

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-510619

(P2006-510619A)

(43) 公表日 平成18年3月30日(2006.3.30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K 14/435 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/435 Z N A	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	4 B O 6 3
<b>A 6 1 P 3/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 3/04	4 B O 6 4
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 31/454 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-554020 (P2004-554020)	(71) 出願人	504376153
(86) (22) 出願日	平成15年11月20日 (2003.11.20)		クリティカル セラピューティクス, イン
(85) 翻訳文提出日	平成17年7月12日 (2005.7.12)		コーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/037507		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(87) 国際公開番号	W02004/046345		4 2 1 レキシントン, ウェストビュー
(87) 国際公開日	平成16年6月3日 (2004.6.3)		アベニュー 6 0
(31) 優先権主張番号	60/427, 841	(74) 代理人	100095832
(32) 優先日	平成14年11月20日 (2002.11.20)		弁理士 細田 芳徳
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ニューマン, ウォルター
(31) 優先権主張番号	60/427, 846		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(32) 優先日	平成14年11月20日 (2002.11.20)		1 1 5 ボストン, ダーラム ストリート
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ナンバー 3 3
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 抗炎症剤としてのHMGB断片の使用

## (57) 【要約】

細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を阻害するため、および患者における炎症性サイトカインカスケードを阻害するための組成物および方法が開示される。組成物は、HMGB Aボックス、および/またはHMGB Bボックスに特異的に結合する抗体調製物、および/またはTNF生物学的活性のインヒビターを含む。方法は、プロ炎症性サイトカインの放出を阻害するのに、または炎症性サイトカインカスケードを阻害するために十分な量の組成物で細胞または患者を処置することを含む。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

高移動度群ボックス(HMGB)タンパク質で処理した細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を阻害しうる高移動度群ボックスタンパク質(HMGM)Aボックスまたはそのバリエーションを含有してなり、該HMGB Aボックスが、HMG1L5 Aボックス、HMG1L1 Aボックス、HMG1L4 Aボックス、BACクローンRP11-395A23のHMGB Aボックスポリペプチド、HMG1L9 Aボックス、LOC122441 Aボックス、LOC139603 Aボックス、およびHMG1L8 Aボックスからなる群より選ばれる、ポリペプチド。

## 【請求項 2】

高移動度群ボックス(HMGB)タンパク質で処理した細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を阻害しうる高移動度群ボックスタンパク質(HMGM)Aボックスを含有してなり、該HMGB Aボックスが、HMG1L5 Aボックス、HMG1L1 Aボックス、HMG1L4 Aボックス、BACクローンRP11-395A23のHMGB Aボックスポリペプチド、HMG1L9 Aボックス、LOC122441 Aボックス、LOC139603 Aボックス、およびHMG1L8 Aボックスからなる群より選ばれる、ポリペプチド。

## 【請求項 3】

高移動度群ボックス(HMGB)タンパク質で処理した細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を阻害しうる高移動度群ボックスタンパク質(HMGM)Aボックス生物学的活性断片またはそのバリエーションであるポリペプチドであって、該HMGB Aボックス生物学的活性断片が、HMG1L5 Aボックス断片、HMG1L1 Aボックス断片、HMG1L4 Aボックス断片、BACクローンRP11-395A23断片のHMGB Aボックスポリペプチド、HMG1L9 Aボックス断片、LOC122441 Aボックス断片、LOC139603 Aボックス断片、およびHMG1L8 Aボックス断片からなる群より選ばれる、ポリペプチド。

## 【請求項 4】

高移動度群ボックス(HMGB)タンパク質で処理した細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を阻害しうる高移動度群ボックスタンパク質(HMGM)Aボックス生物学的活性断片であるポリペプチドであって、該HMGB Aボックス生物学的活性断片が、HMG1L5 Aボックス断片、HMG1L1 Aボックス断片、HMG1L4 Aボックス断片、BACクローンRP11-395A23のHMGB Aボックスポリペプチド断片、HMG1L9 Aボックス断片、LOC122441 Aボックス断片、LOC139603 Aボックス断片、およびHMG1L8 Aボックス断片からなる群より選ばれる、ポリペプチド。

## 【請求項 5】

高移動度群ボックス(HMGB)タンパク質で処理した細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を阻害しうる高移動度群ボックスタンパク質(HMGM)Aボックスまたはそのバリエーションを含有するポリペプチドを含有してなり、該HMGB Aボックスが、HMG1L5 Aボックス、HMG1L1 Aボックス、HMG1L4 Aボックス、BACクローンRP11-395A23のHMGB Aボックスポリペプチド、HMG1L9 Aボックス、LOC122441 Aボックス、LOC139603 Aボックス、およびHMG1L8 Aボックスからなる群より選ばれる、組成物。

## 【請求項 6】

高移動度群ボックス(HMGB)タンパク質で処理した細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を阻害しうる高移動度群ボックスタンパク質(HMGM)Aボックスを含有するポリペプチドを含有してなり、該HMGB Aボックスが、HMG1L5 Aボックス、HMG1L1 Aボックス、HMG1L4 Aボックス、BACクローンRP11-395A23のHMGB Aボックスポリペプチド、HMG1L9 Aボックス、LOC122441 Aボックス、LOC139603 Aボックス、およびHMG1L8 Aボックスからなる群より選ばれる、組成物。

## 【請求項 7】

薬学的に許容されうる担体中の高移動度群ボックス(HMGB)タンパク質で処理した細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を阻害しうる高移動度群ボックスタンパク質(HMGM)Aボックス生物学的活性断片またはそのバリエーションであるポリペプチドを含有してなり、該HMGB Aボックス生物学的活性断片が、HMG1L5 Aボックス断片、HMG1L1 Aボックス断片、HMG1L4 Aボックス断片、BACクローンRP11-395A23のHMGB Aボックスポリペプチド断片、HMG1

L9 Aボックス断片、LOC122441 Aボックス断片、LOC139603 Aボックス断片、およびHMG1L8 Aボックス断片からなる群より選ばれる、組成物。

【請求項 8】

薬学的に許容されうる担体中の高移動度群ボックス(HMGB)タンパク質で処理した細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を阻害しうる高移動度群ボックスタンパク質(HMGM)Aボックス生物学的活性断片であるポリペプチドを含有してなり、該HMGB Aボックス生物学的活性断片が、HMG1L5 Aボックス断片、HMG1L1 Aボックス断片、HMG1L4 Aボックス断片、BACクローンRP11-395A23のHMGB Aボックスポリペプチド断片、HMG1L9 Aボックス断片、LOC122441 Aボックス断片、LOC139603 Aボックス断片、およびHMG1L8 Aボックス断片からなる群より選ばれる、組成物。

10

【請求項 9】

高移動度群ボックスタンパク質(HMGB)Bボックスに特異的に結合するが、HMGBの非Bボックスエピトープには特異的には結合しない抗体の精製調製物であって、該抗体がHMGBで処理した細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を阻害し得、該HMGB BボックスがHMG1L5 Bボックス、HMG1L1 Bボックス、HMG1L4Bボックス、およびBACクローンRP11-395A23のHMG B Bボックスからなる群より選ばれる、精製調製物。

【請求項 10】

高移動度群ボックスタンパク質(HMGB)Bボックスまたはそのバリエーションを含有するが、全長HMGBを含有せず、細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を引き起こし得、該HMGB BボックスがHMG1L5 Bボックス、HMG1L1ボックス、HMG1L4 Bボックス、およびBACクロー 20  
ンRP11-395A23のHMGB Bボックスポリペプチドからなる群より選ばれる、ポリペプチド。

20

【請求項 11】

高移動度群ボックスタンパク質(HMGB)Bボックスを含有するが、全長HMGBを含有せず、細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を引き起こし得、該HMGB BボックスがHMG1L5 Bボックス、HMG1L1ボックス、HMG1L4 Bボックス、およびBACクローンRP11-395A23のHMGB Bボックスポリペプチドからなる群より選ばれる、ポリペプチド。

【請求項 12】

高移動度群ボックスタンパク質(HMGB)Bボックス生物学的断片またはそのバリエーションであり、該HMGB Bボックス生物学的活性断片がHMG1L5 Bボックス断片、HMG1L1ボックス断片、HMG1L4 Bボックス断片、およびBACクローンRP11-395A23のHMGB Bボックスポリペプチド断片からなる群より選ばれる、ポリペプチド。 30

30

【請求項 13】

高移動度群ボックスタンパク質(HMGB)Bボックス生物学的断片であり、該HMGB Bボックス生物学的活性断片がHMG1L5 Bボックス断片、HMG1L1ボックス断片、HMG1L4 Bボックス断片、およびBACクローンRP11-395A23のHMGB Bボックスポリペプチド断片からなる群より選ばれる、ポリペプチド。

【請求項 14】

炎症性サイトカインカスケードを阻害するのに十分な量の、高移動度群ボックスタンパク質(HMGB)Bボックスに特異的に結合するが、HMGBの非Bボックスエピトープに特異的には結合しない抗体の精製調製物を患者に投与することを含み、HMGB BボックスがHMG1L5 Bボックス、HMG1L1 Bボックス、HMG1L4 Bボックス、およびBACクローンRP11-395A23のHMGB Bボックスポリペプチドからなる群より選ばれる、炎症性サイトカインカスケードの活性化により特徴付けられる患者の状態を処置する方法。 40

40

【請求項 15】

細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を阻害するのに十分な量の、高移動度群ボックス(HMGB)タンパク質で処理した細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を阻害しうる高移動度群ボックスタンパク質(HMGB)Aボックスまたはそのバリエーションを含有するポリペプチドを患者に投与することを含み、HMGB AボックスがHMG1L5 Aボックス、HMG1L1 Aボックス、HMG1L4 Aボックス、BACクローンRP11-395A23のHMGB Aボックスポリペプチド、HMG1L9 Aボックス、LOC122441 Bボックス、LOC139603 Aボックス、およびHMG1L8 Aボックスか 50

50

らなる群より選ばれる、炎症性サイトカインカスケードの活性化により特徴付けられる患者の状態を処置する方法。

【請求項 16】

細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を阻害するのに十分な量の、高移動度群ボックス (HMGB) タンパク質で処理した細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を阻害しうる高移動度群ボックスタンパク質 (HMGB) A ボックス生物学的活性断片またはそのバリエーションであるポリペプチドを患者に投与することを含み、HMGB A ボックスが HMG1L5 A ボックス、HMG1L1 A ボックス、HMG1L4 A ボックス、BAC クローン RP11-395A23 の HMGB A ボックスポリペプチド、HMG1L9 A ボックス、LOC122441 A ボックス、LOC139603 A ボックス、および HMG1L8 A ボックスからなる群より選ばれる、炎症性サイトカインカスケードの活性化により特徴付けられる患者の状態を処置する方法。

10

【請求項 17】

細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を刺激するのに十分な量の高移動度群ボックスタンパク質 (HMGB) B ボックスまたはそのバリエーションを含有するが、全長 HMGB ポリペプチドを含有しないポリペプチドの有効量を患者に投与することを含み、該 HMGB B ボックスが HMG1L5 B ボックス、HMG1L1 B ボックス、HMG1L4 B ボックス、および BAC クローン RP11-395A23 の HMGB B ボックスポリペプチドからなる群より選ばれる、患者において体重減少をもたらすか、肥満症を処置するための方法。

【請求項 18】

細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を刺激するのに十分な量の高移動度群ボックスタンパク質 (HMGB) B ボックス生物学的活性断片またはそのバリエーションであるポリペプチドの有効量を患者に投与することを含み、該 HMGB B ボックス生物学的活性断片が HMG1L5 B ボックス断片、HMG1L1 B ボックス断片、HMG1L4 B ボックス断片、および BAC クローン RP11-395A23 の HMGB B ボックスポリペプチド断片からなる群より選ばれる、患者において体重減少をもたらすか、肥満症を処置するための方法。

20

【請求項 19】

化合物と、

(a) 高移動度群ボックスタンパク質 (HMGB) B ボックスまたはその生物学的活性断片に曝された場合、プロ炎症性サイトカインを放出する細胞；および

(b) HMGB B ボックスまたはその生物学的活性断片、ここで該 HMGB B ボックスが HMG1L5 B ボックス、HMG1L1 B ボックス、HMG1L4 B ボックス、および BAC クローン RP11-395A23 の HMGB B ボックスからなる群より選ばれる；

30

とを組み合わせ、次いで該化合物が細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を阻害するか否かを決定する、化合物が炎症を阻害するか否かを測定する方法。

【請求項 20】

高移動度群ボックス (HMGB) タンパク質で処理した細胞からの炎症性サイトカインの放出を阻害しうる高移動度群ボックス (HMGB) A ボックスまたはその断片もしくはバリエーションを含有するポリペプチドおよび TNF 生物学的活性を阻害する薬剤を含有してなり、該薬剤が薬学的に許容されうる担体中のインフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、CDP870、CDP571、レネルセプト、およびサリドマイドである、医薬組成物。

40

【請求項 21】

前記ポリペプチドが哺乳動物 HMGB A ボックスである請求項 20 記載の医薬組成物。

【請求項 22】

前記ポリペプチドが哺乳動物 HMGB1 A ボックスである請求項 21 記載の医薬組成物。

【請求項 23】

前記ポリペプチドが配列番号：4 を含有してなる請求項 22 記載の医薬組成物。

【請求項 24】

前記ポリペプチドが配列番号：4 を含有してなる請求項 23 記載の医薬組成物。

【請求項 25】

前記哺乳動物 HMGB A ボックスが、HMG1L5 A ボックス、HMG1L1 A ボックス、HMG1L4 A ボッ

50

クス、BACクローンRP11-395A23のHMGB Aボックスポリペプチド、HMG1L9 Aボックス、LOC122441 Aボックス、LOC139603 Aボックス、およびHMG1L8 Aボックスからなる群より選ばれる請求項 2 1 記載の医薬組成物。

【請求項 2 6】

HMGBポリペプチドに結合する抗体またはその生物学的に活性な断片およびTNF生物学的活性を阻害する薬剤を含有してなり、該薬剤が薬学的に許容されうる担体中のインフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、CDP870、CDP571、レネルセプト、およびサリドマイドからなる群より選ばれる、医薬組成物。

【請求項 2 7】

前記HMGBポリペプチドが哺乳動物HMGBポリペプチドである請求項 2 6 記載の医薬組成物 10。

【請求項 2 8】

前記HMGBポリペプチドがHMGB1ポリペプチドである請求項 2 7 記載の医薬組成物。

【請求項 2 9】

前記HMGB1ポリペプチドが配列番号：1を含有してなる請求項 2 8 記載の医薬組成物。

【請求項 3 0】

前記HMGB1ポリペプチドが配列番号：1を含有してなる請求項 2 9 記載の医薬組成物。

【請求項 3 1】

前記生物学的活性HMGB断片がHMGB Bボックスまたはその生物学的活性断片である請求項 2 6 記載の医薬組成物。 20

【請求項 3 2】

前記HMGB Bボックスが配列番号：5からなる請求項 3 1 記載の医薬組成物。

【請求項 3 3】

前記HMGB Bボックス生物学的断片が配列番号：23からなる請求項 3 1 記載の医薬組成物。

【請求項 3 4】

前記HMGB BボックスがHMG1L5 Bボックス、HMG1L1 Bボックス、HMG1L4 Bボックス、およびBACクローンRP11-395A23のHMGB Bボックスポリペプチドからなる群より選ばれる請求項 3 1 記載の医薬組成物。

【請求項 3 5】

前記抗体がモノクローナル抗体である請求項 2 6 記載の医薬組成物。 30

【請求項 3 6】

前記抗体がポリクローナル抗体である請求項 2 6 記載の医薬組成物。

【請求項 3 7】

高移動度群ボックス(HMGB)タンパク質で処理した細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を阻害しうる高移動度群ボックス(HMGB)Aボックスまたはその断片もしくはバリエーションを含有するポリペプチドおよびTNF生物学的活性を阻害する薬剤を含有する組成物を患者に投与することを含み、該薬剤がインフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、CDP870、CDP571、レネルセプト、およびサリドマイドからなる群より選ばれる、炎症性サイトカインカスケードの活性化により特徴付けられる患者における状態の処置方法。 40

【請求項 3 8】

前記組成物が薬学的に許容されうる担体をさらに含有する請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 3 9】

前記ポリペプチドが哺乳動物HMGB Aボックスである請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 4 0】

前記ポリペプチドが哺乳動物HMGB1 Aボックスである請求項 3 9 記載の方法。

【請求項 4 1】

前記ポリペプチドが配列番号：4を含有する請求項 4 0 記載の方法。

【請求項 4 2】

前記ポリペプチドが配列番号：4からなる請求項 4 1 記載の方法。 50

**【請求項 4 3】**

前記哺乳動物HMGB Aボックスが、HMG1L5 Aボックス、HMG1L1 Aボックス、HMG1L4 Aボックス、BACクローンRP11-395A23のHMGB Aボックスポリペプチド、HMG1L9 Aボックス、LOC122441 Aボックス、LOC139603 Aボックス、およびHMG1L8 Aボックスからなる群より選ばれる請求項 3 9 記載の方法。

**【請求項 4 4】**

前記状態が、敗血症、移植片拒絶、リウマチ様関節炎、喘息、狼瘡、成人呼吸促進症候群、慢性閉塞性肺疾患、乾癬、脾臓炎、腹膜炎、火傷、心筋虚血、器官虚血、再灌流虚血、ベーチェット病、対宿主性移植片病、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、および悪液質からなる群より選ばれる請求項 3 7 記載の方法。

10

**【請求項 4 5】**

HMGBポリペプチドに結合する抗体またはその生物学的活性断片およびTNF生物学的活性を阻害する薬剤を含有する組成物を患者に投与することを含み、該薬剤がインフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、CDP870、CDP571、レネルセプト、およびサリドマイドからなる群より選ばれる、炎症性サイトカインカスケードの活性化により特徴付けられる患者における状態の処置方法。

**【請求項 4 6】**

該組成物が薬学的に許容されうる担体をさらに含有する請求項 4 5 記載の方法。

**【請求項 4 7】**

前記(HMGB)ポリペプチドが哺乳動物HMGBポリペプチドである請求項 4 5 記載の方法。

20

**【請求項 4 8】**

前記HMGBポリペプチドがHMGB1ポリペプチドである請求項 4 7 記載の方法。

**【請求項 4 9】**

前記HMGB1ポリペプチドが配列番号：1 を含有する請求項 4 8 記載の方法。

**【請求項 5 0】**

前記HMGB1ポリペプチドが配列番号：1 からなる請求項 4 9 記載の方法。

**【請求項 5 1】**

前記生物学的活性HMGB断片が、HMGB Bボックスまたはその生物学的活性断片である請求項 4 5 記載の方法。

**【請求項 5 2】**

HMGB Bボックスが、HMG1L5 Bボックス、HMG1L1 Bボックス、HMG1L4Bボックス、RP11-395A23のHMGB Bボックスポリペプチドから選ばれる請求項 5 1 記載の方法。

30

**【請求項 5 3】**

前記HMGB1 Bボックスが配列番号：5 からなる請求項 5 1 記載の方法。

**【請求項 5 4】**

前記HMGB1 Bボックス生物学的活性断片が配列番号：2 3 からなる請求項 5 1 記載の方法。

**【請求項 5 5】**

抗体がモノクローナル抗体である請求項 4 5 記載の方法。

**【請求項 5 6】**

抗体がポリクローナル抗体である請求項 4 5 記載の方法。

40

**【請求項 5 7】**

前記状態が、敗血症、移植片拒絶、リウマチ様関節炎、喘息、狼瘡、成人呼吸促進症候群、慢性閉塞性肺疾患、乾癬、脾臓炎、腹膜炎、火傷、心筋虚血、器官虚血、再灌流虚血、ベーチェット病、対宿主性移植片病、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、および悪液質からなる群より選ばれる請求項 4 5 記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【発明の詳細な説明】**

50

## 【 0 0 0 1 】

## 関連出願

本出願はともに2002年11月20日に出願された米国特許出願60 / 427,841および60 / 427,846の利点を主張する。両方の出願の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

## 【 0 0 0 2 】

## 発明の背景

炎症はしばしばプロ炎症サイトカイン、例えば腫瘍壊死因子 (TNF)、インターロイキン (IL) -1、IL-1、IL-6、血小板活性化因子 (PAF)、マクロファージ遊走抑制因子 (MIF) および他の化合物により誘導される場合が多い。これらのプロ炎症サイトカインは数種の異なる細胞型、最も重要なものは免疫細胞 (例えば単球、マクロファージおよび好中球) によってのみならず、非免疫細胞、例えば線維芽細胞、骨芽細胞、平滑筋細胞、上皮細胞およびニューロンによってもまた生産される。これ等のプロ炎症サイトカインは炎症サイトカインカスケードの早期の段階において種々の疾患に寄与している。

## 【 0 0 0 3 】

炎症サイトカインカスケードは多くの疾患の炎症およびアポトーシスを含む有害な特徴に寄与している。これ等に含まれるものは局所および全身性の反応の両方を特徴とする障害、例えば、胃腸管および関連組織の関与する疾患 (例えば虫垂炎、消化性潰瘍、胃潰瘍および十二指腸潰瘍、腹膜炎、膵炎、潰瘍性、偽膜性、急性および虚血性の結腸炎、憩室炎、喉頭蓋炎、無弛緩症、胆管炎、胆嚢炎、セルリアック病、肝炎、クローン病、腸炎およびホウウィップル病); 全身性または局所性の炎症性の疾患および状態 (例えば喘息、アレルギー、アナフィラキシーショック、免疫複合体病、臓器虚血症、再灌流傷害、臓器壊死、枯草熱、セブシス、敗血症、内毒素ショック、悪液質、異常高熱、好酸球性肉芽腫、肉芽腫症およびサルコイドーシス); 泌尿器科系および関連組織の関与する疾患 (例えば敗血症性流産、精巣上体炎、膣炎、前立腺炎および尿道炎); 呼吸系および関連組織の関与する疾患 (例えば気管支炎、気腫、鼻炎、嚢胞性線維症、肺炎、成人呼吸窮迫症候群、肺超顕微鏡的珪素火山じん肺症、肺炎、細気管支炎、喉頭炎、胸膜炎および副鼻腔炎); 種々のウイルス (例えばインフルエンザ、呼吸シンシチウムウイルス、HIV、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスおよびヘルペス、細菌 (例えば播種性菌血症、デング熱)、カビ (例えばカンジダ症) および原虫および多細胞の寄生虫 (例えばマラリア症、フィラリア症、アメーバ症および肝嚢胞症) による感染から生じる疾患; 皮膚科疾患および皮膚の状態 (例えば熱傷、皮膚炎、皮膚筋炎、日焼け、蕁麻疹および膨疹); 心臓血管系および関連組織の関与する疾患 (例えば血管炎、脈管炎、心内膜炎、動脈炎、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、血栓静脈炎、心外膜炎、うっ血性心障害、心筋炎、心筋虚血、結節性動脈周囲炎およびリウマチ熱); 中枢および末梢神経系および関連する組織の関与する疾患 (例えばアルツハイマー病、髄膜炎、脳炎、多発性硬化症、脳梗塞、脳塞栓、ギラン・バレー症候群、神経炎、神経痛、脊髄傷害、麻痺およびブドウ膜炎); 骨、関節、筋肉および結合組織の疾患 (例えば種々の関節炎および関節痛、骨髄炎、筋膜炎、パジエット病、痛風、歯周病、慢性関節リウマチおよび骨膜炎); 他の自己免疫および炎症性疾患 (例えば重症筋無力症、甲状腺炎、全身エリテマトーデス、グッドパスチャー症候群、ベーチェット症候群、同種移植片拒絶、移植片対宿主疾患、I型糖尿病、強直性脊椎炎、パーリキン病); および何れかの場合の何れかの原発疾患に対する炎症性または免疫性の宿主の応答であるが、これらに限定されない。

## 【 0 0 0 4 】

早期のプロ炎症サイトカイン (例えばTNF、IL-1等) は炎症を媒介し、高移動度群ボックス1 (HMGB1) (HMG-1およびHMG1としても知られている)、即ち、血清中に蓄積し、遅延致死性および早期のプロ炎症サイトカインの更なる誘導を媒介するタンパク質の後期の放出を誘導する。

## 【 0 0 0 5 】

HMGB1は、DNAの構造および安定性にとって重要である高移動度群ボックス (HMGB) タン

パク質と称されるDNA結合タンパク質のファミリーの基礎的メンバーとして初めて発見された。これは配列特異性を有さない2本鎖DNAに結合するユビキタスに発現される核タンパク質として約40年前に発見された。

#### 【0006】

HMGB1結合は、グルココルチコイド受容体およびRAGリコンビナーゼの遺伝子転写を容易にする核タンパク質複合体の形成と安定性をDNAに促進させる。HMGB1分子は3つのドメイン、即ちHMGB AおよびHMGB Bボックスと称された2つのDNA結合モチーフおよび酸性カルボキシル末端を有する。2つのHMGBボックスは高度に保存された80アミノ酸のL型ドメインである。HMGBボックスはまたRNAポリメラーゼI転写因子、ヒト上流結合因子およびリンパ球様特異的因子を含む他の転写因子においても発現される。

10

#### 【0007】

最近の証拠によれば、HMGB1は炎症状態のサイトカインメディエーターとされている。例えばHMGB1は内毒素血症における遅延致死性のサイトカインメディエーターとされている。この研究によれば、細菌内毒素（リポ多糖類（LPS））は単球/マクロファージを活性化して活性化への後期の応答としてHMGB1を放出し、毒性である血漿中HMGB1濃度の上昇をもたらしている。HMGB1に対する抗体は、たとえ抗体投与が初期サイトカイン応答後まで遅延する場合であっても、内毒素の致死性を阻止する。他のプロ炎症サイトカインと同様、HMGB1は単球の強力な活性化剤である。HMGB1の気管内投与は急性の肺傷害をもたらす、抗HMGB1抗体は内毒素誘導肺浮腫に対抗した保護作用を示す。血清HMGB1濃度は敗血症または出血性ショックを有する臨床的に罹病した患者においては上昇し、そして濃度は生存者と比較して非生存者において有意に高値となる。

20

#### 【0008】

HMGB1はまた、RAGE、即ち免疫グロブリンスーパーファミリーのマルチリガンド受容体のためのリガンドとされている。RAGEは内皮細胞、平滑筋、単球および神経において発現され、リガンド相互作用はMAPキナーゼ、P21rasおよびNF- $\kappa$ Bを介してシグナルを伝達する。内毒素血症の間のHMGB1出現の遅延動態は、これを潜在的に良好な治療薬としているが、HMGB1のシグナリングおよび毒性の分子的機序については殆ど知られていない。

#### 【0009】

従って、HMGB1のプロ炎症活性の特徴、特にこの活性の原因をもたらしている活性ドメインおよび他のドメインの何れかの抑制作用を発見することは有用である。

30

#### 【0010】

発明の要旨

本発明は（1）HMGB AボックスがHMGBプロ炎症作用の競合的抑制剤として機能し、（2）HMGB BボックスがHMGBの優勢なプロ炎症活性を有し、そして（3）HMGBの生物活性を抑制する薬剤およびTNFの生物活性を抑制する薬剤を含む複合療法が炎症サイトカインカスケードの活性化により特徴づけられる状態の治療のために使用できるという発見に基づく。HMGBの生物活性を抑制する薬剤はHMGB Aボックスを包含し、これはHMGBのプロ炎症作用の競合的阻害剤、およびHMGBに対する抗体、例えばHMGB Bボックスとして機能する。

