

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-502355

(P2008-502355A)

(43) 公表日 平成20年1月31日(2008.1.31)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 Q 1/02 (2006.01)	C 12 Q 1/02	Z N A 2 G 04 5
G 01 N 33/15 (2006.01)	G 01 N 33/15	Z 4 B 02 4
G 01 N 33/50 (2006.01)	G 01 N 33/50	Z 4 B 06 3
A 61 K 38/00 (2006.01)	A 61 K 37/02	4 C 08 4
A 61 K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00	4 C 08 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 95 頁) 最終頁に続く

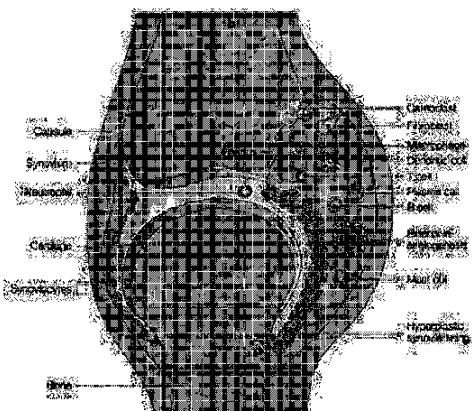
(21) 出願番号	特願2007-526437 (P2007-526437)	(71) 出願人	504064364 ガラパゴス・ナムローゼ・フェンノートシ ヤップ Galapagos N. V.
(86) (22) 出願日	平成17年6月14日 (2005. 6. 14)		
(85) 翻訳文提出日	平成19年2月7日 (2007. 2. 7)		
(86) 國際出願番号	PCT/EP2005/052754		
(87) 國際公開番号	W02005/121778		
(87) 國際公開日	平成17年12月22日 (2005. 12. 22)		
(31) 優先権主張番号	60/579,307	(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(32) 優先日	平成16年6月14日 (2004. 6. 14)	(72) 発明者	レギナルド ブリス ベルギー コルベエクーディジュレ ピー - 3060 ニジュベルセバアン 206
(33) 優先権主張国	米国(US)	(72) 発明者	ニク バンデグヒンステ ベルギー デュッフェル ピー-2570 ヘルマンスストラクト 3 プス 14 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】変性性及び炎症性疾患の治療に役立つ同定方法及び化合物

## (57) 【要約】

本発明は、関節の変性抑制及び/又は抗炎症用の医薬組成物を含む、細胞外マトリックス分解を抑制するためのインビボ及びインビトロ方法、薬剤並びに化合物スクリーニングアッセイ、並びに対象で細胞外マトリックス分解が関与する疾患を治療及び/又は予防する際のその使用に関する。

【選択図】 図1

Schematic view of a normal joint and its changes in rheumatoid arthritis  
(From Smolen and Steiner, 2003).

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

細胞外マトリックス( E C M )分解を抑制する化合物の同定方法であって；  
化合物を、配列番号 101～125 及び 501～564 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと接触させること；及び  
細胞外マトリックス( E C M )分解に関する化合物 - ポリペプチド特性を測定することを含む、前記方法。

**【請求項 2】**

前記ポリペプチドがインビトロ無細胞調製物内にある、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 3】**

前記ポリペプチドが哺乳動物細胞に存在する、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 4】**

前記特性が、前記ポリペプチドに対する前記化合物の結合親和性である、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 5】**

前記特性が、細胞外マトリックス( E C M )分解の指標となる生化学的マークターを産生する生物学的経路の活性化である、請求項 3 記載の方法。

**【請求項 6】**

前記指標が MMP 1 である、請求項 5 記載の方法。

**【請求項 7】**

前記ポリペプチドが、配列番号 101～125 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 6 記載の方法。

**【請求項 8】**

前記化合物が、市販のスクリーニングライブラリーの化合物、及び配列番号 101～125 及び 501～564 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと結合親和性を有する化合物からなる群から選択される、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 9】**

前記化合物がファージディスプレイライブラリー又は抗体断片ライブラリーのペプチドである、請求項 2 記載の方法。

**【請求項 10】**

アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム及び低分子干渉 RNA( s i R N A )からなる群から選択される細胞外マトリックス( E C M )分解を抑制する薬剤であって、配列番号 1～25 からなる群から選択される核酸配列の約 17 から約 30 の連続したヌクレオチドの天然ポリヌクレオチド配列と相補的であるか、又はそれから操作された核酸配列を含む、前記方法。

**【請求項 11】**

哺乳動物細胞のベクターが前記薬剤を発現する、請求項 10 記載の薬剤。

**【請求項 12】**

前記ベクターがアデノウイルス、レトロウイルス、アデノ関連ウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルス又はセンダイウイルスのベクターである、請求項 11 記載の薬剤。

**【請求項 13】**

前記アンチセンスポリヌクレオチド及び前記 s i R N A が、センス鎖に相補的な 17～25 のヌクレオチドのアンチセンス鎖を含み、前記センス鎖が、配列番号 1～25 からなる群から選択される核酸配列の 17～25 の連続したヌクレオチドから選択される、請求項 10 記載の薬剤。

**【請求項 14】**

前記 s i R N A が前記センス鎖をさらに含む、請求項 13 記載の薬剤。

**【請求項 15】**

前記センス鎖が配列番号 201～324 からなる群から選択される、請求項 14 記載の

10

20

30

40

50

薬剤。

【請求項 16】

前記 s i R N A が、前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖を接続するループ領域をさらに含む、請求項 15 記載の薬剤。

【請求項 17】

前記ループ領域が、配列番号 26 で規定される核酸配列を含む、請求項 16 記載の薬剤。

【請求項 18】

前記薬剤が、配列番号 201 ~ 324 からなる群から選択される核酸配列を含むアンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム又は s i R N A である、請求項 17 記載の薬剤。 10

【請求項 19】

前記薬剤が、配列番号 201 ~ 324 からなる群から選択される核酸配列を含むアンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム又は s i R N A である、請求項 18 記載の薬剤。

【請求項 20】

治療的有効量の請求項 10 記載の薬剤を、医薬として許容し得る担体との混合物として含む、E C M 分解抑制医薬組成物。

【請求項 21】

前記対象に請求項 20 記載の医薬組成物を投与することを含む、細胞外マトリックス (E C M) 分解が関与する疾患の、その疾患に患っているか感受性の対象における治療及び / 又は予防方法。 20

【請求項 22】

前記疾患が関節変性疾患である、請求項 22 記載の方法。

【請求項 23】

前記疾患が関節リウマチである、請求項 23 記載の方法。

【請求項 24】

細胞外マトリックス (E C M) 分解が関与する疾患の治療及び / 又は予防のための医薬品の製造における、請求項 10 から 19 記載の薬剤の使用。

【請求項 25】

前記疾患が、関節の変性疾患及び炎症性疾患からなる群から選択される、請求項 24 記載の使用。 30

【請求項 26】

前記疾患が関節リウマチである、請求項 24 又は 25 記載の使用。

【請求項 27】

治療的有効量の請求項 10 記載のマトリックスメタロプロテイナーゼ抑制剤を投与することを含む、異常なマトリックスメタロプロテイナーゼ活性を特徴とする病態の治療方法。

【請求項 28】

M M P 1 の異常な細胞発現が関与する疾患から選択される病態の治療方法であって、請求項 10 記載の薬剤のマトリックスメタロプロテイナーゼを抑制する治療的有効量を投与することを含む、前記方法。

対象において細胞外マトリックス (E C M) 分解に関係する病的状態又はその病態に対する感受性を診断するための方法であって、前記対象から得られる生体試料中に存在する配列番号 101 ~ 125 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの第 1 の量を測定することと、前記第 1 の量を健康者集団で測定されるポリペプチド量の範囲と比較することとを含み、健康者で測定した量の範囲と比較した前記生体試料中のポリペプチドの量の増加は前記病的状態の存在を示すものである方法。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

10

20

30

40

50

本発明は、細胞外マトリックス（ECM）の分解をもたらす経路に関係するタンパク質の発現を抑制することができる化合物及び発現抑制剤の同定方法に関し、前記抑制は関節変性及びそのような分解及び／又は炎症が関与する疾患の予防及び治療に役立つ。

#### 【背景技術】

##### 【0002】

細胞外マトリックスの分解が関与する疾患としては、それらには限定されないが、乾癬性関節炎、若年性関節炎、初期の関節炎、反応性関節炎、変形性関節炎、強直性脊椎炎、骨粗鬆症、腱炎及び歯周疾患のような骨格筋の疾患、癌転移、気道疾患（COPD、喘息）、腎臓及び肝臓の線維症、アテローム性動脈硬化症及び心不全のような心臓血管疾患並びに神経炎及び多発性硬化症のような神経系疾患がある。主に関節の変性が関与する疾患としては、それらには限定されないが、乾癬性関節炎、若年性関節炎、初期の関節炎、反応性関節炎、変形性関節炎、強直性脊椎炎がある。

10

##### 【0003】

関節リウマチ（RA）は慢性の関節変性疾患であり、関節構造の炎症及び破壊を特徴とする。阻止されないと疾患は関節機能の喪失による実質的な障害及び疼痛を、また早死にさえもたらす。RA療法の狙いは、したがって、関節の破壊を止めるために疾患を遅らせることではなく、寛解を達成することである。疾患予後の重大度の他に、RAの高い有病率（世界中で成人の約0.8%が影響を受ける）は、大きな社会経済的影響を意味する。（RAに関するレビューについては、Smolen及びSteiner（2003）；Lee及びWeinblatt（2001）；Choy及びPanayi（2001）；O'Dell（2004）及びFirestein（2003）を参照する）。

20

##### 【0004】

RAが自己免疫疾患であることは広く受け入れられているが、疾患の「開始段階」を作動させる正確なメカニズムに関してコンセンサスはない。知られていることは、素因のある宿主で最初の引き金がカスケード事象を媒介し、それらが様々な細胞型（B細胞、T細胞、マクロファージ、線維芽細胞、内皮細胞、樹状細胞その他）の活性化を導くことである。同時に、様々なサイトカインの増産が関節及び関節周囲の組織で観察される（例えばTNF-、IL-6、IL-1、IL-15、IL-18その他）。疾患が進行するとき、細胞活性化及びサイトカイン産生カスケードは無限に継続するようになる。この初期段階で、関節構造の破壊はこのような早い段階ですでに非常に明白である。患者の30パーセントは診断時点で骨性浸食のエックス線撮影像を有し、この割合は2年後に60パーセントまで増加する。

30

##### 【0005】

RA患者の関節の組織学的分析は、明らかにRA関連の分解過程に関係するメカニズムを明示する。滑膜は細胞層であり、下内張り、及び滑膜の空洞から関節囊を分離する内層領域から構成される。炎症を起こした滑膜は、RAの病態生理学にとって重要である。正常患者及びRA患者の間の滑膜の組織学的差を、図1で示す。A．滑膜関節は、2つの隣接した骨末端から構成され、それぞれは軟骨層で覆われ、関節空間によって分離され、滑膜層及び関節囊によって囲まれる。滑膜層は、滑膜細胞の薄い（1～3細胞）層及び非常に血管の多い下内張り結合組織層からなる滑膜内層（軟骨及び骨に面する）で構成される。滑膜層は、軟骨を除いてほとんどすべての関節腔内の構造物を覆う。B．他の多くの形態の関節炎と同様に、関節リウマチ（RA）は、最初に、局所の又は浸潤した单核細胞の活性化と同様に各種の单核細胞の重要な流入を特徴とする滑膜層の炎症性反応（「滑膜炎」）を特徴とする。内膜層は過形成を生じ（>20細胞の厚さとなることもある）、滑膜層は拡大する。しかし、さらに、RAの特質は関節の破壊である。「浸食」とも呼ばれる軟骨分解及び隣接骨の破壊の徵候が起こるにしたがって、関節空間は狭くなるか消失する。滑膜層の破壊部分は、「パンヌス」と呼ばれる。滑膜細胞によって分泌される酵素は、軟骨分解を導く。

40

##### 【0006】

この分析は、RA関連の関節分解を担う主なエフェクターはパンヌスであり、ここにおいて滑膜線維芽細胞は多様なタンパク質分解酵素を産生することから、軟骨及び骨の浸食

50

の主要な作動因子であることを示す。進行した R A 患者では、パンヌスは隣接した軟骨の分解を媒介して関節空間の狭小化を導き、また、隣接した骨及び軟骨に侵入する能力を有する。骨及び軟骨の組織はそれぞれ主にコラーゲン I 又は II で構成されるので、パンヌスの破壊的及び浸潤的な特性はコラーゲン溶解性プロテアーゼ、主にマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) の分泌によって媒介される。軟骨の下の骨及び隣接した骨の浸食も R A 過程の一部であり、主に骨及びパンヌスの境界面の破骨細胞の存在に起因する。破骨細胞は骨組織に付着して閉鎖コンパートメントを形成し、その中で破骨細胞は骨組織を分解するプロテアーゼ (カテプシン K、MMP 9) を分泌する。関節内の破骨細胞集団は、活性化された S F 及び T 細胞による NFKB リガンド (RANKL) の受容体活性化剤の分泌によって誘導される前駆細胞からの骨芽細胞形成によって、異常に増加する。

10

## 【0007】

細胞外マトリックス (ECM) の安定性を規定する上で、各種のコラーゲンが重要な役割を果たす。コラーゲン I 型及びコラーゲン II 型は、例えば、それぞれ骨及び軟骨の主成分である。コラーゲンタンパク質は、一般的に、コラーゲン原纖維と称される多量体の構造物に組織化する。未変性のコラーゲン原纖維は、タンパク分解性の切断に非常に抵抗性である。僅かの種類の ECM 分解タンパク質が未変性のコラーゲンを分解する能力を有すると報告されており、それらはマトリックスメタロプロテアーゼ類 (MMP) 及びカテプシン類である。カテプシンの中では、主に破骨細胞で活性であるカテプシン K の特徴が最も解明されている。MMP の中では、MMP 1、MMP 2、MMP 8、MMP 13 及び MMP 14 がコラーゲン溶解性特性を有することが知られている。滑膜線維芽細胞 (S F) による MMP 1 の発現増加及び関節炎疾患の進行間の相互関係は立証されていて、関節浸食過程の前兆となる (Cunnane ら、2001)。したがって R A との関連で、MMP 1 は関連性の高いコラーゲン分解タンパク質を表す。インビトロでは、R A 病理学と関連したサイトカイン (例えば TNF - 及び IL 1 ) による培養 S F の処理は、これらの細胞による MMP 1 の発現を増加させる (Andreakos ら、2003)。したがって、S F によって発現される MMP 1 のレベルを監視することはインビオで軟骨分解を担う浸食性表現型への S F の活性化を示すものなので、R A の分野では重要な読み出し情報である。S F による MMP 1 発現の抑制は、R A の治療のための価値ある治療手段となる。

20

## 【0008】

ECM 分解タンパク質の活性は、R A と異なる様々な疾患、例えば関節の分解と関連する他の疾患の進行の原因となるか又は相関する可能性もある。これらの疾患としては、それらには限定されないが、乾癬性関節炎、若年性関節炎、初期の関節炎、反応性関節炎、変形性関節炎、及び強直性脊椎炎がある。本発明によって同定される化合物により、本明細書で記載されている MMP の発現に関係する標的を用いて治療することができる他の疾患は、骨粗鬆症、腱炎及び歯周疾患のような骨格筋の疾患 (Gapski ら、2004)、癌転移 (Coussens ら、2002)、気道疾患 (COPD、喘息) (Suzuki ら、2004)、肺、腎臓線維症 (Schanstra ら、2002)、慢性 C 型肝炎と関連する肝臓線維症 (Reiff ら、2005)、アテローム性動脈硬化症及び心不全のような心臓血管疾患 (Creemers ら、2001)、並びに神経炎及び多発性硬化症のような神経系疾患 (Rosenberg、2002) である。そのような疾患を患っている患者は、(ECM を分解から保護することによって) ECM を安定させることから利益を受けることができる。

30

## 【0009】

## (報告された開発)

NSAID (非ステロイド系抗炎症薬剤) は、R A と関連する疼痛を低減し、患者の生活の質を改善するために用いられる。しかし、これらの薬剤は R A 関連の関節破壊を減速させない。

コルチコステロイドは X 線撮影で検出されたように R A の進行を低減することが発見されており、R A 患者の一部 (30 ~ 60 %) を治療するために低用量で用いられる。しかし、重大な副作用が長いコルチコステロイド使用に伴う (皮膚菲薄化、骨粗鬆症、白内障、高血圧、高脂血症)。

40

50

## 【0010】

合成D M A R D（疾患修飾性抗リウマチ薬剤）（例えばメトトレキセート、レフルノミド（leflunomide）、スルファサラジン）は、主にR Aの免疫炎症性成分に対処する。主な短所として、これらの薬剤は限定された効力を有するだけである（関節破壊はD M A R Dによって遅延するだけであり阻止されず、長期的には疾患が進行する）。効力の欠如は、メトトレキセートによる24ヵ月の治療の後、平均して患者の僅か30%がA C R 50スコアを達成するという事実が示す。このことは、米国リウマチ学会によると、患者の僅か30%が彼らの症状の50%の改善を成し遂げることを意味する（O'Dellら、1996）。さらに、D M A R Dの正確な作用機構はしばしば不明である。

## 【0011】

生物学的D M A R D（インフリキシマブ、エタナーセプト、アダリムマブ、リツキシマブ、C T L A 4 - I g）は、R A病態生理学で重要な役割を演じるサイトカイン（例えばT N F - ）又は細胞（例えばT細胞若しくはB細胞）を不活性化する、タンパク質治療薬である（Kremerら、2003；Edwardsら、2004）。T N F - 一遮断薬（インフリキシマブ、エタナーセプト、アダリムマブ）及びメトトレキセートの併用療法は今日利用できる最も有効なR A治療法であるけれども、この療法でさえ12ヵ月の療法の後に患者の50～60%で病徵の50%の改善（A C R 50）を達成するだけであることは、特筆すべきである（St Clairら、2004）。抗T N F - 薬剤の有害事象の警告がいくつか存在し、この種の薬剤に関連する副作用が明らかにされている。感染症（結核）、血液学的事象及び脱髓性障害に対するリスクの増加が、T N F - 遮断薬に関して記載されている。（Gomez-Reinoら、2003も参照）。重大な副作用の他に、T N F - 遮断薬は生物製剤クラスの薬物治療法の一般的短所も共有するが、それらは不快な投与方法（注入部位反応を伴う頻繁な注射）及び高い生産コストである。後期開発段階のより新しい剤は、T細胞共刺激分子及びB細胞を標的とする。これらの薬剤の効力は、T N F - 遮断薬のそれと類似すると予想される。様々な標的療法は類似するが限定された効力を有するという事実は、R Aについて複数の病原性因子があることを示唆する。このことも、R Aに関連する病原性事象の理解が欠乏していることを示す。

## 【0012】

R Aの現在の療法は、限定された効力（患者の30%で十分な療法が存在しない）のために十分でない。このことは、寛解を達成するための更なる手法を要求する。残りの疾患は進行性の関節損傷の、したがって進行性の障害のリスクを抱えているので、寛解が要求される。R A治療のために現在用いられる薬剤の主な標的である、R A疾患の免疫炎症性成分を抑制しても、この疾患の主要な特質である関節の悪化は阻止されない。

## 【0013】

R A患者の関節の組織学的分析は、パンヌスを関節分解の主な犯人となる攻撃的で浸潤性の組織としてはっきりと同定する。パンヌス内では、滑膜線維芽細胞は、R A発生病理の基礎である異常に引き起こされた免疫系の開始及び最終的な関節浸食の間の関係を象徴する。現在のR A療法は長期的にパンヌスの浸食活性を有效地に消滅させるものではないので、パンヌスの生成及び／又は活性を抑制する新規薬剤及び／又は薬剤標的の発見は、新規R A治療法の開発のための重要な道標を意味する。

## 【0014】

本発明は、M M P 1などの細胞外マトリックス（E C M）分解プロテアーゼの発現をもたらす経路である種類のタンパク質が機能し、これらのタンパク質の活性の阻害剤はそのようなプロテアーゼの異常に高い発現が関与する疾患の治療に役立つという発見に基づく。

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0015】

(発明の要約)

本発明は、細胞外マトリックス（E C M）の分解を抑制する化合物の同定方法に関する

10

20

30

40

50

ものであり、この方法は、化合物を、配列番号 101～125（以下、「ターゲット」）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド及びその断片と、前記ポリペプチドとその化合物との結合を可能にする条件下で接触させること、及び細胞外マトリックス（ECM）分解に関連した化合物・ポリペプチド特性を測定することを含む。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本方法の態様としては、配列番号 501～564 からなる群から選択されるものを含むターゲット及びその断片のポリペプチドを用いる化合物のインビトロアッセイ、並びに、ターゲット抑制に続いて効力の指標、例えば、ターゲット発現レベル及び／又はマトリックスメタロプロテイナーゼ 1 レベルを観察する細胞アッセイがある。

10

【0017】

本発明は、関節リウマチのような慢性関節変性疾患の治療又は予防に役立つ、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム及び低分子干渉 RNA（siRNA）の群から選択されるポリヌクレオチドを含む発現抑制剤、前記薬剤を含む医薬組成物にも関し、前記ポリヌクレオチドは配列番号 101～125 及び 501～564 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする天然ポリヌクレオチド配列と相補的であるか、又はそれから操作された核酸配列を含む。

【0018】

本発明の他の態様は、その疾患に患っているか感受性の対象において、発現抑制剤のターゲット発現を抑制するのに有効な量を含む医薬組成物を投与することによる、細胞外マトリックス（ECM）の分解が関与する病態の治疗方法又は予防方法である。

20

本発明の他の態様は、細胞外マトリックス（ECM）の分解を特徴とする病状に関する診断のための、対象におけるターゲット発現レベル指標の測定を含む方法である。

【0019】

本発明の他の態様は、炎症が関与する疾患、特に異常なマトリックスメタロプロテアーゼ活性を特徴とする疾患の治療に役立つ、治療法における本化合物の使用、医薬組成物及びそのような組成物の製造に関するものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

(詳細な説明)

30

以下の用語はそれとともに下で提示される意味を有するものとし、本発明の記載及び対象とする範囲を理解するために役立つ。

用語「薬剤」は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド及び小分子を含む任意の分子を意味する。

【0021】

用語「アゴニスト」は、最も広い意味ではリガンドが結合する受容体を刺激するリガンドを指す。

用語「アッセイ」は、化合物の特定の特性を測定するために用いられる任意の方法を意味する。「スクリーニングアッセイ」は、化合物の集団からそれらの活性に基づいて化合物の特徴を明らかにするかそれらを選択するために用いられる方法を意味する。

40

用語「結合親和性」は、2つ以上の化合物が互いに非共有結合でどの程度強く結合するかを記述する特性である。結合親和性は、質的に（例えば「強い」、「弱い」、「高い」又は「低い」）、或いは量的に（例えば、 $K_D$  の測定）特徴付けることができる。

【0022】

用語「担体」は、医薬組成物に媒体、嵩及び／又は使用可能な形態を提供するために医薬組成物の製剤で用いる無毒性材料を意味する。担体は賦形剤、安定剤又は水性の pH 緩衝溶液などのそのような材料の 1 つ又は複数を含むことができる。生理的に許容できる担体の例としては：リン酸、クエン酸及び他の有機酸を含む水性又は固体の緩衝成分；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子（約 10 未満残基）ポリペプチド、血清アルブミン、

50

ゼラチン又は免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース又はデキストリンを含む单糖、二糖及び他の炭水化物；E D T Aなどのキレート剤；マンニトール又はソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；並びに / 或いは T W E E N (商標)、ポリエチレンジリコール (P E G) 及び P L U R O N I C S (商標)などの非イオン性界面活性剤である。

## 【0023】

用語「複合体」は、2つ以上の化合物が互いに結合するときに形成される実体を意味する。

用語「化合物」は、本明細書では本発明のアッセイと関連して記載される「試験化合物」又は「薬剤候補化合物」との関連で用いられる。こうしたものとして、これらの化合物は合成又は天然供給源由来の有機又は無機の化合物を含む。化合物には、無機又は有機の化合物、例えば比較的低分子量を特徴とするポリヌクレオチド、脂質又はホルモン類似体が含まれる。他のバイオポリマー有機試験化合物としては、約2から約40のアミノ酸を含むペプチド及び約40から約500のアミノ酸を含むより大きなポリペプチド、例えば抗体若しくは抗体複合体がある。

## 【0024】

用語「病態」又は「疾患」は、症状(すなわち病気)の明白な提示又は異常な臨床指標(例えば生化学指標)の現れを意味する。或いは、用語「疾患」は、そのような症状又は異常な臨床指標を起こす遺伝的若しくは環境的リスク又はその傾向を指す。

用語「接触」又は「接触させる」は、インビトロ系であれインビボ系であれ、少なくとも2つの部分を一緒にすることを意味する。

## 【0025】

用語「ポリペプチド誘導体」は、ポリペプチドの一続きの連続したアミノ酸残基を含み、そのタンパク質の生物的活性を保持するペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質及び酵素に関し、その例としては、そのポリペプチドの天然形態のアミノ酸配列と比較してアミノ酸変異を有するポリペプチドがある。誘導体は、ポリペプチドの天然形態のアミノ酸配列と比較して別の天然の、変化させられた、グリコシル化された、アシル化された、又は非天然のアミノ酸残基をさらに含むことができる。それは、ポリペプチドの天然形態のアミノ酸配列と比較して1つ又は複数の非アミノ酸置換基を含むこともでき、その例としてはそのアミノ酸配列と共有結合又は非共有結合で結合したリポーター分子又は他のリガンドがある。

## 【0026】

用語「ポリヌクレオチドの誘導体」は、ポリヌクレオチドの一続き又は核酸残基を含むDNA分子、RNA分子及びオリゴヌクレオチドに関するものであり、その例として、ポリヌクレオチド天然形態の核酸配列と比較して核酸の変異を有することができるポリヌクレオチドがある。誘導体は、PNA、ポリシロキサン、及び2'-O-(2-メトキシ)エチルホスホチオエートなどの修飾された骨格を有する核酸、非天然の核酸残基、又は1つ又は複数の核酸置換基、例えばメチル-、チオ-、サルフェート、ベンゾイル-、フェニル-、アミノ-、プロビル-、クロロ-及びメタノカルバヌクレオシド、或いはその検出を容易にするリポーター分子をさらに含むことができる。

## 【0027】

用語「E C M 分解性タンパク質」及び「E C M 分解活性」は、骨及び軟骨で見られる細胞外マトリックスを分解することが可能なタンパク質及び活性をそれぞれ指す。

用語「有効量」又は「治療的有効量」は、医師又は他の臨床医によって探求されている対象の生物学的又は医学的な反応を導き出す化合物又は剤の量を意味する。

## 【0028】

用語「内因性」とは、哺乳類が自然に产生する物質を意味する。用語「プロテアーゼ」、「キナーゼ」又はGタンパク質結合受容体(「G P C R」)に関して内因性とは、それが哺乳類(例えばそれには限定されないがヒト)によって自然に产生されるものを意味す

10

20

30

40

50

る。対照的に、この関係における用語非内因性は、哺乳類（例えばそれには限定されないがヒト）によって自然に産生されないものを意味する。両用語は、「インビボ」及び「インビトロ」系の両方を記載するために用いることができる。例えば、それらには限定されないが、スクリーニング手法において、内因性又は非内因性のターゲットはインビトロスクリーニング系に関することでよい。それには限定されないが他の例として、哺乳類のゲノムが非内因性のターゲットを含むように操作された場合、インビボ系による候補化合物のスクリーニングが有効である。

用語「発現可能な核酸」は、タンパク性分子をコードする核酸、RNA分子又はDNA分子を意味する。

#### 【0029】

10

用語「発現」は、トランスタクションによる内因性の発現と過剰発現をどちらも含む。

用語「発現抑制剤」は、正常に細胞内で発現する特定のポリペプチド又はタンパク質の転写、翻訳及び／又は発現に選択的に干渉するように設計されたポリヌクレオチドを意味する。より詳しくは、「発現抑制剤」は少なくとも、特定のポリペプチド又はタンパク質をコードするポリリボヌクレオチド配列中の少なくとも約17の連続したヌクレオチドと同一であるか相補的なヌクレオチド配列を含む、DNA又はRNA分子を含む。例示的な発現抑制分子としては、リボザイム、二本鎖siRNA分子、自己相補的一本鎖siRNA分子、遺伝子のアンチセンス構築物及び修飾された安定化骨格を有する合成RNAアンチセンス分子がある。

#### 【0030】

20

用語「発現可能な核酸」は、タンパク性分子をコードする核酸、RNA分子又はDNA分子を意味する。

用語「ポリヌクレオチド断片」は、完全な配列と実質的に類似するが必ずしも同一でない活性を示す一続きの連続した核酸残基を含むオリゴヌクレオチドに関するものである。

用語「ポリペプチド断片」は、一続きの連続したアミノ酸残基を含み、完全な配列と実質的に類似するが必ずしも同一でない機能的活性を示すペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質及び酵素に関するものである。

#### 【0031】

30

用語「ハイブリダイゼーション」は、塩基対形成を通して核酸鎖と相補鎖とを結合させる任意の方法を意味する。用語「ハイブリダイゼーション複合体」は、相補的塩基間での水素結合の形成によって、2つの核酸配列間で形成される複合体を指す。ハイブリダイゼーション複合体は溶液中で形成することができ（例えばC<sub>0</sub><sub>t</sub>又はR<sub>0</sub><sub>t</sub>分析）、又は溶液中に存在する1つの核酸配列と固体支持体（例えば紙、膜、フィルター、チップ、ピン又はガラススライド、又は細胞若しくはそれらの核酸が固定された他のいかなる適当な基質）上で固定された他の核酸配列との間で形成することができる。用語「ストリンジエントな条件」は、ポリヌクレオチドと請求されたポリヌクレオチドとの間でのハイブリダイゼーションを可能にする条件を指す。ストリンジエントな条件は塩濃度、有機溶剤、例えばホルムアミドの濃度、温度及び当技術分野で公知である他の条件によって規定することができる。詳細には、塩濃度を低くするか、ホルムアミドの濃度を高くするか、ハイブリダイゼーション温度を上昇させることにより、ストリンジエンシーを増大させることができる。

40

#### 【0032】

用語「反応」との関係で用語「抑制する」又は「抑制性」は、化合物がない場合と対照的に化合物の存在下で反応が減少するか、阻止されることを意味する。

用語「抑制」は、過程の減少、ダウンレギュレーション、又はタンパク質若しくはポリペプチドの発現の消失又は最小化をもたらす、過程への刺激の除去を指す。

用語「誘導」は、タンパク質又はポリペプチドの発現をもたらす過程の誘導、アップレギュレーション又は刺激を指す。

用語「リガンド」は、内因性の天然の受容体に特異的な内因性の天然分子を意味する。

#### 【0033】

50

用語「医薬として許容し得る塩類」は、本発明の化合物の、非毒性の無機及び有機の酸付加塩、並びに塩基付加塩を指す。これらの塩類は、本発明で役立つ化合物の最終的な単離及び精製の間に、*in situ*で調製することができる。

用語「ポリペプチド」は、タンパク質、タンパク性分子、タンパク質の分画、ペプチド、オリゴペプチド、酵素（例えばキナーゼ、プロテアーゼ、G C P R、その他）に関するものである。

#### 【0034】

用語「ポリヌクレオチド」は、一本鎖又は二本鎖の、センス又はアンチセンスの配向性のポリ核酸、ストリンジエントな条件で特定のポリ核酸にハイブリダイズする相補的なポリ核酸、及びその塩基対の少なくとも約60パーセントで相同的なポリヌクレオチドを意味し、より好ましくはその塩基対の70パーセント、最も好ましくは90パーセント、特別な実施形態ではその塩基対の100パーセントが共通するポリヌクレオチドが好ましい。ポリヌクレオチドには、ポリリボ核酸、ポリデオキシリボ核酸及びそれらの合成類似体が含まれる。それには、修飾された骨格を有する核酸、例えばペプチド核酸（PNA）、ポリシロキサン及び2'-O-(2-メトキシ)エチルホスホチオエートも含まれる。ポリヌクレオチドは、長さの範囲が約10から約5000の塩基、好ましくは約100から約4000の塩基、より好ましくは約250から約2500の塩基の配列によって記述される。ポリヌクレオチドの一実施形態は、長さが約10から約30の塩基を含む。ポリヌクレオチドの特別な実施形態は、約10から約22のヌクレオチドのポリリボヌクレオチド、より一般的には低分子干渉RNA（s i RNA）と記載されるポリリボヌクレオチドである。他の特別な実施形態は、ペプチド核酸（PNA）、ポリシロキサン、及び2'-O-(2-メトキシ)エチルホスホチオエートなどの修飾された骨格を有する核酸であり、又は非天然の核酸残基、又は1つ若しくは複数の核酸置換基、例えばメチル-、チオ-、サルフェート、ベンゾイル-、フェニル-、アミノ-、プロピル-、クロロ-及びメタノカルバヌクレオシド、又はその検出を容易にするリポーター分子を含む。

#### 【0035】

用語「ポリペプチド」は、タンパク質（例えばターゲット）、タンパク性分子、タンパク質分画、ペプチド及びオリゴペプチドに関するものである。

用語「溶媒和物」は、本発明に役立つ化合物と1つ以上の溶媒分子との物理的結合を意味する。この物理的結合には、水素結合が含まれる。ある例では、溶媒和物は、例えは1つ以上の溶媒分子が結晶質固体の結晶格子内に組み込まれた場合などに、単離が可能である。「溶媒和物」は、溶相及び単離可能な溶媒和物の両方を含む。代表的な溶媒和物としては、水和物、エタノレート及びメタノレートがある。

#### 【0036】

用語「対象」は、ヒト及び他の哺乳動物を含む。

用語「ターゲット」又は「ターゲット類」は、本アッセイに従ってMMP1レベルの誘導に関与していることが同定されたタンパク質を意味する。好ましいターゲットは、表1の配列番号101～125と同定される。より好ましいターゲットは、表1で同定されるキナーゼ、プロテアーゼ及びGタンパク質結合型受容体（GPCR）である。

#### 【0037】

「治療的有効量」は、医師又は他の臨床医によって探求されている対象の生物学的又は医学的な反応を導き出す薬剤又は医薬の量を意味する。詳細には、細胞外マトリックスの分解を特徴とする病状を治療することについて、用語「マトリックスメタロプロテアーゼ抑制有効量」は、対象の疾患患部組織でMMP1の產生の生物学的に意味がある減少をもたらし、細胞外マトリックス分解が有意に減少するような、本発明化合物の有効量を意味するものとする。マトリックスメタロプロテアーゼ抑制特性を有する化合物、又は「マトリックスメタロプロテアーゼ抑制化合物」は、細胞に有効量を投与するとそのような細胞内でMMP-Iの產生の生物学的に意味がある減少を引き起こすことができる化合物を意味する。

#### 【0038】

10

20

30

40

50

用語「治療する」は、それらの障害若しくは病態の1つ又は複数の症状を含めて障害、疾患若しくは病態の発生を予防するかその病理を変更し、それによって軽減することを目的に実施する診療行為を意味する。したがって、「治療する」は治癒的な治療及び予防的若しくは防止的な処置の両方を指す。治療を要する者としては、すでにその障害を有する者、並びにその障害を予防すべき者が含まれる。用語「治療する」が上で定義されているように、本明細書で使用する関連語「治療」は、障害、症状、疾患又は病態を治療する行為を指す。

【0039】

(細胞外マトリックス分解とのターゲット関係に基づく出願人の発明)

上記したように、本発明はターゲットポリペプチドが細胞外マトリックス分解のアップレギュレーションおよび/又は誘導における因子であるという本発明者の発見に基づく。ECM分解タンパク質の活性は、関節の分解と関係する疾患を含め、細胞外マトリックスの分解の増加と関連する様々な疾患の原因となり、またその進行と相関すると考えられている。

【0040】

本発明は、細胞外マトリックスの分解を抑制する薬剤候補化合物のアッセイ方法に関するものであり、化合物を配列番号101～125及び501～564のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、前記ポリペプチドとその化合物との結合を可能にする条件下で接触させること、及び前記ポリペプチドと前記化合物との間の複合体の形成を検出することを含む。複合体形成を測定する好ましい1手段は、前記ポリペプチドとの前記化合物の結合親和性を測定することである。

【0041】

より詳細には、本発明は細胞外マトリックス分解を抑制する薬剤の方法同定に関し、前記方法は、

(a) 哺乳動物細胞の集団を、ターゲットポリペプチドとの結合親和性を示す1つ又は複数の化合物と接触させることと

(b) 細胞外マトリックス分解に関する化合物ポリペプチド特性を測定することとをさらに含む。

【0042】

上で言及した化合物ポリペプチド特性は、ターゲットの発現に関連し、当業者によって選択される測定可能な現象である。測定可能な特性は、例えば、ポリペプチドターゲットのペプチドドメイン、例えば配列番号501～564との結合親和性でよく、又は、細胞外マトリックス分解のいくつかの生化学的マーカーレベルのいずれか1つのレベルでよい。細胞外マトリックス分解は、例えばその過程で誘導される酵素のレベル、例えば MMP及び/又はカテーテシンポリペプチドの発現を測定することによって測定することができる。

【0043】

本発明の好ましい一実施形態では、ターゲットポリペプチドは表1のリストに記載されている配列番号101～125からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

