

(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2006-504637

(P2006-504637A)

(43) 公表日 平成18年2月9日(2006.2.9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	4 B O 6 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-514460 (P2004-514460)	(71) 出願人	500501546 ユニバーシティー ヘルス ネットワーク カナダ国 オンタリオ州 トロント ユニ バーシティー アベニュー 610
(86) (22) 出願日	平成15年6月19日 (2003.6.19)	(74) 代理人	100068526 弁理士 田村 恭生
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月16日 (2005.2.16)	(74) 代理人	100076521 弁理士 坪井 有四郎
(86) 国際出願番号	PCT/CA2003/000882	(74) 代理人	100126778 弁理士 品川 永敏
(87) 国際公開番号	W02004/000367	(72) 発明者	ヨーゼフ・エム・ベンニンガー オーストリア、アー-1030ヴィエナ、 ヒンメルホーフガッセ62番
(87) 国際公開日	平成15年12月31日 (2003.12.31)		
(31) 優先権主張番号	60/389,709		
(32) 優先日	平成14年6月19日 (2002.6.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心臓、肺および腎臓疾患および高血圧症の治療のためのACE2活性化

(57) 【要約】

本発明は、心血管疾患、腎臓疾患、肺疾患および高血圧症の予防および治療のためのACE2を活性化する化合物に関する。本発明はまた、ACE2発現の測定またはヌクレオチド多型分析により心血管疾患、腎臓疾患、肺疾患および高血圧症を診断する方法をも包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A C E 2 低減状態を治療する方法であって、当該状態を有する哺乳動物に治療学的有効量の A C E 2 アゴニストを投与することを含む方法。

【請求項 2】

該哺乳動物がヒトである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

低減した A C E 2 状態が、高血圧症、収縮性心不全、慢性心不全、急性心不全、心筋梗塞、動脈硬化症および腎不全および肺疾患よりなる群から選ばれた疾患と関連する、請求項 1 または 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4】

A C E 2 低減状態の遺伝子療法の方法であって、有効量のコードするトランスジーンを臓器に送達することを含む方法。

【請求項 5】

罹患している臓器が心臓または腎臓または肺または血管である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

A C E 2 トランスジーンを遺伝子療法ベクター中にて患者に投与する、請求項 4 または 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

遺伝子療法ベクターがウイルスベクターを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

患者がヒトである、請求項 4 ないし 7 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 9】

A C E 2 低減状態が、高血圧症、収縮性心不全、慢性心不全、急性心不全、心筋梗塞、動脈硬化症および腎不全および肺疾患よりなる群から選ばれた疾患と関連する、請求項 4 ないし 8 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 10】

遺伝子 A C E 2 の対立遺伝子の一方が破壊されている非ヒト哺乳動物。

【請求項 11】

A C E 2 をコードする遺伝子の両対立遺伝子が破壊されている非ヒト哺乳動物。

【請求項 12】

破壊された A C E 2 の突然変異を含み、該破壊が A C E 2 をコードする遺伝子のヌル突然変異という結果となる、非ヒト哺乳動物。

【請求項 13】

齧歯類である、請求項 10 ないし 12 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 14】

マウスである請求項 13 に記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 15】

高血圧症または心筋収縮能の欠陥または腎臓の欠陥、または肺障害への増大した感受性を特徴とする、請求項 10 ないし 14 に記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 16】

A C E 2 ノックアウト構築物を含む核酸。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の核酸を含むマウス胚性幹細胞株。

【請求項 19】

高血圧症および心筋収縮能および腎不全および肺障害をモデュレートする化合物をスクリーニングする方法であって、請求項 11 ないし 14 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物

10

20

30

40

50

に化合物を導入し、ついで血圧および/または心筋収縮能および/または腎臓機能および/または肺感染における増大または低減を決定することを含む方法。

【請求項 20】

A C E 2 活性のアゴニストである化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) (i) A C E 2 を含む精製した調製物、(ii) 基質、および(iii) 被験化合物を用意し、

(b) 該 A C E 2 および該基質を該 A C E 2 が該基質に作用して生成物を生成しうる条件下で混合し、その際、該混合は該被験化合物の存在下および不在下で行い、ついで

(c) 該被験化合物の存在下または不在下で生成した生成物の量を直接または間接に測定する

10

ことを含む方法。

【請求項 21】

該基質がアンジオテンシン I またはアンジオテンシン II である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

該生成物が A n g 1 - 9 または A n g 1 - 7 を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

請求項 20 ないし 22 に従って単離した化合物。

【請求項 24】

A C E 2 アクチベーターの医薬物質としての使用。

20

【請求項 25】

心血管疾患または腎臓疾患または肺疾患の治療のための A C E 2 アクチベーターの使用

【請求項 26】

心血管疾患または腎臓疾患または肺疾患の治療用医薬の製造のための A C E 2 アクチベーターの使用。

【請求項 27】

哺乳動物における心血管疾患または腎臓疾患または肺疾患の医学的治療方法であって、当該治療を必要とする哺乳動物に有効量の A C E 2 アクチベーターを投与することを含む方法。

30

【請求項 28】

A C E 2 アクチベーターを A C E インヒビターとともに投与する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

A C E 2 ポリペプチドをコードする単離核酸分子であって、該核酸は A C E 2 核酸コード領域の上流または下流にヌクレオチド多型を含み、該多型が野生型 A C E 2 に比べて A C E 2 発現を低減させるものである、単離核酸分子。

【請求項 30】

該多型が A C E 2 a ~ A C E 2 m の少なくとも一つよりなる群から選ばれたものである、請求項 1 に記載の単離核酸分子。

40

【請求項 31】

動物で A C E 2 低減状態を検出する方法であって、該動物から D N A 試料を得、ついで該 D N A 試料中で請求項 29 または 30 に記載の核酸を同定することを含む方法。

【請求項 32】

動物で A C E 2 低減状態を特徴とする疾患または疾患の素因を診断する方法であって、該動物からの D N A 試料中で請求項 29 または 30 に記載の核酸を同定することを含む方法。

【請求項 33】

該動物が該ヌクレオチド多型についてホモ接合性であるかまたはヘテロ接合性であるかを決定することを含む、請求項 31 または 32 に記載の方法。

50

【請求項 3 4】

A C E 2 低減状態が、高血圧症、収縮性心不全、慢性心不全、急性心不全、心筋梗塞、動脈硬化症および腎不全よりなる群から選ばれた心血管疾患または腎臓疾患または肺疾患と関連する、請求項 3 1 ないし 3 3 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 3 5】

(i) A C E 2 核酸コード領域の上流または下流の領域に特異的に結合する配列を含み、該領域が A C E 2 発現を低減させるヌクレオチド多型に近接している、ポリヌクレオチド。

【請求項 3 6】

8 ~ 1 0、8 ~ 1 5、8 ~ 2 0、8 ~ 2 5、2 5 ~ 5 0、5 0 ~ 7 5、5 0 ~ 1 0 0、1 0 0 ~ 2 0 0、2 0 0 ~ 5 0 0 または 5 0 0 ~ 1 0 0 0 のヌクレオチドを含む、請求項 3 5 に記載のポリヌクレオチド。 10

【請求項 3 7】

該核酸が A C E 2 a ~ A C E 2 m の一つに近接して高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下で特異的に結合する、請求項 3 5 または 3 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 8】

該ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が 6 5 で $0.1 \times S S C$ 、0.1 % S D S を含む、請求項 3 7 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 9】

A C E 2 多型に相補的な配列を含む、請求項 3 5 に記載のポリヌクレオチド。 20

【請求項 4 0】

(a) ヌクレオチド多型に近接している A C E 2 の上流または下流領域の 8 ~ 5 0 ヌクレオチド、ここで配列は A C E 2 a ~ A C E 2 m の一つを含み、図 1 1 に示す配列の全部または一部を含む、

(b) (a) で特定した配列に相補的な配列、および

(c) (a) または (b) の配列と少なくとも 7 0 % の配列同一性を有し、A C E 2 に高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズすることのできる配列

よりなる群から選ばれた配列を含む、請求項 3 9 に記載のポリヌクレオチド。 30

【請求項 4 1】

該核酸がハイブリダイゼーションアッセイにおいてプローブとして使用できる、請求項 3 5 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4 2】

該核酸配列を検出可能なように標識してある、請求項 4 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4 3】

検出可能な標識が、

(a) 蛍光原性染料、および / または

(b) ビオチン化修飾、および / または

(c) 放射性標識 40

を含む、請求項 4 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4 4】

動物からの核酸試料中の A C E 2 多型の存在を検出するための検出用試薬を含む、A C E 2 遺伝子型決定キット。

【請求項 4 5】

検出試薬が核酸および / または制限酵素を含む、請求項 4 4 に記載のキット。

【請求項 4 6】

検出試薬を保持するための生物学的試料容器をさらに含む、請求項 4 4 に記載のキット。

【請求項 4 7】

プレートにさらに含み、該プレートが複数のウェルを有し、該プレートにACE2多型を含むACE2配列に特異的に結合する核酸配列を有するプローブが結合している、請求項44に記載のキット。

【請求項48】

核酸を増幅するための増幅試薬をさらに含む、請求項44に記載のキット。

【請求項49】

該増幅試薬が、ACE2a～ACE2mよりなる群から選ばれたACE2単一ヌクレオチド多型に近接したACE2核酸の領域を増幅させる、請求項48に記載のキット。

【請求項50】

該増幅試薬がプライマーのセットを含み、各プライマーが、ACE2a～ACE2mの一つに近接して特異的に結合するか、またはACE2a～ACE2mの一つを通して伸長を引き起こす、請求項48に記載のキット。

10

【請求項51】

動物がACE2低減状態の疾患を有するかまたはそのリスクにあることを検出するための、請求項144に記載のキット。

【請求項52】

該疾患が心血管疾患または腎臓疾患または肺疾患を含むかまたは血管に罹患する、請求項51に記載のキット。

【請求項53】

該疾患が、高血圧症、収縮性および拡張性の慢性心不全、急性心不全、心筋梗塞、冠状動脈疾患、動脈硬化症および腎不全および肺疾患よりなる群から選ばれる、請求項52に記載のキット。

20

【請求項54】

動物のACE2遺伝子型を決定する方法であって、

(a) ACE2コード領域の上流および下流の領域を含む動物からのACE2核酸試料を得、ついで

(b) ACE2単一ヌクレオチド多型を含むACE2核酸の領域を検出することを含む方法。

【請求項55】

該ヌクレオチド多型がACE2a～ACE2mよりなる群から選ばれる、請求項54に記載の方法。

30

【請求項56】

動物がACE2多型についてホモ接合性であるかまたはヘテロ接合性であるかを決定することを含む、請求項55に記載の方法。

【請求項57】

該動物がヒトであり、該ACE2遺伝子型を用いて該動物がACE2低減状態の疾患を有するかまたはそのリスクにあるか否かを決定する、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

該疾患が心血管疾患または腎臓疾患または肺疾患を含むかまたは血管に罹患する、請求項57に記載の方法。

40

【請求項59】

動物からの該核酸を増幅することによって該核酸を得る、請求項54に記載の方法。

【請求項60】

請求項7ないし15のいずれかに記載のポリヌクレオチドの全部または一部を増幅することによって該核酸を得る、請求項59に記載の方法。

【請求項61】

検出工程がACE2核酸のヌクレオチド配列を決定することを含む、請求項54に記載の方法。

【請求項62】

検出工程が、該核酸を請求項7ないし15のいずれかに記載のポリヌクレオチドと高ス

50

トリンジェンシー条件下で接触させることを含む、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 3】

該ポリヌクレオチドが、(i) ACE 2 多型とは区別される単一多型を含む ACE 2 核酸の領域に近接して選択的にハイブリダイズする、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

検出工程が、

(a) 該核酸の制限エンドヌクレアーゼ消化を行い、それによって核酸消化物を生成させ、ついで

(b) 該消化物を該ポリヌクレオチドと接触させる

ことを含む、請求項 5 4 に記載の方法。

10

【請求項 6 5】

ハイブリダイゼーションが PCR 増幅の際または PCR 増幅後のいずれかで起こり、分析を「即時」PCR 分析、または蛍光測光分析により行う、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

検出工程が該核酸のサイズ分析を含む、請求項 6 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、高血圧症、冠状動脈性心疾患、心不全、腎不全、肺浮腫、および中毒性ショックや人工換気などの肺障害を含む、心臓、肺および腎臓の疾患を診断および治療するのに用いる組成物および方法を提供する。

20

【背景技術】

【0002】

心血管系疾患は 21 世紀における健康管理の負担の大きい第一のものであり、2020 年までに世界中の死亡の最も一般的な原因となるであろうことが予測されている。心疾患の主たるリスク因子は高血圧である。高血圧症は、遺伝的因子および環境因子の両者によって制御される多因性の定量的形質である。食事や身体活動などの高血圧に貢献しうる環境因子については多くのことがわかっているが、心血管系疾患への素因となる遺伝的因子についてはあまりわかっていない。動物モデルでの高血圧と関係のある幾つかの推定の遺伝子の定量的形質部位 (quantitative trait loci; QTL) の同定にも拘わらず、これらの部位のいずれも遺伝子に翻訳されていない。それゆえ、高血圧症および他の心血管系疾患の基礎となる分子的および遺伝的メカニズムの多くは不明のままである。

30

【0003】

血圧のホメオスタシスの一つの重要なレギュレーターはレニン - アンジオテンシン系 (RAS) である。プロテアーゼのレニンは、アンジオテンシノーゲンを不活性な十量体ペプチドであるアンジオテンシン I (Ang I) に開裂する。ついで、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) の作用は活性な八量体アンジオテンシン II (Ang II) への Ang I の開裂を触媒し、このアンジオテンシン II (Ang II) が血管平滑筋の血管収縮および腎細管でのナトリウムの再吸収を促進することにより高血圧症に貢献しうるのである。ACE 突然変異体マウスは、突発性の高血圧症、部分的な雄の不妊、および腎臓の奇形を示す。ヒトでは ACE 多型は腎機能および心血管機能の決定要因と関係付けられており、ACE および Ang II レセプターの薬理的な抑制は血圧および腎臓疾患の低下に有効である。さらに、ACE および Ang II レセプターの抑制は心不全にも有利な効果を有する。

40

【0004】

最近、ACE 2 と称する ACE のホモログが同定されたが、このものは腎臓および心臓の血管内皮細胞で優先的に発現される。興味深いことには、2 つの ACE ホモログが八工にも存在する。ACE とは異なり、ACE 2 はカルボキシペプチダーゼとして機能し、Ang I から単一残基を開裂して Ang 1 - 9 を生成し、Ang II から単一残基を開裂して Ang 1 - 7 を生成する。これらのインビトロでの生化学データは、ACE 2 が RAS

50

をモデュレートすること、それゆえ血圧制御に何らかの役割を果たしているかもしれないことを示唆している。インビボでの心血管系およびRASにおけるACE2の役割はわかっていない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

Actonらは米国特許第6,194,556号において、ACE2関連疾患状態の診断および治療におけるACE2の使用を記載している。この特許は、ACE2発現レベルが高血圧症で増大していること、およびACE2活性のアンタゴニストまたはインヒビターが高くなった血圧または関連する障害の治療に有用であることを述べている。カナダ特許出願第2,372,387号はACE2インヒビターの特定の例を提供しているが、これは高血圧症などの心疾患の治療に有用であることを意図したものである。この文献もACE2活性を増大させるのではなく抑制する必要があることを強調している。これら文献はACE2活性の抑制の必要性を教示するものであるが、インビトロでの実験データに基づくものにすぎない。それら文献は、ACE2を特徴付けるためのノックアウト哺乳動物のデータなどのインビボでのデータを提供していない。これまで高血圧症の治療のための医薬として承認されたACE2インヒビターはない。さらに、心血管系およびRASでのACE2のインビボでの役割は殆どわかっていないままである。心臓および腎臓の疾患の治療のための適切な診断試験および医薬をデザインすることができるように、ACE2の機能の特徴付ける必要性が存在する。

10

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明はレニン-アンジオテンシン系の制御のための新たなパラダイムを提供するものであり、インビトロデータ(Actonの特許)に基づく予測とは対照的に、また従来技術では予期しないことに、心臓機能および血圧制御に必要なRASの重要な負のレギュレーターとしてのACE2の全く新規かつ予期しない使用を示す。ACE2の活性化は、心臓、肺および腎臓疾患の治療および予防にとって重大である。本発明は、ACE2アクチベーターの動物への投与が高血圧症および心臓および腎臓疾患、および肺障害を予防および治療することを初めて示すものである。

30

【0007】

発明の詳細な説明

本発明はRAS系の制御のための新たなパラダイムを提供するものであり、ACE2が心臓機能および心血管機能、腎臓機能および肺障害に必要なRASの重要な負のレギュレーターであることを示すものである。ACE2の活性化は、心臓および腎臓の疾患および高血圧症および肺の疾患の治療および予防にとって重大である。本発明は、ACE2アクチベーターの動物への投与が心不全および高血圧症、腎臓疾患および肺障害を予防および治療することを初めて教示するものである。

【0008】

この結果は、心臓疾患を治療するにはACE2活性を抑制しなければならないと教示する上記米国特許第6,194,556号やカナダ特許出願第2,372,387号などの従来技術の文献からすると全く予期しないものである。それゆえ、ACE2の発現および/または活性を活性化することによって心臓疾患が実際に治療されることは驚くべきことである。

40

【0009】

本発明は、ACE2機能および/またはACE2 mRNAおよびACE2タンパク質発現のアクチベーターを含む(これに限られるものではない)アクチベーター、および該アクチベーターを含む医薬組成物を包含する。本発明はまた、治療を必要とする動物に有効量のアクチベーターを投与することによる、心臓疾患、肺疾患および腎臓疾患の医学的な治療方法をも包含する。肺疾患としては、これらに限られるものではないが、慢性閉塞性肺疾患、肺炎、喘息、慢性気管支炎、肺気腫、嚢胞性線維症、間質性肺疾患、原発性肺

