

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4610337号
(P4610337)

(45) 発行日 平成23年1月12日(2011.1.12)

(24) 登録日 平成22年10月22日(2010.10.22)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N 33/92	(2006.01)	GO 1 N 33/92	A
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	GO 1 N 33/92	Z
A 6 1 K 51/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 K 49/02	C
GO 1 N 27/62	(2006.01)	A 6 1 P 9/10	

請求項の数 18 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-536615 (P2004-536615)	(73) 特許権者	592130699
(86) (22) 出願日	平成15年9月15日(2003.9.15)		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
(65) 公表番号	特表2005-539226 (P2005-539226A)		The Regents of The University of Calif ornia
(43) 公表日	平成17年12月22日(2005.12.22)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 607 オークランド フランクリン ス トリート 1111 トゥエルフス フロ ア
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/029361		
(87) 国際公開番号	W02004/025270	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成16年3月25日(2004.3.25)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成18年9月12日(2006.9.12)	(74) 代理人	100096183
(31) 優先権主張番号	60/410, 352		弁理士 石井 貞次
(32) 優先日	平成14年9月13日(2002.9.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗アテローム発生の指標としての *in vivo* での逆コレステロール輸送速度の測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体系における逆コレステロール輸送の第1アームの速度を決定する方法であって、

1種以上のアイソトープ標識された高密度リポタンパク質(HDL)粒子、アイソトープ標識されたコレステロール分子、またはアイソトープ標識されたコレステロール前駆体を投与された生体系由来の血漿HDLから取得された、アイソトープ標識されたコレステロール分子のアイソトープ含量、アイソトープパターン、または、アイソトープ含量もしくはアイソトープパターンの変化の速度を測定すること、

内因性の未標識コレステロールによる、アイソトープ標識されたコレステロール分子の希釈の速度を算出して、生体系における逆コレステロール輸送の第1アームの速度を決定すること、

を含む、前記方法。

【請求項 2】

逆コレステロール輸送の第2アームの速度を決定する方法であって、

- a) 請求項 1 に従って、逆コレステロール輸送の第1アームの速度を決定すること；
b) 1種以上のアイソトープ標識された胆汁酸を投与された生体系より取得された、1種以上の胆汁酸のアイソトープ含量、アイソトープパターン、または、アイソトープ含量もしくはアイソトープパターンの変化の速度を測定すること、ここで、

i) アイソトープ標識された胆汁酸が、前記1種以上のアイソトープ標識された高密度リポタンパク質(HDL)粒子、アイソトープ標識されたコレステロール分子、もしくはアイソ

トープ標識されたコレステロール前駆体の標識化パターンとは異なる様式で投与されているか、または

ii) アイソトープ標識された胆汁酸のアイソトープ標識が、前記1種以上のアイソトープ標識された高密度リポタンパク質(HDL)粒子、アイソトープ標識されたコレステロール分子、もしくはアイソトープ標識されたコレステロール前駆体のアイソトープ標識とは異なり；

c) 血漿HDL中のコレステロールの胆汁酸への変換の分子流速を算出して、生体系における逆コレステロール輸送の第2アームの速度を決定すること、を含む、前記方法。

【請求項 3】

10

標識された胆汁酸が、コール酸、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、およびリソコール酸からなる群より選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

胆汁酸がコール酸である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

1種以上のアイソトープ標識された胆汁酸のアイソトープ標識が、 ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、または ^{18}O である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記アイソトープ標識が ^2H である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

20

1種以上のアイソトープ標識されたHDL粒子が生体系に投与されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

1種以上のアイソトープ標識されたHDL粒子をex vivoで形成させた、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

1種以上のアイソトープ標識されたHDL粒子が、血管内注入により投与されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

生体系がヒトである、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 11】

生体系がげっ歯類である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

アイソトープ標識されたコレステロール分子がコレステロールエステルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

血漿HDLが、血液サンプルから取得されたものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

コレステロール分子のアイソトープ含量、アイソトープパターン、または、アイソトープ含量もしくはアイソトープパターンの変化の速度を、質量分析法、NMR分光法、および液体シンチレーション計測法からなる群より選択される方法により決定する、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 15】

生体系においてアテローム性動脈硬化症に対する薬剤の効果を評価する方法であって、請求項 1 に記載の方法に従って、生体系における逆コレステロール輸送の第1アームの速度を決定すること；

請求項 1 に記載の方法に従って前記生体系における逆コレステロール輸送の第1アームの速度を決定すること、ここで、該生体系は前記薬剤を投与されたものであり、かつ前記薬剤の生体系への投与の前後での逆コレステロール輸送の第1アームの速度における差異が、アテローム性動脈硬化症に対する薬剤の効果を特定するものである、

50

を含む、前記方法。

【請求項 16】

前記薬剤が公知の医薬品である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記薬剤がデオキシリボヌクレオチド分子である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

生体系におけるアテローム性動脈硬化症に対する食事改変の効果を評価する方法であって、

請求項 1 に記載の方法に従って、生体系における逆コレステロール輸送の第1アームの速度を決定すること；

請求項 1 に記載の方法に従って前記生体系における逆コレステロール輸送の第1アームの速度を決定すること、ここで、該生体系は食事改変に供されたものであり、かつ前記食事改変の前後での逆コレステロール輸送の第1アームの速度における差異が、生体系におけるアテローム性動脈硬化症に対する効果を特定するものである、

を含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権主張

本願は、2002年9月13日に出願された60/410,352に対する優先権を主張するものであり、これは参照によりその全体が本明細書に組み入れられるものとする。

【0002】

発明の分野

本発明は、コレステロール代謝の分野に関する。特に、逆コレステロール輸送を定量的に測定するための方法を記載する。

【背景技術】

【0003】

アテローム性動脈硬化症、最も一般的な形態のアテローム性動脈硬化症は、大きいサイズおよび中規模のサイズの動脈(例えば、冠動脈、頸動脈、および下肢動脈)、ならびに大動脈および腸骨血管などの弾力性動脈の疾患である。アテローム、または脂質コアと線維性キャップからなる最内部の線維脂肪プラークは特有症候的である(Robbins Pathologic Basis of Disease 557(Cotranら(編)、第4版、1989))。心筋梗塞および脳梗塞に対する主要な危険因子であることに加えて、アテローム性動脈硬化症は、慢性下肢虚血および壊疽などの医学的症状、ならびに腸間膜閉塞の原因となる。近年、冠状心疾患に由来する死亡率が低下しているにも拘わらず、米国における全ての死亡例の約50%は依然としてアテローム性動脈硬化症によるものである(Scientific American Medicine §1(Rubensteinら(編)、1991))。

【0004】

疫学的、検死、および血管造影学的研究は、血清コレステロールレベルの上昇とアテローム性動脈硬化症の発生との間の因果関係を十分に確立してきた(Levineら、Cholesterol Reduction In Cardiovascular Disease, N Eng J Med 332(8):512-521(1995))。それらを危険であると同定する血漿コレステロールの単一のレベルはないが、一般的には、レベルが高くなればなるほど、危険性も高くなる。しかしながら、危険性は200 mg/dlを超えるコレステロールレベルになると有意に上昇する(Robbins Pathologic Basis of Disease、上掲、559頁)。総コレステロールのレベルは、典型的には、望ましいもの(<200 mg/dl)、境界線上のもの(200~239 mg/dl)、または高いもの(≥240 mg/dl)として分類される。低密度リポタンパク質(LDL)コレステロールの高い危険性レベルを有する患者およびアテローム性動脈硬化症の少なくとも2つのさらなる危険因子(たとえば、高血圧、糖尿病、喫煙など)を有する境界線上の危険性レベルを有する患者については、通常食事療法が推奨される。しかしながら、食事療法は、コレステロールおよび飽和脂肪が平均より高い食事

