【０１７７】

本発明は、ＨＩＦ－１α発現の定量的及び／又は定性的レベルを測定するための方法を包含する。ＨＩＦ－１αの発現を測定するための当該技術分野で知られるいかなる技術も本発明の範囲に属するものであり、それらは定量的及び／又は半定量的ＲＴ－ＰＣＲ及びノーザンブロット解析を含むものであるが、これらに限定されるものではない。

【０１７８】

いくつかの態様では、本発明は、本発明の方法に従って虚血性の病気又は疾患に罹患した対象から得られたサンプル、好ましくは組織サンプルにおいて、蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）を用いたＨＩＦ－１α核酸の検出及び／又は定量を包含する。ＦＩＳＨは特に、腫瘍細胞において特異的な染色体異常を検出する際に、例えば、診断及び腫瘍病期分類を補助するために、当該技術分野で用いられる一般的な手法である。本発明の方法において適用されるように、ＨＩＦ－１α核酸の検出及び／又は定量方法としても使用されうる。ＦＩＳＨ方法論の総説として、例えば、「Weier et al., 2002, Expert Rev. Mol. Diagn. 2(2): 109-119；Trask et al., 1991, Trends Genet. 7(5): 149-154」；及び「Tkachuk et al., 1991, Genet. Anal. Tech. Appl. 8: 676-74」を参照されたい。これらの全てを参照して、本明細書に取り込む。

【０１７９】

本発明は、自然に生じるＨＩＦ－１α転写産生物及びその変異体、更に非自然に存在する変異体を測定することを包含する。本発明の方法を用いる対象における虚血性疾患の予後診断の為には、ＨＩＦ－１α転写物は、自然に存在するＨＩＦ－１α転写物であることが好ましい。

【０１８０】

いくつかの態様では、本発明は、対象におけるＨＩＦ－１α転写物の発現を測定することにより、対象における疾病の予後（診断）の方法に関するものである。例えば、標準と比べて低下したＨＩＦ－１αをコードするｍＲＮＡのレベルは、その対象において、虚血状況が進行する増大した危険性を示すであろう。

【０１８１】

一態様では、本発明は、虚血性疾患の対象から得られたサンプルからＲＮＡを単離し、ＨＩＦ－１αのレベルを測定するための上述したようなハイブリダイゼーションやＰＣＲ技術を利用してＲＮＡを試験する方法を包含する。別の態様では、本発明は、逆転写により単離されたＲＮＡからｃＤＮＡを合成することを包含する。生じたｃＤＮＡの全部又は一部は、それからＰＣＲ等のような核酸増幅反応のための鋳型として使用される。本方法の逆転写及び核酸増幅工程において、合成開始試薬（例えば、プライマー）として使用される核酸試薬は、以下に記載されるＨＩＦ－１α核酸分子試薬の中から選択される。そのような核酸試薬の好ましい長さは、少なくとも９～３０ヌクレオチドである。増幅された産生物の検出のために、核酸増幅が、放射性又は非放射性標識のヌクレオチドを使用して実施される。あるいは、標準的なエチジウムブロマイド染色により、又は他の適した核酸染色方法の何れかの利用により可視化できるように、十分な増幅された産生物が生成されるであろう。

【０１８２】

代わりとなる態様では、疾患又は疾病に罹患した対象から得られたサンプルにおいて、当業者に知られる標準的なノーザン解析技術が実施されうる。ノーザン解析において用い

るプローブの好ましい長さは、９～５０ヌクレオチドである。そのような技術を利用して、ＨＩＦ－１α転写物の定量的検出、更に転写物間のサイズに関連する違いも検出できるであろう。

【０１８３】

代わりとなる態様では、本発明は、ｉｎ　ｓｉｔｕ、すなわち、核酸の精製が不要な、生検や再切片から得られた患者の組織の組織切片(固定された及び／又は凍結された)上での直接の遺伝子発現アッセイを包含する。以下に記載されるような核酸試薬が、このようなｉｎ　ｓｉｔｕ手法での、プローブ及び／又はプライマーとして使用されるであろう（例えば、「Nuovo, G. J., 1992, PCR In Situ Hybridization: Protocols And Applications, Raven Press, NY」を参照されたい；これらの全てを参照して、本明細書に取り込む）。

【０１８４】

本発明の標的ＨＩＦ－１α核酸はまた、当業者によく知られたその他の標準的な技術を使用して検出可能である。一般的には、増幅工程は検出工程より先に行われるが、増幅は本発明の方法において、必ずしも必要ではない。例えば、ＨＩＦ－１αの核酸は、サイズ分画（例えば、ゲル電気泳動）により、同定可能である。対照と比較して、サンプルの異なる又は追加的なバンドが存在することは、本発明の標的核酸分子の存在を示唆している。あるいは標的ＨＩＦ－１α核酸は、よく知られた手法に従って、配列により同定可能である。代わりとなる態様では、標的ＨＩＦ－１α核酸に特異的なオリゴヌクレオチドプローブが、特異的な断片の存在を検出するために使用できる。

【０１８５】

配列特異的なプローブハイブリダイゼーションは、生物学的液体又は組織サンプルを含むサンプルにおいて、所望の核酸を検出する公知の方法であり、本発明の範囲に含まれる。つまり、十分に厳しいハイブリダイゼーション条件下で、プローブは実質的に相補的な配列にのみ特異的にハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション条件の厳しさは、異なる量の配列のミスマッチを許容するために、緩められるだろう。標的がはじめに増幅される場合、正しく増幅された標的のみの検出を確実にするために、この配列特異的なハイブリダイゼーションが、増幅された産生物の検出に利用され、これにより関連する生物や他の夾雑配列由来の相同配列の存在によって生じる擬陽性の機会を減少させる。

【０１８６】

これらに限定されないが、溶液相、固相、混合相又はｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションアッセイを含む、当該技術分野で周知の多くのハイブリダイゼーションフォーマットは、本発明の核酸分子検出方法に包含される。溶液(又は液体)相ハイブリダイゼーションにおいては、標的核酸とプローブ又はプライマーの両者が、反応混合溶液内で自由に相互作用する、固相ハイブリダイゼーションアッセイでは、標的又はプローブのどちらかが、溶液内の相補的核酸とハイブリダイゼーションできる固体支持体に結合している。固相フォーマットの例には、サザンハイブリダイゼーション、ドットブロット等を含む。以下の文献は、様々なハイブリダイゼーションアッセイフォーマットの概観を提供するものであり、これらの全てを参照して、本明細書に取り込む。文献は、「Singer et al., 1986 Biotechniques 4: 230; Haase et al., 1984, Methods in Virology, Vol. VII, pp. 189-226」；「Wilkinson, In Situ Hybridization, D. G. Wilkinson ed., IRL Press, Oxford University Press, Oxford」；及び「Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, Hames, B. D. and Higgins, S. J., eds., IRL Press (1987)」である。

【０１８７】

本発明は、本発明の方法に従って、ＨＩＦ－１α核酸配列の検出及び／又は定量のために、同種間に基づくハイブリダイゼーションアッセイ、更に異種間に基づくアッセイを包含する。異種間に基づくアッセイは、ハイブリダイズしない核酸分子からハイブリダイズしたものを分離する能力に依存するものである。そのようなアッセイは、液相に残るハイブリダイズしていない核酸分子が、ハイブリダイゼーション反応の完了後に容易に分離できるように、個体支持体に標的又はプローブを固定化することを含むものである（例えば

、「Southern, 1975, J. Mol. Biol. 98: 503-517」を参照されたい；これらの全てを参照して、本明細書に取り込む）。これに対して、同種間アッセイは、ハイブリダイズした核酸とハイブリダイズしていない核酸を他の手段により区別するものである。同種間アッセイは分離工程を必要としていないため、一般的により望ましいアッセイと考えられている。そのような同種間アッセイの１つは、標的がプローブにハイブリダイズする際に、シグナルを生成できるだけのプローブ核酸につけられた標識の使用によるものである（例えば、「Nelson, et al., 1992, Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press, New York, N.Y., pages 274-310」を参照されたい；これらの全てを参照して、本明細書に取り込む）。

【０１８８】

本発明は、サイクリックプローブ技術（Bakkaoui et al., 1996, BioTechniques 20: 240-8；これらの全てを参照して、本明細書に取り込む）の使用及び分岐プローブ（Urdea et al., 1993, Clin. Chem. 39: 725-6；これらの全てを参照して、本明細書に取り込む）の使用を含むが、これらに限定されるものではなく、そのようなアッセイにおいて、検出可能なシグナルの感度を増加させるための当該技術分野で知られるいかなる方法も包含する。

【０１８９】

ハイブリダイゼーション複合体は、当該技術分野でよく知られた方法に従って検出される。標的に対して特異的にハイブリダイズ可能な核酸プローブは、ハイブリダイズした核酸分子の存在を検出するために一般的に使用されるいくつかの方法のいずれか１つにより標識される。検出の一般的な方法の１つは、^{3}Ｈ、^{125}Ｉ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃ又は^{32}Ｐ等で標識されたプローブを使用する、オートラジオグラフィの使用である。放射性同位体の選択は、選択された同位体の合成の容易さ、安定性及び半減期による研究選択に依存する。その他の標識は、蛍光団、化学発光試薬、又は酵素で標識された抗リガンド又は抗体に結合する化合物(例えば、ビオチンやジゴキシゲニン)を含む。あるいはプローブは、蛍光団、化学発光試薬、又は酵素のような標識に直接結合しうる。標識の選択は、要求される感度、プローブとの結合の容易さ、安定性の要求、及び利用可能な装置に依存する。

【０１９０】

本発明のプローブ及びプライマーは、当業者に知られた技術を使用して、合成及び標識される。プローブ又はプライマーとして使用するためのオリゴヌクレオチドは、「Beaucage, S. L. and Caruthers, M. H., 1981, Tetrahedron Lett. 22(20): 1859-1862」に記載された固相ホスホラミダイトトリエステル法に従って、「Needham-VanDevanter, D. R., et al. 1984, Nucleic Acids Res. 12: 6159-6168」に記載されるように自動合成装置を用いて、化学的に合成されるであろう。オリゴヌクレオチドの精製は、「Pearson, J. D. and Regnier, F. E., 1983, J. Chrom. 255:137-149」に記載のように、非変性アクリルアミドゲル電気泳動又は陰イオン交換ＨＰＬＣのどちらかにより可能である。上記に引用された参考文献の全ては、これらの全てを参照して、本明細書に取り込む。

【０１９１】

（６．３．４　タンパク質の検出）

本発明の方法及びキットは、対象から得られたサンプルにおけるＨＩＦ－１αの検出及び／又は定量を包含する。ＨＩＦ－１αタンパク質の検出及び定量のための当業者に公知の方法の何れも本発明に包含される。本発明の方法及びキットで使用可能なＨＩＦ－１αタンパク質配列は、当該技術分野でよく知られている。例えば、「Wang et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 5510-4」；及び国際公開第９６／３９４２６号公報を参照されたい；これらの全てを参照して、本明細書に取り込む。

【０１９２】

ＨＩＦ－１αタンパク質、抗ＨＩＦ－１α抗体及びその免疫特異的断片が、本発明のアッセイにおいて、適切である。ＨＩＦ－１α遺伝子産生物の検出及び定量は、本明細書に例示されるタンパク質の検出を包含するものである。本発明の方法で対象から得られたサンプルにおいて、減少したＨＩＦ－１α遺伝子産生物のレベルの検出とは、一般的に標準

サンプルと比較するものである。

【０１９３】

いくつかの態様では、自然に存在するＨＩＦ－１αタンパク質に対する抗体が、本発明の方法において使用されうる。本発明は、これらに限定されないが、ウェスタンブロット、ＥＬＩＳＡ及びＦＡＣＳを含み、当業者に知られる標準イムノアッセイ法の何れかの使用を包含するものである。

【０１９４】

一態様では、本発明は、サンプル内のＨＩＦ－１α受容体に免疫特異的な結合が生じうる条件下で、対象由来のサンプルと抗ＨＩＦ－１α抗体又はその免疫特異的断片を接触させ、それによって、免疫複合体を形成し、形成される複合体の量を検出及び／又は測定することを含む、イムノアッセイの使用を包含する。特定の態様では、サンプルにおいて、ＨＩＦ－１αの存在をアッセイするためにＨＩＦ－１αに対する抗体が使用され、そこでは標準サンプルと比較してＨＩＦ－１αの増加したレベルが検出される。

【０１９５】

いくつかの態様では、生物学的サンプルは、ニトロセルロース、又は細胞、細胞粒子若しくは可溶性タンパク質を固定化できる他の固体支持体のような、固相支持体又は担体に接触させられて、固定化される。支持体は、適切な緩衝液で洗浄され、続いて、ＨＩＦ－１αタンパク質に選択的に又は特異的に結合する抗体により処理される。固相支持体は、それに結合していない抗体を除去するために、緩衝液で洗浄される。その後、固相支持体に結合した抗体の量が、一般的な方法により検出されるであろう。

【０１９６】

本明細書で使用される「固相支持体又は担体」とは、抗原又は抗体に結合可能なあらゆる支持体をいう。よく知られた支持体又は担体には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然及び修飾セルロース、ポリアクリルアミド、ガブロ（gabbros）及びマグネタイトが含まれる。本発明の目的のためには、担体の性質は、いくらか可溶性であっても、不溶性であってもよい。支持体物質は、結合した分子が抗原又は抗体に結合できる限り、視覚的にいかなる可能な構造配置であっても良い。こうして、支持体の構造は、ビーズのように球形でも、試験管の内側又は竿の外側表面のように、円筒型であってもよい。あるいは、表面は、シート、試験紙等のように平らでも良い。好ましい支持体には、ポリスチレンビーズが含まれる。抗体又は抗原を結合するための他の多くの適した担体は当該技術分野で公知であり、通常の実験の使用により、それらを確認できるであろう。

【０１９７】

いくつかの態様では、抗ＨＩＦ－１α抗体又はその免疫特異性断片は、それらを酵素に結合して、酵素免疫アッセイ（ＥＩＡ）（Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", 1978, Diagnostic Horizons 2:1, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD.；Voller, A. et al., 1978, J. Clin. Pathol. 31:507-520；Butler, J. E., 1981, Meth. Enzymol. 73:482；Maggio, E. ed., 1980, Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL.；Ishikawa, E. et al., eds., 1981, Enzyme Immunoassay, Kgaku Shoin, Tokyo；これらの全てを参照して、本明細書に取り込む）において、標識された抗体を使用することにより、検出可能に標識される。抗体に結合する酵素は、例えば、分光分析、蛍光分析、又は可視化の方法により検出できる化学的部分を生成するように、適切な基質、好ましくは好色素性基質と反応するであろう。抗体を検出可能なように標識するために使用可能な酵素には、数ある中でも、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌のヌクレアーゼ、δ－５－ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、α－グリセロフォスフェート、デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ及びアセチルコリンエステラーゼが含まれるが、これらに限定されるものではない。検出は、酵素

に対する好色素性基質を用いる色素的手法により達成されうる。検出はまた、同様に調製される標準と比較して、基質の酵素的反応の程度を視覚的に比較することによっても、達成されるであろう。