50

高血圧症、肺塞栓症、肺サルコイドーシス、結核および肺癌が挙げられる。

【0010】

本発明はまた、心臓および腎臓の疾患および高血圧症および肺疾患を治療するのに用いることのできるACE2アクチベーターを検出するためのスクリーニングアッセイをも包含する。これらアッセイはインビトロであってもインビボであってもよい。好ましい態様において、本発明は、候補化合物がACE2の発現または活性を増大させることができるか否かを評価するための内皮、腎臓、肺または心臓の細胞アッセイを包含する。細胞をACE2の発現または活性を活性化する能力について決定しようとする少なくとも1つの化合物の存在下で培養し、ACE2発現の増大について細胞を測定する。本発明の他の側面は、ACE2の喪失の効果を克服しうる化合物を同定するためのACE2ノックアウトマウスに関する。これらアッセイにおいてポリペプチドおよび小さな有機分子を試験する。本発明は、本発明のスクリーニング法によって同定され、医薬組成物にて動物に投与するのに適した全ての化合物を包含する。

10

【0011】

本発明の他の側面は、心臓および/または腎臓の疾患および/または高血圧症および/または肺疾患の発症またはリスクの診断である。このことは、心臓、血清、または腎臓、または他の組織中のACE2レベルを測定することによって診断することができる。野生型レベルよりも低いレベルのACE2は「ACE2低減状態」を示し、これは本発明が心臓および/または腎臓の疾患および/または高血圧症、および/または肺疾患、または疾患のリスクと直接関係することを示すものである。ACE2の野生型レベルおよび低減レベルは当業者には明らかであろう。ACE2低減状態はまた、以下に記載する多型ACE2a~ACE2mによっても示される。本発明は低減したACE2の発現または活性と関連する疾患を治療および診断するのに有用である。診断はまた、場合により、ACE2低減状態と関係するACE2遺伝子の上流および下流および遺伝子内の多型の分析によっても達成される。本明細書に記載する手段によって多型を識別するヌクレオチドの検出に必要な試薬はすべて、動物から単離したゲノムDNAの分析のための単一のキットにて提供することができる。該キットは、疾患のリスクまたは発症の診断のため、遺伝子型決定および表現型決定を可能とすべくACE2の多型を識別する標識プローブを含んでいるであろう。多型特異的なプローブは、唯一つの多型特異的プローブがハイブリダイズして検出することができ、それによって特異的なACE2多型を同定できるように、適当に標識し、生成DNA切片にアニーリング条件下で加えることができる。

20

30

【0012】

治療法

上記で記載したように、本発明はACE2遺伝子発現が高血圧症、心臓および腎臓疾患ではダウンレギュレーションされていることを示した。従って、本発明は、治療または予防を必要とする動物にACE2の発現を増大させうる薬剤の有効量を投与することを含む、高血圧症、心臓疾患、肺または腎臓疾患の治療または予防方法を提供する。

【0013】

本明細書で使用する「ACE2の発現を増大させうる薬剤」なる語は、該薬剤の不在下で同じ種類の細胞でのACE2遺伝子またはタンパク質のレベルまたは活性と比べてACE2遺伝子またはタンパク質のレベルまたは活性を増大させることのできるあらゆる薬剤を意味する。該薬剤はいかなる種類の物質であってもよく、核酸分子(ACE2またはその断片を含む)、タンパク質(Ace2またはその断片を含む)、ペプチド、炭水化物、小分子、または有機化合物を含むがこれらに限られるものではない。ACE2遺伝子が増大したか否かは、ウエスタンブロットティング、SDS-PAGE、免疫化学、RT-PCR、ノーザンブロットティングおよびインシトゥハイブリダイゼーションを含む公知の方法を用い、当業者により容易に決定することができる。

40

【0014】

本明細書で使用する「動物」の語は、動物界のあらゆる成員を含む。動物は好ましくはヒトである。

50

【0015】

本明細書で使用する「有効量」なる語は、ACE2のレベルを高めるのに必要な投与量および期間で有効な量を意味する。

【0016】

本明細書において使用する「治療または治療する」の語は、臨床的な結果を含む有利なまたは所望の結果を得るためのアプローチを意味する。有利なまたは所望の臨床結果としては、これらに限られるものではないが、検出するかどうか検出しえないかに拘わらず、1またはそれ以上の徴候の軽減または改善、疾患の程度の減少、疾患の安定化した（すなわち、悪化しない）状態、疾患の拡散の予防、疾患の進行の遅滞、疾患状態の改善または一時的緩和、および緩解（部分的または全体的）が挙げられる。「治療」はまた、治療を施さなかった場合に予想される生存と比べて長引いた生存をも意味する。

10

【0017】

ACE2核酸分子の投与

一つの態様において、ACE2遺伝子の発現がACE2遺伝子またはその一部を含む核酸を投与することによって増大する。

【0018】

他の態様において、ACE2遺伝子の発現は、本明細書に開示したスクリーニングアッセイを用いて同定した薬剤を含む、ACE2遺伝子発現を増大させる薬剤を投与することによって増大させることができる。

【0019】

疾患、障害または異常な身体状態を患う動物はACE2のアップレギュレーションによって治療することができるので、ACE2発現を増大させる遺伝子療法は心臓または腎臓または肺の疾患の発生/進行を緩和するのに有用である。

20

【0020】

本発明は、低減したACE2発現またはACE2ポリペプチドの活性の低減したレベルを特徴とする疾患、障害または異常な身体状態の治療のためのACE2遺伝子療法を提供する方法および組成物を包含する。

【0021】

本発明は、動物の細胞でのACE2の発現が該細胞にACE2ポリペプチドの生物学的活性または表現型をもたらすように、ACE2をコードする核酸分子または機能的に同等の核酸分子を該細胞に提供する方法および組成物を包含する。該細胞にACE2ポリペプチドの生物学的活性または表現型をもたらされるように、十分な量の核酸分子を投与し、十分なレベルで発現させる。たとえば、該方法は、好ましくは、ACE2をコードするDNAを含むベクターを主体に投与することを含む、心血管または腎臓または肺の疾患を有する動物の細胞にACE2をコードする核酸分子を送達する方法を包含する。該方法はまた、ACE2をコードするDNAを投与することによって心血管または腎臓または肺の疾患を有する動物に生物学的に活性なACE2ポリペプチドをもたらす方法にも関する。該方法は、インビボまたはエクスピボ（たとえば、肺、心臓、内皮または腎臓の幹細胞、先祖細胞（progenitor cells）または他の細胞が移植細胞であってよい）で行うことができる。ACE2を単離細胞または動物に投与（遺伝子療法における場合を含む）する方法および組成物は、たとえば、米国特許第5,672,344号、同第5,645,829号、同第5,741,486号、同第5,656,465号、同第5,547,932号、同第5,529,774号、同第5,436,146号、同第5,399,346号、同第5,670,488号、同第5,240,84号、同第6,322,536号、同第6,306,830号および同第6,071,890号および米国特許出願第20010029040号（参照のためのその全体を本明細書中に引用する）に説明されている。

30

40

【0022】

本発明はまた、ACE2をコードするDNAを含む遺伝子療法に適したウイルスを産生することによる、組換えウイルスのストックを製造する方法にも関する。この方法は、好ましくは、ウイルス複製（該ウイルスは核酸分子を含む）を許容する細胞をトランスフェ

50

クションし、ついで産生したウイルスを回収することを含む。

【0023】

該方法および組成物はインビボまたはインビトロで用いることができる。本発明はまた組成物（好ましくは遺伝子療法のための医薬組成物）をも包含する。該組成物はACE2を含むベクターを含む。担体は、医薬担体またはベクターを含む宿主形質転換体であってよい。当該技術分野で知られたベクターとしては、これらに限られるものではないが、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ヘルペスウイルスベクター、たとえばワクシニアウイルスベクター、HIVおよびレンチウイルスベースのベクター、またはプラスミドが挙げられる。本発明はまた、ベクターを製造するのに必要なパッケージングおよびヘルパー細胞株をも包含する。ベクターを製造する方法および該ベクターを用いた遺伝子療法の方法もまた本発明に包含される。

10

【0024】

本発明はまた、該ベクターおよび組換えACE2核酸分子配列を含む形質転換細胞をも包含する。

【0025】

ACE2突然変異体の使用 - ポリペプチド配列の修飾

ACE2突然変異体を本発明の方法に用いることができる。化学的に同等かまたは類似のアミノ酸配列という結果となる変化は本発明の範囲に包含される。ACE2レセプターに対して配列同一性を有するポリペプチドは、本発明の方法に使用するのに適していることを確認すべく試験される。本発明のポリペプチドの突然変異体は、たとえば突然変異により天然でも存在するし、またはたとえば部位特異的突然変異誘発などのポリペプチド工学法（アミノ酸置換の技術分野でよく知られている）を用いて製造することもできる。たとえば、グリシンなどの疎水性アミノ酸残基を他の疎水性残基、たとえばアラニンで置換することができる。アラニン残基は、ロイシン、バリンまたはイソロイシンなどのさらに疎水性の残基で置換することができる。アスパラギン酸などの負に荷電したアミノ酸はグルタミン酸で置換することができる。リジンなどの正に荷電したアミノ酸はアルギニンなどの他の正に荷電したアミノ酸で置換することができる。

20

【0026】

それゆえ、本発明は、アミノ酸配列に保存的な変化または置換を有するポリペプチドを包含する。保存的な置換は、置換されたアミノ酸と同様の化学的性質の1またはそれ以上のアミノ酸を挿入する。本発明は、化合物の活性を損なわない保存的な置換がされている配列を包含する。

30

【0027】

1またはそれ以上のdアミノ酸を含むポリペプチドが本発明に包含される。1またはそれ以上のアミノ酸がN末端でアセチル化されているポリペプチドも本発明に包含される。当業者であれば、本発明の対応ポリペプチド化合物と同じかまたは類似の所望の化合物活性を有するが、溶解度、安定性、および/または加水分解およびタンパク質分解に対する感受性に関して該ポリペプチドよりも有利な活性を有するポリペプチドミメチックを構築するのに種々の技術を利用できることを認識するであろう。たとえば、MorganおよびGainor, Ann. Rep. Med. Chem., 24: 243-252 (1989)を参照。ポリペプチドミメチックの例は米国特許第5,643,873号に記載されている。ミメチックの製造および使用法を記載した他の特許としては、たとえば、米国特許第5,786,322号、同第5,767,075号、同第5,763,571号、同第5,753,226号、同第5,683,983号、同第5,677,280号、同第5,672,584号、同第5,668,110号、同第5,654,276号、同第5,643,873号が挙げられる。本発明のポリペプチドのミメチックはまた、当該技術分野で知られた他の方法に従っても製造することができる。たとえば、水素基をヒドロキシやアミノ基などの他の基に変化させることによって側鎖基を化学的に変える薬剤を用いて本発明のポリペプチドを処理することにより行うことができる。ミメチックは、すべてがアミノ酸からなる配列、またはアミノ酸と修飾アミノ酸または他の有機分子とを含むハイブリッドである配列を含んでいるのが好ましい。

40

50

【0028】

本発明はまた、たとえばヌクレオチド配列が第二の配列と組み合わされているハイブリッドおよびポリペプチドをも包含する。

【0029】

本発明はまた、ACE2のポリペプチド断片が活性を保持している場合に化合物に活性を付与するのに用いることのできる該断片の使用法をも包含する。本発明はまた、ポリペプチドまたはその活性を特徴付けるリサーチツールとして用いることのできる本発明のポリペプチドおよび該ポリペプチドの断片をも包含する。そのようなポリペプチドは少なくとも5つのアミノ酸からなるのが好ましい。好ましい態様において、そのようなポリペプチドは、6~10、11~15、16~25、26~50、51~75、76~100または101~250または250~500アミノ酸からなっていてよい。断片は、化合物の配列において1またはそれ以上のアミノ酸、たとえばC末端アミノ酸が除去された配列を含んでいてよい。

10

【0030】

ACE2ポリペプチド活性の促進

ACE2の活性は、選択的な部位特異的突然変異誘発を行うことにより増大または低減する。Pharmacia BiotechからのU.S.E.(Unique site elimination)突然変異誘発キットまたは市販の他の突然変異誘発キットを用い、またはPCRを用い、該核酸分子または配列同一性を有する核酸分子を含むDNAプラスミドまたは発現ベクターをこれら研究に用いるのが好ましい。突然変異が生成されDNA配列分析によって確認されたら、突然変異体ポリペプチドを発現系を用いて発現させ、その活性をモニターする。

20

【0031】

本発明はまた、ヒトまたはマウスACE2(またはその部分配列)に対して少なくとも約20%、>25%、>28%、>30%、>35%、>40%、>50%、>60%、>70%、>80%または>90%、さらに好ましくは少なくとも約>95%、>99%または>99.5%の配列同一性を有するポリペプチドの使用法をも包含する。修飾したポリペプチド分子は以下で検討する。好ましくは約1、2、3、4、5、6~10、10~25、26~50または51~100または101~250のヌクレオチドまたはアミノ酸が修飾される。

【0032】

同一性は当該技術分野で知られた方法に従って計算する。配列同一性は、BLAST version 2.1プログラムアドバンストサーチ(上記のパラメーター)により評価するのが最も好ましい。BLASTは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>でオンラインで利用できる一連のプログラムである。アドバンストBLASTサーチ(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi?Jform=1>)はデフォルトでパラメーターを選択するようにセッティングされている。(すなわち、Matrix BLOSUM62; Gap existence cost 11; Per residue gap cost 1; Lambda ratio 0.85 default)。

30

【0033】

BLASTサーチに関する参照文献は以下のとおりである: Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215: 403-410; Gish, W. & States, D.J. (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search." Nature Genet. 3: 266-272; Madden, T.L., Tatusov, R.L. & Zhang, J. (1996) "Applications of network BLAST server" Meth. Enzymol. 266: 131-141; Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation." Genome Res. 7: 649-656.

40

【0034】

50

好ましくは約 1、2、3、4、5、6 ~ 10、10 ~ 25、26 ~ 50 または 51 ~ 100 または 101 ~ 250 のヌクレオチドまたはアミノ酸が修飾される。本発明は、活性の付与に關与しないポリペプチドの部分でのアミノ酸変化か、またはポリペプチドの活性を増大または低減させるべく活性の付与に關与するポリペプチドの部分でのアミノ酸変化を引き起こす突然変異を有するポリペプチドを包含する。

【0035】

A C E 2 アクチベーターのスクリーニング

A C E 2 の発現または活性を増大させるか否かを決定すべく小さな有機分子をスクリーニングする。A C E 2 のポリペプチド断片並びに A C E 2 との配列同一性を有するポリペプチドもまた、インビトロアッセイおよび細胞株でのインビボで A C E 2 活性を増大させるか否かを決定すべく試験する。アクチベーターは、A C E 2 の特異的ドメインに向けられて A C E 2 活性化を増大させるのが好ましい。特異性を達成するため、アクチベーターは A C E 2 の独特の配列を標的とすべきである。

10

【0036】

本発明はまた、A C E 2 発現を増大させる物質の単離をも包含する。とりわけ、A C E 2 遺伝子またはタンパク質に結合することのできるリガンドまたは物質を単離することができる。生物学的試料および市販のライブラリーを、A C E 2 遺伝子またはタンパク質に結合するタンパク質などの物質について試験することができる。たとえば、A C E 2 タンパク質のアミノ酸配列を用いてペプチドライブラリーをプロービングすることができ、一方、A C E 2 をコードする核酸配列を用いて核酸ライブラリーをプロービングすることができる。さらに、A C E 2 に対して調製した抗体を用いて A C E 2 への親和性を有する他のペプチドを単離することができる。たとえば、標識抗体を用いてファージディスプレイライブラリーまたは生物学的試料をプロービングすることができる。

20

【0037】

ある物質と A C E 2 遺伝子またはタンパク質との複合体の生成を可能にする条件は、該物質および A C E 2 遺伝子またはタンパク質の性質および量などの因子を考慮したうえで選択することができる。物質 - タンパク質または物質 - 遺伝子複合体、遊離の物質または複合体を生成していない物質の単離は、通常の単離法、たとえば、塩析、クロマトグラフィー、電気泳動、ゲル濾過、分画、吸着、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、凝集、またはそれらの組み合わせにより行うことができる。成分のアッセイを容易にするため、A C E 2 または該物質に対する抗体、または標識タンパク質、または標識物質を用いることができる。抗体、タンパク質、または物質は、以下に記載する検出可能な物質を用い、適切に標識することができる。

30

【0038】

潜在的な結合パートナーが単離されたら、A C E 2 遺伝子またはタンパク質に結合する物質が A C E 2 発現を促進させるための本発明の方法において有用であるか否か、従って疾患の治療に有用であるか否かを決定するため、スクリーニング法をデザインすることができる。

【0039】

それゆえ、本発明は、A C E 2 遺伝子またはタンパク質に結合することのできる物質を同定するための方法をも提供する。とりわけ、該方法は、A C E 2 に結合することができ、A C E 2 の発現を増大または促進することのできる物質を同定するのに用いることができる。従って、本発明は、A C E 2 遺伝子またはタンパク質に結合する物質の同定方法であって、下記工程：

40

(a) 好ましくは固定化した A C E 2 遺伝子またはタンパク質を被験物質と複合体の生成を可能とする条件下で反応させ、ついで

(b) 複合体、遊離の物質、および複合体を生成していない遺伝子またはタンパク質についてアッセイする

を含む方法を提供する。

【0040】

50

タンパク質 - タンパク質相互作用を検出するいかなるアッセイ系または試験方法をも用いることができ、これには同時免疫沈降 (co-immunoprecipitation)、架橋および勾配またはクロマトグラフィーカラムによる同時精製 (co-purification) が含まれる。さらに、X線結晶解析法を物質および分子との相互作用を評価する手段として用いることができる。たとえば、本発明の複合体中の精製した組換え分子は、適当な形状に結晶化させたときにX線結晶解析による分子内相互作用の検出に供することができる。分光法もまた相互作用の検出に用いることができ、とりわけQ - T O F装置を用いることができる。生物学的試料および市販のライブラリーをACE2結合性ペプチドについて試験することができる。さらに、ACE2に対して調製した抗体を用いてACE2結合親和性を有する他のペプチドを単離することができる。たとえば、標識抗体を用いてファージディスプレイライブラリーまたは生物学的試料をプロービングすることができる。この観点から生物学的発現系を用いてペプチドを開発することができる。これら系の使用は、ランダムペプチド配列の大きなライブラリーの作製および特定のタンパク質に結合するペプチド配列についてのこれらライブラリーのスクリーニングを可能にする。ライブラリーの作製は、ランダムなペプチド配列をコードする合成DNAを適当な発現ベクター中にクローニングすることにより行うことができる (Christianら、1992, J. Mol. Biol. 227: 711; Devlinら、1990 Science 249: 404; Cwirlaら、1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378を参照)。ライブラリーはまた重複するペプチドの同時合成によっても構築することができる (米国特許第4,708,871号を参照)。アクチベーターを高血圧症、心臓または腎臓疾患の動物モデルで試験する。

