

(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2006-508646
(P2006-508646A)

(43) 公表日 平成18年3月16日(2006.3.16)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
A 61 K 31/7088 (2006.01)	A 61 K 31/7088	4 B 0 6 3
A 61 K 35/76 (2006.01)	A 61 K 35/76	4 B 0 6 4
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	N 4 B 0 6 5
A 61 K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00	4 C 0 8 1

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-529405 (P2004-529405)	(71) 出願人	505347329 バスキュロスタティン エルエルシー
(86) (22) 出願日	平成15年8月13日 (2003.8.13)		アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 ピッ
(85) 翻訳文提出日	平成17年4月15日 (2005.4.15)		ツバーグ シエンリー ロード 404
(86) 國際出願番号	PCT/US2003/025473	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(87) 國際公開番号	W02004/016151	(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(87) 國際公開日	平成16年2月26日 (2004.2.26)	(72) 発明者	スチュアート アンドリュー エフ. アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 ピッ
(31) 優先権主張番号	60/403,805		ツバーグ シエンリー ロード 404
(32) 優先日	平成14年8月15日 (2002.8.15)	(72) 発明者	フィアッチーテーシュ ナタリー アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 ピッ
(33) 優先権主張国	米国(US)		ツバーグ シエンリー ロード 404

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PTHrP由來の平滑筋増殖モジュレータ

(57) 【要約】

本発明は、平滑筋細胞関連疾患の治療のため、またその細胞の活性化および増殖を阻害するための、副甲状腺ホルモンに関連したタンパク質変異体の使用に関する。本方法を多様な組織において使用して、平滑筋の活性化（これは平滑筋の過剰な増殖をもたらす）によって発現する疾病および疾患に関する治療および予防的な軽減効果をもたらすことができる。例えば、脈管構造において使用された場合、本発明の方法を用いて血管形成後の再狭窄を治療することができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

副甲状腺ホルモン関連タンパク質変異体のポリペプチドを含む化合物であり、
(a) 化合物の機能的核移行シグナルが欠失している；
(b) 血管平滑筋細胞における化合物の過剰発現が、該化合物非存在下で観察されるリン酸化された免疫反応性網膜芽細胞腫ポリペプチドレベルと比較して、リン酸化された免疫反応性網膜芽細胞腫ポリペプチドのレベルを低下させる；および
(c) 血管平滑筋細胞における化合物の過剰発現が、該化合物非存在下で観察される免疫反応性p27kip1ポリペプチドレベルと比較して、免疫反応性p27kip1ポリペプチドのレベルを上昇させる
という特徴を有する、化合物。

10

【請求項 2】

単離された核酸をコードする、請求項1記載の化合物。

【請求項 3】

請求項2記載の核酸を含むベクター。

【請求項 4】

核酸分子と動作可能的に連結したプロモーターをさらに含む、請求項3記載のベクター。

【請求項 5】

請求項4記載のベクターを含む細胞。

20

【請求項 6】

請求項4記載のベクターを含むウイルス。

【請求項 7】

アデノウイルスである、請求項6記載のウイルス。

【請求項 8】

請求項1記載の化合物および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項 9】

請求項1記載の化合物と免疫特異的に結合する、抗体またはその断片。

【請求項 10】

モノクローナル抗体である、請求項9記載の抗体。

30

【請求項 11】

ヒト化抗体である、請求項10記載の抗体。

【請求項 12】

請求項11記載の抗体および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項 13】

請求項4記載の核酸分子および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項 14】

請求項6記載のウイルスを含む、薬学的組成物。

【請求項 15】

化合物を調製する方法であり、以下の工程を含む方法：

40

(a) 化合物の発現を提供するような条件下で、核酸を含む請求項5記載の細胞を培養する工程；および

(b) 発現された化合物を回収する工程。

【請求項 16】

試料中の請求項1記載の化合物の存在または量を決定する方法であり、以下の工程を含む方法：

(a) 試料を提供する工程；

(b) 化合物に免疫特異的に結合する抗体を、試料に接触させる工程；および

(c) 化合物に結合した抗体の存在または量を決定し、それにより試料中の化合物の存在または量を決定する工程。

50

【請求項 17】

試料中の請求項2記載の核酸分子の存在または量を決定する方法であり、以下の工程を含む方法：

- (a) 試料を提供する工程；
- (b) 核酸分子に結合するプローブを、試料に接触させる工程；および
- (c) 核酸分子に結合したプローブの存在または量を決定し、それにより試料中の核酸分子の存在または量を決定する工程。

【請求項 18】

請求項1記載の化合物に結合する化合物を同定する方法であり、以下の工程を含む方法：

- (a) 化合物と請求項1記載の化合物とを接触させる工程；および
- (b) 化合物が請求項1記載の化合物に結合するか否かを決定する工程。

【請求項 19】

平滑筋細胞増殖関連疾患を治療または予防する方法であり、以下の工程を含む方法：被験者における平滑筋細胞増殖関連疾患の治療または予防のために十分な量の、請求項1記載の化合物を、このような治療または予防の望まれる被験者に投与する工程。

【請求項 20】

平滑筋細胞増殖関連疾患が、子宮線維腫 (uterine fibroid tumor)、前立腺肥大症、気管支喘息、肝硬変における門脈圧亢進症、肺動脈高血圧、全身性動脈性高血圧、アテローム性動脈硬化症、膀胱疾患、および血管形成後の血管の再狭窄からなる群より選択される、請求項19記載の方法。

【請求項 21】

被験者がヒトである、請求項19記載の方法。

【請求項 22】

平滑筋細胞増殖関連疾患を治療または予防する方法であり、以下の工程を含む方法：被験者における平滑筋細胞増殖関連疾患の治療または予防のために十分な量の、請求項4記載の核酸を、このような治療または予防の望まれる被験者に投与する工程。

【請求項 23】

平滑筋細胞増殖関連疾患が、子宮線維腫、前立腺肥大症、気管支喘息、肝硬変における門脈圧亢進症、肺動脈高血圧、全身性動脈性高血圧、アテローム性動脈硬化症、膀胱疾患、および血管形成後の血管の再狭窄からなる群より選択される、請求項22記載の方法。

【請求項 24】

被験者がヒトである、請求項23記載の方法。

【請求項 25】

一つまたは複数の容器中に請求項8記載の薬学的組成物およびその内容物の使用説明書を含む、キット。

【請求項 26】

一つまたは複数の容器中に請求項12記載の薬学的組成物およびその内容物の使用説明書を含む、キット。

【請求項 27】

一つまたは複数の容器中に請求項13記載の薬学的組成物およびその内容物の使用説明書を含む、キット。

【請求項 28】

一つまたは複数の容器中に請求項14記載の薬学的組成物およびその内容物の使用説明書を含む、キット。

【請求項 29】

哺乳動物における病理的状態を治療する方法であり、以下の工程を含む方法：病理的状態を緩和するのに十分な量の化合物を哺乳動物に投与する工程であって、化合物が、請求項1記載の化合物と少なくとも90%同一なアミノ酸配列を有する化合物である、工程。

【請求項 3 0】

哺乳動物における病理的状態を治療する方法であり、以下の工程を含む方法：
病理的状態を緩和するのに十分な量の、請求項12記載の抗体を哺乳動物に投与する工程。

【請求項 3 1】

哺乳動物における病理的状態を治療する方法であり、以下の工程を含む方法：
病理的状態を緩和するのに十分な量の、請求項6記載のウィルスを哺乳動物に投与する工程。

【請求項 3 2】

哺乳動物における平滑筋細胞増殖関連疾患を治療する方法であり、以下の工程を含む方法：

請求項1記載の化合物の発現または活性化を調整する少なくとも一つの化合物を哺乳動物に投与する工程。

【請求項 3 3】

平滑筋細胞増殖関連疾患が、子宮線維腫(uterine fibroid tumor)、前立腺肥大症、
気管支喘息、肝硬変における門脈圧亢進症、肺動脈高血圧、全身性動脈性高血圧、アテローム性動脈硬化症、膀胱疾患、および血管形成後の血管の再狭窄からなる群より選択され
る、請求項32記載の方法。

【請求項 3 4】

平滑筋細胞増殖関連疾患の治療に使用される、請求項1記載の化合物。

【請求項 3 5】

平滑筋細胞増殖関連疾患を治療する薬剤を製造するための化合物の使用であり、化合物
が請求項1記載の化合物である、使用。

【請求項 3 6】

請求項1記載の化合物に結合する化合物を同定する方法であり、以下の工程を含む方法
：

- (a) 候補化合物を提供する工程；
- (b) 候補化合物と請求項1記載の化合物の間に複合体が形成されるような条件下で、候補
化合物と請求項1記載の化合物を接触させる工程；
- (c) 複合体の共結晶が形成されるような条件下で複合体をインキュベーションする工程
；
- (d) X線回折によって複合体の構造原子座標を決定する工程；および
- (e) 複合体の構造をモデリングして、候補化合物の請求項1記載の化合物への結合を決定
する工程。

【請求項 3 7】

化合物および請求項36記載の方法によって調製された被験化合物の、結晶調製物。

【請求項 3 8】

請求項1記載の化合物に結合する化合物を同定する方法であり、以下の工程を含む方法
：

- (a) 候補化合物を提供する工程；
- (b) 候補化合物と請求項1記載の化合物の間に複合体が形成されるような条件下で、候補
化合物と請求項1記載の化合物を接触させる工程；
- (c) 核磁気共鳴分析法または質量分析法により複合体の結合または構造を決定する工程
；および任意で
- (d) 複合体の構造をモデリングする工程。

【請求項 3 9】

請求項1記載の化合物、請求項2記載の化合物、請求項4記載の化合物、請求項6記載の
化合物、および請求項9記載の化合物からなる群より選択される化合物でコーティングされ
た表面を含む、装置。

【請求項 4 0】

パッチ、ステント、およびカテーテルからなる群より選択される、請求項39記載の装置

10

20

30

40

50

【請求項 4 1】

哺乳動物における平滑筋細胞増殖関連疾患を治療する方法であり、被験者に請求項39記載の装置を接触させる工程を含む方法。

【請求項 4 2】

平滑筋細胞増殖関連疾患が、子宮線維腫 (uterine fibroid tumor)、前立腺肥大症、気管支喘息、肝硬変における門脈圧亢進症、肺動脈高血圧、全身性動脈性高血圧、アテローム性動脈硬化症、膀胱疾患、および血管形成後の血管の再狭窄からなる群より選択される、請求項41記載の方法。

【請求項 4 3】

被験者がヒトである、請求項41記載の方法。

【請求項 4 4】

副甲状腺ホルモン関連タンパク質変異体のポリペプチドを含む化合物であり、機能的核移行シグナルを有しあつPThrP (112-139) 領域中に一つまたは複数の改変アミノ酸を有する、化合物。

【請求項 4 5】

PThrP (112-139) 領域中のアミノ酸の改変が、欠失、置換、および誘導体化からなる群より選択される、請求項44記載の化合物。

【請求項 4 6】

副甲状腺ホルモン関連タンパク質変異体ペプチドを含む化合物であり、機能的核移行シグナルを有しあつ配列番号：5、6、7、8、9、10、11、および12からなる群より選択されるポリペプチドを有する、化合物。

【請求項 4 7】

請求項44記載の化合物をコードする、単離された核酸。

【請求項 4 8】

請求項47記載の核酸を含むベクター。

【請求項 4 9】

核酸分子に動作可能的に連結したプロモーターをさらに含む、請求項48記載のベクター。

【請求項 5 0】

請求項49記載のベクターを含む細胞。

【請求項 5 1】

請求項49記載のベクターを含むウィルス。

【請求項 5 2】

アデノウィルスである、請求項51記載のウィルス。

【請求項 5 3】

請求項44記載の化合物および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項 5 4】

請求項44記載の化合物に免疫特異的に結合する抗体、またはその断片。

【請求項 5 5】

モノクローナル抗体である、請求項54記載の抗体。

【請求項 5 6】

ヒト化抗体である、請求項55記載の抗体。

【請求項 5 7】

請求項56記載の抗体および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項 5 8】

請求項49記載の核酸分子および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項 5 9】

請求項52記載のウィルスを含む、薬学的組成物。

【請求項 6 0】

10

20

30

40

50

化合物を調製する方法であり、以下の工程を含む方法：

(a) 化合物の発現を提供するような条件下で、核酸を含む請求項47記載の細胞を培養する工程；および

(b) 発現された化合物を回収する工程。

【請求項 6 1】

試料中の請求項44記載の化合物の存在または量を決定する方法であり、以下の工程を含む方法：

(a) 試料を提供する工程；

(b) 化合物に免疫特異的に結合する抗体を、試料に接触させる工程；および

(c) 化合物に結合した抗体の存在または量を決定し、それにより試料中の化合物の存在または量を決定する工程。 10

【請求項 6 2】

試料中の請求項47記載の核酸分子の存在または量を決定する方法であり、以下の工程を含む方法：

(a) 試料を提供する工程；

(b) 核酸分子に結合するプローブを、試料に接触させる工程；および

(c) 核酸分子に結合したプローブの存在または量を決定し、それにより試料中の核酸分子の存在または量を決定する工程。

【請求項 6 3】

請求項44記載の化合物に結合する化合物を同定する方法であり、以下の工程を含む方法 20
：

(a) 化合物と請求項44記載の化合物とを接触させる工程；および

(b) 化合物が請求項44記載の化合物に結合するか否かを決定する工程。

【請求項 6 4】

平滑筋細胞増殖関連疾患を治療または予防する方法であり、以下の工程を含む方法：
被験者における平滑筋細胞増殖関連疾患の治療または予防のために十分な量の、請求項44
記載の化合物を、このような治療または予防の望まれる被験者に投与する工程。

【請求項 6 5】

平滑筋細胞増殖関連疾患が、子宮線維腫 (uterine fibroid tumor)、前立腺肥大症、
気管支喘息、肝硬変における門脈圧亢進症、肺動脈高血圧、全身性動脈性高血圧、アテロ
ーム性動脈硬化症、膀胱疾患、および血管形成後の血管の再狭窄からなる群より選択され
る、請求項64記載の方法。 30

【請求項 6 6】

被験者がヒトである、請求項64記載の方法。

【請求項 6 7】

平滑筋細胞増殖関連疾患を治療または予防する方法であり、以下の工程を含む方法：
被験者における平滑筋細胞増殖関連疾患の治療または予防のために十分な量の、請求項49
記載の核酸を、このような治療または予防の望まれる被験者に投与する工程。

【請求項 6 8】

平滑筋細胞増殖関連疾患が、子宮線維腫 (uterine fibroid tumor)、前立腺肥大症、
気管支喘息、肝硬変における門脈圧亢進症、肺動脈高血圧、全身性動脈性高血圧、アテロ
ーム性動脈硬化症、膀胱疾患、および血管形成後の血管の再狭窄からなる群より選択され
る、請求項67記載の方法。 40

【請求項 6 9】

被験者がヒトである、請求項68記載の方法。

【請求項 7 0】

一つまたは複数の容器中に請求項53記載の薬学的組成物およびその内容物の使用説明書
を含む、キット。

【請求項 7 1】

一つまたは複数の容器中に請求項57記載の薬学的組成物およびその内容物の使用説明書

50

を含む、キット。

【請求項 7 2】

一つまたは複数の容器中に請求項58記載の薬学的組成物およびその内容物の使用説明書を含む、キット。

【請求項 7 3】

一つまたは複数の容器中に請求項59記載の薬学的組成物およびその内容物の使用説明書を含む、キット。

【請求項 7 4】

哺乳動物における病理的状態を治療する方法であり、以下の工程を含む方法：
病理的状態を緩和するのに十分な量の化合物を哺乳動物に投与する工程であって、化合物が、請求項44記載の化合物と少なくとも90%同一なアミノ酸配列を有する化合物である、工程。 10

【請求項 7 5】

哺乳動物における病理的状態を治療する方法であり、以下の工程を含む方法：
病理的状態を緩和するのに十分な量の、請求項54記載の抗体を哺乳動物に投与する工程。

【請求項 7 6】

哺乳動物における病理的状態を治療する方法であり、以下の工程を含む方法：
病理的状態を緩和するのに十分な量の、請求項51記載のウイルスを哺乳動物に投与する工程。

【請求項 7 7】

哺乳動物における平滑筋細胞増殖関連疾患を治療する方法であり、以下の工程を含む方法：

請求項44記載の化合物の発現または活性化を調整する少なくとも一つの化合物を哺乳動物に投与する工程。

【請求項 7 8】

平滑筋細胞増殖関連疾患が、子宮線維腫(uterine fibroid tumor)、前立腺肥大症、気管支喘息、肝硬変における門脈圧亢進症、肺動脈高血圧、動脈性高血圧、アテローム性動脈硬化症、膀胱疾患、および血管形成後の血管の再狭窄からなる群より選択される、請求項77記載の方法。 30

【請求項 7 9】

平滑筋細胞増殖関連疾患の治療に使用される、請求項44記載の化合物。

【請求項 8 0】

平滑筋細胞増殖関連疾患を治療する薬剤を製造するための化合物の使用であり、化合物が請求項44記載の化合物である、使用。

【請求項 8 1】

請求項44記載の化合物に結合する化合物を同定する方法であり、以下の工程を含む方法：

- (a) 候補化合物を提供する工程；
- (b) 候補化合物と請求項44記載の化合物の間に複合体が形成されるような条件下で、候補化合物と請求項44記載の化合物を接触させる工程；
- (c) 複合体の共結晶が形成されるような条件下で複合体をインキュベーションする工程；
- (d) X線回折によって複合体の構造原子座標を決定する工程；および
- (e) 複合体の構造をモデリングして、候補化合物の請求項44記載の化合物への結合を決定する工程。 40

【請求項 8 2】

化合物および請求項81記載の方法によって調製された被験化合物の、結晶調製物。

【請求項 8 3】

請求項44記載の化合物に結合する化合物を同定する方法であり、以下の工程を含む方法：

10

20

30

40

50

- (a) 候補化合物を提供する工程；
- (b) 候補化合物と請求項44記載の化合物の間に複合体が形成されるような条件下で、候補化合物と請求項44記載の化合物を接触させる工程；
- (c) 核磁気共鳴分析法または質量分析法により複合体の結合または構造を決定する工程；および任意で
- (d) 複合体の構造をモデリングする工程。

【請求項84】

請求項44記載の化合物、請求項46記載の化合物、請求項47記載の化合物、請求項48記載の化合物、請求項51記載の化合物、および請求項54記載の化合物からなる群より選択される化合物でコーティングされた表面を含む、装置。10

【請求項85】

パッチ、ステント、およびカテーテルからなる群より選択される、請求項84記載の装置。10

【請求項86】

哺乳動物における平滑筋細胞増殖関連疾患を治療する方法であり、被験者に請求項84記載の装置を接触させる工程を含む方法。10

【請求項87】

平滑筋細胞増殖関連疾患が、子宮線維腫(uterine fibroid tumor)、前立腺肥大症、気管支喘息、肝硬変における門脈圧亢進症、肺動脈高血圧、全身性動脈性高血圧、アテローム性動脈硬化症、膀胱疾患、および血管形成後の血管の再狭窄からなる群より選択される、請求項86記載の方法。20

【請求項88】

被験者がヒトである、請求項86記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

連邦政府後援の研究における政府の権利に関する記述

本発明の開発に関わる研究は、アメリカ合衆国、国立衛生研究所からの助成金NIDDK R-01 55081号により、全体的または部分的に援助されている。従ってアメリカ合衆国政府は、当出願の権利を一部所有するものである。30

【背景技術】

【0002】

発明の背景

平滑筋細胞の表現型の柔軟性により、この筋肉細胞系統が、尿生殖器および消化管に加え、動脈壁、子宮、呼吸器、肝臓を含む多数の組織における様々な機能を補助することが可能になる。従って、過剰な細胞増殖の原因となる平滑筋細胞の活性化は、多種多様な病理的状態を引き起こす原因となり得る。このような状態には、子宮線維腫、前立腺肥大症、気管支喘息、肝硬変における門脈圧亢進症、膀胱疾患、肺高血圧および全身性動脈性高血圧、アテローム性動脈硬化、ならびに血管形成後の血管の再狭窄、冠状動脈性心臓疾患、血栓症、心筋梗塞、脳梗塞、腸および子宮の平滑筋腫および平滑筋肉腫などの平滑筋新生物、ならびに代用血管および移植器官の閉塞性疾患が含まれる。40

【0003】

アテローム硬化性の冠状動脈性心臓疾患および末梢血管の障害は、先進国の住民たちに對し、健康および経済面で莫大な負担を課している。そして、肥満と糖尿病の世界的な増加、および先進国人口の高齢化により、この問題がさらに深刻化することが広く予想される。冠動脈疾患の治療および心筋梗塞の予防の支柱の一つは冠動脈血管形成術であり、末梢血管、腎血管、および頸動脈組織を含む他の動脈系での当技術の一般的な適用が進んでいる(Klugherz et al., Nat. Biotechnol. 18(11): 1181 (2000); Morice et al., N. Engl. J. Med. 346(23): 1773 (2002); Schnyder et al., N. Engl. J. Med. 345(22): 1593 (2001))。血管形成術は極めて効果的ではあるが、現在は初期および後期の両方の機50

能不全により制限されている。冠状動脈および末梢血管の疾患の血管形成術を用いた治療は増加している。血管形成術を受けた患者の約20-50%で、再狭窄による後期機能不全が起こっている。後期機能不全は一般的に、動脈平滑筋細胞の増殖、および動脈壁中膜の平滑筋層から、内腔への動脈平滑筋細胞の移動により生じる現象である、動脈の再狭窄に起因する。動脈平滑筋細胞は内腔に、新生内膜と呼ばれる新しい動脈層を形成する。新生内膜は、血管平滑筋(VSM)細胞と、それらにより分泌された細胞外マトリックスから成り、時間とともに膨張して最終的に血管形成された動脈の内腔を狭める。

【0004】

改変された平滑筋増殖により生じる疾患を予防および治療する方法が、当技術分野において引き続き必要とされている。

10

【発明の開示】

【0005】

発明の要約

本発明は、改変された平滑筋増殖を特徴とする病状を有する被験者の、予防および治療上の処置の方法に加え、平滑筋細胞の活性化および平滑筋の増殖をアンタゴナイズする特性を有する平滑筋細胞調節(SMCM)組成に関連している。さらに詳しくは、組成は、副甲状腺ホルモン関連タンパク質変異体に関連している。

【0006】

ある局面において、本発明は、副甲状腺ホルモン関連タンパク質変異体のポリペプチドを含むSMCM化合物を含んでおり、ここで化合物は、(a)機能的核移行シグナルを欠いており；(b)血管平滑筋細胞における化合物の過剰発現により、化合物非存在下で観察される免疫反応性網膜芽細胞腫ポリペプチドのリン酸化レベルと比較して、免疫反応性網膜芽細胞腫ポリペプチドのリン酸化レベルが低下し；かつ(c)血管平滑筋細胞における化合物の過剰発現により、化合物非存在下で観察される免疫反応性p27kip1ポリペプチドのレベルと比較して、免疫反応性p27kip1ポリペプチドのレベルが増加し、これらのSMCM化合物をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。また、変異体、類似体、同族体、またはポリペプチドおよびポリヌクレオチド配列の断片、およびそれらを組み込んだ小分子も含まれる。

20

【0007】

別の局面において、本発明は、副甲状腺ホルモン関連タンパク質変異体のポリペプチドを含むSMCM化合物を含んでおり、ここで化合物は、機能的核移行シグナルを有し、またPTHRP(112-139)領域において一つまたは複数の改変アミノ酸を有している。一つの態様において、PTHRP(112-139)領域におけるアミノ酸の改変は、欠失、置換、および誘導体化から成る群から選択され、さらにこのようなSMCM化合物をコードするポリヌクレオチドを含む。変異体、類似体、同族体、またはポリペプチドおよびポリヌクレオチド配列の断片、およびそれらを組み込んだ小分子も含まれる。

30

【0008】

別の態様において、SMCM変異体ポリペプチドは、機能的核移行シグナル、および配列番号：5、6、7、8、9、10、11、および12から成る群から選択されたポリペプチドを有している。

40

【0009】

別の態様において、本発明は、SMCM化合物をコードする、単離された核酸分子を含む。さらに別の態様において、単離された核酸はベクターであり、またベクターは、核酸に動作可能的に連結するプロモーター配列を任意的に含み、ここでプロモーターにより核酸分子の発現が起こる。一つの態様において、プロモーターは誘発性である。さらに別の態様において、ベクターは、原核細胞や真核細胞など、望ましくは哺乳動物の細胞、またはさらに望ましくはヒト細胞などの、細胞に変換される。またさらに別の態様において、ベクターは、哺乳動物の細胞に感染力があり、ウィルスに感染した動物におけるSMCM化合物ポリペプチド発現の原因となる、ウィルスベクターである。別の態様において、ウィルスはアデノウィルスである。

50

【0010】

別の局面において、本発明は、SMCM化合物、SMCM化合物をコードするポリヌクレオチド、SMCM化合物をコードするポリヌクレオチドを含むウィルス、または抗体、免疫特異的にSMCM化合物に結合する抗体の断片、および薬学的に許容される担体を有する薬学的組成物を含む。

【0011】

一つの局面において、本発明は、一つまたは複数の容器に、薬学的SMCM組成、SMCM化合物をコードするポリヌクレオチド、免疫特異的にSMCM化合物に結合する抗体、SMCM化合物をコードするポリヌクレオチドを含むウィルス、および内容物の使用説明書が入っているキットを含む。

10

【0012】

さらに別の局面において、本発明は、SMCM化合物への抗体、または免疫特異的にSMCM化合物ポリペプチドに結合する抗体の断片を含む。一つの態様において、抗体は、Fab、(Fab)2、FvまたはFc断片のような、しかしこれらに限定されない抗体の断片である。別の態様において、抗体またはその断片はモノクローナル抗体である。また別の態様において、抗体またはその断片はヒト化抗体である。さらに別の態様において、本発明は、抗体またはSMCM化合物に免疫特異的な抗体断片、および薬学的に許容される担体を含む。またさらに別の態様において、本発明は、SMCM化合物ポリペプチド、またはSMCM化合物の核酸配列を有する薬学的組成物、抗体または抗体断片、および薬学的に許容される担体を含む。

【0013】

さらに別の局面において、本発明は、SMCM化合物の調製方法、すなわちSMCM化合物の発現に備えた状態において、SMCM化合物をコードする核酸を含む細胞を培養する段階、および発現されたSMCM化合物を回収する段階を有する方法を含む。

20

【0014】

さらに別の局面において、本発明は、試料中のSMCM化合物の存在またはその量を決定する方法、すなわち試料を提供し、その試料に抗体またはSMCM化合物と免疫特異的に結合する抗体断片を接触させ、SMCM化合物に結びついた抗体の存在、またはその量を決定し、それにより試料中のSMCM化合物の存在または量を決定する段階を有する方法を含む。

【0015】

またさらに別の局面において、本発明は、試料中のSMCM化合物をコードする核酸分子の存在またはその量を決定する方法、すなわち試料を提供し、その試料に核酸分子と混成される核酸プローブを接触させ、核酸分子と混成されたプローブの存在または量を決定し、それにより試料中の核酸分子の存在またはその量を決定する段階を有する方法を含む。

30

【0016】

別の局面において、本発明は、SMCM化合物に結合する候補化合物の同定方法、すなわち化合物にSMCM化合物を接触させ、候補化合物がSMCM化合物と結合するかどうかを決定する段階を有する方法を含む。

【0017】

一つの局面において、本発明は、平滑筋増殖関連疾患を治療または予防する方法、すなわち、被験者における平滑筋増殖関連疾患の治療または予防のために十分な量のSMCM化合物を、治療または予防の望まれる被験者に投与することを含む方法を含む。一つの態様において、平滑筋増殖関連疾患は、子宮線維腫、前立腺肥大症、気管支喘息、肝硬変における門脈圧亢進症、肺動脈高血圧、全身性動脈性高血圧、アテローム性動脈硬化症、膀胱疾患、および血管形成後の血管の再狭窄から成る群から選択される。さらに別の態様において、本発明は、被験者における組織分化要因に関連した疾患の治療または予防のために十分な量の、SMCMをコードするポリヌクレオチドを、このような治療または予防の望まれる被験者に投与することによって、平滑筋増殖関連疾患を治療または予防する方法を含む。一つの態様において、被験者はヒトである。別の態様において、被験者は動物である。

40

【0018】

さらに別の局面において、本発明は、哺乳動物における病理的状態を治療する方法、す

50

なわち病理的状態を緩和するのに十分な量のSMCM化合物を哺乳動物に投与することから成る方法を含む。ここで化合物は、SMCM化合物と少なくとも90%同一なアミノ酸配列を有する。

【0019】

別の局面において、本発明は、哺乳動物における病理的状態を治療する方法、すなわち病理的状態を緩和するのに十分な量の、抗体もしくはSMCM化合物に免疫特異性の抗体の断片、またはSMCM化合物をコードするポリヌクレオチドを含むウイルスを、哺乳動物に投与することから成る方法を含む。一つの態様において、本発明は、哺乳動物における平滑筋増殖関連疾患を治療する方法、すなわちSMCM化合物の発現または活性化を調整する少なくとも一つの化合物を哺乳動物に投与することを含む方法を含む。さらに別の態様において、平滑筋増殖関連疾患は、子宮線維腫、前立腺肥大症、気管支喘息、肝硬変における門脈圧亢進症、肺動脈高血圧、全身性動脈性高血圧、アテローム性動脈硬化症、膀胱疾患、および血管形成後の血管の再狭窄から成る群から選択される。

【0020】

さらに別の局面において、本発明は平滑筋細胞増殖関連疾患の治療に使用される化合物を提供し、ここで化合物はSMCM化合物である。別の局面において、本発明は平滑筋細胞増殖関連疾患の医薬用薬剤製造における化合物の使用法を提供し、ここで化合物はSMCM化合物である。別の局面において、本発明は哺乳動物における病理的状態の治疗方法、すなわち病理的状態を緩和するのに十分な量の、SMCMをコードするポリヌクレオチドを含むウイルスを哺乳動物に投与することから成る方法を提供する。

【0021】

別の局面において、本発明は、SMCM化合物と結合する候補化合物を同定する方法、すなわち候補化合物を提供し、被験化合物とSMCM化合物との間に複合体が形成されるような条件下で候補化合物にSMCM化合物を接触させ、複合体の共結晶が形成されるような条件下で複合体をインキュベーションし、複合体の構造原子座標をX線回折により決定し、かつ複合体の模型を作り候補化合物のSMCM化合物への結合を決定する段階を有する方法を含む。一つの態様において、本発明は候補化合物とSMCM化合物の結晶調製物を含む。別の態様において、複合体は結晶化はされないが、核磁気分光または質量分析にかけられ、複合体の結合が決定される。

【0022】

別の局面において、本発明は、SMCM化合物、SMCM化合物をコードするポリヌクレオチド、SMCM化合物をコードするポリヌクレオチドを含むウイルス、およびSMCM化合物に免疫特異的に結合する抗体またはその断片からなる群より選択される化合物でコーティングされた表面を含む装置を提供する。一つの態様において、装置は、パッチ、ステント、およびカテーテルからなる群より選択される。別の局面において、本発明は哺乳動物における平滑筋細胞の増殖に関連する疾患を治療する方法、すなわちSMCM化合物、SMCM化合物をコードするポリヌクレオチド、SMCM化合物をコードするポリヌクレオチドを含むウイルス化合物、およびSMCM化合物に免疫特異的に結合する抗体またはその断片からなる群より選択される物質でコーティングされた表面を含む装置に、被験者を接触させることを含む方法を提供する。別の態様において、平滑筋細胞増殖関連疾患は、子宮線維腫、前立腺肥大症、気管支喘息、肝硬変における門脈圧亢進症、肺動脈高血圧、全身性動脈性高血圧、アテローム性動脈硬化症、膀胱疾患および血管形成後の血管の再狭窄からなる群より選択される。別の態様において、被験者はヒトである。

【0023】

発明の詳細な説明

I. 定義

「副甲状腺ホルモン関連タンパク質」(PThrP)という用語は、合成または組み換えPThrPに加え、天然に存在するPThrPを含んでいる。さらに「副甲状腺ホルモン関連タンパク質」という用語は、対立遺伝子の変異体、種の変異体、および保存アミノ酸置換の変異体を含む。この用語はPThrP様の生物活性を有したペプチド類似薬の小分子を含むPThrPの断

10

20

30

40

50

片の他に、全長のPThrPをも指す。PThrPには、ヒトPThrP(hPThrP)、ウシPThrP(bPThrP)、およびラットPThrP(rPThrP)が含まれるが、これらに限定されない。

