

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 529375

(P2003 - 529375A)

(43)公表日 平成15年10月7日(2003.10.7)

| (51) Int.Cl ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マ-ド [*] (参考) |
|--------------------------|------|-----------------|-------------------------|
| C 1 2 N 15/09 | ZNA | A 6 1 K 31/7088 | 2 G 0 4 5 |
| A 6 1 K 31/7088 | | 39/395 | D 4 B 0 2 4 |
| 38/43 | | 45/00 | 4 B 0 6 3 |
| 39/395 | | 48/00 | 4 C 0 8 4 |
| 45/00 | | A 6 1 P 3/06 | 4 C 0 8 5 |

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 95数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 573040(P2001 - 573040)

(86)(22)出願日 平成13年3月29日(2001.3.29)

(85)翻訳文提出日 平成14年9月30日(2002.9.30)

(86)国際出願番号 PCT/US01/10590

(87)国際公開番号 W001/075168

(87)国際公開日 平成13年10月11日(2001.10.11)

(31)優先権主張番号 09/539,569

(32)優先日 平成12年3月31日(2000.3.31)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/541,468

(32)優先日 平成12年3月31日(2000.3.31)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
ティ オブ カリフォルニア
アメリカ合衆国 94607 - 5200 カリフォル
ニア州 オークランド トウエルフス フ
ロア フランクリン ストリート 1111

(72)発明者 フォージェルマン、アラン、エム .
アメリカ合衆国 90212 - 4107 カリフォル
ニア州 ビバリー ヒルズ ヒルグリーン
ドライブ 481

(74)代理人 弁理士 中島 淳 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト動脈壁細胞内で酸化脂質により誘発される遺伝子の制御

(57)【要約】

本発明は、アテローム性硬化症の1つ以上の症状を抑制する新規な方法を提供する。さらに、アテローム性硬化症の1つ以上の症状の進行を抑制および/または改善する化合物に関するアッセイも提供する。これらの方法およびアッセイは、部分的には、酸化LDLまたはその成分が、アテローム性硬化症のプラーク形成に特徴的な“炎症反応”をもたらず、MAPキナーゼホスファターゼ-1の強力なアップレギュレーションを誘発するという発見に基づく。MKP-1の抑制は、この反応(例えば単球付着、単球走化性、マクロファージへの分化など)の1つ以上の症状を抑制する。従って、MKP-1の抑制は、アテローム性硬化症の症状を抑制する有効な方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アテローム性硬化症の1つ以上の症状を改善する化合物を同定する方法であって、

MKP-1 遺伝子を含む細胞を供試薬剤と接触させること、および

MKP-1 遺伝子の発現を検出し、それによってMKP-1 発現の抑制は該供試薬剤がアテローム性硬化症の1つ以上の症状を改善する化合物であることを示すこと、

を包含する、方法。

【請求項2】 MAPキナーゼホスファターゼ1 (MKP-1) の発現をアップレギュレートする酸化低密度リポタンパク質 (Ox-LDL) または酸化リン脂質を含むその成分に前記細胞を接触させることを更に包含し、ここで、前記検出がMKP-1 遺伝子の発現を検出することを含み、それによって酸化低密度リポタンパク質 (Ox-LDL) またはその成分と接触し供試薬剤とは接触しなかったか又は低濃度の供試薬剤と接触した細胞と比較した、供試薬剤と接触した細胞における発現抑制が、該供試薬剤はアテローム性硬化症の1つ以上の症状を改善する化合物であることを示す、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記低密度リポタンパク質 (Ox-LDL) またはその成分が、以下から成る群から選択される脂質の酸化形態であるリン脂質：酸化された1-パルミトイル-2-アラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン (Ox-PAPC)、1-パルミトイル-2-オキソバレロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン (POVPC)、1-パルミトイル-2-グルタロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン (PGPC)、1-パルミトイル-2-エポキシイソプロスタン-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン (PEIPC)、1-ステアロイル-2-アラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン (Ox-SAPC)、1-ステアロイル-2-オキソバレロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン (SOVPC)、1-ステアロイル-2-グルタロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン (SGPC)、1-ステアロイル-2-エポキシイソプロスタン-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン (SEIPC)、1-ステアロイル-2-アラキドニル-sn-グリセロ-

3 - ホスホリルエタノールアミン (O x - S A P E)、1 - ステアロイル - 2 - オキソバレロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (S O V P E)、1 - ステアロイル - 2 - グルタロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (S G P E)、および1 - ステアロイル - 2 - エポキシイソプロスタン - s n - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (S E I P E) である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 前記細胞が哺乳類細胞である、請求項2に記載の方法。

【請求項5】 前記細胞がヒトの細胞である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記細胞がヒトの血管細胞である、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 前記検出がM K P - 1 核酸の検出を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項8】 前記検出がM K P - 1 m R N Aまたはc D N Aの検出を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項9】 前記検出がM K P - 1 ポリペプチドの検出を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項10】 前記検出がM K P - 1 ポリペプチド活性の測定を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項11】 前記検出がアテローム性硬化症の症状の検出を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項12】 前記アテローム性硬化症の症状が、単球の結合または単球の走化性である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記M K P - 1 の発現レベルが、前記細胞中のM K P - 1 m R N A レベルの測定によって検出される、請求項2に記載の方法。

【請求項14】 前記M K P - 1 m R N A レベルが、M K P - 1 核酸と特異的にハイブリダイズするプローブに前記m R N A をハイブリダイズさせることによって測定される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 前記ハイブリダイゼーションが、ノザンプロット、M K P - 1 R N A に由来するD N A を用いるサザンプロット、アレーハイブリダイゼーション、アフィニティークロマトグラフィー、およびin situハイブリダイゼ

ーションから成る群から選択される方法による、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記プローブがプローブのアレーを形成する複数のプローブの1メンバーである、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 前記MKP-1 mRNAレベルが核酸増幅反応を用いて測定される、請求項13に記載の方法。

【請求項18】 前記MKP-1レベルが、前記生物学的サンプル中のMKP-1タンパク質の発現レベルを測定することによって検出される、請求項2に記載の方法。

【請求項19】 前記検出が、キャピラリー電気泳動、ウェスタンブロット、質量分析法、ELISA、免疫クロマトグラフィー、および免疫組織化学から成る群から選択される方法による、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 前記細胞がex vivoで培養される、請求項2に記載の方法

。

【請求項21】 前記供試薬剤が、MKP-1核酸またはMKP-1タンパク質を含む細胞を含む動物に投与される、請求項2に記載の方法。

【請求項22】 前記供試薬剤が抗体でない、請求項2に記載の方法。

【請求項23】 前記供試薬剤がタンパク質でない、請求項2に記載の方法

。

【請求項24】 前記供試薬剤が有機小分子である、請求項2に記載の方法

。

【請求項25】 MKP-1核酸の発現またはMKP-1タンパク質を変化させる供試薬剤を、MKP-1活性の調節物質のデータベース、またはアテローム性硬化症の1つ以上の症状を改善する薬剤のデータベースに記録することを更に包含する、請求項2に記載の方法。

【請求項26】 MKP-1調節物質を予備スクリーニングする方法であって、

(a) MKP-1核酸またはMKP-1タンパク質を供試薬剤と接触させること、および

(b) 該供試薬剤の該MKP-1タンパク質または核酸への特異的結合を検出

すること、ここで、該供試薬剤と該MKP - 1タンパク質または核酸との特異的結合は該供試薬剤がMKP - 1の可能性のある調節物質であることを示す、

を包含する、方法。

【請求項27】 前記MKP - 1核酸または前記MKP - 1タンパク質と特異的に結合する供試薬剤を、MKP - 1活性の調節物質候補薬剤のデータベースまたは、アテローム性硬化症の1つ以上の症状を改善する薬剤のデータベースに記録することを更に包含する、請求項26に記載の方法。

【請求項28】 前記供試薬剤が抗体でない、請求項26に記載の方法。

【請求項29】 前記供試薬剤がタンパク質でない、請求項26に記載の方法。

【請求項30】 前記検出が、前記供試薬剤の前記MKP - 1核酸への特異的結合を検出することを含む、請求項26に記載の方法。

【請求項31】 前記結合が、ノザンプロット、DNAを用いるサザンプロット、アレーハイブリダイゼーション、アフィニティークロマトグラフィー、およびin situハイブリダイゼーションから成る群から選択される方法を用いて検出される、請求項30に記載の方法。

【請求項32】 前記検出が、前記供試薬剤の前記MKP - 1タンパク質への特異的結合を検出することを含む、請求項26に記載の方法。

【請求項33】 前記検出が、キャピラリー電気泳動、ウェスタンプロット、質量分析法、ELISA、免疫クロマトグラフィー、および免疫組織化学から成る群から選択される方法による、請求項32に記載の方法。

【請求項34】 前記供試薬剤をMKP - 1核酸またはMKP - 1タンパク質と直接接触させる、請求項26に記載の方法。

【請求項35】 前記供試薬剤をMKP - 1核酸またはMKP - 1タンパク質を含む細胞と接触させる、請求項26に記載の方法。

【請求項36】 前記細胞がex vivoで培養される、請求項35に記載の方法。

【請求項37】 前記供試薬剤をMKP - 1核酸またはMKP - 1タンパク質を含む細胞を含む動物と接触させる、請求項26に記載の方法。

【請求項38】 アテローム性硬化症の1つ以上の症状を改善する方法であつて、MAPキナーゼホスファターゼ1(MKP-1)の発現を抑制することを包含する、方法。

【請求項39】 前記抑制が、酸化低密度リポタンパク質(Ox-LDL)または酸化リン脂質を含むその成分に対応したMKP-1のアップレギュレーションを抑制することを包含する、請求項38に記載の方法。

【請求項40】 前記抑制が、MKP-1核酸をアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させることを包含する、請求項38に記載の方法。

【請求項41】 前記抑制が、MKP-1核酸を特異的に開裂するリボザイムに前記MKP-1核酸を接触させることを包含する、請求項38に記載の方法。

【請求項42】 前記抑制が、MKP-1核酸を特異的に開裂する触媒性DNAに前記MKP-1核酸を接触させることを包含する、請求項38に記載の方法。

【請求項43】 前記抑制が、MKP-1遺伝子、MKP-1プロモーターまたは介在核酸との相同組換えによってMKP-1遺伝子を不活化する核酸を、MKP-1遺伝子を含む細胞にトランスフェクトすることを包含する、請求項38に記載の方法。

【請求項44】 前記抑制が、MKP-1ポリペプチドと特異的に結合するイントラボディをコードする核酸を、MKP-1遺伝子を含む細胞にトランスフェクトすることを包含する、請求項38に記載の方法。

【請求項45】 前記抑制が、前記MKP-1遺伝子のアップレギュレーションを抑制する有機小分子にMKP-1遺伝子を含む細胞を接触させることを包含する、請求項38に記載の方法。

【請求項46】 前記有機小分子が、酸化LDLまたは酸化リン脂質を含むその成分に反応した前記MKP-1遺伝子のアップレギュレーションを抑制する、請求項45に記載の方法。

【請求項47】 前記抑制が、前記MKP-1遺伝子のアップレギュレーションを抑制するリン脂質にMKP-1遺伝子を含む細胞を接触させることを包含

する、請求項38に記載の方法。

【請求項48】 前記症状が、アテローム性硬化症であるか又はその危険性があると診断されたヒト患者に存在する、請求項38に記載の方法。

【請求項49】 前記症状が、アテローム性硬化症であると診断されたヒト患者に存在する、請求項48に記載の方法。

【請求項50】 前記症状が、癌であると診断されていないヒト患者に存在する、請求項38に記載の方法。

【請求項51】 アテローム性硬化症の1つ以上の症状を改善する化合物をスクリーニングするためのキットであって、

MKP-1核酸を含む細胞、および

MKP-1ポリペプチドと特異的に結合する標識抗体、MKP-1核酸と特異的に結合する核酸、およびMKP-1核酸またはそのフラグメントを特異的に増幅させるプライマーから成る群から選択される検出部分

を含む、キット。

【請求項52】 前記キットが、酸化低密度リポタンパク質または酸化リン脂質を含むその成分を更に含む、請求項51に記載のキット。

【請求項53】 前記酸化低密度リポタンパク質またはその成分が、以下から成る群から選択される酸化リン脂質：酸化された1-パルミトイル-2-アラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(Ox-PAPC)、1-パルミトイル-2-オキソバレロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(POVPC)、1-パルミトイル-2-グルタロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(PGPC)、1-パルミトイル-2-エポキシイソプロスタノール-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(PEIPC)、酸化された1-ステアロイル-2-アラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(Ox-SAPC)、1-ステアロイル-2-オキソバレロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(SOVPC)、酸化されたSAPC、1-ステアロイル-2-グルタロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(SGPC)、1-ステアロイル-2-エポキシイソプロスタノール-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(SEIPC)、酸化された1-ステアロイル-2-アラキドニル-s

n - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (O x - S A P E)、1 - ステアロイル - 2 - オキソバレロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (S O V P E)、1 - ステアロイル - 2 - グルタロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (S G P E)、および1 - ステアロイル - 2 - エポキシイソプロスタノール - s n - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (S E I P E) を含む、請求項52に記載のキット。

【請求項54】 MKP - 1の抑制物質をスクリーニングするプロトコルを提供し、そのような抑制物質がアテローム性硬化症の1つ以上の症状を改善することを教示する指示物を更に含む、請求項51に記載のキット。

【請求項55】 MKP - 1の発現を抑制するためのキットであって、MKP - 1アンチセンス分子、MKP - 1リボザイム、酸化リン脂質に反応してMKP - 1のアップレギュレーションを抑制する脂質、MKP - 1と結合しMKP - 1活性を阻害する抗体から成る群から選択されるMKP - 1の抑制物質を含む、キット。

【請求項56】 アテローム性硬化症または慢性関節リウマチの1つ以上の症状を改善する方法としてMKP - 1の抑制を教示する指示物を更に含む、請求項55に記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(関連出願のクロス・リファレンス)

本出願は、USSN09/541,468号(2000年3月31日出願)およびUSSN09/539,569号(2000年3月31日出願)(両文献は、本明細書中に参考として援用されている)についての優先権および特典を主張する。

(連邦政府支援研究開発により達成された発明の権利に関する記載)

本発明は、米国立衛生研究所グラント番号HL30568により政府の支援を得て達成された。合衆国政府は、本発明に関して一定の権利を有する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、アテローム性硬化症の分野に関する。特に、本発明は、酸化LDLがMKP-1をアップレギュレートし、アテローム性硬化症のプラーク形成に特徴的な炎症性反応を惹起するという発見に関する。

【0003】

(発明の背景)

心臓血管系疾患は、特に合衆国および西欧諸国において罹病率および死亡率の主要な原因である。原因となる幾つかの因子は、該疾患に対する遺伝的素因、性別、ライフスタイルに関する因子(例えば、喫煙および食事)、年齢、高血圧および高脂血症(高コレステロール血症を含む)を含む心臓血管系疾患の発生と関連を有する。これらの因子の幾つか、特に、高脂血症および高コレステロール血症(高い血中コレステロール濃度を示す)は、アテローム性硬化症と密接に関連する顕著な危険因子をもたらす。

コレステロールは、リポタンパク質粒子内部で遊離型およびエステル型コレステロールとして血中に存在する。リポタンパク質粒子は、カイロミクロン、超低密度リポタンパク質(VLDL)、低密度リポタンパク質(LDL)、および高密度リポタンパク質(HDL)として一般的に知られている。血中の総コレステロール濃度は、(1)消化管からのコレステロール吸収、(2)食事成分(例えば、炭水化物、タンパク質、脂肪およびエタノール)からのコレステロールの合

成、および(3)組織(特に肝臓)による血液からコレステロールの除去、それに続くコレステロールの胆汁酸、ステロイドホルモンおよび胆汁コレステロールへの変換によって影響を受ける。

【0004】

血中コレステロール濃度の維持は、遺伝因子および環境因子の両方の影響を受ける。遺伝因子には、個体のコレステロール生合成における律速酵素の濃度、肝臓の低密度リポタンパク質に対するレセプターの濃度、コレステロール胆汁酸変換を行う律速酵素の濃度、リポタンパク質の合成および分泌の速度、および性別が含まれる。ヒトの血中コレステロール濃度のホメオスタシスに影響を与える環境因子には、食事構成、喫煙の事象、身体的活動、および種々の薬剤の使用が含まれる。食事性変動因子には、脂肪の量およびタイプ(飽和およびポリ不飽和脂肪酸)、コレステロールの量、繊維の量およびタイプ、並びに恐らくはビタミン(例えば、ビタミンCおよびD)およびミネラル(例えば、カルシウム)の量が含まれる。

【0005】

上記で示したように、高い血中コレステロール濃度は、ヒトの脈管系疾患および冠状動脈心疾患の主要危険因子の1つである。低密度リポタンパク質コレステロール(“LDL-コレステロール”)および総コレステロールの上昇は、冠状動脈心疾患の危険性の増加に直接関連する(Cholesterol and Mortality:30 Years of Follow-Up from the Framingham Study, Anderson, Castelli, & Levy (1987) JAMA, 257:2176-80)。

【0006】

高レベルの総コレステロールおよびLDL-コレステロールはアテローム性硬化症および脈管系疾患発生の危険因子であるが、高密度リポタンパク質コレステロール(以下では“HDL-コレステロール”)の不足は、これらの症状を発生させる危険因子であることが最近になって認識された。幾つかの臨床試験が、アテローム性硬化症に対抗するHDL-コレステロールの防護的役割を支持している。ある研究では、女性において、血中HDL-コレステロールが1mg/dL増加する毎に冠動脈疾患のリスクが3%減少することが示された(High-density

Lipoprotein Cholesterol and Cardiovascular Disease: Four Prospective American Studies, Gordon, Probstfield, and Garrison et al., (1989) *Circulation*, 79:8-15)。

【0007】

HDLが“防護的”リポタンパク質であり (Vega and Grundy (1996) *Curr. Opin. Lipidology*, 7:209-216)、さらにHDLの血漿レベルの増加がアテローム性硬化症の発生に対して直接的防御を提供し得ると広く信じられている。多数の研究で、ヒトの冠状動脈心疾患 (CHD) の危険性および動物の実験的アテローム性硬化症の重篤度の両方が、血清のHDLコレステロール (HDL-C) 濃度と逆比例することが示された (Russ et al. (1951) *Am. J. Med.*, 11:480-493; Gofman et al. (1996) *Circulation*, 34:679-697; Miller and Miller (1975) *Lancet*, 1:16-19; Gordon et al. (1989) *Circulation*, 79:8-15; Stampfer et al. (1991) *N. Engl. J. Med.*, 325:373-381; Badimon et al. (1989) *Lab. Invest.*, 60:455-461)。

HDL/LDL比が、集団レベルでアテローム性硬化症および心臓疾患の危険性に対する優れたマーカーを提供することは明らかであるが、HDLおよび/またはLDL測定値は、個体レベルでは不十分な予後インジケータであることが判明した。高いHDL:LDL比を有する特定の個体で特に、重篤なアテローム性硬化症が観察されたが、一方、逆に非常に低いHDL:LDL比を有する個体ではアテローム性硬化症の証拠は特定されなかった。

【0008】

(発明の概要)

本発明は、アテローム性硬化症の1つ以上の症状を抑制する新規な方法を提供する。さらに、本発明は、アテローム性硬化症の1つ以上の症状の進行を抑制および/または改善する化合物に関するアッセイを提供する。本方法およびアッセイは、部分的には、酸化されたLDLまたはその成分が、MAPキナーゼホスファターゼ-1 (MKP-1) の強力なアップレギュレーションを誘発し、それは続いて、アテローム性硬化症のプラーク形成に特徴的な“炎症反応”に関連するという発見に基づく。MKP-1の抑制は、この反応の1つ以上の症状 (例えば

、単球の付着、単球の走化性、マクロファージへの分化など)を抑制する。従って、MKP-1の抑制は、アテローム性硬化症の症状を抑制する効果的な方法を提供する。

【0009】

従って、1つの実施態様では、本発明は、アテローム性硬化症(または他の炎症性疾患、例えば、慢性関節リウマチ、特発性肺線維症、狼瘡など)の1つ以上の症状を改善させる化合物を同定する方法を提供する。本方法は、MKP-1遺伝子を含む細胞を供試薬剤と接触させること、およびMKP-1遺伝子発現を検出することを包含し、それによって、MKP-1発現の抑制は、供試薬剤がアテローム性硬化症の1つ以上を改善する化合物であることを示すものである。ある実施態様では、本方法はさらに、酸化された低密度リポタンパク質(Ox-LDL)またはその成分(MAPキナーゼホスファターゼ-1(MKP-1)の発現をアップレギュレートする酸化リン脂質を含む)と細胞を接触させることを包含する。これらの実施態様では、検出は、好ましくはMKP-1遺伝子の発現の検出を含み、それによって、酸化された低密度リポタンパク質(Ox-LDL)またはその成分と接触し供試薬剤とは接触しなかった(または低濃度の供試薬剤と接触した)細胞と比較したとき、供試薬剤と接触した細胞中の発現の抑制は、供試薬剤がアテローム性硬化症の1つ以上の症状を改善する化合物であることを示すものである。ある種の実施態様では、多数の供試薬剤を同じ細胞で同時にアッセイできることが理解されよう。複数の供試薬剤について陽性結果が得られた場合、この複数の薬剤を含む各薬剤を個々に再テストすることができる。

【0010】

特に好ましいアッセイでは、低密度リポタンパク質(Ox-LDL)またはその成分は、以下から成る群から選択される1つ以上の脂質の酸化形態である酸化されたリン脂質である：酸化1-パルミトイル-2-アラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(Ox-PAPC)、1-パルミトイル-2-オキソバレロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(POVPC)、1-パルミトイル-2-グルタロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(PGPC)、1-パルミトイル-2-エポキシイソプロスタン-sn-グリセロ-

3 - ホスホリルコリン (PEIPC)、1 - ステアロイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (Ox-SAPC)、1 - ステアロイル - 2 - オキソバレロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (SOVPC)、1 - ステアロイル - 2 - グルタロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (SGPC)、1 - ステアロイル - 2 - エポキシイソプロスタン - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (SEIPC)、1 - ステアロイル - 2 - アラキドニル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (Ox-SAPE)、1 - ステアロイル - 2 - オキソバレロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (SOVPE)、1 - ステアロイル - 2 - グルタロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (SGPE)、および1 - ステアロイル - 2 - エポキシイソプロスタン - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (SEIPE)。

【0011】

好ましい実施態様では、細胞は哺乳類細胞、より好ましくはヒトの細胞である。特に好ましい細胞にはヒトの血管細胞が含まれる。特に好ましい細胞はex vivoで培養された細胞である。

MKP - 1 発現の検出には、好ましくはMKP - 1 核酸 (例えば、MKP - 1 mRNA、cDNA、cRNAなど) もしくはそのフラグメントの検出、MKP - 1 ポリペプチドもしくはそのフラグメントの検出、またはMKP - 1 ポリペプチド活性の測定が含まれる。特に好ましい実施態様では、MKP - 1 タンパク質活性の検出は、アテローム性硬化症の症状 (例えば、単球の結合、単球の走化性など) の検出を含む。特に好ましい実施態様では、MKP - 1 の発現レベルは、前記細胞中のMKP - 1 mRNAレベルの測定によって検出される。特に好ましい実施態様では、MKP - 1 mRNAレベルは、該mRNAをMKP - 1 核酸と特異的にハイブリダイズするプローブとハイブリダイズさせることによって測定される。好ましいハイブリダイゼーション様式には、ノザンプロット、MKP - 1 RNAに由来するDNAを用いるサザンプロット、アレーハイブリダイゼーション、アフィニティークロマトグラフィー、およびin situハイブリダイゼーションが含まれるが、但しこれらに限定されない。前記ハイブリダイゼーシ