20

30

【表1】

表1

Hit No.	遺伝子名	記載	Ref/SEQ アクセション (DNA)	配列 番号 DNA	Ref/SEQ アクセション (タンパク質)	配列番号 タンパク質	タンパク質 クラス	配列番号 KD ターゲット
H31-290	RIPK2	ヒト受容体相互作用セリンスレオニンキナーゼ2 (RIPK2)、mRNA。	NM_003821	1	NP_003812	101	キナーゼ	201-205 317-319
H31-035	PRKCE	ヒトプロテインキナーゼC、イプシロン (PRKCE)、mRNA。	NM_005400	2	NP_005391	102	キナーゼ	206-210 316
H31-319	MST3	Manningら、Science、からのヒトキナーゼSK246	SK246	3		103	キナーゼ	211-215 313
			NM_003576	4		104	キナーゼ	211-215 313
H34-088	MAPKAP K5	ヒトマイトジエン活性化プロテインキナーゼ活性化プロテインキナーゼ5 (MAPKAPK5)、転写産物変異体1、mRNA。	NM_003668	5	NP_003659	105	キナーゼ	216-220 305-310
			NM_139078	6		106	キナーゼ	221-225 305-310
H34-087	MKNK1	ヒトMAPキナーゼ相互作用セリン／スレオニンキナーゼ1 (MKNK1)、mRNA。	NM_003684	7	NP_003675	107	キナーゼ	226-230 311-312
H31-031	CAMK4	ヒトカルシウム／カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIV (CAMK4)、mRNA。	NM_001744	8	NP_001735	108	キナーゼ	231-235 293
	CAMK4		SK061	9		109	キナーゼ	236-240 320
H31-347	SEPT1	ヒトセプチン1 (SEPT1)、mRNA。	NM_052838	10	NP_443070	110	分泌される	241-245
H31-450	PGPEP1	ヒトピログルタミルペプチダーゼI。	NM_017712	11		111	プロテアーゼ	241-245 314-315
H31-351	CD72	ヒトCD72抗原 (CD72)、mRNA。	NM_001782	12	NP_001773	112	分泌される	246-250
H31-301	TPST1	ヒトチロシルプロテインスルホトランスフェラーゼ1 (TPST1)、mRNA。	NM_003596	13	NP_003587	113	酵素	251-255 299,322
H31-242	GPR21	ヒトGタンパク質結合型受容体21 (GPR21)、mRNA。	NM_005294	14	NP_005285	114	GPCR	256-260 304
H31-047	USP21	ヒトユビキチン特異的プロテアーゼ21 (USP21)、転写産物変異体1、mRNA。	NM_012475	15	NP_036607	115	プロテアーゼ	261-265 323-324
	USP21	ヒトユビキチン特異的プロテアーゼ21 (USP21)、転写産物変異体2、mRNA。	NM_016575	16	NP_057656	116	プロテアーゼ	263-267 323-324

10

20

30

40

H34-092	FZD4	ヒト frizzled ホモログ 4 (Drosophila) (FZD4)、mRNA。	NM_012193	17	NP_036325	117	GPCR	268-272 301-303
			GAL_GPCR 0379	18	GAL_GPCR 0379	118	GPCR	268-272
H31-180	TM7SF1	ヒト膜貫通 7 スーパー ファミリーメンバー 1 (腎臓でアップレギュレーションされる) (TM7SF1)、mRNA。	NM_003272	19	NP_003263	119	GPCR	273-277 321
H31-384	FXYD5	イオン移動調節因子 5 を含むヒト FXYD ドメイン (FXYD5)、mRNA。	NM_014164	20	NP_054883	220	分泌される	278-282 300
H31-360	RIT1	CAAX1 のないヒト Ras 様 (RIT1)、mRNA。	NM_006912	21	NP_008843	121	酵素	283-287
H31-049	CASP10	ヒトカスパーゼ 10、アポトーシス関連のシステインプロテアーゼ (CASP10)、転写産物変異体 A、mRNA。	NM_001230	22	NP_001221	122	プロテアーゼ	288-292 295
	CASP10	ヒトカスパーゼ 10、アポトーシス関連のシステインプロテアーゼ (CASP10)、転写産物変異体 B、mRNA。	NM_032974	23	NP_116756	123	プロテアーゼ	289-290 292-295 298
	CASP10	ヒトカスパーゼ 10、アポトーシス関連のシステインプロテアーゼ (CASP10)、転写産物変異体 C、mRNA。	NM_032976	24	NP_116758	124	酵素	288-292 295
	CASP10	ヒトカスパーゼ 10、アポトーシス関連のシステインプロテアーゼ (CASP10)、転写産物変異体 D、mRNA。	NM_032977	25	NP_116759	125	プロテアーゼ	289-292 295,298
		ループ						26

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 4 】

当業者の選択に従い、本アッセイ方法は一連の測定として機能するように設計することができ、そのそれぞれは薬剤候補化合物が実際にポリペプチドに作用して細胞外マトリックス分解を抑制するかどうかを決定するように設計される。例えば、化合物のポリペプチド又はその断片に対する結合親和性を測定するように設計されたアッセイは、試験化合物が対象に投与されたときに細胞外マトリックス分解の抑制に役立つかどうかを確認するために必要かもしれないが十分ではない。

## 【 0 0 4 5 】

そのような結合情報は、生化学経路のさらに下の異なる特性、例えば MMP - 1 発現を測定するアッセイで使用するための一組の試験化合物を同定する際に役立つはずである。そのような第 2 のアッセイは、ポリペプチドに結合親和性を有する試験化合物が実際に細胞外マトリックス分解を抑制することを確認するように設計することができる。偽陽性の読み取値でないことを保証するために、適当な対照を常に設置しなければならない。

## 【 0 0 4 6 】

これらの測定の順序は本発明の実施に重要であるとは考えられておらず、任意の順序で実行することができる。例えば、情報が知られていない一組の化合物のスクリーニングアッセイを、ポリペプチドに対するそれらの化合物の結合親和性を考慮しながら最初に実施することができる。或いは、ポリペプチドドメインに対して結合親和性を有すると同定された一組の化合物、又はそのポリペプチドの阻害剤であると同定された化合物のクラスを

スクリーニングすることができる。しかし、本アッセイが薬剤候補化合物の究極の用途に意味があるようにするために、細胞外マトリックス分解活性の測定が必要である。対照及び本発明のポリペプチドへの結合親和性の測定を含むバリデーション試験は、それにもかかわらず任意の治癒的又は診断的用途で有用な化合物を同定する際に役立つ。

【0047】

本アッセイ方法は、1つ以上のターゲットタンパク質又はその断片を用いて、インピトロで実行することができる。選択されたターゲットの例示的なタンパク質ドメイン断片のアミノ酸配列は下記の表1Aのリストに記載された配列番号501～564である。

【表2】

表1A

アクセション	名前	タンパク質部分	配列番号 タンパク質部分
NM_005294	GPR21	細胞外のドメイン	501
NM_005294	GPR21	膜貫通領域	502
NM_005294	GPR21	細胞内ドメイン	503
NM_005294	GPR21	膜貫通領域	504
NM_005294	GPR21	細胞外のドメイン	505
NM_005294	GPR21	膜貫通領域	506
NM_005294	GPR21	細胞内ドメイン	507
NM_005294	GPR21	膜貫通領域	508
NM_005294	GPR21	細胞外のドメイン	509
NM_005294	GPR21	膜貫通領域	510
NM_005294	GPR21	細胞内ドメイン	511
NM_005294	GPR21	膜貫通領域	512
NM_005294	GPR21	細胞外のドメイン	513
NM_005294	GPR21	膜貫通領域	514
NM_005294	GPR21	細胞内ドメイン	515
NM_012193	FZD4	細胞外のドメイン	516
NM_012193	FZD4	膜貫通領域	517
NM_012193	FZD4	細胞内ドメイン	518
NM_012193	FZD4	膜貫通領域	519
NM_012193	FZD4	細胞外のドメイン	520
NM_012193	FZD4	膜貫通領域	521
NM_012193	FZD4	細胞内ドメイン	522
NM_012193	FZD4	膜貫通領域	523
NM_012193	FZD4	細胞外のドメイン	524
NM_012193	FZD4	膜貫通領域	525
NM_012193	FZD4	細胞内ドメイン	526
NM_012193	FZD4	膜貫通領域	527
NM_012193	FZD4	細胞外のドメイン	528
NM_012193	FZD4	膜貫通領域	529
NM_012193	FZD4	細胞内ドメイン	530
NM_003272	TM7SF1	細胞外のドメイン	531
NM_003272	TM7SF1	膜貫通領域	532
NM_003272	TM7SF1	細胞内ドメイン	533
NM_003272	TM7SF1	膜貫通領域	534
NM_003272	TM7SF1	細胞外のドメイン	535
NM_003272	TM7SF1	膜貫通領域	536
NM_003272	TM7SF1	細胞内ドメイン	537
NM_003272	TM7SF1	膜貫通領域	538
NM_003272	TM7SF1	細胞外のドメイン	539
NM_003272	TM7SF1	膜貫通領域	540
NM_003272	TM7SF1	細胞内ドメイン	541
NM_003272	TM7SF1	膜貫通領域	542
NM_003272	TM7SF1	細胞外のドメイン	543
NM_003272	TM7SF1	膜貫通領域	544

10

20

30

40

NM_003272	TM7SF1	細胞内ドメイン	545
NM_001782	CD72	細胞内ドメイン	546
NM_001782	CD72	膜貫通領域	547
NM_001782	CD72	細胞外のドメイン	548
NM_014164	FXYD5	細胞外のドメイン	549
NM_014164	FXYD5	膜貫通領域	550
NM_014164	FXYD5	細胞内ドメイン	551
GAL_GPCR0379	FZD4	細胞内ドメイン	552
GAL_GPCR0379	FZD4	膜貫通領域	553
GAL_GPCR0379	FZD4	細胞外のドメイン	554
GAL_GPCR0379	FZD4	膜貫通領域	555
GAL_GPCR0379	FZD4	細胞内ドメイン	556
GAL_GPCR0379	FZD4	膜貫通領域	557
GAL_GPCR0379	FZD4	細胞外のドメイン	558
GAL_GPCR0379	FZD4	膜貫通領域	559
GAL_GPCR0379	FZD4	細胞内ドメイン	560
GAL_GPCR0379	FZD4	膜貫通領域	561
GAL_GPCR0379	FZD4	細胞外のドメイン	562
GAL_GPCR0379	FZD4	膜貫通領域	563
GAL_GPCR0379	FZD4	細胞内ドメイン	564

10

20

30

40

50

## 【0048】

ポリペプチドターゲットを有する化合物の結合親和性は、当技術分野で公知の方法、例えば表面プラズモン共鳴バイオセンサー(Biacore)、標識化合物による飽和結合分析(例えばScatchard及びLindmo分析)、示差UV分光光度計、蛍光偏光アッセイ、蛍光定量的イメージングプレートリーダー(FLIPR(商標))系、蛍光共鳴エネルギー転移及びバイオルミネセンス共鳴エネルギー転移によって測定することができる。化合物の結合親和性は、解離定数( $K_d$ )、又はIC<sub>50</sub>若しくはEC<sub>50</sub>として表すこともできる。IC<sub>50</sub>は、他のリガンドのポリペプチドとの結合の50%抑制に必要な、化合物濃度を意味する。EC<sub>50</sub>は、ターゲット機能を測定する任意のアッセイで最大効果の50%を得るために必要な濃度を意味する。解離定数 $K_d$ は、リガンドがどの程度ポリペプチドに結合するかを見るための測定手段であり、ポリペプチド上の結合部位の正確に半分を飽和させるために必要なリガンド濃度と等価である。高親和性結合を有する化合物は、低い $K_d$ 、IC<sub>50</sub>及びEC<sub>50</sub>値を有し、すなわち100nMから1pMの範囲である。中等度から低い親和性の結合は、高い $K_d$ 、IC<sub>50</sub>及びEC<sub>50</sub>値と関連し、すなわちマイクロモル濃度の範囲である。

## 【0049】

本アッセイ方法は細胞アッセイで実行することもできる。ターゲットを発現する宿主細胞としては、内因性発現を有する細胞、又は例えばトランスタクションによってターゲットを過剰発現する細胞が可能である。ポリペプチドの内因性発現が、容易に測定することができるベースラインを測定するのに十分でないときは、ターゲットを過剰発現する宿主細胞を用いることができる。過剰発現は、ターゲット基質最終産物のレベルが内因性の発現による活性レベルより高い利点を有する。したがって、現在利用できる手法を用いてそのようなレベルを測定することは、より簡単である。

## 【0050】

細胞外マトリックス(ECM)分解を減少させる化合物を同定するための本方法の一実施形態は、ターゲットポリペプチド又はその機能的断片若しくは誘導体を発現する哺乳動物細胞の集団を培養すること、前記細胞集団でECM分解の第1のレベルを測定すること、前記細胞集団を化合物又は化合物の混合物へ露出させること、前記細胞集団の前記化

物又は前記化合物の混合物への露出の間又は後に前記細胞集団で ECM 分解の第 2 のレベルを測定すること、並びに、 ECM 分解を減少させる化合物を同定することを含む。上記したように、 ECM 分解はターゲットポリペプチド及び / 又は既知の ECM 分解タンパク質の発現及び / 又は活性を測定することによって測定することができる。好ましい実施形態では、前記 ECM 分解タンパク質はコラーゲンを分解することができ、より好ましくは、コラーゲン I 型及び / 又はコラーゲン II 型を分解することができる。本発明の他の好ましい実施形態では、前記 ECM 分解タンパク質はマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) であって、より好ましくは MMP1、MMP2、MMP3、MMP8、MMP9、MMP13 及び MMP14 からなる群から選択される。これとの関係で、最も好ましい ECM 分解タンパク質は、マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MMP1) である。さらに他の好ましい実施形態では、前記 ECM 分解タンパク質は、カテプシン K である。

10

## 【0051】

ECM 分解タンパク質の発現は、当技術分野で公知の方法、例えば特異抗体を用いるウェスタンプロット法又は特定の ECM 分解タンパク質を特異的に認識する抗体を用いる ELISA で測定することができる。

ECM 分解タンパク質の活性は、蛍光発生性の小ペプチド基質を用いて測定することができる。しかし、これらの基質の特異性はしばしば限定される。一般に、これらの基質の使用は、他のプロテアーゼの干渉を避けるために生化学アッセイでの精製プロテアーゼの試験に限定される。

本発明者らは、培養細胞の上清などの複合媒体中のコラーゲン分解酵素の活性のハイスループット検出を可能にするプロトコルを開発した。このプロトコルは、基質として蛍光標識された未変性のコラーゲンを利用する。

20

## 【0052】

本発明者らは、「ノックイン」ライブラリーを用いて ECM 分解に関する標的遺伝子を同定した。この種のライブラリーは、細胞内の特定の遺伝子及び対応する遺伝子産物の発現及び活性を誘導する組換えアデノウイルスによって cDNA 分子が細胞内に形質導入されるスクリーンである。ウイルスベクター内の各 cDNA は、特定の天然遺伝子に対応する。 ECM 分解を刺激する cDNA を同定することによって、特定の遺伝子発現と ECM 分解との間の直接的な相互関係を導くことができる。ノックインライブラリーを用いて同定したターゲット遺伝子（そのタンパク質発現産物は本明細書では「ターゲット」ポリペプチドと称す）は、次に、 ECM 分解を阻止するために用いることができる化合物を同定するための本発明の方法で用いる。実際は、表 3 のリストに記載した配列（配列番号 201 ~ 324）を含む shRNA 化合物及びそれに対応するアンチセンス配列は、これらのターゲット遺伝子の発現及び / 又は活性を抑制し、細胞の ECM 分解活性を低減するこ<sup>30</sup>とから、 ECM 分解におけるこれらのターゲット遺伝子の役割が確認される。

## 【表 3】

表 3

これらの遺伝子の発現の RNAi ベースのダウンレギュレーションで用いる  
SFR のコラーゲン溶解性活性のモジュレータとして同定された遺伝子の  
コード配列内で選択された標的配列のリスト。

40

ディスプレイ ID	アクセション	名前	s i RNA 名	配列番号
CAMK4	NM_001744	A150100-CAMK4_v1	NM_001744_idx445	232
CAMK4	NM_001744	A150100-CAMK4_v10	NM_001744_idx1045	297
CAMK4	NM_001744	A150100-CAMK4_v11	NM_001744_idx1186	234
CAMK4	NM_001744	A150100-CAMK4_v2	NM_001744_idx258	235
CAMK4	NM_001744	A150100-CAMK4_v3	NM_001744_idx668	233

50

GPR21	NM_005294	A150100-GPR21_v11	NM_005294_idx936	258
GPR21	NM_005294	A150100-GPR21_v12	NM_005294_idx168	304
GPR21	NM_005294	A150100-GPR21_v13	NM_005294_idx868	256
GPR21	NM_005294	A150100-GPR21_v14	NM_005294_idx988	260
GPR21	NM_005294	A150100-GPR21_v9	NM_005294_idx161	259
MAPKAPK5	NM_003668	A150100-MAPKAPK5_v1	oKD102	219
MAPKAPK5	NM_003668	A150100-MAPKAPK5_v10	NM_003668_idx856	305
MAPKAPK5	NM_003668	A150100-MAPKAPK5_v11	NM_003668_idx1542	225
MAPKAPK5	NM_003668	A150100-MAPKAPK5_v12	NM_003668_idx456	306
MAPKAPK5	NM_003668	A150100-MAPKAPK5_v13	NM_003668_idx609	307
MAPKAPK5	NM_003668	A150100-MAPKAPK5_v2	oKD103	308
MAPKAPK5	NM_003668	A150100-MAPKAPK5_v8	oKD104	309
MAPKAPK5	NM_003668	A150100-MAPKAPK5_v9	NM_003668_idx686	310
MAPKAPK5	NM_139078	A150100-MAPKAPK5_v1	oKD102	219
MAPKAPK5	NM_139078	A150100-MAPKAPK5_v10	NM_003668_idx856	305
MAPKAPK5	NM_139078	A150100-MAPKAPK5_v11	NM_003668_idx1542	225
MAPKAPK5	NM_139078	A150100-MAPKAPK5_v12	NM_003668_idx456	306
MAPKAPK5	NM_139078	A150100-MAPKAPK5_v13	NM_003668_idx609	307
MAPKAPK5	NM_139078	A150100-MAPKAPK5_v2	oKD103	308
MAPKAPK5	NM_139078	A150100-MAPKAPK5_v8	oKD104	309
MAPKAPK5	NM_139078	A150100-MAPKAPK5_v9	NM_003668_idx686	310
MKNK1	NM_003684	A150100-MKNK1_v1	oKD110	311
MKNK1	NM_003684	A150100-MKNK1_v14	oKD109	230
MKNK1	NM_003684	A150100-MKNK1_v15	oKD108	226
MKNK1	NM_003684	A150100-MKNK1_v16	NM_003684_idx384	228
MKNK1	NM_003684	A150100-MKNK1_v17	NM_003684_idx549	229
MKNK1	NM_003684	A150100-MKNK1_v18	NM_003684_idx1216	312
MST3	SK246	A150100-MST3_v2	SK246_idx413	215
MST3	SK246	A150100-MST3_v3	SK246_idx508	214
MST3	SK246	A150100-MST3_v4	SK246_idx918	212
MST3	SK246	A150100-STK24_v1	NM_003576_idx300	211
MST3	SK246	A150100-STK24_v2	NM_003576_idx950	313
MST3	SK246	A150100-STK24_v3	NM_003576_idx1020	213
PGPEP1	NM_017712	A150100-FLJ20208_v10	NM_017712_idx176	243
PGPEP1	NM_017712	A150100-FLJ20208_v11	NM_017712_idx404	241

10

20

30

40

CAMK4	NM_001744	A150100-CAMK4_v9	NM_001744_idx427	231
CASP10	NM_001230	A150100-CASP10_v1	NM_001230_idx934	295
CASP10	NM_001230	A150100-CASP10_v10	NM_001230_idx1532	291
CASP10	NM_001230	A150100-CASP10_v13	NM_001230_idx1111	292
CASP10	NM_001230	A150100-CASP10_v2	NM_001230_idx382	290
CASP10	NM_001230	A150100-CASP10_v8	NM_032974_idx317	289
CASP10	NM_032974	A150100-CASP10_v1	NM_001230_idx934	295
CASP10	NM_032974	A150100-CASP10_v11	NM_032974_idx1674	293
CASP10	NM_032974	A150100-CASP10_v12	NM_032974_idx1829	294
CASP10	NM_032974	A150100-CASP10_v13	NM_001230_idx1111	292
CASP10	NM_032974	A150100-CASP10_v2	NM_001230_idx382	290
CASP10	NM_032974	A150100-CASP10_v7	NM_032974_idx981	298
CASP10	NM_032974	A150100-CASP10_v8	NM_032974_idx317	289
CASP10	NM_032976	A150100-CASP10_v1	NM_001230_idx934	295
CASP10	NM_032976	A150100-CASP10_v10	NM_001230_idx1532	291
CASP10	NM_032976	A150100-CASP10_v13	NM_001230_idx1111	292
CASP10	NM_032976	A150100-CASP10_v2	NM_001230_idx382	290
CASP10	NM_032976	A150100-CASP10_v8	NM_032974_idx317	289
CASP10	NM_032977	A150100-CASP10_v1	NM_001230_idx934	295
CASP10	NM_032977	A150100-CASP10_v10	NM_001230_idx1532	291
CASP10	NM_032977	A150100-CASP10_v13	NM_001230_idx1111	292
CASP10	NM_032977	A150100-CASP10_v2	NM_001230_idx382	290
CASP10	NM_032977	A150100-CASP10_v7	NM_032974_idx981	298
CASP10	NM_032977	A150100-CASP10_v8	NM_032974_idx317	289
CD72	NM_001782	A150100-CD72_v2	NM_001782_idx376	249
CD72	NM_001782	A150100-CD72_v3	NM_001782_idx742	246
CD72	NM_001782	A150100-CD72_v4	NM_001782_idx975	299
CD72	NM_001782	A150100-CD72_v5	NM_001782_idx1049	247
CD72	NM_001782	A150100-CD72_v6	NM_001782_idx1054	250
CD72	NM_001782	A150100-CD72_v7	NM_001782_idx901	248
FXYD5	NM_014164	A150100-FXYD5_v2	NM_014164_idx224	281
FXYD5	NM_014164	A150100-FXYD5_v3	NM_014164_idx417	280
FXYD5	NM_014164	A150100-FXYD5_v4	NM_014164_idx436	278
FXYD5	NM_014164	A150100-FXYD5_v5	NM_014164_idx542	282
FXYD5	NM_014164	A150100-FXYD5_v6	NM_014164_idx603	279
FXYD5	NM_014164	A150100-FXYD5_v7	NM_014164_idx672	300
FZD4	NM_012193	A150100-C(27)-3BETA-HSD_v3	NM_025193_idx1374	301
FZD4	NM_012193	A150100-FZD4_v10	NM_012193_idx849	271
FZD4	NM_012193	A150100-FZD4_v5	NM_012193_idx481	269
FZD4	NM_012193	A150100-FZD4_v6	NM_012193_idx1570	302
FZD4	NM_012193	A150100-FZD4_v7	NM_012193_idx745	272
FZD4	NM_012193	A150100-FZD4_v8	NM_012193_idx1160	303
FZD4	NM_012193	A150100-FZD4_v9	NM_012193_idx534	270
GPR21	NM_005294	A150100-GPR21_v10	NM_005294_idx638	257

10

20

30

40

PGPEP1	NM_017712	A150100-FLJ20208_v5	NM_017712_idx289	245
PGPEP1	NM_017712	A150100-FLJ20208_v6	NM_017712_idx164	242
PGPEP1	NM_017712	A150100-FLJ20208_v7	NM_017712_idx496	314
PGPEP1	NM_017712	A150100-FLJ20208_v8	NM_017712_idx198	244
PGPEP1	NM_017712	A150100-FLJ20208_v9	NM_017712_idx298	315
PRKCE	NM_005400	A150100-PRKCE_v10	NM_005400_idx760	208
PRKCE	NM_005400	A150100-PRKCE_v11	NM_005400_idx1276	209
PRKCE	NM_005400	A150100-PRKCE_v2	NM_005400_idx1240	206
PRKCE	NM_005400	A150100-PRKCE_v7	NM_005400_idx1109	207
PRKCE	NM_005400	A150100-PRKCE_v8	NM_005400_idx2050	210
PRKCE	NM_005400	A150100-PRKCE_v9	NM_005400_idx148	316
RIPK2	NM_003821	A150100-RIPK2_v1	oKD111	201
RIPK2	NM_003821	A150100-RIPK2_v10	NM_003821_idx993	317
RIPK2	NM_003821	A150100-RIPK2_v11	NM_003821_idx1416	318
RIPK2	NM_003821	A150100-RIPK2_v2	oKD112	203
RIPK2	NM_003821	A150100-RIPK2_v3	oKD113	204
RIPK2	NM_003821	A150100-RIPK2_v9	NM_003821_idx612	319
RIT1	NM_006912	A150100-RIT_v2	NM_006912_idx247	286
RIT1	NM_006912	A150100-RIT_v3	NM_006912_idx536	283
RIT1	NM_006912	A150100-RIT_v4	NM_006912_idx622	285
RIT1	NM_006912	A150100-RIT_v5	NM_006912_idx824	287
RIT1	NM_006912	A150100-RIT_v6	NM_006912_idx263	284
SEPT1	NM_052838	A150100-SEPT1_v2	NM_052838_idx305	320
SEPT1	NM_052838	A150100-SEPT1_v3	NM_052838_idx329	238
SEPT1	NM_052838	A150100-SEPT1_v4	NM_052838_idx480	239
SEPT1	NM_052838	A150100-SEPT1_v5	NM_052838_idx677	237
SEPT1	NM_052838	A150100-SEPT1_v6	NM_052838_idx954	236
SEPT1	NM_052838	A150100-SEPT1_v7	NM_052838_idx1218	240
MST3	NM_003576	A150100-MST3_v2	SK246_idx413	215
MST3	NM_003576	A150100-MST3_v3	SK246_idx508	214
MST3	NM_003576	A150100-MST3_v4	SK246_idx918	212
MST3	NM_003576	A150100-STK24_v1	NM_003576_idx300	211
MST3	NM_003576	A150100-STK24_v2	NM_003576_idx950	313
MST3	NM_003576	A150100-STK24_v3	NM_003576_idx1020	213
TM7SF1	NM_003272	A150100-TM7SF1_v11	NM_003272_idx637	277
TM7SF1	NM_003272	A150100-TM7SF1_v12	NM_003272_idx673	274
TM7SF1	NM_003272	A150100-TM7SF1_v13	NM_003272_idx764	321
TM7SF1	NM_003272	A150100-TM7SF1_v14	NM_003272_idx775	276
TM7SF1	NM_003272	A150100-TM7SF1_v9	NM_003272_idx275	273
TPST1	NM_003596	A150100-TPST1_v1	NM_003596_idx722	255
TPST1	NM_003596	A150100-TPST1_v2	NM_003596_idx1262	253
TPST1	NM_003596	A150100-TPST1_v3	NM_003596_idx425	251
TPST1	NM_003596	A150100-TPST1_v5	NM_003596_idx1229	252
TPST1	NM_003596	A150100-TPST1_v6	NM_003596_idx1260	254
TPST1	NM_003596	A150100-TPST1_v7	NM_003596_idx1444	322

10

20

30

40

USP21	NM_012475	A150100-USP21_v1	NM_012475_idx1574	261
USP21	NM_012475	A150100-USP21_v13	NM_012475_idx741	266
USP21	NM_012475	A150100-USP21_v14	NM_012475_idx928	323
USP21	NM_012475	A150100-USP21_v15	NM_012475_idx682	263
USP21	NM_012475	A150100-USP21_v16	NM_012475_idx733	267
USP21	NM_012475	A150100-USP21_v17	NM_012475_idx1573	262
USP21	NM_012475	A150100-USP21_v2	NM_012475_idx1224	265
USP21	NM_012475	A150100-USP21_v3	NM_012475_idx269	264
USP21	NM_012475	A150100-mmUsp21_v5	NM_013919_idx1120	324
USP21	NM_016572	A150100-USP21_v13	NM_012475_idx741	266
USP21	NM_016572	A150100-USP21_v14	NM_012475_idx928	323
USP21	NM_016572	A150100-USP21_v15	NM_012475_idx682	263
USP21	NM_016572	A150100-USP21_v16	NM_012475_idx733	267
USP21	NM_016572	A150100-USP21_v2	NM_012475_idx1224	265
USP21	NM_016572	A150100-USP21_v3	NM_012475_idx269	264
USP21	NM_016572	A150100-mmUsp21_v5	NM_013919_idx1120	324

10

20

## 【0053】

表1で示すターゲット遺伝子は、異なる種類のポリペプチドをコードすることを理解されたい。例えば、本明細書で開示される(表1)配列番号114、117~119で示すターゲットは、GPCRである。これらのGPCRのそれぞれはエフェクタータンパク質を活性化することができ、それにより細胞内の二次伝達物質レベルの変化が生じる。GPCRの活性は、そのような二次伝達物質の活性レベルを測定することによって測定することができる。細胞内の2つの重要で有用な二次伝達物質は、環状AMP(cAMP)及びCa<sup>2+</sup>である。活性レベルは当業者に公知の方法を用い、ELISA若しくは放射能技術により直接、又はCa<sup>2+</sup>と接触すると蛍光又はルミネッセンスシグナルを生成する基質を用いることにより、或いはリポーター遺伝子分析によって間接に測定することができる。

30

## 【0054】

1つ又は複数の二次伝達物質の活性レベルは、一般的にプロモーターによって調節されるリポーター遺伝子で測定することができ、このプロモーターはその二次伝達物質に反応性である。当技術分野で公知でありそのような目的のために用いられるプロモーターは、細胞内の環状AMPレベルに反応性である環状AMP反応性プロモーター、及び細胞内の細胞質Ca<sup>2+</sup>レベルに感受性のNF-AT反応性プロモーターである。リポーター遺伝子は、一般的に、容易に検出することができる遺伝子産物を有する。リポーター遺伝子は、宿主細胞内で安定して感染すること又は一過性にトランスフェクションすることができる。有用なりポーター遺伝子は、アルカリホスファターゼ、強調緑色蛍光タンパク質、不安定化緑色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ及びβ-ガラクトシダーゼである。

40

## 【0055】

本明細書で開示されるターゲットの多くは、配列番号101~108で示されるターゲットなどのキナーゼ及びホスファターゼである。化合物の存在下又は非存在下で実施される、基質のリン酸化をキナーゼ又はホスファターゼで測定することによるキナーゼ又はホスファターゼの活性を測定する特定の方法は、当技術分野で公知であり、一部は実施例で記載される。

## 【0056】

配列番号111、115、116、122、123及び125で表されるターゲットは、プロテアーゼ類である。プロテアーゼであるポリペプチドによる基質の切断を測定する

50

ことによる化合物による抑制を測定する特定の方法は、当技術分野で公知である。

ポリペプチドを発現する細胞は自然にポリペプチドを発現する細胞でよく、又は先に述べたように、細胞はポリペプチドを発現するようにトランスフェクションすることができることを理解されたい。

#### 【0057】

一実施形態では、本発明の方法は細胞の集団をポリペプチドのアゴニストと接触させる段階をさらに含むことが好ましい。このことは、ある選択された細胞集団内のポリペプチドの発現がその活性の適当な検出にとって低過ぎる場合の方法で役立つ。アゴニストを用いるとポリペプチドを誘導することができ、化合物がポリペプチドを抑制するならば適当な読み出しを可能にする。類似の考慮事項がECM分解の測定に適用される。好ましい一実施形態では、本方法で用いられる細胞は哺乳類の滑膜線維芽細胞であり、ECM分解活性を誘導するために用いることができる引き金は、関節炎の分野で関連するサイトカイン、例えばTNF、IL1、IL6、OSM、IL17及びMIF1である。他の好ましい実施形態では、引き金は関節炎の分野で関連するサイトカイン産生細胞、例えば単球、マクロファージ、T細胞及びB細胞を接触させることによって生成する因子の混合物である。サイトカイン産生細胞は、因子の複合体及び偏らない混合物を產生することによって接觸に応答する。用いられるサイトカイン産生細胞がパンヌスでも見られ、この引き金に適用されるサイトカインが関節リウマチ患者の滑液で見られるならば、最終的に產生される因子混合物は関節炎患者の関節に存在する因子の一部を含む。

10

#### 【0058】

本発明は、さらに、細胞外マトリックス分解を抑制する化合物の方法同定に関し：

(a) 化合物を、配列番号101～125及び501～564からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと接觸させることと；

(b) ポリペプチドへの化合物の結合親和性を測定することと；

(c) 前記ポリペプチドを発現する哺乳動物細胞の集団を少なくとも10マイクロモルの結合親和性を示す化合物と接觸させることと；

(d) 細胞外マトリックス分解を抑制する化合物を同定することを含む。

20

#### 【0059】

細胞集団は、異なる手段を通して、例えば媒体内での直接インキュベーションによって又は細胞内への核酸移動によって、化合物又は化合物の混合物に露出させることができる。そのような移動は多種多様な手段により、例えば裸の単離されたDNA若しくはRNAの直接的トランスフェクションにより、又は組換えベクターなどの送達系によって達成することができる。リポソーム又は他の脂質ベースのベクターなどの他の送達手段を用いることもできる。好ましくは、核酸化合物は、組換えウイルスなどの(組換え)ベクターによって送達される。

30

#### 【0060】

ハイスループット目的のためには、抗体断片ライブラリー、ペプチドファージディスプレイライブラリー、ペプチドライブラリー(例えばLOPAP(商標)、Sigma Aldrich)、脂質ライブラリー(BioMol)、合成化合物ライブラリー(例えばLOPAC(商標)、Sigma Aldrich)、又は天然化合物ライブラリー(Specs、TimTec)などの化合物ライブラリーを用いることができる。

40

#### 【0061】

好ましい薬剤候補化合物は、低分子量化合物である。低分子量化合物、すなわち500ダルトン以下の分子量のものは、生物系で優れた吸収性及び浸透性を有し、したがって500ダルトンを超える分子量を有する化合物よりも候補薬として成功する可能性が高い(Lipinskiら(1997))。ペプチドには、他の好ましいクラスの薬剤候補化合物が含まれる。多くのGPCRは、アゴニスト又はアンタゴニストとしてペプチドを有する。ペプチドは優れた候補薬ことができ、生殖ホルモン及び血小板凝集阻害薬など、商業的に価値あるペプチドの複数の例がある。天然化合物は、他の好ましいクラスの薬剤候補化合物である。そのような化合物は天然供給源で見られまたそれらから抽出され、それらはその後

50

合成することができる。脂質は、他の好ましいクラスの薬剤候補化合物である。多くのG P C Rは、リガンドとして脂質を有する。

#### 【0062】

他の好ましいクラスの薬剤候補化合物は抗体である。本発明は、ターゲットを対象とした抗体も提供する。これらの抗体は細胞中で内因的に產生されてターゲットと結合することができるか、組織に加えて細胞外に存在するターゲットポリペプチドと結合することができる。これらの抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体でよい。本発明は、キメラ、単鎖及びヒト化の抗体、さらにはまた、F A b フラグメント、F A b 発現ライプラリーの生成物、並びにF v フラグメント及びF v 発現ライプラリーの生成物を含む。他の実施形態では、化合物は天然の单ードメイン抗体の最も小さな機能的断片であるナノ体でよい(Cortez-Retamozoら2004)。

10

#### 【0063】

ある実施形態では、本発明の実施においてポリクローナル抗体を用いることができる。当業者は、ポリクローナル抗体を調製する方法を知っている。ポリクローナル抗体は哺乳動物で、例えば免疫化剤、及び所望によりアジュvantの1つ又は複数の注射によって作製することができる。一般的に、免疫化剤及び/又はアジュvantは、哺乳類では皮下又は腹腔内の複数の注射によって注入される。抗体は、無傷のターゲットタンパク質若しくはポリペプチドに対して、又はターゲットタンパク質若しくはポリペプチドの断片、コンジュゲート体を含む誘導体、若しくは他のエピトープに対して、例えば細胞膜中に包埋されたターゲット、又はファージディスプレイライプラリーなどの抗体可変部のライプラリーに対して作製することもできる。

20

#### 【0064】

免疫化する哺乳動物で免疫原性であることが知られているタンパク質に免疫化剤をコンジュゲートすることは、役立つ可能性がある。そのような免疫原性タンパク質の例としては、それらには限定されないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシのサイログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターがある。使用することができるアジュvantの例としては、フロインド完全アジュvant及びMPL-TDMアジュvant(—リン酸化リピドA、合成トレハロースジコリノミコレート)がある。当業者は、過度の実験をしなくても免疫化プロトコルを選択することができる。

30

#### 【0065】

いくつかの実施形態では、抗体はモノクローナル抗体でよい。モノクローナル抗体は、当業界周知の方法によって調製することができる。本発明のモノクローナル抗体は、宿主が抗体に対して免疫応答を起こすことを予防するために「ヒト化」されたものでよい。「ヒト化抗体」は、軽鎖及び/又は重鎖可変ドメインフレームワークの相補性決定部(CDR)及び/又は他の部分はヒト以外の免疫グロブリンに由来するが、分子の残りの部分は1つ又は複数のヒト免疫グロブリンに由来するものである。ヒト化抗体には、供与体又は受容体の非修飾軽鎖又はキメラ軽鎖と結合したヒト化重鎖、又はその逆を特徴とする抗体も含まれる。抗体のヒト化は、当技術分野で公知の方法によって達成することができる(例えば、Mark及びPadlan、(1994)「第4章。モノクローナル抗体のヒト化」、The Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 113, Springer-Verlag, New York、を参照)。

