(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2019-527192
(P2019-527192A)
(43)公表日　令和1年9月26日(2019.9.26)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 38/10	(2006.01)	A61K	38/10	ZNA	4B063
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	N	4C084
A61P 9/00	(2006.01)	G01N	33/53	M	4C085
A61P 37/02	(2006.01)	A61P	9/00		4H045
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	37/02		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 113 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-559732 (P2018-559732)
(86)(22)出願日　平成29年5月31日 (2017.5.31)
(85)翻訳文提出日　平成30年11月7日 (2018.11.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/035308
(87)国際公開番号　WO2017/210360
(87)国際公開日　平成29年12月7日 (2017.12.7)
(31)優先権主張番号　62/343,601
(32)優先日　平成28年5月31日 (2016.5.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　518395887
カーディオバックス　リミテッド　ライアビリティ　カンパニー
アメリカ合衆国　９００６７　カリフォルニア州　ロサンゼルス　サンタ　モニカ　ブールバード　１０１００　スイート　９２５
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】全身性エリテマトーデスの診断及び治療方法

(57)【要約】
本発明で提供するのは、ヒトを含む哺乳動物における全身性エリテマトーデスの予防及び／または治療的処置用のペプチド及び抗体と、ＳＬＥの発症リスクの高低ならびに／または疾患のグレード、病期、及び／もしくは予後に関連する抗体の有無を診断することである。

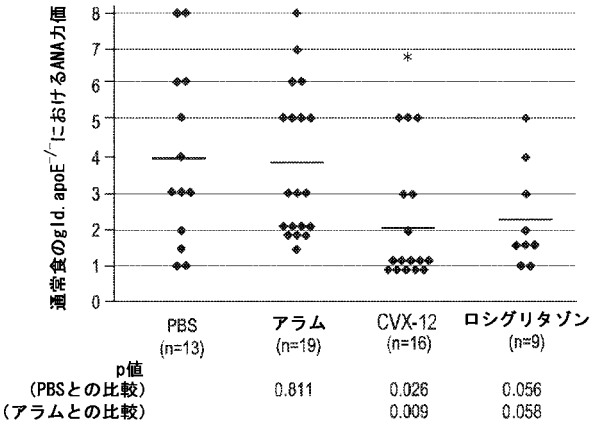
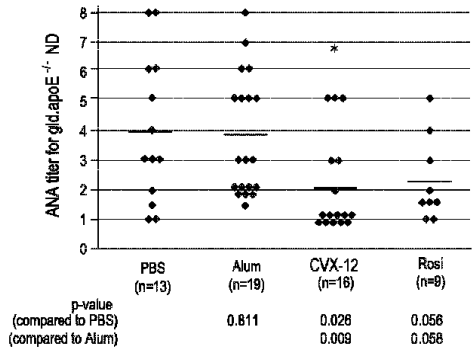


FIG. 4



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＳＬＥを有する対象における心血管疾患を治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する方法であって、（ａ）ＡｐｏＢの１つもしくは複数のペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログを含む組成物を用意することと、（ｂ）（ＳＬＥ）を有する対象における心血管疾患を治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進するために、有効量の前記組成物を前記対象に投与することとを含む、前記方法。
【請求項２】
全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）の治療、阻害、予防、その重症度の低減、その進行の遅延、及び／またはその予防の促進を必要とする対象におけるＳＬＥを治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する方法であって、（ａ）ＡｐｏＢ－１００（「ＡｐｏＢ」）の１つもしくは複数のペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログを含む組成物を用意することと、（ｂ）前記対象におけるＳＬＥを治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進するために、有効量の前記組成物を前記対象に投与することとを含む、前記方法。
【請求項３】
ＡｐｏＢの前記ペプチドが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０２に示されているＡｐｏＢ－１００のペプチド１～３０２のうちのいずれか１つまたは複数である、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
ＡｐｏＢ－１００の前記ペプチドが、Ｐ２１０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１０）である、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
ＡｐｏＢ－１００の前記ペプチドが、Ｐ４５（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５）である、請求項３に記載の方法。
【請求項６】
前記ペプチドが、コレラ毒素Ｂ（ＣＴＢ）に融合されている、請求項３に記載の方法。
【請求項７】
ＳＬＥの治療、阻害、予防、その重症度の低減、その進行の遅延、及び／またはその予防の促進を必要とする対象におけるＳＬＥを治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する方法であって、（ａ）ＡｐｏＢの１つもしくは複数のペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞を含む組成物を用意することと、（ｂ）前記対象におけるＳＬＥを治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進するために、有効量の前記組成物を前記対象に投与すること含む、前記方法。
【請求項８】
ＳＬＥを有する対象における心血管疾患を治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する方法であって、（ａ）ＡｐｏＢの１つもしくは複数のペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞を含む組成物を用意することと、（ｂ）（ＳＬＥ）を有する対象における心血管疾患を治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進するために、有効量の前記組成物を前記対象に投与することとを含む、前記方法。
【請求項９】
ＡｐｏＢの前記ペプチドが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０２に示されているＡｐｏＢのペプチド１～３０２のうちのいずれか１つまたは複数である、請

求項７または８に記載の方法。
【請求項１０】
ＡｐｏＢの前記ペプチドが、Ｐ２１０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１０）である、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
ＡｐｏＢの前記ペプチドが、Ｐ４５（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５）である、請求項９に記載の方法。
【請求項１２】
前記ペプチドが、コレラ毒素Ｂ（ＣＴＢ）に融合されている、請求項７または８に記載の方法。
【請求項１３】
有効量の１つまたは複数のエンハンサーを投与することをさらに含む、請求項７または８に記載の方法。
【請求項１４】
前記エンハンサーが、ＩＬ－２、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＴＧＦ－β、ＩＬ２／抗ＩＬ－２抗体複合体、またはこれらの組み合わせのうちのいずれか１つまたは複数である、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
ＳＬＥを治療する必要のある対象におけるＳＬＥを受動免疫によって治療する方法であって、ＡｐｏＢの少なくとも１つの酸化断片と結合する抗体を用意することと、ＳＬＥを治療するために治療上または予防上有効な量の前記抗体を投与することとを含む、前記方法。
【請求項１６】
前記抗体がヒト抗体である、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記抗体が重鎖可変領域（V_H）及び軽鎖可変領域（V_L）を含み、前記V_H領域がＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０３に示されている配列からなり、前記軽鎖可変領域（V_L）がＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０４に示されている配列からなる、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
ＡｐｏＢの少なくとも１つの酸化断片に結合する有効量の抗体を投与することをさらに含む、請求項１、２、５または６に記載の方法。
【請求項１９】
前記抗体がヒト抗体である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記抗体が重鎖可変領域（V_H）及び軽鎖可変領域（V_L）を含み、前記V_H領域がＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０３に示されている配列からなり、前記軽鎖可変領域（V_L）がＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０４に示されている配列からなる、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記心血管疾患が、アテローム性動脈硬化症である、請求項１または８に記載の方法。
【請求項２２】
前記アテローム性動脈硬化症が、加速性アテローム性動脈硬化症である、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
ＳＬＥを診断する必要のある対象におけるＳＬＥを診断するためのアッセイであって、
前記対象から試料を採取することと、
前記試料をアッセイして、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルを決定することと、
前記自己抗体のレベルが参照値と比べて低い場合に前記対象がＳＬＥを有する可能性が高いと判断するか、または前記自己抗体のレベルが参照値と比べて高い場合に前記対象がＳＬＥを有する可能性が低いと判断することと

を含む、前記アッセイ。
【請求項２４】
ＳＬＥを有するかまたはＳＬＥを有する疑いのある対象における心血管疾患の可能性を判断するためのアッセイであって、
前記対象から試料を採取することと、
前記試料をアッセイして、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルを決定することと、
前記自己抗体のレベルが参照値と比べて低い場合に前記対象が心血管疾患を有する可能性が高いと判断するか、または前記自己抗体のレベルが参照値と比べて高い場合に前記対象が心血管疾患を有する可能性が低いと判断することと
を含む、前記アッセイ。
【請求項２５】
イムノアッセイを用いることを含む、請求項２３または２４に記載のアッセイ。
【請求項２６】
前記イムノアッセイが、ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、ウエスタンブロッティング、サザンブロッティング、またはこれらの組み合わせのうちのいずれか１つまたは複数である、請求項２５に記載のアッセイ。
【請求項２７】
前記試料が、血液、血漿、尿、組織、またはこれらの組み合わせである、請求項２３または２４に記載のアッセイ。
【請求項２８】
ＳＬＥに対する治療の前、最中、または後に、前記試料を採取する、請求項２７に記載のアッセイ。
【請求項２９】
前記対象がヒトである、請求項２３または２４に記載のアッセイ。
【請求項３０】
前記参照値が、ＳＬＥを有しない対象の集団におけるＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルの平均値または中央値である、請求項２３または２４に記載のアッセイ。
【請求項３１】
前記参照値が、異なる時点に前記対象から採取した試料におけるＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルの平均値または中央値である、請求項２３または２４に記載のアッセイ。
【請求項３２】
前記参照値が、ＳＬＥを有しかつＳＬＥに対する治療を受けたことがあるかまたは受けている対象の集団におけるＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルの平均値または中央値である、請求項２３または２４に記載のアッセイ。
【請求項３３】
前記参照値が、ＳＬＥを有しかつＳＬＥに対する治療を受けたことがあるかまたは受けており、かつ心血管疾患に対する治療を受けたことがなく受けてもいない対象の集団におけるＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルの平均値または中央値である、請求項２３または２４に記載のアッセイ。
【請求項３４】
前記心血管疾患が、アテローム性動脈硬化症である、請求項２４に記載のアッセイ。
【請求項３５】
前記アテローム性動脈硬化症が、加速性アテローム性動脈硬化症である、請求項３４に記載のアッセイ。
【請求項３６】
可溶形態のアポトーシスシグナル伝達レセプターであるＦａｓ、ＴＮＦ－Ｒ１、及び／またはＴＲＡＩＬ－Ｒ２のレベルを決定することと、前記アポトーシスシグナル伝達レセプターのレベルが参照値と比べて高い場合に前記対象がＳＬＥを有する可能性が高いと判

断するか、または前記アポトーシスシグナル伝達レセプターのレベルが参照値と比べて低い場合に前記対象がＳＬＥを有する可能性が低いと判断することとをさらに含む、請求項２３に記載のアッセイ。

【請求項３７】

ＳＬＥに対する治療の有効性を判断する必要のある対象におけるＳＬＥに対する治療の有効性を判断するためのアッセイであって、

前記対象から試料を採取することと、

前記試料をアッセイして、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルを決定することと、

前記自己抗体のレベルが参照値と比べて高い場合に前記治療が有効であると判断するか、または前記自己抗体のレベルが参照値と比べて低い場合に前記治療が有効ではないと判断することと

を含む、前記アッセイ。

【請求項３８】

ＳＬＥを有する対象における心血管疾患に対する治療の有効性を判断するためのアッセイであって、

前記対象から試料を採取することと、

前記試料をアッセイして、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルを決定することと、

前記自己抗体のレベルが参照値と比べて高い場合に前記治療が有効であると判断するか、または前記自己抗体のレベルが参照値と比べて低い場合に前記治療が有効ではないと判断することと

を含む、前記アッセイ。

【請求項３９】

ＳＬＥを診断する必要のある対象におけるＳＬＥを診断するためのアッセイであって、

前記対象から試料を採取することと、

前記試料をアッセイして、可溶形態のアポトーシスシグナル伝達レセプターであるＦａｓ、ＴＮＦ－Ｒ１、及び／またはＴＲＡＩＬ－Ｒ２のレベルを決定することと、

前記アポトーシスシグナル伝達レセプターのレベルが参照値と比べて高い場合に前記対象がＳＬＥを有する可能性が高いと判断するか、または前記アポトーシスシグナル伝達レセプターのレベルが参照値と比べて低い場合に前記対象がＳＬＥを有する可能性が低いと判断することと

を含む、前記アッセイ。

【請求項４０】

前記試料をアッセイして、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルを決定することと、前記自己抗体のレベルが参照値と比べて低い場合に前記対象がＳＬＥを有する可能性が高いと判断するか、または前記自己抗体のレベルが参照値と比べて高い場合に前記対象がＳＬＥを有する可能性が低いと判断することとをさらに含む、請求項３９に記載のアッセイ。

【請求項４１】

ＳＬＥを有するかまたはＳＬＥを有する疑いのある対象における心血管疾患の可能性を判断するためのアッセイであって、

前記対象から試料を採取することと、

前記試料をアッセイして、可溶形態のアポトーシスシグナル伝達レセプターであるＦａｓ、ＴＮＦ－Ｒ１、及び／またはＴＲＡＩＬ－Ｒ２のレベルを決定することと、

前記アポトーシスシグナル伝達レセプターのレベルが参照値と比べて高い場合に前記対象が心血管疾患を有する可能性が高いと判断するか、または前記アポトーシスシグナル伝達レセプターのレベルが参照値と比べて低い場合に前記対象が心血管疾患を有する可能性が低いと判断することと

を含む、前記アッセイ。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本願は、米国特許法第１１９条（ｅ）の下、２０１６年５月３１日に出願された米国特許仮出願第６２／３４３，６０１号（その内容は、参照により、全体が本明細書に援用される）に基づく優先権を主張するものである。
【０００２】
技術分野
本発明は、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）の治療方法と、ＳＬＥの診断方法と、ＳＬＥを有する対象における心血管疾患の診断方法とを提供する。
【背景技術】
【０００３】
背景
本明細書内の文献はいずれも、個々の文献または特許出願がそれぞれ参照により援用されることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、参照により援用される。下記の説明には、本発明を理解する際に有用となり得る情報が含まれている。本明細書に示されている情報のいずれかが、先行技術であったり、もしくは今回特許請求する発明に関連したりすること、または具体的または黙示的に参照する文献のいずれかが、先行技術であることを認めるものではない。
【０００４】
加速性アテローム性動脈硬化症は、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）の重篤かつ命にかかわる合併症である。ＳＬＥは、妊娠可能年齢の女性とアフリカ系アメリカ人で多く見られる。現行の治療は、かなり重大な副作用がある非特異的な免疫抑制剤である。これらの薬剤を用いても、患者は心血管合併症のリスクにさらされ続ける。治療に対する応答性が不完全であることから、より特異的で毒性の少ない治療法の必要性が示されている。今では、ＳＬＥ患者におけるアテローム性動脈硬化症の発症と進行は、アテローム形成抑制性とアテローム形成促進性という対立する免疫応答のバランスによって調節されていることが分かっている。本発明では、ＳＬＥの治療方法と、ＳＬＥを有する対象における心血管疾患の可能性の診断方法を提供する。
【発明の概要】
【０００５】
概要
本発明の下記の実施形態と態様は、範囲を限定するものではなく、例示と例証のためのものとして意図されているシステム、組成物、及び方法に関して説明及び例証されている。
【０００６】
本発明で提供するのは、病態を治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する必要のある対象における前記病態を治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する方法である。この方法は、対象の病態を治療し、阻害し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進するために、ＡｐｏＢ－１００の１つもしくは複数のペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログを含む組成物を用意することと、有効量の前記組成物を対象に投与することとを含む。一実施形態では、この病態は、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）である。別の実施形態では、この病態は心血管疾患である。さらなる実施形態では、この病態は、ＳＬＥを有する対象における心血管疾患である。
【０００７】
また、本発明で提供するのは、病態を治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する必要のある対における前記病態を

治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する方法である。この方法は、対象の病態を治療し、阻害し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進するために、ＡｐｏＢ－１００の１つもしくは複数のペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞を含む組成物を用意することと、（ｂ）有効量の前記組成物を対象に投与することとを含む。一実施形態では、この病態は全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）である。別の実施形態では、この病態は心血管疾患である。さらなる実施形態では、この病態は、ＳＬＥを有する対象における心血管疾患である。

【０００８】

本明細書に記載されている方法の様々な実施形態において、ＡｐｏＢ－１００のペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０２に示されているＡｐｏＢ－１００のペプチド１～３０２のうちのいずれか１つまたは複数である。一実施形態では、ＡｐｏＢ－１００のペプチドはＰ２１０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１０）である。別の実施形態では、ＡｐｏＢ－１００のペプチドはＰ４５（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５）である。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００のペプチドはコレラ毒素Ｂ（ＣＴＢ）に融合されている。一実施形態では、Ｐ２１０がＣＴＢに融合されている。別の実施形態では、Ｐ４５がＣＴＢに融合されている。

【０００９】

また、本発明で提供するのは、病態の診断が必要な対象における病態の診断方法である。この方法は、対象から試料を採取することと、その試料をアッセイして、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルを決定することと、その自己抗体のレベルが参照値と比べて低い場合にその対象がその疾患に罹患している可能性が高くなっていると判断するか、またはその自己抗体のレベルが参照値と比べて高い場合にその対象がその疾患に罹患している可能性が低いと判断することとを含む。一実施形態では、この病態はＳＬＥである。別の実施形態では、この病態は心血管疾患である。さらなる実施形態では、この病態は、ＳＬＥを有する対象における心血管疾患である。

【００１０】

さらに、本発明で提供するのは、疾患に対する治療の有効性を判断する必要のある対象の疾患に対する治療の有効性を判断するためのアッセイである。このアッセイは、対象から試料を採取することと、その試料をアッセイして、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルを決定することと、その自己抗体のレベルが参照値と比べて高い場合にその治療が有効であると判断するか、またはその自己抗体のレベルが参照値と比べて低い場合にその治療が有効ではないと判断することとを含む。一実施形態では、この疾患は、ＳＬＥを有する対象における心血管疾患である。別の実施形態では、この疾患はＳＬＥである。さらなる実施形態では、この疾患は心血管疾患である。

【図面の簡単な説明】

【００１１】

例示的な実施形態は、参照する図で例証されている。本明細書に開示されている実施形態と図は、限定的なものではなく、例証するためのものとみなすように意図されている。

【００１２】

【図１】本発明の様々な実施形態による場合の、実施例１に記載されている試験の期間中の体重測定値を示している。値は、平均±ＳＥＭである。

【図２】本発明の様々な実施形態による場合の、試験期間中の飼料消費測定値を示している。値は、平均±ＳＥＭである。

【図３】本発明の様々な実施形態に従って、通常食を与えたｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスにおいて、ＣＶＸ－１２の投与により、ｏｘＰＬが有意に増加したことを示している。ＰＢＳ群、アラム群及びＣＶＸ－１２群における、実施例１のビオチン化ＡｐｏＢ（ｂｉｏｔ．ＡｐｏＢ）、酸化リン脂質に対するビオチン化抗体（ｂｉｏｔ．Ｅ０６）及び酸化リン脂質／ａｐｏＢ１００（ＯｘＰＬ／ＡｐｏＢ）である。

【図４】本発明の様々な実施形態に従って、実施例１で検出された、抗核抗体の反応性を示している。値は、ＡＮＡの反応性が検出可能である最大血清希釈率に対応しており、１は１：１００、２は１：１０００、４は１：１００００、６は１：３００００、８は１：９００００である。

【図５】本発明の様々な実施形態による場合の、血清中の抗カルジオリピン抗体の反応性を示している。通常食を与えたｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスの血清中の抗カルジオリピン抗体である。

【図６】図６Ａ～図６Ｄは、本発明の様々な実施形態に従って、ｅｎ　ｆａｃｅによる大動脈の動脈硬化性プラークの範囲を示している。アテローム性動脈硬化病巣の範囲が、ｅｎ　ｆａｃｅによる大動脈の総面積に対するパーセンテージ（プラークで覆われた面積／総面積）として示されている。大動脈のプラークを測定したのは、ａｐｏＥ－／－（図６Ａ）、ｇｌｄ（図６Ｂ）、通常食を与えたｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－（図６Ｃ）、ウェスタン食を与えたｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－（図６Ｄ）である。

【図７】図７Ａ～図７Ｃは、実施例１に記載されている本発明の様々な実施形態による場合の、大動脈起始部におけるアテローム性動脈硬化病巣の面積を示している。ａｐｏＥ$^{-}$／$^{-}$マウス（図７Ａ）、通常食のｇｌｄ．ａｐｏＥ$^{-}$／$^{-}$マウス（図７Ｂ）及びウェスタン食のｇｌｄ．ａｐｏＥ$^{-}$／$^{-}$マウス（図７Ｃ）の大動脈起始部のオイルレッドＯ染色断面である。各処置群（ＰＢＳ、アラム及びＣＶＸ－１２）の代表的な画像と、断面プラーク面積の測定値（mm^2）が示されている。ａｐｏＥ$^{-}$／$^{-}$－アラム（＊）とａｐｏＥ$^{-}$／$^{-}$－ＣＶＸ－１２（＊）をａｐｏＥ$^{-}$／$^{-}$－ＰＢＳと比較した場合、Ｐ＜０．０５である。

【図８】実施例１に記載されている本発明の様々な実施形態による場合の、犠死時の脾臓とリンパ節の重量である。値は、平均±ＳＥＭである。ＣＶＸ－１２で処置したｇｌｄと、ＰＢＳで処置したｇｌｄと比較した場合のＰ値は０．０１７であり、通常食を与え、ロシグリタゾンで処置したｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－と、通常食を与え、ＰＢＳで処置したｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－を比較した場合のＰ値は０．００２である（＊）。

【図９】実施例１に記載されている本発明の様々な実施形態による場合の、ループスマウスモデルにおける糸球体係蹄のサイズを示している。矢印が、糸球体係蹄を示している。係蹄区域のサイズは、ピクセル数によって測定されている。ＳＥＭが示されている。

【図１０】図１０Ａ～図１０Ｃは、本発明の様々な実施形態による場合、Ｄｅａｔｈレセプターリガンドが、細胞上清において可溶性Ｄｅａｔｈレセプターの放出を誘導することを示している。ＩＬ－１β（１０ｎｇ／ｍｌ）、可溶性Ｆａｓリガンド（０．５μｇ／ｍｌ）、ＴＮＦ（１０ｎｇ／ｍｌ）またはＬＰＳ（１０μｇ／ｍｌ）で処置した健常ドナーＰＢＭＣを新たに培養したものの細胞上清から得られた可溶性ＤｅａｔｈレセプターＴＲＡＩＬＲ２（図１０Ａ）、Ｆａｓ（図１０Ｂ）及びＴＮＦＲ１（図１０Ｃ）のレベルである。

【図１１Ａ】図１１Ａ～図１１Ｆは、本発明の様々な実施形態に従って、ＳＬＥ患者では、ＰＢＭＣを可溶性Ｆａｓリガンドで処置すると、コントロールにおけるほど広範には、アポトーシスが活性化されないことを示している。可溶性ＤｅａｔｈレセプターＦＡＳ（図１１Ａ）、ＴＲＡＩＬ（図１１Ｂ）、及びＴＮＦＲ１（図１１Ｃ）のレベルである。前方及び側方散乱でのリンパ球ゲートでゲーティングした末梢血単核球（図１１Ｄ）であり、可溶性Ｆａｓリガンド（２．５μｇ／ｍｌ）で処置後の初期アポトーシスリンパ球細胞（アネキシン$^{+}$／７－ＡＡＤ$^{-}$）（図１１Ｅ）及び後期アポトーシスリンパ球細胞（アネキシン$^{+}$／７－ＡＡＤ$^{+}$）（図１１Ｆ）として示されている。

【図１１Ｂ】図１１Ａの説明を参照。

【図１１Ｃ】図１１Ａの説明を参照。

【図１１Ｄ】図１１Ａの説明を参照。

【図１１Ｅ】図１１Ａの説明を参照。

【図１１Ｆ】図１１Ａの説明を参照。

【図１２】本発明の様々な実施形態に従って、Ｍａｌｍｏ　Ｄｉｅｔ　ａｎｄ　Ｃａｎｃ

ｅｒの心血管コホートと、実施例３の試験参加者の募集を示すフローチャートを示している。＊１．Ｍａｎｊｅｒ Ｊ，Ｅｌｍｓｔａｈｌ Ｓ，Ｊａｎｚｏｎ Ｌ，Ｂｅｒｇｌｕｎｄ Ｇ．Ｉｎｖｉｔａｔｉｏｎ ｔｏ ａ ｐｏｐｕｌａｔｉｏｎ－ｂａｓｅｄ ｃｏｈｏｒｔ ｓｔｕｄｙ：ｄｉｆｆｅｒｅｎｃｅｓ ｂｅｔｗｅｅｎ ｓｕｂｊｅｃｔｓ ｒｅｃｒｕｉｔｅｄ ｕｓｉｎｇ ｖａｒｉｏｕｓ ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ．Ｓｃａｎｄ Ｊ Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ．２００２；３０（２）：１０３－１１２、２．Ｍａｎｊｅｒ Ｊ，Ｃａｒｌｓｓｏｎ Ｓ，Ｅｌｍｓｔａｈｌ Ｓ，Ｇｕｌｌｂｅｒｇ Ｂ，Ｊａｎｚｏｎ Ｌ，Ｌｉｎｄｓｔｒｏｍ Ｍ，Ｍａｔｔｉｓｓｏｎ Ｉ，Ｂｅｒｇｌｕｎｄ Ｇ．Ｔｈｅ Ｍａｌｍｏ Ｄｉｅｔ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ ｓｔｕｄｙ：ｒｅｐｒｅｓｅｎｔａｔｉｖｉｔｙ，ｃａｎｃｅｒ ｉｎｃｉｄｅｎｃｅ ａｎｄ ｍｏｒｔａｌｉｔｙ ｉｎ ｐａｒｔｉｃｉｐａｎｔｓ ａｎｄ ｎｏｎ－ｐａｒｔｉｃｉｐａｎｔｓ．Ｅｕｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ Ｐｒｅｖ．２００１ Ｄｅｃ；１０（６）：４８９－４９９を参照されたい。

【図１３】図１３Ａ～図１３Ｅは、本発明の様々な実施形態に従って、１５年間のフォローアップ中における、アポリポタンパク質Ｂ－１００（ａｐｏＢ－１００）ペプチドｐ４５及びｐ２１０を認識する自己抗体の三分位数の無冠動脈イベント生存率を示している。ａｐｏＢ－１００ペプチドｐ４５及びｐ２１０に対する自己抗体の三分位数のカプラン・マイヤー無イベント生存曲線によって、有意な正の直線的傾向が明らかになり、自己抗体のレベルが上昇すると、冠動脈イベントの発生数が低下することが示されている。ＩｇＭ－ｐ４５$_{ネイティブ}$（図１３Ａ）、ＩｇＭ－ｐ４５$_{ＭＤＡ}$（図１３Ｂ）、ＩｇＭ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$（図１３Ｃ）、ＩｇＭ－ｐ２１０$_{ＭＤＡ}$（図１３Ｄ）及びＩｇＧ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$（図１３Ｅ）の三分位数である。ログランク（マンテル・コックス）］検定を用いて、直線的傾向に対するＰ値を算出した。

【図１４】本発明の様々な実施形態に従って、心血管疾患（ＣＶＤ）を有する全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）患者とＣＶＤを有しないＳＬＥ患者におけるｐ４５免疫グロブリン（Ｉｇ）Ｍ、マロンジアルデヒド（ＭＤＡ）－ｐ４５　ＩｇＭ、ｐ２１０　ＩｇＧ及びＭＤＡ－ｐ２１０　ＩｇＧの中央値と９５％信頼区間を示す一次元の箱ひげ図を示している。

【図１５Ａ】図１５Ａ～図１５Ｄは、本発明の様々な実施形態に従って、ＰＢＳ、ＣＶＸ－１４またはＡｄｊｕｐｈｏｓで処置した後のＭＲＬ／ｌｐｒ／Ａｐｏｅ$^{-}$／$^{-}$マウスの大動脈弓部におけるプラークの組成と特徴を示している。ＰＢＳ、ＣＶＸ－１４またはＡｄｊｕｐｈｏｓで処置した群における大動脈弓のオイルレッドＯ脂質染色画分（図１５Ａ）、プラーク面積（図１５Ｂ）、ＣＤ６８画分（図１５Ｃ～図１５Ｄ）である。ＦＯＸＰ３（図１５Ｅ）、ＴＧＦ－β（図１５Ｆ）及びＴＮＦ－α（図１５Ｇ）の頸動脈でのｍＲＮＡ遺伝子の発現である。

【図１５Ｂ】図１５Ａの説明を参照。

【図１５Ｃ】図１５Ａの説明を参照。

【図１５Ｄ】図１５Ａの説明を参照。

【図１５Ｅ】図１５Ａの説明を参照。

【図１５Ｆ】図１５Ａの説明を参照。

【図１５Ｇ】図１５Ａの説明を参照。

【図１６Ａ】図１６Ａ～図１６Ｅは、本発明の様々な実施形態に従って、ＭＲＬ／ｌｐｒ／Ａｐｏｅ$^{-}$／$^{-}$マウスをＰＢＳ、ＣＶＸ－１４またはＡｄｊｕｐｈｏｓで処置した後、フローサイトメトリーによって免疫細胞を評価したものを示している。処置したマウスにおける調節性Ｔ細胞（ＣＤ２５＋Ｆｏｘｐ３＋ＣＤ３＋ＣＤ４＋細胞、図１６Ａ）、ヘルパーＴ細胞（ＣＤ４＋ＣＤ３＋細胞、図１６Ｂ）、細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＤ８＋ＣＤ３＋細胞、図１６Ｃ）、末梢樹状細胞（Ｂ２２０＋ＣＤ１１ｃ＋、図１６Ｄ）及び単球（ＣＤ１１ｂ＋ＣＤ１１５＋、図１６Ｅ）細胞集団の脾細胞の量である。

【図１６Ｂ】図１６Ａの説明を参照。

【図１６Ｃ】図１６Ａの説明を参照。

【図１６Ｄ】図１６Ａの説明を参照。
【図１６Ｅ】図１６Ａの説明を参照。
【図１７】本発明の実施形態に従って、ＭＲＬ／ｌｐｒ／Ａｐｏｅ$^{-/-}$マウスの大動脈弓における動脈硬化性プラークの発生を示している。１０週間、週に１度、経口免疫を反復実施した後、オイルレッドＯで脂質染色したものである。処置群は、ＰＢＳ（ｎ＝１１）、ＣＴＢ（３０μｇ／ｍｌ、ｎ＝１３）、ｐ４５－ＣＴＢ（５μｇ／ｍｌ、ｎ＝１３）、ｐ４５－ＣＴＢ（１５μｇ／ｍｌ、ｎ＝１０）及びｐ４５－ＣＴＢ（３０μｇ／ｍｌ、ｎ＝１２）である。一元ＡＮＯＶＡとシダックの多重比較検定を用いて、統計解析を行い、ＰＢＳとＣＴＢを比較したところ、＊＊ｐ＜０．０１であった。各点は、１匹のマウスを表している。
【図１８Ａ】図１８Ａ～図１８Ｉは、本発明の実施形態に従って、ＭＲＬ／ｌｐｒ／Ａｐｏｅ$^{-/-}$マウスをＰＢＳ、３０μｇ／ｍｌのＣＴＢ、５μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢ、１５μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢ及び３０μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢで処置した後、フローサイトメトリーによって脾細胞の表現型を評価したものを示している。ヘルパーＴ細胞（ＣＤ３$^{+}$ＣＤ４$^{+}$）（図１８Ａ）、細胞溶解性Ｔ細胞（ＣＤ３$^{+}$ＣＤ８$^{+}$）（図１８Ｂ）、Ｔヘルパーセントラルメモリー細胞（ＣＤ４$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ４４$^{int-hi}$）（図１８Ｃ）、Ｔヘルパーエフェクター細胞（ＣＤ４$^{+}$ＣＤ６２$^{-}$ＣＤ４４^{hi}）（図１８Ｄ）、ナイーブヘルパーＴ細胞（ＣＤ４$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ４４^{lo}）（図１８Ｅ）、調節性Ｔ細胞（ＣＤ３$^{+}$ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$ＦｏｘＰ３$^{+}$）（図１８Ｆ）、セントラルメモリー細胞溶解性Ｔ細胞（ＣＤ８$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ４４$^{int-hi}$）（図１８Ｇ）、細胞溶解性エフェクターＴ細胞（ＣＤ８$^{+}$ＣＤ６２$^{-}$ＣＤ４４^{hi}）（図１８Ｈ）及びナイーブ細胞溶解性Ｔ細胞（ＣＤ８$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ４４^{lo}）（図１８Ｉ）の脾細胞中のパーセンテージである。一元ＡＮＯＶＡとシダックの多重比較検定を用いて、統計解析を行い、ＰＢＳとＣＴＢを比較したところ、＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１及び＊＊＊ｐ＜０．００１であった。各点は、１匹のマウスを表している。
【図１８Ｂ】図１８Ａの説明を参照。
【図１８Ｃ】図１８Ａの説明を参照。
【図１８Ｄ】図１８Ａの説明を参照。
【図１８Ｅ】図１８Ａの説明を参照。
【図１８Ｆ】図１８Ａの説明を参照。
【図１８Ｇ】図１８Ａの説明を参照。
【図１８Ｈ】図１８Ａの説明を参照。
【図１８Ｉ】図１８Ａの説明を参照。
【図１９Ａ】図１９Ａ～図１９Ｉは、本発明の実施形態に従って、ＭＲＬ／ｌｐｒ／Ａｐｏｅ$^{-/-}$マウスをＰＢＳ、３０μｇ／ｍｌのＣＴＢ、５μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢ、１５μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢ及び３０μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢで処置した後、フローサイトメトリーによってリンパ節細胞の表現型を評価したものを示している。ヘルパーＴ細胞（ＣＤ３$^{+}$ＣＤ４$^{+}$）（図１９Ａ）、細胞溶解性Ｔ細胞（ＣＤ３$^{+}$ＣＤ８$^{+}$）（図１９Ｂ）、Ｔヘルパーセントラルメモリー細胞（ＣＤ４$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ４４$^{int-hi}$）（図１９Ｃ）、Ｔヘルパーエフェクター細胞（ＣＤ４$^{+}$ＣＤ６２$^{-}$ＣＤ４４^{hi}）（図１９Ｄ）、ナイーブヘルパーＴ細胞（ＣＤ４$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ４４^{lo}）（図１９Ｅ）、調節性Ｔ細胞（ＣＤ３$^{+}$ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$ＦｏｘＰ３$^{+}$）（図１９Ｆ）、セントラルメモリー細胞溶解性Ｔ細胞（ＣＤ８$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ４４$^{int-hi}$）（図１９Ｇ）、細胞溶解性エフェクターＴ細胞（ＣＤ８$^{+}$ＣＤ６２$^{-}$ＣＤ４４^{hi}）（図１９Ｈ）及びナイーブ細胞溶解性Ｔ細胞（ＣＤ８$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ４４^{lo}）（図１９Ｉ）の脾細胞中のパーセンテージである。一元ＡＮＯＶＡとシダックの多重比較検定を用いて、統計解析を行い、ＰＢＳとＣＴＢを比較したところ、＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１及び＊＊＊ｐ＜０．００１であった。各点は、１匹のマウスを表している。
【図１９Ｂ】図１９Ａの説明を参照。
【図１９Ｃ】図１９Ａの説明を参照。

【図１９Ｄ】図１９Ａの説明を参照。
【図１９Ｅ】図１９Ａの説明を参照。
【図１９Ｆ】図１９Ａの説明を参照。
【図１９Ｇ】図１９Ａの説明を参照。
【図１９Ｈ】図１９Ａの説明を参照。
【図１９Ｉ】図１９Ａの説明を参照。
【図２０】本発明の実施形態に従って、５６日のうちの４２日目の処置日に、ＭＲＬ／ｌｐｒ／Ａｐｏｅ$^{-}$／$^{-}$マウスから採取した血液のフローサイトメトリー解析を示している。処置中における血液中の調節性Ｔ細胞（ＣＤ３＋ＣＤ４＋ＣＤ２５＋ＦｏｘＰ３＋）のパーセンテージである。処置群は、ＰＢＳ（ｎ＝１１）、ＣＴＢ（３０μｇ／ｍｌ、ｎ＝１３）、ｐ４５－ＣＴＢ（５μｇ／ｍｌ、ｎ＝１２、ｎ＝９）及びｐ４５－ＣＴＢ（３０μｇ／ｍｌ、ｎ＝１１）である。技術的に困難なために、５μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢ群の１匹のマウス、１５μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢ群の１匹のマウス、３０μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢ群の２匹のマウスを除外した。
【発明を実施するための形態】
【００１３】
詳細な説明
本明細書に引用されている参照文献はいずれも、参照により、完全に示されているかのように、その全体が援用される。別段の定めのない限り、本明細書で用いられている技術的用語と科学的用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。Ａｌｌｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ ２２^{ｎｄ} ｅｄ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐｒｅｓｓ（Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ １５，２０１２）、Ｈｏｒｎｙａｋ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｎａｎｏｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ（２００８）、Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ ａｎｄ Ｓａｉｎｓｂｕｒｙ，Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ３^{ｒｄ} ｅｄ．，ｒｅｖｉｓｅｄ ｅｄ．，Ｊ．Ｗｉｌｅｙ & Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ ２００６）、Ｓｍｉｔｈ，Ｍａｒｃｈ’ｓ Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ，Ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ７^{ｔｈ} ｅｄ．，Ｊ．Ｗｉｌｅｙ & Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ ２０１３）、Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ，Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ ＤＮＡ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３^{ｒｄ} ｅｄ．，Ｗｉｌｅｙ－Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ（Ｎｏｖｅｍｂｅｒ ２８，２０１２）及びＧｒｅｅｎ ａｎｄ Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ４ｔｈ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ ２０１２）は、当業者に、本願で用いられている多くの用語に対する全般的な指針を提供する。抗体の調製方法に関する参照用としては、Ｇｒｅｅｎｆｉｅｌｄ，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ２^{ｎｄ} ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ ＮＹ，２０１３）、Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｄｅｒｉｖａｔｉｏｎ ｏｆ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｐｒｏｄｕｃｉｎｇ ｔｉｓｓｕｅ ｃｕｌｔｕｒｅ ａｎｄ ｔｕｍｏｒ ｌｉｎｅｓ ｂｙ ｃｅｌｌ ｆｕｓｉｏｎ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９７６ Ｊｕｌ，６（７）：５１１－９、Ｑｕｅｅｎ ａｎｄ Ｓｅｌｉｃｋ，Ｈｕｍａｎｉｚｅｄ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎｓ、米国特許第５，５８５，０８９号（１９９６年１２月）及びＲｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｒｅｓｈａｐｉｎｇ ｈｕｍａｎ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅｒａｐｙ，Ｎａｔｕｒｅ １９８８ Ｍａｒ ２４，３３２（６１６２）：３２３－７を参照されたい。
【００１４】

当業者であれば、本明細書に記載されている方法と材料と類似または等価な多くの方法と材料を認識するであろうし、本発明の実施の際には、これらの多くの方法と材料を使用できるであろう。本発明のその他の特徴と利点は、例として、本発明の実施形態の様々な特徴を例示している添付の図面と併せて、下記の詳細な説明を考察すれば、明らかになるであろう。実際、本発明は、記載されている方法と材料に限定されることは決してない。便宜上、本明細書、実施例及び添付の図面で用いられている特定の用語が本明細書でまとめられている。

【００１５】

別段の定めのない限り、または文脈から別段に黙示されていない限り、下記の用語と語句には、下に示されている意味が含まれる。別段の明示的な定めのない限り、または文脈から明らかではない限り、本発明が属する分野において、その用語または語句に与えられている意味が、下記の用語と語句から除外されることはない。特定の実施形態を説明するのを助けるために、定義を示すのであって、特許請求する発明を限定するようには意図していない。本発明の範囲は、請求項によってのみ限定されるからである。別段の定めのない限り、本明細書で用いられている技術的用語と科学的用語はいずれも、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。

【００１６】

本明細書で使用する場合、「含むこと」または「含む」という用語は、実施形態に有用である組成物、方法及びそのそれぞれの構成要素に関して使用されているが、有用か否かにかかわらず、示されていない要素を含めることが認められる。概して、本明細書で用いられている用語が概ね、「オープン」タームとして意図されていること（例えば、「～が挙げられる（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」は、「～が挙げられるが、これらに限らない（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ　ｂｕｔ　ｎｏｔ　ｌｉｍｉｔｅｄ　ｔｏ）」と解釈すべきであり、「有する」という用語は、「少なくとも有する」と解釈すべきであり、「～が挙げられる（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」という用語は、「～が挙げられるが、これらに限らない（ｉｎｃｌｕｄｅｓ　ｂｕｔ　ｉｓ　ｎｏｔ　ｌｉｍｉｔｅｄ　ｔｏ）」と解釈すべきであることなど）は、当業者には分かるであろう。

【００１７】

「投与すること」及び／または「投与する」とは、本明細書で使用する場合、医薬組成物を患者に送達するためのいずれかの経路を指す。送達経路としては、非侵襲的経口（口を通じた）経路、局所（皮膚）経路、経粘膜（経鼻、口腔内／舌下、膣内、眼局所及び直腸）経路、吸入経路、非経口経路、ならびに当該技術分野において知られているその他の方法を挙げてよい。非経口とは、概して注射と関連付けられている送達経路を指し、眼窩内経路、注入経路、動脈内経路、頸動脈内経路、嚢内経路、心臓内経路、皮内経路、筋肉内経路、腹腔内経路、肺内経路、髄腔内経路、胸骨内経路、髄腔内経路、子宮内経路、静脈内経路、くも膜下経路、被膜下経路、皮下経路、経粘膜経路または経気管経路が挙げられる。非経口経路による場合、医薬組成物は、注入用もしくは注射用の液剤もしくは懸濁剤の形態、または凍結乾燥粉末としてのものであってよい。

【００１８】

「有益な結果」としては、病状の重症度を抑制または緩和すること、病状の悪化を防ぐこと、病状を治癒させること、病状の発現を防ぐこと、患者が病状を発現する可能性を低下させること、及び／または患者の寿命もしくは推定余命を延ばすことが挙げられるが、決してこれらには限らない。いくつかの実施形態では、この病状はＳＬＥである。

【００１９】

「有効量」という用語は、本明細書で使用する場合、本明細書に開示されているような１つもしくは複数のペプチド、またはその変異体、バリアント、アナログもしくは誘導体を含む医薬組成物の量のうち、疾患または障害の少なくとも１つ以上の症状を軽減する量を指し、所望の作用をもたらすのに十分な薬理組成物の量に関するものである。「治療上有効な量」という語句は、本明細書で使用する場合、いずれかの医療に適用可能な合理的な利益／リスク比で、障害を治療するのに十分な組成物の量を意味する。

【００２０】
治療上または予防上有意に症状が軽減されることは、例えば、測定パラメーターが、コントロール、未治療の対象、または本明細書に記載されているペプチドを投与する前の対象の状態と比べて、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約１００％、少なくとも約１２５％、少なくとも約１５０％またはそれを上回る割合軽減されることである。測定するかまたは測定可能なパラメーターとしては、臨床的に検出可能な疾患マーカー、例えば、生物学的マーカーレベルの上昇または低下と、アテローム性動脈硬化症の症状またはマーカーの臨床的に許容されるスケールに関するパラメーターが挙げられる。しかしながら、本明細書に開示されているような組成物と製剤の１日の総使用量は、担当医が妥当な医学的判断の範囲内で決定することになるのは分かるであろう。正確な必要量は、治療する疾患の種類、対象の性別、年齢及び体重のような要因によって変化することになる。
【００２１】
「対象」、「個体」、「動物」、「患者」または「哺乳動物」は、診断、予後診断または治療が望まれるいずれかの対象、特に哺乳動物の対象を意味する。哺乳動物の対象としては、ヒト、飼われている動物、家畜、動物園の動物、競技用の動物、ペットの動物（イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、家畜のウシ、ウシなど）、霊長類動物（類人猿、サル、オラウータン及びチンパンジーなど）、イヌ科動物（イヌ及びオオカミなど）、ネコ科動物（ネコ、ライオン及びトラなど）、ウマ科動物（ウマ、ロバ及びゼブラスなど）、食用動物（ウシ、ブタ及びヒツジなど）、有蹄類動物（シカ及びキリンなど）、齧歯類動物（マウス、ラット、ハムスター及びモルモットなど）などが挙げられるが、これらに限らない。特定の実施形態では、哺乳動物は、ヒトの対象である。
【００２２】
「治療」及び「治療する」とは、本明細書で使用する場合、治療的処置と、予防的（ｐｒｏｐｈｙｌａｃｔｉｃ）または予防的（ｐｒｅｖｅｎｔａｔｉｖｅ）手段の両方を指し、予防的手段の目的は、その処置が最終的に成果をあげなくても、標的の病態を予防または遅延（抑制）すること、病態を予防すること、有益な結果を追及もしくは実現すること、個体が病態を発現する可能性を低下させることである。治療を必要とする者としては、すでにその病態に罹患している者と、その病態に罹患する傾向のある者、またはその病態を予防すべき者が挙げられる。
【００２３】
「患者の転帰」とは、その患者が、治療の結果、生存するか死亡するかを指す。本発明で提供されるような、患者のさらに正確な予後診断は、患者が生存する可能性を上昇させる。
【００２４】
「予後不良」とは、がん（例えば肺癌）治療の標準ケア、すなわち、手術、放射線治療、化学療法にかかわらず、生存し、疾患から回復するという見込みが低いことを意味する。予後不良は、メディアン生存時間よりも生存時間が短い患者のカテゴリーである。
【００２５】
「予後良好」とは、疾患治療の標準ケア、例えば、手術、放射線治療、化学療法により、生存し、疾患から回復するという見込みが高いことを意味する。予後良好は、生存時間がメディアン生存時間以上である患者のカテゴリーである。
【００２６】
「薬学的に許容可能な担体」とは、本明細書で使用する場合、本発明において有用な従来の薬学的に許容可能な担体を指す。
【００２７】
「融合タンパク質」という用語は、本明細書で使用する場合、別のタンパク質に由来する２つ以上のポリペプチドを結合させることを通じて作られるタンパク質を示す。特には、融合タンパク質は、組み換えＤＮＡ技法によって作ることができ、典型的には、生物学

的な研究または治療で使用される。融合タンパク質は、融合タンパク質のポリペプチド部分間にリンカーを挿入するか、または挿入せずに、化学的共有結合を通じて作ることもできる。

【００２８】

「結合する」または「結合された」という用語は、本明細書で使用する場合、２つ以上の構成要素を１つにするために、結合、リンク、力またはつながりによって連結または一体化することを指し、例えば、第１のポリペプチドが、第２のポリペプチドまたは物質に直接結合する場合と、１つ以上の中間化合物、特にポリペプチドが、第１のポリペプチドと第２のポリペプチドまたは物質との間に配置される実施形態のように、直接的な結合または間接的な結合のいずれもが含まれる。

【００２９】

「タンパク質」または「ポリペプチド」という用語は、本明細書で使用する場合、２つ以上のアミノ酸モノマーで構成された有機ポリマー及び／またはそのアナログを示す。「ポリペプチド」という用語には、完全長タンパク質、完全長ペプチド、それらのアナログ及び断片を含め、いずれかの長さのアミノ酸ポリマーが含まれる。３個以上のアミノ酸のポリペプチドは、オリゴペプチドともいう。本明細書で使用する場合、「アミノ酸」、「アミノ酸モノマー」または「アミノ酸残基」という用語は、２０個の天然アミノ酸のいずれかを指し、非天然の側鎖を持つ合成アミノ酸を含むとともに、Ｄ光学異性体とＬ光学異性体の両方を含む。「アミノ酸アナログ」という用語は、１つ以上の個々の原子が、異なる原子、同位体、または異なる官能基のいずれかに置き換えられているが、それ以外は、その天然のアミノ酸アナログと同一であるアミノ酸を指す。

【００３０】

「ペプチド模倣体」とは、本明細書で使用する場合、タンパク質の機能を模倣するように設計されているタンパク質様の低分子鎖である。ペプチド模倣体は、既存のペプチドを改変したものであっても、既知のペプチドを模倣するように新たに設計したものであってもよい。ペプチド模倣体は、例えば、ペプトイド、β－ペプチド及び／またはＤ－ペプチドであってよい。

【００３１】

「組み換えウイルス」とは、（例えば、その粒子に、異種の核酸コンストラクトを付加または挿入することによって）遺伝子組換えされたウイルスを指す。

【００３２】

「遺伝子」、「コード配列」、または特定のタンパク質もしくはペプチドを「コードする」配列は、適切な調節配列の制御下に置かれているときに、インビトロまたはインビボで、転写され（ＤＮＡの場合）、ポリペプチドに翻訳される（ｍＲＮＡの場合）核酸分子である。遺伝子の境界は、５’（すなわちアミノ）末端の開始コドンと、３’（すなわちカルボキシ）末端の翻訳終止コドンによって決定する。遺伝子としては、原核生物または真核生物ｍＲＮＡから得られるｃＤＮＡ、原核生物ＤＮＡまたは真核生物ＤＮＡのゲノムＤＮＡ配列、及びさらには合成ＤＮＡ配列を挙げることができるが、これらに限らない。転写終結配列は通常、遺伝子配列の３’側に位置することになる。

【００３３】

「制御エレメント」という用語は、プロモーター領域、ポリアデニル化シグナル、転写終結配列、上流調節ドメイン、複製起点、内部リボソーム侵入部位（「ＩＲＥＳ」）、エンハンサーなどを総称的に指し、これらは、連動して、レシピエント細胞において、コード配列の複製、転写及び翻訳を行わせる。適切な宿主細胞において、所定のコード配列を複製、転写、及び翻訳できる限りは、これらの制御エレメントのすべてが必ずしも存在する必要はない。

【００３４】

「プロモーター領域」という用語は、本明細書では、その通常の意味で用いられており、ＤＮＡ調節配列（その調節配列は、ＲＮＡポリメラーゼと結合して、下流（３’方向）のコード配列の転写を開始させることができる遺伝子に由来する）を含むヌクレオチド領

域を指す。

【００３５】

「機能可能に連結した」とは、エレメントの配列のうち、機能可能に連結していると記載されている構成要素が、それらの通常の機能を果たすようになっている配列を指す。したがって、コード配列に機能可能に連結している制御エレメントは、コード配列を発現させることができる。制御エレメントは、コード配列の発現を誘導するように機能する限りは、コード配列と隣接している必要はない。したがって、例えば、翻訳されないが、転写される介在配列が、プロモーター配列とコード配列との間に存在することができ、それでも、そのプロモーター配列は、コード配列に「機能可能に連結している」とみなすことができる。

【００３６】

「遺伝子移入」または「遺伝子送達」とは、外来ＤＮＡを宿主細胞に確実に挿入するための方法または系を指す。このような方法により、非組み込み型の移入ＤＮＡの一過性発現、移入レプリコン（例えばエピソーム）の染色体外での複製及び発現、または宿主細胞のゲノムＤＮＡへの移入遺伝物質の組み込みを行うことができる。遺伝子移入によって、後天性疾患と遺伝性疾患の治療に対するユニークなアプローチが得られる。哺乳動物細胞に遺伝子を移入する目的で、数多くの系が開発されている。例えば、米国特許第５，３９９，３４６号を参照されたい。遺伝子を移入するための周知なビヒクルの例としては、アデノウイルス及び組み換えアデノウイルス（ＲＡｄ）、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、単純ヘルペスウイルス１型（ＨＳＶ－１）、ならびにレンチウイルス（ＬＶ）が挙げられる。

【００３７】

「遺伝子組換え細胞」、「遺伝子操作細胞」または「組換え細胞」とは、本明細書で使用する場合、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～３０２のうちのいずれか１つもしくは複数の配列を有するポリヌクレオチドもしくはそれらの組み合わせ、またはそれらのバリアント、誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログのうちの１つまたは複数を発現する細胞を指す。一実施形態では、この細胞は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１０の配列を有するポリヌクレオチド、またはそのバリアント、誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログを発現する。

【００３８】

「ネイキッドＤＮＡ」とは、本明細書で使用する場合、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～３０２のうちのいずれか１つもしくは複数の配列を有するポリペプチドもしくはそれらの組み合わせ、またはそれらのバリアント、誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログをコードするＤＮＡであって、好適な発現ベクターで、適切な発現方向でクローニングされるＤＮＡを指す。用いてよいウイルスベクターとしては、ＳＩＮレンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、フォーミーウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター、ハイブリッドベクター及び／またはプラスミドトランスポゾン（例えばＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポゾン系）もしくはインテグラーゼベースのベクター系が挙げられるが、これらに限らない。本発明の代替的実施形態との関連で用いてよいその他のベクターは、当業者には明らかであろう。

【００３９】

本明細書で使用する場合、「ポリヌクレオチド」としては、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｃＤＮＡ（相補的ＤＮＡ）、ｍＲＮＡ（メッセンジャーＲＮＡ）、ｒＲＮＡ（リボソームＲＮＡ）、ｓｈＲＮＡ（低分子ヘアピンＲＮＡ）、ｓｎＲＮＡ（低分子核内ＲＮＡ）、ｓｎｏＲＮＡ（短鎖核内ＲＮＡ）、ｍｉＲＮＡ（マイクロＲＮＡ）、ゲノムＤＮＡ、合成ＤＮＡ、合成ＲＮＡ及び／またはｔＲＮＡが挙げられるが、これらに限らない。

【００４０】

「トランスフェクション」という用語は、本明細書では、細胞による外来ＤＮＡの取り込みを指す目的で用いられている。外因性ＤＮＡが細胞膜の内側に導入されたら、その細胞は、「トランスフェクションされた」ことになる。多くのトランスフェクション技法は

概ね、当該技術分野において知られている。例えば、Ｇｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，５２：４５６（１９７３）、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９）、Ｄａｖｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂａｓｉｃ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ（１９８６）及びＣｈｕ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅ １３：１９７（１９８１）を参照されたい。このような技法を用いて、１つ以上の外因性ＤＮＡ部分（プラスミドベクター及びその他の核酸分子など）を好適な宿主細胞に導入できる。「トランスフェクション」という用語は、遺伝物質の安定な取り込みと一過性の取り込みの両方を指す。

【００４１】

「ベクター」、「クローニングベクター」及び「発現ベクター」とは、本明細書で使用する場合、宿主をトランスフォーメーションして、導入配列の発現（例えば、転写及び翻訳）を促進するために、ポリヌクレオチド配列（例えば外来遺伝子）を宿主細胞に導入できるビヒクルを指す。ベクターには、プラスミド、ファージ、ウイルスなどが含まれる。