10

20

30

40

50

を摂取する患者においてのみ有効であり(Adult Treatment Panel II, National Cholesterol Education Program: Second Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, *Circulation* 89:1333-1445(1994))、高コレステロール血症に対する遺伝的素因を有する患者においては無効であることが見出されている。持続的に高いコレステロールレベルの場合には、薬物療法を処方することができる。

【0005】

高コレステロール血症の治療のための現在市販されている薬剤は、de novoでコレステロール合成を阻害し、および/またはLDL受容体によるLDLコレステロールのクリアランスを刺激し(例えば、ロバスタチン)、超低密度リポタンパク質(VLDL)の産生を減少させ(例えば、ゲムフィプロジル)、もしくは小腸における胆汁酸再吸収を阻害する(例えば、コレステラミン)ことによるなどの方法により働く。しかしながら、コレステロール代謝の試験はまた、逆コレステロール輸送のプロセスにより、コレステロールを組織から除去し、体外に排出する経路が可能になることを示している。現在では、生きている生物中で組織から排出までの逆コレステロール輸送経路を通るコレステロールの流速を測定する方法は知られていない。

【0006】

逆コレステロール輸送(RCT)は、コレステロールが体の末梢組織から肝臓へ流通および輸送される生物学的経路である。図1に示されるように、2つのアームの経路が存在し、肝臓外組織からのコレステロールの流出(高密度リポタンパク質(HDL)アームまたはRCTの第1アーム)および血流から肝臓へのコレステロールの輸送(HDL後のアームまたはRCTの第2アーム)により表される。結局、コレステロールは胆汁中に排出された後、最終的には体内から排出される。RCTは、コレステロールを組織から除去することができる唯一の既知の生物学的経路または活性な機構である。上述したように、アテローム性動脈硬化症におけるよく確立された役割のため、RCTは抗アテローム発生プロセスの鍵となると考えられ、一般的には、抗アテローム発生特性および血漿の高密度リポタンパク質(HDL)画分の心血管の危険性の低下との臨床的な相関に対する説明であると考えられる。

【0007】

しかしながら、HDLレベルは、現在ではRCTの分子経路の1成分のみを反映し(図1)、RCT経路を通過するコレステロールの真の流れを必ずしも反映するわけではないと認識されている。RCT経路は、肝臓外組織から血漿へのHDLによるコレステロールの輸送、次いでレシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)の作用を介するIDL(中密度リポタンパク質)への送達、次いで最終的にはLDL(低密度リポタンパク質)への送達を含む。その後、LDLのうちいくらかは、肝臓により取り込まれ、胆汁酸として小腸に排出される(Ganong W.F., *Review of Medical Physiology* 284-288(第15版, 1991))。RCTの他の経路も考えられたが、上記の順序が現在では最も優勢であると考えられる。

【0008】

RCT経路の分子的な詳細は、過去数年間、関心を増してきた。分子的な理解におけるこれらの最近の進歩の1つの重要な含意は、単離における血漿HDLc(HDL-コレステロール)レベルは、HDLcの変化を担う機構に依存して、経路を通過する真の流れを反映してもしなくてもよいという認識である。例えば、個体におけるHDLcの血漿濃度がABC(A)-1(ATP結合カセット輸送因子)を介する組織から、ABC(A)-1ヘテロ接合体として血漿アポAI-含有粒子への流れを表すならば、HDLcは有用なマーカーである。しかしながら、別の個体中のHDLcが、HDLcの、その受容体への送達の阻害(例えば、コレステロールエステル輸送タンパク質活性の低下、肝臓SRBI(スカベンジャー受容体BI)活性の低下に起因する)が原因で蓄積するとすれば、HDLcレベルはRCTを反映しないであろう。スタチンなどのapoB含有粒子の産生および運命を変化させる介入のRCTに対する影響を考慮する場合、状況は特に複雑となり得る。apoB粒子はコレステロールを前方(すなわち、組織へ)ならびに逆(すなわち、肝臓へ戻る)に運搬することができるため、個体におけるapoB粒子の実際の運命は、いかなる血漿HDLレベルにおいてもRCTの効率に寄与し得る。それにより、HDLc濃度とRCTとの分

10

20

30

40

50

離の可能性は、有効なスタチン療法の設定(またはVLDLおよびLDL粒子が肝臓に戻るのを促進する任意の他の介入)において上昇する。

【0009】

RCTなどの生化学的プロセスの速度を測定することは、生化学的分子の濃度を測定することより難しい。前者は反応速度論的方法を必要とするが、後者は静的測定を含む。全ての速度は、分母に時間を含むため(例えば、移動の物理的速度についてマイル/時間と同様に、生化学的速度についてはmg/分)、反応速度論的測定は時間の次元を含む必要がある(すなわち、時間的手順を実行する必要がある)。典型的には、生化学的反應速度論については、目的の分子またはそれに対する前駆体を標識し、標識分子から種々の経路への標識の流れを、時間に対して測定する。

10

【0010】

理論的には、組織コレステロールを標識して、末梢細胞からのその流出を追跡することができるが、実際には、投与される標識材料がコレステロール自身であるか、またはその生合成前駆体(例えば、 ^{14}C -アセテート、 $^3\text{H}_2\text{O}$ 、もしくは $^2\text{H}_2\text{O}$)であるか、肝臓および血液コレステロールを同時に標識することなく非肝臓コレステロールを標識することは本質的には不可能である。これは、いくつかの理由についての場合である：1)肝臓コレステロール合成が非常に活発であり、体内のコレステロールのための標準的な標識生合成前駆体が、肝臓中のコレステロールを不可避免的に標識する；2)末梢(非肝臓)組織を排他的に標識化する標識基質は知られていない；3)末梢組織中のコレステロールプールは非常に大きく、向きを変えるのが遅いため、十分な標識化を達成するのに長時間(週または月)かかる；ならびに4)コレステロールは肝臓、血液および組織間で迅速に交換するため、標識されたコレステロールの起源を識別し、輸送の直接的な速度を推測するのがすぐに不可能になる。

20

【0011】

これらの理由全てのために、逆コレステロール輸送の速度を測定するためのin vivoにおける方法が必要であり、医学的治療ならびに薬剤の発見および開発にとって非常に有用であろう。

【発明の開示】

【0012】

発明の概要

これらの要件を満たすために、本発明は逆コレステロール輸送の速度を決定する方法を提供する。一態様において、逆コレステロール輸送の第1アームを生体系において決定することができる。1種以上のアイソトープ標識された高密度リポタンパク質(HDL)粒子、アイソトープ標識されたコレステロール分子、またはアイソトープ標識されたコレステロール前駆体を、標識が血漿HDL中に組み込まれるのに十分な時間、生体系に投与する。1種以上のアイソトープ標識されたコレステロール分子を、血漿HDLから取得する。次いで、アイソトープの含量、アイソトープパターン、アイソトープ含量の変化の速度、またはコレステロール分子のアイソトープパターンを測定する。次いで、内因性の未標識コレステロールによる単離された標識コレステロール分子の希釈の速度を算出して、生体系における逆コレステロール輸送の第1アームの速度を決定する。

30

【0013】

別の態様においては、逆コレステロール輸送の第2アームの速度を決定することができる。第1に、逆コレステロール輸送の第1アームの速度を、上記のように決定する。1種以上のアイソトープ標識された胆汁酸を、アイソトープ標識されたHDL粒子、アイソトープ標識されたコレステロール、またはアイソトープ標識されたコレステロール前駆体分子の標識における様式とは異なる様式で、生体系に投与する。あるいは、アイソトープ標識された胆汁酸を、アイソトープ標識されたHDL粒子、アイソトープ標識されたコレステロール、またはアイソトープ標識されたコレステロール前駆体分子とは異なるアイソトープを用いて標識する。1種以上のアイソトープ標識された胆汁酸を、生体系から取得する。胆汁酸のアイソトープ含量、アイソトープパターン、アイソトープ含量またはアイソトープパターンの変化の速度を測定する。血漿HDL-コレステロールを胆汁酸に変換する分子流速

