

(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2005-508913

(P2005-508913A)

(43) 公表日 平成17年4月7日(2005.4.7)

(51) Int. Cl. ⁷	F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	G	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 39/00	H	4 B 0 6 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00	Z	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/02	A 6 1 K 31/7088		4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/02		4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求			(全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-530326 (P2003-530326)
 (86) (22) 出願日 平成14年9月25日 (2002. 9. 25)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年3月25日 (2004. 3. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2002/004080
 (87) 国際公開番号 W02003/026691
 (87) 国際公開日 平成15年4月3日 (2003. 4. 3)
 (31) 優先権主張番号 M12001A001986
 (32) 優先日 平成13年9月25日 (2001. 9. 25)
 (33) 優先権主張国 イタリア (IT)

(71) 出願人 500287400
 フォンダジオーネ セントロ サン ラファエロ デル モンテ タボール
 イタリア, ミラノ アイ-20132, ヴィア オルゲッティナ 60
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (72) 発明者 ビアンキ マルコ
 イタリア国 ミラノ アイ-20132
 ヴィア オルゲッティナ 60 フォンダジオーネ セントロ サン ラファエロ
 デル モンテ タボール

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 樹状細胞の活性化のためのHMGB 1の使用

(57) 【要約】

抗原提示細胞 (A P C) の活性化を誘導するためのタンパク質 H M G B 1、若しくはその変形又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドの使用。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原提示細胞（A P C）の活性化を誘導するための、タンパク質 H M G B 1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドの使用。

【請求項 2】

前記 A P C が樹状細胞である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

活性化がインビトロで行われる、請求項 1 又は 2 に記載の使用。

【請求項 4】

免疫応答を刺激するための医薬品を調製するための、タンパク質 H M G B 1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドの使用。 10

【請求項 5】

前記医薬品がワクチンの剤型である、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 6】

前記ワクチンが、腫瘍若しくは細菌又はウイルス感染に対して使用される、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

前記医薬品がアジュバントの剤型である、請求項 4 ~ 6 のいずれか記載の使用。

【請求項 8】

アジュバントとして使用する医薬品の調製のための、タンパク質 H M G B 1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドの使用。 20

【請求項 9】

細菌又はウイルス感染の治療又は予防用の医薬品の調製のための、タンパク質 H M G B 1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドの使用。

【請求項 10】

A P C の活性化低下のための、タンパク質 H M G B 1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドの使用。

【請求項 11】

前記活性化低下がインビトロで行われる、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 12】

抗原特異的免疫応答をダウンレギュレートするための医薬品の調製のための、タンパク質 H M G B 1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドの阻害剤の使用。 30

【請求項 13】

炎症又は自己免疫疾患、アレルギー又は移植片拒絶反応の治療用の医薬品の調製のための、タンパク質 H M G B 1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドの阻害剤の使用。

【請求項 14】

阻害剤が抗体又はアンチセンス配列である、請求項 12 又は 13 に記載の使用。

【請求項 15】

前記医薬品が抗原をさらに含む、請求項 12 ~ 14 のいずれか記載の使用。 40

【請求項 16】

前記医薬品がワクチンの剤型である、請求項 12 ~ 15 のいずれか記載の使用。

【請求項 17】

タンパク質 H M G B 1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドに A P C を曝露することを含む、活性化 A P C を製造するための方法。

【請求項 18】

前記 A P C がインビトロで曝露される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 A P C が抗原にも曝露される、請求項 17 又は 18 に記載の方法。 50

- 【請求項 20】
前記 A P C がインビボで抗原に曝露される、請求項 19 に記載の方法。
- 【請求項 21】
前記 A P C 及び / 又は抗原が T 細胞にも曝露される、請求項 17 ~ 20 のいずれか記載の方法。
- 【請求項 22】
前記 A P C 及び / 又は抗原がインビボで T 細胞に曝露される、請求項 21 に記載の方法。
- 【請求項 23】
前記抗原が腫瘍若しくは細菌又はウイルス抗原である、請求項 19 ~ 22 のいずれか記載の方法。 10
- 【請求項 24】
タンパク質 H M G B 1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドの阻害剤に A P C を曝露することを含む、A P C の活性化の低下又は予防のための方法。
- 【請求項 25】
前記阻害剤が抗体又はアンチセンス配列である、請求項 24 に記載の方法。
- 【請求項 26】
前記 A P C がインビトロで曝露される、請求項 24 又は 25 に記載の方法。
- 【請求項 27】
前記 A P C が抗原にも曝露される、請求項 24 ~ 26 のいずれか記載の方法。 20
- 【請求項 28】
前記 A P C がインビボで抗原に曝露される、請求項 27 に記載の方法。
- 【請求項 29】
前記 A P C 及び / 又は抗原が T 細胞にも曝露される、請求項 24 ~ 28 のいずれか記載の方法。
- 【請求項 30】
前記 A P C 及び / 又は抗原がインビボで T 細胞に曝露される、請求項 29 に記載の方法。
- 【請求項 31】
前記抗原がアレルギーであり、又は炎症状態、自己免疫疾患、又は移植片拒絶と関連する、請求項 27 ~ 30 のいずれか記載の方法。 30
- 【請求項 32】
前記 A P C が抗原又は M H C 分子の発現のためのベクターでトランスフェクションされる、請求項 17 ~ 31 のいずれか記載の方法。
- 【請求項 33】
前記 A P C が樹状細胞である、請求項 17 ~ 32 のいずれか記載の方法。
- 【請求項 34】
前記 H M G B 1 がワクチンの剤型である、請求項 17 ~ 33 のいずれか記載の方法。
- 【請求項 35】
タンパク質 H M G B 1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドを含有する医薬組成物。 40
- 【請求項 36】
ワクチンの剤型である、請求項 35 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 37】
抗原をさらに含む、請求項 35 又は 36 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 38】
A P C をさらに含む、請求項 35 ~ 37 のいずれか記載の医薬組成物。
- 【発明の詳細な説明】 50

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質HMG B 1、又はそれをコードするポリヌクレオチドの使用、及びこれらに限定されないが具体的には、抗原特異的免疫応答と関連した疾患を治療する方法、及びHMG B 1タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチドを含む組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫系は、いわゆる抗原を認識し、且つこれに対して応答することによって潜在的に有害な物質から体を保護する。抗原は、大分子（通常、タンパク質）、細胞の一部又は表面の構成要素、若しくはウイルス、真菌、又は細菌である。毒素、化学薬品、薬剤、及び外来粒子など一部の非生物物質は抗原でありうる。これらの抗原を含有する物質は、免疫系によって認識され、且つ破壊される。免疫系は、MHC（ヒトにおけるHLA）分子に関連した抗原を「正常」又は「自己」と認識し、通常、それらに対して反応することもない。

10

【0003】

獲得（適応）免疫は、体が種々の抗原に曝露され、その抗原に対して特異的である防御を確立すると発達する。リンパ球は、獲得免疫応答における重要な役割の担い手であるサブグループ、Bリンパ球及びTリンパ球を含有する。Bリンパ球（B細胞とも呼ばれる）は、抗体を産生する。抗体は、特定の抗原に付着し、食細胞による抗原の破壊を容易にさせる。Tリンパ球（T細胞）は、細胞の表面上のMHC関連抗原を認識し、免疫応答の制御を提供する。1つの抗原型に対して特異的であるB細胞及びT細胞が発現する。従って、免疫系が異なる抗原に曝露されると、異なるB細胞及びT細胞が形成される。

20

【0004】

リンパ球が成長すると、それらは、ヒトの体内に通常では見出されない（非自己）組織及び粒子と体自身の組織（自己）を識別することを通常学習する。B細胞及びT細胞がいったん形成されると、その細胞のいくつかは増殖し、免疫系に対する「メモリー」を提供する。これにより免疫系は、次にヒトが同じ抗原に曝露される場合に迅速、且つより有効に反応することが可能となり、多くの場合には、ヒトの発病を予防する。例えば、適応免疫は、水痘に再び罹ることに対していわゆる「免疫」であるために、水痘に罹った個人に帰する。

30

【0005】

ワクチン接種（免疫化）は免疫応答を誘発する手段である。抗原（死んだウイルス又は弱毒化した生きたウイルス）の少量投与は、免疫系「メモリー」を活性化（活性化Bリンパ球及び感作Tリンパ球）。メモリーは、ヒトの体を今後の曝露に対して迅速に且つ有効に反応することを可能にする。上述のように、これはヒトが微生物に曝露された場合、微生物は疾患を引き起こす前に破壊されることを意味する。

【0006】

免疫系疾患は、免疫応答が不適切、過剰、又は不足している場合に生じる。アレルギーは、大多数の人々において、体が無害と感知する物質に対する免疫応答に影響を及ぼす。移植片拒絶は、移植された組織又は臓器の破壊を伴い、臓器移植の主要な合併症である。輸血反応は、血液投与の合併症である。自己免疫疾患（紅斑性狼瘡及び関節リウマチなど）は、免疫系が正常な体組織を破壊するように作用する場合に生じる。免疫不全疾患（遺伝性免疫不全及びAIDSなど）は、免疫系の全部又は一部に障害がある場合に生じる。

40

【0007】

従って、通常、免疫応答の活性化が好ましい。場合によっては、免疫系の抑制が必要である（例えば、自己免疫疾患又はアレルギーの治療において）。これは通常、副腎皮質ステロイド又は他の免疫抑制薬剤を投与することによって達成されるが、これらは全般的な免疫抑制効果を有し、すなわち抗原特異的ではない。

【0008】

50

従って、効果的な免疫応答は、多くの疾患及び障害に対して保護する。効果的でない免疫応答は、疾患を生じさせる。不十分、不適切な、又は過剰な免疫応答は、免疫系疾患を引き起こす。

【0009】

変化した免疫応答に関係している合併症として挙げられるのは、

- ・疾患の進行
- ・アレルギー・過敏症
- ・アナフィラキシー
- ・自己免疫疾患
- ・輸血反応
- ・免疫不全疾患
- ・血清病
- ・移植片拒絶反応
- ・移植片宿主疾患

10

である。

【0010】

免疫応答を変化させる種々の手段が提案されているが、上述したような疾患を治療する手段を提供することが継続的に必要とされている。

【0011】

非ヒストン核タンパク質HMGB1は、高移動性グループとしても知られるHMGTanパク質のBファミリーに属する。最近、非ヒストン核タンパク質HMGB1がネクローシス細胞によって放出されることが報告されている(10)。生細胞において、HMGB1は安定した方法でクロマチンに結合することはなく、他方、アポトーシス中に脱アセチル化される核クロマチンによって没収される。

20

【0012】

特許文献1は、医薬組成物における細胞毒性剤用のHMGTanパク質の使用を開示している。より詳しくは、腫瘍を有するラットへの細胞毒性剤としてのHMGB1の投与が記載されている。HMGB1は現在、HMGA1、すなわち、HMGBファミリーと分子類似性を有することがないHMGAファミリー由来として呼ばれる。Bファミリーの活性に関して、特許文献1には証拠は提供されていない。

30

【0013】

特許文献1における開示とは対照的に、本願発明者らは現在、HMGB1が直接的な細胞毒性活性を有さず、むしろ免疫応答の活性化に協力することを見出した。従って、これを用いて抗原特異的抗腫瘍免疫応答を発現させ、抗腫瘍剤の効果を補完しうる。

【0014】

細胞外HMGB1は、TNF-及び他のサイトカインの産生を決定し、敗血症ショックの病因に関与する(12、13、特許文献2)。さらに、HMGB1の濃度は、細菌成分の非存在下の出血ショック中に増大する(14)。より詳しくは、特許文献2は、HMGB1(現在はHMGB1と呼ばれる)の拮抗薬又は阻害剤を含む炎症性サイトカインカスケードの活性化によって特徴づけられる状態を治療するための医薬組成物を記載している。特許文献2は、炎症性サイトカインカスケードによって仲介されるとして記載されている多くの状態を示している。特許文献2の方法とは対照的に、本願発明者らは現在、HMGB1を用いて抗原介在性免疫応答を調節しうることを見出した。例えば、特許文献2において開示された方法では、一部の感染症及び一部の悪性腫瘍などの状態は、HMGB1の拮抗薬を用いることによって治療されうる。しかし、本発明の抗原特異的免疫応答法によって、本願発明者らはHMGB1の投与を使用されうることを見出した。

40

【0015】

従って、本発明は、得られた免疫応答と関連したさまざまな疾患を治療する別の方法を提供する。

【0016】

50

【特許文献1】EP1079849号明細書

【特許文献2】国際公開第00/47104号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

一般的には、本発明は、抗原提示細胞の活性化（成熟）の調節に関する。1つの実施形態では、本発明は、抗原提示細胞の活性化（調節）を誘導するための方法、この目的のために使用される組成物、及び免疫応答の活性化におけるその使用に関する。特に、現在、HMGB1が樹状細胞の成熟の誘導に対する顕著な効果を有することが意外にも見出されている。

10

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明の1つの態様によれば、抗原提示細胞（APC）の活性化を誘導するための、タンパク質HMGB1、若しくはその変異体（バリエーション）又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドの使用が提供される。

【0019】

好ましくは、前記APCは樹状細胞である。

【0020】

1つの実施形態では、活性化はインビトロで行われるが、同時にインビボで十分に行われうる。

20

【0021】

本発明の別の態様によれば、免疫応答を刺激するための医薬品を調製するための、タンパク質HMGB1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドの使用が提供される。

【0022】

好ましくは、前記医薬品はワクチンの剤型である。

【0023】

好ましくは、ワクチンは、腫瘍若しくは細菌又はウイルス感染に対して使用され、より好ましくは、抗癌ワクチンである。

【0024】

好ましくは、HMGB1は医薬品におけるアジュバントとして作用する。

30

【0025】

従って、本発明の別の態様によれば、アジュバントとして使用する医薬品の調製のための、タンパク質HMGB1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドの使用が提供される。

【0026】

本発明の別の態様によれば、細菌又はウイルス感染の治療又は予防用の医薬品の調製のための、タンパク質HMGB1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドの使用が提供される。

【0027】

本発明の別の態様によれば、APCの活性化低下のための、タンパク質HMGB1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドの使用が提供される。

40

【0028】

1つの実施形態では、前記活性化低下はインビトロで行われるが、同時にインビボで十分に行われうる。

【0029】

換言すれば、本発明は、抗原特異的免疫応答をダウンレギュレートするための医薬品の調製のための、タンパク質HMGB1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドの阻害剤の使用が提供される。

50

【0030】

本発明の別の態様によれば、炎症又は自己免疫疾患、アレルギー又は移植片拒絶反応の治療用の医薬品の調製のための、タンパク質HMGB1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドの使用の阻害剤が提供される。

【0031】

1つの実施形態では、阻害剤は抗体又はアンチセンス配列である。

【0032】

好ましくは、医薬品は抗原をさらに含む。

【0033】

好ましくは、医薬品はワクチンの剤型である。

10

【0034】

本発明の別の態様によれば、タンパク質HMGB1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドにAPCを曝露することを含む、活性化APCを製造するための方法が提供される。

【0035】

1つの実施形態では、APCはインビトロで曝露される、同時にインビボで十分に曝露される。

【0036】

好ましくは、APCは抗原にも曝露される。

【0037】

好ましくは、APCはインビボの抗原に曝露される。

20

【0038】

好ましくは、APC及び/又は抗原はT細胞にも曝露される。

【0039】

1つの実施形態では、APC及び/又は抗原はインビボのT細胞に曝露されるが、同時にインビボに十分に曝露される。

【0040】

好ましくは、抗原は腫瘍、細菌又はウイルス抗原である。

【0041】

別の態様では、本発明は、タンパク質HMGB1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドの阻害剤にAPCを曝露することを含むAPCの活性化の低下又は予防のための方法も提供する。

30

【0042】

1つの実施形態では、阻害剤は抗体又はアンチセンス配列である。

【0043】

1つの実施形態では、APCはインビトロで曝露されるが、同時にインビボで十分に曝露されうる。

【0044】

好ましくは、APCは抗原にも曝露される。

【0045】

好ましくは、APCはインビボの抗原に曝露される。

40

【0046】

好ましくは、APC及び/又は抗原はT細胞にも曝露される。

【0047】

好ましくは、APC及び/又は抗原はインビボのT細胞に曝露される。

【0048】

1つの実施形態では、抗原はアレルゲンであり、又は炎症状態、自己免疫疾患、又は移植片拒絶と関係している。

【0049】

1つの実施形態では、APCは抗原又はMHC分子の発現のためのベクターでトランス

50

フェクションされる。

【0050】

好ましくは、APC樹状細胞である。

【0051】

好ましくは、HMGB1はワクチンの剤型である。

【0052】

本発明の別の態様によれば、タンパク質HMGB1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドを含有する医薬組成物が提供される。