#### 【0011】

従って、1つの実施形態において、本発明は、高移動度群ボックス（HMGB）タンパク質を投与された細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制できる、高移動度群ボックスタンパク質（HMGB）Aボックスまたはその変異体、または、Aボックスの生物学的活性断片またはその変異体を含むポリペプチドであり、ここでHMGB Aボックスは、HMG1L5（以前のHMG1L10）Aボックス、HMG1L1Aボックス、HMG1L4Aボックス、BACクローンRP11-395A23のHMGB Aボックスポリペプチド、HMG1L9Aボックス、LOC122441Aボックス、LOC139603AボックスおよびHMG1L8Aボックスよりなる群から選択される。1つの実施形態において、ポリペプチドは薬学的に許容される担体中に存在することができる。

40

#### 【0012】

別の実施形態において、本発明は高移動度群ボックスタンパク質（HMGB）Bボックスに特異的に結合するがHMGBの非Bボックスエピトープには特異的に結合しない抗体の精製さ

50



れた調製物であり、ここで抗体はHMGBを投与された細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制することができ、そしてHMGB BボックスはHMG1L5 (以前のHMG1L10) Bボックス、HMG1L1Bボックス、HMG1L4Bボックス、BACクローンRP11-395A23のHMGB Bボックスポリペプチドよりなる群から選択される。1つの実施形態において、抗体は薬学的に許容される担体中に存在することができる。

【0013】

更に別の実施形態において、本発明は高移動度群ボックスタンパク質 (HMGB) Bボックスまたはその変異体、または、Bボックスの生物学的活性断片またはその変異体を含むが完全長HMGBは含まないポリペプチドであり、ここでポリペプチドは細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を誘発することができ、そしてHMGB BボックスはHMG1L5 (以前のHMG1L10) Bボックス、HMG1L1Bボックス、HMG1L4Bボックス、BACクローンRP11-395A23のHMGB Bボックスポリペプチドよりなる群から選択される。1つの実施形態において、ポリペプチドは薬学的に許容される担体中に存在することができる。

【0014】

別の実施形態において本発明は上記したポリペプチドをコードするベクターを含む。

【0015】

更に別の実施形態において、本発明は哺乳類細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制する方法であり、方法は、高移動度群ボックスタンパク質 (HMGB) Bボックスに特異的に結合するがHMGBの非Bボックスエピトープには特異的に結合しない抗体の精製された調製物のある量を細胞に投与することを包含し、ここでHMGB BボックスはHMG1L5 (以前のHMG1L10) Bボックス、HMG1L1Bボックス、HMG1L4Bボックス、BACクローンRP11-395A23のHMGB Bボックスポリペプチドよりなる群から選択される。

【0016】

別の実施形態において、本発明は哺乳類細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制する方法であり、この方法は、細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制するのに十分な量の高移動度群ボックス (HMGB) タンパク質を投与された細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制できる、高移動度群ボックスタンパク質 (HMGB) Aボックスまたはその変異体、または、Aボックスの生物学的活性断片またはその変異体を含むポリペプチドを細胞に投与することを含み、ここでHMGB Aボックスは、HMG1L5 (以前のHMG1L10) Aボックス、HMG1L1Aボックス、HMG1L4Aボックス、BACクローンRP11-395A23のHMGB Aボックスポリペプチド、HMG1L9Aボックス、LOC122441Aボックス、LOC139603AボックスおよびHMG1L8Aボックスよりなる群から選択される。1つの実施形態において、細胞にはAボックスポリペプチド、Aボックスの生物学的活性断片またはその変異体を含むポリペプチドをコードするベクターを投与することができる。

【0017】

別の実施形態において、本発明は炎症サイトカインカスケードの活性化を特徴とする患者における状態を治療する方法であり、これは、炎症サイトカインカスケードを抑制するのに十分な量の高移動度群ボックスタンパク質 (HMGB) Bボックスに特異的に結合するがHMGBの非Bボックスエピトープには特異的に結合しない抗体の精製された調製物を患者に投与することを含み、ここでHMGB BボックスはHMG1L5 (以前のHMG1L10) Bボックス、HMG1L1Bボックス、HMG1L4Bボックス、BACクローンRP11-395A23のHMGB Bボックスポリペプチドよりなる群から選択される。

【0018】

別の実施形態において、本発明は炎症サイトカインカスケードの活性化を特徴とする患者における状態を治療する方法であり、これは、細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制するために十分な量の、高移動度群ボックス (HMGB) タンパク質を投与された細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制できる、高移動度群ボックスタンパク質 (HMGB) Aボックスまたはその変異体、あるいはAボックスの生物学的活性断片またはその変異体を含むポリペプチドを患者に投与することを含み、ここでHMGB Aボックスは、HMG1L5 (以前のHMG1L10) Aボックス、HMG1L1Aボックス、HMG1L4Aボックス、BACクローンRP11-395A23

のHMGB Aボックスポリペプチド、HMG1L9Aボックス、LOC122441Bボックス、LOC139603AボックスおよびHMG1L8Aボックスよりなる群から選択される。

【0019】

更に別の実施形態において、本発明は、細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を促進するために十分な量の、高移動度群ボックスタンパク質（HMGB）Bボックスまたはその変異体、あるいはBボックスの生物学的活性断片またはその変異体を含むが完全長HMGBは含まないポリペプチドを細胞に投与することを含む細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を促進する方法であり、ここでHMGB BボックスはHMG1L5（以前のHMG1L10）Bボックス、HMG1L1Bボックス、HMG1L4Bボックス、BACクローンRP11-395A23のHMGB Bボックスポリペプチドよりなる群から選択される。1つの実施形態において、細胞にはBボックスポリペプチド、Bボックスの生物学的活性断片またはその変異体を含むポリペプチドをコードするベクターを投与することができる。

10

【0020】

更に別の実施形態において、本発明は患者において体重減少を起こすか、または肥満を治療するための方法であり、これは、細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を促進するために十分な量の、高移動度群ボックスタンパク質（HMGB）Bボックスまたはその変異体、または、Bボックスの生物学的活性断片またはその変異体を含むが完全長HMGBポリペプチドは含まないポリペプチドの有効量を患者に投与することを含み、ここでHMGB BボックスはHMG1L5（以前のHMG1L10）Bボックス、HMG1L1Bボックス、HMG1L4Bボックス、BACクローンRP11-395A23のHMGB Bボックスポリペプチドよりなる群から選択される。

20

【0021】

別の実施形態において、本発明はある化合物が炎症を抑制するかどうかを調べる方法であって、これは、その化合物を、a) 高移動度群ボックスタンパク質（HMGB）Bボックスまたは生物学的に活性なその断片に曝露されるとプロ炎症サイトカインを放出する細胞；および、b) HMGB Bボックスまたは生物学的に活性なその断片と組み合わせること、ここで、前記HMGB BボックスはHMG1L5（以前のHMG1L10）Bボックス、HMG1L1Bボックス、HMG1L4Bボックス、BACクローンRP11-395A23のHMGB Bボックスポリペプチドよりなる群から選択されるものであること；次に、その化合物が細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制するかどうか調べることを含む。

【0022】

更に別の実施形態において、本発明は、薬学的に許容される担体中に、高移動度群ボックス（HMGB）タンパク質を投与された細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制できる高移動度群ボックスタンパク質（HMGB）Aボックスまたはその断片または変異体、および、TNFの生物学的な活性を抑制する薬剤、ここでその薬剤はインフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、CDP870、CDP571、レネルセプトおよびサリドマイドよりなる群から選択されるもの、を含むポリペプチドを含む医薬組成物である。HMGB Aボックスは、好ましくは脊椎動物のHMGB Aボックス、例えば哺乳類HMGB Aボックス、より好ましくは哺乳類のHMGB1 Aボックス、例えばヒトHMGB1 Aボックス、最も好ましくは配列番号4、配列番号22または配列番号57の配列を含むかこれよりなるHMGB1 Aボックスである。

30

【0023】

別の実施形態において、本発明は、薬学的に許容される担体中にHMGBポリペプチドまたは生物学的に活性なその断片、例えばHMGB Bボックスポリペプチドまたは生物学的に活性なその断片に結合する抗体、および、TNFの生物学的な活性を抑制する薬剤、ここでその薬剤はインフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、CDP870、CDP571、レネルセプトおよびサリドマイドよりなる群から選択されるもの、を含む医薬組成物である。

40

【0024】

更に別の実施形態においては、本発明は、高移動度群ボックス（HMGB）タンパク質を投与された細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制できる、高移動度群ボックスタンパク質（HMGB）Aボックスまたはその断片または変異体を含むポリペプチド、および、TNFの生物学的な活性を抑制する薬剤、ここでその薬剤はインフリキシマブ、エタネルセプト

50

、アダリムマブ、CDP870、CDP571、レネルセプトおよびサリドマイドよりなる群から選択されるもの、を含む組成物を患者に投与することを含む、炎症サイトカインカスケードの活性化を特徴とする患者における状態の治療方法である。

【0025】

更に別の実施形態においては、本発明は、HMGBポリペプチドまたは生物学的に活性なその断片、例えばHMGB Bボックスポリペプチドまたは生物学的に活性なその断片に結合する抗体、および、TNFの生物学的な活性を抑制する薬剤、ここでその薬剤はインフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、CDP870、CDP571、レネルセプトおよびサリドマイドよりなる群から選択されるもの、を含む組成物を患者に投与することを含む、炎症サイトカインカスケードの活性化を特徴とする患者における状態の治療方法である。

10

【0026】

発明の詳細な説明

本発明の実施は特段の記載が無い限り、当業者のよく知る細胞培養、分子生物学、微生物学、細胞生物学および免疫学の従来手法を用いる。このような手法は文献において十分に説明されている。例えばSambrook et al., 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel et al. (1995), "Short Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons; Methods in Enzymology (数巻); Methods in Cell Biology (数巻) および Methods in Molecular Biology (数巻) を参照できる。

【0027】

本発明はプロ炎症サイトカインの生産および炎症サイトカインカスケードを誘導するHMGB1の能力の種々の特性を更に解明する一連の発見に基づく。特にHMGB1のプロ炎症活性ドメインはBボックス（特にBボックスの最初の20アミノ酸）であり、そしてBボックスに特異的な抗体はプロ炎症サイトカインの放出および炎症サイトカインカスケードを抑制し、その結果、炎症サイトカインカスケードにより誘発された有害な症状が軽減できるということが発見された。更にまたAボックスは炎症サイトカイン放出の弱いアゴニストであり、HMGB1のBボックスのプロ炎症活性を競合的に抑制することがわかった。更にまた、TNFの生物学的活性の阻害剤をHMGB Aボックスおよび/またはHMGB1の抗体と組み合わせることにより患者において炎症サイトカインカスケードの活性化を特徴とする状態の治療において使用するための医薬組成物が形成できることがわかった。

20

30

【0028】

本明細書においては、「HMGBポリペプチド」または「HMGBタンパク質」とは実質的に純粋な、または、実質的に純粋で単離されたポリペプチドであり、これはそれに天然に付随している成分から分離されるか、または、同じアミノ酸配列を有する合成または組み換え生産されたポリペプチドであり、そして、炎症を増大させ、および/または、細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を増大させ、および/または炎症サイトカインカスケードの活性を増大させる。1つの実施形態において、HMGBポリペプチドは上記した生物学的活性の1つを有する。別の実施形態において、HMGBポリペプチドは上記した生物学的活性の2つを有する。第3の実施形態において、HMGBポリペプチドは上記した生物学的活性の3つの全てを有する。

40

【0029】

好ましくは、HMGBポリペプチドは哺乳類HMGBポリペプチド、例えばヒトHMGB1ポリペプチドである。HMGBポリペプチドの例は配列番号1、配列番号2、配列番号3または配列番号18を含むかこれよりなるポリペプチドを包含する。好ましくはHMGBポリペプチドは本明細書に記載するとおり、BボックスDNA結合ドメインおよび/またはAボックスDNA結合ドメイン、ならびに/あるいは酸性カルボキシル末端を含有する。HMGBポリペプチドの他の例はGenBank受入れ番号AAA64970、AAB08987、P07155、AAA20508、S29857、P09429、NP\_002119、CAA31110、S02826、U00431、X67668、NP\_005333、NM\_016957およびJ04179に記載されており、これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。HMGBポリペプチドの別の例は、例えば哺乳類HMGB1（例えばGenBank受入れ番号U51677に記載されている（HMGB1））

50

、HMG2（例えばGenBank受入れ番号M83665に記載されている（HMGB2））、HMG-2A（例えばGenBank受入れ番号NM\_005342およびNP\_005333に記載されている（HMGB3、HMG-4））、HMG14（例えばGenBank受入れ番号P05114に記載されているもの）、HMG17（例えばGenBank受入れ番号X13546に記載されているもの）、HMG1（例えばGenBank受入れ番号L17131に記載されているもの）、およびHMGY（例えばGenBank受入れ番号M23618に記載されているもの）；非哺乳類HMG1（例えばGenBank受入れ番号X02666に記載されているもの）およびHMG12（例えばGenBank受入れ番号L32859に記載されているもの）（ニジマス）；HMG-X（例えばGenBank受入れ番号D30765に記載されているもの）（アフリカツメガエル）、HMGD（例えばGenBank受入れ番号X71138に記載されているもの）およびHMGZ（例えばGenBank受入れ番号X71139に記載されているもの）（ショウジョウバエ）；NHP10タンパク質（HMGタンパク質ホモログNHP1）（例えばGenBank受入れ番号Z48008に記載されているもの）（コウボ）；非ヒストン染色体タンパク質（例えばGenBank受入れ番号000476に記載されているもの）（コウボ）；HMG1/2様タンパク質（例えばGenBank受入れ番号Z11540に記載されているもの）（コムギ、トウモロコシ、ダイズ）；上流結合因子（UBF-1）（例えばGenBank受入れ番号X53390に記載されているもの）；PMS1タンパク質ホモログ1（例えばGenBank受入れ番号U13695に記載されているもの）；1本鎖認識タンパク質（SSRP、構造特異的認識タンパク質）（例えばGenBank受入れ番号M86737に記載されているもの）；HMGホモログTDP-1（例えばGenBank受入れ番号M74017に記載されているもの）；哺乳類性別決定領域Yタンパク質（SRY、精巣決定因子）（例えばGenBank受入れ番号X53772に記載されているもの）；カピタンパク質：mat-1（例えばGenBank受入れ番号AB009451に記載されているもの）、ste11（例えばGenBank受入れ番号X53431に記載されているもの）およびMc1；SOX14（例えばGenBank受入れ番号AF107043に記載されているもの）並びにSOX1（例えばGenBank受入れ番号Y13436に記載されているもの）、SOX2（例えばGenBank受入れ番号Z31560に記載されているもの）、SOX3（例えばGenBank受入れ番号X71135に記載されているもの）、SOX6（例えばGenBank受入れ番号AF309034に記載されているもの）、SOX8（例えばGenBank受入れ番号AF226675に記載されているもの）、SOX10（例えばGenBank受入れ番号AJ001183に記載されているもの）、SOX12（例えばGenBank受入れ番号X73039に記載されているもの）およびSOX21（例えばGenBank受入れ番号AF107044に記載されているもの）；リンパ様特異的因子（LEF-1）（例えばGenBank受入れ番号X58636に記載されているもの）；T細胞特異的転写因子（TCF-1）（例えばGenBank受入れ番号X59869に記載されているもの）；MTT1（例えばGenBank受入れ番号M62810に記載されているもの）；およびSP100-HMG核自己抗原（例えばGenBank受入れ番号U36501に記載されているもの）を包含するが、これらに限定されない。

#### 【0030】

HMGBタンパク質の他の例はGenBank受入れ番号NG\_000897（そして特に図14Aおよび14Bに記載されているNG\_000897のヌクレオチド150～797）；AF076674（HMG1L1）（そして特に図14Cおよび14Dに記載されているAF076674のヌクレオチド1～633）；AF076676（HMG1L4）（そして特に図14Eおよび14Fに記載されているAF076676のヌクレオチド1～564）；AC010149（BACクローンRP11-395A23由来のHMG配列）（そして特に図14Gおよび14Hに記載されているAC010149のヌクレオチド75503～76117）；AF165168（HMG1L9）（そして特に図14Iおよび14Jに記載されているAF165168のヌクレオチド729～968）；XM\_063129（LOC122441）（そして特に図14Kおよび14Lに記載されているXM\_063129のヌクレオチド319～558）；XM\_066789（LOC139603）（そして特に図14Mおよび14Nに記載されているXM\_066789のヌクレオチド1～258）；およびAF165167（HMG1L8）（そして特に図14Oおよび14Pに記載されているAF165167のヌクレオチド456～666）を有するHMGB核酸配列（HMG1L5（以前のHMG1L10））によりコードされるポリペプチドである。

#### 【0031】

本発明のHMGBポリペプチドは配列変異体も包含する。変異体には生物における同じ遺伝子座によりコードされる実質的に相同性のポリペプチド、即ち対立遺伝子変異体、並びに他の変異体が包含される。変異体はまた生物における他の遺伝子座から誘導されているが

HMGB核酸分子、その相補体および部分によりコードされるポリペプチドに対する実質的な相同性を有するか、または、HMGB核酸分子のヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるポリペプチドに対する実質的な相同性を有するポリペプチドも包含する。HMGB核酸分子の例は当該分野で知られており、そして、本明細書に記載するとおりHMGBポリペプチドから誘導できる。変異体はまたこれ等のポリペプチドに実質的に相同であるか同一であるが他の生物から誘導されたポリペプチド、即ちオーソログも包含する。変異体はまた、化学合成により生成されたこれ等のポリペプチドに実質的に相同または同一であるポリペプチドも包含する。変異体はまた組み換え法により生成されたこれ等のポリペプチドに実質的に相同または同一であるポリペプチドも包含する。好ましくはHMGBポリペプチドは、本明細書に記載したBLASTプログラムおよびパラメーターならびにHMGBポリペプチドの生物学的活性の1つ以上を用いて測定した場合に、配列番号1、配列番号2、配列番号3および配列番号18よりなる群から選択される配列に少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、75%、80%、85%または90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する。

10

#### 【0032】

別の実施形態においては、本発明はHMGBの生物学的活性を有するHMGBポリペプチド断片に関する。「HMGBの生物学的活性を有するHMGBポリペプチド断片」または「生物学的に活性なHMGB断片」とは、HMGBポリペプチドの活性を有するHMGBポリペプチドの断片を意味する。このようなHMGB断片の例は本明細書に記載したHMGB Bボックスである。生物学的に活性なHMGB断片は、標準的な分子生物学的手法を用い、そして、例えば本明細書に記載した方法を用いて、その断片が細胞に投与されると、適当な対照と比較した場合に細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を増大させるかどうかを調べることにより断片の機能を評価することにより、作成することができる。

20

#### 【0033】

本明細書においては、「HMGB Aボックス」とは、本明細書においては「Aボックス」とも記載し、そして、実質的に純粋な、または、実質的に純粋で単離されたポリペプチドであり、これはそれに天然に付随している成分から分離されたものであり、そして、完全長HMGBポリペプチドよりも小さいアミノ酸配列よりなり、そして、以下の生物学的活性、即ち炎症の抑制、および/または細胞からのプロ炎症サイトカインの放出の抑制、および/または炎症サイトカインカスケードの活性の低減、の1つ以上を有する。1つの実施形態においては、HMGB Aボックスポリペプチドは上記した生物学的活性の1つを有する。別の実施形態においては、HMGB Aボックスポリペプチドは上記した生物学的活性の2つを有する。第3の実施形態においては、HMGB Aボックスポリペプチドは上記した生物学的活性の3つ全てを有する。好ましくは、HMGB Aボックスは完全長HMGBポリペプチドの生物学的活性の10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%以下を有する。1つの実施形態においては、HMGB Aボックスのアミノ酸は配列番号4、配列番号22または配列番号57の配列、または、哺乳類におけるHMGBタンパク質の相当する領域のアミノ酸配列よりなる。

30

#### 【0034】

HMGB Aボックスはまた上記したAボックス配列と同様のアミノ酸配列を有する組み換えにより生成されたポリペプチドでもある。好ましくは、HMGB Aボックスは哺乳類HMGB Aボックス、例えばヒトHMGB Aボックスである。本発明のHMGB Aボックスポリペプチドは好ましくは配列番号4、配列番号22または配列番号57の配列、または、哺乳類におけるHMGBタンパク質の相当する領域のアミノ酸配列よりなる。HMGB Aボックスは約85アミノ酸以下、約4アミノ酸以上を有する場合が多い。内部にAボックスを有するポリペプチドの例は本明細書に記載したHMGBタンパク質およびポリペプチドであるが、これらに限定されない。そのようなポリペプチド中のAボックスの配列は本明細書に記載した方法を用いて、例えば本明細書に記載したAボックスとの配列の比較により、そして本明細書に記載した方法または当該分野で知られた他の方法を用いてAボックスの生物学的活性を試験することにより、測定し、そして単離することができる。

40

50

## 【0035】

HMGB Aボックスポリペプチドの別の例は以下の配列、即ち、PDASVNFSEF SKKCSERWKT MS  
AKEKGKFE DMAKADKARY EREMPTYIPP KGET (ヒトHMGB1; 配列番号40); DSSVNFAEF SKKCSERW  
KT MSAKEKSKFE DMAKSDKARY DREMKNYVPP KGDK (ヒトHMGB2; 配列番号41); PEVPVNFAEF SK  
KCSERWKT VSGKEKSKFD EMAKADKARY DREMVDYGA KGGK (ヒトHMGB3; 配列番号42); PDASVNFSE  
EF SKKCSERWKT MSAKEKGKFE DMAKADKARY EREMPTYIPP KGET (HMG1L5 (以前のHMG1L10); 配  
列番号43); SDASVNFSEF SNKCSERWKT MSAKEKGKFE DMAKADKTHY ERQMPTYIPP KGET (HMG1L1;  
配列番号44); PDASVNFSEF SKKCSERWKA MSAKDKGKFE DMAKVDKADY EREMPTYIPP KGET (HMG1L  
4; 配列番号45); PDASVKFSEF LKKCSETWKT IFAKEKGKFE DMAKADKAHY EREMPTYIPPKGEK (BAC  
クローンRP11-395A23のHMG配列; 配列番号46); PDASINFSEF SQKCPETWKT TIAKEKGKFE DMA  
KADKAHY EREMPTYIPP KGET (HMG1L9; 配列番号47); PDASVNSSEF SKKCSERWKTMTKQKGKFE DMA  
KADRAH (HMG1L8; 配列番号48); PDASVNFSEF SKKCLVRGKT MSAKEKGQFE AMARADKARY EREMPTY  
IP PKGET (LOC122441; 配列番号49); LDASVSFSEF SNKCSERWKT MSVKEKGKFE DMAKADKACY ER  
EMKIYPYL KGRQ (LOC139603; 配列番号50); およびGKGDPKKPRG KMSSYAFFVQ TCREEHKKKH PD  
ASVNFSEF SKKCSERWKT MSAKEKGKFE DMAKADKARY EREMPTYIPP KGET (ヒトHMGB1 Aボックス;  
配列番号57)を包含する。

## 【0036】

本発明のHMGB Aボックスポリペプチドは配列変異体も包含する。変異体には生物におけ  
る同じ遺伝子座によりコードされる実質的に相同性のポリペプチド、即ち対立遺伝子変異  
体、並びに他の変異体が包含される。変異体はまた生物における他の遺伝子座から誘導さ  
れているがHMGB Aボックス核酸分子、その相補体および部分によりコードされるポリペプ  
チドに対する実質的な相同性を有するか、または、HMGB Aボックス核酸分子のヌクレオチ  
ド配列を含む核酸分子によりコードされるポリペプチドに対する実質的な相同性を有する  
ポリペプチドも包含する。HMGB Aボックス核酸分子の例は当該分野で知られており、そし  
て、本明細書に記載するとおりHMGB Aボックスポリペプチドから誘導できる。変異体はま  
たこれ等のポリペプチドに実質的に相同であるか同一であるが他の生物から誘導されたポ  
リペプチド、即ちオーソログも包含する。変異体はまた、化学合成により生成されたこれ  
等のポリペプチドに実質的に相同または同一であるポリペプチドも包含する。変異体はま  
た組み換え法により生成されたこれ等のポリペプチドに実質的に相同または同一であるポ  
リペプチドも包含する。好ましくはHMGB Aボックスは、本明細書に記載したBLASTプログ  
ラムおよびパラメーターならびにHMGB Aボックスポリペプチドの生物学的活性の1つ以上  
を用いて測定した場合、本明細書に記載した方法または当該分野で知られた他の方法を用  
いて測定した場合に、本明細書に記載したHMGB Aボックスポリペプチド、例えば配列番号  
4、配列番号22または配列番号57の配列に、少なくとも60%、より好ましくは少なくとも7  
0%、75%、80%、85%または90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有す  
る。

## 【0037】

本発明はまたAボックスの生物学的活性断片も特徴とする。「Aボックスの生物学的活性  
を有するAボックス断片」または「Aボックスの生物学的活性断片」とは本明細書に記載し  
たHMGB Aボックスの活性を有するHMGB Aボックスの断片を意味する。例えばAボックス断  
片は脊椎動物細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を低減し、炎症を低減し、および/  
または炎症サイトカインカスケードの活性を低下させ得る。Aボックス断片は、標準的な  
分子生物学の手法を用い、そして、例えば本明細書に記載した方法を用いて、その断片が  
細胞に投与されると細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制するかどうかを調べる  
ことにより断片の機能を評価することにより、作製することができる。Aボックスの生物  
学的活性断片は完全長のAボックスポリペプチドが使用される本明細書に記載した方法に  
おいて、例えば細胞からのプロ炎症サイトカインの放出の抑制、または、炎症サイトカイ  
ンカスケードの活性化を特徴とする状態を有する患者の治療において使用することができ  
る。

## 【0038】

本明細書において使用される「HMGB Bボックス」とは、本明細書においては「Bボックス」とも記載し、そして、実質的に純粋な、または、実質的に純粋で単離されたポリペプチドであり、これはそれに天然に付随している成分から分離されたものであり、そして、完全長HMGBポリペプチドよりも小さいアミノ酸配列よりなり、そして、以下の生物学的活性、即ち炎症の増大、およびまたは細胞からのプロ炎症サイトカインの放出の増大、およびまたは炎症サイトカインカスケードの活性の増大、の1つ以上を有する。1つの態様においては、HMGB Bボックスポリペプチドは上記した生物学的活性の1つを有する。別の態様においては、HMGB Bボックスポリペプチドは上記した生物学的活性の2つを有する。第3の態様においては、HMGB Bボックスポリペプチドは上記した生物学的活性の3つ全てを有する。好ましくは、HMGB Bボックスは完全長HMGBポリペプチドの生物学的活性の少なくとも25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%を有する。別の態様においては、HMGB BボックスはHMGB Aボックスを含まない。