40

50

を算出して、生体系における逆コレステロール輸送の第2アームの速度を決定する。

【0014】

標識にとって好適な胆汁酸としては、限定されるものではないが、コール酸、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、およびリソコール酸が挙げられる。好ましくは、胆汁酸はコール酸である。

【0015】

分子、例えば、コレステロール、胆汁酸などをアイソトープ標識するための技術は、当業界で公知である。標識に用いることができるアイソトープとしては、限定されるものではないが、 ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、または ^{18}O が挙げられる。標識にとって好ましいコレステロール分子は、コレステロールエステルである。

10

【0016】

別の変法では、*ex vivo*で再構成する代わりに、HDL粒子を、アイソトープ標識されたコレステロールまたはアイソトープ標識されたコレステロール前駆体を被験体に投与した後、血漿から標識HDLを単離および精製し、異なる被験体または同じ被験体に再導入することにより、*in vivo*で形成させることができる。

【0017】

さらに、本発明の方法を適用して、アテローム性動脈硬化症に対する危険性に対する薬剤の効果を評価することができる。一般的には、この方法は、薬剤を被験体に投与し、薬剤の投与の前後の被験体における逆コレステロール輸送の速度を比較するか、または薬剤を投与されなかった適合させた被験体と比較し、薬剤の投与の前後の逆コレステロール輸送の速度における差異を算出することを含む。この薬剤は、アテローム性動脈硬化症に影響する公知の医薬品または公知のデオキシリボ核酸分子であってよい。

20

【0018】

別の変法においては、アテローム性動脈硬化症に対する危険性に対する食事改変の効果を、食事改変の前後の被験体における逆コレステロール輸送の速度を比較し、食事改変の前後の逆コレステロール輸送の速度における差異を算出することにより評価する。

【0019】

さらに別の変法においては、逆コレステロール輸送の速度を決定するためのキットを提供する。このキットは、標識HDL粒子、標識コレステロール、標識胆汁酸、またはその組み合わせ、ならびにキットの使用のための説明書を含んでもよい。このキットは、必要に応じて、標識HDL粒子、標識コレステロール前駆体、または標識胆汁酸の被験体への投与のための道具および被験体からサンプルを回収するための器具も含んでもよい。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

発明の詳細な説明

本発明は、アイソトープ標識されたコレステロールおよび胆汁酸を用いて*in vivo*で逆コレステロール輸送を定量的に測定するための生化学的試験を提供する。

【0021】

一般的技術

本発明の実施は、一般的には、特に指摘しない限り、当業者の技術の範囲内にある、分子生物学、微生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学の従来技術を用いる。そのような技術は、例えば、Cell Biology: A Laboratory Notebook(J.E. Cellis(編)、1998); Current Protocols in Molecular Biology(F.M. Ausubelら(編)、1987); Short Protocols in Molecular Biology(WileyおよびSons、1999); Mass Isotopomer Distribution Analysis: A Technique for Measuring Biosynthesis and Turnover of Polymers(Hellersteinら、Am J Physiol 263(Endocrinol Metab 26):E988-E1001(1992)); ならびにMass Isotopomer Distribution Analysis at Eight Years: Theoretical, Analytic, and Experimental Considerations (Hellersteinら、Am J Physiol 276(Endocrinol Metab 39): E1146-1170(1999))などの文献で完全に説明されている。さらに、典型的には、市販のアッセイキットおよび試薬を用いる手順を、特に指摘しない限りは製造業者の規定のプロトコルに従

40

50

って用いる。

【0022】

定義

本明細書において、「生体系」とは、細胞、細胞系、組織、器官、および生物を含む任意の生きている存在を意味する。生物の例としては、任意の動物が挙げられるが、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトである。哺乳動物の例としては、非ヒト霊長類、家畜、愛玩動物、例えば、ネコおよびイヌ、ならびに研究用動物、例えば、マウス、ラット、ならびにヒトが挙げられる。

【0023】

「アイソトープ標識された基質」は、生体系において目的の分子中に組み込まれ得る任意のアイソトープ標識された前駆体分子を含む。アイソトープ標識された基質の例としては、限定されるものではないが、 $^2\text{H}_2\text{O}$ 、 $^3\text{H}_2\text{O}$ 、 ^2H -グルコース、 ^2H -標識アミノ酸、 ^2H -標識有機分子、 ^{13}C -標識有機分子、 ^{14}C -標識有機分子、 $^{13}\text{CO}_2$ 、 $^{14}\text{CO}_2$ 、 ^{15}N -標識有機分子および $^{15}\text{NH}_3$ が挙げられる。

10

【0024】

「アイソトポログ(isotopologue)」は、アイソトープ相同体または同一の元素および化学組成を有するが、アイソトープ含量が異なる分子種(例えば、上記の例では CH_3NH_2 と CH_3NHD)を指す。アイソトポログは、そのアイソトープ組成により定義され、従って、各アイソトポログはユニークで正確な質量を有するが、ユニークな構造は有さない場合がある。アイソトポログは通常、分子上のアイソトープの位置が異なるアイソトープ異性体(アイソトポマー)のファミリーからなる(例えば、 CH_3NHD と CH_2DNH_2 は同じアイソトポログであるが、異なるアイソトポマーである)。

20

【0025】

「アイソトープ含量」は、天然の(すなわち、アイソトープ標識された前駆体分子の投与または接触前の)分子または分子集団における含量と比較した、分子または分子集団中のアイソトープの含量を指す。用語「アイソトープ富化」は、本明細書においてはアイソトープ含量と互換的に用いられる。

【0026】

「アイソトープパターン」は、分子または分子集団内のアイソトープ標識の内部関係、例えば、異なるアイソトープ含量を有する分子種の相対的な割合、分子構造内の異なる化学座中にアイソトープ標識を有する分子の相対的割合、分子中のアイソトープの絶対含量よりもむしろ内部パターンの他の態様を指す。

30

【0027】

「正確な質量」は、分子式中の全てのアイソトープの正確な質量を総和することにより算出される質量を指す(例えば、 CH_3NHD については、32.04847)。

【0028】

「名目質量」は、分子の正確な質量を四捨五入することにより得られる整数の質量を指す。

【0029】

「質量アイソトポマー」は、アイソトープ組成よりもむしろ名目質量に基づいてグループ化されるアイソトープ異性体のファミリーを指す。質量アイソトポマーは、アイソトポログと違って、異なるアイソトープ組成の分子を含んでもよい(例えば、 CH_3NHD 、 $^{13}\text{CH}_3\text{NH}_2$ 、 $\text{CH}_3^{15}\text{NH}_2$ は、同じ質量アイソトポマーの一部であるが、異なるアイソトポログである)。操作上の用語では、質量アイソトポマーは、質量分析器により解像されないアイソトポログのファミリーである。四極子質量分析器については、これは典型的には、質量アイソトポマーが名目質量を共有するアイソトポログのファミリーであることを意味する。かくして、アイソトポログ CH_3NH_2 と CH_3NHD は名目質量において異なり、異なる質量アイソトポマーであるとして区別されるが、アイソトポログ CH_3NHD 、 CH_2DNH_2 、 $^{13}\text{CH}_3\text{NH}_2$ 、および $\text{CH}_3^{15}\text{NH}_2$ は全て同じ名目質量であり、従って、同じ質量アイソトポマーである。従って、各質量アイソトポマーは典型的には、2種以上のアイソトポログからなり、2種以上の正確な

40

50

質量を有する。アイソトポログと質量アイソトポマーの区別は、全ての個々のアイソトポログは四極子質量分析器を用いて解像されず、より高い質量解像度をもたらす質量分析器を用いても解像することができず、質量スペクトルデータからの算出はアイソトポログよりもむしろ質量アイソトポマーの量について実施する必要があるため、実用上有用である。質量が最も小さい質量アイソトポマーを M_0 と表す；ほとんどの有機分子については、これは全て ^{12}C 、 ^1H 、 ^{16}O 、 ^{14}N などを含む種である。他の質量アイソトポマーは、 M_0 とのこれらの質量の差異により区別される(M_1 、 M_2 など)。所与の質量アイソトポマーについては、分子内のアイソトープの位置が特定されず、それは変化してもよい(すなわち、「位置的アイソトポマー」は区別されない)。