40

ヒト化抗体を発現するために、トランスジェニック動物を用いることができる。

#### 【0066】

ヒト抗体は、ファージディスプレイライプラリーを含めて当技術分野で公知の様々な手法を用いて产生することができる(Hoogenboom及びWinter、(1991) J. Mol. Biol. 227:381-8; Marksら、(1991) J. Mol. Biol. 222:581-97)。Coleら及びBoernerらの手法も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用できる(Coleら、(1985)「モノクローナル抗体及び癌療法」Alan R. Liss, p. 77; Boernerら、(1991) J. Immunol., 147(1): 86-95)。

#### 【0067】

単鎖抗体の产生のための当技術分野で公知の手法は、本発明のターゲットポリペプチド及びタンパク質に対する単鎖抗体を产生するために応用することができる。抗体は、一価

50

抗体でよい。一価抗体の調製法は当技術分野で公知である。例えば、1つの方法は、免疫グロブリン軽鎖及び修飾された重鎖の組換え発現を含む。重鎖は、重鎖架橋性を阻止するために、一般にFc部の任意の点でトランケーションされる。或いは、架橋性を阻止するために関連するシステイン残基が他のアミノ酸残基で置換されるか削除される。

#### 【0068】

二重特異性抗体は少なくとも2つの異なる抗原に対して、好ましくは細胞表面タンパク質又は受容体又は受容体サブユニットに対して結合特異性を有する、モノクローナルの、好ましくはヒトの又はヒト化の抗体である。この場合は、結合特異性の1つはターゲットの1ドメインに対するものであり、他の1つは、同じく異なるターゲットの他のドメインに対するものである。

10

#### 【0069】

二重特異性抗体の作製法は当技術分野で公知である。従来法では、二重特異性抗体の組換え產生は2つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の共発現に基づき、2つの重鎖は異なる特異性を有する(Milstein及びCuello、(1983) Nature 305:537-9)。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のランダムな組合せのために、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は10の異なる抗体分子の潜在的混合物を产生するが、僅か1つだけが正しい二重特異性構造を有する。アフィニティークロマトグラフィ段階は、通常、正しい分子の精製を達成する。類似した手法は、Trauneckerら、(1991) EMBO J. 10:3655-9、で開示される。

#### 【0070】

他の好ましい実施形態によると、ターゲットへの結合親和性を有すると同定され、且つ／又は1つ又は複数のターゲットに対するアンタゴニスト活性などのダウンレギュレーション活性を有するとすでに同定された薬剤候補化合物を、アッセイ方法は用いる。

20

#### 【0071】

さらに、本発明は細胞外マトリックス分解を抑制するための、哺乳動物細胞を、配列番号1～25からなる群から選択されたヌクレオチド配列の少なくとも約17～約30の連続したヌクレオチドと相補するポリリボヌクレオチド配列を含む発現抑制剤と接触させることを含む方法に関する。

#### 【0072】

本発明の他の態様は、哺乳動物細胞を、ターゲットポリペプチドをコードするポリリボヌクレオチドの細胞内での翻訳を抑制する発現抑制剤と接触させることを含む、細胞外マトリックス分解の抑制方法に関するものである。特定の実施形態は、剤をターゲットmRNAと対合してそれによってターゲットポリペプチドの発現をダウンレギュレート又は阻止する働きをする少なくとも1つのアンチセンス鎖を含むポリヌクレオチドを含む組成物に関するものである。抑制剤は好ましくはアンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム及び低分子干渉RNA(siRNA)を含み、前記薬剤は配列番号1～25からなる群から選択される天然ポリヌクレオチド配列と相補的であるかそれから操作される核酸配列を含む。

30

#### 【0073】

本発明の特別な実施形態は、発現抑制剤がアンチセンスRNA、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)、配列番号1～25をコードするポリリボヌクレオチドを切断するリボザイム、配列番号1～25に対応するポリリボヌクレオチドの一部に十分に相同意的であり、その結果そのsiRNA、好ましくはshRNAがターゲットポリペプチドへのターゲットポリリボヌクレオチドの翻訳に干渉する低分子干渉RNA(siRNA)、好ましくはshRNA)からなる群から選択される方法に関するものである。

40

#### 【0074】

本発明の他の実施形態は、発現抑制剤がアンチセンスRNA、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)、配列番号1～25によってコードされるポリリボヌクレオチドを切断するリボザイム、配列番号1～25に対応するポリリボヌクレオチドの一部に十分に相同意的であり、その結果そのsiRNA、好ましくはshRNAがターゲットポリペプチドへのターゲットポリリボヌクレオチドの翻訳に干渉する低分子干渉RNA(siRNA)からなる群から選択される方法に関するものである。

50

R N A、好ましくは s h R N A ) を発現する核酸である方法に関するものである。好ましくは、発現抑制剤はアンチセンス R N A、リボザイム、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド、又は s i R N A、好ましくは s h R N A であり、配列番号 1 ~ 2 5 からなる群から選択されたヌクレオチド配列の少なくとも約 1 7 から約 3 0 の連続したヌクレオチドと相補するポリリボヌクレオチド配列を含む。より好ましくは、発現抑制剤はアンチセンス R N A、リボザイム、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド、又は s i R N A、好ましくは s h R N A であり、配列番号 1 ~ 2 5 からなる群から選択されたヌクレオチド配列の少なくとも約 1 7 から約 2 5 の連続したヌクレオチドと相補するポリリボヌクレオチド配列を含む。特別な実施形態は、配列番号 2 0 1 ~ 3 2 4 からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列と相補するポリリボヌクレオチド配列を含む。

10

## 【 0 0 7 5 】

アンチセンス核酸を用いる遺伝子発現のダウンレギュレーションは、翻訳又は転写のレベルで達成することができる。本発明のアンチセンス核酸は、好ましくはターゲットポリペプチド又は対応するメッセンジャー R N A をコードする核酸の全部又は一部と特異的にハイブリダイズすることができる核酸断片である。さらに、その転写一次産物のスプライシングを抑制することによってターゲットポリペプチドをコードすることができる核酸配列の発現を減少させる、アンチセンス核酸を設計することができる。それがターゲットをコードする核酸の発現をダウンレギュレートするか阻止することができる限り、任意の長さのアンチセンス配列が本発明の実施のために適当である。好ましくは、アンチセンス配列は長さが少なくとも約 1 7 ヌクレオチドである。アンチセンス核酸、アンチセンス R N A をコードする D N A の調製及び使用、並びにオリゴ及び遺伝子アンチセンスの使用は当技術分野で公知である。

20

## 【 0 0 7 6 】

発現抑制剤の一実施形態は、配列番号 1 ~ 2 5 を含む核酸にアンチセンスである核酸である。例えば、アンチセンス核酸( 例えは D N A ) は、配列番号 1 ~ 2 5 を含む核酸の細胞内発現を抑制するための遺伝子治療として、インビトロで細胞に導入することができるか、又は対象にインビボ投与することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは好ましくは、約 1 7 から約 1 0 0 のヌクレオチドを含む配列を含み、より好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは約 1 8 から約 3 0 のヌクレオチドを含む。アンチセンス核酸は、逆向きで表される配列番号 1 ~ 2 5 の配列から選択される約 1 7 から約 3 0 の連続したヌクレオチドから調製することができる。

30

## 【 0 0 7 7 】

アンチセンス核酸は好ましくはオリゴヌクレオチドであり、デオキシリボヌクレオチドのみ、修飾されたデオキシリボヌクレオチドのみ又は両者の組合せからなり得る。アンチセンス核酸は、合成オリゴヌクレオチドでよい。安定性及び / 又は選択性を改善するために、オリゴヌクレオチドは所望により化学的に修飾することができる。オリゴヌクレオチドは細胞内ヌクレアーゼによる分解に感受性があるので、修飾としては、例えは、ホスホジエステル結合の遊離酸素を置換する硫黄基の使用があり得る。この修飾は、ホスホロチオエート結合と呼ばれる。ホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチドは、水溶性で、ポリ陰イオン性で、内因性のヌクレアーゼに抵抗性である。さらに、ホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチドがそのターゲット部位にハイブリダイズするとき、R N A - D N A 二重鎖は、ハイブリッド分子の m R N A 成分を切断する内因性の酵素リボヌクレアーゼ( R N A ゼ ) H を活性化する。

40

## 【 0 0 7 8 】

さらに、ホスホラミダイト及びポリアミド( ペプチド )とのアンチセンスオリゴヌクレオチドの結合は、合成することができる。これらの分子は、ヌクレアーゼ分解に非常に抵抗性でなければならない。さらに、安定性を強化してターゲット部位へのアンチセンスオリゴヌクレオチドの結合を促進するために、化学基を糖部分の 2 ' 炭素及びピリミジンの 5 炭素( C - 5 )に加えることができる。修飾としては、2 ' - デオキシ、O - ペントキシ、O - プロポキシ、O - メトキシ、フルオロ、メトキシエトキシホスホロチオエート、

50

修飾塩基、並びに当業者に公知の他の修飾があり得る。

【0079】

ターゲットのレベルを低減する他の種類の発現抑制剤は、リボザイムである。リボザイムは、別々の触媒及び基質の結合ドメインを有する触媒性RNA分子(RNA酵素)である。基質結合配列はヌクレオチド相補性により、また恐らく非水素結合相互作用により、そのターゲット配列と結合する。触媒部分は、特定の部位でターゲットRNAを切断する。リボザイムの基質ドメインは、それを指定されたmRNA配列に向けるように工作することができる。リボザイムは、相補的な塩基対形成を通してターゲットmRNAを認識して、次に結合する。一旦それが正しいターゲット部位に結合するならば、リボザイムは酵素的にターゲットmRNAを切断する働きをする。リボザイムによるmRNAの切断は、対応するポリペプチドの合成を指示するその能力を無効にする。一旦リボザイムがそのターゲット配列を切断したならば、それは放出されて、他のmRNAで繰り返し結合及び切断することができる。

10

【0080】

リボザイム形態には、ハンマーヘッドモチーフ、ヘアピンモチーフ、デルタ型肝炎ウイルス、I群イントロン若しくはリボヌクレアーゼP RNA (RNAガイド配列と結合)モチーフ又はNeurospora VS RNAモチーフがある。これらの触媒RNA分子は細胞中で真核生物のプロモーターから発現させることができるので、ハンマーヘッド又はヘアピン構造を有するリボザイムは容易に調製される(Chenら、(1992) Nucleic Acids Res. 20:458 1-9)。本発明のリボザイムは、真核細胞で適当なDNAベクターから発現させることができる。所望により、リボザイムの活性は、第2のリボザイムによる転写一次産物からのその放出によって高めることができる(Venturaら(1993) Nucleic Acids Res. 21: 3249-55)。

20

【0081】

リボザイムは、オリゴデオキシリボ核酸を、転写後にターゲットmRNAにハイブリダイズする配列に連なるリボザイム触媒ドメイン(20ヌクレオチド)と結合することによって、化学的に合成することができる。オリゴデオキシリボ核酸は、基質結合配列をプライマーとして用いることにより増幅される。増幅生成物は、真核生物の発現ベクターにクローン化される。

30

【0082】

リボザイムは、DNA、RNA又はウイルスのベクターに挿入された転写単位から発現される。リボザイム配列の転写は、真核生物のRNAポリメラーゼI(ポルI)、RNAポリメラーゼII(ポルII)又はRNAポリメラーゼIII(ポルIII)のプロモーターから始動される。ポルII又はポルIIIプロモーターからの転写産物は、全ての細胞で高レベルで発現される。与えられた細胞型内の与えられたポルIIプロモーターのレベルは、近くの遺伝子調節配列によって決まる。原核生物のRNAポリメラーゼ酵素が適当な細胞で発現されるならば、原核生物のRNAポリメラーゼプロモーターも用いられる(Gao及びHuang、(1993) Nucleic Acids Res. 21: 2867-72)。これらのプロモーターから発現されるリボザイムは、哺乳動物細胞で機能することが証明された(Kashani-Sabetら(1992) Antisense Res. Dev. 2: 3-15)。

40

【0083】

特に好ましい抑制剤は、低分子干渉RNA(siRNA、好ましくは小さなヘアピンRNA、「shRNA」)である。siRNA、好ましくはshRNAは、抑制されたRNAに配列が相同的である二重鎖RNA(dsRNA)によって、遺伝子抑制の転写後過程を媒介する。本発明によるsiRNAは、配列番号1~25で記載される配列の群、好ましくは配列番号201~324で記載される配列の群から選択される連続した17~25のヌクレオチド配列と相補的又は相同な17~25のヌクレオチドのセンス鎖、並びにこのセンス鎖に相補的な17~25のヌクレオチドのアンチセンス鎖を含む。最も好ましいsiRNAは、互いに100パーセント相補的なセンス鎖及びアンチセンス鎖、及びターゲットポリヌクレオチド配列を含む。好ましくは、siRNAはセンス鎖及びアンチセン

50

ス鎖を結合するループ領域をさらに含む。

【0084】

本発明による自己相補一本鎖 s h R N A 分子ポリヌクレオチドは、ループ領域リンカーによって接続されたセンス部分及びアンチセンス部分を含む。好ましくは、ループ領域配列は、長さが 4 ~ 30 ヌクレオチド、より好ましくは長さが 5 ~ 15 ヌクレオチド、最も好ましくは長さが 8 ヌクレオチドである。最も好ましい実施形態では、リンカー配列は U U G C U A U A (配列番号 26、図 16 を参照) である。自己相補的一本鎖 s i R N A はヘアピンループを形成して、普通の d s R N A よりも安定である。さらに、それらはベクターからより容易に產生される

【0085】

アンチセンス R N A に類似して、s i R N A は核酸溶解性分解に対する抵抗性を保証するために、又は活性を強化するために、又は細胞分布を強化するために、又は細胞取り込みを強化するために修飾することができ、そのような修飾は修飾されたヌクレオシド間結合、修飾された核酸塩基、修飾された糖及び / 又は 1 つ又は複数の部分若しくはコンジュゲート体への s i R N A 化学結合からなる。s i R N A 設計規則に適合しないヌクレオチド配列と比較してターゲット配列の減少が改善されたヌクレオチド配列が、これらの s i R N A 設計規則に従って選択される (これらの規則及び s i R N A 調製例の議論については、国際公開 2004094636、2004 年 11 月 4 日公表、及び UA20030198627 が本明細書で参照により組み込まれている)。

【0086】

本発明は、細胞外マトリックス分解を抑制することができるポリヌクレオチドを発現することができる D N A 発現ベクターを含み、本明細書で先に発現抑制剤として記載されている組成物及び前記組成物を用いる方法にも関する。

【0087】

これらの組成物及び方法の具体的な態様は、ターゲットポリペプチドと選択的に相互作用することができる細胞内結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの誘導された発現による、ターゲットポリペプチドの発現のダウンレギュレーション又は阻止に関する。細胞内結合タンパク質には、それが発現される細胞内のポリペプチドと選択的に相互作用又は結合して、ポリペプチドの機能を中和することができる任意のタンパク質が含まれる。好ましくは、細胞内結合タンパク質は、配列番号 101 ~ 125 のターゲットポリペプチドのエピトープに、好ましくは配列番号 501 ~ 564 のドメインに結合親和性を有する中和抗体又は中和抗体の断片である。より好ましくは、細胞内結合タンパク質は单鎖抗体である。

【0088】

この組成物の具体的な実施形態は、アンチセンス R N A 、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド ( O D N ) 、配列番号 101 ~ 125 をコードするポリリボヌクレオチドを切断するリボザイム、配列番号 1 ~ 25 に対応するポリリボヌクレオチドの一部に十分に相同的であり、その結果その s i R N A がターゲットポリペプチドへのターゲットポリリボヌクレオチドの翻訳に干渉する低分子干渉 R N A ( s i R N A ) からなる群から選択される発現抑制剤を含む。

【0089】

発現抑制剤を発現するポリヌクレオチドは、好ましくはベクター内に含まれる。ポリ核酸は核酸配列の発現を可能にするシグナルに作動可能的に結合されて、好ましくは組換えベクター構築物を利用して細胞内に導入され、この構築物は一旦ベクターが細胞に導入されるとアンチセンス核酸を発現する。様々なウイルスベースの系が利用でき、それらにはアデノウイルス、レトロウイルス、アデノ関連ウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルス又はセンダイウイルスのベクター系が含まれ、全てはターゲット細胞内に発現抑制剤のポリヌクレオチド配列を導入して発現するために用いることができる。

【0090】

好ましくは、本発明の方法で用いられるウイルスベクターは、複製に欠陥がある。その

10

20

30

40

50

のような複製不完全なベクターは、感染細胞内でのウイルスの複製のために必要な少なくとも1つの領域を通常含む。これらの領域は、当業者に公知の任意の手法によって除去する（全体若しくは一部）か、又は機能不全にすることができる。これらの手法には、全除去、置換、部分欠失又は必須の（複製のために）領域への1つ又は複数の塩基の付加が含まれる。そのような手法はインビトロ（単離されたDNA上で）又はin situで遺伝子操作手法を用いて、又は突然変異誘発物質での処理により実施することができる。好ましくは、複製欠陥ウイルスはそのゲノムのウイルス粒子の封入に必要な配列を保持する。

#### 【0091】

好ましい一実施形態では、ウイルス要素はアデノウイルスに由来する。好ましくは、媒体はアデノウイルスカプシドに封入されたアデノウイルスベクター、その機能性部分、誘導体及び／又は類似体を含む。アデノウイルスの生物学的特徴は、分子レベルで比較的よく知られている。アデノウイルスベクターのための多くのツールがすでに開発され、これからも開発が継続されるので、アデノウイルスカプシドは本発明のライブラリーに組み込むための好ましい媒体となる。アデノウイルスは、多種多様な細胞に感染することができる。しかし、アデノウイルス血清型が異なると、細胞に対する好みも異なる。好ましい一実施形態で本発明のアデノウイルスカプシドが入ることができるターゲット細胞集団を組み合わせて拡張するために、媒体は少なくとも2つのアデノウイルスからのアデノウイルス纖維タンパク質を含む。好ましいアデノウイルス纖維タンパク質配列は、血清型17、45及び51である。これらのキメラベクターの手法又は構築及び発現は米国公表特許出願20030180258及び20040071660で開示され、これらは本明細書で参照によって組み込まれる。

10

#### 【0092】

好ましい一実施形態では、アデノウイルスに由来する核酸としては、アデノウイルス後期タンパク質、その機能部分、誘導体及び／又は類似体をコードする核酸がある。アデノウイルス後期タンパク質、例えばアデノウイルス纖維タンパク質は、好ましくはある細胞を媒体の標的にするために、又は媒体の細胞への送達増を誘導するために用いることができる。好ましくは、アデノウイルスに由来する核酸は基本的に全てのアデノウイルス後期タンパク質をコードし、アデノウイルスカプシド全体又はその機能部分、類似体及び／又は誘導体の形成を可能にする。好ましくは、アデノウイルスに由来する核酸としては、アデノウイルスE2A、又はその機能部分、誘導体及び／又は類似体をコードする核酸がある。好ましくは、アデノウイルスに由来する核酸としては、少なくとも1つのE4領域タンパク質又はその機能部分、誘導体及び／又は類似体をコードする核酸があり、それらは少なくとも部分的に、細胞内でのアデノウイルス由来核酸の複製を促進する。この用途の実施例で用いられるアデノウイルスベクターは、本発明の治療方法に役立つベクターの例である。

20

#### 【0093】

本発明のある実施形態では、レトロウイルス系を用いる。レトロウイルスは分裂細胞に感染する組み込み型ウイルスであり、それらの構築は当技術分野で公知である。レトロウイルスベクターは異なる種類のレトロウイルスから、例えばM o M u L V（「マウスマロニー白血病ウイルス」）、M S V（「マウスマロニー肉腫ウイルス」）、H a S V（「ハーベイ肉腫ウイルス」）；S N V（「脾臓壊死ウイルス」）；R S V（「ラウス肉腫ウイルス」）及びフレンドウイルスから構築することができる。レンチウイルス系も本発明の実施において用いることができる。レトロウイルス系及びヘルペスウイルス系は、神経細胞のトランスフェクションのための好ましい媒体である。

30

#### 【0094】

本発明の他の実施形態では、アデノ随伴ウイルス（「A A V」）が利用される。A A Vウイルスは、安定して部位特異的に感染細胞のゲノムに組み込む、比較的小な大きさのDNAウイルスである。それらは、細胞成長、形態及び分化に対するどんな影響をも誘導することなく広範囲の細胞に感染することができ、しかも、それらはヒトに病原性ではないようである。

40

50

## 【0095】

ベクターの構築において、本発明のポリヌクレオチド剤は、1つ又は複数の調節領域に結合することができる。1つ又は複数の適当な調節領域の選択は、当業者の技術レベルの範囲で解決できる日常の問題である。調節領域はプロモーターを含み、エンハンサー、サプレッサー、その他を含むことができる。

## 【0096】

本発明の発現ベクターで用いることができるプロモーターは、構成プロモーター及び調節された（誘導可能な）プロモーターの両方を含む。プロモーターは、宿主によっては原核生物性又は真核生物性でよい。本発明の実施に役立つ原核生物の（バクテリオファージを含む）プロモーターには、lac、lacZ、T3、T7、ラムダP.su b.r、P.su b.l及びtrpプロモーターがある。本発明の実施に役立つ真核生物（ウイルスのものを含む）プロモーターとしては以下のものがある。遍在性のプロモーター（例えば、Hprt、ビメンチン、アクチン、チューブリン）、中間フィラメントプロモーター（例えばデスミン、ニューロフィラメント、ケラチン、Gfap）、治療的遺伝子プロモーター（例えばMDR型、CFTR、第VIII因子）、組織特異プロモーター（例えば平滑筋細胞のアクチンプロモーター、又は内皮細胞で活性なF1t及びF1kプロモーター）、例えば動物転写調節領域であり、これらは組織特異性を示し、トランスジェニック動物で利用されている：臍臓腺房細胞で活性なエラスターーゼI遺伝子調節領域（Swiftら(1984) Cell 38:639-46；Ornitzら(1986) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409；MacDonald(1987) Hepatology 7:425-515）；臍臓細胞で活性なインシュリン遺伝子調節領域（Hanahan(1985) Nature 315:115-22）、リンパ系細胞で活性な免疫グロブリン遺伝子調節領域（Grosschedlら(1984) Cell 38:647-58；Adamesら(1985) Nature 318:533-8；Alexanderら(1987) Mol. Cell. Biol. 7:1436-44）、精巣、乳腺、リンパ細胞及び肥満細胞で活性なマウス乳癌ウイルス調節領域（Lederら(1986) Cell 45:485-95）、肝臓で活性なアルブミン遺伝子調節領域（Pinkertら(1987) Genes and Devel. 1:268-76）、肝臓で活性なアルファフェトプロテイン遺伝子調節領域（Krumlaufら(1985) Mol. Cell. Biol., 5:1639-48；Hammerら(1987) Science 235:53-8）、肝臓で活性な1抗トリプシン遺伝子調節領域（Kelseyら(1987) Genes and Devel., 1: 161-71）、骨髄性細胞で活性な-グロビン遺伝子調節領域（Mogramら(1985) Nature 315:338-40；Kolliasら(1986) Cell 46:89-94）、脳の乏突起神経膠細胞で活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子調節領域（Readheadら(1987) Cell 48:703-12）、骨格筋で活性なミオシン軽鎖2遺伝子調節領域（Sani (1985) Nature 314:283-6）、並びに視床下部で活性な性腺刺激ホルモン放出因子遺伝子調節領域（Masonら(1986) Science 234:1372-8）。

## 【0097】

本発明の実施において用いることができる他のプロモーターとしては、分裂細胞で優先して活性化されるプロモーター、刺激に応答するプロモーター（例えばステロイドホルモン受容体、レチノ酸受容体）、テトラサイクリン調節転写モジュレータ、前初期のサイトメガロウイルス、レトロウイルスLTR、メタロチオネイン、SV40、E1a及びMLPプロモーターがある。

## 【0098】

更なるベクター系としては、患者へのポリヌクレオチド剤の導入を促進する非ウイルス性の系がある。例えば、所望の配列をコードするDNAベクターは、インビボでリポフェクションによって導入することができる。リポソーム媒介トランスフェクションで遭遇する問題点を制限するように設計された合成陽イオン脂質は、マーカーをコードする遺伝子のインビボトランスフェクションのためのリポソームを調製するために用いることができる（Felgnerら(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7；Mackeyら(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8027-31；Ulmerら(1993) Science 259:1745-8を参照）。陽イオン脂質の使用は、負に荷電した核酸の被包性を促進し、そのうえ負に荷電した細胞膜との融合を促進することができる（Felgner及びRingold、(1989) Nature 337:387-8）。核酸移動に特に役立つ脂質化合物及び組成物は、国際特許公開95/18863、国際公開96/17823、

10

20

30

40

50

及び米国特許第5459127号で記載されている。インビボで外来性の遺伝子を特定の臓器に導入するためのリポフェクションの使用は、一定の実用上の利点を有し、特定の細胞型にトランスフェクションを導入することは、細胞異質性の組織、例えば脾臓、肝臓、腎臓及び脳で特に有利である。脂質は、ターゲティング目的のために他の分子と化学的に結合することができる。ホルモン類若しくは神経伝達物質などの標的のペプチド、及び抗体などタンパク質、又は非ペプチド分子は、化学的にリポソームに結合することができた。他の分子も、インビボでの核酸のトランスフェクションを促進するために有用であり、例としては陽イオンオリゴペプチド（例えば国際特許公開95/21931）、DNA結合タンパク質に由来するペプチド（例えば国際特許公開96/25508）、又は陽イオンポリマー（例えば国際特許公開95/21931）がある。

10

## 【0099】

裸のDNAプラスミドとしてインビボでDNAベクターを導入することも可能である（米国特許第5693622号、第5589466号及び第5580859号を参照）。治療目的のための裸のDNAベクターは、当技術分野で公知の方法、例えばトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、トランスタクション、細胞融合、DEAEデキストラム、リン酸カルシウム沈殿、遺伝子銃の使用、又はDNAベクタートランスポータの使用などで、所望の宿主細胞に導入することができる（例えば、Wilsonら(1992) J. Biol. Chem. 267:963-7；Wu及びWu、(1988) J. Biol. Chem. 263:14621-4；Hartmutら、1990年3月15日に出願のカナダ特許出願2012311；Williamsら(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726-30参照）。受容体媒介DNA送達手法を用いることができる（Curielら(1992) Hum. Gene Ther. 3:147-54；Wu及びWu、(1987) J. Biol. Chem. 262:4429-32）。

20

## 【0100】

本発明は、本明細書で先に記載したようにターゲット阻害剤及び／又は発現抑制剤として同定された1つ又は複数の化合物の有効量を含む、生体適合性の細胞外マトリックス分解抑制組成物も提供する。

30

## 【0101】

生体適合性組成物は、本発明の化合物、ポリヌクレオチド、ベクター及び抗体が活性型で、例えば生物的活性を発揮することが可能な形態で維持されている、固体、液体、ゲル、又は他の形態であることができる組成物である。例えば、本発明の化合物はターゲットに対する逆作動薬、すなわちアンタゴニスト活性を有し、核酸は複製すること、メッセージを解釈すること、又はターゲットの相補的なmRNAにハイブリダイズすることができ、ベクターは、本明細書で先に記載されているように、ターゲット細胞をトランスフェクションすること、及びアンチセンス、抗体、リボザイム又はsiRNAを発現することができ、抗体は、ターゲットポリペプチドドメインと結合する。

40

## 【0102】

好ましい生体適合性組成物は、例えば、トリス、リン酸又はHEPES緩衝液を用いて緩衝される、塩イオンを含む水溶液である。通常、塩イオンの濃度は生理的レベルと類似する。生体適合性溶液は、安定化剤及び保存料を含むことができる。より好ましい実施形態において、生体適合性組成物は医薬として許容し得る組成物である。そのような組成物は、局所、経口、腸管外、鼻腔内、皮下及び眼内の各経路による投与のために製剤化することができる。非経口的投与は、静脈内注射、筋肉内注射、動脈内注射又は注入手法を含むものとする。組成物は、所望により標準で公知の非毒性の生理的に許容される担体、アジュバント及び媒体を含む投薬単位製剤で、非経口的に投与することができる。

50

## 【0103】

本組成物発明の特に好ましい実施形態は、本明細書で先に記載されている発現抑制剤の治療的有効量を医薬として許容し得る担体と混合して含む、細胞外マトリックス分解抑制医薬組成物である。他の好ましい実施形態は、ECM分解に関する病態又はその病態に対する感受性の治療又は予防のための医薬組成物であり、ターゲットアンタゴニスト又は逆作動薬、その医薬として許容し得る塩、水和物、溶媒和物又はそのプロドラッグの細胞

外マトリックス分解抑制有効量を、医薬として許容し得る担体との混合物として含む。

【0104】

経口投与のための医薬組成物は、当技術分野で公知の医薬として許容し得る担体を経口投与に適当な投薬量で用いて製剤化することができる。そのような担体は、医薬組成物が患者による摂取のために錠剤、丸剤、糖衣丸、カプセル、液体、ゲル、シロップ剤、スラリー、懸濁液、などとして製剤化されるのを可能にする。経口用の医薬組成物は、活性化合物を固体賦形剤と組み合わせ、生じる混合物を任意選択に粉碎し、錠剤又は糖衣丸コアを得るために所望により適当な補助剤を加えた後に顆粒剤の混合物を加工することによって調製することができる。適当な賦形剤は、炭水化物又はタンパク質の充填剤、例えばラクトース、ショ糖、マンニトール又はソルビトールを含む糖類、トウモロコシ、小麦、米、ジャガイモ又は他の植物からの澱粉、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース又はナトリウムカルボキシメチルセルロースなどのセルロース、アラビアゴム及びトラガカンタゴムを含むゴム、及びゼラチン及びコラーゲンなどのタンパク質である。所望により、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸又はその塩、例えばアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤又は可溶化剤を加えることができる。糖衣丸コアは適当なコーティングとともに用いることができ、例としてはアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カーボポルゲル、ポリエチレングリコール及び／又は二酸化チタンを含むこともできる濃縮糖液、ラッカー溶液並びに適当な有機溶媒又は溶媒混合物がある。色素又は顔料を製品識別のために、又は活性化合物の量、すなわち投薬量を明らかにするために、錠剤又は糖衣丸コーティングに加えることができる。

10

20

30

【0105】

経口的に用いることができる医薬用製剤としては、ゼラチンで作られた押込嵌めカプセル、並びにゼラチン及び、グリセリン又はソルビトールなどのコーティングで作られた柔らかく、密封されたカプセルがある。押込嵌めカプセルは、ラクトース若しくは澱粉などの充填剤又は結合剤、タルク若しくはステアリン酸マグネシウムなどの滑剤、及び任意選択に安定剤と混合した有効成分を含むことができる。軟カプセルでは、活性化合物を、安定剤の有無にかかわらず、適当な液体、例えば脂肪油、液体、液体ポリエチレングリコールの中に溶かすか懸濁することができる。

【0106】

好ましい無菌の注射製剤は、無毒性の非経口的に許容できる、溶媒又は希釈液の溶液又は懸濁液でよい。医薬として許容し得る担体の例は、生理食塩水、緩衝生理食塩水、等張性生理食塩水（例えばリン酸一ナトリウム若しくは二ナトリウム、塩化ナトリウム、カリウム、カルシウム若しくはマグネシウム、又はそのような塩類の混合物）、リンガー液、ブドウ糖、水、滅菌水、グリセリン、エタノール、及びそれらの組合せである。1,3-ブタジオール及び無菌の不揮発性油は、溶媒又は懸濁媒体として便利に使用される。いかなる低刺激性の不揮発性油も使用することができ、例としては合成のモノグリセリド又はジグリセリドがある。さらに、オレイン酸などの脂肪酸も、注射剤の調製で使用することができる。

40

【0107】

組成物媒体はヒドロゲルでもよく、それは任意の生体適合性又は非細胞傷害性のホモポリマー又はヘテロポリマー、例えば薬剤吸収スponジの働きをする親水ポリアクリル酸ポリマーから調製される。それらのあるものは、例えば特にエチレン及び／又はプロピレンオキシドから得られるものは市販されている。ヒドロゲルは、例えば外科的インターベンションの間に、治療する組織の表面へ直接置くことができる。

50

【0108】

本発明の医薬組成物の実施形態は、本発明のポリヌクレオチド抑制剤をコードする複製欠陥組換えウイルスベクター、及びポロキサマー（poloxamer）などのトランスフェクションエンハンサーを含む。ポロキサマーの例はPoloxamer 407であり、それは市販（BASF、Parsippany、N.J.）されている無毒性、生体適合性のポリオールである。組換えウイルスを含浸させたポロキサマーは、例えば外科的診療行為の間に、治療する組織の表

50

面へ直接置くことができる。ポロキサマーは基本的にヒドロゲルと同じ利点を有するが、粘度は低い。

#### 【0109】

活性発現抑制剤は、コロイド薬剤送達系（例えばリポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマクロエマルジョンにおいて、例えば界面重合により調製したマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-（メチルメタシレート）マイクロカプセルに封入することもできる。そのような手法は、Remington's Pharmaceutical Sciences (1980)、第16版、Osol, A.編、で開示されている。

#### 【0110】

徐放性製剤を調製することができる。徐放性製剤の適当な例としては、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスがあり、そのマトリックスは造形品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形状である。徐放性マトリックスの例には、ポリエステル類、ヒドロゲル（例えばポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、若しくはポリ（ビニルアルコール））、ポリ乳酸（米国特許第3773919号）、L-グルタミン酸及び-L-エチル-L-グルタミン酸のコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON

DEPOT（商標）（乳酸グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なマイクロスフェア）などの分解可能な乳酸グリコール酸コポリマー、並びにポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸がある。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸グリコール酸などのポリマーは100日以上の分子の放出を可能にするが、あるヒドロゲルはより短い期間、タンパク質を放出する。カプセル化抗体が長い間体内に残るときは、それらは37の湿気に曝露する結果変性又は凝集を起こし、結果として生物的活性の消失及び免疫原性の変化の可能性をもたらす。関係するメカニズムに応じて、安定化のために合理的な手法を考案することができる。例えば、凝集メカニズムがチオジスルフィド相互変換を通しての分子間S-S結合形成であることが判明した場合、スルフィドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥し、適当な添加剤を用いて含水量を制御し、特定のポリマー-マトリックス組成物を開発することにより安定化を達成することができる。

#### 【0111】

上で定義されたように、治療有効量はタンパク質、ポリヌクレオチド、ペプチド又はその抗体、アゴニスト若しくはアンタゴニストの、症状又は病態を改善する量を意味する。そのような化合物の治療効力及び毒性は、細胞培養又は実験動物で標準的な薬学手法、例えばED50（集団の50%で治療効果の見られる用量）及びLD50（集団の50%に致死的な用量）で測定することができる。毒性効果と治療効果との間の用量比を治療指數といい、LD50/ED50で表される。大きな治療指數を示す医薬組成物が好ましい。細胞培養アッセイ及び動物試験から得られたデータは、ヒトで使用される用量の範囲を処方するために使用される。そのような化合物の投薬量は、好ましくはほとんど毒性がなく、ED50を含む循環濃度範囲内にある。投薬量は、使用される剤形、患者の感受性及び投与経路に従ってこの範囲内で変動する。

#### 【0112】

任意の化合物について、最初に、細胞培養アッセイで、又は動物モデルで、通常はマウス、ウサギ、イヌ若しくはブタで、治療有効量を推定することができる。動物モデルは、望ましい濃度域及び投与経路に到達するために用いられる。そのような情報は、次にヒトで役立つ用量及び投与経路を決定するために用いることができる。正確な投薬量は、治療される患者を考慮して個々の医師によって選択される。用量及び用法は、活性部分の十分なレベルを提供するために、又は所望の効果を維持するために調節される。考慮することができる更なる要素としては、患者の疾病状態の重症度、年齢、体重及び性別、食事、所望の治療期間、投与方法、投与の時間及び頻度、併用薬、反応感度並びに治療に対する寛容性/反応がある。長時間作用の医薬組成物は、特定の製剤の半減期及びクリアランス速度次第で3~4日ごとに、毎週、又は2週間に1回投与してもよい。

#### 【0113】

10

20

30

40

50

本発明による医薬組成物は、様々な方法によって対象に投与することができる。それらは標的組織に直接加えることができ、陽イオン脂質との複合体を形成することができ、リポソーム中に封入することができ、又は当技術分野で公知の他の方法によって標的細胞に送達することができる。所望の組織への局所投与は、直接注入、経皮吸収、カテーテル、注入ポンプ又はステントによって実施することができる。DNA、DNA／媒体複合体、又は組換えウイルス粒子は、治療部位に局所的に投与される。代替の送達経路としては、それらには限定されないが、静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射、エアゾール吸入、経口用（錠剤若しくは丸剤）、局所、全身、目、腹腔内及び／又はクモ膜下の送達がある。リボザイム送達及び投与の例は、Sullivanら国際公開94/02595で提供されている。

