

(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2007-515632**(P2007-515632A)**

(43) 公表日 平成19年6月14日(2007.6.14)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68		2 G O 4 5
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00		4 C O 8 4
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁)

(21) 出願番号 特願2006-542851 (P2006-542851) (86) (22) 出願日 平成16年12月6日 (2004. 12. 6) (85) 翻訳文提出日 平成18年7月25日 (2006. 7. 25) (86) 国際出願番号 PCT/US2004/040766 (87) 国際公開番号 W02005/055810 (87) 国際公開日 平成17年6月23日 (2005. 6. 23) (31) 優先権主張番号 60/527, 178 (32) 優先日 平成15年12月5日 (2003. 12. 5) (33) 優先権主張国 米国 (US) (31) 優先権主張番号 60/600, 527 (32) 優先日 平成16年8月11日 (2004. 8. 11) (33) 優先権主張国 米国 (US) (31) 優先権主張番号 60/600, 551 (32) 優先日 平成16年8月11日 (2004. 8. 11) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 500064708 ザ クリーブランド クリニック ファウン デーション アメリカ合衆国 オハイオ 44195, クリーブランド, ユークリッド アベ ニュー 9500 (74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策 (74) 代理人 100062409 弁理士 安村 高明 (74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹 <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
---	---

(54) 【発明の名称】 心臓血管疾患に対するリスクマーカー

(57) 【要約】

被験体、特にヒト被験体が心臓血管疾患の合併症を発症する、有する、または経験する危険性を有するかどうかを調べるための方法および現方法により心臓血管疾患の危険性があることが発見された被験体を治療する方法を提供する。1つの実施形態において、方法は被験体の身体由来サンプル中の酸化されたアポリポタンパク質 A - I 関連生体分子1つ以上のレベルを測定することを含む。更にまた、本方法において使用するためのキットおよび試薬を提供する。更にまた、被験体における心臓血管疾患の状態、および、心臓血管疾患を有する被験体に対する治療薬の作用をモニタリングするための方法も提供する。このような方法は経時的または治療の前後に被験体から採取した身体由来サンプル中の酸化されたアポリポタンパク質 A - I 関連分子1つ以上のレベルを測定することを含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

心臓血管疾患を有する被験体の危険性を特徴付けるための方法であって、該方法は、

該被験体由来の生物学的サンプル中の 1 つ以上の酸化アポリポタンパク質 A - I (a p o A - I) 関連生体分子のレベルを決定する工程であって、ここで該 1 つ以上の酸化 a p o A - I 関連生体分子は、酸化 H D L、酸化 a p o A - I および酸化 a p o A - I ペプチドフラグメントから選択される、工程を包含し、そして

対照値または内標準と比較した場合の該生物学的サンプル中の該 1 つ以上の a p o A - I 関連酸化生体分子のレベルの上昇は、該被験体が心臓血管疾患を有する危険性を有することを示す、方法。

10

【請求項 2】

前記 1 つ以上の酸化 a p o A - I 関連生体分子の少なくとも 1 つが、酸化 a p o A - I または酸化 a p o A - I ペプチドフラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記方法が、以下のアミノ酸残基：クロロチロシン、ニトロチロシン、ジチロシン、トリヒドロキシフェニルアラニン、ジヒドロキシフェニルアラニン、メチオニンスルホキシドおよびチロシンパーオキシドの 1 つ以上を含む、酸化 a p o A - I または酸化 a p o A - I ペプチドフラグメントを検出するための手順または試薬を使用する、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記方法が、配列番号 1 における位置 1 8、位置 2 9、位置 1 6 6、位置 1 9 2、位置 2 3 6 の任意の 1 つ、または該位置の任意の組合せにおいて酸化アミノ酸残基を含む、酸化 a p o A - I または酸化 a p o A - I ペプチドを検出するための手順を使用する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 1 つ以上の酸化 a p o A - I 関連生体分子のレベルが、ヒト被験体の対照集団由来の比較可能な生物学的サンプル中の、該 1 つ以上の酸化 a p o A - I 関連生体分子のレベルに基づいた対照値または対照値の範囲と比較される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記生物学的サンプルが、血液、血清または血漿である、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 7】

心臓血管疾患についての被験体の危険性プロファイルを特徴付けるための方法であって、該方法は、

該被験体由来の身体サンプル中の 1 つ以上の酸化 a p o A - I 関連生体分子のレベルを対照値と比較することによって、第 1 の危険値を決定する工程；ならびに、

該被験体における 1 つ以上のさらなる心臓血管危険値を測定する工程であって、ここで該 1 つ以上のさらなる危険値は、

a) 該被験体の血圧を決定する工程；

b) 該被験体由来の生物学的サンプル中の低密度リポタンパク質もしくはコレステロール、または両方のレベルを決定する工程；

40

c) ストレス試験に対する該被験体の応答を評価する工程；

d) 該被験体由来の生物学的サンプル中のミエロペルオキシダーゼ、C 反応性タンパク質または両方のレベルを決定する工程；および、

e) 該被験体のアテローム性動脈硬化性プラーク負荷を決定する工程

によって得られる、工程、ならびに、

該第 1 の危険値を該 1 つ以上のさらなる危険値と合わせて、最終危険値を提供する工程を包含する、方法。

【請求項 8】

心臓血管疾患を発症する被験体の危険性を特徴付けるための方法であって、該方法は、

50

該被験体由来の生物学的サンプル中の1つ以上の酸化 a p o A - I 関連生体分子のレベルを決定する工程であって、ここで該1つ以上の a p o A - I 関連生体分子は、酸化 H D L、酸化 a p o A - I および酸化 a p o A - I ペプチドフラグメントから選択される、工程

を包含し、そして

対照値または内標準と比較した場合の該生物学的サンプル中の該1つ以上の a p o A - I 関連酸化生体分子のレベルの上昇は、該被験体が心臓血管疾患を発症する危険性を有することを示す、方法。

【請求項9】

前記1つ以上の酸化 a p o A - I 関連生体分子の少なくとも1つが、酸化 a p o A - I または酸化 a p o A - I ペプチドフラグメントである、請求項8に記載の方法。 10

【請求項10】

前記方法が、以下のアミノ酸残基：クロロチロシン、ニトロチロシン、ジチロシン、トリヒドロキシフェニルアラニン、ジヒドロキシフェニルアラニン、メチオニンスルホキシドおよびチロシンパーオキシドの1つ以上を含む、酸化 a p o A - I または酸化 a p o A - I ペプチドフラグメントを検出するための手順または試薬を使用する、請求項8に記載の方法。

【請求項11】

前記方法が、配列番号1における位置18、位置29、位置166、位置192、位置236の任意の1つ、または該位置の任意の組合せにおいて酸化アミノ酸残基を含む、酸化 a p o A - I または酸化 a p o A - I ペプチドを検出するための手順を使用する、請求項8に記載の方法。 20

【請求項12】

前記1つ以上の酸化 a p o A - I 関連生体分子のレベルが、ヒト被験体の対照集団由来の比較可能な生物学的サンプル中の、該1つ以上の酸化 a p o A - I 関連生体分子のレベルに基づいた対照値または対照値の範囲と比較される、請求項8に記載の方法。

【請求項13】

前記生物学的サンプルが、血液、血清または血漿である、請求項8に記載の方法。

【請求項14】

前記被験体が、見かけ上健康なヒト被験体である、請求項8に記載の方法。 30

【請求項15】

前記被験体が、非喫煙者である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記被験体が、心臓血管疾患の高い危険性を有することが別段知られない、請求項8記載の方法。

【請求項17】

胸部痛を呈している被験体において重大な有害心臓事象を経験する短期的な危険性を特徴付けるための方法であって、該方法は、

該被験体由来の生物学的サンプル中の1つ以上の酸化 a p o A - I 関連生体分子のレベルを決定する工程であって、ここで該1つ以上の a p o A - I 関連生体分子は、酸化 H D L、酸化 a p o A - I および酸化 a p o A - I ペプチドフラグメントから選択される、工程 40

を包含し、そして

対照値または内標準と比較した場合の該生物学的サンプル中の該1つ以上の a p o A - I 関連酸化生体分子のレベルの上昇は、該被験体が重大な心臓事象を経験する危険性を有することを示す、方法。

【請求項18】

前記1つ以上の酸化 a p o A - I 関連生体分子の少なくとも1つが、酸化 a p o A - I または酸化 a p o A - I ペプチドフラグメントである、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記方法が、以下のアミノ酸残基：クロロチロシン、ニトロチロシン、ジチロシン、トリヒドロキシフェニルアラニン、ジヒドロキシフェニルアラニン、メチオニンスルホキシドおよびチロシンパーオキシドの1つ以上を含む、酸化 apo A - I または酸化 apo A - I ペプチドフラグメントを検出するための手順または試薬を使用する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

前記方法が、配列番号 1 における位置 18、位置 29、位置 166、位置 192、位置 236 の任意の1つ、または該位置の任意の組合せにおいて酸化アミノ酸残基を含む、酸化 apo A - I または酸化 apo A - I ペプチドを検出するための手順を使用する、請求項 17 に記載の方法。

10

【請求項 21】

前記1つ以上の酸化 apo A - I 関連生体分子のレベルが、ヒト被験体の対照集団由来の比較可能な生物学的サンプル中の、該1つ以上の酸化 apo A - I 関連生体分子のレベルに基づいた対照値または対照値の範囲と比較される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 22】

前記生物学的サンプルが、血液、血清または血漿である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 23】

心臓血管疾患を有することが疑われるか、または心臓血管疾患を有すると診断された被験体において治療を評価するための方法であって、該方法は、

治療の前に該被験体から採取された生物学的サンプル中の1つ以上の酸化 apo A - I 関連生体分子のレベルを決定する工程、および、

治療の間または治療の後に該被験体から採取された対応する生物学的サンプル中の該酸化 apo A - I 関連生体分子の1つ以上のレベルを決定する工程を包含し、

ここで治療の前に採取されたサンプル中の該1つ以上の酸化 apo A - I 関連生体分子のレベルと比較した場合の、治療の後または治療の間に採取されたサンプル中の該1つ以上の酸化 apo A - I 関連生体分子のレベルの低下は、処置される被験体における心臓血管疾患に対する治療の正の効果を示す、方法。

20

【請求項 24】

前記生物学的サンプルが、血液、血清または血漿である、請求項 13 に記載の方法。

30

【請求項 25】

心臓血管疾患の合併症を経験する被験体の危険性を評価する方法であって、該方法は、

該被験体由来の生物学的サンプル中の生体分子の1つ以上の酸化形態のレベルを、被験体の対照集団由来の生物学的サンプル中の該生体分子の該1つ以上の酸化形態のレベルと比較する工程であって、

ここで該生体分子は、酸化 HDL、酸化 apo A - I、1つ以上の酸化 apo A - I ペプチドフラグメント、またはそれらの組合せである、工程、ならびに、

被験体の対照集団に由来する対照値と比較した、該被験体の身体サンプル中の該1つ以上の酸化生体分子のレベルに基づいて、心臓血管疾患の合併症を経験する該被験体の危険性を特徴付ける工程

を包含する、方法。

40

【請求項 26】

被験体の対照集団の由来の生物学的サンプル中の生体分子の前記1つ以上の酸化形態のレベルとを比較した場合の、該被験体由来の生物学的サンプル中の該生体分子の該1つ以上の酸化形態のレベルとの間の差が、心臓血管疾患の合併症を経験する該被験体の危険性の程度を示す、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記方法が、以下のアミノ酸残基：クロロチロシン、ニトロチロシン、ジチロシン、トリヒドロキシフェニルアラニン、ジヒドロキシフェニルアラニン、メチオニンスルホキシド残基およびチロシンパーオキシドの1つ以上を含む、酸化 apo A - I または酸化 apo

50

A - I ペプチドフラグメントを検出するための手順または試薬を使用する、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記サンプルが、血液またはその画分である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 29】

胸部痛を呈している被験体において医療介入を必要とする短期的な危険性を決定する方法であって、該方法は、

該被験体由来の身体サンプル中の危険性予測因子のレベルを評価する工程であって、ここで該危険性予測因子は、酸化 HDL、酸化 apo A - I、酸化 apo A - I ペプチドフラグメント、またはこれらの任意の組合せである、工程を包含し、

10

ここで該被験体の身体サンプル中の該危険性予測因子のレベルと、対照集団由来の比較可能な身体サンプル中の該危険性予測因子のレベルとの間の差は、該被験体において短期的な医療介入を必要とする危険性の程度を確立する、方法。

【請求項 30】

1 以上の急性有害心臓血管事象を経験している被験体において、次の急性心臓血管事象を経験する危険性を特徴付ける方法であって、該方法は、

最初の時点において該被験体から採取された生物学的サンプルと、次の時点において該被験体から採取された対応する生物学的サンプルとにおける酸化 apo A - I 関連生体分子の 1 つ以上のレベルを決定する工程

20

を包含し、

ここで該最初の時点と比較した、該次の時点において採取された生物学的サンプル中の該 1 つ以上の酸化 apo A - I 関連生体分子のレベルの上昇は、次の有害な心臓血管事象を経験する該被験体の危険性が増加していることを示す、方法。

【請求項 31】

心臓血管疾患 (CVD) を有する被験体において、CVD の状態を経時的にモニタリングするための方法であって、該方法は、

最初の時点において該被験体から採取された生物学的サンプルと、次の時点において該被験体から採取された対応する生物学的サンプルとにおいて、酸化 apo A - I 関連生体分子の 1 つ以上のレベルを決定する工程

30

を包含し、ここで該最初の時点と比較した、該次の時点において採取された生物学的サンプル中の該 1 つ以上の酸化 apo A - I 関連生体分子のレベルの上昇は、該被験体の CVD が悪化したことを示す、方法。

【請求項 32】

酸化 apo A - I または酸化 apo A - I ペプチドフラグメントに対して免疫特異的な抗体であって、該 apo A - I ペプチドフラグメントは、少なくとも 3 アミノ酸長であり、そして、以下のアミノ酸残基：クロロチロシン、ニトロチロシン、ジチロシン、トリヒドロキシフェニルアラニン、ジヒドロキシフェニルアラニン、メチオニンスルホキシド残基およびチロシンパーオキシドの 1 つ以上を含む、抗体。

【請求項 33】

前記酸化 apo A - I タンパク質または酸化 apo A - I ペプチドフラグメントが、少なくとも 1 つのクロロチロシンを含む、請求項 32 に記載の抗体。

40

【請求項 34】

前記酸化 apo A - I タンパク質または酸化 apo A - I ペプチドフラグメントが、少なくとも 1 つのニトロチロシンを含む、請求項 32 に記載の抗体。

【請求項 35】

前記酸化 apo A - I タンパク質または酸化 apo A - I ペプチドフラグメントが、少なくとも 1 つのジヒドロフェニルアラニンを含む、請求項 32 に記載の抗体。

【請求項 36】

前記酸化 apo A - I タンパク質または酸化 apo A - I ペプチドフラグメントが、少な

50

くとも1つのトリヒドロキシフェニルアラニンを含む、請求項32に記載の抗体。

【請求項37】

前記酸化 a p o A - I タンパク質または酸化 a p o A - I ペプチドフラグメントが、少なくとも1つのジチロシンを含む、請求項32に記載の抗体。

【請求項38】

前記酸化 a p o A - I タンパク質または酸化 a p o A - I ペプチドフラグメントが、少なくとも1つのメチオニンスルホキシドを含む、請求項32に記載の抗体。

【請求項39】

前記酸化 a p o A - I タンパク質または酸化 a p o A - I ペプチドフラグメントが、少なくとも1つのチロシンパーオキシドを含む、請求項32に記載の抗体。

10

【請求項40】

キットであって、該キットは、

酸化 a p o A - I または a p o A - I の酸化フラグメントを検出するための1つ以上の試薬、ならびに

1つ以上の以下の印刷された物質：心臓血管疾患の試験被験体の危険性を評価する方法において該試薬を使用するための説明書、試験被験体の心臓血管疾患の危険性を評価するための情報、および心臓血管疾患の危険性を有すると決定された被験体を処置するための推奨事項、を含む、キット。

【請求項41】

20

前記1つ以上の試薬の少なくとも1つが、酸化 a p o A I もしくは a p o A I の酸化ペプチドフラグメント、または両方に対して免疫特異的である抗体である、請求項40に記載のキット。

【請求項42】

前記1つ以上の試薬の少なくとも1つが、酸化 H D L、酸化 a p o A - I、酸化 a p o A - I ペプチドフラグメントである、請求項40に記載のキット。

【請求項43】

心臓血管疾患を有することが疑われるか、または心臓血管疾患を有すると診断されたヒトを処置する方法であって、該方法は、

該被験体由来の生物学的サンプル中の1つ以上の酸化 a p o A - I 関連生体分子のレベルを決定する工程であって、ここで該1つ以上の a p o A - I 関連生体分子は、酸化 H D L、酸化 a p o A - I および酸化 a p o A - I ペプチドフラグメントから選択される、工程を包含し、

30

ここで該1つ以上の酸化 a p o A - I 関連生体分子のレベルは、対照サンプルと比較して高く、短期的な有害心臓事象の該ヒトの危険性を低減するための介入処置を提供する方法。

【請求項44】

前記介入処置が、被験体に対して心臓血管疾患の薬物療法を推奨すること、該被験体に対して冠動脈造影を推奨すること、該被験体に対して冠動脈バイパス手術を推奨することから選択される、請求項43に記載の方法。

40

【請求項45】

心臓血管疾患を有することが疑われるか、または心臓血管疾患を有すると診断されたヒトを処置する方法であって、該方法は、

該被験体由来の生物学的サンプル中の1つ以上の酸化 a p o A - I 関連生体分子のレベルを決定する工程であって、ここで該1つ以上の a p o A - I 関連生体分子は、酸化 H D L、酸化 a p o A - I および酸化 a p o A - I ペプチドフラグメントから選択される、工程を包含し、そして、

ここで該1つ以上の酸化 a p o A - I 関連生体分子のレベルは、対照サンプルと比較し

50

て高く、該ヒトの長期的な心臓血管の健康状態を改善するために該ヒトにアドバイスを提供する、方法。

【請求項 46】

心臓血管障害の危険性を低下されるために被験体を処置するための方法であって、該方法は、

該被験体由来の生物学的サンプル中の 1 つ以上の酸化 a p o A - I 関連生体分子のレベルを決定する工程であって、ここで該 1 つ以上の a p o A - I 関連生体分子は、酸化 H D L、酸化 a p o A - I および酸化 a p o A - I ペプチドフラグメントから選択される、工程

を包含し、そして、

ここで該 1 つ以上の酸化 a p o A - I 関連生体分子のレベルは、対照サンプルと比較して高く、抗炎症剤、抗血栓剤、抗血小板剤、フィブリン溶解剤、脂質低下剤、直接的トロンビンインヒビター、糖タンパク質 I I b / I I I a レセプターインヒビター、細胞接着分子に結合してこのような分子に結合する白血球の能力を阻害する薬剤、カルシウムチャンネルブロッカー、アドレナリン作用性レセプターブロッカー、シクロオキシゲナーゼ - 2 インヒビターまたはアンギオテンシン系インヒビターから選択される薬剤が、該被験体に投与される、方法。

【請求項 47】

該被験体が、薬剤による処置を要する症状を別段有さない、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記被験体が、見かけ上健康であり、そして有害な心臓血管事象の高い危険性を別段有さない、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 49】

前記被験体が、非高脂血症である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 50】

前記薬剤が、非アスピリン抗炎症剤である、請求項 46 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(政府の権利)

本出願において記載された研究は、助成金番号 H L 6 2 5 2 6、H L 0 7 6 4 9 1、H L 7 0 6 2 1、H L 0 7 7 6 9 2 および H L 6 6 0 8 2 によって、少なくとも部分的に支持される。

【0002】

(優先権の主張)

本出願は、米国特許仮出願第 60 / 5 2 7 , 1 7 8 号 (2 0 0 3 年 1 2 月 5 日出願)、米国特許仮出願第 60 / 6 0 0 , 5 2 7 号 (2 0 0 4 年 8 月 1 1 日出願)、米国特許仮出願第 60 / 6 0 0 , 5 5 1 号 (2 0 0 4 年 8 月 1 1 日出願)、および米国特許仮出願第 60 / 6 1 9 , 0 4 4 号 (2 0 0 4 年 1 0 月 1 5 日出願) に対する優先権を主張し、これらの全ては、本明細書においてその全体が参考として援用される。

【0003】

(発明の分野)

本発明は心臓血管疾患の分野に関する。より詳細には、被験体、特にヒト被験体が心臓血管疾患を発症するか、心臓血管疾患を有するか、または、心臓血管疾患の合併症を経験する危険性を有するかどうかを調べるためのマーカーおよび方法に関する。本出願はまた被験体における心臓血管疾患の状態、および、心臓血管疾患を有する被験体に対する治療薬の作用をモニタリングするためのこのようなマーカーおよび方法の使用にも関する。

【背景技術】

【0004】

心臓血管疾患 (C V D) はアテローム性動脈硬化症、冠動脈心疾患、脳血管疾患、大動

10

20

30

40

50

脈腸骨動脈疾患および末梢血管疾患を包含する心臓および血管の疾患に関する一般的な用語である。CVDを有する被験体は多くの合併症、例えば心筋梗塞、卒中、狭心症、一過性虚血発作、うっ血性心障害、大動脈瘤および死亡を発症する場合がある。CVDは米国の死亡例では2例中の1例に相当し、死亡原因の第1位である。即ち、心臓血管疾患の防止は主要な公共健康上の重要な領域である。

【0005】

低脂肪食および運動はCVDを防止するために推奨されている。更に、多くの治療薬がCVD発症または保有の危険性を有することが解っている個体に対して医療専門家により処方されている。これらにはコレステロールおよびトリグリセリドの血中濃度を低下させる脂質低下剤、血圧を正常化させる薬剤、血小板の活性化を防止し、血管の炎症を低減するアスピリンまたは血小板ADPレセプター拮抗剤（例えばクロピドグレルおよびチクロピジン）のような薬剤、および、炎症を低減し、インスリン感受性を誘発し、血管機能を改善し、脂質の異常性を是正する広範な代謝作用を有する寄生栄養性の薬剤、例えばパーオキシソーム増殖物質活性化レセプター（PPAR）作用薬が包含される。より攻撃的な治療、例えば複数の薬剤の投与または外科的介入がハイリスクの個体において使用される。CVD療法は有害な副作用を有する場合があるため、CVDを発症するか保有している危険性を有する個体、特にハイリスクの個体を発見するための方法が望まれている。

10

【0006】

現在、数種の危険因子がCVDを発症または保有する個体の危険性を評価し、そしてハイリスクの個体を発見するために医療専門家により使用されている。心臓血管疾患の主要な危険因子は年齢、高血圧、早期CVDの家族歴、喫煙、高値の総コレステロール、低値のHDLコレステロール、肥満および糖尿病を包含する。CVDの主要な危険因子は相加的なものであり、典型的にはCVDに関する治療により最も利益を被ると考えられる個体を標的にした危険予測アルゴリズムにおいて医師等により共に使用されている。これらのアルゴリズムは10年以内のCVDの危険性を予測するための高い感度および特異性を達成する。しかしながら、既存のアルゴリズムがCVD発症のより高い確率を予測する能力は限定されている。現在危険因子の何れも有していない個体のうち、CVD発症の10年間の危険性はなお約2%である。更にまた、多数のCVDの合併症は現在知られた危険因子を使用して判定した場合、見かけ上は軽度または中等度の危険プロファイルを有する個体において起こっている。即ち既存の心臓血管危険性のアルゴリズムを拡張してCVDの危険性を有するか罹患している個体のより広いスペクトルを発見する必要がある。