【０１９８】

検出はまた、当業者に公知のその他の方法の何れかを用いても達成されうる。例えば、抗体又は抗体断片の放射性標識により、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）（例えば、「Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986」を参照されたい）の使用によるＨＩＦ－１αタンパク質の検出が可能である。放射性同位元素は、ガンマカウンター又はシンチレーションカウンターのような手段により、又はオートラジオグラフィにより検出可能であろう。

【０１９９】

その他の態様では、本発明は、蛍光化合物で標識された抗体を包含する。蛍光標識された抗体が、適切な波長の光に曝されると、蛍光によってその存在が検出できる。最も一般に使用される蛍光標識化合物は、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、ｏ－フタルデヒド（phthaldehyde）及びフルオレサミンである。さらにその他の態様では、抗体はまた、^{152}Ｅｕやランタナイド系列の他の元素のような蛍光発光金属を使用して、検出可能に標識しうる。これらの金属は、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）やエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）のような金属キレート基を用いて抗体に結合可能である。

【０２００】

本発明はさらに、化学発光化合物に抗体を結合させることで、検出可能に標識することを包含する。化学発光標識された抗体の存在は、化学反応工程の間に上昇する発光の存在を検出することにより、決定される。特に、有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、テロマティックアクリジニウムエステル（theromatic acridinium ester）、イミダゾール、アクリジニウム塩、及びシュウ酸エステルである。同様に、生物発光化合物が、本発明の抗体を標識するために使用可能である。生物発光は、触媒タンパク質が化学発光反応の効率を増加させる生物学的システムにおいて見出される化学発光のタイプである。生物発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することにより、決定される。標識を目的とする生物発光化合物は、例えば、ルシフェリン、ルシフェラーゼ及びエクオリンを含む。

【０２０１】

本発明はまた、間接的なＨＩＦ－１αの検出方法を包含する。特定の態様では、本発明は、病気又は疾病に罹患した対象由来のサンプルを、抗ＨＩＦ－１α抗体(一次抗体)又はその免疫特異的断片に、サンプル内のＨＩＦ－１αタンパク質に免疫特異的結合が生じるような条件下で接触させ、これにより免疫複合体を形成させて、一次抗体への免疫特異的な結合が起こるような条件下で、二次抗体を添加して、間接的に形成された複合体の量を検出すること及び／又は定量することを含んでなる、イムノアッセイの使用を包含する。

【０２０２】

抗ＨＩＦ－１α抗体又は免疫特異的なその断片は、サンプル内のＨＩＦ－１αを定量的又は定性的に検出するために使用されうる。いくつかの態様では、サンプルが組織の場合には、抗ＨＩＦ－１α抗体又は免疫特異的なその断片は、ＨＩＦ－１α受容体のｉｎ　ｓｉｔｕ検出のために、当業者に知られている一般的な技術を用いて、例えば、免疫蛍光又は顕微鏡の検討を、組織学的に用いることができる。ｉｎ　ｓｉｔｕ検出は、対象から組織学的標本、例えば胸部組織などのパラフィン包埋された組織切片を調製し、それに本発明の標識された抗体を適用することにより達成される。抗体(断片)は、好ましくは標識抗体（又は断片）を生物学的サンプルに重ねることにより、適用される。そのような手順を用いることにより、ＨＩＦ－１αタンパク質の存在だけでなく、検討された組織におけるその分布も評価できるであろう。本発明の方法を用いることで、通常の当該分野の技術をもつものは、様々な組織学的方法（染色手順のような）の何れかを、そのようなｉｎ　ｓ

ｉｔｕ検出を達成するために変更できるであろう。

【０２０３】

（６．４　ＨＩＦ－１αをコードする核酸）

本発明の方法は、ＨＩＦ－１αレベルを決定するための代用物として、ＨＩＦ－１αをコード化する核酸、その類縁体、断片、又は誘導体を使用しても良い。核酸は、当業者に知られる技術を使って製造される、ＤＮＡ分子（例えば、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ）、ＲＮＡ分子(例えば、ｈｎＲＮＡ、ｍＲＮＡ前駆体、ｍＲＮＡ)及びＤＮＡ又はＲＮＡの類縁体(例えばペプチド核酸)を包含することを意図する。ＨＩＦ－１αレベルに対する代用物として測定される核酸は、一本鎖又は二本鎖でありうる。

【０２０４】

例えば、しかしながら限定されるものではないが、本発明の方法及びキットにおいて用いられるヌクレオチド配列は、米国特許第６，４５５，６７４号（Ｅｉｎａｔらに発行）；同第６，６５２，７９９号（Ｓｅｍｅｎｚａに発行）；同第６，２２２，０１８号（Ｓｅｍｅｎｚａに発行）；「Wang et al., 1995 PNAS USA, 92: 5510-4」；及び国際公開第９６／３９４２６号公報において開示されるヌクレオチド配列の全て又は一部を含むことができる。本発明は、ＧＥＮＢＡＮＫ登録番号ＮＭ＿００１５３０及び同ＮＭ＿１８１０５４を有する、ヒトＨＩＦ－１αのヌクレオチド配列の全部又は一部を包含する。上記に参照された全てのヌクレオチド配列は、これらの全てを参照して、本明細書に取り込む。

【０２０５】

一般的に、当該技術分野で公知のＨＩＦ－１α核酸の何れかは、本発明の方法及びキットにおいて、有用であろう。そのような核酸は、一般的にＨＩＦ－１αの少なくとも一部をコード化するか、又は本明細書に記載されるハイブリダイズ条件下で、ＨＩＦ－１αをコードする核酸に、ハイブリダイズする配列を有している。

【０２０６】

一態様では、本発明の方法は、ＨＩＦ－１αをコードする核酸の、コード配列、５’若しくは３‘非翻訳領域又はそれらの断片をプローブとして使用でき、それらは自然に存在する及び非自然に存在する変異体を含むものである。非自然に存在する変異体は、ヒトにより設計されるものである（例えば、ペプチド核酸プローブ）。本発明の方法で、対象のサンプルにおけるＨＩＦ－１α又はＨＩＦ－１αをコードするｍＲＮＡが検出又は測定される場合には、野生型遺伝子産生物、更に変異体、対立遺伝子の変異体、スプライシングバリアント、多型変異体等を含むが、これらに限定されるものではない、自然に存在する遺伝子産生物が検出される。一般的に、変異体は、ＨＩＦ－１αをコードする野生型遺伝子産生物と、例えば少なくとも９０％、９５％、９８％又は９９％のアミノ酸配列同一性（当該技術分野で知られる標準的なアルゴリズムにより決定される、例えば、「Altschul, 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 2264-2268」；「Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5873-5877」；「Altschul et al., 1990 J. Mol. Biol. 215: 403-410」を参照されたい）であるような、高度に相同性があるであろう。

【０２０７】

プローブとして使用されるＨＩＦ－１α変異体は、厳しい条件下でＨＩＦ－１αをコードする核酸にハイブリダイズする核酸によりコードされるものであって良い。核酸ハイブリダイゼーション方法は、当該技術分野でよく知られている（例えば、「Sambrook et al., 2001 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York」；「Ausubel et al., eds., 1994-1997, in the Current Protocols in Molecular Biology」：「Series of laboratory technique manuals, John Wiley and Sons, Inc.」；「Shilo and Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6789-92」；「Dyson, 1991 Essential Molecular Biology: A Practical Approach, vol. 2, T. A. Brown, ed., 111-156, Press at Oxford University Press, Oxford, UK」を参照されたい）。「厳しい条件」という用語は、第一のポリヌクレオチド分子が、ハイブリダイズし、６５℃での０．５ＭのＮａＨＰＯ$_4$、７％のドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、１ｍＭのＥＤＴＡ中で第二のポリヌクレオチド分子との結

合を保持し、引き続く４２℃での０．２ｘＳＳＣ／０．１％のＳＤＳで洗浄することでの、第一のポリヌクレオチド分子の能力を意味する（「Ausubel et al. (eds.), 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., New York, at p. 2.10.3」を参照されたい）。特定の態様では、検出又は測定される変異体は、野生型配列に比べて１，２，３，４，５，１０，１５又は２０以下の点変異（置換）を包含するものである（又は、核酸の場合ならば、それをコードするものである）。

【０２０８】

ＨＩＦ－１α又はその一部をコードする単離された核酸プローブは、当該技術分野で公知の方法の何れかにより、例えば、寄託されたプラスミドから、配列の３‘及び５’末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを用いるＰＣＲ増幅、及び／又は標準的なスクリーニング技術を用いるｃＤＮＡ若しくはゲノムライブラリーからのクローニング、又はポリヌクレオチド合成により得ることができる。特定の配列の検出及び定量のためのそのようなプローブの使用は、当該技術分野でよく知られている（「Erlich, e.d., 1989, PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification, Macmillan Publishers Ltd., England」；「Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001」を参照されたい）。

【０２０９】

いくつかの態様では、本発明の方法は、遺伝子コード配列、例えば、ｃＤＮＡ、ＨＩＦ－１αの遺伝子コード配列を用いることができ、この場合の配列は、上記のような厳しい条件下で、ＨＩＦ－１αのタンパク質の検出に有用である、ＨＩＦ－１αタンパク質の遺伝子コード配列の少なくとも約６個、好ましくは約１２個、最も好ましくは約１８個又はそれ以上の連続したヌクレオチドをハイブリダイズすることが好ましい。

【０２１０】

ハイブリダイゼーションプローブとして、本明細書に例示されるもののような、ＨＩＦ－１αタンパク質をコードする核酸配列の全部又は一部を使用して、ＨＩＦ－１αタンパク質をコードする全長核酸分子が、本発明の方法における使用のための、すなわちＨＩＦ－１αレベルの代用物として、標準的なハイブリダイゼーション技術（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3.sup.rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001、参照）により定量可能である。

【０２１１】

本発明の方法において用いられるＨＩＦ－１α配列は、好ましくはヒトの配列である。しかしながら、その他の動物から単離されたヒトＨＩＦ－１αの相同体は、特に、対象が非ヒト動物の場合に、ＨＩＦ－１αレベルの代用物として本発明の方法に使用できる。このように本発明はまた、本発明の方法において、非ヒト霊長類、ラット、マウス、これらに限定されないが、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタなどを含む農場動物、これらに限定されないが、ネコ、イヌを含む家庭用ペット等のような非ヒト動物から同定される、ＨＩＦ－１αの相同体の使用を含む。

【０２１２】

本発明の方法はまた、本発明の方法の何れかにおいて、本明細書に開示される核酸の何れかの断片を使用しても良い。断片は、本明細書に開示される配列の少なくとも１０，２０，５０，１００又は２００個の連続するヌクレオチドを含むのが好ましい。

【０２１３】

本発明の方法及びキットにおける使用のために、当該技術分野で知られる標準的な組み換えＤＮＡ技術が、ＨＩＦ－１αタンパク質又はＨＩＦ－１αタンパク質をコードする核酸、又はそれらの断片を提供するために使用することができる。いくつかの態様では、標準としてＨＩＦ－１αや核酸を提供するために、目的とするＨＩＦ－１αタンパク質をコードする対応するヌクレオチド配列がクローニングされうる。本発明に従って、使用され

るＰＣＲ技術とクローニング手法の総説として、例えば、「PCR Primer, 1995, Dieffenbach et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook et al., 2001」を参照されたい。そして、これらは、全てを参照して、本明細書に取り込む。

【０２１４】

（６．５　ＨＩＦ－１αタンパク質）

本発明は、本発明の方法のために抗体を産生する目的で、ＨＩＦ－１αタンパク質又はその断片を使用することを提供する。ＨＩＦ－１αのポリペプチドと断片はまた、本発明の方法において、タンパク質の量又は活性の標準として使用されうる。

【０２１５】

例えば、本発明は、これらに限定されないが、米国特許第６，４５５，６７４号（Ｅｉｎａｔらに発行）；米国特許第６，６５２，７９９号（Ｓｅｍｅｎｚａに発行）；米国特許第６，２２２，０１８号（Ｓｅｍｅｎｚａに発行）；「Wang et al., 1995 PNAS USA, 92: 5510-4」；米国特許第６，４３６，６５４号（Ｂｅｒｋｅｎｓｔａｍに発行）；国際公開第９６／３９４２６号公報に開示されるＨＩＦ－１αのアミノ酸配列を包含する。上記文献に参照されるアミノ酸配列は、その全てを参照して、本明細書に全て取り込む。本発明は、ＧＥＮＢＡＮＫ登録番号ＮＰ＿００１５２１及びＮＰ＿８５１３９７を有する、ヒトＨＩＦ－１αのアミノ酸配列を包含し、それらの各々は、その全てを参照して、本明細書に取り込む。

【０２１６】

いくつかの態様では、ＨＩＦ－１αタンパク質は、当該技術分野で公知のＨＩＦ－１αタンパク質の何れかのアミノ酸配列に対して、少なくとも約６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は９９％の配列類似性を示すアミノ酸配列を含む。２つのタンパク質配列間の同一性パーセントを決定するためのアルゴリズムは、当該技術分野でよく知られている。例えば、「Altschul, 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 2264-2268」；「Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5873-5877」；「Altschul et al., 1990 J. Mol. Biol. 215: 403-410」を参照されたい。それらの各々は、それらの全てを参照して、本明細書に取り込む。

【０２１７】

特定の態様では、タンパク質は少なくとも１０個の連続したアミノ酸からなるＨＩＦ－１αタンパク質断片からなるもの、又はそれを含むものである。別の態様では、断片は、使用、例えば、抗体を産生するために、ＨＩＦ－１αタンパク質由来の少なくとも２０，３０，４０又は５０の連続したアミノ酸からなる又はそれを包含するものである。そのような断片はまた、例えば、本発明の方法やキットにおける標準や対照として有用である。

【０２１８】

本発明の方法における使用のために、ＨＩＦ－１αタンパク質や断片を発現するために、様々な宿主発現ベクターシステムが使用することができる。そのような宿主発現システムは、公知であり、目的のタンパク質を産生し、続いて精製する必要な手段を提供する。本発明に従って、使用可能な宿主発現ベクターシステムの例は：ＨＩＦ－１α核酸をコードする配列を含む組み換えバクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ又はコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換されたバクテリア細胞（例えば、大腸菌、バシラス・サブチリス）；ＨＩＦ－１αをコードする配列を含む組み換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母細胞（例えば、サッカロミセス、ピキア）；ＨＩＦ－１α核酸をコードする配列を含む組み換えウィルス発現ベクター（例えば、バキュロウィルス）で感染された昆虫細胞；組み換えウィルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス（ＣａＭＶ）、タバコモザイクウイルス（ＴＭＶ））で感染された、又はＨＩＦ－１α核酸をコードする配列を含む組み換えプラスミド発現ベクター（例えば、Ｔｉプラスミド）で形質転換された植物細胞；又は哺乳動物細胞のゲノム（例えば、メタロチオネインプロモーター）又は哺乳動物ウィルス（例えば、アデノウィルス後期プロモーター；ワクシニアウィルス７．５Ｋプロモーター）由来のプロモーターを含む、組み換え発現コンストラクトを保持している（harboring）、哺乳動物の細胞（例えば、ＣＯＳ、ＣＨＯ、ＢＨＫ、２９３、３