【0030】

「質量アイソトポマーエンベロープ」は、モニターされる各分子またはイオン断片と結合したファミリーを含む質量アイソトポマーのセットを指す。

【0031】

「質量アイソトポマーパターン」は、分子の質量アイソトポマーの量のヒストグラムを指す。伝統的には、このパターンは、全ての量を、最も豊富な質量アイソトポマーの量に対して正規化した場合の相対量(%)として表される；最も豊富なアイソトポマーを100%と言う。しかしながら、質量アイソトポマー分布分析(MIDA)などの確率分析を含む用途のための好ましい形態は、それぞれの種が総量に寄与する画分を用いる場合には、割合または画分量である。用語「アイソトープパターン」を、用語「質量アイソトポマーパターン」と同義的に用いることができる。

【0032】

「モノアイソトープ質量」は、 ^1H 、 ^{12}C 、 ^{14}N 、 ^{16}O 、 ^{32}S などを全て含む分子種の正確な質量を指す。C、H、N、O、P、S、F、Cl、Br、およびIからなるアイソトポログについては、最も小さい質量を有するアイソトポログのアイソトープ組成は、これらの元素の最も豊富なアイソトープも質量が最も小さいため、ユニークであり、明白である。モノアイソトープ質量は m_0 と省略され、他の質量アイソトポマーの質量は m_0 とこれらの質量の差異により同定される(m_1 、 m_2 など)。

【0033】

「アイソトープ的に摂動した」とは、天然に量の少ないアイソトープが過剰に(富化)または不足して(枯渇)存在するかどうか、天然において最も一般的に見出される分布とは異なるアイソトープの分布を有する元素または分子の明確な組込みから得られる元素または分子の状態を指す。

【0034】

「前駆体分子」は、特定の分子の重合合成中に用いられる代謝前駆体を指す。前駆体分子の例としては、アセチルCoA、リボ核酸、デオキシリボ核酸、アミノ酸、グルコース、およびグリシンが挙げられる。

【0035】

本明細書で用いる「標識された水」は、アイソトープを含む水を指す。標識された水の例としては、 $^2\text{H}_2\text{O}$ 、 $^3\text{H}_2\text{O}$ 、および H_2^{18}O が挙げられる。本明細書で用いる、用語「アイソトープ標識された水」は「標識された水」と互換的に用いられる。

【0036】

「分子流速」は、細胞、組織、もしくは生物内の分子の合成および/または分解の速度を指す。「分子流速」はまた、分子のプールへの分子の入力または分子のプールからの分子の除去を指し、従って、前記分子プールに出入りする流れと同義である。

【0037】

「薬剤」、「医薬品」および「薬理学的薬剤」は互換的に用いられ、使用されているか、もしくは使用について認可されているか、またはヒトもしくは動物において治療剤としての使用について試験もしくは考慮されている、生物学的プロセスに対して有用または有用である可能性を有する治療作用を有する化学的存在または生物学的薬剤(例えば、遺伝子配列、ポリもしくはモノクローナル抗体、サイトカイン、ホルモンなど)を指す。薬剤

10

20

30

40

50

としては、限定されるものではないが、例えば、The Merck Indexの第13版(米国の刊行物、Whitehouse Station, N.J., USA)に開示された任意の化合物または組成物が挙げられ、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられるものとする。「公知の薬剤」は、米国においてヒトにおける薬剤としての治療的使用について認可されている薬剤または化学的存在を指す。

【0038】

「目的の分子」は、限定されるものではないが、コレステロール、コレステロール誘導体、胆汁酸、胆汁酸誘導体、アミノ酸、炭水化物、脂肪酸、ペプチド、糖、脂質、核酸、ポリヌクレオチド、グリコサミノグリカン、ポリペプチド、または生体系内の代謝経路内に存在するタンパク質などの任意の分子を意味する。

10

【0039】

「個体」は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。用語「被験体」は、本明細書においては「個体」と互換的に用いられる。

【0040】

「生物学的分子」は、組織または個体中で合成される任意の分子を指す。生物学的分子は、限定されるものではないが、総細胞タンパク質のセット、ゲノムDNA、ミトコンドリアDNA、メッセンジャーRNA、またはリボソームRNAなどの分子クラスを指してもよい。あるいは、生物学的分子は、特定のタンパク質(例えば、アポリポタンパク質)もしくは特定のポリヌクレオチド配列(例えば、アポリポタンパク質をコードするポリヌクレオチド)などの、特定の構造的特徴または配列を有する特定の分子であってもよい。

20

【0041】

本明細書で用いる、「危険性のある」個体は、疾患状態または生理状態に発展する可能性が、危険性のない個体よりも高いと考えられる個体である。「危険性のある」個体は、疾患もしくは生理状態を示唆する検出可能な症候を有しても有さなくてもよく、また本明細書に開示される治療方法(例えば、治療的介入)の前に検出可能な疾患を示していてもいなくてもよい。「危険性のある」とは、個体が1つ以上のいわゆる危険因子を有するということである。1つ以上のこれらの危険因子を有する個体は、これらの危険因子を有さない個体よりも、1種以上の疾患または生理状態に発展する可能性が高い。これらの危険因子としては、限定されるものではないが、1種以上の疾患、関連する症状、もしくは病理に発展する家族員の履歴、以前の疾患の病歴、年齢、性別、人種、食事、前兆となる疾患の存在、遺伝子的(すなわち、遺伝的)考慮、および環境への曝露などが挙げられる。

30

【0042】

「精製する」とは、他の類似化合物の混合物のうちの1種以上の成分を取り出す方法を指す。例えば、「タンパク質またはペプチドを精製する」とは、タンパク質またはペプチドの混合物中の1種以上のタンパク質またはペプチドから、タンパク質またはペプチドを取り出すことを指す。

【0043】

「単離する」とは、化合物の混合物から、ある化合物を分離することを指す。例えば、「タンパク質またはペプチドを単離する」とは、1種以上のタンパク質またはペプチドの混合物中の他のタンパク質またはペプチド全てから、1種の特定のタンパク質またはペプチドを分離することを指す。

40

【0044】

「生物学的サンプル」は、組織または個体から得られる任意のサンプルを包含する。この定義は、最小的に侵襲的または非侵襲的な手法(例えば、尿採集、血液吸引、針による吸引、および最小の危険性、不快性もしくは努力を含む他の手順)によるサンプリングを介して個体からアクセス可能である、血液および生物起源の他の液体サンプルを包含する。生物学的サンプルは、試薬による処理、可溶化、またはタンパク質もしくはポリヌクレオチドなどの特定成分の富化など、その入手後に任意の方法で操作されたサンプルを含む。用語「生物学的サンプル」はまた、血清、血漿、他の生物流体、または組織サンプルなどの臨床サンプルも包含し、また培養物、細胞上清および細胞溶解物中の細胞も含む。

50

【0045】

「生物流体」としては、限定されるものではないが、尿、血液、間質液、浮腫液、唾液、涙、炎症滲出液、滑液、膿瘍、蓄膿もしくは他の感染した液体、脳脊髄液、汗、肺分泌物(痰)、精液、糞便、胆汁、間質分泌物、または他の生物流体が挙げられる。

【0046】

逆コレステロール輸送の測定方法

本発明は、標識されたコレステロールの流れの代わりに、組織から血流および/または血漿HDLから胆汁酸への非標識コレステロールの流れを測定することにより、in vivoで逆コレステロール輸送(RCT)を決定するための方法を提供する。