ンはアレーベース様式で実施してもよいが、その場合、MKP-1 核酸と特異的に結合するプローブは、プローブのアレーを形成する複数のプローブのうちの1つ以上のメンバーである。MKP-1 mRNAレベルは、幾つかの実施態様では核酸増幅反応（例えば、PCR）を用いて測定される。他の実施態様では、MKP-1 発現レベルは、生物学的サンプル中のMKP-1 タンパク質の発現レベルを検出することによって測定される。好ましいタンパク質検出方法には、キャピラリー電気泳動、ウェスタンブロット、質量分析法、ELISA、免疫クロマトグラフィー、および免疫組織化学が含まれるが、但しこれらに限定されない。

【0012】

ある種の実施態様では、供試薬剤を培養細胞と接触させ、他の実施態様では、供試薬剤をMKP-1 核酸またはMKP-1 タンパク質を含む細胞を含む動物に投与する。本質的にいずれの分子組成物または組み合わせ分子も供試薬剤を含み得るが、好ましい供試薬剤は抗体ではなく、および/またはタンパク質ではない。特に好ましい供試薬剤は、有機の小分子である。

好ましい実施態様では、本方法はさらに、MKP-1 核酸またはMKP-1 タンパク質の発現を変化させる供試薬剤を、MKP-1 活性調節物質のデータベース、またはアテローム性硬化症の1つ以上の症状を改善する薬剤のデータベースに記録することを含む。

【0013】

別の実施態様では、本発明は、MKP-1 の調節物質または抑制物質の予備スクリーニング方法を提供する。これらの方法は、MKP-1 核酸またはMKP-1 タンパク質を供試薬剤と接触させ；さらに供試薬剤とMKP-1 タンパク質または核酸との特異的結合を検出することを包含し、ここで、供試薬剤とMKP-1 タンパク質または核酸との特異的結合は、該供試薬剤がMKP-1 調節物質としての可能性を有することを示す。ある種の実施態様では、本方法はさらに、MKP-1 核酸またはMKP-1 タンパク質と特異的に結合する供試薬剤をMKP-1 活性の調節物質の候補薬剤のデータベース、および/またはアテローム性硬化症の1つ以上の症状を改善する薬剤のデータベースに記録することを含む。特

に好ましい実施態様では、供試薬剤は抗体ではなく、および/またはタンパク質ではない。特に好ましい供試薬剤は、疎水性化合物、および/または脂質、および/または有機小分子である。結合の検出は、当業者に公知である多数の方法のいずれかによる。従って、例えば、幾つかの実施態様では、前記検出は、供試薬剤とMKP-1核酸との特異的な結合の検出を含む(例えば、ノザンプロット、DNAを用いるサザンプロット、アレーハイブリダイゼーション、アフィニティークロマトグラフィー、およびin situハイブリダイゼーションから成る群から選択される方法を用いる)。他の実施態様では、前記検出は、供試薬剤と該MKP-1タンパク質との特異的な結合を検出することを含む(例えば、キャピラリー電気泳動、ウェスタンプロット、質量分析法、ELISA、免疫クロマトグラフィー、および免疫組織化学から成る群から選択される方法による)。

【0014】

アッセイ様式に応じて、供試薬剤をMKP-1核酸もしくはMKP-1タンパク質と直接接触させるか、または供試薬剤をMKP-1核酸もしくはMKP-1タンパク質を含む細胞と(ex vivoでの培養下で)接触させるか、または供試薬剤をMKP-1核酸もしくはMKP-1タンパク質を含む細胞を含む動物と接触させる。

別の実施態様では、本発明は、アテローム性硬化症の1つ以上の症状を改善する方法を提供する。本方法は、MAPキナーゼホスファターゼ1(MKP-1)の発現を抑制することを含む。MKP-1発現はあらゆるコンテキストで抑制され得る、または、抑制は組織特異的もしくは特定の時期であってよく、または特異的な刺激に対してであっても良い。ある実施態様では、MKP-1の抑制は、酸化された低密度リポタンパク質(Ox-LDL)またはその成分(例えば、酸化リン脂質を含む)に対する反応中に代表的に生じるMKP-1のアップレギュレーションの抑制を含む。

【0015】

MKP-1抑制は、以下(但し、これらに限定されない)を含む様々な方法のいずれによっても良い: MKP-1核酸をアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させる; MKP-1核酸をリボザイムおよび/または触媒性DNAと接触させ

る；MKP - 1 遺伝子を含む細胞に、MKP - 1 遺伝子、MKP - 1 プロモーターまたは介在核酸との相同性組換えによってMKP - 1 遺伝子を不活化する核酸をトランスフェクトする；MKP - 1 遺伝子を含む細胞に、MKP - 1 ポリペプチドと特異的に結合するイントラボディをコードする核酸をトランスフェクトする；MKP - 1 遺伝子を含む細胞を、MKP - 1 遺伝子のアップレギュレーション（例えば、酸化LDLまたは酸化リン脂質を含むその成分と反応して典型的に生じるアップレギュレーション）を抑制する小有機分子と接触させる；およびMKP - 1 遺伝子を含む細胞を、該MKP - 1 のアップレギュレーションを抑制するリン脂質と接触させる。

【0016】

ある種の実施態様では、本方法はヒト以外の哺乳類で実施されるが、特に好ましい実施態様では、本方法はヒトで実施される。好ましいヒトは、アテローム性硬化症と診断されたか、またはアテローム性硬化症の危険性を有すると診断されたヒトの患者（被験者）である。特に好ましいヒトには、アテローム性硬化症と診断されたヒト患者が含まれる。ある種の実施態様では、本方法は、癌と診断されていないか、または癌もしくは他の新生物の危険性があると診断されていないヒトの被験者、および/または癌が緩解もしくは“治癒”したと診断された被験者で実施される。

【0017】

本発明はまた、本発明のアッセイおよび“治療”方法を実施するためのキットを提供する。従って、本発明のある実施態様では、アテローム性硬化症の1つ以上の症状（例えば、単球の付着、単球の走化性、単球のマクロファージへの分化など）を改善する化合物をスクリーニングするキットが提供される。本キットは、好ましくはMKP - 1 核酸を含む細胞；および以下から成る群から選択される検出成分を含む：MKP - 1 ポリペプチドと特異的に結合する標識抗体、MKP - 1 核酸と特異的に結合する核酸、およびMKP - 1 核酸またはそのフラグメントを特異的に増幅させるプライマー。幾つかの実施態様では、本キットはさらに、酸化リン脂質を含む酸化された低密度リポタンパク質またはその成分を含む。好ましい酸化リン脂質には本明細書で述べたものが含まれるが、但しこれらに限

定されない。必要に応じて、本キットはさらにまた指示物を含み、前記指示物は、MKP-1の抑制物質をスクリーニングするプロトコルを提供し、さらに必要に応じて、そのような抑制物質は、アテローム性硬化症および/または付随する病態、および/または慢性関節リウマチ、および/または他の炎症性経過の1つ以上の症状を改善することを教示する。

【0018】

また別の実施態様では、本発明は、MKP-1の発現を抑制するキットを提供する。好ましいキットは、MKP-1アンチセンス分子、MKP-1リボザイム、酸化リン脂質と反応してMKP-1がアップレギュレートするのを抑制する脂質、MKP-1と結合しMKP-1活性を阻害する抗体から成る群から選択されるMKP-1の抑制物質を含む。そのようなキットは、さらに、必要に応じて、アテローム性硬化症、および/または慢性関節リウマチ、および/または他の炎症性経過の1つ以上の症状を改善する方法としてMKP-1の抑制を教示する指示物を含む。

【0019】

定義：

“アテローム性硬化症”とは、動脈壁上/内部へのコレステロール蓄積の過程であり、冠状動脈および脳動脈の閉塞または狭窄をもたらし、しばしば、それに続いて心筋梗塞および発作をもたらす。

“ポリペプチド”、“ペプチド”および“タンパク質”という用語は、本明細書では相互交換的に用いられ、アミノ酸残基のポリマーを指す。これらの用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマーと同様に、1つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工的な化学的類似体であるアミノ酸ポリマーにも適用される。

“MKP-1核酸”という用語は、MAPキナーゼホスファターゼ1(MKP-1)(例えば、GenBank承認番号x68277を参照されたい)をコードする核酸、またはそれに由来する核酸を指す。従って、MKP-1核酸には、MKP-1遺伝子(例えば、erp/mkp-1)、MKP-1 RNA、MKP-1 cDNA、MKP-1 cRNAなどが含まれるが、但しこれらに限定されない。

【0020】

“MKP-1タンパク質またはポリペプチド”は、MKP-1遺伝子またはcDNAによって発現されるタンパク質、例えば、MAPキナーゼホスファターゼ1である。

“発現を抑制する”という用語は、MKP-1の抑制を指して用いられ、MKP-1の転写、および/または翻訳、および/または活性なMKP-1タンパク質の形成もしくは利用可能性の低下もしくは阻害を指す。

MKP-1核酸という用語は、MKP-1をコードする核酸もしくはそのフラグメント、またはMKP-1をコードする核酸もしくはそのフラグメントに相補的な核酸を指す。MKP-1核酸には、MKP-1のゲノムDNA、mRNA、cDNA、cRNAまたはそれらのフラグメントが含まれるが、但しこれらに限定されない。

“MKP-1 mRNAまたはcDNAを検出する”という用語は、MKP-1核酸の検出および/または定量、またはその定量がMKP-1核酸の発現レベルの指標を提供する、前記に由来する核酸の検出および/または定量を指す。本用語には、従って、MKP-1 mRNA、cDNA、MKP-1増幅産物および前記のいずれかのフラグメントが含まれるが、但しこれらに限定されない。

【0021】

“結合パートナー”または“捕捉薬剤”または“結合対”の1メンバーという用語は、特異的に他方の分子と結合し、結合複合体（例えば、抗原-抗体、レクチン-炭水化物、核酸-核酸、ビオチン-アビジンなど）を形成する分子を指す。

本明細書で用いられるように、“特異的に結合する”という用語は、生体分子（例えば、タンパク質、核酸、抗体など）を指すときは、分子の異質な集団（例えば、タンパク質および他の生物学的物質）中の前記生体分子の存在を決定する結合反応を指す。従って、規定された条件（例えば、抗体の場合には免疫アッセイ条件または核酸の場合にはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件）下では、特定のリガンドまたは抗体は、その固有の“標的”分子と結合し、サンプル中に存在する他の分子とは有意な量で結合しない。

“アテローム性硬化症の症状”という語句は、アテローム性硬化症プラークの形成および付随する病態に特徴的な1つ以上の症状を指す。そのような症状には、血管壁への単球の結合、単球の内皮下腔への走化性、単球のマクロファージへの分化、血管閉塞、血管閉塞に伴う血圧上昇、血管壁の硬化、発作、および炎症を惹起するようなもの、並びに幾つかの事例では、その後に血栓症を伴うプラークの断裂またはプラークの侵食が含まれるが、但しこれらに限定されない。

【0022】

本明細書中の“核酸”または“オリゴヌクレオチド”という用語または文意的等価物は、共有結合した少なくとも2つのヌクレオチドを指す。本発明の核酸は、好ましくは一本鎖または二本鎖であり、一般にはホスホジエステル結合を含む。しかしながら、幾つかの事例では、下記に概略するように、例えば、以下を含む代替的骨格を有する核酸類似体を含み得る：ホスホルアミド (Beaucage et al. (1993) *Tetrahedron* 49(10):1925およびその中の参考文献；Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800；Sprinzl et al. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81:579；Letsinger et al. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:3487；Sawai et al. (1984) *Chem. Lett.* 805, Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470；およびPauwels et al. (1986) *Chemica Scripta* 26:1419)、ホスホロチオエート (Mag et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437；および米国特許5,644,048号)、ホスホロジチオエート (Briu et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321)、O-メチルホスホロアミダイト結合 (Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Pressを参照されたい)、並びにペプチド核酸骨格および結合 (Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895；Meier et al. (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008；Nielsen (1993) *Nature* 365:566；Carlsson et al. (1996) *Nature* 380:207)。

【0023】

他の類似の核酸には、ポジティブ骨格を有するもの (Denpcy et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6097)、非イオン性骨格を有するもの (米国特許5,386,023号；同5,637,684号；同5,602,240号；同5,216,141号；同4,469,863号；*Angew. (1991) Chem. Intl. Ed. English* 30:423；Letsinger et al. (1988

) J. Am. Chem. Soc. 110:4470 ; Letsinger et al. (1994) Nucleotide & Nucleotide 13:1597 ; Chapters 2 and 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook ; Mesmaeker et al.(1994) Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4:395 ; Jeffs et al. (1994) J. Biomolecular NMR 34:17 ; Tetrahedron Lett. 37:743 (1996)) および非リボース骨格を有するもの(以下の文献に記載されたものを含む: 米国特許5,235,033号および同5,034,506号 ; Chapter6 and 7, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook) が含まれる。1つ以上の炭素環式糖を含む核酸も、本核酸の定義に含まれる(Jenkins et al. (1995) Chem. Soc. Rev. pp169-176を参照されたい)。幾つかの核酸類似体は次の文献に記載されている: Rawls, C & E News June 2, 1997 page35)。リボース - ホスフェート骨格のこれらの改変は、また別の部分(例えば、標識)の付加を容易にするため、またはそのような分子の生理的環境下での安定性および半減期を増すために実施することができる。

【0024】

本明細書で用いられるように、“特異的にハイブリダイズする”および“特異的なハイブリダイゼーション”および“選択的にハイブリダイズする”という用語は、核酸分子が優先的に特定のヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下で、結合するか、デュプレックスを形成するか、またはハイブリダイズすることを指す。“ストリンジェントな条件”という用語は、その条件下でプローブがその標的配列と優先的にハイブリダイズし、他の配列とはより低い度合いでハイブリダイズする(完全にハイブリダイズしないわけではない)条件を指す。核酸のハイブリダイゼーションに関連するストリンジェントなハイブリダイゼーション条件およびストリンジェントな洗浄条件は、配列に依存し、異なる環境パラメーター下では異なる。核酸のハイブリダイゼーションについての広範囲の手引きは、例えば、以下に見出される: Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes part I, chapt2, Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays, Elsvier, NY(Tijssen)。

【0025】

一般に、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件および洗浄条件は、指定イオン強度およびpHでの特異的配列に関する融解温度(T_m)よりも約5℃低くなるように選択される。前記 T_m は、(規定のイオン強度およびpHで)標的配列の50%が、完全にマッチするプローブとハイブリダイズする温度である。非常にストリンジェントな条件は、特定のプローブに関する T_m と等しくなるように選択される。100以上の相補性残基を有する相補性核酸の、サザンまたはノザンプロットにおけるアレー上もしくはフィルター上での、ハイブリダイゼーションのためのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例は、42℃で標準的なハイブリダイゼーション溶液(例えば、以下を参照されたい: Sambrook (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, および下記の詳細な考察)を用い、ハイブリダイゼーションは一晩実施される。高度にストリンジェントな洗浄条件の例は、0.15M NaCl、72℃で約15分間である。ストリンジェントな洗浄条件の例は、65℃で15分間の0.2×SSCによる洗浄である(SSC緩衝液の説明については、例えば、上掲書(Sambrook)を参照されたい)。高度にストリンジェントな洗浄の前にしばしば低度のストリンジェントな洗浄が先行し、バックグラウンドのプローブシグナルが除去される。例えば、100ヌクレオチド以上のデュプレックスのための中等度にストリンジェントな洗浄の例は、1×SSC、45℃で15分間である。例えば、100ヌクレオチド以上のデュプレックスのための低度にストリンジェントな洗浄の例は、4×~6×SSC、40℃で15分間である。

【0026】

“供試薬剤”という用語は、本明細書に記載する1つ以上のアッセイでスクリーニングされる薬剤を指す。該薬剤は、実質的には任意の化合物であり得る。それは単離された単一の化合物として存在し得るか、または化学物質(例えば、組み合わせ)ライブラリーの1メンバーであってもよい。特に好ましい実施態様では、該供試薬剤は有機小分子である。

“有機小分子”という用語は、薬剤中で一般に用いられている有機分子に匹敵

するサイズを有する分子を指す。本用語は、生物学的巨大分子（例えば、タンパク質、核酸など）を除外する。好ましい有機小分子の範囲は、約5000Daまで、より好ましくは2000Daまで、最も好ましくは約1000Daまでのサイズである。

【0027】

データベースという用語は、情報を記録しこれを検索するための手段を指す。好ましい実施態様では、データベースは、保存した情報をソートおよび/またはサーチするための手段も提供する。データベースは、ペーパー式、カード式、機械式、電子式、光学式、磁気式、またはそれらの組合わせを含む（但し、これらに限定されない）任意の簡便な媒体を含むことができる。好ましいデータベースには、電子式（例えば、コンピュータに基づく）データベースが含まれる。データベースの保存および操作で使用するコンピュータシステムは、当業者に周知であり、“パーソナルコンピュータシステム”、メインフレームシステム、インターネットまたはイントラネットによる配分ノード、特殊化ハードウェア（例えば、マイクロチップ）に保存されたデータまたはデータベースなどが含まれるが、但しこれらに限定されない。

【0028】

（詳細な説明）

本発明は、アテローム性硬化症の1つ以上の症状を抑制する新規な方法を提供する。さらに、アテローム性硬化症の1つ以上の症状の進行を抑制し、および/またはこれを改善する化合物に関するアッセイも提供される。これらの方法およびアッセイは、部分的には、酸化脂質（例えば、脂質および軽度または高度に酸化されたLDLの分画）がアテローム性硬化症のプラーク形成に特徴的な炎症性反応を誘発するメカニズムの解明に基づいている。

新しく単離された低密度リポタンパク質（LDL）は脂質過酸化水素を含むことが注目された（Sevanian et al. (1997) J. Lipid Res. 38:419-428）。本発明者らは、in vitroでのLDLの酸化は、それが酸化され得る前にLDLが反応種とともに“播種（seeded）”されることが必要であると考えている。酸化脂質の存在は、炎症反応（単球の結合、走化性およびマクロファージへの分化の誘発

)をもたらす。この過程は、アテローム性硬化症を特徴づけているプラーク形成および他の炎症性疾患の基礎となる。

【0029】

特定の理論に拘束されるものではないが、より具体的には、軽度に酸化されたLDL (m/z 594、610、および828)中の生物学的に活性な脂質は、3つの一続きの工程で形成される。第一の工程では、リノール酸およびアラキドン酸の代謝産物およびコレステリル過酸化水素とともにLDLが播種される。第二の工程は、内皮下腔でのLDLが捕捉されること、および付近の動脈壁細胞から生じた更なる反応性酸素種がこの捕捉されたLDLに供給されることを含む。第三の工程は、“播種分子”(例えば、13-ヒドロペルオキシオクタデカジエノン酸[13(S)-HPODE]および15-ヒドロペルオキシエイコサテトラエノン酸[15(S)-HPETE])の臨界閾値がLDLに及んだときに起こるLDLリン脂質の非酵素的酸化である。これによって、単球の結合、走化性およびマクロファージへの分化を誘発する特定の酸化脂質(m/z 594, 610, 828)の形成が生じる。

【0030】

“炎症反応”(例えば、単球の結合、走化性およびマクロファージへの分化の誘発)は、制御されたホスファターゼ(MAPキナーゼホスファターゼ1(MKP-1))としても知られている)の強いアップレギュレーションによって仲介される、というのが本発明の発見であった。特に、軽度または高度に酸化された低密度リポタンパク質(LDL)またはその成分、特に酸化リン脂質が、MKP-1遺伝子の強いアップレギュレーションを誘発することを本明細書で示す。この遺伝子のアップレギュレーションは、プラーク形成および/または慢性関節リウマチに付随する炎症、または他の炎症症状に特徴的な“炎症反応”をもたらす。特に、MKP-1遺伝子のアップレギュレーションは、アテローム性硬化症のプラーク形成で観察されるものと本質的に同じ様式で単球の付着、走化性およびマクロファージへの分化をもたらす。

【0031】

さらにまた、MKP-1の抑制はこの炎症反応をブロックし、さらに血管内皮

を酸化脂質、および/または軽度もしくは高度に酸化されたLDLの悪影響から効果的に防護することを本明細書で示す。MKP-1の抑制が、生物体に重大な悪影響を与えないことは、例えば、MKP-1ノックアウトマウスの作製によって示された。(実際のところ、この“検出可能な作用”の欠如のために、生物体におけるMKP-1の機能は不明であった)。MKP-1のノックアウトまたは抑制に付随する悪影響が見かけ上存在しないので、この遺伝子のブロッキングまたはダウンレギュレーションは、アテローム性硬化症および/または慢性関節リウマチの1つ以上の症状を改善する有効な方法を提供する。

【0032】

従って、ある実施態様では、本発明は、アテローム性硬化症および/または慢性関節リウマチの1つ以上の症状を改善する方法を提供する。本方法は、MKP-1発現のブロッキング、ノックアウト、または抑制を含む。特に好ましい実施態様では、MKP-1のブロッキングは、酸化LDLおよび/またはその成分に対するMKP-1の反応の特異的なブロッキングである。このブロッキングまたは抑制は、転写レベルでも翻訳レベルでも良く、または活性タンパク質が抑制/拮抗され得る。

【0033】

本明細書中で提供される開示に鑑みると、MKP-1は、アテローム性硬化症、慢性関節リウマチまたは他の炎症性経過/病理の治療に有用な薬剤のスクリーニングのための優れた標的である。代表的には、本方法は、核酸、および/または細胞、および/または組織、および/または器官、および/または生物体(例えば、哺乳類)を1つ以上の供試薬剤と接触させ、さらにこれらの薬剤が、MKP-1転写、MKP-1翻訳またはMKP-1タンパク質の活性をブロックする、好ましくは特異的にブロックする能力を評価することを包含する。MKP-1は、酸化リン脂質の存在下で強くアップレギュレートされることを本明細書で示したので、供試薬剤のアップレギュレート遺伝子に対する作用を容易に検出することができるように、酸化リン脂質の存在下でMKP-1ブロッカー/ダウンレギュレーターについてアッセイを実施するのが便利である。しかしながら、MKP-1の発現/活性を抑制/ブロックする能力について薬剤を一般的にスクリー

ニングすることが可能なときは、酸化リン脂質の使用は要求されない。

【0034】

I. 酸化リン脂質によって誘発されるMKP - 1 発現を調節する薬剤のアッセイ

上記で示したように、ある局面では、本発明は、酸化リン脂質がMKP - 1 の発現を誘発し、MKP - 1 のアップレギュレーション / 発現によって、アテローム性硬化症のプラーク形成および / または慢性関節リウマチまたは他の炎症性病態に特徴的な炎症性反応が惹起されるという発見を前提にしている。さらに、そのような発現が反応を誘発された内皮細胞で抑制されるとき、該内皮細胞は、酸化リン脂質に暴露された後も単球結合または単球走化性の誘発を示さない。従って、酸化リン脂質によるMKP - 1 のアップレギュレーションをブロックする薬剤は、アテローム性硬化症の症状（例えば、プラーク形成、単球結合、心臓発作、卒中）および / または慢性関節リウマチの症状の改善に有用であると期待される。

