

(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2005-524395

(P2005-524395A)

(43) 公表日 平成17年8月18日(2005.8.18)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	Z N A
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 45/06	A 6 1 K 45/06	4 B O 2 4
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	4 B O 6 3
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-586587 (P2003-586587)	(71) 出願人	504389821
(86) (22) 出願日	平成15年4月18日 (2003. 4. 18)		ザ スクリップス リサーチ インスティテュート
(85) 翻訳文提出日	平成16年12月20日 (2004. 12. 20)		アメリカ合衆国、92037 カリフォルニア州、ラ ジョラ、ノース トレーイ
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/012109		パインズ ロード 10550-ティーピーシー-8
(87) 国際公開番号	W02003/089903	(74) 代理人	100104411
(87) 国際公開日	平成15年10月30日 (2003. 10. 30)		弁理士 矢口 太郎
(31) 優先権主張番号	60/374, 110	(74) 代理人	100104215
(32) 優先日	平成14年4月19日 (2002. 4. 19)		弁理士 大森 純一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100099656
			弁理士 山口 康明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテアーゼ活性化受容体 (P A R 1) を用いた、内皮細胞シグナル伝達に関連した組成物と方法

(57) 【要約】

【課題】

【解決手段】 本発明は、プロテアーゼ活性化受容体 1 (P A R 1) を介して作用する活性化プロテイン C (A P C) による、内皮細胞プロテイン C 受容体 (E P C R) 依存性シグナル伝達の特性解析に基づく組成物と方法に関するものである。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

プロテアーゼ活性化受容体(PAR)-1経路により内皮細胞のシグナル伝達を調節する化合物を同定する方法であって、

内皮プロテインC受容体(EPCR)と活性化プロテインC(APC)に対する反応性をシグナル伝達することができるPAR1とを共発現した細胞を有する細胞アッセイ系に、テスト化合物を接触させる工程と、

シグナル伝達を活性化するのに効果があるように選択した量で、前記アッセイ系にAPCを用いる工程と、

前記アッセイ系においてPAR1シグナル伝達への前記テスト化合物の影響を検出する工程であって、前記アッセイにおける前記テスト化合物の有効性は、前記調節を示すものである、検出する工程と、

を有するものである。

【請求項2】

請求項1の方法において、前記アッセイ系は内皮細胞を有するものである。

【請求項3】

請求項1の方法において、前記アッセイ系はPAR1欠乏性線維芽細胞を有するものである。

【請求項4】

請求項3の方法であって、さらに、前記PAR1欠乏性線維芽細胞中のレポーター遺伝子の活性を測定する方法を有するものである。

【請求項5】

請求項1の方法において、前記検出する工程は、さらにAPC、EPCR、PAR1を介した活性化または抑制を受ける内皮細胞において、一連の遺伝子の遺伝子発現レベルを決定する工程を有するものである。

【請求項6】

請求項5の方法において、前記一連の遺伝子に、SH-PTP3、W28170、フルクトース-6-ホスファターゼ、2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、W28616、BID、NF-KB2、トロンボスポンジン-1、6-pホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、神経線維腫症2型腫瘍抑制因子(neurofibromatosis 2 tumor suppressor)、陽イオン性アミノ酸トランスポーター2(cationic amino acid transporter 2)、W28616、NF-B p65 3、TTF-I相互作用ペプチド(interacting peptide)12、ATRC2、アデューシン、sortilin、p53細胞腫瘍抗原、W28257、hERRa1、G蛋白共役受容体、EGFRBP-GRB2、Pax8、SH-PTP3、5T4、bcl-xL、ディスインテグリン-メタロプロテアーゼ、C1q-関連因子、サイクリンD1、AI743606、ミオシン-Ixb、GNS、ISLR、Stat2、幹細胞因子、c-ets-1、usurpin、染色体5q21-22、クローン-A3-A、トロンボスポンジン、ELL2、二重特異性蛋白ホスファターゼ(dual-specificity protein phosphatase)、ビトロネクチン受容体サブユニット、PCTAIRE-2、follistatin、ets-2、ELL2、utrophin、C8FWリントタンパク質、PCTAIRE-2、fra-2、MINOR、GADD34、IL8、SSR、神経由来オーファン受容体、CGGBP、nma、jun-B、チロシンホスファターゼ、GRO、CtIP、PRDIIBF1、血管内皮増殖因子、スタニオカルシン関連タンパク質、CL100、BMP-2A、NF-Atc、mrg1、jun-B、VEGF、STC、ATF3の少なくとも1つが含まれるものである。

【請求項7】

請求項5の方法において、前記一連の遺伝子はMCP-1、qe82d12.x1、R

10

20

30

40

50

A C H 1、P A C 7 4 7 L 4、T - プラスチン、エンドセリン受容体 B 型様、V E G F、w x 6 9 d 1 0 . x 1 の少なくとも 1 つを含むものである。

【請求項 8】

組織の炎症反応を抑制する遺伝子を同定する方法であって、

内皮プロテイン C 受容体 (E P C R) 依存性プロテアーゼ活性化受容体 (P A R) - 1 経路により、活性化プロテイン C (A P C) に対する反応をシグナル伝達できる内皮細胞を有する細胞アッセイ系と、テスト化合物とを接触させる工程と、

A P C または P A R 1 によるシグナル伝達に特異的なテスト化合物で、前記細胞アッセイ系を刺激する工程と、

刺激された細胞の m R N A に対応する c D N A を単離する工程と、

遺伝子発現分析システムを用い、単離された c D N A を分析する工程であって、E P C R 依存性 P A R 1 シグナル伝達経路を介して A P C によりシグナルを伝達することで、刺激された細胞で制御される一連の遺伝子を同定し、前記遺伝子 1 つ以上を制御することで組織の炎症反応を抑制することができる、分析する工程と、

を有するものである。

【請求項 9】

請求項 8 の方法であって、さらに、遺伝子発現分析システムを用いて前記単離した c D N A を分析し、P A R 1 または A P C によるシグナル伝達でアップレギュレートされ、P A R 2 によるシグナル伝達でダウンレギュレートされる一連の遺伝子を同定する工程を有するものである。

【請求項 10】

請求項 9 の方法において、前記一連の遺伝子は M C P - 1、q e 8 2 d 1 2 . x 1、R A C H 1、P A C 7 4 7 L 4、T - プラスチン、エンドセリン受容体 B 型様、V E G F、w x 6 9 d 1 0 . x 1 の少なくとも 1 つが含まれるものである。

【請求項 11】

請求項 8 の方法であって、さらに、前記遺伝子発現分析システムを用いて前記単離した c D N A を分析し、P A R 1 または A P C によるシグナル伝達でダウンレギュレートされ、トロンピンによるシグナル伝達でアップレギュレートされる前記一連の遺伝子を同定する方法を有するものである。

【請求項 12】

請求項 11 の方法において、前記一連の遺伝子は、S H - P T P 3、W 2 8 1 7 0、フルクトース - 6 - ホスファターゼ、2 - キナーゼ / フルクトース - 2, 6 - ビスホスファターゼ、W 2 8 6 1 6、B I D、N F - K B 2、トロンボスポンジン - 1、6 - p ホスホフルクト - 2 - キナーゼ / フルクトース - 2, 6 - ビスホスファターゼ、神経線維腫症 2 型腫瘍抑制因子、陽イオン性アミノ酸トランスポーター 2、W 2 8 6 1 6、N F - p 6 5 3、T T F - I 相互作用ペプチド 1 2、A T R C 2、アデューシン、s o r t i l i n、p 5 3 細胞腫瘍抗原、W 2 8 2 5 7、h E R R a 1、G 蛋白共役受容体、E G F R B P - G R B 2、P a x 8、S H - P T P 3、5 T 4、b c l - x L、ディスインテグリン - メタロプロテアーゼ、C 1 q - 関連因子、サイクリン D 1、A I 7 4 3 6 0 6、ミオシン - I x b、G N S、I S L R、S t a t 2、幹細胞因子、c - e t s - 1、u s u r p i n、染色体 5 q 2 1 - 2 2、クローン - A 3 - A、トロンボスポンジン、E L L 2、二重特異性蛋白ホスファターゼピトロネクチン受容体 サブユニット、P C T A I R E - 2、f o l l i s t a t i n、e t s - 2、E L L 2、u t r o p h i n、C 8 F W リンタンパク質、P C T A I R E - 2、f r a - 2、M I N O R、G A D D 3 4、I L 8、S S R、神経由来オーファン受容体、C G G B P、n m a、j u n - B、チロシンホスファターゼ、G R O、C t I P、P R D I I - B F 1、血管内皮増殖因子、スタニオカルシン関連タンパク質、C L 1 0 0、B M P - 2 A、N F - A t c、m r g 1、j u n - B、V E G F、S T C、A T F 3 の少なくとも 1 つを含むものである。

【請求項 13】

プロテアーゼ活性化受容体 (P A R) - 1 経路を介して内皮細胞のシグナル伝達を調節

10

20

30

40

50

する化合物を同定する方法であって、

内皮プロテインC受容体(EPCR)依存性PAR1経路により、活性化プロテインC(APC)に対する反応をシグナル伝達できる内皮細胞を有する細胞アッセイ系とテスト化合物とを接触させる工程と、

APCまたはPAR1によるシグナル伝達に特異的な前記テスト化合物で、前記細胞アッセイ系を刺激する工程と、

前記テスト化合物の存在下および非存在下で刺激された2群の細胞のmRNAに対応するcDNAを単離する工程と、

遺伝子発現分析システムを用い、前記単離されたcDNAを分析し、刺激された細胞で制御される一連の遺伝子を同定する工程と、

2群の刺激された細胞において、アップレギュレートまたはダウンレギュレートされた遺伝子を検出し、それによってAPCまたはPAR1を介してシグナル伝達を調節する前記テスト化合物を同定する、検出および同定する工程と、

を有するものである。

【請求項14】

請求項13の方法において、前記検出する工程は、さらにPAR1またはAPCを介してシグナル伝達する遺伝子のアップレギュレーション、およびPAR2を介してシグナル伝達する遺伝子のダウンレギュレーションにより、遺伝子発現を制御する前記テスト化合物を同定する工程を有するものである。

【請求項15】

請求項13の方法において、前記検出する工程は、PAR1またはAPCを介してシグナル伝達する遺伝子のダウンレギュレーション、およびトロンピンを介してシグナル伝達する遺伝子のアップレギュレーションにより、遺伝子発現を制御する前記テスト化合物を同定する工程を有するものである。

【請求項16】

組織で内皮プロテインC受容体(EPCR)依存性プロテアーゼ活性化受容体(PAR)-1経路の活性化状態を検出する方法であって、

内皮プロテインC受容体(EPCR)依存性PAR1経路により、活性化プロテインC(APC)に対する反応をシグナル伝達できる内皮細胞を有する細胞アッセイ系とテスト化合物とを接触させる工程と、

APCまたはPAR1によるシグナル伝達に特異的な、前記テスト化合物を用い、前記細胞アッセイ系を刺激する方法と、

APC、EPCRまたはPAR1を介する内皮細胞のシグナル伝達に対する、活性化状態と関連した制御遺伝子を発現する一連の遺伝子を同定する工程と、

APCまたはPAR1を介する活性化を受ける前記組織で前記一連の遺伝子の遺伝子発現レベルを決定し、それによって前記組織の前記遺伝子活性化状態を決定する工程と、

を有するものである。

【請求項17】

請求項16の方法において、前記決定する工程は、さらにAPCおよびEPCR依存性PAR1経路を介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる前記一連の遺伝子の遺伝子発現レベルを同定する工程と、PAR2を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる前記一連の遺伝子を同定する工程と、を有するものである。

【請求項18】

請求項17の方法において、前記一連の遺伝子はMCP-1、qe82d12.x1、RACH1、PAC747L4、T-プラスチン、エンドセリン受容体B型様、VEGF、wx69d10.x1の少なくとも1つを含むものである。

【請求項19】

請求項16の方法において、前記決定する工程は、さらにAPCおよびEPCR依存性PAR1経路を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる前記一連の遺伝子の遺伝子発現レベルを同定する工程と、トロンピンを介したシグナル伝達によりアップレギ

10

20

30

40

50

ユレートされる前記一連の遺伝子の遺伝子発現レベルを同定する工程を有するものである。

【請求項20】

請求項19の方法において、前記一連の遺伝子は、SH-PTP3、W28170、フルクトース-6-ホスファターゼ、2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、W28616、BID、NF-KB2、トロンボスポンジン-1、6-pホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、神経線維腫症2型腫瘍抑制因子、陽イオン性アミノ酸トランスポーター2、W28616、NF-p65、3、TTF-I相互作用ペプチド12、ATRC2、アデュージン、sortilin、p53細胞腫瘍抗原、W28257、hERRa1、G蛋白共役受容体、EGFRBP-GRB2、Pax8、SH-PTP3、5T4、bcl-xL、ディスインテグリン-メタロプロテアーゼ、C1q-関連因子、サイクリンD1、AI743606、ミオシン-Ixb、GNS、ISLR、Stat2、幹細胞因子、c-ets-1、usurpin、染色体5q21-22、クローン-A3-A、トロンボスポンジン、ELL2、二重特異性蛋白ホスファターゼピトロネクチン受容体サブユニット、PCTAIRE-2、folliclistatin、ets-2、ELL2、utrophin、C8FWリンタンパク質、PCTAIRE-2、fra-2、MINOR、GADD34、IL8、SSR、神経由来オーファン受容体、CGGBP、nma、jun-B、チロシンホスファターゼ、GRO、CtIP、PRDII-BF1、血管内皮増殖因子、スタニオカルシン関連タンパク質、CL100、BMP-2A、NF-Atc、mrg1、jun-B、VEGF、STC、ATF3の少なくとも1つを含むものである。

【請求項21】

哺乳類対象物で炎症または敗血症を治療する方法であって、

内皮プロテインC受容体(EPCR)依存性プロテアーゼ活性化受容体(PAR)-1経路を介して、内皮細胞のシグナル伝達を調節する化合物の治療有効量を投与する工程を有し、前記化合物は細胞アッセイ系でAPCを介したPAR1シグナル伝達のアゴニストとして作用し、前記化合物は哺乳類対象物の炎症または敗血症の発生数を減少させるのに効果的である。

【請求項22】

請求項21の方法であって、さらに、細胞アッセイ系でトロンピンを介したPAR1シグナル伝達のアゴニストとして作用する第2の化合物の治療有効量を投与する工程であって、前記第2の化合物は哺乳類対象物の炎症または敗血症の発生数を減少させるのに効果的である、投与する工程を有するものである。

【請求項23】

請求項21の方法であって、さらに、APC、EPCR、PAR1を介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる遺伝子を同定する工程と、PAR2を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる遺伝子を同定する工程とを有するものである。

【請求項24】

請求項21の方法であって、さらにAPC、EPCR、PAR1を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる遺伝子と、トロンピンを介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる遺伝子を同定する工程とを有するものである。

【請求項25】

哺乳類対象物で脳卒中を治療する方法であって、

内皮プロテインC受容体(EPCR)依存性プロテアーゼ活性化受容体(PAR)-1経路を介して、内皮細胞のシグナル伝達を調節する化合物の治療有効量を投与する工程を有し、前記化合物は細胞アッセイ系でAPCを介したPAR1シグナル伝達のアゴニストとして作用し、前記化合物は哺乳類対象物の脳卒中の発生数を減少させるのに効果的である。

【請求項26】

請求項25の方法であって、さらに、細胞アッセイ系でトロンピンを介したPAR1シ

グナル伝達のアゴニストとして作用する第2の化合物の治療有効量を投与する工程を有し、前記第2の化合物は哺乳類対象物の脳卒中の発生数を減少させるのに効果的である、投与する工程を有するものである。

【請求項27】

請求項25の方法であって、さらに、前記細胞アッセイ系において、APC、EPCR、PAR1を介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる遺伝子を同定する工程と、前記細胞アッセイ系において、PAR2を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる遺伝子を同定する工程を有するものである。

【請求項28】

請求項25の方法であって、さらに、APC、EPCR、PAR1を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる遺伝子と、トロンピンを介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる遺伝子を同定する工程とを有する。

10

【請求項29】

哺乳類対象物で虚血性障害を治療する方法であって、

内皮プロテインC受容体(EPCR)依存性プロテアーゼ活性化受容体(PAR)-1経路を介して、内皮細胞のシグナル伝達を調節する化合物の治療有効量を投与する工程を有し、前記化合物は細胞アッセイ系でAPCを介したPAR1シグナル伝達のアゴニストとして作用し、前記化合物は哺乳類対象物の虚血性障害の発生数を減少させるのに効果的である。

【請求項30】

20

請求項29の方法であって、さらに、細胞アッセイ系でトロンピンを介したPAR1シグナル伝達のアゴニストとして作用する、第2の化合物の治療有効量を投与する工程を有し、前記第2の化合物は哺乳類対象物の虚血性障害の発生数を減少させるのに効果的である、投与する工程を有するものである。

【請求項31】

請求項29の方法であって、さらに、前記細胞アッセイ系において、APC、PAR1、EPCRを介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる遺伝子を同定する工程と、前記細胞アッセイ系において、PAR2を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる遺伝子を同定する工程とを有するものである。

【請求項32】

30

請求項29の方法であって、さらにAPC、EPCR、PAR1を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる遺伝子と、トロンピンを介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる遺伝子を同定する方法を有するものである。

【請求項33】

哺乳類細胞でアポトーシスを予防する方法であって、

内皮プロテインC受容体(EPCR)依存性プロテアーゼ活性化受容体(PAR)-1経路を介して、内皮細胞のシグナル伝達を調節する化合物の治療有効量を投与する工程を有し、前記化合物は細胞アッセイ系でPAR1シグナル伝達のアゴニストとして作用し、前記化合物は哺乳類細胞のアポトーシスの発生数を減少させるのに効果的である。

【請求項34】

40

請求項33の方法であって、さらに、細胞アッセイ系でトロンピンを介したPAR1シグナル伝達のアゴニストとして作用する、第2の化合物の治療有効量を投与する工程を有し、前記第2の化合物は哺乳類細胞のアポトーシスの発生数を減少させるのに効果的である、投与する工程を有するものである。

【請求項35】

請求項33の方法であって、さらに、前記細胞アッセイ系において、APC、PAR1、EPCRを介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる遺伝子を同定する工程と、前記細胞アッセイ系において、PAR2を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる遺伝子を同定する工程とを有するものである。

【請求項36】

50

請求項 33 の方法であって、さらに、APC、EPCR、PAR1 を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる遺伝子と、トロンピンを介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる遺伝子を同定する工程を有するものである。

【請求項 37】

哺乳類細胞でアポトーシスを予防するテスト化合物を同定する方法であって、

活性化プロテイン C (APC) に対する反応をシグナル伝達できる、内皮プロテイン C 受容体 (EPCR) とプロテアーゼ活性化受容体 (PAR) - 1 を共発現した細胞アッセイ系で、前記哺乳類細胞にテスト化合物を接触させる工程と、

前記哺乳類細胞の死に対する前記テスト化合物の効果をアッセイすることで、前記哺乳類細胞のアポトーシスを予防する化合物を同定する工程とを有するものである。

10

【請求項 38】

哺乳類対象物で薬物候補をスクリーニングする方法であって、

前記哺乳類対象物に化合物治療有効量を投与する工程を有し、前記化合物は内皮プロテイン C 受容体 (EPCR) 依存性プロテアーゼ活性化受容体 (PAR) - 1 経路のアゴニストとして作用し、前記化合物は内皮細胞アッセイの PAR1 シグナル伝達経路を介してシグナル伝達を調節する、投与する工程を有するものである。

【請求項 39】

請求項 38 の方法であって、さらに、細胞アッセイ系でトロンピンを介した PAR1 シグナル伝達のアンタゴニストとして作用する、第 2 の化合物の治療有効量を投与する工程を有し、前記第 2 の化合物は内皮細胞アッセイ系で PAR1 シグナル伝達経路を介し、シ

20

【請求項 40】

請求項 38 の方法において、前記シグナル伝達は活性化プロテイン C (APC) / EPCR / PAR1 シグナル伝達により遺伝子をダウンレギュレートし、トロンピンシグナル伝達により遺伝子をアップレギュレートするものである。

【請求項 41】

請求項 40 の方法において、刺激された細胞で制御される前記一連の遺伝子は、SH-PTP3、W28170、フルクトース-6-ホスファターゼ、2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、W28616、BID、NF-KB2、トロンボスポンジン-1、6-pホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、神経線維腫症 2 型腫瘍抑制因子、陽イオン性アミノ酸トランスポーター 2、W28616、NF- κ B p65 3、TTF-I 相互作用ペプチド 12、ATRC2、アデューシン、sortilin、p53 細胞腫瘍抗原、W28257、hERRa1、G 蛋白共役受容体、EGFRBP-GRB2、Pax8、SH-PTP3、5T4、bc1-xL、ディスインテグリン-メタロプロテアーゼ、C1q-関連因子、サイクリン D1、AI743606、ミオシン-Ixb、GNS、ISLR、Stat2、幹細胞因子、c-ets-1、usurpin、染色体 5q21-22、クローン-A3-A、トロンボスポンジン、ELL2、二重特異性蛋白ホスファターゼピトロネクチン受容体サブユニット、PCTAIRE-2、follicistatin、ets-2、ELL2、utrophin、C8FW リンタンパク質、PCTAIRE-2、fra-2、MINOR、GADD34、IL8、SSR、神経由来オーファン受容体、CGGBP、nma、jun-B、チロシンホスファターゼ、GRO- α 、CtIP、PRDII-BF1、血管内皮増殖因子、スタニオカルシン関連タンパク質、CL100、BMP-2A、NF-Atc、mrg1、jun-B、VEGF、STC、ATF3 の少なくとも 1 つを含むものである。

30

40

【請求項 42】

請求項 38 の方法において、前記シグナル伝達は APC / EPCR / PAR1 のシグナル伝達により遺伝子をアップレギュレートし、PAR2 シグナル伝達により遺伝子をダウンレギュレートするものである。

【請求項 43】

50

請求項42の方法において、刺激された細胞で制御される、前記一連の遺伝子はMCP-1、q e 8 2 d 1 2 . x 1、RACH1、PAC747L4、T-プラスチン、エンドセリン受容体B型様、VEGF、w x 6 9 d 1 0 . x 1の少なくとも1つを含むものである。

【請求項44】

請求項42の方法において、APC/EPCR/PAR1シグナル伝達による前記アップレギュレーションが約1.3倍以上で、PAR2による前記ダウンレギュレーションが約1.3倍未満である。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連文献の相互参照

この出願書類では、2002年4月19日に出版された米国特許仮出願第60/374,110号に対して優先権を主張しており、その開示はこの参照により組み込まれる。

【0002】

本発明は、プロテアーゼ活性化受容体1(PAR1)を介して作用する、活性化プロテインC(APC)による、内皮細胞プロテインC受容体(EPCR)依存性シグナル伝達の特異性解析に基づく組成、分子の同定方法、スクリーニング法に関するものである。本発明ではさらに、炎症や敗血症など様々な疾患状態について、哺乳類対象物を治療する方法を提供する。

20

【背景技術】

【0003】

敗血症において、組織因子により開始される凝固は致死的な反応を誘発し(A. A. Creasey et al., J Clin Invest 91:2850, 1993; F. B. Taylor et al., Blood 91:1609, 1998; F. B. Taylor, Jr. et al., Circ Shock 33:127, 1991)、この反応には、G蛋白共役PARによる、凝固プロテアーゼを介した炎症誘発性シグナル伝達が関与すると考えられている(S. R. Coughlin, Nature 407:258, 2000; J. O'Brien, et al., Oncogene 20:1570, 2001; Camerer, et al., Proc Natl Acad Sci U S A 97:5255, 2000; Riewald, W. Ruf, Proc Natl Acad Sci U S A 98:7742, 2001)。前記PC経路は、大腸菌誘導性死亡から動物を保護し(F. B. Taylor et al., Blood 95:1680, 2000; F. B. Taylor, Jr., in Bacterial Endotoxins: Basic Science to Anti-Sepsis Strategies, J. Levin, S. J. H. Van Deventer, T. Van der Poll, A. Sturk, Eds. (Wiley-Liss, Inc., New York, 1994); F. B. Taylor et al., J Clin Invest 79:918, 1987)、APCは重篤な敗血症患者の死亡率を低下させる(G. R. Bernard et al., N Engl J Med 344:699, 2001)。EPCRに結合したPCは凝固のフィードバック・ループによって活性化され、このループでは、微量のトロンピンが一度トロンボモジュリンに結合すると、PCを特異的に活性化する(C. T. Esmon, Faseb J 9:946, 1995)。APCはトリプシン様の凝固プロテアーゼであり、PARはこれらの酵素の細胞センサーとして機能する(S. R. Coughlin, Nature 407:258, 2000; J. O'Brien, et al., Oncogene 20:1570, 2001)。PCの抗凝固経路は、EPCRとともに、PAR1およびPAR2を発現した内皮細胞で作用する。APCによる蛋白分解性シグナル伝達は内皮細胞で保護反応を誘導するが(D. E. Joyce, et al., J Biol Chem 276:11199, 2001)、このプロセスにおけるPARの関与はまだ不明であ

30

40

50

る。

【0004】

敗血症に伴うイベントは依然として複雑であるが、敗血症の凝固と炎症の増悪は、プロテインC (PC) の経路が介する保護作用により均衡されることが知られている。敗血症において、血小板レベルでの障害と止血および炎症の増悪に対する細胞反応は、一部、密接に関係するG蛋白共役受容体、つまり、プロテアーゼ活性化受容体 (PAR) - 1、- 3、- 4 のトロンビンの活性化媒介している。内皮細胞プロテインC受容体 (EPCR) は、活性化プロテインC (APC) による敗血症の保護に重要な役割を果たしているが、APCの正確なシグナル伝達の機序はまだ明らかになっていない。

【発明の開示】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

敗血症における凝固と炎症の増悪は、保護作用のあるプロテインC (PC) 経路によって均衡される。活性化プロテインC (APC) は、内皮細胞にあるプロテアーゼ活性化受容体1 (PAR1) を開裂する際の補助受容体として、内皮細胞のPC受容体 (EPCR) を利用することが示された。PAR1を介したAPCシグナルも、内皮細胞でトロンビンの受容体となることが知られている。特に、APCはEPCRに依存してPAR1を活性化し、PAR1のシグナル伝達を行う。

【0006】

遺伝子プロファイリングからは、PAR1のシグナル伝達により、APCで誘導される保護遺伝子をすべて説明できることが証明された。本明細書に記載された組成物と方法では、APCで誘導される保護遺伝子の例を提供する。例えば、免疫調節性の単球遊走因子-1 (MCP-1) は、PAR1の活性化によって選択的に誘導されるが、PAR2の活性化では誘導されない。

20

従って、プロトタイプトロンビン受容体はEPCR依存性APCシグナル伝達の標的であり、敗血症の予防において、この受容体カスケードの役割が示唆される。

【0007】

APCとEPCRの相互作用によって、PAR1を介したシグナル伝達の影響を受ける、炎症および敗血症に関連した疾患の診断と治療に有用な組成物および方法が、本明細書において説明される。

30

【0008】

前記方法では、内皮細胞のシグナル伝達を測定するための様々な細胞アッセイ系を説明しているが、そのシグナル伝達はAPC、EPCR、PAR1、PAR2またはその組み合わせに依存している。これらの系を用い、シグナル伝達を調整する化合物をスクリーニングすることができる。これらの同定された化合物は、特定のシグナル伝達経路を調節するため、またこれらのシグナル伝達経路によって制御される炎症プロセスまたは敗血症を調節するために使用する上で、治療に有効となりうる候補化合物である。

【課題を解決するための手段】

【0009】

1つの態様では、プロテアーゼ活性化受容体1 (PAR1) 経路を介した内皮細胞のシグナル伝達を調節する化合物の同定方法が提供され、この方法は活性化プロテインC (APC) に対する反応性をシグナル伝達することができ、内皮プロテインC受容体 (EPCR) とPAR1を共発現した細胞を有する細胞アッセイ系によりテスト化合物と接触する方法を有する。前記方法は、シグナル伝達を活性化するのに有効であると選択された量でアッセイ系に対するAPCを提供し、アッセイ系でのPAR1のシグナル伝達に対するテスト化合物の効果、つまりアッセイで調節作用を示すテスト化合物の効果を検出する。そのような方法のいくつかでは、細胞アッセイ系が内皮細胞またはPAR1が欠乏した線維芽細胞を有することができる。前記方法はさらに、内皮細胞またはPAR1が欠乏した線維芽細胞でレポーター遺伝子の活性を測定する方法を有する。本発明のさらなる態様では、前記検出する段階は、さらに、APC、EPCR、PAR1を介した活性化または抑制

40

50

を受ける内皮細胞において、一連の遺伝子の遺伝子発現レベルを決定する方法を有する。

【0010】

本発明の詳細な態様では、前記一連の遺伝子は、SH-PTP3、W28170、フルクトース-6-ホスファターゼ、2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、W28616、BID、NF-KB2、トロンボスポンジン-1、6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、神経線維腫症2型腫瘍抑制因子(neurofibromatosis 2 tumor suppressor)、陽イオン性アミノ酸トランスポーター2(cationic amino acid transporter 2)、W28616、NF- κ B p65 3、TTF-I相互作用ペプチド12(TTF-I interacting peptide) 10、ATRC2、アデュシン、sortilin、p53細胞腫瘍抗原、W28257、hERRa1、G蛋白共役受容体、EGFRBP-GRB2、Pax8、SH-PTP3、5T4、bcl-xL、ディスインテグリン-メタロプロテアーゼ、C1q-関連因子、サイクリンD1、AI743606、ミオシン-Ixb、GNS、ISLR、Stat2、幹細胞因子、c-ets-1、usurpin-、染色体5q21-22、クロ- 20
ーン-A3-A、トロンボスポンジン、ELL2、二重特異性蛋白ホスファターゼ(dual-specificity protein phosphatase)、ビトロネクチン受容体サブユニット、PCTAIRE-2、フォリスタチン、ets-2、ELL2、ユートロフィン、C8FWリン蛋白質、PCTAIRE-2、fra-2、MINOR、GADD34、IL8、SSR、神経由来オーファン受容体(neuron d- 20
erived orphan receptor)、CGGBP、nma、jun-B、チロシンホスファターゼ、GRO-、CtIP、PRDII-BF1、血管内皮増殖因子、スタニオカルシン関連蛋白質、CL100、BMP-2A、NF-Atc、mrg1、jun-B、VEGF、STC、ATF3のうち少なくとも1つが含まれる。前記方法のさらに詳細な態様では、前記一連の遺伝子にMCP-1、qe82d12.x1、RACH1、PAC747L4、T-プラスチン、エンドセリン受容体B型様、VEGF、wx69d10.x1の少なくとも1つが含まれる。

【0011】

別の態様では、組織で炎症反応を抑制する遺伝子を同定する方法が提供され、EPCR依存性PAR1経路によりAPCに対する反応をシグナル伝達することができる内皮細胞 30
を有する細胞アッセイ系とテスト化合物とを接触させる方法を有する。前記方法では、APCまたはPAR1によるシグナル伝達に特異的なテスト化合物を用い、細胞アッセイ系を刺激する方法と、刺激された細胞でmRNAに対応するcDNAを単離する方法を示す。前記方法ではさらに、遺伝子発現分析システムを用い、単離されたcDNAを分析する方法を提供し、EPCR依存性PAR1シグナル伝達経路を介してAPCによりシグナル伝達することで、刺激された細胞で制御される一連の遺伝子を同定し、前記遺伝子の1つ以上を制御することで組織の炎症反応を抑制することができる。

【0012】

別の態様では、組織で炎症反応を抑制する遺伝子を同定する方法が提供され、EPCR依存性PAR1経路によりAPCに対する反応をシグナル伝達することができる内皮細胞 40
を有する細胞アッセイ系とテスト化合物とを接触させる方法と、APCまたはPAR1によるシグナル伝達に特異的なテスト化合物を用い、細胞アッセイ系を刺激する方法とを有する。前記方法はさらに、刺激された細胞でmRNAに対応するcDNAを単離する方法と、遺伝子発現分析システムを用い、単離されたcDNAを分析する方法を有し、EPCR依存性PAR1シグナル伝達経路を介してAPCによりシグナルを伝達することで、刺激された細胞で制御される一連の遺伝子を同定し、前記遺伝子の1つ以上を制御することで組織の炎症反応を抑制することができる。

【0013】

さらなる態様では、前記方法は、遺伝子発現分析システムを用い、単離されたcDNAを分析する方法を有し、PAR1またはAPCによるシグナル伝達でアップレギュレート 50

される、およびPAR2によるシグナル伝達でダウンレギュレートされる一連の遺伝子を同定する。さらに詳細な態様では、前記一連の遺伝子はMCP-1、qe82d12.x1、RACH1、PAC747L4、T-プラスチン、エンドセリン受容体B型様、VEGF、wx69d10.x1の少なくとも1つを含む。

【0014】

さらなる態様では、前記方法は、遺伝子発現分析システムを用い、単離されたcDNAを分析する方法を有し、PAR1またはAPCによるシグナル伝達でダウンレギュレートされる、およびトロンピンによるシグナル伝達でアップレギュレートされる前記一連の遺伝子を同定する。さらに詳細な態様では、前記一連の遺伝子は、SH-PTP3、W28170、フルクトース-6-ホスファターゼ、2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、W28616、BID、NF-KB2、トロンボスポンジン-1、6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、神経線維腫症2型腫瘍抑制因子、陽イオン性アミノ酸トランスポーター2、W28616、NF-Bp653、TTF-I相互作用ペプチド12、ATRC2、アデューシン、sortilin、p53細胞腫瘍抗原、W28257、hERRa1、G蛋白共役受容体、EGFRBP-GRB2、Pax8、SH-PTP3、5T4、bc1-xL、ディスインテグリン-メタロプロテアーゼ、C1q-関連因子、サイクリンD1、AI743606、ミオシン-Ixb、GNS、ISLR、Stat2、幹細胞因子、c-ets-1、usurpin、染色体5q21-22、クローン-A3-A、トロンボスポンジン、ELL2、二重特異性蛋白ホスファターゼ、ピトロネクチン受容体サブユニット、PCTAIRE-2、フォリスタチン、ets-2、ELL2、ユートロフィン、C8FWリン蛋白質、PCTAIRE-2、fra-2、MINOR、GADD34、IL8、SSR、ニューロン由来オーファン受容体、CGGBP、nma、jun-B、チロシンホスファターゼ、GRO、CtIP、PRDII-BF1、血管内皮増殖因子、スタニオカルシン関連蛋白質、CL100、BMP-2A、NF-Atc、mrg1、jun-B、VEGF、STC、ATF3の少なくとも1つを含む。

10

20

【0015】

別の態様では、PAR1経路を介して内皮細胞でシグナル伝達を調節する化合物を同定する方法が提供され、EPCR依存性PAR1経路によりAPCに対する反応をシグナル伝達することができる内皮細胞を有する細胞アッセイ系とテスト化合物とを接触させる方法を有する。前記方法では、APCまたはPAR1によるシグナル伝達に特異的なテスト化合物を用い、細胞アッセイ系を刺激する方法が提供される。前記方法ではさらに、テスト化合物存在下および非存在下で刺激された、2群の細胞のmRNAに対応するcDNAを単離する方法が提供される。前記方法ではさらに、遺伝子発現分析システムを用いて、単離されたcDNAを分析する方法と、ここにおいては例えば本明細書に記載された遺伝子から刺激された細胞で制御される、前記一連の遺伝子を同定し、ここにおいては2つの刺激された細胞群でアップレギュレートまたはダウンレギュレートされた遺伝子を検出する方法と、それによってAPCまたはPAR1を介したシグナル伝達を調節するテスト化合物を同定する方法とが提供される。

30

【0016】

さらなる態様では、前記方法の検出する工程は、PAR1またはAPCを介してシグナル伝達する遺伝子のアップレギュレーション、およびPAR2を介してシグナル伝達する遺伝子のダウンレギュレーションにより、遺伝子発現を制御するテスト化合物を同定する方法を有する。さらなる態様では、前記方法の検出する工程は、PAR1またはAPCを介してシグナル伝達する遺伝子のダウンレギュレーション、およびトロンピンを介してシグナル伝達する遺伝子のアップレギュレーションにより、遺伝子発現を制御するテスト化合物を同定する方法を有する。

40

【0017】

別の態様では、組織のEPCR依存性PAR1経路の活性化状態を検出する方法が提供され、EPCR依存性PAR1経路によりAPCに対する反応をシグナル伝達することが

50

できる内皮細胞を有する細胞アッセイ系とテスト化合物を接触させる方法を有する。前記方法では、A P CまたはP A R 1によるシグナル伝達に特異的なテスト化合物を用い、細胞アッセイ系を刺激する方法を提供する。前記方法ではさらに、A P C、E P C R、またはP A R 1を介した内皮細胞のシグナル伝達において、活性化状態と関連し、制御された遺伝子である、前記一連の遺伝子を同定する方法と、A P CまたはP A R 1を介した活性化を受ける前記一連の遺伝子要因に対する、遺伝子の発現レベルを決定する方法とを有し、それによって組織の遺伝子活性化状態を決定する。

【0018】

さらなる態様では、前記方法の決定する工程は、A P CおよびE P C R依存性P A R 1経路を介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる前記一連の遺伝子要素に対する、遺伝子の発現レベルを同定する方法と、P A R 2を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる、例えば本明細書で説明する遺伝子から、前記一連の遺伝子を同定する方法を有する。さらなる態様では、前記方法の決定する工程は、A P CおよびE P C R依存性P A R 1経路を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる例えば本明細書で説明する遺伝子から、一連の遺伝子要素に対する、遺伝子の発現レベルを同定する方法と、トロンピンを介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる、前記一連の遺伝子に対する遺伝子発現レベルを同定する方法を有する。