## 【0114】

10

本発明による抗体は、ボーラスとしてだけ送達すること、経時的に注入すること、又はボーラスとしての投与及び経時的注入の両方が可能である。当業者は、タンパク質のものとは異なる製剤をポリヌクレオチドのために使用することができる。同様に、ポリヌクレオチド又はポリペプチドの送達は、特定の細胞、病態、部位、その他に特異的である。

## 【0115】

本明細書で先に議論されたように、本発明に役立つポリヌクレオチド剤をコードするDNAを導入するために、組換えウイルスを用いることができる。本発明による組換えウイルスは、通常、約 $10^{-4}$ から約 $10^{-14}$ のpfuの用量の形で製剤化及び投与される。AAV及びアデノウイルスの場合、約 $10^6$ から約 $10^{11}$ のpfuの用量を用いるのが好ましい。用語pfu（「plaques forming units」）は、ビリオン懸濁液の感染力に対応して、適当な細胞培養を感染させて形成されるplaques数を測定することで決定される。ウイルス溶液のpfu力を測定するための手法は、先行技術で十分記載されている。

20

## 【0116】

本発明は、細胞外マトリックス分解を抑制するための、細胞外マトリックス分解に関する病状を患っている対象に対して、本明細書で記載した細胞外マトリックス分解抑制医薬組成物を、好ましくは本発明の発現抑制剤の治療的有効量を投与することを含む方法も提供する。細胞外マトリックスの分解が関与する疾患としては、乾癬性関節炎、若年性関節炎、初期の関節炎、反応性関節炎、変形性関節炎、強直性脊椎炎、骨粗鬆症、腱炎及び歯周疾患のような骨格筋の疾患、癌転移、気道疾患（COPD、喘息）、腎臓及び肝臓の線維症、アテローム性動脈硬化症及び心不全のような心臓血管疾患並びに神経炎及び多発性硬化症のような神経系疾患がある。本発明に従う治療のためより好ましい疾患は、乾癬性関節炎、若年性関節炎、初期の関節炎、反応性関節炎、変形性関節炎、強直性脊椎炎などの変形性関節疾患である。本方法に従う治療について最も好ましい変形性関節疾患は、関節リウマチである。

30

## 【0117】

本発明の発現抑制剤の対象患者への投与は、自己投与及び他の人による投与を含む。患者は既存の疾患又は医学的な状態のために治療が必要であることもあり、骨代謝の障害に影響される疾患及び医学的な状態のリスクを予防又は低減するために、予防的処置が必要かもしれない。本発明の発現抑制剤は、対象患者に対して経口、経皮、吸入、注射、経鼻、経直腸、又は徐放性製剤により送達することができる。

40

## 【0118】

本方法の好ましい療法は、炎症を特徴とする病状を患う対象に対して、その患者で異常なレベルの細胞外マトリックス分解を減少させ、好ましくは前記分解を担う無限に継続する過程を終了させるのに十分な時間、本発明の発現抑制剤の有効抑制量を投与することを含む。本方法の特別な実施形態は、関節リウマチを患うかその発症に感受性の対象に対して、前記患者の関節でコラーゲン及び骨分解をそれぞれ低減又は予防し、好ましくは前記分解を担う自己永続的過程を終了させるのに十分な時間、本発明の発現抑制剤の有効なマトリックスメタロプロテアーゼ抑制量を投与することを含む。

本発明は、細胞外マトリックス分解が関与する疾患を治療又は予防するための医薬品の調製のための先に述べた剤の使用にも関する。

50

好ましくは、病的状態は関節炎である。より好ましくは、その病的状態は関節リウマチである。

#### 【0119】

本明細書で記載される本発明の実施で役立つポリペプチド及びポリヌクレオチドは、溶液中で遊離状態でも、固体支持体に固定されても、細胞表面で運ばれても、細胞内に置かれてもよい。本方法を実施するために、ターゲットポリペプチド又は化合物を固定してそのポリペプチドの非複合形態から複合体の分離を促進し、且つアッセイをオートメーション化することが可能である。化合物とのターゲットポリペプチドの相互作用（例えば、結合）は、反応体を収納するのに適当な任意の容器内で達成することができる。そのような容器の例としては、マイクロタイタープレート、試験管及び微量遠心管がある。一実施形態では、ポリペプチドのマトリックスへの結合を可能にするドメインを加える、融合タンパク質を提供することができる。例えば、ターゲットポリペプチドは「H i s」タグを付け、次にN i - N T Aマイクロタイタープレート上へ吸着させることができ、又は、ターゲットポリペプチドとのP r o t A融合をI g Gに吸着させ、それを次に細胞溶解物（例えば、(35)<sup>s</sup>標識）及び候補化合物と組み合わせ、混合物は複合体形成に好都合な条件下（例えば、生理的条件の塩及びp H）でインキュベートする。インキュベーションに続いて、プレートを洗浄して未結合の標識があれば除去し、マトリックスを固定化する。放射能の量は直接、又は複合体の解離後に上清で測定することができる。或いは、複合体をマトリックスから解離してS D S - P A G Eで分離し、ターゲットタンパク質へのタンパク質結合のレベルを標準の電気泳動手法を用いてゲルから定量化することができる。

10

20

30

40

#### 【0120】

マトリックス上のタンパク質の固定化のための他の手法も、化合物の同定方法で用いることができる。例えば、ターゲット又は化合物は、ビオチン及びストレプトアビシンのコンジュゲーションを利用して固定化することができる。ビオチン化ターゲットタンパク質分子は、当技術分野で公知の技術（例えばビオチン化キット、Pierce Chemicals、Rockford, I I I . ）を用いてビオチン - N H S ( N - ヒドロキシスルシンイミド ) から調製して、ストレプトアビシンでコーティングされた9 6 穴プレート ( Pierce Chemical ) のウェル内に固定化することができる。或いは、ターゲットと反応性であるがターゲットと化合物との結合を干渉しない抗体をプレートのウェルに誘導することができ、ターゲットは抗体コンジュゲーションによってウェルに捕捉することができる。先に述べたように、標識候補化合物の調製物はターゲットを提示するプレートのウェル内でインキュベートされ、ウェルに捕捉された複合体の量は定量することができる。

#### 【0121】

ターゲットポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号1 ~ 2 5と同定される。出願人は、発現可能な形でのこれらのポリヌクレオチドによる哺乳動物細胞のトランسفエクションは細胞外マトリックス分解を促進する因子の放出を増加させることを明らかにした。

本発明は、E C M 分解に関係する病的状態の診断のための、対象のゲノムD N A中の配列番号1 ~ 2 5の遺伝子の少なくとも1つの核酸配列を決定すること、その配列をデータベース及び/又は健康者から得られる核酸配列と比較すること、及び病的状態の開始に関するいかなる差をも同定すること、とを含む方法にも関する。

#### 【0122】

本発明の他の態様は、対象で細胞外マトリックス分解を伴う病的状態又はその病態への感受性を診断するための方法であって、生体試料中の配列番号1 0 1 ~ 1 2 5からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの量を測定することと、その量を健康対象におけるそのポリペプチドの量と比較することとを含む方法に関し、このとき、健康対象と比較してのポリペプチド量の増加はその病的状態の存在の指標となる。

本発明は、以下の図及び実施例でさらに記述される。

#### 【実施例】

#### 【0123】

50

整列させたアデノウイルスライブリーアー（その作製及び使用は、国際公開99/64582に記載される）と組み合わせて用いると、以下のアッセイは軟骨の主成分であるコラーゲンを分解する滑膜の線維芽細胞（S F）の能力を調整する因子の発見に役立つ。候補因子は最初は一次アッセイで、続いて二次アッセイで篩にかけられる。実施例1は、マトリックスメタロプロテアーゼ1（M M P 1）のタンパク質レベルの検出のためにE L I S Aを用いるアデノウイルスc D N Aライブリーアーの一次アッセイスクリーニングの開発及び設定を記載し、本明細書で「M M P 1アッセイ」と称する。実施例2は、該一次アッセイスクリーニング及びその結果を記載する。実施例3及び4は、より機能中心的で、S Fの上清中でコラーゲン分解を検出し、本明細書では「コラーゲン分解アッセイ」と称する二次アッセイを記載する。実施例5は、S Fにおける因子の内因性発現の試験を記載する。この方法は、様々なR Aに由来するS F（R A S F）のヒットの「発現プロファイリング」と称される。実施例6は、サイトカイン誘導性のS F M M P 1発現に及ぼす様々な遺伝子活性の低下の影響を記載し、それによりR A S Fのコラーゲン溶解活性を決定する。

#### 【0124】

##### （用いた対照ウイルス）

これらの試験において用いた対照ウイルスを、下で列記する。国際公開99/64582で記載されているように、d E 1 / d E 2 Aアデノウイルスは、P E R . E 2 Aパッケージング細胞内のヘルパープラスミドp W E A d 5 A f 1 I I - r I T R . d E 2 Aの同時トランスクレクションによってこれらのアダプタープラスミドから生成される。

#### 【0125】

##### （A）陰性対照ウイルス：

A d 5 - L a c Z : 国際公開02/070744でp I P s p A d A p t 6 - l a c Zと記載される。

A d 5 - A L P P : 1.9 k b インサートは、p G T 6 5 - P L A P (Invitrogen)からN s i Iによる消化によって単離され、平滑末端化され、E c o R Iで消化され、E c o R I及びH p a Iで消化されたp I P s p A d A p t 6へクローニングされる。

A d 5 - e G F P : 国際公開02/070744でp I P s p A d A p t 6 - E G F Pと記載される。

A d 5 - e G F P \_ K D : 標的配列：G C T G A C C C T G A A G T T C A T C (配列番号401)。国際公開03/020931で記載されているようにS a p I部位を用いてベクターへクローニングされ、ウイルスが生成される。

A d 5 - ルシフェラーゼ\_K D\_v 1 3 : 標的配列：G C T G A C C C T G A A G T T C A T C (配列番号402)。国際公開03/020931で記載されているようにS a p I部位を用いてベクターへクローニングされ、ウイルスが生成される。

A d 5 - M 6 P R \_ K D \_ v 1 : 標的配列：G C T G A C C C T G A A G T T C A T C。国際公開03/020931で記載されているようにS a p I部位を用いてベクターへクローニングされ、ウイルスが生成される。

#### 【0126】

##### （B）陽性対照ウイルス：

A d 5 - R E L A : R E L Aをコードするc D N Aは、ヒト胎盤c D N Aライブリーアーの以下のプライマーを用いたP C Rで得られる：

上流側：G C G A A G C T T G C G G C A T G G A C G A A C T G T (配列番号403)及び

下流側：G C G G G A T C C C A G G C G T C A C C C C T T A G (配列番号404)。

1 6 8 1 b pのD N Aインサートが生成され、その5'配列はN M \_ 0 2 1 9 7 5に対応する。プライマーは、P C R生成物がH i n d I I I - B a m H Iクローニングによってp I P s p A d a p t 6ベクターに挿入できるように設計される。

#### 【0127】

A d 5 - M M P 1 : p I P s p A d a p t 6プラスミドにクローニングされたM M P 1を

10

20

30

40

50

コードする cDNA は、ヒト胎盤 cDNA ライブライリー（国際公開02/070744を参照）から、古典的なフィルターコロニーハイブリダイゼーション手法によって単離する。ヒト胎盤 cDNA ライブライリーは細菌に形質転換されて、寒天プレート上へプレーティングされる。何千もの個々のコロニーを選択して（Q-pix装置（Genetix）を用いる）、寒天プレート上で再整列させる。細菌を成長させた後、これらのプレートをハイブリダイゼーションフィルター上へオーバーレイする。これらのフィルターを対象に、MMP1特異的プローブによる古典的なハイブリダイゼーション法を実施する。このプローブは、以下のプライマーを用いて胎盤 cDNA ライブライリーの PCR によって得られる：

上流側： G T T C T G G G G T G T G G T G T C T C A C A G C (配列番号 405)  
、及び

下流側： C A A A C T G A G C C A C A T C A G G C A C T C C (配列番号 406)  
。

ハイブリダイゼーション後のフィルター上の陽性シグナル点のそれに対応する位置の細菌コロニーを選択して、プラスミド調製のために用いる。5'配列の検証は、インサートの5'配列は NM\_002421 に対応することを確認する。

#### 【0128】

A d 5 - T R A F 6 : T R A F 6 をコードする cDNA は、MMP1で記載したものと同じコロニーハイブリダイゼーション手法によって単離される。この T R A F 6 特異的プローブは、以下のプライマーを用いて胎盤 cDNA ライブライリーの PCR によって得られる：

上流側： C C A G T C T G A A A G T G A C T G C T G T G T G G (配列番号 407)  
、及び

下流側： C A A C T G G A C A T T T G T G A C C T G C A T C C (配列番号 408)  
。

ハイブリダイゼーション後のフィルター上の陽性シグナル点のそれに対応する位置の細菌コロニーを選択して、プラスミド調製のために用いる。5'配列の検証は、インサートの5'配列は NM\_004620 . 2 に対応することを確認する。

#### 【0129】

A d 5 - M M P 1 3 : MMP13 の cDNA は、ヒト滑膜の線維芽細胞からの cDNA 調製物から、PCR によって単離される。1498bp の PCR 生成物を、HindIII / EcoRI クローン化手法を用いて pIPspAdapt6 へクローン化する。配列検証は、インサートが NM\_002427 の塩基対 18 ~ 1497 に対応することを確認する。

#### 【0130】

A d 5 - M Y D 8 8 : この cDNA は、pIPspAdapt6 に構築されたヒト胎盤 cDNA ライブライリーから単離される。MYD88 の発現を媒介するウイルスは、Galapagos Genomics で実施されたゲノムスクリーンの 1 つにおけるヒットとして同定される。インサートの配列検証は、インサートが NM\_002468 の塩基対 40 ~ 930 に対応することを確認する。

#### 【0131】

A d 5 T N F R I A : このウイルスは、pIPspAdapt6 に構築されたヒト胎盤 cDNA ライブライリーから単離される。MYD88 の発現を媒介するウイルスは、Galapagos Genomics で実施されたゲノムスクリーンの 1 つにおけるヒットとして同定される。1 . 4 kb インサートの 5' 配列の検証は、インサートが NM\_001065 の塩基対 958 から始まる事を示す。国際公開03/020931で記載されているようにウイルスが生成される。

#### 【0132】

A d 5 - M M P 1 \_ K D \_ v 1 0 : 標的配列： G C T G A C C C T G A A G T T C A T C (配列番号 409)。国際公開03/020931で記載されているように S a p I 部位を用いてベクターへクローン化され、ウイルスが生成される。

10

20

30

40

50

## 【0133】

(実施例1：MMPアッセイの開発)

マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)は様々な生理的役割を有し、例えば、それらは他のプロテアーゼ、成長因子の成熟、及び細胞外マトリックス成分の分解に関係する。MMP1はMMPファミリーのメンバーであって、骨及び軟骨の主成分である未変性のコラーゲンを分解することができる。滑膜線維芽細胞(SF)によるMMP1の発現増加は関節炎疾患の進行の診断指標であり、関節浸食過程の前兆となる(Cunnaneら、2001)。MMP1のSFによる発現は、サイトカインTNF- $\alpha$ 及びIL1などの関節リウマチに関連した引き金によるSFの活性化によって増加し得る(Andreakosら、2003)。活性化されたSFによって生じるMMP1レベルの測定はRAとの関連で大いに意義があり、その理由はこの事象がパンヌスで見られるような浸食性表現型へ向けたSFの活性化レベルを反映するからである。活性化されたSFにおける候補標的タンパク質の発現の減少がこれらの細胞内でのMMP1発現の減少を導くならば、その標的はMMP1発現の調節に関与することが示され、したがってRAの治療のための治療的手法の開発に適切と考えられる。そのような標的タンパク質の同定は、さらに「Ad-cDNA」と称される、cDNAライブラリーの発現を媒介する組換えアデノウイルスの集団のスクリーニングを含む。本明細書で用いられる集団は、さらに「アデノウイルスcDNAライブラリー」又は「FlexSelect集団」(国際公開99/64582を参照)と称される。

## 【0134】

MMP1アッセイは、最初に滑膜線維芽細胞(SF)のMMP1を産生する能力を試験することによって開発される。

A. MMP1を産生するSFの能力を評価するために、TRAF6及びMYD88の発現を媒介する一組のアデノウイルス、IL1経路のアダプター分子、並びにMMP1発現を増加させると予想される免疫及び炎症性反応に関係する因子の発現を増加することが公知のNF-B転写因子のサブユニットであるp65/Rε1Aが、SFを感染させるために用いられる(Vincenti及びBrinckerhoff、2002、を参照)。

## 【0135】

6穴プレートの1ウェルにつき40,000のSFをDMEM+10%FBSに接種して、細胞あたり7500のウイルス粒子(vp/細胞)の感染多度(MOI)で感染させた。SFによるMMP1の発現を、先ずリアルタイムの定量PCRによってmRNAレベルで測定する。対照ウイルスに感染した細胞のRNAは、メーカーの説明書に従ってSV RNA単離キット(Promega)を用いて感染の48時間後に調製する。cDNAは、MultiScribe逆転写酵素(50U/ $\mu$ l、Applied Biosystems)及びランダム六量体を用いてこのRNAから調製する。cDNA合成を、1×TaqMan緩衝液A(P.E Applied Biosystems)、5mM MgCl<sub>2</sub>、500mM総dNTP、2.5mMランダム六量体、0.4U/ $\mu$ l RNアーゼ阻害剤、及び1.25U/ $\mu$ l MultiScribe逆転写酵素から成る25 $\mu$ lの総容積で実施する。混合物を、25で10分、48で30分及び95で5分間、インキュベートする。特定のDNA生成物を、結果として生じるcDNAから、適したプライマー対を用いて40PCRサイクルの間、AmpliTaq Go 1d DNAポリメラーゼ(Applied Biosystems)で増幅する。特定のDNA生成物の増幅は、ABI PRISM(登録商標)7000配列検出システム上で監視する。以降のリアルタイムPCR反応では、1×SYBR Greenミックス(Applied Biosystems)、300nM順方向プライマー及び300nM逆方向プライマーからなる25 $\mu$ lの総容積中に、5 $\mu$ lのRT反応生成物が含まれた。各試料は、2反復で分析する。PCR反応を以下のプログラムを用いて実施する：95で10分間に繰り返す、95で15秒、60で1分のサイクルを40サイクル。各PCR反応の後、95で15秒間及び60で15秒間インキュベートし、続いて20分間95に温度を上昇させ、最後は95で15秒間にすることによって解離曲線を測定することによって生成物を分析する。MMP1、18S及び $\beta$ -アクチンの発現の検出のために用いられるプライマー対の配列は、表2で列記する。

10

20

30

40

50

【0136】

【表4】

表2. 本明細書で用いられるプライマー及びそれらの配列のリスト

ヒット ナンバー	プライマーナイ	プライマーパリエ	配列 番号
NA	pAdapt_FW	GGTGGGAGGTCTATATAAGC	410
	pAdapt_REV	GGACAAACCACAACATAGAATGC	411
	MMP2_For	CCCCAGGCACTGGTGTG	412
	MMP2_Rev	ACGGACCACCTGGCCTTCT	413
	MMP1_For	CCGGTTTTCAAAGGAAATAAGTAC	414
	MMP1_Rev	TTCACAGTTCTAGGGAAAGCCAAAG	415
	CAMK4_For	CAGCATCCGTGGGTCA	416
	CAMK4_Rev	TTCACCGCTGCCCTAACGCTT	417
	PRKCE_For	TGAGGACGACCTATTGAGTCCAT	418
	PRKCE_Rev	GGGATTCTCGTCATGAAAGCT	419
H31-031	USP21_For	CTGCGAAGCTGTGAATCCTACTC	420
	USP21_Rev	GGCATCCTGCTGGCTGTATC	421
H31-035	CASP10_For	TCCTGGCAGAACTCCTCTATATCATA	422
	CASP10_Rev	TGACAGTTCTCGTAGAGCAGGTTCTA	423
H31-047	TM7SF1_For	GAACTTGTACTTCACGCAGGTG	424
	TM7SF1_Rev	CAACAGGAAAACAAGGCTGATG	425
H31-049	GPR21_For	TGCGTGGTCCCTTCTTATCAC	426
	GPR21_Rev	GCCATGGAGACGCTTTCAG	427
H31-242	RIPK2_For	CATTAAATGAACCTACATAGGAAAAC	428
	RIPK2_Rev	AGGGCAATTTCATGCAGGAT	429
H31-301	TPST1_For	GGAGTGTCTCTGTCAAAAGTGG	430
	TPST1_Rev	ACCCATTTGATAGAGCTCCTACATT	431
H31-319	MST3_For	GACATTAAAGCGGCCAACGT	432
	MST3_Rev	CTCGGGTGCCATCCAGAA	433
H31-347	SEPT1_For	GCGAGAAAAGACGAAGAGCTGC	434
	SEPT1_Rev	GCCTGGCTCTGCTGCATT	435
H31-351	CD72_For	CAGTCAAATTATCCACAATCACAC	436
	CD72_Rev	AGAGCTGAGGCCAGTCCAATAT	437
H31-360	RIT_For	GGTAGGAAAGAGTGCATGA	438
	RIT_Rev	GCATCTTCAATGGTGGGATCA	439
H31-384	FXYD5_For	TGGTCGCCTGTGTCTCTCA	440
	FXYD5_Rev	GTGGTATCTTCAACGTCTGCTC	441
H31-450	Q9ESW8_For	GAGGAAGGCGGTGGTAGTGA	442
	Q9ESW8_Rev	CTCAACCGGAATCTCGTACACA	443
H34-067	FZD6_For	TGGGAGATAACTGGGTCTCTGAT	444
	FZD6_Rev	AAGCCAATTCTGGTCAGCTT	445
H34-087	MKNK1_For	AGGGAGCCTATGCCAAAGTTC	446
	MKNK1_Rev	CTCGATGATTGACGGCATA	447
H34-088	MAPKAPK5_For	GAGGAAGCTCTGAAGGTCAAAC	448
	MAPKAPK5_Rev	CAACCACTGCCCTGTCCATC	449
H34-092	FZD4_For	AGCCAGCTGCAGTTCTCCTT	450
	FZD4_Rev	TCACAGCGTCTTGTACTGAAAG	451

10

20

30

40

50

## 【0137】

MMP1はSYBR Green法を用いて検出されるが、PCR反応のための内部較正物質として使用される18S rRNAのレベルは、Taqmanプローブ(TaqMan(登録商標)リボソームRNA調節試薬、Applied Biosystems)を用いて測定される。増幅グラフ、及び生じるCt値は、試料中に存在する特定のmRNAの量の指標である。-Ct値が提示され、これはAd5-eGFPに感染した対照試料における発現レベルと比較して、陽性対照ウイルスに感染した試料におけるMMP1 mRNAの標準化された(18S較正物質と比較して)レベルを意味する。結果は、感染していないかAd5-eGFPに感染したSFと比較して、SFにおけるp65/RelA、TRAF6又はMYD88の発現によるMMP1 mRNAレベルの強いアップレギュレーションを示す。

10

## 【0138】

SFによって発現されたMMP1のレベルは、ウェスタンプロット法によってタンパク質レベルでも測定される。感染の2日後に、リアルタイムPCR実験のために示した様々な組換えアデノウイルスに感染した細胞の上清を収集して、古典的なTCA沈殿によって15倍に濃縮する。上清の15μlは、10%ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEによって解析する。これらの実験のために用いる培地は、M199培地+1%FBSである。MMP1対照試料のために、Ad5-MMP1に感染した細胞の濃縮されない上清をゲルへ添加する。解析されたタンパク質を、ニトロセルロース膜上に移す。移動物の品質及び試料の均等の添加は、膜のPonceau-S染色で検査する。一次抗体としてヤギ抗MMP1ポリクローナル抗体(R&D Systems、1/500希釈溶液)及び二次抗体としてHRP結合ウサギ抗ヤギ抗体(DAKO、1/10000希釈溶液)、及びECLプラスHRP基質(Amersham Biosciences)を用いて、免疫検出を実施する。ウェスタンプロット法は、Ad5-eGFP感染細胞と比較して、p65/RelA、TRAF6又はMYD88の発現を媒介するアデノウイルスに感染したSFの上清中の、MMP1タンパク質レベルの大きな増加を示す。Ad5-MMP1感染細胞の上清では、非常に強いシグナルが検出される(図2、パネルB及びC)。

20

## 【0139】

Ad5-p65/RelA、Ad5-TRAF6又はAd5-MYD88感染SFの上清に存在する高レベルのMMP1タンパク質は、市販のMMP1活性ELISA(RPN2629、Amersham Biosciences)を用いて確認される。このELISAでは、MMP1はウェルに固定された抗体によって捕捉され、その量はその後MMP1基質の変換に基づいて定量化される。メーカーによる推奨通り、SFの非濃縮上清(ウェスタンプロット法実験について示したように調製する)の50μlをこのELISAで処理する。

30

これらの実験は、SF一般、及びスクリーニング及び検証実験で用いる細胞バッチの、炎症経路の誘起後にMMP1タンパク質を産生する能力を確認する。

## 【0140】

MMP1の測定のための384穴フォーマットELISAが開発される。様々なELISAプロトコルと同様に様々な一次抗体が試験される。384穴プレートでSF上清中のMMP1レベルを測定するために、以下のプロトコルが開発、検証される：白色Luminotrac600 384穴プレート(Greiner)を2μg/mlの抗MMP1抗体MAB1346(Chemicon)でコーティングする。抗体は、緩衝液40(1LのmilliQ水中に1.21gのトリスペース(Sigma)、0.58gのNaCl(Calbiochem)及び5mlの10%NaN3(Sigma)、pH8.5に調節)で希釈する。4で一晩インキュベーションの後、プレートをPBS(10LのmilliQ中に80gのNaCl、2gのKCl(Sigma)、11.5gのNa2HPO4·7H2O及び2gのKH2PO4、pH7.4)で洗浄して、100μl/ウェルのカゼイン緩衝液(PBS中に2%カゼイン(VWR International))でブロックする。翌日、カゼイン緩衝液をELISAプレートから除去して、50μl/ウェルのEC緩衝液(1L milliQ中に4gのカゼイン、2.13gのNa2HPO4(Sigma)、2gのウシアルブミン(Sigma)、0.69gのNaH2PO4·H2O(Sigma)、0.5gのCHAPS(Roche)、23.3gのNaCl、4mlの0.5M EDTA

40

50

pH 8 (Invitrogen)、5 mlの10%NaN<sub>3</sub>、pH 7.0に調節)によって置換する。0.25 mMのDTT (Sigma)を、解凍した試料プレートに加える。EC緩衝液を除去した後、試料の20 µlをELISAプレートへ移す。4で一晩のインキュベーションの後、プレートをPBSで2回、PBST (0.05%ツイーン20を含むPBS (Sigma))で1回洗浄して、35 µl / ウェルのビオチン化抗MMP1抗体溶液 (R&D)とインキュベートする。この二次抗体は、緩衝液C (2 LのmilliQ中に0.82 gのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O、4.82 gのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、46.6 gのNaCl、20 gのウシアルブミン及び4 mlの0.5 M EDTA pH 8、pH 7.0に調節)で、5 µg / mlの濃度に希釈する。室温で2時間のインキュベーションの後、プレートは先に述べたように洗浄して、50 µl / ウェルのストレプトアビジン - HRPコンジュゲート体 (Biosource)とインキュベートする。ストレプトアビジン - HRPコンジュゲート体は、緩衝液Cで0.25 µg / mlの濃度に希釈する。45分後に、プレートを前記の通り洗浄して、50 µl / ウェルのBM Chem ELISA基質 (Roche)と5分間インキュベートする。読み出しありは、Luminoscan Ascent Liminometer (Labsystems)上で200ミリ秒の積分時間で、又はEnvisionリーダー (Perkin Elmer)で実施する。

10

## 【0141】

開発したMMP1 ELISAで得られた典型的結果は、図3で示す。この実験のために、3000のSFを96穴プレートのDMEM + 10%FBS内に接種する。24時間後に、SFはALPP、MYD88、MMP1の発現を媒介するアデノウイルスにより10000のMOIで感染させるか、未感染のままにする。感染の1日後、細胞の培地を、1%FBSを添加したM199培地 (Invitrogen)で置換する。48時間のインキュベーションの後、上清を収集して384穴プレートへ移し、上述のMMP1 ELISA手法を実施する。頑健で、3.5倍を超えるアップレギュレーションのシグナルが観察される。この実験は、MMP1 ELISAの頑健性及び特異性を示した。

20

## 【0142】

RAの分野に関連するサイトカイン (TNF、IL1 及びOSM) 又はその組合せによる処理後のSFによるMMP1発現の増加を監視する。結果を、図10の白色バーで示す。この実験のために、SFを96穴プレートに3000細胞 / ウェルで接種する。24時間後に、培地は1%FBSを添加したM199培地に変更する。培地変更の1日後、サイトカイン又はその組合せを、各サイトカインが25 ng / mlの最終濃度になるように培養物に加える。図3で記載されているように、サイトカイン添加の72時間後に上清を収集して、ELISAで処理する。図10の白色のバーで示すように、TNFだけがMMP1発現のほぼ3倍の増加を誘導する。TNF及びOSM及び/又はIL1の組合せによるSFの誘起は、より高いMMP1発現レベルを導く。この実験は、RA発生病理に関係するサイトカインによって誘発されるSFによるMMP1発現の増加を測定するのに、開発したMMP1 ELISAの感度が十分であることを証明する。

30

## 【0143】

(実施例2:MMP1アッセイにおける4224の組換えアデノウイルスのスクリーニング)

40

異なるスクリーニングにおけるアッセイの品質を評価するために、384穴対照プレートが作製される。このプレートの組成を図4A示す。ウェルは、FlexSelectアデノウイルスcDNAライブラリーと同じ条件の下で產生された対照ウイルスで満たす。この対照プレートは、対角線に配列されて、3組の48陰性対照ウイルス (N<sub>1</sub> (Ad5-eGFP)、N<sub>2</sub> (Ad5-LacZ)、N<sub>3</sub> (Ad5-ALPP)、B1: ブランコ、非感染) が介在する、3組の48陽性対照ウイルス (P<sub>1</sub> (Ad5-MMP1)、P<sub>2</sub> (Ad5-TRAF6)、P<sub>3</sub> (Ad5-MYD88)) を含む。全てのウェルは、50 µlのウイルス粗溶解液を含む。対照プレートに含まれるウイルスは、FlexSelect収集の構築のために適用したプロトコルに従って生成される。この対照プレートの複数の一定量を作製し、-80 °Cで保存する。

## 【0144】

50

最適スクリーニングプロトコル：R A S F を、10 % ウシ胎仔血清（I C N ）、100 単位 / m l のペニシリン（Invitrogen）及び 100 μ g / m l ストレプトマイシン（Invitrogen）を添加した D M E M 培地（Invitrogen）で培養し、37 及び 10 % C O<sub>2</sub> でインキュベートする。細胞は、週に一度、1 / 3 分割によって継代培養する。スクリーニングで用いた R A S F の最大継代数は、11 である。スクリーニングのために、S F は 0.1 % ゼラチン（Merck）でコーティングされた透明な 384 穴プレート（Greiner）の 25 μ l の滑膜細胞増殖培地（Cell Applications社）内に、1500 細胞 / ウエルの密度で接種する。一晩インキュベーションの後、細胞は Galapagos FlexSelect アデノウイルス c DNA ライブライリーからの、3 μ l の Ad - c DNA に感染させる。アデノウイルスライブライリーの平均力価が  $3 \times 10^9$  ウイルス粒子 / m l であるので、これは 6000 の M O I を意味する。感染の 24 時間後に、培地を 1 % F C S を添加した 50 μ l の M 19 培地に変更する。40 μ l の上清を 72 時間後に新しい透明な 384 穴プレート（Greiner）に収集して、さらに MMP1 ELISA で処理するまで -80 で保存する。感染、培地変更及び培地収集段階は、TECAN Freedom ピペットで実施する。ELISA 段階は実施例 1 で示すように実施する。

10

#### 【0145】

上述のプロトコルで試験された対照プレートの性能の代表例を、図 4B に示す。滑膜線維芽細胞は、TECAN 384 チャンネルピペットを用いて、対照プレートに整然と含まれるウイルスの 3 μ l で感染させる。培地は感染翌日に一新し、上清は 72 時間の産生時間後に収集して、前の実施例で記載した 384 穴フォーマット MMP1 ELISA を実施した。得られた生の発光シグナルを示す。

20

#### 【0146】

ストリンジエントなカットオフ、つまり全 144 の陰性対照ウイルスの平均プラスこれらの試料の標準偏差の 4.5 倍を適用した。予想通りに、Ad5 - MMP1 対照ウイルスは、アッセイで高スコアをマークし、48 の Ad5 - MMP1 ウイルスの全てはこのカットオフより上のヒットとして選択された。Ad5 - MYD88 対照ウイルスも頑健にスコアし、Ad5 - MYD88 対照ウイルスの 84 % は適用したカットオフより上で選択された。MMP1 mRNA レベルのより弱い増加をもたらしたより弱い Ad5 - TRAF6 対照（実施例 1 を参照）の成績は良くなく、このカットオフが強い MMP1 インデューサーを同定する可能性が高いことを示す。

30

#### 【0147】

上述の R A S F の MMP1 アッセイは、Galapagos Genomics で開発されたアデノウイルス c DNA ライブライリー（Flex Select（商標）収集）に対してスクリーニングされる。このアデノウイルス収集の主要部は、G P C R、キナーゼ、プロテアーゼ、ホスホジエステラーゼ及び核ホルモン受容体のような「医薬とし得る」クラスからの遺伝子の c DNA を含む。これらの c DNA の大部分は、下で簡単に説明した P C R に基づく手法によって得られる。RefSeq データベースから得られる選択された遺伝子の配列に基づき、P C R プライマーは A T G 開始コドンから終止コドンまでの完全な読取り枠の増幅のために設計される。プライマーは、順方向プライマー及び逆方向プライマーが 96 穴プレート内で P C R レディ濃度で混合された整列したフォーマットで受け取られる。この時点から後は、整列したフォーマットは全ての取扱い（P C R からウイルス産生まで）を通して維持され、その結果整列したアデノウイルス c DNA ライブライリーが得られる。P C R 反応のテンプレートとして、胎盤、胎児肝臓、胎児脳及び脊髄の c DNA ライブライリーが用いられる（Invitrogen 又は Edge Biosystems から）。単一のエクソンによってコードされる遺伝子については、ヒトゲノム D N A で P C R 反応が実施される。増幅反応の後、P C R 生成物の大きさが推定されて、配列情報に基づく予測された大きさと比較される。得られた P C R 生成物は、96 穴 P C R クリーンアップ系（Wizard magneSil、Promega、Madison、WI、USA）で精製され、適当な制限酵素で消化され（A s c I、N o t I 又は S a l I の制限部位はプライマーに含まれる）、D N A ライゲーションキットバージョン 2（Takara、Berkeley、CA、USA）を用いてアデノウイルスアダプタープラスマミド p I s p

40

50

A d A d a p t - 1 0 - Z e o (米国特許第6340595号で記載される)へ直接クローン化される。形質転換及び選択段階の後、国際公開99/64582で記載される手法に従い、1遺伝子につき、配列が確認されているクローンの複数がプラスミドDNAの調製及び以降のアデノウイルスの生成のために用いられる。

#### 【0148】

全FlexSelectアデノウイルスcDNAライブラリーは、スクリーニングされた時点で11×384穴プレートで構成された。4224試料は1705遺伝子を意味する。

MMP1アッセイは、上述の最適化されたプロトコルを用いてFlexSelectアデノウイルスcDNAライブラリーに対してスクリーニングされる。あらゆるcDNAライブラリープレートは、一次スクリーニング及び再スクリーニングで2反復でスクリーニングされる。このように、4つのデータポイントが各cDNAクローンについて得られる。スクリーニング結果及びヒットを同定するために実施された分析の代表例を、図5に示す。

#### 【0149】

SFを384穴プレートに接種して、384穴プレート内に整列して含まれる(TECANピペッタを用いる)FlexSelect収集の384の異なる組換えアデノウイルスの3μlで感染させる。培地は、感染の翌日に一新する。上清を72産生時間後収集し、発光基質を用いてMMP1ELISAを実施した。得られた生の発光シグナルを示す。あらゆる個々のウイルス、特にPRKCE、CASP10及びUSP21の発現を媒介するウイルスについて、一次スクリーニング(図5A)及び再スクリーニング(図5B)で得られた2つのデータポイント(図5A及びB)を示す。

#### 【0150】

ヒットコーリングのためのカットオフ値を決定するために、10%の最高値及び10%の最低値を除いた後にスクリーニングバッチ毎に得られた全てのデータポイントについて標準偏差の他に平均値も計算する。次にカットオフ値を、標準偏差の3倍プラス平均値と定義する。このカットオフは、図5のグラフで水平線として示される。スクリーニング及び再スクリーニング結果は、PRKCEをコードする4つのcDNA、USP21をコードする5つのcDNA及びCASP10をコードする4つのcDNAについて図6で示す。全4つのPRKCE cDNAクローンは一次スクリーニングと再スクリーニングの両方で2反復ともカットオフより上のスコアをマークし、5つのUSP21クローン中4つは一次スクリーニング及び再スクリーニングでカットオフより上のスコアをマークし、4つのCASP10 cDNAクローン中3つは2反復とも一次スクリーニング及び再スクリーニングでスコアをマークした。これらのデータは、スクリーニング及びFlexSelect cDNA収集の品質を示す。

