

(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2010-532872

(P2010-532872A)

(43) 公表日 平成22年10月14日(2010.10.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A X	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	4 B O 6 3
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 B O 6 5
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	4 C O 8 4
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 76 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-516033 (P2010-516033)	(71) 出願人	510006945
(86) (22) 出願日	平成20年7月7日 (2008.7.7)		プロメディオール、 インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成22年3月3日 (2010.3.3)		アメリカ合衆国 ペンシルベニア 193
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/008315		55, マルバーン, フェニックスビル
(87) 国際公開番号	W02009/009019		パイク 371
(87) 国際公開日	平成21年1月15日 (2009.1.15)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/958,634		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成19年7月6日 (2007.7.6)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	12/215,700	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成20年6月27日 (2008.6.27)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 線維化関連障害のための治療および診断方法

(57) 【要約】

患者における、C反応性タンパク質(CRP)に対する血清アミロイドP(SAP)の濃度の比を利用する線維化関連障害の治療のための組成物および方法が提供される。その方法は、FcRIIAのR131/H131多型を決定するステップをさらに含んでもよい。診断法もまた提供される。本発明はまた、患者における線維化関連障害を治療し、予防し、またはその重症度を低下させるための方法をさらに提供する。CRPおよびSAPの濃度を生物学的サンプルから測定して、SAP対CRP比を決定する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者が線維化関連障害を発症する危険性を決定する方法であって、

(i) 該患者の生物学的サンプルにおける C 反応性タンパク質 (C R P) および血清アミロイド P (S A P) の濃度を測定して S A P 対 C R P 比を決定するステップと、

(i i) 1 つまたは複数の基準 S A P 対 C R P 比と、ステップ (i) から決定された S A P 対 C R P 比を比較するステップと、

(i i i) 該 1 つまたは複数の基準比よりも少なくとも 10 % 低い S A P 対 C R P を、該患者が線維化関連障害の危険性にさらされている指標と解釈するステップとを含む方法。

10

【請求項 2】

F c R I I A 対立遺伝子の R 1 3 1 / H 1 3 1 多型について該患者の第 2 の生物学的サンプルをアッセイするステップをさらに含み、該ステップは、前記患者の両方の F c R I I A 対立遺伝子における 1 3 1 位のアミノ酸残基を決定するステップを含み、1 つまたは複数の基準比よりも少なくとも 5 % 低い S A P 対 C R P 比が、該患者の一方または両方の該対立遺伝子が R 1 3 1 である場合に該患者が線維化関連障害の危険性にさらされている指標と解釈される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

患者における線維化関連障害の状態を診断する方法であって、

(i) 該患者から生物学的サンプルを得るステップと、

(i i) 該生物学的サンプルの C 反応性タンパク質 (C R P) および血清アミロイド P (S A P) の濃度を測定するステップと、

(i i i) 該生物学的サンプルにおける S A P 対 C R P 比を決定するステップと、

(i v) 1 つまたは複数の基準 S A P 対 C R P 比と、ステップ (i) から決定された S A P 対 C R P 比を比較するステップと、

(v) 該 1 つまたは複数の基準比よりも少なくとも 20 % 低い S A P 対 C R P 比を有する患者において線維化関連障害を診断するステップとを含む方法。

20

【請求項 4】

患者における線維化関連障害を治療し、予防し、またはその重症度を低下させるための方法であって、

(i) 該患者の生物学的サンプルにおける C 反応性タンパク質 (C R P) および血清アミロイド P (S A P) の濃度を測定して S A P 対 C R P 比を決定するステップと、

(i i) 1 つまたは複数の基準 S A P 対 C R P 比と、ステップ (i) から決定された S A P 対 C R P 比を比較するステップと、

(i i i) 該 1 つまたは複数の基準比よりも少なくとも 10 % 低い S A P 対 C R P 比を有する該患者に抗線維化療法を施すステップとを含む方法。

30

【請求項 5】

前記患者の両方の F c R I I A 対立遺伝子における 1 3 1 位のアミノ酸残基を決定するステップを含む、F c R I I A 対立遺伝子の R 1 3 1 / H 1 3 1 多型について該患者の第 2 の生物学的サンプルをアッセイするステップをさらに含み、1 つまたは複数の基準比よりも少なくとも 5 % 低い S A P 対 C R P 比が、該患者の一方または両方の該対立遺伝子が R 1 3 1 である場合に該患者が線維化関連障害の危険性にさらされている指標と解釈される、請求項 4 に記載の方法。

40

【請求項 6】

患者における線維化関連障害の治療を調整するための方法であって、

(i) 該患者の生物学的サンプルにおける C 反応性タンパク質 (C R P) および血清アミロイド P (S A P) の濃度を測定して S A P 対 C R P 比を決定するステップと、

(i i) 決定された S A P 対 C R P 比を 1 つまたは複数の基準 C R P 対 S A P 比と比較

50

するステップと、

(i i i) 該 1 つまたは複数の基準比よりも低い S A P 対 C R P 比を有する該患者に抗線維化療法を施すステップと、

(i v) 該患者の生物学的サンプルにおける C R P および S A P の濃度を測定して第 2 の S A P 対 C R P 比を決定するステップと、

(v) 該線維化関連障害を治療するための目標比以上の S A P 対 C R P 比を達成するために、該抗線維化療法の投薬の投薬量または頻度を調整するステップとを含む方法。

【請求項 7】

ステップ (i v) および (v) が、少なくとも 1 回、2 回、3 回、またはそれ以上繰り返される、請求項 6 に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記基準比が、約 5 ~ 約 6 0 の間にある、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

測定された C R P および S A P の濃度が、C R P および S A P の遊離濃度である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0】

前記生物学的サンプルが、血清または血漿である、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 1】

前記抗線維化療法が、1 つまたは複数の S A P アゴニスト、C R P アンタゴニスト、またはその組合せの投与を含む、請求項 4 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

患者における線維化関連障害を治療し、予防し、またはその重症度を低下させるための方法であって、該障害を治療し、予防し、またはその重症度を低下させる必要のある患者に、治療有効量の 1 つまたは複数の C R P アンタゴニストおよび 1 つまたは複数の S A P アゴニストと一緒に投与するステップを含む方法。

【請求項 1 3】

前記 S A P アゴニストが、S A P シグナル伝達を増加させる、請求項 1 1 または 1 2 に記載の方法。

30

【請求項 1 4】

前記 S A P アゴニストが、S A P シグナル伝達を模倣する、請求項 1 1 または 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 S A P アゴニストが、S A P 活性を増加させる、請求項 1 1 または 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記 S A P アゴニストが、S A P 発現を増加させる、請求項 1 1 または 1 2 に記載の方法。

40

【請求項 1 7】

前記 S A P アゴニストが、血清 S A P レベルを増加させる、請求項 1 1 または 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記 S A P アゴニストが、小分子、核酸、またはポリペプチドから選択される、請求項 1 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記 S A P アゴニストが、S A P ポリペプチドから選択される、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

50

前記 S A P アゴニストが、抗 F c R I 抗体、抗 F c g R I I A 抗体、抗 F c g R I I I 抗体、架橋抗 F c g R 抗体、凝集 I g G 抗体、または架橋 I g G 抗体から選択される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

患者における線維化関連障害を治療し、予防し、またはその重症度を低下させるための方法であって、

(i) 線維化関連障害に罹患した患者を同定するステップと、

(i i) 該患者の生物学的サンプルにおける C 反応性タンパク質 (C R P) 濃度を測定するステップと、

(i i i) 1 つまたは複数の基準値よりも少なくとも 10 % 高い C R P 濃度を有する患者に 1 つまたは複数の C R P アンタゴニストを投与するステップとを含む方法。

10

【請求項 22】

F c R I I A 対立遺伝子の R 1 3 1 / H 1 3 1 多型について前記患者の第 2 の生物学的サンプルをアッセイするステップをさらに含み、該ステップが、該患者の両方の F c R I I A 対立遺伝子における 1 3 1 位のアミノ酸残基を決定するステップを含み、抗線維化療法が、該患者の一方または両方の対立遺伝子が R 1 3 1 である場合に 1 つまたは複数の基準値よりも少なくとも 5 % 高い C R P 濃度を有する患者に施される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記基準値が、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の間にある、請求項 21 または 22 に記載の方法。

20

【請求項 24】

測定された C R P の濃度が、C R P の遊離濃度である、請求項 21 から 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記生物学的サンプルが、血清または血漿である、請求項 21 から 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記線維化関連障害が、アテローム性動脈硬化症ではない、請求項 1 から 25 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 27】

前記 C R P アンタゴニストが、C R P シグナル伝達を減少させる、請求項 11、12、または 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記 C R P アンタゴニストが、F c R I または F c R I I A または F c R I I I に結合する C R P を減少させる、請求項 11、12、または 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記 C R P アンタゴニストが、C R P 発現を減少させる、請求項 11、12、または 21 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 30】

前記 C R P アンタゴニストが、C R P の血清レベルを低下させる、請求項 11、12、または 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記 C R P アンタゴニストが、C R P の活性を低下させる、請求項 11、12、または 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記 C R P アンタゴニストが、小分子、核酸、またはポリペプチドから選択される、請求項 11、12、21、または 27 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 33】

前記 CRP アントゴニストが、IL - 10 の産生を減少させる、請求項 11、12、21、または 27 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記 CRP アントゴニストが、TGF の産生を減少させる、請求項 11、12、21、または 27 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記 CRP アントゴニストが、シクロオキシゲナーゼ - 2 阻害剤、抗血小板薬、スタチン、コレステロール吸収の阻害剤、抗高脂血症薬、ナイアシン、抗糖尿病薬、 α - アドレナリン受容体アントゴニスト、酸化防止剤、ACE 阻害剤、IL - 6 阻害剤、11 - ベータヒドロキシラーゼ阻害剤、およびアンジオテンシン受容体遮断薬から選択される、請求項 32 に記載の方法。

10

【請求項 36】

前記 CRP アントゴニストが、抗 CRP 抗体である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 37】

前記 CRP アントゴニストが、抗 Fc R I 抗体である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 38】

前記 CRP アントゴニストが、抗 Fc R I I A 抗体である、請求項 32 に記載の方法

。

【請求項 39】

前記 CRP アントゴニストが、抗 Fc R I I I 抗体である、請求項 32 に記載の方法

。

20

【請求項 40】

患者における線維化関連障害の治療を提供するためのキットであって、(i) 1 つまたは複数の CRP アントゴニストおよび (ii) 1 つまたは複数の SAP アゴニストを含み、(i) および (ii) が、一緒に投与されるように製剤されるキット。

【請求項 41】

前記 SAP アゴニストが、SAP シグナル伝達を増加させる、請求項 40 に記載のキット。

【請求項 42】

前記 SAP アゴニストが、SAP シグナル伝達を模倣する、請求項 40 に記載のキット

。

30

【請求項 43】

前記 SAP アゴニストが、SAP 活性を増加させる、請求項 40 に記載のキット。

【請求項 44】

前記 SAP アゴニストが、SAP 発現を増加させる、請求項 40 に記載のキット。

【請求項 45】

前記 SAP アゴニストが、血清 SAP レベルを増加させる、請求項 40 に記載のキット

。

【請求項 46】

前記 SAP アゴニストが、小分子、核酸、またはポリペプチドから選択される、請求項 40 から 45 のいずれか一項に記載のキット。

40

【請求項 47】

前記 SAP アゴニストが、SAP ポリペプチドまたはその変異体から選択される、請求項 46 に記載のキット。

【請求項 48】

前記 SAP アゴニストが、抗 Fc R I 抗体、抗 Fc g R I I 抗体、抗 Fc g R I I I 抗体、架橋抗 Fc R 抗体、凝集 Ig G 抗体、または架橋 Ig G 抗体から選択される、請求項 46 に記載のキット。

【請求項 49】

50

前記CRPアンタゴニストが、CRP発現を減少させる、請求項40に記載のキット。

【請求項50】

前記CRPアンタゴニストが、CRPの血清レベルを低下させる、請求項40に記載のキット。

【請求項51】

前記CRPアンタゴニストが、CRP活性を低下させる、請求項40に記載のキット。

【請求項52】

前記CRPアンタゴニストが、CRPシグナル伝達を低下させる、請求項40に記載のキット。

【請求項53】

前記CRPアンタゴニストが、FcRIまたはFcRIIAまたはFcRIIIに結合するCRPを低下させる、請求項40に記載のキット。

【請求項54】

前記CRPアンタゴニストが、IL-10の産生を減少させる、請求項40に記載のキット。

【請求項55】

前記CRPアンタゴニストが、TGF β の産生を減少させる、請求項40に記載のキット。

【請求項56】

前記CRPアンタゴニストが、小分子、核酸、またはポリペプチドから選択される、請求項40から55のいずれか一項に記載のキット。

【請求項57】

前記CRPアンタゴニストが、シクロオキシゲナーゼ-2阻害剤、抗血小板薬、スタチン、コレステロール吸収の阻害剤、抗高脂血症薬、ナイアシン、抗糖尿病薬、 α -アドレナリン受容体アンタゴニスト、酸化防止剤、ACE阻害剤、およびアンジオテンシン受容体遮断薬から選択される、請求項40に記載のキット。

【請求項58】

前記CRPアンタゴニストが、抗CRP抗体である、請求項40に記載のキット。

【請求項59】

前記CRPアンタゴニストが、抗FcRI抗体である、請求項40に記載のキット。

【請求項60】

前記CRPアンタゴニストが、抗FcRII抗体である、請求項40に記載のキット。

【請求項61】

前記CRPアンタゴニストが、抗FcRIII抗体である、請求項40に記載のキット。

【請求項62】

線維化関連障害を治療し、予防し、またはその重症度を低下させる必要性のある患者において、該障害を治療し、予防し、またはその重症度を低下させるための方法であって、(a)該患者の両方のFcRIIA対立遺伝子における131位のアミノ酸残基を決定することによって、FcRIIA対立遺伝子のR131/H131多型について該患者の生物学的サンプルを分析するステップと、(b)該患者に最も有効な治療計画を選択するステップとを含む方法。

【請求項63】

前記治療計画が、FcRIIA対立遺伝子の一方または両方において131位にヒスチジンを有する患者におけるSAPアゴニストの投与を含む、請求項62に記載の方法。

【請求項64】

前記治療計画が、FcRIIA対立遺伝子の一方または両方において131位にアルギニンを有する患者におけるCRPアンタゴニスト、SAPもしくはSAPアゴニスト、またはその組合せの投与を含む、請求項62に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 65】
投与される S A P または S A P アゴニストの量が、患者における C R P のレベルに依存する、請求項 64 に記載の方法。
- 【請求項 66】
診断業務を行うための方法であって、
(i) 生物学的サンプルを受け取るステップと、
(i i) 前記生物学的サンプルにおいて、C 反応性タンパク質 (C R P) および血清アミロイド P (S A P) の濃度を測定するステップと、
(i i i) 該生物学的サンプルにおける C 反応性タンパク質 (C R P) および血清アミロイド P (S A P) の濃度の報告書を作成するステップと
を含む方法。 10
- 【請求項 67】
測定された S A P および C R P の濃度が、S A P および C R P の遊離濃度である、請求項 66 に記載の方法。
- 【請求項 68】
前記生物学的サンプルが、血清または血漿である、請求項 66 または 67 に記載の方法。
- 【請求項 69】
S A P 対 C R P の比を決定するステップをさらに含む、請求項 66 に記載の方法。
- 【請求項 70】 20
前記報告書が、S A P 対 C R P の比を含有する、請求項 69 に記載の方法。
- 【請求項 71】
患者が線維化関連障害を発症する危険性の評価に有用なデータを決定するための方法であって、
(i) 該患者から生物学的サンプルを得るステップと、
(i i) 該生物学的サンプルの C 反応性タンパク質 (C R P) の濃度を測定するステップと、
(i i i) 両方の F c R I I A 対立遺伝子における 131 位のアミノ酸残基を決定するステップを含む、F c R I I A 対立遺伝子の R 131 / H 131 多型を決定するステップと
を含む方法。 30
- 【請求項 72】
前記生物学的サンプルの S A P の濃度を測定するステップをさらに含む、請求項 71 に記載の方法。
- 【請求項 73】
測定された S A P および C R P の濃度が、S A P および C R P の遊離濃度である、請求項 71 に記載の方法。
- 【請求項 74】
前記生物学的サンプルが、血清または血漿である、請求項 71 または 72 に記載の方法。 40
- 【請求項 75】
S A P 対 C R P の比を決定するステップをさらに含む、請求項 73 に記載の方法。
- 【請求項 76】
P B M または単球細胞において、C R P に対する応答性を決定するための方法であって、
(i) ある濃度の C R P と P B M または単球細胞をインキュベートするステップと、
(i i) C R P が該細胞の線維細胞分化を活性化するかどうかを決定するステップと
を含み、線維細胞増殖の刺激が、該細胞が C R P に応答性であることを示す方法。
- 【請求項 77】 50
C R P アンタゴニストの抗線維化作用に対する患者の応答性を決定するための方法であ

って、

(i) 患者から P B M または単球細胞を得るステップと、

(i i) 1 つまたは複数の濃度の C R P と、 P B M または単球細胞をインキュベートするステップと、

(i i i) P B M または単球細胞における線維細胞分化の C R P 誘発の程度を決定するステップと

を含み、線維細胞分化の誘発の程度が、C R P アンタゴニストに対する該患者の応答性を示す方法。

【請求項 7 8】

患者における、線維細胞分化を防止する最小 S A P 対 C R P 比を決定する方法であって

10

(i) 患者から P B M C または単球を得るステップと、

(i i) 線維細胞分化の最大の刺激をもたらすのに必要な、C R P の最小濃度を決定するステップと、

(i i i) 線維細胞分化の量を > 9 0 % 低下させるために、ステップ (i i) によって決定される C R P の濃度において必要な S A P の濃度を決定するステップと、

(i v) ステップ (i i i) において決定される S A P 濃度を、ステップ (i i i) において決定される C R P 濃度で割ることによって、患者における線維細胞分化を防止するのに有効な S A P 対 C R P 比を決定するステップを含む方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

(関連出願への相互参照)

本願は、「TREATMENT AND DIAGNOSTIC METHODS FOR FIBROSIS RELATED DISORDERS」と題された、2008年6月27日に出願された実用出願の継続出願であり、この実用出願は、2007年7月6日に出願された米国仮特許出願第60/958,634号の利益を主張し、この米国仮特許出願の全体の内容は、本明細書中に参考として援用される。本願はまた、2007年7月6日に出願された米国仮特許出願第60/958,634号の利益を主張し、この米国仮特許出願の全体の内容は、本明細書中に参考として援用される。

30

【背景技術】

【0002】

発明の背景

創傷治癒の一部としての組織修復のプロセスは、2つの段階を含む。第1段階は、再生段階であり、傷害細胞が、同じ型の細胞と交換される。第2段階は、線維増殖または線維化とも呼ばれる線維組織の形成であり、結合組織が、正常な実質組織に取って代わる。組織修復プロセスは、線維化段階が抑制されないままである場合、病原性のものとなり得、広範囲の組織リモデリングおよび永久的な瘢痕組織の形成に至る。

【0003】

米国における、45%までの死亡は、線維増殖性疾患に起因し得ることが推定されており、これは、多くの組織および器官系に影響を与え得る。主な器官線維性疾患は、肺炎症および線維化によって特徴づけられる間質性肺疾患 (I L D) を含む。I L D は、サルコイドーシス、珪肺症、コラーゲン血管疾患、および全身性強皮症などのいくつかの原因を有することが知られている。しかしながら、I L D の一般的な型である特発性肺線維症は、原因が知られていない。他の器官線維性障害は、肝硬変、B型またはC型慢性肝炎感染から結果として生じる肝線維症、腎疾患、心疾患、ならびに黄斑変性症ならびに網膜および硝子体の網膜症を含む眼疾患を含む。線維増殖性障害はまた、全身性および局所性の強皮症、ケロイド、および肥厚性瘢痕、アテローム性動脈硬化症、ならびに再狭窄を含む。さらなる線維増殖性疾患は、外科手術、化学療法剤誘発性の線維化、放射線誘発性の線維化、ならびに傷害およびやけどから結果として生じる過剰瘢痕を含む。

40

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

現在、コルチコステロイドなどの一般的な免疫抑制剤および他の抗炎症性治療を含む治療が、線維性障害に利用可能である。しかしながら、線維化の調節に關与するメカニズムは、炎症のメカニズムから明確に区別できるように思われ、抗炎症性療法は、線維化を低下させるまたは予防するのにほとんど有効ではない。したがって、線維化を低下させ、予防しかつ線維性障害をコントロールするための治療を開発する必要性が依然としてある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

発明の要旨

本出願は、患者が線維化関連障害を発症する危険性を決定するための方法を提供する。C反応性タンパク質(CRP)および血清アミロイドP(SAP)の濃度を生物学的サンプルから測定して、SAP対CRP比を決定する。この比を、1つまたは複数のSAP対CRP基準比と比較する。1つまたは複数の基準比より少なくとも10%低いSAP対CRP比は、患者が、線維化関連障害を発症する危険性にさらされている指標である。いくつかの実施形態において、患者の第2の生物学的サンプルをアッセイして、多型FcRIIA対立遺伝子の配列を決定する。R131多型の一方または両方の対立遺伝子および基準比よりも少なくとも5%低いSAP対CRP比を有する患者は、線維化関連障害を発症する危険性にさらされていることが示される。

【0006】

本出願は、患者における線維化関連障害を診断する方法をさらに提供する。CRPおよびSAPの濃度を生物学的サンプルから測定して、SAP対CRP比を決定する。比を、1つまたは複数のSAP対CRP基準比と比較される。1つまたは複数の基準比より少なくとも20%低いSAP対CRP比は、患者が、線維化関連障害を発症する危険性にさらされている指標である。

【0007】

本出願は、患者における線維化関連障害を治療し、予防し、またはその重症度を低下させるための方法をさらに提供する。CRPおよびSAPの濃度を生物学的サンプルから測定して、SAP対CRP比を決定する。比を、1つまたは複数のSAP対CRP基準比と比較する。基準比よりも少なくとも10%低いSAP対CRP比を有する患者に、抗線維化療法を施す。いくつかの実施形態において、患者の第2の生物学的サンプルをアッセイして、多型FcRIIA対立遺伝子の配列を決定する。R131多型の一方または両方の対立遺伝子および基準比よりも少なくとも5%低いSAP対CRP比を有する患者に、抗線維化療法を施す。

【0008】

本出願は、患者における線維化関連障害の治療を調整するための方法をさらに提供する。患者のCRPおよびSAPの濃度を測定して、SAP対CRP比を決定する。比を、1つまたは複数の基準SAP対CRP比と比較する。基準比よりも低いSAP対CRP比を有する患者に、抗線維化療法を施す。患者のCRPおよびSAPの濃度を再度測定して、それに続く比を決定する。目標SAP対CRP比を達成するために、抗線維化療法の投薬の投薬量または頻度を調整する。

【0009】

CRPおよびSAPの濃度は、血清、血漿、健常組織、または線維性組織から測定することができ、CRPタンパク質またはSAPタンパク質の総濃度としてまたは遊離濃度もしくは非結合濃度として測定することができる。測定は、線維化関連障害の治療を調整するためのプロセスにおいて繰り返し成されてもよい。基準比は、線維性組織と比較する場合、患者の健常組織のものであってもよい。基準比はまた、患者と同じ年齢および性別の対象のコホートから得ることができる。SAP対CRP比は、60、50、40、30、20、10、または5であってよい。抗線維化療法は、CRPアンタゴニストおよび/

10

20

30

40

50

またはSAPアゴニストを含んでもよく、SAPアゴニストおよびCRPアンタゴニストは、個々にまたは一緒に投与することができる。

【0010】

本出願は、治療有効量の1つまたは複数のCRPアンタゴニストおよび1つまたは複数のSAPアゴニストと一緒に投与することによって、患者における線維化関連障害を治療し、予防し、またはその重症度を低下させるための方法をさらに提供する。

【0011】

SAPアゴニストは、小分子、核酸、またはポリペプチドから選択することができる。SAPアゴニストは、SAPシグナル伝達を増加させることができ、SAPシグナル伝達を模倣することができ、SAP活性を増加させることができ、SAP発現を増加させることができ、または血清SAPレベルを増加させることができる。いくつかの実施形態において、SAPアゴニストは、SAPポリペプチド、FcR抗体(抗FcRI、抗FcRIIA、もしくは抗FcRIII)、架橋抗FcR抗体(抗FcRI、抗FcRIIA、もしくは抗FcRIII)、凝集IgG抗体、または架橋IgG抗体であってもよい。

10

【0012】

本出願は、生物学的サンプルにおけるCRPの濃度を決定することによって、患者における線維化関連障害を治療し、予防し、またはその重症度を低下させるための方法をさらに提供する。生物学的サンプルにおけるCRPの濃度は、1つまたは複数のCRP基準値と比較される。1つまたは複数の基準値よりも少なくとも10%高いCRP濃度には、1つまたは複数のCRPアンタゴニストが投与される。いくつかの実施形態において、患者の第2の生物学的サンプルは、多型FcRIIA対立遺伝子の配列を決定するためにアッセイされる。R131多型の一方または両方の対立遺伝子および基準比よりも少なくとも5%高いCRP濃度を有する患者は、抗線維化療法を施される。いくつかの実施形態において、線維化関連障害は、アテローム性動脈硬化症ではない。

20

【0013】

CRPの濃度は、血清、血漿、健常組織、または線維性組織から測定することができ、CRPタンパク質の総濃度としてまたは遊離濃度もしくは非結合濃度として測定することができる。測定は、線維化関連障害の治療を調整するためのプロセスにおいて繰り返し成されてもよい。基準比は、線維性組織と比較する場合、患者の健常組織のものであってもよい。基準比はまた、患者と同じ年齢および性別の対象のコホートから得ることができる。CRP基準値は、0.1μg/ml、0.5μg/ml、1μg/ml、3μg/ml、10μg/ml、または20μg/mlであってもよい。抗線維化療法は、CRPアンタゴニストおよび/またはSAPアゴニストを含んでもよく、SAPアゴニスト、CRPアンタゴニストは、個々にまたは一緒に投与することができる。

30

【0014】

CRPアンタゴニストは、小分子、核酸、またはポリペプチドから選択することができる。CRPアンタゴニストは、CRPシグナル伝達を減少させることができ、CRP活性を減少させることができ、CRP発現を減少させることができ、血清CRPレベルを減少させることができ、IL-10の産生を減少させることができ、TGF-βの産生を減少させることができ、またはFcRIもしくはFcRIIAもしくはFcRIIIへのCRP結合を減少させることができる。いくつかの実施形態において、CRPアンタゴニストは、抗CRP抗体、抗FcRI抗体、抗FcRII抗体、または抗FcRIII抗体であってもよい。いくつかの実施形態において、CRPアンタゴニストは、シクロオキシゲナーゼ-2阻害剤、抗血小板薬、スタチン、コレステロール吸収の阻害剤、抗高脂血症薬、ナイアシン、抗糖尿病薬、α-アドレナリン受容体アンタゴニスト、酸化防止剤、ACE阻害剤、IL-6阻害剤、11-β-ヒドロキシラーゼ阻害剤、およびアンジオテンシン受容体遮断薬から選択することができる。

40

【0015】

本出願は、患者における線維化関連障害の治療のためのキットをさらに提供する。キッ

50

トは、一緒に投与されるように製剤することができる1つまたは複数のCRPアンタゴニストおよび1つまたは複数のSAPアゴニストを含む。キットにおけるSAPアゴニストは、小分子、核酸、またはポリペプチドから選択することができる。キットにおけるSAPアゴニストは、SAPシグナル伝達を増加させることができ、SAPシグナル伝達を模倣することができる、SAP活性を増加させることができ、SAP発現を増加させることができ、血清SAPレベルを増加させることができる。いくつかの実施形態において、キットにおけるSAPアゴニストは、SAPポリペプチド、FcR抗体（抗FcRI、抗FcRIIA、もしくは抗FcRIII）、架橋抗FcR抗体（抗FcRI、抗FcRIIA、もしくは抗FcRIII）、凝集IgG抗体、または架橋IgG抗体であってもよい。キットにおけるCRPアンタゴニストは、小分子、核酸、またはポリペプチドから選択することができる。キットにおけるCRPアンタゴニストは、CRPシグナル伝達を減少させることができ、CRP活性を減少させることができ、CRP発現を減少させることができ、血清CRPレベルを減少させることができ、IL-10の産生を減少させることができ、TGF- β の産生を減少させることができ、またはFcRIもしくはFcRIIAもしくはFcRIIIへのCRP結合を減少させることができる。いくつかの実施形態において、キットにおけるCRPアンタゴニストは、抗CRP抗体、抗FcRI抗体、抗FcRIIA抗体、または抗FcRIII抗体であってもよい。いくつかの実施形態において、キットにおけるCRPアンタゴニストは、シクロオキシゲナーゼ-2阻害剤、抗血小板薬、スタチン、コレステロール吸収の阻害剤、抗高脂血症薬、ナイアシン、抗糖尿病薬、 α -アドレナリン受容体アンタゴニスト、酸化防止剤、ACE阻害剤、IL-6阻害剤、11- β -ベータヒドロキシラーゼ阻害剤、およびアンギオテンシン受容体遮断薬から選択することができる。

10

20

30

40

50

【0016】

本出願は、多型FcRIIA対立遺伝子の配列を決定し、前記データを使用して患者に最も有効な治療計画を選択することによって、患者における線維化関連障害を治療し、予防し、またはその重症度を低下させるための方法をさらに提供する。治療計画は、SAPアゴニストまたはCRPアンタゴニストまたはその組合せの投与を含んでもよい。一方または両方のFcRIIA対立遺伝子の131位にヒスチジンを有する患者に、1つもしくは複数のSAPアゴニスト、1つもしくは複数のCRPアンタゴニスト、またはその組合せを投与することができる。一方または両方のFcRIIA対立遺伝子の131位にアルギニンを有する患者は、H131対立遺伝子についてホモ接合性の患者よりも高用量のSAPアゴニストを必要とし得る。

【0017】

本出願は、診断業務を行うための方法をさらに提供する。その方法は、生物学的サンプルを受け取るステップと、生物学的サンプルにおけるCRPおよびSAPの濃度を測定するステップと、CRPおよびSAPの濃度の報告書を作成するステップとを含む。CRPおよびSAPの濃度は、血漿、健常組織、または線維性組織から測定することができる。CRPタンパク質またはSAPタンパク質の総濃度としてまたは遊離濃度、つまり非結合濃度として測定することができる。いくつかの実施形態において、その方法は、SAP対CRPの比を決定するステップと、前記比を報告するステップとをさらに含む。

【0018】

本出願は、患者が線維化関連障害を発症する危険性の評価に有用なデータを決定するための方法をさらに提供する。危険性の評価は、生物学的サンプルにおけるCRPの濃度の測定に基づくものである。患者の第2の生物学的サンプルをアッセイして、多型FcRIIA対立遺伝子の配列を決定する。いくつかの実施形態において、生物学的サンプルをSAPの濃度について測定する。CRPおよびSAPの濃度は、血清、血漿、健常組織、または線維性組織から測定することができる。CRPタンパク質またはSAPタンパク質の総濃度としてまたは遊離濃度、つまり非結合濃度として測定することができる。いくつかの実施形態において、SAP対CRPの比を決定する。

【0019】

本出願は、P B M Cまたは単球細胞における、C R Pに対する応答性を決定するための方法をさらに提供する。その方法は、1つまたは複数の濃度のC R Pと共に、P B M Cまたは単球を培養するステップと、線維細胞分化のC R P誘発の程度を決定するステップとを含む。いくつかの実施形態において、C R P濃度は、0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。線維細胞分化の程度は、C R Pに対する細胞の応答性を示す。