【0053】

好ましくは、組成物はワクチンの剤型である。

10

【0054】

好ましくは、医薬組成物が抗原をさらに含む。

【0055】

好ましくは、医薬組成物はAPCをさらに含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【0056】

本発明の実施では、他に指示がない限り、当業者の能力の範囲内にある、化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA、及び免疫学の従来技法を使用する。かかる技法は文献において説明されている。例えば、J. サムブルック (Sambrook)、E. F. フリッチュ (Fritsch) と T. マニアティス (Maniatis)、1989年、分子クローニング (Molecular Cloning) : 実験マニュアル (A Laboratory Manual)、第2版、第1~3巻、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press)、オースベル (Ausubel)、F. M. ら (1995年及び定期的補遺、分子生物学における最新のプロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)、第9、13、及び16章、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ (John Wiley & Sons) (ニューヨーク州 (N.Y.)、ニューヨーク)、B. ロー (Roe)、J. クラブツリー (Crabtree)、及びA. カーン (Kahn)、1996年、DNAの分離と配列決定 (DNA Isolation and Sequencing) : 本質的技法 (Essential Techniques)、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ (John Wiley & Sons)、J. M. ポラック (Polak) と ジェームズ (James) O' D. マクギー (McGee)、1990年、インサイツハイブリッド形成 (In Situ Hybridization) : 原理と実践 (Principles and Practice)、オックスフォード大学出版 (Oxford University Press)、M. J. ゲイト (Gait) (編集)、1984年、オリゴヌクレオチド合成 (Oligonucleotide Synthesis) : 実際の方法 (A Practical Approach)、アイル・プレス (Irl Press)、及びD. M. J. リリー (Lilley) と J. E. ダールベルグ (Dahlberg)、1992年、酵素学の方法 (Methods of Enzymology) : DNAの構造パートA (DNA Structure Part A) : 酵素学におけるDNA法における合成及び物理的分析 (Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology)、アカデミック・プレス (Academic Press) を参照。これら一般的な各テキストは、本明細書中で参考によって援用される。

20

30

40

【0057】

本発明は、特定の抗原に対する免疫応答を刺激するための医薬組成物の調製のための、タンパク質HMGB1、若しくはその変異体又は断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドの使用に関する。前記組成物は、ワクチン接種、特に腫瘍又は感染性物質に対するワクチン接種において使用されうる。タンパク質HMGB1、若しくはその変異体又は

50

断片、或いはそれをコードするポリヌクレオチドは、適切に形成され、抗原といっしょに、又はそれから切り離して、アジュバントの機能とともに投与される。

【0058】

本発明は、自己免疫又は炎症性病態の治療のための受容体阻害剤及び拮抗薬など、HMGB1、若しくはその断片、又は他の機能的阻害剤の断片に対する抗体の使用も含む。実際に、HMGB1の活性の阻害は、催炎症性刺激に応じた樹状細胞の成熟を妨げ、自己反応性T細胞又は高アフィニティー抗体に影響を及ぼす慢性自己免疫疾患及び炎症性疾患（例えば、全身又は臓器特異的自己免疫疾患、脈管炎）の治療において使用されうる。

【0059】

従って、本発明は一般に、免疫応答、特に適応又は抗原特異的免疫応答を調節する方法に関し、且つより具体的には、本発明は、APCの活性化の調節に関する。本明細書中で用いられる用語「調節する(modulates/modulating)」は、好ましくは、活性を不利に影響する、減少させる、除去する、抑制する、中和する、阻害する、又はダウンレギュレートするのいずれか1つ以上を意味する。

【0060】

HMGB1

前述の通り、HMGB1は、高移動性(high mobility) グループタンパク質としても知られる、HMGTanpak質のBファミリーのメンバーである。HMGB1は哺乳動物においてほぼ同一(約99%アミノ酸が同一)である。好ましくは、本発明ではヒトHMGB1を使用する。ラットHMGB1は、ビアンキ(Bianchi)ら、1989年、核タンパク質HMG1による十字形DNAの特異的認識、Science 243、pp. 1056~1059(データバンクの配列アクセス番号Y00463)において報告されている。ヒトHMGB1及びマウスHMGB1は、いくつかのアクセス番号(例えば、ヒトではNM_002128、及びマウスではNM_010439)において報告されている。

【0061】

国際公開第00/47104号において報告されているように、HMG1は、非ヒストンクロマチン関連タンパク質の増大する高移動性グループ(HMG)に属する30kDaの染色体核タンパク質である。グループとして、HMGTanpak質は独特のDNA構造を認識し、ヌクレオソーム構造の決定及び安定性を含む多種多様の細胞機能のほか、転写及び/又は複製にかかわっている。最初、HMGTanpak質は、ジョーンズ(Johns)とグッドウィン(Goodwin)によって、ポリアクリルアミドゲルにおける高い電気泳動移動性を有するクロマチン成分として特徴づけられた(HMG染色体タンパク質(The HMG Chromosomal Proteins)、E.W. ジョーンズ(Johns)、1982年、アカデミック・プレス(Academic Press)(ロンドン)を参照)。高等真核生物は、HMGTanpak質の3つのファミリー、すなわちHMG-1・-2ファミリー、HMG-14・-17ファミリー、及びHMG-1・-Yファミリーを示す。これらのファミリーは、サイズ及びDNA結合タンパク質によって区別できる。HMGTanpak質は、種にわたって高度に保存され、遍在的に分布し、きわめて豊富であり、且つ0.35M NaCl中のクロマチンから抽出可能であり、5%過塩素酸又はトリクロ酢酸中に可溶性である。一般に、HMGTanpak質は、DNAを曲げ、例えば、プロゲステロン受容体、エストロゲン受容体、HOXTanpak質、及びOct1、Oct2、及びOct6を含む、種々の転写因子のその同起源の配列への結合を促進させると考えられている。最近、一部の転写因子及び他のDNA相互作用タンパク質を含むきわめて多種多様の大きなグループのタンパク質が、HMG1と同様の1個以上の領域を含有することが明らかとなり、且つこの特徴がHMG1ボックス又はHMG1ドメインとして知られるようになった。HMG1をコードするcDNAは、ヒト、ラット、マウス、デバネズミ、マス、ハムスター、ブタ、及び子牛の細胞からクローン化されており、HMG1は全脊椎動物の細胞核に豊富であると考えられている。タンパク質は、80%の範囲で種間配列同一性によって高度に保存されている。クロマチンにおいては、HMG1は又

10

20

30

40

50

クレオソーム間のリンカーDNA、及びパンドローム、十字形、及びステムループ構造など種々の非-DNA構造のほか、シスプラチン修飾DNAに結合する。HMG1によるDNA結合は一般に配列無感応であると考えられている。HMG1は、洗浄核又はクロマチンから最も高頻度に調製されるが、タンパク質は細胞質においても検出されている。(ランドマン(Landsman)とバスティン(Bustin)著、BioEssays、1993年(15)、pp.539~546、バックスバニス(Baxevanis)とランドマン(Landsman)著、Nucleic Acids Research、1995年(23)、pp.514~523の検討)。

【0062】

本発明は、HMG B1の変異体、誘導体、及び断片にも関する。好ましくは、変異配列等は、少なくとも本明細書中で示される配列と同じく生物学的に活性である。 10

【0063】

本明細書で用いられる「生物学的に活性」は、自然に発生する配列と同様の構造的機能(但し、必ずしも同じ程度ではない)、及び/又は同様の調節機能(但し、必ずしも同じ程度ではない)、及び/又は同様の生化学的機能(但し、必ずしも同じ程度ではない)を有する配列を指す。

【0064】

好ましくは、かかる変異体、誘導体、及び断片は、1つ又は両方のHMGボックスを含む。

【0065】

「タンパク質」なる用語は、一本鎖ポリペプチド分子、及び個々の構成ポリペプチドが共有又は非共有手段によって結合される複数のポリペプチド錯体を含む。「ポリペプチド」なる用語は、長さが2個以上のアミノ酸、一般的には5、10、又は20個を超えるアミノ酸を有するペプチドを含む。 20

【0066】

本発明において使用されるアミノ酸配列は、特定の配列若しくはその断片又は特定のタンパク質から得られる配列に限定されないだけでなく、任意の起源、例えば、関連ウイルス・細菌タンパク質、細胞相同物、及び合成ペプチドのほか、その変異体及び誘導体から得られる相同性配列も含むことが理解されるであろう。

【0067】

従って、本発明は、本発明において使用されるアミノ酸配列の変異体、相同物、又は誘導体のほか、本発明において使用されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の変異体、相同物、又は誘導体に及ぶ。 30

【0068】

本発明との関連で、相同性配列は、アミノ酸レベルで少なくとも60、70、80、又は90%同一、好ましくは、少なくとも95又は98%同一であるアミノ酸配列を含むと取られる。特に、相同性は一般的に、非必須隣接配列ではなくAPC活性に必須であることが周知の配列の領域に関して考えられるべきである。相同性は類似性の点でも考えられる(すなわち、同様の化学特性・機能を有するアミノ酸残留物)が、本発明との関連では、配列の同一性の点で相同性を表すことが好ましい。 40

【0069】

相同性の比較は、目測で、より普通には、容易に利用可能な配列比較プログラムによって実行されうる。これら市販のコンピュータプログラムは、2つ以上の配列間の%相同性を計算することができる。

【0070】

%相同性は、隣接配列にわたって計算されうる。すなわち、1つの配列は他の配列と一直線となり、1つの配列における各アミノ酸が他の配列の対応するアミノ酸と直接比較され、同時に1つの残留物と比較される。これは「非ギャップド」整列と呼ばれる。通常、かかる非ギャップド整列は、比較的短い数の残留物(例えば、50個未満の隣接アミノ酸)上のみで行われる。 50

【0071】

これはきわめて簡単且つ一貫性のある方法ではあるが、例えば、その他の点では同一の配列ペアにおいて、1つの挿入又は欠失により次のアミノ酸残留物が整列から締め出され、包括的な整列が行われる場合に%相同性の大きな低下が潜在的にもたらされることが考慮されていない。従って、大部分の配列比較法は、全体的な相同性スコアを過度に不利にすることなく可能な挿入及び欠失を考慮に入れる最適な整列を生成するように設計されている。これは配列の整列に「ギャップ」を挿入し、局所的相同性を最大限にすることによって達成される。

【0072】

しかし、これらのより複雑な方法は、整列において生じる各ギャップに「ギャップペナルティー」を与え、同数の同一のアミノ酸については、できるだけ少ないギャップを有する配列の整列 - 2つの比較される配列間の高い相関性を反映 - が、多くのギャップを有するものよりも高いスコアを達成する。ギャップの存在に対して比較的高いコスト、及びギャップにおけるその後の各残留物に対して小さなペナルティーを課す「アフィンギャップコスト」が一般的に用いられる。これは最も一般的に使用されるギャップスコアリングシステムである。高いギャップペナルティーはもちろん、より少ないギャップの最適化された整列をもたらす。大部分の整列プログラムは、変化されるギャップペナルティーを可能にする。しかし、配列比較のためのかかるソフトウェアを用いる場合にデフォルト値を用いることが好ましい。例えば、GCG ウィスコンシンベストフィット (Wisconsin Bestfit) パッケージ (以下参照) を用いる場合、アミノ酸配列のデフォルトギャップペナルティーは、ギャップについて - 12 であり、各延長について - 4 である。

【0073】

従って、最大%相同性の計算は最初に、ギャップペナルティーを考慮に入れた最適な整列の生成を必要とする。かかる整列を行うための適切なコンピュータプログラムは、GCG ウィスコンシンベストフィットパッケージ (ウィスコンシン大学 (米国)、デベロー (Devereux) ら、Nucleic Acids Research、1984年 (12)、p. 387) である。配列比較を行うことができる他のソフトウェアとしては、BLAST パッケージ (オスベル (Ausbel) ら、1999年、同書、第18章参照)、FASTA (アシュール (Atschul) ら、J. Mol. Biol.、1990年、pp. 403 ~ 410)、及び比較ツールのGENEWORKSセットが挙げられるが、これらに限定されない。BLASTとFASTAは両方ともオフライン及びオンライン検索に使用可能である (オスベル (Ausbel) ら、1999年、同書、pp. 7 - 58 ~ 7 - 60 参照)。しかし、GCG ベストフィットプログラムを使用することが好ましい。

【0074】

最終%相同性は同一性の点で測定されうるが、整列工程そのものは通常、全か無かの一対比較に基づかない。その代わりに、化学的類似性又進化距離に基づき二つ一組の各比較にスコアを与える概算類似性スコアマトリックスが一般的に使用される。通常使用されるかかるマトリックスの例が、BLASTプログラムセット用のデフォルトマトリックスであるBLOSUM62マトリックスである。GCG ウィスコンシンプログラムは一般に、供給される場合、一般のデフォルト値又はカスタム記号比較表のいずれかを使用する (詳細についてはユーザマニュアルを参照)。GCG パッケージには一般のデフォルト値を使用し、他のソフトウェアの場合には、BLOSUM62などのデフォルトマトリックスを使用することが好ましい。

【0075】

ソフトウェアにより最適な整列が得られたら、%相同性、好ましくは%配列同一性を計算することが可能である。ソフトウェアは通常、これを比較の一環として行い、数値の結果を生成する。

【0076】

H M G B 1 の変異体及び誘導體

本発明のアミノ酸配列に関して用語「変異体」又は「誘導體」は、結果として生じるアミノ酸配列がA P C活性化活性を有すること、好ましくは、ヒトH M G B 1と少なくとも同じ活性を有するとの条件で、配列から又は配列への1個（又はそれ以上）のアミノ酸の代用物、変異物、変異体、代替物、欠失、又は添加を含む。

【0077】

H M G B 1は、本発明において使用するために変異されうる。通常、配列の活性を維持する変異が行われる。アミノ酸代用物は、例えば、変異配列がA P C活性化活性を保持するという条件で、1、2、又は3～10、20、又は30個の代用物から作製されうる。アミノ酸代用物は、例えば、治療的に投与されるポリペプチドの血漿半減期を増大させる自然に発生しない類似体の使用を含みうる。

10

【0078】

保存性代用物が、例えば、以下の表に従って作製されうる。第2欄の同じブロック、且つ好ましくは第3欄の同じラインのアミノ酸が互いの代用物となりうる。

【0079】

【表1】

脂肪族	非-極性	GAP
		ILV
	極性-非荷電	CSTM
		NQ
	極性-荷電	DE
		KR
芳香族		HFVY

20

【0080】

本発明において使用されるタンパク質は通常、例えば、以下に記載されるような組換え手段によって作製される。しかし、それらは、固相合成など当業者に公知の技法を用いる合成手段によっても作製されうる。本発明において使用されるタンパク質は、例えば、抽出及び精製の補助となる融合タンパク質としても製造されうる。融合タンパク質パートナーの例としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、6xHis、GAL4(DNA結合及び/又は転写活性化ドメイン)、及び-ガラクトシダーゼが挙げられる。融合タンパク質パートナーと当該タンパク質配列との間にプロテアーゼ切断部位を含み、融合タンパク質の除去を可能にすることも有利でありうる。融合タンパク質は当該タンパク質の活性化を妨げないことが好ましい。

30

【0081】

本発明において使用されるタンパク質は、実質的に分離形態でありうる。そのタンパク質は、タンパク質の意図された目的に干渉せず、実質的に分離されていると依然としてみなされる担体又は希釈剤と混合されうると理解されるであろう。本発明のタンパク質は、実質的に精製形態でもありうるが、その場合には、一般に、製剤中のタンパク質の90%を超える、例えば、95%、98%、又は99%が本発明のタンパク質である製剤中のタンパク質を含む。

40

【0082】

ポリヌクレオチド

本発明において使用されるポリヌクレオチドは、誘導體、変異体、断片等を含む、H M G B 1タンパク質をコードする核酸配列を含む。当業者によって、多くの異なるポリヌクレオチドが遺伝子コードの変質の結果として同じタンパク質をコードしうるということが理解さ

50

れるであろう。また、当業者は、ルーチン技法を用いて、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質配列に影響を及ぼすことがなく、本発明において使用されるタンパク質が発現される特定の宿主生物のコドン使用を反映するヌクレオチド代用物を作製しうると理解すべきである。

【0083】

本発明において使用されるポリヌクレオチドは、DNA又はRNAを含みうる。それらは一本鎖又は二本鎖でありうる。それらは、それらの内部に合成又は修飾ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドでもありうる。オリゴヌクレオチドに対する多くの異なる種類の修飾が当業界で周知である。これらは、メチルホスホン酸及びチオリン酸バックボーン、分子の3'及び/又は5'末端でのアクリジン又はポリリシン鎖の付加を含む。本発明を目的として、本明細書中に記載されるポリヌクレオチドは当業界で利用可能な任意の方法によって修飾されうると理解されるべきである。かかる修飾は、インビボ活性又は本発明において使用されるポリヌクレオチドの寿命を増強するために実施されうる。