【００４２】

治療方法

本発明で提供するのは、ＳＬＥを治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する必要のある対象におけるＳＬＥを治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する方法である。この方法は、対象におけるＳＬＥを治療し、阻害し、その重症度を低減し、及び／またはその予防を促進するために、ＡｐｏＢ－１００の１つもしくは複数のペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログを用意することと、治療上または予防上有効な量の前記１つまたは複数のペプチドを対象に投与することとを含む。いくつかの実施形態では、ＳＬＥを有する対象は、心血管疾患と診断されているか、または心血管疾患の疑いがある。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００の１つまたは複数のペプチドは、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１～３０２に示されているかまたは表１に記載されている配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００の１つまたは複数のペプチドは、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１～３０２に示されているかまたは表１に記載されているペプチドの免疫原性断片である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドは、ＡｐｏＢ－１００に対して特異的な抗体とともに、順次または同時に投与される。例示的な実施形態では、この抗体は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３０３及び／もしくは３０４に示されている配列を含むか、これらの配列からなるか、またはこれらの配列から本質的になる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているペプチドは、既存のＳＬＥ治療とともに、順次または同時に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗体は、既存のＳＬＥ治療とともに、順次または同時に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているペプチドと抗体は、既存のＳＬＥ治療とともに、順次または同時に投与される。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００の１つまたは複数のペプチドは、１日に１～３回または１週間に１～７回、対象に投与される。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００の１つまたは複数のペプチドは、１～５日間、１～５週間、１～５カ月、または１～５年、対象に投与される。一実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドは、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２１０に示されている配列を有するペプチドＰ２１０、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログである。一実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドは、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４５に示されている配列を有するペプチドＰ４５、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドは、ＣＴＢに融合されている。一実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドは、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ

：２１０に示されている配列を有するペプチドＰ２１０、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログであり、ＣＴＢに融合されている（Ｐ２１０－ＣＴＢ）。一実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５に示されている配列を有するペプチドＰ４５、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログであり、ＣＴＢに融合されている（Ｐ４５－ＣＴＢ）。

【００４３】

また、本発明で提供するのは、心血管疾患を治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する必要のある対象における心血管疾患を治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する方法である。この方法は、対象における心血管疾患を治療し、阻害し、その重症度を低減し、及び／またはその予防を促進するために、ＡｐｏＢ－１００の１つもしくは複数のペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログを用意することと、治療上または予防上有効な量の前記１つまたは複数のペプチドを対象に投与することとを含む。いくつかの実施形態では、心血管疾患を有する対象は、ＳＬＥと診断されているかまたはＳＬＥの疑いがある。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００の１つまたは複数のペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～３０２に示されているかまたは表１に記載されている配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００の１つまたは複数のペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～３０２に示されているかまたは表１に記載されているようなペプチドの免疫原性断片である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドは、ＡｐｏＢ－１００に対して特異的な抗体とともに、順次または同時に投与される。例示的な実施形態では、この抗体は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０３及び／または３０４に示されている配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているペプチドは、ＳＬＥ治療とともに、順次または同時に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗体は、ＳＬＥ治療とともに、順次または同時に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているペプチドと抗体は、ＳＬＥ治療とともに、順次または同時に投与される。様々な実施形態において、本明細書に記載されているＡｐｏＢ－１００ペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログは、ＳＬＥを有するかまたはＳＬＥを有する疑いのある対象が心血管疾患を発症する前、発症している最中、または発症した後に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００の１つまたは複数のペプチドは、１日に１～３回または１週間に１～７回、対象に投与される。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００の１つまたは複数のペプチドは、１～５日間、１～５週間、１～５カ月、または１～５年、対象に投与される。一実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１０に示されている配列を有するペプチドＰ２１０、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている方法は、本明細書に記載されているペプチドとともに、アテローム性動脈硬化症用の既存の治療剤を同時または順次に併用投与することをさらに含む。一実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５に示されている配列を有するペプチドＰ４５、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドは、ＣＴＢに融合されている。一実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１０に示されている配列を有するペプチドＰ２１０、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログであり、ＣＴＢに融合されている（Ｐ２１０－ＣＴＢ）。一実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５に示されている配列を有するペプチドＰ４５、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログであり、ＣＴＢに融合され

ている（Ｐ４５－ＣＴＢ）。

【００４４】

また、本発明で提供するのは、ＳＬＥを有するかまたはＳＬＥを有する疑いのある対象における心血管疾患を治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する方法である。この方法は、対象におけるＳＬＥを治療し、阻害し、その重症度を低減し、及び／またはその予防を促進するために、ＡｐｏＢ－１００の１つもしくは複数のペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログを用意することと、治療上または予防上有効な量の前記１つまたは複数のペプチドを対象に投与することとを含む。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００の１つまたは複数のペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～３０２に示されているかまたは表１に記載されている配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００の１つまたは複数のペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～３０２に示されているかまたは表１に記載されているようなペプチドの免疫原性断片である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドは、ＡｐｏＢ－１００に対して特異的な抗体とともに、順次または同時に投与される。例示的な実施形態では、この抗体は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０３及び／または３０４に示されている配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているペプチドは、既存のＳＬＥ治療とともに、順次または同時に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗体は、既存のＳＬＥ治療とともに、順次または同時に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているペプチドと抗体は、既存のＳＬＥ治療とともに、順次または同時に投与される。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００の１つまたは複数のペプチドは、１日に１～３回または１週間に１～７回、対象に投与される。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００の１つまたは複数のペプチドは、１～５日間、１～５週間、１～５カ月、または１～５年、対象に投与される。一実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１０に示されている配列を有するペプチドＰ２１０、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログである。一実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５に示されている配列を有するペプチドＰ４５、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドは、ＣＴＢに融合されている。一実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１０に示されている配列を有するペプチドＰ２１０、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログであり、ＣＴＢに融合されている（Ｐ２１０－ＣＴＢ）。一実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５に示されている配列を有するペプチドＰ４５、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログであり、ＣＴＢに融合されている（Ｐ４５－ＣＴＢ）。

【００４５】

さらに、本発明で提供するのは、ＳＬＥを治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する必要のある対象におけるＳＬＥを治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する方法である。この方法は、対象におけるＳＬＥを治療し、阻害し、その重症度を低減し、及び／またはその予防を促進するために、ＡｐｏＢ－１００の１つもしくは複数のペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞を用意することと、治療上または予防上有効な量の前記１つまたは複数のペプチドを対象に投与することとを含む。いくつかの実施形態では、ＳＬＥを有する対象は、心血管疾患を有するかまたは心血管疾患を有する疑いがある。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００の１つまたは複数のペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～３０２に示されているかまたは表１に記載されている配列を有する

ペプチドである。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００の１つまたは複数のペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～３０２に示されているかまたは表１に記載されているようなペプチドの免疫原性断片である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＡｐｏＢ－１００に対して特異的な抗体とともに、順次または同時に投与される。例示的な実施形態では、この抗体は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０３及び／または３０４に示されている配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているＡｐｏＢ－１００ペプチドによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞は、既存のＳＬＥ治療とともに、順次または同時に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗体は、既存のＳＬＥ治療とともに、順次または同時に投与される。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００ペプチドによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞と、本明細書に記載されている抗体は、既存のＳＬＥ治療とともに、順次または同時に投与される。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００ペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞は、１日に１～３回または１週間に１～７回、対象に投与される。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００ペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞は、１～５日間、１～５週間、１～５カ月、または１～５年、対象に投与される。一実施形態では、ＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１０に示されている配列を有するペプチドＰ２１０、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログによって活性化されている。一実施形態では、ＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５に示されている配列を有するペプチドＰ４５、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログによって活性化されている。一実施形態では、ＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５に示されている配列を有するペプチドＰ４５、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログによって活性化されている。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている方法は、本明細書に記載されている、ＡｐｏＢ－１００ペプチドによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞とともに、既存のＳＬＥ治療剤を同時または順次に併用投与することをさらに含む。

【００４６】

また、本発明で提供するのは、心血管疾患を治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する必要のある対象における心血管疾患を治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する方法である。この方法は、対象における心血管疾患を治療し、阻害し、その重症度を低減し、及び／またはその予防を促進するために、ＡｐｏＢ－１００の１つもしくは複数のペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞を用意することと、治療上または予防上有効な量の前記１つまたは複数のペプチドを対象に投与することとを含む。いくつかの実施形態では、心血管疾患を有する対象は、ＳＬＥと診断されているかまたはＳＬＥの疑いがある。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００の１つまたは複数のペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～３０２に示されているかまたは表１に記載されている配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００の１つまたは複数のペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～３０２に示されているかまたは表１に記載されているようなペプチドの免疫原性断片である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている治療方法で用いるＡｐｏＢ－１００ペプチドによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＡｐｏＢ－１００に対して特異的な抗体とともに、順次または同時に投与される。例示的な実施形態では、この抗体は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０３及び／または３０４に示されている配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているＡｐｏＢ－１００ペプチドによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＳＬＥ治療とともに、順次または同時に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗体は、ＳＬＥ治療とともに、順次または同時に投与される。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ

－１００ペプチドによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞と、本明細書に記載されている抗体は、ＳＬＥ治療とともに、順次または同時に投与される。様々な実施形態において、ＡｐｏＢ－１００ペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＳＬＥを有するかまたはＳＬＥを有する疑いのある対象が心血管疾患を発症する前、発症している最中、または発症した後に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００ペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞は、１日に１～３回または１週間に１～７回、対象に投与される。いくつかの実施形態では、ＡｐｏＢ－１００ペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞は、１～５日間、１～５週間、１～５カ月、または１～５年、対象に投与される。一実施形態では、ＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１０に示されている配列を有するペプチドＰ２１０、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログによって活性化されている。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている方法は、本明細書に記載されているペプチドとともに、アテローム性動脈硬化症用の既存の治療剤を同時または順次に併用投与することをさらに含む。一実施形態では、ＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５に示されている配列を有するペプチドＰ４５、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログによって活性化されている。

【００４７】

本明細書に記載されているように、いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているペプチド及び／または抗体は、ＳＬＥ治療とともに、順次または同時に投与される。例示的な実施形態では、既存のＳＬＥ治療としては、全身性炎症に対する治療（抗マラリア剤－ヒドロキシクロロキン、コルチコステロイド、シクロホスファミド、ミコフェノール酸モフェチル、アザチオプリン、メトトレキセート、もしくはこれらの組み合わせなど）、免疫細胞標的療法剤（抗ＣＤ２０（リツキシマブ）、抗ＣＤ２２（エプラツズマブ）、アベチムス（ＬＪＰ－３９４）、ベリムマブ、アタシセプトなど）、共刺激経路を標的とする薬剤、抗サイトカイン療法剤、メマンチン、静注用免疫グロブリン（ＩＶＩＧ）、ＤＮＡワクチンの投与、またはこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限らない。例示的な実施形態では、アテローム性動脈硬化症用の既存の治療としては、スタチン、抗血小板剤、βブロッカー、アンジオテンシン変換酵素（ＡＣＥ）インヒビター、カルシウムチャネルブロッカー、手術（血管形成とステント留置、線維素溶解療法、経皮的冠動脈インターベンション（ＰＣＩ）、冠動脈バイパスグラフト術（ＣＡＢＧ）、頸動脈内膜切除術など）、またはこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限らない。

【００４８】

様々な実施形態において、本明細書に記載されている方法で用いる、ＡｐｏＢ－１００ペプチドのいずれか１つもしくは複数及び／もしくはそれらの組み合わせ、またはそれらのアナログ、薬学的等価物、もしくはペプチド模倣体の治療上または予防上有効な量は、約０．０１～０．０５μｇ／ｋｇ／日、０．０５～０．１μｇ／ｋｇ／日、０．１～０．５μｇ／ｋｇ／日、０．５～５μｇ／ｋｇ／日、０．５～１μｇ／ｋｇ／日、１～５μｇ／ｋｇ／日、５～１０μｇ／ｋｇ／日、１０～２０μｇ／ｋｇ／日、２０～５０μｇ／ｋｇ／日、５０～１００μｇ／ｋｇ／日、１００～１５０μｇ／ｋｇ／日、１５０～２００μｇ／ｋｇ／日、２００～２５０μｇ／ｋｇ／日、２５０～３００μｇ／ｋｇ／日、３００～３５０μｇ／ｋｇ／日、３５０～４００μｇ／ｋｇ／日、４００～５００μｇ／ｋｇ／日、５００～６００μｇ／ｋｇ／日、６００～７００μｇ／ｋｇ／日、７００～８００μｇ／ｋｇ／日、８００～９００μｇ／ｋｇ／日、９００～１０００μｇ／ｋｇ／日、０．０１～０．０５ｍｇ／ｋｇ／日、０．０５～０．１ｍｇ／ｋｇ／日、０．１～０．５ｍｇ／ｋｇ／日、０．５～１ｍｇ／ｋｇ／日、１～５ｍｇ／ｋｇ／日、５～１０ｍｇ／ｋｇ／日、１０～１５ｍｇ／ｋｇ／日、１５～２０ｍｇ／ｋｇ／日、２０～５０ｍｇ／ｋｇ／日、５０～１００ｍｇ／ｋｇ／日、１００～２００ｍｇ／ｋｇ／日、２００～３００ｍｇ／ｋｇ／日、３００～４００ｍｇ／ｋｇ／日、４００～５００ｍｇ／ｋｇ／日、５００～

６００ｍｇ／ｋｇ／日、６００～７００ｍｇ／ｋｇ／日、７００～８００ｍｇ／ｋｇ／日、８００～９００ｍｇ／ｋｇ／日、９００～１０００ｍｇ／ｋｇ／日、またはこれらを組み合わせた量のうちのいずれか１つまたは複数である。ＡｐｏＢ－１００ペプチドのいずれか１つもしくは複数及び／もしくはそれらの組み合わせ、またはそれらのアナログ、薬学的等価物、もしくはペプチド模倣体の典型的な投与量は、既知の治療用化合物を用いる場合には、メーカーの推奨する範囲内であることができ、また、インビトロでの応答または動物モデルでの応答によって当業者に示される範囲内であることができる。このような投与量は典型的には、関連する生物学的活性を喪失しなければ、およそ一桁まで、濃度または量を低減できる。実際の投与量は、医師の判断、患者の状態、及び例えば、関連する培養細胞試料もしくは組織培養組織試料（生検悪性腫瘍など）のインビトロ応答性または適切な動物モデルで観察された応答に基づく、治療法の効果によって決定できる。様々な実施形態において、ＡｐｏＢ－１００ペプチド及び／もしくはそれらの組み合わせ、またはそれらのアナログ、薬学的等価物、もしくはペプチド模倣体のうちのいずれか１つまたは複数は、有効量を対象に投与するために（この有効量は、本明細書に記載されている用量のうちのいずれか１つまたは複数である）、１日に１回（ＳＩＤ／ＱＤ）、１日に２回（ＢＩＤ）、１日に３回（ＴＩＤ）、１日に４回（ＱＩＤ）、またはこれを上回る回数で投与されてもよい。

【００４９】

様々な実施形態において、本明細書に記載されている方法で用いる、ＡｐｏＢ－１００に特異的な抗体またはその断片の治療上または予防上有効な量は、約０．０１～０．０５μｇ／ｋｇ／日、０．０５～０．１μｇ／ｋｇ／日、０．１～０．５μｇ／ｋｇ／日、０．５～５μｇ／ｋｇ／日、０．５～１μｇ／ｋｇ／日、１～５μｇ／ｋｇ／日、５～１０μｇ／ｋｇ／日、１０～２０μｇ／ｋｇ／日、２０～５０μｇ／ｋｇ／日、５０～１００μｇ／ｋｇ／日、１００～１５０μｇ／ｋｇ／日、１５０～２００μｇ／ｋｇ／日、２００～２５０μｇ／ｋｇ／日、２５０～３００μｇ／ｋｇ／日、３００～３５０μｇ／ｋｇ／日、３５０～４００μｇ／ｋｇ／日、４００～５００μｇ／ｋｇ／日、５００～６００μｇ／ｋｇ／日、６００～７００μｇ／ｋｇ／日、７００～８００μｇ／ｋｇ／日、８００～９００μｇ／ｋｇ／日、９００～１０００μｇ／ｋｇ／日、０．０１～０．０５ｍｇ／ｋｇ／日、０．０５～０．１ｍｇ／ｋｇ／日、０．１～０．５ｍｇ／ｋｇ／日、０．５～１ｍｇ／ｋｇ／日、１～５ｍｇ／ｋｇ／日、５～１０ｍｇ／ｋｇ／日、１０～１５ｍｇ／ｋｇ／日、１５～２０ｍｇ／ｋｇ／日、２０～５０ｍｇ／ｋｇ／日、５０～１００ｍｇ／ｋｇ／日、１００～２００ｍｇ／ｋｇ／日、２００～３００ｍｇ／ｋｇ／日、３００～４００ｍｇ／ｋｇ／日、４００～５００ｍｇ／ｋｇ／日、５００～６００ｍｇ／ｋｇ／日、６００～７００ｍｇ／ｋｇ／日、７００～８００ｍｇ／ｋｇ／日、８００～９００ｍｇ／ｋｇ／日、９００～１０００ｍｇ／ｋｇ／日、またはこれらを組み合わせた量のうちのいずれか１つまたは複数である。抗体の典型的な投与量は、既知の治療用化合物を用いる場合には、メーカーの推奨する範囲内であることができ、また、インビトロでの応答または動物モデルでの応答によって当業者に示される範囲内であることができる。このような投与量は典型的には、関連する生物学的活性を喪失しなければ、およそ一桁まで、濃度または量を低減できる。実際の投与量は、医師の判断、患者の状態、及び例えば、関連する培養細胞試料もしくは組織培養組織試料（生検悪性腫瘍など）のインビトロ応答性または適切な動物モデルで観察された応答に基づく、治療法の効果によって決定できる。様々な実施形態において、本発明の抗体は、有効量を対象に投与するために（この有効量は、本明細書に記載されている用量のうちのいずれか１つまたは複数である）、１日に１回（ＳＩＤ／ＱＤ）、１日に２回（ＢＩＤ）、１日に３回（ＴＩＤ）、１日に４回（ＱＩＤ）、またはこれを上回る回数で投与されてもよい。

【００５０】

様々な実施形態において、対象は、ヒト、ヒト以外の霊長類動物、サル、類人猿、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、マウス、及びラットからなる群より選択される。

【００５１】

診断方法

さらに、本発明で提供するのは、ＳＬＥを診断する必要のある対象におけるＳＬＥを診断するためのアッセイである。このアッセイは、対象から試料を採取することと、その試料をアッセイして、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルを決定することと、その自己抗体のレベルが参照値と比べて低い場合に対象がＳＬＥを有する可能性が高いと判断するか、または、その自己抗体のレベルが参照値と比べて高い場合に対象がＳＬＥを有する可能性が低いと判断することとを含む。いくつかの実施形態では、この方法は、ＳＬＥに対する治療法を選択または処方することをさらに含んでよい。

【００５２】

また、本発明で提供するのは、ＳＬＥを有するかまたはＳＬＥを有する疑いのある対象における心血管疾患の可能性を判断するためのアッセイである。このアッセイは、対象から試料を採取することと、その試料をアッセイして、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルを決定することと、自己抗体のレベルが参照値と比べて低い場合に対象が心血管疾患を有する可能性が高いと判断するか、またはその自己抗体のレベルが参照値と比べて高い場合に対象が心血管疾患を有する可能性が低いと判断することとを含む。いくつかの実施形態では、この方法は、心血管疾患に対する治療法を選択または処方することをさらに含んでよい。

【００５３】

また、本発明で提供するのは、ＳＬＥの治療の有効性を判断する必要のある対象におけるＳＬＥの治療の有効性を判断するためのアッセイである。このアッセイは、ＳＬＥの治療を受けている対象から試料を採取することと、その試料をアッセイして、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルを決定することと、その自己抗体のレベルが参照値と比べて高い場合にその治療が有効であると判断するか、またはその自己抗体のレベルが参照値と比べて低いかもしくは参照値と変わらない場合にその治療が有効ではないと判断することとを含む。

【００５４】

また、本発明で提供するのは、ＳＬＥを有する対象における心血管疾患の治療の有効性を判断するためのアッセイである。このアッセイは、心血管疾患の治療を受けている対象から試料を採取することと、その試料をアッセイして、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルを決定することと、その自己抗体のレベルが参照値と比べて高い場合にその治療が有効であると判断するか、またはその自己抗体のレベルが参照値と比べて低いかもしくは参照値と変わらない場合にその治療が有効ではないと判断することとを含む。

【００５５】

さらに、本発明で提供するのは、ＳＬＥの診断を必要とする対象におけるＳＬＥを診断するためのアッセイである。このアッセイは、対象から試料を採取することと、その試料をアッセイして、可溶形態のアポトーシスシグナル伝達レセプターであるＦａｓ、ＴＮＦ－Ｒ１、及び／またはＴＲＡＩＬ－Ｒ２のレベルを決定することと、前記アポトーシスシグナル伝達レセプターのレベルが参照値と比べて高い場合に対象がＳＬＥを有する可能性が高いと判断するか、または前記アポトーシスシグナル伝達レセプターのレベルが参照値と比べて低い場合に対象がＳＬＥを有する可能性が低いと判断することとを含む。

【００５６】

さらに、本発明で提供するのは、ＳＬＥの治療の有効性を判断する必要のある対象におけるＳＬＥの治療の有効性を判断するためのアッセイである。このアッセイは、対象から試料を採取することと、その試料をアッセイして、可溶形態のアポトーシスシグナル伝達レセプターであるＦａｓ、ＴＮＦ－Ｒ１、及び／またはＴＲＡＩＬ－Ｒ２のレベルを決定することと、前記アポトーシスシグナル伝達レセプターのレベルが参照値と比べて低い場合にその治療が有効であると判断するか、または前記アポトーシスシグナル伝達レセプターのレベルが参照値と比べて高い場合にその治療の有効性が低いかもしくはその治療が有効でないと判断することとを含む。

【００５７】

また、本発明で提供するのは、ＳＬＥを有するかまたはＳＬＥを有する疑いのある対象における心血管疾患の可能性を判断するためのアッセイである。このアッセイは、対象から試料を採取することと、その試料をアッセイして、可溶形態のアポトーシスシグナル伝達レセプターであるＦａｓ、ＴＮＦ－Ｒ１、及び／またはＴＲＡＩＬ－Ｒ２のレベルを決定することと、前記アポトーシスシグナル伝達レセプターのレベルが参照値と比べて高い場合に対象が心血管疾患を有する可能性が高いと判断するか、または前記アポトーシスシグナル伝達レセプターのレベルが参照値と比べて低い場合に対象が心血管疾患を有する可能性が低いと判断することとを含む。

【００５８】

様々な実施形態において、アッセイは、イムノアッセイを用いることを含む。イムノアッセイの例示的な実施形態としては、ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、ウエスタンブロッティング、サザンブロッティング、またはこれらの組み合わせのうちのいずれか１つまたは複数が挙げられるが、これらに限らない。

【００５９】

本明細書に記載されているアッセイのいくつかの実施形態では、試料は、血液、血漿、尿、組織、またはこれらの組み合わせのうちのいずれか１つまたは複数である。本明細書に記載されているアッセイのいくつかの実施形態では、試料は、ＳＬＥの治療前、治療の最中、または治療後に採取される。

【００６０】

本明細書に記載されているアッセイの一実施形態では、対象はヒトである。

【００６１】

本明細書に記載されているアッセイの一実施形態では、心血管疾患はアテローム性動脈硬化症である。例示的な実施形態では、アテローム性動脈硬化症は加速性アテローム性動脈硬化症である。いくつかの実施形態では、試料は、ＳＬＥを有するかまたはＳＬＥを有する疑いのある対象において、心血管疾患の治療前、治療の最中、及び／または治療後に採取される。

【００６２】

市販されているものを含め、いずれかの好適なイムノアッセイ方法を用いて、本発明に従って測定するＡｐｏＢ－１００特異的自己抗体のレベルを決定してもよい。既知のイムノアッセイ技法の広範な考察は、本明細書では不要である。これらの技法は、当業者に知られているからである。典型的な好適なイムノアッセイ技法としては、サンドイッチ酵素結合イムノアッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、競合結合アッセイ、ホモジニアスアッセイ、ヘテロジニアスアッセイなどが挙げられる。様々な既知のイムノアッセイ方法は、例えば、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，７０，ｐｐ．３０－７０　ａｎｄ　１６６－１９８（１９８０）で論評されている。

【００６３】

本発明のアッセイでは、「サンドイッチ型」アッセイフォーマットを使用できる。このようなサンドイッチ型アッセイのいくつかの例は、Ｇｒｕｂｂらの米国特許第４，１６８，１４６号と、Ｔｏｍらの米国特許第４，３６６，２４１号に記載されている。代替的な技法は、「競合型」アッセイである。競合アッセイでは、概して、標識プローブが、分析対象物と同一であるか、または分析対象物のアナログである分子とコンジュゲートされている。したがって、この標識プローブが、利用可能な受容物質に対して、目的の分析対象物と競合する。競合アッセイは典型的には、ハプテンのような分析対象物の検出に使用され、各ハプテンは、一価であり、１つの抗体分子のみと結合できる。競合イムノアッセイ装置の例は、Ｄｅｕｔｓｃｈらの米国特許第４，２３５，６０１号、Ｌｉｏｔｔａの米国特許第４，４４２，２０４号及びＢｕｅｃｈｌｅｒらの米国特許第５，２０８，５３５号に記載されている。

【００６４】

本発明の抗体は、標識することができる。いくつかの実施形態では、検出抗体は、酵素、蛍光化合物または金属による標識、化学発光化合物による標識に共有結合させることに

よって標識する。例えば、検出抗体は、カタラーゼで標識でき、変換では、ヨウ化カリウム、過酸化水素及びナトリウムチオサルフェートを含む比色基質組成物を使用する。酵素は、アルコールデヒドロゲナーゼであることができ、変換では、アルコール、ｐＨ指示薬及びｐＨ緩衝液を含む比色基質組成物を使用し、このｐＨ指示薬は、ニュートラルレッドであり、ｐＨ緩衝液は、グリシン－水酸化ナトリウムである。酵素は、ヒポキサンチンオキシダーゼであることもでき、変換では、キサンチン、テトラゾリウム塩、及び４，５－ジヒドロキシ－１，３－ベンゼンジスルホン酸を含む比色基質組成物を使用する。一実施形態では、検出抗体は、酵素、蛍光化合物もしくは金属による標識、または化学発光化合物による標識に共有結合させることによって標識する。

【００６５】

イムノアッセイでは、直接標識と間接標識を使用できる。直接標識は、天然の状態で、裸眼、または光学フィルター及び／もしくは蛍光を促進する刺激、例えば、紫外光の付加の補助により視認可能であるものとして定義できる。使用できる着色標識の例としては、金属ゾル粒子、金ゾル粒子、色素ゾル粒子、染色ラテックス粒子、またはリポソームに封入した色素が挙げられる。その他の直接標識としては、放射性核種と、蛍光または発光部分が挙げられる。本発明に従って、酵素のような間接標識も用いることができる。例えば、アルカリホスファターゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ、リゾチーム、グルコース－６－ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ラクテートデヒドロゲナーゼ、及びウレアーゼのように、様々な酵素が、標識用として知られている。イムノアッセイにおける酵素の詳細な考察については、Ｅｎｇｖａｌｌ，Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ ＥＬＩＳＡ ａｎｄ ＥＭＩＴ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，７０，４１９－４３９（１９８０）を参照されたい。

【００６６】

抗体は、表面に結合できる。所望の抗原を検出するために、抗体を結合できる有用な表面の例としては、ニトロセルロース、ＰＶＤＦ、ポリスチレン、及びナイロンが挙げられる。表面または支持体は、多孔質支持体であってもよい（例えば、米国特許第７，９３９，３４２号を参照されたい）。アッセイは、ＰＢ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．の米国特許第４，９０６，４３９号、同第５，０５１，２３７号及び同第５，１４７，６０９号に記載されているものを含む様々なアッセイ装置フォーマットで行うことができる。

【００６７】

参照値

本明細書に記載されているアッセイの様々な実施形態において、参照値は、ＡｐｏＢ－１００特異的自己抗体のレベルに基づいている。一実施形態では、参照値は、ＳＬＥを有しない対象の集団におけるＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルの平均値または中央値である。別の実施形態では、参照値は、異なる時点（例えば、治療開始前）に対象から採取した試料におけるＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルの平均値または中央値である。さらなる実施形態では、参照値は、ＳＬＥを有しかつＳＬＥに対する治療を受けたことがあるかまたは受けている対象の集団における、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルの平均値または中央値である。追加の実施形態では、参照値は、ＳＬＥを有しかつＳＬＥに対する治療を受けたことがあるかまたは受けており、かつ心血管疾患に対する治療を受けたことがなく受けてもいない対象の集団における、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルの平均値または中央値である。追加の実施形態では、参照値は、ＳＬＥを有しかつＳＬＥに対する治療を受けたことがあるかまたは受けており、心血管疾患に対する治療を受けたことがあるかまたは受けている対象の集団における、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルの平均値または中央値である。

【００６８】

様々な実施形態において、対象のＡｐｏＢ－１００特異的自己抗体のレベルは、参照値と比べて少なくともまたは約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％低い。様々な実施形態において、対象のＡｐｏＢ－１

００特異的自己抗体のレベルは、参照値と比べて少なくともまたは約１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、１５倍、２０倍、２５倍、３０倍、３５倍、４０倍、４５倍、５０倍、５５倍、６０倍、６５倍、７０倍、７５倍、８０倍、８５倍、９０倍、９５倍、または１００倍低い。

【００６９】

ＡｐｏＢ－１００のペプチド

ＡｐｏＢ－１００の特異的な免疫原性エピトープを特徴付け、３０２種のペプチドを含むペプチドライブラリー（各ペプチドの長さは約２０個のアミノ酸残基であり、ヒトＡｐｏＢ－１００の全４５６３個のアミノ酸の配列を網羅している）を作製した。ペプチドは、５個のアミノ酸が重複するように作製して、切断ポイントにおいて、すべての配列を網羅した。ペプチドは、下記の表１に示されているように、ＡｐｏＢ－１００のＮ末端から開始して、１～３０２番目まで番号付けをした。

【００７０】

（表１）

ペプチド	配列	アポリポタンパク質Ｂ	SEQ ID NO
P1:	EEEML ENVSL VCPKD ATRFK	aa 1-20	SEQ ID NO: 1
P2:	ATRFK HLRKY TYNYE AESSS	aa 16-35	SEQ ID NO: 2
P3:	AESSS GVPGT ADSRS ATRIN	aa 31-50	SEQ ID NO: 3
P4:	ATRIN CKVEL EVPQL CSFIL	aa 46-65	SEQ ID NO: 4
P5:	CSFIL KTSQC TLKEV YGFNP	aa 61-80	SEQ ID NO: 5
P6:	YGFNP EGKAL LKKTK NSEEF	aa 76-95	SEQ ID NO: 6
P7:	NSEEF AAAMS RYELK LAIPE	aa 91-110	SEQ ID NO: 7
P8:	LAIPE GKQVF LYPEK DEPTY	aa 106-125	SEQ ID NO: 8
P9:	DEPTY ILNIK RGIIS ALLVP	aa 121-140	SEQ ID NO: 9
P10:	ALLVP PETEE AKQVL FLDTV	aa 136-155	SEQ ID NO: 10

P11:	FLDTV YGNCS THFTV KTRKG	aa 151-170	SEQ ID NO: 11
P12:	KTRKG NVATE ISTER DLGQC	aa 166-185	SEQ ID NO: 12
P13:	DLGQC DRFKP IRTGI SPLAL	aa 181-200	SEQ ID NO: 13
P14:	SPLAL IKGMT RPLST LISSS	aa 196-215	SEQ ID NO: 14
P15:	LISSS QSCQY TLDAK RKHVA	aa 211-230	SEQ ID NO: 15
P16:	RKHVA EAICK EQHLF LPFSY	aa 226-245	SEQ ID NO: 16
P17:	LPFSY NNKYG MVAQV TQTLK	aa 241-260	SEQ ID NO: 17
P18:	TQTLK LEDTP KINSR FFGEG	aa 256-275	SEQ ID NO: 18
P19:	FFGEG TKKMG LAFES TKSTS	aa 271-290	SEQ ID NO: 19
P20:	TKSTS PPKQA EAVLK TLQEL	aa 286-305	SEQ ID NO: 20
P21:	TLQEL KKLTI SEQNI QRANL	aa 301-320	SEQ ID NO: 21
P22:	QRANL FNKLV TELRG LSDEA	aa 316-335	SEQ ID NO: 22
P23:	LSDEA VTSLL PQLIE VSSPI	aa 331-350	SEQ ID NO: 23
P24:	VSSPI TLQAL VQCGQ PQCST	aa 346-365	SEQ ID NO: 24
P25:	PQCST HILQW LKRVH ANPLL	aa 361-380	SEQ ID NO: 25
P26:	ANPLL IDVVT YLVAL IPEPS	aa 376-395	SEQ ID NO: 26
P27:	IPEPS AQQLR EIFNM ARDQR	aa 391-410	SEQ ID NO: 27
P28:	ARDQR SRATL YALS AVNNY	aa 406-425	SEQ ID NO: 28
P29:	AVNNY HKTNP TGTQE LLDIA	aa 421-440	SEQ ID NO: 29
P30:	LLDIA NYLME QIQDD CTGDE	aa 436-455	SEQ ID NO: 30
P31:	CTGDE DYTYL ILRVI GNMGQ	aa 451-470	SEQ ID NO: 31
P32:	GNMGQ TMEQL TPELK SSILK	aa 466-485	SEQ ID NO: 32
P33:	SSILK CVQST KPSLM IQKAA	aa 481-500	SEQ ID NO: 33
P34:	IQKAA IQALR KMEPK DKDQE	aa 496-515	SEQ ID NO: 34
P35:	DKDQE VLLQT FLDDA SPGDK	aa 511-530	SEQ ID NO: 35
P36:	SPGDK RLAAY LMLMRSPSQA	aa 526-545	SEQ ID NO: 36
P37:	SPSQA DINKIVQILP WEQNE	aa 541-560	SEQ ID NO: 37
P38:	WEQNE QVKNF VASHI ANILN	aa 556-575	SEQ ID NO: 38
P39:	ANILN SEELD IQDLK KLVKE	aa 571-590	SEQ ID NO: 39
P40:	KLVKE ALKES QLPTV MDFRK	aa 586-605	SEQ ID NO: 40
P41:	MDFRK FSRNY QLYKS VSLPS	aa 601-620	SEQ ID NO: 41
P42:	VSLPS LDPAS AKIEG NLIFD	aa 616-635	SEQ ID NO: 42
P43:	NLIFD PNNYL PKESM LKTTL	aa 631-650	SEQ ID NO: 43
P44:	LKTTL TAFGF ASADL IEIGL	aa 646-665	SEQ ID NO: 44
P45:	IEIGL EGKGF EPTLE ALFGK	aa 661-680	SEQ ID NO: 45
P46:	ALFGK QGFFP DSVNK ALYWV	aa 676-695	SEQ ID NO: 46
P47:	ALYWV NGQVP DGVSK VLVDH	aa 691-710	SEQ ID NO: 47
P48:	VLVDH FGYTK DDKHE QDMVN	aa 706-725	SEQ ID NO: 48
P49:	QDMVN GIMLS VEKLI KDLKS	aa 721-740	SEQ ID NO: 49
P50:	KDLKS KEVPE ARAYL RILGE	aa 736-755	SEQ ID NO: 50
P51:	RILGE ELGFA SLHDL QLLGK	aa 751-770	SEQ ID NO: 51
P52:	QLLGK LLLMG ARTLQ GIPQM	aa 766-785	SEQ ID NO: 52
P53:	GIPQM IGEVI RKGSK NDFFL	aa 781-800	SEQ ID NO: 53
P54:	NDFFL HYIFM ENAFE LPTGA	aa 796-815	SEQ ID NO: 54
P55:	LPTGA GLQLQ ISSSG VIAPG	aa 811-830	SEQ ID NO: 55
P56:	VIAPG AKAGV KLEVA NMQAE	aa 826-845	SEQ ID NO: 56
P57:	NMQAE LVAKP SVSVE FVTNM	aa 841-860	SEQ ID NO: 57
P58:	FVTNM GIIIP DFARS GVQMN	aa 856-875	SEQ ID NO: 58
P59:	GVQMN TNFFH ESGLE AHVAL	aa 871-890	SEQ ID NO: 59
P60:	AHVAL KAGKL KFIIP SPKRP	aa 886-905	SEQ ID NO: 60
P61:	SPKRP VKLLS GGNTL HLVST	aa 901-920	SEQ ID NO: 61
P62:	HLVST TKTEV IPPLI ENRQS	aa 916-935	SEQ ID NO: 62

P63:	ENRQS WSVCKQVFPG LNYCT	aa 931-950	SEQ ID NO: 63
P64:	LNYCT SGAYS NASST DSASY	aa 946-965	SEQ ID NO: 64
P65:	DSASY YPLTG DTRLE LELRP	aa 961-980	SEQ ID NO: 65
P66:	LELRP TGEIE QYSVS ATYEL	aa 976-995	SEQ ID NO: 66
P67:	ATYEL QREDR ALVDT LKFVT	aa 991-1010	SEQ ID NO: 67
P68:	LKFVT QAEGA KQTEA TMTFK	aa 1006-1025	SEQ ID NO: 68
P69:	TMTFK YNRQS MTLSS EVQIP	aa 1021-1040	SEQ ID NO: 69
P70:	EVQIP DFDVD LGTIL RVNDE	aa 1036-1055	SEQ ID NO: 70
P71:	RVNDE STEGK TSYRL TLDIQ	aa 1051-1070	SEQ ID NO: 71
P72:	TLDIQ NKKIT EVALM GHLSC	aa 1066-1085	SEQ ID NO: 72
P73:	GHLSC DTKEE RKIKG VISIP	aa 1081-1100	SEQ ID NO: 73
P74:	VISIP RLQAE ARSEI LAHWS	aa 1096-1115	SEQ ID NO: 74
P75:	LAHWS PAKLL LQMDS SATAY	aa 1111-1130	SEQ ID NO: 75
P76:	SATAY GSTVS KRVAW HYDEE	aa 1126-1145	SEQ ID NO: 76
P77:	HYDEE KIEFE WNTGT NVDTK	aa 1141-1160	SEQ ID NO: 77
P78:	NVDTK KMTSN FPVDL SDYPK	aa 1156-1175	SEQ ID NO: 78
P79:	SDYPK SLHMY ANRLL DHRVP	aa 1171-1190	SEQ ID NO: 79
P80:	DHRVP ETDMT FRHVG SKLIV	aa 1186-1205	SEQ ID NO: 80
P81:	SKLIV AMSSW LQKAS GSLPY	aa 1201-1220	SEQ ID NO: 81
P82:	GSLPY TQTLQ DHLNS LKEFN	aa 1216-1235	SEQ ID NO: 82
P83:	LKEFN LQNMG LPDFH IPENL	aa 1231-1250	SEQ ID NO: 83
P84:	IPENL FLKSD GRVKY TLNKN	aa 1246-1260	SEQ ID NO: 84
P85:	TLNKN SLKIE IPLPF GGKSS	aa 1261-1280	SEQ ID NO: 85
P86:	GGKSS RDLKM LETVR TPALH	aa 1276-1295	SEQ ID NO: 86
P87:	TPALH FKSVG FHLPS REFQV	aa 1291-1310	SEQ ID NO: 87
P88:	REFQV PTFTI PKLYQ LQVPL	aa 1306-1325	SEQ ID NO: 88
P89:	LQVPL LGVLD LSTNV YSNLY	aa 1321-1340	SEQ ID NO: 89
P90:	YSNLY NWSAS YSGGN TSTDH	aa 1336-1355	SEQ ID NO: 90
P91:	TSTDH FSLRA RYHMK ADSVV	aa 1351-1370	SEQ ID NO: 91
P92:	ADSVV DLLSY NVQGS GETTY	aa 1366-1385	SEQ ID NO: 92
P93:	GETTY DHKNT FTLSC DGSLR	aa 1381-1400	SEQ ID NO: 93
P94:	DGSLR HKFLD SNIKF SHVEK	aa 1396-1415	SEQ ID NO: 94
P95:	SHVEK LGNNP VSKGL LIFDA	aa 1411-1430	SEQ ID NO: 95
P96:	LIFDA SSSWG PQMSA SVHLD	aa 1426-1445	SEQ ID NO: 96
P97:	SVHLD SKKKQ HLFVK EVKID	aa 1441-1460	SEQ ID NO: 97
P98:	EVKID GQFRV SSFYA KGTYG	aa 1456-1475	SEQ ID NO: 98
P99:	KGTYG LSCQR DPNTG RLNGE	aa 1471-1490	SEQ ID NO: 99
P100:	RLNGE SNLRF NSSYL QGTNQ	aa 1486-1505	SEQ ID NO: 100
P101:	QGTNQ ITGRY EDGTL SLTST	aa 1501-1520	SEQ ID NO: 101
P102:	SLTST SDLQS GIIKN TASLK	aa 1516-1535	SEQ ID NO: 102
P103:	TASLK YENYE LTLKS DTNGK	aa 1531-1550	SEQ ID NO: 103
P104:	DTNGK YKNFA TSNKM DMTFS	aa 1546-1565	SEQ ID NO: 104
P105:	DMTFS KQNAL LRSEY QADYE	aa 1561-1580	SEQ ID NO: 105
P106:	QADYE SLRFF SLLSG SLNSH	aa 1576-1595	SEQ ID NO: 106
P107:	SLNSH GLELN ADILG TDKIN	aa 1591-1610	SEQ ID NO: 107
P108:	TDKIN SGAHK ATLRI GQDGI	aa 1606-1625	SEQ ID NO: 108
P109:	GQDGI STSAT TNLKCSLLVL	aa 1621-1640	SEQ ID NO: 109
P110:	SLLVL ENELN AELGL SGASM	aa 1636-1655	SEQ ID NO: 110
P111:	SGASM KLTTN GRFRE HNAKF	aa 1651-1670	SEQ ID NO: 111
P112:	HNAKF SLDGK AALTE LSLGS	aa 1666-1685	SEQ ID NO: 112
P113:	LSLGS AYQAM ILGVD SKNIF	aa 1681-1700	SEQ ID NO: 113
P114:	SKNIF NFKVS QEGLK LSNDM	aa 1696-1715	SEQ ID NO: 114

P115:	LSNDM MGSYA EMKFD HTNSL	aa 1711-1730	SEQ ID NO: 115
P116:	HTNSL NIAGL SLDFS SKLDN	aa 1726-1745	SEQ ID NO: 116
P117:	SKLDN IYSSD KFYKQ TVNLQ	aa 1741-1760	SEQ ID NO: 117
P118:	TVNLQ LQPYS LVTTL NSDLK	aa 1756-1775	SEQ ID NO: 118
P119:	NSDLK YNALD LTNNG KLRLE	aa 1771-1790	SEQ ID NO: 119
P120:	KLRLE PLKLH VAGNL KGAYQ	aa 1786-1805	SEQ ID NO: 120
P121:	KGAYQ NNEIK HIYAI SSAAL	aa 1801-1820	SEQ ID NO: 121
P122:	SSAAL SASYK ADTVA KVQGV	aa 1816-1835	SEQ ID NO: 122
P123:	KVQGV EFSHR LNTDI AGLAS	aa 1831-1850	SEQ ID NO: 123
P124:	AGLAS AIDMS TNYNS DSLHF	aa 1846-1865	SEQ ID NO: 124
P125:	DSLHF SNVFR SVMAP FTMTI	aa 1861-1880	SEQ ID NO: 125
P126:	FTMTI DAHTN GNGKL ALWGE	aa 1876-1895	SEQ ID NO: 126
P127:	ALWGE HTGQL YSKFL LKAEP	aa 1891-1910	SEQ ID NO: 127
P128:	LKAEP LAFTF SHDYK GSTSH	aa 1906-1925	SEQ ID NO: 128
P129:	GSTSH HLVSR KSISA ALEHK	aa 1921-1940	SEQ ID NO: 129
P130:	ALEHK VSALL TPAEQ TGTWK	aa 1936-1955	SEQ ID NO: 130
P131:	TGTWK LKTQF NNNEY SQDLD	aa 1951-1970	SEQ ID NO: 131
P132:	SQDLD AYNTK DKIGV ELTGR	aa 1966-1985	SEQ ID NO: 132
P133:	ELTGR TLADL TLLDS PIKVP	aa 1981-2000	SEQ ID NO: 133
P134:	PIKVP LLLSE PINII DALEM	aa 1996-2015	SEQ ID NO: 134
P135:	DALEM RDAVE KPQEF TIVAF	aa 2011-2030	SEQ ID NO: 135
P136:	TIVAF VKYDK NQDVH SINLP	aa 2026-2045	SEQ ID NO: 136
P137:	SINLP FFETL QEYFE RNRQT	aa 2041-2060	SEQ ID NO: 137
P138:	RNRQT IIVVV ENVQR NLKHI	aa 2056-2075	SEQ ID NO: 138
P139:	NLKHI NIDQF VRKYR AALGK	aa 2071-2090	SEQ ID NO: 139
P140:	AALGK LPQQA NDYLN SFNWE	aa 2086-2105	SEQ ID NO: 140
P141:	SFNWE RQVSH AKEKL TALTK	aa 2101-2120	SEQ ID NO: 141
P142:	TALTK KYRIT ENDIQ IALDD	aa 2116-2135	SEQ ID NO: 142
P143:	IALDD AKINF NEKLS QLQTY	aa 2131-2150	SEQ ID NO: 143
P144:	QLQTY MIQFD QYIKD SYDLH	aa 2146-2165	SEQ ID NO: 144
P145:	SYDLH DLKIA IANII DEIIE	aa 2161-2180	SEQ ID NO: 145
P146:	DEIIE KLKSL DEHYH IRVNL	aa 2176-2195	SEQ ID NO: 146
P147:	IRVNL VKTIH DLHLF IENID	aa 2191-2210	SEQ ID NO: 147
P148:	IENID FNKSG SSTAS WIQNV	aa 2206-2225	SEQ ID NO: 148
P149:	WIQNV DTKYQ IRIQI QEKLQ	aa 2221-2240	SEQ ID NO: 149
P150:	QEKLQ QLKRH IQNID IQHLA	aa 2236-2255	SEQ ID NO: 150
P151:	IQHLA GKLKQ HIEAI DVRVL	aa 2251-2270	SEQ ID NO: 151
P152:	DVRVL LDQLG TTISF ERIND	aa 2266-2285	SEQ ID NO: 152
P153:	ERIND VLEHV KHFVI NLIGD	aa 2281-2300	SEQ ID NO: 153
P154:	NLIGD FEVAE KINAF RAKVH	aa 2296-2315	SEQ ID NO: 154
P155:	RAKVH ELIER YEVDQ QIQVL	aa 2311-2330	SEQ ID NO: 155
P156:	QIQVL MDKLV ELTHQ YKLKE	aa 2326-2345	SEQ ID NO: 156
P157:	YKLKE TIQKL SNVLQ QVKIK	aa 2341-2360	SEQ ID NO: 157
P158:	QVKIK DYFEK LVGFI DDAVK	aa 2356-2375	SEQ ID NO: 158
P159:	DDAVK KLNEL SFKTF IEDVN	aa 2371-2390	SEQ ID NO: 159
P160:	IEDVN KFLDM LIKKL KSFDY	aa 2386-2405	SEQ ID NO: 160
P161:	KSFDY HQFVD ETNDK IREVT	aa 2401-2420	SEQ ID NO: 161
P162:	IREVT QRLNG EIQAL ELPQK	aa 2416-2435	SEQ ID NO: 162
P163:	ELPQK AEALK LFLEE TKATV	aa 2431-2450	SEQ ID NO: 163
P164:	TKATV AVYLE SLQDT KITLI	aa 2446-2465	SEQ ID NO: 164
P165:	KITLI INWLQ EALSS ASLAH	aa 2461-2480	SEQ ID NO: 165
P166:	ASLAH MKAKF RETLE DTRDR	aa 2476-2495	SEQ ID NO: 166

P167:	DTRDR MYQMD IQQEL QRYLS	aa 2491-2510	SEQ ID NO: 167
P168:	QRYLS LVGQV YSTLV TYISD	aa 2506-2515	SEQ ID NO: 168
P169:	TYISD WWTLA AKNLT DFAEQ	aa 2521-2540	SEQ ID NO: 169
P170:	DFAEQ YSIQD WAKRM KALVE	aa 2536-2555	SEQ ID NO: 170
P171:	KALVE QGFTV PEIKT ILGTM	aa 2551-2570	SEQ ID NO: 171
P172:	ILGTM PAFEV SLQAL QKATF	aa 2566-2585	SEQ ID NO: 172
P173:	QKATF QTPDF IVPLT DLRIP	aa 2581-2600	SEQ ID NO: 173
P174:	DLRIP SVQIN FKDLK NIKIP	aa 2596-2615	SEQ ID NO: 174
P175:	NIKIP SRFST PEFTI LNTFH	aa 2611-2630	SEQ ID NO: 175
P176:	LNTFH IPSFT IDFVE MKVKI	aa 2626-2645	SEQ ID NO: 176
P177:	MKVKI IRTID QMQNS ELQWP	aa 2641-2660	SEQ ID NO: 177
P178:	ELQWP VPDIY LRDLK VEDIP	aa 2656-2675	SEQ ID NO: 178
P179:	VEDIP LARIT LPDFR LPEIA	aa 2671-2690	SEQ ID NO: 179
P180:	LPEIA IPEFI IPTLN LNDFQ	aa 2686-2705	SEQ ID NO: 180
P181:	LNDFQ VPDLH IPEFQ LPHIS	aa 2701-2720	SEQ ID NO: 181
P182:	LPHIS HTIEV PTFGK LYSIL	aa 2716-2735	SEQ ID NO: 182
P183:	LYSIL KIQSP LFTLD ANADI	aa 2731-2750	SEQ ID NO: 183
P184:	ANADI GNGTT SANEA GIAAS	aa 2746-2765	SEQ ID NO: 184
P185:	GIAAS ITAKG ESKLE VLNFD	aa 2761-2780	SEQ ID NO: 185
P186:	VLNFD FQANA QLSNP KINPL	aa 2776-2795	SEQ ID NO: 186
P187:	KINPL ALKES VKFSS KYLRT	aa 2791-2810	SEQ ID NO: 187
P188:	KYLRT EHGSE MLFFG NAIEG	aa 2806-2825	SEQ ID NO: 188
P189:	NAIEG KSNTV ASLHT EKNTL	aa 2821-2840	SEQ ID NO: 189
P190:	EKNTL ELSNG VIVKI NNQLT	aa 2836-2855	SEQ ID NO: 190
P191:	NNQLT LDSNT KYFHK LNIPK	aa 2851-2870	SEQ ID NO: 191
P192:	LNIPK LDFSS QADLR NEIKT	aa 2866-2885	SEQ ID NO: 192
P193:	NEIKT LLKAG HIAWT SSGKG	aa 2881-2900	SEQ ID NO: 193
P194:	SSGKG SWKWA CPRFS DEGTH	aa 2896-2915	SEQ ID NO: 194
P195:	DEGTH ESQIS FTIEG PLTSF	aa 2911-2930	SEQ ID NO: 195
P196:	PLTSF GLSNK INSKH LRVNQ	aa 2926-2945	SEQ ID NO: 196
P197:	LRVNQ NLVYE SGSLN FSKLE	aa 2941-2960	SEQ ID NO: 197
P198:	FSKLE IQSQV DSQHV GHSVL	aa 2956-2975	SEQ ID NO: 198
P199:	GHSVL TAKGM ALFGE GKAEF	aa 2971-2990	SEQ ID NO: 199
P200:	GKAEF TGRHD AHLNG KVIGT	aa 2986-3005	SEQ ID NO: 200
P201:	KVIGT LKNSL FFSAQ PFEIT	aa 3001-3020	SEQ ID NO: 201
P202:	PFEIT ASTNN EGNLK VRFPL	aa 3016-3035	SEQ ID NO: 202
P203:	VRFPL RLTGK IDFLN NYALF	aa 3031-3050	SEQ ID NO: 203
P204:	NYALF LSPSA QQASW QVSAR	aa 3046-3065	SEQ ID NO: 204
P205:	QVSAR FNQYK YNQNF SAGNN	aa 3061-3080	SEQ ID NO: 205
P206:	SAGNN ENIME AHVGI NGEAN	aa 3076-3095	SEQ ID NO: 206
P207:	NGEAN LDFLN IPLTI PEMRL	aa 3091-3110	SEQ ID NO: 207
P208:	PEMRL PYTII TTPPL KDFSL	aa 3106-3125	SEQ ID NO: 208
P209:	KDFSL WEKTG LKEFL KTTKQ	aa 3121-3140	SEQ ID NO: 209
P210:	KTTKQ SFDLS VKAQY KKNKH	aa 3136-3155	SEQ ID NO: 210
P211:	KKNKH RHSIT NPLAV LCEFI	aa 3151-3170	SEQ ID NO: 211
P212:	LCEFI SQSIK SFDRH FEKNR	aa 3166-3185	SEQ ID NO: 212
P213:	FEKNR NNALD FVTKS YNETK	aa 3181-3200	SEQ ID NO: 213
P214:	YNETK IKFDK YKAEK SHDEL	aa 3196-3215	SEQ ID NO: 214
P215:	SHDEL PRTFQ IPGYT VPVVN	aa 3211-3230	SEQ ID NO: 215
P216:	VPVVN VEVSP FTIEM SAFGY	aa 3226-3245	SEQ ID NO: 216
P217:	SAFGY VFPKA VSMPS FSILG	aa 3241-3260	SEQ ID NO: 217
P218:	FSILG SDVRV PSYTL ILPSL	aa 3256-3275	SEQ ID NO: 218