#### 【0151】

指摘したように、あらゆるスクリーニングプレートは2反復でスクリーニング及び再スクリーニングされる。4データポイント中3つについてカットオフ値(平均値プラス標準偏差の3倍)より上のスコアをマークした試料だけを、ヒットとして選択する。さらに、複数のクローンがプラスのスコアの場合は、遺伝子につき最大で2つのクローンがコラーゲン分解アッセイによりさらに処理される。このように、229の遺伝子を表す253のヒットしたAd-cDNAを最終的に選択し、増殖させて、コラーゲン分解アッセイで試験する。

#### 【0152】

表1に列記される各種の標的遺伝子の発現を媒介する「ノックインウイルス」は、以下の通りに試験される。1日目に、3000細胞/ウェルの密度でゼラチンコーティングされた96穴プレートに、又は1500細胞/ウェルの密度で384穴プレート内の滑膜増殖培地にSFを接種する。接種の1日後に、細胞を図で示す量で又はMOIで感染させる。3日目に、培地は1%FBSを添加したM199培地に一新する。6日目に上清を収集して、上述のプロトコルに従ってそれに対してMMP1ELISAを実施する。Ad5-ルシフェラーゼ、Ad5-eGFP又はAd5-空ウイルスは、陰性対照ウイルスとして用いる。SEPT1、TPST1、USP21、MKNK1、RIPK2(図13A)

10

20

30

40

50

、 P G P E P 1 、 R I T 1 ( 図 1 3 B ) 、 C A M K 4 、 M S T 3 、 P R K C E ( 図 1 3 C ) 及び C D 7 2 、 T M 7 S F 1 、 G P R 2 1 ( 図 1 3 D ) の発現を誘起する組換えアデノウイルスによる S F の感染は、その感染 S F による M M P 1 の発現増加を明らかに媒介した。図 1 3 で示す結果は、2 反復のデータポイントの平均である。

#### 【 0 1 5 3 】

( 実施例 3 : 一次滑膜線維芽細胞 ( S F ) のコラーゲン溶解活性の測定のためのスクリーニング法の開発 : コラーゲン分解アッセイ )

M M P 1 アッセイは、 S F における M M P 1 発現の増加を媒介したヒットを選択するための第 1 のフィルターとして用いる。しかし、 S F の上清に存在する M M P 1 の量は、未変性のコラーゲンの分解を媒介するのに十分でないかもしれない。さらに、 M M P 1 の他に、単独で又は M M P 1 との相乗効果でコラーゲン分解を媒介する更なるプロテアーゼが、 S F によって発現されるかもしれない。我々のヒットを S F のコラーゲン溶解活性を増加させるそれらの潜在能力の順に並べるために、本発明者らは、 S F 上清内で未変性コラーゲンの分解の程度を測定する機能性アッセイを開発した。以下に記すアッセイを実施するために用いた様々な試薬及び緩衝液は、特に指摘しない限り Chondrex ( Redmond, USA ) からのものである。

#### 【 0 1 5 4 】

第 1 に、一次ヒト細胞の c D N A ライブラリースクリーニングに適合するように、アッセイを開発する。第 2 の開発段階として、整列させた、中程度の処理能力アッセイに適合するように、そのアッセイを小型化する。小型化された構成での一次細胞で実施されたコラーゲンアッセイの感度は、非小型化された構成でのアッセイと比較して保存されることを実験は確認した。この知見を例示する典型的な実験の結果を、図 6 に示す。この実験のために、 S F ( 3 0 0 0 細胞 / ウエルの密度で 9 6 穴プレート内の 1 % F B S 添加 M 1 9 9 培地に接種 ) を A d 5 - A L P P 、 A D 5 - T R A F 6 又は A d 5 - M Y D 8 8 に感染させる ( M O I 1 0 , 0 0 0 ) 。 4 8 時間 ( 感染後 ) のインキュベーション時間の後、上清を収集して小型化及び非小型化のコラーゲン分解アッセイで試験する。コラーゲン分解レベルに比例する蛍光シグナルを示す。

#### 【 0 1 5 5 】

「 非小型化 」 コラーゲン分解アッセイプロトコル : 1 0 0  $\mu$  l の S F 上清又は r M M P 1 ( R & D systems ) 若しくはキモトリプシン ( Sigma ) の指示量を添加した M 1 9 9 培地 + 1 % F B S の 1 0 0  $\mu$  l を、 9 0  $\mu$  l の緩衝液 B と混合する。これらの混合物は、 1 0  $\mu$  l のトリプシン活性化溶液又は 1 0  $\mu$  l の A P M A ( 4 - アミノフェニル酢酸水銀、最終 2 mM 、 Sigma ) 活性化溶液に加える。これらの活性化溶液は、これらのプロテアーゼを不活性態に保つ M M P のプロドメインの除去を媒介する。トリプシン活性化の場合、混合物は 3 5 度 6 0 分間インキュベートし、続いて全ての非コラーゲン溶解性プロテアーゼを不活性化するために S B T I ( 大豆トリプシンインヒビター ) を添加するが、 A P M A 活性化の場合は、混合物は 3 5 度 1 0 分間インキュベートする。 1 0 0  $\mu$  l の緩衝液 A 及び 1 0 0  $\mu$  l の未変性の F I T C 標識ウシコラーゲン I 型 ( 1 m g / m l 、 0 . 0 1 N 酢酸溶液 ) を混合して活性化試料に加え、その後 3 5 度 2 時間のインキュベーション段階が続き、その間にコラゲナーゼは F I T C 標識コラーゲンを典型的な 1 / 4 及び 3 / 4 断片に切断する。反応は、停止液 ( 1 , 1 0 フェナントロリン、最終 1 0 mM 、 S i g m a ) を 1 0  $\mu$  l 添加して停止させる。大きなコラゲナーゼ断片は、 1 0  $\mu$  l のエラスター ( 「 エンハンサー 」 溶液 ) の添加及び 3 5 度 3 0 分間のインキュベーションによってさらに消化する。試料を冷却した後に、未切断のコラーゲン断片を沈殿させるために 4 0 0  $\mu$  l の抽出緩衝液を加える。これらの断片は、遠心工程 ( 1 0 , 0 0 0 r p m 、 1 0 分 ) によって消化されたコラーゲン断片から分離される。試料の 2 0 0  $\mu$  l は、 F l u o s t a r リーダー ( B M G ) 上で実施する蛍光測定 ( 放射及び励起波長としてそれぞれ 5 2 0 n m 、 4 8 0 n m ) のために、黒い 9 6 穴プレートへ移す。

#### 【 0 1 5 6 】

「 小型化されたコラーゲン分解アッセイ 」 プロトコル : 9 6 穴プレート ( V 底、 G r e

10

20

30

40

50

iner)を、1ウェルにつき9μlの溶液B及び1μlのトリプシン溶液で満たす。10μlの試料を各ウェルに加え、34で15分間インキュベーションを行う。インキュベーションの後、1μlのSBTⅠを加える。20μlのFTTC-コラーゲン混合物(10μl FITC標識コラーゲンⅠ型+10μl溶液A)を活性化された試料に加えて34で24時間の間インキュベーションを行う。1μlの1.10フェナントロリン(Sigma)を、反応混合物に加える。1μlのエンハンサー溶液(エラスターーゼ)を加え、34で30分の間インキュベーションを行う。反応混合物が室温であるときは、40μlの抽出緩衝液を加え、プレートを密封して(Nuncシール)攪拌する。4000rpmで25分間の遠心(Beckman遠心機)の後、上清の50μlを黒いF底プレート(Greiner)に移し、Fluostarリーダー(BMG)を用いて480nmの励起波長、520nmの放射波長で蛍光を測定する。実験結果は図8に示すが、それらはAd5-TRAF6並びにAd5-MYD88感染細胞の上清におけるコラーゲンⅠ型の分解の増加を示す。このように、SFの「MMP1アッセイ」で同定された2つの陽性対照も、SFのコラーゲン溶解能力の増加を媒介する。このことは、「MMP1アッセイ」におけるcDNAの能力は、SFの大局的コラーゲン溶解活性を増加させるその能力の予測を可能にするものであることを示唆する。小型化されたアッセイにおける蛍光シグナルのレベルは非小型化のアッセイと比較して低いけれども、Ad5-ALPP対照と比較しての陽性試料中の蛍光の相対的増加は維持される。このように、非小型化アッセイと同等の感度レベルを有する、SFの小型化コラーゲン分解アッセイが開発された。この結果は、上述のコラーゲン分解アッセイのために用いた方法が、一次細胞(この実施例ではヒトSF)のcDNAライブラリー(この実施例ではアデノウイルスフォーマット)のスクリーニングに適合することを立証する。様々な実験は、以下のプロトコルの態様が重要であることを証明した:

・細胞上清中の潜在性MMPの活性化のためのトリプシンの使用は、このアッセイを用いたコラゲナーゼ活性の検出に役立つ。

・未感染細胞の上清は、いかなる検出可能なバックグラウンドコラゲナーゼ活性も含まない。この低バックグラウンドシグナルを得るために、血清含有量が低く(1%FBS)フェノールレッドを含まない培地(M199培地、フェノールレッドを含まない、Invitrogen)の使用が好ましいとされる。

・変性コラーゲン(ゼラチン)を分解する能力を有する酵素であるキモトリプシンによってコラーゲン分解は全く媒介されないので、このアッセイのために用いるコラーゲンはほとんど未変性の、3重ヘリックス構造である。用いるコラーゲンの未変性の特徴は、このアッセイにも好ましい。

#### 【0157】

上記の小型化アッセイはコラーゲン分解について他の低処理能力検出法と比較され、そこでは以下の試料が試験される: Ad5-ALPP、Ad5-TRAFF6、Ad5-PRKCD、Ad5-MMP13(MMP13は強力なコラゲナーゼである)又はAd5-TNFR1Aに、全て10,000のMOIで、非感染であるか感染したSF(96穴プレート内の1%FBS添加M199培地で培養)の上清。これらの試料で(前実施例で記載したプロトコルに従って)実行された小型化コラーゲン分解アッセイの結果を、図7に示す。示した組換えアデノウイルスによるSFの感染後、及び48時間の産生時間後に得られた上清について、小型化(蛍光ベースの)コラーゲン分解アッセイ及びコラーゲン分解の低処理能力視覚評価を実施する。後の試験のために、様々な上清を未変性コラーゲンとインキュベートする。反応混合物をポリアクリルアミドゲルで解析し、未変性コラーゲン(バンドA及びB)から3/4N末端TC<sup>A</sup>断片(バンドC及びD)へのヘテロトリマーコラーゲンⅠ型原線維の分解を、クーマシー染色後に評価する。

#### 【0158】

この実験のヒット対非ヒットのカットオフ値は、未感染対照試料のデータポイントの平均プラスこれらのデータポイントの標準偏差の3倍と定義し、図7の棒グラフ上の点線で示す。これらのデータは、Ad5-TRAFF6及びAd5-MMP13陽性対照に加えて、PRKCD及びTNFR1Aの過剰発現後にSFのコラーゲン溶解能力が増加したこと

10

20

30

40

50

を示す。TNF<sub>α</sub>はRA発生病理に関する公知の作動因子であるので、TNF<sub>α</sub>受容体であるTNFR1Aの過剰発現はコラーゲン分解の増加を導くことが予想される。この結果は、RA発生病理に関する関連cDNAを同定するための我々の手法の正当性をさらに立証する。この実験では、PRKCDはSFによるコラーゲン分解の他の重要な媒介物質として同定される。

#### 【0159】

次に、同じ試料を以下の設定で試験する：試料の10μlを10μlのEDANS緩衝液(50mMトリス-HCl、pH7.5、150mMNaCl、10mMCaCl<sub>2</sub>、0.05%Brrij-35、50μMZnCl<sub>2</sub>)、10μlのコラーゲンI型溶液(IBFB、Germany、1mg/mlを0.01N酢酸に溶解する)と混合する。APMAを、2mMの最終濃度までこの反応混合液に加える。反応混合液を、35で48時間インキュベートする。25μlの反応混合液を次に沸騰させ、8%SDSポリアクリルアミドゲル(Novex)で解析し、次にクーマシーブルー染色を行う。未変性コラーゲンI型は、2つの1及び1つの2鎖から構成される3重ヘリックスである。これらの鎖は対照試料ではゲルの上で見ることができ、図7の下部の矢印A及びBで示す。陽性対照試料Ad5-MMP13、Ad5-TRAF6及びAd5-PRKCDでは、これらの2つのバンドは矢印C及びDで示す<sup>3/4</sup>N末端の「TC<sup>A</sup>」断片に切断される。この典型的制限パターンは、単一の位置でコラーゲン3重ヘリックスを切断して、それにより特徴的な1/4C末端「TC<sup>B</sup>」及び3/4N末端「TC<sup>A</sup>」断片を生成するMMP型コラゲナーゼの作用を示す。これらの結果は、コラーゲン分解アッセイで得られるシグナルと試験試料に存在するコラーゲン分解活性との間に存在する直接的関係を視覚的に確認する。これらのデータは、コラーゲン分解アッセイで得られるシグナルはMMP型コラゲナーゼの活性作用の結果であることを確認する。

10

20

30

40

#### 【0160】

軟骨の主成分はコラーゲンII型であるので、我々はFITC標識コラーゲンI型及びFITC標識コラーゲンII型で実施されたコラーゲン分解アッセイ読み出し情報を比較した。代表的な実験の結果は、図8に示す。この実験のために、Ad5-TRA6、Ad5-ALPP又はAd5-MYD88を10,000のMOIで感染させたSF(96穴プレートで培養、M199+1%FBS中に3000細胞/ウェル)の上清を用いる。これらの細胞の上清を感染後48時間に収集し、図8で記載した非小型化コラーゲン分解アッセイ法を、FITC標識未変性コラーゲンI型又はFITC標識コラーゲンII型(FITC標識コラーゲンI型と同じ量)を用いて実施した。図8に示す結果は、コラーゲンII型の分解は低い蛍光シグナルを発生することを示し、コラーゲンI型と比較してコラーゲンII型のタンパク分解性に対する高い抵抗性を示唆する。コラーゲンII型を用いたときに得られる低いシグナルレベルにもかかわらず、本明細書でAd5-TRA6によって例証されるように、コラーゲンII型分解の増加を媒介するcDNAが同定される。コラーゲン分解の誘導に向けたヒットの能力の順序は、コラーゲンI型で実行したアッセイと比較してコラーゲンII型で実行したコラーゲン分解アッセイで維持される。これらの結果は、このアッセイでコラーゲンI型の分解を誘導するヒットの能力は、コラーゲンII型の分解を誘導するその能力の予測を可能にするものであることを示す。

30

#### 【0161】

(実施例4：コラーゲン分解アッセイにおける、「MMP1アッセイ」の253のヒットの試験及び1679の組換えアデノウイルスのスクリーニング)

一次滑膜線維芽細胞(SF)上のMMP1アッセイのヒットとして同定されたアデノウイルスをFlexSelectアデノウイルスcDNAライブラリーから選択し、PER.E2Aプロデューサー細胞に感染させて96穴プレートフォーマットで再増殖させる(国際公開99/64582を参照)。これらのプレートは、「MMP1ヒット増殖プレート」とさらに称される。これらのプレート上では、4つのAd5-ALPP及び4つのAd5-ルシフェラーゼ対照ウイルスも含まれる。これらのプレートの境界ウェルは、実験での偶発的な「周辺効果」を避けるために用いられない。MMP1ヒット増殖プレートは、50のヒットウイ

50

ルス及び 10 の陰性対照ウイルスを含む。このウイルス材料は、次に 3 種類の M O I で、S F のコラーゲン I 型分解アッセイにより 2 反復で以下の通りに試験される。S F をトリプシン処理して、96 穴プレート (Nunc、透明プレート、組織培養処理) に接種する。トリプシン処理した S F を 30,000 細胞 / ml の密度で滑膜細胞増殖培地 (Cell Applications) の中に再懸濁し、この懸濁液の 100 μl をマルチドロップディスペンサー (Labsystems) により各ウェルに注入する。細胞を接種してから約 24 時間後に、Tecan Freedom 200 ピペッタ (Tecan) を用いて 96 穴 MMP 1 ヒット増殖プレートに存在するウイルス材料の 6, 12 又は 18 μl で細胞の 2 重感染を実施する。このように、MMP 1 ヒット増殖プレートの内容物を、接種された S F を含む 6 つの 96 穴プレートへ移す。コラーゲン分解アッセイで各ヒットウイルスにつき 6 つのデータポイントを生成する。感染の約 24 時間後に、8 チャンネル Vacusafe 装置 (Integra) を用いてウイルス及び培地をセルから除去し、0.5% FBS 添加 M 199 培地の 60 μl を各ウェルに加える。

10

#### 【0162】

培地更新の 72 時間後に、Tecan Freedom 200 ピペッタで上清を 96 穴プレート (V 底、Greiner) へ移す。上清を使用まで -80° で保存する。アッセイを実施するには、上清を解凍して、上の実施例 3 で記載した小型化コラーゲン I 型分解アッセイのプロトコルに従ってアッセイを実施する。

20

#### 【0163】

ヒット選択は、以下の通りに実施される：各プレートについて、対照ウイルスを感染させた 8 つのウェルで得られた蛍光測定について、平均値及び標準偏差を計算する。ヒット対ノーヒットのカットオフは、これらの対照試料の平均プラス標準偏差の 2 倍と規定される。ウイルスが 6 データポイントの少なくとも 3 つについてカットオフ値より上のシグナルを誘導するならば、そのウイルスはヒットとみなされる。MMP 1 アッセイで同定された 253 のヒットは、この手法で再試験された。これらの中で、61 の Ad - cDNA が S F のコラーゲン溶解活性をかなり増加させ、冗長性を考慮したとき 55 の個々の遺伝子に相当した。これらの 55 のヒットの他に、スクリーニングで拾われた 2 つの Ad - cDNA は、スクリーニングに対して原理の証明を与えた。これらのヒットの 1 つは、MMP 1 をコードした。他のヒットは、IKK (IKBKB) をコードする。このキナーゼは TNF などの炎症作動因子に対する細胞の反応で中心的な役割を担う。RA を治療指標とする小さな薬剤阻害剤は、現在 IKK を対象に設計されている (Andreakosら、2003)。RA の分野に関連するヒットが拾われるという事実は、我々のスクリーニング概念の品質及び用いた材料 (アッセイ及びライブラリー) の品質を確証する。

30

#### 【0164】

これらのヒット Ad - cDNA に関する最終的な品質管理として、それらの同一性を配列分析によって確認される。配列分析のための手順は、以下の通りである。96 穴プレートで P E R . E 2 A プロデューサー 細胞を用いてヒットウイルスを増殖させる。P E R . E 2 A 細胞は、96 穴プレート内の 180 μl の培地に、40,000 細胞 / ウェルの密度で接種する。細胞は、39° で一晩、CO<sub>2</sub> 濃度が 10% の加湿インキュベータでインキュベートする。1 日後、ヒット Ad - cDNA を含む FlexSelect 原液からの粗細胞溶解液の 1 μl で細胞を感染させる。細胞は、細胞変性効果 (一般的に感染後 7 日に出現する細胞の膨張及び球状化) が現れるまで、さらに 34° 、10% の CO<sub>2</sub> 濃度でインキュベートする。上清を収集して、ウイルスの粗溶解物をプロテイナーゼ K で処理する。12 μl の粗溶解物を、無菌の P C R 管内で 4 μl の緩衝液 (1 mg / ml のプロテイナーゼ K (Roche Molecular Biochemicals、カタログ番号 745723) 及び 0.45% ツイーン 20 (Roche Molecular Biochemicals、カタログ番号 1335465) を添加した、MgCl<sub>2</sub> を含む 1 × Expand High Fidelity 緩衝液 (Roche Molecular Biochemicals、カタログ番号 1332465) に加える。これらを 55° で 2 時間インキュベートした後、95° で 15 分の不活化段階が続く。P C R 反応については、1 μl の溶解液を 5 μl の MgCl<sub>2</sub> を含む 10 × Expand High Fidelity 緩衝液、0.5 μl の d NTP 混合液 (各 d NTP が 10 mM) 、

40

50

1 μl の「順方向プライマー」(10 mM 原液、配列：5' GGT GGG AGG T C T A T A T A A G C ; 配列番号 452)、1 μl の「逆方向プライマー」(10 mM 原液、配列：5' GGA CAA ACC ACA ACT AGA ATG C ; 配列番号 453)、0.2 μl の Expand High Fidelity DNA ポリメラーゼ (3.5 U / μl、Roche Molecular Biochemicals) 及び 41.3 μl の H<sub>2</sub>O から構成される PCR マスター混合液に加える。

#### 【0165】

PCR は、PE Biosystems GeneAmp PCR システム 9700 で、以下の通りに実施される：PCR 混合物（合計 50 μl）を 95 で 5 分の間インキュベートする；各サイクルは 95 で 15 秒間、55 で 30 秒間、68 で 4 分間で実行し、35 サイクルを繰り返す。68 での最終的なインキュベーションは、7 分間実施する。5 μl の PCR 混合物を 2 μl の 6 × ゲルローディング緩衝液と混合し、増幅生成物を解析するために 0.5 μg / μl 臭化ホウ素を含む 0.8% アガロースゲル上に加える。増幅した断片の大きさを、同じゲルに加えた標準の DNA ラダーから推定する。配列決定分析については、標的アデノウイルスによって発現された cDNA を、pIPspAdapt6 プラスミドの SapI 部位と連なるベクター配列に相補的なプライマーを用いて、PCR により増幅する。PCR 断片の配列を決定して、予想される配列と比較する。

10

#### 【0166】

（コラーゲン分解アッセイにおけるFlexSelect収集サブセットのスクリーニング）

ある因子が、MMP1 以外のコラゲナーゼを通して SF のコラーゲン溶解活性の増加を媒介する可能性が存在する。そのような因子を同定するために、FlexSelect 収集のサブセットを、SF のコラーゲン分解アッセイでスクリーニングする。キナーゼ及び GPCR の発現を媒介する Ad-cDNA を主に含む、FlexSelect 収集からの 384 穴プレートをスクリーニングする。以下のスクリーニングプロトコルを適用する。SF をトリプシン処理して、30,000 細胞 / ml の密度で滑膜細胞増殖培地 (Cell Applications) の中に再懸濁する。この細胞懸濁液の 100 μl を、「マルチドロップ」ディスペンサー (Labsystems) により 96 穴プレート (Nunc、組織培養処理済) の各ウェルに注入する。細胞接種の約 24 時間後に、それらは以下の通りにライプラリー Ad-cDNA に感染させる。処理する FlexSelect ライプラリーアリコートプレート (384 穴フォーマット、-80 で保存) を、層流キャビネット内で室温で 1 時間解凍する。次に、更なる処理までプレートを 4 で保存する。

20

#### 【0167】

384 穴アデノウイルス cDNA ライプラリーアリコートプレートの 4 分の 1 の各ウェルのために、SF を含む 96 穴プレートのウェルへ 10 μl のウイルス粗溶解液を移す。この動作は、TECAN Freedom 200 ピペッタの 96 ニードルヘッドで実施する。各ウイルスは、2 反復で分析する。このように、各 384 穴ウイルスライプラリーアリコートプレートのために、SF を含む 8 つの 96 穴プレートを感染させる。各ピペット操作段階の間に、ピペットの針を漂白洗浄場所で空にして、175 μl の漂白剤 (5%) で 2 回、200 μl の水で 2 回、最後に 200 μl のエタノール (20%) で洗浄する。感染の約 24 時間後に、細胞の培地を更新する。ウイルス及び培地は Vacusafe (Integra) デ除去し、0.5% FBS を添加した 60 μl の新しい M199 培地を加える。培地の更新の 72 時間後に、TECAN Freedom 200 ピペッタを用いて細胞上清を感染 SF を含む 96 穴プレートから 96 穴プレート (V 底、Greiner) に移す。次いで、この試料について、小型化コラーゲン I 型分解アッセイを実施する。このアッセイでは全体で 1679 の試料を 2 反復でスクリーニングし、これらは 449 の遺伝子に相当する。

40

#### 【0168】

ヒット選択のために以下の分析を実施する：各スクリーニングバッチにつき、最大値の 10% 及び最低値の 10% を除去した後、平均及び標準偏差を全ての試料について計算する。上記のように、スクリーニングされた各 Ad-cDNA 試料について 2 つのデータポイントが得られる。両データポイントのスコアが平均プラス標準偏差の 2 倍よりも高い試

50

料と同様に、2つのデータポイントの1つのスコアが平均プラス標準偏差の4倍よりも高いA d - c D N A 試料をヒットとして選択する。2反復でスクリーニングした96のウイルス(1アッセイプレート)についてのスクリーニングで得られた結果の代表例を、図9に示す。各個々のウイルスについて、一次スクリーニングで得られた2つのデータポイント(A及びB)を示す。C A S P 1 0 及びM M P 3 の発現を媒介するウイルスを示す。試料について得られたシグナルは、下記式を用いて標準偏差及び平均と比較して表す：[平均からの標準偏差の倍数 = (試料値 - 平均値) / 標準偏差]。ヒットコーリングのためのカットオフ(平均プラス標準偏差の2倍又は4倍)は、それぞれ実線又は点線で示す。スクリーニング結果を示した96のA d - c D N A の中で、4つ(その内3つは選択基準に従って評価された)はM M P 3 の発現を媒介し、4つ(その内3つは選択基準に従って評価された)はC A S P 1 0 の発現を媒介した。冗長性を考慮すると79の遺伝子に相当する108のA d - c D N A は、この方法に従ってヒットとして選択される。

【0169】

これらのヒットを再増殖させ、コラーゲン分解アッセイにおけるM M P 1アッセイのヒットのスクリーニングのために記載した手法を用いて、再度スクリーニングする。108の一次ヒットの中で、20の個々の遺伝子に相当する31のヒットは、再スクリーニングでかなりのレベルのコラーゲンI型分解を媒介した。「M M P 1アッセイ」を通してヒットとして同定され、コラーゲン分解アッセイで実証された55遺伝子の中の4つは、コラーゲン分解アッセイのF l e x S e l e c t 収集のサブセットのスクリーニングでヒットとして同定された20の遺伝子にも存在するので、一次ヒトS Fで発見又は活性化されるときコラーゲン溶解能力を増加させる合計71の遺伝子が同定された。このアッセイで同定された好ましいヒット遺伝子を、表1に列記する。コラーゲン分解アッセイにおけるこれらの性能を、表4に要約する。

10

20

## 【表5】

表4 ターゲット遺伝子の特徴の概要

遺伝子記号	実験の説明				
	ノックイン	ノックイン		ノックダウン	ノックダウン
MMP1 誘導	コラーゲン分解 の誘導	一次 RASF の発現	サイトカイン 誘導性 MMP1 の抑制	サイトカイン 誘導性コラーゲン 分解の抑制	
<b>RIPK2</b>	SP	SP	SP	SP	NT
<b>PRKCE</b>	SP	SP	P	SP	SP
<b>MST3</b>	SP	SP	P	P	NT
<b>MAPKAPK5</b>	N	N	P	SP	SP
<b>MKNK1</b>	SP	SP	P	N	NT
<b>CAMK4</b>	P	P	P	SP	SP
<b>SEPT1</b>	P	P	P	SP	NT
<b>PGPEP1</b>	P	P	P	SP	NT
<b>CD72</b>	P	P	P	SP	NT
<b>TPST1</b>	P	P	SP	SP	P
<b>GPR21</b>	P	P	P	SP	NT
<b>USP21</b>	SP	SP	P	P	NT
<b>FZD4</b>	N	N	P	SP	NT
<b>TM7SF1</b>	P	P	P	SP	NT
<b>FXYD5</b>	N	N	SP	SP	NT
<b>RIT1</b>	P	P	P	SP	SP
<b>CASP10</b>	SP	SP	P	N	NT

P : アッセイでの陽性応答

SP : アッセイでの強い陽性応答

NT : 試験実施せず

N : アッセイでの陰性応答

## 【0170】

(実施例5：R A 患者の滑膜に由来するヒト一次滑膜線維芽細胞で同定されたターゲットの発現分析)

同定された全てのターゲットの発現量を、一次ヒト滑膜線維芽細胞の少なくとも3つの異なる分離株で測定する。

## 【0171】

R A S F の1分離株を、Cell Applications Inc. から低温保存された2継代目の細胞として得る(カタログ番号404-05)。これらの細胞を、10% (v/v) 热不活化F B S ( I C N ) 及び 1 × P e n / S t r e p ( Invitrogen ) を添加した D M E M ( Invitrogen ) で培養して増殖させる。

## 【0172】

10

20

30

40

50

R A と診断された患者の膝関節鏡検査法の間に得られた滑膜層生検材料を元に、他の 2 つの分離株を確立する。切除後、組織試料を 15% (v/v) 熱不活化 FBS、1×ピルビン酸ナトリウム (Invitrogen)、1×抗生物質 (Invitrogen) 及び 10% (v/v) DMSO (Sigma) を含む DMEM (Invitrogen) 中で凍結させて、液体窒素中で保存する。細胞培養は、以下の通りにこれらの滑膜組織試料から開始する。2×抗生物質を添加したハンクス均衡塩類溶液 (Invitrogen) で組織を完全に洗浄し、10% (v/v) 熱不活化 FBS、1×ピルビン酸ナトリウム、2×抗生物質を含む DMEM 中で、37℃ で一晩、0.2% (v/v) IV 型コラゲナーゼ (Invitrogen) で消化する。細胞を収集して洗浄し、増殖培地 (10% 热不活化 FBS、1×ピルビン酸ナトリウム、1×抗生物質を加えた DME M) 中に再懸濁して、最後に 6 穴組織培養プレートの 3 つの異なるウェルにブレーティングする。非付着細胞は、3 日後に増殖培地を変えることによって除去する。細胞が 90~95% の密集度に到達したとき、それらをトリプシン処理 (0.25% トリプシン / 1 mM EDTA) によって収集し、25cm<sup>2</sup> の組織培養フラスコへ継代する。1/3 分割によって更なる継代培養を行い、増殖培地は週に 2 回変更する。発現分析のためには、細胞は 6~10 の継代培養で用いる。  
10

#### 【0173】

RNA 調製のためには、一次ヒト滑膜線維芽細胞を 10cm ペトリ皿 (500,000 細胞 / 皿) に接種する。一晩インキュベーションの後、培地を 1×Pen/Strep を含む 1% (v/v) 热不活化 FBS を加えた 6ml の M199 培地に更新する。24 時間後に、「SV Total RNA Isolation キット」 (Promega) を用いて全 RNA を抽出する。収集する前に特定の試料を刺激する。この場合、収集する前の 24 時間、以下の培地を皿に加える：組換えヒト TNF (25ng/ml) により、M199 培地 + 新しい M199 + 1% FBS 中で 2 倍希釈した 1% FBS の液中で 72 時間誘起した THP1 細胞 (ヒト単核球性細胞系) の上清。  
20

#### 【0174】

各試料中の RNA 濃度は、「Ribogreen RNA 定量キット」 (Molecular Probes) を用いて蛍光定量的に定量化する。各調製物からの RNA の同程度の量を、Applied Biosystems からの「Taqman 逆転写キット」で第 1 の鎖の cDNA に逆転写する。つまり、40ng の RNA が、50pmol のランダム六量体、10U のリボヌクレアーゼ阻害剤、25U の Multiscribe 逆転写酵素、5mM の MgCl<sub>2</sub> 及び 0.5mM の各 dNTP を含む反応混合物の各 20μl に含まれる。反応混合物は 25℃ で 10 分間インキュベートし、続いて 48℃ で 30 分間のインキュベーション、及びサーモサイクラー (Dyad, MJ Research) 内での逆転写酵素の熱失活 (95℃ で 5 分間) を実施する。反応液は、プログラムの終了直後に 4℃ に冷やす。得られた cDNA の複数回の凍結 / 解凍サイクルを避けるために、異なる試料を 96 穴プレートに貯留して等分し、-20℃ で保存する。  
30

#### 【0175】

リアルタイム PCR 反応を実施して、「ABI PRISM 7000 配列検出システム機器」 (Applied Biosystems) を用いて監視する。プライマーは「Primer Express ソフトウェアバージョン 2.0」 (Applied Biosystems) で設計され、Sigma-Genosys から購入した。プライマーの特異性は、BLASTN 検索によって確認する。PCR 混合物は、1×SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)、7.5 pmol の順方向プライマー及び逆方向プライマー、及び 2μl の逆転写反応生成物からなり、総容積は 25μl である。95℃ で 10 分間の最初の変性段階の後、cDNA 生成物を 95℃ で 15 秒、及び 60℃ で 1 分間からなるサイクルを 40 回繰り返して増幅し、その後 60~95℃ のスローランプと規定される解離プロトコルを実施する。非特異的増幅を除外するために、解離プロトコルを用いて、各種遺伝子の PCR 反応で单一のピークを確認する。異なる試料間での cDNA の初期量の変動を標準化するために、ヒト 18S rRNA 及び「Taqman Universal PCR Mastermix no AmpEraseUNG」のために自家製 - アクチンプライマー及び SYBR Green PCR Master Mix、又は「前開発したプライマー及び Taqman プローブミックス」 (全て Appli  
40

ied Biosystems) をメーカーの説明書に従って用いて、ハウスキーピング遺伝子 - アクチン / 18 S rRNAについて同じ cDNA を用いた増幅反応を実施する。残留ゲノム DNA から生じるいかなる汚染を同定するために、各試料について、逆転写酵素を添加しなかった以外は同じ条件下で実施した対照 (- RT) の逆転写反応からの生成物に対する、リアルタイム PCR 反応が含まれる。閾値サイクル値 (Ct) 、すなわち、関心の増幅遺伝子の量が一定の閾値に到達したサイクル数を、各試料について測定する。各試料について、内因性対照 (- アクチン) の Ct 値を標的遺伝子で得た Ct 値から引き算することによって、Ct 値を決定する。活性化されているか否かにかかわらず入手できる 3 つの滑膜分離株の少なくとも 1 つにおいて、このヒットで得た Ct 値が 13.3 のように低いならば、遺伝子は一次ヒト SF で発現されるとみなす。発現プロファイリング実験の結果を、表 5 に要約する。誘起されていない SF 又は 25% 「複合サイトカイン混合物」で誘起された SF における全ての標的遺伝子 (表 1 で列記される) について得られた - アクチンと比較した DCt 値は、この表 5 で示す。この研究で用いたプライマーを、表 2 に列記する。

【表6】

表5—一次滑膜線維芽細胞での標的遺伝子の発現

遺伝子記号	非誘起RASF	誘起RASF
<b>RIPK2</b>	<b>6.7</b>	<b>3.7</b>
<b>PRKCE</b>	<b>8.8</b>	<b>7.8</b>
<b>MST3</b>	<b>6.4</b>	<b>5.2</b>
<b>MAPKAPK5</b>	<b>7.5</b>	<b>6.0</b>
<b>MKNK1</b>	<b>5.9</b>	<b>5.6</b>
<b>CAMK4</b>	<b>14.2</b>	<b>11.6</b>
<b>SEPT1</b>	<b>7.0</b>	<b>7.1</b>
<b>PGPEP1</b>	<b>8.7</b>	<b>8.1</b>
<b>CD72</b>	<b>9.0</b>	<b>9.1</b>
<b>TPST1</b>	<b>5.1</b>	<b>3.1</b>
<b>GPR21</b>	<b>11.5</b>	<b>9.8</b>
<b>USP21</b>	<b>8.1</b>	<b>6.9</b>
<b>FZD4</b>	<b>7.4</b>	<b>7.3</b>
<b>TM7SF1</b>	<b>7.6</b>	<b>7.1</b>
<b>FXYD5</b>	<b>2.8</b>	<b>2.1</b>
<b>RIT1</b>	<b>6.5</b>	<b>4.4</b>
<b>CASP10</b>	<b>14.5</b>	<b>11.9</b>

10

20

30

【0176】

(実施例6A: siRNA技術を用いて同定されたターゲットの試験)

40

S Fにおけるアデノウイルスの発現又は因子の活性化がこれらの細胞のコラーゲン分解能力を増加させるときは、この因子の活性化はこれらの細胞によるコラーゲン分解を増加させるのに十分である。このことは、その因子がMMP1及び/又はコラーゲン分解に関係する他のプロテアーゼの調節にとって重要な情報伝達経路を制御するか、それらに働きかけをしていることを示す。しかし、因子がMMP1の発現又はコラーゲン分解に不可欠であることを確認するために、以下の「逆MMP1アッセイ」実験を実施する。これらの実験は、ターゲットタンパク質の抑制がサイトカイン誘導性のMMP1発現、コラーゲン分解を低減し、したがってECM分解が関与する疾患に治療効力を有するかどうかを判断する上で重要である。

