

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5762407号  
(P5762407)

(45) 発行日 平成27年8月12日 (2015. 8. 12)

(24) 登録日 平成27年6月19日 (2015. 6. 19)

(51) Int. Cl.

F I

<b>A 6 1 K</b>	<b>35/74</b>	<b>(2015. 01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>35/74</b>	<b>A</b>
<b>A 6 1 P</b>	<b>9/10</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>9/10</b>	
<b>A 6 1 K</b>	<b>45/00</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>45/00</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>43/00</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>43/00</b>	<b>1 2 1</b>

請求項の数 10 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2012-524330 (P2012-524330)  
 (86) (22) 出願日 平成22年8月12日 (2010. 8. 12)  
 (65) 公表番号 特表2013-501775 (P2013-501775A)  
 (43) 公表日 平成25年1月17日 (2013. 1. 17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2010/053652  
 (87) 国際公開番号 W02011/018769  
 (87) 国際公開日 平成23年2月17日 (2011. 2. 17)  
 審査請求日 平成25年4月18日 (2013. 4. 18)  
 (31) 優先権主張番号 09290627.0  
 (32) 優先日 平成21年8月13日 (2009. 8. 13)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 510113726  
 アンスティトゥー パストゥール  
 フランス国 エフー75015 パリ リ  
 ュ デュ ドクトール ルー 28  
 (73) 特許権者 512034911  
 アンスティトゥー ナショナル ドゥ ラ  
 ルシェルシュ アグロノミーク  
 フランス国 エフー75007 パリ リ  
 ュ ドゥ リュニヴェルシテ 147  
 (74) 代理人 110000796  
 特許業務法人三枝国際特許事務所  
 (72) 発明者 マルシャル ジル  
 フランス国 エフー75014 パリ ア  
 ヴェニュー デュ ジェネラル ルクレ  
 ル 102

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アテローム性動脈硬化を予防又は治療するための、長期凍結乾燥 (EFD) により死滅したマイコバクテリウム・ボビスBCGの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記 (i) ~ (iv) を含む工程によって得られた、長期凍結乾燥により死滅したマイコバクテリウム・ボビスBCG細菌を含む、アテローム性動脈硬化を予防又は治療するための組成物；

(i) 生きたマイコバクテリウム・ボビスBCG細菌細胞の培養物を回収することと、

(ii) 水中で又は塩の水溶液中で前記マイコバクテリウム・ボビスBCG細菌細胞を凍結することと、

(iii) 凍結した前記マイコバクテリウム・ボビスBCG細菌細胞を、凍結乾燥器中で少なくとも98.5%の水を除去するのに十分な時間該細胞を乾燥させることにより、死滅させることと、

(iv) 長期凍結乾燥した前記マイコバクテリウム・ボビスBCGの死滅した細菌細胞を回収すること。

【請求項 2】

前記マイコバクテリウム・ボビスBCG細菌が、変性していないタンパク質を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記マイコバクテリウム・ボビスBCG細菌が、一次構造が保存されているタンパク質を有する、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記マイコバクテリウム・ボビス B C G 細菌が、1 . 5 % 未満の水を含有する、死滅しておりかつ変性していないマイコバクテリウム・ボビス B C G 細菌からなる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

$10 \mu\text{g} \sim 10 \text{mg}$  の長期凍結乾燥により死滅した前記マイコバクテリウム・ボビス B C G 細菌を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

$100 \mu\text{g} \sim 1 \text{mg}$  の長期凍結乾燥により死滅した前記マイコバクテリウム・ボビス B C G 細菌を含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

$100 \mu\text{g}$  の長期凍結乾燥により死滅した前記マイコバクテリウム・ボビス B C G 細菌を含み、前記組成物は 1 週間毎の皮下投与を目的とするものである、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 8】

$100 \mu\text{g}$  の長期凍結乾燥により死滅した前記マイコバクテリウム・ボビス B C G 細菌を含み、前記組成物は 1 ヶ月毎の皮下投与を目的とするものである、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 9】

$100 \mu\text{g}$  の長期凍結乾燥により死滅した前記マイコバクテリウム・ボビス B C G 細菌を含み、前記組成物は 3 ヶ月毎 ~ 6 ヶ月毎の皮下投与を目的とするものである、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 10】

抗炎症薬又は免疫変調薬の一種以上と、同時、別々又は連続して投与することを目的とする、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アテローム性動脈硬化を予防又は治療するための、長期凍結乾燥 (Extended Freeze Drying) ( E F D ) により死滅したマイコバクテリウム・ボビス (Mycobacterium bovis: ウシ型結核菌) B C G の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

アテローム性動脈硬化は、数十年かけて進行する複雑な慢性の炎症プロセスである。アテローム性動脈硬化は、酸化低密度リポタンパク質 ( L D L ) の蓄積、細胞死の増大、及び動脈壁の肥大性の変性を特徴とし、チャネルの狭窄を引き起こすことにより血流が損なわれる。アテローム性動脈硬化は、身体のいずれの領域においても発症する可能性があるが、心臓、脳又は脳に通じる血管において発症する場合、最も重要である。狭窄は、動脈の内壁における粥腫 (盛り上がった斑部) の形成に起因する。これらの粥腫は、低密度リポタンパク質、崩壊する筋肉細胞、線維組織、血小板の凝集物、コレステロール、マクロファージ、T リンパ球、及び時としてカルシウムからなる。粥腫は、乱流の血流の領域において形成される傾向があり、血流中に高濃度のコレステロールを有する者において見出されることが最も多い。粥腫の数及び厚みは年齢とともに増大し、血管内面の円滑さの喪失を引き起こし、血栓 (血餅) の形成を促進する。時には、血栓の断片が裂けて塞栓を形成し、これが血流中を移動し、より小さな血管を封鎖する。

【0003】

アテローム性動脈硬化及びその臨床病態は、男性及び女性の両方において罹患及び死亡の主因である。冠動脈 (冠動脈心疾患) を含むアテローム硬化性心疾患は、全ての死の 3 分の 1 を占める最も一般的な死因である。脳への血液供給に対するアテローム硬化性の障

10

20

30

40

50

害（脳卒中）は、がん続く3番目に一般的な死因である。血管不全は、他の主幹動脈（例えば腎臓、下肢及び腸への）における血液の流れを低減させることにより多数の重度の疾病を引き起こすアテローム性動脈硬化の別の臨床病態である。

#### 【0004】

残念なことに、アテローム性動脈硬化は、動脈に対する損傷が血流を制限するほどに重篤となるまで症状を生じない。アテローム性動脈硬化に起因する心筋への血流の制限により、狭心症又は心筋梗塞（心発作）が引き起こされる可能性がある。下肢の筋肉への血流の制限により、間欠性跛行（歩行により引き起こされ、休息により軽減される下肢の疼痛）が引き起こされる。脳に血液を供給する動脈の狭窄により、一過性の虚血性発作（24時間未満持続する脳卒中の症状及び徴候）及び眩暈のエピソード、又は最終的には脳卒中それ自体が引き起こされる可能性がある。

10

#### 【0005】

アテローム性動脈硬化に関する現在の薬剤的処置としては、幾つかの薬剤、例えばスタチン系薬剤（ロスバスタチン）及びフィブラート系薬剤の使用が挙げられる。二次的な凝固及び血栓形成を最小限に抑えようとする際に使用される抗凝血薬以外では、血管拡張薬は症状軽減をもたらすが、治療的な価値はない。薬剤的処置に回答しないものに対して、又は或る特定の高リスク状況においては外科的処置が利用可能である。バルーン血管形成術は、狭くなった血管を拡張し、血液供給の改善を促進することができる。心臓への血液供給を冠動脈バイパス外科処置により回復させることもできる。大型アテローム性閉塞及び石灰化動脈閉塞を、動脈内膜切除術により除去することができ、疾患状態にある末梢血管部分全体を、織ったプラスチック管の移植片に置き換えることができる。

20

#### 【0006】

アテローム性動脈硬化の発病は、炎症、自己免疫及び組織特異的変性の複雑な相互作用を伴う。

#### 【0007】

アテローム性動脈硬化に関する多数のリスク因子としては、高血圧、喫煙、真性糖尿病、脂質異常症（高コレステロール血症）、メタボリック・シンドローム、肥満、虚血、男性であること、年齢、心疾患の家族歴、及びセデンタリー・ライフスタイルが挙げられる。

#### 【0008】

因子が何であっても、結果として起こる動脈内膜の慢性炎症が、アテローム性動脈硬化の発症の主要な原動力である。アテローム性動脈硬化に関与する主要な細胞プロセスは、ケモカインを放出する内皮細胞の活性化を含む。酸化低密度リポタンパク質（LDL）は、炎症細胞の動員及び浸潤を助ける糖タンパク質接着分子（血管細胞接着分子-1（VCAM-1）、細胞内細胞接着分子-1（ICAM-1）及びE-セレクトリン）を発現する内皮細胞の活性化を誘導する。内皮との結合後、白血球が内膜中に浸潤する。そこで、単球がマクロファージに分化し、マクロファージが酸化LDLからコレステロールを捕捉することにより泡沫細胞となる。結果として起こる動脈壁上への脂肪線条の蓄積の後に、進行性アテローム硬化性病変の形成が起こる。血管平滑筋細胞は増殖し、病変に向かって移動する。それらの動員の際、血管平滑筋細胞は、脂質アテローム上に線維性粥腫を形成する細胞外マトリクスを分泌する。最終的に、不安定な粥腫が、進行する慢性炎症の結果として崩壊することがある。結果として生じる血栓は、急性の冠動脈事象、例えば心筋梗塞及び脳卒中に関与する。

30

40

#### 【0009】

NF- $\kappa$ Bはアテローム硬化性病変における炎症応答の活性化と関連する関連マーカーであり（非特許文献1）、PPAR- $\gamma$ シグナル伝達炎症性サイトカインの産生を阻害する（非特許文献2）。I- $\kappa$ Bのリン酸化により、この疾患プロセスにおいて一定の役割を果たすNF- $\kappa$ Bが活性化される。しかしながら、NF- $\kappa$ Bの活性化がアテローム性動脈硬化に必要であるという直接的な証拠は存在しない（非特許文献3）。マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）経路はレチノイドX受容体（RXR）をリ

50

ン酸化するが、非リン酸化型の R X R は、P P A R とともにヘテロ二量体を形成し、炎症を相乗的に低減させる（非特許文献 4）。

#### 【 0 0 1 0 】

炎症を標的にすることは、アテローム性動脈硬化に対する治療を開発するためのアプローチである。抗炎症薬の中には、アテローム形成の主要段階における心保護効果を発揮することが示されたものがある。チアゾリンジオンは、2 型糖尿病の治療のために臨床的に使用されているペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（P P A R）アゴニストである。P P A R は、アテローム性動脈硬化に寄与する多数の細胞プロセスを調節する。i n v i t r o の動物モデル及び臨床研究により、チアゾリンジオンが、内皮の機能不全を是正し、慢性の炎症プロセスを抑制し、脂肪線条形成を低減させ、粥腫発生及び血管壁肥厚化を遅延させ、粥腫安定化を増強することが示されている。したがってチアゾリンジオンは、2 型糖尿病を有する患者においてアテローム性動脈硬化に関連するグルコースレベル及び長期的な心血管リスクの両方を改善させることができる抗炎症性抗トロンビン（a n t i t h r o m b i c）剤としての可能性を示す（非特許文献 5）。しかしながら、P P A R - アゴニスト（心血管疾患のリスクが高い糖尿病患者においてインスリン増感剤として使用される）と P P A R - アゴニスト（脂質異常症を治療するために使用される）との組合せにより、A p o E - / - においてアテローム性動脈硬化が増強され（非特許文献 6）、ヒトにおいて主要な心血管の有害事象が誘導された（非特許文献 7）。

10

#### 【 0 0 1 1 】

最近になって、免疫系がアテローム形成プロセスを変調させる主要な因子であることを示唆する証拠が増大している（概説に関しては、非特許文献 8 を参照されたい）。アテローム硬化性病変におけるほとんどの炎症細胞がマクロファージであるが、該細胞の多くて 2 0 % が T リンパ球である（非特許文献 9）。この疾患プロセスは、自然免疫応答及び獲得免疫応答の両方により標的化される修飾型自己抗原（酸化 L D L、H S P、アポトーシス性断片）の局所的な形成と関連する。これらの自己免疫応答は、酸化 L D L 及び死滅する細胞由来の潜在的に有害な残りの産物の除去を容易にする有益な効果を有する可能性がある。しかしながら、保護的な自己免疫と疾患促進性の自己免疫との間の均衡が失われると、自己免疫系は破壊的な炎症促進性プロセスに向かって加速することになり、粥腫の成長及び不安定化が引き起こされる。これらの観察結果は、粥腫抗原に対する免疫応答の変調に基づく、アテローム性動脈硬化に対する新たな治療の開発の可能性を指摘している。

20

30

#### 【 0 0 1 2 】

動物研究により、酸化 L D L に存在する抗原に基づくワクチンにより粥腫抗原に対する免疫応答を変調させることによってアテローム性動脈硬化の発症を阻止することが可能であるという原理の証明の裏付けが提示された。しかしながら、酸化 L D L は、標準化するのが困難な抗原組成物を有する複雑な粒子であるため、また、酸化 L D L は潜在的に、有害な抗原を含有する可能性もあるため、酸化 L D L それ自体は理想的なワクチン成分ではない。したがって、ここ数年にわたり、相当な努力が、アテローム保護性免疫を誘導する酸化 L D L 中の正確な抗原を特徴付けることに費やされてきた。酸化 L D L において以下の 2 つの抗原が同定された：酸化リン脂質（ホスホリルコリン）及びアポ B - 1 0 0 ペプチド（非特許文献 1 0）。ホスホリルコリンに基づくワクチン及びアポ B ペプチドに基づくワクチンの両方に伴う制約は、作用メカニズムがあまり理解されていないことである。酸化リン脂質は、その発現の調節があまり理解されておらず、老化細胞及び細胞屑と関連する自己抗原と交差反応する、自然抗体と称される I g M のサブクラスにより認識される。高い特異性及び標準化したワクチン調製物を産生する可能性は、アポ B ペプチドに基づくワクチンの幾つかの利点であり、現在ヒトワクチンが前臨床開発中である。このアプローチに伴う欠点としては、治療前に患者のヒト白血球抗原（H L A）遺伝子型判定を行う必要があること、及び H L A 型に応じてワクチンを個人に合わせる必要があるというリスクが挙げられる。

40

#### 【 0 0 1 3 】

しかしながらこれまで、アポ B ペプチドに基づくワクチンの他には、免疫系を標的にす

50

る他の治療的アプローチは、アテローム性動脈硬化の治療に対しては開発されていない。

#### 【0014】

身体が自己免疫応答の活性を制御するためには複数の方法が存在し、そのうち重要な方法の1つは、調節性T細胞 (Treg) である。Tregの複数のサブタイプが同定されている。天然CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregが、胸腺において発生し、その後末梢組織に入り、該組織において該Tregは全T細胞の5%~10%を構成する。天然Tregとは対照的に、IL-10を産生する1型調節性T細胞 (Tr1) 及びTGF-

を産生する3型ヘルパーT細胞 (Th3) は、樹状細胞 (DC) による抗原提示及び活性化の後に、末梢においてナイーブT細胞から生成される。複数の証拠が、Tregの機能の調節不全がアテローム性動脈硬化に関係するとしている。アテローム性動脈硬化におけるTregの保護的役割に関する機能的な証拠も蓄積されている。CD80/86、CD28又はICOSの欠失、及び抗CD25抗体処理を介した天然Tregの除去により、粥腫形成が顕著に増大する (非特許文献11、非特許文献12)。同様に、TGF-に関するT細胞受容体の欠失を介したTh3細胞の阻害により、疾患の進行が顕著に増強される (非特許文献13) が、その同種 (cognate) 抗原とともにオボアルブミン特異的なTr1細胞のクローンを投与することにより、アポリポタンパク質E欠損 (ApoE<sup>-/-</sup>) マウスにおいて粥腫の発達が阻害された (非特許文献14)。しかしながら、アテローム性動脈硬化における調節性T細胞の役割の理解は、依然として非常に不完全である。

#### 【0015】

これらの知見は、免疫調節経路が誘起されて、炎症を低減させ、アテローム性動脈硬化を治療又は予防し得る可能性を提起した。興味深いことに、マイコバクテリウム・ボビスBCG (カルメット・ゲラン桿菌) ワクチン接種が乳児におけるアトピーの発症を防ぐことが示され、BCGが免疫応答の調節不全を予防することができることが示唆された (非特許文献15)。抗炎症治療としての生きたBCGの実現不可能な送達を回避するために、BCGを長期凍結乾燥により死滅させ (EFD BCG又はEFD)、それがアレルギー (喘息、PCTの国際出願の特許文献1、非特許文献16、非特許文献17) 及び腸の炎症性疾患 (炎症性腸疾患、PCTの国際出願の特許文献2) に関する複数の動物モデルにおいて強力な抗炎症剤であることが示された。EFDは、生きたBCG又は熱により死滅したBCGと関連する毒性の副作用を引き起こさず、DTH皮膚試験による結核の診断を妨害しない。EFDは、TNF- $\alpha$ 、IL-12、IFN- $\gamma$  及びT-betが関連するTh1シグナル伝達経路だけでなく、IL-4、IL-13及びGATA-3が関連するTh2シグナル伝達経路、並びにIL-17及びPPAR- $\gamma$  が関連すると考えられる新たなシグナル伝達経路にも作用するという独自の特性を有する (PCTの国際出願の特許文献2)。アレルギー及び腸の炎症性疾患の症状に対するEFDの保護/治療効果は、IL-10を産生するCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>調節性細胞の刺激と関連する (PCTの国際出願の特許文献1及び特許文献2)。