10

【0019】

別の態様では、哺乳類の対象物の炎症または敗血症を治療する方法が提供され、E P C R依存性P A R 1経路を介して内皮細胞でシグナル伝達を調節する、化合物治療有効量の投与方法を有し、前記化合物は細胞アッセイ系において、A P Cを介したP A R 1シグナル伝達のアゴニストとして作用し、前記化合物は哺乳類対象物で炎症または敗血症の発生数を減少させるのに効果的である。

20

【0020】

さらなる態様では、前記方法はA P C、E P C R、およびP A R 1を介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる遺伝子を同定する方法と、P A R 2を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる遺伝子を同定する方法とを有する。さらなる態様では、前記方法がA P C、E P C R、およびP A R 1を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる遺伝子と、トロンピンを介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる遺伝子とを同定する方法を有する。詳細な態様では、前記方法はさらに、細胞アッセイ系でトロンピンを介したP A R 1シグナル伝達のアнтаゴニストとして作用する、第2の化合物治療有効量を投与方法を有し、前記第2の化合物は哺乳類対象物の炎症または敗血症の発生数を減少させるのに効果的である。

30

【0021】

別の態様では、哺乳類の対象物で脳卒中を治療する方法が提供され、E P C R依存性P A R 1経路を介して内皮細胞でシグナル伝達を調節する、化合物治療有効量を投与方法を有し、前記化合物が細胞アッセイ系において、A P Cを介したP A R 1シグナル伝達のアゴニストとして作用し、前記化合物は哺乳類対象物で脳卒中の発生数を減少させるのに効果的である。

【0022】

さらなる態様では、前記方法がA P C、E P C R、P A R 1を介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる遺伝子を同定する方法と、P A R 2を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる遺伝子を同定する方法を有する。さらなる態様では、前記方法がA P C、E P C R、P A R 1を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる遺伝子と、トロンピンを介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる遺伝子を同定する方法を有する。前記方法の詳細な態様では、さらに、細胞アッセイ系でトロンピンを介したP A R 1シグナル伝達のアнтаゴニストとして作用する、治療有効量の第2の化合物を投与方法を有し、第2の化合物は哺乳類対象物の脳卒中の発生数を減少させるのに効果的である。

40

【0023】

50

別の態様では、哺乳類の対象物で虚血性障害を治療する方法が提供され、EPCR依存性PAR1経路を介して内皮細胞でシグナル伝達を調節する、化合物治療有効量を投与する方法を有し、前記化合物は細胞アッセイ系において、APCを介したPAR1シグナル伝達のアゴニストとして作用し、前記化合物は哺乳類対象物の虚血性障害の発生数を減少させるのに効果的である。

【0024】

さらなる態様では、前記方法はAPC、EPCR、PAR1を介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる遺伝子を同定する方法と、PAR2を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる遺伝子を同定する方法とを有する。さらなる態様では、前記方法はAPC、EPCR、PAR1を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる遺伝子と、トロンピンを介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる遺伝子とを同定する方法を有する。詳細な態様では、前記方法はさらに、細胞アッセイ系でトロンピンを介したPAR1シグナル伝達のアнтаゴニストとして作用する、第2の化合物治療有効量を投与する方法を有し、前記第2の化合物は哺乳類対象物の虚血性障害の発生数を減少させるのに効果的である。

10

【0025】

別の態様では、哺乳類細胞でアポトーシスを予防する方法が提供され、EPCR依存性PAR1経路を介して内皮細胞でシグナル伝達を調節する、化合物治療有効量を投与する方法を有し、前記化合物細胞アッセイ系においてAPCを介したPAR1シグナル伝達のアゴニストとして作用し、前記化合物は哺乳類細胞でアポトーシスの発生数を減少させるのに効果的である。

20

【0026】

さらなる態様では、前記方法はAPC、EPCR、PAR1を介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる遺伝子を同定する方法と、PAR2を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる遺伝子を同定する方法とを有する。さらなる態様では、前記方法はAPC、EPCR、PAR1を介したシグナル伝達によりダウンレギュレートされる遺伝子と、トロンピンを介したシグナル伝達によりアップレギュレートされる遺伝子とを同定する方法を有する。詳細な態様では、前記方法はさらに、細胞アッセイ系でトロンピンを介したPAR1シグナル伝達のアнтаゴニストとして作用する、第2の化合物治療有効量を投与する方法を有し、前記第2の化合物は哺乳類細胞のアポトーシスの発生数を減少させるのに効果的である。

30

【0027】

別の態様では、哺乳類細胞のアポトーシスを予防するテスト化合物を同定する方法が提供され、APCに対する反応をシグナル伝達することができるEPCRおよびPAR1を共発現させるため、細胞アッセイ系で哺乳類細胞にテスト化合物を接触させる方法と、哺乳類細胞の死亡に対するテスト化合物の作用をアッセイする方法とを有し、それによって哺乳類細胞のアポトーシスを予防する化合物を同定する。

【0028】

別の態様では、哺乳類対象物で薬物候補をスクリーニングする方法が提供され、哺乳類対象物に化合物治療有効量を投与する方法を有し、前記化合物はEPCR依存性PAR1経路のアゴニストとして作用し、前記化合物は内皮細胞アッセイ系でPAR1シグナル伝達経路を介し、シグナル伝達を調節する。

40

【0029】

さらなる態様で、前記方法は細胞アッセイ系でトロンピンを介したPAR1シグナル伝達のアнтаゴニストとして作用する、第2の化合物治療有効量を投与する方法を有し、前記第2の化合物は内皮細胞アッセイ系でPAR1シグナル伝達経路を介しシグナル伝達を調節する。さらなる態様で、前記方法はAPC/EPCR/PAR1のシグナル伝達によって遺伝子をダウンレギュレートし、トロンピンのシグナル伝達によって遺伝子をアップレギュレートするシグナル伝達を提供する。さらなる態様では、前記方法はAPC/EPCR/PAR1のシグナル伝達によって遺伝子をアップレギュレートし、PAR2のシグ

50

ナル伝達によって遺伝子をダウンレギュレートするシグナル伝達を提供する。詳細な態様では、A P C / E P C R / P A R 1 のシグナル伝達によるアップレギュレーションは約 1 . 3 倍以上で、P A R 2 によるダウンレギュレーションは約 1 . 3 倍未満である。

【 0 0 3 0 】

さらに熟考されるとおり、現在 A P C は、内皮細胞のプロテアーゼ活性化受容体 1 (P A R 1) として知られるトロンピン受容体を介してシグナル伝達することが発見されていた。特に、A P C は E P C R に依存して P A R 1 を活性化し、シグナル伝達を行うことが発見されている。前記発明の詳細は、典型的な実施形態に示されている。

【 0 0 3 1 】

本明細書に説明するとおり、様々な組成物と方法が、A P C と E P C R の相互作用によって P A R 1 を介したシグナル伝達の影響を受ける、炎症および敗血症に関連した疾患の診断と考えられる治療に有用である。

10

【 0 0 3 2 】

前記教示によれば、内皮細胞のシグナル伝達を測定する様々な細胞アッセイ系があることが分かっており、そのシグナル伝達は A P C 、 E P C R 、 P A R 1 、 P A R 2 またはその組み合わせに依存している。これらの系を用い、シグナル伝達を調整する化合物をスクリーニングすることができる。これらの同定された化合物は、特定のシグナル伝達経路を調節する、またこれらのシグナル伝達経路によって制御される炎症プロセスまたは敗血症を調節するのに使用する上で、治療に有効な候補化合物である。

【 0 0 3 3 】

従って、1つの実施形態では、P A R 1 経路を介した内皮細胞のシグナル伝達を調節する化合物のスクリーニング法を示し、a) 典型的な実施形態に沿って A P C に対する反応をシグナル伝達できる、内皮細胞を共発現した E P C R および P A R 1 を有する細胞アッセイ系を提供する工程、b) A P C 活性量の存在下または非存在下で、細胞アッセイ系とテスト化合物を混合する工程、および c) 細胞アッセイ系のシグナル伝達に対するテスト化合物の効果を決定する工程であって、P A R 1 依存性のシグナル伝達を調節する化合物を同定する方法を有する。

20

【 0 0 3 4 】

関連する実施形態では、対象のシグナル伝達経路の調節に關与する遺伝子を同定する、スクリーニング法が提供される。典型的な実施形態に示した方法を用い、シグナル伝達を制御する選択された遺伝子の遺伝子発現レベルの変動を測定することができる。同様に、遺伝子マイクロアレイ分析を用い、シグナル伝達経路の制御に關与する新しい遺伝子を同定することができる。マイクロアレイ分析の典型的な方法は、典型的な実施形態に示す。

30

【 0 0 3 5 】

従って、内皮細胞で制御される遺伝子を同定する方法は記載され：

- a) 典型的な実施形態に沿って E P C R 依存性 P A R 1 経路により A P C に対する反応をシグナル伝達することができる内皮細胞を有する細胞アッセイ系を提供する工程と；
- b) A P C 、 P A R 1 、 または P A R 2 によるシグナル伝達に特異的な化合物を用い、細胞アッセイ系を刺激する工程と；
- c) 刺激された細胞の m R N A に対応する c D N A を単離する工程と；
- d) 遺伝子発現分析系を用いて単離された c D N A を分析し、刺激された細胞でアップレギュレートまたはダウンレギュレートされる遺伝子を同定することで、A P C 、 P A R 1 、 または P A R 2 を介したシグナル伝達により制御される遺伝子を同定する工程と、を有する。

40

【 0 0 3 6 】

本発明は多くの遺伝子を同定し、これらの遺伝子は組織の活性化状態を検出するために有用な標的である (例えば、実施形態 1 および 2 ; 図 1 、 2 、 3) 。これらの一連の標的遺伝子を用い、シグナル伝達の制御状態が疾患の評価または治療の診断または予後に有効である、炎症状態、敗血症、他の疾患のエピソードが生じているか、そのリスクがある患者から得た組織サンプルについて、あらかじめ選択された遺伝子の活性化状態を評価する

50

ことができる。従って、本発明では組織のAPC、PAR1、またはPAR2経路の活性化状態を検出する方法を検討し：a) 典型的な実施形態に沿って、EPCR、PAR1、PAR2、またはAPCを介した内皮細胞のシグナル伝達に対する、活性化状態と関連した制御される遺伝子を示す、前記一連の遺伝子を提供する工程と；b) EPCR、PAR1、PAR2、またはAPCを介した活性化を受ける内皮細胞を含む組織で、前記一連の遺伝子要因に対する遺伝子の発現レベルを決定する工程であって、それによって組織の遺伝子活性化状態を決定する工程とを有する。

【0037】

これらの標的遺伝子をスクリーニングアッセイに用い、前記標的遺伝子によって制御される、シグナル伝達を調節できる化合物を同定することもできる。

10

【0038】

さらに検討しているのは、内皮細胞でシグナル伝達を制御する化合物をスクリーニングする方法であり：a) 典型的な実施形態に沿って、EPCR依存性PAR1経路によりAPCに対する反応をシグナル伝達できる内皮細胞を有する細胞アッセイ系を提供する工程と；b) テスト化合物の存在下および非存在下で、APC、PAR1、またはPAR2によるシグナル伝達に特異的な化合物を用いて、細胞アッセイ系を刺激する工程と；c) 前記テスト化合物の存在下および非存在下両方で刺激された細胞のmRNAに対応するcDNAを単離する工程と；d) 遺伝子発現分析システムを用いて単離されたcDNAを分析し、前記刺激された細胞で調節される遺伝子を同定する工程と；e) 刺激された細胞群でアップレギュレートまたはダウンレギュレートされた遺伝子を比較する工程であって、それによりAPC、PAR1、またはPAR2を介したシグナル伝達により調節される化合物を同定する工程と、を有する。

20

【0039】

また、組成物および製品が検討され、それらは本発明の方法の実行に用いるために形成または包装される、典型的な実施形態で説明された1つ以上の試薬を含む。

【発明を実施するための最良の形態】**【0040】**

「内皮細胞のシグナル伝達」という用語は、APCなどのリガンドと、内皮プロテインC受容体(EPCR)やプロテアーゼ活性化受容体(PAR)-1などの受容体とが相互作用することで、保護的なプロテインC経路またはプロテアーゼ活性化受容体(PAR)-1経路内で内皮細胞の保護的なシグナル伝達が生じることを指す。

30

【0041】

「活性化プロテインC(APC)」という用語は、内皮細胞でのPAR1開裂の補助受容体として内皮プロテインC受容体(EPCR)を用いることが示されているプロテアーゼを指す。前記保護的なプロテインC経路は、敗血症における凝固と炎症の増悪を均衡する。「APC活性量」という用語は、PAR1などの細胞受容体と相互作用し、内皮細胞で保護的な蛋白活性レベルまで、遺伝子が発現する量のAPCを指す。

【0042】

「内皮プロテインC受容体(EPCR)」という用語は、内皮細胞に特異的なシグナル伝達に関与する受容体を指す。EPCRはAPCに結合し、PAR1開裂の補助受容体であり、保護的なプロテインC経路内で内皮細胞の保護的なシグナル伝達が生じる。

40

【0043】

「プロテアーゼ活性化受容体(PAR)」という用語は、7回膜貫通型ドメインのG蛋白共役受容体を指す。PAR1は、APCまたはトロンビンによる蛋白分解で活性化される。APCは補助受容体として内皮プロテインC受容体(EPCR)を利用する、内皮細胞のPAR1を開裂し、PAR1を活性化することが示されている。遺伝子プロファイリングからは、APC/EPCR/PAR1のシグナル伝達は、例えば単球遊走因子-1(MCP-1)などを含む、APC誘導性保護遺伝子をすべて説明できることが証明された。

【0044】

50

トロンピンはPAR1のN末端エキソドメイン(exodomain)に結合し、Arg41の後で開裂し、新しい受容体のN末端を生成する。PAR1、PAR3、PAR4はトロンピンにより活性化することができ、トロンピンはほぼ確実に、in vivoでこれらの受容体の生理活性化因子である。他にもいくつかのプロテアーゼがこれらの受容体を生産的に開裂することができ、in vivoでその機能に寄与することができる。APCはPAR1を開裂し、その受容体を活性化することができる。PAR2は、トリプシン自身、肥満細胞のトリプターゼ、好中球プロテイナーゼ3、組織因子/第VIIa因子/第Xa因子、膜につながったセリンプロテアーゼ-1を含む、複数のトリプシン様セリンプロテアーゼによって活性化される。ただし、PAR2はトロンピンによって開裂されない。

10

【0045】

「プロテアーゼ活性化受容体(PAR)-1経路」、「保護的なプロテインC(PC)経路」または「PAR1依存性シグナル伝達」という用語は、保護的なプロテインC(PC)何のAPCおよびEPCRによりPAR1受容体を活性化し、トロンピン誘導性炎症反応を均衡または遮断し、敗血症を予防することを指す。

【0046】

「APC/EPCR/PAR1で誘導される保護的な遺伝子」または「APC/EPCR/PAR1で誘導される保護的な蛋白質」という用語は、APC/EPCR/PAR1シグナル伝達経路によって誘導、活性化、不活性化、または抑制され、その結果哺乳類対象物の炎症反応の抑制および敗血症の予防を生じる遺伝子、蛋白質、またはポリペプチド

20

【0047】

「細胞アッセイ系」という用語は、例えば、保護的なプロテインC経路内の内皮細胞の保護性シグナル伝達を測定するため、EPCR、PAR1、PAR2を発現した線維芽細胞または内皮細胞などの細胞株を利用したin vitro細胞アッセイ系を指す。細胞アッセイ系には、これだけに限らないが、以下の例がある、(1)ヒトEPCR、EPCR変異株、ヒトPAR2、またはヒトPAR1を形質移入したPAR1欠乏性線維芽細胞における、Egr-1プロモーター-ルシフェラーゼリポーター活性の誘導。ルシフェラーゼ活性のfold inductionは、APC、PAR1アゴニストペプチド、PAR2アゴニストペプチド、またはトロンピンで刺激することで測定される。図1Aおよび1Bを参照、(2)Erk1/2リン酸化で測定した、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)でのAPCシグナル伝達。PAR1アゴニスト、PAR2アゴニスト、またはトロンピン刺激。図1Cおよび1Dを参照、(3)遺伝子アレイアッセイによりヒト内皮細胞で前記一連の遺伝子を誘導した、APC-およびPAR1特異的アゴニスト。図2を参照。

30

【0048】

前記細胞アッセイ系は、内因的にまたはPAR1およびEPCRのDNA発現ベクターで遺伝子移入した細胞によって、PAR1およびEPCRを発現したあらゆる細胞タイプで実行することができる。PAR1は広範な細胞で発現され、APC-EPCR-PAR1シグナル伝達は、事実上、EPCRを発現したすべての細胞で生じる可能性がある。EPCRは内皮細胞に非常に特異的であるが、EPCR発現は胎盤の栄養芽細胞(Crawley, J. T., et al., Thromb Haemost 88: 259~66, 2002)、単球および単球細胞株(Galligan, L., et al., Br J Haematol 115: 408~14, 2001)、様々なヒト腫瘍細胞タイプ(Tsuneyoshi, N., Thromb Haemost 85: 356~61, 2001; Scheffer, G. L., et al., Eur J Cancer 38: 1535~42, 2002)で示されている。さらに、可溶性EPCRは活性化好中性白血球に補充することができ、APC-EPCR-PAR1シグナル伝達経路はこれらの細胞でも有効と考えられる(Kurosawa, S., et al., J Immunol 165: 4697~703, 2000)。

40

50

【0049】

「レポーター遺伝子の活性を測定する方法」という用語は、遺伝子産物、核酸、蛋白質を測定することを指し、前記遺伝子は、真核細胞で容易に検出され、DNAが密接に関連している、または結合した別の遺伝子の活性を決定するマーカーとして用いられる産物を生産する、真核細胞由来の遺伝子であることが多い。前記レポーター遺伝子の活性には、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコール・アセチル・トランスフェラーゼ、緑色蛍光蛋白質などがあるが、これだけに限らない。前記レポーター遺伝子の活性は、通常、APC/EPCR/PAR1経路を介したシグナル伝達の結果としての遺伝子転写レベルでの遺伝子発現の指標である。

【0050】

「テスト化合物」という用語は、APC/EPCR/PAR1経路を介したシグナル伝達の結果としての遺伝子発現が上昇または減少するように定められた、核酸、DNA、RNA、蛋白質、ポリペプチド、または小さな化学物質を指す。前記テスト化合物は、アンチセンスRNA、リボザイム、ポリペプチド、または小さな分子化学物質でありうる。「テスト化合物」という用語は、いかなる小さな化学化合物、または例えば、蛋白質、糖、核酸、脂質などの生物学的存在でもよい。典型的にテスト化合物は、小さな化学分子とポリペプチドである。「APCまたはPAR1によるシグナル伝達に特異的なテスト化合物」は、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質の修飾因子と決定される。

【0051】

「遺伝子発現を調節する」、または「シグナル伝達を調節する」という用語は、APC/EPCR/PAR1経路を介したシグナル伝達の結果として遺伝子発現産物、RNAまたは蛋白質が増加または減少することを指す。

【0052】

「遺伝子の活性化状態」、「アップレギュレーション」、または「ダウンレギュレーション」という用語は、テスト化合物またはエフェクター分子で処理した細胞または組織で遺伝子発現を調節し、APC/EPCR/PAR1経路を介したシグナル伝達の結果として、遺伝子発現産物、RNA、または蛋白質が増加または減少することを指す。「遺伝子の活性化状態」は、テスト化合物を処理していない組織と比較し、テスト化合物を処理した組織に由来するマイクロアレイで、遺伝子の倍増または減少を測定することで、遺伝子発現パネルのマイクロアレイで測定することができる。「遺伝子の活性化状態」は、例えば、ヒトEPCRを遺伝子移入したPAR1欠乏性線維芽細胞の、またはErk1/2のリン酸化として測定されるヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)のEgr-1プロモーター/ルシフェラーゼ活性などのレポーター遺伝子活性により測定することができる。遺伝子活性化状態の「アップレギュレーション」または「遺伝子発現レベルの活性化」は、テスト化合物またはエフェクター分子を処理した細胞または組織で遺伝子発現が増加し、APC/EPCR/PAR1経路を介したシグナル伝達の結果として、遺伝子発現産物、RNAまたは蛋白質で測定した遺伝子活性が約1.3倍以上増加することを指す。遺伝子活性化状態の「ダウンレギュレーション」または「遺伝子発現レベルの抑制」は、テスト化合物またはエフェクター分子を処理した細胞または組織で遺伝子発現が低下し、APC/EPCR/PAR1経路を介したシグナル伝達の結果として、遺伝子発現産物、RNAまたは蛋白質で測定した遺伝子活性化状態が約0.7倍未満となることを指す。前記遺伝子活性化状態は、APC/EPCR/PAR1経路を介したシグナル伝達の結果として、遺伝子発現産物RNAまたは蛋白質により測定した場合、遺伝子発現の差が約1.0倍、また典型的には約0.7~1.3倍の場合は、変化がないと見なすことができる。

【0053】

「接触する」という用語は、PAR1受容体を介したシグナル伝達に対する作用を測定できるように、被験物質を可溶性の状態に細胞アッセイ系に混合することを指す。

【0054】

「反応をシグナル伝達する」または「シグナル伝達の活性化に効果的である」または「細胞アッセイ系を刺激する」という用語は、PAR1受容体の蛋白質分解性開裂のための

10

20

30

40

50

補助受容体としてのEPCRを用い、それによりPAR1を活性化し、炎症および敗血症に対する内皮細胞の保護反応を誘導する、APCの活性を指す。

【0055】

「作用を検出する」という用語は、細胞アッセイ系で作用を測定することを指す。例えば、前記検出された作用は、ヒトEPCRを遺伝子移入したPAR1欠乏性線維芽細胞で測定することができ、APCまたはアゴニストで刺激することで、Egr-1プロモーター活性(ルシフェラーゼレポーター)のfold inductionを測定することができる。前記検出された作用は、Erk1/2リン酸化で測定した、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)でのAPCシグナル伝達である可能性がある。さらに、前記検出された作用は、遺伝子アレイアッセイによりヒト内皮細胞で前記一連の遺伝子を誘導した、APCおよびPAR1特異的アゴニストであり得る。

10

【0056】

「調節が示されるアッセイ」という用語は、細胞アッセイ系が、APCによる細胞活性化でPAR1受容体を開裂する補助酵素としてEPCRを利用し、それによりPAR1を活性化する結果を指す。PAR1の活性化は、炎症と敗血症に対する内皮細胞の保護反応を誘導する。

【0057】

「炎症」または「炎症反応」という用語は、細菌、外傷、毒素、熱、その他の原因により組織が傷害された時に発生する、自然免疫反応を指す。傷害された組織は、ヒスタミン、ブラジキニン、セロトニンなどを含む化合物を放出する。炎症とは、急性反応(つまり、炎症プロセスが活動的な反応)と慢性反応(つまり、ゆっくりとした進行と新しい結合組織の形成で特徴付けられる反応)の両方を指す。急性炎症と慢性炎症は、関与する細胞のタイプで区別することができる。急性炎症には多形核好中球が関与することが多いが、慢性炎症は通常、リンパ組織球性および/または肉芽腫性の反応によって特徴付けられる。炎症には、特異的および非特異的な防御システムの両方の反応が含まれる。特異的な防御システムの反応は、抗原(可能性としては自己抗原も含む)に対する特異的な免疫系反応である。非特異的な防御システムの反応は、免疫記憶ができない白血球を介した炎症反応である。そのような細胞には、顆粒球、マクロファージ、好中球、好酸球が含まれる。特異的なタイプの炎症の例は、広汎性炎症、病巣性炎症、クループ性炎、間質性炎症、閉塞性炎症、実質性炎症、反応性炎症、特異的炎症、毒性炎症、外傷性炎症である。

20

30

【0058】

「敗血症」または全身性炎症反応症候群(SIRS)という用語は、入院100件につき2件の割合で発生する疾患を指す。敗血症は細菌感染によって引き起こされ、体内のどこからでも生じうる。一般的な敗血症の部位は、腎臓、肝臓、胆嚢、腸、皮膚、肺などである。敗血症には髄膜炎が伴う可能性もある。小児では、敗血症に骨の感染(骨髄炎)が伴う可能性がある。

【0059】

「虚血性障害」という用語は、例えば、冠動脈の遮断により、心筋組織が破壊されることで生じる虚血性心筋症を指す。虚血性心筋症は、うっ血精神不全の原因として一般的である。虚血性心筋症の患者は、一時期、急性心発作、狭心症、不安定性狭心症になる可能性がある。

40

【0060】

「脳卒中」という用語は、脳の一部への血液供給が遮断され、虚血性障害または組織の死および脳機能の損失に至ることを指す。脳卒中は、血餅またはアテローム性動脈硬化の結果、生じる可能性がある。脳卒中のリスクは、喫煙、高血圧、糖尿病、高脂血症、心疾患により上昇する。

【0061】

「アポトーシス」という用語は、プログラムされた細胞死を指す。アポトーシスは、核DNAの断片化で特徴付けられる、遺伝的に定められた細胞の自己破壊プロセスを指す。アポトーシスは、刺激の存在によってか、刺激あるいは抑制因子の除去によって活性化す

50

る。これは、(自己寛容の発達の中で自己を標的とした免疫細胞や変態を受ける両生類の幼生細胞として)DNAが傷害されたか、余分であるか、望ましくない細胞を除去する正常な生理学的プロセスであり、(遺伝子変異により)停止すると、制御できない細胞増殖や腫瘍の形成に至る可能性がある。

【0062】

遺伝子発現プロファイル

本方法では、内皮細胞を調節する組成物をスクリーニングする。遺伝子の発現レベルは内皮細胞の様々な細胞状態で決定され、発現プロファイルを示す。特定の内皮細胞の状態に関する内皮の発現プロファイルは、状態の「指紋」となる可能性がある；2つの状態で特定の遺伝子を同様に発現することができるが、多数の遺伝子を同時に評価すると、その細胞の状態に特有の遺伝子発現を発生させることができる。敗血症の凝固および炎症増悪の状態と対比して、抗炎症状態で内皮細胞の発現プロファイルを比較することで、これらの状態のそれぞれで(遺伝子のアップレギュレーションおよびダウンレギュレーションを含む)遺伝子の重要性に関する情報を入手する。その後、この情報を多数の方法で用いることができる。例えば、特定の治療法の評価が可能であり：遺伝子発現プロファイルに沿って、特定患者で抗炎症薬が抗炎症薬として作用するか否かを評価することができる。同様に、診断を行い、確認することができる：患者が抗炎症性内皮細胞の遺伝子発現プロファイルを持つか否かを確認することができる。さらに、これらの遺伝子発現プロファイルを薬物候補のスクリーニングに用いることができ、特定の発現プロファイルを模倣した薬物を発見することができる；例えば、EPCRを内皮細胞でPAR1を開裂する補助受容体として用い、APCと同様の抗炎症性発現プロファイルを誘導する薬物として、スクリーニングを行うことができる。従って、異なる状態の内皮細胞の中で、異なって発現される遺伝子を同定、説明し、そこから本明細書にさらに説明するとおり、発現プロファイルを作成する。例えば、抗炎症状態または敗血症の凝固および炎症増悪状態にある内皮細胞に対する、異なって発現された核酸を決定することがここにおいて提供される。

【0063】

本明細書で用いる「ディファレンシャル(差次的)発現」、または文法的に同等の用語は、内皮細胞中の遺伝子の時間的パターンまたは細胞発現パターンの定性的かつ定量的な差を指す。従って、異なって発現された遺伝子は、内皮細胞の状態の活性化または不活性化を含む、定性的にその発現を変化させることができ、例えば、組織因子やトロンピンで開始される敗血症の凝固および炎症増悪は、介する致死的な反応を誘発することができ、また保護蛋白(PC)経路は、活性化プロテインC(APC)、内皮細胞PC受容体(EPCR)、プロテアーゼ活性化受容体(PAR)-1を介することができる。遺伝子は、別の状態と比べた特定の状態で、作動したり、停止することができる。2つ以上の状態を比較することもできる。そのような定性的に制御される遺伝子は、ある状態や細胞タイプで発現パターンを示し、そのような状態や細胞タイプの1つにおいて、標準的な方法により検出することができるが、両方で検出することはできない。代わりに、発現が増加または減少する、つまり、遺伝子発現がアップレギュレートすることで転写量が増加するか、ダウンレギュレートすることで転写量が減少するという点で、測定は定量的となりうる。発現が異なる程度は、標準的な特徴決定法、例えばAffymetrix GeneChip(登録商標)発現アレイ(Lockhart, Nature Biotechnology, 14:1675~1680, 1996;この参考文献と本明細書で引用されるすべての参考文献は、この参照により組み込まれる)を用い、定量するために十分であればよい。他の方法には、定量的な逆転写酵素PCR、ノーザン分析、RNAアーゼ保護などがあるが、それだけに限らない。発現の変化または調節(つまり、アップレギュレーションまたはダウンレギュレーション)は、少なくとも約5%、典型的には少なくとも約10%、典型的には少なくとも約20%、少なくとも約30%、または典型的には少なくとも約50%、または少なくとも約75%、典型的には少なくとも約90%である。

【0064】

1、2、3、4、5、10以上のいずれの遺伝子でも、炎症反応と敗血症、そのような

反応の遮断について、根拠の評価が可能である。表3では、APC-PAR1シグナル伝達により変化がないかダウンレギュレートされる、そしてトロンビンのシグナル伝達によりアップレギュレートされることが示されている。例えば、敗血症または炎症に有効な治療を開発する上で、以下の遺伝子ターゲットをダウンレギュレートし、敗血症または炎症反応の一方または両方を予防することができる。これらの遺伝子には、SH-PTP3、W28170、フルクトース-6-ホスファターゼ、2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、W28616、BID、NF-KB2、トロンボスポンジン-1、6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、神経線維腫症2型腫瘍抑制因子、陽イオン性アミノ酸トランスポーター2、W28616、NF- κ B p65、3、TTF-I相互作用ペプチド12、ATRC2、アデューシン、sortilin、p53細胞腫瘍抗原、W28257、hERRa1、G蛋白共役受容体、EGFRBP-GRB2、Pax8、SH-PTP3、5T4、bcl-xL、ディスインテグリン-メタロプロテアーゼ、C1q-関連因子、サイクリンD1、AI743606、ミオシン-Ixb、GNS、ISLR、Stat2、幹細胞因子、c-ets-1、usurpin、染色体5q21-22、クローン-A3-A、トロンボスポンジン、ELL2、二重特異性蛋白ホスファターゼ、ピトロネクチン受容体サブユニット、PCTAIRE-2、フォリスタチン、ets-2、ELL2、ユートロフィン、C8FWリン蛋白質、PCTAIRE-2、fra-2、MINOR、GADD34、IL8、SSR、ニューロン由来オーファン受容体、CGGBP、nma、jun-B、チロシンホスファターゼ、GRO- α 、CtIP、PRDII-BF1、血管内皮増殖因子、スタニオカルシン関連蛋白質、CL100、BMP-2A、NF-Atc、mrg1、jun-B、VEGF、STC、ATF3などがあるが、これだけに限らない。これらの遺伝子の受入番号は、表3に見ることができる。この前記一連の遺伝子は、APC/EPCR/PAR1シグナル伝達経路の結果として、APCを処理した細胞でダウンレギュレートまたは抑制されるが、トロンピンを処理した細胞でアップレギュレートされる。

【0065】

1、2、3、4、5、10以上のいずれの遺伝子でも、炎症反応と敗血症とそのような反応の遮断について、根拠の評価が可能である。表1は、PAR2アゴニストのシグナル伝達により変化がないか、内皮細胞のPAR1アゴニストのシグナル伝達またはAPCのシグナル伝達によりアップレギュレートされる、以下の遺伝子を示している。例えば、敗血症または炎症に有効な治療を開発する上で、以下の遺伝子ターゲットをアップレギュレートし、敗血症または炎症反応の一方または両方を予防することができる。評価すべきさらなる遺伝子には、MCP-1、qe82d12、x1、RACH1、PAC747L4、T-プラスチン、エンドセリン受容体B型様、VEGF、wx69d10、x1などがあるが、これだけに限らない。これらの遺伝子の受入番号は、表1に見ることができる。この前記一連の遺伝子はPAR1受容体アゴニストまたはAPCによりアップレギュレートまたは誘導されるが、PAR2受容体アゴニストでは誘導されない。一般に、これらの遺伝子評価に用いられるオリゴヌクレオチドアレイは、3'の非翻訳領域に由来する。

【0066】

異なって発現された遺伝子は、「発現プロフィール遺伝子」を意味することができ、これには「ターゲット遺伝子」が含まれる。本明細書で用いる「発現プロフィール遺伝子」は、内皮細胞の状態または活性の調節、または疾患の治療に有用な化合物を同定する方法でその発現パターンを利用することができる、異なって発現された遺伝子を指すか、代わりに、前記遺伝子を免疫疾患の予後評価または診断評価の一部として利用することができる。例えば、通常、抗炎症反応などの特定状態と関連して示される、前記発現プロフィール遺伝子の化合物の効果は、例えば、その状態を調節するか、誘導または維持するため、前記化合物の効果の評価のために用いることができる。そのようなアッセイについては、以下に詳述する。代わりに、以下にさらに詳述するとおり、前記遺伝子を炎症性疾患または敗血症の診断または治療に利用することができる。場合によっては、以下にさらに詳

述するとおり、発現プロファイル遺伝子の一部のみを利用する。

【0067】

本明細書で用いるとおり、「発現プロファイル」は、特定の状態で存在する、2種類から全種類の発現プロファイル遺伝子から作成した遺伝子発現パターンを指す。前記に概要を示したとおり、発現プロファイルはある意味で特定の細胞状態の「指紋」または「青写真」であり、2つ以上の状態が同様に発現される遺伝子を有する場合、その状態全体の発現プロファイルはその状態に特有である。特定の内皮細胞状態について得られた遺伝子発現プロファイルは、特定の疾患または病状の診断や様々な治療法の評価などを含む、様々な応用に有用である可能性がある。さらに、異なる内皮細胞状態の発現プロファイル間を比較することも、同様に有用である。発現プロファイルには、異なって発現された少なくとも2つの遺伝子が表現されている限り、2つの状態で感知できるほど変化しない遺伝子を含む可能性がある。前記遺伝子発現プロファイルには、以下に定義するとおり、少なくとも1つのターゲット遺伝子を含むこともできる。代わりに、前記プロファイルに1つ以上の状態を表現した、すべての遺伝子を含めることができる。具体的な発現プロファイルは、以下に説明する。

10

【0068】

遺伝子発現プロファイルは、いくつかの方法で定義することができる。例えば、遺伝子発現プロファイルは、どのような数でも、遺伝子特定セットの相対的な転写レベルでありうる。代わりに、1つの状態の様々な遺伝子発現レベルと別の状態の同じ遺伝子発現レベルとを比較することで、遺伝子発現プロファイルを定義することもできる。例えば、遺伝子はアップレギュレートされる、ダウンレギュレートされる、または2つの状態で実施的に同一レベルである可能性がある。

20

【0069】

抗炎症療法に反応する細胞の遺伝子発現には、SH-PTP3、W28170、フルクトース-6-ホスファターゼ、2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、W28616、BID、NF-KB2、トロンボスポンジン-1,6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、神経線維腫症2型腫瘍抑制因子の少なくとも2つの組み合わせを含むことができる。この発現プロファイルは、APCの存在下でダウンレギュレートされる遺伝子と、トロンビンの存在下でアップレギュレートされる遺伝子に対するものである。抗炎症療法に反応する細胞に対する、別の遺伝子発現プロファイルはMCP-1を含めることができる。この発現プロファイルは、APCまたはPAR1でアップレギュレートされる遺伝子と、PAR2アゴニストで変化しない遺伝子とに対するものである。

30

【0070】

ターゲット遺伝子と経路遺伝子 (Pathway gene)

発現プロファイル遺伝子に加え、ターゲット遺伝子についても提供される。本明細書で用いる「ターゲット遺伝子」は、異なって発現された発現プロファイル遺伝子を指し、その発現が特定の状態に固有であり、それによりターゲット遺伝子の転写の有無が細胞の状態を示すことができる。ターゲット遺伝子は、特定の状態に完全に固有のものとすることができ、前記遺伝子の有無が特定の細胞状態のみで見られるか、代わりに他のすべての状態にある細胞が前記遺伝子を発現しているが、最初の状態のみで見ることができる。従って、例えばSH-PTP3の発現は、敗血症または炎症状態の指標とすることができる。SH-PTP3の発現は、APCの存在下でダウンレギュレートされ、トロンビンの存在下でアップレギュレートされる。代わりに2つの状態の比較と関連させてターゲット遺伝子を同定することができ、つまり、その状態を別の特定の状態と比較し、ターゲット遺伝子の特異性を決定する。ターゲット遺伝子は、本明細書に説明する、診断、予後、化合物同定方法に利用することができる。

40

【0071】

最初の状態のターゲット遺伝子を、第2の状態の発現プロファイル遺伝子とすることが可能であることは理解されるべきことである。1つの状態での特定のターゲット遺伝子の

50

有無は、その状態の診断に有用となる可能性があり、異なる状態の同じ遺伝子を発現プロフィール遺伝子とすることができる。

【0072】

さらに、経路遺伝子について、本明細書に示す。「経路遺伝子」は、発現プロフィール遺伝子と相互作用する遺伝子産物が能力によって定義される。経路遺伝子は、ターゲット遺伝子または発現プロフィール遺伝子の一方または両方を示すこともでき、以下にさらに詳述するとおり、発現プロフィール遺伝子の修飾因子として含めることができる。そのような発現プロフィール遺伝子、ターゲット遺伝子、経路遺伝子の産物、またはそのような遺伝子産物に対する抗体も含めることができる。さらに、そのようなプロフィール、遺伝子、遺伝子産物が寄与できる、細胞および動物を基本とした内皮細胞状態のモデルに関する組換えと利用についても述べる。

10

【0073】

遺伝子ネットワークのマッピングと遺伝子機能の同定における遺伝子発現モニタリングの利用

遺伝子ネットワークを調べ、特定遺伝子の正常機能と異常機能を研究する方法、組成物、装置が提要される。前記方法には、多数の遺伝子の発現レベルを定量することが関係する。実施形態によっては、高密度のオリゴヌクレオチドアレイをターゲットの核酸サンプルとハイブリダイズするために用い、典型的には10以上、100以上、また典型的には1000以上の、多数の遺伝子の発現レベルを検出する。