【0020】

本出願は、C R Pアンタゴニストの抗線維化作用に対する患者の応答性を決定するための方法をさらに提供する。その方法は、患者からP B M Cまたは単球細胞を得るステップと、1つまたは複数の濃度のC R Pと共にこれらの細胞をインキュベートするステップと、線維細胞分化のC R P誘発の程度を決定するステップとを含む。いくつかの実施形態において、C R P濃度は、0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。線維細胞分化の程度は、C R Pに対する患者の応答性を示す。

【0021】

本出願は、患者における線維細胞分化を防止する最小S A P対C R P比を決定するための方法をさらに提供する。その方法は、患者からP B M Cまたは単球細胞を得るステップと、1つまたは複数の濃度のC R Pと共にこれらの細胞を培養して、線維細胞分化の最大の刺激をもたらす最小C R P濃度を決定するステップとを含む。いくつかの実施形態において、C R P濃度は、0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。その方法は、線維細胞分化の最大の刺激をもたらす最小C R P濃度の存在下において、線維細胞分化を少なくとも90%低下させる、S A Pの最小濃度を決定するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、S A Pの濃度は、0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。次いで、示されたS A P濃度は、示されたC R P濃度で割り、*in vivo*において線維細胞分化を防止する最小S A P対C R P比を決定する。

【0022】

本明細書において記載される方法のいくつかの実施形態において、線維化関連障害は、アテローム性動脈硬化症ではない。

【0023】

本明細書において記載される方法のいくつかの実施形態において、第1および第2の生物学的サンプルは、同じである。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】ヒト(配列番号1、Genbank受入番号NP_001630のアミノ酸20~223)、*Gallus gallus*(配列番号2、Genbank受入番号NP_001034653のアミノ酸20~227)、*Bos taurus*(配列番号3、Genbank受入番号AAI02624のアミノ酸20~224)、および*Cricetulus migratorius*(配列番号4、Genbank受入番号AAB28726のアミノ酸20~223)の血清アミロイドPポリペプチド(シグナル配列表さず)のアミノ酸配列アラインメントを示す図である。ヒトS A Pと同一のアミノ酸は網掛けす

10

20

30

40

50

る。

【図2】hMCSFを用いる線維細胞分化アッセイ治療を示す図である。X軸は、ドナー単球と共にインキュベートされるhMCSFの濃度を示す。Y軸は、 5.0×10^4 細胞当たりの線維細胞の計数によって測定される、5日目の線維細胞増殖の量を示す。

【図3】in vivoにおいて線維細胞分化を防止するために有効なSAP/CRP比を決定するための線維細胞分化アッセイを示す図である。(A) X軸は、ドナー単球と共にインキュベートされるhSAPの濃度を示す。Y軸は、 5.0×10^4 細胞当たりの線維細胞の計数によって測定される、5日目の線維細胞増殖の量を示す。(B) X軸は、 25 ng/ml hMCSFおよび $2 \mu\text{g/ml}$ hSAPを含む培地中であらかじめ懸濁したドナー単球と共にインキュベートされるCRPの濃度を示す。Y軸は、 5.0×10^4 細胞当たりの線維細胞の計数によって測定される、線維細胞増殖の量を示す。

10

【図4】sFcRIIIBへのSAP結合を示す図である。データは、sFcRIIIBへのSAP結合の代表的なセンサーグラムであり、5つの異なる受容体濃度での結合段階または接触段階および解離段階を示す。グラフの上部に、アッセイの間の送達の間に対するsFcRIIIB濃度を示す。図のY軸は、表面プラズマ共鳴ユニット(RU)を示し、X軸は、時間を示す。データは、時間に対する、細胞表面の質量の変化として図示される。

【図5】図5Aは、sFcRIへのCRP結合を示す図である。データは、sFcRIへのCRP結合の代表的なセンサーグラムであり、CRPの結合のオン速度およびオフ速度を示す。図のY軸は、表面プラズマ共鳴ユニット(RU)を示し、X軸は、時間を示す。データは、時間に対する、細胞表面の質量の変化として図示される。グラフ上の情報は、sFcRIおよび緩衝液の注入の時間を示し、アッセイされる受容体の異なる濃度を示す。図5Bは、sFcRIIIBへのCRP結合を示す図である。データは、sFcRIIIBへのCRP結合の代表的なセンサーグラムであり、CRPの結合のオン速度およびオフ速度を示す。図のY軸は、表面プラズマ共鳴ユニット(RU)を示し、X軸は、時間を示す。データは、時間に対する、細胞表面の質量の変化として図示される。グラフ上の情報は、sFcRIおよび緩衝液の注入の時間を示し、アッセイされる受容体の異なる濃度を示す。

20

【図6】図6Aは、FcRIへのCRP結合の親和性を示す図である。図のY軸は、表面プラズマ共鳴ユニットによって測定される、CRPへのFcRIの結合の平衡時の応答を示し、X軸は、FcRIの濃度を示す。図6Bは、FcRIIIBへのCRP結合の親和性を示す図である。図のY軸は、表面プラズマ共鳴ユニットによって測定される、FcRIIIBへのCRPの結合の平衡時の応答を示し、X軸は、FcRIIIBの濃度を示す。

30

【図7】FcRII対立遺伝子のPCR遺伝子型同定を示す図である。ゲノムDNAは、ヒトPBMCから抽出し、 253 bp 産物を産生する、FcRIIの第2の細胞外ドメインにおける異なるヌクレオチドに従って設計した特異的なセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを使用して遺伝子型を同定した。増幅PCR産物は、2%アガロースゲル上で分離した。群1は、R131ホモ接合性ドナーの遺伝子型を示し、群2は、H131ホモ接合性ドナーの遺伝子型を示し、群3は、R131/H131ヘテロ接合性ドナーの遺伝子型を示す。

40

【図8A】R131ホモ接合性ドナー単球を用いる線維細胞分化アッセイを示す図である。X軸は、 $2 \mu\text{g/ml}$ または $1 \mu\text{g/ml}$ のいずれかのSAPを含有する培地中に懸濁したドナー単球と共にインキュベートされるCRPの濃度を示す。Y軸は、 5.0×10^4 細胞当たりの線維細胞の計数によって測定される、線維細胞増殖の量を示す。

【図8B】H131ホモ接合性ドナー単球を用いる線維細胞分化アッセイを示す図である。X軸は、 25 ng/ml hMCSF + $2 \mu\text{g/ml}$ のhSAPまたは培地のみをいずれかを含有する培地中に懸濁したドナー単球と共にインキュベートされるCRPの濃度を示す。Y軸は、 5.0×10^4 細胞当たりの線維細胞の計数によって測定される、線維細胞増殖の量を示す。

50

【図 8 C】 R 1 3 1 / H 1 3 1 ヘテロ接合性ドナー単球を用いる線維細胞分化アッセイを示す図である。X 軸は、培地のみ懸濁したドナー単球と共にインキュベートされる C R P の濃度を示す。Y 軸は、 5.0×10^4 細胞当たりの線維細胞の計数によって測定される、線維細胞増殖の量を示す。

【発明を実施するための形態】

【0025】

概要

線維化に至る創傷治癒および調節不全事象では、共に、線維芽細胞が増殖および分化し、細胞外マトリックスが沈着する。線維細胞、線維細胞前駆体、筋線維芽細胞前駆体、および造血単球前駆体は、血管新生および創傷治癒を促進するために組織傷害の部位に入る、末梢血単球に由来する線維芽細胞様細胞の別個の集団を構成する。近年、血清または血漿の非存在下において培養された C D 1 4 + 末梢血単球は、72 時間以内に線維細胞に分化するが、血清アミロイド P (S A P) は、血漿において見つけられるレベルと同様のレベルで、線維細胞、線維細胞前駆体、筋線維芽細胞前駆体、および / または造血単球前駆体の分化を阻害することができたことが報告された。対照的に、S A P を欠乏させると、血漿が、線維細胞、線維細胞前駆体、筋線維芽細胞前駆体、および / または造血単球前駆体の分化を阻害する能力を低下させる。健常な個人および関節リウマチを有する対象の血清と比較すると、2 つの全身性線維性疾患、強皮症および混合性結合組織疾患を有する対象の血清は、線維細胞、線維細胞前駆体、筋線維芽細胞前駆体、および / または造血単球前駆体の分化を *in vitro* においてそれほど阻害することができず、相応して、S A P の、より低い血清レベルを有した。これらの結果は、異常に低いレベルの S A P が、したがって、線維化に至る病的プロセスを増大させる可能性があることを示唆する。これらのデータはまた、慢性の炎症性の状態における線維化を阻害するまたは反対に、創傷治癒を促進するためのメカニズムをも示唆する。

【0026】

S A P が、免疫グロブリン G に対する F c 受容体に結合する (I g G ; F c R) とともに、F c R 活性化は、続いて、線維細胞、線維細胞前駆体、筋線維芽細胞前駆体、および / または造血単球前駆体の分化に対する阻害シグナルとなることが実証された。F c R は、凝集 I g G によって活性化され、凝集しているが、単量体ではないヒト I g G は、ヒト線維細胞、線維細胞前駆体、筋線維芽細胞前駆体、および / または造血単球前駆体の分化を阻害することが示された。F c R I (C D 6 4) または F c R I I (C D 3 2) に結合するモノクローナル抗体もまた、線維細胞、線維細胞前駆体、筋線維芽細胞前駆体、および / または造血単球前駆体の分化を阻害する。F c ドメインを欠く凝集 I g G または凝集 I g A、I g E、もしくは I g M は、線維細胞、線維細胞前駆体、筋線維芽細胞前駆体、および / または造血単球前駆体の分化を阻害しない。凝集 I g G との単球のインキュベーションは、S A P のように、線維細胞、線維細胞前駆体、筋線維芽細胞前駆体、および / または造血単球前駆体の分化を阻害した。プロテインキナーゼ酵素の阻害剤を使用すると、S y k 関連チロシンキナーゼおよび S r c 関連チロシンキナーゼは、線維細胞、線維細胞前駆体、筋線維芽細胞前駆体、および / または造血単球前駆体の分化の阻害に参加することもまた示された。これらの観察は、線維細胞、線維細胞前駆体、筋線維芽細胞前駆体、および / または造血単球前駆体の分化が、止血の回復の後など、S A P および凝集 I g G のレベルが低い状況において生じ得ることを示唆する。

【0027】

血清アミロイド P (「S A P」) は、ディスク状の分子中で非共有結合した 5 つの同一のサブユニットまたはプロトマーから構成される、哺乳動物における自然発生血清タンパク質である。S A P は、5 つの非共有結合 2 5 , 0 0 0 ダルトンプロトマーから構成される 1 2 5 , 0 0 0 ダルトン五量体糖タンパク質である。S A P は、この環状の五量体構造によって特徴づけられる、タンパク質のペントラキシンスーパーファミリーに属する。古典的な短いペントラキシンは、S A P および C 反応性タンパク質を含む (O s m a n d , A . P . ら、P r o c . N a t . A c a d . S c i . 、 7 4 巻 : 7 3 9 ~ 7 4

10

20

30

40

50

3頁(1977年))。それは、肝臓において合成され、ヒトSAPの生理学的半減期は24時間である。ヒトSAPサブユニットの配列は、配列番号1に表される(GeneBank受入番号NP_001630のアミノ酸20~223、シグナル配列表さず)。

【0028】

C反応性タンパク質(CRPおよびPTX1としても知られている)は、多種多様の炎症性サイトカインに応じて、肝臓において産生される必須のヒト急性期反応物である。血漿CRPレベルは、感染、虚血、外傷、やけど、および炎症性の状態に応じて1,000倍増加する。CRPタンパク質は、カルシウム依存性の様式において、ホスホコリン、フィブロネクチン、クロマチン、ヒストン、およびリボ核タンパク質などの広範囲の細胞性物質に結合する(Szalaiら、Immuno. Res., 1997年、16巻、127~136頁)。それは、食作用性白血球上の特異的受容体に対するリガンドであり、単球およびマクロファージ上の活性化反応を媒介し、補体を活性化する(Szalaiら、Immunol. Res., 1997年、16巻、127~136頁)。

10

【0029】

CRPの機能は、先天性の免疫系におけるその役割に関連する。IgGと同様に、それは、補体を活性化し、Fc受容体に結合し、様々な病原体に対するオプソニンとして作用する。Fc受容体とのCRPの相互作用は、炎症反応を抑制する抗炎症性サイトカインの生成に至る。

【0030】

当技術分野内の現在の従事者らは、血漿または組織におけるCRPまたはSAPの絶対的なレベルおよび炎症性疾患プロセスまたは線維性疾患プロセスに影響を与えるそれらの個々の役割に注目した。対照的に、本出願は、CRPおよびSAPが、炎症および線維化に対する互いの効果を釣り合わせるように機能することを開示する。血漿または組織におけるSAP対CRPの低い比は、FcRに結合したSAP対CRPの、より低い比、それによって、傷害の部位での、TGF β ならびに他の線維形成促進性のサイトカインおよびケモカインの産生の増加をもたらし、線維化を促進するであろう。CRPレベルを減少させるもしくはSAPレベルを増加させるまたはFcRに結合しているCRPを減少させるもしくはFcRに結合しているSAPを増加させることによってこの比を増加させる作用物質は、線維性疾患の進行を遅らせるまたは線維性疾患を逆戻りさせるのに有効な治療薬となるであろう。同じく、個々の集団内のSAP対CRPの比のモニターにより、線維化関連障害を発症する危険性にさらされ、かつそのため、予防的療法をより必要とする集団が同定されるはずである。

20

30

【0031】

本出願の一態様は、部分的に、FcRIIAへのCRPの結合に影響を与えるFcRIIAの多型もまた、線維性疾患の進行に影響を与えるという驚くべき発見に関する。細胞上のFcRIIA受容体へのIgG2およびCRPの結合ならびにそれに続くシグナル伝達に影響を与えるヒトFcRIIA遺伝子座の遺伝的多型は、同定されている(NCBI refSNPs 1801274)。R131/H131対立遺伝子として本明細書において知られている多型は、GeneBank受入番号NP_067674(配列番号6)によって定義されるように、FcRIIAの第2のIg様ドメインにおけるアミノ酸166にある。IgG2結合については、アルギニンがこの位置にある場合(GeneBank受入番号NM_021642(配列番号5)によって定義されるように、mRNA配列の535位のコドンにおける2番目の位置のGのために)、受容体はIgG2に非常に弱くしか結合しないのに対して、ヒスチジンがこの位置にある場合(mRNA配列の535位のコドンにおける2番目の位置のAのために)、受容体はIgGに効率的に結合する。

40

【0032】

CRPは、オプソニン化、C1qに結合することによる補体活性化、およびFcRへの結合を含む、いくつかの機能活性をIgGと共有する。CRPは、宿主防御、炎症の調節、および自己免疫疾患の調整に関与する。しかしながら、FcRIIAへのCRP結

50

合は、R 1 3 1対立遺伝子についてのみ効率的であるように思われ、H 1 3 1対立遺伝子にほとんど結合せず、これは、I g G 2結合と正反対である。この表現型についてヘテロ接合性の個人は、中間の表現型を示す。R 1 3 1対立遺伝子へのC R P結合は、C a ²⁺シグナル伝達事象の開始をもたらす。

【0033】

炎症性の部位でのP M Nおよび単球の活性化は、ヒトF c R I I AのR 1 3 1対立遺伝子に対するC R Pの選択性に影響を与えない。F c R I I AのR 1 3 1対立遺伝子についてホモ接合性の個人は、C R Pオプソニン化細菌に応答する時に、H 1 3 1ホモ接合性である個人よりも効率的であり、これは、これらの場合において、感染に対する初期の保護的サイトカイン応答を増強すると思われる。C R P媒介性の食作用は、F c R I I AがF c R Iと同時発現する場合に生じ得ることおよびこれは、F c R I I A H 1 3 1よりもF c R I I A R 1 3 1でより効率的であることが報告されている(B o d m a n - S m i t hら、2002年、I m m u n o l o g y 107巻：252～260頁)。

10

【0034】

ループス腎炎の関連において、腎炎がより進行し、極度のI g G 2沈着を有する個人においてF c R I I A R 1 3 1の発現が増加している。C R Pは、これらの患者の腎免疫沈着物中に見つめられた。F c R I I A R 1 3 1は、循環免疫複合体の除去の障害の一因となる可能性があり、これらの患者における糸球体内で食細胞活性化および炎症媒介物質の放出を有効に誘発する可能性がある。したがって、F c R I I Aにおけるアミノ酸131位(配列番号6の残基166)の遺伝的多型はどのように個人がF c Rを通してC R P効果をシグナル伝達するかならびにこれらの差異が、宿主防御、炎症の調節、および自己免疫疾患の調整に影響する可能性を有する異なる応答に至り得るかに影響を与える。

20

【0035】

F c Rはまた、関連するペントラキシンS A Pに対する受容体でもあり、S A Pレベルは、線維化の生物学的現象に影響を与える。P B M細胞へのS A P結合は、線維促進性の線維細胞に分化するためのそれらの能力を遮断する。P B M細胞へのC R P結合は、線維細胞分化に影響を与えるように先に記載されていない。本出願は、C R Pが、濃度依存性の様式において、P B M細胞からの線維細胞分化を活性化することおよびC R Pがこの効果を媒介する能力が、F c R I I AのR 1 3 1対立遺伝子に依存することを提供する。アミノ酸131位(配列番号6の残基166)のF c R I I Aのハプロタイプは、そのため、F c Rシグナル伝達へのC R PおよびS A Pの寄与に影響を与えることならびに結果的に、線維化に対して特異な効果を及ぼすことが期待されるであろう。r s 1801274に関するN C B I S N Pデータベース(r e f S N P)における情報は、F c R I I AのR 1 3 1対立遺伝子が、ヒト集団において著しく代表されることを示す。R 1 3 1およびH 1 3 1は本質的に共優性である。N C B Iデータベース(広範囲の民族からの数百人の個人の遺伝子型についてのデータを提供する)において立証される遺伝子型分布は、R / Rホモ接合体については約21%であり、R / Hヘテロ接合体については47%であり、H / Hホモ接合体については32%である。集団として、日本/中国からのアジア民族は、他の民族よりもH / H遺伝子型がより代表的である。そのため、この遺伝子座のF c R I I Aのハプロタイプは、線維化に影響することおよびこのヒト集団内で抗線維化療法に著しく応答することが期待されるであろう。

30

40

【0036】

定義

本明細書において使用されるように、用語「治療」、「治療すること」などは、所望の薬理的および/または生理的效果を得ることを指す。効果は、その障害もしくは症状を完全にもしくは部分的に予防する点から、予防的なものであってもよく、ならびに/または線維性障害もしくは線維増殖性障害および/またはその障害に起因する悪影響に対する部分的なまたは完全な治癒の点から治療的なものであってもよい。「治療」は、本明細書に

50

において使用されるように、哺乳動物における、特にヒトにおける疾患の任意の治療を包含し、(a)生存時間を増加させること、(b)疾患による死亡の危険性を減少させること、(c)疾患にかかりやすい可能性があるが、それを有すると今までに診断されたことがない対象において疾患が生じることを予防すること、(d)疾患を阻害すること、つまり、その発症を抑止すること(たとえば、疾患進行の速度を低下させること)、および(e)疾患を軽減すること、つまり疾患の後退を引き起こすことを含む。

【0037】

本明細書において使用されるように、障害または状態を「予防する」治療薬は、統計的サンプルにおいて、未治療コントロールサンプルと比較して、治療サンプルにおける障害もしくは状態の発生を低下させるまたは未治療コントロールサンプルと比較して、障害もしくは状態の1つもしくは複数の症状の発症を遅らせるもしくはその重症度を低下させる化合物である。

10

【0038】

本明細書において使用されるように、用語「対象」および「患者」は、ヒトを含む哺乳動物を含む動物を指す。用語「哺乳動物」は、霊長類、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、ヤギ、ブタ、マウス、ラット、ウサギ、モルモットを含む家畜動物、動物園の動物などの捕獲動物、および野生動物を含む。本明細書において使用されるように、用語「組織」は、器官または皮膚組織、肺組織、腎組織、および他の型の細胞などの特殊化した細胞のセットを指す。

20

【0039】

用語「治療有効量」は、所望の治療効果を容易にするのに有効な、治療剤の量またはそのような治療剤の送達速度を意味する。厳密な所望の治療効果は、治療される線維性の状態または線維増殖性の状態、投与される製剤、および当業者らによって十分に理解される多種多様の他の因子に従って変動するであろう。

【0040】

本明細書において使用されるように、線維化関連障害という用語は、1つまたは複数の組織における線維化を含む状態を指す。本明細書において使用されるように、用語「線維化」は、器官または組織の正常な構成要素としてではなく、修復プロセスまたは反応プロセスとして線維組織の形成を指す。線維化は、任意の特定の組織における正常な沈着を超過した線維芽細胞蓄積およびコラーゲン沈着によって特徴づけられる。本明細書において使用されるように、用語「線維化」は、「線維芽細胞蓄積およびコラーゲン沈着」と同義的に使用される。線維芽細胞は、結合組織細胞であり、これらは、体の全体にわたって結合組織中に分散している。線維芽細胞は、I型および/またはIII型コラーゲンを含有する柔軟な細胞外マトリックスを分泌する。組織に対する傷害に応じて、近くの線維芽細胞は、傷に移動し、増殖し、大量のコラーゲン性細胞外マトリックスを産生する。コラーゲンは、細胞外マトリックスおよび結合組織、軟骨、ならびに骨の主な構成成分である、グリシンおよびプロリンが豊富な繊維状タンパク質である。コラーゲン分子は、鎖と呼ばれる三重鎖ヘリックス構造であり、これらは、ロープ状ヘリックスで互いに巻きついている。コラーゲンは、いくつかの形態または型で存在し、これらのうち、I型は、最も一般的であり、皮膚、腱、および骨中に見つけられ、III型は、皮膚、血管、および内臓器官中に見つけられる。

30

40

【0041】

「強皮症」は、皮膚および他の器官における線維芽細胞による新しいコラーゲンの産生過剰によって引き起こされる皮膚の肥厚および硬化によって特徴づけられる線維化関連障害である。強皮症は、局所性または全身性疾患として得る。全身性强皮症は、いくつかの器官に影響を与える可能性がある。全身性硬化症は、特に手および顔の皮膚の肥厚および下にある組織への癒着と共に、ヒアリン化コラーゲン性線維組織および肥厚コラーゲン性線維組織の形成によって特徴づけられる。疾患はまた、蠕動の損失および食道の粘膜下の線維化による嚥下障害、肺線維症による呼吸困難、心筋線維症、ならびに腎血管変化によって特徴づけられてもよい。肺線維症は、強皮症患者の30~70%に影響を与えて、拘

50

束性肺疾患をもたらすことが多い。

【 0 0 4 2 】

「特発性肺線維症」は、慢性で、進行性の、普通の場合、致命的な肺障害であり、慢性の炎症性のプロセスの結果であると考えられる。

【 0 0 4 3 】

治療方法

本出願の一態様は、線維化関連障害を治療し、予防し、またはその重症度を低下させるための方法であって、患者の生物学的サンプルにおけるCRPおよびSAPの濃度を測定してSAP対CRP比を決定するステップを含む方法を提供する。決定された比を、1つまたは複数のSAP対CRP基準比と比較し、抗線維化療法を、1つまたは複数の基準比よりも低いSAP対CRP比を有する患者に施す。

10

【 0 0 4 4 】

いくつかの実施形態において、患者の生物学的サンプルは、健常対象からの生物学的サンプルから決定されるSAP対CRP基準比または健常対象の集団の平均比から決定される基準比と比較される。いくつかの実施形態において、基準比は、年齢および性別などの同様の患者特徴を有する対象の集団の平均比から決定される。いくつかの実施形態において、抗線維化療法は、基準比よりも少なくとも10、20、30、40、50、70、または100%低いSAP対CRP比を有する患者に施される。いくつかの実施形態において、抗線維化療法は、25、20、15、10、または5未満であるSAP対CRP比を有する患者に施される。いくつかの実施形態において、SAP対CRP基準比は、60、50、40、30、20、15、10、または5である。患者のSAP対CRP比についての知識を有する医師は、個々の患者にとって適切なレベルに、SAPまたは他の抗線維化療法の投薬量をより正確に調整することができるであろう。

20

【 0 0 4 5 】

いくつかの実施形態において、SAPおよびCRPの濃度は、同じ型の組織または細胞性材料からの生物学的サンプルから決定される。ある実施形態において、患者の線維性組織から得られる生物学的サンプルから決定されるSAP対CRP比は、同じ患者の非線維性生物学的サンプルと比較される。いくつかの実施形態において、非線維性生物学的サンプルは、線維性生物学的サンプルと同じ組織由来のものである。いくつかの実施形態において、生物学的サンプルは、血清または血漿である。

30

【 0 0 4 6 】

SAPの血漿濃度は、Immunology、171巻のPilling, D. J : 5537~5546頁(2003年)において記載されるように、たとえば、市販で入手可能なSAP抗体(たとえばAlpha Diagnostic International Cat # SAP12-S)を使用して、血清に対してELISAアッセイを実行することによって決定することができる。CRPの血漿濃度は、Alpha Diagnostic International Cat # 1000およびChemicon Cat # CYT298からのヒトC反応性タンパク質(CRP)ELISAキットを含む、市販で入手可能なキットを使用して決定することができる。さらに、Luminox(商標)ベースのサイトメトリックビーズアレイアッセイは、SAPおよびCRPについて開発されており、Rules Based Medicine(商標)によって提供される。健常対象におけるSAPの平均的血漿濃度は、20~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間である。健常対象におけるCRPの平均的血漿濃度は、0~2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間である。いくつかの実施形態において、測定されたSAPおよびCRPの濃度は、「遊離濃度」またはむしろ非結合SAPおよび非結合CRPの濃度である。SAPおよびCRPの遊離濃度の決定は、たとえばサンドイッチELISAアッセイを使用して実行することができる。たとえば、SAPのFcR結合部位を認識する第1の抗体は、生物学的サンプルのSAPを捕捉するために使用される。次いで、SAPのリガンド結合部位を認識する第2の抗体は、サンプル中のSAPの遊離濃度を検出するために使用される。

40

【 0 0 4 7 】

50

いくつかの実施形態において、その方法は、第2の生物学的サンプルをアッセイして、FcRIIAの131対立遺伝子のアミノ酸を決定するステップをさらに含んでもよい。いくつかの実施形態において、抗線維化療法は、基準比よりも少なくとも5、10、20、30、40、50、70、または100%低いSAP対CRP比を有するR131ホモ接合性患者に施される。いくつかの実施形態において、SAP対CRP基準比は、60、50、40、30、20、15、10、または5である。いくつかの実施形態において、抗線維化療法は、25、20、15、10、または5よりも低いSAP対CRP比を有するR131ホモ接合性患者に施される。いくつかの実施形態において、抗線維化療法は、基準比よりも少なくとも5、10、20、30、40、50、70、または100%低いSAP対CRP比を有するH131ホモ接合性患者に施される。いくつかの実施形態において、SAP対CRP基準比は、60、50、40、30、20、15、10、または5である。いくつかの実施形態において、抗線維化療法は、25、20、15、10、または5よりも低いSAP対CRP比を有するH131ホモ接合性患者に施される。いくつかの実施形態において、抗線維化療法は、基準比よりも少なくとも5、10、20、30、40、50、70、または100%低いSAP対CRP比を有するH131/R131ヘテロ接合性患者に施される。いくつかの実施形態において、SAP対CRP基準比は、60、50、40、30、20、15、10、または5である。いくつかの実施形態において、抗線維化療法は、25、20、15、10、または5よりも低いSAP対CRP比を有するH131/R131ヘテロ接合性患者に施される。

10

【0048】

20

理論によって拘束されることを望むものではないが、FcRIIA対立遺伝子の根底にある遺伝的多型は、SAP/CRP比が抗線維化療法応答を正確に予測する能力に影響を与えるであろう。FcRIIAのH131対立遺伝子についてホモ接合性の個人は、CRPにそれほど応答性ではないことが予測されるであろう。そのため、CRPは、SAPの抗線維化作用をあまり緩和しないであろう。そのため、H131ホモ接合性の個人は、SAPまたはSAPアゴニストの抗線維化作用に対してより感受性であり、CRP阻害メカニズムを通して機能する他の作用物質またはCRPアンタゴニストの抗線維化作用に対してそれほど感受性ではない可能性がある。R131ホモ接合性の個人はまた、SAPに対して感受性であるが、SAPまたはSAPアゴニストの有効治療投薬量は、CRPレベルに依存するであろう。SAPまたはSAPアゴニストの投薬量は、R131ホモ接合性であり、高いCRPレベルを有する患者における有効な治療のために増加させる必要があるであろう。

30

【0049】

いくつかの実施形態において、個々の患者におけるFcRIIA対立遺伝子パターンを決定するための方法は、たとえば、1)適切な免疫細胞の表面上に存在するFcRIIAポリペプチドの1つもしくは複数の対立形質の免疫学的検出、つまり「表現型の特徴づけ」または2)たとえば、核酸の増幅もしくは配列決定ありもしくはなしで核酸プローブを使用する、1つもしくは複数のFcRIIA対立形質をコードするDNAもしくはRNAの分子検出、つまり「遺伝子型の特徴づけ」を含んでもよい。

【0050】

40

いくつかの実施形態において、FcRIIA多型の同定と組み合わせたSAP対CRP比の決定またはCRPレベルの測定は、抗線維化療法および投薬を選択するための診断ツールとして使用されるであろう。患者のSAP対CRP比およびFcRIIAの両方の131対立遺伝子についての知識を有する医師は、個々の患者にとって適切なレベルに、SAPまたは他の抗線維化療法の投薬量をより正確に調整することができるであろう。

【0051】

いくつかの実施形態において、FcRIIAの多型対立遺伝子を決定するために使用される第2の生物学的サンプルは、SAPおよび/またはCRPの濃度をアッセイするために使用される第1の生物学的サンプルと同じであるまたは異なる。生物学的サンプルは、細胞、FcRIIAタンパク質、および/または核酸(mRNAもしくはゲノムDN

50

A)を抽出することができる血清、血漿、健常組織、または線維性組織由来のものであってもよい。

【0052】

本出願の他の態様は、患者における線維化関連障害の治療を調整するための方法であって、患者におけるCRPおよびSAPの濃度を測定してSAP対CRP比を決定するステップと、その比を、1つまたは複数のSAP対CRP基準比と比較するステップと、1つまたは複数の基準比よりも低いSAP対CRP比を有する患者に抗線維化療法を施すステップと、患者におけるCRPおよびSAPの濃度をさらに測定して第2のSAP対CRP比を決定するステップとを含む方法を提供する。抗線維化療法は、第2のSAP対CRP比に基づいて調整される。

10

【0053】

患者におけるCRPおよびSAPの濃度のそれに続く測定は、抗線維化療法の開始の後の任意の時間に行われてもよい。その測定は、抗線維化療法コースの間にまたはその完了の後に実行されてもよい。治療スケジュールの全体にわたっておよび経過観察ケアの一部として治療の後に、CRPおよびSAPの濃度は、複数回、決定されてもよく、比は、計算されてもよい。

【0054】

SAP対CRPの目標比は、患者の性別および疾患状態を含む、多種多様の因子に依存するであろう。個々の患者の目標比を決定することは、本開示を考慮して当業者の範囲内にある。いくつかの実施形態において、SAP対CRP目標比は、少なくとも2、5、7、10、12、14、16、18、20、30、40、50、60、またはそれ以上である。