P219:	ILPSL ELPVL HVPRN LKLSL	aa 3271-3290	SEQ ID NO: 219
P220:	LKLSL PHFKE LCTIS HIFIP	aa 3286-3305	SEQ ID NO: 220
P221:	HIFIP AMGNI TYDFS FKSSV	aa 3301-3320	SEQ ID NO: 221
P222:	FKSSV ITLNT NAELF NQSDI	aa 3316-3335	SEQ ID NO: 222
P223:	NQSDI VAHLL SSSSS VIDAL	aa 3331-3350	SEQ ID NO: 223
P224:	VIDAL QYKLE GTTRL TRKRG	aa 3346-3365	SEQ ID NO: 224
P225:	TRKRG LKLAT ALSLS NKFVE	aa 3361-3380	SEQ ID NO: 225
P226:	NKFVE GSHNS TVSLT TKNME	aa 3376-3395	SEQ ID NO: 226
P227:	TKNME VSVAK TTKAE IPILR	aa 3391-3410	SEQ ID NO: 227
P228:	IPILR MNFKQ ELNGN TKSKP	aa 3406-3425	SEQ ID NO: 228
P229:	TKSKP TVSSS MEFKY DFNSS	aa 3421-3440	SEQ ID NO: 229
P230:	DFNSS MLYST AKGAV DHKLS	aa 3436-3455	SEQ ID NO: 230
P231:	DHKLS LESLT SYFSI ESSTK	aa 3451-3470	SEQ ID NO: 231
P232:	ESSTK GDVKG SVLSR EYSGT	aa 3466-3485	SEQ ID NO: 232
P233:	EYSGT IASEA NTYLN SKSTR	aa 3481-3500	SEQ ID NO: 233
P234:	SKSTR SSVKL QGTSK IDDIW	aa 3496-3515	SEQ ID NO: 234
P235:	IDDIW NLEVK ENFAG EATLQ	aa 3511-3530	SEQ ID NO: 235
P236:	EATLQ RIYSL WEHST KNHLQ	aa 3526-3545	SEQ ID NO: 236
P237:	KNHLQ LEGLF FTNGE HTSKA	aa 3541-3560	SEQ ID NO: 237
P238:	HTSKA TLELS PWQMS ALVQV	aa 3556-3575	SEQ ID NO: 238
P239:	ALVQV HASQP SSFHD FPDLG	aa 3571-3590	SEQ ID NO: 239
P240:	FPDLG QEVAL NANTK NQKIR	aa 3586-3605	SEQ ID NO: 240
P241:	NQKIR WKNEV RIHSG SFQSQ	aa 3601-3620	SEQ ID NO: 241
P242:	SFQSQ VELSN DQEKA HLDIA	aa 3616-3635	SEQ ID NO: 242
P243:	HLDIA GSLEG HLRFL KNIIL	aa 3631-3650	SEQ ID NO: 243
P244:	KNIIL PVYDK SLWDF LKLDV	aa 3646-3665	SEQ ID NO: 244
P245:	LKLDV TTSIG RRQHL RVSTA	aa 3661-3680	SEQ ID NO: 245
P246:	RVSTA FVYTK NPNGY SFSIP	aa 3676-3695	SEQ ID NO: 246
P247:	SFSIP VKVLA DKFIT PGLKL	aa 3691-3710	SEQ ID NO: 247
P248:	PGLKL NDLNS VLVMP TFHVP	aa 3706-3725	SEQ ID NO: 248
P249:	TFHVP FTDLQ VPSCK LDFRE	aa 3721-3740	SEQ ID NO: 249
P250:	LDFRE IQIYK KLRTS SFALN	aa 3736-3755	SEQ ID NO: 250
P251:	SFALN LPTLP EVKFP EVDVL	aa 3751-3770	SEQ ID NO: 251
P252:	EVDVL TKYSQ PEDSL IPFFE	aa 3766-3785	SEQ ID NO: 252
P253:	IPFFE ITVPE SQLTV SQFTL	aa 3781-3800	SEQ ID NO: 253
P254:	SQFTL PKSVS DGIAA LDLNA	aa 3796-3815	SEQ ID NO: 254
P255:	LDLNA VANKI ADFEL PTIIV	aa 3811-3830	SEQ ID NO: 255
P256:	PTIIV PEQTI EIPSI KFSVP	aa 3826-3845	SEQ ID NO: 256
P257:	KFSVP AGIVI PSFQA LTARF	aa 3841-3860	SEQ ID NO: 257
P258:	LTARF EVDSP VYNAT WSASL	aa 3856-3875	SEQ ID NO: 258
P259:	WSASL KNKAD YVETV LDSTC	aa 3871-3890	SEQ ID NO: 259
P260:	LDSTC SSTVQ FLEYE LNVLG	aa 3886-3905	SEQ ID NO: 260
P261:	LNVLG THKIE DGTLA SKTKG	aa 3901-3920	SEQ ID NO: 261
P262:	SKTKG TLAHR DFSAE YEEDG	aa 3916-3935	SEQ ID NO: 262
P263:	YEEDG KFEGL QEWEG KAHLN	aa 3931-3950	SEQ ID NO: 263
P264:	KAHLN IKSPA FTDLH LRYQK	aa 3946-3965	SEQ ID NO: 264
P265:	LRYQK DKKGI STSAA SPAVG	aa 3961-3980	SEQ ID NO: 265
P266:	SPAVG TVGMD MDEDD DFSKW	aa 3976-3995	SEQ ID NO: 266
P267:	DFSKW NFYYS PQSSP DKKLT	aa 3991-4010	SEQ ID NO: 267
P268:	DKKLT IFKTE LRVRE SDEET	aa 4006-4025	SEQ ID NO: 268
P269:	SDEET QIKVN WEEEA ASGLL	aa 4021-4040	SEQ ID NO: 269
P270:	ASGLL TSLKD NVPKA TGVLY	aa 4036-4055	SEQ ID NO: 270

P271:	TGVLY DYVNK YHWEH TGLTL	aa 4051-4070	SEQ ID NO: 271
P272:	TGLTL REVSS KLRRN LQNNA	aa 4066-4085	SEQ ID NO: 272
P273:	LQNNA EWVYQ GAIRQ IDDID	aa 4081-4100	SEQ ID NO: 273
P274:	IDDID VRFQK AASGT TGTYQ	aa 4096-4115	SEQ ID NO: 274
P275:	TGTYQ EWKDK AQNLY QELLT	aa 4111-4130	SEQ ID NO: 275
P276:	QELLT QEGQA SFQGL KDNVF	aa 4126-4145	SEQ ID NO: 276
P277:	KDNVF DGLVR VTQKF HMKVK	aa 4141-4160	SEQ ID NO: 277
P278:	HMKVK HLIDS LIDFL NFPRF	aa 4156-4175	SEQ ID NO: 278
P279:	NFPRF QFPGK PGIYT REELC	aa 4171-4190	SEQ ID NO: 279
P280:	REELC TMFIR EVGTV LSQVY	aa 4186-4205	SEQ ID NO: 280
P281:	LSQVY SKVHN GSEIL FSYFQ	aa 4201-4220	SEQ ID NO: 281
P282:	FSYFQ DLVIT LPFEL RKHKL	aa 4216-4235	SEQ ID NO: 282
P283:	RKHKL IDVIS MYREL LKDLS	aa 4231-4250	SEQ ID NO: 283
P284:	LKDLS KEAQE VFKAI QSLKT	aa 4246-4265	SEQ ID NO: 284
P285:	QSLKT TEVLR NLQDL LQFIF	aa 4261-4280	SEQ ID NO: 285
P286:	LQFIF QLIED NIKQL KEMKF	aa 4276-4295	SEQ ID NO: 286
P287:	KEMKF TYLIN YIQDE INTIF	aa 4291-4310	SEQ ID NO: 287
P288:	INTIF NDYIP YVFKL LKENL	aa 4306-4325	SEQ ID NO: 288
P289:	LKENL CLNLH KFNEF IQNEL	aa 4321-4340	SEQ ID NO: 289
P290:	IQNEL QEASQ ELQQI HQYIM	aa 4336-4355	SEQ ID NO: 290
P291:	HQYIM ALREE YFDPS IVGWT	aa 4351-4370	SEQ ID NO: 291
P292:	IVGWT VKYYE LEEKI VSLIK	aa 4366-4385	SEQ ID NO: 292
P293:	VSLIK NLLVA LKDFH SEYIV	aa 4381-4400	SEQ ID NO: 293
P294:	SEYIV SASNF TSQLS SQVEQ	aa 4396-4415	SEQ ID NO: 294
P295:	SQVEQ FLHRN IQEYL SILTD	aa 4411-4430	SEQ ID NO: 295
P296:	SILTD PDGKG KEKIA ELSAT	aa 4426-4445	SEQ ID NO: 296
P297:	ELSAT AQEII KSQAI ATKKI	aa 4441-4460	SEQ ID NO: 297
P298:	TKKII SDYHQ QFRYK LQDFS	aa 4457-4476	SEQ ID NO: 298
P299:	LQDFS DQLSD YYEKF IAESK	aa 4472-4491	SEQ ID NO: 299
P300:	IAESK RLIDL SIQNY HTFLI	aa 4487-4506	SEQ ID NO: 300
P301:	HTFLI YITEL LKKLQ STTVM	aa 4502-4521	SEQ ID NO: 301
P302:	STTVM NPYMK LAPGE LTIIL	aa 4517-4536	SEQ ID NO: 302

【００７１】

これらのペプチド配列を調製し、国際公開第２００２０８０９５４号（その内容は、参照により、その全体が本明細書に援用される）で以前説明されたように、免疫原性について評価した。

【００７２】

これらのペプチド配列に対する抗体を調製し、ＷＯ２００７／０２５７８１とＷＯ２００９／０８３２２５（その内容は、参照により、その全体が本明細書に援用される）で以前説明されたように、免疫原性について評価した。

【００７３】

ＡｐｏＢ－１００のペプチド（例えばＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～３０２）とコレラ毒素Ｂ（ＣＴＢ）とを含む融合タンパク質の調製物を調製し、ＷＯ２０１１／０９５６２８（その内容は、参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているようにして評価した。

【００７４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているＡｐｏＢ－１００ペプチドもしくはその組み合わせ、またはそのアナログ、薬学的等価物及び／もしくはペプチド模倣体は、修飾ペプチドである。「修飾ペプチド」は、本発明のペプチドへのラクタム架橋、ヘッドトゥテール環化、非天然アミノ酸の導入（ペプチド（またはその組成物の他の構成要素のうち、プロテアーゼ認識配列以外のもの）への合成の非天然アミノ酸、置換アミノ酸、または１つ以上のＤ型アミノ酸の導入を含む）を含んでよい。Ｄ型アミノ酸を含むペプチドは、Ｌ型アミノ酸を含む形態と比べて、インビトロまたはインビボでの安定性が向上している。したがって、インビボまたは細胞内での安定性が高いほど望ましいか、または高

いことが要求されるときには、Ｄ型アミノ酸が導入されたペプチドを構築することは、特に有用である場合がある。さらに具体的には、Ｄ－ペプチドは、内因性のペプチダーゼとプロテアーゼに対する耐性を有し、それにより、結合薬物とコンジュゲート体の口腔上皮及び皮膚経由での送達が改善し、膜透過性複合体のバイオアベイラビリティが向上し（さらなる考察については、下記を参照されたい）、血管内及び間質での寿命が延長するのが望ましい場合、これらの特性が実現される。Ｄ型異性体ペプチドの使用により、結合薬物と他のカーゴ分子の経皮及び口腔上皮経由の送達を高めることもできる。加えて、Ｄ型ペプチドは、ヘルパーＴ細胞への主要組織適合遺伝子複合体クラスＩＩ拘束性提示を行うための処理を効率的には行えないので、その生物全体において、液性免疫応答を誘導する可能性が低い。したがって、例えば、Ｄ型異性体形態の細胞透過性ペプチド配列と、Ｌ型異性体形態の切断部位と、Ｄ型異性体形態の治療用ペプチドとを用いて、ペプチドコンジュゲートを構築できる。すなわち、いくつかの実施形態では、本開示のペプチドはＬ型アミノ酸とＤ型アミノ酸を含み、含まれているＤ型アミノ酸は、１個以下、２個以下、３個以下、４個以下、５個以下、６個以下、７個以下、８個以下、９個以下、または１０個以下である。特定の態様では、本開示のペプチドは１０個より多くのＤ型アミノ酸を含み、特定の態様では、ペプチドの全アミノ酸がＤ型アミノ酸である。

【００７５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているＡｐｏＢ－１００ペプチドもしくはその組み合わせ、またはそのアナログ、薬学的等価物及び／もしくはペプチド模倣体は、本明細書に記載されているＡｐｏＢ－１００ペプチドもしくはその組み合わせ、またはそのアナログ、薬学的等価物及び／もしくはペプチド模倣体のレトロインバーソペプチドである。「レトロインバーソペプチド」とは、少なくとも１つの位置で、ペプチド結合の向きが逆になっているペプチド、すなわち、アミノ酸の側鎖に対するアミノ末端とカルボキシル末端が逆になっているペプチドを指す。したがって、レトロインバーソアナログでは、末端が逆になっているとともに、ペプチド結合の向きが逆になっているが、側鎖のトポロジーは、ネイティブペプチド配列における状態がおおむね維持されている。レトロインバーソペプチドは、Ｌ型アミノ酸もしくはＤ型アミノ酸、またはＬ型アミノ酸とＤ型アミノ酸との混合物を含むことができ、すべてのアミノ酸がＤ型異性体であることもできる。部分的にレトロインバーソなペプチドアナログは、配列の一部のみが反転しており、エナンチオマーのアミノ酸残基に置き換えられているポリペプチドである。このようなアナログのレトロインバーソ部分では、アミノ末端とカルボキシル末端が逆向きなので、レトロインバーソ部分に隣接するアミノ酸残基はそれぞれ、類似の側鎖を持つ、一つの原子に同種原子が二つ結合したα置換ジアミノメタンとマロネートによって置き換えられている。レトロインバーソ形態の細胞透過性ペプチドは、天然形態と同様に、膜を通じた移行の際に効率的に機能することが分かっている。レトロインバーソペプチドアナログの合成は、Ｂｏｎｅｌｌｉ，Ｆ．ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ Ｊ Ｐｅｐｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｒｅｓ．２４（６）：５５３－６（１９８４）、Ｖｅｒｄｉｎｉ，Ａ ａｎｄ Ｖｉｓｃｏｍｉ，Ｇ．Ｃ，Ｊ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｐｅｒｋｉｎ Ｔｒａｎｓ．１：６９７－７０１（１９８５）及び米国特許第６，２６１，５６９号（これらは、参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されている。部分的にレトロインバーソなペプチドアナログの固相合成プロセスが説明されており（ＥＰ９７９９４－Ｂ）、この特許も、参照により、その全体が本明細書に援用される。

【００７６】

本明細書に記載されているペプチド（例えば、本明細書に記載されているＡｐｏＢ－１００ペプチドもしくはその組み合わせ、またはそのアナログ、薬学的等価物及び／もしくはペプチド模倣体）のその他のバリアントは、保存的に置換された配列を含むことができ、この置換は、元のペプチドのアミノ酸残基の１つ以上が、異なる残基によって置き換えられており、保存的に置換されたペプチドが、所望の生物学的活性、すなわち、アテローム性動脈硬化症を治療する能力であって、元のペプチドの治療能力と本質的に同等な治療能力を保持していることを意味する。保存的置換の例としては、本明細書に記載されてい

るＡｐｏＢ－１００ペプチドもしくはその組み合わせ、またはそのアナログ、薬学的等価物及び／もしくはペプチド模倣体の二次及び／もしくは三次構造を変化させないアミノ酸置換、全体的もしくは局所的な疎水性特性を変化させない置換、全体的もしくは局所的な電荷を変化させない置換、等価な側鎖サイズを持つ残基による置換、または類似の反応性基を持つ側鎖による置換が挙げられる。

【００７７】

その他の例には、親配列において、種を越えて進化的に保存されなかったアミノ酸置換がある。有益なことに、いくつかの実施形態では、保存的に置換された配列を作製する場合、これらの保存されたアミノ酸と構造は変化しない。

【００７８】

類似の生理化学的特性を有する残基によって、所定のアミノ酸を置き換えることができ、例えば、ある脂肪族残基を別の脂肪族残基に置換したり（Ｉｌｅ、Ｖａｌ、ＬｅｕまたはＡｌａを互いに置換するなど）、ある極性残基を別の極性残基に置換したりできる（ＬｙｓとＡｒｇ、ＧｌｕとＡｓｐ、またはＧｌｎとＡｓｎとの置換など）。他のこのような保存的置換、例えば、同様の疎水性特性を有する領域全体の置換、または同様の側鎖体積を持つ残基の置換は、周知である。本明細書に記載されているアッセイのいずれか１つにおいて、保存的アミノ酸置換を含む単離ペプチドを試験して、所望の活性、例えば、本明細書の他の箇所で説明されているアッセイによって判断した場合に、アテローム性動脈硬化症の軽減が保持されることを確認できる。

【００７９】

アミノ酸は、その側鎖の特性の類似性に従って分類でき（Ａ．Ｌ．Ｌｅｈｎｉｎｇｅｒ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，ｓｅｃｏｎｄ ｅｄ．，ｐｐ．７３－７５，Ｗｏｒｔｈ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９７５））、（１）非極性アミノ酸は、Ａｌａ（Ａ）、Ｖａｌ（Ｖ）、Ｌｅｕ（Ｌ）、Ｉｌｅ（Ｉ）、Ｐｒｏ（Ｐ）、Ｐｈｅ（Ｆ）、Ｔｒｐ（Ｗ）、Ｍｅｔ（Ｍ）であり、（２）無電荷極性アミノ酸は、Ｇｌｙ（Ｇ）、Ｓｅｒ（Ｓ）、Ｔｈｒ（Ｔ）、Ｃｙｓ（Ｃ）、Ｔｙｒ（Ｙ）、Ａｓｎ（Ｎ）、Ｇｌｎ（Ｑ）であり、（３）酸性アミノ酸は、Ａｓｐ（Ｄ）、Ｇｌｕ（Ｅ）であり、（４）塩基性アミノ酸は、Ｌｙｓ（Ｋ）、Ａｒｇ（Ｒ）、Ｈｉｓ（Ｈ）である。あるいは、天然残基は、共通する側鎖特性に基づいて分類することができ、（１）疎水性残基は、ノルロイシン、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐであり、（２）中性親水性残基は、Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ａｌａ、Ｔｙｒ、Ｈｉｓ、Ｐｒｏ、Ｇｌｙであり、（３）酸性残基は、Ａｓｐ、Ｇｌｕであり、（４）塩基性残基は、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇであり、（５）鎖の向きに影響を及ぼす残基は、Ｇｌｙ、Ｐｒｏであり、（６）芳香族残基は、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ、Ｐｒｏ、Ｈｉｓまたはヒドロキシプロリンである。非保存的置換は、これらのクラスのうちの１つのメンバーを別のクラスに入れ替えることを伴うことになる。

【００８０】

本明細書に記載されているバリアントで用いるのに特に好ましい保存的置換は、ＡｌａのＧｌｙもしくはＳｅｒへの置換、ＡｒｇのＬｙｓへの置換、ＡｓｎのＧｌｎもしくはＨｉｓへの置換、ＡｓｐのＧｌｕもしくはＡｓｎへの置換、ＣｙｓのＳｅｒへの置換、ＧｌｎのＡｓｎへの置換、ＧｌｕのＡｓｐへの置換、ＧｌｙのＡｌａもしくはＰｒｏへの置換、ＨｉｓのＡｓｎもしくはＧｌｎへの置換、ＩｌｅのＬｅｕもしくはＶａｌへの置換、ＬｅｕのＩｌｅもしくはＶａｌへの置換、ＬｙｓのＡｒｇ、ＧｌｎもしくはＧｌｕへの置換、ＭｅｔのＬｅｕ、Ｔｙｒもしくは Ｉｌｅへの置換、ＰｈｅのＭｅｔ、Ｌｅｕもしくは Ｔｙｒへの置換、ＳｅｒのＴｈｒへの置換、ＴｈｒのＳｅｒへの置換、ＴｒｐのＴｙｒもしくはＰｈｅへの置換、ＴｙｒのＰｈｅもしくはＴｒｐへの置換、及び／またはＰｈｅのＶａｌ、Ｔｙｒ、Ｉｌｅもしくは Ｌｅｕへの置換である。概して、保存的置換には、残基を、物理化学的特性が類似のものである残基に置き換えること（すなわち、疎水性残基を別の疎水性アミノ酸に置換すること）が含まれる。

【００８１】

本明細書に記載されている単離ペプチドの適切なコンホメーションの維持に関与しないいずれかのシステイン残基を、概してセリンで置換して、その分子の酸化安定性を向上させ、異常な架橋を防ぐこともできる。これに対して、本明細書に記載されている単離ペプチドに、システイン結合を付加して、その安定性を向上させたり、または多量体化を促進したりすることもできる。

【００８２】

本明細書で使用する場合、「機能的断片」とは、アミノ酸を少なくとも３個、少なくとも４個、または少なくとも５個含むとともに、本明細書に記載されているアッセイに従って、アテローム性動脈硬化症を治療及び／または軽減できるペプチド断片またはペプチドセグメントである。機能的断片は、アテローム性動脈硬化症を治療及び／または軽減する機能を保持する限りは、本明細書に開示されている配列の保存的置換を含むことができる。

【００８３】

安定性、バイオアベイラビリティ、及び／または細胞へのペプチドの送達を向上させるために、ペプチドを改変することができる。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている単離ペプチドは、少なくとも１つのペプチド結合置換を含むことができる。１つのペプチド結合または複数のペプチド結合、例えば、２個の結合、３個の結合、４個の結合、５個の結合、もしくは６個以上の結合、またはすべてのペプチド結合を置換することができる。本明細書に記載されている単離ペプチドは、１種類のペプチド結合置換または複数種のペプチド結合置換、例えば、２種類、３種類、４種類、５種類、またはより多くのペプチド結合置換を含むことができる。ペプチド結合置換の非限定的な例としては、尿素、チオ尿素、カルバメート、スルホニル尿素、トリフルオロエチルアミン、オルト－（アミノアルキル）－フェニル酢酸、パラ－（アミノアルキル）－フェニル酢酸、メタ－（アミノアルキル）－フェニル酢酸、チオアミド、テトラゾール、ボロン酸エステル、オレフィン基、及びこれらの誘導体が挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているＡｐｏＢ－１００ペプチドもしくはその組み合わせ、またはそのアナログ、薬学的等価物、及び／もしくはペプチド模倣体は、体内滞留性を高める物質とコンジュゲートされている。滞留性を高める物質の例としては、セルロース、脂肪酸、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、またはこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限らない。

【００８４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている単離ペプチドは、生物によって産生されるポリペプチド及び／またはタンパク質で広く見られる天然アミノ酸、例えば、Ａｌａ（Ａ）、Ｖａｌ（Ｖ）、Ｌｅｕ（Ｌ）、Ｉｌｅ（Ｉ）、Ｐｒｏ（Ｐ）、Ｐｈｅ（Ｆ）、Ｔｒｐ（Ｗ）、Ｍｅｔ（Ｍ）、Ｇｌｙ（Ｇ）、Ｓｅｒ（Ｓ）、Ｔｈｒ（Ｔ）、Ｃｙｓ（Ｃ）、Ｔｙｒ（Ｙ）、Ａｓｎ（Ｎ）、Ｇｌｎ（Ｑ）、Ａｓｐ（Ｄ）、Ｇｌｕ（Ｅ）、Ｌｙｓ（Ｋ）、Ａｒｇ（Ｒ）及びＨｉｓ（Ｈ）を含むことができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている単離ペプチドは、代替的なアミノ酸を含むことができる。代替的なアミノ酸の非限定的な例としては、Ｄ型アミノ酸、β－アミノ酸、ホモシステイン、ホスホセリン、ホスホトレオニン、ホスホチロシン、ヒドロキシプロリン、γ－カルボキシグルタメート、馬尿酸、オクタヒドロインドール－２－カルボン酸、スタチン、１，２，３，４，－テトラヒドロイソキノリン－３－カルボン酸、ペニシラミン（３－メルカプト－Ｄ－バリン）、オルニチン、シトルリン、α－メチル－アラニン、パラ－ベンゾイルフェニルアラニン、パラ－アミノフェニルアラニン、ｐ－フルオロフェニルアラニン、フェニルグリシン、プロパルギルグリシン、サルコシン、ｔｅｒｔ－ブチルグリシン）、ジアミノ酪酸、７－ヒドロキシ－テトラヒドロイソキノリンカルボン酸、ナフチルアラニン、ビフェニルアラニン、シクロヘキシルアラニン、アミノ－イソ酪酸、ノルバリン、ノルロイシン、ｔｅｒｔ－ロイシン、テトラヒドロイソキノリンカルボン酸、ピペコリン酸、フェニルグリシン、ホモフェニルアラニン、シクロヘキシルグリシン、デヒドロロイシン、２，２－ジエチルグリシン、１－アミノ－１－シクロペンタンカルボン酸、１－アミ

ノ－１－シクロヘキサンカルボン酸、アミノ－安息香酸、アミノ－ナフトエ酸、γ－アミノ酪酸、ジフルオロフェニルアラニン、ニペコチン酸、α－アミノ酪酸、チエニル－アラニン、ｔ－ブチルグリシン、トリフルオロバリン、ヘキサフルオロロイシン、フッ素化アナログ、アジド修飾アミノ酸、アルキン修飾アミノ酸、シアノ修飾アミノ酸及びこれらの誘導体が挙げられる。

【００８５】

いくつかの実施形態では、単離ペプチドは、修飾することができ、例えば、そのペプチドを含むアミノ酸の１つ以上に、ある部分を付加することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている単離ペプチドは、１つ以上の部分分子、例えば、ペプチド１つ当たり１つ以上の部分分子、ペプチド１つ当たり２つ以上の部分分子、ペプチド１つ当たり５つ以上の部分分子、ペプチド１つ当たり１０個以上の部分分子、またはペプチド１つ当たりこれを上回る部分分子を含むことができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている単離ペプチドは、１種類以上の修飾及び／または部分、例えば、１種類の修飾、２種類の修飾、３種類の修飾、またはこれを上回る種類の修飾を含むことができる。修飾及び／または部分の非限定的な例としては、ＰＥＧ化、グリコシル化、ＨＥＳ化、ＥＬＰ化、脂質化、アセチル化、アミド化、エンドキャッピング修飾、シアノ基、リン酸化及び環化が挙げられる。いくつかの実施形態では、エンドキャッピング修飾は、Ｎ末端のアセチル化、Ｎ末端のアシル化及びＮ末端のホルミル化を含むことができる。いくつかの実施形態では、エンドキャッピング修飾は、Ｃ末端のアミド化、Ｃ末端のアルコール、アルデヒド、エステル及びチオエステル部分の導入を含むことができる。

【００８６】

本明細書に記載されている単離ペプチドは、第２の機能的な分子、ペプチド及び／またはポリペプチドにカップリングまたは連結することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている単離ペプチドは、標的化分子にカップリングする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている単離ペプチドは、そのペプチドと標的化分子を融合ペプチドとして、任意に応じて、そのペプチドと標的化分子との間に入るペプチドリンカー配列とともに発現させることによって、標的化分子にカップリングする。本明細書で使用する場合、「標的化分子」は、特定の種類の細胞または組織に結合できるか、特定の種類の細胞または組織が結合できるいずれかの分子、例えば、ペプチド、抗体もしくはその断片、抗原、標的リポソーム、または小分子であることができる。非限定的な例として、（例えば、ＳＬＥを有する対象のアテローム性動脈硬化症を治療し、アテローム性動脈硬化症を阻害し、アテローム性動脈硬化症の重症度を低減し及び／またはアテローム性動脈硬化症の進行を遅延させる目的で、）アテローム性動脈硬化領域を標的とするのが望ましい場合、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～３０２のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む単離ペプチド（例えばＰ２１０）を、その標的領域に対して特異的である抗体またはその断片にカップリングできる。

【００８７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている単離ペプチドは、融合ペプチドまたは融合ポリペプチドであることができる。融合ポリペプチドは、本明細書に記載されている、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～３０２のアミノ酸配列を含むペプチド、またはその誘導体、バリアント、機能的断片、プロドラッグもしくはアナログの第１のドメインと、融合ペプチドの少なくとも第２のドメインとの間に配置されたペプチドリンカードメインを含むことができる。この第１のペプチドドメインは、Ｎ末端ドメインであることも、Ｃ末端ドメインであることも、内部配列であることもでき、この場合、構成パートのフラグメントコンプリメンテーション後に、パートナードメインを形成する。融合タンパク質を合成または作製する方法は、当業者には周知である。「融合タンパク質」という用語は、本明細書で使用する場合、２つ以上のタンパク質を含む組み換えタンパク質を指す。融合タンパク質は、例えば、一方のタンパク質をコードする核酸配列と、別のタンパク質をコードする核酸とを接合して、それらの核酸が、細胞内で、意図するすべてのタンパク質をもたらす１つのポリペプチドに翻訳できる１つのオープンリーディングフレームを構成するよ

うにすることによって作製できる。これらのタンパク質の配列順は様々であることができる。融合タンパク質は、エピトープタグまたは半減期延長因子を含むことができる。エピトープタグとしては、ビオチン、ＦＬＡＧタグ、ｃ－ｍｙｃ、ヘマグルチニン、Ｈｉｓ６、ジゴキシゲニン、ＦＩＴＣ、Ｃｙ３、Ｃｙ５、緑色蛍光タンパク質、Ｖ５エピトープタグ、ＧＳＴ、β－ガラクトシダーゼ、ＡＵ１、ＡＵ５及びアビジンが挙げられる。半減期延長因子としては、Ｆｃドメイン及び血清アルブミンが挙げられる。

【００８８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている単離ペプチドは、薬学的に許容可能なプロドラッグであることができる。本明細書で使用する場合、「プロドラッグ」とは、いくつかの化学プロセスまたは生理プロセス（例えば、酵素プロセス及び代謝的加水分解）を介して、治療剤に変換できる化合物を指す。したがって、「プロドラッグ」という用語は、薬学的に許容可能である生物活性化合物の前駆体も指す。プロドラッグは、対象に投与するときには不活性、すなわち、エステルであってよいが、インビボで、例えば、遊離カルボン酸または遊離ヒドロキシルに加水分解されることによって、活性化合物に変換される。プロドラッグ化合物は、生物において、溶解性、組織適合性または遅延放出という利点をもたらすことが多い。また、「プロドラッグ」という用語は、対象に投与すると、インビボで活性化合物を放出するいずれかの共有結合担体を含むことも意味する。活性化合物のプロドラッグは、活性化合物に存在する官能基を修飾して、その修飾部が、常法の操作またはインビボのいずれかで切断されて、親活性化合物になるようにすることによって調製してよい。プロドラッグとしては、ヒドロキシ基がいずれかの基に結合しており、活性化合物のプロドラッグを対象に投与すると切断されて、遊離ヒドロキシが形成される化合物、アミノ基がいずれかの基に結合しており、活性化合物のプロドラッグを対象に投与すると切断されて、遊離アミノが形成される化合物、またはメルカプト基がいずれかの基に結合しており、活性化合物のプロドラッグを対象に投与すると切断されて、遊離メルカプト基が形成される化合物が挙げられる。プロドラッグの例としては、アルコールのアセテート誘導体、フォーメート誘導体及びベンゾエート誘導体、または活性化合物におけるアミン官能基のアセトアミド誘導体、ホルムアミド誘導体及びベンズアミド誘導体などが挙げられるが、これらに限らない。Ｈａｒｐｅｒ，“Ｄｒｕｇ Ｌａｔｅｎｔｉａｔｉｏｎ”ｉｎ Ｊｕｃｋｅｒ，ｅｄ．Ｐｒｏｇｒｅｓｓ ｉｎ Ｄｒｕｇ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４：２２１－２９４ （１９６２）、Ｍｏｒｏｚｏｗｉｃｈ ｅｔ ａｌ，“Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｈｙｓｉｃａｌ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｔｏ Ｐｒｏｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ”ｉｎ Ｅ．Ｂ．Ｒｏｃｈｅ ｅｄ．Ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｔｈｒｏｕｇｈ Ｐｒｏｄｒｕｇｓ ａｎｄ Ａｎａｌｏｇｓ，ＡＰＨＡ Ａｃａｄ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．４０（１９７７）、Ｂｉｏｒｅｖｅｒｓｉｂｌｅ Ｃａｒｒｉｅｒｓ ｉｎ Ｄｒｕｇ ｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ，Ｔｈｅｏｒｙ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ，Ｅ．Ｂ．Ｒｏｃｈｅ，ｅｄ．，ＡＰＨＡ Ａｃａｄ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．（１９８７）、Ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ Ｐｒｏｄｒｕｇｓ，Ｈ．Ｂｕｎｄｇａａｒｄ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ（１９８５）、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．“Ｐｒｏｄｒｕｇ ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ ｔｏ ｔｈｅ ｉｍｐｒｏｖｅｄ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｐｅｐｔｉｄｅ ｄｒｕｇ”ｉｎ Ｃｕｒｒ．Ｐｈａｒｍ．Ｄｅｓｉｇｎ．５（４）：２６５－２８７（１９９９）、Ｐａｕｌｅｔｔｉ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｉｍｐｒｏｖｅｍｅｎｔ ｉｎ ｐｅｐｔｉｄｅ ｂｉｏａｖａｉｌａｂｉｌｉｔｙ：Ｐｅｐｔｉｄｏｍｉｍｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｐｒｏｄｒｕｇ Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ，Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ．Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖ．２７：２３５－２５６、Ｍｉｚｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９８）“Ｔｈｅ Ｕｓｅ ｏｆ Ｅｓｔｅｒｓ ａｓ Ｐｒｏｄｒｕｇｓ ｆｏｒ Ｏｒａｌ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ（３－Ｌａｃｔａｍ ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃｓ，”Ｐｈａｒｍ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．ｌｌ，：３４５－３６５、Ｇａｉｇｎａｕｌｔ ｅｔ ａｌ．（１９９６）“Ｄｅｓｉｇｎｉｎｇ Ｐｒｏｄｒｕｇｓ ａｎｄ Ｂｉｏｐｒｅｃｕｒｓｏｒｓ Ｉ．Ｃａｒｒｉｅｒ Ｐｒｏｄｒｕｇｓ，”Ｐｒａｃｔ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．６７１－６９６、Ａｓｇｈａｒ

nejad, “Improving Oral Drug Transport”, in Transport Processes in Pharmaceutical Systems, G. L. Amidon, P. I. Lee and E. M. Topp, Eds., Marcell Dekker, p. 185−218 (2000)、Balant et al., “Prodrugs for the improvement of drug absorption via different routes of administration”, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 15(2):143−53 (1990)、Balimane and Sinko, “Involvement of multiple transporters in the oral absorption of nucleoside analogues”, Adv. Drug Delivery Rev., 39(1−3):183−209 (1999)、Browne, “Fosphenytoin (Cerebyx)”, Clin. Neuropharmacol. 20(1):1−12 (1997)、Bundgaard, “Bioreversible derivatization of drugs−principle and applicability to improve the therapeutic effects of drugs”, Arch. Pharm. Chemi 86(1):1−39 (1979)、Bundgaard H. “Improved drug delivery by the prodrug approach”, Controlled Drug Delivery 17:179−96 (1987)、Bundgaard H. “Prodrugs as a means to improve the delivery of peptide drugs”, Arfv. Drug Delivery Rev. 8(1):1−38 (1992)、Fleisher et al. “Improved oral drug delivery:solubility limitations overcome by the use of prodrugs”, Arfv. Drug Delivery Rev. 19(2):115−130 (1996)、Fleisher et al. “Design of prodrugs for improved gastrointestinal absorption by intestinal enzyme targeting”, Methods Enzymol. 112(Drug Enzyme Targeting, Pt. A):360−81, (1985)、Farquhar D, et al., “Biologically Reversible Phosphate−Protective Groups”, Pharm. Sci., 72(3):324−325 (1983)、Freeman S, et al., “Bioreversible Protection for the Phospho Group:Chemical Stability and Bioactivation of Di(4−acetoxy−benzyl) Methylphosphonate with Carboxyesterase,” Chem. Soc., Chem. Commun., 875−877 (1991)、Friis and Bundgaard, “Prodrugs of phosphates and phosphonates:Novel lipophilic alpha acyloxyalkyl ester derivatives of phosphate− or phosphonate containing drugs masking the negative charges of these groups”, Eur. J. Pharm. Sci. 4:49−59 (1996)、Gangwar et al., “Pro−drug, molecular structure and percutaneous delivery”, Des. Biopharm. Prop. Prodrugs Analogs, [Symp.] Meeting Date 1976, 409−21. (1977)、Nathwani and Wood, “Penicillins:a current review of their clinical pharmacology and therapeutic use”, D

rugs 45(6):866-94(1993)、Sinhababu and Thakker,“Prodrugs of anticancer agents”,Adv.Drug Delivery Rev.19(2):241-273(1996)、Stella et al.,“Prodrugs.Do they have advantages in clinical practice?”,Drugs 29(5):455-73(1985)、Tan et al.“Development and optimization of anti-HIV nucleoside analogs and prodrugs:A review of their cellular pharmacology,structure-activity relationships and pharmacokinetics”,Adv.Drug Delivery Rev.39(1-3):117-151(1999)、Taylor,“Improved passive oral drug delivery via prodrugs”,Adv.Drug Delivery Rev.,19(2):131-148(1996)、Valentino and Borchardt,“Prodrug strategies to enhance the intestinal absorption of peptides”,Drug Discovery Today 2(4):148-155(1997)、Wiebe and Knaus,“Concepts for the design of anti-HIV nucleoside prodrugs for treating cephalic HIV infection”,Adv.Drug Delivery Rev.:39(l-3):63-80(1999)、Waller et al.,“Prodrugs”,Br.J.Clin.Pharmac.28:497-507(1989)(これらは、参照により、その全体が本明細書に援用される)を参照されたい。

【0089】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている単離ペプチドは、薬学的に許容可能な溶媒和物であることができる。「溶媒和物」という用語は、本明細書に記載されている単離ペプチドが固体状態であるものであって、好適な溶媒の分子が結晶格子に組み込まれているものを指す。治療投与に適する溶媒は、投与する用量において、生理的に耐え得るものである。治療投与に適する溶媒の例は、エタノールと水である。水が溶媒であるときには、その溶媒和物は、水和物という。概して、溶媒和物は、化合物を適切な溶媒に溶解して、冷却するか、または貧溶媒を用いることで溶媒和物を単離することによって形成する。溶媒和物は典型的には、周囲条件下で乾燥または共沸する。

【0090】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている単離ペプチドは、非結晶体、すなわち、非晶質固体の形態であることができる。

【0091】

一態様では、本発明で説明するのは、本明細書に記載されているペプチドをコードする核酸を含むベクターである。「ベクター」という用語は、本明細書で使用する場合、宿主細胞への送達用または異なる宿主細胞間での輸送用に設計された核酸コンストラクトを指す。本明細書で使用する場合、ベクターは、ウイルスベクターであることも、ウイルス以外のベクターであることもできる。「ベクター」という用語には、適切な制御エレメントと関連付けると複製できるとともに、遺伝子配列を細胞に移入できるいずれかの遺伝エレメントが含まれる。ベクターとしては、クローニングベクター、発現ベクター、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルス、ビリオンなどを挙げることができるが、これらに限らない。外来遺伝子を標的の哺乳動物細胞に移送するのに有用なベクターは、数多く入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、サイトメガロウイルス、アデノウイルスなどのウイルス由来ベクターのように、エピソーマルベクターであることも、例えば、レトロウイルス由来のベクター(MMLV、HIV-1、ALVなど)のように、相同組み換えまたはランダムインテグレーションを通じて、標的細胞ゲ

ノムに組み込むこともできる。多くのウイルスベクターが当該技術分野において知られており、核酸調節化合物を細胞に運ぶ輸送体として使用できる。例えば、細胞への感染またはトランスダクション用のレトロウイルスベクターとレンチウイルスベクターを含め、ポリペプチドをコードする核酸を含むコンストラクトを、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）もしくは単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）またはその他のウイルスのような非複製型の欠損ウイルスゲノムに組み込んで、パッケージングすることができる。あるいは、このコンストラクトは、エピソーマル複製できるベクター、例えば、ＥＰＶベクターとＥＢＶベクターに組み込むことができる。ベクターに組み込む核酸は、発現制御配列に機能可能に連結して、その発現制御配列が、そのポリヌクレオチド配列の転写と翻訳を制御及び調節するようにできる。

【００９２】

本明細書で使用する場合、「発現ベクター」という用語は、そのベクターの転写調節配列に連結された配列からのＲＮＡまたはポリペプチドの発現を誘導するベクターを指す。発現される配列は、細胞に対して異種の配列であることが多いが、これは必須ではない。発現ベクターは、追加のエレメントを含むことができ、例えば、発現ベクターは、２つの複製系を有することができ、これにより、２つの生物、例えば、発現用のヒト細胞と、クローニングと増幅用の原核生物宿主で維持可能になる。

【００９３】

「トランスフェクション」という用語は、本明細書で使用する場合、外因性核酸（本明細書に記載されているペプチドをコードする核酸配列など）を細胞に導入するための方法（化学的方法など）を指す。本明細書で使用する場合、トランスフェクションという用語には、外因性核酸を細胞に導入する、ウイルスベースの方法は含まれない。トランスフェクション方法としては、物理的処理（エレクトロポレーション、ナノ粒子、マグネトフェクション）と、化学ベースのトランスフェクション方法が挙げられる。化学ベースのトランスフェクション方法としては、シクロデキストリン、ポリマー、リポソーム、ナノ粒子、陽イオン性脂質またはこれらの混合物（例えば、ＤＯＰＡ、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ及びＵｐｔｉＦｅｃｔｉｎ）、ならびに陽イオン性ポリマー（ＤＥＡＥ－デキストランまたはポリエチレンイミンなど）を用いる方法が挙げられるが、これらに限らない。

【００９４】

本明細書で使用する場合、「ウイルスベクター」という用語は、ウイルス由来のエレメントを少なくとも１つ含むとともに、パッケージングされてウイルスベクター粒子になる能力を有する核酸ベクターコンストラクトを指す。ウイルスベクターは、非必須のウイルス遺伝子の代わりに、本明細書に記載されているペプチドをコードする核酸を含むことができる。ベクター及び／または粒子は、インビトロまたはインビボのいずれかで、いずれかの核酸を細胞に移入する目的で使用できる。多くの形態のウイルスベクターが、当該技術分野において知られている。「複製能欠失型」という用語は、ウイルスベクターに関して用いるときには、ウイルスベクターが、そのゲノムをさらに複製したり、パッケージングしたりできないことを意味する。例えば、対象の細胞に、複製能欠失型の組み換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ビリオンを感染させると、異種（導入遺伝子としても知られている）遺伝子が、患者の細胞内で発現するが、ｒＡＡＶは、複製欠損型であり（例えば、ウイルスをパッケージングするのに必須のタンパク質をコードするアクセサリー遺伝子が欠損している）、ウイルス粒子を患者の細胞内で形成することができない。「トランスダクション」という用語は、本明細書で使用する場合、ウイルス粒子またはウイルスを用いて、外因性核酸を細胞に導入することを指す。

【００９５】

レトロウイルス（レンチウイルスなど）は、目的の薬剤をコードする核酸配列を送達するための利便的なプラットフォームをもたらす。当該技術分野において知られている技法を用いて、所定の核酸配列をベクターに挿入して、レトロウイルス粒子にパッケージングできる。そして、組み換えウイルスを単離し、例えば、インビトロまたはエキソビボで細胞に送達できる。レトロウイルス系は、当該技術分野において周知であり、例えば、米国

特許第５，２１９，７４０号、Ｋｕｒｔｈ ａｎｄ Ｂａｎｎｅｒｔ（２０１０）“Ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓｅｓ：Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ａｎｄ Ｐａｔｈｏｇｅｎｅｓｉｓ”Ｃａｌｓｔｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（ＩＳＢＮ：９７８－１－９０４５５－５５－４）及びＨｕ ａｎｄ Ｐａｔｈａｋ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ２０００ ５２：４９３－５１２（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されている。

【００９６】

いくつかの実施形態では、目的のヌクレオチド配列をアデノウイルスベースの発現ベクターに挿入する。宿主ゲノムに組み込まれるレトロウイルスとは異なり、アデノウイルスは、染色体外に留まるので、挿入変異誘発と関連するリスクが最小限になる（Ｈａｊ－Ａｈｍａｄ ａｎｄ Ｇｒａｈａｍ（１９８６）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．５７：２６７－７４、Ｂｅｔｔ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６７：５９１１－２１、Ｍｉｔｔｅｒｅｄｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ５：７１７－２９、Ｓｅｔｈ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６８：９３３－４０、Ｂａｒｒ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １：５１－５８、Ｂｅｒｋｎｅｒ，Ｋ．Ｌ．（１９８８）ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ６：６１６－２９及びＲｉｃｈ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ４：４６１－７６）。アデノウイルスベクターには、遺伝子療法におけるいくつかの利点がある。アデノウイルスベクターは、多種多様な細胞に感染し、宿主範囲が広く、感染効率が高く、異種配列の発現を高レベルで誘導し、インビボにおけるこれらの配列の長期的な発現を実現する。このウイルスは、無細胞ビリオンとして十分な感染性を持つので、プロデューサー細胞株の注射が不要である。安全性に関しては、アデノウイルスは、ヒトの重篤な病変とは関連付けられておらず、このウイルスに由来する組み換えベクターは、ウイルスゲノムの初期遺伝子領域１（「Ｅ１」）を欠損させることによって、複製能欠失型にすることができる。また、アデノウイルスは、比較的容易に、大量に作製することができる。これらのすべての理由から、ヒトアデノウイルスに由来するベクターであって、少なくともＥ１領域が欠損されており、目的の遺伝子に置き換わっているベクターは、前臨床段階と臨床段階の遺伝子療法実験で広範に使用されている。本明細書に記載されている組成物と方法で用いるアデノウイルスベクターは、様々なアデノウイルス抗原型のうちのいずれかに由来することができ、４０個を超える抗原型株のアデノウイルスのうちのいずれか（抗原型２、５、１２、４０及び４１など）が挙げられるが、これらに限らない。本明細書に記載されている方法で使用するアデノウイルスベクターは概して、複製欠損型であり、好適なプロモーターの制御下で、目的の配列を含む。例えば、米国特許第６，０４８，５５１号（参照により、その全体が本明細書に援用される）には、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）プロモーターの制御下で、ヒト遺伝子を含む複製欠損型アデノウイルスベクターが記載されている。各種抗原型であり、異なるプロモーター系を含むその他の組み換えアデノウイルスは、当業者であれば作製することができる。例えば、米国特許第６，３０６，６５２号（参照により、その全体が本明細書に援用される）を参照されたい。核酸配列を送達するためのその他の有用なアデノウイルスベースベクターとしては、米国特許第６，３０６，６５２号に記載されているような「最小」アデノウイルスベクターであって、少なくともキャプシド化に必要なウイルスゲノム部分（キャプシド化シグナル）と、ＩＴＲの少なくとも機能的部分または誘導体を少なくとも１コピーを保持するベクター、ウイルスゲノムの大部分が除去されているとともに、本質的にウイルスタンパク質を産生しない「ガットレス」（ヘルパー依存型）アデノウイルスが挙げられるが、これらに限らず、このようなベクターにより、１回投与した後、１年超にわたって、遺伝子発現を持続させることができる（Ｗｕ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ａｎｅｓｔｈｅｓ．９４：１１１９－３２、Ｐａｒｋｓ（２０００）Ｃｌｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．５８：１－１１、Ｔｓａｉ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．２：５１５－２３）。

【００９７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているペプチドをコードするヌクレオチ

ド配列を、アデノ随伴ウイルスベースの発現ベクターに挿入する。ＡＡＶは、ディペンドウイルス属に属するパルボウイルスであり、他のウイルスには見られない特徴をいくつか有する。ＡＡＶは、非分裂細胞を含む広範な宿主細胞に感染できる。ＡＡＶは、様々な種の細胞に感染できる。ＡＡＶは、いずれのヒト疾患または動物疾患にも関連付けられておらず、組み込まれる際に、宿主細胞の生物学的な特性を変更しないと見られている。実際、ヒト集団の８０～８５％が、このウイルスに暴露されていると推定されている。そして、ＡＡＶは、広範な物理的条件と化学的条件で安定しており、作製、保存及び輸送が容易である。ＡＡＶは、ヘルパー依存型ウイルスであり、すなわち、野生でＡＡＶビリオンを形成するには、ヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクシニア）との共感染を必要とする。ヘルパーウイルスとの共感染がなければ、ＡＡＶは、潜伏状態（ウイルスゲノムが宿主細胞染色体に挿入されるが、感染性ビリオンは産生されない状態）となる。その後、ヘルパーウイルスに感染すると、組み込まれたゲノムが活性化され、そのゲノムを複製及びパッケージングさせて、感染性ＡＡＶビリオンにする。ＡＡＶは、様々な種の細胞に感染できるが、ヘルパーウイルスは、宿主細胞と同じ種のものでなければならない。したがって、例えば、ヒトＡＡＶは、イヌアデノウイルスに共感染させたイヌ細胞で複製することになる。アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、遺伝子療法での使用に成功している。ＡＡＶは、目的の遺伝子を送達するように、ＡＡＶゲノムの内部の非反復部分（すなわち、ｒｅｐ遺伝子とｃａｐ遺伝子）を取り除いて、異種の配列（このケースでは、薬剤をコードする配列）をＩＴＲの間に挿入することによって操作されている。異種の配列は典型的には、患者の標的細胞において、適切な条件下で発現を誘導できる異種のプロモーター（構成的プロモーター、細胞特異的プロモーターまたは誘導性プロモーター）に機能的に連結する。目的の薬剤をコードする核酸配列を含む組み換えＡＡＶビリオンは、米国特許第５，１３９，９４１号、同第５，６２２，８５６号、同第５，１３９，９４１号、同第６，００１，６５０号及び同第６，００４，７９７号（それぞれの内容は、参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているように、当該技術分野で認識されている様々な技法を用いて作製できる。ヘルパーウイルスを含まないｒＡＡＶストックを調製するのに必要なベクターと細胞株は、ＡＡＶ　Ｈｅｌｐｅｒ－Ｆｒｅｅ　Ｓｙｓｔｅｍ（カタログ番号２４００７１）（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，　Ｓａｎｔａ　Ｃｌａｒａ，　Ｃａｌｉｆ．）として市販されている。

【００９８】

本明細書に記載されているペプチドをコードする核酸分子を送達するのに有用なさらなるウイルスベクターとしては、ワクシニアウイルス及びトリポックスウイルスを含むポックスファミリーウイルスに由来するものが挙げられる。あるいは、鶏痘ウイルス及びカナリアポックスウイルスのようなアビポックスウイルスを用いて、遺伝子を送達することができる。ヒト及びその他の哺乳動物種の細胞でアビポックスベクターを用いることは、安全性の面で有益である。アビポックス属の膜は、感受性を持つ種のトリでのみ生産的に複製できるからである。組み換えアビポックスウイルスの作製方法は、当該技術分野において知られており、遺伝子組み換えを使用する。例えば、ＷＯ９１／１２８８２、ＷＯ８９／０３４２９及びＷＯ９２／０３５４５を参照されたい。

【００９９】

本明細書に記載されているペプチドをコードする配列の送達には、分子コンジュゲートベクター（アデノウイルスキメラベクターなど）を用いることができる（Ｍｉｃｈａｅｌ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：６８６６－６９及びＷａｇｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９：６０９９－６１０３）。核酸配列を送達するためのウイルスベクターとして、アルファウイルス属のメンバー、例えば、シンドビスウイルス及びセムリキ森林ウイルスを用いることもできる（例えば、Ｄｕｂｅｎｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７０：５０８－１９、ＷＯ９５／０７９９５、ＷＯ９６／１７０７２を参照されたい）。

【０１００】

いくつかの実施形態では、ベクターは、本発明のペプチドに機能可能に連結したシグナルペプチドをさらに含む。シグナルペプチドは、末端（通常、Ｎ末端）に位置するペプチド配列であって、タンパク質を膜内にまたは膜経由で移動させるペプチド配列である。用途によって異なるシグナルペプチドが有用であることがある。例えば、本明細書に記載されている単離ペプチドを産生させるための細胞系に関しては、分泌シグナルペプチドによって、収量と精製のしやすさを向上させることができる。さらなる例としては、本明細書に記載されているペプチドを産生するとともに、対象を治療する目的で投与する細胞に関しては、複数のシグナルペプチド、例えば、第１の細胞から分泌させるためのペプチドシグナル伝達と、第２の細胞によってインターナリゼーションさせるためのペプチドシグナル伝達と、核局在化のための最終的なペプチドシグナル伝達によって、標的環境に到達するペプチドの量を増大させることができる。さらなる例としては、例えば、遺伝子療法用途に関しては、核局在化のためのペプチドシグナル伝達によって、標的環境に到達するペプチドの量を増大させることができる。シグナルペプチドは、当該技術分野において知られている。哺乳動物細胞で用いる核局在化シグナル（ＮＬＳ）ペプチドの非限定的な例としては、

ＳＶ４０ラージＴ抗原ＮＬＳ
(PKKKRKV) (SEQ ID NO: 305)
ヌクレオプラスミンＮＬＳ
(KR[PAATKKAGQA]KKKK)(SEQ ID NO: 306)
K-K/R-X-K/R (SEQ ID NO: 307)
コンセンサスＮＬＳ
NLS (KKXR (SEQ ID NO: 308); KKXK (SEQ ID NO: 309); KRXK (SEQ ID NO: 310); KRXR (SEQ ID NO: 311)

及びＰＹ－ＮＬＳが挙げられる（さらなる考察については、例えば、Ｄｉｎｇｗａｌｌ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ １８８ １０７：８４１－９及びＭａｋｋｅｒｈ ｅｔ ａｌ．Ｃｕｒｒ Ｂｉｏｌ．１９９６ ６：１０２５－７（これらはいずれも、参照により、その全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。哺乳動物細胞で用いられる分泌シグナルペプチドの非限定的な例としては、

ヒトアルブミンシグナルペプチド
(MKWVTFISLLFLFSSAYS) (SEQ ID NO: 312)
ヒトキモトリプシンシグナルペプチド
(MAFLWLLSCWALLGTTGF) (SEQ ID NO: 313)
ヒトインターロイキン２シグナルペプチド
(MQLLSCIALILALV) (SEQ ID NO: 314)
ヒトトリプシノーゲン２シグナルペプチド
(MNLLLILTFVAAAVA) (SEQ ID NO: 315)

及びシグナルペプチダーゼ、フューリンまたはその他のプロホルモンコンバターゼ（例えばＰＣ３）による前駆体切断のシグナルのコード領域を含む配列が挙げられる。例えば、フューリン（ＰＡＣＥとしても知られている。米国特許第５，４６０，９５０号を参照されたい）、その他のスブチリシン（ＰＣ２、ＰＣ１／ＰＣ３、ＰＡＣＥ４、ＰＣ４、ＰＣ５／ＰＣ６、ＬＰＣ／ＰＣ７ＩＰＣ８／ＳＰＣ７及びＳＫＩ－Ｉなど。Ｎａｋａｙａｍａ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．，３２７：６２５－６３５（１９９７））、エンテロキナーゼ（米国特許第５，２７０，１８１号を参照されたい）またはキモトリプシンによって切断されるシグナル（ペプチド）配列を、本明細書に定義されているようなシグナル（ペプチド）配列に導入できる。さらなるシグナルペプチドは、当該技術分野において知られており、シグナルペプチドの選択は、細胞の種類、成長条件、及びペプチドの所望の送達先の影響を受けることがある。

【０１０１】

一態様では、本発明で説明するのは、本明細書に記載されているペプチドをコードする

核酸を含むベクターを発現する細胞である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているベクターを発現する細胞は、ポリペプチドの産生に適する細胞である。ポリペプチドの産生に適する細胞は、原核細胞または真核細胞、例えば、細菌、ウイルス、酵母、真菌、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などであることができる。非限定的な例として、タンパク質を産生させる細胞は、市販されており、例えば、細菌細胞（ＢＬ２１由来細胞－カタログ番号６０４０１－１、Ｌｕｃｉｇｅｎ；Ｍｉｄｄｌｅｔｏｎ，　ＷＩ）と、哺乳動物細胞（２９３　Ｆ細胞－カタログ番号１１６２５－０１９、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；　Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，　ＮＹ）である。

【０１０２】

組み換え分子、例えば、本明細書に記載されているベクターは、細胞に、トランスフォーメーション、特にトランスダクション、コンジュゲーション、リポフェクション、プロトプラスト融合、可動化、粒子ボンバードメント、エレクトロポレーション（Ｎｅｕｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｇｅｎｅ　Ｔｒａｎｓｆｅｒ　ｉｎｔｏ　Ｍｏｕｓｅ　Ｌｙｏｍａ　Ｃｅｌｌｓ　ｂｙ　Ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ　ｉｎ　Ｈｉｇｈ　Ｅｌｅｃｔｒｉｃ　Ｆｉｅｌｄｓ，”ＥＭＢＯ　Ｊ．１（７）：８４１－８４５（１９８２）、Ｗｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｅｌｅｃｔｒｉｃ　Ｆｉｅｌｄ　Ｍｅｄｉａｔｅｄ　Ｇｅｎｅ　Ｔｒａｎｓｆｅｒ，”Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｒｅｓ　Ｃｏｍｍｕｎ　１０７（２）：５８４－５８７（１９８２）、Ｐｏｔｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｅｎｈａｎｃｅｒ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｏｆ　Ｈｕｍａｎ　Ｋａｐｐａ　Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ　Ｇｅｎｅｓ　Ｉｎｔｒｏｄｕｃｅｄ　ｉｎｔｏ　Ｍｏｕｓｅ　ｐｒｅ－Ｂ　Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅｓ　ｂｙ　Ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ，”Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８１（２２）：７１６１－７１６５（１９８４）（これらは、参照により、その全体が本明細書に援用される））、ポリエチレングリコールの媒介によるＤＮＡ取り込み（Ｊｏｓｅｐｈ　Ｓａｍｂｒｏｏｋ　＆　Ｄａｖｉｄ　Ｗ．Ｒｕｓｓｅｌｌ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ　ｃｐ．１６（２ｄ　ｅｄ．１９８９）（参照により、その全体が本明細書に援用される））、またはプロトプラストとその他の実体（例えば、キメラ遺伝子を含むミニ細胞、細胞、リソソームもしくはその他の融合可能な脂質表面の物体）との融合（Ｆｒａｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｌｉｐｏｓｏｍｅ－ｍｅｄｉａｔｅｄ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ｏｆ　Ｔｏｂａｃｃｏ　Ｍｏｓａｉｃ　Ｖｉｒｕｓ　ＲＮＡ　ｉｎｔｏ　Ｔｏｂａｃｃｏ　Ｐｒｏｔｏｐｌａｓｔｓ：Ａ　Ｓｅｎｓｉｔｉｖｅ　Ａｓｓａｙ　ｆｏｒ　Ｍｏｎｉｔｏｒｉｎｇ　Ｌｉｐｏｓｏｍｅ－ｐｒｏｔｏｐｌａｓｔ　Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ，”Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７９（６）：１８５９－１８６３（１９８２）（参照により、その全体が本明細書に援用される））によって導入できる。続いて、目的のタンパク質またはポリペプチドの発現に好適な培地かつ好適な条件下で、その宿主細胞を培養する。培養後、物理的または化学的手段によって、その細胞を破壊し、得られた粗抽出物から、タンパク質またはポリペプチドを精製する。あるいは、培養には、タンパク質またはポリペプチドが、組み換え宿主細胞の培養培地に分泌され、そのタンパク質またはポリペプチドを培養培地から単離する条件を含めてもよい。好適な場合には、代替的な方法を用いてもよい。

【０１０３】

「エンハンサー」及び「増強する」という用語は、ＣＤ８Ｔ細胞と関連する分子に関する場合、分子が、免疫系細胞の活性化を促進することによって、免疫応答を調節する能力を指す。適切なエンハンサーの選択によって、免疫応答の活性化の制御を可能にできる。例示的なエンハンサーとしては、ＩＬ－２のようなサイトカインが挙げられる。「サイトカイン」という用語は、本明細書で使用する場合、免疫調節剤として機能する細胞シグナル伝達分子を指し、当業者であれば認識可能であるインターロイキン及びインターフェロンのようなタンパク質を含む。好適なサイトカインの選択により、適切な条件下で、液性免疫応答または細胞性免疫応答を優先的に誘導できる。

【０１０４】

一実施形態では、エンハンサーは、インターロイキン２（ＩＬ２）、インターロイキン１５（ＩＬ－１５）、ＴＧＦ－ベータ（ＴＧＦ－β）、ＩＬ２－抗ＩＬ－２抗体複合体、及び／または当業者が本開示を読めば認識できるさらなるエンハンサーであることができる。Ｔ細胞の活性化と関連して、エンハンサーの例示的な使用について記載しているＭｉｔｃｈｅｌｌ ｅｔ ａｌ ２０１０（３８）、Ｐｅｒｒｅｔ ｅｔ ａｌ ２００８（３９）及びＫａｍｉｍｕｒａ ｅｔ ａｌ ２００７（４０）の参照文献（それぞれ、参照により、その全体が援用される）を参照されたい。

【０１０５】

特に、いくつかの実施形態では、増強は、個体の樹状細胞によるＣＤ８６の発現及び／またはＩＬ１２の分泌を低下させることによって行う。

【０１０６】

本発明のペプチドは、アジュバントに結合することもできる。「アジュバント」という用語は、免疫応答を増強し、及び／または接種後に適切な吸収速度を促す化合物または混合物を指し、本明細書で使用する場合、任意の取り込み促進剤を含む。アジュバントの非限定的な例としては、ケモカイン（例えば、デフェンシン、ＨＣＣ－１、ＨＣＣ４、ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－３、ＭＣＰ４、ＭＩＰ－１α、ＭＩＰ－１β、ＭＩＰ－１δ、ＭＩＰ－３α、ＭＩＰ－２、ＲＡＮＴＥＳ）、ケモカインレセプターの他のリガンド（例えば、ＣＣＲ１、ＣＣＲ－２、ＣＣＲ－５、ＣＣＲ６、ＣＸＣＲ－１）、サイトカイン（例えば、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７（Ａ－Ｆ）、ＩＬ－１８、ＩＦＮα、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＧＭ－ＣＳＦ）、ＴＧＦ）－β、ＦＬＴ－３リガンド、ＣＤ４０リガンド、これらのサイトカインのレセプターの他のリガンド、Ｔｈ１サイトカイン（ＩＦＮ－γ、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８及びＴＮＦが挙げられるが、これらに限らない）、Ｔｈ２サイトカイン（ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０及びＩＬ－１３が挙げられるが、これらに限らない）、Ｔｈ１７サイトカイン（ＩＬ－１７（Ａ～Ｆ）、ＩＬ－２３、ＴＧＦ－β及びＩＬ－６が挙げられるが、これらに限らない）、細菌ＤＮＡもしくはオリゴヌクレオチドにおける免疫刺激性ＣｐＧモチーフ、リポ多糖類の誘導体（モノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬ）など）、ムラミルジペプチド（ＭＤＰ）及びその誘導体（例えば、ムラブチド、スレオニル－ＭＤＰ、ムラミルトリペプチド、Ｎ－アセチル－ムラミル－Ｌ－スレオニル－Ｄ－イソグルタミン（ｔｈｒ－ＭＤＰ）、Ｎ－アセチル－ノル－ムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミン（ＣＧＰ１１６３７、ノル－ＭＤＰという）、Ｎ－アセチルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミニル－Ｌ－アラニン－２－（１’－２’－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３ヒドロキシホスホリルオキシ）－エチルアミン（ＣＧＰ１９８３５Ａ、ＭＴＰ－ＰＥという））、ＭＦ５９（国際公開第９０／１４８３７を参照されたい）、ポリ［ジ（カルボキシラトフェノキシ）ホスファゼン］（ＰＣＰＰポリマー、米国のＶｉｒｕｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）、ＲＩＢＩ（ＧＳＫ）（２％スクアレン／Ｔｗｅｅｎ８０エマルジョン中に、細菌から抽出した３つの構成要素（モノホスホリルリピドＡ、トレハロースジミコレート及び細胞壁骨格（ＭＰＬ＋ＴＤＭ＋ＣＷＳ））を含む）、ＯＭ－１７４（リピドＡに関連するグルコサミン二糖、スイス、メイランのＯＭ Ｐｈａｒｍａ ＳＡ）、熱ショックタンパク質及びその誘導体、ｅｌＦ４ａのＬｅｉｓｈｍａｎｉａホモログ及びその誘導体、細菌ＡＤＰ－リボシル化外毒素及びその誘導体（例えば、遺伝子変異体、Ａ及び／もしくはＢサブユニット含有断片、化学的にトキソイド化した型）、細菌ＡＤＰ－リボシル化外毒素もしくはその誘導体を含む化学的コンジュゲートもしくは遺伝子組み換え体、Ｃ３ｄタンデムアレイ、リピドＡ及びその誘導体（例えば、モノホスホリルリピドＡ、ジホスホリルリピドＡ、リピドＡアナログ、ＡＧＰ、ＡＳ０２、ＡＳ０４、ＤＣ－Ｃｈｏｌ、Ｄｅｔｏｘ、ＯＭ－１７４）、ＩＳＣＯＭＳ及びサポニン（例えば、Ｑｕｉｌ Ａ、ＱＳ－２１、Ｓｔｉｍｕｌｏｎ（登録商標）（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ））、スクアレン、スーパー抗原、または塩（例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、リン酸カルシウム）が挙げられる。他の有用なアジュバントにつ

いては、Ｎｏｈｒｉａ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ，７：２６１－２６９，１９９４、Ｒｉｃｈａｒｄｓ ｅｔ ａｌ．，ｉｎ Ｖａｃｃｉｎｅ Ｄｅｓｉｇｎ，Ｅｄｓ．、Ｐｏｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ，１９９５及びＰａｓｈｉｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，１１：Ｓ６３－Ｓ６８，４／２００５）も参照されたい。アジュバントのさらなる例としては、ＲＩＢＩアジュバント系（Ｒｉｂｉ Ｉｎｃ．，Ｈａｍｉｌｔｏｎ，ＭＴ．）、アラム、鉱物ゲル（水酸化アルミニウムゲルなど）、水中油型エマルジョン、油中水型エマルジョン（例えば、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバントなど）、ブロックコポリマー（ＣｙｔＲｘ，Ａｔｌａｎｔａ ＧＡ）、ＱＳ－２１（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ｉｎｃ．，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ ＭＡ）、ＳＡＦ－Ｍ（Ｃｈｉｒｏｎ，Ｅｍｅｒｙｖｉｌｌｅ ＣＡ）など）、ＡＭＰＨＩＧＥＮ（登録商標）アジュバント、サポニン、Ｑｕｉｌ Ａまたはその他のサポニン画分、モノホスホリルリピドＡ、アブリジン脂質－アミンアジュバント及びＭＥＴＡＳＴＩＭ（登録商標）を挙げることができる。その他の好適なアジュバントとしては、例えば、表面活性物質（リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、炭化水素エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノールなど）を挙げることができる。

【０１０７】

いくつかの実施形態では、細胞を遺伝子操作して、本明細書に記載されているペプチドを発現させてもよく、その遺伝子操作された細胞を細胞療法に用いてもよい。用いてもよい細胞の例としては、治療上関連する子孫を生み出すことのできる樹状細胞、Ｔリンパ球（Ｔ細胞）、ナイーブＴ細胞（T_N）、メモリーＴ細胞（例えば、セントラルメモリーＴ細胞（T_{CM}）、エフェクターメモリー細胞（T_{EM}））、ナチュラルキラー細胞、造血幹細胞、及び／または多能性胚性／誘導幹細胞が挙げられるが、これらに限らない。一実施形態では、この遺伝子操作細胞は、自己細胞である。例として、本発明の個々のＴ細胞は、ＣＤ４＋／ＣＤ８－、ＣＤ４－／ＣＤ８＋、ＣＤ４－／ＣＤ８－、またはＣＤ４＋／ＣＤ８＋であってよい。これらのＴ細胞は、ＣＤ４＋／ＣＤ８－細胞とＣＤ４－／ＣＤ８＋細胞の混合集団または単一のクローンの集団であってよい。ＣＤ４＋Ｔ細胞は、本発明のペプチドを発現する細胞（例えば、ＣＤ２０＋及び／またはＣＤ１９＋腫瘍細胞）とインビトロで共培養すると、ＩＬ－２、ＩＦＮγ、ＴＮＦα、及びその他のＴ細胞エフェクターサイトカインを産生できる。$CD8^+$Ｔ細胞は、標的細胞とインビトロで共培養すると、抗原特異的標的細胞を溶解させることができる。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、$CD45RA^+CD62L^+$ナイーブ細胞、$CD45RO^+CD62L^+$セントラルメモリー細胞、$CD62L^-$エフェクターメモリー細胞、またはこれらの組み合わせのうちのいずれか１つまたは複数であってもよい（Ｂｅｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｏｐｔｉｖｅ ｔｒａｎｓｆｅｒ ｏｆ ｖｉｒｕｓ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｄ ｔｕｍｏｒ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｔ ｃｅｌｌ ｉｍｍｕｎｉｔｙ．Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００９ ２１（２）２２４－２３２）。

【０１０８】

いくつかの実施形態では、寛容化された抗原提示細胞を細胞療法で用いてもよい。例としては、Ｂ細胞、樹状細胞、マクロファージなどが挙げられる。これらの細胞は、ヒトを含むいずれかに由来するものであってよい。これらの細胞は、本明細書に記載されているペプチドを用いて寛容化されうる。いくつかの実施形態では、これらの細胞は、サイトカインの存在下で寛容化される。

【０１０９】

いくつかの実施形態では、例えば、ＳＬＥを有する対象のアテローム性動脈硬化症（加速性アテローム性動脈硬化症など）を治療し、アテローム性動脈硬化症を阻害し、アテローム性動脈硬化症の重症度を低減し、及び／またはアテローム性動脈硬化症の進行を遅延させるために、本明細書に記載されているペプチドを産生する細胞を対象に投与できる。

【０１１０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているペプチドを含むナノ粒子を対象に

投与できる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているペプチドとともに用いるナノ粒子は、Ｌｅｖｉｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｏｌｙｍｅｒｓｏｍｅｓ：Ａ ｎｅｗ ｍｕｌｔｉ－ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｔｏｏｌ ｆｏｒ ｃａｎｃｅｒ ｄｉａｇｎｏｓｉｓ ａｎｄ ｔｈｅｒａｐｙ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２００８ Ｖｏｌ ４６ ｐｇ ２５－３２に記載されているようなもの、またはＳ Ｊａｉｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｇｏｌｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ａｓ ｎｏｖｅｌ ａｇｅｎｔｓ ｆｏｒ ｃａｎｃｅｒ ｔｈｅｒａｐｙ．Ｂｒ Ｊ Ｒａｄｉｏｌ．２０１２ Ｆｅｂ；８５（１０１０）：１０１－１１３に記載されているようなものであってよい。

【０１１１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているペプチドをコードするベクターを発現する細胞は、対象、例えば、ＳＬＥを有する対象のアテローム性動脈硬化症（加速性アテローム性動脈硬化症など）を治療し、阻害し、その重症度を低減し、及び／またはその進行を遅延させるために遺伝子療法剤を投与する対象の細胞であることができる。遺伝子療法用のベクターは、本明細書の別の箇所に記載されているようなウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを含むことができる。

【０１１２】

本発明のいくつかの実施形態は、番号が付された下記の項のいずれかとして定義することができる。

１．ＳＬＥを有する対象における心血管疾患を治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する方法であって、（ａ）ＡｐｏＢの１つもしくは複数のペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログを含む組成物を用意することと、（ｂ）（ＳＬＥ）を有する対象における心血管疾患を治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進するために、有効量の前記組成物を前記対象に投与することとを含む、前記方法。

２．全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）の治療、阻害、予防、その重症度の低減、その進行の遅延、及び／またはその予防の促進を必要とする対象におけるＳＬＥを治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する方法であって、（ａ）ＡｐｏＢ－１００（「ＡｐｏＢ」）の１つもしくは複数のペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログを含む組成物を用意することと、（ｂ）前記対象におけるＳＬＥを治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進するために、有効量の前記組成物を前記対象に投与することとを含む、前記方法。

３．ＡｐｏＢの前記ペプチドが、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１～ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３０２に示されているＡｐｏＢ－１００のペプチド１～３０２のうちのいずれか１つまたは複数である、項１または２に記載の方法。

４．ＡｐｏＢ－１００の前記ペプチドが、Ｐ２１０（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２１０）である、項３に記載の方法。

５．ＡｐｏＢ－１００の前記ペプチドが、Ｐ４５（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４５）である、項３に記載の方法。

６．前記ペプチドが、コレラ毒素Ｂ（ＣＴＢ）に融合されている、項３に記載の方法。

７．ＳＬＥの治療、阻害、予防、その重症度の低減、その進行の遅延、及び／またはその予防の促進を必要とする対象におけるＳＬＥを治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する方法であって、（ａ）ＡｐｏＢの１つもしくは複数のペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞を含む組成物を用意することと、（ｂ）前記対象におけるＳＬＥを治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進するために、有効量の前記組成物を前記対象に投与すること含む、前記方法。

８．ＳＬＥを有する対象における心血管疾患を治療し、阻害し、予防し、その重症度を

低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進する方法であって、（ａ）ＡｐｏＢの１つもしくは複数のペプチド、またはその誘導体、薬学的等価物、ペプチド模倣体、もしくはアナログによって活性化されたＣＤ８＋Ｔ細胞を含む組成物を用意することと、（ｂ）（ＳＬＥ）を有する対象における心血管疾患を治療し、阻害し、予防し、その重症度を低減し、その進行を遅延させ、及び／またはその予防を促進するために、有効量の前記組成物を前記対象に投与することとを含む、前記方法。

９．ＡｐｏＢの前記ペプチドが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０２に示されているＡｐｏＢのペプチド１～３０２のうちのいずれか１つまたは複数である、項７または８に記載の方法。

１０．ＡｐｏＢの前記ペプチドが、Ｐ２１０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１０）である、項９に記載の方法。

１１．ＡｐｏＢの前記ペプチドが、Ｐ４５（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５）である、項９に記載の方法。

１２．前記ペプチドが、コレラ毒素Ｂ（ＣＴＢ）に融合されている、項７または８に記載の方法。

１３．有効量の１つまたは複数のエンハンサーを投与することをさらに含む、項７または８に記載の方法。

１４．前記エンハンサーが、ＩＬ－２、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＴＧＦ－β、ＩＬ２／抗ＩＬ－２抗体複合体、またはこれらの組み合わせのうちのいずれか１つまたは複数である、項１３に記載の方法。

１５．ＳＬＥを治療する必要のある対象におけるＳＬＥを受動免疫によって治療する方法であって、ＡｐｏＢの少なくとも１つの酸化断片と結合する抗体を用意することと、ＳＬＥを治療するために治療上または予防上有効な量の前記抗体を投与することとを含む、前記方法。

１６．前記抗体がヒト抗体である、項１５に記載の方法。

１７．前記抗体が重鎖可変領域（V_H）及び軽鎖可変領域（V_L）を含み、前記V_H領域がＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０３に示されている配列からなり、前記軽鎖可変領域（V_L）がＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０４に示されている配列からなる、項１６に記載の方法。

１８．ＡｐｏＢの少なくとも１つの酸化断片に結合する有効量の抗体を投与することをさらに含む、項１、２、５または６に記載の方法。

１９．前記抗体がヒト抗体である、項１８に記載の方法。

２０．前記抗体が重鎖可変領域（V_H）及び軽鎖可変領域（V_L）を含み、前記V_H領域がＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０３に示されている配列からなり、前記軽鎖可変領域（V_L）がＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０４に示されている配列からなる、項１９に記載の方法。

２１．前記心血管疾患が、アテローム性動脈硬化症である、項１または８に記載の方法。

２２．前記アテローム性動脈硬化症が、加速性アテローム性動脈硬化症である、項２１に記載の方法。

２３．ＳＬＥを診断する必要のある対象におけるＳＬＥを診断するためのアッセイであって、

前記対象から試料を採取することと、

前記試料をアッセイして、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルを決定することと、

前記自己抗体のレベルが参照値と比べて低い場合に前記対象がＳＬＥを有する可能性が高いと判断するか、または前記自己抗体のレベルが参照値と比べて高い場合に前記対象がＳＬＥを有する可能性が低いと判断することと
を含む、前記アッセイ。

２４．ＳＬＥを有するかまたはＳＬＥを有する疑いのある対象における心血管疾患の可能性を判断するためのアッセイであって、

前記対象から試料を採取することと、

前記試料をアッセイして、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルを決定することと、
前記自己抗体のレベルが参照値と比べて低い場合に前記対象が心血管疾患を有する可能性が高いと判断するか、または前記自己抗体のレベルが参照値と比べて高い場合に前記対象が心血管疾患を有する可能性が低いと判断することと
を含む、前記アッセイ。
２５．イムノアッセイを用いることを含む、項２３または２４に記載のアッセイ。
２６．前記イムノアッセイが、ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、ウエスタンブロッティング、サザンブロッティング、またはこれらの組み合わせのうちのいずれか１つまたは複数である、項２５に記載のアッセイ。
２７．前記試料が、血液、血漿、尿、組織、またはこれらの組み合わせである、項２３または２４に記載のアッセイ。
２８．ＳＬＥに対する治療の前、最中、または後に、前記試料を採取する、項２７に記載のアッセイ。
２９．前記対象がヒトである、項２３または２４に記載のアッセイ。
３０．前記参照値が、ＳＬＥを有しない対象の集団におけるＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルの平均値または中央値である、項２３または２４に記載のアッセイ。
３１．前記参照値が、異なる時点に前記対象から採取した試料におけるＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルの平均値または中央値である、項２３または２４に記載のアッセイ。
３２．前記参照値が、ＳＬＥを有しかつＳＬＥに対する治療を受けたことがあるかまたは受けている対象の集団におけるＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルの平均値または中央値である、項２３または２４に記載のアッセイ。
３３．前記参照値が、ＳＬＥを有しかつＳＬＥに対する治療を受けたことがあるかまたは受けており、かつ心血管疾患に対する治療を受けたことがなく受けてもいない対象の集団におけるＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルの平均値または中央値である、項２３または２４に記載のアッセイ。
３４．前記心血管疾患が、アテローム性動脈硬化症である、項２４に記載のアッセイ。
３５．前記アテローム性動脈硬化症が、加速性アテローム性動脈硬化症である、項３４に記載のアッセイ。
３６．可溶形態のアポトーシスシグナル伝達レセプターであるＦａｓ、ＴＮＦ－Ｒ１、及び／またはＴＲＡＩＬ－Ｒ２のレベルを決定することと、前記アポトーシスシグナル伝達レセプターのレベルが参照値と比べて高い場合に前記対象がＳＬＥを有する可能性が高いと判断するか、または前記アポトーシスシグナル伝達レセプターのレベルが参照値と比べて低い場合に前記対象がＳＬＥを有する可能性が低いと判断することとをさらに含む、項２３に記載のアッセイ。
３７．ＳＬＥに対する治療の有効性を判断する必要のある対象におけるＳＬＥに対する治療の有効性を判断するためのアッセイであって、
前記対象から試料を採取することと、
前記試料をアッセイして、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルを決定することと、
前記自己抗体のレベルが参照値と比べて高い場合に前記治療が有効であると判断するか、または前記自己抗体のレベルが参照値と比べて低い場合に前記治療が有効ではないと判断することと
を含む、前記アッセイ。
３８．ＳＬＥを有する対象における心血管疾患に対する治療の有効性を判断するためのアッセイであって、
前記対象から試料を採取することと、
前記試料をアッセイして、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルを決定することと、

前記自己抗体のレベルが参照値と比べて高い場合に前記治療が有効であると判断するか、または前記自己抗体のレベルが参照値と比べて低い場合に前記治療が有効ではないと判断することと
を含む、前記アッセイ。
３９．ＳＬＥを診断する必要のある対象におけるＳＬＥを診断するためのアッセイであって、
前記対象から試料を採取することと、
前記試料をアッセイして、可溶形態のアポトーシスシグナル伝達レセプターであるＦａｓ、ＴＮＦ－Ｒ１、及び／またはＴＲＡＩＬ－Ｒ２のレベルを決定することと、
前記アポトーシスシグナル伝達レセプターのレベルが参照値と比べて高い場合に前記対象がＳＬＥを有する可能性が高いと判断するか、または前記アポトーシスシグナル伝達レセプターのレベルが参照値と比べて低い場合に前記対象がＳＬＥを有する可能性が低いと判断することと
を含む、前記アッセイ。
４０．前記試料をアッセイして、ＡｐｏＢ－１００に対する自己抗体のレベルを決定することと、前記自己抗体のレベルが参照値と比べて低い場合に前記対象がＳＬＥを有する可能性が高いと判断するか、または前記自己抗体のレベルが参照値と比べて高い場合に前記対象がＳＬＥを有する可能性が低いと判断することとをさらに含む、項３９に記載のアッセイ。
４１．ＳＬＥを有するかまたはＳＬＥを有する疑いのある対象における心血管疾患の可能性を判断するためのアッセイであって、
前記対象から試料を採取することと、
前記試料をアッセイして、可溶形態のアポトーシスシグナル伝達レセプターであるＦａｓ、ＴＮＦ－Ｒ１、及び／またはＴＲＡＩＬ－Ｒ２のレベルを決定することと、
前記アポトーシスシグナル伝達レセプターのレベルが参照値と比べて高い場合に前記対象が心血管疾患を有する可能性が高いと判断するか、または前記アポトーシスシグナル伝達レセプターのレベルが参照値と比べて低い場合に前記対象が心血管疾患を有する可能性が低いと判断することと
を含む、前記アッセイ。
【実施例】
【０１１３】
下記の実施例は、本発明の特許請求の範囲を限定するようには意図されておらず、むしろ、特定の実施形態を例示するように意図されている。例示されている方法の変形形態であって、当業者が思いつくいずれの変形形態も、本発明の範囲内であるように意図されている。
【０１１４】
実施例１：雌ｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスにおけるＣＶＸ－１２の有効性試験
本発明者は、キャリアタンパク質（ｃＢＳＡ）にコンジュゲートされているヒトａｐｏＢ－１００由来ペプチドｐ２１０を含みかつアジュバント（アラム）が配合されているプロトタイプワクチンＣＶＸ－２１０－Ｂ（ＣＶＸ－１２）のアテローム形成抑制作用を所定の系統のマウスで試験した。
【０１１５】
本明細書に記載されているように、ＡｐｏＢペプチドワクチンＣＶＸ－１２は、アテローム性動脈硬化症のマウスモデルにおいてアテローム形成抑制に有益性を有することが示されている。本発明者らは、これらの有益性は加速性アテローム性動脈硬化症を有するループスマウスモデル（ｇｌｄ及びｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－系統）にまで及ぶのではないかという仮説を立て、これらのマウスにおいて、ＣＶＸ－１２（１ｍＬ当たり１．０ｍｇのコンジュゲートで調合した製剤２１（ＣＶＸ－２１０－Ｂ）：Ｐ－Ｃ－Ａ比は１－１－６．９であり、０．２ｍＬ投与した）による免疫が、アテローム性動脈硬化症、脾細胞免疫細胞集団及びサイトカインの産生、ならびに自己免疫疾患の表現型に及ぼす影響を本発明

者らは調べた。ａｐｏＥ－／－マウスにおいて、ＣＶＸ－１２による免疫によって動脈硬化性プラークの範囲が減少した。通常食で飼育したｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスにおいて、ＣＶＸ－１２によって抗核抗体反応性が低下した。

【０１１６】

ｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウス系統は、全身性エリテマトーデスを背景とする加速性アテローム性動脈硬化症の許容可能なモデルである。この試験で使用した試験物質は、その潜在的なアテローム形成抑制作用を上記のモデルにおいて明らかにするためのものであった。

【０１１７】

実験方法

この試験では、２ｍｇ／ｍｌのＰ２１０コンジュゲート（ＣＶＸ－３－８４）または２．１ｍｇ／ｍｌのＰ２１０－Ｂコンジュゲート（ＣＶＸ－３－１２３）のいずれかの濃度のＣＶＸ－１２を使用した。ロシグリタゾン（Ｒｏ）をポジティブコントロールとして使用した。

【０１１８】

ビヒクルと試験物質は、４℃で保存した。試験物質は、Ｐ２１０－Ｂの入った０．５ｍｌバイアルに、０．５ｍＬのアラムアジュバントを滅菌シリンジで分注することによって調製した。このようにして組み合わせたものが均一になるまで、ピペッティングによって混合した。アラムコントロールは、保存バイアルから直接投与した。

【０１１９】

自家作製ポジティブコントロールとして使用するロシグリタゾンは、通常食中で投与するものとして調製した。８ｍｇのロシグリタゾン錠剤を乳鉢と乳棒によって粉砕し、通常食に混ぜた（餌１ｋｇ当たりに５０ｍｇのロシグリタゾン）。ロシグリタゾン食は、４℃で保存した。

【０１２０】

実験設計

この試験では、ＡｐｏＥ$^{-}$／$^{-}$（ｎ＝６０）、ｇｌｄ（ｎ＝６０）、及びｇｌｄ．ＡｐｏＥ$^{-}$／$^{-}$（ｎ＝２００）という３系統の雌マウスを評価した。試験を行ったマウスの総数は、３２０匹であった。ｇｌｄマウスは、ＦａｓリガンドＦａｓＬ）（レセプターであるＦａｓに結合してアポトーシスを誘導する死因子である）に変異を有するマウスである。ｇｌｄマウスでは、自己免疫疾患の加速が見られ、ｇｌｄマウスは、ＳＬＥを研究するためのマウス種として使用できる。

【０１２１】

マウスには、通常食を与えるか、通常食と高コレステロール食（コレステロール０．２０％、脂肪２１％）を組み合わせて与えるかした。後者の群では、０日目（７週齢）から４１日目までの免疫期間を通じて、１５０匹の雌マウス（６０匹のＡｐｏＥ$^{-}$／$^{-}$と９０匹のｇｌｄ．ＡｐｏＥ$^{-}$／$^{-}$）を通常食で飼育した。４２日目に餌を高コレステロール食に変えて、安楽死させるまで、これを継続した。通常食のみの群では、１７０匹の雌マウス（６０匹のｇｌｄと９０匹のｇｌｄ．ＡｐｏＥ$^{-}$／$^{-}$）と、ポジティブコントロール群としての追加の２０匹のｇｌｄ．ＡｐｏＥ$^{-}$／$^{-}$に、試験期間にわたって（０日目から安楽死させるまで）通常食を与えた。

【０１２２】

試験物質を投与した各マウスには、０日目（７週齢）に背側肩胛骨間区域の皮下で一次免疫を行ってから、２１日目（１０週齢）と３５日目（１２週齢）に追加免疫を行った。ＣＶＸ－３－８４を用いて、ＡｐｏＥ$^{-}$／$^{-}$（ｎ＝２０）マウス、ｇｌｄマウス（ｎ＝２０）に投与した。ＣＶＸ－３－１２３を用いて、ｇｌｄ．ＡｐｏＥ$^{-}$／$^{-}$（高コレステロール食のｎ＝３０、通常食のｎ＝３０）に投与した。

【０１２３】

ポジティブコントロール群の２０匹のｇｌｄ．ＡｐｏＥ$^{-}$／$^{-}$マウスには、０日目（７週齢）から、ロシグリタゾンを１０ｍｇ／ｋｇ／日、通常食中で経口投与し、これを調査

期間にわたって継続した。ロシグリタゾンを投与したマウスは、１２６日目（２５週齢）に犠死させた。

【０１２４】

通常食を与えたｇｌｄマウス、ＡｐｏＥ－／－マウス及びｇｌｄ．ＡｐｏＥ－／－マウスは、１２６日目（２５週齢）に安楽死させた。高コレステロール食を与えたｇｌｄ．ＡｐｏＥ－／－は、１２６日目（２５週齢）または９８日目（２１週齢）のいずれかに犠死させた。高コレステロール食を与えたｇｌｄ．ＡｐｏＥ－／－系統のマウスで重篤な疾患が観察されたため、この群の生存期間は、１２６日（２５週齢）から９８日（２１週齢）に短縮した。これらのマウスの終了時が早くなった結果、高コレステロール食の期間は、８４日から５６日に短縮した。

【０１２５】

ａｐｏＥ－／－実験マウス及びｇｌｄ実験マウス（それぞれｎ＝６０）はいずれも、試験に参加させる前の馴化期間が１週間であった。

【０１２６】

マウスは、出生日に基づいて試験に参加させ、出生日の一致するマウスを試験物質とコントロールのコホート（すなわちＰＢＳ、アラム及びＣＶＸ－１２）に分けて、各終了時の日に、日にちの一致したコントロールを得た。すべてのマウスの健康状態を獣医のスタッフが１日単位でモニタリングした。

【０１２７】

マウスには、表２のスケジュールに従って投与を行った。

（表２）試験物質の投与

マウスモデル	N (320)	食餌	製剤番号	試験物質	コンジュゲート (mg/mL)	コンジュゲート (mg/投与)	アルミニウム (mg/投与)	投与量 (mL)	一連の投与日 (日目)	犠死 (日目)
ApoE$^{-/-}$	20	0～41日目に通常食、42～126日目にHC食	A	PBS コントロール	0	0	0	0.2	0, 21, 35	126
ApoE$^{-/-}$	20	0～41日目に通常食、42～126日目にHC食	B	アラム コントロール	0	0	1.38	0.2	0, 21, 35	126
ApoE$^{-/-}$	20	0～41日目に通常食、42～126日目にHC食	21	CVX-210-B	1.0	0.2	1.38	0.2	0, 21, 35	126
Gld	20	0～126日目に通常食	A	PBS コントロール	0	0	0	0.2	0, 21, 35	126
Gld	20	0～126日目に通常食	B	アラム コントロール	0	0	1.38	0.2	0, 21, 35	126
Gld	20	0～126日目に通常食	21	CVX-210-B	1.0	0.2	1.38	0.2	0, 21, 35	126
gld.ApoE$^{-/-}$	30	0～41日目に通常食、42～126日目にHC食	A	PBS コントロール	0	0	0	0.2	0, 21, 35	98または126[a]
gld.ApoE$^{-/-}$	30	0～41日目に通常食、42～126日目にHC食	B	アラム コントロール	0	0	1.38	0.2	0, 21, 35	98または126[a]
gld.ApoE$^{-/-}$	30	0～41日目に通常食、42～126日目にHC食	21	CVX-210-B	1.0	0.2	1.38	0.2	0, 21, 35	98または126[a]
gld.ApoE$^{-/-}$	30	0～126日目に通常食	A	PBS コントロール	0	0	0	0.2	0, 21, 35	126
gld.ApoE$^{-/-}$	30	0～126日目に通常食	B	アラム コントロール	0	0	1.38	0.2	0, 21, 35	126
gld.ApoE$^{-/-}$	30	0～126日目に通常食	21	CVX-210-B	1.0	0.2	1.38	0.2	0, 21, 35	126
gld.ApoE$^{-/-}$	20	0～126日目に通常食	R	ロシグリタゾン*	0	0	0	*	0 - 126	126

【０１２８】

上記の表２では、１）投与する用量を標準化するために、６．９ｍｇ　Ａｌ／ｍＬの濃

度の５０％希釈液を用いて、アラム（Ｉｍｊｅｃｔ　Ａｌｕｍ）アジュバントストック溶液を調製する。２）製剤２１（ＣＶＸ－２１０－Ｂ）は、１ｍＬ当たり１．０ｍｇのコジュゲートで調合したものであり、Ｐ－Ｃ－Ａ（ペプチド、コンジュゲート、アジュバント）の比率は１－１－６．９である。製剤ＡはＰＢＳコントロールである。製剤Ｂはアラムである。３）アスタリスク（＊）は、１０ｍｇ／ｋｇ／日の用量で通常食中で経口投与されるポジティブコントロール（ロシグリタゾン）を示している。４）上付きの「ａ」は、高コレステロール食を与えたｇｌｄ．ＡｐｏＥ$^{-/-}$系統マウスにおいてストレスレベルが高かったため、この群の生存期間を１２６日（２５週齢）から９８日（２１週齢）に短縮したことを示している。同様に、高コレステロール食の期間は８４日から５６日に短縮した。

【０１２９】

ケージサイドでの観察：いずれのマウスも、病的状態、死亡、損傷、及び餌と水の摂取について、少なくとも１日に２回観察した。試験期間中、場合によっては、獣医による診察を行った。すべての治療と観察を記録した。

【０１３０】

詳細な臨床観察：投与日と、投与の３日後と、投与と投与の間に１週間に１度、臨床観察結果を記録した。

【０１３１】

体重：無作為化の前と、試験中、週に１回、すべてのマウスの体重を測定及び記録した。ケージごとに、餌摂取量を週に１回ベースで測定し、マウス１匹当たりの摂取量を算出した。

【０１３２】

身体診察：スタッフの獣医による予備試験によって、すべてのマウスに対して、全身の身体診察を行った。

【０１３３】

血清解析：試験の６３日目（１６週齢）に、血清と尿を採取した。試験の６３日目に採取した血清の抗Ｐ２１０　ＩｇＭ抗体と抗Ｐ２１０　ＩｇＧ抗体について解析した。通常食で飼育したｇｌｄ．ａｐｏＥ$^{-/-}$マウスにおいては、酸化リン脂質のレベルも測定した。

【０１３４】

検死評価：安楽死の際に、血清と尿を採取した。終了時血清の抗核抗体（ＡＮＡ）力価、総コレステロール、トリグリセリド、抗Ｐ２１０　ＩｇＭ抗体、及び抗Ｐ２１０　ＩｇＧ抗体について解析した。通常食で飼育したｇｌｄ．ＡｐｏＥ$^{-/-}$マウスから得た終了時血清では、抗カルジオリピン抗体についても解析した。抗核抗体力価は、ＮＯＶＡ－ｌｉｔｅ　Ｈｅｐ２　ＡＮＡのアッセイを用いて試験し、１：１００、１：１０００、１：１００００、１：３００００及び１：９００００という血清希釈率で、ヒト上皮細胞に対する核局在化抗体反応性について試験した。反応性は、ＦＩＴＣコンジュゲートヤギ抗マウスＩｇＧ抗体を用いて検出した。ＡＮＡは、各力価における、抗体シグナルの有無に基づきスコア化した。総コレステロールは、コレステロールＥ試薬をメーカーのプロトコールに従って用いて評価した。トリグリセリドレベルは、トリグリセリド試薬と、標準物質のグリセロールによって評価した。抗Ｐ２１０抗体は、ＥＬＩＳＡによって、再構成したＰ２１０ペプチドを用いて検出した。

【０１３５】

リンパ節と脾臓を摘出し、計量した。脾細胞を単離し、調節性Ｔ細胞集団について、免疫蛍光染色とフローサイトメトリーによって解析した。また、脾細胞を培養して、Ｍｏｕｓｅ　Ｔ－Ａｃｔｉｖａｔｏｒ　ＣＤ３／ＣＤ２８によって、Ｔ細胞をインビトロで活性化させた。活性化Ｔ細胞によるサイトカインＩＮＦ－γ、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２及びＴＧＦ－βの産生をイムノアッセイで評価した。

【０１３６】

腎臓を固定し、切断し、ヘマトキシリンとエオシンで染色して、糸球体係蹄のサイズと

細胞数を評価した。ｅｎ　ｆａｃｅによるオイルレッドＯ染色を行った調製済み大動脈と、オイルレッドＯ染色した大動脈起始部切片によって、アテローム性動脈硬化症の程度を定量した。

【０１３７】

下記の表３には、この試験における統計解析で用いた一連の比較群が定められている。

【０１３８】

（表３）統計解析比較

群	比較群
製剤A（PBSコントロール）	異なるマウスモデルから得た全ての製剤A群
製剤B（アラム）	異なるマウスモデルから得た全ての製剤B群
製剤21（CVX-210-B または CVX-12）	異なるマウスモデルから得た全ての製剤21群
各マウスモデル内	製剤21 vs. 製剤B vs. 製剤A

【０１３９】

死亡：ＰＢＳまたはアラムで処置した２匹のａｐｏＥ－／－マウスと１匹のｇｌｄマウスは、猫背の姿勢と運動性の低下により、安楽死させた。通常食を与えた１９匹のｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスと、ウェスタン食を与えた３７匹のｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスと、ロシグリタゾンで処置した７匹のｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスは、健康状態の懸念により、安楽死させたか、または犠死予定日前に死亡していることが分かった。予定外の死亡は、処置群間（ＰＢＳ、アラム及びＣＶＸ－１２）で見られ、ＣＶＸ－１２は、予定外の死亡の発生に影響を及ぼさなかった。

【０１４０】

体重と臓器重量：体重データは、図１に示されている。平均飼料消費測定値は、図２に示されている。試験物質と関連する体重変化または餌摂取量変化は見られなかった。すべての群で、マウスにおける正常範囲内の体重変動が見られた。

【０１４１】

試験の中間時点（６３日目）と終了時点（安楽死時点）に、抗Ｐ２１０　ＩｇＭと抗Ｐ２１０　ＩｇＧのレベルを評価したところ、ｇｌｄまたはａｐｏＥ－／－におけるレベルは、アラムまたはＣＶＸ－１２の処置を行っても変化しなかった（表４）。ｇｌｄマウスにおける抗Ｐ２１０　ＩｇＧレベルは、ａｐｏＥ－／－マウスにおけるＩｇＧレベルよりも元々高い。ａｐｏＥ－／－マウスにおいては、抗Ｐ２１０　ＩｇＭの全体的なレベルは、処置群（ＰＢＳ、アラム及びＣＶＸ－１２）にかかわらず、中間時点と終了時点との間で、時間とともに低下した。これに対して、ｇｌｄマウスにおいて、抗Ｐ２１０　ＩｇＧレベルは、３つのすべての処置群（ＰＢＳ、アラム及びＣＶＸ－１２）において、中間時点と終了時点の解析間で、時間とともに上昇した。

【０１４２】

（表４）ｇｌｄマウスとａｐｏＥ－／－マウスにおける抗Ｐ２１０抗体の相対的なレベル。値は、４０５ｎｍにおける抗Ｐ２１０　ＯＤ±ＳＥＭである。[a]中間時点と終了時点との比較において、ｐ＜０．０５である。

	中間時点		終了時点	
	IgM	IgG	IgM	IgG
apoE$^{-/-}$ PBS	3.37 ± 0.014	0.73 ± 0.19	2.60 ± 0.19 [a]	0.47 ± 0.05
apoE$^{-/-}$ アラム	3.34 ± 0.15	1.27 ± 0.47	2.37 ± 0.19 [a]	0.47 ± 0.06
apoE$^{-/-}$ CVX-12	3.29 ± 0.14	0.90 ± 0.24	2.38 ± 0.22 [a]	0.38 ± 0.04 [a]
gld PBS	3.29 ± 0.14	1.28 ± 0.19	3.20 ± 0.19	2.75 ± 0.26 [a]
gld アラム	3.78 ± 0.11	1.37 ± 0.53	3.34 ± 0.20	2.78 ± 0.27 [a]
gld CVX-12	3.23 ± 0.15	1.46 ± 0.22	3.61 ± 0.12	3.14 ± 0.20 [a]

【０１４３】

ＣＶＸ－１２で免疫したｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスでは、抗Ｐ２１０抗体は、増加しなかった（表５）。しかし、ウェスタン食を与えたｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスでは、ＣＶＸ－１２による免疫によって、抗Ｐ２１０　ＩｇＭは減少した。ロシグリタゾンによる処置でも、抗Ｐ２１０　ＩｇＭ抗体に対する同様の作用が見られ、ｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－において、この抗体のレベルが、通常食または高コレステロール食のいずれのプロトコールのＰＢＳ処置マウスよりも低下した。

【０１４４】

（表５）ｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスにおける抗Ｐ２１０抗体の相対的なレベル。値は、４０５ｎｍにおける抗Ｐ２１０　ＯＤ±ＳＥＭである。[a]中間時点と終了時点との比較において、ｐ＜０．０５である。[b]通常食（ＮＤ）とウェスタン食（ＷＤ）との比較においては、ｐ＜０．０５である。[c]治療とＰＢＳコントロールとの比較においては、ｐ＜０．０５である。

	中間時点		終了時点	
	IgM	IgG	IgM	IgG
gld.apoE$^{-/-}$ (ND) PBS	0.60 ± 0.03	0.57 ± 0.05	0.58 ± 0.04	0.66 ± 0.06
gld.apoE$^{-/-}$ (ND) アラム	0.59 ± 0.02	0.55 ± 0.04	0.50 ± 0.03 [a]	0.61 ± 0.04
gld.apoE$^{-/-}$ (ND) CVX-12	0.62 ± 0.03	0.59 ± 0.05	0.53 ± 0.04	0.65 ± 0.04
gld.apoE$^{-/-}$ (WD) PBS	0.76 ± 0.04[b]	0.57 ± 0.06	0.66 ± 0.04	0.69 ± 0.04
gld.apoE$^{-/-}$ (WD) アラム	0.70 ± 0.02[b]	0.55 ± 0.05	0.61 ± 0.04 [a]	0.76 ± 0.05 [a]
gld.apoE$^{-/-}$ (WD) CVX-12	0.64 ± 0.05	0.54 ± 0.06	0.53 ± 0.03 [c]	0.69 ± 0.05
ロシグリタゾン	0.64 ± 0.03	0.68 ± 0.07	0.42 ± 0.06 [a,c]	0.68 ± 0.07

【０１４５】

ＡｐｏＢ１００に由来するペプチドは、病原性Ｔ細胞に対する抗原であると考えられているので、これらのペプチドは、病原性Ｔ細胞の応答に対する免疫寛容を誘導できると考えられる。本発明者らは、リードアウトとして、ＡｐｏＢ１００関連抗原に対する抗体の減少が見られると予測した。そして、通常食を与えたｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスでは、ａｐｏＢと、酸化リン脂質（ＯｘＰＬ）（Ｅ０６抗体によって測定した）を測定したところ、ＣＶＸ－１２の投与によりｏｘＰＬが有意に増加したことが明らかになり（図３）、このことは、免疫による効果があったことを示している。

【０１４６】

抗核抗体力価：通常食を与えたｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスでは、ＣＶＸ－１２によ

る免疫によって、抗核抗体力価が低下した（図４）。このことは、ＣＶＸ－１２がループス疾患に効果があることを示しているが、ループス疾患へのＣＶＸ－１２の適用は、これまで試験されたことはなかった。

【０１４７】

抗カルジオリピン解析：通常食を与えたＣＶＸ－１２免疫ｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスにおいて抗核抗体力価が低下したので、抗カルジオリピン抗体反応性も評価した（図５）。本発明者らは、通常食を与えたＣＶＸ－１２免疫ｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスにおいて、抗カルジオリピン抗体は有意には低下しなかったものの低下する傾向にあることを観察した。これらのデータは、試料サイズが大きいほど統計的に有意な作用が見られる可能性のあることを示唆している。

【０１４８】

検死評価：ｅｎ　ｆａｃｅによる大動脈プラーク及び大動脈起始部プラークの測定値は、図６と図７に示されている。ｇｌｄマウスでは、アテローム性動脈硬化病巣が発現しなかったとともに、これらのマウスでは、ＣＶＸ－１２によって、自然発生性病変の形成が誘発されなかった。ａｐｏＥ－／－マウスでは、アテローム性動脈硬化病巣のｅｎ　ｆａｃｅによる割合は処置群間で同程度であったが、大動脈起始部切片の測定値によって、ａｐｏＥ－／－マウスにおけるアテローム動脈硬化性プラークの深さがアラムとＣＶＸ－１２による免疫によって低減されたことが示された。ｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスでは、病巣のｅｎ　ｆａｃｅによる測定によって定量したアテローム性動脈硬化病巣の割合は、ＣＶＸ－１２による影響をコントロールマウスよりも受けなかった。通常食で飼育したｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスでは、アラムとＣＶＸ－１２のいずれで処置した場合でも、病巣面積の縮小傾向が観察されたが、これらの変化は、統計的に有意なものではなかった。

【０１４９】

臓器重量：脾臓とリンパ節の重量が図８に示されている。ｇｌｄマウスでは、ＣＶＸ－１２による免疫によって、顎下リンパ節のサイズが拡大したが、ａｐｏＥ－／－またはｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスでは、リンパ節のサイズに対する影響はなかった。ＣＶＸ－１２は、脾臓のサイズには影響を及ぼさなかった。

【０１５０】

腎臓解析：自己免疫を増強したｇｌｄマウスとｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスにおいて、腎臓糸球体係蹄面積を測定した（図９）。通常食またはウェスタン食のいずれかを与えたｇｌｄまたはｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスでは、平均糸球体係蹄面積は、ＣＶＸ－１２による免疫の影響を受けなかった。

【０１５１】

脾細胞解析：ＣＶＸ－１２による免疫は、Ｔ細胞によるサイトカインの放出の調節を介して、アテローム性動脈硬化症に作用するという仮説が立てられている。したがって、ＣＤ３及びＣＤ２８によって活性化した培養脾細胞によるサイトカインの放出を、サイトカインＩＦＮγ、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２（ｐ７０）及びＴＮＦαについて評価した（表６～１２）。ＣＶＸ－１２による免疫によって、ａｐｏＥ－／－マウスでは、脾臓Ｔ細胞からのサイトカインのＩＬ－６とＩＬ－１０の放出が増大した。ｇｌｄマウスでは、アッセイしたサイトカインのレベルは、ＣＶＸ－１２による免疫による影響を受けなかった。ｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスの脾細胞によるＩＦＮγとＩＬ－６の産生は、ロシグリタゾンによって低減されたが、通常食を与えたｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－の脾細胞によるＩＦＮγの放出は、ＣＶＸ－１２による処置によって増大した。ウェスタン食を与えたｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスをＣＶＸ－１２によって免疫したところ、ｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－の脾細胞から放出されるＩＬ－１０が減少した。

【０１５２】

（表６）ａｐｏＥ－／－マウスの脾臓Ｔ細胞からのサイトカインの産生量。すべての値は、ｐｇ／ｍＬである。＊ＰＢＳとの比較において、Ｐ＜０．０５である。

		IFN-γ			IL-6			IL-10			IL-12 (p70)			TNFα		
		PBS	アラム	CVX-12	PBS	アラム	CVX-12	PBS	アラム	CVX-12	PBS	アラム	CVX-12	PBS	アラム	CVX-12
刺激なし	Avg	33.9	581.0	845.0	269.9	549.0	893.1*	34.8	43.1	85.8*	52.2	12.0	12.3	8.0	23.3	7.5
	SEM	±19.5	±385.6	±23.0	±121.8	±124.8	±182.2	±12.3	±9.5	±10.1	±40.4	±0.5	±0.7	±4.3	±14.8	±0.9
刺激あり	Avg	12545	11411	12507	1689.6	3861.0*	2925.2*	1206.7	1390.2	1676.3*	12.9	12.9	13.6	75.7	540.9	80.7
	SEM	±716.7	±1027.1	±683.9	±295.4	±828.8	±350.3	±144.3	±314.3	±171.3	±0.4	±0.6	±0.7	±4.0	±265.1	±4.8

【０１５３】

（表７）ｇｌｄマウスの脾臓Ｔ細胞からのサイトカインの産生量。すべての値は、ｐｇ／ｍＬである。

		IFN-γ			IL-6			IL-10			IL-12 (p70)			TNFα		
		PBS	アラム	CVX-12	PBS	アラム	CVX-12	PBS	アラム	CVX-12	PBS	アラム	CVX-12	PBS	アラム	CVX-12
刺激なし	Avg	171.0	112.6	82.9	302.4	576.5	152.4	142.9	147.5	74.1	434.0	233.4	169.7	8.4	57.9	3.7
	SEM	±55.9	±48.8	±48.1	±99.7	±323.4	±43.9	±34.8	±65.8	±22.2	±153.4	±155.6	±73.1	±4.5	±38.0	±0.4
刺激あり	Avg	11145	12509	13780	2115.5	2290.4	1538.3	945.5	1132.5	1255.3	451.4	142.7	254.2	46.7	106.9	49.9
	SEM	±894.4	±1119.7	±1098.7	±246.9	±462.2	±217.4	±127.1	±187.5	±198.3	±152.7	±47.0	±139.0	±6.8	±43.8	±5.0