10

#### 【0039】

別の態様においては、HMGB Bボックスは完全長HMGB1ポリペプチドの長さの約90%、80%、70%、60%、50%、40%、35%、30%、25%または20%であるポリペプチドである。別の態様においては、HMGB Bボックスは配列番号5、配列番号20または配列番号58の配列あるいは哺乳動物におけるHMGBタンパク質の相当する領域のアミノ酸配列を含むかこれらよりなるが、完全長HMGBポリペプチドよりなお短いものである。HMGB Bボックスポリペプチドはまた上記したHMGB Bボックスポリペプチドと同じアミノ酸配列を有する組み換えにより生成されたポリペプチドでもある。好ましくは、HMGB Bボックスは哺乳動物HMGB Bボックス、例えばヒトHMGB Bボックスである。HMGB Bボックスは約85アミノ酸以下、約4アミノ酸以上を有する場合が多い。内部にBボックスを有するポリペプチドの例は本明細書に記載したHMGBタンパク質およびポリペプチドであるが、これらに限定されない。そのようなポリペプチド中のBボックスの配列は本明細書に記載した方法を用いて、例えば本明細書に記載したBボックスとの配列の比較により、そして本明細書に記載した方法または当該分野で知られた方法を用いて生物学的活性を試験することにより、測定し、そして単離することができる。

20

#### 【0040】

HMGB Bボックスポリペプチド配列のさらなる例は以下の配列、FKDPNAPKRP PSAFFLFCSE YRPKIKGEHP GLSIGDVAKK LGEMWNNTAA DDKQPYEKKA AKLKEKYEKD IAAY (ヒトHMGB1; 配列番号51); KDPNAPKRP PSAFFLFCSE HRPKIKSEHP GLSIGDTAKK LGEMWSEQSA KDKQPYEQKA AKLKEKYEKD IAAY (ヒトHMGB2; 配列番号52); FKDPNAPKRL PSAFFLFCSE YRPKIKGEHP GLSIGDVAKK LGEMWNNTAA DDKQPYEKKA AKLKEKYEKD IAAY (HMG1L5 (以前のHMG1L10); 配列番号53); FKDPNAPKRP PSAFFLFCSE YHPKIKGEHP GLSIGDVAKK LGEMWNNTAA DDKQPYEKKA AKLKEKYEKD IAAY (HMG1L1; 配列番号54); FKDSNAPKRP PSAFFLFCSE YCPKIKGEHP GLPISDVAKK LVEMWNNTFA DDKQLCEKKA AKLKEKYKTD TATY (HMG1L4; 配列番号55); FKDPNAPKRP PSAFFLFCSE YRPKIKGEHP GLSIGDVVKK LAGMWNNTAA ADKQFYEKKA AKLKEKYKTD IAAY (BACクローンRP11-359A23のHMG配列; 配列番号56); およびFKDPNAPKRP PSAFFLFCSE YRPKIKGEHP GLSIGDVAKK LGEMWNNTAA DDKQPYEKKA AKLKEKYEKD IAAYRAKGKP DAAKGVVKA EK (ヒトHMGB1ボックス; 配列番号58) を包含する。

30

40

#### 【0041】

本発明のHMGB Bボックスポリペプチドは配列変異体も包含する。変異体には生物における同じ遺伝子座によりコードされる実質的に相同性のポリペプチド、即ち対立遺伝子変異体、並びに他の変異体が包含される。変異体はまた生物における他の遺伝子座から誘導されているがHMGBボックス核酸分子、その相補体および部分によりコードされるポリペプチドに対する実質的な相同性を有するか、または、HMGB Bボックス核酸分子のヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるポリペプチドに対する実質的な相同性を有するポリペプチドも包含する。HMGB Bボックス核酸分子の例は当該分野で知られており、そして、本明細書に記載のHMGB Bボックスポリペプチドから誘導できる。変異体はまたこれ等のポリペプチドに実質的に相同であるか同一であるが他の生物から誘導されたポリペプチド

50

、即ちオーソログも包含する。変異体はまた、化学合成により生成されたこれ等のポリペプチドに実質的に相同または同一であるポリペプチドも包含する。変異体はまた組み換え法により生成されたこれ等のポリペプチドに実質的に相同または同一であるポリペプチドも包含する。好ましくは非天然のHMGB Bボックスポリペプチドは、本明細書に記載したBLASTプログラムおよびパラメーターを用いて測定した場合、本明細書に記載したHMGB Bボックスの配列、例えば配列番号5、配列番号20または配列番号58の配列に、少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、75%、80%、85%または90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する。好ましくはHMGB Bボックスは配列番号5、配列番号20または配列番号58の配列、または、哺乳動物におけるHMGBタンパク質の相当する領域のアミノ酸配列よりなり、そして、本明細書に記載した方法または当該分野で知られた他の方法を用いて測定した場合にHMGB Bボックスの生物学的活性の1つ以上を有する。 10

#### 【0042】

別の態様において、本発明はBボックスの生物学的活性を有するHMGB Bボックスの生物学的活性断片、または、非天然のHMGB Bボックス断片を含むポリペプチドに関する。別の態様においては、本発明は脊椎動物のHMGB BボックスまたはBボックスの生物学的活性を有するその断片、または非天然HMGB Bボックスを含むが、完全長のHMGBポリペプチドは含まないポリペプチドに関する。「Bボックスの生物学的活性を有するBボックス断片」または「Bボックスの生物学的活性断片」とはHMGB Bボックスの活性を有するHMGB Bボックスの断片を意味する。例えばBボックス断片は脊椎動物細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を誘導し得、炎症を増大させ、或は炎症サイトカインカスケードを誘導得る。このよ 20  
うなBボックス断片の例は本明細書に記載したHMGB1Bボックスの最初の20アミノ酸を含む断片（配列番号16または配列番号23）である。Bボックス断片は、標準的な分子生物学の手法を用い、そして、例えば本明細書に記載した方法または当該分野で知られた他の方法を用いて、その断片が細胞に投与されると適当な対照と比較した場合に細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を増大させるかどうかを調べることにより断片の機能を評価することにより、作製することができる。

#### 【0043】

天然または非天然のいずれかのHMGBポリペプチド、HMGB AボックスおよびHMGB Bボックスは、本明細書に記載したHMGBポリペプチド、HMGB AボックスおよびHMGB Bボックスのとの配列同一性を有するポリペプチドを包含する。本明細書においては、2つのポリペプチド（またはポリペプチドの領域）は、アミノ酸配列が少なくとも約60%、70%、75%、80%、85%、90%または95%あるいはそれ以上、相同または同一である場合に実質的に相同または同一である。2つのアミノ酸配列（2つのまたは核酸配列）の同一性パーセントは至適比較目的のために配列をアラインメントすることにより測定できる（例えばギャップを最初の配列の配列中に導入することができる）。次に対応する位置におけるアミノ酸またはヌクレオチドを比較し、そして、2つの配列の間の同一性パーセントは配列により共有される同一の位置の数の関数となる（即ち、%同一性 = 同一位置の数 / 位置の総数 × 100）。特定の態様においては、比較目的のためにアラインメントしたHMGBポリペプチド、HMGB AボックスポリペプチドまたはHMGB Bボックスポリペプチドの長さは、比較対照配列、例えば図12A~12E、図14A~14Pに示した配列、ならびに配列番号18、20および22の長さの 40  
少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも60%、更に好ましくは少なくとも70%、80%、90%または100%である。2つの配列の実際の比較は例えば数学的アルゴリズムを用いたよく知られた方法で行うことができる。このような数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例はKarlinら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877, 1993）に記載されている。このようなアルゴリズムはSchafferら（Nucleic Acids, Res., 29:2994-3005, 2001）に記載されたBLASTNおよびBLASTXプログラム（バージョン2.2）に組み込まれている。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えばBLASTN）のデフォルトパラメーターを使用できる。National Center for Biotechnology Information（NCBI）のインターネットサイトを参照できる。1つの態様においては、検索すべきデータベースは非冗長（NR）データベースであり、そし 50



て配列比較のためのパラメーターはフィルター無し;期待値は10;Word Sizeは3;MatrixはBLOSUM62;そしてGap CostはExistenceが11およびExtensionが1を有するものに設定できる。

#### 【0044】

配列の比較のために利用できる数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例はMyersおよびMiller, CABIOS (1989) のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムはGCG (Accelrys) 配列アライメントソフトウェアパッケージの部分であるALIGNプログラム (バージョン2.0) に組み込まれている。アミノ酸配列の比較のためにALIGNプログラムを利用する場合は、PAM120ウエイトレシデュートーブル、ギャップ長ペナルティー12、およびギャップペナルティー4を使用できる。配列分析のためのさらなるアルゴリズムは当該分野

10

#### 【0045】

別の態様においては、2つのアミノ酸配列の間の同一性パーセントはBlossom 63マトリックスまたはPAM250マトリックスの何れか、およびギャップウエイト12、10、8、6または4およびレングスウエイト2、3または4を用いて、GCGソフトウェアパッケージ (Accelrys, San Diego, California) 中のGAPプログラムを用いて行うことができる。更に別の態様においては2つの核酸配列の間の同一性パーセントはギャップウエイト50およびレングスウエイト3を用いて、GCGソフトウェアパッケージ (Accelrys, San Diego, California) 中のGAPプログラムを用いて行うことができる。

20

#### 【0046】

本明細書において使用される「サイトカイン」は哺乳動物細胞により天然に生産され、そしてマイクロ~ピコモル濃度において体液性の調節物質としてインビボで機能する可溶性のタンパク質またはペプチドである。サイトカインは正常または病的な条件下のいずれかにおいて個々の細胞および組織の機能的活性をモジュレートする。プロ炎症サイトカインは以下に記載する炎症に関連する生理学的反応、即ち、血管拡張、充血、浮腫に伴う血管の増大した浸透性、顆粒球および単核食細胞の蓄積、またはフィブリンの付着のいずれかを誘発できるサイトカインである。一部の場合においては、プロ炎症サイトカインはまた、例えばTNFが心筋細胞のアポトーシスを促進することがわかっている慢性心疾患の場合のようにアポトーシスを誘導することもできる (Pulkki, Ann. Med. 29:339-343, 1997;およびTsutsuiら, Immunol. Rev. 174:192-209, 2000)。

30

#### 【0047】

プロ炎症サイトカインの非限定的な例は、腫瘍壊死因子 (TNF)、インターロイキン (IL) -1、IL-1、IL-6、IL-8、IL-18、インターフェロン、HMG-1、血小板活性化因子 (PAF) およびマクロファージ遊走抑制因子 (MIF) である。

#### 【0048】

プロ炎症サイトカインは炎症のメディエーターではないIL-4、IL-10およびIL-13のような抗炎症サイトカインとは区別しなければならない。

#### 【0049】

多くの場合、プロ炎症サイトカインは、サイトカインの放出が哺乳動物の生理学的状態に影響する哺乳動物における少なくとも1つのプロ炎症サイトカインのインビボの放出として本明細書において定義する炎症サイトカインカスケードにおいて生産される。即ち、炎症サイトカインカスケードはプロ炎症サイトカインの放出が有害な生理学的状態を誘発する本発明の態様において抑制される。

40

#### 【0050】

本明細書において使用される「TNFの生物学的活性を抑制する薬剤」とはTNFの生物学的活性の1つ以上を低減する薬剤である。TNF生物学的活性の例は血管拡張、充血、浮腫に伴う血管の増大した浸透性、顆粒球および単核食細胞の蓄積、またはフィブリンの付着を包含するが、これらに限定されない。TNF生物学的活性を抑制する薬剤はTNFとTNF受容体と

50

の間の相互作用を抑制（低減）する薬剤を包含する。このような薬剤の例はTNFに結合する抗体またはその抗原結合断片、TNF受容体に結合する抗体またはその抗原結合断片、およびTNFまたはTNF受容体に結合してTNF/TNF受容体相互作用を防止する分子を包含する。このような薬剤の例は、ペプチド、タンパク質、合成分子、例えば合成有機分子、天然の分子、例えば天然の有機分子、核酸分子およびその成分を包含するが、これらに限定されない。TNFの生物学的活性を抑制する薬剤の好ましい例は、インフリキシマブ（Remicade; Centocor, Inc., Malvern, Pennsylvania）、エタネルセプト（Immunex; Seattle, Washington）、アダリムマブ（D2E7; Abbot Laboratories, Abbot Park Illinois）、CDP870（Pharmacia Corporation; Bridgewater, New Jersey）、CDP571（Celltech Group plc, United Kingdom）、レネルセプト（Roche, Switzerland）およびサリドマイドを包含する。

10

#### 【0051】

炎症サイトカインカスケードは多くの疾患の炎症およびアポトーシスを含む有害な特性に寄与している。これ等に包含されるものは、局所および全身の両方の反応を特徴とする障害、例えば非限定的に本明細書に記載した障害（例えば本明細書の背景技術に記載した状態）である。炎症サイトカインカスケードを特徴とする特定の障害は、例えば、敗血症、同種移植片拒絶、慢性関節リウマチ、喘息、狼瘡、成人呼吸窮迫症候群、慢性閉塞性肺疾患、乾癬、脾炎、腹膜炎、熱傷、心筋虚血、臓器虚血、再灌流虚血、ペーチェット病、移植片対宿主疾患、クローン病、潰瘍性結腸炎、多発性硬化症および悪液質を包含する。

#### 【0052】

20

Aボックスポリペプチドおよびその生物学的活性断片

本明細書に記載するとおり、1つの局面において、本発明はHMGで処理された細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制できるか、または、炎症サイトカインカスケードの活性化を特徴とする状態を治療するために使用できる、脊椎動物HMGB Aボックスまたはその生物学的活性断片を含むポリペプチド組成物に関する。特定の態様において、本発明はTNFの生物学的活性を抑制する薬剤、例えばインフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、CDP870、CDP571、レネルセプトおよびサリドマイドの1つ以上と組み合わせて、HMGB Aボックスまたはその生物学的活性断片もしくは変異体を含む組成物に関する。このような組成物はHMGを投与した脊椎動物細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制するために使用でき、および/または、炎症サイトカインカスケードの活性化を特徴とする状態を治療するために使用できる。

30

#### 【0053】

プロ炎症サイトカインの放出に対する本発明の組成物または方法の何れかの作用に言及する場合は、「抑制」または「低減」という用語は、プロ炎症サイトカイン放出の少なくとも少しではあるが測定可能な低減を包含する。好ましい態様においては、プロ炎症サイトカインの放出は非処理対照よりも少なくとも20%抑制され；より好ましい態様においては、抑制は少なくとも50%であり；更により好ましい態様においては、抑制は少なくとも70%であり；そして最も好ましい態様においては、抑制は少なくとも80%である。抑制は本明細書に記載した方法または当該分野で知られた他の方法を用いて評価できる。プロ炎症サイトカイン放出のこのような低減はインビボの態様における炎症サイトカインカスケードの有害な作用を低減することができる。

40

#### 【0054】

HMGB Aボックス（例えば脊椎動物HMGB Aボックス）は高水準の配列保存性（例えばラット、マウスおよびヒトのHMGBポリペプチドのアミノ酸配列の比較に関する図13を参照）を有しているため、HMGB Aボックス（例えば脊椎動物HMGB Aボックス）はHMGBで処理した脊椎動物細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制できると考えられる。従って、HMGB Aボックス（例えば脊椎動物HMGB Aボックス）は本発明の範囲内に含まれる。好ましくは、HMGB Aボックスは脊椎動物HMGB Aボックス（例えば哺乳動物HMGB Aボックス、例えば配列番号4、配列番号22または配列番号57として本明細書に示されるヒトHMGB1 Aボックス）である。更にまた本発明は、本明細書に記載するとおりHMGB Aボックスの生物学的活性を

50

有するHMGB1 Aボックスの断片も包含される。

【0055】

当業者の知るとおり、非天然のHMGB Aボックス（またはその生物学的活性断片）を特に予定外の実験を行うことなく作製することができ、これは脊椎動物HMGBで処理された脊椎動物細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制する。このような非天然の機能的Aボックス（変異体）は、種々の原料からHMGB Aボックスのアミノ酸配列をアラインメントし、そして、Aボックスが異なるアミノ酸位置における配列の1つにおいて置換1つ以上を起こすことにより作製できる。置換は好ましくは比較するAボックス中に存在するものと同じアミノ酸残基を用いて行う。或は、保存的置換を残基の何れかから行う。

【0056】

保存的アミノ酸置換とは類似する側鎖を有する残基の互換性を指す。保存的に置換されたアミノ酸はその側鎖の化学特性に従ってグループ分けできる。例えばアミノ酸の1つのグループは中性および疎水性の側鎖を有するアミノ酸であり（a, v, l, i, p, w, fおよびm）；別のグループは中性および極性の側鎖を有するアミノ酸であり（g, s, t, y, c, nおよびq）；別のグループは塩基性側鎖を有するアミノ酸であり（k, rおよびh）；別のグループは酸性の側鎖を有するアミノ酸であり（dおよびe）；別のグループは脂肪族側鎖を有するアミノ酸であり（g, a, v, lおよびi）；別のグループは脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸であり（sおよびt）；別のグループはアミン含有側鎖を有するアミノ酸であり（n, q, k, rおよびh）；別のグループは芳香族側鎖を有するアミノ酸であり（f, yおよびw）；ならびに別のグループはイオウ含有側鎖を有するアミノ酸である（cおよびm）。好ましい保存的アミノ酸置換のグループはr-k、e-d、y-f、l-m、v-iおよびq-hである。

【0057】

保存的アミノ酸置換はHMGB Aボックスポリペプチドの生物学的活性を保持することが期待されるが、以下に示すものは、ヒトHMGB1 Aボックス（配列番号4）をヒトHMGB2 Aボックスの配列番号3の残基32～85（配列番号17）と比較することにより、どのようにして非天然のAボックスポリペプチド（変異体）が作製できるかの1例である。

HMGB1 pdasvnfsef skkcserwkt msakekgkfe dmakadkary eremktyipp kget（配列番号4）；  
HMGB2 pdssvnfaef skkcserwkt msakekskfe dmaksdkary dremknyvpp kgdk（配列番号17）

【0058】

非天然HMGB Aボックスは、例えばHMGB1 Aボックスの第3位におけるアラニン（a）残基をHMGB2 Aボックスの第3位に存在するセリン（s）残基で置換することにより作製できる。当業者の知るとおり、s残基はHMGB2 Aボックスのその位置において機能できるため、置換は機能的な非天然Aボックスを与える。或は、HMGB1 Aボックスの第3位をアラニンまたはセリンに対して保存的な何れかのアミノ酸、例えばグリシン（g）、スレオニン（t）、バリン（v）またはロイシン（l）で置換できる。当業者の認識する通り、このような置換は、Aボックスは第3位において不変異体ではなく、保存的置換はその位置において天然に存在するアミノ酸に対する十分な構造的代替物を与えるため、機能的Aボックスをもたらすと期待される。

【0059】

上記した方法に従って、非常に多くの非天然のHMGB Aボックスを特に予定外の実験を行うことなく作製でき、これ等は機能的であることが期待され、そして、何れかの特定の非天然のHMGB Aボックスの機能性が十分な正確さで予測できる。何れの場合においても、何れかの非天然のHMGB Aボックスの機能性はそれをHMGBポリペプチドと共に細胞に単に添加し、そして例えば本明細書に記載した方法を用いて細胞によるプロ炎症サイトカインの放出をAボックスが抑制するかどうかを調べることにより、特に予定外の実験を行うことなく調べることができる。

【0060】

AボックスまたはAボックスの生物学的活性断片がHMGB誘導プロ炎症サイトカインの放出を抑制する細胞はプロ炎症サイトカインを産生するように誘導できる何れかの細胞である

10

20

30

40

50

こともできる。好ましい態様においては、細胞は哺乳動物の細胞、例えば免疫細胞（例えばマクロファージ、単球または好中球）である。

【0061】

現在知られているか、または、後に発見される、何れかの単一のプロ炎症サイトカインの産生を抑制することができるAボックスまたはAボックスの生物学的活性断片を含むポリペプチドは本発明の範囲に包含される。好ましくは、抗体はTNF、IL-1 および/またはIL-6の産生を抑制できる。最も好ましくは、抗体は脊椎動物細胞により産生される何れかのプロ炎症サイトカインの産生を抑制できる。

【0062】

Bボックスポリペプチドおよびその生物学的活性断片

10

本明細書に記載したとおり、1つの局面において、本発明は脊椎動物HMGB Bボックスまたはその生物学的活性断片を含むポリペプチド組成物に関し、これはHMGBを投与した脊椎動物細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を増大させることができる。

【0063】

プロ炎症サイトカインの放出に対する本発明の組成物または方法の何れかの作用に言及する場合、「増大させる」という用語の使用は、プロ炎症サイトカイン放出の少なくとも僅かではあるが測定可能な上昇を包含する。好ましい態様においては、プロ炎症サイトカインの放出は非投与対照と比較して、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも5倍、または少なくとも10倍増大する。このようなプロ炎症サイトカイン放出の増大はインビボの態様における炎症サイトカインカスケードの作用を増大させることができる。このよう

20

【0064】

全てのHMGB Bボックスが高い水準の配列保存を示すため（例えばラット、マウスおよびヒトのHMGBポリペプチドのアミノ酸配列の比較に関する図13を参照）、機能的な非天然のHMGB Bボックスは、機能的な非天然のAボックスの作製について上記した通り、1つ以上の保存的アミノ酸置換を行うか、または、種々の原料に由来する天然に存在する脊椎動物Bボックスを比較し、類縁のアミノ酸を置換することにより、予定外の実験を行うことなく作製できる。特に好ましい態様においては、BボックスはヒトHMGB1Bボックスの配列（3種の異なる長さ）である配列番号5、配列番号20または配列番号58を含むか、または、図14A～14Pに示すポリペプチドに由来するBボックス配列を含むか、Bボックスの生物学的活性

30

【0065】

HMGBおよびHMGB Bボックスポリペプチドに対する抗体

本発明はまたHMGBポリペプチドまたはその生物学的活性断片に結合する抗体（抗HMGB抗体）の精製された調製物に関する。抗HMGB抗体は中和抗体であることができる（即ちHMGBポリペプチドまたはその生物学的活性断片の生物学的活性、例えば、HMGBにより誘導された脊椎動物細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制することができる）。本発明はまた、脊椎動物の高移動度群タンパク質（HMGB）Bボックスまたはその生物学的活性断片に特異的に結合するがHMGBの非Bボックスエピトープには選択的に結合しない抗体（抗HMGB Bボックス抗体）の精製された調製物に関する。これ等の態様において、抗体はまた中和抗体であることもできる（即ちこれ等はBボックスポリペプチドまたはその生物学的活性断片の生物学的活性、例えばHMGBにより誘導された脊椎動物細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制することができる）。このような抗体はTNFの生物学的活性を抑制する1つ以上の薬剤、例えばインフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、CDP870、CDP571、レネルセプトまたはサリドマイドと組み合わせることができる。

40

【0066】

50

本明細書において使用される「抗体」または「精製された抗体」という用語は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、即ち抗原に選択的に結合する抗原結合部位を含む分子を指す。本発明のポリペプチドに選択的に結合する分子はポリペプチドまたはその断片には結合するが、試料、例えばポリペプチドを天然に含有する生物学的試料中の他の分子には実質的に結合しない分子である。好ましくは抗体はそれが天然に会合しているタンパク質および天然の有機分子を含まずに少なくとも60重量%である。より好ましくは抗体調製物は少なくとも75%または90%、最も好ましくは99重量%抗体である。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例は、ペプシンのような酵素で抗体を処理することにより生成することができるF(ab)およびF(ab')<sub>2</sub>断片を包含する。

10

#### 【0067】

本発明は本発明のHMGB Bボックスポリペプチドに選択的に結合するポリクローナルおよびモノクローナル抗体を提供する。本明細書において使用される「モノクローナル抗体」または「または組成物」という用語は、本発明のポリペプチドの特定のエピトープと免疫反応することができる抗原結合部位の唯一の種のみを含有する抗体分子の集団を指す。即ち、モノクローナル抗体組成物は典型的には、それが免疫反応する本発明の特定のポリペプチドに対する単一の結合アフィニティを示す。

#### 【0068】

ポリクローナル抗体は例えば本明細書に記載するとおり、適当な被験体を所望の免疫原、例えば本発明のHMGB Bボックスポリペプチドまたはその断片で免疫化することにより調製できる。免疫化された被験体の抗体力価は固定化ポリペプチドを用いた酵素連結免疫吸着試験(ELISA)のような標準的な手法により経時的にモニタリングできる。所望により、ポリペプチドに指向させた抗体分子を哺乳動物(例えば血液)から単離してプロテインAクロマトグラフィーのようなよく知られた手法により更に精製することによりIgG画分を得ることができる。

20

#### 【0069】

免疫化後の適切な時点において、例えば、抗体力価が最高値となった時点で、抗体産生細胞を被験体から取得し、これを使用して、KohlerおよびMilstein(Nature 256:495-497, 1975)が最初に記載したハイブリドーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kozborら, Immunol. Today 4:72, 1983)、EBVハイブリドーマ法(Coleら, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985)またはトリオーマ法のような標準的な手法によりモノクローナル抗体を調製できる。ハイブリドーマを生産する手法はよく知られている(一般的にはCurrent Protocols in Immunology, Coliganら, (編) John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1994を参照)。簡単には、不死化細胞株(典型的には骨髓腫)を上記したとおり免疫原で免疫化した哺乳動物から得たリンパ球(典型的には脾細胞)に融合し、そして得られたハイブリドーマ細胞の培養上清をスクリーニングして特定のポリペプチド(例えば本発明のポリペプチド)に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定する。

30

#### 【0070】

リンパ球と不死化細胞系を融合するための多くの知られたプロトコルの何れかを本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を作製する目的に適用させることができる(例えばCurrent Protocols in Immunology, 上出; Galfreら(Nature, 266:55052, 1977); R. H. Kenneth, Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); Lerner(Yale J. Biol. Med. 54:387-402, 1981)参照)。更にまた、当業者の知る通り同様に有用であるこのような方法の多くの変法がある。

40

#### 【0071】

モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを調製する一つの代替法において、本発明のHMGB Bボックスポリペプチドに対するモノクローナル抗体は、ポリペプチドを用いて組み換えのコンビナトリアルな免疫グロブリンライブラリ(例えば抗体ファージディスプレイラ

50

イブラリ)をスクリーニングすることによりポリペプチドに結合する免疫グロブリンライブラリメンバーを単離することにより、発見し、単離することができる。ファージディスプレイライブラリを作製してスクリーニングするためのキットは市販されている(例えばPharmacia Recombinant Phage Antibody System, カタログ番号27-9400-01;およびStratagene SurfZAP(商標) Phage Display Kit, カタログ番号240612)。更にまた、抗体ディスプレイライブラリを作製してスクリーニングする際に特に適する方法および試薬の例は、例えば米国特許5,223,409号;国際公開第W092/18619号;国際公開第W091/17271号;国際公開第W092/20791号;国際公開第W092/15679号;国際公開第W093/01288号;国際公開第W092/01047号;国際公開第W092/09690号;国際公開第W090/02809号;Fuchsら, Bio/Technology 9:1370-1372, 1991;Hayら, Hum. Antibod. Hybridomas3:81-85, 1992;Huseら, (Science 246:1275-1281, 1989);Griffithsら(EMBO J. 12:725-734, 1993に記載されている。