【0074】

様々な遺伝子サンプルはこれらの方法に沿って調整され、遺伝子ネットワークの多数の状態を表現する。これらのサンプルの発現レベルを比較することで、一定の統計学的信頼性で、遺伝子間の制御関係を決定することができる。発現データに基づき、動的マップを作成することができる。

20

【0075】

そのような遺伝子ネットワークマップは、創薬に非常に有用である。例えば、対象の遺伝子が特定の疾患と関連していることが分かった場合、そのような遺伝子ネットワークマップを用い、考えられる上流の制御遺伝子リストを見つけることができる。そうすれば、薬物のターゲットとして、前記考えられる上流遺伝子に研究努力を注ぐことができる。同様に、遺伝子変異が疾患を引き起こす場合、その疾患の病因に関連する遺伝子と関連しない遺伝子の両方に影響する可能性がある。前記関係を探索することで、病原体遺伝子を発見することができる。そのような実施形態では、疾患状態と多数の遺伝子発現との関係を決定し、患部組織で発現が変化した遺伝子を同定する。前記変化した遺伝子を制御する上流の遺伝子は、機能が変化したか、可能性としては変異したと示すことができる。

30

【0076】

一般に、ターゲット遺伝子下流の制御遺伝子を同定したら、遺伝子の制御関係を探索し、考えられる変異を検出することができる。1つの実施形態では、高密度オリゴヌクレオチドアレイを用い、下流で正の制御されていると考えられるいくつかの遺伝子の発現をモニターする。これらの正の制御された遺伝子の発現が減少することは、ターゲット遺伝子の機能が障害されている可能性を示唆する。そのような機能障害は、ターゲット遺伝子に変異がある可能性を示していることがある。次に、タイリング法(tiling method)などの他の変異検出法を用い、変異の性質を確認、検出することができる。各遺伝子セットがターゲット遺伝子で制御され、そのような考えられる下流の正の制御遺伝子について、多数のセットを同時にモニターすることができる。この、多数の遺伝子の変異を同時に検出する方法は、以前の技術方法と比べて大きく改善している。正の制御されている下流遺伝子も同様に利用できることは、当業者にとって明白であろう。

40

【0077】

同様に、一部の実施形態では、多数の遺伝子をモニタリングすることで、特定遺伝子の制御機能を同定することができる。さらなる実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドを適用することで、対象遺伝子の発現が抑制される。多数の遺伝子発現をモニターす

50

ること、発現パターンを提供する。次に、対象遺伝子の発現を修復し、多数の遺伝子の発現を同様にモニターし、別の発現パターンを提供する。発現パターンを比較することで、対象遺伝子の制御機能を推測することができる。

【0078】

遺伝子発現制御の検出

遺伝子の活性は、その産物、つまり前記遺伝子によってコードされる蛋白質や、他の分子の活性によって反映される。これらの産物分子は、生物学的機能を果たす。しかし、特定の遺伝子では、遺伝子産物の活性を直接測定することが困難なことが多い。代わりに、抗炎症活性や最終産物の量、またはペプチドプロセッシングの中間体を、前記遺伝子活性の指標として決定する。さらに頻繁には、転写物、RNAプロセッシングの中間体、成熟mRNAなど、中間体の量や活性は、遺伝子活性の指標として検出される。

10

【0079】

多くの場合、遺伝子最終産物の形態と機能は不明である。このような場合、遺伝子活性は従来、転写物、RNAプロセッシングの中間体、成熟mRNA、または蛋白質産物の量や活性、または蛋白質産物の機能活性により測定している。

【0080】

遺伝子の活性を測定する方法はすべて、少なくともいくつかの実施形態に有用である。例えば、従来のノーザンブロット法、ハイブリダイゼーション、ヌクレアーゼ保護、RT-PCR、ディファレンシャルディスプレイ法は、遺伝子活性の検出に利用されてきた。これらの方法は、いくつかの実施形態で有用である。しかし、これらの方法は、多数の遺伝子の発現を検出する方法と関連した場合に最も有用である。

20

【0081】

高密度のアレイは、特に転写、RNAプロセッシング、分解レベルでの発現制御をモニターリングする上で有用である。遺伝子発現モニターリングにおける高密度アレイの製造と応用は、例えば、これまでも国際公開番号第WO 97/10365号、第WO 92/10588号、米国特許番号第6,309,822号；米国特許第6,040,138号；1993年12月15日に提出された米国シリアル番号第08/168,904号；1990年12月6日に提出されたシリアル番号07/624,114、1990年6月7日に提出されたシリアル番号第07/362,901号で開示され、それぞれ参考文献はこの参照により本明細書に組み込まれる。高密度アレイを用いたいくつかの実施形態では、米国特許番号番号5,445,934で開示され、非常に大規模な固定ポリマーの合成(Very Large Scale Immobilized Polymer Synthesis: VLSIPS)などの方法を用いて、高密度オリゴヌクレオチドアレイを合成し、この参照により本明細書に組み込まれる。各オリゴヌクレオチドは、基質の既知の部位を占めている。核酸ターゲットのサンプルは、高密度アレイオリゴヌクレオチドでハイブリダイズし、次にアレイ中の各プローブとハイブリダイズしたターゲットの核酸量を定量する。1つの定量法は、共焦点顕微鏡と蛍光標識を用いる方法である。GeneChip(登録商標)システム(Affymetrix、カリフォルニア州サンタクララ)は、特にハイブリダイゼーションの定量に適しているが、同様のシステムや他の事実上等価な検出法も利用できることは、当業者にとって明白であろう。

30

40

【0082】

高密度のアレイは、大量の不均一な核酸存在下、遺伝子の発現レベルのわずかなばらつきを定量するのに適している。そのような高密度のアレイは、基質で新規(denove)合成するか、核酸アレイを基質の特定部位にスポットまたは輸送することで、製造することができる。核酸は、対象アレイをクローニングした断片を含む細菌プラスミドなどの生物物質から精製、単離する。鋳型の増幅により、適当な核酸を生成することもできる。説明を限定するつもりはないが、ポリメラーゼ連鎖反応および/またはin vitroでの転写の一方または両方が、核酸の増幅法として適している。

【0083】

合成されたオリゴヌクレオチドアレイは、本明細書の方法に特に有用である。オリゴヌ

50

クレオチドアレイは、生産効率、アレイ内やアレイ間の変動性の減少、情報内容の増加、高いシグナル - ノイズ比など、他の方法に対して多数の利点がある。

【0084】

当業者は当該分野の技術の1つにより、遺伝子ネットワークを調査するため、転写の制御を測定することが望ましいことが理解される。通常、生物の細胞核はすべて同じ遺伝子を持つため、異なる細胞タイプの蛋白質産物の違いは、通常、選択的な遺伝子発現の結果である。制御の最初の段階は転写レベル、つまり、遺伝子がRNAポリメラーゼにより初期のpre-mRNAに転写される頻度を変化させることであることは、当該分野で周知である。転写はmRNAプールの入力情報を構成するため、遺伝子発現の制御において、転写の制御は最も重要な段階の1つである。当該分野では、様々な方法で転写制御を達成できることが一般的に知られている。制限するつもりはないが、例として、転写はa) シス作用型の転写制御アレイと転写因子、b) 単一の転写ユニットからの異なる遺伝子産物、c) 連続的発現機構、d) クロマチン構造による遺伝子発現の長期的制御により制御することができる。これらのすべての制御レベルで個々の遺伝子の転写制御を検出する方法が提供される。

10

【0085】

大量の並列的な遺伝子発現モニタリング

大量の並列的な遺伝子発現をモニタリングする1つの方法は、高密度の核酸アレイを基本としている。遺伝子発現をモニタリングする核酸アレイ法は、PCT出願の番号第WO 92/10588号で開示、考察され、本明細書にこの参考により組み込まれる。

20

【0086】

一般に、遺伝子発現をモニタリングするこれらの方法には、(a) 1つ以上のターゲット遺伝子のRNA転写物、またはこのRNA転写物に由来する核酸を有するターゲット核酸のプール示す工程と、(b) 高密度アレイのプロブに核酸サンプルをハイブリダイズする工程と、(c) ハイブリダイズした核酸を検出し、相対的および/または絶対的な発現(転写、RNAプロセッシング、または分解)レベルを計算する工程とを含む。

【0087】

当業者は当該分野の技術の1つにより、核酸サンプルが、対象転写物を反映したターゲットの核酸アレイを含むことが望ましいことが理解される。従って、適切な核酸サンプルは、対象転写物を含むことができるか、対象転写物由来の核酸を含むことができる。本明細書に使用するとおり、転写物由来の核酸は、その合成に対してmRNA転写物または部分列が、最終的に鋳型として機能する核酸を指す。従って、転写物から逆転写したcDNA、そのcDNAから転写したRNA、そのcDNAから増幅したDNA、増幅したDNAから転写したRNAなどは、すべて前記転写物に由来し、そのように由来した産物を検出することは、サンプル中に元の転写物が存在するおよび/または豊富にあることを示す。従って、適切なサンプルには、遺伝子の転写物または遺伝子、前記転写物から逆転写したcDNA、前記cDNAから転写したcRNA、前記遺伝子から増幅したDNA、増幅したDNAから転写したRNAおよびそれと同等なものが含まれるが、これだけに限らない。本明細書で用いるとおり、転写物にはpre-mRNA新生転写物、転写物のプロセッシング中間体、成熟mRNA、分解生成物を含むことができるが、これだけに限らない。すべてのタイプの転写物をモニターする必要はない。例えば、成熟mRNAレベルのみを測定すると選択することもできる。例えば、米国特許番号第6,340,565号、米国特許出願番号第20010031462号を参照し、本明細書にこのそれぞれの参考により組み込まれる。

30

40

【0088】

他の適切な増幅方法には、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(Innis, et al., PCR Protocols. A Guide to Methods and Application. Academic Press, Inc. San Diego, 1990)、リガーゼ連鎖反応(LCR)(Wu and Wallace, Genomics, 4:560, 1989, Landegren, et al., Science

50

, 241:1077, 1988、および Barringer, et al., Gene, 89:117, 1990)、転写増幅 (Kwoh, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173, 1989)、自己維持的なアレイ複製 (self-sustained sequence replication) (Guatelli, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87:1874, 1990) などがあるが、これだけに限らない。それぞれの引用は、この参考により本明細書に組み込まれる。

【0089】

細胞可溶化物または組織ホモジネートには、ポリメラーゼ活性の阻害物質が多く含まれることが多い。従って、後で増幅の鋳型として利用するため、RT-PCRには典型的に、全RNAまたはmRNAを単離する予備段階が盛り込まれている。1試験管によるmRNAの捕捉法を用い、同じ試験管で行う即時RT-PCR法に適したポリ(A)⁺RNAサンプルを調整することができる (Boehringer Mannheim)。逆転写の混合物、次にPCR混合物を加えることで、捕捉されたmRNAに直接RT-PCRを行うことができる。

10

【0090】

1つの実施形態では、前記サンプルmRNAを逆転写酵素とオリゴ(dT)およびフェーズT7プロモーターをコードするアレイを有するプライマーにより逆転写し、一本鎖DNAの鋳型を作る。第2のDNA鎖をDNAポリメラーゼで重合する。二本鎖cDNAを合成後、T7 RNAポリメラーゼを加え、RNAをcDNA鋳型から転写する。各一本鎖cDNAから連続的に転写すると、RNAが増幅される。in vitroでの重合法は当業者に周知であり (例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.), Vols. 1~3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)、または Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubelら編、Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987)を参照、これらは本明細書にこの参考により組み込まれる)、この特定の方法は、Van Gelder, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1663~1667, 1990で詳述されており、彼らはこの方法により、in vitroでの増殖で、様々なRNA転写物の相対頻度が保存されることを証明し、本明細書にこの参考により組み込まれる。さらに、Eberwine et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:3010~3014では (本明細書にこの参考により組み込まれる)、in vitroでの転写により2回の増幅を利用するプロトコルを示しており、元の開始物質を10⁶倍以上に増幅することで、生物サンプルが限られている場合でも、発現のモニタリングが可能である。

20

30

【0091】

上述された直接転写法によりアンチセンス (aRNA) のプールができることは、当業者に理解されるだろう。アンチセンスRNAをターゲットの核酸として用いた場合、アンチセンス核酸の部分列に相補的となるように、アレイに与えられたオリゴヌクレオチドプローブを選択する。逆に、ターゲットの核酸プールがセンス核酸のプールの場合、センス核酸の部分列に相補的となるように、オリゴヌクレオチドプローブを選択する。最後に、核酸のプールが二本鎖の場合、ターゲット核酸にはセンス鎖とアンチセンス鎖の両方が含まれるため、前記プローブはどちらのセンス鎖も取りうる。

40

【0092】

前記に引用したプロトコルには、センスまたはアンチセンス核酸のプールを作成する方法も含まれる。実際、1つのアプローチを用い、望み通りセンスまたはアンチセンス核酸を作ることができる。例えば、T3およびT7プロモーターに隣接するように、cDNAをベクター (例えば、Stratageneのp Bluescript II KS (+) ファージミド) に方向性を持ってクローニングすることができる。T3ポリメラー

50

ぜによる *in vitro*での転写では、1つのセンス鎖(挿入アレイの方向によるセンス鎖)のRNAが生成されるが、T7ポリメラーゼによる *in vitro*での転写では、逆のセンス鎖を持つRNAが生成される。他の適切なクローニング系には、Cre-loxPプラスミドのサブクローニング用にデザインされたファージであるベクターなどがある(例えば、Palazzolo et al., Gene, 88:25~36, 1990を参照)、これらは本明細書にこの参考により組み込まれる。

【0093】

増幅の過程または増幅後、ターゲットの核酸に様々な標識を組み込むことができる。適切な標識はフルオレセインやビオチンなどで、ビオチンはハイブリダイゼーション後、フィコエリトリン-ストレプトアビジンで染色することで検出される。いくつかの方法では、ターゲット核酸をハイブリダイゼーションしたものを対照核酸と比較する。任意に、そのようなハイブリダイゼーションを異なる標識を用いて同時に行うことができ、ターゲットおよび対照サンプルに用いる。望ましい場合は、ハイブリダイゼーションの前に対照およびターゲットサンプルを希釈し、蛍光強度を均一にすることもできる。

【0094】

支持体

ガラス、シリカ、プラスチック、ナイロン、ニトロセルロースなど、様々な材料で支持体を作ることができる。支持体は硬く、平面を持つこととする。支持体は、典型的に、1~10,000,000個の分散した、空間的に取り扱い可能な領域または細胞を持つ。10~1,000,000または100~100,000または1000~100,000個の細胞を持つ支持体が一般的である。細胞の密度は、典型的には少なくとも1cm²あたり細胞1000、10,000、100,000、1,000,000個である。典型的には、細胞1個あたりプローブは1つである。支持体によっては、すべての細胞にプールされたプローブの混合物が入る。別の支持体では、一部の細胞にプールされたプローブの混合物が入り、他の細胞には、少なくとも合成法により得られる程度の純度まで、1種類のポリヌクレオチドが入る。本出願書類で述べたプローブデザインの戦略は、それぞれ本明細書にこの参考により組み込まれる、WO 95/11995、EP 717,113、およびWO 97/29212で述べられている戦略のように、同じアレイで他の戦略と組み合わせることができる。

【0095】

前記アレイの中で、それぞれ異なるポリヌクレオチドプローブの位置とアレイは、一般的に知られている。さらに、多数の異なるプローブは、1cm²あたり約60以上、より一般的には約100以上、最も一般的には約600以上、また約1000以上のことも多く、約5,000以上のことがさらに多く、約10,000以上のことが最も多く、典型的には約40,000以上、約100,000以上、典型的には約400,000以上の異なるポリヌクレオチドプローブというプローブ密度を持つ、高密度アレイの比較的小さな領域を占めることができる。アレイの表面積が小さいと(約10cm²未満であることが多く、約5cm²未満、約2cm²未満、典型的には約1.6cm²未満)、サンプル容積が小さくても、非常に均一なハイブリダイゼーションの条件でも使用することができる。

【0096】

プローブアレイの合成

プローブアレイは支持体に段階的に合成されるか、あらかじめ合成した形で結合されることができる。1つの合成法がVLSIPS(登録商標)であり(Fodor et al., 1993, Nature 364, 555-556; McGall et al., U.S. S.N. 08/445,332; U.S. 5,143,854; EP 476,014を参照、それぞれは本明細書にこの参考として組み込まれる)、この方法では高密度の小型化アレイにポリヌクレオチドプローブを合成するため、光を利用する。合成サイクルの数を減少させるマスクデザインのアルゴリズムについてはHubbel et al., 米国特許番号第U.S. 5,571,639号および第U.S. 5,593,

10

20

30

40

50

839号で説明され、それぞれは本明細書にこの参考により組み込まれる。機械的に抑制した流路で支持体の細胞にモノマーを送達させることで、アレイをコンビナトリアル合成することもできる。インクジェットプリンターを用い、支持体にモノマー試薬をスポットすることで、アレイを合成することもできる。欧州特許番号第EP 624, 059号、第EP 728, 520号を参照し、それぞれは本明細書にこの参考として組み込まれる。

【0097】

上述のとおり、対照サンプルとターゲットサンプルを1つ以上のプローブセットを含むアレイにハイブリダイゼーションし、任意結合していないプローブと非特異的に結合したプローブを除去するために洗浄した後、アレイ中の各プローブについて、それぞれのサンプルのハイブリダイゼーション強度を決定する。蛍光標識では、例えば光子計数モードの走査型共焦点顕微鏡により、ハイブリダイゼーション強度を決定することができる。適切な走査装置は、例えば、米国特許第U.S. 5, 578, 832号、第U.S. 5, 631, 734号に述べられており、本明細書にこの参考として組み込まれる、GeneChip（登録商標）標識を用い、Affymetrix, Inc. から入手できる。いくつかの種類標識は、酵素法により増幅できるシグナルを示す。Broude, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 3072~3076, 1994を参照し、本明細書にこの参考により組み込まれる。

10

【0098】

アレイのデザイン

(A) カスタマイズされたアレイと一般的アレイ

発現モニタリングのアレイデザインは、全般的に、例えばWO 97/27317およびWO 97/10365で説明されており、本明細書にこの参考により組み込まれる。アレイには2つの主要カテゴリーがある。1タイプのアレイは、あらかじめ分かっている特定のmRNAアレイの存在とレベルを検出する。これらのアッセイでは、ポリヌクレオチドプローブを選択し、mRNA遺伝子アレイのあらかじめ選択された特定部分列にハイブリダイズする。そのような発現モニタリングアレイには、検出すべき各mRNAの複数のプローブを含むことができる。mRNA核酸の解析では、核酸に組み込まれる（つまり、3'末端）mRNAの領域に相補的となるように、前記プローブをデザインする。前記アレイには、1つ以上の対照プローブを含むことができる。

20

30

【0099】

一般的アレイには、特定の長さの考えられるヌクレオチド、つまり、アレイのすべての順列に対応するアレイを持つポリヌクレオチドをすべて含むことができる。従って、本明細書の方法のポリヌクレオチドプローブには4塩基まで（A、G、C、T）または（A、G、C、U）またはこれらの塩基の誘導体を含むため、長さXの考えられるすべてのヌクレオチドが、実質的に 4^X の異なる核酸を含む（例えば、2merで16種類の核酸、3merで64種類の核酸、8merで65536種類の核酸）。合成上の問題、および故意の相違のため、一部の小数のアレイでは、特定の長さの考えられるヌクレオチドがすべてプールされていない可能性もある。長さXの考えられるヌクレオチドをすべて有するアレイは、長さXの考えられるヌクレオチドを実質的にすべて有するアレイを指す。長さXの考えられるすべてのヌクレオチドは、90%以上、典型的には95%以上、98%以上、99%以上、また典型的には99.9%以上で、考えられる数の異なるヌクレオチドを含む。一般的アレイは、2つのmRNA集団またはそれに由来する核酸の間で、比較ハイブリダイゼーション分析に特に有用である。

40

【0100】

(B) 対照プローブ

カスタマイズされたプローブアレイまたは一般的プローブアレイには、前記プローブに加え、対照プローブを含むことができる。

【0101】

規格化対照プローブは、典型的には、核酸サンプルに加えられた1つ以上の標識標準ポ

50

リヌクレオチドと完全に相補的である。ハイブリダイゼーション後の規格化対照プローブから得たシグナルは、ハイブリダイゼーションの条件、標識強度、効率の測定値と分析、アレイの間で異なる完全なハイブリダイゼーションのシグナルを生じる他の因子などの多様性に対する対照を提供する。アレイの他のプローブすべてから読み取ったシグナル（蛍光強度など）は、対照プローブのシグナル（蛍光強度など）によって分けることができ、それにより測定が規格化される。

【0102】

事実上、すべてのプローブを規格化対照プローブとすることができる。しかし、ハイブリダイゼーション効率は、塩基の組成物とプローブの長さによって変化する可能性がある。規格化プローブは、アレイにある他のプローブの平均的な長さを反映するように選択することができるが、長さの範囲を網羅するように選択することもできる。規格化対照プローブは、アレイにある他のプローブの（平均的な）塩基組成物を反映するように選択することができる。ただし、1つまたは数個の規格化プローブを用い、これを十分にハイブリダイズし（つまり、二次構造なし）、特定のターゲットプローブとマッチしないように選択することができる。

10

【0103】

ハイブリダイゼーション効率の空間的変動を制御するため、規格化プローブは、アレイ中のどの位置に入れることもでき、またはアレイ中の複数の位置に入れることもできる。規格化対照プローブは、アレイの端や縁、またアレイの中央に入れることができる。

【0104】

発現レベルの対照プローブは、生物学的サンプルで恒常的に発現した遺伝子と特異的にハイブリダイズするプローブとすることができる。発現レベルの対照プローブは、全体的に細胞の健康な代謝活性を制御するようにデザインすることができる。発現レベルの対照プローブとターゲット核酸の発現レベルの共分散を検討することで、遺伝子の発現レベルで測定された変化やばらつきがその遺伝子の転写率の変化によるものであるのか、または細胞の健康の全体的なばらつきによるものであるのかを示すことができる。従って、例えば細胞の健康状態が悪いが、重要な代謝が欠如している場合は、活性なターゲット遺伝子と恒常的に発現された遺伝子両方の発現レベルが低下することが予想される。逆もしかりである可能性がある。従って、発現レベルの対照プローブとターゲット遺伝子の両方の発現レベルが、ともに減少または増加するように見える場合、その変化は、問題のターゲット遺伝子の発現の差ではなく、細胞全体としての代謝活性の変化に起因している可能性がある。逆に、ターゲット遺伝子の発現レベルと発現レベルの対照プローブがともに変化している場合、ターゲット遺伝子の発現レベルの変動は、遺伝子制御の差に起因し、細胞代謝活性の全体的な変動には起因していない可能性がある。

20

30

【0105】

事実上、恒常的に発現される遺伝子は、発現レベルの対照プローブのターゲットとして適している可能性がある。典型的な発現レベルの対照プローブは、 α -アクチン遺伝子、トランフェリンレポーター遺伝子、GAPDH遺伝子など、恒常的に発現される遺伝子の部分列に相補的なアレイを持つことができる。

【0106】

発現レベルの対照や規格化対照では、ミスマッチ制御もターゲット遺伝子のプローブとすることができる。ミスマッチ制御は、典型的には、既知のmRNA種にマッチプローブを含む、カスタマイズされたアレイに利用される。例えば、そのようなアレイの一部が、マッチプローブそれぞれに対応するミスマッチプローブを含む。前記ミスマッチプローブは、ミスマッチの少なくとも1部位を除き、対応するマッチプローブと同一である。ミスマッチの塩基とは、前記プローブが特異的にハイブリダイズする以外には、ターゲットアレイの対応する塩基に相補的とならないように選択した塩基である。適切なハイブリダイゼーションの条件（例えば、厳密な条件など）で、検討するプローブまたは対照プローブがターゲットアレイとハイブリダイズすることが予想できるが、ミスマッチプローブがハイブリダイズできない（または有意に小規模でハイブリダイズできる）ように、1つ以上

40

50

のミスマッチを選択する。ミスマッチプローブには、中心ミスマッチを含むことができる。従って、例えばプローブが20merの場合、対応するミスマッチプローブは6~14位のいずれかで1塩基のミスマッチ(例えばAに対してG、C、Tと置換する)を除いて同一のアレイを持つことができる(中心ミスマッチ)。

【0107】

一般的(例えば、ランダム、任意、または偶然など)アレイでは、ターゲット核酸がターゲット核酸が未知のため、完全マッチプローブおよびミスマッチプローブを先験的に決定、デザイン、選択することはできない。この場合、事前に選択した1つ以上のヌクレオチドでプローブの各対が異なる場合、対として前記プローブは提供されることができる。従って、対のどちらのプローブが完全マッチするか先験的には分からないが、1つのプローブが特定のターゲットアレイと特異的にハイブリダイズする場合は、対のもう1つのプローブがターゲットアレイのミスマッチ対照として機能できることが分かる。前記完全マッチプローブおよびミスマッチプローブを対とする必要はないが、特定の事前に選択したヌクレオチドが互いに異なるプローブを、より大きな集まり(例えば3、4、5以上)として示すことができる。

10

【0108】

カスタマイズされた配列および一般的なアレイのミスマッチプローブはいずれも、プローブが相補的なターゲット以外のサンプルと非特異的に結合するか、クロスハイブリダイズするような対照を提供することができる。従って、ミスマッチプローブは、ハイブリダイゼーションが特異的か否かを示すことができる。例えば、相補的なターゲットがある場合、完全マッチプローブはミスマッチプローブよりも一貫して強く発光することができる。さらに、全ての中心ミスマッチが存在する場合、そのミスマッチプローブを用いて変異を検出することができる。最後に、完全マッチプローブとミスマッチプローブの強度差($I(PM) - I(MM)$)は、前記ハイブリダイズした物質の濃度の優れた指標となることができる。

20

【0109】

アレイには、サンプルを調整/増幅する対照プローブを含むこともできる。これらのアレイは、選択した制御遺伝子の部分列に相補的なプローブとすることができるが、これは通常、このようなプローブが、アッセイされる特定の生物サンプルの核酸には発生しないためである。適切なサンプルを調整/増幅する対照プローブには、例えば、問題のサンプルが真核生物の生物サンプルである細菌性遺伝子(Bio Bなど)のプローブが含まれる。

30

【0110】

次に、RNAサンプルを既知量の核酸でスパイクし、この核酸に対して、プロセッシング前にサンプルを調整/増幅する対照プローブを処理することができる。次に、サンプルを調整/増幅する対照プローブのハイブリダイゼーションを定量することで、プロセッシング段階で生じた豊富な核酸の変化を測定することができる(PCR、逆転写、in vitroでの転写など)。

【0111】

定量対照は同様である。典型的には、ハイブリダイゼーション前に量が既知のサンプル核酸と組み合わせることができる。これらは定量基準として有用であり、ハイブリダイゼーション量(濃度)の定量で検量線を決定することができる。

40

【0112】

検出法

1つの検出法では、mRNAまたはそこから由来する核酸を、典型的には変性した形でアレイに当てはめる。核酸の構成成分(コンポーネント)成分鎖は相補的なプローブとハイブリダイズし、これは標識を検出することで同定される。任意に、マッチプローブのハイブリダイゼーションシグナルを、対応するミスマッチまたは他の対照プローブと比較することができる。ミスマッチプローブの結合はバックグラウンドの指標として機能し、マッチプローブの結合から引くことができる。完全マッチプローブとミスマッチプローブの

50

結合において有意な差があることは、マッチプローブと相補的な核酸があることを示す。完全マッチプローブへの結合力は、典型的には、ミスマッチプローブへの結合より、少なくとも1.2、1.5、2、5、または10、または20倍高い。

【0113】

前記方法の変化形では、核酸を標識しないが、鋳型として核酸鎖を用いて核酸鎖にハイブリダイズしたプローブの鋳型特異性伸長 (template-directed extension) で検出する。前記プローブは標識したヌクレオチドで伸長し、標識の位置がアレイ中のどのプローブが伸長されたかを示す。異なる標識を持つ様々な塩基を用い、複数回伸長することで、タグをハイブリダイズしたプローブとの完全な相補性を決定するよりも、タグの追加塩基の同一性を決定することが可能である。プローブのターゲット依存的な伸長の利用については、米国特許第US 5,547,839号で説明され、本明細書にこの参考により組み込まれる。

10

【0114】

さらなる変化形では、プローブをイノシンで伸長することができる。イノシン鎖の標識が可能である。イノシン (他のすべての塩基と対を作ることができる) などの変性塩基の追加は、ポリヌクレオチドプローブと変性した一本鎖DNA核酸の二本鎖の安定性を向上することができる。プローブの末端に1~6イノシンを追加することで、一般的な連鎖アレイで、ハイブリダイゼーションと連鎖反応の両方のシグナル強度を上昇させることができる。これにより、高温での連鎖が可能である。変性塩基の利用については、国際公開番号第WO 97/27317号で説明され、本明細書にこの参考により組み込まれる。

20

【0115】

連鎖反応では、特に、ミスマッチがポリヌクレオチドプローブの5'末端の近くにある場合、完全に相補的なハイブリッドと1つ以上の塩基対が異なるハイブリッドの識別を改善することができる。シグナル検出で連鎖反応を利用することで、ハイブリッド二本鎖の安定性が向上し、(特に短いポリヌクレオチドプローブ (例えば5~12mers) で) ハイブリダイゼーションの特異性が改善し、場合に応じてさらにアレイの情報が得られる。シグナル検出で利用される連鎖反応については、WO 97/27317で説明され、本明細書にこの参考により文献が組み込まれる。場合によっては、イノシンまたは他の塩基を用い、連鎖反応を鋳型による伸長と合わせて用いることができる。

30

【0116】

ハイブリダイゼーションパターンの分析

米国特許番号第5,143,854、5,578,832号、PCT国際出願の公開公報第WO 90/15070号で説明されているように (それぞれは本明細書にこの参考により組み込まれる)、標識の位置は読取機を用いて、アレイ中の各プローブで検出する。カスタマイズされたアレイについては、ハイブリダイゼーションパターンを分析し、例えば、国際公開番号第WO 97/10365号に説明されているとおり (本明細書にこの参考により組み込まれる)、分析するサンプル中の既知mRNAの有無や相対量または絶対量を決定することができる。2つのサンプルの発現パターンを比較することは、2つのサンプル間で異なって発現されたmRNAと対応する遺伝子の同定に有用である。

【0117】

多数の遺伝子の発現レベルを定量的にモニタリングすることは、遺伝子機能を解明し、疾患の原因と機序を探索し、考えられる治療と診断上のターゲットを発見するために有益であることが分かる。発現モニタリングを用い、疾患状態で発現が変化した核酸の発現 (転写) レベルをモニターすることができる。例えば、炎症や敗血症は、単球分泌蛋白質 (monocyte secretory protein: MCP-1) などの特定マーカーが過剰発現することで特徴付けられる。

40

【0118】

発現モニタリングを用い、薬物などの規定された刺激に反応する様々な遺伝子の発現をモニターすることができる。エンドポイント説明が複雑なものであり、特定の遺伝子が過剰発現されているか、過小発現されているかを単純に求め、これは特に新薬開発で有用で

50

ある。従って、疾患の状態または薬物の作用様式の特徴が十分に分かっていない場合は、発現モニタリングにより、特に関連した遺伝子を迅速に決定することができる。

【0119】

一般的アレイでは、ハイブリダイゼーションパターンも、サンプル中の相対的 mRNA の有無と量の指標であるが、サンプル中でどのプローブがどの mRNA に対応するかはすぐに分からない。

【0120】

しかし、特定の遺伝子について知識が欠如しているからといって、有用な治療の同定ができない訳ではない。例えば、健康な細胞の特定の一般的アレイでハイブリダイゼーションのパターンが分かっており、疾患細胞のパターンと有意に異なる場合、化合物ライブラリから、疾患細胞のパターンを健康な細胞に似せる化合物をスクリーニングすることができる。これにより、薬物に対する細胞反応の詳細な指標が分かる。

10

【0121】

一般的アレイは、遺伝子発見、また様々な刺激に対する複雑な細胞反応の根底にあるメカニズムを解明するために、強力なツールを提供することもできる。例えば、一般的遺伝子は、発現のフィンガープリント法に用いることができる。特定の細胞タイプの mRNA が様々な状況で明確に異なる全体的なハイブリダイゼーションパターンを示していることが分かたらどうか（例えば、疾患状態で特定の遺伝子に変異がある場合など）。その結果、この発現パターン（発現のフィンガープリント）が異なる場合でも再現性があり、明確に区別できる場合は、非常に詳細な診断に用いることができる。そのパターンを完全に解釈できる必要はなく、特定の細胞状態や診断または予後との関連性に特異的であるだけでよい。

20

【0122】

カスタマイズされたアレイと一般的アレイは、いずれも薬物の安全性研究に用いることができる。例えば新しい抗生物質を作っている場合、抗生物質が哺乳類細胞の発現プロフィールに大きく影響すべきではない。前記ハイブリダイゼーションパターンは、例えば毒性学的スクリーニングなど、細胞に対する薬物の作用の詳細な指標として用いることができる。

【0123】

一般的アレイのハイブリダイゼーションパターンから示されたアレイ情報を用い、アレイとハイブリダイズする mRNA をコードした遺伝子を同定することができる。本明細書にこの参考により組み込まれる国際公開番号第 WO 97/27317 号に説明されているとおり、そのような方法は、ターゲット核酸として DNA 核酸を用いて行うことができる。本明細書にこの参考により文献として組み込まれる国際公開番号第 WO 97/27317 号で説明されている標準的な条件により、DNA 核酸を変性させ、プローブの相補的な領域にハイブリダイズすることができる。前記ハイブリダイゼーションパターンからは、どのプローブがサンプルの核酸鎖と相補的であるかが示される。2つのサンプルのハイブリダイゼーションパターンを比較することで、2つのサンプルで異なって発現された mRNA に由来する核酸鎖と、どのプローブがハイブリダイズするかが示される。これらのプローブには、異なる発現を受けた mRNA 種に相補的なアレイが含まれるため、特に興味深い。そのようなプローブのアレイは既知であり、データベース中のアレイと比較して、そのような mRNA が事前にアレイ決定されていれば、異なる発現を示した mRNA の全長を識別することができる。代わりにプローブのアレイを用い、異なって発現された mRNA をクローニングする、ハイブリダイゼーションプローブまたはプライマーをデザインすることができる。異なって発現された mRNA は、典型的には、対象の mRNA が高レベルで発現されたサンプルからクローニングされる。いくつかの方法では、前記鋳型に依存的な伸長により、プローブのアレイから推測される以上に追加のアレイ情報が提供されることで、データベースの比較やクローニングが促進される。

30

40

【0124】

内皮細胞活性の修飾因子のスクリーニング

50

(A) 候補生理活性物質

適切な発現プロフィール数を同定した場合、その情報は様々な方法で利用される。1つの方法では、高い処理能力のスクリーニング技術と合わせて発現プロフィールを用い、候補物質を投与後の発現プロフィール遺伝子のモニタリングが可能である (Zlokarnik, et al., Science 279: 84~8, 1998, Heid et al., Genome Res. 6: 986, 1996、それぞれは本明細書にこの参考により組み込まれる)。1つの方法では、候補物質を細胞に加える。

【0125】

「候補生理活性物質」または「薬物候補」という用語、または本明細書で用いられる文法的に同等の用語は、例えば蛋白質、オリゴペプチド、小さな有機分子、多糖類、ポリヌクレオチドなど、直接的または間接的に内皮細胞の活性を変化させることができる、生理活性のある物質として検討される分子を示す。1つの方法では、生理活性のある物質が、発現プロフィール、または発現プロフィールの核酸または本明細書で示される蛋白質を調節する。前記方法のさらなる実施形態では、例えば、以下にさらに詳述するとおり、発現プロフィール、核酸、蛋白質、または内皮細胞活性に対する薬物の作用により、前記候補物質が免疫抑制耐性反応を誘導するか、適応があればそのような反応を維持する。一般に、様々な濃度に対する異なる反応を得るため、異なる薬物濃度に応じて複数のアッセイ混合物を検討する。典型的には、これらの濃度の1つを負の対照、つまり、濃度ゼロまたは検出レベル以下とする。

10

【0126】

候補物質は多数の化学物質クラスを網羅するが、典型的には分子量100ダルトン以上、約2,500ダルトン未満の小さな有機化合物などの有機分子である。候補物質は、特に水素結合など、蛋白質と構造的に相互作用するために必要な官能基を有し、典型的には、少なくともアミン、カルボニル、ヒドロキシ、またはカルボキシル基、例えば少なくとも2つの化学官能基を含む。前記候補物質は、前記官能基の1つ以上と置換された環式炭素または複素環構造や、芳香族や多環芳香族構造を有することが多い。候補物質は、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導體、構造アナログ、またはその組み合わせなど、生物分子の中にも見られる。さらなる実施形態では、候補物質がペプチドである。

20

【0127】

候補物質は、合成化合物または天然化合物のライブラリなど、様々な供給源から得られる。例えば、ランダム化されたオリゴヌクレオチドの発現など、様々な有機分子や生物分子をランダムにおよび特異的に合成するため、様々な方法が利用できる。代わりに、細菌、真菌、植物、動物の抽出物の形で、天然化合物のライブラリを利用することができる、または容易に作成される。さらに、天然または合成ライブラリおよび化合物は、従来の化学的、物理的、生化学的方法により、容易に修飾される。既知の薬物は、アシル化、アルキル化、エステル化、アミノ化などの、特異的、またはランダムな化学修飾により、構造アナログを合成することができる。