【０１５４】

（表８）ｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスの脾臓Ｔ細胞からのＩＦＮ－γの産生量。すべての値は、ｐｇ／ｍＬである。＊通常食、ＰＢＳの場合との比較において、Ｐ＜０．０５である。

		通常食			ウェスタン食			
		PBS	アラム	CVX-12	PBS	アラム	CVX-12	ロシグリタゾン
刺激なし	Avg	65.9	79.8	85.4	127.9	139.0	132.3	24.2*
	SEM	±9.4	±23.7	±19.3	±83.3	±52.8	±56.3	±8.4
刺激あり	Avg	12053.5	11111.9	14852.3*	12957.2	13721.5	9755.3	11419.9
	SEM	±1047.4	±1202.1	±421.0	±1431.8	±679.1	±1745.3	±2002.3

【０１５５】

（表９）ｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスの脾臓Ｔ細胞からのＩＬ－６の産生量。すべての値は、ｐｇ／ｍＬである。＊通常食とＰＢＳの場合との比較において、Ｐ＜０．０５

である。

		通常食			ウェスタン食			
		PBS	アラム	CVX-12	PBS	アラム	CVX-12	ロシグリタゾン
刺激なし	Avg	612.3	542.1	674.8	572.0	1024.0	1855.2	255.9*
	SEM	±98.8	±121.1	±268.3	±127.2	±315.5	±731.9	±84.6
刺激あり	Avg	2642.1	2972.8	2703.0	2556.8	3208.1	3476.3	385.0*
	SEM	±309.7	±701.4	±539.4	±450.4	±511.1	±771.7	±79.0

【０１５６】

（表１０）ｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスの脾臓Ｔ細胞からのＩＬ－１０の産生量。すべての値は、ｐｇ／ｍＬである。＊ウェスタン食、アラム及び通常食、ＣＶＸ－１２の場合との比較において、Ｐ＜０．０５である。

		通常食			ウェスタン食			
		PBS	アラム	CVX-12	PBS	アラム	CVX-12	ロシグリタゾン
刺激なし	Avg	147.5	177.3	158.1	302.8	230.4	215.6	196.0
	SEM	±24.4	±42.4	±42.4	±156.8	±84.5	±89.2	±100.6
刺激あり	Avg	1603.7	1472.1	1723.3	1696.9	1671.0	1023.5*	1528.3
	SEM	±240.7	±224.3	±194.2	±323.9	±237.0	±188.0	±233.9

【０１５７】

（表１１）ｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスの脾臓Ｔ細胞からのＩＬ－１２（ｐ７０）の産生量。すべての値は、ｐｇ／ｍＬである。

		通常食			ウェスタン食			
		PBS	アラム	CVX-12	PBS	アラム	CVX-12	ロシグリタゾン
刺激なし	Avg	121.1	160.2	145.9	427.4	212.0	404.7	89.2
	SEM	±39.7	±51.0	±61.8	±281.2	±83.2	±223.7	±40.3
刺激あり	Avg	147.9	235.0	70.1	743.1	148.7	225.3	44.7
	SEM	±64.7	±124.0	±19.1	±414.1	±48.5	±131.4	±30.0

【０１５８】

（表１２）ｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスの脾臓ＴＮＦαの産生量。すべての値は、ｐｇ／ｍＬである。

		通常食			ウェスタン食			
		PBS	アラム	CVX-12	PBS	アラム	CVX-12	ロシグリタゾン
刺激なし	Avg	9.4	29.4	11.4	7.5	25.0	4.6	8.9
	SEM	±1.2	±17.0	±2.1	±1.3	±18.6	±0.6	±1.5
刺激あり	Avg	50.1	42.9	58.3	59.0	68.4	53.5	39.5
	SEM	±6.0	±4.3	±6.8	±7.4	±26.5	± 18.0	±8.7

【０１５９】

ＣＶＸ－１２による免疫によって、通常食を与えたｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－マウスにおいて、抗核抗体力価レベルが低下したことから、心血管疾患を伴うかにかかわらず、ＳＬＥ患者の治療に対するＣＶＸ－１２の利用可能性が示された。ウェスタン食を与えたｇｌｄ．ａｐｏＥ－／－では、ＣＶＸ－１２によって、抗ｐ２１０　ＩｇＭが減少した。腎機能障害の第１の測定値としての糸球体係蹄面積は、正の方向でも負の方向でも、アラムまたはＣＶＸ－１２による処置の影響を受けなかった。総合すると、ループスに関連する加速性アテローム性動脈硬化症を有するループスマウスモデルでのＣＶＸ－１２による免疫は、安全とみられるとともに、抗核抗体力価を有効に低下させる。

【０１６０】

実施例２：可溶性Ｄｅａｔｈレセプターレベルの上昇は、全身性エリテマトーデスにおける心血管疾患と関連している。

アテローム性動脈硬化症には、アポトーシス制御不全が関与しているので、今回の試験では、ＤｅａｔｈレセプターであるＦａｓ、ＴＲＡＩＬレセプター２（ＴＲＡＩＬ－Ｒ２）、及びＴＮＦ－Ｒ１の血漿中レベルが、ＳＬＥ患者における心血管疾患（ＣＶＤ）の存在に関連しているかを調べた。

【０１６１】

実験方法

患者及びコントロール：患者とコントロールは、２００４年１月と２０１３年１０月の間に集めた。患者は全員、１９８２に改定された、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｃｏｌｌｅｇｅ　ｏｆ　Ｒｈｅｕｍａｔｏｌｏｇｙ（ＡＣＲ）のＳＬＥ分類基準［Ｔａｎ　ＥＭ　ｅｔ　ａｌ．Ｔｈｅ　１９８２　ｒｅｖｉｓｅｄ　ｃｒｉｔｅｒｉａ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｓｙｓｔｅｍｉｃ　ｌｕｐｕｓ　ｅｒｙｔｈｅｍａｔｏｓｕｓ．Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ　Ｒｈｅｕｍ　１９８２；２５：１２７１－７］の４つ以上を満たしていた。患者は、１８歳超であることを要件とし、それ以外には、除外基準はなかった。集団の登録において、最初の３２２人のＳＬＥ患者と個別に適合したコントロール集団を特定した。適合は、年齢差１年以内で、性別、居住領域について行った。コントロールに書簡で連絡して、参加するかたずねた。コントロールにおける唯一の除外基準は、ＳＬＥと診断されたことであった。解析プラットフォームの制限により、無作為に選択した６９人のコントロールを今回の試験から除外した。

【０１６２】

データ収集：患者とコントロールは全員、リウマチ学者が直接調べた。ＣＶＤの従来の危険因子をまとめた。高血圧は、収縮期血圧＞１４０ｍｍＨｇ及び／もしくは拡張期血圧＞９０ｍｍＨｇ、または血圧降下治療を利用していることとして定義した。患者が以前、糖尿病と診断された場合には、糖尿病が存在するものとみなした。問診と、医療ファイルの検討を通じて、客観的に検証された心筋梗塞、虚血性脳血管疾患または末梢血管疾患の履歴として定義される血管イベント履歴を得た。ＳＬＥ患者では、診断時の年齢、疾患継続期間、及びループスの顕在化（自己抗体を含む）を記録した。ループス腎炎は、１９８２年に改定された、ＡＣＲの腎炎分類基準［Ｔａｎ　ＥＭ，Ｃｏｈｅｎ　ＡＳ，Ｆｒｉｅｓ　ＪＦ，ｅｔ　ａｌ．Ｔｈｅ　１９８２　ｒｅｖｉｓｅｄ　ｃｒｉｔｅｒｉａ　ｆｏｒ

the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982;25:1271－7］に従って定義した。臓器損傷は、Systemic Lupus International Collaborating Clinics／ACR Damage index（SDI）［Gladman D, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics／American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1996;39:363－9］によって評価した。すべての血液試料は、一晩絶食後に採取し、臨床検査は、新鮮な血液試料、または－７０℃で保存後のいずれかで、盲検で行った。

【０１６３】

血漿中の循環Deathレセプターの解析：Proximity Extension Assay（PEA）技法によって、Proseek Multiplex CVD$^{96\times96}$試薬キットを用いて、Fas、TNF－R1、及びTRAIL－R2の血漿中レベルを解析した。オリゴヌクレオチド標識抗体プローブ対を、血漿試料に存在するそれぞれの標的に結合させ、DNAポリメラーゼを加えて伸長させて、それらの２つのオリゴヌクレオチドを接合し、PCRテンプレートを形成させた。ユニバーサルプライマーを用いて、DNAテンプレートを並列でプレ増幅した。そして、特異的プライマーを用いて、マイクロ流体リアルタイム定量PCRチップによって、個々のDNA配列を検出及び定量した。測定内変動と測定間変動の平均変動係数は、Fasでは８％と１２％、TNF－R1では７％と１１％、TRAIL－R2では７％と１５％であった。同じランで、すべての試料を解析した。データ解析は、前処理正規化手順によって、Olink Wizard for GenExを用いて行った。すべてのデータは、任意単位（AU）として表されている。おおかまな濃度を算出するための一般的な検量線は、OLINKのホームページ（http：／／www.olink.com）で入手可能である。

【０１６４】

p45、p210及びβ$_2$GPI自己抗体の測定：ヒトapoB－１００の６６１～６８０位のアミノ酸
(p45; IEIGLEGKGFEPTLEALFGK)
と、３１３６～３１５５位のアミノ酸
(p210; KTTKQSFDLSVKAQYKKNKH)
に対応するペプチドを合成して、ELISAで使用した。［Fredrikson GN, et al. Identification of immune responses against aldehyde－modified peptide sequences in Apo B－100 associated with cardiovascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23:872－8］に記載されているように、これらのペプチドを０．５MのMDAによって3時間、３７℃で修飾して、１mM EDTAを含むPBSに対して透析した。ネイティブペプチドとMDA修飾ペプチドをPBSで希釈したもの（pH７．４（２０μg／ml））をマイクロタイタープレートのウェルに、一晩のインキュベートにおいて４℃で吸収させた。０．０５％Tween－２０を含むPBS（PBS－T）で洗浄した後、コーティングしたプレートをTBS中のSuperBlockで３０分、室温でブロックしてから、TBS－０．１％Tween－２０と１０％Superblock（TBS－T）で１／１００で希釈した試験血漿を２時間、室温でインキュベートしてから、一晩、４℃でインキュベートした。すすいだ後、TBS－Tで適切に希釈したビオチン化ウサギ抗ヒトIgMまたはIgG抗体を用いて、上記のペプチドに対する自己抗体の沈着を検出した。再度、２時間、室温でインキュベートした後、プレートを洗浄し、結合したビオチン化抗体をアルカリホスファターゼコンジュゲートストレプト

アビジンによって検出し、２時間、室温でインキュベートした。ホスファターゼ基質キットを用いることによって、発色反応を行わせ、室温で、ＩｇＭについては９０分、ＩｇＧについては１２０分インキュベートしてから、４０５ｎｍでの吸光度を測定した。抗体ＥＬＩＳＡの特異性と可変性に関するデータは、以前に公開されている［Ｆｒｅｄｒｉｋｓｏｎ ＧＮ，ｅｔ ａｌ．Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｉｍｍｕｎｅ ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ ａｇａｉｎｓｔ ａｌｄｅｈｙｄｅ－ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｐｅｐｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｉｎ ａｐｏ Ｂ－１００ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ ｄｉｓｅａｓｅ．Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ Ｔｈｒｏｍｂ Ｖａｓｃ Ｂｉｏｌ ２００３；２３：８７２－８、Ｆｒｅｄｒｉｋｓｏｎ ＧＮ，ｅｔ ａｌ．．Ａｕｔｏａｎｔｉｂｏｄｙ ａｇａｉｎｓｔ ｔｈｅ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ６６１－６８０ ｉｎ ａｐｏ Ｂ－１００ ｉｓ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｄｅｃｒｅａｓｅｄ ｃａｒｏｔｉｄ ｓｔｅｎｏｓｉｓ ａｎｄ ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ ｅｖｅｎｔｓ．Ａｔｈｅｒｏｓｃｌｅｒｏｓｉｓ ２００７；１９４：ｅ１８８－９２］。

【０１６５】

マルチプレックスイムノアッセイＢｉｏＰｌｅｘ ２２００ ＡＰＬＳ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｉｎｃ．，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ，ＵＳＡ）によって、抗β_2ＧＰＩ抗体ＩｇＭ／ＩｇＧを測定した。ＩｇＭに関しては１．９～１６０Ｕ／ｍＬ、ＩｇＧに関しては１．９～１６０Ｕ／ｍＬの範囲で結果が記録された。結果は、連続変数として扱った。マルチプレックスアッセイでは、≧２０Ｕ／ｍＬの場合に陽性とみなされる。このカットオフレベルは、健常な血液ドナーの少なくとも９９パーセンタイルに相当する。

【０１６６】

ヒト末梢血単核球（ＰＢＭＣ）の単離：ＦｉｃｏｌｌＰａｑｕｅ Ｐｌｕｓ（ＧＥ ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｗａｕｋｅｓｈａ，ＷＩ，ＵＳＡ）の密度勾配遠心分離をメーカーの指示に従って用いて、ＳＬＥ患者（ｎ＝６、ｘ女性及びｘ男性、年齢ｘ±ｘ歳）と、適合する健常なコントロール（ｎ＝６、ｘ女性及びｘ男性、年齢ｘ±ｘ歳）と、健常ドナーのＰＢＭＣを単離した。ＳＬＥ患者とコントロールから得た細胞を４０％自己血清、４０％ＲＰＭＩ１６４０培地（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ）及び２０％ジメチルスルホキシド（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＩ，ＵＳＡ）に再懸濁し、液体窒素中で凍結した。

【０１６７】

ヒトドナーＰＢＭＣのＤｅａｔｈレセプターの活性化：健常ドナーから得た細胞を新鮮な状態で、１ウェル当たり0.5×10^6個の密度で、２％のＦＢＳを含む完全ＲＰＭＩ（１０Ｕ／ｍｌのペニシリン／ストレプトマイシン、１％のＬ－グルタミン、１％のナトリウムピルベート、１％のＨｅｐｅｓ及び０．１％のメルカプトエタノール）（ＨｙＣｌｏｎｅ Ｓｏｕｔｈ Ｌｏｇａｎ，ＵＴ，ＵＳＡ）に播種した。Ｄｅａｔｈレセプターの活性化においては、ＩＬ－１βを１０ｎｇ／ｍｌの濃度で、可溶性Ｆａｓリガンドを０．５μｇ／ｍｌの濃度で、ＴＮＦ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ，Ｒｏｃｋｙ Ｈｉｌｌ，ＮＪ，ＵＳＡ）を１０ｎｇ／ｍｌの濃度で、ＬＰＳ（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）を１０μｇ／ｍｌの濃度で用いた。

【０１６８】

フローサイトメトリー：健常ドナーから得た細胞を新鮮な状態で、１ウェル当たり0.5×10^6個の密度で、２％のＦＢＳを含む完全ＲＰＭＩ（１０Ｕ／ｍｌのペニシリン／ストレプトマイシン、１％のＬ－グルタミン、１％のナトリウムピルベート、１％のＨｅｐｅｓ及び０．１％のメルカプトエタノール）（ＨｙＣｌｏｎｅ Ｓｏｕｔｈ Ｌｏｇａｎ，ＵＴ，ＵＳＡ）に播種した。Ｄｅａｔｈレセプターの活性化においては、ＩＬ－１βを１０ｎｇ／ｍｌの濃度で、可溶性Ｆａｓリガンドを０．５μｇ／ｍｌの濃度で、ＴＮＦα（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ，Ｒｏｃｋｙ Ｈｉｌｌ，ＮＪ，ＵＳＡ）を１０ｎｇ

／ｍｌの濃度で、ＬＰＳ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）を１０μｇ／ｍｌの濃度で用いた。

【０１６９】

細胞上清の可溶性Ｄｅａｔｈレセプターの解析：Ｌｕｍｉｎｅｘ機（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）によって得られる磁気ビーズ系マルチプレックスアッセイ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，　ＭＮ，　ＵＳＡ）を用いた可溶性Ｆａｓ、ＴＮＦ－Ｒ１、及びＴＲＡＩＬ－Ｒ２の測定に、健常ドナーとＳＬＥ患者／コントロールから得たＤｅａｔｈレセプター活性化ＰＢＭＣの細胞上清を用いた。ＳＬＥ患者とコントロールにおいては、ＥＬＩＳＡ（Ａｂｃａｍ）をメーカーの推奨内容に従って用いて、ＴＮＦ－Ｒ１の濃度を測定した。

【０１７０】

統計：臨床的特徴は、連続変数の中央値（四分位範囲、ＩＱＲ）と、カテゴリー変数のパーセンテージとして表されている。正規分布していない連続変数は、対数変換した。対数変換後に、正規分布にならなかった場合には、ノンパラメトリック検定を用いた。データの種類に応じて、スチューデントｔ検定、マンホイットニー検定またはカイ二乗検定を用いて、群間差を比較した。スピアマンの順位相関係数の算出を通じて、相関関係を調べた。多変数で調整したロジスティック回帰モデルを実行して、自己抗体と心血管／臓器損傷の転帰との関連性を評価した。

【０１７１】

可溶性Ｄｅａｔｈレセプターの血漿中レベルは、ＳＬＥ患者において高いとともに、臓器損傷の重症度と関連付けられている。

本発明者らは、４８４人のＳＬＥ患者と、２５３人の健常コントロールのコホートにおいて、可溶性Ｄｅａｔｈレセプターの血漿中レベルを解析した。ＳＬＥ患者とコントロールとの間に有意な年齢差は見られなかったが、コントロール群における方が、女性の割合が高かった（表１３）。ＳＬＥ患者では、コントロールと比べて、Ｆａｓの循環血液中レベルが３４．１％高く、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２の循環血液中レベルが１３．６％高く、ＴＮＦ－Ｒ１の循環血液中レベルが４７．４％高かった（いずれの場合においても、ｐ＜０．００１であった）（表１３）。

【０１７２】

（表１３）ＳＬＥ患者とコントロールにおける循環血液中のＤｅａｔｈレセプターレベル。分布は、中央値（四分位範囲）またはパーセンテージで示されている。群間差は、マンホイットニーＵ検定によって解析した。Ｆａｓ、ＴＲＡＩＬレセプター２及びＴＮＦレセプター１の値は、任意単位として示されている。

	SLE 患者 (n=484)	**コントロール (n=253)**	***P***
年齢（歳）	46.4 (33.7-57.6)	49.3 (36.0-58.8)	ns
女性の割合 (%)	86.7	93.3	0.006
Death レセプター			
Fas	181 (143-234)	135 (114-166)	<0.001
TRAIL レセプター 2	2.5 (1.9-3.5)	2.2 (1.9-2.7)	<0.001
TNF レセプター 1	5873 (4576-7750)	3984 (3362-4689)	<0.001

【０１７３】

ＣＶＤの事例が、ＳＬＥ群で６９件、コントロール群で８件見られた（表１４）。

【０１７４】

（表１４）ＳＬＥ患者とコントロールの臨床的特徴。分布は、中央値（四分位範囲）またはパーセンテージで示されている。ＣＶＤデータは、１４人のＳＬＥ患者において紛失していた。

	SLE患者			コントロール		
	CVDなし (n=401)	CVD (n=69)	*P*	CVDなし (n=245)	CVD (n=8)	*P*
年齢（歳）	43.9 (31.9-56.1)	56.8 (49.5-66.1)	<0.001	50.0 (35.9-58.8)	54.3 (50.1-61.6)	ns
女性の割合（%）	85	91	ns	93	88	ns
SLEの特徴						
疾患継続期間（年）	6.5 (1.7-13.6)	17.2 (7.8-32.2)	<0.001	NA	NA	
SLICC損傷指数 (SDI)	1 (1-2)	3 (2-5)	<0.001	NA	NA	
危険因子						
喫煙 (%)	49	71	0.002	48	50	ns
収縮期血圧 (mm Hg)	120 (110-135)	130 (120-150)	<0.001	120 (110-137)	140 (125-168)	0.02
拡張期血圧 (mm Hg)	78 (70-80)	80 (70-85)	ns	75 (70-80)	85 (85-90)	0.003
高血圧治療 (%)	28.9	59.4	<0.001	15.1	50	0.008
肥満度指数 (kg/m^2)	23.8 (21.4–27.1)	25.3 (21.9–29.8)	0.04	24.2 (22.0-27.5)	31.3 (27.0-35.1)	0.001
糖尿病 (%)	1.4	0	ns			
HDL (mmol/L)	1.3 (1.1- 1.6)	1.2 (1.0-1.6)	ns	1.5 (1.2-1.8)	1.4 (1.1-1.5)	ns
LDL (mmol/L)	3.0 (2.5-3.6)	2.9 (2.3-3.6)	ns	3.3 (2.6-4.0)	3.7 (3.0-4.4)	ns
トリグリセリド (mmol/L)	1.0 (0.6-1.4)	1.4 (1.0-1.7)	<0.001	0.8 (0.6-1.1)	0.8 (0.7-1.7)	ns
グルコース	4.8 (4.4-5.2)	5.1 (4.6-5.6)	0.001	4.9 (4.6-5.2)	5.3 (5.0-6.3)	0.02
高感度CRP	1.5 (0.6-5.0)	2.4 (1.0-7.0)	0.04	0.9 (0.5-2.2)	3.2 (2.5-7.6)	0.006
クレアチニン	67 (57-80)	76 (64-94)	0.001	65 (60-72)	70 (56-89)	ns

【０１７５】

ＣＶＤイベントが見られたＳＬＥ患者ほど高齢で、ＳＬＥの継続期間が長く、ＳＬＩＣＣ損傷指数が高く、心血管危険因子が多かった。ＳＬＥ群では、ＣＶＤが見られた患者は、ＣＶＤが見られなかった患者よりも、Ｆａｓと、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２と、ＴＮＦ－Ｒ１のレベルが有意に高かった（表１５）。ロジスティック回帰モデルにおいて年齢と性別の影響を調整したところ、この差は、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２とＴＮＦ－Ｒ１に関しては有意なままであったが、Ｆａｓでは有意差はなかった。コントロール群では、ＣＶＤ有病者とＣＶＤ未有病者との間で、Ｆａｓ（１４４（ＩＱＲ１３７～２０１）に対して１３４ＡＵ（ＩＱＲ１１４～１６６））、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２（２．３（ＩＱＲ２．１～２．９）に対して２．２ＡＵ（ＩＱＲ１．９～２．７））またはＴＮＦ－Ｒ１（４２１１（ＩＱＲ３９５６～４８９８）に対して３９８４ＡＵ（ＩＱＲ３３５０～４６８９））に関して、有意差は見られなかった。可溶性Ｄｅａｔｈレセプターのレベルの上昇が、臓器損傷の一般的マーカーであるか判断するために、本発明者らは最後に、＞１のＳＬＩＣＣスコアとしての永久的な臓器損傷指標との関係を解析した。ＳＬＩＣＣ＞１は、Ｆａｓ、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、及びＴＮＦ－Ｒ１の血漿中レベルの上昇と関連があることが分かったとともに、これらの差は、年齢と性別に関して調整しても、統計的に有意なままであった（表１５）。

【０１７６】

（表１５）腎炎を有するおよび有しない、ならびにＳＬＩＣＣ＞１であるおよびＳＬＩＣＣ＞１ではない、ＳＬＥ患者における、循環血液中のＤｅａｔｈレセプターレベル。分布は、中央値（四分位範囲）で示されている。

	Fas	TRAILレセプター２	TNFレセプター１
CVDなし(n=401)	177 (141-229)	2.4 (1.8-3.4)	5557 (4513-7564)
CVD (n=69)	209 (162-272)	3.3 (2.2-4.5)	6562 (5480-9090)
P	0.004	<0.001	0.001
OR (95% C.I.) 年齢と性別を調整	1.44 (0.87-2.38)	1.63 (1.16-2.29)	1.84 (1.12-3.01)
SLICC≤1	170 (134-215)	2.3 (1.8-3.2)	5367 (4292-6985)
SLICC>1	209 (165-280)	3.0 (2.0-4.4)	6608 (5203-9027)
P	<0.001	ns	<0.001
OR (95% C.I.) 年齢と性別を調整	2.34 (1.60-3.43)	1.56 (1.20-2.03)	2.53 (1.72-3.72)

【０１７７】

可溶性Ｄｅａｔｈレセプターと心血管危険因子との関連性

可溶性Ｄｅａｔｈレセプターの血漿中レベルは、ＳＬＥ患者とコントロールの両方において、年齢とともに上昇していた（表１６）。これにもかかわらず、ＳＬＥの疾患継続期間との関連性は、希薄にすぎなかったか、またはＳＬＥの疾患継続期間との関連性は見られなかった。ＳＬＥとコントロールの両方において、血圧、ＢＭＩ、ＬＤＬ（Ｆａｓのみ）、トリグリセリド、グルコース、ｈｓＣＲＰ及びクレアチニンとの関連性が観察された。ＳＬＥ群におけるＴＲＡＩＬ－Ｒ２とＴＮＦ－Ｒ１と、コントロール群におけるＴＮＦレセプター１に関しては、ＨＤＬとの逆相関性が見られた。喫煙者（現喫煙者または元喫煙者）のレベルは、非喫煙者よりも高かった（Ｆａｓでは、１７０ＡＵ（ＩＱＲ１３４～２１９）に対して１８７（ＩＱＲ１５２～２４７）、ｐ＝０．００１であり、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２では、２．２ＡＵ（ＩＱＲ１．８～３．０）に対して２．５（ＩＱＲ１．９～３．５）、ｐ＝０．００４であり、またはＴＮＦ－Ｒ１では、５３８６ＡＵ（ＩＱＲ４３７５～６７１２）に対して６２５２（ＩＱＲ４７３８～８７２０）、ｐ＝０．００３であった）。

【０１７８】

（表１６）危険因子と循環血液中Ｄｅａｔｈレセプターレベルとの関連性。スピアマンの順位相関係数。＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１。

	SLE患者			コントロール		
	Fas	TRAILレセプター2	TNFレセプター1	Fas	TRAILレセプター2	TNFレセプター1
年齢（歳）	0.26***	0.21***	0.19***	0.31***	0.23***	0.16*
疾患継続期間（年）	0.10*	ns	ns	NA	NA	NA
収縮期血圧 (mm Hg)	0.26***	0.21***	0.23***	0.36***	0.22***	0.16*
拡張期血圧 (mm Hg)	0.17***	ns	0.13**	0.29***	ns	ns
BMI (kg/m^2)	0.20***	0.13*	0.14**	0.21**	0.16**	0.22**
HDL (mmol/L)	ns	-0.14**	-0.19***	ns	ns	-0.14*
LDL (mmol/L)	0.14**	ns	ns	0.19**	ns	ns
トリグリセリド (mmol/L)	0.37***	0.37***	0.45***	0.16*	0.19**	ns
グルコース	0.18***	ns	0.12***	0.22***	0.19**	0.22***
高感度CRP	0.18***	0.29***	0.43***	0.22**	0.14*	0.14*
クレアチニン	0.35***	0.27***	0.43***	0.15*	0.15*	0.20**

【０１７９】

可溶性Ｄｅａｔｈレセプターと免疫バイオマーカーとの関連性

可溶性Ｆａｓ、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、及びＴＮＦ－Ｒ１のレベルが高いことは、好中球数の増加およびリンパ球数の減少と相関していた（表１７）。可溶性Ｄｅａｔｈレセプターの一部と、ＳＬＥの免疫バイオマーカー（Ｃ３ｄｇ、カルジオリピンＩｇＧ及びβ２ＧＰ１　ＩｇＧなど）の血漿中レベルとの間にも、有意な関連性が見られた。本発明者らは、

アポリポタンパク質（ａｐｏ）Ｂに対する抗体が、アテローム性動脈硬化症において抑制的な役割を有することと、ＳＬＥ患者のａｐｏＢ　ｐ２１０　ＩｇＧのレベルが低いことを示した。興味深いことに、本発明者らは、今回の試験において、可溶性Ｄｅａｔｈレセプターとｐ２１０　ＩｇＧとの逆相関性を観察した（表１７）。

【０１８０】

（表１７）ＳＬＥ患者における循環血液中Ｄｅａｔｈレセプターレベルと、血液細胞、補体及び自己抗体との関連性。スピアマンの順位相関係数。＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１。

	Fas	TRAILレセプター2	TNFレセプター1
白血球			
リンパ球	-0.15**	-0.11*	-0.15**
好中球	0.19**	0.24***	0.26***
補体			
C1q	-0.02	-0.09	-0.08
C3	-0.11*	-0.06	-0.10*
C3dg	0.34***	0.09	0.33***
自己抗体			
カルジオリピンIgG	ns	0.09*	0.15**
カルジオリピンIgM	ns	ns	ns
β2GP1 IgG	ns	0.09*	0.15**
β2GP1 IgM	ns	ns	ns
Apo B p210 IgG	-0.21***	-0.15**	-0.13**
Apo B p210 IgM	ns	-0.11*	ns

【０１８１】

Ｆａｓリガンドは、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）からの可溶性Ｄｅａｔｈレセプターの放出を活性化する。

アポトーシスシグナル伝達における細胞表面Ｄｅａｔｈレセプターの役割は、十分に特徴付けられているが、これらのレセプターの可溶形態の放出を調節する因子は、あまり研究されていない。したがって、本発明者らは、異なるＤｅａｔｈレセプターリガンドと、炎症誘発性因子の存在下で、ヒトＰＢＭＣを培養した。Ｆａｓリガンドに細胞が暴露されると、培養培地へのＦａｓとＴＲＡＩＬ－Ｒ２の放出が刺激されたが、ＩＬ－１βに暴露されても、効果はなく、ＬＰＳは、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２の放出量のわずかな上昇を誘導したに過ぎなかった（図１０Ａ及び１０Ｂ）。ＴＮＦ－αとインキュベートしたところ、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２の放出はわずかに阻害されたが、ＰＢＭＣからのＦａｓの放出に対する作用は見られなかった。Ｆａｓリガンド、ＩＬ－１β及びＬＰＳはいずれも、ＴＮＦ－Ｒ１の放出を刺激したが、ＴＮＦ－αに対する応答では、作用は見られなかった（図１０Ｃ）。これらの観察結果から、Ｆａｓリガンド／Ｆａｓ経路の活性化によって、Ｆａｓ及びＴＲＡＩＬ－Ｒ２の放出が誘導されるが、炎症誘発性因子に対する応答では、誘導は見られなかったことが示されている。これに対して、ＴＮＦ－Ｒ１の放出は、Ｆａｓリガンドと炎症誘発性因子の両方によって刺激される。

【０１８２】

ＳＬＥ患者から得たＰＢＭＣと、健常コントロールから得たＰＢＭＣは、Ｆａｓリガンドによる刺激に対する応答が異なる。

ＳＬＥ患者から得たＰＢＭＣをＦａｓリガンドで刺激したところ、ＦＡＳの放出が７３％上昇し、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２の放出が７倍上昇した（図１１Ａ及び図１１Ｂ）。Ｆａｓリガンドに暴露した健常コントロールでも、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２の放出の同様の上昇が見られたが、Ｆａｓに対する作用は、ＳＬＥ患者よりも顕著ではなく、ペアｔ検定において、統計的有意性には達しなかった。Ｆａｓリガンドによる刺激は、ＴＮＦ－Ｒ１の分泌を活性化しなかった（図１１Ｃ）。Ｆａｓリガンドとインキュベートしたところ、健常コントロールから採取したＰＢＭＣでは、アポトーシスリンパ球の出現頻度が上昇したが、ＳＬＥ患者から得たＰＢＭＣでは、上昇しなかった（図１１Ｃ）。

【０１８３】
今回の試験により、ＳＬＥ患者は、年齢と性別を適合させた健常コントロールと比べて、可溶性Ｆａｓ、ＴＮＦ－Ｒ１、及びＴＲＡＩＬ－Ｒ２の血漿中レベルが高いことが示されている。さらに、腎炎歴がある患者は、臓器損傷スコアが高いほど、疾患の顕在化が穏やかな患者よりも、Ｆａｓ、ＴＮＦ－Ｒ１、及びＴＲＡＩＬ－Ｒ２の血漿中レベルが高かった。

【０１８４】
それぞれのリガンド（主に、ＦａｓＬ、ＴＮＦ－α、及びＴＲＡＩＬ）によるＤｅａｔｈレセプターの活性化は、免疫応答終了時における活性化Ｔ細胞の除去と、ウイルス感染細胞及びがん細胞の殺傷を含め、いくつかのタイプの生理的アポトーシスにとって重要である。しかしながら、Ｄｅａｔｈレセプターシグナル伝達の機能不全的活性化も、自己免疫と関連付けられている。自己免疫性リンパ増殖症候群は、Ｆａｓ遺伝子の変異を原因とする希少疾患であり、自己抗体の高度な発現、再発性の自己免疫性血球減少、及びその他の自己免疫性臓器合併症を引き起す。いくつかのエビデンス群により、ＦａｓＬ／Ｆａｓシグナル伝達もＳＬＥの発症機序に関連付けられている。特には、ＦａｓＬ／Ｆａｓシグナル伝達の変化は、自己反応性リンパ球のクリアランス障害と、隠れた自己抗原の暴露の増大に寄与することによって、疾患プロセスにおいて重要な役割を果たすとみなされている。Ｆａｓ遺伝子に機能的変異を有するマウス（ｌｐｒマウス）とＦａｓＬ遺伝子に機能的変異を有するマウス（ｇｌｄマウス）は、ＳＬＥ様の表現型を発現する。さらに、ＳＬＥ患者から得られるＴ細胞とＢ細胞は、Ｆａｓの細胞表面発現の増大によって特徴付けられ、この発現は疾患活性と相関することが示されている。

【０１８５】
可溶形態の細胞もＤｅａｔｈレセプターを放出できる。本発明者らの知る限りでは、これまで、可溶性ＦａｓとＴＲＡＩＬ－Ｒ２の放出を誘導する因子は、詳しく研究されたことはない。本発明者らは、今回の試験で、ヒトＰＢＭＣからの可溶性ＦａｓとＴＲＡＩＬ－Ｒ２の放出は、ＦａｓＬによって増強されるが、ＩＬ－１βまたはＴＮＦ－αによっては増強されないことを示している。これにより、ＳＬＥ患者において、可溶性Ｆａｓ及びＴＲＡＩＬ－Ｒ２と、ＣＲＰとの間に有意な関連性が観察されるのは、炎症に応答してこれらのＤｅａｔｈレセプターが放出されることではなく、アポトーシスの調節障害を原因とする炎症の反映であることが示唆されている。ＳＬＥにおける可溶性ＴＮＦ－Ｒ１レベルの上昇の原因は、もっと複雑である。ＰＢＭＣからのこのレセプターの放出は、ＦａｓＬと炎症誘発性因子（ＩＬ－β及びＬＰＳなど）の両方によって刺激されるからである。このことから、ＴＮＦ－Ｒ１レベルの上昇が、外因性アポトーシスシグナル伝達と炎症の両方のマーカーとなり得ることが示唆されている。本発明者らが以前、ＳＬＥにおけるｓＴＮＦ－Ｒ１について、全身性炎症の観点から調べたところ、ｓＴＮＦ－Ｒ２及びＴＮＦ－αとともに、ｓＴＮＦ－Ｒ１が、ＳＬＥ疾患活性の優れたマーカーであることが示されたとともに、ＣＶＤとも関連付けられた。興味深いことに、本発明者らは、ＴＮＦ－αによる刺激に応答してＴＮＦ－Ｒ１の放出が増加することを観察しなかった。これは、多形核白血球と微小血管内皮細胞に関する過去の調査とは異なっている。

【０１８６】
可溶形態のＦａｓは、膜結合形態のＦａｓへのＦａｓＬの結合をブロックすることによってアポトーシスを阻害することが示されている。したがって、実験動物において、ＦａｓＬ／Ｆａｓシグナル伝達の阻害が、ＳＬＥ様の表現型の発現に寄与するのと同じ形で、ＳＬＥを有する対象で見られる可溶性Ｆａｓのレベルの上昇は、ＳＬＥ疾患の特徴の発現に寄与し得る可能性が高い。この関連では、コントロールの対象から得たＰＢＭＣにおけるＦａｓＬ誘導性のアポトーシスは、Ｆａｓ分泌量の有意な増加と関連付けられなかったが、ＳＬＥを有する対象から得たＰＢＭＣでは、ＦａｓＬによる刺激によって、アポトーシスに影響が及ぶことなく、Ｆａｓの放出が刺激されたことに留意するのが興味深い。この観察結果に対する考え得る説明の１つは、ＳＬＥ　ＰＢＭＣは、ＦａｓＬの結合に対して膜結合Ｆａｓと競合する可溶性Ｆａｓを放出することによって、ＦａｓＬ誘導性のアポ

トーシスをブロックできることであろう。図１１において、ＳＬＥのＰＢＭＣとコントロールのＰＢＭＣを比較する実験において、ＦａｓＬが、Ｆａｓの放出に及ぼす作用が有意でなかったのは、図１０に示されている所見（コントロールのＰＢＭＣにおいて、ＦａｓＬによる刺激によって、Ｆａｓ分泌の有意な増加が誘導された）とは矛盾しているように見えるであろう。しかしながら、後者の実験における細胞はいずれも、同じ個体から得たものであり、分泌の増加は、約１０％に過ぎなかったことに留意すべきである。

【０１８７】

ＣＶＤが臨床的に顕在化したＳＬＥ患者は、その症状のない者よりも、可溶性Ｄｅａｔｈレセプターのレベルが高かった。とりわけ、アポトーシスの調節と処理の障害は、ＳＬＥとアテローム性動脈硬化症（急性心血管イベントの主な原因）の興味深い共通の特徴である。動脈硬化性プラークにおける平滑筋細胞のアポトーシスの増強は、プラーク破裂リスクを増大させ、この破裂が、急性心筋梗塞の主な原因とみなされている。しかしながら、アポトーシスシグナル伝達の阻害と、アポトーシス物質のクリアランス障害が、アテローム性動脈硬化症の発現に寄与する実験的証拠がある。この知見と一致して、ＦａｓＬまたはＦａｓを欠損しているＡｐｏＥ$^{-}$／$^{-}$マウスのいずれにおいても、アテローム性動脈硬化症の発現が増大することが示されている。また、ＴＮＦ－Ｒ１欠損マウスは、アテローム性動脈硬化症をさらに発症しやすい。ＴＮＦ－α^{-}／$^{-}$／ＡｐｏＥ$^{-}$／$^{-}$マウスは動脈硬化性プラークの形成の低減によって特徴付けられており、ＴＮＦ－Ｒ１を通じたＴＮＦ－αシグナル伝達はアテローム形成抑制的であり、その他のＴＮＦレセプターの真の作用はアテローム形成促進作用であることが示唆されている。

【０１８８】

アテローム性動脈硬化症におけるＴＲＡＩＬ－Ｒ２の役割は、比較的不明なままであるが、ＴＲＡＩＬとＴＲＡＩＬレセプターの両方が動脈硬化性プラークに存在するという観察結果により、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２が、この疾患プロセスにおいて役割を果たす可能性のあることが示唆されている。可溶性Ｄｅａｔｈレセプターレベルの上昇と、１を超えるＳＬＩＣＣスコアとの正の関連性により、これらの機構も、心血管系外の臓器損傷に寄与し得ることが示唆されている。したがって、これらの観察結果は、臓器で顕在化したＳＬＥ患者において、可溶性Ｆａｓレベルが上昇するというこれまでの報告と一致している。

【０１８９】

今回の試験においてひときわ目を引く観察結果は、可溶性Ｄｅａｔｈレセプターレベルの上昇と、メタボリック症候群と関連する因子（高いＢＭＩ、グルコース、トリグリセリド、収縮期血圧及び低いＨＤＬを含む）との明らかな関連性であった。これらの関連性を担う機構は、まだ完全には解明されていない。本発明者らは、今回の試験において、可溶性Ｄｅａｔｈレセプターと、ＬＤＬ抗原ＡｐｏＢ　ｐ２１０に対する自己抗体との逆相関性も特定した。本発明者らは、このタイプの自己抗体のレベルが高いことはＣＶＤリスクが低いことと関連性があり、ＳＬＥ患者はＡｐｏＢ自己抗体のレベルが低いことを最近報告した。さらに、ＡｐｏＢに対する組み換えＩｇＧは、実験動物モデルにおいて、アテローム性動脈硬化症を軽減することが示されている。これらの自己抗体は、何らかの方法で、Ｄｅａｔｈレセプターシグナル伝達を低下させることができ、この機構を通じて、アテローム性動脈硬化症の発現に作用し得ることは、興味深い可能性である。

【０１９０】

今回の所見により、ＳＬＥにおいて、可溶形態のアポトーシスシグナル伝達レセプターであるＦａｓ、ＴＮＦ－Ｒ１、及びＴＲＡＩＬ－Ｒ２の放出が増加することと、これらのレセプターの血漿中レベルが、ＣＶＤの存在と、その他のタイプのＳＬＥ関連臓器合併症と関連性があることが示されている。本発明者らの所見から、可溶性ＦａｓとＴＲＡＩＬ－Ｒ２の血漿中レベルは、膜結合Ｄｅａｔｈレセプターを介したシグナル伝達を反映するものであることと、可溶性Ｆａｓレベルの上昇は、ＦａｓＬへの結合を通じて、ＳＬＥにおいて、アポトーシスの誘導を阻害し得ることも示唆されている。アポトーシスの調節障害は概して、アテローム性動脈硬化症の発現を促進することも示されているので、可溶性Ｄｅａｔｈレセプターの発現の増加は、ＳＬＥにおける心血管合併症に寄与し得ることを

本発明者らは提示する。

【０１９１】

実施例３．アポリポタンパク質Ｂ－１００自己抗体が低レベルであることは、冠動脈イベントリスクの増大と関連性がある。

過去の小規模な調査によって、酸化低密度リポタンパク質エピトープに対する自己抗体と、心血管疾患との逆相関性が示されている。今回の試験では、大きな母集団ベースのコホートで、アポリポタンパク質Ｂ－１００ペプチドｐ４５及びｐ２１０に対する各自己抗体と、心血管疾患発症リスクとの関連性を調べた。

【０１９２】

Ｍａｌｍｏ　Ｄｉｅｔ　ａｎｄ　Ｃａｎｃｅｒの研究の心血管アームに属する５３９３人の個体（年齢４６～６８歳）を含み、フォローアップ期間が１５年超である前向き研究において、アポリポタンパク質Ｂ－１００自己抗体をＥＬＩＳＡによって解析した。フォローアップ中に急性冠動脈イベントを発症した対象（ｎ＝３８２）は、ベースライン時に、ネイティブのアポリポタンパク質Ｂ－１００ペプチドｐ４５及びｐ２１０と、マロンジアルデヒドにより修飾されたアポリポタンパク質Ｂ－１００ペプチドｐ４５及びｐ２１０を認識するＩｇＭ自己抗体のレベルが低かったとともに、ネイティブｐ２１０を認識するＩｇＧレベルも低かったが、脳卒中のリスクとの関連性は見られなかった（ｎ＝３１７）。コックス比例ハザード回帰モデルで、心血管危険因子について調整した後、ＩｇＭ－ｐ４５$_{ＭＤＡ}$（ハザード比［９５％信頼区間］：０．７２［０．５５，０．９４］、Ｐ＝０．０１７）及びＩｇＧ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$（ハザード比［９５％信頼区間］：０．７３［０．５６，０．９７］、Ｐ＝０．０２９）の最高三分位の対象は、最低三分位と比べて、冠動脈イベント発症リスクが低かった。さらに、ＩｇＧ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$のレベルの高い対象は、ベースライン時に超音波検査によって評価した際に頸動脈プラークを有する傾向が弱かった（危険因子に関して調整後のオッズ比＝０．８１、９５％信頼区間０．７０－０．９５、Ｐ＝０．００８）。

【０１９３】

規模の大きいこの前向き試験によって、アポリポタンパク質Ｂ－１００自己抗体のレベルが高い対象は、冠動脈イベントのリスクが低いことが示されており、心血管疾患におけるこれらの自己抗体の抑制的な役割が裏付けられている。

【０１９４】

本発明者らは、ネイティブｐ４５に対するＩｇＭ及びＩｇＧ自己抗体（ＩｇＭｐ４５ネイティブ及びＩｇＧ－ｐ４５ネイティブ）、ネイティブｐ２１０に対するＩｇＭ及びＩｇＧ自己抗体（ＩｇＭ－ｐ２１０ネイティブ及びＩｇＧ－ｐ２１０ネイティブ）、ＭＤＡ修飾ｐ４５に対するＩｇＭ及びＩｇＧ自己抗体（ＩｇＭ－ｐ４５ＭＤＡ及びＩｇＧｐ４５ＭＤＡ）、ならびにＭＤＡ修飾ｐ２１０に対するＩｇＭ及びＩｇＧ自己抗体（ＩｇＭ－ｐ２１０ＭＤＡ及びＩｇＧｐ２１０ＭＤＡ）の血漿中レベルと、心血管イベントの発症との関係を調べた。その所見により、ａｐｏＢ－１００自己抗体のレベルが高いことは、冠動脈イベントの発症率の低さと関連性があることが認められる。

【０１９５】

実験方法

Ｍａｌｍｏ　Ｄｉｅｔ　ａｎｄ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｓｔｕｄｙ（ＭＤＣＳ）は、食事とがんとの関連性について調べた前向き集団ベースコホート（ｎ＝２８，４４９）研究である［Ｂｅｒｇｌｕｎｄ　Ｇ，ｅｔ　ａｌ．Ｔｈｅ　Ｍａｌｍｏ　Ｄｉｅｔ　ａｎｄ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｓｔｕｄｙ．Ｄｅｓｉｇｎ　ａｎｄ　ｆｅａｓｉｂｉｌｉｔｙ．Ｊ　Ｉｎｔｅｒｎ　Ｍｅｄ．１９９３；２３３：４５－５１］。この研究に参加する資格があったのは、１９２６～１９４５年に産まれた、マルメ在住の対象であった。１９９１年１０月～１９９４年２月に、参加者のうち、２人に１人の割合で、頸動脈疾患の疫学に焦点を当てたサブ試験への参加についても案内を行った（ＭＤＣＳ心血管コホート、ｎ＝６，１０３）［Ｈｅｄｂｌａｄ　Ｂ，ｅｔ　ａｌ．Ｒｅｌａｔｉｏｎ　ｂｅｔｗｅｅｎ　ｉｎｓｕｌｉｎ　ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ　ａｎｄ　ｃａｒｏｔｉｄ　ｉｎｔｉｍａ－ｍｅｄｉａ　ｔｈｉ

ｃｋｎｅｓｓ ａｎｄ ｓｔｅｎｏｓｉｓ ｉｎ ｎｏｎ－ｄｉａｂｅｔｉｃ ｓｕｂｊｅｃｔｓ．Ｒｅｓｕｌｔｓ ｆｒｏｍ ａ ｃｒｏｓｓ－ｓｅｃｔｉｏｎａｌ ｓｔｕｄｙ ｉｎ Ｍａｌｍｏ，Ｓｗｅｄｅｎ．Ｄｉａｂｅｔ Ｍｅｄ．２０００；１７：２９９－３０７］。今回の試験では、ａｐｏＢ－１００自己抗体を評価するための血漿試料は、ＭＤＣＳの心血管コホートに参加した対象５，３９３人（図１２）であって、４６～６８歳（平均年齢５７．６歳）の対象の無作為副標本で入手可能であった。参加者は、ベースライン調査時から、最初の心血管疾患（ＣＶＤ）イベント、スウェーデンからの転出または死亡まで、最長で２００９年１２月３１日まで追跡した。用いた登録機関（Ｓｗｅｄｉｓｈ Ｄｉｓｃｈａｒｇｅ Ｒｅｇｉｓｔｒｙ、Ｓｔｒｏｋｅ Ｒｅｇｉｓｔｅｒ ｏｆ Ｍａｌｍｏ及びＣａｕｓｅ ｏｆ Ｄｅａｔｈ Ｒｅｇｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｓｗｅｄｅｎ）の症例及び妥当性の評価は、高いことが示された。冠動脈イベントは、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｄｉｓｅａｓｅｓ第９版（ＩＣＤ－９）のコード４１０及び第１０版（ＩＣＤ－１０）のコードＩ２１に基づき、致死的な心筋梗塞または非致死的な心筋梗塞として定義した。虚血性心疾患による死亡は、コード４１２及び４１４（ＩＣＤ－９）またはＩ２２、Ｉ２３及びＩ２５（ＩＣＤ－１０）に基づき定義した。脳卒中イベントは、致死的な脳卒中または非致死的な脳卒中（ＩＣＤ－９：４３０、４３１、４３４及び４３６）、出血性脳卒中（ＩＣＤ－９：４３０、４３１またはＩＣＤ－１０：Ｉ６０、Ｉ６１）、ならびに虚血性脳卒中（ＩＣＤ－９：４３４、４３６またはＩＣＤ－１０：Ｉ６３）として定義した。フォローアップ期間を通じて、初期ＣＶＤイベントの発症が６６８件（冠動脈イベント３９８件及び脳卒中３２９件（いずれか早い方））認められた。３９８件の冠動脈イベントの発症では、致死的な心筋梗塞が６６件、非致死的な心筋梗塞が２９３件、虚血性心疾患が３９件認められた。さらに、３２９件の脳卒中イベントの発症では、致死的な脳卒中が２５件、非致死的な脳卒中が３０４件認められ、そのうち、虚血性脳卒中は２６９件、出血性脳卒中は５２件、未特定な脳卒中は８件認められた。高血圧は、血圧≧１４０／９０ｍｍＨｇまたは血圧降下薬の服用として、高コレステロールは、＞５ｍｍｏｌ／Ｌとして、喫煙は、喫煙中として定義した。血圧、喫煙習慣及び脂質レベルは、以前に説明されたようにして決定した［Ｈｅｄｂｌａｄ Ｂ，ｅｔ ａｌ．Ｒｅｌａｔｉｏｎ ｂｅｔｗｅｅｎ ｉｎｓｕｌｉｎ ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ ａｎｄ ｃａｒｏｔｉｄ ｉｎｔｉｍａ－ｍｅｄｉａ ｔｈｉｃｋｎｅｓｓ ａｎｄ ｓｔｅｎｏｓｉｓ ｉｎ ｎｏｎ－ｄｉａｂｅｔｉｃ ｓｕｂｊｅｃｔｓ．Ｒｅｓｕｌｔｓ ｆｒｏｍ ａ ｃｒｏｓｓ－ｓｅｃｔｉｏｎａｌ ｓｔｕｄｙ ｉｎ Ｍａｌｍｏ，Ｓｗｅｄｅｎ．Ｄｉａｂｅｔ Ｍｅｄ．２０００；１７：２９９－３０７］。この試験は、Ｒｅｇｉｏｎａｌ Ｅｔｈｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗ Ｂｏａｒｄ ｉｎ Ｌｕｎｄ（ＬＵ ５１－９０）から承認を受けたとともに、Ｈｅｌｓｉｎｋｉ Ｄｅｃｌａｒａｔｉｏｎに従って実施した。対象の全員から、承諾書を得た。このコホート研究の報告は、ＳＴＲＯＢＥのガイドラインに従っている。

【０１９６】

Ｂモード超音波：以前に説明されたように、７－ＭＨｚトランスデューサーを備えるＡｃｕｓｏｎ １２８ ＣＴシステムを用いて、総頸動脈及び頚動脈分岐部の解析を行った［Ｈｅｄｂｌａｄ Ｂ，Ｎｉｌｓｓｏｎ Ｐ，Ｊａｎｚｏｎ Ｌ ａｎｄ Ｂｅｒｇｌｕｎｄ Ｇ．Ｒｅｌａｔｉｏｎ ｂｅｔｗｅｅｎ ｉｎｓｕｌｉｎ ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ ａｎｄ ｃａｒｏｔｉｄ ｉｎｔｉｍａ－ｍｅｄｉａ ｔｈｉｃｋｎｅｓｓ ａｎｄ ｓｔｅｎｏｓｉｓ ｉｎ ｎｏｎ－ｄｉａｂｅｔｉｃ ｓｕｂｊｅｃｔｓ．Ｒｅｓｕｌｔｓ ｆｒｏｍ ａ ｃｒｏｓｓ－ｓｅｃｔｉｏｎａｌ ｓｔｕｄｙ ｉｎ Ｍａｌｍｏ，Ｓｗｅｄｅｎ．Ｄｉａｂｅｔ Ｍｅｄ．２０００；１７：２９９－３０７］。簡潔に述べると、遠位総頸動脈の３ｃｍと、分岐部と、内頸動脈及び外頸動脈の１ｃｍを含む所定のウィンドウ内で、右頸動脈分岐部をスキャンした。プラークの厚みを測定するための画像はすべて、最も厚い内膜中膜複合体厚を示す長軸方向の撮影で得た。プラークは、内膜中膜の限局的な肥厚が１．２ｍｍを超えることとして定義した。