【0035】

従って、ある実施態様では、本発明は、酸化リン脂質によって誘発されるMKP - 1 の発現を調節し、従って、アテローム性硬化症の1つ以上の症状、心臓発作および / または卒中の病因における1つ以上の因子、および / または慢性関節リウマチの1つ以上の症状を調節する薬剤のスクリーニング方法を提供する。本方法は、問題の薬剤の存在下で、MKP - 1 遺伝子または遺伝子産物（例えば、MAPキナーゼホスファターゼ1）の発現レベルおよび / または活性レベルを検出することを含む。供試薬剤が存在しないか、または低濃度で存在する場合の陰性コントロールと比較したとき、MKP - 1 発現の抑制および / またはMKP - 1 ポリペプチド活性の抑制は、この供試薬剤がMKP - 1 の反応を改善すること、および該薬剤がアテローム性硬化症、心臓病変、卒中または慢性関節リウマチの予防および / または治療における優良なリード化合物としての可能性を有することを示す。ある種の好ましい実施態様では、本アッセイは、酸化リン脂質がMKP - 1 のアップレギュレーションのために用いられ、前記酸化リン脂質により誘発されるMKP - 1 の発現 / 活性を抑制する能力について、薬剤をスクリーニングするアッセイ様式で用いられる。

【0036】

好ましい実施態様では、このアッセイは、（例えば、培養下またはin vivoで）細胞を1つ以上の供試薬剤と、及び酸化リン脂質（例えば、Ox - P A P C）と接触させることを含む。MKP - 1 遺伝子の発現レベルを測定し、供試薬剤処理細胞における酸化リン脂質により誘発された発現レベルの低下が、上記で考察したように、供試薬剤がアテローム性硬化症の1つ以上の症状を改善することを示す。供試薬剤は、細胞を酸化リン脂質と接触させる前、それと同時に、またはその後で添加することができる。

ただ1つの酸化リン脂質を用いてもよいし、種々の酸化リン脂質の組み合わせを用いてもよい。実質的にいずれのリン脂質も本アッセイに用いることができる。具体的にいずれのリン脂質またはリン脂質の組み合わせが好適であるかは、酸化リン脂質を細胞と接触させ、MKP - 1 遺伝子が、本明細書で述べたようにアップレギュレートされるか否かを測定することによって容易に決定できる。

【0037】

特に好ましい酸化リン脂質には以下のリン脂質の酸化形態が含まれるが、但しこれらに限定されない：1 - パルミトイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (Ox - P A P C)、1 - パルミトイル - 2 - オキソバレロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (P O V P C)、1 - パルミトイル - 2 - グルタロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (P G P C)、1 - パルミトイル - 2 - エポキシイソプロスタン - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (P E I P C)、酸化された1 - ステアロイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (Ox - S A P C)、1 - ステアロイル - 2 - オキソバレロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (S O V P C)、1 - ステアロイル - 2 - グルタロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (S G P C)、1 - ステアロイル - 2 - エポキシイソプロスタン - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (S E I P C)、1 - ステアロイル - 2 - アラキドニル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (Ox - S A P E)、1 - ステアロイル - 2 - オキソバレロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (S O V P E)、1 - ステアロイル - 2 - グルタロイ

ル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (SGPE)、1 - ステアロイル - 2 - エポキシイソプロスタノール - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (SEIPE)、または関連するリン脂質の酸化生成物など。

【0038】

遺伝子 (例えば、ERP/MKP-1) の発現レベルは、遺伝子産物の転写 (即ち、mRNAの転写) における変化、および/または遺伝子産物の翻訳 (即ち、タンパク質の翻訳) における変化、および/または翻訳後修飾 (例えば、タンパク質の折り畳み、グリコシル化など) によって変化させることができる。従って、本発明の好ましいアッセイは、転写された mRNA (または MKP-1 遺伝子に由来する他の核酸) レベル、翻訳されたタンパク質レベル、翻訳されたタンパク質の活性などに関するアッセイを含む。そのようなアプローチの例は、下記で述べる。

【0039】

A) 核酸をベースにするアッセイ

1) 標的分子

MKP-1 発現レベルの変化は、MKP-1 mRNA および/または mRNA 由来の核酸 (例えば、逆転写 cDNA など) 中の変化を測定することによって検出できる。MKP-1 発現レベルを測定するために、そのような分析のための核酸サンプルを提供することが望ましい。好ましい実施態様では、核酸は生物学的サンプル中に存在するか、または生物学的サンプルから誘導される。本明細書で用いられるように、“生物学的サンプル” という用語は、生物体、生物体の成分 (例えば、細胞)、および/または in vitro の細胞培養物もしくは組織培養物から得られたサンプルを指す。サンプルは、いずれの生物学的組織でも生物学的液体でもよい。生物学的サンプルには、器官または組織切片 (例えば、組織学的目的で採取された凍結切片) も含まれる。

【0040】

ある種の好ましい実施態様では、核酸 (例えば、mRNA または mRNA に由来する核酸) は、当業者に周知の多数の方法のいずれかによってサンプルから単離される。mRNA を単離する方法は、当業者に周知である。例えば、核酸の単

離および精製方法は、以下の文献に詳細に記載されている (Tijssen ed., (1993) Chapter 3 of Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Elsevier, N.Y. and Tijssen ed.)。

好ましい実施態様では、“全”核酸が、例えば、酸グアニジニウム - フェノール - クロロホルム抽出法を用いて所与のサンプルから単離され、さらにポリA⁺ mRNAがオリゴdTカラムクロマトグラフィーによって、または(dT)_n磁性ビーズを用いて単離される(例えば、以下の文献を参照されたい: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.), Vol.1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); または、Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., ed. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987))。

【0041】

しばしば、発現レベルのアッセイ前に、核酸サンプルを増幅することが所望される。核酸を増幅する方法は当業者に周知であり、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(例えば、以下の文献を参照されたい: Innis et al., (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Application. Academic Press, Inc. San Diego)、リガーゼ連鎖反応(LCR)(以下の文献を参照されたい: Wu and Wallace (1989) Genomics 4:560; Landegren et al. (1988) Science 241:1077; および Barringer et al. (1990) Gene 89:117)、転写増幅(Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173)、自己保持型配列複製(self-sustained sequence replication)(Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874)、ドットPCR、およびリンカーアダプターPCRなどが含まれるが、但し、これらに限定されない。

【0042】

サンプル中のMKP-1の転写レベル(つまり、発現レベル)を定量することを所望する場合の特に好ましい実施態様では、核酸サンプルは、MKP-1 mRNA転写物の濃度、またはMKP-1 mRNA転写物に由来する核酸の濃度が当該遺伝子の転写レベル(つまり、発現レベル)に比例しているサンプルであ

る。同様に、ハイブリダイゼーションシグナルの強度は、ハイブリダイズされた核酸量に比例していることが好ましい。前記の比例性が比較的厳密であること（例えば、転写速度が2倍になればサンプルの核酸プール中のmRNA転写物が2倍になり、ハイブリダイゼーションシグナルが2倍になる）は望ましいことであるが、一方、当業者には前記比例性がより緩やかなもので、非直線的であってもよいことが理解されよう。従って、例えば、標的mRNAの濃度で5倍の相違がハイブリダイゼーションの強度で3～6倍の相違を生じるアッセイが、殆どの目的に関して十分である。

【0043】

より正確な定量が要求される場合には、好適なコントロールを使用し、サンプル調製およびハイブリダイゼーションで導入された変動を本明細書で述べるように補正できる。さらに、“標準”標的核酸（例えば、mRNA）の段階希釈を用い、当業者に周知の方法に従って、カリブレーション曲線を作製することができる。もちろん、転写物の有無についての簡単な検出または核酸濃度変化の大きな違いを所望する場合は、複雑なコントロールまたはカリブレーションは要求されない。

最も単純な実施態様では、MKP-1含有核酸サンプルは、生物学的サンプルから単離した、および/またはそうでなければ前記サンプルに由来する全mRNAまたは全cDNAである。この核酸サンプルは、上記に示したように当業者に周知の多数の方法のいずれかに従って、サンプルから単離できる。

【0044】

2) ハイブリダイゼーションをベースにするアッセイ

MKP-1の公知の配列（例えば、GenBank承認番号x68277を参照されたい）を用いるMKP-1転写物の検出および/または定量は、核酸ハイブリダイゼーション技術を使用してルーチンに実施できる（例えば、上掲書（Sambrook et al.）を参照されたい）。例えば、MKP-1逆転写cDNAの有無または量を調べる1つの方法は“サザンプロット”を含む。サザンプロットでは、DNA（例えば、逆転写MKP-1 mRNA）（代表的には、フラグメント化され電気泳動ゲル上で分離されている）を、MKP-1に特異的なプローブ（例えば、配列

番号：1)とハイブリダイズさせる。MKP-1プローブからのハイブリダイゼーションシグナルの強度を“コントロール”プローブ(例えば、“ハウスキーピング遺伝子”のためのプローブ)と比較することによって、標的核酸の相対的発現レベルの概算が得られる。

【0045】

また別の選択肢として、MKP-1 mRNAは、ノザンプロットで直接定量することができる。簡単に記せば、mRNAを、例えば、酸グアニジニウム-フェノール-クロロホルム抽出法を用いて、所与の細胞サンプルから単離する。続いて、mRNAを電気泳動によってmRNA種に分離し、このmRNAをゲルからニトロセルロース膜に移す。サザンプロットのように、標識プローブを用いて標的MKP-1 mRNAを同定および/または定量する。好適なコントロール(例えば、ハウスキーピング遺伝子に対するプローブ)によって、相対的発現レベルを評価するためのリファレンスが提供される。

【0046】

MKP-1発現レベルを測定するまた別の手段は、in situハイブリダイゼーションである。In situハイブリダイゼーションは周知である(例えば、Angerer (1987) Meth. Enzymol. 152:649)。一般に、in situハイブリダイゼーションは以下の主要な工程を含む：(1)分析されるべき組織または生物学的構造物の固定；(2)標的DNAのアクセス能力を高め、非特異的結合を減少させるための予備ハイブリダイゼーション処置；(3)核酸混合物と、生物学的構造物または組織中の核酸とのハイブリダイゼーション；(4)ハイブリダイゼーションで結合しなかった核酸フラグメントを除去するためのハイブリダイゼーション後の洗浄；および(5)ハイブリダイズした核酸フラグメントの検出。これらの工程の各々で用いられる試薬および使用条件は、個々の適用に応じて変動する。

幾つかの適用例では、反復配列のハイブリダイゼーション能力をブロックすることが必要である。従って、幾つかの実施例では、非特異的ハイブリダイゼーションをブロックするために、tRNA、ヒトゲノムDNAまたはCot-1DNAが用いられる。

【0047】

3) 増幅をベースにするアッセイ

別の実施態様では、増幅をベースにするアッセイを用いて、MKP-1 発現 (転写) レベルを測定できる。そのような増幅ベースアッセイでは、標的核酸配列 (即ち、MKP-1 またはそのフラグメント) は、増幅反応 (例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) または逆転写 PCR (RT-PCR)) の鋳型として機能する。定量的な増幅では、増幅産物の量は、最初のサンプル中の鋳型 (例えば、MKP-1 mRNA) の量に比例するであろう。好適なコントロール (例えば、健全組織または供試薬剤に曝されていない細胞) と比較することによって、MKP-1 転写レベルを測定できる。

【0048】

“定量的”増幅の方法は、当業者に周知である。例えば、定量的PCRは、既知量のコントロール配列を、同じプライマーを用いて同時に共増幅することを含む。これによって、PCR反応のカリブレーションに用いることができる内部標準が提供される。定量的PCRのための詳細なプロトコルは、以下の文献に提供されている (Innis et al. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y.)。例えば、アプローチの1つは、標的を増幅するのに用いたのと同じプライマーを用いて、既知量のコントロール配列を同時に共増幅することを含む。これによって、PCR反応のカリブレーションに用いることができる内部標準が得られる。

【0049】

好ましい内部標準の1つは、合成AW106 cRNAである。AW106 cRNAを当業者に公知の標準的技術に従って、サンプルから単離したRNAと結合させる。続いて、逆転写酵素を用いて前記RNAを逆転写し、コピーDNAを提供する。続いて、標識プライマーを用いて前記cDNA配列を (例えば、PCR) によって増幅する。増幅産物を、代表的には電気泳動によって分離し、標識された核酸量 (増幅産物の量に比例する) を測定する。続いて、既知のAW106 RNA標準物によって生じたシグナルと比較することにより、サンプル中のmRNA量を算出する。定量的PCRの詳細なプロトコルは、文献 (Innis et al. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic

Press, Inc. N.Y.) で提供される。MKP - 1 の公知の核酸配列は、当業者がプライマーをルーチンに選択してMKP - 1 遺伝子の任意の部分を増殖させるのに十分である。

【0050】

4) ハイブリダイゼーションの様式およびハイブリダイゼーション条件の最適化

a) アレーベースハイブリダイゼーション様式

ある実施態様では、本発明の方法をアレーベースのハイブリダイゼーション様式で用いることができる。アレーとは、1つ以上の面（例えば、固体、膜またはゲル）に結合させた複数の異なる“プローブ”または“標的”核酸（または他の化合物）である。好ましい実施態様では、複数の核酸（または他の部分）が単一の連続面または互いに並列に並べられた複数の面に結合している。

アレー様式では、多数の異なるハイブリダイゼーション反応が、本質的に“並行して”実施できる。これによって、迅速に、本質的に同時に、多数のハイブリダイゼーションを単一の“実験”で評価することができる。アレーベース様式でハイブリダイゼーション反応を実施する方法は、当業者に周知である（例えば、以下の文献を参照されたい：Pastinen (1997) Genome Res. 7:606-614; Jackson (1996) Nature Biotechnology 14:1685; Chee (1995) Science 274:610; W096/17958; Pinkel et al.(1998) Nature Genetics 20:207-211)。

【0051】

アレー、特に核酸アレーは、当業者に周知の様々な方法に従って製造できる。例えば、簡単な実施態様では、“低密度”アレーは、種々の核酸を固体支持体（例えば、ガラス表面、膜など）上の異なる位置に（例えば、ピペットを用いて手で）滴下することにより単純に作製できる。

この単純な滴下手法を自動化して、高密度滴下アレーが作製された（例えば、米国特許5,807,522号参照）。この特許は、表面に向けて毛細管の口を開けて少量の生物学的サンプルを沈積させる自動化システムの使用を開示している。このプロセスを繰り返して、高密度アレーを作製する。

アレーは、オリゴヌクレオチド合成技術を用いて製造もできる。従って、例えば、米国特許5,143,854号、PCT特許公開W090/15070号および同92/10092号は

、高密度オリゴヌクレオチド・アレーの光誘導による組み合わせ合成の使用を開示している。高密度アレーの合成は、米国特許5,744,305号、同5,800,992号および同5,445,934号にも記載されている。

【0052】

b) 他のハイブリダイゼーション様式

上記で述べたように、様々な核酸ハイブリダイゼーション様式が当業者に公知である。例えば、一般的な様式には、サンドイッチアッセイおよび競合または置換アッセイが含まれる。そのようなアッセイ様式は、一般に以下の文献に記載されている：Hames and Higgins (1985) *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press; Gall and Pardue (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. US A* 63:378-383; およびJohn et al. (1969) *Nature* 223:582-587。

サンドイッチアッセイは、核酸配列を単離または検出するための市販されているハイブリダイゼーションアッセイである。そのようなアッセイは、固体支持体に共有結合により固定された“捕捉”核酸および溶液中の標識された“シグナル”核酸を利用する。この“捕捉”核酸および“シグナル”核酸プローブは標的核酸とハイブリダイズし、“サンドイッチ”ハイブリダイゼーション複合体を形成する。最も効率よくするためには、シグナル核酸は捕捉核酸とハイブリダイズしてはならない。

【0053】

代表的には、標識シグナル核酸を用いてハイブリダイゼーションを検出する。相補性の核酸またはシグナル核酸は、ハイブリダイズしたポリヌクレオチドの存在を検出するために代表的に用いられる幾つかの方法のうち、任意の方法によって標識し得る。最も一般的な検出方法は、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C または ^{32}P 標識されたプローブなどによるオートラジオグラフィーの使用である。他の標識には、標識された抗体、蛍光発色団、化学発光薬剤、酵素および、標識リガンドに対して特異的結合対メンバーとして機能できる抗体と結合するリガンドが含まれる。

【0054】

ハイブリダイゼーション複合体の検出には、標的およびプローブポリヌクレオ

チドまたは核酸とのデュプレックスとシグナル発生複合体との結合を要求されることがある。代表的には、そのような結合は、リガンド結合プローブとシグナルと結合した抗リガンドとの間で生じるような、リガンドと抗リガンドとの相互作用を介して起こる。

ハイブリダイゼーションアッセイの感度は、検出される標的核酸を倍増させる核酸増幅システムを用いて増強できる。そのようなシステムの例には、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）系およびリガーゼ連鎖反応（LCR）系が含まれる。当分野で最近報告された他の方法は、核酸配列をベースとする増幅（nucleic acid sequence based amplification（NASBAO）；Cangene, Mississauga, Ontario）およびQベータレプリカーゼシステムである。

【0055】

c) ハイブリダイゼーション条件の最適化

核酸のハイブリダイゼーションは、単に、変性プローブとその相補性標的が安定なハイブリッド・デュプレックスを相補性塩基対結合により形成することができる条件下で、この変性プローブおよび標的核酸を提供することを包含する。続いて、ハイブリッド・デュプレックスを形成しない核酸を洗い流して、（代表的には、結合させた検出可能な標識の検出により）検出されるべきハイブリダイズした核酸を残す。一般には、核酸を含む緩衝液の温度を上昇させるか、もしくは塩濃度を減少させることにより、または化学薬剤を添加するか、またはpHを上昇させることにより、核酸を変性させることが認識されている。低ストリンジェンシー条件下では（例えば、低温および/または高い温度および/または高い標的濃度）、アニールされた配列が完全には相補的でない場合でも、ハイブリッド・デュプレックス（例えば、DNA：DNA、RNA：RNAまたはRNA：DNA）が形成されるであろう。従って、ハイブリダイゼーションの特異性は、より低いストリンジェンシーで減少する。逆に、より高いストリンジェンシー（例えば、より高温またはより低い塩濃度）では、ハイブリダイゼーションの達成は、ミスマッチが少ないことが要求される。

【0056】

当業者には、ハイブリダイゼーション条件を選択して任意の程度のストリンジ

エンシーを提供できることが理解されよう。好ましい実施態様では、ハイブリダイゼーションを低ストリンジェンシーで実施してハイブリダイゼーションを確実にし、続いてその後の洗浄をより高いストリンジェンシーで実施して、ミスマッチのハイブリッド・デュプレックスを排除する。連続洗浄を、所望のレベルのハイブリダイゼーション特異性が得られるまで、ストリンジェンシーを徐々に高めて実施してもよい(例えば、37 から70 で0.25×SSPEの低さまで)。ストリンジェンシーは、ホルムアミドのような薬剤を添加することによっても高めることができる。ハイブリダイゼーション特異性は、テストプローブとのハイブリダイゼーションを、存在し得る種々のコントロールとのハイブリダイゼーションと比較することによって評価することができる。

【0057】

一般に、ハイブリダイゼーション特異性(ストリンジェンシー)とシグナル強度との間には取り引き(tradeoff)が存在する。従って、好ましい実施態様では、洗浄は、一致した結果を生じ、かつバックグラウンド強度の約10%より高いシグナル強度をもたらす最高のストリンジェンシーで実施される。従って、好ましい実施態様では、ハイブリダイズしたアレーは、より高いストリンジェンシーの溶液で連続的に洗浄し、各洗浄の間に測定値を読み取ることができる。このようにして作製したデータセットの分析によって、それより上ではハイブリダイゼーションパターンが大きくは変化せず、問題の特定のプローブについて好適なシグナルを提供する洗浄ストリンジェンシーが明らかになる。

【0058】

好ましい実施態様では、ブロッキング試薬(例えば、tRNA、精子DNA、cot-1 DNAなど)をハイブリダイゼーション時に使用し、非特異的結合を減少させることによってバックグラウンドシグナルを低下させる。ハイブリダイゼーションでブロッキング試薬を使用することは、当業者に周知である(例えば、上掲書(Tijssen)の第8章を参照されたい)。

ハイブリダイゼーション条件を最適化させる方法は、当業者に周知である(例えば、以下の文献を参照されたい:Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 24: Hybridization With Nucleic

Acid Probes, Elsevier, N.Y.)。

【0059】

最適の条件は、基質のタイプ、蛍光色素、励起および放射バンド、スポットサイズなどの組み合わせに対する標識（例えば、蛍光）の検出感度の関数でもある。蛍光バックグラウンドが低い表面を用いることができる（例えば、以下の文献を参照されたい：Chu (1992) Electrophoresis 13:105-114）。種々の直径を有するスポットの候補面での検出感度は、例えば、蛍光で末端標識したDNAフラグメントの連続希釈物をスポット滴下することにより容易に測定できる。続いて、これらのスポットを、通常の蛍光顕微鏡を用いて画像化する。蛍光色素と固体表面（例えば、ガラス、熔融シリカなど）との種々の組み合わせにより達成できる感度、直線性および動的範囲はこのように測定できる。既知の相対比を有する蛍光色素対の連続希釈物も分析できる。これは、検出装置によって許容される動的範囲の実際の蛍光比、およびプローブが固定された基質の蛍光を反映する正確さを決定する。

【0060】

d) 核酸の標識および検出

MKP-1 発現レベルを検出するために本明細書で使用するプローブは、完全長のMKP-1 mRNAでも完全長未満のものでもよい。より短いプローブは特異性について経験的に検査される。好ましいプローブは、ストリンジェントな条件下でMKP-1 標的核酸と特異的にハイブリダイズするように十分に長い。好ましいサイズ範囲は、約10塩基対からMKP-1 mRNAの長さまで、好ましくは約15または20塩基からMKP-1 mRNAの長さまで、より好ましくは約30塩基からMKP-1 mRNAの長さまで、最も好ましくは約40塩基からMKP-1 mRNAの長さまでである。

【0061】

プローブは、代表的には検出可能な標識で標識される。本発明での使用に適した検出可能な標識には、分光光度計的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段によって検出できる任意の組成物が含まれる。本発明で有用な標識には、標識ストレプトアビジン結合物による染色用ビオチン、磁

性ビーズ（例えば、ダイナビーズ（Dynabeads）（登録商標））、蛍光染料（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質など（例えば、以下の文献を参照されたい：Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA））、放射性標識（例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C または ^{32}P ）、酵素（例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼおよびELISAで一般的に使用される他のもの）、および比色計用標識、例えば、コロイド状の金（例えば、直径が40 - 80 nmのサイズ範囲の金粒子は高効率で緑色光を散乱させる）または着色ガラスまたはプラスチックビーズ（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）が含まれる。そのような標識の使用を教示している特許には、米国特許3,817,837号；同3,850,752号；同3,939,350号；同3,996,345号；同4,277,437号；同4,275,149号；同4,366,241号が含まれる。

【0062】

蛍光標識は、非常に強いシグナルを提供しバックグラウンドは低いので、好ましい。それはまた、迅速なスキャン方法により高い解析性および感度で光学的にも検出することができる。核酸サンプルは全て単一の標識、例えば、単一の蛍光標識で標識することができる。別の選択肢として、また別の実施態様では、異なる核酸サンプルを同時にハイブリダイズさせることができる。この場合、各核酸サンプルは異なる標識を有する。例えば、1つの標的は緑色蛍光標識を有し、第二の標的は赤色蛍光標識を有する。スキャンの工程は、緑色蛍光標識が結合した部位と赤色蛍光標識が結合した部位を識別するであろう。各核酸サンプル（標識核酸）は、それぞれ別個に分析することができる。

【0063】

利用できる好適な色素原には、特有の範囲の波長を有する光を吸収しその結果発色を観察できる分子および化合物、或いは、特定の波長または波長範囲の放射線を照射したときに光を放射するもの、例えば、蛍光物質が含まれる。