30

【0128】

一部の実施形態では、候補生理活性物質が蛋白質である。本明細書で「蛋白質」とは、少なくとも2つの共有結合でつながったアミノ酸を意味し、蛋白質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチドを含む。蛋白質は、天然のアミノ酸やペプチド結合、または合成ペプチド類似構造をとることができる。従って、本明細書で使用する「アミノ酸」または「ペプチド残基」は、天然および合成のアミノ酸の両方を意味する。例えば、ホモフェニルアラニン、シトルリン、ノレレウシン (noreleucine) は、本明細書の方法の目的で、アミノ酸と見なす。「アミノ酸」には、プロリンやヒドロキシプロリンなどのイミノ酸残基も含む。側鎖は(R)配置または(S)配置のいずれも取ることができる。さらなる実施形態では、前記アミノ酸が(S)またはL配置である。非天然由来の側鎖を用いる場合は、非アミノ酸置換基を用い、例えば *in vivo* での分解を予防または遅延させることができる。

40

50

【0129】

1つの方法では、候補生理活性物質が天然由来の蛋白質または天然由来蛋白質の断片である。従って、例えば蛋白質を含む細胞抽出物、またはランダムまたは特異的に消化された蛋白性細胞抽出物を利用することができる。この方法では、スクリーニング用に原核生物、真核生物の蛋白質ライブラリを作成し、本明細書の方法で用いることができる。前記ライブラリは細菌、真菌、ウイルス、哺乳類の蛋白質、ヒトの蛋白質を取りうる。

【0130】

いくつかの方法では、候補生理活性物質が約5～約30のアミノ酸、典型的には約5～約20のアミノ酸、典型的には約7～約15のアミノ酸から成るペプチドである。前記ペプチドは、前記に概要をまとめた天然由来蛋白質、ランダムペプチド、「バイアス(偏った)」ランダムペプチドの消化物である可能性がある。本明細書の「ランダム化された」または文法的に同等の用語は、各核酸とペプチドがそれぞれ基本的にランダムなヌクレオチドとアミノ酸から成ることを意味する。これらのランダムなペプチド(または核酸、以下に考察する)は化学的に合成されているため、どの位置にどのヌクレオチドまたはアミノ酸を組み込んでよい。合成プロセスは、ランダム化された蛋白質または核酸を生成するようにデザインされ、アレイの長さについて考えられる組み合わせのすべてまたはほとんどを生成することができるため、ランダム化された候補生理活性蛋白質物質のライブラリを作成することができる。

【0131】

いくつかの方法では、どの位置でもアレイを優先または一定とすることなく、前記ライブラリを完全にランダムとすることができる。他の方法では、前記ライブラリにバイアスを持たせることができる。アレイ内のいくつかの位置は、一定とするか、限られた数の可能性から選択される。例えば、いくつかの方法では、核酸またはアミノ酸残基を、例えば、核酸結合ドメインができるように、システインで架橋ができるように、SH-3ドメインでプロリン、セリン、トレオニン、チロシン、またはリン酸化部位でヒスチジン、またはプリンが形成するように、疎水性アミノ酸、親水性残基、立体的に偏った(小さいか大きい)残基など、定められたクラス内でランダム化される。他の方法では、前記候補生理活性物質は上述のとおり、核酸である。

【0132】

前記で一般に蛋白質について述べられたとおり、核酸生理活性候補物質は、天然の核酸、ランダムな核酸、または「バイアス(偏った)」ランダムな核酸とすることができる。例えば、原核生物または真核生物ゲノムの消化物は、前記で蛋白質についてまとめたとおり用いることができる。

【0133】

一部の方法では、前記候補生理活性物質が有機化学分子である。

【0134】

(B) 薬物のスクリーニング法

いくつか異なる薬物のスクリーニング法を行い、内皮細胞活性を調節する薬物または生理活性物質を同定することができる。そのような方法の1つは、特定の発現プロファイルを誘導し、関連する表現型を生成することができる候補物質をスクリーニングすることである。本明細書で示すとおり、免疫抑制作用のある発現プロファイルと類似した発現プロファイルを模倣するか生成することができる候補物質は、免疫抑制作用のある表現型を生じることが予想される。同様に、本明細書で示すとおり、耐性の発現プロファイルと類似した発現プロファイルを模倣するか生成することができる候補物質は、耐性の表現型を生じることが予想される。従って、いくつかの方法では、発現プロファイルを模倣するか、あるプロファイルを別のものに変化させる候補物質を決定することができる。

【0135】

他の方法では、異なって発現された遺伝子が1つの状態で重要であることを同定した後、候補物質のスクリーニングを行い、個々の遺伝子の発現を変化させることができる。例えば、特に2つの状態の間でその有無が固有のターゲット遺伝子の場合、ターゲット遺伝

10

20

30

40

50

子発現の修飾因子をスクリーニングすることができる。

【0136】

他の方法では、スクリーニングを行い、異なって発現された遺伝子の発現産物の生理機能を変化させることができる。ここでも、特定の状態での遺伝子の重要性を同定することで、以下に概要を示すとおり、結合するか、おおび/または遺伝子産物の生理活性を調節する物質をスクリーニングすることができる。

【0137】

従って、遺伝子発現レベルまたは蛋白質レベルで内皮細胞の活性を調節する候補物質をスクリーニングすることができる。

【0138】

一部の方法では、前記ように内皮細胞の活性発現プロフィールと関連性があるすべての状態の内皮細胞に、候補物質を投与することができる。本明細書で「投与する」または「接触する」とは、前記物質が細胞で作用するように、取り込みまたは細胞内の作用により、または細胞表面の作用により、細胞に候補物質を加えることを意味する。いくつかの実施形態では、蛋白質の候補物質をコードする核酸(つまりペプチド)を、レトロウイルスの構築物のようにウイルスの構築物に入れるか、ペプチド因子が発現するように細胞に加えることができる; PCT US 97/01019を参照、本明細書にこの参考により組み込まれる。

【0139】

一度、候補物質を細胞に投与すれば、望ましい場合で、ある期間、生理学的条件で培養することができるれば、前記細胞を洗浄することができる。次に本明細書に概要を示すとおり、前記細胞を採取し、新しい遺伝子発現プロフィールを作成する。

【0140】

例えば、耐性の表現型を作る物質について、内皮細胞をスクリーニングすることができる。少なくとも1つの遺伝子の発現プロフィールが変化することは、前記物質が内皮細胞活性に対して作用することを示す。1つの方法では、抗原刺激の前後および/またはその間に、抗炎症プロフィールを誘導するか維持する。そのような抗炎症反応のサインを定義することで、抗炎症性の表現型を模倣した新しい薬物のスクリーニングを考案することができる。このアプローチでは、前記薬物ターゲットは既知である必要がなく、最初の発現スクリーニングの基盤に表現されている必要もなく、ターゲット蛋白質の転写物レベルが変化する必要もない。いくつかの方法では、前記物質が、これだけに限らないが、例えば SH-PTP3、W28170、フルクトース-6-ホスフェート、2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、W28616、BID、NF-KB2、トロンボスポンジン-1,6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、神経線維腫症2型腫瘍抑制因子などの少なくとも2遺伝子の組み合わせなど、APC存在下でダウンレギュレートされ、トロンピン存在下でアップレギュレートされる遺伝子を示すプロフィールを誘導するか維持する。

【0141】

いくつかの方法では、個々の遺伝子および遺伝子産物でスクリーニングを行うことができる。特定の異なって発現された遺伝子が、特定の状態で重要であるとして同定された後、遺伝子または遺伝子産物自体の発現の修飾因子をスクリーニングすることができる。

【0142】

従って、いくつかの方法では、特定遺伝子の発現の修飾因子をスクリーニングすることができる。これは前記に概要を示したとおりに行われるが、一般には、1つまたは数種類の遺伝子のみが発現が評価される。いくつかの方法では、最初に異なって発現された蛋白質に結合することができる候補物質を発見するようにスクリーニングをデザインし、次に、候補物質の異なって発現された活性を調節する能力を評価する、他のアッセイにこれらの物質を用いることができる。結合アッセイや活性アッセイなど、実行できる異なるアッセイは多数ある。

【0143】

10

20

30

40

50

さらなる方法では、結合アッセイを行う。一般に、精製するか単離した遺伝子産物を用いる、つまり、1つ以上の異なって発現された核酸の遺伝子産物を作る。内皮細胞の状態で異なって発現された蛋白質をコードする、本明細書の方法と組成物の核酸を用い、様々な発現ベクターを作ることができる。前記発現ベクターは、自己複製型染色体外ベクターが、宿主ゲノムに組み込まれるベクターのいずれでもよい。一般に、これらの発現ベクターには、異なって発現された蛋白質をコードする核酸と実施可能な結合を持つ、転写および翻訳の制御核酸が含まれる。「制御アレイ」という用語は、特定の宿主生物で実施可能な結合を持つコードアレイの発現に必要なDNAアレイを指す。原核生物に適した制御アレイは、例えば、プロモーター、場合によってはオペレーターアレイ、リボソーム結合部位などである。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、エンハンサー

10

【0144】

核酸は、他の核酸アレイと機能的に関連するように配置された場合、「実施可能な結合」である。例えば、ポリペプチドの分泌に関連する蛋白質前駆体として発現された場合は、シグナルペプチドまたは分泌リーダーのDNAはポリペプチドのDNAと実行可能な結合を持ち、アレイの転写に影響する場合は、プロモーターまたはエンハンサーはコードアレイと実行可能な結合を持ち、翻訳を促進するように位置している場合、リボソーム結合部位はコードアレイに実行可能な結合を持つ。一般に、「実行可能な結合」とは、結合したDNAアレイが近接していること、また分泌リーダーの場合は近接し、読み取り期(reading phase)にあることを意味する。ただし、エンハンサーは近接している必要はない。都合のいい制限部位で連結反応により結合が達成される。そのような部位がない場合は、従来の慣習に沿って、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを用いる。転写および翻訳の制御核酸は、一般に、異なって発現された蛋白質を発現するために用いられる宿主細胞に適しており、例えば、Bacillusの転写および翻訳の制御核酸のアレイを用い、Bacillusで異なって発現された蛋白質を発現させる。多数の適切な発現ベクター、および適切な制御アレイは、当該分野において、様々な宿主細胞で知られている。

20

【0145】

一般に、転写および翻訳の制御アレイには、プロモーターアレイ、リボソーム結合部位、転写開始アレイと転写停止アレイ、翻訳開始アレイと翻訳停止アレイ、エンハンサーまたはアクチベーターアレイなどが含まれるが、これだけに限らない。1つの方法では、前記制御アレイにプロモーターと転写開始アレイおよび転写停止アレイが含まれる。

30

【0146】

プロモーターアレイは、構成プロモーターまたは誘導プロモーターのいずれかをコードしている。前記プロモーターは、天然由来プロモーターまたはハイブリッドプロモーターのいずれかを取りうる。ハイブリッドプロモーターは1つ以上のプロモーターの要素を合わせ持ち、当該分野でも知られ、本明細書の方法に有用である。

【0147】

さらに、前記発現ベクターは追加要素を有することができる。例えば、発現ベクターが2つの複製システムを持つため、例えば哺乳類や昆虫細胞の発現や、原核生物宿主のクロニングや増幅など、2つの生物で維持することができる。さらに、発現ベクターを組み込むためには、前記発現ベクターに、宿主細胞のゲノムと相同なアレイが少なくとも1つ、典型的には、発現ベクターに隣接する相同的なアレイが2つ含まれている。ベクターを封入するため、適切な相同的アレイを選択することで、ベクターの組み込みは宿主細胞の特定の遺伝子座に行うことができる。ベクターを組み込むための構築物は、当該分野で周知である。相同的な組換えを行う方法は、PCT US 93/03868およびPCT US 98/05223で説明されており、それぞれは本明細書にこの参考により組み込まれる。

40

【0148】

いくつかの方法では、前記発現ベクターが選択可能なマーカー遺伝子を含み、形質転換

50

した宿主細胞の選択が可能である。選択遺伝子は当該分野で周知であり、使用する宿主細胞ごとに異なる。

【0149】

1つの発現ベクター系はレトロウイルスベクター系であり、PCT/US97/01019およびPCT/US97/01048で一般的に説明され、それぞれは本明細書にこの参考により組み込まれる。

【0150】

本方法と組成物の異なって発現された蛋白質は、適切な条件下で異なって発現された蛋白質をコードした核酸を含む、発現ベクターで形質転換した宿主細胞を培養することで生成され、異なって発現された蛋白質の発現を誘導または引き起こす。異なって発現された蛋白質の発現に適した条件は発現ベクターと宿主細胞の選択によって異なり、当業者により、日常的な実験によって容易に確認される。例えば、発現ベクター中の構造プロモーターを使用するためには、宿主細胞の成長と増殖を最適化する必要があるが、誘導プロモーターを使用するためには、誘導に適した成長条件が必要である。いくつかの方法では、収集時期が重要である。例えば、昆虫の細胞発現に利用されるバキュロウイルス系は溶菌ウイルスであるため、収集時期の選択が産物収量に重要である可能性がある。

10

【0151】

適切な宿主細胞には、酵母、細菌、古細菌 (archaeobacteria)、真菌、昆虫細胞、哺乳類細胞などの動物細胞が含まれる。特に興味深いのは、キイロショウジョウバエ細胞、サッカロマイセス・セレビスエなどの酵母、大腸菌、枯草菌、SF9細胞、C129細胞、293細胞、パンカビ属、BHK、CHO、COS、HeLa細胞である。いくつかの方法では、本明細書に内皮細胞と宿主細胞を示し、例えば一次細胞株などの非組換え細胞株を含む。さらに、遺伝子組換え株または非遺伝子組換え株由来の精製した主な内皮細胞を利用することもできる。代わりに宿主細胞を内皮細胞障害があることが知られている内皮細胞とすることもできる。

20

【0152】

1つの方法では、前記異なって発現された蛋白質が哺乳類細胞で発現される。哺乳類の発現系には、レトロウイルス系を含めることができる。哺乳類プライマーは、哺乳類RNAポリメラーゼに結合し、異なって発現された蛋白質のアレイコードをmRNAに下流(3')転写を開始することができる。プロモーターには転写開始領域があり、これは通常、コードアレイの5'末端とTATAボックスの近くにあり、転写開始部位の上流に位置する25-30塩基対を用いる。前記TATAボックスは、RNAポリメラーゼIIに正しい位置でRNA合成を開始させると考えられている。哺乳類のプロモーターには、典型的にはTATAボックスの上流100~200塩基対内に位置する上流のプロモーター要素(エンハンサー要素)が含まれる。上流のプロモーター要素は、転写が開始される割合を決定し、いずれの方向にも作用することができる。哺乳類のプロモーターとして特に利用されるのは、哺乳類ウイルス遺伝子のプロモーターであるが、これは前記ウイルス遺伝子が高頻度で発現されることが多く、宿主の範囲が広いためである。例えば、SV40初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルスLTRプロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、単純ヘルペスウイルスプロモーター、CMVプロモーターなどである。

30

40

【0153】

典型的には、哺乳類細胞によって認識される転写終止とポリアダニル化アレイが、翻訳停止コドンの3'に位置する制御領域であるため、プロモーター要素とともに、コードアレイに隣接する。成熟mRNAの前記3'末端は、位置特異的な翻訳後開裂とポリアダニル化により生成される。転写ターミネーターとポリアダニル化のシグナル例は、SV40に由来するそれらを含む。

【0154】

核酸を哺乳類の宿主また他の宿主に導入する方法は、当該分野で周知であり、利用する宿主細胞によって異なる。デキストランを介した形質移入、リン酸カルシウムの沈殿、ポリブレンを介した形質移入、原形質融合、電気穿孔法、ウイルス感染、ポリヌクレオチド

50

のリボソームへの封入、DNAの核への直接微量注入などの技術がある。

【0155】

いくつかの方法では、異なって発現された蛋白質が当該分野で周知の細菌系で発現される。

【0156】

他の方法では、異なって発現された蛋白質を昆虫細胞で生成することができる。昆虫細胞の形質転換を行う発現ベクター、特にバキュロウイルスの発現ベクターは、当該分野で周知である。

【0157】

いくつかの方法では、異なって発現された蛋白質を酵母細胞で生成する。酵母の発現系は当該分野で周知であり、サッカロマイセス・セレピシエ、カンジダ・アルピカンスおよび *C. maltosa*、*Hansenula polymorpha*、*Kluyveromyces fragilis* および *K. lactis*、*Pichia guillierimondii* および *P. pastoris*、シゾサッカロミセス・ポンベ、*Yarrowia lipolytica* の発現ベクターを含む。

10

【0158】

異なって発現された蛋白質は、当該分野で周知の技術を用い、融合蛋白質として作ることもできる。例えば、モノクローナル抗体の作成では、望みのエピトープが小さければ、前記異なって発現された蛋白質を担体蛋白質に融合し、免疫原を作ることができる。代わりに、異なって発現された蛋白質を融合蛋白質として作成し、発現を亢進させることができる。例えば、異なって発現された蛋白質が異なって発現されたペプチドの場合、発現の目的で、ペプチドをコードする核酸を他の核酸に結合することができる。同様に、本明細書の方法および組成物における異なって発現された蛋白質は、緑色蛍光蛋白質 (GFP)、赤色蛍光蛋白質 (RFP)、黄色蛍光蛋白質 (YFP)、青色蛍光蛋白質 (BFP) などの蛋白質の標識に結合することができる。

20

【0159】

1つの実施形態では、前記蛋白質は組換え型である。「組換え蛋白質」は、遺伝子組換え技術を用いて、つまり前記組換え型核酸の発現によって作られた蛋白質である。組換え型蛋白質は、少なくとも1つ以上の特徴で天然由来蛋白質と区別される。例えば、前記蛋白質は、野生型の宿主と正常に関連しているため、実質的に純粋である可能性がある蛋白質および化合物の一部またはすべてから単離または精製することができる。例えば、単離された蛋白質には、通常、その天然状態には物質が少なくともいくつかを伴わず、その物質は、典型的には少なくとも特定サンプルの総蛋白質重量の約0.5%、典型的には少なくとも約5%に相当する。実質的に純粋な蛋白質は、総蛋白質重量の少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約90%を有する。前記定義には、異なる生物または宿主細胞で1つの生物とは異なって発現された蛋白質の生産が含まれる。代わりに、前記蛋白質が高濃度で作られるように、誘導プロモーターまたは高発現プロモーターを利用することで、前記蛋白質を通常見られるよりも大幅に高い濃度で作ることができる。代わりに、以下に考察するとおり、エピトープタグの追加やアミノ酸の置換、挿入、欠失など、前記蛋白質を通常天然では見られない形とすることができる。

30

40

【0160】

いくつかの方法では、前記異なって発現された蛋白質を用いて抗体を作成した場合、前記蛋白質は本明細書で示した、異なって発現された核酸の全長を転写した産物と、少なくとも1つのエピトープまたは決定因子を共有する必要がある。本明細書で「エピトープ」または「決定因子」とは、抗体を作成するおよび/または抗体と結合する蛋白質の一部分を意味する。従って、大抵の場合、より小さな蛋白質に作られた抗体は、全長の蛋白質に結合できるはずである。1つの実施形態では、前記エピトープが固有であり、つまり、固有のエピトープに作成された抗体が交差反応 (cross-reactivity) をほとんどまたは全く示さない。

【0161】

50

いくつかの方法では、本明細書で示す抗体が、以下に考察するとおり、異なって発現された蛋白質の生物学的機能を低下または消失させることができる。抗体（ポリクローナルまたはモノクローナル）を蛋白質（または前記異なって発現された蛋白質を含む細胞）に加えることで、蛋白質の活性を低下または消失させることができる。一般に、少なくとも25%の活性低下が認められ、典型的には少なくとも約50%、典型的には約95~100%の低下が観察される。

【0162】

さらに、前記蛋白質を変異型蛋白質とし、1つ以上のアミノ酸の置換、挿入、欠失を有することができる。

【0163】

1つの実施形態では、異なって発現された蛋白質を発現後に精製または単離する。異なって発現された蛋白質は、様々な方法で単離または精製することができる。標準的な精製法には、電気泳動法、分子法、免疫法、また、イオン交換、疎水性、親和性、逆相HPLCクロマトグラフィー、等電点電気泳動などのクロマトグラフィー法が含まれる。例えば、標準的な抗異なって発現された蛋白質抗体カラムを用い、異なって発現された蛋白質を精製することができる。蛋白質濃度と関連して、限外ろ過法およびダイアフィルトレーション法も有用である。適切な精製法の一般的ガイドラインについては、Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, NY, 1982を参照し、本明細書にこの参考により組み込まれる。必要な精製度は、前記異なって発現された蛋白質の利用によって異なる。一部では、精製が必要ない。

10

20

【0164】

一旦前記異なって発現された蛋白質の遺伝子産物が作られたら、結合アッセイを行うことができる。これらの方法は、異なって発現された蛋白質と候補生理活性物質とを合わせる方法と、候補物質の異なって発現された蛋白質への結合を測定する方法とを有する。この方法ではヒトの異なって発現された蛋白質を用いるが、齧歯類（マウス、ラット、ハムスター、モルモット）、家畜（ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ）、霊長類などの他の哺乳類蛋白質も使用することができる。後者の方法を用い、ヒト疾患の動物モデルを開発することもできる。いくつかの方法では、前記に概要をまとめたとおり、欠失した異なって発現された蛋白質など、異なって発現された蛋白質の変異体または誘導体を用いることができる。

30

【0165】

本明細書のアッセイでは、本明細書に定義するとおり、異なって発現された蛋白質を利用する。いくつかのアッセイでは、異なって発現された蛋白質の一部を利用することができる。他のアッセイでは、異なって発現された活性の一部を利用することができる。さらに、本明細書で述べたアッセイは、単離された異なって発現された蛋白質、または異なって発現された蛋白質を有する細胞を利用することができる。いくつかの方法では、異なって発現された蛋白質または候補物質が、単離されたサンプルを受ける部分を持つ不溶性の支持体（マイクロタイタープレートまたはアレイ）に拡散せずに結合する。前記不溶性の支持体は、その組成物が結合することができ、可溶性物質から容易に分離される組成物から作ることができ、そうでなければ、全体的なスクリーニング法と適合するものである。そのような支持体の表面は、固体または多孔性、またはいかなる簡便な形とすることもできる。適切な不溶性の支持体の例としては、マイクロタイタープレート、アレイ、膜、ビーズなどがある。これらは、典型的にはガラス、プラスチック（ポリスチレンなど）、多糖類、ナイロン、またはニトロセルロース、およびテフロン（登録商標）でできている。マイクロタイタープレートおよびアレイは特に便利であるが、これは、少量の試薬やサンプルを用い、多数のアッセイを同時に実行することができるためである。場合によっては、電磁ビーズなどを含める。本明細書に説明する試薬および全体的な方法と適合し、組成物の活性を維持し、非拡散性である限り、組成物を結合する特定の方法は重要ではない。結合法には、（前記蛋白質を支持体に結合したとき、リガンド結合部位または活性化アレイを立体的に遮断しない）抗体を用いる方法、「粘着性」またはイオン性の支持体に直接

40

50

結合させる方法、化学的架橋、表面に蛋白質または試薬を合成する方法などがある。蛋白質または試薬を結合後、過剰の結合していない物質を洗い、除去する。次に、サンプルを受け取る部分をウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、他の無害な蛋白質または他の部分をインキュベーションすることで、遮断することができる。また、本明細書の方法および組成物に含まれているのは、固体支持体を用いていないスクリーニングアッセイである。

【0166】

他の方法では、前記異なって発現された蛋白質が支持体に結合し、候補生理活性物質がアッセイに加えられる。代わりに、候補物質を支持体に結合し、異なって発現された蛋白質を加える。新規の結合物質には、特異的抗体、化学物質ライブラリのスクリーニングで同定された非天然由来結合物質、ペプチドアナログなどがある。特に興味深いのは、ヒト細胞に毒性が低い物質のスクリーニングアッセイである。この目的で、様々なアッセイを利用することができ、標識した *in vitro* 蛋白質-蛋白質結合アッセイ、電気泳動の移動度シフトアッセイ、蛋白質結合に関するイムノアッセイ、(リン酸化アッセイなどの)機能的アッセイなどがある。

10

【0167】

前記候補生理活性物質の異なって発現された蛋白質に対する結合の定量は、多数の方法で行うことができる。いくつかの方法では、候補生理活性物質を標識し、直接結合を定量する。例えば、これは異なって発現された蛋白質のすべてまたは一部を固体支持体に結合し、標識(例えば蛍光標識)した候補物質を加え、過剰の試薬を洗い流し、前記標識が固体支持体にあるか否かを判断することで行う。様々な遮断および洗浄のステップを利用することができる。

20

【0168】

本明細書の「標識」とは、ラジオアイソトープ、蛍光剤、酵素、抗体、磁粉、化学発光剤(chemiluminescer)、特異的結合分子などの粒子など、検出可能なシグナルを出す標識により、前記化合物を直接的または間接的に標識することを意味する。特異的結合分子には、ビオチン、ストレプトアビジン、ジゴキシン、アンチジゴキシンなどのペアを含む。特異的結合分子について、前記に概要を示した既知の手順に従い、通常、相補的な分子を検出に使用される分子で標識する。前記標識は、直接的または間接的に検出可能なシグナルを示すことができる。

30

【0169】

いくつかの方法では、前記化合物の1つのみが標識される。例えば、蛋白質(または蛋白質性の候補物質)は、 ^{125}I を用いてチロシンの位置で標識するか、フルオロフォア(fluorophores)で標識することができる。代わりに、例えば蛋白質に ^{125}I 、候補物質にフルオロフォアを用いるなど、1つ以上の成分を異なる標識で標識することができる。

【0170】

他の方法では、競合的結合アッセイを用いて、前記候補生理活性物質の結合を定量する。この方法では、競合物質が、抗体、ペプチド、結合パートナー、またはリガンドなどのターゲット分子に結合することが知られている結合部分である。一定の条件では、生理活性のある物質と結合部分との間で競合的に結合することができ、結合部分が生理活性のある物質と置換される。このアッセイを用い、異なって発現された蛋白質と競合剤の間の結合を阻害する、候補物質を決定することができる。

40

【0171】

いくつかの方法では、前記候補生理活性物質が標識される。候補生理活性物質または競合剤のいずれかまたは両方があれば、まず結合に十分な時間で蛋白質に加える。インキュベーションは、最適な活性を促すすべての温度で実施でき、典型的には4 ~ 40 である。インキュベーション時間は適切な活性に対して選択するが、迅速な高処理能力のスクリーニングを促すように最適化することもできる。典型的には、0.1 ~ 1時間で十分である。過剰の試薬は、通常、除去するか洗い流す。次に第2の成分を加え、標識された成

50

分の有無を追跡し、結合を示す。

【0172】

他の方法では、まず競合剤を加え、次に候補生理活性物質を加える。競合剤が置換されることは、候補生理活性物質が異なって発現された蛋白質に結合しているため、異なって発現された蛋白質に結合し、潜在的にその活性を調節できることを示す。この方法では、いずれの成分を標識することもできる。例えば、前記競合剤を標識した場合、洗浄溶液中に標識があることが、前記物質によって置換されたことを示す。代わりに、候補生理活性物質を標識した場合、支持体に標識があることが、置換されたことを示す。

【0173】

他の方法では、候補生理活性物質を最初に加え、インキュベーション、洗浄した後、競合剤を加える。競合剤が結合していないことは、生理活性のある物質が、異なって発現された蛋白質に高い親和性で結合していることを示している可能性がある。従って、前記候補生理活性物質を標識した場合、支持体に標識があり、加えて競合剤が結合していなければ、前記候補物質が異なって発現された蛋白質に結合できることを示すことができる。

【0174】

競合的結合法は、ディファレンシャルスクリーニングとして実施することもできる。これらの方法では、最初のサンプルに異なって発現された蛋白質と競合剤を有することができる。第2のサンプルは、候補生理活性物質、異なって発現された蛋白質、競合剤を有する。前記競合剤の結合を両方のサンプルで定量し、2サンプル間の結合の変化や差によって、異なって発現された蛋白質に結合できる、および潜在的にその活性を調節できる物質の有無を示す。前記競合剤の結合が、最初のサンプルと比べて第2のサンプルで異なっていた場合、その物質は異なって発現された蛋白質に結合することができる。

【0175】

他の方法では、ディファレンシャルスクリーニングを利用し、天然の異なって発現された蛋白質に結合するが、修飾された異なって発現された蛋白質には結合できない薬物候補を同定する。異なって発現された蛋白質の構造をモデル化し、その部位と相互作用する物質を合成するための理論的な薬物デザインに用いることができる。異なって発現された生理活性に影響する薬物候補も、蛋白質の活性を向上または低下させることができる薬物のスクリーニングにより同定される。

【0176】

いくつかの方法では、異なって発現された蛋白質の活性を調節する物質をスクリーニングする。一般に、このスクリーニングは、前記異なって発現された蛋白質の既知の生物活性に基づいて行われる。これらの方法では、候補生理活性物質を上述のとおり、異なって発現された蛋白質のサンプルに加え、前記蛋白質の生物活性の変化を定量する。「活性を調節する」ことには、活性を上昇、活性を低下、存在する活性の種類を変化させることなどが含まれる。従って、これらの方法では、前記候補物質がいずれも結合して異なって発現し（ただし、これは必要ないこともある）、本明細書に定義するとおり、生物活性または生化学的活性を変化させる。前記方法には、前記に一般的概要を示したとおり、*in vitro*のスクリーニング法と、異なって発現された蛋白質の存在、分布、活性、量の変化に関する*in vivo*の細胞スクリーニングが含まれる。

【0177】

いくつかの方法は、異なって発現されたサンプルと候補生理活性物質とを合わせる方法と、次に内皮細胞の抗炎症活性に対する効果を評価する方法とを有する。「異なって発現された活性」または本明細書で用いられる文法的に同等の用語は、これだけに限らないが、抑制、耐性、活性化に影響力を及ぼす内皮細胞能力を含む生物活性の1つを意味する。本明細書の1つの活性は、ターゲット遺伝子に結合するか、発現プロファイルを調節する能力である。発現プロファイルが誘導または維持されるおよび/または望みの内皮細胞状態が誘導または維持される。

【0178】

他の方法では、異なって発現された蛋白質の活性が上昇し、他の方法では、異なって発

10

20

30

40

50

現された蛋白質の活性が低下する。従って、アンタゴニストである生理活性物質が有用な方法もあれば、アゴニストである生理活性物質が有用な方法もある。

【0179】

異なって発現された蛋白質の活性を調節できる生理活性物質をスクリーニングする方法を示す。これらの方法は、前記に定義したとおり、異なって発現された蛋白質を有する細胞に候補生理活性物質を加える方法を有する。細胞のタイプはほぼすべての細胞を含む。前記細胞は、異なって発現された蛋白質をコードする組換え核酸を含む。1つの方法では、複数の細胞で候補物質のライブラリを検討する。次に、内皮細胞活性に対する前記候補物質の効果を評価する。

【0180】

前記アッセイでは、正の対照（ポジティブコントロール）と負の対照（ネガティブコントロール）を用いることができる。すべての対照と試験サンプルは少なくとも3回実施し、統計学的に有意な結果を得る。すべてのサンプルを、試薬が蛋白質に結合するのに十分な時間、インキュベーションする。インキュベーション後、非特異的な結合物質がなくなるようにすべてのサンプルを洗い、結合した一様な標識物質を定量する。例えば、放射標識を利用した場合、前記サンプルをシンチレーションカウンターでカウントし、結合した化合物を定量することができる。

【0181】

前記スクリーニングアッセイに、様々な他の試薬を含めることができる。この試薬には、最適な蛋白質-蛋白質結合を促し、非特異的またはバックグラウンドの相互作用を減少させるために用いることができる、塩、中和蛋白質（例えば、アルブミンや洗剤）などの試薬を含める。（プロテアーゼインヒビター、ヌクレアーゼインヒビター、抗菌薬など）前記アッセイの効率を改善する以外の試薬を用いることもできる。要求性の結合を提供するように、成分の混合物を加えることができる。

【0182】

本明細書で示すアッセイについて、本明細書で示す成分を合わせ、キットを作成することもできる。前記キットは、蛋白質および/または異なって発現された蛋白質をコードする核酸の使用を基本とすることができる。核酸の使用に関するアッセイは、以下に詳述する。

【0183】**(C) 動物モデル**

1つの方法では、異なって発現された蛋白質またはその修飾体をコードする核酸を用い、「ノックイン」および「ノックアウト」動物などの遺伝子組換え動物のいずれかを作成することができる。つまり、治療に有効な試薬の開発とスクリーニングに有用である。非ヒト遺伝子組換え動物（マウスやラットなど）は、導入遺伝子を含む細胞を持った動物であり、この導入遺伝子は、前記動物または例えば胚形成期などの出生前の動物の原種に導入される。導入遺伝子は、遺伝子組換え動物を開発した細胞のゲノムに組み込まれたDNAであり、遺伝子のすべてまたは一部の追加または、遺伝子のすべてまたは一部の欠失を含めることができる。いくつかの方法では、異なって発現された蛋白質をコードするcDNAを用い、確立された方法に従って、異なって発現された蛋白質をコードするゲノムDNAをクローニングし、望みのDNAを発現（または過剰発現）するか抑制する細胞を含む、遺伝子組換え動物の作成に用いられるゲノムアレイをクローニングすることができる。特にマウスやラットなどの遺伝子組換え動物を作成する方法は、当該分野で慣習的となっており、例えば米国特許番号第4,736,866号および第4,870,009号で説明され、それぞれが本明細書にこの参考により組み込まれる。典型的には、特定の細胞をターゲットとし、組織特異的エンハンサーにより、異なって発現された蛋白質の導入遺伝子を組み込む。胚形成期に動物の生殖系列に導入された、異なって発現された蛋白質をコードする導入遺伝子のコピーを含む遺伝子組換え動物を用い、前記望みの核酸の発現を増加させる効果を検討することができる。そのような動物は、例えば過剰発現に伴う病的状態から保護すると考えられる試薬の、試験動物として用いることができる。この面に基

10

20

30

40

50

き、動物に試薬を投与し、導入遺伝子を持つ非投与の動物と比べ病的状態の発生数が減少すれば、その病的状態に対して治療的に介入できる可能性が示される。同様に、異なって発現された蛋白質の非ヒト相同体を用い、異なって発現された蛋白質を「ロックアウト」した動物を有する遺伝子組換え動物を作成し、この動物には、異なって発現された蛋白質をコードする内因性遺伝子と、前記動物の胚細胞に導入された、異なって発現された蛋白質をコードする、変化したゲノムDNAとの間で相同的な組換えが行われた結果、異なって発現された蛋白質をコードする遺伝子の欠陥または変化を有している。例えば、異なって発現された蛋白質をコードするcDNAを用い、確立された手法に従って、異なって発現された蛋白質をコードするゲノムDNAをクローニングすることができる。異なって発現された蛋白質をコードするゲノムDNAの一部は、欠失させるまたは組み込みをモニターするために利用できる選択的マーカーをコードする遺伝子など、別の遺伝子で置換させることができる。典型的には、数キロベースの不変側方DNA(5'および3'末端の両方)はベクターに含まれる(例えば、相同体の組換えベクターについて説明するために、Thomas and Capecchi, Cell 51:503, 1987を参照、本明細書にこの参考により組み込まれる)。前記ベクターを(電気穿孔法などにより)胚幹細胞株に導入し、導入されたDNAを内因性DNAと相同的に組み換えた細胞を選択する(例えば、本明細書にこの参考により組み込まれる、Li et al., Cell 69:915, 1992を参照)。次に、前記選択された細胞を動物(マウス、ラットなど)の胚盤胞に注入し、凝集キメラ(aggregation chimeras)を形成する(例えば、Bradley, in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113~152を参照)。次に、キメラ胚を適切な偽妊娠、雌の里親動物に移植し、胚を出産予定日まで保ち、「ロックアウト」動物を作成することができる。生殖細胞に相同的組換えDNAを持つ子孫は、標準的な方法で同定することができ、動物のすべての細胞が相同的組換えDNAを含む動物を繁殖するために用いることができる。例えば、ロックアウト動物の特定の病的状態を防御する能力、および異なって発現された蛋白質のポリペプチドの非存在が原因の病的状態の発症について、ロックアウト動物を特徴付けることができる。

【0184】

内皮細胞関連疾患の動物モデル、または内皮細胞活性の特定の状態を持つ動物モデルには、例えば遺伝子モデルを含むことができる。例えば、そのような動物モデルには、非肥満糖尿病(NOD)マウス(例えば、McDuffie, M., Curr Opin Immunol. 10(6):704~9, 1998; Tochino, Y., Crit Rev Immunol 8(1):49~81, 1987を参照)、実験的自己免疫脳脊髄炎(EAE)(例えば、Wong, F. S., Immunol Rev 169:93~104, 1999を参照)を含むことができる。Schwartz, R. S. and Datta, S. K., Autoimmunity and Autoimmune Diseases, Ch. 31, in Fundamental Immunology, Paul, W. E. (ed.) (Raven Press 1989)も参照し、それぞれは本明細書にこの参考により組み込まれる。他のモデルでは、移植片拒絶反応に関する研究を含めることができる。

【0185】

内皮細胞に関連した疾患様の症状を示す動物モデルは、例えば、当業者に周知の、遺伝子組換え動物を作成する技術と関連して、異なって発現されたアレイを利用することで組み換えられる。例えば、遺伝子アレイを対象動物のゲノムに導入するか、対象動物のゲノムで過剰発現させるか、内因性のターゲット遺伝子アレイがある場合は、過剰発現させるか、代わりに分離し、ターゲット遺伝子の発現を過小発現させるか、不活化させることができる。

【0186】

ターゲット遺伝子のアレイを過剰発現させるため、前記ターゲット遺伝子アレイのコード部分を、対象の動物および細胞タイプに遺伝子を発現させることができる制御アレイに結合することができる。そのような制御領域は当業者に周知であり、必要以上の実験を行わなくとも、利用することができる。

【0187】

内因性のターゲット遺伝子アレイの過小発現については、対象動物のゲノムに再導入する際、内因性のターゲット遺伝子の対立遺伝子を不活化するように、そのようなアレイを単離、組み換えすることができる。組み換えられたターゲットアレイは、組換えターゲットアレイを動物のゲノムに導入する時点で前記内因性のターゲットアレイを分離するように、遺伝子ターゲティングを介して導入する。