【0177】

50

このアッセイでは、S F 内で過剰発現又は活性化されたときに、M M P 1 を発現するかコラーゲンを分解するこれらの細胞の効力を増加させるターゲット遺伝子に対応する複数の「ノックダウン」ウイルスを用いた。特定の「ノックダウン」ウイルスは、「M M P アッセイ」でFlexSelect収集のスクリーニングを通して同定されない他の3つの標的遺伝子（M A P K A P K 5、F X Y D 5 及びF Z D 4）に対しても設計される。「ノックダウン」ウイルスは、自己相補性一本鎖 s i R N A 分子ポリヌクレオチドの発現を起動し、結果として標的ポリペプチドをコードする対応するm R N A レベルを減少させるアデノウイルスと定義される。s i R N A ポリヌクレオチドは、ターゲットポリペプチドをコードする遺伝子配列に基づいて設計され、s i R N A 設計規則に適合しないヌクレオチド配列と比較して標的配列の発現の減少が改善されたこれらのs i R N A 設計規則に従って選択されるPCT/EP03/04362を参照）。必ずしも全てのs i R N A が与えられたターゲット遺伝子のm R N A レベルの低減に有効ではないので、複数のウイルスを生成して各ターゲット遺伝子について試験する。

10

## 【0178】

S F を384穴又は96穴プレートに接種し、S F M M P 1 発現又はS F コラーゲン分解を調整するプレーヤーとして同定された標的に対して生成されたノックダウンウイルスを様々なM O I で感染させる。感染から5日後の、S F 中の標的m R N A のレベルがノックダウンウイルスによって有効に低減された時点で、S F を関節炎の分野に関連した作動因子又は作動因子の混合物で「活性化」する。非感染S F 、又は対照のノックダウンウイルスに感染したS F では、この作動因子又は作動因子の混合物は、M M P 1 の発現及びコラーゲンを分解させる細胞の能力の増加を導く。

20

## 【0179】

作動因子の適用の2日後に、S F の上清中のM M P 1 のレベルをM M P 1 E L I S A で測定するか、又は、S F の上清によるコラーゲン分解をコラーゲン分解アッセイで測定する。ある標的遺伝子の発現量の減少が、適用したR A 関連の作動因子に対する細胞反応の低下を導くならば、それはS F がこの作動因子に応答するためにこの標的遺伝子が不可欠なことを示す。したがって、この遺伝子のポリペプチド生成物の活性の抑制、又はこの遺伝子の発現の減少は、R A の治療のための適当な手法を表すかもしれない。

30

## 【0180】

偏りのない研究のために、R A の分野に関連した因子の複合混合物を、以下の通りに生成する：代表的なヒト単球細胞系であるT H P - 1 細胞を、ヒト組換えT N F （S i g m a、25 n g / m l ）の存在下で48時間培養する。この細胞系の上清を次に収集して、更なる使用まで-80°で保存する。単球はT N F アルファ作動因子に対して他の様々なサイトカイン及び因子を産生することによって応答するが、そのほとんどは炎症誘発性である。高レベルのT N F アルファに加えて単球（マクロファージ）もR A 患者の罹患関節に存在するので、このように産生された作動因子混合物はR A の分野に関連し、R A 患者の関節に存在する因子混合物を代表するものである。産生された混合物はまさに複合体であって、R A に関係することが未知の因子又は現在まで知られていない因子さえも含むかもしれない。この方法の偏りがない特徴は重要な利点を意味する。

40

## 【0181】

図10の白色バーは、R A の分野に関連するサイトカイン（T N F 、I L 1 及びO S M ）又はそれらの組合せによる処理後のS F M M P 1 の発現の増加を示す。この実験のために、S F を96穴プレートに3000細胞 / ウェルで接種する。24時間後、培地は1% F B S を添加したM 1 9 9 培地に交換する。培地交換の1日後、サイトカイン又はそれらの組合せを、各サイトカインが25 n g / m l の最終濃度になるように培養物に加える。サイトカイン添加の72時間後に上清を収集して、M M P 1 E L I S A で処理する。この実験と平行して、未処理のままの、又は同じサイトカイン若しくはサイトカインの組合せによりM 1 9 9 培地 + 1% F B S 中で48時間処理されたT H P 1 細胞の上清（M 1 9 9 + 1% F B S で2倍に希釈）を用いて、同じプロトコルによりS F を誘起する。これらの試料のM M P 1 レベルは、図10に灰色バーで示す。T N F 処理T H P 1 細胞

50

の上清によるMMP1発現レベルの誘導は、組換えTNF単独による誘導(3倍の誘導)と比較して強く(>4.5倍の誘導)、3つの精製サイトカイン(TNFアルファ、IL1、OSM)の混合物によって得られる誘導のはば5倍に等しい。この結果は、TNF誘導THP1細胞の上清が、MMP1産生の方へSFを誘導する更なる炎症誘発因子を含むことを示す。

#### 【0182】

他の実験では、TNF誘起THP1細胞のSN(上清)に対するSFの反応の抑制を調査する。SFを384穴プレートに1500細胞/ウェルで接種し、感染させずにそのままにするか、対照のノックダウンウイルスAd5-eGFP\_KD又は対照のノックインウイルスAd5-MMP1に感染させる。感染から1日後、古典的な消炎剤デキサメサゾン及びSB203580(p38アルファ及びp38ベータ(TNF及び他のサイトカインに対する細胞の反応に関するキナーゼ類)の阻害剤、Calibiochemで購入、100%DMSOに溶解)を、TNF活性化THP1細胞のSNの2倍希釈液で細胞を誘起する1時間前に、それぞれ100nM及び5μMの最終濃度でSF培養物に加える。処理の72時間後にSNを収集して、MMP1\_ELISAを実施する。結果を図11に示す: SFは感染させずにそのままにするか、対照のノックインウイルス(Ad5-MMP1\_KI)又は対照のノックダウンウイルス(Ad5-eGFP\_KD)に感染させる。MMP1レベルに比例する生の発光シグナルを示す。

10

#### 【0183】

細胞の誘起は、MMP1発現の6倍の増加を導いた。さらに高いMMP1レベルがAd5-MMP1に感染させた試料で測定され、このことはTHP1 SN誘導のMMP1レベルはMMP1\_ELISAを飽和させるものではないことを示す。デキサメサゾン及びSB203580で処理した試料で得られたMMP1レベルは、対照レベルよりもそれぞれ4倍及び3倍低く、このことは設定されたアッセイがSFの炎症性反応の阻害剤の同定に適当なことを示す。SFにおける遺伝子発現の有効な減少は、ノックダウンウイルスを用いるRNAi(RNA干渉)又はsiRNA二重鎖のトランスクレプションで得られる。

20

#### 【0184】

(実施例6B: Ad-siRNAによるターゲット遺伝子のmRNA発現の減少の分析)  
一次ヒト滑膜線維芽細胞を、ゼラチンでコーティングした6穴プレート内の1×Pen/Strep(Invitrogen)を添加した2mlの滑膜増殖培地(Cell Applications Inc.)に接種する(75,000細胞/ウェル)。一晩インキュベーションの後、細胞を対象とする遺伝子を標的にするAd5-siRNAに3000のMOIで感染させる。陰性対照として、他のウェルを、虫ルシフェラーゼ遺伝子を標的にするAd5-siRNAに同じMOIで感染させる。感染から5日後、培地を1%(v/v)熱不活化FBSを加えた2mlのM199培地に更新する。同時に、M199+1%FBSで2倍に希釈した「複合サイトカイン混合物」の溶液の2mlで培地を更新することによって、並行試料を刺激する。48時間後に、「SV Total RNA Isolationキット」(Promega)を用いて全RNAを抽出する。RNAを定量して、実施例5で記載されているようにcDNAを調製する。各試料について、ターゲット及び18S rRNA遺伝子についてリアルタイムPCR反応を実施して、Ct値を実施例5で前述の通り計算する。Ad5-siRNAによる感染の後に内因性のターゲットmRNAのノックダウン率を計算するために、方程式: 相対発現 =  $2^{-\Delta Ct}$  と  $Ct = C_{target} - C_{Ad5-\text{ルシフェラーゼ}-v13-KD \text{に感染させた試料}} - C_{target} (\text{ターゲット特異的Ad5-siRNAに感染させた試料})$  を用いて、先ずAd5-ルシフェラーゼ-v13\_KDウイルスに感染させた対照試料と比較して値を表す。DCt値は、実施例5で示すように-アクチンと比較しての発現を示す。表6は、大部分の選択されたAd5-siRNAによる感染後の、細胞が「複合サイトカイン混合物」で刺激されたかどうかに関係のない、ターゲットmRNAの60%を超える減少を示す。略記号「Rel Expr」は、相対発現を意味する。

30

40

## 【表7】

表6

標的	Ad5-siRNA	作動因子なし				誘起される			
		DCt	DDCt	Rel. Expr.	% KD	DCt	DDCt	Rel. Expr.	% KD
CAMKIV	Ad5-CamK4-v1_KD	16.7	-2.9	0.13	86.6	18.3	-3.8	0.07	92.8
	Ad-ルシフェラーゼ-v13 KD	13.8	0	1.00	0.0	14.5	0	1.00	0.0
PRKCE	Ad5-PRKCE-v11_KD	10	-1.1	0.47	53.3	8.7	-0.9	0.54	46.4
	Ad-ルシフェラーゼ-v13 KD	8.9	0	1.00	0.0	7.8	0	1.00	0.0
MMP1	Ad5-MMP1-v10_KD	13.4	-4.9	0.03	96.7	5	-3.2	0.11	89.1
	Ad-ルシフェラーゼ-v13 KD	8.5	0	1.00	0.0	1.8	0	1.00	0.0
MAPKAPK5	Ad5-MAPKAPK5-v2_KD	9.3	-2.3	0.20	79.7	7.4	-3	0.13	87.5
	Ad5-MAPKAPK5-v8_KD	9.2	-2.2	0.22	78.2	7.3	-2.9	0.13	86.6
	Ad-ルシフェラーゼ-v13 KD	7	0	1.00	0.0	4.4	0	1.00	0.0
RIT	Ad5-RIT-v5_KD	7.0	-1.2	0.44	56.5	6.5	-1.9	0.27	73.2
	Ad-ルシフェラーゼ-v13 KD	5.9	0	1.00	0.0	4.6	0	1.00	0.0
TPST1	Ad5-TPST1-v1_KD	7.3	-0.9	0.54	46.4	8.2	-2.3	0.20	79.7
	Ad-ルシフェラーゼ-v13 KD	6.4	0	1.00	0.0	5.9	0	1.00	0.0
USP21	Ad5-USP21-v3_KD	9.5	-1.2	0.44	56.5	8.9	-1.3	0.41	59.4
	Ad-ルシフェラーゼ-v13 KD	8.3	0	1.00	0.0	7.6	0	1.00	0.0
MST3	Ad5-MST3-v4_KD	6.9	-2	0.25	75.0	7.1	-2.1	0.23	76.7
	Ad5-STK24-v1_KD	7.8	-2.9	0.13	86.6	6.4	-1.4	0.38	62.1
	Ad-ルシフェラーゼ-v13 KD	4.9	0	1.00	0.0	5	0	1.00	0.0

## 【0185】

(実施例6C: Ad-siRNAウイルスは、MAPKAPK5、PRKCE及びCAMK4の発現をタンパク質レベルでノックダウンする働きをする。)

図14は、ヒト細胞でターゲット遺伝子(PRKCE、MAPKAPK5及びCAMK4)の発現をタンパク質レベルで減少させるAd-siRNAの機能を例示する。

MAPKAPK5、PRKCE及びCAMK4を標的にするsiRNAの発現を媒介する組換えアデノウイルスは、国際公開03/020931で記載されている手法によって生成する。それらに基づいてsiRNAが設計され組換えアデノウイルスを生成するために用いたこれらの遺伝子内の標的配列を、表3に列記する。

## 【0186】

MAPKAPK5を標的にするアデノウイルスの機能は、以下の通りに試験する。1日

10

20

30

40

50

目に、500,000の一次ヒトS Fを各ペトリ皿に接種する。1日後、4000のM O I(それらのウイルスについてQ - r t - P C Rによって規定された力価(m 1あたりのウイルス粒子数)に基づく)で、Ad 5 - MAPKAPK5 - v 2 \_ K D、Ad 5 - MAPKAPK5 - v 8 \_ K D又はAd 5 - e G F P - v 5 \_ K Dに細胞を感染させる。7日目に、トリプシンE D T A溶液を用いる標準の手順により、細胞をペトリ皿から分離する。次に10%F B S添加D M E M増殖培地を加えて、トリプシンを中和する。次に、細胞を遠心工程(1000r p m、5分)により収集する。ペレットを、100μlの新しいR I P A緩衝液(50mMトリスp H 7 . 5、150mM N a C l、1%デオキシコレート、1%トリトンX 100、0 . 1% S D S)に溶解する。次に試料を10秒間超音波処理する。次に、業者によって説明されているようにB C Aキット(Pierce、カタログ番号23227)を用い、B S Aを標準として用いて試料のタンパク質濃度を測定する。R I P A緩衝液で19 . 5 μ lに希釈した30 μ gの細胞溶解物に対し、3 . 5 μ lの還元剤(N u P a g e 還元剤N o 1 0、Invitrogen N P 0 0 0 4)及び7 . 5 μ lの試料緩衝液(N u P a g e L D S試料緩衝液、Invitrogen N P 0 0 0 7)を加える。次に30 μ lの試料を5分間沸騰して、10%ポリアクリルアミドゲル(Invitrogen N P 0 3 0 1)上に加える。次にゲルを、1 × M O P S / S D S N u P a g e 流動緩衝液(Invitrogen N P 0 0 1)中で100Vで2時間流す。ゲル上のタンパク質の大きさを推定するために、10 μ lのSeablue Plus Prestained標準(Invitrogen L C 5 9 2 5)を用いる。次にゲル上のタンパク質を、100m lのN u P a g e T r a n s f e r 緩衝液20\*(N P 0 0 0 6 - 1)、400m lメタノール及び1500m lのM i l l i Q水を混ぜることによって調製したトランスファー緩衝液を用いてウェットプロッティング法により、P V D F膜(Invitrogen L C 2 0 0 2)の上に移す。移動の前に、膜はメタノール及びトランスファー緩衝液に先ず浸漬する。移動は、100Vで90分間実施する。次に膜を30分間ブロック緩衝液(PBST(0.1%ツイーン20添加PBS(Sigma、P 1 3 7 9))で調製した2%ブロックパウダー(Amersham、R P N 2 1 0 9))に浸漬してブロックする。ブロックした後に、ブロック緩衝液で250倍に希釈したMAPKAPK5に対するマウスモノクローナル抗体(B D B i o s c i e n c e s、カタログ番号6 1 2 0 8 0)を用いて、免疫検出を実施する。この一次抗体との一晩のインキュベーションの後、膜を3回P B S Tで洗浄して、ブロック緩衝液で50000倍に希釈した二次抗体((ポリクローナルヤギ抗マウスI g、H R P 標識(D A K O P 0 4 4 7))と1時間インキュベートする。次にプロットを3回P B S Tで洗浄し、メーカーの説明に従ってKodakimage r上のE C Lアドバンス(R P N 2 1 0 9、Amersham)で検出を実施する。ウェスタンプロット法は、Ad 5 - e G F P - v 5 \_ K D陰性対照ウイルスに感染した細胞と比較して、Ad 5 - MAPKAPK5 - v 2 \_ K D及びAd 5 - MAPKAPK5 - v 8 \_ K D感染細胞内での低いMAPKAPK5発現量を明らかにした。30 μ g試料の等量の添加は、「ストリッピング手法」(P B S T中で膜を5分間沸騰)によるMAPKAPK5抗体の除去後、-アクチンの免疫検出によって実証する。-アクチンの免疫検出はMAPKAPK5検出のために記載した方法で実施するが、一次抗体として-アクチンに対するヤギポリクローナル抗体(Santa Cruz、S C - 1 6 1 5)を1000倍希釈で、及び二次抗体としてウサギ抗ヤギ抗体を50000倍希釈で用いる。この実験の結果を、図14Cに示す。

#### 【0187】

P R K C Eを標的にするアデノウイルス(Ad 5 - P R K C E - v 1 1 \_ K D)の機能はMAPKAPK5のために上述したものと同じプロトコルに従って試験するが、細胞の感染のために2000のM O Iを用いることが異なる。ウェスタンプロット手法は、MAPKAPK5の検出のために記載したものと同じであるが、P R K C E特異抗体(BD Bio sciences、カタログ番号6 1 0 0 8 5)を250倍希釈で用いた点が異なる。MAPKAPK5の検出に関しては同じ二次抗体を用いる。結果を図14Bに示す。

#### 【0188】

C A M K 4を標的にするアデノウイルスの機能は、以下の通りに試験する：これらのア

10

20

30

40

50

デノウイルスを用いて、以下の通りに 6 穴プレートで培養された H e k 2 9 3 T 細胞を感染させる。1 日目に、4 0 0 0 0 0 の H e k 2 9 3 T 細胞を各 6 穴プレートの D M E M + 1 0 % F B S 内に接種する。1 日後、5 0 0 ( それらのウイルスについて Q - r t - P C R によって定義された力価 ( m lあたりのウイルス粒子数) ) に基づく ) の M O I ( 感染多 10 重度 ) で、A d 5 - C A M K 4 - v 1 \_ K D 、C A M K 4 - C A M K 4 - v 9 \_ K D 又は A d 5 - e G F P - v 5 \_ K D で細胞を感染させる。感染から 1 日後、培地を更新する。7 日目に、トリプシン E D T A 溶液を用いる標準の手順により、細胞をペトリ皿から分離する。細胞ペレット、ゲルの流動 / ブロッティング及び免疫検出手法の取扱いは M A P K A P K 5 のために記載したものと同じであるが、4 0  $\mu$  g のタンパク質をゲル上に加え、C A M K 4 に対するマウスモノクローナル抗体 ( Santa Cruz 、 S c - 1 7 7 6 2 、プロック緩衝液で 1 0 0 倍に希釈 ) を用いることが異なる。ウェスタンプロット法は、A d 5 - e G F P - v 5 \_ K D 陰性対照ウイルスに感染した細胞と比較して、A d 5 - C A M K 4 - v 1 \_ K D 及び A d 5 - C A M K 4 - v 9 \_ K D 感染細胞内での低い C A M K 4 発現量を明らかにする。3 0  $\mu$  g 試料の等量の添加を、「ストリッピング手法」による C A M K 4 抗体の除去後、- アクチンの免疫検出によって実証する。この実験の結果を、図 1 4 A に示す。

これらの実験は、A d - s i R N A ウイルスがヒト細胞で対応する M A P K A P K 5 、C A M K 4 及び P R K C E のポリペプチドの発現レベルを低減する働きをすることを証明する。

#### 【 0 1 8 9 】

( 実施例 6 D : 一次 S F における A d - s i R N A による様々なターゲット遺伝子の発現の減少は、S F 誘導性の M M P 1 発現を抑制する。 )

図 1 2 は、ターゲット遺伝子の発現を低減する A d - s i R N A によるサイトカイン誘導性の S F M M P 1 発現の減少を例示する。これらの A d - s i R N A は、国際公開 03 / 020931 で記載されている手法によって生成する。それらに基づいて s i R N A が設計され組換えアデノウイルスを生成するために用いたこれらの遺伝子内の標的配列 ( K D S E Q ) を、表 3 に列記する。

#### 【 0 1 9 0 】

「 M M P アッセイ 」 における A d 5 - s i R N A の効力は、以下の通りに試験する。1 日目に、S F ( 繙代培養 9 ~ 1 0 ) を 3 0 0 0 細胞 / ウェルの密度で 9 6 穴プレートの完全滑膜増殖培地 ( Cell Applications ) に接種する。1 日後、細胞を次第に多くなる量 ( 図 1 2 A で示す実験では 3 、 7 . 5 、 1 2 又は 1 5  $\mu$  l 、図 1 2 B で示す実験では 3 、 6 、 9 、 1 2 及び、 1 5  $\mu$  l 、また、図 1 2 C 及び 1 2 D で示す実験では 3 、 6 、 9 及び 1 2  $\mu$  l ) の A d - s i R N A で感染させる。以下のウイルスを陰性対照として用いる。A d 5 - e G F P - v 5 \_ K D 、A d 5 - ルシフェラーゼ - v 1 3 \_ K D 及び A d - M 6 P R - v 1 \_ K D 。A d 5 - M M P 1 - v 1 0 \_ K D を陽性対照ウイルスとして用いる。ウイルス負荷を中性ウイルス A d 5 - ルシフェラーゼ - v 1 3 \_ K D の添加によって矯正し、細胞上の最終ウイルス量を各ウェルで 1 5  $\mu$  l にする。この矯正により、観察された影響が細胞に加えられたウイルス負荷の差から生じるものではないことが保証される。次に、活性化段階の前に細胞を 5 日間インキュベートする。この段階は、2 5  $\mu$  l の「複合作動因子」を添加した 7 5  $\mu$  l の M 1 9 9 培地による、各ウェルの増殖培地の置換を含む。活性化段階から 4 8 時間後、上述のように上清を収集してそれに対して M M P 1 E L I S A を実施する。

#### 【 0 1 9 1 】

この実験の結果を、図 1 2 A 、 B 、 C 及び D に示す。2 反復のデータポイントの平均を、これらの図に示す。実験の品質は、M M P 1 自体を標的にする A d - s i R N A ウイルスの効力によって示される。この陽性対照ウイルスは S F による M M P 1 発現を強く低減するが、ルシフェラーゼ、M 6 P R 及び e G F P の発現を標的にするように設計された陰性対照ウイルスは、予想通り M M P 1 の発現レベルに影響しない。ターゲット遺伝子 ( G P R 2 1 、 F Z D 4 、 T M 7 S F 1 、 P G P E P 1 、 S E P T 1 、 C D 7 2 、 F X Y D 5 50

(図12A.) ; PRKCE、CAMK4、MAPKAPK5(図12B.) ; RIPK2、RIT1(図12C.)及びPPST1、USP21及びSTK24(図12D.))に対して設計されたAd-siRNAは、一次ヒトSFによる複合作動因子によって誘導されたMMP1発現の明らかな減少も導く。特定のターゲット遺伝子(例えばCAMK4、MAPKAPK5)については、2つの独立したAd-siRNAがSFによるサイトカイン誘導性のMMP1発現を減少させる効力を示した。図12A及びBではMMP1発現レベルを100%に設定したAd5-ルシフェラーゼ-v13\_KDだけで感染させた試料と比較して表す。

## 【0192】

10

大部分のターゲット遺伝子については、各ターゲット遺伝子について設計された5つのAd-siRNAの少なくとも1つは、SFによるサイトカイン誘導性のMMP1発現の減少を媒介した。MKNK1及びCASPI0の場合はそうではなかった。USP21及びMST3で観察された影響はより弱かった。

これらの遺伝子はSFでMMP1の発現を調整することが示される価値ある薬剤標的を代表することが、この実験から結論することができる。同様に、小分子化合物によるこれらの遺伝子のタンパク質生成物の活性の抑制は、「MMPアッセイ」において「複合サイトカイン」誘導性のMMP1発現を低減することが予想される。小分子化合物によるこれらの遺伝子のタンパク質生成物の活性の抑制は、RAと関連する関節の分解を低減することも予測される。

20

## 【0193】

(実施例6E：一次SFにおけるAd-siRNAによるMAPKAPK5及びCAMK4の発現の減少は、サイトカイン誘導性のコラーゲン分解を抑制する)

この実験では、未変性コラーゲンの分解はMMP1と異なるプロテアーゼの作用によるかもしれない、MMP1\_ELISAよりもさらにストリンジエントである、コラーゲンI型のサイトカイン誘導性の分解を低減するAd-siRNAの能力を測定する。この実験で用いるAd-siRNAを、国際公開03/020931に記載されている手法に従って生成する。この実験で用いる組換えAd-siRNAは、表3で列記した標的遺伝子の標的配列に基づいて生成した。

## 【0194】

30

上記「小型化未変性コラーゲンI型分解アッセイ」におけるAd5-siRNAの効力は、以下の通りに試験する：1日目に、SF(継代培養9~10)を3000細胞/ウェルの密度で96穴プレートの完全滑膜増殖培地(Cell Applications)に接種する。1日後に、細胞を次第に増加する量(3、6、9、12及び15μl)の図で示したAd-siRNAで感染させる。以下のウイルスを陰性対照として用いる：Ad5-eGFP-v5\_KD及びAd5-ルシフェラーゼ-v13\_KD。ウイルス負荷を中性ウイルスAd5-ルシフェラーゼ-v13\_KDの添加によって矯正し、各ウェルに加える最終ウイルス量を15μlにする。この矯正により、観察された影響が細胞に加えられたウイルス負荷の差から生じるものではないことが保証される。次に、活性化段階の前に細胞を5日間インキュベートする。この段階は、15μlの「複合作動因子」を添加した45μlのM199培地による、各ウェルの増殖培地の置換を含む。4日後に上清を収集して、前記プロトコルに従って小型化コラーゲンI型分解アッセイを実施する。この実験の結果を、図15に示す。

40

## 【0195】

ルシフェラーゼ及びeGFPの発現を標的にするように設計された陰性対照ウイルスは、予想通りコラーゲン分解のレベルに影響しない。MAPKAPK5及びCAMK4を標的にするAd-siRNAは、一次ヒトSFによる複合作動因子誘導性のコラーゲン分解の明らかな減少を媒介する。これらの遺伝子は、SFによるコラーゲン分解を調整することが示される価値ある薬剤標的を代表することが、この実験から結論することができる。同様に、小分子化合物によるこれらの遺伝子のタンパク質生成物の活性の抑制は、SFに

50

よる「複合サイトカイン」誘導性のコラーゲン分解を低減することが予想される。小分子化合物によるこれらの遺伝子のタンパク質生成物の活性の抑制は、RAと関連する関節の分解を低減することも予測される。類似した実験では、Ad5-MMP1-v10\_KDウイルスは、SFによるサイトカイン誘導性のコラーゲン分解を大きく低減することが示され、そのことは、MMP1自体がSFによるサイトカイン誘導性のコラーゲン分解を担う主なコラゲナーゼであるという事実を意味する。このように、このことは、RAと関連する軟骨の分解を低減するために、SFによるMMP1発現を調整することが十分であることを意味する。

## 【0196】

(参考文献)

10

- Andreakos E, et al. (2003). *Arthritis Rheum.* 48: 1901-12.  
 Choy EH, Panayi GS. (2001). *N Engl J Med.* 344: 907-16.  
 Cortez-Retamozo V, et al. (2004). *Cancer Res.* 64(8): 2853-7  
 Coussens LM, et al. (2002). *Science* 295: 2387-92.  
 Creemers EE, et al. (2001). *Circ Res.* 2001 89:201-10  
 Cunnane G, et al. (2001). *Arthritis Rheum* 44: 2263-74.  
 Firestein GS. (2003). *Nature.* 423:356-61.  
 Gapski R, et al. (2004). *J Periodontol.* 75:441-52.  
 Gomez-Reino JJ, et al. (2003). *Arthritis Rheum.* 48: 2122-7.  
 Lee DM, Weinblatt ME (2001). *Lancet.* 358: 903-11.  
 Lipinski CA, et al. (2001). *Advanced Drug Delivery Reviews.* 46(1-3): 3-26.  
 Maini RN, et al. (2004). *Arthritis Rheum.* 50: 1051-65.  
 Rosenberg GA. (2002). *Glia.* 39:279-91.  
 Schanstra JP, et al. (2002). *J Clin Invest.* 110:371-9.  
 Smolen JS, Steiner G. (2003). *Nat Rev Drug Discov.* 2: 473-88.  
 Suzuki R, et al. (2004). *Treat Respir Med.* 3:17-27.  
 Vincenti MP, Brinckerhoff CE. (2002). *Arthritis Res* 4:157-64

20

## 【0197】

前述の記載は本来例示的及び説明的であり、本発明及びその好ましい実施形態を例示することが目的であることを、当業者は理解されよう。日常の実験を通して、本発明の精神から逸脱することなく加えることができる明らかな修正及び変更を、当業者は認めるであろう。このように、本発明は、上記の記載によってではなく、前記請求項及びそれらの同等物によって規定されるものとする。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0198】

【図1】正常関節及び関節リウマチにおけるその変化の略図である(Smolen及びSteiner、2003、から)。

【図2】滑膜線維芽細胞によるMMP1発現の特徴を示す図である。パネルAでは、SF溶解物に存在するMMP1のmRNAレベルは、リアルタイムPCRで測定される。これらのMMP1レベルは、同じ試料についてリアルタイムPCRによっても測定される18Sレベルに標準化される。パネルBは、MMP1特異的ポリクローナル抗体を用いて、MMP1タンパク質レベルの検出のためにウェスタンプロット法にかけた上清から検出されるMMP1シグナルを示す。パネルCは、上清を市販のMMP1「活性ELISA」(Amersham Biosciences)にかけた結果を示す。表したシグナルは、試験試料に存在するMMP1活性に比例する。

40

【図3】様々なモデルアデノウイルスで引き起こされた、SFによるMMP1の発現の増加を示す図である。SF上清の非感染性SF及び示したモデル組換えアデノウイルスに感染したSFをMMP1 ELISAにかけ、発光生成基質を用いて測定したMMP1レベルを示す。

【図4】MMP1 ELISAアッセイのために作製された対照プレートのレイアウト及

50

び性能を示す図である。

【図5】1次スクリーン( A )及び再スクリーン( B )で2反復で試験したFlect集団の384のAd-cDNAのサブセットで実施したMMP1 ELSAの性能の代表例を示す図である。

【図6】コラーゲン分解アッセイの規模縮小を示す図である。

【図7】コラーゲン分解アッセイ読み出し情報と、コラーゲン分解の視覚評価との突き合わせを示す図である。

【図8】コラーゲン分解アッセイでの、FITC標識コラーゲンII型及びFITC標識コラーゲンI型の分解の比較を示す図である。

【図9】コラーゲン分解アッセイの性能を示す図である。

10

【図10】様々な複合サイトカイン混合物によるSFの活性化を示す図である。表示の組換えサイトカイン又は表示のサイトカインで活性化されたTHP1細胞の上清を用いて引き起こされてから72時間後に収集されたSFの上清のMMP1 ELSA測定値からの生の発光シグナルを示す。これらの測定値は、MMP1レベルに比例する。

【図11】2つの阻害剤による複合サイトカイン混合物に対するSFの反応の抑制を示す図である。

【図12】様々な「ノックダウン」ウイルスによる感染による、複合サイトカイン混合物への反応としてのSFによるMMP1の発現の抑制を示す図である。

20

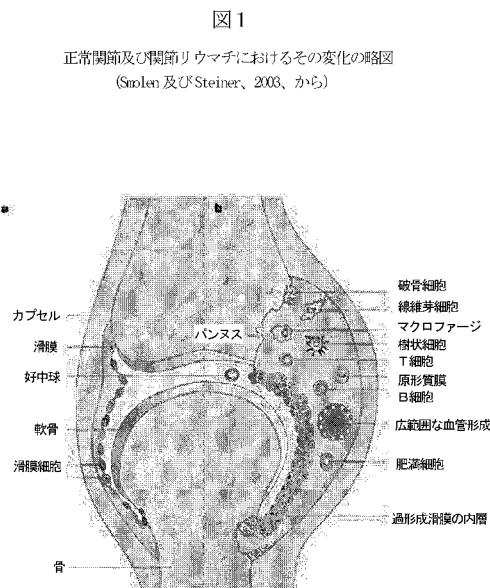
【図13】標的遺伝子のアデノウイルス媒介性発現によるSFによるMMP1の発現の誘導を示す図である。

【図14】これらの遺伝子を標的する様々なAd-siRNAウイルスによる細胞の感染による、MAPKAPK5、PRKCE及びCAMK4の発現のタンパク質レベルでの減少を示す図である。

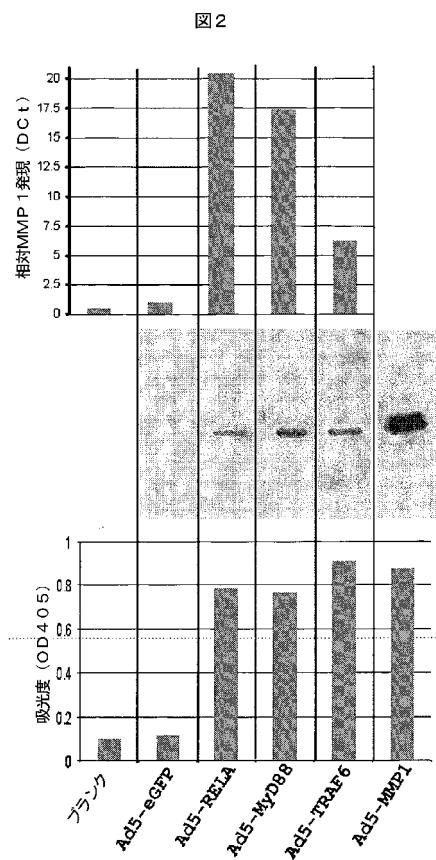
【図15】様々な「ノックダウン」ウイルスによる細胞の感染による、複合サイトカイン混合物への反応としてのSFによるコラーゲン分解の抑制を示す図である。

【図16】ヒト受容体相互作用セリンスレオニンキナーゼ2(RIPK2)mRNAを標的にしたショートヘアピンRNA(shRNA)の構造を示す図である。

【図1】

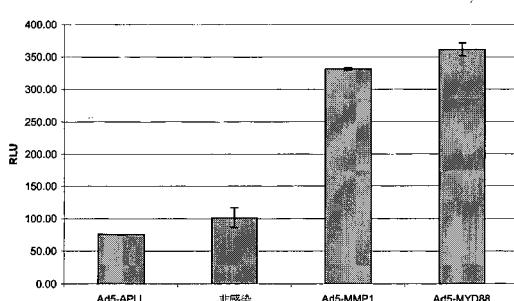


【図2】



【図3】

図3



【図4】

図4 A

A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
B	P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	B1	N3	B1	P1	B1	N1	B1	P2	N2	B1	P3	N3	B1	N3	B1
C	N1	N1	P2	N2	N2	P3	N3	N3	P1	P1	N1	B1	P2	B1	N2	B1	P3	N3	B1	P1	N2	B1	P1	B1
D	N1	N1	P2	N2	N2	P3	N3	N3	P1	P1	N1	B1	P2	B1	N2	B1	P3	N3	B1	P1	N2	B1	P1	B1
E	P2	P2	N2	N2	P3	N3	N3	P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	N3	N3	P1	P1	N1	N1	N1	N1
F	P2	B1	N2	B1	N3	B1	P1	B1	N1	B1	P2	B1	N2	B1	P3	B1	N3	B1	P1	B1	N1	B1	P1	B1
G	N2	N2	P3	N3	N3	P1	P1	N1	P2	P2	N2	P3	N3	P1	P1	N1	N1	P2						
H	N2	N2	P3	N3	N3	P1	P1	N1	P2	P2	N2	P3	N3	P1	P1	N1	N1	P2						
I	P3	P3	N3	P1	P1	N1	N1	N1	P2	P2	N2	P3	P3	N1	P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	N2	N2
J	P3	B1	N3	B1	P1	B1	N1	B1	P2	B1	N2	B1	P3	B1	N3	B1	P1	B1	N1	B1	P2	B1	N2	B1
K	N3	N3	P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	N3	P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	P3
L	N3	N3	P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	N3	P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	P3
M	P1	B1	N1	B1	P2	N2	N2	N2	N3	N3	P1	P1	N1	P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	P3
N	P1	B1	N1	B1	P2	B1	N2	B1	P3	B1	N3	B1	P1	B1	N1	B1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	P3	
O	N1	N1	N1	N1	P2	N2	N2	P3	P3	N3	N3	P1	P1	N1	P1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	N3	N3
P	N1	B1	P2	B1	N2	P3	B1	N3	B1	P1	P1	N1	P1	B1	P2	B1	N2	B1	N3	B1	P1	P1	B1	

図4 B

	平均	標準偏差	カットオフ	陽性率
Ad5-MMP-1	P1	856.0	91.8	100.0 of 48
Ad5-TRA6	P2	187.2	38.9	16.7 of 48
Ad5-MYD88	P3	325.7	96.8	83.3 of 48
Ad5-eGFP	N1	75.0	32.9	0.0 of 48
Ad5-LacZ	N2	60.6	19.7	0.0 of 48
Ad5-PLAP	N3	93.8	32.1	0.0 of 48
ブランコ		89.6	39.5	1.0 of 96
全て陽性		456.3	300.0	
全て陰性		76.4	31.8	219.4

【図5】

【図6】

図5

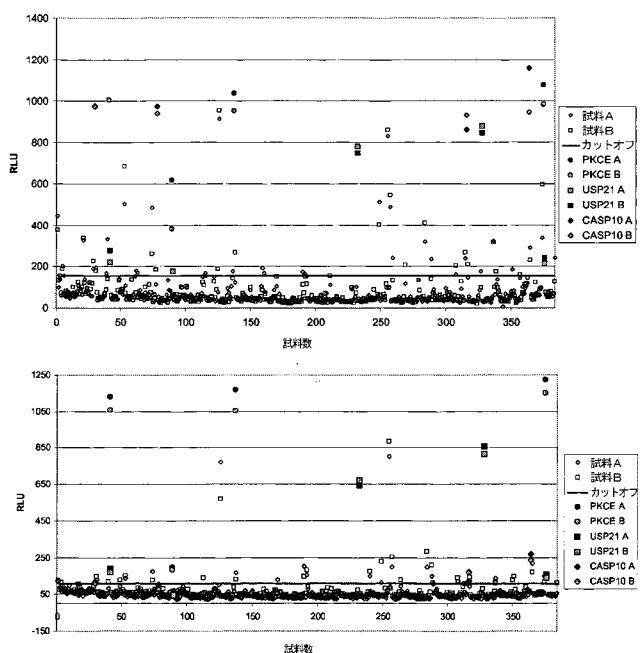
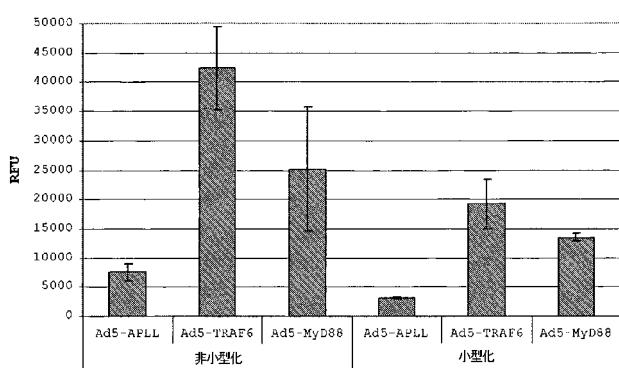