Ｔ３）である。

【０２１９】

バクテリアシステムでは、ＨＩＦ－１αを発現することを意図した使用に合わせて、多くの発現ベクターが利点を考えて選択されうる。例えば、抗体を産生するためにそのようなタンパク質が大量に産生されるようにする場合には、容易に精製されるタンパク質生成物が、高レベルに発現できるベクターが望ましいだろう。そのようなベクターは、融合タンパク質が産生されるように、ｌａｃＺコード領域を有するベクターインフレームに、ＨＩＦ－１αコード配列が連結する、大腸菌発現ベクターｐＵＲ２７８（Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791）；ｐＩＮベクター（Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 264:5503）；などが含まれるが、これらに限定されるものではない。ｐＧＥＸベクターもまた、グルタチオンＳトランスフェラーゼ（ＧＳＴ）との融合タンパク質として、外来ポリペプチドを発現させるために使用可能である。一般に、そのような融合たんぱく質は可溶性で、グルタチオンアガロースビーズからなるカラムに吸着及び結合させ、続いて遊離グルタチオン存在下での溶出によって、溶解した細胞から容易に精製可能である。ｐＧＥＸベクターは、クローンの標的遺伝子産生物がＧＳＴ部分から解離できるように、例えばトロンビンやＸａ因子プロテアーゼ開裂部位を含むようにデザインされている。

【０２２０】

昆虫システムでは、外来遺伝子を発現するためのベクターとして、オートグラファ・カ．リフォルニカ（Autographa californica）核多角体病ウィルス（ＡｃＮＰＶ)が使用できる。ウィルスは、ヨトウガ（スポドプテラ・フルギペルダ：Spodoptera frugiperda）細胞内で成長する。ＨＩＦ－１αをコードする配列は、ウィルスの個々の非必須領域(例えば、ポリヘドリン遺伝子)にクローンを作り、ＡｃＮＰＶプロモーター（例えば、ポリヘドロンプロモーター）の制御下に配置されうる。ＨＩＦ－１αコード配列の成功した挿入は、ポリヘドロン遺伝子の不活性化と塞がれていない組み換えウィルス（すなわち、ポリヘドロン遺伝子により、コードするタンパク質性の被覆を欠如しているウィルス）の産生をもたらすだろう。これらの組み換えウィルスは、挿入された遺伝子が発現するヨトウガ（スポドプテラ・フルギペルダ）細胞を感染するのに使用されうる（例えば、「Smith et al., 1983, J. Virol. 46:584」；Ｓｍｉｔｈの米国特許第４，２１５，０５１号を参照されたい）。

【０２２１】

哺乳動物宿主細胞では、多くのウィルス性発現システムを使用することができる。アデノウィルスが発現ベクターとして使用される場合、目的のＨＩＦ－１αをコードする配列は、例えば、後期プロモーター及び３部からなるリーダー配列等、アデノウィルス転写／翻訳制御複合体に連結されうる。このキメラ遺伝子は、次にインビトロ又はインビボでの組み換えでアデノウィルスゲノムに挿入されうる。ウィルスゲノムの非必須領域（例えば、Ｅ１又はＥ３領域）への挿入は、感染宿主において生存して、ＨＩＦ－１αを発現可能な組み換えウィルスを生じるであろう（例えば、「Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655」を参照されたい）。特定の開始シグナルがまた、挿入されたＨＩＦ－１αコード配列の効率的な翻訳に必要であろう。これらのシグナルは、ＡＴＧ開始コドン及び近接の配列を含む。それ自身の開始コドンと近接した配列を含む完全ＨＩＦ－１α遺伝子が、適切な発現ベクターに挿入される場合には、追加的な翻訳制御配列は、不要であろう。しかしながら、ＨＩＦ－１αコード配列の一部のみが挿入された場合には、必要があれば、ＡＴＧ開始コドンを含む外来翻訳制御シグナルが提供されなければならない。これらの外来翻訳制御シグナル及び開始コドンは、様々な起源のもので、自然に存在するもの及び合成されるものでありうる。更に、開始コドンは、挿入物全体が正確に翻訳されることを確実にするために、所望のコード配列の読み込みフレームと一致していなければならない。発現効率は、適切な転写のエンハンサーエレメント、転写ターミネーター等を包含させることにより、増大されるであろう（「Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153: 516」を参照されたい）。

【０２２２】
加えて、挿入配列の発現を調節する、又は所望される特別な方法で遺伝子産生物を修飾又はプロセシングする宿主細胞株が、選ばれるであろう。そのようなタンパク質産生物の修飾(例えば、グリコシル化）及びプロセシング（例えば、開裂）は、タンパク質の機能にとって重要であろう。異なる宿主細胞は、タンパク質及び遺伝子産生物の翻訳後プロセシング及び修飾において、特徴的で特異的な機構を有している。適切な細胞株又は宿主システムが、発現された外来タンパク質の正しい修飾及びプロセシングを確実にするために選択されうる。この目的を達成するために、一次転写物の正しいプロセシング、遺伝子産生物のグリコシル化及びリン酸化のための、細胞性機構を有する真核宿主細胞が使用されうる。そのような哺乳動物宿主細胞には、ＣＨＯ、ＶＥＲＯ、ＢＨＫ、ＨｅＬａ、ＣＯＳ、ＭＤＣＫ、２９３、３Ｔ３、ＷＩ３８、並びに特に、例えば、ＢＴ４８３、Ｈｓ５７８Ｔ、ＨＴＢ２６、ＢＴ２０及びＴ４７Ｄのような乳癌細胞株、そして例えば、ＣＲＬ７０３０及びＨｓ５７８Ｂｓｔのような正常乳腺細胞株を含むが、これらに限定されるものではない。

【０２２３】
組み換えタンパク質の長期の高産生のために、安定な発現が好ましい。例えば、ＨＩＦ－１αの遺伝子産生物を安定に発現する細胞株が設計されうる。宿主細胞は、ウィルス起源の複製を含む発現ベクターを使用するよりもむしろ、適切な発現制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル部位等)によって制御されるＤＮＡ、及び選択マーカーで形質転換されうる。

【０２２４】
外来ＤＮＡの挿入に続いて、設計された細胞は、１～２日間強化培地中で成長させた後、選択培地に変えることができる。選択培地に対する抵抗性を与えることのできる、プラスミドのような組み換え構築物における選択マーカーは、細胞が染色体内へプラスミドを安定に一体化させ、そして順番に、クローンを作り、細胞株へ拡大される、フォーカスを形成するように成長する。本方法は、ＨＩＦ－１α遺伝子産生物を安定に発現する細胞株を設計するために、有利に使用されうる。そのような設計された細胞株は、特にＨＩＦ－１α遺伝子産生物の内在性活性に影響を与える化合物のスクリーニング及び評価において有用である。

【０２２５】
これらに限定されないが、単純ヘルペスウィルスのチミジンキナーゼ（Wigler et al., 1977, Cell 11: 223）、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026）、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Lowy et al., 1980, Cell 22: 817）遺伝子を含む多くの選択系が、ｔｋ⁻、ｈｇｐｒｔ⁻又はａｐｒｔ⁻の細胞のそれぞれに用いることができる。また、抗代謝物抵抗性は、以下の遺伝子のための選択法として用いられうる：メトトレキサートに対する抵抗性を与えるｄｈｆｒ（Wigler et al., 1980, Proc Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527）；ミコフェノール酸に対する抵抗性を与えるｇｐｔ（Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072）；アミノグリコシドＧ－４１８に対する抵抗性を与えるｎｅｏ（Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150: 1）；及びハイグロマイシンに対する抵抗性を与えるｈｙｇｒｏ（Santerre et al., 1984, Gene 30: 147）。

【０２２６】
（６．６　ＨＩＦ－１αに対する抗体）
本発明の方法及びキットは、ＨＩＦ－１αタンパク質の１つ又はそれ以上のエピトープを特異的に認識する抗ＨＩＦ－１α抗体又はその断片の使用を包含する。従って、免疫特異的にＨＩＦ－１αタンパク質に結合する抗体を産生する免疫源として、あらゆるＨＩＦ－１αタンパク質、誘導体又は断片が使用可能である。そのような抗体及び断片は、本明細書に開示されるような本発明の方法の何れかを遂行するために、サンプル内のＨＩＦ－１αの検出及び定量において使用できる。

【０２２７】
そのような抗体は、これらに限定されないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（ｍＡｂｓ）、ヒト化又はキメラ抗体、単鎖抗体、Ｆａｂ断片、F(ａｂ‘)$_2$断片、Ｆｖ断片、Ｆａｂ発現ライブラリーにより産生された断片、抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体、及び上記の何れかのエピトープ結合断片を含むことができる。特定の態様では、ヒトＨＩＦ－１αタンパク質に対する抗体が使用される。
【０２２８】
抗体又はその免疫特異性断片の一般的な産生方法が、本明細書に開示される。そのような抗体や断片の何れかは、適切な宿主生物において、標準的な免疫的手法、又は抗体若しくはその免疫性断片をコードする核酸分子を発現する組み換え体により産生されうる。
【０２２９】
ＨＩＦ－１αに対する抗体の産生のために、様々な宿主動物が、ＨＩＦ－１α遺伝子産生物又はその一部を注入して免疫され得る。そのような宿主動物には、ウサギ、マウス、及びラットが含まれるが、これらに限定されるものではない。宿主種に依存する免疫応答性を増加させるために、これらに限定されないが、フロインドのもの（完全又は非完全）、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、リゾレシチンのような界面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、又はＢＣＧ（bacille Calmette-Guerin）及びコリネバクテリウム・パルバムのような可能性のある有用なヒトアジュバントを含む様々なアジュバントが使用されうる。
【０２３０】
抗ＨＩＦ－１αモノクローナル抗体が、本発明の方法及びキットにおける使用に好ましい。モノクローナル抗体は、連続的な細胞株により、インキュベーションで抗体分子を産生するために提供される技術により得られる。これらは、これらに限定されないが、ＫｏｈｌｅｒとＭｉｌｓｔｅｉｎのハイブリドーマ技術（「1975, Nature 256: 495」；及び米国特許第４，３７６，１１０号）、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（「Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4: 72」；「Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026」）、及びＥＢＶハイブリドーマ技術（Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77）を含む。そのような抗体は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、ＩｇＤ及びそれらのサブクラスを含むあらゆるイムノグロブリンクラスでありうる。本発明のｍＡｂを産生するハイブリドーマは、インビトロ又はインビボでインキュベーションされうる。
【０２３１】
適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を適切な生理学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子とスプライスすることにより、「キメラ抗体」を産生するために開発された技術（Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature 312, 604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314, 452-454）は、本発明において有用な抗体を調製するために使用されうる。キメラ抗体は、マウスｍＡｂ由来の可変領域とヒト免疫グロブリンの定常領域を有するというような、異なる部分が異なる動物種に由来する分子である（例えば、Ｃａｂｉｌｌｙらの米国特許第４，８１６，５６７号；及びＢｏｓｓらの米国特許第５，８１６，３９７号を参照されたい）。本発明は、このように、ＨＩＦ－１αタンパク質に特異的で、選択的なキメラ抗体を考慮する。しばしば治療のために設計されるが、そのようなキメラ抗体は、本発明の方法に従って、ＨＩＦ－１αレベルを定量するのに有用でありうる。
【０２３２】
更に、ヒト化抗体が本発明の方法及びキットにおいて使用されうる。つまり、ヒト化抗体とは、非ヒト種由来の１つ又はそれ以上の超可変領域又は相補性決定領域（ＣＤＲ）と、ヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する、非ヒト種由来の抗体分子である。フレームワーク領域及びＣａｒｓの範囲は、詳細に決定されている（「"Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E. et al., U.S. Department of

Health and Human Services (1983)」を参照されたい）。ヒト化抗体を産生するために開発されている技術の例は、当該技術分野で知られており、本発明の範囲内で有用である（例えば、Ｑｕｅｅｎの米国特許第５，５８５，０８９号及びＷｉｎｔｅｒの米国特許第５，２２５，５３９号を参照されたい）。ヒト化抗体は一般的には、治療薬として開発されている。しかしながら、そのような抗体は本発明においてＨＩＦ－１αレベルを定量するために使用できるように、本発明の方法及びキットにおいて用いられる。

【０２３３】

ファージ提示法技術が、ＨＩＦ－１α遺伝子産生物に対する抗体の親和性を増加させるために使用されうる。この技術は、ＨＩＦ－１α遺伝子産生物に対するより高い親和性抗体を得るために有用であり、そのような抗体は、本発明に従って病気や疾患に罹患した対象の診断及び予後のために用いられる。親和性成熟と称される技術は、変異又はＣＤＲウォーキングを使用し、最初の又は親抗体と比較して、抗原に対してより高い親和性で結合する抗体を同定するために、ＨＩＦ－１α遺伝子産生物抗原を用いて再選択するものである（例えば、「Glaser et al., 1992, J. Immunology 149:3903」を参照されたい）。単一ヌクレオチドよりもコドン全体を突然変異させると、アミノ酸変異のセミランダムなレパートリーを生じる。ライブラリーは、各々のクローンが、単一ＣＤＲにおいて１アミノ酸変性により異なるものである様々なクローンの集団（pool）から構築され、各々のＣＤＲ残基にそれぞれ可能なアミノ酸置換を示す変異体を含むものである。抗原に対して増加した結合親和性を有する変異体は、固定化された変異体を標識された抗原と接触させることでスクリーニングできる。当該技術分野で知られるスクリーニング方法の何れも、抗原に対する増加した親和力を有する変異抗体を同定するために使用可能である（例えば、ＥＬＩＳＡ）（「Wu et al., 1998, Proc Natl. Acad. Sci. USA 95:6037」；「Yelton et al., 1995, J. Immunology 155:1994」を参照されたい）。軽鎖をランダム化するＣＤＲウォーキングもまた有用であろう（「Schier et al., 1996, J. Mol. Bio. 263:551」を参照されたい）。

【０２３４】

あるいは、一本鎖抗体の産生に関し記述される技術（米国特許第４，９４６，７７８号；「Bird, 1988, Science 242:423」；「Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879」；及び「Ward et al., 1989, Nature 334: 544」）がＨＩＦ－１α遺伝子産生物に対する一本鎖抗体を産生するために、適用される。一本鎖抗体は、アミノ酸ブリッジを介して、Ｆｖ領域の重鎖と軽鎖を結合することによって形成され、一本鎖のポリペプチドを生じる。大腸菌において機能的なＦｖ断片を集積するための技術がまた、使用されうる（Skerra et al., 1988, Science 242:1038）。

【０２３５】

特異的なエピトープを認識する抗体断片が、既知の方法により産生されうる。そのような断片は、当該技術分野で知られる利用可能な方法の何れかに従って、ＨＩＦ－１α遺伝子産生物を定量するために使用可能である。例えば、そのような断片は、抗体分子のペプシン消化により生成できるＦ(ａｂ‘)$_2$断片；Ｆ(ａｂ’)$_2$断片のジスルフィド結合を還元することで生成できるＦａｂ断片；抗体分子をパパインと還元試薬で処理することにより生成できるＦａｂ断片；及びＦｖ断片を含むが、これらに限定されるものではない。あるいはＦａｂ発現ライブラリーが、所望の特異性を有するヒトモノクローナルＦａｂ断片を迅速かつ容易に同定できるように構築されうる（Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281）。