10

【0188】

これだけに限らないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、マイクロピッグ (micro-pigs)、ヤギ、ヒト以外の霊長類 (ヒヒ、サル、チンパンジーなど) など、いかなる種の動物も利用し、内皮細胞関連疾患の動物モデルを作成するか、内皮細胞を絶え間なく望みの状態とすることができる。

【0189】

(D) 核酸に基づく治療学

異なって発現されたポリペプチド、アンタゴニスト、アゴニストをコードする核酸は、遺伝子治療に利用することもできる。概して、遺伝子治療ベクターは、移入される哺乳類細胞に医学的に有用な表現型の作用を生み出す、内因性ポリヌクレオチドである。ベクターには、複製開始点があっても、なくてもよい。例えば、患者に投与する前にベクターを増殖させるため、ベクターに複製開始点を含めることは有用である。しかし、前記ベクターが宿主の染色体DNAに組み込まれるか、宿主のmRNAまたはDNAに結合するようにデザインされている場合、複製開始点は投与前に除去することも多い。遺伝子治療で利用されるベクターは、ウイルス性と非ウイルス性が可能である。ウイルスベクターは、通常、ウイルス成分として患者に導入される。非ウイルスベクター、典型的にはdsDNAは、裸のDNA (naked DNA) として移入するか、受容体認識蛋白質、リポアミン、カチオン脂質など、移入を促進する媒体とともに用いることができる。

20

【0190】

レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスなどのウイルスベクターは、2つの成分、つまり修飾されたウイルスゲノムとそれを囲む外被構造でできていることが多いが (一般的には、Smith et al., Ann. Rev. Microbiol. 49: 807~838, 1995を参照、本明細書にこの参考により組み込まれる)、ウイルスベクターが裸の形で導入されているか、ウイルス蛋白質以外の蛋白質でコーティングされていることもある。最近のベクターには、野生型ウイルスと同様の外被構造がある。この構造はウイルスの核酸を包み、保護し、ターゲット細胞に結合し、進入する手段を提供する。しかし、遺伝子治療用にデザインされたベクターのウイルス核酸は、多数の方法で変えられる。これらの変化の目的は、利用できるパッケージング細胞またはヘルパー細胞に入ったベクターの形で増殖能力を維持したままターゲット細胞のウイルス増殖を無効にし、外因性のDNAアレイを挿入するためにウイルスゲノム内に空間を作り、対象遺伝子の適切な発現をコードし可能にする新しいアレイを組み込む。従って、ベクター核酸は一般に、ヘルパー細胞株で複製とパッケージングを行うために重要なシス作用型のウイルスアレイと、外因性遺伝子の転写単位との2つの成分を有する。他のウイルス機能は、特定のパッケージング細胞株またはヘルパー細胞株において、トランス型で発現される。

30

40

【0191】

遺伝子治療に用いる非ウイルス核酸ベクターには、プラスミド、RNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド (メチルホスホネートまたはホスホロチオレート)、ポリアミド核酸、酵母人口染色体 (YAC) などがある。そのようなベクターには、典型的には蛋白質またはRNAを発現する発現カセットが含まれる。そのような発現カセットのプロモーター

50

は構成的、細胞タイプに特異的、ステージに特異的であり、(例えば、グルココルチコイドなどのホルモン、MMTVプロモーターにより)調節可能である。転写は、ベクターにエンハンサーアレイを挿入することで亢進させることができる。エンハンサーは10~300bpのシス作用型のアレイであり、プロモーターによる転写を亢進させる。エンハンサーは、転写ユニットの5'または3'にある時、効率的に転写を亢進させることができる。エンハンサーはイントロンまたはコードアレイ自体にある時にも効果的である。典型的には、SV40エンハンサー、サイトメガロウイルスエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、アデノウイルスエンハンサーなどのウイルスエンハンサーが用いられる。マウスの免疫グロブリン重鎖エンハンサーなど、哺乳類系のエンハンサーアレイも一般的に用いられる。

10

【0192】

典型的には全身投与(例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、頭蓋内注射)または局所投与で個々の患者に投与することで、遺伝子治療のベクターを*in vivo*で送達することができる。代わりに、個々の患者から外植された細胞(例えば、リンパ球、骨髄穿刺液、組織生検)や万能ドナー造血幹細胞など、*ex vivo*で細胞にベクターを送達した後、通常はベクターに組み込んだ細胞を選択し、それに続き患者に細胞を再移植することができる。

【0193】

PAR1経路による内皮細胞のシグナル伝達調節

(A) PAR1シグナル伝達修飾因子のアッセイ

本発明の多数の実施形態において、PAR1シグナル伝達のレベルは、*in vivo*または*in vitro*でポリペプチド、抗体、アミノ酸、ヌクレオチド、脂質、炭水化物、または有機分子や無機分子など多数のPAR1調節分子を細胞に投与することにより、細胞内で調節される。

20

【0194】

PAR1を調節することができる分子を同定するため、アッセイを行い、細胞のPAR1シグナル伝達活性に対する様々な化合物の効果を検出する。PAR1シグナル伝達は、様々な*in vitro*および*in vivo*アッセイを用いて評価し、例えば、他の分子へのPAR1の結合を測定する(APCまたはEPCRへの放射性結合)、炎症反応を保護するAPC/EPCR/PAR1で誘導される遺伝子の蛋白質またはRNAレベルを測定する、またはAPC/EPCR/PAR1で誘導される保護遺伝子の他の態様(例えば、リン酸化レベル、転写レベル、受容体活性、リガンドの結合など)を測定するなど、機能的、化学的、物理的作用を定量することができる。そのようなアッセイを用いて、PAR1シグナル伝達のアクチベーターおよびインヒビターをいずれも検討することができる。従って、同定された修飾因子は、例えば多くの診断、治療への応用に有用である。

30

【0195】

前記アッセイのAPC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質は、典型的には組換え型または天然由来ポリペプチド、またはその保存的修飾変異体である。代わりに、前記アッセイのAPC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質が真核生物に由来し、天然由来のAPC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質と、相同なアミノ酸アレイを有するアミノ酸部分列とが含まれる。一般に、アミノ酸アレイの相同性は、少なくとも70%、任意に少なくとも75%、85%、または86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%以上である。任意に、前記アッセイのポリペプチドがAPC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質のドメインを有する。特定の実施形態では、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質のドメイン、例えばZnフィンガー結合ドメインを固体基質に結合し、例えば結合するか、その活性を調節する分子を単離するために用いる特定の実施形態では、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護ポリペプチドのドメイン、例えばN末端ドメイン、C末端ドメインを非相同的ポリペプチドに融合することで、キメラポリペプチドを形成する。また、そのようなキメラポリペプチドは、例えばAPC/EPCR/PAR1

40

50

1で誘導される保護蛋白質の修飾因子を同定するアッセイで有用である。

【0196】

潜在的なAPC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質インヒビターまたはアクチベーターを投与したサンプルまたはアッセイを比較し、テスト化合物なしでサンプルを制御し、調節の程度を検討する。(アクチベーターまたはインヒビターを投与していない)対照サンプルは、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質の相対的活性値100を割り当てる。APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質の対照に対する活性値が約90%、任意に約50%、任意に約25~0%の場合、APC/EPCR/PAR1で誘導した保護蛋白質が阻害される。APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質の対照に対する活性値が約110%、任意に約150%、200~500%、または1000-2000%の場合、APC/EPCR/PAR1で誘導した保護蛋白質が活性化される。

10

【0197】

前記パラメーターのいずれかを検討することで、ポリペプチドの機能に対するテスト化合物の効果を測定することができる。APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質の活性に影響する適切な生理学的変化を用い、本発明のポリペプチドに対するテスト化合物の影響を評価することができる。無傷細胞または動物を用いて機能的結果を判定する場合、細胞増殖の変化または細胞-細胞間の相互作用の変化など、様々な効果を測定することができる。

【0198】

APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質遺伝子発現を調節することで作用する、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質の修飾因子も同定することができる。例えば、対象のAPC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質を含む宿主細胞を、相互作用させるのに十分な時間、テスト化合物と接触させ、その遺伝子発現レベルを測定する。時間を経過させ、時間の関数として転写レベルを測定することで、そのような相互作用をさせる時間は経験的に決定することができる。当業者に知られた、いかなる適切な方法を用いても、転写量を測定することができる。例えば、ノーザンブロットを用いるか、イムノアッセイによりポリペプチド産物を検出することで、対象蛋白質のmRNA発現を検出することができる。

20

【0199】

(B) APC/EPCR/PAR1で誘導された保護蛋白質と相互作用する化合物のアッセイ

30

特定の実施形態ではアッセイを行い、APC/EPCR/PAR1で誘導された保護蛋白質と物理的に相互作用する分子を同定する。そのような分子は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、アミノ酸、ヌクレオチド、炭水化物、脂質、他の有機または無機分子など、どのタイプの分子でもよい。そのような分子は、通常はAPC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質と相互作用する分子を意味するか、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質と相互作用できる合成分子または他の分子とすることができ、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質と相互作用するか、調節することができる分子のクラスを同定する、リード化合物として利用できる可能性がある。そのようなアッセイは、アフィニティークロマトグラフィー、免疫沈降、2ハイブリッドのスクリーニング、または他の結合アッセイなどの物理的結合アッセイを意味するか、遺伝子アッセイを意味することができる。

40

【0200】

本明細書に述べる結合アッセイまたは機能アッセイのすべてで、*in vivo*または*in vitro*において、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質、または誘導體、変異体、ホモログ、または天然由来APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質フラグメント(断片)を利用することができる。好ましくは、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質が、天然由来APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質のアミノ酸アレイと少なくとも約85%の相同性を有する。多数の実施形

50

態では、A P C / E P C R / P A R 1で誘導される保護蛋白質のフラグメントを用いている。そのようなフラグメントは、単独で用いるか、他のA P C / E P C R / P A R 1で誘導される保護蛋白質フラグメントと組み合わせて用いるか、非相同的蛋白質のアレイと組み合わせて用いることができ、例えば、前記フラグメントを非相同的ポリペプチドと融合させることで、キメラポリペプチドを形成させることができる。

【0201】

A P C / E P C R / P A R 1で誘導される保護蛋白質またはそのフラグメントと特異的に結合する能力に基づき、A P C / E P C R / P A R 1で誘導される保護蛋白質と相互作用する化合物を単離することができる。多数の実施形態では、A P C / E P C R / P A R 1で誘導される保護蛋白質または蛋白質フラグメントを固体支持体に結合させる。1つの実施形態では、A P C / E P C R / P A R 1で誘導される保護ポリペプチドを用いてアフィニティーカラムを作成し、物理的に相互作用する分子を同定する。クロマトグラフィー法はどのスケールでも、多数の異なる製品の装置（例えばPharmacia Biotechnology）を用いても実施できることは、当業者にとって明白である。さらに、in vivoでA P C / E P C R / P A R 1で誘導される保護蛋白質と相互作用する分子は、免疫共沈降などの方法、つまり、細胞または細胞抽出物の抗A P C / E P C R / P A R 1で誘導される保護蛋白質抗体を用いてA P C / E P C R / P A R 1で誘導される保護蛋白質を免疫沈降するA P C / E P C R / P A R 1で誘導される保護蛋白質と沈殿する、蛋白質などの化合物を同定するなどの方法で同定することができる。そのような方法は当業者に周知であり、例えばAusubelら、Sambrookら、Harlow & Laneなどで報告されている。

10

20

【0202】

(C)細胞中のA P C / E P C R / P A R 1で誘導された保護蛋白質活性のレベルの上昇

特定の実施形態では、本発明は細胞中のA P C / E P C R / P A R 1で誘導される保護蛋白質レベルを上昇させることで、炎症または敗血症を治療する方法を提供する。典型的には、そのような方法を用い、例えば、内皮細胞レベルの減少など、A P C / E P C R / P A R 1で誘導される保護蛋白質のレベル減少を亢進し、例えば、A P C / E P C R / P A R 1で誘導される保護遺伝子のコピー数を増加させるか、A P C / E P C R / P A R 1で誘導されるmRNA、蛋白質、または細胞の蛋白質活性を上昇させるなど、多数の方法のいずれかでそのような方法を実施することができる。好ましくは、A P C / E P C R / P A R 1で誘導された保護蛋白質の活性レベルが、正常な内皮細胞に典型的なレベルまで上昇するが、前記レベルは正常細胞に典型的なレベルの前後を含め、内皮細胞のP A R 1シグナル伝達を亢進させるのに十分なレベルまで上昇させることができる。好ましくは、そのような方法にA P C / E P C R / P A R 1で誘導された保護蛋白質のアクチベーターを使用する方法が含まれ、ここで「A P C / E P C R / P A R 1で誘導された保護蛋白質のアクチベーター」とは、A P C / E P C R / P A R 1で誘導された保護遺伝子のポリヌクレオチドレベル、ポリペプチドレベル、蛋白質活性を上昇させるように作用する分子である。そのようなアクチベーターには、A P C / E P C R / P A R 1で誘導された保護蛋白質の小分子アクチベーターが含まれるが、これだけに限らない。

30

40

【0203】

(D)細胞中のA P C / E P C R / P A R 1で誘導された保護蛋白質活性のレベルの低下

特定の実施形態では、本発明は細胞中のA P C / E P C R / P A R 1で誘導される保護蛋白質レベルを低下させることで、炎症または敗血症を治療する方法を提供する。典型的には、そのような方法を用い、例えば、内皮細胞レベルの上昇など、A P C / E P C R / P A R 1で誘導される保護蛋白質のレベル上昇を抑制し、例えば、A P C / E P C R / P A R 1で誘導される保護遺伝子のコピー数を減少させるか、mRNAレベル、蛋白質、または細胞の蛋白質活性を低下させるなど、多数の方法のいずれかで、そのような方法を実施することができる。好ましくは、A P C / E P C R / P A R 1で誘導された保護蛋白質

50

の活性が、正常な内皮細胞に典型的なレベルまで低下するが、前記レベルは正常細胞に典型的なレベルの前後を含め、前記細胞のPAR1シグナル伝達を亢進させるのに十分なレベルまで低下させることができる。好ましくは、そのような方法にAPC/EPCR/PAR1で誘導された保護蛋白質のインヒビターを使用する方法が含まれ、ここで「APC/EPCR/PAR1で誘導された保護蛋白質のインヒビター」とは、APC/EPCR/PAR1で誘導された保護蛋白質のポリヌクレオチドレベルおよび/またはポリペプチドレベル、蛋白質活性を低下させるように作用する分子である。そのようなインヒビターには、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、抗体、優性障害(ドミナントネガティブ)APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質の形態、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質の小分子インヒビターなどがあるが、これだけに限らない。

10

【0204】

好適な実施形態では、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質レベルが上昇した炎症または敗血症を抑制するように、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質レベルを低下させる。細胞増殖とは、細胞または細胞集団が分裂する速度、または細胞または細胞集団が分裂するか増殖する程度を指す。増殖は、細胞成長率および細胞分裂率や細胞死の割合など、多数の因子をすべて反映する。以下に示す理論に縛られることはないが、APC/EPCR/PAR1の増幅および/または過剰発現が内皮細胞で遺伝子を誘導し、炎症誘発性のシグナル伝達を予防することが指摘されている。APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質の抗炎症活性は、敗血症の凝固または炎症性増悪を予防するように作用することができる。本化合物すべてのAPC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質活性に作用する能力は、例えばmRNAやgDNAなどのAPC/EPCR/PAR1で誘導される保護ポリヌクレオチドレベル、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護ポリペプチドレベル、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに対する化合物の結合度、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質の細胞内局在化、または、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質の活性が敗血症で凝固や炎症性増悪を予防する能力などの、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質の機能的特徴など、これだけに限らないが、多数の因子に基づき決定することができる。

20

【0205】

(E) APC/EPCR/PAR1で誘導される保護ポリヌクレオチドのインヒビター
特定の実施形態では、APC/EPCR/PAR1で誘導された保護蛋白質活性は、アンチセンスポリヌクレオチド、つまり、APC/EPCR/PAR1で誘導されたmRNAやその部分列などのmRNAコード核酸アレイに相補的で、好ましくはmRNAコード核酸アレイに特異的にハイブリダイズすることができる核酸を使用することで、ダウンレギュレートまたは完全に阻害される。mRNAに対するアンチセンスポリヌクレオチドの結合は、APC/EPCR/PAR1で誘導されるmRNAの翻訳および安定性を減少させる。

30

【0206】

本発明との関連で、アンチセンスポリヌクレオチドは天然由来ヌクレオチド、または天然由来のサブユニットまたは精密なホモログから作成した合成種を有することができる。アンチセンスポリヌクレオチドには、変化した糖部分または糖間結合がある可能性もある。このうち典型的なものは、当該分野で利用されていることが知られている、ホスホロチオエートと他の硫黄含有種とである。そのようなアナログはすべて、効果的に機能しAPC/EPCR/PAR1で誘導されたmRNAとハイブリダイズする限り、本発明で理解される。

40

【0207】

そのようなアンチセンスポリヌクレオチドは、組み換え法を用いて容易に合成できるか、*in vitro*で合成することができる。そのような合成のための装置は、Applied Biosystemsなど、いくつかの供給メーカーが販売している。ホスホロ

50

チオエートやアルキル化誘導体など他のオリゴヌクレオチドの調整も、当業者に周知である。

【0208】

アンチセンスポリヌクレオチドに加え、リボザイムを用いてAPC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質の転写をターゲットとし、抑制することができる。リボザイムとは、他のRNA分子を触媒的に開裂するRNA分子である。グループIリボザイム、ハンマーヘッド型リボザイム、ヘアピン型リボザイム、RNAアーゼP、斧頭型リボザイム(ax head ribozyme)など、異なる種類のリボザイムについても報告されてきた。(例えば、異なるリボザイムの性質に関する概要については、Castanotto et al., Adv. in Pharmacology 25:289~317, 1994を参照)。

【0209】

ヘアピン型リボザイムの一般的な性質は、例えばHampel et al., Nucleic Acids Res., 18:299~304, 1990; Hampel et al., 1990、欧州特許番号0 360 257; 米国特許番号5, 254, 678などで報告されている。調整法は、当該分野で周知である(例えば、Wong-Staal et al., WO 94/26877; Ojwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6340~6344, 1993; Yamada et al., Human Gene Therapy 1:39~45, 1994; Leavitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:699~703, 1995; Leavitt et al., Human Gene Therapy 5:1151~120, 1994; and Yamada et al., Virology 205:121~126, 1994を参照)。

【0210】

APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質の活性は、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質のインヒビターを加えることでも、抑制可能である。これは、優性阻害APC/EPCR/PAR1で誘導される保護ポリペプチド、例えば、それ自体活性がなく、機能的なAPC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質と同じ細胞に存在する時、機能的なAPC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質のAPC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質活性を抑制または消失させる、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質の一種を提供するなど、多数の方法で達成することができる。主な優性阻害形態のデザインは当業者に周知であり、Herzkowitz, Nature, 329:219~22, 1987などに報告されている。また、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質活性を抑制する能力をスクリーニングすることで、不活性なポリペプチド変異体(ムテイン)を用いることができる。ムテインを作成する方法は、当業者に周知である(例えば、米国特許番号第5, 486, 463号、第5, 422, 260号、第5, 116, 943号、第4, 752, 585号、第4, 518, 504号を参照)。さらに、すべてのペプチド、アミノ酸、ヌクレオチド、脂質、炭水化物、または他の有機、無機分子など、すべての小分子について、下記に説明するとおり、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質に結合するか、その活性を抑制する能力をスクリーニングすることができる。

【0211】

(F) 修飾因子と結合化合物

APC/EPCR/PAR1で誘導された保護蛋白質の修飾因子として検討された化合物は、蛋白質、糖、核酸、脂質など、いかなる小さな化学化合物または生物学的存在でもよい。典型的には、テスト化合物は小さな化学分子とペプチドである。本質的に、本発明のアッセイでは、すべての化学化合物を潜在的修飾因子または結合化合物として利用することができるが、ほとんどの場合、化合物は水溶液または有機溶液(特にDMSOをベースとした溶液)に溶解することができる。前記アッセイは、アッセイ段階を自動化し、アッセイに有用な資源から化合物を提供することで、大量の化学物質ライブラリをスクリー

10

20

30

40

50

ニングするようにデザインされており、典型的には（例えば、ロボットアッセイでマイクロタイタープレートを用いるマイクロタイター形式で）同時に実行される。当然のことながら、Sigma（ミズーリー州セントルイス）、Aldrich（ミズーリー州セントルイス）、Sigma-Aldrich（ミズーリー州セントルイス）、Fluka Chemika-Biochemika Analytika（スイス、ブッフス）など、多数の化学物質供給業者がある。

【0212】

1つの好適な実施形態では、高処理スクリーニング法に、多数の考えられる治療化合物（潜在的修飾因子または結合化合物）を含む、コンビナトリアル化学物質またはペプチドのライブラリを示す方法が関与する。本明細書で示したとおり、そのような「コンビナトリアル化学物質のライブラリ」を1つ以上のアッセイでスクリーニングし、望ましい特徴の活性を示すこれらのライブラリ化合物（特に化学物質やサブクラス）を同定する。このように同定された化合物は、従来の「リード化合物」とすることができ、またはそれ自体を潜在的に、または実際に治療効果があるものとして用いることができる。

10

【0213】

コンビナトリアル化学物質のライブラリは、試薬など、多数の化学的「部分構造」を組み合わせることで、化学合成または生物学的合成により生成した多種多様な化学物質の集まりである。例えば、ポリペプチドライブラリなどの直線的コンビナトリアル化学物質ライブラリは、一定の化合物長（つまり、ポリペプチド化合物のアミノ酸数）で考えられるすべての方法により、化学的部分構造（アミノ酸）のセットを組み合わせることで形成される。そのような化学的部分構造をコンビナトリアルで混合することにより、何百万もの化学化合物を合成することができる。

20

【0214】

コンビナトリアル化学物質ライブラリの調整とスクリーニングは、当業者に周知である。そのようなコンビナトリアル化学物質ライブラリには、ペプチドライブラリなどがあるが、それだけに限らない（例えば、米国特許番号第5,010,175号；Furka, Int. J. Pept. Prot. Res. 37:487~493, 1991およびHoughton et al., Nature 354:84~88, 1991を参照）。化学的多様性のライブラリを作成する他の化学を利用することもできる。そのような化学には、ペプチド（PCTの公開番号第WO 91/19735号など）、コードペプチド（PCTの公開番号第WO 93/20242号など）、ランダム・バイオオリゴマー（random bio-oligomers）（PCTの公開番号第WO 92/00091号など）、ベンゾジアゼピン（米国特許番号第5,288,514号など）、ヒダントイン、ベンゾジアゼピン、ジペプチドなどの多様体（diversomer）（Hobbs et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90:6909~6913, 1993）、ビニロガスポリペプチド（vinyllogous polypeptides）（Hagihara et al., J. Amer. Chem. Soc. 114:6568, 1992）、グルコースを材料とした非ペプチド性ペプチドミミック（Hirschmann et al., J. Amer. Chem. Soc. 114:9217~9218, 1992）、小化合物ライブラリの類似性有機合成（Chen et al., J. Amer. Chem. Soc. 116:2661, 1994）、オリゴカルバメート（Cho et al., Science 261:1303, 1993）、またはペプチジルホスホネート（Campbell et al., J. Org. Chem. 59:658, 1994）、核酸ライブラリ（Ausubel, Berger, および Sambrookなどを参照）、ペプチド核酸ライブラリ（米国特許番号第5,539,083号などを参照）、抗体ライブラリ（Vaughn et al., Nature Biotechnology, 14:309~314, 1996およびPCT/US96/10287などを参照）、炭水化物ライブラリ（Liang et al., Science, 274:1520~1522, 1996および米国特許番号5,593,853などを参照）、小さな有機分子ライブラリ（ベンゾジアゼピン、Baum, C&EN, 50

30

40

50

page 33, Jan 18, 1993; イソプレノイド、米国特許番号第5,569,588号; チアゾリジノンおよびメタチアザノン、米国特許番号第5,549,974号; ピロリジン、米国特許番号第5,525,735号および第5,519,134号; モルフォリノ化合物、米国特許番号第5,506,337号; ベンゾジアゼピン、米国特許番号第5,288,514号などを参照) などがあるが、これだけに限らない。

【0215】

コンビナトリアルライブラリの調整に用いる装置は市販されている(357 MPS、390 MPS、Advanced Chem Tech、ケンタッキー州ルイビル、Symphony, Rainin、マサチューセッツ州ウォバーン、433A Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティ、9050 Plus, Millipore、マサチューセッツ州ベッドフォードなどを参照)。さらに、多数のコンビナトリアルライブラリ自体も市販されている(ComGenex、ニュージャージー州プリンストン、Tripos, Inc.、ミズーリー州セントルイス、3D Pharmaceuticals、ペンシルバニア州エクストン、Martek Biosciences、メリーランド州コロンビアなどを参照)。

10

【0216】

(G) 固体状態および可溶性の高処理アッセイ

1つの実施形態では、本発明でN末端またはC末端ドメインを単独、または非相同的蛋白質に共有結合させた分子などを用いて可溶性アッセイを行い、キメラ分子を作成する。別の実施形態では、本発明で高処理型の固相での *in vitro* アッセイを示し、この場合、ドメイン、キメラ分子、APC/EPCR/PAR1で誘導された保護蛋白質、またはAPC/EPCR/PAR1で誘導された保護蛋白質を発現する細胞または組織を固相基質に結合する。

20

【0217】

本発明の高処理アッセイでは、1日で数千種類の修飾因子をスクリーニングすることが可能である。特に、マイクロタイタープレートの各ウェルを用い、特定の潜在的調節因子に対して別のアッセイを実施することができ、また濃度またはインキュベーション時間の効果が観察される場合、5-10ウェルごとに1つの修飾因子を検討することができる。従って、1つの標準的なマイクロタイタープレートにより、約100種類(96種類など)の修飾因子をアッセイすることができる。1536ウェルプレートを用いた場合、1つのプレートで約100~約1500種類の化合物を容易にアッセイすることができる。1日に数種類のプレートをアッセイすることが可能で、本発明の統合システムを用い、約6,000~20,000種類までの化合物をスクリーニングするアッセイが可能である。より最近では、試薬を操作するマイクロ流体アプローチが開発された。

30

【0218】

対象分子は、共有結合または非共有結合(タグを用いるなど)により、直接的または間接的に固体状態の化合物に結合させることができる。前記タグは、多種多様な化合物のいずれでもよい。一般に、タグを結合させる分子(タグ結合剤)を固体支持体に固定し、タグまたはタグ結合剤の相互作用により、対象のタグを付けた分子を固体支持体に結合する。

40

【0219】

文献で多数報告されている既知分子の相互作用に基づき、多数のタグおよびタグ結合剤を利用することができる。例えば、タグに天然由来結合剤、例えばビオチン、A蛋白(プロテインA)、G蛋白(プロテインG)などがある場合、適当なタグ結合剤(アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラビジン(neutravidin)、免疫グロブリンのFc領域)と併用することができる。ビオチンなどの天然由来結合剤を持つ分子に対する抗体も広く利用されており、適切なタグ結合剤である(SIGMA Immunochemicals 1998 catalogue SIGMA(ミズーリー州セントルイス)を参照)。

【0220】

50

同様に、適切な抗体と併用し、ハプテン化合物または抗原性化合物を用いて、タグ/タグ結合剤のペアを形成することができる。何千種類の特定の抗体が市販されており、多数の追加抗体が文献に報告されている。例えば、1つの共通配置では、前記タグが1次抗体であり、タグ結合剤が1次抗体を認識する2次抗体である。

【0221】

ポリウレタン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリウレア、ポリアミド、ポリエチレンイミン、硫化ポリアリーレン、ポリシロキサン、ポリイミド、ポリアセテートなどの合成ポリマーも、適切なタグまたはタグ結合剤を形成することができる。本開示の展望について、当業者に明白であるとおり、他の多くのタグ/タグ結合剤ペアも、本明細書で説明したアッセイ系に有用である。

10

【0222】

ペプチド、ポリエーテルなどの共通リンカーもタグとして作用することができ、約5~200アミノ酸のポリ-glyアレイなどのポリペプチドアレイなどがある。そのような順応性のあるリンカーは当業者に周知である。例えば、ポリ(エチレングリコール)リンカーがShearwater Polymers, Inc. (アラバマ州ハンツビル)から入手できる。これらのリンカーは、任意に、アミド結合、スルフヒドリル結合、ヘテロ機能的結合(heterofunctional linkages)を有する。

【0223】

タグ結合剤は、現在利用されている多種多様な方法を用い、固体基質に固定する。固体基質は、一般的に、基質のすべてまたは一部を、タグ結合剤の一部と反応する表面に化学官能基を固定する化学試薬に接触させることで、誘導体化または官能性化させる。例えば、長い側鎖に結合させるのに適した官能基は、アミン、ヒドロキシ、チオール、カルボキシ基などである。アミノアルキルシランおよびヒドロキシルアルキルシランを用い、ガラス表面などの様々な面を官能性化することができる。そのような固相バイオポリマーアレイの構築については、文献で多数報告されている。Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149~2154, 1993 (ペプチドなどの固相合成について報告); Geysen et al., J. Immun. Meth. 102: 259~274, 1987 (ピン上での固相成分の合成について報告); Frank & Doring, Tetrahedron 44: 6031~6040, 1988 (セルロースディスク上でのさまざまなペプチドアレイの合成について報告); Fodor et al., Science, 251: 767~777, 1991; Sheldon et al., Clinical Chemistry 39: 718~719, 1993; および Kozal et al., Nature Medicine 2: 753~759, 1996 (すべて、固体基質に固定したバイオポリマーのアレイについて報告)などを参照していただきたい。基質にタグ結合剤を固定する非化学的アプローチには、熱、UV放射による架橋など、他にも一般的な方法がある。

20

30

【0224】

(H) 合理的な薬物デザインアッセイ

APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質の活性を調節する化合物に対するさらに別のアッセイは、コンピューターによる薬物デザインが関与し、コンピューターシステムを用い、アミノ酸アレイによりコード化された構造情報をもとに、APC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質の3次元構造を作成する。入力されたアミノ酸アレイは直接、積極的にコンピュータープログラムの中で事前に確定されたアルゴリズムと相互作用し、前記蛋白質の二次、三次、四次構造モデルを作る。次に、蛋白質構造のモデルを検討し、結合できる構造領域を同定する。次にこれらの領域を用い、蛋白質に結合する化合物を同定する。

40

【0225】

前記蛋白質の3次元構造モデルは、少なくとも10アミノ酸残基のアミノ酸アレイ、またはAPC/EPCR/PAR1で誘導される保護ポリペプチドをコードした対応する核酸アレイをコンピューターシステムに入力することで作成する。前記ヌクレオチドアレイ

50

は、天然由来遺伝子アレイのポリペプチドまたはそのアミノ酸アレイ、およびその保存的に修飾されたアレイをコードする。前記アミノ酸アレイは蛋白質の主要なアレイまたは部分列を表し、これは蛋白質の構造情報をコードしている。少なくとも10残基のアミノ酸アレイ（または10アミノ酸をコードしたヌクレオチドアレイ）をコンピューターキーボードからコンピューターシステムに入力し、コンピューターで読み込み可能な回路基板には、電子保存メディア（磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップなど）、光学メディア（CD-ROMなど）、インターネットサイト、RAMで配信される情報などがあるが、これだけに限らない。次に、当業者に周知のソフトウェアを用い、アミノ酸アレイとコンピューターシステムとの相互作用により、前記蛋白質の3次元モデルを作成する。

10

【0226】

アミノ酸アレイは、対象蛋白質の二次、三次、四次構造を形成するために必要な情報をコードする一次構造を示す。前記ソフトウェアは、一次アレイによってコードされた特定のパラメータを探し、構造モデルを作成する。これらのパラメータは「エネルギー項」を指し、主に電気ポテンシャル、疎水性ポテンシャル、溶媒接触可能表面、水素結合を含む。第2のエネルギー項には、ファンデルワールス・ポテンシャルが含まれる。生物分子は、蓄積したエネルギー項を最小限とする構造を形成する。従って、コンピュータープログラムでは、一次構造またはアミノ酸アレイによってコード化されたこれら項を用い、二次構造モデルを作成する。

【0227】

次に、二次構造のエネルギー項をもとに、二次構造でコード化される蛋白質の三次構造が形成される。この時点で、ユーザーは、蛋白質が膜に結合しているか、可溶性か、体内の蛋白質の位置、蛋白質の細胞内の位置（例えば、細胞質、表面、核）などの追加変数を入力することができる。二次構造のエネルギー項とともにこれらの変数を用い、三次構造のモデルを作成する。三次構造のモデリングでは、コンピュータープログラムが二次構造の疎水面と類似の構造、二次構造の親水面と類似の構造をマッチさせる。

20

【0228】

前記構造が作成されたら、コンピューターシステムによって、考えられる修飾因子の結合領域を同定する。上述のとおり、アミノ酸またはヌクレオチドアレイ、または化合物の化学式を入力し、考えられる修飾因子の3次元構造を作成する。次に、考えられる修飾因子の3次元構造をAPC/EPCR/PAR1で誘導される保護蛋白質と比較し、前記蛋白質に結合する化合物を同定する。蛋白質と化合物との結合親和性はエネルギー項を用いて決定し、どの化合物が蛋白質に結合する確率が高いかを決定する。

30

【0229】

コンピューターシステムを用いて、APC/EPCR/PAR1で誘導される遺伝子の突然変異体、多型変異体、対立遺伝子、種間相同体もスクリーニングする。そのような変異には、疾患状態または遺伝的形質が関与する可能性がある。上述のとおり、GeneChip（登録商標）および関連技術を用い、突然変異体、多型変異体、対立遺伝子、種間相同体をスクリーニングすることもできる。前記変異体が同定されると、診断アッセイを用い、そのような変異した遺伝子を持つ患者を同定することができる。変異したAPC/EPCR/PAR1で誘導される遺伝子の同定には、天然由来のAPC/EPCR/PAR1で誘導される遺伝子の一次核酸とアミノ酸アレイ、それぞれおよびその保存的に修飾されたアレイの入力を受け取ることが含まれる。上述のとおり、前記アレイをコンピューターシステムに入力する。次に、一次核酸またはアミノ酸アレイを、一次アレイと実質的に相同的な二次核酸またはアミノ酸アレイと比較する。前記方法で、前記二次アレイをコンピューターシステムに入力する。一次アレイと二次アレイを比較したら、2つのアレイでヌクレオチドまたはアミノ酸の差を同定する。そのようなアレイは、様々なAPC/EPCR/PAR1で誘導される遺伝子の対立遺伝子の差、および疾患状態と遺伝的形質に關係する突然変異を示している可能性がある。

40

【0230】

50

診断法

アッセイ、動物モデルの作成、核酸を基本とした治療に加え、重要な異なって発現された遺伝子の同定では、診断にこれらの遺伝子を利用することを可能にする（例えば、細胞状態や異常内皮細胞の状態の診断）。変異または異なって発現された遺伝子に基づく疾患を決定することもできる。細胞で内因性の異なって発現された遺伝子の少なくとも1つのアレイを、すべてまたは一部決定する方法を有する、変異した異なって発現された遺伝子を含む細胞を同定する方法を示す。当業者に理解されるように、これは何種類のアレイ決定法を用いて行ってもよい。個体の異なって発現された遺伝子の少なくとも1つの配列のすべてまたは一部を決定する方法を有する、個体の異なって発現された遺伝子型を同定する方法も示す。一般的にこれは、個体の少なくとも1つの組織で行われ、多数の組織または同一組織の異なるサンプルの評価を含めることができる。前記方法には、アレイ決定した異なって発現された遺伝子のアレイを、既知の異なって発現された遺伝子、つまり野生型遺伝子と比較する方法が含まれてもよい。

10

【0231】

次に、異なって発現された遺伝子のすべてまたは一部を、既知の異なって発現された遺伝子のアレイと比較し、違いがあるか否かを判断することができる。これは、Bestfitや、本明細書で概要を示した他のプログラムなど、何種類の既知のアレイ同定プログラムを用いて行ってもよい。いくつかの方法では、患者の異なって発現された遺伝子と、既知の異なって発現された遺伝子の間にアレイの違いがあることが、本明細書に概要を示したとおり、疾患状態または疾患状態の傾向を示す。

20

【0232】

同様に、本明細書の方法と組成物を用い、内皮細胞状態の診断を行うことができる。患者の内皮細胞の遺伝子発現プロフィールを評価することで、内皮細胞の状態を決定することができる。これは、薬物、例えば免疫抑制剤などの作用を確認するために、特に有用である。他の方法は、患者に前記薬物を投与する方法、および前記患者から細胞サンプル、特に内皮細胞を採取する方法を有する。次に、本明細書で概要を示したとおり、例えば健康人の対応するサンプルの発現プロフィールと比較することで、前記細胞の遺伝子発現プロフィールを評価する。この方法では、効果（つまり、前記薬物から正しい発現プロフィールが作成されているか否か）と用量（正しい発現プロフィールが生じるための正しい用量）の両方を確認することができる。

30

【0233】

従って、内皮細胞で異なって発現されることの役割に関する今回の発見は、内皮細胞の状態の相違を誘導するか維持する方法を示している。1つの方法では、異なって発現された蛋白質、特に異なって発現されたフラグメントが、内皮細胞活性を介する疾患の研究または治療、つまり内皮細胞が介する疾患を診断、治療、または予防するために有用である。従って、「内皮細胞を介する疾患」または「疾患状態」には、例えば関節炎、糖尿病、または多発性硬化症が関与する疾患を含めることができる。

