

(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2004-512307

(P2004-512307A)

(43) 公表日 平成16年4月22日(2004.4.22)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 35/66	A 6 1 K 35/66	4 C 0 8 4
A 6 1 K 35/72	A 6 1 K 35/72	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/74	A 6 1 K 35/74	C
A 6 1 K 45/06	A 6 1 K 45/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 61 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-537324 (P2002-537324)	(71) 出願人	503155245
(86) (22) 出願日	平成13年10月25日 (2001.10.25)		アゼロマスタット・プロプライエタリー・
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月25日 (2003.4.25)		リミテッド
(86) 国際出願番号	PCT/IB2001/002005		オーストラリア国ウェスタン・オーストラ
(87) 国際公開番号	W02002/034273		リア 6000, パース, ジ・エスプラネ
(87) 国際公開日	平成14年5月2日 (2002.5.2)		ード 28, ビー・ジー・シー・センター
(31) 優先権主張番号	PR 1016		, レベル 11
(32) 優先日	平成12年10月25日 (2000.10.25)	(74) 代理人	100089705
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		弁理士 社本 一夫
		(74) 代理人	100076691
			弁理士 増井 忠式
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 心血管障害の診断および治療のための組成物および方法

## (57) 【要約】

心血管障害の予防または治療処置の方法について開示し、方法は障害に関係する T h 2 型 T 細胞応答のサイトカイン・プロフィールに比較して T h 1 型 T 細胞応答に特徴的なサイトカイン・プロフィールを亢進的に調節するための 1 つ以上の物質の有効量を、それを必要とする被験者に投与することを含む。方法において使用するための組成物も更に開示する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

心血管障害の予防または治療処置の方法であり、障害に係る T h 2 型 T 細胞応答のサイトカイン・プロファイルと比較して T h 1 型 T 細胞応答に特徴的なサイトカイン・プロファイルを亢進的に調節するための 1 つ以上の物質の有効量を、それを必要とする被験者に投与することを含む上記方法。

## 【請求項 2】

T h 2 型 T 細胞応答に特徴的なサイトカイン・プロファイルを T h 1 応答に特徴的なサイトカイン・プロファイルにシフトすることを含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

被験者において T h 1 型 T 細胞応答を亢進的に調節し、T h 2 型 T 細胞応答を抑制的に調節する能力がある物質を投与することを含む、請求項 1 または 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

被験者において T h 1 型 T 細胞応答に特徴的なサイトカインの作用を増強し、T h 2 応答に特徴的なサイトカインの作用を抑制する能力のある物質を投与することを含む、請求項 1 または 2 記載の方法。

## 【請求項 5】

被験者において T h 1 型 T 細胞応答を亢進的に調節する能力のある物質を投与することを含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 6】

被験者において T h 1 型 T 細胞応答に特徴的なサイトカインの作用を増強する能力のある物質を投与することを含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 7】

被験者において T h 2 型 T 細胞応答を抑制する能力のある物質を投与することを含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 8】

被験者において T h 2 型 T 細胞応答に特徴的なサイトカインの作用を抑制する能力のある物質を投与することを含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 9】

1 つ以上の物質が微生物またはその成分、抽出物、音波処理物、もしくは分泌物、あるいは上記のいくつか、もしくは全ての混合物を含む、請求項 1 から 8 のいずれかに記載される方法。

## 【請求項 10】

抽出物が微生物の細胞壁画分を含有する、請求項 9 記載の方法。

## 【請求項 11】

微生物が酵母および細菌から成る群から選択される、請求項 9 または 10 に記載される方法。

## 【請求項 12】

微生物が共生細菌である、請求項 11 記載の方法。

## 【請求項 13】

共生細菌が乳酸桿菌およびミコバクテリウム種から成る群から選択される、請求項 12 記載の方法。

## 【請求項 14】

乳酸桿菌種が被験者において T h 2 応答を抑制し、コレステロールレベルを低下させる能力を有する、請求項 13 記載の方法。

## 【請求項 15】

共生細菌が好酸性乳酸桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、発酵乳酸桿菌 (*Lactobacillus fermentum*)、およびミコバクテリウム・バッカエ (*Mycobacterium vaccae*) から選択される、請求項 12 記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 16】

微生物がラクトバチルス・カゼイ ( *casei* )、ラクトバチルス・プランタラム ( *plantarum* )、ラクトバチルス・カムノサス ( *chamnosus* )、およびビフィドバクテリウム・ブレーベ ( *breve* ) から成る群から選択される細菌である、請求項 11 記載の方法。

## 【請求項 17】

微生物が生菌である、請求項 11 から 16 のいずれかに記載される方法。

## 【請求項 18】

Th1 型 T 細胞応答に特徴的なサイトカイン・プロフィールを亢進的に調節するための物質に加えて、被験者を治療するための医薬的に活性な少なくとも 1 つの物質の有効量を被験者に投与することを更に含む、請求項 1 から 17 のいずれかに記載される方法。

10

## 【請求項 19】

医薬的に活性な物質が脂質低下剤、抗高血圧剤、および抗糖尿病剤から成る群から選択される、請求項 18 記載の方法。

## 【請求項 20】

Th1 型 T 細胞応答に特徴的なサイトカイン・プロフィールを亢進的に調節するための物質を医薬的に活性な物質の前に、同時に、または後に被験者に投与する、請求項 18 または 19 記載の方法。

## 【請求項 21】

障害に関係する Th2 型 T 細胞応答が細菌感染、細菌性抗原、多クローン性活性物質、超抗原、または自己抗原によって悪化する、請求項 1 から 20 のいずれかに記載される方法。

20

## 【請求項 22】

感染がクラミジア・ニューモニエ ( *Chlamydia pneumoniae* )、ヘリコバクター・ピロリ ( *Helicobacter pylori* )、または型別不能ヘモフィルス・インフルエンザ ( *Haemophilus influenzae* ) による、または細菌性抗原がそれら由来である、請求項 20 記載の方法。

## 【請求項 23】

心血管障害が安定した、または不安定な病状を有するアテローム患者から成る群から選択される、請求項 1 から 22 のいずれかに記載される方法。

30

## 【請求項 24】

心血管障害の診断またはそれへの罹病性の評価の方法であり、被験者において T 細胞応答を評価することを含み、ここで Th2 型 T 細胞応答の亢進的調節および / または Th1 型 T 細胞応答の抑制が障害への罹病性、またはその存在を示す、上記方法。

## 【請求項 25】

被験者が亢進的に調節された Th2 型 T 細胞応答および抑制された Th1 型 T 細胞応答を有するかどうかを測定することを含む、請求項 24 記載の方法。

## 【請求項 26】

評価が、Th1 型 T 細胞応答に特徴的な 1 つ以上のサイトカインの活性もしくは生成が抑制されるかどうか、そして / または Th2 型 T 細胞応答に特徴的な 1 つ以上のサイトカインの活性もしくは生成が促進されるかどうかの測定を含む、請求項 24 記載の方法。

40

## 【請求項 27】

評価が、Th1 型 T 細胞応答に特徴的な 1 つ以上のサイトカインの活性または生成が抑制されるかどうか、および Th2 型 T 細胞応答に特徴的な 1 つ以上のサイトカインの活性または生成が増強されるかどうかの測定を含む、請求項 26 記載の方法。

## 【請求項 28】

サイトカイン ( 単数または複数 ) が IFN - 、 IL - 4、IL - 10、および IL - 12 から成る群から選択される、請求項 26 または 27 記載の方法。

## 【請求項 29】

T 細胞応答を循環 T 細胞の分析によって評価する、請求項 24 から 28 のいずれかに記載

50

される方法。

【請求項 30】

心血管障害の診断する、または被験者が障害への罹病性を有するかどうかを評価する方法であり、以下：

(a) 障害の影響を受けた 1 つ以上の免疫グロブリンレベルを測定して試験データを得；そして

(b) 参照データと試験データを比較して被験者が心血管障害への罹病性を有するかどうか、または心血管障害を有するかどうかを評価すること

を含む上記方法。

【請求項 31】

1 つ以上の I g G レベルを測定することを含む、請求項 30 記載の方法。

【請求項 32】

総 I g G 2 サブクラス免疫グロブリンの測定を含む、請求項 31 記載の方法。

【請求項 33】

I g G 2 サブクラス特異的抗体のレベルの測定を含む、請求項 31 または 32 のいずれかに記載される方法。

【請求項 34】

I g G 2 サブクラス特異的抗体がクラミジア・ニューモニエ、ヘリコバクター・ピロリ、または型別不能ヘモフィルス・インフルエンザに特異的である、請求項 33 記載の方法。

【請求項 35】

総 I g G 2 サブクラスと I g G 2 サブクラス特異的抗体の比率、または総 I g G 2 サブクラスと I g G 2 サブクラス特異的抗体の比率の変化が障害への罹病性、またはその存在を示す、請求項 31 記載の方法。

【請求項 36】

心血管障害が安定な、または不安定な病状を有するアテローム患者から選択される、請求項 30 から 35 のいずれかに記載される方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は心血管障害の診断法および同障害の治療または予防処置における使用に好適な組成物に関する。特に本発明は冠状動脈疾患の診断および治療に好適な方法および組成物に関する。

【0002】

(発明の背景)

アテロームは動脈に関係する炎症過程であり、特に冠状動脈疾患、一般には血管変性疾患を実証するものである。Tリンパ球がアテローム斑内で炎症を作動するというコンセプトを支持するデータが存在する。特にプラーク内の単核細胞の 2 - 10 % が T 細胞であり、その 2 / 3 が CD 4 + v e であり、そしてそのほとんどが CD 4 5 R O、M H C クラス I I、および I L - 2 R を発現することが報告されている ( L a m o n ら , I m m u n o l o g y T o d a y 1 8 ( 1 9 9 7 ) 2 7 2 - 7 )。前炎症性 ( p r o - i n f l a m m a t o r y ) サイトカイン (例えば I L - 1、I L - 6、T N F - 、および I N F - ) はプラーク内の細胞から分泌されるが、これは細胞修飾因子 (例えば P D G F、M C P - 1、および M - C S F) およびタンパク分解酵素 (例えばマトリクス・メタロプロテイナーゼ ( m a t r i x m e t a l l o p r o t e i n a s e s )、例えばコラゲナーゼおよびゼラチナーゼ B ) と同様である ( L a m o n ら , 1 9 9 7 )。

【0003】

プラーク内の Tリンパ球およびマクロファージ間の重要かつ複雑な関係には、一部には、マクロファージ (および他の細胞) 上の CD 4 0 による活性化型プラーク T 細胞上の CD 4 0 L のライゲーションを通したレセプター・リガンド結合が介在し、プラークのリモデリング、プラーク破壊 ( r u p t u r e )、および抗原提示を含む一定の結果に影響して

10

20

30

40

50

いるのかもしれない (Lamonら, 1997)。

【0004】

近年、特定の微生物がアテロームの促進と関連づけられている。クラミジア・ニューモニエは最もキャラクタライズされているが、最近の総説で、一般に持続感染は血管内炎症 (intimal inflammation) およびアテローム斑増殖に関連づけられることが示唆されている (Saikuら, Lancet 116 (1998) 983-5; Sharら, S Afr Med J 82 (1992) 158-61; Mejerら, JAMA 281 (1999) 427)。アテロームの進行、または '疫学的に関係する' 微生物がアテローム増殖を促進する過程の原因となる基本的な機構を明らかにするデータは存在しない。

10

【0005】

免疫応答に基づく心血管障害 (例えば冠状動脈疾患) の診断を補助する改善された方法、およびそれらの症状の予防または治療のための組成物が必要とされている。

【0006】

(発明の概要)

従来技術の問題の1つ以上を克服もしくは改善する、または少なくとも有用な代替法を提供することが本発明の目的である。

【0007】

本発明は、アレルギーの状態のような現代生活の "Th2 サイトカイン" の偏りによる冠状動脈疾患 (例えばアテローム)、および 'Th2 への偏り' に関する "現代生活" の疾病の発症の主要な新規の機構の同定に基づく。多くの因子がTh2炎症反応のアテローム促進効果を変化させる (例えば脂質レベル、喫煙、高血圧など)。特定の作用機構に拘束されることは望まないが、原因はおそらく腸内細菌に対する環境の影響であり、Th1促進微生物 (例えば乳酸桿菌) がTh2応答に関する他の微生物で置換されているためである。

20

【0008】

この新たな所見により、アテロームの傾向にある、またはアテローム負荷量が高い被験者を、それぞれ検出および変更するための診断および治療の独自の機会が提供される。特に、一定の '伝統的な' 細菌 (共生細菌) での腸の再構成は有用な治療的アプローチの1つであることが認められている。

30

【0009】

いったん確立されたTh2への偏りを更に悪化させる別の特定の微生物 (例えばクラミジア・ニューモニエおよびヘリコバクター・ピロリ) に合わせた診断および治療も特にここで企図する。'現代生活型アテローム' は腸内細菌叢の変化に次ぐサイトカイン・パターンの変化によって誘引されるというコンセプトは、先進国および発展途上国におけるアテローム間の本質的な相違は先進国におけるプラークでの過剰量の炎症であるという見解と一致する。

【0010】

従って広義には、本発明は血中のTh2応答の種々のマーカーおよび指標の評価に基づく顕著なTh2介在型アテローム (例えば冠状動脈疾患) の診断または検出の方法、並びに、Th1応答を促進する、および/またはTh2応答を抑制する能力のある治療または予防物質として使用することができる組成物に関する。

40

【0011】

特に、本発明のある観点では心血管障害の予防または治療処置の方法を提供し、方法はそれを必要とする被験者に、障害に関するTh2型T細胞応答のサイトカイン・プロファイルと比較してTh1型T細胞応答に特徴的なサイトカイン・プロファイルを亢進的に調節するための少なくとも1つの物質の有効量を投与することを含む。

【0012】

Th1型T細胞応答に特徴的なサイトカイン・プロファイルの亢進的調節は、被験者におけるTh1型T細胞応答の亢進的調節および/またはTh2型T細胞応答の抑制によって

50

行ってもよい。あるいはまた、亢進的調節はT h 1型T細胞応答に特徴的なサイトカインの活性の増強および/またはT h 2 応答に特徴的なサイトカインの活性の抑制によって行ってもよい。

【0013】

単一の物質または複数の物質を被験者に投与して所望の結果を得てもよい。これはT h 2 型T細胞応答を抑制し、それによってT h 1型T細胞応答の相対的な亢進的調節を行う物質（単数または複数）を投与するか、またはT h 1型T細胞応答の測定可能な上昇を起こす物質（単数または複数）を投与することによって行ってもよい。あるいはまた、T h 1 型T細胞応答の測定可能な上昇を起こす能力のある1つ以上の物質、並びにT h 2 型T細胞応答を抑制する1つ以上の物質を被験者に投与してもよい。好ましくは、T h 1型T細胞応答を亢進的に調節し、T h 2 型T細胞応答を抑制する能力のある少なくとも1つの物質を投与する。

10

【0014】

一般に、方法はT h 2 型T細胞応答に特徴的なサイトカイン・プロフィールをT h 1型T細胞応答に特徴的なサイトカイン・プロフィールにシフトすることを含む。

【0015】

従って、本発明の別の観点では、心血管障害の予防または治療処置の方法を提供し、方法はそれを必要とする被験者に、T h 1型T細胞応答を亢進的に調節する能力のある少なくとも1つの物質、および/または障害に関係するT h 2 型T細胞応答を抑制する能力のある少なくとも1つの物質の有効量を投与することを含む。