10

#### 【0072】

更にまた、標準的な組み換えDNA手法を用いて作製できるヒトおよび非ヒト部分の両方を含むキメラまたはヒト化モノクローナル抗体のような組み換え抗体も本発明の範囲に包含される。このようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は当該分野で知られた組み換えDNA手法で生産することができる。

#### 【0073】

一般的に、本発明の抗体(例えばモノクローナル抗体)はアフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降法のような標準的な手法により本発明のHMGB Bボックスポリペプチドを単離するために使用できる。ポリペプチド特異的抗体は細胞からの天然のポリペプチドおよび宿主細胞内に発現される組み換え生産されたポリペプチドの精製を容易にする。更にまた、本発明のHMGB Bボックスポリペプチドに特異的な抗体を用いてポリペプチド(例えば細胞溶解物、細胞上清または組織試料中)を検出することによりポリペプチドの発現の量およびパターンを評価することができる。

20

#### 【0074】

脊椎動物HMGBポリペプチドおよびHMGB Bボックスは高水準の配列保存性を示しているため、脊椎動物HMGBポリペプチドまたはHMGB Bボックスは一般的に脊椎動物細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を誘導できると考えられている。従って、脊椎動物HMGBポリペプチドまたはHMGB Bボックスに対する抗体は本発明の範囲に包含される。1つの態様においては、抗体は中和抗体である。

30

#### 【0075】

好ましくは、HMGBポリペプチドは本明細書に記載した哺乳動物HMGであり、より好ましくは哺乳動物HMGB1ポリペプチド、最も好ましくは本明細書において配列番号1として示したヒトHMGB1ポリペプチドである。抗体はまたHMGBポリペプチドの生物学的活性を有するHMGBポリペプチド断片に対して指向されたものであることもできる。

#### 【0076】

好ましくは、HMGB Bボックスは哺乳動物HMGB Bボックス、より好ましくは哺乳動物HMGB1Bボックス、最も好ましくは本明細書において配列番号5、配列番号20または配列番号58として示したヒトHMGB1Bボックスである。抗体はまたBボックスの生物学的活性を有するHMGB Bボックス断片に対して指向されたものであることができる。

40

#### 【0077】

HMGB免疫原またはHMGB Bボックス免疫原に対して作製された抗体は、HMGBポリペプチドまたはその断片、HMGB Bボックスまたはその断片、またはHMGBポリペプチド、HMGB Bボックスまたはその断片を含有する細胞を動物、好ましくは非ヒトに対し、日常的プロトコルを用いて投与することにより得ることができる。抗原性または免疫学的に等価である誘導体のようなポリペプチドを抗原として用いることによりマウスまたは他の動物、例えばラットまたはニワトリを免疫化する。免疫原は例えばコンジュゲーションにより免疫原性担体タンパク質、例えばウシ血清アルブミン(BSA)またはスカシガイヘモシアニン(KLH)と会合させ得る。或は、HMGBまたはHMGB Bボックスまたは断片のマルチコピーを含むマル

50

チ抗原ペプチドは免疫原性を改善するために十分抗原性であり、担体を不必要とする。各々が異なるHMGBまたはHMGB Bボックスのエピトープに対して指向している2つの抗原結合ドメインを有するに二重特異的な抗体もまた日常的な方法により生産してよい。

【0078】

モノクローナル抗体の調製のためには、連続細胞株培養により産生される抗体を与える当該分野で知られた何れかの方法を使用できる。例えばKohlerおよびMilstein, 上出;およびColeら, 上出を参照できる。

【0079】

1本鎖抗体の生産のための手法(米国特許4,946,778号)をHMGB、Bボックスまたはその断片に対する1本鎖抗体を生産するために採用できる。更にまたトランスジェニックマウスまたは他の生物、例えば他の哺乳動物を使用してヒト化抗体を発現してもよい。

【0080】

インビボの用途において抗体を治療的に使用する場合は、抗体は好ましくは個体内において免疫原性が低くなるように修飾する。例えば個体がヒトである場合は抗体は好ましくは「ヒト化」され、即ち、抗体の相補性決定領域をヒト抗体に移入する(例えばJonesら(Nature 321:522-525, 1986);およびTempestら(Biotechnology 9:226-273, 1991)に記載)。

【0081】

抗Bボックス抗体を保有しているかどうかについてスクリーニングされたヒトから得たかまたはナイーブのライブラリから得た、リンパ球のPCR増幅v遺伝子のレパートリーから得たポリペプチドに対して、結合活性を有する抗体遺伝子を選択するためにファージディスプレイ法も用いることができる(McCaffertyら, Nature 348:552-554, 1990;およびMarksら, Biotechnology 10:779-783, 1992)。これ等の抗体のアフィニティーはまた鎖シャッフリングにより改善することもできる(Clacksonら, Nature 352:624-628, 1991)。

【0082】

HMGBエピトープまたはHMGB Bボックスエピトープに特異的に結合する抗体が得られたら、次にそれらを、予定外の実験を行うことなく、プロ炎症サイトカインの放出を抑制する能力の有無についてスクリーニングすることができる。何れかの単一のプロ炎症サイトカインの生産の抑制、および/または、細胞からのプロ炎症サイトカインの放出の抑制、および/または炎症サイトカインカスケードの活性化を特徴とする状態の抑制が可能である抗HMGB Bボックス抗体は本発明の範囲内である。好ましくは、抗体はTNF、IL-1 および/またはIL-6の生産を抑制できる。最も好ましくは、抗体は脊椎動物細胞により生産される何れかのプロ炎症サイトカインの生産を抑制できる。

【0083】

HMGB Bボックスまたはその生物学的活性断片に対する抗体を使用した細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制する方法、または、炎症サイトカインカスケードの活性化を特徴とする状態を治療する方法のためには、細胞はプロ炎症サイトカインを生産するように誘導できる如何なる細胞であることもできる。好ましい態様においては、細胞は免疫細胞、例えばマクロファージ、単球または好中球である。

【0084】

HMGB Aボックスポリペプチド、HMGBに対する抗体、HMGB Bボックスに対する抗体およびTNF生物学的活性の抑制剤の1つ以上を含む組成物

特定の態様においては、本発明は、薬学的に許容される担体中に上記のポリペプチド(例えばHMGB Aボックスポリペプチドまたは本発明に記載した生物学的活性断片)の何れかを含む組成物に関する。適当な薬学的に許容される担体は本明細書に記載したものを包含する。これ等の態様においては、組成物は炎症サイトカインカスケードの活性化を特徴とする状態を抑制できる。状態は炎症サイトカインカスケードが内毒素ショックのような全身反応を誘発するものであり得る。或は、状態は慢性関節リウマチの場合のように局在化した炎症サイトカインカスケードにより媒介され得る。本発明により有用な治療ができる状態の非限定的な例は、本明細書の背景技術のセクションにおいて列挙した状態を包含す

10

20

30

40

50

る。1つの態様においては、治療対象の状態は、虫垂炎、消化性潰瘍、胃潰瘍および十二指腸潰瘍、腹膜炎、膵炎、潰瘍性、偽膜性、急性および虚血性の結腸炎、肝炎、クローン病、喘息、アレルギー、アナフィラキシーショック、臓器虚血症、再灌流傷害、臓器壊死、枯草熱、セブシス、敗血症、内毒素ショック、悪液質、敗血症性流産、播種性菌血症、熱傷、アルツハイマー病、セルリアック病、うっ血性心障害、成人呼吸窮迫症候群、脳梗塞、脳塞栓、脊髄傷害、麻痺、同種移植片拒絶、移植片対宿主疾患を包含する。別の態様においては、状態は内毒素ショックまたは同種移植片拒絶を包含する。状態が同種移植片拒絶である場合は、組成物は好都合にはシクロスポリンのような同種移植片拒絶の抑制に使用される免疫抑制剤を含有してもよい。

#### 【0085】

10

別の態様においては、本発明は、薬学的に許容される担体中に上記の抗体調製物（例えば抗HMGB Bボックス抗体または本発明に記載したその生物学的活性断片）を含む組成物に関する。これ等の態様においては、組成物は炎症サイトカインカスケードの活性化を特徴とする状態を抑制できる。これ等の組成物で治療できる状態は前述において列挙したとおりである。

#### 【0086】

別の態様においては、本発明は上記したHMGB Aボックスポリペプチド、および/またはHMGBに結合する抗体またはその抗原結合断片、および/または、HMGB Bボックスに結合する抗体またはその抗原結合断片、およびTNF生物学的活性を抑制する薬剤のいずれかを含む組成物（総称して「併用療法組成物」と称する）に関する。TNF生物学的活性を抑制する薬剤の好ましい例はインフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、CDP870、CDP571、レネルセプトおよびサリドマイドである。このような併用療法組成物は更に薬学的に許容される担体を含むことができる。適当な薬学的に許容される担体は本明細書に記載したものを包含する。これ等の態様においては、併用療法組成物は炎症サイトカインカスケードの活性化を特徴とする状態の抑制、および/または、細胞からのプロ炎症サイトカインの放出の抑制が可能である。状態は炎症サイトカインカスケードが内毒素ショックのような全身反応を誘発するものであり得る。或は、状態は慢性関節リウマチの場合のように局在化した炎症サイトカインカスケードにより媒介され得る。本発明により有用な治療ができる状態の非限定的な例は、本明細書の背景技術のセクションにおいて列挙した状態を包含する。1つの態様においては、治療すべき状態は、セブシス、同種移植片拒絶、慢性関節リウマチ、喘息、狼瘡、成人呼吸窮迫症候群、慢性閉塞性肺疾患、乾癬、膵炎、腹膜炎、熱傷、心筋虚血、臓器虚血、再灌流虚血、ペーチェット病、移植片対宿主疾患、クローン病、潰瘍性結腸炎、多発性硬化症および悪液質を包含する。好ましくは併用療法組成物は細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制するため、および/または、炎症サイトカインカスケードの活性化を特徴とする状態を治療するために十分な量、これを必要とする患者に投与する。1つの態様においては、本明細書に記載した方法または当該分野で知られている他の方法を用いて評価した場合に、プロ炎症サイトカインの放出は少なくとも10%、20%、25%、50%、75%、80%、90%または95%抑制される。

20

30

#### 【0087】

ポリペプチド（例えばHMGB Aボックスポリペプチドまたはその生物学的活性断片）、抗体（例えば抗HMGB Bボックス抗体またはその生物学的活性断片）または併用療法組成物（例えばHMGB Aボックスポリペプチドまたはその生物学的活性断片およびTNF生物学的活性を抑制する薬剤、および/または、HMGBに結合する抗体またはその抗原結合断片およびTNF生物学的活性を抑制する薬剤、および/または、HMGB Bボックスに結合する抗体またはその抗原結合断片およびTNF生物学的活性を抑制する薬剤）と共に含まれる担体または賦形剤は治療用途における組成物の投与の予測される経路に基づいて選択される。組成物の投与経路は治療すべき状態により異なる。例えば、内毒素ショックのような全身障害の治療のためには静脈内注射が好ましく、そして胃潰瘍のような胃腸障害の治療のためには経口投与が好ましい。投与経路および投与すべき組成物の用量は標準的な用量 - 応答試験により、予定外の実験を行うことなく、当業者が決定できる。このような決定を行う際に考

40

50



慮すべき関連の状況は、治療すべき状態、投与される組成物の選択、個々の患者の年齢、体重および応答、および患者の症状の重症度を包含する。即ち、状態に応じて、抗体組成物は経口、非経口、鼻内、腔内、直腸内、舌、舌下、頬、頬内および経皮的に患者に投与できる。

#### 【0088】

従って、経口、舌、舌下、頬、頬内への投与のために設計された組成物は、例えば不活性の希釈剤または食用担体を用いて、当該分野でよく知られた手段により予定外の実験を行うことなく作製できる。組成物はゼラチンカプセル内に封入するか、または、錠剤中に圧縮してもよい。経口治療用の投与の目的のためには、本発明の医薬組成物は賦形剤と共に配合し、錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウエハース、チューインガム等の形態で使用してよい。

10

#### 【0089】

錠剤、丸薬、カプセル、トローチ等はまたバインダー、賦形剤(recipient)、崩壊剤、潤滑剤、甘味剤およびフレーバー剤を含有してよい。バインダーの一部の例は微晶質セルロース、トラガカントガムおよびゼラチンである。賦形剤の例は澱粉および乳糖を包含する。崩壊剤の一部の例はアルギン酸、コーンスターチ等を包含する。潤滑剤の例はステアリン酸マグネシウムおよびステアリン酸カリウムを包含する。流動促進剤の例はコロイド状の酸化ケイ素である。甘味剤の一部の例はスクロース、サッカリン等を包含する。フレーバー剤の例はペパーミント、サリチル酸メチル、オレンジフレーバー等を包含する。これ等の種々の組成物を調製する際に使用する物質は薬学的に純粋であり、使用量において

20

#### 【0090】

本発明の組成物は例えば静脈内、筋肉内、髄腔内または皮下注射のように非経口的に容易に投与できる。非経口投与は本発明の組成物を溶液または懸濁液中に組み込むことにより行うことができる。このような溶液または懸濁液はまた、滅菌希釈剤、例えば注射用水、生食、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールおよび/または他の合成溶媒を含有してよい。非経口製剤はまた抗細菌剤、例えばベンジルアルコール、および/またはメチルパラベン、抗酸化剤、例えばアスコルビン酸および/または重亜硫酸ナトリウムおよびキレート剤、例えばEDTAを含有してよい。緩衝剤、例えば酢酸塩、クエン酸塩および/またはリン酸塩および浸透圧調節剤、例えば塩化ナトリウムおよび/またはデキストロースも添加してよい。非経口製剤はガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジまたは複数回投薬バイアルに充填できる。

30

#### 【0091】

直腸投与には直腸または大腸内に医薬組成物を投与することを包含する。これは坐剤または浣腸を用いて行うことができる。坐剤製剤は当該分野で知られた方法により容易に作製できる。例えば、坐剤製剤はグリセリンを約120 に加熱し、ポリペプチド組成物、抗体組成物および/または併用療法組成物をグリセリンに溶解し、加熱されたグリセリンを混合し、その後精製水を添加し、熱混合物を坐剤鋳型に注入することにより調製できる。

#### 【0092】

経皮投与には皮膚を経由する組成物の経皮吸収が包含される。経皮製剤は貼付剤、軟膏、クリーム、ジェル、膏薬等を包含する。

40

#### 【0093】

本発明は組成物の治療有効量を哺乳動物(例えばヒト)に経鼻投与することを包含する。本明細書においては経鼻投与または鼻内投与には患者の鼻道または鼻腔の粘膜に組成物を投与することを包含する。本明細書においては組成物の鼻内投与用の医薬組成物は例えば鼻スプレー、点鼻薬、懸濁液、ジェル、軟膏、クリームまたは粉末剤として投与するためのよく知られた方法で調製された治療有効量のポリペプチド、抗体および/または併用療法剤を含有する。組成物の投与は鼻タンポンまたは鼻スポンジを用いて行ってもよい。

#### 【0094】

本明細書に記載した医薬組成物(例えばポリペプチド組成物、抗体組成物および/または

50

は併用療法組成物)はまた早期セブシスメディエーターの拮抗剤を包含する。本明細書においては何れかの早期セブシスメディエーターは炎症サイトカインカスケードの誘導(例えばLPSへの曝露)後即座(即ち30~60分以内)に細胞から放出されるプロ炎症サイトカインである。これ等のサイトカインの非限定的な例はTNF、IL-1、IL-1、IL-6、PAFおよびMIFである。早期セブシスメディエーターとしてやはり包含されるものは、これ等のサイトカインの受容体(例えば腫瘍壊死因子受容体1型)およびこれ等のサイトカインの生産に必要な酵素、例えばインターロイキン-1変換酵素)である。現在知られている、または後に発見される早期セブシスメディエーターの拮抗剤は炎症サイトカインカスケードを更に抑制することによりこれ等の態様のために有用である。

#### 【0095】

早期セブシスメディエーターの拮抗剤の非限定的な例は早期セブシスメディエーターのmRNAに結合してその発現を防止するアンチセンス化合物(例えばOjwangら(Biochemistry 36:6033-6045, 1997);Pampferら(Biol. Reprod. 52:1316-1326, 1995);米国特許6,228,642号;Yahataら,(Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 6:55-61, 1996);およびTaylorら,(Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 8:199-205, 1998)参照)、早期セブシスメディエーターのmRNAを特異的に切断するリボザイム(例えばLeavittら,(Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10:409-414, 2000)Hendrixら,(Biochem. J. 314(Pt.2):655-661, 1996)参照)、および早期セブシスメディエーターに結合してその作用を抑制する抗体(例えばKamおよびTargan(Expert Opin. Pharmacother. 1:615-622, 2000);Nagahiraら,(J. Immunol. Methods 222, 83-92, 1999);Lavigneら(J. Cereb. Blood Flow Metab. 18:52-58, 1998);およびHolmesら(Hybridoma 19:363-367, 2000)参照)である。現在知られている、または後に発見される早期セブシスメディエーターの拮抗剤の何れかが本発明の範囲に包含される。当業者は通常の用量-応答試験により予定外の実験を行うことなく何れかの特定の炎症サイトカインカスケードを抑制するためのこれ等の組成物中に使用するための早期セブシスメディエーターの量を決定できる。

#### 【0096】

本明細書に記載した組成物と共に投与できる他の薬剤は、例えばVitaxin(商標)および他の抗体ターゲティング<sub>v</sub><sub>3</sub>インテグリン(例えば米国特許5,753,230号、国際公開第WO 00/78815号および第WO 02/70007号参照;参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)および抗-IL-9抗体(例えば国際公開第W097/08321号参照;参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)を包含する。本明細書に記載したポリペプチド組成物と共に投与できる別の薬剤は例えばB7拮抗剤(例えばCTLA4Ig、抗-CD80抗体、抗-CD86抗体)、メトトレキセート、および/またはCD40拮抗剤(例えば抗-CD40リガンド(CD40L))を包含する(例えばSaitoら,J. Immunol. 160(9):4225-31(1998)参照)。

#### 【0097】

さらなる態様においては、本発明はまた哺乳動物細胞からのプロ炎症サイトカインの放出を抑制する方法にも関する。方法は、上記したHMGB Aボックス組成物の何れか、および/または、HMGB BボックスまたはHMGB Bボックスの生物学的活性断片抗体の組成物の何れか、および/または、併用療法組成物の何れかで細胞を処理することを包含する。この方法はプロ炎症サイトカインを生産する何れかの哺乳動物細胞からのサイトカインの放出を抑制するために有用であると考えられる。しかしながら好ましい態様においては、プロ炎症サイトカインのマクロファージ生産が幾つかの重要な疾患に関連していることから、細胞はマクロファージである。

#### 【0098】

この方法は哺乳動物細胞により生産される何れかのプロ炎症サイトカインの抑制のために有用である。好ましい態様においては、プロ炎症サイトカインはTNF、IL-1、IL-1、MIFおよび/またはIL-6であるが、その理由はこれ等のプロ炎症サイトカインは疾患の特に重要なメディエーターであるためである。

#### 【0099】

これ等の態様の方法は細胞におけるプロ炎症性サイトカイン産生の生物学的特徴を測定

するための研究の場合など、インビトロの応用に有用である。しかしながら、好ましい態様は、炎症性サイトカインカスケードの活性化を特徴とする状態に罹患しているかその危険性がある患者に細胞が存在するインビボの治療への応用である。

#### 【0100】

特定の態様において、本発明は炎症性サイトカインカスケードの活性化を特徴とする患者における状態を処置する方法に関する。方法は前述した何れかのHMGB Aボックス組成物（非天然のAボックスポリペプチドおよびAボックスの生物学的活性断片を含む）、何れかのHMGB BボックスまたはBボックスの生物学的活性断片の抗体組成物（非天然のBボックスポリペプチドまたはその生物学的活性断片を含む）および/または何れかの複合療法組成物を患者に投与することを包含する。この方法は以前に列挙した何れかのものを含む炎症性サイトカインカスケードにより媒介される何れかの状態に対して有用であると期待される。前述したインビボの方法の場合と同様、好ましい状態は、虫垂炎、消化性潰瘍、胃潰瘍および十二指腸潰瘍、腹膜炎、膵炎、潰瘍性、偽膜性、急性および虚血性の大腸炎、肝炎、クローン病、喘息、アレルギー、アナフィラキシーショック、臓器虚血、再灌流傷害、臓器壊死、枯草熱、セプシス、敗血症、内毒素ショック、悪液質、敗血性流産、播種性菌血症、熱傷、アルツハイマー病、脳梗塞、脳塞栓症、脊髄損傷、麻痺、同種移植拒絶、または対宿主性移植片病を包含する。最も好ましい態様においては、状態は内毒素ショックまたは同種移植拒絶である場合は、組成物はまた、好都合にはシクロスポリンのような同種移植拒絶の抑制に使用される免疫抑制剤を含有してもよい。

10

20

#### 【0101】

これ等の方法はまた、早期セプシスメディエーターの拮抗剤、抗  $\gamma$   $\gamma$   $\gamma$  抗体、抗 IL-9 抗体、B7拮抗剤（例えばCTLA4Ig、抗CD80抗体、抗CD86抗体）、メトトレキサート、および/またはCD40拮抗剤（例えば抗CD40リガンド（CD40L））の投与を有用に包含することができる。これ等の薬剤の性質は前述した通りである。

#### 【0102】

本明細書に記載したBボックスポリペプチドおよびその生物学的活性断片はインビトロもしくはエクスピボで適切な単離された細胞において、または、インビボの処置として、炎症性サイトカインの誘導のために使用できる。これ等の処置のいずれかにおいて、ポリペプチドまたは断片はBボックスまたはBボックス断片が処置される細胞または患者において合成されるようにコードされたBボックスまたはBボックス断片に作動可能に連結した適切な制御配列を、BボックスまたはBボックス断片をコードするDNAまたはRNAベクターに与えることにより投与できる。インビボの応用は体重減少処置としてのBボックスポリペプチドまたはBボックス断片ポリペプチドまたはベクターの使用を包含する。HMGB1を用いた処置が体重減少を誘導することを明らかにしているW0 00 / 47104を参照のこと（参照によりその全体が本明細書に援用される）。

30

#### 【0103】

特定の態様においては、本発明は細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を刺激する方法に関する。方法はBボックスポリペプチドまたは生物学的活性Bボックス断片ポリペプチド、例えば本明細書に記載した配列番号：5、配列番号：20、配列番号：58、配列番号：16または配列番号：23の配列を含むかこれらよりなるポリペプチド（非天然のBボックスポリペプチドおよび断片を含む）の何れかで細胞を処理することを含む。この方法はインビトロの応用、例えば生産細胞の生物学的特徴に対するプロ炎症性サイトカインの生産の影響の検討のために有用である。HMGB BボックスはHMGBタンパク質の活性を有するため、Bボックスはまた体重減少を誘導すると期待される。従って、さらなる態様においては、本発明は患者において体重の減少をもたらす、または肥満を処置するための方法である。方法は、有効量の、本明細書に記載したBボックスポリペプチドまたはBボックス断片ポリペプチド（非天然Bボックスポリペプチドおよび断片を含む）の何れかを患者に投与することを含む。別の態様においては、BボックスポリペプチドまたはBボックス断片ポリペプチドは薬学的に許容される担体中にある。

40

50

## 【0104】

細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出のモジュレーターのスクリーニング

本発明はまた化合物（被験化合物）が炎症および／または炎症応答を抑制するかどうかを調べる方法に関する。方法は（a）脊椎動物HMGB Bボックスまたはその生物学的活性断片に曝露された場合にプロ炎症性サイトカインを放出する細胞、および（b）HMGB Bボックスまたはその生物学的活性断片に化合物を組み合わせること、そして次に、適当な対照と比較した場合に細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を化合物が抑制するかどうかを調べることを含む。このアッセイにおいてプロ炎症性サイトカインの放出を抑制する化合物は炎症および／または炎症応答を処置するために使用できる化合物である。HMGB Bボックスまたは生物学的活性HMGB Bボックス断片は細胞に対して内因性であり得るか、または、標準的な組み換え分子生物学的手法を用いて細胞に導入することができる。

## 【0105】

被験化合物の非存在下において脊椎動物HMGB Bボックスまたはその生物学的活性断片への曝露に応答してプロ炎症性サイトカインを放出する任意の細胞は、本発明において有用であると期待される。選択された細胞は試験される抑制化合物を用いて処置されるべき状態の病因において重要であると予測される。多くの状態について、好ましい細胞はヒトマクロファージであると予期される。

## 【0106】

化合物が細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を抑制するかどうかを調べる任意の方法がこれらの態様において有用であろう。好ましい方法は例えば多くの市販のELISAアッセイの何れかを用いたプロ炎症性サイトカインの直接測定であると予測される。しかしながら、一部の態様においては、放出されたサイトカインの炎症作用の測定は、特に被験細胞により産生される数種のプロ炎症性サイトカインが存在する場合には好ましくあり得る。前述したとおり、多くの重要な障害において、優勢なプロ炎症性サイトカインはTNF、IL-1、IL-1、MIFまたはIL-6であり、特にTNFである。

## 【0107】

本発明はまた化合物が炎症応答および／または炎症を増大させるかどうかを調べる方法の特徴とする。方法は（a）脊椎動物HMGB Aボックスまたはその生物学的活性断片に曝露された場合にプロ炎症性サイトカインを放出する細胞、および（b）HMGB Aボックスまたは生物学的活性断片に化合物（被験化合物）を組み合わせること、そして次に、適当な対照と比較して細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を化合物が増大させるかどうかを調べることを含む。このアッセイにおいてプロ炎症性サイトカインの放出を増大させる化合物は、炎症応答および／または炎症を増大させるために使用できる化合物である。HMGB AボックスまたはHMGB Aボックス生物学的活性断片は細胞に対して内因性であり得るか、または、標準的な組み換え分子生物学的手法を用いて細胞に導入することができる。

## 【0108】

上記した炎症のインヒビターの同定のために有用な細胞型と同様、任意の被験化合物の非存在下における脊椎動物のHMGB Aボックスまたはその生物学的活性断片への曝露に応答してプロ炎症性サイトカインの放出が正常に抑制される任意の細胞が本発明に有用であると期待されよう。選択された細胞は試験される抑制化合物を用いて処置されるべき状態の病因において重要であろうと予測される。多くの状態について、好ましい細胞はヒトマクロファージであると予期される。

## 【0109】

化合物が細胞からのプロ炎症性サイトカインの放出を増大させるかどうかを調べる任意の方法がこれらの態様において有用であろう。好ましい方法は例えば多くの市販のELISAアッセイの何れかを用いたプロ炎症性サイトカインの直接測定であると予測される。しかしながら、一部の態様においては、放出されたサイトカインの炎症作用の測定は、特に被験細胞により産生される数種のプロ炎症性サイトカインが存在する場合には好ましくあり得る。前述したとおり、多くの重要な障害において、優勢なプロ炎症性サイトカインはTNF、IL-1、IL-1、MIFまたはIL-6であり、特にTNFである。

## 【 0 1 1 0 】

本発明の好ましい態様を以下の実施例により説明する。本発明の範囲内にある他の態様も、本明細書を考慮するか、または本明細書に開示されるように本発明を実施すれば、当業者には自明であろう。明細書は、実施例および請求項とともに例示であるとのみ見なされることを意図している。