20

【0055】

抗線維化療法は、たとえば投薬量、投薬の頻度によって、または投与される抗線維化作用物質を変えることによって調整することができる。たとえば、当業者は、SAP対CRP目標比に達した患者における投薬量を低下させてもよいが、SAP対CRP比が著しく増加しなかった患者の投薬量を増加させることができる。そのため、SAP対CRP比は、患者の治療に対する応答の客観的な指標を医者に提供する。いくつかの実施形態において、当業者は、患者のSAP対CRP比に基づいて、肉眼的な線維性症状をもしや示さない患者に抗線維化療法を施し続けてもよい。

30

【0056】

本出願の他の態様は、患者が線維化関連障害を発症する危険性にさらされているかどうかを決定する方法であって、患者におけるCRPおよびSAPの濃度を測定してSAP対CRP比を決定するステップと、決定されたSAP対CRP比を1つまたは複数の基準比と比較するステップと、1つまたは複数の基準比よりも低いSAP対CRPを、患者が線維化関連障害の危険性にさらされている指標と解釈するステップとを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、その方法は、第2の生物学的サンプルをアッセイしてFcγRIIAの131対立遺伝子のアミノ酸を決定するステップをさらに含んでもよい。

【0057】

典型的に、基準比の比からの、個々の患者における比の偏差が大きいほど、線維化関連障害の発症の危険性が大きくなる。いくつかの実施形態において、基準比よりも少なくとも5、10、20、40、60、80、または100%低いSAP対CRP比は、患者が危険性にさらされている指標である。いくつかの実施形態において、25、20、15、10、または5よりも低いSAP対CRP比は、患者が危険性にさらされている指標である。いくつかの実施形態において、SAP対CRP基準比は、60、50、40、30、20、15、10、または5である。

40

【0058】

一度、患者が、危険性にさらされているとして同定されたら、適した、抗線維化療法を用いる治療を始めるなど、防止的で予防的な測定が行われてもよい。

【0059】

50

いくつかの実施形態において、患者は、化学療法、放射線治療、および様々な傷害またはやけどからの苦痛を含む線維化関連障害のさらなる危険性を示し得る。これらの場合において、基準比のSAP対CRP比からの個人のSAP対CRP比のわずかに小さな偏差は、さらなる危険因子の存在と組み合わせると、患者が、線維化関連障害を発症する危険性が高いということを示し得る。いくつかの実施形態において、基準比よりも少なくとも2、5、10、20、40、60、80、または100%低いSAP対CRP比は、1つまたは複数のさらなる危険因子を有する患者が危険性にさらされている指標である。

【0060】

そのようなさらなる1つの危険因子は、FcRIIA多型の一方または両方の対立遺伝子のアミノ酸131位（配列番号6の166位）のアルギニンの存在である。いくつかの実施形態において、R131対立遺伝子の存在は、患者が線維化関連障害を発症する危険性を増加させる。いくつかの実施形態において、FcRIIA多型の同定は、患者の最も適切な抗線維化療法を決定するであろう。

10

【0061】

本出願の他の態様は、線維化関連障害を診断する方法であって、患者におけるCRPおよびSAPの濃度を測定してSAP対CRP比を決定するステップと、決定されたSAP対CRP比を1つまたは複数の基準比と比較するステップと、基準比よりも低いSAP対CRP比を有する患者において線維化関連障害を診断するステップとを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、基準比よりも少なくとも5、10、20、40、60、80、100、または150%低いSAP対CRP比は、線維化関連障害に対する陽性診断として解釈される。いくつかの実施形態において、SAP対CRP基準比は、60、50、40、30、20、15、10、または5である。

20

【0062】

本出願の他の態様は、1つまたは複数のCRPアンタゴニストおよび1つまたは複数のSAPアゴニストの一緒に投与によって線維化関連障害を治療するための方法を提供する。本明細書において使用されるように、句「一緒に投与」は、先に投与された治療化合物が体内でまだ有効である間に、第2の化合物が投与されるような、2つ以上の異なる治療化合物の投与の任意の形態を指す（たとえば、2つの化合物は、患者において同時に有効であり、これは、2つの化合物の相乗効果を含んでもよい）。たとえば、異なる治療化合物は、同じ製剤または別々の製剤において、併用してまたは経時的に投与することができる。したがって、そのような治療を受ける個人は、異なる治療化合物の組み合わせた効果から利益を得ることができる。

30

【0063】

本出願の他の態様は、1つまたは複数のCRPアンタゴニストおよび1つまたは複数のSAPアゴニストを含む、線維化関連障害を治療するためのキットを提供する。アンタゴニストおよびアゴニストは、一緒に投与するために製剤される。化合物は、別々にまたは組み合わせた製剤で投与することができる。化合物はまた、同時にまたは異なる投薬スケジュールで投与することができる。

【0064】

いくつかの実施形態において、キットにおけるSAPアゴニストは、小分子、核酸、またはポリペプチドから選択される。キットにおけるSAPアゴニストは、SAPシグナル伝達を増加させることができ、SAPシグナル伝達を模倣することができ、SAP活性を増加させることができ、SAP発現を増加させることができ、または血清SAPレベルを増加させることができる。ある実施形態において、キットにおけるSAPアゴニストは、SAPポリペプチド、FcR抗体（抗FcRI、抗FcRIIA、もしくは抗FcRIII）、架橋抗FcR抗体（抗FcRI、抗FcRIIA、もしくは抗FcRIII）、凝集IgG抗体、または架橋IgG抗体である。いくつかの実施形態において、キットにおけるCRPアンタゴニストは、小分子、核酸、またはポリペプチドから選択することができる。

40

【0065】

50

いくつかの実施形態において、キットにおけるCRPアンタゴニストは、CRPシグナル伝達を減少させることができ、CRP活性を減少させることができ、CRP発現を減少させることができ、血清CRPレベルを減少させることができ、IL-10の産生を減少させることができ、TGF- β の産生を減少させることができ、またはFcRIもしくはFcRIIAもしくはFcRIIIへのCRP結合を減少させることができる。ある実施形態において、キットにおけるCRPアンタゴニストは、抗CRP抗体、抗FcRI抗体、抗FcRIIA抗体、または抗FcRIII抗体である。ある実施形態において、キットにおけるCRPアンタゴニストは、シクロオキシゲナーゼ-2阻害剤、抗血小板薬、スタチン、コレステロール吸収の阻害剤、抗高脂血症薬、ナイアシン、抗糖尿病薬、 α -アドレナリン受容体アンタゴニスト、酸化防止剤、ACE阻害剤、IL-6阻害剤、11-ベータヒドロキシラーゼ阻害剤、およびアンジオテンシン受容体遮断薬から選択される。

10

【0066】

本出願の他の態様は、線維化関連障害を治療するための方法であって、線維化関連障害に罹患した患者を同定するステップと、患者の生物学的サンプルにおけるCRP濃度を測定するステップと、濃度が、1つまたは複数の基準値よりも高いかどうかを決定するステップと、基準値よりも高いCRP濃度を有する患者にCRPアンタゴニストを投与するステップとを含む方法を提供する。

【0067】

いくつかの実施形態において、測定されたCRPの濃度は、「遊離濃度」またはむしろ非結合CRPの濃度である。ある実施形態において、患者の生物学的サンプルは、健常対象からの生物学的サンプルから決定されるCRP基準値または健常対象の集団に由来する基準値と比較される。ある実施形態において、基準値は、年齢および性別などの同様の患者特徴を有する対象の集団に由来する。いくつかの実施形態において、CRP基準値は、0.1 μ g/ml、0.5 μ g/ml、1 μ g/ml、3 μ g/ml、10 μ g/ml、または20 μ g/mlである。

20

【0068】

本出願の他の態様は、診断業務を行うための方法を提供する。その方法は、生物学的サンプルを受け取るステップと、生物学的サンプルのCRPおよび/またはSAPの濃度を測定するステップと、CRPおよび/またはSAPの濃度の報告書を作成するステップとを含む。CRPおよびSAPの濃度は、血清、血漿、健常組織、または線維性組織から測定することができる。CRPタンパク質またはSAPタンパク質の総濃度としてまたは遊離濃度もしくは非結合濃度として測定することができる。作成された報告書は、患者または医療提供者に送られてもよい。用語「医療提供者」は、人、コミュニティーなどに医療サービスを提供する個人または団体を指す。「医療提供者」の例は、医者、病院、高齢者継続ケアコミュニティー、高度看護施設、亜急性ケア施設、クリニック、多専門クリニック、独立外来センター、家庭医療機関、およびHMOを含む。いくつかの実施形態において、その方法は、生物学的サンプルにおけるSAP対CRPの比を決定および報告するステップをさらに含む。

30

【0069】

本出願の他の態様は、患者が線維化関連障害を発症する危険性の評価に有用なデータを決定するための方法であって、患者から生物学的サンプルを得るステップと、生物学的サンプルにおけるCRPの濃度を測定するステップと、FcRIIA多型の両方の対立遺伝子の131位(配列番号6の166位)のアミノ酸を決定するステップとを含む方法を提供する。生物学的サンプルは、細胞、FcRIIAタンパク質、および/または核酸(RNAもしくはゲノムDNA)を抽出することができる血清、血漿、健常組織、または線維性組織由来のものであってもよい。いくつかの実施形態において、その方法は、生物学的サンプルにおけるSAPの濃度を決定するステップをさらに含む。CRPおよびSAPの濃度は、血漿、健常組織、または線維性組織から測定ことができ、CRPタンパク質またはSAPタンパク質の総濃度としてまたは遊離濃度もしくは非結合濃度として測

40

50

定することができる。いくつかの実施形態において、SAPおよびCRPの濃度は、SAP対CRP比を決定するために使用されるであろう。このデータは、患者が線維性障害を発症する危険性の客観的な指標を医者に提供し、抗線維化治療に対する、患者の応答の指標となる。いくつかの実施形態において、当業者は、この危険性評価に基づいて患者に施すための最も適切な抗線維化療法を決定することができる。

【0070】

本出願の他の態様は、線維化関連障害を治療し、予防し、またはその重症度を低下させるための方法であって、FcRIIA対立遺伝子の多型について患者の生物学的サンプルを分析するステップを含む方法を提供する。その方法は、患者の両方のFcRIIA対立遺伝子における131位多型のアミノ酸残基（配列番号6の166位）を決定するステップと、患者に最も有効な治療計画を選択するステップとを含む。一方または両方のFcRIIA対立遺伝子の131位にヒスチジンを有する患者に、1つまたは複数のSAPアゴニストを投与することができる。一方または両方のFcRIIA対立遺伝子の131位にアルギニンを有する患者に、1つもしくは複数のSAPアゴニスト、1つもしくは複数のCRPアンタゴニスト、またはその組合せを投与することができる。一方または両方のFcRIIA対立遺伝子の131位にアルギニンを有する患者は、H131対立遺伝子についてホモ接合性の患者よりも高用量のSAPアゴニストの投与を必要とし得る。SAPアゴニストの投薬量は、患者におけるCRP濃度に依存するであろう。高レベルの血漿CRPを有する、R131についてホモ接合性の患者は、有効な治療のために、より高用量のSAPアゴニストを投与される。

10

20

【0071】

本明細書において記載されるFcRIIA多型はまた、抗線維化治療の薬剤開発プロセスの多くの異なる側面を改善するのに有用でもある。たとえば、本発明の態様は、FcRIIA 131多型に基づいて、臨床試験のための個人を選択することを含む。たとえば、少なくとも1つのH131対立遺伝子を有する個人は、彼/彼女らが、おそらく、SAPポリペプチドまたはSAPアゴニストに陽性に応答するであろうということおよびSAP治療の効果を評価する試験に含むことができることを示す。その代わりに、少なくとも1つのR131対立遺伝子を有する個人もまたSAPベースの臨床試験に含まれていてもよいが、その個人らは、より高用量のSAPを必要とする可能性がある。

30

【0072】

本出願の他の態様は、線維細胞分化についての、CRPに対する、PBMCまたは単球細胞の応答性を決定するための方法を提供する。いくつかの実施形態において、細胞は、様々な組織培養系から得ることができる。いくつかの実施形態において、その方法は、PBMCまたは単球細胞を含有する、患者の生物学的サンプルを得るステップを含む。生物学的サンプルは血清、血漿、健常組織、または線維性組織由来のものであってもよい。細胞は、線維細胞分化の程度を決定するために、様々な濃度のCRPを有する培地中で培養される。CRPの濃度は、0.0001 μ g/ml \sim 1mg/mlまで及び得、いくつかの実施形態において、0.001 μ g/ml、1.0 μ g/ml、5 μ g/ml、10 μ g/ml、15 μ g/ml、20 μ g/ml、25 μ g/ml、30 μ g/ml、35 μ g/ml、40 μ g/ml、45 μ g/ml、50 μ g/ml、100 μ g/ml、200 μ g/ml、300 μ g/ml、または500 μ g/mlである。このアッセイのいくつかの実施形態において、培地は1 \sim 100ng/mlのhMCSFを補充してもよく、hMCSFの好ましい濃度は25ng/mlである。PBMCおよび単球が線維細胞に分化したという指標は、当業者によって決定することができる。一般に、線維細胞は、細長い紡錘形を有し、楕円形の核が存在する接着細胞として形態学的に定義される。このアッセイのいくつかの実施形態において、細胞は、固定され、倒立顕微鏡を使用する直接的な集計によって線維細胞を数える前に、Hema 3染色を用いて染色される。線維細胞分化の量は、CRPに対する、細胞の応答性の指標として当業者によって解釈される。線維細胞分化の量が大きいほど、より大きな程度のCRP応答性を示す。

40

【0073】

50

本出願の他の態様は、CRPアンタゴニストの抗線維化作用に対する患者の応答性を決定するための方法を提供する。その方法は、PBM Cまたは単球細胞を含有する、患者の生物学的サンプルを得るステップを含む。生物学的サンプルは血清、血漿、健常組織、または線維性組織由来のものであってもよい。細胞は、線維細胞分化の程度を決定するために、様々な濃度のCRPを有する培地中で培養される。CRPの濃度は、 $0.0001 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 1 \text{mg}/\text{ml}$ まで及び得、いくつかの実施形態において、 $0.001 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $35 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $45 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、または $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。このアッセイのいくつかの実施形態において、培地は $1 \sim 100 \text{ng}/\text{ml}$ のhMCSFを補充してもよく、hMCSFの好ましい濃度は $25 \text{ng}/\text{ml}$ である。PBM Cおよび単球が線維細胞に分化したという指標は、当業者によって決定される。一般に、線維細胞は、細長い紡錘形を有し、楕円形の核が存在する接着細胞として形態学的に定義される。このアッセイのいくつかの実施形態において、細胞は、固定され、倒立顕微鏡を使用する直接的な集計によって線維細胞を数える前に、Hema 3染色を用いて染色される。線維細胞分化の量は、CRPに対する、患者の応答性の指標として当業者によって解釈される。線維細胞分化の量が大きいほど、患者における、より大きな程度のCRP応答性を示す。

10

【0074】

本出願の他の態様は、患者における線維細胞分化を防止する最小SAP対CRP比を決定するための方法を提供する。その方法は、PBM Cまたは単球細胞を含有する、患者の生物学的サンプルを得るステップを含む。生物学的サンプルは血清、血漿、健常組織、または線維性組織由来のものであってもよい。細胞は、線維細胞分化の最大の誘発を提供する、CRPの最小濃度を決定するために、様々な濃度のCRPを有する培地中で培養される。CRPの濃度は、 $0.0001 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 1 \text{mg}/\text{ml}$ まで及び得、いくつかの実施形態において、 $0.001 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $35 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $45 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、または $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。次いで、患者から得られたさらなるPBM Cまたは単球細胞は、この最小濃度のCRPおよび様々な濃度のSAPを補充した培地中で培養される。CRPの濃度は、 $0.0001 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 1 \text{mg}/\text{ml}$ まで及び得、いくつかの実施形態において、 $0.001 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $35 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $45 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、または $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。このアッセイにおいて、細胞は、CRPの存在下において、線維細胞分化を少なくとも90%低下させるのに必要なSAPの最小濃度を決定するためにモニターされる。次いで、示されたSAP濃度は、示されたCRP濃度で割り、*in vivo*において線維細胞分化を防止する最小SAP対CRP比を決定する。このアッセイのいくつかの実施形態において、培地に $1 \sim 100 \text{ng}/\text{ml}$ のhMCSFを補充し、hMCSFの好ましい濃度は $25 \text{ng}/\text{ml}$ である。PBM Cおよび単球が線維細胞に分化したという指標は、当業者によって決定することができる。一般に、線維細胞は、細長い紡錘形を有し、楕円形の核が存在する接着細胞として形態学的に定義される。このアッセイのいくつかの実施形態において、細胞は、固定され、倒立顕微鏡を使用する直接的な集計によって線維細胞を数える前に、Hema 3染色を用いて染色される。

20

30

40

【0075】

Fc受容体

免疫グロブリンの受容体(Fc受容体またはFcR)は、免疫系の全体にわたって広く発現される。抗体Fc部分に結合することによって、それらは、適応免疫系の特異性およ

50

び先天性免疫エフェクター細胞によって誘発されるエフェクター機能の間のつながりを提供する。同じ細胞上での活性化FcRおよび阻害FcRの同時発現は、免疫複合体（エピトープと、そのエピトープに対して向けられる抗体の組合せ）による免疫細胞活性化に対する閾値を定める。免疫応答の遠心性の段階へのそれらの関与に加えて、それらはまた、B細胞および樹状細胞（DC）の活性化を調節することによって適応免疫応答を調整するのに重要である。DC上のFcRによる免疫複合体の取り込みならびに活性化シグナル伝達経路および阻害シグナル伝達経路を同時に誘発することは、開始されるT細胞応答の強さを決定するであろう。この釣り合いのとれたシグナル伝達の損失は、健常組織の損傷および最終的に、自己免疫プロセスの開始に至り得る無制御応答をもたらす。

【0076】

FcRは、免疫系の細胞上に広く発現され、内皮細胞、メサンギウム細胞、および破骨細胞などの他の細胞型を選択し、顕著なFcR発現を示さない少数の造血細胞型のうちの1つは、T細胞である。異なる4つのクラスのFcRがげっ歯動物において同定されている：FcRI、FcRIIB、FcRIII、およびFcRIV。FcRは、異なる哺乳動物間で十分に保存されており、これらのげっ歯動物受容体に対するオルソログなタンパク質は、ほとんどの種において見つけられた。対応するヒトタンパク質は、FcRIA、FcRIIB（CD32B）、FcRIIA（CD32A）、FcRIIC、FcRIIIA（CD16）、およびFcRIIBと呼ばれる。FcRIIAの細胞外部分は、マウスFcRIIIに高度に相同であるが、細胞内部分は著しく異なる。FcRIIBおよびFcRICなどの他のヒトFcR遺伝子は、オープンリーディングフレームの破壊により機能的タンパク質をコードしない。さらに、好中球上に選択的に発現されるGPIアンカー型FcRであるFcRIIBは、マウスにおいて見つけられていない。

【0077】

機能レベルでは、FcRは、2つの方法で分類することができる：第1は、それらのリガンドに対する親和性に基づくもの、第2は、FcR架橋で開始されるシグナル伝達経路の型に基づくものである。FcRIIB、FcRIII、およびFcRIVならびにそれらの対応するヒト対応物FcRIIA/B/CおよびFcRIIIA/Bを含む大多数のFcRは、マイクロモル濃度の範囲（ $10^{-5} \sim 10^{-7}$ ）の、IgGFc部分に対する低い親和性を有する。FcRIのみが、より高い親和性（ $10^8 \sim 10^9$ M^{-1} ）を示し、単量体の抗体への著しい結合を可能にする。他のすべてのFcRは、免疫複合体の形態の抗体と選択的に相互作用し、これらは、普通の場合、それらの標的抗原に結合した多数の抗体から成る。FcRは、それらが開始するシグナル伝達経路に関して異なる。活性化受容体（FcRI、FcRIIA、およびFcRIIIA）は、それらの細胞質側領域またはそれらの関連するシグナル伝達領域において、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）を含有する。それらは、免疫エフェクター細胞活性化/増殖、炎症媒介物質の放出、酸化バースト、食作用、および抗原提示を刺激する。阻害受容体（FcRIIB1およびFcRIIB2）は、それらの細胞質側尾部において、免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ（ITIM）を含有する。両受容体クラスを発現する細胞において、免疫応答は、活性化受容体および阻害受容体の間の比、したがって、サイトカイン環境に依存する。Th1およびTh2のサイトカインは、活性化受容体および阻害受容体の発現をそれぞれアップレギュレートする。

【0078】

これらの「活性化」FcRはすべて、キナーゼのSrcファミリーのメンバーによってチロシンリン酸化されるようになる、それらの細胞質ゾル部分におけるITAMを含有する。ITAM配列のリン酸化により、Sykキナーゼのドッキングおよび活性化のためのSH2部位が作り出される。細胞型および個々のFcRに依存して、関与するSrcキナーゼファミリーメンバーは変動してもよい。たとえば、Lynは、肥満細胞におけるFcRI経路と関連するのに対して、Lckは、NK細胞におけるFcRIIIAと関連する。マクロファージにおいて、これらのキナーゼの両方およびHckは、FcRIお

10

20

30

40

50

よび Fc RIIA と関連する (Takai, 2002 年)。ITAMモチーフのリン酸化に続いて、PI3K、Btk、および他の Tecファミリーキナーゼ、ホスホリパーゼ C- (PLC)、ならびに SLP-76 および BLNK などのアダプタータンパク質を含む多種多様の細胞内基質の動員に至る、Syk キナーゼの動員および活性化が結果として起こる。さらに、Ras/Raf/MAPキナーゼ経路は、Shc のリン酸化に対して動員される Grb2 に結合した Sos を通して活性化される。他の重大なステップは、Syk による PI3K の活性化であり、これは、ホスファチジル-イノシトール-3-リン酸の生成をもたらす。これは、それらのプレクストリン相同 (PH) ドメインで PIP3 を認識する Btk および PLC の動員に至り、イノシトール三リン酸 (IP3) およびジアシルグリセロール (DAG) の産生に至り、これは、細胞内カルシウムの動員および

10

20

30

40

50

【0079】

阻害受容体シグナル伝達の役割は、PIP3 などの重要な中間体の生成に干渉することによって、これらの活性化経路を抑えることである。これは、SH2ドメイン含有イノシトールホスファターゼ (SHIP) の動員および活性化に至る、Lyn による Fc RII B の細胞質ゾル部分の ITIMモチーフのリン酸化によって開始される。活性化 SHIP の重要な機能は、PIP3 などのホスファチジルイノシトール中間体を加水分解し、それによって、Btk および PLC の膜動員に干渉し、したがって、ITAMシグナル伝達媒介性カルシウム放出ならびに ADCC、食作用、サイトカイン分泌、および炎症媒介物質の放出などの下流のエフェクター機能を抑えることである。Ras 経路はまた、チロシンリン酸化 SHIP への Shc および DOK の動員によって阻害され、これは、細胞増殖を阻害する。

【0080】

Fc RIIA の多型 R131/H131

第2の細胞外ドメインの131位のアルギニン (R) からヒスチジン (H) へのアミノ酸変化をもたらす、エキソン4のコード領域のヌクレオチド494での、アデニン (A) へのグアニン (G) の単一塩基置換から成る、ヒト Fc RII (Fc RIIA) 遺伝子の対立遺伝子多型は (Stuartら、1887年; Brooksら、1989年; Seki、1989年)、先に記載されている (Clarkら、1989年; Warmerdamら、1990年; Tateら1992年)。本明細書において使用されるように、ヒト Fc RIIA の「131」位での多型は、未成熟タンパク質 (配列番号6) における166位および成熟タンパク質における133位を指す。歴史上、さらなる解明を必要とするこの Fc RIIA 多型のアミノ酸位置に関して矛盾する命名法があった。NP_067674 の下で NCBI データベースにおいて記録されるタンパク質配列は、Fc RIIA の未成熟形態を示し、これは、細胞表面への受容体タンパク質の輸送の間に次いで切り離されるシグナルペプチド配列と共に合成される (配列番号6)。細胞表面の最終タンパク質受容体は、成熟タンパク質として知られている。ヒト Fc RIIA についてのシグナル配列は、受入番号 P12318 を有する NCBI データベース配列中の未成熟タンパク質の最初の33アミノ酸として記載される。シグナル配列の除去により、未成熟タンパク質 (配列番号6を参照) の166の Arg/His のアミノ酸位置が成熟機能的タンパク質における133の Arg/His に変わる。成熟 Fc RIIA は、成熟タンパク質配列のアミノ酸1および未成熟タンパク質配列のアミノ酸34として最初に同定された (修正は、Powellら、1999年において確立)。R131/H131多型の同定および命名は、ヒト Fc RII の正確なN末端におけるこの修正が成される前の期間の間に行われた (Warmerdamら、1990年)。定義される NM_021642 (配列番号5) におけるように、R131/H131多型が mRNA 535位で生じる検証はまた、Fleschら1998年に対する参照によって得ることもできる。この学術論文は、対立遺伝子特異的プライマーを用いる PCR を使用する、R131/H13

1 ヒト Fc R I I A 多型の急速なタイピングのための方法を定義する。この多型はまた、Gene bank 受入番号 SNP re 1 8 0 1 2 7 4 (配列番号 7) において記載される SNP によって定義することができ、アンチセンス鎖の 3 0 1 位のヌクレオチドは、C または T となり得る。アンチセンス鎖は、多型が、Fc R I I A リーディングフレームにおいて A または G となるであろうコード鎖を解釈するために使用することができる。出願人に知られている。出願人は、アルギニン/ヒスチジン多型を指す場合、命名法 1 3 1 位を使用する。

【0081】

1 3 1 多型は、少なくとも 3 つの I g G サブクラス、すなわちマウス (m) I g G 1、ヒト (h) I g G 2、および h I g G 3 についての受容体の親和性を変える。多型は、T 細胞有糸分裂誘発アッセイにおける、ヒト単球の Fc R I I への m I g G 1 抗 C D 3 m A b の結合における差異によって当初、定義された。アミノ酸 1 3 1 に R を有する対立形質は、m I g G 1 に対する高い親和性を発現したのに対して、H 1 3 1 を有する形態は、低い親和性を示し、それぞれ、高いおよび低い機能的応答を与えた。ヘテロ接合性の細胞は、完全にまたは不定に応答性であることが報告された。形質移入体において発現される受容体についてのそれに続く試験で、H 1 3 1 形態が、h I g G 2 に対する高い親和性を示したのに対して、R 1 3 1 遺伝子型形態は、h I g G 2 にほとんどまたは全く結合しなかったことが分かった。単球を使用する結合アッセイにより、この結果を確認し、H 1 3 1 形態が、Fc R I I A の R 1 3 1 形態よりも著しくより h I g G 3 に結合したことをさらに示した。

10

20

【0082】

近年のデータは、この多型が、健康および疾患において、とりわけ、抗炭水化物免疫応答においてなど、h I g G 2 が、産生される主な抗体サブクラスである状況において Fc R I I 機能に関連する可能性があることを示唆する (Insel および Anderson、1988 年)。H 1 3 1 についてホモ接合性の多形核好中球 (PMN) は、R 1 3 1 についてホモ接合性の PMN が示すよりも、h I g G 2 を用いてオプソニン化された細菌または赤血球を貪食するための優れた性能を示す (Salmon ら、1992 年; Sanders ら 1994 年)。この多型はまた、血小板 Fc R I I を密集させて、誘発する抗血小板ヘパリン依存性抗体と関連する障害であるヘパリン誘発性血小板減少症 (HIT) に対する感受性にも関係する可能性がある (Cines ら 1980 年; Chong ら、1982 年、Isenhardt ら、1994 年; Keltton ら 1988 年; Chong ら、1989 年)。さらに、H 1 3 1 についてホモ接合性の個人の頻度は、再発性細菌感染症を有する患者の群においておよび髄膜炎菌性疾患にかかりやすい群において少ないように思われる (Sanders ら 1994 年; Fijen ら 1993 年)。さらに、循環 h I g G 2 のレベルは、R/R 1 3 1 遺伝子型を有する個人と比較して、H/H 1 3 1 個人において著しく低い (Parren ら、1992 年)。

30

【0083】

本明細書において使用されるような「多型」は、個人における遺伝子のヌクレオチド配列における変異を意味する。多型の結果として異なるヌクレオチド配列を有する遺伝子は、「対立遺伝子」である。「多型位置」は、配列内の、所定のヌクレオチド位置である。いくつかの場合において、遺伝的多型は、アミノ酸配列変異によって反映され、したがって、多型位置は、ポリペプチドの配列における所定の位置のアミノ酸配列の多型の位置をもたらす得る。特定の多型について「ホモ接合性の」個人は、遺伝子の両方のコピーが多型位置で同じ配列を含有する個人である。特定の多型について「ヘテロ接合性の」個人は、遺伝子の 2 つのコピーが多型位置の異なる配列を含有する個人である。

40

【0084】

生物学的サンプルにおける R 1 3 1 / H 1 3 1 Fc R I I A 多型の同定

本出願は、ヒト Fc R I I A 受容体アイソフォームをコードする遺伝子における 1 3 1 多型が、線維性疾患の危険性、進行、および/または治療に対する効果を有するという発見に部分的に基づく。いくつかの実施形態において、本出願は、ヒト患者において、F

50

c R I I A 遺伝子の対立遺伝子パターンを決定するための方法を提供する。その方法は、ハイブリダイゼーションプローブとしてのおよび/またはDNA増幅のためのプライマーとしての対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドの使用ならびに直接的なDNA配列決定の使用を包含する。受容体対立遺伝子の同定はまた、細胞表面上にFc R I I A 受容体を発現する血液細胞を、異なる多型形態の受容体を区別する抗体と接触させることによって、免疫学的に達成されてもよい。

【0085】

いくつかの実施形態において、白血球またはそのサブセットは、たとえば勾配遠心分離法および/または免疫吸着法などの、当技術分野において十分に知られている方法を使用して、試験されることとなる患者から単離される。次いで、異なる対立形質のFc R I I A を区別することができる抗体は、それぞれの対立形質の存在および相対量を決定するために、単離細胞にかける。抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであってもよく、好ましくはモノクローナルである。細胞に結合する特異的抗体の測定は、限定を伴うことなく、定量的フローサイトメトリーまたは酵素結合イムノアッセイもしくは蛍光結合イムノアッセイを含む、任意の知られている方法によって行うことができる。特定の対立遺伝子の存在または非存在および対立遺伝子パターン（つまりホモ接合性対ヘテロ接合性）はまた、遺伝子型が知られている患者の集団から定められる平均と患者から得られる値を比較することによっても決定される。

10

【0086】

いくつかの実施形態において、DNAは、患者から得られ、特定のFc R I I A 対立遺伝子に対応するDNA配列の存在は決定される。DNAは、任意の細胞源または体液から得ることができる。臨床業務において入手可能な細胞源の非限定的な例は、血液細胞、頬の細胞、頸腔部の細胞、尿からの上皮細胞、胎児細胞、または生検によって得られる組織中に存在する任意の細胞を含む。体液は、感染、炎症、または線維化の部位の血液、尿、脳脊髄液、および組織滲出液を含む。DNAは、当技術分野において標準的な多数の方法のうちいずれかを使用して、細胞源または体液から抽出される。DNAを抽出するために使用される特定の方法は、供給源の性質に依存することが理解されるであろう。

20

【0087】

一度抽出されたら、DNAは、さらなる操作を伴うことなく使用することができる。その代わりに、Fc R I I A のすべてまたは一部に対応するDNA領域は、当技術分野において知られているPCRまたは他の増幅方法によって増幅することができる。この場合において、増幅領域は、プライマーとしての使用のための特定のランキング配列の選択によって特定される。このステップでの増幅は、Fc R I I A DNA配列の濃度を増加させるという利点を提供する。増幅することができるDNA配列の長さは、80bp~30kbpまで及ぶ。好ましくは、異なる対立形質の受容体間で異なる配列を含有する比較的短いセグメントを確定するプライマーが、使用される。