20

【0016】

本発明の更に別の観点では、心血管障害の予防または治療処置の方法を提供し、方法はそれを必要とする被験者に、障害に関係するT h 2 型T細胞応答に特徴的なサイトカインの活性を抑制する能力のある少なくとも1つの物質、および/またはT h 1型T細胞応答に特徴的なサイトカインの作用を増強する能力のある少なくとも1つの物質の有効量を投与することを含む。

【0017】

本発明の更なる観点では、心血管障害を有する被験者におけるサイトカイン・バランスを変化させる方法を提供し、方法はそれを必要とする被験者に、T h 1型T細胞応答を亢進的に調節する能力のある少なくとも1つの物質、および/または障害に関係するT h 2 型T細胞応答を抑制する能力のある少なくとも1つの物質の有効量を投与することを含む。

30

【0018】

本発明の更に別の観点では、心血管障害を有する被験者におけるサイトカイン・バランスを変化させる方法を提供し、方法はそれを必要とする被験者に、障害に関係するT h 2 型T細胞応答に特徴的なサイトカインの作用を抑制する能力のある少なくとも1つの物質、および/またはT h 1型T細胞応答に特徴的なサイトカインの作用を増強する能力のある少なくとも1つの物質の有効量を投与することを含む。

【0019】

本発明の方法に使用するのに好ましい物質は所望の結果が得られる微生物、またはその成分、抽出物、もしくは分泌物である。微生物は例えば酵母、細菌、およびそれらの混合物であってもよい。好ましくは微生物は細菌であり、より好ましくは共生細菌である。好適な共生細菌は乳酸桿菌種および/またはミコバクテリウム種から選択してもよい。T h 2 応答を抑制し、コレステロールを低下させる能力を有する乳酸桿菌は好ましい。特に好ましいのは好酸性乳酸桿菌およびミコバクテリウム・バッカエである。

40

【0020】

理解されるように、微生物の投与は生きたまま、不活性化して、または死滅させて行ってもよい。好ましくは共生細菌を生菌として投与する。

【0021】

しかしながら、本発明は微生物の使用に限定されるのではなく、理解されるようにT h 1 型T細胞応答に特徴的なサイトカイン・プロフィールをT h 2 型T細胞応答のそれに比較

50

して亢進的に調節させる能力のある物質のいずれを利用してよい。他の物質には、例えば抗体およびその結合フラグメントがある。抗CD40抗体またはその結合フラグメントは特に好ましい。更に、CD40の他のリガンドを使用してもよい。

【0022】

サイトカイン・マーカーはTh1またはTh2応答のいずれかと特徴的に関係するサイトカイン（単数または複数）のいずれでもよい。例えばTh1応答ではサイトカインはインターフェロン- またはインターロイキン-12であってもよく、Th2応答ではサイトカインはインターロイキン-4、インターロイキン-10、TGF-、および/またはインターロイキン-13であってもよい。しかしながら、理解されるように、他のサイトカイン・マーカーは、Th1またはTh2応答のいずれかに特異的な、または同定可能なマーカーである限り有用である。

10

【0023】

上に概説した処置を、心血管障害を悪化させる根本となる症状の治療に使用される1つ以上の医薬的に活性な物質（例えば脂質低下剤、抗高血圧剤、および抗糖尿病剤）の投与と組み合わせることができる。

【0024】

T細胞応答の変更または関連するサイトカインの活性の調節のために使用される物質をそれらの医薬的に活性な物質の1つ以上の前に、同時に、または後に投与することができる。

【0025】

本発明の方法は、サイトカイン・バランスの障害または好適なT細胞応答の欠如が細菌感染、細菌性抗原、多クローン性活性化物質（例えばエンドトキシンなど）、超抗原（例えばコロニー形成細菌からの）、または自己抗原（血管壁のプラーク内の）によって悪化した被験者においても有効である。特に本発明に関連するのは、クラミジア・ニューモニエ、ヘリコバクター・ピロリ、または型別不能ヘモフィルス・インフルエンザによる感染、またはそれら由来の細菌性抗原である。

20

【0026】

従って、本発明の更なる観点では心血管障害の診断またはそれへの罹病性の評価の方法を提供し、方法は被験者においてT細胞応答を評価することを含み、ここでTh2応答の亢進的調節および/またはTh1応答の抑制は、障害への罹病性またはその存在を示す。

30

【0027】

本発明の別の観点では、心血管障害の診断またはそれへの罹病性の評価の方法を提供し、方法は被験者においてT細胞応答を評価することを含み、ここでTh1応答に特徴的なサイトカインの活性もしくは生成の抑制、および/またはTh2応答に特徴的なサイトカインの活性もしくは生成の増強は、被験者の障害への罹病性またはその存在を示す。

【0028】

本発明の更なる観点では、心血管障害の診断、または被験者が障害への罹病性を有するかどうかの評価の方法を提供し、方法は以下を含む：

(a) 障害によって影響される1つ以上の免疫グロブリンレベルを測定して試験データを得；そして

40

(b) 試験データを参照データと比較して被験者が心血管障害への罹病性を有するかどうか、または同障害を有するかどうかを評価する。

【0029】

好ましくは免疫グロブリンはIgGであり、より好ましくはIgG2サブクラスである。

【0030】

好ましくは免疫グロブリンは病原性細菌（例えばクラミジア・ニューモニエ、ヘリコバクター・ピロリ、または型別不能ヘモフィルス・インフルエンザ）に特異的なIgG2サブクラスの抗体である。当業者に明らかなように、他の特異的抗体を使用してもよい。

【0031】

好ましくは、総IgG2とIgG2サブクラス特異的抗体との比率、または総IgG2サ

50

ブクラスの免疫グロブリンとI g G 2サブクラスの特異的抗体の比率の変化を、心血管障害の存在またはその罹病性の指標として使用する。

【0032】

‘心血管障害’という用語はアテロームおよび血管変性疾患、そして冠状動脈の炎症を伴う心血管症状または疾患（1から3の冠状動脈疾患を含む）を包含するものとみなす。

【0033】

一般に心血管障害は血管変性疾患であり、より一般的にはアテロームである。

【0034】

特に、本発明の方法は、最小限の、または広範な冠状動脈アテローム硬化症を有するが安定した疾病であるアテローム患者、並びに最近心筋梗塞を起こした、または不安定な狭心症を有する不安定な疾病であるアテローム患者の治療に適用できる。

10

【0035】

好ましくは、T細胞応答を循環T細胞の分析によって評価する。しかしながら、理解されるようにT細胞応答は特定のT細胞応答に特徴的なマーカーサイトカイン（単数または複数）、例えばTh1応答ではインターフェロン- $\gamma$ もしくはIL-12、またはTh2応答ではインターロイキン-4および/もしくはインターロイキン-13の測定によって評価してもよい。

【0036】

ここに記載する方法に使用するための組成物もまた、明確に本発明の範囲内に含まれる。更に、心血管障害の予防または治療処置のために被験者に投与する医薬品または治療組成物の製造における、ここに記載する物質の使用も明確に包含される。

20

【0037】

更に、本発明の診断または評価の方法に使用するためのキットも提供する。キットは例えばアッセイを実施するための1つ以上の試薬、例えば抗体、バッファー、コントロール、および使用説明書を含んでもよい。

【0038】

ここで本発明の特徴および利点について、多くの好ましい非限定的な本発明の態様と関連して以下に記載する。

本発明の好ましい態様の詳細な説明

顕著なアテロームの存在によってIL-4の血中レベルが上昇し、それに伴ってIFN- $\gamma$ レベルが低下することが観察されている。このサイトカイン・バランスの変化はTh2応答へのシフトを示すものであり、アテロームの診断に有用である。またこの観察によってT細胞応答をTh1応答へ変化させることを目的とする治療のための確実な基準が提供され、従って冠状動脈疾患、および同様の根本的な機構に基づくアテロームを含む他の心血管障害の予防および/または治療に有用である。

30

【0039】

ここで企図される可能な治療剤の例は、サイトカイン・バランスをTh1応答の方に戻し、それによって心血管障害の進行を低減する、その発症を予防する、または逆行させることができる共生細菌（例えば乳酸桿菌）を含むものである。しかしながら、他の物質および組成物、例えば以下に記載する細菌アジュバントで応答をTh2からTh1にシフトさせる能力を有するものも、ここに記載する症状の治療に有用である。

40

【0040】

循環T細胞中のTh2への偏りを検出する方法は、それが直接的なものであっても、あるいは間接的なものであっても（例えばこの偏りの下流の効果、例えばI g GサブクラスのバリエーションまたはI g Gサブクラス特異的抗体のバリエーションで、クラミジア・ニューモニエまたはヘリコバクター・ピロリ（しかしそれらの病原体に限定されない）に対する抗体産生において起こるもののモニタリングによるような）、冠状動脈疾患の指標として有用である。例えばI g G 2は、サイトカイン・パターンがTh2方向にシフトする場合、相対的に低い。I g G 2サブクラスの免疫グロブリン、または（例えばクラミジア・ニューモニエまたはヘリコバクター・ピロリに）特異的なI g G 2サブクラス抗体全体

50

のこのような比率の変化（または低レベル）は‘アテロームを促進する’サイトカインの偏りを示す。

【0041】

実際、免疫グロブリン、例えばIgG2サブクラス抗体のレベルを測定し、参照レベルまたは比率と比較して、被験者が心血管障害（例えばアテローム）に罹患しやすいかどうか、あるいは疾病を有するかどうかについての評価を行ってもよい。好適な参照レベルまたは比率は一般に健康な個体から得た対応する測定値に基づき、通常、慣例的な方法に従って集団の代表群から得た平均値を含む。

【0042】

更に、本発明で企図するアテロームの予防、治療、または逆行の方法は、共生細菌（特に乳酸桿菌種）の投与のような、サイトカイン・バランスをTh1応答側にシフトまたは変化させる処置を含む。例えば好酸性乳酸桿菌はIL-4を抑制的に調節し、脾臓内のT細胞（すなわち循環細胞）からのINF-分泌を亢進的に調節し、従ってアテロームおよび他のそのような心血管障害の治療に適用できる。他の治療にはTh2サイトカイン分泌を抑制する、もしくはそれらのサイトカインの作用を阻害する因子の投与、および/またはINF-のようなTh1サイトカインの分泌または活性を促進する治療がある。

10

【0043】

当業者に明らかなように、抗原（例えばクラミジア・ニューモニエまたはヘリコバクター・ピロリ）または非特異的活性化因子（例えば多クローン性活性化物質、エンドトキシン、または超抗原）と特異的に反応する循環T細胞からのサイトカイン分泌のレベルまたは

20

【0044】

更に、サイトカイン・バランスをTh1応答側に変化させることができる共生細菌または他の物質と、‘リスク因子’を対象とする既存の療法（例えば脂質低下物質、抗高血圧剤など）とを併用する治療を有効に利用してもよい。多くの更なる因子がアテロームを誘引し（例えば血中脂質、糖尿病、高血圧、喫煙）、サイトカイン・バランスを変化させる療法と根底にある症状を治療する療法との併用もここで企図する。

【0045】

一般に、T細胞サイトカイン・プロフィールおよび/またはT細胞応答を評価するために被験者からサンプルを採取する。サンプルは全血サンプル、全血の細胞成分、単離した細胞、または例えばアッセイに好適な組織生検サンプルであってもよい。

30

【0046】

微生物は細菌および酵母株から選択してもよく、それらにはサッカロミセス（saccharomyces）種、例えばサッカロミセス・セレビジエ（cerevisiae）およびサッカロミセス・ブラルディ（boulardii）がある。好ましくは細菌は共生細菌である。あるいはまた、微生物（単数または複数）の成分、音波処理物、抽出物もしくは分泌物、またはそれらの混合物を使用してもよい。抽出物には、例えば細胞壁画分がある。微生物（単数または複数）の成分は抗原、例えば、十分当業者の範囲内にある酵素的処理によって得られる抗原性ペプチドなどを含有してもよい。

【0047】

細菌は例えば（それらに限定されるわけではないが）乳酸桿菌種、乳酸菌、ミコバクテリウム種、およびピフィドバクテリウム種から選択してもよい。更に好ましくは、好酸性乳酸桿菌（L. acidophilus）、発酵乳酸桿菌（L. fermentum）、もしくはミコバクテリウム・バッカエ（M. vaccae）、またはその成分、抽出物、音波処理物、分泌物、もしくはそれらの混合物で、Th1細胞応答を誘導する能力のあるものを使用する。特に好ましいのは好酸性乳酸桿菌、発酵乳酸桿菌、またはミコバクテリウム・バッカエであり、所望のTh1型T細胞応答を誘導する能力がある限り、それらを生菌で、または不活性化標品として使用してもよい。

40

【0048】

好ましくは好酸性乳酸桿菌および発酵乳酸桿菌を生菌標品として使用する。（共生作用を

50

有するか、または有さない)他の細菌を使用してもよく、それらは例えばラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・プランタラム、ラクトバチルス・ラムノサス(rhannosus)、ビフィドバクテリウム・ブレーベなどのような周知の補助(adjuvating)細菌である。

【0049】

被験者に投与する微生物またはその抽出物などの用量は心血管障害の性質および重篤度、物質が投与されるのは予防目的か治療目的か、そして関係する生物のタイプに従って変化しうる。治療パラメーター、並びに必要な投与量は当業者が容易に決定できる。

【0050】

好ましくは、微生物または微生物を含有する組成物は錠剤またはカプセルの形態である。しかしながら、当業者に明らかなように、微生物を液体、または他の形態の固体製剤として提供してもよい。特に、微生物を食物源(例えばヨーグルトまたは他の乳製品)、または(例えば大豆を主成分とする)同様の非乳製品として提供してもよい。

10

【0051】

微生物などは一般に、一定間隔で経口投与し、通常、治療期間中は毎日であり、これは数カ月以上の期間まで延長してもよい。好ましくは微生物を1日あたりlog3からlog12の用量で投与する。共生細菌を生きた全菌体として投与する場合、その用量は約 $1 \times 10^8$ から約 $1 \times 10^{12}$ 生物の範囲であってもよい。

【0052】

しかしながら、Th1型T細胞応答に特徴的なサイトカイン・プロフィールを亢進的に調節する能力のある他の物質を本発明の方法に従って使用してもよい。当業者はここに提供する記述に基づく慣例的な試験および実験によってそのような他の物質を容易に同定できる。そのような他の物質には、例えば抗体およびその結合フラグメントが含まれうる。

20

【0053】

この点について、発明者らはアテロームに関係するT細胞分泌IL-4の血中レベルが冠状動脈疾患の程度と相互に関係することを発見した。この印象的な相互関係は、T細胞が介在する炎症はCD4+ T細胞上のCD40Lと、一連の構造(structural)および循環細胞(血小板を含む)上のCD40とのライゲーシオンによって誘導されるという発明者らによる観察と十分一致する。特に血小板は、活性化されたCD4+ T細胞上に発現した(expression)CD40Lと血小板上に発現したCD40とのライゲーシオンの結果として、IL-4生成のための重要な因子であると考えられる。