図6

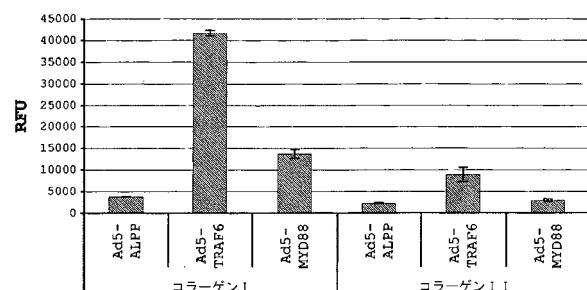
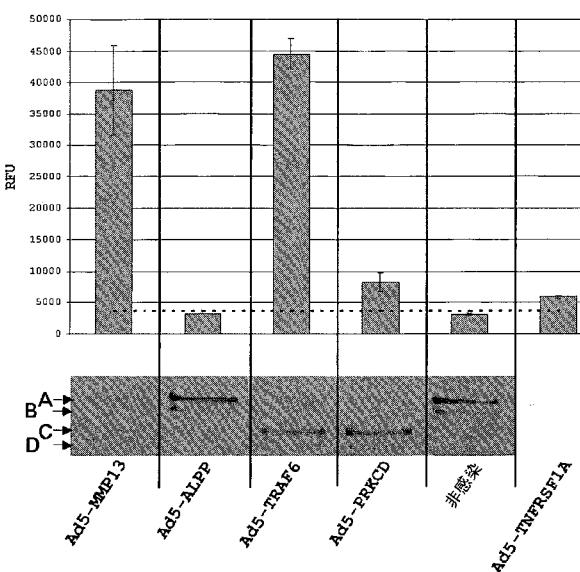


【図7】

【図8】

図7

図8

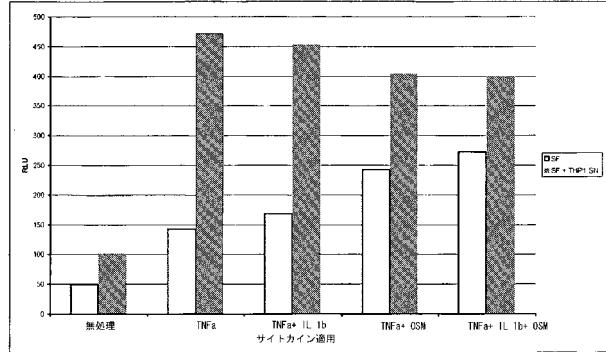
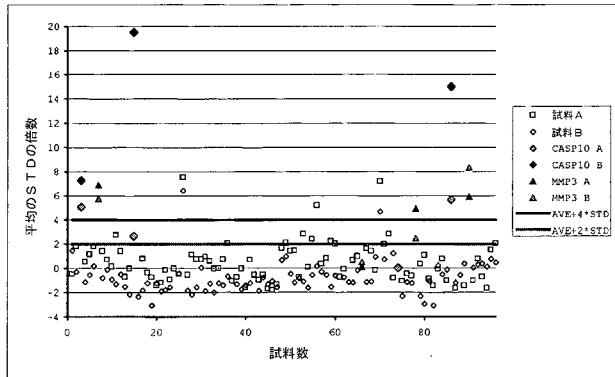


【図 9】

【図 10】

図 9

図 10



【図 11】

【図 12-1】

図 11

図 12

SFにおける様々な標的遺伝子の発現のAd-siRNA媒介性の減少はサイトカインへ応答してMMP1を発現するこれらの細胞の能力を低下させる。

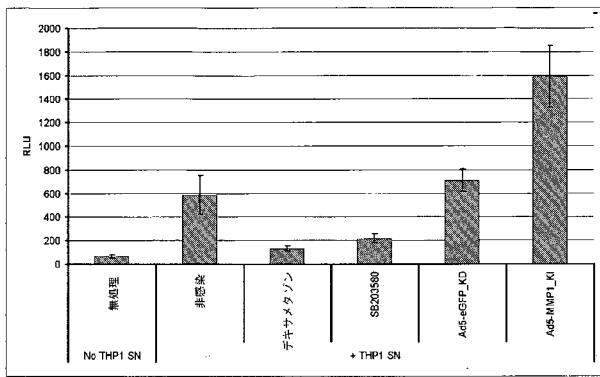
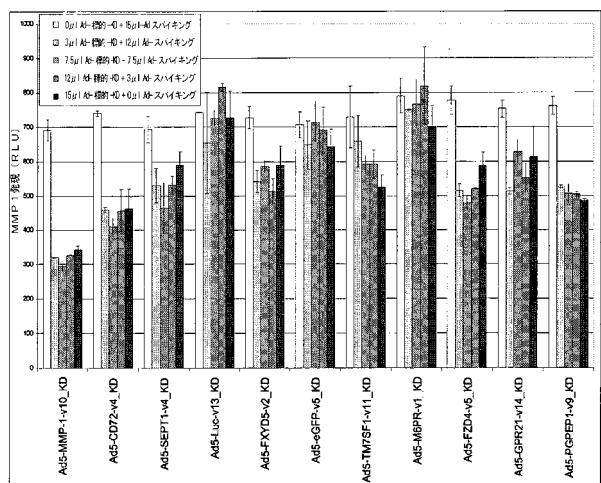


図 12 A



【図 12-2】

【図 12-3】

図 12 B

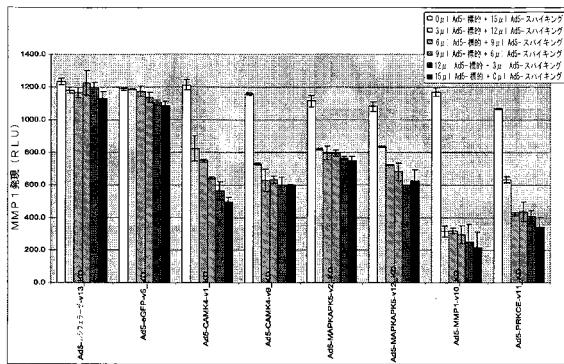


図 12 C

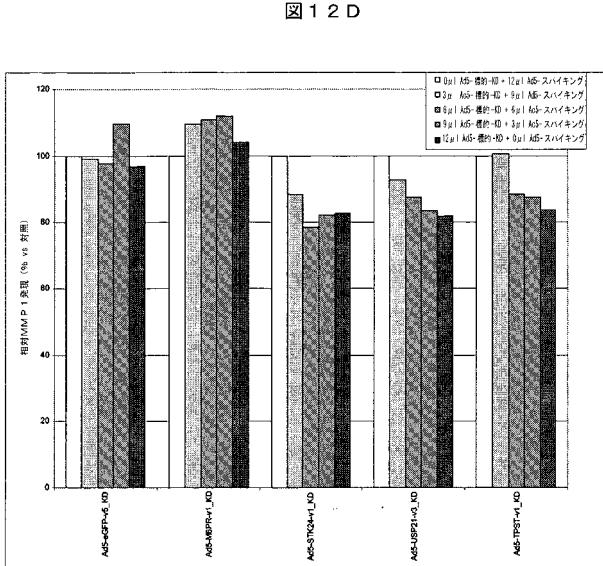
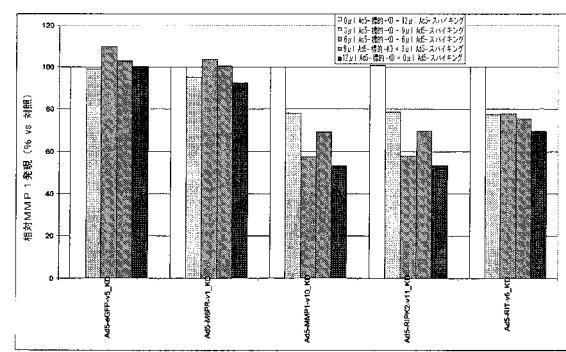


図 12 D



【図 13-1】

【図 13-2】

図 13

一次ヒトS/Fにおける組換えアデノウイルスによる様々な標的遺伝子の発現はMMP 1の発現を誘導する

図 13 A

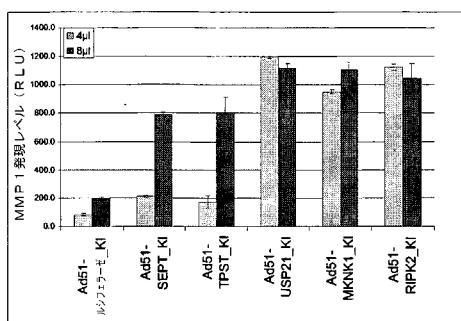


図 13 B

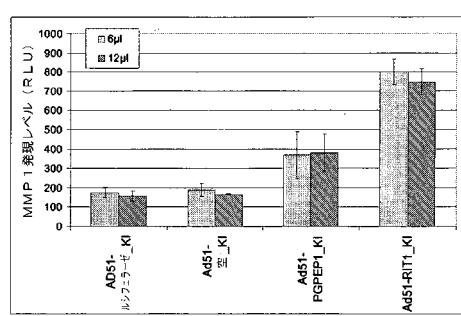


図 13 C

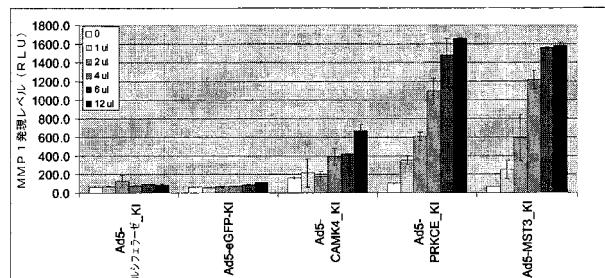
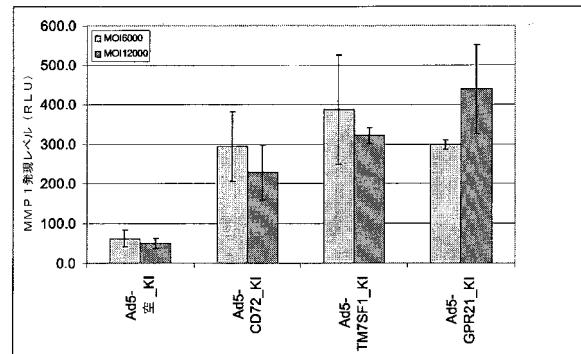
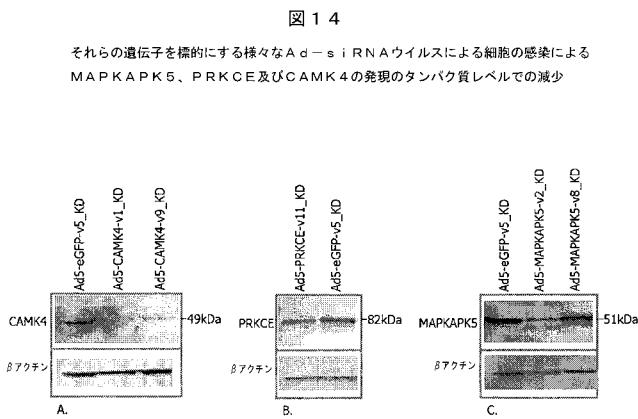


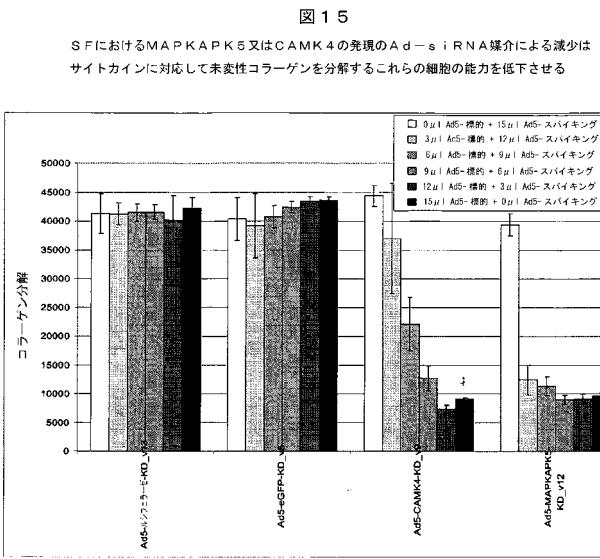
図 13 D



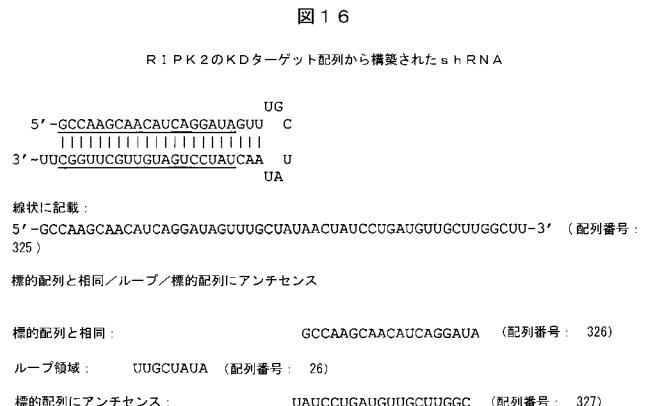
【図 14】



【図 15】



【図 16】



**【配列表】**2008502355000001.xml**【手続補正書】****【提出日】**平成19年6月28日(2007.6.28)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**全文**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】****【請求項1】**

細胞外マトリックス(ＥＣＭ)分解を抑制する化合物の同定方法であって；  
化合物を、配列番号27～51及び232～295からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと接触させること；及び  
細胞外マトリックス(ＥＣＭ)分解に関する化合物・ポリペプチド特性を測定することを含む、前記方法。

**【請求項2】**

前記ポリペプチドがインビトロ無細胞調製物内にある、請求項1記載の方法。

**【請求項3】**

前記ポリペプチドが哺乳動物細胞に存在する、請求項1記載の方法。

**【請求項4】**

前記特性が、前記ポリペプチドに対する前記化合物の結合親和性である、請求項1記載の方法。

**【請求項5】**

前記特性が、細胞外マトリックス(ＥＣＭ)分解の指標となる生化学的マークを産生する生物学的経路の活性化である、請求項3記載の方法。

**【請求項6】**

前記指標がMMP1である、請求項5記載の方法。

**【請求項7】**

前記ポリペプチドが、配列番号27～51からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項6記載の方法。

**【請求項8】**

前記化合物が、市販のスクリーニングライブラリーの化合物、及び配列番号27～51及び232～295からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと結合親和性を有する化合物からなる群から選択される、請求項1記載の方法。

**【請求項9】**

前記化合物がファージディスプレイライブラリー又は抗体断片ライブラリーのペプチドである、請求項2記載の方法。

**【請求項10】**

アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム及び低分子干渉RNA(siRNA)からなる群から選択される細胞外マトリックス(ＥＣＭ)分解を抑制する薬剤であって、配列番号1～25からなる群から選択される核酸配列の約17から約30の連続したヌクレオチドの天然ポリヌクレオチド配列と相補的であるか、又はそれから操作された核酸配列を含む、前記方法。

**【請求項11】**

哺乳動物細胞のベクターが前記薬剤を発現する、請求項10記載の薬剤。

**【請求項12】**

前記ベクターがアデノウイルス、レトロウイルス、アデノ関連ウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルス又はセンダイウイルスのベクターである、請求項11記載の薬剤。

**【請求項 13】**

前記アンチセンスポリヌクレオチド及び前記 s i R N A が、センス鎖に相補的な 17 ~ 25 のヌクレオチドのアンチセンス鎖を含み、前記センス鎖が、配列番号 1 ~ 25 からなる群から選択される核酸配列の 17 ~ 25 の連続したヌクレオチドから選択される、請求項 10 記載の薬剤。

**【請求項 14】**

前記 s i R N A が前記センス鎖をさらに含む、請求項 13 記載の薬剤。

**【請求項 15】**

前記センス鎖が配列番号 52 ~ 175 からなる群から選択される、請求項 14 記載の薬剤。

**【請求項 16】**

前記 s i R N A が、前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖を接続するループ領域をさらに含む、請求項 15 記載の薬剤。

**【請求項 17】**

前記ループ領域が、配列番号 26 で規定される核酸配列を含む、請求項 16 記載の薬剤。

**【請求項 18】**

前記薬剤が、配列番号 52 ~ 175 からなる群から選択される核酸配列を含むアンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム又は s i R N A である、請求項 17 記載の薬剤。

**【請求項 19】**

前記薬剤が、配列番号 52 ~ 175 からなる群から選択される核酸配列を含むアンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム又は s i R N A である、請求項 18 記載の薬剤。

**【請求項 20】**

治療的有効量の請求項 10 記載の薬剤を、医薬として許容し得る担体との混合物として含む、E C M 分解抑制医薬組成物。

**【請求項 21】**

前記対象に請求項 20 記載の医薬組成物を投与することを含む、細胞外マトリックス ( E C M ) 分解が関与する疾患の、その疾患に患っているか感受性の対象における治療及び / 又は予防方法。

**【請求項 22】**

前記疾患が関節変性疾患である、請求項 22 記載の方法。

**【請求項 23】**

前記疾患が関節リウマチである、請求項 23 記載の方法。

**【請求項 24】**

細胞外マトリックス ( E C M ) 分解が関与する疾患の治療及び / 又は予防のための医薬品の製造における、請求項 10 から 19 記載の薬剤の使用。

**【請求項 25】**

前記疾患が、関節の変性疾患及び炎症性疾患からなる群から選択される、請求項 24 記載の使用。

**【請求項 26】**

前記疾患が関節リウマチである、請求項 24 又は 25 記載の使用。

**【請求項 27】**

治療的有効量の請求項 10 記載のマトリックスメタロプロテイナーゼ抑制剤を投与することを含む、異常なマトリックスメタロプロテイナーゼ活性を特徴とする病態の治療方法。

**【請求項 28】**

M M P 1 の異常な細胞発現が関与する疾患から選択される病態の治療方法であって、請求項 10 記載の薬剤のマトリックスメタロプロテイナーゼを抑制する治療的有効量を投与することを含む、前記方法。

対象において細胞外マトリックス ( E C M ) 分解に関係する病的状態又はその病態に対

する感受性を診断するための方法であって、前記対象から得られる生体試料中に存在する配列番号27～51からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの第1の量を測定することと、前記第1の量を健康者集団で測定されるポリペプチド量の範囲と比較することとを含み、健康者で測定した量の範囲と比較した前記生体試料中のポリペプチドの量の増加は前記病的状態の存在を示すものである方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

(発明の要約)

本発明は、細胞外マトリックス(ＥＣＭ)の分解を抑制する化合物の同定方法に関するものであり、この方法は、化合物を、配列番号27～51(以下、「ターゲット」)からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド及びその断片と、前記ポリペプチドとその化合物との結合を可能にする条件下で接触させること、及び細胞外マトリックス(ＥＣＭ)分解に関連した化合物・ポリペプチド特性を測定することを含む。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

本方法の態様としては、配列番号232～295からなる群から選択されるものを含むターゲット及びその断片のポリペプチドを用いる化合物のインビトロアッセイ、並びに、ターゲット抑制に続いて効力の指標、例えば、ターゲット発現レベル及び／又はマトリックスメタロプロテイナーゼ1レベルを観察する細胞アッセイがある。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

本発明は、関節リウマチのような慢性関節変性疾患の治療又は予防に役立つ、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム及び低分子干渉RNA(siRNA)の群から選択されるポリヌクレオチドを含む発現抑制剤、前記薬剤を含む医薬組成物にも関し、前記ポリヌクレオチドは配列番号27～51及び232～295からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする天然ポリヌクレオチド配列と相補的であるか、又はそれから操作された核酸配列を含む。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

本発明の他の態様は、その疾患に患っているか感受性の対象において、発現抑制剤のターゲット発現を抑制するのに有効な量を含む医薬組成物を投与することによる、細胞外マトリックス(ＥＣＭ)の分解が関与する病態の治療方法又は予防方法である。

本発明の他の態様は、細胞外マトリックス(ＥＣＭ)の分解を特徴とする病状に関する診断のための、対象におけるターゲット発現レベル指標の測定を含む方法である。

**【手続補正6】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0036**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0036】**

用語「対象」は、ヒト及び他の哺乳動物を含む。

用語「ターゲット」又は「ターゲット類」は、本アッセイに従って MMP1 レベルの誘導に関与していることが同定されたタンパク質を意味する。好ましいターゲットは、表 1 の配列番号 27～51 と同定される。より好ましいターゲットは、表 1 で同定されるキナーゼ、プロテアーゼ及び G タンパク質結合型受容体 (GPCR) である。

**【手続補正7】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0040**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0040】**

本発明は、細胞外マトリックスの分解を抑制する薬剤候補化合物のアッセイ方法に関するものであり、化合物を配列番号 27～51 及び 232～295 のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、前記ポリペプチドとその化合物との結合を可能にする条件下で接触させること、及び前記ポリペプチドと前記化合物との間の複合体の形成を検出することを含む。複合体形成を測定する好ましい 1 手段は、前記ポリペプチドとの前記化合物の結合親和性を測定することである。

**【手続補正8】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0042**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0042】**

上で言及した化合物ポリペプチド特性は、ターゲットの発現に関連し、当業者によって選択される測定可能な現象である。測定可能な特性は、例えば、ポリペプチドターゲットのペプチドドメイン、例えば配列番号 232～295 との結合親和性でよく、又は、細胞外マトリックス分解のいくつかの生化学的マーカーレベルのいずれか 1 つのレベルでよい。細胞外マトリックス分解は、例えばその過程で誘導される酵素のレベル、例えば MMP 及び / 又はカテーテシンポリペプチドの発現を測定することによって測定することができる。

**【手続補正9】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0043**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0043】**

本発明の好ましい一実施形態では、ターゲットポリペプチドは表 1 のリストに記載されている配列番号 27～51 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【表1】

表1

ヒット ナン バー	遺伝子名	記載	Ref/SEQ アクセション (DNA)	配列 番号 D N A	Ref/SEQ アクセション (タンパク 質)	配列番号 タンパク 質	タンパク 質 クラス	配列番 号KDタ ーゲット
H31-290	RIPK2	ヒト受容体相互作用セリンスレオニンキナーゼ2(RIPK2)、mRNA。	NM_003821	1	NP_003812	27	キナーゼ	52-56 168-170
H31-035	PRKCE	ヒトプロテインキナーゼC、イプシロン(PRKCE)、mRNA。	NM_005400	2	NP_005391	28	キナーゼ	57-61 167
H31-319	MST3	Manning ら、Science、からのヒトキナーゼSK246	SK246	3		29	キナーゼ	62-66 164
			NM_003576	4		30	キナーゼ	62-66 164
H34-088	MAPKAPK5	ヒトマイトジエン活性化プロテインキナーゼ活性化プロテインキナーゼ5(MAPKAPK5)、転写産物変異体1、mRNA。	NM_003668	5	NP_003659	31	キナーゼ	67-71 156-161
			NM_139078	6		32	キナーゼ	72-76 156-161
H34-087	MKNK1	ヒトMAPキナーゼ相互作用セリン／スレオニンキナーゼ1(MKNK1)、mRNA。	NM_003684	7	NP_003675	33	キナーゼ	77-81 162-163
H31-031	CAMK4	ヒトカルシウム／カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIV(CAMK4)、mRNA。	NM_001744	8	NP_001735	34	キナーゼ	82-86 148
	CAMK4		SK061	9		35	キナーゼ	87-91 171
H31-347	SEPT1	ヒトセプチン1(SEPT1)、mRNA。	NM_052838	10	NP_443070	36	分泌される	92-96
H31-450	PGPEP1	ヒトピログルタミルペプチダーゼI。	NM_017712	11		37	プロテアーゼ	92-96 165-166
H31-351	CD72	ヒトCD72抗原(CD72)、mRNA。	NM_001782	12	NP_001773	38	分泌される	97-101
H31-301	TPST1	ヒトチロシルプロテインスルホトランスフェラーゼ1(TPST1)、mRNA。	NM_003596	13	NP_003587	39	酵素	102-106 150,173
H31-242	GPR21	ヒトGタンパク質結合型受容体21(GPR21)、mRNA。	NM_005294	14	NP_005285	40	GPCR	107-111 155
H31-047	USP21	ヒトユビキチン特異的プロテアーゼ21(USP21)、転写産物変異体1、mRNA。	NM_012475	15	NP_036607	41	プロテアーゼ	112-116 174-175
	USP21	ヒトユビキチン特異的プロテアーゼ21(USP21)、転写産物変異体2、mRNA。	NM_016575	16	NP_057656	42	プロテアーゼ	114-118 174-175
H34-092	FZD4	ヒトfrizzledホモログ4(Drosophila)(FZD4)、mRNA。	NM_012193	17	NP_036325	43	GPCR	119-123 152-154
			GAL_GPCR 0379	18	GAL_GPCR 0379	44	GPCR	119-123
H31-180	TM7SF1	ヒト膜貫通7スープーファミリーメンバー1(腎臓でアップレギュレーションされる)(TM7SF1)、mRNA。	NM_003272	19	NP_003263	45	GPCR	124-128 172
H31-384	FXYD5	イオン移動調節因子5を含むヒトFXYDドメイン(FXYD5)、	NM_014164	20	NP_054883	46	分泌される	129-133 151

		mRNA。						
H31-360	RIT1	CAAX1 のないヒト Ras 様 (RIT1)、mRNA。	NM_006912	21	NP_008843	<u>47</u>	酵素	<u>134-138</u>
H31-049	CASP10	ヒトカスパーゼ10、アポトーシス関連のシステインプロテアーゼ(CASP10)、転写産物変異体A、mRNA。	NM_001230	22	NP_001221	<u>48</u>	プロテアーゼ	<u>139-143</u> <u>146</u>
	CASP10	ヒトカスパーゼ10、アポトーシス関連のシステインプロテアーゼ(CASP10)、転写産物変異体B、mRNA。	NM_032974	23	NP_116756	<u>49</u>	プロテアーゼ	<u>140-141</u> <u>143-146</u> <u>149</u>
	CASP10	ヒトカスパーゼ10、アポトーシス関連のシステインプロテアーゼ(CASP10)、転写産物変異体C、mRNA。	NM_032976	24	NP_116758	<u>50</u>	酵素	<u>139-143</u> <u>146</u>
	CASP10	ヒトカスパーゼ10、アポトーシス関連のシステインプロテアーゼ(CASP10)、転写産物変異体D、mRNA。	NM_032977	25	NP_116759	<u>51</u>	プロテアーゼ	<u>140-143</u> <u>146,149</u>
		ループ						26

## 【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0047

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0047】

本アッセイ方法は、1つ以上のターゲットタンパク質又はその断片を用いて、インピトロで実行することができる。選択されたターゲットの例示的なタンパク質ドメイン断片のアミノ酸配列は下記の表1Aのリストに記載された配列番号232～295である。

【表2】

表1A

アクセション	名前	タンパク質部分	配列番号 タンパク質部分
NM_005294	GPR21	細胞外ドメイン	232
NM_005294	GPR21	膜貫通領域	233
NM_005294	GPR21	細胞内ドメイン	234
NM_005294	GPR21	膜貫通領域	235
NM_005294	GPR21	細胞外ドメイン	236
NM_005294	GPR21	膜貫通領域	237
NM_005294	GPR21	細胞内ドメイン	238
NM_005294	GPR21	膜貫通領域	239
NM_005294	GPR21	細胞外ドメイン	240
NM_005294	GPR21	膜貫通領域	241
NM_005294	GPR21	細胞内ドメイン	242
NM_005294	GPR21	膜貫通領域	243
NM_005294	GPR21	細胞外ドメイン	244
NM_005294	GPR21	膜貫通領域	245
NM_005294	GPR21	細胞内ドメイン	246
NM_012193	FZD4	細胞外ドメイン	247
NM_012193	FZD4	膜貫通領域	248
NM_012193	FZD4	細胞内ドメイン	249
NM_012193	FZD4	膜貫通領域	250
NM_012193	FZD4	細胞外ドメイン	251
NM_012193	FZD4	膜貫通領域	252
NM_012193	FZD4	細胞内ドメイン	253
NM_012193	FZD4	膜貫通領域	254
NM_012193	FZD4	細胞外ドメイン	255
NM_012193	FZD4	膜貫通領域	256
NM_012193	FZD4	細胞内ドメイン	257
NM_012193	FZD4	膜貫通領域	258
NM_012193	FZD4	細胞外ドメイン	259
NM_012193	FZD4	膜貫通領域	260
NM_012193	FZD4	細胞内ドメイン	261
NM_003272	TM7SF1	細胞外ドメイン	262
NM_003272	TM7SF1	膜貫通領域	263
NM_003272	TM7SF1	細胞内ドメイン	264
NM_003272	TM7SF1	膜貫通領域	265
NM_003272	TM7SF1	細胞外ドメイン	266
NM_003272	TM7SF1	膜貫通領域	267
NM_003272	TM7SF1	細胞内ドメイン	268
NM_003272	TM7SF1	膜貫通領域	269
NM_003272	TM7SF1	細胞外ドメイン	270
NM_003272	TM7SF1	膜貫通領域	271
NM_003272	TM7SF1	細胞内ドメイン	272
NM_003272	TM7SF1	膜貫通領域	273
NM_003272	TM7SF1	細胞外ドメイン	274
NM_003272	TM7SF1	膜貫通領域	275
NM_003272	TM7SF1	細胞内ドメイン	276
NM_001782	CD72	細胞内ドメイン	277
NM_001782	CD72	膜貫通領域	278
NM_001782	CD72	細胞外ドメイン	279
NM_014164	FXYD5	細胞外ドメイン	280
NM_014164	FXYD5	膜貫通領域	281
NM_014164	FXYD5	細胞内ドメイン	282
GAL_GPCR0379	FZD4	細胞内ドメイン	283
GAL_GPCR0379	FZD4	膜貫通領域	284

GAL_GPCR0379	FZD4	細胞外ドメイン	<u>285</u>
GAL_GPCR0379	FZD4	膜貫通領域	<u>286</u>
GAL_GPCR0379	FZD4	細胞内ドメイン	<u>287</u>
GAL_GPCR0379	FZD4	膜貫通領域	<u>288</u>
GAL_GPCR0379	FZD4	細胞外ドメイン	<u>289</u>
GAL_GPCR0379	FZD4	膜貫通領域	<u>290</u>
GAL_GPCR0379	FZD4	細胞内ドメイン	<u>291</u>
GAL_GPCR0379	FZD4	膜貫通領域	<u>292</u>
GAL_GPCR0379	FZD4	細胞外ドメイン	<u>293</u>
GAL_GPCR0379	FZD4	膜貫通領域	<u>294</u>
GAL_GPCR0379	FZD4	細胞内ドメイン	<u>295</u>

## 【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0 0 5 2】

本発明者らは、「ノックイン」ライブラリーを用いて E C M 分解に関係する標的遺伝子を同定した。この種のライブラリーは、細胞内の特定の遺伝子及び対応する遺伝子産物の発現及び活性を誘導する組換えアデノウイルスによって c D N A 分子が細胞内に形質導入されるスクリーンである。ウイルスベクター内の各 c D N A は、特定の天然遺伝子に対応する。E C M 分解を刺激する c D N A を同定することによって、特定の遺伝子発現と E C M 分解との間の直接的な相互関係を導くことができる。ノックインライブラリーを用いて同定したターゲット遺伝子（そのタンパク質発現産物は本明細書では「ターゲット」ポリペプチドと称す）は、次に、E C M 分解を阻止するために用いることができる化合物を同定するための本発明の方法で用いる。実際は、表 3 のリストに記載した配列（配列番号5 2 ~ 1 7 5）を含む s h R N A 化合物及びそれに対応するアンチセンス配列は、これらのターゲット遺伝子の発現及び／又は活性を抑制し、細胞の E C M 分解活性を低減することから、E C M 分解におけるこれらのターゲット遺伝子の役割が確認される。

## 【表3】

表3.