10

20

【0041】

一つの態様において、本発明は、ACE2発現または活性を活性化する能力について決定しようとする少なくとも1の化合物の存在下で細胞 (好ましくは腎臓または心臓細胞) を培養し、その後、ACE2発現および/または活性のレベルの増大について該細胞をモニターすることにより、ある候補化合物がACE2発現または活性を増大させることができるか否かを評価するアッセイを包含する。増大したACE2発現および/または活性は、該候補化合物が心臓または腎臓疾患または高血圧症の治療に有用であることを示している。

【0042】

同様のスクリーニングアッセイを心臓疾患または腎臓疾患の罹患傾向のある当該技術分野で知られた哺乳動物で行うことができる。候補化合物を該哺乳動物に投与し、ACE2発現および/または活性を測定する。増大したACE2発現および/または活性は、該候補化合物が心臓および/または腎臓疾患の治療に有用であることを示している。

30

【0043】

ある候補化合物がACE2の活性を増大させる (そして心血管疾患および/または腎臓疾患および/または肺、および/または高血圧症を治療するのに有用である) か否かを決定する方法はまた、下記工程:

(a) (i) ACE2、ACE2の断片または両者のいずれかの誘導体を(ii) ACE2基質と、候補化合物の存在下で接触させ、ついで

(b) 該基質でのACE2活性が増大され、それによって該化合物がACE2の活性を増大させることを示すか否かを決定する

40

をも含んでよい。増大したACE2活性は、該化合物が本明細書に列記した心臓疾患または腎臓疾患または高血圧症の治療に有用であることを示している。ACE2活性の増大の決定は、該化合物がACE2のタンパク質分解活性を増大させる (基質の加水分解を増大させる) か否かを決定することを含むのが好ましい。本発明の一つの態様において、本発明のアッセイは、候補化合物がナトリウム - ハロゲン塩またはカリウム - ハロゲン塩ではないことおよびアッセイがイオン濃度の増大がACE2タンパク質加水分解に及ぼす影響を測定することに向けられないこと、を条件とする。ACE2基質としては、Ang I、Ang II、des - Ang、Ang II、アペリン - 13、ダイノルフィン13、ベータ - カソモルフィンおよびニューロテンシンが挙げられる。

50

【 0 0 4 4 】

A C E 2 の製造法は C A 2 , 3 7 2 , 3 8 7 号に記載されている。A C E 2 活性化のインビトロアッセイの一例は、Vickersら、Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. J. Biol. Chem. 2002, 277(17): 14838に示されている。他のアッセイ（並びに上記アッセイの改変したものは、本明細書の記載および米国特許第 5, 8 5 1, 7 8 8 号、同第 5, 7 3 6, 3 3 7 号および同第 5, 7 6 7, 0 7 5 号（その全体を参照のため本明細書中に引用する）などに記載された技術から明らかであろう。

【 0 0 4 5 】

ノックアウト哺乳動物

マウス A C E 2 のクローニングおよび A C E 2 ノックアウトマウスの生成の実際の例は下記実施例に記載してある。「ノックアウト」なる語は、哺乳動物の単一の細胞、選択した細胞、またはすべての細胞の A C E 2 遺伝子によってコードされたポリペプチドの少なくとも一部の発現の部分的または完全な低減をいう。該哺乳動物は、内生遺伝子の一方の対立遺伝子が破壊され他方の対立遺伝子がおお存在している「ヘテロ接合性ノックアウト」であってよい。X 染色体上の A C E 2 において、雌はヘテロ接合性であってよい。雄では唯一つの対立遺伝子があるのみであり、雄はホモ接合性である。あるいは、該哺乳動物は、内生遺伝子の両対立遺伝子が破壊された「ホモ接合性ノックアウト」であってよい。

10

【 0 0 4 6 】

「ノックアウト構築物」とは、哺乳動物の 1 またはそれ以上の細胞において内生遺伝子によってコードされたポリペプチドの発現を低減または抑制すべくデザインしたヌクレオチド配列をいう。ノックアウト構築物として用いるヌクレオチド配列は、典型的に、(1) 抑制されるべき内生遺伝子のある部分（1 またはそれ以上のエクソン配列、イントロン配列、および / またはプロモーター配列）からの D N A、および (2) 細胞中のノックアウト構築物の存在を検出するのに用いるマーカー配列からなる。ノックアウト構築物を、ノックアウトしようとする内生遺伝子を含む細胞に挿入する。ついで、ノックアウト構築物は内生 A C E 2 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子内に組み込まれ、そのような A C E 2 ノックアウト構築物の組み込みは完全長の内生 A C E 2 遺伝子の転写を妨害または中断させることができる。細胞の染色体 D N A 中への A C E 2 ノックアウト構築物の組み込みは、典型的には相同的組換えによって達成される（すなわち、ノックアウト構築物を細胞中に挿入したときに、内生の A C E 2 D N A 配列に相同なまたは相補的な A C E 2 ノックアウト構築物の領域が互いにハイブリダイズすることができる；ついで、これら領域はノックアウト構築物が内生 D N A の対応位置に組み込まれるように組換えられる）。

20

30

【 0 0 4 7 】

典型的には、ノックアウト構築物は胚性幹細胞（E S 細胞）と称する未分化の細胞に挿入する。E S 細胞は、通常、以下で検討するように、それを導入することのできる発生胚と同じ種の胚または胚盤胞からのものである。

【 0 0 4 8 】

「遺伝子の破壊」、「遺伝子破壊」、「発現の抑制」および「遺伝子抑制」は、細胞での完全長 A C E 2 分子の発現を低減または妨害するための、内生 A C E 2 遺伝子のコード領域（通常、1 またはそれ以上のエクソンを含む）および / または該遺伝子のプロモーター領域の相同領域への A C E 2 ヌクレオチド配列ノックアウト構築物の挿入をいう。挿入は、通常、相同的組換えによって行われる。例として、抗生物質耐性遺伝子を含むヌクレオチド配列を、破壊すべき A C E 2 をコードする単離ヌクレオチド配列の一部に挿入することによってヌクレオチド配列ノックアウト構築物を調製することができる。ついで、このノックアウト構築物が胚性幹細胞（「E S 細胞」）に挿入されたら、該構築物は少なくとも 1 の A C E 2 対立遺伝子のゲノム D N A 中に組み込まれることができる。かくして、A C E 2 の内生コード領域の少なくとも一部が今や抗生物質耐性遺伝子によって破壊されているので、該細胞の多くの子孫は少なくとも幾つかの細胞においてもはや A C E 2 を発現しないか、または低減したレベルで、および / または末端切断された形態で A C E 2 を

40

50

発現するであろう。

【0049】

「マーカー配列」とは、(1) ACE2の発現を破壊するためのより大きなヌクレオチド配列構築物(すなわち、「ロックアウト構築物」)の一部として用いられ、(2)染色体DNA中にACE2ロックアウト構築物が組み込まれた細胞を同定する手段として用いられる、ヌクレオチド配列をいう。マーカー配列はこれら目的を達成できる限りいかなる配列であってもよいが、典型的には抗生物質耐性遺伝子や天然では細胞中に認められないアッセイしうる酵素などの細胞に検出可能な特性を付与するタンパク質をコードする配列であろう。マーカー配列はまた、典型的に、その配列を制御する同種または異種のプロモーターをも含んでいるであろう。

10

【0050】

本発明の範囲には、一方または両方のACE2対立遺伝子、並びに他の遺伝子の一方または両方の対立遺伝子がロックアウトされた哺乳動物が包含される。そのような哺乳動物は、ACE2ロックアウト哺乳動物を生成するための本明細書に記載した手順を繰り返すが他の遺伝子を用いることにより、またはACE2の一方または両方の対立遺伝子をロックアウトした哺乳動物と、第二の遺伝子の一方または両方の対立遺伝子をロックアウトした哺乳動物との2つの哺乳動物を互いに飼育し、二重のロックアウト遺伝子型(二重のヘテロ接合性または二重のホモ接合性ロックアウト遺伝子型、またはそれらの突然変異体)を有する子孫をスクリーニングすることによって得ることができる。

【0051】

他のロックアウト動物および細胞も同様の方法を用いて作製することができる。

20

【0052】

医薬組成物

ACE2発現および活性のアクチベーターは、医薬組成物において担体などの他の成分と組み合わせるのが好ましい。これら組成物は、動物、好ましくはヒトに、心臓疾患、腎臓疾患または高血圧症を予防または治療するために可溶性の形態で投与することができる。心臓疾患としては、慢性心不全、左心室肥大、急性心不全、心筋梗塞、および心筋症が挙げられる。腎臓疾患としては腎不全が挙げられる。ACE2アクチベーターは、血圧および動脈の高血圧を制御するのに有用である。正常血圧は、85 mmHg未満の拡張血圧を有する。高い正常血圧は、85 ~ 89 mmHgの拡張血圧を有する。穏やかな高血圧症は90 ~ 104 mmHgの拡張血圧に対応する。中程度の高血圧症は105 ~ 114 mmHgの拡張血圧に対応する。重篤な高血圧症は115 mmHgよりも高い拡張血圧を有する。異常な血圧はまた、収縮血圧からも決定される(拡張血圧が90 mmHg未満である場合に)。正常血圧は、140 mmHg未満の収縮血圧を有する。境界領域の収縮性高血圧症は、140 ~ 159 mmHgの収縮血圧を示す。散発的な(isolated)収縮性高血圧症は160 mmHgよりも高い収縮血圧を有する(Cecil: Essentials of Medicine、第3版、Andreoliら、W.B. Saunders Company (1993))。高血圧症は、年齢18歳以上の成人において、少なくとも2回の来診で2回またはそれ以上の血圧の測定の平均値が90 mmHgよりも高い拡張血圧または140 mmHgの収縮血圧であるときに診断される。子供や妊婦はより低い血圧を有するので、120/80(すなわち、120 mmHgの収縮血圧/80 mmHgの拡張血圧)を超える血圧は高血圧症であることを示す。

30

40

【0053】

医薬組成物はヒトまたは動物に、局所投与、経口投与、エアゾル投与、気管内点滴注入、腹腔内注射、および静注を含む(これらに限られるものではない)種々の方法により投与することができる。投与すべき投与量は、患者の必要性、所望とする効果および選択した投与経路による。ポリペプチドはリポソームなどの(これに限られるものではない)インピボ送達ビヒクルを用いて細胞に導入することができる。

【0054】

医薬組成物は、有効量の核酸分子またはポリペプチドが薬理的に許容しうるビヒクルと混合物中で組み合わせられるように、患者に投与することのできる薬理的に許容しうる

50

組成物の調製のための公知の方法により調製することができる。適当なビヒクルは、たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, イーストン、ペンシルベニア、米国) に記載されている。

【0055】

この観点から、医薬組成物は核酸分子やポリペプチドなどの活性化合物または物質を1またはそれ以上の薬理的に許容しうるビヒクルまたは希釈剤とともに含んでいてよく、適当なpHおよび生理学的流体と等張な緩衝溶液中に含まれていてよい。活性分子をビヒクルと組み合わせる方法または活性分子を希釈剤と組み合わせる方法は当業者によく知られている。医薬組成物は活性化合物を組織内の特定の部位に輸送するための標的剤を含んでいてよい。

10

【0056】

A C E 2 の異種過剰発現

発現ベクターは高レベルのA C E 2 発現をもたらすのに有用である。本発明の核酸分子で形質転換した細胞培養液は、とりわけA C E 2 低減状態の研究のためのリサーチツールとして有用である。本発明は、A C E 2 を通常生産している心臓細胞および腎臓細胞好ましくは内皮細胞に選択的なベクターを包含する。本発明はまた、これらベクターを含むトランスフェクションした細胞をも包含する。心臓細胞および腎臓細胞のためのベクターの例は、たとえば、Rosengartら、米国特許第6,322,536号; Marchら、米国特許第6,224,584号; Hammondら、米国特許第6,174,871号; Wolfgang-M. Franzら、Analysis of tissue-specific gene delivery by recombinant adenoviruses containing cardiac-specific promoters. Cardiovascular Research 35(1997) 560-566; Rothmann T.ら、Heart muscle-specific gene expression using replication defective recombinant adovirus. Gene Ther. 1996 Oct. 3(10): 919-26; Phillips M.ら、Vigilant vector: heart-specific promoter in an adeno-associated virus vector for cardioprotection. Hypertension 2002, Feb. 39(2Pt2): 651-5; Herold BCら、Herpes simplex virus as a model vector system for gene therapy in renal disease. Kidney Int. 2002 Jan. 61 Suppl. 1: 3-8; Figlin RAら、Technology evaluation: interleukin-2 gene therapy for the treatment of renal cell carcinoma. Curr. Opin. Mol. Ther. 1999 Apr. 1(2): 271-8; Varda-Bloom N.ら、Tissue-specific gene therapy directed to tumor angiogenesis. Gene Ther. 2001 Jun. 8(11): 819-27; Scott-Taylor TH.ら、Adenovirus facilitated infection of human cells with ecotropic retrovirus. Gene Ther. 1998 May, 5(5): 621-9; Langer JC.ら、Adeno-associated virus gene transfer into renal cells: potential for in vivo gene delivery. Exp. Nephrol. 1998 May-Jun, 6(3): 189-94; Lien YH.ら、Gene therapy for renal diseases. Kidney Int. Suppl. 1997 Oct. 61: S85-8; およびOhno K.ら、Cell-specific targeting of Sindbis virus vectors displaying IgG-binding domains of protein A. Nat. Biotechnol. 1997 Aug. 15(8): 763-7 に記載されている。

20

30

【0057】

細胞培養、好ましくは心臓および腎臓細胞培養および内皮細胞培養を、当該技術分野で知られた多くの方法に従って過剰発現および研究に用いる。たとえば、細胞株(不死化した細胞培養かまたは初代細胞培養のいずれか)をA C E 2 核酸分子(または配列同一性を有する分子)を含むベクターでトランスフェクションして核酸分子の発現および核酸分子およびポリペプチドの活性のレベルを測定する。これら細胞はまた、該ポリペプチドに結合し活性化する化合物を同定するのにも有用である。

40

【0058】

A C E 2 活性および/または発現を測定する診断キット

A C E 2 発現または活性の測定はまた、(i)心臓または腎臓の疾患、肺疾患および/または高血圧症の診断、(ii)そのような疾患の発症前の疾患を発症するリスクにある患者の同定、(iii)冠状動脈疾患、慢性心不全などの心臓疾患、または腎臓疾患および/または高血圧症および/または肺障害を有する患者での治療応答の測定、および(iv)そ

50

のようなリスクにある患者での介入的疾患予防戦略の成功の測定、にも用いる。本発明は、下記工程：(a)動物から回収した検体から心臓または腎臓または肺の試料を調製し、(b)該試料中のACE2の存在について試験し、ついで(c)試料中のACE2の存在またはレベルを動物での心臓または腎臓または肺疾患などの疾患の存在(またはリスク)と関連させることを含む、動物でのACE2のレベルを評価する方法を包含する。正常未満のACE2レベルまたは低いACE2活性は疾患の存在またはリスクを示す。

【0059】

ACE2単一ヌクレオチド多型に基づく診断キット

本発明はまた、低減したヒトACE2発現がACE2遺伝子発現を制御する多型の結果であることをも示す。ラットでのQTLマッピングは、低減したACE2のレベルと高血圧症および心血管疾患および腎臓疾患との間に100%の相関関係があることを示している。以下に記載する多型のいずれもACE2コード領域には見出されていない。すべてACE2コード領域の上流または下流に存在する。これら多型あるいは心血管疾患、腎臓疾患、肺疾患および高血圧症におけるこれら多型の役割はこれまで知られていなかった。特定のSNPハプロタイプは疾患のリスクの増大と関係している。このハプロタイプは、疾患のリスクの評価のため、および適当な医療処置の決定のために重要な診断ツールである。

【0060】

これら多型は以下のとおりである：

【表1】

SNP名	SNPの表示	アフリカ系			参照
		アメリカ人	アジア人	カフカス人	
ACE2a rs879922	C(C/G)	60	100	70	C
ACE2b rs757066	T(C/T)	100	100	70	T
ACE2c rs714205	C(C/G)	70	50	80	C
ACE2d rs329442	C(A/C)	50	90	90	A/C
ACE2e rs233574	C(C/T)	80	100	60	C
ACE2f rs1978124	C(C/T)	90	100	50	C
ACE2g rs1514282	A(A/G)	70	100	100	A
ACE2h	A(A/G)	20	50	30	A

【表2】

rs1514282-2 ACE2i	A(A/G)	70	100	100	A
rs1514281 ACE2j	A(A/G)	20	50	50	A
rs1514281-2 ACE2k	A(A/G)	検出されず	100	70	A
rs1514279 ACEl	C(C/T)	80	100	80	C
2 rs1514280 ACE2m rs233575	C(C/T)	100	100	50	C

【0061】

上記および図11に記載したACE2遺伝子発現を制御する多型のヌクレオチド番号は、当業者が容易に決定することができる。

【0062】

図表は、該図表中の3つの各集団(アフリカ系アメリカ人、カフカス人、アジア人)で参照塩基が見出されるパーセントを示す。たとえば、SNP rs233574では予測

10

20

30

40

50

されたSNPはC/Tであり、参照ピークはCである。この場合、アフリカ系アメリカ人の対立遺伝子頻度は80% C；アジア人の対立遺伝子頻度は100% C（換言すると、単一形態のマーカー）；およびカフカス人の対立遺伝子頻度は60% Cである。

【0063】

本発明は、動物の遺伝子型の決定、すなわち、あるヒトがこれら多型の一つまたは他方についてホモ接合性であるかあるいはこれら多型についてヘテロ接合性であるか否か、敷衍すればあるヒトの表現型の決定に用いることのできるポリヌクレオチドプローブを提供する。表現型は、そのヒトの細胞でのACE2発現の量を示す。さらに、本発明は、そのような遺伝子型および表現型の決定にそのようなポリヌクレオチドを使用する方法を提供する。本発明のオリゴヌクレオチドは、当該技術分野で知られた方法（たとえば、米国特許第5,792,851号および同第5,851,788号を参照）に従って核酸分子を検出するためのプローブとして用いることができる。

10

【0064】

たとえば、本発明のポリヌクレオチドは、その末端をジゴキシゲニン-11-デオキシウリジン三リン酸を用いて標識することによりプローブに変換することができる。そのようなプローブは、アルカリホスファターゼをコンジュゲートしたポリクローマルヒツジ抗ジゴキシゲニンF(ab)フラグメントおよびニトロブルーテトラゾリウムを発色性基質としての5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸とともに用いて免疫学的に検出することができる。

【0065】

それゆえ、本発明の一つの側面によれば、ACEの上流または下流配列の一部に選択的にハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブが提供される。プローブは、特定の多型を識別するため、一つのACE2多型にはストリンジェントな条件下でハイブリダイズするが他の多型にはハイブリダイズしないようにデザインすることができる。

20

【0066】

本発明の多型特異的なポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブは、たとえば、ゲノムDNAまたは合成DNAを含んでよい。そのようなオリゴヌクレオチドプローブは自動合成により合成することができ、約10~30塩基を含んでいるのが好ましいが、オリゴヌクレオチドプローブハイブリダイゼーションアッセイの技術分野で理解されるように、標的との潜在的なミスマッチが生じるプローブ内での位置、プローブ上の標識がハイブリダイゼーションを妨害する程度、およびプローブと標的とのハイブリダイゼーションを行う物理的条件（たとえば、温度、pH、イオン強度）に依存して、わずか8のヌクレオチドも約50もの多くのヌクレオチドも有用でありうる。常法に従えば、本発明によるポリヌクレオチドプローブのデザインは、ハイブリダイゼーション条件（温度、イオン強度、暴露時間）に適合させるが多型特異性は確保すべくプローブの長さを調節することを含むのが好ましい。

30

【0067】

本発明の他の側面によれば、下記：

- (a) ACE2の5'または3'領域の少なくとも一部を含む核酸を増幅させる手段、ここで該一部はACE2 a~ACE2 mの一つに対応するヌクレオチドを含む、および
- (b) 一つのACE2多型を他の多型から識別する本発明のポリヌクレオチドプローブを含む遺伝子型決定のための試験キットが提供される。

40

【0068】

「増幅させる手段」は、当業者であれば容易に理解できるように、使用した増幅法に依存する。それゆえ、これら手段は、もしも増幅がPCR法によって行われるのであれば、適当なプライマー、適当なDNAポリメラーゼ、および4種の2'-デオキシリボヌクレオチド三リン酸(dA、dC、dG、dT)を含んでよい。他の例を挙げると、増幅を3SR法などの転写に基づく方法によって行うのであれば、これら手段は、2つのプライマー（そのうち少なくとも一方は二本鎖となったときにプロモーターを提供する）、該プロモーターから転写することのできるRNAポリメラーゼ、プライマーにより開始され

50

DNA指向 (DNA-directed) およびRNA指向 (RNA-directed) のDNA重合において、およびおそらくRNA/RNAハイブリッドからDNA鎖を遊離させるRNAのRNAse H分解において機能する逆転写酵素、4種のリボヌクレオシド三リン酸 (A、C、GおよびU)、および4種の2'-デオキシリボヌクレオシド三リン酸を含んでいるであろう。他の例として、増幅をLCRにより行うのであれば、これら手段は、2つのオリゴヌクレオチド、および標的 (該標的にはこれら両オリゴヌクレオチドがライゲート可能な方向にて互いに隣接してハイブリダイズすることができる) が存在する場合にこれら2つのオリゴヌクレオチドを連結する適当なDNAリガーゼを含んでいるであろう。

【0069】

本発明のオリゴヌクレオチドプローブは標識するのが好ましいであろう。標的は、そのようなプローブの技術分野で利用できる種々の標識のいずれであってもよく、³²P; ³⁵S; ビオチン (これにアビジンと結合したまたは複合体を形成したシグナル生成残基を複合させることができる); 蛍光残基; アルカリホスファターゼ (発色性反応を触媒することができる) などの酵素; 上記に記載したジゴキシゲニンなどが含まれるが、これらに限られるものではない。

【0070】

RFLP分析、電気泳動SSCP分析またはシーケンシング分析もまたACE2多型の検出に用いることができる。

【0071】

本発明の他の側面によれば、動物に由来するACE2核酸中のACE2多型特異的な標的配列の遺伝子型を決定する (typing) 方法であって、下記工程:

(a) 心臓または腎臓からのDNAに適用した標的核酸増幅法により、ACE2の上流または下流領域の部分配列 (subsequence) (または部分配列の相補鎖) である配列を有するアッセイ可能な量の増幅した核酸を得、ここで該部分配列はACE2多型が存在するかもしれないヌクレオチドを含んでおり、ついで

(b) 工程(a)で得た増幅核酸を分析して (たとえば、本発明によるポリヌクレオチドプローブを用いた核酸プローブハイブリダイゼーションアッセイにて) 多型の位置にある1またはそれ以上の塩基を決定する

を含む方法もまた提供される。

【0072】

本発明の遺伝子型決定法の一つの応用において、これら方法は、ある個体に適用して該個体が心臓または腎臓疾患を発症するリスクにあるか否かを決定する。

【0073】

冠状動脈疾患を有しおよび/またはその後のバイパス手術を受けた患者は心臓の低酸素症を有する。それはまた、心性気絶 (cardiac stunning) または心性冬眠 (cardiac hibernation) としても知られる。これら患者では心臓の構造上の変化は殆どみられないが心臓の機能は低下している。構造上の変化なしに心臓の機能が変化することは非常にまれなことである。心性気絶または低酸素症のマウスモデルでは、動物はACE2マウスの表現型と正確に似通った表現型を有する。さらに、本発明者らは低酸素症のマーカーがACE2欠失マウスで誘発されることを示した。総合すると、本発明者らのデータは、これらマウスが慢性低酸素症のために心臓機能が低下しており、それゆえ冠状動脈疾患のモデルであることを示している。それゆえ、ヒトにおいてこの状態を診断するため、多型および/または低減したACE2発現または活性を用いることができる。他の例は、拡張型心筋症を有する患者の心臓の機能が該疾患の発症がACE2多型と関係することを示すか否かを試験することである。ACE2発現および活性の増大を該状態を治療するために用いることができる。

【0074】

RASの負のレギュレーターとしてのACE2の特徴付け

ACE2は高血圧の3つのラットモデルにおいて高血圧症と関係するQTLにマッピングされ、ACE2レベルはこれら高血圧症ラット株のすべてにおいて低減される。マウス

10

20

30

40

50

では相位的組換えを用いたACE2の遺伝子不活化は、組織中のAngIIペプチドレベルの増大、心臓での低酸素症遺伝子のアップレギュレーション、および重篤な心臓の機能不全という結果となる。

【0075】

ace2欠失背景でのACE発現の除去(ablation)は、ace2単一ノックアウトマウスの心不全表現型を完全に排除した。これらデータはRASの制御のための新たなパラダイムを提供するものであり、ACE2を心臓機能を制御するRASの負のレギュレーターとして同定するものである。

【0076】

ACE2および血圧の制御

大抵の心血管疾患は、遺伝的因子および環境因子の両者によって制御される多因性の定量的形質である。心血管疾患の一つの主たる因子はRASである。遍在的に発現されるACEとは対照的に、最近同定されたACE2は組織特異的な発現を示す。ACE2は、そのAngI基質に対してACEと競合することにより、および/またはAngIIを開裂してAng1-7を生成することにより、内生のAngIIレベルを制御している。本発明の前には心血管系におけるACE2のインビボの役割については何も知られていなかった。ACE2はAngIIの内生レベルを制御している。ACE2はまたRASの負のレギュレーターとしても機能している。

【0077】

自発的なまたは食餌により誘発した高血圧症および心血管疾患を発症している3つの異なるラット株において、ACE2はX染色体上の定められたQTL内にマッピングされる。これら高血圧症に対して罹患性のラット株のすべてにおいて、ACE2 mRNAおよびタンパク質のレベルはダウンレギュレーションされていた。SabraラットでのQTL分析において同定されたSS-X遺伝子座はまた、塩負荷(salt loading)に対して耐性を付与する遺伝子座としても同定された。塩感受性株におけるACE2の低減および耐性株におけるその発現の変化がないことは、ACE2が食餌誘発による血圧の変化に対して耐性を付与することを示している。

【0078】

その地図上の位置および低減した発現は、ACE2がX染色体上の高血圧性QTLに寄与する遺伝子であることを示している。さらに、ace2ヌルマウスにおけるAngIおよびAngIIの増大した発現は、ACE2がインビボでのRAS系のレギュレーターであることを確認している。しかしながら、本発明者らのマウスでのACE2の喪失は、ACE機能を阻止した場合でも血圧の直接的な変化という結果とはならなかった。血圧の変化は、老齢の雄マウスに極度の心臓機能不全が存在する場合にみ生じた。高血圧症に寄与する遺伝的因子は、それ自体では血圧を変化させることはない。むしろ、これらQTLは、それが他の遺伝的多型と協調して血圧の変化を促進するような血圧の単一の決定因子を定めるものである。本発明者らはヒトの集団においてACE2多型と高血圧との関係を同定した。重要なことには、本発明者らのデータはACE2が高くなった血圧の負のレギュレーターとして機能することを示している。

【0079】

ACE2および心臓機能の制御

予期しないことに、マウスでのACE2の喪失は、老齢マウスにおいて全身血圧の重篤な低下に導く重度の収縮機能不全という結果となる。重要なことに、この心臓機能不全はACEの破壊によって完全に元に戻り、ACEの触媒産物がACE2の不在下での収縮障害を駆動することが示唆される。これら収縮性欠陥は肥大または血圧の検出しうる変化の不在下でも生じうるので、本発明者らのデータはまた、RAS制御された心臓疾患表現型が血圧および心臓肥大に対するその影響とは遺伝的に切り離しうるという遺伝的な証拠をも提供するものである。

【0080】

ACE阻害剤およびAngIIレセプターブロッカーはヒトの心不全において心臓保護

10

20

30

40

50

の役割を有することが示されており、それゆえ Ang II は心臓疾患に關与している。本発明者らの ace / ace 2 二重突然変異マウスでの心臓機能不全の完全な排除は、RAS が心臓機能を直接制御していること、および ACE 2 は RAS および心不全と拮抗する重要な負のレギュレーターであることを示している。本発明者らの遺伝的救済実験は、心不全を駆動するのは実際に ACE の産物であること、すなわち ace 2 マウスでの心臓で認められる Ang II の増大が心臓機能不全の原因であることを強く示している。Ang II レセプターの薬理的な抑制が ace 2 突然変異体マウスの心臓表現型を救済するの否かは決定する必要がある。興味深いことに、ハエにおける本発明者らの結果は、ACE ホモログである ACE R と関連した P 因子突然変異が心臓形態形成の重篤かつ致死的な欠陥という結果となる（データは示していない）ことを示しており、これは心臓での ACE / ACE 2 機能が進化の過程で保存されてきたことを示している。

10

【0081】

ace 2 突然変異体心臓での欠陥は、重篤な収縮性機能不全および低酸素症により制御された遺伝子のアップレギュレーション（老齢マウスではわずかなりモデリングのみ）、肥大がないこと、筋細胞喪失の徴候のないことを特徴とする。これらの ace 2 突然変異体マウスでの機能障害の（failing）心臓の表現型および分子パラメーターは、肥大および拡張性心筋炎とは異なるものである。むしろ、興味をそそられることには、ace 2 突然変異体心臓は、ヒトの冠状動脈疾患の症例およびバイパス手術の症例で認められる心性気絶および冬眠に似ている。これらヒトの疾患および心性気絶 / 冬眠の動物モデルでは、慢性の低酸素状態が筋細胞代謝の補償的な変化、低酸素症誘発性遺伝子のアップレギュレーション、および心臓機能の低減に導く。ACE 2 は血管の内皮で発現され心筋細胞では発現されないため、ACE 2 の作用は脈管系に限定されていそうである。たとえば、Ang II の局所的な増大は血管収縮に導き、低灌流（hypoperfusion）および低酸素症という結果となる。Ang II はまた、酸化ストレスの誘発により内皮の機能不全を引き起こすことが示されている。ACE 2 の喪失が低酸素症誘発性遺伝子のアップレギュレーションという結果となりうるメカニズムは決定される必要がある。重要なことに、本発明者らのデータは ACE 2 の多型がヒトにおいて冠状心疾患の病理を引き起こすことを示している。

20

【0082】

実施例

30

ACE 2 は3つの高血圧症ラット株においてX染色体上のQTLにマッピングされる

高血圧症および大抵の心血管疾患は性質が多因子性であり、疾患の病因は複数の罹病性遺伝子座の影響を受ける。種々の組換えラットモデルにおいて、高血圧症の複数の QTL が同定されている。ACE 2 がヒトの X 染色体上にマッピングされること、および高血圧症の幾つかのラットモデルにおいて QTL が X 染色体上にマッピングされ、これには未だに候補遺伝子が割り当てられていないことから、ACE 2 がこの QTL の候補遺伝子でありうる。ラット ACE 2 の染色体マッピングを容易にするため、ラット腎臓 cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより完全長のラット ACE 2 cDNA をクローニングした。ラット ACE 2 はヒト ACE 2 と高度に相同であり、ヒトおよびマウスの ACE と 32% 同一で 42% 類似である（図 1 a）。ヒト ACE 2 と同様、ラット遺伝子は保存された亜鉛結合部位を含む単一の ACE ドメイン、シグナルペプチドおよび膜貫通ドメインを含む（図 1 b）。ヒトと同様、マウスおよびラットでの ACE 2 は腎臓および心臓で優先的に発現され、肺および肝臓でも弱い発現が認められる（図 1 c）。

40

【0083】

放射線ハイブリッドマッピング（radiation hybrid mapping）は、ラット ACE 2 遺伝子が X 染色体上にマッピングされることを示し、マーカー DX Rat 9、DX Wox 14、DX Wox 15 および DX Rat 42 への有意の LOD スコアを有し、ace 2 は DX Rat 9 と DX Rat 42 との間に位置付けられた（図 1 d）。比較マッピングは、ace 2 マッピングの位置がマーカー DX Mgh 12 と DX Rat 8 との間で認められ Sabra 塩感受性ラットで同定された高血圧症についての QTL 間隔（interval）（SS - X）と

50

重複することを示していた。さらに、染色体 *ace2* 領域は *SHRS P* ラット (stroke-prone spontaneously hypertensive rats) で定められた *B P 3 Q T L* にマッピングされ、以前に同定された高血圧症 *B B . X Q T L* はコンジェニック分析により自然発症高血圧症ラット (*SHR*) の *X* 染色体上で同定された (図 1 d)。それゆえ、*ACE 2* は自然発症および食餌誘発高血圧症の 3 つの別個のモデルにおいてラット *X* 染色体上の *Q T L* にマッピングされる。

【0084】

高血圧症ラットにおける *ACE 2* 発現のダウンレギュレーション

腎臓が血圧制御の主たる部位であるので、これら 3 つの高血圧症ラット株の腎臓での *ACE 2* 発現レベルを決定した。*ACE 2* mRNA レベルをまず塩感受性 *Sabra* 高血圧症 (*SBH / y*) ラットおよび対照の塩耐性 *Sabra* 正常血圧 (*SBN / y*) ラットの腎臓で測定した。塩負荷 (*DOCA* 塩による) は正常血圧 *SBN / y* ラットにおける *ACE 2* mRNA 発現に対して影響を及ぼさなかった。興味をそそられることには、*SBH / y* ラットでは、塩負荷および高血圧症の発症は正常血圧 *SBN / y* ラットと比較して *ACE 2* mRNA 発現の有意の低減と関係していた (図 2 a)。注目すべきは、通常の食餌を与えられた *SBH / y* ラットでも同様の食餌を与えられた *SBN / y* 対照と比較して *ACE 2* mRNA が低かったことである。この後者の知見は、通常の食餌を与えられた *SBH / y* ラットと *SBN / y* ラットとの間で観察された血圧の 10 ~ 20 mmHg の差異と一致する。

【0085】

ACE 2 タンパク質レベルを測定するため、*ACE 2* (マウス *ACE 2* のアミノ酸 206 ~ アミノ酸 225) 特異的なウサギ抗血清を生成した。この抗血清はラット *ACE 2* およびヒト *ACE 2* の両者と交差反応した (示していない)。低減した *ACE 2* mRNA 発現と一致して、通常の食餌を与えられた *SBH / y* 動物では *ACE 2* タンパク質の発現は顕著に低下した (図 2 b)。4 週間 *DOCA* 塩の食餌を与えた後の *SBH / y* ラットの血圧の上昇は、*ACE 2* タンパク質発現のさらなる低減と相関していた (図 2 b)。塩耐性 *SBN / y* 対照ラットでは、塩負荷は血圧の上昇を駆動することも *ACE 2* 発現を変へることもなかった (図 2 b)。 *ACE 2* タンパク質レベルはまた、*WKY* 対照と比較して自然発症高血圧症 *SHRS P* および *SHR* 動物の腎臓で有意に低減した (図 2 b)。さらに、*ACE 2* mRNA のレベルは高血圧症 *SHRS P* および *SHR* ラットで顕著に低下した (示していない)。高血圧症ラット株での *ACE 2* のコード領域のクローニングおよびシーケンシングからは配列変化が明らかにされず、低減した *ACE 2* 発現は *ACE 2* 遺伝子発現を制御している多型の結果によりそうであることを示していた。地図上の位置および 3 つの異なるラット株での *ACE 2* の低減した発現は、*ace2* が *X* 染色体上のこの高血圧 *Q T L* の強力な候補遺伝子であることを示している。さらに、3 つのすべての高血圧症ラット株における低減した *ACE 2* 発現は、この酵素が負のレギュレーターとして機能することを示唆していた。