【0024】

本明細書で使用される「塩基性アミノ酸」とは、側鎖pK値が7より大きい親水性アミノ酸のことをいう。塩基性アミノ酸は通常、ヒドロニウムイオンの関係から、生理的pHで、プラス帯電した側鎖を有する。遺伝的にコードされた塩基性アミノ酸の例には、アルギニン、リジンおよびヒスチジンが含まれる。また遺伝的にコードされていない塩基性アミノ酸の例には、非環式アミノ酸であるオルニチン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノ酪酸およびホモアルギニンが含まれる。

【0025】

本明細書で使用される「被験者」とは、望ましくは、ヒトなどの哺乳動物であり、また家畜(例えばイヌ、ネコなど)、農業用の家畜(例えばウシ、ヒツジ、ブタ、ウマなど)および実験動物(例えばラット、マウス、モルモットなど)であることもある。

【0026】

本明細書で使用される、化合物の「有効量」とは、目的とする治療および/または予防効果を達成するのに十分な量、例えば、上述のTGF- β スーパーファミリーポリペプチドに関連した疾病などの、治療を受ける疾病に関連した症状を予防するまたは軽減することのできる量をいう。被験者に投与される化合物の量は、疾病の種類および重症度、ならびに全身の健康状態、年齢、性別、体重および薬に対する耐性などの個々の性質による。これはまた疾病の段階、重症度、および種類にもよる。熟練した技術者であれば、これらの、またその他の要因に基づいて適切な用量を決定することができる。典型的には、治療または予防効果をあげるのに十分な本発明のSMCM化合物、または本発明のSMCM化合物をコードするポリヌクレオチドの有効量は、体重1キロにつき1日約0.000001 mgから、体重1キロにつき1日約10,000 mgである。望ましくは、用量の範囲は、体重1キロにつき1日約0.0001 mgから、体重1キロにつき1日約100 mgである。典型的には、PThrPまたは本発明のSMCM化合物をコードするポリヌクレオチド構築物を含む、治療または予防効果をあげるのに十分なウィルス性の担体(たとえばアデノウィルス)の有効量が、1 pfu/mlから 1×10^{14} pfu/mlの範囲の濃度で投与される。本発明の別の態様において、治療または予防効果をあげるウィルス性の担体の有効量が、1 pfu/mlから 1×10^{14} pfu/mlの範囲の濃度で投与される。また本発明の化合物を、それぞれの組み合わせ、または一つまたは複数の他の治療用化合物と組み合わせて投与することもできる。

【0027】

本明細書で使用される「変異体」という用語は、本発明の化合物とは異なるが、それらの本質的な特性を保持した化合物を指す。これの非限定的な例として、ポリヌクレオチド、または一般に変性変異体として知られている対照化合物に対し、保存的置換を有しているポリペプチド化合物がある。変異体の別の非限定的な例として、構造的には異なるが、例えばポリペプチド化合物のN-末端伸長、C-末端伸長、または切断など、本発明の化合物と同じ活性領域を有する化合物がある。通常、変異体は本発明の化合物と総体的に非常に類似しており、多くの領域において同一である。従って、変異体は、コード領域、非コード領域の交互、またはその両方の変更を含む。

【0028】

本明細書で使用される「配列の同一性」という用語は、比較する特定の範囲にわたり、二つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列が残基毎に同一である度合いを意味する。

【0029】

本明細書で使用される「配列の同一性の割合」は、比較領域内にわたる最適に位置合わせされた2つの配列を比較することによって計算される。すなわち、両方の配列に同一の核酸塩基(例えばA、T、C、G、U、または核酸の場合1)が現れている位置の数を決定し、合致している位置数を得、合致した位置数を比較する領域中の位置数(ウインドウサイズ)で割ってその結果に100をかけることにより配列の同一性の割合が得られる。

10

20

30

40

50

【0030】

本明細書で使用される「実質的な同一性」という用語は、ポリヌクレオチド配列の特性を意味し、ここでポリヌクレオチドは、比較領域内にわたる対照配列と比較して少なくとも80パーセントの配列の同一性、望ましくは少なくとも85の同一性、またしばしば90から95パーセントの配列の同一性、より一般的には少なくとも99パーセントの配列の同一性のある配列を有している。

【0031】

本明細書で使用される NLS SMCMおよび NLS PTHrPという用語は、同じものを意味するものと解釈され、「PTHrPのNLS欠失構築物」または「-NLS」という用語と同義に使用されている。図9および図10、またそれらの図の説明に関して使用されているNLSとは、PTHrPのNLS欠失構築物を過剰発現しているA-10細胞を意味する。「ad- NLS」とは、アデノウイルスに発現したPTHrPのNLS欠失構築物のことである。

【0032】

本出願全般に引用されている参考文献は、その全てが、参照として本明細書に組み込まれている。

【0033】

III. 概要

副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTH様アデニル酸シクラーゼ刺激タンパク質 (PTHrP) としても知られる) は、もとは悪性液性高カルシウム血症の原因となる体液要因の研究において同定されたものである (Philbrick et al., *Physiol Rev.* 76 (1): 127 (1996) ; Clemens et al., *Br. J. Pharmacol.* 134 (6): 1113 (2001))。PTHrPは動脈壁で調製され、血管の外傷、バルーンの膨張および血管収縮薬によってアップレギュレートされ、血管平滑筋 (VSM) の弛緩薬として作用する。PTHrPは現在、哺乳動物の発達、カルシウムイオン輸送、細胞増殖および細胞死の制御において様々な役割を果たす、広く分布したパラクリン、オートクリン、イントラクリンおよび内分泌の要因として知られている (Philbrick et al., *Physiol Rev.* 76 (1): 127 (1996) ; Clemens et al., *Br. J. Pharmacol.* 134 (6): 1113 (2001))。PTHrPはまた88-106の領域に核・核小体移行シグナル (NLS) を有している。これらの役割は生存のために重要である。実際に、PTHrP遺伝子の破壊は、マウスの胎児致死の原因となる (KaraplisおよびKronenberg, *Vitam. Horm.* 52: 177 (1996))。PTHrPを調製する組織の一つに動脈壁のVSM細胞がある。

(Ozeki et

al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(4): 565 (1996); Nakayama et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 200(2):1028 (1994); Massfelder and Helwig, *Endocrinology* 140(4): 1507 (1999); Qian et al., *Endocrinology* 140(4): 1826 (1999); Maeda et al., *Endocrinology* 140(4): 1815 (1999); Stuart et al., *Am. J Physiol Endocrinol Metab.* 279(1): E60 (2000))

PTHrPは、全身的に注射された場合、強力な血管拡張剤および血圧降下剤となることがわかっている。

(Ozeki et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(4): 565 (1996); Nakayama et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 200(2):1028 (1994); Massfelder and Helwig, *Endocrinology* 140(4): 1507 (1999); Qian et al., *Endocrinology* 140(4): 1826 (1999); Maeda et al., *Endocrinology* 140(4): 1815 (1999); Stuart et al., *Am. J Physiol Endocrinol Metab.* 279(1): E60 (2000))

さらに、遺伝子組み換えマウスの動脈壁におけるPTHrPまたはその受容体の過剰発現は、一酸化窒素および環状AMPにより介される低血圧の原因となる。

(Ozeki et al., *Arterioscler.*

Thromb. Vasc. Biol. **16**(4): 565 (1996); Nakayama et al., *Biochem Biophys Res Commun.*

200(2):1028 (1994); Massfelder and Helwig, *Endocrinology* **140**(4): 1507 (1999); Qian et al.,

Endocrinology **140**(4): 1826 (1999); Maeda et al., *Endocrinology* **140**(4): 1815 (1999); Stuart

et al., *Am. J Physiol Endocrinol Metab.* **279**(1): E60 (2000))

血管拡張剤としての役割に加え、PTHRPはまたインビオ、インビトロ両方において、動脈平滑筋の増殖速度を調整するものと見られている (Massfelder et al., Proc Natl Acad Sci USA 94 (25) : 13630 (1997) ; de Miguel et al., Endocrinology 142 (9) : 4096 (2001))。血管平滑筋細胞におけるPTHRPの過剰発現により増殖が促進されることがわかっている (Massfelder et al., Proc Natl Acad Sci USA 94 (25) : 13630 (1997) ; de Miguel et al., Endocrinology 142 (9) : 4096 (2001))。一方、PTHRP遺伝子が破壊により、マウス胎児の動脈壁における細胞周期が減速される (Massfelder et al., Proc Natl Acad Sci USA 94 (25) : 13630 (1997) ; de Miguel et al., Endocrinology 142 (9) : 4096 (2001))。

【0034】

この、PTHRPのVSMの増殖を促進する能力は、無傷の核移行シグナル、またはインポーチンを含むNSL (核輸送機構の成分と相互作用する標準的塩基性アミノ酸の古典的な二分配列) (図1) の存在に一部依存する (Massfelder et al., Proc Natl Acad Sci USA 94 (25) : 13630 (1997) ; de Miguel et al., Endocrinology 142 (9) : 4096 (2001) ; Henderson et al., Mol Cell Biol. 15 (8) : 4064 (1995) ; NguyenおよびKaraplis, J. Cell. Biochem. 70 (2) : 193 (1998))。PTHRPのmRNAは2つの代替的翻訳開始点を含み、そのうちの一つは、PTHRPの翻訳の産物を結果として起こる開口分泌とともに分泌経路に方向付ける機能性シグナルペプチドのすぐ上流にある。シグナルペプチド内の二つ目の翻訳開始点を使用することもできる (Henderson et al., Mol Cell Biol. 15 (8) : 4064 (1995) ; NguyenおよびKaraplis, J. Cell. Biochem. 70 (2) : 193 (1998))。この後者の翻訳開始点は、シグナルペプチドを分裂させて、PTHRPの翻訳の産物を細胞質へと方向付け、そこでNLSと協調して、これを核へと方向付ける。その結果、NLSが存在するか否かによって、PTHRPが有糸分裂誘発性または抗有糸分裂誘発性のいずれかを有することが以前に実証されている。野生型 (WT) PTHRの過剰発現は、VSM細胞数、およびPTHRの核内への進入に関連した、トリチウム化したチミジンのVSM培養内への組み込みの著しい増加の原因となる (Massfelder et al., Proc Natl Acad Sci USA 94 (25) : 13630 (1997) ; de Miguel et al., Endocrinology 142 (9) : 4096 (2001))。一方、欠失したNLS (-NSL-PTHR) を含むPTHRの過剰発現は、この反対の結果を引き起こし、VSM細胞における増殖が減速され、またPTHRの核への経路が絶たれることになる (Massfelder et al., Proc Natl Acad Sci USA 94 (25) : 13630 (1997) ; de Miguel et al., Endocrinology 142 (9) : 4096 (2001))。

【0035】

PTHRPは血管形成に対する新生内膜の反応に関わっている。PTHRPが血管形成された冠状動脈の動脈平滑筋でアップレギュレートされることは繰り返し実証されている (Philbrick et al., Physiol Rev. 76 (1) : 127 (1996) ; Clemens et al., Br. J. Pharmacol. 134 (6) : 1113 (2001))。さらにPTHRPは、冠状動脈バイパス移植時に切除されるアテローム硬化性ヒト冠状動脈においてもアップレギュレートされる。

(Ozeki et al.,

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **16**(4): 565 (1996); Nakayama et al., *Biochem Biophys Res Commun.* **200**(2):1028 (1994); Massfelder and Helwig, *Endocrinology* **140**(4): 1507 (1999);

Qian et al., *Endocrinology* **140**(4): 1826 (1999); Maeda et al., *Endocrinology* **140**(4): 1815 (1999); Stuart et al., *Am. J Physiol Endocrinol Metab.* **279**(1): E60 (2000))

さらにまたPThrPは、VSM細胞の増殖を双方向的に調整することができる (Massfelder et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (25) : 13630 (1997) ; de Miguel et al., *Endocrinology* 142 (9) : 4096 (2001))。

10

【0036】

以下の例は例示目的のみのために提供されたものであり、本発明の範囲を限定することを意図したものではない。

【0037】

III. 本発明の組成物

A. 平滑筋細胞調節化合物

本発明は、PThrPの誘導体であり、平滑筋細胞の機能を調節する平滑筋細胞調節 (SMCM) 化合物を提供する。このようなSMCM組成物は、例えば、これらに限定はされないが、網膜芽細胞腫タンパク質 (pRp) のリン酸化、p27kip1タンパク質の調節、および平滑筋細胞の増殖の原因となる、PThrPのPThrP対象分子への結合などの、平滑筋の細胞活性化の阻害が望まれる場合に、被験者に投与されることが適している。子宮線維腫、前立腺肥大症、気管支喘息、肝硬変における門脈圧亢進症、肺および全身性動脈性高血圧、アテローム性動脈硬化症、および血管形成後の血管の再狭窄などの病理的状態は、平滑筋細胞の活性化、および平滑筋細胞の過剰増殖の結果であると考えられる。従って、本発明のSMCM化合物は、例えば子宮線維腫、前立腺肥大症、気管支喘息、肝硬変における門脈圧亢進症、肺および全身性動脈性高血圧、膀胱疾患、アテローム性動脈硬化症、および血管形成後の血管の再狭窄などの、平滑筋の活性化および平滑筋の過剰増殖によって発現する疾患の予防処置、または治療上の処置において有用である。平滑筋の活性化および平滑筋細胞の過剰増殖の部分的アンタゴニストである化合物を提供することも、本発明の目的である。

20

【0038】

本発明のSMCM化合物はPThrPのポリペプチド誘導体で、ヒトおよび動物の多数の腫瘍およびその他の組織により調製された、139以上のアミノ酸から成るタンパク質である。さらに、本発明のSMCM化合物をコードするポリヌクレオチドも、本発明の範囲内に企図される。

30

【0039】

ヒトPThrPの遺伝子構造には、複数のエクソン、およびmRNAの形成中にスプライシングパターンを入れ替える複数の部位が含まれる。139、141、および173のアミノ酸のタンパク質産物が生産され、その他の分子形態は、使用可能な内部の切断部位における組織特異的切断に起因する。ヒトPThrPをコードするヌクレオチド配列 (BT007178[gi : 30583194] ; 配列番号 : 1) を表1に示す。

40

【0040】

【表1】

atgcagcggagactgggtcagcagtggagcgtcgcggtttccctgctgagctacgcg
 gtgcgcctcctcgccccgtcggtggagggtctcagccgcgcctcaaaagagctgtg
 tctgaacatcagtcctccatgacaagggaaagtccatccaagatttacggcgacga
 ttcttccttaccatctgatcgacaaatccacacagctgaaatcagagctacctcg
 gaggtgtcccttaactccaagccctctcccaacacaaagaaccacccgtccgattt
 gggctgtatgatgagggcagatacctaactcaggaaactaacaagggtggagacgtac
 aaagagcagccgctcaagacacctggaaagaaaaagaaaggcaagccggaaacgc
 aaggagcagggaaaagaaaaacggcgaactcgctcgctggtagactctggagtg
 actgggagtgggctagaaggggaccacctgtctgacacccacaacgtcgctggag
 ctgcattcacggtag

10

【0041】

ヒトPTHRPポリペプチドのアミノ酸配列 (AAP35842[gi:30583195])；配列番号：2)を表2に示す。

【0042】

【表2】

MQRRLVQQWSVAVFLLSYAVPSCGRSVEGLSRLKRAVSEHQLLHDKGKSIQDLRRR
 FFLHHHLIAEIHAEIRATSEVSPNSKPSNTPNHPVRFGSDEGRYLTQETNKVETY
 KEQPLKTPG**KKKKGKPGKRKEQEKKKR**TRSAWLDGVTGSGLEGDHLSDTSTSLE
 LDSR

20

【0043】

核移行シグナル (NLS) を含むPTHRPポリペプチドを、細胞核へと方向付けることができる。PTHRP中のNLSは、例えばアルギニンおよびリジンなど、二連の、アミノ酸の複数塩基配列である。ヒトPTHRP中のNLS配列は、表2および表3において太字でハイライトされている。

【0044】

【表3】

KKK**G**KpgKR**K**eqq**K**KK**R**R (配列番号 :3)
 KKK**K**GKPGKR**K**QE**K**KK**R**R (配列番号 :13)

30

【0045】

一つの態様において、本発明のSMCM化合物には、機能性のPTHRP NLS (NLS SMCM) が欠けている。概説すると、これらのSMCM化合物は、NLSの認識によってSMCM発現細胞の核へと方向付けされることがない。変異体、類似体、同族体、または種の同族体など、これらの化合物の断片もまたそれらの変性型と同様、本発明に含まれる。NLS SMCM化合物は、例えば配列番号：3および13など、NLS配列内の任意のアミノ酸残基に一つ、二つ、三つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含むことができる。置換には天然アミノ酸、非天然アミノ酸、d-アミノ酸およびL-アミノ酸、およびそれらの任意の組み合わせが含まれる。NLS SMCM化合物では、配列番号：3および13のNLSの一つまたは複数のアミノ酸が欠失する可能性がある。

【0046】

PTHRP (107-139) のカルボキシ末端配列を表4に示す (配列番号：4；de Miguel et al. , Endocrinology 142: 4096-4105 (2001))。107から111のカルボキシ末端アミノ酸は、種間でよく保存されており、太字でハイライトされている。例えばSer119、Ser130、Thr132、Ser133、およびSer138など、下線のついたセリンおよびトレオニンアミノ酸残基は、例えば、これらに限定はされないが、リン酸化、O-グリコシル化 (例えばN-アセチルガラクトサミンなど)、およびアシル化などの、翻訳後修飾の可能性のある部位である。

40

【0047】

【表4】

TRSAWLDGVTGSGLEGDHLSDTSTSLELDSR (配列番号 :4)

50

【0048】

別の態様において、SMCM化合物はPTHrP(112-139)のカルボキシ末端領域で改変される(C末端SMCM)。変異体、類似体、同族体、または例えば種の同族体などの、これらの化合物の断片もまたこれらの変性型と同様、本発明に含まれている。本発明のC末端SMC M化合物には機能性のNLSが含まれている。C末端SMCM化合物では、PTHrP(112-139)領域内において、一つまたは複数のアミノ酸が欠失する可能性がある。PTHrP(112-139)領域における代表的な欠失には、表5に要約された以下のポリペプチド配列が含まれるが、これらに限定されない。

【0049】

【表5】

10

欠失	配列	配列番号:
Δ112-120	TRSAWLEGDHLSDTSTTSLELDSR	5
Δ121-130	TRSAWLDSGVTGSGTTSLELDSR	6
Δ131-139	TRSAWLDSGVTGSGLEGDHLSDTS	7

【0050】

C末端SMCM化合物は、PTHrP(112-139)領域内の任意のアミノ酸残基に、一つ、二つ、三つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含むことができる。置換には、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、d-アミノ酸およびl-アミノ酸、およびそれらの任意の組み合わせが含まれる。PTHrP(112-139)領域において単基、二基、または三基のアミノ酸置換を伴う代表的なポリペプチドは、表6に要約された以下のポリペプチド配列を含むが、これらに限定されない。置換された残基には下線が引かれている。

20

【0051】

【表6】

30

欠失	配列	配列番号:
AC	TRSAWLDSGVTGAGLEGDHLSDTATAAELDAR	8
A119	TRSAWLDSGVTGAGLEGDHLSDTSTTSLELDSR	9
A130	TRSAWLDSGVTGSGLEGDHLSDTATTSLLELDSR	10
A132	TRSAWLDSGVTGSGLEGDHLSDTSTASLELDSR	11
A138	TRSAWLDSGVTGSGLEGDHLSDTSTTSLELDA<u>R</u>	12

【0052】

上述のように、本発明のSMCM化合物には天然アミノ酸、非天然アミノ酸、d-アミノ酸およびl-アミノ酸、ならびにそれらの組み合わせが含まれる。特定の態様において、本発明の化合物に、遺伝的にコードされていない、一般的に見られるアミノ酸が含まれる。これらの遺伝的にコードされていないアミノ酸は、-アラニン(-Ala)ならびに3-アミノプロピオン酸(Dap)、2,3-ジアミノプロピオン酸(Dpr)、4-アミノ酪酸およびその他；-アミノイソ酪酸(Aib)；-アミノヘキサン酸(Aha)；-アミノ吉草酸(Ava)；N-メチルグリシンまたはサルコシン(MeGly)；オルニチン(Orn)；シトルリン(Cit)；t-ブチルアラニン(t-BuA)；t-ブチルグリシン(t-BuG)；N-メチルイソロイシン(Melle)；フェニルグリシン(Phg)；シクロヘキシリラニン(Cha)；ノルロイシン(Nle)；2-ナフチルアラニン(2-Nal)；4-クロロフェニルアラニン(Phe(4-Cl))；2-フルオロフェニルアラニン(Phe(2-F))；3-フルオロフェニルアラニン(Phe(3-F))；4-フルオロフェニルアラニン(Phe(4-F))；ペニシラミン(Pen)；1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸(Tic)；-2-チエニルアラニン(Thi)；メチオニンスルホキシド(MSO)；ホモアルギニン(hArg)；N-アセチルリジン(AcLys)；2,3-ジアミノ酪酸(Dab)；2,3-ジアミノ酪酸(Db)；p-アミノフェニルアラニン(Phe(pNH₂))；N-メチルバリン(MeVal)；ホモシステイン(hCys)およびホモセリン(hSer)などの、そ

40

50

の他のオメガアミノ酸を含むが、これらに限定されない。SMCM化合物の天然に存在しない変異体は、突然変異誘発技術、または直接的合成によって調製される。本発明のSMCM化合物は、N末端もしくはC末端またはN末端とC末端の両方でキャップ構造が付加される。

【0053】

本発明のSMCM化合物のペグ化、または例えばリジン残基などの反応性の側鎖を含む任意のアミノ酸残基における分岐のような、改変が行われることがある。

【0054】

一つの態様において、SMCM化合物は配列番号：2-12の類似体または同族体を含む。本発明の化合物は、配列番号：2-12と同族で、例えば望ましくは50%以上のアミノ酸の同一性、より望ましくは、75%以上のアミノ酸の同一性、そしてさらに望ましくは90%以上のアミノ酸の同一性を有するものを含む。

【0055】

配列の同一性は、デフォルト設定されたパラメータを内蔵した配列分析ソフトウェア (Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center (ウィスコンシン大学バイオテクノロジーセンター、ジェネティックスコンピュータグループの配列ソフトウェアパッケージ) 、 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705) を使用して測定することができる。

【0056】

対照配列との同一性が100%未満であるポリペプチド配列の場合、同一でない位置は、必ずというわけではないが、望ましくは対照配列の保存的置換である。保存的置換は通常、以下の群内の置換を含む：グリシンおよびアラニン；バリン、イソロイシンおよびロイシン；アスパラギン酸およびグルタミン酸；アスパラギンおよびグルタミン；セリンおよびトレオニン；リジンおよびアルギニン；およびフェニルアラニンおよびチロシン。このように、対応する親配列を有するポリペプチドとの、配列、構造、機能、および抗原性またはその他の機能における同族性が維持されるような状態で変異した配列を有するペプチドが、本発明に含まれる。このような突然変異は、例えば分子特性がおおむね類似しているアミノ酸間での変化などの、アミノ酸の保存的変化を伴った突然変異であり得る。例えば、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンなどの脂肪族基内での交換は保存的であると見なされる。またこれらのうちの一つとグリシンとの置換が保存的であると見なされることもある。その他の保存的交換として、アスパラギン酸塩およびグルタミン酸塩などの脂肪族基内；アスパラギンおよびグルタミンなどのアミド基内；セリンおよびトレオニンなどのヒドロキシル基内；フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンなどの芳香族基内；リジン、アルギニンおよびヒスチジンなどの塩基性基内；およびメチオニンおよびシステインなどの硫黄含有基内での置換が含まれる。メチオニンおよびロイシンなどの基内での置換が保存的と見なされることもある。好適な保存的置換基には、アスパラギン酸塩-グルタミン酸塩；アスパラギン-グルタミン；バリン-ロイシン-イソロイシン；アラニン-バリン；フェニルアラニン-チロシン；およびリジン-アルギニンなどがある。

【0057】

また本発明は、アミノ酸配列全体を長くする挿入を含む、配列の変更を有する化合物をも提供し、ここで化合物は、例えば、これらに限定はされないが、網膜芽細胞腫タンパク質 (pRp) のリン酸化、p27kip1タンパク質の調節、および平滑筋細胞の増殖の原因となる、PThrPのPThrP対象分子への結合などの平滑筋の細胞活性化の阻害のような、適切な平滑筋細胞調節特性を維持する。特定の態様において、NLS領域またはPThrP (112-139) カルボキシ末端領域内の一つまたは複数のアミノ酸残基が、置換される残基と同様の物理的および/または化学的特性を有する、他のアミノ酸残基で置換される。望ましくは、保存アミノ酸置換は、以下により詳しく説明されるように、あるアミノ酸が、同一の指定された分類内に含まれる別のアミノ酸と置換されたものである。挿入、欠失、および置換は、それにより化合物の機能特性が侵されない場合に適切である。改変された化合物の機能性は、以下に説明する、改変された化合物のSMCM様の特性を分析するために設計された、生体外およびインビボのアッセイ法に基づいて分析される。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 8 】

B. SMCM核酸配列

本発明の化合物は、その変性変異体を含むSMCMポリペプチドをコードする、一つまたは複数のポリヌクレオチドを含む。従って、本発明のSMCM化合物をコードする核酸配列と、ストリンジエンシーの低い状態でハイブリダイズすることのできる核酸配列は、本発明の範囲内にあると考えられる。例えば、約20-40塩基の核酸配列の、一般的なプレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、および洗浄手順は以下の通りである：(1) プレハイブリダイゼーション：変性した対象DNAを含むニトロセルロースフィルターを、5×デンハルト溶液、6×SSC(10 NのNaOHでpH7.0に調節された、800 mlのH₂O中の175 gのNaCl、88.2 gのクエン酸ナトリウムから成る20×SSC)、0.1% SDS、および100 mg/mlの変性したサケ精子のDNA中で、55℃で3-4時間インキュベーションする、(2) ハイブリダイゼーション：プレハイブリダイゼーション溶液中のフィルターとプローブを、42℃で14-48時間インキュベーションする、(3) 洗浄：6×SSCと0.1% SDS中、室温で15分間の洗浄を三回、続いて6×SSCと0.1% SDS中、55℃で、1-1.5分間最終洗浄する。他のこれに相当する手順、たとえばホルムアミドなどの有機溶媒の使用など、が当技術分野においてよく知られている。標準的ストリンジエンシーの状態は、一般的な分子生物学クローニングのテキストにおいてよく特徴付けられている。Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed., Sambrook, FritschおよびManiatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989) ; DNA Cloning, Volumes IおよびII (D. N. Glovered., 1985) ; Oligonucleotide synthesis (M. J. Gait ed., 1984) ; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds, 1984) 参照。

【 0 0 5 9 】

本発明はまた同じ対立遺伝子の変異体、つまりポリヌクレオチドによりコードされたものと同一、同族または関連したPTHRPポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドの天然に存在する変性形態を含む。一方、天然に存在しない変異体は、当技術分野において周知の突然変異誘発技術、または直接合成技術によって調製される。

【 0 0 6 0 】

C. SMCM組み換え発現ベクター

本発明の別の局面には、SMCM化合物をコードする一つまたは複数の核酸配列を含むベクターが含まれる。本発明の一つまたは複数のポリペプチドの組み換え発現のため、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の全体または一部を含む核酸が、以下に説明されるように、当技術分野で周知の組み換えDNA技術により、適切なクローンベクター、または発現ベクター（すなわち、挿入されるポリペプチドコード配列の転写および翻訳に必要な要素を含むベクター）中に挿入される。

【 0 0 6 1 】

一般的に、組み換えDNA技術に有用な発現ベクターは、プラスミドの形態をとることが多い。本明細書において、プラスミドがベクターの最も一般的に使用されている形態であるとして、「プラスミド」および「ベクター」は同義に使用されている。しかしながら本発明は、同等の機能をするウィルスベクター（例えば複製不全のレトロウィルス、アデノウィルスおよびアデノ関連ウィルス）のような、理論的にプラスミドではない発現ベクターの形態を含むことを意図している。これらのウィルスベクターによって、被験者を感染させ、その被験者における化合物の発現を可能にする (Becker et al., Meth. Cell Biol. 43: 161-89 (1994) 参照)。

【 0 0 6 2 】

本発明の組み換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適した形態の、SMCM化合物をコードする核酸を含み、これは組み換え発現ベクターが、発現される核酸配列に動作可能な状態で連結した、宿主細胞が発現に使用されることに基づいて選択された、一つまたは複数の制御配列を含んでいることを意味する。組み換え発現ベクター内において、「動作可能的に連結する」とは、ヌクレオチド配列が、（例えば生体外転写/翻訳システム、またはベクターが宿主細胞に導入される場合の宿主細胞における）ヌクレオチド

配列を発現させるような方法で制御配列に連結することを意味する。

【 0 0 6 3 】

「制御配列」という用語は、プロモーター、エンハンサーおよびその他の発現制御要因(例えはポリアデニル化シグナル)を含むことを意図している。このような制御配列については、例えはGoeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)の中で説明されている。制御配列には、多様な宿主細胞におけるヌクレオチド配列の構築物的発現を目的とするもの、および特定の宿主細胞のみにおけるヌクレオチド配列の発現を目的とするもの(例えは組織特異的制御配列)が含まれる。発現ベクターの設計が、転換される宿主細胞の選択や、目的とするポリペプチドの発現レベルなどの要因に依存することが、当技術分野に精通した技術者によって認められている。本発明の発現ベクターは宿主細胞中に導入され、ここで説明されるような核酸によってコードされた融合ポリペプチド(例えはSMCM化合物およびSMCM由来の融合ポリペプチドなど)を含む、ポリペプチドまたはペプチドを作製する。

【 0 0 6 4 】

D. SMCMを発現する宿主細胞

本発明の別の局面は、一つまたは複数のSMCM化合物をコードする核酸を含む、SMCMを発現する宿主細胞に関連している。本発明の組み換え発現ベクターを、原核細胞または真核細胞において、SMCM化合物を発現するように設計することができる。例えはSMCM化合物は、大腸菌(*E. coli*)のような細菌性細胞、昆虫細胞(バキュロウイルス発現ベクターを使用する)、例えは酵母、酵母菌などの真菌細胞、または哺乳動物の細胞において発現される。適切な宿主細胞については、Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)中にさらに詳しく説明されている。一方、組み換え発現ベクターを、例えはT7プロモーター制御配列およびT7ポリメラーゼを使用して、生体外で転写および翻訳することができる。SMP2プロモーターは、平滑筋細胞内のポリペプチドの発現において有用である(Qian et al., Endocrinology 140 (4): 1826 (1999))。

【 0 0 6 5 】

原核細胞におけるポリペプチドの発現はほとんどの場合、融合または非融合ポリペプチドのいずれかの発現を目指す、構造的または誘導性プロモーターを含むベクターにより、大腸菌(*E. coli*)において起こる。融合ベクターは、コードされたポリペプチド、通常組み換えポリペプチドのアミノ末端に多数のアミノ酸を追加する。このような融合ベクターは一般的に次の三つの目的を果たす:(i)組み換えポリペプチドの発現を増加させる;(ii)組み換えポリペプチドの溶解性を増進させる;および(iii)アフィニティー精製において配位子として機能することにより、組み換えポリペプチドの精製を助ける。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解の切断部が融合部分と組み換えポリペプチドとの接合部に導入され、融合ポリペプチドの精製後の、融合部分からの組み換えポリペプチドの分離を可能にする。このような酵素、およびそれらと同族の認識配列に、Xa因子、トロンビンおよびエンテロキナーゼが含まれる。典型的融合発現ベクターに、ポリペプチドもしくはポリペプチドAとそれぞれ結合したグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、またはポリペプチドもしくはポリペプチドAとそれぞれ結合したマルトースEを目的の組み換えポリペプチドと融合させるpGEX(Pharmacia Biotech Inc; SmithおよびJohnson, 1988. Gene 67: 31-40)や、pMAL(New England Biolabs, Beverly, Mass.)およびpRIT5(Pharmacia, Piscataway, N. J.)が含まれる。

【 0 0 6 6 】

適切な誘発性の非融合大腸菌(*E. coli*)発現ベクターの例として、pTrc(Amrann et al., Gene 69: 301-315 (1988))およびpET 11d(Studier et al., GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89)が含まれる。

【 0 0 6 7 】

組み換えポリペプチドをタンパク質分解的に切断する能力が損なわれた宿主細菌中でボ

10

20

30

40

50

リペプチドを発現させることは、大腸菌 (*E. coli*) における組み換えポリペプチド発現を最大化する一つの方法である。Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128参照。別の方法として、各アミノ酸の個々のコドンが、例えば大腸菌 (*E. coli*) のような発現宿主において選択的に使用されるものとなるように、発現ベクター中に挿入される核酸の核酸配列を変更することが挙げられる (Wada, et al., Nucl. Acids Res. 20: 2111-2118 (1992) 参照)。本発明のこのような核酸配列の変更は、標準DNA合成技術によって行われる。