## 【 0 1 1 1 】

## 実施例 1

## 材料および方法

## HMGB1のクローニングおよびHMGB1変異体の生産

以下の方法を用いてヒトHMGB1のクローンおよび変異体を作成した。以下のプライマー、即ちフォワードプライマー：5'GATGGGCAAAGGAGATCCTAAG3'（配列番号：6）およびリバースプライマー：5'GCGGCCGCTTATTCATCATCATCATCTTC3'（配列番号：7）を用いて、ヒト脳 Quick-Clone cDNA調製物（Clontech, Palo Alto, CA）からPCR増幅により組み換え全長ヒトHMGB1（651塩基対；GenBank受入れ番号U51677）をクローニングした。ヒトHMGB1変異体は以下の通りクローニングし、精製した。ヒト脳Quick-Clone cDNA調製物（Clontech, Palo Alto, CA）からPCR増幅により、トランケーションされた形態のヒトHMGB1をクローニングした。使用したプライマーは以下の通り（各々フォワードおよびリバース）である。カルボキシ末端変異体（557bp）：5'GATGGGCAAAGGAGATCCTAAG3'（配列番号：8）および5'GCGGCCGCTCACTTGCTTTTTTTCAGCCTTGAC3'（配列番号：9）。アミノ末端+Bボックス変異体（486bp）：5'GAGCATAAGAAGAAGCACCCA3'（配列番号：10）および5'GCGGCCGCTCACTTGCTTTTTTTCAGCCTTGAC3'（配列番号：11）。Bボックス変異体（233bp）：5'AAGTTCAAGGATCCCAATGCAAAG3'（配列番号：12）および5'GGCCGCTCAATATGCAGCTATATCCTTTTC3'（配列番号：13）。アミノ末端+Aボックス変異体（261bp）：5'GATGGGCAAAGGAGATCCTAAG3'（配列番号：14）および5'TCACTTTTTTGTCTCCCCTTTGGG3'（配列番号：15）。

## 【 0 1 1 2 】

停止コドンを変異体に添加することによりタンパク質の大きさの正確さを確保した。PCR産物は製造業者の使用説明書（Invitrogen, Carlsbad, CA）に従ってTAクローニング法を用いてpCRII-TOPOベクターEcoRI部位にサブクローニングした。増幅の後、PCR産物をEcoRIで消化し、GSTタグpGEX（Pharmacia）で発現ベクター内にサブクローニングし；正しい方向および陽性のクローンを両方の鎖に関するDNA配列決定により確認した。組み換えプラスミドをプロテアーゼ欠損大腸菌株BL21またはBL21（DE3）plysS（Novagen, Madison, WI）に形質転換し、そして融合タンパク質発現をイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）で誘導した。組み換えタンパク質はグルタチオンセファロース樹脂カラム（Pharmacia）を用いたアフィニティー精製を用いて得た。

## 【 0 1 1 3 】

上述したとおり作成したHMGB変異体は以下のアミノ酸配列を有する。

## 野生型 HMGB1：

MGKGDPPKPTGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKT  
MSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGETKKKFKDPNAPKRLPSAF  
FLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAACLKE  
KYEKDIAAYRAKGKPDAAKKGVVKAEEKSKKKKEEEEEDEEEDDEEEDDEE  
DEEEDDEDDDE（配列番号：18）

## 【 0 1 1 4 】

## カルボキシ末端変異体：

MGKGDPPKPTGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKT  
MSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGETKKKFKDPNAPKRLPSAF  
FLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAACLKE  
KYEKDIAAYRAKGKPDAAKKGVVKAEEKSK（配列番号：19）

## 【 0 1 1 5 】

Bボックス変異体：FKDPNAPKRLPSAFFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEM  
WNNTAADDKQPYEKKAACKLKEKYEKDIAAY (配列番号：20)

【0116】

アミノ末端+Aボックス変異体：MGKGDPKKPTGKMSSYAFFVQTCREEHKKK  
HPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPP  
KGET (配列番号：21)、ここでAボックスは配列  
PTGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGK  
FEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET (配列番号：22) よりなる。

【0117】

HMGB1タンパク質を欠損したGSTベクターから作成されたポリペプチドが対照 (GSTタグのみを含有) として含まれた。野生型HMGB1および一部の変異体 (カルボキシ末端およびBボックス) に結合した細菌DNAを不活性化するために、カルボキシ末端およびBボックス変異体に対してはDNaseI (Life Technologies)、または野生型HMGB1に対してはベンゾナーゼヌクレアーゼ (Novagen, Madison, WI) を約20単位/ml細菌溶解物で添加した。DNAの分解は処理の前後においてHMGB1タンパク質を含有するアガロースゲルのエチジウムブロマイド染色により確認した。タンパク質溶出物をポリミキシンBカラム (Pierce, Rockford, IL) に通して存在する混在LPSを除去し、リン酸塩緩衝生理食塩水に対して十分透析して過剰な還元グルタチオンを除去した。次に調製物を凍結乾燥し、使用前に滅菌水に再溶解した。LPS濃度はリムルスアメーバ様細胞分解産物試験 (Bio Whittaker Inc., Walkersville, MD) による測定によれば変異体の全てにつき60pg/μgタンパク質未満、野生型HMG-1については300pg/μgであった。タンパク質の一体性はSDS-PAGEを用いて確認した。組み換えラットHMGB1 (Wangら, Science 285:248-251, 1999) は精製されたヒトHMGB1で観察されるような分解断片を有さないため、これを一部の実験で使用した。

10

20

【0118】

ペプチド合成

ペプチドは90%純度でユタ州立大学バイオテクノロジーセンター (Logan, Utah) において合成し、HPLC精製した。内毒素はリムルスアッセイによる測定によれば合成ペプチド調製物中検出できなかった。

【0119】

細胞培養

マウスマクロファージ様RAW264.7細胞 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) を10%ウシ胎仔血清 (Gemini, Catabasas, CA)、ペニシリンおよびストレプトマイシン (Life Technologies) を添加したRPMI1640培地 (Life Technologies, Grand Island, NY) 中で培養し、血清非含有Opti-MEM 1培地 (Life Technologies, Grand Island, NY) 中で90%コンフルエントで使用した。ポリミキシンB (Sigma, St. Louis, MO) を日常的に100~1,000単位/mlで添加して、前述の通りいかなる混在LPSの活性をも中和し; ポリミキシンBのみはトリパンプルー (Wangら, 前出) で評価した細胞の生存率には影響しなかった。ポリミキシンBは合成ペプチド研究の実験においては使用しなかった。

30

【0120】

細胞からのTNF放出の測定

TNF放出は標準的なマウス線維芽細胞L929 (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD) 細胞毒性バイオアッセイ (Bianchiら, Journal of Experimental Medicine 183:927-936, 1996) により、最小検出濃度30pg/mlで測定した。組み換えマウスTNFはR&D system Inc. (Minneapolis, MN) から入手した。マウス線維芽細胞L929細胞 (ATCC) を5%CO<sub>2</sub>の加湿インキュベーター中、10%ウシ胎仔血清 (Gemini, Catabasas, CA)、ペニシリン (50単位/ml) およびストレプトマイシン (50μg/ml) (Life Technologies) を添加したDMEM (Life Technologies, Grand Island, NY) 中で培養した。

40

【0121】

抗体生産

HMGB1 Bボックスに対するポリクローナル抗体はウサギ (Cocalico Biologicals, Inc., R

50

eamstown, PA) 中で作成し、イムノブロットングにより力価に関して検定した。IgGは製造業者の使用説明書 (Pierce, Rockford, IL) に従ってプロテインAアガロースを用いて抗HMGB1抗血清から精製した。抗HMGB1 Bボックス抗体は臭化シアン活性化セファロースビーズ (Cocalico Biological, Inc.) を用いてアフィニティー精製した。非免疫ウサギIgGはSigma (St. Louis, MO) から購入した。抗体はイムノアッセイにおいて全長のHMGB1およびBボックスを検出したが、TNF、IL-1およびIL-6とは交差反応しなかった。

#### 【0122】

Na-<sup>125</sup>IによるHMGB1の標識および細胞表面結合

精製されたHMGB1タンパク質 (10 μg) を製造業者の使用説明書に従ってIodo-beads (Pierce, Rockford, IL) を用いて担体不含<sup>125</sup>I (NEN Life Science Products Inc., Boston, MA) 0.2mCiで放射性標識した。<sup>125</sup>I-HMGB1タンパク質を未反応の<sup>125</sup>Iから300mM塩化ナトリウム、17.5mMクエン酸ナトリウム、pH7.0および0.1%ウシ血清アルブミン (BSA) で予め平衡化しておいたゲルクロマトグラフィーカラム (P6 Micro Bio-Spinクロマトグラフィーカラム、Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) で分離した。溶出したHMGB1の比放射能は約 $2.8 \times 10^6$  cpm / μgタンパク質であった。細胞表面結合研究は以前に記載されている通り行った (Yangら, Am. J. Physiol. 275: C675-C683, 1998)。RAW264.7細胞を24ウェルのディッシュにプレーティングし、コンフルエントとなるまで生育させた。細胞を0.1%BSA含有氷冷PBSで2回洗浄し、結合は120mM塩化ナトリウム、1.2mM硫酸マグネシウム、15mM酢酸ナトリウム、5mM塩化カリウム、10mMTris.HCl、pH7.4、0.2%BSA、5mMグルコースおよび25,000cpm<sup>125</sup>I-HMGB1を含有する結合緩衝液0.5mlを用いて2時間4で行った。インキュベーション終了時に、上清を廃棄し、細胞を0.1%BSA含有氷冷PBS0.5mlで3回洗浄し、室温で20分間0.5N NaOHおよび0.1%SDSの0.5mlを用いて溶解した。次に溶解産物中の放射能をガンマカウンターを用いて測定した。特異的結合は過剰量 of 非標識HMGB1またはAボックスタンパク質の存在下に得られた放射能を総結合から差し引いたものとして求めた。

#### 【0123】

動物実験

TNFノックアウトマウスはAmgen (Thousand Oaks, CA) から入手し、B6x129バックグラウンド上であった。齢を合わせた野生型B6x129マウスを、研究の対照として使用した。マウスはフロリダ大学の特異的病原体不含トランスジェニックマウス施設 (Gainesville, FL) で集団内で繁殖させ、6~8週齢で使用した。

#### 【0124】

雄性6~8週齢Balb/cおよびC3H/HeJマウスをHarlen Sprague-Dawley (Indianapolis, IN) より購入し、実験に使用する前に7日間馴化させた。全ての動物はNorth Shore University Hospital Animal Facilityにおいて標準的な温度および明暗サイクルの下に収容した。

#### 【0125】

盲腸の結紮および穿刺

盲腸の結紮および穿刺 (CLP) は以前に記載されている通り行った (FinkおよびHeard, J. Surg. Res. 49: 186-196, 1990; Wichmannら, Crit. Care Med. 26: 2078-2086, 1998; およびRemickら, Shock 4: 89-95, 1995)。概すれば、Balb/cマウスを75mg/kgケタミン (Fort Dodge, Fort Dodge, Iowa) および20mg/kgキシラジン (Boehringer Ingelheim, St. Joseph, MO) を筋肉内投与して麻酔した。正中切開を行い、盲腸を分離した。6-0プロレン縫合糸結紮を回盲弁から離れる方向に盲腸先端から5.0mmの深さに配置した。

#### 【0126】

次に結紮した盲腸の断端を22ゲージの針を用いて糞を直接排出させずに一度穿刺した。次に盲腸を正常な腹腔内の位置に戻した。次に液体の漏出を防止するために腹膜と筋膜を個別に二層として6-0プロレンのランニング縫合糸で腹部を閉じた。全動物に20ml/kg体重の通常の生理食塩水を皮下投与することにより蘇生させた。各マウスには術後30分にイミペネム (0.5mg/マウス) (Primaxin, Merck&Co., Inc., West Point, PA) を皮下注射した。次に動物を回復させた。死亡率は処置後1週間まで記録し、生存動物は2週間追跡して観

10

20

30

40

50

察することにより、後の死亡がないことを確認した。

【0127】

D-ガラクトサミン感作マウス

D-ガラクトサミン感作モデルは以前に報告されている (Galanosら, Proc Natl. Acad. Sci. USA 76:5939-5943, 1979; および Lehmannら, J. Exp. Med. 165:657-663, 1997)。マウスには 20mg D-ガラクトサミン-HCL (Sigma) / マウス (200  $\mu$  IPBS 中) および 0.1 または 1mg の HMGB1 Bボックスまたはベクタータンパク質 (200  $\mu$  IPBS 中) のいずれかを腹腔内注射した。注射後 72 時間まで毎日死亡例を記録し、生存動物を 2 週間追跡し、Bボックス毒性によるその後の死亡例は観察されなかった。

【0128】

脾臓細菌培養

マウス 14 匹に抗 HMGB1 抗体 (n=7) または対照 (n=7) のいずれかを、本明細書に記載の通り CLP 後 24 および 30 時間に与え、安楽死させて剖検に付した。脾臓細菌は以前に記載されている通り回収した (Villaら, J. Endotoxin Res. 4:197-204, 1997)。脾臓を無菌的手法により取り出し、PBS 2ml 中にホモゲナイズした。PBS で連続希釈した後、ホモジネートをトリプシン大豆アガープレート (Difco, Detroit, MI) 上に 0.15ml ずつプレーティングし、37 で一夜インキュベートした後に CFU を計数した。

【0129】

統計学的分析

特段の記載が無い限りデータは平均  $\pm$  SEM として表わした。群間の差は両側スチューデント t 検定、一元配置 ANOVA、その後の最小有意差検定または両側フィッシャー正確確率検定により調べた。

【0130】

実施例 2

サイトカイン活性の誘導に関する HMGB1 ドメインのマッピング

HMGB1 は 2 つの DNA 結合ドメイン (A および B ボックス) および負に帯電した酸性のカルボキシル末端 (tail) を有する。HMGB1 サイトカイン活性の構造的根拠を解明するために、そして、炎症性タンパク質ドメインをマッピングするために、本発明者等は変異誘発により HMGB1 の全長およびトランケーション型を発現させ、単球培養において刺激活性に関して精製タンパク質をスクリーニングした (図 1)。全長 HMGB1、カルボキシル末端が欠失している変異体、B ボックスのみを含有する変異体および A ボックスのみを有する変異体を作成した。ヒト HMGB1 のこれ等の変異体は本明細書に記載する特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により作成し、そして変異タンパク質は製造業者の使用説明書に従ってグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 遺伝子融合系 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) を用いて発現させた。概すれば、PCR 法により作成した DNA 断片を GST 融合ベクターに融合し、大腸菌中で増幅させた。次に発現された HMGB1 タンパク質および HMGB1 変異体を GST アフィニティーカラムを用いて単離した。

【0131】

マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞 (ATCC) からの TNF の放出に対する変異体の作用を以下の通り行った。RAW264.7 細胞を 10% ウシ胎仔血清 (Gemini, Catabasas, CA)、ペニシリンおよびストレプトマイシン (Life Technologies) を添加した RPMI 1640 培地 (Life Technologies, Grand Island NY) 中で培養した。ポリミキシン (Sigma, St. Louis, MO) を 100 単位 / ml で添加して、いかなる混在 LPS の活性をも抑制した。細胞は 1  $\mu$ g / ml の全長 (野生型) HMGB1 および各々の HMGB1 変異タンパク質と共に Opti-MEM I 培地中 8 時間インキュベートした。コンディショニングされた上清 (細胞から放出された TNF を含有する) を採取し、細胞から放出された TNF を標準的なマウス線維芽細胞 L929 (ATCC) 細胞毒性バイオアッセイ (Bianchiら, 前出) により、最小検出濃度 30pg / ml で測定した。組み換えマウス TNF は R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN) から入手し、これ等の実験における対照として使用した。この研究の結果は図 1 に示す。図 1 のデータは全て特段の記載が無い限り平均  $\pm$  SEM で表示した (N=6 ~ 10)。

10

20

30

40

50



## 【0132】

図1に示す通り、野生型HMGB1およびカルボキシルトランケーションHMGB1は単球培養物（マウスマクロファージ様RAW264.7細胞）によるTNFの放出を有意に刺激した。Bボックスは単球TNF放出の強力な活性化因子であった。このBボックスの刺激作用は、AボックスはTNF放出をごく僅かに活性化しただけであったことから、特異的であった。

## 【0133】

## 実施例3

HMGB1 Bボックスタンパク質は用量依存的にサイトカイン活性を促進する

HMGB1 Bボックスのサイトカイン産生に対する作用を更に調べるために種々の量のHMGB1 Bボックスのマウスマクロファージ様RAW264.7細胞におけるTNF、IL-1 $\beta$ およびIL-6産生に対する作用を評価した。RAW264.7細胞は8時間、図2A～2Cに示す通り0～10  $\mu$ g/mlのBボックスタンパク質で刺激した。コンディショニングされた培地を採取し、TNF、IL-1 およびIL-6の濃度を測定した。TNFの濃度は本明細書に記載するとおり測定し、そしてマウスIL-1 およびIL-6の濃度はマウスIL-1 およびIL-6の酵素結合免疫吸着検定（ELISA）キット（R&D System Inc.Minneapolis,MN）を用い、全実験についてN>5で測定した。試験の結果は図2A～2Cに示す。

## 【0134】

図2Aに示す通り、RAW264.7細胞からのTNFの放出は細胞に投与したBボックスの量が増大するに従って増大した。図2Bに示す通り、1  $\mu$ g/mlまたは10  $\mu$ g/mlのBボックスの添加によりRAW264.7細胞からのIL-1 の放出が増大した。更に、図2Cに示す通り、RAW264.7細胞からのIL-6の放出は細胞に投与したBボックスの量が増大するに従って増大した。

## 【0135】

Bボックス誘導TNF放出の動態も調べた。TNFの放出およびTNFmRNAの発現をBボックスポリペプチドまたは対照（ベクター）として用いたGSTタグポリペプチドのみ（10  $\mu$ g/ml）で0～48時間誘導したRAW264.7細胞において測定した。上清のTNFタンパク質濃度をL929細胞毒性試験（N=3～5）により本明細書に記載したとおり分析した。mRNAの測定のために、細胞を100mmプレートにプレATINGし、Bボックスポリペプチドまたはベクターのみを含有するOpti-MEM I培地中で図2Dに示すとおり0、4、8または24時間処理した。ベクターのみの試料は4時間の時点で試験した。細胞をプレートから掻き取り、全RNAは製造業者の使用説明書に従ってRNAzolB法を用いて単離した（Tel-Test"B",Inc.,Friendswood,TX）。TNF（287bp）はRNase保護試験により測定した（Ambion,Austin,TX）。均等なローディングおよびRNAの一体性はアガロースホルムアルデヒドゲル上のRNA試料のエチジウムブロマイド染色により確認した。RNase保護試験の結果は図2Dに示す。図2Dに示す通り、単球のBボックス活性化は、Bボックスタンパク質に曝露した単球でTNFmRNAが有意に増大していたことから、遺伝子転写のレベルで起こっていた（図2B）。TNFmRNA発現は4時間で最高値となり、8および24時間では低下していた。ベクターのみの対照（GSTタグ）はTNFmRNA発現に対して作用を示さなかった。同様の研究を本明細書に記載したL929細胞毒性試験を用いてBボックスまたはベクターのみ（GSTタグ）の投与後0、4、8、24、32または48時間後にRAW264.7細胞からのTNFタンパク質放出を測定しながら実施した。対照（培地のみ）と比較して、Bボックス処置はTNFタンパク質発現を刺激し（図2E）、そしてベクターのみは刺激しなかった（図2F）。データは3つの個別の実験を示すものである。これ等のデータは共に、HMGB1 Bボックスドメインはサイトカイン活性を有し、全長HMGB1のサイトカイン刺激活性の原因であることを示す。

## 【0136】

要約すれば、HMGB1 Bボックスは用量依存的に単球培養物からのTNF、IL-1 およびIL-6の放出を刺激し（図2A～2C）、全長HMGB1の炎症活性と合致していた（Anderssonら,J.Exp.Med.192:565-570,2000）。更にまた、これ等の研究は最大TNFタンパク質放出は8時間以内に起こることを示している（図2E）。このTNF放出の遅延パターンはHMGB1そのものにより誘導されるTNF放出と同様であり、そして、LPSにより誘導されるTNFの動態よりも有意に遅延している（Anderssonら,前出）。

## 【0137】

## 実施例 4

HMGB1 Bボックスの最初の20アミノ酸がTNF活性を刺激する

HMGB1 BボックスのTNF刺激活性を更にマッピングした。この研究は以下の通り行った。Bボックスの断片を本明細書に記載するとおり合成ペプチド保護法を用いて作成した。HMGB1 Bボックスのアミノ酸1~20、16~25、30~49、45~64または60~74を含有する5種のHMGB1 Bボックス断片（配列番号：20由来）を図3に示すとおり作成した。RAW264.7細胞は10時間、図3に示すとおりBボックス（1 $\mu$ g/ml）またはBボックスの合成ペプチド断片（10 $\mu$ g/ml）で処理し、そして、上清中のTNFの放出を本明細書に記載するとおり測定した。示したデータは平均 $\pm$ SEMである（n=3実験、各々2連で実施、合成ペプチドの3種の異なるロットを用いて確認した）。図3に示す通り、TNF刺激活性は配列番号：20のHMGB1 Bボックスのアミノ酸1~20（fkdpnapkrlpsafflfcse；配列番号：23）に相当する合成ペプチドにより保持された。1~20merのTNF刺激活性は全長合成Bボックス（1~74mer）または全長HMGB1の何れよりも強度は低かったが、刺激作用は、HMGB1 Bボックスの16~25、30~49、45~64または60~74を含有するアミノ酸断片の合成20merはTNF放出を誘導しなかったことから、特異的なものであった。これ等の結果はBボックスのマクロファージ刺激活性が配列番号：20のHMGB Bボックスドメインの最初の20アミノ酸に特異的に位置することを示す直接の証拠である。このBボックス断片は例えばプロ炎症性サイトカインの放出を刺激するため、または、炎症性サイトカインカスケードの活性化を特徴とする患者における状態の処置のために、全長Bボックスポリペプチドをコードするポリペプチドと同様の方法で利用できる。

10

20

## 【0138】

## 実施例 5

HMGB1 Aボックスタンパク質は用量依存的にHMGB1誘導サイトカイン活性に拮抗する

弱いアゴニストは定義では拮抗剤である。図1に示す通り、HMGB1 AボックスはTNF産生を弱く誘導するのみであるため、HMGB1 AボックスがHMGB1活性の拮抗剤として作用する能力を評価した。本研究は以下の通り実施した。24ウェルのディッシュ中のサブコンフルエントのRAW264.7細胞をHMGB1（1 $\mu$ g/ml）および0、5、10または25 $\mu$ g/mlのAボックスで16時間、Opti-MEM I培地中、ポリミキシンB（100単位/ml）の存在下に処理した。Aボックスを投与しない試料中のTNF刺激活性（本明細書に記載したL929細胞毒性試験を用いて試験）を100%とし、Aボックスによる抑制をHMGB1単独のパーセントとして表示した。RAW264.7細胞からのTNF放出に対するAボックスの作用の結果を図4Aに示す。図4Aに示す通り、Aボックスは用量依存的にHMGB1誘導TNF放出を抑制し、見かけのEC<sub>50</sub>値はおおよそ7.5 $\mu$ g/mlであった。図4Aのデータは平均 $\pm$ SD（n=2~3独立実験）として示す。

30

## 【0139】

## 実施例 6

HMGB1 Aボックスタンパク質は全長HMGB1およびHMGB1 Bボックスのサイトカイン活性を抑制する

HMGB1 AボックスまたはGSTタグ（ベクター対照）による全長HMGB1活性の拮抗もまた全長HMGB1と共にAボックスを同時添加することにより刺激されたRAW264.7マクロファージ培養物からのTNF放出を測定することにより調べた。RAW264.7マクロファージ細胞（ATCC）を24ウェルの組織培養プレートに播種し、90%コンフルエントで使用した。細胞をHMGB1および/またはAボックスで、記載したとおり、16時間、Optimum I培地（Life Technologies, Grand Island, NY）中、ポリミキシンB（100単位/ml、Sigma, St. Louis, MO）の存在下に処理し、上清を採取してTNF測定に付した（マウスELISAキット、R&D System Inc, Minneapolis, MNより）。TNF誘導活性はHMGB1単独で達成される活性のパーセントとして表示した。これ等の研究の結果を図4Bに示す。図4BはHMGB1（HMG-1）単独、Aボックス単独、ベクター（対照）単独、HMGB1とAボックスの組み合わせ、および、HMGB1とベクターの組み合わせの作用のヒストグラムである。図4Bで明らかな通り、HMGB1 Aボックスは全長HMGB1のTNF刺激活性を有意に減衰させた。

40

50

## 【0140】

## 実施例 7

HMGB1 Aボックスタンパク質はHMGB1サイトカイン活性をこれに結合することにより抑制する

HMGB1 AボックスがHMGB1結合を置き換えることにより拮抗剤として機能するかどうかを調べるために、 $^{125}\text{I}$ 標識HMGB1をマクロファージ培養物に添加し、4 で2時間後に結合を測定した。RAW264.7細胞における結合アッセイは本明細書に記載するとおり実施した。 $^{125}\text{I}$ -HMGB1結合は図5Aに示す時間24ウェルディッシュ中にプレーティングしたRAW264.7細胞において測定した。記載した特異的結合は非標識HMGB1の5000倍モル過剰量の存在下の細胞結合CPM/ウェルを総細胞結合 $^{125}\text{I}$ -HMGB1 (CPM/ウェル) から差し引いたものに等しい。図5Aは経時的な $^{125}\text{I}$ -HMGB1の結合のグラフである。図5Aに示されるとおり、HMGB1は飽和可能な一次結合動態を示した。結合の特異性は実施例1に記載したとおり評価した。

## 【0141】

更に、 $^{125}\text{I}$ -HMGB1の結合は24ウェルディッシュにプレーティングし、 $^{125}\text{I}$  HMGB1単独または非標識のHMGB1もしくはAボックスの存在下にインキュベートしたRAW264.7細胞において測定した。この結合アッセイの結果を図5Bに示す。データは3つの個別の実験の平均 $\pm$ SEMを示す。図5Bは総CPM/ウェルのパーセントとして測定した場合の、非標識HMGB1もしくはHMGB1 Aボックスの非存在下、または、5000モル過剰量の非標識HMGB1もしくはHMGB1 Aボックスの存在下の $^{125}\text{I}$ -HMGB1の細胞表面結合のヒストグラムである。図5Bにおいて、「合計」は4 で2時間非標識HMGB1またはAボックスの非存在下における細胞結合 $^{125}\text{I}$ -HMGB1の分当りカウント (CPM) / ウェルに等しい。「HMGB1」または「Aボックス」は5000モル過剰量の非標識HMGB1または非標識Aボックスの存在下の細胞結合 $^{125}\text{I}$ -HMGB1のCPM/ウェルに等しい。データは非標識HMGB1タンパク質の非存在下に得られた総カウント (2,382,179CPM/ウェル) のパーセントとして表示する。これ等の結果はHMGB1 AボックスがインビトロのHMGB1活性の競合的拮抗剤であり、そして、HMGB1のTNF刺激活性を抑制することを示している。