【0086】

マウス *ACE 2* のクローニングおよび *ACE 2* ノックアウトマウスの生成

Q T L としての *ACE 2* の候補性を確認するため、および *ACE 2* が実際に心血管生理および心血管疾患の病因において本質的な役割を果たしているか否かを試験するため、マウス *ACE 2* 遺伝子をクローニングした (図 1 a)。ラットおよびヒト *ACE 2* と同様、マウス *ACE 2* もまた *X* 染色体上にマッピングされ (示していない)、単一の *ACE* - ドメインを含み (図 1 b)、腎臓および心臓で優先的に発現された (図 1 c)。興味深いことに、マウスでは *ACE 2* について 2 つのイソ型が全ての陽性の組織で観察された。COS 細胞におけるマウス *ACE 2* の過剰発現は *ACE 2* が *Ang I* を *Ang 1 - 9* に開裂することを示しており (示していない)、マウス *ACE 2* がヒト *ACE 2* と同じ生化学的特異性を有することを示していた。 *ACE 2* のインビボでの役割を決定するため、マウスの *ace2* 遺伝子を破壊してエクソン 9 をネオマイシン耐性遺伝子で置換し、亜鉛結合触媒ドメインを有効に欠失させた (方法および図 3 a)。 *ace2* 遺伝子座で突然変異した 2

10

20

30

40

50

つのES細胞株を用いてキメラマウスを生成し、これをC57BL/6に戻し交配して生殖細胞伝達(germ transmission)を得た。両マウス株は同一の表現型を示した。ace2突然変異の伝達はサザンブロット分析により確認した(図3b)。ace2のヌル突然変異は、ノーザンブロット分析(示していない)およびウエスタンブロット分析(図3c)でのace2 mRNA転写物およびタンパク質の不在によって確認された。腎臓および心臓でのACE mRNA発現はace2突然変異体マウスでも変わらなかった(図3d)。

【0087】

ACE2遺伝子はX染色体上にマッピングされるので、雄の子孫はすべてACE2に関してヌル突然変異体(ace2^{- / y})かまたは野生型(ace2^{+ / y})のいずれかであり、一方、雌の子孫はace2の突然変異に関して野生型(ace2^{+ / +})、ヘテロ接合性(ace2^{+ / -})、またはホモ接合性(ace2^{- / -})のいずれかであった。以下に記載する全ての実験において、ace2^{+ / -}雌はace2^{+ / +}雌と同様の挙動を示し、ace2^{+ / y}雄はace2のヘテロ接合性の見かけの影響がないことを示していたことに注意すべきである。ACE2ヌルマウスは予期されたメンデルの法則による頻度で生まれ、健康に見え、分析した全ての臓器で肉眼的な検出しうる変化を示さなかった。さらに、有意に低減した捻性を示すace2^{- / -}雄マウスと対照的に、雄および雌のace2ヌルマウスはいずれも捻性である。

【0088】

ace2突然変異体マウスにおける血圧

ace2突然変異体マウスは低下した血圧および腎臓の病理を示すことが以前に示されている。それゆえ、ACE2発現の喪失が血圧のホメオスタシスおよび/または腎臓の発生または機能に影響を及ぼすか否かをまず試験した。興味をそそられることには、ACE2の喪失は、対照の同腹子と比較して3ヶ月齢のace2^{- / y}雄マウス(図4a)またはace2^{- / -}雌マウス(示していない)で血圧の変化という結果とはならなかった。ACE2の喪失をACEが補償するということはあるので、本発明者らはace2欠失マウスをカプトプリル(ACE機能を阻害するがACE2機能は阻害しない)で処理した。しかしながら、カプトプリルを用いたACEのインビボでの抑制は、ace2^{- / y}雄マウスの血圧をカプトプリル処理した野生型の同腹子で観察されるのと同程度に低下させた(図4a)。それゆえ、ACE抑制というシナリオにおいても、この定められたマウスの背景においてACE2の喪失は血圧のホメオスタシスに対して何ら明らかな直接的な影響を及ぼさない。本発明者らのRAS QTLデータに基づき、本発明者らの突然変異体マウスを他のマウス背景に戻し交配してヒトにおける遺伝的背景と同様に血圧制御におけるACE2の役割を示した。

【0089】

ace2突然変異体マウスにおける腎臓機能の障害

ACE2は腎臓で高度に発現されるので、本発明者らは腎臓の形態および機能を調べた。3ヶ月齢および6ヶ月齢のace2^{- / y}雄マウスおよびace2^{- / -}雌マウスはすべて正常な腎臓の形態を示し、腎臓のいかなる超微細構造の見かけの変化も示さなかった(図4b)。腎管系および糸球体の正常な細胞性および腎構造もまた、連続切片形態計測を用いて確認された。

【0090】

雄ace2欠失マウスおよび年齢を一致させた同腹子対照マウスからの腎臓を、光学顕微鏡(PAS染色)および電子顕微鏡(TEM)を用い、3ヶ月齢および12ヶ月齢で調べた。各糸球体の硬化の重篤度を以下のとおり盲検により0から4+までの段階で評価した: 0は病変のないことを示す、1+は糸球体の<25%の硬化、2+、3+、および4+は、それぞれ糸球体の25~50%の硬化、50~75%の硬化、および>75%の硬化を示す。3ヶ月齢ではace2欠失マウスからの腎臓に病理学的変化の徴候は認められなかった。しかしながら、12ヶ月齢では、光学顕微鏡は糸球体硬化/障害の増大を明らかにした: 1.45 ± 0.2 vs 0.25 ± 0.06; n = 6; p < 0.01。電子顕微鏡は

10

20

30

40

50

、腎メサングウム中の膠原原線維の沈着の増大および肥厚した基底膜を示した。上昇した Ang II レベルへの長期にわたる暴露は、ace2 欠失マウスからの腎臓で低酸素症および酸化ストレスに導く。ウエスタンブロット分析は、ace2 欠失マウスからの腎臓において低酸素症誘発因子 1 (hypoxia inducible factor-1 alpha; HIF1- α) および血管内皮増殖因子 (VEGF) の上昇した発現を明らかにした。脂質過酸化産物の測定は、6ヶ月齢の ace2 欠失マウスでの酸化ストレスの増大を示した：ヘキサナール (1001 ± 161 vs 115 ± 13 ナノモル/g; $n = 5$; $p < 0.01$) およびマロンジアルデヒド (48 ± 6.4 vs 24.3 ± 2.8 ナノモル/g; $n = 5$; $p < 0.01$)。

【0091】

これら結果は、ACE2 の喪失が組織特異的な仕方でアンジオテンシン II シグナル伝達の促進に導くこと、このシグナル伝達の促進が最終的に ace2 欠失マウスの腎臓での有害な作用を媒介することを示している。低減した ACE2 発現は、腎臓疾患において重要な病理学的役割を果たしている。

【0092】

ACE2 の喪失は心臓機能の重篤な欠陥という結果となる

ACE または Ang II レセプターの薬理的な抑制は、心臓機能の制御および心臓肥大における RAS の役割を示唆した。しかしながら、ace2 欠失マウスもアンジオテンシノーゲン欠失マウスもともに明白な心臓疾患を発症しない。ACE2 は心臓の血管で高度に発現されるので、ace2 欠失マウスの心臓を分析した。ace2 突然変異体マウスの心臓は、左心室壁のわずかな肉薄および心室サイズの増大を示す (図 5 a)。ace2 欠失心臓での左心室前壁 (anterior left ventricular wall; AW) の肉薄および左心室端拡張径 (left ventricle end diastolic dimension; LVEDD) の増大も心エコーにより認めることができる (表 1)。これらの構造的な変化は、主として6ヶ月齢の雄マウスで観察される。しかしながら、心重量比は年齢を一致させた3ヶ月齢 (示していない) および6ヶ月齢の ace2^{-/-} マウスと ace2^{+/+} マウスとの間で同程度であった (図 5 a、図 5 b)。心エコーはまた、左心室重量 (LVM) および LVM/体重比が正常であることを示した (表 1)。間質性心臓線維症の適応症も (図 5 c、図 5 d) ANF、BNP、 α -MHC、 β -MHC、および骨格筋アクチン遺伝子発現の基本型変化も (示していない) 認められなかったため、拡張性心筋炎の構造的および生化学的变化の特徴は観察されなかった。さらに、ACE2 欠失マウスの個々の心筋細胞は肥大の徴候を示さず、TUNEL 染色によって検出されるように (示していない) 本発明者らは ACE2 欠失マウスで変化した心筋細胞アポトーシスの証拠を観察しなかった。それゆえ、6ヶ月齢の ACE2 欠失マウスの心臓の軽い拡張にも拘わらず、心臓肥大または拡張性心筋炎の証拠はなかった。

【0093】

興味深いことに、心エコーによる心臓機能の評価は、短縮比 (fractional shortening; FS) の低減、および周辺繊維短縮の速度 (velocity of circumferential fiber shortening) の低減によって決定されるように (表 1 および図 6 a、図 6 b)、すべての ace2^{-/-} 雄マウスおよび ace2^{-/-} 雌マウスが重篤な収縮性心不全を示すことを明らかにした。機能の低減は年齢を一致させた3ヶ月齢のマウスと比較して6ヶ月齢の雄および雌マウスの方が重篤であることが認められ、表現型の進行を示唆していた (表 1)。心筋収縮能の低下と一致して、6ヶ月齢 ace2^{-/-} マウスは血圧の低下を示したが (図 6 c)、これは年齢の一致する ace2^{-/-} 雌マウスおよび3ヶ月齢の雄マウスでは認められない特徴であり、血圧の低下が重篤な心臓の機能不全の結果によるものであって全身血圧に対する ACE2 の喪失の直接の効果ではないことを示唆していた。これらの驚くべき結果は、ACE2 が心臓の収縮能の重要な負のレギュレーターであることを示している。

【0094】

心臓機能における心エコー欠陥を確認するため、侵襲性の血行力学的測定を ace2 欠

10

20

30

40

50

ルマウスで行った。重要なことに、侵襲性の血行力学的測定は $dP/dT - \max$ および $dP/dT - \min$ の両者が *ace2* 突然変異体マウスで顕著に低下することを示し (表 2)、収縮性の心臓機能の重篤な障害を示していた。ACE2 の喪失はまた大動脈圧および心室圧の有意の低下という結果となり、観察された心筋収縮能の低下と一致していた (表 2)。注目すべきことに、これらデータは、*ace2* 突然変異体マウスの心筋収縮能の欠陥が明らかな心臓肥大がなくても起こり、血圧の変化とは遺伝的に関係がありえないことを確立するものである。

【0095】

ace2 ヌルマウスにおける低酸素症誘発性遺伝子のアップレギュレーション

ace2 ヌルマウスでの肥大または心臓線維症の不在下での重篤な収縮性の機能不全および軽い拡張は、ヒトおよび動物モデルでの心性気絶/冬眠と似ている。心性気絶および冬眠は、冠状動脈疾患やその後のバイパス手術などの慢性の低酸素症への適応応答である。ACE2 は血管内皮細胞で高度に発現されるが収縮能は心筋細胞によって制御されるので、ACE2 の喪失は心臓の低酸素症という結果となりうるということが考えられた。それゆえ、BNIP3^{2 5} や PAI-1 などの低酸素症誘発性遺伝子の発現レベルをノーザンブロットングにより分析した。すべての *ace2* ヌルマウスの心臓において、BNIP3 および PAI-1 の mRNA 発現は野生型の同腹子と比較して顕著にアップレギュレーションしていた (図 7 a)。それゆえ、ACE2 の喪失は低酸素症制御された遺伝子発現プロファイルの誘発という結果となる。

10

【0096】

ace2 ヌルマウスでの増大したアンジオテンシン II レベル

ACE2 はカルボキシペプチダーゼとして機能し、Ang I から単一残基を解離して Ang 1-9 を、Ang II から単一残基を解離して Ang 1-7 を生成するので、ACE2 は基質 Ang I および / または Ang II の開裂および不活化に対して ACE と競合することにより RAS の負のレギュレーターとして機能するという仮説が立てられた。もし正しければ、ACE2 の喪失はインビボで Ang II レベルを増大させるに違いない。ラジオイムノアッセイを用い、Ang II レベルが実際に *ace2* 突然変異体マウスの腎臓および心臓において有意に増大することがわかった (図 7 b)。さらに、Ang I の増大もまた観察され (図 7 b)、このことは Ang I が ACE2 作用のインビボでの基質であることと一致していた。ACE の mRNA レベルは、対照と比べて *ace2* 突然変異体マウスの心臓および腎臓で差異は認められず、増大した Ang II の組織レベルが増大した ACE 発現によるものではないことを示していた (図 3 d)。これらデータは、ACE2 が RAS の負のレギュレーターとして機能し、Ang II の内生レベルを制御していることを示している。

20

30

【0097】

ace2 欠失マウスでの ACE 発現の排除は心不全を救済する

もしも *ace2* 突然変異体マウスの心臓の表現型が Ang II レベルの増大によるものであるなら、ACE の遺伝的排除と ACE2 の破壊との組み合わせは Ang II レベルを低減させ ACE2 突然変異体マウスで観察された表現型を救済できる。この考えを検証するため、*ace/ace2* 二重突然変異マウスを生成した。これら二重突然変異マウスは予期されたメンデルの法則比に従って生まれ、健康にみえた。*ace-ace2* 二重ヌルマウスでの血圧 (図 8 a) および腎臓の欠陥 (示していない) は *ace* 単一突然変異マウスのものと同様であった。*ace-ace2* 二重突然変異マウスの検性は問題とならなかった (not addressed)。それゆえ、ACE および ACE2 の両者の喪失は *ace* 単一突然変異マウスで認められるもの以上の明らかな疾患を引き起こすことはない。

40

【0098】

ACE ノックアウトマウスの心臓機能はこれまでに報告されていないので、これらマウスでの心臓パラメーターをまず分析した。*ace^{-/-}* マウスでは心臓は組織学的に正常であり (示していない)、心臓機能の欠陥は 6 ヶ月齢では検出することができなかった (図 8 b、図 8 c)。重要なことに、*ace2* 突然変異背景上の ACE 発現の排除は *ace*

50

2 単一ノックアウトマウスの心不全表現型を完全になくした (図 8 b、図 8 c)。さらに、心エコーを用い、6 ヶ月齢の年齢を一致させた *ace-ace2* 二重突然変異マウスのすべての心臓機能は、*ace* 単一突然変異同腹子および野生型同腹子のものに匹敵していた (表 1)。心臓機能の回復は雄および雌の両方の *ace-ace2* 二重突然変異マウスで生じた。これら遺伝的データは、ACE2 の不在下で収縮性の心不全を誘起するには ACE 発現が必要であることを示している。重要なことに、*ace* ノックアウトマウスと *ace/ace2* ノックアウトマウスとで血圧に差異はなく (図 8 a)、より老齢の雄の *ace2* マウスでの血圧の低下は心臓機能の劇的な増大によるものであることがさらに示唆された。

【0099】

ACE2 は肺障害を負に制御する

成人呼吸障害症候群 (ARDS) は急性肺障害の重篤な症例であり、集中治療を受けられる場合であっても致死率は 40 ~ 70 % である。外傷、重度の敗血症 (全身感染)、散在性 (diffuse) 肺炎およびショックが ARDS の最も重篤な原因であり、これらのうちでも酸誘発肺障害 (acid-induced lung injury) は最も一般的な原因の一つである。酸呼吸関連肺障害 (acid aspiration-associated lung injury) を引き起こす潜在的なメカニズムとしては、肺胞 - 毛細管膜への HCl により誘発された損傷、および多形核好中球 (PMN) の付着、活性化および隔離 (sequestration) (肺浮腫およびガス交換の劣化という結果となる) が挙げられる。ARDS の治療は、機械換気、および陥っている病気または障害の継続した治療からなる。肺がさらなる肺胞 - 毛細管膜の損傷に陥ることを防ぐ新規な薬剤を用いた支持的な治療は、患者が陥っている病気や障害を治療するために ARDS 患者の肺の機能を保存し、ARDS の致死率の低下に導くであろう。

【0100】

ACE2 は肺で発現されるので、本発明者らは ACE2 の喪失が急性肺障害において何らかの役割を果たしているか否かを評価した。図 9 は、HCl 処理したマウスおよび対照マウスでの肺エラスタンスの 3 時間の間での変化を示す。HCl 投与後、野生型マウスは 4 時間以上生存したのに対し、ACE2 ノックアウトマウスは 2 ~ 3 時間以内に死亡した。生存の差異を反映して、ACE2 ノックアウトマウスは肺エラスタンスにおいて野生型マウスよりも有意に重篤な応答を示した。それゆえ、ACE2 は急性の酸誘発障害から肺を保護するうえで顕著な役割を果たしている。かくして、ACE2 の機能および / または発現を促進させることは、ARDS および肺障害の治療の新規かつ予期されなかった標的である。