【０２３６】

目的の抗原に対する抗体の分子クローンは、当業者に知られる技術により、調製可能である。組み換えＤＮＡ手法（例えば、「Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York」を参照されたい）が、モノクローナル抗体分子又はその免疫特異性断片をコードする核酸配列を構築するために使用可能である。

【０２３７】

抗体分子は、例えば、免疫吸着や免疫親和性クロマトグラフィ、ＨＰＬＣ（高速液体クロマトグラフィ）のようなクロマトグラフ手法、及びそれらの組み合わせの、よく知られた技術で、精製可能である。

【０２３８】

抗体の生成において、所望の抗体のスクリーニングが、例えば、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着検定法）などの当該技術分野で知られる技術により、達成されうる。例えば、ＨＩＦ－１αの特異的ドメインを認識する抗体を選択するために、産生されたハイブリドーマは、そのようなドメインを含むＨＩＦ－１α断片に結合する産生物を分析するのが可能である。

【０２３９】

前述の抗体は、本発現の方法及びキットにおいて、例えば適切なサンプル中のレベルを測定する等のＨＩＦ－１αタンパク質の定量に使用されうる。

【０２４０】

本明細書で用いられる抗体産生手法は、ＨａｒｌｏｗとＬａｎｅにより記載されるものを含み（Harlow, E. and Lane, D., 1988, and later editions, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.）、これらの全てを参照して、本明細書に取り込む。

【０２４１】

ＨＩＦ－１αの１つ又はそれ以上のエピトープに対するいかなる抗体も、本発明の方法及びキットにおいて使用可能である。例えば、「Novus Biologicals, Inc. (Littleton, Colo.)」；「Affinity BioReagents,(Golden, Colo.)」から入手可能な、ＨＩＦ－１α抗体が本発明において使用されうる。

【０２４２】

（６．７　キット）

本発明は、本発明の化合物で満たされる１つ又はそれ以上の容器を含む薬学的なパックやキットを提供する。加えて、疾患の処置に有用な１つ又はそれ以上の他の予防薬又は治療薬もまたその薬学的パックやキットに包含されうる。本発明はまた、本発明の薬学的組成物の１つ又はそれ以上の成分で満たす、１つ又はそれ以上の容器を含む薬学的パック又はキットを提供する。そのような容器は、薬学的又は生物学的製品の製造、使用又は販売を規制する政府機関により指示された形態における通知を伴っていてもよく、その通知は、ヒトに対する製造、使用及び販売が政府により認められたことを反映するものである。

【０２４３】

本発明は、上述の方法において使用可能なキットを提供する。ある態様では、キットは本発明の１つ又はそれ以上の化合物を含む。別の態様では、キットは更に、１つ又はそれ以上の容器の中に、虚血の処置に有用な１つ又はそれ以上の予防薬及び治療薬を含む。

【実施例】

【０２４４】

（７．　実施例）

以下の実施例は、本発明の態様を例示するものであり、これらに限定されるものではない。これらの実施例に用いられる記号や慣習は、例えば、米国化学会雑誌（J. Am. Chem. Soc.）及びテトラヘドロン（Tetrahedron）のような現代の、国際的な化学文献で用いられるものと一致することが意図されている。

【０２４５】

（７．１　アデノシンによるＨＩＦ－１αの調節）

化学物質及び試薬：　Ａ３７５メラノーマ、ＮＣＴＣ２５４４ケラチン生成細胞、Ｕ２ＯＳ骨肉腫、Ｕ８７ＭＧグリア芽種ヒト細胞は、アメリカンティッシュカルチャーコレクション（American Tissue Culture Collection：ＡＴＣＣ）から得られた。組織培養の培地及び生育のための添加物は、ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒより得られた。ＧａｓＰａｋ　Ｐｏｕｃｈ(登録商標)システムは、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎから得られた。別途記載されなければ、他のすべての化学物質は、シグマ（Sigma）から購入された。抗Ｈ

ＩＦ－１α及び抗ＨＩＦ－１β抗体（ｍＡｂ）は、トランスダクションラボラトリー（Transduction Laboratories：BD, Milano, Italy）から得られた。Ｕ０１２６（ＭＥＫ－１及びＭＥＫ－２の阻害剤）、ＳＢ２０２１９０（ｐ３８ ＭＡＰキナーゼの阻害剤）、Ａｎｔｉ－ＡＣＴＩＶＥ(登録商標)ＭＡＰＫ及び抗ＥＲＫ １／２（ｐＡｂ）は、プロメガ（Promega）から得られた。ホスホ－ｐ３８及びｐ３８ ＭＡＰキナーゼ抗体は、セルシグナリングテクノロジー（Cell Signaling Technology）から得られた。抗アデノシンA_3受容体（ｐｏｌｙＡｂ）は、アビバアンチボディコーポレーション（Aviva Antibody Corporation）から得られた。

【０２４６】

細胞培養及び低酸素処置： 細胞は、１０％のウシ胎児血清、ペニシリン（１００Ｕ／ｍｌ）、ストレプトマイシン（１００ｕｇ／ｍｌ）、及びL－グルタミン（２ｍＭ）を含むＤＭＥＭ（Ａ３７５）、ＥＭＥＭ（ＮＣＴＣ２５４４）又はＲＰＭＩ１６４０（Ｕ８７ＭＧ、Ｕ２ＯＳ）培地中で、３７℃にて５％の二酸化炭素／９５％の空気中で、維持された。細胞は、週に２，３回、１対５及び１対１０の間の比率で継代された。低酸素状態曝露は、３５℃２時間以内のインキュベーションで、２％より少ない酸素濃度に減らす、ＢＢＬ(登録商標) ＧａｓＰａｋ ｐｏｕｃｈ(登録商標)システム（ベクトンディッキンソン）中で実施した。

【０２４７】

［^{3}Ｈ］－チミジンの取り込み：細胞増殖試験： 細胞は、１０％ウシ胎児血清、ペニシリン（１００Ｕ／ｍｌ）、ストレプトマイシン（１００ｕｇ／ｍｌ）及びＬ－グルタミン（２ｍＭ）を含むＤＭＥＭ中に、１μＣｉ／ｍｌの［^{3}Ｈ］－チミジンと共に新鮮な培地中に撒かれた。標識の２４時間後、細胞はトリプシン処理され、９６ウェルプレートの４ウェルに分配され、マイクロメイト１９６細胞収集器（Micro-Mate 196 cell harvester：Packard Instrument Company）を用いて、ワットマン（Whatman）ＧＦ／Ｃグラスファイバーろ紙を通して、ろ過された。放射活性が結合したろ紙は、マイクロシンチ２０（Micro-Scint 20）を有するトップカウントマイクロプレートシンチレーションカウンター（Top Count Microplate Scintillation Counter）（効率５７％）で計数された。

【０２４８】

フローサイトメトリー解析： Ａ３７５接着細胞は、トリプシン処理し、浮遊細胞と混合し、ＰＢＳで洗浄し、そして７０％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）エタノール／ＰＢＳ溶液中で４℃にて少なくとも２４時間、透過性を高めた。細胞は、ＰＢＳで洗浄し、ＤＮＡは２０μｇ／ｍｌのヨウ化プロピジウム及び１００μｇ／ｍｌのＲＮＡｓｅを含むＰＢＳ溶液中で、室温下３０分染色した。細胞は、ＥＰＩＣＳ ＸＬフローサイトメーター（Beckman Coulter, Miami, FL）で分析し、ＤＮＡ含量は、Ｃｅｌｌ－ＬＩＳＹＳプログラム（Becton-Dickinson）により評価した。細胞周期位相間の細胞の分配及びアポトーシス細胞の百分率は、すでに開示されている（Merighi 2002）ように評価された。つまり、細胞周期の分配は、ヨウ化プロピジウム染色で判定される２ｎ（Ｇ０／Ｇ１位相）、４ｎ（Ｇ２及びＭ位相）、４ｎ＞ｘ＞２ｎのＤＮＡ量（Ｓ位相）を含む細胞の百分率として示される。アポトーシス集団は、２ｎより少ないＤＮＡ含量を有する細胞の百分率である。

【０２４９】

低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）の設計： A_3受容体ｍＲＮＡ（ｓｉＲＮA_{A3}）を標的とする低分子干渉ＲＮＡを産生するために、3‘末端に2’－デオキシリボヌクレオシドの存在を除く、リボヌクレオシドからなる8つのオリゴヌクレオチドが、Ｅｌｂａｓｈｉｒ（参照文献）推奨、製造元の取り扱い説明書（Ｓｉｌｅｎｃｅｒ（登録商標）siRNA Construction Kit, Ambion）及び既に開示されている方法（Mirandola, 2004）に従って、合成され、アニーリングされた。オリゴ－１として、センス配列：５’－ＧＣＵＵＡＣＣＧＵＣＡＧＡＵＡＣＡＡＧＵＵ－３’（配列番号１）及びアンチセンス：５’－ＣＵＵＧＵＡＵＣＵＧＡＣＧＧＵＡＡＧＣＵＵ－３’（配列番号２）。オリゴ－２として、センス配列：５’－ＧＡＣＧＧＣＵＡＡＧＵＣＣＵＵＧＵＵＵＵＵ－３’（配列番号３）及びアンチセンス：５’－ＡＡＡＣＡＡＧＧＡＣＵＵＡＧＣＣＧＵＣＵＵ－３’（配列番号

４）。オリゴ－３として、センス配列：５’－ＡＣＡＣＵＵＧＡＧＧＧＣＣＵＧＵＡＵＧＵＵ－３’（配列番号５）及びアンチセンス：５’－ＣＡＵＡＣＡＧＧＣＣＣＵＣＡＡＧＵＧＵＵＵ－３’（配列番号６）。オリゴ－４として、センス配列：５’－ＣＣＵＧＣＵＣＵＣＧＧＡＧＧＡＵＧＣＣＵＵ－３’（配列番号７）及びアンチセンス：５’－ＧＧＣＡＵＣＣＵＣＣＧＡＧＡＧＣＡＧＧＵＵ－３’（配列番号８）。標的配列は、他の遺伝子に有意な相同性がない配列であることを確認するために、ＢＬＡＳＴ検索でヒトゲノムデータベースに対しアラインメントされた。オリゴ－１、オリゴ－２、オリゴ－３及びオリゴ－４の標的配列は、A_3受容体ｍＲＮＡ配列（Ｌ２０４６３）の開始コドンの下流、３３７、６７９、１００９及び１３５６番目のベース（bases）にそれぞれ位置する。

【０２５０】

ｓｉＲＮＡを用いた細胞の処置：　Ａ３７５細胞は、６ウェルプレートに撒かれ、トランスフェクションの前に、５０～７０％密集度になるまで育てられた。ｓｉＲＮＡのトランスフェクションは、ＲＮＡｉＦｅｃｔ(登録商標)トランスフェクションキット（Qiagen）を用いて、１００ｎＭの濃度で行われた。細胞は、完全培地中でインキュベーションされ、A_3受容体ｍＲＮＡのリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ解析及びA_3受容体タンパク質のウェスタンブロット解析のために、２４、４８、７２時間での、全ＲＮＡが単離された。トランスフェクションから４８時間後に、Ａ３７５細胞は、次の２４時間の間血清除去され、その後、低酸素状態で４時間、増大する濃度のA_3アデノシン受容体アゴニストＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡに曝された。全タンパク質は、その後、ウェスタンブロット解析のために回収された。対照として、細胞は$siRNA_{A_3}$を含まないＲＮＡｉＦｅｃｔ(登録商標)トランスフェクション試薬に曝された。細胞のトランスフェクション効率を定量化するために、本発明者らは、ｓｉＲＮＡ－ＦＩＴＣ標識（Qiagen）を用いた。トランスフェクション２４時間後、細胞はトリプシン処理され、フローサイトメトリー解析のためにＰＢＳ中に再縣濁された。ＦＩＴＣ－ｓｉＲＮＡトランスフェクション細胞から得られた蛍光は、非トランスフェクション対照により生成される自家蛍光と比較された。

【０２５１】

リアルタイムＲＴ－ＰＣＲ実験：　全細胞質ＲＮＡは、酸性グアニジウムチオシアン酸フェノール法（Chomczynski & Sacchi, 1987）により抽出された。ＨＩＦ－１α及びA_3ｍＲＮＡ転写物の定量的リアルタイムＲＴ－ＰＣＲアッセイ（Higuchi, 1993）は、ＡＢＩ　Ｐｒｉｓｍ７７００配列検出システム（Applied Biosystems, Warrington Cheshine, UK）で、遺伝子特異的な二重蛍光標識ＴａｑＭａｎ　ＭＧＢプローブ（マイナー溝結合体）を用いて実施された。以下のプライマー及びプローブ配列が、リアルタイムＲＴ－ＰＣＲのために用いられた：A_3フォワードプライマー、５’－ＡＴＧＣＣＴＴＴＧＧＣＣＡＴＴＧＴＴＧ－３’（配列番号９）；A_3リバースプライマー、５’－ＡＣＡＡＴＣＣＡＣＴＴＣＴＡＣＡＧＣＴＧＣＣＴ－３’（配列番号１０）；A_3ＭＧＢプローブ、５’－ＦＡＭ－ＴＣＡＧＣＣＴＧＧＧＣＡＴＣ－ＴＡＭＲＡ－３’（配列番号１１）；ＨＩＦ－１α遺伝子のリアルタイムＲＴ－ＰＣＲのために、ａｓｓａｙｓ－ｏｎ－ｄｅｍａｎｄ(登録商標)遺伝子発現産生物登録番号ＮＭ０１９０５８が用いられた（Applied Biosystems, Monza, Italy）。蛍光レポーターＦＡＭ及び消光剤ＴＡＭＲＡは、それぞれ６－カルボキシフルオレセイン及び６－カルボキシ－Ｎ，Ｎ，Ｎ‘，Ｎ’－テトラメチルローダミンである。対照遺伝子のリアルタイムＲＴ－ＰＣＲのために、内因性対照ヒトβアクチンキットが用いられ、そのプローブは、ＶＩＣ(登録商標)（Applied Biosystems, Monza, Italy）で蛍光標識された。

【０２５２】

ウェスタンブロッティング：　Ａ３７５、ＮＣＴＣ２５４４、Ｕ２ＯＳ及びＵ８７ＭＧ細胞は、アデノシン又はアデノシンアナログで処置され、そして正常酸素分圧及び低酸素状態に異なる時間（２～２４時間）曝された。細胞は回収され、１ｍＭのオルトバナジウム酸ナトリウム、１０４ｍＭのＡＥＢＳＦ、０．０８ｍＭのアプロチニン、２ｍＭのロイペプチン、４ｍＭのベスタチン、１．５ｍＭのペプスタチンＡ、１．４ｍＭのＥ－６４を含む氷冷ＰＢＳで洗浄された。細胞はその後トリトン溶解緩衝液に溶解された。タンパク