## 【0142】

## 実施例 8

抗Bボックスポリクローナル抗体による全長HMGB1およびHMGB1 Bボックスサイトカイン活性の抑制。

HMGB1 Bボックスに対して指向された抗体が全長またはHMGB1 Bボックスの作用を調節する能力も評価した。HMGB1 Bボックスに対して指向されたアフィニティー精製された抗体 (Bボックス抗体) を本明細書に記載したとおり、かつ標準的な手法を用いて作成した。RAW264.7細胞からのHMGB1誘導またはHMGB1 Bボックス誘導TNF放出に対する抗体の作用を試験するために、24ウェルディッシュ中のサブコンフルエントRAW264.7細胞を抗Bボックス抗体 (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  または 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  抗原アフィニティー精製、Cocalico Biologicals, Inc., Reamstown, PA) または非免疫IgG (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  または 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Sigma) の添加ありまたはなしで10時間、HMGB1 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) またはHMGB1 Bボックス (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) で処理した。RAW264.7細胞からのTNF放出は本明細書に記載するとおりL929細胞毒性試験を用いて測定した。この研究の結果は図6に示すとおりであり、これは、無投与、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のHMGB1、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のHMGB1 + 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の抗Bボックス抗体、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のHMGB1 + 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のIgG (対照)、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のBボックス、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のBボックス + 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の抗Bボックス抗体または10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のBボックス + 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のIgG (対照) を投与したRAW264.7細胞により放出されたTNFのヒストグラムである。HMGB1単独 (Bボックス抗体無添加) により誘導された細胞から放出されたTNFの量を100%とし、図6に示したデータは3つの独立した実験の結果である。図6に示される通り、HMGB1 Bボックスに対して指向されたアフィニティー精製された抗体は全長HMGB1またはHMGB1 Bボックスのいずれかにより誘導されたTNFの放出を有意に抑制した。これ等の結果は、かかる抗体がHMGB1の機能を調節するために使用できることを示している。

## 【0143】

## 実施例 9

HMGB1 Bボックスタンパク質はD-ガラクトサミン感作Balb/cマウスに対して毒性である

HMGB1 Bボックスがインビボでサイトカイン活性を有するかどうかを調べるため、本発明者等はサイトカイン毒性を研究するために広範に使用されているモデルであるD-ガラクトサミン (D-gal) で感作された非麻酔のBalb/cマウスに対しHMGB1 Bボックスタンパク質を投与した (Galanosら, 上出)。概すれば、表1に示すとおりマウス (20~25グラム、雄性、Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, IN) にD-gal (20mg) (Sigma, St. Louis, Missouri) およびBボックス (0.1mg/ml/マウスまたは1mg/ml/マウス) またはGSTタグ (ベクター、0.1mg/ml/マウスまたは1mg/ml/マウス) を腹腔内注射した。マウスの生存は7日までモニタリングし、後発の死亡がないことを確認した。本試験の結果を表1に示す。

【 0 1 4 4 】

【 表 1 】

表 1: D-ガラクトサミン感作 Balb/c マウスに対するHMGB1 Bボックスの毒性

	処理	生存 / 合計
対照	-	10/10
ベクター	0.1 mg/マウス	2/2
	1 mg/マウス	3/3
Bボックス	0.1 mg/マウス	6/6
	1 mg/マウス	2/8*

\* $P < 0.01$  対ベクター単独、フィッシャーの正確確率検定で測定

【 0 1 4 5 】

本研究の結果はHMGB1 Bボックスが用量依存的にD-ガラクトサミン感作マウスに対して致死的事であることを示した。死亡があった全ての場合において、それは12時間以内に起こっていた。致死性はBボックスを含まない精製されたGSTベクタータンパク質の相当する調製物で処理されたマウスでは観察されなかった。

【 0 1 4 6 】

## 実施例 10

HMGB1 Bボックスタンパク質を投与されたD-ガラクトサミン感作Balb/cマウスまたはC3H/Hejマウスの組織学的特徴

インビボのHMGB1 Bボックスタンパク質の致死性を更に評価するために、HMGB1 Bボックスを再度D-ガラクトサミン感作Balb/cマウスに投与した。マウス (群当り3匹) に7時間腹腔内でD-gal (20mg/マウス) +Bボックスまたはベクター (1mg/マウス) を与え、次に断首して屠殺した。血液を採取し、臓器 (肝臓、心臓、腎臓および肺) を採取し、10%ホルムアルデヒド中で固定した。組織切片をヘマトキシリンおよびエオシン染色により調製し、組織学的評価に付した (Criterion Inc., Vancouver, Canada)。これらの試験の結果を図7A~7Jに示し、これらはヘマトキシリンエオシン染色した未投与マウスから得た腎臓切片 (図7A)、心筋切片 (図7C)、肺切片 (図7E) および肝切片 (図7Gおよび7I)、ならびにHMGB1 Bボックスで処理したマウスから得た腎臓切片 (図7B)、心筋切片 (図7D)、肺切片 (図7F) および肝切片 (図7Hおよび7J) のスキャン画像である。対照マウスと比較して、Bボックス処理は腎 (図7Aおよび7B) および肺 (図7Eおよび7F) において異常を引き起こさなかった。マウスは幾分かの虚血性変化および心臓の心筋繊維の交差条線の消失を示していた (図7Cおよび7D、図7Dにおいて矢印で示す)。肝臓は進行中の肝炎で示される通りBボックスによる損傷の大部分を示していた (図7G~7J)。図7Jにおいて、肝細胞の脱落が蓄積した多形核白血球に包囲されて観察される。図7Jの矢印は多形核蓄積 (点線) またはアポトーシス肝細胞 (実線) の部位を指す。インビボのHMGB1 Bボックスの投与もまた有意にIL-6の血清中濃度の増大 (315+93対20+7pg/ml、Bボックス対 対照、 $p < 0.05$ ) およびIL-1 (15+3対4+1pg/ml、Bボックス対 対照、 $p < 0.05$ ) を刺激した。

## 【0147】

C3H/HeJマウス（内毒素に反応しない）へのBボックスタンパク質の投与もまた致死性であり、HMGB1 BボックスがLPSシグナル伝達の非存在下において致死性であることを示している。Bボックスの投与後8時間に採取した肺および腎臓のヘマトキシリンおよびエオシン染色した切片は異常な形態学的変化を示さなかった。しかしながら心臓から得た切片の検査によれば、心筋繊維に不定形のピンク色の細胞質を伴った交差条線の消失を有する虚血の徴候が明らかになった。肝の切片は一部の肝細胞の脱落およびアポトーシス、ならびに散見される多形核白血球を伴った軽度の急性炎症反応を示していた。これ等の特定の病理学的変化は全長HMGB1の投与後に観察されたものに匹敵するものであり、Bボックス単独でインビボのHMGB1に対する致死病的病理学的反応を反復できることを確認するものである。

10

## 【0148】

HMGB1のTNF刺激活性がBボックスによる致死性の媒介に寄与するかどうかを調べるため、本発明者等は、D-グルコサミン（20mg/マウス）で感作し、Bボックス（1mg/マウス、腹腔内注射）に曝露したTNFノックアウトマウス（TNF-KO, Nowakら, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278:R1202-R1209, 2000）および野生型対照（B6x129系統）における致死性を測定した。Bボックスは野生型マウスに対しては高度に致死性（曝露した9匹中6匹死亡）であったが、致死性はBボックスで処理されたTNF-KOマウスでは観察されなかった（曝露した9匹中0匹死亡、 $p < 0.05$ 対（v.）野生型）。本明細書に記載したRAW264.7マクロファージ培養のデータとあわせれば、これ等のデータはここで、HMGB1のBボックスが特定のTNF刺激サイトカイン活性を与えることを示している。

20

## 【0149】

## 実施例 1 1

HMGB1タンパク質濃度は敗血症マウスにおいて増大する

敗血症におけるHMGB1の役割を調べるため、本発明者等はマウス中にセプシスを樹立し、以前に記載された定量的イムノアッセイを用いて血清中HMGB1を測定した（Wangら, 前出）。多微生物腹膜炎およびセプシスをもたらす外科的に作成された盲腸憩室を穿刺することにより発生させたセプシスの十分特性化されているモデルである盲腸結紮穿孔（CLP）にマウスを付した（FinkおよびHeard, 前出; Wichmannら, 前出; およびRemickら, 前出）。次にHMGB1の血清中濃度を測定した（Wangら, 前出）。図8はCLPに付した0時間、8時間、18時間、24時間、48時間および72時間後のマウスにおけるHMGB1の濃度を示すグラフにおいてこの研究の結果を示している。図8に示されるとおり、血清中HMGB1濃度は盲腸穿刺後最初の8時間には有意に上昇せず、次いで18時間後には有意に上昇した（図8）。上昇した血清中HMGB1はCLP後少なくとも72時間は上昇したプラトー状態を維持し、その動態的特徴は以前に報告されている内毒素血症における遅延HMGB1動態と極めて類似している（Wangら, 前出）。HMGB1放出のこの一時的なパターンはマウスにおけるセプシスの徴候の発症に緊密に相当するものであった。盲腸穿刺後最初の8時間の間は動物は軽度の疾患状態を示し、一部は運動性の低下および探索行動の減少を示した。その後の18時間に渡り、動物は重篤な状態となり、立毛状態で集合し、水および試料を探索せず、そして外部からの刺激や飼育者の検査に対しても殆ど反応しなくなった。

30

40

## 【0150】

## 実施例 1 2

HMGB1 Aボックスタンパク質によるセプシスマウスの処理によりマウスの生存性が増大する。

HMGB1 Aボックスがセプシスの間HMGB1の致死性を抑制できるかどうかを調べるために、マウスを盲腸穿刺に供し、セプシス発症後24時間からAボックスの投与によって処理した。CLPは本明細書に記載したとおり雄性Balb/cマウスに対して実施した。動物を、一群当たりマウス15~25匹となるように無作為に分類した。HMGB1 Aボックス（60または600  $\mu$ g/マウス、各回）またはベクター（GSTタグ、600  $\mu$ g/マウス）単独をCLP後24時から開始して3日間1日2回腹腔内投与した。生存性は1日2回2週間までモニタリングし、後発の死亡

50

がないことを確認した。本研究の結果を図9に示し、これは経時的な生存性に対するベクター（GST；対照）60 $\mu$ g/マウスまたは600 $\mu$ g/マウスの作用のグラフである（\* $P<0.03$  対 対照、フィッシャーの正確確率検定による）。図9に示されるように、HMGB1 Aボックスの投与はマウスをセプシスの致死作用から有意に救済し、そしてAボックスを含有しないベクタータンパク質（GST）から精製したタンパク質で処理した動物における28%からAボックス投与動物では68%まで生存率が向上した（ $P<0.03$ 、フィッシャーの正確確率検定による）。このセプシスモデルにおけるHMGB1 Aボックスの救済作用はAボックス用量に依存しており；Aボックス600 $\mu$ g/マウスで処理した動物は、ベクター誘導調製物で処理した対照動物、または、僅か60 $\mu$ gのAボックスで処理した動物の何れと比較しても、有意により高い警戒性、運動性を示し、そして、摂餌行動を回復した。後者の動物は重篤な状態であり続け、低減した活動性および摂餌行動を数日間続け、大部分は死亡した。

10

#### 【0151】

##### 実施例 1 3

抗HMGB1抗体によるセプシスマウスの処理によりマウスの生存性が上昇する

重大な疾患状態となっているセプシスマウスの抗HMGB1抗体による受動免疫も評価した。本研究においては、雄性Balb/cマウス（20～25gm）を本明細書に記載するとおりCLPに付した。アフィニティー精製された抗HMGB1 Bボックスポリクローナル抗体またはウサギIgG（対照として）を術後24時間から1日2回3日間、600 $\mu$ g/マウスで投与した。生存性は2週間モニタリングした。この研究の結果は図10Aに示し、これは対照抗体または抗HMGB1抗体のいずれかで処理したセプシスマウスの生存性のグラフである。結果によれば、盲腸穿孔の開始24時間後にマウスに投与した抗HMGB1抗体は非免疫抗体の投与と比較して動物を死亡から有意に救済している（ $p<0.02$ 、フィッシャーの正確確率検定による）ことが示されている。抗HMGB1抗体の投与後12時間以内においては、処理動物は非免疫抗体投与対照と比較して増大した活動性および応答性を示した。非免疫抗体で処理した動物は集合し、体毛状態が悪く、活動性が低くあり続けたのに対し、処理動物は有意に改善し、48時間以内に正常な摂餌行動を回復した。抗HMGB1抗体はこのモデルにおいては、本発明者等が妥当でない抗体を投与した動物と比較して処理動物においてCLP後31時間の脾臓から同等の菌数（CFU、好気性菌のコロニー形成単位）を観察したことから、細菌の増殖を抑制しなかった（対照菌数 $=3.5 \pm 0.9 \times 10^4$  CFU/g;  $n=7$ ）。その後2週間まで動物をモニタリングしたところ、後発の死亡例は観察されず、抗HMGB1での処理は致死性のセプシスからの完全な救済をもたらし、死亡時期を遅延させるのみではなかったことが示唆された。

20

30

#### 【0152】

本発明者等の知見によれば、他の特異的サイトカイン指向治療薬はセプシス発症後これほど遅延して投与された場合にはこれほど有効ではない。比較によれば、抗TNFの投与は実際にこのモデルにおける死亡率を上昇させ、そして抗MIF抗体は盲腸穿孔後8時間を越えて投与した場合には無効である（Remickら, 上出；およびCalandraら, Nature Med. 6:164-170, 2000）。これ等のデータはHMGB1は樹立されたセプシスの致死性の症例を救済するためには盲腸穿孔後24時間もの遅い時期に標的化できることを示している。

#### 【0153】

抗Bボックス抗体を用いた内毒素血症マウスの救済の別の例において、抗HMGB1 Bボックス抗体のLPS誘導セプシスマウスの救済能力について評価した。雄性Balb/cマウス（20～25gm、群当り26匹）に腹腔内注射（IP）によりLPS（15mg/kg）のLD75用量で処理した。抗HMGB1 Bボックスまたは非免疫ウサギ血清（各回マウス当り0.3ml、IP）をLPS投与後0、+12時間および+24時間に与えた。マウスの生存性を経時的に評価した。本研究の結果は図10Bに示し、これは抗HMGB1 Bボックス抗体または非免疫血清を投与されたセプシスマウスの生存性のグラフである。図10Bに示す通り、抗HMGB1 Bボックス抗体はセプシスマウスの生存性を向上させた。

40

#### 【0154】

##### 実施例 1 4

抗RAGE抗体を用いたHMGB1シグナリング経路の抑制

50

過去のデータはRAGEを脳の発達時の神経突起の生長および創傷治癒における平滑筋の遊走を媒介できるHMGB1受容体として含意している (Horiら, J. Biol. Chem. 270:25752-25761, 1995; Merenmiesら, J. Biol. Chem. 266:16722-16729, 1991; および Degryseら, J. Cell Biol. 152:1197-1206, 2001)。本発明者等は、抗RAGE抗体 (25  $\mu$ g/ml) または非免疫IgG (25  $\mu$ g/ml) の存在下、HMGB1 (1  $\mu$ g/ml)、LPS (0.1  $\mu$ g/ml) またはHMGB1 Bボックス (1  $\mu$ g/ml) で刺激したRAW264.7培養物においてTNF放出を測定した。概すれば、細胞を24ウェルの組織プレートに播種し、90%コンフルエントで使用した。LPS (大腸菌0111:B4、Sigma, St. Louis, MO) は使用前に20分間超音波処理した。細胞は血清不含Opti-MEM I培地 (Life Technologies) 中16時間、図11Aに示すとおり抗RAGE抗体 (25  $\mu$ g/ml) または非免疫IgG (25  $\mu$ g/ml) の存在下、HMGB1 (HMG-1; 1  $\mu$ g/ml)、LPS (0.1  $\mu$ g/ml) またはHMGB1 Bボックス (Bボックス; 1  $\mu$ g/ml) で処理し、上清を収集して本明細書に記載したL929細胞毒性試験を用いたTNFの測定に付した。IgG精製ポリクローナル抗RAGE抗体 (カタログ番号 sc-8230、N-16, Santa Cruz Biotech, Inc., Santa Cruz, CA) は使用前にPBSに対して十分透析した。本研究の結果は図11Aに示し、これは、RAW264.7細胞からのTNFの放出に対する抗RAGE抗体または非免疫IgG (対照) の存在下のHMGB1、LPSまたはHMGB1 Bボックスの作用のヒストグラムである。図11Aに示されるとおり、非免疫IgGと比較して、抗RAGE抗体はHMGB1 Bボックス誘導TNF放出を有意に抑制した。この抑制は抗RAGEがLPS刺激TNF放出は有意に抑制しなかったことから、特異的であった。重要な点は、抗RAGEの最高抑制作用は40%しかHMG-1のシグナリングを低減せず、他のシグナル伝達経路がHMGB1シグナリングに関与し得ることが示唆された。

10

20

#### 【0155】

HMGB1またはHMGB1 BボックスのNF- $\kappa$ B依存性ELAMプロモーターに対する作用を調べるために以下の実験を実施した。RAW264.7マクロファージはMeansら, (J. Immunol. 166:4074-4082, 2001) に記載の通り、NF- $\kappa$ B依存性ELAMプロモーターの制御下、マウスMyD88優性陰性 (DN) 変異体 (アミノ酸146~296に相当) をコードする発現プラスミドまたは空ベクター+ルシフェラーゼレポータープラスミドで一過的に同時トランスフェクトした。次に細胞の一部を全長HMGB1 (100ng/ml) または精製されたHMGB1 Bボックス (10  $\mu$ g/ml) で5時間刺激した。次に細胞を回収し、標準的な方法を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。全てのトランスフェクションは3連で、少なくとも3回反復して行い、1回の代表的な実験を図11Bに示した。図11Bに示されるとおり、HMGB1はMyD88優性陰性で同時トランスフェクトしない試料中ではルシフェラーゼ活性を刺激し、そしてMyD88優性陰性で同時トランスフェクトした試料中では刺激のレベルは低下していた。この作用はHMGB Bボックスを投与した試料においても観察された。

30

#### 【0156】

本発明はその好ましい態様を参照しながら特に示し、説明したが、当業者の知るとおり形態および詳細における種々の変更が添付の請求の範囲に含まれる本発明の範囲から外れることなく行える。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0157】

【図1】図1はHMGB1突然変異体およびTNF放出 (pg/ml) におけるその活性を示す模式図である。

40

【図2】図2AはRAW264.7細胞におけるTNF放出 (pg/ml) に対するBボックス0  $\mu$ g/ml、0.01  $\mu$ g/ml、0.1  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/mlまたは10  $\mu$ g/mlの作用を示すヒストグラムである。図2BはRAW264.7細胞におけるIF-1 放出 (pg/ml) に対するBボックス0  $\mu$ g/ml、0.01  $\mu$ g/ml、0.1  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/mlまたは10  $\mu$ g/mlの作用を示すヒストグラムである。図2CはRAW264.7細胞におけるIL-6放出 (pg/ml) に対するBボックス0  $\mu$ g/ml、0.01  $\mu$ g/ml、0.1  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/mlまたは10  $\mu$ g/mlの作用を示すヒストグラムである。図2DはRAW264.7細胞におけるTNF mRNA発現に対するBボックス (投与後0時間、4時間、8時間または24時間) またはベクターのみ (投与後4時間) の作用を示すRNase保護試験のプロットのスキニング画像である。図2Eは投与後0時間、4時間、8時間、24時間、32時間または48時

50

間のRAW264.7細胞からのTNFタンパク質放出 (pg/ml) に対するHMGB1Bボックスの作用のヒストグラムである。図2Fは投与後0時間、4時間、8時間、24時間、32時間または48時間のRAW264.7細胞からのTNFタンパク質放出 (pg/ml) に対するベクターの作用のヒストグラムである。

【図3】図3はHMGB1Bボックス突然変異体およびTNF放出 (pg/ml) におけるその活性を示す模式図である。

【図4】図4AはRAW264.7細胞からのTNFの放出に対するHMG1Aボックスタンパク質の0μg/ml、5μg/ml、10μg/mlまたは25μg/mlの作用 (HMGB1媒介TNF放出のみの場合のパーセントとして) のグラフである。図4BはRAW264.7細胞からのTNFの放出に対するHMGB1 (0または1.5μg/ml)、HMGB1 Aボックス (0または10μg/ml) またはベクター (0または10μg/ml) の単独または組み合わせの作用 (HMGB1媒介TNF放出のみの場合のパーセントとして) のヒストグラムである。 10

【図5】図5Aは経時的 (分) なRAW264.7細胞への<sup>125</sup>I-HMGB1結合 (CPM/ウェル) の結合のグラフである。図5Bは総CPM/ウェルのパーセントとして測定した場合の未標識HMGB1またはHMGB1 Aボックスの非存在下、2時間4 (合計)、または、未標識HMGB1 (HMGB1) またはAボックス (Aボックス) の5000モル過剰量の存在下の、<sup>125</sup>I-HMGB1結合のヒストグラムである。

【図6】図6はRAW264.7細胞からのTNF放出に対するHMGB1 (HMG-1; 0μg/mlまたは1μg/ml) またはHMGB1Bボックス (Bボックス; 0μg/mlまたは10μg/ml) の単独、または抗Bボックス抗体 (25μg/mlまたは100μg/ml) またはIgG (25μg/mlまたは100μg/ml) と 20  
組み合わせた場合の作用のヒストグラムである (HMGB1媒介TNF放出のみの場合のパーセントとして表示)。

【図7】図7Aは未投与マウスから得たヘマトキシリンエオシン染色腎切片のスキャニング画像である。図7BはHMGB1Bボックス投与マウスから得たヘマトキシリンエオシン染色腎切片のスキャニング画像である。図7Cは未投与マウスから得たヘマトキシリンエオシン染色心筋切片のスキャニング画像である。図7DはHMGB1Bボックス投与マウスから得たヘマトキシリンエオシン染色心筋切片のスキャニング画像である。図7Eは未投与マウスから得たヘマトキシリンエオシン染色肺切片のスキャニング画像である。図7FはHMGB1Bボックス投与マウスから得たヘマトキシリンエオシン染色肺切片のスキャニング画像である。図7Gは未投与マウスから得たヘマトキシリンエオシン染色肝切片のスキャニング画像 30  
である。図7HはHMGB1Bボックス投与マウスから得たヘマトキシリンエオシン染色肝切片のスキャニング画像である。図7Iは未投与マウスから得たヘマトキシリンエオシン染色肝切片のスキャニング画像 (高倍率) である。図7JはHMGB1Bボックス投与マウスから得たヘマトキシリンエオシン染色肝切片のスキャニング画像 (高倍率) である。

【図8】図8は盲腸結紮および穿刺 (CLP) に付したマウスにおける経時的 (時間) なHMG B1濃度 (ng/ml) のグラフである。

【図9】図9は盲腸結紮および穿刺 (CLP) の後の経時的 (日) なマウスの生存に対するH MGB Aボックス (60μg/マウスまたは600μg/マウス) または無投与の作用のグラフである。

【図10】図10Aは盲腸結紮および穿刺 (CLP) の後の経時的 (日) なマウスの生存に 40  
対する抗HMGB1抗体 (黒丸) または無投与 (白丸) の作用のグラフである。図10Bはリポ多糖類 (LPS) を投与したマウスの生存 (日) に対する抗HMGB1Bボックス抗血清 (黒四角) または無投与 (\*) の作用のグラフである。

【図11】図11AはHMGB1 (HMG-1)、リポ多糖類 (LPS) またはHMGB1Bボックス (Bボックス) を投与したRAW264.7細胞からのTNF放出に対する抗RAGE抗体または非免疫IGGの作用のヒストグラムである。図11BはマウスMyD88優性陰性 (+myD88DN) 突然変異 (アミノ酸146-296に相当) または空ベクター (-MyD88DN) で同時トランスフェクトしたRAW264.7細胞におけるNF-κB依存性ELAMプロモーターの活性化 (ルシフェラーゼ活性により測定) に対するHMGB1 (HMG-1) またはHMGB1Bボックス (Bボックス) ポリペプチドの作用のヒストグラムである。データは未刺激および刺激細胞 (バックグラウンド差し引き) から得た 50



平均のルシフェラーゼ値+SDの比（倍活性化）として表示する。

【図12】図12AはヒトHMG1ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号1）である。図12BはラットおよびマウスのHMG1ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号2）である。図12CはヒトHMG2のアミノ酸配列（配列番号3）である。図12Dはヒト、マウスおよびラットのHMG1Aボックスポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号4）である。図12Eはヒト、マウスおよびラットのHMG1Bボックスポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号5）である。図12FはヒトHMG1に対するフォワードプライマーの核酸配列（配列番号6）である。図12GはヒトHMG1に対するリバースプライマーの核酸配列（配列番号7）である。図12HはヒトHMG1のカルボキシ末端突然変異体に対するフォワードプライマーの核酸配列（配列番号8）である。図12IはヒトHMG1のカルボキシ末端突然変異体に対するリバースプライマーの核酸配列（配列番号9）である。図12JはヒトHMG1のアミノ末端+Bボックスに対するフォワードプライマーの核酸配列（配列番号10）である。図12KはヒトHMG1のアミノ末端+Bボックスに対するリバースプライマーの核酸配列（配列番号11）である。図12LはヒトHMG1のBボックス突然変異体に対するフォワードプライマーの核酸配列（配列番号12）である。図12MはヒトHMG1のBボックス突然変異体に対するリバースプライマーの核酸配列（配列番号13）である。図12NはヒトHMG1のアミノ末端+Aボックス突然変異体に対するフォワードプライマーの核酸配列（配列番号14）である。図12OはヒトHMG1のアミノ末端+Aボックス突然変異体に対するリバースプライマーの核酸配列（配列番号15）である。

10

【図13】図13はラット（配列番号2）、マウス（配列番号2）およびヒト（配列番号18）のHMGB1ポリペプチド配列の配列アライメントである。

20

【図14】図14AはHMGBポリペプチドをコードするHMG1L5（以前のHMG1L10）の核酸配列（配列番号32）である。図14BはHMGBポリペプチドをコードするHMG1L5（以前のHMG1L10）のポリペプチド配列（配列番号24）である。図14CはHMGBポリペプチドをコードするHMG1L1の核酸配列（配列番号33）である。図14DはHMGBポリペプチドをコードするHMG1L1のポリペプチド配列（配列番号25）である。図14EはHMGBポリペプチドをコードするHMG1L4の核酸配列（配列番号34）である。図14FはHMGBポリペプチドをコードするHMG1L4のポリペプチド配列（配列番号26）である。図14GはBACクローンRP11-395A23のHMGBポリペプチド配列の核酸配列（配列番号35）である。図14HはHMGBポリペプチドをコードするBACクローンRP11-395A23のHMGBポリペプチド配列のポリペプチド配列（配列番号27）である。図14IはHMGBポリペプチドをコードするHMG1L9の核酸配列（配列番号36）である。図14JはHMGBポリペプチドをコードするHMG1L9のポリペプチド配列（配列番号28）である。図14KはHMGBポリペプチドをコードするLOC122441の核酸配列（配列番号37）である。図14LはHMGBポリペプチドをコードするLOC122441のポリペプチド配列（配列番号29）である。図14MはHMGBポリペプチドをコードするLOC139603の核酸配列（配列番号38）である。図14NはHMGBポリペプチドをコードするLOC139603のポリペプチド配列（配列番号30）である。図14OはHMGBポリペプチドをコードするHMG1L8の核酸配列（配列番号39）である。図14PはHMGBポリペプチドをコードするHMG1L8のポリペプチド配列（配列番号31）である。

30

【配列表】

40

## SEQUENCE LISTING

<110> Critical Therapeutics, Inc.  
Newman, Walter  
O'Keefe, Theresa L.