【0047】

一態様において、本発明は、1種以上のアイソトープ標識された高密度リポタンパク質(HDL)粒子、アイソトープ標識されたコレステロール分子、またはアイソトープ標識されたコレステロール前駆体を、生体系に投与することにより逆コレステロール輸送の第1アームの速度を決定することに向けられる。第2の態様において、本発明は、RCTの第1アームの速度を決定し、1種以上のアイソトープ標識された胆汁酸を投与して、血漿コレステロールの胆汁酸への変換(RCTの第2アーム)の分子流速を決定することにより、逆コレステロール輸送の第2アームの速度を決定することに向けられる。一般的には、この方法を、哺乳動物の被験体、好ましくはヒトにおいて実行する。哺乳動物としては、限定されるものではないが、霊長類、家畜、狩猟用動物、ネコおよびイヌなどの愛玩動物、モルモット、ウサギ、マウス、ならびにラットが挙げられる。

【0048】

1. 生体系における逆コレステロール輸送の第1アームの速度の決定

一態様においては、逆コレステロール輸送の第1アームの速度を、生体系において決定することができる。1種以上のアイソトープ標識された高密度リポタンパク質(HDL)粒子、アイソトープ標識されたコレステロール分子、またはアイソトープ標識されたコレステロール前駆体を、標識が血漿HDL中に組み込まれるのに十分な時間、生体系に投与する。1種以上のアイソトープ標識されたコレステロール分子を、血漿HDLから取得する。次いで、コレステロール分子のアイソトープ含量、アイソトープパターン、アイソトープ含量またはアイソトープパターンの変化の速度を測定する。次いで、内因性の非標識コレステロールによる、単離された標識コレステロール分子の希釈速度を算出して、生体系における逆コレステロール輸送の第1アームの速度を決定する。

【0049】

A. アイソトープ標識された高密度リポタンパク質(HDL)粒子、アイソトープ標識されたコレステロール分子、またはアイソトープ標識されたコレステロール前駆体の投与

アイソトープ標識された高密度リポタンパク質(HDL)粒子、アイソトープ標識されたコレステロール分子、またはアイソトープ標識されたコレステロール前駆体を、限定されるものではないが、経口、非経口、皮下、静脈、および腹腔内投与などの種々の方法により、生体系に投与することができる。

【0050】

典型的には、アイソトープ標識されたHDL粒子を、例えば、アポリポタンパク質AIと、卵ホスファチジルコリン、遊離²H₆-コレステロール、およびコール酸とを1:80:8:80の比でインキュベートすることにより、ex vivo(被験体の外で)で形成させる。他の好適な範囲を、過度に実験することなく、当業者には公知の手順を用いる試行錯誤により決定することができる。好ましい実施形態においては、次いで、血漿画分またはレシチン-コレステロール-アシル-トランスフェラーゼ活性を含む精製酵素ならびにホスファチジルコリンを運搬するための血清アルブミンを加えた後、それぞれ、サイズ排除クロマトグラフィーおよび透析などの技術により、該酵素およびコール酸を除去する。一般的には、再構成されたHDL粒子を、混合により形成することができる。ex vivoでコレステロール-標識HDL粒子を形成する他の方法は、公知であるか、または当業者により容易に決定することができる。

【0051】

アイソトープ標識されたコレステロールまたはアイソトープ標識されたコレステロールの前駆体を被験体に投与した後、血漿から標識HDLを取得することにより、HDL粒子をin vivoで標識することができる。アイソトープを用いるコレステロールおよびコレステロール前駆体の標識化は、当業界で公知の方法により実行することができる。in vitroまたはin vivoでコレステロールを標識するのに用いることができるアイソトープとしては、限定されるものではないが、 ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、または ^{18}O が挙げられる。標識化にとって好適なコレステロール分子としては、遊離コレステロール、コレステロールエーテル、およびコレステロールエステルが挙げられる。好ましい変法においては、コレステロールエステルを標識する。

10

【0052】

アイソトープ標識された高密度リポタンパク質(HDL)粒子、アイソトープ標識されたコレステロール分子、またはアイソトープ標識されたコレステロール前駆体を、連続的または反復的に投与することができる。投与は様々な方法で達成することができる。投与は連続的または反復的に達成することができる。アイソトープ標識された高密度リポタンパク質(HDL)粒子、アイソトープ標識されたコレステロール分子、またはアイソトープ標識されたコレステロール前駆体を、非連続的に投与することもできる。非連続的な標識方法については、投与を1回以上行った後、投与を中止し、体内の前駆体プールから、標識された投与された粒子または分子の洗浄を起こさせる。

20

【0053】

典型的には、本発明の方法は哺乳動物、好ましくはヒトの被験体で行われる。哺乳動物としては、限定されるものではないが、霊長類、家畜、狩猟用動物、マウスおよびラットが挙げられる。

【0054】

一般的には、アイソトープ標識されたHDL粒子、アイソトープ標識されたコレステロール、またはアイソトープ標識された前駆体を、所定の容量およびアイソトープ濃度で好適な担体中で投与する(特定の比活性を得るため)。好適な担体としては、生理食塩溶液、トリグリセリド乳液およびイントラリピドが挙げられる。典型的には、アイソトープ濃度は、例えば、ボーラスまたは維持投与として与えられるかどうかなどの目的に応じて変化する。アイソトープ標識されたHDL粒子、アイソトープ標識されたコレステロール、またはアイソトープ標識された前駆体を、HDL-コレステロリン血漿中の安定状態レベルを達成するのに十分な時間に渡って投与する。

30

【0055】

B. 血漿HDLからのアイソトープ標識されたコレステロールの取得

標識されたHDL粒子、コレステロール、またはコレステロール前駆体分子の投与の後、生物学的サンプルを取得する。生物学的サンプルのHDL画分からアイソトープ標識されたコレステロールを、当業界で公知の技術により取得し、部分精製し、または単離する。

【0056】

生物学的サンプリングの頻度は、種々の因子に応じて変化し得る。そのような因子としては、限定されるものではないが、生物学的サンプルの性質、サンプリングの容易性および安全性、生物学的速度定数およびコレステロールの代謝回転速度、ならびに被験体または個体に投与する薬剤の半減期が挙げられる。

40

【0057】

標識されたコレステロールを、高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)、高速液体クロマトグラフィー(FPLC)、化学的抽出、薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、および/もしくは当業者に公知の他の分離方法などの従来の精製方法により、精製、部分精製するか、または必要に応じて、単離することもできる。

【0058】

別の実施形態においては、アイソトープ標識されたコレステロールを、加水分解または他の手段で分解して、より小さい分子を形成させることができる。加水分解方法としては

50

、限定されるものではないが、化学的加水分解(酸加水分解など)および生化学的分解などの、当業界で公知の任意の方法が挙げられる。加水分解または分解を、コレステロールの精製および/または単離の前または後に行うことができる。また、コレステロールを、高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)、高速液体クロマトグラフィー(FPLC)、ガスクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、および/または当業者には公知の化学的および/もしくは生化学的化合物の任意の他の分離方法により、部分精製するか、または必要に応じて、単離してもよい。

【0059】

コレステロールを誘導体化することもできる。例えば、コレステロールを、そのTMS誘導体に誘導体化した後、検出することができる。

10

【0060】

コレステロール分子を取得し、精製し、および単離する方法は、例えば、Cell Biology : A Laboratory Notebook(J.E. Cellis(編)、1998) ; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubelら(編)、1987) ; Short Protocols in Molecular Biology (WileyおよびSons、1999)、ならびに当業界で公知の他の資料に見出すことができる。

【0061】

C. アイソトープ標識されたコレステロール分子のアイソトープ含量、アイソトープパターン、アイソトープ含量またはアイソトープパターンの変化の速度の測定

次いで、アイソトープ標識されたコレステロール分子のアイソトープ含量、アイソトープパターン、アイソトープ含量またはアイソトープパターンの変化の速度を決定する。アイソトープ標識されたコレステロール分子のアイソトープ含量、アイソトープパターン、アイソトープ含量またはアイソトープパターンの変化の速度は、限定されるものではないが、質量分析法、核磁気共鳴(NMR)分光法、液体シンチレーション計測法などの方法または当業界で公知の他の方法により決定することができる。コレステロールのアイソトープ含量、アイソトープパターン、アイソトープ含量またはアイソトープパターンの変化の速度を直接的に測定することもできるし、またはコレステロールを化学的もしくは生化学的に改変した後分析することもできる。