【0234】

細胞または生物中の内皮細胞活性を調節する方法を示す。一部の方法は、異なって発現された蛋白質に対する抗体、または本明細書で特定された他の物質（因子）を、本明細書で示された方法により細胞に投与し、内因性の異なって発現された蛋白質の生物活性を低下または消失させる方法を有する。代わりに、前記方法は異なって発現された蛋白質をコードする組換え核酸、またはアンチセンス核酸を含む修飾因子を、細胞または生物に投与する方法を有する。当業者に理解されるように、これはあらゆる種類の方法で達成してもよい。いくつかの方法では、細胞内で異なった発現量を増加させる、例えば、内因性の異なった発現を過剰発現させる、または例えば既知の遺伝子治療法を用い、異なって発現された遺伝子を投与することで、異なって発現される活性を亢進させる。1つの方法では、例えばPCT/US93/03868で報告されているとおり、前記遺伝子治療法には増強された相同的組み換え（enhanced homologous recombination：EHR）を用い、外因性遺伝子を組み込む方法が含まれ、本明細書にその全

40

50

体がこの参考により組み込まれる。

【0235】

個体で内皮細胞活性に関連した疾患を診断する方法を示す。前記方法は、個体または患者の組織中で、異なって発現された蛋白質の活性を測定する方法を有し、前記蛋白質の量または特定の活性の測定を含むことができる。前記活性を、第二の非罹患個体、または第一の個体の非患部組織からの異なって発現された活性とを比較する。これらの活性が異なる場合、第一の個体は内皮細胞活性を介する疾患のリスクがある可能性がある。

【0236】

さらに、異なって発現された蛋白質をコードするヌクレオチドアレイを用い、異なって発現された蛋白質をコードする遺伝子をマッピングし、遺伝病個体の遺伝子分析を行うためのハイブリダイゼーションプローブを構築することもできる。インサイツ (*in situ*) ハイブリッド形成法、既知の染色体マーカーに対する結合分析、ライブラリを用いたハイブリダイゼーションスクリーニングなどの既知の方法を用い、本明細書で示したヌクレオチドアレイを染色体および染色体の特定部位にマッピングすることができる。

【0237】

抗体

いくつかの方法では、*zenki* 異なって発現された蛋白質を用い、異なって発現された蛋白質に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作成することができる、これは本明細書に示すとおり有用である。多数の免疫原を用い、異なって発現されたポリペプチドに特異的に結合する抗体を作成する。全長の異なって発現されたポリペプチドは免疫原に適している。典型的には、対象の免疫原が少なくとも約3アミノ酸のペプチド、より典型的には前記ペプチドが5アミノ酸長、前記フラグメントが少なくとも10アミノ酸長、典型的には前記フラグメントが少なくとも15アミノ酸長である。前記ペプチドは(例えば融合蛋白質として)担体蛋白質と結合することができるか、免疫化ベクター (*immunization vector*) で組み換え技術により発現させる。抗体が結合する、ペプチドの抗原決定基は、典型的には3~10アミノ酸長である。純粋または不純物の入った天然由来ポリペプチドも用いられる。組換えポリペプチドは、原核細胞または真核細胞で発現し、標準的な技術を用いて精製する。次に、ポリペプチドまたはその合成型を、抗体を産生することができる動物に注入する。後でイムノアッセイに使用するため、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれかを作成し、前記ポリペプチドの存在および量を測定することができる。

【0238】

これらの抗体は、様々な応用で利用されている。例えば、異なって発現された抗体を標準的なアフィニティークロマトグラフィーカラムに結合し、以下に詳述するとおり、異なって発現された蛋白質の精製に利用することができる。前記に概要を示したとおり、前記抗体は異なって発現された蛋白質に特異的に結合するため、遮断ポリペプチドとして利用することもできる。

【0239】

抗異なって発現された蛋白質抗体は、ポリクローナル抗体を有することができる。ポリクローナル抗体を産生する方法は、当業者に周知である。簡単に言うと、例えば、精製したポリペプチド、適切な担体に結合したポリペプチド(例えばGSTおよび鍵穴に吸着するヘモシアニン)、または組換えワクチンウイルスなどの免疫化ベクターに組み込まれたポリペプチドなどの免疫原を(米国特許番号4,722,848を参照)アジュバントと混合し、動物を前記混合物で免疫する。検査血液を採取し、対象ポリペプチドに対する反応性の力価を決定することで、免疫原製剤に対する動物の免疫反応をモニターする。免疫原に対する適切な高力価の抗体が得られた場合、血液を動物から採取し、抗血清を調整する。ポリペプチドに対して反応性のある抗体を濃縮するため、適宜、抗血清をさらに分画する。例えば、Coligan, 1991, *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene, NY; および Harlow and Lane, 1989, *Antibodies: A Laboratory M*

10

20

30

40

50

annual Cold Spring Harbor Press, NY. を参照、それぞれは本明細書にこの参考により組み込まれている。

【0240】

異なって発現された蛋白質の事前に定義されたフラグメントに対する、結合フラグメントおよびその1本鎖組換え体などを含む抗体は、例えば上述のとおり担体蛋白質とフラグメントの抱合体などで動物を免疫することで増加する。

【0241】

異なって発現された蛋白質に対する抗体は、代わりに、モノクローナル抗体とすることもできる。モノクローナル抗体は、望みの抗体を分泌する細胞から調整する。通常のポリペプチドまたは修飾したポリペプチドに対する結合について、これらの抗体をスクリーニングされるか、例えば異なって発現された蛋白質を介した活性などのアゴニストまたはアンタゴニストの活性に対してスクリーニングされる。場合によっては、マウス、齧歯類、霊長類、ヒトなど、様々な哺乳類宿主からモノクローナル抗体を調整することが望ましい。そのようなモノクローナル抗体を調整する方法の説明は、例えば、Stites et al. (eds.) Basic and Clinical Immunology (4th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CAとそこに引用されている参考文献; Harlow and Lane, Supra; Goding, 1986, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed.) Academic Press, New York, NY; および Kohler and Milstein, Nature 256: 495~497, 1975などに見ることができ、それぞれは本明細書にこの参考により組み込まれる。

10

20

【0242】

免疫剤は典型的に、異なって発現された蛋白質のポリペプチドまたはその融合蛋白質を含む。一般に、ヒト由来の細胞が好ましい場合は末梢血リンパ球(「PBL」)を用い、ヒト以外の哺乳類源が望ましい場合は脾臓細胞またはリンパ節細胞を用いる。次に、ポリエチレングリコールなどの適切な融合剤を用いて不死化細胞株とリンパ球を融合し、ハイブリドーマ細胞を作成する(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986, pp. 59~103、本明細書にこの参考により組み込まれる)。不死化細胞株は、通常、形質転換した哺乳類細胞、特に齧歯類、ウシ、ヒトの骨髓腫細胞である。通常、ラットまたはマウスの骨髓腫細胞株を利用する。ハイブリドーマ細胞は、非融合不死化細胞の成長と生存を阻害する1つ以上の物質を含む適切な培地で培養することができる。例えば、親細胞に酵素ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRTまたはHPRRT)がない場合、典型的には、ハイブリドーマの培地にヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン(「HAT培地」)が含まれ、この物質がHGPRT欠乏細胞の成長を阻害する。

30

【0243】

不死化細胞株は、効率的に融合し、特定の抗体産生細胞による抗体の発現レベルを安定で、高く維持し、HAT培地などの培地に感受性が高い。多くの不死化細胞株はマウスの骨髓腫細胞株であり、例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerおよびメリーランド州ロックビルのAmerican Type Culture Collectionから入手することができる。ヒト骨髓腫細胞株およびマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株も、ヒトモノクローナル抗体の産生について報告されてきた(Kozbor, J. Immunol., 133: 3001, 1984; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, pp. 51~63、それぞれは本明細書にこの参考により組み込まれる)。

40

【0244】

50

次に、ハイブリドーマ細胞を培養する培地を、異なって発現された蛋白質に対するモノクローナル抗体の存在について、アッセイすることができる。ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、ラジオイムノアッセイ (RIA) や酵素免疫抗体法 (ELISA) などの免疫沈降や *in vitro* 結合アッセイによって決定する。そのような技術やアッセイは当該分野で周知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、本明細書にこの参考により組み込まれる Munson and Pollard, *Anal. Biochem.* 107: 220, 1980 の Scatchard 分析により決定することができる。

【0245】

望みのハイブリドーマ細胞を同定した後、前記クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法で培養することができる (Goding 他)。この目的に適した培地は、例えばダルベッコ変法イーグル培地および RPMI-1640 培地などである。代わりに、ハイブリドーマ細胞を哺乳類の腹水で *in vivo* 培養することもできる。

10

【0246】

サブクローンが分泌するモノクローナル抗体は、例えば、A-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーなどの従来免疫グロブリン精製法により、培地または腹水から単離または精製することができる。

【0247】

他の適切な方法には、ファージまたは同様のベクターで組換え型抗体のライブラリを選択することが関係する。それぞれ本明細書にこの参考により組み込まれる、Huse et al., *Science* 246: 1275~1281, 1989 および Ward, et al., *Nature* 341: 544~546, 1989 を参照していただきたい。

20

【0248】

また、組換え型免疫グロブリンを作成することもできる。それぞれ本明細書にこの参考により組み込まれる、米国特許番号第 4,816,567 号および Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 10029~10033, 1989 を参照していただきたい。

【0249】

簡単に述べると、任意に定常部と結合した、軽鎖および重鎖の可変部をコードする核酸を発現ベクターに挿入する。軽鎖および重鎖は、同一または異なる発現ベクターでクローニングすることができる。抗体鎖をコードする DNA セグメントを、発現ベクターの制御アレイに連結し、これにより抗体鎖の発現を確認する。そのような制御アレイには、シグナルアレイ、プロモーター、エンハンサー、転写終止アレイなどが含まれる。発現ベクターは、典型的には、エピソームとして、または宿主染色体の不可欠な部分として、宿主の生物で複製可能である。

30

【0250】

大腸菌 (*E. coli*) は、抗体を発現させるために有用な 1 つの原核生物宿主である。使用に適した他の微生物宿主には、*Bacillus subtilus* などの桿菌、サルモネラ、セラチア、様々なシュードモナス属などの、他の腸内細菌科が含まれる。このような原核宿主でも、発現ベクターを作ることができ、典型的には宿主細胞と適合する発現制御アレイ (複製開始点など)、およびラクトース・プロモーター系、トリプトファン (*trp*) ・プロモーター系、 λ -ラクタマーゼ・プロモーター系、またはファージのプロモーター系などの制御アレイが含まれる。

40

【0251】

酵母などの他の微生物を発現に用いることもできる。サッカロミセス属は 1 つの宿主であり、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の糖分解酵素、複製開始点、終止アレイなどを含むプロモーターなど、発現制御アレイを持つ適切なベクターがある。

【0252】

50

哺乳類の組織細胞培養を用い、抗体を発現、および産生することができる(本明細書にこの参考により組み込まれる Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., 1987を参照)。真核細胞が有用であるのは、無傷抗体を分泌できる適当な宿主細胞株が多数開発されてきたためである。免疫グロブリンをコードする核酸の発現に適した宿主細胞は、SV40で形質転換したサル腎臓CV1細胞株(COS-7、ATCC CRL 1651);ヒト胚性腎臓細胞株(human embryonic kidney line)(293)(Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59, 1977);BHK(baby hamster kidney)細胞株(BHK, ATCC CCL 10);チャイニーズハムスター卵巣細胞DHFR(CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:4216, 1980);マウスセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243~251, 1980);サル腎細胞(CV1 ATCC CCL 70);アフリカミドリザル腎細胞(VERO-76, ATCC CRL 1587);ヒト頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2);イヌ腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34);バッファローラット肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75);ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065);マウス乳腺腫瘍(MMT 060562, ATCC CCL 51);およびTRI細胞(Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44~46, 1982);バキュロウイルス細胞などがある。それぞれは本明細書にこの参考により組み込まれる。

【0253】

対象のポリヌクレオチドアレイ(例えば、重鎖および軽鎖をコードするアレイ、発現制御アレイ)を含むベクターは、宿主細胞に移行することができる。真核細胞では塩化カルシウムの注入が一般的に利用されるが、他の細胞宿主ではリン酸カルシウム処理または電気穿孔法を利用することができる。全般的には、本明細書にこの参考により組み込まれる、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press, 2d ed., 1989を参照して頂きたい。重鎖と軽鎖を別の発現ベクターでクローニングする場合、前記ベクターを同時形質移入し、無傷免疫グロブリンの発現と構築が得られる。組換え型DNAを導入後、免疫グロブリン産物を発現する細胞株は細胞選択的である。安定な発現が可能な細胞株は有用である(つまり、細胞株を50回継代後も発現レベルが減少しない)。

【0254】

一度発現されると、硫酸塩析、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動など、当該分野で標準的な手順に沿って、完全な抗体、その二量体、個々の軽鎖および重鎖、または他の形の免疫グロブリンを精製することができる。全般的には、本明細書にこの参考により組み込まれる、Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., 1982を参照。実質的に純粋な免疫グロブリンは、均質性が少なくとも約90~95%、より典型的には98~99%以上である。

【0255】

ポリペプチドおよび抗体は、検出可能なシグナルを示す物質を、共有結合または非共有結合により標識される。様々な標識と共役の技術が知られており、科学文献および特許文献のいずれでも、広範に報告されている。従って、分析対象物を検出するために用いる抗体は、検出可能な部分で直接標識することができ、例えば、それ自体を直接的または間接的に標識した二次抗体に結合させることで、間接的に標識することもできる。

【0256】

異なって発現された蛋白質を単離するため、抗体をアフィニティークロマトグラフィーに用いる。例えば、固体支持体(例えばアガロース、セファデックスなどの粒子)に結合

した抗体を用いてカラムを調整し、細胞可溶化物をカラムに通し、洗浄、濃度増加していく弱い変性剤で処理し、それによって精製した異なって発現されたポリペプチドが遊離する。

【0257】

ヒトモノクローナル抗体またはその結合フラグメントをコードするDNAアレイを単離するさらなるアプローチとは、本明細書にこの参考により組み込まれるHuse et al., Science 246:1275-1281, 1989に概要が示された、一般的なプロトコールに沿ったヒトB細胞のDNAライブラリをスクリーニングし、次に望みの特異性を持つ抗体（または結合フラグメント）をコードするアレイをクローニング、増幅するものである。そのようなB細胞は、望みの抗原、フラグメント、前記抗原またはフラグメントを含むより長いポリペプチド、または抗イディオタイプ抗体で免疫したヒトから得ることができる。任意に、そのようなB細胞を抗原に曝露していない個人から得る。ヒト免疫グロブリンアレイを発現した遺伝子組み換え非ヒト動物からB細胞を得ることもできる。遺伝子組み換え非ヒト動物を、抗原または抗原の集まりで免疫することができる。前記動物は免疫しなくてもよい。ヒト抗体をコードするB細胞のmRNAアレイを用い、逆転写酵素を用いてcDNAを作成することができる。次に、cDNAアレイの断片をコードするV領域を、抗体のV領域の発現を方向づけるDNAベクターにクローニングする。典型的には、クローニング前に、前記V領域のアレイをPCRで特異的に増幅する。また、典型的には、前記V領域のアレイを融合蛋白質として発現するように構築したDNAベクター内の部位に、前記V領域アレイをクローニングする。そのような融合蛋白質の例としては、m13大腸菌ファージ遺伝子3および遺伝子8融合蛋白質などがある。クローニングしたV領域のアレイを集めたものを用い、抗体V領域の発現ライブラリを作成する。発現ライブラリを作成するためには、前記クローニングされたV領域アレイを有するDNAベクターを用い、真核または原核宿主細胞を形質転換する。V領域に加え、前記ベクターはウイルスゲノムのすべてまたは一部を任意にコードすることができ、ウイルスのパッケージングアレイを有することができる。場合によっては、前記ベクターがウイルスゲノム全体を有さず、前記ベクターをヘルパーウイルスまたはヘルパーウイルスのDNAアレイとともに用いる。発現した抗体のV領域は、形質転換した細胞、または形質転換した細胞のウイルス粒子の中または表面に認められる。次に、前記細胞またはウイルス粒子を有するこの発現ライブラリを用い、事前に決定した抗原と反応する抗体または抗体フラグメントをコードしたV領域アレイを同定する。これらのV領域アレイを同定するため、事前に決定した抗原と、発現したV領域の反応性について、発現ライブラリをスクリーニングまたは選択する。クローニングされたV領域アレイを有するか、発現したV領域がある細胞またはウイルス粒子は、事前に決定した抗原と反応する（結合関係または触媒活性など）V領域を持つ細胞またはウイルス粒子を同定または濃縮する方法によってスクリーニングまたは選択する。例えば、次に発現したV領域と結合する放射性または蛍光標識抗原を検出し、利用し、細胞またはウイルス粒子を同定または分類することができる。個体の基質またはビーズに結合した抗原を用い、表面に反応性V領域を有する細胞またはウイルス粒子を選択することができる。このように発現ライブラリから同定されたV領域のアレイを用い、形質転換した宿主細胞で抗体またはそのフラグメントを直接発現させ、この抗体またはそのフラグメントは事前に決定した抗原と反応することができる。

【0258】

Huseが報告させたプロトコールは、ファージ提示法と併用することで、より効率的になる。例えば、それぞれ本明細書にこの参考により組み込まれるDowerらの国際公開番号第WO 91/17271号およびMcCaffertyらの国際公開番号第WO 92/01047号、米国特許番号第5,871,907号、第5,858,657号、第5,837,242号、第5,733,743号、第5,565,332号を参照していただきたい。これらの方法では、ファージのライブラリを作成し、その要素（ディスプレイパッケージ（display packages））が外表面に異なる抗体を提示する。抗体は、通常FvまたはFabフラグメントとして提示される。抗原またはそのフ

ラグメントに対する親和性を向上させることで、望みの特異性を持ったファージ提示抗体を選択することができる。ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現し、免疫された遺伝子組み換え非ヒト動物と組み合わせてファージ提示法を用い、抗原に対する免疫反応が弱い場合でも、抗原特異的抗体を得ることができる。

【0259】

ファージ提示法の1つのバリエーションでは、特定のマウス抗体に結合特異性を持つヒト抗体を産生することができる。例えば、本明細書にこの参考により組み込まれるWO 92/20791を参照していただきたい。この方法では、開始物質として、特定のマウス抗体の重鎖または軽鎖可変部のいずれかを用いる。例えば、軽鎖の可変部を開始物質として選択した場合、ファージライブラリを作成し、その構成要素が同じ軽鎖可変部（つまり、前記マウスの開始物質）と異なる重鎖可変部とを提示するように構築される。重鎖可変部は、再アレイしたヒト重鎖可変部のライブラリから得る。強い特異的結合を示すファージ（例えば、少なくとも 10^8 、典型的には少なくとも $10^9 M^{-1}$ ）を選択することができる。次に、このファージのヒト重鎖可変部を、さらにファージライブラリを構築する開始物質とする。このライブラリでは、各ファージが同じ重鎖可変部（つまり、最初の提示ライブラリから同定した領域）と異なる軽鎖可変部とを提示する。軽鎖可変部は、再アレイしたヒト軽鎖可変部のライブラリから得る。ここでも、特定の強い特異的結合を示すファージを選択する。ヒト抗体と類似した人工抗体は、例えばCDR領域にランダムアレイまたは合成アレイを組み込んだファージ提示ライブラリから入手することができる。

10

【0260】

別の実施形態では、異なって発現された蛋白質または蛋白質アナログに対する抗体フラグメントを示す。典型的には、これらのフラグメントが、完全な免疫グロブリンと同様に、異なって発現された蛋白質受容体に特異的に結合する。抗体フラグメントは、分離重鎖、軽鎖 F_{ab} 、 F_{ab} 、 $F_{(ab)2}$ 、 F_v などである。フラグメントは、組み換えDNA技術または無傷免疫グロブリンの酵素的または化学的分割により生成する。

20

【0261】

前記抗体は一価抗体とすることができる。一価抗体を調整する方法は、当該分野で周知である。例えば、1つの方法では、免疫グロブリンの軽鎖および修飾した重鎖の組み換え発現が関与する。通常、重鎖の架橋を阻害するため、 F_c 領域のいずれかの点で前記重鎖が切断される。代わりに、架橋を阻害するため、前記該当するシステイン残基を別のアミノ酸残基と置換するか、欠失させてもよい。

30

【0262】

一価抗体を調整するため、*in vitro*法も適している。そのフラグメント、特に F_{ab} フラグメントを生成するための抗体の消化は、当該分野で知られた日常的な方法を用いて達成することができる。

【0263】

代わりに方法は、組み換えDNA技術によりヒトの定常領域に非ヒト抗体のCDR領域を結合することで、ヒト化免疫グロブリンを作成するものである。本明細書にこの参考により組み込まれる米国特許番号第5,585,089号を参照していただきたい。非ヒト（マウスなどの）抗体のヒト化型は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小限アレイが含まれる免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント（ F_v 、 F_{ab} 、 F_{ab} 、 F_{ab2} または他の抗体の抗原結合部分列など）である。ヒト化抗体には、受容側の相補性決定領域（CDR）の残基を、望みの特異性、親和性、性能を持つマウス、ラット、ウサギなど、非ヒト種のCDR残基（供与抗体）で置換したヒト免疫グロブリン（受容抗体）などがある。場合によっては、ヒト免疫グロブリンの F_v 骨格の残基を対応する非ヒト残基で置換する。ヒト化抗体は、受容抗体、または取り込まれたCDRまたは骨格アレイのいずれにもない残基を有することもできる。一般に、ヒト化抗体は実質的に、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインをすべて有し、非ヒト免疫グロブリンに対応するCDR領域のすべてまたは実質的にすべてと、FR領域のすべてまたは実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリンのコンセンサスアレイの領域である。ヒト化抗体は、任意に F_c

40

50

領域の少なくとも一部を有し、典型的にはヒト免疫グロブリンの一部を有する。それぞれ本明細書にこの参考により組み込まれる Jones et al., Nature, 321: 522~525, 1986; Riechmann et al., Nature, 332: 323~329, 1988および Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593~596, 1992を参照していただきたい。

【0264】

キメラ抗体とヒト化抗体は、キメラ抗体とヒト化抗体を構築するための開始物質を提供するマウスまたは他の非ヒト抗体と、同一または同様の結合特異性と親和性を持っていて、キメラ抗体は、典型的には遺伝子組み換えにより異なる種に属する免疫グロブリン遺伝子の断片から、軽鎖または重鎖遺伝子を構築した抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体遺伝子の可変部(V)断片をIgG₁およびIgG₄などのヒト定常部(C)に結合することができる。ヒトアイソタイプIgG₁が利用されることが多い。従って、典型的なキメラ抗体は、マウス抗体のVドメインまたは抗原結合ドメインおよびヒト抗体のCドメインまたはエフェクタードメインを有するハイブリッド蛋白質である。

10

【0265】

ヒト化抗体には、実質的なヒト抗体の可変領域骨格残基(受容抗体と呼ぶ)、実質的なマウス抗体の相補的決定領域(供与免疫グロブリンと呼ぶ)とがある。それぞれ本明細書にこの参考により組み込まれる Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029~10033, 1989および WO 90/07861、U.S. 5,693,762、U.S. 5,693,761、U.S. 5,585,089、U.S. 5,530,101、U.S. 5,225,539を参照していただきたい。存在する場合は、定常領域も実質的または全体的にヒト免疫グロブリンのものとする。ヒト可変ドメインは、通常、骨格アレイがCDRが由来するマウスの可変領域ドメインと高度なアレイの同一性を示す、ヒト抗体から選択する。重鎖および軽鎖の可変領域の骨格残基は、同一または異なるヒト抗体アレイから得ることができる。ヒト抗体アレイは、天然由来ヒト抗体のアレイ、またはいくつかのヒト抗体のコンセンサスアレイとすることができる。本明細書にこの参考により組み込まれる WO 92/22653を参照していただきたい。ヒト可変領域の骨格残基にある特定のアミノ酸は、CDRの配置および/または抗原に対する結合に影響する可能性に基づき、置換を選択する。そのような考えられる影響の検討は、モデリング、特定の位置にあるアミノ酸の特徴検討、または特定アミノ酸の置換または変異の効果を経験的に観察することである。

20

30

【0266】

例えば、マウス可変領域の骨格残基と特定のヒト可変領域の骨格残基でアミノ酸が異なる場合、アミノ酸が(1)非共有結合により直接抗原に結合する、(2)CDR領域に隣接している、(3)隣接していない場合はCDR領域と相互作用する(例えばCDR領域の約6Å以内にある)、または(4)VL-VHインターフェースに関与することが合理的に予想される場合、ヒト骨格のアミノ酸は、通常、マウス抗体の相当する骨格アミノ酸で置換する必要がある。

【0267】

その他の置換候補は、その部位のヒト免疫グロブリンではまれな、受容体ヒト骨格アミノ酸である。これらのアミノ酸は、マウスの供与抗体の対応する部位、またはより典型的にはヒト免疫グロブリンの対応する部位のアミノ酸と置換することができる。その他の置換候補は、その部位のヒト免疫グロブリンとしてはまれな、受容体ヒト骨格アミノ酸である。ヒト化免疫グロブリンの可変部骨格は、ヒト可変部の骨格アレイまたはそのようなアレイのコンセンサスアレイと少なくとも85%のアレイ同一性を示す。

40

【0268】

ヒト抗体は、前記で考察したファージ提示ライブラリなど、当該分野で知られている様々な技術を用いて産生することができる(Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381, 1991; Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581, 1991)。ColeらおよびBoerner

50

らの技術も、ヒトモノクローナル抗体の作成に利用することができる (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77, 1985 および Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86~95, 1991)。同様に、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリンの遺伝視座を遺伝子組み換え動物、例えば内因性免疫グロブリン遺伝子を部分的、または完全に不活化したマウスなどに導入することで作成することができる。負荷すると、遺伝子の再アレイ、組み立て、抗体のレパートリーなど、あらゆる点でヒトと密接に近似した、ヒト抗体の産生が観察される。このアプローチは、例えば米国特許番号 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016 で報告されているが; Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779~783, 1992; Lonberg et al., *Nature*, 368: 856~859, 1994; Morrison, *Nature*, 368: 812~13, 1994; Fishwild et al., *Nature Biotechnology*, 14: 845~51, 1996; Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826, 1996; Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65~93, 1995 も参照していただきたい。それぞれの引用は、この参考により本明細書に組み込まれる。

【0269】

二重特異性抗体は、少なくとも2種類の抗原に対して結合特異性を持つ、典型的にはヒトまたはヒト化されたモノクローナル抗体である。今回のケースでは、結合特異性の1つが異なって発現された蛋白質に対するもので、もう1つ結合特異性は他の抗原、および細胞表面蛋白質または受容体または受容体サブユニットに対するものである。

【0270】

二重特異性抗体を作成する方法は、当該分野で周知である。典型的には、二重特異性抗体の組換え体の産生が、2つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖ペアの共発現に基づいており、2つの重鎖は特異性が異なる。(Milstein and Cuello, *Nature*, 305: 537~539, 1983)。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の組み合わせがランダムなため、これらのハイブリドーマ(クアドローマ(quadromas))から、10種類の抗体分子の考えられる混合物が産生され、このうち1つのみが正しい二重特異性構造を持つ。正しい分子の精製は、通常、アフィニティークロマトグラフィーの段階で達成される。同様の手順は、1993年5月13日に発表された国際公開番号第WO 93/08829号、および Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659, 1991 で公開されている。それぞれの引用は、この参考により本明細書に組み込まれる。

【0271】

望みの結合特異性(抗体-抗原結合部位)を持った抗体の可変ドメインは、免疫グロブリンの定常ドメインアレイと融合することができる。前記融合は、典型的には免疫グロブリンの重鎖定常ドメインと行い、ヒンジ領域、CH2領域、CH3領域の少なくとも1つを有する。典型的には、第1の重鎖定常領域(CH1)は、少なくとも1つの融合に存在する軽鎖の結合に必要な部位を含む。免疫グロブリン重鎖の融合をコードするDNAと、望ましい場合は、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別の発現ベクターに挿入し、適当な宿主微生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作成する詳細については、例えば、本明細書にこの参考により組み込まれる Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210, 1986 を参照していただきたい。

【0272】

ヘテロ接合抗体(heteroconjugate antibodies)も、本方法と組成物の範囲である。ヘテロ接合抗体は、2つの共有結合した抗体から成る。そのような抗体は、例えば不必要な細胞に対する免疫系細胞をターゲットとする方法(米国特許番号 4,676,980)や、HIV感染の治療(国際公開番号第WO 91/0036

0号；第WO 92/200373号；欧州特許番号第EP 03089号）に提案されてきた。架橋剤が関与する方法など、合成蛋白質の化学で知られた方法を用い、抗体を *in vitro* で調整できることを検討している。例えば、ジスルフィド交換反応を用いるか、チオエーテル結合を形成することで、免疫毒素を構築することができる。この目的で適切な試薬の例は、イミノチオエート (*iminothiolate*) およびメチル-4-メルカプトブチリミデート (*methyl-4-mercaptobutyrimidate*) や、例えば米国特許番号4,676,980で開示された試薬などがある。それぞれの引用は、この参考により本明細書に組み込まれる。

【0273】

抗異なって発現された蛋白質に対する抗体には、様々な有用性がある。例えば、抗異なって発現された蛋白質抗体を、異なって発現された蛋白質の診断アッセイ、例えば特定の細胞、組織、血清での発現検出に利用することができる。競合結合アッセイ、直接的または間接的なサンドイッチアッセイ、均一または不均一な相で行われる免疫沈降アッセイなど、様々な診断アッセイ技術を用いることができる (*Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., pp. 147~158, 1987*)。前記診断アッセイに用いられる抗体は、検出可能な分子の一部で標識することができる。検出可能な分子の一部は、直接的または間接的に、検出可能なシグナルを生成することができる必要がある。例えば、検出可能な分子の一部を³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、¹²⁵Iなどの放射性同位元素、またはフルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ルシフェリンなどの蛍光または化学発光化合物、またはアルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼなどの酵素とすることができる。抗体を検出可能な分子の一部に結合するため、当該分野で知られている方法を用いることができ、*Hunter et al., Nature, 144:945, 1962*；*David et al., Biochemistry, 13:1014, 1974*；*Pain et al., J. Immunol. Meth., 40:219, 1981*；および *Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30:407, 1982*で報告されている方法などがある。それぞれの引用は、この参考により本明細書に組み込まれる。

【0274】

異なって発現された蛋白質に対する抗体は、組み換え細胞の培養や天然資源の異なって発現された蛋白質をアフィニティー精製するためにも有用である。このプロセスでは、異なって発現された蛋白質に対する抗体を、当該分野で周知の方法を用い、セファデックス樹脂やろ紙などの適当な支持体に固定する。次に、固定した抗体を、これから精製する異なって発現された蛋白質を含むサンプルと接触させ、その後、固定された抗体に結合した異なって発現された蛋白質以外、サンプル中の実質的なすべての物質を除去する、適切な溶媒で前記支持体を洗い流す。最後に、前記抗体から異なって発現された蛋白質を遊離させるための別の適切な溶媒で前記支持体を洗い流す。

【0275】

医薬品と投与法

抗異なって発現された蛋白質抗体を治療に用いることもできる。いくつかの方法では、前記抗体が細胞内で異なって発現された蛋白質に結合し、調節するように、前記抗体をコードする遺伝子を用いる。他の方法では、の異なって発現された蛋白質、アゴニスト、またはアンタゴニスト治療有効量を患者に投与する。「治療有効量」、「医薬品として認められる用量」、「医薬品として認められる量」とは、免疫抑制剤または薬物の組み合わせ十分な量を用い、適切な治療法で投与した際に、例えば疾患または障害の症状、または疾患または障害の進行を予防、遅延、抑制、改善するなど、望みの結果を達成することを意味する。

【0276】

医薬品として認められる担体は、一部、投与する特定の組成物、および前記組成物を投与するために用いる特定の方法により決定する。従って、医薬品に適当な製剤は幅広くに

ある（例えば、本明細書にこの参考により組み込まれる Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., 1990を参照）。医薬品は、一般的に、患者に投与するのに適した形態で、蛋白質、アゴニスト、またはアンタゴニストを有する。前記医薬品は、通常は滅菌で、実質的に等張で、すべて米国食品医薬品局の医薬品製造管理および品質管理基準（GMP）に完全に従い、製剤化される。

【0277】

経口投与に適した製剤は、(a)水、食塩水、PEG400などの希釈液に懸濁した、有効量のパッケージされた核酸(packaged nucleic acid)などの液体溶液；(b)それぞれ事前に定められた量の液体、固体、顆粒、ゼラチンなどの主成分を含む、カプセル、小袋、錠剤；(c)適当な液体中の懸濁液；(d)適当な乳剤から成ることができる。錠剤の形態には、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、コーンスターチ、片栗粉、微結晶性セルロース、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸などの医薬品添加物、着色剤、賦形剤、結合剤、希釈剤、緩衝剤、保湿剤、防腐剤、香料、色素、粉碎剤、医薬品として適合する基剤の1つ以上を含めることができる。トローチ剤は、当該分野で知られている主成分、基剤に加え、香料として主成分、通常はスクロースおよびアラビアゴムまたはトラガカントを有することができ、ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアラビアゴムのエマルジョン、ゲルなど、不活性な基剤として主成分を有するトローチを有することができる。

10

【0278】

いくつかの方法では、医薬品として認められた塩類として存在しているなど、前記医薬品が水溶性であり、酸および塩基を加えた塩の両方を含めることとする。「医薬品として認められた酸を加えた塩類」とは、遊離塩基の生物学的効果を保持した塩を指し、非生物学的、また他に望ましくない、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機塩、および酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、マレイン酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸などの有機酸で形成された塩類を指す。「医薬品として認められた塩基を加えた塩類」とは、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、銅、マンガン、アルミニウム塩、特にアンモニウム、カリウム、ナトリウム、マグネシウム塩などの無機塩基に由来する塩類を含む。医薬品として認められた毒性のない有機塩基に由来する塩類には、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、エタノールアミンなど、1級、2級、3級アミン、および天然の置換されたアミン、環状アミン、塩基性イオン交換樹脂などの置換されたアミンの塩類を含む。

20

30

【0279】

核酸のみ、または他の成分と併用して、エアロゾール製剤（つまり、「噴霧」することができる）を作り、吸入投与することができる。エアロゾール製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの加圧した噴霧剤に入れることができる。

【0280】

直腸内投与に適した製剤には、例えば坐剤があり、坐剤の基剤とともにパッケージされた核酸から成る。適切な坐剤の基剤には、天然または合成トリグリセリド、またはパラフィン炭化水素が含まれる。さらに、例えば液体トリグリセリド、ポリエチレングリコール、パラフィン炭化水素などの基剤とともにパッケージされた核酸の組み合わせから成る、ゼラチン状の直腸カプセルを用いることも可能である。

40

【0281】

例えば関節内、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下経路など、非経口投与に適した製剤には、酸化防止剤、緩衝液、静菌剤、目的とするレシipientの血液で等張の製剤を溶かして精製する溶質などを含むことができる、水性および非水性の等張滅菌注射液と、懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、防腐剤などを含むことができる、水性および非水性の

50

滅菌懸濁液などがある。組成物は、例えば静脈内に、また経口、局所、腹腔内、膀胱内、くも膜下腔内に投与することができる。注射用製剤は、例えば、アンプル、多用量の容器など単位量の形で、防腐剤を加えて提示することができる。

【0282】

注射液および懸濁液は、前記に説明したような、滅菌した粉末、顆粒、錠剤から調整することができる。ex vivo療法との関連で、前記パッケージされた核酸で形質導入した細胞を、前記のように静脈内または非経口的に投与することもできる。

【0283】

患者に投与する用量は、経時的に患者に有益な治療反応を示すのに十分である必要がある。前記用量は、利用する特定のベクターの効果と患者の状態、また治療する患者の体重または表面積により決定する。前記用量の大きさは、特定患者の特定のベクター、または形質導入される細胞タイプの投与に伴う有害な副作用の有無、性質、程度によって決定される。

10

【0284】

本方法および組成物の異なって発現された蛋白質の発現により生じる、疾患の治療または予防に対し、投与されるベクターの効果的な量を決定する上で、医師はベクターの循環血漿中レベル、ベクターの毒性、疾患の進行、抗ベクター抗体の産生を評価する。一般に、ベクターの裸の核酸に相当する量は、典型的な70kgの患者で約1μg~100μgであり、レトロウイルス粒子を含むベクターの用量を計算し、治療に有効な核酸に相当する量を求める。

20

【0285】

投与については、患者の質量と全体的な健康状態に適用されるように、インヒビター、ベクター、または形質導入細胞タイプのLD₅₀、様々な濃度のインヒビター、ベクターまたは細胞タイプの副作用により決定した割合で、インヒビターと形質導入細胞を投与することができる。投与は単回投与または分割投与により達成することができる。

【0286】

形質導入した細胞の再注入は、確立された方法に沿って調整する。それぞれ本明細書にこの参考により組み込まれるAbrahamsen et al., J. Clin. Apheresis 6:48~53, 1991; Carter et al., J. Clin. Apheresis 4:113~117, 1998; Aebersold et al., J. Immunol. Meth. 112:1~7, 1998; Muul et al., J. Immunol. Methods, 101:171~181, 1987; およびCarter et al., Transfusion 27:362~365, 1987を参照していただきたい。約2~4週間の培養後、前記細胞の数は 1×10^8 および 1×10^{12} となる必要がある。この点について、細胞の増殖特性は、患者ごと、細胞タイプごとに異なる。形質導入した細胞の再注入の約72時間前、一定量を表現型、および治療薬を発現している細胞の割合を分析するために採取する。

30

【0287】

キット

前記異なって発現された蛋白質、アゴニスト、またはアンタゴニスト、またはそのホモログは、PAR1経路を介した内皮細胞のシグナル伝達の発現と制御を検討するために有用なツールである。異なって発現された蛋白質をコードする核酸を特異的にハイブリダイズする試薬（異なって発現された蛋白質のプローブやプライマーなど）と、異なって発現された蛋白質に特異的に結合する試薬（抗体など）とを用い、発現と制御を検討する。