望ましくは、蛍光標識は、約300 nm以上、好ましくは約350 nm、より好ましくは約400 nm以上の光を吸収すべきで、通常は、吸収光の波長より約10 nm以上長い波長で放射される。結合した染料に固有の吸収と放射が、未結合染料とは異なることは留意されるべきである。従って、染料の種々の波長およ

び特徴をいうとき、未結合の任意の溶媒中にある染料ではなく利用されている染料を指している。

【0064】

蛍光物質に光を照射することによって複数の放射物が得られるので、一般に蛍光物質が好ましい。従って、単一の標識が複数の測定可能な事象を提供することができる。

検出可能なシグナルは、化学発光原および生物発光原によっても提供される。化学発光原には、化学反応によって電氣的に励起され、続いて検出可能なシグナルとして機能するか、または蛍光受容体にエネルギーを付与する光を放射することができる化合物が含まれる。また別には、ルシフェリンをルシフェラーゼまたはルシゲニンと一緒に用いて生物発光を提供することができる。

スピン標識は、不対電子スピンを有するレポーター分子によって提供され、それは電子スピン共鳴 (E S R) 分光分析によって検出できる。代表的なスピン標識には、有機フリーラジカル、遷移金属複合体 (特に、バナジウム、銅、鉄およびマンガン) などが含まれる。代表的なスピン標識には、ニトロキシドフリーラジカルが含まれる。

【0065】

標識は、ハイブリダイゼーションの前または後に標的 (サンプル) 核酸に添加できる。いわゆる “ 直接標識 ” とは、ハイブリダイゼーション前に標的 (サンプル) 核酸と直接結合させるか、または直接取り込ませた検出可能な標識である。反対に、いわゆる “ 間接標識 ” は、ハイブリダイゼーション後でハイブリッド・デュプレックスに結合させる。しばしば、間接標識は、ハイブリダイゼーション前に標的核酸に結合させた結合部分に付加される。従って、例えば、標的核酸にハイブリダイゼーション前にビオチンを付加することができる。ハイブリダイゼーション後に、アビジン結合蛍光発色団をビオチン保持ハイブリッド・デュプレックスに結合させると、容易に検出できる標識を提供する。核酸の標識方法およびハイブリダイズした標識核酸の検出方法の詳細な概説については、以下の文献を参照されたい: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol.24: Hybridization With Nucleic Acid Probes, P. Tijssen ed. Else

vier, N.Y., (1993)。

蛍光標識はin vitro転写反応時に容易に添加できる。従って、例えば、フルオレセイン標識UTPおよびCTPは、in vitro転写で産生されるRNAに取り込ませることができる。

【0066】

標識は、直接またはリンカー部分を介して結合させることができる。一般に、標識部位またはリンカー - 標識結合部位はいかなる特定の場所にも限定されない。例えば、標識は、所望の検出またはハイブリダイゼーションに干渉しない任意の位置で、ヌクレオシド、ヌクレオチドまたはその類似体に結合させることができる。例えば、ある種の標識 - ON試薬 (Clontech, Palo Alto, CA) は、オリゴヌクレオチドのホスフェート骨格全体に点在する標識ならびに3'および5'末端の末端標識を提供する。例えば、本明細書に示すように、標識は、リボース環上の位置に結合させることができ、また、このリボースは改変することができ、所望の場合は排除することもできる。有用な標識試薬の塩基部分は、天然に存在するもの、またはそれらが付加される目的に干渉しない様式で改変させたものを含むことができる。改変された塩基には、7 - デアザAおよびG、7 - デアザ - 8 - アザAおよびG、並びに他の複素環式部分が含まれるが、但しこれらに限定されない。

【0067】

蛍光標識は、単一の有機分子種に限定されず、無機分子、有機および/または無機分子の複数分子混合物、結晶物、ヘテロポリマーなどが含まれることは理解されよう。従って、例えば、シリカの殻に封入されたCdSe - CdSコア - シェル・ナノクリスタルは、生物学的分子とカップリングさせるために容易に誘導できる (Bruchez et al. (1998) Science 281:2013-2016)。同様に、強い蛍光を有する量子ドット (硫化亜鉛キャップを有するセレン化カドミウム) を、超高感度な生物学的検出に使用されるように生体分子と共有結合させた (Warren and Nie (1998) Science 28:2016-2018)。

【0068】

B) ポリペプチドをベースにするアッセイ

1) アッセイ様式

M K P - 1 核酸の発現レベルの検出の他に、またはM K P - 1 核酸の発現レベルの検出の代わりに、翻訳されたM K P - 1 ポリペプチドの量および/または活性を検出および/または定量することによって、M K P - 1 の発現の変化を検出および/または定量することができる。

2) 発現タンパク質の検出

M K P - 1 によってコードされるポリペプチドは、当業者に周知の多数の方法のいずれによっても検出および定量することができる。これらの方法には、生化学的分析方法（例えば、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）、薄層クロマトグラフィー（T L C）、高拡散クロマトグラフィーなど）、または種々の免疫学的方法（例えば、免疫組織化学、液体もしくはゲル沈降反応、（単一もしくは二重）免疫拡散、免疫電気泳動、放射性イムノアッセイ（R I A）、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）、免疫蛍光アッセイ、ウェスタンブロットなど）が含まれる。

【0069】

ある実施態様では、M K P - 1 ポリペプチドは、電気泳動によるタンパク質分離（例えば、一次元または二次元電気泳動）で検出/定量される。電気泳動技術を用いるタンパク質の検出方法は、当業者に周知である（一般には、以下を参照されたい：R. Scopes (1982) *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher (1990) *Methods in Enzymology Vol.182: Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc., N.Y.)。

別の実施態様では、M K P - 1 ポリペプチドは、免疫組織化学的に検出/定量される。免疫組織化学的方法は、代表的には、標識した抗M K P - 1 抗体を標識に利用し、それによって発現されたM K P - 1 ポリペプチドを定量する。M K P - 1 の検出/定量のための免疫組織化学的方法は、当業者に周知である（例えば、以下を参照されたい：J. Biol. Chem. 272:16917-16923）。

【0070】

さらに別の好ましい実施態様では、ウェスタンブロット（免疫ブロット）分析を用いて、サンプル中の本発明のポリペプチドの存在を検出および定量する。こ

の技術は、一般に、サンプルのタンパク質を分子量に基づきゲル電気泳動で分離し、分離されたタンパク質を好適な固体支持体に移し（例えば、ニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルター、または誘導ナイロンフィルター）、およびこのサンプルを標的ポリペプチドと特異的に結合する抗体と共にインキュベートすることを含む。

それらの抗体は、標的ポリペプチドと特異的に結合し、それらは、直接標識してもよいが、或いは、抗体の1つのドメインと特異的に結合する標識抗体（例えば、標識ヒツジ抗マウス抗体）を用いて後で検出してもよい。

【0071】

好ましい実施態様では、MKP-1ポリペプチドは、イムノアッセイを用いて検出される。本明細書で用いられるように、イムノアッセイは、被分析物（例えば、標的ポリペプチド）と特異的に結合する抗体を利用するアッセイである。従って、イムノアッセイは、被分析物の単離、標的化および定量のために他の物理的または化学的性質を使用するものとは反対に、本発明のポリペプチドとの抗体の特異的結合を検出することを特徴とする。

周知の免疫結合アッセイの多くのいずれも（例えば、以下を参照されたい：米国特許4,366,241号、4,376,110号、4,517,288号および4,837,168号）、本明細書で同定したポリペプチドの検出または定量に非常に適している。一般的なイムノアッセイの概説としては、以下の文献も参照されたい：Asai (1993) *Methods in Cell Biology*. Vol. 37: *Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc., N.Y.; Stites & Terr (1991) *Basic and Clinical Immunology* 7th Edition.

【0072】

免疫学的結合アッセイ（またはイムノアッセイ）は、被分析物（MKP-1ポリペプチド）に特異的に結合し、しばしば不動化するために、代表的には“捕捉物質”を利用する。好ましい実施態様では、この捕捉物質は抗体である。

イムノアッセイもしばしば標識物質を利用し、捕捉物質と被分析物によって形成された結合複合物と特異的に結合しこれを標識する。この標識物質それ自身が、抗体/被分析物の複合体を含む部分の1つであってもよい。従って、その標識物質は、標識されたポリペプチド、または既に結合されている標的ポリペプチド

を特異的に認識する標識抗体でもよい。また別の選択肢として、標識物質は、捕捉物質 / ポリペプチドの複合体と特異的に結合する第三の部分（例えば、別の抗体）でもよい。

【0073】

免疫グロブリンの定常領域と特異的に結合し得る他のタンパク質（例えば、プロテインAまたはG）も標識物質として用いることができる。これらのタンパク質は、ストレプトコッカス細菌の細胞壁の通常の構成成分である。それらは、様々な種に由来する免疫グロブリンの定常領域に対して強力な非免疫学的応答を示す（例えば、一般的には以下の文献を参照されたい：Kronval et al.(1973) J. Immunol., 111:1401-1406; およびAkerstrom (1985) J. Immunol., 135:2589-2542）。

標的ポリペプチドを検出する好ましいイムノアッセイは、競合または非競合のいずれかである。非競合イムノアッセイは、捕捉された被分析物の量が直接的に測定されるアッセイである。例えば、好ましい“サンドイッチ”アッセイの1つでは、捕捉物質（抗体）は、固体化支持体に直接結合させることができ、この支持体にそれら捕捉物質は固定される。続いて、これらの固定化抗体は、テストサンプル中に存在する標的ポリペプチドを補足する。このようにして固定された標的ポリペプチドを、標識物質（例えば、標識を含む第二の抗体）と結合させる。

【0074】

競合アッセイでは、サンプル中に存在する被分析物（MKP-1ポリペプチド）の量は、サンプル中に存在する被分析物によって捕捉物質（抗体）から置換された（競合して排除された）添加（外因性）被分析物の量を測定することによって間接的に測定される。ある競合アッセイでは、既知量の、この場合は標識ポリペプチドをサンプルに添加し、続いてこのサンプルを捕捉物質と接触させる。前記抗体と結合した標識されたポリペプチドの量は、サンプル中に存在する標的ポリペプチドの濃度と反比例する。

特に好ましい実施態様の1つでは、抗体は固体支持体上に固定される。抗体と結合する標的ポリペプチドの量は、ポリペプチド / 抗体複合物中に存在する標的

ポリペプチドの量を測定するか、または複合体を形成していない残存するポリペプチドの量を測定することによって測定できる。

【0075】

本発明の免疫アッセイの方法には酵素イムノアッセイ（EIA）が含まれるが、これは、使用する具体的なプロトコルに応じて、MKP-1ポリペプチドと結合するポリクローナルもしくはモノクローナル抗体、または抗体フラグメントまたは単鎖抗体の非標識または標識（例えば、酵素標識）した誘導体を、単独または組み合わせて用いる。MKP-1ポリペプチドと結合する抗体が標識されない場合には、別の検出可能なマーカー、例えば、MKP-1ポリペプチドと結合するモノクローナル抗体と結合することができる酵素標識抗体を用いることができる。EIAの公知の改変のいずれも、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）も用いることができる。上記で示したように、免疫プロットイムノアッセイ技術、例えば、酵素による検出システムを利用するウェスタンブロットも本発明に包含される。

【0076】

本発明で使用されるイムノアッセイの方法は、他の公知のイムノアッセイでもよい。これらは、例えば、蛍光物質（例えば、フルオレセインまたはローダミン）の抗体結合物もしくは抗原結合物を用いる蛍光イムノアッセイ、抗体被覆もしくは抗原被覆ラテックス粒子によるラテックス凝集、抗体被覆もしくは抗原被覆された赤血球による血球凝集反応、およびアビジン-ビオチンまたはストレプトアビジン-ビオチン検出系を用いるイムノアッセイなどである。

【0077】

本発明のイムノアッセイで用いられる具体的なパラメーターは、種々の因子、例えば、サンプル中の抗原濃度、サンプルの性質、用いられるイムノアッセイのタイプなどに従って、広く変動し得る。当業者は、最適条件を容易に確立できる。ある種の実施態様では、MKP-1ポリペプチドと結合する抗体の量は、代表的にはサンプルの非存在下で検出可能マーカーの50%が結合するように選択される。精製抗体が抗体源として用いられる場合、アッセイ当たり用いられる抗体の量は、一般的に約1ng～約100ngの範囲であろう。代表的なアッセイ条

件は、温度範囲が約4 ~ 約45、好ましくは約25 ~ 約37、最も好ましくは約25、pH範囲が約5 ~ 9、好ましくは約7であり、イオン強度の範囲は、蒸留水のイオン強度 ~ 約0.2 Mの塩化ナトリウムのイオン強度まで、好ましくは約0.15 Mの塩化ナトリウムのイオン強度を含む。時間は、アッセイの性質に従って、広く変動し、一般には約0.1分 ~ 約24時間の範囲である。様々な緩衝液、例えば、PBSを用いることが可能で、他の試薬、例えば、イオン強度を増すための塩、タンパク質（例えば、血清アルブミン）、安定剤、殺菌剤および非イオン性デタージェントも含み得る。

【0078】

本発明のアッセイは、当業者に周知の標準的方法に従って（陽性もしくは陰性または標的ポリペプチド量として）スコア化できる。スコア化の具体的な方法は、アッセイ様式および選択した標識によって左右される。例えば、ウェスタンブロットアッセイは、酵素標識によって産生された着色産物を可視化することによって判定できる。正確な分子量で明瞭に可視化されている着色バンドまたはスポットは陽性結果として判定されるが、一方、明瞭に可視化されたスポットまたはバンドが存在しない場合は陰性と判定される。バンドまたはスポットの濃度は、標的ポリペプチド濃度の定量的測定値を提供できる。

本明細書に記載した種々のイムノアッセイに使用される抗体は市販されているか、または下記で述べるように作製できる。

3) MKP - 1 活性の検出

マイトジェン活性化タンパク質 (MAP: mitogen-activated protein) キナーゼホスファターゼ - 1 (MKP - 1) は、成長因子およびストレスに応答する即時型遺伝子によりコードされる二重特異性タンパク質ホスファターゼである。MKP - 1 タンパク質は、調節性ThrおよびTyr残基の脱ホスホリル反応によってMAPキナーゼをin vitroで選択的に不活化する (Scimeca et al. (1997) Oncogene 15(6):717-725 および論文中引用文献)。従って、標的残基のMKP - 1 仲介脱ホスホリル反応を阻害する能力について薬剤をスクリーニングすることができる。MKP - 1 の脱ホスホリル活性をアッセイする方法は、当業者に公知である（例えば、以下を参照されたい: Duff et al. (1995) 270:(13) 7161-7

166および論文中の引用文献)。

【0079】

酸化リン脂質に反応してMKP-1がアップレギュレートし、アテローム性硬化症で観察される反応に類似する血管内皮中の“炎症”反応を誘発することが、本発明の発見であった。この反応の特徴には、単球の結合および単球の走化性反応が含まれるが、但しこれらに限定されない。単球の結合および/または走化性反応のアッセイ方法は、当業者に周知であり(例えば、以下の文献を参照されたい: Berliner et al. (1990) J. Clinical Invest. 85(4):1260-1266; Navab et al. (1997) J. Clin. Invest. 99(12):3043; Navab et al. (1997) J. Clin. Invest. 99(8):2005-2019)、さらに本明細書中に示した実施例の中で例示する。

【0080】

4) MKP-1ポリペプチドに対する抗体

ポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれも、本明細書で述べる免疫アッセイで用いることができる。ポリクローナル抗体は、好ましくは、実質的に純粋なポリペプチドまたは抗原性ポリペプチドを、好適なヒト以外の哺乳類に多数回注射(例えば、皮下または筋肉内注射)することによって作製される。標的ペプチドの抗原性は、前記ペプチドで免疫された動物の抗体応答の程度を測定する通常の技術によって決定できる。一般に、本発明の方法で使用する抗体を作製するために用いられるペプチドは、MKP-1遺伝子によってコードされる標的ポリペプチドに対して比較的高い親和性を有する、高力価の抗体の産生を誘発するものであるべきである。

【0081】

所望の場合は、免疫用ペプチドは、当分野で周知の技術を用いる複合体化によって担体タンパク質と結合させることができる。ペプチドに化学的に結合される、一般的に使用されるそのような担体には、スカシガイ・ヘモシアニン(KLH)、サイログロブリン、ウシ血清アルブミン(BSA)および破傷風トキソイドが含まれる。結合ペプチドは続いて、動物(例えば、マウスまたはウサギ)の免疫に用いられる。

次に、その哺乳類から採取した血液サンプルから抗体を得る。ポリクローナル

抗体を作製するために用いられる技術は、当分野で公知である（例えば、以下の文献を参照されたい：Methods of Enzymology, "Production of Antisera With Small Doses of Immunogen: Multiple Intradermal Injections", Langone, et al. eds. (Acad. Press, 1981)）。その動物から作製されたポリクローナル抗体は、例えば、それに対して抗体を生じさせたペプチドを結合させたマトリックスに結合させ、マトリックスから溶出させることによって、さらに精製できる。当業者は、ポリクローナル抗体の精製および/または濃縮について、モノクローナル抗体と同様に、免疫学の分野で一般的な様々な技術を知るであろう（例えば、以下の文献を参照されたい：Coligan et al. (1991) Unit 9, Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience）。

【0082】

しかしながら、好ましくは、作製される抗体はモノクローナル抗体（“mAb”）であろう。モノクローナル抗体を調製するためには、マウスまたはラットを免疫するのが好ましい。本発明で用いられるように、“抗体”という用語には、完全な分子ならびにそのフラグメント、例えば、FabおよびF(ab')₂、および/または単鎖抗体（例えば、scFv）（これらはエピトープ決定基に結合することができる）が含まれる。さらに、これに関連して、“本発明のmAb's”という用語は、MKP-1ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに対する特異性を有するモノクローナル抗体を指す。

【0083】

mAbを分泌するハイブリドーマを作製するために用いられる一般的な方法は周知である（Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495）。簡単に記せば、Kohler & Milsteinが記載したように、この技術は、メラノーマ、奇形癌、子宮頸癌、神経膠腫または肺癌のいずれかを患う別々の5人の癌患者の局所排出リンパ節（これらは外科標本から得られた）からリンパ球を単離し、それら細胞をプールし、さらにこれら細胞をSHFP-1と融合させることを包含した。ハイブリドーマは、癌細胞株と結合する抗体の産生についてスクリーニングされた。mAb間の特異性の確認は、比較的ルーチンなスクリーニング技術（例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ、または“ELISA”）を用いて実施し、問題のmAbの

基本的な反応パターンを決定することができる。

【0084】

抗体フラグメント、例えば、単鎖抗体 (s c F v または他のもの) も、ファージディスプレイ技術を用いて作製/選別することができる。細菌に感染したウイルス (バクテリオファージまたはファージ) の表面に抗体フラグメントを発現させる能力によって、例えば、 10^{10} 個より多い非結合クローンのライブラリーからただ1つの結合抗体フラグメントを単離することが可能になる。ファージ表面に抗体フラグメントを発現 (ファージディスプレイ) させるために、抗体フラグメントの遺伝子をファージの表面タンパク質 (例えば、p III) をコードする遺伝子に挿入し、抗体フラグメント - p III 融合タンパク質をファージ表面にディスプレイさせる (McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554; Hoogenboom et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:4133-4137)。

【0085】

ファージ表面の抗体フラグメントは機能を有するので、抗原結合抗体フラグメントを担持するファージは、抗原親和性クロマトグラフィーによって非結合ファージから分離できる (McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554)。抗体フラグメントの親和性に応じて、1回のアフィニティー選別について20倍~100000000倍の濃縮係数が得られる。しかしながら、前記溶出ファージを細菌に感染させることによって、より多くのファージを増殖させることができ、これらをまた別の選別に供することができる。このようにして、1回で100000000倍の濃縮が2回の選別で100000000000倍になる (McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554)。従って、濃縮が低いときでも (Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597)、複数回のアフィニティー選別によって希少ファージを単離することができる。抗原によるファージ抗体ライブラリーの選別が濃縮をもたらすので、3~4回の選別後に大部分のクローンは抗原と結合する。従って、比較的少数 (数百) のクローンが抗原結合の分析に必要とされるだけである。

【0086】

ヒト抗体は、極めて大きくかつ様々なV - 遺伝子レパートリーをファージ上にディスプレイすることによって予備免疫を施さずに作製することができる (Mark

s et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597)。ある実施態様では、ヒト末梢血リンパ球に存在する天然の V_H および V_L レパートリーが、PCRにより非免疫ドナーから単離された。このV-遺伝子レパートリーは、PCRを用いてランダムに一緒にスプライスされ、scFv遺伝子レパートリーが作製され、これをファージベクター中にクローニングして30000000個のファージ抗体ライブラリーが得られた(上掲書)。このただ1つの“ナイーブ”ファージ抗体ライブラリーから、17個以上の異なる抗原(ハプテン、多糖類およびタンパク質を含む)に対する結合抗体フラグメントが単離された(Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597; Marks et al. (1993) Bio/Technology 10:779-783; Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12:725-734; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628)。抗体は、ヒトのサイログロブリン、免疫グロブリン、腫瘍壊死因子およびCEAを含む自己タンパク質に対して作製された(Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12:725-734)。また、完全な(intact)細胞上で直接選別することによって、細胞表面抗原に対する抗体を単離することもできる。前記抗体フラグメントは、選別に用いた抗原に対して高度に特異的であり、1:M~100nMの範囲の親和性を有する(Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597; Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12:725-734)。大きなファージライブラリーによって、より大きな割合の抗原に対してより高い結合親和性を有する、より多くの抗体が単離できる。

さらに、抗体は、任意の多数の市販のサービスによって製造されることも認識される(例えば、Berkeley antibody laboratories, Bethyl Laboratories, Anawa, Eurogenetecなど)。さらに、MKP-1抗体は市販されている(例えば、Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)。

【0087】

C) MKP-1発現の変化の評価

ある実施態様では、本発明のアッセイにおいて、酸化リン脂質に反応してMKP-1がアップレギュレートするのを低下および/または排除するときに、供試薬剤は陽性と判定される。これは、転写もしくは翻訳の抑制または翻訳されたMKP-1ポリペプチドの活性の減弱によって生じ得る。本アッセイでは、供試薬

剤存在下での酸化リン脂質に誘発される発現が、供試薬剤の非存在下または低濃度で供試薬剤が存在する場合の酸化リン脂質誘発発現よりも低く検出されるときには、陽性と判定される。検出可能な差異は好ましくは統計的に有意な差であり、例えば、信頼レベルが80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、最も好ましくは98%または99%以上である。

テスト細胞（供試薬剤と接触させた細胞）とコントロール細胞（例えば、供試薬剤と接触させなかった細胞）との間の比較は、直接比較（例えば、同時または連続的に実施した実験での比較）で実施できる。或いは、比較は“間接的”、即ち、以前に別の機会に、および/または異なる実験セットで、および/または異なる組み合わせで得られたデータとの比較でもよい。

D) アッセイの最適化

本発明のアッセイは、細胞、組織または器官のMKP-1発現を調節する薬剤のスクリーニングに直ちに利用できる。本発明のアッセイは、特定の状況で使用されるために、例えば、供給源および/または生物学的サンプルの性質、および/または特定の供試薬剤、および/または利用可能な分析設備に対応して、最適化させることができる。従って、最適化には、例えば、結合アッセイの最適条件、最適なサンプル処理条件（例えば、好ましいPCR条件）、ノイズに対してシグナルを最大にするハイブリダイゼーション条件、処理量を改善するプロトコルなどが含まれ得る。さらに、アッセイ様式も、装置および/または試薬の利用可能性に従って、選択および/または最適化できる。従って、例えば、市販の抗体またはELISAキットが入手可能である場合は、タンパク質濃度をアッセイすることが望ましいかもしれない。逆に、MKP-1遺伝子の転写を変化させる調節物質をスクリーニングしようとする場合は、核酸をベースとするアッセイが好ましい。