これらの遺伝子の発現のRNAiベースのダウンレギュレーションで用いるSFの  
コラーゲン溶解性活性のモジュレータとして同定された遺伝子の  
コード配列内で選択された標的配列のリスト。

ディスプレイID	アクセション	名前	siRNA名	配列番号
CAMK4	NM_001744	A150100-CAMK4_v1	NM_001744_idx445	<u>83</u>
CAMK4	NM_001744	A150100-CAMK4_v10	NM_001744_idx1045	<u>148</u>
CAMK4	NM_001744	A150100-CAMK4_v11	NM_001744_idx1186	<u>85</u>
CAMK4	NM_001744	A150100-CAMK4_v2	NM_001744_idx258	<u>86</u>
CAMK4	NM_001744	A150100-CAMK4_v3	NM_001744_idx668	<u>84</u>
CAMK4	NM_001744	A150100-CAMK4_v9	NM_001744_idx427	<u>82</u>
CASP10	NM_001230	A150100-CASP10_v1	NM_001230_idx934	<u>146</u>
CASP10	NM_001230	A150100-CASP10_v10	NM_001230_idx1532	<u>142</u>
CASP10	NM_001230	A150100-CASP10_v13	NM_001230_idx1111	<u>143</u>
CASP10	NM_001230	A150100-CASP10_v2	NM_001230_idx382	<u>141</u>
CASP10	NM_001230	A150100-CASP10_v8	NM_032974_idx317	<u>140</u>
CASP10	NM_032974	A150100-CASP10_v1	NM_001230_idx934	<u>146</u>
CASP10	NM_032974	A150100-CASP10_v11	NM_032974_idx1674	<u>144</u>
CASP10	NM_032974	A150100-CASP10_v12	NM_032974_idx1829	<u>145</u>
CASP10	NM_032974	A150100-CASP10_v13	NM_001230_idx1111	<u>143</u>
CASP10	NM_032974	A150100-CASP10_v2	NM_001230_idx382	<u>141</u>
CASP10	NM_032974	A150100-CASP10_v7	NM_032974_idx981	<u>149</u>
CASP10	NM_032974	A150100-CASP10_v8	NM_032974_idx317	<u>140</u>
CASP10	NM_032976	A150100-CASP10_v1	NM_001230_idx934	<u>146</u>
CASP10	NM_032976	A150100-CASP10_v10	NM_001230_idx1532	<u>142</u>
CASP10	NM_032976	A150100-CASP10_v13	NM_001230_idx1111	<u>143</u>
CASP10	NM_032976	A150100-CASP10_v2	NM_001230_idx382	<u>141</u>
CASP10	NM_032976	A150100-CASP10_v8	NM_032974_idx317	<u>140</u>
CASP10	NM_032977	A150100-CASP10_v1	NM_001230_idx934	<u>146</u>
CASP10	NM_032977	A150100-CASP10_v10	NM_001230_idx1532	<u>142</u>
CASP10	NM_032977	A150100-CASP10_v13	NM_001230_idx1111	<u>143</u>

CASP10	NM_032977	A150100-CASP10_v2	NM_001230_idx382	<u>141</u>
CASP10	NM_032977	A150100-CASP10_v7	NM_032974_idx981	<u>149</u>
CASP10	NM_032977	A150100-CASP10_v8	NM_032974_idx317	<u>140</u>
CD72	NM_001782	A150100-CD72_v2	NM_001782_idx376	<u>100</u>
CD72	NM_001782	A150100-CD72_v3	NM_001782_idx742	<u>97</u>
CD72	NM_001782	A150100-CD72_v4	NM_001782_idx975	<u>150</u>
CD72	NM_001782	A150100-CD72_v5	NM_001782_idx1049	<u>98</u>
CD72	NM_001782	A150100-CD72_v6	NM_001782_idx1054	<u>101</u>
CD72	NM_001782	A150100-CD72_v7	NM_001782_idx901	<u>99</u>
FXYD5	NM_014164	A150100-FXYD5_v2	NM_014164_idx224	<u>132</u>
FXYD5	NM_014164	A150100-FXYD5_v3	NM_014164_idx417	<u>131</u>
FXYD5	NM_014164	A150100-FXYD5_v4	NM_014164_idx436	<u>129</u>
FXYD5	NM_014164	A150100-FXYD5_v5	NM_014164_idx542	<u>133</u>
FXYD5	NM_014164	A150100-FXYD5_v6	NM_014164_idx603	<u>130</u>
FXYD5	NM_014164	A150100-FXYD5_v7	NM_014164_idx672	<u>151</u>
FZD4	NM_012193	A150100-C(27)-3BETA-HSD_v3	NM_025193_idx1374	<u>152</u>
FZD4	NM_012193	A150100-FZD4_v10	NM_012193_idx849	<u>122</u>
FZD4	NM_012193	A150100-FZD4_v5	NM_012193_idx481	<u>120</u>
FZD4	NM_012193	A150100-FZD4_v6	NM_012193_idx1570	<u>153</u>
FZD4	NM_012193	A150100-FZD4_v7	NM_012193_idx745	<u>123</u>
FZD4	NM_012193	A150100-FZD4_v8	NM_012193_idx1160	<u>154</u>
FZD4	NM_012193	A150100-FZD4_v9	NM_012193_idx534	<u>121</u>
GPR21	NM_005294	A150100-GPR21_v10	NM_005294_idx638	<u>108</u>
GPR21	NM_005294	A150100-GPR21_v11	NM_005294_idx936	<u>109</u>
GPR21	NM_005294	A150100-GPR21_v12	NM_005294_idx168	<u>155</u>
GPR21	NM_005294	A150100-GPR21_v13	NM_005294_idx868	<u>107</u>
GPR21	NM_005294	A150100-GPR21_v14	NM_005294_idx988	<u>111</u>
GPR21	NM_005294	A150100-GPR21_v9	NM_005294_idx161	<u>110</u>
MAPKAPK5	NM_003668	A150100-MAPKAPK5_v1	oKD102	<u>70</u>
MAPKAPK5	NM_003668	A150100-MAPKAPK5_v10	NM_003668_idx856	<u>156</u>
MAPKAPK5	NM_003668	A150100-MAPKAPK5_v11	NM_003668_idx1542	<u>76</u>

MAPKAPK5	NM_003668	A150100-MAPKAPK5_v12	NM_003668_idx456	<u>157</u>
MAPKAPK5	NM_003668	A150100-MAPKAPK5_v13	NM_003668_idx609	<u>158</u>
MAPKAPK5	NM_003668	A150100-MAPKAPK5_v2	oKD103	<u>159</u>
MAPKAPK5	NM_003668	A150100-MAPKAPK5_v8	oKD104	<u>160</u>
MAPKAPK5	NM_003668	A150100-MAPKAPK5_v9	NM_003668_idx686	<u>161</u>
MAPKAPK5	NM_139078	A150100-MAPKAPK5_v1	oKD102	<u>70</u>
MAPKAPK5	NM_139078	A150100-MAPKAPK5_v10	NM_003668_idx856	<u>156</u>
MAPKAPK5	NM_139078	A150100-MAPKAPK5_v11	NM_003668_idx1542	<u>76</u>
MAPKAPK5	NM_139078	A150100-MAPKAPK5_v12	NM_003668_idx456	<u>157</u>
MAPKAPK5	NM_139078	A150100-MAPKAPK5_v13	NM_003668_idx609	<u>158</u>
MAPKAPK5	NM_139078	A150100-MAPKAPK5_v2	oKD103	<u>159</u>
MAPKAPK5	NM_139078	A150100-MAPKAPK5_v8	oKD104	<u>160</u>
MAPKAPK5	NM_139078	A150100-MAPKAPK5_v9	NM_003668_idx686	<u>161</u>
MKNK1	NM_003684	A150100-MKNK1_v1	oKD110	<u>162</u>
MKNK1	NM_003684	A150100-MKNK1_v14	oKD109	<u>81</u>
MKNK1	NM_003684	A150100-MKNK1_v15	oKD108	<u>77</u>
MKNK1	NM_003684	A150100-MKNK1_v16	NM_003684_idx384	<u>79</u>
MKNK1	NM_003684	A150100-MKNK1_v17	NM_003684_idx549	<u>80</u>
MKNK1	NM_003684	A150100-MKNK1_v18	NM_003684_idx1216	<u>163</u>
MST3	SK246	A150100-MST3_v2	SK246_idx413	<u>66</u>
MST3	SK246	A150100-MST3_v3	SK246_idx508	<u>65</u>
MST3	SK246	A150100-MST3_v4	SK246_idx918	<u>63</u>
MST3	SK246	A150100-STK24_v1	NM_003576_idx300	<u>62</u>
MST3	SK246	A150100-STK24_v2	NM_003576_idx950	<u>164</u>
MST3	SK246	A150100-STK24_v3	NM_003576_idx1020	<u>64</u>
PGPEP1	NM_017712	A150100-FLJ20208_v10	NM_017712_idx176	<u>94</u>
PGPEP1	NM_017712	A150100-FLJ20208_v11	NM_017712_idx404	<u>92</u>
PGPEP1	NM_017712	A150100-FLJ20208_v5	NM_017712_idx289	<u>96</u>
PGPEP1	NM_017712	A150100-FLJ20208_v6	NM_017712_idx164	<u>93</u>
PGPEP1	NM_017712	A150100-FLJ20208_v7	NM_017712_idx496	<u>165</u>
PGPEP1	NM_017712	A150100-FLJ20208_v8	NM_017712_idx198	<u>95</u>

PGPEP1	NM_017712	A150100-FLJ20208_v9	NM_017712_idx298	<u>166</u>
PRKCE	NM_005400	A150100-PRKCE_v10	NM_005400_idx760	<u>59</u>
PRKCE	NM_005400	A150100-PRKCE_v11	NM_005400_idx1276	<u>60</u>
PRKCE	NM_005400	A150100-PRKCE_v2	NM_005400_idx1240	<u>57</u>
PRKCE	NM_005400	A150100-PRKCE_v7	NM_005400_idx1109	<u>58</u>
PRKCE	NM_005400	A150100-PRKCE_v8	NM_005400_idx2050	<u>61</u>
PRKCE	NM_005400	A150100-PRKCE_v9	NM_005400_idx148	<u>167</u>
RIPK2	NM_003821	A150100-RIPK2_v1	oKD111	<u>52</u>
RIPK2	NM_003821	A150100-RIPK2_v10	NM_003821_idx993	<u>168</u>
RIPK2	NM_003821	A150100-RIPK2_v11	NM_003821_idx1416	<u>169</u>
RIPK2	NM_003821	A150100-RIPK2_v2	oKD112	<u>54</u>
RIPK2	NM_003821	A150100-RIPK2_v3	oKD113	<u>55</u>
RIPK2	NM_003821	A150100-RIPK2_v9	NM_003821_idx612	<u>170</u>
RIT1	NM_006912	A150100-RIT_v2	NM_006912_idx247	<u>137</u>
RIT1	NM_006912	A150100-RIT_v3	NM_006912_idx536	<u>134</u>
RIT1	NM_006912	A150100-RIT_v4	NM_006912_idx622	<u>136</u>
RIT1	NM_006912	A150100-RIT_v5	NM_006912_idx824	<u>138</u>
RIT1	NM_006912	A150100-RIT_v6	NM_006912_idx263	<u>135</u>
SEPT1	NM_052838	A150100-SEPT1_v2	NM_052838_idx305	<u>171</u>
SEPT1	NM_052838	A150100-SEPT1_v3	NM_052838_idx329	<u>89</u>
SEPT1	NM_052838	A150100-SEPT1_v4	NM_052838_idx480	<u>90</u>
SEPT1	NM_052838	A150100-SEPT1_v5	NM_052838_idx677	<u>88</u>
SEPT1	NM_052838	A150100-SEPT1_v6	NM_052838_idx954	<u>87</u>
SEPT1	NM_052838	A150100-SEPT1_v7	NM_052838_idx1218	<u>91</u>
MST3	NM_003576	A150100-MST3_v2	SK246_idx413	<u>66</u>
MST3	NM_003576	A150100-MST3_v3	SK246_idx508	<u>65</u>
MST3	NM_003576	A150100-MST3_v4	SK246_idx918	<u>63</u>
MST3	NM_003576	A150100-STK24_v1	NM_003576_idx300	<u>62</u>
MST3	NM_003576	A150100-STK24_v2	NM_003576_idx950	<u>164</u>
MST3	NM_003576	A150100-STK24_v3	NM_003576_idx1020	<u>64</u>
TM7SF1	NM_003272	A150100-TM7SF1_v11	NM_003272_idx637	<u>128</u>

TM7SF1	NM_003272	A150100-TM7SF1_v12	NM_003272_idx673	<u>125</u>
TM7SF1	NM_003272	A150100-TM7SF1_v13	NM_003272_idx764	<u>172</u>
TM7SF1	NM_003272	A150100-TM7SF1_v14	NM_003272_idx775	<u>127</u>
TM7SF1	NM_003272	A150100-TM7SF1_v9	NM_003272_idx275	<u>124</u>
TPST1	NM_003596	A150100-TPST1_v1	NM_003596_idx722	<u>106</u>
TPST1	NM_003596	A150100-TPST1_v2	NM_003596_idx1262	<u>104</u>
TPST1	NM_003596	A150100-TPST1_v3	NM_003596_idx425	<u>102</u>
TPST1	NM_003596	A150100-TPST1_v5	NM_003596_idx1229	<u>103</u>
TPST1	NM_003596	A150100-TPST1_v6	NM_003596_idx1260	<u>105</u>
TPST1	NM_003596	A150100-TPST1_v7	NM_003596_idx1444	<u>173</u>
USP21	NM_012475	A150100-USP21_v1	NM_012475_idx1574	<u>112</u>
USP21	NM_012475	A150100-USP21_v13	NM_012475_idx741	<u>117</u>
USP21	NM_012475	A150100-USP21_v14	NM_012475_idx928	<u>174</u>
USP21	NM_012475	A150100-USP21_v15	NM_012475_idx682	<u>114</u>
USP21	NM_012475	A150100-USP21_v16	NM_012475_idx733	<u>118</u>
USP21	NM_012475	A150100-USP21_v17	NM_012475_idx1573	<u>113</u>
USP21	NM_012475	A150100-USP21_v2	NM_012475_idx1224	<u>116</u>
USP21	NM_012475	A150100-USP21_v3	NM_012475_idx269	<u>115</u>
USP21	NM_012475	A150100-mmUsp21_v5	NM_013919_idx1120	<u>175</u>
USP21	NM_016572	A150100-USP21_v13	NM_012475_idx741	<u>117</u>
USP21	NM_016572	A150100-USP21_v14	NM_012475_idx928	<u>174</u>
USP21	NM_016572	A150100-USP21_v15	NM_012475_idx682	<u>114</u>
USP21	NM_016572	A150100-USP21_v16	NM_012475_idx733	<u>118</u>
USP21	NM_016572	A150100-USP21_v2	NM_012475_idx1224	<u>116</u>
USP21	NM_016572	A150100-USP21_v3	NM_012475_idx269	<u>115</u>
USP21	NM_016572	A150100-mmUsp21_v5	NM_013919_idx1120	<u>175</u>

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0053

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0053】

表1で示すターゲット遺伝子は、異なる種類のポリペプチドをコードすることを理解さ

れたい。例えば、本明細書で開示される(表1)配列番号40、43～45で示すターゲットは、G P C Rである。これらのG P C Rのそれぞれはエフェクタータンパク質を活性化することができ、それにより細胞内の二次伝達物質レベルの変化が生じる。G P C Rの活性は、そのような二次伝達物質の活性レベルを測定することによって測定することができる。細胞内の2つの重要で有用な二次伝達物質は、環状AMP(cAMP)及びCa<sup>2+</sup>である。活性レベルは当業者に公知の方法を用い、ELISA若しくは放射能技術により直接、又はCa<sup>2+</sup>と接触すると蛍光又はルミネッセンスシグナルを生成する基質を用いることにより、或いはリポーター遺伝子分析によって間接に測定することができる。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0055

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0055】

本明細書で開示されるターゲットの多くは、配列番号27～34で示されるターゲットなどのキナーゼ及びホスファターゼである。化合物の存在下又は非存在下で実施される、基質のリン酸化をキナーゼ又はホスファターゼで測定することによるキナーゼ又はホスファターゼの活性を測定する特定の方法は、当技術分野で公知であり、一部は実施例で記載される。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0056

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0056】

配列番号37、41、42、48、49及び51で表されるターゲットは、プロテアーゼ類である。プロテアーゼであるポリペプチドによる基質の切断を測定することによる化合物による抑制を測定する特定の方法は、当技術分野で公知である。

ポリペプチドを発現する細胞は自然にポリペプチドを発現する細胞でよく、又は先に述べたように、細胞はポリペプチドを発現するようにトランスフェクションすることができることを理解されたい。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0058

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0058】

本発明は、さらに、細胞外マトリックス分解を抑制する化合物の方法同定に関し：

(a) 化合物を、配列番号27～51及び232～295からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと接触させることと；

(b) ポリペプチドへの化合物の結合親和性を測定することと；

(c) 前記ポリペプチドを発現する哺乳動物細胞の集団を少なくとも10マイクロモルの結合親和性を示す化合物と接触させることと；

(d) 細胞外マトリックス分解を抑制する化合物を同定することを含む。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0074

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0074】

本発明の他の実施形態は、発現抑制剤がアンチセンスRNA、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)、配列番号1～25によってコードされるポリリボヌクレオチドを切断するリボザイム、配列番号1～25に対応するポリリボヌクレオチドの一部に十分に相同意であり、その結果そのsiRNA、好ましくはshRNAがターゲットポリペプチドへのターゲットポリリボヌクレオチドの翻訳に干渉する低分子干渉RNA(siRNA、好ましくはshRNA)を発現する核酸である方法に関するものである。好ましくは、発現抑制剤はアンチセンスRNA、リボザイム、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド、又はsiRNA、好ましくはshRNAであり、配列番号1～25からなる群から選択されたヌクレオチド配列の少なくとも約17から約30の連続したヌクレオチドと相補するポリリボヌクレオチド配列を含む。より好ましくは、発現抑制剤はアンチセンスRNA、リボザイム、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド、又はsiRNA、好ましくはshRNAであり、配列番号1～25からなる群から選択されたヌクレオチド配列の少なくとも約17から約25の連続したヌクレオチドと相補するポリリボヌクレオチド配列を含む。特別な実施形態は、配列番号52～175からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列と相補するポリリボヌクレオチド配列を含む。

#### 【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0083

【補正方法】変更

【補正の内容】

#### 【0083】

特に好ましい抑制剤は、低分子干渉RNA(siRNA、好ましくは小さなヘアピンRNA、「shRNA」)である。siRNA、好ましくはshRNAは、抑制されたRNAに配列が相同意である二重鎖RNA(dsRNA)によって、遺伝子抑制の転写後過程を媒介する。本発明によるsiRNAは、配列番号1～25で記載される配列の群、好ましくは配列番号52～175で記載される配列の群から選択される連続した17～25のヌクレオチド配列と相補的又は相同な17～25のヌクレオチドのセンス鎖、並びにこのセンス鎖に相補的な17～25のヌクレオチドのアンチセンス鎖を含む。最も好ましいsiRNAは、互いに100パーセント相補的なセンス鎖及びアンチセンス鎖、及びターゲットポリヌクレオチド配列を含む。好ましくは、siRNAはセンス鎖及びアンチセンス鎖を結合するループ領域をさらに含む。

#### 【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0087

【補正方法】変更

【補正の内容】

#### 【0087】

これらの組成物及び方法の具体的な態様は、ターゲットポリペプチドと選択的に相互作用することができる細胞内結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの誘導された発現による、ターゲットポリペプチドの発現のダウンレギュレーション又は阻止に関する。細胞内結合タンパク質には、それが発現される細胞内のポリペプチドと選択的に相互作用又は結合して、ポリペプチドの機能を中和することができる任意のタンパク質が含まれる。好ましくは、細胞内結合タンパク質は、配列番号27～51のターゲットポリペプチドのエピトープに、好ましくは配列番号232～295のドメインに結合親和性を有する中和抗体又は中和抗体の断片である。より好ましくは、細胞内結合タンパク質は单鎖抗体である。

#### 【手続補正19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0088

【補正方法】変更

**【補正の内容】****【0088】**

この組成物の具体的な実施形態は、アンチセンスRNA、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)、配列番号27～51をコードするポリリボヌクレオチドを切断するリボザイム、配列番号1～25に対応するポリリボヌクレオチドの一部に十分に相同意あり、その結果そのsiRNAがターゲットポリペプチドへのターゲットポリリボヌクレオチドの翻訳に干渉する低分子干渉RNA(siRNA)からなる群から選択される発現抑制剤を含む。

**【手続補正20】****【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0122****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0122】**

本発明の他の態様は、対象で細胞外マトリックス分解を伴う病的状態又はその病態への感受性を診断するための方法であって、生体試料中の配列番号27～51からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの量を測定することと、その量を健康対象におけるそのポリペプチドの量と比較することとを含む方法に関し、このとき、健康対象と比較してのポリペプチド量の増加はその病的状態の存在の指標となる。

本発明は、以下の図及び実施例でさらに記述される。

**【手続補正21】****【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0125****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0125】****(A)陰性对照ウイルス：**

A d 5 - L a c Z : 国際公開02/070744でp I P s p A d A p t 6 - l a c Zと記載される。

A d 5 - A L P P : 1.9kbインサートは、p G T 6 5 - P L A P (Invitrogen)からN s i Iによる消化によって単離され、平滑末端化され、E c o R Iで消化され、E c o R I及びH p a Iで消化されたp I P s p A d A p t 6へクローニ化される。

A d 5 - e G F P : 国際公開02/070744でp I P s p A d A p t 6 - E G F Pと記載される。

A d 5 - e G F P \_ K D : 標的配列：G C T G A C C C T G A A G T T C A T C (配列番号179)。国際公開03/020931で記載されているようにS a p I部位を用いてベクターへクローニ化され、ウイルスが生成される。

A d 5 - ルシフェラーゼ\_K D\_v 1 3 : 標的配列：G C T G A C C C T G A A G T T C A T C (配列番号180)。国際公開03/020931で記載されているようにS a p I部位を用いてベクターへクローニ化され、ウイルスが生成される。

A d 5 - M 6 P R \_ K D \_ v 1 : 標的配列：G C T G A C C C T G A A G T T C A T C (配列番号180)。国際公開03/020931で記載されているようにS a p I部位を用いてベクターへクローニ化され、ウイルスが生成される。

**【手続補正22】****【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0126****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0126】****(B)陽性对照ウイルス：**

**A d 5 - R E L A :** R E L A をコードする c D N A は、ヒト胎盤 c D N A ライブラリーでの以下のプライマーを用いた P C R で得られる：

上流側： G C G A A G C T T G C G G C A T G G A C G A A C T G T ( 配列番号 1 8 1 ) 及び

下流側： G C G G G A T C C C A G G C G T C A C C C C C T T A G ( 配列番号 1 8 2 )。

1 6 8 1 b p の D N A インサートが生成され、その 5' 配列は N M \_ 0 2 1 9 7 5 に応する。プライマーは、 P C R 生成物が H i n d I I - B a m H I クローニングによって p I P s p A d a p t 6 ベクターに挿入できるように設計される。

【手続補正 2 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 7】

**A d 5 - M M P 1 :** p I P s p A d a p t 6 プラスミドにクローン化された M M P 1 をコードする c D N A は、ヒト胎盤 c D N A ライブラリー（国際公開02/070744を参照）から、古典的なフィルターコロニーハイブリダイゼーション手法によって単離する。ヒト胎盤 c D N A ライブラリーは細菌に形質転換されて、寒天プレート上へプレーティングされる。何千もの個々のコロニーを選択して（Q-pix装置（Genetix）を用いる）、寒天プレート上で再整列させる。細菌を成長させた後、これらのプレートをハイブリダイゼーションフィルター上へオーバーレイする。これらのフィルターを対象に、 M M P 1 特異的プローブによる古典的なハイブリダイゼーション法を実施する。このプローブは、以下のプライマーを用いて胎盤 c D N A ライブラリーの P C R によって得られる：

上流側： G T T C T G G G G T G T G G T G T C T C A C A G C ( 配列番号 1 8 3 )  
、及び

下流側： C A A A C T G A G C C A C A T C A G G C A C T C C ( 配列番号 1 8 4 )  
。

ハイブリダイゼーション後のフィルター上の陽性シグナル点のそれに対応する位置の細菌コロニーを選択して、プラスミド調製のために用いる。5' 配列の検証は、インサートの 5' 配列は N M \_ 0 0 2 4 2 1 に応することを確認する。

【手続補正 2 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 8】

**A d 5 - T R A F 6 :** T R A F 6 をコードする c D N A は、 M M P 1 で記載したものと同じコロニーハイブリダイゼーション手法によって単離される。この T R A F 6 特異的プローブは、以下のプライマーを用いて胎盤 c D N A ライブラリーの P C R によって得られる：

上流側： C C A G T C T G A A A G T G A C T G C T G T G G ( 配列番号 1 8 5 )  
、及び

下流側： C A A C T G G A C A T T T G T G A C C T G C A T C C ( 配列番号 1 8 6 )  
。

ハイブリダイゼーション後のフィルター上の陽性シグナル点のそれに対応する位置の細菌コロニーを選択して、プラスミド調製のために用いる。5' 配列の検証は、インサートの 5' 配列は N M \_ 0 0 4 6 2 0 . 2 に対応することを確認する。

【手続補正 2 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0132

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0132】

A d 5 - M M P 1 \_ K D \_ v 1 0 : 標的配列： G C T G A C C C T G A A G T T C A T C (配列番号187)。国際公開03/020931で記載されているようにS a p I部位を用いてベクターへクローン化され、ウイルスが生成される。

【手続補正26】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0136

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0136】

## 【表4】

表2. 本明細書で用いられるプライマー及びそれらの配列のリスト。

ヒットナンバー	プライマーナンバー	プライマーパターン	配列番号
NA	pAdapt_FW	GGTGGGAGGTCTATATAAGC	188
	pAdapt_REV	GGACAAACCACAACAGAATGC	189
NA	MMP2_For	CCCCAGGCACTGGTGTTG	190
	MMP2_Rev	ACGGACCACTTGGCCTTCT	191
NA	MMP1_For	CCGGTTTTCAAAGGAAATAAGTAC	192
	MMP1_Rev	TTCACAGTTCTAGGGAAGCCAAAG	193
H31-031	CAMK4_For	CAGCATCCGTGGGTACACA	194
	CAMK4_Rev	TTCACCGCTGCCTTAAGCTT	195
H31-035	PRKCE_For	TGAGGACGACCTATTGAGTCCAT	196
	PRKCE_Rev	GGGATTCTCGTCATGAAAGCT	197
H31-047	USP21_For	CTGCGAAGCTGTGAATCCTACTC	198
	USP21_Rev	GGCATCCTGCTGGCTGTATC	199
H31-049	CASP10_For	TCCTGGCAGAACTCCTCTATATCATAC	200
	CASP10_Rev	TGACAGTTCGTAGAGCAGGTTCTA	201
H31-180	TM7SF1_For	GAACTTGTACTTCACGCAGGTG	202
	TM7SF1_Rev	CAACAGGAAAACAAGGCTGATG	203
H31-242	GPR21_For	TGCGTGGTCCCTTCTTATCAC	204
	GPR21_Rev	GCCATGGAGACGCTCTTCAG	205
H31-290	RIPK2_For	CATTAAATGAACTCCTACATAGGAAAAC	206
	RIPK2_Rev	AGGGCAATTTCATGCAGGAT	207
H31-301	TPST1_For	GGAGTGTCTCTGTCAAAAGTGG	208
	TPST1_Rev	ACCCATTGATAGAGCTCCTACATT	209
H31-319	MST3_For	GACATTAAAGCGGCCAACGT	210
	MST3_Rev	CTCGGGTGCCATCCAGAA	211
H31-347	SEPT1_For	GCGAGAAAGACGAAGAGCTGC	212
	SEPT1_Rev	GCCTGGCTCTGCTGCATT	213
H31-351	CD72_For	CAGTGAAATTATCCACAAATCACAC	214
	CD72_Rev	AGAGCTGAGGCCAGTCCAATAT	215

H31-360	RIT_For	GGTGTAGGGAAGAGTGCCATGA	<u>216</u>
	RIT_Rev	GCATCTTCAATGGTGGGATCA	<u>217</u>
H31-384	FXYD5_For	TGGTCGCCTGTGTCTTCTCA	<u>218</u>
	FXYD5_Rev	GTGGTATCTTCAACGTCTGTCCTC	<u>219</u>
H31-450	Q9ESW8_For	GAGGAAGGCCGTGGTAGTGA	<u>220</u>
	Q9ESW8_Rev	CTCAACCGGAATCTCGTACACA	<u>221</u>
H34-067	FZD6_For	TGGGAGATAACTGGGTCTCTGAT	<u>222</u>
	FZD6_Rev	AAGCCAATTCTGGTCGAGCTT	<u>223</u>
H34-087	MKNK1_For	AGGGAGCCTATGCCAAAGTTC	<u>224</u>
	MKNK1_Rev	CTCGATGATTTGACGGCATAAC	<u>225</u>
H34-088	MAPKAPK5_For	GAGGAAGCTCCTGAAGGTCAAAC	<u>226</u>
	MAPKAPK5_Rev	CAACCACTGCCTTGTCCATC	<u>227</u>
H34-092	FZD4_For	AGCCAGCTGCAGTTCTCCTT	<u>228</u>
	FZD4_Rev	TCACAGCGTCTTGAUTGAAAG	<u>229</u>

## 【手続補正27】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0164

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0164】

これらのヒットA d - c D N Aに関する最終的な品質管理として、それらの同一性を配列分析によって確認される。配列分析のための手順は、以下の通りである。96穴プレートでP E R . E 2 Aプロデューサー細胞を用いてヒットウイルスを増殖させる。P E R . E 2 A細胞は、96穴プレート内の180μlの培地に、40,000細胞／ウェルの密度で接種する。細胞は、39度で一晩、CO<sub>2</sub>濃度が10%の加湿インキュベータでインキュベートする。1日後、ヒットA d - c D N Aを含むFlexSelect原液からの粗細胞溶解液の1μlで細胞を感染させる。細胞は、細胞変性効果（一般的に感染後7日に出現する細胞の膨張及び球状化）が現れるまで、さらに34、10%のCO<sub>2</sub>濃度でインキュベートする。上清を収集して、ウイルスの粗溶解物をプロテイナーゼKで処理する。12μlの粗溶解物を、無菌のP C R管内で4μlの緩衝液（1mg / mlのプロテイナーゼK（Roche Molecular Biochemicals、カタログ番号745723）及び0.45%ツイーン20（Roche Molecular Biochemicals、カタログ番号1335465）を添加した、MgCl<sub>2</sub>を含む1×Expand High Fidelity緩衝液（Roche Molecular Biochemicals、カタログ番号1332465）に加える。これらを55度で2時間インキュベートした後、95度で15分の不活化段階が続く。P C R反応については、1μlの溶解液を5μlのMgCl<sub>2</sub>を含む10×Expand High Fidelity緩衝液、0.5μlのd N T P混合液（各d N T Pが10mM）、1μlの「順方向プライマー」（10mM原液、配列：5' G G T G G G A G G T C T A T A T A A G C；配列番号230）、1μlの「逆方向プライマー」（10mM原液、配列：5' G G A C A A C C A C A A C T A G A A T G C；配列番号231）、0.2μlのExpand High Fidelity D N Aポリメラーゼ（3.5U / μl、Roche Molecular Biochemicals）及び41.3μlのH<sub>2</sub>Oから構成されるP C

Rマスター混合液に加える。

【手続補正28】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0196

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0196】

(参考文献)

Andreakos Eらの論文 (2003). *Arthritis Rheum.* 48: 1901-12.

Choy EH, Panayi GSの論文 (2001). *N Engl J Med.* 344: 907-16.

Cortez-Retamozo Vらの論文 (2004). *Cancer Res.* 64(8): 2853-7

Coussens LMらの論文 (2002). *Science* 295: 2387-92.

Creemers EEらの論文 (2001). *Circ Res.* 2001 89:201-10

Cunnane Gらの論文 (2001). *Arthritis Rheum* 44: 2263-74.

Firestein GSの論文 (2003). *Nature.* 423:356-61.

Gapski Rらの論文 (2004). *J Periodontol.* 75:441-52.

Gomez-Reino JJらの論文 (2003). *Arthritis Rheum.* 48: 2122-7.

Lee DM, Weinblatt MEの論文 (2001). *Lancet.* 358: 903-11.

Lipinski CAらの論文 (2001). *Advanced Drug Delivery Reviews.* 46(1-3): 3-26.

Maini RNらの論文 (2004). *Arthritis Rheum.* 50: 1051-65.

Rosenberg GAの論文 (2002). *Glia.* 39:279-91.

Schanstra JPらの論文 (2002). *J Clin Invest.* 110:371-9.

Smolen JS, Steiner Gの論文 (2003). *Nat Rev Drug Discov.* 2: 473-88.

Suzuki Rらの論文 (2004). *Treat Respir Med.* 3:17-27.

Vincenti MP, Brinckerhoff CEの論文 (2002). *Arthritis Res* 4:157-64

【手続補正29】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図16

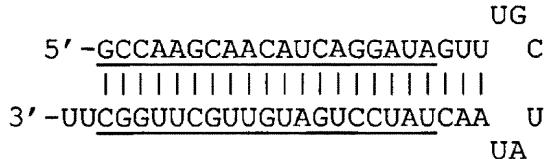
【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 16】

## 図 16

R I P K 2 の K D ターゲット配列から構築された s h R N A



線状に記載：

5' -GCCAAGCAACAUCAGGAUAGUU U G C U A U A C U A U C C U A U C A A -3' (配列番号 : 176)

標的配列と相同／ループ／標的配列にアンチセンス

標的配列と相同：

GCCAAGCAACAUCAGGAUA (配列番号 : 177)

ループ領域：

U U G C U A U A (配列番号 : 26)

標的配列にアンチセンス：

U A U C C U G A U G U U G C U U G G C (配列番号 : 178)

【手続補正 30】

【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】

2008502355000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2005/052754
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12N15/11		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, EMBASE, BIOSIS, PAJ, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THOME M ET AL: "Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1." CURRENT BIOLOGY : CB. 16 JUL 1998, vol. 8, no. 15, 16 July 1998 (1998-07-16), pages 885-888, XP002370217 ISSN: 0960-9822 abstract  _____ -/-_	1-4, 7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the International filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
8 August 2006	27/09/2006	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Weinberg, S	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2005/052754
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RAY ALPANA ET AL: "Induction of matrix metalloproteinase 1 gene expression is regulated by inflammation-responsive transcription factor SAF-1 in osteoarthritis." ARTHRITIS AND RHEUMATISM. JAN 2003, vol. 48, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 134-145, XP002370218 ISSN: 0004-3591 abstract	1-28
X	WO 03/027229 A (ISIS PHARMACEUTICALS, INC; WARD, DONNA, T; COWSERT, LEX, M) 3 April 2003 (2003-04-03) abstract	10,12, 13,15, 18-20
Y	KOBAYASHI K ET AL: "RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 416, 14 March 2002 (2002-03-14), pages 194-199, XP002957712 ISSN: 0028-0836 abstract page 196, right-hand column	1-28
Y	ELLIOTT SARAH F ET AL: "Bcl-3 is an interleukin-1-responsive gene in chondrocytes and synovial fibroblasts that activates transcription of the matrix metalloproteinase 1 gene." ARTHRITIS AND RHEUMATISM. DEC 2002, vol. 46, no. 12, December 2002 (2002-12), pages 3230-3239, XP002372708 ISSN: 0004-3591 abstract page 3231 page 3235	1-28
Y	MCCARTHY JV ET AL: "RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 273, no. 27, 3 July 1998 (1998-07-03), pages 16968-16975, XP002078583 ISSN: 0021-9258 abstract page 16972	1-28
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2005/052754

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>WO 2004/092413 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS PHARMA GMBH; BODIAN, DALE, LESLEY; DAOUI, SHERI) 28 October 2004 (2004-10-28)  page 32  page 38  page 47 – page 49  page 111 – page 112; table V</p> <p>ANONYMOUS: "MAPKAPK5"  SIRNA DATABASE, AMBION INC., [Online]  July 2004 (2004-07), XP002393980  INTERNET ARTICLE  Retrieved from the Internet:  URL:<a href="http://www.ambion.com/catalog/sirna_search.php?num=20&amp;page=1&amp;B1nFTVars=g1.name%..">http://www.ambion.com/catalog/sirna_search.php?num=20&amp;page=1&amp;B1nFTVars=g1.name%..</a>  ..&gt; [retrieved on 2006-08-08]  the whole document</p> <p>ANONYMOUS: "RIT1"  SIRNA DATABASE, AMBION INC., [Online]  July 2004 (2004-07), XP002393981  INTERNET ARTICLE  Retrieved from the Internet:  URL:<a href="http://www.ambion.com/catalog/sirna_search.php?num=20&amp;page=1&amp;B1nFTVars=g1.name%..">http://www.ambion.com/catalog/sirna_search.php?num=20&amp;page=1&amp;B1nFTVars=g1.name%..</a>  ..&gt;  the whole document</p> <p>ANONYMOUS: ""Matched siRNAs and assays""  TECHNOTES, AMBION INC., [Online]  vol. 11, no. 4, July 2004 (2004-07),  XP002393982  INTERNET ARTICLE  Retrieved from the Internet:  URL:<a href="http://www.ambion.com/techlib/tn/114/4.html">http://www.ambion.com/techlib/tn/114/4.html</a>&gt; [retrieved on 2006-08-08]  paragraph [0003]</p> <p>RUSYN E V ET AL: "Rit, a non-lipid-modified Ras-related protein, transforms NIH3T3 cells without activating the ERK, JNK, p38 MAPK or PI3K/Akt pathways."  ONCOGENE. 28 SEP 2000,  vol. 19, no. 41,  28 September 2000 (2000-09-28), pages 4685-4694, XP002393983  ISSN: 0950-9232</p>	1-28
X		10-20
X		10-20
A		
A		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2005/052754
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HYNDS DIANNA L ET AL: "Rit promotes MEK-independent neurite branching in human neuroblastoma cells." JOURNAL OF CELL SCIENCE. 15 MAY 2003, vol. 116, no. Pt 10, 15 May 2003 (2003-05-15), pages 1925-1935, XP002393984 ISSN: 0021-9533</p> <p>SPENCER MICHAEL L ET AL: "Induction of neurite extension and survival in pheochromocytoma cells by the Rit GTPase" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 23, 7 June 2002 (2002-06-07), pages 20160-20168, XP002393985 ISSN: 0021-9258</p> <p>SETERNES OLE-MORTEN ET AL: "Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway." THE EMBO JOURNAL. 8 DEC 2004, vol. 23, no. 24, 8 December 2004 (2004-12-08), pages 4780-4791, XP002393986 ISSN: 0261-4189 abstract</p> <p>BAIN JENNY ET AL: "The specificities of protein kinase inhibitors: an update." THE BIOCHEMICAL JOURNAL. 1 APR 2003, vol. 371, no. Pt 1, 1 April 2003 (2003-04-01), pages 199-204, XP002393987 ISSN: 0264-6021</p> <p>SHI YU ET AL: "Elimination of protein kinase MK5/PRAK activity by targeted homologous recombination." MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. NOV 2003, vol. 23, no. 21, November 2003 (2003-11), pages 7732-7741, XP002393988 ISSN: 0270-7306</p>	10-20

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

	International application No. PCT/EP2005/052754
--	--

**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**Although claims 21-23, 27 and 28 are directed to a method of treatment or diagnosis of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.**
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of Invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

**see additional sheet**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers 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.:  
**Claims 1-28 (all partially): subject-matter relating to inventions 1 5 and 21.**
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 Application No. PCT/EP2005/052754

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

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

**Invention 1: Claims 1-28 (all partially)**

A method for identifying a compound that inhibits extracellular matrix degradation comprising contacting a compound with a polypeptide comprising SEQ ID NO.101; an agent for inhibiting extracellular matrix degradation comprising a nucleic acid sequence complementary to, or engineered from, a naturally-occurring polynucleotide sequence of about 17-30 contiguous nucleotides of SEQ ID NO.1; methods of treatment using said agent.

**Inventions 2-25: Claims 1-28 (all partially)**

As for Invention 1, but wherein the protein is indicated by one of SEQ ID NOS.102-125 and the agent comprises a nucleic acid sequence complementary to encoding SEQ ID NOS.2-25 respectively.

**Inventions 26-30: Claims 1-6, 8, 9 (all partially)**

As for Invention 1, but wherein the protein is indicated by one of the proteins whose segments are set out by SEQ ID NOS 501-515 (GPR21), 516-530 and 552-564 (FZD4), 531-545 (TM7SF1), 546-548 (CD72) and 549-551 (FXYD5) respectively.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/EP2005/052754

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 03027229	A	03-04-2003	AU US	2002322551 A1 6426221 B1		07-04-2003 30-07-2002
WO 2004092413	A	28-10-2004	EP	1618209 A2		25-01-2006

## 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 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 7
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 H 0 4 5
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	

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

(72)発明者 ペテル ヘルヴィグ マリア トムメ

ベルギー ゲント ビー- 9 0 0 0 、 ボゲルマルクト 3 3

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB20 BB50 DA36 FA11 FB01 FB03 GC15  
 4B024 AA01 AA11 AA20 BA80 CA02 CA04 CA09 CA12 CA20 DA03  
 EA02 GA11 GA19 HA11 HA13 HA14 HA17 HA20  
 4B063 QA05 QQ02 QQ08 QQ21 QQ36 QQ41 QQ61 QQ79 QQ89 QQ91  
 QQ95 QR08 QR16 QR32 QR35 QR40 QR48 QR55 QR56 QR62  
 QR73 QR77 QR80 QS16 QS25 QS33 QS34 QS36 QX01 QX02  
 4C084 AA02 BA02 BA22 DC32 NA14 ZA962 ZB152 ZC202  
 4C086 AA02 EA16 MA03 MA04 NA14 ZA96 ZB15  
 4C087 AA02 BC83 CA12 MA02 NA14 ZA96 ZB15  
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75 EA20 EA50