30

【0054】

従って、CD40LとCD40とのライゲーシオンを阻害する能力のある物質、例えば抗体、特に抗CD40抗体またはその結合フラグメントの投与によって、患者におけるTh2応答に特徴的なサイトカイン・プロフィールが変化しうる。結合フラグメントとは、抗体の結合能力を保持し、Fabおよび(Fab')<sub>2</sub>フラグメント(それぞれ、パパインまたはペプシンでの蛋白分解による開裂で得られる)を含む抗体のフラグメントを意味する。更に、当業者に周知のCD40の他のリガンドまたはそのペプチドフラグメントを投与して、所望の、Th2型T細胞応答に比較したTh1型T細胞応答の亢進的調節を行ってもよい。好適なそれらのリガンドおよび物質は、付記する実施例に開示するような方法論を使用して容易に同定することができる。それらの物質は静脈内、筋肉内、もしくは皮下、または好適であると考えられる他のいずれの経路で投与してもよい。

40

【0055】

それらの物質、および微生物の抽出物、音波処理物などのような他の物質を、医薬的に許容されるキャリアー、希釈剤、および/または添加剤に混合して医薬組成物に調製し、意図する被験者に投与してもよい。そのような他の活性物質の投与量は一般に、それらの使用のための慣例的な治療計画に従い、年齢、体重、治療すべき症状の性質、および被験者の全身的な健康状態のような因子を考慮するが、これは容易に認識される通りである。

【0056】

剤形には注射用の水溶液および注射液の即時調製用の粉末がある。それらの注射用組成物

50

は注射可能な程度までの流動性を有し、一般に製造後の保存を考慮した安定性を有する。キャリアーは1つ以上のエタノール、ポリオール（例えばグリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、植物油、およびそれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒である。レシチンのようなコーティングの使用によって、分散の場合は必要とされる粒子サイズの維持によって、そして界面活性剤の使用によって、流動性を保持してもよい。

【0057】

注射液は通常、所望の量の活性物質を好適な溶媒に、種々の上記の他の成分と共に混合して調製する。一般的に、分散液の調製は分散媒および他の成分を含有する賦形剤に活性物質を混合して行う。注射液の調製のための粉末の場合、好ましい調製法は、活性成分の粉末を生成する真空乾燥および凍結乾燥技術である。

10

【0058】

経口投与では、好適だと考えられる経口的に許容されるキャリアーに物質を調合してもよい。特に、活性成分を不活性な希釈剤、吸収可能な食用キャリアーと共に調製するか、または硬質もしくは軟質ゼラチンカプセルに封入してもよい。あるいはまた、上記のように食品に直接混合してもよい。更にまた、活性物質を経口摂取可能な錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップなどの形態で使用してもよい。

【0059】

本発明の組成物に1つ以上の好適な保存剤（例えばソルビン酸）を混合してもよい。多くの場合、組成物は等張性物質（例えば糖または塩化ナトリウム）を更に含有してもよい。

【0060】

錠剤、トローチ、ピル、カプセルなどは以下の1つ以上を含有してもよい：結合剤、例えばトラガカントガム、アカシアガム、コーンスターチ、またはゼラチン；添加剤、例えばリン酸2カルシウム；崩壊剤、例えばコーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸など；潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウム；甘味剤、例えばスクロース、ラクトース、もしくはサッカリン、または着香剤。投与ユニット形態がカプセルである場合、1つ以上の上記成分の他に液体キャリアーを含有してもよい。種々の他の成分をコーティングとして、あるいは投与ユニットの物理的形態を修飾するために含有してもよい。例えば錠剤、ピル、またはカプセルをシェラック、糖、または両方でコーティングしてもよい。更に、活性物質を好適な持続放出調剤または製剤に混合してもよい。

20

【0061】

医薬的に許容されるキャリアー、希釈剤、および/または添加剤には慣例的に知られる好適な溶媒、分散媒、および等張性製剤または溶液がある。医薬的に活性な物質のためのこれらの成分および媒質の使用は周知である。慣例的な媒質または物質が活性成分と不適合でない限り、治療および予防組成物におけるこれらの使用は企図される。必要により、補足のための活性成分を組成物に混合することもできる。

30

【0062】

認識されるように、これらの組成物中の物質（単数または複数）の量は、企図される投与様式を考慮して好適な有効量が被験者に運搬されるようなものである。

【0063】

ここで使用する投与ユニット形態とは、治療すべき被験者に単位投与として好適な物理的に分離したユニットを意味し、各ユニットは所望の治療または予防効果が得られるように算出した既定の量の活性物質を、適切なキャリアー、希釈剤、および/または添加剤と共に含有する。

40

【0064】

物質を1つ以上の抗生物質または1つ以上の他の医薬的に活性な物質と共に投与して心血管障害または障害を悪化させる元となる症状を治療してもよく、また抗生物質による治療または他の活性物質での治療の前に、それと同時に、またはその後投与してもよい。

実施例

実施例1：乳酸桿菌はIL-4分泌を阻害する

乳酸桿菌がIL-4生成を調節する能力を有するかどうかを確認するために、段階的に変

50

化させた用量の発酵乳酸桿菌 (VRI 002株。New South Wales 大学 Culture Collection of the School of Microbiology and Immunology (オーストラリア シドニー) から入手可) を、等量の健常な被験者由来のヘパリン化全血および AIM-V 血清非含有培地を含有する培養液に添加した。コントロールの培養液には培地のみを含有させた。全ての培養液を ConA (5  $\mu$ g/ml) で刺激した。24時間のインキュベーション後、分泌された IL-4 の量を捕捉 IL-4 ELISA で測定した。図1に示すように、IL-4 分泌は発酵乳酸桿菌の存在下で用量依存的に阻害され、 $2 \times 10^5$  細菌/培養液で最大効果を得た。このデータは、発酵乳酸桿菌が Th2 応答に関係する IL-4 介在型炎症の抑制的調節に有効であることを示している。

10

実施例 2 : Th1 / Th2 サイトカイン応答に対する共生細菌の効果

共生細菌が Th2 サイトカイン応答を抑制的に調節し、Th1 サイトカイン応答を亢進的に調節するかどうかを確認するために、C57/B16 マウスに種々の数の好酸性乳酸桿菌 (VRI 001株。New South Wales 大学 Culture Collection of the School of Microbiology and Immunology (オーストラリア シドニー) から入手可) を2週間にわたって連日、給餌針 (feeding needle) を使用して胃内投与し、その後、8  $\mu$ g のオボアルブミン (OVA) および水酸化アルミニウムを 0.2 mL のリン酸バッファーに混合したものを腹膜内注射によって投与して刺激した。マウスに更に10回、発酵乳酸桿菌を2週間にわたって2日毎に摂取させた後、殺害した。脾臓をふるいを通して teasing してリンパ球を単離し、PBS で洗浄し、 $10 \times 10^6$  細胞/mL 培養液で再懸濁した。次いで細胞懸濁液の 1 mL アリコートをして 24 ウェル平底マイクロタイタープレートのウェルに分注し、OVA (5  $\mu$ g/mL) で刺激した。4日間インキュベートした後、上清を回収し、標準的な ELISA 技術によって IL-4 または IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体ペアを使用して IL-4 および IFN- $\gamma$  生成についてアッセイを行った。

20

【0065】

手短に言えば、24 ウェル・マイクロタイタープレートのウェルを捕捉抗 IL-4 抗体で被覆した。室温で1時間インキュベートした後、ウェルを洗浄し、ビオチン化した抗 IL-4 抗体を各ウェルに添加した。更に1時間インキュベートした後、ウェルを洗浄してストレプトアビジン (streptavidin) - ペルオキシダーゼ・コンジュゲートを各ウェルに添加した。30分間インキュベートした後、ウェルを洗浄し、次いで TMB 基質を添加した。ELISA プレートリーダーで、450/620 nm で発色を測定した。未知サンプル中の IL-4 レベルを、内挿法により検量線を使用して定量した。IFN- $\gamma$  の測定にも同様の手順を使用した。

30

【0066】

結果を図2A および図2B に示す。ここに見られるように、図2A は好酸性乳酸桿菌の投与によって IL-4 の生成が用量依存的に抑制されることを示しており、図2B は IFN- $\gamma$  の生成が向上されることを示している。従って全血中の分泌 IL-4 の生成の増加は冠状動脈疾患を有する被験者における疾病の重篤度と相互に関係する。

実施例 3 : 被験者の選択と測定

40

3.1 被験者 John Hunter 病院 (オーストラリア ニューキャッスル) の被験者を血管造影研究の後、選択した。リスク因子を記録した (脂質プロファイル、高血圧、糖尿病、喫煙、家族歴)。以下の群を同定した: (a) 最小限の (minimal) 冠状動脈アテローム硬化症 ( $n = 100$ ); (b) 安定な病状である広範な (extensive) 冠状動脈アテローム硬化症 ( $> 50\%$  3つの主要な血管が関係) ( $n = 100$ ); および (c) 不安定な病状である広範な冠状動脈アテローム硬化症 ( $n = 100$ ) (最近の心筋梗塞または不安定な狭心症)。

【0067】

抗体および T 細胞研究のために、血管造影の後、選択した被験者から血液 (20 mL) を採取した。John Hunter 病院 (オーストラリア ニューキャッスル) での血管

50

造影研究数は約30 - 40 / 週で、正常な動脈または最小限の疾患が約10 - 15%、3つの動脈疾患が20 - 30%であり、その約1 / 3が不安定な病状であり、2 / 3が安定した病状であった。

【0068】

3.2 抗クラミジア・ニューモニエ抗体 クラミジア・ニューモニエ特異性抗原に対する免疫グロブリンIgGについての微量免疫蛍光試験(microimmunofluorescence test)によって抗体を検出した(クラミジア - cel Pnキット、Cell Labs Pty社、オーストラリア)。特異的IgGサブクラス抗血清を使用してIgGサブクラス抗体を検出した。

【0069】

3.3 T細胞の増殖 全血リンパ球培養を3重複測定で、96ウェル丸底マイクロタイター・プレート中で実施した。ヘパリン化した血液を、以下のように調製したクラミジア・ニューモニエの要素体(elemental bodies)(EB)を段階的に変化させた量(0.1、1.0、10 µg/ml)で含有するAIM-V血清未含有培地で1:1(v/v)に希釈した。全ての被験者を「無関係の」抗原コントロールとしてクラミジア・トラコマチス(C. trachomatis)またはEB抗原(0.1、1.0、10 µg/ml)で更に刺激した。5% CO<sub>2</sub>中、37 °Cで5日後、力価測定したチミジン(培養液あたり0.5 µCi)を最後の6時間に添加した後、回収してカウントした。

【0070】

3.4 サイトカイン生成 サイトカインに基づく全血アッセイをEB反応性T細胞の検出に使用した。96ウェル丸底マイクロタイタープレートのウェル中で、ヘパリン化した血液を種々の濃度のEB抗原を含有する、または含有しないAIM-V培地で1:1(v/v)に希釈した。IL-4の生成を測定するために、いくつかのウェルを捕捉モノクローナル抗IL-4抗体(Endogen, CSL)であらかじめ被覆した。培養液を5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37 °Cで24 - 48時間インキュベートし、その後IL-2、IL-10、およびIFN-γアッセイのために血漿上清を回収した(Endogenキット, CSL)。アッセイキットに記載されるように洗浄してdeveloping抗IL-4抗体を添加した後、好適なスタンダードと共に捕捉されたIL-4を直接測定した。抗原反応性T細胞およびサイトカイン生成プロファイルの測定のための全血アッセイは、ヘリコバクター・ピロリに感染したヒト被験者における研究に関して確認されている。

【0071】

3.5 クラミジア・ニューモニエからの要素体の調製 HeLa細胞229にadaptさせたクラミジア・ニューモニエKajani株(P. Saikku博士(ヘルシンキ大学、フィンランド)から入手)を、5%ウシ胎仔血清(FCS)およびストレプトマイシンを補足したRPMI 1640培地を含有する培養フラスコ中で、5% CO<sub>2</sub>、加湿雰囲気下、37 °CでHeLa細胞中で増殖させた。3日後、培養した細胞からクラミジア要素体を単離した。無菌のヘラ(scraper)で細胞をフラスコから剥離させ、洗浄してリン酸バッファー(PBS)に懸濁し、超音波処理によって封入体を破壊した。細胞破壊片を遠心分離によって除去した後、EB物質を超遠心分離によって30,000gで回収した。次いでEB物質をPBSに再懸濁し、30 - 60% Nycodenz溶液(Nycomed、ノルウェイ)上に積層した。遠心分離後、60%グラジエント以上で(above the 60% gradient)回収したEB物質を洗浄し、1%ホルムアルデヒドで24時間不活性化した。十分に(extensive)洗浄した後、EB物質をPBSに再懸濁し、タンパク質濃度を測定した(Pierce Proteinキット)。Saikku博士らから入手したEB抗原も比較のために研究に使用した。クラミジア・トラコマチスからの要素体抗原の調製にも同様の方法を使用した(ここでもサンプルはP. Saikku博士から提供を受けた)。

【0072】

3.6 特異的にクローン化したタンパク質 Saikku博士およびMakela博

10

20

30

40

50

士（フィンランド、上記）から提供されたクラミジア・ニューモニエからクローン化した抗原のサイトカイン・バランスを試験した（上記）。クローン化した抗原は枯草菌（*B. subtilis*）で生成した組換えタンパク質としてMOMP、OMP2、およびHSP60を含有した。これらは1 µg/mlで試験した。

#### 【0073】

特に、ヘパリン化した全血を、クラミジア・ニューモニエに関して血清陽性（n = 17）または血清陰性（n = 27）のいずれかである冠状動脈アテローム硬化症患者から回収した。上記のように37 °Cで一晩インキュベートした後、分泌されたIL-4を捕捉ELISAで、IFN-γを血漿上清中で測定した。

#### 【0074】

図3Aおよび3Bに示すように、軽度または1血管疾患を有する被験者に比較して2-3血管疾患を有する被験者では、より高いレベルのIL-4が検出された。正常な被験者では低レベルまたは検出不能なレベルが観察された。クラミジア・ニューモニエ血清陽性被験者では、血清陰性被験者（特に1血管疾患を有する者）に比較して1-3血管疾患を有する被験者で、分泌されたIL-4がより高いレベルで検出され、これは分泌されたIL-4の生成の増加は感染状態と関係することを示唆している。しかしながら、研究を行った全ての被験者でIL-4分泌は培養液中でのクラミジア・ニューモニエ抗原による刺激に依存しておらず、このことはIL-4の自発的生成が*in vivo*におけるT細胞の活性化の結果であり、これらのT細胞は培養液中でもはや更なる抗原刺激には反応しないことを示唆している。44被験者からのデータを合わせると結果は同様であり、抗原刺激に関係なく、全血培養液中でのIL-4分泌のレベルは疾病の程度と相互に關係していた。

#### 実施例4：自発的Tリンパ球活性化のパターン

著しく対照的に、IL-4分泌とIFN-γ生成の間には逆の關係がある（図4Aおよび4B参照）。しかしながら、IFN-γレベルおよび疾病の重篤度の間には相関關係がなく、これはアテロームにおける炎症反応がIL-4の亢進的調節でのCD4+ Th2ヘルパー細胞介在型炎症によって引き起こされることを示している。

#### 【0075】

特に、サイトカインの自発的生成の結果は、IL-4の生成量において‘正常な’冠状血管造影を有する者と2または3の血管疾患を有する者（‘高負荷量（high load）’アテロームを表す）の間に有意な差異を示しており、軽度または最低限の冠状動脈アテローム硬化症と定義される者はその中間であった。INF-γに関して、正常と‘アテロームが検出された’被験者の間に差異があることが見出され、‘正常な’被験者はより高いレベルであった。INF-γに関して軽度および重度のアテローム間の差異は、IL-4で観察された差異のレベルより顕著ではない。考え合わせると、これらの結果は明らかに、アテロームの量に相関してTh1-Th2バランスがシフトすることを示している。

#### 【0076】

Th2パターンサイトカイン応答を有するT細胞の刺激物質に反応する傾向がある被験者は、Th2 T細胞活性化につながる炎症反応の経路の結果として血管壁におけるアテロームの過剰蓄積を促進すると結論づけられる。ここで測定されるサイトカインは全血培養液中でT細胞から自発的に分泌されるので、活性化は*in vivo*で起こったものである。刺激物質には多クローン性活性化物質（例えば腸内細菌叢からのエンドトキシン）、超抗原（例えばコロニー形成細菌からの）、自己抗原（プラークまたは血管壁内の（within the plaque of blood vessel wall? 英文p6-15行目参照）抗原を含む）、または特異性抗原（特に宿主（例えばクラミジア・ニューモニエ、ヘリコバクター・ピロリ、型別不能ヘモフィルス・インフルエンザなど）とコロニー形成または寄生關係にある微生物からの）がある。後者は、クラミジア・ニューモニエではなく“特定の微生物種に關係しない慢性感染”がアテローム硬化症の進行に關する‘リスク因子’であり、独自の抗原的役割を有するという見解と一致する（Groyston JT, Kuo Coulson ASら, Circulation (1995

10

20

30

40

50

92:3397-3400; Bachmaier K, Neumann, Science (1999) 283:1335-1339; Mejer D, Derby LE, JAMA (1999) 18:272-277)。更に図3Aおよび3Bのデータが示すところによれば、クラミジア・ニューモニエ抗原で刺激した培養液中において‘Th2極性化(polarisation)’が高くなる傾向は、免疫系の‘Th2傾向’に関して、特定の微生物はTh2応答への作動を促進し、それによってアテロームプラークの更なる進行が促進されるという考えと一致する。循環細胞はアテロームプラークに含まれるものと交換される。従って慢性感染は顕著なアテロームを有する被験者においてTh2への偏りを悪化させる。しかしながら、クラミジア感染を有する被験者および有さない被験者についてのデータは、Th2サイトカインの基本的な“傾向”はクラミジア感染に依存しないことを示している(上記のように感染が偏りを悪化させることはありうるが)。

10

## 【0077】

この研究は、自発的Tリンパ球活性化のパターンが一般に(しかし、特に冠状動脈において)アテロームの量と関係するという結論を支持している。

実施例5:高コレステロール食を摂取させたマウスにおけるアテローム硬化症に対する乳酸菌投与の影響

アテローム硬化症の発生に対する抗コレステロール食の影響を、マウスの大動脈洞(根)における脂肪条痕の生成によって評価して確認した。

## 【0078】

食餌は以下の成分を含有した:

20

## 【0079】

## 【表1】

	g/100g
スクロース	51.3
カゼイン(酸)	20.0
キャノーラ油	1.00
ココア脂	15.00
セルロース	5.10
DL-メチオニン	0.30
AIN93G ミネラル	3.50
AIN93G ビタミン	1.00
塩化コリン 50%w/w	1.00
Sodium Cholate	0.50
コレステロール	1.00
DL $\alpha$ -酢酸トコフェロール	0.26

30

## 【0080】

手短かに言えば、オスのC57/B16マウス(8週齢)に高コレステロール食(HCD)またはコレステロール未含有普通食を施与し、飲料水は自由に摂取させた。マウス群(n=10)にHCDを1週間摂取させた後、発酵乳酸桿菌(VRI 002)を含有する食餌療法を行った。一晚培養した液からの洗浄した細菌懸濁液を再懸濁して最終密度をlog 9.5からlog 10.5生物の間としたサンプルの200 $\mu$ lと共に投与量を1週間に3回、口/胃から投与した。コントロール・マウスには200 $\mu$ lの食塩水のみを投与した。5週間後、不完全フロイドアジュバントに乳濁した5mg/mLの死滅ミコバクテリウム・ツベルクロシス(tuberculosis)(MT, Difco)の0.1mLを2群のマウスに皮下投与して免疫化した。免疫化段階の理論的根拠は、死滅細菌での免疫化による免疫系の活性化によって大動脈洞での脂肪条痕生成が促進されることを示唆している最近の報告に基づく(George Jr, Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 1999, 9:505-510)。

40

50

## 【0081】

HCDおよび共生細菌処理の開始後7週間で、全てのマウスを殺害した。心臓穿刺によって血液を回収した。心臓を一体として(en bloc)除去し、大動脈洞(根)を含む上部分を切除し、PBSに混合した10%ホルマリンで固定した。ホルマリン/PBS中で一晚固定した後、組織をOCT培地に包埋し、凍結した後、クリオスタット中で切片化した。6から7切片(厚さ8-10 $\mu$ m)を採取し、オイルレッドOで染色した。ブラインドの観察者によって切片毎の病変部にスコアを付けた。脂肪条痕生成の存在に従って0-5の病変スコアリングシステムを採用した。図5Aに示すように、HCDのみを摂取したマウスは乳酸菌で処理したものより脂肪条痕の生成が多かった。同様の結果がMTで免疫化したマウスで観察されたが(図5B)、これらのマウスでは病変の量は免疫化していない群より低く、このことは免疫化はアテローム発生を制限しうることを示唆している。

10

実施例6：冠状動脈疾患を有する患者由来の全血培養液におけるIL-4の生成は抗CD40モノクローナル抗体によって阻害される  
冠状動脈疾患を有する被験者からヘパリン化した血液を採取し、等量の血清未含有AIM-V培地(総容量300 $\mu$ L)(段階的に変化させた濃度の抗CD40L抗体を含有)中、抗IL-4抗体でコーティングした96ウェル平底プレートで培養した。コントロールの培養液には培地のみ、またはマウスIgG1アイソタイプ・コントロールを含有させた。24時間インキュベートした後、分泌されたIL-4の量を捕捉ELISAアッセイで測定した。図6に示すように、IL-4の生成はコントロールに比較して、抗CD40によって用量依存的に阻害され(9被験者で $p < 0.05$ )、マウスIgG1アイソタイプ・コントロールまたは抗CD40Lの添加(データは示していない)による影響はなかった。結果が示すように、全血培養液中でのIL-4の生成にはCD40の関与(engagement)が重要である。

20

## 【0082】

本発明について好ましい態様を参照して記述したが、当業者に理解されるように多くの変化および修飾が、本発明の範囲から逸脱することなく可能である。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、発酵乳酸桿菌による全血中のIL-4分泌の抑制を示す。

【図2】図2Aおよび2Bはそれぞれ、好酸性乳酸桿菌によるIL-4分泌の抑制およびIFN-分泌の増加を示す。

30

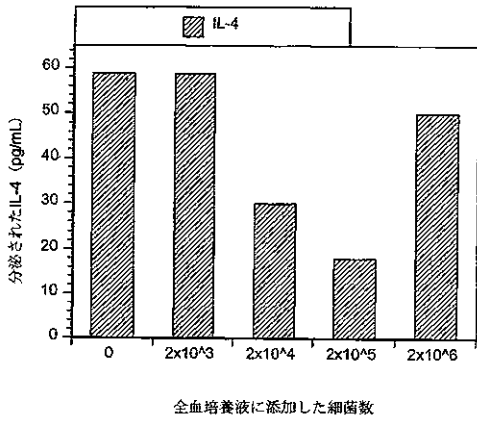
【図3】図3Aおよび3Cはそれぞれ、正常な被験者に比較した冠状血管疾患を有するクラミア・ニューモニエ血清陰性および血清陽性被験者におけるIL-4の分泌を示す。

【図4】図4Aおよび4Dはそれぞれ、正常な被験者に比較した冠状血管疾患を有する被験者におけるIL-4およびIFN-の分泌を示す。

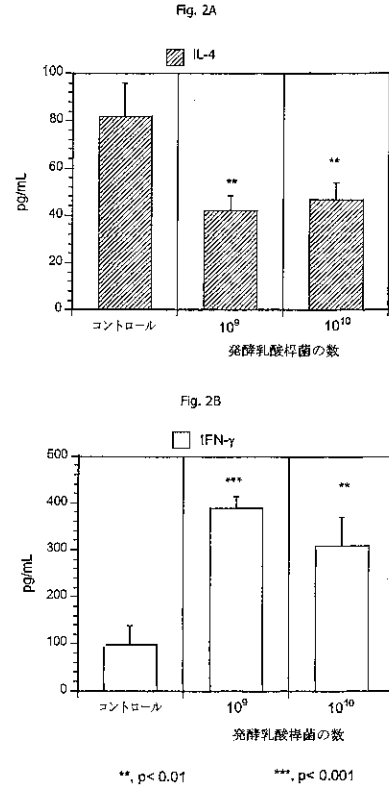
【図5】図5は、高コレステロール食を摂取させたマウスにおけるアテロームに対する発酵乳酸桿菌KLDの効果を示す。

【図6】図6は、抗CD40モノクローナル抗体を含有する全血培養液の処理によるIL-4生成の阻害を示す。

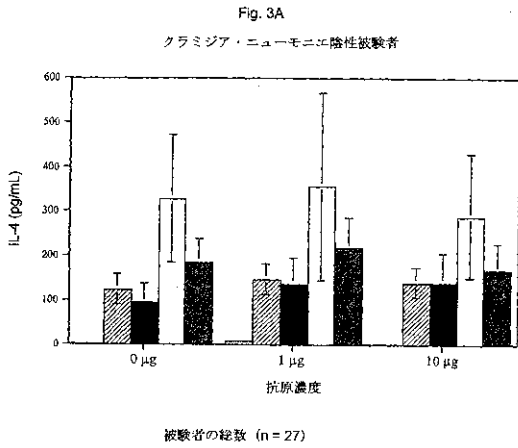
【 図 1 】



【 図 2 】



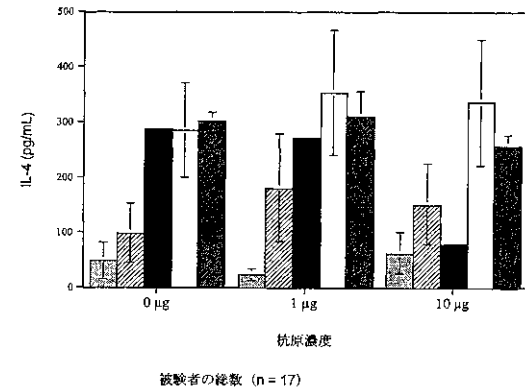
【 図 3 】



- 正常 (n = 1)
- ▨ 軽度 (n = 10)
- 1血管冠状動脈疾患 (n = 5)
- 2血管冠状動脈疾患 (n = 2)
- 3血管冠状動脈疾患 (n = 9)

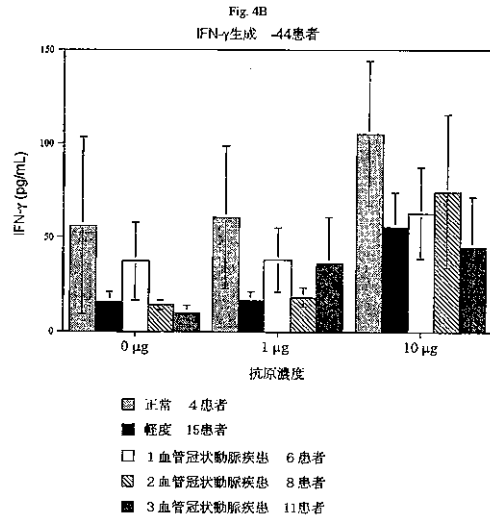
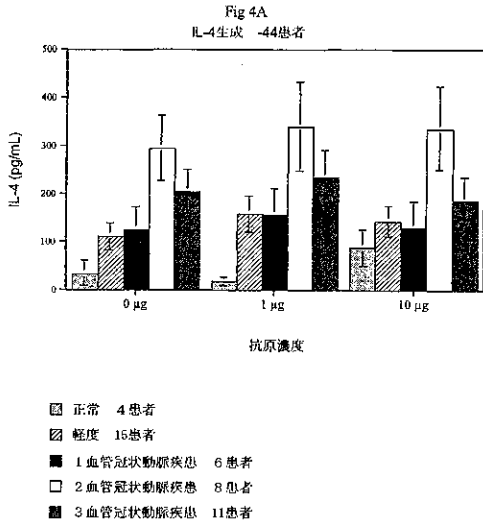
Fig. 3B

クラミジア・ニューモニア陽性被験者

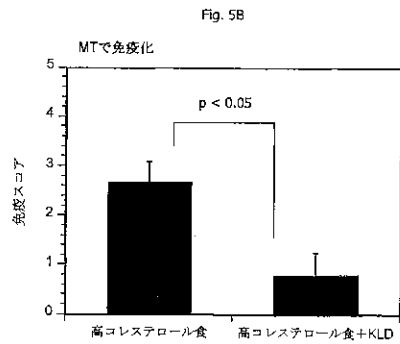
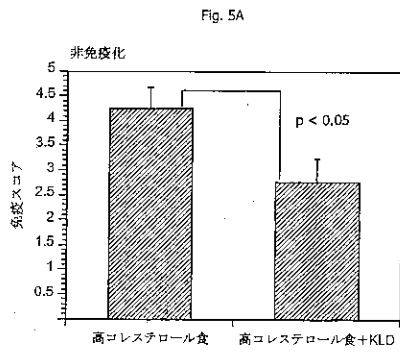


- 正常 (n = 3)
- ▨ 軽度 (n = 5)
- 1血管冠状動脈疾患 (n = 1)
- 2血管冠状動脈疾患 (n = 6)
- 3血管冠状動脈疾患 (n = 2)

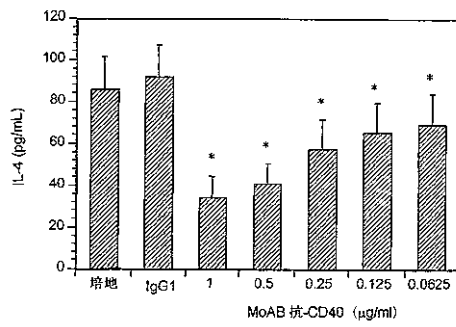
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



\* , p < 0.05 ( paired t test, n = 9 )

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(18) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
2 May 2002 (02.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/34273 A1

- (51) International Patent Classification: A61K 35/74, A61P 9/00, C12Q 1/00, G01N 33/53
  - (31) International Application Number: PCT/E01/02005
  - (22) International Filing Date: 25 October 2001 (25.10.2001)
  - (25) Filing Language: English
  - (26) Publication Language: English
  - (36) Priority Data: PR 1016 25 October 2000 (25.10.2000) AU
  - (71) Applicant (for all designated States except US): ATHEROMASTAT PTY LTD. [AU/AU]; Level 11, BRC Centre, Perth, WA 6000 (AU).
  - (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): PANG, Gerald [AU/AU]; 4/25 Billiard Avenue, Elizabeth Bay, NSW 2011 (AU); CONWAY, Patricia [AU/AU]; 20 Cloonwahl Avenue, La Paroise, NSW 2036 (AU); CHAMBERS, Robert [AU/AU]; VRI BioMedical Limited, Level 4, David Madison Building, Newcastle, NSW 2300 (AU).
  - (74) Agent: ADAMTHWAITE, David; Baldwin Shelston Waters, 60 Margaret Street, Sydney, NSW 2000 (AU).
  - (81) Designated States (officially): AP, AG, AI, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GU, GT, HK, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KH, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NZ, NL, NO, NZ, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
  - (84) Designated States (regionally): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/34273 A1

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CARDIOVASCULAR DISORDERS

(57) Abstract: There is disclosed a method of prophylactic or therapeutic treatment of a cardiovascular disorder comprising administering to a subject in need thereof an effective amount of one or more agents for upregulating a cytokine profile characteristic of a Th1 T cell response relative to a cytokine profile of a Th2 T cell response associated with the disorder. There is further disclosed compositions for use in the methods.

