

(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2011-526916

(P2011-526916A)

(43) 公表日 平成23年10月20日(2011.10.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 38/43 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/48 Z N A	2 G O 4 5
<b>A 6 1 P 17/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 17/00	4 B O 6 3
<b>A 6 1 P 11/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 11/00	4 B O 6 5
<b>A 6 1 P 37/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/02	4 C O 8 4
<b>C 1 2 N 5/0786 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/00 2 O 2 N	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-516818 (P2011-516818)	(71) 出願人	503249418
(86) (22) 出願日	平成21年6月30日 (2009.6.30)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ ミシガン
(85) 翻訳文提出日	平成23年1月31日 (2011.1.31)		アメリカ合衆国 4 8 1 0 4 - 2 5 9 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/049261		ミシガン, アン アーバー, エス, ユニバーシティー アベニュー 1 2 1 4 , 2 エヌディー フロアー
(87) 国際公開番号	W02010/002895	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成22年1月7日 (2010.1.7)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	61/076, 913	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成20年6月30日 (2008.6.30)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 全身性紅斑性狼瘡を同定および処置するための診断標的および治療標的としてのリソソームホスホリパーゼA2 (LPLA2) 活性

#### (57) 【要約】

本発明は、全身性紅斑性狼瘡および薬物誘発性全身性紅斑性狼瘡の診断および処置のための方法に関する。より具体的には、本明細書では、全身性紅斑性狼瘡および薬物誘発性全身性紅斑性狼瘡などの自己免疫障害の診断および処置の方法においてリソソームホスホリパーゼA2を用いる方法を述べる。本発明では、例えば、個体における可染体マクロファージの蓄積を減少させる方法であって、可染体マクロファージの蓄積を有する細胞を、可染体マクロファージの蓄積を減少させる量および時間で、LPLA2酵素活性を有する作用物質と接触させるステップを含む方法が提供される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

細胞内可染体マクロファージの蓄積を減少させる方法であって、可染体マクロファージの蓄積を有する細胞を、可染体マクロファージの蓄積を減少させるのに有効な量のリソソームホスホリパーゼ A 2 ( L P L A 2 ) 酵素活性を有する作用物質と接触させるステップを含む方法。

**【請求項 2】**

前記 L P L A 2 酵素活性を有する作用物質が、配列番号 1 ~ 2 8 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記作用物質が哺乳類 L P L A 2 酵素である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記作用物質がヒト L P L A 2 酵素である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記作用物質が 1 つまたは複数のマンノース残基を含む L P L A 2 酵素である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記ヒト L P L A 2 酵素が、配列番号 1 に示されているアミノ酸配列、またはその断片、L P L A 2 酵素活性を有する配列番号 1 の誘導体もしくは変異体を含む、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記ヒト L P L A 2 酵素が、配列番号 1 のアミノ酸 1 9 6 ~ 2 0 0 ( A - X - S - X - G ) に対応する触媒部位を含む、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記ヒト L P L A 2 酵素が、配列番号 1 の 6 5 位における C y s と C y s 8 9 の間のシステイン結合に対応するシステイン結合をさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記ヒト L P L A 2 酵素が、長さが少なくとも 7 5 残基であり、配列番号 1 のアミノ酸 1 9 6 ~ 2 0 0 を含む配列番号 1 の断片のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記哺乳類 L P L A 2 酵素が、配列番号 1 ~ 2 8 8 ならびに配列番号 1 ~ 2 8 8 の断片、誘導体および変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質である、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記 L P L A 2 酵素が触媒コンセンサス配列 - A - X - S - X - G - を含む、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

可染体マクロファージの細胞内蓄積によって特徴付けられる障害を有すると診断された患者を処置する方法であって、該患者に L P L A 2 酵素活性を有する有効量の作用物質を投与することを含む方法。

**【請求項 13】**

前記障害が全身性紅斑性狼瘡である、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記障害が薬物誘発性狼瘡である、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記 L P L A 2 酵素活性を有する作用物質が、配列番号 1 ~ 2 8 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質である、請求項 12 から 14 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 16】**

10

20

30

40

50

前記作用物質が哺乳類 L P L A 2 酵素である、請求項 1 2 から 1 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7】

前記作用物質がヒト L P L A 2 酵素である、請求項 1 2 から 1 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 8】

前記作用物質が 1 つまたは複数のマンノース残基を含む L P L A 2 酵素である、請求項 1 2 から 1 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 9】

前記ヒト L P L A 2 酵素が、配列番号 1 に示されているアミノ酸配列、またはその断片、L P L A 2 酵素活性を有する配列番号 1 の誘導体もしくは変異体を含む、請求項 1 8 に記載の方法。

10

【請求項 2 0】

前記ヒト L P L A 2 酵素が、配列番号 1 のアミノ酸 1 9 6 ~ 2 0 0 ( A - X - S - X - G ) に対応する触媒部位を含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記ヒト L P L A 2 酵素が、配列番号 1 の 6 5 位における C y s と C y s 8 9 の間のシステイン結合に対応するシステイン結合をさらに含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記ヒト L P L A 2 酵素が、長さが少なくとも 7 5 残基であり、配列番号 1 のアミノ酸 1 9 6 ~ 2 0 0 を含む配列番号 1 の断片のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 0 に記載の方法。

20

【請求項 2 3】

前記哺乳類 L P L A 2 酵素が、配列番号 1 ~ 2 8 8 ならびに配列番号 1 ~ 2 8 8 の断片、誘導体および変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記 L P L A 2 酵素が触媒コンセンサス配列 - A - X - S - X - G - を含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

可染体マクロファージの細胞内レベルを低下させる治療薬候補をスクリーニングする方法であって、該方法は、試験化合物の存在下および非存在下での狼瘡マウスモデルにおける細胞内可染体マクロファージの数または食作用指数を測定するステップを含み、該試験化合物の存在下での細胞内可染体マクロファージレベルが、該試験化合物の非存在下での細胞内可染体マクロファージレベルと比較して低いことにより、該試験化合物が治療薬候補として特定され、該試験化合物が配列番号 1 ~ 2 8 8 の断片、変異体または誘導体である方法。

30

【請求項 2 6】

可染体マクロファージの細胞内レベルを低下させる治療薬候補をスクリーニングする方法であって、該方法は、試験化合物の存在下および非存在下での L P L A 2 酵素活性を測定するステップを含み、該試験化合物の存在下での L P L A 2 酵素活性のレベルが、該試験化合物の非存在下と比較して高いことにより、該試験化合物が治療薬候補として特定される方法。

40

【請求項 2 7】

個体における全身性紅斑性狼瘡を診断する方法であって、該方法は、個体からの試料におけるリソソームホスホリパーゼ A 2 ( L P L A 2 ) 酵素活性を決定するステップ、または個体からの試料における L P L A 2 発現を決定するステップを含み、該個体における L P L A 2 酵素活性または L P L A 2 発現レベルが、正常個体における L P L A 2 酵素活性または L P L A 2 発現レベルと比較して低いことが、全身性紅斑性狼瘡という診断を示唆し、該正常個体が全身性紅斑性狼瘡に罹患していないことが分かっている方法。

50

**【請求項 28】**

前記個体における L P L A 2 酵素活性または L P L A 2 発現レベルが、同じ個体における以前の L P L A 2 酵素活性または L P L A 2 発現レベルと比較して低いことが、全身性紅斑性狼瘡という診断を示唆する、請求項 27 に記載の方法。

**【請求項 29】**

個体における全身性紅斑性狼瘡に対する感受性を決定するための方法であって、該方法は、個体からの試料におけるリソソームホスホリパーゼ A 2 ( L P L A 2 ) 酵素活性を決定するステップ、または個体からの試料における L P L A 2 発現を決定するステップを含み、該個体における L P L A 2 酵素活性または L P L A 2 発現レベルが、正常個体における L P L A 2 酵素活性または L P L A 2 発現レベルと比較して低いことが、全身性紅斑性狼瘡に対する感受性を示す方法。

10

**【請求項 30】**

L P L A 2 酵素活性または L P L A 2 発現レベルが、同じ個体における以前の L P L A 2 酵素活性または L P L A 2 発現レベルと比較して低いことが、全身性紅斑性狼瘡に対する感受性を示す、請求項 29 に記載の方法。

**【請求項 31】**

全身性紅斑性狼瘡を診断するための方法であって、該方法は、個体からの試料におけるリソソームホスホリパーゼ A 2 ( L P L A 2 ) 自己抗体を検出するステップを含み、該個体における L P L A 2 自己抗体のレベルが、正常個体における L P L A 2 自己抗体のレベルと比較して高いことを検出することが、全身性紅斑性狼瘡という診断を示唆し、該正常個体が全身性紅斑性狼瘡に罹患していないことが分かっている方法。

20

**【請求項 32】**

個体からの試料における L P L A 2 自己抗体のレベルが、同じ個体における L P L A 2 自己抗体の以前のレベルと比較して高いことを検出することが、全身性紅斑性狼瘡という診断を示唆する、請求項 31 に記載の方法。

**【請求項 33】**

個体における全身性紅斑性狼瘡に対する感受性を決定するための方法であって、該方法は、個体からの試料におけるリソソームホスホリパーゼ A 2 ( L P L A 2 ) 自己抗体を検出するステップを含み、該個体における L P L A 2 自己抗体のレベルが、正常個体における L P L A 2 自己抗体のレベルと比較して高いことを検出することが、全身性紅斑性狼瘡感受性を示唆し、該正常個体が全身性紅斑性狼瘡に罹患していないことが分かっている方法。

30

**【請求項 34】**

個体からの試料における L P L A 2 自己抗体のレベルが、同じ個体における L P L A 2 自己抗体の以前のレベルと比較して高いことを検出することが、全身性紅斑性狼瘡に対する感受性を示唆する、請求項 33 に記載の方法。

**【請求項 35】**

個体における全身性紅斑性狼瘡の進行を決定するための方法であって、該方法は、経時的に採取した該個体からの試料におけるリソソームホスホリパーゼ A 2 ( L P L A 2 ) 酵素活性を決定するステップを含み、該個体における経時的に採取した該試料における L P L A 2 酵素活性の低下が全身性紅斑性狼瘡の進行を示唆する方法。

40

**【請求項 36】**

個体における全身性紅斑性狼瘡の進行を決定するための方法であって、該方法は、経時的に採取した該個体からの試料におけるリソソームホスホリパーゼ A 2 ( L P L A 2 ) 自己抗体を検出するステップを含み、該個体における経時的に採取した該試料における L P L A 2 自己抗体の増加が全身性紅斑性狼瘡の進行を示唆する方法。

**【請求項 37】**

L P L A 2 の発現または活性を減少させる多型を有する患者を処置することをさらに含む、請求項 1 または請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 38】**

50

前記多型が配列番号1のアミノ酸196~200に対応する位置にある、請求項37に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、米国国立衛生研究所により付与された助成金交付番号R01DK055823のもとでの政府の支援により行われた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0002】

発明の分野

本発明は、一般的に、全身性紅斑性狼瘡(SLE)およびその症状を診断する方法および処置する方法に関する。

10

【背景技術】

【0003】

関連技術の背景

全身性紅斑性狼瘡(SLE)は、多臓器に罹患する自己免疫疾患である。臨床徴候は、一定しないが、皮膚、腎臓、肝臓、肺、心臓およびリンパ器官が関与することが多い。LPLA2ノックアウトマウス(非特許文献1)は、SLEの表現型を模写する、高度に頑健な後期発現リンパ球増殖を示す。より具体的には、このマウス表現型は、脾腫、リンパ節腫脹、肺炎、肝炎、ならびに腎不全や、免疫グロブリン、C3およびC1qの沈着を伴う糸球体腎炎によって特徴付けられる。これらのマウスは、高レベルの血中免疫グロブリンならびに高力価の抗核抗体(ANA)および抗二本鎖DNA抗体(抗dsDNA)によっても特徴付けられる。このような顕著な表現型は、LPLA2が狼瘡において異常に制御される免疫学的過程を媒介するののかという疑問を提起するものである。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Hiraokaら、Mol Cell Biol、26巻、6139~6148頁、2006年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0005】

したがって、当技術分野では、SLEの原因に関するさらなる理解と、そのような自己免疫障害に対する新たな治療的介入の特定が依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

発明の概要

リソソームホスホリパーゼA2(LPLA2)は、リパーゼおよびトランスアシラーゼの活性、リソソーム局在化ならびに酸性至適pHを含めたいくつかの独特な特徴を有する。これらの特徴に基づいて、二重条件付き遺伝子ターゲティング(double conditional gene targeting)を用いて、LPLA2の機能を解明した。LPLA2活性に必須のリパーゼモチーフをコードするLPLA2遺伝子のエキソン5の全身欠失によって、LPLA2欠損マウスを作製した。LPLA2欠損マウスは、後期発現リンパ球増殖表現型、リンパ組織の拡大、腎不全および糸球体腎炎、高い血中免疫グロブリンレベル、陽性の抗核抗体(ANA)および抗二本鎖DNA抗体、ならびにマクロファージにおける消化されないアポトーシス小体または可染体の蓄積を含む、全身性紅斑性狼瘡(SLE)の特徴を示した。

40

【0007】

本発明は、驚くべきことに、LPLA2がSLEにおいて異常に制御される免疫学的過程を媒介することを実証している。したがって、本発明は、活動性SLEのマーカーとしてのLPLA2酵素活性の喪失の役割を実証している。本明細書で述べる研究は、LPL

50

A 2 のレベルの低下が、S L E の症状を同定し、処置するための診断および治療標的として使用できることを実証している。

【 0 0 0 8 】

本明細書では、「L P L A 2」は、由来する種に関係なく、X V 群ホスホリパーゼ A 2 と呼ばれている全長リソソームホスホリパーゼ A 2 酵素、ならびにその断片、誘導体および酵素活性を有する変異体を意味する。「変異体」という用語は、アミノ酸の付加、欠失または置換を指す。「誘導体」という用語は、アミノ酸の化学修飾もしくは修飾アミノ酸の組み込み、親水性ポリマーとのコンジュゲーション、または他の化学部分とのコンジュゲーションなど、L P L A 2 の付加的な化学修飾を包含する。

【 0 0 0 9 】

「L P L A 2 酵素活性」は、細胞外リン脂質を分解して、遊離脂肪酸ならびにリゾホスファチジルコリン ( l y s o - p h o p h a t i d y l c h o l i n e ) およびリゾホスファチジルエタノールアミンを生成する L P L A 2 の能力を指す。

【 0 0 1 0 】

「L P L A 2 触媒コンセンサス配列」は、配列番号 1 の 1 9 6 ~ 2 0 0 位におけるアミノ酸 - A - X - S - X - G - を指す。

【 0 0 1 1 】

「L P L A 2 自己抗体」は、個体の自己の L P L A 2 タンパク質に対して免疫特異的である個体により産生される抗体を指す。

【 0 0 1 2 】

「可染体マクロファージ」は、脾細胞がアポトーシス細胞を除去できないことに起因する肥大化したマクロファージを指す。

【 0 0 1 3 】

本明細書では、「S L E」は、全身性紅斑性狼瘡または可染体マクロファージの蓄積の症状を示す他のあらゆる自己免疫疾患を含む。「薬物誘発性狼瘡」は、特定の薬物による長期治療による可染体マクロファージの蓄積などの狼瘡の症状の発現を指す。

【 0 0 1 4 】

本発明は、個体における可染体マクロファージの蓄積を減少させる方法であって、可染体マクロファージの蓄積を有する細胞を、可染体マクロファージの蓄積を減少させる量および時間で、L P L A 2 酵素活性を有する作用物質 ( a g e n t ) と接触させるステップを含む方法を提供する。

【 0 0 1 5 】

一態様では、L P L A 2 活性を有する作用物質は、配列番号 1 ~ 2 8 8 から選択されるアミノ酸配列を有するタンパク質である。

【 0 0 1 6 】

他の態様では、該作用物質は、哺乳類 L P L A 2 酵素である。一実施形態では、該作用物質は、配列番号 1 ~ 2 8 8 から選択されるアミノ酸配列を有する哺乳類 L P L A 2 酵素またはその酵素活性を有する断片、誘導体もしくは変異体である。

【 0 0 1 7 】

さらに他の態様では、該作用物質は、ヒト L P L A 2 酵素である。一実施形態では、該作用物質は、配列番号 1 におけるアミノ酸配列を有するヒト L P L A 2 酵素またはその酵素活性を有する断片、誘導体もしくは変異体である。

【 0 0 1 8 】

一実施形態では、該作用物質は、1 つもしくは複数のマンノース残基または 1 つもしくは複数のマンノース - 6 - リン酸残基を含む L P L A 2 酵素である。

【 0 0 1 9 】

他の実施形態では、該作用物質は、配列番号 1 のアミノ酸 1 9 6 ~ 2 0 0 ( - A - X - S - X - G - ) に対応する触媒部位を含むヒト L P L A 2 酵素またはその変異体もしくは誘導体である。

【 0 0 2 0 】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、ヒト L P L A 2 酵素、その変異体または誘導体は、配列番号 1 の 65 位における C y s と C y s 89 の間のシステイン結合に対応するシステイン結合をさらに含む。

【0021】

一態様では、該作用物質は、長さが少なくとも 50、75、100、125、150、175、200 または 225 残基であり、配列番号 1 のアミノ酸 196 ~ 200 ( - A - X - S - X - G - ) に対応する触媒部位を含む配列番号 1 の断片のアミノ酸配列との少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% のまたはそれより高い同一性を有するアミノ酸配列を含むヒト L P L A 2 酵素またはその変異体もしくは誘導体である。

10

【0022】

他の態様では、該作用物質は、触媒コンセンサス配列 - A - X - S - X - G - を含む L P L A 2 酵素である。さらに他の態様では、該作用物質は、配列番号 1 のアミノ酸 196 ~ 200 ( - A - X - S - X - G - ) に対応する触媒コンセンサス配列を含む L P L A 2 酵素である。関連する態様では、L P L A 2 酵素は、配列番号 1 の 65 位における C y s と C y s 89 の間のシステイン結合に対応するシステイン結合を含む。

【0023】

本発明は、個体における異常な L P L A 2 活性に伴う状態を処置するための方法であって、前記個体に該状態を軽減するのに有効な量で L P L A 2 酵素活性を有する作用物質を投与するステップを含む方法をさらに提供する。

20

【0024】

一態様では、本発明は、可染体マクロファージの細胞内蓄積によって特徴付けられる障害を有すると診断された患者を処置するための方法であって、該患者に有効な量の L P L A 2 酵素活性を有する作用物質を投与することを含む方法を提供する。

【0025】

他の態様では、該状態は、異常な L P L A 2 酵素活性である。他の態様では、該状態は、異常な L P L A 2 m R N A 転写である。さらに他の態様では、該状態は、可染体マクロファージの蓄積である。さらに他の態様では、該状態は、S L E または全身性紅斑性狼瘡である。他の態様では、該状態は、薬物誘発性狼瘡である。

【0026】

一実施形態では、該個体は、L P L A 2 の発現または活性を低下させる、配列番号 1 に対応する L P L A 2 遺伝子における多型を有する。ヒト L P L A 2 酵素をコードするヒトゲノム D N A 配列は、配列番号 289 に示されている。該ヒトゲノム D N A 配列は、15715 塩基である。ヒト m R N A 配列は、ヌクレオチド 1 . . 210、3947 . . 4103、9576 . . 9694、9939 . . 10037、10423 . . 10647 および 13803 . . 15715 に対応すると予測される。コーディング領域は、ヌクレオチド 84 . . 210、3947 . . 4103、9576 . . 9694、9939 . . 10037、10423 . . 10647 および 13803 . . 14314 に対応すると予測される。ヒト L P L A 2 酵素をコードするヒト c D N A 配列は、配列番号 290 に示されている。いくつかの実施形態では、該個体は、配列番号 1 のアミノ酸 196 ~ 200 に対応する触媒部位をコードする遺伝子の位置における多型を有する。さらに他の実施形態では、該個体は、L P L A 2 酵素の切断または陽イオン性アミノ酸の損失をもたらす多型を有する。さらに他の実施形態では、該個体は、L P L A 2 酵素発現の喪失をもたらす L P L A 2 遺伝子に関連する調節制御領域における多型を有する。

30

40

【0027】

さらなる態様では、L P L A 2 活性を有する作用物質は、配列番号 1 ~ 288 から選択されるアミノ酸配列を有するタンパク質である。

【0028】

他の態様では、該作用物質は、哺乳類 L P L A 2 酵素である。一実施形態では、該作用物質は、配列番号 1 ~ 288 から選択されるアミノ酸配列を有する哺乳類 L P L A 2 酵素

50

またはその酵素活性を有する断片、誘導体もしくは変異体である。

【0029】

さらに他の態様では、該作用物質は、ヒトLPLA2酵素である。一実施形態では、該作用物質は、配列番号1におけるアミノ酸配列を有するヒトLPLA2酵素またはその酵素活性を有する断片、誘導体もしくは変異体である。

【0030】

一実施形態では、該作用物質は、配列番号1のアミノ酸196~200(A-X-S-X-G)に対応する触媒部位を含む、ヒトLPLA2酵素、その変異体または誘導体である。他の態様では、該作用物質は、触媒コンセンサス配列-A-X-S-X-G-を含む、LPLA2酵素、その変異体または誘導体である。

10

【0031】

いくつかの実施形態では、LPLA2酵素、変異体または誘導体は、配列番号1の65位におけるCysとCys89の間のシステイン結合に対応するシステイン結合をさらに含む。

【0032】

一態様では、該作用物質は、長さが少なくとも50、75、100、125、150、175、200または225残基であり、配列番号1のアミノ酸196~200(-A-X-S-X-G-)に対応する触媒部位を含む配列番号1の断片のアミノ酸配列との少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%のまたはそれより高い同一性を有するアミノ酸配列を含むヒトLPLA2酵素、その変異体または誘導体である。関連する態様では、LPLA2酵素は、配列番号1の65位におけるCysとCys89の間のシステイン結合に対応するシステイン結合をさらに含む。

20

【0033】

一実施形態では、該個体は、LPLA2の発現または活性を低下させる多型を有する。他の実施形態では、該個体は、配列番号1のアミノ酸196~200に対応する位置における多型を有する。さらなる実施形態では、該個体は、LPLA2酵素の切断または陽イオン性アミノ酸の損失をもたらす多型を有する。さらに他の実施形態では、該個体は、LPLA2酵素発現の喪失をもたらすLPLA2の調節制御領域における多型を有する。

【0034】

さらに他の態様では、該作用物質は、1つまたは複数のマンノース残基を含むLPLA2酵素である。

30

【0035】

本発明はまた、可染体マクロファージの細胞内レベルを低下させる治療薬候補(potential therapeutic)をスクリーニングする方法であって、該方法は、試験化合物の存在下または非存在下でのLPLA2欠損マウスモデルにおける細胞内可染体マクロファージのレベルを測定するステップを含み、試験化合物の存在下での細胞内可染体マクロファージのレベルが、試験化合物の非存在下での細胞内可染体マクロファージのレベルと比較して低いことにより、試験化合物が治療薬候補として特定される方法を提供する。

【0036】

40

本発明はまた、個体におけるSLEを診断する方法であって、該方法は、個体からの試料におけるLPLA2酵素活性を決定するステップを含み、該個体におけるLPLA2酵素活性が、正常個体におけるLPLA2酵素活性と比較して低いことが、SLEを示唆し、前記正常個体がSLEに罹患していないことが分かっている方法を提供する。ここで全体を通して、「正常個体」は、特定の疾患に罹患していないことが分かっている個体を意味する。

【0037】

本発明はさらに、個体におけるSLEを診断する方法であって、該方法は、個体からの試料におけるLPLA2自己抗体を検出するステップを含み、該個体におけるLPLA2自己抗体が、正常個体におけるLPLA2自己抗体の検出と比較して高いことを検出する

50

ことがSLEを示唆し、前記正常個体がSLEに罹患していないことが分かっている方法を提供する。

【0038】

本発明は、個体におけるSLEを診断する方法であって、該方法は、個体におけるLPLA2酵素活性を検出するステップを含み、個体におけるLPLA2酵素活性が、同じ個体における以前のLPLA2酵素活性と比較して低いことがSLEを示唆する方法を提供する。