20

【0062】

1. 質量分析法

アイソトープ標識されたコレステロール分子のアイソトープ富化を、限定されるものではないが、ガスクロマトグラフィー-質量分析(GC-MS)、アイソトープ比質量分析、GC-アイソトープ比-燃焼-MS、GC-アイソトープ比-ピロライシス-MS、液体クロマトグラフィー-MS、電子スプレーイオン化-MS、フライト-MSのマトリックス援用レーザー脱着-時間、フーリエトランスフォーム-イオン-サイクロトロン-共鳴-MS、およびサイクロイド-MSなどの質量分析法などの様々な方法により決定することができる。

30

【0063】

質量分析器は、分子を急速に移動性気体イオンに変換し、その質量-電荷比に基づいてそれらを分離するものである。かくして、イオン、またはイオン断片のアイソトープまたはアイソトポログの分布を用いて、複数の分子におけるアイソトープ富化を測定することができる。

40

【0064】

一般的には、質量分析器は、イオン化手段と質量分析装置とを含む。いくつかの異なる型の質量分析装置が当業界で公知である。これらのものとしては、限定されるものではないが、磁気セクター分析装置、電子スプレーイオン化、四極子、イオントラップ、フライト質量分析装置の時間、およびフーリエトランスフォーム分析装置が挙げられる。

【0065】

質量分析器はまた、いくつかの異なるイオン化方法を含んでもよい。これらのものとしては、限定されるものではないが、電子衝突、化学的イオン化、およびフィールドイオン化などの気相イオン化源、ならびにフィールド脱着、高速原子衝突、マトリックス援用レーザー脱着/イオン化、および表面増強レーザー脱着/イオン化などの脱着源が挙げられ

50

る。

【0066】

さらに、まず2種以上の質量分析装置を組み合わせる(MS/MS)前駆体イオンを分離した後、気相断片イオンを分離および測定することができる。これらの器具は、分子のイオン断片の最初のシリーズを生成した後、最初のイオンの第2の断片を生成するものである。得られる重複配列は、数分(+コンピューターの分析時間)以内の単一の質量スペクトル分析に基づいて、「パズルのピース(pieces of the puzzle)」上を一緒につなぐことにより、タンパク質の配列決定を完了させる。

【0067】

質量分析法により作成されたMS/MS断片化パターンおよび正確な分子質量決定は、分子の化学組成に関するユニークな情報を提供する。1回の質量スペクトル分析走査により、未知の分子を数分以内に同定することができる。新たに利用可能となった化学的断片化パターンのライブラリーは、ほぼ確実性をもって複雑な混合物の成分を同定する機会を提供する。

10

【0068】

別のイオン化方法も当業界で公知である。1つの鍵となる進歩は、巨大な、非揮発性の巨大分子のイオン化のための技術の開発であった。この型の技術は、電子スプレーイオン化(ESI)およびマトリックス援用レーザー脱着/イオン化(MALDI)を含んでいた。これらにより、MSと液体クロマトグラフィーおよびキャピラリーゾーン電気泳動などの強力なサンプル分離導入技術とを組み合わせる適用することが可能となった。

20

【0069】

さらに、質量分析器を、ガスクロマトグラフィー(GC)および高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)などの分離手段と組み合わせることができる。ガスクロマトグラフィー質量分析(GC/MS)においては、ガスクロマトグラフィーに由来するキャピラリーカラムを、必要に応じてジェット分離器を用いて、質量分析器と直接組み合わせる。そのような用途においては、ガスクロマトグラフィー(GC)カラムは、サンプル気体混合物からサンプル成分を分離し、分離された成分をイオン化し、質量分析器中で化学的に分析する。

【0070】

GC/MSを用いて有機分子の質量アイソトポマー量を測定する場合、アイソトープ標識された水からの水素標識されたアイソトープの組み込みを、有機分子中に組み込まれる水素原子の数に応じて、3~7倍に増幅する。

30

【0071】

一般的には、コレステロールまたはコレステロール誘導体の基線質量アイソトポマー頻度分布を決定するために、そのようなサンプルを、アイソトープ標識された前駆体の注入前に取得する。そのような測定は、目的の分子の質量アイソトポマーの天然の頻度を、細胞、組織または生物中で確立する1つの手段である。細胞、組織または生物が、類似した環境履歴を有する被験体の集団の一部である場合、集団アイソトポマー頻度分布を、そのようなバックグラウンド測定に用いることができる。さらに、アイソトープの既知の平均天然量を用いて、そのような基線アイソトポマー頻度分布を評価することができる。例えば、天然では、有機炭素中に存在する¹³Cの天然量は1.11%である。そのようなアイソトポマー頻度分布を決定する方法を以下に考察する。典型的には、目的の分子のサンプルを、被験体へのアイソトープ標識された分子の投与の前後に取得し、アイソトポマー頻度について分析する。

40

【0072】

D. アイソトープ標識されたコレステロール分子の希釈速度の算出

投与後のアイソトープ標識されたコレステロール分子のアイソトープ含量、アイソトープパターン、アイソトープ含量またはアイソトープパターンの変化の速度を、投与前のHDL粒子またはコレステロール前駆体のアイソトープ標識されたコレステロール分子のアイソトープ含量、アイソトープパターン、アイソトープ含量またはアイソトープパターンの変化の速度と比較して、未標識コレステロールによる標識されたコレステロールの希釈率

50

を算出する。希釈方程式は当業界で公知であり、例えば、Hellersteinら(1992)、上掲により記載されている。次いで、希釈速度を用いて、RCTの第1アームに対応する、HDLへの組織コレステロールの分子流速を決定する。

【0073】

血漿コレステロールの希釈速度を、標識されたコレステロールの注入速度から、未標識コレステロールの注入速度を減算することにより、直接決定することができる。

【0074】

$$\text{希釈速度} = \frac{\text{注入速度(標識コレステロール)}}{\text{富化(標識コレステロール)}} - \text{注入速度(標識コレステロール)}$$

10

【0075】

II. 生体系における逆コレステロール輸送の第2アームの分子流速の決定

別の態様において、本発明は第1に逆コレステロール輸送の第1アームの速度を決定し、第2に逆コレステロール輸送の第2アームの速度を決定することに向けられる。

【0076】

A. RCTの第1アームの速度の決定

RCTの第2アームの速度を決定するために、RCTの第1アームの速度を上記のように決定する。逆コレステロール輸送の第2アームの速度も、以下のように決定する。

【0077】

20

B. 1種以上のアイソトープ標識された胆汁酸の投与

1種以上のアイソトープ標識された胆汁酸を、アイソトープ標識されたHDL粒子、アイソトープ標識されたコレステロール、またはアイソトープ標識されたコレステロール前駆体分子の標識を投与する様式とは異なる様式で、生体系に投与する。あるいは、アイソトープ標識された胆汁酸は、アイソトープ標識されたHDL粒子、アイソトープ標識されたコレステロール、またはアイソトープ標識されたコレステロール前駆体とは異なるアイソトープ標識を有する。1種以上のアイソトープ標識された胆汁酸を生体系から取得し、胆汁酸のアイソトープ含量、アイソトープパターン、アイソトープ含量またはアイソトープパターンの変化の速度を測定する。血漿HDL-コレステロールの胆汁酸への変換の分子流速を算出して、生体系における逆コレステロール輸送の第2アームの速度を決定し、それにより生体系における逆コレステロール輸送の速度を決定する。

30

【0078】

好適なアイソトープ標識された胆汁酸としては、コール酸、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、およびリソコール酸が挙げられる。好ましい標識胆汁酸は、コール酸およびケノデオキシコール酸である。胆汁酸を標識するのに用いることができるアイソトープとしては、限定されるものではないが、²H、³H、¹³C、¹⁴C、または¹⁸Oが挙げられる。