<120> USE OF HMGB FRAGMENTS AS  
ANTI-INFLAMMATORY AGENTS

<130> 3258.1008003

<150> 60/427,846

<151> 2002-11-20

<150> 60/427,841

<151> 2002-11-20

<160> 58

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
 1      5      10      15
Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
 20      25      30
Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
 35      40      45
Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
 50      55      60
Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro
 65      70      75      80
Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
 85      90      95
Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys
100     105     110
Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
115     120     125
Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
130     135     140
Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
145     150     155     160
Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val
165     170     175
Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu
180     185     190     195
Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu
200     205
Glu Glu Asp Asp Asp Glu
210     215

```

<210> 2

<211> 215

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

20

30

```

<400> 2
Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
1      5      10      15
Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu His Lys Lys Lys His Pro
20      25      30
Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
35      40      45
Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
50      55      60
Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro
65      70      75      80
Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
85      90      95
Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys
100     105     110
Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
115     120     125
Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
130     135     140
Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
145     150     155     160
Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val
165     170     175
Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Asp Asp Glu Glu
180     185     190
Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu
195     200     205
Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
210     215

```

10

```

<210> 3
<211> 209
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

20

```

<400> 3
Met Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
1      5      10      15
Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
20      25      30
Asp Ser Ser Val Asn Phe Ala Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
35      40      45
Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Ser Lys Phe Glu Asp Met Ala
50      55      60
Lys Ser Asp Lys Ala Arg Tyr Asp Arg Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro
65      70      75      80
Pro Lys Gly Asp Lys Lys Gly Lys Lys Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
85      90      95
Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu His Arg Pro Lys
100     105     110
Ile Lys Ser Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys Lys
115     120     125
Leu Gly Glu Met Trp Ser Glu Gln Ser Ala Lys Asp Lys Gln Pro Tyr
130     135     140
Glu Gln Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
145     150     155     160
Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Ser Glu Ala Gly Lys Lys Gly Pro Gly
165     170     175
Arg Pro Thr Gly Ser Lys Lys Lys Asn Glu Pro Glu Asp Glu Glu Glu
180     185     190
Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu

```

30

Glu 195 200 205  
 <210> 4  
 <211> 54  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4  
 Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met  
 20 25 30  
 Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile  
 35 40 45  
 Pro Pro Lys Gly Glu Thr  
 50 10  
 <210> 5  
 <211> 69  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5  
 Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp  
 20 25 30  
 Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp  
 35 40 45  
 Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu  
 50 55 60  
 Lys Asp Ile Ala Ala  
 65 20  
 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6  
 gatgggcaaa ggagatccta ag 22  
 <210> 7  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens 30  
 <400> 7  
 gcggccgctt attcatcatc atcatcttc 29  
 <210> 8  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8  
 gatgggcaaa ggagatccta ag 22

<210> 9  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 9  
 gcggccgctc acttgctttt ttcagccttg ac 32

<210> 10  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 10  
 gagcataaga agaagcacc a 21

10

<210> 11  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 11  
 gcggccgctc acttgctttt ttcagccttg ac 32

<210> 12  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 12  
 aagttcaagg atcccaatgc aaag 24

20

<210> 13  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 13  
 gcggccgctc aatatgcagc tatatccttt tc 32

<210> 14  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 14  
 gatgggcaaa ggagatccta ag 22

<210> 15 30

<211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 15  
 tcactttttt gtctcccctt tggg 24

<210> 16  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 16

40

Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Tyr Arg Pro Lys  
 20

<210> 17  
 <211> 54  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 17  
 Pro Asp Ser Ser Val Asn Phe Ala Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Ser Lys Phe Glu Asp Met  
 20 25 30  
 Ala Lys Ser Asp Lys Ala Arg Tyr Asp Arg Glu Met Lys Asn Tyr Val  
 35 40 45  
 Pro Pro Lys Gly Asp Lys  
 50

10

<210> 18  
 <211> 216  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 18  
 Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Thr Gly Lys Met Ser Ser Tyr  
 1 5 10 15  
 Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro  
 20 25 30  
 Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg  
 35 40 45  
 Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala  
 50 55 60  
 Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro  
 65 70 75 80  
 Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys  
 85 90 95  
 Arg Leu Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys  
 100 105 110  
 Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys  
 115 120 125  
 Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr  
 130 135 140  
 Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala  
 145 150 155 160  
 Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val  
 165 170 175  
 Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu  
 180 185 190  
 Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp  
 195 200 205  
 Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu  
 210 215

20

30

<210> 19  
 <211> 182  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 19

```

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Thr Gly Lys Met Ser Ser Tyr
1      5      10      15
Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
20      25      30
Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
35      40      45
Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
50      55      60
Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro
65      70      75      80
Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
85      90      95
Arg Leu Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys
100     105     110
Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
115     120     125
Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
130     135     140
Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
145     150     155     160
Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val
165     170     175
Lys Ala Glu Lys Ser Lys
180

```

10

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 74

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 20

```

Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Leu Pro Ser Ala Phe Phe Leu
1      5      10      15
Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu
20      25      30
Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr
35      40      45
Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys
50      55      60
Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr
65      70

```

20

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 85

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 21

```

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Thr Gly Lys Met Ser Ser Tyr
1      5      10      15
Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
20      25      30
Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
35      40      45
Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
50      55      60
Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro
65      70      75      80
Pro Lys Gly Glu Thr

```

30

85

<210> 22  
 <211> 77  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 22  
 Pro Thr Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg  
 1 5 10 15  
 Glu Glu His Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu  
 20 25 30  
 Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu  
 35 40 45  
 Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu  
 50 55 60  
 Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly Glu Thr  
 65 70 75

10

<210> 23  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 23  
 Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Leu Pro Ser Ala Phe Phe Leu  
 1 5 10 15  
 Phe Cys Ser Glu  
 20

20

<210> 24  
 <211> 216  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 24  
 Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Thr Gly Lys Met Ser Ser Tyr  
 1 5 10 15  
 Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro  
 20 25 30  
 Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg  
 35 40 45  
 Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala  
 50 55 60  
 Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro  
 65 70 75 80  
 Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys  
 85 90 95  
 Arg Leu Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys  
 100 105 110  
 Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys  
 115 120 125  
 Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr  
 130 135 140  
 Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala  
 145 150 155 160  
 Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val  
 165 170 175  
 Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu

30



```

      180      185      190
Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp
      195      200      205
Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
      210      215

```

```

<210> 25
<211> 211
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 25
Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
 1      5      10      15
Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Ser
 20      25      30
Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Asn Lys Cys Ser Glu Arg
 35      40      45
Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
 50      55      60
Lys Ala Asp Lys Thr His Tyr Glu Arg Gln Met Lys Thr Tyr Ile Pro
 65      70      75      80
Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
 85      90      95
Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr His Pro Lys
100     105     110
Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
115     120     125
Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Gly
130     135     140
Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
145     150     155     160
Ala Tyr Gln Ala Lys Gly Lys Pro Glu Ala Ala Lys Lys Gly Val Val
165     170     175
Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu
180     185     190
Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Asp
195     200     205
Asp Asp Glu
210

```

```

<210> 26
<211> 188
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 26
Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
 1      5      10      15
Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu Cys Lys Lys Lys His Pro
 20      25      30
Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
 35      40      45
Trp Lys Ala Met Ser Ala Lys Asp Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
 50      55      60
Lys Val Asp Lys Asp Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro
 65      70      75      80
Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Glu Asp Ser Asn Ala Pro Lys
 85      90      95
Arg Pro Pro Ser Ala Phe Leu Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Cys Pro Lys

```

10

20

30

```

      100      105      110
Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Pro Ile Ser Asp Val Ala Lys Lys
      115      120      125
Leu Val Glu Met Trp Asn Asn Thr Phe Ala Asp Asp Lys Gln Leu Cys
      130      135      140
Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Lys Lys Asp Thr Ala
      145      150      155      160
Thr Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val
      165      170      175
Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu
      180      185

```

<210> 27  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

```

<400> 27
Met Asp Lys Ala Asp Pro Lys Lys Leu Arg Gly Glu Met Leu Ser Tyr
 1      5      10      15
Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Gln Glu Glu His Lys Lys Lys Asn Pro
 20      25      30
Asp Ala Ser Val Lys Phe Ser Glu Phe Leu Lys Lys Cys Ser Glu Thr
 35      40      45
Trp Lys Thr Ile Phe Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
 50      55      60
Lys Ala Asp Lys Ala His Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro
 65      70      75      80
Pro Lys Gly Glu Lys Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
 85      90      95
Arg Pro Pro Leu Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys
 100      105      110
Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Asp Asp Val Val Lys Lys
 115      120      125
Leu Ala Gly Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Ala Asp Lys Gln Phe Tyr
 130      135      140
Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Lys Lys Asp Ile Ala
 145      150      155      160
Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asn Ser Ala Lys Lys Arg Val Val
 165      170      175
Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu
 180      185      190
Asp Glu Gln Glu Glu Asn Glu Glu Asp Asp Asp Lys
 195      200      205

```

20

<210> 28  
 <211> 80  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30

```

<400> 28
Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Cys
 1      5      10      15
Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Trp Glu Glu His Lys Lys Gln Tyr Pro
 20      25      30
Asp Ala Ser Ile Asn Phe Ser Glu Phe Ser Gln Lys Cys Pro Glu Thr
 35      40      45
Trp Lys Thr Thr Ile Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Pro
 50      55      60
Lys Ala Asp Lys Ala His Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro

```

10

20

30

<210> 32  
<211> 648  
<212> DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 32

```

atgggcaaag gagatcctaa gaagccgaca ggcaaaatgt catcatatgc attttttgtg 60
caaacttgtc gggaggagca taagaagaag caccagatg cttcagtcaa cttctcagag 120
ttttctaaga agtgctcaga gaggtggaag accatgtctg ctaaagagaa aggaaaattt 180
gaagatatgg caaaggcgga caaggcccgat tatgaaagag aaatgaaaac ctatatccct 240
cccaaagggg agacaaaaaa gaagttcaag gatcccaatg caccgaagag gcttccttcg 300
gcctttcttc tcttctgctc tgagtatcgc ccaaaaatca aaggagaaca tcctggcctg 360
tccattgggtg atgttgcgaa gaaactggga gagatgtgga ataactctgc tgcagatgac 420
aagcagcctt atgaaaagaa ggctgcgaag ctgaaggaaa aatacgaaaa ggatatagct 480
gcataatcgag ctaaaaggaaa gcctgatgca gcaaaaaagg gagttgtcaa ggctgaaaaa 540
agcaagaaaa agaaggaaaga ggagggaagat gaggaagatg aagaggatga ggaggaggag 600
gaagatgaag aagatgaaga agatgaagaa gaagatgatg atgatgaa 648

```

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 633

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 33

```

atgggcaaag gagatcctaa gaagccgaga ggcaaaatgt catcatatgc attttttgtg 60
caaacttgtc gggaggagca taagaagaag cactcagatg cttcagtcaa cttctcagag 120
ttttctaaga agtgctcaga gaggtggaag accatgtctg ctaaagagaa aggaaaattt 180
gaggatatgg caaaggcgga caagacccat tatgaaagac aaatgaaaac ctatatccct 240
cccaaagggg agacaaaaaa gaagttcaag gatcccaatg caccgaagag gcctccttcg 300
gcctttcttc tcttctgctc tgagtatcac ccaaaaatca aaggagaaca tcctggcctg 360
tccattgggtg atgttgcgaa gaaactggga gagatgtgga ataactctgc tgcagatgac 420
aagcagcctg gtgaaaagaa ggctgcgaag ctgaaggaaa aatacgaaaa ggatatgtct 480
gcataatcaag ctaaaaggaaa gcctgaggca gcaaaaaagg gagttgtcaa agctgaaaaa 540
agcaagaaaa agaaggaaaga ggagggaagat gaggaagatg aagaggatga ggaggaggaa 600
gatgaagaag atgaagaaga tgatgatgat gaa 633

```

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 564

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 34

```

atgggcaaag gagaccctaa gaagccgaga ggcaaaatgt catcatatgc attttttgtg 60
caaacttgtc gggaggagtg taagaagaag caccagatg cttcagtcaa cttctcagag 120
ttttctaaga agtgctcaga gaggtggaag gccatgtctg ctaaagataa aggaaaattt 180
gaagatatgg caaagggtgga caaagaccgt tatgaaagag aaatgaaaac ctatatccct 240
cctaaagggg agacaaaaaa gaagttcgag gattccaatg caccgaagag gcctccttcg 300
gcctttttgc tgttctgctc tgagtattgc ccaaaaatca aaggagagca tcctggcctg 360
cctattagcg atgttgcaaa gaaactggta gagatgtgga ataactctt tgcagatgac 420
aagcagcctt gtgaaaagaa ggctgcgaag ctgaaggaaa aatacaaaaa ggatacagct 480
acataatcgag ctaaaaggaaa gcctgatgca gcaaaaaagg gagttgtcaa ggctgaaaaa 540
agcaagaaaa agaaggaaaga ggag

```

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 615

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 35

```

atggacaaag cagatcctaa gaagctgaga ggtgaaatgt tatcatatgc attttttgtg 60
caaacttgtc aggaggagca taagaagaag aaccagatg cttcagtcaa gttctcagag 120
tttttaaga agtgctcaga gacatggaag accatttttg ctaaagagaa aggaaaattt 180
gaagatatgg caaaggcgga caaggcccat tatgaaagag aaatgaaaac ctatatccct 240
cctaaagggg agaaaaaaa gaagttcaag gatcccaatg caccgaagag gcctcctttg 300
gccttttttc tgttctgctc tgagtatcgc ccaaaaatca aaggagaaca tcctggcctg 360

```

10

20

30

40

```

tccattgatg atgttgtgaa gaaactggca gggatgtgga ataacaccgc tgcagctgac 420
aagcagtttt atgaaaagaa ggctgcaaaag ctgaaggaaa aatacaaaaa ggatattgct 480
gcatatcgag ctaaaggaaa gcctaattca gcaaaaaaga gagggtgtcaa ggctgaaaaa 540
agcaagaaaa agaagggaaga ggaagaagat gaagaggatg aacaagagga ggaaaatgaa 600
gaagatgatg ataaa                                     615

```

```

<210> 36
<211> 240
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 36
atgggcaaaag gagatcctaa gaagccgaga ggcaaaatgt catcatgtgc attttttgtg 60
caaaacttgtt gggaggagca taagaagcag taccagatg cttcaatcaa cttctcagag 120
ttttctcaga agtgcccaga gacgtggaag accacgattg ctaaagagaa aggaaaattt 180
gaagatatgc caaaggcaga caaggcccat tatgaaagag aatgaaaaac ctatatacc 240

```

10

```

<210> 37
<211> 240
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 37
aaacagagag gcaaaatgcc atcgtatgta ttttgtgtgc aaacttgtcc ggaggagcgt 60
aagaagaaac accagatgc ttcagtcac ttctcagagt tttctaagaa gtgcttagtg 120
agggggaaga ccatgtctgc taaagagaaa ggacaatttg aagctatggc aagggcagac 180
aaggcccggt acgaaagaga aatgaaaaca tatatccctc ctaaagggga gacaaaaaaa 240

```

```

<210> 38
<211> 258
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

20

```

<400> 38
atgggcaaaa gagaccctaa gcagccaaga ggcaaaatgt catcatatgc attttttgtg 60
caaaactgtct agggaggagca caagaagaaa caactagatg cttcagtcag tttctcagag 120
ttttctaaga actgctcaga gagggtggaag accatgtctg ttaaagagaa aggaaaattt 180
gaagacatgg caaaggcaga caaggcctgt tatgaaagag aatgaaaat atatccctac 240
ttaaagggga gacaaaaa                                     258

```

```

<210> 39
<211> 211
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 39
atgggcaaaag gagaccctaa gaagccaaga gagaaaatgc catcatatgc attttttgtg 60
caaaacttcta gggaggcaca taagaacaaa catccagatg cttcagtcag ctctcagag 120
ttttctaaga agtgctcaga gagggtggaag accatgccta ctaaacagaa aggaaaattc 180
gaagatatgg caaaggcaga cagggcccat a                                     211

```

30

```

<210> 40
<211> 54
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 40
Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu
1           5           10          15
Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met

```

```

      20      25      30
Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile
      35      40      45
Pro Pro Lys Gly Glu Thr
      50

```

```

<210> 41
<211> 53
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 41
Asp Ser Ser Val Asn Phe Ala Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
 1      5      10      15
Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Ser Lys Phe Glu Asp Met Ala
      20      25      30
Lys Ser Asp Lys Ala Arg Tyr Asp Arg Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro
      35      40      45
Pro Lys Gly Asp Lys
      50

```

10

```

<210> 42
<211> 54
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 42
Pro Glu Val Pro Val Asn Phe Ala Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu
 1      5      10      15
Arg Trp Lys Thr Val Ser Gly Lys Glu Lys Ser Lys Phe Asp Glu Met
      20      25      30
Ala Lys Ala Asp Lys Val Arg Tyr Asp Arg Glu Met Lys Asp Tyr Gly
      35      40      45
Pro Ala Lys Gly Gly Lys
      50

```

20

```

<210> 43
<211> 54
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 43
Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu
 1      5      10      15
Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met
      20      25      30
Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile
      35      40      45
Pro Pro Lys Gly Glu Thr
      50

```

30

```

<210> 44
<211> 54
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 44
Ser Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Asn Lys Cys Ser Glu

```

40

```

      1           5           10           15
Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met
      20           25           30
Ala Lys Ala Asp Lys Thr His Tyr Glu Arg Gln Met Lys Thr Tyr Ile
      35           40           45
Pro Pro Lys Gly Glu Thr
      50

```

```

<210> 45
<211> 54
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 45
Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu
      1           5           10           15
Arg Trp Lys Ala Met Ser Ala Lys Asp Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met
      20           25           30
Ala Lys Val Asp Lys Ala Asp Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile
      35           40           45
Pro Pro Lys Gly Glu Thr
      50

```

10

```

<210> 46
<211> 54
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 46
Pro Asp Ala Ser Val Lys Phe Ser Glu Phe Leu Lys Lys Cys Ser Glu
      1           5           10           15
Thr Trp Lys Thr Ile Phe Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met
      20           25           30
Ala Lys Ala Asp Lys Ala His Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile
      35           40           45
Pro Pro Lys Gly Glu Lys
      50

```

20

```

<210> 47
<211> 54
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 47
Pro Asp Ala Ser Ile Asn Phe Ser Glu Phe Ser Gln Lys Cys Pro Glu
      1           5           10           15
Thr Trp Lys Thr Thr Ile Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met
      20           25           30
Ala Lys Ala Asp Lys Ala His Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile
      35           40           45
Pro Pro Lys Gly Glu Thr
      50

```

30

```

<210> 48
<211> 38
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

&lt;400&gt; 48

Pro Asp Ala Ser Val Asn Ser Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Arg Trp Lys Thr Met Pro Thr Lys Gln Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala  
 20 25 30  
 Lys Ala Asp Arg Ala His  
 35

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 54

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 49

Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Leu Val  
 1 5 10 15  
 Arg Gly Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Gln Phe Glu Ala Met  
 20 25 30  
 Ala Arg Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile  
 35 40 45  
 Pro Pro Lys Gly Glu Thr  
 50

10

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 54

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 50

Leu Asp Ala Ser Val Ser Phe Ser Glu Phe Ser Asn Lys Cys Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Arg Trp Lys Thr Met Ser Val Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met  
 20 25 30  
 Ala Lys Ala Asp Lys Ala Cys Tyr Glu Arg Glu Met Lys Ile Tyr Pro  
 35 40 45  
 Tyr Leu Lys Gly Arg Gln  
 50

20

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 74

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 51

Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu  
 1 5 10 15  
 Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu  
 20 25 30  
 Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr  
 35 40 45  
 Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys  
 50 55 60  
 Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr  
 65 70

30

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 74

&lt;212&gt; PRT



<213> Homo sapiens

<400> 52

```

Lys Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu
 1           5           10           15
Phe Cys Ser Glu His Arg Pro Lys Ile Lys Ser Glu His Pro Gly Leu
 20           25           30
Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Ser Glu Gln
 35           40           45
Ser Ala Lys Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Gln Lys Ala Ala Lys Leu Lys
 50           55           60
Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr
65           70

```

<210> 53

<211> 74

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

```

Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Leu Pro Ser Ala Phe Phe Leu
 1           5           10           15
Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu
 20           25           30
Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr
 35           40           45
Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys
 50           55           60
Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr
65           70

```

<210> 54

<211> 74

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

```

Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu
 1           5           10           15
Phe Cys Ser Glu Tyr His Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu
 20           25           30
Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr
 35           40           45
Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Gly Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys
 50           55           60
Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr
65           70

```

<210> 55

<211> 74

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

```

Phe Lys Asp Ser Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Leu Leu
 1           5           10           15
Phe Cys Ser Glu Tyr Cys Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu
 20           25           30
Pro Ile Ser Asp Val Ala Lys Lys Leu Val Glu Met Trp Asn Asn Thr

```

10

20

30

35 40 45  
 Phe Ala Asp Asp Lys Gln Leu Cys Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys  
 50 55 60  
 Glu Lys Tyr Lys Lys Asp Thr Ala Thr Tyr  
 65 70

<210> 56  
 <211> 74  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 56  
 Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu  
 1 5 10 15  
 Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu  
 20 25 30  
 Ser Ile Gly Asp Val Val Lys Lys Leu Ala Gly Met Trp Asn Asn Thr  
 35 40 45  
 Ala Ala Ala Asp Lys Gln Phe Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys  
 50 55 60  
 Glu Lys Tyr Lys Lys Asp Ile Ala Ala Tyr  
 65 70

10

<210> 57  
 <211> 84  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 57  
 Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala  
 1 5 10 15  
 Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp  
 20 25 30  
 Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp  
 35 40 45  
 Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys  
 50 55 60  
 Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro  
 65 70 75 80  
 Lys Gly Glu Thr

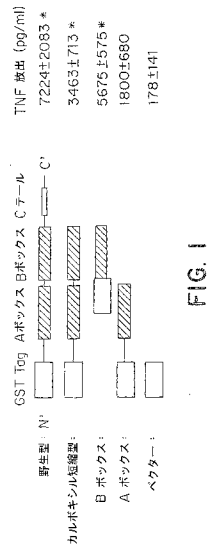
20

<210> 58  
 <211> 92  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

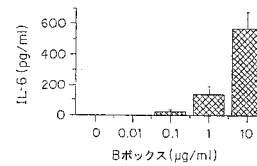
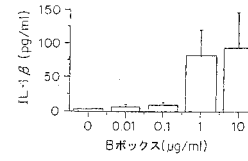
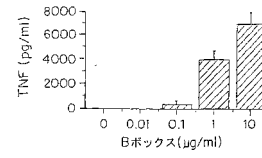
30

<400> 58  
 Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu  
 1 5 10 15  
 Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu  
 20 25 30  
 Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr  
 35 40 45  
 Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys  
 50 55 60  
 Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys

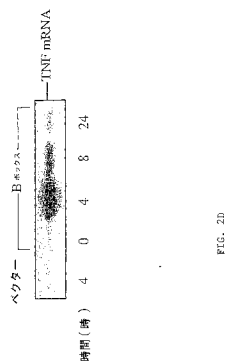
【図 1】



【図 2 - 1】



【図 2 - 2】

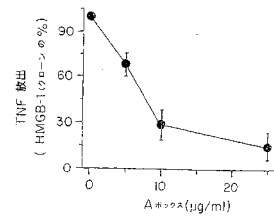


【図 3】

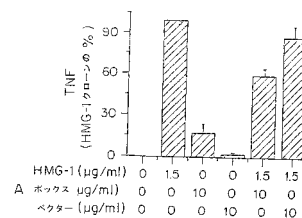
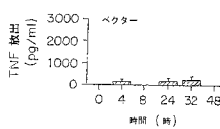
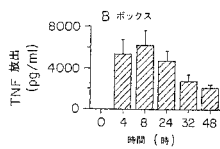
B ボックス濃度	TNF 放出 (pg/ml)
0	5675 ± 575
1-20	2100 ± 756
16-35	100 ± 10
30-49	120 ± 75
45-64	100 ± 36
60-74	100 ± 20

FIG. 3

【図 4】



【図 2 - 3】



【 図 5 】

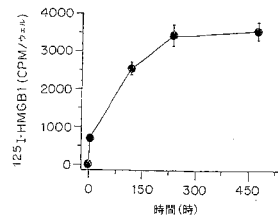


FIG. 5A

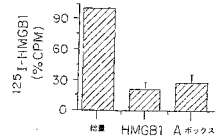


FIG. 5B

【 図 6 】

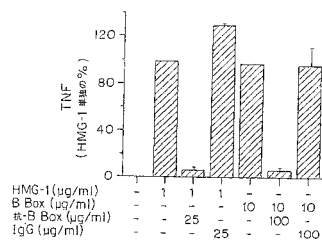


FIG. 6

【 図 7 - 2 】

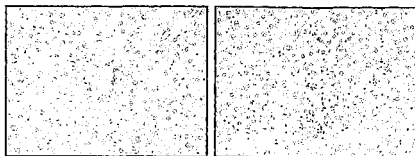


FIG. 7G

FIG. 7H

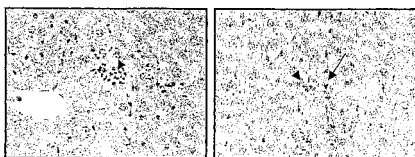


FIG. 7I

FIG. 7J

【 図 8 】

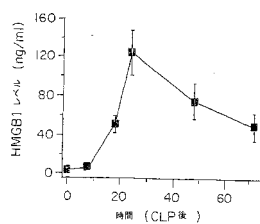


FIG. 8

【 図 7 - 1 】

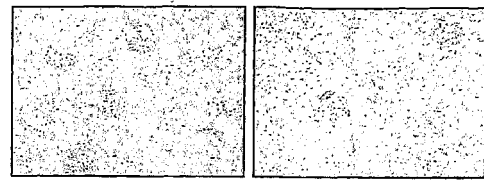


FIG. 7A

FIG. 7B

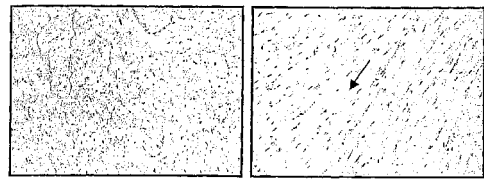


FIG. 7C

FIG. 7D

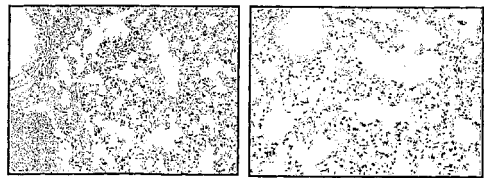


FIG. 7E

FIG. 7F

【 図 9 】

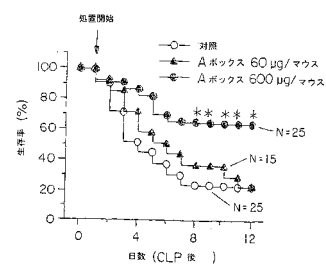
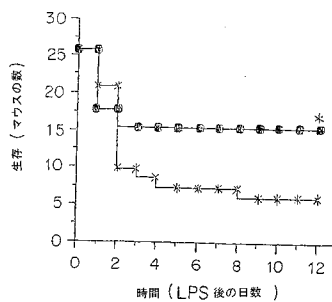
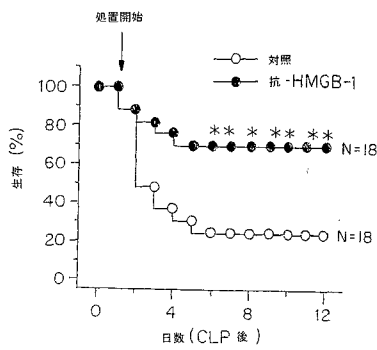
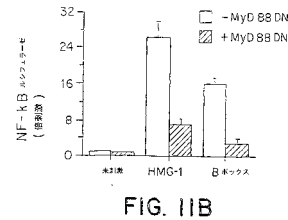
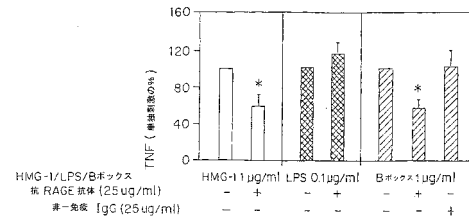