質濃度は、ＢＣＡタンパク質アッセイキット（Pierce）を用いて決定された。等量のタンパク質（３５μｇ）を、７．５％のドデシル硫酸ナトリウムアクリルアミドゲル上で電気泳動処理された。その後、ゲルはニトロセルロース膜上に電気的に転写された。膜は、０．１％のＴｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳ中の５％の無脂肪乾燥ミルクでブロックされ、そして０．１％のＴｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳ中の５％の無脂肪乾燥ミルク中で、ＨＩＦ－１α（１対２５０希釈）及びＨＩＦ－１β（１対１０００希釈）に対する抗体とともに４℃で一晩インキュベートされた。全タンパク質サンプルのアリコート（５０μｇ）は、リン酸化（Ｔｈｒ１８３／Ｔｙｒ１８５）又は全ｐ４４／ｐ４２ＭＡＰＫ（１対５０００希釈）、リン酸化（Ｔｈｒ１８０／Ｔｙｒ１８２）又は全ｐ３８ＭＡＰＫ（１対１０００希釈）及びA_3受容体（１μｇ／ｍｌ希釈）に対する特異的な抗体を用いて分析された。ろ紙は洗浄され、マウス及びウサギのＩｇＧに対するペルオキシダーゼ結合２次抗体（１対２０００希釈）で室温下１時間インキュベートされた。特異的な反応は、促進化学発光ウェスタンブロット検出試薬（Amersham Corp., Arlington Heights, Ill.）で明らかにされた。膜は剥がされ、等量のタンパク質が装填されていることを確認するためにチューブリン（１対２５０）で再プローブされた。

【０２５３】

代謝阻害剤：　細胞は、アデノシン又はアデノシンアナログで処理する前に、代謝阻害剤又は薬物溶液（ＤＭＳＯ）で３０分間処置された。Ｕ０１２６は、ｐ４４及びｐ４２のＭＡＰＫ活性化を防ぐため、ＭＥＫ－１及びＭＥＫ－２の阻害剤として、１０及び３０μＭで用いた。ＳＢ２０２１９０は、ｐ３８ＭＡＰＫの阻害剤として、１及び１０μＭで用いた。

【０２５４】

デンシトメトリー解析：　イムノブロットアッセイにおける各々のバンド強度は、モレキュラーアナリスト／ＰＣデンシトメトリーソフトウェア（Bio-Rad）を用いて定量化した。独立した実験から得られた平均的なデンシトメトリーデータは、対照の細胞の結果に対して標準化された。データは、平均値±標準誤差で表現され、ステューデントのテストにより解析した。

【０２５５】

統計解析：　図や文章中の全ての値は、ｎ個の観察結果（ｎは３以上）の平均値±標準誤差（Ｓ．Ｅ．）として表現される。データセットは、分散分析（ＡＮＯＶＡ）及びダネットテスト（Dunnet's test）（必要であれば）により検討した。０．０５より小さなＰ値は、統計的に有意であると考えられる。

【０２５６】

結果：　アデノシンは、低酸素状態におけるＨＩＦ－１αタンパク質の蓄積を誘導する。本発明者らは、ヒトＡ３７５メラノーマ細胞株において長期間の酸素除去により産み出される生物学的効果を評価した。低酸素状態に２４時間曝露されたＡ３７５細胞の生存率及び増殖は、アポトーシス細胞の百分率及び細胞周期の異なる位相間の分配を分析することにより評価された。本発明者らは、アポトーシス、G_0／G_1、Ｓ及びG_2／Ｍ期の状態の細胞を区別するために、ヨウ化プロピジウムによるＤＮＡ染色とフローサイトメトリーを実施した。その結果は、低酸素状態は、メラノーマ細胞をG_0／G_1及びＳ期に拘束し、G_2／Ｍ期にいる細胞の数を減少させ、増殖を阻害したが、有意な細胞死を促進しなかった（図１）。これらのデータは、トリパンブルー除外試験、細胞計数及び［^{3}Ｈ－チミジン］取り込み試験を用いることで確認された（データは示されていない）。

【０２５７】

Ａ３７５細胞を低酸素状態に曝露すると、ＨＩＦ－１αタンパク質発現が誘導された（図２）。低酸素状態によるＨＩＦ－１αの誘導は速く、増大は、低酸素状態でのインキュベーション後の最初の２～３時間にみられた。最大の刺激は、酸素除去条件におけるインキュベーションの４～８時間に得られたが、ＨＩＦ－１αタンパク質レベルは、長期の低酸素状態では幾分低くなった。逆に、ＨＩＦ－１βのレベルは、変化しなかった。

【０２５８】

転写因子ＨＩＦ－１に及ぼすアデノシンの効果を研究するために、Ａ３７５メラノーマ細胞は低酸素条件下、増大する濃度のヌクレオシドで４時間処置された。図３Ａにみられるように、アデノシンは低酸素状態メラノーマ細胞におけるＨＩＦ－１αタンパク質の発現を上方制御した。特に、アデノシンは、EC_{50}値が２．１±０．２μＭで最大上昇が１００μＭで２．６±０．２倍、用量依存的にＨＩＦ－１αタンパク質の蓄積を誘導した（図３Ｂ）。本発明者らは、ＨＩＦ－１βタンパク質のいかなる修飾も観察しなかった。

【０２５９】

アデノシン受容体ファミリーは、A_1、A_{2A}、A_{2B}及びA_3と記される４つのサブタイプのＧタンパク質連結型受容体からなる。本発明者らは、４つ全てのアデノシン受容体がヒトメラノーマＡ３７５細胞に発現していることを、以前に証明した。低酸素条件下でのＨＩＦ－１αタンパク質発現に果たす、アデノシン受容体サブタイプの機能的な役割を評価するために、本発明者らはＤＰＣＰＸ（A_1受容体アンタゴニスト）、ＳＣＨ５８２６１（選択的A_{2A}受容体アンタゴニスト）、ＭＲＥ２０２９Ｆ２０（選択的A_{2B}受容体アンタゴニスト）、及びＭＲＥ３００８Ｆ２０（選択的A_3受容体アンタゴニスト）との組合せでアデノシンの効果を検討した（Baraldi 2004; Merighi 2001; Varani 2000）。A_1、A_{2A}及びA_{2B}受容体アンタゴニストは、アデノシン誘導ＨＩＦ－１αタンパク質発現を阻害しなかったが、A_3受容体アンタゴニストのＭＲＥ３００８Ｆ２０は、アデノシンが誘導するＨＩＦ－１αタンパク質発現の増加を抑制した（図３Ｃ～Ｄ）。さらには、ＨＩＦ－１β発現は、アデノシン又は合成アデノシン受容体アンタゴニストによって影響されなかった。これらの結果は、アデノシンがA_3受容体を介してＨＩＦ－１αタンパク質発現を増大させていることを示唆する。

【０２６０】

A_3アデノシン受容体は、低酸素状態におけるＨＩＦ－１αタンパク質の蓄積を誘導する。ＨＩＦ－１αタンパク質発現の修飾におけるA_3受容体の関与を調べるために、本発明者らはＡ３７５細胞を選択的A_3受容体アゴニストＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡで処置した。本発明者らは、Ａ３７５細胞が１００ｎＭのＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡで２－２４時間曝される経時変化実験を行った。A_3アデノシン受容体刺激は、正常酸素分圧下でＨＩＦ－１αタンパク質の蓄積を促進しなかったが、低酸素条件下でＨＩＦ－１αタンパク質発現は時間依存的に増大した（図４）。特に、培地にＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡを添加後２時間から、ＨＩＦ－１αは増大し、最大ピークレベルは４時間後に観察された。低酸素状態下での長期間のA_3受容体刺激は、ＨＩＦ－１αタンパク質レベルの修飾に小さな影響しかもたらさなかった。すでにアデノシンで観察されたように、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡはまた、正常分圧下でも低酸素状態下でもＨＩＦ－１β発現を修飾しなかった。

【０２６１】

A_3受容体刺激によるＨＩＦ－１α発現の誘導をより詳細に性状解析するために、Ａ３７５細胞は様々な濃度のA_3受容体アゴニストで４時間処置された。予想されたとおり、正常酸素分圧下では、A_3受容体の活性化は、ＨＩＦ－１αの検出可能なレベルの誘導をしなかった。逆に、低酸素状態では、アデノシンにより産出される効果を再現するように（図３）、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡは用量依存的にＨＩＦ－１αタンパク質の蓄積を誘導した（図５Ａ）。ＨＩＦ－１αタンパク質の最大の発現は、１００ｎＭのＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡにより誘導され、ED_{50}値は、１０．６±１．２ｎＭだった（図５Ｂ）。対照的に、A_3受容体刺激は、正常酸素分圧下でも、低酸素状態下でもＨＩＦ－１βタンパク質発現に影響をもたらさなかった。

【０２６２】

低酸素状態下でＨＩＦ－１αタンパク質発現を有意に増大させるA_3受容体の能力を更に解析するために、本発明者らはA_3選択的受容体アンタゴニスト（ＭＲＥ３００８Ｆ２０及びＭＲＥ３００５Ｆ２０）（Baraldi 2004）がこのような効果を阻害する能力を評価する一連の実験を行った。Ａ３７５細胞は増大する濃度のＭＲＥ３００８Ｆ２０及びＭＲＥ３００５Ｆ２０で３０分間、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ（１０及び１００μＭ）の存在下又は非存在下で、処理された。ＭＲＥ３００８Ｆ２０及びＭＲＥ３００５Ｆ２０（１０及び

１００μＭ）両方とも、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡのＨＩＦ－１αの修飾効果を抑制した。予想されたように、ＭＲＥ３００８Ｆ２０とＭＲＥ３００５Ｆ２０のいずれも、ＨＩＦ－１β発現に影響をもたらさなかった。図６Ａ～Ｂは、ＭＲＥ３００８Ｆ２０により得られた結果を示す。同様の結果は、アンタゴニストＭＲＥ３００５Ｆ２０によっても得られた（データは示されていない）。

【０２６３】

本発明者らは次に、最大近くの用量のＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡにより誘導されるＨＩＦ－１αタンパク質の増加に及ぼす、増大する濃度のＭＲＥ３００８Ｆ２０の影響を調べた。１０ｎＭのＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡにより誘導されたＨＩＦ－１αタンパク質の増加は、増大する濃度のＭＲＥ３００８Ｆ２０（０．３～３０ｎＭ）により、IC_{50}値が０．９０±０．０８ｎＭで阻害された（図６Ｃ～Ｄ）。

【０２６４】

最後に、アデノシンに応答してＨＩＦ－１αタンパク質が蓄積することにA_3受容体が必要であることを、さらに証明するために、Ａ３７５細胞は、分解のためにA_3受容体ｍＲＮＡを標的とするｓｉＲＮＡ（$siRNA_{A3}$）でのトランスフェクト又は偽のトランスフェクトされた。トランスフェクション効率を評価するために、Ａ３７５細胞はまた、蛍光標識された対照のｓｉＲＮＡでトランスフェクトされた。フローサイトメトリーによって、トランスフェクション効率は８５±５％であることが観察された（図７Ａ）。トランスフェクション後、細胞は完全培地でインキュベーションされ、A_3受容体ｍＲＮＡのリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ解析及びA_3受容体タンパク質のウェスタンブロッティング解析のために、２４，４８，７２時間で、全ＲＮＡが単離された。予想されたように、A_3受容体ｍＲＮＡレベルは、$siRNA_{A3}$をトランスフェクトされた細胞で有意に減少した（図７Ｂ）。更に、A_3受容体タンパク質発現は、$siRNA_{A3}$処理細胞で大きく減少した（図７Ｃ～Ｄ）。偽のトランスフェクションと無関係なｍＲＮＡを標的にしたｓｉＲＮＡのトランスフェクションのいずれも、A_3受容体ｍＲＮＡ又はタンパク質発現を阻害しなかった。それゆえ、$siRNA_{A3}$トランスフェクションの７２時間後に、Ａ３７５細胞は増大する濃度のA_3アデノシン受容体アゴニストＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ（１～１００ｎＭ）に低酸素状態下で４時間曝された。全タンパク質がウェスタンブロット解析のために回収された。対照として、Ａ３７５細胞は、$siRNA_{A3}$を含まないＲＮＡｉＦｅｃｔ(登録商標)トランスフェクション試薬に曝された。本発明者らは、A_3受容体発現の阻害が、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ誘導ＨＩＦ－１α蓄積を阻害するのに十分であることを見出した（図７Ｅ）。

【０２６５】

ＨＩＦ－１α発現に及ぼすA_3受容体刺激の効果が一般的な現象かどうかを決定するために、本発明者らは、A_3アデノシン受容体を発現している様々な細胞株においてＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡがＨＩＦ－１αレベルを誘導する能力を評価した。ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ処置下で低酸素４時間後に、本発明者らは、ヒトケラチン生成細胞ＮＣＴＣ２５４４において、並びにヒト腫瘍のＵ８７ＭＧグリア芽腫及びＵ２ＯＳ骨肉腫の細胞において、ＨＩＦ－１αタンパク質発現を有意に増大させることを検出できた（図８）。

【０２６６】

A_3受容体は、転写とは独立し、翻訳に依存した経路でＨＩＦ－１αの蓄積を仲介する。低酸素状態でのA_3受容体刺激に応じたＨＩＦ－１α蓄積に含まれる経路を更に理解するために、本発明者らは、ＨＩＦ－１αｍＲＮＡ蓄積に及ぼすＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡの効果を調べた。Ａ３７５細胞を低酸素状態下４時間処理後、ＲＮＡが抽出され、リアルタイムＲＴ－ＰＣＲ解析が実行された。メラノーマ細胞を１０ｎＭ、１００ｎＭ及び１μＭのＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡで活性化すると、対応する未処置細胞に対するＨＩＦ－１αｍＲＮＡ蓄積の増加は、それぞれ１．１３±０．１０、１．２５±０．１５及び１．１９±０．１３倍であった。このことは、A_3受容体刺激は、ＨＩＦ－１αｍＲＮＡ転写を調節していないことを示唆している。この仮説を確認するために、Ａ３７５細胞は、デノボ（de novo）の遺伝子転写を阻害するために、１０μｇ／ｍｌのアクチノマイシンＤ（Ａｃｔ－

Ｄ）で前処置された。その後、Ａ３７５細胞は、増大する濃度のＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ（１００ｎＭ）の存在下、低酸素状態で４時間、インキュベーションされた。本発明者らは、A_3受容体刺激がＡｃｔ－Ｄの存在下でも、ＨＩＦ－１αタンパク質発現を増加させることができることを見出した（図９）。