【0068】

別の態様において、SMCM発現ベクターは酵母発現ベクターである。酵母菌、サッカロマイセスセルヴィシエに発現するベクターの例には、pYEPsec1 (Baldari, et al., EMBO J. 6: 229-234 (1987))、pMFA (KurjanおよびHerskowitz, Cell 30: 933-943 (1982))、pJRY88 (Schultz et al., Gene 54: 113-123 (1987))、pYES2 (InVitrogen Corporation, San Diego, Calif.)、およびpicZ (InVitrogen Corp, San Diego, Calif.) が含まれる。一方、バキュロウイルス発現ベクターを使用して、昆虫細胞にSMCMを発現させることができる。pAcシリーズ (Smith, et al., Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165 (1983)) およびpVLシリーズ (LucklowおよびSummers, Virology 170: 31-39 (1989)) を含む、培養された昆虫細胞 (例えばSF9細胞) 中で、ポリペプチドを発現させるためにバキュロウイルスベクターを使用することができる。

【0069】

また別の態様において、本発明の核酸は、哺乳動物の発現ベクターを使用して哺乳動物細胞に発現される。哺乳動物の発現ベクターの例に、pCDM8 (Seed, Nature 329: 842-846 (1987)) およびpMT2PC (Kaufman, et al., EMBO J. 6: 187-195 (1987)) が含まれる。哺乳動物の細胞中で使用された場合、発現ベクターの制御機能は、しばしばウイルス制御成分によって提供される。例えば一般的に使用されているプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40に由来する。その他の適切な原核細胞および真核細胞の両方のための発現組織については、Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989の第16および17章を参照。

【0070】

別の態様において、哺乳動物の組み換え発現ベクターは、特定の細胞型における核酸の発現を選択的に指定することができる (例えば組織特異的制御成分は、核酸の発現に使用される)。組織特異的制御成分は、当技術分野において周知のものである。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例として、アルブミンプロモーター (肝臓特異的; Pinkert, et al., Genes Dev. 1: 268-277 (1987))、リンパ特異的プロモーター (CalameおよびEaton, Adv. Immunol. 43: 235-275 (1988))、T細胞受容体の特定のプロモーター (WinotoおよびBaltimore, EMBO J. 8: 729-733 (1989)) および免疫グロブリン (Banerji, et al., Cell 33: 729-740 (1983) ; QueenおよびBaltimore, Cell 33: 741-748 (1983))、ニューロン特異的プロモーター (例えばニューロフィラメントプロモーター: ByrneおよびRuddle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477 (1989))、脾臓特異的プロモーター (Edlund, et al., Science 230: 912-916 (1985))、および乳腺特異的プロモーター (例えば乳清プロモーター; 米国特許第4,873,316号およびヨーロッパ公開公報第264,166号) が含まれる。例えばネズミのホメオティック (hox) プロモーター (KesselおよびGruss, Science 249: 374-379 (1990)) および -フェトプロテインプロモーター (CampesおよびTilghman, Genes Dev. 3: 537-546 (1989)) のような発達調節のプロモーターも含まれる。

【0071】

本発明はさらに、アンチセンス方向で発現ベクターにクローニングされた本発明のDNA分子を含む、組み換え発現ベクターを提供する。すなわち、DNA分子は、(DNA分子の転写による) SMCM mRNAのアンチセンスであるRNA分子の発現を可能にするような形で、制御配

10

20

30

40

50

列に動作可能な状態で連結している。多様な細胞型におけるアンチセンスRNA分子の連続的発現を目的とする、アンチセンス方向でクローニングされた核酸に動作可能な状態で連結した制御配列を選択することができる。例えば、アンチセンスRNAの構造的、組織特異的または細胞型に特異的な発現を目的とする、ウィルスプロモーターおよび/またはエンハンサー、または制御配列を選択することができる。アンチセンス発現ベクターは、組み換えプラスミド、ファージミドまたは高性能な調節領域の制御の下でアンチセンス核酸を調製する弱毒化ウィルスの形態をとり、その活性はベクターが導入される細胞のタイプにより決定される。アンチセンス遺伝子を使用した遺伝子発現の調整の説明については、Weintraub, et al., "Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis," *Review s-Trends in Genetics*, Vol. 1 (1) 1986を参照。

10

【0072】

本発明の別の局面は、本発明の組み換え発現ベクターが導入される宿主細胞に関連している。「宿主細胞」および「組み換え宿主細胞」という用語は、ここでは同義に使用されている。これらの用語は、特定の被験者の細胞だけでなく、そのような細胞の子孫または潜在的子孫をも意味することが知られている。変異または環境の影響などにより、後に続く世代にある種の改変が起こることがあるため、これらの子孫が事実上親細胞と同一ではなくても、ここに使用されている用語の範囲内に含まれる。

20

【0073】

宿主細胞は、原核細胞または真核細胞のどちらであってもよい。例えば、SMCMは、大腸菌 (E. coli) のような細菌性細胞、昆虫細胞、酵母、または (チャイニーズハムスターの卵巣細胞 (CHO) またはCOS細胞のような) 哺乳動物の細胞などにおいて発現される。その他の適切な宿主細胞が、当技術分野に精通した技術者に知られている。

20

【0074】

ベクターDNAを、従来の変換またはトランスフェクション技術により、原核細胞または真核細胞に導入することができる。本明細書で使用される「変換」および「トランスフェクション」という用語は、外来の核酸 (例えばDNA) を宿主中に導入する、リン酸カルシウム共沈法、塩化カルシウム共沈法、DEAE-デキストラノン媒介のトランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションなどを含む、当技術分野で認められている様々な技術を意味する。宿主細胞の変換またはトランスフェクションの適切な方法については、Sambrook, et al. (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)、およびその他の実験マニュアルを参照。

30

【0075】

哺乳動物の細胞の安定したトランスフェクションについて、発現ベクターおよび使用されるトランスフェクション技術により、細胞のごく一部分のみが外来DNAをそのゲノム中に組み込むことが知られている。これらの成分を同定しかつ選択するため、選択可能マーカー (例えば抗体に対する耐性) をコードする遺伝子が、通常、対象となる遺伝子とともに宿主細胞内に導入される。様々な選択可能マーカーとして、G418、ハイグロマイシンおよびメトトレキサートなどの薬物に耐性を与えるものが含まれる。選択可能マーカーをコードする核酸を、SMCMをコードするベクターと同じベクター上の宿主細胞に導入する、または異なるベクター上に導入することができる。導入された核酸により安定にトランスフェクションされた細胞は、薬剤の選別により同定できる (例えば、選択可能マーカー遺伝子を組み入れた細胞は生き残るが、その他の細胞は死亡する)。

40

【0076】

培養液中の原核または真核宿主細胞のような、本発明の化合物を含む宿主細胞を、組み換えSMCMを調製 (すなわち発現) するために使用することができる。一つの態様において、本方法は、(SMCMをコードする組み換え発現ベクターが導入された) 本発明の宿主細胞を、SMCMの調製に適した培地で培養することを含む。別の態様において、本方法はさらに、SMCMを培地または宿主細胞から単離する工程を含む。組み換えポリペプチドの精製は、当技術分野でよく知られており、イオン交換精製技術、または例えば化合物に対する抗体

50

によるアフィニティー精製技術を含む。本発明の化合物に対する抗体の調製方法を以下に説明する。

【0077】

IV. SMCM化合物の調製

A. SMCM化合物のペプチド合成

一つの態様において、例えば固相または液相ペプチド合成のような標準的ペプチド合成技術を用い、SMCM化合物を化学的に合成することができる。すなわち、SMCM化合物は、例えば当技術分野で周知の組成物および方法を用いて、個体の支持体または溶液中で化学的に合成される。Fields, G.B. (1997) *Solid-Phase Peptide Synthesis*. Academic Press, San Diego参照。

10

【0078】

SMCM化合物は、Fmoc (塩基に不安定な保護基) またはBoc (酸に不安定な -アミノ保護基) ペプチド合成のいずれかにより調製される。合成の後SMCM化合物は、例えばC-18、C-8、およびC-4カラム、サイズ排除クロマトグラフィー、疎水相互作用に基づいたクロマトグラフィーを使用した、例えばイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、逆相HPLCのような標準的ポリペプチド精製技術、またはその他のポリペプチド精製方法を用いた適切な精製法により、実質的に前駆的化学物質またはその他の化学物質のない状態にされる。

20

【0079】

B. 組み換えDNA技術を使用したSMCM化合物の産出

別の態様において、SMCM化合物は、組み換えDNA技術によって調製される。例えば、細菌、酵母、バキュロウイルスまたは真核細胞における化合物の過剰発現は、十分な量の化合物を産出する。例えば反応混合物、または細胞溶解液、またはその他の未精製の部分など、異質成分から成る混合物からの化合物の精製は、例えばイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィーまたはその他のポリペプチド精製法のような、当技術分野で周知の方法により行われる。これらは、切断可能な、またはそうでなければ不活性のエピトープまたは配列に、融合とされているSMCM化合物を発現させることにより促進される。精製方法、および発現系の選択は当技術に精通した技術者には周知のものである。

30

【0080】

本発明により提供されたポリヌクレオチドを、対応する化合物が（構造的に、または組織の分化もしくは発達の特定な段階において、または病状において、のいずれか）選択的に発現されている組織のマーカーとして、分析、特性描写、または治療用の、組み換え化合物の発現に使用することができる。

40

【0081】

本発明の一つまたは複数の化合物の組み換え発現に関して、ペプチドをコードするヌクレオチド配列全体、またはその一部を含む核酸が、適切な発現ベクター（すなわち、挿入されたペプチドコード配列の転写および翻訳のために必要な成分を含むベクター）に挿入される。いくつかの態様において、制御成分は異種のものである（すなわち天然遺伝子プロモーターではない）。一方、必要な転写および翻訳シグナルは、遺伝子および/またはそれらのランキング領域の天然プロモーターによって提供されてもよい。

【0082】

様々な宿主ベクター組織が、ペプチドコード配列の発現に使用される。これには、(i) ワクシニアウィルス、アデノウィルスなどに感染した哺乳動物の細胞組織；(ii) バキュロウイルスなどに感染した昆虫細胞組織；(iii) 酵母ベクターを含む酵母、または(iv) バクテリオファージ、DNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNAに転換した細菌が含まれるが、これらに限定されない。使用される宿主ベクター組織により、多くの適切な転写および翻訳成分のうちいずれか一つが使用される。

【0083】

本発明で提供されるように、発現ベクター内のプロモーター/エンハンサー配列には、

50

植物、動物、昆虫、または菌類の制御配列が使用される。例えば、酵母およびその他の菌類からのプロモーター/エンハンサー成分（例えばGAL4プロモーター、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、アルカリホスファターゼプロモーター）を使用することができる。また、もしくは他に、動物の転写調節領域、例えば（i）臍臍細胞内で活性であるインスリン遺伝子調節領域（Hanahan, et al., *Nature* 315: 115-122 (1985) 参照）；（ii）リンパ細胞内で活性である免疫グロブリン遺伝子調節領域（Grosschedl, et al., *Cell* 38: 647-658 (1984) 参照）；（iii）肝臍内で活性であるアルブミン遺伝子調節領域（Pinckert, et al., *Genes and Dev* 1: 268-276 (1987) 参照）；（iv）脳のオリゴデンドロサイト細胞内で活性であるミエリン塩基性ポリペプチド遺伝子調節領域（Readhead, et al., *Cell* 48: 703-712 (1987) 参照）；および（v）視床下部内で活性であるゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子調節領域（Mason, et al., *Science* 234: 1372-1378 (1986) 参照）などが含まれることがある。
10

【0084】

発現ベクターまたはその誘導体には、例えばヒトまたは動物のウィルス（例えばワクシニアウィルスまたはアデノウィルス）；昆虫ウィルス（例えばバキュロウィルス）；酵母ベクター；バクテリオファージベクター（例えばラムダファージ）；プラスミドベクターおよびコスミドベクターなどが含まれる。

【0085】

挿入された対象となる配列の発現を調節する、または目的とする特定の方法で配列によりコードされた、発現ペプチドを改変またはプロセシングする宿主細胞株が選択される。加えて、ある種のプロモーターからの発現は、選択された宿主株内における特定な誘導因子の存在により増加され、それにより遺伝子組み換えされた化合物の発現の制御が促進される。さらに、異種の宿主細胞は、発現されたペプチドの、翻訳および翻訳後プロセシングおよび改変（例えばグリコシル化、リン酸化など）の性質、およびそのための特定のメカニズムを有している。適切な細胞系または宿主組織は、従って、異質ペプチドの目的の改変およびプロセシングの遂行を確実にするように選択される。例えば細菌組織内のペプチド発現は、非グリコシル化コアペプチドの産出に使用され、その一方哺乳動物の細胞内での発現は、異種ペプチドの「天然」グリコシル化を確実にする。
20

【0086】

C. SMCM由来のキメラ化合物または融合ポリペプチド化合物の調製

本発明の、SMCM由来のキメラ化合物または融合ポリペプチド化合物は、当技術分野で周知の標準的組み換えDNA技術により産出することができる。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNA断片は、例えば、ライゲーション用の平滑末端終端もしくはねじれ型末端終端、適切な端末を提供するための制限酵素消化、必要に応じた付着端の穴埋め、望ましくない結合を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素結合などを使用した、従来の技術に基づいてインフレームにまとめて結合される。別の態様において、自動DNA合成機を含む従来の技術により、融合遺伝子が合成される。一方、後にキメラ遺伝子配列を調製するためにアニールおよび再増幅される、二つの連続した遺伝子断片間に、相補的な突出部を生じさせるアンカーブライマーを使用して、遺伝子断片のPCR増幅が行われる（Ausubel, et al., (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992参照）。さらに、融合部分をすでにコードした多くの発現ベクターが市販されている（例えばGSTポリペプチド）。SMCMをコードする核酸配列に、インフレームに連結するように、SMCMをコードする核酸をこのよう発現ベクターにクローニングすることができる。
30 40

【0087】

D. SMCM化合物ポリペプチドライブリの作製

加えて、SMCM化合物をコードする核酸配列断片のライブリを使用して、SMCM化合物の変異体のスクリーニングおよびその後の選択のための、SMCM断片の集合を産出することができる。一つの態様において、SMCM化合物をコードする核酸配列の二本鎖のPCR断片を、一つの分子につきおよそ一回だけしか切断（nicking）が起こらない様な状況下でヌクレ

アーゼによって処理し、二本鎖DNAを変性させ、DNAを再生させて別々の切断部分から得られたセンス/アンチセンスペアを含む二本鎖DNAを形成し、S1ヌクレアーゼでの処理によって再生された二本鎖から一本鎖部分を取り除き、その結果得られた断片ライプラリを発現ベクターに結合させるとこによって、コード配列断片のライプラリを作製することができる。この方法により、N-末、C-末、および様々な大きさのSMCM化合物の内部断片をコードする発現ライプラリが得られる。

【0088】

点突然変異または切り詰めにより作製された組み合わせのライプラリの遺伝子産物をスクリーニングするため、また選択された特性を有する遺伝子産物についてcDNAライプラリのスクリーニングをするための、数多くの技術が当技術分野において知られている。このような技術は、SMCM化合物の組み合わせの突然変異誘発により作製されたDNAライプラリの、迅速なスクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライプラリをスクリーニングできるハイスループットの分析法に修正可能な、もっとも一般的に使用される技術には典型的には以下が含まれる：複製可能な発現ベクターへの遺伝子ライプラリのクローニング、その結果得られるベクターライプラリを適切な細胞へ形質転換すること、ならびに目的の活性を検出する条件下で組み合わせ遺伝子の発現であって、この検出によって検出された産物の遺伝子をコードするベクターの単離が容易になる、発現。ライプラリにおける機能的な変異体の頻発度を高める新しい技術である、再帰的集合突然変異誘発 (Recursive ensemble mutagenesis (REM)) を、SMCM化合物の変異体を同定するスクリーニング試験と組み合わせて使用することができる。ArkinおよびYourvan, Proc. Natl. Acad. Sci. U 20 SA 89: 7811-7815 (1992) ; およびDelgrave, et al., Polypeptide Engineering 6: 327-331 (1993) 参照。

【0089】

SMCM化合物のライプラリはまた変性した一連の潜在的SMCM化合物配列が、個々のポリペプチド、またはその中に一連のSMCM化合物配列を含む、(例えばファージ提示法のための)一連のより大きな融合ポリペプチドと同様に発現可能となるように、例えば合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列と酵素的に結合させることによって調製される。変性したオリゴヌクレオチド配列から潜在的SMCM変異体化合物のライプラリを作製するための、多様な方法が存在する。変性した遺伝子配列の科学的合成を自動DNA合成機で行うことができる。合成された遺伝子は次に適切な発現ベクターに結合する。変性した一連の遺伝子を使用することにより、一つの混合物における、潜在的なSMCM化合物配列の目的の一連をコードする全ての配列を供給することが可能となる。変性オリゴヌクレオチドの合成方法は当技術分野において周知のものである。Narang Tetrahedron 39: 3 (1983) ; Itakura, et al., Annu. Rev. Biochem. 53: 323 (1984) ; Itakura, et al., Science 198: 10 30 56 (1984) ; Ike, et al., Nucl. Acids Res. 11: 477 (1983) 参照。

【0090】

E. 抗SMCM化合物抗体

本発明は、抗SMCM化合物抗体を產生する免疫原としての使用に適した、ポリペプチドおよびポリペプチド断片を含む化合物を提供する。化合物は、二重特異性またはその他の多価抗体を含む、抗体全体、および本発明の任意のSMCM化合物に免疫特異的に結合するFv、Fabまたは(Fab)2のような抗体断片を產生するのに使用される。

【0091】

単離されたSMCMポリペプチド化合物、またはその断片の一部分が、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体調製の標準的技術によってSMCM化合物またはPTHrPポリペプチドまたはPTHポリペプチドに結合するような、抗体を產生する免疫原として使用される。全長のPTHrPポリペプチドが使用される、またはまた一方、本発明は、SMCM化合物またはSMCM断片を含む化合物の免疫原としての使用法も提供している。SMCM化合物ペプチドは、配列番号：4に示されるアミノ酸配列の少なくとも四つのアミノ酸残基を含み、またSMCM化合物のエピトープを包含して、ペプチドに対して調製された抗体が、PTHrPポリペプチド、PTHポリペプチド、またはSMCM化合物と特異的な免疫複合体を形成するようにする。望まし 50

くは、抗原性ペプチドは、少なくとも5、8、10、15、20、または30のアミノ酸残基を含む。使用法によって、また当技術分野に精通した技術者に周知の方法によると、より長い抗原性ペプチドの方が、より短い抗原性ペプチドよりも望ましい場合がある。

【0092】

本発明の特定の態様において、抗原性ペプチドに包含された少なくとも一つのエピトープは、ポリペプチドの表面に位置するSMCM化合物の一領域（例えば親水性の領域）である。抗体の調製を目的とする方法として、フーリエ変換の有無に関わらず、例えばKyte Doolittle法またはHopp Woods法を含む、当技術分野で周知の任意の方法により、親水性および疎水性の領域を示すハイドロバシープロット法を行うことができる（いずれも完全なものとして、本明細書において参照用に取り入れられている、HoppおよびWoods, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 3824-3828 (1981) ; KyteおよびDoolittle I 157: 105-142 (1982) を参照されたい）。

【0093】

本明細書に説明されているように、これらのポリペプチド成分に免疫特異的に結合する抗体の形成において、SMCM化合物またはその誘導体を、免疫原として使用することができる。特定の態様において、ヒトSMCMポリペプチドに対する抗体が開示されている。配列番号：4-12のSMCM化合物ポリペプチド配列、またはそれらの誘導体、断片、類似体または同族体に対する、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を調製するために、当技術分野で知られている様々な手順を使用することができる。これらのポリペプチドのいくつかについて、以下に説明する。

【0094】

ポリクローナル抗体の產生について、様々な宿主動物（例えばウサギ、ヤギ、マウス、またはその他の動物）に天然ポリペプチド、もしくはその合成変異体、またはこれらの誘導体を注射することによって免疫性を与えることができる。適切な免疫原の調製は、例えば組み換え技術によって発現されたSMCM化合物または化学的に合成されたSMCM化合物を含むことができる。調製はさらに、アジュバントを含む。免疫反応を高めるために使用される多様なアジュバントには、（完全および不完全）フロイントアジュバント、ミネラルジェル（例えば水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えばリゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、ジニトロフェノールなど）、カルメット・グラン桿菌（BCG）およびコリネバクテリウムパルヴムなどのヒトアジュバント、または同様の免疫活性化化合物が含まれるが、これらに限定されない。必要に応じ、PTHrPまたはSMCM化合物に対抗する抗体分子を哺乳動物（例えば血液）から単離し、IgG画分を得るためのポリペプチドAクロマトグラフィーなどの、周知の技術によってさらに精製することができる。

【0095】

特定のSMCM化合物、またはその誘導体、断片、類似体または同族体に対するモノクローナル抗体の調製に、連續的継代細胞系培養による抗体分子の調製を提供する、任意の技術を使用することができる。このような技術には、ハイブリドーマ法（Kohler & Milstein Nature 256: 495-497 (1975) 参照）；トリオーマ法；ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Kozbor, et al., Immunol. Today 4: 72 (1983) 参照）、およびヒトモノクローナル抗体を調製するEBVハイブリドーマ法（Cole, et al., 1985. In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96）が含まれるが、これらに限定されない。ヒトモノクローナル抗体が本発明の実施に使用され得る、およびヒトハイブリドーマを使用して（Cote, et al., Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030 (1983) 参照）または生体外で、EBウィルスによりヒトのB細胞を変換することによって調製されうる（Cole, et al., 1985. In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 参照）。上記の引用はそれぞれ完全なものとして、本明細書において参照用に組み込まれている。合成デンドロメリックツリー(dendromeric trees)を例えばリジンのような反応性アミノ酸側鎖に加えて、SMCM化合物の免疫原性の特質を高めることができる。CPGジヌクレオチド法を使用して、SMCM化合物化合物の免疫原性の特質を高めることもで

10

20

30

40

50

きる。

【 0 0 9 6 】

本発明によると、これらの技術をSMCM化合物に特異的な一本鎖抗体の産出に適応することができる（米国特許第4,946,778号参照）。加えて、これらの方法をFab発現ライプラリの構築物に適応させて（Huse, et al., Science 246: 1275-1281 (1989) 参照）、例えばポリペプチドまたはその誘導体、断片、類似体または同族体などのSMCM化合物に対する特異性を有する、モノクローナルFab断片の迅速で効果的な同定を可能にすることができる。非ヒト性抗体を、当技術分野で周知の技術により、「ヒト化」することができる。米国特許第5,225,539号参照。SMCM化合物へのイディオタイプを含む抗体断片は、(i)抗体分子のペプシン消化によって調製されるF(ab')2断片；(ii)F(ab')2断片のジスルフィド架橋の還元によってできるFab断片；(iii)パパインおよび還元化合物による抗体の処置によってできるFab断片；および(iv)Fv断片などを含み、またこれらに限定されない、当技術分野で知られている技術により調製される。

【 0 0 9 7 】

加えて、ヒト性および非ヒト性の両方の部分を含む、標準組換えDNA技術によって作られる、キメラおよびヒト化モノクローナル抗体などのような組換え抗SMCM化合物抗体は、本発明の範囲内にある。このようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、国際出願第PCT/US86/02269号；欧洲特許出願第184,187号；欧洲特許出願第171,496号；欧洲特許出願第173,494号；PCT国際公開公報第86/01533号；米国特許第4,816,567号；第5,225,539号；欧洲特許出願第125,023号；Better, et al., Science 240: 1041-1043 (1988)；Liu, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443 (1987)；Liu, et al., J. Immunol. 139: 3521-3526 (1987)；Sun, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218 (1987)；Nishimura, et al., Cancer Res. 47: 999-1005 (1987)；Wood, et al., Nature 314: 446-449 (1985)；Shaw, et al., J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559 (1988)；Morrison Science 229: 1202-1207 (1985)；Oi, et al. Bio Techniques 4: 214 (1986)；Jones, et al., Nature 321: 552-525 (1986)；Verhoeven, et al., Science 239: 1534 (1988)；およびBeidler, et al., J. Immunol. 141: 4053-4060 (1988)などで説明されている方法を使用して、当技術分野で周知の組換えDNA技術により產生されてもよい。上述の引用はそれぞれ完全なものとして、参照により本明細書に組み込まれている。

【 0 0 9 8 】

一つの態様において、SMCM化合物に対する目的の特異性を有する抗体のスクリーニングに使用される方法には、酵素結合免疫反応吸着測定法（ELISA）、およびその他の当技術分野において既知の免疫を介した技術を含み、またこれらに限定されない。特定の態様において、SMCM化合物ポリペプチドの特定のドメインに特異性のある抗体の選択は、そのようなドメインを有するSMCM化合物ポリペプチドの断片に結合するハイブリドーマの生成により促進される。従って、SMCM化合物またはその誘導体、断片、類似体または同族体の内部の目的とするドメインに特異的である抗体もまた、本明細書に提供されている。

【 0 0 9 9 】

PTHRPポリペプチドまたはSMCM化合物の局在化および/または計量に関連する、当技術分野において知られている方法に、抗SMCM化合物抗体を使用することができる（例えば適切な生理学的試料内のPTHRPポリペプチドレベルまたはSMCM化合物レベルの測定における使用、診断法における使用、ポリペプチドの画像化における使用など）。所定の態様において、抗体由来の結合ドメインを含むSMCM化合物またはその誘導体、断片、類似体または同族体に対する抗体が、薬理的に活性である化合物（以後「治療剤」と呼ぶ）として使用される。

【 0 1 0 0 】

抗SMCM化合物抗体（例えばモノクローナル抗体）を、アフィニティーコロマトグラフィーまたは免疫沈降法などの標準的技術によってSMCM化合物またはPTHRPポリペプチドを単離するために使用できる。抗SMCM化合物抗体は、細胞からの天然PTHRPポリペプチド、お

10

20

30

40

50

10 より宿主細胞中に発現した組換えによって產生されたSMCM化合物の精製を促進することができる。さらに、抗SMCM化合物抗体を使用して、PTHrPポリペプチドまたはSMCM化合物の量およびパターンを評価するために、(例えば細胞溶解液または細胞上清において) PTHrPポリペプチドまたはSMCM化合物を検出することができる。抗SMCM化合物抗体を使用して、診断上、臨床実験の手順の一部として、組織中のポリペプチドレベルを観察する、例えば所定の治療計画の効能を決定することができる。抗体を検出可能な物質に連結させる(すなわち物理的に結合させる)ことにより、検出を促進することができる。検出可能な物質の例として、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射性物質が含まれる。適切な酵素の例には、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれ; 適切な補欠分子族の複合体の例にはストレプトアビジン・ビオチンおよびアビジン・ビオチンが含まれ; 適切な蛍光物質の例にはウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが含まれ; 発光物質の例としてはルミノールが含まれ; 生物発光物質の例にはルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれ、かつ適切な放射性物質の例には、³²P、¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S、³³P、¹⁴C、¹³C、または³Hが含まれる。

【0101】

V. SMCM化合物の生物活性

A. PTHrPの生物作用

20 PTHrPは、胎児の骨の発達および成人の生理機能に、重要な発達上の影響を及ぼす。マウスにおけるPTHrP遺伝子(またはPTH受容体の遺伝子)の同型(homozygous)ノックアウトは、動物が軟骨異形成に類似した重度の骨格変形を持って生まれる、致死的奇形の原因となる。脳、臍臓、心臓、肺、乳房組織、胎盤、内皮細胞、および平滑筋を含む、多数の異なる細胞の種類がPTHrPを產生する。動物の胎児において、PTHrPは経胎盤カルシウム輸送を引き起こし、かつ高濃度のPTHrPが乳房組織で產生され、乳汁中に分泌される。例えば、ヒトおよびウシの乳汁には非常に高濃度のホルモンが含まれているが、後者の生物学的意義は知られていない。PTHrPはまた、子宮の収縮、およびその他の組織部分に分類される生物機能にも関与している。

【0102】

30 PTHrPは、臨界のアミノ端末においてPTHと有意義な相同意を持ったため、PTHに見られるのとよく似た効能をもって、PTH/PTHrP受容体と結合し、かつ活性化する。しかしながら、PTHrPが骨量全体の発達に重要であることから、PTHではなくPTHrPが骨量の主要な生理的調節因子であると見られている。これを実証するべく、骨芽細胞でPTHrP遺伝子に傷害のある、しかし成人の骨における正常なPTHレベルを有するマウスを使用した、条件付の遺伝子のノックアウトにより、成人骨内でのPTHrPの產生が局所的に阻止された。PTHrPが欠乏すると、これらのマウスは骨粗しょう症を発症し、骨芽細胞由来のPTHrPが骨芽細胞の機能を促進することにより、骨における同化作用の効果をあげることを実証した。参考用に組み込まれている、Karaplis, A.C.「Conditional Knockout of PTHrP in Osteoblasts Leads to Premature Osteoporosis」; Abstract 1052, Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, September 2002, San Antonio, TX; J Bone Mineral Res, (Suppl 1), pp S138, 2002を参照のこと。

【0103】

40 500アミノ酸のPTH/PTHrP受容体(PTH1受容体としても知られる)は、グルカゴン、セクレチン、および血管活性腸管ペプチドの受容体を含む、GCPKのサブファミリーに属する。細胞外領域はホルモン結合に関与し、かつホルモンの活性化の後、細胞内ドメインはGタンパク質のサブユニットと結合し、二次メッセンジャーを通してホルモンのシグナルを細胞の応答へと伝達する。

【0104】

50 第2のPTH受容体(PTH2受容体)は、脳、臍臓、およびその他の組織に発現される。その

アミノ酸配列およびその結合パターン、ならびにPTHおよびPTHRPへの促進応答は、PTH1受容体のものとは異なる。PTH/PTHRP受容体はPTHおよびPTHRPに対して同等に反応するが、PTH2受容体はPTHのみに反応する。この受容体の内因性のリガンドは、チューブ状の漏斗型ペプチド39またはTIP39であると思われる。PTH2受容体-TIP39系の生理学的意義は、まだ定義されていない。近年、39個のアミノ酸の視床下部のペプチドである、チューブ状の漏斗型ペプチド(TIP-39)が特徴づけられ、PTH2受容体の天然リガンドであると見込まれている。

【0105】

PTH1およびPTH2受容体は、進化的時間を魚までさかのぼることができる。ゼブラフィッシュのPTH1およびPTH2受容体は、PTHおよびPTHRPに対し、ヒトのPTH1およびPTH2受容体に対するのと同じ選択的反応を示す。構造および機能の進化的保存性は、これらの受容体に対する独特的生物学的役割を示唆している。GsクラスのGタンパク質は、PTH/PTHRP受容体を、環状AMPを生成する酵素であるアデニル酸シクラーゼに結合させ、その結果プロテインキナーゼAを活性化する。GqクラスのGタンパク質との連結により、ホルモン作用がイノシトールリン酸(例えはIP3)およびDAGを生成する酵素であるホスホリバーゼCと結合され、プロテインキナーゼCが活性化され、細胞内部のカルシウムが放出される。クローニングされたPTH/PTHRP受容体を使用した研究により、PTHおよびPTHRPにより刺激された経路の多様性が明確に説明され、PTH/PTHRP受容体を、一つより多くのGタンパク質および二次メッセンジャー-キナーゼ経路に連結できることが確認された。特徴付けが不十分な二次メッセンジャー反応(例えはMAPキナーゼの活性化)は、ホスホリバーゼCまたはアデニル酸シクラーゼの刺激(後者はしかしながら、PTHおよびPTHRPの、最も強く、最もに特徴付けられた二次メッセンジャー-シグナル伝達経路である)とは無関係であると思われる。

10

20

30

40

【0106】

環状AMP、IP3、DAG、ならびにECFカルシウムおよびリン酸イオンの転位または骨細胞の機能に決定的な変化をもたらす細胞内Ca²⁺の細胞内濃度を高める、生化学的処置の詳細は知られていない。プロテインキナーゼ(AおよびC)の刺激、および細胞内のカルシウム輸送は、様々な、ホルモン特異的な組織の反応に関連している。これらの反応には、リン酸塩および重炭酸塩の輸送の阻害、カルシウム輸送の促進、および腎臓における腎性1a-ヒドロキシラーゼの活性化が含まれる。骨における反応には、コラーゲン合成への効能；アルカリホスファターゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ、クエン酸デカルボキシラーゼ、およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの活性の増大；DNA、タンパク質、およびリン脂質の合成；カルシウムおよびリン酸塩の輸送；および局所的サイトカイン増殖因子の放出が含まれる。最終的には、これらの生化学的事象は、骨の代謝回転およびカルシウムの恒常性における統合したホルモン反応をもたらす。