30

【0088】

Fc R I I A 対立遺伝子特異的DNA配列の存在は、限定を伴うことなく、直接的なDNA配列決定、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション、および一本鎖高次構造多型分析(SSCP)を含む、任意の知られている方法によって決定されてもよい。直接的な配列決定は、Maxam-Gilbert法を使用する化学的配列決定によってまたはSanger法を使用する酵素的配列決定によって行うことができる。後者の場合において、特異的オリゴヌクレオチドは、標準的な方法を使用して合成され、ジデオキシヌクレオチド配列決定反応のためのプライマーとして使用される。患者においてFc R I I A 対立遺伝子を決定するための代替方法は、131多型を特異に認識するPCRプライマーを使用する。この方法は、実施例5において詳細に記載され、DNAを配列決することなく、H131/R131対立遺伝子を区別するために使用することができる。

40

【0089】

いくつかの実施形態において、Fc R I I A を発現する細胞は、免疫吸着法によって

50

単離され、RNAは、グアニジウムチオシアネートフェノールクロロホルム抽出などの十分に知られている方法を使用して免疫精製細胞から単離される (Chomocyznskiら、1987年、Anal. Biochem.、162巻：156頁)。次いで、単離RNAは、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプライマーを使用して、共役逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応による増幅 (RT-PCR) にかける。プライマーアニーリングのための条件は、特異的な逆転写および増幅を確実にするために選ばれ、したがって、増幅産物の出現は、用いられる特定のプライマーによって特定される対立遺伝子の存在の診断となる。他の実施形態において、FcRIIAをコードするRNAは、逆転写され、対立遺伝子非依存性の様式において増幅され、この後に、増幅FcRコードcDNAは、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションによってまたは直接的なDNA配列決定によって同定される。

10

【0090】

いくつかの実施形態において、本出願は、個人において、FcRIIA遺伝子内の131位の配列の決定のためのキットを提供する。キットは、多型位置の配列を決定するのに有用な試薬を含み、多型パターンの分析のためのデータを任意選択で含んでもよい。配列決定のための試薬は、適した核酸ベースの免疫学的試薬を含んでもよい。好ましくは、キットはまた、適した緩衝液、適切な場合にはコントロール試薬、および多型位置の配列を決定するための指示をも含む。

【0091】

いくつかの実施形態において、本出願は、患者におけるSAPおよびCRPの濃度レベルを決定するための試薬をさらに含むキットを提供する。SAPの血漿濃度は、Immunology、171巻のPilling, D. J: 5537~5546頁(2003年)において記載されるように、たとえば、市販で入手可能なSAP抗体(たとえばAlpha Diagnostic International Cat # SAP12-S)を使用して、血清に対してELISAアッセイを実行することによって決定することができる。CRPの血漿濃度は、Alpha Diagnostic International Cat # 1000およびChemicon Cat # CYT298からのヒトC反応性タンパク質(CRP)ELISAキットを含む、市販で入手可能なキットを使用して決定することができる。さらに、Luminex(商標)ベースのサイトメトリックビーズアレイアッセイは、SAPおよびCRPについて開発されており、Rules Based Medicine(商標)によって提供される。健常対象におけるSAPの平均的血漿濃度は、20~40 μg/mlの間である。健常対象におけるCRPの平均的血漿濃度は、0~2 μg/mlの間である。いくつかの実施形態において、測定されたSAPおよびCRPの濃度は、「遊離濃度」またはむしろ非結合SAPおよび非結合CRPの濃度である。SAPおよびCRPの遊離濃度の決定は、たとえばサンドイッチELISAアッセイを使用して実行することができる。たとえば、SAPのFcR結合部位を認識する第1の抗体は、生物学的サンプルのSAPを捕捉するために使用される。次いで、SAPのリガンド結合部位を認識する第2の抗体は、サンプル中のSAPの遊離濃度を検出するために使用される。いくつかの実施形態において、生物学的サンプルのSAPおよびCRPの濃度の決定は、SAP対CRP比を決定するために使用することができる。当業者は、SAPまたは他の抗線維化療法の投薬量を個々の患者にとって適切なレベルにより正確に調整するために、SAP対CRP比を使用することができるであろう。

20

30

40

【0092】

抗線維化療法

線維化関連障害のための様々な治療は、当業者らに知られている。治療は、抗炎症性作用物質、コルチコステロイド、ペニシラミン、およびコルヒチンを含む。たとえばBers, MHおよびBerkow, R編The Merck Manual, 7th ed. Merck Research Laboratories、1999年を参照されたい。いくつかの実施形態において、抗線維化療法は、線維促進性因子アンタゴニ

50

ストおよび/または抗線維化作用物質の投与を含む。

【0093】

線維促進性因子アンタゴニスト

抗線維化療法は、線維性組織の形成および維持に関与する、1つまたは複数の成長因子またはサイトカインをアンタゴナイズする作用物質などの、線維促進性因子を阻害するまたはアンタゴナイズする作用物質を包含する。このように、抗線維化療法は、線維細胞、線維細胞前駆体、筋線維芽細胞前駆体、および/または造血単球前駆体の分化ならびに線維性組織形成および維持を標的とする。

【0094】

本発明の療法の一部としての、アンタゴニストを用いて標的とされてもよい線維促進性因子は、限定を伴うことなく、形質転換成長因子型(TGF-15を含むTGF-)、VEGF、EGF、RANTES、インターロイキンファミリーのメンバー(たとえばIL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、およびIL-13)、腫瘍壊死因子アルファ型(TNF-)、血小板由来成長因子(PDGF)、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、単球走化性タンパク質1型(MCP-1)、マクロファージ炎症タンパク質(たとえばMIP-1、MIP-2)、結合組織成長因子(CTGF)、エンドセリン-1、アンギオテンシン-II、レンニン、レプチン、ケモカイン(たとえばCCL2、CCL12、CXCL12、CXCR4、CCR3、CCR5、CCR7)、SLC/CCL21、ならびに線維性組織の形成、成長、または維持を促進するまたはそれに関連することが知られている他の因子を含む。本発明は、1つまたは複数の前述の因子およびサイトカインを標的とする組成物または方法を含んでもよい。

10

20

【0095】

ある実施形態において、抗線維化療法は、1つまたは複数の線維促進性因子に対する抗体を含んでもよい。そのような抗体は、精製される、精製されない、または部分的に精製される。抗体は、マウス、ウサギ、ラット、ヒト、ウマ、ヤギ、ウシなどなどの任意の適した動物源に由来するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってもよい。そのような抗体は、抗体断片、単鎖抗体、重合抗体、および/または抗体断片などを含んでもよい。

【0096】

ある実施形態において、抗線維化療法は、1つまたは複数の線維促進性因子の対応する受容体のアンタゴニストを含んでもよい。そのようなアンタゴニストは、その断片などの、1つまたは複数の線維促進性因子および/またはサイトカインの不活性形態を含んでもよい。適した濃度のそのような形態は、その対応する線維促進性因子および/またはサイトカインとその受容体への結合について競合してもよい。同様に、受容体に対するある抗体は、対応する線維促進性因子および/またはサイトカインが受容体に結合することに干渉するまたはそれを予防するために使用することができる。

30

【0097】

他の選択される実施形態において、抗線維化療法は、可溶性受容体が、その対応する天然細胞受容体と標的リガンドについて競合するように、1つまたは複数の線維促進性因子および/またはサイトカインの受容体の可溶性形態を含んでもよい。

40

【0098】

他の選択される実施形態において、組成物の適した構成成分は、1つまたは複数の線維促進性因子および/またはサイトカインの、その受容体との結合と競合するまたはその他の形でそれに干渉する化合物を含んでもよい。たとえば、プロテオグリカンであるデコリンは、TGF-に結合することが知られており、それによって、その受容体への結合についてのその利用可能性を低下させる。マンノース-6-リン酸もまた、その対応する受容体への結合についてTGF-と競合することが知られている。TGF-の他の知られている結合阻害剤は、潜在型形質転換因子-結合タンパク質(LTBP)および潜在性関連ペプチド(LAP)を含み、両者とも、TGF-の細胞内前駆体に自然に結合する。

50

【 0 0 9 9 】

ある実施形態において、抗線維化療法は、1つまたは複数の線維促進性因子および/またはサイトカインに対してアンチセンスである少なくとも1つの配列を含有する1つまたは複数のオリゴリボヌクレオチドを含んでもよい。そのような構成成分はまた、アンチセンス配列を産出する、適した転写コントロール配列を有する1つまたは複数の発現プラスミドを含んでもよい。他の選択される実施形態において、抗線維化療法は、RNA干渉を介して、1つまたは複数の線維促進性因子および/またはサイトカインの転写物を分解するのに適している、1つまたは複数の二本鎖オリゴリボヌクレオチドまたはそれをコードする発現プラスミドを含んでもよい。他の選択される実施形態において、抗線維化療法は、それらの同起源の受容体への線維促進性因子の結合を阻害するまたはそれに干渉するのに適している、1つまたは複数の一本鎖オリゴヌクレオチドアプタマーまたはそれをコードする発現プラスミドを含んでもよい。

10

【 0 1 0 0 】

適した線維促進性因子アンタゴニストは、その対応する受容体への結合に際して1つまたは複数の線維促進性因子によって活性化される細胞内シグナル伝達経路の1つまたは複数の構成成分を阻害する、減衰させる、またはそれに干渉することが知られている構成成分を含んでもよい。

【 0 1 0 1 】

たとえば、抗線維化療法は、SMADファミリーメンバーおよびSARAなどの、下流のシグナル経路分子を阻害するまたは減衰させる構成成分を含んでもよい。

20

【 0 1 0 2 】

適した抗線維化療法は、線維化に必要とされる細胞の癒着を阻害するまたはそれに干渉するのに適している1つまたは複数の分子を含んでもよい。たとえば、適した構成成分は、ICAM-1および/またはCD11分子、CD49分子、もしくはCD18分子に干渉する抗体を含み、それによって、それらの間の癒着相互作用に干渉してもよい。

【 0 1 0 3 】

他の選択される実施形態において、適した線維促進性因子アンタゴニストは、コラーゲン前駆体の翻訳後処理に干渉するプロリン類似体などの、コラーゲン合成の阻害剤を含んでもよい。ピルフェニドンは、たとえば、コラーゲン合成を阻害し、多数のサイトカインの産生をダウンレギュレートし、かつ線維芽細胞増殖を遮断する可能性がある経口的に活性の小分子薬である。

30

【 0 1 0 4 】

TGF- アンタゴニスト

形質転換成長因子(TGF)ベータファミリーのサイトカインは、創傷治癒および組織修復において中心的な役割を果たし、すべての組織において見つけられる。TGF- は、多くの実質細胞型ならびにリンパ細胞、単球/マクロファージ、および血小板などの浸潤細胞によって産生される。創傷または炎症に続いて、そのような細胞は、TGF- の供給源となる可能性がある。一般に、TGF- は、様々な細胞外マトリックスタンパク質の産生を刺激し、これらのマトリックスタンパク質の分解を阻害し、組織線維化を促進する。これらはすべて、患部組織の修復および回復に寄与する。多くの疾患において、過剰TGF- は、正常な器官機能を損ない得る組織線維化の病理的過剰の一因となる。

40

【 0 1 0 5 】

用語「TGF- 」は、本明細書において使用されるように、TGF- 1、TGF 2、TGF- 3、TGF- 4、およびTGF- 5を含む。同様の特性を有する他の関連するタンパク質もまた含まれる。

【 0 1 0 6 】

本明細書において使用されるように、「TGF- アンタゴニスト」は、細胞内のまたは生理学的システム内のいずれかにおいてTGF- の量または活性を減少させることができる任意の分子である。好ましくは、TGF- アンタゴニストは、TGF- 1、2、または3の量または活性を減少させるように作用する。たとえば、TGF- アンタゴ

50

ニストは、転写、翻訳、処理、または輸送のレベルで、TGF- の発現を阻害する分子であってもよく、それは、TGF- の安定性または活性成熟形態への前駆体分子の変換に影響を与えてもよい、それは、1つもしくは複数の細胞受容体（たとえばI、II、もしくはIII型）に結合するTGF- の能力に影響を与えてもよい、またはそれは、TGF- シグナル伝達に干渉してもよい。

【0107】

多種多様のTGF- アンタゴニストおよび産生のための方法は、当技術分野において知られており、さらに多くのものが現在、開発中である。用いられる特異的なTGF- アンタゴニストは、限定的な特徴ではなく、本明細書において定義されるような任意の有効なTGF- アンタゴニストが、本発明の方法および組成物において有用である可能性がある。好ましくは、TGF- アンタゴニストは、TGF- 1、TGF- 2、またはTGF- 3のアンタゴニストである。最も好ましくは、アンタゴニストは、TGF- 1アンタゴニストである。

10

【0108】

TGF- アンタゴニストの例は、TGF- の1つまたは複数のアイソフォームに対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体（Daschら、米国特許第5,571,714号；国際公開第97/13844号および国際公開第00/66631号もまた参照されたい）、TGF- 受容体、そのような受容体の可溶性形態（好ましくは可溶性TGF- III型受容体）、またはTGF- 受容体に対して向けられる抗体（Segariniら、米国特許第5,693,607号、Linら、米国特許第6,001,969号、米国特許第6,010,872号、米国特許第6,086,867号、米国特許第6,201,108号；国際公開第98/48024号；国際公開第95/10610号；国際公開第93/09228号；国際公開第92/00330号）、潜在性関連ペプチド（国際公開第91/08291号）、大きな潜在型TGF- （国際公開第94/09812号）、フェチュイン（米国特許第5,821,227号）、デコリンならびにバイグリカン、フィブロモジュリン、ルミカン、およびエンドグリンなどの他のプロテオグリカン（国際公開第91/10727号；Ruoslahtiら、米国特許第5,654,270号、米国特許第5,705,609号、米国特許第5,726,149号；Border、米国特許第5,824,655号；国際公開第91/04748号；Letarteら、米国特許第5,830,847号、米国特許第6,015,693号；国際公開第91/10727号；国際公開第93/09800号；および国際公開第94/10187号）、ソマトスタチン（国際公開第98/08529号）、マンノース-6-リン酸またはマンノース-1-リン酸（Ferguson、米国特許第5,520,926号）、プロラクチン（国際公開第97/40848号）、インスリン様成長因子II（国際公開第98/17304号）、IP-10（国際公開第97/00691号）、arg-gly-asp含有ペプチド（Pfeffer、米国特許第5,958,411号；国際公開第93/10808号）、植物、菌類、および細菌の抽出物（EP-A-813875；日本特許第8119984号；およびMatsunagaら、米国特許第5,693,610号）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（Chung、米国特許第5,683,988号；Fakhraïら、米国特許第5,772,995号；Dzau、米国特許第5,821,234号、米国特許第5,869,462号；および国際公開第94/25588号）、SMADおよびMADを含む、TGF- シグナル伝達に關与するタンパク質（EP-A-874046；国際公開第97/31020号；国際公開第97/38729号；国際公開第98/03663号；国際公開第98/07735号；国際公開第98/07849号；国際公開第98/45467号；国際公開第98/53068号；国際公開第98/55512号；国際公開第98/56913号；国際公開第98/53830号；国際公開第99/50296号；Falb、米国特許第5,834,248号；Falbら、米国特許第5,807,708号；およびGimenoら、米国特許第5,948,639号）、SkiおよびSno（Vogel、1999年、Science、286巻：665頁；およびStroscheinら、1999年、Science

20

30

40

50

、286巻：771～774頁)、その同起源の受容体へのTGFの結合を阻害するまたはそれに干渉するのに適している、1つまたは複数の一本鎖オリゴヌクレオチドアプターまたはそれをコードする発現プラスミド、ならびにTGFの活性を阻害する能力を保持する、上記に同定される分子の任意の突然変異体、断片、または誘導体を含むが、これらに限定されない。

【0109】

ある好ましい実施形態において、TGFアンタゴニストは、その受容体へのTGF結合を遮断するヒトモノクローナル抗体またはヒト化モノクローナル抗体(またはF(ab)₂断片、Fv断片、単鎖抗体、およびTGFに結合する能力を保持する抗体の他の形態もしくは断片などのその断片)である。好ましいモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ1D11.16(Daschら、米国特許第5,783,185号において記載されるATCC受入番号HB9849)から得られるマウスモノクローナル抗体のヒト形態またはヒト化形態である。

10

【0110】

TGF受容体およびTGF受容体のTGF結合断片、とりわけ、可溶性断片は、本発明の方法における有用なTGFアンタゴニストである。ある実施形態において、TGF機能の好ましい阻害剤は、可溶性TGF受容体、とりわけ、たとえば、TGFBIIRまたはTGFBIIRの細胞外ドメイン、最も好ましくは組換え可溶性TGF受容体(rsTGFBIIRまたはrsTGFBIIR)を含む、TGF-II型受容体(TGFBIIR)またはTGF-II型受容体(TGFBIIRもしくはペタグリカン)である。TGF受容体およびTGF受容体のTGF結合断片、とりわけ、可溶性断片は、本発明の方法における有用なTGFアンタゴニストである。TGF受容体およびそれらをコードする核酸は、当技術分野において十分に知られている。TGF-1型受容体をコードする核酸配列は、GENBank受入番号L15436およびDonahoeらの米国特許第5,538,892号において開示される。TGF-2型受容体の核酸配列は、GENBank受入番号AW236001、AI35790、AI279872、AI074706、およびAA808255の下で公的に入手可能である。TGF-3型受容体の核酸配列もまた、GENBank受入番号NM003243、AI887852、AI817295、およびAI681599の下で公的に入手可能である。

20

30

【0111】

本発明における使用のための適したTGFアンタゴニストはまた、TGFの量または活性を阻害するそれらの能力が保持される限り、前述のTGFアンタゴニストの機能的突然変異体、変異体、誘導体、および類似体をも含むであろう。本明細書において使用されるように、「突然変異体、変異体、誘導体、および類似体」は、親化合物に対して同様の形または構造を有し、TGFアンタゴニストとして作用する能力を保持する分子を指す。たとえば、本明細書において開示されるTGFアンタゴニストのいずれも、結晶化されてもよく、有用な類似体は、(1つまたは複数の)活性部位の形のための担う座標に基づいて合理的に設計されてもよい。その代わりに、当業者は、不必要な実験を伴うことなく、知られているアンタゴニストの官能基を修飾してもよく、活性、半減期、生物学的利用能、または他の望ましい特徴の増加についてそのような修飾分子をスクリーニングしてもよい。TGFアンタゴニストがポリペプチドである場合、ポリペプチドの断片および修飾体は、送達の容易さ、活性、半減期などを増加させるために産生されてもよい(たとえば、上記に議論されるようなヒト化抗体または機能的抗体断片)。合成および組換えポリペプチドの産生の当技術分野における技術のレベルを考慮すれば、そのような修飾体は、不必要な実験を伴うことなく、達成される可能性がある。当業者らはまた、本明細書において記載されるTGF阻害剤の結晶構造および/または活性部位についての知識に基づいて新規な阻害剤を設計してもよい。

40

【0112】

可溶性TGF受容体などのポリペプチド阻害剤はまた、遺伝子移入を介して有効に

50

導入されてもよい。したがって、本発明の方法のある実施形態は、TGF- 受容体または結合パートナー、好ましくは可溶性受容体または可溶性結合パートナーの発現のための適したベクターの使用を含む。ある好ましい実施形態において、可溶性TGF- アンタゴニストの投与は、可溶性アンタゴニストをコードするcDNA、最も好ましくは、TGF- II型受容体(rsTGFBIIR)またはTGF- III型受容体(rsTGFBIIR)の細胞外ドメインをコードするcDNAを含むベクターを使用する遺伝子移入によって達成することができ、このベクターは、ベクターを用いて形質移入される器官の細胞中で可溶性TGF- アンタゴニストの*in situ*発現を引き起こすために、ドナー器官に、好ましくは局所的に投与される。そのような*in situ*発現は、TGF- の活性を阻害し、TGF- 媒介性の線維形成を抑制する。任意の適したベクターを使用することができる。好ましいベクターは、遺伝子移入の目的で開発されたアデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、エプスタインバーウイルス(EBV)ベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、およびレトロウイルスベクターを含む。遺伝子移入の他の非ベクター方法、たとえば脂質/DNA複合体、タンパク質/DNA抱合体、裸のDNAの移入方法などもまた使用することができる。

10

【0113】

アデノウイルス遺伝子移入を介しての送達のために開発されたさらなる適したTGF- アンタゴニストは、Ig Fcドメインに融合された、TGF- II型受容体の細胞外ドメインをコードするキメラcDNA(Isakara, 1999年, *Kidney Int.*, 55巻: 465~475頁)、TGF- II型受容体のドミナントネガティブ突然変異体のアデノウイルス遺伝子移入ベクター(Zhaoら, 1998年, *Mech. Dev.*, 72巻: 89~100頁)、およびTGF- 結合プロテオグリカンであるデコリンのアデノウイルス遺伝子移入ベクター(Zhaoら, 1999年, *Am. J. Physiol.*, 277巻: L412~L422頁)を含むが、これらに限定されない。アデノウイルス媒介性の遺伝子移入は、他の遺伝子送達様式と比較して、効率が非常に高い。

20

【0114】

抗線維化作用物質

ある実施形態において、線維促進性因子アンタゴニストは、IL-12、IL-10、IFN-、またはBMP-7(OP-1)などの、抗線維化作用を有することが知られているサイトカインと交換することができ、またはそれを用いて増大させることができる。

30

【0115】

IFN- ポリペプチドをコードする核酸配列は、公的データベース、たとえばGenbank、雑誌刊行物などから入手することができる。様々な哺乳動物IFN- ポリペプチドがヒト疾患の治療のために興味深い。一般に、ヒトタンパク質が使用されるであろう。ヒトIFN- コード配列は、Genbank受入番号P01579およびCAA00375において見つけられてもよい。対応するゲノム配列は、Genbank受入番号J00219、M37265、およびV00536において見つけられてもよい。たとえばGrayら(1982年)*Nature* 295巻: 501頁(Genbank X13274); およびRinderknechtら(1984年)*J. Biol. Chem.* 259巻: 6790頁を参照されたい。

40

【0116】

IFN- 1b(Actimmune(登録商標); ヒトインターフェロン)は、140アミノ酸の単鎖ポリペプチドである。それは、*E. coli*において組換えで作製され、グリコシル化されていない。Rinderknechtら(1984年)*J. Biol. Chem.* 259巻: 6790~6797頁。

【0117】

抗線維化療法において使用されることとなるIFN- は、それらがIFN- 活性、特にヒトIFN- 活性を有する限り、天然IFN-、組換えIFN-、およびその

50

誘導体のいずれかであってもよい。IFN- は、上記に提供されるような配列に基づくが、タンパク質の産生およびタンパク質分解処理によりその処理変異体をもたらすことができる。Grayら、前掲によって提供される未処理配列は、166アミノ酸(aa)から成る。E. coliにおいて産生される組換えIFN- は、146アミノ酸(アミノ酸20で始まる)であると当初考えられたが、天然ヒトIFN- は、残基23の後で切断され、143aaタンパク質または細菌における発現に必要とされるように、末端メチオニンが存在する場合、144aaを産生することが続いて分かった。精製の際に、成熟タンパク質は、さらに、残基162の後のC末端で切断され(Grayらの配列を参照されたい)、139アミノ酸または最初のメチオニンが存在する場合、たとえば、細菌の発現に必要とされる場合、140アミノ酸のタンパク質をもたらすことができる。N末端メチオニンは、E. coli発現の特定の場合において処理されない、mRNA翻訳「開始」シグナルAUGによってコードされる人工物である。他の微生物系または真核生物発現系において、メチオニンは除去されてもよい。

10

【0118】

本発明の方法における使用のために、抗線維性活性を有していてもよい天然IFN- ペプチド、その修飾体、および変異体のいずれもまたは1つまたは複数のペプチドの組合せを使用することができる。対象とするIFN- ペプチドは、断片を含み、完全な配列と比較して、カルボキシ末端の末端で様々に切断することができる。そのような断片は、アミノ酸24~約149(未処理ポリペプチドの残基からナンバリング)が存在する限り、ヒトガンマイインターフェロンの特徴的な特性を示し続ける。外来の配列は、活性の損失を伴うことなく、アミノ酸155に続くアミノ酸配列の代わりに用いることができる。たとえば、参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第5,690,925号を参照されたい。天然IFN- 部分は、アミノ酸残基24~150、24~151、24~152、24~153、24~155、および24~157からの、様々に及ぶ分子を含む。これらの変異体および当技術分野において知られており、IFN- 活性を有する他の変異体のいずれも、本発明の方法において使用することができる。

20

【0119】

IFN- ポリペプチドの配列は、配列中で標的とされる変化を生成するために、当技術分野において知られている様々な方法において変えられてもよい。変異ポリペプチドは、普通の場合、本明細書において提供される配列に実質的に同様である、つまり、少なくとも1つのアミノ酸が異なるであろう、また、少なくとも2つであるが、約10個以下のアミノ酸が異なってもよい。配列の変化は、置換、挿入、または削除としてもよい。アラニンまたは他の残基を系統的に導入する突然変異のスクランは、重要なアミノ酸を決定するために使用することができる。対象とする特異的なアミノ酸置換は、保存的および非保存的变化を含む。保存的アミノ酸置換は、以下の群内の置換を典型的に含む：(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)、または(フェニルアラニン、チロシン)。

30

【0120】

一次アミノ酸配列を変える可能性があるまたは変えない可能性がある対象とする修飾は、ポリペプチドの化学的誘導、たとえば、アセチル化またはカルボキシル化、グリコシル化部位を導入するまたは除去する、アミノ酸配列中の変化、タンパク質がPEG化を受けやすくさせる、アミノ酸配列中の変化などを含む。ある実施形態において、本発明は、国際公開第01/36001号において記載されるIFN- ポリペプチド変異体などの、血清クリアランスが低下したグリコシル誘導ポリペプチドおよび/またはPEG誘導ポリペプチドを提供するために操作される1つまたは複数の非自然発生グリコシル化部位および/またはペグ化部位を有するIFN- 変異体の使用を企図する。グリコシル化の修飾体、たとえば、その合成および処理の間にまたはさらなる処理ステップにおいてポリペプチドのグリコシル化パターンを修飾することによって、たとえば、哺乳動物のグリコシル化酵素または脱グリコシル化酵素などのグリコシル化に影響を与える酵素にポリペプチド

40

50

をさらすことによって作製される修飾体もまた含まれる。リン酸化アミノ酸残基、たとえばホスホチロシン、ホスホセリン、またはホスホトレオニンを有する配列もまた包含される。

【0121】

他の実施形態において、抗線維化作用物質は、ベラパミルなどのカルシウムチャネル遮断薬とすることができる。そのような作用物質は、コラーゲンI型の合成を減らすそれらの能力だけではなく、結果としての、コラーゲンI型線維の分解の刺激による抗線維化作用を有し得る。線維芽細胞についての *in vitro* 試験は、コラーゲンの細胞外輸送が、カルシウムの存在に依存することを示す。カルシウムチャネル遮断薬であるベラパミルは、細胞内カルシウム濃度を低下させて、コラーゲナーゼ活性を増加させる。それはまた、線維芽細胞の増殖を阻害する。

10

【0122】

本出願のいくつかの実施形態において、抗線維化療法は1つもしくは複数のSAPアゴニスト、1つもしくは複数のCRPアンタゴニスト、またはその組合せを含む。

【0123】

SAPアゴニスト

本出願の一態様は、様々な障害の治療において有用なSAPアゴニストを提供する。SAPアゴニストは、SAP活性を増加させる化合物を含む、内在性SAPシグナル伝達を増加させるまたはその他の形で模倣する化合物および組成物をすべて包含する。

20

【0124】

(i) ヒト血清アミロイドP

ある実施形態において、SAPシグナル伝達アゴニストは、SAPポリペプチドまたはその変異体である。ある実施形態において、SAPポリペプチドは、5つのヒトSAPプロトマー（配列番号1）を含むSAPである。用語「SAPプロトマー」は、Brutla gらのアルゴリズムに基づいて、FASTDBコンピュータープログラムを使用して決定されるように（Comp. App. Biosci., 6巻：237~245頁（1990年））、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または100%、ヒトSAPプロトマーに同一であるポリペプチドを指すように意図される。特定の実施形態において、アミノ酸アラインメントの同一性パーセントおよび類似性パーセントを計算するために用いられるパラメーターは、Matrix = PAM 150、k-tuple = 2、Mismatch Penalty = 1、Joining Penalty = 20、Randomization Group Length = 0、Cutoff Score = 1、Gap Penalty = 5、およびGap Size Penalty = 0.05を含む。用語「SAPプロトマー」は、先のものいずれかを含む機能的断片および融合タンパク質を包含する。一般に、SAPプロトマーは、生物学的に適切な温度、pHレベル、および浸透圧の水溶液中で可溶性となるように設計されるであろう。相互に非共有結合して、SAPを形成するプロトマーは、同一のアミノ酸配列および/もしくは翻訳後修飾を有していてもよく、またはその代わりに、個々のプロトマーは、異なる配列および/もしくは修飾を有していてもよい。

30

40

【0125】

本発明のいくつかの態様は、ポリペプチドを提供するまたはそれらのポリペプチドを用いるための治療方法を提供し、前記ポリペプチドは、参照配列に対して、少なくとも部分的に定義される。したがって、そのようなポリペプチドは、参照配列に同一ではないある割合のアミノ酸残基を有していてもよい。いくつかの実施形態において、非同一残基は、それらが同一ではない残基と同様の化学的特性を有する。同様の特性を有する群は、以下のアミノ酸を含む：E、D、N、Q；H、K、R；Y、F、およびW；I、L、V、M、C、A；ならびにS、T、C、P、A。

【0126】

いくつかの実施形態において、同一ではない残基は、同じ目内の種においてなど、少な

50

くとも1つの進化的に関連する種において、参照配列およびオルソログ配列の間で進的に保存されていない残基である。脊椎動物参照配列の場合には、好ましい実施形態において突然変異させてもよいアミノ酸は、他の脊椎動物種において、参照配列およびオルソログ配列の間で保存されていないアミノ酸である。たとえば、本発明の方法において使用されるポリペプチドが、ヒトSAP（配列番号1）に少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含むと表現される場合、前記ポリペプチドは、ヒトSAPおよび他の脊椎動物のSAPが異なるそれらの位置に非同残基を有していてもよい。図1は、2つの哺乳動物SAP配列および1つのトリSAP配列に対してアラインさせたヒトSAPを表す。網掛けされていない残基は、ヒトSAP配列と異なる残基を示す。

【0127】

配列番号1と少なくとも95%の同一性を共有するポリペプチドは、相違するこれらのエリアにおいて保存的置換を有するポリペプチドを含む。互いに、脂肪族アミノ酸Ala、Val、Leu、およびIleの間の交換、ヒドロキシル残基SerおよびThrの交換、酸性残基AspおよびGluの交換、アミド残基AsnおよびGlnの間の置換、塩基性残基LysおよびArgの交換、ならびに芳香族残基Phe、Tyrの間の交換が保存的置換と典型的に見なされる。どのアミノ酸変化がおそらく、表現型的に無変化となるかに関するさらなるガイダンスは、Bowierら、Science 247巻：1306～1310頁（1990年）において見つけることができる。

【0128】

少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、または少なくとも99%配列番号1に同一のポリマーを含むSAPポリペプチドは、好ましくは、線維化を阻害する。

【0129】

ある実施形態において、SAPシグナル伝達アゴニストは、SAP変異体である。用語「SAP変異体」は、ヒトSAP五量体と比較して、1つまたは複数の以下の特徴を実証する、2～5つのSAPプロトマーを含むタンパク質を指すように意図される：血漿半減期の増加、in vitro安定性の増加、またはヒトSAPと比較したin vivo安定性の増加。