アッセイ様式のルーチンな選択および最適化は、当業者に周知である。

【0088】

II. MKP-1ポリペプチドおよび/または核酸と結合する薬剤、またはMKP-1ポリペプチドおよび/または核酸の誘発に必要なレセプターと結合する薬剤の予備スクリーニング

ある種の実施態様では、MKP-1 核酸またはポリペプチドと相互作用する（例えば、特異的に結合する）能力について供試薬剤を予備スクリーニングすることが望ましい。供試薬剤と特異的に結合することは、MKP-1 と相互作用し、それによってMKP-1 の発現および/または活性を調節し易い。従って、幾つかの好ましい実施態様では、供試薬剤は、本明細書で述べる、より複雑なアッセイを実施する前に、MKP-1 核酸またはMKP-1 タンパク質との結合について予備スクリーニングされる。

【0089】

ある実施態様では、そのような予備スクリーニングは、単純な結合アッセイを用いて実施される。核酸またはタンパク質に対する特定のリガンドの特異的結合または結合親和性についてのアッセイ手段は、当業者に周知である。好ましい結合アッセイでは、MKP-1 タンパク質または核酸が固定され、供試薬剤（これは標識されてあってもよい）に暴露される。また別の選択肢として、供試薬剤が固定され、MKP-1 タンパク質またはMKP-1 核酸（これらは標識されてあってもよい）に暴露される。続いて、固定された部分を洗浄して、一切の非結合物質を除去し、結合した供試薬剤または結合したMKP-1 核酸もしくはタンパク質を（例えば、結合分子に付着している標識を検出することによって）検出する。固定されている標識の量は、MKP-1 タンパク質もしくは核酸と供試薬剤との結合の程度に比例する。

【0090】

III . 高い処理量のスクリーニング

本発明のアッセイはまた容易に“高い処理量”の様式にも使用することができる。通常は、有用な特性（例えば、MKP-1 の酸化リン脂質誘発発現または活性の調節）を有する新規な化学物質は、幾つかの望ましい特性または活性を有する化合物（“リード化合物”と称される）を同定し、前記リード化合物の変種を作製し、これら変種化合物の特性および活性を評価することによって創出される。しかしながら、薬剤発見の全ての局面について、タイムスケールを短縮するのが現在の趨勢である。多数の物質を迅速かつ効率よくテストする能力のゆえに、高い処理量のスクリーニング（HTS）法が、通常のリード化合物同定方法に置

き換えられつつある。

好ましい実施態様の1つでは、高処理量スクリーニング方法は、所望の活性を有する可能性がある多数の化合物（候補化合物）を含むライブラリーを提供することを含む。続いて、そのような“組合せ集合化学物質ライブラリー”を本明細書に記載するように1つ以上のアッセイでスクリーニングし、所望の特徴的な活性を示すそれらのライブラリーのメンバー（特に化学物質の種またはサブクラス）を同定する。そのようにして同定された化合物は、従来の“リード化合物”として機能するか、またはそれ自身可能性を有する治療薬もしくは事実上の治療薬として使用することができる。

A) 組合せ集合化学物質ライブラリー

最近、新規な化合物見本の作製を支援するために、組合せ集合化学物質ライブラリーの使用が注目されている。組合せ集合化学物質ライブラリーとは、多数の化学的“ビルディングブロック”（例えば、試薬）を結合させることにより、化学合成または生物学的合成によって生成した様々な化合物の集合体である。例えば、線形組合せ集合化学物質ライブラリー、例えば、ポリペプチドライブラリーは、アミノ酸と呼ばれる1セットの化学的ビルディングブロックを、あらゆる可能な態様で所与の化合物の長さ（即ち、ポリペプチド化合物中のアミノ酸の数）のために一体化させることによって形成される。何百万もの化合物を、そのような化学的ビルディングブロックの組合せ集合混合物から合成できる。例えば、ある解説者によれば、相互に取替え可能な100個の化学的ビルディングブロックを含む系統的組合せ集合混合物によって、理論的に1億個の4量体の化合物または100億個の5量体化合物が合成できる（Gallop et al. (1994) 37(9):1233-1250）。

【0091】

組合せ集合化学物質ライブラリーの調製およびスクリーニングは、当業者に周知である。そのような組合せ集合化学物質ライブラリーには、ペプチドライブラリー（例えば、米国特許5,010,175号；Furka (1991) Int. J. Pept. Prot. Res. 37:487-493；Houghton et al. (1991) Nature, 354:84-88）が含まれるが、但しこれに限定されない。ペプチド合成は、本発明における使用が想定または意図

される唯一のアプローチでは決してない。化学的に様々なライブラリーの作製を目的とする他の化学手段もまた用いることができる。そのような化学手段には、ペプチド (PCT公開公報W091/19735号(1991年12月26日))、コードされたペプチド (PCT公開公報W093/20242号(1993年10月14日))、ランダムバイオオリゴマー (PCT公開公報W092/00091号(1992年1月9日))、ベンゾジアゼピン (米国特許号5,288,514号)、ダイバーソマー (例えば、ヒダントイン、ベンゾジアゼピンおよびジペプチド) (Hobbs et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6909-6913)、ビニローガス・ポリペプチド (Hagihara et al. (1992) J. Amer. Chem. Soc. 114:6568)、ベータ-D-グルコースの足場を有する非ペプチド性ペプチド類似体 (Hirschmann et al. (1992) J. Amer. Chem. Soc. 114:9217-9218)、小化合物ライブラリーの類似の有機合成 (Chen et al. (1994) J. Amer. Chem. Soc. 116:2661)、オリゴカルバメート (Cho et al. (1993) Science 261:1303)、および/またはペプチジルホスホネート (Campbell et al. (1994) J. Org. Chem. 59:658。一般には以下を参照されたい: Gordon et al. (1994) J. Med. Chem. 37:1385)、核酸ライブラリー (例えば、Strategene, Corp)、ペプチド核酸ライブラリー (例えば、米国特許5,539,083号)、抗体ライブラリー (例えば、Vaughn et al. (1996) Nature Biotechnology 14(3)309-314およびPCT/US96/10287)、炭水化物ライブラリー (例えば、Liang et al. (1996) Science 274:1520-1522および米国特許5,593,853号)、および小有機分子ライブラリー (例えば、ベンゾジアゼピン (Baum (1993) C&EN, 1月18日, 33ページ)、イソプレノイド (米国特許5,569,588号)、チアゾリジノンおよびメタチアザノン (米国特許5,549,974号)、ピロリジン (米国特許5,525,735号および5,519,134号)、モルフォリノ化合物 (米国特許5,506,337号)、ベンゾジアゼピン (米国特許5,288,514号) など) が含まれるが、但しこれらに限定されない。

【0092】

組合せ集合ライブラリーの調製装置は市販されている (例えば、375MPS, 390M PS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433 A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA)。

【0093】

液相化学合成のために、周知の多くのロボットシステムも開発されている。これらのシステムは、武田薬品工業株式会社（大阪、日本）により開発された自動化合成装置のような自動化ワークステーションおよび、化学技術者が実施する手動の合成操作を真似るロボットアーム(Zymate II, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, Calif.)を利用する多数のロボットシステムを含む。上記装置のいずれも本発明での使用に適している。本明細書の記載に従ってそれらを操作することができるように、前記装置に対して加えられる改変（もし有るとすれば）の性質および方法は、当業者に明白であろう。さらに、多数の組合せ集合ライブラリー自体が市販されている（例えば、ComGenex, Princeton, N.J., Asinex, Moscow, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, MO, ChemStar, Ltd, Moscow RU, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MDなど）。

【0094】

B) 化学物質ライブラリーの高処理アッセイ

M K P - 1 の発現を調節するか、またはM K P - 1 ポリペプチドの結合特異性および/または活性を変化させる物質のためのいずれのアッセイも、高処理量スクリーニングに容易に適合させることができる。上記で述べたように、酸化リン脂質誘発されるM K P - 1 発現の特徴は、アテローム性硬化症、心臓疾患、卒中または慢性関節リウマチに固有の特色を示すことが判明したので、酸化リン脂質に対するM K P - 1 の反応を抑制する物質は、上記の症状をおそらく改善するであろうと考えられ、従って、ここで述べるアッセイに対して興味が喚起される。そのようなアッセイは、高処理量の様式に適合させやすい。

【0095】

特定の核酸またはタンパク質産物の有無または定量のための高処理量アッセイは、当業者に周知である。同様に、結合アッセイも周知である。従って、例えば、米国特許5,559,410号は、タンパク質の高処理量スクリーニング方法を開示し、米国特許5,585,639号は、核酸結合（即ち、アレー形式）のための高処理量スクリーニング方法を開示し、米国特許5,576,220号および5,541,061号は、リガン

ド / 抗体結合のための高処理量方法を開示している。

さらに、高処理量スクリーニング・システムは市販されている（例えば、Zy mark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, MAなど）。これらのシステムは、代表的には、全サンプルおよび試薬のピペット操作、液体分注、時間調節インキュベーションおよびアッセイに適した検出装置でのマイクロプレートの最終読み取りを含む全工程が自動化されている。これら組み立て可能なシステムは、高処理および迅速なスタートアップの他に、高度の融通性およびカスタマイゼーションを提供する。そのようなシステムの製造業者は、様々な高処理のための詳細なプロトコルを提供している。従って、例えば、ザイマーク社 (Zy mark Corp.) は、遺伝子の転写、リガンドの結合などの調節を検出するためのスクリーニング・システムについて記載した技術会報を提供している。

【0096】

IV . 酸化リン脂質に反応したMKP - 1 アップレギュレーション / 活性の抑制

酸化リン脂質に反応したMKP - 1 アップレギュレーションの抑制は、アテローム性硬化症に付随する症状の抑制 / 改善をもたらす。特に、プラーク形成に特徴的な炎症反応の様相（例えば、単球漸増および血管内皮への付着）が軽減される。これは、プラーク形成の帰結、例えば、心筋梗塞、卒中、血管閉塞、高血圧などを軽減する。さらに、慢性関節リウマチに特有の炎症反応を低下 / 排除する。

MKP - 1 発現は以下を含む（但し、これらに限定されない）広範囲のアプローチを用いて抑制できる：アンチセンス分子、MKP - 1 特異的リボザイム、MKP - 1 特異的触媒性DNA、MKP - 1 タンパク質に対して誘導されたイントラボディー、酸化リン脂質の作用を競合的に（または非競合的に）阻害する脂質 / リン脂質、MKP - 1 をロックアウトする遺伝子治療によるアプローチ、およびMKP - 1 の発現 / 過剰発現を抑制するか、またはMKP - 1 誘発に必要なレセプターをブロックする小有機分子。

【0097】

A) アンチセンス・アプローチ

MKP-1 遺伝子調節は、アンチセンス分子を使用することによってダウンレギュレートまたは完全に抑制することができる。“アンチセンス配列またはアンチセンス核酸”とは、MKP-1 mRNAをコードする核酸配列またはそのサブ配列に相補的な核酸である。アンチセンス分子のMKP-1 mRNAへの結合は、MKP-1 ポリペプチドの正常な翻訳に干渉する。

従って、本発明の好ましい実施態様によれば、好ましいアンチセンス分子には、MKP-1 メッセンジャーRNAとハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド類似体が含まれる。この関係は一般に“アンチセンス”と呼ばれる。前記オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド類似体は、RNAの機能（そのタンパク質への翻訳、その細胞質への移動、またはその全体的な生物学的機能に対して必要な他の一切の活性のいずれか）を抑制することができる。メッセンジャーRNAがその機能の全てまたは一部分を発揮することができないと、MKP-1 ポリペプチド発現の低下または完全な抑制がもたらされる。

【0098】

本発明では、“オリゴヌクレオチド”という用語は、天然のホスホジエステル結合によって結合した、天然に存在する塩基および/またはシクロフラノシル基から形成されるポリヌクレオチドを指す。この用語は、実際には、天然に存在する種または、天然に存在するサブユニットまたはそれらの近縁な相同体から形成される合成種を指す。“オリゴヌクレオチド”という用語も、オリゴヌクレオチドと同様に機能するが、天然に存在する部分をもたない部分も指す。従って、オリゴヌクレオチドは、変化した糖部分または糖間結合を有することができる。それらの中で代表的なものは、ホスホチオエートおよび他の硫黄含有種で当分野における使用が知られているものである。幾つかの好ましい実施態様では、オリゴヌクレオチドの少なくとも1つのホスホジエステル結合は、その活性が調節されるべきRNAが位置する細胞領域内に浸透する組成物の能力を強化するように機能する構造で置換されている。そのような置換は、ホスホチオエート結合、メチルホスホネート結合、または単鎖アルキルもしくはシクロアルキル構造を含

むことが好ましい。他の好ましい実施態様では、ホスホジエステル結合は、実質的に非イオン性であり同時に非キラル構造、またはキラル構造を有し更にエナンチオマーとして固有である構造で置換される。当業者は、本発明で使用できる他の結合を選択することができる。

【0099】

特に好ましい実施態様の1つでは、ヌクレオチド間ホスホジエステル結合は、ペプチド結合で置換される。そのようなペプチド核酸は、改善された安定性を示す傾向があり、より容易に細胞に浸透し、それらの標的に対して強い親和性を示す。ペプチド核酸の作製方法は、当業者に周知である（例えば、以下の文献を参照されたい：米国特許6,015,887号、6,015,710号、5,986,053号、5,977,296号、5,902,786号、5,864,010号、5,786,461号、5,773,571号、5,766,855号、5,736,336号、5,719,262号および5,714,331号）。

【0100】

オリゴヌクレオチドは、少なくとも幾つかの改変塩基形を含有する種を含むこともできる。従って、自然界で通常見い出されるもの以外のプリンおよびピリミジンも用いることができる。同様に、ヌクレオチドサブユニットのフラノシル部分の改変も、本発明の必須の概念に忠実である限り実施することができる。そのような改変の例は、2'-O-アルキル-および2'-ハロゲン-置換ヌクレオチドである。本発明で有用な糖部分の2'位における改変の幾つかの具体例は、OH、SH、SCH₃、F、OCH₃、OCN、O(CH₂)_nNH₂またはO(CH₂)_nCH₃（式中、nは1～約10である）、および同様な特性を有する他の置換基である。

そのようなオリゴヌクレオチドは、天然のオリゴヌクレオチドまたは天然の系列に沿った合成オリゴヌクレオチド（天然構造とは1以上の相違を有するが）と機能的に互換性であるものと規定できる。そのような全ての類似体は、それらが効率的にMKP-1のメッセンジャーRNAとハイブリダイズし、前記RNAの機能を抑制する限り本発明に包含される。

【0101】

本発明のオリゴヌクレオチドは、好ましくは約3～約50のサブユニットを含

む。より好ましくは、そのようなオリゴヌクレオチドおよび類似体は約8～約25のサブユニットを含み、さらに好ましくは約12～約20のサブユニットを有する。サブユニットとは、塩基と糖の結合体が、隣接するサブユニットとホスホジエステル結合または他の結合を介して好適に結合したものであることが理解されよう。本発明で用いられるオリゴヌクレオチドは、周知の固相合成技術により好都合かつルーチンに製造できる。そのような合成に必要な装置は、幾つかの販売業者（Applied Biosystemsを含む）により販売されている。そのような合成を目的とする他の手段のいずれをも用いることができるが、実際に存在するオリゴヌクレオチドの合成は周知である。他のオリゴヌクレオチド、例えば、ホスホロチオエートおよびアルキル化誘導体の製造もまた周知である。

MKP-1 遺伝子 / cDNA の公知の配列を用いると、好適で有効なアンチセンスオリゴヌクレオチド配列を容易に決定できる。そのような配列の1つは、実施例1で用いられているとおり、5′ - G G A A C T C A G T G G A A C T C A G G - 3′（配列番号：2）である。

【0102】

B) 触媒性RNAおよびDNA

1) リボザイム

別のアプローチでは、MKP-1の発現はリボザイムの使用によって抑制できる。本明細書で用いられるように、“リボザイム”には、固有の認識のためのアンチセンス配列、およびRNA開裂酵素活性を含むRNA分子が含まれる。触媒性の鎖は、標的(MKP-1)RNAの特異的部位を、好ましくは化学量論的濃度より高い濃度で開裂する。2つの“タイプ”のリボザイム、ハンマーヘッド・リボザイム(Rossi et al. (1991) Pharmac. Ther. 50:245-254)およびヘアピン・リボザイム(Hampel et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18:299-304および米国特許5,254,678号)が本発明で特に有用である。

【0103】

ハンマーヘッド型およびヘアピン型の両リボザイムとも、アンチセンスおよびエンドリボヌクレオチダーゼ活性を有する触媒性分子であるので、リボザイム技術は、遺伝子不活化へのアンチセンスによるアプローチを強力に広げる可能性を

有するものとして出現した。本発明のリボザイムは、代表的にはRNAから成るが、そのようなリボザイムも、キメラ核酸配列(DNA/RNA配列のような)および/または核酸類似体(例えば、ホスホロチオエート)を含む核酸分子で構成されている。

従って、本発明のある局面では、MKP-1発現に対して能力を有するリボザイムが提供される。そのようなリボザイムは、“ハンマーヘッド”型(例えば、以下の文献に記載されている: Forster & Symons (1987) Cell 48:211-220; Haseloff & Gerlach (1988) Nature 328:596-600; Walbot & Bruening (1988) Nature 334:196; Haseloff & Gerlach (1988) Nature 334:585)または“ヘアピン”型(例えば、以下を参照されたい: 米国特許5,254,678号および欧州特許出願公開公報0360257号(1990年3月26日, Hampel et al.))であり、MKP-1核酸を特異的な標的化し、開裂する能力を有する。

【0104】

ヘアピン・リボザイムに要求される配列は、NNNB⁺N⁺GUCNNNNNNNから成る任意のRNA配列(式中、N⁺Gは開裂部位であり、BはG、CまたはUのいずれかで、NはG、U、CまたはAのいずれかである)(配列番号: __)である。ヘアピン・リボザイムのための好適なMKP-1認識または標的配列は、MKP-1配列から容易に決定できる。ある種の好適な配列には、アンチセンス分子のための標的として用いられる配列(例えば、配列番号: __を参照されたい)が含まれるが、但しこれに限定されない。

ハンマーヘッド・リボザイムのための開裂部位に要求される配列は、NUX(式中、NはG、U、CまたはAのいずれかで、XはC、UまたはAを表す)から成る任意のRNA配列が標的化される。従って、ヘアピンリーダー配列内の同じ標的、GUCがハンマーヘッド・リボザイムに有用である。ハンマーヘッド・リボザイムまたはヘアピン・リボザイムのさらなるヌクレオチドは、標的フランキング配列およびハンマーヘッド・コンセンサス配列によって決定される(Ruffiner et al.(1990) Biochemistry 29:10695-10702を参照のこと)。

【0105】

米国特許4,987,071号(Cech et al.)には、エンドリボヌクレアーゼ活性を有

するある種の合成リボザイムの調製および使用が開示されている。これらのリボザイムは、テトラヒメナのリボソームRNAの自己スプライス反応の特性をベースにしており、8塩基対の標的部位を必要とする。50℃の最適温度がエンドリボヌクレアーゼ活性について報告されている。開裂により生じるフラグメントは5′リン酸基および3′ヒドロキシル基を含み、遊離グアノシン・ヌクレオチドが開裂されたRNAの5′末端に結合している。本発明の好ましいリボザイムは、生理的温度で効率的に標的配列とハイブリダイズし、in vivoでの使用に特に適している。

【0106】

本発明のリボザイムは、並びに、そのようなリボザイムをコードするDNAおよび他の好適な核酸分子は、核酸分子の合成に関する当分野で周知の方法を用いて化学的に合成できる。また別の選択肢として、プロメガ社 (Promega, Madison, Wisconsin, USA) は、リボザイムのようなRNA分子の製造に適した一連のプロトコルを提供している。リボザイムはまた、RNAポリメラーゼプロモーター (例えば、T7 RNAポリメラーゼまたはSP6 RNAポリメラーゼのためのプロモーター) と作動可能に連結させたDNA分子または他の核酸分子 (転写に際してRNA分子を生じる) から調製できる。そのような構築物は、ベクターと称され得る。従って、本発明は、本発明のリボザイムをコードする核酸分子、例えば、DNAまたはcDNAも提供する。前記ベクターがまたDNA分子に作動可能に結合させたRNAポリメラーゼプロモーターを含む場合は、RNAポリメラーゼおよび好適なヌクレオチドとともにin vitroでインキュベートすると、リボザイムを生成させることができる。別の実施態様では、DNAは発現カセットに挿入することができる (例えば、以下の文献を参照されたい: Cotton & Birnstiel (1989) EMBO J, 8(12):3861-3866; Hempel et al. (1989) Biochem., 28:4929-4933など)。

合成した後、リボザイムを安定化させる能力を有するDNAに連結することによって前記リボザイムを改変し、リボヌクレアーゼに対して耐性にする。或いは、リボソーム・デリバリー系で使用するために、リボザイムをホスホチオ類似体に改変できる。この改変によって、リボザイムはエンドヌクレアーゼ活性に対し

ても耐性になる。

【0107】

リボザイム分子は、培養中の宿主原核細胞または真核細胞内、または生物/患者の細胞内に存在することもできる。好適な原核および真核細胞は、本発明のリボザイムをコードするDNA分子を含む好適なトランスファーベクターでトランスフェクトすることができる。或いは、例えば、以下による形質転換のような古くからの方法を用いて宿主細胞にリボザイム分子(リボザイムをコードする核酸分子を含む)を導入してもよい:リン酸カルシウム沈殿(Dubensky et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7529-7533)、無傷の標的細胞への前記核酸分子の直接的マイクロインジェクション(Acsadi et al. (1991) Nature 352:815-818)、およびエレクトロポレーション(これにより、電導性溶液に浮遊している細胞は強い電場に置かれ、膜が一過性に分極し核酸分子の浸入が可能になる)。他の方法には、不活化アデノウイルスに結合させた核酸分子の使用(Cotton et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6094)、リポフェクチン(Felgner et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417)、ミクロ発射爆撃(microprojectile bombardment)(Williams et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:2726-2730)、ポリカチオン化合物(例えば、ポリリジン、レセプター特異的リガンド、核酸分子をトラップしたリポソーム、スフェロプラスト融合(この方法により、核酸分子を含む大腸菌の外側の細胞壁が剥がされ、ポリエチレングリコールを用いて動物細胞と融合される)、ウイルスによる形質導入(Cline et al. (1985) Pharmac. Ther. 29:69; およびFriedmann et al. (1989) Science 244:1275)、およびDNAリガンド(Wu et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:16985-16987)、並びにソラレン不活化ウイルス(例えば、センダイウイルスまたはアデノウイルス)が含まれる。好ましい実施態様の1つでは、リボザイムは、脂質、リポソームまたはレトロウイルスベクターを活用して、宿主細胞に導入される。

【0108】

DNA分子がRNA転写プロモーターに作動可能に連結されている場合は、宿主細胞をDNA分子の転写を促進する好適な条件下で増殖させるとき、前記ホ

スト細胞内でRNAを産生できる。ベクターは、プラスミド、ウイルス、レトロトランスポゾンまたはコスミドでもよいが、但しこれらに限定されない。そのようなベクターの例は、米国特許5,166,320号に開示されている。他の代表的なベクターには、アデノウイルスベクター（例えば、W094/26914号、W093/9191号；Kolls et al. (1994) PNAS 91(1):215-219; Kass-Eisler et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90(24):11498-502; Guzman et al. (1993) Circulation 88(6):2838-48(1993); Guzman et al. (1993) Cir. Res. 73(6):1202-1207, 1993; Zabner et al. (1993) Cell 75(2):207-216; Li et al. (1993) Hum. Gene Ther. 4(4):403-409; Caillaud et al. (1993) Eur. J. Neurosci. 5(10):1287-1291)、アデノ付随ベクター1型（“AAV-1”）もしくはアデノ付随ベクター2型（“AAV-2”）（例えば、以下を参照されたい：W095/13365; Flotte et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(22):10613-10617）、レトロウイルスベクター（例えば、EP0415731; W090/07936; W091/02805; W094/03622; W093/25698; W093/25234; 米国特許5,219,740号; W093/11230; W093/10218）およびヘルペスウイルスベクター（例えば、米国特許5,288,641号）が含まれるが、但しこれらに限定されない。遺伝子治療にそのようなベクターを利用する方法は、当分野で周知であり、例えば以下の文献を参照されたい：Larrick & Burck (1991) Gene Therapy: Application of Molecular Biology, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, New York; およびKreigler (1990) Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual, W.H. Freeman & Company, New York.