【0107】

B. SMCM化合物の効能の測定

SMCM化合物は、平滑細胞活性化の阻害剤として機能する。平滑筋の活性化を調節することができる、本発明のSMCM化合物の合成、選択、および使用は、当業者の能力の範囲内にある。例えば、周知のインピトロまたはインピボアッセイ法を使用して、平滑筋細胞の活性化を調節する分子事象を促進するための種々の候補SMCM化合物の効能を決定することができる。Lester et al., Endocrine Rev. 10: 420-36 (1989) 参照。さらに、図7に示された、例えばサイクリンE、cdk2、サイクリンA、サイクリンD1、およびcdk4/6のよう、細胞の活性化および増殖の分子マーカーの活性、変化または発現を測定するように開発された、任意のインピトロまたはインピボアッセイ法を使用して、本発明のSMCM化合物の活性を評価してもよい。

【0108】

例えばNLS SMCM化合物のような、分泌型SMCMの活性は、インピトロ結合アッセイ法を使用して評価することができる。例えば、骨芽細胞の特性を備え、ラット由来またはヒト由来のいずれかのPTHRPの受容体を有する永久細胞株である骨芽細胞様の細胞を使用することができる。適切な骨芽細胞様の細胞には、ROS 17/2 (Jouishomme et al., Endocrino

50

logy, 130: 53-60 (1992))、UMR 106 (Fujimori et al., Endocrinology, 130: 29-60 (1992))、およびヒト由来のSaOS-2 (Fukuyama et al., Endocrinology, 131: 1757-1769 (1992))が含まれる。細胞系は、メリーランド州ロックビル (Rockville, MD) のAmerican Type Culture Collectionから入手可能であり、標準仕様の培養培地で維持することができる。加えて、ヒトPTH1またはPTH2受容体を発現するトランスフェクションされたヒトの胎児の腎細胞 (HEK 293) を、インビトロ結合アッセイ法において使用することができる (Pines et al., Endocrinology, 135: 1713-1716 (1994))。さらに、A-10血管平滑筋細胞発現を、SMCMとPTH/PTHrP受容体とのインビトロ結合アッセイ法に使用することができる (De Miguel et al., Endocrinology, 142: 4096-105 (2001))。

【0109】

インビトロ機能アッセイ法について、濃度域内のSMCM化合物候補である NSL SMCM化合物を培養液中の細胞に、PTHrPポリペプチド、またはその断片の存在下、および不在下で接触させ、例えば、細胞内の環状AMPの蓄積の促進、またはプロテインキナーゼCの酵素活性の増加 (どちらも従来のアッセイ法で容易に観察することができる) のような、受容体に連結した二次メッセンジャー分子の活性化の促進を評価することにより、SMCMの活性を試験することができる。Jouishomme et al., Endocrinology, 130: 53-60 (1992) ; Abou-Samra et al., Endocrinology, 125: 2594-2599 (1989) ; Fujimori et al., Endocrinology, 128: 3032-3039 (1991) ; Fukuyama et al., Endocrinology, 134: 1851-1858 (1994) ; Abou-Samra et al., Endocrinology, 129: 2547-2554 (1991) ; およびPines et al., Endocrinology, 135: 1713-1716 (1994) 参照。cAMP定量の方法、細胞の取り扱い法、およびアッセイ法のセットアップに関する詳しい手順は、Sistane et al., Pharmacopeial Forum 20: 7509-7520 (1994) に説明されている。PTHrP作用のその他のパラメータは、細胞質内のカルシウムおよびホスホイノシトールの増加、p27kipの発現、網膜芽細胞腫タンパク質のリン酸化、トリチウム化したチミジンの取り込み、およびアルカリホスファターゼ活性の変化を含む。細胞の増殖を、SMCM機能の指標として観察することができる。

【0110】

PTHrPの変異体化合物の免疫学的局在決定は、Massfelder et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94: 13630-635 (1997) に説明されている要領で行うことができる。

【0111】

実施例1および実施例3に示されるように、網膜芽細胞腫タンパク質およびp27kip1タンパク質などの分子マーカーのリン酸化と同様に、細胞の増殖速度を、SMCM化合物をコードするベクターによりトランスフェクションされたA-10 VSM細胞で観察して、細胞の活性化に対するSMCMポリペプチドの過剰発現の影響を評価することができる。

【0112】

生物活性、すなわちSMCM化合物のアゴニストまたはアンタゴニスト特性は、平滑筋細胞の活性化を測定するために開発された、従来型の任意のインビトロアッセイ法を使用して明らかにすることができます。例えば、インビトロアッセイ法を使用して、SMCM候補化合物は、実施例2、4、および5に説明されるように、ラット、ブタ、またはウサギにおける新生内膜の過形成を組成する能力により特徴付けられる。

【0113】

VI. 薬学的組成物

SMCMをコードする核酸分子、SMCMポリペプチド化合物、SMCM化合物をコードするベクターのウィルス担体、および本発明の抗SMCM化合物抗体 (本明細書では「活性化合物」とも呼ばれている)、およびその誘導体、断片、類似体および同族体を、投与に適した薬学的組成物に組み込むことができる。このような組成物は一般的に、核酸分子、ポリペプチド、または抗体および薬学的に許容される担体を含んでいる。本明細書で使用される「薬学的に許容される担体」とは、薬剤投与に適合した、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌性および抗真菌性の化合物、ならびに等張化合物および吸収遅延化合物などを含んでいる。適切な担体については、本明細書において参照用に組み込まれている、当技術分野の標準的参考書である「Remington's Pharmaceutical Sciences」の最新版に説

10

20

30

40

50

明されている。このような担体または希釈剤の好適な例として、水、生理食塩水、リンガーリン液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンが含まれるが、これらに限定されない。不揮発性油のような、リポソームおよび非水性の媒質もまた使用することができる。薬学的に活性な物質に対する、このような媒体および化合物の使用は、当技術分野において周知である。従来型の媒体または化合物が活性化合物と混合できない場合を除いて、それらの組成物中の使用が企図される。補助的な活性化合物もまた、組成物に組み込むことができる。

【0114】

本発明の薬学的組成物は、対象とする投与経路に適合するように製剤化される。投与経路の例には、例えば静脈、皮内、皮下などの非経口、経口（例えば吸入）、経皮（すなわち局所）、経粘膜、および直腸投与などが含まれる。非経口、皮内、または皮下用に使用される溶液または懸濁液には以下の成分が含まれる：注射用蒸留水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたはその他の合成溶媒のような滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌性化合物；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの酸化防止剤；エチレンジアミン四酢酸（EDTA）などのキレート化合物（cheating compound）；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩などの緩衝剤、および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張度を調節する化合物。pHは、塩化水素酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基により調節できる。非経口製剤は、アンプル、使い捨て注射器、またはガラス製またはプラスティック製の多回用量バイアル内に入れられる。

10

20

30

【0115】

注射用に適した薬学的組成物には、滅菌水溶液（水溶性のもの）または分散液、および滅菌注射用水溶液または分散液の即席調剤のための滅菌粉剤が含まれる。静脈内への投与に適した担体には、生理食塩水、静菌性の水、クレモフォール（Cremophor）ELTM（BASF、Parsippany, N.J.）またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が含まれる。全ての場合において、組成物は無菌性でなくてはならず、注射針を通過しやすい程度の流動体でなくてはならない。またこれらは製造および保管の条件下で安定していなくてはならず、バクテリアおよび菌類などの微生物の汚染作用から保護されていなくてはならない。担体は例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適切な混合物を含む、溶媒または分散媒であり得る。レシチンなどのコーティングの使用により、分散剤の場合は既定の粒子のサイズの維持により、および界面活性剤の使用により、適切な流動性を維持することができる。微生物の作用は、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、およびチメロサールなどの様々な抗菌性および抗真菌性の化合物によって防止することができる。多くの場合、組成物に、例えば糖質、マニトールやソルビトールなどの多価アルコール、および塩化ナトリウムなどの等張性の化合物を含むことが好ましい。例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの、吸収を遅らせる化合物を組成物に含めることによって、注入可能な組成物の吸収時間を長引かせることができる。

【0116】

滅菌注射液は、所要量の活性化合物（例えばSMCM化合物または抗SMCM化合物抗体）を、上記に列挙された成分の一つまたはそれらの組み合わせと共に適切な溶媒中に加え、必要に応じてその後フィルター滅菌を行うことによって調製される。一般に、分散剤は、活性化合物を塩基性分散媒および上記に列挙されたその他の所要の成分を含む滅菌媒質に加えることによって調製される。滅菌注射液を調製するための滅菌粉剤の場合は、調製法は真空乾燥および凍結乾燥であり、これらにより、活性成分、およびあらかじめフィルター滅菌されたそれらの溶液からの任意の追加的な所望の成分が生産される。

40

【0117】

経口用の組成物は通常不活性の希釈剤または食用の担体を含む。これらはゼラチンカプセルの中に入れられるか、錠剤に圧縮される。経口治療の投与のため、活性化合物を賦形剤に加え、錠剤、トローチ、またはカプセルなどの形態で使用することができる。経口用

50

の組成物はまた、マウスウォッシュに使用される液体担体を使用して調製することができる。ここで液体担体中の化合物は口に含まれた後、吐き出されるかまたは飲み込まれる。薬学的に許容される結合用の化合物、および/またはアジュバント物質が、組成物の一部として含まれることもある。錠剤、丸薬、カプセル、およびトローチなどには、以下の成分または同様の性質の化合物が含まれていてもよい：微結晶性セルロース、トラガカントゴム、もしくはゼラチンなどの結合剤；デンプンもしくは乳糖などの賦形剤；アルギン酸、プリモゲル(Primogel)、もしくはコーンスタークなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムもしくはステローテス(Sterotes)などの潤滑剤；コロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤；スクロースもしくはサッカリンなどの甘味剤；またはペパーミント、メチルサリチル酸、もしくはオレンジ香味料などの香味剤。

10

【0118】

吸入用の投与の場合、化合物は、二酸化炭素のようなガスなどの適切な噴射剤を含んだ加圧容器もしくはディスペンサーまたは噴霧器からのエアゾールスプレーの形態で供給される。

【0119】

全身投与は、経粘膜的または経皮的な手段であってもよい。経粘膜的投与または経皮的投与について、バリアを透過するのに適した浸透剤が組成物中に使用されている。これらの浸透剤は当技術分野で一般的に知られているもので、例えば経粘膜的投与用としては、界面活性剤、胆汁塩、およびフシジン酸の誘導体などが含まれる。経粘膜的投与は、鼻腔用スプレーまたは座薬の使用によって行われてもよい。経皮的投与について、活性化合物は、当技術分野で一般的に知られているように、軟膏、塗り薬、ジェル、またはクリームなどの形態で製剤化される。

20

【0120】

化合物はまた、座薬(例えばカカオバターおよびその他のグリセリドのような従来からの座薬担体を使用したもの)、または直腸供給用の停留浣腸などの形態で薬学的組成物として調製することができる。

【0121】

一つの態様において、活性化合物は、インプラントおよびマイクロカプセルの中に入れた送達システムを含む放出制御性の製剤などの、化合物を体内からの急速な排出から保護する担体によって調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物(polyanhydride)、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの、生分解性、生体適合性のポリマーを使用することができる。このような製剤の調製法は、当業者には明らかなものである。物質はまた、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc.から市販されている。リポソーム懸濁液(ウィルス抗原に対するモノクローナル抗体による、感染細胞を標的としたリポソームを含む)を、薬学的に許容される担体として使用することができる。これらは米国特許第4,522,811号に説明されているような、当業者には既知の方法によって調製できる。

30

【0122】

投与が容易で用量を一定化できる単位用量剤形で経口または非経口用の組成物を製剤することは、特に有益である。本明細書で使用される単位用量剤形とは、治療を受ける被験者への単位用量に合わせた物理的に分離した単位のことを指し、各単位には、所定の薬学的担体に付随して、目的とする治療効果をあげるように計算された規定量の活性化合物が含まれている。本発明の単位用量剤形の詳述は、活性化合物に独特の特性、および達成されるべき特定の治療効果、および個体を治療するための活性化合物を化合する技術に特有の限界の影響を受け、かつそれらに直接依存している。

40

【0123】

本発明の核酸分子をベクター中に挿入し、遺伝子治療ベクターとして使用することができる。遺伝子治療ベクターは、例えば静脈注射、局所投与(米国特許第5,328,470号参照)、または定位注射(Chen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054-3057 (1994)参照)により被験者に送達される。遺伝子治療ベクターの薬学的調剤には、適切な希釈

50

剤中の遺伝子治療ベクターが含まれ、または遺伝子送達用の媒質が埋め込まれた持続放出性の基質を含むこともある。または、完全な遺伝子送達ベクターが、例えばレトロウィルスベクターのような組換え細胞から原型を保って產生される場合、薬学的調剤には、遺伝子送達システムを作り出す一つまたは複数の細胞が含まれる。薬学的組成物は、投与の説明書とともに容器、パッケージ、またはディスペンサー内に同梱される。

【0124】

VII. 疾病および疾患の治療

A. 本発明の組成物の予防および治療用の使用

本発明のSMCM化合物は、被験者の様々な疾患（「疾病および疾患」の項参照）に関連する、予防および治療への潜在的応用において有用である。（疾患または疾患を患っていない被験者と比較して）平滑筋細胞の生物活性の活性化およびその増殖のレベルが高まることを特徴とする疾患および疾患は、治療または予防のために投与することのできる、活性にアンタゴナイズする（すなわち低減させるまたは阻害する）SMCM基盤の治療化合物によって治療できる。使用可能な治療化合物には、以下のものが含まれ、またこれらに限定されない：（i）前述のSMCM化合物、またはその類似体、誘導体、断片または同族体；（ii）PTHRPまたはSMCM化合物に対する抗SMCM化合物抗体；（iii）SMCM化合物をコードするポリヌクレオチド；（iv）SMCM化合物をコードするベクターを含むウィルスベクターの投与；または（v）前述の化合物とその結合パートナーの間の相互作用を変化させるモジュレータ（すなわち阻害剤、作動剤、本発明のペプチド模倣体または本発明のペプチドに特異的な抗体をさらに含むアンタゴニスト）。

【0125】

患者の組織試料（例えば生検組織などから得られたもの）を採取し、そのRNAレベルまたはポリペプチドレベル、構造および/または発現されたポリペプチド（または前述のポリペプチドのmRNA）の活性についてインビトロでアッセイして、SMCM化合物ポリペプチドおよび/またはRNAを定量化することにより、レベルの増減を容易に検出することができる。当技術分野で周知の方法には、免疫アッセイ法（例えばウェスタンプロット分析、免疫沈降とそれに続くドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲルの電気泳動、免疫細胞化学など）、および/またはmRNAの発現を検出するハイブリダイゼーションのアッセイ法（ノーザン解析（Northern assay）、ドットプロット、インサイチューハイブリダイゼーションなど）が含まれ、またこれらに限定されない。

【0126】

SMCM化合物をコードするcDNAは遺伝子治療において有用であり、ポリペプチドSMCM化合物は、そのような治療を必要とする被験者に投与された場合に有用である。非限定的な例として、本発明の組成物は、後述の「疾病および疾患」の項に記されている疾患有する患者の治療に効能を有する。

【0127】

i. 予防方法

一つの局面において、本発明は、SMCM化合物、SMCM化合物をコードするポリヌクレオチド、SMCM化合物をコードするベクターを含むウィルスベクター、または平滑筋細胞の活性化および細胞増殖を阻害するSMCM化合物模倣体を、被験者に投与することによって、被験者における平滑筋細胞の活性化および増殖に関する疾患または疾患を予防する方法を提供する。

【0128】

例えば本明細書に説明された任意の診断または予防アッセイ法またはそれらの組み合わせにより、平滑筋細胞の異常な活性化および増殖が原因となるまたはそれらによってもたらされる疾患有かかる危険性の高い被験者を同定することができる。疾患または疾患を予防し、またはその進行を遅らせるために、この異常の特徴である症状が現れる前にSMCM化合物を予防的に投与することができる。異常の種類により、例えば平滑筋細胞の活性化および増殖に対するアンタゴニストとして作用する、SMCM化合物、SMCM化合物模倣体、SMCM化合物をコードするベクターを有するウィルス、または抗SMCM化合物抗体など、本明細書

10

20

30

40

50

に説明されるスクリーニングアッセイに基づく適切な化合物を決定することができる。

【0129】

ii. 治療方法

本発明の別の局面には、治療を目的とした、被験者における平滑筋細胞の活性化および増殖の阻害方法が含まれる。本発明の調節方法は、平滑筋細胞の活性化および細胞の増殖を阻害する本発明の化合物を細胞に接触させることを含む。核酸、またはポリペプチド、抗SMCM化合物抗体、またはSMCM化合物をコードするベクターを含むウイルスなどの、平滑筋細胞の活性化および増殖を阻害する化合物については本明細書に説明されている。これら的方法はインピトロで（例えば細胞をSMCM化合物とともに培養する）、またはインピボで（例えば被験者にSMCM化合物を投与する）実施することができる。このように本発明は、平滑筋の異常な活性化および増殖により発現する疾病または疾患にかかっている個体を治療する方法を提供する。一つの態様において、本方法は、SMCM化合物（例えば本明細書に説明されたスクリーニング試験により同定された化合物）、または平滑筋細胞の増殖を阻害するSMCM化合物の組み合わせの投与を含む。

10

【0130】

B. SMCMに基づいた治療の生物学的効果の決定

本発明の様々な態様において、適切なインピトロまたはインピボアッセイが実施され、SMCMに基づいた特定の治療の効果、およびその投与により被験者の罹患組織の治療の徵候が現れたか否かが決定される。

20

【0131】

様々な特定の態様において、患者の疾患に関連する代表的な細胞の種類によりインピトロアッセイを行い、所定のSMCMに基づいた治療が細胞種において目的とする効果を挙げたかどうかを決定することができる。治療法に使用される化合物は、ヒトの被験者において試験する前に、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギなどを含むがそれらに限定されない、適切な動物モデル系において試験されうる。同様に、インピボの試験でも、ヒトの被験者に投与する前に、当技術分野で知られている任意の動物モデル系が使用される。

【0132】

C. 疾病および疾患

平滑筋細胞の増殖は多数の疾患に関連しており、それらの全てが平滑筋細胞増殖の発達（調節剤）による影響を受ける。本発明は、これらに限定はされないが、例えば、平滑筋細胞の活性化および平滑筋細胞の過剰増殖の結果であると考えられている、子宮線維腫、前立腺肥大症、気管支喘息、肝硬変における門脈圧亢進症、膀胱疾患、肺および全身性動脈性高血圧、アテローム性動脈硬化症、および血管形成後の血管の再狭窄などの、平滑筋細胞の異常な活性化に関連した疾患にかかる危険性の高い（またはこれらの影響を受けやすい）被験者、またはこのような疾患を有する被験者を治療する、予防的および治療的な両方の方法を提供する。PThrPは平滑筋細胞の活性化および増殖によって発現する疾患に関連しており、従ってSMCM化合物は、PThrPの発現を介する平滑筋細胞の活性化および増殖の治療において有用である。

30

【0133】

本発明のSMCM化合物は、子宮平滑筋腫（線維腫または筋腫）の予防または治療上の処置において有用である。子宮平滑筋腫（線維腫または筋腫）は、ヒトの子宮の良性腫瘍であり、子宮の平滑筋細胞から発達する。M. Yoshidaらは、PThrPが子宮平滑筋腫上で、オートクリン/パラクリン式の細胞増殖の局所的修飾因子として作用することを実証した（Endocr J; 46 (1): 81-90 (1999)）。

40

【0134】

本発明のSMCM化合物は、前立腺癌および前立腺肥大の予防または治療上の処置において有用である。年配の男性の最も一般的な疾患の一つである、良性前立腺過形成（BPH）は、間質細胞の異常増殖を特徴としており、前立腺間質の主要細胞成分は、SMCより成っている（Shapiro E, et al., J Urol 147: 1167-1170 (1992)）。加えて、SMCの増殖およ

50

び伸張は、BPHにより二次的に発生する膀胱の流出路閉塞の重要な一因である (Tenniswoo d MP, et al., *Cancer Metast Rev* 11: 197-220 (1992))。さらに、PThrPは、前立腺癌および良性前立腺過形成の両方において発現し (Asadi F et al., *Hum Pathol.* 27(12): 1319-23 (1996))、加えてPThrPは前立腺癌細胞の増殖を増進させ、またその溶骨効果を促進する (Tover Sepulveda VA, Falzon M. *Mol Cell Endocrinol.*; 204(1-2): 51-64 (2003))。

【0135】

本発明のSMCM化合物は、肝硬変における門脈圧亢進症の予防または治療上の処置において有用である。肝臓において、亜広汎性 (submassive) 壊死後の再生および様々な胆汁鬱滞性肝疾患が、胆管数の著しい増加に付随して起こる。正常な生検3件、胆汁鬱滞性肝疾患11件、限局性結節性過形成6件、および再生肝3件を含む、様々なヒトの肝臓におけるPThrPの免疫組織化学的発現の研究で、T. Roskamsら (*Histopathology*; 23(1): 11-9 (1993))は、PThrPが胆管細胞内に局在化していることを発見した。これは、ヒトの反応性胆管の増殖および/または分化におけるこのホルモンの役割を示す。

【0136】

本発明のSMCM化合物は、膀胱の疾患の予防または治療上の処置において有用である。PThrPは、神経因性膀胱障害を含む、膀胱疾患に関与している。Vaidyanathan Sら (*Spinal Cord*; 38(9): 546-51 (2000))は、非神経因性膀胱の上皮が、PThrPに対し免疫染色を全く示さない、または示したとしても非常にかすかな陽性染色であることを実証した。これに対して、神経因性膀胱障害の膀胱の上皮では、PThrPに対する陽性の免疫染色がはるかに頻繁に観察された。高血圧の特徴である血管中膜の肥厚は、血管平滑筋細胞 (VSMC) の肥大および過形成に関連している (Nolan BP et al., *Am J Hypertens.*; 16(5Pt1): 393-400 (2003))。

【0137】

本発明のSMCM化合物は、気管支喘息の予防または治療上の処置において有用である。SM Puddicombeら (*Am J Respir Cell Mol Biol.* 28(1): 61-8 (2003))は、喘息において、p21 (waf) の過剰発現が細胞の増殖および生存に影響を与えることを実証した。SMCの増殖は喘息に大きな影響を与える。喘息患者の気道に起こるより長期にわたる構造の変化はSMCの過形成および肥大により促進されるため、SMCの増殖は喘息に大きな影響を与える (Freyer AM., *Am J Respir Cell Mol Biol.*; 25 (5): 569-76 (2001))。

【0138】

本発明のSMCM化合物は、肺および動脈性の高血圧症の予防または治療上の処置において有用である。肺高血圧症は、平滑筋細胞の増殖、および特に新生内膜中への移行に伴う血管の構築および機能の変化を特徴とする、進行が急速で、また致命的となり得る疾患である (Rabinovitch, *Cardiovasc Res.* 34: 268-272 (1997) ; Nichols et al., *Endocrinology* 119: 349 (1986))。

【0139】

本発明のSMCM化合物は、アテローム性動脈硬化症、および血管形成後の血管の再狭窄の予防または治療上の処置において有用である。SMCの増殖および移行は、新生内膜形成の原因となる血管形成後の再狭窄 (Segev A, et al., *Cardiovasc Res.*; 53(1): 232-41 (2002))を含む、循環器疾患の病理生態学において主要な役割を果たすことが広く認められている (Martinez-Gonzalez J et al., *Circ Res.*; 92 (1): 96-103 (2003))。

【0140】

VIII. スクリーニングおよび検出方法

以下にさらに詳しく説明されるように、(例えば遺伝子治療への応用における宿主細胞中の組換え発現ベクターにより) SMCM化合物を発現させる、または(例えば生物学的試料中の) SMCM mRNAまたはSMCM遺伝子中の遺伝的損傷を検出する、およびPThrPまたはSMCM化合物の活性を調節するために、本発明の化合物を使用することができる。加えて、SMCMポリペプチドを使用して、PThrPまたはSMCM化合物の活性または発現を調節する薬剤または化合物をスクリーニングし、かつPThrPポリペプチドの產生不足または過剰產生、またはP

10

20

30

40

50

THrP野生型ポリペプチドと比較して異常な活性を有するPThrPポリペプチド形態の產生を特徴とする疾患の治療をすることができる。さらに、本発明の抗SMCM化合物抗体を使用して、単離されたPThrPまたはSMCM化合物を検出し、かつそれらの活性を調節することができる。このように、本発明はさらに、本明細書に説明されるスクリーニングアッセイおよび上記に説明された治療におけるそれらの使用によって同定される、新規の化合物を含む。

【0141】

A. スクリーニングアッセイ

本発明は、モジュレータ、すなわち候補化合物、被験化合物、または（例えばペプチド、ペプチド模倣体、小分子、またはその他の薬剤のような）SMCM化合物またはPThrPポリペプチドに結合する化合物、または例えばSMCM化合物またはPThrPポリペプチドの発現または活性化に刺激的または阻害効果を有する化合物を同定する方法（本明細書では「スクリーニングアッセイ」とも呼ばれる）を提供する。本発明はまた、本明細書に説明されるスクリーニングアッセイで同定される化合物をも含む。

【0142】

一つの態様において、SMCM化合物またはPThrPポリペプチドまたはそれらの生物活性部分に結合する、またはそれらの活性を調節する候補化合物または被験化合物をスクリーニングするアッセイ法を含む。本発明の化合物は、生物学的ライプラリ；空間的にアドレス可能な平行な固相または液相ライプラリ；形状解析を必要とする合成ライプラリ法；「一ビーズ、一化合物（one-bead one-compound）」ライプラリ法；およびアフィニティーコロマトグラフィーの選択を使用した合成ライプラリ法などを含む、当技術分野において知られているライプラリ法の組み合わせによる多数のアプローチの任意のものによって得ることができる。生物学的ライプラリアプローチはペプチドライプラリに限定されているが、他の4つのアプローチは化合物のペプチド、非ペプチドオリゴマー、または小分子ライプラリに適用することができる。Lam, 1997. *Anticancer Drug Design* 12: 145参照。

【0143】

真菌、細菌、または藻類の抽出物のような、化学および/または生物学的混合物のライプラリは、当技術分野で既知のものであり、当業者に既知のものに加え、本明細書に説明される任意のアッセイ法によってスクリーニングできる。分子ライプラリの合成方法の例は、例えば、DeWitt, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6909 (1993) ; Erb, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422 (1994) ; Zuckermann, et al., *J. Med. Chem.* 37: 2678 (1994) ; Cho, et al., *Science* 261: 1303 (1993) ; Carrell, et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059 (1994) ; Carell, et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061 (1994) ; およびGallop, et al., *J. Med. Chem.* 37: 1233 (1994) などの科学文献中に見ることができる。

【0144】

化合物のライプラリは、溶液中（例えば、Houghten, *Biotechniques* 13: 412-421 (1992)）、またはビーズ上（Lam, *Nature* 354: 82-84 (1991)）、チップ上（Fodor, *Nature* 364: 555-556 (1993)）、細菌（Ladner、米国特許第5,223,409号）、胞子（Ladner、米国特許第5,233,409号）、プラスミド（Cull, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869 (1992)）、またはファージ上（ScottおよびSmith, *Science* 249: 386-390 (1990) ; Devlin, *Science* 249: 404-406 (1990) ; Cwirla, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6378-6382 (1990) ; Felici, *J. Mol. Biol.* 222: 301-310 (1991) ; Ladner、米国特許第5,233,409号）に提供されている。

【0145】

化合物の、SMCMポリペプチドの活性化を調節する能力は、例えばSMCM化合物がそのSMCM化合物の標的分子と結合する、または相互作用する能力を決定することによって、決定することができる。標的分子とはSMCM化合物が結合するまたは相互作用する分子のことで、例えばSMCMと相互作用するポリペプチドを発現する細胞の表面にある分子、第2の細胞の表面にある分子、細胞外環境にある分子、細胞膜の内壁面に付随する分子、細胞質分子、

10

20

20

30

40

50

または核内にある分子などである。SMCM化合物の標的分子は、非SMCM化合物分子のこととも、または本発明のSMCM化合物のこともある。一つの態様において、SMCM化合物の標的分子は、細胞外のシグナル（例えば機械的シグナル、または化学的シグナル、例えばPTHrP受容体分子のような分裂誘発性の標的分子と結合されることによって発生するシグナル）が細胞膜を通り細胞内に伝達することを促進する、シグナル伝達経路の成分である。標的は、例えば、触媒活性を有する第2の細胞内ポリペプチド、または下流シグナル分子と細胞の活性化および増殖との関連を促進するポリペプチドであり得る。本発明の化合物は、これらの相互作用、および説明されたアッセイ法により測定される、結果的に起こる生物学的反応を、アゴナイズまたはアンタゴナイズする。

【0146】

10

SMCMポリペプチド化合物が、SMCM化合物の標的分子と結合または相互作用する能力は、上記に説明された直接結合を測定する方法により決定される。一つの態様において、SMCM化合物の標的分子と結合または相互作用する能力は、標的分子の活性を測定することによって決定される。例えば、標的分子の活性は、標的の細胞性二次メッセンジャー（すなわち細胞内のCa²⁺、ジアシルグリセロール、IP3など）の誘発を検出すること、標的および適切な基質の触媒・酵素活性を検出すること、レポーター遺伝子（例えばルシフェラーゼなどの検出可能なマーカーをコードする核酸に動作可能的に連結した、SMCMに反応する調節成分を含む）の誘発を検出すること、または、例えば細胞の生存、分化、または増殖などの細胞応答を検出することによって測定される。

【0147】

20

また別の態様において、本発明のアッセイ法は、SMCM化合物またはその生物学的に活性な部分を被験化合物と接触させ、被験化合物がSMCMポリペプチド、SMCM化合物、またはそれらの生物学的に活性な部分に結合する能力を決定することを含む、無細胞アッセイ法である。被験化合物のSMCM化合物への結合は、上述の要領で直接的、または間接的に決定できる。このような態様の一つにおいて、アッセイ法は、SMCM化合物またはその生物学的に活性な部分を、SMCMと結合してアッセイ混合物を形成することが知られている化合物と接触させ、アッセイ混合物を被験化合物と接触させ、被験化合物がSMCM化合物と相互作用する能力を決定することを含んでおり、ここで、被験化合物がSMCM化合物と相互作用する能力の決定には、既知の化合物と比較した、被験化合物の、SMCMまたはそれらの生物学的に活性な部分に選択的に結合する能力を決定することが含まれる。

30

【0148】

さらに別の態様において、本発明のアッセイ法は、SMCM化合物またはその生物学的に活性な部分を被験化合物と接触させ、被験化合物がSMCM化合物またはその生物学的に活性な部分の活性を調節する（例えば刺激または阻害する）能力を決定することを含む、無細胞アッセイ法である。被験化合物がSMCMの活性を調節する能力は、例えば、上述の直接結合を測定する方法の一つにより、SMCM化合物がSMCM化合物の標的分子と結合する能力を決定することによって決定されうる。代替的な態様において、被験化合物がSMCM化合物の活性を調節する能力は、SMCM化合物がさらにSMCM化合物の標的分子を調節する能力を測定することによって決定されうる。例えば、適切な基質上の標的分子の触媒/酵素活性は上述の要領で決定される。

40

【0149】

さらに別の態様において、無細胞アッセイ法は、SMCM化合物またはその生物学的に活性な部分を、SMCM化合物との結合により試験化合物を形成することが知られている化合物に接触させ、試験化合物を被験化合物と接触させ、被験化合物がSMCM化合物と相互作用する能力を決定することを含んでおり、ここで、被験化合物がSMCM化合物と相互作用する能力の決定には、SMCM化合物がSMCM化合物の標的分子に選択的に結合する能力、またはSMCM化合物がSMCM化合物の標的分子の活性を調節する能力を決定することが含まれる。

【0150】

本発明の上述のアッセイ法の二つ以上の態様においては、アッセイ法の自動化を提供することに加え、SMCM化合物またはその標的分子を固定して、一つまたは両方のポリペプチ