#### 【0016】

しかしながら、アテローム性動脈硬化等の自己免疫疾患を治療するための調節性T細胞刺激因子の使用と関連し得る主要な副作用が存在する (非特許文献8)。調節性T細胞が過度に抑制的であり、免疫抑制が罹患した組織に限定されない場合、感染に対する防御、及びCD8<sup>+</sup>T細胞依存性の腫瘍細胞サーベイランスが損なわれるというリスクが存在する。例えば、週1回注射した場合、麻疹ウイルス由来のウイルスの核タンパク質が、マウスにおいてアテローム性動脈硬化を低減させることが示されている (非特許文献18)。しかしながら、この核タンパク質により、*in vitro*での刺激に対してIL-10を分泌する抑制性Tregの発生が誘起され、マウスへのその投与により、T細胞によるIL-4及びIFN- $\gamma$  の産生が低減し、この麻疹核タンパク質処理が免疫抑制的である可能性があることが示唆された。

#### 【0017】

本発明者らにより、以下の3つの相異なるマウスモデルにおいてEFD BCGがアテ

10

20

30

40

50

ローム性動脈硬化を低減させることが実証された：1) 30週で進行性のアテローム性動脈硬化病変を自発的に発症するアポリポタンパク質E欠損(ApoE<sup>-/-</sup>)マウス、2) 高脂肪食(hyperlipidemic diet)によりアテローム性動脈硬化を発症する低密度リポタンパク質受容体欠損(Ldlr<sup>-/-</sup>)マウス、及び3) T細胞上に機能的TGF- $\beta$ 受容体を欠き、12週でアテローム性動脈硬化病変を自発的に発症するApoE<sup>-/-</sup> × CD4dnt<sup>-/-</sup> RIIマウス。

#### 【0018】

EFD BCGにより、標的化された遺伝子及びTGF- $\beta$ シグナル伝達とは関係なく、3つのアテローム性動脈硬化誘発性(prone)マウスモデルにおいてアテローム硬化性病変の大きさが有意に低減した。

10

#### 【0019】

EFD BCGにより、以下のことが同時に誘発された：1) IL-10産生及びTregの増殖を介した免疫調節効果、2) NF- $\kappa$ B活性化の阻害、並びに3) PPAR- $\gamma$ レベルの変化を伴わないPPAR- $\gamma$ の増大。

#### 【0020】

このEFD BCGは、PPAR- $\gamma$ の選択的な誘導因子であり、PPAR- $\gamma$ 活性化を誘導しないが、これは1つの利点であり、臨床的使用に関するその可能性を裏付ける。

#### 【0021】

予期せぬことに、その免疫調節活性にもかかわらず、EFD BCGは、Th1免疫応答及びTh2免疫応答を起こすワクチン(ナイセリア・メニンジティデイス(Neisseria meningitidis)、BCG)によりもたらされる保護を弱体化せず、病原体感染(ウイルス(インフルエンザウイルス)、細菌(マイコバクテリウム・ツベルクローシス(M. tuberculosis: ヒト型結核菌))又は寄生虫(リーシュマニア・メジャー(Leishmania major)))の経過も悪化させなかった。宿主の効率的な免疫能の維持により、EFD BCGがヒトにおいて耐容性を有する治療剤であることが示唆される。

20

#### 【0022】

EFD BCGに応答して、免疫抑制の徴候を有しない免疫調節プロファイルが誘導される。EFD BCGで処理したマウスにおける全身的炎症プロファイルの変調は、アテローム硬化性疾患における最大の危険である粥腫の崩壊を防止し得るものでもある、粥腫におけるMOMA<sup>+</sup>マクロファージの局所的な蓄積の低減とも関連した。

30

#### 【0023】

さらに、EFD BCGは本研究において、測定可能な程度の副作用を有しなかった。

#### 【0024】

これらの結果により、EFDがアテローム性動脈硬化の予防及び治療のための新たな治療アプローチであることが示される。EFDは、長い活性持続時間(少なくとも2ヶ月)を有すると予想される。したがって、EFDは、1日1回の繰り返しの投与を必要とする現在使用されている薬剤と比較して、投与の回数が非常に限られるという利点を有する。加えて、EFD治療は、免疫抑制を誘導しないため、安全である。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

40

#### 【0025】

【特許文献1】国際公開第03/049752号

【特許文献2】国際公開第2007/072230号

#### 【非特許文献】

#### 【0026】

【非特許文献1】Bank et al., J. Clin. Invest., 1996, 97, 1715-1722

【非特許文献2】Jiang et al., Nature, 1998, 391, 82-86

【非特許文献3】T. Collins and M.I Cybulsky, J. Clinical Investigation, 2001, 107, 255-262

【非特許文献4】Yamazaki et al., Gut, 2007, 56, 1557-1563

50

【非特許文献 5】B. Staels, Current Medical Research and Opinion, 2005, 21, suppl 1, S13-S20

【非特許文献 6】Calkin et al., Atherosclerosis, 2007, 195, 17-22

【非特許文献 7】Nissen et al., JAMA, 2005, 294, 2581-2586

【非特許文献 8】Nilsson, J. and G.K. Hanson, Journal of Internal Medicine, 2008, 263, 464-478

【非特許文献 9】Hansson, G.K., N. Engl. J. Med., 2005, 352, 1685-1695

【非特許文献 10】Klingenberg et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2010, 30, 946-952

【非特許文献 11】Ait-Oufella et al., Nat. Med., 2006, 12, 178-180

10

【非特許文献 12】Gotsman et al., Circulation, 2006, 114, 2047-2055

【非特許文献 13】Roberson et al., J. Clin. Invest., 2003, 112, 1342-1350

【非特許文献 14】Mallat et al., Circulation, 2003, 108, 1232-1237

【非特許文献 15】Shirakawa et al., Science, 1997, 275, 77-79

【非特許文献 16】Lagranderie et al., J. Allergy Clin. Immunol., 2008, 121, 471-478

【非特許文献 17】Lagranderie et al., The Journal of Immunology, 2010, 184, 1062-1070

【非特許文献 18】Ait-Oufella et al., Circulation, 2007, 116, 1707-1713

【発明の概要】

20

【0027】

本発明は、アテローム性動脈硬化を予防又は治療するための、長期凍結乾燥（EFD）により死滅したマイコバクテリウム・ボビスBCG細菌の使用に関する。

【0028】

本発明との関連で使用される場合、「EFD」、「EFD BCG」又は「長期凍結乾燥したマイコバクテリウム・ボビスBCG」という表現は、換言すれば、死滅しておりかつ変性していないマイコバクテリウム・ボビスBCG細菌を表す。本発明との関連では、「変性していない」は、マイコバクテリウム・ボビスBCG細菌分子の構造、特に高分子（タンパク質、多糖、脂質）の一次構造が保存されていることを意味する。好ましくは、タンパク質の一次構造が保存されている。EFD中で保存されているタンパク質の一例は、Apaであり、これは、生きたBCGから抽出されるタンパク質と同じSDS-PAGEゲル中の移動特徴を有する（Laqueyrie et al., Infect. Immun., 1995, 63, 4003-4010）。EFDは、長期凍結乾燥、又はその高分子成分の構造を保存しながら細菌を死滅させる任意の他のプロセスにより調製することができる。好ましくは、かかるプロセスにより、細菌細胞由来の高分子の一次構造が保存される。EFDを調製するのに使用することができるこれらのプロセスは、当業者に既知であり、物理的手段、例えば長期凍結乾燥、シリカ又はジルコニウムビーズの存在下での粉碎等の使用、いわゆる「フレンチプレス」及び超音波処理の使用を含む。

30

【0029】

上で記載されるようなEFDの画分は、本発明の「EFD」という表現に包含される。この画分は、以下からなる群において選択される：グリコシダーゼによるEFDの処理の残留物（脱グリコシル化残留物）、DNase及び/又はRNaseによるEFDの消化の残留物、プロテアーゼによるEFDの処理の残留物、順番にグリコシダーゼ、DNase及び/又はRNase並びに最後にプロテアーゼによるEFDの処理の残留物、並びにプロテアーゼ（例えばスブチリシン（subtilisin）等）及びDNaseによる上記EFDの処理の残留物。

40

【0030】

本発明の好ましい1つの実施の形態によれば、EFDは、1.5%未満の水、好ましくは1%未満の水、より好ましくは0.5%未満の水を含有する、死滅しておりかつ変性していないマイコバクテリウム・ボビスBCG細菌からなる。

50

## 【 0 0 3 1 】

本発明の別の好ましい実施の形態によれば、E F Dを、参照により本明細書に援用されるP C Tの国際出願の特許文献1に記載されるような方法であって、( i ) 生きた細菌細胞の培養物を回収する工程と、( i i ) 水中で又は塩の水溶液中で該細菌細胞を凍結する工程と、( i i i ) 該凍結した細菌細胞を、凍結乾燥器中で少なくとも98.5%の水、好ましくは少なくとも99%の水、より好ましくは少なくとも99.5%の水を除去するのに十分な時間該細胞を乾燥させることによりを死滅させる工程と、( i v ) 長期凍結乾燥した死滅した細菌細胞を回収する工程とを含む、方法により調製する。必要に応じて、水中で又は塩の水溶液中で細菌細胞を洗浄する工程を、工程( i )と工程( i i )との間に導入することができる。

10

## 【 0 0 3 2 】

E F Dの全ての画分が、水又は任意の親水性溶媒中に長期凍結乾燥した細菌を再懸濁すること、及び処理を適用することにより得られる。貯蔵を容易にするために、古典的な凍結乾燥を、画分に対して後で適用することもできる。

## 【 0 0 3 3 】

本発明の別の有利な実施の形態によれば、上記E F Dが、薬学的に許容可能な担体及び/又は添加剤及び/又は免疫刺激剤及び/又はアジュバントを更に含む、アテローム性動脈硬化を予防又は治療するための医薬品組成物中に含まれる。

## 【 0 0 3 4 】

当業者に既知の任意の好適な担体を、本発明の医薬品組成物に利用することができ、該担体の種類は投与様式に応じて異なる。非経口投与、例えば皮下注射に関しては、担体は好ましくは、水、食塩水緩衝剤、ラクトース、マンニトール、グルタメート、脂肪又はワックスを含み、注射可能な医薬品組成物は好ましくは等張溶液(およそ300ミリオスモル~320ミリオスモル)である。経口投与に関しては、上記の担体、又は固体担体、例えばマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルカム(talcum)、セルロース、グルコース、スクロース及び炭酸マグネシウムのいずれかを、利用することができる。生分解性の微粒子(例えばポリ乳酸ガラクトド(poly-lactic galactide))を、本発明の医薬品組成物のための担体として利用することもできる。例えば米国特許第4,897,268号及び同第5,075,109号において、好適な生分解性の微粒子が開示されている。抗凝集剤、抗酸化剤、色素、香味増強剤、又は平滑化剤、集合化(assembling)剤若しくは分離(isolating)剤の中から、包括的には薬学産業において従来から使用されている任意の添加物の中から添加剤を選択することができる。様々なアジュバント/免疫刺激剤のいずれかを、免疫応答を増強するために本発明の組成物において利用することができる。ほとんどのアジュバントが、急速な異化から抗原を保護するように又は制御された炎症反応を生み出すように設計された物質、例えば水酸化アルミニウム、及び免疫応答の非特異的な刺激因子を含有する。ヒト投与のための好適なアジュバントは、例えば水酸化アルミニウム、生分解性の微粒子、モノホスホリルA及びQ u i l Aとして市販されている。

20

30

## 【 0 0 3 5 】

医薬品組成物は、経口投与に好適な形態であり得る。例えば、組成物は、経口投与のための錠剤、通常のカプセル、ゼラチンカプセル又はシロップの形態である。これらのゼラチンカプセル、通常のカプセル、及び錠剤形態は、医薬品製剤中において従来から使用されている添加物、例えばアジュバント、又は結着剤、例えばデンプン、ガム及びゼラチン、アジュバント、例えばリン酸カルシウム、崩壊剤、例えばコーンスターチ若しくはアルギン酸(alginic acids)、滑剤、例えばステアリン酸マグネシウム、甘味料、又は香料を含有していてもよい。溶液又は懸濁液を、薬理学的に適合性を有する溶媒の添加により、水性媒体又は非水性媒体中で調製することができる。これらは、グリコール、ポリグリコール、プロピレングリコール、ポリグリコールエーテル、D M S O及びエタノールを含む。

40

## 【 0 0 3 6 】

50



一般的に、組成物を、非経口注射（例えば皮内注射、筋肉内注射、静脈内注射又は皮下注射）により、鼻腔内に（例えば吸引又は噴霧により）、経口的に、舌下に、又は局所的に、皮膚を介して、又は直腸上皮を介して投与することができる。

【0037】

本発明の組成物中に存在するEFDの量は、治療上の有効量である。EFDの治療上の有効量は、EFDが、組成物が投与される被験体において過度の負の効果を引き起こすことなくアテローム性動脈硬化の徴候を低減させるその役割を果たすために必要な量である。使用されるEFD及び投与される組成物の正確な量は、治療対象の種（ヒト、動物）、被験体の種類（アテローム性動脈硬化のリスクを有する被験体、例えば脂質異常症の被験体、メタボリック・シンドロームの被験体、2型糖尿病の被験体）、投与様式、投与頻度、並びに組成物中の他の成分等の因子に応じて変化する。

10

【0038】

好ましくは、組成物は、約10 $\mu$ g～約10mg、より好ましくは約100 $\mu$ g～約1mgのEFDを含む。「約」は、僅かに低い又は高い量のEFDを使用することができることを意味する。

【0039】

例えば、非経口投与、例えば皮下注射に関しては、治療対象の個体を、1週間毎、1ヶ月毎又は3ヶ月毎～6ヶ月毎に約10 $\mu$ g～約10mg、より好ましくは約100 $\mu$ g～約1mg、例えば100 $\mu$ gのEFDという1用量スケジュール（a 1 dose schedule）に供することができる。

20

【0040】

組成物を、アテローム性動脈硬化と過去に診断された患者、アテローム性動脈硬化のリスクが高い患者、若しくは黄色腫を呈する患者、特に黄色板腫を呈する患者においてアテローム性動脈硬化を予防するために、又はアテローム性動脈硬化のエピソードの開始時の患者においてアテローム性動脈硬化を治癒させるために使用することができる。

【0041】

本発明は、アテローム性動脈硬化の予防及び/又は治療における同時、別々又は連続の使用のための組合せ調製物としての、本発明に規定されるようなEFD又はその画分と、該第1の製品と異なる第2の製品であって、抗炎症薬及び免疫変調薬（例えばアセチルサリチル酸又はチアゾリジンジオン（グリタゾン））からなる群から選択される、第2の製品とを含有する製品にも関する。

30

【0042】

本発明は、上で規定されるような、アテローム性動脈硬化を予防又は治療するための薬物の製造のための、長期凍結乾燥（EFD）により死滅したマイコバクテリウム・ボビスBCG細菌の使用にも関する。

【0043】

本発明は、上で規定されるような、アテローム性動脈硬化に罹患している又はそれにかかりやすい患者に対する有効量のEFD含有組成物の投与を含む、アテローム性動脈硬化を予防又は治療する方法にも関する。

【0044】

マウスのアテローム性動脈硬化の3つの実験モデルにおけるEFD処理によるアテローム性動脈硬化の予防及び治療を例示する実施例に言及する以下の更なる記載及び図面により、本発明を更に例示する。しかしながら、これらの実施例が本発明の例示の目的でのみ提示され、その限定を決して構成しないことを理解すべきである。

40

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】長期的なEFD BCG処理により、ApoE<sup>-/-</sup>マウスにおいて血清サイトカインレベルが変化し、免疫変調プロファイルが誘導されることを示す図である。サイトカインが、PBSで処理したマウス（白色のバー；1群当たりのマウス数n=6）と比較して、皮下注射による100 $\mu$ gのEFDで2ヶ月に1回、計3回処理したApoE<sup>-/-</sup>

50

マウス (SC; ストライプを付したバー) の個々の血清試料中で増大した。PBSで処理したマウスとの統計的差異を示す: \*\*\*:  $P = 0.001$ 。

【図2】長期的な EFD BCG 処理により、ApoE<sup>-/-</sup>マウスにおいて血清サイトカインレベルが変化し、免疫変調プロファイルが誘導されることを示す図である。サイトカイン及びケモカインが、PBSで処理したマウス (白色のバー; 1群当たりのマウス数  $n = 6$ ) と比較して、皮下注射による  $100 \mu\text{g}$  の EFD で2ヶ月に1回、計3回処理した ApoE<sup>-/-</sup>マウス (SC; ストライプを付したバー) の個々の血清試料中で低減した。PBSで処理したマウスとの統計的差異を示す: \*\*:  $P = 0.01$ 、\*\*\*:  $P = 0.001$ 。

【図3】PBSで処理したマウス (白色のバー; 1群当たりのマウス数  $n = 6$ ) と比較して、皮下注射による  $100 \mu\text{g}$  の EFD で2ヶ月に1回、計3回処理した ApoE<sup>-/-</sup>マウス (SC; ストライプを付したバー) の個々の血清試料中で変化しないままであるサイトカイン及びケモカインを示す図である。