10

【0084】

ヌクレオチド配列に関して「変異体」、「相同物」、又は「誘導體」なる用語は、結果として生じるヌクレオチド配列が、APCを活性化する能力を有するポリヌクレオチドをコードするとの条件で、配列から又は配列への1個(又はそれ以上)の核酸の置換、変異、修飾、代替、欠失、又は付加を含む。

【0085】

上述した通り、配列の相同性に関して、本明細書中の配列リストに示されている配列と少なくとも75%、より好ましくは、少なくとも85%、より好ましくは、少なくとも90%の相同性があることが好ましい。少なくとも95%、より好ましくは98%の相同性があることがより好ましい。ヌクレオチドの相同性比較は、上述したように行うことができる。好ましい配列比較プログラムは、上述されたGCGウィスコンシンベストフィットプログラムである。デフォルトスコアリングマトリックスは、各同一のヌクレオチドに対して10のマッチ値、及び各ミスマッチに対して-9を有する。各ヌクレオチドについて、デフォルトギャップ生成ペナルティーは-50であり、デフォルトギャップ延長ペナルティーは-3である。

20

【0086】

本発明は、本明細書中に示された配列、若しくはその変異体、断片、又は誘導體、或いは上記のいずれかの相補配列に選択的にハイブリッド形成することが可能なヌクレオチド配列も包含する。ヌクレオチド配列は、好ましくは、長さが少なくとも15個のヌクレオチドであり、より好ましくは、長さが少なくとも20、30、40、又は50個のヌクレオチドである。

30

【0087】

本明細書中で用いられる「ハイブリッド形成」なる用語は、「核酸のストランドが塩基対合によって相補的ストランドと結合する工程」、並びにポリメラーゼ連鎖反応法で行われる増幅の工程を含む。

【0088】

本明細書中に示されたヌクレオチド配列、又はその相補体を選択的にハイブリッド形成する能力がある本発明において使用されるポリヌクレオチドは、少なくとも20、好ましくは少なくとも25又は30、例えば少なくとも40、60、又は100個又はそれ以上の隣接ヌクレオチドの範囲に対して本明細書中に示された対応するヌクレオチド配列と一般に少なくとも70%、好ましくは少なくとも80又は90%、より好ましくは少なくとも95%又は98%相同となる。本発明において使用される好ましいポリヌクレオチドは、HMGボックスと相同の領域、好ましくは少なくとも80又は90%、より好ましくは少なくとも95% HMGボックスと相同の領域を含む。

40

【0089】

「選択的にハイブリッド形成可能」なる用語は、プローブとして使用されるポリヌクレオチドが、本発明において使用される標的ポリヌクレオチドが背景を顕著に超えるレベル

50

でプローブにハイブリッド形成することが見出される条件下に用いられることを意味する。背景ハイブリッド形成は、例えば、スクリーニングされる cDNA 又はゲノム DNA ライブラリーに存在する他のポリヌクレオチドのため生じうる。この場合、背景は、標的 DNA で確認される特異的相互作用と比べ 10 倍未満、好ましくは 100 倍未満の強さであるプローブとライブラリーの非特異的 DNA メンバーとの間の相互作用によって生成されるシグナルのレベルを意味する。相互作用の強度は、例えば、プローブを、例えば³²P で放射標識することによって測定されうる。

【0090】

ハイブリッド形成条件は、ベルガー (Berger) とキンメル (Kimmel) (1987 年、分子クローニング法マニュアル (Guide to Molecular Cloning Techniques)、Methods in Enzymology、第 152 巻、アカデミック・プレス (Academic Press) (カリフォルニア州、サンディエゴ)) において開示された核酸結合錯体の融点 (T_m) に基づき、以下で説明される明確な「厳重さ」を与える。

【0091】

最大の厳重さは通常、約 T_m - 5 (プローブの T_m よりも 5 低い) で生じ、T_m よりも約 5 ~ 10 低い温度で高い厳重さ、T_m よりも約 10 ~ 20 低い温度で中間の厳重さ、T_m の約 20 ~ 25 下で低い厳重さが生じる。当業者によって理解されるように、最大の厳重さのハイブリッド形成を用いて、同一のポリヌクレオチド配列を識別又は検出しようと同時に、中間 (又は低い) 厳重さのハイブリッド形成を用いて同様の又は関連したポリヌクレオチド配列を識別又は検出する。

【0092】

好ましい態様では、本発明は、厳重な条件下 (例えば、65 及び 0.1 × SSC (1 × SSC = 0.15 M NaCl、0.015 M Na₃クエン酸 pH 7.0)) に本発明のヌクレオチド配列にハイブリッド形成しうるヌクレオチド配列をカバーする。

【0093】

本発明において使用されるポリヌクレオチドが二本鎖である場合は、二重鎖の両方のストランドは、個別に又は結合して、本発明によって包含される。ポリヌクレオチドが一本鎖である場合は、ポリヌクレオチドの相補的配列も本発明の範囲内に含まれることが理解されるべきである。

【0094】

本発明において使用される配列と 100% 相同ではないが、本発明の範囲内にあるポリヌクレオチドは、多くの手段によって得ることができる。本明細書中に記載された配列の他の変異体は、例えば、多くの個体、例えば異なる集団の個体から作製される DNA ライブラリーをプロービングすることによって得ることができる。また、他のウイルス・細菌、又は細胞相同物、特に哺乳動物細胞 (例えば、ラット、マウス、ウシ、及び霊長類の細胞) において見出される細胞相同物が得られうるとともに、かかる相同物及びその断片は一般に、本明細書中の配列リストに示された配列に選択的にハイブリッド形成する能力がある。かかる配列は、他の動物種で作製される cDNA ライブラリー又はゲノム DNA ライブラリーをプロービングし、且つ中間 ~ 高い厳重さの条件下にヒト HMGB1 配列の全部又は一部を含むプローブでかかるライブラリーをプロービングすることによって得ることができる。同様の考慮は、本発明において使用されるタンパク質又はヌクレオチドの種相同物及び対立遺伝子多型を得ることに適用される。

【0095】

変異体及び株・種相同物は、本発明の配列内の保存アミノ酸配列をコードする変異体及び相同物内の標的配列に設計されたプライマーを使用する縮重 (degenerate) PCR を用いて得ることもできる。保存配列は、例えば、一部の変異体・相同物からのアミノ酸配列を整列することによって予測されうる。配列の整列は、当業界で周知のコンピュータソフトウェアを用いて行うことができる。例えば、GCG ウィスコンシンパイルアップ (PileUp) プログラムが広く使用されている。

10

20

30

40

50

【0096】

縮重PCRにおいて用いられるプライマーは、1つ以上の縮重位置を含み、周知の配列に対して単一の配列プライマーで配列をクローニングするために用いられるよりも低い厳重さの条件で使用される。

【0097】

或いは、かかるポリヌクレオチドは部位特異的突然変異誘発法によって得られうる。これは、例えば、ポリヌクレオチド配列が発現されている特定の宿主細胞に対するコドン選択を最適化するために配列にサイレントコドン変化が必要とされる場合に有用でありうる。他の配列変化が、制限酵素の認識部位を導入するために望ましい場合がある。

【0098】

本発明のポリヌクレオチドを用いて、プライマー、例えば、PCRプライマー、代替の増幅反応のプライマー、例えば、放射性又は非放射性標識を用いる従来的手段による露出標識で標識されたプローブを製造することができ、又はポリヌクレオチドをベクターにクローン化する。かかるプライマー、プローブ、及び他の断片は、好ましくは長さが少なくとも20、例えば少なくとも25、30、又は40個のヌクレオチドであり、本明細書中で用いられる本発明のポリヌクレオチドなる用語によっても包含される。

【0099】

本発明において使用されるDNAポリヌクレオチド及びプローブなどのポリヌクレオチドは、組換え技術的に、合成的に、又は当業者に利用可能な手段によって製造されうる。それらは標準の技法によってもクローン化されうる。

【0100】

一般に、プライマーは、一度に1個のヌクレオチドの所望の核酸配列の段階的な製造を含む、合成的手段によって製造される。自動化技法を用いるこれを達成するための技法は、当業界で容易に利用可能である。

【0101】

長いポリヌクレオチドは一般に、例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）クローン化技法を用いる組換え技術手段を用いて製造される。これは、クローン化することが望ましい脂質標的配列の領域をフランキングする一対のプライマー（例えば、約15～30個のヌクレオチド）を製造するステップ、プライマーを動物又はヒト細胞から得られるmRNA又はcDNAと接触させるステップ、所望の領域の増幅をもたらす条件下にポリメラーゼ連鎖反応を実行するステップ、増幅断片を分離するステップ（例えば、アガロースゲル上で反応混合物を精製することによって）、及び増幅DNAを回収するステップを含む。プライマーは、適切な制限酵素認識部位を含有し、増幅DNAが適切なクローニングベクターにクローン化されうるように設計されうる。

【0102】

ヌクレオチドベクター

本発明のポリヌクレオチドは、組換え複製可能ベクターに組込むことができる。このベクターを用いて、適合性宿主細胞における核酸を複製しうる。従って、別の実施形態では、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを複製可能ベクターに導入し、ベクターを適合性宿主細胞に導入し、且つベクターの複製をもたらす条件下に宿主細胞を成長させることによって本発明において使用されるポリヌクレオチドを作製する方法を提供する。個のベクターは、宿主細胞から回収されうる。適切な宿主細胞としては、大腸菌（*E. coli*）などの細菌、酵母菌、哺乳動物細胞系、及び他の真核細胞系、例えば昆虫Sf9細胞が挙げられる。

【0103】

ベクター中の本発明のポリヌクレオチドは、宿主細胞によってコード配列の発現を提供する能力がある制御配列に操作可能に結合されること、すなわちベクターが発現ベクターであることが好ましい。「操作可能に結合される」なる用語は、記載された成分がその意図された方法でそれらを機能させることを可能にする関係にあることを意味する。コード配列に「操作可能に結合される」調節配列は、コード配列の発現が制御配列と適合性の条

10

20

30

40

50

件下に達成される方法でライゲーションされる。

【0104】

制御配列は、例えば、別の転写調節要素を添加し、制御配列によって制御される転写のレベルを転写修飾物質に対してより反応性にすることによって修飾されうる。

【0105】

本発明のベクターは、以下に記載されるような適切な宿主細胞に形質転換又はトランスフェクションされ、本発明のタンパク質の発現を提供しうる。この工程は、タンパク質をコードし、且つ必要に応じて発現タンパク質を回収するコード配列のベクターによる発現を提供する条件下に上述された発現ベクターで形質転換される宿主細胞を培養するステップを含みうる。

10

【0106】

ベクターは、例えば、複製の起点、必要に応じて前記ポリヌクレオチドの発現のためのプロモーター、及び必要に応じてプロモーターの調節因子を備えたプラスミド又はウイルスでありうる。ベクターは1個以上の選択可能なマーカー遺伝子、例えば、細菌プラスミドの場合にはアンピシリン耐性遺伝子、又は哺乳動物ベクターについてはネオマイシン耐性遺伝子を含む。ベクターを用いて、例えば、宿主細胞をトランスフェクション又は形質転換しうる。

【0107】

好ましい実施形態では、H M G B 1は細菌細胞(ビアンキ(Bianchi)、Gene、1991年(104)、pp. 271~275、リー(Lee)ら、Gene、1998年(225)、pp. 97~105)、酵母菌(ミストリー(Mistry)ら、Biotechniques、1997年(22)、pp. 718~729)、又は細胞培養又は哺乳動物組織からの精製によって製造されうる。

20

【0108】

本発明において使用されるベクター・ポリヌクレオチドは、トランスフェクション、形質転換、及び電気穿孔など当業界で周知の種々の技法を用いて適切な宿主細胞に導入されうる。本発明のベクター・ポリヌクレオチドが動物に投与される場合、いくつかの技法、例えば、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、及びアデノウイルスなど組換えウイルスベクターによる感染、核酸の直接注射、及び生物標識(biolytic)形質転換が当業界で周知である。

30

【0109】

タンパク質の発現及び精製

本発明のポリヌクレオチドを含む宿主細胞を用いて、本発明において使用されるタンパク質を発現しうる。宿主細胞は、本発明のタンパク質の発現を可能にする適切な条件下に培養されうる。本発明のタンパク質の発現は、それらが継続的に製造されるように構成的であり、又は誘導性であり、発現を開始させる刺激を必要としうる。誘導性の発現の場合、タンパク質の製造は、必要に応じて、例えば、培養培地、例えばデキサメタゾン又はIPTGへの誘導物質の添加によって開始されうる。

【0110】

本発明において使用されるタンパク質は、酵素、化学及び/又は浸透圧溶解、及び物理崩壊を含む当業界で周知の種々の技法によって宿主細胞から抽出されうる。

40

【0111】

免疫応答

本発明は、免疫応答、具体的には抗原介在性免疫応答を調節する方法に関する。

【0112】

非特異的機序の誘発に加えて、例えば、感染中の病原体も抗原特異的適応免疫応答を誘発する。感染に対する適応免疫応答は、免疫系のT細胞及びB細胞介在性コンパートメントに参与する。本発明は、特に、抗原提示細胞(APC)が適応免疫の開始に参与するいわゆる誘導相に関する。APC機能は、適応免疫応答の維持にも必要とされる。

【0113】

50

より詳しくは、A P C は、抗原を内在化し、それを処理し、そのエピトープをクラス I 及びクラス II の M H C 分子の協力によって発現する能力がある細胞の錯体を構成する。一般に、医学的に使用される A P C のグループの細胞の一般的な特徴は、細胞表面上のクラス II 並びにクラス I の M H C 分子の発現であると言える。このグループは主に樹状細胞、活性化マクロファージ、中枢神経系の小グリア細胞、及び B リンパ球を含む。これらの中では、樹状細胞 (D C) が抗原提示において特に特殊化され、独特の特徴を有する集団を構成し、組織中に広く分布している。D C は、感染、自己免疫疾患、及び移植片拒絶など種々の病態の経過において T リンパ球の刺激によって起こる免疫応答の活性化に参与する。D C の活性化又は成熟は、T 細胞を「プライミング」し、且つ免疫応答を開始させるために必要な工程である。

10

【 0 1 1 4 】

自己免疫疾患及び移植片拒絶、すなわち病原物質の非存在下に、インビボの内因性分子処理免疫刺激活性によって樹状細胞の成熟の誘導が行われる。死にかけている細胞が、免疫応答を増幅することが可能である分子を含有し、放出することが知られている (3 ~ 8)。これらの分子は、通常、生きた細胞の内部に隔離され、アポトーシス過程において残存すると同時に、細胞死の間に放出される。

【 0 1 1 5 】

細胞死後の培養培地中に放出される細胞構成要素は、D C の成熟を誘発することが可能である (3、4)。他方、初期のアポトーシス状態での細胞、又はその培養培地で刺激された D C は、活性化されない (3 ~ 5、9)。同様に、D C はネクローシス多形核球 (P M N) 白血球によって活性化されない。

20

【 0 1 1 6 】

本願発明者らは現在、H M G B 1 が A P C の成熟を活性化する能力があることを見出した。「活性化」によって、本願発明者らは A P C の成熟を誘導することを含む。逆に言えば、本願発明者らは H M G B 1 の拮抗薬が A P C の活性化を阻止又は削減する能力があることを見出した。従って、例えば、H M G B 1 の拮抗薬が、成熟が発生する能力がある条件下に A P C の集団に添加されると、H M G B 1 拮抗薬の非存在下よりも成熟に進行する A P C は少なくなる。

【 0 1 1 7 】

A P C

抗原提示細胞 (A P C) としては、マクロファージ、樹状細胞、B 細胞、及び M H C 分子を発現する能力がある実質的にすべての他の細胞型が挙げられる。

30

【 0 1 1 8 】

マクロファージは、細胞内に存在する単球系の食細胞であり、特に有効な抗原提示のために十分に備わっている。それらは一般に M H C クラス II の分子を発現し、その食細胞特性とともに、高分子又は粒子状物質を飲み込み、それを消化し、広範囲なリソソーム系によって抗原性ペプチド形態に加工し、且つ T リンパ球による認識のために細胞表面上に発現することにおいてきわめて効率的である。

【 0 1 1 9 】

樹状細胞は、その高度に分岐した形態のためにそのように呼ばれるが、体全体を通じて多くの器官に見出され、骨髄由来であり、通常、高レベルの M H C クラス I 抗原を発現する。樹状細胞は能動的に運動性であり、血流と組織との間で再循環しうる。このようにして、それらは最も重要な A P C とみなされている。ランゲルハンス細胞は、皮膚に位置している樹状細胞の例である。

40

【 0 1 2 0 】

B リンパ球は、能動的に食細胞性ではないが、クラス II 陽性であり、細胞表面抗原特異的受容体、免疫グロブリン、又は抗体分子を有する。その高いアフィニティー抗原結合に対する潜在的可能性により、B 細胞は独自にその表面上の低濃度の抗原を濃縮し、それを取込み、加工し、その表面上の M H C 抗原と協力して抗原性ペプチドとの関連で提示する能力に恵まれている。このようにして、B 細胞はきわめて有効な A P C となる。

50

【0121】

ワクチン

本発明の別の態様は、個体、特に哺乳動物、好ましくはヒトにおける免疫応答を誘導するための方法であって、本発明のHMG B1タンパク質、若しくはその断片又は変異体で個体を接種し、抗体及び/又はT細胞免疫応答を十分に生成し、前記個体を例えば腫瘍、又は細菌又はウイルス感染などの感染から保護する方法に関する。かかる免疫応答が腫瘍の増殖若しくはウイルス又は細菌の複製を遅らせる方法も提供される。

【0122】

本発明の別の態様は、個体、好ましくはヒトに導入された場合、その内部に免疫応答を誘発する能力があり、かかる個体における免疫応答を誘発する免疫組成物に関する。免疫応答は治療的又は予防的に使用されうるとともに、CTL又はCD4+T細胞から生じる細胞免疫など、抗体免疫及び/又は細胞免疫の形を取りうる。

10

【0123】

免疫応答は、本発明のHMG B1タンパク質に対するものでありうるが、しかし、意外にも、HMG B1タンパク質は、免疫応答が別の抗原に向けられている組成物中のアジュバントとして使用されうることを見出した。従って、HMG B1はワクチン組成物におけるアジュバントとして使用されうる。

【0124】

活性成分(類)として免疫原性ポリペプチド(類)を含有するワクチンの調製は、当業者には周知である。通常、かかるワクチンは、液体溶液又は懸濁液のいずれかの注射物質として調製され、注射前の液体中の溶液、又は懸濁液に適した固体形態も調製されうる。調製は乳化もされ、又はタンパク質はリポソームにカプセル化されうる。活性免疫原性成分はしばしば、医薬的に許容され、且つ活性成分と適合性である賦形剤と混合される。適切な賦形剤は、例えば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等、及びその組合せである。

20

【0125】

また、必要に応じて、ワクチンは、ワクチンの有効性を増強する湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝剤、及び/又はアジュバントなど少量の補助物質を含有しうる。

【0126】

本発明のワクチン製剤は、製剤の免疫原性を増強するためのアジュバント系に関し、及び/又はこれを含むことが好ましい。アジュバント系は主に応答のTH1型を引きこすことが好ましい。

30

【0127】

免疫応答は、液性又は細胞介在性免疫応答(伝統的に、それぞれ抗体及び保護の細胞エフェクター機序によって特徴づけられる)である2つの極端な範疇に大ざっぱに区別されうる。応答のこれらの範疇は、TH1型応答(特に細胞内病原体及び腫瘍細胞に対して有効)、及びTH2型免疫応答(主に細胞外病原体に対する応答に關与する液性応答)と呼ばれている。

【0128】

極端なTH1型免疫応答は、抗原特異的ハプロタイプ制限細胞毒性Tリンパ球の生成、及び自然のキラー細胞応答によって特徴づけられうる。マウスにおけるTH1型応答はしばしばIgG2aサブタイプの抗体の生成によって特徴づけられるが、ヒトにおいてこれらはIgG1型抗体に対応する。TH2型免疫応答は、マウスにおけるIgG1、IgA、及びIgMを含む広範囲の免疫グロブリンアイソタイプの生成によって特徴づけられる。

40

【0129】

これら2つの型の免疫応答の発現の背後にある推進力はサイトカインであると考えられうる。高レベルのTH1型サイトカインは、所定の抗原に対する細胞介在性免疫応答の誘導に有利に働く傾向があるが、高レベルのTH2型サイトカインは、抗原に対する液性免疫応答の誘導に有利に働く傾向がある。

50

【0130】

TH1型及びTH2型の免疫応答の区別は絶対的ではない。実際に、個体は、主にTH1又は主にTH2であると記載されている免疫応答を支持する。しかし、モスマン(Mosmann)とコフマン(Coffman)(モスマン(Mosmann)、T.R.及びコフマン(Coffman)、R.L.、TH1細胞とTH2細胞(TH1 and TH2 cells):リンホカイン分泌の異なるパターンが異なる機能的特性につながる(different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties)、Annual Review of Immunology、1989年(7)、p145~173)によるマウスCD4+veT細胞クローンにおいて記載された点からサイトカインのファミリーを考慮することがしばしば有利である。伝統的に、TH1型応答は、Tリンパ球によるINF-及びIL-2サイトカインの産生と関連している。他のサイトカインはしばしば、IL-12などT細胞によって産生されないTH1型免疫応答の誘導と直接関連している。その一方、TH2型応答は、IL-4、IL-5、IL-6、及びIL-13と関連している。

【0131】

特定のワクチンアジュバントは、TH1型又はTH2型のサイトカイン応答のいずれかの刺激に特に適している。伝統的に、ワクチン接種又は感染後の免疫応答のTH1:TH2の均衡の最良の指標としては、抗原による再刺激後のインビトロのTリンパ球によるTH1又はTH2サイトカインの産生の直接的測定、及び/又は抗原特異的抗体反応のIgG1:IgG2a比の測定が挙げられる。

【0132】

従って、TH1型アジュバントは、分離T細胞集団を優先的に刺激し、インビトロでの抗原による再刺激に際して高レベルのTH1型サイトカインを産生し、且つCD8+細胞毒性Tリンパ球応答及びTH1型アイソタイプと関連した抗原特異的免疫グロブリン応答の発現を促進するものである。

【0133】

本発明のHMB1タンパク質は、種々のワクチン型におけるアジュバントとして使用されうる。かかるワクチン型の非限定的例としては、サブユニットワクチン及び細胞ワクチン、例えば、樹状細胞による腫瘍の免疫療法が挙げられる。

【0134】

本発明の組成物は、(追加の)アジュバントを含みうる。アジュバント及び他の薬剤の例としては、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムカリウム(alum)、硫酸バリウム、シリカ、カオリン、炭素、油中水乳剤、水中油乳剤、ムラミールジペプチド、細菌エンドトキシン、脂質X、コリネバクテリウム・パルヴム(プロピオノバクテリウムアクネス)、百日咳菌、ポリリボヌクレオチド、アルギン酸ナトリウム、ラノリン、リゾレシチン、ビタミンA、サポニン、リポソーム、レバミゾール、DEAEデキストラン、ブロックコポリマー、又は合成アジュバントが挙げられる。かかるアジュバントは種々の供給源、例えば、メルク(Merck)アジュバント65(メルク・アンド・カンパニー(Merck and Company Inc.)社、ニュージャージー州(N.J.)、ローウェー)、又はフロイント不完全アジュバント及び完全アジュバント(ジフコ・ラボラトリーズ(Difco Laboratories)、ミシガン州(Michigan)、デトロイト)から市販されている。

【0135】

通常、アムフィゲン(水中油)、アルヒドロゲル(水酸化アルミニウム)、又はアムフィゲンとアルヒドロゲルの混合物が使用される。水酸化アルミニウムのみがヒト使用に承認されている。

【0136】

免疫原とアジュバントの割合は、両方が有効な量で存在する限り、広範囲にわたって変動しうる。例えば、水酸化アルミニウムは、ワクチン混合物(Al₂O₃基準)の約0.5

%の量で存在しうる。ワクチンは、免疫原の最終濃度が0.2~200 µg/ml、好ましくは5~50 µg/mlの範囲、最も好ましくは15 µg/mlで含有するように調製されることが好都合である。

【0137】

調製後、ワクチンは、次いで密閉され、低温、例えば4℃で保存される無菌容器に組込まれ、又は凍結乾燥されうる。凍結乾燥は安定した形態で長期保存を可能にする。

【0138】

アジュバントの有効性は、種々のアジュバントからもなっているワクチンにおけるこのポリペプチドの投与から生じる抗原性配列を含有する免疫原ポリペプチドに対する抗体又はT細胞の量を測定することによって判定しうる。

10

【0139】

ワクチンは、例えば、皮下又は筋内のいずれかによる注射によって、従来的に非経口投与される。他の投与形態に適した追加の製剤としては、坐剤、及び、場合によっては、経口製剤が挙げられる。坐剤用に、伝統的な結合剤及び担体としては、例えば、ポリアルキレングリコール又はトリグリセリドが挙げられ、かかる坐剤は、0.5%~10%、好ましくは1%~2%の範囲の活性成分を含有する混合物から形成されうる。経口製剤としては、例えば、医薬グレードのマニトール、乳糖、でんぷん、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなど通常使用される賦形剤が挙げられる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸薬、カプセル剤、徐放製剤、又は粉剤の形を取り、10%~95%、好ましくは25%~70%の活性成分を含有する。ワクチン組成物が凍結乾燥されている場合、凍結乾燥物質は、例えば懸濁液として、投与前に再構成されうる。再構成は緩衝液中で行われることが好ましい。

20

【0140】

患者に経口投与されるためのカプセル剤、錠剤、及び丸薬は、例えば、オイドラギット「S」、オイドラギット「L」、酢酸セルロース、フタル酸酢酸セルロース、又はヒドロキシプロピルメチルセルロースを含む腸溶コーティングで提供されうる。

【0141】

本発明のポリペプチドは、中性又は塩の形としてワクチンに調製されうる。医薬的に許容される塩としては、酸付加塩（ペプチドの遊離アミノ基で形成）が挙げられ、これらは、例えば、塩酸又はリン酸などの無機酸、或いは酢酸、シュウ酸、酒石酸、及びマレイン酸などの有機酸で形成される。遊離カルボキシル基で形成される塩は、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、又は水酸化鉄などの無機塩基、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、及びプロカインなどの有機塩基由来でもありうる。

30

【0142】

皮下、皮内、静脈内、結節内、又は腫瘍内のいずれかのAPCの注射に依拠する追加のワクチン接種が最近、開発されている。細胞は通常、注射前に適切な等張媒体中に再懸濁され、これがさらにアジュバントによって補充される。

【0143】

作用薬と拮抗薬

本発明の方法及び組成物は、一部の実施形態では、HMGB1の活性の阻害に依拠する。他の実施形態では、HMGB1を上方制御する薬剤を使用することも可能である。HMGB1の活性を増大させる能力がある薬剤は、活性の作用薬と呼ばれる。同様に、拮抗薬はHMGB1の活性を低下させる。

40

【0144】

当業界で用いられる「拮抗薬」なる用語は、一般に酵素に結合し、酵素の活性を阻害する化合物を指すとみられる。しかし、本明細書で用いられるこの用語は、広範に、必ずしもそれに結合することによってではなく、分子の活性を阻害する薬剤を指すことが意図されている。

【0145】

50

従って、これにはタンパク質の発現、若しくは分子の生合成、又は阻害剤の活性の修飾因子の発現に影響を及ぼす薬剤が含まれる。阻害される特定の活性は、分子に特有である活性、例えば、APCを活性化する能力でありうる。APC活性のアッセイは当業界で周知である。

【0146】

拮抗薬は、関連分子、例えば、HMGボックス上の1つ以上の部位に結合し、これを得るために争うことがありうる。かかる結合は、分子と別の存在物との間の相互作用を阻害することが好ましい。

【0147】

HMG B1タンパク質又はタンパク質阻害剤の活性の阻害は、細胞内のタンパク質又は阻害剤の発現レベルを低下させることによって達成されうる。例えば、細胞はアンチセンス化合物、例えば、タンパク質又はタンパク質阻害剤mRNAに対して特異的な配列を有するオリゴヌクレオチドで処理されうる。

【0148】

一般に、本明細書で用いられる「拮抗薬」なる用語は、原子又は分子などの薬剤を含むがこれに限定されず、ここで分子は無機また有機、生物エフェクター分子及び/又は生物エフェクター分子などの薬剤をコードする核酸、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸、ペプチド核酸(PNA)、ウイルス、ウイルス様粒子、ヌクレオチド、リボヌクレオチド、ヌクレオチドの合成類似体、リボヌクレオチドの合成類似体、修飾ヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、アミノ酸、アミノ酸類似体、修飾アミノ酸、修飾アミノ酸類似体、ステロイド、プロテオグリカン、脂質、脂肪酸、及び糖質でありうる。薬剤は溶液又は懸濁液(例えば、結晶、コロイド状、又は他の粒状形態)中にありうる。薬剤は、モノマー、ダイマー、オリゴマー等の形、又はその他の点では錯体でありうる。

【0149】

「拮抗薬」及び「薬剤」なる用語も、構造的タンパク質、酵素、サイトカイン(インターフェロン及び/又はインターロイキンなど)、抗生物質、ポリクローナル又はモノクローナル抗体、又はFv断片などその有効な一部、抗体又はその一部が、天然、合成、又はヒト化され、ペプチドホルモン、受容体、シグナル分子、又は他のタンパク質、以下に記載される、オリゴヌクレオチド又は修飾オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド又は修飾アンチセンスオリゴヌクレオチド、cDNA、ゲノムDNA、人工又は天然の染色体(例えば、酵母人工染色体)又はその一部、mRNA、tRNA、rRNA又はリボザイム、又はペプチド核酸(PNA)を含むRNAを含むがこれらに限定されない核酸、ウイルス又はウイルス様粒子、修飾され又は修飾され得ないヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド又はその合成類似体、修飾され又は修飾され得ないアミノ酸又はその類似体、非ペプチド(例えば、ステロイド)ホルモン、プロテオグリカン、脂質、又は糖質を含むが、これらに限定されないタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドを含むことが意図されている。ポリペプチドの活性部位に結合し、又はこれを占有し、正常な生物活性が抑制されるように触媒部位が基質にアクセスできないようにする無機及び有機化学薬品を含む小分子も含まれる。小分子の例としては、小ペプチド又はペプチド様分子が挙げられるが、これらに限定されない。

アンチセンス化合物

上述した通り、拮抗薬は、HMG B1の発現レベルを低下させる能力があるアンチセンスRNA及びアンチセンスDNAを含む1つ以上のアンチセンス化合物を含みうる。アンチセンス化合物は、HMG B1をコードするmRNAに相補的な配列を含むことが好ましい。

【0150】

アンチセンス化合物は、オリゴマーアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドであることが好ましい。アンチセンス化合物は、好ましくは、HMG B1をコードする1つ以上の核酸で特異的にハイブリッド形成する。本明細書で用いられる「HMG B1をコードする核酸は、HMG B1をコードするDNA、DNAなどから転写されるRNA(プレm

R N A 及び m R N A を含む)、及びかかる R N A 由来の c D N A をも包含する。その標的核酸によるオリゴマー化合物の特異的ハイブリッド形成は、核酸の正常な機能に干渉する。それに特異的にハイブリッド形成する化合物による標的核酸のこの機能の修飾は一般に「アンチセンス」と呼ばれる。干渉される D N A の機能としては、複製及び転写が挙げられる。干渉される R N A の機能としては、例えば、タンパク質翻訳部位への R N A の転座、R N A からのタンパク質の翻訳、1つ以上の m R N A 種を得る R N A のスプライシング、及び R N A に関与し、又はそれによって促進されうる触媒活性が挙げられる。標的核酸機能とのかかる干渉の全体的な効果は、H M G B 1 の発現の調節である。本発明に関して、「調節」は遺伝子の発現における増大(刺激)又は低下(抑制)のいずれかを意味する。例えば、H M G B 1 活性の抑制剤をコードする遺伝子の発現、又は H M G B 1 の発現の抑制剤は増大しうる。しかし、好ましくは、発現の抑制、特に、H M G B 1 発現の抑制は、遺伝子発現及び m R N A の調節の好ましい形態は、好ましい標的である。

10

【0151】

アンチセンス構成物は、米国特許第 6,100,090 号(モニア(Monia)ら)、及びネッカーズ(Neckers)ら、Crit Rev Oncog、1992年(3)(1~2)、pp.175~231において詳細に記載されている。

【0152】

抗体

本発明は、本発明において使用されるタンパク質又はその断片に対するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体も提供する。従って、本発明は、本発明において使用されるタンパク質に対するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の製造のための方法をさらに提供する。

20

【0153】

ポリクローナル抗体が望ましい場合は、選択された哺乳動物(例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ等)が、H M G B 1 エピトープ(類)を有する免疫原ポリペプチドで免疫化される。免疫化動物からの血清が収集され、周知の手順に従って処理される。エピトープに対するポリクローナル抗体を含有する血清が他の抗原に対する抗体を含有する場合は、ポリクローナル抗体は免疫アフィニティークロマトグラフィーによって精製されうる。ポリクローナル抗血清を製造し、加工する技法は当業界で周知である。かかる抗体が作製されるために、本発明は、動物又はヒトにおける免疫原として使用される別のポリペプチドにハプテン化される本発明のポリペプチド又はその断片も提供する。

30

【0154】

本発明のポリペプチドにおけるエピトープに対するモノクローナル抗体も当業者によって容易に製造されうる。ハイブリドーマによってモノクローナル抗体を作製するための一般的な方法は公知である。不死の抗体産生細胞株は、細胞融合によって、また発癌性 D N A による B リンパ球の直接的形質転換、又はエプスタイン-バーウイルスによるトランスフェクションなど他の技法によっても作製されうる。エピトープに対して産生されるモノクローナル抗体のパネルは、種々の特性について、すなわち、アイソトープ及びエピトープアフィニティーについてスクリーニングされうる。

【0155】

別の技法は、例えば、ファージが、多種多様の相補性決定領域(CDR)とともにそのコートの表面上に s c F v 断片を発現するファージディスプレイライブラリーのスクリーニングを含む。この技法は当業界で周知である。

40

【0156】

エピトープに対する抗体は、モノクローナル及びポリクローナルのいずれも特に診断において有用であり、中性化されているものは受動免疫療法において有用である。特に、モノクローナル抗体は、抗イディオタイプ抗体をもたらすために使用されうる。抗イディオタイプ抗体は、保護が望ましい薬剤の抗原の「内部イメージ」を有する免疫グロブリンである。

【0157】

50

抗イディオタイプ抗体をもたらすための技法は当業界で周知である。これらの抗イディオタイプ抗体は治療にも有用でありうる。

【0158】

本発明において、「抗体」なる用語は、反対が規定されていない限り、標的抗原に対するその結合活性を保持する全抗体の断片を含む。かかる断片としては、Fv、F(ab')、及びF(ab')₂断片のほか、一本鎖抗体(scFv)が挙げられる。さらに、抗体及びその断片は、例えば、EP-A-239400号において記載されたヒト化抗体でありうる。

【0159】

抗体は、

(a) 本発明の抗体を提供する工程と、

(b) 抗体-抗原錯体の形成を可能にする条件下に前記抗体で生体試料をインキュベートする工程と、

(c) 前記抗体を含む抗体-抗原錯体が形成されているかどうかを判定する工程と、を含む方法によって、生体試料に存在する本発明のポリペプチドを検出する方法にいて使用されうる。

【0160】

適切な試料としては、脳、胸部、卵巣、肺、結腸、脾臓、精巣、肝臓、筋などの組織、及び骨組織、又はかかる組織由来の腫瘍性成長物からの抽出物が挙げられる。

【0161】

本発明の抗体は、固体担体に結合され、且つ・又は適切な試薬、対照、指図等とともに適切な容器中のキットに包装されうる。

【0162】

アッセイ

本発明は、化合物をスクリーニングし、HMGB1に対する作用薬及び拮抗薬を識別する方法も提供する。候補の化合物は、種々の供給源、例えば、細胞、細胞を含まない製剤、化学ライブラリー、ペプチド及び遺伝子ライブラリー、及び天然の生成物の混合物から識別されうる。こうして識別されるかかる作用薬若しくは拮抗薬又は阻害剤は、天然又は修飾物質、リガンド、受容体、酵素等でありうるが、場合によっては、レチノール結合タンパク質受容体、若しくはその構造的又は機能的擬態でもありうる(コリガン(Coligan)ら、Current Protocols in Immunology 1、1991年(2):第5章を参照)。

【0163】

スクリーニング法は、候補の化合物と直接的又は間接的に関連した標識によって、候補の化合物のHMGB1への結合を簡単に測定することができる。或いは、スクリーニング法は、標識競合物との競合を含みうる。さらに、これらのスクリーニング法は、受容体を有する細胞に相応しい検出システムを用いて、候補の化合物がHMGB1の活性化又は抑制によって生成されるシグナルを生じるかどうかを試験しうる。結合するが応答を誘発することがない化合物により、拮抗薬としての化合物が識別される。拮抗薬化合物は、結合し、反対の応答を生成する化合物でもあり、換言すれば、増殖の削減及び必要に応じて鑑別の誘導をもたらす。

【0164】

治療的タンパク質

本発明のタンパク質は、治療的に患者に投与されうる。単に自然に発生するアミノ酸からなるのではなく、例えば、免疫原を削減し、患者の体内における循環半減期を増大させ、生物学的利用能を増強し、且つ・又は効率及び/又は特異性を増強するように改変されているタンパク質を使用することが好ましい。

【0165】

治療用途のタンパク質を改変する多くの方法が用いられている。1つの方法が、ペプチド又はタンパク質をポリエチレングリコール(PEG)及びポリプロピレングリコール(

10

20

30

40

50

PPG)など種々のポリマーへの結合である - 例えば、米国特許第5,091,176号、同第5,214,131号、及び同第5,264,209号を参照。

【0166】

D-アミノ酸及びN-メチルアミノ酸など非コード又は修飾アミノ酸による自然に発生するアミノ酸の代用もタンパク質を改変するために使用されうる。

【0167】

別の方法は、プロピオン酸N-スクシニミジル3-(2ピリジルジチオ)、ヘキサン酸スクシニミジル6-[3-(2ピリジルジチオ)プロピオンアミド]、及びヘキサン酸スルホスクシニミジル6-[3-(2ピリジルジチオ)プロピオンアミド]などの二官能性架橋剤の使用である(米国特許第5,580,853号を参照)。

10

【0168】

配座制約されている本発明のタンパク質の誘導体を使用することが望ましい場合もある。配座制約は、タンパク質によって想定される三次元状の安定性及び好ましい配座を指す。配座制約としては、タンパク質における単一残留物の配座移動性の制限を含む局所制約、その残留物が一部の二次的構造単位を形成しうる一群の残留物の配座移動性の制限を含む局所制約、全タンパク質構造を含む全体的制約が挙げられる。

【0169】

タンパク質の活性配座は、環化などの共有修飾によって、或いはガンマ-ラクタム又は他のタイプのブリッジの取込みによって安定化されうる。例えば、側鎖は、相互作用部位の各側面上L-ガンマ-ラクタム部分を生成するためにバックボーンに環化されうる。一般に、ルビー(Ruby)ら著、「合成ペプチドの応用(Applications of Synthetic Peptides)」、合成ペプチド(Synthetic Peptides):ユーザガイド(A User's Guide)、1992年、pp.259~345(W.H.フリーマン(Freeman)アンド(&)コー(Co.))を参照。環化は、例えば、システインブリッジの形成、それぞれ末端アミノ酸のアミノ及びカルボキシ末端基の結合、又はAsp、Glu、又は関連相同物のカルボキシ基とLys残基又は関連相同物のアミノ基の結合によっても達成されうる。ヨード酢酸無水物を用いるリシン残基のイプシロン-アミノ基とポリペプチドのアルファ-アミノ基の結合も行ふことができる。ウッド(Wood)とウェツェル(Wetzell)、Int'l J. Peptide Protein Res.、1992年(39)、pp.533~39を参照。

20

30

【0170】

米国特許第5,891,418号に記載された別の方法は、タンパク質構造における金属-イオン錯化バックボーンを含むことである。通常、好ましい金属-ペプチドバックボーンは、所定の錯化金属イオンの配位圏によって必要とされる必要な数の特定配位基に基づく。一般に、有用であることが判明しうる大部分の金属イオンは、4~6個の配位数を有する。タンパク質鎖における配位基の性質としては、アミン、アミド、イミダゾール、又はグアニジノ官能性を有する窒素原子、チオール又はジスルフィドのイオウ原子、及びヒドロキシ、フェノール、カルボニル、又はカルボキシル官能性を有する酸素原子が挙げられる。また、タンパク質鎖又は個々のアミノ酸は、例えば、オキシム、ヒドラジン、スルフヒドリル、リン酸塩、シアノ、ピリジノ、ピペリジノ、又はモルホリノなどの配位基を含むように化学的に変化されうる。タンパク質構成物は線状又は環状のいずれかであり、線状構成物が一般的に好ましい。小さな線状ペプチドの一例は、4個の配位数を有する金属イオンに錯化しうるバックボーンにおいて4個の窒素(N₄錯化系)を有するGly-Gly-Gly-Glyである。

40

【0171】

治療的タンパク質の特性を改善するための別の技法は、非ペプチドペプチド擬態の使用である。タンパク質の正確な構造を解明するために多種多様の有用な技法が使用されうる。これらの技法としては、アミノ酸配列決定、X線結晶学、質量分析、核磁気共鳴分光法、コンピュータ補助分子モデリング、及びその組合せが挙げられる。タンパク質の構造分

50

析は一般に、タンパク質のアミノ酸配列及びその原子成分の三次元的配置を含む大量のデータを提供する。この情報から、治療的活性に対して必要な化学的機能を有するが、より安定であり、例えば、生物学的劣化の影響を受けにくい非ペプチドペプチド擬態が設計されうる。この方法の例が、米国特許第 5, 811, 512 号において提供されている。

【0172】

本発明の治療的タンパク質を化学的に合成する技法は上記の引例に記載されており、ボルジア (Borgia) とフィールズ (Fields) (TibTech、2000年(18)、pp. 234~251) によって検討もされ、その中に含まれる文献において詳細に記載されている。

【0173】

方法

本発明において使用される未成熟樹状細胞は、造血前駆体又は幹細胞、例えば P B M C 細胞から、GM-CSF、IL-4、及び flt3-L などのサイトカインでの適切な処理によって得ることができる。

【0174】

抗原提示細胞の活性化又は成熟は、HMGB1タンパク質及び場合によってはサイトカインなどの他の補助剤を培養培地に添加することによって、未成熟又は不活性細胞の培養を根幹として達成されうる。

【0175】

成熟がもたらされ、又は活性化されると、抗原提示細胞、特に DC は、特定の抗原に応じた T リンパ球の活性化に使用することができ、こうして活性化したリンパ球は、次いで対象に投与され、前記抗原に対するその免疫応答を刺激することができる。

【0176】

活性化の指標は、考慮中の細胞型によって変動しうる。例えば、マクロファージ、ミクログリア、及び B リンパ球に関しては、(27、28) において記載されているように、他のアジュバントとの接触後の M H C 分子及び同時刺激分子の膜発現の増大とともに機能的活性化である。

【0177】

樹状細胞の場合には、CD83及びCD86表面分子など「成熟表現型」に特有のマーカーの発現増大、又はCD115、CD14、CD68、及びCD32など未成熟表現型の特有のマーカーの発現減少を示す細胞が、活性化又は成熟とみなされる。

【0178】

従って、1つの実施形態によれば、本発明は、以下のステップを含む T リンパ球の活性化のためのエキスピボの方法に関する。すなわち、

- a) 不活性 APC の調製物を、その活性化を誘導するために、HMGB1と、又はその生物学的に活性な断片と接触させるステップと、
- b) 活性化 APC を特定の抗原と接触させるステップ、
- c) 活性化され、抗原に曝露されている APC に T リンパ球を曝露するステップ。

【0179】

好ましい実施形態によれば、樹状細胞が APC として使用される。

【0180】

上述のステップ a) ~ c) は、異なる順序で行うことができる。例えば、抗原は、HMGB1タンパク質又はその断片の前に未成熟又は不活性な APC の培養に添加することができる。また、APC 又は DC は、特定の抗原又はそれに由来するポリペプチドの発現のためのベクター、或いは特定の M H C 分子の発現のためのベクターでトランスフェクションすることができる。微生物、ウイルス、腫瘍、又は自己免疫疾患と関連した抗原は、記載された方法によるリンパ球の活性化のために使用することができる。腫瘍抗原として、腫瘍組織又は細胞から分離されたタンパク質又はその断片に加えて、アポトーシス又はネクローシスによって死滅されている全細胞を使用することが可能である。ウイルス又はレトロウイルス、特に HIV、又はミコバクテリウムやプラズモディウムなどの細胞内病原

10

20

30

40

50

体と関連した抗原を使用することも可能である。

【0181】

別の実施形態において、本発明は、HMGB1及び必要に応じて抗原が患者に、例えばリンパ節又は腫瘍に導入されるインビボ方法に関する。抗原は、HMGB1の前、同時、又は後に導入されうる。或いは、抗原は、例えばHLAとしてインビボに存在し、又は移植中に導入されている。

【0182】

全実施形態において、HMGB1及び/又は抗原は、ポリヌクレオチド配列として、すなわち遺伝子送達法を用いて導入されうる。

核酸配列のAPCへの導入

APCは、上述した通り、必要に応じてウシ胎児血清の存在下に、DMEM又は他の規定培地など適切な培養培地において培養されうる。

【0183】

HMGB1は、APCに投与され、タンパク質をコードする核酸構成物・ウイルスベクターをAPCにおけるポリペプチドに発現を可能にする条件下に細胞に導入されうる。同様に、アンチセンス構成物をコードする核酸構成物がAPCに導入され、トランスフェクション、ウイルス感染、又はウイルス形質導入によって導入されうる。

【0184】

本発明の拮抗薬も同様の方法でHMGB1に投与されうる。

【0185】

送達系

本発明は、本発明のタンパク質、ポリヌクレオチド、作用薬、又は拮抗薬のための送達系をさらに提供する。参照を簡単にするために、タンパク質、作用薬及び/又は拮抗薬を本節では「薬剤」と呼ぶ。

【0186】

本発明の送達系は、ウイルス又は非ウイルス送達系でありうる。非ウイルス系機序としては、脂質介在性トランスフェクション、リポソーム、免疫リポソーム、リポフェクチン、カチオン顔面両親媒性物質(CFA)、及びその組合せが挙げられるが、これらに限定されない。既述した通り、その後の発現のためにポリヌクレオチドの形で細胞に送達される場合、その薬剤はレトロウイルス送達系によって送達されることが好ましい。しかし、ポリヌクレオチドは、適切な遺伝子送達溶剤、GDVによって標的細胞集団に送達されうる。これには、脂質又はタンパク質錯体で調製され、又は注射又は生物標識送達によってネーキッドDNAとして投与されるDNA、及びレトロウイルスなどのウイルスが含まれるが、これらに限定されない。或いは、ポリヌクレオチドは、単球、マクロファージ、リンパ球、又は造血幹細胞などの細胞によって送達される。特に、細胞依存性送達系が用いられる。この送達系では、薬剤をコードするポリヌクレオチドが1つ以上の細胞がエクスピボで導入され、次いで患者に導入される。

【0187】

本発明の薬剤は単独で投与されうるが、一般には医薬組成物として投与される。

【0188】

治療

これにはヒト又はヒト以外の動物のためになりうる治療用途が含まれる。哺乳動物の治療は特に好ましい。ヒトと動物の両方の治療が本発明の範囲内である。

【0189】

治療は現存する状態に対するものであり、又は予防的でありうる。治療は、成人、小児、乳児、胎児、又は前記のいずれかの一部(例えば、臓器、組織、細胞、核酸分子)のものでありうる。

【0190】

本発明の方法によって調製されたAPCは、悪性腫瘍に罹患した患者に投与されうる。

【0191】

10

20

30

40

50

一般に、エキスピボの方法において、患者は、治療されるAPCの起源である同じ患者となる。治療されうる悪性腫瘍の例としては、胸部、子宮頸部、結腸、直腸、子宮内膜、腎臓、肺、卵巣、膵臓、前立腺、皮膚、胃、膀胱、CNS、食道、頭部又は頸部、肝臓、精巣、胸腺又は甲状腺の癌が挙げられる。血液細胞、骨髄細胞、Bリンパ球、Tリンパ球、リンパ球前駆細胞、又は骨髄性細胞の前駆細胞の悪性腫瘍も治療されうる。

【0192】

腫瘍は、充実性腫瘍又は非充実性腫瘍でありうるとともに、原発性腫瘍又は播種性転移性（二次性）腫瘍でありうる。非充実性腫瘍として挙げられるのは、急性骨髄芽球性、急性前骨髄球性、急性骨髄単球性、急性単球性、赤白血病など白血病（急性又は慢性、リンパ球性又は骨髄性）、及びホジキン型、非ホジキン型、及びパーキット型などのリンパ腫である。充実性腫瘍としては、癌、結腸癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、腺癌、黒色腫、基底又は扁平上皮癌、中皮腫、腺癌、神経芽細胞腫、神経膠腫、星細胞腫、髓芽細胞腫、網膜芽腫、肉腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、線維肉腫、骨肉腫、肝癌、及び精上皮腫が挙げられる。

10

【0193】

通常、本発明の組成物は、腫瘍細胞の表面上で過剰発現している抗原など腫瘍特異的抗原とともに投与されうる。

【0194】

APCを用いて進行中の免疫応答（アレルギー状態又は自己免疫疾患など）を治療することができ、又はこれを用いて、患者における耐性を生成することができる。従って、本発明の細胞は、動物及びヒトにおける不適切なリンパ球活性によって特徴づけられる疾患を治療し、予防するための治療法において使用されうる。APCを用いて、単一の抗原又は複数の抗原に対する耐性を付与することができる。

20

【0195】

通常、APCは患者又はドナーから得られ、上述した通り、患者に戻される前に投与される（エキスピボ療法）。

【0196】

治療又は予防されうる特定の状態としては、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、糖尿病、アレルギー、喘息、及び移植片拒絶が挙げられる。本発明は、臓器移植又は骨髄移植においても使用されうる。

30

【0197】

医薬組成物

医薬組成物は、治療有効量の医薬的に活性な薬剤を含む、又はこれから成る組成物である。医薬的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤（その組合せを含む）が含まれることが好ましい。治療用に許容される担体又は希釈剤は医薬業界において周知であり、例えば、A.R.ジェナロ（Gennaro）編、レミントン薬学（Remington's Pharmaceutical Sciences）、1985年（マック・パブリッシング社（Mack Publishing Co.））において記載されている。医薬担体、賦形剤、又は希釈剤の選択は、意図された投与経路及び標準薬務に関して選択されうる。医薬組成物は、担体、賦形剤、又は希釈剤として、又はこれらに加えて、適切な結合剤（類）、潤滑剤（類）、懸濁剤（類）、コーティング剤（類）、溶解剤（類）を含みうる。

40

【0198】

「治療有効量」は、その意図された目的を達成するのに有効である治療薬の量を指す。個々の患者の要求は変動しうるが、HMG B1の有効量に対する最適な範囲の決定は当業技術範囲内である。一般に、本発明の化合物及び/又は組成物による状態の治療のための用量は、患者のタイプ、年齢、体重、性別、食事、及び病状、機能不全の重篤度、投与経路、使用される特定の化合物の活性、有効性、薬物動態、及び毒性プロフィール、薬物送達系が使用されるかどうか、及びその化合物が混合薬の一部として投与されるかどうか、且つ当業者によって調整されうるかどうかを含む種々の因子に従って選択される。従って

50

、実際に使用される用量は大きく変動し、本明細書中に記載された好ましい用量から逸脱しうる。

【0199】

医薬的に許容される担体の例としては、例えば、水、食塩水、アルコール、シリコーン、ろう、ワセリン、植物油、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、リポソーム、糖、ゼラチン、乳糖、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、界面活性剤、ケイ酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸モノグリセリド及びジグリセリド、ペトロエト랄 (petroethral) 脂肪酸エステル、ヒドロキシメチル-セルロース、ポリビニルピロリドン等が挙げられる。

【0200】

必要に応じて、医薬組成物は、吸入による、坐剤又はペッサリーの剤型による、局所的にローション、溶液、クリーム、軟膏、又は散布剤の剤型による、皮膚パッチの使用による、でんぶん又は乳糖などの賦形剤を含有する錠剤の剤型による、若しくは経口的に単独又は賦形剤との混合のカプセル又は胚珠、或いは香料又は着色剤を含有するエリキシル、溶液、又は懸濁液の剤型による形態の、いずれか1つ以上によって投与することができ、或いは非経口的に、例えば海綿体内、静脈内、筋内、又は皮下注射することができる。非経口投与のために、組成物は、他の物質、例えば溶液を血液と等張性にするのに十分な塩又は単糖類を含有しうる滅菌水溶液の剤型で使用されることが最善でありうる。口腔内又は舌下投与のために、組成物は、従来の方法で製剤化しうる錠剤又はトローチ剤の剤型で投与されうる。

【0201】

異なる送達系に応じて異なる組成物・製剤の要件がありうる。一例として、本発明の医薬組成物は、ミニポンプを用いて、又は粘膜経路によって、例えば、吸入又は注射用溶液用の鼻噴霧又はエアロゾルとして、若しくは送達用に、例えば、静脈内、筋内、又は皮下経路によって、組成物が注射用剤形によって製剤化されている非経口的に送達されるように製剤化されうる。或いは、製剤は両方の経路によって送達されるようにデザインされうる。

【0202】

通常、各抱合体は、0.01~30mg/kg体重、好ましくは0.1~10mg/kg、より好ましくは0.1~1mg/kg体重の用量で投与されうる。

【0203】

ポリヌクレオチド・ベクターがネーキッド核酸として投与される場合、投与される核酸の量は通常、1µg~10mg、好ましくは100µg~1mgの範囲である。

【0204】

哺乳動物細胞によるネーキッド核酸構成物の摂取は、例えばトランスフェクション剤の使用を含むいくつかの周知のトランスフェクション法によって増強される。これらの薬剤の例としては、陽イオン剤 (例えば、リン酸カルシウム及びDEAE-デキストラン) 及びリポフェクタント (lipofectant) (例えばリポフェクタム (商標) 及びトランスフェクタン (商標)) が挙げられる。通常、核酸構成物はトランスフェクション剤と混合され、組成物を生成する。

【0205】

記載された投与経路及び投与量は、熟練者であれば、特定の患者及び状態に対する最適な投与経路及び投与量を容易に決定することができるためガイドとしてのみ意図されている。

【0206】

これから以下の非限定的な実施例及び図面を参考にして本発明をさらに説明する。

【実施例】

【0207】

現在、意外にも、HMG B1が樹状細胞の成熟の誘導の顕著な効果を有することが見出されている。

10

20

30

40

50

【 0 2 0 8 】

この確認として、HMGB1は、B-LCL又はHeLaなどDCの成熟を誘導するネクローシス細胞の培養培地に蓄積することが確認されている。対照的に、HMGB1を含有しないネクローシス多形核細胞の培養培地は、前記樹状細胞の活性化を誘導することはない。

【 0 2 0 9 】

最初に、ネクローシス細胞から放出されたHMGB1がDCの成熟に必要であるかどうかを評価した。このために、樹状細胞をマウス胎児線維芽細胞の培養培地及び対応するHmgb1- -細胞の培地によって刺激した。HMGB1を含有するネクローシス線維芽細胞の培地のみが、DCの成熟を誘導した。HMGB1の特異的効果は、組換えHMGB1を用いて明らかにされたが、これはネクローシス細胞と同じ程度に成熟を誘導することができた。しかし、組換えタンパク質も、ネクローシス細胞の培養培地も、HMGB1中和抗体の存在下にDCの活性化を誘発しないことがわかった。

10

【 0 2 1 0 】

次いで、インビボで抗原提示DCの成熟を誘発するHMGB1の能力を評価した。予想通り、アポトーシスを起こしたリンパ球そのものが辛うじて免疫原性であるため（それらはそれらと同系であるマウスによって「自身」と認識されるため）、アポトーシスを起こしたRMA細胞を接種したマウスすべてが腫瘍を発現した。対照的に、HMGB1の存在下にリンパ腫細胞で免疫化した動物の80%は腫瘍を拒絶し、他の20%については腫瘍性成長が大きく抑制された。

20

【 0 2 1 1 】

総合すれば、これらの結果は、HMGB1がインビトロ及びインビボで抗原提示細胞を活性化することを示す。HMGB1は、ネクローシス細胞によって放出されると、成熟、及びその後のリンパ節への移動と免疫応答の開始のために必要なシグナルでDCを抑制すると考えられる。

【 0 2 1 2 】

実施例 1 - 細胞

記載されているように(26)、DC細胞及び好中球を健康なドナーの血液から得た。胚性線維芽細胞を野生型及びHmgb1- -動物から得た。全株のマイコプラズマによる汚染をPCRを用いて試験した。

30

【 0 2 1 3 】

実施例 2 - アポトーシスとネクローシス

記載されているように(4)、細胞を3つの周期の凍結・解凍の結果として壊死によって殺傷した。実際の死滅は、FITC-アネキシンV及びヨウ化プロピジウムで染色した後、FACS分析によって確認された(9、26)。アポトーシスはUV放射によって誘発された(9)。

【 0 2 1 4 】

実施例 3 - DCの成熟

未成熟DC細胞をアポトーシス又はネクローシス細胞(DC:死細胞比=2:1)、又はそれらの培養培地で刺激した。必要に応じて、抗HMGB1ポリクローナル抗体(ファルミンゲン(Pharmingen))の存在下又は非存在下に実験を行った。平行実験では、精製HMGB1(0.1~100ng/ml)又はタンパク質HOXD9をDCに接種した。48時間後、形態所見及びフローサイトメトリー(9)に基づき成熟を評価した。細胞活力を種々の治療時間で評価した。エンドトキシンによる可能な汚染を排除するために、記載されているように(12)、ポリミキシン(シグマ(Sigma)、70u/ml)を含有する培地中で実験を行った。これらの条件下、精製LPS(シグマ(Sigma))からの大腸菌026:B6、100ng/ml)の添加は顕著な成熟をもたらすことはなかったが、組換えTNFはDCの有効な成熟をひき起こした。

40

【 0 2 1 5 】

実施例 4 - HMGB1の製造及び検出

50

大腸菌 B L 2 1 (-) における全長の H M G B 1 の発現のために p T 7 - 7 - r H M G B 1 c m プラスミドを用いた。次いで、タンパク質を精製した (1 0) 。洗浄剤で得られた死にかけている細胞の抽出物、又はニトロセルロース上に移動させた上清を、F I T C (ベーリングー (B o e h r i n g e r) を共役させた特異的抗 - H M G B 1 ポリクローナル抗体及び抗ウサギ抗体でプロービングした (1 0) 。D A P I で核を対比染色した (1 0) 。

【 0 2 1 6 】

実施例 5 - 免疫化

C 5 7 B L ・ 6 マウスに対し、組換え H M G B 1 (0 . 5 μ g / マウス) の存在下又は非存在下に、P B S 又は 1×10^6 アポトーシス R M A 細胞を週 2 回皮下注射した。動態試験「Q L C カプトガニ血球抽出成分 (L i m u l u s a m e b o c y t e c e l l l y s a t e) 」 (バイオウィタッカー (B i o W h i t t a k e r) (メリーランド州 (M D) 、ウォーカービル)) で評価されたエンドトキシンによる汚染は、0 . 0 3 U / 動物未満であった。1 4 日後、マウスの反対側横腹を 50×10^3 生リンパ腫 R M A 細胞で皮下刺激した。記載されているように (1 8) 、腫瘍の外観及びサイズを評価した。

10

【 0 2 1 7 】

実施例 6 - 可溶性抗原に対する抗体の製造に対する H M G B 1 のアジュバント効果の評価
ワクチン接種法は、防御免疫応答を誘発するアジュバントシグナルの利用可能性を必要とする。データは、核構成物質 H M G B 1 が、粒子状抗原 (すなわち、死にかけている腫瘍細胞) とともに投与されると、アジュバントシグナルを送達することを示している。ここで、本願発明者らは H M G B 1 が実際に可溶性抗原に対する抗体の製造に有利に働くかどうかを分析する。このために、本願発明者らは実験動物にわずかな抗原 (鶏卵アルブミン、O V A) を接種し、1 0 日後、O V A 特異的免疫グロブリンの濃度を評価した。

20

【 0 2 1 8 】

C 5 7 B 1 ・ 6 (B 6) マウスを購入し、当施設の S P F ユニットにおいて維持し、飼育した。5 週齢動物を免疫化し、2 0 日後に再ブーストした。すべての免疫化は、オボアルブミン・マウス (シグマ (S i g m a)) 2 0 μ g の足蹠への皮下注射によって行われ、単独又は組換え精製 H M G B 1 1 μ g / マウスと混合のいずれかの可溶性剤形 (P B S 中) で投与された。

【 0 2 1 9 】

I g M 及び I g G I の E L I S A による血清分析のために、2 m g / m l O V A でウェルをコーティングし、各 1 匹の免疫化動物からの血清試料の連続希釈に曝露した。使用された血清は免疫化後 1 0 日に得られた。アルカリホスファターゼ (A P) に結合されたアイソタイプ特異的ポリクローナルヤギ抗マウス抗体 (すべてサザン・バイオテクノロジー・アソシエート社 (S o u t h e r n B i o t e c h n o l o g y A s s o c i a t e I n c .) (アラバマ州 (A L) 、バーミングラム) 製) を用いて O V A 特異的抗体が示された。3 , 3 , 5 , 5 - テトラメチルベンジジン基質溶液の添加前にプレートを洗浄した。反応を 0 . 5 M H 2 S O 4 で停止させ、O D を 4 5 0 n m で読んだ。

30

【 0 2 2 0 】

H M G B 1 の存在下に O V A で免疫化されたマウスは、I g M 及び I g G I アイソタイプの高力価の O V A 特異的免疫グロブリンを発現した。

40

【 0 2 2 1 】

本発明は、腫瘍、細菌、及びウイルスを含む病原体に対するアジュバントとして作用する H M G B 1 の能力に関する。液性抗体反応を増大させる能力は、感染物質に対する大部分のワクチン接種法にとって重要である。これらのワクチン接種は、i) 直接、病原体に結合し、それを不活性化し、又は i i) 宿主の細胞に侵入する病原体の能力を阻害することが可能な抗体を発現させるレシピエントにおける抗原の注射に依拠する。後者のステップは、例えば、H I V 又は H C V のような扱いにくい病原体に対する「予防的」ワクチンの開発にとって重要である。

【 0 2 2 2 】

50

上記明細書において言及された全刊行物は、本明細書中で参考によって援用される。本発明の記載された方法及びシステムの種々の変更及び変異体は、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく当業者には明らかであろう。本発明は特定の好ましい実施例とייייしよに記載されているが、請求された発明はかかる特定の実施例に過度に限定すべきではないことが理解されるべきである。実際に、分子生物学又は関連分野における当業者には明らかである本発明を実施するために記載された態様の種々の変更が、以下の請求項の範囲内であることが意図されている。

【 0 2 2 3 】

(文献)

1. Janeway, C.A. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious nonself. *Immunol Today*. 13, 11-16 (1992). 10
2. Banchereau, J. & Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252 (1998).
3. Gallucci, S., Lolkema, M. & Matzinger, P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med*. 5, 1249-1255 (1999).
4. Sauter, B., Albert, M.L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S. & Bhardwaj, N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* 191, 423-434 (2000). 20
5. Ignatius, R., Marovich, M., Mehlhop, E., Villamide, L., Mahnke, K., Cox, W.I., Isdell, F., Frankel, S.S., Mascola, J.R., Steinman, R.M. & Pope, M. Canarypox virus-induced maturation of dendritic cells is mediated by apoptotic cell death and tumor necrosis factor alpha secretion. *J. Virol.* 74, 11329-11338 (2000).
6. Shi, Y., Zheng, W. & Rock, K.L. Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 14590-14595. (2000).
7. Basu, S., Binder, R.J., Suto, R., Anderson, K.M. & Srivastava, P.K. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int. Immunol.* 12, 1539-1546 (2000). 30
8. Larsson, M., Fonteneau, J.F. & Bhardwaj, N. Dendritic cells resurrect antigens from dead cells. *Trends Immunol.* 3, 141-148 (2001).
9. Rovere, P., Vallinoto, C., Bondanza, A., Crosti, M.C., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Rugarli, C. & Manfredi, A.A. Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J. Immunol.* 161, 4467-4471 (1998).
10. Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M.E. Retention of HMGB1, a nuclear protein that mediates inflammation, distinguishes apoptosis from necrosis. Submitted to *Nature*. 40

【 0 2 2 4 】

11. Yang, H., Wang, H. & Tracey K.J. HMG-1 rediscovered as a cytokine. *Shock* 15, 247-253 (2001).
12. Andersson, U., Wang, H., Palmblad, K., Aveberger, A.C., Bloom, O., Erlandsson-Harris, H., Janson, A., Kokkola, R., Zhang, M., Yang, H. & Tracey, K.J. High Mobility Group 1 Protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J. Exp. Med.* 192, 565-570 (2000).
13. Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J.M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K.R., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J., Andersson, U., Molina, P.E., Abumrad, N.N., Sama, A. & Tracey, K.J. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285, 248-251 (1999).
14. Ombrellino, M., Wang, H., Ajemian, M.S., Talhouk, A., Scher, L.A., Friedman, S.G., Tracey, K.J. Increased serum concentrations of high-mobility-group protein 1 in haemorrhagic shock. *Lancet* 354, 1446-1447 (1999).
15. Austyn, J.M. Death, destruction, danger and dendritic cells. *Nat Med.* 5, 1232-1233 (1999).
16. Gallucci, S. & Matzinger, P. Danger signals: SOS to the immune system. *Current Opin. Immunol.* 13, 114-119 (2001).
17. Calogero, S., Grassi, F., Aguzzi, A., Voigtlander, T., Ferrier, P., Ferrari, S., Bianchi, M.E. The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet.* 22, 276-280 (1999).
18. Ronchetti, A., Rovere, P., Iezzi, G., Galati, G., Heltai, S., Protti, M.P., Garancini, M.P., Manfredi, A.A., Rugarli, C., Bellone M. Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. *J Immunol.* 163, 130-136 (1999).
19. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89 (1998).
20. Inaba, K., Turley, S., Yamaide, F., Iyoda, T., Mahnke, K., Inaba, M., Pack, M., Subklewe, M., Sauter, B., Sheff, D., Albert, M., Bhardwaj, N., Mellman, I. & Steinman, R.M. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the

10

20

30

- major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 188, 2163-2173 (1998).
21. Kurts, C., Miller, J.F.A.P., Subramaniam, R.M., Carbone, F.R. & Heath, W.R. MHC class I restricted cross presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J. Exp. Med.* 188, 409-414 (1998).
 22. Steinman, R.M., Turley, S., Mellman, I., Inaba, K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 191, 411-416 (2000).
 23. Savill, J. & Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788 (2000).
 24. Platt, N., da Silva, R.P & Gordon, S. Recognising death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol.* 8, 365-372 (1998).
 25. Gregory, C.D. CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system. *Current Opin. Immunol.* 12, 27-34 (2000).
 26. Rovere, P., Peri, G., Fazzini, F., Bottazzi, B., Doni, A., Bondanza, A., Zimmermann, V.S., Garlanda, C., Fascio, U., Sabbadini, M.G., Rugarli, C., Mantovani, A. & Manfredi, A.A. The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen presenting dendritic cells. *Blood* 96, 4300-4306 (2000).
 27. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 17; 406(6797): 782-7 (Aug 2000).
 28. Ogata H, Su I, Miyake K, Nagai Y, Akashi S, Mecklenbrauker I, Rajewsky K, Kimoto M, Tarakhovsky A. The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signalling in B cells. *J Exp Med.* 2000 Jul 3; 192(1): 23-9.

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【 0 2 2 6 】

【図 1】 DC の成熟を引き起こすネクローシス細胞の上清は HMGB1 を含有する。

【図 1 a】 CD83 及び CD86 表面分子の発現を、未処置未成熟 DC 又は HeLa、B-LCL、及び凍結・解凍 (F/T) PMN、又はそれらの上清 (sup) で刺激された DC のフローサイトメトリーによって評価した。

【図 1 b】 HMGB1 を、HeLa、B-LCL、又はネクローシス F/T PMN のペレット (P) 又は上清 (S) におけるウエスタンブロット法によって評価した。精製組換え HMGB1 を対照として用いた (rHMGB1、10、50、又は 100 ng / レーン)。

【図 1 c】 HMGB1 の細胞内分布を、PMN 及び HeLa 細胞における免疫組織化学によって評価した (右側パネル)。核は DAPI 染色によって示された (左側パネル)。

【図 2】 HMGB1 は十分に DC の成熟を誘発する。

【図 2 a】 表面分子 HLA-DR、CD40、CD83、CD80、及び CD86 の発現を、未処置未成熟 DC 又は HMGB1 (25 又は 100 ng / ml) 処置 DC のフローサイトメトリーによって評価した。

【図 2 b】 表面発現の相対的増大は、未処置未成熟 DC 細胞の平均蛍光強度 (MFI) に対する rHMGB1 処置細胞の MFI として表されている。実験は異なるドナーからの DC で少なくとも 3 回繰り返された。コルモゴロフスミルノフ (Kolmogorov-Smirnov) アルゴリズム (* = D / s (n) 値 > 25) に基づく差は統計的に有意であった。

【図3】HMGB1は、ネクローシス細胞によって誘発されるDCの成熟に必要である。

【図3a】表面分子HLA-DR、CD40、CD83、CD80、及びCD86の発現を、未処置未成熟DC若しくはネクローシス野生型線維芽細胞(F/T+/+)又は対応するHmgb1-/-線維芽細胞の上清処置DCのフローサイトメトリーによって評価した。

【図3b】表面発現の相対的増大は、未処置未成熟DC細胞の平均蛍光強度(MFI)に対するHmgb1+/+ネクローシス線維芽細胞の上清処置DC又はHmgb1-/-ネクローシス線維芽細胞の上清処置DCのMFIとして表されている。実験は種々のドナーからのDCで少なくとも3回繰り返された。Hmgb1+/+ネクローシス線維芽細胞の上清処置DCのみが、コルモゴロフスミルノフ(Kolmogorov/Smirnov)アルゴリズム(*=D/s(n)値>25)に基づき有意に高かった。

10

【図3c】HMGB1に対して特異的な抗体は、rHMGB1(25ng/ml)によって誘発されるDCの成熟を抑制する。結果は、以下のように計算された抑制率として表されている。すなわち、抑制% = $100 \times (1 - \text{抗HMGB1抗体の存在下のrHMGB1処置DCのMFI} / \text{抗HMGB1抗体の非存在下のrHMGB1処置DCのMFI})$ 。

【図3d】HMGB1に対して特異的な抗体は、ネクローシスF/T B-LCLの上清によって誘発されるDCの成熟を抑制する。結果は、以下のように計算された抑制率として表されている。すなわち、抑制% = $100 \times (1 - \text{抗HMGB1抗体の存在下のネクローシスF/T B-LCLの上清処置DCのMFI} \cdot \text{抗HMGB1抗体の非存在下のネクローシスF/T B-LCLの上清処置DCのMFI})$ 。

20

【図4】HMGB1は、アポトーシスリンパ腫細胞の免疫原性を増大させる。RMAリンパ腫細胞の皮下成長を、PBS(中空円)、 1×10^6 アポトーシスRMA細胞(明充実円)、又はrHMGB1の存在下の 1×10^6 アポトーシスRMA細胞(0.5µg/マウス-暗充実円)をワクチン接種した5匹のC57BL/6マウスの群において評価した。

【図4a】示された結果(y軸)は、生リンパ腫細胞(x軸)の投与後の異なる時間での腫瘍のないマウスの割合を示す。

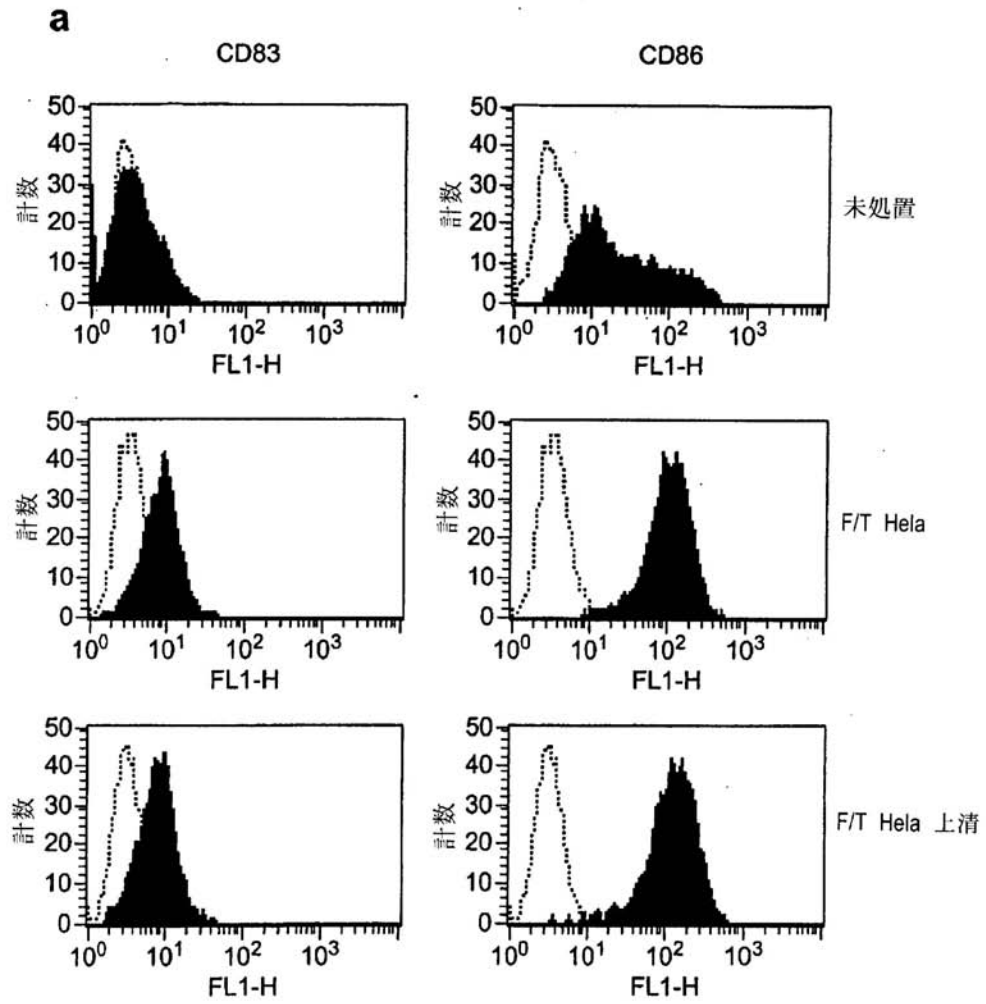
【図4b】示された結果(y軸)は、生リンパ腫細胞(x軸)の投与後の異なる時間での腫瘍の平均径を示す。

【図5】組換え精製HMGB1の非存在下(A)又は存在下(B)の可溶性抗原による免疫化後10日にELISAによって検出されたオボアルブミン特異的IgM抗体。

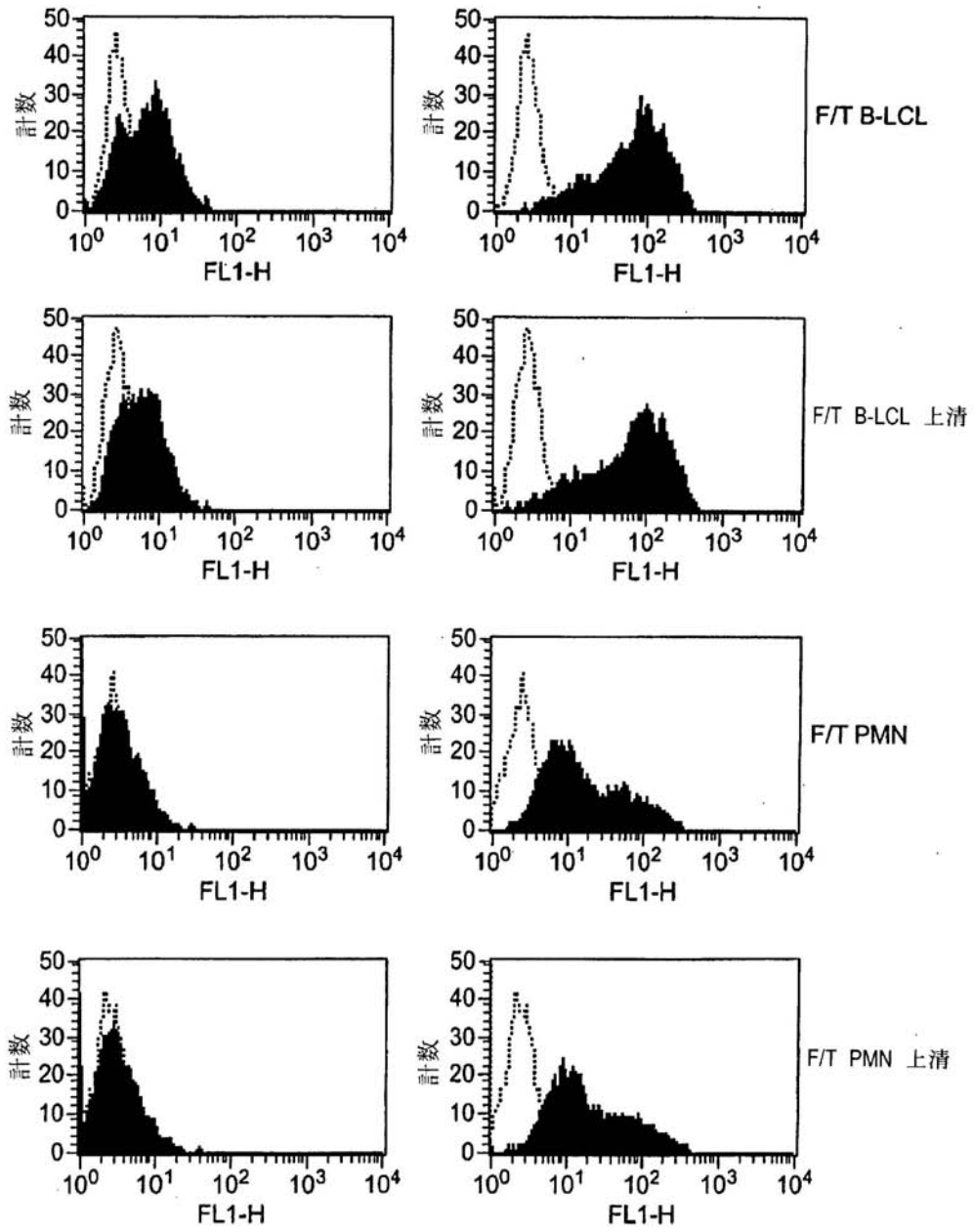
30

【図6】組換え精製HMGB1の非存在下(A)又は存在下(B)の可溶性抗原による免疫化後10日にELISAによって検出されたオボアルブミン特異的IgG抗体。

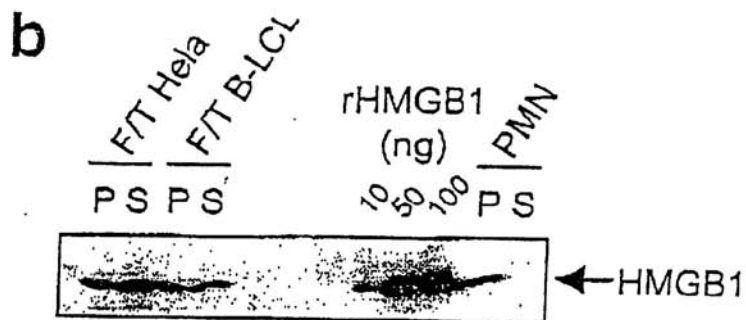
【 図 1 a - 1 】



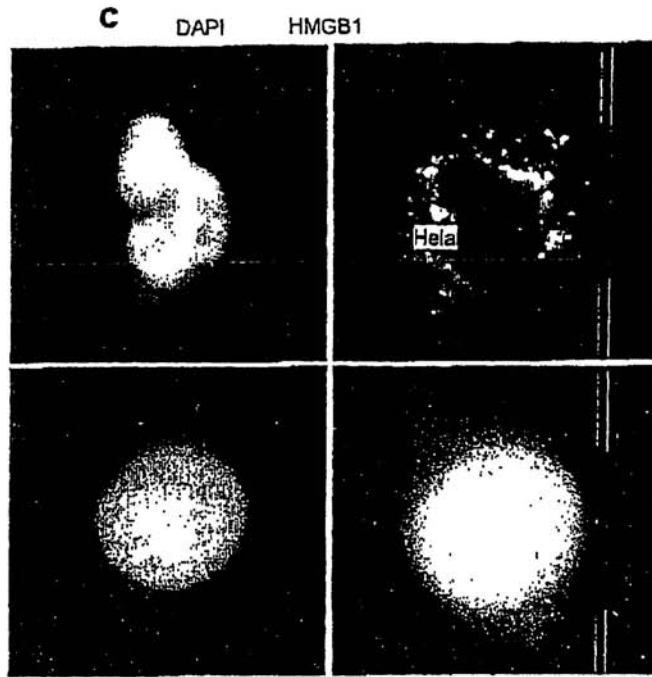
【 図 1 a - 2 】



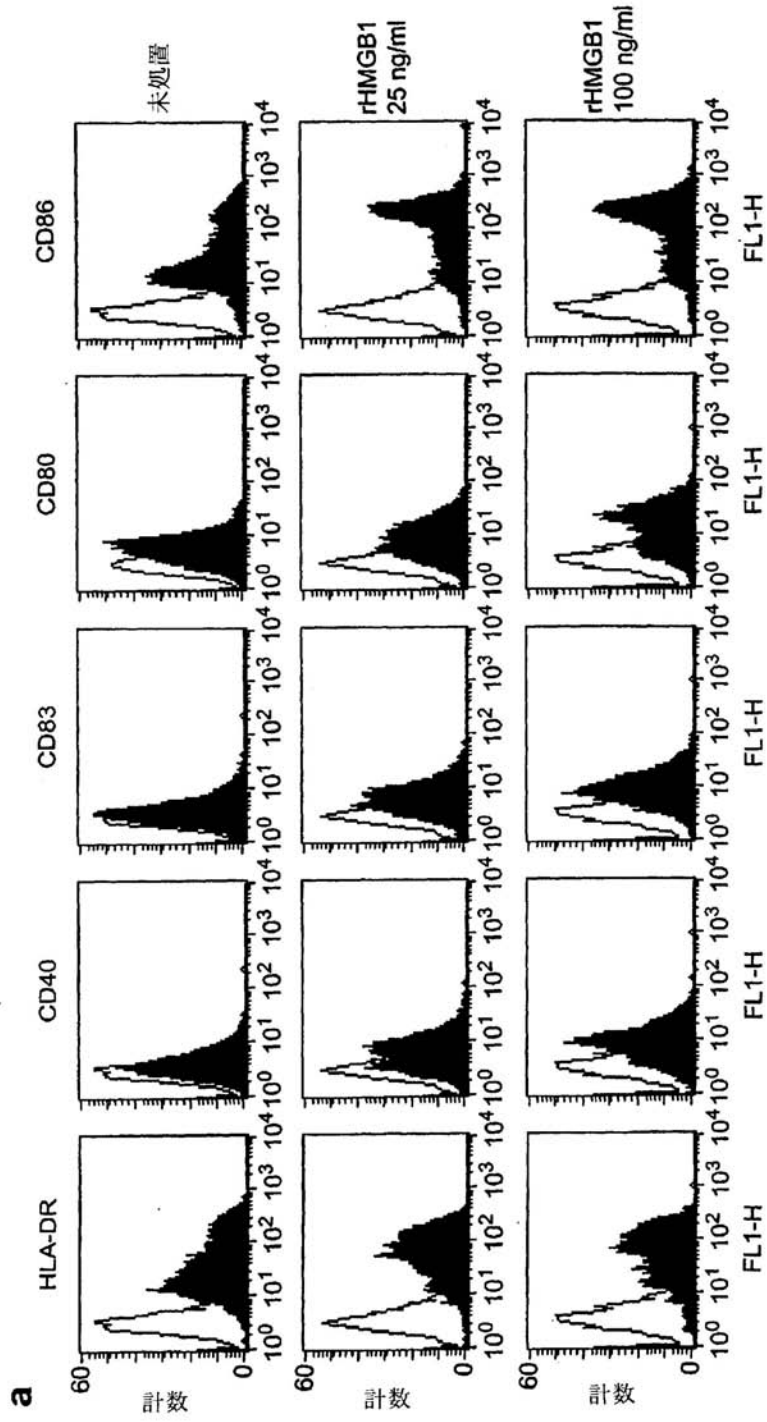
【 図 1 b 】



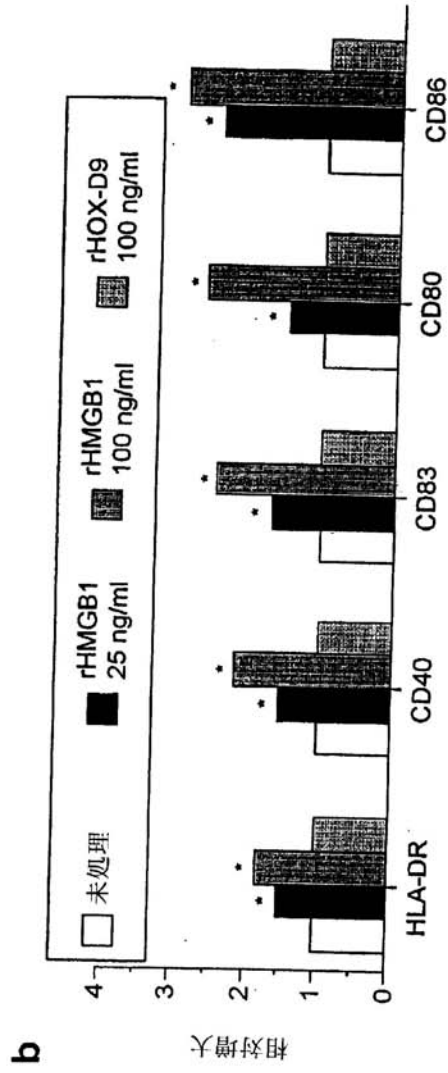
【 図 1 c 】



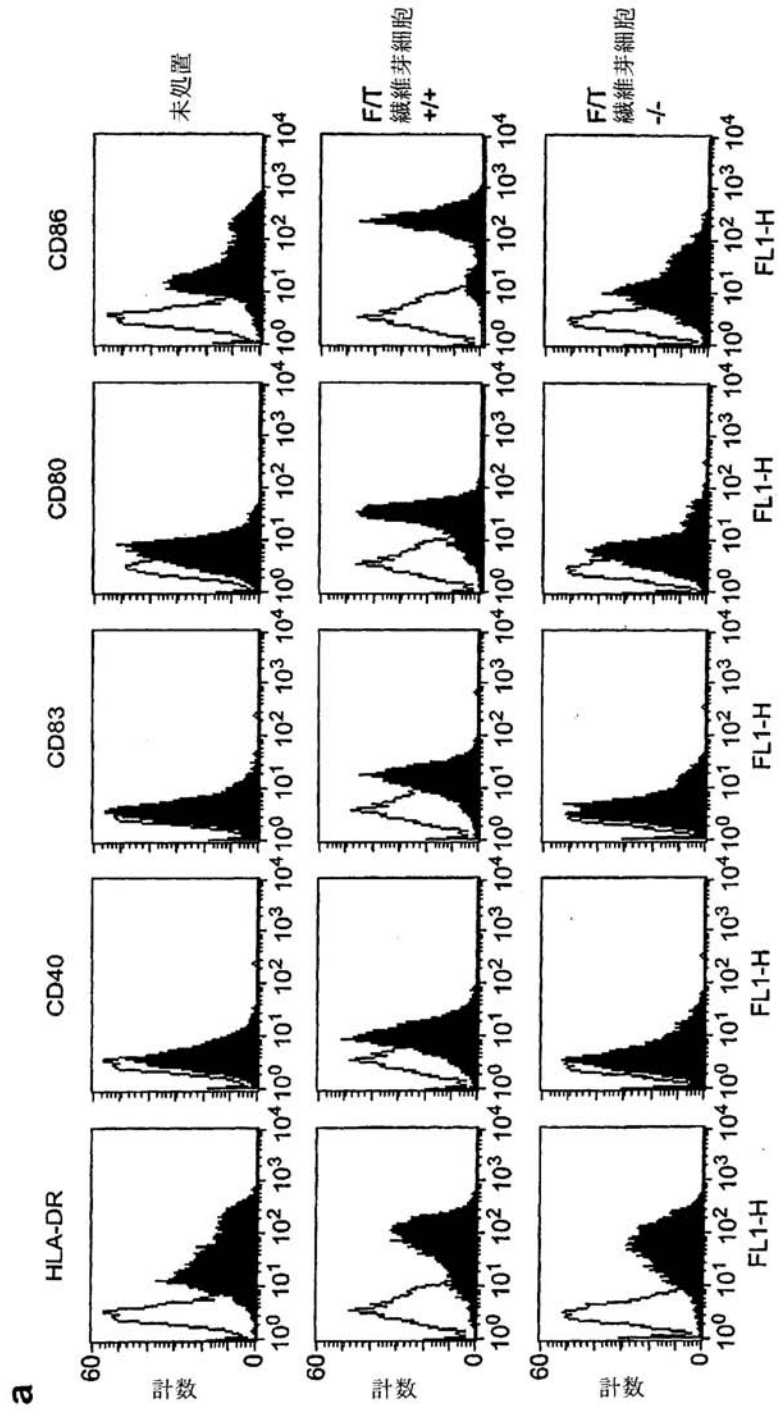
【 図 2 - 1 】



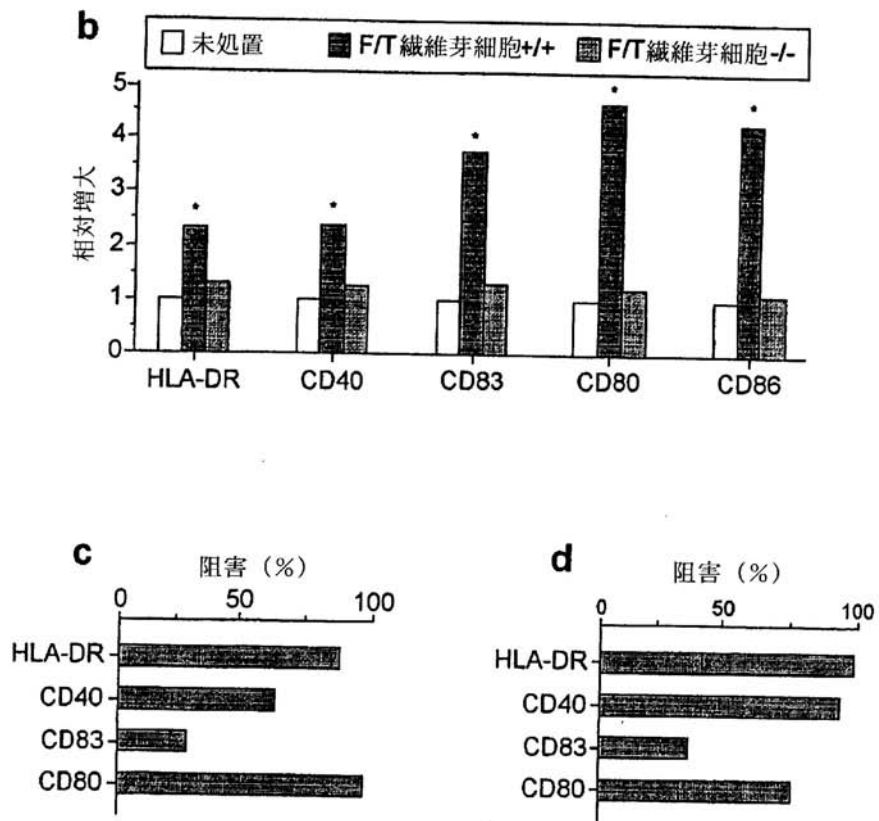
【 図 2 - 2 】



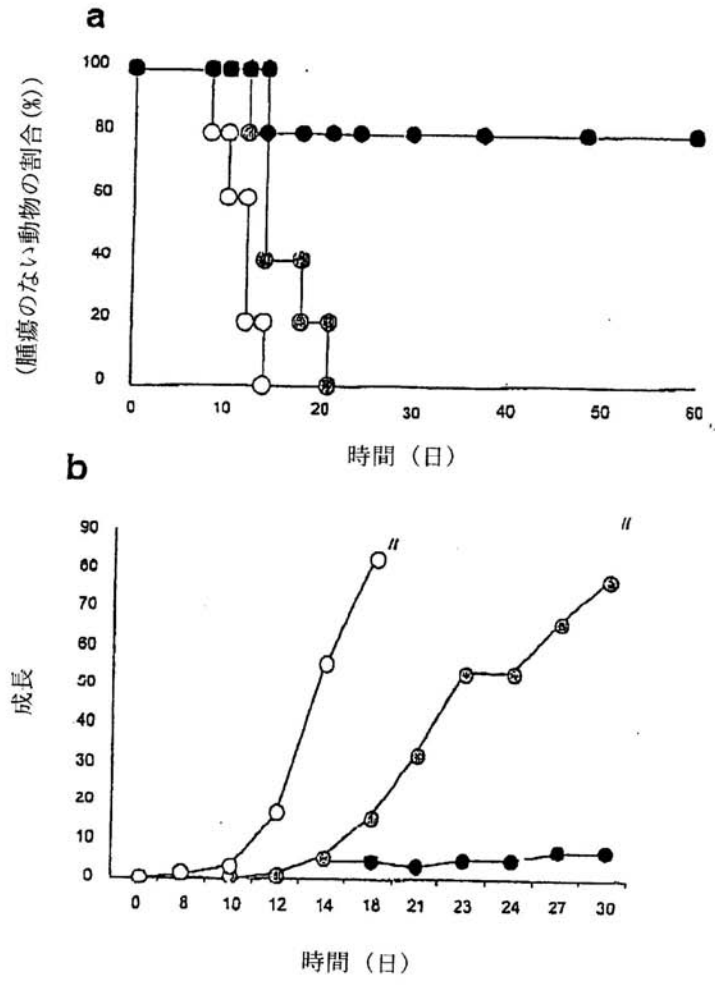
【 図 3 - 1 】



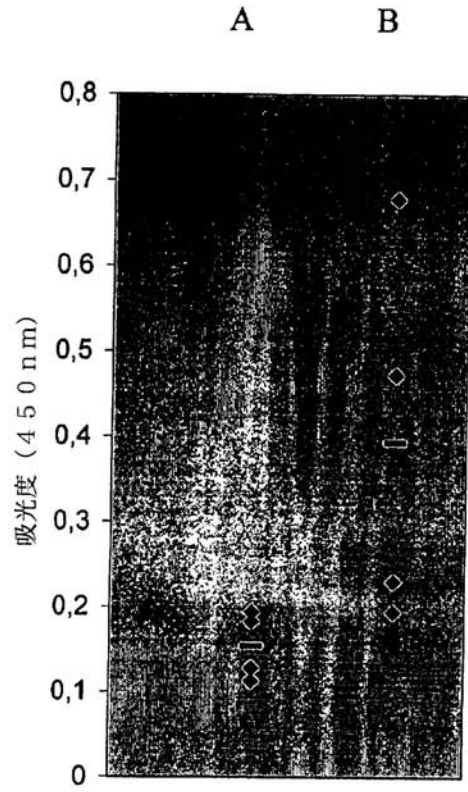
【 図 3 - 2 】



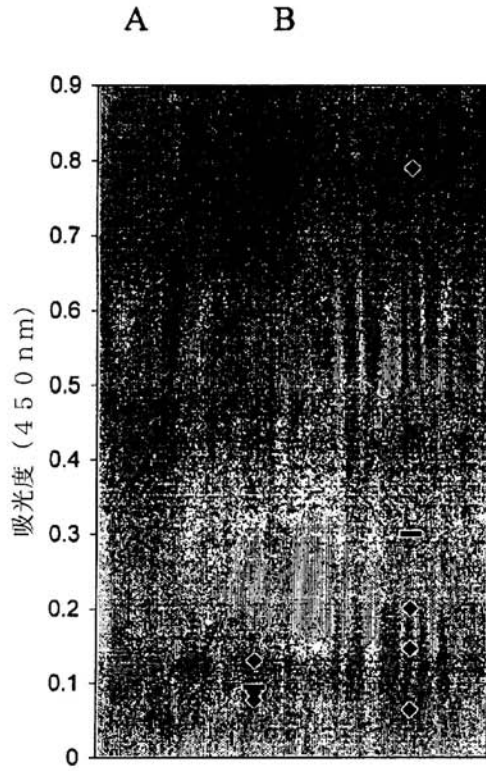
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/IB 02/04080
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/39 A61K38/17 A61P37/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 59609 A (VANDER WAY LIMITED) 25 November 1999 (1999-11-25) cited in the application the whole document ---	1-38
A	WO 00 47104 A (THE PICOVER INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH) 17 August 2000 (2000-08-17) cited in the application the whole document -----	1-38
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*I* 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 19 March 2003		Date of mailing of the international search report 27/03/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2230 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2340, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB 02/04080**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1, 2, 10, 17, 24-25 and 28-34 (as far they concern in vivo methods) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims 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. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB 02/04080

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9959609	A	25-11-1999	IT MI981094 A1 19-11-1999
			AT 211391 T 15-01-2002
			AU 4363199 A 06-12-1999
			DE 69900756 D1 28-02-2002
			DE 69900756 T2 13-03-2003
			DK 1079849 T3 22-04-2002
			WO 9959609 A2 25-11-1999
			EP 1079849 A2 07-03-2001
			ES 2171086 T3 16-08-2002
			JP 2002515445 T 28-05-2002
			PT 1079849 T 28-06-2002

			WO 0047104
AU 3698300 A 29-08-2000			
CA 2359926 A1 17-08-2000			
EP 1165110 A2 02-01-2002			
WO 0047104 A2 17-08-2000			
US 2003017155 A1 23-01-2003			
US 6468533 B1 22-10-2002			
US 2002102609 A1 01-08-2002			

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 31/12	
C 1 2 N 5/06	A 6 1 P 35/00	
// C 1 2 N 15/09	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 N 5/00	E
	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 マンフレディ アンジェロ

イタリア国 ミラノ アイ - 2 0 1 3 2 ヴィア オルゲッティナ 6 0 フォンダジオーネ セントロ サン ラファエロ デル モンテ タボール

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA04 CA05 CA06 DA06 EA04 FA02 FA10 GA11
GA19 HA03 HA08 HA14
4B065 AA92X AA94X AC12 AC20 BA24 BB19 CA44
4C084 AA01 AA02 AA13 BA35 BA44 DA27 MA02 NA14 ZB261 ZB331
ZB351
4C085 AA04 AA38 BA07 BA51 BB01 BB07 BB36 CC07 CC08 CC21
DD23 EE03 FF24
4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 NA14 ZB26 ZB33 ZB35