【0130】

本発明の特定の実施形態において、SAP、SAP変異体、またはSAP機能的断片を含有する組成物は、少なくとも0.5 μg/mlで、標的位置におけるSAP濃度を上昇させるのに調節可能であってもよい。ヒトにおいて、I¹²⁵放射標識SAPが、アミロイドーシスを有する患者を試験するために以前に投与された。治療において、約600 μgのSAPが、成人のヒトに投与された。したがって、全身的に成人のヒトへの、約600 μgのSAPの投与は、安全である。より高い投薬量もまた、適切な条件下で安全である可能性がある。

【0131】

(ii) SAPアゴニストとしての抗FcR抗体

本発明の一態様において、SAPシグナル伝達を模倣する1つまたは複数の化合物が提供される。いくつかの実施形態において、SAPシグナル伝達アゴニストは、抗FcR抗体であり、抗体は、FcRI、FcRIIA、またはFcRIIIのいずれかにそれぞれ結合することができる抗FcRI、抗FcRIIA、および抗FcRIII抗体のクラスから選択される。抗FcR抗体は、IgG抗体のFc部分に対する受容体（FcR）に結合するIgG抗体である。抗FcR抗体は、それらの定常（Fc）領域を通してではなく、それらの可変領域を通して結合する。抗FcR抗体は、抗体の任意のアイソタイプを含んでもよい。抗FcR抗体は、さらなる抗体または他の手段を用いてまたは用いないで、さらに架橋されてもよく、または凝集されてもよい。このプロセスは、FcR活性化と一致する細胞内シグナル伝達事象を開始する。

【0132】

抗FcRI抗体、抗FcRII抗体、および/または抗FcRIII抗体を含有

10

20

30

40

50

する組成物は、線維化性障害および慢性の炎症性の状態において、不適切な位置における線維細胞の分化を抑制するために使用することができる。

【0133】

特定の実施形態において、約 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗FcR抗体を含有する組成物は、線維細胞分化を約50%阻害するのに有効である可能性がある。他の実施形態において、組成物は、標的組織に $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗FcR抗体を送達するのに十分な量を含有していてもよい。

【0134】

抗FcR抗体は、患者における、望ましくない量の細胞死を引き起こすことなく、約 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗FcR抗体を標的組織に送達するのに十分な量で、または線維細胞分化を阻害するのに十分な他の用量で投与することができる。

10

【0135】

(iii)凝集FcドメインおよびFc含有抗体

いくつかの実施形態において、SAPシグナル伝達アゴニストは、架橋IgGまたは凝集IgGである。適切な供給源由来のIgG（たとえばヒト受容体に対するヒトIgG）は、通常、そのFc領域を通してFcRに結合することができる。架橋IgGまたは凝集IgGは、少なくとも2つのそのようなIgG抗体が互いに物理的に連結されるという条件で、そのFc領域を通して、標的FcRに結合することができる任意のIgGを含んでもよい。

20

【0136】

両方の型の抗体は、全抗体またはその部分、好ましくは、線維細胞分化の抑制において機能的な部分を含んでもよい。たとえば、それらは、FcRを架橋することができる任意の抗体部分を含んでもよい。これは、凝集されたまたは架橋された全抗体、 $F(ab')_2$ 断片、および可能性として考えられるFc断片などの、凝集されたまたは架橋された抗体またはその断片を含んでもよい。

【0137】

抗体の凝集または架橋は、熱による凝集または化学的凝集などの、任意の知られている方法によって行うことができる。凝集の増加が、線維細胞抑制の増加をもたらす可能性があるが、任意のレベルの凝集または架橋で、十分である可能性がある。抗体はハイブリドーマ細胞から産生される抗体などの、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってもよい。組成物および方法は、類似のまたは異なる抗体に架橋されてもよく、または凝集されてもよい、多数のモノクローナル抗体の混合物などの、抗体の混合物を用いてもよい。

30

【0138】

架橋IgGまたは凝集IgGを含有する組成物は、とりわけ、不適切な位置においてならびに線維化性障害および慢性の炎症性の状態において、線維細胞の分化を抑制するために使用することができる。

【0139】

他の特定の実施形態において、組成物は、わずか $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の架橋IgGまたは凝集IgGを含有していてもよい。凝集IgGまたは架橋IgGは、患者における、望ましくない量の細胞死を引き起こすことなく、少なくとも $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ IgGを標的組織に送達するのに十分な量でまたは線維細胞分化を阻害するのに十分な他の用量で投与することができる。

40

【0140】

(iv)SAPペプチド模倣薬

ある実施形態において、SAPアゴニストは、ペプチド模倣薬を含む。本明細書において使用されるように、用語「ペプチド模倣薬」は、非自然発生のアミノ酸、ペプトイドなどを含有する、化学的に修飾されたペプチドおよびペプチド様分子を含む。ペプチド模倣薬は、対象に投与された場合の、安定性の増強を含む、ペプチドに対する様々な利点を提

50

供する。ペプチド模倣薬を同定するための方法は、当技術分野において十分に知られており、可能性のあるペプチド模倣薬のライブラリーを含有するデータベースのスクリーニングを含む。たとえば、Cambridge Structural Databaseは、結晶構造が知られている300,000個を超える化合物のコレクションを含有する(Allenら、Acta Crystallogr. Section B、35巻:2331頁(1979年))。標的分子の結晶構造が入手可能でない場合に、構造は、たとえば、プログラムCONCORDを使用して生成することができる(Rusinkoら、J. Chem. Inf. Comput. Sci. 29巻:251頁(1989年))。他のデータベース、Available Chemicals Directory(Molecular Design Limited、Informations Systems; San Leandro Calif.)は、市販で入手可能であり、SAPポリペプチドの可能性のあるペプチド模倣薬を同定するために検索することもできる、約100,000個の化合物を含有する。

【0141】

(v) SAP活性の増加

いくつかの実施形態において、SAPアゴニストは、SAP活性を増加させる。SAP活性は、SAPの濃度を増加させることによって、たとえば、SAP転写を増加させる、翻訳を増加させる、SAP分泌を増加させる、SAP RNA安定性を増加させる、SAPタンパク質安定性を増加させる、またはSAPタンパク質分解を減少させることによって増加させることができる。SAP活性はまた、たとえばSAP内在性結合パートナーを減少させることによって、SAPの「遊離濃度」またはむしろ非結合形態を特異的に増加させることによって、増加させることもできる。

【0142】

(iv) Fc R架橋剤

いくつかの実施形態において、フィブロネクチンベースの足場ドメインタンパク質は、Fc Rを架橋するためにSAPアゴニストとして使用することができる。フィブロネクチンベースの足場ドメインタンパク質は、フィブロネクチンIII型ドメイン(Fn3)、特に、フィブロネクチンIII型第10ドメイン(¹⁰Fn3)を含んでもよい。

【0143】

Fc Rを架橋するために、米国特許第7,115,396号において記載されるように、Fc R結合Fn3ドメインのマルチマーが生成されてもよい。

【0144】

フィブロネクチンIII型(Fn3)ドメインは、N末端からC末端の順番に、ベータ鎖またはベータ様鎖、A;ループ、AB;ベータ鎖またはベータ様鎖、B;ループ、BC;ベータ鎖またはベータ様鎖、C;ループCD;ベータ鎖またはベータ様鎖、D;ループDE;ベータ鎖またはベータ様鎖、E;ループ、EF;ベータ鎖またはベータ様鎖F;ループFG;およびベータ鎖またはベータ様鎖Gを含む。BC、DE、およびFGループは、共に、免疫グロブリンからの相補性決定領域(CDR)に構造的におよび機能的に類似している。Fn3ドメインは、1つまたは複数のBC、DE、およびFGのループの配列を変えることによって、ほとんどのあらゆる化合物に結合するように設計することができる。特異的な結合剤を生成するための方法は、高親和性TNF結合剤を開示する米国特許第7,115,396号および高親和性VEGFR2結合剤を開示する米国特許出願公開第2007/0148126号において記載されている。フィブロネクチンベースの足場タンパク質の例は、Adnectins(商標)(Adnexus、a Bristol-Myers Squibb R&D Company)である。

【0145】

いくつかの実施形態において、SAPアゴニストは、アプタマーである。Fc Rを架橋するために、Fc R結合アプタマーのマルチマーが生成されてもよい。

【0146】

アプタマーは、合成または天然のものであり得、タンパク質または代謝物質などの特定

10

20

30

40

50

の標的分子に結合するオリゴヌクレオチドである。典型的に、結合は、古典的なWatson-Crick型塩基対以外の相互作用を通してのものである。アプタマーは、現在、臨床前開発および臨床開発における有望なクラスの治療剤を代表するものである。生物製剤、たとえばペプチドまたはモノクローナル抗体のように、アプタマーは、分子標的に特異的に結合することができ、結合を通して標的機能を阻害することができる。典型的なアプタマーは、サイズが10~15 kDa (つまり30~45ヌクレオチド)であり、ナノモル以下の親和性でその標的に結合し、密接に関連する標的を区別する(たとえば、同じ遺伝子ファミリーからの他のタンパク質に典型的に結合しないであろう)(Griffinら(1993年)、Gene 137巻(1号):25~31頁;Jenisonら(1998年)、Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 8巻(4号):265~79頁;Bellら(1999年)、In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 35巻(9号):533~42頁;Watsonら(2000年)、Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10巻(2号):63~75頁;Danielsら(2002年)、Anal. Biochem. 305巻(2号):214~26頁;Chenら(2003年)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100巻(16号):9226~31頁;Khatiら(2003年)、J. Virol. 77巻(23号):12692~8頁;Vaishら(2003年)、Biochemistry 42巻(29号):8842~51頁)。

【0147】

アプタマーは、米国特許第5,475,096号および第5,270,163号において記載されるように、ランダム配列オリゴヌクレオチドのライブラリーから、完全にin vitroでの選択プロセス(Systematic Evaluation of Ligands by Experimental Enrichment、つまりSELEX(登録商標))によって作り出すことができる。アプタマーは、成長因子、酵素、免疫グロブリン、および受容体を含む、治療的に対象とする多数のタンパク質に対して生成されてきた(EllingtonおよびSzostak(1990年)、Nature 346巻(6287号):818~22頁;TuerkおよびGold(1990年)、Science 249巻(4968号):505~510頁)。

【0148】

アプタマーは、治療薬としての使用のためのいくつかの魅力的な特徴を有する。高標的親和性および特異性に加えて、アプタマーは、標準的なアッセイにおいて毒性または免疫性をほとんどまたは全く示していない(Wlotzkaら(2002年)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99巻(13号):8898~902頁)。実際に、いくつかの治療アプタマーは、薬物動態学的分析、細胞モデルおよび動物疾患モデルにおける生物学的効力の特徴づけ、ならびに予備的安全薬理学評価を含む、臨床前開発の様々な段階を通して最適化され、進歩してきた。(ReydermanおよびStavchansky(1998年)、Pharmaceutical Research 15巻(6号):904~10頁;Tuckerら、(1999年)、J. Chromatography B. 732巻:203~212頁;Watsonら(2000年)、Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10巻(2号):63~75頁)。

【0149】

対象とする標的に対するアプタマーを生成するための適した方法は、「Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment」(「SELEX(商標)」)と題されるプロセスを用いるものである。SELEX(商標)プロセスは、標的分子への高度に特異的な結合を有する核酸分子のin vitro進化のための方法であり、たとえば、1990年年6月11日に出版された米国特許出願第07/536,428号、「Nucleic Acid Ligands」と題される、現在の放棄されている米国特許第5,475,096号、および

「Nucleic Acid Ligands」と題される、米国特許第5,270,163号(国際公開第91/19813号もまた参照されたい)において記載される。それぞれの、SELEX(商標)で同定された核酸リガンドは、所与の標的化合物または標的分子の特異的なリガンドである。SELEX(商標)プロセスは、核酸が、多種多様の二次元および三次元構造を形成するための十分な性能ならびに単量体またはポリマーにかかわらず、事実上、あらゆる化学物質と、リガンドとして作用する(特異的な結合対を形成する)ための、それらの単量体の範囲内で利用可能な十分な化学的多用途性を有するというユニークな見識に基づくものである。任意のサイズまたは組成の分子が標的として役立つ。高親和性結合の利用のために適用されるSELEX(商標)法は、結合親和性および選択性のあらゆる所望の判断基準を事実上達成するために、同じ一般的な選択系を使用する、候補オリゴヌクレオチドの混合物からの選択ならびに結合、分離、および増幅の段階的反復を含む。ランダム化配列のセグメントを好ましくは含む、核酸の混合物から始めて、SELEX(商標)法は、結合に好都合な条件下で標的と混合物を接触させるステップ、標的分子に特異的に結合した核酸から非結合核酸を分離するステップ、核酸標的複合体を解離するステップ、核酸標的複合体から解離した核酸を増幅して、リガンドが豊富な、核酸の混合物を産出するステップ、次いで、所望される回数のサイクルを通して、結合、分離、解離、および、増幅のステップを反復して、標的分子に対する高度に特異的な高親和性核酸リガンドを産出するステップを含む。Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment、「SELEX(商標)」は、たとえば、米国特許第5,475,096号および第5,270,163号ならびにPCT/US91/04078において記載されるように、あらゆる所望の標的に対する核酸リガンドを作製するための方法であり、これらのそれぞれは、参照によって本明細書に具体的に組み込まれる。

【0150】

CRPアンタゴニスト

本出願の一態様は、様々な障害の治療において有用なCRPアンタゴニストを提供する。CRPアンタゴニストは、CRPシグナル伝達を減少させ、遮断し、または阻害するすべての化合物および組成物を包含する。いくつかの実施形態において、方法に有用なCRPシグナル伝達アンタゴニストは、小分子、ポリペプチド(抗体を含む)、または核酸(アンチセンス核酸、アプタマー、リボザイム、および低分子干渉RNAもしくはsiRNAを含む)を含む。CRPシグナル伝達アンタゴニストは、少なくとも5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、95、97、98、99、または100%、CRPの活性を調整する、影響を与える、変える、阻害する、または低下させる任意の組成物を包含する。

【0151】

(i) CRP発現レベルの減少

いくつかの実施形態において、CRPシグナル伝達アンタゴニストは、CRP発現レベルを阻害する。CRP発現レベルは、RNAまたはタンパク質のレベルで減少してもよい。

【0152】

ある実施形態において、1つまたは複数のCRPシグナル伝達アンタゴニストは、CRPの発現を標的とするアンチセンス核酸である。「アンチセンス核酸」によって、RNA-RNA、RNA-DNA、またはRNA-PNA(タンパク質核酸)の相互作用の手段によって、標的核酸に結合し、標的核酸の活性を変える非酵素核酸化合物が意味される(概説については、SteinおよびCheng、1993年Science261巻、1004頁およびWoolfら、米国特許第5,849,902号を参照されたい)。典型的に、アンチセンス分子は、アンチセンス分子の単一の隣接配列に沿って標的配列に相補的である。しかしながら、ある実施形態において、アンチセンス分子は、ループを形成することができ、ループを形成する基質核酸に結合する。したがって、アンチセンス分子は、2つ(もしくはそれ以上)の非隣接基質配列に相補的となり得るまたはアンチセンス

分子の2つ(またはそれ以上)の非隣接配列部分は標的配列に相補的となり得るまたは両方に相補的になり得るまたはその両方である。現在のアンチセンス戦略の概説については、Schmajukら、1999年、J. Biol. Chem.、274巻、21783~21789頁、Deliharsら、1997年、Nature、15巻、751~753頁、Steinら、1997年、Antisense N. A. Drug Dev.、7巻、151頁、Crooke、2000年、Methods Enzymol.、313巻、3~45頁; Crooke、1998年、Biotech. Genet. Eng. Rev.、15巻、121~157頁、Crooke、1997年、Ad. Pharmacol.、40巻、1~49頁を参照されたい。

【0153】

他の実施形態において、CRPシグナル伝達アンタゴニストは、siRNAであってもよい。用語「小分子干渉RNA」、「siRNA」または「小分子干渉核酸」は、細胞によって適切に処理された場合にRNAiまたは遺伝子サイレンシングを媒介することができる任意の核酸化合物を指す。たとえば、siRNAは、自己相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を含む二本鎖ポリヌクレオチド分子とすることができ、アンチセンス領域は、標的核酸化合物(たとえばCRP)に対する相補性を含む。siRNAは、自己相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を有する一本鎖ヘアピンポリヌクレオチドとすることができ、アンチセンス領域は、標的核酸化合物に対する相補性を含む。siRNAは、2つ以上のループ構造ならびに自己相補的なセンスおよびアンチセンス領域を含むステムを有する環状一本鎖ポリヌクレオチドとすることができ、アンチセンス領域は、標的核酸化合物に対する相補性を含み、環状ポリヌクレオチドは、RNAiを媒介することができる活性siRNAを生成するために、*in vivo*においてまたは*in vitro*において処理することができる。siRNAはまた、標的核酸化合物に対する相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含むことができ、一本鎖ポリヌクレオチドは、5'-リン酸などの末端リン酸基(たとえばMartinezら、2002年、Cell.、110巻、563~574頁を参照されたい)または5',3'-二リン酸をさらに含むことができる。

【0154】

本明細書において記載されるように、本発明のsiRNAは、長さが約19~30ヌクレオチドである、さらにより好ましくは、長さが21~23ヌクレオチドである。siRNAは、ヌクレアーゼ複合体を動員し、特異的な配列と対になることによってこの複合体を標的mRNAに導くことが分かっている。その結果として、標的mRNAは、タンパク質複合体中のヌクレアーゼによって分解される。特定の実施形態において、21~23ヌクレオチドsiRNA分子は、3'ヒドロキシル基を含む。ある実施形態において、siRNA構築物は、たとえば酵素ダイサーの存在下において、より長い二本鎖RNAを処理することによって生成することができる。ある実施形態において、ショウジョウバエ*in vitro*系が使用される。この実施形態において、dsRNAはショウジョウバエ胚に由来する可溶性抽出物と組み合わせられ、それによって化合物を産生する。化合物は、dsRNAが、約21~約23ヌクレオチドのRNA分子に処理される条件下で維持される。siRNA分子は、当業者らに知られているいくつかの技術を使用して精製することができる。たとえば、ゲル電気泳動法は、siRNAを精製するために使用することができる。その代わりに、非変性カラムクロマトグラフィーなどの非変性方法は、siRNAを精製するために使用することができる。さらに、クロマトグラフィー(たとえば分子ふるいクロマトグラフィー)、グリセリン勾配遠心分離法、抗体を用いる親和性精製は、siRNAを精製するために使用することができる。

【0155】

本発明のsiRNAの産生は、化学的合成方法または組換え核酸技術によって実行することができる。処理細胞の内在性RNAポリメラーゼは、*in vivo*において転写を媒介してもよく、またはクローニングRNAポリメラーゼは、*in vitro*において転写に使用することができる。本明細書において使用されるように、開示のsiRNA分

10

20

30

40

50

子は、RNAのみを含有するそれらの分子に限定する必要はないが、化学的に修飾されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドをさらに包含する。たとえば、dsRNAは、たとえば、細胞のヌクレアーゼに対する感受性を低下させる、生物学的利用能を改善する、製剤の特徴を改善する、および/または他の薬物動態学的特性を変えるために、リン酸-糖主鎖またはヌクレオシドのいずれかに対する修飾を含んでもよい。例証として、天然RNAのホスホジエステル結合は、窒素または硫黄のヘテロ原子の少なくとも1つを含むように修飾されてもよい。RNA構造における修飾は、dsRNAに対する一般的な応答を回避しながら、特異的な遺伝子阻害を可能にするように適合させてもよい。同じく、塩基は、アデノシンデアミナーゼの活性を遮断するように修飾されてもよい。dsRNAは、酵素によってまたは部分的な/完全な有機合成によって産生されてもよく、あらゆる修飾リボヌクレオチドは、*in vitro*における酵素合成または有機合成によって導入することができる。RNA分子を化学的に修飾するための方法は、dsRNAの修飾に適應させることができる(たとえば、Heidenreichら(1997年) *Nucleic Acids Res*, 25巻: 776~780頁; Wilsonら(1994年) *J Mol Recog* 7巻: 89~98頁; Chenら(1995年) *Nucleic Acids Res* 23巻: 2661~2668頁; Hirschbeinら(1997年) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7巻: 55~61頁を参照されたい)。単なる例証として、dsRNAの主鎖は、ホスホロチオエート、ホスホロアミデート、ホスホジチオエート、キメラメチルホスホネート-ホスホジエステル、ペプチド核酸、5-プロピニル-ピリミジン含有オリゴマー、または糖修飾(たとえば2'-置換リボヌクレオシド、 α -配置)を用いて修飾することができる。ある場合において、開示のdsRNAは、2'-ヒドロキシ(2'-OH)含有ヌクレオチドを欠く。

10

20

30

40

50

【0156】

特定の実施形態において、siRNA分子の少なくとも1つの鎖は、長さが約1~約6のヌクレオチドの3'オーバーハングを有するが、長さが2~4ヌクレオチドであってもよい。より好ましくは、3'オーバーハングは、長さが1~3ヌクレオチドである。ある実施形態において、一方の鎖は、3'オーバーハングを有し、他方の鎖は、平滑末端であるまたはそれもまたオーバーハングを有する。オーバーハングの長さは、それぞれの鎖について同じであってもよく、または異なってもよい。siRNAの安定性をさらに増強するために、3'オーバーハングは、分解に対して安定させることができる。ある実施形態において、RNAは、アデノシンヌクレオチドまたはグアノシンヌクレオチドなどのプリンヌクレオチドを含むことによって安定させる。その代わりに、修飾類似体によるピリミジンヌクレオチドの置換、たとえば、2'-デオキシチミジンによるウリジンヌクレオチド3'オーバーハングの置換は、許容され、RNAiの効率に影響を与えない。2'ヒドロキシルが存在しないと、組織培養培地中でオーバーハングのヌクレアーゼ抵抗性が著しく増強し、これは、*in vivo*において有益である可能性がある。

【0157】

他の特定の実施形態において、本発明のdsRNAはまた、長い二本鎖RNAの形態とすることもできる。たとえば、dsRNAは、少なくとも25、50、100、200、300、または400塩基である。いくつかの場合において、dsRNAは、長さが400~800塩基である。任意選択で、dsRNAは、たとえば、細胞中でsiRNA配列を産生するために、細胞内で消化される。しかしながら、*in vivo*における長い二本鎖RNAの使用は、おそらく、配列非依存性のdsRNA応答によって引き起こされる可能性がある有害な効果のために、必ずしも実用的だとは限らない。そのような実施形態において、局所性送達系および/またはインターフェロンもしくはPKRの効果を低下させる作用物質の使用は好ましい。

【0158】

さらなる特定の実施形態において、dsRNAは、ヘアピン構造(ヘアピンRNAまたは低分子ヘアピンRNAと名付けられる)の形態をしている。ヘアピンRNAは、外因的

に合成することができ、または *in vivo* において、RNAポリメラーゼIIIプロモーターから転写することによって形成することができる。たとえば、哺乳動物細胞中の遺伝子サイレンシングのためにそのようなヘアピンRNAを作製するおよび使用する例は、たとえばPaddisonら、Genes Dev、2002年、16巻：948～58頁；McCaffreyら、Nature、2002年、418巻：38～9頁；McManusら、RNA、2002年、8巻：842～50頁；Yuら、Proc Natl Acad Sci USA、2002年、99巻：6047～52頁）において記載されている。好ましくは、そのようなヘアピンRNAは、所望の遺伝子の継続的で安定性の抑制を確実にするために、細胞中でまたは動物において操作される。siRNAは、細胞中でヘアピンRNAを処理することによって産生することができることが当技術分野において知られている。

10

【0159】

ある実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ロックド核酸(LNA)を用いる修飾を含み、2'-ヒドロキシル基は、糖環の4'炭素原子に連結され、それによって、2'-C, 4'-C-オキシメチレン結合を形成し、それによって、二環式糖部分を形成する。結合は、好ましくは、2'酸素原子および4'炭素原子を架橋するメチレン(CH_2)基であり、nは、1または2である(Singhら、Chem. Commun.、1998年、4巻、455～456頁)。LNAおよびLNA類似体は、相補DNAおよび相補RNAとの非常に高い二重鎖熱的安定性($T_m = +3 \sim +10^\circ\text{C}$)、3'-エキソヌクレアーゼ分解に対する安定性、ならびに好適な可溶特性を示す。LNAを含有する強力で、無毒性のアンチセンスオリゴヌクレオチドは記載されている(Wahlestedtら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、2000年、97巻、5633～5638頁)。

20

【0160】

それらのオリゴマー形成に加えた、LNA単量体アデニン、シトシン、グアニン、5-メチルシトシン、チミン、およびウラシルの合成および調製ならびに核酸認識特性は記載されている(Koshkinら、Tetrahedron、1998年、54巻、3607～3630頁)。LNAおよびその調製はまた、国際公開第98/39352号および国際公開第99/14226号においても記載されている。

30

【0161】

ある実施形態において、本発明のsiRNA分子は、たとえば、siRNA分子の5'-末端、3'-末端、5'および3'-末端の両方、またはその任意の組合せで1つまたは複数の(たとえば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上)ロックド核酸(LNA)ヌクレオチドを含む。

【0162】

PCT特許出願国際公開第01/77350号は、真核細胞中で同じ導入遺伝子のセンスRNA転写物およびアンチセンスRNA転写物の両方を産出するための、導入遺伝子の双方向性の転写のための例示的なベクターを記載する。したがって、ある実施形態において、本開示は、以下のユニークな特徴を有する組換えベクターを提供する：それは、反対の向きに配置され、対象とするdsRNAのための導入遺伝子の側面に位置する、2つのオーバーラップする転写単位を有するウイルスのレプリコンを含み、2つのオーバーラップする転写単位は、宿主細胞中で、同じ導入遺伝子断片からセンスRNA転写物およびアンチセンスRNA転写物の両方を産出する。

40

【0163】

他の実施形態において、1つまたは複数のCRPシグナル伝達アンタゴニストは、酵素核酸であってもよい。「酵素核酸」によって、特定される標的遺伝子に対して基質結合領域中で相補性を有し、標的核酸を特異的に切断するのに活性である酵素活性をも有する核酸が意味される。酵素核酸は、核酸を分子間で切断することができ、それによって、標的核酸を不活性化することができることが理解される。これらの相補的領域は、標的核酸への酵素核酸の十分なハイブリダイゼーションを可能にし、したがって、切断を可能にする

50

。100パーセントの相補性（同一性）が好ましいが、50～75%ほどの低い相補性もまた有用となり得る（たとえばWernerおよびUhlenbeck、1995年、Nucleic Acids Research、23巻、2092～2096頁；Hammannら、1999年、Antisense and Nucleic Acid Drug Dev.、9巻、25～31頁を参照されたい）。酵素核酸は、塩基、糖、および/またはリン酸基で修飾することができる。本明細書において記載されるように、用語「酵素核酸」は、リボザイム、触媒RNA、酵素RNA、触媒DNA、アプタザイムもしくはアプタマー結合リボザイム、調節可能なりボザイム、触媒オリゴヌクレオチド、ヌクレオザイム、DNAザイム、RNA酵素、エンドリボヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、ミニザイム、リードザイム、オリゴザイム、またはDNA酵素などの句と区別なく使用される。これらの術語はすべて、酵素活性を有する核酸について記載する。本明細書において記載される特定の酵素核酸は、限定的なものとなるようには意味されず、当業者らは、酵素核酸において重要なのは、それが、1つまたは複数の標的核酸領域に相補的である特異的な基質結合部位を有し、それが、その基質結合部位内にまたはそのまわりに、分子に対する核酸切断活性および/またはライゲーション活性を与えるヌクレオチド配列を有することであるということ認識するであろう（Cechら、米国特許第4,987,071号；Cechら、1988年、260巻 JAMA 3030頁）。ある実施形態において、酵素核酸は、mRNAの翻訳を予防するためにmRNA転写物を触媒的に切断するように設計されるリボザイムである（たとえば、1990年10月4日に公開されたPCT特許出願国際公開第90/11364頁；Sarverら、1990年、Science 247巻：1222～1225頁；および米国特許第5,093,246号を参照されたい）。他の実施形態において、酵素核酸は、DNA酵素である。DNA酵素を作製するおよび投与するための方法は、たとえば米国特許第6,110,462号において見つけることができる。

【0164】

いくつかの実施形態において、CRPアンタゴニストは、米国特許第6,964,950号において記載されるようなアンチセンス化合物である。

【0165】

(ii) CRP血漿レベルの減少

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のCRPシグナル伝達アンタゴニストは、CRPの血清レベルを減少させる（Prasad, K. Cardiovascular Drug Review 21巻：33～50頁（2006年））。CRP低下剤は、アスピリンならびにロフェコキシブおよびセレコキシブなどのシクロオキシゲナーゼ-2阻害剤などの抗炎症性薬；クロピドグレルなどの抗血小板剤；アトルバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、およびセリバスタチンを含むスタチン、エゼチミブ、フェノフィブラート、ならびにナイアシン（ビタミンB₃）などの脂質低下剤；チアゾリジンジオンおよびロシグリタゾンなどの抗糖尿病薬；DIO-902（DiObex）などの11-β-ヒドロキシラーゼ阻害剤；カルベジロールなどのα-アドレナリン受容体アンタゴニスト；トコフェロール、ビタミンE、およびビタミンCなどの酸化防止剤；ラミプリル、ホシノプリル、およびカプトプリルなどのアンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤；バルサルタン、ロサルタン、テルミサルタン、イルベサルタン、およびオルメサルタンなどのアンギオテンシン受容体遮断薬を含む。

【0166】

(iii) CRPシグナル伝達の減少

ある実施形態において、1つまたは複数のCRPシグナル伝達アンタゴニストは、Nanobody、Evibody、Ankyrin repeat protein、Trans-body、Anticalin、Microbody、AdNectin、Domain antibody、Affibody、Maxibody、Tetranectin、Affilin molecule、iMabs、およびMonobodyなどの足場ベースの結合タンパク質である。（Heyら、Trends Biotechno

1、2005年、23巻：514～522頁；Binzら、Nat Biotechnol、2005年、23巻：1257～1268頁；Hosse, R. J.ら、Protein Science、15巻：14～27頁（2006年）。ある実施形態において、タンパク質ディスプレイ足場は、フィブロネクチンベースの「アドレス指定可能な」治療結合分子である。フィブロネクチンドメインIII（FnIII）ループは、有用な治療ツールを開発するために、ランダム突然変異ならびに標的結合、選択、およびさらなる突然変異のラウンドを繰り返す定方向進化系にかけられてもよい領域を含む。フィブロネクチンベースのタンパク質治療薬の例示的な実施形態は、PCT出願国際公開第00/34784号、国際公開第01/64942号、および国際公開第02/032925号において記載されるようなAdnectins（商標）である。

10

【0167】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のCRPシグナル伝達アンタゴニストは、CRPまたはCRPリガンドタンパク質に結合する抗体または抗原結合断片を含む。抗体は、Fab、Fv、scFv、Fab'、およびF(ab')₂、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、操作された抗体（キメラ抗体、単鎖抗体、CDR移植抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、および人為的に選択された抗体を含む）、ならびにファージディスプレイまたは代替技術を使用して産生される合成抗体または半合成抗体を含むことが理解される。