【０１９７】

ｐ４５自己抗体及びｐ２１０自己抗体の測定：ヒトａｐｏＢ－１００の６６１～６８０位のアミノ酸
(p45; IEIGLEGKGFEPTLEALFGK)
と３１３６～３１５５位のアミノ酸
(p210; KTTKQSFDLSVKAQYKKNKH)
に対応するペプチドを合成し（ＫＪ Ｒｏｓｓ Ｐｅｔｅｒｓｅｎ ＡＳ，Ｈｏｒｓｈｏｌｍ，Ｄｅｎｍａｒｋ）、ＥＬＩＳＡで使用した。これらのペプチドを０．５ＭのＭＤＡによって３時間、３７℃で修飾し、説明されているようにして、１ｍＭのＥＤＴＡを含むＰＢＳに対して透析した［Ｐａｌｉｎｓｋｉ Ｗ，Ｗｉｔｚｔｕｍ ＪＬ．Ｉｍｍｕｎｅ ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ ｔｏ ｏｘｉｄａｔｉｖｅ ｎｅｏｅｐｉｔｏｐｅｓ ｏｎ ＬＤＬ ａｎｄ ｐｈｏｓｐｈｏｌｉｐｉｄｓ ｍｏｄｕｌａｔｅ ｔｈｅ ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ ａｔｈｅｒｏｓｃｌｅｒｏｓｉｓ．Ｊ Ｉｎｔｅｒｎ Ｍｅｄ．２０００；２４７：３７１－３８０］。ネイティブペプチドとＭＤＡ修飾ペプチドをＰＢＳで希釈したもの（ｐＨ７．４、２０μｇ／ｍｌ）をマイクロタイタープレートのウェル（Ｎｕｎｃ ＭａｘｉＳｏｒｐ，Ｎｕｎｃ，Ｒｏｓｋｉｌｄｅ，Ｄｅｎｍａｒｋ）に、４℃での一晩のインキュベートにおいて吸収させた。０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳ（ＰＢＳ－Ｔ）で洗浄した後、コーティングしたプレートをＴＢＳ中のＳｕｐｅｒＢｌｏｃｋ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、＃３７５３５）で３０分、室温（ＲＴ）でブロックしてから、１／１００で、０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、＃２８３２０）と、１０％Ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋ（ＴＢＳ－Ｔ）を含むＴＢＳにおいて希釈した試験血漿を２時間、室温でインキュベートし、４℃で一晩インキュベートした。すすいだ後、ヒトＩｇＧに対するビオチン化ウサギポリクローナル二次抗体（Ａｂｃａｍ ａｂ７１５９）またはＩｇＭ抗体（ＩＣＮ６７－３２１、オハイオ州オーロラのＢｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．）をＴＢＳＴで適切に希釈したものを用いて、上記のペプチドに対する自己抗体の沈着を検出した。２時間、室温で再度インキュベートした後、プレートを洗浄し、結合したビオチン化抗体をアルカリホスファターゼコンジュゲートストレプトアビジン（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ ４０５２１１）によって検出し、２時間、室温でインキュベートした。ホスファターゼ基質キット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、＃３７６２０）を用いることによって、発色反応を行わせ、室温で、ＩｇＭについては９０分、ＩｇＧについては１２０分インキュベートしてから、４０５ｎｍでの吸光度を測定した。個体の血漿試料の吸光度と、コントロール血漿（各ＥＬＩＳＡプレートでの任意の健常な血液ドナーラン由来血漿プール）の吸光度の比率を算出し、解析に使用した。抗体ＥＬＩＳＡの特異性と可変性に関するデータは、以前に公開されている［Ｆｒｅｄｒｉｋｓｏｎ ＧＮ，ｅｔ ａｌ．Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｉｍｍｕｎｅ ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ ａｇａｉｎｓｔ ａｌｄｅｈｙｄｅｍｏｄｉｆｉｅｄ ｐｅｐｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｉｎ ａｐｏＢ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ ｄｉｓｅａｓｅ．Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ Ｔｈｒｏｍｂ Ｖａｓｃ Ｂｉｏｌ．２００３；２３：８７２－８７８、Ｆｒｅｄｒｉｋｓｏｎ ＧＮ，ｅｔ ａｌ．Ａｕｔｏａｎｔｉｂｏｄｙ ａｇａｉｎｓｔ ｔｈｅ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ６６１－６８０ ｉｎ ａｐｏＢ－１００ ｉｓ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｄｅｃｒｅａｓｅｄ ｃａｒｏｔｉｄ ｓｔｅｎｏｓｉｓ ａｎｄ ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ ｅｖｅｎｔｓ．Ａｔｈｅｒｏｓｃｌｅｒｏｓｉｓ．２００７；１９４：ｅ１８８－ｅ１９２］。今回の試験では、測定内変動係数は、８つのすべてのａｐｏ－Ｂ１００自己抗体において９～１０％であったとともに、測定間係数は、ＩｇＭ－ｐ４５$_{ネイティブ}$及びＩｇＭ－ｐ４５$_{ＭＤＡ}$において２５％、ＩｇＧｐ－４５$_{ネイティブ}$及びＩｇＧｐ４５$_{ＭＤＡ}$において２３％、ＩｇＭ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$及びＩｇＭ－ｐ２１０$_{ＭＤＡ}$において１３％、ＩｇＧｐ－２１０$_{ネイティブ}$及びＩｇＧｐ２１０$_{ＭＤＡ}$において２２％であった。測定内変動係数は、同じ日の各プレートでのコントロール血漿プールランの吸光度値を用いることによって算出し、測定間係数は、全解析期間中のコントロール血漿プールランのすべての吸光度値を用いることによっ

て算出した。

【０１９８】

統計：臨床的特徴は、連続変数の中央値（四分位範囲、ＩＱＲ）と、カテゴリー変数のパーセンテージとして表されている。ａｐｏＢ－１００自己抗体のレベルの測定の際に、技術的理由により喪失した１８２件のデータは、解析から除外した（図１２）。歪んだ連続変数は、対数変換した。独立標本ｔ検定を用いて、正規分布の連続変数を評価し、心血管イベントを発症した対象と、発症しなかった対象の比率については、カイ二乗検定を用いた。ノンパラメトリック検定（マンホイットニー検定）を用いて、非正規分布の連続変数を評価した。適宜、スピアマンの相関係数を用いて、連続変数間の関係を調べた。８つのａｐｏ－Ｂ１００自己抗体の多重検定の際には、補正は行わなかった。予想交絡因子として、ケースとコントロール間で有意差のあったベースラインの臨床的特徴のいくつか（表１８）、すなわち、年齢、性別、トリグリセリド、ＬＤＬ、ＨＤＬ（ただし、コレステロール、ＬＤＬ／ＨＤＬ比またはａｐｏＢは除く）、ｈｓ－ＣＲＰ、喫煙中、糖尿病を罹患していること（ただし、グルコースまたはＨｂＡ１ｃは除く）、収縮期血圧（ただし、拡張期血圧は除く）、及び血圧降下薬の服用を選択した。含めなかった交絡因子は、モデルに含まれている関連危険因子の代表である。線形回帰モデルを用いて、独立関連性を算出し、（補正変数として含めた所定の予想交絡因子による）ロジスティック回帰解析を用いて、ａｐｏＢ－１００自己抗体と、頸動脈プラークの存在との関連性を明らかにした。カプラン・マイヤー法を用いて、ａｐｏＢ－１００自己抗体三分位の無冠動脈イベント生存率または無脳卒中イベント生存率を評価し、ログランク検定によって、差異を解析した。コックス比例ハザード回帰モデルを用いて、自己抗体三分位間で、冠動脈イベントまたは脳卒中イベントの発症を比較したとともに、危険因子で調整したハザード比（９５％信頼区間、ＣＩ）を算出した。経時的に異なる群においてハザード関数をプロットしたところ、比例ハザードの仮定が崩れなかったことが示された。

【０１９９】

試験コホートの特徴：ＭＤＣＳの心血管アームから得た５３９３人の個体（４６～６８歳）のこのコホート（図１２）では、フォローアップ中、２００９年１２月３１日まで、３９８件の冠動脈イベントの発症（致死的な心筋梗塞６６件と、非致死的な心筋梗塞２９３件と、虚血性心疾患３９件）と、３２９件の脳卒中イベント（致死的な脳卒中２５件と、非致死的な脳卒中３０４件、そのうち、虚血性脳卒中が２６９件、出血性脳卒中が５２件、未特定の脳卒中が８件）が記録された。ノンケースとＣＶＤケースのベースライン特徴が表１８に示されている、ノンケースとの比較において、ＣＶＤ発症者（冠動脈イベントまたは脳卒中イベント）の方が高齢で、含まれたのは男性の方が多く、喫煙者の方が多く、高血圧の個体であり、糖尿病有病率が高かった。また、ＣＶＤケースでは、血中脂質、ヘモグロビンＡ１ｃ、及び高感度Ｃ反応性タンパク質も高かった（表１８）。

【０２００】

（表１８）試験コホートのベースラインの臨床的特徴

	ノンケース(n=4666)	ケース(n=398),*冠動脈イベント	ケース(n=329),*脳卒中
スクリーニング時の年齢（歳)	57.6 (52.2–62.5)	61.6 (57.2–64.7)†	62.1 (58.0–64.4)†
性別、男性の割合，%	39.8	61.6†	50.8†
現喫煙者, %	26.1	33.8†	32.8‡
糖尿病, %§	7.4	19.8†	18.2†
高血圧, %‖ グルコース, mmol/L	62.5 4.9 (4.6–5.3)	81.2† 5.1 (4.7–5.6)†	85.1† 5.1 (4.7–5.5)†
トリグリセリド, mmol/L	1.2 (0.9–1.6)	1.4 (1.0–1.9)†	1.3 (1.0–1.9)†
コレステロール, mmol/L	6.1 (5.4–6.8)	6.3 (5.6–7.0)†	6.1 (5.5–6.9)
HDL, mmol/L	1.4 (1.1–1.6)	1.2 (1.0–1.4)†	1.2 (1.0–1.4)†
LDL, mmol/L	4.1 (3.5–4.8)	4.4 (3.7–5.0)†	4.2 (3.6–4.9)
LDL/HDL, 比率	3.1 (2.3–3.9)	3.8 (2.9–4.7)†	3.6 (2.6–4.4)†
apoB, mg/L¶	1042 (883–1205)	1136 (997–1266)†	1074 (923–1232)
収縮期血圧, mm Hg	140 (126–152)	150 (138–160)†	150 (140–160)†
拡張期血圧, mm Hg	86 (80–92)	90 (82–95)†	90 (85–98)†
HbA1c, %	4.8 (4.5–5.1)	5.0 (4.6–5.4)†	5.0 (4.6–5.3)†
hs-CRP, mg/L	1.3 (0.7–2.7)	2.0 (1.0–4.1)†	(1.0–3.8)†

【０２０１】

上記の表１８では、値は、中央値と四分位範囲またはパーセンテージとして表されている。ＡｐｏＢはアポリポタンパク質Ｂ、ＢＰは血圧、ＨｂＡ１ｃはヘモグロビンＡ１ｃ、ＨＤＬは高密度リポタンパク質、ｈｓ－ＣＲＰは高感度Ｃ反応性タンパク質、ＬＤＬは低密度リポタンパク質を示している。＊カテゴリーデータに関しては、マンホイットニー検定またはχ２検定である。†Ｐ＜０．００１である。‡Ｐ＜０．０５である。§糖尿病履歴、投薬または絶食時グルコース≧６．１ｍｍｏｌ／Ｌである。¶血圧≧１４０／９０ｍｍＨｇまたは血圧降下治療である。ノンケース、冠動脈イベント１６７件、脳卒中イベント１３７件である。

【０２０２】

ＡｐｏＢ－１００自己抗体と、ＣＶＤの発症：ＣＶＤケースは、ネイティブａｐｏＢ－１００とＭＤＡ修飾ａｐｏＢ－１００　ｐ４５及びｐ２１０の両方に対するＩｇＭレベルが低く、ネイティブａｐｏＢ－１００　ｐ２１０に対するＩｇＧレベルも低いことが分かったが、他のＩｇＧ自己抗体のレベルでは、群間差はなかった。冠動脈イベントの発症が見られた対象と脳卒中の発症が見られた対象を別々に解析したところ、ノンケースと、冠動脈イベントが見られた者の間で、同じパターン差が観察された。しかしながら、ａｐｏＢ－１００ペプチド自己抗体と、総脳卒中リスクとの間に関連性は見られなかった（表１９）。

【０２０３】

（表１９）ノンケースとＣＶＤケースにおけるＡｐｏＢ－１００自己抗体のレベルの比率

ApoB-100 Abs,	ノンケース(n=4512)	ケース(n=382), 冠動脈イベント	ケース(n=317), 脳卒中
IgM-p45$_{ネイティブ}$	0.307 (0.135–0.579)	0.237 (0.089–0.497)†	0.292 (0.119–0.512)
IgM-p45$_{MDA}$	0.434 (0.260–0.685)	0.360 (0.211–0.588)†	0.406 (0.243–0.605)
IgM-p210$_{ネイティブ}$	0.668 (0.518–0.818)	0.649 (0.493–0.781)‡	0.659 (0.488–0.811)
IgM-p210$_{MDA}$	0.750 (0.606–0.881)	0.721 (0.571–0.852)†	0.723 (0.593–0.853)
IgG-p45$_{ネイティブ}$	0.231 (0.105–0.468)	0.217 (0.092–0.452)	0.224 (0.090–0.455)
IgG-p45$_{MDA}$	0.368 (0.241–0.564)	0.341 (0.226–0.530)	0.351 (0.228–0.575)
IgG-p210$_{ネイティブ}$	0.395 (0.290–0.530)	0.372 (0.266–0.478)†	0.392 (0.275–0.520)
IgG-p210$_{MDA}$	0.649 (0.489–0.830)	0.619 (0.465–0.840)	0.651 (0.462–0.873)

【０２０４】

上記の表１９では、Ａｂｓは抗体、ＡｐｏＢ－１００はアポリポタンパク質Ｂ－１００、ＣＶＤは心血管疾患、ＩｇＧは免疫グロブリン、ＩｇＭは免疫グロブリンＭ、ＭＤＡはマロンジアルデヒドを示す。＊個体の血漿試料とコントロール血漿プールの比率である。

値は、ａｐｏＢ－１００自己抗体のレベルの比率の中央値と四分位範囲として示されている。歪んだ変数は、解析前に対数変換した。†Ｐ＜０．０１である（スチューデントｔ検定）。‡Ｐ＜０．０５である。

【０２０５】

また、虚血性脳卒中の発症が見られた個体のみを解析したところ、関連性は検出されなかった。

【０２０６】

自己抗体と冠動脈イベントの発症との間に、時間依存性の関連性があるか判断するために、自己抗体のレベルを三分位に分け、それらをカプラン・マイヤー生存曲線にプロットした。この生存曲線により、ＩｇＭ－ｐ４５$_{ネイティブ}$、ＩｇＭ－ｐ４５$_{ＭＤＡ}$、ＩｇＭ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$、ＩｇＭ－ｐ２１０$_{ＭＤＡ}$及びＩｇＧ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$自己抗体の三分位において、有意な正の線形トレンドが認められた（ログランク［マンテル・コックス］検定、線形トレンドのＰ＜０．０５、図１３）。ＩｇＧ－ｐ４５$_{ネイティブ}$、ＩｇＧ－ｐ４５$_{ＭＤＡ}$またはＩｇＧ－ｐ２１０$_{ＭＤＡ}$においては、有意な線形トレンドは見られなかった。コックス比例ハザード回帰モデルでは、いくつかの予想交絡因子、例えば、年齢、性別、ＬＤＬ、ＨＤＬ、トリグリセリド、高感度Ｃ反応性タンパク質、喫煙中、糖尿病を罹患していること、血圧降下薬の服用及び収縮期血圧に関して調整した後、ＩｇＭ－ｐ４５$_{ＭＤＡ}$のレベルが高いことと、冠動脈イベント発症リスクの低下との間に、有意な関連性が認められた（ハザード比［９５％信頼区間（ＣＩ）］：０．７２［０．５５，０．９４］、第３三分位と第１三分位の比較におけるＰ＝０．０２、表２０）。さらに、同じ危険因子を有するモデルの調整後、ＩｇＧ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$のレベルが高いことと、冠動脈イベントリスクの低下との間の有意な関連性が見られた（ハザード比［９５％ＣＩ］：０．７３［０．５６，０．９７］、第３三分位と第１三分位の比較におけるＰ＝０．０３、表２０）。

【０２０７】

（表２０）ＩｇＭ－ｐ４５$_{ＭＤＡ}$及びＩｇＧ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$自己抗体の三分位ごとの冠動脈イベント発症のハザード比（ＨＲ）及び９５％信頼区間（ＣＩ）

モデル		第1三分位	第2三分位	第3三分位	トレンドのP値
	IgM-p45$_{MDA}$, 比率*	<0.313	0.313–0.578	>0.579	
	冠動脈イベント数	159	126	97	<0.0001
1	冠動脈イベントのHR (95% CI)	1.00	0.79 (0.62–0.99)†	0.59 (0.46–0.76)‡	0.001
2	冠動脈イベントのHR (95% CI)	1.00	0.94 (0.73–1.20)	0.72 (0.55–0.94)†	0.112
	IgM-p210$_{ネイティブ}$, 比率*	<0.324	0.324–0.475	>0.476	
	冠動脈イベント数	148	137	97	0.001
1	冠動脈イベントのHR (95% CI)	1.00	0.91 (0.72–1.15)	0.66 (0.51–0.85)‡	0.005
2	冠動脈イベントのHR (95% CI)	1.00	1.10 (0.86–1.40)	0.73 (0.56–0.97)†	0.051

【０２０８】

上記の表２０において、コックス比例ハザード回帰を用いて、年齢、性別、ＬＤＬ、ＨＤＬ、収縮期血圧、トリグリセリド、ｈｓ－ＣＲＰ、喫煙中、血圧降下薬の服用及び糖尿病を罹患していることに関して調節せずに（モデル１）、またこれらに関して調節して（モデル２）、ＩｇＭ－ｐ４５$_{ＭＤＡ}$及びＩｇＧ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$自己抗体の三分位と、冠動脈イベントの発症との関連性を算出した。線形トレンドのχ２検定によって、イベント数と、自己抗体の三分位との有意な関連性を判断した。ＣＩは信頼区間、ＨｂＡ１ｃはヘモグロビンＡ１ｃ、ＨＤＬは高密度リポタンパク質、ＨＲはハザード比、ｈｓ－ＣＲ

Ｐは高感度Ｃ反応性タンパク質、ＩｇＧは免疫グロブリン、ＩｇＭは免疫グロブリンＭ、ＬＤＬは低密度リポタンパク質、ＭＤＡはマロンジアルデヒドを示す。＊個体の血漿試料とコントロール血漿プールの比率である。†Ｐ＜０．０５である。‡第１三分位に対するＰ＜０．００１であり、太字で強調されている。

【０２０９】

他のａｐｏＢ－１００自己抗体の三分位間では、有意差は検出されなかった（表２１）。

【０２１０】

（表２１）ａｐｏ－Ｂ１００自己抗体の三分位ごとの冠動脈イベント発症のハザード比（ＨＲ）及び９５％信頼区間（ＣＩ）

	第1三分位	第2三分位	第3三分位	トレンドのP値
IgM-p45ネイティブ, 比率†				
冠動脈イベント数	137	109	95	0.004
冠動脈イベントのHR (95% CI)	1.00	0.84 (0.64-1.09)	0.76 (0.58-1.03)	0.010
IgG-p45ネイティブ, 比率†				
冠動脈イベント数	140	119	123	0.269
冠動脈イベントのHR (95% CI)	1.00	0.87 (0.67-1.14)	1.02 (0.79-1.32)	0.167
IgG-p45MDA, 比率				
冠動脈イベント数	138	118	113	0.098
冠動脈イベントのHR (95% CI)	1.00	0.85 (0.66-1.11)	0.89 (0.68-1.16)	0.892
IgM-p210ネイティブ, 比率†				
冠動脈イベント数	144	129	109	0.023
冠動脈イベントのHR (95% CI)	1.00	1.07 (0.83-1.38)	0.90 (0.67-1.18)	0.298
IgM-p210MDA 比率†				
冠動脈イベント数	147	121	114	0.032
冠動脈イベントのHR (95% CI)	1.00	0.95 (0.73-1.23)	1.04 (0.80-1.35)	0.368
IgG-p210MDA 比率†				
冠動脈イベント数	144	113	125	0.216
冠動脈イベントのHR (95% CI)	1.00	0.81 (0.63-1.06)	0.96 (0.74-1.23)	0.289

【０２１１】

上記の表２１では、年齢、性別、ＬＤＬ、ＨＤＬ、収縮期血圧、トリグリセリド、ｈｓ－ＣＲＰ、喫煙中、血圧降下薬の服用及び糖尿病を罹患していることに関して調整して、コックス比例ハザード回帰を用いて、ａｐｏＢ－１００自己抗体の三分位と冠動脈イベントの発症との関連性を算出した。線形トレンドのχ２検定によって、イベント数と自己抗体の三分位との有意な関連性を判断した。†個体の血漿試料とコントロール血漿プールの比の三分位である。三分位におけるトレンドの有意なＰ値は、太字のテキストで強調されている。

【０２１２】

ＩｇＭ－ｐ４５$_{ＭＤＡ}$のレベルが高いことと、冠動脈イベント発症リスクの低下との関連性は、同じ抗原を認識するＩｇＧ－抗体のレベルから独立していた（ＩｇＧ－ｐ４５$_{ＭＤＡ}$、ハザード比［９５％ＣＩ］：０．５９［０．４６，０．７６］、Ｐ＜０．００１）。これと一致して、ＩｇＧ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$のレベルが高いことは、ＩｇＭ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$のレベルから独立していた（ハザード比［９５％ＣＩ］：０．７１［０．５４，０．９３］、Ｐ＝０．０１）。総合すると、これらの結果から、一部のａｐｏＢ－１００自己抗体は、冠動脈イベントの発症率の低下と関連があることが示唆されている。

【０２１３】

頸動脈プラークが存在する個体は、頸動脈プラークのない対象と比べて、ａｐｏ－Ｂ１００自己抗体のうちの３つのレベルが低かった（ＩｇＭ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$（吸光度比が０．６８±０．２２に対して０．６６±０．２１、Ｐ＜０．０１）、ＩｇＭ－ｐ２１０$_{ＭＤＡ}$（吸光度比が０．７５±０．２０に対して０．７３±０．２０、Ｐ＜０．００１）、ＩｇＧ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$（吸光度比が、０．４４±０．２２に対して０．４１±０．２２、Ｐ＜０．００１）。さらに、カイ二乗検定により、これらの３つのａｐｏＢ－１００自己抗体の三分位において、頸動脈プラークの存在に関して有意な線形トレンドが認められ、また、ＩｇＧ－ｐ４５$_{ＭＤＡ}$においても認められた（表２２）。

【０２１４】

（表２２）頸動脈プラークの存在と、ａｐｏＢ－１００自己抗体の三分位との関連性

	第1三分位	第2三分位	第3三分位	トレンドの*P*値
IgM-p45$_{ネイティブ}$, 比率†				
頸動脈プラーク数（%）	689 (45.4)	659 (43.3)	654 (43.0)	0.169
IgM-p45$_{MDA}$, 比率†				
頸動脈プラーク数（%）	768 (46.3)	702 (42.2)	731 (43.5)	0.114
IgG-p45$_{ネイティブ}$, 比率†				
頸動脈プラーク数（%）	749 (44.7)	736 (44.4)	716 (43.0)	0.319
IgG-p45$_{MDA}$, 比率†				
頸動脈プラーク数（%）	760 (46.1)	713 (43.5)	695 (42.5)	0.039
IgM-p210$_{ネイティブ}$ 比率†				
頸動脈プラーク数（%）	770 (46.0)	732 (44.3)	699 (41.7)	0.011
IgM-p210$_{MDA}$ 比率†				
頸動脈プラーク数（%）	778 (46.7)	742 (44.4)	681 (40.9)	0.001
IgG-p210$_{ネイティブ}$ 比率†				
頸動脈プラーク数（%）	801 (48.1)	729 (43.7)	671 (40.2)	<0.001
IgG-p210$_{MDA}$ 比率†				
頸動脈プラーク数（%）	748 (45.0)	721 (43.1)	732 (43.9)	0.525

【０２１５】

上記の表２２では、数値は、その三分位において、頸動脈プラークのある個体数（ｎ）を、パーセンテージ（％）は、頸動脈プラークのある個体の割合を表している。線形トレンドのχ^2検定によって、頸動脈プラークの存在と、自己抗体の三分位との有意な関連性を判断した。†個体の血漿試料とコントロール血漿プールの比率の三分位である。三分位数全体におけるトレンドの有意なＰ値は、太字のテキストで強調されている。

【０２１６】

ロジスティック回帰モデル（上記と同じ危険因子に関して調整した）では、上の三分位

では、頸動脈プラークが存在する個体は、ＩｇＧ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$の最低三分位と比べて少なかったが（ＯＲ＝０．８１３、９５％ＣＩ　０．７０～０．９５、Ｐ＝０．００８）、他の自己抗体に関しては、関連性は見られなかった。ＩｇＭ－ｐ４５$_{ネイティブ}$以外のすべての自己抗体は、ＬＤＬレベルと逆相関していたが、ｐ２１０を認識する抗体のみで、ａｐｏＢとの有意な逆相関が示された（表２３）。

【０２１７】

（表２３）ＡｐｏＢ－１００自己抗体のレベルとＬＤＬまたはＡｐｏＢとの間のスピアマン二変量相関（ｒ）

Apo B-100 Abs, 比率*	LDL,† mmol/L	apoB,‡ mg/L
IgM-p45$_{ネイティブ}$	NS	NS
IgM-p45$_{MDA}$	r =−0.032§	NS
IgM-p210$_{ネイティブ}$	R = −0.064‖	R = −0.080‖
IgM-p210$_{MDA}$	R = −0.046	R = −0.083‖
IgG-p45$_{ネイティブ}$	R = −0.032§	NS
IgG-p45$_{MDA}$	R = −0.04	NS
IgG-p210$_{ネイティブ}$	R = −0.069‖	R = −0.083‖
IgG-p210$_{ネイティブ}$	R = −0.042	R = −0.047§

【０２１８】

上記の表２３では、Ａｂｓは抗体、ＡｐｏＢ－１００はアポリポタンパク質Ｂ－１００、ＩｇＧは免疫グロブリン、ＩｇＭは免疫グロブリンＭ、ＬＤＬは低密度リポタンパク質、ＭＤＡはマロンジアルデヒド、ＮＳは有意差なしを示している。＊個体の血漿試料とコントロール血漿プールの比率である。†４５１２件のノンケース、３８２件の冠動脈イベント及び３１７件の脳卒中イベントを含む。‡１８４２件のノンケース、１６７件の冠動脈及び１３７件の脳卒中イベントを含む。§Ｐ＜０．０５である。¶Ｐ＜０．０１である。Ｐ＜０．００１である。

【０２１９】

５３９３人の白人個体を含むこのスウェーデンでの前向き集団ベース試験は、ａｐｏＢ－１００ペプチドを認識する自己抗体のＣＶＤにおける役割について調べたこれまでで最大規模の研究である。過去のいくつかの試験は、後ろ向きのケースコントロールデザインであったとともに、小規模な選定済み患者集団（異なる心血管危険因子が確立されていた個体など）を含めたものであった。しかしながら、今回の試験デザインでは、自己抗体のレベルによって、一般コミュニティーの対象における将来の心血管イベントのリスクを予想できるか判断可能にした。その所見により、ネイティブ形態のｐ２１０を認識するＩｇＧ自己抗体は、頸動脈プラークの存在の低減と横断的な関連があることが確認された。さらに、ＩｇＭ－ｐ４５$_{ＭＤＡ}$及びＩｇＧ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$自己抗体ではそれぞれ、将来の冠動脈イベントリスクの低下との独立関連性が見られた。

【０２２０】

酸化ＬＤＬ粒子全体に対する自己抗体と、その自己抗体とＣＶＤとの関連性を分析した以前の試験では、矛盾する所見が見られた。その不確定的な結果は、抗原の標準化が困難なことに左右されるとみられる。ＬＤＬ粒子の酸化プロセス中、ネオエピトープが形成され、その他のものは分解される。このプロセスは、多様な個体から単離したＬＤＬ粒子の組成差に応じて逸脱することがあり、その結果、抗原の定義が不十分となる。単一のＬＤＬ由来抗原（ホスホリルコリンまたはａｐｏＢ－１００ペプチドなど）を用いる試験は、より明らかな状況を示している。ａｐｏＢ－１００ペプチド自己抗体を解析した以前の試験では、糖尿病患者と全身性エリテマトーデス患者においても、自己抗体とＣＶＤとの逆相関性が示されている。したがって、臨床試験により、酸化ＬＤＬにおける特異的抗原を認識する抗体の抑制的な役割が示唆されている。これは、ＭＤＡ－ｐ４５エピトープを認識するヒト組み換えＩｇＧで、アテローム性動脈硬化症の傾向のあるマウスを処置したところ、大動脈プラーク面積とプラーク炎症が低減したことが分かった実験的研究によって裏付けられている。

【０２２１】
ＩｇＧ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$の血漿中レベルが高いことは、非糖尿病患者と糖尿病患者の両方における冠動脈病巣の重症度の低下、心筋梗塞発症リスクの低下、無症状アテローム性動脈硬化症の重症度の低下、頸動脈内膜切除術患者における術後の心血管死リスクの低下、及び全身性エリテマトーデス患者におけるＣＶＤ有病率の低下と以前関連付けられている。今回、本発明者らは、大きな母集団ベースの前向き研究において、ＩｇＧ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$自己抗体のレベルが低いことによって、冠動脈イベントリスクが予測されることを示すことによって、これらの所見を拡大する。興味深いことに、ｐ４５エピトープではなく、ｐ２１０エピトープを認識する抗体のみで、ａｐｏＢとの逆相関が見られた。インタクトなＬＤＬ粒子において、ｐ２１０は、免疫系で認識可能であるが、ｐ４５エピトープは、リン脂質層に隠れていて、酸化プロセス後のみに認識可能となると推測できる。さらに、ＩｇＧ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$自己抗体は、ネイティブｐ２１０ペプチドまたは穏やかな修飾が行われたｐ２１０ペプチドを認識するとともに、このエピトープは、より大規模なＭＤＡ修飾を行ったｐ２１０ペプチドよりも、アテローム発生において重要な役割を果たすと見られる。

【０２２２】
本発明者らは以前の試験において、ｐ２１０$_{ＭＤＡ}$を認識する自己抗体のレベルが高いことと、無症状アテローム性動脈硬化症及び女性における頸動脈疾患の重症度の低下との逆相関性を検出した。いずれのケースでも、エピトープは、ＩｇＭ自己抗体によって認識された。未解決の問題は、これらの抗体が、内因的に作られるその他の構造体（酸化特異的エピトープなど）を認識することが以前に示された天然のＩｇＭ抗体であるのか、またはこれらの抗体が、古典的なＩｇＭ抗体であるのかという問題である。Ｔ細胞活性化Ｂ２細胞は、適応ＩｇＭを分泌することが知られており、Ｂ１細胞は、自然ＩｇＭ抗体を自発的に分泌する。実験的研究により、Ｂ２細胞にはアテローム形成促進的な役割があり、Ｂ１細胞は、自然ＩｇＭ抗体の分泌によってアテローム形成抑制性であることが示唆されている。総合すると、これにより、修飾ａｐｏＢ－１００エピトープを認識するＩｇＭ抗体が、アテローム形成抑制性の自然ＩｇＭ抗体であることを示すことができる。興味深いことに、ａｐｏＢ－１００におけるメチルグリオキサール修飾ペプチドｐ２２０を認識するＩｇＭのレベルが低い対象は、心血管イベントを発現するリスクが高いことと、抗メチルグリオキサール－ｐ２２０　ＩｇＭが、Ｂ１細胞によって産生されることを本発明者らは以前に示している。酸化ＬＤＬの別の重要な酸化特異的エピトープであるホスホリルコリンエピトープは、詳細に特徴付けられた自然ＩｇＭ抗体である抗ホスホリルコリンＩｇＭに認識されることが分かっている。ホスホリルコリンエピトープに対するこの自然ＩｇＭ抗体は、マウスにおける実験的なアテローム性動脈硬化症において抑制作用を発揮するとともに、ヒトにおける心血管リスクの低下と関連があることも示されている。裏付けとして、今回の試験では、ＩｇＭ－ｐ４５$_{ＭＤＡ}$のレベルが高いことと、将来の冠動脈イベントリスクの低下との逆相関性が示された。このＩｇＭ抗体のレベルが高いことは、以前の試験でも、全身性エリテマトーデス患者におけるＣＶＤ有病率の低下との関連性が示されている。さらに、２型糖尿病患者において、ＡＧＥ修飾ａｐｏＢ－１００を認識するＩｇＭ自己抗体のレベルが高いことは、冠動脈疾患の重症度の低下と関連があることが分かった。総合すると、酸化ＬＤＬエピトープを認識するＩｇＭ及びＴ細胞依存性ＩｇＧ抗体にはいずれも、アテローム発生において抑制的な役割があると見られ、自然免疫応答と適応免疫応答の両方の重大な寄与が示唆されている。ａｐｏＢ－１００エピトープを認識する自己抗体であって、今回の試験で測定した自己抗体のうちの２つのみが、冠動脈イベント発症リスクの低下と関連付けられた理由は、これらの２つのエピトープが、異なるＬＤＬ粒子修飾段階に現れて、免疫応答の活性化にとって重要である形で提示されることになることであると見られ、ＬＤＬの酸化の程度が、血漿中自己抗体のレベルに影響を及ぼすことを反映している。

【０２２３】
炎症と免疫応答の両方が、冠動脈疾患の発症機序と、脳卒中のリスクと原因に影響を及

ぼすことが分かっている。すでにプライミングした個体では、心筋における酸化ストレスの誘導と、その後のＬＤＬの酸化によって、抗体応答を迅速に活性化でき、これらの抗体が直接消費され、その結果、そのイベントの翌日に、ベースラインレベルとなる。

【０２２４】

酸化特異的エピトープに対する自然ＩｇＭ抗体のレベルは、いくつかのヒトでの試験において、ＣＶＤとの逆相関が示されている。そのアテローム形成抑制性は、酸化ＬＤＬの酸化特異的エピトープを認識する能力に依存していると思われる。したがって、ＩｇＭ－ｐ４５$_{ＭＤＡ}$自己抗体は、その抗体と、将来の冠動脈イベントのリスクの低下との関連性を説明する自然ＩｇＭ抗体であると見られる。

【０２２５】

今回の試験の長所は、集団のサイズが大きいことと、前向きなデザインと、１５年のフォローアップ期間であり、６００件を超えるイベントが含まれており、上記のａｐｏＢ－１００エピトープ自己抗体によって、将来の心血管イベントのリスクが予測されるのかという評価を可能にすることによって、独自な試験となっている。今回の所見により、ＩｇＭ－ｐ４５$_{ＭＤＡ}$またはＩｇＧ－ｐ２１０$_{ネイティブ}$自己抗体のレベルが高いことと、冠動脈イベントのリスクの低下との関連性が示されている。総合すると、また、過去の小規模な試験に鑑みると、今回の所見により、高レベルのａｐｏＢ－１００自己抗体には、ＣＶＤにおいて抑制的な役割があることが認められる。

【０２２６】

実施例４．アポリポタンパク質Ｂ－１００抗原に対する自己抗体のレベルの低下は、全身性エリテマトーデスにおける心血管疾患と関連性がある。

自己抗体の産生の増加は、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）の特有の特徴であり、これらの自己抗体のいくつかが、ＳＬＥにおける心血管疾患（ＣＶＤ）の増加に寄与し得るというエビデンスがある。アポリポタンパク質（ａｐｏ）Ｂ－１００ペプチドｐ４５及びｐ２１０に対する自己抗体は、非ＳＬＥコホートにおいて、ＣＶＤリスクの低下と関連付けられている。今回の試験の目的は、抑制的である可能性のあるこれらの自己抗体の産生に、ＳＬＥがどのような形で作用するのかを調べることであった。今回の試験コホートは、４３４人のＳＬＥ患者と、年齢と性別を適合させた３２２人の集団コントロールで構成させた。ネイティブｐ４５及びｐ２１０とマロンジアルデヒド（ＭＤＡ）修飾ｐ４５及びｐ２１０に対する抗体を酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）によって測定した。ＳＬＥ患者は、ｐ２１０免疫グロブリン（Ｉｇ）Ｇ及びｐ４５　ＩｇＭ（いずれも、ネイティブ形態とマロンジアルデヒド（ＭＤＡ）修飾形態）のレベルが有意に低かった。ＣＶＤ（心筋梗塞、虚血性脳血管疾患または末梢血管疾患）が顕在化したＳＬＥ患者は、ＣＶＤではないＳＬＥ患者よりも、ｐ２１０　ＩｇＧ及びｐ４５　ＩｇＭのレベルが低かった。これらの自己抗体のレベルの低下は、Ｓｙｓｔｅｍｉｃ　Ｌｕｐｕｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｎｇ　Ｃｌｉｎｉｃｓ／Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｃｏｌｌｅｇｅ　ｏｆ　Ｒｈｅｕｍａｔｏｌｏｇｙ（ＡＣＲ）Ｄａｍａｇｅ　Ｉｎｄｅｘ（ＳＤＩ）によって評価したところ、永久的な臓器損傷のあるＳＬＥ患者でも観察された。今回の所見から、ＳＬＥ（多数の特異性の自己抗体が多量なことによって概して特徴付けられる状態）の患者は、ａｐｏ　Ｂ－１００抗原ｐ４５及びｐ２１０に対する抗体のレベルが低いことと、ＣＶＤを有するＳＬＥ患者では、これらの抗体のレベルがさらに低いことが示されている。これらの観察から、抗体の媒介による損傷ＬＤＬ粒子の除去が損なわれることが、ＳＬＥにおける血管合併症と臓器損傷の発現に寄与する可能性が示唆されている。

【０２２７】

今回の試験において、本発明者らは、ＳＬＥ患者と適合コントロールのコホートにおいて、ネイティブｐ４５及びｐ２１０ならびにＭＤＡ修飾ｐ４５及びｐ２１０に対するＩｇＧとＩｇＭの血漿中レベルを解析した。その結果から、ＳＬＥ患者はｐ４５　ＩｇＭ及びｐ２１０　ＩｇＧ自己抗体のレベルが低く、このことは、ＣＶＤ及びその他の臓器合併症のリスクの上昇と関連があることが示されている。

【０２２８】
実験方法
患者及びコントロール：患者及びコントロールは、２００４年１月～２０１３年１０月に含めた。１９８２年に改定されたＡｍｅｒｉｃａｎ Ｃｏｌｌｅｇｅ ｏｆ Ｒｈｅｕｍａｔｏｌｏｇｙ（ＡＣＲ）のＳＬＥ分類基準［Ｔａｎ ＥＭ，Ｃｏｈｅｎ ＡＳ，Ｆｒｉｅｓ ＪＦ ｅｔ ａｌ．Ｔｈｅ １９８２ ｒｅｖｉｓｅｄ ｃｒｉｔｅｒｉａ ｆｏｒ ｔｈｅ ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｓｙｓｔｅｍｉｃ ｌｕｐｕｓ ｅｒｙｔｈｅｍａｔｏｓｕｓ．Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｒｈｅｕｍ １９８２；２５：１２７１－７］のうちの４つ以上を満たしたとともに、上記の期間中に、Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｒｈｅｕｍａｔｏｌｏｇｙ，Ｋａｒｏｌｉｎｓｋａ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｈｏｓｐｉｔａｌ Ｓｏｌｎａで、ＳＬＥに対する診療を受けた患者全員に、参加するかたずねた。患者は、１８歳超であることを要件とし、それ以外には、除外基準はなかった。集団の登録において、最初の３２２人のＳＬＥ患者と個別に適合したコントロール集団を特定した。適合は、年齢差１年以内で、性別、居住領域について行った。コントロールに書簡で連絡して、参加するかたずねた。コントロールにおける唯一の除外基準は、ＳＬＥと診断されたことであった。Ｌｏｃａｌ Ｅｔｈｉｃｓ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｋａｒｏｌｉｎｓｋａ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｈｏｓｐｉｔａｌから、試験のプロトコールの承認を受けた。参加者全員から、参加するためのインフォームドコンセントを書面で得た。
【０２２９】
データ収集：患者とコントロールは全員、リウマチ学者が直接調べた。ＣＶＤの従来の危険因子をまとめた。高血圧は、収縮期血圧＞１４０ｍｍＨｇ及び／または拡張期血圧＞９０ｍｍＨｇ、あるいは血圧降下治療を利用していることとして定義した。患者が以前、糖尿病と診断された場合には、糖尿病が存在するものとみなした。問診と、医療ファイルの検討を通じて、客観的に検証された心筋梗塞、虚血性脳血管疾患または末梢血管疾患の履歴として定義される血管イベント履歴を得た。ＳＬＥ患者では、診断時の年齢、疾患継続期間及びループスの顕在化（自己抗体を含む）を記録した。ループス腎炎は、１９８２年に改定された、ＡＣＲの腎炎分類基準［Ｔａｎ ＥＭ，ｅｔ ａｌ．Ｔｈｅ １９８２ ｒｅｖｉｓｅｄ ｃｒｉｔｅｒｉａ ｆｏｒ ｔｈｅ ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｓｙｓｔｅｍｉｃ ｌｕｐｕｓ ｅｒｙｔｈｅｍａｔｏｓｕｓ．Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｒｈｅｕｍ １９８２；２５：１２７１－７］に従って定義した。臓器損傷は、Ｓｙｓｔｅｍｉｃ Ｌｕｐｕｓ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｎｇ Ｃｌｉｎｉｃｓ／ＡＣＲ Ｄａｍａｇｅ ｉｎｄｅｘ（ＳＤＩ）［Ｇｌａｄｍａｎ Ｄ，ｅｔ ａｌ．Ｔｈｅ ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ａｎｄ ｉｎｉｔｉａｌ ｖａｌｉｄａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｓｙｓｔｅｍｉｃ Ｌｕｐｕｓ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｎｇ Ｃｌｉｎｉｃｓ／Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｏｌｌｅｇｅ ｏｆ Ｒｈｅｕｍａｔｏｌｏｇｙ ｄａｍａｇｅ ｉｎｄｅｘ ｆｏｒ ｓｙｓｔｅｍｉｃ ｌｕｐｕｓ ｅｒｙｔｈｅｍａｔｏｓｕｓ．Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｒｈｅｕｍ １９９６；３９：３６３－９］によって評価した。すべての血液試料は、一晩絶食後に採取し、臨床検査は、新鮮な血液試料、または－７０℃で保存後のいずれかで、盲検で行った。
【０２３０】
内膜中膜複合体厚の測定：７．０ＭＨｚのＡＲＴリニアアレイトランスデューサーを備えるデュプレックススキャナー（Ａｃｕｓｏｎ １２８ＸＰ、米国カリフォルニア州マウンテンビュー）を用いて、頸動脈超音波で、３０２人の患者を調べた。左右の頸動脈を調べた。ＩＭ厚は、内腔エコーの先端と、中膜／外膜エコーの先端との間の距離として定義した［Ｗｉｋｓｔｒａｎｄ Ｊ，Ｗｅｎｄｅｌｈａｇ Ｉ．Ｍｅｔｈｏｄｏｌｏｇｉｃａｌ ｃｏｎｓｉｄｅｒａｔｉｏｎｓ ｏｆ ｕｌｔｒａｓｏｕｎｄ ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ ｏｆ ｉｎｔｉｍａ－ｍｅｄｉａ ｔｈｉｃｋｎｅｓｓ ａｎｄ ｌｕｍｅｎ ｄｉａｍｅｔｅｒ．Ｊ Ｉｎｔｅｒｎ Ｍｅｄ １９９４；２３６：５５５－９］。Ｉ

Ｍ厚は、１ｃｍの長さにわたって、球部のすぐ近位で測定した。両側における平均内膜中膜厚（ＩＭＴ）の値を各対象において算出した。１人の技師が、すべての測定を記録した。

【０２３１】

ｐ４５、ｐ２１０及びβ$_2$ＧＰＩ自己抗体の測定：ヒトａｐｏＢ－１００の６６１～６８０位のアミノ酸
(p45; IEIGLEGKGFEPTLEALFGK)
と３１３６～３１５５位のアミノ酸
(p210; KTTKQSFDLSVKAQYKKNKH)
に対応するペプチドを合成し（デンマーク、ヘルスホルムのＫＪ Ｒｏｓｓ Ｐｅｔｅｒｓｅｎ ＡＳ）、ＥＬＩＳＡで使用した。これらのペプチドを０．５ＭのＭＤＡによって３時間、３７℃で修飾し、説明されているようにして、１ｍＭのＥＤＴＡを含むＰＢＳに対して透析した［Ｆｒｅｄｒｉｋｓｏｎ ＧＮ，ｅｔ ａｌ．Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｉｍｍｕｎｅ ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ ａｇａｉｎｓｔ ａｌｄｅｈｙｄｅ－ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｐｅｐｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｉｎ ａｐｏ Ｂ－１００ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ ｄｉｓｅａｓｅ．Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ Ｔｈｒｏｍｂ Ｖａｓｃ Ｂｉｏｌ ２００３；２３：８７２－７８］。ネイティブペプチドとＭＤＡ修飾ペプチドをＰＢＳで希釈したもの（ｐＨ７．４、２０μｇ／ｍｌ）をマイクロタイタープレートのウェル（Ｎｕｎｃ ＭａｘｉＳｏｒｐ、デンマーク、ロスキレのＮｕｎｃ）に、４℃での一晩のインキュベートにおいて吸収させた。０．０１％Ｔｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳ（ＰＢＳ－Ｔ）で洗浄した後、コーティングしたプレートをＴＢＳ中のＳｕｐｅｒＢｌｏｃｋ（イリノイ州ロックフォードのＰｉｅｒｃｅ）で３０分、室温でブロックしてから、１／１００で、ＴＢＳ－０．０１％Ｔｗｅｅｎ－２０（ＴＢＳ－Ｔ）において希釈した試験血漿を２時間、室温でインキュベートし、４℃で一晩インキュベートした。すすいだ後、ビオチン化ウサギ抗ヒトＩｇＭ（ＩＣＮ、オハイオ州オーロラのＢｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．）またはＩｇＧ抗体（Ａｂｃａｍ、ａｂ７１５９）をＴＢＳ－Ｔで適切に希釈したものを用いて、上記のペプチドに対する自己抗体の沈着を検出した。２時間、室温で再度インキュベートした後、プレートを洗浄し、結合したビオチン化抗体をアルカリホスファターゼコンジュゲートストレプトアビジン（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、４０５２１１）によって検出し、２時間、室温でインキュベートした。ホスファターゼ基質キット（Ｐｉｅｒｃｅ）を用いることによって、発色反応を行わせ、室温で１時間インキュベートした後、４０５ｎｍでの吸光度を測定した。値は、標準参照血漿に対する比率として表されている。抗体ＥＬＩＳＡの特異性と可変性に関するデータは、以前に公開されている［Ｆｒｅｄｒｉｋｓｏｎ ＧＮ，ｅｔ ａｌ．Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｉｍｍｕｎｅ ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ ａｇａｉｎｓｔ ａｌｄｅｈｙｄｅ－ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｐｅｐｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｉｎ ａｐｏ Ｂ－１００ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ ｄｉｓｅａｓｅ．Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ Ｔｈｒｏｍｂ Ｖａｓｃ Ｂｉｏｌ ２００３；２３：８７２－７８、Ｆｒｅｄｒｉｋｓｏｎ ＧＮ，ｅｔ ａｌ．Ａｕｔｏａｎｔｉｂｏｄｙ ａｇａｉｎｓｔ ｔｈｅ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ６６１－６８０ ｉｎ ａｐｏ Ｂ－１００ ｉｓ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｄｅｃｒｅａｓｅｄ ｃａｒｏｔｉｄ ｓｔｅｎｏｓｉｓ ａｎｄ ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ ｅｖｅｎｔｓ．Ａｔｈｅｒｏｓｃｌｅｒｏｓｉｓ ２００７；１９４：ｅ１８８－９２］。

【０２３２】

マルチプレックスイムノアッセイＢｉｏＰｌｅｘ ２２００ ＡＰＬＳ（米国カリフォルニア州ハーキュリーズのＢｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｉｎｃ．）によって、抗β$_2$ＧＰＩ抗体ＩｇＭ／ＩｇＧを測定した。ＩｇＭに関しては１．９～１６０Ｕ／ｍＬ、ＩｇＧに関しては１．９～１６０Ｕ／ｍＬの範囲で結果が記録された。結果は、連続変数として扱った。マルチプレックスアッセイでは、≧２０Ｕ／ｍＬの場合に陽性と

みなされる。このカットオフレベルは、健常な血液ドナーの少なくとも９９パーセンタイルに相当する。

【０２３３】

統計：臨床的特徴は、連続変数の中央値（四分位範囲、ＩＱＲ）と、カテゴリー変数のパーセンテージとして表されている。正規分布していない連続変数は、対数変換した。対数変換後に、正規分布にならなかった場合には、ノンパラメトリック検定を用いた。データの種類に応じて、スチューデントｔ検定、マンホイットニー検定またはカイ二乗検定を用いて、群間差を比較した。スピアマンの順位相関係数の算出を通じて、相関関係を調べた。多変数で調整したロジスティック回帰モデルを実行して、自己抗体と心血管／臓器損傷の転帰との関連性を評価した。部分相関関係を算出して、自己抗体とＩＭＴとの関連性を明らかにし、年齢と性別に関して調整した。

【０２３４】

ＳＬＥ患者とコントロール群の臨床的特徴が表２４に示されている。試験対象の約９０％が女性であったとともに、年齢の中央値は、５０歳弱であった。臨床的に顕在化したＣＶＤ（心筋梗塞、脳卒中または末梢動脈疾患）の有病率は、ＳＬＥ群の方が１３倍高かった。

【０２３５】

（表２４）全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）患者とコントロールの臨床的特徴

	SLE 患者 (n= 434)、中央値 (IQR)*	コントロール (n = 322)、中央値 (IQR)*	*P*値
年齢（歳）	47·2 (34·2–57·8)	48·2 (35 ·4–58·6)	n.s.
女性の割合（%）	86	92	0·01
SLEの特徴			
SLE基準の数	6 (5–7) 17件は喪失	n.a.	
疾患継続期間（年）	10·6 (2·8–20·9)	n.a.	
SLICC 損傷指数 (SDI)	1 (IQR: 0–2, 範囲:0〜10)	n.a.	
従来の危険因子及び臨床検査			
現喫煙者, (%)	18·8	14·6	n.s.
収縮期血圧 (mmHg)	120 (110–140)	120 (110–135)	n.s.
拡張期血圧 (mmHg)	78 (70–80)	75 (70–82)	n.s.
高血圧治療 (%)	37·2	13·7	<0·0001
肥満度指数 (kg/m2)	24·0 (21·4–27·2)	24·3 (22·0–27·6)	n.s.
糖尿病 (%)	1·4	0·9	n.s.
総コレステロール (mmol/l)	4·9 (4·2–5·7)	5·1 (4·4–5·9)	0·009
高密度リポタンパク質 (mmol/l)	1·1 (1·1–1·6)	1·5 (1·2–1·8)	0·006
低密度リポタンパク質 (mmol/l)	3·0 (2·5–3·6)	3·2 (2·6–3·9)	0·0002
トリグリセリド (mmol/l)	1·0 (0·7–1·5)	0·78 (0·55–1·10)	<0·0001
アポリポタンパク質 A1 (mg/ml)	1·5 (1·3–1·7)	1·7 (1·4–1·9)	<0·0001
アポリポタンパク質 B (mg/ml)	0·81 (0·69–0·96)	0·81 (0·66–0·97)	n.s.
グルコース	4·8 (4·5–5·2)	4·9 (4·6–5·2)	n.s.
高感度 CRP	1·7 (0·7–5·3)	0·9 (0·4–0·9)	<0·0001
クレアチニン	69 (58–84)	66 (59–73)	0·0005
心血管疾患			
心血管イベント† (%)	16·1	1·2	<0·0001
虚血性心疾患 (%)	6·5	0·3	<0·0001
虚血性脳血管疾患（%）	8·7	1·6	<0·0001
虚血性末梢血管疾患（%）	2·8	0·6	<0·0001
IMT mm（両側の平均）	0·053 (0·048–0·063)	n.a.	
治療（継続中）			
プレドニゾロン（%）	61·4		
抗マラリア剤（%）	37·1		
アザチオプリン（%）	17·4		
ミコフェノール酸モフェチル（%）	11·4		

【０２３６】

上記の表２４では、＊分布は、別段の定めのない限り、中央値［四分位範囲（ＩＱＲ）］として示されている。†心筋梗塞、虚血性脳血管疾患及び末梢動脈疾患を含む。ＩＭＴは内膜中膜厚である。ＣＲＰはＣ反応性タンパク質、ＳＬＩＣはＳｙｓｔｅｍｉｃ Ｌｕｐｕｓ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｎｇ Ｃｌｉｎｉｃｓ、ｎ．ａ．は該当なし、ｎ．ｓ．は有意差なしである。

【０２３７】

ＳＬＥ患者の方が、ａｐｏＢ ｐ４５ ＩｇＭ及びｐ２１０ ＩｇＧのレベルが低かった。本発明者らはまず、ＳＬＥ患者とコントロールとの間で、ａｐｏＢに対する自己抗体の発現差が見られるかを調べた。これは、ネイティブａｐｏＢ配列ｐ４５及びｐ２１０ならびにマロンジアルデヒド（ＭＤＡ）修飾ａｐｏＢ配列ｐ４５及びｐ２１０に対するＩｇＭ及びＩｇＧ抗体を解析することによって決定した。β_2ＧＰＩ（ａｐｏＨともいう）に対する自己抗体を用いて、ａｐｏＢペプチド自己抗体のパターンと、リポタンパク質及び膜リン脂質に結合する別の抗原に対する自己抗体のパターンを比較した。ＳＬＥ患者は、ｐ２１０ ＩｇＧ及びｐ４５ ＩｇＭ（ネイティブ形態とＭＤＡ修飾形態の両方）のレベルが有意に低かったが、ネイティブｐ２１０及びＭＤＡ－ｐ２１０に対するＩｇＭは増加した（表２５）。

【０２３８】

（表２５）全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）患者とコントロールにおけるアポリポタンパク質Ｂ自己抗体とβ$_2$－糖タンパク質－Ｉ（ＧＰＩ）自己抗体

	SLE 患者 (n = 434)、中央値 (IQR)*	コントロール (n = 322)、中央値 (IQR)*	*P*
アポリポタンパク質B 抗体			
p45 IgM	0·64 (0·30–1·29)	0·86 (0·47–1·72)	0·001
MDA-p45 IgM	0·72 (0·37–1·43)	0·92 (0·56–0·92)	0·001
p45 IgG	0·49 (0·23–1·03)	0·42 (0·20–0·90)	n.s.
MDA-p45 IgG	0·52 (0·28–1·02)	0·43 (0·23–0·95)	n.s.
p210 IgM	0·77 (0·52–1·06)	0·70 (0·53–0·89)	0·007
MDA-p210 IgM	0·87 (0·63–1·03)	0·79 (0·62–0·93)	0·002
p210 IgG	0·48 (0·24–0·84)	0·54 (0·35–0·89)	0·02
MDA-p210 IgG	0·70 (0·51–0·98)	0·82 (0·61–1·05)	0·005
b2GPI 抗体			
b2GPI IgM	1·9 (1·9–3·9)	1·9 (1·9–2·5)	0·002
b2GPI IgG	1·9 (1·9–10·2)	1·9 (1·9–1·9)	0·001

【０２３９】

上記の表２５では、＊分布は、中央値［四分位範囲（ＩＱＲ）］として示されている。Ｉｇは免疫グロブリンであり、ＭＤＡはマロンジアルデヒドであり、ｎ．ｓ．は有意差なしである。

【０２４０】

ネイティブペプチドに対する抗体レベルは概して、同じペプチドのＭＤＡ修飾形態に対する抗体のレベルと強く相関するが、他のａｐｏＢペプチドに対する抗体との相関性は、それよりもかなり弱い。例として、ｐ２１０　ＩｇＧのＭＤＡ－ｐ２１０　ＩｇＧに対するスピアマンの相関係数は０．８５であったが、ｐ２１０　ＩｇＧのｐ４５　ＩｇＧに対する係数は０．１３、ｐ２１０　ＩｇＧのＭＤＡ－ｐ４５　ＩｇＧに対する係数は０．１４に過ぎなった。ｐ４５　ＩｇＭとｐ２１０　ＩｇＭでも同様の傾向が観察された。予測されるように、ＳＬＥ患者は、抗β$_2$ＧＰＩ　ＩｇＧ及びＩｇＭのレベルも有意に高かった。ｐ２１０　ＩｇＭとＭＤＡ－ｐ２１０　ＩｇＭのいずれのレベルも、β$_2$－ＧＰ－Ｉ　ＩｇＧと相関していたとともに（ｐ２１０　ＩｇＭでは、ｒ＝０．１９、Ｐ＜０．００１、ＭＤＡ－ｐ２１０　ＩｇＭでは、ｒ＝０．１８、Ｐ＜０．００１）、ｂ２－ＧＰ－Ｉ　ＩｇＭレベルと相関していた（ｐ２１０　ＩｇＭでは、ｒ＝０．２３、Ｐ＝０．００１、ＭＤＡ－ｐ２１０　ＩｇＭでは、ｒ＝０．２１、Ｐ＜０．０１）。ｐ４５　ＩｇＭとＭＤＡ－ｐ４５　ＩｇＭのいずれのレベルも、β$_2$－ＧＰ－Ｉ　ＩｇＭのレベルと相関していた（ｐ４５　ＩｇＭでは、ｒ＝０．１３、Ｐ＝０．００１、ＭＤＡ－ｐ４５　ＩｇＭでは、ｒ＝０．１４、Ｐ＜０．００１）が、それ以外では、ａｐｏＢペプチドに対する自己抗体のレベルと、抗β$_2$ＧＰＩとの間に関連性はなかった。ＭＤＡ－ｐ４５　ＩｇＧと負の関連性が見られた抗マラリア剤（Ｐ＝０．０３）を除き、一般的なＳＬＥ薬には、ａｐｏＢに対する自己抗体と関連性があるものはなかった。

【０２４１】

ａｐｏＢ　ｐ４５　ＩｇＭ及びｐ２１０　ＩｇＧのレベルが低いことは、ＳＬＥにおけるＣＶＤと関連性がある。次に、本発明者らは、ＣＶＤを罹患したＳＬＥ患者と、ＣＶＤではないＳＬＥ患者の、ａｐｏＢペプチドに対する自己抗体のレベルとβ$_2$ＧＰＩに対す

る自己抗体のレベルを比較した。ＣＶＤ患者の方が、ネイティブｐ４５　ＩｇＭ及びＭＤＡ－ｐ４５　ＩｇＭ、ネイティブｐ２１０　ＩｇＭ、ネイティブｐ２１０　ＩｇＧ及びＭＤＡ－ｐ２１０　ＩｇＧのレベルが低かったが、β_2ＧＰＩ　ＩｇＧのレベルは、ＣＶＤ患者の方が高かった。ＭＤＡ－ｐ４５　ＩｇＭ、ＭＤＡ－ｐ２１０　ＩｇＧ及びβ_2ＧＰＩ　ＩｇＧのレベルは、年齢と性別に関して調整しても、有意差のあるままであった（表２６及び図１４）。

【０２４２】

（表２６）心血管疾患を有する全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）患者、および心血管疾患を有しないＳＬＥ患者における、アポリポタンパク質Ｂ自己抗体およびβ_2－糖タンパク質－Ｉ（ＧＰＩ）自己抗体

		SLE			
	CVD (n = 62) 中央値 (IQR)*		CVDなし(n = 370) 中央値 (IQR)*	*P*	調整後の *P*値
Apo B抗体					
p45 IgM	0·47 (0·19–1·17)		0·70 (0·33–1·29)	0·01	n.s.
MDA-p45 IgM	0·55 (0·24–1·02)		0·75 (0·41–1·48)	0·003	0·04
p45 IgG	0·36 (0·17–0·90)		0·54 (0·23–1·05)	n.s.	n.s.
MDA-p45 IgG	0·46 (0·29–0·84)		0·54 (0·28–1·04)	n.s.	n.s.
p210 IgM	0·64 (0·42–0·99)		0·78 (0·53–1·07)	0·03	n.s.
MDA-p210 IgM	0·80 (0·51–1·02)		0·54 (0·28–1·04)	n.s.	n.s.
p210 IgG	0·32 (0·10–0·64)		0·50 (0·25–0·88)	0·004	n.s.
MDA-p210 IgG	0·60 (0·3–0·84)		0·72 (0·53–1·00)	0·001	0·05
Apo H抗体					
β_2GPI IgM	1·9 (1·9–3·5)		1·9 (1·9–4·0)	n.s.	n.s.
β_2GPI IgG	4·0 (1·9–30·9)		1·9 (1·9–8·7)	0·02	0·01

【０２４３】

上記の表２６では、＊分布は、中央値［四分位範囲（ＩＱＲ）］として示されている。Ｉｇは免疫グロブリンであり、ＭＤＡはマロンジアルデヒドであり、ＣＶＤは心血管疾患であり、ｎ．ｓ．は有意差なしである。

【０２４４】

上記の自己抗体と、ＳＬＥ患者の心血管疾患との関連性をさらに明らかにするために、本発明者らは、超音波検査によって評価した場合の頸動脈ＩＭＴの測定値を用いた。頸動脈ＩＭＴとすべてのａｐｏＢ自己抗体において、関連性は負の方向のものであった。ｐ４５では、ネイティブＩｇＭ抗体とＭＤＡ修飾ＩｇＭ抗体の両方において、年齢と性別の調整後に有意となったが、これらの関連性は概して、非常に弱かったので、生物学的な関連性は疑わしい。すべてのｐ２１０抗体における調整前の関連性は有意であったが、これらの関連性は、年齢及び性別から独立していなかった（表２７）。

【０２４５】

（表２７）アポリポタンパク質Ｂ自己抗体及びβ_2－糖タンパク質－Ｉ（ＧＰＩ）自己抗体と、ＳＬＥ患者における頸動脈内膜中膜厚（ＩＭＴ）との関連性

	SLE 患者 (n = 302)	*P*	年齢及び性別に関して調整した*P*値
アポリポタンパク質B抗体			
p45 IgM	–0·05	n.s.	0·02
MDA-p45 IgM	–0·08	n.s.	0·02
p45 IgG	–0·10	n.s.	n.s.
MDA-p45 IgG	–0·07	n.s.	n.s.
p210 IgM	–0·23	0·001	n.s.
MDA-p210 IgM	–0·16	0·005	n.s.
p210 IgG	–0·20	0·001	n.s.
MDA-p210 IgG	–0·19	0·001	n.s.
アポリポタンパク質H抗体			
β_2GPI IgM	0·04	n.s.	n.s.
β_2GPI IgG	–0·03	n.s.	n.s.