【0101】

方法

マウスおよびラット ACE2 のクローニングおよび染色体 QTL マッピング マウス ACE2 を特許 (proprietary) EST データベースからクローニングした。マウス ACE2 プロブを用い、本発明者らはいついでラット腎臓 cDNA (Invitrogen) をスクリーニングして DNA シークエンシングによって決定されるように完全長ラット cDNA を得た。染色体マッピングのため、ラット ACE2 cDNA 特異的プロブを用いてラット PAC ライブラリー (RPCI-31, Research Genetics) をスクリーニングし、2 つの陽性クローン (6M6 および 125K9) を同定した。これらクローンの末端配列を決定し、ラット特異的なプライマー (mc2L: 5' - TCAATTTACTGCTGAGGGGG - 3', mc2R: 5' - GAGGGATAAACCCAGTGCAAA - 3') をデザインして放射性ハイブリッドパネル (RH07.5, Research Genetics) をスクリーニングすることによりラットでの ACE2 の染色体地図上の位置を決定した。SHR および対照 WKY ラットを Harlan から入手し、Ontario Cancer Institute の動物施設にて研究所のガイドラインに従って維持した。SHRSP ラットからの組織は、Detlev Ganten 博士 (ドイツ) の好意により提供された。塩耐性および塩感受性の Sabra ラットは、Ben-Gurion University Barzilai Medical Center (イスラエル) の動物施設で飼育し保持した。Doca-塩処理は上記に記載したとおりであった。

10

20

30

40

50

【0102】

発現分析 全RNAをラット腎臓からトリ試薬 (tri-reagent) を用いて調製した。20 mgのRNAを0.8%ホルムアルデヒドゲル上で分離した。ナイロンメンブレン (Amersham) にプロットし、部分的ラットACE2 cDNAクローン (9-1) でプローブした。 - アクチンプローブおよびMultiple tissue Northern blotsはClontechから購入した。ウエスタン分析のため、腎臓を「完全」プロテアーゼインヒビターカクテル (Roche) および1 mM Na_3VO_4 を添加した溶解緩衝液 (50 mM Tris-HCl、pH 7.4、20 mM EDTA、および1%トリトン-X100) 中でホモジナイズした。100 mgのタンパク質を8%トリス-グリシゲル上のSDS-PAGEにより分離した。ACE2免疫血清は、マウス特異的ACE2ペプチドDYEAEGADGYNYNRNQLIEDで免疫したウサギから得た。この血清をsulpho-link kit (Pierce) を用いて免疫ペプチドでアフィニティー精製した。市販の - アクチン抗体を負荷対照として用いた (Santa Cruz)。

【0103】

ACE2突然変異体マウスの生成 標的ベクター (559塩基対のショートアーム、および8.1キロベースのロングアーム) をpKO Scrambler NTKV-1907ベクター (Stratagene) を用いて構築した。ヌクレオチド+1069~+1299を含むace2ゲノムDNAの一部をネオマイシン耐性カセットとアンチセンスの方向で置換した。ターゲティング構築物をE14K ES細胞にエレクトロポレーションにより導入し、陽性の相同組換えESクローンのスクリーニングを5'および3'フランキングプローブにハイブリダイズしたEcoRI-消化ゲノムDNAのザーンプロットングにより行った。2つの独立したace^{-/-} ES細胞株をC57BL/6由来胚盤胞に注入してキメラマウスを生成し、これをC57BL/6マウスに戻し交配した。2つのES細胞株は、独立した生殖細胞伝達を与えた。この原稿で報告するデータは、これら2つの突然変異体マウス株の間で一致するものである。ACE2発現の排除がRT-PCR、ノーザンプロット分析、およびウエスタンプロット分析により確認された。すべての実験に同腹子のマウスのみを用いた。すべての組織の組織学、アポトーシスアッセイ、血液の血清学、および腎臓の形態計測は文献記載によった^{3,1}。完全なACE突然変異体マウスはこれまでに記載されており⁸、Jackson Laboratoriesから入手した。マウスはOntario Cancer Instituteの動物施設にて研究所のガイドラインに従って維持した。

【0104】

心臓の形態計測、心エコー、血行力学および血圧の測定 心臓の形態計測のため、心臓を10%緩衝ホルマリンで60 mmHgにて灌流し、その後、パラフィン中に埋設した。心筋間質性線維症の決定は、Photoshop 6.0ソフトウェアと結合したImage Processing Tool Kit version 2.5を用いた色彩減算コンピューター支援造影分析 (color-subtractive computer assisted image analysis) を用いた定量的な形態計測により行った。Picro-Sirus赤色染色切片を用い、全視野と比較した陽性のPSR染色を有する面積の比として間質性線維症を計算した。心エコー評価は、野生型および突然変異体の同腹子を用いて文献記載に従って行った^{3,2}。マウスをイソフルオラン/酸素で麻酔し、15 MHz一次変換器を備えたAcuson^R Sequoia C256を用いた経胸腔的心エコーにより調べた。FSは、 $FS = [(EDD - ESD) / EDD] * 100$ として計算した。Vcfは心拍数について補正したFS/拍出時間として計算した。血行力学的測定は文献記載に従って行った。簡単に説明すると、マウスを麻酔し、右頸動脈を単離し、増幅器 (TCP-500, Millar Inc.、ヒューストン) につないだ1.4 French Millarカテーテル (Millar Inc.) を用いてカニューレを挿入した。カテーテルを頸動脈に挿入した後、カテーテルを大動脈ついで左心室まで進め、大動脈圧および心室圧を記録した。測定および分析したパラメーターは、心拍数、大動脈圧、左心室 (LV) 収縮期圧、LV拡張期圧、およびLV圧の最大および最小一次導関数 (first derivatives) (それぞれ+dP/dt maxおよびdP/dt min) であった。Visitech Systems (アベックス、ノース・カロライナ) によって製造されたVisitech BP-2000 Blood Pressure Analysis Systemを用い、テール-カフ (tail-cuff) 40 50

血圧測定法を採用した。カプトプリル処理にあたっては、血圧測定前に2週間にわたって400 mg/Lのカプトプリル(Sigma)を飲水に添加した。

【0105】

組織のアンジオテンシンペプチドレベル 心臓および腎臓を、フェニルメチルスルホニルフルオライド(PMSF、100 μM)を含む上記ペプチダーゼインヒビターを含有する80%エタノール/0.1N HCl中、氷上でホモジナイズした。タンパク質ホモジネートを30,000 gで20分間遠心分離にかけ、上澄みをデカントし、1%(v/v)ヘプタフルオロ酪酸(HFBA、Pierce、ロックフォード、イリノイ)で酸性にした。上澄みをSavant真空遠心管(Savant、ファーマーグデール、ニューヨーク)で5 mlに濃縮し、濃縮した抽出物を活性化Sep-Paksに適用し、0.1% HFBAで洗浄し、5 mlの80%メタノール/0.1% HFBAで溶出した。心臓および腎臓組織からの抽出物中のアンジオテンシンペプチド含量のラジオイムノアッセイ分析を行った。Ang IIおよびAng IRIAについての検出限界は、それぞれ0.5フェムトモル/管およびAng I 5フェムトモル/管であった。

10

【0106】

急性肺障害モデル ACE2ノックアウトマウスおよびその同腹子(8~12週齢)をこの研究に用いた。吸引攻撃の1分前に2回の深い吸入(1回呼吸量の3倍)を送達して容積歴(volume history)を標準化し、測定をベースラインとして行った。麻酔し機械換気したマウスに2 mL/kgのHCl(pH=1.5)、ついで空気ボラス(a bolus of air)を気管内注射した。対照群ではマウスに食塩水注射をするかまたは注射をしなかった。すべての群で測定は30分間隔で3時間行った。肺障害を生理的に評価するため、気管の最大圧、流量、および容積を測定することにより肺エラストランス(EL;肺コンプライアンスの逆数)を評価した。ELは気管最大圧を容積で除することにより計算した。ELの変化は肺実質の変化および肺の硬化(stiffening)を反映している。

20

【0107】

本発明を詳細に且つ好ましい態様に特に言及しながら記載した;しかしながら、当業者であれば本発明の意図および範囲から逸脱することなく改変を行いうることが理解されるであろう。たとえば、本願がタンパク質について言及しているときはペプチドおよびポリペプチドもしばしば用いられることが明らかである。同様に、遺伝子を本願において記載している場合は核酸分子または遺伝子断片もしばしば用いられることが明らかである。

30

【0108】

すべての刊行物(ジーンバンクの収録項目を含む)、特許および特許出願は、それぞれの個々の刊行物、特許または特許出願がその全体において参照のため引用されると明確かつ個別に示されているのと同程度に、その全体において参照のため引用される。

【0109】

参考文献

【表 3】

- Yusuf, S., Reddy, S., Ounpuu, S., および Anand, S. Global burden of cardiovascular diseases Part I: General considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 104, 2746-2753 (2001).
- Carretero, O.A., および Oparil, S. Essential hypertension Part I: Definition and etiology. *Circulation* 101, 329-335 (2000). 10
- Jacob, H.J. Physiological genetics: Application to hypertension research. *Clin. Exp. Pharm. Phys.* 26, 530-535 (1999).
- Rapp, J.P. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol. Rev.* 80, 135-172 (2000).
- Stoll, M. ら A genomic-systems biology map for cardiovascular function. *Science* 294, 1723-1726 (2001). 20
- Corvol, P., Williams, T.A. in *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Barrett, A.J., Rawlings, N.D., and Woessner, J.F., eds) pp. 1066-1076. (Academic Press, London, 1998)
- Skeggs, L.T., Dorer, F.E., Levine, M., Lentz, K.E., および Kahn J.R. The biochemistry of the renin-angiotensin system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 130, 1-27 (1980). 30
- Krege, J.H. ら Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 375, 146-148 (1995).

【 0 1 1 0 】

【表4】

Esther, C.R. ら Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab Invest.* **74**, 953-965 (1996).

Wuyts, B., Delanghe, J., および De Buyzere, M.. Angiotensin I-converting enzyme insertion/deletion polymorphism: clinical implications. *Acta Clin. Belg.* **52**, 338-49 (1997).

10

Elkind, M.S., および Sacco, R.L. Stroke risk factors and stroke prevention. *Semin. Neurol.* **18**, 429-440 (1998).

Hollenberg, N.K. Angiotensin converting enzyme inhibition and the kidney. *Curr. Opin. Cardiol.* **3(Suppl 1)**, S19-29 (1988).

Garg, R., および Yusuf, S. Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. *JAMA.* **273**, 1450-1456 (1995).

20

Tipnis, S.R. ら A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **275**, 33238-33243 (2000).

Donoghue, M. ら A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res.* **87**, e1-e8 (2000)

30

Yagil C. ら Role of chromosome X in the Sabra rat model of salt-sensitive hypertension. *Hypertension* **33(part II)**, 261-265 (1999).

Hilbert, P. ら Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* **353**, 521-529 (1991).

【0111】

40

【表5】

- Kloting, I., Voigt, B., Kovacs, P. Metabolic features of newly established congenic diabetes-prone BB.SHR rat strains. *Life Sci.* **62**, 973-979 (1998).
- Laragh, J.H. Renovascular hypertension: a paradigm for all hypertension. *J. Hypertension* **4(suppl. 4)**, S79-S88 (1986).
- Yagii, C. ら Development, genotype and phenotype of a new colony of the Sabra hypertension prone (SBH/y) and resistant (SBN/y) rat model of salt sensitivity and resistance. *J. Hypertension* **14**, 175-82 (1996). 10
- Tanimoto, K. ら Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J. Biol. Chem.* **269**, 31334-31337 (1994).
- Kloner, R.A., Bolli, R., Marban, E., Reinlib, L., および Braunwald, E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation* **97**, 1848-1867 (1998). 20
- Murphy, A.M. ら Transgenic mouse model of stunned myocardium. *Science* **287**, 488-491 (2000).
- Heusch, G. Hibernating myocardium. *Physiol. Rev.* **78**, 1055-1085 (1998).
- Sowter, H.M., Ratcliffe, P.J., Watson, P., Greenberg, A.H., および Harris, A.L. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res.* **61**, 6669-6673 (2001). 30
- Kletzmann, T., Roth, U., および Jungermann, K. Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood* **94**, 4177-4185 (1999).

【0112】

【表 6】

Taylor, C.A.M., Coates, D., および Shirras, A.D. The *Acer* gene in *Drosophila* codes for an angiotensin-converting enzyme homologue. *Gene (Amst.)* **181**, 191-197 (1996).

Giordano, F.J. ら A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 5780-5785 (2001). 10

Weiss, D., Sorescu, D., および Taylor, W.R. Angiotensin II and atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* **87**, 25C-32C (2001).

Enseleit, F., Hurlimann, D., および Luscher, T.F. Vascular protective effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and their relation to clinical events. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **37**(suppl. 1), S21-S30 (2001).

Kong, Y.Y. ら OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **397**, 315-23 (1999). 20

Wickenden, A.D. ら Targeted expression of a dominant-negative K(v)4.2 K(+) channel subunit in the mouse heart. *Circ. Res.* **85**, 1067-1076 (1999).

Zvaritch, E. ら The transgenic expression of highly inhibitory monomeric forms of phospholamban in mouse heart impairs cardiac contractility. *J. Biol. Chem.* **275**, 14985-14991 (2000) 30

Rosengart ら 米国特許 No. 6,322,536

March ら 米国特許 No. 6,224,584

Hammond ら 米国特許 No. 6,174,871

【 0 1 1 3 】

【表7】

Wolfgang-M. Franz ら Analysis of tissue-specific gene delivery by recombinant adenoviruses containing cardiac-specific promoters. *Cardiovascular Research* 35(1997) 560-566

Rothmann T. ら Heart muscle-specific gene expression using replication defective recombinant adenovirus. *Gene Ther* 1996 Oct;3(10):919-26

Phillips MI ら Vigilant vector: heart-specific promoter in an adeno-associated virus vector for cardioprotection. *Hypertension* 2002, Feb; 39(2 Pt 2):651-5

Herold BC ら Herpes simplex virus as a model vector system for gene therapy in renal disease. *Kidney Int* 2002 Jan;61 Suppl 1:3-8

Figlin RA ら Technology evaluation: interleukin-2 gene therapy for the treatment of renal cell carcinoma. *Curr Opin Mol Ther* 1999 Apr;1(2):271-8

Varda-Bloom N ら Tissue-specific gene therapy directed to tumor angiogenesis. *Gene Ther* 2001 Jun;8(11):819-27

Scott-Taylor TH ら Adenovirus facilitated infection of human cells with ecotropic retrovirus. *Gene Ther* 1998 May;5(5):621-9

Langer JC ら Adeno-associated virus gene transfer into renal cells: potential for in vivo gene delivery. *Exp Nephrol* 1998 May-Jun;6(3):189-94

Lien YH ら Gene therapy for renal diseases. *Kidney Int Suppl* 1997 Oct;61:S85-8

Ohno K ら Cell-specific targeting of Sindbis virus vectors displaying IgG-binding domains of protein A. *Nat Biotechnol* 1997 Aug;15(8):763-7

【0114】

表1 : ace2 ヌルマウスの心臓機能

10

20

30

40

【表 8】

	3ヶ月齢 - 雄			6ヶ月齢 - 雄			6ヶ月齢 - 雌		
	ace2 ^{+/+}	ace2 ^{-/-}	n	ace2 ^{+/+}	ace2 ^{-/-}	n	ace2 ^{+/+}	ace2 ^{-/-}	n
心拍数、bpm	469 ±12	466 ±18	n=7	495 ±15	482 ±12	n=8	460 ±6	452 ±14	n=3
AW, mm	0.65 ±0.02	0.62 ±0.01		0.66 ±0.01	0.59 ±0.02*		0.65 ±0.02	0.57 ±0.04	
LVEDD, mm	4.09 ±0.04	4.25 ±0.10		4.12 ±0.10	4.49 ±0.12*		3.71 ±0.10	4.11 ±0.07*	
LVESD, mm	2.11 ±0.04	2.69 ±0.09**		2.13 ±0.06	3.29 ±0.14**		1.74 ±0.07	2.68 ±0.11**	
% FS	48.42 ±1.14	36.73 ±0.89**		48.12 ±0.84	26.76 ±1.78**		53.00 ±1.68	34.85 ±1.76**	
PAV, M/s	0.992 ±0.029	0.922 ±0.033		0.902 ±0.044	0.802 ±0.037		0.875 ±0.048	0.809 ±0.044	
Vcfc, circ/s	9.49 ±0.48	7.28 ±0.45*		9.46 ±0.26	4.93 ±0.33**		10.34 ±0.81	6.16 ±0.31**	
LVM, mg	95.69 ±1.88	95.50 ±2.28		102.41 ±4.00	100.49 ±3.39		92.27 ±2.02	89.60 ±1.54	
LVM/BW, mg/g	3.32 ±0.08	3.53 ±0.18		3.19 ±0.10	3.32 ±0.15		3.29 ±0.37	3.30 ±0.09	

10

20

30

* p < 0.05 ; ace2^{-/-} 对 ace2^{+/+} または ace2^{-/-} 对 ace2^{+/-}
 ** p < 0.01 ; ace2^{-/-} 对 ace2^{+/+} または ace2^{-/-} 对 ace2^{+/-}

Bpm = 1 分間当たりの心拍数 ; AW = 前壁の肉薄 ; LVEDD = 左心室端拡張径 ; LVEED = 左心室端収縮径 ; %FS = パーセント短縮比 ; PAV = 最大大動脈流出速度 (peak aortic outflow velocity) ; Vcfc = 周辺纖維短縮の速度 ; LVM = 計算した左心室重量 ; BW = 体重

【 0 1 1 5 】

表 2 : 6ヶ月齢 ace2^{-/-} マウスの侵襲性血行力学パラメーター

40

【表 9】

	<i>ace2^{+/y}</i>	<i>ace2^{-/y}</i>
	N = 8	N = 8
心拍数、bpm	303 ±16	298 ±8
SBP, mmHg	111.5 ±2.4	91.6 ±3.0
DBP, mmHg	70.5 ±3.0	50.3 ±2.4**
MBP, mmHg	84.2 ±2.8	64.0 ±2.6**
LVSBP, mmHg	107.4 ±4.5	87.5 ±2.3**
LVEDBP, mmHg	5.5 ±0.8	5.3 ±0.7
dP/dT max	5579 ±422	3034 ±124**
dP/dT min	-5055 ±257	-2029 ±271**