【0168】

本出願のいくつかの実施形態において、提供される抗体断片は、切断鎖（カルボキシル末端で切断）である。ある実施形態において、これらの切断鎖は、1つまたは複数の免疫グロブリン活性（たとえば補体固定活性）を持つ。切断鎖の例は、Fab断片（VL、VH、CL、およびCH1のドメインから成る）；Fd断片（VHおよびCH1のドメインから成る）；Fv断片（抗体の単鎖のVLおよびVHのドメインから成る）；dab断片（VHドメインから成る）；単離CDR領域；二価断片である（Fab'）₂断片（ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む）を含むが、これらに限定されない。切断鎖は、酵素切断または組換えDNA技術などの従来の生化学的技術によって産生することができ、これらのそれぞれは当技術分野において知られている。これらのポリペプチド断片は、当技術分野において十分に知られている方法によってまたはFab断片を産生するためにCH1の後にもしくは（Fab'）₂断片を産生するためにヒンジ領域の後になど、部位特異的突然変異誘発を使用して、ベクター中の所望の位置に終止コドン挿入することによって、完全抗体のタンパク質分解切断によって産生されてもよい。単鎖抗体は、VLタンパク質断片およびVHタンパク質断片を連結するペプチドリンカーをコードするDNAとVLコード領域およびVHコード領域をつなぐことによって産生されてもよい。

20

30

【0169】

本出願はまた、抗CRP抗体の断片をも提供し、これは、たとえば、完全な抗体の抗原結合領域または可変領域などの、完全な抗体の一部を含んでもよい。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFvの断片；二重特異性抗体；線状抗体（Zapataら、Protein Eng. 1995年；8巻（10号）：1057～1062頁）；単鎖抗体分子；ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体を含む。抗体のパパイン消化により、それぞれ、単一の抗原結合部位を有する「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片およびその名称が容易に結晶化するその能力を反映する、残りの「Fc」断片が産生される。抗体のペプシン処理により、2つの抗原結合部位を有し、なお抗原に架橋することができるF(ab')₂断片が産出される。「Fv」は、普通の場合、完全抗原認識部位および完全抗原結合部位を含有する最小抗体断片を指す。この領域は、密接に非共有結合した1つの重鎖可変領域および1つの軽鎖可変領域の二量体から成る。V_H-V_L二量体の表面上の抗原結合部位を確定するためにそれぞれの可変領域の3つのCDRが相互作用するのはこの配置においてである。共同して、CDRは、抗体に対する抗原結合特異性を与える。しかしながら、おそらく、全結合部位よりも低い親和性

40

50

であろうが、単一の可変領域（または抗原に対して特異的な3つのCDRを含むFvの半分）でさえ、抗原を認識し、結合する能力を有する。

【0170】

Fab断片はまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常ドメイン（CH1）を含有する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの1つまたは複数のシステインを含む、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端の少数の残基の追加により、Fab断片と異なる。Fab'-SHは、Fab'に対する本明細書における命名であり、定常ドメインの（1つまたは複数の）システイン残基が遊離チオール基を持つ。F(ab')₂抗体断片は、それらの間にヒンジシステインを有する、Fab'断片の対として当初、産生された。抗体断片の他の化学的共役もまた知られている。

10

【0171】

「単鎖Fv」または「scFv」抗体断片は、抗体のV_HおよびV_Lのドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖で存在する。ある実施形態において、Fvポリペプチドは、scFvが、抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にする、V_HおよびV_Lのドメインの間にポリペプチドリッカーをさらに含む。scFvの概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、113巻、RosenburgおよびMore編（Springer-Verlag: New York、1994年）、269～315頁を参照されたい。

【0172】

SMPは、標的結合領域ならびにエフェクタードメイン（CH2およびCH3のドメイン）を含むように操作された単鎖ペプチドのクラスである。たとえば、米国特許出願公開第20050238646号を参照されたい。標的結合領域は、抗体、たとえば本出願のEphB4抗体の可変領域またはCDRに由来してもよい。その代わりに、標的結合領域は、EphB4に結合するタンパク質に由来する。

20

【0173】

用語「二重特異性抗体」は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を指し、これらの断片は、同じポリペプチド鎖において、軽鎖可変領域（V_L）に連結された重鎖可変領域（V_H）を含む（V_H-V_L）。短すぎて、同じ鎖上の2つのドメインの間で対になることができないリンカーを使用することによって、ドメインは、他の鎖の相補的なドメインと対になり、2つの抗原結合部位を作り出すように強えられる。二重特異性抗体は、たとえば欧州特許第404,097号；国際公開第93/11161号；およびHollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻：6444～6448頁（1993年）に、より十分に記載される。

30

【0174】

Fc領域を有する、抗体の分子（または病原体）への結合が、分子（または病原体）の処理およびクリアランスを助けることは十分に知られている。抗体のFc部分は、免疫エフェクター細胞によって発現される、特殊化した受容体によって認識される。IgG1およびIgG3の抗体のFc部分は、マクロファージおよび好中球などの食細胞の表面上に存在するFc受容体によって認識され、これらは、それによって、これらのアイソタイプの抗体でコーティングされた分子または病原体に結合し、それらを貪食することができる（Janewayら、Immunobiology 5th edition、147頁、Garland Publishing（New York、2001年））。

40

【0175】

本出願の抗CRP抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA、およびIgEならびにIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、およびIgG4を含む任意のアイソタイプを含むすべての型の定常領域を有する抗体を含む。抗体の軽鎖は、カッパ軽鎖またはラムダ軽鎖とすることができる。

【0176】

ある実施形態において、単鎖抗体ならびに異なる種に由来する部分を含むキメラ、ヒト

50

化、または霊長類化（CDR移植）抗体およびキメラ単鎖抗体またはCDR移植単鎖抗体もまた、抗体の抗原結合断片として本開示によって包含される。これらの抗体の様々な部分は、従来の技術によって相互に化学的につなぐことができ、または遺伝子工学技術を使用して、隣接タンパク質として調製することができる。たとえば、キメラ鎖またはヒト化鎖をコードする核酸は、隣接タンパク質を産生するために発現させることができる。たとえば米国特許第4,816,567号および第6,331,415号；米国特許第4,816,397号；欧州特許第0,120,694号；国際公開第86/01533号；欧州特許第0,194,276 B1号；米国特許第5,225,539号；ならびに欧州特許第0,239,400 B1号を参照されたい。霊長類化抗体に関するNewmanら、BioTechnology、10巻：1455～1460頁（1992年）もまた参照されたい。たとえば、Ladnerら、米国特許第4,946,778号；および単鎖抗体に関するBirdら、Science、242巻：423～426頁（1988年）を参照されたい。

10

【0177】

いくつかの実施形態において、CRPシグナル伝達アンタゴニストは、アプタマーである。アプタマーは、それらの同起源の受容体への線維促進性因子の結合を阻害するまたはそれに干渉するのに適している可能性がある。いくつかの実施形態において、アプタマーは、その同起源の受容体へのTGF β の結合を阻害してもよい。

【0178】

いくつかの実施形態において、CRPシグナル伝達アンタゴニストは、小分子である。いくつかの実施形態において、小分子は、Pepys, MB., Nature、440巻：1217～1221頁（2006年）において記載されるようなビス（ホスホコリン）ヘキサン化合物である。ある実施形態において、小分子は、1,4-ビス（ホスホコリン）-ヘキサン、1,5-ビス（ホスホコリン）-ヘキサン、1,6-ビス（ホスホコリン）-ヘキサン、または1,7-ビス（ホスホコリン）-ヘキサンから選択される。いくつかの実施形態において、小分子は、米国特許出願第2006/0019930号において開示されるCRP阻害剤である。いくつかの実施形態において、小分子は、ホスホコリン-ヘキサン-ホスホコリン（PCHPC）またはその誘導体である。

20

【0179】

本発明の一態様において、CRPシグナル伝達をアンタゴナイズする1つまたは複数の化合物が提供される。いくつかの実施形態において、CRPシグナル伝達アンタゴニストは、抗Fc γ R抗体であり、抗体は、Fc γ RI、Fc γ RIIA、またはFc γ RIIIのいずれかにそれぞれ結合することができる抗Fc γ RI、抗Fc γ RIIA、および抗Fc γ RIII抗体のクラスから選択される。抗Fc γ R抗体は、IgG抗体のFc部分に対する受容体（Fc γ R）に結合するIgG抗体である。抗Fc γ R抗体は、それらの定常（Fc）領域を通してではなく、それらの可変領域を通して結合する。抗Fc γ R抗体は、抗体の任意のアイソタイプを含んでもよい。抗Fc γ R抗体は、さらなる抗体または他の手段を用いてまたは用いないで、さらに架橋されてもよく、または凝集されてもよい。このプロセスは、Fc γ R活性化と一致する細胞内シグナル伝達事象を開始する。

30

【0180】

抗Fc γ RI抗体、抗Fc γ RII抗体、および/または抗Fc γ RIII抗体を含有する組成物は、線維化性障害および慢性の炎症性の状態において、不適切な位置における線維細胞の分化を抑制するために使用することができる。

40

【0181】

特定の実施形態において、約1.0 μ g/ml抗Fc γ R抗体を含有する組成物は、線維細胞分化を約50%阻害するのに有効である可能性がある。他の実施形態において、組成物は、標的組織に1.0 μ g/ml抗Fc γ R抗体を送達するのに十分な量を含有しているもよい。

【0182】

抗Fc γ R抗体は、患者における、望ましくない量の細胞死を引き起こすことなく、約

50

1.0 μg/mlの用量で、1.0 μg/ml抗Fc R抗体を標的組織に送達するのに十分な量で、または線維細胞分化を阻害するのに十分な他の用量で投与することができる。

【0183】

線維化関連障害

線維化は、コラーゲン性結合組織の病理的または過剰な蓄積によって一般に特徴づけられる。本発明の方法を用いる治療に適用可能である可能性がある線維化関連障害は、コラーゲン病、間質性肺疾患、ヒト線維性肺疾患（たとえば閉塞性細気管支炎、特発性肺線維症、知られている病因からの肺線維症、肺疾患における腫瘍間質、肺に影響を与える全身性硬化症、Hermansky - Pudlak症候群、石炭労働者の塵肺症、石綿肺、珪肺症、慢性肺高血圧症、AIDS関連肺高血圧症、サルコイドーシス、中から重度の喘息など）、線維性血管疾患、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、静脈瘤症、冠状動脈梗塞症、脳梗塞、心筋線維症、筋骨格線維症、手術後の癒着、ヒト腎疾患（たとえば腎炎症候群、Alport症候群、HIV関連腎症、多発性嚢胞腎疾患、Fabry病、糖尿病腎症、慢性糸球体腎炎、全身性ループスと関連する腎炎など）、進行性全身性硬化症（PSS）、原発性硬化性胆管炎（PSC）、肝線維症、肝硬変、腎線維症、肺線維症、嚢胞性線維症、慢性移植片対宿主疾患、強皮症（局所性および全身性）、Grave眼症、糖尿病網膜症、緑内障、Peyronie病、陰茎線維症、膀胱鏡の後の尿道狭窄症、外科手術の後の内部癒着、瘢痕、骨髄線維症、特発性後腹膜線維症、知られている病因からの腹膜線維症、薬剤誘発性麦角中毒、良性または悪性の癌に対する線維化事変、微生物感染（たとえばウイルス、細菌、寄生虫、菌類など）に対する線維化事変、Alzheimer病、炎症性腸疾患に対する線維化事変（Crohn病および顕微鏡的大腸炎における狭窄形成を含む）、間質細胞腫瘍、粘膜炎、化学的か環境的侵襲によって誘発される線維症（たとえば癌化学療法、殺虫剤、放射線（たとえば癌放射線療法）など）などを含むが、これらに限定されない。

10

20

【0184】

いくつかの実施形態において、線維化関連障害は、全身性または局所性の強皮症、ケロイド、肥厚性瘢痕、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、肺炎症および線維症、特発性肺線維症、肝硬変、B型またはC型慢性肝炎感染から結果として生じる線維症、腎疾患、瘢痕組織から結果として生じる心疾患、黄斑変性症、ならびに網膜および硝子体の網膜症から選択される。いくつかの実施形態において、線維化関連障害は、化学療法剤、放射線誘発性の線維化、ならびに傷害およびやけどから結果として生じる。

30

【0185】

抗線維化療法組成物は、局所的にまたは全身的に適用されてもよい。組成物はまた、組み合わせてまたは補助因子と共に提供されてもよい。組成物は、組成物が標的位置に通常存在する場合、正常なレベルを回復させるのに十分な量で投与することができ、または標的位置において、正常なレベルより上にレベルを上昇させる量で投与することができる。

【0186】

抗線維化療法組成物は、外因性の供給源から標的位置に提供されてもよく、またはそれらは、標的位置における細胞または標的位置と同じ組織体中の細胞によってin vivoにおいて作製されてもよい。

40

【0187】

抗線維化療法組成物は、任意の生理学的に適切な製剤中のものとしてもよい。それらは、注入によって、局所的に、吸入によって、経口的に、または他の有効な手段によって組織体に投与することができる。

【0188】

過剰な線維化の形成および維持を抑制するまたは阻害するための、上記に記載される同じ組成物および方法論はまた、不適切な線維化の形成を抑制するまたは阻害するために使用することができる。たとえば、それらは、肝臓、腎臓、肺、心臓および心膜、目、皮膚、口、膵臓、胃腸管、脳、乳房、骨髄、骨、尿生殖器、腫瘍、または傷において生じる状

50

態を治療してもよく、または予防してもよい。

【0189】

一般に、それらは、関節リウマチ、ループス、病原性の線維化、線維化性疾患、S c h i s t o s o m a j a p o n i c u m 感染の後に形成されたものなどの線維性病変、放射線損傷、自己免疫疾患、L y m e 病、化学療法誘発性の線維化、H I V 誘発性のまたは感染誘発性の巣状硬化症、脊髄の外科手術瘢痕による腰椎術後疼痛症候群 (f a i l e d b a c k s y n d r o m e)、外科手術瘢痕後の腹部癒着、および線維嚢胞形成を含むが、これらに限定されない状態から結果として生じる線維化関連障害を治療してもよく、または予防してもよい。

【0190】

具体的に、肝臓において、それらは、アルコール、薬剤、および/または化学的誘発性の肝硬変、虚血再灌流、肝臓の移植の後の傷害、壊死性肝炎、B型肝炎、C型肝炎、原発性胆汁性肝硬変、ならびに原発性硬化性胆管炎を含むが、これらに限定されない状態から結果として生じる線維化を治療してもよく、または予防してもよい。

【0191】

腎臓に関して、それらは、増殖性糸球体腎炎および硬化性糸球体腎炎、腎性線維化性皮膚症、糖尿病性腎症、腎尿細管間質性線維症、ならびに巣状分節性糸球体硬化症を含むが、これらに限定されない状態から結果として生じる線維化を治療してもよく、または予防してもよい。

【0192】

肺に関して、それらは、肺間質性線維症、薬剤誘発性サルコイドーシス、肺線維症、特発性肺線維症、喘息、慢性閉塞性肺疾患、びまん性肺胞損傷疾患、肺高血圧症、新生児気管支肺異形成症、慢性喘息、および肺気腫を含むが、これらに限定されない状態から結果として生じる線維化を治療してもよく、または予防してもよい。

【0193】

心臓および/または心膜に関して、それらは、心筋線維症、アテローム性動脈硬化症、冠動脈再狭窄、鬱血性心筋症、心不全、および他の虚血後の状態を含むが、これらに限定されない状態から結果として生じる線維化を治療してもよく、または予防してもよい。

【0194】

目に関して、それらは、G r a v e 病の眼球突出症、増殖性硝子体網膜症、前部カプセル白内障 (a n t e r i o r c a p s u l e c a t a r a c t)、角膜線維症、外科手術による角膜瘢痕、線維柱帯切除術誘発性の線維化、および他の目の線維化を含むが、これらに限定されない状態から結果として生じる線維化を治療してもよく、または予防してもよい。

【0195】

皮膚に関して、それらは、D e p u y t r e n 拘縮、強皮症、ケロイド瘢痕、乾癬、やけどによる肥大性瘢痕、および脊髄傷害によって引き起こされた偽性強皮症を含むが、これらに限定されない状態から結果として生じる線維化を治療してもよく、または予防してもよい。

【0196】

口に関して、それらは、歯周疾患瘢痕および薬剤に伴う歯肉増殖症を含むが、これらに限定されない状態から結果として生じる線維化を治療してもよく、または予防してもよい。

【0197】

膵臓に関して、それらは、膵線維症、間質リモデリング膵臓炎、および間質線維症を含むが、これらに限定されない状態から結果として生じる線維化を治療してもよく、または予防してもよい。

【0198】

胃腸管に関して、それらは、コラーゲン蓄積大腸炎、絨毛萎縮、陰窩過形成、ポリープ形成、C r o h n 病の線維化、および胃潰瘍治癒を含むが、これらに限定されない状態か

10

20

30

40

50

ら結果として生じる線維化を治療してもよく、または予防してもよい。

【0199】

脳に関して、それらは、グリア性瘢痕組織を含むが、これらに限定されない状態から結果として生じる線維化を治療してもよく、または予防してもよい。

【0200】

乳房に関して、それらは、線維嚢胞性疾患および乳癌に対する結合組織形成反応を含むが、これらに限定されない状態から結果として生じる線維化を治療してもよく、または予防してもよい。

【0201】

骨髄に関して、それらは、脊髄形成異常症における線維化および新生物疾患を含むが、これらに限定されない状態から結果として生じる線維化を治療してもよく、または予防してもよい。

10

【0202】

骨に関して、それらは、リウマチパンプス形成を含むが、これらに限定されない状態から結果として生じる線維化を治療してもよく、または予防してもよい。

【0203】

泌尿生殖組織に関して、それらは、子宮内膜症、子宮筋腫、および卵巣筋腫を含むが、これらに限定されない状態から結果として生じる線維化を治療してもよく、または予防してもよい。

【0204】

以下の実施例は、本発明の特定の実施形態を実証するために含まれる。続く実施例において開示される技術は、本発明の実施において十分に機能するように、発明者らによって発見された技術を示すことが当業者らによって十分に理解されるべきである。しかしながら、当業者らは、本開示に照らして、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、多くの変更を、開示される特定の実施形態において成すことができ、多くの変更によって、なお、類似のまたは同様の結果を得ることができることを十分に理解するべきである。

20

【0205】

医薬調製物および製剤

ある実施形態において、本明細書において記載される方法では、対象に抗線維化療法を施す。治療剤は、1つまたは複数の生理学的に許容可能な担体または賦形剤を使用して、従来の様式において製剤することができる。たとえば、治療剤ならびにそれらの生理学的に許容可能な塩および溶媒化合物は、たとえば注入（たとえばSub Q、IM、IP）、吸入もしくは通気（口もしくは鼻のいずれかを通して）、または経口投与、頬側投与、舌下投与、経皮投与、経鼻投与、非経口投与、もしくは直腸投与による投与のために製剤することができる。ある実施形態において、治療剤は、標的細胞が存在する部位に、つまり特定の組織、器官、または体液（たとえば血液、脳脊髄液、腫瘍など）中に、局所的に投与することができる。

30

【0206】

治療剤は、全身投与、局所投与、および局部投与を含む、投与の多種多様のモードのために製剤することができる。技術および製剤は、一般に、Remington's Pharmaceutical Sciences、Meade Publishing Co.、Easton、PAにおいて見出され得る。非経口的投与については、筋肉内、静脈内、腹腔内、および皮下を含む注入が好ましい。注入のために、化合物は、液体中に、好ましくは、Hank溶液またはRinger溶液などの生理学的に適合性の緩衝液中に製剤することができる。さらに、化合物は、固体形態で製剤され、使用の直前に再溶解または懸濁してもよい。凍結乾燥形態もまた含まれる。

40

【0207】

経口投与については、医薬組成物は、たとえば、結合剤（たとえばあらかじめゼラチン化したトウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、もしくはヒドロキシプロピルメチルセルロース）などの薬学的に許容可能な賦形剤；増量剤（たとえばラクトース、結晶セ

50

ルロース、もしくはリン酸水素カルシウム)；滑沢剤(たとえばステアリン酸マグネシウム、タルク、もしくはシリカ)；崩壊剤(たとえばデンプンもしくはデンプングリコール酸ナトリウム)；または湿潤剤(たとえばラウリル硫酸ナトリウム)を用いて、従来の手段によって調製される錠剤、ロゼンジ、またはカプセル剤の形態をとってもよい。錠剤は、当技術分野において十分に知られている方法によってコーティングされてもよい。経口投与のための液体調製物は、たとえば、水剤、シロップ剤、もしくは懸濁剤の形態をとってもよく、またはそれらは、使用の前に水または他の適した媒体と構成させるための乾燥産物として提供されてもよい。そのような液体調製物は、懸濁化剤(たとえばソルビトールシロップ、セルロース誘導体、または硬化食用脂)；乳化剤(たとえばレシチンまたはアカシア)；非水性媒体(たとえばアチオンド(atitiond)油、油性エステル、エチルアルコール、または分留植物油)；および防腐剤(たとえばp-ヒドロキシ安息香酸メチルもしくはp-ヒドロキシ安息香酸プロピルまたはソルビン酸)などの薬学的に許容可能な添加剤を用いて、従来の手段によって調製されてもよい。調製物はまた、緩衝塩、香味料、着色料、および甘味料を必要に応じて含有してもよい。経口投与のための調製物は、活性化化合物の放出制御を生じるように適宜、製剤することができる。

10

【0208】

吸入による投与については(たとえば肺の送達)、治療剤は、適した噴霧剤、たとえばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の適した気体を使用して、加圧バックまたはネブライザーからのエアロゾルスプレーの形態で好都合に送達されてもよい。加圧エアロゾルの場合においては、投薬量ユニットは、計量された量を送達するように弁を提供することによって決定されてもよい。吸入器または通気器における使用のためのたとえばゼラチンのカプセル剤およびカートリッジは、化合物およびラクトースまたはデンプンなどの適した粉末ベースの粉末ミックスを含有して製剤することができる。

20

【0209】

治療剤は、注入による、たとえばボラス注入または持続輸液による非経口投与のために製剤することができる。注入のための製剤は、防腐剤を追加して、ユニット投薬量形態で、たとえば、アンプル中にまたは多用量容器中に提供されてもよい。組成物は、油性または水性の媒体中で、懸濁剤、水剤、または乳剤のような形態をとってもよく、懸濁剤、安定剤、および/または分散剤などの、製剤に関する作用物質を含有してもよい。その代わりに、活性成分は、使用の前に、適した溶媒、たとえば無菌の発熱物質なしの水と構成させるための粉末形態であってもよい。

30

【0210】

さらに、治療剤はまた、デポー調製物として製剤することができる。そのような長期作用製剤は、移植(たとえば皮下にもしくは筋肉内に)または筋肉内注入によって投与することができる。したがって、たとえば、治療剤は、適したポリマーもしくは疎水性の材料(たとえば許容可能な油中の乳剤として)またはイオン交換樹脂を用いてまたは難溶性の誘導体として、たとえば難溶性の塩として製剤することができる。放出制御の処方はまだ、パッチをも含む。

【0211】

ある実施形態において、本明細書において記載される化合物は、中枢神経系(CNS)への送達のために製剤することができる(Begley, Pharmacology & Therapeutics 104巻: 29~45頁(2004年)において概説される)。CNSへの薬剤送達のための従来のアプローチは、神経外科的戦略(たとえば脳内注入または脳室内輸液)；内在性輸送経路のBBBのうちの1つを活用するための試みにおける、作用物質の分子操作(たとえば、それ自体、BBBを横断することができない作用物質と組み合わせた、内皮細胞表面分子に対する親和性を有する輸送ペプチドを含むキメラ融合タンパク質の産生)；作用物質の脂質可溶性を増加させるために設計された薬理的戦略(たとえば脂質またはコレステロールの担体への水溶性作用物質の抱合)；および高浸透圧破壊による完全なBBBの一時的な破壊(頸動脈の中へのマンニトール溶液の輸

40

50

液またはアンギオテンシンペプチドなどの生物学的に活性の作用物質の使用から結果として生じる)を含む。

【0212】

ある実施形態において、治療剤は、一般に、局所薬剤の投与に適した局所担体を含み、当技術分野において知られているあらゆるそのような材料を含む局所製剤の中に組み込まれる。局所担体は、所望の形態で、たとえば、軟膏剤、ローション剤、クリーム、マイクロエマルジョン、ゲル、油、水剤などとして、組成物を提供するように選択することができ、自然発生の起源または合成起源の材料からなり得る。選択された担体が、局所製剤の活性作用物質または他の構成成分に悪影響を与えないことは好ましい。本明細書における使用に適した局所担体の例は、水、アルコール、および他の無毒性有機溶媒、グリセリン、鉱油、シリコン、ワセリン、ラノリン、脂肪酸、植物油、パラベン、ろうなどを含む。

10

【0213】

医薬組成物(化粧品調製物を含む)は、0.001~10重量%または0.1重量%~5重量%など、約0.00001~100重量%の、本明細書において記載される1つまたは複数の治療剤を含んでもよい。ある局所製剤において、活性作用物質は、約0.25重量%~75重量%の製剤の範囲の量で、好ましくは、約0.25重量%~30重量%の製剤の範囲で、より好ましくは、約0.5重量%~15重量%の製剤の範囲で、および最も好ましくは、約1.0重量%~10重量%の製剤の範囲で存在する。

20

【0214】

目の状態は、たとえば、治療剤の全身、局所、眼内注入によって、または治療剤を放出する徐放性デバイスの挿入によって治療するまたは予防することができる。化合物が、目の角膜領域および内部領域、例として、前眼房、後眼房、硝子体、眼房水、硝子体液、角膜、虹彩/毛様体、レンズ、脈絡膜/網膜、および強膜に浸透することを可能にする十分な期間、化合物が眼球表面に接して維持されるように、治療剤は、薬学的に許容可能な点眼用の媒体中で送達されてもよい。薬学的に許容可能な点眼用の媒体は、たとえば、軟膏剤、植物油、または封入材料であってもよい。その代わりに、化合物は、硝子体および房水の中に直接、注入されてもよい。さらなる代替において、化合物は、目の治療のために、静脈内輸液または静脈内注入によってなど、全身的に投与することができる。

30

【0215】

本明細書において記載される治療剤は、当技術分野における方法に従って無酸素環境において保管されてもよい。

【0216】

核酸化合物を送達するための方法は、当技術分野において知られている(たとえばAkhtarら、1992年、Trends Cell Bio., 2巻、139頁;およびDelivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, Akhtar編、1995年;Sullivanら、PCT国際公開第94/02595号を参照されたい)。これらのプロトコルは、事実上、任意の核酸化合物の送達のために利用することができる。核酸化合物は、リポソーム中への封入、イオン導入法によるもの、またはヒドロゲル、シクロデキストリン、生分解性ナノカプセル、および生体接着マイクロスフェアなどの他の媒体の中への組み込みによるものを含むが、これらに限定されない、当業者らに知られている多種多様な方法によって細胞に投与することができる。その代わりに、核酸/媒体化合物は、直接的な注入によってまたは輸液ポンプの使用によって局所的に送達される。送達の他の経路は、経口送達(錠剤または丸剤の形態)および/または鞘内送達を含むが、これらに限定されない(Gold、1997年、Neuroscience、76巻、1153~1158頁)。他のアプローチは、たとえば抱合体および生分解性ポリマーの使用を通しての、様々な輸送系および担体系の使用を含む。薬剤送達戦略についての包括的な概説については、Hoら、1999年、Curr. Opin. Mol. Ther., 1巻、336~343頁およびJain、Drug Delivery Systems: Tec

40

50

hnologies and Commercial Opportunities, Decision Resources、1998年およびGroothuisら、1997年、J. NeuroVirol.、3巻、387~400頁を参照されたい。核酸送達および投与のより詳細な説明は、Sullivanら、前掲、Draperら、PCT国際公開第93/23569号、Beigelmanら、PCT国際公開第99/05094号、およびKlimukら、PCT国際公開第99/04819号において提供される。

【0217】

siRNAなどのアンチセンスヌクレオチドは、多種多様の方法を使用して、癌細胞に送達されてもよい。連結した「積荷」分子を細胞質ゾルの中に運ぶための能力を有する細胞浸透ペプチド(CPP)を使用されてもよい(Juliano、Ann N Y Acad Sci. 2006年12月; 1082巻: 18~26頁を参照されたい)。ある実施形態において、アテロコラーゲン媒介性のオリゴヌクレオチド送達系が使用される(HanaïらAnn N Y Acad Sci. 2006年12月; 1082巻: 9~17頁)。LPD製剤(リポソーム-ポリカチオン-DNA複合体)は、腫瘍細胞にsiRNAを送達するために使用されてもよい(LiらAnn N Y Acad Sci. 2006年12月; 1082巻: 1~8頁)。ポリエチレンイミン(PEI)とのsiRNAの複合体形成もまた、細胞の中にsiRNAを送達するために使用されてもよい(Aigner、J Biomed Biotechnol. 2006年; 2006巻(4号): 71659頁)。siRNAはまた、in vivo送達のために、キトサンコーティングポリソヘキシルシアノアクリレート(PIHCA)ナノ粒子と複合体を形成してもよい(Pilleら、Hum Gene Ther. 2006年12月; 17巻(10号): 1019~26頁)。

【実施例】

【0218】

(実施例1) 単球分化を阻害するための目標SAP対CRP比を決定するためのin vitroモデル

線維細胞分化アッセイ

単球は、当技術分野において標準的な負磁気ビーズ選択(たとえばCAT#113~41D、Invitrogen、Carlsbad、CA)を使用して、全血由来のPBM Cから精製し、25または50ng/mlのM-CSFを補充したFibroLife Mediaを含有する96ウェル組織培養プレート中で三連で培養した。プレートは、5%CO₂インキュベーター中で37で96時間、インキュベートした。次いで、細胞は、パラホルムアルデヒドを用いて固定し、Hema 3染色を用いて染色した(Cat #122-911、Hema 3 Stain、Fisher Scientific、Hampton、NH)。ウェル当たりの線維細胞の数は、倒立顕微鏡を使用して、ウェル当たり、5つの異なるフィールドの集計を合計することによって決定した。線維細胞は、細長い紡錘形を有し、楕円形の核が存在する接着細胞として形態学的に定義した。データは、25または50ng/mlのM-CSFのいずれも、このドナーにおいて、約50%、単球から分化する線維細胞の数を増加させるのに十分であることを示した(図2)。それに続く実験に、必要とされる、下記に定義されるような25ng/mlのM-CSFを補充したFibroLife Mediaを使用した。

【0219】

FibroLife Media: (Cat # LM-0001、Lifeline Cell Technology、Walkersville、MD) 10mM HEPES (Cat # H0887、Sigma-Aldrich)、1x非必須アミノ酸 (Cat # M7145、Sigma-Aldrich)、1mMピルビン酸ナトリウム (Cat # S8636、Sigma-Aldrich)、2mMグルタミン (Cat # 25030-149、Invitrogen)、100U/mlペニシリンおよび100ug/mlストレプトマイシン (Cat # P0781、Sigma-Aldr

ich)、ならびにITS-3(Cat # I2771、500ug/mlウシ血清アルブミン、10ug/mlインスリン、5ug/mlトランスフェリン、5ng/ml亜セレン酸ナトリウム、5ug/mlリノール酸、ならびに5ug/mlオレイン酸;Sigma-Aldrich)を補充。

【0220】

このアッセイの代替バージョンにおいて、PBMCまたは単球を全血から精製し、様々な量のSAPおよびCRPを補充したFibroLife Media中で三連で培養した。線維細胞の数は、あるドナーにおいて、CRP濃度を増加させると増加し、すべてのドナーにおいて、SAP濃度を増加させると減少する。