【０２４６】
上記の表２７では、年齢と性別に関して補正する場合には、部分相関を算出して、自己抗体とＩＭＴとの独立関連性を明らかにした。Ｉｇは免疫グロブリンであり、ＭＤＡはマロンジアルデヒドであり、ｎ．ｓ．は有意差なしである。
【０２４７】
ａｐｏＢ自己抗体のレベルが低いことは、ＳＬＥにおける臓器損傷の顕在化と関連性がある。最後に本発明者らは、ａｐｏＢ自己抗体の血漿中レベルは、ＳＬＥにおける臓器損傷の臨床徴候と関連性があるのかを明らかにした。永久的な臓器損傷のあるＳＬＥ患者（ＳＤＩ＞１）は、ＳＤＩ≦１のＳＬＥ患者よりも、ｐ４５　ＩｇＭ（ネイティブ形態とＭＤＡ修飾形態の両方）、ｐ２１０　ＩｇＭ及びｐ２１０　ＩｇＧ（ネイティブ形態とＭＤＡ修飾形態の両方）のレベルが低かった（表２８）。年齢と性別について補正したところ、ＭＤＡ－ｐ２１０　ＩｇＧのみにおいて、群間差が有意なままであった（表２８）。対照的に、永久的な臓器損傷のあるＳＬＥ患者は、β$_2$ＧＰＩ　ＩｇＧのレベルが高かった（表２８）。
【０２４８】
（表２８）臓器損傷のある全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）患者（ＳＤＩ＞１）と臓器損傷のないＳＬＥ患者におけるアポリポタンパク質Ｂ自己抗体とβ$_2$－糖タンパク質－Ｉ（ＧＰＩ）自己抗体

	SDI > 1 中央値 (IQR)*	SDI ≤ 1 中央値 (IQR)*	*P*	年齢に関して調整した*P*値
アポリポタンパク質Ｂ				
p45 IgM	0·53 (0·24–1·19)	0·72 (0·36–1·38)	0·02	n.s.
MDA-p45 IgM	0·60 (0·28–1·22)	0·79 (0·44–1·55)	0·003	n.s.
p45 IgG	0·48 (0·19–0·91)	0·50 (0·24–1·04)	n.s.	n.s.
MDA-p45 IgG	0·50 (0·30–0·97)	0·56 (0·27–1·03)	n.s.	n.s.
p210 IgM	0·68 (0·44–1·02)	0·83 (0·57–1·07)	0·006	n.s.
MDA-p210 IgM	0·80 (0·55–1·02)	0·89 (0·68–1·05)	n.s.	n.s.
p210 IgG	0·37 (0·16–0·66)	0·54 (0·28–0·95)	0·001	n.s.
MDA-p210 IgG	0·61 (0·41–0·84)	0·76 (0·56–1·05)	0·001	0·005
アポリポタンパク質Ｈ抗体				
β_2GPI IgM	1·9 (1·9–5·9)	1·9 (1·9–3·1)	n.s.	n.s.
β_2GPI IgG	2·1 (1·9–21·5)	1·9 (1·9–7·6)	0·02	0·006

【０２４９】
上記の表２８では、＊分布は、中央値［四分位範囲（ＩＱＲ）］として示されている。Ｉｇは免疫グロブリンであり、ＭＤＡはマロンジアルデヒドであり、ＳＤＩはＳｙｓｔｅｍｉｃ　Ｌｕｐｕｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｎｇ　Ｃｌｉｎｉｃｓの損傷指数であり、ｎ．ｓ．は有意差なしである。
【０２５０】
抗体レベルと臓器合併症（心血管合併症を含む）との関連性の多くは、年齢に左右されることが分かったので、本発明者らは、抗体レベルと年齢との関係を具体的に解析した。ＳＬＥ患者とコントロールの両方において、すべてのａｐｏＢ自己抗体が、年齢とともに減少することが分かったが、β$_2$ＧＰＩ抗体においては、このような傾向は観察されなかった（表２９）。
【０２５１】
（表２９）全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）患者とコントロールにおけるアポリポタンパク質Ｂ自己抗体及びβ$_2$－糖タンパク質－Ｉ（ＧＰＩ）自己抗体と、年齢との関連性

	SLE 患者(n = 434)	*P*	コントロール(n=322)	*P*
アポリポタンパク質B抗体				
p45 IgM	–0·19	0·001	–0·24	0·001
MDA-p45 IgM	–0·22	0·001	–0·24	0·001
p45 IgG	–0·17	0·001	–0·12	0·04
MDA-p45 IgG	–0·16	0·001	–0·07	n.s.
p210 IgM	–0·26	0·001	–0·26	0·001
MDA-p210 IgM	–0·19	0·001	–0·21	0·001
p210 IgG	–0·29	0·001	–0·28	0·001
MDA-p210 IgG	–0·30	0·001	–0·27	0·001
アポリポタンパク質H抗体				
β_2GPI IgM	0·07	n.s.	0·12	0·04
β_2GPI IgG	0·01	n.s.	0·09	n.s.

【０２５２】

上記の表２９では、ＩｇＧは免疫グロブリンであり、ＭＤＡはマロンジアルデヒドであり、ｎ．ｓ．は有意差なしである。

【０２５３】

多数の自己抗体が産生されることは、ＳＬＥ特有の特徴であり、これらの自己抗体のいくつか、特にａＰＬが、ＳＬＥにおけるＣＶＤの増大に寄与するエビデンスがある。ａｐｏＢ－１００ペプチドｐ４５及びｐ２１０に対する自己抗体は、大半の個体において見られるが、その一方で、観察的研究において、ＣＶＤリスクの低下と関連付けられている。今回の試験では、ＳＬＥが、抑制的である可能性のあるこれらの抗体の産生に、どのような形で作用するかについて調べた。本発明者らの所見から、ＳＬＥを有する対象は、ｐ４５　ＩｇＭとｐ２１０　ＩｇＧのレベルが低いことが示されている。さらに、ＣＶＤが臨床的に顕在化したＳＬＥ患者は、ＣＶＤではない患者よりも、ｐ４５　ＩｇＭとｐ２１０　ＩｇＧのレベルが低かったが、年齢と性別に関して補正した後には、ＭＤＡ－ｐ４５　ＩｇＭとＭＤＡ－ｐ２１０　ＩｇＧのレベルのみが有意なままであった。ＭＤＡ－ペプチドを認識する自己抗体との関連性の方が強かったことの考え得る説明の１つは、それらの抗体の方が、酸化ＬＤＬに存在するエピトープに対して特異的であるからだと思われる。また、ＳＤＩスコア＞１によって評価したところ、永久的な臓器損傷が臨床的に顕在化していたＳＬＥ患者は、ＭＤＡ－ｐ２１０　ＩｇＧのレベルが低かった。比較の際、抗β_2ＧＰＩ　ＩｇＧレベルは、ＳＬＥ患者において高いとともに、ＣＶＤを罹患している患者は、ＣＶＤではない患者よりも、そのレベルが高かった。総合すると、これらの観察結果から、ＳＬＥは、抑制作用を持つ可能性のある一連の天然の自己抗体の抑制と関連性があることが示され、このことが、ＳＬＥにおける臓器損傷とＣＶＤの発症リスクの上昇に寄与すると見られることが示唆されている。ＳＬＥの治療に用いるいくつかの薬剤にも、アテローム形成抑制作用があるというエビデンスが存在する。しかしながら、今回の試験では、プレドニゾロン、アザチオプリンまたはミコフェノール酸モフェチルによる治療と、ａｐｏＢペプチド自己抗体との間に関連性は見られなかったが、抗マラリア剤の使用は、ＭＤＡ－ｐ４５　ＩｇＧのレベルの低下との関連性が見られた。

【０２５４】

ａｐｏＢ抗原に対する自己抗体が、ＳＬＥにおいてアテローム性動脈硬化症および他のタイプの臓器損傷を抑えることのできる機構が、いくつか存在する。第１に、まず、ＬＤＬが酸化による修飾を受けると、ａｐｏＢ抗原が免疫系によって認識される可能性が高い。この酸化には、ａｐｏＢタンパク質のより小さいペプチド断片への分解と、アルデヒドによる修飾とを伴う。アルデヒドにより修飾されたａｐｏＢペプチドは免疫系によって容易に認識されるが、ＬＤＬのリン脂質膜に正常に組み込まれている場合は、非修飾ａｐｏＢペプチド配列も免疫系の標的となり得る。酸化ＬＤＬは、血管細胞に対して細胞傷害性を持ち、動脈硬化性プラークの発現と不安定化を導く炎症を促進する。したがって、酸化ＬＤＬの早期除去を促進する因子は、アテローム形成を抑制する作用を持つ可能性が高い。ｐ４５　ＩｇＧとｐ２１０　ＩｇＧのいずれも、ヒト単球／マクロファージにおける酸

化ＬＤＬの取り込みを促進することが示されており、ＬＤＬｒ$^{-}$／$^{-}$／ヒトａｐｏＢ$^{+}$／$^{+}$マウスをＭＤＡ－ｐ４５　ＩｇＧで処置すると、酸化ＬＤＬの血漿中レベルが低下する。酸化ＬＤＬ／ＭＤＡｐ４５免疫複合体は、抑制性ＦｃγＲＩＩレセプターの活性化を通じて、抗炎症性を有する。高コレステロール血症マウスを組み換えマロンジアルデヒド－ｐ４５　ＩｇＧで処置すると、血漿中コレステロールレベルの低下と合わさった場合、アテローム性動脈硬化症の発現が阻害され、プラークの退縮が促進されることが示されている。ａｐｏＢペプチドに対する自己抗体のレベルの低下は、アテローム性動脈硬化症の重症度の向上および心筋梗塞の発症リスクの上昇と関連性があることが示されている。また、酸化ＬＤＬにおけるホスホリルコリン（ＰＣ）を標的とするＩｇＭ自己抗体は、心血管疾患において抑制的な役割を果たすと考えられている。いくつかの試験により、ＳＬＥ患者における無症状頸動脈疾患は、これらの自己抗体のレベルの低下と関連性があることが示されており、酸化ＬＤＬ抗原に対する自己抗体によって、ＳＬＥにおける心血管合併症が抑えられると見られるという所見にさらなる裏付けが与えられている。酸化ＬＤＬが自己免疫疾患における血管損傷に寄与するとともに、抗ＰＣ抗体が当該損傷を抑えることができるという所見と一致して、関節リウマチにおける心血管イベントの発現は酸化ＬＤＬの血漿中レベルの上昇および抗ＰＣ　ＩｇＭレベルの低下の両方と関連性があることが、Ａｊｅｇａｎｏｖａと共同研究者によって報告された。

【０２５５】

β$_2$ＧＰＩは、進化の過程で保存されてきたタンパク質であって、ヒトの循環血液中で豊富に見られるタンパク質である。β$_2$ＧＰＩの機能は、まだ研究中であるが、最近のデータによって、β$_2$ＧＰＩは主に、有害な細菌産物、例えばＬＰＳに結合して、それを除去する能力を有するスカベンジャー分子であることが示されている。β$_2$ＧＰＩは、内因性老廃物（微小粒子及び細胞破片など）のクリアランスにも関与する。いくつかの抗ａｐｏＢ抗体と同様に、低親和性抗β$_2$ＧＰＩは、よく保存された病原性構造体、例えば、細菌抗原または酸化産物から我々を守る天然の抗体レパートリーに属しているというエビデンスが増加し続けている。以前の試験の大半では、抗β$_2$ＧＰＩ抗体の有無は、ＡＰＳの基準で用いられるカットオフに従って評価されている。しかしながら、今回の試験では、本発明者らは、抗ａｐｏＢ抗体と同様に、連続的な力価とアイソタイプを調べた。本発明者らの結果から、ＳＬＥ患者において、ＩｇＧアイソタイプの抗β$_2$ＧＰＩ抗体のみがコントロールよりも高い力価で産生され、高い力価は特に、過去にＣＶＤを罹患したＳＬＥサブグループにおいてよく見られることが示されている。抗ａｐｏＢ抗体とは異なり、抗β$_2$ＧＰＩ抗体は、年齢とともには低下せず、むしろ、コントロール群では高齢な対象の方が力価が高かったことも本発明者らは確認している。

【０２５６】

ＳＬＥでは、大量のアポトーシス細胞抗原に対する寛容性の喪失は、重要な病原性因子である。アテローム性動脈硬化症では、アポトーシス細胞抗原に対する寛容性の喪失は主に、動脈硬化性プラークの環境（酸化ＬＤＬにおける抗原に対する寛容性が、同様に喪失している）において生じると見られる。総合すると、これらの所見により、ＳＬＥのアテローム性動脈硬化病巣において、寛容性の制御の問題が特に重要となり得ることが示唆されている。酸化ＬＤＬは、ＳＬＥにおいて増強され、アポトーシス細胞と酸化ＬＤＬの両方のクリアランスを媒介する食細胞レセプターへの結合と競合することによって、ＳＬＥのアテローム性動脈硬化病巣において、アポトーシス細胞に対する炎症誘発性応答をさらに悪化させることがある。これらの機構は、ＳＬＥにおける加速性アテローム性動脈硬化症において役割を果たすとともに、抗体の媒介による酸化ＬＤＬの除去は、ＳＬＥにおいて、血管の炎症と、おそらくは、一般的な全身性炎症を制限するのを助けることができる可能性が高い。

【０２５７】

本発明者らは、ＳＬＥ（概して高い自己抗体産生量を特徴とする状態）の患者はａｐｏＢ－１００ペプチドｐ４５及びｐ２１０に対するアテローム形成抑制的な自己抗体のレベルが低いことを報告している。これらの抗体のレベルは、ＣＶＤを発現していたＳＬＥ患

者においてさらに低かった。本発明者らは、ＳＬＥにおいて、抗体の媒介による酸化ＬＤＬ除去機能の不全が、血管組織における寛容性の喪失と炎症の増大に寄与し得ることを提示している。

【０２５８】

実施例５：全身性エリテマトーデスのマウスモデルにおいて、ＡｐｏＢ１００ペプチドワクチンで免疫すると、アテローム性動脈硬化症の発現が低減される。

今回の試験では、本発明者らは、高コレステロール血症とＳＬＥ様の表現型の両方を示すＭＲＬ／ｌｐｒ／ＡｐｏＥ－／－マウスにおいて、ＣＶＸ－４（ａｐｏＢペプチドｐ２１０と、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）の担体と、アルミニウムホスフェートアジュバントのＡｄｊｕｐｈｏｓからなるプロトタイプワクチン）で免疫すると、アテローム性動脈硬化症の発現に影響が及ぶかを調べた。

【０２５９】

実験方法

マウス：マウスの飼育と実験手順は、Ｌｕｎｄ ＵｎｉｖｅｒｓｉｔｙのＡｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅの内部委員会から承認を得た。Ｃ５７ｂｌ／６バックグラウンドのＭＲＬ／ｌｐｒ ＡｐｏＥ－／－マウス（元々は、Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（ドイツ）から得たもの）を動物施設で飼育し、雌マウスを今回の試験に使用した。１２週齢から実験終了時点まで、高脂肪食（ＨＦＤ、０．１５％のコレステロール、２１％の脂肪、スウェーデンのＬａｎｔｍａｎｎｅｎ）を投入した。マウスには、６週齢、９週齢、１１週齢及び２１週齢に、アジュバントとしてのアルミニウムホスフェートゲル（Ａｄｊｕｐｈｏｓ）とともに、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、ＣＶＸ－１４）にコンジュゲートしたｐ２１０を皮下注射した（２００μＬ）。リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）またはＡｄｊｕｐｈｏｓのみの注射をコントロールとした。マウスは、２２週齢に、ケタミンとキシラジンの腹腔内注射によって犠死させた。脾臓を摘出し、氷上ＰＢＳで保存し、血漿を心臓穿刺によって採取し、解析まで－８０℃で保存した。続いて、マウスの全身にＰＢＳを灌流させてから、Ｈｉｓｔｏｃｈｏｉｃｅ（米国オハイオ州ソロンのＡｍｒｅｓｃｏ）を灌流させ、続いて、下行動脈を結合組織と脂肪から切り離し、長手方向に切断し、ｅｎ ｆａｃｅで調製し、Ｈｉｓｔｏｃｈｏｉｃｅで保存した［Ｓｃｈｉｏｐｕ，Ａ．，ｅｔ ａｌ．２００４．Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ｈｕｍａｎ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｇａｉｎｓｔ ａｌｄｅｈｙｄｅ－ｍｏｄｉｆｉｅｄ ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｂ－１００ ｐｅｐｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｉｎｈｉｂｉｔ ａｔｈｅｒｏｓｃｌｅｒｏｓｉｓ．Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ １１０：２０４７－２０５２］。心臓を摘出し、保存または切片化用に液体窒素で急速凍結した。

【０２６０】

下行動脈の染色：下行動脈のｅｎ ｆａｃｅ調製物を蒸留水で洗浄し、７８％メタノールに浸漬し、７８％メタノール／０．２ｍｏｌ Ｌ）１のＮａＯＨで希釈した０．１６％オイルレッドＯで４０分、染色した。ＢｉｏＰｉｘ ｉＱ ２．３．１（ＢｉｏＰｉｘ ＡＢ）を用いて、オイルレッドＯ染色プラークの面積を盲検で定量した。

【０２６１】

免疫組織化学：凍結心臓をＴｉｓｓｕｅ Ｔｅｋ（日本のＳａｋｕｒａ Ｆｉｎｅ Ｔｅｋ．）で包埋し、動脈硬化性プラークの免疫組織化学染色用に、１０μｍの切片を大動脈起始部から切り取った。切片を氷冷アセトンで１０分間固定してから、０．５％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００（米国のＭｅｒｃｋ，Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）で浸透化処理し、各工程間には、ＰＢＳで５分間洗浄した。さらに、切片をＰＢＳ中の１０％マウス血清で３０分ブロックした。ジアミノベンゼン（ＤＡＢ、米国カリフォルニア州のＶｅｃｔｏｒ Ｌａｂｓ）を用いて二次的なビオチン化ヤギ抗ウサギ（Ａｂｃａｍ）によって検出されるウサギ抗ＣＤ６８（英国ケンブリッジのＡｂｃａｍ）を用いた、マクロファージの免疫組織化学染色を行った。コントロールとして、一次または二次抗体を除外した。ＢｉｏＰｉｘ ２．０ Ｓｏｆｔｗａｒｅ（スウェーデン、ヨーテボリのＢｉｏＰｉｘ ＡＢ）において、

免疫染色面積を盲検で定量した。

【０２６２】

脾臓細胞の調製と細胞培養：脾臓を７０－μｍのセルストレイナー（米国ニュージャージー州フランクリンレイクスのＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ）に通すことによって、単一細胞懸濁液中の脾細胞を調製した。赤血球溶解バッファー（米国ミズーリ州セントルイスのＳｉｇｍａ）を用いて、赤血球を除去した。細胞は、９６ウェル丸底プレート（ドイツ、ニュームブレヒトのＳａｒｓｔｅｄｔ）中の培養培地（１０％熱不活化ウシ胎仔血清、１ｍｍｏｌ　Ｌ$^{-1}$のナトリウムピルベート、１０ｍｍｏｌ$^{-1}$のＨｅｐｅｓ、５０Ｕのペニシリン、５０μｇ／ｍＬのストレプトマイシン、０．０５ｍｍｏｌ　Ｌ$^{-1}$のβ－メルカプトエタノール及び２ｍｍｏｌ　Ｌ$^{-1}$のＬ－グルタミンを含むＲＰＭＩ１６４０培地、英国ペイズリーのＧＩＢＣＯ）で培養した。

【０２６３】

フローサイトメトリー：脾細胞を蛍光色素コンジュゲート抗体で染色し、ＣｙＡｎ　ＡＤＰフローサイトメーター（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）によって測定した。Ｔ細胞には、フィコエリトリン／Ｃｙ７コンジュゲート抗ＣＤ３抗体、パシフィックブルーコンジュゲート抗ＣＤ４抗体、アロフィコシアニンコンジュゲート抗ＣＤ２５抗体、フィコエリトリンコンジュゲート抗Ｆｏｘｐ３抗体及びアロフィコシアニン／Ｃｙ７コンジュゲート抗ＣＤ８抗体を使用し、フルオレセインイソチオシアネートコンジュゲート抗Ｂ２２０抗体、パシフィックブルーコンジュゲート抗ＣＤ１１ｂ抗体、フィコエリトリン／Ｃｙ７コンジュゲート抗ＣＤ１１ｃ抗体及びアロフィコシアニンコンジュゲート抗ＣＤ１１５抗体。解析は、ＦｌｏｗＪｏ　Ｖ１０というソフトウェア（Ｔｒｅｅ　Ｓｔａｒ）によって行った。

【０２６４】

ＩｇＧの測定：Na_2CO_3－$NaHCO_3$で希釈した２０μｇ／ｍｌのｐ２１０で、９６ウェルＥＬＩＳＡプレートをコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。３サイクル洗浄後、そのプレートをＰＢＳ中の２％ヤギ血清で６０分ブロックした。１回洗浄後、そのプレートに１：５０で希釈した血漿試料を加え、１時間、３７℃でインキュベートした。３サイクル洗浄後、検出抗体（抗マウスＩｇＧ－ビオチン）を加え、プレートを１時間、３７℃でインキュベートした。さらに３サイクル洗浄後、ストレプトアビジン－ＨＲＰを加え、２０分、遮光下でインキュベートした。反応停止液（１ＭのH_2SO_4）を加え、４５０ｎｍにおいて吸光度を測定した。

【０２６５】

血漿中のコレステロール及びトリグリセリド：血漿中の総コレステロールを比色アッセイのＩｎｆｉｎｉｔｙ（商標）Ｃｈｏｌｅｓｔｅｒｏｌ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で、血漿中の総トリグリセリドレベルをＴｒｉｇｌｙｃｅｒｉｄｅ（ＩＮＴ）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で定量した。

【０２６６】

血漿中サイトカイン：マルチプレックス法（Ｌｕｍｉｎｅｘ　Ａｓｓａｙ、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｃ．）をメーカーの指示に従って用いて、血漿中のサイトカイン（ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６及びＩＬ－１０）の濃度を決定した。

【０２６７】

統計：データは、平均±標準偏差として示されている。正規分布標本では、両側スチューデントｔ検定を使用し、歪んだデータでは、マンホイットニーの順位和検定を使用した。Ｐ≦０．０５のレベルで、統計的に有意とみなした。

【０２６８】

ＭＲＬ／ｌｐｒ／ＡｐｏＥ－／－マウスに、ＰＢＳ、ＣＶＸ－１４またはＡｄｊｕｐｈｏｓを単独で４回、６週齢、９週齢、１１週齢、及び２１週齢に皮下注射した。マウスを２２週齢に犠死させ、大動脈のオイルレッドＯ（ＯＲＯ）によるｅｎ　ｆａｃｅ染色と、大動脈起始部の断面プラーク面積の測定によって、アテローム性動脈硬化症を評価した。ＣＶＸ－１４で免疫した場合、ＰＢＳの場合と比べて、大動脈におけるプラークの発現が

５５．５％軽減された（ＯＲＯ染色面積が２．９７±２．２６％に対して１．３２±０．３６、ｐ＝０．０１３３、図１５Ａ）。Ａｄｊｕｐｈｏｓのみを投与したマウスでも、アテローム性動脈硬化症が低減される傾向が観察された。大動脈起始部のプラーク面積は、ＰＢＳ処置群とＣＶＸ－１４処置群との間では、有意差は見られなかったが（図１５Ｂ）、ＣＶＸ－１４による処置では、ＰＢＳコントロールと比べて、マクロファージ染色（ＣＤ６８）陽性のプラーク面積は、６６．２％縮小した（３４．６±６．９％に対して１１．２±６．９、ｐ＝０．００５、図１５Ｃ及び図１５Ｄ）。Ａｄｊｕｐｈｏｓのみを投与した場合には、プラークのマクロファージ染色に対する作用は見られなかった。頸動脈におけるサイトカインｍＲＮＡの発現を解析することによって、ＣＶＸ－１４による処置が血管炎症に及ぼす作用をさらに評価した。ＣＶＸ－１４処置マウスの動脈では、ＴＮＦ－α及びＴＧＦ－βのｍＲＮＡと、Ｆｏｘｐ３のｍＲＮＡの発現が減少していることが分かった（図１５Ｅ～図１５Ｇ）。

【０２６９】

ＣＶＸ－１４処置マウスでは、ＰＢＳコントロールと比べて、血漿中コレステロールが増大したが、トリグリセリドレベルまたは体重においては、差は観察されなかった（表３０）。ｐ２１０　ＩｇＧ１も、有意な群間差は見られなかった（表３０）。

【０２７０】

（表３０）

	PBS	CVX-14	Adjuphos
コレステロール	2.80±2.22	4.77±1.41	4.30±0.69
トリグリセリド	0.63±0.55	0.92±0.21	0.99±0.22
P210-IgG1	0,47±0,32	0,45±0,32	0.51±0.48

【０２７１】

脾細胞をフローサイトメトリーで解析して、免疫マウスにおける免疫系の全身的変化を決定した。ＣＶＸ－１４で免疫したマウスでは、ＰＢＳコントロールと比べて、調節性Ｔ細胞（ＣＤ３$^{+}$ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$細胞として定義した）の出現頻度の上昇が見られたが、Ａｄｊｕｐｈｏｓのみの場合でも、同様の上昇が観察された（図１６Ａ）。また、ＣＶＸ－１４による免疫では、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の画分が減少したが（図１６Ｃ）、脾臓形質細胞様樹状細胞及びＣＤ１１ｂ$^{+}$ＣＤ１１５$^{+}$の画分に対する作用は見られなかった（図１６Ｄ～図１６Ｅ）。

【０２７２】

修飾ＬＤＬ粒子に対する自己免疫応答が、動脈炎とアテローム性動脈硬化症の発現を悪化させるエビデンスは蓄積されている。自己抗原に対する寛容性の喪失は、ＳＬＥとアテローム性動脈硬化症の重大な特徴であるので、血管細胞外マトリックス内に捕捉されているＬＤＬに対する自己免疫応答が、ＳＬＥにおける心血管合併症の発現に寄与すると仮定するのが妥当である。本発明者らは今回の試験において、アテローム性動脈硬化症に罹患しやすいＳＬＥマウスモデルにおいて、ＡｐｏＢペプチドｐ２１０による免疫によってプラークの発現と炎症が低減されることを明らかにした。この作用は、動脈でのサイトカインの発現の減少と、脾臓におけるＴｒｅｇの増加と関連付けられたが、ｐ２１０　ＩｇＧのレベルでは、変化は観察されなかった。これらの観察結果は、ａｐｏＢペプチドと酸化ＬＤＬによる免疫によって、Ｔｒｅｇの活性化と、ＬＤＬ寛容性の促進を通じて、アテローム性動脈硬化症が阻害されることを示した以前の試験とよく一致している。Ａｄｊｕｐｈｏｓのみを注射したマウスでも、脾臓におけるＴｒｅｇの増加と、アテローム性動脈硬化症が軽減される傾向が観察された。アルミニウムベースのアジュバントのアテローム形成抑制作用は、いくつかの研究で過去に確認されており、アジュバントが皮下で酸化ＬＤＬを取り込むことによって説明されることが示唆されている。これにかかわらず、アルミニウムベースのアジュバントは、今後作られる可能性のあるアテローム性動脈硬化症ワクチン用として、魅力的なアジュバント候補である。

【０２７３】

ＳＬＥにおける心血管合併症の予防策の改善に対するアンメットクリニカルニーズはかなりある。ＳＬＥを有する対象における無作為化臨床試験では、スタチンによる治療は、頸動脈疾患の進行に対する作用が見られなかったとともに、ＳＬＥの治療で用いられる他の薬剤が心血管リスクを低下させる程度は、依然として不明である。この点において、酸化ＬＤＬは、興味深い標的候補となっている。酸化ＬＤＬは、ＳＬＥとアテローム性動脈硬化症の両方に関係しているからである。酸化ＬＤＬ結合リン脂質抗原に対する自己抗体は、ＳＬＥで広く見られる。酸化ＬＤＬとアポトーシス細胞は、マクロファージ上の同じスカベンジャーレセプターへの結合に対して競合することから、ＳＬＥでは、大量の酸化ＬＤＬの存在により、アポトーシス細胞の処理がさらに損なわれることが示唆されている。ヒト動脈硬化性プラークは、酸化ＬＤＬ抗原に対して特異的なＴ細胞を含み、実験マウスモデルでは、ａｐｏＢにおけるエピトープを認識するＴ細胞が、アテローム性動脈硬化症を加速させることが示されている。ＡｐｏＢ１００由来のペプチドによる免疫は、潜在的に、ＳＬＥにおける心血管系損傷を予防するための魅力的なアプローチとなり得るのみならず、他の臓器に対する作用も有する可能性がある。以前の試験で、ＡｐｏＢ１００由来のペプチドでの免疫によって、ＬＤＬ特異的なＴｒｅｇの産生が促進されることが示されているので、これらの細胞には、ネイティブＬＤＬまたは酸化ＬＤＬに暴露されるいずれの臓器においても、免疫抑制作用がある可能性が高い。

【０２７４】

この試験の結果から、ＳＬＥ様の表現型を有するＡｐｏｅ$^{-/-}$マウスにおいて、ｐ２１０含有ワクチンでの免疫によって、アテローム性動脈硬化症の発現が低減されることが示されている。ＳＬＥを有しない高コレステロール血症Ａｐｏｅ$^{-/-}$マウスにおいて、ｐ２１０含有ワクチンを用いた以前の試験に一致して、ｐ２１０での免疫後、調節性Ｔ細胞が全身的に増加した。ＡｐｏＢペプチドベースのワクチンは、ＳＬＥにおけるＣＶＤを予防するための新規なアプローチとなる可能性があり、さらに調べる価値がある。

【０２７５】

実施例６

自己免疫障害の全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）における炎症応答によって、末梢炎症が重篤な形で臨床的に顕在化する。ＳＬＥの炎症的顕在化の１つであるアテローム性動脈硬化症は、動脈壁における脂質の蓄積とリポタンパク質の修飾の結果、発現する。心筋梗塞（ＭＩ）と脳卒中の両方の根底をなすアテローム性動脈硬化症は、さらに、心血管疾患（ＣＶＤ）イベントと死亡の主原因の１つである。ＣＶＤの発症率はＳＬＥ患者において有意に向上しており、全身性炎症の増強が、酸化低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）及び他のアテローム促進性抗原に対する機能障害保護に寄与することが示唆されている。ＬＤＬ抗原のペプチド配列を含むワクチン製剤を用いて、高コレステロール血症のＳＬＥマウスにおけるアテローム性動脈硬化症の作用を評価して、免疫応答を評価した。本発明者らは、大動脈におけるプラークの発現を調べることによって、アテローム性動脈硬化症を評価した。免疫化に対する応答は、脾細胞とリンパ節細胞のフローサイトメトリーによって調べた。上記のワクチンで処置したマウスでは、大動脈におけるプラークの進行が有意に軽減された。さらに、炎症性免疫細胞集団が有意に減少した。このワクチン候補は、今後、ＳＬＥにおけるＣＶＤに対する新たな治療法となる可能性がある。

【０２７６】

全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）は、個体が自己の組織に対して様々な免疫応答を示す複雑な自己免疫疾患である。（１）この自己免疫状態によって生じる炎症応答によって、重篤な臨床的症状が起こり、アテローム性動脈硬化症、腎不全及び高血圧などのような合併症に至る。

【０２７７】

アテローム性動脈硬化症は、動脈壁における脂質の蓄積と修飾によって生じる慢性炎症性疾患である。心筋梗塞（ＭＩ）と脳卒中の両方の根底をなすアテローム性動脈硬化症は、心血管疾患（ＣＶＤ）の臨床的顕在化の主原因の１つである。アテローム性動脈硬化プロセスは、低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）粒子が血管壁内に捕捉されて、酵素または活

性酸素種によって修飾され、酸化ＬＤＬ（ｏｘＬＤＬ）が形成されると開始される。マクロファージは、ｏｘＬＤＬを取り込むことによって、ｏｘＬＤＬを除去しようとし、最終的には、これにより、血管壁において、泡沫細胞が蓄積し、免疫細胞が活性化され、動脈病変が生じる。

【０２７８】

ＣＶＤの発症率はＳＬＥ患者において有意に向上しており、全身性炎症の増強が、ｏｘＬＤＬ及び他のアテローム促進性抗原に対する機能障害保護に寄与することが示唆されている。例えば、ＳＬＥの女性は、ＭＩの発症リスクが最大で５０倍高く、ＳＬＥにおけるアテローム性動脈硬化症を阻害するための代替的な予防策に対する必要性が強まる。ＳＬＥのような全身性自己免疫疾患は、免疫不全と密接に関連していることが示唆されている。この不全は、免疫系の欠陥に起因するとともに、遺伝的変異と、環境因子と、免疫細胞の活性化を特徴とする。自己免疫の一般的な特徴は、抗核抗体（ＡＮＡ）と、抗スミス／リボ核タンパク質（抗ｓｍ／ＲＮＰ）と、「インターフェロン（ＩＦＮ）シグネチャー」（末梢血液細胞で、Ｉ型ＩＦＮ誘導性遺伝子の有意なアップレギュレーションが見られること）である。

【０２７９】

ワクチンは臨床において、抗原に対して、個体自身の免疫による防御を誘導するのに長期にわたって用いられている。したがって、抗原に特異的な調節によるワクチンは、治療法として、非常に興味深いものとなるだろう。本発明者らは、実験用のＳＬＥにおいて、ＡｐｏＢ１００ペプチド４５による免疫調節療法が、アテローム性動脈硬化症とアポトーシスを軽減できるかを調べた。

【０２８０】

実験方法

マウス：雌ＭＲＬ／ｌｐｒ　ＡｐｏＥ$^{-/-}$マウス（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（ドイツ）から購入した）を動物施設で飼育した。６週齢から実験終了時点まで、高脂肪食（ＨＦＤ、０．１５％コレステロール、２１％脂肪、スウェーデンのＬａｎｔｍａｎｎｅｎ）を投入した。以前に説明されたように（Ｓｕｎ　ＪＢ，Ｃｚｅｒｋｉｎｓｋｙ　Ｃ　ａｎｄ　Ｈｏｌｍｇｒｅｎ　Ｊ．Ｂ　ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅｓ　ｔｒｅａｔｅｄ　ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ｗｉｔｈ　ａｎｔｉｇｅｎ　ｃｏｕｐｌｅｄ　ｔｏ　ｃｈｏｌｅｒａ　ｔｏｘｉｎ　Ｂ　ｓｕｂｕｎｉｔ　ｉｎｄｕｃｅ　ａｎｔｉｇｅｎ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ　Ｆｏｘｐ３（＋）ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ　Ｔ　ｃｅｌｌｓ　ａｎｄ　ｐｒｏｔｅｃｔ　ａｇａｉｎｓｔ　ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　ａｕｔｏｉｍｍｕｎｅ　ｅｎｃｅｐｈａｌｏｍｙｅｌｉｔｉｓ．Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２；１８８：１６８６－９）、ＡｐｏＢ１００ペプチド４５（Ｐ４５）をコレラ毒素Ｂにカップリングした（Ｐ４５－ＣＴＢ）。３０μｇ、１５μｇ、５μｇのｐ４５－ＣＴＢコンジュゲート、３０μｇのＣＴＢまたはＰＢＳによる処置を１８週齢（０日目）に開始し、０日目、２日目、５日目、７日目、１４日目、２１日目、２８日目、３５日目、４２日目及び４９日目に経口投与した。血液と尿を０日目、１４日目、２８日目、４２日目及び５６日目に採取した。体重を０日目、２８日目及び５６日目にモニタリングした。処置の５６日目、マウスを２６週齢にケタミン／キシラジンの注射によって犠死させた。血漿用の血液を採取した後に、全身にＰＢＳを潅流させてから、心臓、腎臓、頸動脈及び腸間膜リンパ節を摘出し、液体窒素で急速冷凍し、そして、解析するまで－８０℃で保存した。大動脈を周囲組織から切り離し、Ｈｉｓｔｏｃｈｏｉｃｅ（米国オハイオ州ソロンのＡｍｒｅｓｃｏ）で固定した。脾臓と、残りの腸間膜リンパ節を摘出し、さらなる解析まで、氷上で保存した。マウスの飼育と実験手順は、Ｌｕｎｄ　ＵｎｉｖｅｒｓｉｔｙのＡｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅの内部委員会から承認を得た。

【０２８１】

大動脈弓の脂質染色：大動脈弓をｅｎ　ｆａｃｅで調製し、蒸留水、７８％メタノールで洗浄し、７８％メタノール（０．２ｍｏｌ／ＬのＮａＯＨ）で希釈した０．１６％オイ

ルレッドOで４０分、染色した。定量は、ＢｉｏＰｉｘ ｉ．Ｑ２．０というソフトウェア（スウェーデン、ヨーテボリのＢｉｏｐｉｘ ＡＢ）を用いて盲検で行った。この際、えんじ色に着色された領域を、プラークにおける中性脂肪の含有量とした。

【０２８２】

脾臓細胞とリンパ節細胞のサイトカインの測定：脾臓とリンパ節を７０ｕＭのシングルセルメッシュに通し、ＲＰＭＩで洗浄し、７００ｘｇで５分間、遠心分離した。脾臓由来の赤血球細胞をＲｅｄ Ｂｌｏｏｄ Ｃｅｌｌ Ｌｙｓｉｓ Ｂｕｆｆｅｒ（Ｓｉｇｍａ）で溶解させた。細胞を計数し、ＲＰＭＩで洗浄し、７００ｘｇで５分間、遠心分離してから、２％ＦＢＳを添加したｃＲＰＭＩに再懸濁し、０．５×１０（６）個／ウェルの密度で播種した。その細胞をＣＤ３／２８ビーズ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で刺激し、７２時間、３７＊ｃ、５％ＣＯ２でインキュベートした。サイトカインの測定は、マルチプレックスアッセイで行うことになる。

【０２８３】

血液、脾臓細胞及びリンパ節細胞のフローサイトメトリー解析：４２日目に得た血液細胞を調節性Ｔ細胞パネルとＴヘルパー１／Ｔヘルパー１７パネルにおいて、ＣＤ３－ＰｅＣｙ７、ＣＤ４－ＰＢ、ＣＤ２５－ＡＰＣ、ＦｏｘＰ３－ＰＥ ＩＬ－１７－ＡＰＣ及びＩＦＮ－γ－ＰＥ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）で染色した。血液細胞（２０μｌ）も、丸底９６ウェルプレートで、１０％ＦＢＳとともに、１００ｕｇ／ｍｌのＢｒｅｆｅｌｄｉｎ Ａ（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）を添加したｃＲＰＭＩに２４時間播種し、そして、フローサイトメトリー解析のために、Ｔヘルパー１／Ｔヘルパー１７パネルにおいて、ＣＤ３－ＰｅＣｙ７、ＣＤ４－ＰＢ、ＣＤ８－ＡＰＣ、ＩＬ－１７－ＡＰＣ及びＩＦＮ－γ－ＦＩＴＣ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）で染色した。

【０２８４】

フローサイトメトリー解析のために、脾臓細胞とリンパ節細胞を抗ＣＤ３－ＰｅＣｙ７、ＣＤ４－ＰＢ、ＣＤ２５－ＡＰＣ、ＦｏｘＰ３－ＰＥ、ＣＤ４４－ＡＦ４８８、ＣＤ６２Ｌ－ＰＥ、ＣＤ８－ＡＰＣ／Ｃｙ７、Ｂ２２０－ＦＩＴＣ、Ｂ２２０－ＰＢ、ＣＤ２４－ＰＥ、ＣＤ５－ＰＥ／Ｃｙ７、ＣＤ２３－ＰＢ、ＣＤ２１／３５－ＡＰＣ／Ｃｙ７、ＣＤ１ｄ－ＡＦ４８８、ＣＤ４０－ＰＥ、ｍＴＧＦβ－ＡＰＣ及びＣＤ８６－ＡＰＣ／Ｃｙ７（すべてＢｉｏｌｅｇｅｎｄ）で染色し、Ｇａｌｌｉｏｓというフローサイトメーター（Ｂａｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）にかけて、ＦｌｏｗＪｏというソフトウェア（Ｔｒｅｅ ｓｔａｒ）で解析した。

【０２８５】

免疫組織化学：凍結心臓と腎臓をＴｉｓｓｕｅ Ｔｅｋ（日本のＳａｋｕｒａ Ｆｉｎｅ Ｔｅｋ．）で包埋し、大動脈起始部の断面を、心臓では厚さ１０μｍ、腎臓では５μｍで採取した。ウサギ抗ＣＤ６８（英国ケンブリッジのＡｂｃａｍ）を用いてマクロファージの染色を、ラット抗ＣＤ３（英国ケンブリッジのＡｂｃａｍ）を用いてＣＤ３の染色を、ラット抗ＣＤ８ａ（ＢＤ Ｐａｒｍｉｎｇｅｎ）を用いてＣＤ８の染色を行い、ジアミノベンゼン（ＤＡＢ）によって検出した。簡潔に述べると、切片を０．５％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００（米国のＭｅｒｃｋ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）で浸透化処理し、ＰＢＳ中の３％H_2O_2でインキュベートした。切片を、ＰＢＳ中の１０％ヤギ（ＣＤ６８）またはマウス（ＣＤ３及びＣＤ８）血清（米国のＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）でブロックしてから、予め湿らせたチャンバーで、１μｇ／ｍｌの一次抗ＣＤ６８、抗ＣＤ３または抗ＣＤ８抗体とともに一晩、４℃でインキュベートした。

【０２８６】

大動脈弓及び／または腎臓の免疫グロブリンＧの染色は、ビオチン化抗マウスＩｇＧ（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を一次抗体として用いることによって、免疫グロブリンＭの染色は、ビオチン化抗マウスＩｇＭ（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を一次抗体として用いることによって行うことになる。抗ＣＤ６８の検出には、ヤギで産生させた二次ビオチン化抗ウサギＩｇＧ（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂ）を使用し、ＣＤ３及びＣＤ８の検出には、ビオチン化マウス抗ラット（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂ）を使用

した。ビオチン化抗体に結合するＤＡＢ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（米国カリフォルニア州のＶｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｓ）によって、呈色させ、ＢｉｏＰｉｘ　ｉ．Ｑ２．０というソフトウェアで、免疫染色面積を定量した。

【０２８７】

抗原提示による、Ｔｒｅｇのインビトロ誘導

ＣＤ１１ｃ陽性選択キットとＥａｓｙＳｅｐという磁気ビーズ（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて、ＣＤ１１ｃ$^{+}$樹状細胞をＭＲＬ／ｌｐｒ　ＡｐｏＥ－／－脾臓から単離した。ＣＤ４陰性選択キット（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて、ＣＤ４＋Ｔ細胞を単離してから、ＣＤ２５陽性選択キット（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて、ＣＤ２５$^{-}$ＣＤ４$^{+}$細胞を単離した。細胞は、いずれの実験でも、完全ＲＰＭＩ（２％熱不活化ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、１ｍｍｏｌ　Ｌ－１のナトリウムピルベート、１０ｍｍｏｌ　Ｌ－１のＨｅｐｅｓ、５０Ｕのペニシリン、５０μｇ　ｍＬ－１のストレプトマイシン、０．０５ｍｍｏｌ　Ｌ－１のｂ－メルカプトエタノール及び２ｍｍｏｌ　Ｌ－１のＬ－グルタミンを含むＲＰＭＩ－１６４０培地、いずれもＧＩＢＣＯ製）で培養した。

【０２８８】

ＣＤ１１ｃ＋細胞を５μｇ／ｍｌ、１５μｇ／ｍｌ、３０μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢ、３０μｇ／ｍｌのＣＴＢまたはＰＢＳで２時間、３７℃でパルス処理してから、ＰＢＳで３回洗浄した。ＣＤ２５$^{-}$ＣＤ４$^{+}$細胞をＣｅｌｌｔｒａｃｅ　Ｖｉｏｌｅｔという増殖マーカー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）とともに１時間、３７℃でインキュベートした。続いて、１００，０００個のＣＤ１１ｃ＋細胞を１００，０００個のＣＤ４＋ＣＤ２５－Ｔエフェクター細胞と、完全ＲＰＭＩにおいて７２時間共培養した。すべてのウェルに、ＩＬ－２を２５Ｕ／ｍｌ、ＴＧＦ－β（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）を１０ｎｇ／ｍｌ加えて、Ｔｒｅｇを誘導した。樹状細胞とＴｒｅｇの誘導は、上ですでに説明したように、フローサイトメトリーによって、抗ＣＤ１２３ＰＥ、ＣＤ８６－ＰｅＣｙ７、ＣＤ３－ＰｅＣｙ７、ＣＤ２５－ＡＰＣ、ＦｏｘＰ３－ＰＥ、ＣＤ４－ＡＦ４８８、ＣＤ８ａ－ＡＰＣ／Ｃｙ７抗体を用いて確認した。

【０２８９】

低コレステロール血症マウスでＰ４５を用いた以前の試験によって、免疫化は、アテローム性動脈硬化症の進行の阻害と、抗炎症性を有する防御免疫応答の誘導と関連があることが示されている。さらに、動脈内膜を切除した患者において、Ｐ４５　ＩｇＧ自己抗体のレベルと、動脈硬化性プラーク、炎症、修復及び心血管イベントとの関連性の臨床的エビデンスがある。実験用ＳＬＥにおいて、ＡｐｏＢ１００ペプチド４５が、アテローム形成抑制を誘導するとともに、アポトーシスを低減することができるか調べるために、ＭＲＬ／ｌｐｒ　ＡｐｏＥ$^{-}$／$^{-}$マウスを、処置の０日目、２日目、５日目、７日目、１４日目、２１日目、２８日目、３５日目、４２日目、４９日目に、Ｐ４５－ＣＴＢ（５μｇ／ｍｌ、１５μｇ／ｍｌもしくは３０μｇ／ｍｌ）、ＣＴＢ（３０μｇ／ｍｌ）またはＰＢＳで経口免疫した。

【０２９０】

ｅｎ　ｆａｃｅで調製した大動脈をオイルレッドＯ（ＯＲＯ）で解析したところ、５ｕｇ／ｍｌ及び１５ｕｇ／ｍｌのＰ４５－ＣＴＢでは、ＰＢＳコントロールと比べて、大動脈弓において、プラークの減少が見られた（図１７）。脂質のＯＲＯ陽性染色は、ＰＢＳ処置群（２０．８±４．９％）と比べて、５μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢで免疫した場合には５８．１％（１２．１±５．０％、ｐ＜０．０１）、１５μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢで免疫した場合には、５８．５％（１２．１±４．１％、ｐ＜０．０１）減少した。しかしながら、３０μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢで処置した群では、ＰＢＳとの比較において、減少は観察されなかった。各処置群とＣＴＢとの間に有意差は見られなかったが、５μｇ／ｍｌ及び１５μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢは、ＣＴＢと比べて、減少傾向を見ることができる。