【０２６７】

ＨＩＦ－１αは、正常酸素分圧下ではプロテアソーム経路を介して分解されることが示されてきた。ＨＩＦ－１αのプロリン５６４の酵素的水酸化は、ｖｏｎ Ｈｉｐｐｅｌ Ｌｉｎｄａｕタンパク質との相互作用のためのタグをつけることにより、タンパク質の代謝回転を制御する（Ivan 2001; Jaakkola, 2001; Yu 2001; Maxwell 1999）。細胞が低酸素状態になると、プロリン残基は水酸化されず、ＨＩＦ－１αたんぱく質が蓄積する。プロリン５６４水酸化に及ぼす低酸素状態の効果は、コバルト、鉄キレーターのような遷移金属、及びプロリルヒドロキラーゼ酵素の阻害剤により、模倣されうる（Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001）。

【０２６８】

本発明者らは、プロリルヒドロキラーゼ酵素の阻害剤、塩化コバルト（$CoCl_2$）の存在下、ＨＩＦ－１αの蓄積を修飾するA_3アデノシン受容体の能力を検討した。本発明者らは、A_3受容体刺激が、$CoCl_2$処理細胞においても、ＨＩＦ－１αタンパク質レベルを増大できることを観察した（図１０Ａ）。A_3受容体がＨＩＦ－１α発現を翻訳依存的な経路で誘導するかどうかを判定するために、タンパク質翻訳阻害剤、シクロヘキシミド（ＣＨＸ）の存在下、ＨＩＦ－１αタンパク質修飾を測定した。このために、Ａ３７５細胞は、酸素依存的なＨＩＦ－１αタンパク質分解を避けるように１００μＭの$CoCl_2$の存在下、正常酸素分圧下で４時間培養した後、Ａ３７５細胞は、ＣＨＸ（１μＭ）の存在下及び非存在下で１００ｎＭのＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡで処理された。ＣＨＸに曝された細胞では、ＣＨＸ非存在下で観察されるように、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡは、６時間以内にＨＩＦ－１αを増大させることができなかった（図１０Ｂ）。纏めると、これらの結果は、A_3受容体の活性化が、ＨＩＦ－１αタンパク質レベルを翻訳依存的な経路で増大することを示唆している。

【０２６９】

低酸素状態のＡ３７５培養を正常酸素分圧に戻した後、ＨＩＦ－１αタンパク質のレベルは急激に減少し、１５分後には消失した（図１１Ａ）。それゆえ、ＨＩＦ－１αの分解に及ぼすA_3受容体活性化の影響を検討するために、Ａ３７５細胞は、１００ｎＭのＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡの存在下及び非存在下で、低酸素状態下でインキュベーションされた。４時間後、メラノーマ細胞は、正常酸素分圧に曝され、ＨＩＦ－１α消失の経時変化を確認した。低酸素条件の除去後１５分以内に、ＨＩＦ－１αタンパク質の減少が、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ の存在下非存在下において、変わらない消失速度を有することが観察された（図１１Ｂ）。これらの結果は、正常酸素条件下では、A_3受容体活性化がＨＩＦ－１α分解を防ぐことはできないことを示している。

【０２７０】

主な細胞内シグナル伝達経路は、低酸素状態でのＨＩＦ－１αの蓄積時にA_3受容体によって持続される。ＭＡＰＫがＨＩＦ－１α活性化に関与していることが証明されてきた。ＭＡＲＫ経路が、A_3受容体活性化により誘導されるＨＩＦ－１αタンパク質の増加に必要とされるかどうかを決定するために、Ａ３７５細胞は、ｐ４４／ｐ４２のリン酸化の上流の調節因子である（Favata 1998）ＭＥＫ１／２の有力な阻害剤であるＵ０１２６、又はｐ３８ＭＡＰＫの阻害剤であるＳＢ２０２１９０（Kramer 1996）で前処理された。その後、細胞は、１００ｎＭのＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡに低酸素状態下で４時間曝され、全細胞タンパク質抽出液が、ＨＩＦ－１α及びチューブリンタンパク質レベルのイムノブロットアッセイのために調製された。図１２Ａに示されるように、ＭＥＫ阻害剤であるＵ０１２６（１０及び３０μＭ）及びｐ３８ＭＡＰＫ阻害剤であるＳＢ２０２１９０（１及び１０μＭ）の両方は、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡが誘導するＨＩＦ－１αタンパク質発現の増大を阻害することができた。これらの結果は、ｐ４４／ｐ４２及びｐ３８ＭＡＰＫ活性が

A_3受容体活性化により誘導されるＨＩＦ－１α発現の上昇に必要であることを示唆している。

【０２７１】

さらに、ｐ４４／ｐ４２及びｐ３８ＭＡＰＫ が、A_3受容体活性化によって始まるシグナル伝達経路に含まれることを確認するために、本発明者らはまた、A_3受容体アゴニスト処理に応じた内因性のｐ４４／ｐ４２及びｐ３８ＭＡＰＫの活性化レベルを調べた。Ａ３７５細胞は、増大する濃度のＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ（１～１０００ｎＭ）で低酸素状態下で４時間インキュベーションされ、全細胞タンパク質抽出液が、ホスホ－ｐ４４、ホスホ－ｐ４２及びホスホ－ｐ３８のレベルを決定するために用いられた。

【０２７２】

図１２Ｂに示されるように、ｐ４４及びｐ４２のリン酸化は、ナノモル濃度のＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡに応答して誘導され、ｐ４４／ｐ４２キナーゼリン酸化状態の誘導は、１００ｎＭのA_3受容体アゴニストの処理で最大であった（図１２Ｃ）。さらに、本発明者らは、ウェスタンブロット上のリン酸化体の検出によりA_3受容体刺激によるｐ３８ＭＡＰＫの活性化レベルを観察した。図１２Ｄにみられるように、ｐ３８ＭＡＰＫのリン酸化における大きな増加は、低酸素状態によるA_3受容体刺激の４時間後に観察された。特に、Ａ３７５細胞の様々な濃度のＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡに対する曝露は、用量依存的にｐ３８ＭＡＰＫのリン酸化を増加した（図１２Ｅ）。ホスホ－ｐ４４、ホスホ－ｐ４２、ホスホ－ｐ３８のブロットは剥がされ、全ｐ４４、ｐ４２、及びｐ３８ＭＡＰＫを等しく認識する抗体で再ブロットされた。本発明者らは、ｐ４４、ｐ４２及びｐ３８ＭＡＰＫのリン酸化レベルにおける観察された変化は、全タンパク質の発現レベルに有意な変化を伴わなかったことを見出した（図１２Ｂ～Ｄ）。

【０２７３】

議論： 本発明者らの知る限りにおいて、本明細書が酸素感受性細胞における低酸素状態時の細胞応答の修飾に果たすアデノシンの役割を記載する最初の報告である。

【０２７４】

低酸素状態は、癌の増殖における最初の出来事の１つであり；この工程は、一方で細胞外アデノシンの蓄積を助け、もう一方で、ＨＩＦ－１αのような、低酸素誘導因子を安定化する状況を作る（Winn, 1981; Decking 1997; Ledoux 2003）。

【０２７５】

本検討の結果は、アデノシン受容体介在のシグナル伝達の本来の経路に基づいて、低酸素状態が癌成長に貢献する新しい経路を示す。はじめて、本発明者らはここで、アデノシンがＡ３７５ヒトメラノーマ細胞において用量及び時間依存的に、低酸素状態に応答してＨＩＦ－１αタンパク質発現を増大でき、ここでＨＩＦ－１βタンパク質レベルは影響されないことを証明する。

【０２７６】

本発明者らは以前に、４つのアデノシン受容体全てがヒトメラノーマＡ３７５細胞で発現していることを証明した（Merighi, 2001）。ここで本発明者らは、この細胞株においてＨＩＦ－１α調節に及ぼすアデノシンの観察された影響を、A_3受容体サブタイプが仲介することを報告する。

【０２７７】

ＨＩＦ－１αタンパク質蓄積に及ぼすアデノシンの効果は、A_1、A_{2A}又はA_{2B}受容体によっては仲介されない。この結論を支持するように、A_1、A_{2A}及びA_{2B}受容体にそれぞれ高度に選択的なアデノシン受容体アンタゴニストである、ＤＰＣＰＸ、ＳＣＨ５８２６１及びＭＲＥ２０２９Ｆ２０が、ＨＩＦ－１αタンパク質増加に及ぼすアデノシンの刺激効果を阻害しなかった。

【０２７８】

ＨＩＦ－１α蓄積に及ぼすアデノシンの効果が、A_3受容体によって仲介されるという結論は、ＨＩＦ－１αタンパク質に及ぼすこのヌクレオシドの効果が、A_3受容体アゴニストであるＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡによって模倣され、A_3受容体アンタゴニストであるＭ

ＲＥ３００８Ｆ２０及びＭＲＥ３００５Ｆ２０によって阻害される、という観察によって支持される。特に、これらの薬剤の能力が、アデノシンＡ$_3$受容体への結合実験で観測された、阻害的な平衡定数（Ｋｉ）と一致している（Merighi 2001）。

【０２７９】

更に、ｍＲＮＡとタンパク質レベルでのＡ$_3$受容体発現の阻害は、Ａ$_3$受容体誘導性ＨＩＦ－１αタンパク質蓄積を阻害するのに十分である。それゆえ、本発明者らの結果は、細胞表面Ａ$_3$アデノシン受容体が、細胞外低酸素シグナルを細胞内へ伝達することを示している。Ａ$_3$受容体は、メラノーマ細胞に存在し、これらの発現は低酸素の損傷とＨＩＦ－１α蓄積との間の橋渡しするように思われ、酸素感受性受容体のように、細胞の低酸素への応答を制御している。腫瘍細胞の低酸素への応答能力に、Ａ$_3$受容体がどの程度影響を及ぼすかは、更なる研究が必要であろう。

【０２８０】

異なる細胞（ケラチン生成細胞、メラノーマ、骨肉腫、グリア芽腫）において得られた同様の結果は、低酸素状態におけるＨＩＦ－１αタンパク質発現に対するＡ$_3$受容体の刺激効果が、正常細胞と癌細胞の区別をできなくし、それにより、全てではないが、多くの細胞型で共用される一般的なシグナル伝達経路でありうることを示している、という関心事を高めた。

【０２８１】

Ａ$_3$アデノシン受容体刺激は、リアルタイムＲＴ－ＰＣＲ実験で観察されたように、ＨＩＦ－１αｍＲＮＡ蓄積に影響を与えなかった。従って、Ａｃｔ－Ｄ実験は、Ａ$_3$受容体が転写依存的機構を通じて、ＨＩＦ－１αタンパク質発現を制御しているのではないことを示している。転写レベルでのＨＩＦ－１αへのアデノシン効果の欠如は、ＨＩＦ－１αの低酸素制御が主としてＨＩＦ－１αタンパク質の安定化により決定されるという事実の見地からも、驚くことではない（Huang, 1998）。加えて、本発明者らは、Ａ$_3$アデノシン受容体が翻訳依存性経路を通じて、ＨＩＦ－１αタンパク質レベルを調節するが、他方、ＨＩＦ－１αの酸素依存性分解に影響を与えない、という証拠が得られた。本発明者らのデータは、Ａ$_3$アデノシン受容体が、ＨＩＦ－１αタンパク質の半減期を増加させない一方で、様々な成長因子の効果と同様に、ＨＩＦ－１αタンパク質合成速度を増加させるかもしれないことを示している（Zhong 2000；Fukuda, 2002）。しかしながら、本発明者らは、Ａ$_3$アデノシン受容体が、ＨＩＦ－１α分解を阻害するタンパク質の翻訳を制御しているという可能性を排除することはできない。

【０２８２】

リン酸化及び脱リン酸化活性は、ＨＩＦ－１活性化を導くシグナル伝達経路において、重要であることを示唆している。いくつかの報告は、低酸素状態がＨＩＦ－１αの核への局在と転写活性の両方を増加させる、ｐ４４／ｐ４２及びｐ３８ＭＡＰＫによるＨＩＦ－１αのリン酸化を、誘導することを示している（Semenza 2001 ICurrOpCB; Richard 1999 BBRC；Berra 2000；Richard 1999JBC；Conrad 1999；Sodhi 2000；Mottet D, 2003；Semenza 2002）。加えて、アデノシンは、Ａ３７５ヒトメラノーマ細胞で、ＭＡＰＫを直接促進する（Merighi et al., 2002）が、ヒトＡ$_3$受容体で安定に形質転換された非ヒト細胞株でも、促進される（Hammarberg 2004；Schulte 2000-2002-2003）ことが示されている。本検討において、本発明者らは、ｐ４４／ｐ４２及びｐ３８ＭＡＰＫがＨＩＦ－１αレベルを増加させるのに必要だが、またこれらのキナーゼは、Ａ$_3$受容体関与により生成される分子シグナル伝達経路に含まれることを観察した。結論として、本検討は、アデノシンがＡ$_3$受容体を介して、ｐ４４／ｐ４２及びｐ３８ＭＡＰＫ経路を通じたＨＩＦ－１αレベルを増加できることを示している。実際、低酸素状態におけるＨＩＦ－１αの減少した代謝回転、増加した寿命、及び伝達におけるｐ４４／ｐ４２及びｐ３８ＭＡＰＫの役割を評価するためには、更なる検討が必要である。

【０２８３】

ＨＩＦ－１αは、低酸素状態の結果として腫瘍内に過剰発現し、血管新生、浸潤、及び変化したエネルギー代謝のような腫瘍生物学の鍵となる局面に関わる（Ratcliffe 2000）

。ＨＩＦ－１活性の阻害は、特に、腫瘍内の低酸素状態をさらに増大させ、このようなＨＩＦ阻害剤の使用のためのより大きな治療ウィンドウを提供するであろう血管形成阻害剤との組合せで、がん治療への新規な治療アプローチを示すと認識されている。最近の検討は、ＨＩＦ－１α及び特にがん細胞の生存に重要なＨＩＦにより調節される遺伝子の薬学的阻害は、ＨＩＦ遺伝子の不活性化の治療的アプローチ（Mabjeesh et al., 2003）よりも利点があることを示している。多くの正常な組織は、ＨＩＦを活性化するのに十分なpO_2値で機能する、そしてシステムは正常な生理的条件下で重要な機能を有している（Hopfl, 2004）。これは臨床使用のための薬学的阻害剤の開発において、考慮されることが必要であろう。

【０２８４】

アデノシンによって誘導されるＨＩＦ－１αタンパク質発現の蓄積を阻害する能力がA_3アデノシン受容体アンタゴニストにあるとすれば、本発明者らのデータは、A_3アデノシン受容体アンタゴニストが癌治療に有用であることを意味している。特に、本発明者らは、インビボシステムにおいて、固形腫瘍の細胞外液が、アデノシン受容体機能に役割を果たす内因性アゴニストである、増大したレベルのアデノシンを含むことに注目する。それゆえ、癌治療にA3受容体アンタゴニストを用いて、高濃度のアデノシンがＨＩＦ－１αの蓄積を増加している、腫瘍の低酸素細胞においてのみ、生物学的効果が見られるような、組織選択性を達成することが可能であろう。