ベクターを用いてin vivoでリボザイムを製造するために、リボザイムをコードするヌクレオチド配列は、好ましくは強力なプロモーター（例えば、lacプロモーター、SV40後期、SV40初期プロモーター、またはラムダプロモーター）の制御下に置かれる。続いて、リボザイムはトランスファーベクターから直接in vivoで製造される。In vivo発現に適したトランスフェクターベクターは、下記で考察する。

【0109】

2) 触媒性DNA

リボザイムと類似の様式で、DNAも触媒（例えば、ヌクレアーゼ）活性を示

すことができる。天然に存在するそのようなDNAは知られていないが、高度に触媒性の種が指定された進化および選別によって開発された。50個のランダムヌクレオチドを含む 10^{14} 個のDNA集団から開始して、連続して選別増幅することにより、それ以外の意味では完全なDNA配列の内部に埋め込まれた標的リボヌクレオシド3'-O-P結合の Pb^{2+} 依存性開裂を最も促進する個体を濃縮した。5回目までに、集団全体としては、 0.2分^{-1} の速度で前記反応を進行させた。この集団から単離した20個体の配列を基にして、分子間で稼動する触媒性ドメインの単純化型は、ターンオーバー速度が 1分^{-1} であった(例えば、Breaker & Joyce (1994) Chem Biol 4:223-229を参照のこと)。

【0110】

より最近の研究では、類似の戦略を用いて、生理的条件に類似する条件下で殆ど全ての標的RNA基質を開裂することができるDNA酵素が作製された。この酵素は、15デオキシヌクレオチドの触媒性ドメインを含み、前記ドメインは、各々が7~8個のデオキシヌクレオチドを有する2つの基質認識ドメインにフランキングしている。RNA基質は、ワトソン-クリック塩基対形成により結合し、非対合プリンおよび対合形成ピリミジン残基との間に位置する特定のホスホジエステルで開裂される。その小さなサイズにもかかわらず、このDNA酵素は、多数のターンオーバー条件下で約 $10^9 \text{M}^{-1} \text{分}^{-1}$ の触媒効率(kcat/Km)を有し、他の公知のいずれの核酸酵素の触媒効率も超えている。基質認識ドメインの配列を変化させることによって、異なるRNA基質を標的化するようにこのDNA酵素を作製することができる(Santoro & Joyce (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94(9):4262-4266)。好適なターゲティング配列に改変することによって(例えば、上掲書(Santoro & Joyce)に記載されたように)、容易にこのDNA酵素をMKP-1 mRNAに再標的化させ、それによってリボザイムのように機能させることができる。

【0111】

C) MKP-1のノックアウト

別のアプローチでは、MKP-1遺伝子を“ノックアウト”することによって、MKP-1を抑制/単純にダウンレギュレートすることができる。代表的には

、これは、MKP - 1 遺伝子、前記遺伝子を調節するプロモーター、または前記プロモーターと前記遺伝子との間の配列を破壊することによって実施される。そのような破壊は、相同組換えによって特異的にMKP - 1 に向けることができる。この場合、“ノックアウト構築物”は、構築物が標的とするドメインと相補的なフランキング配列を含む。(例えば、MKP - 1 遺伝子内への)ノックアウト構築物の挿入は、その遺伝子の破壊をもたらす。“遺伝子の破壊”および“遺伝子破壊”という語句は、天然のDNA配列の1つの領域(通常は1つ以上のエクソン)および/または遺伝子のプロモーター領域への核酸配列の挿入を指し、挿入の結果、野生型または天然に存在する前記遺伝子の配列と比較して、細胞内でその遺伝子の発現が低下または妨げられる。例えば、核酸構築物は、破壊されるべきDNA配列(プロモーターおよび/またはコード領域)に相補的であるDNA配列に挿入される抗生物質耐性遺伝子をコードするDNA配列を含むように製造することができる。続いて、この核酸構築物を細胞にトランスフェクトすると、その構築物はゲノムDNAに組み込まれるであろう。DNAは今や構成物質耐性遺伝子によって破壊されているので、従って、その細胞およびその子孫はもはやその遺伝子を発現しないか、または低いレベルでの発現となる。

【0112】

ノックアウト構築物は、当業者に公知の標準的な方法によって製造できる。ノックアウト構築物は化学的に合成するか、または、例えば、組換えDNA法を用いて組み立てることができる。ノックアウト構築物の産生に用いられるDNA配列は、このDNA配列内の好適な位置にマーカー遺伝子をコードする新しいDNA配列を挿入できるような位置で開裂するように選択した、特定の制限酵素で消化される。マーカー遺伝子挿入のために好適な位置は、天然の遺伝子の発現を妨げるように機能する位置である。この位置は、種々の因子、例えば、切断されるべき配列の制限部分、およびエクソン配列もしくはプロモーター配列またはその両方が妨害されるべきか否か(即ち、プロモーター機能を抑制するか、または天然のエクソンの合成を抑制するために必要な挿入の正確な位置)によって左右される。好ましくは、DNAを切断するために選択される酵素は長腕および短腕を生成するであろう。この場合、短腕は少なくとも約300塩基対(bp)である

。幾つかの事例では、マーカー遺伝子をノックアウト構築物に挿入したとき、当初のゲノム配列に匹敵するようにノックアウト構築物の長さを保持するように、抑制すべき遺伝子の1つ以上のエクソンの一部分または全部さえ実際には除去することが所望されるであろう。これらの事例では、適当なサイズのフラグメントを除去できるように、ゲノムDNAは好適なエンドヌクレアーゼで切断される。

【0113】

マーカー遺伝子は、検出可能および/またはアッセイ可能な任意の核酸配列でもよいが、代表的には、マーカー遺伝子は抗生物質耐性遺伝子または、その発現もしくはゲノム中の存在が容易に検出できる他の遺伝子である。そのマーカー遺伝子は、通常は、それ自身のプロモーターまたは、前記遺伝子が挿入される細胞内で活性であるかもしくは容易に活性化できる任意の供給源からの別の強力なプロモーターに作動可能に連結される。しかしながら、そのマーカー遺伝子は、抑制されるべき前記遺伝子のプロモーターを用いて転写され得るので、それ自身のプロモーターが結合される必要はない。さらに、マーカー遺伝子は、通常はその遺伝子の3'末端に結合されたポリA配列を有するであろう。この配列は、この遺伝子の転写を終止させるように機能する。好ましいマーカー遺伝子は、任意の抗生物質耐性遺伝子であり、neo (ネオマイシン耐性遺伝子) および beta-gal (ベータ - ガラクトシダーゼ遺伝子) が含まれるが、但しこれらに限定されない。

【0114】

ゲノムDNA配列を好適な制限酵素で消化した後、当業者に周知の方法を用いて、マーカー遺伝子配列を前記ゲノムDNA配列に連結する(例えば、以下の文献を参照されたい: Berger & Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, vol.152, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A laboratory Manual (2nd ed.), vol.1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY; Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. a

nd John Wiley & Sons, Inc., (1994) 増補)。連結されるべきDNAフラグメントの末端は、適合性をもたなければならない。これは、適合性末端を生成する酵素で全てのフラグメントを切断するか、またはライゲーション前に末端を平滑化することによって達成される。末端の平滑化は、当分野で周知の方法、例えば、クレノウフラグメント(DNAポリメラーゼI)を用いて、粘着末端で充填して達成される。

【0115】

好適なノックアウト構築物を作製し、これを用いてMKP-1ノックアウトマウスが作製された(例えば、Dorfman et al. (1996) *Oncogene* 13:925-931を参照のこと)。ノックアウト構築物は、下記に述べるように、遺伝子治療デリバリー・ビヒクル(例えば、レトロウイルス、リポソーム、脂質、 dendriマーなど)を用いてin vivoで細胞にデリバリーすることができる。遺伝子のノックアウト方法は、文献に詳細に記載され、当業者にはルーチンな作業である(例えば、以下を参照されたい: Thomas et al. (1986) *Cell* 44(3):419-428; Thomas et al. (1987) *Cell* 51(3):503-512) 1; Jasin & Berg (1988) *Genes & Development* 2:1353-1363; Mansour et al. (1988) *Nature* 336:348-352; Brinster et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:7087-7091; Capecchi (1989) *Trends in Genetics* 5(3):70-76; Frohman & Martin (1989) *Cell* 56:145-147; Hasty et al. (1991) *Mol. Cell Biol.* 11(11):5586-5591; Jeannotte et al. (1991) *Mol. Cell Biol.* 11(11):557814-5585; およびMortensen et al. (1992) *Mol. Cell Biol.* 12(5):2391-2395を参照のこと)。

相同組換えを用いて内因性遺伝子の発現を変化させることも、以下に詳細に記載されている: 米国特許5,272,071号、W091/09955、W093/09222、W096/29411、W095/31560およびW091/12650。

【0116】

D) イントラボディ

別の実施態様では、MKP-1発現/活性は、対象細胞(例えば、血管内皮細胞)に、イントラボディ(intrabody)を発現する核酸構築物をトランスフェクトすることによって抑制される。イントラボディとは細胞内抗体(intracellular a

ntibody)のことであり、本事例では、MKP - 1ポリペプチドを認識し、これと結合することができる。イントラボディは、“抗体カセット”によって発現される。抗体カセットは、問題の細胞内でこの抗体を発現可能にするプロモーターに作動可能に連結された、標的(MKP - 1ポリペプチド)と結合することができる抗体の一部分をコードする十分な数のヌクレオチドを含んでいる。イントラボディをコードする構築物は、細胞にデリバリーされ、その細胞内で抗体は発現し標的MKP - 1と結合し、それによって標的の正常な作用を崩壊させる。この抗体は、時に“イントラボディ”と称される。

【0117】

1つの好ましい実施態様では、抗体カセットの“イントラボディ遺伝子”(抗体)は、抗体の重鎖可変(V_H)ドメインおよび軽鎖可変(V_L)ドメインをコードするcDNAを利用できる。それらのドメインは、前記2つのドメインの架橋として好適なオリゴヌクレオチドによってDNAレベルで結合され、翻訳されると、標的(例えば、MKP - 1タンパク質)と結合できる単一のペプチド(単鎖可変フラグメント“sFv”と呼ばれる)を形成することができる。好ましくは、イントラボディ遺伝子は、機能的な分泌配列をコードせず、従って、発現された抗体は細胞内に留まる。

本発明の方法で、イントラボディとしての使用/発現に適した抗MKP - 1抗体は、様々な方法によって容易に製造できる。そのような方法には、“完全な”ポリクローナル抗体を作製する慣用的な方法(これは改変して単鎖抗体を作製することができる)、または例えば、ファージディスプレイライブラリーをスクリーニングし、MKP - 1に対して高い特異性および/または親和性を示す抗体を選別する方法が含まれるが、但しこれらに限定されない。前記スクリーニング方法は、上記で詳細に記載されている。

【0118】

抗体カセットは、公知の手段のいずれかにより細胞にデリバリーされる。好ましいデリバリー・システムの1つは、米国特許出願08/199,070号(Marasco, 1994年2月22日出願)に記載されている(この文献は、本明細書中に参考として援用されている)。前記特許出願は、標的部分および結合部分を含む融合タンパク質

の使用を開示している。この標的成分は、ベクターを細胞に運び、一方、結合部分は抗体カセットを含んでいる。他の方法には、例えば、以下の文献の方法が含まれる (Miller (1992) Nature 357:455-460; Anderson (1992) Science 256:808-813; Wu et al. (1988) J. Biol. Chem. 263:14621-14624)。例えば、これら (抗MKP-1) の抗体遺伝子 (例えば、sFv遺伝子) を含むカセットは、多数の技術 (組織特異的プロモーターの使用、組織特異的ベクターの使用などを含むが、但しこれらに限定されない) によって特定の細胞に標的化される。イントラボディを製造および使用する方法は、米国特許6,004,940号に詳細に記載されている。

E) 酸化リン脂質の標的シグナル形質導入分子へのアクセス阻止

上記で示したように、酸化リン脂質は、MKP-1の強いアップレギュレーションを誘発する。特定の理論に拘束されるものではないが、この反応は、酸化リン脂質と、レセプターおよび/または1つ以上のシグナリングタンパク質との相互作用によって仲介されると考えられる。酸化リン脂質が標的シグナル形質導入分子にアクセスするのをブロックすることによって、酸化リン脂質との反応によるMKP-1のアップレギュレーションが達成できる。

そのようなブロッキングへのアプローチの1つは、競合的阻害物質の使用である。好ましい実施態様の1つでは、そのような競合的阻害物質には、脂質 (好ましくは、非酸化脂質) または他の疎水性および/または両親媒性の分子が含まれる。阻害物質 (競合的または非競合的) は、レセプター/シグナリングタンパク質と結合または相互作用し、それによって酸化リン脂質 (または他の関連するLDL分画) がレセプター/シグナリングタンパク質をもはや利用できないようにする。脂質/疎水性分子は、当業者に周知の多数の方法のいずれかによって (例えば、小有機分子または標的化リポソーム、組織特異的脂質など) 標的部位にデリバリーできる。

好適な脂質または両親媒性分子は、本発明のスクリーニング方法を用いると、ルーチンなスクリーニングのみで同定できる。

【0119】

F) 小有機分子

別の実施態様では、MKP-1の発現および/またはMKP-1タンパク質活性は、小有機分子の使用によって抑制できる。そのような分子には、MKP-1プロモーターおよび/またはコード領域を含むDNAと特異的に結合する分子、MKP-1 mRNAと結合しこれと複合体を形成する分子、MKP-1アップレギュレーションをもたらすシグナリング経路を抑制する分子、MKP-1ポリペプチドと結合および/または競合する分子が含まれるが、但しこれらに限定されない。MKP-1発現を抑制するのに有効な小有機分子は、本発明の方法を用いてルーチンなスクリーニングで同定できる。

上記に述べたMKP-1発現を抑制する方法は、例示を目的としており、限定するものではない。本明細書に提示した教示から、当業者は、MKP-1を抑制する他の方法を知ることができる。

【0120】

G) 投与の様式

MKP-1阻害物質の投与様式は、特定の薬剤の性質に左右される。MKP-1阻害物質として用いられるアンチセンス分子、触媒性RNA(リボザイム)、触媒性DNA、小有機分子および他の分子(例えば、脂質、抗体など)は、医薬として製剤化され(例えば、好適な賦形剤とともに)、下記で述べるように、標準的な医薬製剤およびデリバリー方法を用いてデリバリーされる。アンチセンス分子、触媒性RNA(リボザイム)、触媒性DNA、および加えて、ロックアウト構築物およびイントラボディをコードする構築物を標的細胞にデリバリーし、さらに(必要な場合には)標的細胞(例えば、血管内皮細胞)内で、例えば下記で述べるような遺伝子治療の方法を用いて発現させることができる。

【0121】

1) 医薬の投与

本発明の方法を実施するために、MKP-1発現の1つ以上の阻害物質(例えば、リボザイム、抗体、アンチセンス分子、小有機分子など)を個体に投与して、アテローム性硬化症および/または慢性関節リウマチの1つ以上の症状を改善する。ヒトを例にとって本発明を一般的に記載するが、獣医学的応用も本発明の範囲内に包含される。

様々な阻害物質を、所望の場合は、塩、エステル、アミド、プロドラッグ、誘導体などの形態で投与できるが、但し、それらの塩、エステル、アミド、プロドラッグまたは誘導体は薬理的に好適であること、即ち、本方法で有効であることを条件とする。活性薬剤の塩、エステル、アミド、プロドラッグおよび他の誘導体は合成有機化学の当業者に公知であり、さらに例えば、以下の文献に記載されている標準的な方法を用いて製造できる：March (1992) *Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanisms and Structure*, 4th Ed. N.Y. Wiley-Interscience。

【0122】

MKP - 1 阻害物質およびそれらの種々の誘導体および/または製剤は、冠状動脈疾患および/または慢性関節リウマチの予防的および/または治療的処置を目的とする非経口投与、局部投与、経口投与、または局所投与（例えば、エアロゾルによる、または経皮的に）に有用である。本医薬組成物は、投与方法に応じて様々な単位投薬形態で投与できる。好適な単位投薬形態には、粉剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、ロゼンジ、座薬などが含まれるが、但しこれらに限定されない。

MKP - 1 阻害物質およびその種々の誘導体および/または製剤は、代表的には医薬として許容できる担体（賦形剤）と一緒にして、薬理作用を有する組成物が形成される。医薬として許容できる担体は、1つ以上の生理的に許容できる化合物で、例えば、組成物を安定化させるために、または活性薬剤の吸収を増加または減少させるために作用するものを含むことができる。生理的に許容できる化合物には、例えば、炭水化物（例えば、グルコース、ショ糖またはデキストラン）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸またはグルタチオン）、キレート剤、低分子量タンパク質、活性薬剤の除去または加水分解を低下させる組成物、または賦形剤もしくは他の安定剤および/または緩衝剤が含まれる。

【0123】

他の生理的に許容できる化合物には、湿潤剤、乳化剤、分散剤、または微生物の増殖または作用の防止に特に有用な保存剤が含まれる。様々な保存剤が周知であるが、例えば、フェノールおよびアスコルビン酸が含まれる。当業者には、

医薬として許容できる担体（生理学的に許容できる化合物を含む）の選択は、例えば、活性薬剤の投与ルートおよび活性薬剤の具体的な生理化学的特性に左右されることは理解されよう。賦形剤は好ましくは無菌的で、さらに一般には望ましくない物質を含まない。これらの組成物は、慣用されている周知の殺菌技術によって滅菌し得る。

製剤中の活性薬剤の濃度は、大きく変動が可能で、選択される具体的な投与様式および患者側の必要性に従って、主に液体容積、粘度、体重などを基準にして選択される。

【0124】

治療で用いる場合は、本発明の組成物は、疾患（例えば、アテローム性硬化症および/または付随する症状、および/または慢性関節リウマチ）を患う患者に、前記疾患および/またはその症状を治癒させるかまたは少なくとも部分的に進行を抑える（例えば、プラーク形成の低下、単球漸増の低下など）のに十分な量で投与される。前記を達成するために好適な量は、“治療的に有効な用量”と規定される。このような使用に有効な量は、疾患の重篤度および患者の一般的な健康状態に左右されるであろう。患者が必要とする、または患者が耐えられる用量および頻度に従って、前記組成物が1回または複数回投与される。いずれの場合にも、患者を効果的に治療する（1つ以上の症状を改善する）ために、前記組成物は、本発明の製剤の活性薬剤の十分な量を提供すべきである。

【0125】

ある種の好ましい実施態様では、MKP-1阻害物質は経口的に（例えば、錠剤により）または、当業者に周知の標準的方法に従って、注射物として投与される。他の好ましい実施態様では、MKP-1阻害物質はまた、通常経皮的ドラッグデリバリー系、即ち、経皮的“パッチ”（この場合、活性薬剤は、代表的には、皮膚に固定されるドラッグデリバリー装置として機能するラミネート構造の内部に含まれている）を用いて皮膚からデリバリーされる。そのような構造では、薬剤組成物は、代表的には上面の裏打ち層の下にある層または“貯留装置”中に含まれている。本文中の“貯留装置”という用語は、皮膚表面へのデリバリーのために最終的に利用可能なある量の“活性薬剤”を指すことは理解されよう。

従って、例えば、“貯留装置”は、パッチの裏打ち層上の粘着物質中に、または当業者に公知の非常に様々な任意のマトリックス製剤中に活性成分を含むことができる。前記パッチはただ1つの貯留装置を含むことができるが、また複数の貯留装置を含んでも良い。

【0126】

ある実施態様では、貯留装置は、ドラッグデリバリー時に前記システムを皮膚に固定するために機能する、医薬として許容できる接触粘着材で構成されたポリマーマトリックスを含む。好適な皮膚接触粘着材の例には、ポリエチレン、ポリシロキサン、ポリイソブチレン、ポリアクリレート、ポリウレタンなどが含まれるが、但しこれらに限定されない。或いは、薬剤含有貯留装置および皮膚接触粘着物質は、別個の分離した層として存在し、粘着物質は貯留装置の下に存在する。この場合、貯留装置は上記のようなポリマーマトリックスであっても、または液体もしくはヒドロゲルの貯蔵装置であってもよく、また他の形態を有するものでもよい。これらのラミネート構造中の裏打ち層（これは装置の上部表面として機能する）は、好ましくは、“パッチ”の主要な構成成分として機能し、装置にその柔軟性の多くを提供する。この裏打ち層として選択される材料は、好ましくは実質的に活性薬剤および他の一切の存在物質に対して非透過性である。

前述の製剤および投与方法は例示であって制限を意図するものではない。本明細書に提供した教示を利用して他の好適な製剤および投与態様を容易に考案できることは理解されよう。

【0127】

2) 遺伝子治療

上記で示したように、アンチセンス分子、触媒性RNA（リボザイム）、触媒性DNA、さらにまたロックアウト構築物およびイントラボディをコードする構築物を標的細胞（例えば、血管内皮細胞）に、遺伝子治療の方法を用いてデリバリーし、前記細胞内で転写および/または発現させることができる。従って、ある種の好ましい実施態様では、ロックアウト構築物、イントラボディ、アンチセンス分子、触媒性RNAまたはDNAなどをコードする核酸が、*in vitro*および/または*in vivo*で細胞（例えば、ヒトまたは他の哺乳類細胞）をトランスフェク

トする能力を有する遺伝子治療ベクターにクローニングされる。

【0128】

in vivo、ex vivoおよびin vitroで、細胞に核酸を導入する多くの方法が知られている。これらの方法には、脂質またはリポソームをベースにする遺伝子デリバリー(W096/18372;W093/24640; Mannino & Gould-Fogerite (1988) Bio Techniques 6(7):682-691; 米国特許5,279,833号 (Rose); W091/06309; および Felgner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7414)、およびレトロウイルスゲノム的一部分として治療用ポリヌクレオチド配列を含む複製欠損レトロウイルスベクター(例えば、Miller et al. (1990) Mol. Cell. Biol. 10:4239 (1990); Kolberg (1992) J. NIH Res. 4:43; Cornetta et al. (1991) Hum. Gene Ther. 2:215)が含まれる。

【0129】

遺伝子治療法の概説には、例えば、以下を参照されたい: Anderson, Science (1992) 256:808-813; Nabel and Felgner (1993) TIBTECH 11:211-217; Mitani & Caskey (1993) TIBTECH 11:162-166; Mulligan (1993) Science, 926-932; Dillon (1993) TIBTECH 11:167-175; Miller (1992) Nature 357:455-460; Van Brunt (1988) Biotechnology 6(10):1149-1154; Vigne (1995) Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36; Kremer and Perricaudet (1995) British Medical Bulletin 51(1):31-44; Haddada et al. (1995) in Current Topics in Microbiology and Immunology, Doerfler and Bohm (eds), Springer-Verlag, Heidelberg, Germany; and Yu et al. (1994) Gene Therapy 1:13-26.