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

**COMPOSITIONS AND METHODS FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT OF  
CARDIOVASCULAR DISORDERS**

**Technical Field**

The present invention relates to methods for diagnosis of cardiovascular disorders  
5 and to compositions suitable for use in therapeutic or prophylactic treatment of such  
disorders. In particular the present invention relates to methods and compositions  
suitable for the diagnosis and treatment of coronary artery disease.

**Background Of The Invention**

Atheroma is the inflammatory process involving arteries that underpins coronary  
10 artery disease in particular and degenerative vascular disease in general. Data exists to  
support the concept that T lymphocytes drive inflammation within the atherosclerotic  
plaque. In particular, it has been reported that 2-10% of mononuclear cells in the plaque  
are T cells, two thirds of which are CD4+ve, and most of which express CD45RO, MHC  
class II, and IL-2R (Lamon et al *Immunology Today* 18 (1997) 272-7). Pro-inflammatory  
15 cytokines such as IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and INF- $\gamma$  are secreted from cells within plaques, as  
are cell modifying factors such as PDGF, MCP-1, and M-CSF, and proteolytic enzymes  
such as matrix metalloproteinases, e.g. collagenase and gelatinase B (Lamon et al, 1997).

The critical but complex relationship between T lymphocytes and macrophages  
within the plaque may be mediated in part by a receptor ligand couple through ligation of  
20 CD40L on activated plaque T cells by CD40 on macrophages (and other cells) to influence  
a range of outcomes including plaque remodelling, plaque rupture and antigen presentation  
(Lamon et al, 1997).

Recently, particular microbes have been linked to the promotion of atheroma. The  
most characterised has been *Chlamydia pneumoniae*, though recent reviews have

CONFIRMATION COPY

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 2 -

suggested that persistent infection in general may be linked to intimal inflammation and atheroma plaque growth (Saiku et al, *Lancet* 116 (1998) 983-5; Shar et al *S Jy Med J* 82 (1992) 158-61; Mejer et al *JAMA* 281 (1999) 427). No data exists to clarify the basic mechanisms responsible for atheroma progression or processes whereby

5 'epidemiologically-linked' microbes facilitate atheroma growth.

There is a need for improved methods for assisting in the diagnosis of cardiovascular disorders which have basis in the immune response, e.g. coronary artery disease, and for compositions for the prophylaxis or therapy of such conditions.

#### Summary Of The Invention

10 It is an aim of the present invention to overcome or ameliorate one or more of the problems of the prior art, or to at least provide a useful alternative.

The present invention is based on the identification of a major new mechanism for development of coronary artery disease, such as atheroma, due to the "Th2 cytokine" bias of modern living, not unlike the situation of allergy, also a disease of "modern living"

15 linked to 'Th2 bias'. Many factors modify the atheroma-promoting effect of Th2 inflammatory responses (e.g. lipid levels, smoking, hypertension, etc). Not wishing to be bound by any particular mechanism of action, the cause is probably an environmental effect on gut bacteria, replacing Th1 promoting microbes such as *Lactobacilli* with others linked with Th2 responses.

20 This new observation provides a unique opportunity for diagnostics and therapies to detect and modify respectively, atheroma-prone or high load atheroma subjects. In particular, reconstituting the gut with certain 'traditional' bacteria (probiotics) is identified as one useful therapeutic approach.

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 3 -

Diagnostics and therapy geared at additional specific microbes that further exacerbate the Th2 bias (eg *C.pneumoniae* and *H.pylori*) once established, are also specifically contemplated herein. The concept that 'modern living atheroma' is driven by altered cytokine patterns secondary to gut flora shifts, is consistent with the view that an essential difference between atheroma in developed versus developing countries, is the excess amount of inflammation in plaque in developed countries.

Thus, in broad terms the present invention is concerned with methods for diagnosing or detecting significant Th2-mediated atheroma, eg. coronary artery disease, based on the assessment of various markers and indicators of a Th2 response in blood (which interchanges with tissue spaces in the arterial wall), and with compositions capable of use as therapeutic or prophylactic agents able to promote a Th1 response and/or to suppress the Th2 response.

In particular, in one aspect of the present invention there is provided a method of prophylactic or therapeutic treatment of a cardiovascular disorder comprising administering to a subject in need thereof an effective amount of at least one agent for upregulating a cytokine profile characteristic of a Th1 T-cell response relative to a cytokine profile of a Th2 T-cell response associated with the disorder.

The upregulation of the cytokine profile characteristic of a Th1 T-cell response may be achieved by upregulating a Th1 T-cell response and/or suppressing Th2 T-cell response in the subject. Alternatively, the upregulating may be achieved by potentiating the activity of cytokines characteristic of a Th1 T-cell response and/or suppressing the activity of cytokines characteristic of a Th2 response.

A single agent or a plurality of agents may be administered to the subject to achieve the desired outcome. This may be obtained by administering an agent or agents which suppress the Th2 T cell response and thereby achieve a relative upregulation of

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 4 -

the Th1 T cell response, or by administering an agent or agents which produce a measurable elevation in Th1 T cell response. Alternatively, one or more agents capable of measurably elevating the Th1 T cell response may be administered to the subject as well as one or more agents for suppressing the Th2 T cell response. Preferably, at least one agent capable of upregulating the Th1 T cell response and suppressing the Th2 T cell response will be administered.

Typically, the method will comprise shifting the cytokine profile characteristic of a Th2 T-cell response to a cytokine profile characteristic of a Th1 T-cell response.

Accordingly, in another aspect of the present invention there is provided a method of prophylactic or therapeutic treatment of a cardiovascular disorder, comprising administering to a subject in need thereof an effective amount of at least one agent capable of upregulating a Th1 T-cell response, and/or at least one agent capable of suppressing a Th2 T-cell response associated with the disorder.

In yet another aspect of the present invention there is provided a method of prophylactic or therapeutic treatment of a cardiovascular disorder, comprising administering to a subject in need thereof an effective amount of at least one agent capable of suppressing the activity of cytokines characteristic of a Th2 T-cell response associated with the disorder, and/or at least one agent capable of potentiating the action of cytokines characteristic of a Th1 T-cell response.

In a further aspect of the present invention there is provided a method of altering cytokine balance in a subject with a cardiovascular disorder, comprising administering to a subject in need thereof of an effective amount of at least one agent capable of upregulating of a Th1 T-cell response, and/or at least one agent capable of suppressing a Th2 T-cell response associated with the disorder.

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 5 -

In still another aspect of the present invention there is provided a method of altering cytokine balance in a subject with a cardiovascular disorder, comprising administering to a subject in need thereof of an effective amount of at least one agent capable of suppressing the action of cytokines characteristic of a Th2 T-cell response associated with the disorder, and/or at least one agent capable of potentiating the action of cytokines characteristic of a Th1 T-cell response.

Preferred agents for use in methods of the invention are microorganisms, or components, extracts or secreted products thereof capable of achieving the desired outcome. The microorganisms may for instance be yeasts, bacteria, and mixtures of these. Preferably, the microorganisms will be bacteria and more preferably, probiotic bacteria. Suitable probiotic bacteria may be selected from *Lactobacillus spp.* and/or *Mycobacterium spp.* *Lactobacilli* having the capability of suppressing the Th2 response and lower cholesterol are preferred. Particularly preferred are *Lactobacillus acidophilus* and *Mycobacterium vaccae*.

It will be understood that the microorganisms may be administered alive, inactivated or killed. Preferably, probiotic bacteria are administered as viable organisms.

However, the invention is not limited to the use of microorganisms and it will be understood that any agent capable of eliciting the upregulation of a cytokine profile characteristic of a Th1 T-cell response relative to that of a Th2 T-cell response may be utilised. Other agents include, for example, antibodies and binding fragments thereof. Anti-CD40 antibodies or binding fragments thereof are particularly preferred. In addition, other ligands for CD40 may be used.

The cytokine marker(s) may be any cytokine or cytokines characteristically associated with either a Th1 or a Th2 response. For example, for a Th1 response the cytokine may be interferon- $\gamma$  or interleukin-12, while for a Th2 response the cytokines

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 6 -

may be interleukin-4, interleukin-10, TGF- $\beta$  and/or interleukin-13. However, it will be understood that any other cytokine marker is useful as long as it is a specific or identifiable marker for either a Th1 or Th2 response.

The treatments outlined above can be combined with the administration of one or more pharmaceutically active agents used to treat underlying conditions which may exacerbate the cardiovascular disorder, such as for example lipid-lowering drugs, anti-hypertensive agents and anti-diabetic agents.

The agent used to alter the T-cell response or to modulate the activity of the relevant cytokines can be administered prior to, simultaneously with or subsequent to one or more such pharmaceutically active agents.

The methods of the invention may also be effective in subjects in which the disturbance in cytokine balance or the lack of an appropriate T cell response is exacerbated by bacterial infection, bacterial antigens, polyclonal activators (e.g. endotoxin etc.), super antigens (e.g. from colonising bacteria) or autoantigens (within the plaque of blood vessel walls). Particularly relevant to the present invention is infection by, or bacterial antigen from, *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* or non-typable *Haemophilus influenzae*.

Hence, in a still further aspect of the present invention there is provided a method of diagnosing or evaluating susceptibility to a cardiovascular disorder, comprising evaluating a T-cell response in a subject wherein an upregulated Th2 response and/or suppressed Th1 response is indicative of susceptibility to, or the presence of, the disorder.

In another aspect of the present invention there is provided a method of diagnosing or evaluating susceptibility to a cardiovascular disorder, comprising evaluating a T-cell response in a subject wherein suppressed activity or production of cytokines

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 7 -

characteristic of a Th1 response and/or potentiated activity or production of cytokines characteristic of a Th2 response is indicative of susceptibility of the subject to, or the presence of, the disorder.

In a further aspect of the present invention there is provided a method of  
5 diagnosing a cardiovascular disorder or evaluating whether a subject is susceptible to the disorder, comprising:

(a) measuring one or more immunoglobulin levels affected by the disorder to obtain test data; and

(b) comparing the test data with reference data to evaluate whether the subject is  
10 susceptible to, or has, the cardiovascular disorder.

Preferably, the immunoglobulin is IgG and more preferably, the IgG2 subclass.

Preferably, the immunoglobulin is an antibody of the IgG2 subclass which is specific for pathogenic bacteria such as for example *Chlamydia pneumoniae*,  
*Helicobacter pylori* or non-typable *Haemophilus influenzae*. It will be clear to those  
15 skilled in the art that other specific antibodies may also be employed.

Preferably, a ratio of total IgG2 to IgG2 subclass specific antibody, or an altered ratio of total IgG2 subclass immunoglobulin to IgG2 subclass specific antibody will be used as an indicator of the presence of or susceptibility to the cardiovascular disorder.

The term 'cardiovascular disorder' is to be taken to encompass atheroma and  
20 degenerative vascular disease, and any cardiovascular condition or disease associated with inflammation of the coronary arteries including 1 to 3 coronary artery disease.

Generally, the cardiovascular disorder will be a degenerative vascular disease and more usually, atheroma.

Specifically, methods of the invention have application for the treatment of  
25 subjects suffering from atheroma (as determined by angiography) with minimal or

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 8 -

extensive coronary atherosclerosis but stable clinical disease, as well as atheroma subjects with unstable clinical disease associated with recent myocardial infarction or unstable angina.

Preferably, the T cell response will be evaluated by analysis of circulating T-cells.

- 5 However, it will be understood that the T cell response may also be evaluated by measurement of any marker cytokine or cytokines characteristic of a particular T-cell response, such as for example, interferon- $\gamma$  or IL-12 for a Th1 response or interleukin-4 and/or interleukin-13 for a Th2 response.

- 10 Compositions for use in the methods described herein are also specifically encompassed within the scope of the invention. Further, the use of the agents as described herein in the manufacture of a medicament or therapeutic composition for administering to a subject for the prophylaxis or therapeutic treatment of a cardiovascular disorder, is also specifically encompassed.

- 15 In addition, there are also provided kits for use in the methods of diagnosis or evaluation of the invention. A kit may for instance comprise one or more of reagents for performing the assays such as antibodies, buffers, controls and instructions for use.

The features and advantages of the present invention will be now be described hereinafter with reference to a number of preferred, non-limiting embodiments of the invention.

20 **Brief Description Of The Accompanying Drawings**

Figure 1 illustrates suppression of IL-4 secretion in whole blood by *L. fermentum*;

Figure 2A and 2B illustrate suppression of IL-4 secretion and potentiation of IFN- $\gamma$  secretion by *L. acidophilus*, respectively;

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 9 -

Figure 3A and 3C illustrate secretion of IL-4 in *C. pneumoniae* seronegative and seropositive subjects with coronary vessel disease compared to normal subjects respectively;

Figure 4A and 4D illustrate secretion of IL-4 and IFN- $\gamma$  in subjects with coronary vessel disease compared to normal subject respectively;

Figure 5 illustrates the effect of *Lactobacillus fermentum* KLD on atherosclerosis in mice fed a high cholesterol diet; and

Figure 6 illustrates inhibition of IL-4 production by treatment of whole blood cultures with anti-CD40 monoclonal antibody.

#### 10 **Detailed Description Of Preferred Embodiments Of The Present Invention**

It has been observed that the presence of significant atheroma results in elevated blood levels of IL-4 and a concomitant reduction in IFN- $\gamma$  levels. This alteration in the cytokine balance is indicative of a shift towards a Th2 response and is useful in the diagnosis of atheroma. The observation also provides a sound basis for treatments which are aimed at altering the T cell response towards a Th1 response and thus, are beneficial in preventing and/or treating coronary artery disease and other cardiovascular disorders including atheroma which have basis in a similar underlying mechanism.

An example of possible therapeutic preparations contemplated herein are those which include probiotic bacteria (such as lactobacilli) which can drive the cytokine balance back towards a Th1 response and thus reduce progression of, prevent onset of or reverse the cardiovascular disorder. However, other agents and compositions, such as for example bacterial adjuvants as described further below that have the ability to shift the response from Th2 to Th1, are also useful in therapies for the conditions described herein.