【0079】

投与する胆汁酸を、HDL、コレステロール、またはコレステロール前駆体を標識するのに用いられるアイソトープ標識とは異なるアイソトープ標識を用いて標識する。あるいは、胆汁酸を、HDL、コレステロール、またはコレステロール前駆体と同じアイソトープを用いるが、胆汁酸を、コレステロールまたはコレステロール前駆体を標識するのに用いられる様式と区別できる様式(例えば、異なる時間、パルス、停止対継続および当業者には公知の他の区別可能な特徴)で標識する。

40

【0080】

アイソトープ標識された胆汁酸を、アイソトープ標識されたHDL粒子、アイソトープ標識されたコレステロール、もしくはアイソトープ標識されたコレステロール前駆体と同時に、または別々に投与することができる。アイソトープ標識された胆汁酸を、所定の容量およびアイソトープ濃度で(特定の比活性を得るため)好適な担体中で投与する。好適な担体としては、生理食塩溶液、トリグリセリド乳液およびイントラリピドが挙げられる。典型的には、アイソトープ濃度は、ボーラスまたは維持投与として与えられるかどうかなど

50

、目的に応じて変化する。標識されたHDL粒子、標識されたコレステロール、または標識されたコレステロール前駆体と同様、アイソトープ標識された胆汁酸を、目的の分子中で安定状態レベルを達成するのに十分な時間に渡って投与する。

【0081】

標識された胆汁酸の被験体への投与は、経口または非経口経路、例えば、静脈内注入または皮下、筋肉内、もしくは腹腔内注入によるものであってよい。

【0082】

胆汁酸を取得し、アイソトープ含量、アイソトープパターン、アイソトープ含量の変化の速度、またはアイソトープパターンの変化の速度を、コレステロールについて上記したように算出することができる。

10

【0083】

標識された胆汁酸を、標識されたHDLと一緒に被験体に投与する場合、標識されたコレステロールを、当業界で公知の技術により生物学的サンプル中の胆汁酸から取得する。本明細書に記載されるように、投与された胆汁酸のアイソトープ標識は、投与されたHDLのものとは区別できる。

【0084】

D. アイソトープ標識された胆汁酸のアイソトープ含量、アイソトープパターン、アイソトープ含量またはアイソトープパターンの変化の速度の測定

次いで、単離された胆汁酸のアイソトープ富化を、投与されたHDL粒子および投与された胆汁酸の両方から決定し、投与前のHDL粒子および胆汁酸のアイソトープ含量と比較する。HDLコレステロールから胆汁酸への寄与および未標識コレステロールによる胆汁中の標識されたコレステロールへの胆汁酸の希釈(全体の流れ)を算出する。この様式では、RCTの第2アームの速度(HDLcから胆汁酸；図1)を算出することができる。

20

【0085】

1. 相対的および絶対的質量アイソトポマー量の測定

測定された質量スペクトルのピーク高、またはあるいは、ピーク下面積を、親(ゼロ質量のアイソトープ)アイソトポマーに対する比として表すことができる。サンプル中のアイソトポマーの量に関する相対値および絶対値を提供する任意の計算方法を、本発明の目的のために、そのようなデータを記述するのに用いることが理解される。

【0086】

2. 目的の分子の標識：未標識比率の算出

次いで、標識された目的の分子と未標識の目的の分子との比率を算出する。実行者はまず、分子の単離されたアイソトポマー種に関する測定された過剰のモル比を決定する。次いで、実行者は、測定された過剰比の内部パターンと、理論的パターンとを比較する。そのような理論的パターンは、米国特許第5,338,686号、同第5,910,403号および同第6,010,846号(これらはその全体が参照により本明細書に組み入れられるものとする)に記載のような二項または多項分布関係を用いて算出することができる。この計算は、質量アイソトポマー分布分析(MIDA)を含んでもよい。質量アイソトポマー分布分析(MIDA)コンビナトリアルアルゴリズムの変動を、当業者には公知のいくつかの異なる資料において考察する。この方法はさらに、HellersteinおよびNeese(1999)、ならびにChinkesら(1996)、ならび

30

40

【0087】

上記の参考文献に加えて、前記方法を実行する計算ソフトウェアが、University of California, BerkeleyのMarc Hellerstein教授から公共的に利用可能である。

【0088】

過剰モル比と理論的パターンとの比較を、目的の分子について作成された表を用いて、または決定された関係を用いて図式的に実行することができる。これらの比較から、前駆体サブユニットプール中のサブユニットの質量アイソトープ富化の確率を記述するp値などの値を決定する。次いで、この富化を用いて、全てのアイソトポマーが新たに合成され

50

た場合、存在すると期待されるアイソトポマー過剰比を示す、各質量アイソトポマーについての新たに合成された分子の富化を記述する、 A_x^* 値などの値を決定する。

【0089】

次いで、画分量を算出する。個々のアイソトープ(元素について)または質量アイソトポマー(分子について)の画分量は、その特定のアイソトープまたは質量アイソトポマーにより表される画分の総量である。これは、最も豊富な種に100の値を与え、他の全ての種を100に対して正規化し、相対量(%)として表す場合、相対量と区別される。質量アイソトポマー M_x について、

$$M_x \text{の画分量} = A_x = \frac{\text{量 } M_x}{\sum_{i=0}^n \text{量 } M_i}$$

10

であり、式中、 $0 \sim n$ は量が起こる最も小さい質量(M_0)質量アイソトポマーに対する名目質量の範囲である。

【0090】

Δ 画分量(富化または枯渇) =

$$(A_x)_e - (A_x)_b = \left(\frac{\text{量 } M_x}{\sum_{i=0}^n \text{量 } M_i} \right)_e - \left(\frac{\text{量 } M_x}{\sum_{i=0}^n \text{量 } M_i} \right)_b$$

20

であり、式中、下付きのeは富化されていることを指し、bは基線または天然量を指す。

【0091】

前駆体投与の期間中に実際に新たに合成された分子の画分を決定するために、測定された過剰モル比(EM_x)を、全てのアイソトポマーが新たに合成された場合、存在すると期待されるアイソトポマー過剰比を示す、各質量アイソトポマーについての新たに合成された生体高分子(biopolymer)の富化を記述する、算出された富化値 A_x^* と比較する。

30

【0092】

E. HDLコレステロールから胆汁酸への変換の分子流速の算出

合成速度の決定方法は、分子前駆体プール中に存在する質量アイソトープ標識されたサブユニットの比率を算出し、この比率を用いて、少なくとも1種の質量アイソトープ標識されたサブユニットを含む目的の分子の期待される頻度を算出することを含む。次いで、この期待される頻度を、実際の、実験的に決定された目的の分子のアイソトポマー頻度と比較する。これらの値から、選択された取り込み期間中に添加されたアイソトープ標識された前駆体から合成される目的の分子の比率を決定することができる。かくして、そのような時間中の合成速度を決定することもできる。

40

【0093】

次いで、前駆体-生成物関係を適用して、アイソトープ標識されたHDL、アイソトープ標識されたコレステロール、またはアイソトープ標識されたコレステロール前駆体に由来する標識された胆汁酸の割合を決定することができる。連続的な標識方法については、アイソトープ富化を、漸近的(すなわち、最大の可能性)富化と比較し、速度パラメータ(例えば、合成速度)を、前駆体-生成物式から算出する。画分合成速度(k_s)を、連続的標識を適用することにより、前駆体-生成物式：

$$k_s = [-\ln(1-f)]/t$$

(式中、 f = 画分合成 = 生成物富化 / 漸近的前駆体 / 富化であり、 t = 試験する系において

50

接触の標識投与の時間である)
により決定することができる。

【0094】

非連続的標識方法については、アイソトープ富化における減少速度を算出し、目的の分子の速度パラメータを、指数崩壊式から算出する。崩壊速度定数(k_d)を、指数的または他の速度崩壊曲線：

$$k_d = [-\ln f]/t$$

に基づいて算出することができる。

【0095】

アイソトープ標識された胆汁酸の希釈速度を、例えば、下記式：

10

$$\text{希釈速度} = \frac{\text{注入速度(標識胆汁酸)}}{\text{富化(標識胆汁酸)}} - \text{注入速度(標識胆汁酸)}$$