** p < 0.01 ; *ace2^{-/y}* 对 *ace2^{+/y}*

S B P = 収縮血圧 ; D B P = 拡張血圧 ; M B P = 平均動脈血圧 ; L V S B P = 左心室収縮血圧 ; L V E D B P = 左心室端拡張血圧 ; d P / d T m a x = 左心室圧の変化 / 時間の最大一次導関数 ; d P / d T m i n = 左心室圧の変化 / 時間の最小一次導関数

【0116】

表 3 : 6ヶ月齢 *ace* マウスおよび *ace/ace2* マウスの心臓機能

【表 10】

	<i>ace⁺</i>	<i>ace⁺ace2^{-/y}</i>
	n=8	n=8
心拍数、 bpm	507 ±17	491 ±10
AW, mm	0.63 ±0.01	0.65 ±0.02
LVEDD, mm	3.86 ±0.04	3.79 ±0.07
LVESD, mm	2.11 ±0.04	2.13 ±0.07
% FS	45.34 ±1.11	43.95 ±1.24
PAV, M/s	0.995 ±0.064	0.931 ±0.040
Vcfc, circ/s	8.94 ±0.25	8.40 ±0.27

A W = 前壁の肉薄 ; L V E D D = 左心室端拡張径 ; L V E S D = 左心室端収縮径 ; % F S = パーセント短縮比 ; P A V = 最大大動脈流出速度 ; V c f c = 周辺繊維短縮の速度

【図面の簡単な説明】

【0117】

【図 1】ラット A C E 2 の配列および染色体マッピングを示す。(a) ラット、マウスおよびヒト A C E 2 のマウスおよびヒト精巢 - A C E (T - A C E) とのタンパク質アラインメント。黒い陰影はアミノ酸の同一性を示し、灰色の陰影はアミノ酸の類似性の程度を示す。(b) A C E および A C E 2 のドメイン構造の模式図。A C E 2 は共通亜鉛結合部位 H E M G H を含む A C E ドメインを一つしか含まないことに注意。触媒中心は黒色で、シグナルペプチドは灰色で、膜貫通ドメインは斜線で示す。(c) 種々の成体組織および胚発生の種々の日数 (E 7 = 胚の第 7 日目) でのマウスおよびラット A C E 2 遺伝子の発現パターン。A C E 2 の 2 つのイソ型がマウスには存在するがラットまたはヒトには存在

しない(示していない)ことに注意(これはACEについて認められるのと同様の特徴である¹⁵)。(d) Sabra塩感受性(Sabra salt-sensitive)動物(SS-X)、SHRSP(BP3)、およびSHRラット(BB.X)で同定したQTLのマッピングと比較した、ラットACE2の放射性ハイブリッドマッピングの結果。多型マーカー名を表意文字の左に示す。ACE2と関連するマーカーのLODスコアおよびシータ値を示す。cR = センチラド。

【0118】

【図2a】高血圧症のラットモデルにおけるACE2の発現を示す。Sabra SBH/yおよびSBN/yラットの腎臓からのACE2 mRNAのノーザンブロット分析を示す。上段はアクチン対照レベルとともにノーザンブロットの表示を示す。下のパネルはアクチンレベルに標準化したace2メッセージの相対レベルを示す。

10

【0119】

【図2b】高血圧症のラットモデルにおけるACE2の発現を示す。Sabra SBH/yおよびその対照SBN/yラット並びにSHRおよびSHRSPおよびその対照WKYラットの腎臓からのACE2タンパク質レベルのウエスタンブロット分析を示す。上段は代表的なウエスタンブロットを示す。各Sabraラットでの収縮血圧(BP)をmmHgで示す。下のパネルはアクチンレベルに補正したACE2の相対的なタンパク質レベルを示す。棒グラフは平均値±SEMを示す。* = $p < 0.05$ 、** = $p < 0.01$ (n = 4、全ての群について)。

【0120】

20

【図3a】相同的組換えによるマウスACE2のターゲティングした破壊を示す。遺伝子ターゲティング戦略。マウスace2野生型遺伝子座の一部(最上段)を示す。黒塗りはエクソンを示す。亜鉛結合触媒ドメインをコードするエクソン9を、アンチセンス方向に置いたネオマイシン(neo)耐性遺伝子カセットで置換すべくターゲティングベクターをデザインした。チミジンキナーゼ(TK)を負の選択のために用いた。サザン分析に用いた3'および5'フランキングプローブを斜線の四角で示す。

【0121】

【図3b】相同的組換えによるマウスACE2のターゲティングした破壊を示す。ace2^{+/y}およびace2^{-/y} EC細胞のサザンブロット分析。ゲノムDNAをEcoRIで消化し、(a)に示した3'および5'フランキングプローブにハイブリダイズさせた。

30

【0122】

【図3c】相同的組換えによるマウスACE2のターゲティングした破壊を示す。ace2^{+/y}およびace2^{-/y}マウスの腎臓でのACE2タンパク質発現のウエスタンブロット分析。抗ACE2抗体を欠失のN末端側の領域に反応させる。

【0123】

【図3d】相同的組換えによるマウスACE2のターゲティングした破壊を示す。ace2^{+/y}およびace2^{-/y}マウスの心臓および腎臓におけるACE mRNA発現のRT-PCR分析。線状増幅および対照としてのGAPDH mRNAレベルについての種々のPCRサイクルを示す。

【0124】

40

【図4】正常血圧および腎臓の機能を示す。(a) ACE阻害剤であるカプトプリルの不在下(左のパネル)または存在下での3ヶ月齢ace2^{+/y} (n = 8)およびace2^{-/y} (n = 8)マウスでの血圧測定。尾の平手打ち(tail cuffing)を用いて血圧を測定し、平均値±SDを示す。方法の欄に示すように、血圧を測定する2週間前にカプトプリルを投与した。これらの血圧を、侵襲性の血行力学的ランゲンドルフ測定法(示していない)を用いて確認した。カプトプリル処理したace2^{+/y}およびace2^{-/y}マウスの両者での差異は、それぞれの未処理群の差異よりも有意の差異があった(**p < 0.01)。(b) 正常な腎臓組織が6ヶ月齢のace2^{+/y}およびace2^{-/y}マウスで観察された。矢印は糸球体を示している。

【0125】

50

【図5 a】心臓の形態を示す。6ヶ月齢の $ace2^{+/y}$ および $ace2^{-/y}$ マウスから単離した心臓のH & E染色切片。大きくなった左心室(LV)および右心室(RV)が $ace2^{-/y}$ マウスで観察された。しかしながら、全体としての心臓の大きさは両遺伝子型で同様であり、肉眼でも単離した心筋細胞でも心肥大の証拠はなかった。

【0126】

【図5 b】心臓の形態を示す。心肥大の指標としての6ヶ月齢 $ace2^{+/y}$ ($n=8$) および $ace2^{-/y}$ ($n=8$) マウスからの心重量/体重比の定量。体重、心重量、脛骨長、および心重量/脛骨長の比もまた、分析した全ての年齢での種々の遺伝子型群で変化が認められなかった(示していない)ことに注意すべきである。

【0127】

【図5 c】心臓の形態を示す。 $ace2^{-/y}$ マウスで間質性線維症は存在しなかった。拡張型心筋症の顕著な特徴の一つは、間質性線維症である。しかしながら、間質性線維症は $ace2^{+/y}$ ($n=8$) および $ace2^{-/y}$ ($n=8$) マウスの心臓で同様であった。個々の心臓のPSS染色を示す。通常の脈管周辺の線維症は、野生型および突然変異動物の両者において赤く染色されることに注意。

【0128】

【図5 d】心臓の形態を示す。 $ace2^{-/y}$ マウスで間質性線維症は存在しなかった。拡張型心筋症の顕著な特徴の一つは、間質性線維症である。しかしながら、間質性線維症は $ace2^{+/y}$ ($n=8$) および $ace2^{-/y}$ ($n=8$) マウスの心臓で同様であった。間隙における線維症変化の定量。

【0129】

【図6 a】ACE2の喪失は重篤な収縮性心不全という結果となることを示す。6ヶ月齢の $ace2^{+/y}$ および2匹の $ace2^{-/y}$ マウスでの収縮期心臓の心エコー測定。ピークおよび谷は個々の心拍数の収縮期および拡張期を示す。矢印は、短縮比のパーセント(%FS)を決定する値である収縮期の収縮(LVESD)と拡張期の弛緩(LVEDD)との距離を示す。 $ace2^{-/y}$ マウスでの拡張期および収縮期の大きさの増大は心臓の拡張を示すことに注意。実験データは表1に見出すことができる。

【0130】

【図6 b】ACE2の喪失は重篤な収縮性心不全という結果となることを示す。心臓収縮の2つの顕著なパラメーターであるパーセント短縮比および周辺繊維短縮の速度が、6ヶ月齢 $ace2^{+/y}$ ($n=8$) および $ace2^{-/y}$ ($n=8$) マウスおよび6ヶ月齢 $ace2^{+/y}$ ($n=5$) および $ace2^{-/y}$ ($n=5$) 雌マウスで認められた。値は心エコーにより決定した。平均値 \pm SDを示す。*遺伝子型群間での $p < 0.05$ および**遺伝子型群間での $p < 0.01$ 。実験データは表1に見出すことができる。

【0131】

【図6 c】ACE2の喪失は重篤な収縮性心不全という結果となることを示す。6ヶ月齢雄 $ace2^{+/y}$ ($n=8$) および $ace2^{-/y}$ ($n=8$) マウスおよび6ヶ月齢雌 $ace2^{+/y}$ ($n=5$) および $ace2^{-/y}$ ($n=5$) 雌マウスでの血圧測定。平均値 \pm SDを示す。血圧は、表2からわかるように、侵襲性の血行力学的測定を用いて確認した。* $p < 0.05$ 。

【0132】

【図7 a】ACE2不在下での低酸素マーカーのアップレギュレーションおよびアンジオテンシンIIレベルの増大。2つの低酸素誘発性遺伝子であるBNIP3およびPAI-1のmRNA発現レベルの6ヶ月齢雄 $ace2^{+/y}$ ($n=5$) および $ace2^{-/y}$ ($n=5$) マウスでのノーザンブロット分析。個々のノーザンブロットデータを示す。** $p < 0.01$ 。

【0133】

【図7 b】ACE2不在下での低酸素マーカーのアップレギュレーションおよびアンジオテンシンIIレベルの増大。2つの低酸素誘発性遺伝子であるBNIP3およびPAI-1のmRNA発現レベルの6ヶ月齢雄 $ace2^{+/y}$ ($n=5$) および $ace2^{-/y}$ ($n=5$)

10

20

30

40

50

n = 5) マウスでのノーザンブロット分析。gapdh対照に対して標準化したBNIP3およびPAI-1のmRNAレベルの相対レベルを示す。**p < 0.01。

【0134】

【図7c】ACE2不在下での低酸素マーカーのアップレギュレーションおよびアンジオテンシンIIレベルの増大。6ヶ月齢雄ace2^{+/y} (n = 8)およびace2^{-/y} (n = 8)同腹子マウスの心臓および腎臓におけるアンジオテンシンI (Ang I)およびアンジオテンシンII (Ang II)ペプチドレベル。Ang IおよびAng IIの組織レベルはラジオイムノアッセイにより決定した。平均値±SDを示す。**p < 0.01。

【0135】

【図8a】ACE-ACE2二重突然変異マウスは心不全を起こさないことを示す。6ヶ月齢雄ace2^{+/y} (n = 8)、ace^{-/-} (n = 8)、およびace^{-/-}ace2^{-/y}二重突然変異 (n = 6) マウスでの血圧測定。平均値±SDを示す。血圧は、侵襲性の血行力学的測定を用いて確認した。**野生型マウスと比べて突然変異体のp < 0.01。

【0136】

【図8b】ACE-ACE2二重突然変異マウスは心不全を起こさないことを示す。6ヶ月齢雄ace2^{+/y} (n = 8)、ace2^{-/y} (n = 8)、ace^{-/-} (n = 8)およびace^{-/-}ace2^{-/y}二重突然変異 (n = 6) 同腹子におけるパーセント短縮比および周辺繊維短縮の速度。値は心エコーにより決定した。平均値±SDを示す。**20 遺伝子型群間でのp < 0.01。実験データは表3に見出すことができる。

【0137】

【図8c】ACE-ACE2二重突然変異マウスは心不全を起こさないことを示す。6ヶ月齢雄ace2^{+/y}、ace2^{-/y}、ace^{-/-}およびace^{-/-}ace2^{-/y}二重突然変異同腹子マウスにおける収縮期心臓の心エコー測定。心エコーを図6aの記載と同様にして分析し、標識した。ace2ヌルバックグラウンドでのACEの除去がace2^{-/y}単一突然変異マウスで観察された収縮期の心臓の障害を完全に救済することに注意。

【0138】

【図9】ベースラインからのエラスタンスの変化のパーセントを経時的に計算した。肺のエラスタンスは気管の最大圧を容積で除することにより計算した。30

【0139】

【図10】(a) ヒトACE2 DNA (配列番号1)。(b) ヒトACE2ポリペプチド (配列番号2)。

【0140】

【図11】(a) マウスACE2 DNA (配列番号3)。(b) マウスACE2ポリペプチド (配列番号4)。

【0141】

【図12】ACE2ヌクレオチド多型および配列。

【 図 3 b 】

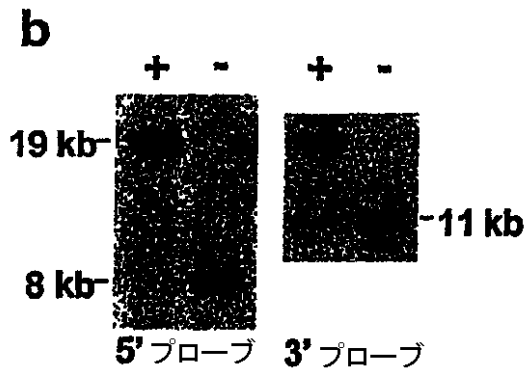
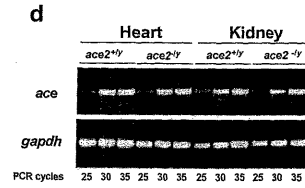
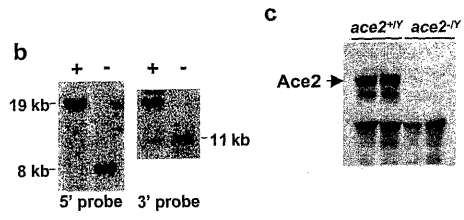


Figure 3b, 3c, 3d



【 図 3 d 】

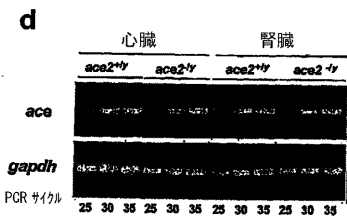
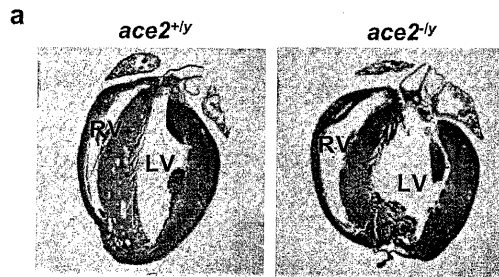
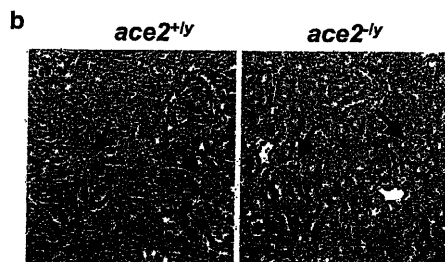
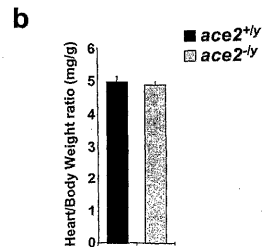
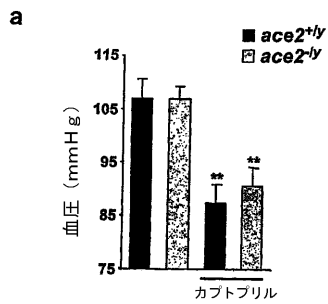


Figure 5a, 5b



【 図 4 】



【 図 5 b 】

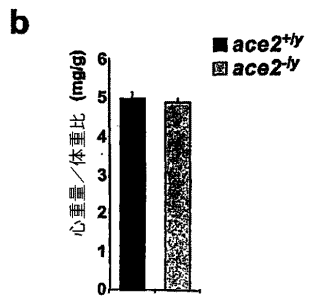
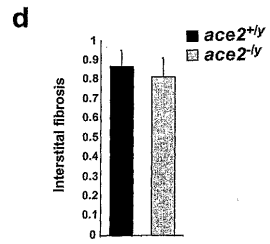
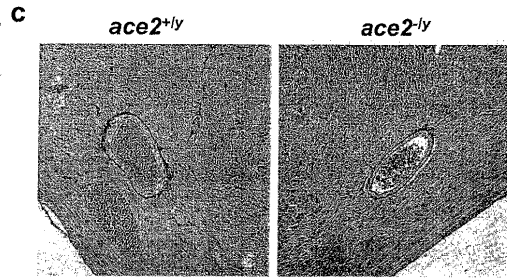


Figure 5c, 5d



【 図 5 d 】

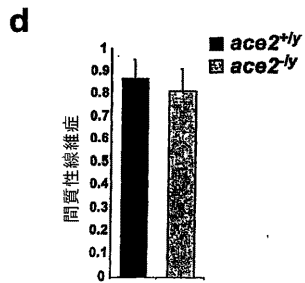
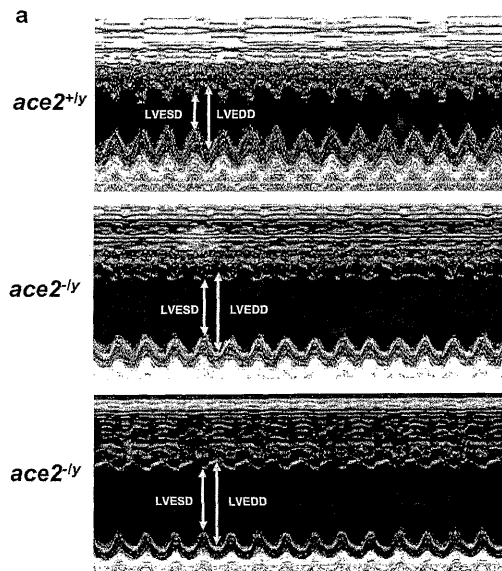