【0130】

広く用いられるレトロウイルスベクターには、ネズミ白血病ウイルス(MuLV)、テナガザル(gibbon ape)白血病ウイルス(GaLV)、サル免疫不全ウイルス(SIV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、アルファウイルスおよびそれらの組み合わせをベースにしたベクターが含まれる(例えば、以下を参照されたい: Buchscher et al. (1992) J. Virol. 66(5):2731-2739; Johann et al. (1992) J. Virol. 66(5):1635-1640(1992); Sommerfelt et al. (1990) Virol. 176:58-59; Wilson et al. (1989) J. Virol. 63:2374-2378; Miller et al. J. Virol

. 65:2220-2224(1991); PCT/US94/05700 (Wong-Staal et al.); Rosenberg & Fauci (1993) in *Fundamental Immunology*, Third Ed., Paul(ed), Raven Press, Ltd., New York (および論文中の引用文献); Yu et al. (1994) *Gene Therapy*, 上掲書; 米国特許6,008,535号など。)

【0131】

ベクターに対応するレトロウイルスに感染しない細胞にまでベクターのホスト域を拡大するために、ベクターは必要に応じて、シュードタイプ化される。例えば、水疱性口内炎ウイルスのエンベロープ糖タンパク質(VSV-G)を用いて、VSV-GシュードタイプHIVベクターが構築された(Naldini et al.(1996) *Science* 272:263; およびAkkina et al.(1996) *J. Virol.* 70:2581)。このシュードタイプベクターは造血幹細胞に感染することができる。

また、アデノ関連ウイルス(AAV)をベースにするベクターを用いて、例えば、核酸およびペプチドの*in vitro*産生、並びに*in vivo*および*ex vivo*遺伝子治療により、細胞に標的核酸が形質導入される。例えば、AAVベクターに関する概説には、以下の文献を参照されたい: West et al. (1987) *Virology* 160:38-47; 米国特許4,797,368号(Carter et al. (1989)); W093/24641(Carter et al.(1993)); Kotin (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Muzyczka (1994) *J. Clin. Invest.* 94:1351。組換えAAVベクターの構築は、以下を含む多数の文献に記載されている: 米国特許5,173,414号(Lebkowski); Tratschin et al.(1985) *Mol. Cell. Biol.* 5(11):3251-3260; Tratschin et al.(1984) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Hermonat and Muzyczka (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. US A*, 81:6466-6470; McLaughlin et al.(1988); およびSamulski et al.(1989) *J. Virol.* 63:3822-3828。rAAVによって形質転換できる細胞株には、Lebkowski et alら(*J. Mol. Cell. Biol.* 8:3988-3966(1988))が記載した細胞株が含まれる。他の好適なウイルスベクターには、ヘルペスウイルス、レンチウイルスおよびワクシニアウイルスが含まれる。

【0132】

a) レトロウイルストランスフェクション系

特に好ましい実施態様では、レトロウイルス(例えば、レンチウイルス)を用

いて、MKP-1発現をブロックまたは抑制する構築物で標的細胞をトランスフェクトする。レトロウイルス、特にレンチウイルス（例えば、HIVまたはSIVなど）は非分裂細胞に感染できるので、特に前記の応用に適している。レトロウイルスを核酸のトランスフェクションに使用する方法は、当業者に公知である（例えば、米国特許6,013,576号を参照されたい）。

【0133】

レトロウイルスはRNAウイルスであり、ウイルスゲノムがRNAである。ホスト細胞にレトロウイルスが感染すると、ゲノムRNAはDNA中間体に逆転写され、この中間体は非常に効率的に感染細胞の染色体DNAに組み込まれる。この組み込まれたDNA中間体を、プロウイルスと称する。プロウイルスの転写および感染性ウイルスへのアッセンブリーは、好適なヘルパーウイルスの存在下、または夾雑ヘルパーウイルスの同時産生を伴うことなく被包化できる好適な配列を含む細胞株で生じる。好ましい実施態様では、被包化のための配列は、好適なベクターで同時トランスフェクトすることによって提供することができるので、組換えレトロウイルス産生のためにヘルパーウイルスを利用する必要はない。

【0134】

レトロウイルスゲノムおよびプロウイルスDNAは、3つの遺伝子を有する。即ち、gag、polおよびenvであり、これらは、2つの長末端反復（LTR）配列にフランキングされている。gag遺伝子は内部構造（マトリックス、キャプシドおよびヌクレオキャプシド）タンパク質をコードし、pol遺伝子は、RNA依存性DNAポリメラーゼ（逆転写酵素）をコードし、さらにenv遺伝子はウイルスエンベロープ糖タンパク質をコードしている。5'および3'LTRは、ビリオンRNAの転写およびポリアデニル化を促進するよう機能する。LTRは、ウイルス複製に必要な全ての他のcis-作動性配列を含む。レンチウイルス（HIV-1、HIV-2およびSIV）は、vit、vpr、tat、rev、vpu、nefおよびvpxを含む更なる遺伝子を有する。

【0135】

5'LTRに隣接して、ゲノムの逆転写に必要な配列（tRNAプライマー結合部位）、およびウイルスRNAの粒子への効率的な被包化のための配列（Ps

i 部位)が存在する。被包化(またはレトロウイルスRNAの感染性ビリオンへのパッケージング)に必要な配列がウイルスゲノムから欠損する場合、結果はゲノムRNAの被包化を妨げるcis型欠損である。しかしながら、生じた変異体は、それでも全てのビリオンタンパク質の合成を指令する能力を有する。

ある好ましい実施態様では、本発明は、非分裂細胞に感染し得る組換えレトロウイルスを提供する。この組換えレトロウイルスは、ウイルスGAG、ウイルスPOL、ウイルスENV、調節核酸配列に作動可能に連結された異種核酸配列、並びに上記で述べたようにパッケージング、逆転写および組み込みに必要なcis-作動性核酸配列を含む。本発明の組換えレトロウイルスは、非分裂細胞と同様に、分裂細胞にも感染することができることが理解されよう。

【0136】

好ましい実施態様では、本組換えレトロウイルスは、従って、遺伝的に改変され、その結果、天然のウイルスの構造的、感染性遺伝子の幾つか(例えば、env、gag、pol)が除去され、代わりに、標的の非分裂細胞にデリバリーされるべき核酸配列(例えば、MKP-1発現ブロックまたは抑制する構築物をコードする配列)で置換されている。このウイルスが細胞に感染した後、ウイルスはその核酸を細胞に注入し、そのレトロウイルスの遺伝物質は宿主細胞のゲノムに組み込まれ得る。伝達されたレトロウイルスの遺伝物質は、続いて転写され、必要に応じて宿主細胞内で翻訳される。レンチウイルスベクターの作製および使用方法は、米国特許6,013,516号、5,932,467号などで詳細に考察されている。

【0137】

2) アデノウイルスベクター

別の好ましい実施態様では、MKP-1の発現をブロックまたは抑制する構築物は、遺伝子治療に適したアデノウイルスベクター中で発現される。アデノウイルスベクターの使用は、W096/25507に詳細に記載されている。特に好ましいアデノウイルスベクターは、Willsら(Hum. Gene Therap. 5:1079-1088(1994))に記載されている。代表的には、アデノウイルスベクターは、アデノウイルス初期領域3および/または初期領域4に欠損を含み、この欠損はタンパク質IX遺伝子

の部分および全ての欠損を含み得る。ある実施態様では、アデノウイルスベクターはE 1 aおよび/またはE 1 b配列の欠損を含む。

【0138】

多数の種々のアデノウイルスベクターが、遺伝子トランスファーのために最適化されている。そのようなアデノウイルスベクターの1つは、米国特許6,020,191号に記載されている。このベクターは、トランスジーンに作動可能に連結されるCMVプロモーターを含み、さらにE 1欠損およびE 3領域に1.6 kbの部分的欠損を有する。これは、トランスジーン(例えば、サブユニット遺伝子)およびその発現制御配列をその中に挿入することができるE 1領域に欠損を有する複製欠損ベクターであり、好ましくはこのベクターにはCMVプロモーターが含まれる。それは、さらに野生型アデノウイルスのE 2およびE 4領域を含む。このベクターは、アデノウイルス・ヌクレオチド29292~30840の1549ヌクレオチドに亘るE 3領域内の欠損を有する(Roberts et al.(1986) Adenovirus DNA, in Developments in Molecular Virology, W. Doerfler, ed., 8: 1-51)。ベクター中のE 3領域でのこれらの改変は、以下の変化をもたらす:(a) E 3領域の全ての下流のスプライスアクセプター部位が欠損し、mRNAのみがE 3プロモーターから合成される(Tollefson et al.(1996) J. Virol. 70: 2296-2306; Tollefson et al.(1996) Virology 220:152-162); (b) E 3 AのポリA部位は欠損するが、E 3 BのポリA部位は保持される;(c) E 3 gp 19K(MHC I結合タンパク質)遺伝子は保持される;(d) E 3の11.6K(A d死滅タンパク質)遺伝子は欠損する。

【0139】

そのようなアデノウイルスベクターは、任意のアデノウイルス血清タイプ(アデノウイルス血清タイプ2、5および他の全ての好ましくは非発癌性血清型を含むが、但しこれらに限定されない)のアデノウイルスゲノム配列を利用することができる。

好ましい実施態様の1つでは、サイトメガロウイルス(CMV)の即時型プロモーター(Boshart et al.(1985) Cell 41:521-530)を用いて、MKP-1の発現をブロックまたは抑制する構築物の転写および/または翻訳を制御する。また

は、同様に機能するこのプロモーターの切形フラグメントを用いてもよい。CMVプロモーターは、転写ユニットではトランスジーン（例えば、MKP-1発現をブロックまたは抑制する構築物）に対して、5´側に配置される。完全長プロモーターの部分を、トランスジーンの永続的発現を可能にする能力についてテストすることができるが、これらに限定されない。

トランスジーンの3´末端に配置することができるポリアデニル化シグナルには、ウシ成長ホルモン（BGH）およびSV40に由来するものが含まれる。

【0140】

MKP-1発現をブロックまたは抑制する構築物をコードする転写ユニット（発現カセット）を含む、本発明の組換えアデノウイルスベクターを作製するために、アデノウイルスゲノムフラグメントに挿入された転写ユニットを含むプラスミドを、問題のアデノウイルスベクター由来の直線化ウイルスゲノムとともに、相同組換えが前記ゲノムフラグメントとウイルスとの間で生じる条件下で、レシピエント細胞に同時トランスフェクトする。好ましくは、転写ユニットは、E1欠損の部位に遺伝子工学的に挿入される。結果として、所望のトランスジーンをコードする転写ユニットは、それが前記プラスミドにクローニングされる部位でアデノウイルスゲノムに挿入されて、組換えアデノウイルスベクターが得られる。相同組換えの後で、（ウイルスプラークの形成によって確認されるように）、このベクターゲノムはビリオン中に被包化される。複製欠損ベクターストックの調製は、ベクターから欠落したウイルスの遺伝子を相補性細胞株（例えば、欠損アデノウイルスE1ゲノム配列を含む293細胞またはA549細胞）を用いて達成できる。好適な相補性細胞株でプラークを増幅させた後、凍結融解によってウイルスを回収し、続いて塩化セシウム遠心沈殿を用いて精製することができる。或いは、ウイルス精製は、（例えば、国際出願PCT/US96/13872で説明されるように）クロマトグラフィー技術を用いて実施することができる。

複製欠損アデノウイルスベクターストックの力価は、相補性細胞株（例えば、293細胞）中のプラーク形成によって測定できる。例えば、アデノウイルス・ヘキソタンパク質に対する抗体を用いる終末点希釈を用いて、ウイルスの産生を定量してもよい（Armentano et al. (1995) Hum. Gene Ther. 6:1343-1353）。

【0141】

3) 非ウイルス性トランスフェクション

単独で又はウイルスベクターと組み合わせて、多数の非ウイルスベクターを細胞のトランスフェクションに用いて、MKP-1発現をブロックまたは抑制する構築物を発現することも有用である。好適な非ウイルス性ベクターには、プラスミド、コスミド、ファージミド(phagemid)、リポソーム、油-水乳濁液、ポリエチレンイミン、バイオリスティックペレット(biolistic pellet) / ビーズおよびデンドリマーが含まれるが、但しこれらに限定されない。

【0142】

リポソームは、細胞膜のモデルとして1965年に初めて報告され、物質を細胞にデリバリーするために直ちに応用された。リポソームは、それらをカチオン性リポソームまたはpH感受性リポソームに分類することになった、2つのメカニズムの1つによってDNAを取り込む。カチオン性リポソームは正に荷電したリポソームで、これは負に荷電したDNA分子と相互反応し、安定な複合体を形成する。カチオン性リポソームは、代表的には正荷電脂質および補助脂質から成る。一般的に用いられる補助脂質には、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)またはジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)が含まれる。補助脂質(ヘルパー脂質とも称される)は、殆どの場合、リポソーム複合体の安定化に必要である。様々な正荷電脂質製剤が市販されており、さらに他の多くの脂質製剤が開発されつつある。最も頻繁に挙げられる2つのカチオン性脂質はリポフェクタミンおよびリポフェクチンである。リポフェクチンは、Phil Felgner(1987)が遺伝子を培養細胞にデリバリーするために最初に報告した市販のカチオン性脂質である。リポフェクチンは、N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N-N-N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)およびDOPEの混合物である。

【0143】

DNAおよびリポフェクチンまたはリポフェクタミンは、自然に相互作用し、100%のローディング効率を有する複合体を形成する。換言すれば、十分な脂質が利用可能であることを前提にして、DNAの実質的に全てが脂質と複合体を

形成する。DNA分子の負の荷電がDOTMAの正の荷電基と相互作用すると推定される。このような複合体を形成するのに用いられる脂質：DNA比および全体的な脂質濃度は、効率的な遺伝子トランスファーに極めて重要であり、用途により変動する。

リポフェクチンは、直線状DNA、プラスミドDNA、およびRNAを様々な培養細胞にデリバリーするために用いられた。それが導入されてまもなく、リポフェクチンは遺伝子をin vivoでデリバリーするために用いることができることが示された。リポフェクチン-DNA複合体を静脈内投与した後、肺臓および肝臓の両方とも、これら複合体の取り込みおよびトランスジーン発現に対して顕著な親和性を示した。これら複合体の他の組織への注射は、様々な結果を示し、殆どの部分で、肺臓または肝臓へのリポフェクチン仲介遺伝子トランスファーよりも効率がはるかに低い。

【0144】

pH感受性（または負荷電リポソーム）は、DNAとの複合体を形成するよりもむしろDNAを取り込む。DNAも脂質も同じように荷電しているので、複合体形成よりもむしろ反発が生じる。それでもなお、いくらかのDNAは、首尾よくこれらリポソームの水性的内部に取り込まれる。幾つかの事例では、これらリポソームは低pHで不安定になり、従って、pH感受性と称される。今日まで、カチオン性リポソームは、in vivoでもin vitroでも遺伝子デリバリー効率がpH感受性リポソームよりもはるかに高かった。pH感受性リポソームは、それらのカチオン性対応物よりもはるかに高い効率でin vivoでDNAをデリバリーする潜在的能力を有し、さらに毒性および血清タンパク質との干渉を減少させながらそのようなデリバリーを実現させることができるはずである。

【0145】

また別のアプローチでは、DNAと dendrimer との複合体を用いて、細胞がトランスフェクトされた。そのような dendrimer には、“スターバースト” dendrimer および種々の dendrimer・ポリカチオンが含まれるが、但しこれらに限定されない。

dendrimer・ポリカチオンは、三次元の高度な秩序を有するオリゴマー化合

物および/またはポリマー化合物で、代表的には、コア分子またはイニシエーターと称される分子上でオリゴマーおよび/またはポリマーが付加され、正に荷電した外側表面を提供する反復反応の連続によって形成される。これらデンドリマーは以下に開示されるように製造できる：PCT/US83/02052、および米国特許4,507,466号、4,558,120号、4,568,737号、4,587,329号、4,631,337号、4,694,064号、4,713,975号、4,737,550号、4,871,779号、4,857,599号。

【0146】

代表的には、デンドリマー・ポリカチオンは、その上にポリマーが付加されたコア分子を含む。前記ポリマーは、正電荷を獲得することができる末端基を含むオリゴマーまたはポリマーであろう。好適なコア分子は、少なくとも2つの反応性残基を含み、これはコア分子がオリゴマーおよび/またはポリマーと結合するために利用できる。反応性残基の例は、とりわけ、ヒドロキシル、エステル、アミノ、イミノ、イミド、ハロゲン化物、カルボキシル、カルボキシハライドマレイミド、ジチオピリジル、およびスルフヒドリルである。好ましいコア分子は、とりわけ、アンモニア、トリス-(2-アミノエチル)アミン、リジン、オルニチン、ペンタエリトリールおよびエチレンジアミンである。これらの残基の組合せも、他の反応性残基と同様に好適である。

【0147】

本発明のデンドリマー・ポリカチオンの調製に適したオリゴマーおよびポリマーは、身体に好ましく受け入れられる、医薬として許容できるオリゴマーおよび/またはポリマーである。これらの例は、とりわけ、 α,ω -エチレン不飽和カルボン酸のアルキルエステルまたは α,ω -エチレン不飽和アミドと、アルキレンポリアミドまたはポリアルキレンポリアミンとの反応に由来するポリアミドアミンである。好ましいものは、メチルアクリレートおよびエチレンジアミンである。前記ポリマーは、好ましくはコア分子に共有結合している。

オリゴマーおよび/またはポリマーに結合させることができる末端基は、正の電荷を獲得できるべきである。これらの例は、アゾールおよび第一、第二、第三および第四脂肪族ならびに芳香族アミンおよびアゾール(これらはSまたはOで置換されてあってもよい)、グアニジニウム、およびそれらの組合せである。末

端カチオン基は、好ましくは共有結合でオリゴマーおよび/またはポリマーに結合されている。好ましい末端カチオン基は、アミンおよびグアニジニウムである。しかしながら、他のものもまた利用できる。末端カチオン基は、オリゴマーおよび/またはポリマーの全ての末端基の約10~100%の割合で、より好ましくは約50~100%の割合で存在することができる。

【0148】

デンドリマー・ポリカチオンは、前記カチオン基以外に0~90%の末端反応残基を含むこともできる。前記末端カチオン基以外の好適な末端反応残基は、とりわけ、ヒドロキシル、シアノ、カルボキシル、スルフヒドリル、アミドおよびチオエーテルおよびそれらの組合せである。しかしながら、他のものもまた利用できる。

デンドリマー・ポリカチオンは、一般におよび好ましくは、ポリヌクレオチドと非共有結合で結合する。これによって、いったん細胞にデリバリーされると容易に組成物の解離または脱アセンブリーが生じる。本発明での使用に適した代表的なデンドリマー・ポリカチオンは、約2000~1000000Daの範囲、より好ましくは約5000~500000Daの範囲の分子量を有する。しかしながら、他の分子量もまた好適である。好ましいデンドリマー・ポリカチオンは、約11~60、より好ましくは約15~55の流体力学半径を有する。しかしながら他のサイズもまた好適である。デンドリマーの製造および遺伝子治療でのその使用は当業者には周知で、さらに例えば、米国特許5,661,025号に記載されている。

【0149】

好適な場合には、2つ以上のベクターと一緒に用いられる。例えば、プラスミドベクターはリポソームと一緒に用いることができる。非ウイルスベクターの場合には、核酸は、当分野で知られている任意の好適な手段によって非ウイルス性ベクターに合体させることができる。プラスミドの場合、これは、代表的には構築物を好適な制限部位に連結することを含む。ベクター、例えば、リポソーム、水-油乳濁液、ポリエチレンアミンおよびデンドリマーの場合、これらベクターおよび構築物は、当分野で公知の好適な条件下で混合することによって結合さ

せることができる。

【0150】

V. キット

別の実施態様では、本発明は、本明細書に記載した1つ以上のアッセイを実施するための、または治療に利用するためのキットを提供する。アッセイキットは、好ましくは、MKP-1遺伝子を含む細胞、組織、または器官を入れた1つ以上の容器を含む。前記キットは、必要に応じて、MKP-1遺伝子産物の発現を検出する手段を含む。前記手段には、MKP-1タンパク質特異的抗体（標識または非標識）、および/またはMKP-1遺伝子もしくはcDNAもしくはmRNA特異的プローブ（標識または非標識）、および/またはMKP-1もしくはそのフラグメントの増幅に適した1つ以上のプライマーが含まれるが、但しこれらに限定されない。また必要に応じて含まれるものは、軽度または高度に酸化されたLDLおよび/またはその成分であり、前記は、例えば、本明細書に記載したような酸化リン脂質を含む。本キットは、場合によってアッセイの実施を促進するための装置および試薬を含む。そのような装置および試薬には、マイクロタイタープレート（例えば、高処理適用のためのもの）、緩衝液、標識、可視化試薬/検出試薬、自動化アッセイ実施用および/またはアッセイ結果入手用および/または分析用ソフトウェアなどが含まれるが、但しこれらに限定されない。

【0151】

治療用キットは、好ましくはMKP-1発現をブロックおよび/または抑制することができる薬剤を入れた1つ以上の容器を含む。これらの薬剤は、必要に応じて、アンチセンス構築物をコードする核酸、イントラボディをコードする核酸、触媒性RNAまたは触媒性DNAをコードする核酸、MKP-1ノックアウト構築物、MKP-1発現/活性をブロックまたはダウンレギュレート/抑制する小有機分子、抑制性脂質、疎水性または両親媒性分子などを含むが、但しこれらに限定されない。これらの薬剤は、医薬として許容できる賦形剤中でおよび単位投薬形で提供できる。

【0152】

さらに、前記キットは、場合によって標識用物質および/または本発明の方法

を実施するためまたは本発明の“治療薬”を使用するための指示を提供する（即ち、プロトコル）指示用物質を含む。好ましい指示物質は、アテローム性硬化症および/または慢性関節リウマチの1つ以上の症状の改善に使用できる潜在的能力を有する化合物としてMKP-1阻害物質をスクリーニングすることについて記載する。前記方法は、MKP-1抑制のための簡単なスクリーニングおよび/またはアッセイでの酸化LDLまたはその成分の使用を教示することができる。治療用/予防用キットでは、指示物質は、アテローム性硬化症、および/または付随する病変および/または慢性関節リウマチの1つ以上の症状を改善する治療または予防としてMKP-1の抑制を教示する。指示用物質は、必要に応じて、好ましい投与量/治療計画、副指示などを教示することもできる。

指示物質は代表的には手書きまたは印刷物質を含むが、それらは前記のようなものに限定されない。前記のような指示を保存し、さらに末端ユーザーにそれらを伝達することができる任意の媒体が本発明で意図される。そのような媒体には、電子式保存媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学媒体（例えば、CDROM）などが含まれるが、但しこれらに限定されない。そのような媒体は、そのような指示物質を提供するインターネットサイトのアドレスを含むことができる。

【0153】

（実施例）

以下の実施例は例示のために示すもので、請求の範囲に示される本発明を制限するものではない。

実施例1

MKP-1は軽度または高度に酸化されたLDLまたはその成分に反応してアップレギュレートされる

ヒト大動脈内皮細胞（HAEC）のコンフルエント培養物を種々の濃度（図1に示される）のOx-PAPCまたはPAPCで4時間処理した。処理の後、細胞を溶解し、全RNAを単離した。各条件からの全RNAの10μgをゲル電気泳動に付し、ニトロセルロース膜に移した。固定されたRNAを、ヒトGro-、IL-8、アネキシンII、MKP-1およびコントロール遺伝子（GAP