40

【0288】

サンプル中の異なって発現された蛋白質の有無を調べる核酸アッセイには多数の技術があり、サザン解析、ノーザン解析、ドットプロット、RNアーゼ保護、S1分析、PCRおよびLCRなどの増幅技術、高密度オリゴヌクレオチドアレイ分析、in situハイブリッド法などが当業者に知られている。in situハイブリッド法では、例えば、細胞内でハイブリダイゼーションが行われるが、その後の解釈と分析では細胞の形態が

50

保存されるように、ターゲット核酸を細胞周囲から遊離する。それぞれ本明細書にこの参考により組み込まれる Singer et al., *Biotechniques* 4: 230~250, 1986; Haase et al., *Methods in Virology*, vol. VII, pp. 189~226, 1984; および *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (Hames et al., eds., 1987) では、*in situ* ハイブリッド法の分野の概要が示されている。さらに、前記様々な免疫アッセイ法により、異なって発現された蛋白質を検出することができる。前記被験サンプルは、典型的には正の対照（ポジティブコントロール）（組換え型の異なって発現された蛋白質を発現したサンプルなど）および負の対照（ネガティブコントロール）両方と比較する。

10

【0289】

内皮細胞活性の修飾因子をスクリーニングするキット。そのようなキットは、容易に入手できる物質から調整することができ、試薬も提供されている。例えば、そのようなキットは、異なって発現された蛋白質、アゴニスト、またはアンタゴニスト、反応試験管、異なって発現された遺伝子の活性を検査するための使用説明書の1つ以上を有することができる。キットが対象とするユーザーと前記ユーザーの特定の目的によって、様々なキットおよび成分を調整することができる。例えば、異なって発現された蛋白質の活性または内皮細胞活性の修飾因子を測定するため、前記キットを *in vitro* または *in vivo* アッセイに合わせることができる。

【0290】

上述のとおり、プローブアレイを有するキットが提供されている。前記キットの任意の追加要素は、例えば、他の制限酵素、逆転写酵素またはポリメラーゼ、基質ヌクレオシド三リン酸、標識に用いられる方法（例えば、標識がピオチンの場合はアビジン酵素抱合体と、酵素基質と、色素原）、逆転写、PCR、ハイブリダイゼーション反応に適した緩衝液などである。

20

【0291】

通常、前記キットには、前記方法を実施するための使用説明書も含まれる。我々の実施形態と使用例は、本開示の観点から、当業者に明らかであろう。

【0292】

以下の実施例は、説明のために示されるものであって、制限するためのものではない。

30

【実施例1】

【0293】

実施例1

プロテインC経路による内皮細胞プロテアーゼ活性化受容体1の活性化

敗血症における凝固と炎症の増悪は、保護作用のあるプロテインC（PC）経路によって均衡される。ここでは、活性化PC（APC）が内皮細胞PC受容体（EPCR）を、内皮細胞でのプロテアーゼ活性化受容体（PAR）1開裂の補助受容体として利用することを示す。遺伝子プロファイリングからは、PAR1シグナル伝達が、PAR1により選択的に誘導されるが、PAR2の活性化では誘導されない免疫調節性の単球遊走因子-1など、すべてのAPCで誘導される保護遺伝子を説明していることが証明されている。プロトタイプのトロンピン受容体がAPCシグナル伝達のターゲットであるという、予期しなかった所見は、敗血症におけるAPCの保護作用に新たな洞察を与える。

40

【0294】

適切なPARで形質導入されない限り、PAR1欠乏マウス線維芽細胞は、プロテアーゼによって活性化されない（Camerer, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 5255, 2000; Riewald, W. Ruf, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 7742, 2001）。我々はこれらの細胞のAPCに対する無応答性を生かし、APCによるプロテアーゼシグナル伝達の要件を特徴付けた。APCによる刺激は、事前にすべての細胞表面トロンピン性

50

P A R 1 シグナル伝達を遮断することが示されている、100 nM ヒルジンの存在下で行った (M . R i e w a l d e t a l . , B l o o d , 97 : 3109 , 2001) 。 P A R 1 欠乏性線維芽細胞は、E P C R が P A R と共発現している場合にのみ、20 nM A P C に反応性を示した (図 1 A) 。 E P C R または P A R 2 のみの発現、または A P C 結合が欠乏している E P C R 変異体と P A R 2 との共発現 (P . C . L i a w , e t a l . , J B i o l C h e m , 276 : 8364 , 2001) では、A P C シグナル伝達を補助 (図 1 A) 、 E P C R 結合 A P C のみが P A R を効率的に活性化できることが証明された。

【0295】

E P C R と P A R 1 の共発現でも、A P C に反応した (図 1 B) 。 トロンビンのシグナル伝達と同様、A P C シグナル伝達は、P A R 1 に対する阻止抗体の開裂で抑制されたが、抗 P A R 1 抗体は、非特異的 P A R 1 脱感作を除き、直接的な P A R 1 または他の G 蛋白共役受容体アゴニストによるシグナル伝達を阻害しなかった。従って、蛋白質分解のメカニズムを介するが、プロテアーゼ非依存性受容体を介さない A P C シグナルは、E P C R と P A R の間でクロストークする。P A R 2 活性に対する P A R 1 の A P C 用量反応には差がなく、P A R s の結合が切れやすいという特異的な特徴ではなく、E P C R に結合することで A P C が提示されることが、P A R 開裂の効率を決定することが示された。プロトタイプ トロンビン受容体 P A R 1 が他のプロテアーゼにより活性化されるという所見は、凝固因子 X a も P A R 1 を開裂することを示した最近のデータと一致している (C a m e r e r , e t a l . , P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 97 : 5255 , 2000 ; R i e w a l d , W . R u f , P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 98 : 7742 , 2001 ; M . R i e w a l d e t a l . , B l o o d , 97 : 3109 , 2001) 。 E P C R には、受容体の同時シグナル伝達特性に影響する可能性がある、細胞質のパルミトイル化部位があると考えられる。しかし、単一の細胞質 C y s が S e r に変異したことで、P A R 1 または P A R 2 を介した E P C R 結合 A P C のシグナル伝達は抑制されなかった (図 1 A) 。従って、E P C R のパルミトイル化は P A R s の A P C 依存性開裂に対する厳密な要件ではない。

【0296】

非相同的な過剰発現の実験では、E P C R 結合 A P C が P A R - 1 および P A R - 2 を活性化できることが明確に証明されたが、E P C R が主な内皮細胞の表面で適切な位置にあり、A P C による P A R の開裂を補助するか否かはまだ確立されていない。A P C を用いた内皮細胞の刺激は、M A P キナーゼ E r k 1 / 2 のリン酸化という P A R 1 および P A R 2 シグナル伝達に共通の反応を誘導した (図 1 B および 1 C) 。活性部位をブロックした A P C は M A P キナーゼのリン酸化を誘導できなかったため、A P C の蛋白分解活性が主な細胞での P A R 開裂に必要であることが証明された。さらに、トロンピンではなく、A P C に反応した E r k 1 / 2 のリン酸化は、E P C R の結合と競合する、A P C に阻止された活性部位 10 倍モル濃度過剰に用いることで阻害され、内皮細胞では A P C シグナル伝達が受容体依存的であることが確認された。開裂阻止抗 P A R 1 抗体は、P A R 2 アゴニストペプチドへの反応に影響せずに、A P C に反応した E r k 1 / 2 のリン酸化を抑制した。従って、内皮細胞の P C 経路による M A P キナーゼのリン酸化は、P A R 1 と

【0297】

内皮細胞で P A R の活性化が A P C 依存性遺伝子の誘導を説明しているか否かを決定するため、A P C、または P A R 1 あるいは P A R 2 の選択的アゴニストペプチドで 90 分間刺激した内皮細胞について、大規模な m R N A 発現プロフィールを決定した。この時間は、初期の転写関連イベントおよび後期のエフェクター遺伝子の誘導イベントの両方を捕らえるように選択した。3つの独立した実験をもとに、約 7000 の発現遺伝子の 1% が A P C または P A R アゴニストの刺激により、再現性をもってアップレギュレートされた (図 2) 。 P A R 1 および P A R 2 アゴニストは、これらの遺伝子のほとんどを同程度誘導した (図 2 A) 。最も顕著な例外は、単球遊走因子 - 1 (M C P - 1) の転写であり、

これはPAR1アゴニストのみで誘導された。

【0298】

全体として、APCで誘導される遺伝子は、PAR1(図2B)およびPAR2(図2C)の直接アゴニスト刺激と関連していた。いくつかの遺伝子はPARアゴニストペプチドで誘導されたが、APC刺激では誘導されなかった。最も注目すべきなのは、転写物はAPCで誘導されないが、PAR1アゴニストで誘導されることであり、APC刺激によりMCP-1遺伝子が強力にアップレギュレートされた(図2、BおよびC)。マイクロアレイに表現される遺伝子のさらに1%が、アゴニストの誘導で実験間のばらつきが大きいことが示され、図2、A~Cに含めるための厳密な基準に合致しなかった。これらの追加遺伝子の分析では、さらに、PAR2選択的転写物はAPCによって誘導されなかったが、APCは他のPAR1選択的遺伝子をアップレギュレートした(表1)。より大きな遺伝子の階層的なクラスタリングから、APCシグナル伝達とPAR1反応の同一性が確認された。従って、遺伝子プロファイリングから、内皮細胞のAPCシグナル伝達に対するすべての転写反応が、PAR1シグナル伝達により説明されることを証明している。

【0299】

主な内皮細胞の経時的実験では、MCP-1がAPCとPAR1アゴニストによって同様に誘導されたが、PAR2の直接的な活性化によっては誘導されず、3つのアゴニストすべてが同様の速度論で核受容体TR3を誘導したことが確認された(図3A)。DSCR1の転写物、つまりカルシニユリンの負の制御因子は、APC刺激で誘導されなかった遺伝子の例として選択された。経時的実験では遺伝子チップのデータが確認され、さらに、この転写物がPAR2刺激により選択的にアップレギュレートすることが示されると証明された(図3A)。従って、APCはPAR2アゴニストの刺激に典型的な反応を誘導することはできない。予想通り、抗PAR1抗体はAPCによるPAR1特異的MCP-1遺伝子の誘導を遮断した。抗PAR1抗体も、例えばTR3、HBEGF、NFKB1a、GADD45BなどのPAR1またはPAR2刺激に反応するAPC依存性の遺伝子誘導を阻害した(図3B)。従って、PAR1選択的およびPAR2許容性APC反応は抗PAR1抗体により遮断され、PAR2は内皮細胞のAPCシグナル伝達でPAR1の代用とならないことが証明された。ノックアウト線維芽細胞でPAR1およびPAR2が同時に発現しても、PAR1の共発現がEPCR結合APCによるPAR2の開裂を制限することを除き、APCシグナル伝達の同様なPAR1特異性を生じなかった。選択的APCを介した内皮細胞PAR1の活性化は、特定の微小環境におけるPAR1およびEPCRの細胞タイプ特異的な共存、またはAPC開裂を制限することができる、PAR2の潜在的な翻訳後修飾の可能性(S. J. Compton, et al., *Br J Pharmacol*, 134:705, 2001)によるものの可能性がある。

【0300】

高濃度のAPCでの細胞の前処理は、内皮細胞および単球で炎症性のシグナル伝達を阻害し、細胞生存の経路を誘導することが報告された(D. E. Joyce, et al., *J Biol Chem*, 276:11199, 2001; Shu et al., *FEBS Lett*, 477:208, 2000; S. T. Grey et al., *J Immunol* 153:3664, 1994)。APCシグナル伝達と直接的なPAR活性は、炎症誘発性シグナル伝達経路の逆制御メカニズムとして解釈することができる、初期の転写反応を同様に誘導する(表2)。これには、G蛋白共役受容体(AKAP12、グラビン)、MAPキナーゼ/egr(DUSP1および5、NAB1)、NFB(NFB1)経路の負の制御因子を含む。NFB依存性遺伝子TNFAIP3(A20)(E. G. Lee et al., *Science* 289:2350, 2000)およびZFP36(TTP)(E. Carballo, et al., *Science*, 281:1001, 1998)はTNFシグナル伝達を停止させるために重要であり、これらの遺伝子を標的とした欠失は*in vivo*で慢性炎症に至る。既知の抗アポトーシス機能を持つNFB依存性の遺伝子も、APCおよびPARのシグナル伝達で同様にアップレギュレートされた。TNFAIP3(A20)、IER3、GADD45B

は、TNF誘導性抗アポトーシス遺伝子として知られている。さらに2つのPARおよびAPC誘導性抗アポトーシス遺伝子、つまり、A1とIAP-1も、10倍の高濃度APCで長時間(16時間)にわたり刺激することでアップレギュレートされたが(D. E. Joyce, et al., J. Biol. Chem., 276:11199, 2001)、後の研究では、他のAPCで制御される遺伝子が、我々の実験の初期段階では変化しなかった。PAR1アゴニストとAPCによる保護遺伝子の一致したアップレギュレーションにより、内皮細胞ではAPCシグナル伝達の抗炎症作用および抗アポトーシス作用すべてがPARを介しているという、強力な証拠が示された。

【0301】

APCの生成がトロンビン依存性である場合でも、APCによるプロトタイプトロンビン受容体PAR1の活性化が関連している可能性がある。低濃度のトロンビンを霊長類に注入することで、血小板活性の主要な兆候、つまり、*in vivo*で高感受性トロンビンを介したPAR1反応なしに、プロテインC経路が顕著に活性化し、(S. R. Hanson et al., J Clin Invest, 92:2003, 1993)。トロンビンにより検出可能な血小板PAR1が活性化されないことは、トロンビンのPAR1相互作用的エキソサイトIを占める、高濃度のインヒビターと競合基質の主要フィブリノーゲンが原因である可能性がある(T. K. Vu, et al., Nature 353:674, 1991)。内皮細胞のトロンボモジュリンもエキソサイトIを占めるため(P. Fuentes-Prior et al., Nature 404:518, 2000)、細胞表面でのトロンビンによるPAR1活性を抑制する。より正確に言えば、トロンビン依存的PARシグナル伝達を阻害する、内皮細胞のトロンボモジュリンにトロンビンが補充されるため(B. W. Grinnell, D. T. Berg, Am J Physiol, 270:H603, 1996)、トロンビンはプロテインC経路を活性化し(S. R. Hanson et al., J Clin Invest, 92:2003, 1993)。トロンボモジュリンに補充されたトロンビンはEPCR結合PCを活性化し(C. T. Esmon et al., Thromb Haemost, 82:251, 1999)、EPCR結合APCはPAR1を活性化することを考慮すると、PC経路の生理的活性化は、内皮細胞の保護性PAR1シグナル伝達に、非常に関連したアクチベーター(活性化因子)として浮上する。

【0302】

保護作用を示すAPCシグナル伝達のEPCR補助受容体の機能は、敗血症モデルにおいては、EPCRの抗炎症機能によって十分補助される(F. B. Taylor et al., Blood, 95:1680, 2000)。重篤な敗血症では、内皮機能障害とトロンボモジュリンのダウンレギュレーションがPC活性の広範な抑制を促し、トロンビン生産を亢進するが、それでもEPCRはトロンボモジュリンが枯渇した内皮細胞で検出される(S. N. Faust et al., N Engl J Med, 345:408, 2001)。そのため、PCの血漿レベルが正常でも、治療有効量で投与されたAPCが重篤な敗血症に有益であるという所見は(G. R. Bernard et al., N Engl J Med, 344:699, 2001)、保護性APCシグナル伝達で、余剰のEPCRを利用することで説明できる。この外因性APCは脈管構造でEPCRを発現した内皮細胞を標的とするが、トロンビンのシグナル伝達は、局所的に進行中の凝固活性部位により限定される。さらに、トロンビンは他の細胞を活性化し、血小板を分泌、凝集させ、フィブリンを生成し、炎症細胞の確保と活性化を支援する。つまり、敗血症症候群が進行する中で、トロンビンの効果がAPCのエンドセリンで限定された、保護性PAR1シグナル伝達を再生する可能性は低い。

【0303】

予期しなかった所見は、内皮細胞でのPAR1選択的なMCP-1の誘導であった。内皮細胞に対するAPCの直接的な保護作用に加え、APCによるMCP-1の誘導は、*in vivo*でのAPCシグナル伝達に対する間接的な抗炎症作用を示している可能性がある。MCP-1には、局所的な炎症部位に単球を補充する役割があり、単球のサイトカ

10

20

30

40

50

イン反応の強力な抗炎症制御と対になっている (S. A. Luther, et al., Nat Immunol, 2: 102, 2001)。敗血症の結果に対する局所サイトカインネットワークの重要性は十分理解されており、MCP-1は先天性の免疫系の炎症反応を局所的に制御することができる。さらに、TH、分極、インターロイキン10を含む抗炎症性サイトカインに伴うアップレギュレーションを誘導することで、MCP-1は後天性の免疫系に影響する (C. Gerard, et al., Nat Immunol, 2: 108, 2001)。全身および局所で誘導された敗血症モデルのいずれにおいても、MCP-1投与には保護作用があり、MCP-1の中和は死亡率を上昇させるが (D. A. Zisman et al., J Clin Invest, 99: 2832, 1997; C. L. Bone-Larson et al., Am J Pathol, 157: 1177, 2000)、インターロイキン10は全身の炎症反応を均衡する (M. E. Sewnath et al., J Immunol, 166: 6323, 2001)。従って、提示されたデータは、PC経路特異的なPAR1の活性化を、敗血症における宿主の防御機構の制御と関連した局所および全身の免疫調節性ケモカイン反応に関連付けている。

10

20

30

40

50

【0304】

敗血症における炎症性サイトカインの産生は、トロンボモジュリンをダウンレギュレートすることで生理学的抗凝固経路を機能しないようにするが、トロンボモジュリンが枯渇した内皮細胞では、EPCRがまだ検出可能である (S. N. Faust et al., N Engl J Med, 345: 408, 2001)。治療のために投与したAPCは、シグナル伝達の補助受容体として余剰のEPCRを利用し、重篤な敗血症から保護することができる (G. R. Bernard et al., N Engl J Med, 344: 699, 2001)。敗血症症候群の段階的増悪において、トロンピンはAPCの内皮制限性保護的PAR1シグナル伝達を再生する可能性は低いが、これは、トロンピンのターゲットに微小血栓器官の機能障害との関連で活性化される多数の細胞タイプにあるPARが含まれるためである。予想外に、MCP-1は、内皮細胞のAPC依存性PAR1シグナル伝達により、選択的にアップレギュレートされる遺伝子として同定された。全身および局所で誘導される敗血症のモデルでは、MCP-1に保護作用がある (D. A. Zisman et al., J Clin Invest, 99: 2832, 1997; C. L. Bone-Larson et al., Am J Pathol, 157: 1177, 2000)。APCの直接的な内皮の保護機能に加え、APCによる局所的なMCP-1の誘導は、敗血症で宿主の防御機構を制御する、免疫調節性サイトカインネットワークにより、間接的な抗炎症作用を促進することができる。

【0305】

トロンピンのシグナル伝達でアップレギュレートされるか、APC-PAR1のシグナル伝達で変化がないまたはダウンレギュレートされる内皮細胞の発現プロファイルを表4に示している。表4では、以下の分子がAPC-PAR1シグナル伝達により変化がないかダウンレギュレートし、トロンピンのシグナル伝達によりアップレギュレートすることが示されている：つまり、SH-PTP3、W28170、フルクトース-6-ホスファターゼ、2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、W28616、BID、NF-KB2、トロンボスポンジン-1、6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、神経線維腫症2型腫瘍抑制因子、陽イオン性アミノ酸トランスポーター2、W28616、NF- κ B p65³、TTF-I相互作用ペプチド12、ATRC2、アデューシン、sortilin、p53細胞腫瘍抗原、W28257、hERRa1、G蛋白共役受容体、EGFRBP-GRB2、Pax8、SH-PTP3、5T4、bc1-xL、ディスインテグリン-メタロプロテアーゼ、C1q-関連因子、サイクリンD1、AI743606、ミオシン-Ixb、GN5、ISLR、Stat2、幹細胞因子、c-ets-1、usurpin、染色体5q21-22、クローン-A3-A、トロンボスポンジン、ELL2、二重特異性蛋白ホスファターゼ、ピトロネクチン受容体サブユニット、PCTAIRE-2、フォリス

タチン、ets-2、ELL2、ユートロフィン、C8FWリン蛋白質、PCTAIRE-2、fra-2、MINOR、GADD34、IL8、SSR、ニューロン由来オーファン受容体、CGGBP、nma、jun-B、チロシンホスファターゼ、GRO、CtIP、PRDI1-BF1、血管内皮増殖因子、スタニオカルシン関連蛋白質、CL100、BMP-2A、NF-Atc、mrg1、jun-B、VEGF、STC、ATF3である；これらの遺伝子は、本明細書では、抗炎症性APC-PAR1シグナル伝達によりダウンレギュレートされる遺伝子を指す。

【0306】

同定された遺伝子産物を用い、特定のアクチベーターまたはPAR1アゴニストを開発し、哺乳類対象物の全身の炎症を抑制するか、哺乳類対象物の敗血症を治療することができる。遺伝子発現プロファイルは、APC/PAR1シグナル伝達のため、抗炎症性状態の内皮細胞として示される。表1は、PAR2アゴニストのシグナル伝達により変化がないか、内皮細胞のPAR1アゴニストのシグナル伝達またはAPCのシグナル伝達によりアップレギュレートされる、以下の遺伝子を示している：つまり、MCP-1、qe82d12.x1、RACH1、PAC747L4、T-プラスチン、エンドセリン受容体B型様蛋白質、VEGF、wx69d10.x1である。これらの遺伝子は、本明細書で、PAR1アゴニスト/APCでアップレギュレートされた内皮細胞の発現プロファイル遺伝子を指す。

10

【0307】

材料と方法

レポーター遺伝子のアッセイ。ヒトEPCR cDNAはPCRで増幅され、pEGFP-N1 (Clontech) にサブクローニングして、EPCRとC末端EGFP蛋白質の間に2つのGly残基のリンカーを導入する。PC/APC結合活性がない変異型EPCR構築物は、オリゴヌクレオチドに対する変異誘発性を用い、Tyr154をAlaと置換することで作成した (P. C. Liaw, et al., J Biol Chem, 276:8364, 2001)。EPCRのPALMITOYL化耐性変異株は、細胞質のCys221をSerと点置換することで作成した。すべての構築物のコードアレイは、DNAアレイ決定により確認した。トロンピン、APC、ヒルジン、PAR1アゴニストペプチドTFLLRNPNDK、PAR2アゴニストペプチドSLIGRL、モノクローナル抗PAR1抗体ATAP2 (10 µg/mlで使用)、およびWEDE15 (20 µg/mlで使用) が、これまでに報告されている (M. Riewald, W. Ruf, Proc Natl Acad Sci U S A, 98:7742, 2001; P. J. O'Brien et al., J Biol Chem, 275:13502, 2000; M. Riewald et al., Blood, 97:3109, 2001)。APCには0.5 mM H-D-Phe-L-Phe-Argクロロメチルケトン (Bachem Bioscience Inc.) で修飾した活性部位があり、余剰のAPC活性と遊離クロロメチルケトンがないことは、広範な透析の後に確認された。リゾホスファチジン酸 (LPA) はSigmaから入手した。マウスPAR欠乏性M6-11細胞株には、ヒトPAR1またはPAR2およびegr-1プロモーターシフェラーゼレポーター構築物を同時に形質移入した。一晚、血清欠乏細胞を、20 nM APC、10 µM PAR1アゴニストTFLLRNPNDK、100 µM PAR2アゴニストSLIGRL、または5 nM トロンピン (IIa) と一緒に5時間インキュベートした。APCに関するすべての実験に100 nMヒルジンを含め、トロンピンのシグナル伝達を排除した。開裂阻止抗PAR1抗体は、指示された場合、アゴニストの10分前に加えた。

20

30

40

【0308】

内皮細胞のMAPキナーゼのリン酸化。プライマリーヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を、2%血清を含む新鮮M199を用い、前述のプライマリーアゴニスト刺激前に5時間インキュベートした。Erk1/2リン酸化は、刺激6分後にウェスタンブロット法で分析した。EPCRへのAPCの結合を遮断するため、100 nMクロロメチルケトンで修飾したAPC (APC-CK) を加えた。PAR1の開裂を遮断するため、アゴニス

50

ト刺激の10分前に抗PAR1抗体を加えた。MAPキナーゼによるリン酸化は、プロットのレーザー濃度測定により定量し、統計学的な有意性をt検定で決定した。

【0309】

マイクロアレイ分析。コンフルエント(融合)ヒト臍帯静脈内皮細胞HUV-EC-C(ATCC CRL 1730)は、M199培地、2mM CaCl₂、10mM Hepes中で5時間血清欠乏状態にし、次に10μM TFLLRNPNDK、100μM SLIGRL、10nM APC/100nMヒルジン、または5nMトロンピン(IIa)で90分間、37℃で刺激した。総RNAを単離した後、逆転写した。精製した二本鎖cDNAはビオチン標識dUTPおよびdCTPの存在下、*in vitro*で転写し、断片化したcRNAをHG-U95Av2アレイ(Affymetrix、カリフォルニア州サンタクララ)とハイブリダイズした後、ストレプトアビジン-フィコエリトリンで染色した。アレイは、GeneChip 3.1ソフトウェアを用いてスキャン、分析した。PAR1、PAR2、またはAPCで誘導された遺伝子を分析した3つの個別実験では、アゴニストと対照の間で9回比較した高密度マイクロアレイから12組のデータを得た。3つの個別実験について、各アゴニスト個々の増殖に対するロガリズムの平均を計算し、fold-inductionの平均を求めた。発現していない遺伝子および可変性の高い遺伝子を除去するため、示された遺伝子に対し次の基準を定めた：(1)遺伝子発現レベルは、12組のデータのうち2組以上で、GeneChipソフトウェアにより「ある」とスコア化される必要がある。(2)刺激された場合と対照とをGeneChip 3.1で比較分析し、9回の比較のうち2回以上「増加」とスコア化される必要がある。(3)全アゴニストのfold inductionの平均と各アゴニストによる誘導の標準偏差の平均との比は、図2に含めるためには1以上、より大きな遺伝子セットでPAR1とPAR2の選択的反応を評価するためには0.5以上である必要がある。

【0310】

TaqManリアルタイムPCR。TaqMan(Applied Biosystems)のリアルタイムRT-PCRでは、刺激したプライマリーHUV-EC-Cから4μgの総細胞性RNAを逆転写した後、Superscriptキット(Invitrogen)を用い、RNアーゼで処理した。TaqManプローブは、対象遺伝子についてカスタムデザインされている。すべてのサンプルを、ヒトGAPDHプローブとApplied Biosystemsから入手したプライマーで規格化した。

【0311】

10

20

30

【表 1 - 1】

表 1 : APC、PAR 1、またはPAR 2アゴニストで刺激した内皮細胞のマイクロアレイ分析 (microarray analysis) により決定した、遺伝子導入プロフィール。1組目は、3つのアゴニストによって高い再現性で誘導された遺伝子を示す。繰り返し実験を行った中で可変性の高い、より大きな遺伝子の特定遺伝子を以下に示し、PAR 1およびPAR 2の選択的発現によって分類している。特定の遺伝子はAPCでは誘導されないが、PAR 1またはPAR 2アゴニストで誘導される。

10

遺伝子	誘導の平均値		
	PAR1	PAR2	APC
図2A～Cに示された遺伝子			
L13740 /FEATURE= /DEFINITION=HUMTR3AヒトTR3 オーファン受容体mRNA	4.8	5.4	3.3
L13740 /FEATURE= /DEFINITION=HUMTR3AヒトTR3 オーファン受容体mRNA	4.7	5.4	3.2
Cluster Incl M60278:ヒトヘパリン結合EGF様成長因子mRNA	3.6	3.9	3.5
U12767 /FEATURE= /DEFINITION=HSU12767ヒトマイト ジェン誘導核オーファン受容体 (MINOR)	4.9	3.3	2.6
M29039 /FEATURE=cds /DEFINITION=HUMJUNCAA ヒトトランス活性化因子 (jun-B) 遺伝子	2.8	2.8	4.9
M60721 /FEATURE=mRNA /DEFINITION=HUMHB24 ヒトホモボックス遺伝子	2.8	3.7	2.3
U15932 /FEATURE= /DEFINITION=HSU15932ヒト二重 特異性蛋白ホスファターゼ	2.9	3.3	1.8
Cluster Incl J02931:ヒト胎盤組織因子 (2つの型) mRNA	3.0	2.7	2.1
M22489 /FEATURE= /DEFINITION=HUMBMP2Aヒト骨 形成蛋白質2A (BMP-2A)	2.3	3.2	2.4
Cluster Incl X75918:NOTのホモサピエンスmRNA	2.3	3.3	2.2
Cluster Incl U75697:ヒト転写制御因子RPD3-2B mRNA	2.7	2.6	2.3
Cluster Incl U12767:ヒトマイトジェン誘導核オーファン受容体 (MINOR)	2.4	3.4	1.7
Cluster Incl M92843:ホモサピエンスZnフィンガー転写制御因子mRNA,	2.0	3.4	1.8
Cluster Incl M30474:ヒト腎臓γ-グルタミルトランスぺプチダーゼII 型mRNA	2.7	2.1	2.3
L19871 /FEATURE= /DEFINITION=HUMATF3Xヒト活性 化転写因子3 (ATF3)	2.5	2.6	1.8

20

30

40

【 0 3 1 2 】

【表 1 - 2】

遺伝子	誘導の平均値			
	PAR1	PAR2	APC	
図2A～Cに示された遺伝子				
Cluster Incl M22489:ヒト骨形成蛋白質2A(BMP-2A)	2.4	2.9	1.6	
Cluster Incl X63741:ホモサピエンスパイロットmRNA	1.9	3.0	1.9	
X68277 /FEATURE=cds /DEFINITION=HSCL100蛋白質 チロシンホスファターゼのホモサピエンスCL 100 mRNA	2.1	2.8	1.9	10
Cluster Incl M28211:ホモサピエンスGTP結合蛋白質(RAB4)mRNA	2.0	2.7	1.8	
Cluster Incl AI288757:qm11h01. x1ホモサピエンスcDNA, 3' 末端/クローン=IMAGE-1881553	1.8	2.3	2.3	
Cluster Incl M36820:ヒトサイトカイン(GRO-β)mRNA	2.1	1.6	2.6	
Cluster Incl AL031432:染色体1p35.1-36.13.のクローン65N 24のヒトDNAアレイ	1.9	2.6	1.7	
Cluster Incl Z48054:ペルオキシソームのターゲティングシグナル1 (SKL型)受容体のホモサピエンスmRNA	2.0	1.9	2.2	
Cluster Incl D15050:転写因子AREB6のヒトmRNA	2.1	1.7	2.2	20
Cluster Incl X89066:TRPC1蛋白質のホモサピエンスmRNA	2.6	2.2	0.9	
L05072 /FEATURE=expanded_cds /DEFINITION=HUM IFNRF1Aホモサピエンス・インターフェロン制御因子1遺伝子	1.9	2.0	1.7	
Cluster Incl X51345:JUN-B蛋白質のヒトjun-B mRNA	1.8	1.8	2.1	
Cluster Incl D78579:ニューロン由来オーファン受容体のホモサピエ ンスmRNA	2.6	1.4	1.5	
Cluster Incl J04076:ヒト初期成長反応2(early growth response 2:EGR2)蛋白質mRNA	2.0	2.0	1.5	
Cluster Incl AB014569:KIAA0669蛋白質のホモサピエンスmRNA	1.3	2.0	2.1	30
Cluster Incl AJ005821:X-like 1蛋白質のホモサピエンスmRNA	2.4	1.6	1.4	
Cluster Incl Y00630:Arg-Serpin(プラスミノゲンアクチベーター -インヒビター2, PAI-2)のヒトmRNA	2.2	1.7	1.5	
Cluster Incl M31516:ヒト転写促進因子mRNA	1.7	1.9	1.5	
X94216 /FEATURE=cds /DEFINITION=HSVEGFC VE GF-C蛋白質のホモサピエンスmRNA	1.4	2.1	1.7	
Cluster Incl AL023584:染色体6q24.1-24.3.のクローン67K1 7のヒトDNAアレイ	1.8	2.0	1.3	40
Cluster Incl M28225:単球分泌蛋白質[= MCP-1]をコードする ヒトJE遺伝子	2.1	1.1	2.0	
Cluster Incl D86181:ガラクトセレブロンダーゼのホモサピエンスDN A	1.9	1.5	1.6	

【0313】

【表 1 - 3】

遺伝子	誘導の平均値			
	PAR1	PAR2	APC	
図2A～Cに示された遺伝子				
Cluster Incl AF017786:ホモサピエンスホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼホモログ(Dri42)	1.6	1.6	1.8	
U04636 /FEATURE=mRNA /DEFINITION=HSU04636ヒトシクロオキシゲナーゼ-2(hCox-2)遺伝子	1.3	1.3	2.3	
グアニン・ヌクレオチド交換因子2	1.4	1.4	2.1	10
Cluster Incl AF039843:ホモサピエンスSprouty 2(SPRY2)mRNA	1.6	1.8	1.5	
Cluster Incl U08015:ヒトNF-ATc mRNA	1.4	2.0	1.4	
M59465 /FEATURE= /DEFINITION=HUMA20ヒト腫瘍壊死因子 α 誘導蛋白質A20 mRNA	1.4	1.3	2.1	
U43142 /FEATURE= /DEFINITION=HSU43142ヒト血管内皮増殖因子関連蛋白質VRP	1.4	1.9	1.4	
Cluster Incl U79259:ヒトクロニン23945 mRNA	1.5	1.7	1.5	
Cluster Incl AF068197:ホモサピエンスBCE-1 mRNA	1.5	1.8	1.4	20
Cluster Incl AF054182:ホモサピエンス・ミトコンドリア・プロセッシング・ペプチド β サブユニットmRNA	1.8	1.3	1.5	
Cluster Incl AL050078:ホモサピエンスmRNA; cDNA DKFZp566G0746	1.6	1.6	1.3	
Cluster Incl J04111:ヒトc-junプロト癌遺伝子(JUN)	1.7	1.5	1.4	
M69043 /FEATURE= /DEFINITION=HUMMAD3A Ikb様活性をコードするホモサピエンスMAD-3 mRNA	1.4	1.4	1.8	
Cluster Incl AF050110:ホモサピエンスTGF β 誘導初期蛋白質および初期成長反応蛋白質 α 遺伝子	1.7	1.4	1.4	30
S81439 /FEATURE= /DEFINITION=S81439 EGR α =初期成長反応遺伝子 α	1.8	1.4	1.3	
Cluster Incl AI670788:tz10c02. x1ホモサピエンスcDNA、3'末端/クローン=IMAGE-2288162	1.5	1.4	1.6	
Cluster Incl AB022718:DEPPのホモサピエンスmRNA(プロゲステロンにより誘導される脱落膜蛋白質)	1.3	2.0	0.9	
Cluster Incl U25997:ホモサピエンススタニオカルシン前駆体(STC)mRNA	1.6	1.4	1.2	
Cluster Incl AB004066:DEC1のホモサピエンスmRNA	1.5	1.3	1.5	
Cluster Incl U07802:ヒトTis11d遺伝子	1.5	1.6	1.2	40
Cluster Incl AL096858:染色体1の新規ヒト遺伝子マッピング	1.3	1.5	1.4	
M26683 /FEATURE= /DEFINITION=HUMIFNINDヒトインターフェロン γ 治療誘導mRNA	1.6	1.0	1.6	

【 0 3 1 4 】

【表 1 - 4】

遺伝子	誘導の平均値			
	PAR1	PAR2	APC	
図2A～Cに示された遺伝子				
Cluster Incl AF022375:ホモサピエンス血管内皮増殖因子mRNA	1.5	1.3	1.4	
Cluster Incl U81607:ホモサピエンスグラビンmRNA	1.4	1.3	1.5	
Cluster Incl L43821:ホモサピエンスフィラメント化エンハンサー (Homo sapiens enhancer of filamentation:HEF1)mRNA	1.4	1.2	1.6	10
Cluster Incl AF045451:ホモサピエンス転写制御蛋白質p54	1.5	1.4	1.2	
Cluster Incl AF078077:ホモサピエンス成長停止DNA障害誘導蛋白質GADD45β	1.3	1.3	1.5	
Cluster Incl D50917:KIAA0127遺伝子のヒトmRNA	1.4	1.3	1.2	
Cluster Incl AI985272:ws06b05. x1ホモサピエンスcDNA、3'末端/クローン=IMAGE-2496369	1.3	1.4	1.1	
S81914 /FEATURE= /DEFINITION=S81914 IEX-1=放射線誘導最初期遺伝子	1.3	1.2	1.3	
Cluster Incl Z25821:ミトコンドリアdodecenoyl-CoA δ イソメラーゼのホモサピエンス遺伝子	1.1	1.7	1.0	20
Cluster Incl W27545:32c4ホモサピエンスcDNA	1.2	1.2	1.2	
Cluster Incl U59863:ヒトTRAF相互作用蛋白質I-TRAF mRNA	1.3	1.1	1.2	
変動性が高い遺伝子(図2に示されていない)				
PAR1亢進(PAR2アゴニストで<1.3倍)				
Cluster Incl AI186701:qe82d12. x1ホモサピエンスcDNA、3'末端/クローン=IMAGE-1745495	1.9	1.1	1.6	
Cluster Incl U35735:ヒトRACH1(RACH1)mRNA	1.8	1.1	1.2	30
Cluster Incl AL035297:PAC 747L4のホモサピエンス遺伝子	1.7	1.0	1.4	
Cluster Incl M22299:ヒトT-プラスチンポリペプチドmRNA	1.6	1.2	2.0	
Cluster Incl U87460:ヒト推定内皮受容体B型様蛋白質(putative endothelin receptor type B-like protein)mRNA	1.4	0.9	1.8	
AF024710 /FEATURE= /DEFINITION=AF024710ホモサピエンス血管内皮増殖因子(VEGF)	1.4	1.1	1.1	
Cluster Incl AI953789:wx69d10. x1ホモサピエンスcDNA、3'末端/クローン=IMAGE-2548915	1.3	0.9	1.4	
PAR2亢進(PAR1アゴニストで<1.3倍)				
Cluster Incl AI038821:ox96d03. x1ホモサピエンスcDNA、3'末端/クローン=IMAGE-1664165	1.2	2.0	1.3	40
Cluster Incl U65093:ヒトmsg1関連遺伝子1(mrg1)mRNA	1.3	1.7	1.0	