【0221】

in vitroにおける最小SAP/CRP比の計算

方法1: 単球は、当技術分野において標準的な負磁気ビーズ選択(たとえばCAT# 113-41D、Invitrogen、Carlsbad、CA)を使用して、全血由来のPBMCから精製し、FibroLife Mediaおよび様々な濃度のSAPを含有する96ウェル組織培養プレート中で三連で培養した。プレートは、5%CO₂インキュベーター中で37°Cで96時間、インキュベートした。次いで、細胞は、パラホルムアルデヒドを用いて固定し、Hema 3染色を用いて染色した(Cat # 122-911、Hema 3 Stain、Fisher Scientific、Hampton、NH)。ウェル当たりの線維細胞の数は、倒立顕微鏡を使用して、ウェル当たり、5つの異なるフィールドの集計を合計することによって決定した。線維細胞は、細長い紡錘形を有し、楕円形の核が存在する接着細胞として形態学的に定義した。この系において線維細胞分化の最大の阻害をもたらすのに必要なSAPの最小濃度は、2ug/mlであることが決定された(図3A)。

【0222】

単球は、当技術分野において標準的な負磁気ビーズ選択(たとえばCAT# 113-41D、Invitrogen、Carlsbad、CA)を使用して、全血由来のPBMCから精製し、様々なhCRP、2ug/ml hSAP、および25ng/ml hMCSFを補充したFibroLife Mediaを含有する96ウェル組織培養プレート中で三連で培養した。プレートは、5%CO₂インキュベーター中で37°Cで96時間、インキュベートした。次いで、細胞は、パラホルムアルデヒドを用いて固定し、Hema 3染色を用いて染色した(Cat # 122-911、Hema 3 Stain、Fisher Scientific、Hampton、NH)。ウェル当たりの線維細胞の数は、倒立顕微鏡を使用して、ウェル当たり、5つの異なるフィールドの集計を合計することによって決定した。線維細胞は、細長い紡錘形を有し、楕円形の核が存在する接着細胞として形態学的に定義した。CRP濃度40ug/mlは、2ug/mlのhSAPの効果遮断するのに十分であった(図3B)。示すSAP濃度を、示すCRP濃度で割り、in vivoにおいて線維細胞分化を防止するはずである最小SAP/CRP比を決定した。これらのデータは、局所組織部位で生じる可能性があるように、SAP/CRP比0.05が、無血清条件下で十分であろうことを示す。

【0223】

方法2: このアッセイの代替バージョンにおいて、有効なSAP/CRP比は、線維細胞分化の最大の刺激をもたらすのに必要なCRPの最小濃度を決定し、次いで、線維細胞分化の量を>90%低下させるために、CRPのその濃度に必要なSAPの濃度を決定することによって、線維細胞分化のCRP刺激に応答性であるドナーから計算することができる。次いで、示すSAP濃度を、示すCRP濃度で割り、in vivoにおいて線維細胞分化を防止するはずである最小SAP/CRP比を決定する。目標SAP対CRP比は、in vivo目標比を確認するために、様々なin vivo線維化モデルにおいて試験する。

【0224】

Transwell移動アッセイ

10

20

30

40

50

代替アッセイにおいて、多孔性膜を、片面にコラーゲンIVでコーティングし、HUV EC細胞を同じ面の単層中で培養する。次いで、transwellを、ウェルプレート中の培地中に懸濁し、PBMCを、transwellの上部に追加する。PBMCは、ウェルの底部への、MCP-1などのケモカインを追加することによって、HUV EC層を横切って移動するように誘発する。細胞が移ると、それらは線維細胞に分化する。

【0225】

様々な量のSAPおよびCRPをtranswellの上部に追加して、線維細胞への分化を阻害するSAP対CRP比を決定する。以下の最終濃度を試験する。目標SAP対CRP比は、in vivo目標比を確認するために、様々なin vivo線維化モデルにおいて試験する(表1)。

10

【0226】

【表1】

表1

SAP $\mu\text{g/ml}$	CRP $\mu\text{g/ml}$	SAP対CRP比
10	10	1
5	10	0.5
2	10	0.2
1	10	0.1
0.5	10	0.05
0.25	10	0.025
0.1	10	0.01
10	2.5	5
10	1	10
10	0.5	20
10	0.1	100
10	0.01	1000
10	0.001	10,000

20

30

(実施例2) 例示的なin vivoモデル系

(i) プレオマイシン誘発性の肺線維化

肺線維症を、重さが200~250グラムであるオスSprague-Dawleyラットにおいて生じさせる。0.67ml/kgの容量の、0.9%塩化ナトリウム中に溶解したプレオマイシンの2.5~6.67U/kgの気管内用量(経口腔経路を介して)を、0日目に投与する。

【0227】

試験群1

試験1日目に、SAPおよびCRPの両方についての血清濃度を決定する。1日目に決定した比は、実施例1において確定した目標比に達するために必要とされるSAPの用量を計算するために使用する。計算した用量を、2、4、6、8、および10日目に投与する。治療群のラットに、2~10ml/kgの薬用量のSAPを尾部静脈を介して静脈内に投薬する。未治療ラットに、2~10ml/kgの生理食塩水を投薬する。

40

【0228】

14日目に、肺機能は、血液酸素飽和度(パルスオキシメトリー)および/または PO_2 (血液ガス測定装置)を測定することによって評価し、呼吸速度および心拍数もまた測定する。次いで、動物を屠殺し、左肺は、全コラーゲン含有量のために処理し(Sircolアッセイ)、右肺は、10%ホルマリン中に固定し、切片にし、Sirius Redおよびヘマトキシリンおよびエオシンを用いて染色して、コラーゲン沈着を評価する。

【0229】

50

試験群 2 : 投薬量の調整

試験 1 日目に、S A P および C R P の両方についての血清濃度を決定する。1 日目に決定した比は、実施例 1 において確定した目標比に達するために必要とされる S A P の用量を計算するために使用する。計算した用量は、2 日目に投与する。3 日目に、S A P および C R P の両方についての血清濃度を決定する。投薬量は、2 日目に決定した濃度に基づいて調整する。4 日目に、調整した投薬量を投与する。これらのステップを繰り返す (5、7、および 9 日目に血清濃度を測定 ; 6、8、および 10 日目に、調整した投薬量を投与)。治療群のラットに、1.3 ml / kg の薬用量の S A P を尾部静脈を介して静脈内に投薬する。未治療ラットに、1.3 ml / kg の生理食塩水を投薬する。14 日目に、肺機能は、血液酸素飽和度 (パルスオキシメトリー) および / または P O₂ (血液ガス測定装置) を測定することによって評価し、呼吸速度および心拍数もまた測定する。次いで、動物を屠殺し、左肺は、全コラーゲン含有量のために処理し (S i r c o l アッセイ)、右肺は、10%ホルマリン中に固定し、切片にし、S i r i u s R e d およびヘマトキシリンおよびエオシンを用いて染色して、コラーゲン沈着を評価する。

10

【0230】

参照 :

C o r t i j o からの Attenuation by oral N - a c e t y l c y s t e i n o f b l e o m y c i n - i n d u c e d l u n g i n j u r y i n r a t s . E u r R e s p i r J 17 巻 : 1228 ~ 1235 頁、2001 年。

20

【0231】

(i i) 肝線維症、四塩化炭素投与

肝線維症を、重さが 200 ~ 225 グラムであるオス W i s t a r ラットにおいて生じさせる。0 日目に、ラットは、オリーブ油中の C C l₄ の胃内用量を受ける (0.08 ml C C l₄ / オリーブ油 ml ; 412 mg C C l₄ / kg の初回用量) またはオリーブ油のみ (コントロール)。ラットは、試験の期間、1 週間に 2 回、C C l₄ を投薬し、毎週の用量は、死亡率を低下させるために、体重変化に基づいて調整する。

【0232】

試験群 1

試験 1 日目に、S A P および C R P の両方についての血清濃度を決定する。1 日目に決定した比は、実施例 1 において確定した目標比に達するために必要とされる S A P の用量を計算するために使用する。計算した用量を、2 日目に開始して、一日おきに投与する。治療群のラットに、2 ~ 10 ml / kg の薬用量の S A P を尾部静脈を介して静脈内に投薬する。未治療ラットに、2 ~ 10 ml / kg の生理食塩水を投薬する。

30

【0233】

24 日目に、ラットを屠殺し、体および肝臓の重量を評価し、肝臓組織を分析のために収集する。全コラーゲン含有量は、S i r c o l アッセイを用いて測定し、コラーゲン沈着は、M a s s o n t r i c h r o m e、ヘマトキシリンおよびエオシン、ならびに S i r i u s r e d 染色を用いて測定する。筋線維芽細胞活性化は、- S M A について免疫染色することによって決定する。

40

【0234】

試験群 2 : 投薬量の調整

試験 1 日目に、S A P および C R P の両方についての血清濃度を決定する。1 日目に決定した比は、実施例 1 において確定した目標比に達するために必要とされる S A P の用量を計算するために使用する。計算した用量は、2 日目に投与する。3 日目に、S A P および C R P の両方についての血清濃度を決定する。投薬量は、2 日目に決定した濃度に基づいて調整する。4 日目に、調整した投薬量を投与する。これらのステップを繰り返す (奇数の日に血清濃度を測定 ; 偶数の日に、調整した投薬量を投与)。治療群のラットに、2 ~ 10 ml / kg の薬用量の S A P を尾部静脈を介して静脈内に投薬する。未治療ラットに、2 ~ 10 ml / kg の生理食塩水を投薬する。

50

【0235】

24日目に、ラットを屠殺し、体および肝臓の重量を評価し、肝臓組織を分析のために収集する。全コラーゲン含有量は、Sircolアッセイを用いて測定し、コラーゲン沈着は、Masson trichrome、ヘマトキシリンおよびエオシン、ならびにSirius red染色を用いて測定する。筋線維芽細胞活性化は、 α -SMAについて免疫染色することによって決定する。

【0236】

参照：

Parsons CJら Antifibrotic effects of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 antibody on established liver fibrosis in rats. Hepatology 40巻：1106～1115頁、2004年。

Rivera CAら Attenuation of CCl₄-induced hepatic fibrosis by GdCl₃ treatment or dietary glycine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 281巻：G200～G207頁、2001年。

【0237】

(iii) 肝線維症、胆管結紮

肝臓傷害は、0日目の、総胆管の結紮によって成体オスラットにおいて誘発する。

【0238】

試験群1

試験1日目に、SAPおよびCRPの両方についての血清濃度を決定する。1日目に決定した比は、実施例1において確定した目標比に達するために必要とされるSAPの用量を計算するために使用する。計算した用量を、2日目に開始して、一日おきに投与する。治療群のラットに、2～10ml/kgの薬用量のSAPを尾部静脈を介して静脈内に投薬する。未治療ラットに、2～10ml/kgの生理食塩水を投薬する。

【0239】

14日目に、ラットを屠殺し、体および肝臓の重量を評価し、肝臓組織を分析のために収集する。全コラーゲン含有量は、Sircolアッセイを用いて測定し、コラーゲン沈着は、Masson trichrome、ヘマトキシリンおよびエオシン、ならびにSirius red染色を用いて測定する。筋線維芽細胞活性化は、 α -SMAについて免疫染色することによって決定する。

【0240】

試験群2：投薬量の調整

試験1日目に、SAPおよびCRPの両方についての血清濃度を決定する。1日目に決定した比は、実施例1において確定した目標比に達するために必要とされるSAPの用量を計算するために使用する。計算した用量は、2日目に投与する。3日目に、SAPおよびCRPの両方についての血清濃度を決定する。投薬量は、2日目に決定した濃度に基づいて調整する。4日目に、調整した投薬量を投与する。これらのステップを繰り返す（奇数の日に血清濃度を測定；偶数の日に、調整した投薬量を投与）。治療群のラットに、2～10ml/kgの薬用量のSAPを尾部静脈を介して静脈内に投薬する。未治療ラットに、2～10ml/kgの生理食塩水を投薬する。

【0241】

14日目に、ラットを屠殺し、体および肝臓の重量を評価し、肝臓組織を分析のために収集する。全コラーゲン含有量は、Sircolアッセイを用いて測定し、コラーゲン沈着は、Masson trichrome、ヘマトキシリンおよびエオシン、ならびにSirius red染色を用いて測定する。筋線維芽細胞活性化は、 α -SMAについて免疫染色することによって決定する。

【0242】

参照：

10

20

30

40

50

Kisseleva T Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. J Hepatology 45巻: 429~438頁、2006年。

Hellerbrand C Expression of intracellular adhesion molecule 1 by activated hepatic stellate cells. Hepatology 24巻: 670~676頁、1996年。

Tramas EG、Symeonidis A. Morphologic and functional changes in the livers of rats after ligation and excision of the common bile duct. Am J Pathol 33巻: 13~27頁、1957年。

10

【0243】

(i) 片側尿管閉塞

腎線維症を、片側尿管閉塞によって、成体オスSprague Dawleyラット(5~7週; 200グラム)において誘発する。1本の4-0絹縫合糸を、腎臓のできるだけ近くに、左尿管のまわりにしっかりと結び、右腎臓は、非閉塞コントロールとして使用する。

【0244】

試験群1

試験1日目に、SAPおよびCRPの両方についての血清濃度を決定する。1日目に決定した比は、実施例1において確定した目標比に達するために必要とされるSAPの用量を計算するために使用する。計算した用量を、2、4、6、8、および10日目に投与する。治療群のラットに、2~10ml/kgの薬用量のSAPを尾部静脈を介して静脈内に投薬する。未治療ラットに、2~10ml/kgの生理食塩水を投薬する。

20

【0245】

ラットは、7日目または14日目に屠殺し、左および右腎臓の両方を摘出し、秤量し、組織学的検査のためにホルマリン中に固定した。組織損傷ならびに線維化は、ヘマトキシリンおよびエオシンならびにSirius red染色(コラーゲン)ならびに平滑筋アクチン(-SMA)についての免疫組織化学的検査によって評価する。組織線維細胞は、CD34+/CD45+細胞について免疫染色することによって定量する。

30

【0246】

試験群2: 投薬量の調整

試験1日目に、SAPおよびCRPの両方についての血清濃度を決定する。1日目に決定した比は、実施例1において確定した目標比に達するために必要とされるSAPの用量を計算するために使用する。計算した用量は、2日目に投与する。3日目に、SAPおよびCRPの両方についての血清濃度を決定する。投薬量は、2日目に決定した濃度に基づいて調整する。4日目に、調整した投薬量を投与する。これらのステップを繰り返す(奇数の日に血清濃度を測定; 偶数の日に、調整した投薬量を投与)。治療群のラットに、2~10ml/kgの薬用量のSAPを尾部静脈を介して静脈内に投薬する。未治療ラットに、2~10ml/kgの生理食塩水を投薬する。

40

【0247】

ラットは、7日目または14日目に屠殺し、左および右腎臓の両方を摘出し、秤量し、組織学的検査のためにホルマリン中に固定した。組織損傷ならびに線維化は、ヘマトキシリンおよびエオシンならびにSirius red染色(コラーゲン)ならびに平滑筋アクチン(-SMA)についての免疫組織化学的検査によって評価する。組織線維細胞は、CD34+/CD45+細胞について免疫染色することによって定量する。

【0248】

参照:

50

El Chaar M、Chen J、Seshan SV、Jha S、Richardson I、Ledbetter SR、Vaughan ED, Jr.、Poppas DP、およびFelsen D. Effect of combination therapy with enalapril and the TGF- β antagonist 1D11 in unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* 292巻：F1291~1301頁、2007年。

Wu MJ、Wen MC、Chiu YT、Chiou YY、Shu KH、およびTang MJ. Rapamycin attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Kidney Int* 69巻：2029~2036頁、2006年。

10

【0249】

(実施例3) ヒト心血管疾患におけるSAP/CRP比

近年公開された臨床試験において、循環SAP濃度は、Cardiovascular Health Study (CHS)からの高齢者において準臨床的および臨床的心血管疾患(CVD)を有する患者において測定された(Jennyら2007年 *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27巻：352~358頁)。年齢、性別、および民族性について調整したCox回帰モデルにおいて、SAPの標準偏差増加は、発作またはCVD死亡ではなく、アンギナおよびMIと関連していた。しかしながら、この試験において、SAP対CRPの比の決定は、行われなかった。発明者らは、この試験に含まれたそれぞれの患者においてSAP/CRP比を決定するためにデータの予測分析を行い、次いで、疾患発生率とのこの比の関連を決定した(表2)。発作、CVD死亡、およびすべての死亡を有する患者において、コントロールと比較して、より低いSAP/CRP比の統計的に有意な関連があった。重要なことには、これらの関連は、SAP自体を分析した場合に、もとの公開された試験において認識されなかった。

20

【0250】

【表2】

表2

	平均(SD)SAP/CRP	P-値 (対コントロール)	N
コントロール	24.83 (23.85)	-	786
アンギナ	23.38 (22.47)	0.074	523
MI	22.58 (22.32)	0.176	308
発作	21.25 (20.08)	0.026	323
CVD死亡	18.83 (16.18)	<0.001	288
すべての死亡	21.29(20.49)	0.007	685

30

(実施例4) FcRに対するSAPおよびCRPの相対的な結合の決定

40

発明者らは、SAPおよびCRPの両方へのFc受容体の様々なサブタイプの結合を特徴づけ、比較し、SAPまたはCRPについてそれぞれの選択性を決定し、SAPおよびCRPの両方にわたる結合について、特異的なFc受容体サブタイプの順位をつけた。発明者らのデータは、SAP結合Fc受容体の特徴づけ、SAPおよびCRPの結合を比較し、様々なFc受容体に対するそれらの親和性の差異についての情報を提供する生化学的結合分析の第1のセットを示す。結果は、血漿または血清中のSAP/CRP比の変化の、可能性として考えられる効果の理解に向けた有用な情報を提供する。

【0251】

発明者らは、表面プラズモン共鳴技術を使用して、Fc受容体へのペントラキシンSAPおよびCRPの結合を同定し、定量するための方法を確立した。表面プラズモン共鳴

50

技術は、表面プラズモン共鳴の変化として検出される、チップの表面の質量の変化を通して、2つのタンパク質の間の結合および解離の事象を検出し、定量する。これらの試験のために、発明者らは、Biacore X100機器を使用した。

【0252】

SAPを、チップの試験フローセルの表面に結合し、Fc 受容体の可溶性組換え形態 (sFc R) をチップの表面にわたって流し、接触または結合の段階を示した。次いで、緩衝液をチップ表面にわたって流し、解離段階を示した。時間との、表面プラズモン共鳴ユニット (RU) の変化として検出される時間に対する細胞表面での質量における変化を、センサーグラムと呼ばれるグラフによって示した。Biacore CM5チップのCM5デキストラン表面へのSAPの結合は、ランニング緩衝液としての10mM Hepes、150mM NaCl、0.5mM CaCl₂、pH 7.4の存在下において実行した。SAPの結合は、SAP上の、提示が制限されるアミン基含有アミノ酸を、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドおよびN-ヒドロキシサクシンイミドを用いて活性化したチップ表面上の基に共有結合するアミン共役 (Biacore 試薬) を使用して、非常に短い固定によって安定させた。ネガティブコントロールフローセルは、SAPと同じレベルまでヒト血清アルブミンを固定するために、同じアミン共役手順を使用して調製した。このフローセルへのあらゆる結合は、非特異的結合と考え、試験フローセル結合結果から減算した。可溶性Fc Rタンパク質は、受容体の完全長膜結合形態の細胞外領域を提示し、C末端に、6~10個のヒスチジンのポリヒスチジン尾部を持っていた。5つまでの異なる濃度の可溶性Fc Rを、10mM Hepes、150mM NaCl、0.5mM CaCl₂、pH 7.4を含有するランニング緩衝液を使用して、Biacoreチップの試験フローセルおよびネガティブコントロールフローセルの両方の表面にわたって流した。表面での表面プラズモン共鳴変化は、SAPへのsFc R結合およびSAPからの解離の結合キネティクスを評価するために使用した。ネガティブコントロールフローセル結合結果を使用して、あらゆる非特異的結合を減算すると同様に、シグナルの微量の試験フローセル特異的変動を、試験ランの直前に実行した、いくつかの緩衝液ブランクランの最後の試験フローセルから得たシグナルを使用して、減算した。結合および解離の速度定数、 K_a および K_d は、それぞれ、結合モデルに基づいて、キネティックフィッティング法を通して決定し、SAPへのsFc Rの結合のキネティクスを定義するために使用した。比 K_d / K_a を計算し、Fc 受容体およびSAPの間の結合の親和性 (K_D) を確定するために使用した。発明者らは、SAPからのsFc Rの解離が、非常に遅く、この密接な結合の結果として、他の結合事象を評価するためにチップ表面を再生し、SAP活性を保持することができないことが分かったので、発明者らは、Biacoreによって定義されるような単一サイクルキネティクス方法論およびこの方法に関連するキネティクス評価を使用した。評価には、異なる受容体濃度のサイクルの間の不完全なチップ表面再生に適応し、発明者らが、単一のランから K_a 、 K_d 、および K_D を得るために、5つの異なる受容体濃度を使用することを可能にしたアルゴリズムを適用する。

【0253】

同様の方法は、CRPおよびsFc Rの間の結合相互作用を評価するために使用し、詳細は、ここで述べられる場合以外は、同じである。Biacore CM5チップへのCRPの結合は、PC-KLH (ホスホコリン-キーホールリンペットヘモシニアン抱合体) を介しての捕捉を通して達成した。手短かに言えば、PC-KLHは、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドおよびN-ヒドロキシサクシンイミドを用いて活性化したチップ表面上でアミン共役を通してCM5チップ上に固定した。ネガティブコントロールフローセルは、PC-KLHと同じレベルまでヒト血清アルブミンを固定するために、同じアミン共役を使用して調製した。CM5チップ上に固定したPC-KLHのPC部分へのCRPの結合は、所望の量の結合CRPを達成するために、10mM Hepes、150mM NaCl、0.5mM CaCl₂、pH 7.4中でCRPとCM5チップの表面を接触させることによって達成した。発明者らは、これを、

同じ条件およびランニング緩衝液として同じ10 mM Hepes、150 mM NaCl、0.5 mM CaCl₂、pH 7.4を使用して異なるフローセル上で試みた場合に、同じレベルまで固定したKLHに結合しないことが明らかであったので、結合が、PC-KLH中のPC部分に対して特異的であることを確認した。PC-KLHへのCRPの結合は、アミン共役を使用して、非常に短い固定によって安定させた。発明者らは、CRPからのsFcRの解離が、比較的速く、ランニング緩衝液中で、解離段階の間にチップ表面を完全に再生することが可能であることが分かったので、「再生した」CRPは、sFcRを再結合させるのに際して完全な活性を保持した。この理由で、発明者らは、Biacoreによって定義されるようなマルチサイクルキネティクス方法論およびこの方法に関連するキネティクス評価を使用し、これに、異なる受容体濃度のサイクルの間の、完全なチップ表面再生を必要とするアルゴリズムを適用する。発明者らは、単一マルチサイクル評価からK_Dを得るために5つの異なる受容体濃度を使用した。

10

【0254】

発明者らは、結合が、Ca²⁺の非存在下において生じず、Ca²⁺の存在下において結合したSAPを、10 mM EDTAを用いて容易に除去することができたので、チップ表面上のCM5デキストランへのSAPの結合がCa²⁺依存的事であることを実証した。発明者らは、SAPが、FcRI、FcRIIA(H131変異体)、およびFcRIIBに結合することができるが、FcRIIBに結合することができないことが分かった。結合が生じた場合、オン速度(K_aによって示される)は高く、オフ速度(K_dによって示される)は低かった。表3は、K_d/K_aの比として計算される、それぞれの相互作用についての親和性(K_D)を示す。FcRI、FcRIIA(H131変異体)、およびFcRIIBに対するSAPの親和性は、タンパク質/タンパク質相互作用についての親和性を示すための、当技術分野において知られている親和性の正常範囲と比較して、すべて高く、FcRIIAおよびFcRIIBに対するIgGについて報告されたものよりも高く、FcRIに対するIgGと同様の範囲にある(Gessner JEら、Ann Hematol 76巻: 231頁(1998年))。そのため、SAPは、高い親和性で、ほとんどのFcRに結合することができるが、それは、おそらく、FcR2Aクラスを受容体に優先的に結合するであろう。FcRIIBへのSAPの結合の、代表的なセンサーグラムを図4に示す、また、これは、5つの異なる、経時的に送達した受容体濃度の結合段階または接触段階および解離段階についてのデータを示す。

20

30

【0255】

【表3】

表3 SAPへのsFcγR結合についての親和性

FcγR	K _{D(M)}
FcγR1	5 × 10 ⁻⁹
FcγRIIA(H131)	1.7 × 10 ⁻¹⁰
FcγRIIB	結合なし
FcγRIIB	4 × 10 ⁻¹⁰

40

発明者らは、結合が、Ca²⁺の非存在下において生じず、Ca²⁺の存在下において結合したCRPを、10 mM EDTAを用いて容易に除去することができたので、チップ表面上のPC-KLHのPC部分へのCRPの結合がCa²⁺依存的事であることを実証した。発明者らは、CRPもまた、FcRI、FcRIIA(H131変異体)、およびFcRIIBに結合することができるが、FcRIIBに結合することができず、この意味において、これらの異なるFcRに対する特異性が、SAPと同じであることが分かった。結合が生じた場合、オン速度は高く、オフ速度もまた、SAPとは対照的に、高く、ベースラインに素早く戻った。定性的に、発明者らは、いずれのこれらのFcR受容体に対しても、SAPよりもCRPの親和性が非常に低く、これは、主に、オ

50

フ速度によって推進されることが分かった。これらのデータは、SAP/CRPの比が著しく低下しない限り、SAPが、FcRへの結合についてCRPと有効に競合するであろうということを暗示する。

【0256】

CRPによるFcRの結合のさらなる特徴もまた観察し、CRPの生物学的現象およびSAP/CRP比あたりの生物学的現象に関連すると考えられ、相互作用分析の接触または結合段階の間に、結合受容体の実際の質量は、時間と共に減少し、受容体が一度、結合すると、この段階の間に、CRPへの受容体分子の再結合または最初の結合についての親和性を減少させる高次構造の変化が結果として生じることを暗示した。この効果は、五量体分子内の1を超える、5つまでのCRPプロトマー上の結合部位の、受容体による占有の増加についての可能性が存在する場合、受容体濃度の増加と共に増加した。代表的なセンサーグラムを、CRP(CM5チップ上のPC-KLHに結合)に対するFcRI結合について図5(A)におよびCRP(CM5チップ上のPC-KLHに結合)に対するFcRIIB結合について図5(B)に示す。

10

【0257】

この効果の存在は、sFcRへのCRP結合を正確に定量するための標準的な方法の適用を妨げた。しかしながら、受容体は、完全に解離する(ベースラインに戻る)ことができ、たとえば $0.444 \mu\text{M}$ sFcRIを使用する、重複分析で見られるように、同じ程度までの等価量の受容体の再結合は、影響を与えられないので、効果は、完全に可逆的である。CRPへのFcRIおよびFcRIIBの結合の早いオン速度は、接触段階における初期のほぼ定常な状態の達成を可能にし、それでもなお、発明者らの、初期の結合段階データのみを使用する、親和性についてのおよその読み取りを可能にした。受容体濃度に対する $R_{e,q}$ (平衡時の応答)の代表的なプロットを、FcRIへのCRPの結合について図6(A)におよびFcRIIBへのCRPの結合について図6(B)に示す。

20

【0258】

定性的に、曲線が、表面上、飽和に決して接近しないが(R_{max} (飽和に達した最大の応答)は、約 $100 \times K_D$ 以上で理論的に達する)、多くの濃度の、使用した受容体が、FcRIまたはFcRIIBに対するSAPの $100 \times K_D$ を超えたので、FcRIおよびFcRIIBに対するCRPの親和性がSAPの親和性未満であることは明確である。図6におけるそれぞれのグラフの垂直線は、得られたおよその親和性(K_D)を示すが、これは、親和性のおよその指標としてのみ採用されるべきである。FcRIと同じ濃度範囲にわたって評価した場合、同じチップ上のCRPに結合することができた全FcRIIBはより少なく(図5(A))、たとえオン速度もまた急速であったとしても、FcRI(図5(B))と比較して、CRPに対するFcRIIBの親和性がより低いことを示す。これは、受容体濃度に対する $R_{e,q}$ (平衡時の応答)のプロット(AおよびB)の比較によって支持される(図6)。FcRIIA(H131)もまた同じ濃度範囲にわたって試験した場合、同じチップ上のCRPに結合することができたFcRIIA(H131)は、相当に、より少なく、なおまた同様のオン速度が見られた。異なるチップ上で、CRPに結合することができた全FcRIIA(R131)は、同じ濃度のFcRI(同じ条件)を使用して観察されたものよりも少なかった。この同じチップ上で、同じ条件および濃度下でFcRIIA(R131)およびFcRIIBについて達成された結合レベルは同様であった。FcRIIA(R131)の結合は、用量依存的であった。これは、CRPに結合する、ここで試験した4つのFcR受容体のうち、FcRIIA(H131)が最も低い親和性を有することを暗示し、これは、文献における細胞ベースの試験において報告されたデータと一致し、これは、FcRIIA(H131)へのCRPの結合が、非常に低い親和性によるものであり、FcRIIA(R131)へのCRPの結合よりも低いことを実証する(Stein M-Pら、J. Clin. Invest. 105巻: 369頁(2000年))。

30

40

【0259】

50

本明細書において試験したFc RへのSAPおよびCRPの結合についての親和性の順位：Fc RIIA(H131)/SAP > Fc RIIIB/SAP > Fc RI/SAP >> Fc RI/CRP > Fc RIIIB/CRP ~ Fc RIIA(R131) >> Fc RIIA(H131)/CRP、Fc RIIIBに対して検出可能なSAPまたはCRPの結合なし。

【0260】

Fc RIIA(H131)およびFc RIIIBに対する、SAPおよびCRPの親和性を比較する際に、SAPの親和性が、Fc RIIA(H131)およびFc RIIIBに対するCRP結合の親和性よりも1000倍大きいことは明らかである。ヒト血清において、SAPレベルは、20~40 μg/mlまたは $1.5 \sim 3 \times 10^{-7}$ Mの範囲で全く一定のままである。Fc RIIA(H131)およびFc RIIIBに対するSAP結合について発明者らが得た親和性は、低い 10^{-10} Mの範囲にある。したがって、SAPは、競合する結合の非存在下において、これらの受容体に飽和まで結合することができ、Fc Rに結合するSAPおよびCRPについての発明者らの現在の理解の中で、CRPは、CRPレベルの正常な血漿範囲で競合的ではないであろう。Fc RIについては、SAPの親和性は、CRPよりも高いが、CRPが、1 mg/mlに接近し得る血漿中で増加する場合、おそらく競合が生じるであろう。Fc RIIIBへのSAPまたはCRPの結合の不足は、これが、Fc Rを通して媒介される活性化ITAMシグナル伝達を調節すると考えられる、細胞における完全長膜貫通形態において阻害ITIMシグナル伝達経路を通してシグナル伝達する唯一の受容体であるので、SAPおよびCRPの両方の生物学的現象に関連する(Nimmerjahn FおよびRavetch J V. *Immunity* 24巻: 19頁(2006年))。したがって、Fc Rを通してのIgGシグナル伝達とは対照的に、Fc Rを通してのSAPおよびCRPのシグナル伝達は、活性化シグナル伝達受容体および阻害シグナル伝達受容体のバランスによってではなく、オーバーラップする受容体プールに対するSAPおよびCRPの競合的結合を通して調節されるように思われる。