【0039】

本発明はまた、個体におけるSLEを診断する方法であって、該方法は、個体におけるLPLA2自己抗体を検出するステップを含み、個体におけるLPLA2自己抗体が、同じ個体におけるLPLA2自己抗体の以前の検出と比較して高いことを検出することがSLEを示唆する方法を提供する。

10

【0040】

本発明は、個体におけるSLEに対する感受性を決定するための方法であって、該方法は、個体からの試料におけるLPLA2酵素活性を決定するステップを含み、個体におけるLPLA2酵素活性が、正常個体におけるLPLA2酵素活性と比較して低いことが、SLEに対する感受性を示す方法を提供する。

【0041】

本発明はさらに、個体におけるSLEに対する感受性を決定するための方法であって、該方法は、個体からの試料におけるLPLA2自己抗体を検出するステップを含み、該個体におけるLPLA2自己抗体が、正常個体におけるLPLA2自己抗体の検出と比較して高いことを検出することが、SLEに対する感受性を示す方法を提供する。

20

【0042】

本発明はまた、個体におけるSLEに対する感受性を決定するための方法であって、該方法は、個体からの試料におけるLPLA2酵素活性を検出するステップを含み、個体における低いLPLA2酵素活性が、同じ個体における以前のLPLA2酵素活性と比較して低いことが、SLEに対する感受性を示唆する方法を提供する。

【0043】

本発明はさらに、個体におけるSLEに対する感受性を決定するための方法であって、該方法は、個体からの試料におけるLPLA2自己抗体を検出するステップを含み、個体におけるLPLA2自己抗体が、同じ個体におけるLPLA2自己抗体の以前の検出と比較して低いことを検出することが、SLEに対する感受性を示唆する方法を提供する。

30

【0044】

本発明によって、個体におけるSLEの進行を決定するための方法であって、該方法は、経時的に採取した個体からの試料におけるLPLA2酵素活性を決定するステップを含み、個体における経時的に採取した試料におけるLPLA2酵素活性の低下がSLEの進行を示唆する方法も提供される。

【0045】

本発明はまた、個体におけるSLEの進行を決定するための方法であって、該方法は、経時的に採取した個体からの試料におけるLPLA2自己抗体を検出するステップを含み、個体における経時的に採取した試料におけるLPLA2自己抗体の増加がSLEの進行を示唆する方法を提供する。

40

【0046】

本発明の方法の様々な実施形態では、LPLA2 mRNAレベルおよび/またはLPLA2タンパク質レベルを用いて、試料におけるLPLA2酵素活性を測定する。

【0047】

該方法の様々な態様では、試料は、前記個体の体液、組織および/または器官である。

【0048】

該方法の他の態様では、組織は、脾臓標本である。

【0049】

50

該方法の他の態様では、液体は、血清または血漿である。

【0050】

前述の概要は、本発明のすべての態様を定義するものでなく、さらなる実施形態を詳細な説明などの他の項で述べる。本文書全体は、統一された開示として関連付けられるものであり、特徴の組合せが本文書の同じ文、段落または項と一緒に見出されないとしても、本明細書で述べる特徴のすべての可能な組合せを考慮することができるかと理解すべきである。

【0051】

さらに、本発明は、本明細書における特定の段落により定義される変形形態より多少なりとも範囲が狭い本発明のいずれか1つまたはすべての実施形態を含む。例えば、本発明の特定の態様を属 (genus) として記載する場合、属のすべてのメンバーが個々に本発明の実施形態であり、また、属の2つ以上の組合せが本発明の実施形態であることを理解すべきである。

10

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1A】リソソームホスホリパーゼA2の経路。セラミド (N - アセチルスフィンゴシン (NAS)) などのアクセプターの存在下では、該酵素は、LCATと類似したトランスアシラーゼホスホリパーゼ (transacylase lipase) A2として挙動する。水のみをアクセプターとした場合、LPLA2は、通常のホスホリパーゼA2として挙動する。

20

【図1B】LPLA2およびLCATに認められる触媒3残基 (catalytic triad) およびジスルフィド結合の比較。

【図1C】ヒト、マウスおよびウシLPLA2の推定アミノ酸配列の比較。位置1は、ヒトおよびマウスにおける予測コーディング領域の最初のアミノ酸残基を意味する。点線の囲みは、N - グリコシル化部位コンセンサスモチーフを示し、実線の囲みは、リパーゼモチーフを示す。網掛けの囲みは、触媒3残基を構成するアミノ酸Ser、AspおよびHisを示す。縦線は、推定シグナルペプチド切断部位を示す。アステリスクは、これらの3つの種の間で同一のアミノ酸を表す。

【図2】20カ月齢のLPLA2 - / - ノックアウトおよびLPLA2 + / + 野生型マウスにおける肉眼的解剖学的変化。

30

【図3】20カ月齢のLPLA2 - / - ノックアウトおよびLPLA2 + / + 野生型マウスにおける組織学的変化。組織切片を過ヨウ素酸シッフ試薬で染色した。ピンク色に染色した細胞は、脂質を有するマクロファージを表す。

【図4A】LPLA2 - / - ノックアウトおよびLPLA2 + / + 野生型マウスの腎臓のIg重鎖およびClqの免疫蛍光染色。

【図4B】3 ~ 4カ月齢、12 ~ 14カ月齢および24カ月齢LPLA2 + / + 野生型およびLPLA2欠損マウスの抗dsDNA力価。

【図4C】12カ月齢LPLA2 + / + 野生型およびLPLA2 - / - ノックアウトマウスからのHEL細胞のANA染色。ノックアウトマウス血清を用いたアッセイで均一および斑点状核染色の両方が認められる。

40

【図4D】LPLA2 - / - ノックアウトマウスからの脾臓におけるマクロファージに関連する可染体の同定。凍結切片をTUNEL染色 (緑) によりCD68 (赤) およびアポトーシス小体について染色した。

【図5】図5A ~ 5C。組換えLPLA2で処置したLPLA2欠損マウスからのマクロファージの免疫蛍光染色。LPLA2は、欠損細胞に2時間加えた。次いで、マクロファージを固定し、抗LPLA2モノクローナル抗体 (緑) (図5A) またはリソソームマーカーLAMP-1に対する抗体 (赤) (図5B) で染色した。Alex-flour結合二次抗体を用いて取込みおよび共同在化を評価した (図5C)。

【図6】ノックアウト (KO) LPLA2 - / - マウス対野生型 (WT) LPLA2 + / + マウスにおける24時間タンパク質排出。

50

【図7】図7A～7H。野生型(WT)マウス(図7A～7D)およびノックアウト(KO)マウス(図7E～7H)からの腹膜マクロファージによるアポトーシス胸腺細胞の結合、エンドサイトーシスおよびクリアランス。エンドサイトーシスによって取り込まれた胸腺細胞の時間依存的変化を抗CD68(赤)およびTUNELアッセイ(緑)により検出した。

【図8】アポトーシス小体/マクロファージの数により測定したWTおよびKOマウスからのマクロファージの食作用指数。図示した値は、時点ごとの平均値+/-SD(n=8)を表す。\*は、 $p < 0.05$ を表す。

【図9】図9A～9D。6または8カ月齢WTおよびKOマウスにおけるBおよびT細胞増殖試験。

【図10】図10A～10B。1-O-アシルセラミドシンターゼ活性(図10A)および細胞リン脂質含量(図10B)に対する陽イオン性両親媒性薬物PDMPおよびアミオダロンの影響。

【図11】図11A～11B。LPLA2活性に対する負に荷電した脂質の影響。ジオクタノイル-PC(DOPC)/N-アセチルスフィンゴシン(NAS)またはDOPC/スルファチド/NASからなるリポソームをLPLA2酵素とともにインキュベートし、反応生成物である1-O-オレオイル-NASを時間に対してプロットした(図11A)。各種モル比のスルファチドを含むDOPC/ガラクトシルセラミド/NASまたはDOPC/スルファチド/NASからなるリポソームをLPLA2酵素とともにインキュベートし、反応生成物である1-O-オレオイル-NASをモル比に対してプロットした。

【図12】図12A。LPLA2活性に対するイオン強度の影響。1-O-オレオイル-NASをNaCl濃度(mM)に対してプロットした。図12B。LPLA2活性に対するpHの影響。1-O-オレオイル-NASをpHに対してプロットした。図12C。LPLA2活性に対する陽イオン性両親媒性薬物の影響。DOPCスルファチドおよびNASからなるリポソームを各種濃度の陽イオン性両親媒性薬物アミオダロンとともにブレインキュベートし、次いで、LPLA2酵素とともにインキュベートした。1-O-オレオイル-NASを薬物の濃度( $\mu$ M)に対してプロットした。

【図13】図13A～13C。LPLA2とリポソームとの共沈降。DOPCまたはDOPC/スルファチドからなるリポソームを種々の量のLPLA2とともにインキュベートし、反応生成物をSDS-PAGEにより分離した(図13A)。DOPC、DOPC/スルファチドまたはガラクトシルセラミド(galactosylceramide)(GalCer)からなるリポソームをLPLA2とともにインキュベートし、反応生成物をSDS-PAGEにより分析した(図13B)。DOPCまたはDOPC/スルファチドからなるリポソームをLPLA2とともにNaClまたはアミオダロン(AMIOD)の存在下または非存在下で種々のpHでインキュベートし、反応生成物をSDS-PAGEにより分析した。

【発明を実施するための形態】

【0053】

発明の詳細な説明

全身性紅斑性狼瘡は、依然として理解が十分になされていない自己免疫障害である。この20年間で、狼瘡表現型に類似した遺伝モデルの特定について多大な進歩が達成された。しかし、この以前の研究は、狼瘡患者をより良く定義するための新たな診断ツールに、またはこれらの不運な患者の処置のための新たな治療学に容易に移し変えられなかった。機能の喪失がSLEにおいて重要な役割を果たす、分泌リソソームタンパク質の本明細書における同定は、いくつかの重要な意味がある。第1に、分泌タンパク質として、血清LPLA2の活性は、疾患活動性の有用なマーカーである。第2に、LPLA2に対する自己抗体の存在は、SLE患者のサブセットにおいて機構的に重要である可能性がある。第3に、LPLA2の遺伝性または後天性の欠損が患者のサブセットにおけるSLEの発現の基礎となっている場合、タンパク質自体が有用な治療薬であり得る。マンノース終端リソソームタンパク質は、増加しつつある一連のリソソーム貯蔵病に対する酵素補充戦略の

10

20

30

40

50

基礎である。これらは、I型ゴシェ病、ファブリー病およびハンター症候群などである。マクロファージにおけるLPLA2の強結合、組み込みおよびトラフィッキングを示した以前の研究は、この戦略がSLEにも適用され得ることを示唆している。

【0054】

本発明は、その断片、変異体または誘導体を含めたLPLA2を含む組成物、LPLA2の活性を増強、増大あるいは刺激する組成物、およびLPLA2の発現を増加あるいは刺激する組成物を投与することにより、可染体マクロファージの細胞内蓄積によって特徴付けられる障害を処置する方法に関する。そのような組成物は、リン脂質を異化し、かつ/または哺乳類組織におけるアポトーシス小体の消化もしくはクリアランスを増加し、かつ/または哺乳類組織における可染体マクロファージの蓄積を減少させるために用いることができる。したがって、そのような組成物は、可染体マクロファージの蓄積が関与する障害の徴候および症状を改善するのに、または該障害に罹患している患者が経験する合併症を低減するのに有用であることが企図される。可染体マクロファージの細胞内蓄積によって特徴付けられる障害は、全身性紅斑性狼瘡、薬物誘発性狼瘡、新生児狼瘡、および皮膚狼瘡、関節リウマチなどである。

10

【0055】

関連する態様では、本発明は、LPLA2の活性を増強、増大または刺激する、あるいはLPLA2の発現を増加または刺激することにより、可染体マクロファージの細胞内レベルを低下させる、さらなる作用物質を特定する方法を提供する。

【0056】

さらに他の関連する態様では、本発明は、LPLA2自己抗体の存在について、またはLPLA2の発現もしくは活性の低下について、患者からの体液または組織試料をアッセイすることにより、SLEすなわち全身性紅斑性狼瘡を診断し、またはそれに対する感受性を決定するための方法を提供する。SLEすなわち全身性紅斑性狼瘡の進行をモニタリングする同様の方法を提供する。

20

【0057】

本出願は、アポトーシス小体の消化およびクリアランスにおける特定のリソソームホスホリパーゼA2の関与を実証する。LPLA2を欠くマウスは、蛋白尿、腎不全を伴い、C3、C1qおよびIgを含む免疫複合体沈着に関連する糸球体腎炎を示す。LPLA2欠損マウスの脾臓におけるマクロファージは、エンドサイトーシスによって取り込まれるが分解されないアポトーシス小体となる、非常に高レベルのTUNEL陽性の可染体を示す。LPLA2-/-マウスからの分離腹膜マクロファージは、アポトーシス胸腺細胞を消化できないが、アポトーシス胸腺細胞に結合し、エンドサイトーシスによって取り込む正常な能力があることによって特徴付けられる。LPLA2欠損マウスからのマクロファージが飲み込まれたアポトーシス小体を消化しないという所見により、この機能障害がLPLA2が存在しないことに起因することが分かる。外因性LPLA2による処置は、アポトーシス小体の消化およびクリアランスを増大させ、可染体マクロファージの蓄積を減少させると予想される。

30

【0058】

データから、陽イオン性両親媒性薬物がLPLA2活性を阻害し、細胞リン脂質症をもたらすことも分かる。この阻害の基礎をなすメカニズムは、LPLA2とアニオン脂質膜との静電相互作用を妨げると思われる。

40

【0059】

最後に、データから、LPLA2のmRNA発現が、正常対照の糸球体ならびに糖尿病、高血圧性腎硬化症、微小変化群およびIgA腎症に起因する他の糸球体疾患を有する患者の糸球体と比較して狼瘡を有する患者の顕微解剖糸球体において低下していることが実証されている。

【0060】

可染体マクロファージ

可染体マクロファージは、リンパ組織の胚中心に認められる大きい単核食細胞である（

50

Smithら、Developmental Immunology、6巻(3~4号)、285~294頁、1998年)。これらのマクロファージは、様々な分解の状態の多くの貪食されたアポトーシス細胞(可染体と呼ばれる)を含む(SwartzendruberおよびCongdon、Journal of Cell Biology、19巻、641~646頁、1963年; Tabeら、Acta Otolaryngologica Supplement、523巻、64~67頁、1996年)。これらの細胞は、1型食細胞と呼ばれている(Kotaniら、Acta Anatomica (Basel)、99巻(4号)、391~402頁、1977年)。

#### 【0061】

これらのマクロファージは、時としてサイズが20~30 $\mu$ m以上の範囲にあり、様々な数の封入体を含む。封入体は、核だけでなく、溶解の様々な段階の細胞質デブリでもある。様々な細胞型が可染体を構成するデブリを形成する。例えば、形質細胞およびリンパ球デブリ、顆粒球ならびに貪食された赤血球が胚中心のマクロファージにおいて同定された(Swartzendruberら、J. Cell Biology、19巻、641~646頁、1963年)。

10

#### 【0062】

アポトーシスの最も早期の変化の1つは、原形質膜の外側リーフレット上のホスファチジルセリン(PS)およびホスファチジルエタノールアミン(PE)の曝露である。可染体マクロファージは、PSを認識することによってアポトーシス細胞に結合し、アポトーシス細胞の飲み込みを促進する乳脂肪小球表皮成長因子8(MFG-E8)を強力に発現する。MFG-E8の発現を欠くノックアウトマウスは、脾臓の胚中心に多くの飲み込まれていないアポトーシス細胞を有し、狼瘡様自己免疫疾患を発現する(Hanayamaら、Science、304巻(5674)、1147~1150、2004年およびCurrent Directions in Autoimmunity、9巻、162~172頁、2006年)。アポトーシス小体は、完全な原形質膜および原形質膜の外側リーフレット上のPSの発現によって特徴付けられる。

20

#### 【0063】

可染体マクロファージの蓄積の増大が関節リウマチ患者のリンパ節胚中心に認められる(Imaiら、Acta Pathol Jpn.、1989年2月、39巻(2号)、127~34頁)。

30

#### 【0064】

##### SLEおよびアポトーシス細胞のクリアランス

アポトーシス細胞のクリアランスの不能または減少は、自己免疫の発現の最も一般的な仮説の1つとして明らかにされた(Erwigら、Am J Pathol、171巻、2~8頁、2007年; Savillら、Nature、407巻、784~788頁、2000年; Tanakaら、Curr Med Chem、14巻、2892~2897頁、2007年)。食作用によるアポトーシス細胞のクリアランスは、4つの明確なステップに分けることができる。これらのステップは、アポトーシス細胞が位置する部位への食細胞の動員、受容体および架橋分子によるアポトーシス細胞の認識、アポトーシス小体の食細胞内へのエンドサイトーシス、ならびにエンドサイトーシスによって取り込まれた細胞小体の消化を含む。認識およびエンドサイトーシスに関連するメカニズムの記述について多大な進歩が達成されたが、エンドサイトーシスによって取り込まれたアポトーシス小体の消化に関しては解明されたのは非常にわずかであった。

40

#### 【0065】

アポトーシス細胞クリアランスの機能障害を反映し得る狼瘡の3つの独特な特徴が存在する。これらの病徴的特徴(pathogenomic feature)は、紅斑性狼瘡(LE)細胞(Hargravesら、Mayo Clin Proc、23巻、25~28頁、1948年)、ヘマトキシリン体(Wilsonら、Am J Med Sci、241巻、31~43頁、1961年)および可染体マクロファージ(Baumanら、Arthritis Rheum、46巻、191~201頁、2002年)を含

50

む。これらの病理学的異常の超微細構造的特徴付けに関して公表された少しであるが、すべてが、それらは、それぞれ骨髄、腎臓および肺ならびにリンパ組織における食細胞によって摂取されたアポトーシス小体の持続的な存在を意味することを示唆している (Ruiz-Arguellesら、Scand J Clin Lab Invest Suppl、235巻、31~37頁、2001年; Swartzendruberら、J Cell Biol、19巻、641~646頁、1963年)。Baumannら(2002年)は、アポトーシス細胞は、SLE患者のサブグループにおける胚中心の可染体マクロファージにより適切に除去されないことを報告した (Baumannら、Arthritis and Rheumatism、46巻(1号)、191~201頁、2002年)。

10

#### 【0066】

SLEは、全身性紅斑性狼瘡またはSLE症状もしくは可染体マクロファージの蓄積を示す他の自己免疫疾患を含む。自己抗体は、SLEにおける疾患の発現に役割を果たす (Rahman、Rheumatology、43巻(11号)、1326~1336頁、2004年; Ehrenstein、Rheumatology、38巻、691~693頁、1999年)。全身性紅斑性狼瘡における自己抗体の標的は、核および細胞質巨大分子、脂質成分ならびに血漿タンパク質などである。自己抗体は、標的器官にとどまる免疫複合体を形成し、正常器官の機能を破壊することにより、または標的抗原と交差反応し、組織を損傷させることにより疾患の発現に関与する。全身性紅斑性狼瘡において最も頻繁に関連する自己抗体は、Smith (リボ核タンパク質) に対する抗体、ならびにヌクレオソーム、ヒストンおよび二本鎖(ds)DNAに対する抗体などである。抗dsDNA抗体は、SLEにおいて最も頻繁に検出される抗体である。dsDNA抗体の力価は、全身性狼瘡を診断し、疾患の活動性を評価するのに用いることができる。

20

#### 【0067】

全身性紅斑性狼瘡は、多臓器疾患である。疾患の最も一般的な初期の徴候は、疲労、発熱ならびに筋肉および関節疼痛である。筋肉痛(筋痛)、関節疼痛(関節痛)および関節炎は、狼瘡の新たな発症および後の突然の再発に一般的に伴う。筋肉自体は、時として炎症状態になり、非常に有痛性で、これが衰弱および疲労の一因となる。狼瘡関節炎に係する最も多い関節は、手、膝および手首の関節である。関節への血流の減少によって引き起こされる合併症は、関節の骨の死(無血管性壊死)をもたらし得る。無血管性壊死は、股関節および膝で最も一般的に起こる。

30

#### 【0068】

皮膚症状は、狼瘡患者の90%超において起こり、多くの異なるタイプの皮疹を含み得る。古典的な狼瘡の皮疹は、しばしば日光曝露によってもたらされる頬の発赤(頬部赤面)である。皮膚の赤色皮膚斑点および落屑を伴う円板状狼瘡は、瘢痕化につながり得る独特の皮疹である。これは、一般的に顔面および頭皮上に発生し、頭毛の喪失(脱毛症)をもたらし得る。

#### 【0069】

腎臓における免疫複合体の沈着に起因する腎臓合併症である糸球体腎炎は、狼瘡を有するすべての患者の半数超で認められる。重度腎疾患は、しばしば免疫抑制療法を必要とする。狼瘡を有する患者の50%超は、肺合併症を有する。肺の内層の炎症(胸膜炎)が一般的である。胸水も発生し得る。心臓の周りの炎症(心膜炎)だけでなく、動脈の炎症(血管炎)も起こり得る。狼瘡を有する患者は、アテローム動脈硬化症を発現するより大きい素因もある。

40

#### 【0070】

神経系合併症は、狼瘡患者の約15%で起こる。起こり得る症状は、発作、神経麻痺、重度うつ病、精神病および卒中などである。狼瘡における脊髄炎症は、まれであるが、麻痺を引き起こし得る。狼瘡患者の約半数は、貧血および/または血小板減少および/または白血球減少を有する。一部の狼瘡患者は、凝血塊を発生する素因がある。これは、抗リン脂質抗体を有する患者で起こる可能性が最も高い。腸における凝血塊または血管の炎症

50

に起因する腸の炎症または感染が起こり得る。一部の患者は、指の蒼白、青色 (blue n e s s) および疼痛として発現する、手への血液供給の間欠的中断 (レーノー症候群) を経験する。

#### 【0071】

薬物誘発性狼瘡 (D I L) は、特定の薬物の慢性使用による誘発される、全身性紅斑性狼瘡と類似した症状を伴う障害である。薬物誘発性狼瘡は、40種超の薬物による長期の治療の副作用として報告されたすべての狼瘡症候群の5~10%を占める周知の実体である (Rubin、Toxicology、209巻(2号)、135~47頁、2005年; Perez-Garciaら、Rheumatology、45巻(1号)、114~116頁、2006年) その臨床的および実験室的特徴は、患者が原因薬物を中止した後一般的に回復することを除いて、全身性紅斑性狼瘡と類似している。40種超の薬物は薬物誘発性狼瘡に関連することが公知であるが、最高の数を報告している3つは、プロカインアミド (商品名プロネスチル、心臓不整脈を処置するために用いる)、ヒドララジン (商品名アプレゾリン、高血圧を処置するために用いる) およびキニジン (商品名キナグルート、心臓不整脈を処置するために用いる) である (Hofstra、Drug Metab Rev、26巻(3号)、485~505頁、1994年; Utrechtら、Chem Res Toxicol、1巻(1号)、74~8頁、1998年)。薬物誘発性狼瘡を引き起こす薬物は、アセプトロール、アミオダロン、プロピオン、カプトプリル、カルバマゼピン、クロルプロマジン、ジルチアゼム、ドセタキセル、エトスクシミド、ゲムフィブロジル、グリブリド、金塩、グリセオフルビン、ヒダントイン、ヒドララジン、ヒドロキシクロロキン、インターフェロン、インターロイキン、イソニアジド、酢酸ロイプロリド、リチウム、ロバスタチン、メフェニトイン、メチルドパ、ミノサイクリン、ニトロフラントイン、オランザピン、眼用チモロール、経口避妊薬、ペニシラミン、フェニトイン、プラクトロール、プロカインアミド、プロピルチオ尿素、キニジン、レセルピン、リファンピン、シムバスタチン、スルファサラジン、テトラサイクリン、チクロピジン、臭化チオトロピウム吸入剤、トリメタジオン、腫瘍壊死因子、バルプロ酸塩またはポリコナゾールなどである。全身性紅斑性狼瘡の再燃を引き起こす薬物は、次の通りである: シメチジン、ヒドララジン、ヒドロクロロチアジド、メサントイン、P-アミノ安息香酸 (PABA)、ペニシリン、フェニルブタゾン、スルホンアミドまたはテルピナフィン。