【０２９１】

犠死日における脾臓とリンパ節中の免疫細胞集団は、特に、５μｇ／ｍｌ及び１５μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢの群で、処置による影響を受けた。１５μｇ／ｍｌ及び３０μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢ群の脾臓では、ＣＴＢと比べて、セントラルメモリーヘルパーＴ細胞（ＣＤ３$^{+}$ＣＤ４$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ４４$^{int-hi}$）が減少した（１９．４±５．２％に対して、１５μｇ／ｍｌでは７．６±７．７％、ｐ＜０．００１、３０μｇ／ｍｌでは７．５±６．１％、ｐ＜０．０１）が、ＰＢＳでは減少しなかった（図１８）。リンパ節では、１５μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢにおいて、セントラルメモリーＴ細胞が、ＣＴＢと比べて減少した（３４．５±１０．６％に対して１８．８±１１．５％（図１９）。興味深いことに、脾臓中の細胞溶解性Ｔ細胞集団（ＣＤ３$^{+}$ＣＤ８$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ４４$^{int-hi}$）は、５μｇ／ｍｌ及び１５μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢの群において、ＰＢＳと比べて低い（１７．０±５．１％に対して、５μｇ／ｍｌでは、２９．４±１３．３％、ｐ＜０．０５、１５μｇ／ｍｌでは、３１．９±１５．１％、ｐ＜０．０５）とともに、ＣＴＢと比べても低かった（いずれも、１８．２±３．７％、ｐ＜０．０５）。これに対して、リンパ節では、１５μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢで、ＰＢＳとの比較において、減少が観察された（４１．３±７．６％に対して２３．０±１６．３％、ｐ＜０．０５（図１８～図１９）。

【０２９２】

犠死日においては、脾臓とＬＮでは、Ｔｒｅｇの量に差は観察されなかった。しかしながら、処置中の４２日目では、Ｔｒｅｇに対する血液細胞の染色では、処置群と、ＰＢＳ及びＣＴＢコントロールとの間で、トレンドを見ることができ、５μｇ／ｍｌ及び１５μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢの群において、わずかな上昇を観察できるが、有意ではなかった。

【０２９３】

以前の観察結果から、アテローム性動脈硬化症を標的とするＡｐｏＢ－１００ペプチドコンジュゲートワクチンを開発できる可能性のあることが示唆されている。ＳＬＥ患者は、全身性炎症により、ＣＶＤ発症率が有意に高いので、特異的療法を必要としている。今回の研究では、ＣＴＢにカップリングしたＡｐｏＢ－１００ペプチド（ｐ４５）は、ＭＲＬ／ｌｐｒ　ＡｐｏＥ$^{-/-}$において、免疫調節特性を有しており、大動脈弓におけるアテローム性動脈硬化症を軽減するデータが得られている。

【０２９４】

５μｇ／ｍｌ及び１５μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢの処置群におけるプラークの形成は、ＰＢＳコントロールと比べて低減されたことから、低用量のこのワクチン候補によって、アテローム形成抑制が誘発されることが示唆されている。脾臓とリンパ節で見られる免疫細胞集団から、このワクチンが免疫系にどのような形で影響を及ぼすのかが明らかにされ、すなわち、Ｔ細胞集団において差が見られた。脾臓では、５μｇ／ｍｌ及び１５μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢで処置後、ＣＴＢと比べて、セントラルメモリーヘルパーＴ細胞が減少した。リンパ節では、それほど顕著な作用は見られず、１５μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢの群のみで、減少が見られた。脾臓中の活性化セントラルメモリー細胞溶解性Ｔ細胞は、５μｇ／ｍｌ及び１５μｇ／ｍｌのｐ４５－ＣＴＢの処置群で増加し、リンパ節でも同様であった。このことから、ペプチドワクチンに暴露後、Ｔ細胞のＣＤ８$^{+}$部分の増加により、末梢において、ＣＤ４$^{+}$細胞が減少することが示唆されていると思われる。集団で見ることのできるトレンドがわずかであっても、免疫防御は、調節性Ｔ細胞の抑制よりも、ワクチンによって開始される抗原特異性から細胞溶解性Ｔ細胞を活性化させることを通じて誘導した方がよい。

【０２９５】

オイルレッドＯから得られた結果とフローサイトメトリーによる免疫細胞集団の特徴を併せて勘案すると、ＰＢＳ及び／またはＣＴＢと比べて、低用量の上記のワクチン候補によって免疫作用が観察されることは明白である。アテローム性動脈硬化症に対する治療剤としてＰ４５－ＣＴＢを用いた本発明者らの以前の試験で見られたように、今回、ＳＬＥの状況でも、免疫調節作用を見ることができる。このペプチドワクチンは、ＳＬＥ患者に

おけるＣＶＤを治療するための新たな治療法となる可能性がある。

【０２９６】

上記の様々な方法及び技法によって、本願を実施するための数多くの方法が提供される。当然ながら、本明細書に記載されているいずれかの特定の実施形態に従っても、必ずしも、記載されている目的または利点のすべてを実現できるわけではないことを理解されたい。したがって、例えば、当業者であれば、本明細書に教示されているような１つの利点または一連の利点を実現または最適化する形で、本明細書に教示または示唆されているような他の目的または利点を必ずしも実現させずに、方法を実施できることを認識するであろう。本明細書では、様々な代替形態について言及されている。いくつかの好ましい実施形態には、１つの特徴、別の特徴またはいくつかの特徴が具体的に含まれているが、他の実施形態からは、１つの特徴、別の特徴またはいくつかの特徴が特に除外され、さらに他の実施形態では、１つの有益な特徴、別の有益な特徴またはいくつかの有益な特徴を含めることによって、特定の特徴が緩和されることを理解されたい。

【０２９７】

さらに、当業者は、異なる実施形態の様々な特徴を利用可能であることも認識するであろう。同様に、当業者は、本明細書の原理に従って方法を実施するために、上で論じた様々な要素、特徴及び工程、ならびにそのような各要素、特徴または工程に対するその他の既知の均等物を様々な組み合わせで採用できる。多様な実施形態では、様々な要素、特徴及び工程のうち、いくつかを具体的に含めるとともに、その他の要素、特徴及び工程を特に除外することになる。

【０２９８】

本願は、特定の実施形態及び実施例との関連で開示されているが、本願の実施形態は、具体的に開示されている実施形態を越えて、他の代替的な実施形態及び／またはその用法、修正形態及び等価形態にまで及ぶこと当業者は分かるであろう。

【０２９９】

本願を実施するための最良の形態であって、本発明者が分かっている最良の形態を含め、本願の好ましい実施形態が記載されている。当業者であれば、これらの好ましい実施形態に対する変形形態は、上記の説明を読めば明らかになるであろう。当業者は、このような変形形態を適宜、採用することができるとともに、本願は、本明細書に具体的に示されている以外の形でも実施できることが想定されている。したがって、本願の多くの実施形態には、準拠法で認められているように、本明細書に添付されている請求項で示されている主題のすべての修正形態及び等価物が含まれる。さらに、本明細書に別段の定めのない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、本願には、そのあらゆる考え得る変形形態において、上記の要素をいずれかに組み合わせたものが含まれる。

【０３００】

本明細書で参照されているすべての特許、特許出願、特許出願公開、及びその他の資料（論文、書籍、明細書、刊行物、書類、事柄及び／またはこれらの類似物など）は、本明細書で参照されることにより、あらゆる目的において、その全体が本明細書に援用される。ただし、上記と関連するいずれかの出願経過、上記のうち、本文書と一致しないかもしくは矛盾するいずれかのもの、または上記のうち、本文書と現時点でもしくは今後関連する請求項の最も広い範囲に関して限定的な影響を及ぼし得るいずれかのものは除く。例として、万が一、援用されている資料のいずれかと関連する用語の説明、定義及び／または使用と、本書と関連する用語の説明、定義及び／または使用との間に、いずれかの不一致点または矛盾がある場合には、本書における用語の説明、定義及び／または使用を優先するものとする。

【０３０１】

本明細書に開示されている本願の実施形態は、本願の実施形態の原理を例示するものであることを理解されたい。採用できるその他の修正形態も、本願の範囲内であることができる。すなわち、例としては、これに限らないが、本明細書内の教示に従って、本願の実施形態の代替的な構成を用いることができる。したがって、本願の実施形態は、正確に図

示及び説明されているような実施形態に限らない。

【０３０２】

本発明の様々な実施形態は、上記の詳細な説明において説明されている。これらの説明では、上記の実施形態が直接説明されているが、当業者であれば、本明細書に図示及び説明されている具体的な実施形態に対する修正形態及び／または変形形態を考案できることが分かる。本明細書の範囲内であるこのような修正形態または変形形態のいずれも、本発明にも含まれるように意図されている。別段の断りのない限り、本明細書及び請求項における用語と語句には、当該技術分野の当業者にとって一般的かつ慣習的な意味を与えることが本発明者の意図である。

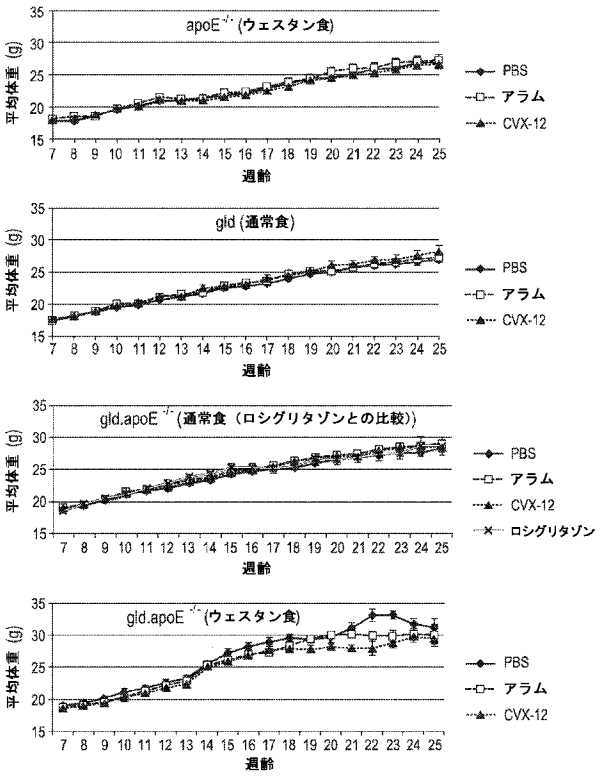
【０３０３】

本出願者が本願の出願時に把握している、本発明の様々な実施形態の上記の説明が示されており、その説明は、例示と説明を行うためのものとして意図されている。本明細書は、包括的であることも、開示されているまさにその形態に本発明を限定するようには意図されておらず、上記の教示に鑑みて、多くの修正形態と変更形態が可能である。記載されている実施形態は、本発明の原理と、その実際の適用を説明して、他の当業者が、想定されている特定の用途に適するように、様々な実施形態で、また、様々な修正形態によって、本発明を利用できるようにする役割を果たす。したがって、本発明は、開示されている特定の実施形態であって、本発明を実施するための特定の実施形態に限定されないように意図されている。

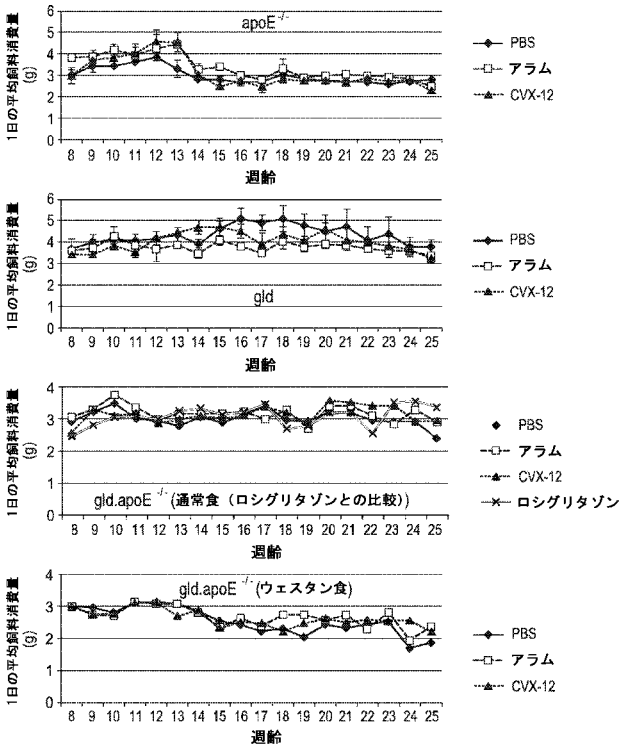
【０３０４】

本発明の特定の実施形態が示されているとともに、説明されているが、本発明及びそのより広範な態様から逸脱しなければ、本明細書における教示に基づき、変更と修正を行ってよく、したがって、添付の請求項には、その範囲内で、このようなあらゆる変更と修正が、本発明の真の趣旨と範囲内であるように含まれることは当業者には明らかであろう。

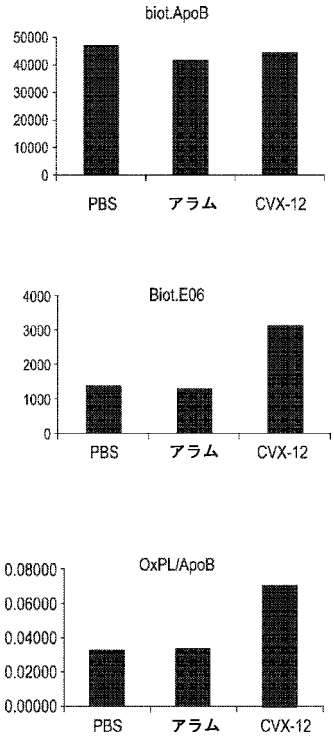
【図１】



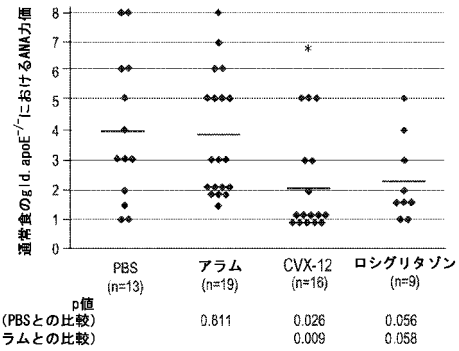
【図２】



【図３】

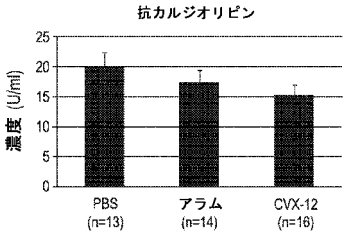


【図４】



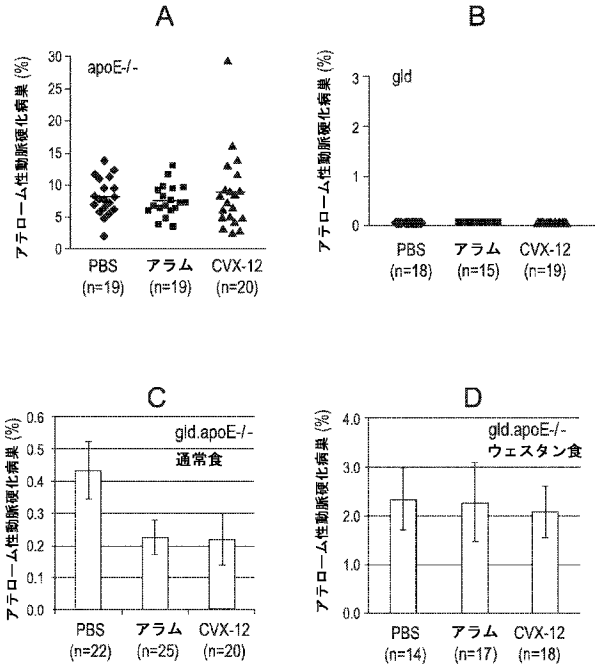
p値	アラム	CVX-12	ロシグリタゾン
(PBSとの比較)	0.811	0.026	0.056
(アラムとの比較)		0.009	0.058

【図５】

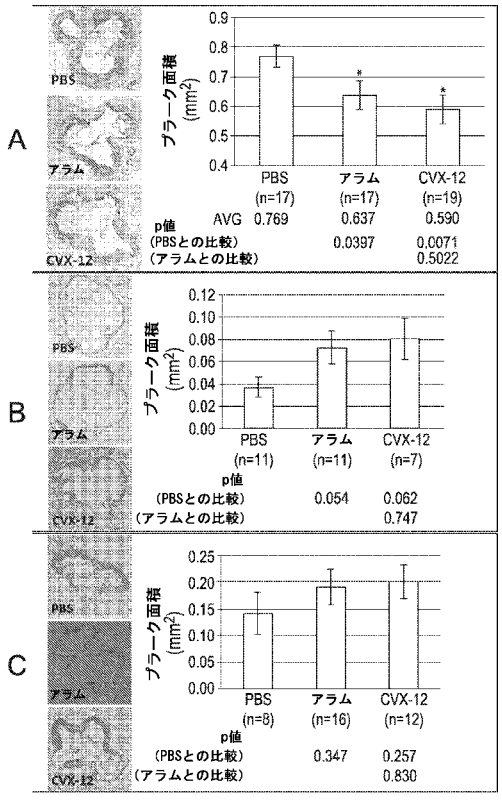


p値	アラム	CVX-12
(PBSとの比較)	0.439	0.126
(アラムとの比較)		0.403

【図６】

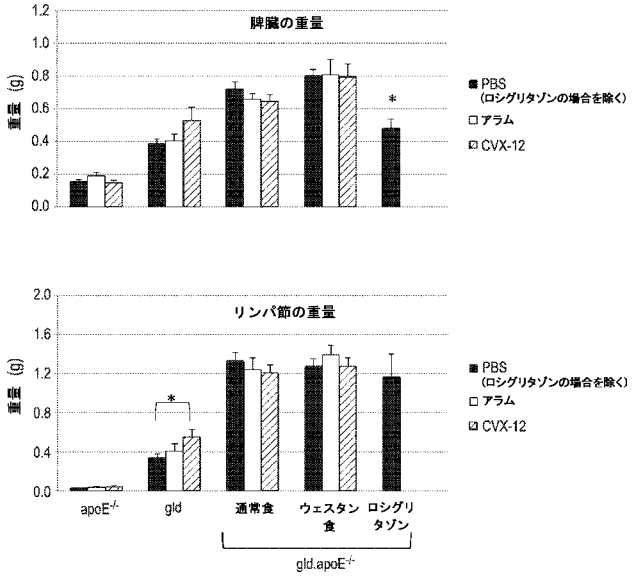


【図７】

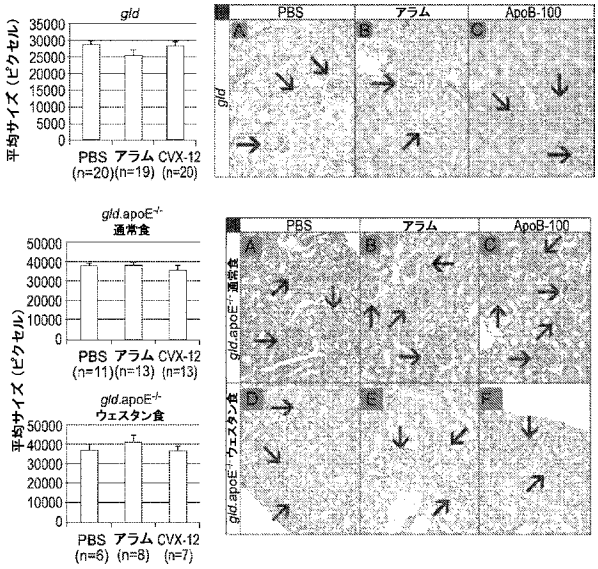


	PBS	アラム	CVX-12
A p値 AVG	0.769	0.637	0.590
A (PBSとの比較)		0.0397	0.0071
A (アラムとの比較)			0.5022
B p値		0.054	0.062
B (アラムとの比較)			0.747
C p値		0.347	0.257
C (アラムとの比較)			0.830

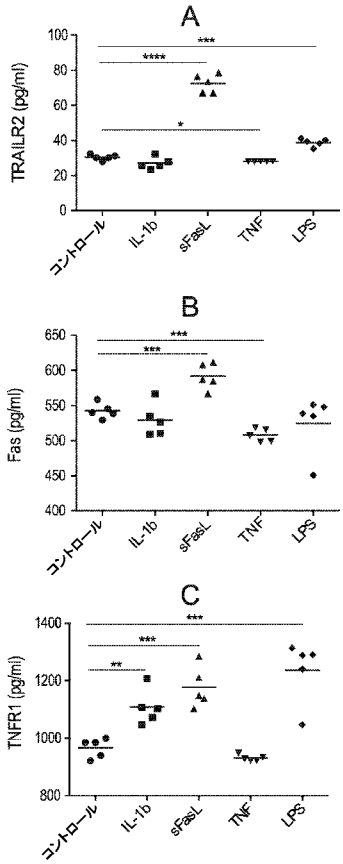
【図８】



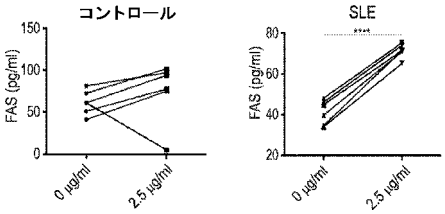
【図９】



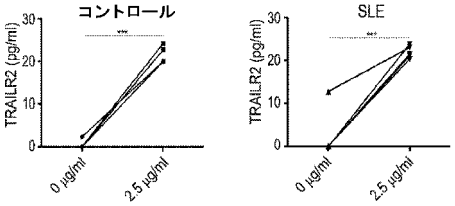
【図１０】



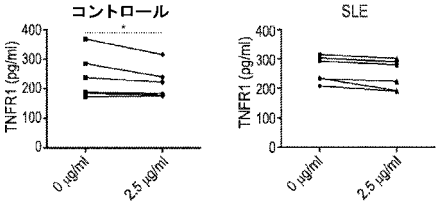
【図１１Ａ】



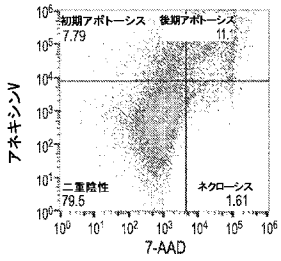
【図１１Ｂ】



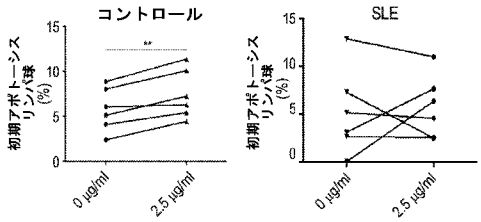
【図１１Ｃ】



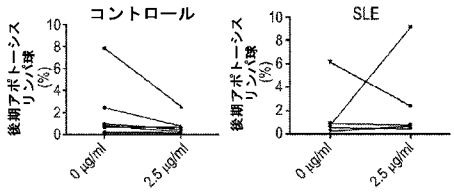
【図１１Ｄ】



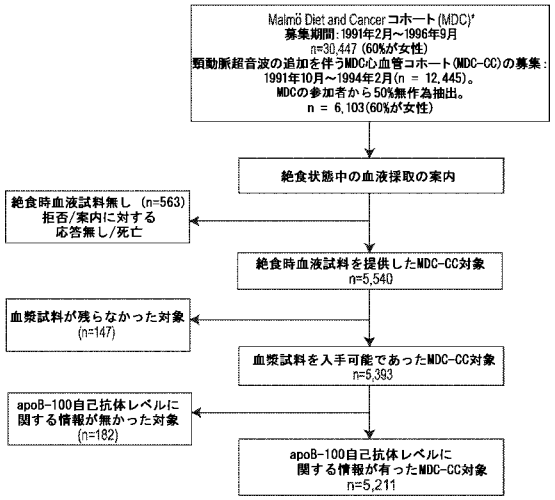
【図１１Ｅ】



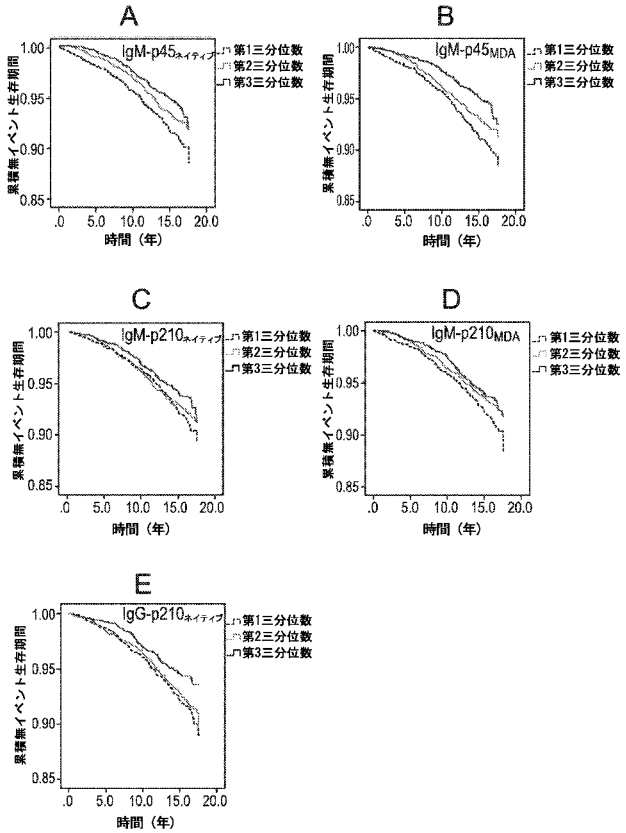
【図１１Ｆ】



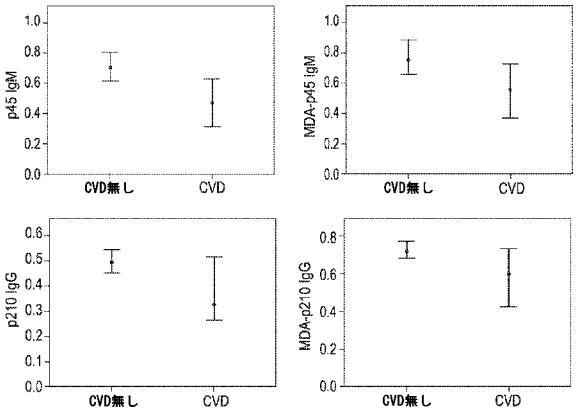
【図１２】



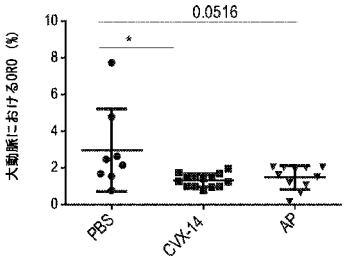
【図１３】



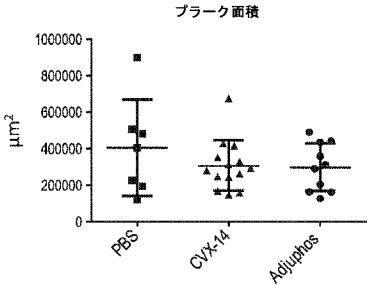
【図１４】



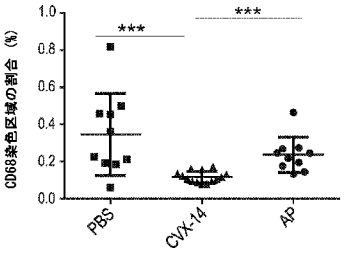
【図１５Ａ】



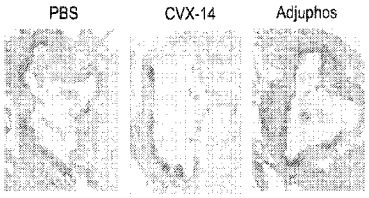
【図１５Ｂ】



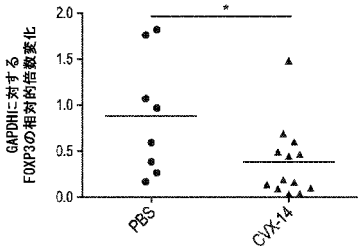
【図１５Ｃ】



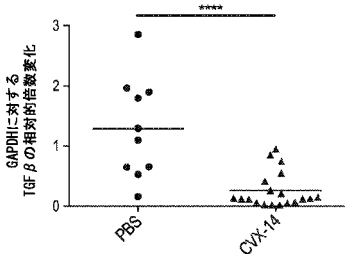
【図１５Ｄ】



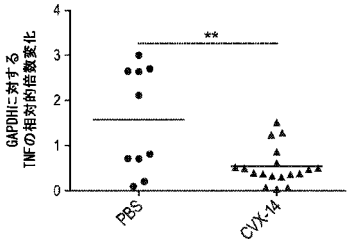
【図１５Ｅ】



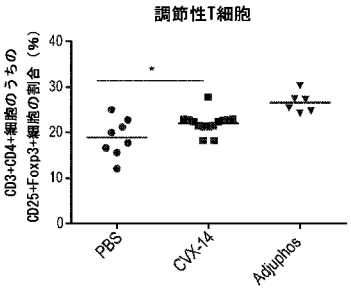
【図１５Ｆ】



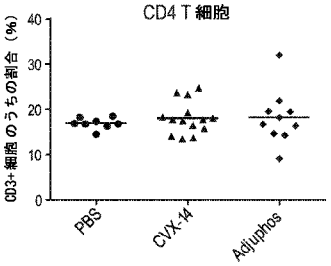
【図１５Ｇ】



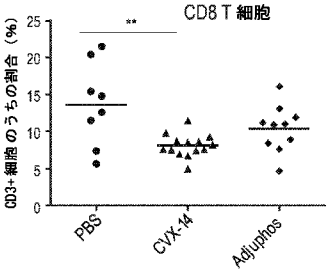
【図１６Ａ】



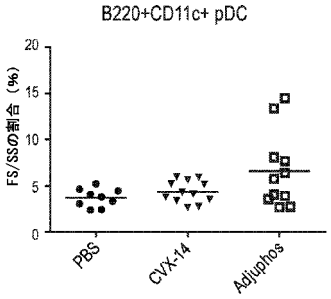
【図１６Ｂ】



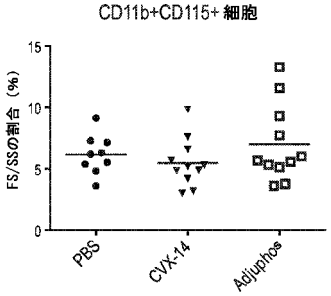
【図１６Ｃ】



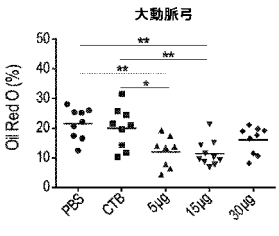
【図１６Ｄ】



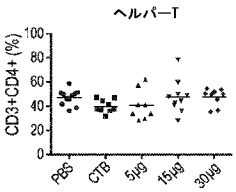
【図１６Ｅ】



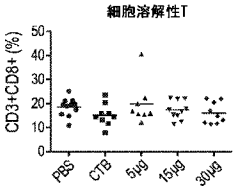
【図１７】



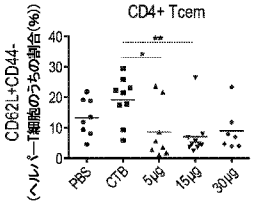
【図１８Ａ】



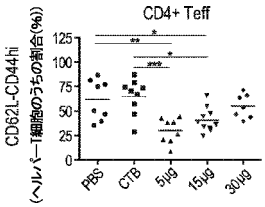
【図１８Ｂ】



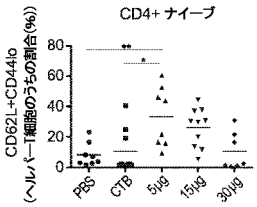
【図１８Ｃ】



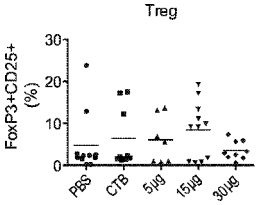
【図１８Ｄ】



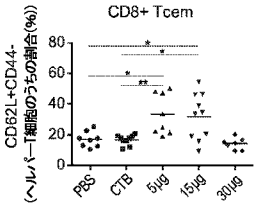
【図１８Ｅ】



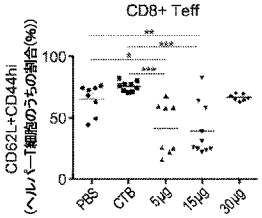
【図１８Ｆ】



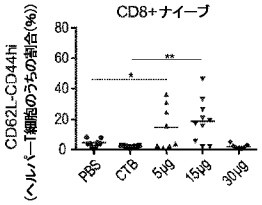
【図１８Ｇ】



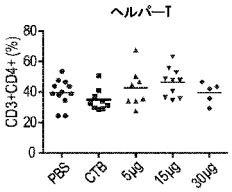
【図１８Ｈ】



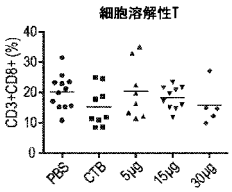
【図１８Ｉ】



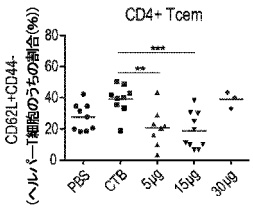
【図１９Ａ】



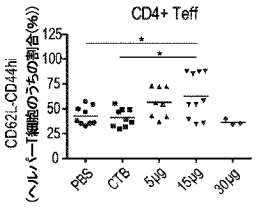
【図１９Ｂ】



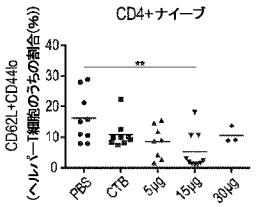
【図１９Ｃ】



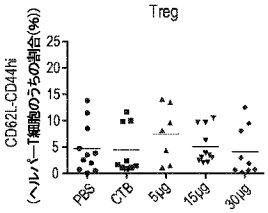
【図１９Ｄ】



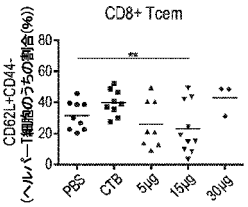
【図１９Ｅ】



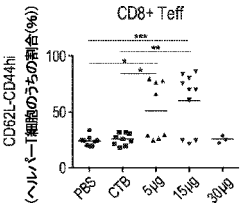
【図１９Ｆ】



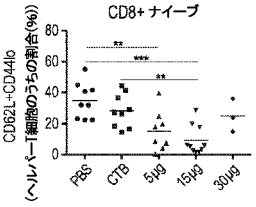
【図１９Ｇ】



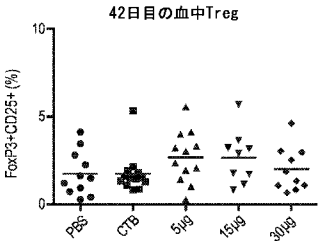
【図１９Ｈ】



【図１９Ｉ】



【図２０】



【配列表】
2019527192000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US17/35308

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - A61K 38/00, 38/16, 38/48, 48/00; C12N 15/113; C12Q 1/68 (2017.01)
CPC - A61K 38/00, 38/16, 38/48, 48/00; C12N 15/113; C12Q 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1186299 A1 (UNIVERSITAIR MEDISCH CENTRUM UTRECHT) March 13, 2002; abstract; paragraphs [0032], [0064], [0065]; claims 1, 2, 12	1-2, 21/1
---		—
Y		3/1-2, 4/3/1-2, 5/3/1-2, 6/3/1-2, 7-8, 9/7-8, 10/9/7-8, 11/9/7-8, 12/7-8, 13/7-8, 14/13/7-8, 21/8, 22/21/1, 22/21/8
Y	US 2008/0268029 A1 (NILSSON et al.) October 30, 2008; paragraphs [0020], [0036], [0037], [0043], [0045], [0053], [0054], [0081], [0082]; Table 1	3/1-2, 4/3/1-2, 5/3/1-2, 6/3/1-2, 9/7-8, 10/9/7-8, 11/9/7-8, 21/8, 23-24, 25/23-24, 26/25/23-24, 27/23-24, 28/27/23-24, 29/23-24, 30/23-24, 31/23-24, 32/23-24, 33/23-24, 34-38
Y	US 2014/0037672 A1 (NILSSON et al.) February 6, 2014; claims 1, 7	6/3/1-2, 12/7-8
Y	US 2014/0308306 A1 (CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER) October 16, 2014; abstract; paragraph [0051]; claim 18	7-8, 9/7-8, 10/9/7-8, 11/9/7-8, 12/7-8, 13/7-8, 14/13/7-8, 22/21/8
Y	WO 2008/070861 A2 (CELLERANT THERAPEUTICS INC.) June 12, 2008; paragraph [0082]	22/21/1, 22/21/8, 35

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
03 October 2017 (03.10.2017)	19 OCT 2017
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US17/35308

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2015/0204866 A1 (SENSE PROTEOMIC LIMITED); July 23, 2015; paragraphs [0006], [0052], [0060], [0082], [0088], [0169]; claims 1, 8, 10, 13	23-24, 25/23-24, 26/25/23-24, 27/23-24, 28/27/23-24, 29/23-24, 30/23-24, 31/23-24, 32/23-24, 33/23-24, 34-38
Y	US 2008/0039857 A1 (ADCOCK) February 23, 2008; abstract; paragraph [0030]	36

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US17/35308

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US17/35308

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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.: 18-20
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:

-***-Please See Supplemental Page-***-

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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.:
1-2, 3/1-2, 4/3/1-2, 5/3/1-2, 6/3/1-2, 7-8, 9/7-8, 10/9/7-8, 11/9/7-8, 12/7-8, 13/7-8, 14/13/7-8, 21/1, 21/8, 22/21/1, 22/21/8, 23-24, 25/23-24, 26/25/23-24, 27/23-24, 28/27/23-24, 29/23-24, 30/23-24, 31/23-24, 32/23-24, 33/23-24, 34-38

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/US17/35308

-***-Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking: -***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-14, 18-38, SEQ ID NO: 1 (ApoB-100 peptide) are directed toward peptides for prevention and/or therapeutic treatment of mammals against systemic lupus erythematosus and cardiovascular disease in mammals having systemic lupus erythematosus, as well as diagnosing the presence or absence of antibodies related to increased or decreased risk of developing SLE and/or to disease grading, staging, and/or prognosis.

The methods will be searched to the extent the peptide encompasses SEQ ID NO: 1 (ApoB-100 peptide). Applicant is invited to elect additional peptide(s) to be searched. Additional peptide(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-2, 3 (in-part), 4 (in-part), 5, (in-part), 6 (in-part), 7-8, 9 (in-part), 10 (in-part), 11 (in-part), 12 (in-part), 13 (in-part), 14 (in-part), and 21-38 encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (ApoB-100 peptide). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected peptide(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a peptide comprising SEQ ID NO: 2 (first exemplary elected ApoB-100 peptide).

Group II, Claims 15-17 are directed toward a method for treating SLE in a subject in need thereof by passive immunization, comprising providing an antibody that binds at least one oxidized fragment of ApoB and administering a therapeutically or prophylactically effective amount.

Groups III, Claims 39-41 are directed toward diagnosing the level of soluble forms of the apoptosis-signaling receptors Fas, TNF-R1, and/or TRAIL-R2 related to increased or decreased risk of developing SLE and cardiovascular disease associated with SLE.

The inventions listed as Groups I+ and II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Groups I+ include providing a composition comprising one or more peptides of ApoB, not present in any of Groups II and III, the special technical features of Group II include passive immunization with an antibody that binds at least one oxidized fragment of ApoB, not present in any of Groups I+ and III, the special technical features of Group III include detecting the level of soluble forms of the apoptosis-signaling receptors Fas, TNF-R1, and/or TRAIL-R2, not present in any of Groups I+ and II.

Groups I+-III share the technical features comprising: a subject having SLE. Groups I and II share the technical features including: treating SLE in a subject. Groups I and III share the technical features including: an assay for diagnosing SLE in a subject in need thereof comprising: obtaining a sample from the subject; assaying the sample; and an assay for determining likelihood of cardiovascular disease in a subject having or suspected of having SLE comprising: obtaining a sample from the subject; assaying the sample. Groups II-III share the technical features comprising: a subject having SLE. Groups I+ share the technical features including: a method of treating, inhibiting, preventing, reducing the severity of slow progression of and/or promoting prophylaxis of cardiovascular diseases in subjects with SLE comprising: (a) providing a composition comprising one or more peptides of ApoB or derivatives, pharmaceutical equivalents, peptidomimetics or analogs thereof; and (b) administering an effective amount of the composition to the subject, so as to treat, inhibit, prevent, reduce the severity of, slow progression of and/or promote prophylaxis of cardiovascular diseases in subjects with (SLE); a method of treating, inhibiting, preventing, reducing the severity of, slowing progression of, and/or promoting prophylaxis of systemic lupus erythematosus (SLE) in subjects in need thereof comprising: (a) providing a composition comprising one or more peptides of ApoB-100 ("ApoB") or derivatives, pharmaceutical equivalents, peptidomimetics or analogs thereof; and (b) administering an effective amount of the composition to the subject, so as to treat, inhibit, prevent, reduce the severity, slow the progression, and/or promote prophylaxis of SLE in the subject; a method of treating, inhibiting, preventing, reducing the severity of, slowing progression of and/or promoting prophylaxis of SLE in a subject in need thereof comprising: (a) providing a composition comprising CD8+ T cells activated with one or more peptides of ApoB or derivatives, pharmaceutical equivalents, peptidomimetics or analogs thereof; and (b) administering an effective amount of the composition to the subject so as to treat, inhibit, prevent, reduce the severity of, slow progression of and/or promote prophylaxis of SLE in the subject; a method of treating, inhibiting, preventing, reducing the severity of, slowing progression of and/or promoting prophylaxis of cardiovascular diseases in subjects with SLE comprising: (a) providing a composition comprising CD8+ T cells activated with one or more peptides of ApoB or derivatives, pharmaceutical equivalents, peptidomimetics or analogs thereof; and (b) administering an effective amount of the composition to the subject, so as to treat, inhibit, prevent, reduce the severity of, slow progression of and/or promote prophylaxis of cardiovascular diseases in subjects with (SLE); an assay for diagnosing SLE in a subject in need thereof comprising: obtaining a sample from the subject; assaying the sample to determine the level of autoantibodies against ApoB-100; and determining that the subject has increased likelihood of having SLE if the level of the autoantibodies is decreased relative to a reference value, or determining that the subject has decreased likelihood of having SLE if the level of autoantibodies is increased relative to a reference value; an assay for determining likelihood of cardiovascular disease in a subject having or suspected of having SLE comprising:
obtaining a sample from the subject; assaying the sample to determine the level of autoantibodies against ApoB-100; and determining that the subject has increased likelihood of cardiovascular disease if the level of the autoantibodies is decreased relative to a reference value, or determining that the subject has decreased likelihood of cardiovascular disease if the level of autoantibodies is increased relative to a reference value.

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US17/35308

-***-Continued from Previous Supplemental Box-***-

The article "Effects of apoB-derived peptide vaccination in a murine model of systemic lupus erythematosus" (SAMUELSEN) discloses a subject having SLE (mouse having SLE; abstract); a method of preventing cardiovascular diseases in subjects with SLE (method to lower the incidence of atherosclerosis (preventing cardiovascular disease) in lupus patients; abstract; page 1, first paragraph) comprising: (a) providing a composition comprising one or more peptides of ApoB ((a) immunization with a apoB peptide (providing a composition comprising one or more peptides of ApoB); abstract); and (b) administering an effective amount of the composition to the subject (administering an effective amount of the composition to the subject; abstract; page 12, first paragraph); a method of treating systemic lupus erythematosus (SLE) in subjects in need thereof (method of increasing antibody titer in a subject (treating SLE); page 22, first paragraph) comprising: (a) providing a composition comprising one or more peptides of ApoB-100 (providing a composition comprising one or more peptides of ApoB-100; abstract; page 22, first paragraph); and (b) administering an effective amount of the composition to the subject (administering an effective amount of the composition to the subject; abstract; page 12, first paragraph); a method of treating SLE in a subject in need thereof (method of increasing antibody titer in a subject (treating SLE); page 22, first paragraph) comprising: (a) providing a composition comprising CD8+ T cells activated with one or more peptides of ApoB (providing a composition comprising CD8+ T cells activated with one or more peptides of ApoB; page 6, second paragraph); and (b) administering an effective amount of the composition to the subject (immunization led to transfer of protective effects (administering an effective amount of the composition to the subject); page 6, second paragraph); a method of preventing cardiovascular diseases in subjects with SLE (method to lower the incidence of atherosclerosis (preventing cardiovascular disease) in lupus patients; abstract; page 1, first paragraph) comprising: (a) providing a composition comprising CD8+ T cells activated with one or more peptides of ApoB (providing a composition comprising CD8+ T cells activated with one or more peptides of ApoB; page 6, second paragraph); and (b) administering an effective amount of the composition to the subject (immunization led to transfer of protective effects (administering an effective amount of the composition to the subject); page 6, second paragraph).

Samuelsen does not disclose so as to treat, inhibit, prevent, reduce the severity of, slow progression of and/or promote prophylaxis of cardiovascular diseases in subjects with (SLE); so as to treat, inhibit, prevent, reduce the severity, slow the progression, and/or promote prophylaxis of SLE in the subject; an assay for diagnosing SLE in a subject in need thereof comprising: obtaining a sample from the subject; assaying the sample to determine the level of autoantibodies against ApoB-100; and determining that the subject has increased likelihood of having SLE if the level of the autoantibodies is decreased relative to a reference value, or determining that the subject has decreased likelihood of having SLE if the level of autoantibodies is increased relative to a reference value; an assay for determining likelihood of cardiovascular disease in a subject having or suspected of having SLE comprising: obtaining a sample from the subject; assaying the sample to determine the level of autoantibodies against ApoB-100; and determining that the subject has increased likelihood of cardiovascular disease if the level of the autoantibodies is decreased relative to a reference value, or determining that the subject has decreased likelihood of cardiovascular disease if the level of autoantibodies is increased relative to a reference value.

US 7,608,395 B2 to Pascual, et al (hereinafter 'Pascual') discloses an assay for diagnosing SLE in a subject in need thereof (an assay for diagnosing SLE in a subject in need thereof; claim 5) comprising: obtaining a sample from the subject (claim 5); assaying the sample (claim 5).

The article "Decreased levels of autoantibodies against apolipoprotein B-100 antigens are associated with cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus" by Svenungsson, et al. (hereinafter 'Svenungsson') discloses SLE patients having low ApoB autoantibody expression (abstract); determining that the subject has increased likelihood of having SLE if the level of the autoantibodies is decreased relative to a reference value (determining SLE if the autoantibodies is decreased relative to a reference value; abstract);, or determining that the subject has decreased likelihood of having SLE if the level of autoantibodies is increased relative to a reference value (detecting levels in normal controls (determining that the subject has decreased likelihood of having SLE if the level of autoantibodies is increased relative to a reference value); abstract); assaying the sample to determine the level of autoantibodies against ApoB-100 (assaying the sample to determine the level of autoantibodies against ApoB-100; abstract); an assay for determining likelihood of cardiovascular disease in a subject having or suspected of having SLE (an assay for determining likelihood of cardiovascular disease in a subject having or suspected of having SLE; abstract); comprising: obtaining a sample from the subject (page 418, second column, second paragraph); assaying the sample to determine the level of autoantibodies against ApoB-100 (assaying the sample to determine the level of autoantibodies against ApoB-100; abstract) and determining that the subject has increased likelihood of cardiovascular disease if the level of the autoantibodies is decreased relative to a reference value (determining that the subject has increased likelihood of cardiovascular disease if the level of the autoantibodies is decreased relative to a reference value; page 418, first column, third paragraph), or determining that the subject has decreased likelihood of cardiovascular disease if the level of autoantibodies is increased relative to a reference value (determining that the subject has decreased likelihood of cardiovascular disease if the level of autoantibodies is increased relative to a reference value; page 418, first column, third paragraph).

The article "Pathogenic immunity in systemic lupus erythematous and atherosclerosis: common mechanisms and possible targets for intervention" by Wigren, et al. (hereinafter 'Wigren') discloses administration of recombinant IgG so as to treat cardiovascular diseases in subjects with (SLE) (page 5, first paragraph); so as to treat of SLE in the subject (page 5, first paragraph).

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US17/35308

-***-Continued from Previous Supplemental Box-***-

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure of Samuelsen, to include an assay for diagnosing SLE in a subject in need thereof comprising: obtaining a sample from the subject; and assaying the sample, as previously disclosed by Pascual, for providing a superior method for diagnosing the presence of SLE in a patient. Furthermore, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure of Samuelsen, to include SLE patients having low ApoB autoantibody expression; determining that the subject has increased likelihood of having SLE if the level of the autoantibodies is decreased relative to a reference value;, or determining that the subject has decreased likelihood of having SLE if the level of autoantibodies is increased relative to a reference value; assaying the sample to determine the level of autoantibodies against ApoB-100; an assay for determining likelihood of cardiovascular disease in a subject having or suspected of having SLE; comprising: obtaining a sample from the subject; assaying the sample to determine the level of autoantibodies against ApoB-100 and determining that the subject has increased likelihood of cardiovascular disease if the level of the autoantibodies is decreased relative to a reference value, or determining that the subject has decreased likelihood of cardiovascular disease if the level of autoantibodies is increased relative to a reference value, as previously disclosed by Svenungsson, a superior method for diagnosing the detecting the presence or absence of antibodies related to increased or decreased risk of developing SLE or cardiovascular disease in a subject having SLE. Additionally, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure of Samuelsen, to include therapeutic administration of recombinant IgG so as to treat cardiovascular diseases in subjects with (SLE); so as to treat of SLE in the subject, as previously disclosed by Wigren, in order to provide a superior therapeutic strategy to treat SLE and cardiovascular disease in a subject in need thereof.

Since none of the special technical features of the Groups I+-III inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Samuelsen, Pascual, Svenungsson, and Wigren references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61K	***38/20***	***(2006.01)***	A61P	43/00	121	
A61K	***38/18***	***(2006.01)***	A61K	38/20		
A61K	***39/395***	***(2006.01)***	A61K	38/18		
A61P	***9/10***	***(2006.01)***	A61K	39/395	D	
C12N	*15/09*	*(2006.01)*	A61K	39/395	N	
C12Q	*1/686*	*(2018.01)*	A61P	9/10	101	
C12Q	*1/6851*	*(2018.01)*	C12N	15/09	Z	
C07K	*16/18*	*(2006.01)*	C12Q	1/686	Z	
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	C12Q	1/6851	Z	
C07K	*7/08*	*(2006.01)*	C07K	16/18		
			C07K	19/00		
			C07K	7/08		

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．プルロニック

(74)代理人　100142929
弁理士　井上　隆一
(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤　利光
(74)代理人　100128048
弁理士　新見　浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林　智彦
(74)代理人　100205707
弁理士　小寺　秀紀
(74)代理人　100114340
弁理士　大関　雅人
(74)代理人　100114889
弁理士　五十嵐　義弘
(74)代理人　100121072
弁理士　川本　和弥
(72)発明者　カーブリン　マーク
アメリカ合衆国　０８８２２　ニュージャージー州　フレミントン　グリーン　ヒルズ　ドライブ　１４
(72)発明者　ニルソン　ジャン
スウェーデン王国　２４７９９　ジェンナルプ　トッペラドュガード　３３１
(72)発明者　ルイス　ステイシー
アメリカ合衆国　９０２１２　カリフォルニア州　ビバリー　ヒルズ　サウス　モレノ　ドライブ

１５２　＃６

Ｆターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QR08 QR32 QR55
QR62 QS25 QS34 QX02
4C084 AA01 AA02 BA01 BA08 BA18 BA23 BA41 DA12 DA14 DB52
MA02 MA52 MA55 MA66 NA05 NA14 ZA361 ZA362 ZB071 ZB072
ZC751
4C085 AA13 AA14 BB11 CC21 EE03 GG01 GG08
4H045 AA30 BA10 BA41 CA11 CA40 DA75 DA83 DA86 EA22 FA20
FA74

专利名称(译)	系统性红斑狼疮的诊断和治疗方法		
公开(公告)号	JP2019527192A	公开(公告)日	2019-09-26
申请号	JP2018559732	申请日	2017-05-31
[标]发明人	ニルソンジャン		
发明人	カーブリン マーク ニルソン ジャン ルイス ステイシー		
IPC分类号	A61K38/10 G01N33/53 A61P9/00 A61P37/02 A61P43/00 A61K38/20 A61K38/18 A61K39/395 A61P9/10 C12N15/09 C12Q1/686 C12Q1/6851 C07K16/18 C07K19/00 C07K7/08		
FI分类号	A61K38/10.ZNA G01N33/53.N G01N33/53.M A61P9/00 A61P37/02 A61P43/00.121 A61K38/20 A61K38/18 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P9/10.101 C12N15/09.Z C12Q1/686.Z C12Q1/6851.Z C07K16/18 C07K19/00 C07K7/08		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA23 4C084/BA41 4C084/DA12 4C084/DA14 4C084/DB52 4C084/MA02 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA361 4C084/ZA362 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZC751 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/EE03 4C085/GG01 4C085/GG08 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA83 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/FA20 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十岚弘		
优先权	62/343601 2016-05-31 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在本发明中提供用于预防和/或治疗性治疗哺乳动物（包括人）的系统性红斑狼疮的肽和抗体，其发展为SLE和/或疾病等级，阶段和/的高风险和低风险 或者，诊断与预后相关的抗体的存在与否。

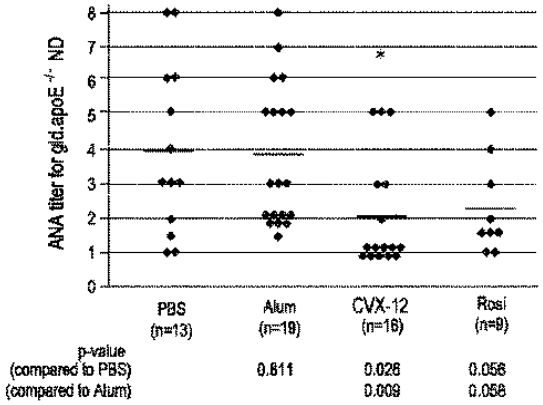



FIG. 4