Figure 6a



【 図 6 b 】

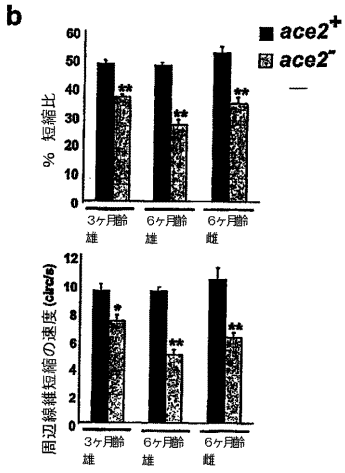
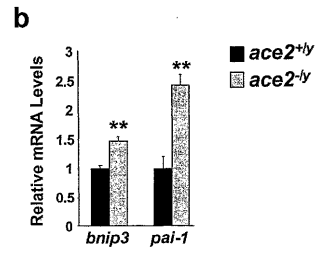
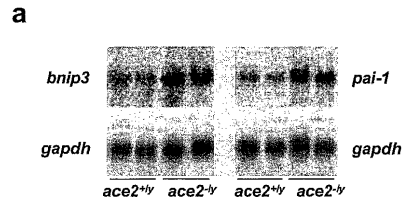
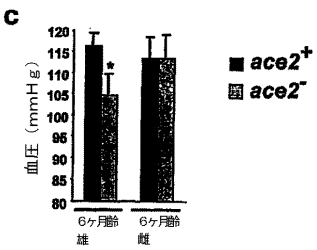


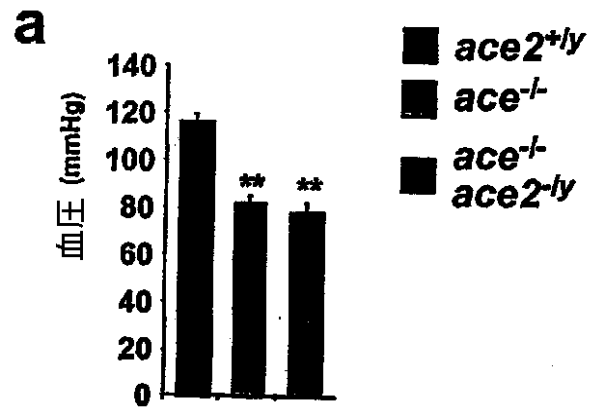
Figure 7a, 7b



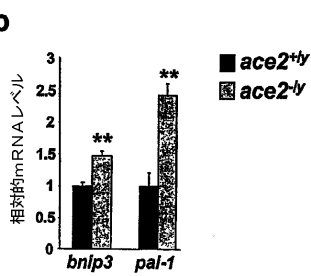
【 図 6 c 】



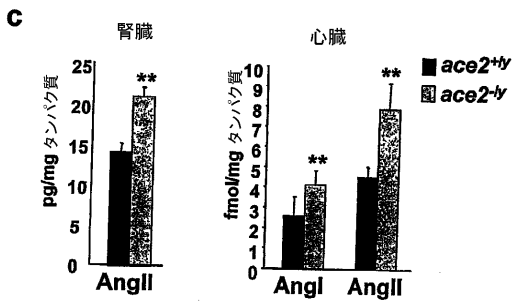
【 図 8 a 】



【 図 7 b 】



【 図 7 c 】



【 図 8 b 】

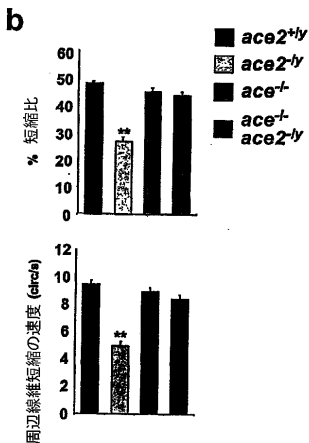
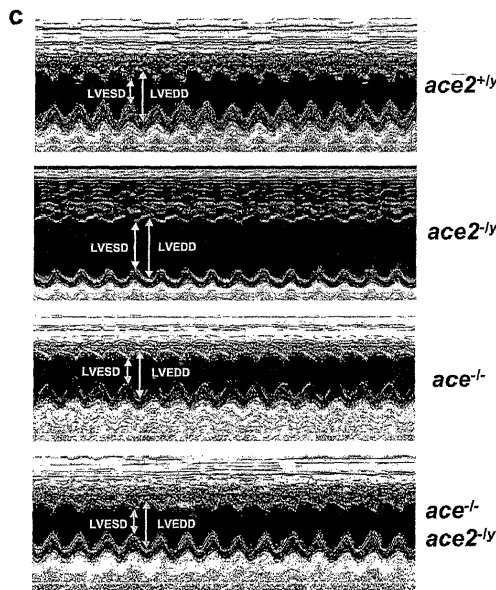


Figure 8c



【 図 9 】

ベースラインからのエラスタンスの変化のパーセント

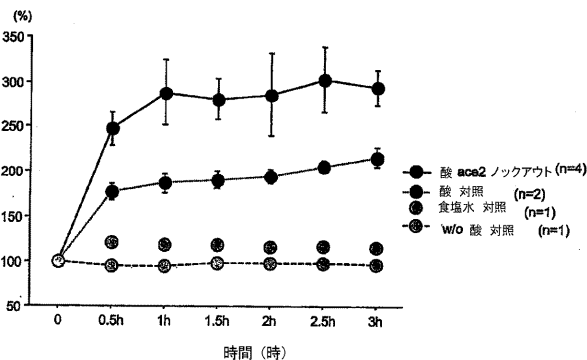


Figure 10a

```

1  cgcccaacc  aagttcaag  gctgetaaga  gagsaatct  catgaggagg  ttttaptcta
61  gggaaagta  ttcagtgat  gtgctcttg  ctccagggg  acgatgtcaa  gctcttctcg
121  gctcctctc  agccttgtg  ctgtaactg  tgctcagtc  accattgagg  acagggccaa
181  gacattttg  gacaagtta  accaagaag  cgaagacctg  ttctatcaaa  gttcaactgc
241  ttcttggat  tataacaca  atattactga  agagaatgc  caaaaacatg  ataagtctgg
301  ggacaatgg  tctgctttt  taasggaca  gtcccaactt  gcccaaatgt  alccacatac
361  agaatcagg  aatctcacg  tcaactgtc  gctgcaggct  ctccgcaaaa  atgggtcttc
421  agtctctca  gaagaacga  gcaaacggt  gaacsaatt  ctaaatcaaa  tgacacacat
481  ctacagtact  gaaaagttt  gtaaccoca  taatccaca  gaatgctat  tacttgaacc
541  aggttgaat  gaataatgg  caaacgitt  agactcaat  gagggctct  gggcttggga
601  aagtgaga  tctgaagtg  gaaagagct  gaggcacaa  tatgaaagt  atgtgtctt
661  gaaaatgag  atgcaagag  caaatcata  tgaggactat  ggggtattt  ggaagggaga
721  ctatgaagta  aatgggtag  atggctatg  ctacagcgc  ggccagtta  ttgaagatgt
781  ggaacatacc  ttgaaagga  ttaaacatt  atatgcaat  ctctatgcc  atgtgagggc
841  aagttgatg  aatgctatc  ctctctata  agtcccaat  ggatgctcc  ctgctcaatt
901  gcttggtgat  atgtgggta  gatttggac  aaatctgtac  tctttgacag  ttccctttgg
961  acagaacaa  aacatagat  ttactgatc  aatggggac  caggctggg  atgcaagag
1021  aeatccaag  gaggcocaga  agtctctgt  atctgttgt  ctctcaata  tgactcaagg
1081  atcttggaa  aatctcctg  taacggacc  aggaatgtt  cagaagcag  tctgccaacc
1141  cacagctgg  aactctggga  agggagact  caggatcctt  atgtgcaaaa  agtgacaact
1201  ggacagctc  ctgacagct  atcatgatg  gggcatatc  cagtatgata  tggcatatgc
1261  tgacaacct  ttctgtcaa  gaaatggag  taatgaaga  ttccatgaag  ctgttgggga
1321  aatcatgca  ottctcgag  ccaacctaa  gcaattaaa  tcaattggc  tctgtcaacc
1381  cgttttcaa  gaaagcaat  aacagaaat  aactctctg  ctcaaacag  cactcaagat
1441  tttgggact  ctgacatta  ctcaatgtt  agagaatgg  aggtggatg  tctttaaagg
1501  ggaatctcc  aagaaccagt  ggatgaaaa  gtgtgggag  atgaagcag  agatagttg
1561  ggtgtggaa  cctgtgccc  atgatgaac  atactgtgc  cccgactcc  tgttccatgt
1621  tctaatgat  taactctca  ttgatatta  caaaaggcc  cttaacact  tccagtttca
1681  aqaagactt  tgtcaagca  ctaaacatg  aggcctctg  caaaaatgg  acatcmeta
1741  ctcaacaga  gctggacaga  aactgttcaa  tatgctgag  cttygaaat  cgaaacctg
1801  gccctagca  ttgaaatg  ttgaggagc  aaagaacat  aatgaagc  caatgctcaa
1861  ctacttggg  occatttta  ctgtgtgaa  agacagaca  aagattctt  ttgtggatg
1921  gactacagc  tggagtcca  atggagacca  aagcatcaa  gtgagataa  gctcaaatc
1981  agctcttgg  gataaagat  atgaatgaa  cgaacatgaa  atgacctgt  tccgatact
2041  ttttcatat  gctatggcg  agtactttt  aaagtmeta  aatcagatg  tcttbtbtg
2101  ggagaggat  gtgagatgg  ctaattgaa  accaagatc  tcttcaat  tcttcttca
2161  tgcctcaaa  aatgtgtgt  atcatctc  tgaactgaa  gttcaaaag  ccaatcagat
2221  tcccccagg  cgtatcaat  atgcttccg  tctgatgac  aacagctag  agtttctgg
2281  gatacagca  acactggac  ctcaacca  gccctctgt  tccatagcc  tgattgttt
2341  tggagtctg  atggagatg  tegtgttgg  cattgtcat  ctgtctcca  ctggatccg
2401  agatggag  agaaaatc  agcaagag  tgggaat  ccttatgct  ccaatgat
2461  tagcaagga  gaaaataat  caggattcca  aaactgat  gatgtcaga  cctctttaa
2521  gaaaatcta  tgttttctc  ctggagtg  tttgtgtg  tgaatgtt  aatttcatg
2581  tatagaat  atagatgat  aagatata  taaatgta  aaactatgc  tctgttcaa
2641  aaaaatgt  tcaaaagca  acatggcaa  ggagagaca  tctctatga  catgtcttc
2701  agtattatt  tctgtctcg  gattgact  ctgttctgt  tcttaaaag  gattttgat
2761  tagatata  taggaaagt  gtgtattgg  tctcaagc  gtttoagga  taatcaat
2821  tcaatgct  gttgaattc  tgaagtga  acaagata  tabatgga  gaaagtgtg
2881  gattttgat  gaaatgga  tggactct  gtaagacag  tgcctggaa  ctggtgagc
2941  tcaagagat  ggaatggca  tgcattgat  cacttcaat  taatctatg  tcaagatga

```

(continued next page)

【手続補正書】

【提出日】平成17年4月13日(2005.4.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2006504637000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/JP 03/00882
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K48/00 C12N9/64 A61K38/48		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE BIOCARTA 'Online! March 2002 (2002-03) GRAMATIKOFF K.: "Angiotensin-converting enzyme 2 regulates heart function" retrieved from WWW.BIOCARTA.COM/PATHFILES/H_ACE2PATHWAY.A SP XP002258714 the whole document	6-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 October 2003		Date of mailing of the international search report 10/11/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Seroz, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/JP 03/00882

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02 12471 A (ACTON SUSAN ;HSIEH FRANK Y (US); ROBISON KEITH E (US); MILLENNIUM) 14 February 2002 (2002-02-14) page 4, line 28,29 page 7, line 18 -page 11, line 29 SEQ ID No 1 figure 13 claims 1,12,16,21,38-40,42 examples 10-14 ---	6-22, 27-66
Y	DONOGHUE MARY ET AL: "A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9" CIRCULATION RESEARCH, GRUNE AND STRATTON, BALTIMORE, US, vol. 87, no. 5, 1 September 2000 (2000-09-01), pages e1-e9, XP002207553 ISSN: 0009-7330 page 7, right-hand column, line 17-24 page 8, right-hand column, paragraph 3 -page 9, left-hand column, paragraph 1 figures 3,10 ---	6-22, 27-66
Y	YAGIL CHANA ET AL: "Role of chromosome X in the Sabra rat model of salt-sensitive hypertension" HYPERTENSION (BALTIMORE), vol. 33, no. 1 PART 2, January 1999 (1999-01), pages 261-265, XP002258712 ISSN: 0194-911X figure 1; tables 1,2 ---	6-22, 27-66
P,X	CRACKOWER MICHAEL A ET AL: "Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function" NATURE (LONDON), vol. 417, no. 6891, 20 June 2002 (2002-06-20), pages 822-828, XP002258713 ISSN: 0028-0836 the whole document -----	6-22, 27-66

International Application No. PCT/CA 03 00882

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 6-9, 27, 28 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.

Although claims 31, 33, 34, 54-66 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-5, 23-26

Present claims 1-5 relate to a method defined by reference to a desirable characteristic or property, namely the use of an undefined ACE2 agonist (claims 1-3 and 23-26) and the use of an undefined transgene (claims 4, 5).

The claims cover all methods, uses and compounds having this characteristic or property, whereas the application does not provide support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for such methods, uses and compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the method by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has not been carried out for claims 1-5, 23-26.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA 03/00882

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.: 1-5, 23-26
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/CA 03/00882

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0212471 A	14-02-2002	AU 8479401 A WO 0212471 A2	18-02-2002 14-02-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 M	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	G 0 1 N 37/00 1 0 2	
	C 1 2 N 15/00 A	
	C 1 2 N 5/00 B	

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

(72) 発明者 マイケル・エイ・クラッコワー

アメリカ合衆国 9 3 0 2 1 カリフォルニア州ムーンパーク、イースト・ミラートン・ロード 1 3 1 3 7 番

F ターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB03 BB20 CB01 CB17 CB21 DA12 DA13 DA14
 DA36 DA77 FB02 FB12
 4B024 AA01 AA11 BA14 CA04 CA05 CA11 DA02 GA14 HA14
 4B063 QA13 QA18 QA19 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62 QS25
 QS34 QX02
 4B065 AA91X AA91Y AB01 BA02 CA33 CA44 CA46
 4C084 AA13 AA17 AA20 NA14 ZA362 ZA422 ZA452 ZA592 ZA812 ZC192
 ZC202
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZA36 ZA42 ZA45 ZA59 ZA81
 ZC19

专利名称(译)	ACE 2激活用于治疗心，肺和肾脏疾病和高血压		
公开(公告)号	JP2006504637A	公开(公告)日	2006-02-09
申请号	JP2004514460	申请日	2003-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	大学健康网络		
申请(专利权)人(译)	大学健康网络		
[标]发明人	ヨーゼフエムペンニンガー マイケルエイクラッコワー		
发明人	ヨーゼフ・エム・ペンニンガー マイケル・エイ・クラッコワー		
IPC分类号	A61K45/00 A01K67/027 A61K35/76 A61K45/06 A61K48/00 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P13/12 A61P43/00 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N37/00 C12N15/09 C12N5/10 A61K38/48 C12N5/06 C12N9/48 C12N15/85 C12N15/86		
CPC分类号	A01K67/0276 A01K2217/075 A01K2227/105 A01K2267/03 A61K38/4813 A61K48/00 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P13/12 A61P43/00 C12N9/48 C12N15/8509 C12Q1/6883 C12Q2600/106 C12Q2600/136 C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q2600/172		
FI分类号	A61K45/00.ZNA A01K67/027 A61K35/76 A61K45/06 A61K48/00 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P9/12 A61P11/00 A61P13/12 A61P43/00.111 C12Q1/68.A C12Q1/68.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.A C12N5/00.B		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB12 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/GA14 4B024/HA14 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA33 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/AA20 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA422 4C084/ZA452 4C084/ZA592 4C084/ZA812 4C084/ZC192 4C084/ZC202 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZA36 4C087/ZA42 4C087/ZA45 4C087/ZA59 4C087/ZA81 4C087/ZC19		
代理人(译)	品川EiSatoshi		
优先权	60/389709 2002-06-19 US		
其他公开文献	JP2006504637A5 JP4598518B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及ACE2基因分型试剂盒，其包含用于检测源自动物，优选人的核酸样品中ACE2多态性的存在的检测剂。

(51) Int. Cl.	F 1	ターマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	4 B O 6 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 51 頁) 最終頁

(21) 出願番号	特願2004-514460 (P2004-514460)	(71) 出願人	500501546
(86) (22) 出願日	平成15年6月19日 (2003. 6. 19)		ユニバーシティー ヘルス ネット
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月16日 (2005. 2. 16)		カナダ国 オンタリオ州 トロント
(86) 国際出願番号	PCT/CA2003/000882		パーシティー アベニュー 610
(87) 国際公開番号	W02004/000967	(74) 代理人	100068526
(87) 国際公開日	平成15年12月31日 (2003. 12. 31)		弁理士 田村 恭生
(31) 優先権主張番号	60/389, 709	(74) 代理人	100076521
(32) 優先日	平成14年6月19日 (2002. 6. 19)		弁理士 坪井 有四郎
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100126778
			弁理士 品川 永敏
		(72) 発明者	ヨーゼフ・エム・ベンニンガー
			オーストリア、アーノ300ヴィ、
			ヒンメルホーフガッセ62番