50

ドの、複合体を形成していない形態からの複合体を形成している形態の単離を促進することが望まれる。被験化合物のSMCM化合物への結合、または候補化合物の存在下および不在下におけるSMCM化合物と標的分子との相互作用反応物を含むことのできる任意の容器内で起こり得る。このような容器の例として、マイクロタイタープレート、試験管、およびマイクロ遠心機管が含まれる。一つの態様において、一つまたは両方のポリペプチドが基質に結合することを可能にする領域を追加する融合ポリペプチドが提供されうる。例えば、GST-SMCM融合ポリペプチド、またはGST標的融合ポリペプチドは、グルタチオンセファロースビーズ (Sigma Chemical, St. Louis, MO) またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着され、次に被験化合物または被験化合物および非吸着標的ポリペプチドまたはSMCM化合物のいずれかと結合し、混合物が複合体の形成を促進する条件下(例えば塩およびpHの生理学的条件下)でインキュベートされる。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄し、非結合成分、ビーズの場合は固定された基質、直接的または間接的に(例えば上述の要領で)決定された複合体などが除去される。一方、複合体を基質から分離し、標準的技術を使用してSMCM化合物の結合または活性レベルを決定することができる。

10

【0151】

ポリペプチドを基質上に固定する、その他の技法を本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用することもできる。例えば、SMCM化合物またはその標的分子のいずれかを、ビオチンおよびストレプトアビジンの接合によって固定化することができる。ビオチニル化されたSMCM化合物または標的分子は、ビオチンNHS (N-ヒドロキシ-スクシニミド) から、当技術分野でよく知られている技術(例えばビオチニル化キット、Pierce Chemicals, Rockford, IL)を使用して調製され、ストレプトアビジンでコーティングされた96ウェルプレート (Pierce Chemical) のウェル内に固定化される。または、SMCM化合物または標的分子に対し反応性はあるが、SMCM化合物がその標的分子へ結合することは妨げないような抗体が、プレートのウェル、非結合標的または抗体との接合によりウェル中に閉じ込められたSMCM化合物に対して誘導体化される。GST固定複合体について上記に説明された方法に加え、このような複合体の検出方法には、SMCM化合物または標的分子に関連した酵素活性の検出に依存した、酵素関連のアッセイ法とともに、SMCM化合物または標的分子に対して反応性のある抗体を使用した複合体の免疫検出が含まれる。

20

【0152】

別の態様において、SMCM化合物の発現のモジュレータは、細胞を候補化合物と接触させ、細胞におけるSMCM mRNAまたはポリペプチドの発現を測定する方法において同定される。候補化合物の存在下でのSMCM mRNAまたはポリペプチドの発現レベルを、候補化合物の不在下でのSMCM mRNAまたはポリペプチドの発現レベルと比較する。この比較に基づくと、候補化合物は、SMCM mRNAまたはポリペプチドの発現のモジュレータとして同定される。例えば、SMCM mRNAまたはポリペプチドの発現が候補化合物の不在下よりも存在下において多い(すなわち統計的に著しく多い)場合、候補化合物はSMCM mRNAまたはポリペプチドの発現の促進物質として同定される。または、SMCM mRNAまたはポリペプチドの発現が、候補化合物の不在下よりも存在下において少ない(統計的に著しく少ない)場合、候補化合物はSMCM mRNAまたはポリペプチドの発現の阻害物質として同定される。細胞におけるSMCM mRNAまたはポリペプチドの発現レベルは、SMCM mRNAまたはポリペプチドの検出について本明細書で説明された方法により測定される。

30

【0153】

本発明のさらに別の局面において、SMCM化合物は、SMCM(「SMCM結合分子」または「SMCM-bp」)と結合または相互作用し、かつSMCMの活性を調節するポリペプチドなどの他の分子を同定するための、ツーハイブリッド(two-hybrid)アッセイまたはスリーハイブリッド(three hybrid)アッセイ(例えば、米国特許第5,283,317号; Zervos, et al., Cell 72: 223-232 (1993); Madura, et al., J. Biol. Chem. 268: 12046-12054 (1993); Bartel, et al., Biotechniques 14: 920-924 (1993); Iwabuchi, et al., Oncogene 8: 1693-1696 (1993); およびBrent WO 94/10300参照)において、「ベイト(bait)ポリ

40

50

ペプチド」として使用される。このようなSMCM結合分子はまた、例えばSMCM経路の上流または下流成分として、SMCM化合物によるシグナルの伝播に関連する可能性が高い。

【0154】

ツーハイブリッド (two-hybrid) システムは、分離可能なDNAの結合および活性化ドメインから成る、ほとんどの転写因子のモジュラーとしての性質に基づく。概説すると、アッセイ法は、二つの異なるDNA構築物を用いる。一つの構築物において、SMCM化合物をコードする遺伝子は、既知の転写因子（例えばGAL-4）のDNA結合ドメインをコードする遺伝子と融合する。他の構築物において、未同定のポリペプチド（「プレイ（prey）」または「試料」）をコードする、DNA配列のライプラリから得られたDNA配列は、既知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子と融合する。「ベイト」および「プレイ」ポリペプチドの、インビオにおける、SMCM依存の複合体を形成する、相互作用が可能な場合、転写因子のDNA結合および活性化ドメインは、極めて近くまで接近される。この近接性により、転写因子と反応する、転写制御部位に動作可能的に連結したレポーター遺伝子（例えばLacZ）の転写が可能になる。レポーター遺伝子の発現が検出され、機能的転写因子を含む細胞コロニーが単離され、これはSMCM化合物と相互作用するポリペプチドをコードするクローニングされた遺伝子を得るのに使用されうる。

【0155】

さらに別の態様において、SMCM化合物の原子座標に関した構造情報を含むシステムが、例えばX線回折などの生物物理学的技法により得ることができる。SMCM化合物と化合物との間の結合が、X線回折によって評価され、例えば標的ポリペプチド/薬剤複合体などのSMCM化合物複合体のX線結晶構造が決定されうる。または、化合物がSMCM化合物と結合した後に観察される化学シフトの変化を分析するために、NMRを使用することができる。このようなアプローチは、化合物をSMCM化合物との結合作用に基づいてスクリーニングするために使用される。

【0156】

本発明はさらに、前述のスクリーニングアッセイにより同定されたSMCM化合物、および本明細書に説明されている治療におけるそれらの使用に関連している。

【0157】

B. 検出試験法

i. SMCM発現の検出

生体試料中のSMCM化合物の存在の有無を検出する例示的な方法には、被験者から生体試料を採取することと、生体試料を化合物、すなわちSMCM化合物、またはSMCM化合物の存在が生体試料中で検出されるようにSMCM化合物をコードする核酸（例えばmRNA、ゲノムDNA）を検出することのできる化合物に接触させることとが含まれる。SMCM mRNAまたはゲノムDNAを検出する化合物はSMCM mRNAまたはゲノムDNAとハイブリダイズすることのできる、標識化された核酸プローブである。核酸プローブは、例えば少なくとも5、15、30、50、100、250、または500ヌクレオチドの長さがあり、ストリンジエントな条件下でSMCM mRNAまたはゲノムDNAと特異的にハイブリダイズするのに適したオリゴヌクレオチドのような、全長のSMCM核酸、またはその一部分である。本発明の診断アッセイに使用されるその他の適切なプローブについて、本明細書に説明する。

【0158】

SMCM化合物を検出する化合物の例に、SMCM化合物と結合することのできる、SMCM化合物に対して作られた抗体、好ましくは検出可能な標識のついた抗体がある。抗体はポリクローナルでも良いが、より好ましくはモノクローナルである。完全な抗体またはその断片（例えばFabまたはF(ab')2）を使用することができる。プローブまたは抗体に関し、「標識された」という用語は、検出可能な物質をプローブまたは抗体につなげる（すなわち物理的に連結させる）ことによる直接的な標識化、そして直接標識された別の化合物との反応性によるプローブまたは抗体の間接的な標識化を包含することを意図している。間接的標識化の例には、蛍光標識された二次抗体を使用し、また蛍光標識されたストレプトアビジョンで検出されるようにDNAプローブを末端標識することによる一次抗体の検出が含まれる

10

20

30

40

50

。「生体試料」という用語には、被験者から単離された組織、細胞、および生体液、および被験者中に存在する組織、細胞、および生体液が含まれる。すなわち、本発明の検出方法を使用して、インビボに加えインビトロで、生体試料中のSMCM mRNA、ポリペプチド、またはゲノムDNAを検出することができる。例えば、インビトロでのSMCM mRNA検出法には、ノーザンハイブリダイゼーション (Northern) およびインサイチュー (in situ) ハイブリダイゼーションが含まれる。生体外でのSMCM化合物の検出技法には、酵素結合免疫反応吸着測定法 (ELISA)、ウェスタンプロット、免疫沈降法、および免疫蛍光法が含まれる。またインビトロでのSMCMゲノムDNAの検出技法にはサザン (Southern) ハイブリダイゼーションが含まれる。さらに、インビボでのSMCM化合物の検出技法は、標識された抗SMCM抗体の被験者への導入を含む。例えば抗体を、被験者における存在および位置を標準的画像技術によって検出できる放射性マーカーで標識することができる。一つの態様において、生体試料は、被験者からのポリペプチド分子を含む。または、生体試料は、被験者からのmRNA、またはゲノムDNA分子を含むこともある。好適な生体試料は、従来の方法により被験者から単離された抹消血白血球試料である。

10

【0159】

別の態様において、本方法はさらに、対照被験者から得られる対照試料を採取すること、SMCM化合物、mRNAまたはゲノムDNAの存在が生体試料中で検出されるように、対照試料を化合物、すなわちSMCM化合物、mRNA、またはゲノムDNAを検出することのできる化合物に接触させること、および対照試料におけるSMCM化合物、mRNAまたはゲノムDNAの存在と、被験試料におけるSMCM化合物、mRNAまたはゲノムDNAの存在とを比較することを含む。

20

【0160】

本発明はまた、生体試料中のSMCM化合物の存在の検出キット、およびその使用説明書を包含する。例えばキットには、標識された化合物、すなわち生体試料におけるSMCM化合物またはmRNAを検出することのできる化合物；試料中のSMCM化合物の量を測定する手段；および試料中のSMCM化合物の量と標準値とを比較する手段が含まれる。化合物を、適切な容器内に包装することができる。キットにはさらに、SMCM化合物または核酸の検出キットの使用説明書が含まれていてもよい。

30

【0161】

IX. SMCM化合物の遺伝子治療

本発明はまた、ベクターに連結した核酸分子をコードするSMCM化合物を提供する。ベクターは自己複製型のベクターであるか、または複製能力のないベクターでありうる。ベクターは遺伝子治療法の薬学的に許容されるベクターであり得る。複製能力のないベクターの一例にLNL6がある (Miller, A. D. et al., Bio Techniques 7: 980-990 (1989))。

40

【0162】

本発明は、平滑筋細胞の活性化および増殖をアンタゴナイズするSMCM化合物の特定の細胞種における、発現ベクターのインビボトランスフェクションおよび発現を特徴とする。

【0163】

SMCM化合物の発現構築物は、SMCM化合物をコードするポリヌクレオチド配列をインビボで効率的に細胞に供給することのできる、任意の生物学的に有効な担体に含まれて投与されうる。これらのアプローチには、組換えレトロウィルス、バキュロウィルス、アデノウィルス、アデノ随伴ウィルス、および単純ヘルペスウィルス-1を含むウィルスベクター、または組換え細菌プラスミドまたは真核生物プラスミドへの被験者の遺伝子の挿入が含まれる。ウィルスベクターは細胞に直接トランスフェクションされ、プラスミドDNAは、例えば陽イオンリポソーム、または誘導体化された（例えば抗体と結合した）ポリリシン結合体、グラミシジンS、人工ウィルスエンベロープ、またはその他の細胞内の担体の助けを借りて、および遺伝子構築物の直接的注入、またはインビボで行われるCaPO₄沈殿によって送達されうる。

【0164】

当技術分野で知られている、ポリヌクレオチド配列をベクターに挿入する任意の方法を使用することができる。例えばどちらも本明細書において参照用に組み込まれている、Sa

50

mbrook et al., 「Molecular Cloning : A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) およびAusubel et al., 「Current Protocols in Molecular Biology」, J. Wiley & Sons, N.Y. (1992) を参照のこと。従来のベクターは、ポリヌクレオチド配列をコードする特定のSMCM化合物のポリヌクレオチド配列に動作可能的に連結した、適切な転写/翻訳制御シグナルから成る。プロモーター・エンハンサーはまた、SMCM化合物の発現を制御するために使用されることもある。プロモーターの活性化は組織特異的であるか、または代謝産物または投与された物質により誘発されてもよい。このようなプロモーター/エンハンサーには、天然E2Fプロモーター、サイトメガロウィルス最初期プロモーター/エンハンサー (Karasuyama et al., J. Exp. Med., 169 : 13 (1989)) ; ヒト-アクチンプロモーター (Gunning et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 : 4831 (1987)) ; マウス乳癌ウィルスの長い末端反復 (MMTV LTR) に存在するグルココルチコイド誘発性プロモーター (Klessig et al., Mol. Cell. Biol., 4 : 1354 (1984)) ; モロニーマウス白血病ウィルスの長い末端反復配列 (MuLV LTR) (Weiss et al., 「RNA Tumor Viruses」, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1985)) ; SV40初期領域プロモーター (BernoistおよびChambon, Nature, 290 : 304 (1981)) ; ラウス肉腫ウィルス (RSV) のプロモーター (Yamamoto et al., Cell, 22 : 787 (1980)) ; 単純ヘルペスウィルス (HSV) チミジンキナーゼプロモーター (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 : 1441 (1981)) ; アデノウィルスプロモーター (Yamada et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 : 3567 (1985)) が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0165】

腫瘍細胞の遺伝子治療に使用される哺乳動物宿主細胞に適合される発現ベクターには、例えばプラスミド；トリ、ネズミ、およびヒトのレトロウィルスベクター；アデノウィルスベクター；ヘルペスウィルスベクター；および非複製型ポックスウィルスが含まれる。特に、複製不全の組換えウィルスは、複製不全ウィルスのみを產生するパッケージ細胞株において生成される。「Current Protocols in Molecular Biology」：Sections 9.10-9.14 (Ausubel et al., eds.), Greene Publishing Associates, 1989を参照のこと。

【0166】

遺伝子移入システムに使用される特定のウィルスベクターが、近年良好に確立されてきている。例えば、Madzak et al., J. Gen. Virol., 73 : 1533-36 (1992 : パポバウィルス SV40) ; Berkner et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158 : 39-61 (1992 : アデノウィルス) ; Moss et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158 : 25-38 (1992 : ワクシニアウィルス) ; Muzyczka, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158 : 97-123 (1992 : アデノ随伴ウィルス) ; Margulies, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158 : 67-93 (1992 : 単純ヘルペスウィルス (HSV) およびエプスタイン・バーウィルス (HBV)) ; Miller, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158 : 1-24 (1992 : レトロウィルス) ; Brandyopadhyay et al., Mol. Cell. Biol., 4 : 749-754 (1984 : レトロウィルス) ; Miller et al., Nature, 357 : 455-450 (1992 : レトロウィルス) ; Anderson, Science, 256 : 808-813 (1992 : レトロウィルス) を参照のこと。これらは全て本明細書において参照用に組み込まれている。

【0167】

潜在的治療遺伝子を既定の細胞集団に移入する、いくつかの方法が知られている。例えば、Mulligan, Science, 260 : 920-31 (1993) 参照。これらの方法には以下のものが含まれる：(1) 直接的遺伝子移入法 (例えば、Wolff et al., Science 247 : 1465-68 (1990) 参照) ; (2) リボソームを介したDNA移入法 (例えば、Caplen et al., Nature Med., 3 : 39-46 (1995) ; Crystal, Nature Med., 1 : 16-17 (1995) ; GaoおよびHuang, Biochem. Biophys. Res. Comm., 179 : 280-85 (1991) 参照) ; (3) レトロウィルスを介したDNA移入法 (例えば、Kav et al., Science, 262 : 117-19 (1993) ; Anderson, Science., 256 : 808-13 (1992) 参照) ; (4) DNAウィルスを介したDNA移入法で、このウィルスにはアデノウィルス (好ましくはAd-2またはAd-0に基づくベクター) 、ヘルペスウィルス (好

ましくは単純ヘルペスウイルスに基づくベクター)、バキュロウイルス、およびパルボウイルス(好ましくは「不完全な」または非自立性のパルボウイルスに基づくベクター、より好ましくはアデノ随伴ウイルスに基づくベクター、最も好ましくはAAV-2に基づくベクター)が含まれる(例えば、Ali, et al., Gene Therapy 1: 367-84 (1994); 参照により本明細書に組み込まれている米国特許第4,797,368号、および参照により本明細書に組み込まれている米国特許第5,139,941号参照)。

【0168】

目的の遺伝子を移入するための特定のベクターシステムの選択は、様々な要因に依存する。一つの重要な要因は、標的となる細胞集団の特性である。レトロウィルスベクターは広く研究され、遺伝子治療の応用に使用されている。

10

【0169】

X. 装置のコーティング剤としてのSMCM組成物の使用

本発明はまた、表面が上述の組成物でコーティングされた、通常管状構造(例えばらせん状のものも含む)を含む、ステントおよびカテーテルを提供する。ステントは、通常円筒形の骨組み(scaffolding)であり、疾病過程(例えば腫瘍の増殖など)のために狭窄したり、外形が不規則であったり、遮断されていたり、または閉塞している体内の導管(例えば胆管など)、または体内の導管の一部に、導管の閉鎖または再閉鎖を防ぐために挿入される。ステントは、挿入された体内における導管の壁を物理的に押し開けておく働きをする。

【0170】

ゲル/溶質の相互作用、溶質の充填、および放出の動力学の意味における局所的薬剤送達システムとしての使用が研究された、市販のポリ(エチレンオキシド)[PEO]およびポリ(アクリル酸)[PAA]ゲルでコーティングされたバルーン血管形成カテーテルを使用することができる(Gehrke et al., 「Intelligent Materials & Novel Concepts for Controlled Release Technologies」、S. DinhおよびJ. DeNuzzio, Eds., ACS Symposium Series, Washington, D.C., 728, 43-53 (1999))。PEOゲルコートにおけるタンパク質の充填は、充填用溶液中へ溶解性デキストランを加えることにより約二倍になる。例えばSMCM化合物、またはSMCM化合物をコードするポリヌクレオチドを有するウィルスなどの溶質のゲルコーティングからの放出は、抵抗の原因がゲルおよび境界層であるとしても、拡散律則となる。

20

【0171】

例えば食道ステント、血管ステント、胆管ステント、膵臓ステント、尿管および尿道ステント、涙管ステント、耳管(Eustachiana tube)ステント、卵管ステントおよび気管/気管支ステント、血管カテーテルおよび尿道カテーテルなどを含む、多様なステントおよびカテーテルが本発明の文脈上使用されうる。

30

【0172】

ステントおよびカテーテルは、商業的供給源から容易に手に入れることもでき、またはよく知られている技法により製造することもできる。ステントの代表的な例には、「ヒドロゲル粘着剤(Hydrogel Adhesive)」と題する米国特許第4,768,523号、「拡張可能な管腔内グラフト、ならびに拡張可能な管腔内グラフト移植の方法および器具(Expandable Intraluminal Graft, and Method and Apparatus for Implanting and Expandable Intraluminal Graft)」と題する米国特許第4,776,337号、「血管内ステントおよび供給システム(Endovascular Stent and Delivery System)」と題する米国特許第5,041,126号、「留置ステントおよび使用法(Indwelling Stent and Method of Use)」と題する米国特許第5,052,998号、「軸長が安定している自己拡張性人工器官(Self-Expanding Prosthesis Having Stable Axial Length)」と題する米国特許第5,064,435号、「医療用不水溶性ポリサッカライドヒドロゲルフォーム(Water-insoluble Polysaccharide Hydrogel Foam for Medical Applications)」と題する米国特許第5,089,606号、「中空導管用ニチノールステント(Nitinol Stent Hollow Body Conduits)」と題する米国特許第5,147,370号、「留置ステント(Indwelling Stent)」と題する米国特許第5,176,626号、「生体分解性

40

50

高分子管腔内の密封方法 (Biodegradable polymeric Endoluminal Sealing Process)」と題する米国特許第5,213,580号などに説明されているものが含まれる。

【0173】

ステントおよびカテーテルは、SMCM化合物の組成物、またはSMCM化合物をコードするポリヌクレオチド、またはSMCM化合物をコードするベクターを含むウイルスにより、以下の例を含む多様な方法でコーティングされる：(a) 装置にSMCM化合物を直接添加する（例えばステントにポリマー/薬剤フィルムを吹き付けるか、またはステントをポリマー/薬剤溶液中に浸す）、(b) 後にSMCM化合物を吸収するヒドロゲルのような物質で装置をコーティングする、(c) SMCM化合物でコーティングされた糸（または糸に形作られたポリマー自体）を装置構造に織り込む (d) 装置をSMCM化合物から成るもしくはSMCM化合物でコーティングされたスリーブもしくはメッシュの中に挿入する、または(e) 装置自体をSMCM化合物で構成する。本発明の好ましい態様において、組成物は、収納中および挿入時に、装置にしっかりと付着していなくてはならない。また好ましくは、収納中、挿入前、または体内で拡張した後に体温まで温まった時、SMCM化合物は、分解してはならない。さらに好ましくは、装置はSMCM化合物の一様な配分により、滑らかにむらなくコーティングされていなくてはならない。本発明の好ましい態様の中で、SMCM化合物の放出は一様で、予測可能でなくてはならず、かついったん分散されたら装置の周辺の組織にまで広がってもよい。血管ステントおよびカテーテルについて、上述の性質に加え、SMCM化合物の組成物は、ステントまたはカテーテルにより、血栓形成を起こしたり（凝血の原因となる）、または血流中の著しい乱流の原因となる（コーティングされていない場合のステントのみの場合以上に）ようなことがあってはならない。

10

20

30

40

50

【0174】

パッチはまた、ウイルス担体の有無に関わらず、SMCM化合物またはSMCM化合物をコードするポリヌクレオチドを含む材料から調製されうる。例えばパッチの材料として、これらに限定はされないが、例えば、ゼルフォームまたはポリビニルアルコール（PVA）、またはその他の適切な材料が使用されうる。このようなパッチを予防的または治療的に使用して、細胞に接触した際にSMCM化合物またはSMCM化合物をコードするポリヌクレオチドを送達してもよい。

【0175】

XI. 構造ベースの合理的な薬剤設計のためのシステムおよび方法

上述のSMCM化合物は、細胞の活性化および平滑筋細胞の過度な増殖をアンタゴナイズする。結晶ポリペプチドを使用した構造ベースの薬剤設計の方法は、少なくとも、どちらもUppenbergによる米国特許第6,329,184号および第6,403,330号に説明されている。タンパク質結晶の成長を高めるためにX線投影および回折を使用する方法は、米国特許第6,468,346号（Arnowitz, et al.）に説明されている。プラッギング反射の自動選択方法およびそのための機器、また結晶の方向性を自動的に決定するシステムについては、米国特許第6,198,796号（Yokoyama, et al.）に説明されている。構造を決定するための¹³C、¹⁵N、および²HによるNMRのためのタンパク質の調製方法および標識方法は、米国特許第6,376,253号（Anderson, et al.）に説明されている。巨大または複合タンパク質のNMR分光法については、米国特許第6,198,281号（Wand, et al.）に説明されている。標的生体分子のリガンドを設計するための核磁気共鳴の使用は、米国特許第5,989,827号（Fesik, et al.,）に説明されている。核磁気共鳴によるSMCM化合物の合理的薬剤設計の方法には以下の工程が含まれる：(a) 二次元の¹⁵N/¹H NMR相關分光法を使用した、標的分子（PTHrP受容体など）に対する潜在的リガンドである候補SMCM化合物を同定する工程；(b) 候補SMCM化合物を標的分子に結合させることによる二元複合体を形成する工程、ならびに(c) 二元複合体の三次元的構造、およびそれによる標的分子上の候補SMCM化合物の空間的方向性を決定する工程。X線結晶学による骨形成タンパク質模倣体の合理的な薬剤設計法も同様な方法で行われるが、標的分子（または複合体の共結晶）に対する潜在的リガンドである候補SMCM化合物の結晶を形成し、X線照射後の原子の反射のデータセットを得ることにより、構造データがまず得られる。これらの方法は、本明細書に提供されている内容から見て、当業

者にとって既知のものである。

【0176】

候補SMCM化合物は次に精製され、標的分子に対する候補SMCM化合物の親和性が高められる。精製には、SMCM化合物の抑制 (constraining) および環化、または立体配座の制限を引き起こす非古典的アミノ酸の組み入れが含まれる。抑制、環化、または堅化されたSMCM化合物は合成的に調製してもよく、SMCM化合物の配列の少なくとも二つの位置において、架橋を形成する処置の後にSMCM化合物を抑制、環化、または堅化するための架橋が可能な化学官能基を提供するアミノ酸またはアミノ酸類似体が挿入されている。環化は、回転誘発のアミノ酸が組み込まれた場合に有利に働く。SMCM化合物を架橋することのできるアミノ酸の例には、ジスルフィドを形成するシステイン、ラクトンまたはラクタムを形成するアスパラギン酸、および遷移金属をキレートし、架橋を形成する-カルボキシルタミン酸 (Gla) (Bachem) のようなキレート剤などがある。保護-カルボキシルタミン酸は、Zee-ChengおよびOlson (Biophys. Biochem. Res. Commun., 94: 1128-1132 (1980)) によって説明された合成法を改変することによって調製されうる。ペプチド配列に架橋可能な少なくとも二つのアミノ酸を含むSMCM化合物は、ペプチドを架橋して、抑制、環化または堅化されたSMCM化合物を形成するように、例えばジスルフィドを形成するためのシステイン残基の酸化、またはキレートを形成するための金属イオンの添加などの処理を受けることがある。

【0177】

本発明は、体系的に架橋を形成する方法を提供する。例えば四つのシステイン残基がペプチド配列に組み込まれている場合、異なる保護基が使用されうる (Hiskey, 'The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology', Vol. 3, GrossおよびMeienhofer, eds., Academic Press: New York, pp. 137-167 (1981); Ponsanti et al., Tetrahedron, 46: 8255-8266 (1990))。システインの最初の対が脱保護されて酸化され、次に二番目のセットが脱保護されて酸化されうる。このように、規定のセットのジスルフィド架橋が形成されうる。または、架橋が異なる化学的性質となるように、システインの対、およびキレート性アミノ酸類似体の対が組み込まれうる。

【0178】

非古典的アミノ酸は、以下に限定されないが、例えば1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸 (Kazmierski et al., J. Am. Chem. Soc., 113: 2275-2283 (1991)) ; (2S,3S)-メチル-フェニルアラニン、(2S,3R)-メチル-フェニルアラニン、(2R,3S)-メチル-フェニルアラニンおよび(2R,3R)-メチル-フェニルアラニン (KazmierskiおよびHruby, Tetrahedron Lett. (1991)) ; 2-アミノテトラヒドロナフタレン-2-カルボン酸 (Lands, Ph. D. Thesis, University of Arizona (1989)) ; ヒドロキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸塩 (Miyake et al., J. Takeda Res. Labs, 43: 53-76 (1989)) ; -カルボリン (DおよびL) (Kazmierski, Ph. D. Thesis, University of Arizona (1988)) ; HIC (ヒスチジンイソキノリンカルボン酸) (Zechel et al., Int. J. Pep. Protein Res., 43 (1991)) ; ならびにHIC (ヒスチジン環状尿素) などの特定の立体構造モチーフを導入するため、SMCM化合物に組み込まれる。アミノ酸類似体およびペプチド模倣体は、ペプチドに組み込まれ、限定されないが以下を含む特定の二次構造を誘発、または支持する: LL-Acp-(LL-3-アミノ-2-プロペニドン-6-カルボン酸)、ターン誘発性ジペプチド類似体 (Kemp et al., J. Org. Chem. 50: 5834-5838 (1985)) ; 類似体を含むシート (Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29: 5081-5082 (1988)) ; 類似体を含むターン (Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29: 5057-5060 (1988)) ; 類似体を含むヘリックス (Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29: 4935-4938 (1988)) ; 類似体を含むターン (Kemp et al., J. Org. Chem. 54: 109: 115 (1989)) ; ならびに以下の参考文献に提供された類似体: NagaiおよびSato, Tetrahedron Lett. 26: 647; 14650 (1985) ; DiMaio et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. p. 1687 (1989) ; さらに、Gly-Alaターン類似体 (Kahn et al., Tetrahedron Lett. 30: 2317 (1989)) ; アミド結合イソエーテル (isoetere) (Jones et al., Tetrahedron Lett. 29: 3853-3856 (1988)) テ

10

20

30

40

50

トラゾール (tretazol) (Zabrocki et al., J. Am. Chem. Soc. 110: 5875-5880 (1988)) ; DTC (Samanen et al., Int. J. Protein Pep. Res., 35: 501: 509 (1990)) ; ならびにOlson et al., J. Am. Chem. Sci. 112: 323-333 (1990) およびGarvey et al., J. Org. Chem. 56: 436 (1990) に説明されている類似体。構造的に制限のある ターンの模倣体および バルジ、およびそれらを含んでいるペプチドについては、1995年8月8日に Kahnに発行された米国特許第5,440,013号に説明されている。

【0179】

いったんSMCM化合物（またはその精製物）の三次元構造が決定されると、GRAM、DOCK、またはAUTODOCKなどのドッキングプログラムを使用したコンピュータモデリングによってその（アンタゴニストまたはアゴニストとしての）治療の潜在能力を試験することができる。SMCM化合物およびその結合複合体の三次元構造の解明を支援するために使用されうるコンピュータプログラムには、QUANTA、CHARMM、INSIGHT、SYBYL、MACROMODE、およびICM、MOLMOL、RASMOL、およびGRASPが含まれる (Kraulis, J. Appl. Crystallogr. 24: 946-950 (1991))。これらのプログラム、およびその他のプログラムの全てと言わないまでもほとんどがインターネットを通してワールドワイドウェブから入手できる。SMCM化合物の合理的設計には、改変されたSMCM化合物の形状および化学構造がSMCM化合物とそのリガンドの間の相互作用をどの程度補完、または干渉するかを解明するための、改変されたSMCM化合物に対する潜在的物質のコンピュータによるフィッティングが含まれる。例えばPTHrP結合部のような、SMCM化合物の標的分子に対する、潜在的治療用SMCM化合物の誘引性、反発性、および立体障害を評価するためにも、コンピュータプログラムを使用することができる。一般に、これらの特性は結合抑制の強さと一致しているため、適合が強い（例えば立体障害が少ない、および/または誘引力が強い）ほど、潜在的治療用SMCM化合物の効能が高くなる。さらに、SMCM化合物の設計が特異的であるほど、関連するSMCMの標的分子と干渉しない傾向が強い。このため他の標的物との望ましくない相互作用による潜在的副作用が最小化される。

【0180】

初めに、例えば組換えバクテリオファージにより作成されたランダムペプチドライブラリ (ScottおよびSmith, Science, 249: 386-390 (1990) ; Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 6378-6382 (1990) ; Devlin et al., Science, 249: 404-406 (1990)) または化学ライブラリのスクリーニングにより、潜在的治療用SMCM化合物を得ることができる。このようにして選択された治療用の候補SMCM化合物は次に、一つまたは複数の見込みのある潜在的治療用SMCM化合物が同定されるまで、コンピュータモデリングプログラムによって体系的に改変される。このような分析法が、HIVプロテアーゼ阻害剤の開発に効果があることがわかっている (Lam et al., Science 263: 380-384 (1994) ; Wlodawer et al., Ann. Rev. Biochem. 62: 543-585 (1993) ; Appelt, Perspectives in Drug Discovery and Design 1: 23-48 (1993) ; Erickson, Perspectives in Drug Discovery and Design 1: 109-128 (1993))。

【0181】

このようなコンピュータモデリングは、そのうちのいずれの一つもが有用な薬剤につながる可能性のある、無数の本質的に無作為の化学的改変とは対照的に、有限数の合理的化学的改変の選択を可能にする。それぞれの化学的改変は、追加的な化学的工程を必要とする。これは、有限数の化合物の合成については適当であるが、全ての可能性のある改変が合成を必要とする場合には、直ちに手に負えなくなる。従って、本明細書に開示された三次元構造解析法およびコンピュータモデリングを使用することにより、これらの多数の候補SMCM化合物を迅速にスクリーニングすることができ、かつ無数のSMCM化合物を手をかけて合成することなく、候補と思われる少数のSMCM化合物を、決定することができる。

【0182】

治療用の候補SMCM化合物は次に、SMCM化合物標的またはその断片に結合する能力について、任意の標準的結合アッセイ（ハイスループット結合アッセイを含む）により試験される。または、SMCM化合物、PTHrPの生物活性、または他の分裂誘発性の化合物/刺激を調節

10

20

30

40

50

する（阻害、または刺激する）能力について、潜在的薬剤を試験することができる。適切な潜在的薬剤が同定された場合は、リガンドと治療用候補SMCM化合物との間に形成された結合複合体上で、二番目の構造解析を任意に行うことができる。本明細書に説明されている全てのスクリーニングアッセイに関し、治療用候補SMCM化合物の構造についてのさらなる緻密化が通常必要とされ、それらは、例えばX線結晶学またはNMRによるさらなる構造分析を含む、特定の薬剤スクリーニングアッセイにより提供される任意および/または全ての工程の連続的な反復によって行われうる。