【図4】EFD BCG が、ApoE<sup>-/-</sup>マウスにおける炎症と関連する主要な転写因子の活性化に影響を及ぼすことを示す図である。PBSで処理したマウスと比較した、皮下注射 (SC) による  $100 \mu\text{g}$  の EFD で2ヶ月に1回、計3回処理した ApoE<sup>-/-</sup>マウスの脾臓細胞核抽出物中の特定のDNAモチーフとの NF- $\kappa$ B (白色のバー) 及び PPAR- $\gamma$  (ストライプを付したバー) の結合。1群当たりのマウス数  $n = 6$ 。PBSで処理したマウスとの統計的差異を示す: \*\*:  $P = 0.01$ 、\*\*\*:  $P = 0.001$ 。EFD BCG は、PBSと比較した EFD BCG 処理後の NF- $\kappa$ B の転位の減少、及び PPAR- $\gamma$  の発現の増大により証明されるように、抗炎症効果を有する。

【図5】長期的な EFD BCG 処理により、ApoE<sup>-/-</sup>マウスにおいて血清サイトカインレベルが変化し、免疫変調プロファイルが誘導されることを示す図である。サイトカイン及びケモカインが、PBSで処理したマウス (白色のバー; 1群当たりのマウス数  $n = 6$ ) と比較して、皮下注射による  $100 \mu\text{g}$  の EFD で月1回、計6回処理した ApoE<sup>-/-</sup>マウス (ストライプを付したバー) の個々の血清試料中で増大した。PBSで処理したマウスとの統計的差異を示す: \*\*\*:  $P = 0.001$ 。

【図6】長期的な EFD BCG 処理により、ApoE<sup>-/-</sup>マウスにおいて血清サイトカインレベルが変化し、免疫変調プロファイルが誘導されることを示す図である。サイトカイン及びケモカインが、PBSで処理したマウス (白色のバー; 1群当たりのマウス数  $n = 6$ ) と比較して、皮下注射による  $100 \mu\text{g}$  の EFD で月1回、計6回処理した ApoE<sup>-/-</sup>マウス (ストライプを付したバー) の個々の血清試料中で低減した。PBSで処理したマウスとの統計的差異を示す: \*\*:  $P = 0.01$ 、\*\*\*:  $P = 0.001$ 。

【図7】PBSで処理したマウス (白色のバー; 1群当たりのマウス数  $n = 6$ ) と比較して、皮下注射による  $100 \mu\text{g}$  の EFD で月1回、計6回処理した ApoE<sup>-/-</sup>マウス (ストライプを付したバー) の個々の血清試料中で変化しないままであるサイトカインを示す図である。

【図8】EFD BCG が、ApoE<sup>-/-</sup>マウスにおける炎症及び免疫調節と関連する主要な転写因子の活性化に影響を及ぼすことを示す図である。ROR- $\gamma$ t、T-bet、GATA3 及び Foxp3 に関してウェスタンブロットにより解析した、PBS又は EFD BCG で月1回、計6回処理したマウス (1群当たりのマウス数  $n = 6$ ) 由来の2つの脾細胞抽出物に関する3つのプール。 $\alpha$ -アクトンを内部対照として使用した。EFD BCG は、T-bet (Th1のシグネチャー) 及び FOXP3 (Tregのシグネチャー) を増大させること、並びに ROR- $\gamma$ t 及び GATA-3 (それぞれ Th17 及び Th2のシグネチャー) を減少させることにより、免疫調節応答を開始する。

【図9】EFD BCG が、ApoE<sup>-/-</sup>マウスにおける炎症と関連する主要な転写因子の活性化に影響を及ぼすことを示す図である。PBSで処理したマウス (1群当たりのマウス数  $n = 6$ ) と比較した、皮下注射による  $100 \mu\text{g}$  の EFD で月1回、計6回処理した ApoE<sup>-/-</sup>マウスの脾臓細胞核抽出物中の特定のDNAモチーフとの NF- $\kappa$ B (白色のバー) 及び PPAR- $\gamma$  (ストライプを付したバー) の結合。PBSで処理した

10

20

30

40

50

マウスとの統計的差異を示す：\*\*\*：P 0.001。EFD BCGは、PBSと比較したEFD BCG処理後のNF Bの転位の減少により証明されるように、抗炎症効果を有する。

【図10】長期的なEFD BCG処理により、ApoE<sup>-/-</sup>マウスにおいて免疫調節プロファイルが誘導されたことを示す図である。マウスに6週齢、10週齢、14週齢、18週齢、22週齢及び26週齢で100 µgのEFD (n = 6) 又は100 µlのPBS (n = 6) を皮下注射し、30週齢で屠殺した。(A) 30週齢でのPBSで処理したマウス (n = 6) 又はEFD BCGで処理したマウス (n = 6) の脾臓中のCD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> リンパ球の絶対数(フローサイトメトリーにより解析した)。(B) 個々のPBSで処理したマウス (n = 6) 又はEFDで処理したマウス (n = 6) の脾臓核抽出物 10  
中におけるSP-1の結合。PBSで処理したマウスとの統計的差異を示す：\*\*：P 0.01、\*\*\*：P 0.001。SP-1転写因子のより高い発現は、EFDで処理したマウスの血清中に見出されるIL-10のより高い産生(図5)と相関する。これらのデータにより、EFD BCGが、IL-10に媒介される免疫調節の重要な成分であるSP-1を活性化することにより免疫調節応答を開始することが示される。EFDで処理したマウスは、PBSで処理したマウスより有意に多数のCD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T細胞(Treg細胞)を有していた。

【図11】長期的なEFD BCG処理により、ApoE<sup>-/-</sup>マウスにおいて血清サイトカインレベルが変化し、免疫変調プロファイルが誘導されることを示す図である。TGF-βが、PBSで処理したマウス(黒色のバー；1群当たりのマウス数n = 6)と比較して、皮下注射による100 µgのEFD BCGで月1回、計6回処理したApoE<sup>-/-</sup>マウス(灰色のバー)の個々の血清試料中で増大した。\*\*\*：P 0.001。 20

【図12】長期的なEFD BCG処理により、Ldlr<sup>-/-</sup>マウスにおいて血清サイトカインレベルが変化し、免疫変調プロファイルが誘導されることを示す図である。サイトカインが、PBSで処理したマウス(白色のバー；1群当たりのマウス数n = 6)と比較して、皮下注射による100 µgのEFDで月1回、計6回処理したLdlr<sup>-/-</sup>マウス(ストライプを付したバー)の個々の血清試料中で増大した。PBSで処理したマウスとの統計的差異を示す：\*\*：P 0.01、\*\*\*：P 0.001。

【図13】長期的なEFD BCG処理により、Ldlr<sup>-/-</sup>マウスにおいて血清中の炎症性サイトカイン及び炎症性ケモカインのレベルが変化することを示す図である。サイトカイン及びケモカインが、PBSで処理したマウス(白色のバー；1群当たりのマウス数n = 6)と比較して、皮下注射による100 µgのEFDで月1回、計6回処理したLdlr<sup>-/-</sup>マウス(ストライプを付したバー)の個々の血清試料中で低減する。PBSで処理したマウスとの統計的差異を示す：\*：P 0.05、\*\*：P 0.01、\*\*\*：P 0.001。 30

【図14】PBSで処理したマウス(白色のバー；1群当たりのマウス数n = 6)と比較して、皮下注射による100 µgのEFDで月1回、計6回処理したLdlr<sup>-/-</sup>マウス(ストライプを付したバー)の個々の血清試料中で変化しないままであるサイトカイン及びケモカインを示す図である。

【図15】長期的なEFD BCG処理により、Ldlr<sup>-/-</sup>マウスにおいて血清サイトカインレベルが変化し、免疫変調プロファイルが誘導されることを示す図である。TGF-βレベルが、PBSで処理したマウス(黒色のバー；1群当たりのマウス数n = 6)と比較して、皮下注射による100 µgのEFD BCGで月1回、計6回処理したLdlr<sup>-/-</sup>マウス(灰色のバー)の個々の血清試料中で僅かに増大した。 40

【図16】EFD BCGが、Ldlr<sup>-/-</sup>マウスにおける炎症と関連する主要な転写因子の活性化に影響を及ぼすことを示す図である。PBS(白色のバー)又はEFD BCG(ストライプを付したバー；1群当たりのマウス数n = 6)で月1回、計6回処理したマウスの、3匹のマウスの2つのプール由来の血管組織(A)及び個々の脾臓(B)の核抽出物中の特定のDNAモチーフとのNF-κB及びPPAR-γの結合。EFD BCGは、PBSと比較したEFD BCG処理後の両方の器官におけるNF-κBの転位の 50

減少、及び P P A R の発現の増大により証明されるように、抗炎症効果を有する。(B)に P B S で処理したマウスとの統計的差異を示す: \* : P 0.05、\*\* : P 0.01。3つの試料の2つのプールを(A)に示したが、統計解析は行わなかった。

【図17】E F D B C Gが、L d l r - / - マウスにおける炎症及び免疫調節と関連する主要な転写因子の活性化に影響を及ぼすことを示す図である。非リン酸化型及びリン酸化型の S T A T - 1、S T A T - 4、S T A T - 5 b 及び S T A T - 6 に関してウェスタンブロットにより解析した、P B S 又は E F D B C G で月1回、計6回処理したマウス(1群当たりのマウス数 n = 6)由来の3つの脾細胞抽出物の2つのプール。 - アクチンを内部対照として使用した。S T A T のリン酸化はその活性化を反映するものであった。E F D B C G は、S T A T - 1、S T A T - 4 及び S T A T - 6 のリン酸化の減少により証明されるように、抗炎症効果を有する。E F D B C G は、p - S T A T - 5 b の活性化により証明されるように、免疫調節応答を開始する。

10

【図18】E F D B C Gが、L d l r - / - マウスにおける炎症及び免疫調節と関連する主要な転写因子の活性化に影響を及ぼすことを示す図である。非リン酸化型及びリン酸化型の R X R - ; R O R t、T - b e t、G A T A 3 及び F o x p 3 に関してウェスタンブロットにより解析した、P B S 又は E F D B C G で月1回、計6回処理したマウス(1群当たりのマウス数 n = 6)由来の3つの脾細胞抽出物の2つのプール。 - アクチンを内部対照として使用した。E F D B C G は、T - b e t (T h 1 のシグネチャー) 及び F O X P 3 (T r e g のシグネチャー) を増大させること、並びに R O R t 及び G A T A - 3 (それぞれ T h 1 7 及び T h 2 のシグネチャー) を減少させることにより、免疫調節応答を開始する。E F D B C G はまた、R X R - のリン酸化の減少により証明されるように抗炎症効果を有する。

20

【図19】E F D B C Gが、L d l r - / - マウスにおける免疫調節と関連する主要な転写因子の活性化に影響を及ぼすことを示す図である。P B S (白色のバー) 又は E F D B C G (ストライプを付したバー; 1群当たりのマウス数 n = 6) で月1回、計6回処理したマウス由来の個々の脾臓核抽出物中のその特定のDNAモチーフとの S P - 1 の結合。I L - 1 0 に媒介される免疫調節の重要な成分である S P - 1 が、E F D 処理後に非常に有意に増強される。これらのデータにより、E F D B C G が S P - 1 を活性化することにより免疫調節応答を開始することが示される。P B S で処理したマウスとの統計的差異を示す: \*\*\* : P 0.001。

30

【図20】E F D 処理が形質細胞様樹状細胞(p D C)の動員を誘導したことを示す図である。P B S 又は E F D B C G (100 µg) の1回目の注射の4日後における、L d l r - / - マウスの鼠径流入領域リンパ節(D L N)へと動員された細胞のフローサイトメトリー解析(C D 1 1 c + 集団内における、C D 1 1 c <sup>h i</sup> B 2 2 0 <sup>n e g</sup> c D C (右下の細区画) 及び C D 1 1 c <sup>l o w</sup> B 2 2 0 <sup>h i</sup> p D C (左上の細区画))。E F D の1回目の皮下注射の4日後、P B S を注射したマウスと比較して、より多くの p D C (C D 1 1 c <sup>l o w</sup> B 2 2 0 <sup>h i g h</sup>) が、E F D B C G マウスにおいて検出された(ゲーティングされた C D 1 1 c + 細胞のうち 0.3% に対して 15%)。対照的に、P B S と比較して、より少ない従来型 D C (c D C ; C D 1 1 c <sup>h i g h</sup> B 2 2 0 <sup>n e g</sup>) が、E F D B C G 注射後に D L N において観察された(ゲーティングされた C D 1 1 c + 細胞のうち 8.3% に対して 3.2%)。

40

【図21】形質細胞様樹状細胞(p D C)が、調節性T細胞(T r e g)を促進したことを示す図である。P B S 又は E F D B C G (100 µg) の1回目の注射の4日後における、L d l r - / - マウスの鼠径流入領域リンパ節(D L N)へと動員された細胞のフローサイトメトリー解析(C D 4 + 集団内における、C D 4 + F o x p 3 + T r e g)。E F D の1回目の皮下注射の4日後、E F D B C G で処理したマウスの D L N における C D 4 + F o x p 3 + T r e g のパーセンテージは、対照マウスと比較して上昇した(ゲーティングされた C D 4 + 細胞のうち 5.5% に対して 13.2%)。

【図22】長期的な E F D B C G 処理により、L d l r - / - マウスにおいて免疫調節プロファイルが誘導されたことを示す図である。P B S 又は E F D B C G の1回目の注

50

射の4日後における、鼠径DLNへと動員された細胞のフローサイトメトリー解析。(A)両方の鼠径DLNにおけるICOS-Lを発現するpDCの数。(B)両方の鼠径DLNにおけるICOSを発現するCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregの数。\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001。

【図23】長期的なEFD BCG処理により、ApoE<sup>-/-</sup>マウスにおいて病変の大きさ及び炎症が低減することを示す図である。マウスに6週齢、10週齢、14週齢、18週齢、22週齢及び26週齢で100μgのEFD(n=6)又は100μlのPBS(n=6)を皮下注射し、30週齢で屠殺した。PBS及びEFD BCGで処理したマウスの(A)大動脈根におけるアテローム性動脈硬化病変の平均横断面積(μm<sup>2</sup>×1000)。(B)大動脈洞におけるマクロファージ染色(MOMA-2<sup>+</sup>細胞)の代表的な顕微鏡写真。EFD BCG処理後において、大動脈根におけるアテローム硬化性病変の平均横断面積は、マクロファージ蓄積と同様に、対照と比較して有意に低かった。

10

【図24】EFDで処理したマウス及びPBSで処理したマウスの大動脈弓、並びにヘマトキシリン・エオシンスライド上でアテローム粥腫の面積を半定量した種々の部位(a、b、c)を表す図である。

【図25】長期的なEFD BCG処理により、Ldlr<sup>-/-</sup>マウスにおいてアテローム硬化性病変が低減することを示す図である。アテローム硬化性の食餌を与えたLdlr<sup>-/-</sup>マウスに、6週齢、10週齢、14週齢、18週齢、22週齢及び26週齢で100μlのPBS又は100μgのEFDを(皮下に)投与した。マウスを30週齢で屠殺し、病変の厚み及び大動脈の厚みの平均値を、各マウスの8個~16個の大動脈弓の切片から算出した。病変の厚みを、Leica QWin画像解析ソフトウェアを使用して解析した。結果を、病変の厚み/大動脈の厚みの比率として表す。

20

【図26】長期的なEFD BCG処理により、Ldlr<sup>-/-</sup>マウスにおいてアテローム硬化性病変が低減することを示す図である。アテローム硬化性の食餌を与えたLdlr<sup>-/-</sup>マウスに、6週齢、10週齢、14週齢、18週齢、22週齢及び26週齢で100μlのPBS又は100μgのEFDを(皮下に)投与した。マウスを30週齢で屠殺し、病変面積及び総大動脈面積の平均値を、各マウスの8個~16個の大動脈弓の切片から算出した。病変面積を、Leica QWin画像解析ソフトウェアを使用して解析した。結果を、病変面積/大動脈面積の比率として表す。

【図27】長期的なEFD BCG処理により、Ldlr<sup>-/-</sup>マウスにおいてアテローム硬化性病変が低減することを示す図である。アテローム硬化性の食餌を与えたLdlr<sup>-/-</sup>マウスに、6週齢、10週齢、14週齢、18週齢、22週齢及び26週齢で100μgのEFD BCG(n=6)又は100μlのPBS(n=6)を皮下注射し、30週齢で屠殺した。(A)大動脈根におけるアテローム性動脈硬化病変の平均横断面積(μm<sup>2</sup>×1000)。(B)スーダンIVで染色した大動脈の代表的な顕微鏡写真。(C)病変横断面積に対する染色された面積のパーセンテージとして表したマクロファージ染色(MOMA-2<sup>+</sup>細胞)。(D)PBS処理又はEFD BCG処理の後の大動脈病変中の大動脈MOMA-2<sup>+</sup>細胞の代表的な顕微鏡写真。元の倍率：×400。\*P<0.05、\*\*P<0.01。

30

【図28】EFD BCG処理により、ApoE<sup>-/-</sup>×CD4dnt RIIマウスにおいて病変の大きさが低減し、免疫調節応答が誘導されることを示す図である。マウスに6週齢及び9週齢で100μgのEFD BCG(n=9)又は100μlのPBS(n=8)を皮下注射し、大動脈、脾臓及び血清を12週で回収した。(A)大動脈根におけるアテローム性動脈硬化病変の平均横断面積(μm<sup>2</sup>×1000)。(B)オイルレッドO染色後における大動脈洞の代表的な顕微鏡写真。(C)Bio-Plexによる個々の血清中のIL-10及びTNF-の測定。(D)脾細胞抽出物中のウェスタンブロットによるFoxp3の検出。各バンドが、3匹のマウス由来の脾細胞抽出物のプールを表す。\*P<0.05、\*\*\*P<0.001。

40

【図29】漸増用量のEFD BCGがOF1非近交系スィスマウスにおいて副作用を誘導しないことを示す図である。様々な用量のEFD(0.01mg、0.1mg及び1mg

50

g) 及び  $100 \mu\text{l}$  の PBS を、OF1 マウスに 1 日 1 回 14 日間皮下投与した (1 群当たり  $n = 6$ )。 (A) 直腸温度を各注射の 24 時間後にモニタリングした。 (B) 各日のマウスの重量。 (C) 実験の終了時 (15 日目) における脾臓核抽出物中のその特定の DNA モチーフとの PPAR- $\alpha$  及び PPAR- $\gamma$  の結合。 \*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ 、\*\*\*  $P < 0.001$ 。

【図 30】 EFD 処理がマイコバクテリウム・ツベルクローシス感染又は BCG ワクチン接種を妨害しないことを示す図である。モルモットを、BCG 注射の前若しくは後に、又は BCG 注射を行うことなく、EFD で処理した。それから、モルモットをマイコバクテリウム・ツベルクローシスに感染させ、脾臓中の病原性細菌のコロニー形成単位 (CFU) を計数した。1 群当たりのモルモット数  $n = 6$ 。

10

【図 31】 EFD 処理が、ナイセリア・メニンジティディス (*Neisseria meningitidis*) のワクチン接種を妨害しないことを示す図である。BALB/C マウスを、EFD 又は PBS で処理した後、ナイセリア・メニンジティディスのワクチン接種を行った。最後のワクチン注射の 2 週間後、ワクチン接種した及びワクチン接種していないマウスに、 $10^7$  CFU の病原性ナイセリア・メニンジティディスを (i.p.) 負荷し、負荷の 2 時間後、6 時間後及び 24 時間後に血中の細菌 (bacteremia) を測定した。1 群当たりのマウス数  $n = 6$ 。 ( ) EFD  $100 \mu\text{g}$  s.c. (d-21) + 不活性化型ナイセリアワクチン接種 (d1、d8、d15)。 ( ) PBS  $100 \mu\text{l}$  s.c. (d-21) + 不活性化型ナイセリアワクチン接種 (d1、d8、d15)。 ( ) PBS  $100 \mu\text{l}$  s.c. (d-21) (ナイセリアワクチン接種なし)。

20

【図 32】 EFD 処理により、インフルエンザウイルス感染の経過が変化しないことを示す図である。 ( ) BALB/C マウスを EFD ( $100 \mu\text{l}$  中  $100 \mu\text{g}$ ) で皮下的に (s.c.) 処理した (d-21)。 ( ) BALB/C マウスを PBS ( $100 \mu\text{l}$ ) で皮下的に (s.c.) 処理した (d-21)。21 日後、両方の群をインフルエンザウイルススコットランド A 株 ( $5000 \text{ p.f.u.}$ ) に鼻腔内感染させ、マウスの臨床症状及び生存しているマウスの数を 14 日目まで 1 日 1 回記録した。

【図 33】 脂質分析結果を示す図である。PBS 又は EFD BCG で処理したマウスの血清中の総コレステロール及びトリグリセリドのレベルを測定した。 (A) Ldlr<sup>-/-</sup> マウス、 (B) ApoE<sup>-/-</sup> マウス、及び (C) ApoE<sup>-/-</sup> × CD4dnt RII マウス。値を、平均値 ± SD (1 群当たりのマウス数  $n = 4$ ) として表す。n.s. = 有意でない。

30

【図 34】 コレステロールリポタンパク質プロファイルを示す図である。PBS 又は EFD BCG で処理したマウスの血清由来のリポタンパク質プロファイルの大きさの分析。簡潔に述べると、マウス由来の血漿試料 ( $50 \mu\text{l}$ ) を、Prominence UFLC システム (株式会社島津製作所) に接続し、Tris 緩衝食塩水 (pH 7.4) で平衡化した HR10/30 Superose 6 カラム (GE HEALTHCARE) 及びプレカラムとしての Disocoverly BIO GFC-500 ( $5 \text{ cm} \times 7.8 \text{ i.d.}$ ; Supelco (登録商標); SIGMA-ALDRICH) により分画した。 $200 \mu\text{l}$  の画分を Foxy Jr (登録商標) (TELEDYNE ISCO INC.) により回収し、各画分中の総コレステロールを、酵素比色分析キット (RANDOX LAB.) を使用して測定した。各画分中のコレステロール濃度 (y 軸) を、保持画分番号 (x 軸) に対してプロットする。 (A) Ldlr<sup>-/-</sup> マウス、 (B) ApoE<sup>-/-</sup> マウス、及び (C) ApoE<sup>-/-</sup> × CD4dnt RII マウス。曲線は、EFD BCG 免疫化マウス (暗灰色の線) 及び PBS 免疫化マウス (明灰色の線) に関する平均値 ± SD を示す。1 群当たりのマウス数  $n = 4$ 。CR、カイロミクロンレムナント。

40

【図 35】 EFD BCG 処理後の oxLDL に対する抗体力価を示す図である。EFD BCG で処理したマウス及び PBS で処理したマウスの血清中の oxLDL に対する抗体を、ELISA により測定した。 (A) Ldlr<sup>-/-</sup> マウス、 (B) ApoE<sup>-/-</sup> マウス、及び (C) ApoE<sup>-/-</sup> × CD4dnt RII マウス。曲線は、EFD BCG 免疫化マウス (暗灰色の線) 及び PBS 免疫化マウス (明灰色の線) に関する平均値

50

± S Dを示す。1群当たりのマウス数  $n = 6$ 。簡潔に述べると、50  $\mu$  L の抗原 (P B S (p H 7 . 4) 中 10  $\mu$  g / m l ) を 96 ウェル E L I S A プレートに添加し、4 で終夜インキュベートした。コーティングしたプレートを P B S で洗浄し、P B S 中の 1 % ゼラチン (GIBCO INVITROGEN) で室温で 1 時間ブロッキングした。次に、プレートを洗浄し、マウス血漿とともに更に 2 時間インキュベートし、T r i s 緩衝食塩水 (T B S) / ゼラチン 0 . 1 % で希釈した。洗浄工程の後、総 I g G レベルを、酵素結合型抗マウス抗体 (BD BIOSCIENCES) を使用して測定した。プレートを洗浄し、比色分析反応物を T M B (BD BIOSCIENCES) により発色させた。吸光度を、マイクロプレートリーダー (V e r s a M a x、MOLECULAR DEVICES) により測定した。

【発明を実施するための形態】

10

【0046】

実施例 1 : E F D の調製

長期凍結乾燥 (E F D) により死滅したマイコバクテリウム・ボビス B C G パスツール株 (1173P2) を、P C T の国際出願の特許文献 1 に以前に記載されたように調製した。E F D 調製物は、カール・フィッシャー法を使用することによる電量計 (METROHM) で決定されるように、手順の終了時に 1 . 5 % 未満の水を含有していた。20 ミリグラムの E F D を M i d d l e b r o o k 7 H 10 (DIFCO) 寒天プレート上で培養して、生きた細菌が存在しないことを確認した。

【0047】

E F D を、1 m g / m L の最終濃度でマンニトール (5 %) 中に再懸濁し、0 . 040 m B a r の圧力下で 72 時間凍結乾燥させ (この工程では、凍結乾燥の目的は乾燥組成物を得ることのみである)、最後に、蒸留水 (最終濃度 1 m g / m l ) に再懸濁した後、マウスに注射した。

20

実施例 2 : A p o E - / - C 57 B 1 / 6 マウスモデル及び L d l r - / - C 57 B 1 / 6 マウスモデルにおけるアテローム性動脈硬化の発症に関する E F D 処理の評価

1) 材料及び方法

a) アテローム性動脈硬化の誘導 / 予防の実験モデル

雄性 A p o E - / - 及び L d l r - / - マウスを、2 つの長期処理モデルとして使用した。アポリポタンパク質 E 欠損型 (A p o E - / -) 及び低密度リポタンパク質受容体欠損型 (L d l r - / -) 雄性 C 57 B 1 / 6 マウスを、Jouy en Josas にある I N R A のキャンパスの動物飼育施設で繁殖させた。実験開始時に 6 匹 ~ 7 匹のマウス (5 週齢 ~ 6 週齢) の群を分配した :

30

1) 群 1 の A p o E - / - マウスには、10 週間毎に (2 ヶ月に 1 回)、計 3 回 100  $\mu$  l の P B S を皮下に投与し、最後の注射の 2 ヶ月後 (34 週齢) に屠殺した。

【0048】

2) 群 2 の A p o E - / - マウスには、群 1 と同じ間隔で 100  $\mu$  g の E F D B C G (E F D) を皮下に投与し、3 回目の E F D 注射の 2 ヶ月後 (34 週齢) に屠殺した。

【0049】

3) 群 3 の A p o E - / - マウスには、4 週間毎に 100  $\mu$  l の P B S を皮下に投与し (6 週齢、10 週齢、14 週齢、18 週齢、22 週齢及び 26 週齢で計 6 回の注射)、最後の注射の 1 ヶ月後 (30 週齢) に屠殺した。

40

【0050】

4) 群 4 の A p o E - / - マウスには、群 3 と同じ間隔で 100  $\mu$  g の E F D B C G (E F D) を皮下に投与し、6 回目の注射の 1 ヶ月後に屠殺した。

【0051】

5) 群 5 の L d l r - / - マウスには、4 週間毎に 100  $\mu$  l の P B S を皮下に投与し (6 週齢、10 週齢、14 週齢、18 週齢、22 週齢及び 26 週齢で計 6 回の注射)、最後の注射の 1 ヶ月後 (30 週齢) に屠殺した。

【0052】

6) 群 6 の L d l r - / - マウスには、群 5 と同じ間隔で 100  $\mu$  g の E F D B C G

50

( E F D ) を皮下に投与し、6 回目の注射の 1 ヶ月後 ( 3 0 週齢 ) に屠殺した。

#### 【 0 0 5 3 】

E F D の 1 回目の注射 ( 5 週齢 ~ 6 週齢 ) から実験終了時まで、A p o E <sup>-/-</sup> マウスには従来の食餌を与えたが、L d l r <sup>-/-</sup> マウスには脂質 ( 1 5 % 豚脂 ) 及び 0 . 5 % コレステロール ( Genestil ) を添加した食餌を投与した。

#### b ) リンパ器官細胞のフローサイトメトリー解析

T r e g 及び樹状細胞 ( D C ) を同定するために、L d l r <sup>-/-</sup> マウスの鼠径流入領域リンパ節 ( D L N ) を、1 回目の E F D B C G 又は P B S の注射の 4 日後に回収した。コラゲナーゼ - D n a s e 消化の後、流入領域リンパ節 ( D L N ) を c e l l s t r a i n e r により粉砕し、細胞を抽出した後、製造業者の推奨に従って、C D 4 に対する抗体、C D 1 1 c に対する抗体、B 2 2 0 に対する抗体 ( B D P H A R M I N G E N ) 、 F o x p 3 に対する抗体 ( E B I O S C I E N C E S ) 、 I C O S に対する抗体、I C O S - L に対する抗体 ( E B I O S C I E N C E S ) 及び P D C A - 1 に対する抗体 ( M I L T E N Y I B I O T E C ) を用いて染色した。

#### 【 0 0 5 4 】

A p o E <sup>-/-</sup> マウス由来の脾細胞を、3 0 週目に脾臓の半分から単離し、C D 4 に対する抗体 ( B D P H A R M I N G E N ) 及び F o x p 3 に対する抗体 ( E B I O S C I E N C E S ) で染色した。全ての試料を、C e l l Q u e s t ソフトウェア ( B D B I O S C I E N C E S ) を使用して F A C S C a l i b u r により解析した。

#### c ) 脾臓細胞抽出物及び大動脈抽出物中の転写因子の検出

脾臓のもう一方の半分 ( 2 匹のマウスのプール ) を - 2 5 ° で凍結して、数日間貯蔵した。タンパク質を、脾臓から抽出し、7 . 5 % S D S - P A G E により分離した。ニトロセルロースシートに移したタンパク質バンドを、マウスモノクローナル抗 F O X P 3 、抗 T - b e t 、抗 G A T A - 3 、抗 R O R t 、抗 R X R 、抗 p - R X R 、抗 S T A T - 1 、抗 p S T A T - 1 、抗 S T A T - 4 、抗 p - S T A T - 4 、抗 S T A T - 5 b 、抗 p - S T A T - 5 b 、抗 S T A T - 6 、抗 p - S T A T - 6 ( S A N T A C R U Z B I O T E C H N O L O G Y ) 、又は - アクチンマウスモノクローナル抗体 ( A c - 1 5 、A B C A M ) を用いて調べた。ポリクローナルヤギ抗ウサギ ( D A K O C Y T O M A T I O N ) 又はヤギ抗ウサギ I g G ( S A N T A C R U Z B I O T E C H N O L O G Y ) ( 両方とも H R P 結合型 ) を二次抗体として使用した。免疫複合体を、増強型化学発光検出システム ( A M E R S H A M ) を用いて可視化し、走査解析した。

#### 【 0 0 5 5 】

核タンパク質を、プロテアーゼ阻害剤処理後に脾臓又は大動脈のホモジネート ( 3 匹のマウスのプール ) から抽出し、製造業者の推奨に従って T r a n s A M ( 商標 ) 転写因子アッセイキット ( A C T I V E M O T I F ) を用いて、N F B p 6 5 、P P A R 、P P A R - 又は S P - 1 で処理した。簡潔に述べると、1 0 µ g の核抽出物を 9 6 ウェルプレート ( 各プレートは、それぞれの転写因子のコンセンサス結合部位を含有する特定のオリゴヌクレオチドでコーティングされている ) に添加した。結合を光学密度 ( O D ) として表した。各実験における処理した試料又はプールの数を、図の説明文において報告する。

#### d ) 血清学的分析

血清を、3 0 週目に L d l r <sup>-/-</sup> マウスから、及び 3 0 週目又は 3 4 週目に A p o E <sup>-/-</sup> マウスから回収した。血清中の炎症促進性サイトカイン及びケモカイン ( I L - 1 、I L - 1 、I L - 6 、I L - 1 3 、I L - 1 7 、K C ( I L - 8 ) 、I L - 1 2 p 4 0 、I L - 1 2 p 7 0 、I F N 、T N F 、M I P - 1 、エオタキシン ) 並びに炎症性サイトカイン ( I L - 1 0 ) のレベルを、B i o - P l e x サイトカインアッセイ ( B I O - R A D ) を使用して測定した。T G F - β を、E L I S A キット ( E B I O S C I E N C E ) により測定した。

#### 【 0 0 5 6 】

E F D B C G で処理したマウス及び P B S で処理したマウスの血漿中のコレステロール及びトリグリセリドのレベルを、製造業者のプロトコルに従って酵素比色分析キット ( R A N D O X L A B . ) を使用して測定した。血漿コレステロールリポタンパク質プロファイルを、Okazaki et al., J. Biochem., 1981, 89,879-887 の変更した方法を使用して検証した



。簡潔に述べると、マウス由来の血漿試料 (50  $\mu$ l) を、Prominence UFLC システム (株式会社島津製作所) に接続し、Tris 緩衝食塩水 (pH 7.4) で平衡化した HR10/30 Superose 6 カラム (GE HEALTHCARE) 及びプレカラムとしての Disoccovery BIO GFC-500 (5 cm  $\times$  7.8 i.d.; Supelco (登録商標); SIGMA-ALDRICH) により分画した。200  $\mu$ l の画分を Foxym J r (登録商標) (TELEDYNE) により回収し、各画分中の総コレステロールを、酵素比色分析キット (RANDOX LAB.) を使用して測定した。

#### 【0057】

EFD BCG で処理したマウス及び PBS で処理したマウスの血清中の oxLDL に対する抗体を、ELISA により測定した。簡潔に述べると、50  $\mu$ l の抗原 (PBS (pH 7.4) 中 10  $\mu$ g/ml) を 96 ウェル ELISA プレートに添加し、4 で終夜インキュベートした。コーティングしたプレートを PBS で洗浄し、PBS 中 1% ゼラチン (GIBCO INVITROGEN) で室温で 1 時間ブロッキングした。次に、プレートを洗浄し、マウス血漿とともに更に 2 時間インキュベートし、Tris 緩衝食塩水 (TBS) / ゼラチン 0.1% で希釈した。洗浄工程の後、総 IgG レベルを、酵素結合型抗マウス抗体 (BD BIOSCIENCES) を使用して測定した。プレートを洗浄し、比色分析反応物を TMB (BD BIOSCIENCES) により発色させた。吸光度を、マイクロプレートリーダー (VersaMax、MOLECULAR DEVICE) により測定した。

#### e) アテローム硬化性病変の組織学的解析及び免疫染色

心臓及び大動脈を、EFD で処理した ApoE<sup>-/-</sup> マウス及び PBS で処理した ApoE<sup>-/-</sup> マウス、並びに EFD で処理した Ldlr<sup>-/-</sup> マウス及び PBS で処理した Ldlr<sup>-/-</sup> マウスから回収し、最適切断温度 (OCT; サクラファインテックジャパン株式会社) において凍結した。凍結したブロックを、低温切開するまで -80 に維持した。

#### 【0058】

ApoE<sup>-/-</sup> マウス及び Ldlr<sup>-/-</sup> マウスの心臓及び上行大動脈を、以前に記載されたように低温切開した (Nicoletti et al., J. Clin. Invest. 1998, 102, 910-918)。10 ミクロン厚の切片を、大動脈弁の開始部分から 100  $\mu$ m から始めて 100  $\mu$ m 間隔で回収した。切片を風乾させ、それぞれ組織学的解析及び免疫組織化学的解析のために PBS 及び氷冷アセトン中で 4% ホルムアルデヒドで固定した。ホルムアルデヒドで固定した切片を、ヘマトキシリン及びオイルレッド-O 又はヘマトキシリン・エオシン (HE) で染色し、光学顕微鏡下で可視化した。病変及び大動脈の横断面の面積を、Leica QWin (LEICA) 及び Atheros (商標) 画像解析ソフトウェアプログラム (MICROVISION INSTRUMENTS) を使用して定量化した。病変の横断面の絶対面積を、100  $\mu$ m 間隔の大動脈根の 8 個の切片に関して算出した。群間の比較を、3 つの最も大きい切片の平均値を使用して行った。Ldlr<sup>-/-</sup> マウスの大動脈弓を低温切開した。切片を風乾させ、氷冷アセトンで固定し、それからヘマトキシリン・エオシン染色を行った。大動脈弓の 3 つの異なる部位 (a、b、c) における病変の面積及び厚みを、Leica

QWin 画像解析ソフトウェアを使用して解析した。結果を、各部位に関するスコア (病変面積) として表した。加えて、病変の厚み及び表面積の平均値、並びに大動脈の厚み及び表面積の平均値を、各マウスの 8 個 ~ 16 個の大動脈弓の切片から算出した。結果を、病変の厚み / 大動脈の厚み、病変面積 / 大動脈面積の比率として、及び病変面積として表した。

#### 【0059】

大動脈弓を、4% ホルムアルデヒドで固定し、縦方向に開き、スーダン IV (MERCK) で染色した。脂質病変は赤色で示された。

#### 【0060】

免疫細胞を、MOMA-2 (マクロファージ) に対する抗体を使用する従来の免疫染色により検出した。

#### f) 統計解析

データを、平均値 $\pm$ SDとして表す。Graph PadソフトウェアのInstatパッケージを、ウェルチの補正を用いるt検定を使用してデータを解析するために使用した。

## 2) 結果

### a) 血清中のサイトカイン及びケモカイン

3回又は6回のEFD注射を行ったApoE<sup>-/-</sup>マウス(群2及び群4)では、炎症性サイトカインIL-10の血清レベルが有意に増大した(8倍; 図1、図5及び図11)。同時に、炎症性サイトカイン及びケモカインIL-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-4、IL-6、IL-12p40、IL-12p70、IL-13、IL-17、エオタキシン、KC(IL-8)、MIP-1 $\alpha$ 及びTNF- $\alpha$ の血清レベルは、PBSで処理したマウスと比較して有意に減少したが、IFN- $\gamma$ の血清レベルは有意に減少しなかった(図1、図2、図5、図6及び図11)。TGF- $\beta$ の血清レベルは、群4のEFDで処理したApoE<sup>-/-</sup>マウスでは有意には増大しなかった(2.6倍)(図11)。試験した他のサイトカイン及びケモカイン(IL-2、IL-3、IL-5、IL-9、G-CSF、GM-CSF、MCP-1、MIP-1 $\beta$ 及びRANTES)は、EFD処理後、変化しないままであった(図3及び図7)。

#### 【0061】

6回のEFD注射を行ったLdlr<sup>-/-</sup>マウス(群6)では、IL-10の血清レベルが、ApoE<sup>-/-</sup>に関して観察された結果と同様に増大した(図12及び図15)。試験した「炎症促進性の」サイトカイン及びケモカインの中では、非処理マウスと比較して、IL-1 $\beta$ 、MIP-1 $\alpha$ 、IL-13、KC(IL-8)及びTNF- $\alpha$ が有意に低減し、IFN- $\gamma$ がやや増大した(図13及び図15)。TGF- $\beta$ レベルは、PBSで処理したマウスと比較して、EFDで処理したLdlr<sup>-/-</sup>マウスの血清中で1.9倍(しかし有意でなく)増大した(図15)。Ldlr<sup>-/-</sup>マウスにおいてはEFD処理によりIL-6、IL-12p40、IL-17及びエオタキシンは有意に低減しなかったが、ApoE<sup>-/-</sup>マウスにおいては3回又は6回のEFD処理後にこれらのサイトカイン及びケモカインが有意に低減したことに留意しなければならない。他のサイトカイン及びケモカインは変化しないままであった(IL-5、MIP-1 $\beta$ 、MIG; 図14)。

#### 【0062】

これらのデータにより、ApoE<sup>-/-</sup>マウス及びLdlr<sup>-/-</sup>マウスへのEFD BCGの投与により全身的な(systemic)IL-10産生が増大し、炎症性サイトカイン(IFN- $\gamma$ を除く)のレベルが減少することが示される。

### b) 脾臓細胞抽出物及び大動脈抽出物中の転写因子

3回又は6回のEFD注射を行ったApoE<sup>-/-</sup>マウスの脾臓細胞核抽出物では、NF- $\kappa$ B p65は有意に減少し、PPAR $\gamma$ の発現は増強又は安定化された(図4及び図9)。

#### 【0063】

6回のEFD注射を行ったApoE<sup>-/-</sup>マウスの脾臓抽出物では、PBSで処理したApoE<sup>-/-</sup>マウスと比較して、ROR $\gamma$ t(Th17の発生を統制する転写因子(Ivanov et al., Cell, 2006, 126, 1121-1133); 炎症性Th17細胞のシグネチャー)及びGATA-3(Th2細胞のシグネチャー)の発現は減少し、T-bet(Th1の発生に重要な転写因子(Szabo et al., Cell, 2000, 100, 655-669); Th1細胞のシグネチャー)及びFOXP3(Treg細胞)の発現は強く増強された(図8)。IL-10に媒介される免疫調節の重要な成分であるSP-1転写因子(Chanteux et al., Respiratory Research, 2007, 8, 71-80)が、EFDで処理したマウスの血清において見出された高レベルのIL-10と相関して、脾臓核抽出物中で有意に増強された(図10)。脾臓細胞のFACS分析により、PBSで処理したマウス(6回の注射)よりEFDで処理したマウスにおいて、有意に多数のCD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Treg細胞が示された(図10)。

## 【0064】

Ldlr<sup>-/-</sup>マウスでは、6回のEFD注射により、6匹のマウス由来の脾細胞核抽出物においてNF- $\kappa$ B活性化が有意に低減し、PPAR $\gamma$ の発現が増強された(図16B)。3匹のマウスのプールの血管樹状(tree)組織の2つの抽出物から、同様の結果が得られた(プールの数が低すぎるため統計解析を行うことができなかった)(図16A)。

## 【0065】

転写を活性化するために、PPAR $\gamma$ はレチノイドX受容体(RXR $\alpha$ )とのヘテロ二量体化を必要とするが、リン酸化型RXR $\alpha$ 及びp-RXR $\alpha$ -PPAR $\gamma$ 複合体は不活性である。EFDで処理したマウスの脾細胞核抽出物中のPPAR $\gamma$ の発現の増強と関連して、そのリン酸化の遮断と関連してEFD処理後にRXR $\alpha$ の発現が増強されるが、PBSで処理したマウスにおいてはp-RXR $\alpha$ の不活性形態が発現された(図18)。さらに、IL-10産生と関連する転写因子であるSP-1のより高い発現が、ApoE<sup>-/-</sup>マウスに関して先に報告された(図10)のと同様に、Ldlr<sup>-/-</sup>マウスのEFD処理後に観察された(図19)。

## 【0066】

それから、T細胞のコミットメントを調節する転写因子に対するEFD-BCGの効果を決定した。EFD処理は、ApoE<sup>-/-</sup>マウスにおいても見出された(図8)のと同様に、Ldlr<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞抽出物におけるT-bet及びFOXp3の増大、並びにROR $\gamma$ t及びGATA-3の減少と関連した(図18)。EFD処理は、STAT-1、STAT-4、STAT-6(全て、Th1及びTh2炎症応答のシグネチャー)のより低いリン酸化と関連した。加えて、STAT-4はTh1細胞の発生を調節する重要な因子であり(Thieu et al., Immunity, 2008, 29, 679-690)、p-STAT-4は近年、Tregの発生を損なうことが示されている(O'Malley JT et al., Immunology, 2009, 127, 587-5953)。対照的に、Tregの応答及び血管平滑筋細胞(VSMC)の成長を活性化することが報告されている転写因子であるp-STAT-5bが増大した(図17)。

## 【0067】

したがって、これらのデータにより、EFD-BCGが、SP-1及びp-STAT-5bを活性化することにより、Th2及びTh17の分化を調節する転写因子の発現を低下させることにより、並びにFoxp3<sup>+</sup>Treg集団を増大させることにより、免疫調節応答を開始することが示される。これらの知見により、EFD-BCGが、RXR $\alpha$ 、STAT-1、STAT-4及びSTAT-6のリン酸化の減少、NF- $\kappa$ Bの活性化の障害、並びにPPAR $\gamma$ の発現の増大により証明されるように、抗炎症効果を有することも示唆される。

c) 形質細胞様樹状細胞(pDC)及び調節性T細胞(Treg)

樹状細胞(DC)の様々な発生段階及びサブセットが他の免疫T細胞を調節又は抑制するT細胞の増殖及び分化に寄与する(Steinman RM et al., Annu. Rev. Immunol., 2003, 21, 685-711)ため、Ldlr<sup>-/-</sup>マウスの鼠径DLNにおけるDCサブセット及びTregの解析を行った。EFD処理により、形質細胞様樹状細胞(pDC)の動員が誘導された。100  $\mu$ gのEFDの1回目の皮下注射の4日後、PBSを注射したマウスと比較して、より多くの形質細胞様(plasmacytoid)DC(pDC; CD11c<sup>low</sup>B220<sup>high</sup>)が、EFD-BCGを注射したマウスの流入領域リンパ節において検出された(ゲーティングされたCD11c<sup>+</sup>細胞のうち0.3%に対して15%; 図20)。対照的に、PBSと比較して、より少ない従来型DC(cDC; CD11c<sup>high</sup>B220<sup>neg</sup>)が、EFD-BCG注射後にDLNにおいて観察された(ゲーティングされたCD11c<sup>+</sup>細胞のうち83%に対して32%; 図20)。さらに、EFD-BCG又はPBSの注射後に鼠径DLNに存在するpDC(CD11c<sup>low</sup>B220<sup>high</sup>)のうち99%~100%が、マウスpDCのマーカーであるPDCA-1を発現した(Asselin et al., J. Immunol., 2003, 171, 6466-6477)。

## 【0068】

成熟 (Maturing) p D C は、高レベルの誘導性同時刺激リガンド ( I C O S - L ) を発現することにより T r e g を生成することができる ( I t o T, et al., J. Exp. Med., 2007, 204, 105-115 )。 L d l r - / - マウスの鼠径 D L N 中において、 P B S 処理後より E F D B C G 注射後に、 I C O S - L を発現する p D C をより多く検出した ( ゲーティングされた C D 1 1 c のうち 0 . 7 % に対して 8 %、絶対数では  $415 \pm 48$  に対して  $38529 \pm 1906$ 、 $P < 0.001$  ; 図 2 2 A )。同時に、対照マウスと比較して、E F D B C G で処理したマウスの鼠径 D L N 中の C D 4 <sup>+</sup> F o x p 3 <sup>+</sup> T r e g のパーセンテージは、増大した ( ゲーティングされた C D 4 <sup>+</sup> 細胞のうち 5 . 5 % に対して 1 3 . 2 % ; 図 2 1 )。 I C O S の発現はアテローム性動脈硬化の低減に關与する ( 非特許文献 1 2 ) ため、E F D - B C G により誘導される I C O S <sup>+</sup> T r e g の数を測定した。鼠径リンパ節中の C D 4 <sup>+</sup> F o x p 3 <sup>+</sup> I C O S <sup>+</sup> 細胞は、P B S 注射後より E F D - B C G 注射後ではるかに多かった (  $22814 \pm 2626$  に対して  $119091 \pm 5890$ 、 $P < 0.001$  ; 図 2 2 B )。

#### d) アテローム硬化性病変

A p o E - / - マウス及び L d l r - / - マウスにおけるアテローム性動脈硬化の発症に対する E F D B C G の効果を決定した。

##### 【 0 0 6 9 】

A p o E - / - マウスの E F D B C G 処理 ( 6 回の注射 ) 後、大動脈根におけるアテローム硬化性病変の平均横断面積は、マクロファージ蓄積 ( M O M A - 2 <sup>+</sup> 細胞 ) ( 図 2 3 B ) と同様に、対照と比較して有意に低かった (  $92502 \pm 43607 \mu m^2$  に対して  $59442 \pm 24695 \mu m^2$  ; 図 2 3 A )。

##### 【 0 0 7 0 】

L d l r - / - マウスへの E F D B C G の投与により、アテローム硬化性病変の大きさが低減した ( 表 I、図 2 4、図 2 5 及び図 2 6 )。

##### 【 0 0 7 1 】

表 I は、P B S 処理群の各 L d l r - / - マウス ( 6 匹のマウス ) 及び E F D 処理群の各 L d l r - / - マウス ( 6 匹マウス ) に関する、大動脈弓の 3 つの異なる部位 ( a、b 又は c ) ( 図 2 4 ) におけるアテローム硬化性病変面積の半定量結果を示す。P B S 処理群及び E F D 処理群に関する各部位の平均値も示す ( 表 I )。

##### 【 0 0 7 2 】

##### 【 表 1 】

表 I : 大動脈弓の種々の部位におけるアテローム硬化性病変の定量結果

P B S で 処理した マウス	大動脈弓の種々の部位における 病変面積 ( 任意単位 )			E F D で 処理した マウス	大動脈弓の種々の部位における 病変面積 ( 任意単位 )		
	a	b	C		a	b	c
番号 1	3	3	N D	番号 1	2	—	N D
番号 2	0 . 5	N D	2	番号 2	2	3	3
番号 3	4	4	1	番号 3	2	2	1
番号 4	3	4	4	番号 4	3	2	1
番号 5	N D	4	4	番号 5	3	2	1
番号 6	4	3	3	番号 6	2	1	N D
平均値	2 . 9	3 . 6	2 . 8	平均値	2 . 4	1 . 6	1 . 5

N D : 決定されなかった

##### 【 0 0 7 3 】

E F D で処理したマウスでは、病変は部位 b において統計的に小さかった (  $p = 0.015$  ; マン・ホイットニー検定 )。

##### 【 0 0 7 4 】

6 匹の E F D で処理した L d l r - / - マウス及び P B S で処理した L d l r - / - マウスにおける病変の面積及び厚みの定量 ( 図 2 5 及び図 2 6 ) により、E F D で処理した L d l r - / - マウスにおいて病変の面積及び厚みが有意に低減することが実証された。

## 【0075】

Ldlr-/-マウスへのEFD BCGの投与により、PBSで処理したマウスと比較して、大動脈根における病変の横断面積が低減し( $204051 \pm 73623 \mu\text{m}^2$  に対して  $87072 \pm 28079 \mu\text{m}^2$ 、 $P < 0.01$ ; 図27A)、図27Bに示されるように、表面の(en face)大動脈標本における脂質病変面積が減少した。

## 【0076】

免疫組織化学的検査により、PBSで処理したマウスと比較して、EFD BCGで処理したマウスにおいて、アテローム硬化性疾患における最大の危険である粥腫の崩壊を防止し得るものでもある、アテローム硬化性病変の横断面におけるMOMA2+マクロファージの浸潤がより少ないことが示された( $P < 0.01$ ; 図27C及び図27D)。

10

e) 脂質プロファイル、及び酸化LDL(oxLDL)に対する抗体力価

血清コレステロール、トリグリセリド及びコレステロール脂質プロファイルは、EFD BCG処理後に変化しなかった(図33及び図34)。

## 【0077】

加えて、血清oxLDLに対する抗体のレベルは、EFD BCGで処理したマウスとPBSで処理したマウスとの間で異なっておらず、EFD BCGによる保護がアテローム性動脈硬化特異的抗原と無関係であることが示唆された(図35)。

実施例3: ApoE<sup>-/-</sup> × CD4dnT RIIマウスモデルにおけるアテローム性動脈硬化の発症に対するEFD BCG処理の評価

## 1) 材料及び方法

20

CD4プロモーター下でドミナントネガティブTGF-β受容体IIを発現するC57BL/6Jバックグラウンドの雌性ApoE<sup>-/-</sup> × CD4dnT RIIマウス(非特許文献13)を、アテローム性動脈硬化の短期間モデルとして使用した。マウスは、ストックホルム州地域倫理委員会の許可を得て、カロリンスカ大学病院の繁殖施設で作製及び飼育した。これらのマウスに、6週齢及び9週齢で、尾の根元に100 μlのPBS又は100 μgのEFD BCGの2回の皮下注射を行った。これらのマウスに標準的な飼料を与え、12週齢で屠殺した。サイトカイン及び転写因子の分析、並びに免疫組織化学的研究を、実施例2に記載されるように行った。

## 2) 結果

TGF-βは、Tregが産生することができるものであり、T細胞の活性化を阻止することによりアテローム性動脈硬化の発症を低減させる(Gojova et al., Blood, 2003, 102, 4052-4058; 非特許文献13; 非特許文献11)。EFD BCGで処理したマウスの血清中でTGF-βのレベルの増大の傾向が観察された(図11及び図15)ため、ApoE<sup>-/-</sup> × CD4dnT RIIマウスにおけるEFD BCGの効果が検証された。

30

## 【0078】

EFD BCGによる短期の処理にもかかわらず、大動脈根におけるアテローム硬化性病変の大きさは、PBSと比較して30%低減した( $278086 \pm 87089 \mu\text{m}^2$  に対して  $193600 \pm 85948 \mu\text{m}^2$ 、 $P < 0.05$ ; 図28A、図28B)。

## 【0079】

40

アテローム性動脈硬化の従来モデル(Ldlr-/-及びApoE<sup>-/-</sup>)では、EFD BCGにより、それぞれ、IL-10産生が4倍~8倍増大し、EFD BCG処理したApoE<sup>-/-</sup> × CD4dnT RIIマウスでは、非処理マウスに対して16倍増大した( $P < 0.001$ ; 図28C)。血清TNF-βレベルは、EFD BCGで処理したマウスではPBSで処理したマウスと比較して僅かに減少した(図28C)が、IFN-γ、IL-4、IL-5、IL-13及びIL-17の血清レベルは2群間で異ならなかった。特に、EFD BCGにより、ApoE<sup>-/-</sup> × CD4dnT RIIマウスの脾細胞抽出物中におけるFoxp3タンパク質の発現が増強された(図28D)。

## 【0080】

これらの結果により、EFD BCGが、TGF-βシグナル伝達の非存在下でTreg

50

g の増殖及び I L - 1 0 の産生を促進することによりアテローム性動脈硬化を低減させることが示唆される。

実施例 4 : E F D B C G 処理は、測定可能な毒性学的副作用を有しない

#### 1) 材料及び方法

毒性学研究に通常使用される雌性 O F 1 スイスマウスを、パスツール研究所の動物実験部で飼育し、100 µl の P B S 又は 0.01 mg、0.1 mg 若しくは 1 mg の E F D B C G を 14 日間連続して注射した (1 群当たりのマウス数 10)。体重及び直腸温度を、以前に記載されたように、1 日毎に、各注射の 24 時間後に測定した (非特許文献 16)。実施例 2 に記載されるように、最後の注射の 24 時間後、マウスを屠殺し、核内の P P A R - 及び P P A R - の測定のために脾臓を回収した。

10

#### 2) 結果

複数回の E F D 注射は、測定可能な副作用を誘導しない

E F D B C G による処理の繰り返しの副作用を、集団レベルでの多様性が高く毒性学的研究に使用されることが多い O F 1 非近交系スイスマウスにおいて評価した。様々な用量の E F D B C G (0.01 mg、0.1 mg、1 mg) の 14 回の連続注射の後、P B S で処理したマウスと比較して、直腸温度の変化は観察されなかった (図 29 A)。E F D B C G で処理したマウス及び P B S で処理したマウスの体重は、0 日目から 14 日目までに同程度 (6% ~ 7%) 増大した (図 29 B)。

#### 【0081】

最後に、本発明者らは、E F D B C G 処理により P P A R の発現に影響を及ぼすことなく P P A R の発現が増強されることも示した。実際に、P P A R - アゴニスト (心血管疾患のリスクが高い糖尿病患者においてインスリン増感剤として使用される) 及び P P A R - アゴニスト (脂質異常症を治療するために使用される) の組合せにより、A p o E - / - においてアテローム性動脈硬化が増強され (非特許文献 6)、ヒトにおいて主要な心血管の有害事象が誘導された (非特許文献 7)。

20

#### 【0082】

したがって、漸増用量の E F D B C G を 14 日間連続して投与した O F 1 スイスマウス由来の脾細胞抽出物中における 2 つの P P A R アイソフォーム (及び) の発現を測定した。P B S を注射したマウスと比較して、E F D B C G 注射後に、P P A R - の発現は用量依存的に増大したが、P P A R - レベルは、最高用量の E F D B C G であっても同一のままであった (図 29 C)。E F D B C G が P P A R - の選択的な誘導因子であり、P P A R - の活性化を誘導しないことは利点であり、ヒトにおける臨床的な使用のためのその可能性を支持する。

30

実施例 5 : E F D 処理は、マイコバクテリウム・ツベルクローシス、リーシュマニア・メジャー若しくはインフルエンザウイルスの感染を妨害せず、又は B C G 若しくはナイセリアのワクチン接種を損なわない。

#### 【0083】

最後に、宿主の防御能に対する E F D B C G の効果を評価した。

#### a) マイコバクテリウム・ツベルクローシス感染、及び B C G ワクチン接種

マウスよりマイコバクテリウム・ツベルクローシスに対する感受性の高い種であるモルモットに、以下のものを注射した：

40

群 1 : 0 日目に P B S (100 µl) (対照)

群 2 : 0 日目に B C G (100 µl の P B S 中 10<sup>6</sup> コロニー形成単位 (C F U))

群 3 : 42 日目に B C G (100 µl の P B S 中 10<sup>6</sup> コロニー形成単位 (C F U))

群 4 : 0 日目に E F D (100 µl の P B S 中 (100 µg))

群 5 : 0 日目に E F D (100 µl の P B S 中 (100 µg))、及び 42 日目に B C G (100 µl の P B S 中 10<sup>6</sup> コロニー形成単位 (C F U))

群 6 : 0 日目に B C G (100 µl の P B S 中 10<sup>6</sup> コロニー形成単位 (C F U))、及び 42 日目に E F D (100 µl の P B S 中 (100 µg))。

#### 【0084】

50

80日目に、全ての群（1群当たりのモルモット数  $n = 6$ ）にマイコバクテリウム・ツベルクローシス（H37Rv； $5 \times 10^5$  CFU）を負荷した。モルモットを122日目に屠殺した。脾臓を回収し、ホモジナイズした。ホモジナイズした脾臓の適当な希釈物を、Middlebrook 7H10寒天培地（DIFCO）上で平板培養した。プレートを、37℃で1ヶ月間インキュベートし、病原性細菌のコロニー形成単位（CFU）を計数した。

#### 【0085】

BCGワクチン接種の前若しくは後の、又はBCGワクチン接種を伴わないEFD処理は、マイコバクテリウム・ツベルクローシス感染に対して感作させず、又はBCGワクチン接種を損なわなかった（図30）。

10

#### b) リーシュマニア・メジャー感染アッセイ

BALB/cマウス（ノンヒーラー（non healer）マウス）及びC57BL/6マウス（ヒーラーマウス）（1群当たり8匹）の尾の根元に、100  $\mu$ lのPBS又は100  $\mu$ lのPBS中100  $\mu$ gのEFDを注射した（0日目）。45日目に、マウスの右耳に、10  $\mu$ l中10個～20個の生きたリーシュマニア・メジャー寄生虫を投与した。

#### 【0086】

局所的な炎症を6ヶ月間観察し、測定した。PBS処理群とEFD処理群との間で差異は観察されなかった。

#### 【0087】

転移性の病変が、160日目に記録された。

20

#### 【0088】

PBS処理群では、全てのマウス（1匹を除く）が、小～中程度の局所的な病変を有していた。5匹は正常な尾を有しており、1匹は尾の根元に小さい病変を有しており、2匹は尾を失くしてしまっており、後足底（rear footpads）に病変を有していた。

#### 【0089】

EFD処理群では、全てのマウスが小～中程度の局所的な病変を有していた。7匹は尾を有しており、2匹は尾の根元に小さい病変を有しており、1匹は尾を失くしてしまっており、両方の後足底に病変を有していた。BALB/cマウス（ノンヒーラーマウス）のPBS処理群とEFD処理群との間で差異は観察されなかった（同様の病変）。PBSを注射したC57BL/6マウス（ヒーラーマウス）及びEFDを注射したC57BL/6マウス（ヒーラーマウス）の間で差異は観察されなかった（全てのマウスで病変なし）。

30

#### 【0090】

EFD処理がマウスをリーシュマニア・メジャー感染に対して感作させないことを示すこれらの結果により、EFDが病原体感染を妨害しないことが示される。

#### c) ナイセリアワクチン接種

1つの群のBALB/cマウスを、100  $\mu$ l中100  $\mu$ gのEFDで皮下的に処理し、2つの他の群には100  $\mu$ lのPBSを投与した（1群当たりのマウス数  $n = 6$ ）。21日後、EFD処理群及びPBS処理群のうちの1群に、熱により死滅したナイセリア・メニンジティディス（*Nesseiria meningitidis*）をワクチン接種した（1週間間隔で3回投与）。PBSを注射したマウスの2つ目の群にはワクチン接種しなかった（対照）。最後のワクチン注射の2週間後、ワクチン接種したマウス及びワクチン接種していないマウスに $10^7$  CFUの病原性ナイセリア・メニンジティディスを負荷（i.p.）し、負荷の2時間後、6時間後及び24時間後に血中の細菌を測定した。EFD処理により、ワクチン接種の保護効果は変化しなかった（図31）。

40

#### d) インフルエンザウイルス感染

1つの群のBALB/cマウスを、100  $\mu$ l中100  $\mu$ gのEFDで皮下的に処理し、他の群には、100  $\mu$ lのPBSを投与した。21日後、両方の群をインフルエンザウイルススコットランドA株（5000 p.f.u.）に鼻腔内感染させ、マウスの臨床症状及び生存しているマウスの数を14日間1日1回記録した。EFD処理群とPBS処理群との間で差異は見出されず（図32）、EFD処理によりインフルエンザウイルス感染の経過

50

が変化しないことが示された。

#### 【0091】

これらのデータにより、その免疫調節効果にもかかわらず、E F D B C Gが、モルモットにおいてマイコバクテリウム・ツベルクローシス、マウスにおいてナイセリア・メニンジティディスに対するワクチン（それぞれ、T h 1に媒介される免疫応答及びT h 2に媒介される免疫応答を誘導する感染）によりもたらされる保護を弱力化することもなく、モルモットにおけるマイコバクテリウム・ツベルクローシス感染、及びマウスにおけるインフルエンザウイルス感染又はリーシュマニア・メジャー感染を悪化させることもなかったことが実証される。したがって、E F D B C Gは、2つの動物種において、種々のマウス株において、及び高用量で投与した場合に、測定可能な程度の有害作用を何ら引き起こさない。

10

#### 実施例1～実施例5からの結論

本研究により、E F D B C Gが3つの相異なるマウスモデルにおいてアテローム性動脈硬化の発症に対する保護効果を発揮することが実証される。E F D B C Gにより、以下のことが同時に誘発された：1) I L - 10産生及びT r e gの増殖を介した免疫調節効果、2) N F - B活性化の阻害、並びに3) P P A R - レベルの変化を伴わないP P A R - の増大。E F D B C Gは、本研究において測定可能な程度の副作用を有さず、また、その免疫調節活性にもかかわらず、T h 1免疫応答及びT h 2免疫応答を生じるワクチンによりもたらされる保護を弱力化することもなく、マイコバクテリウム・ツベルクローシス感染を悪化させることもなかった。

20

#### 【0092】

全てのモデルにおいて、E F D B C Gにより、アテローム硬化性病変の大きさが有意に低減し、I L - 10産生が有意に誘導された。さらに、L d l r - / - マウスにおいて、E F D B C G処理により、注射直後に、流入領域リンパ節における形質細胞様樹状細胞（p D C）及びF o x p 3 + T r e gの数が増大した。実験の終了時に、脾臓におけるT r e gの蓄積、炎症促進性サイトカインの血清レベルの減少、N F - Bの低減、並びに脾臓核抽出物及び血管核抽出物におけるP P A R - の発現の増大が、L d l r - / - マウスにおいて観察された。E F D B C Gで処理したL d l r - / - マウスにおけるI L - 10の血清レベルの上昇は、I L - 10の活性化を統制する転写因子（S P - 1及びp - S T A T 5 b）の脾臓抽出物における発現の増大を伴い、I L - 10がアテローム保護（atheroprotection）を媒介するという考えを支持した。I L - 10シグナル伝達を増強することに加えて、L d l r - / - マウス及びA p o E - / - マウスにおけるE F D B C Gでの長期的処理は、本発明者らが試験した炎症性サイトカインのほとんど（I F N - を除く）を減少させた。L d l r - / - マウスにおいて同時に起こる核内N F - Bの低減、及びリン酸化型R X R - レベルの低減を伴うP P A R の増大により、E F D B C Gが炎症状態を強く阻止することが示唆される。転写因子及びサイトカインの発現プロファイルは、I L - 13のより低い血清レベル、及び脾臓中のG A T A 3及びp - S T A T - 6の減少により証明されるように、E F D B C GによるT h 2分化の下方調節を反映していた。T h 1系列（arm）に関しては、パターンはあまり明らかではなかった。

30

実際、E F D B C Gにより、L d l r - / - マウス及びA p o E - / - マウスの血清中においてT h 1サイトカインのシグネチャーであるI F N - のより高いレベルが誘起され、脾臓細胞抽出物中において、T h 1の発生の重要な転写因子であるT - b e tの発現が増強された。しかしながら、E F D B C Gにより、T h 1細胞の発生を調節する別の重要な因子であるS T A T - 4のリン酸化が低下した。p - S T A T - 4は近年、T r e gの発生を損なうことが示されているため、E F D B C Gにより誘導されるp - S T A T - 4の低減は、本研究において、T r e gの増殖に利益をもたらした可能性がある。最後に、T h 17細胞の役割を、T h 17細胞の発生を統制する転写因子であるR O R tを研究することにより検証した。R O R tのレベルは、E F D B C G処理後にL d l r - / - マウス及びA p o e - / - マウスにおいてより低く、A p o e - / - マウスモデルではI L - 17のレベルの減少を伴っていた。T h 17の低減及びより強いT r e g

40

50



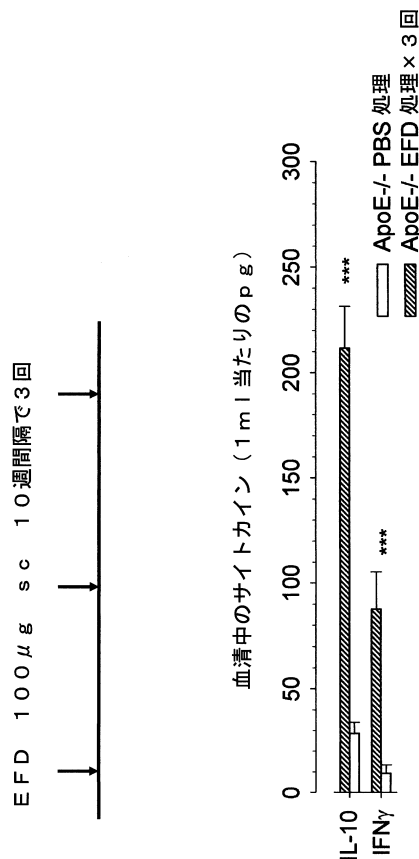
プロファイルと関連する、免疫のTh1系列の部分的な変調は、EFD BCGで処理したマウスにおいてマイコバクテリウム・ツベルクロシス及びナイセリア・メニンジティディスに対する免疫防御が変化しなかったことにより裏付けられるように、宿主の効率的な免疫能を維持しながらアテローム性動脈硬化を防ぐのに十分なものであり得る。EFD

BCGで処理したマウスにおける全身的炎症プロファイルの変調は、アテローム硬化性疾患における最大の危険である粥腫の崩壊を防止し得るものでもある、病変におけるMOMA<sup>+</sup>マクロファージの局所的な蓄積の低減とも関連していた(図23B、図27C及び図27D)。EFD BCGによる免疫化後には、マイコバクテリウム・ツベルクロシスに対する反応性(Th1に媒介される保護)又はナイセリア・メニンジティディスに対する反応性(Th2に媒介される保護)により評価されたように、免疫抑制の痕跡は観察されなかった。EFD BCG処理後における感染に対する免疫能の維持により、EFD

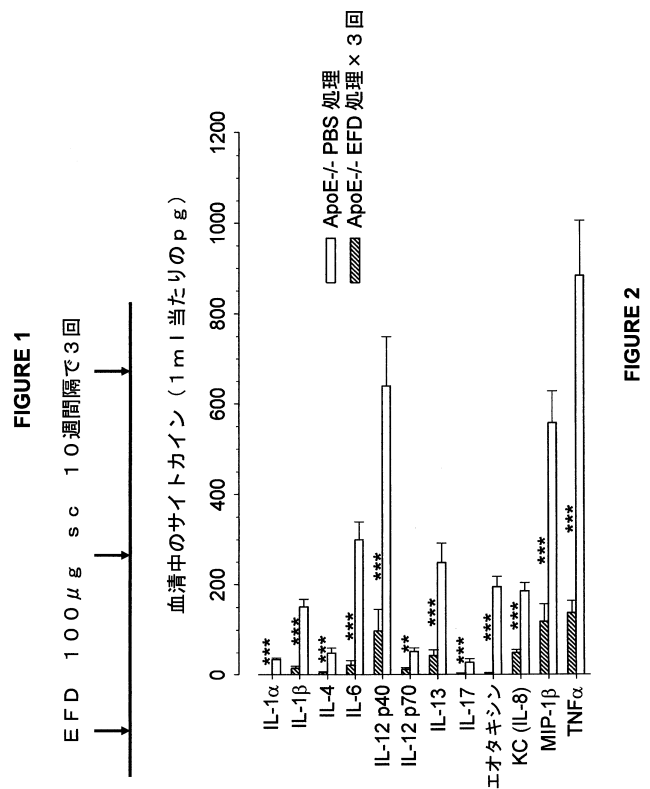
BCGがヒトにおいて耐容性を有する治療剤であることが示唆された。最後に、EFD BCGはPPAR- $\gamma$ の選択的な誘導因子であり、PPAR- $\gamma$ の活性化を誘導しないが、これは1つの利点であり、臨床的使用に関するその可能性を裏付ける。結論として、EFD BCGは、アテローム性動脈硬化の予防及び治療のための、免疫治療用調製物としての有望な候補である。

10

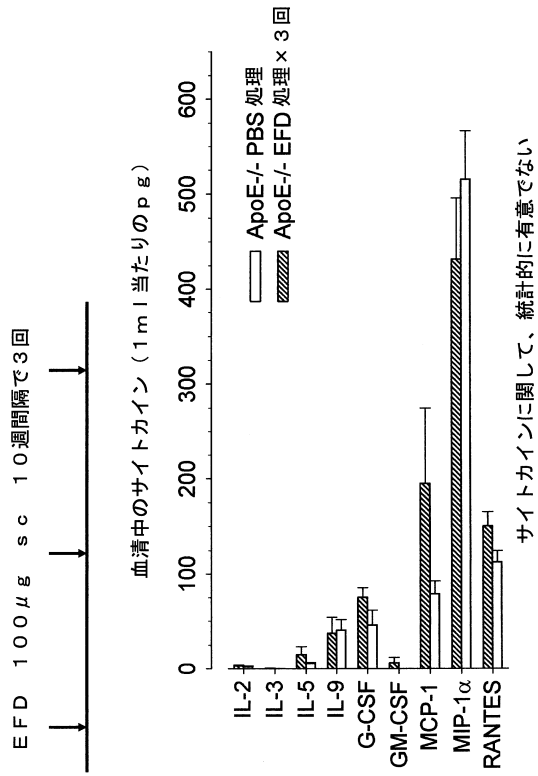
【図1】



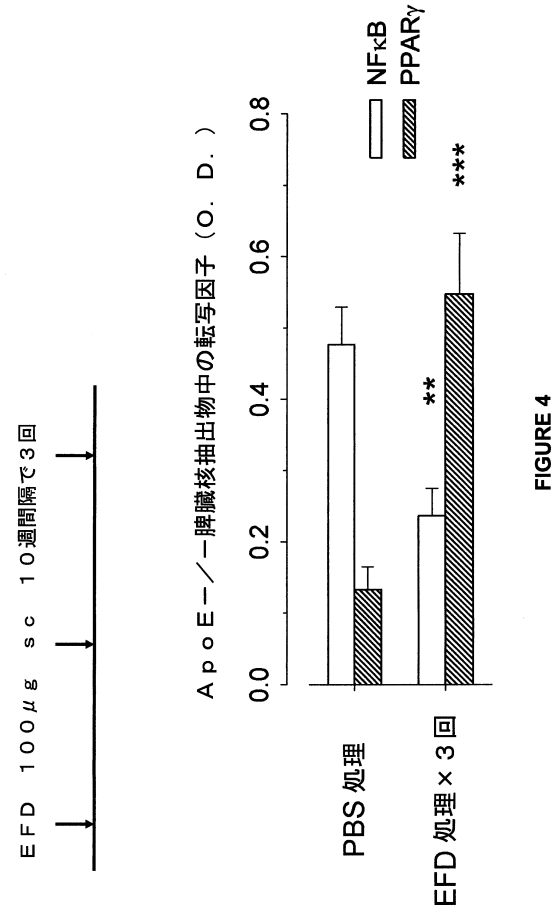
【図2】



【図 3】



【図 4】



【図 5】

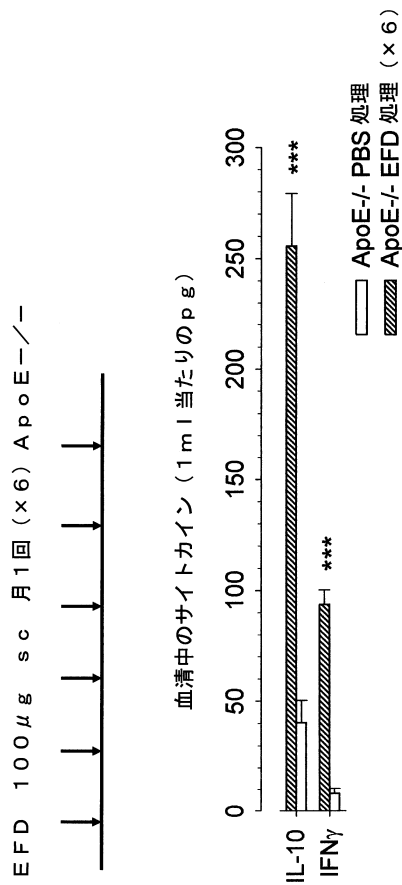
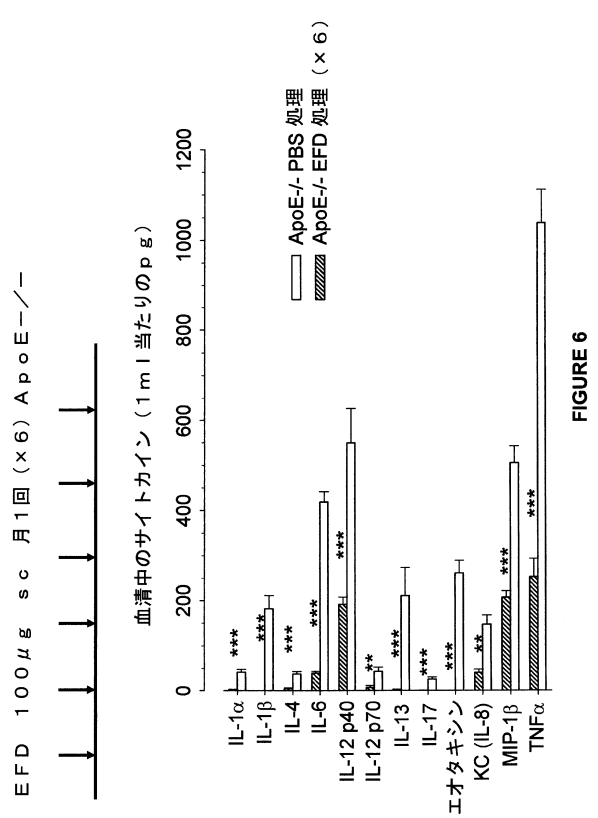
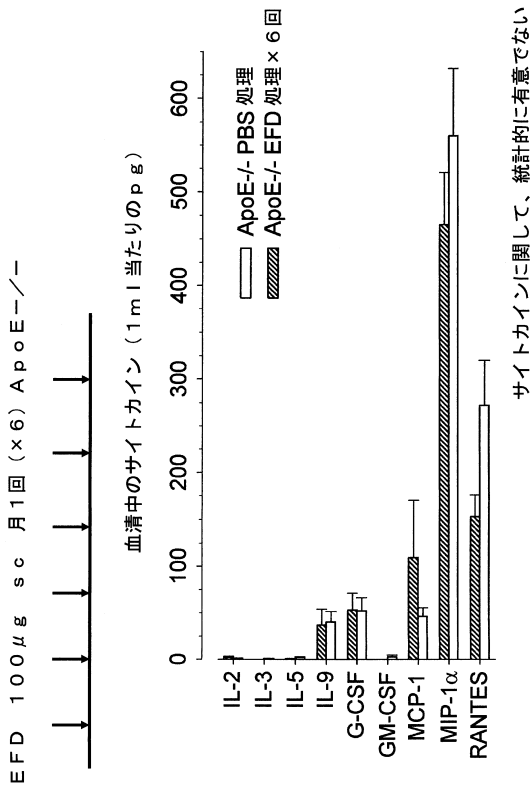


FIGURE 5

【図 6】



【図 7】



【図 8】

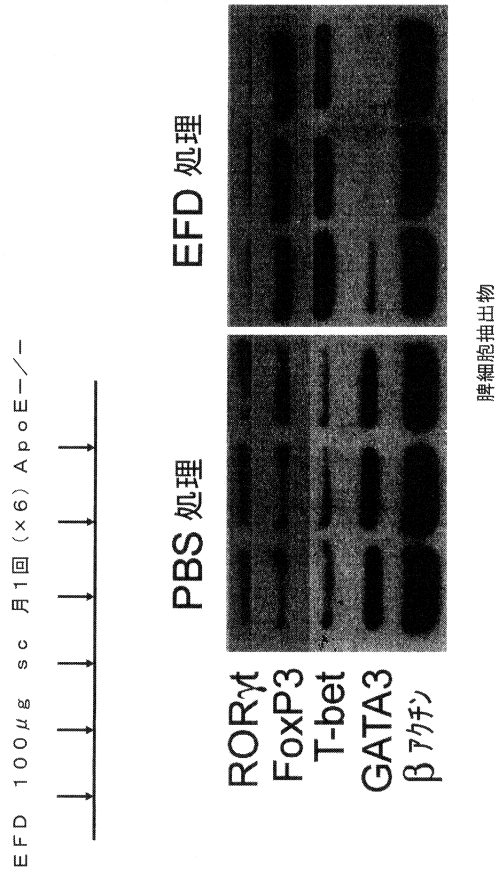


FIGURE 8

【図 9】

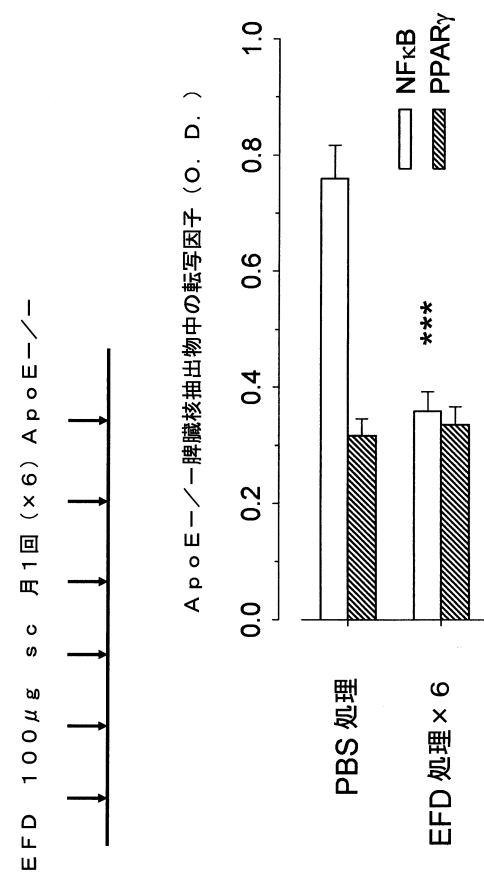


FIGURE 9

【図 10】

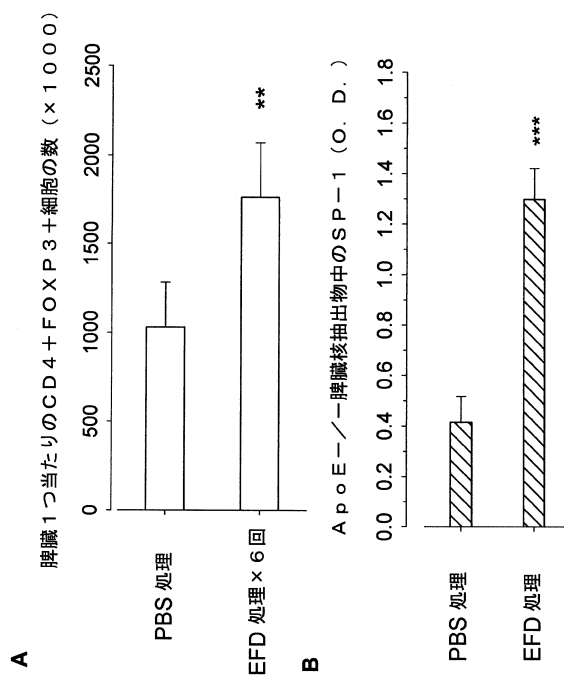


FIGURE 10

【図 1 1】

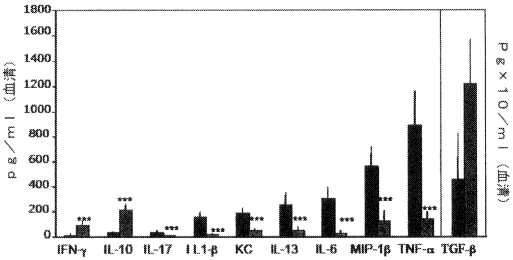


FIGURE 11

【図 1 2】

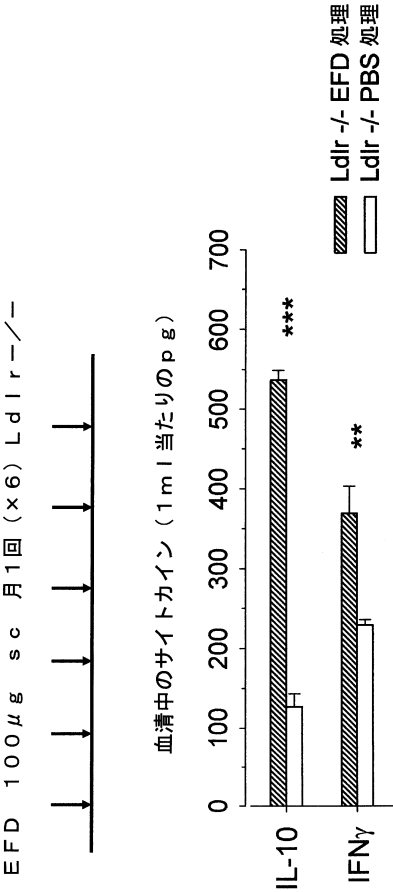


FIGURE 12

【図 1 3】

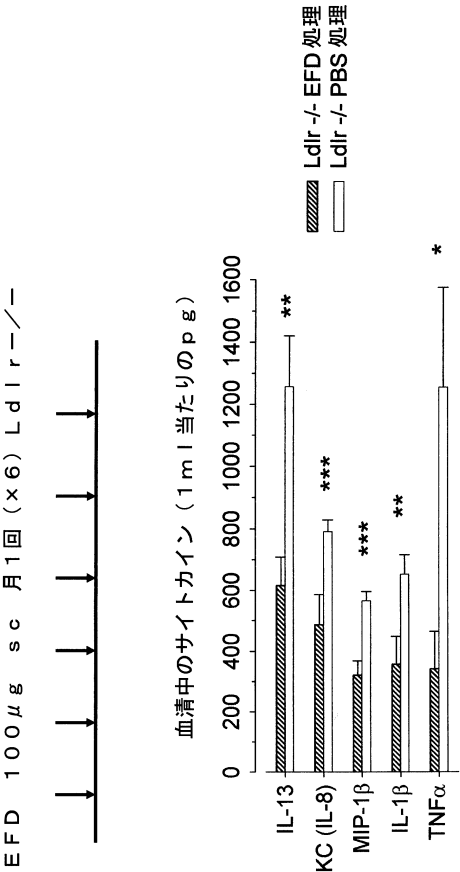
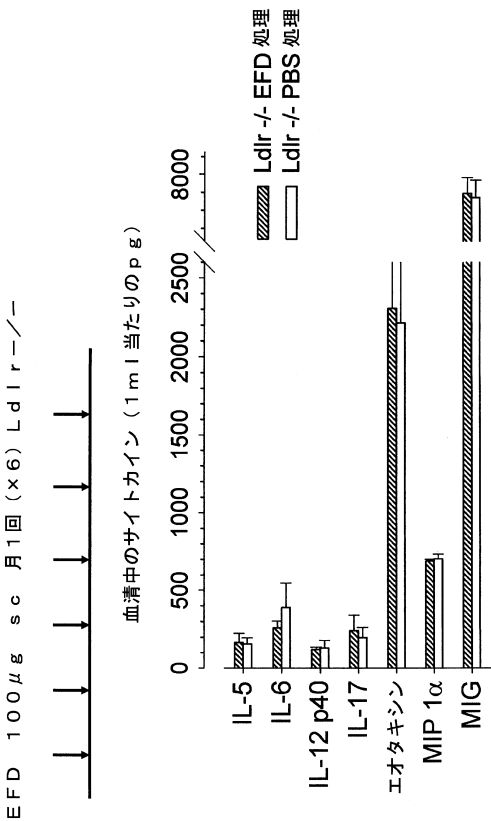


FIGURE 13

【図 1 4】



サイトカインに関して、統計的に有意でない

FIGURE 14

【図 15】

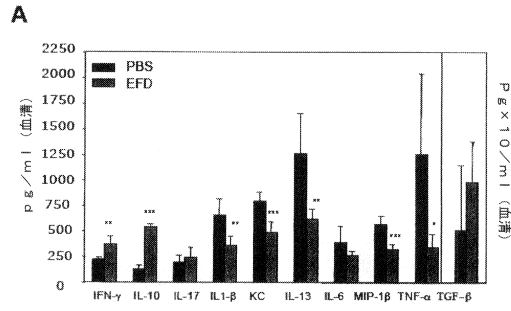


FIGURE 15

【図 16】

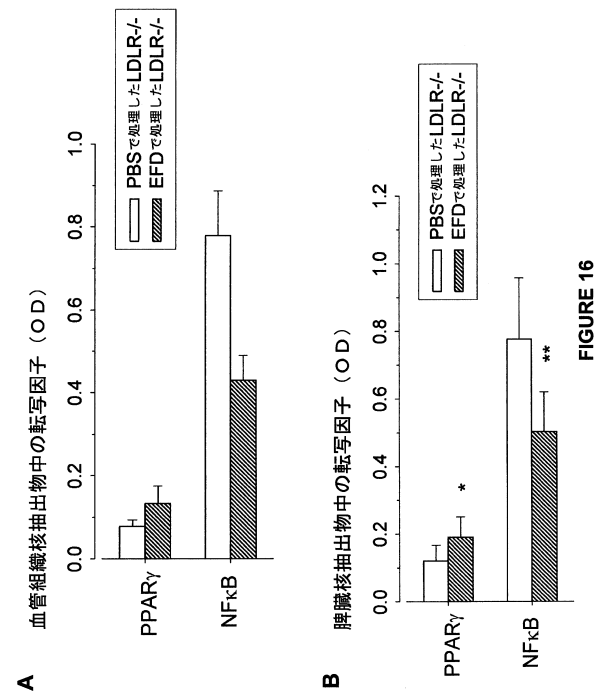


FIGURE 16

【図 17】

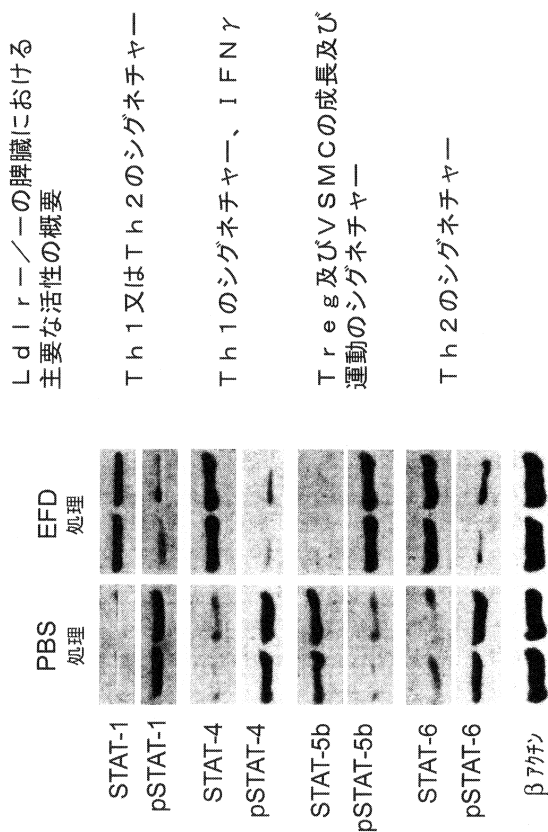


FIGURE 17

【図 18】

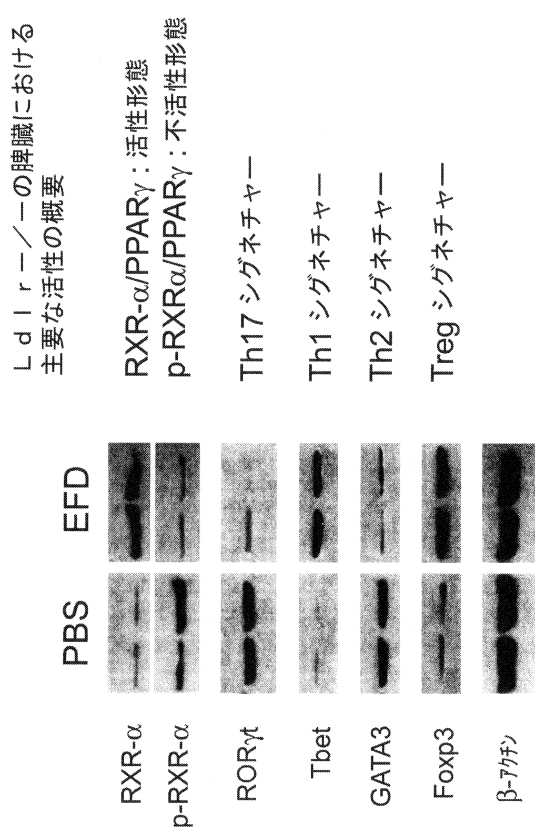


FIGURE 18

【図 19】

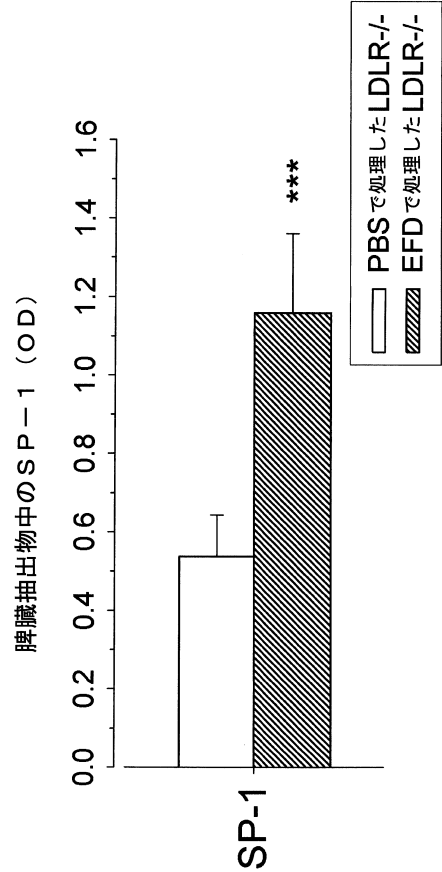


FIGURE 19

【図 20】

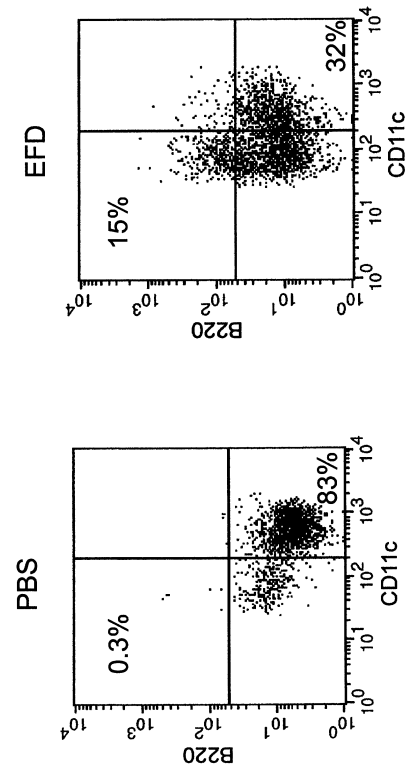


FIGURE 20

【図 21】

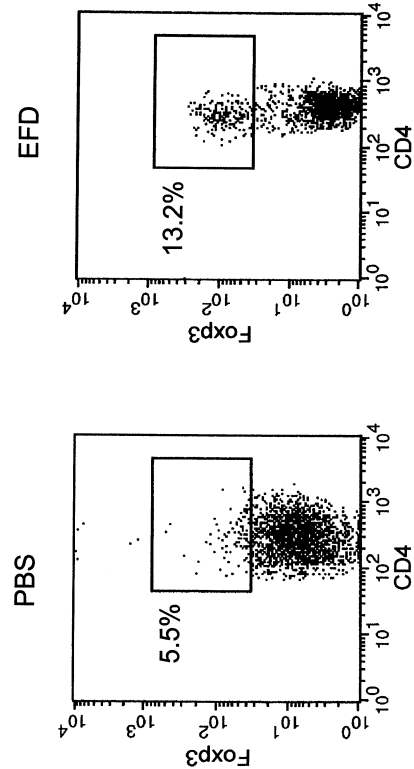


FIGURE 21

【図 22】

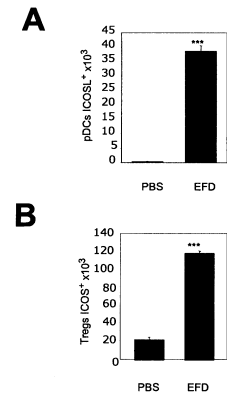


FIGURE 22

【 図 2 3 】

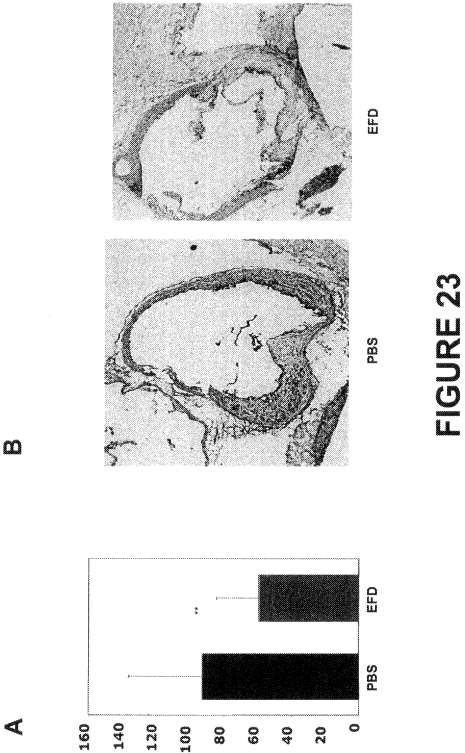


FIGURE 23

【 図 2 4 】

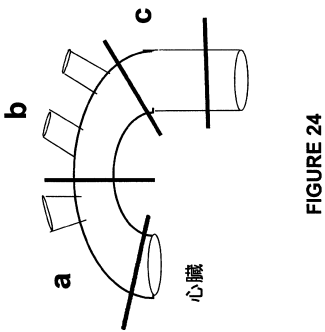


FIGURE 24

【 図 2 5 】

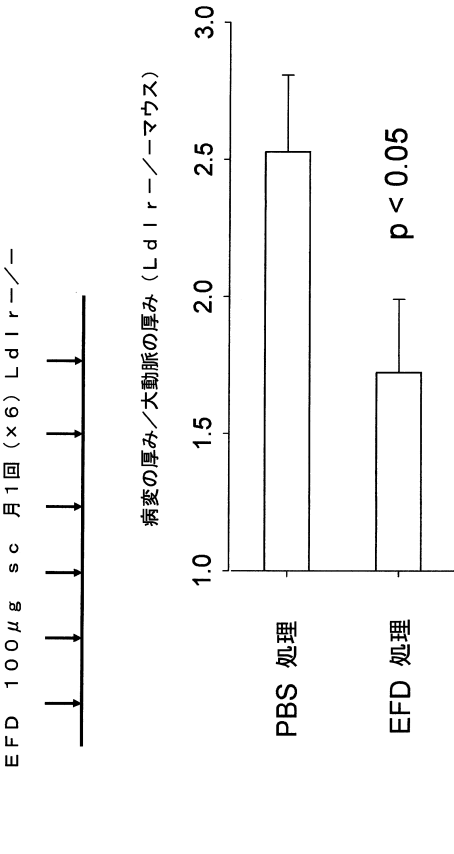


FIGURE 25

【 図 2 6 】

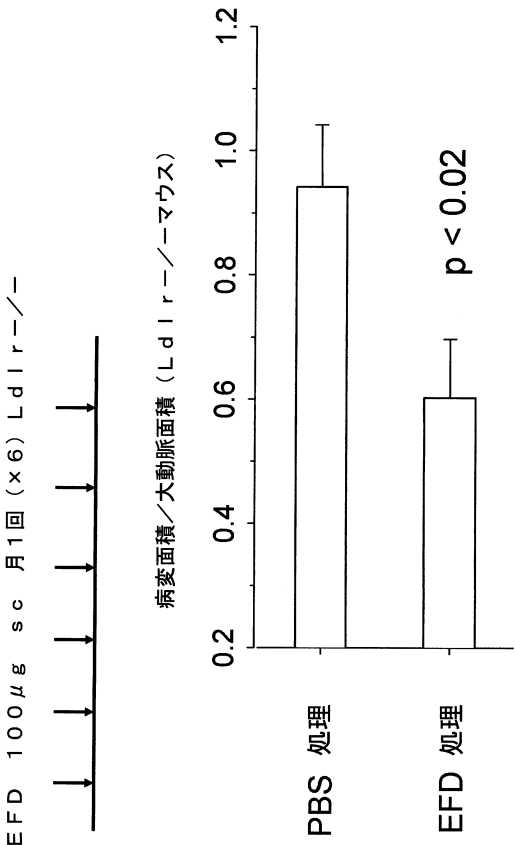
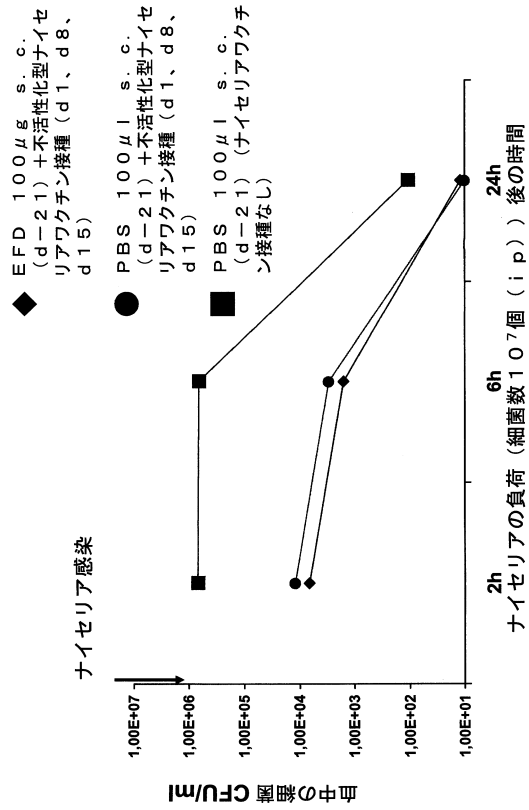


FIGURE 26





【図 3 1】



【図 3 2】

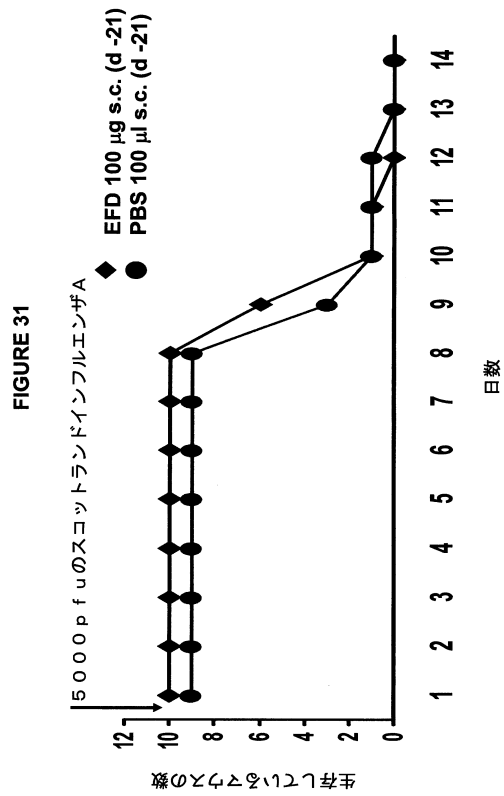


FIGURE 31

FIGURE 32

【図 3 3】

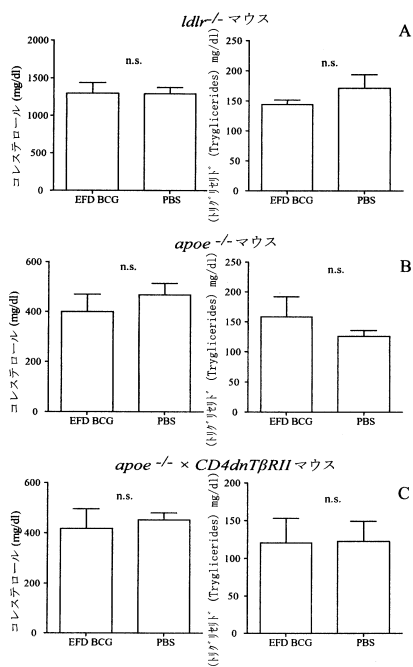


FIGURE 33

【図 3 4】

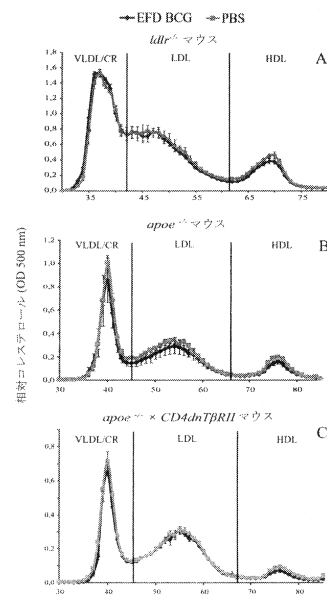


FIGURE 34

【図 35】

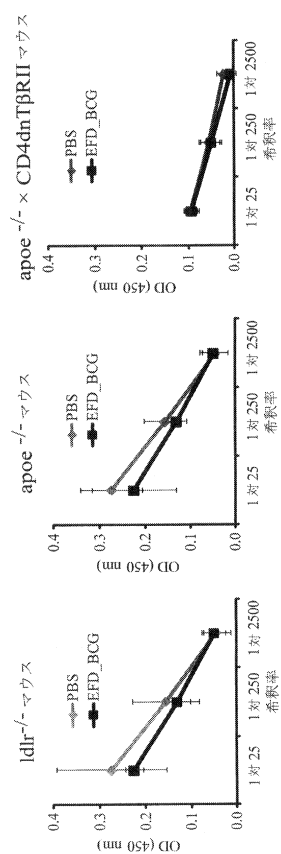


FIGURE 35

---

フロントページの続き

- (72)発明者 ラグランドゥリー ミシュリーヌ  
フランス国 エフ - 9 2 2 0 0 ヌイイ シュル セーヌ リュ シャルル ラフィット 8 4
- (72)発明者 ジュヴァルツ - コルニル イサベル  
フランス国 エフ - 7 8 3 5 0 ジュイ アン ジョザ リュ クレマンソー 1 4

審査官 上條 のぶよ

- (56)参考文献 欧州特許出願公開第 0 2 0 8 7 8 9 8 ( E P , A 1 )  
特表 2 0 0 3 - 5 0 1 4 0 0 ( J P , A )  
国際公開第 2 0 0 8 / 0 4 9 8 8 8 ( W O , A 1 )  
Journal of Allergy and Clinical Immunology , 2 0 0 8 年 , Vol.121, No.2 , p.471-478