FIG. 9

【図 10】



【図 11】



【図 12 - 1】

FIG. 12A  
配列番号: 1  
- ヒト HMGB1 アミノ酸配列  
1 mgkgdipkpr gkmssyaffv qcreehkdk hpdasvnfse fskksesrwk tmsakelgkf  
61 edmakadilar yeremktyip plgedkdkkf dnpakrpps afflfcseyr plukgehppl  
121 sigdvakldg emwnntaadd kqpyekkaak lkelyekdia ayzakgkpdia akkgvzvkaek  
181 skkkkceedd eedeeedee eedeeedee dddde

FIG. 12B  
配列番号: 2  
- マウスおよびラット HMGB1 アミノ酸配列  
1 mgkgdipkpr gkmssyaffv qcreehkdk hpdasvnfse fskksesrwk tmsakelgkf  
61 edmakadilar yeremktyip plgedkdkkf dnpakrpps afflfcseyr plukgehppl  
121 sigdvakldg emwnntaadd kqpyekkaak lkelyekdia ayzakgkpdia akkgvzvkaek  
181 skkkkceedd eedeeedee eedeeedee dddde

FIG. 12C  
配列番号: 3  
- ヒト HMGB2 アミノ酸配列  
1 mgkgdipkpr gkmssyaffv qcreehkdk hpdasvnfse fskksesrwk tmsakelgkf  
61 edmakadilar yeremktyip plgedkdkkf dnpakrpps afflfcseyr plukgehppl  
121 sigdvakldg emwnntaadd kqpyekkaak lkelyekdia ayzakgkpdia akkgvzvkaek  
181 skkkkceedd eedeeedee eedeeedee dddde

FIG. 12D  
配列番号: 4  
- ヒト、マウスおよびラット HMGB1 Aボックスタンパク質配列  
1 pdasvnfse fskksesrwk tmsakelgkf dnmakadilar yeremktyip kget

FIG. 12E  
配列番号: 5  
- ヒト、マウス、およびラット HMGB1 タンパク質配列  
1 rapkppsaif flfcseyrpk kgehpplsi gdvakldgkm wnttaddkq pyekkaaklk  
61 elyekdia

FIG. 12F  
配列番号: 6  
- ヒト HMGB1 のフォワードPCRプライマー  
gaagggaaggaatctctaa  
配列番号: 7

FIG. 12G  
配列番号: 7  
- ヒト HMGB1 のリバーPCRプライマー1  
ggcgccgtattctatcatcatcttc

FIG. 12H  
配列番号: 8  
- ヒト HMGB1 の-C変異体のPCRプライマー  
gaagggaaggaatctctaa

【図 12 - 2】

FIG. 12I  
配列番号: 9  
- ヒト HMGB1 の-C変異体のためのリバーPCRプライマー  
ggcgccgtattctatcatcatcttc

FIG. 12J  
配列番号: 10  
- ヒト HMGB1 のA+BボックスのためのフォワードPCRプライマー  
gagcctaaaggaaggaatctctaa

FIG. 12K  
配列番号: 11  
- ヒト HMGB1 のA+Bボックス変異体のためのリバーPCRプライマー  
ggcgccgtattctatcatcatcttc

FIG. 12L  
配列番号: 12  
- ヒト HMGB1 のBボックス変異体のためのフォワードPCRプライマー  
aagtcgaaggaatctctaa

FIG. 12M  
配列番号: 13  
- ヒト HMGB1 のBボックス変異体のためのリバーPCRプライマー  
ggcgccgtattctatcatcatcttc

FIG. 12N  
配列番号: 14  
- ヒト HMGB1 のN'+Aボックス変異体のためのフォワードPCRプライマー  
gaagggaaggaatctctaa

FIG. 12O  
配列番号: 15  
- ヒト HMGB1 のN'+Aボックス変異体のためのリバーPCRプライマー  
tcattctttgttccctctggg

## 【図 1 3】

1 mkgdpldplpr glmsyaffv qtrechkkk hpdasvnfse fhdoserwk tmsakegkf rat #P07153  
1 mkgdpldplpr glmsyaffv qtrechkkk hpdasvnfse fhdoserwk tmsakegkf mouse #A4A20508  
1 mkgdpldplpr glmsyaffv qtrechkkk hpdasvnfse fhdoserwk tmsakegkf human #A4A464970

A ボックス

61 edmakadlar yeremityip plgettkkkf dnapkprps affisey plkghegpl ラット  
61 edmakadlar yeremityip plgettkkkf dnapkprps affisey plkghegpl マウス  
61 edmakadlar yeremityip plgettkkkf dnapkprps affisey plkghegpl ヒト

B ボックス

121 sigdvahlg emwnnaadd kpyekkaak fkekyekdia ayrakgkpd akggvkaek ラット  
121 sigdvahlg emwnnaadd kpyekkaak fkekyekdia ayrakgkpd akggvkaek マウス  
121 sigdvahlg emwnnaadd kpyekkaak fkekyekdia ayrakgkpd akggvkaek ヒト

181 skkkkeedd ededeede edede deee dddd ラット  
181 skkkkeedd ededeede edede deee dddd マウス  
181 skkkkeedd ededeede edede deee dddd ヒト

FIG. 13

## 【図 1 4 - 2】

FIG. 14E  
AF076676 DNA (塩基 1-564)  
ATGGGCAAG GAGACCTTAA GAAGCCGAGA GGC AAAATGT CATCATATGC  
ATT TTTTGTG CAACTTGTG GGGAGGAGTG TAAGAAGAG ACCCAGATG  
CTTCAGTCAA CTTCAGAG TTTCTAAGA AGGTCTCAGA GAGGTGGAAG  
GCATTTCTG CTAAGAATA AGGAAATTT GAGGTATGG CAAGGTGGA  
CAAGAGCGT TAAGAAGAG AATGAAATC CTATATCCCT CTAAGAAGG  
AGACAAAAA GAGTTGAG GATTCGAATG CACCAAGAG GCCTCTTTCG  
GCCTTTTTCG TGTCTGCTC TGAGTATGCG CCAAAAATCA AAGGAGAGCA  
TCCTGCGCTG CTAATTAAGG ATGTGCAAA GAACTGTGTA GAGGTGTGGA  
ATAACCTTT TCGATGAG AGGAGCTTT CTGAAGAAGA GCGTGCRAAG  
CTGAAGGAAA AATACAAAA GAGTACAGCT ACATATCGAG CTAAGAAGAA  
GCGTGTGCA GCAAAAAGG GAGTTGTCAA GCTGAAAAA AGCAAGAAAA  
AGAGGAAGA GGAG

FIG. 14F  
AF076676 タンパク質  
MKGDPKKPR GRMSSYAFFV QTCRECKKK HPDASVNFSE FSKKCSERWK  
TMSAKEGKF EDMAKADKH YEREMITYIP PKGRTKKKF DMAPKRPSP  
APFLPCSETR PKLKEHPGL SIGGVVKAEL EWNNTAAD KQYERKAAK  
LKEKYKEDIA AYRAKKNPS AKGVVKAEL SKKKKEED EDEDEDEE

FIG. 14G  
AC010149 DNA (塩基 75503-76117)  
ATGGACAAG CAGATCTTAA GAAGCTGAGA GTGAAATGT TATCATATGC  
ATT TTTTGTG CAACTTGTG AGGAGGAGCA TAAGAAGAG AACCCAGATG  
CTTCAGTCAA GTTCTCAGAG TTTTAAAGA AGTCTCAGA GACATGGAAG  
ACCATTTTGT CTAAGAAGAA AGGAAATTT GAGGTATGG CAAGGCGGGA  
CAAGGCCCTT TAAGAAGAG AATGAAATC CTATATCCCT CTAAGAAGG  
AGACAAAAA GAGTTCAAG GATCCGAATG CACCAAGAG GCCTCTTTCG  
GCCTTTTTCG TGTCTGCTC TGAGTATGCG CCAAAAATCA AAGGAGAGCA  
TCCTGCGCTG TCAATTAAGG ATGTGCAAA GAACTGTGTA GAGGTGTGGA  
ATAACCTTT TCGATGAG AGGAGCTTT CTGAAGAAGA GCGTGCRAAG  
CTGAAGGAAA AATACAAAA GAGTACAGCT ACATATCGAG CTAAGAAGAA  
GCGTGTGCA GCAAAAAGG GAGTTGTCAA GCTGAAAAA AGCAAGAAAA  
GAGATGATG ATAA

FIG. 14H  
AC010149 タンパク質  
MDKADPKLR GEMLSYAFFV QTCREHKKK HPDASVNFSE FLKCSERWK  
TTFKEGKGF EDMAKADKH YEREMITYIP PKGRTKKKF DMAPKRPSP  
APFLPCSETR PKLKEHPGL SIGGVVKAEL EWNNTAAD KQYERKAAK  
LKEKYKEDIA AYRAKKNPS AKGVVKAEL SKKKKEED EDEDEDEE

## 【図 1 4 - 1】

FIG. 14A  
NG 000897 DNA (塩基 150-797)  
ATGGGCAAG GAGATCTTAA GAAGCCGAGA GGC AAAATGT CATCATATGC  
ATT TTTTGTG CAACTTGTG GGGAGGAGCA TAAGAAGAG ACCCAGATG  
CTTCAGTCAA CTTCAGAG TTTTCTAAGA AGTCTCAGA GAGGTGGAAG  
ACCATTTTGT CTAAGAAGAA AGGAAATTT GAGGTATGG CAAGGCGGGA  
CAAGGCCCTT TAAGAAGAG AATGAAATC CTATATCCCT CCAAGAAGG  
AGACAAAAA GAGTTCAAG GATCCGAATG CACCAAGAG GCCTCTTTCG  
GCCTTTTTCG TGTCTGCTC TGAGTATGCG CCAAAAATCA AAGGAGAGCA  
TCCTGCGCTG TCAATGATG ATGTGCGAA GAACTGGA GAGATGTGGA  
ATAACCTGCT TCGAGATGAG AAGCAGCTCT ATGAAAAGAG GCGTGCRAAG  
CTGAAGGAAA AATACAAAA GAGTATGCT GATATCGAG CTAAGAAGAA  
GCCTGTGCA GCAAAAAGG GAGTTCTCAA GCTGAAAAA AGCAAGAAA  
AGAAGGAGA GAGGAAGAT GAGGAAGATG AAGAGATGA GAGGAGAGG  
GAGATGAGG AGATGAGA AGATGAGA GAGATGATG ATGATGAA

FIG. 14B  
NG 000897 タンパク質  
MKGDPKKPR GRMSSYAFFV QTCREHKKK HPDASVNFSE FSKKCSERWK  
TMSAKEGKF EDMAKADKH YEREMITYIP PKGRTKKKF DMAPKRPSP  
APFLPCSETR PKLKEHPGL SIGGVVKAEL EWNNTAAD KQYERKAAK  
LKEKYKEDIA AYRAKKNPS AKGVVKAEL SKKKKEED EDEDEDEE

FIG. 14C  
AF076674 DNA (塩基 1-633)  
ATGGGCAAG GAGATCTTAA GAAGCCGAGA GGC AAAATGT CATCATATGC  
ATT TTTTGTG CAACTTGTG GGGAGGAGCA TAAGAAGAG CACTCAGATG  
CTTCAGTCAA CTTCAGAG TTTTCTAAGA AGTCTCAGA GAGGTGGAAG  
ACCATTTTGT CTAAGAAGAA AGGAAATTT GAGGTATGG CAAGGCGGGA  
CAAGGCCCTT TAAGAAGAG AATGAAATC CTATATCCCT CCAAGAAGG  
AGACAAAAA GAGTTCAAG GATCCGAATG CACCAAGAG GCCTCTTTCG  
GCCTTTTTCG TGTCTGCTC TGAGTATGAG CCAAAAATCA AAGGAGAGCA  
TCCTGCGCTG TCAATGATG ATGTGCGAA GAACTGGA GAGATGTGGA  
ATAACCTGCT TCGAGATGAG AAGCAGCTCT ATGAAAAGAG GCGTGCRAAG  
CTGAAGGAAA AATACAAAA GAGTATGCT GATATCGAG CTAAGAAGAA  
GCCTGTGCA GCAAAAAGG GAGTTCTCAA GCTGAAAAA AGCAAGAAA  
AGAAGGAGA GAGGAAGAT GAGGAAGATG AAGAGATGA GAGGAGAGG  
GATGAGAAG ATGAGAAGA TGATGATGAT GAA

FIG. 14D  
AF076674 タンパク質  
MKGDPKKPR GRMSSYAFFV QTCREHKKK HPDASVNFSE FSKKCSERWK  
TMSAKEGKF EDMAKADKH YEREMITYIP PKGRTKKKF DMAPKRPSP  
APFLPCSETR PKLKEHPGL SIGGVVKAEL EWNNTAAD KQYERKAAK  
LKEKYKEDIA AYRAKKNPS AKGVVKAEL SKKKKEED EDEDEDEE

## 【図 1 4 - 3】

FIG. 14I  
AF165168 DNA (塩基 729-968)  
ATGGGCAAG GAGATCTTAA GAAGCCGAGA GGC AAAATGT CATCATATGC  
ATT TTTTGTG CAACTTGTG GGGAGGAGCA TAAGAAGAG TACCAGATG  
CTTCAGTCAA CTTCAGAG TTTTCTAAGA AGTCTCAGA GAGGTGGAAG  
ACCATGATG CTAAGAAGAA AGGAAATTT GAGGTATGG CAAGGCGGGA  
CAAGGCCCTT TAAGAAGAG AATGAAATC CTATATCCCT CCAAGAAGG  
AGACAAAAA GAGTTCAAG GATCCGAATG CACCAAGAG GCCTCTTTCG  
GCCTTTTTCG TGTCTGCTC TGAGTATGAG CCAAAAATCA AAGGAGAGCA  
TCCTGCGCTG TCAATGATG ATGTGCGAA GAACTGGA GAGATGTGGA  
ATAACCTGCT TCGAGATGAG AAGCAGCTCT ATGAAAAGAG GCGTGCRAAG  
CTGAAGGAAA AATACAAAA GAGTATGCT GATATCGAG CTAAGAAGAA  
GCCTGTGCA GCAAAAAGG GAGTTCTCAA GCTGAAAAA AGCAAGAAA  
AGAAGGAGA GAGGAAGAT GAGGAAGATG AAGAGATGA GAGGAGAGG  
GATGAGAAG ATGAGAAGA TGATGATGAT GAA

FIG. 14J  
AF165168 タンパク質  
MKGDPKKPR GRMSSYAFFV QTCREHKKK HPDASVNFSE FSKKCSERWK  
TMSAKEGKF EDMAKADKH YEREMITYIP PKGRTKKKF DMAPKRPSP  
APFLPCSETR PKLKEHPGL SIGGVVKAEL EWNNTAAD KQYERKAAK  
LKEKYKEDIA AYRAKKNPS AKGVVKAEL SKKKKEED EDEDEDEE

FIG. 14K  
XM 063129 DNA (塩基 319-558)  
AAACGAGAG GAGAAATGCC ATGCTATGTA TTTTGTGTC AAACTTGTCC  
GAGGAGCTT TAAGAAGAG AATGAAATC CTATATCCCT CTAAGAAGG  
CTTCAGTCAA CTTCAGAG TTTTCTAAGA AGTCTCAGA GAGGTGGAAG  
ACCATGATG CTAAGAAGAA AGGAAATTT GAGGTATGG CAAGGCGGGA  
CAAGGCCCTT TAAGAAGAG AATGAAATC CTATATCCCT CCAAGAAGG  
AGACAAAAA GAGTTCAAG GATCCGAATG CACCAAGAG GCCTCTTTCG  
GCCTTTTTCG TGTCTGCTC TGAGTATGAG CCAAAAATCA AAGGAGAGCA  
TCCTGCGCTG TCAATGATG ATGTGCGAA GAACTGGA GAGATGTGGA  
ATAACCTGCT TCGAGATGAG AAGCAGCTCT ATGAAAAGAG GCGTGCRAAG  
CTGAAGGAAA AATACAAAA GAGTATGCT GATATCGAG CTAAGAAGAA  
GCCTGTGCA GCAAAAAGG GAGTTCTCAA GCTGAAAAA AGCAAGAAA  
AGAAGGAGA GAGGAAGAT GAGGAAGATG AAGAGATGA GAGGAGAGG  
GATGAGAAG ATGAGAAGA TGATGATGAT GAA

FIG. 14L  
XM 063129 タンパク質  
KQGRMPSYV FCVOTCPEER KKKHPDASV FSKKSKCLV RGTMSAKEK  
GQFEMRRAD KARYEREMK YIPKGRKK

FIG. 14M  
XM 066789 DNA (塩基 1-258)  
ATGGGCAAG GAGACCTTAA GAAGCCGAGA GGC AAAATGT CATCATATGC  
ATT TTTTGTG CAACTTGTG GGGAGGAGCA TAAGAAGAG CACTCAGATG  
CTTCAGTCAA CTTCAGAG TTTTCTAAGA AGTCTCAGA GAGGTGGAAG  
ACCATTTTGT CTAAGAAGAA AGGAAATTT GAGGTATGG CAAGGCGGGA  
CAAGGCCCTT TAAGAAGAG AATGAAATC CTATATCCCT CTAAGAAGG  
AGACAAAAA GAGTTCAAG GATCCGAATG CACCAAGAG GCCTCTTTCG  
GCCTTTTTCG TGTCTGCTC TGAGTATGAG CCAAAAATCA AAGGAGAGCA  
TCCTGCGCTG TCAATGATG ATGTGCGAA GAACTGGA GAGATGTGGA  
ATAACCTGCT TCGAGATGAG AAGCAGCTCT ATGAAAAGAG GCGTGCRAAG  
CTGAAGGAAA AATACAAAA GAGTATGCT GATATCGAG CTAAGAAGAA  
GCCTGTGCA GCAAAAAGG GAGTTCTCAA GCTGAAAAA AGCAAGAAA  
AGAAGGAGA GAGGAAGAT GAGGAAGATG AAGAGATGA GAGGAGAGG  
GATGAGAAG ATGAGAAGA TGATGATGAT GAA

FIG. 14N  
XM 066789 タンパク質  
MKGDPKKPR GRMSSYAFFV QTCREHKKK HPDASVNFSE FSKKCSERWK  
TMSAKEGKF EDMAKADKH YEREMITYIP PKGRTKKKF DMAPKRPSP  
APFLPCSETR PKLKEHPGL SIGGVVKAEL EWNNTAAD KQYERKAAK  
LKEKYKEDIA AYRAKKNPS AKGVVKAEL SKKKKEED EDEDEDEE

## 【図 1 4 - 4】

FIG. 14O  
AF165167 DNA (塩基 456-666)  
ATGGGCAAG GAGACCTTAA GAAGCCGAGA GGC AAAATGT CATCATATGC  
ATT TTTTGTG CAACTTGTG GGGAGGAGCA TAAGAAGAG CACTCAGATG  
CTTCAGTCAA CTTCAGAG TTTTCTAAGA AGTCTCAGA GAGGTGGAAG  
ACCATGATG CTAAGAAGAA AGGAAATTT GAGGTATGG CAAGGCGGGA  
CAAGGCCCTT TAAGAAGAG AATGAAATC CTATATCCCT CTAAGAAGG  
AGACAAAAA GAGTTCAAG GATCCGAATG CACCAAGAG GCCTCTTTCG  
GCCTTTTTCG TGTCTGCTC TGAGTATGAG CCAAAAATCA AAGGAGAGCA  
TCCTGCGCTG TCAATGATG ATGTGCGAA GAACTGGA GAGATGTGGA  
ATAACCTGCT TCGAGATGAG AAGCAGCTCT ATGAAAAGAG GCGTGCRAAG  
CTGAAGGAAA AATACAAAA GAGTATGCT GATATCGAG CTAAGAAGAA  
GCCTGTGCA GCAAAAAGG GAGTTCTCAA GCTGAAAAA AGCAAGAAA  
AGAAGGAGA GAGGAAGAT GAGGAAGATG AAGAGATGA GAGGAGAGG  
GATGAGAAG ATGAGAAGA TGATGATGAT GAA

FIG. 14P  
AF165167 タンパク質  
MKGDPKKPR GRMSSYAFFV QTCREHKKK HPDASVNFSE FSKKCSERWK  
TMSAKEGKF EDMAKADKH YEREMITYIP PKGRTKKKF DMAPKRPSP  
APFLPCSETR PKLKEHPGL SIGGVVKAEL EWNNTAAD KQYERKAAK  
LKEKYKEDIA AYRAKKNPS AKGVVKAEL SKKKKEED EDEDEDEE

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/37507												
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A61K 39/00; C07K 7/00; A61K 38/00 US CL : 530/324; 424/185.1; 514/12 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/324; 424/185.1; 514/12 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) Medline, WEST, STN														
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WANG et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science. 9 July 1999, Vol. 285, No. 5425, page 248-251.</td> <td>1-8, 15-16, 20-25 and 37-44</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>ANDERSSON et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. J. Exp. Med. 21 August 2000, Vol. 192, No. 4, page 565-570.</td> <td>1-8, 15-16, 20-25 and 37-44</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>ABRAHAM et al. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. J. Immunol. 15 September 2000, Vol. 165, No. 6, page 2950-2954.</td> <td>1-8, 15-16, 20-25 and 37-44</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WANG et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science. 9 July 1999, Vol. 285, No. 5425, page 248-251.	1-8, 15-16, 20-25 and 37-44	X	ANDERSSON et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. J. Exp. Med. 21 August 2000, Vol. 192, No. 4, page 565-570.	1-8, 15-16, 20-25 and 37-44	X	ABRAHAM et al. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. J. Immunol. 15 September 2000, Vol. 165, No. 6, page 2950-2954.	1-8, 15-16, 20-25 and 37-44
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	WANG et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science. 9 July 1999, Vol. 285, No. 5425, page 248-251.	1-8, 15-16, 20-25 and 37-44												
X	ANDERSSON et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. J. Exp. Med. 21 August 2000, Vol. 192, No. 4, page 565-570.	1-8, 15-16, 20-25 and 37-44												
X	ABRAHAM et al. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. J. Immunol. 15 September 2000, Vol. 165, No. 6, page 2950-2954.	1-8, 15-16, 20-25 and 37-44												
<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 "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search 20 September 2004 (20.09.2004)		Date of mailing of the international search report 07 OCT 2004												
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Maher M. Haddad <i>J. Roberts for</i> Telephone No. (571) 272-1600												

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/37507

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

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

1. ☐ Claim Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-8, 15, 16, 20-25 and 37-44

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/37

**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

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

1. Claims 1-8, 15-16, 20-25, 37-44, drawn to a polypeptide comprising a high mobility group box protein (HMGB) A box or variant thereof, a composition thereof and a method of treating a condition in a patient characterized by activation of an inflammatory cytokine cascade with a polypeptide comprising (HMGB) A box or variant thereof.
2. Claims 9 and 14, 26-36, 45-57, drawn to a purified preparation of antibodies that specifically bind to a high mobility group protein (HMGB) B box but do not specifically bind to non-B box epitopes of HMGB and a method of treating a condition in a patient characterized by activation of an inflammatory cytokine cascade with antibodies specifically bind to (HMGB) B box, but not specifically bind to non-B-box epitope of HMGB.
3. Claims 10-13, 17-18, drawn to a polypeptide comprising a high mobility group box protein (HMGB) B box or variant thereof, but not comprising a full HMGB and a method for effecting weight loss or treating obesity in a patient with a polypeptide comprising a high mobility group box protein (HMGB) B box or variant thereof.
4. Claim 19, drawn to a method of determining whether a compound inhibits inflammation comprising combining the compound with a cell that releases a proinflammatory cytokine when exposed to a high mobility group box protein (HMGB) B box or a biologically active fragment thereof.

The inventions listed as Groups 1-4 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Parkkinen et al (J Biol Chem. 1993, 268(26):19726-19738) teach a 215 amino acid polypeptide comprising a high mobility group box protein (HMGB) A box, wherein said HMGB A box is an HMG1L5 A box (at amino acid positions 32-85). When a claim recites using an old composition or structure (e.g. HMGB A box protein) and the use is directed to a result or property of that composition or structure (inhibit release of a proinflammatory cytokine from a cell), then the claim lacks novelty. Accordingly, the polypeptide HMG1L5 A box of Group 1 lacks novelty and the groups listed are not so linked by a special technical feature as to form a single inventive concept.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 P 37/04 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/454	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 P 29/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/04	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 11/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
<b>A 6 1 P 11/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 11/06	
<b>A 6 1 P 17/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 11/00	
<b>A 6 1 P 1/18 (2006.01)</b>	A 6 1 P 17/06	
<b>A 6 1 P 17/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/18	
<b>A 6 1 P 9/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 17/02	
<b>A 6 1 P 1/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/02	
<b>A 6 1 P 25/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/04	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/00 1 0 1	
<b>A 6 1 P 31/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/04	
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
<b>C 0 7 K 16/18 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/18	
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08	
	C 1 2 N 15/00 A	

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

(72) 発明者 オキーフ, テレサ, エル.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 3 ウォルサム, パーカーズ レーン 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 CA09 HA11  
 4B063 QA18 QQ61 QQ79 QQ96 QR48 QR77  
 4B064 AG01 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13  
 4C084 AA02 BA02 BA08 BA20 CA18 NA14 ZA022 ZA432 ZA592 ZA662  
 ZA682 ZA702 ZA892 ZB092 ZB112 ZB132 ZB152 ZB262 ZB352 ZC752  
 4C085 AA13 AA14 BB17 CC21  
 4C086 AA01 AA02 BC22 GA07 NA05 ZB07 ZB21 ZC75  
 4H045 AA10 AA11 AA30 CA40 DA76 EA20 EA50 FA72 FA74