【0183】

実施例

以下の実施例は、本発明の特定の態様を非限定的に例示することを意図したものである。引用されている全ての参考文献は完全なものとして、参照により本明細書に組み込まれている。

【0184】

実施例1 PTHrPのカルボキシ末端におけるSER119、SER130、THR132、およびSER138は、VSM細胞増殖の活性化に必要である

I. 概要

研究の初期において、本発明者らは、NLSは核ターゲティングに必要であるが、単独では増殖を刺激するのに十分ではないことを実証した。これには、PTHrP(107-139)領域を重要なものとして定義する未精製のマッピングを伴う、PTHrPのカルボキシ末端領域が必要とされる(Massfelder et al., Proc Natl Acad Sci USA 94 (25): 13630 (1997); de Miguel et al., Endocrinology 142 (9): 4096 (2001))。従って、NLSおよびカルボキシ末端を含むPTHrP(88-139)が、VSM細胞増殖の刺激に必要とされる全てである。これらの研究の目標は、カルボキシ末端領域をより精密にマッピングすることである。

【0185】

II. 方法

A. PTHrP変異体の構築

i. PTHrP欠失変異体

PTHrP欠失構築物は、初期テンプレートとしてプラスミドpGEM-3にクローニングされたヒトPTHrP(-36/+139)のcDNAを使用して、Massfelderおよびその共同研究者(Massfelder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13630-35 (1997))によって先に記載されたように作製された。構築物の全てが、メチオニンをコードするコドンで始まり、翻訳を可能にする。免疫細胞化学的検出用に、それぞれ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン(HA)に対応するC末端において、エピトープタグを有している。それぞれは、mRNAを安定化させるため(mRNAの分解を促進する天然PTHrP 3'-UTR AUUUA不安定モチーフを置換するため)、ならびに、転写終了、ポリアデニル化、およびスプライシングシグナルを提供するため、ヒト-グロビン3'非翻訳領域(UTR)を含んでいる。配列の確認は、DNAシーケンシングにより行われた。構築物は次に、pLJベクターにおいてサブクローニングされ(Massfelder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 13630-635 (1997))、以下に説明するように、A-10細胞にトランスフェクションされた。

【0186】

ii. アラニン変異体

図1に示される構築物は、初期テンプレートとしてプラスミドpcDNA-3+にクローニングされたヒトPTHrP(-36/+139)のcDNAを使用して、De Miguelおよびその共同研究者(De Miguel et al., Endocrinology, 142: 4096-105 (2001))により先に説明された、インビトロ部位特異的変異誘発によって作られた。それぞれは、mRNAを安定化させるため(RNAの分解を促進する天然PTHrP 3'UTR AUUUAの不安定モチーフを置換するため)、ならびに、転写の終了、ポリアデニル化、およびスプライシングシグナルを提供するため、ヒト-グロビン3'UTRを含んでいる。構築物はまた、現在の研究では使用されていないが、以前に、A-10細胞におけるPTHrPの局在化に効果が無く、または機能的効果を有さないことが実証されている(De Miguel et al., Endocrinology, 142: 4096-105 (2001))、ヘマグ

10

20

30

40

50

ルチニン (HA) タグを含んでいる。配列の確認は、DNAシーケンシングにより行われる。

【 0 1 8 7 】

B. インビトロの転写および翻訳

PTHrPの様々な変異体のインビトロにおける転写および翻訳の効率を評価するため、転写結合および翻訳結合したウサギの網状赤血球溶解物システム (Promega Corp., Madison, WI) において、pGEM-3プラスミド内の1 μ gの各構築物を、製造業者による説明書に従って転写および翻訳した。[3 H]リジンで標識された翻訳産物は、A-10においてSDS-PAGEにより20% ポリアクリルアミドトリス-グリシングルに分析され、次にオートラジオグラフィーを使用して試験された。

【 0 1 8 8 】

C. 細胞培養、安定したトランスフェクション、および細胞数の測定

ラット胎児の胸大動脈に由来するVSM細胞系A-10をAmerican Type Culture Collection社 (Rockville, MD) から購入した。細胞は、4.5 g/リットルのグルコース、10% FBS、100 U/mlのペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシン、および2 mMのL-グルタミンを含むDMEM中で培養された。トランスフェクションの24時間前に、A-10細胞を1.5 \times 10⁵/ウェルの濃度で6ウェルプレートにプレーティングした。各プラスミド1 μ gおよび10 μ lのリポフェクタミン (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) を含む無血清培地中で、37^oCで6時間、トランスフェクションを行った。一過的トランスフェクションのため、24時間の回復の後、細胞をガラスチェンバースライド上に再添加し (Lab Tek, Nalge Nunc International, Naperville, IL) 、48時間後に免疫染色した (以下参照)。250 μ g/mlのジェネティシン (G418, Life Technologies, Inc.) での処理により、安定にトランスフェクションされたクローニングを選択した。各構築物につき5~12個の別々のクローニングを選択し、増殖させ、下記に記載されたようにPTHrP構築物の発現を分析した。クローニングは250 μ g/mlのG418の存在下で、継続的に培養された。通常、それぞれの構築物に由来する個々のクローニングについて三回から四回の成長曲線が、各構築物につき合計で七回から十二回の成長曲線が実施された。本方法は、細胞増殖および細胞生存に対するPTHrPの複合効果を評価するが、本システムにおけるPTHrPの効果は、トリチウム化チミジン取り込み反応 (Massfelder et al., Proc. National Acad. Sci. USA, 94: 13630-635 (1997)) およびフローサイトメトリーを使用して決定された増殖を主に反映するものである。

【 0 1 8 9 】

D. PTHrP免疫放射線分析法

異なるPTHrP構築物により安定にトランスフェクションされた、または異なるアデノウイルスによって感染されたA-10血管平滑筋細胞から分泌されたPTHrPを、PTHrP (1-36) に特異的な、二つの位置での (two-site) 免疫放射線分析法 (IRMA) を使用して、コンフルエントの24時間馴化培地において測定した (Massfelder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 13630-635 (1997) ; De Miguel et al., Endocrinology, 142: 4096-105 (2001))。アッセイ法の検出限界は0.5 pMである。細胞抽出液中のPTHrPの測定のため、細胞を100 mmの培養プレートにプレーティングした。コンフルエントになったら、室温でPBSにより細胞を洗浄し、1 % Igepal CA-630 (Sigma, St. Louis, MO) 、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、100 μ g/mlのPMSF、45 μ g/mlのアプロチニン、および1 mMのオルトバナジン酸ナトリウム (sodium orthovanadate) を含むPBS中に氷上で再懸濁した。これらを1秒間ずつ10回超音波分解し、氷上で60分間インキュベートし、次に4^oCで10分間10,000 \times gで遠心分離した。細胞抽出液である上清を、上記で説明したPTHrP (1-36) IRMAを使用して、PTHrP免疫反応性について分析する。プラッドフォード法に基づいてタンパク質を測定し、結果をpmol/mg抽出タンパク質として表す。

【 0 1 9 0 】

E. 統計

成長曲線の統計学的分析を、Student-Newman-Keuls改変法 (modification) による一元配置分散分析を使用して行った。全ての値は平均 \pm SEMとして表される。0.05に等しい、またはそれ以下の「P」値は有意と見なされる。

10

20

20

30

40

40

50

【0191】

III. PTHrP変異体を使用したPTHrPカルボキシ末端領域のマッピング

アミノ酸(107-111)、(112-120)、(121-130)および(131-139)からなる部分の欠失が調製され(図1)、ラットの動脈平滑筋系であるA-10に、安定にトランスフェクションされた。保存性がそれほど高くない(112-139)領域に比べ、(107-111)領域は哺乳動物種間で非常に高度に保存されているため、欠失用として選択された。

【0192】

先に報告されているように(Massfelder et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 94: 13630-635 (1997); de Miguel et al., Endocrinology, 142: 4096-105 (2001))、野生型PTHrP(WT)の過剰発現は、ベクター単独でトランスフェクションされた細胞(図2)と比較して、A-10細胞の成長を刺激する。驚くべきことに、図2に示されるように、その強度な進化的保存性にもかかわらず、(107-111)領域の欠失は、野生型PTHrP構築物で、すなわちWT陽性実験対照群で安定にトランスフェクションされた細胞において観察されるPTHrPを介した刺激と比較して、PTHrPを介したVSM細胞増殖の刺激に対して有害な影響を与えたなかった。同様に驚くべきことには、例えば112-120、121-130、および131-139のような他の三つの欠失変異体それぞれは、PTHrPを介したVSM細胞増殖の刺激を本質的に完全に阻害した(図2)。

【0193】

NetPhos 2.0データベースを使用したPTHrP(112-139)カルボキシ末端領域の分析により、Ser119、Ser130、Thr132、Ser133、およびSer138は、カルモジュリンキナーゼIIおよび/またはプロテインキナーゼCのリン酸化基質としての役目を潜在的に果たすことが示された(図3)。したがって、これらの各部分におけるアラニン置換変異体は、これらのセリンおよびトレオニンがすべてアラニンに変異した六番目の構築物とともに個別に調製され、A-10細胞に安定にトランスフェクションされた(図4)。

【0194】

図5に示されるように、Ser133はPTHrPによるVSM細胞の増殖の刺激に必要とされていない。つまり、Ser133のアラニンへの変換は、増殖に対し悪影響を及ぼさず、これらの細胞は、野生型PTHrPを過剰発現したA-10細胞と同様の速度で、かつ、ベクターのみでトランスフェクションされた細胞よりも早く成長した。これに対し、アラニン結合変異体と同様、他の四つのカルボキシ末端PTHrP変異体はそれぞれ、野生型PTHrPにより駆動される増殖を、本質的に完全に阻害した。従って、PTHrPカルボキシ末端のアミノ酸残基である、Ser119、Ser130、Thr132およびSer138はみな、PTHrPによるVSM細胞増殖の刺激に不可欠である。

【0195】

選択されたクローンがPTHrPを調製できないためにカルボキシ末端PTHrP変異体がA-10細胞において増殖を刺激できないという可能性を排除するために、上記に使用された各構築物の三つ以上のクローンのPTHrPを調製する能力を、細胞抽出液および細胞馴化培地の両方で試験して、三回または四回分析した。PTHrPは、上述のPTHrP(1-36)免疫放射線分析法により分析された。図6に見られるように、使用された個々の構築物により、野生型PTHrP発現細胞において見られるものと同程度に容易に測定できるPTHrPが産生され(点線はアッセイ法の検出限界が0.5 pMであることを表している)、かつそれぞれ、ベクターでトランスフェクションされた細胞よりもはるかに多くのPTHrPを生産した。馴化培地および細胞抽出液の分析により、全てが同等のレベルで発現していることが示されたので(図6)、従って、カルボキシ末端PTHrP変異体がA-10血管平滑筋細胞において増殖を刺激できないことは、構築物の効果が無いことや過少発現に起因したものではない。まとめると、これらの結果は、PTHrPカルボキシ末端のセリンおよびトレオニン残基が生理的機能を有し、かつ、例えばリン酸化、N-アセチルガラクトサミンなどのO-グリコシル化、およびアシル化などの翻訳後修飾、またはその他の翻訳後修飾の重要な対象であることを、初めて示唆するものである。

【0196】

10

20

30

40

50

実施例2 ラットの頸動脈新生内膜形成に対するPThrPカルボキシ末端変異体の影響のインピボにおける測定

例えは、これらに限定はされないが、112-120、121-130、131-139、AC-HA、A119-HA、A130-HA、A132-HA、A133-HA、およびA138-HA PTHrPカルボキシ末端変異体；または112-120、121-130、131-139、AC-HA、A119-HA、A130-HA、A132-HA、A133-HA、およびA138-HA PTHrPカルボキシ末端変異体をコードするポリヌクレオチドなど異なるPThrP構築物で安定にトランスフェクションされた、または例えは、これらに限定はされないが、このようなPThrPカルボキシ末端変異体構築物を含むアデノウィルスのようなウィルスに感染した、A-10血管平滑筋細胞などの宿主細胞から単離されたPThrP変異体ポリペプチドが、バルーンによる血管損傷ラットモデルに及ぼす影響が試験された。例えは、体重450-600 gの成体雄性Sprague-Dawley系ラットを、ケタミン（体重1 kgにつき150 mg）およびキシラジン（体重1 kgにつき15 mg）の腹腔注射により麻酔する。首の切開の後、2Fフォガティー（Fogarty）バルーンカテーテル（Baxter, Irvine, CA）を、動脈切開により左総頸動脈に挿入する。損傷を確実に適切で再現可能なものにするため、較正された加圧装置でバルーンカテーテルを2気圧で5分間膨らませる。バルーンを三回前後に動かした後、取り出す。プラスチック製のカテーテル（27 1/2ゲージ）を外頸動脈切開により導入し、総頸動脈をPBSで洗浄した後、適切な賦形剤のみ、PThrPタンパク質（体重1 kgにつき0.000001 mgから100,000 mgのタンパク質）を含む賦形剤、もしくはカルボキシ末端変異体PThrPタンパク質（体重1 kgにつき0.000001 mgから100,000 mgのタンパク質）を含む賦形剤、または、PThrPタンパク質をコードするポリヌクレオチド（体重1 kgにつき0.000001 mgから100,000 mgのポリヌクレオチド）、または、カルボキシ末端変異体PThrPタンパク質をコードするポリヌクレオチド（体重1 kgにつき0.000001 mgから100,000 mgのポリヌクレオチド）を含む賦形剤を導入する。または、PThrP（1 pfu/mlから 1×10^{14} pfu/ml）をコードする適切なポリヌクレオチド構築物、またはカルボキシ末端変異体PThrP（1 pfu/mlから 1×10^{14} pfu/ml）を含む、アデノウィルスのようなウィルス担体を投与する。

【0197】

例えは、組み換えアデノウィルス株ストックは解凍から2時間以内に使用する。1 pfu/mlから 1×10^{14} pfu/mlのアデノウィルスベクター50 μl（AdLacZまたはAd-カルボキシ末端PThrP変異体）、またはDMEMを、プラスチック製のカテーテルを通して、損傷した単離された総頸動脈部分に注入する。15分後、アデノウィルスまたはDMEMを吸引する。近接部の外頸動脈を結紮し、総頸動脈および内部頸動脈を通る血流を回復させる。バルーンによる損傷の二週間後、対側性の対照群動脈（損傷もアデノウィルス処理も受けていない）、および、アデノウィルス処理されていない（DMEM）またはアデノウィルス処理された（Ad-LacZまたはAd-カルボキシ末端PThrP変異体）バルーンによる損傷を負った動脈を採取し、4

で48時間、4% パラホルムアルデヒド内に固定し、パラフィンブロックに包埋し、切断して（5 gm）、ヘマトキシリンおよびエオシン、またはフォン・ギーゼン法（Von Giesen）のいずれかによって染色して内弾性板および外弾性板（internal and external elastic lamina）を露呈する。画像を得、NIHイメージプログラムを使用して新生内膜および中膜の断面積を測定し、面積比を計算する。

【0198】

賦形剤のみを投与された血管形成術を受けた血管において観察される新生内膜と中膜の比率と比較した、カルボキシ末端PThrP変異体ポリペプチドを投与された血管形成術を受けた血管における新生内膜と中膜の比率の減少は、カルボキシ末端変異体PThrPに抗再狭窄効果があることを表している。同様に、賦形剤のみを投与された血管形成術を受けた血管において観察される新生内膜と中膜の比率と比較した、カルボキシ末端PThrP変異体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの与えられている血管形成術を受けた血管における新生内膜と中膜の比率の減少は、カルボキシ末端変異体PThrPをコードするポリヌクレオチドに抗再狭窄効果があることを表している。さらに、カルボキシ末端変異体PThrPをコードしないポリヌクレオチド構築物を含むウィルス担体を投与された血管形成術を受けた血管において観察される新生内膜と中膜の比率と比較した、カルボキシ末端変異体PT

10

20

30

40

50

HrPをコードするポリヌクレオチド構築物を含むウイルス担体を投与された血管形成術を受けた血管において観察される新生内膜と中膜の比率の減少は、カルボキシ末端変異体PTHrPに抗再狭窄効果があることを表している。処理群の間で観察される新生内膜と中膜の比率の違いを評価するために、Student T-テストが使用される。0.05に等しい、またはそれ以下の「P」値は有意と見なされる。

【0199】

実施例3 VSM細胞における、PTHrPに応答したG₁/Sへの細胞周期の変換は、主要G₁チェックポイント網膜芽細胞腫タンパク質であるpRbのリン酸化に関連している

I. 概要

研究の初期に、本発明者らは、細胞数およびトリチウム化したチミジンの取り込み法 (Massfelder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 13630-635 (1997)) によって評価されたように、VSM細胞における野生型PTHrPの過剰発現が、細胞増殖の速度を速めることを実証した。さらに、PTHrPの分裂誘発効果または抗分裂誘発効果は、細胞から分泌されて細胞への結合によりPTH/PTHrP受容体を活性化するかどうか、または、PTHrPが核移行シグナル (NLS) により細胞核へと方向付けられてそこで細胞増殖を刺激する分子事象が誘発されるかどうかに依存している。NLSはPTHrP分子の中間領域内の複数塩基性アミノ酸領域である。これらの研究の目的は、PTHrPの過剰発現による細胞周期活性化の基礎を成す分子メカニズムを決定することである。

【0200】

II. 方法

A. 組み換えアデノウィルス

-ガラクトシダーゼ (Invitrogen, Carlsbad, CA)、ヒトPTHrP (-36から139)、およびNLS欠失ヒトPTHrPをコードするアデノウィルスが、テキサス州ダラス市、テキサス大学南西医療センター (University of Texas Southwestern in Dallas, TX) のChristopher Newgard博士によって供与されたAd.5構築物を使用して、先に報告されたように (Garcia-Ocana et al., J. Biol. Chem., 278: 343-51 (2003)) 調製された (Becker et al., Methods Cell Biol., 43: 161-89 (1994))。感染多重度 (MOI) は、OD₂₆₀を使用した分光光度法およびプランク測定法により決定された。

【0201】

B. 細胞周期分析

細胞周期の分布をフローサイトメトリーによって測定した。ベクターのみで安定にトランスフェクションされ、指数的に増殖しているA-10血管平滑筋細胞であるWT-PTHrPまたはNLS-PTHrPを、72時間、血清飢餓状態に置いた。細胞をPBSで洗浄し、10% FBS完全DMEMにより24時間インキュベーションした。その後細胞を採取し、トリプシン化して、PBSで洗浄し、70% エタノール中、4℃で少なくとも一晩培養した。フローサイトメトリーを行う日に、固定した細胞をPBSで洗浄し、沈殿させて、50 μg/mlのヨウ化プロピジウム、100U/mlのRNase Aおよび1 g/Lのグルコースを含む染色用PBS溶液中に再懸濁させた。染色された細胞を、30 μmのナイロン製のメッシュを通してろ過し、DNA内容物をBecton-Dickinsonフローサイトメーターで分析した。

【0202】

C. イムノプロット分析

細胞の抽出液を調製して、標準的な方法によりイモビロンP膜にイムノプロットしてトランスファーする、7.5% SDS-PAGEによって分析した (Stuart et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 279: E60-7 (2000))。リン酸化された形態、および脱リン酸化された形態の免疫反応性のpRbタンパク質測定のため、pRbおよびppRbの両方を認識する、一次抗pRb抗体 (Pharmingen, San Diego, CA) を使用した。免疫反応性 -チューブリン、免疫反応性p27、および免疫反応性アクチンのタンパク質レベルの測定には、一次抗 -チューブリン抗体 (Oncogene (商標) Research Products, EMD Bioscience, Inc., San Diego, CA, USA)、一次抗p27抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)、および一次抗アクチン抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) をそれぞ

10

20

30

40

50

れ使用した。

【0203】

D. PTHrP免疫放射線分析法

異なる PTHrP構築物により安定にトランスフェクションされた、または異なるアデノウイルスに感染したA-10血管平滑筋細胞から分泌されたPThrPを、PThrP(1-36)に特異的な二つの位置での免疫放射線分析法(IRM)を使用して、コンフルエントで得られた24時間10
10
馴化培地中で測定した(Massfelder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 13630-6
35(1997); De Miguel et al., Endocrinology, 142: 4096-105(2001))。本アッセイ法の検出限界は0.5 pMである。細胞抽出液中のPThrPの測定のため、細胞を100 mmの培養プレートにプレーティングした。コンフルエントになつたら、室温でPBSにより細胞を洗浄し、1% Igepal CA-630(Sigma, St. Louis, MO)、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、100 μg/mlのPMSF、45 μg/mlのアプロチニン、および1 mMのオルトバナジン酸ナトリウムを含むPBS中に氷上で再懸濁した。これらを1秒間ずつ10回超音波分解し、氷上で60分間インキュベーションし、次に4 20
で10分間10,000×gで遠心分離した。細胞抽出液である上清を、上記で説明したPThrP(1-36)IRMを用いて、PThrP免疫反応性について分析する。ブラッドフォード法に基づいてタンパク質を測定し、結果をpmol/mg抽出タンパク質として表す。

【0204】

III. PTHrPの過剰発現はpRbタンパク質のリン酸化を刺激し、かつA-10 VSM増殖における血清誘発性G1/G0停止を無効にする

図7に示されるように(かつHupfeldおよびWeiss, Am J Physiol Endocrinol Metab 281: E207-E216(2001)に概説されているように)、VSMおよびその他細胞におけるG1-から-S相への移行は、網膜芽細胞腫タンパク質(Rb)のリン酸化を伴い、これによりS相転写因子であるE2Fへの阻害効果が生じ、よって有糸分裂に必要な初期遺伝子の転写が引き起こされる(Hiebert et al., Genes Dev, 6: 177-18(1992))。G1サイクリン(サイクリンD1、サイクリンE)と複合した、サイクリン依存性キナーゼ(CDK2、CDK4、およびCDK6)は、G1の間にRbをリン酸化し、それによって細胞周期移行の運動事象を開始させる。サイクリンキナーゼ阻害因子(CKI)は、サイクリン/CDK複合体の活性を調整し、そのためG1相からS相への進行に重大な影響を与えることがわかっている。p21Waf1/Cip1およびp27Ki67を含むCKIのCip/Kipファミリーは、G1相におけるサイクリン/CDK複合体の活性を阻害することができる(Sherr, Cell 73: 1059-1065(1993))が、これらの分子についての最近の研究により、これらが、ある種の条件下で、サイクリンD依存性およびサイクリンE依存性のキナーゼのアセンブリに必要とされることがわかっている(Cheng et al., EMBO J 18: 1571-1583(1999); Donjerkovic et al., Cell Res 10: 1-16(2000); Weiss et al., J Biol Chem 275: 28340(2000))。

【0205】

細胞周期分析は、図8Aに示されるように、ヨウ化プロピジウムによる標準フローサイトメトリー解析を使用して行われる。図に示されているように、24時間の血清飢餓状態により、トランスフェクションされていないA-10細胞において本質的に完全な増殖の停止が起り、血清を加えることにより細胞周期が再開される。

【0206】

すなわち、血清飢餓条件下で成長したA-10 VSM細胞は、大部分の細胞がG0で、少数がSおよびG2Mにある状態で、緩やかな速度で増殖する。血清を添加した後、A-10細胞は増殖を開始し、SおよびG2Mの両方にある細胞の割合が著しく増加する。これに対し、野生型PTHRPを過剰発現するA-10 VSM細胞は、血清飢餓状態でも減速せず(図8A)、血清が十分にあるA-10 VSM細胞よりも速い速度で増殖する。血清の添加により増殖の速度がより加速されることはない。

【0207】

腫瘍抑制タンパク質である網膜芽細胞腫タンパク質(pRb)は、VSM細胞増殖の重要な調整因子であることがわかっている(Stuart et al., Am J Physiol Endocrinol Metab. 27 50

9 : E60-7 (2000) およびその参考文献) 。分裂誘発性刺激に応答したpRbのリン酸化および不活性化により、G₁/S移行および増殖が起こる。pRbのリン酸化の阻害は、VSM細胞における細胞周期の停止、および増殖阻害の原因となる。さらにG₁進行中のRbのリン酸化は、そのポイントを超えると細胞がDNA合成を始めるG₁制限ポイントを通過する移行と同時に起こる。これらの理由のため、および、pRbの低リン酸化が、細胞表面受容体と相互作用する細胞外PThrP (1-36) の抗分裂誘発性効果に関係しているため (Stuart et al. , Am J Physiol Endocrinol Metab. 279 : E60-7 (2000)) 、核PThrP駆動性のVSM細胞増殖に応答するpRbのリン酸化状態が、本研究により決定された。

【 0 2 0 8 】

図8Bにおいて、Rbのリン酸化は、pRb抗体 (Pharmingen, San Diego, CA) を使用してウエスタンプロットにより試験された。下部のパネルにおいて チューブリンは装填用の対照群として示されている。また示されたように、正常なA-10細胞において、血清が枯渇した状態 (-FBS) であるか血清が十分にある状態 (+S) であるかに関わらず、pRbの大部分は脱リン酸化形態であった。これに対して、野生型PThrPを過剰発現するA-10細胞は、血清が十分にある状態で成長するか血清飢餓状態で成長するかに関わらず、ppRbとして表されるpRbの構造的リン酸化を示した。pRbの高リン酸化に関連して、野生型PThrPの過剰発現がSおよびG₂/Mチェックポイントにおける細胞周期の進行を誘発するという観察は、これらの以前の観察と一致しており、かつ、WT-PThrPを過剰発現するA-10細胞への[³H]チミジン組み込みの促進を表す本発明者らの先の結果と一致している (Massfelder et al. , Proc Natl Acad Sci USA 94 : 13630-5 (1997)) 。これらの研究は、PThrPの核の存在がpRbのリン酸化の原因となることを示している。

【 0 2 0 9 】

またこれは、PThrPが、少なくとも部分的に、サイクリンD-cdk4、pRb、およびE2F経路を介して作用すること、およびこの作用が血清由来増殖因子に依存しないことを実証している。PThrPを過剰発現するA-10 VSM細胞において観察されたpRbの構造的リン酸化は、PThrPが、例えばサイクリンD-cdk4経路など、上流活性因子として機能することを示唆している (図7も参照) 。

【 0 2 1 0 】

図9Aに示されるように、対照群A-10 VSM細胞は、大部分の細胞がG0で少数がSおよびG2Mにある状態で、緩やかな速度で増殖する。これに対して、野生型PThrPタンパク質を過剰発現するために安定にトランスフェクションされたA-10 VSM細胞は、速い速度で増殖し、SおよびG2Mの両方にある細胞の割合は、対照群のA-10 VSM細胞と比較して著しく増加する。核ターゲティングの消失に伴い、PThrP NLS欠失変異体によるA-10 VSM細胞の安定なトランスフェクションにより、G1/G0での細胞のほぼ完全な停止の原因となる。実際に、SおよびG2Mにおける細胞の割合は、対照群のA-10 VSM細胞で観察されるSおよびG2Mにおける細胞の割合よりも低い。図9Bに示されるように、PThrP NLS欠失変異体タンパク質を過剰発現するVSM細胞において見られる増殖の停止は、脱リン酸化形態のpRbタンパク質の存在に関連している。

【 0 2 1 1 】

p27kip1タンパク質は、G1からSへの移行を制御する中心的な調節分子としてますます認められている (Stuart et al. , Am J Physiol Endocrinol Metab, 279 : E60-E67 (2000)) 。正常な細胞において、p27kip1のレベルは細胞が静止状態となるのに伴って増加し、細胞周期の再開により突然減少する (Toyoshima et al. , Cell, 78 : 67-74 (1994)) 。p27kip1の誘発はまた、抗分裂誘発性刺激に応答した細胞周期の停止を調整すると思われる (Durand et al. , Curr Biol 8 : 431-440 (1998) ; Matsuo et al. , Oncogene 16 : 3337-3343 (1998) ; Polyak et al. , Genes Dev 8 : 9-22 (1994)) 。Katoら (Cell 79 : 487-496 (1994)) は、cAMPが、サイクリンD1またはcdk4のレベルを変更せずにp27kip1を誘発することにより、コロニー刺激因子-1に刺激されたマクロファージにおけるG1の増殖停止の原因となることを最初に明らかにした。興味深いことに、Sheaffらによる研究 (Genes Dev 11 : 1464-1478 (1997)) により、p27kip1のレベルがサイクリンE-cdk2複合体そのも

のによって翻訳後に制御されることが証明された。これらの研究において、サイクリンE-*cdk2*複合体の蓄積は、*p27kip*のリン酸化による細胞周期の進行を促進し、これにより細胞からの*p27kip1*の除去を増加させる。

【0212】

A-10 VSM細胞における*p27kip1*の発現に対する、野生型PThrPの過剰発現およびPThrP NLS欠失変異体の影響が、ウェスタンプロット分析により試験された(図10)。図10に示されるように、A-10 VSM細胞は免疫反応性の*p27kip1*タンパク質を発現する。A-10 VSM細胞におけるPThrPタンパク質の過剰発現は、対照群のA-10細胞において見られる免疫反応性の*p27kip1*タンパク質のレベルと比較して、免疫反応性の*p27kip1*タンパク質のレベルを有意に減少させる。これに対し、A-10 VSM細胞がPThrP NLS欠失変異体タンパク質を過剰発現するように操作することにより、対照群のA-10 VSM細胞または野生型PThrPタンパク質を過剰発現するA-10 VSM細胞のいずれかにおいて見られる免疫反応性の*p27kip1*タンパク質のレベルと比較して、免疫反応性の*p27kip1*レベルを有意に増加させる。

【0213】

実施例4 NLS欠損PThrPのアデノウィルス遺伝子の送達は、動脈の再狭窄を阻害する

I. 概要

上述の如く、本発明者らは、完全なPThrPがVSM増殖の強力な活性因子である一方、NLSの欠如したPThrPに関しては反対のことが言えることをこれまでに実証している。NLSの欠如したPThrPは、VSM増殖の強力な阻害因子である(Massfelder et al., Proc Natl Acad Sci USA 94(25): 13630 (1997); de Miguel et al., Endocrinology 142(9): 4096 (2001))。以下の研究において、ラットおよびブタの血管形成モデルを使用して、血管の再狭窄などの平滑筋の増殖により生じる疾患における、PThrP NLS欠失変異体の治療的可能性を評価した。

【0214】

II. 方法

A. 頸動脈血管形成のラットモデル

ケタミン(体重1 kgにつき150 mg)およびキシラジン(体重1 kgにつき15 mg)の腹腔内注射により麻酔された、体重450 g~600 gの成体雄性Sprague-Dawley系ラットの左総頸動脈に、バルーンによる損傷およびアデノウィルス感染を行った。首の切開の後、2Fフォガティーバルーンカテーテル(Baxter, Irvine, CA)を、動脈切開により左総頸動脈に挿入した。損傷を確実に適切で再現可能なものにするため、較正された加圧装置でバルーンカテーテルを2気圧で5分間膨らませた。バルーンを三回前後に動かした後、取り出した。プラスチック製のカテーテル(27 1/2ゲージ)を外頸動脈切開により導入し、アデノウィルスを導入する前に総頸動脈をPBSで洗浄した。組み換えアデノウィルスストックを、解凍から2時間以内に使用した。 10^{10} pfu/mlのアデノウィルスベクター-50 μl(AdLacZまたはAd-NLS)またはDMEMを、プラスチック製のカテーテルを通して、損傷した単離された総頸動脈部分に注入した。15分後、アデノウィルスまたはDMEMを吸引した。近接部の外頸動脈を結紮し、総頸動脈および内部頸動脈を通る血流を回復させた。バルーンによる損傷の二週間後、対側性(右)の対照群の動脈(損傷もアデノウィルス処理も受けていない)、およびアデノウィルス処理されていない(DMEM)またはアデノウィルス処理された(Ad-LacZまたはAd-NLS)、バルーン損傷を負った(左)動脈を採取し、4℃で48時間、4%パラホルムアルデヒド内に固定し、パラフィンブロックに包埋し、切断して(5 μm)、ヘマトキシリンおよびエオシン、またはフォン・ギーゼン法のいずれかによって染色して内弾性板および外弾性板を示した。画像を得、NIHイメージプログラムを使用して新生内膜および中膜の断面積を測定し、面積比を計算した。Student T-テストを使用して、処理群で認められた内膜と中膜の比率の統計的有意性を評価した。0.05に等しい、またはそれ以下の「P」値は有意と見なされる。