【 0 3 1 5 】

【表 1 - 5】

遺伝子	誘導の平均値			
	PAR1	PAR2	APC	
図2A～Cに示された遺伝子				
Cluster Incl Y13115:セリン/トレオニンプロテインキナーゼSAKのホモサピエンスmRNA	1.2	1.6	1.0	
Cluster Incl W26851:17b12ホモサピエンスcDNA	1.2	1.6	1.1	
Cluster Incl U53831:ホモサピエンスインターフェロン制御因子7B	1.1	1.5	1.3	10
Cluster Incl U27655:ヒトRGP3 mRNA	1.2	1.5	1.2	
Cluster Incl U58334:ヒトBcl2、p53結合蛋白質Bbp/53BP2(BBP/53BP2)mRNA	1.1	1.5	1.1	
Cluster Incl AC004475:ホモサピエンス染色体19、コスミドF23858	1.2	1.4	1.2	
Cluster Incl L38696:ホモサピエンス自己抗原p542 mRNA	1.0	1.3	1.1	
Cluster Incl AL049354:ホモサピエンスmRNA; cDNA DKFZp566E183	1.1	1.3	0.9	
Cluster Incl Z25821:ミトコンドリアdodecenoyl-CoA δ イソメラーゼのホモサピエンス遺伝子	1.1	1.7	1.0	20
APCで誘導されない遺伝子 (APCで<1.3倍)				
Cluster Incl AB028069:S期キナーゼアクチベーターのホモサピエンスmRNA	2.0	2.0	1.2	
Cluster Incl U85267:ホモサピエンスダウン症候群候補領域1(down syndrome candidate region 1:DSCR1)遺伝子	1.6	2.0	0.9	
Cluster Incl U78082:ヒトRNAポリメラーゼ転写制御メディエーター(h-MED6)mRNA	1.9	1.3	1.1	
Cluster Incl D38537:プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのヒトmRNA	1.3	1.6	1.0	30
M83667 /FEATURE=mRNA /DEFINITION=HUMNFIL6 BAヒトNF-IL6- β 蛋白質	1.4	1.3	1.1	

【 0 3 1 6 】

【表 2】

表 2 : PAR の活性化および APC シグナル伝達により内皮細胞で誘導された、(図 2 A ~ C の) 特定の保護遺伝子。異なるアゴニストの平均 fold induction と OMIM の略号、および遺伝子バンクの受入番号を示す。IAP および Bcl2 ホモログ A1 は、図 2 に含めるための厳密な基準に合致しなかった。これらの遺伝子は、遺伝子チップ実験でアップレギュレートされ、再現性があり、これまでに長期の APC 刺激で誘導されることが分かっている (D. E. Joyce, et al., J Biol Chem, 276 : 11199, 2001)。

OMIM	受入番号	遺伝子	PAR1	PAR2	APC
AKAP12	U81607	A-キナーゼアンカー蛋白質12、GRAVIN	1.39	1.28	1.47
DUSP1	X68277	二重特異性ホスファターゼ1	2.05	2.78	1.94
DUSP5	U15932	二重特異性ホスファターゼ5	2.93	3.27	1.76
GADD45B	AF078077	成長停止およびDNA損傷誘導遺伝子GADD45、 β	1.26	1.27	1.50
IER3	S81914	最初期反応3	1.30	1.23	1.29
NAB1	AF045451	NGFIA結合蛋白質	1.49	1.38	1.24
NFKBIA	M69043	κ 軽鎖遺伝子の核因子B細胞インヒビター α のエンハンサー	1.38	1.40	1.79
TNFAIP3	M59465	腫瘍壊死因子 α 誘導蛋白質3、A20	1.39	1.32	2.10
ZFP36	M92843	Znフィンガー蛋白質36、トリステトラプロリン(TTP)	1.98	3.38	1.83
BCL2A1	U27467	BCL2関連蛋白質A1、BFL-1	2.04	2.57	1.87
BIRC3	U45878	ヒトアポトーシス蛋白インヒビター(IAP)1	2.39	1.41	1.79

【実施例 2】

【0317】

実施例 2

前記の方法と組成物では、内皮細胞の APC / EPCR / PAR1 シグナル伝達経路を利用した抗炎症療法の新規遺伝子ターゲットを同定している。抗炎症性 APC / EPCR / PAR1 シグナル伝達でダウンレギュレートされる遺伝子を表 3 に示す。PAR1 を介したトロンピンシグナル伝達は、APC シグナル伝達に対して反対の効果を持ち、炎症を促進する。表 3 は、トロンピンによりアップレギュレートまたは誘導されるが、APC / EPCR / PAR1 シグナル伝達ではアップレギュレートまたは誘導されない遺伝子を示す。

10

20

30

40

50

【0318】

同定された遺伝子産物を用い、特定のインヒビターを開発し、哺乳類対象物の全身の炎症を抑制するか、哺乳類対象物の敗血症を治療することができる。トロンビンのシグナル伝達でアップレギュレートされるか、APC- PAR1のシグナル伝達で変化がないまたはダウンレギュレートされる内皮細胞の発現プロフィールを示している。表3では、以下の分子がAPC- PAR1シグナル伝達により変化がないかダウンレギュレートし、トロンビンのシグナル伝達によりアップレギュレートすることが示されている：つまり、SH-PTP3、W28170、フルクトース-6-ホスファターゼ、2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、W28616、BID、NF-KB2、トロンボスポンジン-1、6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ、神経線維腫症2型腫瘍抑制因子、陽イオン性アミノ酸トランスポーター2、W28616、NF- κ B p65 3、TTF-I相互作用ペプチド 12、ATRC2、アデュージン、sortilin、p53細胞腫瘍抗原、W28257、HERRa1、G蛋白共役受容体、EGFRBP-GRB2、Pax8、SH-PTP3、5T4、bcl-xL、ディスインテグリン-メタロプロテアーゼ、C1q-関連因子、サイクリンD1、AI743606、ミオシン-Ixb、GNS、ISLR、Stat2、幹細胞因子、c-ets-1、usurpin、染色体5q21-22、クローン-A3-A、トロンボスポンジン、ELL2、二重特異性蛋白ホスファターゼ、ビトロネクチン受容体 サブユニット、PCTAIRE-2、フォリスタチン、ets-2、ELL2、ユートロフィン、C8FWリン蛋白質、PCTAIRE-2、fra-2、MINOR 20、GADD34、IL8、SSR、ニューロン由来オーファン受容体、CGGBP、nma、jun-B、チロシンホスファターゼ、GRO- α 、CtIP、PRDII-BF1、血管内皮増殖因子、スタニオカルシン関連蛋白質、CL 100、BMP-2A、NF-Atc、mrg1、jun-B、VEGF、STC、ATF3である；これらの遺伝子は、本明細書では、抗炎症性APC- PAR1シグナル伝達によりダウンレギュレートされる遺伝子を指す。

【0319】

【表 3 - 1】

表 3 : APC-PAR1 シグナル伝達/ダウンレギュレーションおよびトロンビンシグナル伝達により、内皮細胞で誘導される保護遺伝子。apc または トロンピン を用いた場合の平均 fold induction ; OMIM の略語 および 遺伝子バンク の受入番号 を示す。

遺伝子バンク	誘導するもの (log 2)	
	APC	トロンピン
D13540 /FEATURE= /DEFINITION=HUMSHPTP3プロテインチロシンホスファターゼのホモサピエンスSH-PTP3 mRNA、完全cds	-1.33	0.65
Cluster Incl W28170:43a12 ホモサピエンスcDNA /gb=W28170 /gi=1308118 /ug=Hs.181165 /len=912	-1.07	0.15
Cluster Incl AB012229:フルクトース-6-ホスファターゼ、2-キナーゼ/フルクトース-2, 6-ビスホスファターゼのホモサピエンス遺伝子、部分cds /cds=(0, 530) /gb=AB012229 /gi=2982725 /ug=Hs.101313 /len=531	-1.07	0.25
Cluster Incl W28616:49b9 ホモサピエンスcDNA /gb=W28616 /gi=1308564 /ug=Hs.74335 /len=840	-0.97	0.30
Cluster Incl AF042083:ホモサピエンスBH3相互作用ドメインdeath agonist(BID) mRNA、完全cds /cds=(140, 727) /gb=AF042083 /gi=3540246 /ug=Hs.172894 /len=1105	-0.87	0.20
U20816 /FEATURE=mRNA #1 /DEFINITION=HSU20816 ヒト核因子 κ-B2(NF-KB2) 遺伝子、部分cds	-0.77	0.70
U12471 /FEATURE=cds #2 /DEFINITION=HSU12471 ヒトトロンボスポンジン-1 遺伝子、部分cds	-0.77	0.70
Cluster Incl D49817:6-ホスホネクト-2-キナーゼ/フルクトース-2, 6-ビスホスファターゼのホモサピエンス遺伝子、完全cds /cds=(18, 1580) /gb=D49817 /gi=1468914 /ug=Hs.101313 /len=1756	-0.73	0.20
神経線維腫症2型腫瘍抑制因子	-0.73	0.55
Cluster Incl D29990:陽イオン性アミノ酸トランスポーター2のヒトmRNA、完全cds /cds=(0, 1976) /gb=D29990 /gi=484049 /ug=Hs.153985 /len=1977	-0.70	0.75
Cluster Incl W28616:49b9 ホモサピエンスcDNA /gb=W28616 /gi=1308564 /ug=Hs.74335 /len=840	-0.67	-0.05

10

20

30

40

【 0 3 2 0 】

【表 3 - 2】

遺伝子バンク	誘導するもの (log 2)	
	APC	トロンピン
U33838 /FEATURE= /DEFINITION=HSU33838ヒトNF- κ -B p65 δ 3 mRNA, スプライシング転写物欠乏エクソン(splliced transcript lacking exons)6および7、部分cds	-0.67	0.10
Cluster Incl AF000421:ホモサピエンスTTF-I相互作用ペプチド12 mRNA、部分cds /cds=(0, 614) /gb=AF000421 /gi=2183080 /ug=Hs. 159219 /len=689	-0.60	0.20
Cluster Incl U76368:ヒト陽イオンアミノ酸トランスポーター-2A (ATRC2) mRNA、完全cds /cds=(194, 2167) /gb=U76368 /gi=2252785 /ug=Hs. 153985 /len=2185	-0.60	0.75
Cluster Incl L07261:ヒト α アデューシンmRNA、代わりのエクソンAおよびBを含む部分cds/cds=UNKNOWN /gb=L07261 /gi=178087 /ug=Hs. 183706 /len=2343	-0.57	0.10
Cluster Incl X98248:sortilinのホモサピエンスmRNA/cds=(21, 2522) /gb=X98248 /gi=1834494 /ug=Hs. 104247 /len=3723	-0.53	-0.15
X02469 /FEATURE=cds /DEFINITION=HSP53 p53細胞腫瘍抗原のヒトmRNA	-0.53	-0.10
Cluster Incl W28257:44c1 ホモサピエンス cDNA /gb=W28257 /gi=1308205 /ug=Hs. 239274 /len=821	-0.50	0.20
L38487 /FEATURE=mRNA /DEFINITION=HUMHERRA1ヒトエストロゲン受容体関連蛋白質(hERRa1)mRNA、3'末端、部分cds	-0.50	0.10
D38449 /FEATURE= /DEFINITION=HUMGPCRAAG蛋白共役受容体のヒトmRNA、完全cds	-0.47	0.10
Cluster Incl M96995:ホモサピエンス上皮細胞成長因子受容体結合蛋白質GRB2(EGFRBP-GRB2)mRNA配列 /cds=(78, 731) /gb=M96995 /gi=181975 /ug=Hs. 239528 /len=1109	-0.43	0.05
X69699 /FEATURE= /DEFINITION=HSPAX8AホモサピエンスPax8 mRNA	-0.43	0.10
D13540 /FEATURE= /DEFINITION=HUMSHPTP3プロテインチロシンホスファターゼのホモサピエンスSH-PTP3 mRNA、完全cds	-0.43	0.40
Z29083 /FEATURE=cds /DEFINITION=HS5T4OA 5T4癌胎児性抗原のホモサピエンス5T4遺伝子	-0.43	0.10
Z23115 /FEATURE=cds /DEFINITION=HSBCLXLホモサピエンスbcl-xL mRNA	-0.40	0.10

10

20

30

40

【 0 3 2 1 】

【表 3 - 3】

遺伝子バンク	誘導するもの (log 2)	
	APC	トロンピン
Cluster Incl Z48579: ディスインテグリン-メタロプロテアーゼのホモサピエンスmRNA(部分) /cds=(0, 2075) /gb=Z48579 /gi=1616600 /ug=Hs. 172028 /len=2423	-0.40	0.20
Cluster Incl AF095154: ホモサピエンスC1q関連因子mRNA、完全cds /cds=(13, 789) /gb=AF095154 /gi=3747096 /ug=Hs. 134012 /len=1284	-0.40	0.10
M64349 /FEATURE= /DEFINITION=HUMCYCD1ヒトサイクリンD(サイクリンD1)mRNA、完全cds	-0.37	0.00
Cluster Incl AI743606: wg51f08. x1 ホモサピエンスcDNA, 3末端 /clone=IMAGE-2368647 /clone_end=3' /gb=AI743606 /gi=5111894 /ug=Hs. 5947 /len=742'	-0.37	-0.05
Cluster Incl U42391: ヒトミオシン-IXb mRNA、完全cds /cds=(0, 6068) /gb=U42391 /gi=1147782 /ug=Hs. 159629 /len=6069	-0.33	-0.15
Cluster Incl Z12173: グルコサミン-6-硫酸塩をコードするホモサピエンスGNS mRNA /cds=(87, 1745) /gb=Z12173 /gi=31866 /ug=Hs. 2703 /len=2379	-0.33	0.60
Cluster Incl AB003184: ISLRのホモサピエンスmRNA、完全cds /cds=(98, 1384) /gb=AB003184 /gi=2554603 /ug=Hs. 102171 /len=2110	-0.30	0.05
U18671 /FEATURE=mRNA /DEFINITION=HSU18671 ヒトStat2遺伝子、完全cds	-0.30	0.05
M59964 /FEATURE= /DEFINITION=HUMSCF ヒト肝細胞因子mRNA、完全cds	-0.27	0.75
X14798 /FEATURE=cds#1 /DEFINITION=HSCETS1 c-ets-1プロト癌遺伝子のヒトDNA	-0.27	0.75
Cluster Incl AF015451: ホモサピエンスUsurpin-β mRNA、完全cds /cds=(0, 1388) /gb=AF015451 /gi=3133282 /ug=Hs. 195175 /len=1389	-0.23	0.45
Cluster Incl AB002450: 染色体5q21-22のホモサピエンスmRNA、クローン-A3-A /cds=UNKNOWN /gb=AB002450 /gi=2943816 /ug=Hs. 169400 /len=1053	-0.20	0.45
X14787 /FEATURE=cds /DEFINITION=HSTS トロンボスポンジンのヒトmRNA	-0.20	0.40

10

20

30

40

【 0 3 2 2 】

【表 3 - 4】

遺伝子バンク	誘導するもの (log 2)	
	APC	トロンピン
Cluster Incl U88629:ヒトRNAポリメラーゼII伸長因子ELL2、完全cds /cds=(0, 1922) /gb=U88629 /gi=1946346 /ug=Hs. 173334 /len=1923	-0.20	0.70
U15932 /FEATURE= /DEFINITION=HSU15932ヒト二重特異性蛋白ホスファターゼmRNA、完全cds	-0.20	0.60
M14648 /FEATURE= /DEFINITION=HUMVTNRヒト細胞接着蛋白(ビトロネクチン)受容体αサブユニットmRNA、完全cds	-0.17	0.60
X66360 /FEATURE=cds /DEFINITION=HSSTHPKCセリン/トレオニンプロテインキナーゼのホモサピエンスmRNA PCTAIRE-2	-0.17	0.65
Cluster Incl M19481:ヒトfollistatin遺伝子/cds=(0, 953) /gb=M19481 /gi=182720 /ug=Hs. 9914 /len=954	-0.13	1.30
J04102 /FEATURE= /DEFINITION=HUMETS2Aヒト赤芽球症ウイルス癌遺伝子ホモログ2(ets-2)mRNA、完全cds	-0.10	0.50
U88629 /FEATURE=cds /DEFINITION=HSU88629ヒトRNAポリメラーゼII伸長因子ELL2、完全cds	-0.10	0.75
Cluster Incl X69086:utrophinのホモサピエンスmRNA /cds=(0, 10301) /gb=X69086 /gi=34811 /ug=Hs. 104252 /len=10302	-0.10	0.60
Cluster Incl AJ000480:C8FWリン蛋白質のホモサピエンスmRNA /cds=(0, 674) /gb=AJ000480 /gi=2274958 /ug=Hs. 143513 /len=675	-0.10	1.15
Cluster Incl X66360:セリン/トレオニンプロテインキナーゼのホモサピエンスmRNA PCTAIRE-2 /cds=(69, 1640) /gb=X66360 /gi=36616 /ug=Hs. 123063 /len=1738	-0.07	0.35
Cluster Incl X16706:ヒトfra-2 mRNA /cds=(3, 983) /gb=X16706 /gi=31464 /ug=Hs. 155210 /len=1007	-0.07	0.50
U12767 /FEATURE= /DEFINITION=HSU12767ヒトマイトジェン誘導核オーファン受容体(MINOR)mRNA、完全cds	-0.07	1.15
Cluster Incl U83981:ホモサピエンスアポトーシス関連蛋白(GAD D34)mRNA、完全cds /cds=(222, 2246) /gb=U83981 /gi=3258617 /ug=Hs. 76556 /len=2331	-0.07	0.50
M28130 /FEATURE=mRNA /DEFINITION=HUMIL8Aヒトインターロイキン8(IL8)遺伝子、完全cds	-0.07	0.40

10

20

30

40

【 0 3 2 3 】

【表 3 - 5】

遺伝子バンク	誘導するもの (log 2)	
	APC	トロンピン
Cluster Incl Z12830:SSR α サブユニットのホモサピエンスmRNA /cds=(29, 889) /gb=Z12830 /gi=551637 /ug=Hs. 76152 /len=974	- 3. 7E - 17	0. 40
Cluster Incl D78579:ニューロン由来オーファン受容体のホモサピ エンスmRNA、完全cds /cds=(731, 2611) /gb=D78579 /gi=1651190 /ug=Hs. 80561 /len=3802	0. 00	1. 55
Cluster Incl AF094481:ホモサピエンストリヌクレオチド繰り返しD NA結合蛋白質p20-CGGBP(CGGBP)遺伝子、完全cds /cds= (479, 982) /gb=AF094481 /gi=4140681 /ug=Hs. 10 7587 /len=1043	0. 00	0. 50
Cluster Incl U23070:ヒト推定膜貫通蛋白質(nma)mRNA、完全 cds /cds=(372, 1154) /gb=U23070 /gi=1262172 / ug=Hs. 78776 /len=1521	0. 00	1. 10
M29039 /FEATURE=cds /DEFINITION=HUMJUNCA A ヒトランス活性化因子(jun-B)遺伝子、完全cds	0. 00	0. 60
チロシンホスファターゼ、 ϵ	0. 03	1. 40
Cluster Incl M36820:ヒトサイトカイン(GRO- β)mRNA、完全c ds /cds=(74, 397) /gb=M36820 /gi=183628 /ug= Hs. 75765 /len=1110	0. 03	0. 35
Cluster Incl U72066:ホモサピエンスCtBP相互作用蛋白質CtIP (CtIP)mRNA、完全cds /cds=(299, 2992) /gb=U72066 /gi=1730320 /ug=Hs. 29287 /len=3237	0. 07	0. 70
Cluster Incl X51435:DNA-結合蛋白質のヒトPRDII-BF1遺 伝子/cds=(324, 8477) /gb=X51435 /gi=38017 /ug =Hs. 306 /len=9020	0. 07	0. 85
Cluster Incl AF022375:ホモサピエンス血管内皮増殖因子mRN A、完全cds /cds=(701, 1276) /gb=AF022375 /gi=37 19220 /ug=Hs. 73793 /len=3154	0. 07	0. 75
Cluster Incl AF098462:ホモサピエンススタニオカルシン関連蛋 白質mRNA、完全cds /cds=(134, 1042) /gb=AF098462 /gi=4050037 /ug=Hs. 155223 /len=2380	0. 07	1. 00
X68277 /FEATURE=cds /DEFINITION=HSCL100蛋白 質チロシンホスファターゼのホモサピエンスCL 100 mRNA	0. 07	1. 75
Cluster Incl M22489:ヒト骨形成蛋白質2A(BMP-2A)mRNA /cds=(323, 1513) /gb=M22489 /gi=179501 /ug=H s. 73853 /len=1547	0. 10	0. 90

10

20

30

40

【 0 3 2 4 】

【表 3 - 6】

遺伝子バンク	誘導するもの (log 2)	
	APC	トロンピン
Cluster Incl U08015:ヒトNF-ATc mRNA、完全cds /cds=(239, 2389) /gb=U08015 /gi=500631 /ug=Hs. 96149 /len=2743	0.10	0.55
Cluster Incl U65093:ヒトmsg1関連遺伝子1(mrg1)mRNA、完全cds /cds=(199, 840) /gb=U65093 /gi=1853998 /ug=Hs. 82071 /len=899	0.13	0.95
Cluster Incl X51345:JUN-B蛋白のヒトjun-B mRNA /cds=(253, 1296) /gb=X51345 /gi=34014 /ug=Hs. 198951 /len=1797	0.13	0.75
AF024710 /FEATURE= /DEFINITION=AF024710 ホモサピエンス血管内皮増殖因子(VEGF)mRNA、3' UTR	0.13	0.90
Cluster Incl U25997:ホモサピエンススタニオカルシン前駆体(STC)mRNA、完全cds /cds=(284, 1027) /gb=U25997 /gi=3006202 /ug=Hs. 25590 /len=3881	0.13	1.10
L19871 /FEATURE= /DEFINITION=HUMATF3X ヒト活性化転写因子3(ATF3)mRNA、完全cds	0.20	1.10

10

20

【実施例 3】

【0325】

実施例 3

PAR1でのトロンピン結合および蛋白分解活性を介した敗血症の凝固および炎症増悪は、EPCRおよびPAR1およびPAR1の蛋白分解活性に対する活性化プロテインC (APC)の結合を介した、保護作用のあるプロテインC経路により、抗炎症反応で均衡される。トロンピンおよびAPCによるPAR1では、蛋白質分解の開裂部位が同一である。PAR1が欠乏した線維芽細胞によるアッセイ系は、APC蛋白分解性の開裂によってのみ活性化され、トロンピン蛋白分解性の開裂では活性化されない、PAR1ポリペプチドをスクリーニングするために有用である。PAR1が欠乏した線維芽細胞によるアッセイ系は、トロンピン蛋白分解性の開裂によってのみ活性化され、APC蛋白分解性の開裂では活性化されない、PAR1ポリペプチドをスクリーニングするためにも有用である。PAR1ポリペプチドをコードしたDNAは、*in vitro*突然変異誘発により治療される。DNAをコードした突然変異性PAR1ポリペプチドをPAR1が欠乏した線維芽細胞に形質移入し、APCまたはトロンピンによる活性化をアッセイする。APCで活性化されるがトロンピンでは活性化されない、またはトロンピンで活性化されるがAPCでは活性化されない突然変異性PAR1ポリペプチドは、*in vitro*突然変異誘発を反復し、APCまたはトロンピンのプロテアーゼによる活性化に反応するが、両方のプロテアーゼには反応しない、PAR1ポリペプチドをコードしたDNAを単離する。PAR1の活性化は、上述のとおり、例えばegr-1プロモーター/ルシフェラーゼアッセイ、またはMAPキナーゼリン酸化アッセイ、遺伝子発現レベルを制御する前記一連の遺伝子のマイクロアレイ分析などを利用して測定する。

30

40

【0326】

APCで活性化されるがトロンピンでは活性化されない、またはトロンピンで活性化されるがAPCでは活性化されない変異型PAR1ポリペプチドを発現した遺伝子組み換えマウスは、哺乳類対象物の敗血症において、前記経路を検討するモデルとして有用である。そのような遺伝子組み換えマウスは、突然変異によるPAR1の変化の性質によって、

50

炎症または敗血症にかかりやすくなることも、かかりにくくなることもある。遺伝子組み換えマウスに投与される医薬品の形で、APCアゴニストまたはトロンビンアンタゴニストとして作用することで炎症または敗血症を予防するテスト化合物も、敗血症のメカニズムの理解に寄与することができる。

【0327】

前記に引用したすべての文献および特許文書は、それぞれを個別に示すように、同程度、すべての目的について、この参考文献により本明細書に全文が組み込まれる。

【0328】

本発明の好適な実施形態に多数の変更および修正を行うことができ、本発明の精神から離れずに、そのような変更と修正を行うことができることは、当業者が理解することである。従って、本発明の真の精神と範囲にある場合、付記された請求項はすべて、そのような同等のバリエーションを網羅することとする。

【図面の簡単な説明】

【0329】

【図1A】APCによる細胞の活性化は、EPCRおよびPARの発現に依存する。(A)ヒトEPCR、Tyr154Ala(EPCR A154)またはCys221Ser(EPCR S221)置換を有するEPCR変異体、ヒトPAR2またはPAR1に感染したPAR1欠乏性線維芽細胞における、egr-1プロモーター活性の誘導。20nM APC(塗りつぶした棒グラフ)、PARアゴニストペプチド(白抜きの棒グラフ; パネルAで100μM SLIGRLおよび10μM TFLLRN)、または5nM トロンビン(斜線の棒グラフ)で刺激した場合のルシフェラーゼ活性のfold inductionが示されている(n=3)。(パネルB)Erk1/2のリン酸化として測定されたHUVECのAPCシグナル伝達。100nMクロロメチルケトンで修飾したAPC(APC-CK)の非存在下(塗りつぶした棒グラフ)または存在下(白抜きの棒グラフ、n=3)で示されたアゴニストで刺激するか、または開裂を遮断する抗PAR1抗体(白抜きの棒グラフ、n=5)で刺激、*p<0.05。パネルCに代表的なウェスタンブロットが示されている。

【図1B】APCによる細胞の活性化は、EPCRおよびPARの発現に依存する。(A)ヒトEPCR、Tyr154Ala(EPCR A154)またはCys221Ser(EPCR S221)に置換したEPCR変異体、ヒトPAR2またはPAR1に感染したPAR1欠乏性線維芽細胞における、egr-1プロモーター活性の誘導。20nM APC(塗りつぶした棒グラフ)、PARアゴニストペプチド(白抜きの棒グラフ; パネルAで100μM SLIGRLおよび10μM TFLLRN)、または5nM トロンビン(斜線の棒グラフ)で刺激した場合のルシフェラーゼ活性のfold inductionが示されている(n=3)。(パネルB)Erk1/2のリン酸化で測定したHUVECのAPCシグナル伝達。100nMクロロメチルケトンで修飾したAPC(APC-CK)の非存在下(塗りつぶした棒グラフ)または存在下(白抜きの棒グラフ、n=3)示されたアゴニストで刺激するか、開裂を遮断する抗PAR1抗体(白抜きの棒グラフ、n=5)で刺激、*p<0.05。パネルCに代表的なウェスタンブロットが示されている。

【図1C】APCによる細胞の活性化は、EPCRおよびPARの発現に依存する。(A)ヒトEPCR、Tyr154Ala(EPCR A154)またはCys221Ser(EPCR S221)に置換したEPCR変異体、ヒトPAR2またはPAR1に感染したPAR1欠乏性線維芽細胞における、egr-1プロモーター活性の誘導。20nM APC(塗りつぶした棒グラフ)、PARアゴニストペプチド(白抜きの棒グラフ; パネルAで100μM SLIGRLおよび10μM TFLLRN)、または5nM トロンビン(斜線の棒グラフ)で刺激した場合のルシフェラーゼ活性のfold inductionが示されている(n=3)。(パネルB)Erk1/2のリン酸化で測定したHUVECのAPCシグナル伝達。100nMクロロメチルケトンで修飾したAPC(APC-CK)の非存在下(塗りつぶした棒グラフ)または存在下(白抜きの棒グラフ、

10

20

30

40

50

n = 3) 示されたアゴニストで刺激するか、開裂を遮断する抗PAR1抗体(白抜きの棒グラフ、n = 5)で刺激、* p < 0.05。パネルCに代表的なウェスタンブロットが示されている。

【図2】APCおよびPAR1に特異的なアゴニストは、ヒトの内皮細胞で類似の遺伝子を誘導する。(A) PAR1アゴニストによるMCP-1の選択的アップレギュレーションを示したPAR1対PAR2のアゴニストペプチドによりfold inductionのプロット(平均、n = 3)。MCP-1と核内受容体TR3は、いずれも2つの独立したプローブセットで表された。APCとPAR1(B)対PAR2(C、D)のアゴニストペプチドで誘導される遺伝子を比較すると、APC刺激によるMCP-1のアップレギュレーションが示された。

【図3】(A) PAR1アゴニスト(塗りつぶされた丸)、PAR2アゴニスト(塗りつぶされた四角)、APC(白抜きの丸)によるHUVECのTR3、MCP-1、DSCR1誘導の時間経過を定量的PCRで分析した。fold inductionはGAPDHレベルで規格化され、典型的な実験について示されている。(B) 抗PAR1抗体の存在下および非存在下における、10 nM APC/100 nMヒルジンによる刺激後に示された遺伝子のfold inductionを定量的PCRで決定した(n = 3)。HBEGFとはヘパリン結合EGF様成長因子、NFBIとはNFBIンヒビター、GADD45Bとは成長停止、DNA修復促進遺伝子(DNA damage-inducible gene beta)を示している。

【図1A】

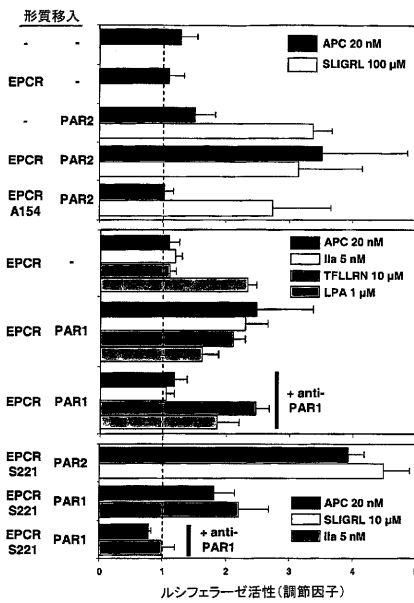


Figure 1A

【図1B】

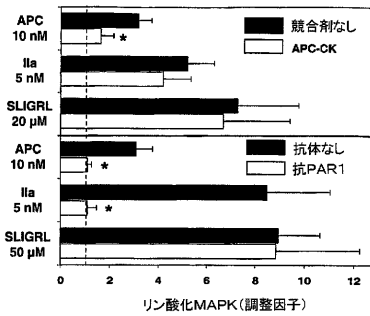


Figure 1B

【図1C】

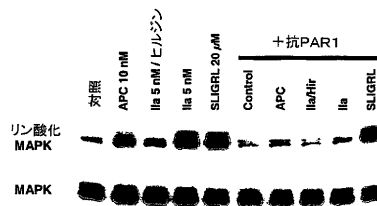


Figure 1C

【 図 2 】

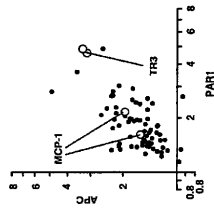


Figure 2B

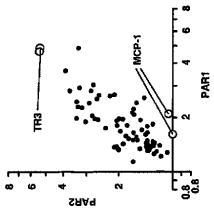


Figure 2A

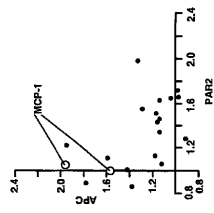


Figure 2D

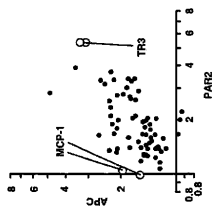


Figure 2C

【 図 3 】

Figure 3A

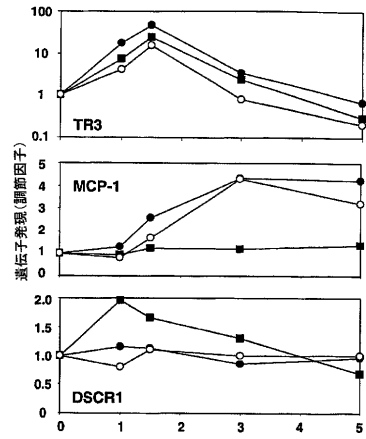
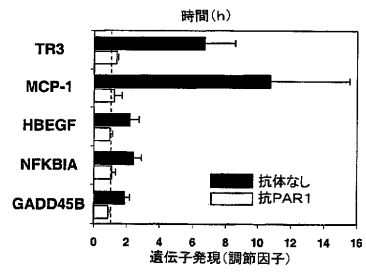


Figure 3B



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/12109
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : G01N 33/53, 33/567; A01N 37/18; A61K 38/00 US CL : 435/7.1, 7.2; 514/2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1, 7.2; 514/2 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 practicable, search terms used) MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOYCE, D.E. et al. Gene expression profile of antithrombic protein C defines new mechanism modulating inflammation and apoptosis. J. Biol. Chem. 6 April 2001, Vol. 276, No. 14, pages 11199-11203.	1-44
A	GU, J.-M. et al. Endotoxin and thrombin elevate rodent endothelial cell protein C receptor mRNA levels and increase receptor shedding in vivo. Blood. 1 March 2000, Vol. 95, No. 5, pages 1687-1693.	1-44
A	COUGHLIN, S.R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. Nature. 14 September 2000, Vol. 407, No. 6801, pages 258-264.	1-44
A	O'BRIEN, P.J. et al. Protease activated receptors: themes and variations. Oncogene. 26 March 2001, Vol. 20, No. 13, pages 1570-1581.	1-44
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 26 August 2004 (26.08.2004)		Date of mailing of the international search report 15 SEP 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 872-9306		Authorized officer Robert Landsman <i>J. Roberts for</i> Telephone No. (571) 272-1600

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A

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

(72) 発明者 ラフ、ウォルフラム

アメリカ合衆国、 9 2 1 1 7 カリフォルニア州、サン ディエゴ、アロヨ リンド アベニュー
4 9 5 6

(72) 発明者 リーワールド、マティアス

アメリカ合衆国、 9 2 0 3 7 カリフォルニア州、ラ ジョラ、カミニト アメカ 3 2 7 2

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 DA12 DA13 DA14 FB03
4B024 AA01 AA11 BA63 CA01 CA04 CA12 DA02 EA04 GA11 HA08
HA12 HA20
4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ42 QQ53 QQ61 QQ91 QR08 QR32 QR42
QR50 QR55 QR62 QR77 QR80 QS03 QS25 QS34 QS36 QX01
4C084 AA02 AA17 AA20 NA05 NA14 ZA362 ZA392 ZB112 ZB212 ZB352

专利名称(译)	使用蛋白酶激活受体 (PAR1) 与内皮细胞信号传导相关的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2005524395A	公开(公告)日	2005-08-18
申请号	JP2003586587	申请日	2003-04-18
[标]申请(专利权)人(译)	斯克里普斯研究学院		
申请(专利权)人(译)	斯克里普斯研究所		
[标]发明人	ラフウォルフラム リーワールドマティアス		
发明人	ラフ、ウォルフラム リーワールド、マティアス		
IPC分类号	G01N33/50 A01N37/18 A61K38/00 A61K45/00 A61K45/06 A61P9/00 A61P9/10 A61P29/00 A61P31/04 A61P43/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/567		
CPC分类号	A61P9/00 A61P9/10 A61P29/00 A61P31/04 A61P43/00 C12Q1/6897 G01N33/5041 G01N33/566 G01N2500/10		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA A61K45/00 A61K45/06 A61P9/00 A61P9/10 A61P29/00 A61P31/04 A61P43/00.105 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ91 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/AA20 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA392 4C084/ZB112 4C084/ZB212 4C084/ZB352		
代理人(译)	矢口太郎 大森純一 山口泰明		
优先权	60/374110 2002-04-19 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及基于通过活化蛋白C (APC) 对内皮细胞蛋白C受体 (EPCR) 依赖性信号转导的表征的组合物和方法, 所述活化蛋白C通过蛋白酶活化受体1 (PAR1) 起作用。

		(43) 公表日 平成17年8月18日 (2005-5)	
		(P2005-5)	
(51) Int. Cl. ⁷	FI	テーマコード (参)	
C12Q 1/02	C12Q 1/02 ZNA	2G045	
A61K 45/00	A61K 45/00	4B024	
A61K 45/06	A61K 45/06	4B063	
A61P 9/00	A61P 9/00	4C084	
A61P 9/10	A61P 9/10		
		審査請求	未請求 予備審査請求 有 (全 89 頁) 最終!
(21) 出願番号	特願2003-586587 (P2003-586587)	(71) 出願人	504389821
(86) (22) 出願日	平成15年4月18日 (2003.4.18)		ザ スクリップス リサーチ イン
(85) 翻訳文提出日	平成16年12月20日 (2004.12.20)		テュート
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/012109		アメリカ合衆国、92037 カリ
(87) 国際公開番号	W02003/089903		ニア州、ラ ジョラ、ノース トレ
(87) 国際公開日	平成15年10月30日 (2003.10.30)		バインズ ロード 10550-チ
(31) 優先権主張番号	60/374,110		ーシー-8
(32) 優先日	平成14年4月19日 (2002.4.19)	(74) 代理人	100104111
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 矢口 太郎
		(74) 代理人	100104215
			弁理士 大森 純一
		(74) 代理人	100099656
			弁理士 山口 康明