20

30

【0007】

アテローム性動脈硬化症の機序は十分理解されていない。過去10年に渡り、多数の臨床、病理、生化学および遺伝子的なデータがアテローム性動脈硬化症は慢性炎症性障害であるという見解を指示している。感受性であるが非特異的な炎症マーカーである急性期の反応体（例えばC反応性タンパク質、補体タンパク質）は脂肪層および後期のアテローム性動脈硬化症患者部においてリッチ化される。最近の予測的臨床試験において、C反応性タンパク質のベースライン血漿中のレベルは初回心筋梗塞および見かけ上健康な個体における卒中の危険性を独立して予測している。特許文献1は心臓血管障害を発症する個体の危険性を特性化するためにC反応性タンパク質、サイトカインおよび細胞接着分子を使用する方法を記載している。有用では有るが、これらのマーカーはCVD以外の原因のために炎症を有する個体の血液中に存在する場合があり、従って、マーカーは十分特異的であるとはいえない。更にまた、そのレベルのモジュレーションはCVDの罹患率または死亡率の低減を予測するとは解っていない。

40

【特許文献1】米国特許第6,040,147号明細書

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は被験体、特にヒト被験体が心臓血管疾患を有する危険性を特性化するための方法を提供する。本発明はまた心臓血管疾患を発症する被験体の危険性を特性化する方法を

50

提供する。別の実施形態においては、本発明は心臓血管疾患の合併症を経験する被験体の危険性を特性化するための方法を提供する。別の実施形態においては、本発明は胸痛を有する被験体が短期的に心臓発作または他の主要な有害心臓事象を経験する危険性を有するかどうかを調べるための方法を提供する。本発明は特に高度に積極的なCVD療法を要する被験体並びにCVDまたはCVDの合併症を抑制または防止することを標的にした療法を必要としない被験体を発見するために有用である。

【0009】

1つの実施形態において本発明の方法は被験体から得られた生体由来サンプル中の酸化された生体分子（以降総称して酸化「アポリポタンパク質A1-関連生体分子」と称する）のレベルを測定することを含む。1つの実施形態において酸化アポリポタンパク質A1（「apoA-I」）関連生体分子は酸化高密度リポタンパク質「HDL」である。別の実施形態においては、酸化apoA-I関連生体分子は酸化apoA-Iである。別の実施形態においては酸化apoA-I関連生体分子は酸化apoA-Iペプチドフラグメントである。被験体由来の生物学的サンプル中の酸化apoA-I関連生体分子1つ以上のレベルを対照被験体集団から得た匹敵する生物学的サンプル中の酸化apoA-I関連生体分子1つ以上の測定から誘導された対照値と比較してよい。或いは、被験体から得られた生物学的サンプル中の酸化apoA-I関連生体分子1つ以上のレベルは、被験体から得られた生物学的サンプル中の酸化された内標準と比較してよい。このような内標準の例は酸化されたアルブミンまたは酸化された総タンパク質を包含するが、これらには限定されない。

10

20

【0010】

1つの実施形態において、比較はCVDを診断するための標準的プロトコルを用いて調べた場合のCVDを有する被験体の現在の危険性を特性化するものである。更にまた、被験体の酸化apoA-I関連生体分子レベルと対照値との間の差の程度も、危険性の程度を特性化し、これにより、どの被験体が特定の療法から最大利益を被るかを決定するために有用である。別の実施形態においては、比較は将来においてCVDを発症する被験体の危険性を特性化する。別の実施形態において、比較は、CVDの合併症を経験する被験体の危険性を特性化するために使用できる。本発明の方法はまた、胸痛を呈している被験体が短期的、例えば被験体が胸痛を呈した翌日、3ヵ月後または6ヶ月後に主要な有害心臓事象、例えば心筋梗塞、再梗塞、再血管化の必要性または死亡を経験する危険性を有するかどうかを調べるためにも使用できる。

30

【0011】

更にまた被験体におけるCVDの状態を経時的にモニタリングするための方法も提供される。1つの実施形態において、方法は、初回において被験体から採取した生物学的サンプル中、および、その後の時点において被験体から採取した相当する生物学的サンプル中の酸化apoA-I関連生体分子1つ以上のレベルを測定することを含む。初回と比較した場合、後の時点において採取した生物学的サンプル中の酸化apoA-I関連生体分子1つ以上のレベルの上昇は、CVDを有する被験体の危険性が上昇していることを示す。酸化apoA-I関連分子1つ以上のレベルが低下していることは、CVDを有する被験体の危険性が低下していることを示す。心筋梗塞または虚血発作のような急性の有害心臓血管事象を既に経験している被験体については、このような方法は後の急性の有害心臓血管事象を経験する被験体の危険性を試験するためにも有用である。このような被験体においては、酸化apoA-I関連生体分子1つ以上のレベルの上昇は、被験体が後の有害な心臓血管事象を経験する危険性が上昇していることを示す。経時的に被験体において酸化apoA-I関連生体分子1つ以上のレベルが低下していることは、被験体が後の有害な心臓血管事象を経験する危険性が低下していることを示す。

40

【0012】

別の実施形態において、本発明はCVDを安定化または退行させることを指向した療法に対する被験体の応答を特性化するための方法を提供する。この方法は治療の前に対照から採取した酸化apoA-I関連生体分子1つ以上のレベルを測定すること、および、治

50

療の最中または後に被験体から採取した相当する生物学的サンプル中の酸化 a p o - A 1 関連生体分子 1 つ以上のレベルを測定することを含む。治療の前に採取したサンプル中の酸化 a p o - A 1 関連生体分子 1 つ以上のレベルと比較した場合の治療の後または最中に採取したサンプル中の酸化 a p o A - I 関連生体分子 1 つ以上のレベルの低下は、治療した被験体における心臓血管疾患に対する治療の正の作用を示している。

【 0 0 1 3 】

別の実施形態において、本発明は本発明の方法において使用する酸化 a p o A - I 関連生体分子 1 つ以上に対して免疫特異的な抗体を提供する。このような抗体は被験体から得た生物学的サンプル中の a p o A - I 関連生体分子のレベルを測定または計測するために有用である。

10

【 0 0 1 4 】

別の実施形態において、本発明は試験被験体から得た生物学的サンプル中の酸化 H D L、酸化 a p o A - I、および / または、酸化 a p o A - I ペプチドフラグメントのレベルを試験するための試薬を含むキットに関する。本キットはまた本方法を実施するための取扱説明書または C V D の試験被験体の危険性を試験するために有用な情報のような印刷物を含む。そのような情報は例えばカットオフ値、特定のカットオフ値における感度、並びに試験の結果に基づいて危険性を特性化するための他の印刷物を包含するがこれらに限定されない。一部の実施形態においては、そのようなキットは対照試薬、例えば酸化 H D L、酸化 a p o A - I、および / または酸化 a p o A - I ペプチドフラグメントも含んでよい。

20

【 0 0 1 5 】

別の実施形態においては、本発明は心臓血管疾患の危険性を低下させるための被験体の治療方法に関する。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 6 】

(発明の詳細な説明)

本発明をより詳細な実施形態を参照しながら、場合により添付図面も参照しながら、これより更に説明する。しかしながら、本発明は異なる形態において具現化してよく、そして本明細書に記載した実施形態に限定して解釈されるべきではない。むしろこのような実施形態は本明細書の開示が十分で完全となり、そして当業者に対し本発明の範囲が伝達されるように提示するものである。

30

【 0 0 1 7 】

特段の記載が無い限り、本明細書において使用する全ての技術的および科学的な用語は本発明が属する技術の当業者が一般的に理解するものと同様の意味を有する。本明細書で本発明の説明において使用する用語は特定の実施形態を説明するのみであり、本発明を限定する意図はない。本発明の説明および添付請求項において使用する場合、特段の記載が無い限り、単数と複数とは区別しない。

【 0 0 1 8 】

特段の記載が無い限り、明細書および請求項において使用する場合の成分の量、分子量、反応条件等の特性を表現する全ての数は「約」という用語により全ての場合において加減されるものである。従って、特段の記載が無い限り、以下の明細書および請求項に記載する数値的特性は本発明の実施形態において得ようとする所望の特性に応じて変動してよい概数である。本発明の広範な範囲を示す数値範囲およびパラメーターは概数であるが、特定の実施例において示した数値は可能な限り厳密に報告する。しかしながら何れの数値もその該当する測定において認められる誤差から必然的に生じるある程度の誤差を含んでいる。

40

【 0 0 1 9 】

本明細書に記載する全ての出版物、特許出願、特許および他の参考文献は参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 0 2 0 】

50

(心臓血管疾患の危険性を予測するための方法およびマーカー)

本明細書に記載するものはCVDを発症する、CVDを保有する、またはCVD合併症を経験する被験体の危険性を特性化するための方法およびマーカーである。この内容において、このような方法およびマーカーは無防備なプラークを有するか、または、心筋梗塞を経験する被験体の危険性を特性化するために有用である。

【 0 0 2 1 】

1つの実施形態において方法は被験体から得た生物学的サンプル中の酸化a p o A - I関連生体分子1つ以上のレベルを測定することを含む。1つの実施形態において、酸化a p o - A 1関連生体分子の少なくとも1つはHDLの酸化形態である。「高密度リポタンパク質」または「HDL」という用語は本明細書においては、当業者の一般的な使用方法に従って定義される。

10

【 0 0 2 2 】

別の実施形態において、酸化a p o A - I関連生体分子の少なくとも1つはアポリポタンパク質A 1の酸化形態である。別の実施形態において、酸化a p o A - I関連生体分子の少なくとも1つは酸化a p o A - Iペプチドフラグメントである。このようなフラグメントは3アミノ酸長以上であり、そこに含有される酸化されたアミノ酸残基以外に、配列番号1の部分と同一のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態においては、このようなa p o A - Iペプチドフラグメントは、ペプチドの誘導元であるa p o A - Iタンパク質がミエロペルオキシダーゼ (M P O) 関連の系により酸化されたことを示す酸化されたアミノ酸1つ以上を含む。特定の実施形態においては、酸化されたアミノ酸は配列番号1の18、29、166、192、236位またはその何れかの組合せにおいて存在する。a p o A - Iの酸化はM P Oにより生成された反応性の塩素化物質種 (例えばM P O / H₂O₂ / C l⁻系またはH O C lにより形成されたもの) またはM P O関連反応性窒素物質種 (例えばM P O / H₂O₂ / N O₂⁻系またはO N O O⁻により形成されたもの) または代替のM P O関連酸化経路 (例えばM P Oにより生成されたチロシル基生成系) への曝露により起こってよい。即ち、適当なペプチドの例はクロロチロシン、ニトロチロシン、ジチロシン、メチオニンスルホキシド、オキシヒスチジン、トリヒドロキシフェニルアラニン、ジヒドロキシフェニルアラニン、チロシンパーオキシドまたはM P Oにより生成された酸化物へのa p o A - Iの曝露により形成された他の酸化されたアミノ酸を含むa p o A - Iペプチドフラグメントを包含するがこれらに限定されない。適当なa p o A - Iペプチドフラグメントは以下の表1に示すペプチドを包含するが、これらに限定されない。

20

30

【 0 0 2 3 】

【表 1】

HDL + MPO/H ₂ O ₂ /Cl ⁻			
ESI/MS/MSにより検出された主要な改変ペプチド	H ₂ O ₂ (μM)		
	10	25	100
L ₁₈₉ AEY _{Cl} HAK ₁₉₅ (配列番号 4)	◆	◆	◆
T ₁₆₁ HLAPY _{Cl} SDLR ₁₇₀ (配列番号 5)		◆	◆
D ₂₈ Y _{Cl} GSALGK ₄₀ (配列番号 6)			◆
V ₂₂₇ SFLSALEEY _{Cl} TK ₂₃₈ (配列番号 7)			◆
HDL + ONOO ⁻			
検出された主要な改変ペプチド			
T ₁₆₁ HLAPY _{NO2} SDLR ₁₇₀ (配列番号 5)			
D ₁₃ LATVY _{NO2} VDVLK ₂₃ (配列番号 8)			
V ₂₂₇ SFLSALEEY _{NO2} TK ₂₃₈ (配列番号 7)			

10

20

次に試験被験体の身体由来サンプル中の酸化 a p o A - I 関連生体分子 1 つ以上のレベルを対照被験体の匹敵する身体由来サンプル中の a p o A - I 関連生体分子 1 つ以上のレベルから誘導された対照値と比較してよい。別の実施形態においては、次に試験被験体の身体由来サンプル中の酸化 a p o A - I 関連生体分子 1 つ以上のレベルを被験体の身体由来サンプル中の他の酸化された生体分子のレベルに基づいた内標準と比較してよい。適当な内標準分子の例は、被験体の身体由来サンプル中の酸化された総タンパク質のレベルおよび被験体の身体由来サンプル中の酸化されたアルブミンのレベルを包含するがこれらに限定されない。自身の a p o A - I 関連生体分子 1 つ以上のレベルが対照値より高値であるか、または対照値の高値範囲内にあるような試験被験体は、自身の a p o A - I 関連生体分子 1 つ以上のレベルが対照値未満であるか対照値の低値範囲内にあるような試験被験体よりも、心臓血管疾患を有するか発症する危険性がより高い。更にまた、被験体の酸化 a p o A - I 関連生体分子レベルと対照値の差は、危険性の程度を特性化し、これにより、どの被験体が特定の療法から最大の利益を被るかを判定するためにも有用である。

30

【0024】

特定の実施形態においては、被験体の C V D 危険性プロファイルは、被験体の身体由来サンプル中の a p o A - I 関連生体分子 1 つ以上のレベルを対照集団における該 a p o A - I 関連生体分子 1 つ以上のレベルと比較することにより得られる第 1 の危険値を、最終危険値を与えるために別の危険値 1 つ以上と組み合わせることにより求める。このような別の危険値は、被験体の血圧を測定すること、ストレス試験への被験体の応答を試験すること、被験体の身体由来サンプル中のミエロペルオキシダーゼ、C 反応性タンパク質、低密度リボタンパク質またはコレステロールのレベルを測定すること、または、被験体のアテローム性動脈硬化性プラーク負荷 (a t h e r o s c l e r o t i c p l a q u e b u r d e n) を試験することを包含するがこれらに限定されない手順により得てよい。

40

【0025】

1 つの実施形態において、心臓血管疾患を有する試験被験体の危険性を評価するために方法を使用する。ヒト被験体が冠動脈疾患を有するか、冠動脈疾患の合併症を経験する危険性を有するかどうかを調べる医療上の手順は、冠動脈血管造影、冠動脈血管内超音波 (I V U S)、ストレス試験 (造影を伴うか伴わない)、頸動脈内膜中央肥厚の試験、仮想

50

病理学の技術の実施を伴うか伴わない頸動脈超音波試験、冠動脈電子線コンピューター断層撮影（E B T C）、心臓コンピューター断層撮影（C T）スキャン、C T血管撮影、心臓磁気共鳴撮影（M R I）および磁気共鳴血管撮影（M R A）を包含するがこれらに限定されない。心臓血管疾患は典型的には被験体の血管の一領域に限局されないため、冠動脈疾患を有するか、有する危険性を有すると診断された被験体はC V Dの他の形態、例えば脳血管疾患、大動脈腸骨動脈疾患および末梢動脈疾患を発症または有する危険性もあると考えられる。心臓血管疾患を有する危険性のある被験体は異常なストレス試験結果または異常な心臓カテーテル挿入を有する危険性がある。C V Dを有する危険性のある被験体はまた、非侵襲的な撮影技術を用いて試験することができる特徴である増大した頸動脈内膜中央肥厚および冠動脈石灰化を示す危険性がある。C V Dを有する危険性のある被験体はまた血管内超音波を用いて調べることができる特徴である増大したアテローム性動脈硬化性のプラーク負荷を有する危険性がある。

10

【0026】

別の実施形態においては、本発明の方法は将来において心臓血管疾患を発症する試験被験体の危険性を試験するために使用する。1つの実施形態において試験被験体は見かけ上は健康な個体である。別の実施形態において被験体は、心臓血管疾患を有する危険性が別段高くない。別の実施形態においては、本発明の方法は、胸痛を呈している被験体が、被験体が胸痛を呈した後の短期間に心臓発作または他の主要な有害心臓事象、例えば心臓発作、心筋梗塞、再梗塞、再血管化の必要性または死亡を経験する危険性を有するかどうかを調べるために使用する。本明細書においては、「短期」という用語は1年以内を意味する。即ち、短期の危険性を有する被験体は胸痛を呈した翌日、3ヵ月後または6ヵ月後までに主要な有害心臓事象を経験する危険性を有する。

20

【0027】

本発明はまたC V Dを有すると診断されている被験体におけるC V Dの状態を経時的にモニタリングするための方法を提供する。この内容において、方法はC V Dを有する被験体のアテローム性動脈硬化症の進行または退行の危険性をモニタリングするためにも有用である。1つの実施形態において、方法は初回において被験体から採取した生物学的サンプル中、および、その後の時点において被験体から採取した相当する生物学的サンプル中の酸化a p o A - I関連生体分子1つ以上のレベルを測定することを含む。初回と比較した場合、後の時点において採取した生物学的サンプル中の酸化a p o A - I関連生体分子1つ以上のレベルの上昇は、被験体のC D Vが進行または悪化していることを示す。酸化a p o A - I関連分子1つ以上のレベルが低下していることはC V Dが改善または退行したことを示している。急性の有害心臓血管事象、例えば心筋梗塞または虚血発作を既に経験している被験体の場合、このような方法はまた、後の急性有害心臓血管事象を有する被験体の危険性を試験するために使用できる。被験体において酸化a p o A - I関連生体分子1つ以上のレベルが経時的に上昇していることは、後の有害心臓血管事象を経験する被験体の危険性が上昇していることを示す。被験体において酸化a p o A - I関連生体分子1つ以上のレベルが経時的に低下していることは、後の有害心臓血管事象を経験する被験体の危険性が低下していることを示す。

30

【0028】

別の実施形態において、本発明は心臓血管疾患を有することが疑われるか、または有すると診断された被験体における治療法を評価するための方法を提供する。この方法は治療の前に対照から採取した生物学的サンプル中の酸化H D L、酸化a p o A - I、a p o A - Iの酸化ペプチドフラグメントおよびこれらの組合せを包含する酸化a p o A - I関連生体分子1つ以上のレベルを測定すること、および、治療の最中または後に被験体から採取した相当する生物学的サンプル中の酸化a p o - A 1関連生体分子1つ以上のレベルを測定することを含む。治療の前に採取したサンプル中の酸化a p o A 1関連生体分子1つ以上のレベルと比較した場合の治療の後または最中に採取したサンプル中の酸化a p o A - I関連生体分子1つ以上のレベルの低下は治療した被験体における心臓血管疾患に対する治療の正の作用を示す。

40

50

【0029】

本発明の心臓血管疾患予測方法は少なくとも部分的には、心臓血管疾患を有する被験体から得た身体由来サンプル中のアポリポタンパク質A1は、総タンパク質と比較して、優先的に酸化、例えばニトロ化または塩素化されることを本発明者らが発見したことに基いている。これらの酸化apoA-I関連生体分子の存在はMPOにより生成された酸化剤を解して生産されと考えられる。MPO（ドナー：過酸化水素、オキシドレダクターゼ、EC 1.11.1.7）は約150kDaの4量体の重度にグリコシル化した塩基性（PI 10）のヘムタンパク質である。これは2つの同一のジスルフィド結合したプロトマーを有し、その各々はプロトポリフィリン含有の59~64kDaの重サブユニットおよび14kDaの軽サブユニットを有している（Nauseef, W. M., et al., Blood 67:1504-1507; 1986）。 10

【0030】

MPOは好中球および単球に豊富であり、それぞれ、これらの細胞の乾燥重量の5%および1~2%に相当する（Nauseef, W. M., et al., Blood 67:1504-1507; 1986, Hurst, J. K. In: Everse J.; Everse K.; Grisham M. B., eds. Peroxydases in chemistry and biology 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 1991:37-62）。ヘムタンパク質は白血球の一次アズール好性顆粒中に貯留され、種々のアゴニストの食細胞活性化の後に細胞外環境および食細胞融解小体の両方の中に分泌される（Klebanoff, S. J., et al., The neutrophil: functions and clinical disorders. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Co.; 1978）。 20

【0031】

最近提案されたMPOに関する実用的な速度論的モデルを図12に示す。MPOは複数の中間的状态を有する複合的ヘムタンパク質であり、その各々は O_2^- および H_2O_2 のような還元型酸素物質種および一酸化窒素（NO、一酸化窒素）の利用性により影響される（Abu-Soud, H. M., et al., J. Biol. Chem. 275:5425-5430; 2000）。基底状態において、MPOは第二鉄（Fe(III)）形態で存在する。 H_2O_2 の添加により、MPOのヘム基が $2e^-$ 等量により酸化され、化合物Iと称される反応性のフェリルカチオンラジカル中間体を形成する。 Cl^- 、 Br^- および I^- のようなハライドおよび擬似ハライドのチオイソシアネート（SCN $^-$ ）の存在下においては、化合物Iは単一の $2e^-$ 工程において容易に還元されて、MPO-Fe(III)および相当する次亜ハロゲン酸（HOX）を再生する。ハライドおよびチオイソシアネートの血漿中レベルにおいては（100mM Cl^- 100mM Br^- 、50mM SCN $^-$ 100nM I^- ）、塩化物が最もよい基質であり、強力な塩素化酸化剤である次亜塩素酸（HOCl）が形成される（Foote, C. S., et al.; Nature 301:715-726; 1983, Weiss, S. J., et al., J. Clin. Invest. 70:598-607; 1982）。 30

【0032】

化合物Iはまた多くの有機物質を酸化することができるが、ヘムは2つの逐次的な $1e^-$ 還元工程を起こし、化合物IIおよびMPO-Fe(III)をそれぞれ生成する（図12）。低分子量化合物は主に、MPOの基質として作用し、拡散性の酸化剤およびフリーラジカル物質種を生成し、次にこれがヘムの酸化電位を遠位の標的に運搬することができる。ハライドおよびSCN $^-$ のほかに、MPOの自然発生的な基質の一部は亜硝酸（NO $_2^-$ ）（van der Vliet, A., et al., J. Biol. Chem. 272:7617-7625; 1997）、チロシン（van der Vliet, A., et al., J. Biol. Chem. 272:7617-7625; 1997）、アスコルビン酸（Marquez, L. A., et al., J. Biol. Chem. 265:5666-5670; 1990）、尿酸（Maehly, H. C. Meth 40

ods Enzymol. 2: 798 - 801; 1955)、カテコールアミン (Metodiawa, D., et al., Eur. J. Biochem. 193: 445 - 448; 1990)、エストロゲン (Klebanoff, S. J. J. Exp. Med. 145: 983 - 998; 1977) およびセロトニン (Svensson, B. E. Chem. Biol. Interact. 70: 305 - 321; 1989) を包含する。MPO-Fe(III) はまた還元されて不活性の第一鉄の形態 MPO-Fe(II) となることができる (Hurst, J. K. In: Everse J.; Everse K.; Grisham M. B., eds. Peroxidases in chemistry and biology 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 1991: 37 - 62., (Kettle, A. J., et al., Redox Rep. 3: 3 - 15; 1997)。MPO-Fe(III) および MPO-Fe(II) はそれぞれ O_2^- および O_2 に結合して第一鉄ジオキシ中間体である化合物 III (MPO-Fe(II)- O_2) を形成する (図 12)。スペクトル試験によれば、化合物 III への H_2O_2 の添加により、最終的には化合物 II が形成されることが実証されている。即ち、化合物 III は間接的に $1e^-$ 過酸化反応を促進する。

【0033】

最近の研究によれば、一酸化窒素シンターゼ (NOS) により生成される比較的寿命の長いフリーラジカルである NO の MPO パーオキシダーゼ活性モジュレーションにおける役割が発見されている (Abu-Soud, H. M., et al., J. Biol. Chem. 275: 5425 - 5430; 2000)。MPO および NOS の誘導型アイソフォームは白血球の一次顆粒中に共同存在している。食細胞活性化の間、例えば細菌の摂食の間、MPO および NOS は食胞融解小体および細胞外コンパートメントの中に分泌され、そして細菌タンパク質のニトロ化が観察される (Evans, T. J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9553 - 9558; 1996)。急速速度論的試験によれば NO の低レベルにおいては、基質の MPO 触媒過酸化の初期速度は上昇することが実証されている。機序は MPO 触媒反応における律速段階である化合物 II から MPO-Fe(III) への還元の加速を介したものである (図 1) (Abu-Soud, H. M., et al., J. Biol. Chem. 275: 5425 - 5430; 2000., Abu-Soud, H. M., et al. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian animal peroxidases. J. Biol. Chem. 275: 37524 - 37532, 2000)。より高いレベルの NO においては、スペクトル識別可能なニトロシル複合体である MPO-Fe(III)-NO の形成を介して MPO の可逆的阻害が起こる (Abu-Soud, H. M., et al., J. Biol. Chem. 275: 5425 - 5430; 2000)。NO はまた MPO 化合物 I に対する基質としても作用し、その化合物 II への還元をもたらす (前述)。更にまた NO の存在下では、パーオキシダーゼサイクルを経由する MPO の全体的ターンオーバー速度はほぼ 1000 倍増強される (前述)。最終的に、NO は MPO-Fe(II) に可逆的に結合して相当する MPO-Fe(II)-NO 中間体を形成し、これは MPO-Fe(II) および MPO-Fe(III)-NO と平衡状態にある (図 1) (Abu-Soud, H. M., et al., J. Biol. Chem. 275: 5425 - 5430; 2000., Abu-Soud, H. M., et al. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian animal peroxidases. J. Biol. Chem. 275: 37524 - 37532, 2000)。

【0034】

上記した通り、MPO は H_2O_2 と共同の基質として種々のものを利用することにより中間体として反応性の酸化剤を形成することができる。これらの物質種により生成された多くの安定な最終生成物が特性化されており、そして、ヒトアテローム性動脈硬化症患者から回収されたタンパク質、脂質および LDL 中でリッチ化されることがわかっている (

Chisolm, G. M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 91: 11452 - 11456; 1994, Hazell, L. J., et al., J. Clin. Invest. 97: 1535 - 1544; 1996, Hazen, S. L., et al., J. Clin. Invest. 99: 2075 - 2081; 1997, Leeuwenburgh, C., et al., J. Biol. Chem. 272: 1433 - 1436; 1997, Leeuwenburgh, C., et al., J. Biol. Chem. 272: 3520 - 3526; 1997)。図13はそれぞれが血管の患部においてリッチ化されることが解っているMPOにより形成される反応性の中間体および生成物の一部をまとめたものである。

【0035】

10

(生物学的サンプル)

被験体における心臓血管疾患を予測またはモニタリングするため、または、心臓血管疾患を有する被験体に対する治療薬の作用を試験するために有用である適当な生物学的サンプルは、例えば全血サンプル、血液画分のサンプル、例えば血清および血漿を包含するがこれらに限定されない。サンプルは新鮮血液または保存血液(例えば血液バンク)または血液画分であってよい。サンプルは本発明の試験のために明示的に入手した血液サンプルまたは本発明の試験のためにサブサンプリングすることのできる別の目的のために得られた血液サンプルであってよい。

【0036】

1つの実施形態において、生物学的サンプルは全血である。全血は標準的な臨床の手順を用いて被験体から得てよい。別の実施形態においては、生物学的サンプルは血漿である。血漿は抗凝固血液の遠心分離により全血サンプルから得てよい。このような操作により白血球成分のパフィーコートおよび血漿の上澄みが得られる。別の実施形態においては、生物学的サンプルは血清である。血清は抗凝固剤非含有の試験管内に収集されている全血サンプルの遠心分離により得られる。血液は遠心分離前に凝固させてよい。遠心分離により得られる黄色みを帯びた赤色の液体が血清である。

20

【0037】

サンプルは必要に応じて適切な緩衝液で希釈することにより前処理し、ヘパリン添加し、必要に応じて濃縮するか、または、何れかの方法、例えば超遠心分離、高速液体クロマトグラフィー(FPLC)による分画、またはデキストランスルフェートによるアポリポタンパク質B含有タンパク質の沈殿または他の方法により分画してよい。生理学的pHにおける種々の緩衝物質、例えばリン酸塩、トリス等の1つを使用した多くの標準的な水性の緩衝溶液のいずれかを使用できる。

30

【0038】

(被験体)

被験体は自身のCVDの危険性を特性化するために試験される何れかのヒトまたは他の動物である。特定の実施形態においては、被験体は有害な心臓血管事象の高い危険性を別段有さない。有害な心臓血管事象の高い危険性を有する被験体とは、心臓血管疾患の家族歴、高値の脂質を有する者、喫煙者、以前の急性の心臓血管事象等を有する者である(例えばHarrison's Principles of Experimental Medicine, 15th Edition, McGraw-Hill, Inc., N. Y. (以後「Harrison's」と称する)を参照)。

40

【0039】

特定の実施形態においては、被験体は見かけ上健康な非喫煙者である。「見かけ上健康な」とは、本明細書においては、アテローム性動脈硬化症の存在を示す何れかの兆候または症状、例えば狭心症、急性の有害心臓血管事象の病歴、例えば心筋梗塞または卒中、例えば冠動脈血管造影のような(しかしこれには限定されない)診断撮影法によるアテローム性動脈硬化症の症候を有する者として以前に診断されたことがない個体を意味する。見かけ上健康な個体はまた、疾患の症状を別段呈さない。換言すれば、このような個体は医療専門家により検査された場合、健康または疾患の症状を有さないものとして特性化され

50

る。「非喫煙者」とは評価時点において喫煙者ではない個体を意味する。これには全く喫煙したことが無い者、並びに過去に喫煙したことがあるが現在はもはや喫煙していない者が包含される。

【0040】

(酸化HDL、apoA-IおよびapoA-Iペプチドフラグメントのレベルを測定するためのイムノアッセイ)

生物学的サンプル中の酸化HDL、apoA-IおよびapoA-Iペプチドフラグメントのレベルはこのような酸化された生体分子に対して免疫反応性であるポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いて測定することができる。例えば、apoA-Iペプチドフラグメントを含有するニトロチロシンに免疫特異的な抗体を作成し、標準的な手順で標識し、次にイムノアッセイで使用するによりサンプル中のこのようなニトロチロシン含有apoA-Iペプチドの存在を検出する。適当なイムノアッセイは、例えば固相および液相の両方のラジオイムノアッセイ、蛍光連結試験、競合的イムノアッセイまたは酵素連結免疫吸着試験を包含する。特定の実施形態においては、イムノアッセイはまたサンプル中に存在する酸化された生体分子の量を定量するために使用される。

10

【0041】

選択された酸化されたポリペプチド物質種に対して作成されたモノクローナル抗体は確立された手順に従って生成される。一般的に酸化apoA-Iタンパク質またはapoA-Iペプチドフラグメントは宿主動物を免疫化するために使用される。

【0042】

適当な宿主動物には、例えばウサギ、マウス、ラット、ヤギおよびモルモットが包含されるがこれらに限定されない。種々のアジュバントを使用して宿主動物における免疫学的応答を増大させてよい。使用するアジュバントは、少なくとも部分的に宿主動物種に依存する。このような動物は抗体分子の異種起源の集団を生産し、これらはポリクローナル抗体と称され、免疫化された動物の血清から誘導してよい。

20

【0043】

特定の抗原に結合する抗体の同種起源の集団であるモノクローナル抗体は連続した細胞系統から得られる。モノクローナル抗体を産生する従来の方法はKohler and Millstein (Nature 356: 495-497 (1975))のハイブリドーマ法およびKosbor et al (Immunology Today 4: 72 (1983))のヒトB細胞ハイブリドーマ法である。このような抗体はIgG、IgM、IgE、IgA、IgDの何れかの免疫グロブリンクラスおよびその何れかのクラスであってよい。改変されたアミノ酸、例えば3-ニトロチロシンに対する抗体を調製するための手順はYe, Y. Z., M. Strong, Z. Q. Huang, and J. S. Beckman, 1996. Antibodies that recognize nitrotyrosine. Methods Enzymol. 269: 201-209に記載されている。

30

【0044】

(抗体の調製)

酸化apoA-Iタンパク質または酸化apoA-Iペプチドフラグメントは酸化されたタンパク質またはペプチドフラグメントに免疫特異的な抗体を産生するための免疫原として使用できる。「免疫特異的」という用語は、抗体が非酸化apoA-Iタンパク質またはapoA-Iペプチドフラグメントを含む他のタンパク質またはポリペプチドに対するよりも酸化apoA-Iタンパク質またはapoA-Iペプチドフラグメントに対する実質的により高値の親和性を有することを意味する。このような抗体は例えばポリクローナル、モノクローナル、キメラ、1本鎖およびFabフラグメントを包含してよい。

40

【0045】

酸化apoA-Iペプチドフラグメントは少なくとも3アミノ酸長であり、そして改変されたapoA-Iタンパク質配列を含む、即ちペプチドは、酸化されたアミノ酸、特に酸化されたチロシン残基の存在を除いて、配列番号1の配列番号と同一の配列を含む。a

50

p o A - I ペプチドフラグメントは3アミノ酸長であることができる。別の実施形態においては、a p o A - I ペプチドフラグメントは4、5、6、7、8、9または10アミノ酸長である。別の実施形態においては、a p o A - I ペプチドフラグメントは11~20、21~30、31~40、41~50、51~60、61~70、71~80、81~90、91~100、101~110、111~120、121~130、131~140、141~150、151~160、161~170、171~180、181~190、191~200、201~210、211~220、221~230または231~242アミノ酸長である。

【0046】

6アミノ酸長未満のペプチドは、従来は別のタンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシアニンまたは抗体キメラ分子のものと融合されている。より大きいフラグメント、例えば6~242アミノ酸長のa p o A - I ペプチドフラグメントもまた免疫原として使用してよい。a p o A - I タンパク質のより大きい免疫原性フラグメントの構造はソフトウェアプログラム、例えばMac Vectorプログラムを用いて決定することができ、これにより親水性および疎水性を判断し、そして分子の表面に存在する可能性のあるタンパク質の領域を確認することができる。

【0047】

ポリクローナル抗体は宿主動物にa p o A - I タンパク質またはa p o A - I ペプチドフラグメントまたはa p o A - I を投与することにより従来の手法を用いて生成する。宿主動物種に応じて、種々のアジュバントを用いて免疫学的応答を増大させてよい。ヒトにおいて使用されるアジュバントのうち、Bacilli-Calmette-Guerin (BCG) およびコリネバクテリウム・パルブムが特に好ましい。従来のプロトコルもまた免疫化された動物から血液を採取するため、および血液から血清およびIgG画分を単離するために使用される。

【0048】

モノクローナル抗体の調製のためには、従来のハイブリドーマ法を使用する。このような抗体は培養物中の連続細胞系統により生産させる。モノクローナル抗体を調製する適当な手法は例えばハイブリドーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法およびEBVハイブリドーマ法を包含するがこれらに限定されない。

【0049】

所望の特異性を有する抗体を発見するためのスクリーニングのために種々のイムノアッセイを用いてよい。これらには競合的結合を使用するプロトコルまたは免疫放射線測定試験を包含し、そして、典型的には該当する酸化a p o A - I ポリペプチドと抗体との間の複合体の形成の測定を包含する。

【0050】

本発明の抗体は被験体由来の生物学的サンプル中の酸化HDL、酸化a p o A - I および酸化a p o A - I ペプチドフラグメントの存在を検出または量を測定するために使用してよい。この方法は本発明の抗体1つ以上に個体から採取したサンプルを接触させること；および抗体とサンプル中のタンパク質またはペプチドとの間の複合体の形成を試験することを含む。検出を容易にするために、抗体をカラム、プラスチックディッシュ、マトリックスまたはメンブレン、好ましくはニトロセルロースのような基盤に結合することができる。サンプルは組織または生物学的液体、例えば尿、全血または滲出物、好ましくは血清であってよい。サンプルは未処理であるか、沈殿、分画、分離または精製に付した後に抗体と混合してよい。サンプル中の抗体と単離されたHDL、タンパク質またはペプチドとの間の相互作用は、放射線測定、比色または蛍光測定の手段、サイズ分離、または沈殿により検出される。好ましくは抗体-タンパク質またはペプチド複合体の検出は検出可能なタグ、例えば酵素、蛍光団または発色団にカップリングされた二次抗体の添加により行う。複合体の形成は個体の生物学的サンプル中の酸化HDL、a p o A - I またはa p o A - I ペプチドフラグメントの存在を示す。

【0051】

10

20

30

40

50

特定の実施形態においては、この方法は酵素連結免疫吸着試験 (E L I S A) またはウエスタンブロット手順を使用する。

【0052】

(酸化HDL、酸化apoA-Iおよび酸化apoA-Iペプチドフラグメントを測定するための別の方法)

質量スペクトル分析系の方法 (例えばLC/ESI/MS/MS) もまた以下の例に示す通り生物学的サンプル中の酸化HDL、酸化apoA-Iおよび酸化apoA-Iペプチドフラグメントのレベルを試験するために使用してよい。このような方法は当該分野で標準的であり、そして例えばオンラインエレクトロスプレーイオン化タンデム質量スペクトル分析を伴ったHPLCを包含する。親 (未改変) および改変 (ニトロ化、塩素化) された形態のための合成による標準的なトリプシン消化ペプチドは市販のfmoc改変アミノ酸を用いた自動ペプチド合成装置により容易に作成できる。親分子、即ち未改変HDL、apoA-IおよびapoA-Iペプチドフラグメントは、付加された部分、付加されたNO₂またはCl⁻部分のために、酸化された分子とは異なる質量を有する。即ち個々の親 娘のイオンの転移が各ペプチドについて可能である。ニトロ基をTyrに付加するとTyr上のフェノキシ水素のpKaが10から7に変化する。即ち、改変および未改変ペプチドの間の電荷の差および極性の変化はHPLCにおいても異なる保持時間を示す可能性が高い。

10

【0053】

(対照値)

試験被験体から得られた生物学的サンプル中の酸化HDL、apoA-Iおよび/またはapoA-Iペプチドフラグメントのレベルは対照値と比較してよい。対照値は対照集団、即ち一般的集団またはヒト被験体の選択された集団から得られた匹敵するサンプル中のそれぞれ酸化HDL、apoA-Iおよび/またはapoA-Iのレベルに基づく。例えば選択集団は見かけ上健康な被験体よりなるものであってよい。「見かけ上健康な」とは、本明細書においては、アテローム性動脈硬化症の存在を示す何れかの兆候または症状、例えば狭心症、急性の有害心臓血管事象の病歴、例えば心筋梗塞または卒中、例えば冠動脈血管造影のような (しかしこれには限定されない) 診断撮影によるアテローム性動脈硬化症の症候を以前に有していたことがない個体を意味する。見かけ上健康な個体はまた、疾患の症状を別段呈さない。換言すれば、このような個体は医療専門家により検査された場合、健康または疾患の症状を有さないものとして特性化される。別の例においては、対照値は見かけ上健康な非喫煙者集団から誘導できる。「非喫煙者」とは評価時点において喫煙者ではない個体を意味する。これには全く喫煙したことが無い者、並びに過去に喫煙したことがあるが現在はもはや喫煙していない者が包含される。見かけ上健康な非喫煙者集団は喫煙者集団または以前に心臓血管障害を有していた者の集団とは異なる正常範囲の酸化HDL、apoA-Iおよび/またはapoA-Iペプチドフラグメントのレベルを有する。従って、選択された対照値は試験被験体が属する範疇を考慮してよい。適切な範疇は当業者による日常の実験内で選択できる。

20

30

【0054】

対照値は試験被験体より得られた酸化されたポリペプチドのレベルを特性化するために使用される数値と関連する。即ち、酸化されたポリペプチドのレベルが血液ml当たりの酸化apoA-Iの単位のような絶対値である場合は、対照値もまた一般的集団またはヒト被験体の選択された集団における個体の血液ml当たりの酸化apoA-Iの単位に基づく。同様に、酸化HDL、apoA-IおよびapoA-Iペプチドフラグメントのレベルがサイトグラムより得られた任意の単位のような代表的数値である場合は、対照値も代表的数値に基づく。

40

【0055】

対照値は種々の形態をとりえる。対照値は中央値または平均値のような単一のカットオフ値であることができる。対照値は1つの定義された群の危険性が別の定義された群の危険性の二倍であるような比較グループに基づいて確立することができる。対照値は均等に

50

(または非均等に)グループ、例えば低危険性群、中危険性群および高危険性群に、或いは最低四半が最低危険性の個体であり最高四半が最高危険性の個体である4分割群に分割でき、そしてCVDを有する試験被験体の危険性はその自身の試験値が属する群に基づくことができる。

【0056】

生物学的サンプル中の酸化HDL、apoA-Iおよび/またはapoA-Iペプチドフラグメントの対照値、例えば平均レベル、中央レベルまたは「カットオフ」レベルは、参照により本明細書に特に組み込まれるKnapp, R. G., and Miller, M. C. (1992), *Clinical Epidemiology and Biostatistics*, William and Wilkins, Harual Publishing Co. Malvern, PAに記載の通り、一般的集団または選択された集団の個体の大標本を試験すること、および、最適特異性(最高真陰性率)および感度(最高真陽性率)を定義することにより確立することができる。「カットオフ」値は試験された各危険予測因子に対して求めることができる。以下に記載する実施例1において使用した標準化された方法はKlebanoff, S. J., Waltersdorff, A. N. and Rosen, H. 1984. "Antimicrobial activity of myeloperoxidase", *Methods in Enzymology*. 105: 399-403に記載されているグアイアコール酸化試験を使用している。

10

【0057】

20

(試験被験体由来の酸化された生体分子と対照値の比較)

個体の生物学的サンプル中の各選択された酸化された生体分子、即ち酸化HDL、酸化apoA-I、酸化apoA-Iポリペプチドフラグメントのレベルは単一の対照値または対照値の範囲と比較してよい。試験被験体の生物学的サンプル中の現在の危険予測因子のレベルが対照値より高値、または対照値を超過するかその高い範囲内にある場合は、試験被験体は対照値に匹敵するかそれ未満または対照値の低い範囲内にあるレベルを有する個体よりもCVDを発症または有する危険性が高値である。逆に、試験被験体の生物学的サンプル中の現在の危険予測因子のレベルが対照値未満、または対照値の低い範囲内にある場合は、試験被験体は対照値に匹敵するかそれより高値または対照値を超過するかその高い範囲内にあるレベルを有する個体よりもCVDを発症または有する危険性が低値である。試験被験体の危険性予測因子のレベルと対照値の間の差の範囲はまた、危険性の範囲を特性化することによりどの個体が特定の積極的治療から最も大きい利益を被るかを決定するためにも有用である。対照値の範囲を複数の群、例えば高危険性、平均的危険性および低危険性の個体に対する対照値範囲に分割されるこのような場合には、比較は該当する危険性予測因子の試験被験体のレベルが属する群内に決定することを包含する。

30

【0058】

或いは、酸化された生体分子、すなわち酸化HDL、酸化apoA-Iまたは酸化apoA-Iペプチドフラグメントのレベルはサンプル中の酸化された内標準のレベルと比較してよい。適当な内標準の例はサンプル中の酸化された総タンパク質のレベルまたはサンプル中の酸化されたアルブミンのレベルを包含するがこれらに限定されない。

40

【0059】

本発明の予測試験はCVDを防止することを目標とする、或いは、CVDの進行を遅延させるための治療薬を個体に対して処方すべきか否か、またはそれを何時行うかを決定するために有用である。例えば、あるカットオフ値より高値または「正常範囲」より上3分の1または4分の1内にある酸化apoA-Iの値を有する個体は脂質低化剤による更に積極的な介入、生活様式の変更等の必要のある者として識別できる。

【0060】

(CVD治療薬の評価)

更にまた、CVDを有するか発症する危険性を有すると診断されている個体に対するCVD治療薬の作用を評価するための方法が提供される。このような治療薬は、抗炎症剤、

50

インスリン感作剤、抗高血圧剤、抗血栓剤、抗血小板剤、フィブリン溶解剤、脂質低化剤、直接のトロンビンインヒビター、ACATインヒビター、CDTPインヒビターチオグリチゾン、糖タンパク質IIb/IIaレセプターインヒビター、HDL代謝を上昇または改変することを指向した薬剤、例えばapoA-IミラノまたはCETPインヒビター（例えばトルセトラピブ）または人工HDLとして作用するように設計された薬剤を包含するがこれらに限定されない。このような評価は治療薬の投与の前に被験体から採取された生物学的サンプルおよび治療薬の投与の後に被験体から採取された相当する生物学的液体の酸化apoA-I関連生体分子1つ以上のレベルを測定することを含む。治療薬投与前に採取されたサンプル中の選択された危険性マーカーのレベルと比較した場合に治療薬投与後に採取されたサンプル中の選択された危険性マーカーのレベルが低下していることは、治療された被験体における心臓血管疾患に対する治療薬の正の作用を示している。

10

【0061】

（キット）

本発明の方法を実施するためのキットも提供される。このようなキットは生物学的サンプル中の酸化apoA-I、酸化apoA-Iペプチドフラグメント、酸化HDLまたはこれらの組合せを試験するための試薬を含有する。1つの実施形態において、試薬は酸化apoA-Iまたは酸化apoA-Iペプチドフラグメントまたは両方に免疫特異的な抗体である。1つの実施形態において、キットはまた本発明の方法において試薬を使用するための取扱説明書を含む。別の実施形態においては、キットは心臓血管疾患または合併症の被験体の危険性を測定するために有用な情報を含む。そのような情報は例えばカットオフ値、特定のカットオフ値における感度、並びに試験の結果に基づいて危険性を特性化するための他の印刷物を包含するがこれらに限定されない。一部の実施形態においては、そのようなキットは対照試薬、例えば酸化HDL、酸化apoA-I、および/または酸化apoA-Iペプチドフラグメントも含んでよい。

20

【0062】

（治療方法）

本発明はまた心臓血管障害またはそのような障害の合併症の危険性を低下させるための被験体の治療方法に関する。1つの実施形態において、この方法は被験体由来の身体由来サンプル中のapoA-I関連生体分子1つ以上のレベルを測定すること、および、apoA-I関連生体分子1つ以上のレベルが被験体の対照集団由来の匹敵する身体由来サンプルのレベルと比較した場合に高値である場合には、抗炎症剤、抗血栓剤、抗血小板剤、フィブリン溶解剤、脂質低下剤、直接的トロンビンインヒビター、糖タンパク質IIb/IIaレセプターインヒビター、細胞接着分子に結合してこのような分子に結合する白血球の能力を阻害する薬剤、カルシウムチャンネルブロッカー、アドレナリン作用性レセプターブロッカー、シクロオキシゲナーゼ-2インヒビター、アンギオテンシン系インヒビターおよび/またはその組合せから選択される薬剤を被験体に投与することを含む。薬剤は将来心臓血管障害を発症する被験体の危険性を低下させるために有効な量で投与する。

30

【0063】

「抗炎症」剤とは、例えばアルクロフェナク；アルクロメタゾンジプロピオネート；アルゲストンアセトニド；アミラーゼ；アムシナファル；アムシナフィド；アムフェナクナトリウム；塩酸アミプリロース；アナキンラ；アニロラク；アニトラザフェン；アパゾン；バルサラジド2ナトリウム；ベンダザク；ベノキサプロフェン；塩酸ベンジダミン；プロメライン；プロペラモール；ブデソニド；カルプロフェン；シクロプロフェン；シクタゾン；クリプロフェン；クロベタゾールプロピオネート；クロベタゾンブチレート；クロピラク；クロチカゾンプロピオネート；コルメタゾンアセテート；コルトドキシソン；デフラザコルト；デソニド；デソキシメタゾン；デキサメタゾンジプロピオネート；ジクロフェナクカリウム；ジクロフェナクナトリウム；ジフロラゾンジアセテート；ジフルミドンナトリウム；ジフルニサル；ジフルプレドネート；ジフタロン；ジメチルスルホキシド；ドロシノニド；エンドリソン；エンリモマブ；エノリカムナトリウム；エピリゾール

40

50

；エトドラック；エトフェナメート；フェルピナク；フェナモール；フェンブフェン；フェンクロフェナク；フェンクロラク；フェンドサール；フェンピパロン；フェンチアザク；フラザロン；フルアザコート；フルフェナミン酸；フルミゾール；フルニゾリドアセテート；フルニキシン；フルニキシンメグルミン；フルオコルチンブチル；フルオロメトロンアセテート；フルカゾン；フルルビプロフェン；フルレトフェン；フルチカゾンプロピオネート；フラプロフェン；フロブフェン；ハルシノニド；ハロベタゾールプロピオネート；ハロブレドンアセテート；イブフェナク；イブプロフェン；イブプロフェンアルミニウム；イブプロフェンピコノール；イロニダップ；インドメタシン；インドメタシンナトリウム；インドプロフェン；インドキソール；イントラゾール；イソフルブレドンアセテート；イソキセバク；イソキシカム；ケトプロフェン；塩酸ロフェミゾール；ロルノキシカム；ロテブレドノールエタボネート；メクロフェナメートナトリウム；メクロフェナミン酸；メクロリゾンジブチレート；メフェナミン酸；メサラミン；メセクラゾン；メチルブレドニソロンスレブタネート；モルニフルメート；ナブメトン；ナプロキセン；ナプロキセンナトリウム；ナプロキソール；ニマゾン；オルサラジンナトリウム；オルゴテイン；オルパノキシン；オキサプロジン；オキシフェンブタゾン；塩酸パラニリン；ペントサンポリスルフェートナトリウム；フェンブタゾンナトリウムグリセレート；ピルフェニドン；ピロキシカム；ピロキシカムシンナメート；ピロキシカムオラミン；ピルプロフェン；プレドナゼート；プリフェロン；プロドール酸；プロカゾン；プロキサゾール；プロキサゾールシトレート；リメキソロン；ロマザリット；サルコレックス；サルナセジン；サルサレート；サリシレート；塩化サンギナリウム；セクラゾン；セルメタシン；スドキシカム；スリンダック；スプロフェン；タルメタシン；タルニフルメート；タロサレート；テブフェロン；テニダップ；テニダップナトリウム；テノキシカム；テシカム；テシミド；テトリダミン；チオピナク；チキソコルトールピバレート；トルメチン；トルメチンナトリウム；トリクロニド；トリフルミデート；ジドメタシン；グルココルチコイド；ゾメピラクナトリウムを包含するがこれらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0064】

「抗血栓」および/または「フィブリン溶解」剤とはプラスミノゲン（プレカリクレイン、キミノゲン、第XII、XIIa因子、プラスミノゲンプロアクティベーターおよび組織プラスミノゲン活性化物質[TPA]の相互作用を介してプラスミンとなる）ストレプトキナーゼ；ウロキナーゼ；アニソイル化プラスミノゲン-ストレプトキナーゼ活性化物質複合体；プロウロキナーゼ；(Pro-UK)；rTPA（アルテプラーゼまたはアクチパーゼ；rは組み換えを示す）；rPro-UK；アボキナーゼ；エミナーゼ；塩酸スレプターゼアナグレリド；ビバリルジン；ダルテパリンナトリウム；ダナパロイドナトリウム；塩酸ダゾキシベン；エフェガトランスルフェート；エノキサパリンナトリウム；イフェトロバン；イフェトロバンナトリウム；チンザパリンナトリウム；レタブラーゼ；トリフェナグレル；ワーファリン；デキストランを包含するがこれらに限定されない。

【0065】

「抗血小板」剤とはクロプリドグレル；スルフィンピラゾン；アスピリン；ジピリダモール；クロフィブレート；ピリジノールカーバメート；PGE；グルカゴン；アンチセロトニン剤；カフェイン；テオフィリンペントキシフィリン；チクロピジン；アナグレリドを包含するがこれらに限定されない。

【0066】

「脂質低下」剤とはジェムフィブログル、コリスチラミン、コレスチポール、ニコチン酸、プロブコールロバスタチン、フルバスタチン、シンバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、セリバスタチンおよび他のHMG-CoA還元酵素インヒビターを包含するがこれらに限定されない。

【0067】

「直接的トロンビンインヒビター」とはヒルジン、ヒルゲン、ヒルログ、アガトロバン、PPACK、トロンビンアブタマーを包含するがこれらに限定されない。

【 0 0 6 8 】

「糖タンパク質 I I b / I I I a レセプターインヒビター」とは抗体および非抗体の両方であり、例えば Re o P r o (アビシキサマブ)、ラミフィバン、チロフィバンを包含するがこれらに限定されない。

【 0 0 6 9 】

「カルシウムチャンネルブロッカー」とは高血圧、狭心症および心不整脈のような幾つかの心臓血管障害を含む種々の疾患の管理において重要な治療上の価値を有する化合物の化学的に多様なクラスである (F l e c k e n s t e i n , C i r . R e s . v . 5 2 , (s u p p l . 1) , p . 1 3 - 1 6 (1 9 8 3) ; F l e c k e n s t e i n , E x p e r i m e n t a l F a c t s a n d T h e r a p e u t i c P r o s p e c t s , J o h n W i l e y , N e w Y o r k (1 9 8 3) ; M c C a l l , D . , C u r r P r a c t C a r d i o l , v . 1 0 . p . 1 - 1 1 (1 9 8 5)) 。カルシウムチャンネルブロッカーは細胞のカルシウムチャンネルを調節することにより細胞へのカルシウムの進入を防止または遅延させる薬剤の異種の群である (R e m i n g t o n , T h e S c i e n c e a n d P r a c t i c e o f P h a r m a c y , N i n e t e e n t h E d i t i o n , M a c k P u b l i s h i n g C o m p a n y , E a t o n , P a . , p . 9 6 3 (1 9 9 5)) 。本発明において有用である現在入手可能なカルシウムチャンネルブロッカーの大部分は薬剤の 3 種の主要な化学的グループ、即ちニフェジピンのようなジヒドロピリジン類、ベラパミルのようなフェニルアルキルアミン類、および、ジルチアゼムのようなベンゾチアゼピン類の 1 つに属する。本発明で有用な他のカルシウムチャンネルブロッカーは例えばアムリノン、アムロジピン、ベンサイクラン、フェロジピン、フェンジリン、フルナリジン、イスラジピン、ニカルジピン、ニモジピン、パーヘキシレン、ガロパミル、チアパミルおよびチアパミル類似体 (例えば 1 9 9 3 R O - 1 1 - 2 9 3 3) 、フェニトイン、バルビツレートおよびペブチドジノルフィン、オメガ - コノトキシンおよびオメガ - アガトキシン等および / または薬学的に受容可能なその塩を包含するがこれらに限定されない。

【 0 0 7 0 】

「 - アドレナリン作用性レセプターブロッキング剤」とは狭心症、高血圧および心不整脈におけるカテコールアミンの心臓血管作用に拮抗する薬剤のクラスである。 - アドレナリン作用性レセプターブロッカーは例えばアテノロール、アセブトロール、アルプレノロール、ベフノロール、ベタキソロール、ブニトロロール、カルテオロール、セリプロロール、ヘドロキサロール、インデノロール、ラベタロール、レボブノロール、メピンドロール、メチプラノール、メチンドール、メトプロロール、メトリゾラノロール、オキシプレノロール、ピンドロール、プロプラノロール、プラクトロール、プラクトロール、ソタロールナドロール、チプレノロール、トマロロール、チモロール、ブプラノロール、ペンブトロール、トリメプラノール、2 - (3 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - アミノ - 2 - ヒドロキシプロポキシ) - 3 - ピリデンカルボニトリル H C l 、 1 - ブチルアミノ - 3 - (2 , 5 - ジクロロフェノキシ) - 2 - プロパノール、1 - イソプロピルアミノ - 3 - (4 - (2 - シクロプロピルメトキシエチル) フェノキシ) - 2 - プロパノール、3 - イソプロピルアミノ - 1 - (7 - メチルインダン - 4 - イルオキシ) - 2 - ブタノール、2 - (3 - t - ブチルアミノ - 2 - ヒドロキシプロピルチオ) - 4 - (5 - カルバモイル - 2 - チエニル) チアゾール、7 - (2 - ヒドロキシ - 3 - t - ブチルアミノプロポキシ) フタリドを包含するがこれらに限定されない。上記した化合物は異性体混合物として、または、そのそれぞれの左旋性または右旋性の形態において使用できる。

【 0 0 7 1 】

適当な C O X - 2 インヒビターは例えば、米国特許 5 , 4 7 4 , 9 9 5 に記載されている C O X - 2 インヒビターである「 c o x - 2 インヒビターとしてのフェニル複素環」；米国特許 5 , 5 2 1 , 2 1 3 の「シクロオキシゲナーゼ - 2 のインヒビターとしてのジアリル 2 環式複素環」；米国特許 5 , 5 3 6 , 7 5 2 の「 C O X - 2 インヒビターとしてのフェニル複素環」；米国特許 5 , 5 5 0 , 1 4 2 の「 C O X - 2 インヒビターとしてのフ

エニル複素環」；米国特許 5,552,422 の「抗炎症剤としてのアリール置換 5,5
 縮合芳香族窒素化合物」；米国特許 5,604,253 の「シクロオキシゲナーゼインヒ
 ビターとしての N-ベンジルインドール-3-イルプロパン酸誘導体」；米国特許 5,6
 04,260 の「シクロオキシゲナーゼ-2 のインヒビターとしての 5-メタンスルホン
 アミド-1-インダノン」；米国特許 5,639,780 の「シクロオキシゲナーゼイン
 ビターとしての N-ベンジルインドール-3-イルブタン酸誘導体」；米国特許 5,6
 77,318 の「抗炎症剤としてのジフェニル-1,2,3-チアジアゾール」；米国特
 許 5,691,374 の「COX-2 インヒビターとしてのジアリール-5-酸素化-2
 -(5H)-フラノン」；米国特許 5,698,584 の「COX-2 インヒビターのプ
 ロドラッグとしての 3,4-ジアリール-2-ヒドロキシ-2,5-ジヒドロフラン」；
 米国特許 5,710,140 の「COX-2 インヒビターとしてのフェニル複素環」；米
 国特許 5,733,909 の「COX-2 インヒビターのプロドラッグとしてのジフェニ
 ルスチルベン」；米国特許 5,789,413 の「COX-2 インヒビターとしてのアル
 キル化スチレン」；米国特許 5,817,700 の「シクロオキシゲナーゼインヒビター
 としてのビスアリールシクロブテン誘導体」；米国特許 5,849,943 の「シクロオ
 キシゲナーゼ-2 インヒビターとして有用なスチルベン誘導体」；米国特許 5,861,
 419 の「選択的シクロオキシゲナーゼ-2 インヒビターとしての置換ピリジン」；米
 国特許 5,922,742 の「選択的シクロオキシゲナーゼ-2 インヒビターとしてのピリ
 ジニル-2-シクロペンテン-1-オン」；米国特許 5,925,631 の「COX-2
 インヒビターのプロドラッグとしてのアルキル化スチレン」を包含するがこれらに限定さ
 れず、これらは全て共通して Merck Frosst Canada, Inc. (Kirkland, Calif.) に譲渡されている。別の COX-2 インヒビターはまた「
 シクロオキシゲナーゼ-2 および 5-リポキシゲナーゼインヒビターとしての置換スルホ
 ニルフェニルヘテロ環」と題された G.D. Searle & Co. (Skokie, Ill.) に譲渡されている米国特許 5,643,933 に記載されている。

10

20

30

40

50

【0072】

「アンギオテンシン系インヒビター」とはアンギオテンシン II の機能、合成または異
 化に干渉する薬剤である。これらの薬剤には例えばアンギオテンシン変換酵素 (ACE)
 インヒビター、アンギオテンシン II 拮抗剤、アンギオテンシン II レセプター拮抗剤、
 アンギオテンシン II の異化を活性化する薬剤、および、アンギオテンシン II が最終的
 に誘導される元になるアンギオテンシン I の合成を防止する薬剤が包含されるがこれらに
 限定されない。レニンアンギオテンシン系は血行力学および水分と電解質のバランスの調
 節に関与している。血液容量、腎灌流圧力または血漿中の Na⁺ の濃度を低下
 させる因子は系を活性化させる傾向にあるが、これらのパラメーターを上昇させる因子は
 その機能を抑制する傾向を有する。

【0073】

アンギオテンシン (レニン-アンギオテンシン) 系インヒビターはアンジオテンシノー
 ゲンまたはアンギオテンシン I からのアンギオテンシン II の生産に干渉するか、または
 、アンギオテンシン II の活性に干渉する作用を有する化合物である。このようなインヒ
 ビターは当業者にはよく知られており、そしてレニンおよび ACE を包含するアンギオテ
 ンシン II の最終的生産に関与する酵素を阻害する作用を有する化合物を包含する。それ
 らはまた生産された後のアンギオテンシン II の活性に干渉する化合物も包含する。この
 ような化合物のクラスの例は、抗体 (例えばレニンに対する)、アミノ酸およびその類似
 体 (例えばより大型の分子にコンジュゲートしたものも含む)、ペプチド (アンギオテン
 シンおよびアンギオテンシン I のペプチド類似体も含む)、プロレニン関連類似体等を包
 含する。最も強力で有用なレニン-アンギオテンシン系のインヒビターに含まれるものは
 レニンインヒビター、ACE インヒビターおよびアンギオテンシン II 拮抗剤である。

【0074】

アンギオテンシン II 拮抗剤の例はペプチド化合物 (例えばサララシン [(San¹)
 (Val⁵) (Ala⁸)] アンギオテンシン-(1-8) オクタペプチドおよび関連の

類似体) ; N - 置換イミダゾール - 2 - オン (米国特許 5 , 0 8 7 , 6 3 4) ; イミダゾールアセテート誘導体、例えば 2 - N - ブチル - 4 - クロロ - 1 - (2 - クロロベンジル) イミダゾール - 5 - 酢酸 (Long et al . , J . Pharmacol . Exp . Ther . 2 4 7 (1) , 1 - 7 (1 9 8 8) 参照) ; 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン - 6 - カルボン酸および類似体誘導体 (米国特許 4 , 8 1 6 , 4 6 3) ; N 2 - テトラゾール - - グルクロニド類似体 (米国特許 5 , 0 8 5 , 9 9 2) ; 置換ピロール類、ピラゾール類およびトリアゾール類 (米国特許 5 , 0 8 1 , 1 2 7) ; フェノールおよび複素環誘導体、例えば 1 , 3 - イミダゾール (米国特許 5 , 0 7 3 , 5 6 6) ; イミダゾ縮合 7 員環複素環 (米国特許 5 , 0 6 4 , 8 2 5) ; ペプチド (例えば米国特許 4 , 7 7 2 , 6 8 4) ; アンギオテンシン I I に対する抗体 (例えば米国特許 4 , 3 0 2 , 3 8 6) ; およびアラルキルイミダゾール化合物、例えば
 10
 ビフェニルメチル置換イミダゾール (例えば E P Number 2 5 3 , 3 1 0 , Jan . 2 0 , 1 9 8 8) ; E S 8 8 9 1 (N - モルホリノアセチル - (1 - ナフチル) - L - アラニル - (4 , チアゾリル) - L - アラニル (3 5 , 4 5) - 4 - アミノ - 3 - ヒドロキシ - 5 - シクロ - ヘキサペントノイル - N - ヘキシルアミド、Sankyo Company , Ltd . , Tokyo , Japan) ; SKF 1 0 8 5 6 6 (E - - 2 - [2 - ブチル - 1 - (カルボキシフェニル) メチル] 1 H - イミダゾール - 5 - イル [メチラン] - 2 - チオフェンプロパン酸、Smith Kline Beecham Pharmaceuticals , Pa .) ; Losartan (DUP 7 5 3 IMK 9 5 4 , DuPont Merck Pharmaceutical Company) ; Rem
 20
 i k i r i n (RO 4 2 - 5 8 9 2 、 F . Hoffman La Roche AG) ; A . sub . 2 アゴニスト (Marion Merrell Dow) および特定の非ペプチド複素環 (G . D . Searle and Company) を包含する。ACE インヒビターとして有用であることが解っている化合物のクラスはアシルメルカプトおよびメルカプトアルカノイルプロリン類、例えばカプトプリル (米国特許 4 , 1 0 5 , 7 7 6) およびゾフェノプリル (米国特許 4 , 3 1 6 , 9 0 6) 、カルボキシアシルキルジペプチド類、例えばエナラプリル (米国特許 4 , 3 7 4 , 8 2 9) 、リシノプリル (米国特許 4 , 3 7 4 , 8 2 9) 、キナプリル (米国特許 4 , 3 4 4 , 9 4 9) 、ラミプリル (米国特許 4 , 5 8 7 , 2 5 8) およびペリンドプリル (米国特許 4 , 5 0 8 , 7 2 9) 、カルボキシアシルキルジペプチド模倣物、例えばシラザプリル (米国特許 4 , 5 1 2 , 9 2 4) およ
 30
 びベナザプリル (米国特許 4 , 4 1 0 , 5 2 0) 、ホスフィニルアルカノイルプロリン類、例えばフォシノプリル (米国特許 4 , 3 3 7 , 2 0 1) およびトランドロプリルを包含する。

【 0 0 7 5 】

米国特許の要件であるレニンインヒビターの例は以下の通り、即ち、ペプチドの尿素誘導体 (米国特許 5 , 1 1 6 , 8 3 5) ; 非ペプチド結合で連結されたアミノ酸 (米国特許 5 , 1 1 4 , 9 3 7) ; ジおよびトリペプチド誘導体 (米国特許 5 , 1 0 6 , 8 3 5) ; アミノ酸およびその誘導体 (米国特許 5 , 1 0 4 , 8 6 9 および 5 , 0 9 5 , 1 1 9) ; ジオールスルホンアミドおよびスルフィニル類 (米国特許 5 , 0 9 8 , 9 2 4) ; 改変されたペプチド (米国特許 5 , 0 9 5 , 0 0 6) ; ペプチジル アミノアシルアミノジオール
 40
 ルカーバメート類 (米国特許 5 , 0 8 9 , 4 7 1) ; ピロールイミダゾロン類 (米国特許 5 , 0 7 5 , 4 5 1) ; フッ素および塩素のスタチンまたはスタトンを含有するペプチド (米国特許 5 , 0 6 6 , 6 4 3) ; ペプチジルアミノジオール類 (米国特許 5 , 0 6 3 , 2 0 8 および 4 , 8 4 5 , 0 7 9) ; N - モルホリノ誘導体 (米国特許 5 , 0 5 5 , 4 6 6) ; ペプスタチン誘導体 (米国特許 4 , 9 8 0 , 2 8 3) ; N - 複素環アルコール類 (米国特許 4 , 8 8 5 , 2 9 2) ; レニンに対するモノクローナル抗体 (米国特許 4 , 7 8 0 , 4 0 1) ; および種々の他のペプチドおよびその類似体 (米国特許 5 , 0 7 1 , 8 3 7 、 5 , 0 6 4 , 9 6 5 、 5 , 0 6 3 , 2 0 7 、 5 , 0 3 6 , 0 5 4 、 5 , 0 3 6 , 0 5 3 、 5 , 0 3 4 , 5 1 2 および 4 , 8 9 4 , 4 3 7) である。

【 0 0 7 6 】

特定の実施形態においては、試験被験体は本発明の薬剤を用いた治療を現時点で別段必要としない見かけ上は健康な被験体である。例えば特定の薬剤を用いた治療が酸化 apo A - I 関連生体分子の上昇したレベルに基づいて生じる場合は、患者は、apo A - I 関連生体分子の上昇したレベルを有する症状以外には、その薬剤（または薬剤が属する薬剤の範疇）を用いた治療を要する症状を有さない。一部の実施形態においては、被験体は薬剤の前述した範疇の何れかの組合せまたは全てのうちの何れかの1つを用いた治療を要する症状を別段有さない。例えば、抗炎症剤に関しては、被験体は慢性関節リウマチ、慢性背部痛、自己免疫疾患、血管疾患、ウイルス疾患、悪性疾患等を有さない。別の実施形態においては、被験体は、酸化 apo A - I 関連生体分子1つ以上の上昇したレベルを有する以外は、有害な心臓血管事象の上昇した危険性を有さない（例えばこのような事象の家族歴を有さない被験体、非喫煙者の被験体、非高脂血症の被験体、全身炎症マーカーの上昇したレベルを有さない被験体）。

10

【0077】

一部の実施形態においては、被験体は非高脂血症の被験体である。「非高脂血症の」とは非高コレステロール血症および/または非高トリグリセリド血症の被験体である被験体である。「非高コレステロール血症の」被験体とは高コレステロール血症の被験体に関する確立された現在の基準に合致しない者である。「非高トリグリセリド血症の」被験体とは高トリグリセリド血症の被験体に関する確立された現在の基準に合致しない者である（例えば Harrison's Principles of Experimental Medicine, 15th Edition, McGraw Hill, Inc., N.Y. 参照、以降「Harrison's」と称する）。高コレステロール血症の被験体および高トリグリセリド血症の被験体は早期の冠動脈心疾患の増大した発生率と関連している。高コレステロール血症の被験体は $> 160 \text{ mg/dL}$ 、または $> 130 \text{ mg/dL}$ の LDL レベル、および、男性、早期冠動脈心疾患の家族歴、喫煙（1日10本超）、高血圧、低 HDL（ $< 35 \text{ mg/dL}$ ）、真性糖尿病、高インスリン血症、腹部肥満、高リポタンパク質（a）、および脳血管疾患または閉塞性末梢血管疾患の個人の病歴よりなる群から選択される少なくとも2つの危険因子を有する。高トリグリセリド血症の被験体は $> 250 \text{ mg/dL}$ のトリグリセリド（TG）レベルを有する。即ち、非高脂血症の被験体は、自身のコレステロールおよびトリグリセリドのレベルが高コレステロール血症および高トリグリセリド血症の被験体の両方に関して上記した通りの限界の値より低値である者として定義される。

20

30

【実施例】

【0078】

（A．タンパク質試験）

（材料）

L - [$^{13}\text{C}_6$] チロシンおよび L - [$^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_1$] チロシンを Cambridge Isotopes Inc. (Andover, MA) より購入した。組織培養用の培地および添加剤は Life Technologies (Gaithersburg, MD) より購入した。RAW264.7細胞は American Type Culture Collection (Rockville, MD) より入手した。[^3H] コレステロールは Amersham (Piscataway, NJ) から入手し、使用前にエタノールに再懸濁した。他の試薬は全て特段の記載が無い限り、Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) より入手した。

40

【0079】

（方法）

（一般的方法）

パーオキシニトライトは記載に従って (Beckman, J. S., Chen, J., Ischiropoulos, H., and Crow, J. P. 1994. Oxidative chemistry of peroxynitrite. Methods in Enzymology 233: 229 - 240)。L - 3 - [$^{13}\text{C}_6$] ニトロ

50

チロシンはL - [$^{13}\text{C}_6$]チロシンおよびパーオキシニトライトから合成し、使用前に残存 NO_2^- を除去するために逆相HPLCにより単離した(Wu, W., Chen, Y., and Hazen, S. L. 1999. Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues. Implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 25933 - 25944)。タンパク質含有量はMarkwell変法のLowryタンパク質試験 (Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L., and Tolbert, N. E. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*. 87: 206 - 210)、標準物質としてウシ血清アルブミンを用いて合成し、定量した。試薬 H_2O_2 の濃度は分光光度計により測定した($\epsilon_{240} = 39.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; 参考文献(Nelson, D. P., and Kiesow, L. A. 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H_2O_2 solutions in the UV). *Analytical Biochemistry*. 49: 474 - 478)。ミエロペルオキシダーゼ(ドナー: 過酸化水素、オキシドレダクターゼ、EC 1.11.1.7)はまずRakitaの記載の通り逐次的レクチンアフィニティーおよびゲル濾過クロマトグラフィーによりヒト白血球の洗剤抽出液から精製し(Rakita, R. M., Michel, B. R., and Rosen, H. 1990. Differential inactivation of *Escherichia coli* membrane dehydrogenases by a meloperoxidase-mediated antimicrobial system. *Biochemistry*. 29: 1075 - 1080)、そして次に、スルホプロピルセファデックスカラムを通すことにより痕跡量の夾雑好酸球パーオキシダーゼを除去した(Wever, R., Plat, H., and Hamers, M. N. 1981. Human eosinophil peroxidase: a novel isolation procedure, spectral properties and chlorinating activity. *FEBS Letters*. 123: 327 - 331)。単離したMPOの純度は $> 0.84 (A_{430} / A_{280})$ のRZ、クーマシーブルー染色によるSDS-PAGE分析およびゲル内テトラメチルベンジジンパーオキシダーゼ染色により明らかにした(van Dalen, C. J., Whitehouse, M. W., Winterbourn, C. C., and Kettle, A. J. 1997. Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase. *Biochemical Journal*. 327: 487 - 492)。酵素濃度はMPOの $89000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ / ヘムの消光係数を利用して分光光度計により測定した(Agner, K. 1972. Structure and function of oxidation-reduction enzymes. Tarrytown, NY: Pergamon Press. 329 - 335)。脱脂および精製したapoA-IはBiodesign International (Saco, ME)より購入し、SDS-PAGEおよび銀染色分析による純度およびオンラインタンデム質量スペクトル分析と組み合わせたHPLCにより有意な遊離脂肪酸の非存在を確認した後に更に精製することなく使用した(Zhang, R., Brennan, M. L., Shen, Z., MacPherson, J. C., Schmitt, D., Molenda, C. E., and Hazen, S. L. 2000. Myeloperoxidase fu

nctions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 46116 - 46122). 低密度リポタンパク質 (LDL; $1.019 < d < 1.063 \text{ g/ml}$ 画分) および高密度リポタンパク質 (HDL; $1.063 < d < 1.21 \text{ g/ml}$ 画分) は逐次的超遠心分離により新鮮血漿から単離した (Hatch, F. T. 1968. *Practical methods for plasma lipoprotein analysis*. *Advances in Lipid Research* 6: 1 - 68). 最終調製物は 50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.0)、200 μM ジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA) に対して十分透析し、そして使用時まで N_2 下に保存した。LDL は無水酢酸を用いてアセチル化した (Glodstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., and Brown, M. S. 1979. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76: 333 - 337). NO_2 Tyr 免疫染色は文献記載の通り実施した (MacPhereson, J. C., Comhair, S. A., Erzurum, S. C., Klei 20
n, D. F., Lipscomb, M. F., Kavuru, M. S., Samoszuk, M. K., and Hazen, S. L. 2001. Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *Journal of Immunology*. 166: 5763 - 5772). NO_2 Tyr に対する免疫染色の特異性は (i) 抗体 - 抗原インキュベーションの間に存在する 10 mM ニトロチロシンを用いた競合試験における; および (ii) ジチオナイトによるサンプルの還元の場合の染色の消失を示すことにより確認した。 30

【0080】

(臨床標本 - 血清)

血清中の総タンパク質、 NO_2 Tyr および Cl Tyr の apo A - I および apo B - 100 の含量の質量スペクトル分析依存定量を用いた試験のために、Preventive Cardiology Clinic of the Cleveland Clinic Foundation で治療を受けている心臓血管疾患 (CVD) の逐次的患者 ($n = 45$) および広告に応募した健常者ボランティア ($n = 45$) を参加させた。CVD は冠動脈疾患、末梢動脈疾患または脳血管疾患として臨床的に定義される。CVD を有する被験体は安定であり心臓症状を有していなかった。参加前 1 ヶ月以内に心筋梗塞または卒中を経験した患者は不適格とした。 NO_2 Tyr および Cl Tyr の HDL のレベルを ABCA1 依存性コレステロール流出活性に相関付ける試験を Preventive Cardiology Clinic の治療を受けている既知 (CVD) を有さない個別の逐次的セットの被験体 ($n = 12$) に対して実施した。全参加者は書面による同意書を提出し、Institutional Review Board of the Cleveland Clinic Foundation は試験プロトコルを認可した。臨床調査は Declaration of Helsinki の原則に従って実施した。医療上の履歴および記録の検討を実施することにより冠動脈の危険因子、例えば真性糖尿病 (空腹時血糖値 $> 125 \text{ mg/dl}$ または血糖低化剤使用)、高血圧 (血圧 $> 140 / 90$ または既知心疾患非存在下の抗高血圧剤使用)、早期の冠動脈心疾患の家族歴 (主観的報告により 60 歳未満の冠動脈疾患を有する一等親)、高コレステロール血症の病歴 (40 50

空腹時LDLコレステロール $>160\text{ mg/dl}$ または既知心疾患非存在下の脂質低下剤使用)および喫煙(試験前1年以内の喫煙)を明らかにした。空腹時の血液サンプルは血清分離試験管を用いて得た。血清を単離し、少量をブチル化ヒドロキシルエン($100\text{ }\mu\text{M}$ 最終)およびDTPA(2 mM 最終、 $\text{pH}7.0$)よりなる抗酸化剤カクテルを添加したクリオバイアル内に入れ、アルゴン被覆し、そして分析時まで -80 に急速冷凍した。

【0081】

(ニトロ化タンパク質の免疫アフィニティー精製)

ImmunoPure Protein A Orientation Kit (Pierce)を用いてアルブミン/IgG枯渇血清からニトロ化タンパク質をアフィニティー精製した。概すれば、製造元の推奨法に従い、ProteoPrep Albumin Depletion Kit (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO)を用いてヒト血清($45\text{ }\mu\text{l}$)をアルブミンおよびIgG枯渇させた。合成オクタペプチド(Cys-Gly-NO₂Tyr-Gly-Gly-Gly-NO₂Tyr-Gly)に対して作成したアフィニティー精製した抗ニトロチロシン抗体をプロテインAに結合させ、ジメチルピメリミデートと交差結合させた。アルブミン/IgG枯渇患者血清は 0.15 M NaCl 、 0.1 M リン酸塩、 $\text{pH}7.2$ 中に希釈し、カラムに適用した。未結合のタンパク質画分を 20 ml のPBSおよび 10 ml の 0.5 M NaCl で溶離させた。結合タンパク質は 0.5 M NaCl 中 5 mM 3-ニトロチロシンで溶離させた。結合画分をCentriprepフィルター装置(YM-10, Millipore)を用いて濃縮し、 0.1 M 尿素に対して透析し、Savant Instrument SpeedVac Concentrator (Savant Instruments Inc., Holbrook, New York)を用いて小容量まで乾燥した。画分中のタンパク質は標準物質としてBSAを用いながらピシンコニン酸試験(Pierce)によりモニタリングした。

【0082】

(2D SDS-PAGE)

透析後、タンパク質約 $50\text{ }\mu\text{g}$ をサンプル再水和緩衝液 $155\text{ }\mu\text{l}$ に添加し、 7 cm の $\text{pH}3\sim10$ の非線形IPG ZOOMストリップ(Invitrogen)上に一夜吸着させた。等電点電気泳動は、InvitrogenのZOOM IPGランナーシステムおよびBiorad3000V電力を用いながら、以下の電圧ステッププロトコル、即ち、 100 V 30分、 200 V 20分、 450 V 15分、 750 V 15分および 2000 V 30分を用いて実施した。第2次元用には、フォーカスしたIPGストリップをLDSサンプル緩衝液(Invitrogen)中NUPAGEサンプル還元剤(Invitrogen)の存在下15分間平衡化させ、そしてLDSサンプル緩衝液中 125 mM ヨードアセトアミドの存在下15分間更にインキュベートした。ストリップを4~12%ビストリスゲル中に入れ、 0.5% アガロース(w/v)中に包埋した。コロイド状ブルーまたはシルバー染色のいずれかを用いてタンパク質についてゲルを染色した。イムノブロッティングのために、ゲルを $0.2\text{ }\mu\text{m}$ Immu-Blot PVDFメンブレン(Bio-Rad, Hercules, CA)に移した。

【0083】

(臨床標本-組織)

LDL様およびHDL様の粒子を生検で得られた大動脈および大腿動脈の組織からアテローム性動脈硬化症患部を単離した(組織採取は死亡後10時間以内)。死亡後の人為的要因は重要でないことを確認するための対照試験では血管手術時に新鮮採取された血管組織($n=5$)を利用した。正常なヒト大動脈組織を移植ドナーから得た。全ての組織は迅速に $100\text{ }\mu\text{M}$ DTPA添加氷冷リン酸塩緩衝食塩水ですすぎ、そして急速に緩衝液A(65 mM リン酸ナトリウム、 $\text{pH}7.4$ 、 $100\text{ }\mu\text{M}$ DTPA、 $100\text{ }\mu\text{M}$ ブチル化ヒドロキシルエン)中 N_2 下 -80 で分析時まで凍結した。

【0084】

(LDLおよびHDL様粒子の単離および正常ヒト大動脈組織およびヒトアテローム性動脈硬化症患者部からの特性化)

LDLおよびHDL様粒子はSteinbrecher and Loughheedの方法の変法(Steinbrecher, U. P., and Loughheed, M. 1992. Scavenger receptor-independent stimulation of cholesterol esterification in macrophages by low density lipoprotein extracted from human aortic intima. Arteriosclerosis & Thrombosis. 12: 608 - 625)を用いて逐次的密度超遠心分離(「患部LDL」に関しては $d = 1.019 \sim 1.070 \text{ g/ml}$ 画分、10「患部HDL」に関しては $d = 1.063 \sim 1.21 \text{ g/ml}$ 画分)によりヒト胸大動脈の脂肪線条および中間患部から記載(Krul, E. S., Tang, J., Kettler, T. S., Clouse, R. E., and Schonfeld, G. 1992. Lengths of truncated forms of apolipoprotein B (apoB) determine their intestinal production. Biochemical & Biophysical Research Communications. 189: 1069 - 1076)に従って単離した。「対照大動脈LDL」および「対照大動脈HDL」様粒子も同様に移植ドナー由来の目視可能なアテローム性動脈硬化症プラークを有さない残余の大動脈組織から単離した。金属キレート形成剤(100 μM DTPA)、ミエロペルオキシダーゼイン 20ヒビター(10 mM 3-アミノトリアゾール)およびPMSFよりなるプロテアーゼカクテルおよびSigmaプロテアーゼインヒビターカクテル(カタログ番号P8340)をリボタンパク質単離に使用した全溶液中に含有させた。対照の大動脈および患部LDLおよびHDLはウサギ抗ヒトapoB-100抗血清(Hazen, S. L., and Heinecke, J. W. 1997. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. Journal of Clinical Investigation. 99: 2075 - 2081)またはヤギ抗ヒトapo 30A-I(Biodesign, Saco, ME)をそれぞれ用いたウエスタンブロット分析と組み合わせたSDS-PAGE(Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680 - 685)に付した。apoB-100に対するポリクローナル抗体を用いた対照大動脈および患部LDL様粒子の分析では未損傷のアポリポタンパク質B100の質量である500 kDaのタンパク質が検出された。前述(Krul, E. S., Tang, J., Kettler, T. S., Clouse, R. E., and Schonfeld, G. 1992. Lengths of truncated forms of apolipoprotein B (apoB) determine 40their intestinal production. Biochemical & Biophysical Research Communications. 189: 1069 - 1076)の通り、凝集/交差結合の低分子質量の形態の免疫反応性のタンパク質はともに血管組織から単離したLDL様粒子中にも存在した。同様のウエスタン分析を対照大動脈および患部HDL様粒子に対してもapoA-Iに対する抗体を用いて実施し、apoA-Iの存在を確認した。高分解能サイズエクスクルーージョンクロマトグラフィー(タンデムSuperose 6および12カラム; Pharmacia LKB)による対照大動脈および患部LDL様粒子の分析によれば、免疫反応性のapoB-100、総コレステロールおよびタンパク質質量の大部分は血漿から単離されたLDLのものと同様の見かけ上の M_r を示していた。対照大動脈および患部HDL様粒子調製物中 50

に存在した主要タンパク質成分としての apo A - I の同定もまたクーマシーブルー染色 SDS - PAGE ゲルから切り出してタンデム MS 配列分析により行った。

【 0 0 8 5 】

幾つかの対照実験によれば死亡後の変化は apo A - I のニトロ化および塩素化に寄与する可能性が低いことが示されている。第 1 に対照試験は血管手術（患部）時に採取された新鮮動脈組織および移植用に採取された臓器（正常 / 非患部動脈組織）に対して実施した。これらの新鮮採取血管組織内では、剖検で得られたものと比較して、NO₂ Tyr および Cl Tyr の同等のレベルが観察された。第 2 に、液体窒素温度においてステンレス製の乳鉢と乳棒を用いて粉末化した大動脈組織の作成の後、大動脈組織粉末（PBS に懸濁）を室温で 10 時間 MPO（100 nM）と共にインキュベートしたところ、質量スペクトル分析および SDS - PAGE およびウエスタンブロット分析（NO₂ Tyr に対して）の両方でモニタリングされたとおり、NO₂ Tyr または Cl Tyr のレベルの上昇はできなかった。第 3 に、対照試験は L - [¹³C₆] チロシンを添加し、室温で 10 時間インキュベートし、そして次に質量スペクトル分析に付した上記した大動脈組織粉末 / MPO 混合物中の 3 - [¹³C₆] Cl Tyr および 3 - [¹³C₆] NO₂ Tyr の有意な形成を示していなかった。

10

【 0 0 8 6 】

（質量スペクトル分析によるタンパク質の同定）

タンパク質の同定は以前に記載されている通り実施した（Kinter, M., and Sherman, N. 2000. Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry, Willard, B. B., Ruse, C. I., Keightley, J. A., Bond, M., and Kinter, M. 2003. Site-specific quantitation of protein nitration using liquid chromatography / tandem mass spectrometry. Analytical Chemistry. 75: 2370 - 2376）。概すれば、クーマシーブルー染色 SDS - PAGE ゲルからバンドを切り出し、DTT で還元し、そしてヨードアセトアミドでアルキル化した。次にトリプシンを添加することによりタンパク質をゲル内消化し、ペプチドを抽出し、次に流量 200 nL / 分でナノスプレーイオン化発生源を装着した LCQ Deca イオントラップ質量スペクトル分析システム（ThermoFinnigan, San Jose, CA）上でキャピラリーカラム HPLC タンデム質量スペクトル分析により分析した。消化ペプチドは New Objective Corp.（Woburn, MA）より購入した 10 μm 先端の付いた 50 μm 内径のカラムを用いた逆相キャピラリー HPLC により分離した。カラムには ~ 6 cm の C18 パッキン材（Phenomenex, Torrance, CA）を充填し、50 mM 酢酸中漸増量のアセトニトリル（2 ~ 70 %）の 45 分間勾配を用いて溶離した。タンパク質の同定は単回の試行において質量スペクトルおよび CID スペクトルの両方を獲得するデータ依存性の分析を用いて実施した（Kinter, M., and Sherman, N. 2000. Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry, Willard, B. B., Ruse, C. I., Keightley, J. A., Bond, M., and Kinter, M. 2003. Site-specific quantitation of protein nitration using liquid chromatography / tandem mass spectrometry. Analytical Chemistry. 75: 2370 - 2376）。検索プログラム Sequest および Mascot をタンパク質同定のために使用した。マニュアルの配列分析は選択された重水素リッチ化ペプチドに対して水素重水素交換質量スペクトル分析の間に実施した。

20

30

40

【 0 0 8 7 】

（ニトロチロシンおよびクロロチロシンの分析）

50

タンパク質結合ニトロチロシンおよびクロロチロシンを、Cohesive Technologies Aria LX Series HPLCマルチプレクシングシステム (Franklin, MA) とインターフェイス接続した3重4極質量スペクトル分析器 (API 4000, Applied Biosystems, Foster City, CA) 上の安定同位体希釈の液体クロマトグラフィータンデム質量スペクトル分析 (Brennan, M. L., Wu, W., Fu, X., Shen, Z., Song, W., Frost, H., Vadseth, C., Narine, L., Lenkiewicz, E., Borchers, M. T., et al. 2002. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. Journal of Biological Chemistry. 277: 17415 - 17427) により定量した。合成 [$^{13}\text{C}_6$] 標識した標準物質をサンプル (血清の一部、組織/患部ホモジネート、またはコロイドブルー染色してPVDFメンブレン上で可視化し、次に切り出したバンド) に添加し、そして天然存在比の分析対象の定量のための内標準として使用した。同時に、ユニバーサル標識前駆体アミノ酸 [$^{13}\text{C}_9$ 、 $^{15}\text{N}_1$] チロシンを添加した。タンパク質をメタンスルホン酸中アルゴン雰囲気下で加水分解し、そして次にサンプルをミニ固相C18抽出カラム (Supelclean LC-C18-SPEミニカラム; 3ml; Supelco, Inc., Bellefonte, PA) 上に通し、その後質量スペクトル分析に付した。結果は同じインジェクション内においてモニタリングした前駆体アミノ酸チロシンの含有量に対して規格化した。ニトロ [$^{13}\text{C}_9$ 、 ^{15}N] チロシンおよびクロロ [$^{13}\text{C}_9$ 、 ^{15}N] チロシンの両方のクロマト中の形成は日常的にモニタリングしたが、使用条件下では無視できるものであった (即ち観察された天然存在比の産物のレベルの< 5%)。

【0088】

(統計学的分析)

検出力の計算は臨床試験における NO_2 Tyrおよび Cl Tyr の以前に報告されている平均および標準偏差に基づいて実施した。40%を検出するために80%の検出力を有するためには各群において少なくとも30人の患者が必要であることがわかった。

【0089】

(実施例1. 血清中のニトロ化タンパク質としてのアポリポタンパク質A-Iの同定)

タンパク質結合ニトロチロシンの血清中レベルは被験体におけるアテローム性動脈硬化症の危険性および負荷の予測因子として機能 (Shishehbor, M. H., Aviles, R. J., Brennan, M. L., Fu, X., Goormastic, M., Pearce, G. L., Gokce, N., Keaney, J. F., Jr., Penn, M. S., Sprecher, D. L., et al. 2003. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. JAMA. 289: 1675 - 1680) し、特定のタンパク質のニトロ化がアテローム性動脈硬化症の過程に寄与するかどうかの疑問が生じる。この疑問を解明する第1の工程として、本発明者らは血清中のニトロ化タンパク質の実体を調べた。CVDを有する患者および対照より得たサンプルをSDS-PAGEで分析し、抗ニトロチロシン抗体を用いたウェスタンブロット分析およびタンパク質に対するクーマシーブルー染色の両方により可視化した。ウェスタンブロットで観察された免疫反応性のパターンとタンパク質染色の比較によれば、血清中タンパク質の全てが等しくニトロ化されているわけではないことがわかった。低値の存在比と旺盛なニトロ化の間の不一致の例は29 kDaタンパク質において再現性を伴って観察された。このタンパク質バンドをクーマ

シーブルー染色ゲルから切り出し、トリプシン消化し、そしてタンパク質配列の96%に相当する>30ペプチドの検出と配列決定に基づけばapoA-I(NCBIアクセッション番号253362)であると明確に同定された。ニトロ化されたタンパク質としてのapoA-Iの実体は、ニトロチロシンに対する固定化抗体よりなるカラムに血清を通し、カラムを高濃度塩で洗浄し、その後5mMニトロチロシン添加高濃度塩で溶離することにより更に確認された。2次元SDS-PAGEおよびキャピラリーLCタンデム質量スペクトル分析系配列決定によるサンプルの分析により、apoA-Iは回収されたタンパク質であることが確認された(LC/ESI/MS/MSによれば>90%相当)。2D SDS-PAGEとその後のapoA-Iに対する抗体を用いたウエスタンブロット分析による抗ニトロチロシンカラム溶出物(高濃度塩+5mMニトロチロシン)のその後の検査により、インビボのニトロ化タンパク質としてのapoA-Iの別の補足的証拠が得られた。

10

【0090】

(実施例2. 血清中並びに心臓血管疾患有無の被験体におけるニトロ化および塩素化の好ましい標的としてのアポリポタンパク質A-Iの実証)

血清のような組織内に標的が大量に存在し、そして複合生物学的マトリックス内の反応性窒素物質種に対して比較的短い拡散距離があるとすれば、血清中タンパク質内のapoA-Iの見かけ上の選択的ニトロ化はインビボのリポタンパク質の近接部におけるNO誘導酸化剤の酵素的原料の存在を強力に示唆するものである。1つの可能性のある候補は酵素MPOで有るが、その理由は最近の研究においてこの酵素がインビボにおけるタンパク質のニトロ化を触媒すること(Brennan, M. L., Wu, W., Fu, X., Shen, Z., Song, W., Frost, H., Vadseth, C., Narine, L., Lenkiewicz, E., Borchers, M. T., et al., 2002. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *Journal of Biological Chemistry*. 277:17415-17427, Zhang, R., Brennan, M. L., Shen, Z., MacPherson, J. C., Schmitt, D., Molenda, C. E., and Hazen, S. L. 2002. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *Journal of Biological Chemistry*. 277:46116-46122, Baldus, S., Eiserich, J. P., Mani, A., Castro, L., Figueroa, M., Chumley, P., Ma, W., Tousson, A., White, C. R., Bullard, D. C., et al. 2001. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *Journal of Clinical Investigation*. 108:1759-1770, Gaut, J. P., Byun, J., Tran, H. D., Lauber, W. M., Carroll, J. A., Hotchkiss, R. S., Belaaouaj, A., and Heinecke, J. W. 2002. Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. *Journal of Clinical Investigation*. 109:1311-1319)並びに炎症部位における細胞外コンパートメント内のような特定の状況下においてNO誘導酸化剤の生成に主要な役割

20

30

40

50

を果たすことの両方が可能であること (Brennan, M. L., Wu, W., Fu, X., Shen, Z., Song, W., Frost, H., Vadseth, C., Narine, L., Lenkiewicz, E., Borchers, M. T., et al., 2002. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. Journal of Biological Chemistry. 277: 17415 - 17427) が判明したためである。インビボの選択的 apo A - I ニトロ化のための可能な酵素的触媒として MPO が作用するという仮説を検討し、かつ apo A - I が CVD を有する被験体内においてより高水準までニトロ化されるかどうかを定量的に評価するために、明確化された CVD を有しながら心臓科に来院した逐次的患者 (n = 45) および健康な対照被験体 (n = 44) に同意を求め、その血清サンプルを採取して分析に付した。NO₂ Tyr および Cl Tyr の両方の含有量は、オンライン電子スプレーイオン化タンデム質量スペクトル分析と組み合わせた安定同位体希釈 HPLC (LC/ESI/MS/MS) を利用して総血清中タンパク質、単離された apo A - I および単離された apo B - 100 内において同時に定量した。表 2 は検査した被験体の臨床上および検査値上の特徴を示している。推測された通り、CVD を有する患者は既知の CVD 危険因子、例えば糖尿病歴、高血圧、喫煙、CVD の家族歴および高脂血症の病歴を有する可能性がより高かった。CVD を有する被験体はより低値の LDL コレステロールレベルを有し、心臓科への CVD 被験体の組み入れと確認の偏位に起因する特徴であるスタチン療法を受けている可能性がより高かった。

10

20

【0091】

【表 2】

表 2

臨床上および検査値上の特徴

	対照 (n=44)	CVD (n=45)	p 値
年齢	44.3 ± 11.1	65.6 ± 8.5	<0.001
男性 (%)	24 (54.6)	17 (37.8)	0.12
糖尿病 (%)	0 (0)	24 (53.3)	<0.001
高血圧 (%)	14 (31.8)	32 (71.1)	<0.001
喫煙 (%)	22 (50.0)	37 (82.2)	0.001
家族性 CVD H x (%)	5 (11.4)	19 (42.2)	0.001
高脂血症 H x (%)	7 (15.9)	31 (68.9)	<0.001
スタチンの使用	0 (0)	28 (62.2)	<0.001
TC (mg/dL)	201 ± 33	165 ± 36	<0.001
HDLc (mg/dL)	60 ± 16	42 ± 15	<0.001
LDLc (mg/dL)	120 ± 34	91 ± 24	<0.001
TG (mg/dL)	108 ± 54	171 ± 96	<0.001
空腹時血糖値 (mg/dL)	93 ± 13	94 ± 3	0.43

10

20

30

データは記載の通りパーセントまたは平均 ± 標準偏差の何れかで表示する。

CVD = 心臓血管疾患；HDLc = 高密度リポタンパク質コレステロール；Hx = 病歴；LDLc = 低密度リポタンパク質コレステロール；TC = 総コレステロール；TG = トリグリセリド。

【0092】

最近発表された研究 (Shishehbor, M. H., Aviles, R. J., Brennan, M. L., Fu, X., Goormastic, M., Pearce, G. L., Gokce, N., Keaney, J. F., Jr., Penn, M. S., Precher, D. L., et al. 2003. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. JAMA. 289: 1675 - 1680) と合致して、血清中の NO₂ Tyr 含有量は CVD を有する被験体においては健常者対照群のものと比較して約 1.5 倍の有意な上昇があった (p < 0.001) (表 3)。同様の結果 (CVD vs 対照で 2 倍上昇；p = 0.001、表 3) は、単離された apoB-100 の NO₂ Tyr 含有量、LDL の主要タンパク質成分およびインビトロで MPO に結合することが報告されているリポタンパク質を分析した場合にも観察された (Carr, A. C., Myzask, M. C., Stocker, R., McCall, M. R., and Frei, B. 2000. Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis)

40

50

lerosis. *FEBS Letters*. 487:176-180, Yang, C. Y., Gu, Z. W., Yang, M., Lin, S. N., Garcia-Prats, A. J., Rogers, L. K., Welty, S. E., and Smith, C. V. 1999. Selective modification of apoB-100 in the oxidation of low density lipoproteins by myeloperoxidase in vitro. *Journal of Lipid Research*. 40:686-698)。著明な点は、血清中総タンパク質および単離されたapoB-100と比較して血清中apoA-IにおいてはNO₂Tyr含有量の70倍リッチ化が観察された。更にまた、apoA-IのNO₂Tyr含有量の有意な上昇はCVDと健常者対照群の被験体の血清を比較した場合にも観察された(p=0.005;表2)。MPO触媒酸化に特異的なタンパク質改変であるClTyrの含有量に関するサンプルの平行分析(Hazen, S. L., Hsu, F. F., Gaut, J. P., Crowley, J. R., and Heinecke, J. W., 1999. Modification of proteins and lipids by myeloperoxidase. *Methods in Enzymology* 300:88-105, Brennan, M. L., Wu, W., Fu, X., Shen, Z., Song, W., Frost, H., Vadseth, C., Narine, L., Lenkiewicz, E., Borchers, M. T., et al. 2002. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *Journal of Biological Chemistry*. 277:17415-17427, Hazen, S. L., and Heinecke, J. W. 1997. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *Journal of Clinical Investigation*. 99:2075-2081, Brennan, M. L., Anderson, M., Shih, D., Qu, X., Wang, X., Mehta, A., Lim, L., Shi, W., Hazen, S. L., Jacob, J., Crowley, J., Heinecke, J. W., and Lusis, A. J. 2001. Increased atherosclerosis in myeloperoxidase-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 107:419-30)によれば血清中の総タンパク質および単離apoB-100においては比較的低レベルであったのに対し、単離されたapoA-IにおいてはClTyr含有量の100倍超のリッチ化が判明した(表2)。更に、CVDを有する被験体におけるClTyrの含有量の上昇の傾向は総タンパク質および単離されたapoB-100において観察されたが、これらの差は統計学的な有意差には達していなかった。一方、ClTyr含有量の有意な上昇が血清から回収されたapoA-Iにおいては観察された(p<0.001;表3)。

【0093】

(表3)

(アポリポタンパク質A-Iは血清において、そして、心臓血管疾患において、ニトロ化および塩素化の好ましい標的である)

【0094】

【表 3】

	ニトロチロシン		クロロチロシン	
	中央値 (IQR) ($\mu\text{mol oxTyr/mol Tyr}$)	p 値	中央値 (IQR) ($\mu\text{mol oxTyr/mol Tyr}$)	p 値
セクション 1.01 血清				
総タンパク質				10
対照	6.1 [3.9 - 7.8]		1.6 [0.6 - 2.4]	
CVD	9.0 [5.7 - 12.9]	<0.001	1.9 [1.3 - 3.1]	0.07
apoB-100				20
対照	4.0 [1.3 - 6.9]		0.0 [0.0 - 1.9]	
CVD	8.7 [5.2 - 12.1]	0.001	1.9 [0.1 - 4.0]	0.24
セクション 1.02 apoA-I				
対照	438 [335 - 598]		186 [114 - 339]	
CVD	629 [431 - 876]	0.005	500 [335 - 765]	<0.001

表 2 の全コホート (CVD および健常者対照被験体) 由来の血清の一部 (100 μg タンパク質) は直接分析 (総タンパク質) するか、または SDS-PAGE で分割し、PVDF メンブレンに移し、apoA-I および apoB-100 に相当するバンドを可視化し、切り出し、次に安定同位体希釈 LC/ESI/MS/MS により「方法」で記載した通り分析した。示した結果は親アミノ酸に対する酸化アミノ酸のモル比として示した総血清中タンパク質または記載したリポタンパク質のニトロチロシンおよびクロロチロシン含有量の中央値および 4 分位範囲である。記載した p 値は相当する記載したタンパク質における対照群と CVD 群の間の NO_2Tyr および ClTyr 含有量の比較を示す。apo = アポリポタンパク質; CVD = 心臓血管疾患; IQR = 4 分位範囲。

【0095】

血清由来の総タンパク質および単離された apoA-I における NO_2Tyr および ClTyr の含有量の間の関係の強度は更に、全コホート (CVD + 対照) において検討した。表 4 (上) に示す通り、 NO_2Tyr 含有量の上昇には、総血清中タンパク質または血清由来の単離された apoA-I の何れかにおいてモニタリングされる通り、CVD の発生率の上昇が伴った。更にまた、高値 vs 低値のレベルの NO_2Tyr (第 3 対第 1 の 3 分位) を有する被験体の間の比較では、総タンパク質または血清由来の単離された apoA-I の何れを調べた場合でも、CVD を有する者について約 6 倍上昇が示されていた (表 3、下)。一方、単離された apoA-I の ClTyr 含有量のみがコホート内の C

10

20

30

40

50

V D 発生率の上昇を伴っており、総血清タンパク質（即ち a p o B - 1 0 0、図示せず）の C l T y r 含有量では伴っていなかった。注目すべき点として、高値（最高 3 分位）の a p o A - I C l T y r 含有量を有する被験体は低値（最低 3 分位）の a p o A - I C l T y r 含有量を有する者よりも C V D を有する可能性が 1 6 倍高値であった（表 4、下）。

【 0 0 9 6 】

（表 4）

（血清中総タンパク質およびアポリポタンパク質 A - I のニトロチロシンおよびクロロチロシン含有量と心臓血管疾患罹患性の間の関係）

【 0 0 9 7 】

【表 4】

10

3 分位当たりの C V D 発生率				
	1	2	3	傾向に関する p
血清				
総タンパク質 NO ₂ Tyr	30.8 %	33.3%	69.2 %	0.005
apoA-I NO ₂ Tyr	32.0 %	44.0 %	72.0 %	0.005
1. 総タンパク質 ClTyr	40.0 %	50.0 %	58.3 %	0.20
apoA-I ClTyr	20.0 %	48.0 %	80.0 %	<0.001
3 分位当たりの C V D の倍率 (95% CI)				
	1	2	3	
血清				
総タンパク質 NO ₂ Tyr	1.0	1.1 (0.4-3.6)	5.1 (1.6-16.4)	
apoA-I NO ₂ Tyr	1.0	1.7 (0.5-5.3)	5.5 (1.6-18.4)	
2. 総タンパク質 ClTyr	1.0	1.5 (0.5-4.6)	2.1 (0.7-6.6)	
apoA-I ClTyr	1.0	3.7 (1.1-13.0)	16.0 (4.0-64.0)	

20

30

40

表示は（上）全コホートの各 3 分位内の心臓血管疾患の罹患の発生率；および（下）C V D の予測因子としての最低（第 1）3 分位と比較した第 2 および第 3 の 3 分位の倍率比および 9 5 % 信頼区間。a p o = アポリポタンパク質；C I = 信頼区間；C l T y r = クロロチロシン；C V D = 心臓血管疾患；N O₂ T y r = ニトロチロシン。

【 0 0 9 8 】

（実施例 3 ヒトアテローム性動脈硬化症患者部内のニトロ化および塩素化の好ましい標的としてのアポリポタンパク質 A - I の実証）

N O[•] および M P O により生成された酸化剤による優先的なターゲティングがヒトアテ

50

ローム中で生じたかどうかを調べるために、ヒト大動脈組織から回収した総タンパク質、
a p o B - 1 0 0 および a p o A - I を検査する別の試験を実施した。L D L 様および H
D L 様粒子を示差浮力密度遠心分離により正常大動脈組織およびアテローム性動脈硬化症
組織の両方から単離し、次に「方法」の項で記載したとおり a p o B - 1 0 0 および a p
o A - I のいずれかに対するポリクローナル抗体を用いたウエスタン分析によりコレステ
ロールと適切なアポリポタンパク質調製物の両方においてリッチ化されていることを確認
した。アテローム性動脈硬化症患者由来の H D L 様粒子から回収した a p o A - I の大部
分は単量体であった。大動脈および患部の総タンパク質および a p o B - 1 0 0 において
観察されたものと相対比較した場合の正常大動脈および患部組織から回収した a p o A -
I の N O ₂ T y r および C l T y r の含有量のより定量的な試験は安定同位体希釈 L C /
E S I / M S / M S 分析により行い、その結果は表 4 に示す通りである。注意すべき点は
、正常大動脈組織およびヒトアテローム性動脈硬化症患者から回収した総タンパク質、 a
p o B - 1 0 0 および a p o A - I における N O ₂ T y r および C l T y r の含有量は血
清中で観察されるものよりも高値であり（表 3 と 5 を比較）、N O および M P O により生
成された酸化剤は、血管内（血液）コンパートメントと比較して動脈壁内、特にアテロ
ーム性動脈硬化症の患部内に優先的に存在することを示唆している。血清および血清誘導単
離リポタンパク質において観察された通り、患部 a p o A - I 中の N O ₂ T y r および C
l T y r 両方の含有量は患部総タンパク質および患部 a p o B - 1 0 0 と相対比較して劇
的選択的にリッチ化されていることを示していた（表 5）。同様に、正常血管組織よりも
罹患組織に由来する総タンパク質および単離リポタンパク質において、より高値のレベル
が観察されている。

10

20

【 0 0 9 9 】

（表 5）

（アポリポタンパク質 A - I はヒト大動脈アテローム性動脈硬化症の患部におけるニト
ロ化および塩素化の好ましい標的である）

【 0 1 0 0 】

【表 5】

	ニトロチロシン		クロロチロシン	
	中央値 (IQR) ($\mu\text{mol oxTyr/mol Tyr}$)	p 値	中央値 (IQR) ($\mu\text{mol oxTyr/mol Tyr}$)	p 値
セクション 1.03				
正常				
総タンパク質	55 [24 - 143]		63 [25 - 128]	
apoB-100	97 [43 - 222]	0.57	49 [21 - 121]	0.93
セクション 1.04	401 [185 - 637]	<0.001	678 [299 - 1,311]	<0.001
apoA-I				
セクション 1.05				
患部				
総タンパク質	108 [51 - 346]		232 [111 - 431]	
apoB-100	255 [91 - 480]	0.67	318 [59 - 385]	0.92
セクション 1.06	2,340 [1,665 - 5,050]*	<0.001	3,930 [1,679 - 7,005] *	<0.001
apoA-I				

正常ヒト大動脈 (n = 10 被験体) およびヒト大動脈アテローム性動脈硬化症組織 (n = 22 被験体) の標本を外膜除去し、次に液体窒素温度においてステンレス製の乳鉢と乳棒を用いて粉末化し、ニトロチロシンおよびクロロチロシンの含有量を安定同位体希釈 LC / ESI / MS / MS により「方法」で記載した通り分析した。バイオマーカーの総タンパク質含有量は粉末ヒト血管組織を用いて確認した。正常大動脈およびアテローム性動脈硬化症患者部から誘導した apoB - 100 および apoA - I における酸化されたアミノ酸の含有量は粉末血管組織から LDL 様および HDL 様粒子を単離した後に、逐次的浮力密度遠心分離して SDS - PAGE により更に分割することにより確認し、PVD Fメンブレンに移行させ、次に apoA - I および apoB - 100 に相当するバンドを可視化し、切り出し、安定同位体希釈 LC / ESI / MS / MS により「方法」で記載した通り分析した。示した結果は親アミノ酸に対する酸化アミノ酸のモル比として示した正常大動脈および患部の総タンパク質または記載したリポタンパク質のニトロチロシンおよびクロロチロシン含有量の中央値および 4 分位範囲である。記載した p 値はヒト正常大動脈およびアテローム性動脈硬化症患者部由来の記載した単離されたりポタンパク質中のニトロチロシンまたはクロロチロシン含有量を正常または患部の大動脈組織の総タンパク質において観察された相当する含有量と対比させたものである。患部 apoA - I と正常大動脈組織 apoA - I の比較に関する * P < 0.001。

【0101】

本試験は動脈壁におけるニトロ化および塩素化の優先的標的としての HDL の主要タンパク質成分である apoA - I の最初の直接の証拠並びに HDL のプロアテローム形成性

形態の発生のための潜在的機序を与えるものである。ヒトアテローム性動脈硬化症患者および全身循環の両方において観察された apoA-I の NO₂ Tyr および Cl Tyr 含有量の顕著な選択的リッチ化は、NO 誘導酸化剤および MPO 触媒反応が酸化改変についてリポタンパク質を選択的にターゲティングすることを示している。本発明者らは患者 apoA-I において 5,500 μmol の ox-アミノ酸 (ox-AA) / mol の複合 ox-AA 含有量を観察した (表 5)。apoA-I 当たり 7 チロシン残基および HDL 粒子当たり 4 個以下の apoA-I 分子が存在するとすれば、ヒト大動脈患者から回収した HDL 様粒子の平均 15% が少なくとも 1 つの酸化改変を保有していると本発明者らは計算している (即ち $5.5 \text{ ox-AA} / 10^3 \text{ Tyr} \times 7 \text{ Tyr} / \text{apoA-I} \times 4 \text{ apoA-I} / \text{HDL 粒子} = 15.4\%$)。10,000 ~ 25,000 μmol ox-AA / mol Tyr の範囲の複合 ox-AA 含有量を示す最高の 4 分位値の場合、この最高の 4 分位値における患者 HDL の注目すべき 28% ~ 50% が Cl Tyr または NO₂ Tyr 残基のいずれかを保有する。MPO、HOC1 改変タンパク質および apoA-I は全て内皮下のコンパートメントの保護された環境内に共局在化しているため、この数値は一部の位置においては更に高値となることは想像に難くない。MPO により生成される酸化生成物の選択的リッチ化は CVD を有する個体の循環 HDL およびヒトアテローム性動脈硬化症患者において最も顕著であったが、明らかなリッチ化はまた健康者被験体の血清および移植ドナー大動脈組織から回収した apoA-I においても観察され、apoA-I の MPO 結合および MPO により形成された酸化剤の捕獲のための潜在的な生理学的抗炎症 / 抗酸化剤の役割を示唆している。

10

20

【0102】

(B. apoA-I ペプチドフラグメント研究)

本試験は apoA-I の MPO 媒介改変に関連する分子事象を明らかにし、そして apoA-I の機能の改変にこれらの事象を特に相関付ける。本発明者らは、タンデム質量スペクトル分析により MPO 媒介ニトロ化および塩素化の部位をマッピングしており、そして今回タンパク質の 2 つの領域の特定の改変を明らかにする。本発明者らはまた改変の階層構造を明らかにし、そして、ヘリックス 8 領域における MPO 相互作用部位による MPO 触媒塩素化およびニトロ化の両方により改変された好ましい残基の共局在を報告する。apoA-I の MPO 媒介部位特異的改変の用量依存的進行と ABCA1-依存性逆コレステロール輸送および apoA-I 脂質結合の抑制の両方との間には強力な相関が観察されている。1 つのデータは MPO 触媒部位特異的 apoA-I 改変と HDL の重要な抗アテローム性動脈硬化症機能の消失との間の繋がりを示唆している。即ち、動脈壁における apoA-I の MPO 触媒酸化改変は MPO と心臓血管疾患の間の臨床的関連性に寄与していると考えられる。

30

【0103】

(実験手順)

(HDL および apoA-I の改変反応)

Cleveland Clinic Foundation の Institutional 評議会により認可された試験プロトコルに関する同意書を提出した健康者ドナーより全血を採取した。示差超遠心分離を用いて HDL をヒト血漿から単離 (密度範囲 - 1.063 g/mL ~ 1.210 g/mL) し、4 暗所において 100 μM ジエチレントリアミン 4 酢酸 (DTPA) を用いて 50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 中で十分透析した。脱脂質化され精製された apoA-I は Biodesign International (Saco, ME) より購入し、更に精製することなく使用した。

40

【0104】

MPO 媒介改変反応は 100 μM DTPA、1 mg/mL タンパク質 (apoA-I)、57 nM 精製ヒト MPO (ドナー: 過酸化水素、オキシドレダクターゼ、EC 1.11.1.7; A₄₃₀ / A₂₈₀ 比 0.79) および 1 mM 亜硝酸 (ニトロ化反应用) または 100 mM 塩化物 (塩素化反应用) のいずれかを含有する 50 mM リン酸塩緩衝液 pH 7.0 中で実施した。ミエロペルオキシダーゼ反応は種々の濃度 (0 ~ 200 μM)

50

において過酸化水素を添加することにより開始し、そして1時間37℃で実施した。これらの反応条件はMPO、塩化物および亜硝酸の生理学的に該当する量、および生理学的～病理学的の範囲にわたる過酸化水素濃度を包含する。

【0105】

パーオキシニトライトおよびHOC1の反応は0～200 μMの終濃度を与えるように添加されたパーオキシニトライトおよびHOC1と共に100 μM DTPAを含有する50 mMリン酸塩緩衝液pH7.0中で1時間37℃で同様に実施した。

【0106】

全反応において、重要な反応体の濃度は、MPOについては430 nmにおいて170 cm⁻¹ mM⁻¹、過酸化水素については240 nmにおいて39.4 cm⁻¹ M⁻¹、HOC1 (NaOC1) については292 nmにおいて350 cm⁻¹ M⁻¹、そして、パーオキシニトライトについては302 nmにおいて1670 cm⁻¹ M⁻¹ のモル消光係数を用いて分光光度計分析により確認した。

10

【0107】

改変されたタンパク質を採取し、即座に下記apoA-I機能試験に付した。各反応物少量を取り出し、アセトンで沈殿させ、SDS-PAGEで分離して質量スペクトル分析実験に付した。

【0108】

(質量スペクトル分析実験)

(タンパク質消化)

タンパク質バンドをゲル内消化の手順に従って消化した(Kinter, M., and Sherman, N.E. (2000). Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry. John Wiley and Sons, New York)。概すれば、タンパク質バンドをゲルから切り出し50%エタノール/5%酢酸で洗浄した後に室温で一夜、改変配列決定等級トリプシン(Promega, Madison, WI)でトリプシン消化した。ペプチドをゲルから抽出し、蒸発乾固させ、1%酢酸または0.1%ギ酸の何れかで再調製し、キャピラリーカラムHPLC電子スプレーイオン化質量スペクトル分析に付した。

20

【0109】

(改変部位の同定)

詳細なマッピングおよびニトロ化および塩素化の部位の検出はナノスプレーイオン化発生源(Protana, Odense, Denmark)を装着したLCQ Decaイオントラップ質量スペクトル分析システム(ThermoFinnigan, San Jose, CA)を用いて実施した。発生源は200 nl/mlの流量でマイクロスプレー条件下に運転した。消化物はNew Objective Corp. (Woburn, MA)より購入した15 μm内径の先端の付いた50 μm内径のカラムを用いた逆相キャピラリーHPLCにより分析した。カラムには～6 cmのC18パッキン材(Phenomenex, Torrence, CA)を充填し、50 mM酢酸中漸増量のアセトニトリル(2～70%)の45分間勾配を用いて溶離した。データはデータ依存性のモードで獲得し、反復サイクルにおいて質量スペクトルおよび3つの衝突誘導解離(CID)スペクトルを記録した(Kinter, M., and Sherman, N.E. (2000). Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry. John Wiley and Sons, New York)。Sequestを用いて全ての記録されたCIDスペクトルをヒトapoA-Iの配列(NCBIアクセッション番号229513)と比較するためにはプログラムSequestを使用し、そして塩素化については+34 Daおよびニトロ化については+45 Daのチロシン残基質量の適切な変化を考慮した。

30

40

【0110】

(タンパク質改変の部位特異的定量)

50

部位特異的定量実験はオートインジェクターを有するCapLC HPLCシステム(Waters)を装着したQToFmicro質量スペクトル分析システム(Waters, Milford, MA)上で実施した。電子スプレーイオン化発生源は600nL/分の流量でマイクロスプレー条件下で運転した。消化物は内径19 μ mのナノスプレー発生源キャピラリーを有する内径75 μ mのカラムを用いた逆相キャピラリーHPLCにより分析した。カラムには10 μ mのC18パッキン材(Phenomenex, Torrance, CA)~15cmを充填し、そして0.1%ギ酸中漸増量のアセトニトリル(2~70%)の45分間勾配を用いて溶離した。定量は選択イオンモニタリングモード(SIM)において翻訳後改変(38, 39)の部位特異的定量のために開発されたNative Reference Peptide法を用いることにより行った。SIM実験のためには、QToF instrumentのtime-of-flight質量分析器および目的の種々のペプチドイオンのm/z値に基づいて構築された質量クロマトグラムを用いてm/z300~m/z1600のフルスキャンを得た。apoA-IペプチドATEHLSTLSEK配列番号9およびQGLLPVLESEFK配列番号10をネイティブの比較参照ペプチドとして使用した。各分析対象の相対量は比較参照ペプチドのクロマトグラフィーピーク面積でその分析対象ペプチドのクロマトグラフィーピーク面積を割ることにより求めた。

10

【0111】

(apoA-Iの機能の試験)

(コレステロール流出)

20

コレステロール流出実験は確立された手順に従って実施した(Smith, J. D., Miyata, M., Ginsberg, M., Grigaux, C., Shmookler, E., and Plump, A. S. (1996) J. Biol. Chem. 271, 30647-30655, Takahashi, Y., and Smith, J. D. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 11358-11363)。24穴ディッシュ中のサブコンフルエントのRAW264.7細胞にコレステロール負荷し、[³H]コレステロール標識アセチル化低密度リポタンパク質(AcLDL)を含有するDGGB(50mMグルコース、2mMグルタミンおよび0.2%BSA添加DMEM)0.5mL中で一夜標識した。[³H]コレステロール標識AcLDLはAcLDLと共に37で30分間[³H]コレステロールをインキュベートすることにより調製し、そして、0.33 μ Ci/ml[³H]コレステロールを含有する50 μ g/ml AcLDLの終濃度となるようにDGGBで希釈した。標識の翌日、細胞をPBS、0.2%BSAで3回洗浄し、16時間0.1mM8-Br-cAMPの存在下または非存在下にDGGB0.5mLと共にインキュベートした。16時間インキュベートした後、8-Br-cAMPの存在下または非存在下のDGGB0.5mL中のHDLタンパク質50 μ g/mLを各ウェルに添加した。37で4時間インキュベートした後、培地100 μ Lを採取し、遠心分離し、培地中の流出コレステロールの尺度として放射能を計数した。各ウェルの該当する細胞をヘキサソノイソプロパノール(3:2、v:v)で抽出し、細胞中に保持されているコレステロールの尺度として放射能を測定した。流出したコレステロールのパーセンテージは総放射能(培地中放射能+細胞放射能)で割った培地中の放射能として計算した。

30

40

【0112】

(脂質の結合)

LDL凝集試験は以前に記載された試験の変法によりapoA-I脂質結合を試験するために使用した(Liu, H., Scraba, D. G., and Ryan, R. O. (1993) FEBS Lett. 316, 27-33)。96穴の試験プレート中、LDL75 μ gを最終容量200 μ Lの反応緩衝液(50mMトリス塩酸、pH7.4, 150mM NaClおよび2mM CaCl₂含有)中3 μ gの対照または改変apoA-Iの存在下または非存在下に混合した。各反応は3連で実施した。次にプレートを10分間37でSpectraMaxプレートリーダー(Molecular Device

50

es, Sunnyvale, CA) 中インキュベートした。1 時間で凝集を誘導するのに十分なバチルス・セレウス誘導希釈ホスホリパーゼ C (Sigma P7147) または緩衝液対照の $20 \mu\text{l}$ 区分を各ウェルに添加してリン脂質の極性先端基を加水分解することにより LDL 表面を疎水性とし、凝集を開始した。37 における凝集は 478 nm における吸光度でモニタリングし、1 時間に渡り 2 分おきに読み取った。apo A - I 脂質結合活性は LDL 凝集の抑制をもたらし、短時間の遅れの後に起こる急速段階の間の凝集速度 (O.D./分) から計算した。改変 apo A - I に関する凝集速度はネイティブの apo A - I の速度に対して規格化した。

【0113】

(ヒトアテローム中の改変 apo A - I の検出)

(apo A - I の単離)

ヒトアテローム組織を死亡 10 時間以内に剖検時に得られた大動脈から単離した。組織を $100 \mu\text{M}$ DTPA 添加氷冷リン酸塩緩衝食塩水中で即座にすすぎ、そして即座に -80°C 窒素下、 $100 \mu\text{M}$ DTPA および $100 \mu\text{M}$ ブチル化ヒドロキシトルエン含有 65 mM リン酸ナトリウム中で分析時まで凍結した。

【0114】

ヒト胸大動脈の脂肪線条および中間患部を液体窒素温度においてステンレス製の乳鉢と乳棒を用いて粉末化し、 $100 \mu\text{M}$ DTPA およびプロテアーゼインヒビターカクテル (Sigma カタログ No. P8340) を含有する PBS と 10 時間 4 で混合した。懸濁患部サンプルを遠心分離し、上澄みを apo A - I の精製に使用した。精製においては、apo A - I を抗 HDL IgY 樹脂 (GenWay Biotech, San Diego, CA) に結合させ、 0.1 M グリシン ($\text{pH} 2.5$) で溶離し、そして溶出液を 1 M トリス ($\text{pH} 8.0$) に添加することにより中和した。中和したサンプルを加熱することなくサンプル負荷緩衝液中に溶解し、 12.5% SDS - PAGE ゲル (Criterion, BioRad Laboratories) 中で泳動し、クーマシーブルー染色により検出した。SDS - PAGE 分析によればカラムから回収されたタンパク質の $>90\%$ が apo A - I であることがわかった。

【0115】

(LC タンデム MS 分析)

免疫アフィニティー単離 apo A - I バンドをゲルから切り出し、上記した通りトリプシンで消化した。LC タンデム MS 実験では Surveyor HPLC ポンプおよびオートサンプラーシステムを有する ThermoFinnigan LTQ リニアイオントラップ質量スペクトル分析器を使用した。サンプルは $10 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$ 内径のキャピラリーカラムに注入し、これを約 $1 \mu\text{L}/\text{分}$ で 50 mM 酢酸中のアセトニトリルの直線勾配により溶離させた。選択反応モニタリング実験 (SRM) を用いてマッピング実験において特性化された各改変チロシン残基を含有するペプチドの分子イオンの生成物イオンスペクトルを記録した。これらのペプチドのクロマトグラムは、該当する CID スペクトル中で最も大量の生成物イオンへの分子イオンのフラグメント化をプロットすることにより再構築した。適切なペプチドの検出はその保持時間において記録された CID スペクトルにより確認した。

【0116】

(統計学的分析)

統計学的有意差は Turkey - Kramer の多重比較試験を用いた一元分散分析または Student の t 検定の何れかにより求めた。統計学的有意差は $p < 0.05$ の場合に報告する。

【0117】

(実施例 4 apo A - I におけるニトロ化および塩素化の部位のマッピング)

初期の実験は種々の濃度の過酸化水素を用いた酵素改変系 ($\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{NO}_2^-$) および種々の濃度のパーオキシニトライトを用いた非酵素系の両方で HDL を処理することにより生産した apo A - I におけるチロシンニトロ化部位を検出することに着目

10

20

30

40

50

していた。各処理の後、HDL中のタンパク質を冷アセトンで沈殿させ、SDS-PAGEで分離し、そしてapoA-Iバンドをゲルから切り出してトリプシンによるゲル内消化に付した。消化物はイオントラップ質量スペクトル分析システムのデータ依存性モードを用いてキャピラリーカラムHPLCタンデム質量スペクトル分析により分析した。約2000CIDスペクトルが記録され、これらのスペクトルは改変ペプチドのスペクトルについて検索した。検索作業はapoA-Iのアミノ酸配列に着目し、ニトロ化ペプチドのスペクトルを発見するために+45Daのチロシン残基質量差を用いた。これらの分析ではタンパク質配列の95%に相当するペプチドが検出され、それには成熟apoA-I配列内のチロシン残基7個全てを含有していたペプチドも含まれていた。ニトロチロシン残基を含有する2ペプチド(Y192およびY166)が過酸化水素濃度<50μMにおいてMPO/H₂O₂/NO₂⁻で処理したHDL中に検出された。より高い過酸化水素濃度(>100μM)においては、別のニトロチロシン含有ペプチド(Y29およびY236)も検出された。3残余チロシン残基はこれらの分析において検出され配列決定されたペプチドに含有されていたが、試験した如何なる反応条件下においても相当するニトロ化形態は検出されなかった。比較として100μMパーオキシニトリルとのHDLの同様の反応では3チロシン残基におけるapoA-Iのニトロチロシン改変; Y166、Y18およびY236が生じた。ここでもまた、残余のチロシン残基は未ニトロ化形態においてのみこれらの分析で検出された。

10

【0118】

5ニトロ化ペプチドのCIDスペクトルを図1に示す。各ペプチドに付き該当するCIDスペクトルに記録された生成イオンのシリーズにより同一性が確立される。これらのCIDスペクトルの成分はニトロチロシン部分の特徴的残基質量である(208Da)。全体として、ペプチド分子量測定、CIDスペクトルにおけるペプチド配列情報および既知apoA-Iアミノ酸配列の組合せにより、ニトロチロシン位置の明確な帰属が可能となる。

20

【0119】

その後の実験においてはHDLを改変するための酵素的(MPO/H₂O₂/Cl⁻)および非酵素的(HOCl)反応の両方による相補タンパク質塩素化系を使用した。塩素化のための4部位、即ちY192、Y166、Y29およびY236がこれらの反応の両方において検出された。これらはMPO/H₂O₂/NO₂⁻反応によりニトロ化されたチロシン残基と同様であった。ニトロ化部位で観察されたとおり、Y192およびY166の塩素化は過酸化水素濃度<50μMで検出されたのに対し、Y29およびY236の塩素化は>100μM過酸化水素を必要とした。パーオキシニトライト処理で観察されたY18ニトロ化部位はMPO-またはHOCl-媒介反応の何れによっても塩素化されなかった。図2は4塩素化ペプチドのCIDスペクトルを含む。これらのCIDスペクトルはクロロチロシンの残基質量を含むフラグメント化パターンを特徴とする(より大量の³⁵Cl同位体については197Da)。ニトロ化ペプチドについて上記した通り、ペプチド分子量、CIDスペクトルにおける情報およびapoA-Iアミノ酸配列の組合せによりクロロチロシン位置の明らかな帰属が可能となる。

30

【0120】

(実施例5. 定量的分析による好ましい改変部位の発見)

apoA-Iにおけるニトロ化および塩素化部位の包括的な地図を図3に示す。初期マッピング実験の間に行われた1つの観察は種々の改変の潜在的階層構造であり、MPO媒介ニトロ化/塩素化部位の2つは、他の2つ、即ちパーオキシニトライトで改変されなかった1MPO媒介改変部位およびMPOで改変されなかった1パーオキシニトライト改変部位より先に改変された。その結果、ニトロ化および塩素化の部位の順序を特に決定するために定量的な実験を設計した。

40

【0121】

これらの定量的な実験はトリプシン消化により形成されるそれぞれのチロシン含有ペプチドとして示されるapoA-Iの種々の領域の消失を追跡するための以前に本発明者ら

50

が記載した Native Peptide Reference 法を用いた (Willard, B. B., Ruse, C. I., Keightley, J. A., Bond, M., and Kinter, M. (2003) Anal. Chem. 75, 2370-2376, Ruse, C. I., Willard, B., Jin, J. P., Haas, T., Kinter, M., and Bond M. (2002) Anal. Chem. 74, 1658-1664)。HDL は MPO 媒介反応において H_2O_2 漸増量、または非酵素的反応においてパーオキシニトライトおよび $HOCl$ の漸増量でニトロ化または塩素化条件下に処理した。反応は -20 のアセトンでタンパク質を沈殿させることにより停止させ、SDS-PAGE により分離した。apo A-I バンドを切り出してトリプシン消化に付し、そして消化物はキャピラリーカラム LC-ESI-MS で分析した。apo A-I の個々の部位の MPO 媒介改変の進行は各チロシン含有ペプチドの質量クロマトグラムをプロットし、そして未改変のネイティブの比較参照ペプチドとの相対比較における各々のピーク面積比を計算することによりモニタリングした。図 4 B および 5 B に示す通り、apo A-I の各部位における H_2O_2 の漸増濃度による MPO 媒介改変の進行は消化物中の各々の未改変ペプチドの回収率低下をもたらす。これらのデータは Y192 が好ましい MPO 触媒ニトロ化および塩素化の部位として作用し、それに続くものが Y166 および Y29 であり、そして酸化剤のより高濃度においても Y236 の改変は極少程度のみであった。酸化改変の匹敵するパターンもまた $HOCl$ 反応において観察された。注目すべき点は $HOCl$ 反応の相対的有効性は MPO 触媒塩素化反応のものよりも有意に低値であった。特に MPO 触媒酸化反応はモル等量の $HOCl$ と相対比較して検討した H_2O_2 の各濃度においてより高値の改変をもたらした。一方、パーオキシニトリル反応の用量応答特性は改変反応の効率および Y18 のニトロ化の明確な優先性および Y192 におけるニトロ化の非存在の両方において異なっていた。

【0122】

(実施例 6 . 酸化的に改変された apo A-I の機能的な障害)

図 4 A および 5 A は ABCA1 媒介コレステロール流出特性に対する HDL の改変の用量依存的作用を示す。HDL は MPO / H_2O_2 / NO_2^- 系、パーオキシニトライト、MPO / H_2O_2 / Cl^- 系または $HOCl$ で処理した。次に 8 Br - cAMP による前処理の存在下および非存在下においてコレステロール負荷マウスマクロファージ RAW264.7 細胞と共に処理サンプルをインキュベートすることによりコレステロールの流出を測定した。8 Br - cAMP の非存在下においては、RAW264.7 細胞は ABCA1 のかなりのレベルを発現することではなく、そして HDL への ABCA1 依存性コレステロール流出を支援するが apo A-I へのコレステロール流出はない (Smith, J. D., Miyata, M., Ginsberg, M., Grigaux, C., Shmookler, E., and Plump, A. S. (1996) J. Biol. Chem. 271, 30647-30655, Remaley, A. T., Stonik, J. A., Demosky, S. J., Neufeld, E. B., Bocharov, A. V., Vishnyakova, T. G., Eggerman, T. L., Patterson, A. P., Duverger, N. J., Santamarina-Fojo, S., and Brewer, H. B., Jr. (2001) Biochem. Biophys. Res. Comm. 280, 818-823, Takahashi, Y., Miyata, M., Zheng, P., Imazato, T., Horwitz, A., and Smith, J. D. (2000) Biochim. Biophys. Acta. 1492, 385-394, Chen, W., Sun, Y., Welch, C., Gorelik, A., Leventhal, A. R., Tabas, I., and Tall, A. R. (2001) J. Biol. Chem. 276, 43564-43569)。RAW264.7 細胞の 8 Br - cAMP 処理は ABCA1 mRNA およびタンパク質を誘導し、HDL への約 2 倍高値のコレステロール流出および脂質非含有 apo A-I へのコレステロール流出の顕著なレベルを可能にしている (Smith, J. D., Miyata, M., Ginsberg, M., Grigaux, C., Shmookler, E

. , and Plump, A. S. (1996) J. Biol. Chem. 271, 30647 - 30655, Takahashi, Y., and Smith, J. D. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 11358 - 11363, Remaley, A. T., Stonik, J. A., Demosky, S. J., Neufeld, E. B., Bocharov, A. V., Vishnyakova, T. G., Eggerman, T. L., Patterson, A. P., Duverger, N. J., Santamarina-Fojo, S., and Brewer, H. B., Jr. (2001) Biochem. Biophys. Res. Comm. 280, 818 - 823, Takahashi, Y., Miyata, M., Zheng, P., Imazato, T., Horwitz, A., and Smith, J. D. (2000) Biochim. Biophys. Acta. 1492, 385 - 394)。従って、8 Br - cAMP 前処理の存在または非存在は ABCA1 依存性および非依存性のコレステロール流出の両方の測定を可能にする。図 7 A および 8 A に示す通り、MPO 媒介のニトロ化および塩素化の反応、および、HOC1 処理は HDL への ABCA1 非依存性の流出に影響することなく HDL への ABCA1 依存性コレステロール流出の用量依存的な損失をもたらした。全体として、種々の改変反応による機能的障害に関する効率の順位付けは MPO 媒介塩素化 > HOC1 塩素化 > MPO 媒介ニトロ化 > パーオキシニトライトニトロ化であった。

【0123】

H₂O₂ のみにより処理された HDL の対照反応は ABCA1 依存性コレステロール流出の低下を示さず、MPO 触媒パーオキシダーゼ反応の重大な性質を示した。同じチロシン残基もまた改変され、そして、完全 MPO 媒介改変系により処理した脂質非含有 apoA - I を用いた対照試験で低減された ABCA1 依存性コレステロール流出の同じパターンが観察された（データ示さず）。これらの結果は脂質の改変ではなくタンパク質の改変と合致しており、流出活性の損失の原因である。

【0124】

apoA - I の脂質結合特性に対する MPO 媒介改変の作用もまた試験した。これらの実験はホスホリパーゼ C (PLC) で処理した LDL の凝集を抑制する apoA - I の能力をモニタリングすることにより apoA - I の脂質結合活性を測定している。apoA - I の抑制は apoA - I 媒介コレステロール流出における初期工程である脂質結合過程を介した改変疎水性 LDL をコーティングするその能力によるものである。図 6 に示す通り、PLC で処理した LDL は未改変の apoA - I または過酸化水素単独で前処理した apoA - I の脂質結合活性により有意に低減された時間依存性凝集をもたらしている（図 9 A）。MPO 媒介のニトロ化および塩素化の系（それぞれ MPO / H₂O₂ / NO₂⁻ および MPO / H₂O₂ / Cl⁻）による apoA - I の前処理はこの還元を有意に抑制し、ニトロ化反応は 10 % 抑制をもたらし、塩素化反応は 35 % 抑制をもたらした。同一の改変または対照の apoA - I の製剤を ABCA1 依存性脂質流出レセプター活性に関して試験し、そして、apoA - I の脂質結合活性の低下は ABCA1 依存性流出レセプター活性の観察された損失と直接関連していた（図 9 B）。

【0125】

（実施例 7 . インビボで観察される特異的 apoA - I 改変部位）

上記した MPO によるインビトロで改変された apoA - I の LC タンデム MS 試験ではインビボの評価のための一連の改変部位が得られた。図 7 はヒトアテローム組織から単離した apoA - I の LC タンデム MC 分析から得られた SRM クロマトグラムのシリーズを示す。2 つの一次ニトロ化部位においてニトロ化を含有するペプチドの溶離は、Y192 および Y166 それぞれ図 7 A および 7 C のクロマトグラムに示す通りである。これらの保持時間において記録された CID スペクトル（それぞれ図 10 B および 10 D）はこれらのニトロ化ペプチドの正確な同一性の明確な証明を与えている。未改変ペプチドと相対比較した場合のニトロ化されたペプチドの量は各クロマトグラフィーピーク面積を積分することにより Y192 含有ペプチドで 9 %、そして Y166 含有ペプチドで 0.2 %

と推定できる。これらの数値はニトロ化対未ニトロ化のペプチドの相対的 LC - MS 応答が測定されていないため、推定値とみなすべきである。インビトロの実験を介して同定された二次ニトロ化部位をターゲティングする同様の実験ではニトロ化された形態において Y 29 および Y 236 含有ペプチドを検出することができなかった（データ示さず）。これらのニトロ化ペプチドを検出することが不可能であったことは、これらの部位の MPO 媒介ニトロ化の比較的不良な効率と合致している。

【0126】

本発明者らは部位特異的塩素化ペプチドの存在を確認する試みを行った。Y 192 位に塩素化を含有するペプチドは、この部位がインビトロモデルにおける塩素化の好ましい部位として同定されたにもかかわらず、検出されなかった（データ示さず）。Y 166 位において塩素化を含有するペプチドは、CID スペクトル（下パネル図 7D）が Y 166 の塩素化および Y 166 の酸化を含有するペプチドイオンが重複したスペクトルを示し、トリヒドロキシフェニルアラニンを示しているにも関わらず、検出されなかった（下パネル図 7B）。この酸化ペプチドは相当する塩素化物質種より 2 Da 小さい分子量を有する。しかしながら二重に荷電したイオンであるため、塩素化および酸化のペプチドは質量スペクトル分析器の m/z スケールにおいては 1 Da の差となる。この m/z 差はイオントラップ検出器の質量分析の第 1 段階の 2 Da 許容度のウインドウにおいては識別不可能である。得られた単一荷電のフラグメントイオンは 2 Da 差があり、CID スペクトルにおいて識別可能である。

10

【図面の簡単な説明】

20

【0127】

【図 1】図 1 はニトロチロシン含有ペプチドの衝突誘導解離（CID）スペクトルを示す。スペクトルは方法において記載する通り、MPO / H₂O₂ / NO₂⁻ タンパク質ニトロ化系（A - D）またはパーオキシニトライト（E）の何れかで処理した HDL に由来する apo A - I のバンドのゲル内トリプシン消化物の分析の間に得られた。二重または三重に荷電されたイオン（記載通り）を検出し、イオントラップ質量スペクトル分析システムを用いた LC タンデム MS 実験においてフラグメント化した。スペクトル A および D において配列決定したペプチドは MPO 媒介反応においてのみ検出された。スペクトル B および C において配列決定したペプチドは MPO 媒介およびパーオキシニトライト媒介反応の両方において検出された。スペクトル E において配列決定されたペプチドはパーオキシニトライト媒介反応においてのみ検出された。

30

【図 2】図 2 はクロロチロシン含有ペプチドの衝突誘導解離（CID）スペクトルを示す。スペクトルは方法において記載する通り、MPO / H₂O₂ / Cl⁻ タンパク質塩素化系の何れかで処理した HDL に由来する apo A - I のバンドのゲル内トリプシン消化物の分析の間に得られた。二重または三重に荷電されたイオン（記載通り）を検出し、イオントラップ質量スペクトル分析システムを用いた LC タンデム MS 実験においてフラグメント化した。同じシリーズのペプチドを MPO および HOC1 媒介反応の両方において配列決定した。

【図 3】図 3 は apo A - I 改変部位の総括である。それぞれの反応により改変された特定のチロシン残基を示す。アミノ酸配列（配列番号 1）は成熟 apo A - I タンパク質に対する NCBI アクセッション番号 229513 に基づく。この論文において引用された全てのアミノ酸残基のナンバリングは成熟タンパク質のこのアミノ酸配列を指す。

40

【図 4】図 4 は用量依存性の apo A - I ニトロ化および逆コレステロール輸送活性の障害を示す。HDL は 1.5 時間、記載の通り、漸増量の H₂O₂ を有する MPO / H₂O₂ / NO₂⁻ 反応またはパーオキシニトライトの何れかのシリーズにおいてニトロ化した。A) HDL の ABCA1 依存性逆コレステロール流出に対するニトロ化反応の作用。各反応の改変 HDL はその後、³H コレステロール標識アセチル化低密度リポタンパク質（AcLDL）を負荷したマウス RAW 264 マクロファージと共にインキュベートした。これらの細胞に cAMP 存在下で改変 HDL を投与することにより逆コレステロール輸送の ABCA1 依存性成分を測定した。4 時間後、培地および細胞内の ³H を計数し、総 ³

50

H コレステロール (培地 + 細胞内) で割った培地中の ^3H コレステロールの量としてパーセント流出を計算した。全数値は未改変 HDL で得られた ABCA1 依存性コレステロール流出に対して規格化した。B) LC-MS を用いて測定した apoA-I ニトロ化の部位特異的定量。改変 HDL 反応中のタンパク質を冷アセトンで沈殿させ、SDS-PAGE で分離し、クーマシーブルー染色により検出した。apoA-I をゲルから切り出し、そして、トリプシン消化した。ニトロ化反応の進行はネイティブの比較参照ペプチド法を用いて定量的に追跡した。ネイティブの比較参照ペプチドに対する各目的のチロシンを含有する各トリプシンペプチドのピーク面積比を測定した。各ペプチドのパーセント改変は未投与対照と相対比較した各ペプチドの量の低減に基づいて求めた。

【図 5】図 5 は用量依存性の apoA-I 塩素化および逆コレステロール輸送活性の障害を示す。HDL は 1.5 時間、記載の通り、漸増量の H_2O_2 を有する MPO / H_2O_2 / Cl^- 反応または HOC1 の何れかのシリーズにおいて塩素化した。A) HDL の ABCA1 依存性逆コレステロール流出に対する各塩素化反応の作用。流出はニトロ化産物に関して図 4 に記載したものと同様の方法を用いて求めた。B) LC-MS を用いて測定した apoA-I 塩素化の部位特異的定量。これらの部位を検出して特性化するために用いた方法は図 4 に示す通りである。

【図 6】apoA-I の改変は ABCA1 依存性コレステロールレセプター活性と同調して脂質の結合を抑制する。A) apoA-I 脂質結合活性は 37 °C、1 時間の過程に渡ってホスホリパーゼ C (PLC) 誘導 LDL 凝集を抑制するその能力により試験した。3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の apoA-I または H_2O_2 改変 apoA-I は概ね同程度まで LDL 凝集を低減した。未改変 apoA-I と比較して、完全 MPO / H_2O_2 / Cl^- 改変系および程度は低下するが MPO / H_2O_2 / NO_2^- 系も PLC 投与 LDL に結合してその凝集を抑制する能力が低下した apoA-I をもたらした。数値は 3 連のウェルの平均を示す。apoA-I が LDL 凝集を抑制する能力は用量依存的であった (データ示さず)。B) 脂質結合は図 6 A に示す実験の初期の傾きから計算し、そして未改変 apoA-I の数値に対して規格化した (x 軸)。同一の apoA-I 調製物を用いて 3 連で 8 Br-cAMP 投与 RAW264.7 からの ABCA1 依存性脂質流出を試験し (図 5 に示す)、未改変の apoA-I に関する数値に対して規格化した (y 軸)。MPO 改変は脂質の結合および ABCA1 依存性のコレステロールレセプター活性の両方の同調した低減をもたらした (直線回帰 $r^2 = 0.96$ 、 $p < 0.0001$)。

【図 7】図 7 は LC タンデム質量スペクトル分析によるヒトアテローム組織から単離された apoA-I 中のニトロ化ペプチドの検出を示す。ヒトアテローム組織から免疫アフィニティー精製された apoA-I のゲル内トリプシン消化の後の未改変、ニトロ化および塩素化されたペプチドのインビボの検出のための選択反応モニタリングクロマトグラム (SRM)。A) インビトロ実験で測定された望ましい Y192 部位を含有するペプチドの未改変およびニトロ化形態の検出。B) ペプチドの同一性とニトロ化の位置を確認するためのこの保持時間において記録された CID スペクトル。C) 二次的な Y166 部位を含有するペプチドの未改変、ニトロ化および塩素化形態 (それぞれ上から下へ) の検出。同様に、この保持時間 (D) で記録された CID スペクトルはペプチドの同一性およびニトロ化および塩素化の位置を確認している。ニトロ化ペプチドの CID スペクトルは明白ではなく、推定塩素化ペプチドの分子イオンの CID スペクトルもまた、同時に溶出し同様の分子量を有するこのペプチドのトリヒドロキシフェニルアラニン含有形態と顕著に重複している。

【図 8 A】図 8 は LC タンデム質量スペクトル分析によるヒトアテローム組織から単離された apoA-I 中のニトロ化ペプチドの検出を示す。ヒトアテローム組織から免疫アフィニティー精製された apoA-I のゲル内トリプシン消化の後の未改変、酸化ペプチドのインビボの検出のための選択反応モニタリングクロマトグラム (SRM)。A) apoA-I の酸化ペプチド ($\text{T}_{161} - \text{R}_{171}$) の CID スペクトル。トリヒドロキシフェニルアラニン (TOPA) またはチロシンヒドロキシパーオキシドと同一の質量を有する残基は CID スペクトルを用いて 166 位に検出される。B) apoA-I の未改変ペ

10

20

30

40

50

チド ($D_{28} - K_{40}$) の CID スペクトル。C) apoA-I の酸化ペプチド ($D_{28} - K_{40}$) の CID スペクトル。TOPA またはチロシンヒドロキシパーオキシドと同一の質量を有する残基が 29 位に検出され、そして、ジヒドロキシフェニルアラニンが 33 位に検出される。

【図 8 B】図 8 は LC タンデム質量スペクトル分析によるヒトアテローム組織から単離された apoA-I 中のニトロ化ペプチドの検出を示す。ヒトアテローム組織から免疫アフィニティー精製された apoA-I のゲル内トリプシン消化の後の未改変、酸化ペプチドのインビボの検出のための選択反応モニタリングクロマトグラム (SRM)。A) apoA-I の酸化ペプチド ($T_{161} - R_{171}$) の CID スペクトル。トリヒドロキシフェニルアラニン (TOPA) またはチロシンヒドロキシパーオキシドと同一の質量を有する残基は CID スペクトルを用いて 166 位に検出される。B) apoA-I の未改変ペプチド ($D_{28} - K_{40}$) の CID スペクトル。C) apoA-I の酸化ペプチド ($D_{28} - K_{40}$) の CID スペクトル。TOPA またはチロシンヒドロキシパーオキシドと同一の質量を有する残基が 29 位に検出され、そして、ジヒドロキシフェニルアラニンが 33 位に検出される。

10

【図 8 C】図 8 は LC タンデム質量スペクトル分析によるヒトアテローム組織から単離された apoA-I 中のニトロ化ペプチドの検出を示す。ヒトアテローム組織から免疫アフィニティー精製された apoA-I のゲル内トリプシン消化の後の未改変、酸化ペプチドのインビボの検出のための選択反応モニタリングクロマトグラム (SRM)。A) apoA-I の酸化ペプチド ($T_{161} - R_{171}$) の CID スペクトル。トリヒドロキシフェニルアラニン (TOPA) またはチロシンヒドロキシパーオキシドと同一の質量を有する残基は CID スペクトルを用いて 166 位に検出される。B) apoA-I の未改変ペプチド ($D_{28} - K_{40}$) の CID スペクトル。C) apoA-I の酸化ペプチド ($D_{28} - K_{40}$) の CID スペクトル。TOPA またはチロシンヒドロキシパーオキシドと同一の質量を有する残基が 29 位に検出され、そして、ジヒドロキシフェニルアラニンが 33 位に検出される。

20

【図 9】図 9 はミエロペルオキシダーゼに関する速度論的モデルである。

【図 10】図 10 は特定のミエロペルオキシダーゼにより生成された反応性の中間体および一部の MPO により生産された酸化生成物の模式図である。

【図 1】

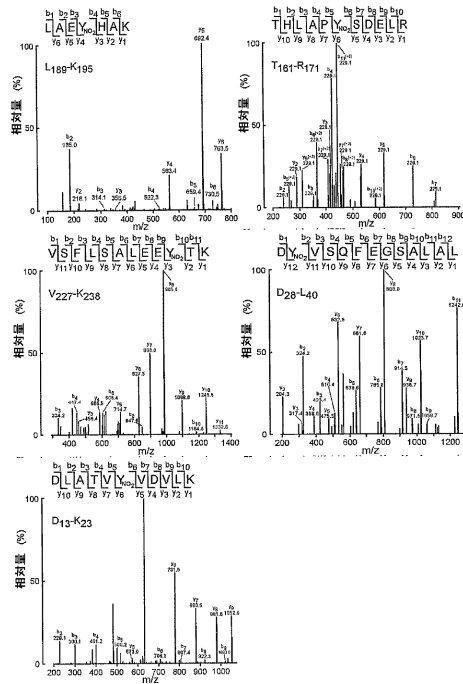


Figure 1

【図 2】

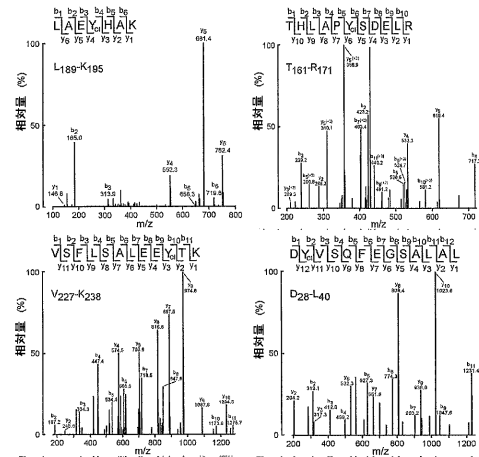


Figure 2

【図 3】

DEPPQSPWDR VKDLATVYVD VLKDSGRD[□]YV SQFEIGSALGK 40
 QLNKLKLDNW DSVTSTFSKL REQLGPVTQ[▲]E FWDNLEKETE 80
 GLRQEMSKDL EEVKAKVQPY LDDFQKKWQE EMELYRQKVE 120
 PLRAELQEGA RQKLHELQEK LSPLGEEMRD RARAHVDALR 160
 THLA[□]YSD[▲]EL RQRLAARLEA LKENGGA^{*}RLA EYHAKATEHL 200
 STLSEKAKPA LEDLRQGLLP VLESFKVSFL SALEEYTKKL 240
 NTQ 243

- MPO 媒介ニトロ化および塩素化部位
 * 好ましいMPO 媒介ニトロ化および塩素化部位
 △ パーオキシニトロイト媒介ニトロ化部位
 ▲ HOCl 媒介塩素化部位

Figure 3

【図 4】

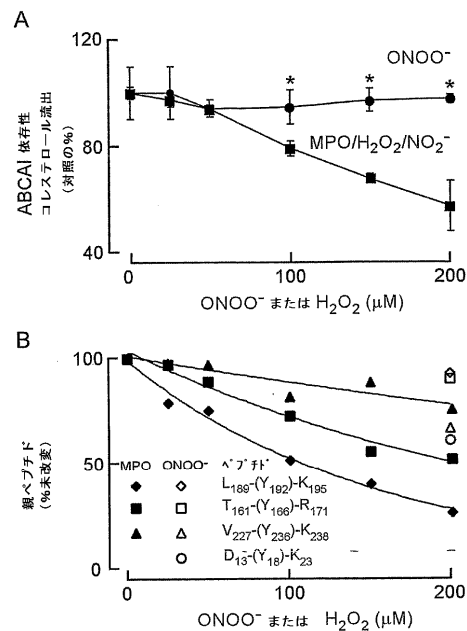


Figure 4

【図 5】

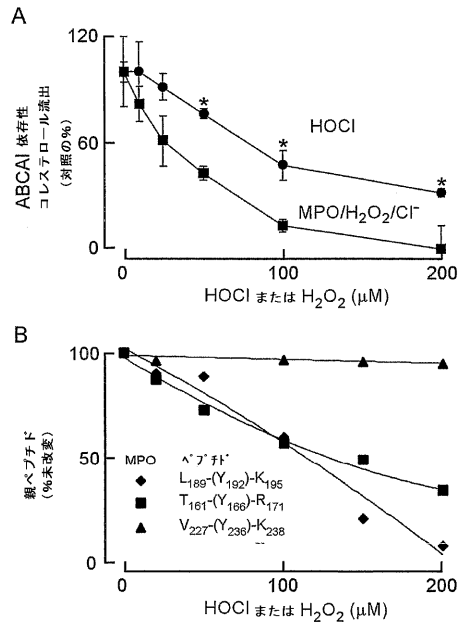


Figure 5

【図 6】

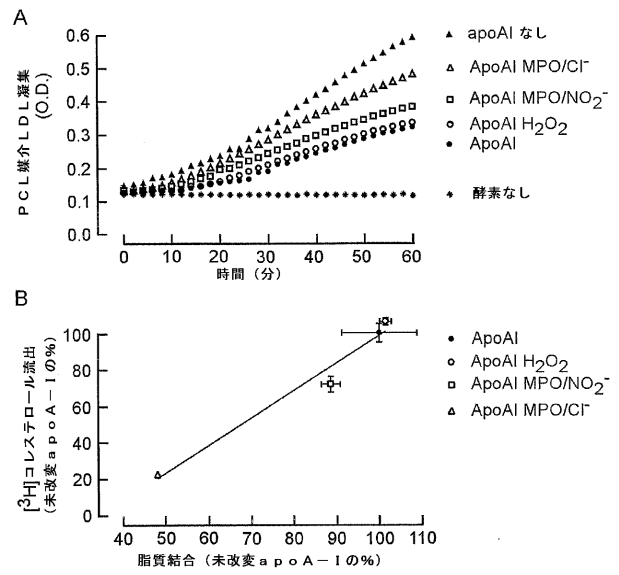


Figure 6

【図 7】

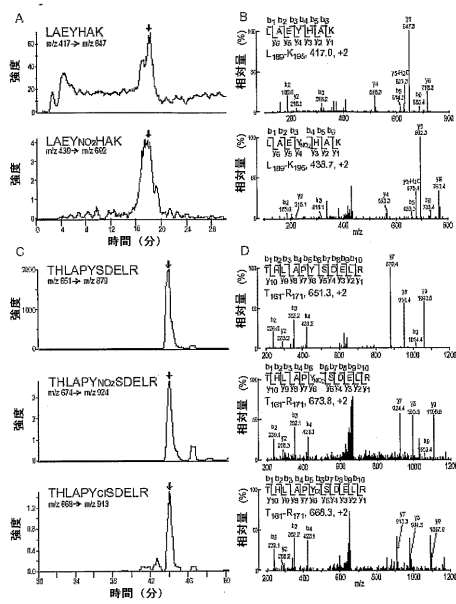


Figure 7

【図 8 A】

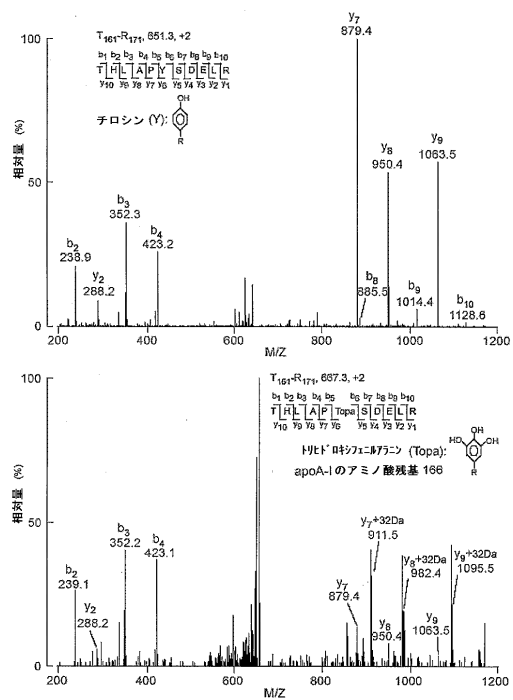


Figure 8A

【 図 8 C 】



【 図 9 】

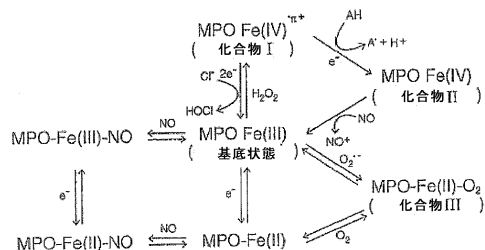


Figure 9

【 図 1 0 】

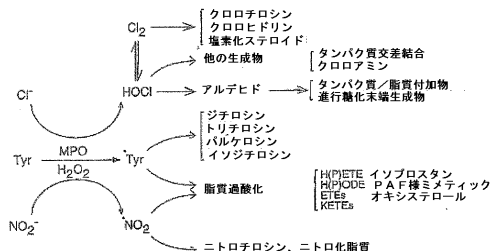


Figure 10

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/40766
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : G01N 33/53 US CL : 435/7.1 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 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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/38395 31 May 2001 (31.05.2001), Abstract, page 30-36, claims 18, 26-27.	1-2, 5-9, 12-18, 21-26, 28-31, 40-45
X	WO 03/023397 20 March 2003 (20.03.2003) Abstract, page 6-8, Experiment I, page 15, claim 1, 8-11.	1-2, 5-9, 12-18, 21-26, 28-31, 40-45
Y	Holvoet et al. Arg123-tyr166 domain of human apoA-1 is critical for HDL-mediated inhibition of macrophage forming and early atherosclerosis in mice. 2001, vol. 21, page 1870-1872 and 1977-1983 (Abstract only)	4, 11, 20,
<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 01 September 2005 (01.09.2005)		Date of mailing of the international search report 12 OCT 2005
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) 305-3230		Authorized officer <i>Maria J. Johnston</i> Long Le Telephone No. 703-305-3399

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/619,044

(32)優先日 平成16年10月15日(2004.10.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(72)発明者 ヘイゼン, スタンレイ

アメリカ合衆国 オハイオ 4 4 1 2 4, ペッパー パイク, ゲイツ ミルズ ブールバード
3 1 6 5 0

(72)発明者 キンター, マイケル

アメリカ合衆国 オハイオ 4 4 1 2 2, シェイカー ハイツ, イングルサイド ロード 3
3 4 5

(72)発明者 ペン, マーク エス.

アメリカ合衆国 オハイオ 4 4 1 2 2, ビーチウッド, シェイカー ブールバード 2 6 0
9 1

(72)発明者 スミス, ジョナサン

アメリカ合衆国 オハイオ 4 4 1 2 2, シェイカー ハイツ, ウェストチェスター ロード
2 2 6 8 7

(72)発明者 チャン, レンリャン

アメリカ合衆国 オハイオ 4 4 1 2 0, クリーブランド, エス. モアランド ブールバード
2 8 4 0, アpartment 7

(72)発明者 チェン, レミン

アメリカ合衆国 オハイオ 4 4 1 4 3, リッチモンド ハイツ, リッチモンド パーク ウ
ェスト 4 4 5, アpartment 5 1 2

F ターム(参考) 2G045 CA26 DA36 DA66 FB03

4C084 AA17 ZA36

专利名称(译)	心血管疾病的风险标记		
公开(公告)号	JP2007515632A	公开(公告)日	2007-06-14
申请号	JP2006542851	申请日	2004-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	克里夫兰诊所基金会		
申请(专利权)人(译)	克利夫兰诊所基金会		
[标]发明人	ハイゼンスタンレイ キンターマイケル ペンマークエス スミスジョナサン チャンレンリャン チェンレミン		
发明人	ハイゼン, スタンレイ キンター, マイケル ペン, マーク エス. スミス, ジョナサン チャン, レンリャン チェン, レミン		
IPC分类号	G01N33/68 A61K45/00 A61P9/00 A61B C07K16/18 G01N33/53 G01N33/92		
CPC分类号	A61P3/06 A61P7/02 A61P9/00 A61P9/10 A61P29/00 A61P43/00 G01N33/6893 G01N33/92 G01N2333 /775 G01N2800/32 C07K16/18 G01N33/561		
FI分类号	G01N33/68 A61K45/00 A61P9/00		
F-TERM分类号	2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/DA66 2G045/FB03 4C084/AA17 4C084/ZA36		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/527178 2003-12-05 US 60/600527 2004-08-11 US 60/600551 2004-08-11 US 60/619044 2004-10-15 US		
其他公开文献	JP2007515632A5 JP4625812B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文提供了用于确定受试者，特别是人受试者是否有发展，患有或经历心血管疾病并发症的风险的方法，以及治疗通过当前心血管疾病风险方法鉴定的受试者的方法。在一个实施方案中，该方法包括测定来自受试者的身体样品中一种或多种氧化的载脂蛋白A-I相关生物分子的水平。此外，提供了用于本方法的试剂盒和试剂。还提供了用于监测受试者中心血管疾病状态或治疗剂对患有心血管疾病的受试者的影响的方法。这种方法包括测定随时间或在治疗之前和之后取自受试者的身体样品中一种或多种氧化载脂蛋白A-1相关分子的水平。

HDL + MPO/H ₂ O ₂ /Cl ⁻			
ESI/MS/MSにより検出された主要な 改変ペプチド	H ₂ O ₂ (μM)		
	10	25	100
L ₁₈₉ AEY _{Cl} HAK ₁₉₆ (配列番号 4)	◆	◆	◆
T ₁₆₁ HLAPY _{Cl} SDLR ₁₇₀ (配列番号 5)		◆	◆
D ₂₈ Y _{Cl} GSALGK ₄₀ (配列番号 6)			◆
V ₂₂₇ SFLSALEEY _{Cl} TK ₂₃₉ (配列番号 7)			◆
HDL + ONOO ⁻			
検出された主要な改変ペプチド			
T ₁₆₁ HLAPY _{NO2} SDLR ₁₇₀ (配列番号 5)			
D ₁₃ LATVY _{NO2} VDVLK ₂₈ (配列番号 8)			
V ₂₂₇ SFLSALEEY _{NO2} TK ₂₃₈ (配列番号 7)			