【0215】

B. ブタの動脈損傷モデル

NLS PThRP変異体遺伝子(Ad-NLS)を含むアデノウィルスにより、またはレポーター

10

20

30

40

50

遺伝子 (Ad-LacZ) により、国産ハンプシャー (Hampshire) 種のブタ (15 kg) の腸骨動脈に、アデノウィルスを介した遺伝子移入を行った。ケタミン (体重1 kgにつき20 mg) およびキシラジン (2 mg/kg) で鎮静させた後、ブタに挿管しイソフルレン/NOで麻酔した。滅菌外科技術により、#3フレンチ・バルーンカテーテルを、内腸骨動脈を通って腸骨動脈内に挿入し、2気圧まで5分間膨らませた。動脈部分を5 mLの生理食塩水で灌いだ。組み換えアデノウィルスストックを、解凍から2時間以内に使用した。 10^{10} pfu/mlのアデノウィルスベクターを1 ml (Ad-LacZまたはAd- NLS)、またはDMEMを、プラスチック製のカテーテルを介して、損傷を受けた、単離された腸骨動脈部分に注入した。30分後、アデノウィルスまたはDMEMを吸引した。アデノウィルス処理後、カテーテルを除去し、動脈の流れを回復させた。アデノウィルス処理の3週間後に動物をと殺し、腸骨動脈の血管形成された部分を、陰性正常対照群部分として使用されたより遠位の部分とともに採取した。

10

20

30

40

50

【0216】

採取した血管組織を4 で48時間、4% パラホルムアルデヒド内に固定し、パラフィンブロックに包埋し、切断し (5 μ m)、ヘマトキシリンおよびエオシン、またはフォン・ギーゼン法のいずれかによって染色して、内弹性板および外弹性板を示した。画像を得、NIHイメージプログラムを使用して新生内膜および中膜の断面積を測定し、面積比を計算した。Student T-テストを使用して、処理群で認められた内膜と中膜の比率の統計的有意性を評価する。0.05に等しい、またはそれ以下の「P」値は有意と見なされる。

【0217】

C. 組み換えアデノウィルスベクター

デューク大学 (Duke University) のDr. Chris Newgardから入手した、E1aおよびE1bが欠失した複製不全Ad5アデノウィルスを、-ガラクトシダーゼ (AdLacZ)、野生型PThrP (Ad-WT)、または、NLS (Ad NLS) 構築物が欠失したPThrPを発現するように操作し、これらの研究に使用した。Beckerおよびその共同研究者によって説明されたように (Becker et al., *Meth. Cell Biol.* 43: 161-89 (1994))、三つの複製不全の組み換えアデノウィルスベクターを構築し、増殖させ、かつ精製した。配列の確認は、DNAシーケンシングにより行われた。これらのベクターは、アデノウィルス5血清型から調製されたもので、E1およびE3領域に欠失を含んでおり、それにより複製不能となっている。三つのアデノウィルスベクター (Ad) には、CMVプロモーターおよびエンハンサーによって駆動される、NLS配列の欠失したPThrPをコードするベクター (Ad NLS) が含まれる。実験の対照群としては、cDNA挿入が欠失したアデノウィルスベクターであるAdLacZが使用される。三番目のアデノウィルスベクターであるAd-WTは野生型PThrPをコードする。ウィルスストックは0.45 μ mのフィルターで滅菌され、MOI 2500でのA-10 VSM細胞の感染により、複製可能なウィルスの存在が評価された (図11参照)。これらの実験で使用されたウィルスストックのなかで、複製可能なウィルスを生じたものはなかった。これらのウィルスストックは、滴定濃度 10^{10} ~ 10^{14} プラーク形成ユニット (pfu)/mlまで希釈され、-20 で保存されて、使用前に氷上で解凍された。

【0218】

III. NLS欠損PThrPのアデノウィルス遺伝子の送達は、ラットの動脈損傷モデルにおける動脈の再狭窄を阻害する

ラットの頸動脈において、VSM細胞でのPThrP遺伝子の発現は、バルーン血管形成に応答した新生内膜の形成中に著しく増加する (Stuart et al., *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 279: E60-7 (2000))。ヒトの冠状動脈において、冠状動脈のアテローム性動脈硬化症部位にあるVSM細胞はPThrPを過剰発現する (Nakayama et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 200: 1028-35 (1994))。Ishikawaら (*Atherosclerosis.* 152: 97-105 (2000)) は近年、PThrP (1-34) の局所投与が、動脈損傷のあるラット腸骨動脈モデルにおいて、非閉塞性ポリエチレンカフによって誘発される内膜の肥厚を阻害することを実証した。これらの観察は、動脈壁内で局所的に產生されたPThrPが、損傷に対する動脈の応答において何らかの役割を果たしていることを暗示しているが、その役割が何であるかは定義していない。NLSの欠如したPThrPがVSM増殖の強力な阻害因子であるという本発明者らの先

の所見は、頸動脈の血管形成時にアデノウイルスにより動脈壁に送達された NLS-PTHrP が、新生内膜過形成の予防における治療効力を有するか否かという疑問を投げかけた。

【0219】

初期の研究が行われて、-ガラクトシダーゼ (AdLacZ)、野生型PTHrP (AdWT) または NLSの欠失したPTHrP (Ad NLS) を発現するアデノウイルスが、培養中のA-10 VSM細胞を効果的に形質導入することが確認され、図11にまとめられた。図11Aに示されるように、AdLacZウイルスを、感染多重度 (MOI) = 0、1250、または2500で、ラットのA-10 VSM培養細胞に15分間導入し、標準的な方法を用いて48時間後に-ガラクトシダーゼを視覚化した。-ガラクトシダーゼ活性の活発な発現がMOI 2500でのA-10 VSM細胞の感染とともに認められた。そのため、三つの全てのウイルスをMOI 2500で15分間A-10 VSM細胞に導入し、48時間後にPTHrPの產生を試験し、先に詳しく説明されたように(図11B; 実施例1も参照)、PTHrP免疫放射線分析法により定量化した。NLSの欠失は、PTHrPの核の侵入を阻害する (Massfelder et al., Proc Natl Acad Sci USA 94 (25): 13630 (1997); de Miguel et al., Endocrinology 142 (9): 4096 (2001)) が、ペプチドのPTHrP (1-36) 領域の產生、または分泌は阻害しない。従って、この分析法はNLS欠失構築物によるPTHrPの產生の測定法として機能する。図11Bに示されるように、野生型およびNLS欠失型のPTHrP両方によるA-10 VSM細胞の感染は、これらの細胞における可測的なPTHrPの產生をもたらす。すなわち、AdLacZまたはAd NLSアデノウイルスベクターは、培養中のA-10 VSM細胞の形質導入に対し有効かつ効果的である。

【0220】

動脈の再狭窄に対するAd- -NLS-PTHrPの過剰発現の影響をインビオで評価するため、上述のように、ラットの標準的な頸動脈血管形成再狭窄モデルを使用した(方法の章を参照されたい)。図12Bに示されるように、バルーン血管形成は、対側性の対照群頸動脈(図12A)には存在しない、著しい動脈再狭窄および新生内膜形成を誘発する。同様に、血管形成とその後に続くAdLacZの投与により、同程度の再狭窄および新生内膜形成が起こる(図12C)。劇的に対照的に、血管形成とそれに続くAd- -NLS-PTHrPアデノウイルスの投与は、このモデルにおける動脈の再狭窄を本質的に完全に抑制する(図12D)。

【0221】

これらの研究の反復により統計的評価が可能になり、これを以下の表7にまとめ、かつ図13にグラフで表した。

【0222】

【表7】

	新生内膜面積 (mm ²)	中膜面積 (mm ²)	新生内膜/中膜の 比率
対照群頸動脈、 血管形成なし (n=28)	0.00	0.145+-0.011	0.00
アデノウイルスなしの 血管形成 (n=9)	0.099+-0.018	0.142+-0.010	0.68+-0.17
Ad-lacZを伴う 血管形成 (n=9)	0.098+-0.020	0.209+-0.042	0.50+-0.12
Ad-Δ-NLS-PTHrPを伴う 血管形成 (n=10)	0.006+-0.002*	0.181+-0.017	0.03+-0.01**

* = p < 0.0025; ** = p < 0.0001

【0223】

血管形成のみ、または血管形成とそれに続くAdLacZによる治療は、新生内膜の著しい形成の原因となる。これに対して、血管形成とそれに続くAd- -NLS-PTHrPによる治療は、動脈の再狭窄を本質的に完全に(95%)阻害する。総合すると、これらの研究はPTHrP、特にNLS欠失型のPTHrPが動脈平滑筋細胞の増殖、移行、およびマトリクスの分泌に関連した疾患における治療的恩典を有することを実証している。この方法を同様にヒトの冠状動脈

10

20

30

40

50

および末梢動脈疾患の治療に使用することができる。

【0224】

仮説のように、血管形成時の、アデノウイルス構築物を使用した NLS-PTHrPの送達は、動脈損傷後の新生内膜の過形成の発生を著しく抑制する。この新生内膜の形成に対する抑制反応は、量的には多く、統計的に有意で、復元性も高い。Ad-lacZウイルスの並行投与には独立した効果がなかったため、この効果は NLS-PTHrPのみの属性であると思われる。重要なことに、血管形成時に NLS-PTHrPを15分間送達する方法は、血管形成を受けているヒトにおいても使用が可能である。

【0225】

特定の理論に拘束されるわけではないが、Ad- NLSが新生内膜の形成を阻害するメカニズムについて、二つの一般的な仮説がある。まず、PTHrPにおけるNLSの欠失によりPTHrPの核の標的化が阻害され、そのため細胞周期を駆動する能力が阻害される。しかしながら、上述のように、 NLS-PTHrPの過剰発現もまたPTHrP(1-36)の分泌を増進する原因となる。上記のように、VSM細胞上のG結合PTH1受容体に作用してアデニリルシクラーゼを刺激するPTHrP(1-36)は、VSM増殖の強力な阻害因子である (MassfelderおよびHelwig, Endocrinology. 140: 1507-10 (1999) ; Clemens et al., Br J Pharmacol. 134: 1113-36 (2001) ; Massfelder et al., Proc Natl Acad Sci USA 94: 13630-5 (1997) ; Stuart et al., Am J Physiol Endocrinol Metab. 279: E60-7 (2000))。従って、この筋書きによると、 NLS-PTHrPの過剰発現により、VSM増殖への核PTHrP刺激の除去、および細胞表面のPTH1受容体を介したVSM増殖の阻害につながるPTHrP(1-36)の分泌の増進の二つの結果がもたらされる。理論的には、 NLS-PTHrPの過剰発現が優性ネガティブな状態で作用している場合には、二番目の筋書きも有効となる。このような場合、 NLS-PTHrPは内因性PTHrPの核への侵入を抑制し、内因性PTHrPが細胞周期の進行を刺激するのを阻害するよう働く。

【0226】

IV. NLS欠損PTHrPのアデノウイルス遺伝子送達は、ブタの動脈損傷モデルにおける動脈の再狭窄を阻害する

動脈再狭窄に対するAd- NLS-PTHrPの過剰発現の影響をインビボで評価するため、上述のように、ブタの腸骨動脈再狭窄モデルを使用した（方法の章を参照されたい）。図14の中央パネルに示されるように、バルーン血管形成は、著しい動脈の再狭窄および新生内膜の形成を誘発する。同様に、血管形成とその後に続くAdLacZの投与により、同程度の再狭窄および新生内膜形成が起こる（図14、左パネル）。劇的に対照的に、血管形成とそれに続くAd NLSアデノウイルスの投与は、このモデルにおける動脈の再狭窄を本質的に完全に阻害する（図14、右パネル）。実際に、Ad NLSアデノウイルスの投与により、AdLacZアデノウイルス (N/M=0.887) で治療された血管で見られる新生内膜と中膜との比率と比較して、90%を上回る新生内膜と中膜との比率 (N/M=0.053) の減少がもたらされる。この研究は、PTHrP、特にNLS欠失型のPTHrPが動脈平滑筋細胞の増殖、移行、およびマトリクスの分泌に関連する疾患における治療的恩典を有することを実証している。さらにこれらの発見により、ラットの動脈損傷モデルにおける観察が確認される。

【0227】

実施例5 ウサギのアテローム性動脈硬化症に対するPTHrP変異体の影響のインビボ測定

例えは、これらに限定はされないが、 112-120、 121-130、 131-139、 AC-HA、 A119-HA、 A130-HA、 A132-HA、 A133-HA、 A138-HA PTHrPカルボキシ末端変異体、およびNLS PTHrP欠失変異体；または 112-120、 121-130、 131-139、 AC-HA、 A119-HA、 A130-HA、 A132-HA、 A133-HA、 A138-HA PTHrPカルボキシ末端変異体、もしくはNLS PTHrP欠失変異体をコードするポリヌクレオチドなど異なるPTHrP構築物で安定にトランスフェクションされた、または例えは、これらに限定はされないが、このようなPTHrP変異体構築物を含むアデノウイルスのようなウイルスに感染した、例えはA-10血管平滑筋細胞などの宿主細胞から単離されたPTHrP変異体ポリペプチドの、ウサギのアテローム性動脈硬化症モデルに対する影響について、Simariおよびその共同研究者 (Simari et al., Clin. Invest., 98: 50

225-35 (1996))により説明されている要領で試験した。概説すると、NZWウサギをケタミン (35 mg/kg 筋肉内投与) およびキシラジン (5 mg/kg、筋肉内投与) で鎮静し、挿管する。麻酔はイソフルレンにより維持する。手術の前に、血液化学、血清コレステロール、およびトリグリセリドレベルの測定を行う (Roche Biomedical Laboratories, Nutley, NJ)。右大腿動脈の外科的露出および動脈切開を行い、3-フレンチ・フォガティーバルーンカテーテル (Baxter Healthcare Corp., Mundelein, IL) を総腸骨動脈に挿入する。バルーンを右腸骨動脈で膨らませて、三回取り出す。右大腿動脈を遠位で結紮し、切開を閉じる。術後、と殺するまで、ウサギに0.5% コレステロールおよび2.3% ピーナッツ油を含む高脂肪食餌を与える。全ての動物に、10 mg/kgのアスピリンを週三回与える。剥離損傷およびコレステロール給餌から3週間後、二匹のウサギをと殺し、腸骨動脈を分析してアテローム硬化症病巣の程度を測定した。

10

【0228】

最初の血管損傷の3週間後、右腸骨動脈に血管形成のバルーン損傷を与える。血清コレステロールおよびトリグリセリドレベルを測定する。中腹部を切開し、末梢大動脈および総腸骨動脈を単離する。腸骨動脈の側枝を単離し結紮する。末梢大動脈切開により2~2.7 5 mmのバルーン血管形成カテーテル (SciMed, BSC, Maple Grove, MN) を右腸骨動脈に挿入する。血管形成バルーンを6気圧まで1分間膨らませ、しばませる。バルーンの膨張と収縮を二回繰り返す。

20

【0229】

試験薬による血管の治療を、バルーンカテーテルを損傷部位のごく近位の位置まで引き抜くことによって行われる。動脈部分を一時的結紮により単離して、5 mlのリン酸緩衝生理食塩水で灌ぎ、その後、適切な賦形剤のみ、またはPTHRPタンパク質 (体重1 kgにつき0.000001 mg -100,000 mgのタンパク質) を含む賦形剤、または変異体PTHRPタンパク質 (体重1 kgにつき0.000001 mg -100,000 mgのタンパク質) を含む賦形剤；またはPTHRPタンパク質をコードするポリヌクレオチド (体重1 kgにつき0.000001 mg-100,000 mgのポリヌクレオチド) もしくは変異体PTHRPタンパク質をコードするポリヌクレオチド (体重1 kgにつき0.000001 mg-100,000 mgのポリヌクレオチド) を含む賦形剤を挿入する。または、例えばPTHRP (1 pfu/mlから 1×10^{14} pfu/ml) または変異体PTHRP (1 pfu/mlから 1×10^{14} pfu/ml) をコードする適切なポリヌクレオチド構築物を含むアデノウィルスのようなウィルス担体を投与する。例えば、組み換えアデノウィルス株は、解凍から2時間以内に使用する。1 pfu/mlから 1×10^{14} pfu/mlのアデノウィルスベクター50 μl (AdLacZまたはAd-PTHRP変異体)、またはDMEMを、プラスチック製のカテーテルを通して、損傷した単離された総頸動脈部分に注入する。15分後、アデノウィルスまたはDMEMを吸引する。近位外部頸動脈を結紮し、総頸動脈および内部頸動脈の血流を回復させる。

30

【0230】

治療の3週間後、対側性の対照群の動脈 (損傷もアデノウィルス処理も受けていないもの)、およびアデノウィルス処理を受けていない (DMEM)、またはアデノウィルス処理を受けた (Ad-LacZまたはAd-PTHRP変異体)、バルーンによる損傷のある動脈を採取し、これらを4% パラホルムアルデヒド中4 で48時間固定し、パラフィンブロックに包埋し、切断して (5 μm)、ヘマトキシリンおよびエオシン、またはフォン・ギーゼン法のいずれかにより染色して内弾性板および外弾性板を表す。画像を得、NIHイメージプログラムを使用して新生内膜および中膜の断面図を分析し、面積比を計算する。

40

【0231】

賦形剤のみを投与された血管形成術を受けた血管において観察される新生内膜と中膜との比率と比較した、PTHRP変異体ポリペプチドを投与された血管形成術を受けた血管における新生内膜と中膜の比率の減少は、PTHRP変異体ポリペプチドに抗再狭窄効果があることを表している。同様に、賦形剤のみを投与された血管形成術を受けた血管において観察される新生内膜と中膜との比率と比較した、PTHRP変異体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの与えられている血管形成術を受けた血管における新生内膜と中膜との比率の減少は、PTHRP変異体ポリペプチドに抗再狭窄効果があることを表している。さらに、

50

変異体PThrPをコードしないポリヌクレオチド構築物を含むウィルス担体を投与された血管形成術を受けた血管において観察される新生内膜と中膜の比率と比較した、変異体PThrPをコードするポリヌクレオチド構築物を含むウィルス担体を投与された血管形成術を受けた血管において観察される新生内膜と中膜の比率の減少は、変異体PThrPに抗再狭窄効果があることを表している。処理群の間で観察される新生内膜と中膜の比率の違いを評価するために、Student T-テストが使用される。0.05に等しい、またはそれ以下の「P」値は有意と見なされる。

【0232】

実施例6 アテローム性動脈硬化症のウサギに対する、ステントにより送達されたPThrP変異体の影響のインビオ測定

10

例えは、これらに限定はされないが、112-120、121-130、131-139、AC-HA、A119-HA、A130-HA、A132-HA、A133-HA、A138-HA PTHrPカルボキシ末端変異体、およびNLS PTHrP欠失変異体；または112-120、121-130、131-139、AC-HA、A119-HA、A130-HA、A132-HA、A133-HA、A138-HA PTHrPカルボキシ末端変異体もしくはNLS PTHrP欠失変異体をコードするポリヌクレオチドなどの異なるPThrP構築物で安定にトランスフェクションされた、または例えは、これらに限定はされないが、このようなPThrP変異体構築物を含むアデノウィルスのようなウィルスに感染した、A-10血管平滑筋細胞などの宿主細胞から単離されたPThrP変異体ポリペプチドが、ステントにより送達された、バルーンによる血管損傷モデルのラットに及ぼす影響が試験される (Rogers et al., Circulation 91: 2995-3001 (1995))。

20

【0233】

鉄製の網目の檻に個々に入れ、ウサギ固形飼料と無制限の水を与えた、体重3から4 kgのニュージーランドシロウサギ (Millbrook Farm Breeding Labs) を、35 mg/kgのケタミン (Aveco Co) の筋肉内投与および4 mg/kgのナトリウムネンプタール (Abbott Laboratories) の静脈注射により麻酔する。各大腿動脈を露出させ結紮して、動脈切開を通って腹大動脈に逆行し、三回膨らませて取り出された3Fバルーン塞栓摘除カテーテル (Baxter Healthcare Corp, Edwards Division) によって、腸骨動脈の内皮細胞を取り除く。短い縦ブリッジ (MULTI-LINK, Advanced Cardiovascular Systems) によってつなげられた一連の波形のリングの形状をした、長さ7 mmのステンレス鉄製のステントを、3mmの血管形成バルーン (Advanced Cardiovascular Systems) 上に同軸に取り付け、動脈切開により各腸骨動脈に逆行させ、2気圧から10気圧まで10秒間膨らませることによって広げる。四つのステントは、厚さ3 μ mの25% (w/v) のブルロニックF-127ゲル溶液 (BASF Wyandotte Co., Wyandotte, MI, USA) によってコーティングされ、別の四つのステントは、PThrPタンパク質 (体重1 kgにつき0.000001 mg-100,000 mgのタンパク質) を含む賦形剤が溶解している同一のゲル溶液でコーティングされ、また別の四つのステントは、変異体PThrPタンパク質 (体重1 kgにつき0.000001 mg-100,000 mgのタンパク質) をふくんだ賦形剤が溶解している同一のゲル溶液でコーティングされている。あるいは、四つのステントは、厚さ3 μ mの25% (w/v) のブルロニックF-127ゲル溶液 (BASF Wyandotte Co., Wyandotte, MI, USA) によってコーティングされ、別の四つのステントは、PThrPタンパク質をコードするポリヌクレオチド (0.000001 mg/ml-100,000 mg/mlのポリヌクレオチド) を含む賦形剤が溶解している同一のゲル溶液でコーティングされ、また別の四つのステントは、変異体PThrPタンパク質をコードするポリヌクレオチド (0.000001 mg/ml-100,000 mg/mlのポリヌクレオチド) を含む賦形剤が溶解している同一のゲル溶液でコーティングされている。PThrP (1 pfu/mlから 1×10^{14} pfu/ml) またはカルボキシ末端変異体PThrP (1 pfu/mlから 1×10^{14} pfu/ml) をコードする適切なポリヌクレオチド構築物を含む例えはアデノウィルスのようなウィルス担体を、ゲル中に混合する。ステントが入れられておらず、バルーンの取り出しによる損傷のみを有する四つの腸骨動脈もまた採取され、組織学的分析のために処理された。

30

40

【0234】

ウサギへの、手術の1日前から飲料水中にアスピリン (Sigma Chemical Co) 0.07 mg/mL

50

の投与を開始して、実験中は1日の投与量約5 mg/kgを達成し、手術時には標準的な抗凝血剤であるヘパリン(100 U/kg、Elkin-Sinn Inc)を1回の静脈注射により与える。

【0235】

バルーンによる損傷の2週間後、腸骨動脈を採取する。ナトリウムネンプタールの静脈注射による深い麻酔のもとで、下大静脈の放血と、それに続く左心室穿刺法による乳酸リシゲル液での灌流を行う。両方の腸骨動脈を切除し、4% パラホルムアルデヒド中4 で48時間固定し、パラフィンブロックに包埋し、切断して(5 gm)、ヘマトキシリンおよびエオシン、またはフォン・ギーゼン法のいずれかにより染色して内弾性板および外弾性板を表す。画像を得、NIHイメージプログラムを使用して新生内膜および中膜の断面図を分析し、面積比を計算する。

10

【0236】

ステントと賦形剤を含むゲル、またはステントとゲルのみ、またはステントのみを投与された血管形成術を受けた血管において観察される新生内膜と中膜との比率と比較した、PTHRP変異体ポリペプチドを含むゲルでコーティングされたステントを投与された血管形成術を受けた血管における新生内膜と中膜の比率の減少は、PTHRP変異体ポリペプチドに抗再狭窄効果があることを表している。同様に、ステントと賦形剤を含むゲル、またはステントとゲルのみ、またはステントのみを投与された血管形成術を受けた血管において観察される新生内膜と中膜との比率と比較した、PTHRP変異体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むゲルでコーティングされたステントを投与された血管形成術を受けた血管における新生内膜と中膜の比率の減少は、PTHRP変異体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに抗再狭窄効果があることを表している。さらに、変異体PTHRPポリペプチドをコードしないポリヌクレオチド構築物を含むウィルス担体と混合したゲルでコーティングされたステントを投与された血管形成術を受けた血管において観察される新生内膜と中膜との比率と比較した、PTHRP変異体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド構築物を含むウィルス担体と混合したゲルでコーティングされたステントを投与された血管形成術を受けた血管において観察される新生内膜と中膜との比率の減少は、変異体PTHRPをコードするポリヌクレオチドを含むウィルス担体に抗再狭窄効果があることを表している。処理群の間で観察される新生内膜と中膜の比率の違いを評価するために、Student T-テストが使用される。0.05に等しい、またはそれ以下の「P」値は有意と見なされる。

20

【0237】

実施例7 SMCMでコーティングされた装置の調製

以下の実験に使用される試薬および機材には、(様々な業者から販売されている、例えば「Strecker」ステントのような医療用ステント)および保持用の器材、キャップ(プラスチック挿入タイプ)付きの20 mlのガラスシンチレーション容器、TLCアトマイザー、窒素ガスタンク、ガラス試験管(1 ml以上、各種サイズ)、ガラスピーカー(各種サイズ)、パストールピペット、ピンセット、ポリカプロラクトン(「PCL」--分子量10,000から20,000; Polysciences)、SMCM化合物、例えば、これらに限定はされないが、112-120、121-130、131-139、AC-HA、A119-HA、A130-HA、A132-HA、A133-HA、A138-HA PTHRPカルボキシ末端変異体、およびNLS PTHRP欠失変異体;または112-120、121-130、131-139、AC-HA、A119-HA、A130-HA、A132-HA、A133-HA、A138-HA PTHRPカルボキシ末端変異体もしくはNLS PTHRP欠失変異体をコードするポリヌクレオチドなどの異なるPTHRP構築物で安定にトランスフェクションされた、または例え、これらに限定はされないが、このようなPTHRP変異体構築物を含むアデノウィルスのようなウィルスに感染した、A-10血管平滑筋細胞などの宿主細胞から単離されたPTHRP変異体ポリペプチド、エチレン酢酸ビニル(「EVA」--洗浄済み--上記参照);ポリ(DL)乳酸(「PLA」--分子量15,000から25,000; Polysciences)、ジクロロメタン(「DCM」--HPLC用、Fisher Scientific)などが含まれる。当然のことながらこれらの手順を用いて、限定はされないが、例え、ステントおよびカテーテルなどの多数の異なる種類の装置の表面をコーティングすることができる。

40

【0238】

A. スプレーステント法

50

3 mmの波形直径、長さ約3 cmのインターリーピング金属ワイヤーステントを使用する一般的な方法を以下に説明する。ステントの直径がより大きな場合、使用されるポリマー/薬剤溶液をより多量にする。簡単に言うと、十分な量のポリマーを20 mlのガラスシンチレーション容器に直接測り入れ、十分な量のDCMを加えて2 % (w/v)溶液を作る。容器にキャップをして、ポリマーを溶解させるために手で混ぜ合わせる。次にステントを、蒸留フラスコスタンド (retort stand)にナイロンで結びつけ、垂直配向に組み立てる。このステント保持器の位置をドラフトの床から上方に6~12インチ離して、適切な支持体 (例えば逆さまにあいた2000 mlのガラスピーカー) の上に置き、水平方向にスプレーできるようにする。自動ピペットを使用し、適切な量 (最低5ml) の2% ポリマー溶液を、別々の20 mlのガラスシンチレーション容器に移す。適切な量のSMCM化合物すなわち、例えば、これらに限定はされないが、 112-120、 121-130、 131-139、 AC-HA、 A119-HA、 A130-HA、 A132-HA、 A133-HA、 A138-HA PTHrPカルボキシ末端変異体、およびNLS PTHrP欠失変異体；または 112-120、 121-130、 131-139、 AC-HA、 A119-HA、 A130-HA、 A132-HA、 A133-HA、 A138-HA PTHrPカルボキシ末端変異体もしくはNLS PTHrP欠失変異体をコードするポリヌクレオチドなど異なるPThrP構築物で安定にトランスフェクションされた、またはこのようなPThrP変異体構築物を含むアデノウィルスのようなウィルスに感染した、A-10血管平滑筋細胞などの宿主細胞から単離された、PThrP変異体ポリペプチドを溶液に加え、手で振って溶解させる。

10

20

【0239】

スプレーの調製のため、容器のキャップを取り除き、TLCアトマイザーの円筒部分 (のみ) をポリマー溶液中に浸す。アトマイザーのタンクをこの手順に使用する必要がないことに注意されたい。20 mlのガラス容器がタンクの役割を果たす。窒素タンクをアトマイザーのガスの注入口に接続する。噴霧およびスプレーが始まるまで、圧力を徐々に上げる。圧力を記録し、作業を通してこの圧力を使用する。ステントをスプレーするため、スプレーとスプレーの間に15秒間の乾燥時間をあけ、5秒間の振動スプレーを施す。5回スプレーを施した後、ステントを90°回転させ、ステントの次の部分にスプレーをする。ステントの全ての面にスプレーが施されるまで、これを繰り返す。乾燥している間は、ガスラインを指でつまんでスプレーのもれを防ぐ。ステント上に適切な量のポリマーが堆積するまでスプレーを続ける。量は、インビボにおける特定のステントの用途に依存しうる。量を決定するためには、スプレーを完了しステントを乾燥させた後にステントの重量を測る。最終重量からステントの元の重量を引くことにより、ステントに塗布されたポリマー (およびパクリタキセル) の重量が得られる。コーティングされたステントは、密封容器内に保存する。

30

40

【0240】

B. ディッピングされたステントの作製

3 mmの波形直径、長さ約3 cmのインターリーピング金属ワイヤーステントを使用する一般的な方法を以下に説明する。ステントの直径がより大きい場合、より大きなサイズの試験管内で、ポリマー/薬剤溶液をより多量に使用する。

40

50

【0241】

2 gのEVAを20mlのガラスシンチレーション容器に測り入れ、20 mlのDCMを加える。容器にキャップをし、2時間置いて溶解させる (溶解を助けるため、頻繁に手で振る)。規定の重量のパクリタキセルを1 mlのガラス試験管に直接測り入れ、0.5 mlのポリマー溶液を加える。ガラスパストールピペットを使用して、例えば、これらに限定はされないが、 112-120、 121-130、 131-139、 AC-HA、 A119-HA、 A130-HA、 A132-HA、 A133-HA、 A138-HA PTHrPカルボキシ末端変異体、およびNLS PTHrP欠失変異体；または 112-120、 121-130、 131-139、 AC-HA、 A119-HA、 A130-HA、 A132-HA、 A133-HA、 A138-HA PTHrPカルボキシ末端変異体、もしくはNLS PTHrP欠失変異体をコードするポリヌクレオチドなどの異なるPThrP構築物で安定にトランスフェクションされた、または例えば、これらに限定はされないが、このようなPThrP変異体構築物を含むアデノウィルスのようなウィルスに感染した、例えばA-10血管平滑筋細胞などの宿主細胞から単離されたPThrP変異体ポリペプチ

ドを、ポリマー溶液を穏やかに前後に動かすことによって溶解させる。いったんこれらの物質が適切に混合されるかまたは溶解されたら、試験管をほぼ水平な位置に保持する（ポリマー溶液は粘着性なので流出しない）。ピンセットを使ってステントを試験管内の底までしっかりと挿入する。試験管の開口部を水平面よりわずか下まで傾けてポリマーを含む溶液を試験管のほぼ開口部まで流し、試験管を水平面のわずか上まで戻す。試験管内でステントをゆっくり回転させながら、ステントをゆっくり抜き取る（約30秒）。

【0242】

ステントを垂直な位置に保持して乾燥させる。密封孔がはじけることがあるため、ポリマーの連続シートには穴が開いている。これは前述のディッピング法を繰り返すことによって改善されるが、この手順を繰り返すことにより、さらにはじける原因となったり、ポリマーの蓄積が全体的に不均一となることもある。一般に、ステントは一度だけディッピングし、かつ、はじけて穴の開いていない部分を切り取ることがよい。ディッピングされたステントは、使用するまで密封容器に保存する。

【0243】

同等物

本発明の特定の態様の前述の詳細な説明から、独特な生物活性ペプチドについての説明がされていることが明らかである。本明細書において特定の態様について詳細に開示されているが、これは例示のみを目的とした一例であり、添付の特許請求の範囲を限定することを意図したものではない。特に、本発明者らにより、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な置換、変更、および改変が本発明に加えられることを意図される。例えば、SMCM類似体、または投与経路の選択などは、本明細書に説明された態様についての知識のある当業者にとっては日常的な技術と考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0244】

本発明は、添付の図面を参照した以下の説明により、さらに理解されよう。

【図1】使用された、ヒト野生型（WT-HA）PTHrPおよびPTHrP由来の欠失変異体の概略図である。野生型PTHrPには、シグナルペプチドおよび核局在配列（NLS）が含まれている。またそれぞれの構築物には、ヘマグルチニン（HA）タグも含まれている。一番目の構築物の上の数値は、PTHrPの翻訳後プロセシングにおいて、およびNLSの場合はPTHrPの核ターゲティングにおいて使用される、塩基性のアミノ酸群の位置を表す。