DH) に対する放射能標識した cDNA とハイブリダイズさせた。

【0154】

別の実験では、HAEC のコンフルエント培養物を Ox - PAPC (50 μ g / mL) または PAPC (50 μ g / mL) で処理した。(図 2 に表示したように) 種々の時点で、細胞を溶解し、全 RNA を単離した。各条件からの全 RNA の 10 μ g をゲル電気泳動に付し、ニトロセルロース膜に移した。固定された RNA を、ヒト IL - 8、アネキシン II および MKP - 1 に対する放射能標識した cDNA とハイブリダイズさせた。

ヒト MKP - 1 に対する “ アンチセンス ” または “ センス ” ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド (100 nM) のいずれかで、HAEC をトランスフェクトした。18 時間後、コントロールおよびトランスフェクト細胞を、未処理のままに放置するか、または Ox - PAPC (50 μ g / mL) でさらに 4 時間処理した。処理の後、細胞ライゼートを調製し、さらに MKP - 1 タンパク質発現についてウェスタンブロットで分析した。図 3 A および図 3 A 1 で示したように、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、Ox - PAPC 誘発 HAEC で MKP - 1 タンパク質の蓄積を防止した。

【0155】

ヒト大動脈内皮細胞に、ヒト MKP - 1 に対する “ アンチセンス ” または “ センス ” ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド (100 nM) のいずれかをトランスフェクトした。18 時間後、コントロールおよびトランスフェクト細胞を、未処理のままに放置するか、または Ox - PAPC (50 μ g / mL) でさらに 4 時間処理した。処理の後、細胞上清を採集し、単球粘着アッセイで分析した。図 4 に示したように、MKP - 1 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドで予備処理した Ox - PAPC 処理 HAEC の上清は、単球吸着を促進しなかった。

ヒト MKP - 1 に対する “ アンチセンス ” または “ センス ” ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド (100 nM) のいずれかで、ヒト大動脈内皮細胞をトランスフェクトした。18 時間後、コントロールおよびトランスフェクト細胞を、未処理のままに放置するか、または Ox - PAPC (50 μ g / mL) でさらに 4 時間処理した。処理の後、細胞上清を採集し、単球の走化性について分析した

。図5 A、図5 Bおよび図5 Cで示したように、MKP - 1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドで予備処理したOx - PAPC誘発HAECの上清は単球の走化性を促進しなかった。

本明細書に記載した実施例および実施態様は例示を目的とし、本発明を考慮した種々の改変または変更は本発明の範囲内に包含されることは理解されよう。本明細書に引用した全ての刊行物、特許、および特許出願は参照により本明細書中に参考として援用されている。

【図面の簡単な説明】

【図1】

培養ヒト大動脈内皮細胞で示された、酸化L - 1 - パルミトイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (PAPC) に反応した、Gro - 、IL - 8およびアネキシンIIと同様の、MKP - 1の用量依存性誘発を示す。

【図2】

時間の関数としての、ヒト大動脈内皮細胞での酸化PAPC (Ox - PAPC) によるMKP - 1の誘発を示す。

【図3】

図3 Aおよび図3 B (2つの別個の実験) はMKP - 1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが、ヒト大動脈内皮細胞でOx - PAPCに誘発されるMKP - 1タンパク質発現を妨げる (センスオリゴヌクレオチドは妨げない) ことをウェスタンブロットによって示している。

【図4】

MKP - 1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒト大動脈内皮細胞で単球付着のOx - PAPC誘発を妨げる (センスオリゴヌクレオチドは妨げない) ことをウェスタンブロットによって示している。

【図5】

図5 A、図5 Bおよび図5 C (3つの別個の実験) はMKP - 1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが、Ox - PAPCに暴露された培養ヒト大動脈内皮細胞による走化性活性単球の分泌を妨げる (センスオリゴヌクレオチドは妨げ

ない)ことを示している。

【配列表】

Sequence Listing

SEQ ID NO: 1 MKP-1 specific probe

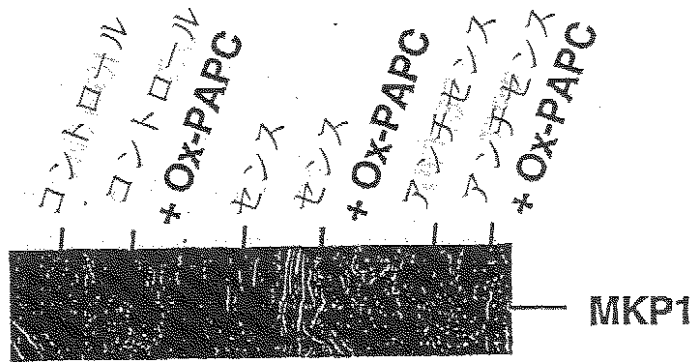
5 GAATGTGCTGAGTTCAGCAAATGTCTTGACGCTAAGTCATCACCATAACTGCTTAGAAACC
CAGAGGAACTCGGGTGAAGTTAAATAAATAAGGACCAGCCCTCTCGAGCCCTCCCAGAGT
TATTGCATTTCTCCTCTCAAGGAGCATGGAGTCCCAATGGGATGTGAAGAGCCTCACCTCC
CGTGGCCTTTCAGCAGCTGGGAGAGGTCGTAATGGGGCTCTGAAGGTAGCTCAGCGCAC TG
10 TTCGTGGAGTGGACAGGGATGGAGACGGGGAAGTTGAACACGGTGCTGGTGGAGGTGCT

SEQ ID NO: 2

5'-GGA ACT CAG TGG AAC TCA GG-3'

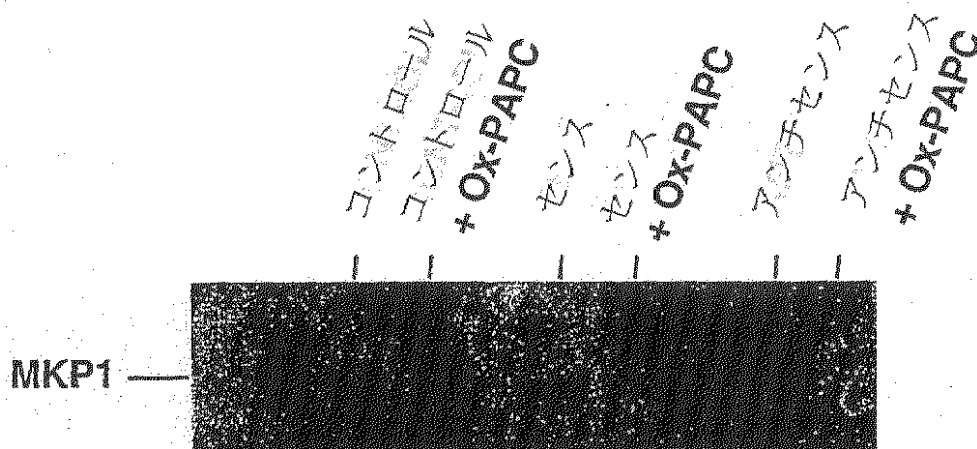
【図3A】

MKP-1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドはHAECでのMKP-1タンパク質のOx-PAPCに誘発される蓄積を防止する



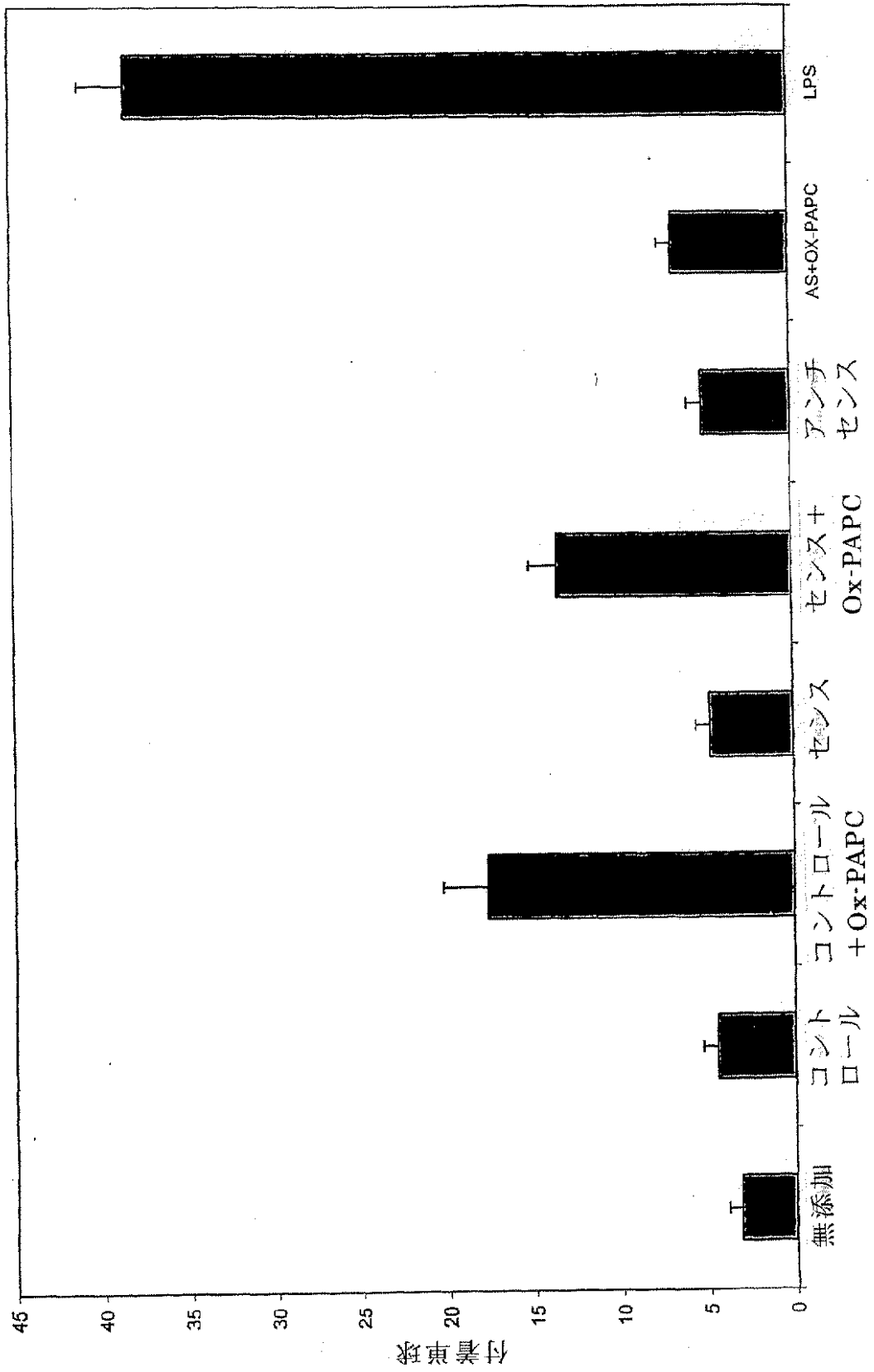
【図3B】

MKP-1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドはHAECでのMKP-1タンパク質のOx-PAPC誘発蓄積を防止する



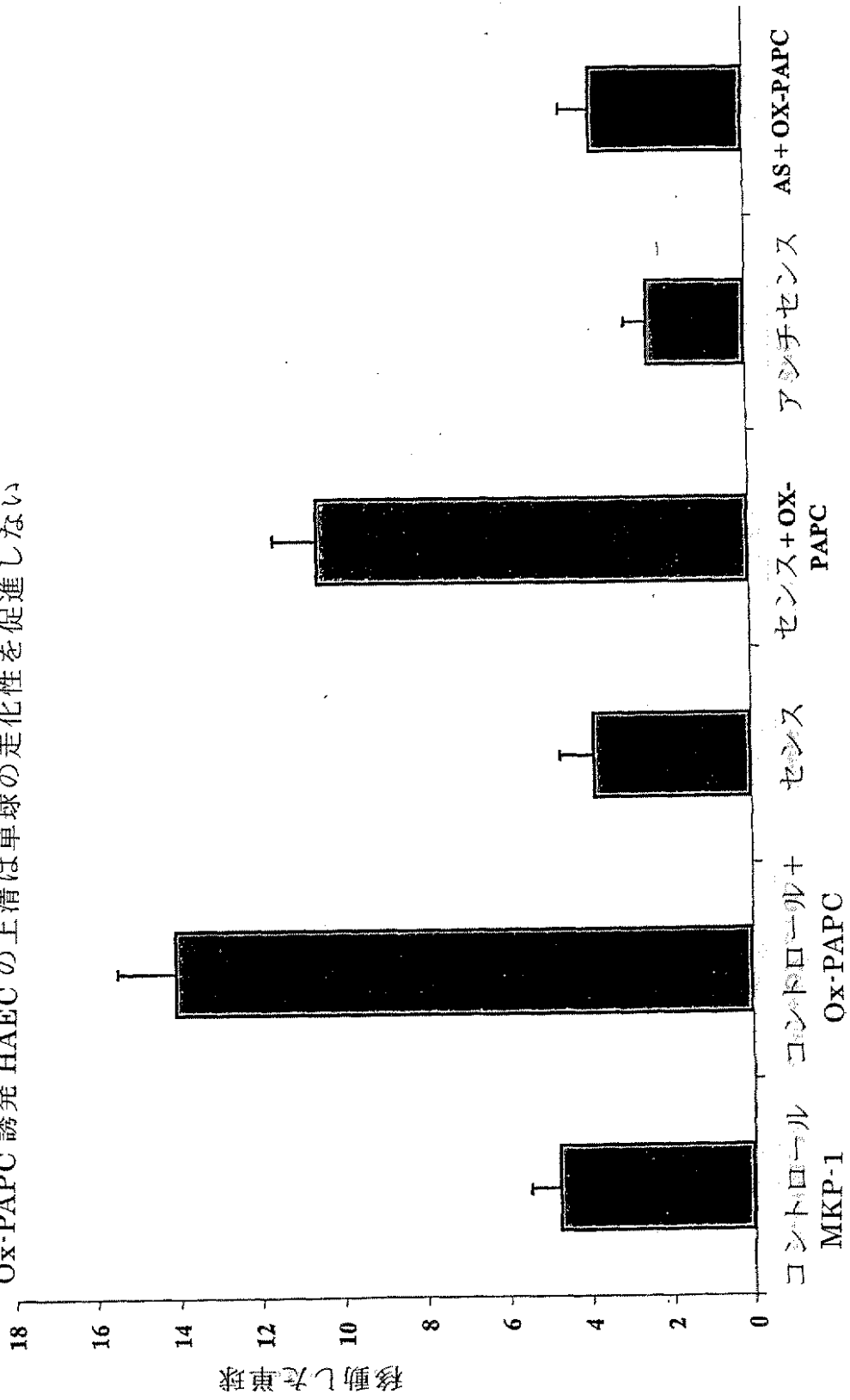
【図4】

MKP-1 付着アッセイ 1/20/100



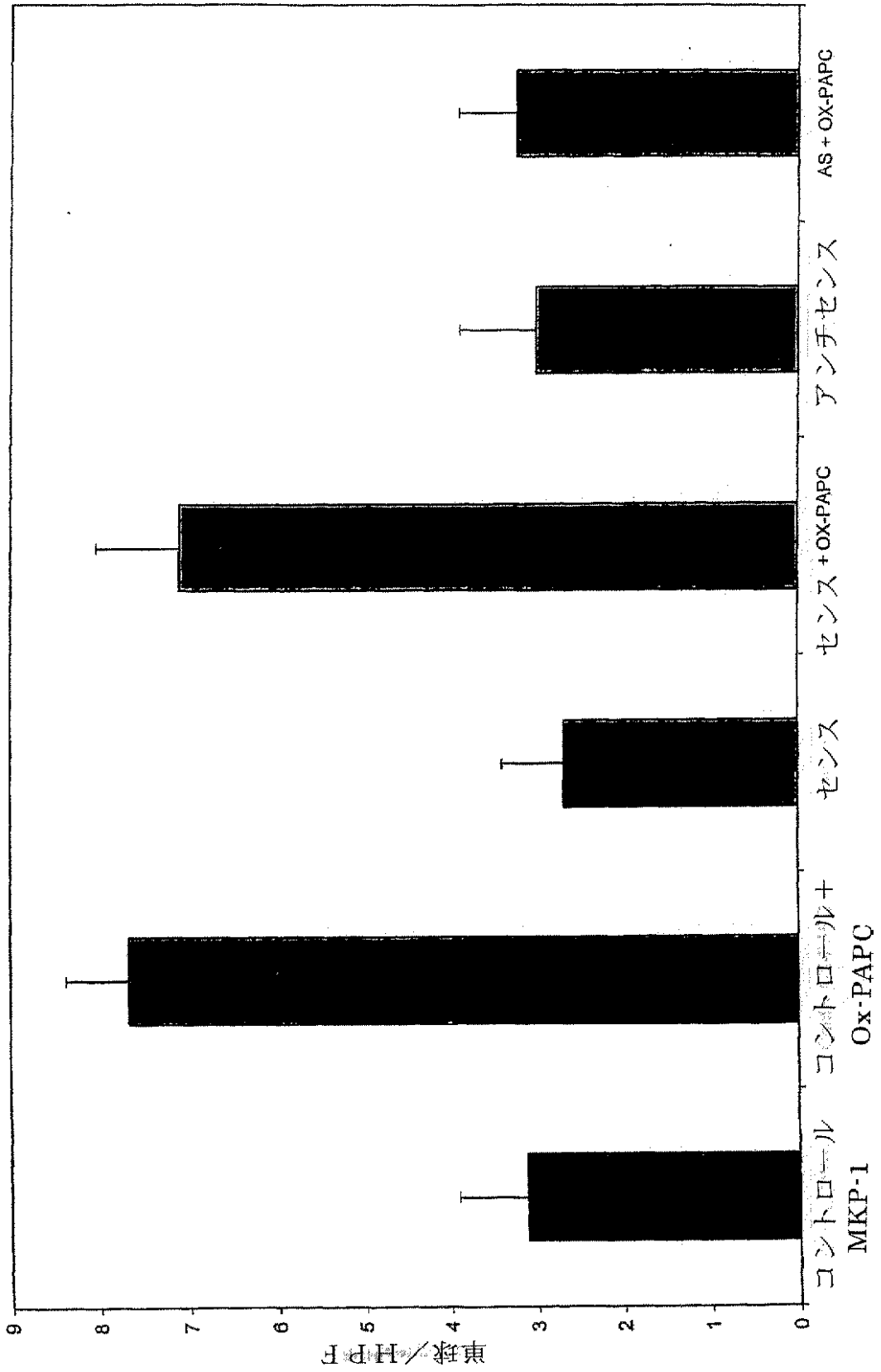
【図5A】

MKP-1 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドで予備処理した Ox-PAPC 誘発 HAEC の上清は単球の走化性を促進しない



【図5B】

MKP-1 走化性アッセイ 1/06/00



【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US01/10590 |
|---|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; G01N 33/53; C07H 21/02, 21/04; A61K 48/00 US CL : 435/6, 7.1; 514/44; 536/23.1, 24.3, 24.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 7.1; 514/44; 536/23.1, 24.3, 24.5 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS, DIALOG, MEDLINE | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | Database BIOSIS on STN. METZLER et al. "LDL stimulates mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression, independent of LDL receptors, in vascular smooth muscle cells". Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. August 1999, Vol. 19, No. 8, pages 1862-1871, abstract. | 1-56 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier document 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 *Z* document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 20 MAY 2001 | | Date of mailing of the international search report 18 JUN 2001 |
| Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230 | | Authorized officer <i>Joyce Baudgers for</i> MARY SCHMIDT Telephone No. (703) 308-0196 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マ-コ-ト' (参考) |
|--------------------------|-------|---------------|-----------------|
| A 6 1 K 48/00 | | A 6 1 P 9/10 | 1 0 1 4 C 0 8 6 |
| A 6 1 P 3/06 | | 19/02 | |
| 9/10 | 1 0 1 | 29/00 | 1 0 1 |
| 19/02 | | C 1 2 Q 1/02 | |
| 29/00 | 1 0 1 | 1/26 | |
| C 1 2 Q 1/02 | | 1/68 | A |
| 1/26 | | G 0 1 N 33/15 | Z |
| 1/68 | | 33/50 | Z |
| G 0 1 N 33/15 | | 33/53 | D |
| 33/50 | | | M |
| 33/53 | | 33/566 | |
| 33/566 | | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| | | A 6 1 K 37/48 | |

(81)指定国 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, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ナヴァブ、モハマド

アメリカ合衆国 90066 - 1735 カリフォルニア州 ロサンゼルス ローズウッド
アベニュー 3247

(72)発明者 ハマ、スーザン

アメリカ合衆国 90505 カリフォルニア州 トーランス グランド サミット
ロード 2639

(72)発明者 レディー、スリニヴァサ、ティー .

アメリカ合衆国 90703 カリフォルニア州 セリトス キャサンドラ アベニュー
18538

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CA20 CB01
DA12 DA13 DA14 DA36 FA36
FB02 FB03 FB05 FB07
4B024 AA01 AA11 BA07 CA04 DA02
EA04 GA11 HA14
4B063 QA18 QA19 QQ08 QQ21 QQ43
QQ53 QR32 QR55 QR62 QS31
4C084 AA02 AA13 AA17 BA44 DC01
MA01 NA14 ZA452 ZA962
ZB152 ZC332
4C085 AA13 CC32 EE01 GG01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16
MA01 MA04 NA14 ZA45 ZA96
ZB15 ZC33

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 控制人动脉壁细胞中氧化脂质诱导的基因 | | |
| 公开(公告)号 | JP2003529375A | 公开(公告)日 | 2003-10-07 |
| 申请号 | JP2001573040 | 申请日 | 2001-03-29 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 加利福尼亚大学董事会 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 加州大学董事会 | | |
| [标]发明人 | フオージェルマンアランエム ナヴァブモハマド ハマスーザン レディースリニヴァサティー | | |
| 发明人 | フオージェルマン、アラン、エム. ナヴァブ、モハマド ハマ、スーザン レディー、スリニヴァサ、ティー. | | |
| IPC分类号 | G01N27/62 A61K31/7088 A61K38/43 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/06 A61P9/10 A61P19/02 A61P29/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/26 C12Q1/42 C12Q1/68 G01N21/78 G01N30/88 G01N33/15 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/573 G01N33/58 G01N33/92 | | |
| CPC分类号 | A61K48/00 A61P19/02 A61P29/00 C07H21/02 C07H21/04 C12Q1/42 C12Q1/6883 G01N33/573 G01N33/92 G01N2500/10 G01N2800/044 | | |
| FI分类号 | A61K31/7088 A61K39/395.D A61K45/00 A61K48/00 A61P3/06 A61P9/10.101 A61P19/02 A61P29/00.101 C12Q1/02 C12Q1/26 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A A61K37/48 | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CA20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA07 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS31 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/DC01 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA452 4C084/ZA962 4C084/ZB152 4C084/ZC332 4C085/AA13 4C085/CC32 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA45 4C086/ZA96 4C086/ZB15 4C086/ZC33 | | |
| 优先权 | 09/539569 2000-03-31 US 09/541468 2000-03-31 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明提供了抑制动脉粥样硬化的一种或多种症状的新颖方法。还提供了抑制和/或改善一种或多种动脉粥样硬化症状进展的化合物的测定法。这些方法和测定部分地诱导了MAP激酶磷酸酶-1的有效上调，其中氧化的LDL或其组分导致动脉粥样硬化斑块形成的“炎症反应”特征。基于发现。MKP-1的抑制会抑制这种反应的一种或多种症状（例如单核细胞粘附，单核细胞趋化性，巨噬细胞分化等）。因此，抑制MKP-1提供了控制动脉粥样硬化症状的有效方法。

量依存性反応