などの当業界で公知の式により算出することができる。

【0096】

RCTの第2アームの速度を、例えば、下記式：

第2アームの速度 = コレステロール由来の胆汁(%) × 胆汁代謝回転速度

などの、当業界で公知の式に従って、コレステロール由来の胆汁酸(%)と生体系における希釈速度とを乗算することにより算出することができる。

20

【0097】

逆コレステロール輸送(RCT)の速度の決定の使用

本発明の方法を、種々の目的に用いることができる。第1に、この方法を用いて、被験体における第1および第2アームRCTの速度を決定することができる。次に、この速度を用いて、アテローム発生に対する種々の因子の効果を評価することができる。

【0098】

例えば、1つの変法においては、前記方法を用いて、アテローム性動脈硬化症に対する薬剤の効果を評価することができる。薬剤を被験体に投与した後、薬剤の投与の前後に被験体における第1アームまたは第2アームのRCTの速度を比較することができる。被験体はアテローム性動脈硬化症を有していても有していなくてもよい。候補薬剤の効果を、該薬剤の投与の前後に測定された速度における変化(例えば、増加、減少、または差異なし)により決定することができる。この薬剤は、RCTの第1および/または第2アームに影響し得る公知の医薬品またはデオキシリボ核酸分子であってよい。

30

【0099】

別の変法においては、前記方法を用いて、アテローム性動脈硬化症に対する食事改変の効果を評価することができる。上記のものと同様、この効果を、食事改変の前後に決定されたRCTの第1および/または第2アームの速度における変化(例えば、増加、減少、または差異なし)により決定する。

【0100】

さらなる変法においては、本発明は、本発明の方法を実施するためのキットを提供する。このキットを、標識HDL粒子、標識コレステロール、標識胆汁酸、またはその組合せなどの成分を、アイソトープ濃度を変化させて、および所定の容量で含有するように形成することができる。さらに、このキットを、キット構成要素の使用のための説明書およびコレステロール希釈の計算方法に関する説明書と共にパッケージ化するのが好ましい。

40

【0101】

標識HDL粒子、標識コレステロール、または標識胆汁酸の投与のための道具(例えば、測定カップ、針、シリンジ、ピペット、IVチューブ)などの他のキット構成要素を、必要に応じて該キット中に提供することができる。同様に、被験体からサンプルを取得するための器具(例えば、標本カップ、針、シリンジ)も、必要に応じて提供することができる。

【0102】

50

本発明の方法を用いて、逆コレステロール輸送を決定することができることを示すために、以下の実施例を提供する。当業者であれば、特定の実施形態が例示および記載されたが、それらは本発明を限定することを意図しないことを認識できるであろう。

【実施例】

【0103】

実施例1

動物モデルにおける逆コレステロール輸送の測定

図2は、ラットモデルなどの動物モデルを含む実験において用いられる実験プロトコルを示す。注入カテーテルを、ラットの頸静脈中に外科的に配置した後、24時間回復させる。 $[^2\text{H}_4]$ -BAおよび $[1-^{13}\text{C}_1]$ -アセテートのIVボラスを与えた後、HDL- $[^2\text{H}_6]$ C-E(コレステロールエステル)の一定IV注入を行う。血液サンプルを2時間後に取得し、24時間後に屠殺する。屠殺の際に、糞便も回収する。

10

【0104】

次いで、血液および糞便サンプルからコレステロールを取得する。次いで、各サンプルにおいて、コレステロールをそのTMS誘導体に誘導体化し、質量分析法により測定する。逆コレステロール合成の第1アームの速度を算出する。

【0105】

実施例2

マウスモデルにおける逆コレステロール輸送の測定

図2は、ラットモデルなどの動物モデルを含む実験において用いられる実験プロトコルを示す。注入カテーテルを、ラットの頸静脈中に外科的に配置した後、24時間回復させる。 $[^2\text{H}_4]$ -BAおよび $[1-^{13}\text{C}_1]$ -アセテートのIVボラスを与えた後、HDL- $[^2\text{H}_6]$ C-E(コレステロールエステル)の一定IV注入を行う。血液サンプルを2時間後に取得し、24時間後に屠殺する。屠殺の際に、糞便も回収する。

20

【0106】

次いで、血液および糞便サンプルからコレステロールを取得する。次いで、各サンプルにおいて、コレステロールをそのTMS誘導体に誘導体化し、質量分析法により測定する。胆汁酸も取得し、誘導体化し、質量分析法により測定する。コレステロール測定値に基づいて、逆コレステロール輸送の第1アームの速度を算出する。胆汁酸測定値に基づいて、逆コレステロール輸送の第2アームの速度を算出する。

30

【0107】

出願人は、いかなる未請求の主題を放棄もまたは公共用に提供もしていない。

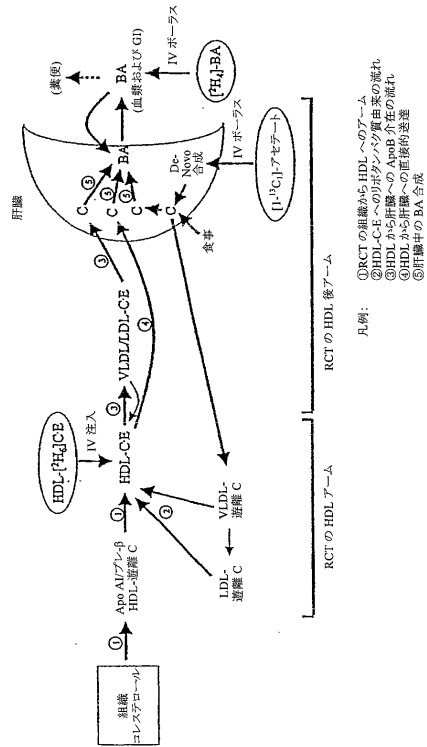
【図面の簡単な説明】

【0108】

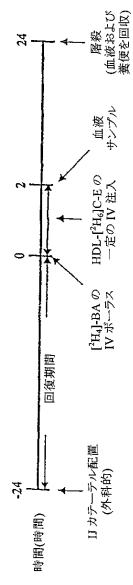
【図1】図1は、逆コレステロール輸送経路を示す。

【図2】図2は、逆コレステロール輸送の速度を決定するためのプロトコルを示す時間表である。

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 27/64 (2006.01)		G 0 1 N 27/62	V
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 27/64	A
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/60 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	Z
		G 0 1 N 33/60	Z

(74)代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(72)発明者 ヘラーシュタイン, マーク, ケイ.

アメリカ合衆国 9 4 7 0 8 カリフォルニア州, ケンジントン, アンソン ウェイ 4

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 特表2000-506370(JP, A)

Roda, A. et al., Results with Six "Kit" Radioimmunoassays for Primary Bile Acids in Human Serum Intercompared, clinical chemistry, 1980年, Vol.26 No.12, 1677-1682

Tint, G.S. et al., Transformation of 5 β -cholest-7-en-3 α -ol to cholesterol and cholestanol in cerebrotendinous Xanthomatosis, Journal of Lipid Research, 1974年 5月, Vol.15 No.3, 256-262

Bandsma, R.H.J. et al., The contribution of newly synthesized cholesterol to bile salt synthesis in rats quantified by mass isotopomer distribution analysis, Biochimica et Biophysica Acta, Elsevier Science B. V., 2000年 1月31日, Vol.1483 No.3, 343-351

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

G01N 33/48 - G01N 33/98

A61K 45/00

A61K 51/00

A61P 9/10

G01N 27/62

G01N 27/64

G01N 33/15

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed