

(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2009-501521

(P2009-501521A)

(43) 公表日 平成21年1月22日(2009.1.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	2G045
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4B063
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	4C084
A61K 45/06 (2006.01)	A61K 45/06	4C085
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02	4C086
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-521645 (P2008-521645)	(71) 出願人	508012873
(86) (22) 出願日	平成18年7月13日 (2006.7.13)		ベス イスラエル ディーコネス メディカル センター
(85) 翻訳文提出日	平成20年2月18日 (2008.2.18)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン ブルックリン アベニュー 330
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/027402		
(87) 国際公開番号	W02007/009071	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成19年1月18日 (2007.1.18)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	60/698,997	(74) 代理人	100119507
(32) 優先日	平成17年7月13日 (2005.7.13)		弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一
		(74) 代理人	100129506
			弁理士 小林 智彦
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 炎症応答を診断および処置する方法

(57) 【要約】

本発明は、VEGF、PIGF、およびsFlt-1レベルが敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショックにおけるような炎症応答において増加するという発見に関する。さらに、本発明は、VEGFもしくはPIGFレベルを減少させること、またはsFlt-1もしくはPIGFレベルを増加させることを含む、そのような炎症応答についての処置を同定する、および処置を施す方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検査被験体から単離された試料におけるsFlt-1発現または活性のレベルを分析する段階を含む、該検査被験体において炎症応答を診断する方法であって、非罹患被験体に見出されるレベルと比較した、該試料におけるsFlt-1発現または活性の増加したレベルが、該検査被験体が該炎症応答を有することを示す、方法。

【請求項 2】

VEGF、PIGF、TNF- α 、IL-6、D-ダイマー、E-セレクトリン、P-セレクトリン、ICAM-1、VCAM-1、Cox-2、またはPAI-1の少なくとも1つのレベルを分析する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

10

【請求項 3】

被験体がヒトである、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

診断される炎症応答が重度敗血症または敗血症性ショックである、請求項1記載の方法

【請求項 5】

以下の段階を含む、炎症応答をもつ被験体を処置するのに有用な候補化合物を同定する方法：

(a) sFlt-1を化合物と接触させる段階；および

(b) 該sFlt-1の活性を測定する段階であって、該化合物の非存在下におけるsFlt-1活性と比較した、該化合物の存在下におけるsFlt-1活性の増加が、炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物であると該化合物を同定する、段階。

20

【請求項 6】

測定段階(b)が、VEGFまたはPIGFの少なくとも1つのsFlt-1への結合を測定する段階を含む、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

化合物が化学ライブラリーから選択される、請求項5記載の方法。

【請求項 8】

以下の段階を含む、炎症応答をもつ被験体を処置するのに有用な候補化合物を同定する方法：

30

(a) sFlt-1をコードするポリヌクレオチドを含む細胞または細胞抽出物を化合物と接触させる段階；および

(b) 該細胞または細胞抽出物におけるsFlt-1発現のレベルを測定する段階であって、該化合物の非存在下におけるレベルと比較した、該化合物の存在下におけるsFlt-1発現の増加したレベルが、炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物であると該化合物を同定する、段階。

【請求項 9】

細胞が哺乳動物中の細胞である、請求項8記載の方法。

【請求項 10】

接触段階(a)の前に哺乳動物にリポ多糖を投与する段階をさらに含む、請求項9記載の方法。

40

【請求項 11】

化合物が化学ライブラリーから選択される、請求項8記載の方法。

【請求項 12】

sFlt-1発現または活性を増加させる組成物の治療的有効量を該被験体に投与する段階を含む、炎症応答をもつ被験体を処置する方法。

【請求項 13】

組成物がsFlt-1を含む、請求項12記載の方法。

【請求項 14】

抗菌剤、流体、昇圧剤、コルチコステロイド、活性化プロテインC、インスリンと共の

50

グルコース、機械的人工換気、腎代替療法(renal replacement therapy)、および鎮静からなる群より選択される処置を施す段階をさらに含む、請求項12記載の方法。

【請求項15】

被験体がヒトである、請求項12記載の方法。

【請求項16】

炎症応答が重度敗血症または敗血症性ショックである、請求項12記載の方法。

【請求項17】

検査被験体から単離された試料におけるPIGF発現または活性のレベルを分析する段階を含む、該検査被験体において炎症応答を診断する方法であって、非罹患被験体におけるレベルと比較した、該試料におけるPIGF発現または活性のレベルの変化が、該検査被験体が該炎症応答を有することを示す、方法。

10

【請求項18】

VEGF、PIGF、TNF- α 、IL-6、D-ダイマー、E-セレクトリン、P-セレクトリン、ICAM-1、VCAM-1、Cox-2、またはPAI-1の少なくとも1つのレベルを分析する段階をさらに含む、請求項17記載の方法。

【請求項19】

被験体がヒトである、請求項17記載の方法。

【請求項20】

診断される炎症応答が重度敗血症または敗血症性ショックである、請求項17記載の方法。

20

【請求項21】

変化が増加である、請求項17記載の方法。

【請求項22】

変化が減少である、請求項17記載の方法。

【請求項23】

以下の段階を含む、炎症応答をもつ被験体を処置するのに有用な候補化合物を同定する方法：

(a)PIGFを化合物と接触させる段階；および

(b)該PIGFの活性を測定する段階であって、該化合物の非存在下におけるPIGF活性と比較した、該化合物の存在下におけるPIGF活性の変化が、炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物であると該化合物を同定する、段階。

30

【請求項24】

化合物が化学ライブラリーから選択される、請求項23記載の方法。

【請求項25】

変化が増加である、請求項23記載の方法。

【請求項26】

変化が減少である、請求項23記載の方法。

【請求項27】

以下の段階を含む、炎症応答をもつ被験体を処置するのに有用な候補化合物を同定する方法：

40

(a)PIGFをコードするポリヌクレオチドを含む細胞または細胞抽出物を化合物と接触させる段階；および

(b)該細胞または細胞抽出物におけるPIGF発現のレベルを測定する段階であって、該化合物の非存在下におけるレベルと比較した、該化合物の存在下におけるPIGF発現のレベルの変化が、炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物であると該化合物を同定する、段階。

【請求項28】

細胞が哺乳動物中の細胞である、請求項27記載の方法。

【請求項29】

接触段階(a)の前に哺乳動物ヘリポ多糖を投与する段階をさらに含む、請求項28記載の

50

方法。

【請求項 3 0】

化合物が化学ライブラリーから選択される、請求項27記載の方法。

【請求項 3 1】

変化が増加である、請求項27記載の方法。

【請求項 3 2】

変化が減少である、請求項27記載の方法。

【請求項 3 3】

以下の段階を含む、炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物を同定する方法

：

(a)PIGF受容体またはそのPIGF結合断片を化合物と接触させる段階；および

(b)該化合物の該受容体への結合を測定する段階であって、該化合物の該PIGF受容体またはその該断片への特異的結合が、該化合物が炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物であることを示す、段階。

【請求項 3 4】

PIGF受容体がニューロピリン-1もしくはVEGFR-1、またはそれらの断片である、請求項33記載の方法。

【請求項 3 5】

化合物が化学ライブラリーから選択される、請求項33記載の方法。

【請求項 3 6】

PIGFの発現または活性を変化させる組成物の治療的有効量を該被験体に投与する段階を含む、炎症応答をもつ被験体を処置する方法。

【請求項 3 7】

組成物がPIGFを含む、請求項36記載の方法。

【請求項 3 8】

組成物が、PIGFをコードする核酸、またはPIGF活性をもつその断片を含む、請求項36記載の方法。

【請求項 3 9】

被験体がヒトである、請求項36記載の方法。

【請求項 4 0】

組成物が、PIGFを特異的に結合する抗体、またはそのPIGF結合断片を含む、請求項36記載の方法。

【請求項 4 1】

組成物が、PIGFタンパク質をコードするmRNAに干渉するRNAを含む、請求項36記載の方法。

【請求項 4 2】

変化させることが増加させることである、請求項36記載の方法。

【請求項 4 3】

変化させることが減少させることである、請求項36記載の方法。

【請求項 4 4】

抗菌剤、流体、昇圧剤、コルチコステロイド、活性化プロテインC、インスリンと共のグルコース、機械的人工換気、腎代替療法、および鎮静からなる群より選択される処置を施す段階をさらに含む、請求項36記載の方法。

【請求項 4 5】

炎症応答が重度敗血症または敗血症性ショックである、請求項36記載の方法。

【請求項 4 6】

PIGF受容体の発現または活性を変化させる組成物の治療的有効量を該被験体に投与する段階を含む、炎症応答をもつ被験体を処置する方法。

【請求項 4 7】

PIGF受容体がニューロピリン-1またはVEGFR-1である、請求項46記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 48】

抗菌剤、流体、昇圧剤、コルチコステロイド、活性化プロテインC、インスリンと共のグルコース、機械的人工換気、腎代替療法、および鎮静からなる群より選択される処置を施す段階をさらに含む、請求項46記載の方法。

【請求項 49】

被験体がヒトである、請求項46記載の方法。

【請求項 50】

変化させることが増加させることである、請求項46記載の方法。

【請求項 51】

変化させることが減少させることである、請求項46記載の方法。

10

【請求項 52】

検査被験体から単離された試料におけるVEGF発現または活性のレベルを分析する段階を含む、該検査被験体において炎症応答を診断する方法であって、非罹患被験体に見出されるレベルと比較した、該試料におけるVEGF発現または活性の増加したレベルが、該検査被験体が炎症応答を有することを示す、方法。

【請求項 53】

PIGF、sFlt-1、TNF- α 、IL-6、D-ダイマー、E-セレクトリン、P-セレクトリン、ICAM-1、VCAM-1、Cox-2、またはPAI-1の少なくとも1つのレベルを分析する段階をさらに含む、請求項52記載の方法。

【請求項 54】

被験体がヒトである、請求項52記載の方法。

20

【請求項 55】

診断される炎症応答が重度敗血症または敗血症性ショックである、請求項52記載の方法。

【請求項 56】

以下の段階を含む、炎症応答をもつ被験体を処置するのに有用な候補化合物を同定する方法：

(a) VEGFを化合物と接触させる段階；および

(b) 該VEGFの活性を測定する段階であって、該化合物の非存在下におけるVEGF活性と比較した、該化合物の存在下におけるVEGF活性の減少が、炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物であると該化合物を同定する、段階。

30

【請求項 57】

化合物が化学ライブラリーから選択される、請求項56記載の方法。

【請求項 58】

以下の段階を含む、炎症応答をもつ被験体を処置するのに有用な候補化合物を同定する方法：

(a) VEGFをコードするポリヌクレオチドを含む細胞または細胞抽出物を化合物と接触させる段階；および

(b) 該細胞または細胞抽出物におけるVEGF発現のレベルを測定する段階であって、該化合物の非存在下におけるレベルと比較した、該化合物の存在下におけるVEGF発現の減少したレベルが、炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物であると該化合物を同定する、段階。

40

【請求項 59】

細胞が哺乳動物中の細胞である、請求項58記載の方法。

【請求項 60】

接触段階(a)の前に哺乳動物ヘリポ多糖を投与する段階をさらに含む、請求項59記載の方法。

【請求項 61】

化合物が化学ライブラリーから選択される、請求項58記載の方法。

【請求項 62】

50

以下の段階を含む、炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物を同定する方法

- ：
- (a) VEGF受容体またはそのVEGF結合断片を化合物と接触させる段階；および
- (b) 該化合物の該受容体への結合を測定する段階であって、該化合物の該VEGF受容体またはその該断片への特異的結合が、該化合物が炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物であることを示す、段階。

【請求項63】

VEGF受容体が、ニューロピリン-1、VEGFR-1、VEGFR-2、またはそれらの断片である、請求項62記載の方法。

【請求項64】

化合物が化学ライブラリーから選択される、請求項62記載の方法。

【請求項65】

VEGFの発現または活性を減少させる組成物の治療的有効量を該被験体に投与する段階を含む、炎症応答をもつ被験体を処置する方法。

【請求項66】

被験体がヒトである、請求項65記載の方法。

【請求項67】

組成物が、VEGFを特異的に結合する抗体、またはそのVEGF結合断片を含む、請求項65記載の方法。

【請求項68】

組成物が、VEGFをコードするmRNAに干渉するRNAを含む、請求項65記載の方法。

【請求項69】

抗菌剤、流体、昇圧剤、コルチコステロイド、活性化プロテインC、インスリンと共のグルコース、機械的人工換気、腎代替療法、および鎮静からなる群より選択される処置を施す段階をさらに含む、請求項65記載の方法。

【請求項70】

炎症応答が重度敗血症または敗血症性ショックである、請求項65記載の方法。

【請求項71】

VEGF受容体の発現または活性を減少させる組成物の治療的有効量を該被験体に投与する段階を含む、炎症応答をもつ被験体を処置する方法。

【請求項72】

VEGF受容体が、ニューロピリン-1、VEGFR-1、またはVEGFR-2である、請求項71記載の方法。

【請求項73】

被験体がヒトである、請求項71記載の方法。

【請求項74】

抗菌剤、流体、昇圧剤、コルチコステロイド、活性化プロテインC、インスリンと共のグルコース、機械的人工換気、腎代替療法、および鎮静からなる群より選択される処置を施す段階をさらに含む、請求項71記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

連邦政府資金による研究に関する言明

本研究は、National Heart, Lung, and Blood Institute of the National Institutes of Healthからの助成金(Number P01 HL076540)により援助された。米国政府は、それゆえに、本発明に一定の権利を有する。

【0002】

発明の背景

本発明は、炎症応答を診断および処置する分野に関する。

【0003】

10

20

30

40

50

炎症応答は、敗血症、重度敗血症、および敗血症性ショックのような生命に関わる状態と関連している。敗血症は、感染に対する全身性炎症応答として定義される。重度の敗血症は、臓器機能不全と関連し、よく見られ(米国において毎年750,000人の新患)、高死亡率(30%)をもつ。発生率は、人口の高齢化、ならびに免疫抑制剤および侵襲的手技のより幅広い使用のため、1年あたり1.5%、増加することが予想される。感染への宿主応答は、複雑で、可溶性介在物質(例えば、炎症および凝血カスケードの構成要素)および細胞(例えば、血小板、単球、および内皮細胞)の精巧な配列を含む。炎症もしくは凝血経路の一つまたは別の構成要素をブロックする以前の努力は、生存にほとんど影響を及ぼしていない。調べられた多くの作用物質および薬物の中で、2つのみが第三相臨床試験において効力を実証されている：ヒト腫瘍壊死因子(TNF)- α に対するマウスモノクローナル抗体およびヒト組換え活性化プロテインC(rhAPC)。しかしながら、これらの介入にも関わらず、死亡率は25~30%で高く留まっている。明らかに、治療の進歩は、敗血症病態生理学の理解の向上を条件とする。未処置の重度敗血症の高死亡率、および本発明の前の、効果的処置の欠如を考えると、敗血症のような炎症応答についてのより良い診断および処置ツールの必要性がある。

10

20

30

40

50

【0004】

血管内皮増殖因子(VEGF)/血管透過因子(VPF)は、Dvorakおよび共同研究者らによって初めて同定され、内皮透過性の強力な刺激物質として特徴付けられた。VEGFは、その後、内皮細胞の増殖、遊走、および生存を促進することが報告された。VEGF(VEGF-Aとも呼ばれる)は、VEGF-B、-C、-D、および胎盤由来増殖因子(PlGF)を含む関連タンパク質の増大するファミリーのメンバーである。VEGFは、2つの膜貫通受容体、すなわち、Flt-1およびFlk-1、に結合し、PlGFはFlt-1のみに結合する。血管壁内で、Flk-1は内皮細胞に選択的に発現する。Flt-1は内皮細胞および単球の両方に存在する。

【発明の開示】

【0005】

発明の概要

第一局面において、本発明は、検査被験体から単離された試料におけるsFlt-1発現または活性のレベルを分析する段階を含む、検査被験体(例えば、ヒト)において炎症応答(例えば、重度敗血症または敗血症性ショック)を診断する方法であって、非罹患被験体に見出されるレベルと比較した、試料におけるsFlt-1発現または活性の増加したレベルが、検査被験体が炎症応答を有することを示す方法を提供する。本方法はさらに、VEGF、PlGF、TNF- α 、IL-6、D-ダイマー、E-セレクトリン、P-セレクトリン、ICAM-1、VCAM-1、Cox-2、またはPAI-1の少なくとも1つのレベルを分析する段階を含みうる。

【0006】

本発明はまた、炎症応答をもつ被験体を処置するために有用な候補化合物を同定する方法であって、sFlt-1を化合物(例えば、化学ライブラリーから選択される化合物)と接触させる段階；およびsFlt-1の活性を測定する段階であって、化合物の非存在下におけるsFlt-1活性と比較した、化合物の存在下におけるsFlt-1活性の増加が、炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物であると化合物を同定する段階を含む方法を提供する。測定段階は、VEGFまたはPlGFの少なくとも1つのsFlt-1への結合を測定する段階を含みうる。

【0007】

本発明はまた、炎症応答をもつ被験体を処置するために有用な候補化合物を同定する方法であって、sFlt-1をコードするポリヌクレオチドを含む細胞(例えば、哺乳動物における細胞)または細胞抽出物を化合物(例えば、化学ライブラリーから選択される化合物)と接触させる段階；および細胞または細胞抽出物におけるsFlt-1発現のレベルを測定する段階であって、化合物の非存在下におけるレベルと比較した、化合物の存在下におけるsFlt-1発現の増加したレベルが、炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物であると化合物を同定する段階を含む方法を提供する。本方法はさらに、接触段階の前に、哺乳動物へリポ多糖を投与する段階を含みうる。

【0008】

本発明はまた、sFlt-1発現または活性を増加させる組成物(例えば、sFlt-1を含む組成物)の治療的有効量を被験体に投与する段階を含む、炎症応答(例えば、重度敗血症または敗血症性ショック)をもつ被験体(例えば、ヒト)を処置する方法を提供する。本方法はさらに、抗菌剤、流体、昇圧剤、コルチコステロイド、活性化プロテインC、インスリンと共のグルコース、機械的人工換気、腎代替療法(renal replacement therapy)、および鎮静からなる群より選択される処置を施す段階を含みうる。

【0009】

本発明はまた、検査被験体から単離された試料におけるPIGF発現または活性のレベルを分析する段階を含む、検査被験体(例えば、ヒト)において炎症応答(例えば、重度敗血症または敗血症性ショック)を診断する方法であって、非罹患被験体におけるレベルと比較した、試料におけるPIGF発現または活性のレベルの変化(例えば、増加または減少)が、検査被験体が炎症応答を有することを示す方法を提供する。本方法はさらに、VEGF、PIGF、TNF- α 、IL-6、D-ダイマー、E-セレクトリン、P-セレクトリン、ICAM-1、VCAM-1、Cox-2、またはPAI-1の少なくとも1つのレベルを分析する段階を含みうる。

10

【0010】

本発明はまた、炎症応答をもつ被験体を処置するために有用な候補化合物を同定する方法であって、PIGFを化合物(例えば、化学ライブラリーから選択される化合物)と接触させる段階；およびPIGFの活性を測定する段階であって、化合物の非存在下におけるPIGF活性と比較した、化合物の存在下におけるPIGF活性の変化(例えば、増加または減少)が、炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物であると化合物を同定する段階を含む方法を提供する。

20

【0011】

本発明はまた、炎症応答をもつ被験体を処置するために有用な候補化合物を同定する方法であって、PIGFをコードするポリヌクレオチドを含む細胞(例えば、哺乳動物における細胞)または細胞抽出物を化合物(例えば、化学ライブラリーから選択される化合物)と接触させる段階；および細胞または細胞抽出物におけるPIGF発現のレベルを測定する段階であって、化合物の非存在下におけるレベルと比較した、化合物の存在下におけるPIGF発現のレベルの変化(例えば、増加または減少)が、炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物であると化合物を同定する段階を含む方法を提供する。本方法はさらに、接触段階の前に、哺乳動物ヘリポ多糖を投与する段階を含みうる。

30

【0012】

本発明はまた、炎症応答(例えば、重度敗血症または敗血症性ショック)をもつ被験体(例えば、ヒト)を処置するための候補化合物を同定する方法であって、PIGF受容体(例えば、ニューロピリン-1もしくはVEGFR-1、またはその断片)またはそのPIGF結合断片を化合物(例えば、化学ライブラリーから選択される化合物)と接触させる段階；および化合物の受容体への結合を測定する段階であって、化合物のPIGF受容体またはその断片への特異的結合が、化合物が炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物であると同定する段階を含む方法を提供する。

【0013】

本発明はまた、PIGFの発現または活性を変化させる(例えば、増加させる、または減少させる)組成物(例えば、PIGF、PIGFをコードする核酸、またはPIGF活性をもつその断片、PIGFを特異的に結合する抗体、またはそのPIGF結合断片、PIGFタンパク質をコードするmRNAに干渉するRNAを含む組成物)の治療的有効量を被験体に投与する段階を含む、炎症応答(例えば、重度敗血症または敗血症性ショック)をもつ被験体(例えば、ヒト)を処置する方法を提供する。本方法はさらに、抗菌剤、流体、昇圧剤、コルチコステロイド、活性化プロテインC、インスリンと共のグルコース、機械的人工換気、腎代替療法、および鎮静からなる群より選択される処置を施す段階を含みうる。

40

【0014】

本発明はまた、PIGF受容体(例えば、ニューロピリン-1もしくはVEGFR-1)の発現または活性を変化させる(例えば、増加させる、または減少させる)組成物の治療的有効量を被験

50

体に投与する段階を含む、炎症応答(例えば、重度敗血症または敗血症性ショック)をもつ被験体(例えば、ヒト)を処置する方法を提供する。本方法はさらに、抗菌剤、流体、昇圧剤、コルチコステロイド、活性化プロテインC、インスリンと共のグルコース、機械的人工換気、腎代替療法、および鎮静からなる群より選択される処置を施す段階を含みうる。

【0015】

本発明はまた、検査被験体から単離された試料におけるVEGF発現または活性のレベルを分析する段階を含む、検査被験体(例えば、ヒト)において炎症応答(例えば、重度敗血症または敗血症性ショック)を診断する方法であって、非罹患被験体に見出されるレベルと比較した、試料におけるVEGF発現または活性の増加したレベルが、検査被験体が炎症応答を有することを示す方法を提供する。本方法はさらに、PIGF、sFlt-1、TNF- α 、IL-6、D-ダイマー、E-セレクトリン、P-セレクトリン、ICAM-1、VCAM-1、Cox-2、またはPAI-1の少なくとも1つのレベルを分析する段階を含みうる。

10

【0016】

本発明はまた、炎症応答をもつ被験体を処置するために有用な候補化合物を同定する方法であって、VEGFを化合物(例えば、化学ライブラリーから選択される化合物)と接触させる段階；およびVEGFの活性を測定する段階であって、化合物の非存在下におけるVEGF活性と比較した、化合物の存在下におけるVEGF活性の減少が、炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物であると化合物を同定する段階を含む方法を提供する。

【0017】

本発明はまた、炎症応答をもつ被験体を処置するために有用な候補化合物を同定する方法であって、VEGFをコードするポリヌクレオチドを含む細胞(例えば、哺乳動物における細胞)または細胞抽出物を化合物(例えば、化学ライブラリーから選択される化合物)と接触させる段階；および細胞または細胞抽出物におけるVEGF発現のレベルを測定する段階であって、化合物の非存在下におけるレベルと比較した、化合物の存在下におけるVEGF発現の減少したレベルが、炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物であると化合物を同定する段階を含む方法を提供する。本方法はさらに、接触段階の前に、哺乳動物ヘリポ多糖を投与する段階を含みうる。

20

【0018】

本発明はまた、炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物を同定する方法であって、VEGF受容体(例えば、ニューロピリン-1、VEGFR-1、VEGFR-2、またはその断片)またはそのVEGF結合断片を化合物(例えば、化学ライブラリーから選択される化合物)と接触させる段階；および化合物の受容体への結合を測定する段階であって、化合物のVEGF受容体またはその断片への特異的結合が、化合物が炎症応答をもつ被験体を処置するための候補化合物であると同定する段階を含む方法を提供する。

30

【0019】

本発明はまた、組成物(例えば、VEGFの発現もしくは活性を減少させるVEGFを特異的に結合する抗体またはそのVEGF結合断片を含む組成物、またはVEGFをコードするmRNAに干渉するRNAを含む組成物)の治療的有効量を被験体に投与する段階を含む、炎症応答(例えば、重度敗血症または敗血症性ショック)をもつ被験体(例えば、ヒト)を処置する方法を提供する。本方法はさらに、抗菌剤、流体、昇圧剤、コルチコステロイド、活性化プロテインC、インスリンと共のグルコース、機械的人工換気、腎代替療法、および鎮静からなる群より選択される処置を施す段階を含みうる。

40

【0020】

本発明はまた、VEGF受容体(例えば、ニューロピリン-1、VEGFR-1、またはVEGFR-2)の発現または活性を減少させる組成物の治療的有効量を被験体に投与する段階を含む、炎症応答(例えば、重度敗血症または敗血症性ショック)をもつ被験体(例えば、ヒト)を処置する方法を提供する。本方法はさらに、抗菌剤、流体、昇圧剤、コルチコステロイド、活性化プロテインC、インスリンと共のグルコース、機械的人工換気、腎代替療法、および鎮静からなる群より選択される処置を施す段階を含みうる。

【0021】

50

「炎症応答」とは、被験体、例えば、ヒトのような哺乳動物における免疫系の活性化を意味する。炎症応答は、サイトカイン、VEGF、PIGF、およびsFlt-1の誘導を伴う場合があり、例えば、自己免疫疾患に起因し得、哺乳動物と、ウイルス、グラム陰性細菌、グラム陽性細菌、またはリポ多糖のようなその構成要素との接触に起因しうる。

【0022】

「血管内皮増殖因子(VEGF)」とは、米国特許第5,332,671号；第5,240,848号；第5,194,596号；およびCharnock-Jones et al.(*Biol. Reproduction*, 48:1120-1128, 1993)に定義された増殖因子と相同であり、かつVEGF生物活性を有する哺乳動物増殖因子を意味する。VEGFは、グリコシル化ホモダイマーとして存在し、少なくとも4つの異なる選択的にスプライシングされたアイソフォームを含む。天然VEGFの生物活性は、血管内皮細胞または臍静脈内皮細胞の選択的増殖の促進および血管新生の誘導を含む。本明細書に用いられる場合、VEGFは、任意のVEGFファミリーメンバーまたはアイソフォーム(例えば、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF189、VEGF165、またはVEGF121)を含む。VEGFは、参照により本明細書に組み入れられた米国特許第6,447,768号；第5,219,739号；および第5,194,596号に記載されている、VEGF121またはVEGF165アイソフォーム(Tischer et al., *J Biol Chem* 266:11947-11954, 1991; Neufed et al., *Cancer Metastasis* 15:153-158, 1996)でありうる。Gille et al.(*J Biol Chem* 276:3222-3230, 2001)に記載されたKDR選択性VEGFおよびFlt選択性VEGFのようなVEGFの突然変異型も含まれる。ヒトVEGFが好ましいが、本発明は、ヒト型に限定されず、VEGFの他の動物型を含みうる(例えば、マウス、ラット、イヌ、またはニワトリ)。

10

20

【0023】

「胎盤増殖因子(PIGF)」とは、GenBankアクセッション番号P49763により定義されたタンパク質と相同である哺乳動物増殖因子、およびPIGF生物活性を有する哺乳動物増殖因子を意味する。PIGFはVEGFファミリーに属するグリコシル化ホモダイマーであり、選択的スプライシング機構を通して2つの異なるアイソフォームとして見出されうる。PIGFは、胎盤において細胞栄養芽層およびシンシチウム栄養芽層によって発現し、PIGF生物活性は、内皮細胞、特に栄養芽細胞の増殖、遊走、および活性化の誘導を含む。

【0024】

「可溶性Flt-1(sFlt-1)」(VEGF-R1としても知られている)とは、GenBankアクセッション番号U01134により定義されたタンパク質と相同である可溶性Flt-1受容体、およびsFlt-1生物活性を有する可溶性Flt-1受容体を意味する。sFlt-1ポリペプチドの生物活性は、例えば、sFlt-1のVEGFへの結合をアッセイすることにより、任意の標準方法を用いてアッセイされうる。sFlt-1は、Flt-1受容体の膜貫通ドメインおよび細胞質チロシンキナーゼドメインを欠損する。sFlt-1は、VEGFおよびPIGFに高親和性で結合できるが、それは、増殖または血管新生を誘導することができず、それゆえに、Flt-1受容体およびKDR受容体とは機能的に異なる。sFlt-1は、最初、ヒト臍内皮細胞から精製され、後で、インビボで栄養芽細胞により産生されることが示された。本明細書に用いられる場合、sFlt-1は、任意のsFlt-1ファミリーメンバーまたはアイソフォームを含む。

30

【0025】

「変化」とは、本明細書に記載された方法のような標準の技術分野公知の方法により検出される場合の遺伝子またはポリペプチドの発現レベルにおける変化(増加または減少)を意味する。本明細書に用いられる場合、増加または減少は、発現レベルにおける25%変化、40%変化、または50%もしくはそれ以上の変化のような発現レベルにおける少なくとも10%変化を含む。「変化」はまた、本発明のポリペプチド(例えば、sFlt-1、VEGF、またはPIGF)のいずれかの生物活性における変化(増加または減少)を示すことができる。PIGFまたはVEGFについての生物活性の例は、イムノアッセイ、リガンド結合アッセイ、またはスキャッチャードプロット分析により測定されるような受容体への結合、およびBrdU標識、細胞計数実験、もしくは³H-チミジン取り込みのようなDNA合成についての定量的アッセイにより測定されるような細胞増殖または遊走の誘導を含む。sFlt-1についての生物活性の例は、イムノアッセイ、リガンド結合アッセイ、またはスキャッチャードプロット分析によ

40

50

り測定されるようなPIGFおよびVEGFへの結合を含む。ポリペプチドのそれぞれについての生物活性の追加例は本明細書に記載されている。本明細書に用いられる場合、増加または減少は、生物活性における10%変化、生物活性における25%変化、40%変化、または50%もしくはそれ以上の変化を含む。

【0026】

「化合物」とは、任意の小分子化学化合物、抗体、核酸分子、もしくはポリペプチド、またはそれらの断片を意味する。

【0027】

「断片」とは、ポリペプチドまたは核酸分子の部分を意味する。この部分は、例えば、参照核酸分子もしくはポリペプチドの全長の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、または60%を含む。断片は、少なくとも5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、もしくは1000ヌクレオチドまたはアミノ酸を含みうる。

10

【0028】

「相同の」とは、比較配列の長さに対して既知の遺伝子またはタンパク質配列と少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%もしくはそれ以上の相同性を有する任意の遺伝子またはタンパク質配列を意味する。「相同の」タンパク質はまた、比較タンパク質の少なくとも1つの生物活性を有しうる。ポリペプチドについて、比較配列の長さは、一般的に、少なくとも16、20、25、または35アミノ酸である。核酸について、比較配列の長さは、一般的に、少なくとも50、60、75、または110ヌクレオチドである。

20

「相同性」はまた、抗体を産生するために用いられるエピトープと、抗体が方向づけられるタンパク質またはその断片との間の実質的類似性を指すことができる。この場合、相同性は、問題のタンパク質を特異的に認識することができる抗体の産生を誘発するのに十分な類似性を指す。

【0029】

「キメラ抗体」とは、もう一つのタンパク質の少なくとも一部(典型的には、免疫グロブリン定常ドメイン)に連結された抗体分子の少なくとも抗原結合部分を含むポリペプチドを意味する。

【0030】

「ヒト化抗体」とは、あらかじめ定められた抗原に結合する能力がある免疫グロブリンアミノ酸配列変異体またはその断片を意味する。通常、抗体は、軽鎖、および少なくとも重鎖の可変ドメインの両方を含む。抗体はまた、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3、またはCH4領域を含みうる。ヒト化抗体は、実質的にヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有するフレームワーク領域(FR)、および実質的に非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列(「輸入(import)」配列)を有する相補性決定領域(CDR)を含む。

30

【0031】

一般的に、ヒト化抗体は、非ヒトである源から導入された1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。一般的に、ヒト化抗体は、CDR領域の全てまたは実質的全てが非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、かつFR領域の全てまたは実質的全てがヒト免疫グロブリン共通配列のFR領域である、少なくとも1つ、および典型的には2つの可変ドメイン(Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab_c、Fv)の実質的全てを含む。ヒト化抗体は、最適には、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域(Fc)の少なくとも一部を含む。

40

【0032】

「ハイブリダイズする」とは、様々なストリンジェンシー条件下で相補性ポリヌクレオチド配列またはそれらの部分間で二本鎖分子を形成しうる対を意味する。(例えば、Wahl and Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399; Kimmel, Methods Enzymol 152:507, 1987。)例えば、ストリンジェントな塩濃度は、通常、約750mM未満のNaClおよび約75mM未満のクエン酸三ナトリウム、例えば、約500mM未満のNaClおよび約50mM未満のクエン酸三ナトリウム、または約250mM未満のNaClおよび約25mM未満のクエン酸三ナトリウムである。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、有機溶媒、例えば、ホルムアミドの非

50

存在下で得られうるが、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、少なくとも約35%または少なくとも50%ホルムアミドの存在下で得られうる。ストリンジェントな温度条件は、通常、少なくとも約30℃、例えば、少なくとも約37℃または少なくとも約42℃の温度を含む。ハイブリダイゼーション時間、界面活性剤、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の濃度、および担体DNAの包含または排除のような変わる追加のパラメーターは、当業者に周知である。様々なストリンジェンシーのレベルは、必要に応じてこれらの様々な条件を組み合わせることにより達成される。一つの態様において、ハイブリダイゼーションは、750mM NaCl、75mMクエン酸三ナトリウム、および1%SDSにおいて30℃で生じる。もう一つの態様において、ハイブリダイゼーションは、500mM NaCl、50mMクエン酸三ナトリウム、1%SDS、35%ホルムアミド、および100 µg/ml変性サケ精子DNA(ssDNA)において37℃で生じる。さらにもう一つの態様において、ハイブリダイゼーションは、250mM NaCl、25mMクエン酸三ナトリウム、1%SDS、50%ホルムアミド、および200 µg/ml ssDNAにおいて42℃で生じる。これらの条件に関する有用な変動は、当業者にとって容易に明らかであると思われる。

10

20

30

【0033】

大部分の適用について、ハイブリダイゼーションの後に続く洗浄段階もまた、ストリンジェンシーによって異なる。洗浄ストリンジェンシー条件は、塩濃度および温度によって定義されうる。上記のように、洗浄ストリンジェンシーは、塩濃度を減少させることにより、または温度を上昇させることにより、増加しうる。例えば、洗浄段階についてのストリンジェントな塩濃度は、約30mM未満のNaClおよび約3mM未満のクエン酸三ナトリウムであり得、ならびに約15mM未満のNaClおよび約1.5mM未満のクエン酸三ナトリウムでありうる。洗浄段階についてのストリンジェントな温度条件は、通常、少なくとも約25℃、42℃、または68℃の温度を含む。一つの態様において、洗浄段階は、30mM NaCl、3mMクエン酸三ナトリウム、および0.1%SDSにおいて25℃で生じる。もう一つの態様において、洗浄段階は、15mM NaCl、1.5mMクエン酸三ナトリウム、および0.1%SDSにおいて42℃で生じる。さらにもう一つの態様において、洗浄段階は、15mM NaCl、1.5mMクエン酸三ナトリウム、および0.1%SDSにおいて68℃で生じる。これらの条件に関する有用な変動は、当業者にとって容易に明らかであると思われる。ハイブリダイゼーション技術は、当業者に周知であり、例えば、Benton and Davis(Science 196:180, 1977); Grunstein and Hogness(Proc Natl Acad Sci USA 72:3961, 1975); Ausubel et al.(Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and Kimmel(Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York); および Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkに記載されている。

【0034】

「特異的に結合する」とは、本発明のポリペプチドを認識および結合するが、自然に本発明のポリペプチドを含む試料、例えば生体試料における他の分子を実質的に認識および結合しない化合物または抗体を意味する。一つの例において、sFlt-1を特異的に結合する抗体は、Flt-1を結合しない。

【0035】

「被験体」とは、限定されるわけではないが、ヒト、またはウシ、ウマ、イヌ、ヒツジ、もしくはネコのような非ヒト哺乳動物を含む、哺乳動物を意味する。

【0036】

「生体試料」または「試料」とは、生物体、または生物体の構成要素(例えば、細胞)から得られる試料を意味する。試料は、任意の生物学的組織または流体でありうる。多くの場合、試料は、被験体由来の試料である「臨床試料」である。そのような試料は、限定されるわけではないが、痰、血液、血液細胞(例えば、白血球)、組織または細針生検試料、尿、腹水、および胸膜液または胸膜細胞を含む。生体試料はまた、組織学的目的のために採取された凍結切片のような組織の切片を含みうる。

【0037】

40

50

「実質的同一の」とは、保存的アミノ酸置換、例えば、一つのアミノ酸の同じクラスのもう一つの代わりとしての置換(例えば、グリシンの代わりとしてバリン、リシンの代わりとしてアルギニンなど)だけ異なる、またはタンパク質の機能を破壊しないアミノ酸配列の位置にある1つもしくは複数の非保存的置換、欠失、または挿入だけ異なるアミノ酸配列を意味する。アミノ酸配列は、もう一つのアミノ酸配列と少なくとも70%、80%、90%、95%、98%、または99%相同でありうる。同一性を決定するための方法は、公的に利用可能なコンピュータプログラムにおいて得られる。2つの配列間の同一性を決定するためのコンピュータプログラム方法は、限定されるわけではないが、GCGプログラムパッケージ(Devereux et al., *Nucleic Acids Research* 12:387, 1984)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990))を含む。周知のSmith Watermanアルゴリズムもまた、同一性を決定するために用いられうる。BLASTプログラムは、NCBIおよび他の供給源から公的に利用可能である(BLAST Manual, Altschul, et al., NCBI NLM NIH, Bethesda, MD 20894; BLAST 2.0 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)。これらのソフトウェアプログラムは、様々な置換、欠失、および他の改変に相同期を割り当てることにより類似した配列をマッチさせる。保存的置換は、典型的には、以下の群内での置換を含む：グリシン、アラニン、；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リシン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。

10

【0038】

「処置すること」とは、疾患、状態、もしくは応答(例えば、炎症応答)の治癒、安定化、寛解、または予防のために薬学的組成物を投与または処方することを意味する。この用語は、積極的処置、すなわち、明確に改善へと向けられた処置を含み、原因処置、すなわち、疾患、状態、または応答の原因の除去へと向けられた処置も含む。加えて、この用語は、緩和処置、すなわち、治癒よりむしろ症状の軽減のために設計された処置；予防的処置、すなわち、予防に向けられた処置；および補助的処置、すなわち、改善へと向けられたもう一つの特定の治療を補うために用いられる処置を含む。「処置すること」という用語はまた、対症療法、すなわち、疾患、状態、または応答の全身症状へ向けられた処置も含む。

20

【0039】

「有効量」とは、疾患または状態の少なくとも1つの症状を処置する能力がある化合物または化合物の組み合わせの量を意味する。活性化合物または組み合わせの治療的有効量は、投与様式、被験体の年齢、体重、および全般的健康に依存して変わりうる。

30

【0040】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明、図面、および特許請求の範囲から明らかであると思われる。

【0041】

詳細な説明

本発明は、敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショックのような炎症応答を診断および処置する方法を含む。本発明はさらに、炎症応答の処置に有用な候補化合物についてスクリーニングする方法を含む。これらの方法は、VEGF、PIGF、およびsFlt-1の循環レベルが敗血症の動物およびヒトモデルにおいて時間依存的様式で敗血症で上昇するという発見、VEGFおよびPIGFの増加したレベルが敗血症の病態に結びつけられるという発見、ならびにsFlt-1での処置が敗血症、重度敗血症、および敗血症性ショックの重症度を減少させる、またはこれらを予防するという発見に由来する。

40

【0042】

具体的には、内毒血症のマウスモデルにおけるsFlt-1のアデノウイルス(Ad)媒介性過剰発現は、VEGFおよびPIGFレベルにおける上昇を減衰させ、心臓機能、血管透過性、および死亡率への内毒血症の効果を遮断する。同様に、盲腸結紮穿孔刺(CLP)モデルにおいて、Ad-sFlt-1は、心臓機能異常および死亡から保護する。内毒血症の発症またはCLPから1時間後に始まる治療計画において投与される場合、sFLTペプチド投与は、結果として、心臓生理学

50

および生存における顕著な改善を生じる。Flk-1に対する抗体の全身投与は敗血症死亡から保護するが、Flt-1に対する抗体は保護しない。VEGFのAd媒介性過剰発現はリポ多糖媒介性毒性効果を憎悪するが、PIGFはリポ多糖媒介性毒性効果を憎悪しない。合わせると、これらのデータは、敗血症表現型を媒介するにおけるVEGFについての病態生理学的役割を支持する。

【0043】

内皮透過性および増殖を促進するにおけるその役割に加えて、VEGFは炎症および凝血に寄与しうる。例えば、インビトロ条件下で、VEGFは、内皮細胞において細胞接着分子(E-セレクトリン、細胞間接着分子(ICAM)-1、および血管細胞接着分子(VCAM)-1)の発現を誘導し、白血球の接着を促進する(Kim et al., J Biol Chem 276:7614-7620, 2001; Reinders et al., J Clin Invest 112:1655-1665, 2003)。さらに、VEGFシグナル伝達は、組織因子mRNA、タンパク質、および凝血促進活性を上方制御する(Lucerna et al., J Biol. Chem 278:11433-11440, 2003)。これらのVEGFの炎症促進/凝血促進効果は、NF- κ B、Egr-1、およびNF-AT転写因子の活性化により、少なくとも一部、媒介される。VEGFは、関節リウマチ、癌、および炎症性腸疾患を含むいくつかのヒト疾患状態における病態生理学的メダイエータとして関係付けられている(Kuenen et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol 22:1500-1505, 2002; Harada et al., Scand J Rheumatol 27:377-380, 1998; Taha et al., Dig Dis Sci 49:109-115, 2004)。2つの独立した研究は、ヒトの重度敗血症/敗血症性ショックと上昇したVEGFの循環レベルとの間の関連を報告している(van der Flier et al., Shock 23:35-38, 2005; Pickkers et al., Shock 24:508-512, 2005)。最新の研究により初めて、VEGFが敗血症表現型を媒介するにおいて病原性役割を果たし、従って、新規な治療標的の代表例であることが突き止められた。

10

20

30

40

50

【0044】

いくつかの異なる動物およびヒトモデルを用いて、本発明者らは、敗血症がVEGFおよびPIGFの増加した循環レベルと関連していることを発見した。このレベルは、内毒血症モデルにおいて最も高く、CLPにおいて中間であり、肺炎において最も低かった。重要なことに、その所見は、内毒血症および重度敗血症のヒトモデルにおいて確認された。すべての場合において、VEGFおよびPIGFレベルの誘導は、TNF- α 、IL-1、およびIL-6と比較して、より遅い時点で起こった。sFlt-1は遊離VEGFおよびPIGFをブロックしたが、TNF- α 、IL-1、およびIL-6の初期増加に効果を生じなかった。さらに、IL-1およびTNF- α に応答する能力を欠く三重突然変異体マウスは、VEGFおよびPIGFレベルにおいてLPS媒介性増加を示さなかった。合わせると、これらの所見は、VEGFおよびPIGFが敗血症の後期マーカーであり、初期応答サイトカインの下流に位置することを示している。

【0045】

sFlt-1の投与は、LPSおよびCLP媒介性罹患率および死亡率を減衰させる。sFlt-1はVEGFおよびPIGFの両方を結合するが、いくつかの所見は、敗血症病態生理を媒介するにおけるVEGFの重要性を指摘している。第一に、PIGF濃度は、ヒト敗血症において循環VEGF濃度の多くとも10分の1であった。第二に、PIGFは、VEGFより低い親和性でFlt-1に結合する。第三に、VEGFは、内皮細胞を低いTNF- α 濃度の効果に対して感受性を増加させたが、PIGFは増加させなかった。第四に、VEGFの過剰発現は、結果として、LPS感受性における顕著な増加を生じたが(100%死亡率)、PIGFは生じなかった。最後に、かつ最も重要なことには、Flk-1に対する抗体は敗血症死亡率を減衰させたが、Flt-1に対する抗体は減衰させなかった。

【0046】

調べられたすべての臓器はPIGFタンパク質の増加したレベルを示したが、心臓、肝臓、および腎臓がVEGF誘導の主要な源であった。VEGFレベルが血清および血漿で類似していた(対照マウスおよびLPS処理されたマウスの両方において)という所見は、VEGFの循環プールへの血小板の有意な寄与と相反する。低酸素症は両方の増殖因子の発現を誘導することが知られているが、低酸素症は敗血症のマウスおよびヒトモデルにおける普遍的な所見ではない。研究は、IL-1、IL-6、およびCoxを含む炎症性メダイエータが、様々な細胞型に

においてVEGFのmRNA発現を増加させうることを示している(Stocks et al., FEBS Lett 579:2551-2556, 2005; Jung et al., Angiogenesis 4:155-162, 2001; Loeffler et al., Int J Cancer 115:202-213, 2005)。インビトロ条件下で、VEGFおよびグルコースは、内皮細胞においてPIGF mRNAおよびタンパク質レベルを誘導することが示されている(Zhao et al., Microvasc Res 68:239-246, 2004)。従って、敗血症と関連したサイトカインストーム(cytokine storm)が、VEGFおよびPIGFレベルにおける増加に寄与しうる。

【0047】

VEGFが、低いTNF- α 濃度の効果に対する内皮細胞の感受性を増加させるという観察は、敗血症における高いVEGFレベルが活性化表現型を減衰させうることを示唆する。加えて、内皮透過性のVEGF誘導は、敗血症における罹患率および死亡率に寄与しうる。

10

【0048】

内毒血症がsFlt-1の増加した循環レベルと関連しているという本発明者らの所見は新規である。以前の研究は、sFlt-1の循環レベルが妊娠第三期において増加し、子癩前症をもつ患者において異常に上昇することを実証している(Maynard et al., J Clin Invest 111:649-658, 2003)。これらの後者の変化は、循環遊離VEGFおよびPIGFにおける低下と関連している。興味深いことに、TNF- α は、正常な胎盤絨毛外植片からのsFlt-1の放出を誘導することが示されている(Ahmad et al., Circ Res 95:884-891, 2004)。合わせると、循環sFlt-1における敗血症関連変化は、内因性代償性抗炎症性機構を表しうる。

【0049】

要約すれば、本発明者らは、敗血症と、VEGF、PIGF、およびsFlt-1の増加した循環レベルとの間の関連を同定した。より重要なことには、その結果は、敗血症表現型を媒介するにおけるVEGFについての病態生理学的役割を示唆し、VEGF、PIGF、およびsFlt-1が診断/予後アッセイの両方に、加えて敗血症のような炎症性障害を処置するにおいて治療的に、有用でありうる。

20

【0050】

VEGF、その変種(例えば、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、およびVEGF-E)、およびPIGFは、膜受容体VEGFR-1(Flt-1)、VEGFR-2(Flk-1/KDR)、VEGFR-3(Flt-4)、およびニューロピリン-1、加えて、炎症応答に参与するこれらの受容体の可溶型(例えば、sFlt-1; 図1参照)と相互作用する。NF- κ B誘導性応答は、図2に、およびより詳細には図3に示されている。

30

【0051】

以下の実施例は、本発明を例証することを意図され、限定するものとして解釈されるべきではない。

【0052】

実施例1

sFlt-1、VEGF、およびPIGF、ならびに炎症応答

リポ多糖(LPS)誘導性内毒血症マウスモデルおよび盲腸結紮穿刺(CLP)マウスモデルの両方における血漿VEGFおよびPIGFレベルの顕著な上方制御が観察される(図4a~4b)。マウスにおけるリポ多糖(LPS)の腹腔内投与は、結果として、血漿VEGFおよびPIGF濃度における時間依存性増加を生じ、ピークレベル(それぞれ、477pg/mlおよび4311pg/ml)は24 hに起きた(図4a)。対照的に、IL-6およびTNF- α の循環レベルは、測定された最も早い時点(6 h)で最大であった。敗血症のCLPモデルにおいて、VEGF(137.26pg/ml)およびPIGF(71.25pg/ml)のピークレベルは、それぞれ、24 hおよび12 hに起きた(図4b)。大腸菌(*Escherichia coli*)肺炎のマウスモデルにおいて、血漿VEGFレベルは有意には変化しなかったが、PIGFレベルは6 hに増加した(23.01pg/ml)(図4c)。

40

【0053】

ヒトデータ

ヒト被験体において、LPSの全身投与は、結果として、VEGFおよびPIGFの上昇した循環レベルを生じ(図4d)、それぞれ1.5 hおよび2.5 hにピークに達したTNF- α およびIL-6(データ非呈示)とは対照的に、ピークレベル(それぞれ、70pg/mlおよび23.5pg/ml)は4 hに起

50

こった。VEGFおよびPIGFの血漿中レベルは、重度敗血症をもつ10人の患者および10人の健康なボランティアにおいて測定された。研究の着手時、患者におけるVEGFレベル(平均およびSD = 46.49 ± 46.17 pg/ml)は、健康なボランティア(平均およびSD = 3.83 ± 3.16 pg/ml)においてより有意に高かった($P=0.009$)。同様に、研究着手時点での患者におけるPIGFレベル(平均およびSD = 13.52 ± 14.55 pg/ml)は、健康なボランティア(平均およびSD = 0.18 ± 0.58 pg/ml)と比較して有意に高かった($P=0.009$)。たいていの場合(8/10)、VEGFおよびPIGFレベルは、彼らのICU滞在中(一部の 경우에는、最高29日間)、上昇し続けた。最大VEGFおよびPIGFレベルは、それぞれ、367pg/mlおよび96pg/mlであった(図4e)。

【 0 0 5 4 】

VEGFレベルの重症度との相関

VEGFレベルは、内毒血症の重症度と有意に相関する。マイル(mile)アッセイは、非感染マウスと比較して、肺感染後の肺、肝臓、および腎臓組織における有意な血液漏出を示す(図5)。PIGFおよびIL-6は両方とも、非感染マウスと比較して、肺感染によって増加しており(図6)、PIGFと炎症応答の間の関連を示している。内毒血症モデルにおける生理学的測定により、年齢をマッチさせた対照マウスと比較して、低下した心拍出量、血圧、および体温が明らかにされた。これらの結果は、被験体におけるVEGFおよびPIGFの検出が敗血症の診断となること、ならびに敗血症の重症度が被験体において検出されたVEGFまたはPIGFの量と相関することを示す。

【 0 0 5 5 】

sFlt-1処置マウス

可溶性Flt-1(sFlt-1)タンパク質による循環VEGFの全身性遮断がLPS誘発性内毒血症症状を防ぐことは、以下の手順を用いて実証された(図7)。sFlt-1は、遊離VEGF-A、VEGF-B、およびPIGFに結合し、それに従って、細胞表面受容体とのそれらの相互作用をブロックする細胞表面受容体Flt-1の天然のスプライシングバリエーションである(Kendall et al., *Biochem Biophys Res Commun* 226:324-328, 1996)。以前の研究は、Ad-sFlt-1がインビボで肝臓肝細胞に形質導入し、結果として、注入後最高2週間、sFlt-1の高い循環レベルを生じること示している(Kuo et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4605-4610, 2001; Maynard et al., *J Clin Invest* 111:649-658, 2003)。

【 0 0 5 6 】

マウスに、sFlt-1をコードする遺伝子(sFlt-ad)または対照遺伝子(ctrl-ad)を含むアデノウイルスベクターを感染させた。4日後、マウスに、18mg/kg LPSの腹腔内(i.p.)注射を施した。1日後(アデノウイルスベクターでの感染から5日後; 図7参照)、マウスを、心エコー図およびECGを用いて評価し、血液(例えば、血清および血漿)および臓器(例えば、脳、心臓、肝臓、肺、脾臓、腎臓)を含むマウス由来の試料を採取し、分析した。図8a~8fに示されているように、Ad-sFlt-1処置されたマウスは、Ad-GFP処置された動物と比較して、血清におけるsFlt-1の上昇したレベルを示した。重要なことには、Ad-sFlt-1は遊離VEGFおよびPIGFのLPS媒介性誘導を有意に阻害したが、対照Adはそのような効果を生じなかった。対照動物において、LPSは、内因性sFlt-1の循環レベルを増加させ(159.62 pg/mlから 1585.40 pg/mlへ)、さらに、Ad-sFlt-1処置された動物において総sFLT-1を増加させた。要約すれば、sFlt-adでの感染は、結果として、ctrl-ad感染マウスと比較して、LPS投与後の遊離VEGFおよびPIGFのほとんど完全なブロックを生じた。

【 0 0 5 7 】

sFlt-ad感染マウスはまた、ctrl-ad感染マウスと比較して、肺、肝臓、および腎臓においてLPS投与により誘発される血液漏出から保護された(図9aおよび9b)。LPS投与は、結果として、バリア機能における臓器特異的喪失を生じ、肺、肝臓、および腎臓においてエバンスブルー色素の血管外遊走の増加があったが、脳、心臓、または脾臓においてはなかった(図9aおよび9b)。sFlt-1の過剰発現は、肝臓および肺においてLPS誘発性血液漏出を完全に遮断したが、腎臓透過性へのLPSの効果を部分的のみ阻害した。

【 0 0 5 8 】

sFlt-ad感染マウスは、ctrl-ad感染マウスと比較して、LPS処理での死亡率の実質的低

10

20

30

40

50

下を示した(図10a)。sFlt-adマウスの24匹のうちの22匹は、LPS処理後96時間生存したが、24匹のctrl-ad感染マウスのうちの6匹のみが生存した。sFlt-ad感染マウスはまた、ctrl-ad感染マウスと比較して、血塊を形成する傾向を測定するD-ダイマー(図11a)、および血清中レベルが炎症応答において増加するIL-6(図11b)における実質的減少を示した。

【0059】

さらに、生存研究が、GFP(対照)、VEGF、PIGF、またはsFltを過剰発現するLPS処理された(20mg/kg)マウスにおいて行われた(図10b)。対照群において、13/24(54.2%)のマウスが内毒血症で死んだ。上で述べられているように、sFlt-1は、結果として、死亡率における有意な低下を生じた(24匹の動物のうち2匹が死んだ)。VEGFの過剰発現(平均血漿中レベル5.08ng/ml)は、結果として、LPS感受性における顕著な増加を生じたが(100%死亡率)、PIGFの過剰発現(平均血漿中レベル28.23ng/ml)はそのような効果を生じなかった。sFlt-1はまた、敗血症のCLPモデルにおいて生存を向上させた(図10c)。sFlt-1を過剰発現する15匹のマウスのうちの合計4匹(27%)が、GFP発現対照群における16匹中の12匹(75%)と比較して、CLP誘発性敗血症で死んだ($p=0.0063$)(図10c)。VEGFについての主な役割を確認するために、動物を、Flt-1またはFlk-1に対する中和抗体で前処理した。これらの実験において、抗Flk-1抗体は、マウス内毒血症モデルにおいて死亡率を低下させたが、抗Flt-1抗体は低下させなかった(それぞれ、図10dおよび10e)。合わせると、これらの所見は、VEGF-Aが敗血症表現型の重要な決定因子であることを示唆している。

【0060】

敗血症の発症後のVEGF阻害が結果として向上した治療成績を生じるかどうかを決定するために、マウスに、ヒト組換え可溶性Flt-1ペプチドまたは等容量のPBS(対照)の1 μ gを、LPS投与またはCLP手順から1 h後に始めて3 hごと(x4用量)に静脈注射した。可溶性Flt-1ペプチドは、下記のように、LPSまたはCLPの左室内径短縮率(fractional shortening)(図12jおよび12kに示されているように)および心拍数(図12nおよび12o)への効果を完全に遮断した。生存研究において、組換えsFlt-1は、敗血症の内毒血症およびCLPモデルの両方において生存を向上させた。LPSにおける死亡率は、80%から20%へ低下し($p=0.0091$)(図10f)、一方、CLP媒介性死亡率は、75%から16.7%へ減少した($p=0.0061$)(図10g)。これらの結果は、VEGF機能を遮断すること(例えば、sFlt-1を用いて)が、敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショックのような炎症性障害の処置に有用でありうることを示している。

【0061】

VEGFの全身性遮断(sFlt-adの感染を介して)は、心拍出量、血圧、および体温によって測定されるように、マウスにおいてLPS誘発性病的状态を防ぐ(図12a~12g参照)。マウスにおけるLPSの全身投与またはCLPは、結果として、心エコー図における低下した左室内径短縮率(図12h~k)および心拍数(図12l~o)により証明されているように、心臓機能の顕著な低下を生じ(図12a~12o)、心エコー図におけるPR間隔延長を伴った(図12f)。これらの効果は、sFlt-1のAd媒介性過剰発現により完全に遮断されたが(図12hおよび12l)、GFP(対照)またはPBS(対照)注入によっては遮断されなかった。同様の結果は、CLPモデルにおいて実証された(図12iおよび12m)。

【0062】

マウスにおける内毒血症は、炎症性および凝血促進性分子の増加したmRNA発現と関連していた(図13g~13l、14g~14l、および15g~15l)。陰性対照として、VE-カドヘリンmRNAレベルは、調べられたいかなる組織においても増加しなかった(データ非呈示)。免疫蛍光研究において、これらの炎症性メディエータの大部分は、主として内皮に位置していた。マウスにおけるsFlt-adの感染はまた、LPSで処理されたマウスにおける炎症のマーカー(例えば、E-セレクトリン、P-セレクトリン、ICAM-1、VCAM-1、Cox-2、およびPAI-1)の発現レベル(Taqman PCRにより測定された場合)およびタンパク質レベル(免疫蛍光により測定された場合)を、LPSで処理されていない対照(非感染およびctrl-ad感染の両方の)マウスに観察されたものと類似したレベルまで減少させる。これらの低下は、心臓(図13a~13l)、脳(図14a~14l)、および肺(図15a~15l)を含む全身性に観察される。心臓において、E-セレクトリン、P-セレクトリン、ICAM-1、VCAM-1、Cox-2は、わずかな細静脈に誘導された。ICA

10

20

30

40

50

M-1およびVCAM-1はまた、毛細血管内皮で増加した。PAI-1は、毛細血管のみに誘導された。脳において、上のメディエータのすべてが、細静脈の内皮に誘導されたが、毛細血管には誘導されなかった。肺において、E-セレクトリン、P-セレクトリン、ICAM-1、VCAM-1、およびCox-2は、細静脈内皮で増加した。ICAM-1およびPAI-1は肺実質で増加した。これらの免疫組織化学的分析は、内毒血症中のこれらの活性化マーカーの内皮発現がsFlt-1の投与により抑止されることを実証した。

【0063】

同様の結果は細胞培養モデルにおいて観察される。LPSで処理されたヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)は、対照細胞と比較して、E-セレクトリン、ICAM-1、およびVCAM-1における増加を示す。これらの増加は、HUVECにsFlt-1をトランスフェクションすることにより逆転する(図16a~16f)。VEGFが敗血症病的状態および死亡を媒介する機構へのさらなる洞察を得るために、HUVECを、TNF- α 、VEGF、およびPIGFと、単独または組み合わせて、4 h、インキュベートした。VEGFは、VCAM-1(9.3倍)および組織因子(16.4倍)を含むいくつかの遺伝子の発現を誘導したが、PIGFは誘導しなかった(図16h~16j参照)。0.1ng/ml TNF- α 単独で処理された内皮細胞は、VCAM-1において29.4倍の増加、TFにおいて2.13倍の増加、およびCox-2 mRNAレベルにおいて変化無しを示した。対照的に、0.1ng/ml TNF- α プラス100ng/ml VEGFは結果として、VEGF単独の効果を超えて、VCAM-1、Cox-2、および組織因子の有意に増加した発現を生じた。VEGFは、それゆえに、内皮細胞をTNF- α の低濃度に対して感受性を増加させうる。

【0064】

LPS処理後の、PIGFの上方制御

PIGFの上方制御もまた、LPS処理後、心臓、肺、腎臓、および脳に観察され、増加はsFlt-1処置によって正常化される(図17a~17f)。LPSで処理されたTNFおよびIL-1受容体ノックアウトマウスもまた、LPSで処理されなかったマウス(野生型マウスおよびTNF/IL-1受容体ノックアウトマウスの両方)と類似したVEGFおよびPIGFのレベルを有するが、LPS処理された野生型マウスはVEGFおよびPIGFの両方における増加を示す(図18aおよび18b)。

【0065】

結果としてLPS処理されたマウスにおける死亡率の増加を生じさせる、PIGF活性の喪失

抗PIGF抗体およびPIGFの遺伝的欠損の敗血症死亡率への効果もまた、生存に関して評価された。研究は、17mg/kg LPS処理された野生型マウスおよびPIGFヌルマウスにおいて、ならびに20mg/kg LPS処理されたマウスにおいて対照IgGまたは抗PIGF抗体を用いて、行われた。野生型マウスにおいて、7/16(43.7%)マウスが内毒血症で死んだ(図10h)。PIGF欠損は結果として、死亡率の有意な増加を生じた(14/17動物が死んだ; $p=0.0179$)。同様に、抗PIGF抗体処理は、結果として、対照IgG処理群(12/18(66.7%)マウスがLPS誘発性内毒血症で死んだ)と比較して、死亡率における顕著な増加(100%死亡率; $p=0.0301$)を生じた(図10i)。

【0066】

増加したVEGFおよびPIGFの源

上昇した増殖因子濃度の源を決定するために、VEGFおよびPIGFレベルをELISAを用いて様々な組織においてアッセイした。マウスにおけるLPSの全身投与は、結果として、肝臓(3.8倍)、腎臓(1.9倍)、および心臓(3.7倍)において6 hに増加したVEGFタンパク質レベルを生じたが、脳、肺、および脾臓において減少したレベルを生じた(図19)。PIGFタンパク質は、脳(4.8倍)、肺(7.1倍)、心臓(71.8倍)、肝臓(35.2倍)、腎臓(28.5倍)、および脾臓(28.4倍)を含む調べられたすべての組織において増加した(図19)。LPS処理されたマウスまたは対照マウスの血漿と比較して、血清におけるVEGFタンパク質に差がなく、内毒血症における血漿VEGFレベルへの血小板の有意な寄与(データ非呈示)と相反した。これらの所見に基づいて、敗血症は、VEGFおよびPIGFの増加した発現および循環レベルと明らかに関連している。

【0067】

sFlt-1によるサイトカイン誘導の効果

10

20

30

40

50

外因性sFlt-1は、内毒血症中に誘導された血漿サイトカインの最初の6 hピークへ効果を生じなかった(図20a~20i)。しかしながら、サイトカインレベルは、対照アデノウイルスと比較して、Ad-sFlt-1を受けた動物においてより急速に減少した。Ad-sFlt-1は、12 hおよび/または24 hにおいてTNF- α 、IL-1 β 、およびIL-6、ならびにD-ダイマーのLPS媒介性誘導を有意に鈍らせた(図20a~20f)。IL-1RIおよび2つのTNF- α 受容体、TNFR1およびTNFR2についてヌルの三重突然変異体マウスにおけるLPS投与は、結果として、24 hに、野生型対照と比較してVEGFおよびPIGFの有意に低い誘導を生じた(図20g~20i)。合わせると、これらの所見は、VEGFおよびPIGFが、一般的に結びつけられる敗血症誘発性サイトカインの下流に位置することを示唆している。

【0068】

これらの結果は、sFlt-1、VEGF、およびPIGFが、敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショックのような炎症応答をもつ被験体を処置するにおける新規な診断標的、スクリーニング標的、および治療標的であることを示す。

【0069】

実施例2

炎症応答の診断

本発明は、VEGF、PIGF、およびsFlt-1の血清中レベルが炎症応答において増加しているという発見に基づいて、敗血症、重度敗血症、および敗血症性ショックのような炎症応答の診断に有用なアッセイを提供する。従って、炎症応答の診断は、被験体から採取された試料におけるVEGF、PIGF、およびsFlt-1の発現または活性のレベルを測定することにより行われうる。この発現または活性のレベルは、その後、対照試料、例えば、対照被験体から採取された試料、と比較されることができ、対照に対するVEGF、PIGF、またはsFlt-1における増加は、炎症応答の徴候、または炎症応答を発生するリスクがある、もしくはは性向を有すると解釈される。

【0070】

VEGF、PIGF、もしくはsFlt-1ポリペプチド、またはポリペプチドの活性のレベルの分析は、被験体試料、例えば、血液または尿を含む試料、をスクリーニングするための基準として用いられうる。ポリペプチドレベルをスクリーニングするための方法は、VEGF、PIGF、もしくはsFlt-1を特異的に結合する抗体を用いる当技術分野において標準の免疫学的技術(例えば、ウェスタンブロットまたはELISA)を含みうる、またはクロマトグラフィー技術もしくは他のタンパク質精製技術を用いて行われうる。もう一つの態様において、VEGF、PIGF、またはsFlt-1の活性が測定されることができ、対照被験体から採取された試料に対する活性における増加は、炎症応答の徴候である。VEGF活性は、例えば、U.S.P.N. 6,787,323に記載されているように、測定されうる。

【0071】

VEGF、PIGF、またはsFlt-1ポリヌクレオチドのレベルの分析もまた、被験体試料をスクリーニングするための基準として用いられうる。一つの態様において、被験体から採取された試料におけるmRNAレベルが分析され、対照試料(例えば、対照被験体から採取された試料)と比較したmRNAレベルにおける増加が、炎症応答、または炎症応答を発生する性向を示す。mRNAレベルをスクリーニングするための方法は、当技術分野において標準のもののいずれか、例えば、ノーザンブロッティング、を含む。mRNAレベルはまた、定量的逆転写酵素(RT)-PCRのようなPCR技術、当技術分野において標準の方法、を用いて分析されうる。

【0072】

VEGF、PIGF、またはsFlt-1ポリヌクレオチドの分析はまた、炎症状態を発生する素因を示す、sFlt-1、PIGF、もしくはVEGFポリヌクレオチドにおける遺伝的変動、突然変異、または多型を有する被験体を同定するために対応するゲノム配列において行われうる。そのような多型は、当技術分野において公知であり、Parry et al.(Eur. J Immunogenet. 26:321-3, 1999)により記載されている。そのような遺伝的变化は、sFlt-1遺伝子のプロモーター配列、オープンリーディングフレーム、イントロン配列、または非翻訳3'領域に存在

10

20

30

40

50

しうる。遺伝的变化に関する情報は、炎症応答またはそのような状態を発生する性向を有すると被験体を診断するために用いられうる。本明細書に述べられているように、sFlt-1、VEGF、および/またはPIGFの生物活性のレベルにおける特定の変化は、炎症を発生する見込み、またはその素因と相関しうる。結果として、与えられた突然変異を検出した当業者は、その後、タンパク質の生物活性をアッセイして、突然変異が炎症応答を発生する見込みをもたらす、または増加させるかどうかを決定することができる。

【0073】

上記の方法におけるポリヌクレオチドの分析は、sFlt-1、VEGF、またはPIGF核酸分子の配列の直接分析により行われうる。例えば、直接分析は、炎症応答を発生する性向についてヒトを診断するために用いられうる。

10

【0074】

本明細書に記載された診断方法は、個々に、または炎症応答(例えば、敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショック)の存在、重症度、もしくは発生の推定時刻のより正確な診断のために本明細書に記載された任意の他の診断方法と組み合わせ、用いられうる。加えて、本明細書に記載された診断方法は、炎症応答の存在、重症度、もしくは発生の推定時刻の正確な診断のために有用であると決定された任意の他の診断方法(例えば、IL-6もしくはTNF- α 発現または活性の測定、またはD-ダイマーアッセイ)と組み合わせ用いられうる。

【0075】

診断キット

20

本発明はまた、診断検査キットを提供する。例えば、診断検査キットは、VEGF、PIGF、またはsFlt-1に対する抗体、ならびに、抗体と、VEGF、PIGF、またはsFlt-1ポリペプチドとの間の結合を検出するための、および評価するための手段を含みうる。検出について、VEGF、PIGF、またはsFlt-1ポリペプチド-抗体の相互作用が、抗体とVEGF、PIGF、またはsFlt-1ポリペプチドの間での結合後、基質に付着した標識の量を測定することにより確立されうるように、抗体かまたはVEGF、PIGF、またはsFlt-1ポリペプチドかのいずれかが標識され、抗体かまたはVEGF、PIGF、またはsFlt-1ポリペプチドかのいずれかが基質に結合する。通常のELISAは、抗体-基質相互作用を検出するための当技術分野において公知の一般的な方法であり、本発明のキットで提供されうる。VEGF、PIGF、またはsFlt-1ポリペプチドは、限定されるわけではないが、尿、血清、血漿、唾液、羊水、または脳脊髄液を含む事実上任意の体液において検出されうる。正常な対照に存在するレベルのような参照に対するVEGF、PIGF、またはsFlt-1ポリペプチドのレベルにおける変化を測定するキットは、本発明の方法における診断キットとして有用である。

30

【0076】

実施例3

候補化合物の同定のためのスクリーニング方法

本発明はまた、VEGF、PIGF、もしくはsFlt-1に結合する、またはこれらの発現もしくは活性を調節する、敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショックのような炎症応答の処置に有用でありうる化合物の同定のためのスクリーニング方法を提供する。有用な化合物は、VEGFの発現もしくは活性を減少させる、PIGFの発現もしくは活性を増加もしくは減少させる、またはsFlt-1の発現もしくは活性を増加させる。

40

【0077】

スクリーニングアッセイ

VEGF発現もしくは活性を減少させる、PIGF発現もしくは活性を増加もしくは減少させる、またはsFlt-1発現もしくは活性を増加させる化合物を同定するためのスクリーニングアッセイは標準方法により行われる。スクリーニング方法は、高処理量技術を含みうる。加えて、これらのスクリーニング技術は、培養細胞または非ヒト生物体において行われうる。これらの生物体におけるスクリーニングは、ヒトVEGF、PIGF、またはsFlt-1に相同的なポリヌクレオチドの使用を含みうる。例えば、マウスにおけるスクリーニングは、候補化合物のマウスVegfaもしくはPgf遺伝子の発現または活性への効果を測定する段階を含みう

50

る。

【0078】

そのようなスクリーニングアッセイを行うためにいくつかの方法でも利用できる。一つのアプローチに従って、候補化合物を、VEGF、PIGF、またはsFlt-1をコードするポリヌクレオチドを発現する細胞の培地へ様々な濃度で添加する。その後、遺伝子発現が、例えば、ポリヌクレオチド分子から調製された任意の適切な断片をハイブリダイゼーションプローブとして用いる、標準ノーザンブロット分析(Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 1997)により、測定される。候補化合物の存在下での遺伝子発現のレベルは、候補分子を欠く対照培地において測定されたレベルと比較される。sFlt-1発現における増加、またはVEGFもしくはPIGF発現における減少を促進する化合物は、本発明において有用であるとみなされる；そのような分子は、例えば、炎症応答(例えば、敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショック)についての治療用物質として、用いられうる。

10

【0079】

必要に応じて、候補化合物の効果は、別の方法で、同じ一般的なアプローチおよびVEGF、PIGF、もしくはsFlt-1に特異的な抗体でのELISA、ウエスタンブロッティング、または免疫沈降のような標準免疫学的技術を用いてポリペプチド産生のレベルにおいて測定されうる。例えば、イムノアッセイは、VEGF、PIGF、もしくはsFlt-1の発現を検出またはモニターするために用いられうる。そのようなポリペプチドに結合する能力があるポリクローナルまたはモノクローナル抗体は、VEGF、PIGF、またはsFlt-1のレベルを測定するために任意の標準イムノアッセイ形式(例えば、ELISA、ウエスタンブロット、またはRIAアッセイ)で用いられうる。sFlt-1の発現における増加、PIGFの発現における増加もしくは減少、またはVEGFの発現における減少を促進する化合物は、特に有用であるとみなされる。この場合もやはり、そのような分子は、例えば、炎症応答(例えば、敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショック)についての治療用物質として、用いられうる。

20

【0080】

代わりに、または加えて、候補化合物は、特異的に結合して、sFlt-1もしくはPIGFを活性化する、またはVEGFもしくはPIGFを阻害するものについてスクリーニングされうる。そのような候補化合物の効力は、ポリペプチドと相互作用するその能力に依存する。そのような相互作用は、標準結合技術および機能アッセイ(例えば、Ausubel et al., 前記に記載されたもの)のいくつかでも用いて容易にアッセイされうる。例えば、候補化合物は、VEGF、PIGF、またはsFlt-1との相互作用および結合についてインビトロで試験されることができ、その活性を調節するその能力は、任意の標準アッセイ(例えば、本明細書に記載されたもの)によりアッセイされうる。

30

【0081】

一つの特定の態様において、VEGF、PIGF、またはsFlt-1に結合する候補化合物はクロマトグラフィーに基づいた技術を用いて同定されうる。例えば、組換えVEGF、PIGF、またはsFlt-1は、VEGF、PIGF、またはsFlt-1を発現するように操作された細胞から標準技術により精製されることができ、カラム上に固定されうる。候補化合物の溶液を、その後、カラムに通過させ、VEGF、PIGF、またはsFlt-1に特異的な化合物が、ポリペプチドに結合してカラム上に固定されるその能力に基づいて同定される。化合物を単離するために、カラムを、非特異的に結合した分子を除去するために洗浄し、対象となる化合物を、その後、カラムから遊離させ、収集する。この方法(または任意の他の適切な方法)により単離された化合物は、必要に応じて、さらに精製されうる(例えば、高速液体クロマトグラフィーにより)。このアプローチにより単離された化合物はまた、例えば、炎症応答(例えば、敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショック)を処置するための治療用物質として、用いられうる。VEGF、PIGF、またはsFlt-1に10mM以下の親和定数で結合すると同定される化合物が、本発明に特に有用であると考えられる。

40

【0082】

可能性のあるアゴニストおよびアンタゴニストは、VEGF、PIGF、もしくはsFlt-1、また

50

はVEGF、PIGF、もしくはsFlt-1をコードするポリヌクレオチドに結合し、それにより、その活性を増加または減少させる、有機分子、ペプチド、ペプチド模倣体、ポリペプチド、および抗体を含む。可能性のあるアンタゴニストは、VEGFまたはPIGFに結合し、これらのタンパク質がそれらの受容体に結合するのを防ぐ小分子を含む。他の可能性のあるアンタゴニストは、アンチセンス分子を含む。または、小分子は、アゴニストとして働き、sFlt-1をその活性が増加するように結合しうる。

【0083】

VEGF、PIGF、またはsFlt-1をコードするポリヌクレオチド配列はまた、炎症応答(例えば、敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショック)を処置するための化合物の発見および開発に用いられうる。発現におけるVEGF、PIGF、またはsFlt-1は、薬物のスクリーニングのための標的として用いられうる。さらに、コードされたポリペプチドのアミノ末端領域をコードするポリヌクレオチド配列、またはそれぞれのmRNAのシャイン-ダルガーノ配列もしくは他の翻訳促進配列が、対象となるコード配列の発現を制御するためのアンチセンス配列を構築するために用いられうる。VEGFまたはPIGFの断片をコードするポリヌクレオチドは、例えば、RNA干渉が起こり、それにより、VEGFもしくはPIGFの発現または活性を低下させるように発現しうる。

10

【0084】

本発明のアンタゴニストおよびアゴニストは、例えば、敗血症、重度敗血症、および敗血症性ショックのような様々な炎症応答を処置するために、用いられうる。

【0085】

任意で、上記アッセイのいずれかにおいて同定された化合物は、標準組織培養方法かまたは動物モデルのいずれかにおいて、炎症応答を遅延させるまたは寛解させるのに有用であると確認されることができ、成功すれば、炎症応答を処置するための治療用物質として用いられうる。

20

【0086】

小分子は有用な候補治療用物質を提供する。そのような分子は、2,000ダルトン未満、300ダルトンと1,000ダルトンの間、または400ダルトンと700ダルトンの間の分子量を有しうる。これらの小分子は有機分子でありうる。

【0087】

試験化合物および抽出物

一般的に、炎症応答(例えば、敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショック)を処置する能力がある化合物は、当技術分野において公知の方法に従って、天然産物もしくは合成(または半合成)抽出物の両方の大きなライブラリー、または化学ライブラリーから同定される。薬物発見および開発の分野における業者は、試験抽出物または化合物の正確な源が本発明のスクリーニング手順にとって重大な意味をもたないことを理解していると思われる。従って、事実上、化学抽出物または化合物のいくつでも、本明細書に記載された方法を用いてスクリーニングされうる。そのような抽出物または化合物の例は、限定されるわけではないが、植物、真菌、原核生物、または動物に基づいた抽出物、発酵ブロス、および合成化合物、加えて既存の化合物の改変を含む。多数の方法もまた、限定されるわけではないが、糖、脂質、ペプチド、およびポリヌクレオチドに基づいた化合物を含む化学化合物のいくつものランダムまたは定方向の合成(例えば、半合成または全合成)を生じるために利用できる。合成化合物ライブラリーは市販されている。または、細菌、真菌、植物、および動物の抽出物の形をとる天然化合物のライブラリーが市販されている。加えて、天然ライブラリーおよび合成製造されたライブラリーは、必要に応じて、当技術分野において公知の方法に従って、例えば、標準抽出および分画方法により、作製される。さらになお、必要に応じて、任意のライブラリーまたは化合物は、標準化学的、物理的、または生化学的方法を用いて容易に改変される。

30

40

【0088】

加えて、薬物発見および開発の分野における業者は、炎症応答を処置するにおけるそれらの活性についてすでに知られた物質のデレプリケーション(dereplication)(例えば、分

50

類学的デレプリケーション、生物学的デレプリケーション、および化学的デレプリケーション、またはそれらの任意の組み合わせ)、または複製体もしくは繰り返し体の除去のための方法が、可能ならいつでも用いられるべきであることを容易に理解している。

【0089】

粗抽出物が、sFlt-1もしくはPIGF発現または活性を増加させる、またはVEGFもしくはPIGF発現または活性を減少させる活性、または結合活性を有することが見出された場合、陽性リード抽出物のさらなる分画が、観察された効果の原因である化学的成分を単離するために必要である。従って、抽出、分画、および精製過程の目的は、炎症応答(例えば、敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショック)を処置するにおいて有用でありうる活性を有する粗抽出物内の化学物質の特徴付けおよび同定である。そのような不均一な抽出物の分画および精製の方法は当技術分野において公知である。必要に応じて、炎症応答(例えば、敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショック)の処置に有用な作用物質であることが示された化合物は、当技術分野において公知の方法に従って化学修飾される。

10

【0090】

実施例4

炎症応答の処置

本発明はまた、敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショックのような炎症応答をもつ被験体を処置する方法を提供する。処置方法は、炎症応答(例えば、敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショック)をもつ被験体においてsFlt-1もしくはPIGFの量または活性を増加させる、またはVEGFもしくはPIGFの量または活性を低下させる化合物の投与を含む。

20

【0091】

sFlt-1およびPIGF

敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショックのような炎症応答をもつ被験体の処置は、sFlt-1またはPIGFの投与により達成されうる。投与は、本明細書に記載された任意の経路によりうる；しかしながら、非経口投与が好ましく、静脈内投与がより好ましい。投与は、sFlt-1の濃度がFltの基底(すなわち、未処置の)レベルに対して2~50倍、例えば5~100倍、増加するような量でありうる。同様に、PIGFの投与は、基底に対して1.1~200倍、例えば、10~100倍、基底(すなわち、未処置の)に対してPIGFのレベルを増加させうる。さらに、投与されるsFlt-1またはPIGFポリペプチドは、翻訳後修飾(例えば、グリコシル化、リン酸化)、または他の化学修飾、例えば、被験体内のsFlt-1もしくはPIGFの分布を変化させる、またはsFlt-1もしくはPIGFの分解および/もしくは排泄の速度を変化させるように設計される修飾、のような修飾を含みうる。

30

【0092】

抗VEGFおよび抗PIGF抗体

炎症応答をもつ被験体の処置はまた、VEGFまたはPIGFタンパク質を特異的に結合する抗VEGFまたは抗PIGF抗体(例えば、モノクローナル抗体)の投与により達成されうる。例えば、U.S.P.N. 6,884,879に記載されているような、抗VEGF抗体が、本発明の処置方法に用いられうる。他の有用な抗VEGF抗体はベパシツマブ(bevacizumab)(Avastin, Genentech, South San Francisco, Calif.)を含む。VEGFおよびPIGF抗体はまた、R & D Systems, Minneapolis, Minnから入手できる。他のVEGF抗体は、HuMV833, 2C3(Peregrine Pharmaceuticals, Tustin, Calif.)およびVEGF-trap(Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, N.Y.)を含む。

40

【0093】

さらに、抗体は、任意の標準方法により作製され、VEGFまたはPIGF活性を直接的にかまたは間接的にかのいずれかで、遮断するそれらの能力について試験されうる。これらの抗体は、それらをヒト投与にとってより適切にするように何らかの改変されうる。例えば、それらは一本鎖抗体またはヒト化抗体でありうる。この場合もやはり、これらの抗体は、任意の経路、剤形、頻度により、または炎症応答の処置に十分なインビボ濃度を達成する任意の用量で、投与される。

【0094】

50

VEGFおよびPIGF受容体阻害性化合物

炎症応答(例えば、敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショック)を処置するための一つのアプローチは、VEGFまたはPIGFの受容体を特異的に結合する阻害性化合物(例えば、抗体)で被験体を処置することによりうる。VEGF受容体は、VEGFR-1(Flt-1)、VEGFR-2(Flk-1/KDR)、VEGFR-3、およびニューロピリン-1を含む；PIGF受容体はVEGFR-1(Flt-1)およびニューロピリン-1を含む。そのような抗体は当技術分野において公知である(例えば、Flk-1およびFlt-1を特異的に結合する抗体(R&D Systems)；2C7、ヒト化抗VEGFR-2モノクローナル抗体)、または当技術分野において標準の方法を用いて作製され、VEGFもしくはPIGF受容体(例えば、本明細書に記載されたもの)を直接的にかもしくは間接的にかのいずれかで結合するそれらの能力について試験されうる。これらの抗体は、それらをヒト投与にとってより適切にするように何らかの変更されうる。例えば、それらは一本鎖抗体またはヒト化抗体でありうる。この場合もやはり、これらの抗体は、任意の経路、剤形、頻度により、または炎症応答の処置に十分なインビボ濃度を達成する任意の用量で、投与される。上記のように、処置のための抗体は、同様に当技術分野において標準の方法により作製されうる。

10

【0095】

他の阻害性化合物は、SU5416(セマキサニブ(semaxanib))、SU6668、SU011248、PTK-787/ZK222584、ZD6474、CD-547632、AG-013736、およびCEP-7055(Bergsland, E.K. Am J Health-Syst Pharm 61(Suppl 5), S4-S11; Bergsland, E.K., Am J Health-Syst Pharm 61(Suppl 5), S12-S20)を含む。

20

【0096】

VEGF阻害性化合物

VEGFまたはVEGF活性を阻害する任意の化合物もまた、本発明の処置方法に有用である。VEGFを阻害するピリジン誘導体および類似体は、例えば、U.S.P.N. 6,706,731に記載されている。VEGFに高親和性で結合するオリゴヌクレオチドは、例えば、U.S.P.N. 6,696,252に記載されている。VEGF受容体阻害剤として働く2-アミノ-ニコチンアミド誘導体は、例えば、U.S.P.N. 6,624,174および6,878,714に記載されている。VEGF活性を阻害するペプチドは、米国特許第6,559,126号、第5,861,484号、第6,383,486号、第6,100,071号、第6,270,993号、第6,777,534号に記載されている。

30

【0097】

遺伝子治療/治療用核酸

sFlt-1もしくはPIGF発現または活性における増加、またはVEGFもしくはPIGF発現または活性における減少はまた、被験体への遺伝子ベクターの導入を通して達成されうる。VEGFのような内皮細胞分裂促進因子を血管傷害の部位へ発現する能力がある核酸(DNAまたはRNA)の送達、傷害された血管の増殖および再内皮化を誘導する。本発明は血管傷害に関連しておらず、VEGFレベルを低下させようと努力しているが、これらの研究に用いられるsFlt-1およびPIGFのような内皮細胞分裂促進因子をコードする核酸の送達のための技術はまた、本発明に用いられうる。これらの技術は、米国特許第5,830,879号および第6,258,787号に記載されており、参照により本明細書に組み入れられている。

40

【0098】

本発明において、核酸は、sFlt-1、VEGF、もしくはPIGF、または任意のsFlt-1、VEGF、もしくはPIGFファミリーメンバーをコードするゲノムDNA、cDNA、およびmRNAを含む任意の核酸(DNAまたはRNA)でありうる。核酸はまた、VEGFまたはPIGF受容体に結合することが示されたタンパク質をコードする任意の核酸を含みうる。所望のタンパク質をコードする核酸は、当技術分野における日常的手順、例えば、組換えDNA、PCR増幅、を用いて得られうる。

【0099】

敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショックのような炎症応答を処置するために、sFlt-1またはPIGF発現は、例えば、標的細胞において発現を作動する能力があるプロモーターに機能的に連結された、sFlt-1またはPIGFをコードするポリヌクレオチド配列を含むべ

50

クターを被験体に投与することにより、増加しうる。もう一つのアプローチにおいて、sFlt-1またはPIGF遺伝子の転写を増加させるタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列が、炎症応答をもつ被験体に投与されうる。任意の標準遺伝子治療ベクターおよび方法がそのような投与に用いられうる。

【0100】

または、敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショックのような炎症応答を処置するためにVEGFまたはPIGFの発現を減少させるために、RNA干渉(RNAi)が用いられうる。VEGFまたはPIGF mRNA転写産物の、ステム-ループ構造を形成する能力がある短い(例えば、9塩基対)配列と結合した短い(例えば、19塩基対)センス標的配列および対応するアンチセンス配列のような標的配列を含むベクターが、炎症応答をもつ被験体に投与されうる。一つの態様において、リボザイム、アンジオザイムが、炎症応答をもつ患者に投与される。このベクターが細胞において発現する場合、小さな阻害性RNA(siRNA)分子がこのステム-ループ構造から生成され、これらはVEGFまたはPIGF mRNA転写産物に結合し、結果として、非標的転写産物に対して標的mRNA転写産物の分解の増加を生じる。VEGF発現を下方制御するためのアンチセンス核酸塩基オリゴマーの使用は、参照により本明細書に組み入れられているU.S.P.N. 6,410,322に記載されている。哺乳動物細胞培養系において異なる配列の効力を試験するために、例えば、pSuper RNAi Systems(OligoEngine, Seattle, Wash)が用いられうる。

10

【0101】

併用療法

20

1)本明細書に記載された処置方法(例えば、化合物および核酸で処置することによって、化合物はVEGFを阻害し、核酸はsFlt-1発現を増加させる)の2つもしくはそれ以上を組み合わせること、または2)本明細書に記載された処置方法を炎症応答についての既存の処置と共に用いることにより、行われうる併用療法もまた、本発明により提供される。既存の処置方法は、抗菌剤(例えば、ペニシリン、アンピシリン、バシトラシン、カルバペネム、セファロsporin、メチシリン、オキサシリン、バンコマイシンのような広域抗生物質)、流体、昇圧剤、コルチコステロイド、活性化プロテインC(Xigris, Eli Lilly and Co.)の投与、および糖とインスリン投与；機械的人工換気；透析；ならびに鎮静を含む。

【0102】

薬学的組成物の製剤

30

本明細書に記載された(例えば、VEGF抗体およびsFlt-1)、または本発明の方法を用いて同定された任意の化合物の投与は、炎症応答を処置する化合物の濃度を結果として生じる任意の適した手段によりうる。化合物は、任意の適した担体物質に任意の適切な量で含まれることができ、一般的に、組成物の総重量の重量で1~95%の量で存在する。組成物は、経口、非経口(例えば、静脈内にまたは筋肉内に)、直腸、皮膚的(cutaneous)、鼻、膺、吸入、皮膚(skin)(パッチ)、眼、または頭蓋内投与経路に適している剤形で供給されうる。従って、組成物は、例えば、錠剤、カプセル、丸薬、粉末、顆粒、懸濁液、乳濁液、溶液、ヒドロゲルを含むゲル、ペースト、軟膏、クリーム、硬膏剤、水薬、浸透圧送達装置、坐剤、浣腸剤、注射可能物質、インプラント、スプレー、またはエアゾールの形をとりうる。通常の薬務に従って製剤化されうる(例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000, ed. A.R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, およびEncyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J.C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York参照)。

40

【0103】

薬学的組成物は、投与直後に、または投与後の任意の所定の時間もしくは期間に活性化化合物を放出するように製剤化されうる。組成物の後者の型は、一般的に、徐放性製剤として知られており、(i)長期間に渡って身体内に本発明の作用物質の実質的一定濃度を生じる製剤；(ii)所定の遅延時間後、長期間に渡って身体内に本発明の作用物質の実質的一定濃度を生じる製剤；(iii)作用物質の血漿中レベルにおける変動(鋸歯状動力学的パターン)と関連した望ましくない副作用の同時最小化で身体において作用物質の比較的一定の有

50

効レベルを維持することにより所定の期間中作用物質作用を持続する製剤；(iv)作用物質の作用を局在化させる製剤、例えば、罹患組織もしくは器官に隣接した、または罹患組織もしくは器官中の、徐放性組成物の空間的配置；(v)投薬の便利さ、例えば、週に1回、または2週間に1回、組成物を投与すること、を達成する製剤；および(vi)化合物を特定の標的細胞型へ送達するように担体または化学的誘導体を用いることにより作用物質の作用をターゲットさせる製剤を含む。徐放性製剤の形をとる化合物の投与は、胃腸管において狭い吸収ウィンドウを有する化合物について特に好ましい。

【0104】

いくつかのストラテジーのいずれかは、放出速度が問題の化合物の代謝速度を上回る徐放性を得るために追跡されうる。一つの例において、徐放性は、例えば、徐放性組成物およびコーティング剤の様々な型を含む様々な製剤パラメータおよび成分の適切な選択により得られる。従って、化合物は、投与で化合物を徐放性様式で放出する薬学的組成物へと適切な賦形剤と共に製剤化される。例は、単回または複数回単位の、錠剤またはカプセル組成物、油溶液、懸濁液、乳濁液、マイクロカプセル、分子複合体、ミクロスフェア、ナノ粒子、パッチ、およびリポソームを含む。

10

【0105】

非経口組成物

本明細書に記載された、または本発明の方法を用いて同定された化合物を含む組成物は、通常、非毒性の薬学的に許容される担体および補助剤を含む、剤形、製剤における、または適した送達装置もしくはインプラントを介しての、注射、注入、または埋め込み(皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内など)により非経口に投与されうる。そのような組成物の製剤および調製は、製剤分野の業者にとって周知である。

20

【0106】

非経口使用のための組成物は、単位用量型で(例えば、単一用量アンプルで)、または数回の用量を含むバイアルで、供給されることができ、それらの中に適した保存剤が添加されてもよい(下記参照)。組成物は、溶液、懸濁液、乳濁液、注入装置、もしくは埋め込みについての送達装置の形をとりうる、またはそれは、使用前に水もしくは別の適した媒体でもどされる乾燥粉末として提供されうる。活性作用物質は別として、組成物は、適した非経口的に許容される担体および/または賦形剤を含みうる。活性作用物質は、徐放性のためにミクロスフェア、マイクロカプセル、ナノ粒子、リポソームなどへ組み入れられうる。さらになお、組成物は、懸濁化剤、可溶化剤、安定剤、pH調整剤、等張化調整剤、および/または分散剤を含みうる。

30

【0107】

上で示されているように、本発明による薬学的組成物は、滅菌注射に適した形をとりうる。そのような組成物を調製するために、適した活性作用物質は、非経口的に許容される液体媒体に溶解または懸濁される。用いられうる許容される媒体および溶媒の中には、水、塩酸、水酸化ナトリウム、もしくは適した緩衝液の適切な量の添加により適したpHへ調整された水、1,3-ブタンジオール、リンガー溶液、デキストロース溶液、および等張性塩化ナトリウム溶液がある。水性製剤はまた、1つまたは複数の保存剤(例えば、メチル、エチル、またはn-プロピルp-ヒドロキシベンゾエート)を含みうる。化合物の1つが水に控えめにまたはわずかにのみ溶解する場合、溶解増強剤もしくは可溶化剤が添加されうる、または溶媒がプロピレングリコールなどの10~60%w/wを含みうる。

40

【0108】

徐放性非経口組成物

徐放性非経口組成物は、水性懸濁液、ミクロスフェア、マイクロカプセル、磁性ミクロスフェア、油溶液、油懸濁液、乳濁液の形をとりうる。組成物はまた、生体適合性担体、リポソーム、ナノ粒子、インプラント、または注入装置に組み入れられうる。

【0109】

ミクロスフェアおよび/またはマイクロカプセルの調製に用いる材料は、例えば、ポリガラクチン、ポリ-(イソブチルシアノアクリレート)、ポリ(2-ヒドロキシエチル-L-グル

50

タミン)、ポリ(乳酸)、ポリグリコール酸、およびそれらの混合物のような生分解性/生体内分解性ポリマーである。徐放性非経口製剤を製剤化する場合に用いられる生体適合性担体は、糖質(例えば、デキストラン)、タンパク質(例えば、アルブミン)、リポタンパク質、または抗体である。インプラントに用いる材料は、非生分解性(例えば、ポリジメチルシロキサン)または生分解性(例えば、ポリ(カプロラクトン)、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、またはポリ(オルトエステル))またはそれらの組み合わせでありうる。

【0110】

経口使用のための固体剤形

経口使用のための製剤は、非毒性の薬学的に許容される賦形剤との混合物において活性成分を含む錠剤を含み、そのような製剤は当業者に公知である(例えば、参照により本明細書に組み入れられている、U.S.P.N.: 5,817,307, 5,824,300, 5,830,456, 5,846,526, 5,882,640, 5,910,304, 6,036,949, 6,036,949, 6,372,218)。これらの賦形剤は、例えば、不活性希釈剤または増量剤(例えば、スクロース、ソルビトール、糖、マンニトール、微結晶性セルロース、ジャガイモデンプンを含むデンプン、炭酸カルシウム、リン酸ナトリウム);造粒剤および崩壊剤(例えば、微結晶性セルロースを含むセルロース誘導体、ジャガイモデンプンを含むデンプン、クロスカルメロースナトリウム、アルギナート、またはアルギン酸);結合剤(例えば、スクロース、グルコース、ソルビトール、アラビアゴム、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、デンプン、化デンプン、微結晶性セルロース、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、エチルセルロース、ポリビニルピロリドン、またはポリエチレングリコール);ならびに、平滑剤、流動促進剤、および付着防止剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、シリカ、水素化植物油、またはタルク)でありうる。他の薬学的に許容される賦形剤は、着色料、着香料、可塑剤、保湿剤、緩衝剤などでありうる。

【0111】

錠剤はコーティングされてなくてもよい、またはそれらは、任意で胃腸管における分解および吸収を遅らせ、それにより、より長期間に渡る持続性作用を提供するために、公知技術によりコーティングされていてもよい。コーティングは、所定のパターンで化合物を放出するように(例えば、徐放性製剤を達成するために)適応しうる、またはそれは胃の通過後までに作用物質を放出しないように適応しうる(腸溶コーティング)。コーティングは、糖コーティング、フィルムコーティング(例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、メチルヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、アクリレートコポリマー、ポリエチレングリコール、および/またはポリビニルピロリドンに基づいた)、または腸溶コーティング(例えば、メタクリル酸コポリマー、酢酸フタル酸セルロース、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、酢酸コハク酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリ酢酸フタル酸ビニル、セラック、および/またはエチルセルロース)でありうる。さらになお、例えば、モノステアリン酸グリセリンまたはジステアリン酸グリセリンのような時間遅延材料が用いられる。

【0112】

固体錠剤組成物は、望ましくない化学変化(例えば、活性物質の放出前の化学分解)から組成物を保護するように適応したコーティングを含みうる。コーティングは、Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 前記に記載されたものと類似した様式で固体剤形に適用されうる。

【0113】

本発明の組成物は、錠剤中にいっしょに混合されうる、または分割されうる。一つの例において、第二作用物質の実質的部分が第一作用物質の放出前に放出されるように、第一作用物質は、錠剤の内側に含まれ、第二作用物質は外側にある。

【0114】

経口使用のための製剤はまた、チュアブル錠として、または活性成分が不活性固体希釈

10

20

30

40

50

剤(例えば、ジャガイモデンプン、ラクトース、微結晶性セルロース、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、またはカオリン)と混合されている硬ゼラチンカプセルとして、または活性成分が水もしくは油媒体、例えば、ピーナッツ油、流動パラフィン、もしくはオリーブ油、と混合されている軟ゼラチンカプセルとして、提供されうる。粉末および顆粒は、例えば、ミキサー、流動床装置、またはスプレードライ装置を用いる通常の様式で上の錠剤およびカプセルの項目で述べられた成分を用いて調製されうる。

【0115】

徐放性経口剤形

経口使用のための徐放性組成物は、例えば、化合物の溶解および/または拡散を制御することにより化合物を放出するように構築されうる。

10

【0116】

溶解または拡散制御性放出は、化合物の錠剤、カプセル、ペレット、もしくは顆粒製剤の適切なコーティングにより、または化合物を適切なマトリックスへ組み入れることにより、達成されうる。徐放性コーティングは、上記のコーティング物質、ならびに/または、例えば、セラック、蜜蝋、糖ワックス、キャストワックス、カルナウバワックス、ステアリルアルコール、モノステアリン酸グリセリン、ジステアリン酸グリセリン、パルミトステアリン酸グリセリン、エチルセルロース、アクリル樹脂、DL-ポリ乳酸、酢酸酪酸セルロース、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ビニルピロリドン、ポリエチレン、ポリメタクリレート、メチルメタクリレート、2-ヒドロキシメタクリレート、メタクリレートヒドロゲル、1,3ブチレングリコール、エチレングリコールメタクリレート、および/もしくはポリエチレングリコールの1つまたは複数を含みうる。徐放性マトリックス製剤において、マトリックス材料はまた、例えば、水和メチルセルロース、カルナウバワックス、およびステアリルアルコール、カルボポール934、シリコン、トリステアリン酸グリセリン、メチルアクリレート-メチルメタクリレート、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、および/またはハロゲン化フルオロカーボンを含みうる。

20

【0117】

本明細書に記載された、または本発明の方法を用いて同定された化合物を含む徐放性組成物はまた、浮遊性錠剤またはカプセル(すなわち、経口投与で、一定期間、胃内容物の上面に浮かぶ錠剤またはカプセル)の形をとりうる。化合物の浮遊性錠剤製剤は、組成物の混合物を賦形剤およびヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、またはヒドロキシプロピルメチルセルロースのような20~75%w/wの親水コロイドと共に顆粒化することにより調製されうる。得られた顆粒は、その後、錠剤へ圧縮されうる。胃液と接触した途端、錠剤は、その表面の周りに実質的に不透水性ゲルバリアを形成する。このゲルバリアは、1未満の密度を維持することに関与し、それにより錠剤が胃液中に浮遊した状態にさせる。

30

【0118】

用量

本明細書に記載された、または本明細書に記載された方法を用いて同定された、任意の化合物の用量は、以下を含むいくつかの因子に依存する：投与方法、処置されるべき炎症応答、炎症応答の重症度、炎症応答が処置されることになっているのかまたは予防されることになっているのか、ならびに処置されるべき被験体の年齢、体重、および健康状態。

40

【0119】

本発明の処置方法に関して、化合物の被験体への投与が、投与、用量、または投薬頻度の特定の様式に限定されることは意図されない；本発明は、筋肉内、静脈内、腹腔内、膀胱内、関節内、病巣内、皮下、または肝炎を処置するのに適切な用量を提供するのに十分な任意の他の経路を含む投与の全様式を企図する。化合物は、単一用量で、または複数回用量で、被験体に投与されうる。例えば、本明細書に記載された、または本発明のスクリーニング方法を用いて同定された化合物は、例えば、2、3、4、5、6、7、8、10、15、20週間またはそれ以上の間、週に1回、投与されうる。任意の特定の被験体について、特定の投与計画は、個体の必要性、および化合物を投与するまたは投与を監督する人のプロト

50

しての判断に従って長い期間をかけて調整されるべきであることは理解されているはずである。例えば、化合物の用量は、より低い用量が炎症応答(例えば、敗血症、重度敗血症、または敗血症性ショック)の処置において十分な活性を供給しない場合には増加させられうる。逆に、化合物の用量は、炎症応答が低下しているまたは除去されている場合には減少させられうる。

【0120】

担当医が最終的に適切な量および投与計画を決定すると考えられるが、本発明に記載された(例えば、VEGF抗体またはsFlt-1)、または本発明のスクリーニング方法を用いて同定された化合物の治療的有効量は、例えば、 $0.0035 \mu\text{g} \sim 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日または $0.010 \mu\text{g} \sim 140 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/週の範囲でありうる。望ましくは、治療的有効量は、毎日、1日おきに、または週に2回、投与される $0.025 \mu\text{g} \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲、例えば、少なくとも0.025、0.035、0.05、0.075、0.1、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、または $9.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、である。加えて、治療的有効量は、毎週、1週間おきに、または月に1回、投与される $0.05 \mu\text{g} \sim 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、例えば、少なくとも0.05、0.7、0.15、0.2、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、10.0、12.0、14.0、16.0、または $18.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重でありうる。さらに、化合物の治療的有効量は、例えば、1日おきに、週に1回、または1週間おきに投与される $100 \mu\text{g}/\text{m}^2 \sim 100,000 \mu\text{g}/\text{m}^2$ の範囲でありうる。望ましい態様において、治療的有効量は、例えば、毎日、1日おきに、週に2回、週に1回、または1週間おきに投与される化合物の $1000 \mu\text{g}/\text{m}^2 \sim 20,000 \mu\text{g}/\text{m}^2$ の範囲、少なくとも1000、1500、4000、または $14,000 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 、である。

10

20

【0121】

方法および材料

以下の方法および材料は上記の実験を行うために用いられた。

【0122】

内毒血症、CLP、および肺炎のマウスモデル

LPS注入、CLP、および肺炎モデルは、雄8週齢のC57BL/6(22~24グラム体重)において行われた。内毒血症モデルについて、マウスに、通常の生理食塩水(対照)、または大腸菌(*Escherichia coli*)血清型0111:B4(Sigma, St. Louis, MO)由来のLPS($18\text{mg}/\text{kg}$ 体重)を腹腔内(IP)注射した。指示された所に、LPSは、TNF受容体1(TNFR1)、TNFR2、およびI型IL-1受容体(IL1RI)についてヌルの三重突然変異体(TM)マウス、または一致したC57BL/6x129/Svバックグラウンドにおける野生型(WT)へ投与された。TMマウスを、特定病原体未感染の条件下で完全バリア施設に維持した(Mizgerd et al., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:L1302-1310)。CLPは、わずかな変化を加えて以前に記載されているように行われた(Rice et al., *J Infect Dis* 191:1368-1376, 2005)。簡単には、マウスをイソフルオランで麻酔した。腹部を剪毛した後、2cm正中切開を無菌状態で作り、盲腸および隣接する腸を露出させた。盲腸の約25~30%を、4-0vicryl縫合糸で回盲弁に対して末梢側を結紮し、その後、21ゲージ針で穿刺した。盲腸をその後、せん孔部位の開通性を保証するために、優しく絞って、少量の糞便を押し出し、腹腔腔へ戻した。マウスは、閉鎖の時点で輸液蘇生法として1mlの生理食塩水をIPに、および苦痛を最小限にするために12時間おきに $0.1 \text{mg}/\text{kg}$ ブプレノルフィン(SC)を受けた。肺炎モデルについて、マウスを、塩酸ケタミン($100 \text{mg}/\text{kg}$)、マレイン酸アセプロマジン($5 \text{mg}/\text{kg}$ IM)、およびアトロピン($0.1 \text{mg}/\text{kg}$ IM)の筋肉内(IM)注射により麻酔した。気管を外科的に露出させ、大腸菌(American Type Culture Collection; Manassas, VAからの菌株19138)を、血管カテーテルを介して気管を通して左気管支へ 10^6CFU /マウスで気管内に投与した。6時間または24時間後、マウスをハロタン吸入により屠殺した。

30

40

【0123】

内毒血症および敗血症のヒトモデル

簡単には、被験体は、包括的スクリーニングを受け、彼らが、精神医学的、神経学的、免疫の、心臓血管の、もしくは睡眠の障害の現在または過去の病歴を有しない；最近の6ヶ月間、喫煙を含む薬物依存/乱用の履歴を有しない；正常な血液化学(完全かつ示差血液

50

計数、T細胞サブセット、グルコース、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、甲状腺刺激ホルモン)ならびに陰性血液および尿毒性を有する場合には、含まれた。被験体は、ブラシーボかまたは2ng/kg大腸菌内毒素(0:113, Lot EC-5)での宿主応答攻撃のいずれかの静脈内注射を受けた。ヒト敗血症研究は、Research Ethics Board of the Hamilton Health Science (Henderson General Hospital, Hamilton, ON)により認可された。重度敗血症をもつ患者は、以前に記載されているように(Liaw et al., Blood 104:3958-3964, 2004)試験対象および除外基準を用いてHenderson General Hospital, St. Joseph's HealthcareおよびHamilton General Hospital(Hamilton, Ontario, Canada)の集中治療室において同定された。Xigrisを受けた患者は分析から除外された。人口学的情報、急性生理学および慢性健康状態評価(acute physiology and chronic health evaluation)(APACHE II)入院スコア、多臓器機能不全(MOD)スコア、共存症、臓器機能、感染の部位および型、ならびに血液学的検査を含む患者の基本特性が収集された(下記の表参照)。

10

【 0 1 2 4 】

年齢(年)平均±SD(最小、最大)	65 ± 14 (36, 81)
APACHE IIスコア 平均±SD(最小、最大)	26.6 ± 8.2 (10, 42)
MODスコア ^a 平均±SD(最小、最大)	11.1 ± 3.7 (3, 15)
感染の原発部位(数)	
肺	11
腹部	1
尿路	1
その他	1
未知	1
陽性血液培養物(数)	
グラム陰性細菌	3
グラム陽性細菌	7
真菌	1
混合	1
未知	3
28日目の死亡率	47%

20

30

^a多臓器機能不全

【 0 1 2 5 】

血漿、血清、または組織可溶化液におけるサイトカインレベルの測定

TNF- およびIL-1は血清において測定された。IL-6、VEGF、およびPIGFは血漿において測定された。マウスから血漿を単離するために、血液試料を、心臓穿刺によりヘパリン化チューブへ収集し、遠心分離し、上清を血漿として取っておいた。マウス血清を得るために、血液試料を4 で一晩インキュベートし、遠心分離し、上清を血清として取っておいた。ヒト内毒血症研究において、血液試料をEDTAチューブに定期的に採取し、2600gでの遠心分離の前に5分間、氷上に置き、その後、血漿をアリコートヘビペッピングし、次のアッセイまで-80 で保存した。重度敗血症をもつ患者において、血液を、重度敗血症の定義に合ってから24時間以内に収集した。血液を、最初の7日間、毎日、その後は、ICUでの患者の滞在の期間中、週に1回、収集した。静脈血(9mL)を、患者から留置カテーテルを介して採取した。対照として、静脈血(9mL)を健康な成人ボランティアから静脈穿刺により採取した。各患者またはボランティアについて、収集された血液の4.5mLを、すぐに0.5mL 0.105M緩衝クエン酸三ナトリウム(pH5.4)を含む15mLのポリプロピレンチューブへ移し、残りの4.5mLを、0.5mL 0.105M緩衝クエン酸三ナトリウム(pH5.4)および1MベンズアミジンHClの100 μL(20mMベンズアミジン最終)を含む15mLのポリプロピレンチューブへ移した。血液を20 で1500g、10分間、回転させ、血漿を-80 でアリコートとして保存した。マウス臓器組織可溶化液を調製するために、マウスを、2mM EDTAを含むPBSで灌流した。臓器を摘出し、液体窒素中で急速凍結した。凍結組織を、50mM Tris-HCl(pH7.4)、150mM

40

50

NaCl、および0.05%プロテアーゼインヒビターカクテル(Sigma)を含む可溶化物緩衝液にホモジナイズし、その後、遠心分離して、上清(組織可溶化液)を得た。マウスsFlt-1、VEGF、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、およびIL-1 α を、Quantikine ELISAキット(R&D systems Inc.)を用いてアッセイした。マウスD-ダイマーを、Asserachrom DI-D、D-ダイマーの酵素免疫アッセイ(Diagnostica Stago, France)を用いて測定した。ヒト血漿PIGF、VEGF-Aを、ヒトPIGFおよびVEGF Quantikine ELISAキット(R&D Systems Inc, Minneapolis, MN)を用いて測定した。クエン酸/ベンズアミジン血漿試料を、以前に記載された(Liaw et al., J Thromb Haemost 1:662-670, 2003)方法を用いるAPCアッセイに用いた。

【0126】

可溶性Flt-1(sFlt)、VEGF、およびPIGFのAd媒介性過剰発現

10

マウスに、Ad過剰発現GFP(対照、 2×10^8 pfu)、マウスsFlt-1(1×10^8 pfu)、マウスVEGF-A(アイソフォーム120)(2×10^8 pfu)、またはマウスPIGF-2(2×10^8 pfu)を静脈注射した。これらのウイルスの構築は、以前に記載されている(H.A. von Recum et al., Proc Natl Acad Sci USA 98:4605-4610, 2001; Maynard et al., J Clin Invest 111:649-658, 2003; Luttmann et al., Nat Med 8:831-840, 2002)。Ad-sFlt-1、Ad-VEGF、およびAd-PIGFの用量を漸増して、約10~25ng/mlの血漿中レベルを達成した。マウスsFlt-1、VEGF、およびPIGFを測定する市販のQuantikine ELISAキット(R&D Systems Inc)は、マウス血漿由来のこれらのサイトカインの循環レベルをアッセイするために用いられた。

【0127】

抗体投与

20

LPS投与の16時間前に、マウスに、800 μ g抗マウスFlk-1抗体(DC101)、1200 μ gの抗マウスFlt-1抗体(MF-1)、または対照PBSの注入をIP注射した。両方の抗体は、親切にもImClone Systems Incorporated(New York, NY)により提供された。

【0128】

可溶性Flt-1ペプチド投与

マウスに、1 μ gのヒト組換え可溶性Flt-1ドメインD1~3(Cell Sciences, Inc, Canton, MA)または等容量PBS(対照)を、LPS投与またはCLPから1時間後に始めて12時間、3時間ごとに静脈注射した。

【0129】

心臓生理学的分析

30

マウスの心エコー検査は以前に記載されているように(McMullen et al., Proc Natl Acad Sci USA 100:12355-12360, 2003; Shioi et al., EMBO J 19:2537-2548, 2000)行われた。簡単には、マウスをケタミンHCl(50mg/kg)およびキシラジン(10mg/kg)のIP注射で麻酔した。12MHzトランスデューサを備えたHewlett-Packard(Andover, MA)Sonos 1500セクタースキャナーは、左室(LV)壁厚さ、LV容積、および左室内径短縮率を評価するために2次元誘導M様式トレーシングを記録するために用いられる。心電図(ECG)の記録は、麻酔されたマウスにおいて多チャンネル増幅器で得られ、分析のためにデジタルシグナルへ変換された(PowerLab system; ADInstruments, Colorado Springs, CO)。

【0130】

透過性アッセイ

40

マウスを、0.5ml AvertinのIP注射により麻酔した。1% Evans青色色素(PBS中)の100 μ lを尾静脈へ注射した。40分後、マウスを、2mM EDTAを含むPBSで心臓穿刺を介して20分間、灌流した。臓器(脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓)を採取し、Evans青色色素を溶出するために3日間、ホルムアミド中でインキュベートした。ホルムアミド溶液のODは620nm波長を用いて測定された。

【0131】

組織RNA単離および定量的TaqMan PCR分析

組織RNAを、Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA)およびRNAミニ調製キット(Qiagen, Germany)を用いて単離した。定量的リアルタイムPCRについて、全RNAを、DNアーゼI処置を含むRNeasy RNA抽出キットを用いて、製造会社の使用説明書に従って(Qiagen, Germany)、

50

調製した。cDNAを生成するために、三連の試料のそれぞれからの全RNA(100ng)を混合し、ランダムプライマーおよびSuperscript III逆転写酵素(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いてcDNAへ変換した。すべてのcDNA試料を等分し、-80℃で保存した。プライマーを、Primer Expressオリゴデザインソフトウェア(Applied BioSystems, Foster City, CA)を用いて設計し、Integrated DNA Technologies(Coralville, IA)により合成した。すべてのプライマーセットは、偽遺伝子または関連遺伝子内の相同ドメインに対する潜在的な相克的転写産物一致を同定するために厳密なデータベース検索に供した。プライマーセットから産生された単位複製配列を、Applied BioSystemsにより供給された一次導関数プライマー融解曲線ソフトウェアを用いて融点温度について分析した。SYBR Green IアッセイおよびABI Prism 7500配列検出システムが、マスター鋳型を用いて逆転写されたcDNA試料からのリアルタイムPCR産物を検出するために用いられた。各試料についてのPCR反応は、二連で行われ、コピー数は以前に記載されているように測定された。標的遺伝子発現のレベルは、各試料において18S rRNAに対して標準化され、データは、 10^6 個の18S rRNAコピーあたりのmRNAコピーとして提示された。

10

20

30

40

50

【0132】

免疫組織化学法

免疫組織化学法は、以前に記載されているように、対照およびLPS処理されたマウスの心臓、脳、ならびに肺からの5 μ m凍結切片で行われた。抗体は、ウサギポリクローナル抗マウスP-セレクチン抗体(Chemicon International, Temecula, CA)、ウサギポリクローナル抗マウスPAI-1抗体(Innovative Research Inc., Southfield, MI)、ウサギポリクローナル抗マウスCox-2抗体(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)、ラットモノクローナル抗マウスE-セレクチン抗体(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA)、ラットモノクローナル抗マウスVCAM-1抗体(Chemicon International)、およびラットモノクローナル抗マウスICAM-1抗体(Serotec Ltd, Oxford, UK)を含んだ。FITCと結合した抗ラットIgG抗体およびCysと結合した抗ウサギIgG抗体(ZYMED Laboratories, South San Francisco, CA)は二次抗体として用いられた。共局在化研究について、ラットモノクローナル抗マウスCD31抗体(BD Biosciences Pharmingen)が、ウサギポリクローナル抗体(P-セレクチン、PAI-1、およびCox-2)との二重免疫蛍光染色に用いられた；ウサギポリクローナル抗マウスvWF抗体(Abcam Inc, Cambridge, MA)は、ラットモノクローナル抗マウス抗体(E-セレクチン、VCAM-1、およびICAM-1)と組み合わせられた。

【0133】

細胞培養

HUVECはEGM培地(Cambrex Bio Science, Walkersville, MD)において培養された。いったん細胞が70%集密に達したならば、それらを、0.5%FBS EGMにおいて20時間、血清飢餓にさせ、その後、0.1ng/ml TNF- α 、100ng/ml VEGF、および200ng/ml PIGFの単独または組み合わせで、4時間、インキュベートした。細胞をRNAのために収集し、上記のように、処理した。

【0134】

生存研究

LPS注入またはCLPの3日前に、C57BL/6雄マウスは、対照(GFP)-アデノウイルス、sFlt-1アデノウイルス、PIGFアデノウイルス、および/またはVEGF-Aアデノウイルスで処置された。または、動物は、上記のような抗Flk-1抗体、抗Flt-1抗体、またはsFlt-1ペプチドを受けた。生存は、LPS注入(20mg/kg体重)またはCLP後24時間目、48時間目、72時間目、および96時間目に評価された。

【0135】

いくつかの手順において、8週齢のC57BL/6雄マウス(22~24g)に、20mg/kgリポ多糖(LPS)(SIGMA, St. Louis, Mo)投与(i.p.注射)の20時間前に、マウスPIGF-2中和抗体または対照IgGの1mgを静脈注射した。8週齢のPIGF(-/-)雄マウス(FVBバックグラウンド)および年齢を一致させた野生型同腹仔もまた、生存研究に用いられた。マウスに、17mg/kg LPSを静脈注射した。マウス生存率は、4日間、様々な時点でモニターされた。

【0136】

統計学的解析

スチューデントt検定が、マウスサイトカインおよび遺伝子発現研究における統計学的解析のために用いられた。ANOVAは、心臓生理学データの統計学的解析のために用いられた。一般的線形モデル(GLM)反復測定が、ヒト被験体群間(プラシーボ対内毒血症)の差を評価するために用いられた。自由度のグリーンハウス・ガイザー補正は、適切な場合には、適用された。有意な条件または相互作用効果の場合、単純対比が、どの時点がお互いに有意に異なるかを特定するために用いられた。生存データは、カプラン・マイヤープロットの構築およびログランク検定の使用により解析された。

【0137】

2005年7月13日に出願された米国仮特許出願第60/698,997号を含む本明細書に挙げられたすべての特許、特許出願、および刊行物は、あたかもそれぞれの独立した特許、特許出願、または刊行物が具体的かつ個々に示されて、参照により組み入れられているかのように、同じ程度に参照により本明細書に組み入れられている。

【図面の簡単な説明】

【0138】

【図1】VEGFファミリーのタンパク質および対応する受容体の概略図である。VEGFは、sVEGFR-1(sFlt-1)、VEGFR-1(Flt-1)、VEGFR-2(Flk-1/KDR)、およびニューロピリン-1と相互作用する；PIGFは、sVEGFR-1(sFlt-1)、VEGFR-1(Flt-1)、およびニューロピリン-1と相互作用する。

【図2】炎症応答中の白血球の付着および小胞の外側への遊走の概略図である。この過程は、血管の内皮細胞上に存在するICAM-1およびVCAM-1への白血球の結合を含む。

【図3】内皮接着分子およびケモカインのNF- κ B誘導性活性化を示す図である。

【図4】図4a~4bは、対照マウス、ならびに6時間目、12時間目、および24時間目での、LPSで処理されたマウスかまたは盲腸結紮および穿刺マウスかのいずれかにおいて循環している、IL-6(血漿)、TNF- α (血清)、PIGF(血漿)、およびVEGF(血漿)レベルを示す1組のグラフである。VEGFおよびPIGFにおける対照マウスに対する増加が、両方のマウスモデルについて観察される。図4cは、6時間目および24時間目でのマウス肺炎モデルにおけるPIGFおよびVEGFレベルを示す1組のグラフである。図4dは、示された時点でのヒト内毒血症モデルにおけるPIGFおよびVEGFレベルを示す1組のグラフである。被験体はLPSまたは生理食塩水(プラシーボ)を投与された。図4eは、集中治療室(ICU)における時間に対してプロットされた、重度敗血症をもつ無作為に選択された患者における血漿PIGFおよびVEGFレベルを示す1組のグラフである。各線が個々の患者(P)を表す。

【図5】肺感染後の肺、腎臓、および肝臓における血液漏出の顕著な誘発を示す1組の画像およびグラフである。

【図6】肺感染後の、血漿PIGFおよびIL-6レベルにおいて顕著な増加があるが、VEGFレベルにおいては示す1組のグラフである。

【図7】LPS注入に対する応答へのsFlt-1の効果を測定するために用いられる実験手順の概略図である。簡単には、マウスに、sFlt-1をコードする遺伝子かまたは対照遺伝子かのいずれかを含むアデノウイルスベクターを感染させる。感染から4日後、マウスは18mg/kg LPSの腹腔内注射を受ける。感染から5日後、心エコー図および心電図(ECG)ならびに血液(例えば、血清および血漿)および臓器(例えば、心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓、脳)を含むマウス由来の試料の評価を含む生理学的評価が評価される。RNAレベル、タンパク質レベル、および組織像の分析が行われる。

【図8】図8a~8cは、対照マウスと比較して、遊離VEGFおよびPIGFの完全な遮断が、sFlt-1をコードする遺伝子に感染したマウスにおいて達成されていることを実証するグラフである。

【図9】図9a~9bは、内毒血症のマウスモデルにおける血管透過性へのsFlt-1過剰発現の効果を示す画像およびグラフである。マウスに、GFP(CTRL-ad)またはsFlt-1(sFlt-ad)を過剰発現するアデノウイルスを感染させた。3日後、動物に、生理食塩水(対照)またはLPS

10

20

30

40

50

をIP投与した。24時間後、動物に、1%Evans青色色素の0.1mlを静脈内注射した。40分後、マウスを灌流し、脳(Br)、肺(Lu)、心臓(H)、肝臓(Li)、腎臓(Ki)、および脾臓(Sp)を採取し、Evans青色色素を溶出するために3日間、ホルムアミド中でインキュベートした。図9aは、臓器の全載顕微鏡写真を示す。各群において、最も左の標本は、対照未処理マウス由来であり、中央の標本はCTRL-ad処理の内毒血症マウス由来であり、右の標本はsFlt-1-ad処理の内毒血症マウス由来である(腎臓の場合、各条件について2つの標本が示されている)。図9bは、Evans青色管外遊出の量を示す(620nmにおけるOD)。* ; p<0.05、** ; p<0.01、*** ; p<0.0001。

【図10】図10aは、sFlt-1遺伝子を含むアデノウイルスベクターを感染させ、続いてLPS投与したマウス(n=24)の、対照ベクターを感染させ、続いてLPS投与した対照マウス(n=24)と比較した、生存率の増加を示すグラフである。sFlt-1を発現する24匹のマウスのうちの22匹が、対照遺伝子が発現する24匹のマウスのうちの6匹と比較して、LPS処理から96時間後、生存していた。図10b~10eは、敗血症のマウスモデルにおける生存研究を示すグラフである。図10bは、GFP(CTRL-as)、sFlt-1(sFlt-ad)、PIGF(PIGF-ad)、およびVEGF(VEGF-ad)を過剰発現し、LPSをIP注射されたマウスについての生存曲線を示す。LPS注入後の24時間目の循環VEGF、PIGF、およびsFlt-1は、それぞれ、VEGF : 5.08+1.41ng/ml、PIGF : 28.23+5.84pg/ml、および20.64+5.20ng/mlであった。図10cは、GFP(CTRL-as)またはsFlt-1(sFlt-ad)を過剰発現し、CLPに曝されたマウスについての生存曲線を示す。図10dは、Flk-1に対する抗体のIP注射で前処置された内毒血症マウスについての生存曲線を示す。図10eは、Flt-1に対する抗体のIP注射で前処置された内毒血症マウスについての生存曲線を示す。図10f~10gは、可溶性sFlt-1ペプチドの敗血症死亡率への治療的効果を示すグラフである。LPS注入(図10f)またはCLP(図10g)から1時間後の、sFlt-1ペプチドまたは同じ容量のPBS(対照)を静脈内に感染させられたマウスについての生存曲線。図10hおよび10iは、PIGF(-/-)マウスおよび抗PIGF抗体で処置されたマウスの生存研究を示すグラフである。PIGFの量またはPIGF活性の減少は、死亡率増加と関連している。

【図11】図11aおよび11bは、IL-6およびD-ダイマーのレベルが、LPSで処理されていないマウス(対照およびsFlt-1を発現の両方)に対してLPSで処理された対照マウスにおいて増加することを示すグラフである。sFlt-1をコードする遺伝子を含むアデノウイルスベクターに感染し、かつLPSで処理されたマウスにおけるのと類似したIL-6およびD-ダイマーの両方のレベルが、LPS未処理マウスにおいて観察される。

【図12】図12a~12oは、内毒血症のマウスモデルにおけるsFlt-1過剰発現の心臓機能への効果を示す画像およびグラフである。sFlt-1をコードする遺伝子を含むアデノウイルスベクターに感染し、続いてLPS処理されたマウスは、LPSで処理されていないマウスと類似した心臓機能を有するが、LPSで処理された対照マウスは、心臓活動の変化を示す。マウスに、GFP(CTRL-ad, C)またはsFlt-1(sFlt-ad, S)を過剰発現するアデノウイルスを注入した(図12a、12h、12i、12l、および12m)。3日後、動物に、生理食塩水(対照)またはLPSをIPに投与した、またはCLPに曝した。または、マウスに、LPS注入またはCLP手順から1時間後、PBC(C)またはsFlt-1ペプチド(S)をIV注射した(図12j、12k、12n、および12o)。図12a~12eは、心エコー図により測定された場合の結果を示し、図12fおよび12gは心電図を示す。心エコー図および心電図は、生理食塩水もしくはLPS注入から24時間後に、またはCLPから26時間後に、行われた。図12aは、内毒血症モデルにおける心エコー図からの代表的なM様式および2-D画像を示す。図12hおよび12jは、内毒血症モデルにおける心エコー図からの左室内径短縮率の定量的分析を示す。図12lおよび12nは、内毒血症モデルにおける心電図上の心拍数測定を示す。図12iおよび12kは、CLPモデルにおいて心エコー図からの左室内径短縮率の定量的分析を示す。図12mおよび12oは、CLPモデルにおける心電図上の心拍数測定を示す。ANOVAが統計学的解析のために用いられた。* ; p<0.05、** ; p<0.01、*** ; p<0.0001。

【図13】図13a~13fは、免疫アッセイによる心臓での、対照マウスおよびsFlt-1をコードする遺伝子を含むアデノウイルスベクターに感染したマウスにおける、E-セレクチン、P-セレクチン、ICAM-1、VCAM-1、Cox-2、およびPAI-1のタンパク質レベルへのLPS投与

の効果を示す画像である。LPSで処理されたsFlit-ad感染マウスは、LPSで処理されていないマウスと比較してこれらのタンパク質の類似したタンパク質レベルおよび発現を示す。図13g~13lは、Taqman PCRによる心臓での、対照(ctrl-ad感染)マウスおよびsFlit-1をコードする遺伝子を含むアデノウイルスベクターに感染した(sFlit-ad感染)マウスにおける、E-セレクトリン、P-セレクトリン、ICAM-1、VCAM-1、Cox-2、およびPAI-1の発現へのLPS投与の効果を示すグラフである。LPSで処理されたsFlit-ad感染マウスは、LPSで処理されていないマウスと比較してこれらの遺伝子の類似した発現レベルを示す。

【図14】図14a~14fは、イムノアッセイによる脳での、対照マウスおよびsFlit-1をコードする遺伝子を含むアデノウイルスベクターに感染したマウスにおける、E-セレクトリン、P-セレクトリン、ICAM-1、VCAM-1、Cox-2、およびPAI-1のタンパク質レベルへのLPS投与の効果を示す画像である。LPSで処理されたsFlit-ad感染マウスは、LPSで処理されていないマウスと比較してこれらのタンパク質の類似したタンパク質レベルおよび発現を示す。図14g~14lは、Taqman PCRによる脳での、対照(ctrl-ad感染)マウスおよびsFlit-1をコードする遺伝子を含むアデノウイルスベクターに感染した(sFlit-ad感染)マウスにおける、E-セレクトリン、P-セレクトリン、ICAM-1、VCAM-1、Cox-2、およびPAI-1の発現へのLPS投与の効果を示すグラフである。LPSで処理されたsFlit-ad感染マウスは、LPSで処理されていないマウスと比較してこれらの遺伝子の類似した発現レベルを示す。

【図15】図15a~15fは、イムノアッセイによる肺での、対照マウスおよびsFlit-1をコードする遺伝子を含むアデノウイルスベクターに感染したマウスにおける、E-セレクトリン、P-セレクトリン、ICAM-1、VCAM-1、およびCox-2のタンパク質レベルへのLPS投与の効果を示す画像である。LPSで処理されたsFlit-ad感染マウスは、LPSで処理されていないマウスと比較してこれらのタンパク質の類似したタンパク質レベルおよび発現を示す。図15g~15lは、Taqman PCRによる肺での、対照(ctrl-ad感染)マウスおよびsFlit-1をコードする遺伝子を含むアデノウイルスベクターに感染した(sFlit-ad感染)マウスにおける、E-セレクトリン、P-セレクトリン、ICAM-1、VCAM-1、Cox-2、およびPAI-1の発現へのLPS投与の効果を示すグラフである。LPSで処理されたsFlit-ad感染マウスは、LPSで処理されていないマウスと比較してこれらの遺伝子の類似した発現レベルを示す。

【図16】図16a~16fは、sFlit-1が、sFlit-1で処置されていない細胞と比較して、2%マウス血清におけるLPSで処理されたヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)におけるE-セレクトリン、ICAM-1、およびVCAM-1の発現を低下させることを示すグラフである。図16g~16jは、一次ヒト内皮細胞のサイトカイン応答性へのVEGFおよびPIGFの効果を示すグラフおよび表である。これらの結果は、VCAM-1(図16gおよび16j)、Cox-2(図16hおよび16j)、および組織因子(図16iおよび16j)の定量的TaqMan分析(10^6 個のコピー/18SあたりのmRNAコピー数)についてである。図16jは、追加として、TNF- α 、VEGF、PIGFの非存在下(CTRL、対照)または単独もしくは組み合わせでの存在下において4時間処理された血清飢餓HUVECにおける、E-セレクトリン、P-セレクトリン、ICMA-1、およびPAI-1を示す。

【図17】図17a~17fは、LPSが、LPSで処理されていない動物と比較して、心臓、肺、腎臓、および脳においてPIGFの上方制御を誘発することを示すグラフである。sFlit-1での処置は、LPS処理でのPIGFの観察された増加を防ぐ。

【図18】図18aおよび18bは、TNFおよびIL-1受容体ノックアウトマウスが、LPSで処理された野生型マウスにおいて観察される増加と比較して、18mg/kg LPSでの処理から24時間後、PIGFおよびVEGFのより少ない増加を示すことを示すグラフである。

【図19】内毒血症のマウスモデルにおけるVEGFおよびPIGFタンパク質レベルを示す1組のグラフである。示された時点での、LPSを注入された、またはLPSを注入されていないマウス由来の組織におけるVEGF(上端)およびPIGF(下端)のELISAの結果が示されている。* ; p<0.05、** ; p<0.01、*** ; p<0.0001。

【図20】図20a~20iは、内毒血症のマウスモデルにおける循環サイトカインレベルおよびD-ダイマーへのsFlit-1過剰発現の効果を示すグラフである。図20a~20fは、GFP(CTRL-ad)またはsFlit-1(sFlit-ad)を過剰発現するアデノウイルスを注入されたマウスを示す。3日後、動物に、生理食塩水(対照)またはLPSをIPに投与した。TNF- α 、IL-1 β 、IL-1 α 、IL-

10

20

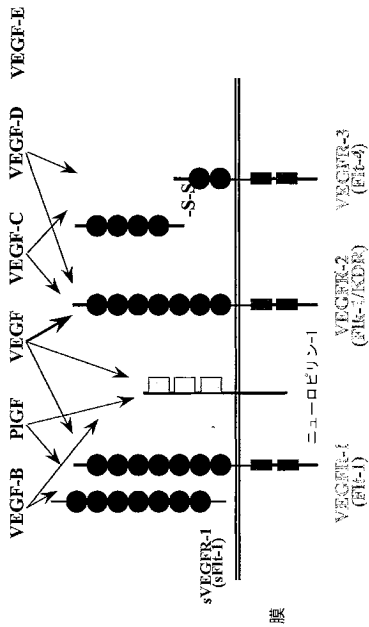
30

40

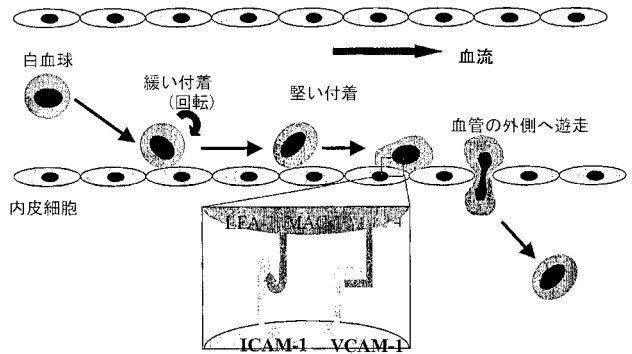
50

6、sFlt-1、およびD-ダイマーの血清または血漿中レベルは、6時間目、12時間目、および/または24時間目に測定された。n.s.、有意でない。* ; p<0.05、* * ; p<0.01、* * * ; p<0.0001。図20g~20iは、LPS誘発性内毒血症をもつ三重突然変異体マウス(IL-1-/-、TNFR-1-/-、TNFR2-/-)におけるVEGFおよびIL-6の循環レベルを示す。生理食塩水(対照)またはLPSのIP注射から24時間後のLPS注射された野生型(WT)または三重突然変異体(TM)マウスにおけるVEGF、PlGF、およびIL-6の血漿レベル。* ; p<0.05、* * ; p<0.01、* * * ; p<0.0001。

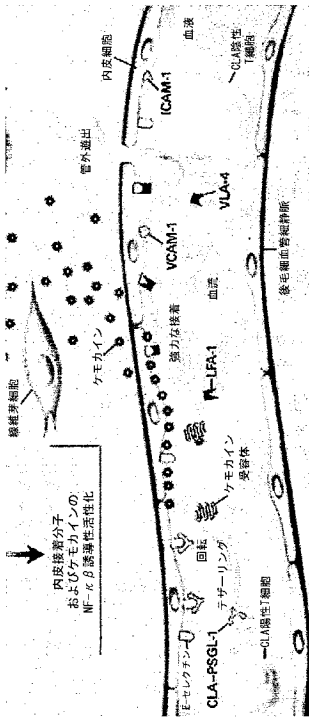
【 図 1 】



【 図 2 】

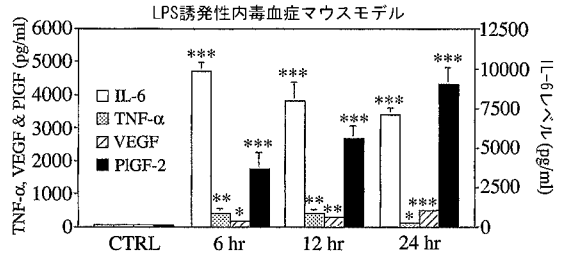


【図3】

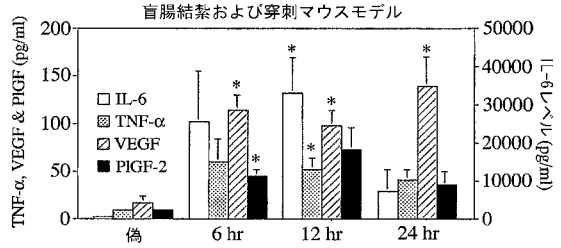


Robert C and Kupper TS, NEJM, 1999

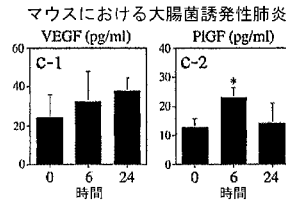
【図4a】



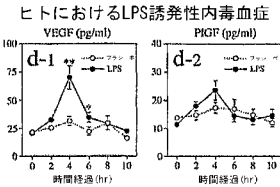
【図4b】



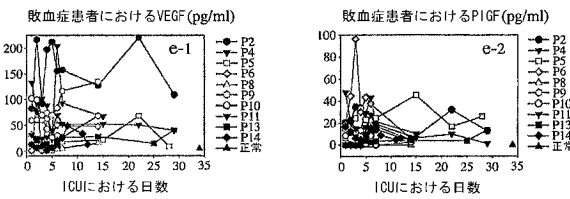
【図4c】



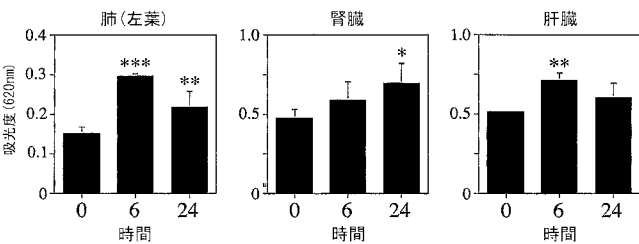
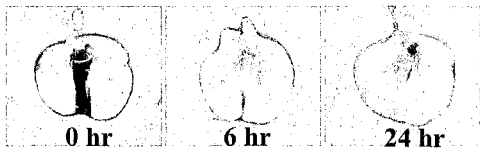
【図4d】



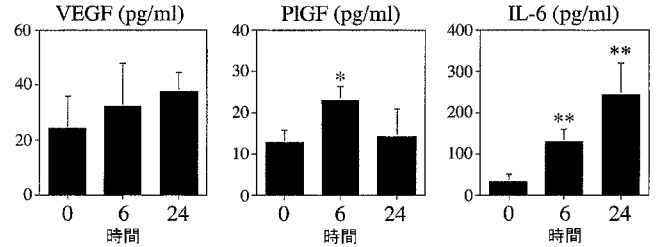
【図4e】



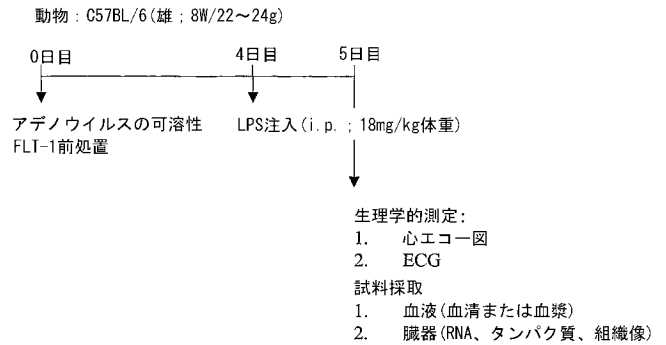
【図5】



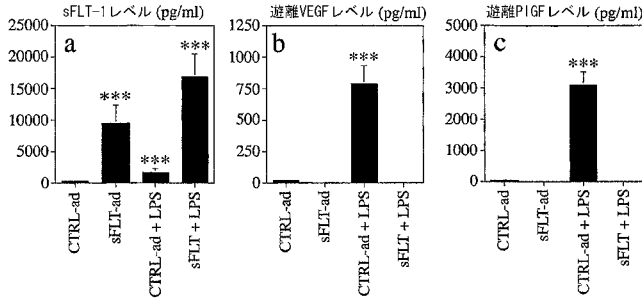
【図6】



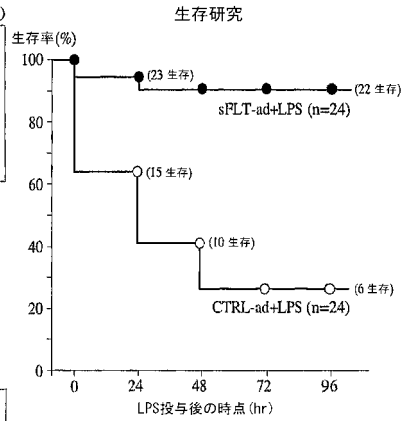
【図7】



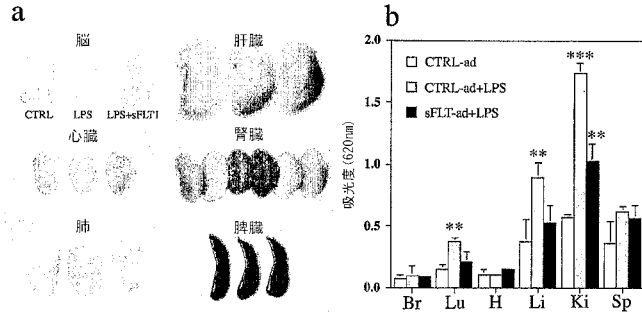
【 図 8 】



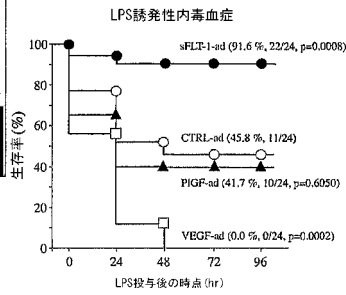
【 図 10 a 】



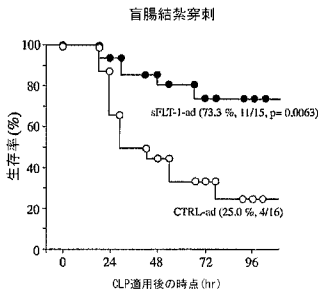
【 図 9 】



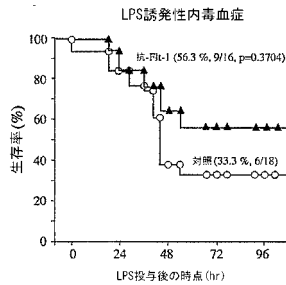
【 図 10 b 】



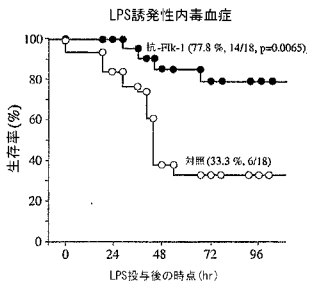
【 図 10 c 】



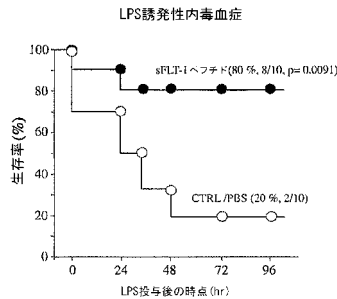
【 図 10 e 】



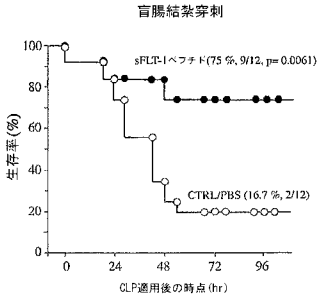
【 図 10 d 】



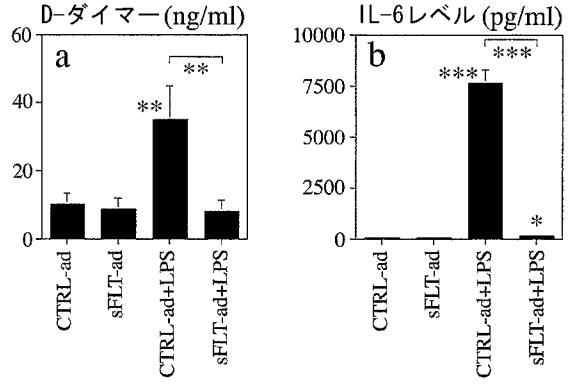
【 図 10 f 】



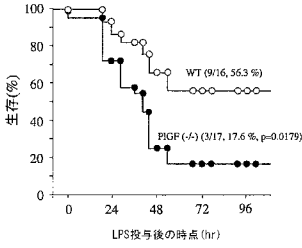
【図10g】



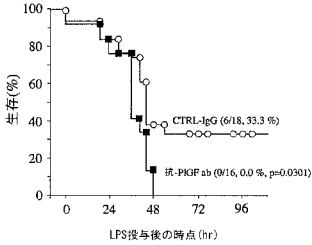
【図11】



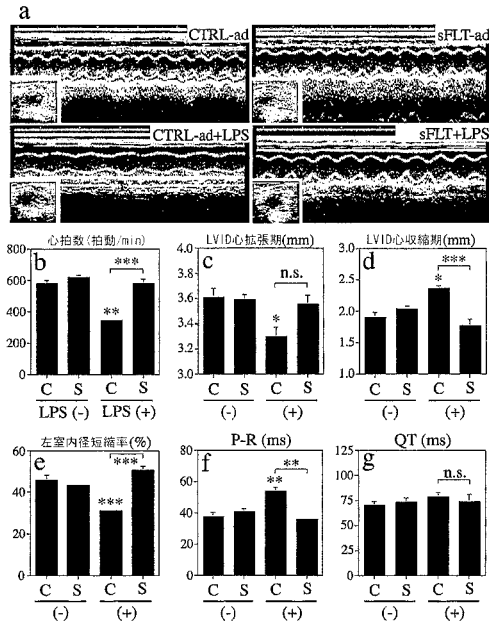
【図10h】



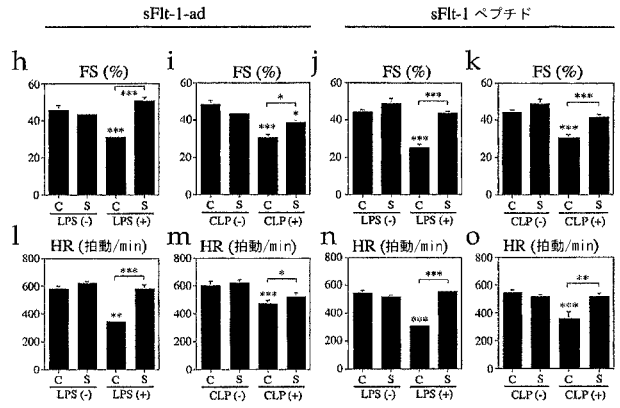
【図10i】



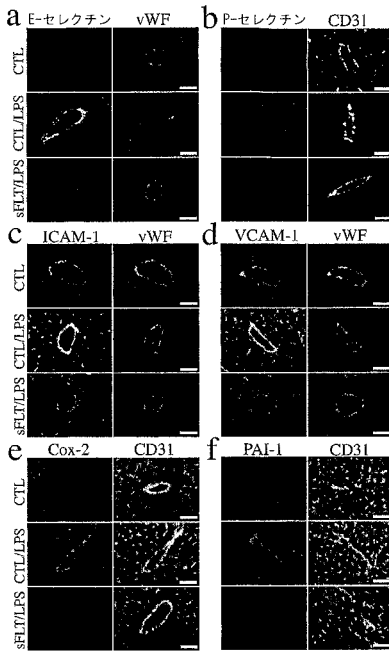
【図12-1】



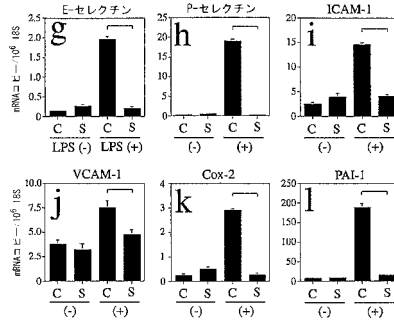
【図12-2】



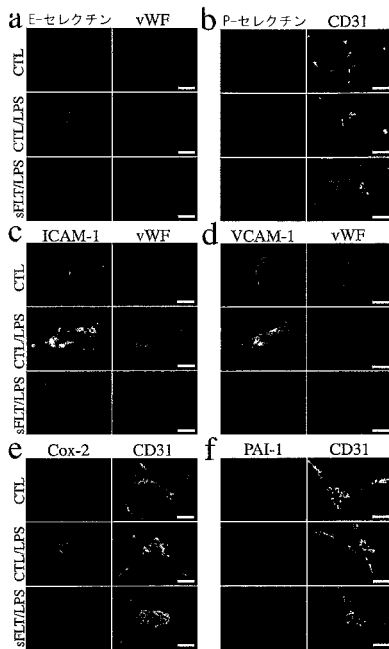
【 図 1 3 - 1 】



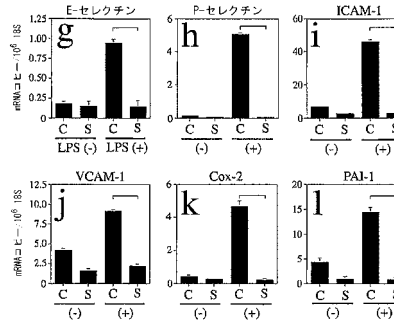
【 図 1 3 - 2 】



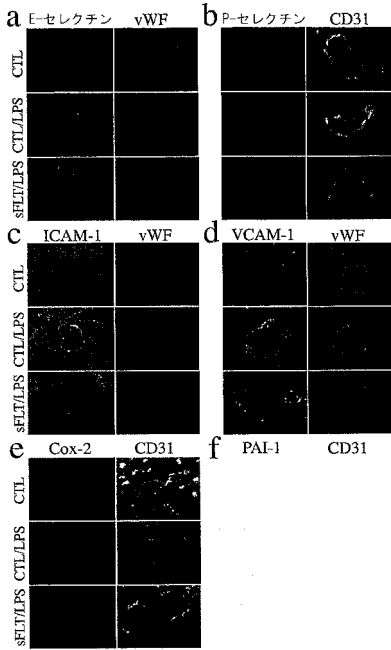
【 図 1 4 - 1 】



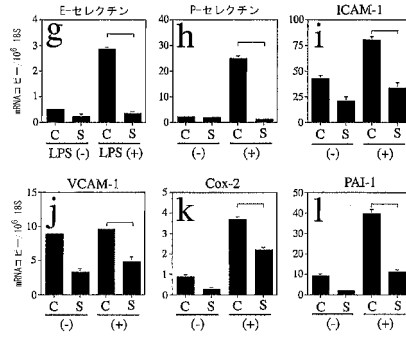
【 図 1 4 - 2 】



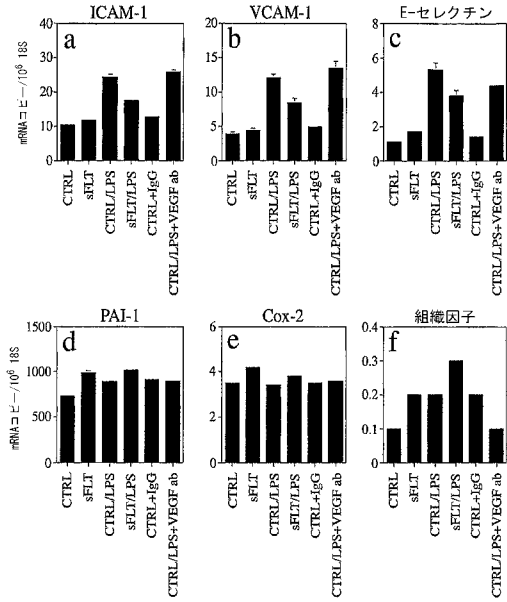
【 図 15 - 1 】



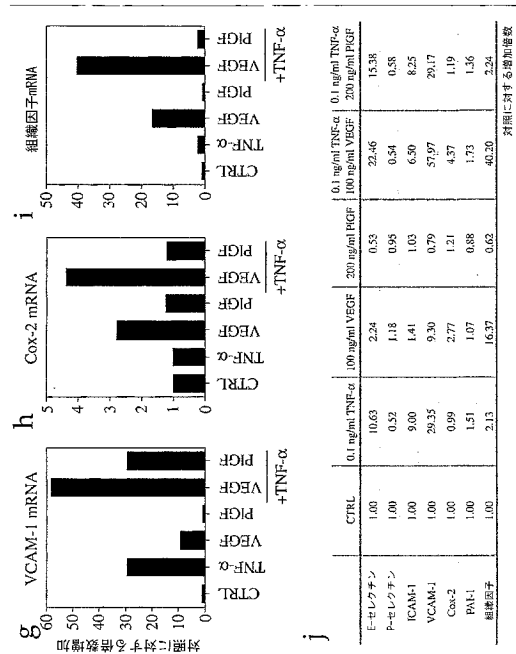
【 図 15 - 2 】



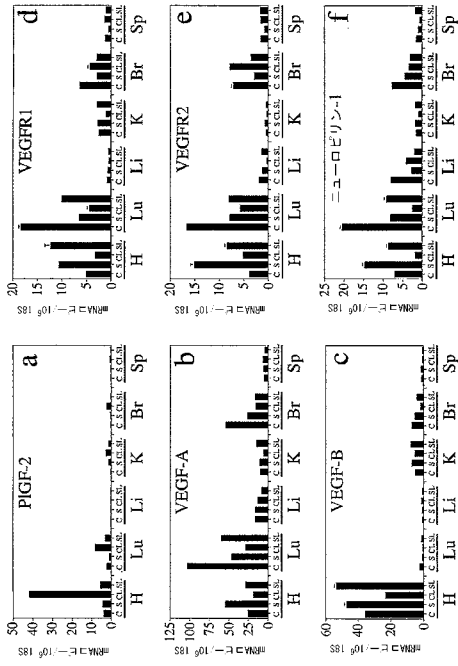
【 図 16 - 1 】



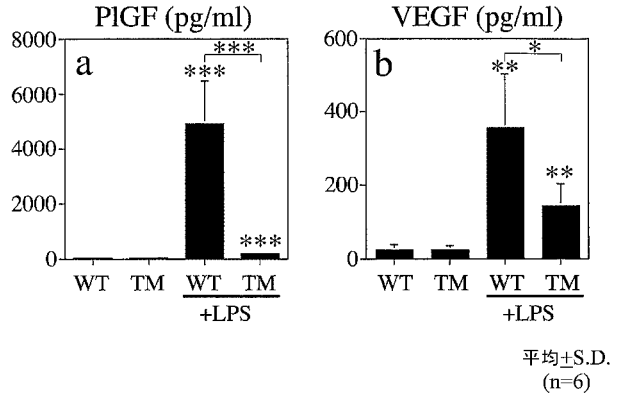
【 図 16 - 2 】



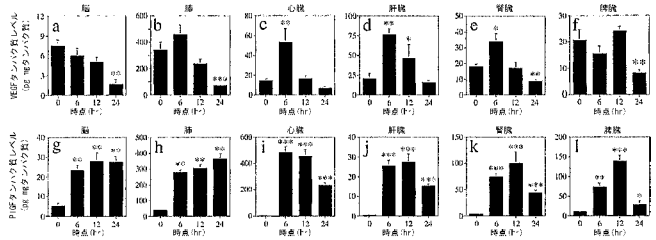
【 図 1 7 】



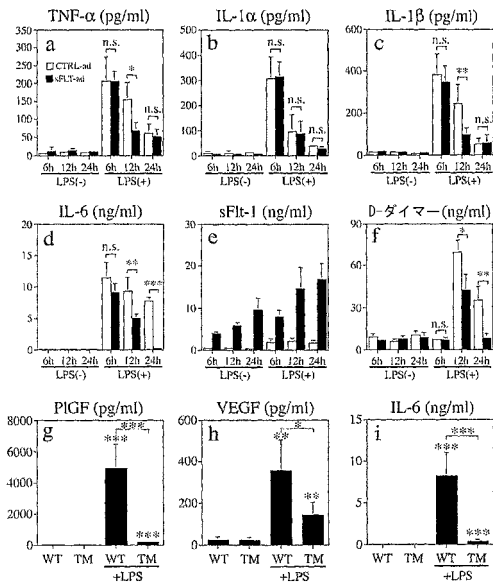
【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【 図 2 0 】



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 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z

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

(74) 代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(72) 発明者 エアード ウィリアム シー .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブルックリン スロンダイク ストリート 1 8

(72) 発明者 矢野 喜一郎
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 チャールスタウン シップウェイ プレイス 3 4

F ターム(参考) 2G045 AA40

4B063 QA18 QA19 QQ08 QQ53 QR36 QR55 QR62 QR77 QS14 QS25
QS34 QX02
4C084 AA02 AA03 AA13 AA17 AA19 AA20 BA35 BA44 DB52 DB63
DB70 DC50 MA02 MA13 MA17 MA22 MA23 MA28 MA31 MA32
MA35 MA36 MA37 MA41 MA52 MA56 MA58 MA59 MA60 MA63
MA66 NA14 ZA052 ZA432 ZB111 ZB112 ZB351 ZB352 ZC352 ZC412
ZC422
4C085 AA14 BB11 CC21 CC23 EE01 EE03
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZB35 ZC41

专利名称(译)	诊断和治疗炎症反应的方法		
公开(公告)号	JP2009501521A	公开(公告)日	2009-01-22
申请号	JP2008521645	申请日	2006-07-13
申请(专利权)人(译)	贝斯以色列女执事医疗中心		
[标]发明人	エアードウィリアムシー 矢野喜一郎		
发明人	エアード ウィリアム シー 矢野 喜一郎		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/02 A61K45/00 A61K45/06 A61K38/00 A61K48/00 A61K39/395 A61K31/7088 A61P31/04 A61P43/00 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15		
CPC分类号	A61P31/04 A61P43/00 C12Q1/6883 C12Q2600/136 C12Q2600/158 G01N33/6863 G01N33/6869 G01N33/74		
FI分类号	C12Q1/68.A C12Q1/02 A61K45/00 A61K45/06 A61K37/02 A61K48/00 A61K39/395.N A61K31/7088 A61P31/04 A61P43/00.111 G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA40 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR36 4B063/QR55 4B063/ /QR62 4B063/QR77 4B063/QS14 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/AA19 4C084/AA20 4C084/BA35 4C084/BA44 4C084/DB52 4C084/ /DB63 4C084/DB70 4C084/DC50 4C084/MA02 4C084/MA13 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA28 4C084/MA31 4C084/MA32 4C084/MA35 4C084/MA36 4C084/MA37 4C084/MA41 4C084/ /MA52 4C084/MA56 4C084/MA58 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA052 4C084/ZA432 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB351 4C084/ZB352 4C084/ZC352 4C084/ZC412 4C084/ZC422 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/ /EE03 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB35 4C086/ZC41		
代理人(译)	清水初衷 小林智彦 渡边真一 井上隆一		
优先权	60/698997 2005-07-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及VEGF, PIGF和sFlt-1水平在炎症反应中增加的发现, 例如败血症, 严重败血症或败血症性休克。另外, 本发明提供了鉴定治疗以及提供这种炎症反应的治疗方法, 包括降低VEGF或PIGF水平, 或增加sFlt-1或PIGF水平。

【 0 1 2 4 】

年齢(年)平均±SD(最小、最大)	65 ± 14 (36, 81)
APACHE IIスコア 平均±SD(最小、最大)	26.6 ± 8.2 (10, 42)
MODスコア ^a 平均±SD(最小、最大)	11.1 ± 3.7 (3, 15)
感染の原発部位(数)	
肺	11
腹部	1
尿路	1
その他	1
未知	1
陽性血液培養物(数)	
グラム陰性細菌	3
グラム陽性細菌	7
真菌	1
混合	1
未知	3
28日目の死亡率	47%