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 10 -

Any method of detecting Th2 bias in circulating T cells, whether directly or indirectly such as by monitoring downstream effects of this bias such as IgG subclass variation or IgG subclass specific antibody variation as would occur in the production of antibody to *C.pneumoniae* or *H.pylori* (but not limited to those pathogens), would be  
5 useful as an indication of coronary artery disease. For example, IgG2 is relatively low when the cytokine patterns shift towards Th2. The thus altered ratio (or low levels) of total IgG2 subclass immunoglobulin or IgG2 subclass antibody specific for instance to *C.pneumoniae* or *H.pylori*, would indicate 'atheroma-promoting' cytokine bias.

Indeed, levels of immunoglobulins such as IgG2 subclass antibody may be measured  
10 and compared to reference levels or ratios to allow an evaluation to be made on whether a subject is susceptible to a cardiovascular disorder such as atheroma or otherwise has the disease. Suitable reference levels or ratios will generally be based on corresponding measurements obtained from healthy individuals and will typically comprise mean values derived from a representative cohort of the population in accordance with conventional  
15 methodology.

Further, methods of preventing, treating or reversing atheroma contemplated by the present invention include any treatment that shifts or otherwise alters the cytokine balance towards a Th1 response, such as the administration of probiotic bacteria (especially *Lactobacilli* species). For instance, *Lactobillus acidophilus* can downregulate IL-4 and  
20 upregulate INF- $\gamma$  secretion from T cells within the spleen (i.e. circulating cells) and thus have application to the treatment of atheroma and other such cardiovascular disorders. Other treatments include the administration of any factor that suppresses Th2 cytokine secretion or inhibits action of these cytokines, and/or any treatment that promotes secretion or activity of Th1 cytokines such as INF- $\gamma$ .

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 11 -

It will also be clear to those skilled in the art that any treatment that specifically modifies the level or pattern of cytokine secretion from circulating T cells specifically reactive to antigens (eg *C.pneumoniae* or *H.pylori*) or non-specific activating factors (eg polyclonal activators, endotoxin or superantigens) can be employed as is contemplated

5 herein.

Further, treatments combining probiotics or other agents capable of altering the cytokine balance towards a Th1 response with any existing therapy aimed at 'risk factors' eg. lipid-lowering drugs, anti-hypertensive agents and the like may also be usefully employed. Many additional factors drive atheroma (eg blood lipids, diabetes,

10 hypertension, smoking) and the combination of therapies which alter cytokine balance with those which treat the underlying condition are also contemplated herein.

Typically, a sample will be obtained from the subject for evaluating T-cell cytokine profile and/or the T-cell response. The sample may be a whole blood sample, a cellular component of whole blood, isolated cells or for instance a tissue biopsy sample suitable for

15 assaying.

The microorganisms may be selected from bacteria and yeast strains including *saccharomyces spp.* such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. Preferably, the bacteria will be a probiotic bacteria. Alternatively, components, sonicates, extracts or secreted products, or mixtures thereof of the microorganism(s) may

20 be used. Extracts include, for example, cell wall fractions. Components of the microorganism(s) may comprise antigens for instance, antigenic peptides and the like obtained by enzymatic treatments well within the scope of the skilled addressee.

Bacteria may, for example be selected from, but not limited to, *Lactobacillus* species, lactic acid bacteria, *Mycobacterium* species and *Bifidobacterium* species. Even

25 more preferred is the use of *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*), *Lactobacillus*

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 12 -

*fermentum* (*L. fermentum*) or *Mycobacterium vaccae* (*M. vaccae*), or components, extracts, sonicates, secreted products or mixtures thereof that are capable of inducing a Th1 cellular response. Specially preferred is *L. acidophilus*, *L. fermentum* or *M. vaccae* which may be used live or as an inactivated preparation, as long as they are capable of

5 inducing the desired Th1 T-cell response.

Preferably, *L. acidophilus* and *L. fermentum* is used as a live preparation. Other bacteria may also be used (whether they have probiotic effect or not), for example the well known adjuvating bacteria such as for example *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium breve* and the like.

10 The dosage of the microorganism or extracts and the like thereof administered to the subject may vary according to the nature and severity of the cardiovascular disorder, whether the agent is administered for prophylactic or therapeutic purposes and the type of organism involved. The treatment parameters as well as the required dosage can be readily determined by the person skilled in the art.

15 Preferably, a microorganism or microorganism-containing composition will be in tablet or capsule form. However, it will be clear to those skilled in the art that the microorganism may be provided in a liquid or other form of solid preparations. In particular, the microorganism may also be provided as a food source such as a yoghurt or other dairy product, or similar non-dairy products based for example on soy.

20 The microorganisms or the like will generally be administered orally at regular intervals, and typically daily for the duration of the treatment period which may extend for a period of up to several months or more. Preferably, the microorganisms will be administered in a dosage of log 3 to log 12 per day. The dosage of probiotic bacterium when administered as live whole bacterium may be in the range of from about  $1 \times 10^5$  to

25 about  $1 \times 10^{12}$  organisms.

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 13 -

However, other agents capable of upregulating a cytokine profile characteristic of a Th1 T-cell response in accordance with methods of the invention may also be utilised. The skilled addressee will be able to readily identify such other agents by routine trial and experimentation on the basis of the teachings provided herein. Such other agents may include, for instance antibodies and binding fragments thereof.

In this regard, the present inventors have found that levels of blood T-cell secreted IL-4 associated with atherosclerosis correlates with the extent of the coronary artery disease. This impressive correlation fits well with observations by the present inventors that T-cell mediated inflammation is driven by ligation of CD40L on CD4+ T-cells by CD40 on a range of structural and circulating cells including platelets. In particular, platelets appear to be an important factor for the production of IL-4 as a result of ligation of CD40L expression on activated CD4+ T-cells by CD40 expressed on the platelets.

Accordingly, administration of an agent capable of inhibiting ligation of CD40L with CD40 such as an antibody, and particularly an anti-CD40 antibody or binding fragments thereof, may alter the cytokine profile characteristic of a Th2 response in the patient. By binding fragments is meant fragments of an antibody which retain the binding capability of the antibody and include Fab and (Fab')<sub>2</sub> fragments as may be obtained by papain or pepsin proteolytic cleavage, respectively. In addition, other ligands for CD40 as will be known the skilled addressee or peptide fragments thereof may be administered for achieving the desired upregulation of a Th1 T cell response relative to a Th2 T cell response. Appropriate such ligands and agents can be readily identified utilising the methodology as disclosed in the accompanying Examples. Such agents may be administered intravenously, intramuscularly, or subcutaneously, or by any other route deemed appropriate.

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 14 -

Such agents and other agents like microorganism extracts, sonicates and the like may be formulated into pharmaceutical compositions incorporating pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or excipients for administration to the intended subject. The dosage of such other active agents will typically be in accordance with conventional treatment regimens for their use taking into account such factors as age, weight, nature of the condition being treated and the general health of the subject as will be readily appreciated.

Pharmaceutical forms include aqueous solutions suitable for injection, and powders for the extemporaneous preparation of injectable solutions. Such injectable compositions will be fluid to the extent that syringability exists and typically, will be stable to allow for storage after manufacture. The carrier may be a solvent or dispersion medium containing one or more of ethanol, polyol (eg glycerol, propylene glycol, liquid polyethylene glycol and the like), vegetable oils, and suitable mixtures thereof. Fluidity may be maintained by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of a dispersion and by the use of surfactants.

Injectable solutions will typically be prepared by incorporating the active agents in the desired amount in the appropriate solvent with various other components enumerated above. Generally, dispersions will be prepared by incorporating the active agents into a vehicle which contains the dispersion medium and other components. In the case of powders for the preparation of injectable solutions, preferred methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying techniques which yield a powder of the active agent.

For oral administration, agents may be formulated into any orally acceptable carrier deemed suitable. In particular, the active ingredient may be formulated with an inert diluent, an assimilable edible carrier or it may be enclosed in a hard or soft shell gelatin capsule. Alternatively, it may be incorporated directly into food as indicated

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 15 -

above. Moreover, an active agent may be used in the form of ingestable tablets, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, and the like.

A composition of the invention may also incorporate one or more suitable preservatives such as sorbic acid. In many cases, a composition may furthermore  
5 include isotonic agents such as sugars or sodium chloride.

Tablets, troches, pills, capsules and the like may also contain one or more of the following: a binder such as gum tragacanth, acacia, corn starch or gelatin; excipients such as dicalcium phosphate; a disintegrating agent such as corn starch, potato starch, alginic acid and the like; a lubricant such as magnesium stearate; a sweetening agent such  
10 as sucrose, lactose or saccharin or a flavouring agent. When the dosage unit form is a capsule, it may contain in addition to one or more of the above ingredients a liquid carrier. Various other ingredients may be present as coatings or to otherwise modify the physical form of the dosage unit. For instance, tablets, pills or capsules may be coated with shellac, sugars or both. In addition, an active agent may be incorporated into any  
15 suitable sustained-release preparation or formulation.

Pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or excipients include any suitable conventionally known solvents, dispersion media and isotonic preparations or solutions. Use of such ingredients and media for pharmaceutically active substances is well known. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the  
20 active agent, use thereof in therapeutic and prophylactic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the compositions if desired.

As will be appreciated, the amount of agent or agents in such compositions will be such that a suitable effective dosage will be delivered to the subject taking into account  
25 the proposed mode of administration.

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 16 -

Dosage unit form as used herein is to be taken to mean physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated, each unit containing a predetermined quantity of active agent calculated to produce the desired therapeutic or prophylactic effect in association with the relevant carrier, diluent and/or excipient.

5 The agent may be administered in conjunction with one or more antibiotics or one or more other pharmaceutically active agents for treating the cardiovascular disorder or any underlying condition that exacerbates the disorder, and may be administered prior to, simultaneously with or subsequent to antibiotic therapy or therapy with other active agents.

10 **Examples**

**Example 1: *Lactobacillus* inhibits IL-4 secretion**

To determine whether *Lactobacillus* has the capacity to regulate IL-4 production, graded doses of *Lactobacillus fermentum* (strain VRI 002 available from the Culture Collection of the School of Microbiology and Immunology at the University of New South  
15 Wales, Sydney, Australia) were added to cultures containing equal volumes of heparinized whole blood from a normal healthy subject and AIM-V serum free medium. Control cultures contained medium alone. All cultures were stimulated with Con A (5 ug/ml). After incubation for 24 hrs, the amount of secreted IL-4 was determined by capture IL-4  
20 ELISA. As shown in Fig. 1, IL-4 secretion was inhibited in a dose dependent manner in the presence of *L. fermentum* with maximal effect occurring at  $2 \times 10^5$  bacteria per culture. This data indicates that *Lactobacillus fermentum* is effective in down-regulating IL-4 mediated inflammation associated with a Th2 response.

**Example 2: Effect of probiotic bacteria on Th1/Th2 cytokine response**

To determine whether probiotic can down-regulate a Th2 and up-regulate a Th1 cytokine response, C57/B16 mice were fed intragastrically, various numbers of *Lactobacillus acidophilus* (strain VRI 001 available from the Culutre Collection of the School of Microbiology and Immunology, University of New South Wales, Sydney, Australia) using a feeding needle on consecutive days for 2 weeks, after which they were sensitised with 8µg of ovalbumin (OVA) and aluminium hydroxide in 0.2 mL phosphate-buffered saline administered by peritoneal injection. The mice were further fed ten times with *L. acidophilus* every two days for two weeks before they were sacrificed. Lymphocytes were isolated by teasing spleens through a sieve, washed with PBS, and resuspended at  $10 \times 10^6$  cells/ml culture medium.

One mL aliquots of the cell suspension were then dispensed into wells of a 24-well flat-bottomed microtitre plate and stimulated with OVA (5 µg/mL). After incubation for 4 days the supernatants were collected and assayed for IL-4 and IFN-γ production by standard ELISA techniques using IL-4 or IFN-γ monoclonal antibody pairs.

Briefly, wells of a 24-well microtitre plate were coated with a capture anti-IL-4 antibody. After incubation at room temperature for 1 hr, the wells were washed and biotinylated anti-IL-4 antibody was added to each well. Following incubation for a further 1 hr, the wells were washed and strepavidin-peroxidase conjugate was added to each well. After incubation for 30 mins, the wells were washed and then TMB substrate was added. The colour development was read at 450/620 nm in an ELISA plate reader. The level of IL-4 in unknown samples was quantitated by interpolation using a standard curve. A similar procedure was used for measurement of IFN-γ.

The results are shown in Fig. 2A and Fig. 2B. As can be seen, Fig. 2A demonstrates that feeding *L. acidophilus* resulted in the suppression of IL-4 production

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 18 -

in a dose-dependent manner whereas Fig. 2B shows that production of IFN- $\gamma$  was enhanced. Accordingly, increased production of secreted IL-4 in whole blood correlates with severity of disease in subjects with coronary artery disease.

**Example 3: Subject selection and measurements**

5 3.1 *Subjects.* Subjects presenting at the John Hunter Hospital (Newcastle, Australia) were selected following angiographic study. Risk factors were recorded (lipid profile, hypertension, diabetes, smoking, family history). The following groups were identified: (a) minimal coronary atherosclerosis (n=100); (b) extensive coronary atherosclerosis (>50% three major vessel involvement) with stable clinical disease (n=100), and (c) 10 extensive coronary atherosclerosis - unstable clinical disease (n=100) (recent myocardial infarction or unstable angina).

Blood (20ml) was taken following angiography from the selected subjects for antibody and T cell studies. The number of angiographic studies at the John Hunter Hospital (Newcastle, Australia) is about 30-40/week, with the distribution being 15 approximately 10-15% with normal arteries or minimal disease and 20-30% with triple artery disease, of which about one third has unstable clinical disease and two thirds have stable clinical disease.

3.2 *Anti-Chlamydia Pneumoniae Antibody.* The antibody was detected by a micro-immunofluorescence test for immunoglobulin IgG to C.pn-specific antigen (Chlamydia-cell 20 Pn kit, CoLLabs Pty Ltd, Australia). IgG subclass antibody was detected using specific IgG subclass antisera.

3.3 *T-cell proliferation.* Whole blood lymphocyte culture was performed in triplicate in 96-well round-bottomed microtitre plates. Heparinised blood was diluted 1:1 (v/v) with AIM-V serum free-medium containing graded amounts (0.1, 1.0, 10 $\mu$ g/ml) of Chlamydia 25 pn elemental bodies (EB) prepared as described below. All subjects were stimulated in

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 19 -

addition with *C. trachomatis* or EB antigen (0.1, 1.0, 10µg/ml) as an 'irrelevant' antigen control. After five days at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, titrated thymidine (0.5µCi per culture) was added for the final six hours before harvesting and counting.

3.4 *Cytokine production.* Cytokine-based whole blood assays for detection of EB-reactive T cells were used. Heparinised blood was diluted 1:1 (v/v) with AIM-V medium with or without various concentrations of EB antigens in wells of a 96-well round-bottomed microtitre plate. For measuring the production of IL-4, some wells were pre-coated with a capture monoclonal anti-IL4 antibody (Endogen, CSL). The cultures were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24-48 hours after which time the plasma supernatants were collected for IL-2, IL-10 and IFN-γ assays (Endogen kits, CSL). Captured IL-4 together with appropriate standards were directly determined in the wells following washing and the addition of developing anti-IL-4 antibody as described in the assay kit. The whole blood assay for measuring antigen-reactive T cells and cytokine production profiles had been validated for studies in human subjects with *H. pylori* infection.