【０２８５】

更なる検討が、A_3受容体アンタゴニストが低酸素状態の固形腫瘍の生存を阻害できるかどうかを決定することを保証する。

【図面の簡単な説明】

【０２８６】

（５．図面の簡単な説明）

【図１】図１は、正常酸素分圧又は低酸素状態で２４時間インキュベーションされたＡ３７５細胞のアポトーシス及び細胞周期解析、ヨウ化プロピジウムを用いたＤＮＡ染色による細胞周期の代表的なフローサイトメトリー解析で、正常分圧及び低酸素状態時のアポトーシス状態及びG_0／G_1、Ｓ及びG_2／Ｍ位相にあるＡ３７５細胞のパターンを示す（Ａ）。サブ－ｄｉｐｏｉｄＤＮＡを中身にもつアポトーシス細胞（Ａｐｏ）が報告され、G_0／G_1、Ｓ及びG_2／Ｍ位相にある細胞のサブ２倍体の定量的解析が図の中に与えられている（Ｂ）。プロットは、平均値±標準誤差値（ｎ＝３）であり、低酸素状態と比較して、＊Ｐ＜０．０１である。

【図２】図２は、低酸素状態によるＨＩＦ－１発現の誘導を示す。Ａ３７５細胞は、正常酸素分圧で４時間（正常酸素分圧レーン）又は低酸素状態条件で２、３、４、８、１６及び２４時間（レーン２～７）インキュベーションされた。全細胞蛋白抽出液が調製され、抗ＨＩＦ－１αモノクローナル抗体を用いてイムノブロット解析された。その後、ブロットは剥がされ、抗ＨＩＦ－１βモノクローナル抗体を用いてＨＩＦ－１β発現を決定するために用いられた。チューブリンは、均等に装填されているタンパク質を示す。

【図３】図３は、ＨＩＦ－１α発現のアデノシンによる誘導を示し（Ａ）、Ａ３７５細胞は、正常酸素分圧で４時間（正常酸素分圧レーン）インキュベーションされた。Ａ３７５細胞は低酸素状態下で、アデノシン無し（レーン１）又は１０ｎＭ（レーン２）、１００ｎＭ（レーン３）、１μＭ（レーン４）、１０μＭ（レーン５）、１００μＭ（レーン６）のアデノシンで４時間処理された。細胞抽出液が調製され、抗ＨＩＦ－１αモノクローナル抗体を用いてイムノブロット解析された。その後、ブロットは剥がされ、抗ＨＩＦ－１βモノクローナル抗体を用いてＨＩＦ－１β発現を決定するために用いられた。チューブリンは、均等に装填されているタンパク質を示し、低酸素状態におけるアデノシンに曝されたＡ３７５細胞の典型的な濃度応答曲線が示されている（Ｂ）。ＨＩＦ－１αイムノブロットシグナルは、モレキュラーアナリスト／ＰＣデンシトメトリーソフトウェア（ＢｉｏＲａｄ）により定量化された。１２回の独立した実験（その１つはパネルＡに示されている）から得られた平均的なデンシトメトリーデータは、アデノシン非存在下での細胞

（対照）から得られた結果に対して標準化された。プロットは、平均値±標準誤差値（ｎ＝１２）であり、A_1、A_{2A}、A_{2B}及びA_3アデノシン受容体アンタゴニストの効果を示す（Ｃ）。Ａ３７５細胞は、低酸素状態下で、アデノシン無し（レーン１、対照）又はアデノシン１００μＭ（レーン２～６）であり、そして１００ｎＭのA_1受容体アンタゴニストＤＰＣＰＸ（レーン３）、１００ｎＭのA_{2A}受容体アンタゴニストＳＣＨ５８２６１（レーン４）、１００ｎＭのA_{2B}受容体アンタゴニストＭＲＥ２０２９Ｆ２０（レーン５）又は１００ｎＭのA_3受容体アンタゴニストＭＲＥ３００８Ｆ２０（レーン６）で４時間処理された。細胞抽出液が調製され、抗ＨＩＦ－１αモノクローナル抗体を用いてイムノブロット解析された。その後、ブロットは剥がされ、抗ＨＩＦ－１βモノクローナル抗体を用いてＨＩＦ－１β発現を決定するために用いられた。チューブリンは、均等に装填されているタンパク質を示す（Ｄ）、イムノブロットシグナルは、モレキュラーアナリスト／ＰＣデンシトメトリーソフトウェア（ＢｉｏＲａｄ）により定量化された。５回の独立した実験（その１つはパネルＣに示されている）から得られた平均的なデンシトメトリーデータは、アデノシン非存在下での細胞（対照）から得られた結果に対して標準化された。プロットは、平均値±標準誤差値（ｎ＝５）であり、対照と比較して、＊Ｐ＜０．０１である。

【図４】図４は、A_3受容体刺激によるＨＩＦ－１発現の誘導の時間経過を示し（Ａ）、Ａ３７５細胞は、正常酸素分圧（レーン正常酸素分圧）で４時間、又は低酸素条件下でA_3受容体アゴニストＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ（１００ｎＭ）の存在下（＋）又は非存在下（－）で、２、４、８、１６及び２４時間インキュベーションされた。全細胞抽出液が調製され、抗ＨＩＦ－１αモノクローナル抗体を用いてイムノブロット解析された。その後、ブロットは剥がされ、抗ＨＩＦ－１βモノクローナル抗体を用いてＨＩＦ－１β発現を決定するために用いられた。チューブリンは、均等に装填されているタンパク質を示し（Ｂ）、イムノブロットシグナルは、モレキュラーアナリスト／ＰＣデンシトメトリーソフトウェア（ＢｉｏＲａｄ）により定量化された。３回の独立した実験（その１つはパネルＡに示されている）から得られた平均的なデンシトメトリーデータは、低酸素状態で４時間ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ非存在下での細胞（対照）から得られた結果に対して標準化された。プロットは、平均値±標準誤差値（ｎ＝３）であり、対照と比較して、＊Ｐ＜０．０１である。

【図５】図５は、A_3受容体刺激によるＨＩＦ－１発現の誘導の用量応答であり（Ａ）、Ａ３７５細胞は、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡなし（レーン１）、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ０．１ｎＭ（レーン２）、１ｎＭ（レーン３）、１０ｎＭ（レーン４）、１００ｎＭ（レーン５）及び１μＭ（レーン６）と共に、正常分圧下及び低酸素状態下で４時間処理された。細胞抽出液が調製され、抗ＨＩＦ－１αモノクローナル抗体を用いてイムノブロット解析された。その後、ブロットは剥がされ、抗ＨＩＦ－１βモノクローナル抗体を用いてＨＩＦ－１β発現を決定するために用いられた（Ｂ）、低酸素条件下でアデノシンに曝されたＡ３７５細胞の典型的な濃度応答曲線が示されている。イムノブロットシグナルは、モレキュラーアナリスト／ＰＣデンシトメトリーソフトウェア（ＢｉｏＲａｄ）により定量化された。１２回の独立した実験（その１つはパネルＡに示されている）から得られた平均的なデンシトメトリーデータは、低酸素ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ非存在下での細胞（対照）から得られた結果に対して標準化された。プロットは、平均値±標準誤差値（ｎ＝１２）である。

【図６】図６は、A_3受容体アンタゴニストＭＲＥ３００８Ｆ２０の効果であり（Ａ）、Ａ３７５細胞は、低酸素状態下で、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ無し（－）又はＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ１０ｎＭあり（＋）で、１０ｎＭのＭＲＥ３００８Ｆ２０（レーン３、４）、及び１００ｎＭのＭＲＥ３００８Ｆ２０（レーン５、６）で４時間処理された。細胞抽出液が調製され、抗ＨＩＦ－１αモノクローナル抗体を用いてイムノブロット解析された。その後、ブロットは剥がされ、抗ＨＩＦ－１βモノクローナル抗体を用いてＨＩＦ－１β発現を決定するために用いられた（Ｂ）、イムノブロットシグナルは、モレキュラーアナリスト／ＰＣデンシトメトリーソフトウェア（ＢｉｏＲａｄ）により定量化された。独立した

実験（その１つはパネルＡに示されている）から得られた平均的なデンシトメトリーデータは、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ非存在下での低酸素状態下細胞（対照、レーン１）から得られた結果に対して標準化された。プロットは、平均値±標準誤差値（ｎ＝３）であり、対照と比較して、＊Ｐ＜０．０１である（Ｃ）。Ａ３７５細胞は低酸素状態下で、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ無し（レーン１）又は１０ｎＭのＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ（レーン２～６）及び０．３ｎＭのＭＲＥ３００８Ｆ２０（レーン３）、１ｎＭ（レーン４）、３ｎＭ（レーン５）及び１０ｎＭ（レーン６）で４時間処理された。細胞抽出液が調製され、抗ＨＩＦ－１αモノクローナル抗体を用いてイムノブロット解析された。その後、ブロットは剥がされ、抗ＨＩＦ－１βモノクローナル抗体を用いてＨＩＦ－１β発現を決定するために用いられ、低酸素状態下、ＭＲＥ３００８Ｆ２０に曝されたＡ３７５細胞の典型的な濃度応答性曲線が示されている（Ｄ）。イムノブロットシグナルは、モレキュラーアナリスト／ＰＣデンシトメトリーソフトウェア（ＢｉｏＲａｄ）により定量化された。３回の独立した実験（その１つはパネルＣに示されている）から得られた平均的なデンシトメトリーデータは、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ非存在下での細胞（対照）から得られた結果に対して標準化された。プロットは、平均値±標準誤差値（ｎ＝３）である。

【図７】図７は、ｓｉＲＮＡトランスフェクションによるA_3受容体発現の抑制で、Ａ３７５細胞におけるｓｉＲＮＡトランスフェクション効果の解析を示し（Ａ）、ｓｉＲＮＡ－ＦＩＴＣでトランスフェクトされたＡ３７５細胞におけるｓｉＲＮＡ－ＦＩＴＣ蓄積の代表的なフロークロマトグラム。埋められていない領域は、$siRNA_{A3}$無しでＲＮＡｉＦｅｃｔ(登録商標)トランスフェクション試薬を用いてトランスフェクトされたＡ３７５細胞を示している。トランスフェクト５時間後に、フローサイトメトリーにより蛍光が定量化された（Ｂ）、リアルタイムＰＣＲによる、βアクチンｍＲＮＡに対するA_3受容体ｍＲＮＡの相対的定量。Ａ３７５細胞は、ＲＮＡｉＦｅｃｔ(登録商標)トランスフェクト試薬又は$siRNA_{A3}$によりトランスフェクトされ、２４、４８及び７２時間正常酸素分圧でインキュベーションされた。プロットは、平均値±標準誤差値（ｎ＝３）であり、対照と比較して、＊Ｐ＜０．０１である（Ｃ）。ＲＮＡｉＦｅｃｔ(登録商標)トランスフェクト試薬（対照）又は$siRNA_{A3}$により処理され、正常分圧下で２４、４８及び７２時間インキュベーションされたＡ３７５細胞からのタンパク質抽出液の、抗A_3受容体ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロット。チューブリンは、均等に装填されているタンパク質を示す（Ｄ）。A_3受容体ウェスタンブロットのデンシトメトリー定量化のプロットは、平均値±標準誤差値（ｎ＝５）であり、対照と比較して、＊Ｐ＜０．０１である（Ｅ）。対照ｓｉ－ＲＮＡ（－）又は$siRNA_{A3}$（＋）で７２時間処理され、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ１００ｎＭのあり（＋）なし（－）で低酸素状態下４時間インキュベーションされたＡ３７５細胞から得られたタンパク質抽出液の抗ＨＩＦ－１αモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析で、チューブリンは、均等に装填されているタンパク質を示す。

【図８】図８は、A_3受容体刺激は、低酸素状態下の様々なヒト細胞株でのＨＩＦ－１α蓄積の誘導を示す。ＮＣＴＣ２５４４ケラチン生成細胞、Ｕ８７ＭＧグリア芽腫、Ｕ２ＯＳ骨肉腫ヒト細胞は、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ１００ｎＭのあり（＋）なし（－）で低酸素状態下４時間処理された。細胞抽出液が調製され、抗ＨＩＦ－１αモノクローナル抗体を用いてイムノブロット解析された。その後、ブロットは剥がされ、抗ＨＩＦ－１βモノクローナル抗体を用いてＨＩＦ－１β発現を決定するために用いられた。

【図９】図９は、転写とは独立した経路でのＨＩＦ－１αの蓄積を誘導するA_3受容体刺激を示し（Ａ）、Ａ３７５細胞はアクチノマイシンＤ（１０μｇ／ｍｌ）で３０分間前処理された後、低酸素状態に曝された。ＨＩＦ－１α蓄積は、アクチノマイシンＤの非存在下（レーン２）又は存在下（レーン４）で、Ａ３７５細胞を１００ｎＭのＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡに低酸素状態下で４時間曝露することにより誘導された。細胞抽出液が調製され、抗ＨＩＦ－１αモノクローナル抗体を用いてイムノブロット解析された。チューブリンは、均等に装填されているタンパク質を示し（Ｂ）、イムノブロットシグナルは、モレキュラーアナリスト／ＰＣデンシトメトリーソフトウェア（ＢｉｏＲａｄ）により定量化され

た。独立した実験（その１つはパネルＡに示されている）から得られた平均的なデンシトメトリーデータは、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ非存在下で低酸素状態４時間後の細胞（対照＝レーン１）から得られた結果に対して標準化された。プロットは、平均値±標準誤差値（ｎ＝３）であり、対照と比較して、＊Ｐ＜０．０１である。

【図１０】図１０は、正常酸素分圧下でのA_3受容体刺激によるＨＩＦ－１α蓄積の誘導を示し（Ａ）、Ａ３７５細胞は、単独（レーン１）又はＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ１ｎＭ（レーン２）、１０ｎＭ（レーン３）、１００ｎＭ（レーン４）、１μＭ（レーン５）及び１０μＭ（レーン６）の存在下、正常酸素分圧の下で１００μＭの$CoCl_2$に４時間曝された。細胞抽出液が調製され、抗ＨＩＦ－１αモノクローナル抗体を用いてイムノブロット解析された。その後、ブロットは剥がされ、抗ＨＩＦ－１βモノクローナル抗体を用いてＨＩＦ－１β発現を決定するために用いられた（Ｂ）。Ａ３７５細胞は、１００μＭの$CoCl_2$に正常酸素分圧の下、４時間曝された。ＨＩＦ－１αの蓄積は、Ａ３７５細胞を、シクロヘキシミド（１μＭ）の非存在下（レーン１及び２）、存在下（レーン３－６）で、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ１００ｎＭ（＋）に４時間（レーン１及び４）、又は６時間（レーン５及び６）曝露することで、誘導された。細胞抽出液が調製され、抗ＨＩＦ－１αモノクローナル抗体を用いてイムノブロット解析された。チューブリンは、均等に装填されているタンパク質を示す。

