

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成 26 年 4 月 24 日 (2014.4.24)

【公表番号】特表 2010-533503 (P2010-533503A)

【公表日】平成 22 年 10 月 28 日 (2010.10.28)

【年通号数】公開・登録公報 2010-043

【出願番号】特願 2010-517192 (P2010-517192)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 N 15/00 G

A 6 1 P 9/10

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 43/00 1 2 1

【誤訳訂正書】

【提出日】平成 26 年 3 月 3 日 (2014.3.3)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

虚血性心筋症の診断又は予測のための、標準試料における 1 つ又は複数の m i R N A のレベルと比較した生体試料における 1 つ又は複数の m i R N A の発現レベルの差の存在を確認する方法であって、

a . 生体試料における 1 つ又は複数の m i R N A の発現レベルを測定することであって、当該 1 つ又は複数の m i R N A が、h s a - m i R - 1 9 9 a (配列番号 2 5)、h s a - m i R - 1 9 5 (配列番号 4)、h s a - m i R - 1 0 0 (配列番号 7)、h s a - m i R - 3 4 2 (配列番号 1 4)、h s a - m i R - 2 8 (配列番号 2 4)、h s a - m i R - 2 6 b (配列番号 3 0)、h s a - m i R - 9 2 a (配列番号 5)、h s a - m i R - 2 2 1 (配列番号 1 7)、h s a - m i R - 4 8 6 (配列番号 1 1)、h s a - m i R - 1 3 3 a (配列番号 1 5)、h s a - m i R - 1 5 0 (配列番号 1 2)、h s a - m i R - 4 2 2 b (配列番号 1 6)、h s a - l e t - 7 f (配列番号 1 8)、h s a - l e t - 7 a (配列番号 2 2)、h s a - m i R - 1 (配列番号 2 3)、h s a - m i R - 2 2 2 (配列番号 2 0)、h s a - l e t - 7 c (配列番号 2 8)、h s a - m i R - 1 3 3 b (配列番号 1 9)、h s a - m i R - 2 2 4 (配列番号 2 1)、h s a - m i R - 4 8 4 (配列番号 2 9)、h s a - l e t - 7 d (配列番号 3 1)、h s a - m i R - 9 2 b (配列番号 4 8)、h s a - l e t - 7 b (配列番号 4 9)、h s a - l e t - 7 e

(配列番号50)、及び h s a - l e t - 7 g (配列番号51) から選択され、

b. 前記生体試料における1つ又は複数の m i R N A の発現レベルを、標準試料における1つ又は複数の m i R N A のレベルと比較することと、

を含み、

前記標準試料における1つ又は複数の m i R N A のレベルと比較した前記生体試料における少なくとも1つ又は複数の m i R N A の発現レベルの差が、虚血性心筋症の診断又は予測に用いられることができる、方法。

【請求項2】

特発性拡張型心筋症の診断又は予測のための、標準試料における1つ又は複数の m i R N A のレベルと比較した生体試料における1つ又は複数の m i R N A の発現レベルの差の存在を確認する方法であって、

a. 生体試料における1つ又は複数の m i R N A の発現レベルを測定することであって、当該1つ又は複数の m i R N A が、h s a - m i R - 1 2 5 b (配列番号2)、h s a - m i R - 1 9 5 (配列番号4)、h s a - m i R - 1 0 0 (配列番号7)、h s a - m i R - 1 8 1 b (配列番号26)、h s a - m i R - 2 3 a (配列番号10)、h s a - m i R - 3 8 2 (配列番号33)、h s a - m i R - 1 3 3 a (配列番号15)、h s a - m i R - 1 3 3 b (配列番号19)、h s a - m i R - 2 2 1 (配列番号17)、h s a - m i R - 1 9 7 (配列番号3)、h s a - m i R - 3 0 c (配列番号13)、h s a - m i R - 9 2 a (配列番号5)、h s a - m i R - 2 2 (配列番号9)、h s a - m i R - 4 8 6 (配列番号11)、h s a - m i R - 5 4 2 - 5 p (配列番号1)、h s a - m i R - 1 3 9 (配列番号6)、h s a - m i R - 1 5 0 (配列番号12)、h s a - m i R - 1 0 b (配列番号32)、h s a - m i R - 4 8 3 (配列番号8)、h s a - m i R - 4 2 2 b (配列番号16)、及び h s a - m i R - 2 0 a (配列番号27) から選択され、

b. 前記生体試料における1つ又は複数の m i R N A の発現レベルを、標準試料における1つ又は複数の m i R N A のレベルと比較することと、

を含み、

前記標準試料における1つ又は複数の m i R N A のレベルと比較した前記生体試料における少なくとも1つ又は複数の m i R N A の発現レベルの差が、特発性拡張型心筋症の診断又は予測に用いられることができる、方法。

【請求項3】

h s a - m i R - 1 9 5 (配列番号4)、h s a - m i R - 1 0 0 (配列番号7)、h s a - m i R - 3 4 2 (配列番号14)、h s a - m i R - 2 8 (配列番号24)、h s a - m i R - 1 9 9 a (配列番号25)、及び h s a - m i R - 2 6 b (配列番号30) から選択される前記1つ又は複数の m i R N A の増加、又は

h s a - m i R - 9 2 a (配列番号5)、h s a - m i R - 2 2 1 (配列番号17)、h s a - m i R - 4 8 6 (配列番号11)、h s a - m i R - 1 3 3 a (配列番号15)、h s a - m i R - 1 5 0 (配列番号12)、h s a - m i R - 4 2 2 b (配列番号16)、h s a - l e t - 7 f (配列番号18)、h s a - l e t - 7 a (配列番号22)、h s a - m i R - 1 (配列番号23)、h s a - m i R - 2 2 2 (配列番号20)、h s a - l e t - 7 c (配列番号28)、h s a - m i R - 1 3 3 b (配列番号19)、h s a - m i R - 2 2 4 (配列番号21)、h s a - m i R - 4 8 4 (配列番号29)、及び h s a - l e t - 7 d (配列番号31) から選択される前記1つ又は複数の m i R N A の減少が、

前記虚血性心筋症の診断又は予測に用いられる、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

h s a - m i R - 1 2 5 b (配列番号2)、h s a - m i R - 1 9 5 (配列番号4)、h s a - m i R - 1 0 0 (配列番号7)、h s a - m i R - 2 3 a (配列番号10)、h s a - m i R - 1 8 1 b (配列番号26)、及び h s a - m i R - 3 8 2 (配列番号33) から選択される前記1つ又は複数の m i R N A の増加、又は

h s a - m i R - 9 2 a (配 列 番 号 5) 、 h s a - m i R - 2 2 (配 列 番 号 9) 、 h s a - m i R - 4 8 6 (配 列 番 号 1 1) 、 h s a - m i R - 3 0 c (配 列 番 号 1 3) 、 h s a - m i R - 1 3 3 a (配 列 番 号 1 5) 、 h s a - m i R - 2 2 1 (配 列 番 号 1 7) 、 h s a - m i R - 1 9 7 (配 列 番 号 3) 、 h s a - m i R - 5 4 2 - 5 p (配 列 番 号 1) 、 h s a - m i R - 1 3 9 (配 列 番 号 6) 、 h s a - m i R - 1 3 3 b (配 列 番 号 1 9) 、 h s a - m i R - 1 5 0 (配 列 番 号 1 2) 、 h s a - m i R - 1 0 b (配 列 番 号 3 2) 、 h s a - m i R - 4 8 3 (配 列 番 号 8) 、 h s a - m i R - 4 2 2 b (配 列 番 号 1 6) 、 及 び h s a - m i R - 2 0 a (配 列 番 号 2 7) から 選 択 さ れ る 前 記 1 つ 又 は 複 数 の m i R N A の 減 少 が、

前記特発性拡張型心筋症の診断又は予測に用いられる、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

被験者において虚血性心筋症を治療又は予防するための医薬組成物であって、治療有効量のm i R N A 模倣物を含む、医薬組成物であり、

前記m i R N A 模倣物が、h s a - m i R - 9 2 a (配 列 番 号 5) 、 h s a - m i R - 2 2 1 (配 列 番 号 1 7) 、 h s a - m i R - 4 8 6 (配 列 番 号 1 1) 、 h s a - m i R - 1 3 3 a (配 列 番 号 1 5) 、 h s a - m i R - 1 5 0 (配 列 番 号 1 2) 、 h s a - m i R - 4 2 2 b (配 列 番 号 1 6) 、 h s a - l e t - 7 f (配 列 番 号 1 8) 、 h s a - l e t - 7 a (配 列 番 号 2 2) 、 h s a - m i R - 1 (配 列 番 号 2 3) 、 h s a - m i R - 2 2 2 (配 列 番 号 2 0) 、 h s a - l e t - 7 c (配 列 番 号 2 8) 、 h s a - m i R - 1 3 3 b (配 列 番 号 1 9) 、 h s a - m i R - 2 2 4 (配 列 番 号 2 1) 、 h s a - m i R - 4 8 4 (配 列 番 号 2 9) 、 及 び h s a - l e t - 7 d (配 列 番 号 3 1) から 選 択 さ れ る 1 つ 又 は 複 数 の m i R N A の 模 倣 物 である、

医薬組成物。

【請求項6】

被験者において虚血性心筋症を治療又は予防するための医薬組成物であって、治療有効量のm i R N A インヒビターを含む、医薬組成物であり、

前記m i R N A インヒビターが、h s a - m i R - 1 9 5 (配 列 番 号 4) 、 h s a - m i R - 1 0 0 (配 列 番 号 7) 、 h s a - m i R - 3 4 2 (配 列 番 号 1 4) 、 h s a - m i R - 2 8 (配 列 番 号 2 4) 、 h s a - m i R - 1 9 9 a (配 列 番 号 2 5) 、 及 び h s a - m i R - 2 6 b (配 列 番 号 3 0) から 選 択 さ れ る m i R N A の 1 つ 又 は 複 数 の インヒビターである、

医薬組成物。

【請求項7】

被験者において特発性拡張型心筋症を治療又は予防するための医薬組成物であって、治療有効量のm i R N A 模倣物を含む、医薬組成物であり、

前記m i R N A 模倣物が、h s a - m i R - 9 2 a (配 列 番 号 5) 、 h s a - m i R - 1 3 9 (配 列 番 号 6) 、 h s a - m i R - 4 8 3 (配 列 番 号 8) 、 h s a - m i R - 2 2 (配 列 番 号 9) 、 h s a - m i R - 4 8 6 (配 列 番 号 1 1) 、 h s a - m i R - 1 5 0 (配 列 番 号 1 2) 、 h s a - m i R - 3 0 c (配 列 番 号 1 3) 、 h s a - m i R - 1 3 3 a (配 列 番 号 1 5) 、 h s a - m i R - 2 2 1 (配 列 番 号 1 7) 、 h s a - m i R - 1 9 7 (配 列 番 号 3) 、 h s a - m i R - 5 4 2 - 5 p (配 列 番 号 1) 、 h s a - m i R - 1 3 3 b (配 列 番 号 1 9) 、 h s a - m i R - 2 0 a (配 列 番 号 2 7) 、 h s a - m i R - 4 2 2 b (配 列 番 号 1 6) 、 及 び h s a - m i R - 1 0 b (配 列 番 号 3 2) から 選 択 さ れ る 1 つ 又 は 複 数 の m i R N A の 模 倣 物 である、

医薬組成物。

【請求項8】

前記m i R N A 模倣物が、前記1つ又は複数のm i R N A の配列を含む、請求項5又は7に記載の医薬組成物。

【請求項9】

被験者において特発性拡張型心筋症を治療又は予防するための医薬組成物であって、治

療有効量の *miRNA* インヒビターを含む、医薬組成物であり、

前記 *miRNA* インヒビターが、*hsa-miR-125b* (配列番号 2)、*hsa-miR-195* (配列番号 4)、*hsa-miR-100* (配列番号 7)、*hsa-miR-23a* (配列番号 10)、*hsa-miR-342* (配列番号 14)、*hsa-miR-28* (配列番号 24)、*hsa-miR-199a* (配列番号 25)、*hsa-miR-181b* (配列番号 26)、及び *hsa-miR-382* (配列番号 33) から選択される 1 つ又は複数の *miRNA* のインヒビターである、

医薬組成物。

【請求項 10】

前記 *miRNA* インヒビターが、前記 1 つ又は複数の *miRNA* と相補的な配列を含む、請求項 6 又は 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記 *miRNA* インヒビターがアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

第 2 の心臓治療薬と一緒に投与される、請求項 5 ないし 11 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記第 2 の心臓治療薬が、強心薬、神経液性遮断薬、アルドステロン拮抗薬、利尿薬、血管拡張薬、エンドセリン受容体拮抗薬、及び *HDAC* 阻害薬からなる群から選択される、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

前記第 2 の心臓治療薬が、前記 *miRNA* 模倣物又は前記 *miRNA* インヒビターと併用投与される、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記第 2 の心臓治療薬が、前記 *miRNA* 模倣物又は前記 *miRNA* インヒビターの前又は後に投与される、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

薬学的に許容可能な担体をさらに含む、請求項 5 ないし 11 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

心臓細胞に投与される、請求項 5 ないし 11 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

被験者における虚血性心筋症又は特発性拡張型心筋症の治療をモニタする方法であって、

a. 第 1 の時点で前記被験者からの第 1 の生体試料を得ることであって、前記第 1 の時点が虚血性心筋症又は特発性拡張型心筋症の薬物治療プロトコルの開始前である、ことと

b. 第 2 の時点で前記被験者からの第 2 の生体試料を得ることであって、前記第 2 の時点が虚血性心筋症又は特発性拡張型心筋症の薬物治療プロトコルの開始後である、ことと

c. 前記第 1 の生体試料及び前記第 2 の生体試料を、*miRNA* アレイ解析、*mRNA* アレイ解析又は標的プロテオーム発現解析によって処理することであって、前記虚血性心筋症の治療をモニタするための前記 *miRNA* アレイ解析が、*hsa-miR-199a* (配列番号 25)、*hsa-miR-195* (配列番号 4)、*hsa-miR-100* (配列番号 7)、*hsa-miR-342* (配列番号 14)、*hsa-miR-28* (配列番号 24)、*hsa-miR-26b* (配列番号 30)、*hsa-miR-92a* (配列番号 5)、*hsa-miR-221* (配列番号 17)、*hsa-miR-486* (配列番号 11)、*hsa-miR-133a* (配列番号 15)、*hsa-miR-150* (配列番号 12)、*hsa-miR-422b* (配列番号 16)、*hsa-let-7f* (配列

番号 18)、h s a - l e t - 7 a (配列番号 22)、h s a - m i R - 1 (配列番号 23)、h s a - m i R - 222 (配列番号 20)、h s a - l e t - 7 c (配列番号 28)、h s a - m i R - 133b (配列番号 19)、h s a - m i R - 224 (配列番号 21)、h s a - m i R - 484 (配列番号 29)、h s a - l e t - 7 d (配列番号 31)、h s a - m i R - 92b (配列番号 48)、h s a - l e t - 7 b (配列番号 49)、h s a - l e t - 7 e (配列番号 50)、及び h s a - l e t - 7 g (配列番号 51) から選択される 1 つ又は複数の m i R N A の発現を測定することを含み、前記特発性拡張型心筋症の治療をモニタするための前記 m i R N A アレイ解析が、h s a - m i R - 125b (配列番号 2)、h s a - m i R - 195 (配列番号 4)、h s a - m i R - 100 (配列番号 7)、h s a - m i R - 181b (配列番号 26)、h s a - m i R - 23a (配列番号 10)、h s a - m i R - 382 (配列番号 33)、h s a - m i R - 133a (配列番号 15)、h s a - m i R - 133b (配列番号 19)、h s a - m i R - 221 (配列番号 17)、h s a - m i R - 197 (配列番号 3)、h s a - m i R - 30c (配列番号 13)、h s a - m i R - 92a (配列番号 5)、h s a - m i R - 22 (配列番号 9)、h s a - m i R - 486 (配列番号 11)、h s a - m i R - 542-5p (配列番号 1)、h s a - m i R - 139 (配列番号 6)、h s a - m i R - 150 (配列番号 12)、h s a - m i R - 10b (配列番号 32)、h s a - m i R - 483 (配列番号 8)、h s a - m i R - 422b (配列番号 16)、及び h s a - m i R - 20a (配列番号 27) から選択される 1 つ又は複数の m i R N A の発現を測定することを含み、

d. 前記第 1 の生体試料からの m i R N A、m R N A、及びタンパク質の発現データを、前記第 2 の生体試料からの発現データと比較して、前記薬物治療プロトコルの有効性の指標となる遺伝子発現パターンの変化を測定することと、

を含む、方法。

【請求項 19】

前記第 1 の時点と前記第 2 の時点との間隔が、約 3 ~ 9 ヶ月である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 m R N A 解析が、Affymetrix プロトコルによって実施される、請求項 18 に記載の方法。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0018

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0018】

本発明はまた、被験者において心不全の治療をモニタする方法も包含する。一実施形態において、本方法は、第 1 の時点で被験者から第 1 の生体試料を採取することであって、第 1 の時点が心不全の薬物治療プロトコルの開始前である、ことと；第 2 の時点で被験者から第 2 の生体試料を採取することであって、第 2 の時点が心不全の薬物治療プロトコルの開始後である、ことと；第 1 の生体試料及び第 2 の生体試料を、m i R N A アレイ解析、m R N A アレイ解析及び標的プロテオーム発現解析によって処理することと；第 1 の生体試料からの m i R N A、m R N A、及びタンパク質の発現データを、第 2 の生体試料からの発現データと比較して、遺伝子発現パターンの変化を測定することであって、遺伝子発現の変化が薬物治療プロトコルの有効性の指標となる、こととを含む。別の実施形態において、第 1 の時点と第 2 の時点との間隔は、約 3 ~ 9 ヶ月である。別の実施形態において、m R N A 解析は、Affymetrix プロトコルによって実施される。

【誤訳訂正 3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0019

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0019】

図面の簡単な説明

【図1】(図1A) miRNAの相対的発現。非不全心(NF、 $n = 6$)と特発性拡張型心筋症の不全心(IDC、 $n = 5$)との対比。解析は、LC Sciences (Houston, TX) のSanger human miRBase 9.0対応miRNA発現アレイチップ、470個のmiRNAのデータセットで実施した。データは擬似温度尺度で表され、赤色が発現の増加を表し、緑色が発現の減少を表す。有意にアップレギュレーション又はダウンレギュレーションされた($p < 0.05$) miRNAのみを示す。(図1B) miRNAの相対的発現。NF心と虚血性心筋症の不全心(ISC、 $n = 5$)との対比。解析は、LC Sciences (Houston, TX) のSanger human miRBase 9.0対応miRNA発現アレイチップ、470個のmiRNAのデータセットで実施した。データは擬似温度尺度で表され、赤色が発現の増加を表し、緑色が発現の減少を表す。有意にアップレギュレーション又はダウンレギュレーションされた($p < 0.05$) miRNAのみを示す。

【図2】ヒトの非不全心(NF、 $n = 6$)と不全心(IDC又はISCH、 $n = 5, 5$)との対比における相対的なmiRNA発現をグラフで表したものの。特定のmiRNAはいずれのタイプの不全心においてもアップレギュレーション又はダウンレギュレーションされるのに対し、他のmiRNAは心不全のタイプによって発現が異なることに留意されたい。

【図3】差次的発現(differential expression)が $p < 0.05$ に達したmiRNAのサブセットの相対的発現。

【図4】非不全(NF)、特発性心筋症(IDC)又は虚血性心筋症(ISC)の被験者から抽出されたRNAから、RT-PCRによって評価したときのmiRNA発現レベル。miRNA発現は、非不全心と不全心とで発現が変わらないmiR-24の発現に対して基準化した。統計解析はANOVAを用いて行った。

【図5】miR-92模倣物又はmiR-92インヒビターをトランスフェクトした新生仔ラット心室筋細胞における胎児遺伝子発現の変化。細胞は、トランスフェクション後24時間で 10^{-7} Mのイソプロテレノール(ISO; 黒色バー)により処置し、処置後48時間で回収した。遺伝子発現はRT-PCRによって計測した。結果は18SrRNA発現レベルに対して基準化し、1と定義した対照の模倣物又はインヒビター(1のライン)をトランスフェクト細胞と比較した。グラフは、3~4回の個別の実験の平均値を表す。

【図6】miR-100模倣物又はmiR-100インヒビターをトランスフェクトした新生仔ラット心室筋細胞における胎児遺伝子発現の変化。細胞は、トランスフェクション後24時間で 10^{-7} Mのイソプロテレノール(ISO; 黒色バー)により処置し、処置後48時間で回収した。遺伝子発現はRT-PCRによって計測した。結果は18SrRNA発現レベルに対して基準化し、1と定義した対照の模倣物又はインヒビター(1のライン)をトランスフェクト細胞と比較した。グラフは、3~4回の個別の実験の平均値を表す。

【図7】miR-133b模倣物又はmiR-133bインヒビターをトランスフェクトした新生仔ラット心室筋細胞における胎児遺伝子発現の変化。細胞は、トランスフェクション後24時間で 10^{-7} Mのイソプロテレノール(ISO; 黒色バー)により処置し、処置後48時間で回収した。遺伝子発現はRT-PCRによって計測した。結果は18SrRNA発現レベルに対して基準化し、1と定義した対照模倣物又はインヒビター(1のライン)をトランスフェクト細胞と比較した。グラフは、3~4回の個別の実験の平均値を表す。

【図8】模倣物miRNA又はインヒビターmiRNAをトランスフェクトしたときのmiRNAレベル。miR-92、miR-100及びmiR-133bの模倣物及びインヒビターを、新生仔ラット心室筋細胞にトランスフェクトした。各miRNAの発現レベ

ルはRT-PCRによって評価した。

【図9】新生仔ラット心室筋細胞においてmiRNA-133bを過剰発現させるか、又はダウンレギュレーションすると、細胞肥大が調節される。細胞は、miRNA-133b模倣物（下側パネル）又はmiRNA-133bインヒビター（上側パネル）をトランスフェクトし、イソプロテレノール処置に供するか（右側パネル）、又はそれ以上の処置は行わなかった（左側パネル）。図は、抗アクチニン抗体による免疫蛍光を示す。

【図10】新生仔ラット心室筋細胞においてmiRNA-133bを過剰発現させるか、又はダウンレギュレーションすると、細胞肥大が調節される。細胞は、miRNA-133b模倣物又はmiRNA-133bインヒビターをトランスフェクトし、トランスフェクト細胞のサブセットをイソプロテレノールに曝露した（黒色バー）。細胞サイズはImage Jソフトウェアを使用して計測した。3つの異なる領域からの合計30個の細胞を計測した。

【図11】miRNAに基づく標的発見方法に向けた統合的な手法としての連続的遺伝子発現解析（serial analysis of gene expression: SAGE）の概略図。miRNAアレイ解析、mRNA（Affymetrix）アレイ解析、及び（標的）プロテオーム発現解析用の生体試料の提供には、心不全（HF）患者からの心内膜心筋生検が用いられる。

【図12】β遮断薬で処置したヒト患者におけるmiRNA-133の発現。β遮断薬で処置した患者からの試料に対してRT-PCR解析を実施した。末期心不全（A）、処置後3ヶ月（B）及び処置後12ヶ月（C）において一連の生検を採取した。miRNA-133b（上のパネル）及びmiRNA-133a（下のパネル）の発現レベルは、miRNA-370（右のパネル）及び低分子RNA RNU66（左のパネル）の発現に対して基準化した。患者20、21、25及び34はβ遮断薬処置に反応したが、患者103はこの処置に反応しなかった。

【図13】β遮断薬で処置したヒト患者におけるmiRNA-1及びmiRNA-19bの発現。β遮断薬で処置した患者からの試料に対してRT-PCR解析を実施した。末期心不全（A）、処置後3ヶ月（B）及び処置後12ヶ月（C）において一連の生検を採取した。miRNA-1（上のパネル）及びmiRNA-19b（下のパネル）の発現レベルは、miRNA-370（右のパネル）及び低分子RNA RNU66（左のパネル）の発現に対して基準化した。患者20、21、25及び34はβ遮断薬処置に反応したが、患者103はこの処置に反応しなかった。

【図14】β遮断薬で処置したヒト患者におけるmiRNA-30d及びmiRNA-92aの発現。β遮断薬で処置した患者からの試料に対してRT-PCR解析を実施した。末期心不全（A）、処置後3ヶ月（B）及び処置後12ヶ月（C）において一連の生検を採取した。miRNA-30d（上のパネル）及びmiRNA-92a（下のパネル）の発現レベルは、miRNA-370（右のパネル）及び低分子RNA RNU66（左のパネル）の発現に対して基準化した。患者20、21、25及び34はβ遮断薬処置に反応したが、患者103はこの処置に反応しなかった。

【図15】β遮断薬で処置したヒト患者におけるmiRNA-208b及びmiRNA-499の発現。β遮断薬で処置した患者からの試料に対してRT-PCR解析を実施した。末期心不全（A）、処置後3ヶ月（B）及び処置後12ヶ月（C）において一連の生検を採取した。miRNA-208b（上のパネル）及びmiRNA-499（下のパネル）の発現レベルは、miRNA-370（右のパネル）及び低分子RNA RNU66（左のパネル）の発現に対して基準化した。患者20、21、25及び34はβ遮断薬処置に反応したが、患者103はこの処置に反応しなかった。

【図16】β遮断薬で処置したヒト患者におけるmiRNA-let-7gの発現。β遮断薬で処置した患者からの試料に対してRT-PCR解析を実施した。末期心不全（A）、処置後3ヶ月（B）及び処置後12ヶ月（C）において一連の生検を採取した。miRNA-let-7gの発現レベルは、miRNA-370（右のパネル）及び低分子RNA RNU66（左のパネル）の発現に対して基準化した。患者20、21、25及び34はβ遮断薬処置に反応したが、患者103はこの処置に反応しなかった。

【図17】（図17A）miRNA-92aはPKCεを標的とする。miRNA-92a模倣物

、miR-92a インヒビター、又はスクランブル対照配列をトランスフェクトしたラット新生仔心筋細胞のウエスタンブロット解析。PKC ϵ (n = 2) を探索したブロット。ローディング対照としてカルネキシン発現を用いた。(図17B) miR-92a はPDE1Aを標的とする。miR-92a 模倣物、miR-92a インヒビター、又はスクランブル対照配列をトランスフェクトしたラット新生仔心筋細胞のウエスタンブロット解析。PDE1A (n = 1) を探索したブロット。ローディング対照としてカルネキシン発現を用いた。

【図18】(図18A) miR-133b はカルモジュリンを標的とする。miR-133b 模倣物、miR-133b インヒビター、又はスクランブル対照配列をトランスフェクトしたラット新生仔心筋細胞におけるカルモジュリンのmRNA発現のRT-PCR解析。カルモジュリン発現レベルは、18Sリボソームサブユニットの発現レベルに対して基準化した。n = 3。(図18B) miR-133b はカルモジュリンを標的とする。カルモジュリン3'UTRに結合したルシフェラーゼコード領域を含む構築物と共に、miR-133b 模倣物、miR-133b インヒビター、又はスクランブル対照配列を共トランスフェクトしたラット新生仔心筋細胞におけるルシフェラーゼ活性。n = 3。(図18C) miR-133b はカルモジュリンを標的とする。miR-133b 模倣物、miR-133b インヒビター、又はスクランブル対照配列をトランスフェクトしたラット新生仔心筋細胞のカルモジュリンについてのウエスタンブロット解析。ローディング対照としてカルネキシン発現を用いた。n = 3。

【誤訳訂正4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0059

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0059】

本発明はまた、被験者において心不全の治療をモニタする方法も企図する。一実施形態において、本方法は、第1の時点で被験者から第1の生体試料を採取することであって、第1の時点が心不全の薬物治療プロトコルの開始前である、ことと；第2の時点で被験者から第2の生体試料を採取することであって、第2の時点が心不全の薬物治療プロトコルの開始後である、ことと；第1の生体試料及び第2の生体試料を、miRNAアレイ解析、mRNAアレイ解析及び標的プロテオーム発現解析によって処理することと；第1の生体試料からのmiRNA、mRNA、及びタンパク質の発現データを、第2の生体試料からの発現データと比較して、薬物治療プロトコルの有効性の指標となる遺伝子発現パターンの変化を測定すること、とを含む。第1の時点と第2の時点との間隔は、約3～約18ヶ月、約3～約12ヶ月、又は好ましくは約3～約9ヶ月であってもよい。薬物治療プロトコルの開始後いくつかの時点で、各患者から追加の生体試料が採取されてもよい。ある実施形態において、薬物治療プロトコルの開始後2つ以上の試料が採集される。他の実施形態において、薬物治療プロトコルの開始後3つ以上の試料が採集される。試料は、約3ヶ月毎、約6ヶ月毎、約9ヶ月毎、又は約12ヶ月毎に採集されてもよい。

【誤訳訂正5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0070

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0070】

アレイ解析：試料をLC Sciences, LLC, Houston, Texasに提出してmicroRNA Detection Microarray Serviceに供した。パイオインフォマティクス解析を用いて470個のマイクロRNA (Sanger miRBase Release 9.0) の相対的発現を同定した。この解析により、非不全(NF)心と不全(ISC及び/又はIDC)心との対比において様々な発現の異なるmiRNAが同定された。2種類の不全心、特発性拡張型心筋症(IDC)を有する患

者に由来するもの、又は虚血性心筋症 (ISC) を有するものを調べた。NF 群では、6 つの心臓 ($n = 6$) を調べた。NF 心を IDC 心 ($n = 5$) と比較すると、図 1 A に示されるとおり、12 個の miRNA について統計的に有意な変化 ($p < 0.05$ 、対応のない t 検定) が認められ、そのうち 3 個は増加し、そのうち 9 個は減少した。NF 心と IDC 心 ($n = 5$) との間で同様に解析すると、図 1 B に示されるとおり、16 個の miRNA の発現の変化が明らかとなり、そのうち 5 個は増加し、そのうち 11 個は減少した。ヒト心臓における NF を IDC 又は ISC のいずれかと比較したときの miRNA 発現のあらゆる有意な変化について、マイクロアレイによる平均した miRNA 発現を図 2 に示す。

【誤訳訂正 6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0087

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0087】

実施例 4 . miRNA に基づく標的発見に向けた SAGE 手法

図 11 に表される概略図は、心不全の治療標的を同定するための連続的遺伝子発現解析 (SAGE) の手法を説明する。心不全臨床試験に関連した心不全 (HF) 患者が、3 つの異なる時点で選択的な心内膜心筋生検を受ける。第 1 の時点は β 遮断薬 (BB) 治療の開始前であり、その他の時点は治療開始後 3 ヶ月及び 12 ヶ月である。各患者からの各時点の生検は、miRNA アレイ解析、mRNA (Affymetrix) アレイ解析、及び (標的) プロテオーム発現解析のために処理される。同じ試料からの miRNA / mRNA / タンパク質発現の固有の組み合わせは、同時に、複数のレベルで遺伝子発現パターンの変化を調べる固有の機会となる。miRNA 発現が mRNA 発現に影響し、続いてそれがタンパク質発現に影響するため、これまでに定義されていない調節制御の制御ポイント間の関連を調べることができる。さらには、ある期間にわたる同じ患者からの試料を解析することで、個人間の遺伝的差異に関連する重要な問題が回避される。治療標的は、同じ患者からの遺伝子発現レベルを異なる時点で比較することによって同定され得る (例えば、治療後 3 ヶ月と治療前等)。遺伝子発現レベルはまた、臨床転帰とも関連し得る。

【誤訳訂正 7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0088

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0088】

実施例 5 . β 遮断薬治療で処置したヒト患者における miRNA 発現の変化

心不全における miRNA の重要性をさらに例証するため、ヒト患者において β 遮断薬による処置前及び処置後に miRNA 発現を評価した。末期心不全 (処置前)、 β 遮断薬治療による処置後 3 ヶ月、及び処置後 12 ヶ月において、5 人の患者から一連の心生検を採取した。各患者の試料の各々に対して miRNA アレイ解析を実施し、miR-1、miR-19b、miR-133b、miR-133a、miR-30d、miR-92a、miR-208b、miR-499、及び miR-let-7g を含む、不全心でダウンレギュレーションされるいくつかの miRNA についての発現レベルを測定した。miRNA アレイ解析で測定された発現レベルを、実施例 1 に記載されるとおり RT-PCR によって確認した。RT-PCR の結果が図 12 ~ 16 に示される。特定の miRNA の発現レベルは、対照として使用した miR-370 (右のパネル) 又は低分子 RNA RNU66 (左のパネル) のいずれかに対して基準化した。末期心不全 (A)、処置後 3 ヶ月 (B) 及び処置後 12 ヶ月 (C) において、miRNA 発現を評価した。 β 遮断薬治療に反応した 4 人の患者 (20、21、25 及び 34) の処置後の試料において、miRNA 発現がアップレギュレーションされた。処置に反応しなかった患者 (患者 103) から採取された試料では、特定の miRNA のアップレギュレーションは認められなかった。こ

の結果は、m i R N A のサブセットの発現レベルが心不全の重症度と相関し、実施例 4 に記載されるとおり特定の薬物治療に対する患者の反応をモニタするためのバイオマーカーとして使用することができることを示している。薬物治療の投薬量又はタイプは、このような m i R N A の 1 つ又は複数の発現レベルに基づき調整され得る。