#### 【0072】

リソソームホスホリパーゼA2およびホスホリパーゼスーパーファミリー

本項では、ホスホリパーゼおよびPLA2酵素のファミリーの一般的な説明を具体的に示す。

#### 【0073】

ホスホリパーゼA2スーパーファミリーは、リン脂質のsn-2エステル結合を加水分解する能力を共有する広範囲の酵素からなっている。この反応の生成物である遊離脂肪酸およびリゾリン脂質は、重要な生物学的役割を有する。前者は、細胞エネルギーの重要な源であるだけでなく、アラキドン酸代謝物の形のさらなる細胞メッセンジャーの基質でもある。後者の生成物は、膜リモデリングおよび膜摂動 (perturbation) に対する重要な作用を有することに加えて、シグナリングの役割を果たす。歴史的にはPLA2は、触媒ヒスチジン、カルシウム依存性を有し、ジスルフィドに富むことによって特徴付けられる小分泌酵素であると考えられていた。酵素のファミリーは、ジスルフィド結合を欠き、触媒性セリンの存在によって特徴付けられるタンパク質に帰することができる細胞質ゾルPLA2活性の発見により著しく拡大した (Gronichら、J Biol Chem、263巻、16645~16651頁、1988年)。現在のところ、15群のホスホリパーゼA2が存在する。群I、II、III、IV、V、IX、XおよびXIは、触媒性ヒスチジンを利用し、小分子量 (13~15 kDa) のものである。群IV、VI、VIIおよびVIIIは、求核性セリンを利用し、触媒作用のためのCa<sup>2+</sup>の要求をほとんどまたは全く有さない。分子量は、より大きい (26~114 kDa)。これらの後者の

群の多くのメンバーは、C2ドメインを有し、 / 折りたたみヒドロラーゼタンパク質のメンバーであり、活性のための必須Ser / His / Asp3残基を含むことがある。

【0074】

1-O-アシルセラミドシンターゼとしても公知であるリソソームホスホリパーゼA2 (LPLA2、LLPL、LYPLA3)は、PLA2の新たな群XVの第1のメンバーとして最近認識された (Schaloskeら、Biochim Biophys Acta、1761巻、1246~1259頁、2006年)。LPLA2は、約40kDaの分子量を有するマンノースに富む単鎖糖タンパク質である。LPLA2は、リパーゼおよびトランスアシラーゼ活性ならびに酸性至適pHを有する。これは、リン脂質ホスファチジルコリン(PC)およびホスファチジルエタノールアミン(PE)に対して特異的である。該タンパク質は、肺胞マクロファージにおいて選択的かつ高度に発現するが、腹膜マクロファージ、末梢血単球または他の組織にもより低い程度で存在する。他のマクロファージ関連ホスホリパーゼA2は、同等な分布を示さない。

10

【0075】

LPLA2は、アゴニストに応答してマクロファージおよびマスト細胞から分泌される。LPLA2は、細胞マンノース受容体により認識され、外因的に投与された場合、リソソームに再取込みされ、トラフィックバックされる。LPLA2の分泌は、リンパ球の動員、増殖およびサイトカインの産生に対する公知の作用を有する生物活性脂質リガンドの生成をもたらす。

【0076】

1996年にセラミド代謝の新規な経路の存在が報告された (Abe, A., Shayman, J. A. および Radin, N. S., J Biol Chem, 271巻、14383~14389頁、1996年)。この経路は、セラミドの高度に親油性の代謝物である1-O-アシルセラミドの生成をもたらす (図1A)。この反応のもとで、ホスファチジルコリンまたはホスファチジルエタノールアミンのsn-2位の脂肪酸がセラミドのC-1ヒドロキシル基に転移する。該酵素の精製により、セラミドまたは水がsn-2脂肪酸のアクセプターとしての役割を果たし得ると判断された (Abe, A. および Shayman, J. A., J Biol Chem, 273巻、8467~8474頁、1998年)。セラミドの存在下では、LPLA2は、ホスファチジルコリンまたはホスファチジルエタノールアミンのsn-2位の脂肪酸のトランスアシル化による1-O-アシルセラミドの生成を触媒する。セラミドまたは他のアルコールの非存在下で、水がアクセプターとしての役割を果たす場合、該酵素は、従来のホスホリパーゼA2として作用する。このホスホリパーゼA2の2つの特性が直ちに明らかになった。第1に、該酵素は酸性至適pH約4.5を有し、第2に、該酵素はリソソームに局在化する。

20

30

【0077】

該酵素の精製に基づいて、LPLA2のいくつかの部分的アミノ酸配列が決定され、コーディングの全長および全長アミノ酸配列が決定された (Hiraokaら、J Biol Chem, 277巻、10090~10099頁、2002年)。発現タンパク質は、ホスホリパーゼA2およびトランスアシラーゼ活性の両方を有することが確認された。コード配列の分析により、LPLA2が、レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)とアミノ酸レベルで49%同一であることが明らかになった。同一性の大部分が触媒ドメインに局在化していた (図1B)。LCATおよびLPLA2の両方が、重複事象により生ずる1つの遺伝子と一致する、それらが隣接して配置されている16q22に共局在化していた。系統発生分析により、両遺伝子がジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼに由来し、LPLA2がLCATの先祖であることが明らかになった。

40

【0078】

ヒトLPLA2の配列を配列番号1に示す。触媒ドメインのより詳細な解析により、LPLA2が、他のホスホリパーゼA2およびアシルヒドロラーゼに存在するコンセンサス

50

配列 - A - X - S - X - G - (配列番号1のアミノ酸196~200)を含むことが明らかになった。セリンは、緊密に近接したアスパラギンおよびヒスチジン残基からなり、セリンを強求核体に変換する役割を果たす触媒3残基の一部である。3残基アミノ酸の部位特異的突然変異誘発は、LPLA2の内因性ホスホリパーゼおよびトランスアシラーゼ活性を除去する。さらなる解析により、Cys65とCys85との間の単一ジスルフィド架橋の存在が明らかになった(Hiraoka, M., Abe, A.およびShayman, J. A., J Lipid Res, 46巻, 2441~2447頁, 2005年)。より最近、酵素のsn-1特異性とsn-2特異性が比較評価された。LPLA2は、sn-2位にアラキドン酸を含むリン脂質に対して高い特異性を有する。しかし、他の脂肪アシル置換が存在する場合、sn-1およびsn-2ヒドロラーゼ活性が認められる(Abe, A., Hiraoka, M.およびShayman, J. A., J Lipid Res, 47巻, 2268~2279頁, 2006年)。セラミドの他の親油性アルコールは、トランスアシル化活性により脂肪酸のアクセプターとしての役割を果たすことができる(Abe, A., Hiraoka, M.およびShayman, J. A., J Lipid Res, 48巻, 2255~2263頁, 2007年)。

10

20

30

40

50

#### 【0079】

2価陽イオンCa<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>は、LPLA2トランスアシラーゼ活性を増大させるが、その活性に必要でない。LPLA2は、ATPまたはジチオトレイトールなどのチオール試薬およびNEMの存在下で活性化もされず、阻害もされない。したがって、該酵素は、そのような試薬に対して高度に敏感である群I、IIおよびIIIホスホリパーゼA2と異なっている。ホスホリパーゼA2阻害剤プロモエノールアセトン(BEL)およびノナデシルテトラエニルトリフルオロメチルケトン(AACOF3)は、酵素活性を阻害しない。

#### 【0080】

LPLA2は、放出された酵素がマンノースまたはマンノース-6-リン酸受容体を介してマクロファージに再組み込まれることを示唆する、高マンノース型糖タンパク質である。HEK293細胞により産生された組換えグリコシル化マウスLPLA2をLPLA2欠損(LPLA2<sup>-/-</sup>)マウス肺胞マクロファージに適用した。外因性LPLA2のLPLA2<sup>-/-</sup>肺胞マクロファージ内への取込みは、濃度依存的に、かつリソソームマーカーLamp-1と共局在化した状態で起こった(Abeら, J. Immunol, 181巻(11号), 7873~81頁, 2008年)。この取込みは、アルファ-メチルマンノシドの存在下では有意に抑制されたが、マンノース-6-リン酸の存在下では抑制されなかった。したがって、外因性LPLA2の取込みの支配的な経路は、マンノース受容体を介するものである(Abeら, J. Immunol, 181巻(11号), 7873~81頁, 2008年)。

#### 【0081】

LPLA2断片、変異体および誘導体

本発明の方法でより有用であるLPLA2は、配列番号1~288のいずれか1つのアミノ酸配列またはその生物学的に活性な断片もしくは変異体もしくは誘導体を含んでよい。そのようなLPLA2、断片、変異体または誘導体を含む組成物は、アポトーシス小体のクリアランスの機能障害および/または可染体マクロファージの蓄積を伴って生じる障害の処置に用いられる。LPLA2、その断片または変異体をコードするポリヌクレオチドも、本発明において例えば、遺伝子治療の目的またはタンパク質の組換え産生のために有用である。

#### 【0082】

LPLA2タンパク質は、配列番号1~288のアミノ酸配列、または配列番号1~288の断片、または配列番号1~288のタンパク質の変異体もしくは保存的置換変異体、または所望の生物学的活性を保持しているその誘導体を含むいずれかの哺乳類タンパク質を含む。特定の態様では、LPLA2タンパク質は、あらゆる天然源、例えば、ヒト(配列番号1)、ウシ、マウス(例えば、これらの配列は図1CおよびHiraokara、

J Biol Chem、277巻、10090～9頁、2002年に示されている)などの哺乳類源に由来するものであるか、あるいは、当業者に公知である合成により、もしくは組換え法により製造される。可染体マクロファージの蓄積に伴う障害、例えば、SLEすなわち全身性紅斑性狼瘡を処置する目的のために、所望の保持された生物学的活性は、リン脂質に対する異化作用、および/またはアポトーシス小体のクリアランスの改善および/または可染体マクロファージの蓄積減少である。

【0083】

A. 断片および変異体

配列番号1～288のいずれかのN末端またはC末端におけるアミノ酸の切断は、所望の生物学的活性を保持している断片をもたらす可能性がある。少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150連続アミノ酸の断片が企図される。そのような断片は、好ましくは、配列番号1のアミノ酸196～200に対応する触媒コンセンサス配列-A-X-S-X-G-を含む。そのような断片は、配列番号1の65位におけるCysとCys89の間のシステイン結合に対応するシステイン結合も含んでいてよい。

10

【0084】

「変異体」という用語は、天然タンパク質の1つもしくは複数の部位における1つもしくは複数のアミノ酸の欠失もしくは付加および/または天然タンパク質の1つもしくは複数の部位における1つもしくは複数のアミノ酸の置換により天然タンパク質から得られたタンパク質を意味するものとする。変異体は、組換え産生によるものを含む、当技術分野で公知の様々な手段のいずれかにより容易に作製される。変異体をコードするポリヌクレオチドは、例えばLPLA2をコードするポリヌクレオチドの部位特異的突然変異誘発により、またはコードするポリヌクレオチド配列の直接合成により作製することができる。

20

【0085】

本発明の天然LPLA2タンパク質の生物学的に活性な変異体は、配列整列プログラムにより判定されるような天然タンパク質のアミノ酸配列との少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有する。本発明のタンパク質の生物学的に活性な変異体は、当タンパク質とわずか1～15アミノ酸残基、6～10などのわずか1～10、わずか5、わずか4、3、2または1アミノ酸残基異なっていてよい。生物学的に活性な変異体は、あるいは、配列番号1をコードするポリヌクレオチドの相補体と厳密な条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされる。高度に厳密な条件は、比較的低いイオン強度および高温のハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を含む。具体例としての高度に厳密な洗浄条件は、65～68における0.1×SSCでの洗浄を含む。具体例としての中程度に厳密な洗浄条件は、55における1×SSCでの洗浄を含む。

30

【0086】

他の例として、配列番号1～288のいずれかのアミノ酸残基の保存的置換または非保存的置換、挿入もしくは欠失は、所望の生物学的活性を保持し、かつ/または配列番号1～288のタンパク質の3次元立体配座構造を保持する変異体を生成し得る。そのような変異体は、好ましくは触媒コンセンサス配列-A-X-S-X-G-を含む。そのような変異体は、配列番号1の65位におけるCysとCys89の間のシステイン結合に対応するシステイン結合も含んでいてよい。

40

【0087】

「保存的置換」という用語は、本明細書では、アミノ酸残基を、疎水性、親水性、陽イオン電荷、陰イオン電荷、形状、極性などに関して生物学的に類似する別の残基に置き換えることを意味する。保存的置換の例は、イソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、システイン、グリシン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、ノルロイシンもしくはメチオニンなど、ある疎水性残基から別の疎水性残基への置換、またはリシンからアルギニンへの置換、アスパラギン酸からグルタミン酸への置換、もしくはア

50

スパラギンからグルタミンへの置換など、ある極性残基から別の極性残基への置換を含む。互いに置換される中性の親水性アミノ酸は、アスパラギン、グルタミン、セリンおよびトレオニンなどである。「保存的置換」という用語は、置換されていない親アミノ酸の代わりに置換または修飾されたアミノ酸を使用することも含み、ただし、置換ポリペプチドに対する抗体も非置換ポリペプチドと免疫反応性を有する。「置換された」または「修飾された」により、本発明は、天然に存在するアミノ酸から改変または修飾されたアミノ酸を含む。

【0088】

したがって、本発明の状況において、保存的置換は、あるアミノ酸が類似の特性を有する別のアミノ酸に置換されていると当技術分野で認識されていることを理解すべきである。例示的な保存的置換は、例えば、記載されている。あるいは、保存的アミノ酸は、Lehninger (Biochemistry、第2版; Worth Publishers, Inc.、N.Y.: N.Y. (1975年)、71~77頁)に記載の通り分類されている。当業者は、特定の保存的置換を示す多くの表を認識している。そのような表の1つの具体例を以下に示す。

【0089】

【表 1】

## 例示的保存的置換の表

<u>元の残基</u>	<u>例示的置換</u>	
Ala (A)	Val, Leu, Ile	
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	10
Asp (D)	Glu	
Cys (C)	Ser	
Gln (Q)	Asn	
Glu (E)	Asp	
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,	
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe	20
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	
Met (M)	Leu, Phe, Ile	
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala	
Pro (P)	Gly	
Ser (S)	Thr	
Thr (T)	Ser	30
Trp (W)	Tyr	
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala	

配列番号 1 ~ 288 の L P L A 2 の触媒ドメインの大部分またはすべてを保持する配列番号 1 ~ 288 のタンパク質の変異体は、本発明の方法において有用であると企図される。上述のように、L P L A 2 の触媒ドメインは、他のホスホリパーゼ A 2 およびアシルヒドロラーゼに存在するコンセンサス配列 - A - X - S - X - G - を含む。セリンは、緊密に近接したアスパラギンおよびヒスチジン残基からなり、セリンを強求核体に変換する役割を果たす触媒 3 残基の一部である。変異体の作製への 1 つの手法は、コンセンサス触媒配列を保持しながら触媒ドメイン内または近傍の保存的置換から始めることと、その後の触媒ドメインの外部での保存的置換または非保存的置換、挿入もしくは欠失である。配列番号 1 の L P L A 2 は、コレステロールレシチンアシルトランスフェラーゼ ( L C A T ) と 50 % の相同性を有し、この相同性の大部分は触媒ドメイン内にある。したがって、そのような変異体がリン脂質の分解を触媒するその特性を保持する限り、当業者が配列番号 1 の触媒ドメインが L C A T の触媒ドメインにより置換されている ( H i r a o k a r a 、 J B i o l C h e m 、 277 巻、10090 ~ 9 頁、2002 年 ) 配列番号 1 の変異体を製造することを選択する可能性があることが企図される。そのような活動は、本明細書の下文中で述べるように容易に評価される。

## 【0090】

さらに、合理的な薬物設計を用いてLPLA2タンパク質の構造的変異体を製造し、それにより、本明細書で検討する方法に用いるさらなる組成物を得る。そのような変異体を創出することにより、熟練研究者は、改変に対する異なる感受性を有する天然分子より活性もしくは安定である、または他の様々な分子の機能に影響を及ぼし得るLPLA2由来のタンパク質を創出することができる。一手法において、例えば、X線結晶学、コンピュータモデリングまたは両手法の組合せによって対象のLPLA2由来タンパク質またはその断片の3次元構造を得ることが望ましい。代替の手法「アラニンスキャン」は、アラニンによるタンパク質全体の残基の系統的な置換の後の機能に対する得られた効果を決定することを必要とする。

10

## 【0091】

さらに、構造の安定化または生分解の軽減をもたらすLPLA2由来タンパク質の非ペプチド変異体も企図される。ペプチド模倣変異体は、対象のタンパク質の1つまたは複数のアミノ酸残基を非ペプチド部分により置換することによって、基礎をなすLPLA2タンパク質構造に基づいて調製する。一態様では、非ペプチド部分は、ペプチドがその天然の立体配座(confirmation)を保持する、または生物活性立体配座を安定化することを可能にする。ペプチドから非ペプチド模倣変異体を調製する方法の一例は、Nachmanら、Regul. Pept.、57巻、359~370頁(1995年)に記載されている。「ペプチド」は、本明細書では前記のすべてを含む。

20

## 【0092】

## B. 誘導体

タンパク質の基本的アミノ酸構造に加えて、LPLA2タンパク質は、それらの取込みを増加させ、毒性を減少させ、循環時間を延長させ、またはLPLA2タンパク質の生体内分布を修正するために修飾することが企図される。例えば、マクロファージによるLPLA2組成物のより大きい取込みを促進する修飾、例えば、マンノース残基を増加させる修飾が企図される。LPLA2のマンノース含量は、例えば、マンノースの化学的コンジュゲーションにより、マンノースをグリコシル化部位に曝露もしくは付加する酵素による処理により、または得られる糖タンパク質の高いマンノース含量に有利に働く組換え製造法の修正により増加させることができる。あるいは、高マンノース含量を有するLPLA2の組成物は、例えば、マンノース受容体、マンノース結合レシチンなどのマンノース結合タンパク質に結合させたマトリックスを用いたアフィニティー精製により調製することができる。

30

## 【0093】

本発明の化合物は、線状ポリマー(例えば、ポリエチレングリコール、ポリリシン、デキストラン等)、分枝鎖ポリマー(例えば、米国特許第4,289,872号;米国特許第5,229,490号;国際公開第93/21259号を参照)、脂質、コレステロール基(ステロイドなど)または炭水化物もしくはオリゴ糖などの担体分子と共有結合または非共有結合により結合させることもできる。他の可能な担体は、抗体部分および特に、抗体から得られる定常領域などである。他の可能な担体は、米国特許第4,640,835号;第4,496,689号;第4,301,144号;第4,670,417号;第4,791,192号および第4,179,337号に記載されているようなポリオキシエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールなどの1つまたは複数の水溶性ポリマー結合を含む。当技術分野で公知の他の有用なポリマーは、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、または他の炭化水素ベースのポリマー、ポリ(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)およびポリビニルアルコールならびにこれらのポリマーの混合物などである。

40

## 【0094】

例えば、Fc領域をLPLA2タンパク質、断片または変異体のN末端またはC末端(

50

または両方)に融合させることができる。本明細書に例示するような複数の媒体、例えば、末端におけるFcおよび他の末端または側鎖におけるPEG基も用いることができる。

【0095】

種々の実施形態において、Fc成分は、天然FcまたはFc変異体である。例として、また制限なく、Fc成分は、ヒト免疫グロブリンIgG1重鎖のFc領域またはその生物学的に活性な断片、誘導體もしくは二量体である(Ellyson, J. W.ら、Nucleic Acids Res., 10巻、4071~4079頁(1982年)を参照)。しかし、本発明に用いるFc領域は、任意の種のIgG、IgA、IgM、IgEまたはIgD由来であってよいことが理解される。天然Fcドメインは、共有結合(すなわち、ジスルフィド結合)および/または非共有結合により二量体または多量体に連結させることができる単量体ポリペプチドで構成されている。天然Fc分子の単量体サブユニット間の分子間ジスルフィド結合の数は、クラス(例えば、IgG、IgA、IgE)またはサブクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgA1、IgGA2)によって1~4の範囲である。天然Fcの一例は、IgGのパイン消化に起因するジスルフィド結合二量体である(Ellysonら(1982年)、Nucleic Acids Res., 10巻、4071~9頁を参照)。

10

【0096】

様々な水溶性ポリマーが生体内分布を修正し、細胞取込みの様態を改善し、生理的バリアを通しての透過性を変化させ、身体からのクリアランスの速度を変更することが示された(Greenwaldら、Crit Rev Therap Drug Carrier Syst., 2000年、17巻、101~161頁; Kopečekら、J Controlled Release, 74巻、147~158頁、2001年)。ターゲティングもしくは持続放出効果を達成するために、薬物部分を末端基として、主鎖の一部として、またはポリマー鎖上のペンダント基として含む水溶性ポリマーが合成された。

20

【0097】

ポリエチレングリコール(PEG)は、その高度の生体適合性および修飾の容易さを考慮して、薬物担体として広く使用されている(Harrisら、Clin Pharmacokinet., 2001年、40巻(7号)、539~51頁)。様々な薬物、タンパク質およびリポソームへの結合が滞在時間を改善し、毒性を減少させることが示された(Greenwaldら、Crit Rev Therap Drug Carrier Syst., 2000年、17巻、101~161頁; Zalipskyら、Bioconj Chem., 1997年、8巻、111~118頁)。一態様では、PEGを鎖の末端のヒドロキシル基を介しておよび他の化学的方法により活性物質に結合させるが、PEG自体は、1分子当たり最大で2つの活性物質に制限する。異なる手法では、PEGとアミノ酸とのコポリマーは、PEGの生体適合性を保持するが、1分子当たり多数の結合点がある(より大きい薬物負荷を可能にする)という付加的な利点を有し、様々な適用分野に適合するように合成的に設計することができる生体材料として探究された(Nathanら、Macromolecules, 1992年、25巻、4476~4484頁; Nathanら、Bioconj Chem., 1993年、4巻、54~62頁)。

30

40

【0098】

当業者は、薬物の有効な修飾のためのPEG化法を知っている。例えば、PEGおよびリシンなどの三官能性モノマーの交互ポリマーからなる薬物送達ポリマーがVectra Med(Plainboro, NJ)によって使用された。PEG鎖(一般的に2000ダルトン以下)を安定なウレタン結合を介してリシンの - および - アミノ基に結合させる。そのようなコポリマーは、厳密に制御され、ポリマー鎖に沿った所定の間隔の反応性ペンダント基(リシンのカルボン酸基)を備えていると同時に、PEGの望ましい特性を保持している。一態様では、反応性ペンダント基は、誘導體化、架橋または他の分子とのコンジュゲーションのために用いる。これらのポリマーは、ポリマーの分子量、PEGセグメントの分子量および薬物とポリマーとの間の開裂可能結合を変化させることによ

50

って安定な長時間循環プロドラッグを製造するのに有用である。PEGセグメントの分子量は、薬物/結合基複合体の間隔およびコンジュゲートの分子量当たりの薬物の量に影響を及ぼす(より小さいPEGセグメントはより大きい薬物負荷を可能にする)。一般的に、ブロックポリマーコンジュゲートの全分子量を増加させることより、コンジュゲートの循環半減期が長くなる。それにもかかわらず、コンジュゲートは、容易に分解できるものであるか、または閾値制限系球体濾過値を下回る分子量(例えば、45 kDa未満)を有さなければならない。したがって、一態様では、PEG化LPLA2タンパク質は、分子量が20 kDaから35 kDaまでの範囲にある。

#### 【0099】

他の組の有用な誘導体は、トレーサーまたは放射性同位体を含む他の治療薬または診断薬にコンジュゲートさせたLPLA2タンパク質である。有用なコンジュゲーションパートナーは、90イットリウム、131ヨウ素、225アクチニウムおよび213ビスマスなどの放射性同位体;リシンA毒素、Pseudomonasエンドトキシン(例えば、PE38、PE40)などの微生物由来毒素など;キャプチャーシステムにおけるパートナー分子(下を参照);ビオチン、ストレプトアビジン(キャプチャーシステムにおけるパートナー分子として、または特に診断用のトレーサーとして有用);ならびに化学療法薬などである。

10

#### 【0100】

##### LPLA2タンパク質を作製する方法

LPLA2タンパク質は、従来の自動ペプチド合成法または組換え発現により製造することができる。タンパク質を設計し、製造するための一般的原則は、当業者には周知である。