3.5 *Preparation of elemental bodies from Chlamydia pn.* A HeLa cell 229 adapted C.pn Kajaani strain obtained from Professor P Saikku (University of Helsinki, Finland) was grown in HeLa cells in culture flasks containing RPMI 1640 medium supplemented with 5% foetal calf serum (FCS) and streptomycin at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. Chlamydia elemental bodies were isolated from cultured cells after three days. The cells were detached from the flask using a sterile scraper, washed and suspended in phosphate buffered saline (PBS) and the inclusion bodies disrupted by sonication. After removal of cell debris by centrifugation, the EB material was collected by ultracentrifugation at 30,000g. The EB material was then resuspended in PBS and layered onto a 30-60% Nycodenz solution (Nycomed, Norway). After centrifugation, the EB materials collected

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 20 -

above the 60% gradient were washed and then inactivated with 1% formaldehyde for 24 hours. After extensive washing, the EB material was resuspended in PBS and the protein concentration determined (Pierce Protein Kit). EB antigens obtained from Professor Saikku and colleagues were also used in the study for comparison. A similar method was used for an elemental body antigen preparation from *C. trachomatis* (with samples again being provided by Professor P Saikku).

3.6 *Specific cloned proteins.* Cloned antigens from *C. pn* supplied by Drs. Saikku and Makela (Finland - above) were tested for cytokine balance (above). The cloned antigens comprised MOMP, OMP2 and HSP60 as recombinant proteins produced in *B. subtilis*.

10 These were tested at 1 µg/ml.

In particular, heparinised whole blood was collected from patients with coronary atherosclerosis who were either seropositive (n=17) or seronegative (n=27) for *C. pneumoniae*. After incubation overnight at 37°C as above, secreted IL-4 was measured by capture ELISA while IFN-γ was measured in plasma supernatant.

15 As shown in Figs.3A and 3B, higher levels of IL-4 were detected in subjects with 2-3 coronary vessel disease compared to subjects with mild or 1 vessel disease. Low to undetectable levels were observed in normal subjects. In *C. pneumoniae* seropositive subjects, higher levels of secreted IL-4 were detected in those with 1-3 vessel disease compared to seronegative subjects especially those with 1 vessel disease, suggesting that increased production of secreted IL-4 is associated with infection status. However, in all subjects studied, IL-4 secretion was not dependent on stimulation with *C. pneumoniae* antigens in culture, indicating that spontaneous production of IL-4 was a result of activated T-cells *in vivo* which are no longer responsive to further antigen stimulation in culture. When the data from the 44 subjects were combined the results were similar in that

irrespective of antigen stimulation the levels of secreted IL-4 in whole blood cultures correlated with the extent of disease.

**Example 4: Pattern of spontaneous T lymphocyte activation**

In marked contrast, there was inverse relationship between secreted IL-4 and IFN- $\gamma$  production (see Figs. 4A and 4B). However, there was no correlation between levels of IFN- $\gamma$  and the severity of disease indicating the inflammatory response in atheroma is driven by CD4+ Th2 helper cell-mediated inflammation with upregulation of IL-4.

In particular, the results of spontaneous cytokine production show a significant difference between those with 'normal' coronary angiograms and those with two or three vessel disease (representing 'high load' atheroma), with those defined as mild or minimal coronary atherosclerosis being intermediate in amount of IL-4 produced. With respect to IFN- $\gamma$ , a difference between normal and 'atheroma-detected' subjects was found to be present, with the 'normal' subjects having higher levels. Differences between mild and severe atheroma for IFN- $\gamma$  is less marked than is the level of difference seen with IL-4. Taken together, these results clearly show that there is a shift in the Th1-Th2 balance correlating with the amount of atheroma.

It is concluded that subjects with a 'set' towards responding to stimuli of T cells with a Th2 pattern cytokine response, promote excessive accumulation of atheroma in blood vessel walls, as a result of the pathways of the inflammatory response linked to Th2 T cell activation. As cytokines measured here are spontaneously secreted from T cells in whole blood culture, activation has occurred *in-vivo*. Stimuli could include polyclonal activators (e.g. endotoxin from gut flora), super antigens (e.g. from colonising bacteria), autoantigens (including antigens within the plaque or blood vessel wall) or specific antigens, especially from microbes in a colonising or parasitic relationship with the host (e.g. *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, non-typable *H. influenzae* etc). The latter is consistent

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 22 -

with the view that "chronic infection unrelated to particular microbial species" is a 'risk factor' for atherosclerosis progression rather than *C.pneumoniae* having an unique antigenic role (Groyston JT, Kuo Coulson AS et al, *Circulation* (1995) 92:3397-3400; Bachmaier K, Neu N et al, *Science* (1999) 283:1335-1339; Mejer D, Derby LE et al, *JAMA* (1999) 18:272-277). In addition, the data in Figs. 3A and 3B show a trend towards greater 'Th2-polarisation' in cultures stimulated with *C.pneumoniae* antigen, consistent with the notion that within the context of a 'Th2 set' of the immune system, particular microbes may enhance the drive towards a Th2 response and thus further progress the atheroma plaque. Circulating cells would interchange with those included in atheroma plaque. Thus, chronic infection can exacerbate the Th2 bias in subjects with significant atheroma. However, the present data on subjects with and without Chlamydial infection show that the basic "set" of Th2 cytokines is independent of Chlamydial infection (although the infection may exacerbate the bias as mentioned above).

This study supports the conclusion that the pattern of spontaneous T lymphocyte activation correlates with the amount of atheroma generally, but in particular in the coronary arteries.

**Example 5: Effect of feeding Lactobacillus on atherosclerosis in mice fed a high cholesterol diet**

The effect of a high cholesterol diet on the development of atherosclerosis as assessed by the formation of fatty streak in the aortic sinus (root) of mice was determined.

The diet contained the following ingredients:

	g/100 g
Sucrose	51.3
Casein ( acid)	20.0
Canola oil	1.00

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 23 -

	Cocoa butter	15.00
	Cellulose	5.10
	DL- methionine	0.30
	AIN93G minerals	3.50
5	AIN93G Vitamins	1.00
	Choline Chloride 50%/w/w	1.00
	Sodium Cholate	0.50
	Cholesterol	1.00
	DL $\alpha$ -Tocopherol acetate	0.26

- 10 Briefly, C57/B16 male mice (8 weeks old) were placed on a high cholesterol diet (HCD) or a cholesterol free normal diet, and with free access to drinking water. Groups of mice (n= 10) were fed HCD for one week and then placed on a feeding regimen comprising *Lactobacillus fermentum* (VRI 002). The dose was administered oro-gastrically 3 times per week with a 200  $\mu$ l sample of a washed bacterial suspension from
- 15 an overnight culture resuspended to give a final density of between log 9.5 and log 10.5 organisms. Control mice were dosed with 200  $\mu$ l of saline alone. After 5 weeks, two groups of mice were immunised subcutaneously with 0.1 mL of 5 mg/mL killed *Mycobacterium tuberculosis* (MT, Difco) emulsified in incomplete Freund's adjuvant. The rationale for the immunisation step was based on a recent report which suggests that
- 20 activation of the immune system by immunisation with killed bacteria can lead to the acceleration of fatty streak formation in the aorta sinus (George J et al. Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 1999, 19: 505-510).

- All mice were sacrificed at 7 weeks after commencement of the HCD and probiotic treatment. Blood was collected by cardiac puncture. The heart was removed *en*
- 25 *bloc* and the upper section containing the aortic sinus (root) was excised and fixed in 10% formalin in PBS. After fixing overnight in formalin/PBS, the tissue was embedded in OCT medium and frozen before sectioning in a cryostat. Six to seven sections (8-10  $\mu$ m thick) were taken and stained with oil Red O. Lesion areas per section were scored by a blind observer. A 0-5 lesion scoring system was adopted according to the presence

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 24 -

of fatty streak formation. As shown in Fig. 5A, mice fed HCD alone had more formation of fatty streak than those treated with *Lactobacillus*. Similar results were obtained with mice immunised with MT (see Fig. 5B) although in these mice the amount of lesion was lower than non-immunised groups, suggesting that immunisation may limit

5 atherogenesis.

**Example 6: IL-4 production in whole blood cultures from patients with coronary artery disease is inhibited by anti-CD40 monoclonal antibody**

Heparinised blood was collected from subjects with coronary artery disease and cultured in equal volume of serum-free AIM-V medium (300  $\mu$ L total volume) containing 10 graded concentrations of anti-CD40L antibody in a 96-well flat-bottomed coated with anti-IL-4 antibody. Control cultures contained medium alone or a mouse IgG1 isotype control. After incubation for 24hrs, the amount of IL-4 secreted was measured by a capture ELISA assay. As shown in Fig. 6, IL-4 production was inhibited by anti-CD40 in a dose-dependent manner compared with control ( $p < 0.05$  for 9 subjects) while the addition of 15 mouse IgG1 isotype control or anti-CD40L (data not shown) had no effect. The result showed that the engagement of CD40 is critical for the production of IL-4 whole blood culture.

Although the present invention has been described with reference to preferred 20 embodiments, the skilled addressee will understand that numerous variations and modifications are possible without departing from the scope of the instant invention.

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 25 -

## CLAIMS

1. A method of prophylactic or therapeutic treatment of a cardiovascular disorder comprising administering to a subject in need thereof an effective amount of one or more agents for upregulating a cytokine profile characteristic of a Th1 T-cell response relative  
5 to a cytokine profile of a Th2 T-cell response associated with the disorder.
2. A method according to claim 1 comprising shifting the cytokine profile characteristic of a Th2 T-cell response to a cytokine profile characteristic of a Th1 response.
3. A method according to claim 1 or 2 comprising administering an agent capable of  
10 upregulating a Th1 T-cell response and suppressing a Th2 T-cell response in the subject.
4. A method according to claim 1 or 2 comprising administering an agent capable of potentiating the action of cytokines characteristic of a Th1 T-cell response and suppressing the action of cytokines characteristic of a Th2 response in the subject.
5. A method according to claim 1 comprising administering an agent capable of  
15 upregulating a Th1 T-cell response in the subject.
6. A method according to claim 1 comprising administering an agent capable of potentiating the action of cytokines characteristic of a Th1 T-cell response in a subject.
7. A method according to claim 1 comprising administering an agent capable of suppressing a Th2 T-cell response in the subject.
- 20 8. A method according to claim 1 comprising administering an agent capable of suppressing the action of cytokines characteristic of a Th2 T-cell response in the subject.
9. A method according to any one of claims 1 to 8 wherein the one or more agents comprises a microorganism or a component, extract, sonicate or secreted product thereof, or a mixture of some or all of the foregoing.

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 26 -

10. A method according to claim 9 wherein the extract comprises a cell wall fraction of the microorganism.
11. A method according to claim 9 or 10 wherein the microorganism is selected from the group consisting of yeast and bacteria.
- 6 12. A method according to claim 11 wherein the microorganism is a probiotic bacterium.
13. A method according to claim 12 wherein the probiotic bacterium is selected from the group consisting of *Lactobacillus* and *Mycobacterium* species.
14. A method according to claim 13 wherein the *Lactobacillus* species is capable of
- 10 suppressing a Th2 response and lowering cholesterol level in the subject.
15. A method according to claim 12 wherein the probiotic bacterium is selected from *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* and *Mycobacterium vaccae*.
16. A method according to claim 11 wherein the microorganism is a bacterium selected from the group consisting of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*,
- 15 *Lactobacillus chammorus* and *Bifidobacterium breve*.
17. A method according to any one of claims 11 to 16 wherein the microorganism is viable.
18. A method according to any one of claims 1 to 17 further comprising administering to the subject an effective amount of at least one pharmaceutically active agent for
- 20 treating the subject in addition to the agent for upregulating a cytokine profile characteristic of a Th1 T-cell response.
19. A method according to claim 18 wherein the pharmaceutically active agent is selected from the group consisting of lipid-lowering drugs, anti-hypertensive agents and anti-diabetic agents.

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 27 -

20. A method according to claim 18 or 19 wherein the agent for upregulating the cytokine profile characteristic of the Th1 T-cell response is administered to the subject prior to, simultaneously with or subsequent to the pharmaceutically active agents.
21. A method according to any one of claims 1 to 20 wherein the Th2 T-cell response  
5 associated with the disorder is exacerbated by bacterial infection, bacterial antigens, polyclonal activators, superantigens or autoantigens.
22. A method according to claim 20 wherein the infection is by, or the bacterial antigen is from, *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* or non-typable *Haemophilus influenzae*.
- 10 23. A method according to any one of claims 1 to 22 wherein the cardiovascular disorder is selected from the group consisting of subjects suffering from atheroma with stable or unstable clinical disease.
24. A method of diagnosing or evaluating susceptibility to a cardiovascular disorder, comprising evaluating a T-cell response in a subject wherein an upregulated Th2 T-cell  
15 response and/or suppressed Th1 T-cell response is indicative of susceptibility to, or the presence of, the disorder.
25. A method according to claim 24 comprising determining whether the subject has an upregulated Th2 T-cell response and a suppressed Th1 T-cell response.
26. A method according to claim 24 wherein the evaluating comprises determining  
20 whether the activity or production of one or more cytokines characteristic of the Th1 T-cell response is suppressed and/or whether the activity or production of one or more cytokines characteristic of a Th2 T-cell response is potentiated.
27. A method according to claim 26 wherein the evaluating comprises determining whether the activity or production of one or more cytokines characteristic of Th1 T-cell

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 28 -

response is suppressed and whether the activity or production of one or more cytokines characteristic of a Th2 T-cells response is potentiated.

28. A method according to claim 26 or 27 wherein the cytokine or cytokines are selected from the group consisting of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 and IL-12.

5 29. A method according to any one of claims 24 to 28 wherein the T-cell response is evaluated by analysis of circulating T-cells.

30. A method of diagnosing a cardiovascular disorder or evaluating whether a subject is susceptible to the disorder, comprising:

- (a) measuring one or more immunoglobulin levels affected by the disorder to  
10 obtain test data; and
- (b) comparing the test data with reference data to evaluate whether the subject is susceptible to, or has, the cardiovascular disorder.

31. A method according to claim 30 comprising measuring one or more IgG levels.

32. A method according to claim 31 comprising measuring total IgG2 subclass  
15 immunoglobulin.

33. A method according to claim 31 or 32 comprising measuring the level of an IgG2 subclass specific antibody.

34. A method according to claim 33 wherein the IgG2 subclass specific antibody is specific for *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* or non-typable *Haemophilus*  
20 *influenzae*.

35. A method according to claim 31 wherein a ratio of total IgG2 subclass to IgG2 subclass specific antibody, or an altered ratio of total IgG2 subclass to IgG2 subclass specific antibody, is indicative of susceptibility to, or presence of, the disorder.

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

- 29 -

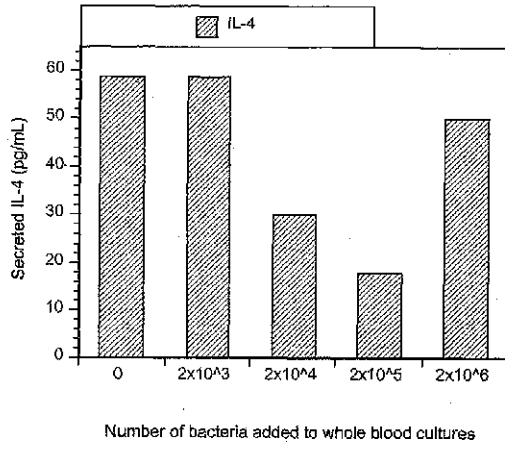
36. A method according to any one of claims 30 to 35 wherein the cardiovascular disorder is selected from subjects suffering from atheroma with stable or unstable clinical disease.

WO 02/34273

PCT/IB01/02005

1/8

Fig. 1



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/34273

PCT/001/02005

2/8

Fig. 2A

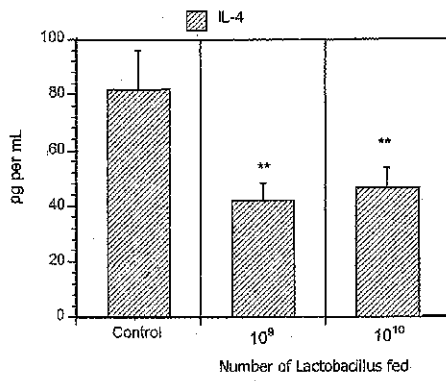
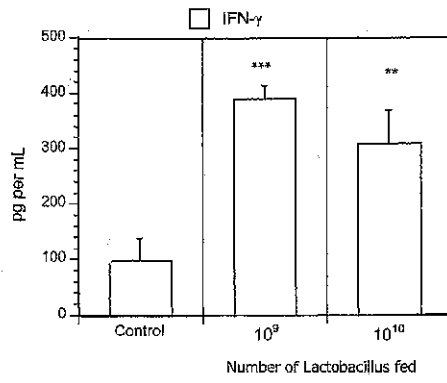


Fig. 2B



\*\* , p < 0.01

\*\*\* , p < 0.001

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

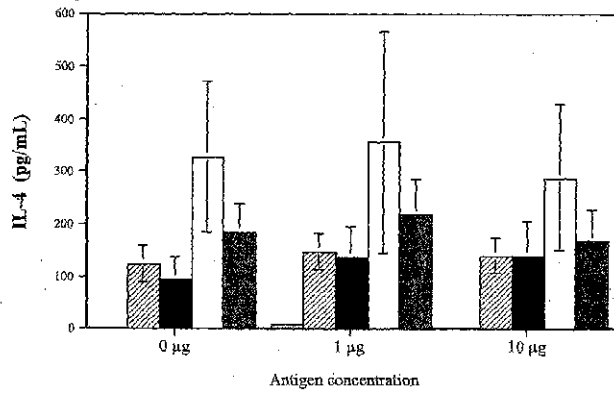
WO 02/34273

PCT/001/02005

3/8

Fig. 3A

C.pn negative subjects



Total number of subjects ( n = 27 )

- Normal (n=1)
- ▨ Mild (n=10)
- 1 vessel C.A.D (n=5)
- 2 vessel C.A.D (n=2)
- 3 vessel C.A.D (n=9)

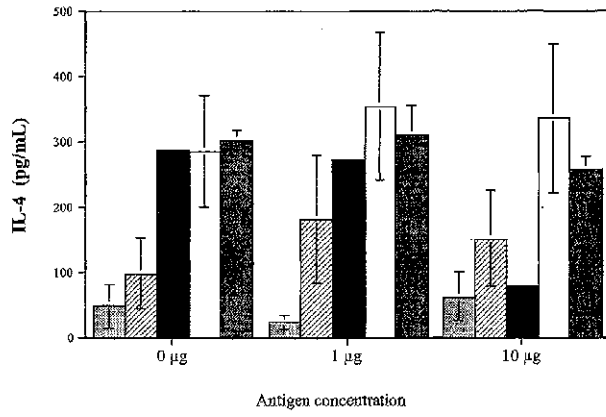
WO 02/34273

PCT/IB01/02005

4/8

Fig. 3B

C.pn positive subjects



Total number of subjects ( n=17 )

- ▨ Normal ( n=3 )
- ▧ Mild ( n=5 )
- 1 vessel C.A.D ( n=1 )
- 2 vessel C.A.D ( n=6 )
- ▩ 3 vessel C.A.D ( n=2 )

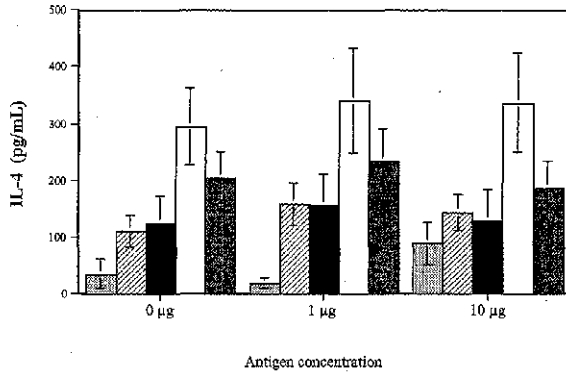
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/34273

PCT/001/02005

5/8

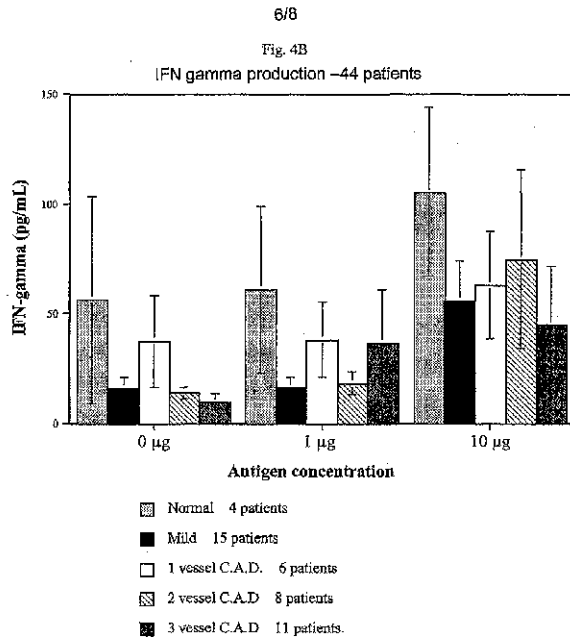
Fig 4A  
IL-4 Production -44 patients



- Normal 4 patients
- Mild 15 patients
- 1 vessel C.A.D 6 patients
- 2 vessel C.A.D 8 patients
- 3 vessel C.A.D 11 patients

WO 02/34273

PCT/IB01/02005



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/34273

PCT/001/02005

7/8

Fig. 5A

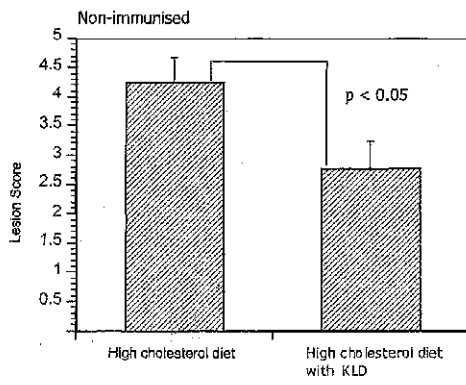
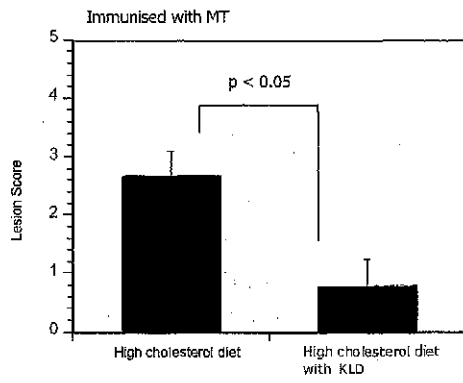
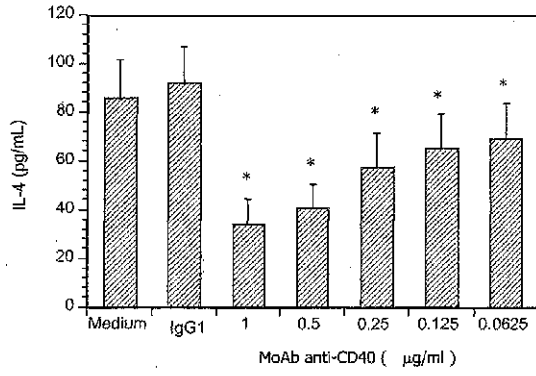


Fig. 5B



8/8

Fig. 6



\* ,  $p < 0.05$  ( paired t test,  $n = 9$  )

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP01/02005
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
Int. Cl. <sup>7</sup> : A61K 35/74; A61P 9/00; C12Q 1/00; G01N 33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC7		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched SEE DATABASES BELOW		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPAT, MEDLINE, CHEMICAL ABSTRACTS: Keywords used - TH1, TH2, cytokine profile, t-cell response, cardiovascular, degenerative vascular, atheroma, atherosclerosis, arteriosclerosis, cholesterol, coronary artery, probiotic, lactobacillus, mycobacterium, interleukin 4, interleukin 10, interleukin 12, IL4, IL10, IL12, interferon gamma, tromonoglobulin G, IgG		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KEREN, P. et al. Effect of hyperglycemia and hyperlipidemia on atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. Diabetes, June 2000, Vol. 49, pages 1064-1069. See entire document.	1-29
X	LEE, T.S. et al. The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in ApoB-deficient mice. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 1999, Vol. 19, pages 734-742. See entire document.	1-29
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"Y" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"C" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 27 February 2002	Date of mailing of the international search report 11 MAR 2002	
Name and mailing address of the ISA/UA AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODENAGT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929	Authorized officer <b>JULIE CAIRNDUFF</b> Telephone No : (02) 6283 2545	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB01/02005
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OXMAN, T. et al. A new method of long-term preventive cardioprotection using <i>Lactobacillus</i> . American Journal of Heart and Circulatory Physiology, May 2000, Vol. 278, pages H1717-H1724. See entire document.	1-23
X	WO A1 00/29007 (REDDY M.) 25 May 2000. See entire document, in particular Example 10.	1-23
X	WO A2 99/49877 (GANEDEN BIOTECH, INC.) 7 October 1999. See entire document.	1-23
X	WO A1 99/07827 (PROBI AB) 18 February 1999. See entire document.	1-23
X	TAYLOR, G.R.J. and WILLIAMS, C.M. Effects of probiotics on blood lipids. British Journal of Nutrition, 1998, Vol. 80, Suppl. 2, pages S225-S230. See entire document.	1-23
X	Derwent Abstract Accession No. 98-524249-45, Class B04, JP 1029841 A (YAKULT HONSHA KK) 2 September 1998. See entire abstract.	1-23
X	Derwent Abstract Accession No. 98-357417/31, Class B04, JP 10139674 A (YAKULT HONSHA KK) 26 May 1998. See entire abstract.	1-23
X A	FROSTEGARD, J. et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. Atherosclerosis, 1999, Vol. 145, pages 33-43. See entire document.	24-29 1-23
X A	MACHI, P. et al. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. The Journal of Clinical Investigation, 1999, Vol. 104, No. 8, pages 1041-1050. See entire document.	24-29 1-23
X A	ZHOU, X. et al. Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. The Journal of Clinical Investigation, 1998, Vol. 101, No. 8, pages 1717-1725. See entire document.	24-29 1-23
X	US 6100098 (NEWKIRK, M.M.) 8 August 2000. See entire document.	30-36
X	KAHAN, T. et al. Greater than normal prevalence of seropositivity for <i>Helicobacter pylori</i> among patients who have suffered myocardial infarction. Coronary Artery Disease, October 2000, Vol. 11, pages 523-526. See entire document.	30-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB01/02005
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KORNER, I. et al. Serological evidence of Chlamydia pneumoniae lipopolysaccharide antibodies in atherosclerosis of various vascular regions. VASA, 1999, Vol. 28, pages 259-263. See entire document.	30-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

International application No.  
PC1/AB01/02005

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member			
WO 99/07527	AU 83726/98	BR 9811825	EP 990024		
	NO 20000268	PL 333578	SE 9702860		
	ZA 9806769				
WO 99/49877	AU 33803/99	EP 1057945			
WO 00/29007	AU 17370/00	EP 1133306	US 6080401		
END OF ANNEX					

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/06	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 2 1
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	K
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	F

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

(74) 代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74) 代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

(72) 発明者 バング, ジェラルド

オーストラリア国ニューサウスウェールズ 2 0 1 1, エリザベス・ベイ, ビルヤード・アベニュー  
4 / 2 5

(72) 発明者 コンウェイ, パトリシア・リン

オーストラリア国ニューサウスウェールズ 2 0 3 6, ラ・ペロウス, ゴーラウォール・アベニュー  
2 0

(72) 発明者 クランシー, ロバート・ルレウェリン

オーストラリア国ニューサウスウェールズ 2 3 0 0, ニューキャッスル, ハンター・ストリート  
4 / 6 7

F ターム(参考) 2G045 AA25 BB03 BB18 BB20 CA18 CB21 DA36 DA37 DA77

4C084 AA17 AA20 MA02 NA05 NA14 ZA451 ZC331 ZC351 ZC421 ZC751

4C087 AA01 AA02 BC11 BC30 BC59 BC64 MA02 NA05 NA14 ZA36

ZA42 ZA45 ZC33 ZC35 ZC75

专利名称(译)	用于诊断和治疗心血管疾病的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004512307A</a>	公开(公告)日	2004-04-22
申请号	JP2002537324	申请日	2001-10-25
申请(专利权)人(译)	Azeromasutatto 专有有限公司		
[标]发明人	パングジェラルド コンウェイパトリシアリン クランシーロバートルレウエリン		
发明人	パング,ジェラルド コンウェイ,パトリシア・リン クランシー,ロバート・ルレウエリン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K35/66 A61K35/74 A61K36/06 A61K45/00 A61K45/06 A61P3/06 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P43/00 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/68 A61K35/72		
CPC分类号	A61K35/741 A61K35/745 A61K35/747 A61K36/062 A61K45/06 A61P29/00 G01N33/6854 A61K2300 /00		
FI分类号	A61K45/00 A61K35/66 A61K35/72 A61K35/74.C A61K45/06 A61P3/06 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P43/00.121 G01N33/50.K G01N33/53.N G01N33/569.F		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BB03 2G045/BB18 2G045/BB20 2G045/CA18 2G045/CB21 2G045/DA36 2G045 /DA37 2G045/DA77 4C084/AA17 4C084/AA20 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA451 4C084/ZC331 4C084/ZC351 4C084/ZC421 4C084/ZC751 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC11 4C087/BC30 4C087/BC59 4C087/BC64 4C087/MA02 4C087/NA05 4C087/NA14 4C087/ZA36 4C087 /ZA42 4C087/ZA45 4C087/ZC33 4C087/ZC35 4C087/ZC75		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	2000PR1016 2000-10-25 AU		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了一种预防性或治疗性治疗心血管疾病的方法，该方法包括给需要的对象施用有效量的一种或多种药剂，用于上调相对于α的胞嘧啶谱的Th1 T细胞应答特征的细胞因子谱。与该病症相关的Th2 T细胞反应。还公开了用于该方法组合物。

	g/100g
スクロース	51.3
カゼイン(酸)	20.0
キャノーラ油	1.00
ココア脂	15.00
セルロース	5.10
DL-メチオニン	0.30
AIN93G ミネラル	3.50
AIN93G ビタミン	1.00
塩化コリン 50%w/w	1.00
Sodium Cholate	0.50
コレステロール	1.00
DL α-酢酸トコフェロール	0.26