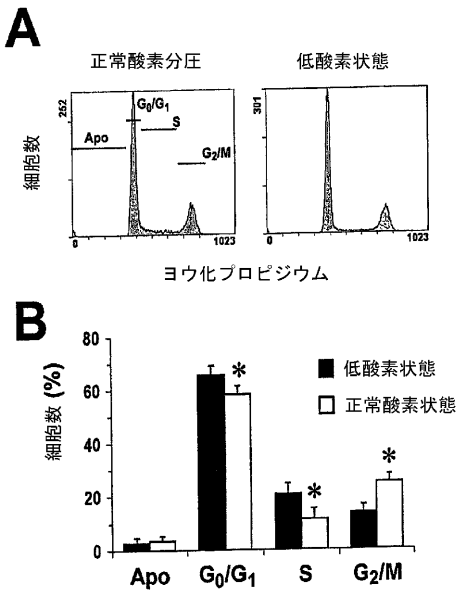
【図１１】図１１は、A_3受容体の活性化が正常酸素分圧下でのＨＩＦ－１α分解に影響を与えないことを示し（Ａ）、Ａ３７５細胞は、低酸素状態で、１００ｎＭのＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡの非存在下（レーン１～４）又は存在下（レーン５～８）でインキュベーションされた。４時間後、メラノーマ細胞は、正常酸素分圧に曝され、ＨＩＦ－１αの消失の経時変化が０、５、１０及び１５分で行われた。細胞抽出液が調製され、抗ＨＩＦ－１αモノクローナル抗体を用いてイムノブロット解析された。チューブリンは、均等に装填されているタンパク質を示す（Ｂ）、イムノブロットシグナルは、モレキュラーアナリスト／ＰＣデンシトメトリーソフトウェア（ＢｉｏＲａｄ）により定量化された。３回の独立した実験（その１つはパネルＡに示されている）から得られた平均的なデンシトメトリーデータは、０時間における細胞（対照）から得られた結果に対して標準化された。残存するＨＩＦ－１αの割合が示されている。

【図１２】図１２は、Ａ３シグナル伝達におけるｐ３８、ｐ４４及びｐ４２ＭＡＰＫｓの役割を示し（Ａ）、Ａ３７５細胞は、ＳＢ２０２１９０（１及び１０μＭ）又はＵ０１２６（１０及び３０μＭ）の存在下又は非存在下で前処理された後、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ１００ｎＭ（＋）又は薬剤調製液（－）に低酸素状態下で４時間曝露された。細胞抽出液が調製され、抗ＨＩＦ－１αモノクローナル抗体を用いてイムノブロット解析された。チューブリンは、均等に装填されているタンパク質を示す（Ｂ）。ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡを介したA_3刺激は、Ａ３７５細胞において低酸素状態４時間後に、ｐ４４／ｐ４２活性化を誘導する。ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ０（レーンＣ）、１０ｎＭ（レーン１）、１００ｎＭ（レーン２）、５００ｎＭ（レーン３）及び１０００ｎＭ（レーン４）がＡ３７５細胞に加えられた。４時間後、細胞が回収され、リン酸化された（Ｔｈｒ１８３／Ｔｙｒ１８５）又は全ｐ４４／ｐ４２ＭＡＰＫｓに特異的な抗体を用いてイムノブロット解析された（Ｃ）。イムノブロットシグナルは、モレキュラーアナリスト／ＰＣデンシトメトリーソフトウェア（ＢｉｏＲａｄ）により定量化された。ｐ４４及びｐ４２リン酸化アイソフォームのデンシトメトリー解析は報告されている。３回の独立した実験（その１つはパネルＢに示されている）から得られた平均的なデンシトメトリーデータは、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ非存在下における細胞（レーンＣ）か得られた結果に対して標準化された。プロットは、平均値±標準誤差値（ｎ＝３）であり、対照（レーンＣ）と比較して、＊Ｐ＜０．０１である（Ｄ）。ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡを介したA_3刺激は、Ａ３７５細胞において低酸素状態４時間後にｐ３８活性化を誘導する。ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ０（レーンＣ）、１０ｎＭ（レーン１）、１００ｎＭ（レーン２）、５００ｎＭ（レーン３）及び１０００ｎＭ（レーン４）がＡ３７５細胞に加えられた。４時間後、細胞が回収され、リン酸化された（Ｔｈｒ１８０／Ｔｙｒ１８２）又は全ｐ３８ＭＡＰＫｓに特異的な抗体を用いてイムノブ

ロット解析された（Ｅ）。イムノブロットシグナルは、モレキュラーアナリスト／ＰＣデンシトメトリーソフトウェア（ＢｉｏＲａｄ）により定量化された。ｐ３８のリン酸化アイソフォームのデンシトメトリー解析は報告されている。３回の独立した実験（その１つはパネルＤに示されている）から得られた平均的なデンシトメトリーデータは、ＣＩ－ＩＢ－ＭＥＣＡ非存在下における細胞（レーンＣ）か得られた結果に対して標準化された。プロットは、平均値±標準誤差値（ｎ＝３）であり、対照と比較して、＊Ｐ＜０．０１である。

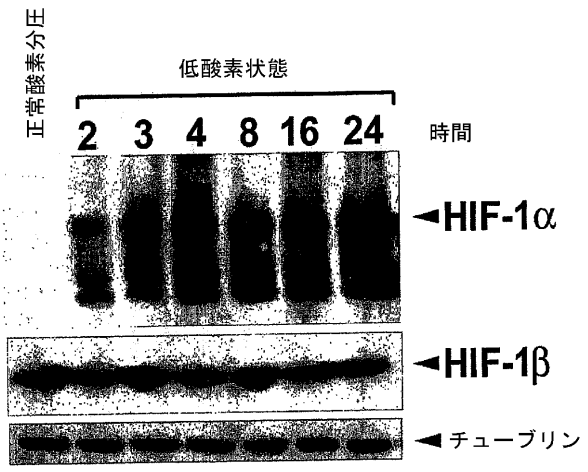
【図１】

図１



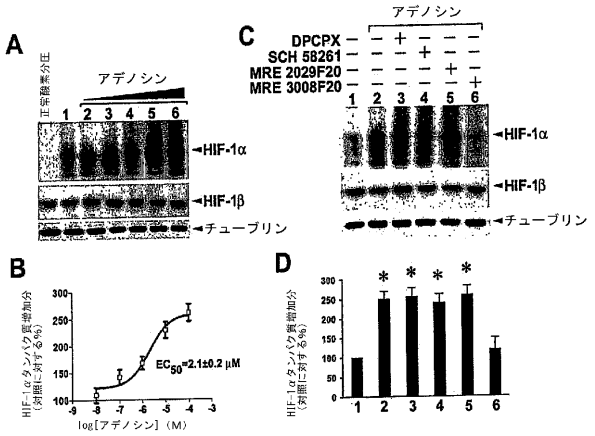
【図２】

図２



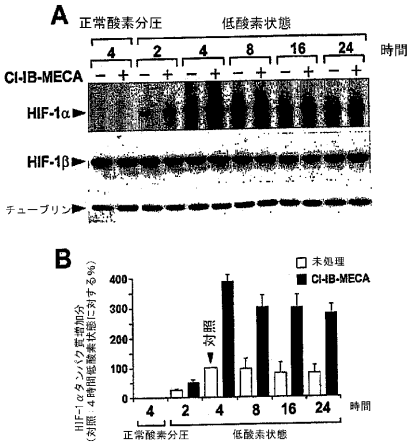
【図３】

図３



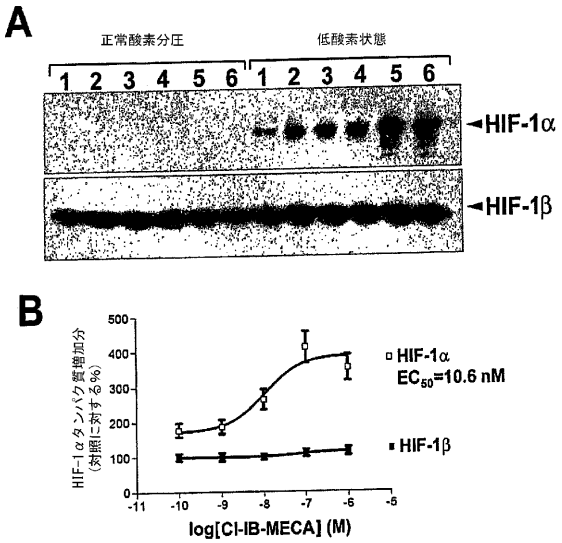
【図４】

図４



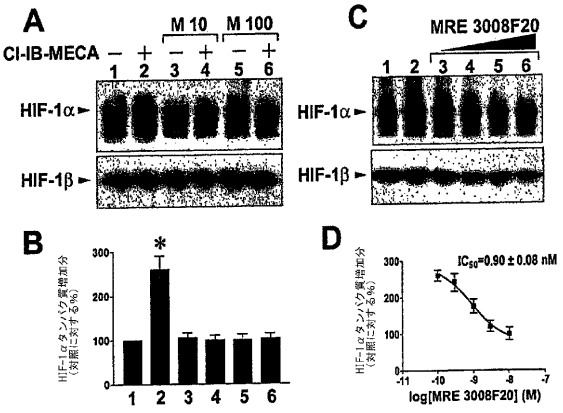
【図５】

図５



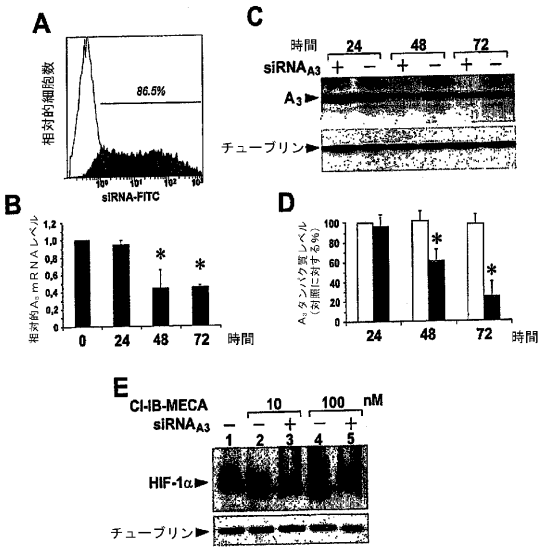
【図６】

図６



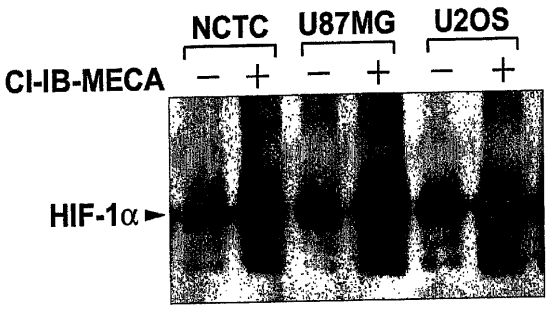
【図７】

図７



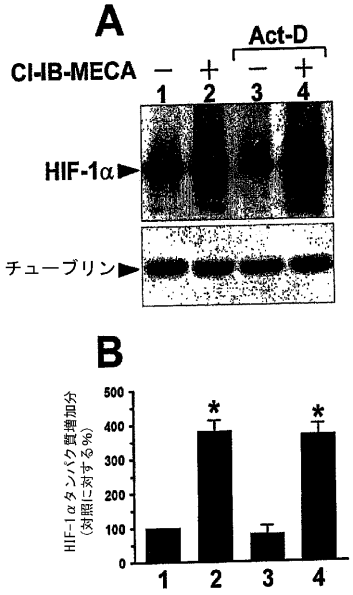
【図８】

図８



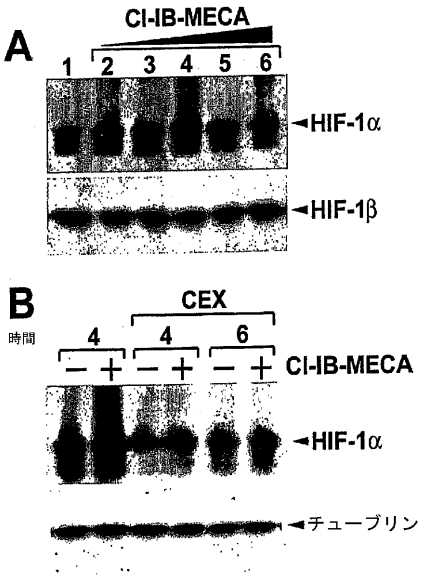
【図９】

図９



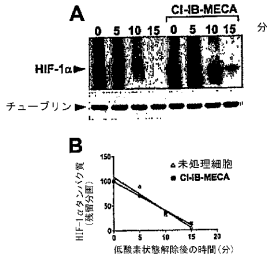
【図１０】

図１０



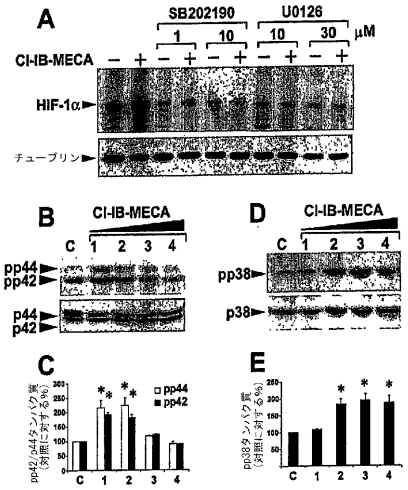
【図１１】

図１１



【図１２】

図１２



【配列表】

2008520747000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/42552

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC: A61K 31/7076(2006.01);A01N 43/28(2006.01)

USPC: 514/46
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 514/46

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6211165 (Liang et al.) 03 April 2001 (03.04.2001)	1, 5-8, 14
X -- Y	US 5573722 (Downey et al.) 12 November 1996 (12.11.1996)	1-8, 11 --- 9, 10, 12, 13
Y	Granger et al., "Pathophysiology of Preeclampsia: Linking Placental Ischemia/Hypoxia with Microvascular Dysfunction" Microcirculation (2002) Vol. 9, pp. 147-160	9, 10
Y	English et al. "Chronic Visceral Ischemia: Symptom-Free Survival after Open Surgical Repair" Vascular and Endovascular Surgery (2004) Vol. 38, No. 6	12, 13
X	WO03/063782 (Cognetix, INC) 7 August 2003 (07.08.2003)	15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 February 2007 (13.02.2007)

Date of mailing of the international search report
06 MAR 2007

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
Shaojia Anna Jiang

Telephone No. ??

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ　9/08	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/08	
Ａ６１Ｐ　43/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00　１１１	
Ａ６１Ｋ　31/7076	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7076	

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

(72)発明者　ジョバンニ　ピアー　バラルディ
イタリア国　フェラーラ　イ－４４１００　ビア・トゥリパーニ　７３
(72)発明者　ステファニア　メリーギ
イタリア国　フェラーラ　イ－４４１００　ビア・デラ・シエーペ　２１
(72)発明者　ステファン　マクレナン
アメリカ合衆国　ノースカロライナ州　２７５１３　カリー　バロメーター・レーン　２０５
(72)発明者　エドワード　レオン
アメリカ合衆国　ノースカロライナ州　２７５１３　カリー　ローズ・スカイ・コート　１１６
(72)発明者　アラン　ムアマン
アメリカ合衆国　ノースカロライナ州　２７７０２　ダラム　スキップウィズ　３

Ｆターム(参考) 4C084 AA17 MA01 NA14 ZA152 ZA362 ZA392 ZA402 ZA422 ZA542 ZC412
4C086 AA01 AA02 EA18 MA01 MA04 NA14 ZA15 ZA36 ZA39 ZA40
ZA42 ZA54 ZC41