20

#### 【0101】

##### A. 自動固相ペプチド合成

一態様では、本発明のタンパク質は、従来の技術により溶液中または固体支持体上で合成する。様々な自動合成装置が市販されており、公知のプロトコールに従って使用されている。例えば、それぞれが参照により本明細書に組み込まれている、StewartおよびYoung、Solid Phase Peptide Synthesis、第2版、Pierce Chemical Co.(1984年); Tamら、J. Am. Chem. Soc.、105巻、6442頁(1983年); Merrifield、Science、232巻、341~347頁(1986年); ならびにBaranyおよびMerrifield、The Peptides、GrossおよびMeienhofer編、Academic Press、New York、1~284頁(1979年)を参照されたい。したがって、LPLA2タンパク質、その断片および変異体は、容易に合成され、関連する活性について、例えば、アシルセラミド(aclyceramide)シンターゼ活性アッセイにより場合によってスクリーニングされる。

30

#### 【0102】

例えば、ペプチドは、Applied Biosystems Inc.製のModel 433Aなどの具体例としてのペプチド合成装置を用いた固相技術により合成する。そのような場合に、自動ペプチド合成または組換え法により生成させた所与のペプチド基質の純度は、一般的に逆相HPLC分析を用いて決定する。各ペプチドの化学的信ぴょう性は、当業者に周知の方法によって立証する。特定の実施形態では、信ぴょう性は、質量分析により立証する。さらに、ペプチドはまた、例えば、CEM Corporation製MDS 2000マイクロ波オープンなどのマイクロ波オープンを用いてマイクロ波加水分解を行うアミノ酸分析を用いて定量する。特定の態様では、試料を逆相HPLCにより分析し、高度積分器を用いて定量化を達成する。当業者は、逆相HPLCと質量分析の組合せを用いてLPLA2のアミノ酸配列を決定する方法の詳細を記載しているHirakaraを参照する。そのような方法は、当業者には周知であり、タンパク質またはペプチドの配列分析に容易に適用される。

40

#### 【0103】

50

## B．組換えタンパク質産生

自動ペプチド合成の代替として、本明細書の下文で述べるように本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞に形質転換またはトランスフェクトし、発現に適する条件下で培養する、組換えDNA技術を用いる。一態様では、配列番号1～288のタンパク質をコードするヌクレオチド配列、その断片または変異体を提供する。組換え法は、本発明の方法で用いるより長いポリペプチドを産生させるのに特に有用である。

### 【0104】

様々な発現ベクター/宿主系が当技術分野で公知である。これらは、組換えバクテリオファージで形質転換した細菌などの微生物、プラスミドもしくはコスミドDNA発現ベクター；酵母発現ベクターで形質転換した酵母；ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）をトランスフェクトした、または細菌発現ベクター（例えば、TiもしくはpBR322プラスミド）で形質転換した植物細胞系；または動物細胞系などである。組換えタンパク質産生に有用な哺乳類細胞は、VERO細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株、COS細胞（COS-7など）、W138、BHK、HepG2、3T3、RIN、MDCK、A549、PC12、K562および293細胞を含むが、これらに限定されない。細菌、酵母および他の無脊椎動物におけるLPLA2ポリペプチドの組換え発現に関する具体例としてのプロトコールは、当業者に公知であり、下で簡単述べる。

### 【0105】

原核宿主に用いる発現ベクターは、一般的に1つまたは複数の表現型選択マーカ―遺伝子を含む。そのような遺伝子は、一般的に例えば、抗生物質耐性を付与する、または栄養要求性要件を満たすタンパク質をコードする。様々なそのようなベクターは、商業的供給源から容易に入手できる。例としては、pSPORTベクター、pGEMベクター（Promega）、pPROEXベクター（LTI、Bethesda、MD）、Bluescriptベクター（Stratagene）、pETベクター（Novagen）およびpQEベクター（Qiagen）などがある。

### 【0106】

所与のタンパク質または融合ポリペプチドをコードするDNA配列をPCRにより増幅し、ベクター、例えば、ベクターによりコードされるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）を含む融合タンパク質、およびベクターのクローニング部位に挿入されたDNA断片によりコードされるタンパク質を産生するように設計されたpGEX-3X（Pharmacia、Piscataway、NJ）にクローニングする。一般的に、PCR用のプライマーは、例えば、適切な切断部位を含むように生成させる。個々の形質転換体からのプラスミドDNAを精製し、自動シーケンサーを用いて部分的に配列決定を行って、適切な配向の所望のコーディング核酸インサートの存在を確認する。ベクターを細胞中に形質転換し、対象のLPLA2タンパク質を精製し、トロンピンまたはXa因子（Pharmacia、Piscataway、NJ）による組換え融合タンパク質の切断により回収する。

### 【0107】

分泌組換えタンパク質は、従来のタンパク質精製法により細菌培地から精製する。酵母宿主細胞における組換えタンパク質産生のための類似のシステムは、製造業者の指示に従って容易に商業的に入手できる、例えば、Pichia Expression System（Invitrogen、San Diego、CA）である。他の代替組換え産生は、昆虫系を用いて達成される。タンパク質発現のための昆虫系は、当業者に周知である。1つのそのような系において、Autographa californica核多角体病ウイルス（AcNPV）をSpodoptera frugiperda細胞またはTrichoplusia幼虫における外来遺伝子を発現するためにベクターとして用いる。基質コード配列を多角体遺伝子などのウイルスの非必須領域にクローニングし、多

10

20

30

40

50

角体プロモーターの制御下におく。基質の挿入に成功を収めると、多角体遺伝子が不活性になり、コートタンパク質コートを欠く組換えウイルスが産生される。次に組換えウイルスを用いて、基質が発現する *S. frugiperda* 細胞または *Trichoplusia* 幼虫を感染させる (Smithら、*J Virol*、46巻、584頁、1983年; Engelhard EKら、*Proc Nat Acad Sci*、91巻、3224~7頁、1994年)。

【0108】

組換えタンパク質の発現のための哺乳類宿主系も当業者に周知である。宿主細胞株は、一般的にタンパク質の活性をもたらすのに有用である発現タンパク質をプロセッシングする、または特定の翻訳後修飾を生じさせる特定の能力について選択される。ポリペプチドのそのような修飾は、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化を含むが、これらに限定されない。タンパク質の「プレプロ」体を切断する翻訳後プロセッシングも正しい挿入、折りたたみおよび/または機能のために重要である。CHO、HeLa、MDCK、293、WI38などの各種宿主細胞は、そのような翻訳後活動のための固有の細胞機構および特有のメカニズムを有し、導入された外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを保証するために選択される。

10

【0109】

一態様では、形質転換細胞は、長期の高収率タンパク質産生のために用いられ、したがって、安定な発現が望ましい。そのような細胞を、選択マーカーならびに所望の発現カセットを含むベクターで形質転換すると、選択培地に切替える前に細胞を富化培地中で1~2日間増殖させる。選択マーカーは、選択に対する耐性を付与するように設計されており、その存在により、導入された配列を成功裏に発現する細胞の増殖および回収が可能になる。安定に形質転換した細胞の耐性集団を、細胞に適切な組織培養技術を用いて増殖させる。

20

【0110】

組換えタンパク質の産生のために形質転換した細胞を回収するのに多くの選択システムが有用である。そのような選択システムは、それぞれ tk、hgprt または aprt 細胞中の HSVチミジンキナーゼ、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼおよびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を含むが、これらに限定されない。他の態様では、抗代謝物耐性を、メトトレキサートに対する耐性を付与する dhfr、ミコフェノール酸に対する耐性を付与する gpt、アミノグリコシド G418 に対する耐性を付与する neo、クロルスルフロニに対する耐性を付与する als およびハイグロマイシンに対する耐性を付与する hygro の選択の基礎として用いる。有用であるさらなる選択遺伝子は、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用することを可能にする trpB または細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用することを可能にする hisD などである。形質転換体の同定のための可視指示を示すマーカーは、アントシアニン、 $\beta$ -グルクロニダーゼおよびその基質である GUS ならびにルシフェラーゼおよびその基質であるルシフェリンなどである。

30

【0111】

C. 組換えタンパク質産生のための発現構築物

40

本発明の LPLA2 タンパク質の組換え産生には、LPLA2 タンパク質をコードするポリヌクレオチド分子を含むベクターを用いる。そのようなベクターを調製ならびにそのようなベクターで形質転換した宿主細胞を作製する方法は、当業者に周知である。一態様では、用いるポリヌクレオチド分子 (例えば、配列番号 1~288 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその断片もしくは変異体) を、宿主における増殖のための選択マーカーおよび複製起点を一般的に含むベクターに連結させる。発現構築物のこれらのエレメントは、当業者に周知である。一般的に、発現ベクターは、哺乳類、微生物、ウイルスまたは昆虫遺伝子に由来するものなどの適切な転写または翻訳調節配列に作動可能に連結した所与のタンパク質をコードする DNA を含む。調節配列の例は、転写プロモーター、オペレーターまたはエンハンサー、mRNA リボソーム結合部位ならびに転写およ

50

び翻訳を制御する適切な配列などである。

【0112】

「発現ベクター」、「発現構築物」または「発現カセット」という用語は、本明細書を通して同義で用い、配列をコードする核酸の一部またはすべてを転写することができ、調節配列に作動可能に連結した遺伝子産物をコードする核酸を含むあらゆるタイプの遺伝的構築物を含むことを意味する。

【0113】

本発明のペプチドまたはポリペプチドの発現のための適切な発現ベクターの選択は、もちろぬ用いられる特定の宿主細胞に依存し、通常、技術者の技術の範囲内にある。哺乳類発現ベクターの構築の方法は、例えば、OkayamaおよびBerg (Mol. Cell Biol., 3巻、280頁(1983年))、Cosmanら (Mol. Immunol., 23巻、935頁(1986年))；Cosmanら (Nature, 312巻、768頁(1984年))；EP-A-0367566およびWO91/18982に開示されている。

10

【0114】

一態様では、発現構築物は、ペプチドまたはポリペプチドの発現の検出を可能にする選択マーカーを含む。通常、薬物選択マーカーの包含は、クローニングおよび形質転換体の選択に役立つ(例えば、ネオマイシン、ピュロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、ゼオシンおよびヒスチジノール)。あるいは、態様は、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(tk)(真核生物)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼまたはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)(原核生物)などの酵素をマーカーとして用いる。あるいは、免疫学的マーカーも用いられている。例えば、FLAGシステム(IBM, New Haven, CT)、HAおよび6xHisシステム(Qiagen, Chatsworth, CA)などのエピトープタグが用いられている。さらに、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)システム(Pharmacia, Piscataway, NJ)またはマルトース結合タンパク質システム(NEB, Beverly, MA)も用いられている。用いられる選択マーカーは、遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現することができる限り、重要であると考えられない。選択マーカーのさらなる例は、当業者に周知である。

20

【0115】

発現には、宿主細胞における対象の核酸の発現を誘導するのに用いられるウイルスおよび哺乳類源の両方からのエンハンサー/プロモーターなどの適切なシグナルがベクターに与えられることが必要である。通常、発現する核酸は、プロモーターの転写制御下にある。「プロモーター」は、遺伝子の特異的転写を開始するために必要とする、細胞の合成機構または導入合成機構により認識されるDNA配列を意味する。調節配列がペプチド基質または融合ポリペプチドをコードするDNAと機能的に関連している場合、ヌクレオチド配列が作動可能に連結している。したがって、プロモーターヌクレオチド配列が配列の転写を誘導する場合、プロモーターヌクレオチド配列は、所与のDNA配列に作動可能に連結する。同様に、「転写制御下」という語句は、プロモーターがRNAポリメラーゼ開始および遺伝子の発現を制御するために核酸に対して正しい位置および配向状態にあることを意味する。

30

40

【0116】

核酸の発現を駆動する任意のプロモーターが用いられる。対象の核酸配列の発現を制御するために用いられる特定のプロモーターは、標的細胞における核酸の発現を誘導することができる限り、重要であると考えられない。したがって、ヒト細胞を標的とする場合、核酸コーディング領域を、ヒト細胞において発現することができるプロモーターに隣接して、その制御下に置くことが好ましい。一態様では、そのようなプロモーターは、ヒトまたはウイルスプロモーターを含む。一般的なプロモーターとしては、すべてが当業者に周知であり、容易に入手可能であり、対象のコード配列の高レベルの発現を得るために用いられるプロモーターである、例えば、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)即時早期遺伝

50

子プロモーター、SV40早期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス長末端反復配列、  
 -  
 アクチン、ラットインスリンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーターお  
 よびグリセルアリデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターなどがある。対象の  
 コード配列の発現を達成するための当技術分野で周知である他のウイルスまたは哺乳類細  
 胞または細菌ファージプロモーターの使用も、発現のレベルが所与の目的のために十分で  
 ある限り、企図される。周知の特性を有するプロモーターを用いることにより、トランス  
 フェクションまたは形質転換後の対象のタンパク質の発現のレベルおよびパターンは最適  
 化される。誘導プロモーターの使用も企図される。

#### 【0117】

タンパク質発現に用いられる他の調節エレメントは、エンハンサーである。これらは、  
 DNAの同じ分子上の遠い位置にあるプロモーターによる転写を増大させる遺伝子エレ  
 メントである。発現構築物がcDNAインサートを用いる場合、遺伝子転写物の適切なポリ  
 アデニル化を達成するためのポリアデニル化シグナル配列を含めることを一般的に望む。  
 ヒトまたはウシ成長ホルモンおよびSV40ポリアデニル化シグナルなどの、選択される  
 トランスジェニック動物種の細胞によって認識されるポリアデニル化シグナル配列は、本  
 発明の実施に適している。

10

#### 【0118】

ターミネーターも発現カセットのエレメントとして企図される。これらのエレメントは  
 、メッセージレベルを増大させ、カセットから他の配列への読み過ぎを最小限にする役  
 割を果たす。本発明により企図されるもののような適用分野における終結領域は比較的置  
 換え可能であると思われるので、終結領域は、便宜上選択される。特定の態様では、終結  
 領域は、転写開始に関して固有であり、他の実施形態では、終結領域は、対象のDNA配  
 列に固有のものであり、あるいは終結領域は、他の供給源に由来するものである。

20

#### 【0119】

##### 遺伝子治療

発現ベクターは、タンパク質の*in vivo*での発現を達成するための遺伝子治療に  
 も用いることができる。一態様では、当業者に公知のいずれかの方法を用いて治療の標的  
 とする細胞に発現構築物を導入する。例えば、発現構築物は、ウイルス送達ベクターの一  
 部を構成する。他の実施形態では、ウイルスを用いない送達が企図される。受容体介した  
 送達も企図される(Ridgeway、In: Rodriguez R L、Denhard  
 T編、Vectors: A survey of molecular  
 cloning vectors and their uses、Stoneham  
 : Butterworth、467 492、1988年; NicolasおよびRu  
 benstein、In: Vectors: A survey of molecu  
 lar cloning vectors and their uses、Rodri  
 guezおよびDenhardt(編)、Stoneham: Butterworth  
 、493 513、1988年; BaichwalおよびSugden、In: Gen  
 e Transfer、Kucherlapati R編、New York、Plen  
 um Press、117 148、1986年; Temin、In: gene Tr  
 ansfer、Kucherlapati(編)、New York、Plenum P  
 res、149 188、1986年)。

30

40

#### 【0120】

様々なウイルスベクターを用いてDNAを細胞に導入することができることは、現在広  
 く認識されている。様々な実施形態では、対象の遺伝子を含むウイルスベクターを含む発  
 現構築物は、アデノウイルス(例えば、それぞれが参照により本明細書に組み込まれてい  
 る、米国特許第5,824,544号;米国特許第5,707,618号;米国特許第5  
 ,693,509号;米国特許第5,670,488号;米国特許第5,585,362  
 号参照);レトロウイルス(例えば、それぞれが参照により本明細書に組み込まれている  
 、米国特許第5,888,502号;米国特許第5,830,725号;米国特許第5,  
 770,414号;米国特許第5,686,278号;米国特許第4,861,719号

50

参照) ; アデノ関連ウイルス (例えば、それぞれが参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第 5, 474, 935 号 ; 米国特許第 5, 139, 941 号 ; 米国特許第 5, 622, 856 号 ; 米国特許第 5, 658, 776 号 ; 米国特許第 5, 773, 289 号 ; 米国特許第 5, 789, 390 号 ; 米国特許第 5, 834, 441 号 ; 米国特許第 5, 863, 541 号 ; 米国特許第 5, 851, 521 号 ; 米国特許第 5, 252, 479 号参照) ; アデノウイルス - アデノ関連ウイルスハイブリッド (例えば、参照により本明細書に組み込まれている米国特許第 5, 856, 152 号参照) またはワクシニアウイルスもしくはヘルペスウイルス (例えば、それぞれが参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第 5, 879, 934 号 ; 米国特許第 5, 849, 571 号 ; 米国特許第 5, 830, 727 号 ; 米国特許第 5, 661, 033 号 ; 米国特許第 5, 328, 688 号参照) ベクターである。

#### 【0121】

ウイルスを用いない遺伝子導入は、リン酸カルシウム沈殿 (Graham および Van Der Eb、*Virology*、52 巻、456~467 頁、1973 年 ; Chen および Okayama、*Mol. Cell Biol.*、7 巻、2745~2752 頁、1987 年 ; Rippe ら、*Mol. Cell Biol.*、10 巻、689~695 頁、1990 年)、DEAE - デキストラン (Gopal、*Mol. Cell Biol.*、5 巻、1188~1190 頁、1985 年)、エレクトロポレーション (Tur-Kaspa ら、*Mol. Cell Biol.*、6 巻、716~718 頁、1986 年 ; Potter ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、81 巻、7161~7165 頁、1984 年)、直接マイクロインジェクション (Harland および Weintraub、*J. Cell Biol.*、101 巻、1094~1099 頁、1985 年)、DNA 負荷リポソーム (Nicolaou および Sene、*Biochim. Biophys. Acta*、721 巻、185~190 頁、1982 年 ; Fraley ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、76 巻、3348~3352 頁、1979 年 ; Felgner、*Sci Am.*、276 巻 (6 号)、1026、1997 年 ; Felgner、*Hum Gene Ther.*、7 巻 (15 号)、1791-3、1996 年)、細胞音波処理 (Fechheimer ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、84 巻、8463~8467 頁、1987 年)、高速マイクロプロジェクトイルを用いる遺伝子ボンバードメント (Yang ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、87 巻、9568~9572 頁、1990 年) および受容体を介したトランスフェクション (Wu および Wu、*J. Biol. Chem.*、262 巻、4429~4432 頁、1987 年 ; Wu および Wu、*Biochemistry*、27 巻、887~892 頁、1988 年 ; Wu および Wu、*Adv. Drug Delivery Rev.*、12 巻、159~167 頁、1993 年) などである。

#### 【0122】

リポソーム送達も企図される (Radler ら、*Science*、275 巻 (5301 号)、810-4、1997 年)。本発明において、「リポフェクション」技術が関与する様々な商業的手法も企図される。リポソームと血球凝集性ウイルス (HVJ) との複合体化は、細胞膜との融合を促進し、リポソーム封入 DNA の細胞侵入を促進する (Kaneda ら、*Science*、243 巻、375~378 頁、1989 年)。他の例示的实施形態では、リポソームを、核非ヒストン染色体タンパク質 (HMG-1) と複合体化するか、またはそれとのコンジュゲーションに用いる (Kato ら、*J. Biol. Chem.*、266 巻、3361~3364 頁、1991 年)。さらなる実施形態では、リポソームを、HVJ および HMG-1 と複合体化するか、またはそれらとのコンジュゲーションに用いる。そのような発現構築物を *in vitro* および *in vivo* で核酸の導入および発現に用いることに成功した場合、それらの発現構築物を本発明に適用できる。

#### 【0123】

受容体媒介遺伝子ターゲティングビヒクルも有用であり、一般的に細胞受容体特異的リガンドおよびDNA結合物質の2成分からなる。いくつかのリガンドが受容体媒介遺伝子導入に用いられた。最も広範に特徴付けがなされたリガンドは、アシアロオロソムコイド(ASOR)(WuおよびWu、1987年、前出)およびトランスフェリン(Wagnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87巻(9号)、3410~3414頁、1990年)である。最近、同じ受容体をASORと認識する、合成ネオ糖タンパク質が遺伝子送達ビヒクルとして用いられ(Ferkolら、FASEB J.、7巻、1081~1091頁、1993年; Peralesら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91巻、4086~4090頁、1994年)、表皮成長因子(EGF)も扁平細胞癌細胞に遺伝子を送達するのに用いられた(Myers、EPO0273085)。

10

20

30

40

50

#### 【0124】

本発明の他の実施形態では、発現構築物は、単に裸の組換えDNAまたはプラスミドからなっている。構築物の導入は、細胞膜を物理的または化学的に透過性にする上述の方法のいずれかによって行う。これは、特に*in vitro*での導入に適用できるが、*in vivo*での使用にも適用される。Dubenskyら(Proc. Nat. Acad. Sci. USA、81巻、7529~7533頁、1984年); BenvenistyおよびNeshif(Proc. Nat. Acad. Sci. USA、83巻、9551~9555頁、1986年)。裸DNA発現構築物はまた、粒子ボンバードメントを用いて導入される(Kleinら、Nature、327巻、70~73頁、1987年; Yangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87巻、9568~9572頁、1990年)。

#### 【0125】

##### タンパク質の精製

本発明のLPLA2タンパク質を、例えば、本発明の治療法に用いるために精製することが望ましい。タンパク質精製技術は、当業者に周知である。これらの技術は、1つのレベルにおいて、細胞環境のポリペプチドおよび非ポリペプチド画分への粗分別を必要とする。本発明のLPLA2タンパク質/ポリペプチドを他のタンパク質から分離したならば、本発明のLPLA2ポリペプチドをクロマトグラフィーおよび電気泳動技術を用いてさらに精製して、部分的または完全な精製(または均一性になるまで精製)を達成する。純ペプチドの調製に特に適する分析方法は、イオン交換クロマトグラフィー、排除クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動である。ペプチドを精製する特に効率のよい方法は、迅速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)または高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)である。具体例としてのHPLC条件は、Hiraokaら、J Biol Chem、277巻、10090~9頁、2002年に例示されているものを含む。

#### 【0126】

本発明の特定の態様は、精製に、また特定の実施形態では、コードされるポリペプチド、タンパク質またはペプチドの実質的精製に関する。「精製ポリペプチド、タンパク質またはペプチド」という用語は、本明細書では、他の成分から分離された組成物を意味し、ポリペプチド、タンパク質またはペプチドがその天然で得ることができる状態に対してある程度精製されている。精製ポリペプチド、タンパク質またはペプチドは、したがって、それが天然で存在している環境にないポリペプチド、タンパク質またはペプチドも意味する。

#### 【0127】

一般的に、「精製」は、他の種々の成分を除去するための分別にかけられたポリペプチド、タンパク質またはペプチド組成物を意味し、組成物がその発現した生物学的活性を実質的に保持している。「実質的に精製された」という用語を用いる場合、この呼びかたは、ポリペプチド、タンパク質またはペプチドが組成物中のタンパク質の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%またはそれ以上を構成するような組成物の

主成分をなす組成物を意味する。

【0128】

タンパク質の精製に用いるのに適する様々な技術が当業者に周知である。これらは、例えば、硫酸アンモニウム、PEG、抗体などによる、または熱変性の後の遠心分離による沈殿；イオン交換、ゲル濾過、逆相、ヒドロキシアパタイトおよびアフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーステップ；等電点電気泳動；ゲル電気泳動；そのようなおよび他の技術の組合せなどである。当技術分野で一般的に公知であるように、種々の精製ステップを実施する順序は置き替えできる、または特定のステップを省略し、結果として、実質的に精製されたポリペプチド、タンパク質またはペプチドの調製に適する方法となると考えられる。