10

20

【0261】

(実施例5)線維細胞成長のCRP媒介性の増強は、Fc RIIa-R131対立遺伝子に依存する。

【0262】

Fc RIIA遺伝子型同定

ゲノムDNAは、Flexigene DNA抽出キット(Qiagen, Valencia Ca)を使用して、ヒトPBMCから抽出した。PCR遺伝子型同定については、特異的センスプライマーは、Fc RII H131およびFc RII H131の第2の細胞外ドメインにおけるヌクレオチドの差異に従って設計し、遺伝子型同定のためのセンスプライマーは、配列番号8および配列番号9によってそれぞれ示す。アンチセンスプライマーは、下流のイントロン配列(配列番号10)に従って設計した。これにより253 bp PCR断片がもたらされる。Phusion High-fidelity PCRキットは、New England Biolabs(Ipswich, A)から購入し、PCR反応溶液は、1×Phusion HF緩衝液、10 mM dNTP、0.1 μgゲノムDNA、それぞれの方向の0.5 mMプライマー、および0.5 μl DNAポリメラーゼを含有する。使用した熱サイクルは、1分間98 °Cを1サイクル、10秒間98 °C、20秒間60 °C、および15秒間72 °Cを30サイクル、5分間72 °Cを1サイクルとした。増幅PCR産物は、2%アガロースゲル上で分離した図7。図において示されるように、R/R(G/G)遺伝子型は、センスプライマーとしてR131のレーンにおいてバンドを示すのみであり、H/H(A/A)遺伝子型は、センスプライマーとしてH131のレーンにおいてバンドを示すのみであるのに対して、H/R遺伝子型は、両方のレーンにおいてバンドを示す。

30

40

【0263】

(1) Flesch BK, Bauer F, Neppert J. *Rapid t*

50

yping of the human Fc gamma receptor IIA polymorphism by polymerase chain reaction amplification with allele-specific primers. Transfusion. 1998年、38巻(2号): 174~6頁。

【0264】

異なるFc RIIa多型を発現する単球を用いる線維細胞アッセイにおけるSAPおよびCRPの活性

線維細胞アッセイは、ドナー1(R/Rホモ接合性)、ドナー2(H/Hホモ接合性)、またはドナー3(H/Rヘテロ接合性)を使用して、実施例1において記載されるよう実行した。線維細胞アッセイは、ドナー単球の線維細胞応答性を増加させるMCSFの存在下または非存在下において実行した。図8Aにおいて見られるように、R131/R131ホモ接合性のドナー1は、線維細胞分化を阻害するためのSAPの能力に対抗する時の最も大きなCRP応答性を実証した。ドナー1については、わずか5ug/mlのCRPが1~2ug/mlのSAPに対抗するのに必要であった。より高い濃度のCRPにより、このドナーのCRP受容体を飽和し、架橋の低下に至り、それによって、その効果を打ち消した。これらのデータは、CRPに対するFcγRII-R131の、報告された、より高い結合活性と十分に相関する。対照的に、H131/H131ホモ接合性のドナー2は、線維細胞分化を阻害するためのSAPの能力に対抗するCRPの能力の著しい低下を実証した図8B。ドナー2については、40ug/mlのCRPが2ug/mlのSAPに対抗するのに必要であり、MCSFなしの培地における線維細胞成長の刺激に対してほとんど影響を及ぼさず、CRPに結合するためのFcγRII-H131の能力の低下と一致した。最後に、R131/H131ヘテロ接合性のドナー3は、MCSFなしの培地における線維細胞分化のCRP依存性で、用量応答性の刺激を実証した(図8C)。これらの結果は、SAPが、CRP駆動性の線維性活性に及ぼす相対的な影響を決定する際に役割を果たすFcγRII-131の多型と一致している。

10

20

【0265】

配列表

配列番号1 ヒト血清アミロイドタンパク質P

【0266】

【数1】

HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIPTLEKPLQNFTLCFRAYS DLSRAYS LFSYNTQGRDNE
LLVYKERVGEYS LYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSSGIAEFWINGTPLVKKGLR
QGYFVEAQP KIVLGQEQDSYGGKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGTPLP
ANILDWQALNYEIRGYVVIKPLVWV

30

配列番号2 Gallus gallus 血清アミロイドタンパク質P

【0267】

【数2】

QEDLYRKVFVFPREDPSDAYVLLQVQLERPLLNFTVCLRSYTDLTRPHSLFSYATKAQDN
EILLFKPKPGYRFYVGGKYVTFRVPENRGEWEHVCASWESGSGIAEFWLN GRPWPRK
GLQKGYEVGNEAVVMLGQEQDAYGGGFDVYNSFTGEMADVHLWDAGLSPDKM RSA
YLALRLPPAPLAWGRLRYEAKGDVVVKPRLREALGA

40

配列番号3 Bos taurus 血清アミロイドタンパク質P

【0268】

【数 3】

QTDLRGKVFVFPRESSTDHVTLITKLEKPLKNLTLCLRAYSDLSRGYSLFSYNIHSDKNE
 LLVFKNGIGEYSLYIGKTKVTVRATEKFPSPVHICTSWESSTGIAEFWINGKPLVKRGLK
 QGYAVGAHPKIVLGQEQDSYGGGFDKNQSFMGEIGDLYMWDSVLSPEEILLVYQGSSSI
 SPTILDWQALKYEIKGYVIVKPMVWG

配列番号 4 *Cricetulus migratorius* 血清アミロイドタンパク質
 P

【0 2 6 9】

10

【数 4】

QTDLTGKVFVFPRESESDYVKLIPRLEKPLENFTLCFRITYDLSRPHSLFSYNTKNKDNE
 LLIYKERMGEYGLYIENVGAIVRGVEEFASPVHFCTSWESSSGIADFWVNGIPWVKKGL
 KKGYTVKTQPSIILGQEQDNYGGGFDKSQSFVGMGDLNMWDSVLTPEEIKSVYEGSW
 LEPNILDWRALNYEMSGYAVIRPRVWH

配列番号 5 ヒト Fc R I I A (N M _ 0 2 1 6 4 2)

【0 2 7 0】

20

【数 5】

1 gtctcttaa acccactgga cggtggcaca gtgctgggat gactatggag acccaaatgt
 61 ctcagaatgt atgtcccaga aacctgtggc tgcctcaacc attgacagtt ttgctgctgc
 121 tggtcttgc agacagtcaa gctgctcccc caaaggctgt gctgaaactt gagccccctg
 181 ggatcaactg gctccaggag gactctgtga ctctgacatg ccaggggct cgcagccctg
 241 agagcgactc cattcagtggt ttccacaatg ggaatctcat tcccaccac acgcagccca
 301 gctacaggtt caaggccaac aacaatgaca gcggggagta cacgtgccag actggccaga
 361 ccagcctcag cgacctgtg catctgactg tgctttccga atggctggtg ctccagacc
 421 ctacactgga gtccaggag ggagaaacca tcatgctgag gtgccacagc tggaaggaca
 481 agcctctggt caaggtcaca ttctccaga atggaaaac ccagaaattc tcccatttgg
 541 atcccactt ctccatcca caagcaaacc acagtcacag tggtgattac cactgcacag
 601 gaaacatagg ctacacgctg ttctcatcca agcctgtgac catcactgtc caagtgccca
 661 gcatgggcag ctctcacca atggggatca ttgtggctgt ggtcattgcg actgctgtag
 721 cagccattgt tgctgctgta gtggccttga tctactgcag gaaaagcgg atttcagcca

30

【0 2 7 1】

【数 6】

781 attccactga tcctgtgaag gctgcccaat ttgagccacc tggacgtcaa atgattgcc
 841 tcagaaagag acaacttgaa gaaaccaaca atgactatga aacagctgac ggcggctaca
 901 tgactctgaa cccagggca cctactgacg atgataaaaa catctacctg actcttcctc
 961 ccaacgacca tgcaacagt aataactaaa gagtaacgtt atgccatgtg gtcatactct
 1021 cagcttgctg agtggatgac aaaagaggg gaattgttaa aggaaaatti aatggagac
 1081 tggaaaaate ctgagcaaac aaaaccacct ggcccttaga aatagcttta actttgctta
 1141 aactacaaac acaagcaaaa ctccacgggg tcatactaca tacaagcata agcaaaactt
 1201 aacttgatc atttctgga aatgcttatg ttagaaataa gacaaccca gccaatcaca
 1261 agcagcctac taacatataa ttaggtgact agggacttcc taagaagata cctaccccca
 1321 aaaaacaatt atgtaattga aaaccaaccg attgccttta tttgcttcc acatttccc
 1381 aataaatact tgctgtgac attttgccac tggaaacta aacttcatga attgcgcctc
 1441 agattttcc titaacatct tttttttt tgacagagtc tcaatctgtt acccaggtg
 1501 gagtgcagtg gtgctatctt ggctcactgc aaaccgcct cccaggttta agcgattctc
 1561 atgcctcagc ctccagtag ctgggattag aggcattgac catcataccc agctaattt
 1621 tgtattttt tttttttt ttagtagag acagggttc gcaatgttg ccaggccgat
 1681 ctgaaactc tggccttag cgatctgcc gcctcggcct cccaaagtgc tgggatgacc
 1741 agcatcagc ccaatgcca gcctcttaa catctctt cctatgcct ctctgtgat
 1801 ccctactgct ggtttctgc ttctcatgc tgagaacaaa atcacctatt cactgctat
 1861 gcagtcggaa gctccagaag acaaagagc ccaattacca gaaccacatt aagtccat
 1921 tgtttgct tgggattga gaagagaatt agagaggtga ggatctgga tttctggac
 1981 taaatcccc ttgggaaga cgaagggatg ctgcagtcc aaaagagaag gactctcca
 2041 gagtcatcta cctgagtc aaagctcct gtctgaaag ccacagacaa tatgtccca
 2101 aatgactgac tgcacctct gtgcctcagc cgtcttgac atcaagaatc ttctgtcca
 2161 catccacaca gccaatataa ttagtcaaac cactgttatt aacagatga gcaacatgag
 2221 aaacgcttat gtacaggtt acatgagagc aatcatgaa gtctatatga ctccagaat
 2281 gttaaaatag actaacctct aacaacaaat taaaagtgat tgttcaagg tgatgcaatt
 2341 attgatgacc tattttatt ttctataatg atcatatatt acctttgtaa taaacatta
 2401 taacaaaac a

10

20

H 1 3 1 / R 1 3 1 対立遺伝子は、mRNA配列中の位置534～536で太字c a t
 コドンによって定義され、これは、タンパク質におけるこの位置でヒスチジンをコードす
 る。第2の位置(535)が、aではなく、その代わりにgである場合、コドンはc t g

30

配列番号6 ヒトFc RIIA (NP_067674)

【0272】

【数7】

MTMETQMSQNVCPRLWLLQPLTVLLLLASADSQAAPPKAVLKL

EPPWINVLQEDSVTLTCQGARSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYRFKANNNDSGEYT

CQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLQTPHLEFQEGETIMLRCHSWKDKPLVKVTFQNGK

SQKFSHLDPTFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLFSSKPVITITVQVPSMGSSSPMGII

40

VAVVIATAVA AIVAAVVALIYCRKKRISANSTDPVKAAQFEPGRQMIAIRKRQLEET

NNDYETADGGYMTLNPRAPTDDDKNIYLTLPNDHVNSNN

太字アミノ酸はシグナル配列を特定する。

【0273】

R 1 3 1 多型が存在する場合、166位のHはRである。

配列番号7 ヒトFc RIIA (SNP rs1801274)

gnl | dbSNP | rs1801274 | allelePos = 301 | totalL

50

en = 601 | taxid = 9606 | snpclass = 1 | alleles = ' C / T ' | mol = Genomic | build = 129

【 0274 】

【 数 8 】

TCCAAGCTCTGGCCCCTACTTGTGGTCAATACTTAGCCAGGCTTCCACC
CCACTCCTCTTTGCTCCAGTGCCCAATTTTGTCTGCTATGGGCTTTCTCAG
ACCTCCATGTAGGCCCATGTGACCTCAGCCCTTGTCCATCCCCTCTTCTC
CCCTCCCTACATCTTGGCAGACTCCCCATACTTGGACAGTGATGGTCAC
AGGCTTGGATGAGAACAGCGTGTAGCCTATGTTTCCTGTGCAGTGGTAAT
CACCCTGTGACTGTGGTTTGTCTTGTGGGATGGAGAAGGTGGGATCCAAA
Y
GGGAGAATTTCTGGGATTTTCCATTCTGGAAGAATGTGACCTTGACCAGA
GGCTTGTCTTCCAGCTGTGGCACCTCAGCATGATGGTTTCTCCCTCCTG
GAACTCCAGGTGAGGGGTCTGGAGCACCAGCCATTCTGAAAGACACAAAT
ATGATAAGAAAAGTTGTAAGGATAGATTCCAAGGGTTTTTCAGTCTCAG
AGGTACGTTACTCACAGAACTTGACATGATGTCTGGCAGACAGAAATGAA
GATGCTTCATGACAGATGTGAGCATTCTTATAGGCAATATATGGTATT

10

301位のYはC/T多型を示す。

配列番号 8 FC RII H131

5' - ATCCCAGAAATTCTCCCA - 3'

配列番号 9 R131:

5' - ATCCCAGAAATTCTCCCG - 3'

配列番号 10 下流のイントロン配列に対するアンチセンスプライマー

5' - CAATTTTGTCTGCTATGGGC - 3'

【 図 1 】

【 図 3 】

Figure 1

Table with 3 columns: Species (Homo sapiens, Gallus gallus, Bos taurus, C. nigritorius) and 4 rows of amino acid sequences.

【 図 2 】

Figure 2

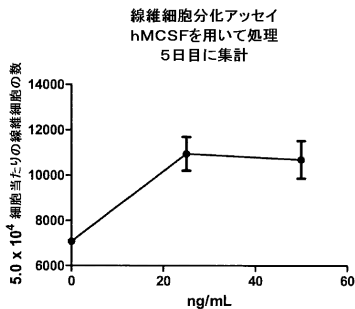
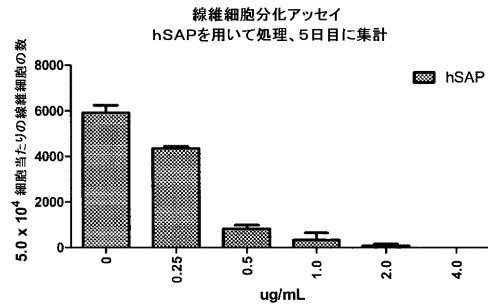
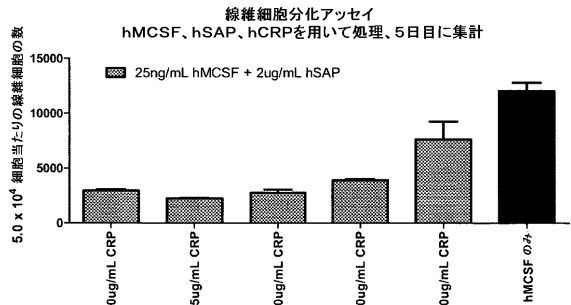


Figure 3

A



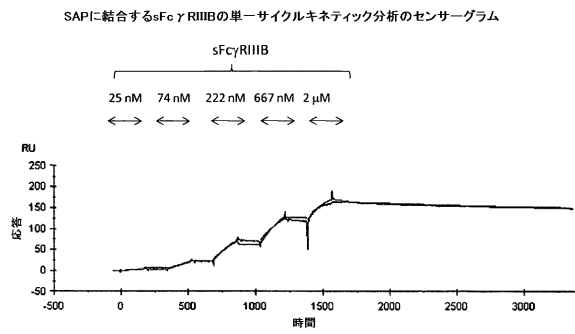
B



20

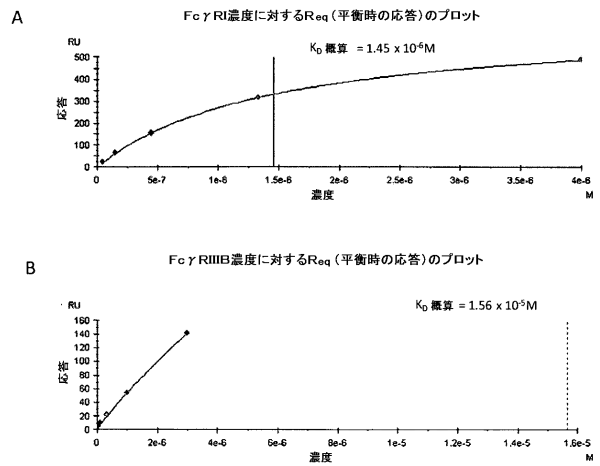
【 図 4 】

Figure 4



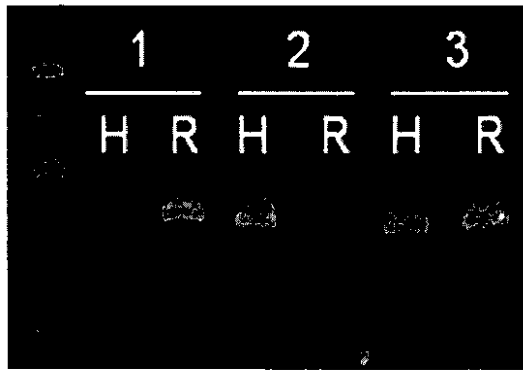
【 図 6 】

Figure 6



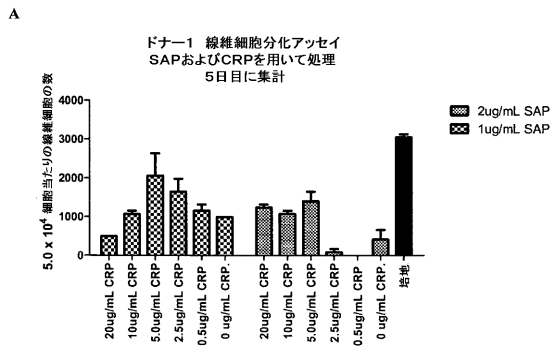
【 図 7 】

Figure 7



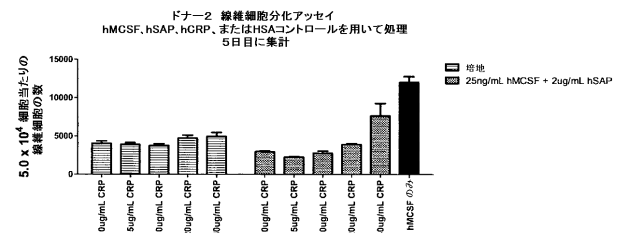
【 図 8 A 】

Figure 8



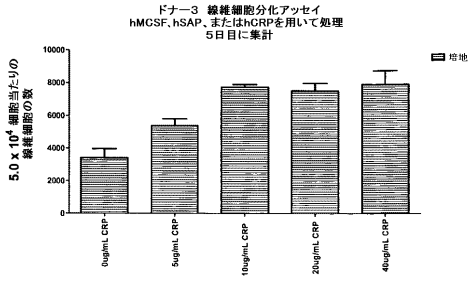
【 図 8 B 】

B



【 図 8 C 】

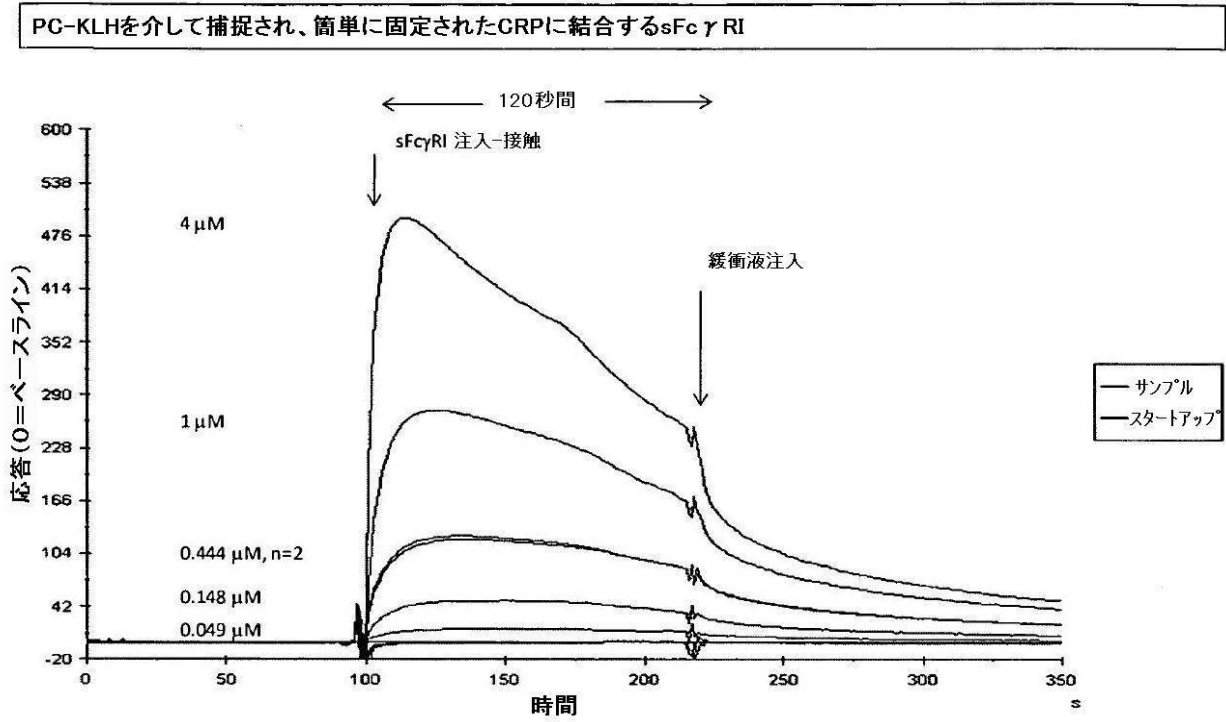
C



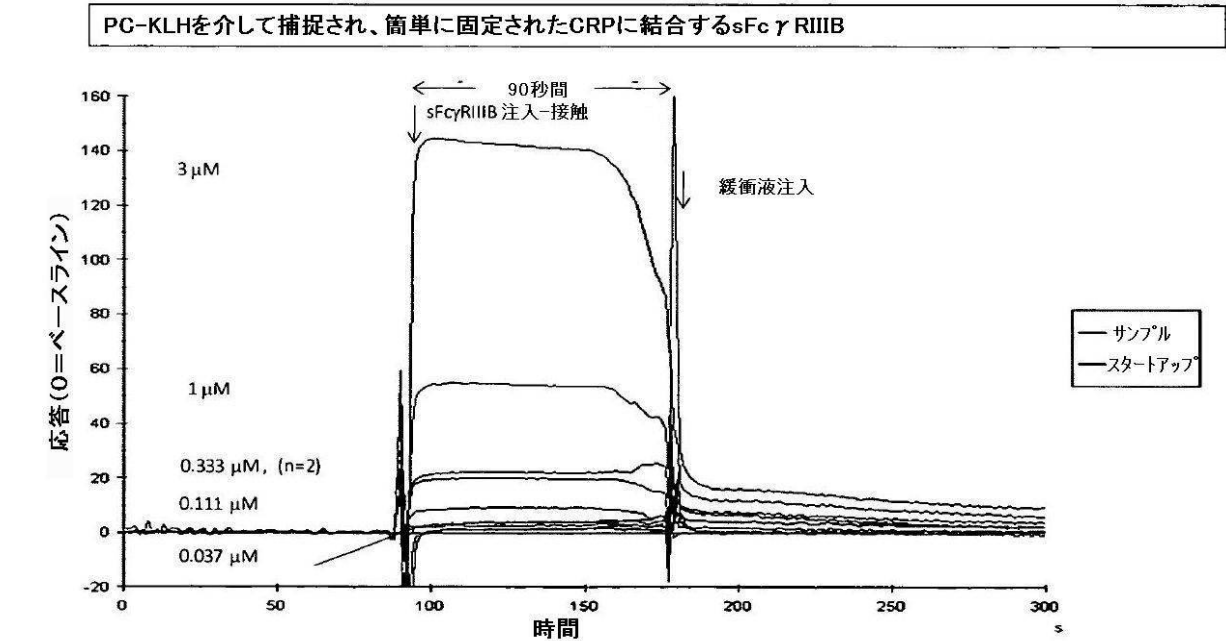
【 図 5 】

Figure 5

A



B



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2008/008315

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K14/47	A61K38/17	A61K39/395 A61K38/39
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2008/070117 A (PROMEDIOR INC [US]; PELURA TIMOTHY J [US]) 12 June 2008 (2008-06-12) whole document esp. pages 2-3, 7, 10-11, 25ff and claims 6, 17-30	1-78
P, Y	PILLING D, ROIFE D, WANG M, RONKAINEN SD, CRAWFORD JR, TRAVIS EL, GOMER RH: "Reduction of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by serum amyloid P" J IMMUNOL, vol. 179, no. 6, 15 September 2007 (2007-09-15), pages 4035-4044, XP002507775 whole document esp pages 4035 and 4042 -/--	1-78.
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 February 2009		Date of mailing of the international search report 11/03/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Brück, Marianne

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/US2008/008315

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/047207 A (AMIRA PHARMACEUTICALS INC [US]; HUTCHINSON JOHN H [US]; PRASIT PETPIBO) 26 April 2007 (2007-04-26) whole document esp. paragraphs [12,52,70,77,78,86,94,96,98,99,126,128,143,153,158,307,308,365] and claims 64,106,128,134 -----	1-78
Y	US 2003/022245 A1 (MILLS RHONDA ANN [US]) 30 January 2003 (2003-01-30) whole document esp paragraphs [10,49,82,136,169,182] and claims 4,5,29 -----	1-78
Y	PILLING D ET AL: "Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 171, no. 10, 15 November 2003 (2003-11-15), pages 5537-5546, XP001180858 ISSN: 0022-1767 whole document esp. pages 5537 and 5544-5545 -----	1-78
Y	CHEN J ET AL: "Platelet FcγRIIA His131Arg polymorphism and platelet function: antibodies to platelet-bound fibrinogen induce platelet activation" JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, BLACKWELL PUBLISHING, OXFORD, GB, vol. 1, no. 2, 1 February 2003 (2003-02-01), pages 355-362, XP009112758 ISSN: 1538-7933 whole document esp. pages 355 and 361 -----	1-78
Y	FLESCH B K; NIKOLAUS S; EL MOKHTARI N E; SCHREIBER S; NEBEL A: "The FCGR2A - Arg131 variant is no major mortality factor in the elderly - evidence from a German centenarian study" INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOGENETICS, vol. 33, August 2006 (2006-08), pages 277-279, XP002516730 whole document esp. abstract -----	1-78

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/008315

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KUCUK HASAN FEHMI; BINGUL SADIK MEHMET; KURT NECMI; KAPTANOGLU LEVENT; AKYOL HUSEYIN; TORLAK OGUZHAN AZIZ; COLAK ELIF: "Effect of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on renal scarring." EUROPEAN SURGICAL RESEARCH, vol. 38, no. 5, 2006, pages 451-457, XP009112823	21-35
Y	whole document esp. 451-452 and 455-456	1-20, 36-78
Y	----- BHARADWAJ DWAIPAYAN; STEIN MARY-PAT; VOLZER MICHAEL; MOLD CAROLYN; DU CLOS TERRY W: "The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is Fcgamma receptor II" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 190, no. 4, 16 August 1999 (1999-08-16), pages 585-590, XP002516731 whole document esp. pages 585 and 589	1-78
Y	----- BHARADWAJ D; MOLD C; MARKHAM E; DU CLOS T W: "Serum amyloid P component binds to Fc gamma receptors and opsonizes particles for phagocytosis" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 166, no. 11, 1 June 2001 (2001-06-01), pages 6735-6741, XP002516732 whole document esp. pages 6735 and 6740	1-78
X	ZHANG RONGXIN; BECNEL LAUREN; LI MIN; CHEN CHANGYI; YAO QIZHI: "C-reactive protein impairs human CD14(+) monocyte-derived dendritic cell differentiation, maturation and function" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 36, no. 11, November 2006 (2006-11), pages 2993-3006, XP002516733 whole document esp. pages 2993,2999-3000,3002-3003	76-78
Y	whole document esp. pages 2993,2999-3000,3002-3003	1-75
X	BARNA B P; JAMES K; DEODHAR S D: "ACTIVATION OF HUMAN MONOCYTE TUMORICIDAL ACTIVITY BY C-REACTIVE PROTEIN" CANCER RESEARCH, vol. 47, no. 5, 1987, pages 3959-3963, XP002516735	76-78
Y	whole document esp. pages 3959 and 3963	1-75

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/008315

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008070117	A	12-06-2008	NONE
WO 2007047207	A	26-04-2007	EP 1933842 A2 25-06-2008 US 2008227807 A1 18-09-2008 US 2007123522 A1 31-05-2007
US 2003022245	A1	30-01-2003	NONE

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 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1	
A 6 1 P 41/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 3	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 41/00	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06	
C 1 2 N 5/0786 (2010.01)	G 0 1 N 33/53 D	
	C 1 2 N 15/00 A	
	C 0 7 K 14/47	
	C 0 7 K 16/18	
	C 1 2 N 5/00 2 0 2 N	

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 サロウィー , テリー
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 1 4 3 , ケノーシャ , サード アベニュー 6 2 1 4

(72) 発明者 リー , シャウン
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 9 3 4 1 , エクストン , ディロン コート 7

(72) 発明者 ルーパー , マーク エル .
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 9 4 2 5 , チェスター スプリングス , エバーグリーン
 レーン 9 0 0

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA04 HA14
 4B063 QA01 QA13 QA17 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QR32 QR40 QR62
 QR72 QR77 QS25 QS34 QX02
 4B065 AA94X AC20 BD39 CA46
 4C084 AA20 MA02 NA05 NA14 ZA151 ZA331 ZA361 ZA401 ZA421 ZA441
 ZA451 ZA591 ZA811 ZA891 ZC751
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 CA42 DA75 DA76 EA50

专利名称(译)	纤维化相关疾病的治疗和诊断方法		
公开(公告)号	JP2010532872A	公开(公告)日	2010-10-14
申请号	JP2010516033	申请日	2008-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	普罗麦迪奥股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	异丙嗪迪奥公司		
[标]发明人	サロウイーテリー リーシャウン ルーパーマークエル		
发明人	サロウイー, テリー リー, シャウン ルーパー, マーク エル.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K45/06 A61P43/00 A61P11/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P41/00 A61P13/12 A61P1/16 A61P17/02 C12Q1/68 C12Q1/06 C12N15/09 C07K14/47 C07K16/18 C12N5/0786		
CPC分类号	A61P1/16 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/02 A61P27/02 C07K14/4737 G01N33/6887 G01N2333/4709 G01N2333/4737 G01N2800/085 G01N2800/382		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.X A61K45/06 A61P43/00.121 A61P43/00.105 A61P11/00 A61P9/10.101 A61P9/12 A61P9/10.103 A61P9/10 A61P41/00 A61P13/12 A61P1/16 A61P17/02 C12Q1/68.Z C12Q1/06 G01N33 /53.D C12N15/00.A C07K14/47 C07K16/18 C12N5/00.202.N		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063 /QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR40 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA94X 4B065/AC20 4B065/BD39 4B065/CA46 4C084 /AA20 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA151 4C084/ZA331 4C084/ZA361 4C084 /ZA401 4C084/ZA421 4C084/ZA441 4C084/ZA451 4C084/ZA591 4C084/ZA811 4C084/ZA891 4C084 /ZC751 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/CA42 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/958634 2007-07-06 US 12/215700 2008-06-27 US		
其他公开文献	JP2010532872A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了利用患者中血清淀粉样蛋白P (SAP) 浓度与C反应蛋白 (CRP) 的比率来治疗纤维化相关病症的组合物和方法。该方法可以进一步包括确定FcγRIIA的R131 / H131多态性的步骤。还提供了诊断方法。本发明还提供了治疗, 预防或降低患者纤维化相关病症严重程度的方法。从生物样品测量CRP和SAP的浓度以确定SAP与CRP的比率。

1

SAP $\mu\text{g/ml}$	CRP $\mu\text{g/ml}$	SAP对CRP比
10	10	1
5	10	0.5
2	10	0.2
1	10	0.1
0.5	10	0.05
0.25	10	0.025
0.1	10	0.01
10	2.5	5
10	1	10
10	0.5	20
10	0.1	100
10	0.01	1000
10	0.001	10,000