【図2】PTHrP欠失変異体がA-10血管平滑筋細胞の増殖に及ぼす影響を表す折れ線グラフである。それぞれのクローニの名称に隣接した「n」は、各成長曲線が実行された回数を表す。それぞれの構築物に由来する三つのクローニそれぞれにつき、成長曲線は3~4回実行されている。エラーバーは標準誤差を表す。

【図3】PTHrPのカルボキシ末端のアミノ酸配列を表す概略図である。欠失用に選択された各カルボキシ末端領域は括弧によって示され、個々のアミノ酸は一文字コードを使用して表されている。太字のアミノ酸残基、Ser119、Ser130、Thr132、Ser133、およびSer138は、カルモジュリンキナーゼII（CKII）および/またはプロテインキナーゼC（PKC）のリン酸化反応基質を表す。

【図4】ヒト野生型（WT-HA）PTHrPおよびPTHrP由来アラニン置換変異体の概略図を示す。ここで、Ser119、Ser130、Thr132、Ser133、およびSer138のそれぞれのアミノ酸は、アラニン（A）をコードするコドンへと突然変異導入した。AC-HA構築物（アラニンの組み合わせまたはAC）は、アラニンに変換されたこれらの五つのアミノ酸の全てを備えている。

【図5】PTHrPアラニン置換変異体がA-10血管平滑筋細胞の増殖に及ぼす影響を表す折れ線グラフである。それぞれのクローニの名称に隣接した「n」は、各成長曲線が実行された回数を表す。それぞれの構築物に由来する三つのクローニそれぞれにつき、成長曲線は3~4回実行されている。エラーバーは標準誤差を表す。

【図6】選択されたPTHrP変異体が安定A-10血管平滑筋細胞クローニにおけるPTHrP（1-36）産生に及ぼす影響を表す棒グラフである。PTHrP（1-36）産生は、放射免疫測定により

10

20

30

40

50

検出されて培地（パネルA）における免疫反応性のタンパク質レベルとして表されるか、または細胞タンパク質1ミリグラムあたりの産生PThrP(1-36)のピコモルで表される（pM/mgタンパク質；パネルB）。エラーバーは標準誤差を表す。点線はPThrP(1-36)0.5pMでの放射免疫測定の検出限界を示す。

【図7】- NLS PThrPを介した血管平滑筋細胞増殖阻害のメカニズムを例証する概略図である。

【図8】PThrP過剰発現が網膜芽細胞腫タンパク質（pRb）のリン酸化に及ぼす影響を図示している。パネルAは、ヨウ化プロピジウムによる標準フローサイトメトリー解析を使用した細胞周期分析を表しており、ここでデータは、DNA含有量の関数としての細胞数として図示されている。パネルBは、pRb抗体（Pharmingen, San Diego, CA）によって検出されたpRbタンパク質のリン酸化反応を表すウェスタンプロットである。パネルの下部には、充填対照群としてのチューブリンが示されている。

10

【図9】PThrP(NLS)のNLS欠失構築物の過剰発現が網膜芽細胞腫タンパク質（pRb）のリン酸化に及ぼす影響を図示している。パネルAは、ヨウ化プロピジウムによる標準フローサイトメトリー解析を使用した細胞周期分析を表しており、ここでデータは、DNA含有量の関数としての細胞数として図示されている。パネルBは、pRb抗体（Pharmingen, San Diego, CA）によって検出されたpRbタンパク質のリン酸化反応を表すウェスタンプロットである。充填対照群としては、チューブリンが使用された（パネル下部）。

20

【図10】PThrP(NLS)のNLS欠失構築物の過剰発現がp27タンパク質の発現に及ぼす影響を図示している。免疫反応性p27タンパク質の細胞発現レベルは、抗p27抗体を使用したウェスタンプロット解析によって決定された。試料充填の対照群としては、アクチンが使用された（パネル下部）。免疫反応性p27タンパク質が、対照群のA-10血管平滑筋細胞中に発現する。それに対して、A-10血管平滑筋細胞（WT）中の過剰発現した野生型PThrPは、対照群のA-10血管平滑筋細胞中で認められた免疫反応性p27タンパク質の発現レベルと比較して、免疫反応性p27タンパク質の発現を阻害する。一方、A-10血管平滑筋細胞中に過剰発現したNLS PThrPは、対照群のA-10血管平滑筋細胞中で認められた免疫反応性p27タンパク質の発現レベルと比較して、免疫反応性p27タンパク質の発現を増加させる。

20

【図11】アデノウィルスを発現する-ガラクトシダーゼ（ad-lacZ）、野生型PThrP（ad-WT）、またはNLSが欠失したPThrPを使用した、A-10平滑筋細胞（VSM）のトランスフェクションを図示している。デューク大学（Duke University）のDr. Chris Newgardの好意により提供された、E1aおよびE1bが欠失した複製不全のAd5アデノウィルスが使用された。パネルAは、ad-lacZウィルスによりそれぞれ0（左）、1250（中央）または2500（右）の感染多度（MOI）で15分間トランスフェクションされたラットのA-10 VSM培養細胞と、標準的な方法を使用して48時間後に可視化された-ガラクトシダーゼの顕微鏡写真を表す。パネルBは、A-10 VSM細胞を、それぞれad-lacZ、ad-WT、または、PThrP(ad-NLS)クローニングNLS欠失構築物を含むアデノウィルスにより、MOI=2500で15分間トランスフェクションした48時間後に観察された、免疫反応性PThrP(1-36)（IRMA 1-36としても知られる）産生（pM）の棒グラフである。「n」の値は、実験が繰り返された回数を示し、エラーバーは標準誤差を表す。PThrP IRMAの検出限界が0.5pMであるPThrP免疫放射線分析法を使用して、馴化培地中のPThrPが評価された。

30

【図12】血管形成およびPThrP遺伝子治療がラットの頸動脈新生内膜形成に及ぼす影響を例証する顕微鏡写真を表す。頸動脈部の血管形成およびそれに続く組織学的分析は、本質的にD'Andreaおよびその共同研究者（D'Andrea et al., Biotech. Histochem. 74 (4) : 172-80 (1999)）により記載されたように行われた。パネルAは、正常な対照群血管を示す。パネルBは血管形成の2週間後の血管を示す。パネルCは血管形成の2週間後にad-lacZにより処理された血管を示す。パネルDは血管形成術の2週間後にPThrP(ad-NLS)のNLS欠失構築物を含むアデノウィルスにより処理された血管を示す。

40

【図13】ラットの頸動脈新生内膜形成への、血管形成およびPThrP遺伝子治療の影響を図示している。「n」の値は、実験が繰り返された回数を示し、エラーバーは標準誤差を表す。血管形成術の2週間後、治療された頸動脈血管と28本の対側性の対照群頸動脈血管

50

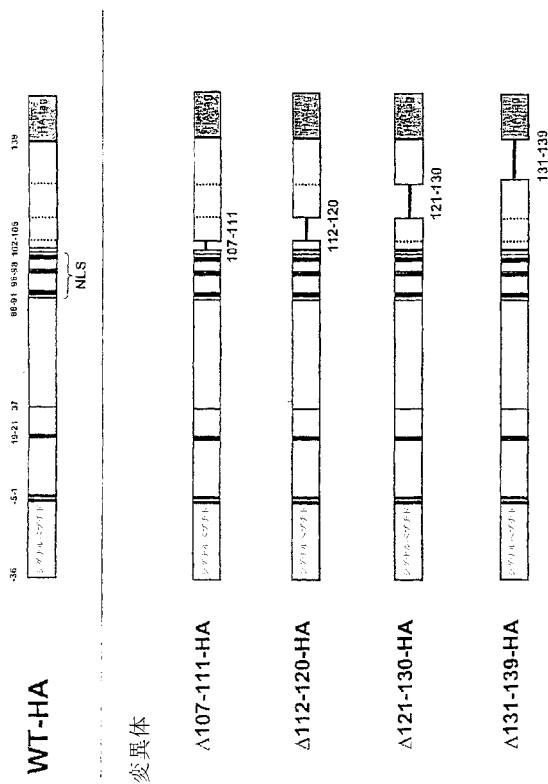
を、D'Andreaおよびその共同研究者 (D'Andrea et al., Biotech. Histochem. 74 (4): 172-80 (1999)) により記載されたように採取し、分析した。概説すると、対側性の対照群の動脈（損傷もアデノウイルス処理も受けていないもの）、およびアデノウイルス処理を受けていない（DMEM）、またはアデノウイルス処理（ad-LacZまたはad- -NLS）を受けたバルーンによる損傷のある動脈を採取し、これらを4% パラホルムアルデヒド中4 で48時間固定し、パラフィンブロックに包埋し、切断して（5 gm）、ヘマトキシリンおよびエオシン、またはフォン・ギーゼン法のいずれかにより染色して内弾性板および外弾性板を表す。画像を得、NIHイメージプログラムを使用して新生内膜および中膜の断面図を分析し、面積比を計算する。

【図14】血管形成およびPThrP遺伝子治療がブタ頸動脈の新生内膜形成に及ぼす影響を図示している。血管形成の2週間後、治療された頸動脈の血管と対側性の対照群の頸動脈血管を、D'Andreaおよびその共同研究者 (D'Andrea et al., Biotech. Histochem. 74 (4): 172-80 (1999)) により記載されたように採取し、分析した。概説すると、対側性の対照群の動脈（損傷もアデノウイルス処理も受けていないもの）、およびアデノウイルス処理を受けていない（DMEM）、またはアデノウイルス処理（ad-LacZまたはad- -NLS）を受けた、バルーンによる損傷のある動脈を採取し、これらを4% パラホルムアルデヒド中4 で48時間固定し、パラフィンブロックに包埋し、切断して（5 gm）、ヘマトキシリンおよびエオシン、またはフォン・ギーゼン法のいずれかにより染色して内弾性板および外弾性板を表す。画像を得、NIHイメージプログラムを使用して新生内膜および中膜の断面図を分析し、面積比を計算する。

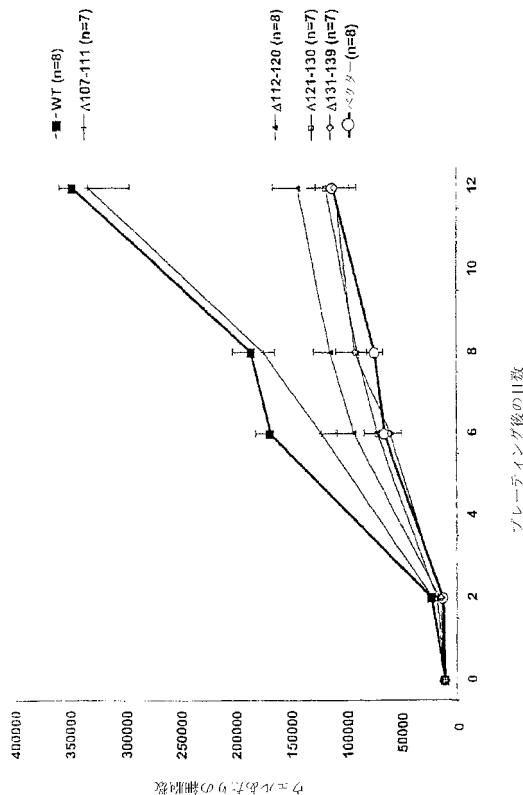
10

20

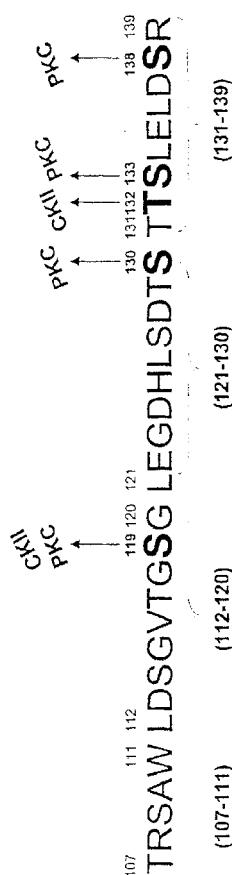
【図1】



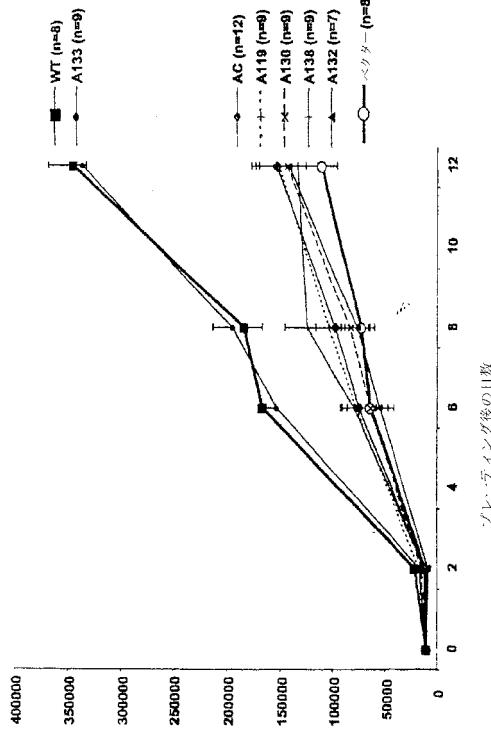
【図2】



【図3】

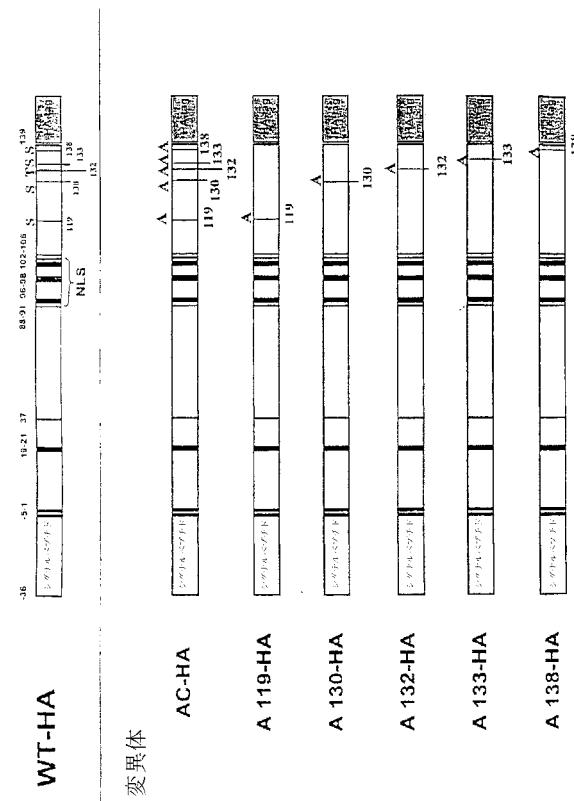


【図5】

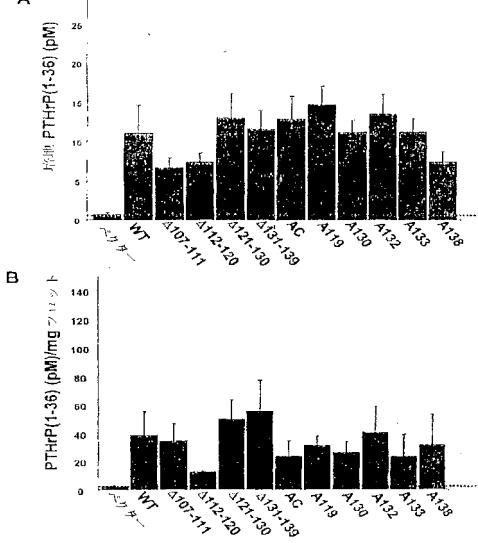


着効性試験

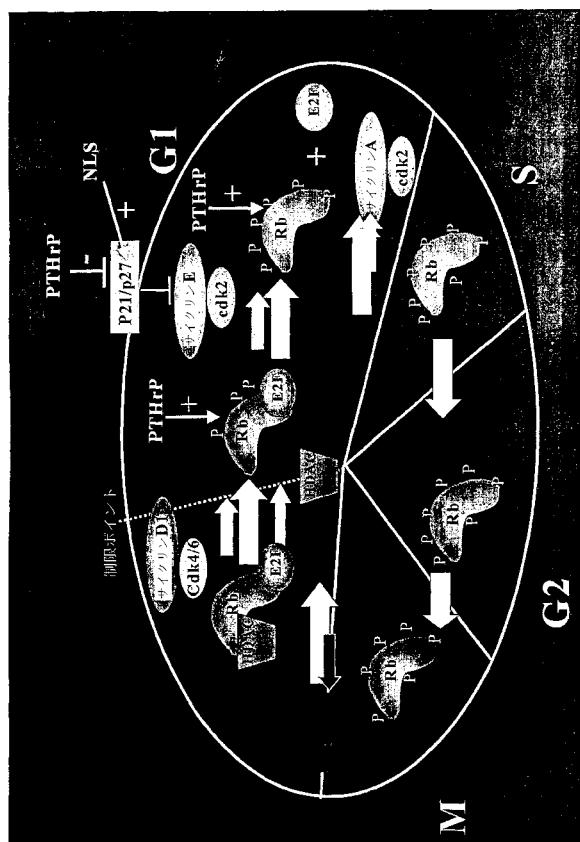
【図4】



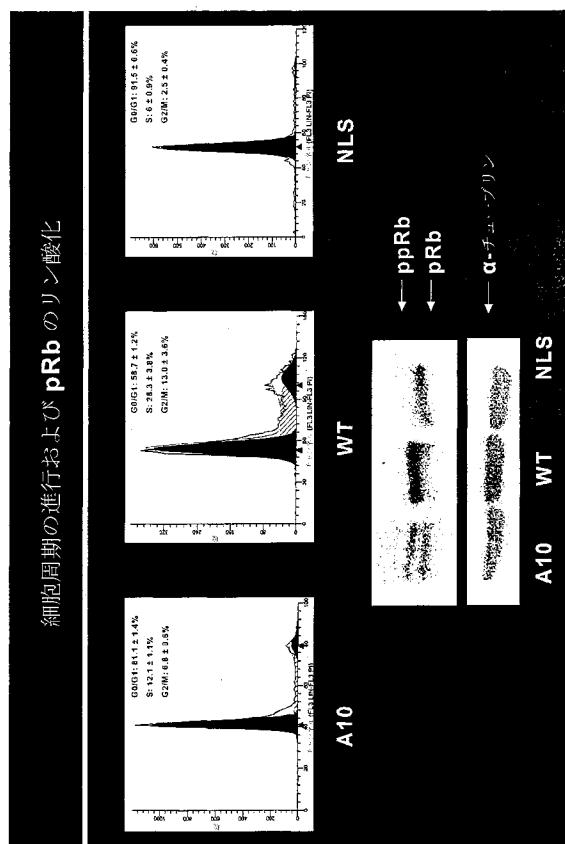
【図6】



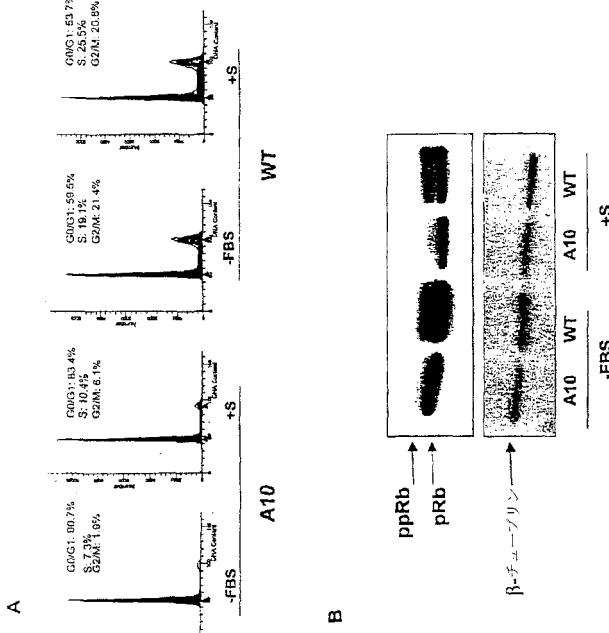
【図7】



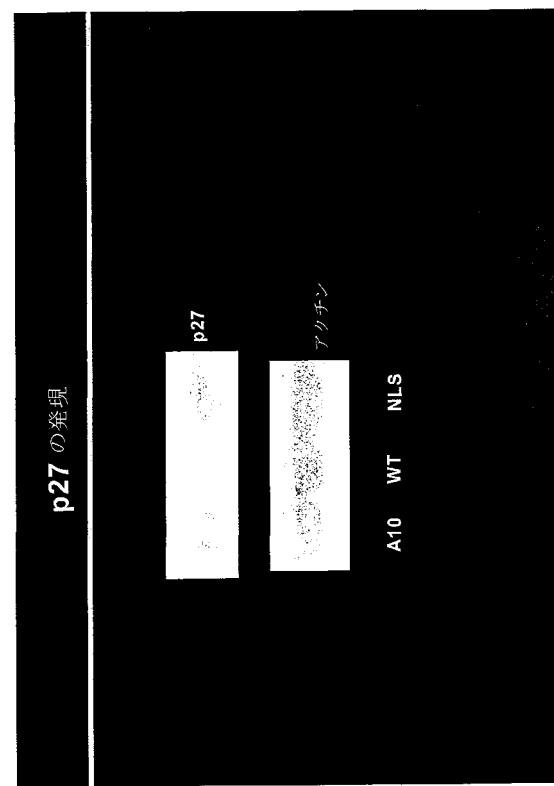
【図9】



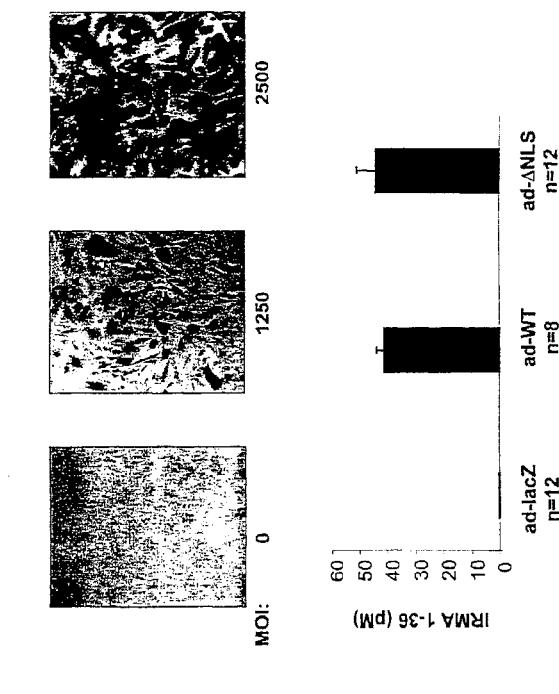
【図8】



【図10】

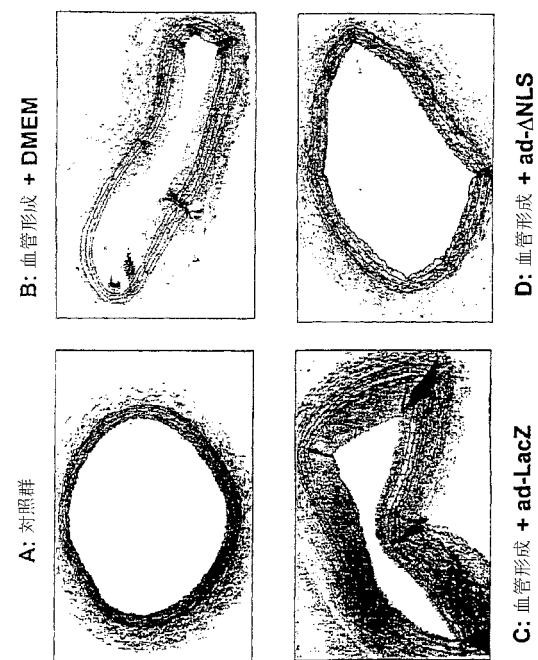


【図 1 1】



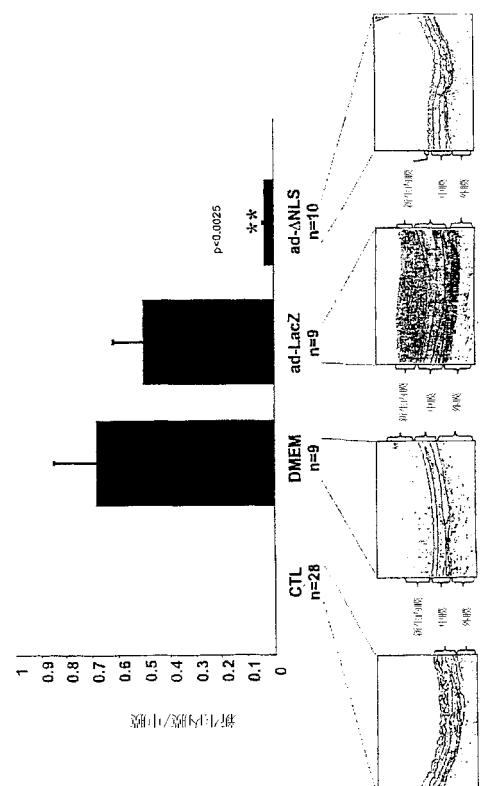
A

【図 1 2】

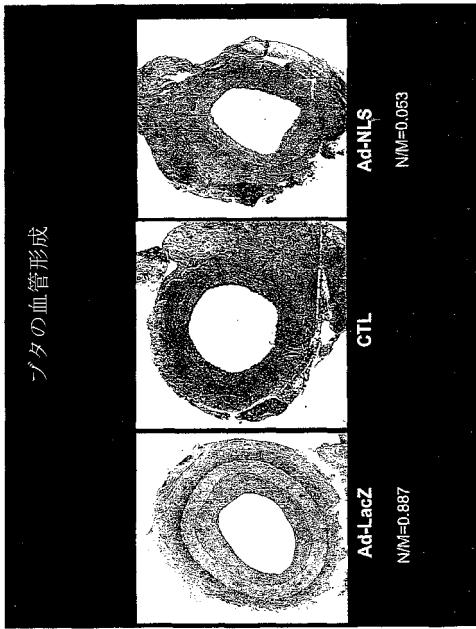


B: 血管形成 + ad-ΔNLS

【図 1 3】



【図 1 4】



B: 血管形成 + ad-ΔNLS

C: 血管形成 + DMEM

D: 血管形成 + CTL

【手続補正書】

【提出日】平成17年9月26日(2005.9.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

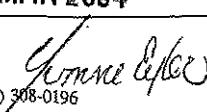
【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2006508646000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/25473												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 38/00, 39/395, 48/00; C07K 14/00, 14/575, 16/26, 16/46; C12N 5/00, 15/00; G01N 33/53 US CL : 514/2, 44; 530/300, 350, 387.1, 388.1; 435/7.1, 7.8, 69.1, 320.1, 325; 424/130.1 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. :														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Please See Continuation Sheet														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">STUART et al. American Journal of Physiology, July 2000, Vol. 279, No. 1, pages E60-E67, especially abstract, figures 4-6.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-12, 15-21, 25, 26, 29, 30, 32-35, 39, 41-45, 47-57, 60-66, 70, 71, 74, 75, 77-80, 84, 86-88.</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">US 5,688,760 (KEMP et al.) 18 November 1997 (18.11.1997), column 2, lines 1-17; column 5, lines 22-67; column 6, line 5-column 7, line 67; column 10, lines 5-49 and column 10, line 62-column 11, line 40.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-12, 15-21, 25, 26, 29, 30, 32-35, 39, 41-45, 47-57, 60-66, 70, 71, 74, 75, 77-80, 84, 86-88.</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">US 5,605,815 (BROADUS et al.) 25 February 1997 (25.02.1997), column 9, line 60-column 10, line 25; column 11, lines 34-55, column 13, lines 10-35.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-12, 15-21, 25, 26, 29, 30, 32-35, 39, 41-45, 47-57, 60-66, 70, 71, 74, 75, 77-80, 84, 86-88.</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	STUART et al. American Journal of Physiology, July 2000, Vol. 279, No. 1, pages E60-E67, especially abstract, figures 4-6.	1-12, 15-21, 25, 26, 29, 30, 32-35, 39, 41-45, 47-57, 60-66, 70, 71, 74, 75, 77-80, 84, 86-88.	Y	US 5,688,760 (KEMP et al.) 18 November 1997 (18.11.1997), column 2, lines 1-17; column 5, lines 22-67; column 6, line 5-column 7, line 67; column 10, lines 5-49 and column 10, line 62-column 11, line 40.	1-12, 15-21, 25, 26, 29, 30, 32-35, 39, 41-45, 47-57, 60-66, 70, 71, 74, 75, 77-80, 84, 86-88.	Y	US 5,605,815 (BROADUS et al.) 25 February 1997 (25.02.1997), column 9, line 60-column 10, line 25; column 11, lines 34-55, column 13, lines 10-35.	1-12, 15-21, 25, 26, 29, 30, 32-35, 39, 41-45, 47-57, 60-66, 70, 71, 74, 75, 77-80, 84, 86-88.
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	STUART et al. American Journal of Physiology, July 2000, Vol. 279, No. 1, pages E60-E67, especially abstract, figures 4-6.	1-12, 15-21, 25, 26, 29, 30, 32-35, 39, 41-45, 47-57, 60-66, 70, 71, 74, 75, 77-80, 84, 86-88.												
Y	US 5,688,760 (KEMP et al.) 18 November 1997 (18.11.1997), column 2, lines 1-17; column 5, lines 22-67; column 6, line 5-column 7, line 67; column 10, lines 5-49 and column 10, line 62-column 11, line 40.	1-12, 15-21, 25, 26, 29, 30, 32-35, 39, 41-45, 47-57, 60-66, 70, 71, 74, 75, 77-80, 84, 86-88.												
Y	US 5,605,815 (BROADUS et al.) 25 February 1997 (25.02.1997), column 9, line 60-column 10, line 25; column 11, lines 34-55, column 13, lines 10-35.	1-12, 15-21, 25, 26, 29, 30, 32-35, 39, 41-45, 47-57, 60-66, 70, 71, 74, 75, 77-80, 84, 86-88.												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See parent 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														
Date of the actual completion of the international search 19 February 2004 (19.02.2004)		Date of mailing of the international search report 12 MAR 2004												
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. (703)305-3230		Authorized officer Regina M. DeBerry  Telephone No. (703) 308-0196												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/25473

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

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

2. Claim Nos.: 46
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Please See Continuation Sheet

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

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/25473

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97/04312 (ICN PHARMACEUTICALS) 06 February 1997 (06.02.1997), page 4, lines 14-25; page 7, lines 25-27; pages 15-17 and page 20, lines 10-19.	1-12, 15-21, 25, 26, 29, 30, 32-35, 39, 41-45, 47-57, 60-66, 70, 71, 74, 75, 77-80, 84, 86-88.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/25473

Continuation of Box I Reason2:

Claim 46 recites sequence identifier numbers (SEQ ID NOS). However, the computer readable form (CRF) and written form have not been received. Thus no meaningful search could be performed on the instant claim.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 2:

WEST: keywords include PHRP, parathyroid hormone related protein, p27kip1, vector, adenovirus, antibody, humanized, pharmaceutical, probe, screen, smooth muscle, kit, tumor, cancer

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 L 31/00 (2006.01)	A 6 1 L 31/00	Z 4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	4 C 0 8 5
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	4 C 0 8 7
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	4 H 0 4 5
A 6 1 P 11/08 (2006.01)	A 6 1 P 11/08	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 13/10 (2006.01)	A 6 1 P 13/10	
A 6 1 P 15/08 (2006.01)	A 6 1 P 15/08	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 14/635 (2006.01)	C 0 7 K 14/635	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 R 1/93 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	
	C 1 2 R 1:93	
	C 1 2 P 21/02	C
	C 1 2 R 1:93	
	C 1 2 Q 1/68	A
	C 1 2 R 1:93	

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IT,LU,MC,NL,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW)

F ターミ(参考) 4B024 AA01 AA11 BA01 CA04 CA09 DA02 EA02 GA11 HA12
 4B063 QA01 QQ45 QR32 QR40 QR55 QS34
 4B064 AG15 CA10 CA12 CA19 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA90Y AA95X AB01 BA02 CA24 CA44
 4C081 AC08 AC09 CD112 DC01
 4C084 AA02 AA07 AA13 BA02 BA13 BA22 BA44 NA14 ZA36 ZA42
 ZA45 ZA59 ZA75 ZA81 ZB21
 4C085 AA14 BB11 CC32 EE01
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA36 ZA42 ZA45
 ZA59 ZA75 ZA81 ZB21
 4C087 AA01 AA02 BC83 NA14 ZA36 ZA42 ZA45 ZA59 ZA75 ZA81
 ZB21

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA30 DA76 EA20 FA72
FA74