10

【0129】

遺伝子治療

治療用タンパク質の適切な細胞への送達は、物理的DNA導入法（例えば、リボソームもしくは化学的処理）の使用による、またはウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、アデノ関連ウイルスもしくはレトロウイルス）の使用によるなどの当技術分野で公知のいずれかが適切なアプローチの使用による *ex vivo*、*in situ* もしくは *in vivo* での遺伝子治療により達成することができる。例えば、*in vivo* 治療のために、LPLA2をコードする核酸を単独で、またはベクター、リボソームもしくは沈殿物と組み合わせて対象に直接注射することができ、またいくつかの実施形態では、LPLA2化合物の発現が望まれる部位に注射することができる。*ex vivo* 治療のために、対象の細胞を除去し、核酸をこれらの細胞に導入し、改良細胞を直接、または例えば、患者に植え込まれる多孔質膜に封入して対象に戻す。例えば、米国特許第4,892,538号および第5,283,187号を参照のこと。核酸を生存細胞に導入するために利用可能な様々な技術が存在する。技術は、核酸を培養細胞に *in vitro* で導入するか、または意図される宿主の細胞に *in vivo* で導入するかによって異なる。核酸を哺乳類細胞に *in vitro* で導入するのに適する技術は、リボソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストランおよびリン酸カルシウム沈殿の使用などである。核酸の *ex vivo* 送達のために一般的に用いられるベクターは、レトロウイルスである。

20

【0130】

他の *in vivo* 核酸導入技術は、ウイルスベクター（アデノウイルス、単純疱疹ウイルスまたはアデノ関連ウイルス）によるトランスフェクションおよび脂質ベースのシステムなどである。核酸およびトランスフェクション物質は、場合によって微粒子に結合させる。具体例としてのトランスフェクション物質は、リン酸カルシウムもしくは塩化カルシウム共同沈殿、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、GIBCO-BRLにより *Lipofectin* として市販されている第四級アンモニウム両親媒性DOTMA（ジオレオイルオキシプロピル）臭化トリメチルアンモニウム（Felgneら（1987年）、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、84巻、7413～7417頁；Maloneら（1989年）、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、86巻、6077～6081頁）；ペンダントトリメチルアンモニウムヘッドを有する親油性グルタミン酸ジエステル（Itora（1990年）、*Biochem. Biophys. Acta*、1023巻、124～132頁）；カチオン脂質ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン（DOGS、*Transfectam*、Promega）およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミルスベルミン（DPPEs）などの代謝性親脂質（J. P. Behr（1986年）、*Tetrahedron Lett.*、27巻、5861～5864頁；J. P. Behrら（1989年）、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、86巻、6982～6986頁）；代謝性第四級アンモニウム塩（DOTB、N-（1-[2,3-ジオレオイルオキシ]プロピル）-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチル硫酸（DOTAP）（Boehringer Mannheim）、ポリエチレンイミン（PEI）

30

40

50

、ジオレオイルエステル、ChoTB、ChoSC、DOSC (Leventisら (1990年)、Biochim. Inter., 22巻、235~241頁); 3ベータ [N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル] コレステロール (DC-Chol)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) / 3ベータ [N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル] コレステロール DC-Chol の1:1混合物 (Gaor (1991年)、Biochim. Biophys. Acta, 1065巻、8~14頁)、スペルミン、スペルミジン、リポポリアミン (Behrら、Bioconjugate Chem, 1994年、5巻、382~389頁)、親油性ポリリシン (LPLL) (Zhouら (1991年)、Biochim. Biophys. Acta, 939巻、8~18頁)、[[ (1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル) クレソキシ] エトキシ] エチル] ジメチルベンジルアンモニウムヒドロキシド (DEBDAヒドロキシド) と過剰のホスファチジルコリン / コレステロール (Ballasら (1988年)、Biochim. Biophys. Acta, 939巻、8~18頁)、臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) / DOPE混合物 (Pinnaduwaera (1989年)、Biochim. Biophys. Acta, 985巻、33~37頁)、グルタミン酸とDOPEとの親油性ジエステル (TMAG)、CTAB、DEBDA、臭化ジドデシルアンモニウム (DDAB) およびホスファチジルエタノールアミンとの混合物中のステアリルアミン (Roseら (1991年)、Biotechnique, 10巻、520~525頁)、DDAB / DOPE (TransfectACE、GIBCO BRL) ならびにオリゴガラクトースを有する脂質などである。導入の効率を高める具体例としてのトランスフェクションエンハンサー物質は、例えば、DEAE-デキストラン、ポリブレン、リソソーム破壊ペプチド (Ohmori NIら、Biochem Biophys Res Commun, 1997年6月27日、235巻 (3号)、726~9頁)、コンドロイチンベースのプロテオグリカン、硫酸化プロテオグリカン、ポリエチレンイミン、ポリリシン (Pollard Hら、J. Biol. Chem, 1998年、273巻 (13号)、7507~11頁)、インテグリン結合ペプチドCYGGRGDTF、線状デキストラン単糖、グリセロール、オリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオチド間結合で結合させたコレステリル基 (Lettinger R. L., 1989年、Proc Natl Acad Sci USA, 86巻 (17号)、6553~6頁)、リゾホスファチド、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミンおよび1-オレオイルリゾホスファチジルコリンなどである。

#### 【0131】

いくつかの状況において、核酸含有ベクターを標的細胞に誘導する物質により核酸を送達することが望ましい。そのような「ターゲティング」分子は、標的細胞上の細胞表面膜タンパク質に特異的な抗体または標的細胞上の受容体に対するリガンドなどである。リソソームを用いる場合、エンドサイトーシスに関連する細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質は、ターゲティングのためおよび / または取込みを促進するために用いることができる。そのようなタンパク質の例は、特定の細胞型に対してトロピックであるキャプシドタンパク質およびその断片、繰返しインターナリゼーションを受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし、細胞内半減期を向上させるタンパク質などである。他の実施形態では、受容体媒介エンドサイトーシスを用いることができる。そのような方法は、例えば、Wuら、1987年またはWagnerら、1990年に記載されている。現在公知の遺伝子マーキングおよび遺伝子治療プロトコルのレビューについては、Anderson、1992年を参照のこと。WO93/25673およびその中で引用されている参考文献も参照のこと。遺伝子治療技術のさらなるレビューについては、Friedmann、Science、244巻、1275~1281頁 (1989年); Anderson、Nature、392巻6679号の増刊、25~30頁 (1998年); Verma、Scientific American、68~84頁 (1990年) およびMiller、Nature、357巻、455-460頁 (1992年) を参照のこと

と。

#### 【0132】

LPLA2の酵素活性を測定する方法

上で示したように、本明細書で用いたLPLA2タンパク質は、トランスアシラーゼ活性を有する。そのような酵素活性は、当業者に公知のアッセイを用いて容易に測定される。LPLA2タンパク質は、一般的にPEおよびPCに対して特異的であるので、トランスアシラーゼ酵素アッセイにおける基質は、例えば、これらのリン脂質の1つまたは両方を含む。具体例としての一般的なアッセイにおける一態様では、ジオレオイルホスファチジルコリン(60.5mol%)、PE(27.3mol%)およびリン酸ジセチル(12.3mol%)を含むリポソームを供試酵素に対するアシル基ドナーとして用いる。具体例としてのアッセイにおいて、そのようなリポソームは、クロロホルム中で成分脂質を混合し、混合物を窒素気流中で乾燥することによって形成させる。50mMクエン酸ナトリウム(pH4.5)を1ml/128nmol脂質リンの容積で乾燥脂質に加える。プローブ音波処理装置を用いて、脂質を氷冷浴中で8分間緩衝液中に分散させる。この手順により、酵素アッセイ用のドナーリポソームが形成される。当業者は、同様なリポソームが市販されていることを理解している。

10

#### 【0133】

例えば、64nmolのリン脂質を含むドナーリポソームを、10nmolのN-アセチルスフィンゴシン(NAS)または5nmolの[3H]NAS(10000cpm)、5μgのウシ血清アルブミンおよびLPLA2タンパク質含有調製物とともに500μlの総容積の40mMクエン酸ナトリウム(pH4.5)中で37°Cでインキュベートする。3mlのクロロホルム/メタノール(2:1)および0.3mlの0.9%(w/v)NaClを加えることにより反応を終結させる。800×gで5分間遠心分離した後、下層を他のガラス管に移し、窒素ガスの気流中で乾燥する。次に脂質抽出物を例えば、高性能薄層クロマトグラフィー(HPTLC)を用いて分析して、1-O-アシル-N-アセチルスフィンゴシン(1-O-アシル-NAS)の存在を確認する。具体例としての実施形態では、HPTLCプレートをクロロホルム/酢酸(9:1)からなる溶媒系で展開する。もちろん脂質異化もガスクロマトグラフィー、HPLCなどの他の技術を用いて容易に分析される。

20

#### 【0134】

具体例としての実施形態では、HPTLCアッセイを非放射性NASを用いて実施し、TLCプレートを乾燥し、水/メタノール/濃H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(60:32:8)中8%(重量/容積)CuSO<sub>4</sub>五水和物を噴霧し、150°Cで15分間炭化する。コンピュータに接続したスキャナー(UMAX Astra Scanner 2200)によりプレートの像を撮影し、NIH Imageプログラム(Version 1.62)によりスキャンして、各バンドの密度を推定する。既知量のセラミドを用いて、標準曲線を得る。放射性NASを用いた具体例としてのアッセイで、1-O-アシル-NASをプリムリン噴霧によりUV光下で検出し、こすり落として、計数する。酵素活性の他のアッセイは、当業者に公知であり、所与のLPLA2変異体または断片が必要なトランスアシラーゼまたはホスホリパーゼ活性を有するかどうかを決定するために容易に適用される。

30

40

#### 【0135】

上のin vitro酵素アッセイに加えて、当業者はまた、試料をLPLA2タンパク質と接触させる前および後の試料中の可染体マクロファージの存在を測定することによって、本明細書で述べたLPLA2タンパク質組成物のいずれかの酵素活性を試験する。上のアッセイのいずれかは、可染体マクロファージの細胞内レベルを低下させる治療薬候補をスクリーニングするためにも用いられる。

#### 【0136】

LPLA2のモジュレーターをスクリーニングする方法

本発明はまた、LPLA2の活性を増強、増大または刺激する、あるいはLPLA2の発現を増加または刺激することにより、可染体マクロファージの細胞内レベルを低下させ

50

るさらなる作用物質を特定する方法を予期する。

【0137】

本発明のスクリーニングアッセイにおいて、候補物質は、基本的な生化学的活性、例えば、LPLA2活性の*in vitro*刺激を最初にスクリーニングし、次に細胞内可染体マクロファージの蓄積を減少させるその能力について試験することができる。この効果を試験するために、可染体マクロファージの蓄積を示す動物モデルは、公知であり、例えば、LPLA2-/-ノックアウトマウスモデルである。

【0138】

当技術分野で公知であるマクロファージ欠損の他のマウスモデルも細胞内可染体マクロファージの蓄積を減少させるその能力について候補物質を試験するのに適している。これらのモデルは、Romausモデル(Xueら、Proc Natl Acad Sci USA、100巻、7503~7508頁、2003年)、Tyro3マウスモデル(Luら、Science、293巻、306~311頁、2001年)、c-merマウスモデル(Cohenら、J Exp Med、196巻、135~140頁、2002年)およびMFG-E8マウスモデル(Hanayamaら、Science、304巻、1147~1150頁、2004年)を含むが、これらに限定されない。

【0139】

a. 結合アッセイ

予備的には、候補物質は、LPLA2に結合する分子についてスクリーニングすることによって特定することができる。分子の標的への結合は、立体、アロステリックまたは電荷-電荷相互作用のため、それ自体またはそれだけで、刺激性であり得る。いくつかの態様では、これは溶液中で行われ、他の態様では、それは固相で行われ、より高度のスクリーニングアッセイに移る前の特定の化合物を速やかに除去するための第1回のスクリーニングとして用いられる。この種の一実施形態では、配列番号1のLPLA2またはその断片に結合する化合物のスクリーニングを提供する。

【0140】

LPLA2は、溶液中で遊離であり、支持体に固定され、または細胞内もしくは細胞表面上で発現している。LPLA2またはスクリーニングする化合物を標識し、それにより、結合の測定が可能になる。結合を測定するために遊離の標識と固定された標識の量を測定することができる。

【0141】

化合物の高処理能力スクリーニングの手法は、WO94/03564に記載されている。多数の小ペプチド試験化合物をプラスチックピンまたは何らかの他の表面などの固体基材上で合成する。ペプチド試験化合物を例えば、LPLA2と反応させ、洗浄する。様々な方法により結合ポリペプチドを検出する。

【0142】

LPLA2は、プレート上に直接コーティングすることにより、またはポリペプチドを固相に固定化するための非中和抗体を用いることにより支持体に固定することができる。あるいは、反応性領域(例えば、末端領域など)を含むLPLA2融合タンパク質を用いて、LPLA2活性領域を固相に結合させることができる。

【0143】

b. *in vitro*アッセイ

候補物質がLPLA2の活性を増強、増大または刺激する能力を測定するアッセイは、i)配列番号1~288のLPLA2を候補モジュレーターと接触させ、ii)前記LPLA2の活性をモニターし、iii)前記候補物質の存在下および非存在下でのLPLA2の活性を比較するステップを一般的に含み、前記LPLA2の活性の増加が、候補物質がLPLA2活性を増強、増大または刺激することを示す。LPLA2活性を測定するための具体例としてのアッセイは、上の「LPLA2の酵素活性を測定する方法」と題する項で述べている。

【0144】

10

20

30

40

50

活性および/または発現の有意な変化は、少なくとも約30%~40%の活性の変化により、いくつかの態様では、少なくとも約50%の変化(より高い値が当然可能である)により示されるものを含む。

【0145】

あるいは、候補物質を分離腹膜マクロファージ、例えば、狼瘡の動物モデルからのマクロファージに加え、可染体マクロファージの数または食作用指数を添加候補物質の存在下および非存在下で測定する。

【0146】

c. in vivoアッセイ

本発明は、様々な動物モデルの使用を特に予期する。上述のように、LPLA2-/-ノックアウトマウスモデルが存在する。狼瘡の他の動物モデルも当技術分野で公知であり、例えば、Romouseモデル、Tyro3マウスモデル、c-merマウスモデルおよびMFG-E8マウスモデルである。

【0147】

これらの動物の試験化合物による治療は、動物への適切な形態の化合物の投与を必要とする。投与は、経口、鼻、頬または局所を含むが、これらに限定されない、臨床または非臨床目的のために用いることができる経路による。あるいは、投与は、気管内滴注、気管支滴注、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内または静脈内注射による。特に予期されるのは、静脈内および候補物質のリンパ組織への局所的送達のための他のメカニズムである。

【0148】

in vivoでの化合物の有効性の判定は、様々な基準を必要とする。そのような基準は、アポトーシス小体のクリアランス、可染体マクロファージの蓄積の減少、生存、SLE関連徴候、症状または合併症の低減および活動を含む一般的身体的状態の改善を含むが、これらに限定されない。これらのマウスの組織について組織学的試験を実施すること、または細胞サイズ、他の形態学的指標もしくはSLE障害に関連する遺伝子の発現の変化を含む、細胞の分子的小および形態学的状態を検査することも可能である。

【0149】

本発明のin vivoスクリーニングアッセイにおいて、化合物をモデル動物にある期間にわたり種々の用量で投与し、可染体マクロファージの蓄積および関連狼瘡様症状の軽減をモニターする。これらの症状の1つまたは複数の改善は、候補物質が有用なモジュレーターであることを示す。

【0150】

d. LPLA2の発現の増大のスクリーニング

候補物質を、当技術分野で公知の技術を用いてLPLA2の発現を増大させるそれらの能力についてスクリーニングする。例えば、正常にLPLA2を発現する細胞または正常にLPLA2を発現しない細胞を候補物質とある期間にわたり接触させ、LPLA2 mRNAのレベルを、例えば、定量的PCR法を用いてモニターする。

【0151】

e. 候補物質

本明細書では、「候補物質」という用語は、本発明のLPLA2のモジュレーターとして作用する可能性があるあらゆる分子を意味する。特定の態様では、候補物質は、タンパク質もしくはその断片、小分子阻害剤または核酸分子である。他の態様では、候補物質は、非特異的転写因子、LPLA2カスケードにおける上流アクチベーター、LPLA2阻害剤の阻害剤、サイレンサー(すなわち、転写を阻害するDNA結合タンパク質)の阻害剤または天然LPLA2プロモーターをより活性なプロモーターで置換する遺伝子治療である。合理的な薬物デザインは、ホスホリパーゼの公知のモジュレーターとの比較だけでなく、標的分子の構造に関する予測も含む。あるいは、非関連もしくは関連有機化合物の全ライブラリー、またはコンビナトリアル的に発生させたライブラリー(例えば、ペプチドライブラリー)の迅速かつ効率的なスクリーニングが可能である。コンビナトリアルアプローチも第1世代に関連する第2、第3および第4世代の化合物の創出による候補薬物

10

20

30

40

50

の迅速な進化に適している。

【0152】

動物、細菌、真菌、葉および樹皮ならびに海産試料を含む植物源などの天然源から分離された化合物を、潜在的に有用な医薬品の存在について候補としてアッセイする。スクリーニングにかかる医薬品は、化学組成物または人工化合物に由来するものでもあり得る、またはそれらから合成することもできることが理解されるであろう。したがって、本発明により特定される候補物質は、ホスホリパーゼA2活性の公知のアクチベーターから出発する合理的薬物デザインによりデザインされるポリペプチド、アポリヌクレオチド (apoly nucleotide)、小分子阻害剤または他の化合物であることが理解される。

10

【0153】

本発明のいくつかの態様では、候補物質は、上述のように調製されるLPLA2の変異体である。そのような変異体は、本明細書で述べたアッセイのいずれかを用いてLPLA2活性の増加について容易に試験される。本発明の他の態様では、候補物質は、LPLA2の抗イディオタイプ抗体である。抗イディオタイプは、所与のタンパク質に特異的な抗体を産生させ、次いで、そのような抗体を抗原として用いて、抗イディオタイプ抗体を産生させることによって発生させる。鏡像の鏡像として、抗イディオタイプの結合部位は、最初の抗原の類似体である。LPLA2のような抗原に対する抗体を調製する方法は、当業者に公知であり、例えば、Sambrookら(2000年)ならびにHarlowおよびLane(1988年)に開示されている。抗イディオタイプ抗体は、例えば、Greenspanら、FASEB J.、7巻、437頁(1993年)を含む、当技術分野で公知の方法により発生させることができる。

20

【0154】

診断方法

本発明はまた、全身性紅斑性狼瘡を診断し、全身性紅斑性狼瘡に対する感受性を判定し、全身性紅斑性狼瘡の進行をモニターする方法を提供する。そのような方法は、LPLA2自己抗体の存在もしくは非存在について、または低下したもしくは正常なLPLA2発現もしくは活性について、患者の体液、細胞または組織試料をアッセイすることを必要とし、LPLA2自己抗体の存在が疾患の診断または疾患に対する感受性を示唆し、低下したLPLA2発現もしくは活性が疾患の診断または疾患に対する感受性を示唆する。

30

【0155】

体液試料の例は、血液、血清、血漿、胸水、肺または気管支洗浄液、滑液、腹水(peritoneal fluid)、骨髓吸引物、リンパ、脳脊髄液、腹水(ascites fluid)、羊水、痰、膀胱洗浄液、精液、尿、唾液および涙液などである。細胞の例は、白血球、BもしくはTリンパ球、腹膜リンパ球、マクロファージまたは樹状細胞などである。組織の例は、脾臓、腎臓、肺、リンパ節または血管からの生検材料などである。適切なアッセイ方法は、当技術分野で周知であり、本明細書における実施例で例示する。

【0156】

一態様では、そのような方法は、個体からの試料中のリソソームホスホリパーゼA2(LPLA2)酵素活性の測定を含む。患者の酵素活性レベルは、正常個体と比較することができ、または代わりになるべきこととして、同じ個体の以前のLPLA2酵素活性レベルと比較することができる。個体におけるLPLA2酵素活性が、正常個体におけるLPLA2酵素活性と比較して低いことを検出すること(前記正常個体はSLEに罹患していないことが分かっている)は、SLEもしくは全身性紅斑性狼瘡の診断、および/またはSLEもしくは全身性紅斑性狼瘡に対する感受性を示唆する。個体におけるLPLA2酵素活性が、同じ個体におけるLPLA2酵素活性の以前の測定と比較して低いことを検出することも、SLEもしくは全身性紅斑性狼瘡の診断、および/またはSLEもしくは全身性紅斑性狼瘡に対する感受性を示唆する。

40

【0157】

50

他の態様では、そのような方法は、個体からの細胞または組織における L P L A 2 の発現の測定を含む。患者の L P L A 2 発現レベルは、正常個体と比較することができ、または代わりになるべきこととして、同じ個体の以前の L P L A 2 発現レベルと比較することができる。個体における L P L A 2 発現レベルが、正常個体における L P L A 2 発現レベルと比較して低いことを検出すること（前記正常個体は S L E に罹患していないことが分かっている）は、S L E もしくは全身性紅斑性狼瘡の診断、および / または S L E もしくは全身性紅斑性狼瘡に対する感受性を示唆する。個体における L P L A 2 発現レベルが、同じ個体における以前の L P L A 2 発現レベルと比較して低いことを検出することも、S L E もしくは全身性紅斑性狼瘡の診断、および / または S L E もしくは全身性紅斑性狼瘡に対する感受性を示唆する。

10

**【 0 1 5 8 】**

さらに他の態様では、そのような方法は、個体からの試料中のリソソームホスホリパーゼ A 2 ( L P L A 2 ) 自己抗体の検出を含む。個体における L P L A 2 自己抗体が、正常個体における L P L A 2 自己抗体と比較して高いことを検出すること（前記正常個体は S L E に罹患していないことが分かっている）は、S L E もしくは全身性紅斑性狼瘡の診断、および / または S L E もしくは全身性紅斑性狼瘡に対する感受性を示唆する。個体からの試料中の L P L A 2 自己抗体が、同じ個体における L P L A 2 自己抗体の以前のレベルと比較して高いことを検出することは、S L E もしくは全身性紅斑性狼瘡の診断、および / または S L E もしくは全身性紅斑性狼瘡に対する感受性を示唆する。

20

**【 0 1 5 9 】**

さらなる態様では、本発明は、個体における S L E または全身性紅斑性狼瘡または関節リウマチの進行をモニターする方法を提供する。そのような方法は、個体からある期間にわたり採取した試料中の L P L A 2 酵素活性のレベル、または L P L A 2 発現のレベル、または L P L A 2 自己抗体のレベルの定期的な測定を含む。レベルは、1 週間、2 週間、3 週間ごと、または月 1 回、または 2、3、4、5、6 もしくは 1 2 カ月ごとに測定することができる。ある期間にわたる L P L A 2 酵素活性のレベルの低下、またはある期間にわたる L P L A 2 発現のレベルの低下、またはある期間にわたる L P L A 2 自己抗体のレベルの増加は、全身性紅斑性狼瘡の進行を示唆する。

**【 0 1 6 0 】**

関連する態様では、本発明は、S L E または全身性紅斑性狼瘡または関節リウマチの薬物療法の有効性をモニターする方法を提供する。いくつかの態様では、方法は、体外から投与された L P L A 2 酵素、またはその断片、変異体もしくは誘導体のレベルをモニターすることを必要とする。他の実施形態では、そのような方法は、個体からある期間にわたり採取した試料中の L P L A 2 酵素活性のレベル、または L P L A 2 発現のレベル、または L P L A 2 自己抗体のレベルの定期的な測定を含む。レベルは、1 週間、2 週間、3 週間ごと、または月 1 回、または 2、3、4、5、6 もしくは 1 2 カ月ごとに測定することができる。ある期間にわたる L P L A 2 酵素活性のレベルの増加、またはある期間にわたる L P L A 2 発現のレベルの増加、またはある期間にわたる L P L A 2 自己抗体のレベルの低下は、療法の有効性を示唆する。

30

**【 0 1 6 1 】**

あるいは、そのような方法は、発現または活性の低下をもたらす L P L A 2 遺伝子の多形の存在または非存在を決定することを必要とし、そのような多形の存在が疾患の診断または疾患に対する感受性を示唆する。そのような方法は、試料の D N A または R N A を増幅することによって必要とする。そのような方法は、( a ) D N A または R N A をオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズさせ、ハイブリダイゼーションを検出すること、( b ) 電気泳動分析、( c ) 制限断片長多形分析および ( d ) ヌクレオチド配列分析を含む当技術分野で公知の手段によって実施することができる。ハイブリダイゼーションのために、プローブを、核酸プローブの特異的ハイブリダイゼーションを可能にするのに十分な条件下で試料からの D N A と接触させる。「特異的ハイブリダイゼーション」は、本明細書では、正確なハイブリダイゼーション（例えば、ミスマッチのない）を示す。

40

50

特異的ハイブリダイゼーションは、高緊縮条件または中緊縮条件、好ましくは高緊縮条件下で行うことができる。Current Protocols in Molecular Biology、Ausubel F.ら編、John Wiley & Sonsを参照のこと。あるいは、プローブを特異的ハイブリダイゼーション条件下で試料のRNAと接触させて、多形または特定のスプライシング変異体の存在を確認する。核酸の突然変異または多形が制限部位の形成または除去をもたらす場合、制限消化による突然変異分析を用いて、多形を検出することができる。おそらくフランキング配列を含むDNAを増幅し、多形により形成または除去された制限部位で切断する制限酵素で消化する。RFLP分析は、当技術分野で公知のように行う(Current Protocols in Molecular Biology、前出を参照)。当該DNA断片の消化パターンは、多形の存在または非存在を示す。当該DNAまたはRNAの配列決定および正常遺伝子配列との比較を用いて多形を検出することもできる。増幅DNAまたはRNAと対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)プローブとのドットプロットハイブリダイゼーション(例えば、Saiki R.ら、Nature、324巻、163~166頁(1986年)を参照)も当技術分野で公知である。「対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド」(本明細書で「対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブ」とも呼ぶ)は、疾患に関連する多形を含む遺伝子と特異的にハイブリダイズする、約10~50塩基対、例えば、約15~30塩基対のオリゴヌクレオチドである。

10

## 【0162】

自己免疫障害を処置する方法

20

本明細書を通して述べたように、LPLA2タンパク質を用いてアポトーシス小体のクリアランスを改善し、かつ/または細胞内可染体マクロファージの蓄積を減少させることが発見された。したがって、本発明は、可染体マクロファージの蓄積の症状を示す障害の処置に用いる所望の生物学的活性を保持している配列番号1~288のLPLA2または断片、変異体もしくは誘導体を提供する。関連する態様では、本発明は、LPLA2の活性を増強、増大または刺激する、あるいはLPLA2の発現を増加または刺激することにより、可染体マクロファージの細胞内レベルを低下させる作用物質を用いる処置の方法を提供する。

## 【0163】

特定の態様では、本発明の方法は、全身性紅斑性狼瘡、薬物誘発性狼瘡、新生児狼瘡および皮膚狼瘡を含む、SLEの処置に有用である。しかし、一態様では、本発明の方法は、関節リウマチなどの他の自己免疫障害を含む、細胞内可染体マクロファージの蓄積において発現するあらゆる障害の処置に有用であることを理解すべきである。本発明はまた、上述の障害の処置用の薬剤の調製における本明細書で述べる治療薬のいずれかの使用を特に考慮する。

30

## 【0164】

LPLA2関連組成物の単独での、または他の治療法と組み合わせたの投与によって適切な治療結果を達成するために、一般的に有効量の治療用タンパク質組成物を対象に投与する。「有効量」は、所望の治療結果、すなわち、疾患の徴候または症状または合併症の1つまたは複数の軽減を再現性よくもたらすのに有効な量である。

40

## 【0165】

本発明によるこれらの組成物の投与は、標的組織が当該経路により到達可能な限り、いずれかの経路によるものである。しかし、他の通常の投与経路、例えば、非経口、皮下、静脈内、皮内、筋肉内、乳房内、腹腔内、硬膜下腔内、眼内、眼球後、肺内、気管内滴注、気管支滴注、エアゾール、舌下、経口、鼻、肛門、腔、または経皮送達、または特定の部位における外科的埋め込み。特に予期されるのは、静脈内および候補物質の局所的にリンパ組織への送達の他のメカニズムである。

## 【0166】

処置は、単回投与またはある期間にわたる複数回の投与からなっていてよい。組成物の投与は、全身的または局所であってよく、治療上有効量のLPLA2タンパク質組成物の

50

単一部位注射または注入を含んでよい。あるいは、治療用組成物を複数の部位で患者に送達することが予期される。複数回の投与は、同時に行ってもよく、またはある期間にわたって投与してよい。付加的治療は、定期的、例えば、毎日、週1回または月1回行ってよい。

【0167】

特定の実施形態では、治療用化合物の非経口投与は、薬品の治療循環レベルを維持するために、初回ボラスに続く持続注入により行う。当業者は、適切な医療慣行 (good medical practice) および個々の患者の臨床状態により決定される有効量および投与法を容易に最適化する。

【0168】

投与頻度は、作用物質の薬物動態パラメータおよび投与経路に依存する。投与経路によって、適切な用量は、体重、体表面積または臓器サイズに従って計算する。動物モデルの利用可能性は、所与の治療薬の適切な用量の決定を促進するうえで特に有用である。一態様では、用量は、本明細書で述べた L P L A 2 - / - ノックアウトマウスモデルなどの動物モデルを用いて決定し、修正し、高等哺乳動物における使用に適応させる。

【0169】

適切な治療用量を決定するために必要な計算のさらなる改善は、必要以上の実験なしに当業者によって常法により行われる。最終的な投与レジメンは、薬物の作用を変化させる因子、例えば、薬物の比活性、障害の重症度および患者の反応性、患者の年齢、状態、体重、性および食事、感染の重症度、投与の時間、もしあるならば、併用治療の種類、投与頻度および所望の効果の種類ならびに他の臨床的因子を考慮して担当医が決定する。試験を行うとき、特定の疾患および状態に対する適切な用量レベルおよび処置の期間に関するさらなる情報が明らかになる。

【0170】

特定の実施形態では、組成物を単独で投与し、他の実施形態では、組成物を、疾患を対象とする、またはその他の症状を対象とする他の治療薬とともに投与する。用量レベルは、1日当たり体重1キログラム当たり約0.01mg~30mg、例えば、約0.1mg~10mg/kg程度である。

【0171】

本発明の医薬組成物および処置方法はヒト医療および動物医療の分野で有用であることは、十分に理解されるであろう。したがって、処置を受ける対象は、ヒトまたは他の哺乳類の動物などの哺乳動物である。獣医学的目的のために、対象は、例えば、乳牛、羊、豚、馬および山羊を含む家畜動物、犬および猫などのペット動物、外来および/または動物園動物、マウス、ラット、ウサギ、モルモットおよびハムスターを含む実験動物；ならびにニワトリ、シチメンチョウ、アヒルおよびガチョウなどの家禽を含む。処置を受ける患者は、あらゆる年齢、例えば、10~50歳、20歳以下または10歳以下である。

【0172】

さらに、本発明のペプチド/タンパク質ベースの組成物は、可染体マクロファージの異常な蓄積に関連する障害に対して現在の療法と併用されることが予期される。例えば、特定の実施形態では、本発明の方法は、公知の S L E 療法との併用で有用であることが予期される。L P L A 2 またはその断片、変異体もしくは誘導体を含む組成物は、そのような療法の前、後または施行中に投与する。

【0173】

S L E を処置するための他の作用物質または薬物による併用療法は、アスピリン、イブプロフェン (Motrin)、ナプロキセン (Naprosyn) およびスリダック (Clinoril) などの抗炎症薬 (NSAIDs)、セレコキシブ (Celebrex)、ロフェコキシブ (Vioxx)、バルデコキシブ (Bextra) およびメロキシカム (Mobicox) などのシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 阻害剤、プレドニゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾンおよびデキサメタゾンなどのコルチコステロイド、ヒドロキシクロロキン (Plaquenil)、ミコフェニレートモフェチル

10

20

30

40

50

(Cellcept)、クロロキン(Aralen)、キナクリン、リツキシマブ(Rituxan)、ダブゾン、レチノイン酸(Retin-A)、プラスマフェレシス、メトトレキサート(Rheumatrex、Trexall)、アザチオプリン(Imuran)、シクロホスファミド(Cytosan)、クロラムブシル(Leukeran)およびシクロスポリン(Sandimmune)などの細胞障害性薬ならびに副刺激(costimulation)ブロッカーCTLA41Gを含むが、これらに限定されない。本明細書で予期される併用療法、すなわち、LPLA2ベースの組成物とSLE薬との組合せは、一態様では、可染体マクロファージの蓄積の減少をもたらすのに有効な総量で投与する。いくつかの態様でのそのような併用投与は、細胞内可染体マクロファージの蓄積に関連する1つまたは複数の徴候、症状または合併症を軽減する。

10

**【0174】****医薬組成物**

本発明による投与用の医薬組成物は、少なくとも1つのLPLA2由来タンパク質(例えば、配列番号1~288のタンパク質、その変異体もしくは誘導体または可染体マクロファージの異化を刺激する他のLPLA2由来タンパク質)を含み得る。医薬組成物はまた、SLEの処置に用いられる他の作用物質、例えば、NSAID、コルチコステロイドまたは細胞障害性薬を含む。これらの製剤のそれぞれは、いくつかの態様では、薬学的に許容される担体と場合によって組み合わせられた薬学的に許容される形態で提供される。これらの組成物は、好ましくは滅菌済みであり、それらの所期の目的を達成するいずれかの方法により投与することができる。

20

**【0175】**

当該組成物は、例えば、経口投与による、経粘膜投与(肺および鼻投与を含む)、非経口投与(皮下投与を含む)、経皮(局所)投与または直腸投与による様々な投与経路、ならびに硬膜下腔内、静脈内、筋肉内、腹腔内、鼻内、眼内または脳室内注射用に製剤化することができる。本発明の化合物または複数の化合物は、徐放性製剤としての注射のように、全身的でなく局所に投与することもできる。

**【0176】**

最適な製剤は、当業者により投与経路および所望の用量によって決定される。そのような処方は、投与薬の物理的状态、安定性、in vivoでの放出の速度およびin vivoでのクリアランスに影響を及ぼす可能性がある。

30

**【0177】**

本明細書で述べた代表的な剤形のほかに、薬学的に許容される賦形剤および担体は、一般的に当業者に公知であり、したがって、本発明に含まれる。そのような賦形剤および担体は、例えば、「Remingtons Pharmaceutical Sciences」、Mack Pub. Co.、New Jerseyに記載されている。

**【0178】**

非経口投与用の注射剤形は、一般的に適切な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤を用いて調製することができる、水性懸濁剤または油懸濁剤を含む。一般的に、これは、発熱物質ならびにヒトまたは動物に有害である可能性ある他の不純物を本質的に含まない組成物を調製することを必要とする。注射剤は、溶液相の形であるか、または溶液として再構成するのに適する凍結乾燥粉末として提供することができる。両方が溶媒または希釈剤を用いて調製される。許容される溶媒またはビヒクルは、滅菌水、リンゲル液または等張性食塩水溶液などである。あるいは、滅菌済み油を溶媒または懸濁化剤として用いることができる。一般的に、天然または合成油、脂肪酸、モノ、ジもしくはトリグリセリドを含む油または脂肪酸は、不揮発性である。注射については、製剤は、安定化剤、pH調整剤、界面活性剤、生物学的利用能調節剤およびこれらの組合せを場合によって含んでよい。化合物は、ポーラス注射または持続注入によるような注射による非経口投与用に製剤化することができる。注射用単位剤形は、アンプルまたは多数回投与用容器入りであってよい。

40

**【0179】**

50

本発明の製剤は、下記のように短時間作用性、速放性、長時間作用性および徐放性であるようにデザインすることができる。したがって、医薬製剤は、放出制御または徐放性用に製剤化することができる。当該組成物は、例えば、ミセルもしくはリポソーム、またはある種の他の封入された形態を含んでいてよく、あるいは長時間貯蔵および/または送達効果をもたらすために長時間放出製剤として投与してよい。したがって、医薬製剤は、ペレットまたはシリンダーに圧縮し、デポ注射剤として、またはステントなどのインプラントとして筋肉内または皮下に埋め込むことができる。そのようなインプラントは、シリコンおよび生分解性ポリマーなどの公知の不活性材料を用いてよい。

【0180】

有効量を含む上の剤形のいずれかは、常用の実験の範囲内にあり、したがって、本発明の範囲内にある。

【0181】

本発明の範囲内の組成物は、有効量の本発明による少なくとも1つのLPLA2由来タンパク質を含むすべての組成物を含む。いくつかの態様では、そのような処置は、上述のSLEの1つまたは複数の徴候または症状または合併症の軽減をもたらす。

【0182】

組成物を安定にし、標的部位における組成物の取込みを可能にするために適切な塩および緩衝剤を用いることを一般的に望む。一般的に、本発明のタンパク質組成物は、投与前に再構成すべき凍結乾燥された形態で提供する。治療薬の再構成用の緩衝液および溶液は、投与のための本発明の水性組成物を産生するために医薬製剤とともに提供することができる。そのような水性組成物は、有効量の用いられるそれぞれの治療薬を含み、薬学的に許容される担体または水性媒体に溶解または分散される。「薬学的または薬理的に許容される」という語句は、動物またはヒトに投与したとき、有害、アレルギーまたは他の都合の悪い反応を引き起こさない分子実体および組成物を意味する。本明細書では、「薬学的に許容される担体」は、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張性および吸収遅延剤などを含む。薬学的に活性な物質に対するそのような媒体および作用物質の使用は、当技術分野で周知である。従来媒体または作用物質が治療用組成物と不適合性である場合を除いて、治療用組成物におけるその使用が予期される。さらに、補助的な有効成分が組成物中に組み込まれる。

【0183】

治療のための投与のためにタンパク質およびペプチドを製剤化する方法もまた、当技術分野で公知である。特定の実施形態では、活性化化合物は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合された遊離塩基または薬理的に許容される塩の水中溶液として投与用に調製する。分散体もグリセロール、液体ポリエチレングリコールおよびそれらの混合物中ならびに油中のものを調製する。貯蔵および使用の通常条件下では、これらの製剤は、微生物の増殖を防ぐための保存剤を含む。

【0184】

注射に適する医薬製剤は、滅菌済み水性溶液または分散体および滅菌済み注射用溶液または分散体の即時調製用の滅菌済み粉末を含む。すべての場合に、製剤は、無菌性でなければならず、容易なシリンジ操作可能性(syringability)が存在する程度に流体でなければならない。それは、製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。いくつかの態様では、担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど)、それらの適切な混合物ならびに植物油を含む溶媒または分散媒である。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することにより、分散体の場合に要求される粒径を維持することにより、界面活性剤を使用することにより維持される。微生物の作用の予防は、様々な抗菌および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによってもたらされる。多くの場合に、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含めることが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる物質、例え

10

20

30

40

50

ば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中で用いることによってもたらされる。

【0185】

滅菌注射液は、必要な量の活性化化合物を必要に応じて上に挙げた他の様々な成分を含む適切な溶媒に組み込んだ後、濾過滅菌を行うことによって調製する。一般的に、分散体は、様々な滅菌済み有効成分を基本的分散媒および上に挙げたものからの必要な他の成分を含む滅菌済みビヒクルに組み込むことによって調製する。滅菌注射液の調製用の滅菌粉末の場合、調製の方法は、有効成分および以前に滅菌濾過済みの溶液からの追加の所望の成分の粉末が得られる、真空乾燥および凍結乾燥技術である。

【0186】

いくつかの態様では、本発明の組成物は、中性または塩形で製剤化されている。薬学的に許容される塩は、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基により生成）であり、例えば、塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸により生成するものである。遊離カルボキシル基により生成する塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは水酸化第二鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基由来である。

【0187】

製剤化後、溶液は、剤形と適合するように、治療上有効であるような量で投与する。製剤は、注射液、薬物放出カプセルなどの様々な剤形で容易に投与される。水溶液での非経口投与の場合、例えば、溶液は、必要ならば適切に緩衝し、液体希釈剤は、最初に十分な生理食塩水またはグルコースで等張にする。これらの個々の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内投与に特に適している。

【0188】

「単位用量」は、適切な担体中に分散した治療用組成物の個別的な量と定義される。

【0189】

本発明はまた、可染体マクロファージの細胞内蓄積、例えば、SLEまたは全身性紅斑性狼瘡の処置に用いるキットを予期する。そのようなキットは、薬学的に許容される担体中に上述のタンパク質/ペプチドを含む少なくとも第1の滅菌済み組成物を含む。他の成分は、場合によって障害の治療用の第2の治療薬ならびに治療用組成物の投与用の適切な容器およびビヒクルである。キットはさらに、懸濁化、希釈用、または第1および第2の組成物の送達を行うための溶液または緩衝液を含んでいてよい。キットはさらに、本発明の方法に用いられる1つまたは複数の組成物の送達のためのカテーテル、シリンジまたは他の送達機器を含んでいてよい。キットはさらに、治療レジメンに関する投与プロトコルを含む指示書を含んでいてよい。

【0190】

以下の実施例は、本発明の特定の好ましい実施形態および態様を示し、さらに例示するために示すものであり、その範囲を制限すると解釈すべきでない。

【実施例】

【0191】

（実施例1）

LPLA2 - / - ノックアウトマウスの特徴付け

二重条件付き遺伝子ターゲティングを使用してLPLA2の機能を解明した。ホスホリパーゼA2活性に必須のリパーゼモチーフをコードするLPLA2遺伝子のエキソン5の全身欠失によってLPLA2欠損マウス(LPLA2 - / -)を作製した(Hiraoka, M., Abe, A., Lu, Y., Yang, K., Han, X., Gross, R. W., およびShayman, J. A. Mol Cell Biol 26巻: 6139~6148頁、2006年)。LPLA2 - / - マウスの生存率は、正常であった。LPLA2 - / - マウスの交配対が正常な産子数を生むことから、遺伝子欠損が出生力または妊孕力を損なわないことが示された。野生型の肺胞マクロファ-

10

20

30

40

50

ジは、放射性標識されたホスファチジルコリンを直ちに分解したが、LPLA2-/-マウスでは分解しなかった。月齢3カ月までに、LPLA2-/-マウスの肺胞マクロファージ、腹腔マクロファージおよび脾臓中に、リン脂質、特にホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンの著しい蓄積が認められた。LPLA2-/-マウスの肺胞および腹腔マクロファージの超微細構造検査により、細胞リン脂質症の特徴である層状封入体とともに泡沫細胞の出現が明らかになった。肺胞マクロファージでは、LPLA2 mRNA およびタンパク質の非常に高い発現が認められていたため、この発見は意外ではなく、サーファクタント異化にLPLA2が果たす役割と一致していた(Abe, A., Hiraoaka, M., Wild, S., Wilcoxon, S. E., Paine, R., 3rd, および Shayman, J. A. J Biol Chem 279巻: 42605~42611頁、2004年)。

#### 【0192】

月齢6カ月までに、LPLA2欠損マウスは、リンパ増殖の徴候を起こし始めた。脾臓腫大は、リンパ節腫張のように容易に見てとれた。月齢18カ月までに、脾臓は野生型マウスから得られる脾臓重量の10倍を超え、びまん性リンパ節症が容易に見てとれた。雌マウスは、雄マウスよりも臓器重量増加に関して極めて大きい傾向を示した。月齢20カ月までには、皮下脂肪の減少からも明らかのようにノックアウトマウスに衰弱の徴候を伴う体重減少が現れた(図2)。リンパ器官の組織学的分析により、泡沫細胞表現型を伴うマクロファージの存在および間質構造の消失が明らかになった(図3)。脾臓リンパ細胞のフローサイトメトリー分析により、B細胞およびT細胞両方の多クローン性増殖が明らかになった。

#### 【0193】

LPLA2-/-マウスの腎臓の組織学的分析から、「フルハウス」型の沈着を伴う免疫複合体性系球体腎炎の存在が明らかになった。LPLA2-/-マウスは、増殖性の変化および毛細血管係蹄の開通性の消失を示し、これは増殖性系球体腎炎と一致した。対応する透過型電子顕微鏡写真により、足突起消失、免疫複合体沈着および電子密度の高いアポトーシス小体の存在が示された。蛍光抗体法により、欠損マウス(LPLA2-/-)の系球体においては、野生型マウス(LPLA2+/+)と比べてIgおよびC1qの沈着が増加していることが示された(図4A)。透過型電子顕微鏡写真によって、メサンギウム、上皮下および内皮下領域を含めた様々な系球体区画における免疫複合体の沈着が明らかになった。血清免疫グロブリンレベルは高齢マウスにおいて著しく上昇し、ANAの存在と同時に(図4C)、抗dsDNA力価も年齢に依存して有意に上昇した(図4B)。その脾臓は、多数の増大したマクロファージおよび大量の可染体マクロファージの存在によって特徴付けられ、アポトーシス細胞を除去することができないことと一致した(図4D)。KO LPLA2-/-マウスの脾臓凍結切片にCD68(赤色)染色およびTUNEL染色法(緑色)を用いてアポトーシス小体染色を行った(図4D)。

#### 【0194】

LPLA2の主要な作用機序は細胞外リン脂質を分解して、遊離脂肪酸、リゾホスファチジルコリンおよびリゾホスファチジルエタノールアミン(lyso-phosphatidylethanolamine)を形成することである。リガンドによって活性化された後にLPLA2はマクロファージから分泌され、続いてマクロファージ上のマンノース受容体に結合し、リソソームに戻される。LPLA2の取込みおよびリソソームとの共局在化を評価するために、LPLA2-/-KOマウス由来のマクロファージを組換えLPLA2で処理し、固定して、抗LPLA2モノクローナル抗体(緑色)(図5A)またはリソソームマーカーであるLAMP-1に対する抗体(赤色)(図5B)を用いて染色した。図5Cは、図5Aと図5Bの重ね合わせを示し、図で黄色はLPLA2とリソソームの共局在化を示している。

#### 【0195】

18カ月およびさらに高齢のマウスにおけるさらなる変化として、腎不全およびタンパク尿の発症があった。図6は、LPLA2-/-マウスにおける24時間のタンパク質排

出量が、野生型マウスと比較して2倍超上昇していることを示している。クレアチニン濃度も、LPLA2+/+マウス(0.25±0.06)に対してLPLA2-/-マウス(0.63±0.22)において上昇していた。

【0196】

(実施例2)

アポトーシス小体の消化障害は、LPLA2-/-マウス由来の腹膜マクロファージにおいても再現される可能性がある

LPLA2-/-ノックアウトマウスの脾臓および系球体内のアポトーシス小体の出現が、取り込まれたアポトーシス細胞の消化の全身における欠損に起因するのかが決定するために、*in vitro*でLPLA2欠損を繰り返した。

【0197】

1年齢の野生型および欠損型マウスに腹腔内チオグリコレート注射した後に、腹腔マクロファージを採取した。胸腺細胞を回収し、デキサメタゾンで24時間処理することによりアポトーシスを誘導した。LPLA2+/+(WT)およびLPLA2-/(KO)のマクロファージを野生型アポトーシス胸腺細胞とともに0.5、1、2および4時間インキュベートした。インキュベート後、プレートを洗浄し、抗CD68およびTUNELを用いてマクロファージを共染色して残ったアポトーシス小体を測定した(図7A~7H)。野生型および欠損型のマクロファージ間で取り込まれたアポトーシス小体の摂取率あるいは最高数に差異は観察されなかった。しかし、4時間目にLPLA2-/-マクロファージ中のアポトーシス小体の持続性に著しい差異が観察された(図7H)。食作用指数として表した場合、野生型および欠損型マクロファージの間に極めて有意な差が観察された(図8)。

【0198】

B細胞およびT細胞の刺激アッセイを利用して、LPLA2-/-マウスおよびLPLA2+/+マウス間の応答性に差異があるかどうかを解明した。8カ月齢の雌マウスの脾臓からB細胞およびT細胞を単離し、CD40(図9A)、CD3(図9B)、およびCD3とCD28(図9C)に対する抗体を用いて刺激して、B細胞刺激、T細胞刺激またはT細胞副刺激をそれぞれ測定した。単離および刺激の3日後に、トリチウム化チミジンの取込みによって細胞増殖を測定した。CD40に対するB細胞の応答性に差異は観察されなかった。しかしLPLA2-/-T細胞は、CD3による直接刺激およびCD3とCD28による副刺激の両方に対して応答が小さかった(図9Bおよび図9C)。この後者の応答は、G2Aノックアウトマウスにおいて報告された応答と対照的である。自家、同系および同種刺激を使用して混合リンパ球反応(MLR)アッセイも実施した(図9D)。同種刺激に対するLPLA2-/-応答は、野生型T細胞において観察された応答よりも有意に低かった。これは、狼瘡患者におけるMLR活性が低下することを実証するいくつかの研究が報告されてきたという点で重要になり得る(Kuntzら、*J Clin Invest.* 63巻(1号):151~153頁、1979年)。

【0199】

(実施例3)

LPLA2は、活性化後にマクロファージから分泌され、マンノース受容体を介してマクロファージの中に再び取り込まれる

LPLA2は、リガンドによる活性化後にマクロファージから分泌されると報告されている(Abeら、*J Immunol* 181巻:7873~7881頁、2008年)。例えば、ザイモサンの結合および食作用の結果、肺胞マクロファージからLPLA2が時間依存的に放出される。

【0200】

LPLA2-/-マウス由来のマクロファージが組換えLPLA2を認識し、取り込み、輸送することができるかを以下の通り調べた。LPLA2欠損肺胞マクロファージを、Hisタグ付きマウスLPLA2に0.3~10μg/mLの異なる濃度で1日間曝露した。細胞の取込みを、抗His抗体またはLPLA2に対するモノクローナル抗体を

10

20

30

40

50

使用したウェスタンブロット法および共焦点顕微鏡によって測定した。細胞内 L P L A 2 の濃度依存的増加を、酵素活性測定により容易に検出し確認した。処理した細胞を抗 L P L A 2 抗体および L a m p - 1 抗体の両方で染色した場合には、組換え酵素とリソソームタンパク質の共局在化を容易に検出した。

#### 【 0 2 0 1 】

組換え L P L A 2 のこの認識および取込みが、マンノース対マンノースリン酸受容体による認識を通してどうか解明するために、10 mM -メチル-マンノシドまたは10 mM マンノース-6-リン酸の存在下で取込み実験を繰り返した。-メチル-マンノシドは、細胞内 1-O-アシル-セラミドシンターゼ活性、免疫ブロット、および共焦点顕微鏡によって測定した通り L P L A 2 の取込みを遮断したが、マンノース-6-リン酸は遮断しなかった。最終的に組換え酵素が細胞内表現型を「救済」する能力は、細胞内リン脂質の含有量を測定することによって確認した。細胞中のホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンの濃度依存的減少が観察された。触媒能のない酵素は、リン脂質レベルを低下させなかった。

10

#### 【 0 2 0 2 】

総括するとこれらのデータは、L P L A 2 がザイモサンに応答したマクロファージによって分泌され、分泌された後にマンノース受容体依存的過程によって回収され得ることを裏付けている。これらのデータは、L P L A 2 の主要な作用機序が、細胞外リン脂質を分解して遊離脂肪酸類、リゾPCおよびリゾPEを生成することである可能性も提起している。

20

#### 【 0 2 0 3 】

##### ( 実施例 4 )

陽イオン性両親媒性薬物が L P L A 2 活性を阻害し、細胞リン脂質症を引き起こす

セラミド類似体である 1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール ( P D M P ) は、細胞のリソソーム分画に局在するセラミドの酸性アシル基転移を阻害することが認められている。P D M P は、陽イオン性両親媒性薬物として化学的に特徴付けられた薬物と構造的に似ている。このような陽イオン性両親媒性薬物が、類似の機構を経て細胞リン脂質症の原因になり得る可能性を次の通りに試験した。

#### 【 0 2 0 4 】

M D C K 細胞を、陽イオン性両親媒性薬物である P D M P、アミオダロンおよびテトラサイクリンで1日または7日間処理した。L P L A 2 活性を、N-アセチルスフィンゴシンのアシル基転移として測定した。アミオダロンは、リン脂質症 ( および S L E ) を引き起こす原型となる作用物質である。テトラサイクリンは、狼瘡ともリン脂質症とも関連性がないと分かっている。セラミドアシル基転移で測定した通り、アミオダロンおよび P D M P は両方とも L P L A 2 活性の濃度依存的阻害に関連していた ( 図 1 0 A )。アミオダロンおよび P D M P は、酵素阻害に対して同程度の I C 5 0 を示したが、テトラサイクリンは示さなかった。テトラサイクリンには阻害効果はなかった。アミオダロン処理は時間依存的に細胞中のリン脂質、特に P C および P E の増加ももたらした。主要な細胞リン脂質を、1日または7日間 C A D に曝露した後にアッセイした。処理7日目までに、L P L A 2 の基質である P E と P C では非常に大きな変化が観察されたが、スフィンゴミエリン ( S M ) では全く変化が観察されなかった ( 図 1 0 B )。

30

40

#### 【 0 2 0 5 】

アミオダロンおよび他の陽イオン性両親媒性物質による L P L A 2 活性の阻害は、拮抗的または非拮抗的效果によってこれらの薬物が酵素に直接結合した結果である可能性があった。代替機構は、L P L A 2 と陰イオン性リソソーム膜との間の静電的相互作用の崩壊であると考えられた。リソソーム膜は、酸性細胞器官、特に後期エンドソームおよびリソソーム中にのみ見られる陰イオンリン脂質であるリゾビスホスファチジン酸の存在によって特徴付けられている。

#### 【 0 2 0 6 】

この可能性を解決するために、L P L A 2 の 1-O-アシルセラミドシンターゼ活性を

50

リポソームにおいて試験したが、そのリポソーム中の陰イオン性脂質含有量を、負の電荷をもち、LPLA2の基質にならない硫酸含有糖脂質であるスルファチドの添加によって変えた。リポソームの基材としてジオクタノイル-PC(DOPC)を使用した。反応混合物は、48mMクエン酸ナトリウム(pH4.5)、10 $\mu$ g/mL BSA、リポソーム(127 $\mu$ Mリン脂質)、14.5ng/mLの組換えマウスLPLA2を全容量500 $\mu$ Lに含んでいた。DOPC/NAS(モル比3:1)またはDOP/スルファチド/NAS(モル比3:0.3:1)からなるリポソームを、酵素と一緒に37 $^{\circ}$ Cで5、10、15、30、および45分間インキュベートした。その反応生成物を抽出し、クロロホルム/酢酸(9:1、v/v)からなる溶媒系を使用したHPTLCプレートによって分離した。プレートをスキャンして定量した反応生成物である1-O-オレオイル-NASを、時間に対してプロットした(図11A)。異なるモル比のDOPC/ガラクトシルセラミド/NASまたはDOPC/スルファチド/NASからなるリポソームを、組換え酵素と一緒に37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした(図11B)。スルファチドの存在下でのアシル基転移活性は時間依存的に増加し、その活性はスルファチドのモル比に応じて増加することが観察された(図11Aおよび図11B)。

#### 【0207】

(実施例5)

陽イオン性両親媒性薬物は、LPLA2と陰イオン性脂質膜との間の静電的相互作用を妨げる

LPLA2酵素活性およびLPLA2とリポソームの間の静電的相互作用に対するイオン強度、pHおよびアミオダロンの効果を決定した。

#### 【0208】

反応混合物は、0~500mM NaCl、48mMクエン酸ナトリウム(pH4.5)、10 $\mu$ g/mL BSA、リポソーム(127 $\mu$ Mリン脂質)および14.5ng/mLの組換えマウスLPLA2(+)、またはマウスLPLA2(+を)トランスフェクトしたMDCK細胞から採取した可溶性画分のタンパク質7.8 $\mu$ g/mLを全容量500 $\mu$ L中に含んでいた。反応を始める前に、DOPC、スルファチドおよびNAS(モル比3:0.3:1)からなるリポソームを37 $^{\circ}$ Cで5分間プレインキュベートした。反応は組換えLPLA2を添加して開始し、37 $^{\circ}$ Cで実行した。その反応性生物を抽出し、クロロホルム/酢酸(9:1、v/v)からなる溶媒系を使用したHPTLCプレートによって分離した。プレートをスキャンして定量した反応生成物の1つである1-O-オレオイル-NASを、NaCl濃度に対してプロットした(図12A)。DOPC、スルファチドおよびNASからなるリソソームを、異なる濃度の陽イオン性両親媒性薬物であるアミオダロンとともに37 $^{\circ}$ Cで5分間プレインキュベートし、次に組換えLPLA2を加えてインキュベートした(図12C)。様々なpHをもつクエン酸ナトリウム/リン酸ナトリウムバッファー中で反応を実行した(図12B)。

#### 【0209】

静電的相互作用に依存する酵素とリポソームの相互作用を予測しようとしたが、反応混合物のNaCl濃度またはpHの増大は、酵素のアシル基転移活性を有意に阻害した(図12Aおよび図12B)。重大なことに、リポソーム非存在下で水溶性基質であるp-ニトロ-フェニルブチレート(p-NPB)を使用して、LPLA2活性をエステラーゼとして単純に測定した場合、pH依存性がほぼ失われた。標準的な陽イオン性両親媒性薬物であるアミオダロン濃度が増加すると、同様に酵素活性を阻害した(図12C)。

#### 【0210】

LPLA2とリポソームの間の静電的相互作用の崩壊を物理的相互作用として測定できるかどうか究明するために、高速超遠心分離およびイオン強度、pH、アミオダロンの存在量を変化させてSDS-PAGEによって分離した後に酵素とリポソームの共沈殿を検出した。DOPCまたはDOPC/スルファチド(モル比10:1)からなるリポソームを、様々な量の組換えマウスLPLA2とともに500 $\mu$ Lの48mMクエン酸ナトリウム(pH4.5)中で氷上にて30分間インキュベートした(図13A)。4 $\mu$ gの組換

え L P L A 2 または 1 6 μ g の組換え L P L A 2 を加えた D O P C、D O P C / スルファチド (モル比 1 0 : 1) または D O P C / ガラクトシルセラミド (モル比 1 0 : 1) からなるリポソームを、5 0 0 m M の N a C l または 3 3 μ M のアミオダロンのありなしでインキュベートした (図 1 3 B および図 1 3 C)。反応混合物を 1 5 0, 0 0 0 g で 4 で 1 時間遠心分離した。これらのアッセイにおける D O P C の濃度は 1 2 7 μ M であった。これら得られた沈殿物を 5 0 m M の冷クエン酸ナトリウム (p H 4 . 5) で簡単に洗い、4 0 μ L の S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動サンプルバッファーで溶解した。この試料を 1 2 % S D S - ポリアクリルアミドゲルを使用して分離した。電気泳動後、C B B 染色により L P L A 2 を検出した。

【 0 2 1 1 】

L P L A 2 とリポソーム間の物理的結合は、スルファチドの存在で増加し (図 1 3 B)、より高い p H、N a C l 濃度またはアミオダロンの存在で阻害された (図 1 3 C)。これらのデータから、陽イオン性両親媒性薬物が、L P L A 2 と陰イオン性脂質膜との間の静電的相互作用を妨げることによって L P L A 2 活性を阻害していることが示される。

【 0 2 1 2 】

( 実施例 6 )

L P L A 2 遺伝子発現量は、他の糸球体疾患の患者と比較して狼瘡患者の糸球体において減少している

狼瘡患者と他の種類の糸球体疾患の患者との間で L P L A 2 の発現が異なるかどうかを究明するために、患者由来の遺伝子発現プロファイルを解析した。ミシガン大学の腎臓病学部門 ( D i v i s i o n o f N e p h r o l o g y ) に応用システム生物学中核研究所 ( A p p l i e d S y s t e m s B i o l o g y C o r e L a b o r a t o r y ) がある。このグループは、ヨーロッパおよび合衆国のセンターから入手した様々な腎障害をもつ患者由来の腎生検の遺伝子発現プロファイルをバイオバンク化し、分析した。対照生検標本は、健康な腎臓提供者から移植時に入手している。生検時には、マイクロダイセクションによって糸球体および尿細管間質区画を分離し、その m R N A プロファイルを手に入れている。マイクロアレイによる統計分析 ( S A M ) を使用する解析から、狼瘡糸球体における発現レベルは、対照または糖尿病、I g A 腎障害、微小変化型疾患、もしくは高血圧性腎硬化症の患者由来の生検と比較して著しく低いことが明らかになった (表 2)。

【 0 2 1 3 】

【 表 2 】

	倍率変化 SAM	q値
SLE (glom) n=32	0.857	0.009
SLE (ti) n=32	1.023	0.198
IgA (glom) n=27	1.086	0.293
IgA (ti) n=25	1.236	0.087
MCD (glom) n=6	1.142	0.336
MCD (ti) n=5	1.012	NS
早期DM (glom) n=22	1.329	0.001
早期DM (ti) n=22	0.970	0.242
Prog DM (glom) n=7	0.116	0.552
Prog DM (ti) n=7	1.040	0.526
HTN (glom) n=15	1.198	0.058
HTN (ti) n=20	1.191	0.407

10

20

30

40

50

早期および進行性糖尿病性腎障害 (DM)、IgA腎障害、微小変化型疾患 (MCD)、および高血圧性腎硬化症 (HTN) を含めた5種類の異なる糸球体疾患から mRNA 発現プロファイルを入手した。様々な推算糸球体濾過量 (GFR) をもち光学および電子顕微鏡による病理学的検査によって診断が確定している患者から5mmコア皮質試料を表す腎生検より mRNA を採取した。生検を糸球体性 (g) および尿細管間質性 (ti) 部分に顕微解剖した。公開されている手順を使用してアレイ間の再現性が0.98より大きい mRNA プロファイルを得た。RNA増幅によって、単離した糸球体の数とは無関係にプローブセットの検出が確実になった。ASBCに保存されたデータを、標準化されたオープンソースの解析パイプラインであるジーンパターン (GenePattern) で処理して、遺伝子発現地図を作成した。LPLA2発現を異なる糸球体疾患の間で比較し、マイクロアレイの有意性解析 (SAM) を使用して解析した (Lorzら、J Am Soc Nephrol. 19巻(5号):904~914頁、2008年)。複数試料の偽陽性発見率を説明するq値として有意性を表した。

10

## 【0214】

これらのデータは、狼瘡患者の顕微解剖糸球体におけるLPLA2 mRNAの発現は、正常対照の糸球体ならびに糖尿病、高血圧性腎硬化症、微小変化型疾患およびIgA腎障害に伴う糸球体疾患患者の糸球体と比較して減少していることを示す。

## 【0215】

(実施例7)

ヒト血清中のLPLA2活性および自己抗体の測定

LPLA2欠損マウスおよびG2A欠損マウスは、前者のノックアウトモデルにおける泡沫細胞の発達を除くと区別ができない。リンパ節または脾臓胚中心においてリゾホスファチジルコリンまたは遊離脂肪酸を局所的に産生できないことは、これら2つの狼瘡モデル間の機構的関連性を表している可能性がある。あるいは、LPLA2は、アポトーシス小体の消化に必要であるとして確認された最初の遺伝子産物を表している可能性がある。

20

## 【0216】

SLEは、複雑な臨床的症候群を意味する。狼瘡症候群は、機構的には異なるが表現型の上では似ているいくつかの疾患からなっている可能性がある。LPLA2は、長い間探求されている酸性の分泌型ホスホリパーゼA2である、新たに報告されたリソソームタンパク質を意味している。マウスにおいてこの活性が失われると、狼瘡の臨床的兆候の多くに類似した非常に強い表現型が生じる。さらに血漿リソソームタンパク質プロテオームの解析により、LPLA2がヒト血行路中を循環していることが明らかになっている。LPLA2活性の消失が活性狼瘡のマーカーになるかどうか試験するために、LPLA2活性用およびLPLA2に対する自己抗体用の血清アッセイが初めて開発された。

30

## 【0217】

A. 血清リソソームホスホリパーゼA2アッセイ

LPLA2活性は、2つの主要な性質に基づいて他の公知のホスホリパーゼA2の活性とは異なっている。第1に、この酵素は4.5の酸性至適pHを示し、pH7.4での活性はほとんど検出できない。第2に、この酵素はホスホリパーゼA2およびトランスアシラーゼの両方の働きがある。N-アセチル-スフィンゴシン (N-acetyl-sphingoline) (NAS、C2セラミド) は、この酵素に対する好ましい親油性受容体である。したがって、C2セラミドの脂肪酸アシルエステルである1-O-アシル-N-アセチル-スフィンゴシンの形成は、非常に特異的な活性測定の基準を提供し、利用しようとする提案されたアッセイのもとになる原理となる (Shayman, J. A.、およびAbe, A. Methods Enzymol 311巻:105~117頁、2000年)。

40

## 【0218】

現在までに、LPLA2アッセイは、組換え酵素、培養細胞、細胞培養上清および組織ホモジネートに制限されてきた。いくつかの要素が、血漿や血清中のLPLA2の回収および測定に影響している可能性があり、このアッセイを検証する過程において研究する必

50

要がある。

【0219】

LPLA2が遊離タンパク質または結合タンパク質として循環しているのかどうか、血漿または血清中の補助因子がLPLA2活性を調節しているのかどうか、血漿または血清中に発見されるLPLA2活性の生成物を代謝する追加の酵素があるのかどうか、および血漿または血清中に測定基質と拮抗しその結果LPLA2活性を阻害する可能性のある内在性脂質があるのかどうかを決定するために、この酵素用に次のアッセイを考案した。

【0220】

リン脂質のDOPCおよびホスファチジルエタノールアミン(PE)ならびにNASをアシル基の供与体および受容体としてそれぞれこの測定系に使用する。1-O-アシル-N-アセチルスフィンゴシンの形成速度の解析によりアシル基転移活性を決定する。反応混合物は、総容量500 $\mu$ L中の45mMクエン酸ナトリウム(pH4.5)、10 $\mu$ g/mLウシ血清アルブミン、リン脂質リポソーム(DOPC/PE/ジセチルホスフェート/NAS(モル比5:2:1:2))に組み込まれた40 $\mu$ M NAS、および可溶性画分(0.7~10 $\mu$ g)からなる。血清または血漿試料を加えることにより反応を開始し、37で5~6分間保ち、3mLのクロロホルム/メタノール(2:1)さらに0.9%(w/v)NaClを0.3mL加えて終了させる。この混合物を室温で5分間遠心分離する。得られた下層を、別のガラス管に移し、窒素ガスの通風下で乾燥させる。乾燥した脂質を40 $\mu$ Lのクロロホルム/メタノール(2:1)に溶解させ、高性能薄層クロマトグラフィープレートにアプライし、クロロホルム/酢酸(9:1)からなる溶媒系で展開する。このプレートを乾燥させ、8%(w/v)CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、6.8%(w/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、および32%(w/v)メタノールに浸漬した。均一に湿ったプレートをヘアドライヤーで短時間風乾し、150のオーブンで15分間炭化させる。このプレートをスキャンし、反応生成物の化学質量をNIH Imageバージョン1.62で推定する。

10

20

【0221】

補助因子、タンパク質結合、干渉脂質、または生成物の代謝作用の潜在的効果をいくつかの実験で評価した。これらの効果には、生成物形成を経時的に、また試料サイズに応じて決定することが含まれている。さらに、血清試料に標準となる既知量の組換えLPLA2を「スパイク」して、妨害物質が存在するかどうか確かめることができる。組換えLPLA2を、アルブミンまたはリポタンパク質の存在下で測定して、これらが測定を妨害するかどうか決定することもできる。この酵素活性を、血清1mL、1分間あたりに形成される1-O-アシル-NASのモル数として表す。ヒト血清および血漿におけるこれらの活性および同一試料の反復測定による測定の再現性を経時的に比較する。貯蔵、ヘパリン、カルシウム、キレート化および凍結融解の効果は、評価すべき追加要因である。

30

【0222】

B. リソソームホスホリパーゼA2自己抗体の血清測定

次の手順を、LPLA2に対する自己抗体の測定に使用する。組換えLPLA2(1 $\mu$ g/50 $\mu$ L PBS中に0.1~0.5 $\mu$ g)を、4で一晩インキュベートしてマイクロタイタープレートウェル上に吸着させる。このプレートをPBS/0.1%Tweenで4回洗浄する。次にこのプレートを10mg/mLウシ血清アルブミンを含む50 $\mu$ LのPBSで1時間ブロッキングする。ウェルをPBS/Tween溶液で洗浄し、次いで血清試料または対照を添加して室温で2時間、次に4で一晩置く。このウェルをPBS/Tweenで再び洗浄し、次いで2次抗ヒトIgG抗体を添加して室温で2時間置く。同じ洗浄ステップの後に、西洋わさびペルオキシダーゼの基質としてO-フェニレンジアミンジヒドロクロリドを利用して検出する。492nmでプレートウェルの吸光度を読み取る。

40

【0223】

確立するために重要な変数としては、血清試料に希釈が必要であるかどうか、プレートのコーティングに使用するLPLA2を炭酸塩緩衝液(pH9.6、0.05M)で変性

50

させるべきかどうか、および血清試料を同様に炭酸塩緩衝液で変性させるべきかどうかを挙げられる。

【0224】

抗体検出の再現性は、このアッセイを検証するのに考慮すべき血清の凍結および貯蔵の効果、ならびに測定において物質を妨害する潜在的効果が一定ではないということを示している。

【0225】

(実施例8)

バイオバンク化されている血清試料中のLPLA2活性および自己抗体の力価およびSLE疾患活動係数と臨床プロファイルの相関

ミシガン狼瘡コホート(MLC)は、ミシガン大学で継続治療を受けているSLE患者の活動的、前向きなコホートである。MLCは、2000年に開設され、現在600人を超える患者(90%が女性、79%が白人、17%が黒人、1%がヒスパニック系、2%がアジア太平洋島民、1%がその他)がいる。コホート参加者は、臨床的、社会的および人口統計データの系統的追跡を可能にするインフォームドコンセントに署名する。疾患活動性(SLEDAIスコア)(Bombardier, C.ら、Arthritis Rheum 35巻:630~640頁、1992年)の前向き評価を含めた詳細な検査および臨床のデータが、それぞれの来診で収集され、この来診は通常3カ月間隔である。血液試料(ほとんどの来診者の協力によって収集される)の保管場所も、MLCの立ち上げ時から将来を見越して作られた。MLCは、SLE診療記録のスクリーニングおよび募集手段としても役立ち、多数の共同研究および補助的事業を促進してきた。

【0226】

MLCは、LPLA2活性および自己抗体の力価を測定するための患者の血清および臨床データの供給源である。臨床データが長期間にわたり豊富にあることから、このデータはこの研究のための特別に価値のある資源となっている。血清は、現在MLCに加入しているすべての患者から測定されている。これらの測定は盲検法で行い、試料は疾患活動性または臨床的表現型に対する関連なしに無作為に測定している。健康な患者および自己免疫疾患のない患者(例えば、骨関節症)由来の年齢および性別が釣り合う試料を対照として試験している。これらの測定に基づいて、LPLA2活性の正常範囲を決定している。対照と比較して著しく低いLPLA2活性または抗LPLA2抗体の強い力価の存在を示すことが確認された患者に対しては、患者の臨床的表現型の総合評価を始める。低いLPLA2活性または上昇した抗LPLA2を示しているかなりの数のMLC患者は、これらの調査結果と特定の臨床的表現型(例えば、リンパ節症)または実験結果(例えば、抗リン脂質抗体)の存在との間で統計的に有意な関連性を示している。陽性結果をもつと分かったこれらの患者については、疾患活動性との相関を調査するのに利用可能なすべての試料についてLPLA2活性および抗体力価を過去にさかのぼって決定している。性別とLPLA2活性および自己抗体力価との間の潜在的関連性も評価している。

【0227】

(実施例9)

動物モデルにおけるLPLA2活性

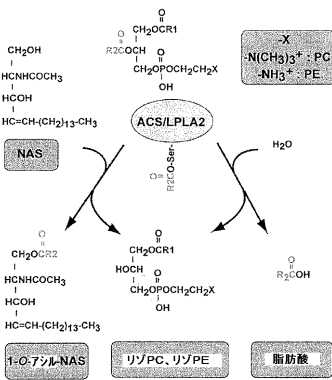
ヒトまたは哺乳類のLPLA2酵素、あるいはその変異体または派生体を可染体マクロファージの蓄積を示す動物モデルで試験することは公知である、例えばLPLA2-/-ノックアウトマウスモデルである。これらの作用物質が、細胞内可染体マクロファージの蓄積、または自己免疫疾患の他の徴候と症状を低減できるかについて試験する、他のマウスモデルとしては、Romausモデル(Xueら、Proc Natl Acad Sci U S A 100巻:7503~7508頁、2003年)、Tyro3マウスモデル(Luら、Science 293巻:306~311頁、2001年)、c-me rマウスモデル(Cohenら、J Exp Med 196巻:135~140頁、2002年)およびMFG-E8マウスモデル(Hanayamaら、Science 304巻:1147~1150頁、2004年)がある。

【 0 2 2 8 】

本明細書の全体にわたって引用された参考文献は、本明細書に記載の事項を補足する例示の手順または別の詳細を提供する限りにおいて、参照によりすべて具体的に本明細書に組み込まれる。

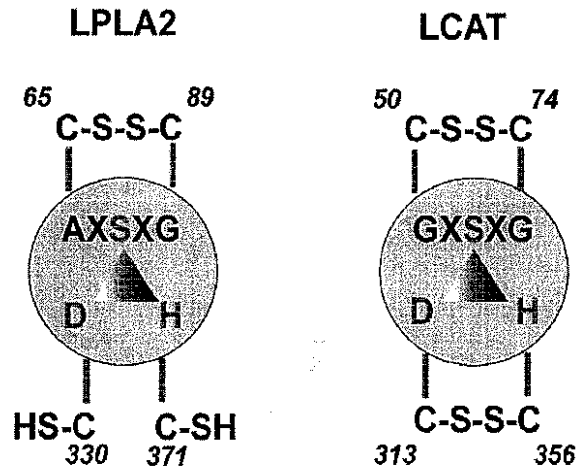
【 図 1 A 】

Fig. 1A.



【 図 1 B 】

Fig. 1B.



【 図 1 C 】

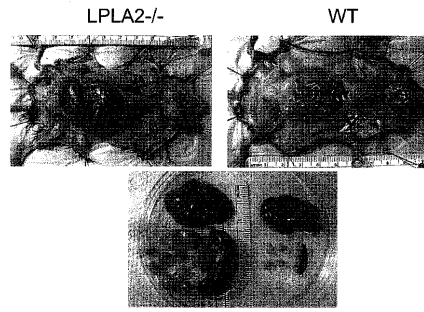
Fig. 1C. ヒト、マウスおよびウシのLPLA2の推定アミノ酸配列

ヒト	1	MGLHLRPFYRVLGPDGLLELLMLLADPALHGRHPPVVLVPGDLGNQLEAKLDKPTV
マウス	1	MDRHLCTRETQRLSGLLPLFLMLMADLTLHQRHPPVVLVPGDLGNQLEAKLDKPKV
ウシ		MGCLCLYRSTLLTGGLFLMLADFAFRAGSRPPVVLVPGDMGNQLEAKLDKFSV
		* * * * *
ヒト	61	VHYLCSKKTESYFTIWLNLLELLPVIIDCWIDNIRLVYNKTSRATQFPDGVDRVVEGFGK
マウス	61	VHYLCSKKTDSYFTIWLNLLELLPVIIDCWIDNIRLVYNKTSRATQFPDGVDRVVEGFGG
ウシ		VHYVCSKRTDHYFTIWLNLLELLPVIIDCWIDNIRLVYNKTSRATQFPDGVDRVVEGEGD
		** * * * *
ヒト	121	TFSLEFLDPKSSVGSYFHTMVESLVGWGCTRGEDVRGAPYDWRRAFNENGGPYFLALREM
マウス	121	TFSMEFLDPKSRNNGSYFYIMVESLVGWGCTRGEDVRGAPYDWRRAFNENGGPYFLALREM
ウシ		TFSMEFLDPKSSVGSYLHMTVESLVGWGCTRGEDVRGAPYDWRRAFNENGGPYFLALREM
		*** * * * *
ヒト	181	IEEMYQLYGGPVLVAHSMGMYLYFLQRQPAWKKDYIRAFVSLGAPWGGVAKTLRVL
マウス	181	IEEMYQYGGPVLVAHSMGMYLYFLQRQPAWKKDYIRAFVSLGAPWGGVAKTLRVL
ウシ		IEEMYQLYGGPVLVAHSMGMYLYFLQRQPAWKKDYIRAFVSLGAPWGGVAKTLRVL
		***** * * * *
ヒト	241	ASGDNNRIPVIGPLKIREQORSVSTSNLLPYNVWSEKVFVQPTTINYLDRYRKFQ
マウス	241	ASGDNNRIPVIGPLKIREQORSVSTSNLLPYNVWSEKVFVQPTTINYLDRYRHFRR
ウシ		ASGDNNRIPVIRSLKIRAQORSVSTSNLLPYSYVTSPOKVFVPTKANYTLQDYRQFFQ
		***** * * * *
ヒト	301	DIGFEDGWLMRQDTEGLVEATMPGGVQLHCLYGTGVTPTDSFYYESFPDRDPKICFGDGD
マウス	301	DIGFEDGWEFRQDTEGLVEATMPGGVELHCLYGTGVTPTNSFYYESFPDRDPKICFGDGD
ウシ		DIGFEDGWSMRQDTEGLVEATVPPGVRNLCLYGTGVTPTESFDYESFPDRDPKIHYGIGD
		***** * * * *
ヒト	361	GTVNLKALQCCQAWQSRQHQVLLQELPGSEHIEMLANATTLAYLKRVLGSP
マウス	361	GTVNLQVLCQAWQSRQHRVSLQELPGSEHIEMLANATTLAYLKRVLLEP
ウシ		GTVNLQALHCHTWGLQKQVSLQALPGNEHIAMLANTTLAYLKRVLGSP
		***** * * * *

Hiraoka, M. et al. J. Biol. Chem. 2002;277:10090-10099

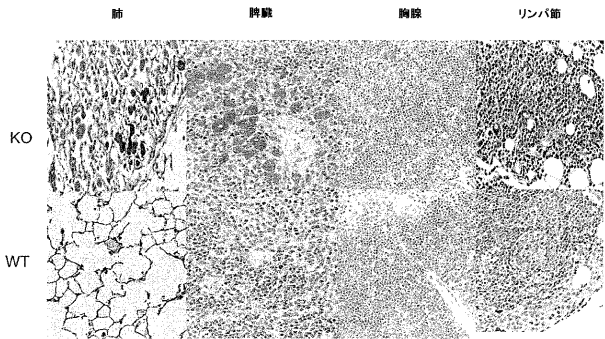
【 図 2 】

Fig. 2.



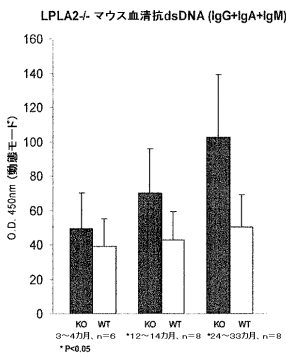
【 図 3 】

Fig. 3.



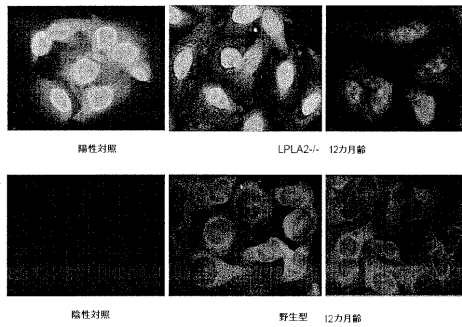
【 図 4 B 】

Fig. 4B.



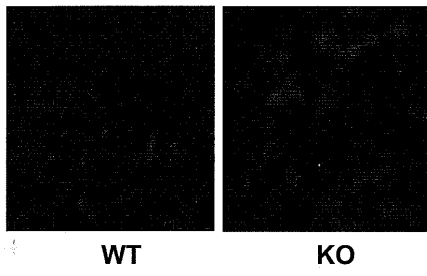
【 図 4 C 】

Fig. 4C.



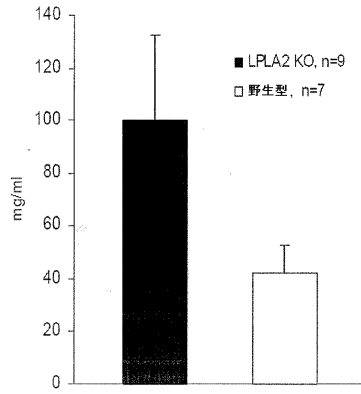
【 図 4 D 】

Fig. 4D.



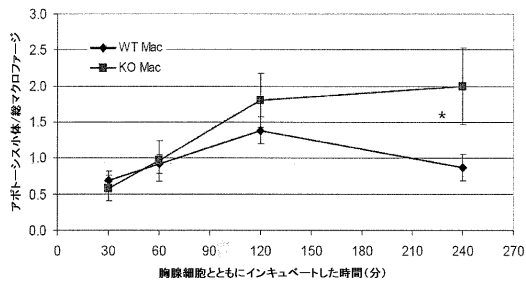
【 図 6 】

Fig. 6.



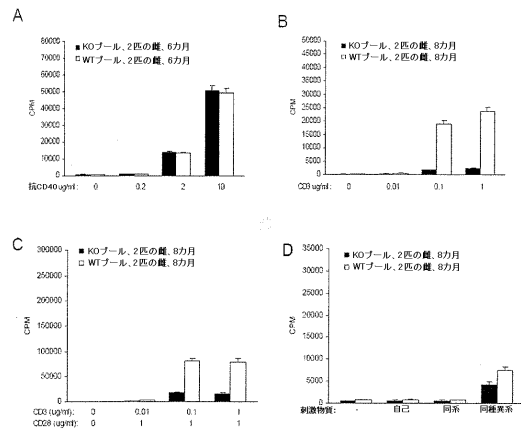
【 図 8 】

Fig. 8.



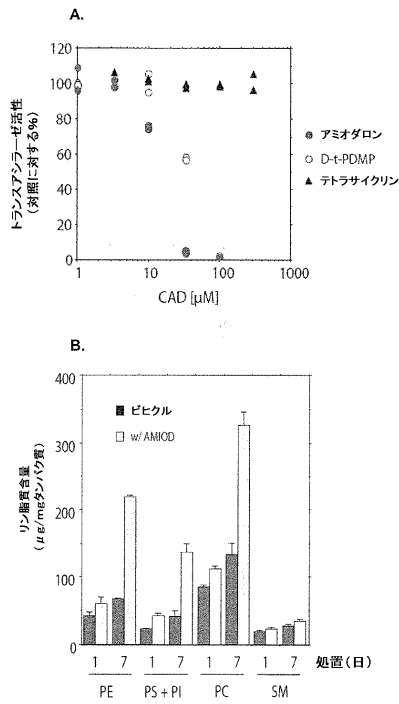
【 図 9 】

Fig. 9.



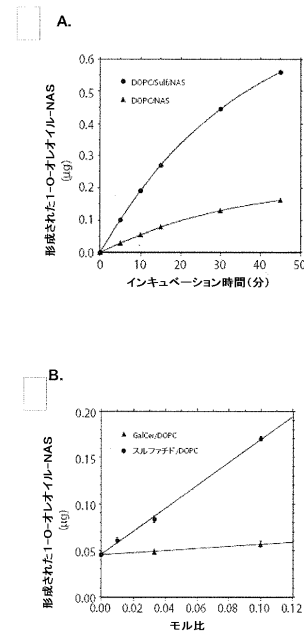
【 図 1 0 】

Fig. 10.



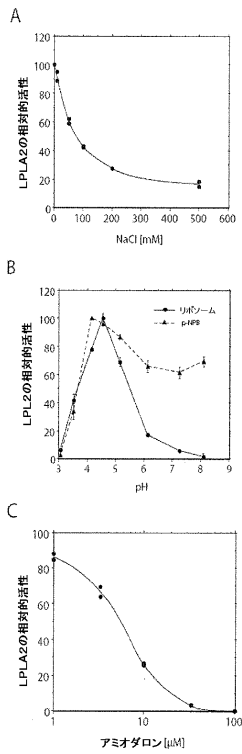
【 図 1 1 】

Fig. 11.



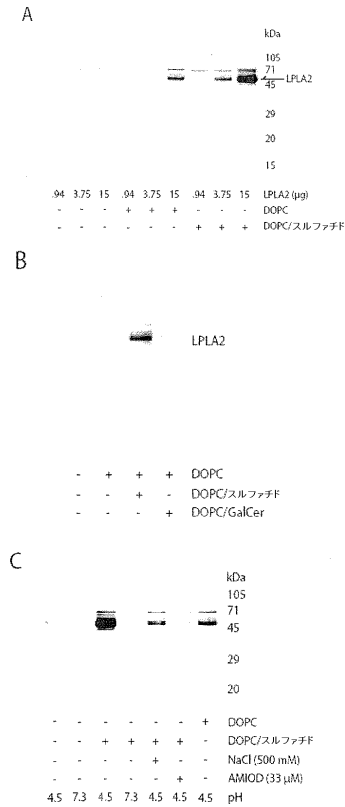
【 図 1 2 】

Fig. 12.



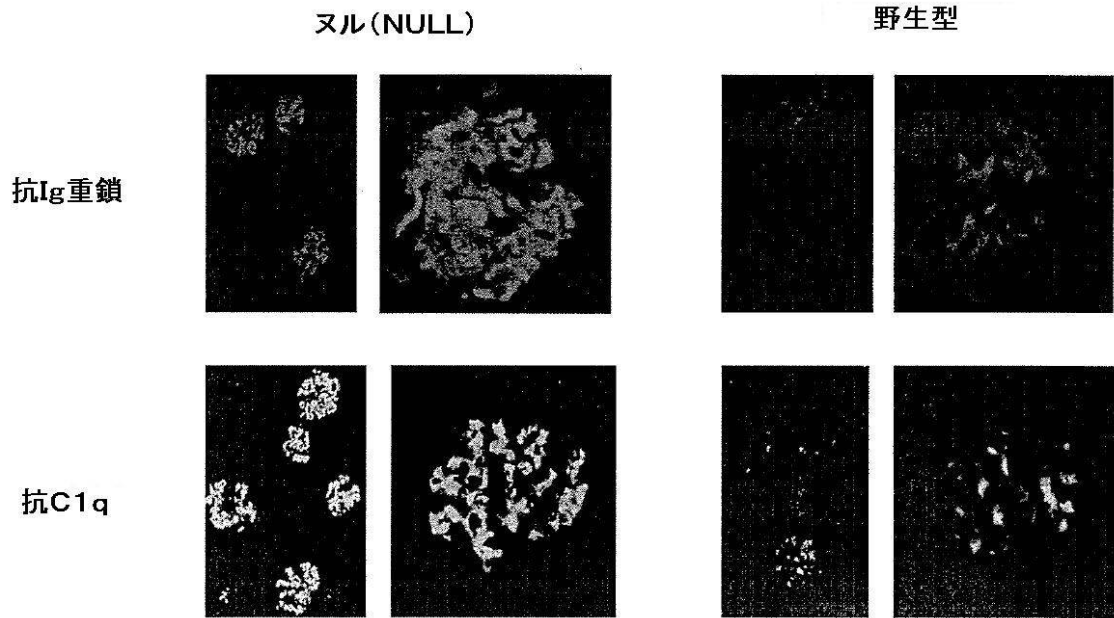
【 図 1 3 】

Fig. 13.



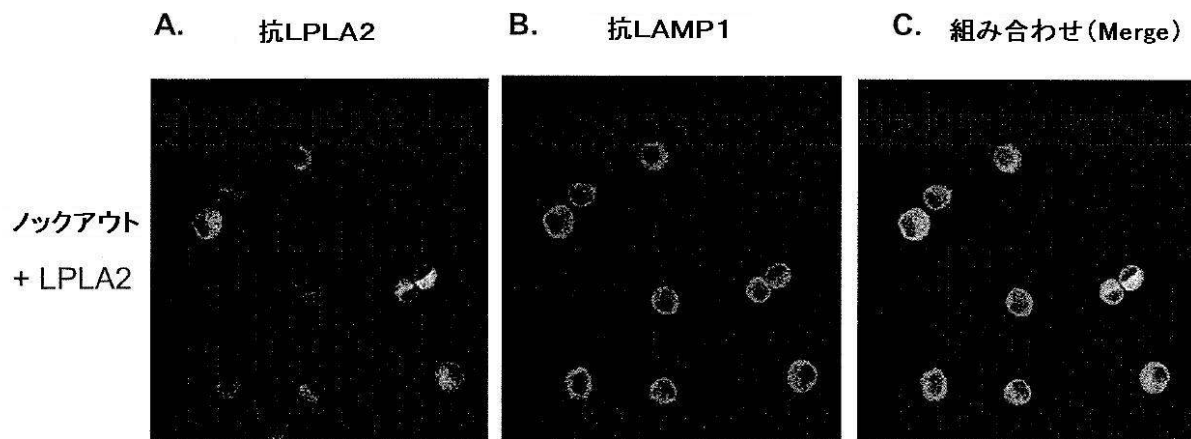
【 図 4 A 】

Fig. 4A.



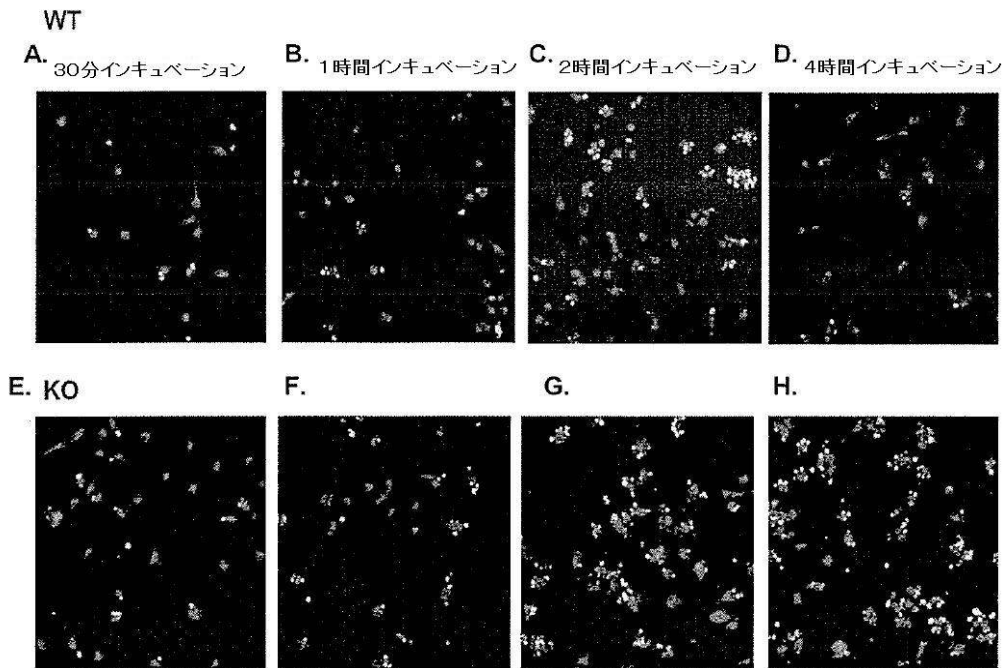
【 図 5 】

Fig. 5.



【 図 7 】



Fig. 7.



【 配列表 】

2011526916000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/US2009/049261</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>A61K 38/43(2006.01)i, A61P 37/00(2006.01)i, C12Q 1/06(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 8: A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) cKOMPASS(KIPO internal), Delphion, Pubmed (tingible body macrophage, lysosomal phospholipase A2 (LPLA2), 1-O-acylceramide synthase (ACS), systemic lupus erythematosus)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Fishman P, et al., The putative role of cytokines in the induction of primary anti-phospholipid syndrome in mice. Clin Exp Immunol. 1992 Nov; 90(2): 266-270 See summary and introduction	1-11, 25-36
A	Hiraoka M, et al., Lysosomal phospholipase A2 and phospholipidosis. Mol Cell Biol. 2006 Aug; 26(16): 6139-6148 See discussion	1-11, 25-36
A	Pruzanski W, et al., Circulating group II phospholipase A2 activity and antilipocortin antibodies in systemic lupus erythematosus. Correlative study with disease activity. J Rheumatol. 1994 Feb; 21(2) :252-257 See Result	1-11, 25-36
A	Gaipi US, et al., Impaired clearance of dying cells in systemic lupus erythematosus. Autoimmun Rev. 2005 Apr; 4(4): 189-194. Epub 2004 Dec 8 See figure 1	1-11, 25-36
A	US 2005-0281803 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 22 Dec.2005 See abstract	1-11, 25-36
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 FEBRUARY 2010 (17.02.2010)		Date of mailing of the international search report <b>24 FEBRUARY 2010 (24.02.2010)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer CHO, Kyung Joo Telephone No. 82-42-481-8287 

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/049261

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 12-24, 37, 38  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 12-24, 37, 38 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2009/049261**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005-0281803 A1	22.12.2005	CA 2559936 A1	29.09.2005
		CA 2606228 A1	02.11.2006
		EP 1748782 A2	07.02.2007
		EP 1888769 A2	20.02.2008
		US 07319015 B2	15.01.2008
		US 2006-0008455 A1	12.01.2006
		US 2005-0281803 A1	22.12.2005
		WO 2006-116746 A2	02.11.2006
		WO 2005-089386 A3	29.09.2005

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q	1/34 (2006.01)	C 1 2 Q 1/34	
C 1 2 Q	1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N	33/573 (2006.01)	G 0 1 N 33/573	A

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

(72)発明者 シェイマン, ジェイムス エー.  
アメリカ合衆国 ミシガン 4 8 1 0 3, アン アーバー, マルホーランド アベニュー 3  
2 2

(72)発明者 アベ, アキラ  
アメリカ合衆国 ミシガン 4 8 1 0 5, アン アーバー, ニールセン コート 1 1 2 5,  
ナンバー 4

(72)発明者 ケリー, ロバート  
アメリカ合衆国 ミシガン 4 8 1 8 3, トレントン, ホウソーン 1 6 0 1

(72)発明者 コールメイヤー, ジェシカ  
アメリカ合衆国 ミシガン 4 8 1 9 7, イプシランティ, コロニー パーク ドライブ 6  
0 4 0

(72)発明者 ルー, イェ  
アメリカ合衆国 ミシガン 4 8 1 0 5, アン アーバー, プラシド ウェイ 2 2 2 5

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA11 DA20 DA36 FB01 FB03  
4B063 QA19 QQ02 QQ08 QQ30 QQ42 QQ53 QQ79 QR10 QR32 QR36  
QR48 QR55 QR72 QR77 QS33 QS34 QX01  
4B065 AA92X AA94X AC20 CA31 CA46  
4C084 BA01 BA02 BA20 BA21 BA22 BA23 CA53 CA59 DC01 NA14  
ZA592 ZA892 ZB072

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011526916A5</a>	公开(公告)日	2012-08-09
申请号	JP2011516818	申请日	2009-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	密歇根大学		
申请(专利权)人(译)	密歇根大学董事会		
[标]发明人	シェイマンジェイムスエー アベアキラ ケリーロバート コールメイヤージェシカ ルーイエ		
发明人	シェイマン, ジェイムス エー. アベ, アキラ ケリー, ロバート コールメイヤー, ジェシカ ルー, イエ		
IPC分类号	A61K38/43 A61P17/00 A61P11/00 A61P37/02 C12N5/0786 C12Q1/02 C12Q1/34 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/573		
CPC分类号	A61K38/45 A61K38/465 A61P11/00 A61P17/00 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 C12Q1/44 C12Y203/01 C12Y301/01005 G01N2333/918 G01N33/6854 G01N2333/91051 G01N2800/104 G01N2800/56		
FI分类号	A61K37/48.ZNA A61P17/00 A61P11/00 A61P37/02 C12N5/00.202.N C12Q1/02 C12Q1/34 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.N G01N33/573.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA11 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ30 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR10 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B065/AA92X 4B065/AA94X 4B065/AC20 4B065/CA31 4B065/CA46 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA20 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/CA59 4C084/DC01 4C084/NA14 4C084/ZA592 4C084/ZA892 4C084/ZB072		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/076913 2008-06-30 US		
其他公开文献	JP2011526916A		

#### 摘要(译)

本发明涉及诊断和治疗系统性红斑狼疮和药物诱导的系统性红斑狼疮的方法。更具体地，本文描述了在诊断和治疗自身免疫疾病如系统性红斑狼疮和药物诱导的系统性红斑狼疮的方法中使用溶酶体磷脂酶A2的方法。在本发明中，例如，用于减少个体中可染色巨噬细胞积聚的方法，包括LPLA2酶活性的量和时间，以减少可染色巨噬细胞积聚的细胞中可染色巨噬细胞的积累。提供了一种方法，包括与具有的试剂接触的步骤

