

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4750716号
(P4750716)

(45) 発行日 平成23年8月17日(2011.8.17)

(24) 登録日 平成23年5月27日(2011.5.27)

| | | | |
|-----------------------|------------------|----------------|---|
| (51) Int. Cl. | | F I | |
| A 6 1 K 38/00 | (2006.01) | A 6 1 K 37/02 | |
| A 6 1 K 31/661 | (2006.01) | A 6 1 K 31/661 | |
| A 6 1 K 31/355 | (2006.01) | A 6 1 K 31/355 | |
| A 6 1 K 35/74 | (2006.01) | A 6 1 K 35/74 | D |
| A 6 1 P 43/00 | (2006.01) | A 6 1 P 43/00 | |

請求項の数 15 (全 49 頁)

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|----------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2006-542849 (P2006-542849) | (73) 特許権者 | 502093896 |
| (86) (22) 出願日 | 平成16年12月2日(2004.12.2) | | クリーブランド クリニック ファウンデーション |
| (65) 公表番号 | 特表2007-513183 (P2007-513183A) | | アメリカ合衆国 オハイオ 44195, |
| (43) 公表日 | 平成19年5月24日(2007.5.24) | | クリーブランド, ユークリッド アベニュー 9500 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2004/040753 | (74) 代理人 | 100078282 |
| (87) 国際公開番号 | W02005/056042 | | 弁理士 山本 秀策 |
| (87) 国際公開日 | 平成17年6月23日(2005.6.23) | (74) 代理人 | 100062409 |
| 審査請求日 | 平成19年11月22日(2007.11.22) | | 弁理士 安村 高明 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/526,461 | (74) 代理人 | 100113413 |
| (32) 優先日 | 平成15年12月2日(2003.12.2) | | 弁理士 森下 夏樹 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 60/526,496 | | |
| (32) 優先日 | 平成15年12月2日(2003.12.2) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フラジェリンを使用して放射線から保護する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

フラジェリンを含む、放射線の影響から哺乳動物を保護するための組成物。

【請求項 2】

前記組成物が、放射線防護剤と組み合わせて使用される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記放射線防護剤が、抗酸化剤である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記抗酸化剤が、アミホスチンおよびビタミン E からなる群より選択される、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記放射線防護剤が、サイトカインである、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記サイトカインが、幹細胞因子である、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記組成物が、前記放射線の前、前記放射線と一緒に、または前記放射線の後に使用される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記放射線が電離放射線である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

10

20

前記放射線が、胃腸症候群または造血症候群を誘導する、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記組成物が成長因子と組み合わせて使用される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記成長因子がケラチノサイト成長因子である、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記組成物がステロイドと組み合わせて使用される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記ステロイドが 5 - アンドロステジオールである、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記組成物が、トリクロロ (ジオキソエチレン - O , O ') テルル酸アンモニウムと組み合わせて使用される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、米国仮出願番号 60 / 526 , 460 号 (2003 年 12 月 2 日出願)、米国仮出願番号 60 / 526 , 461 号 (2003 年 12 月 2 日出願)、米国仮出願番号 60 / 526 , 496 号 (2003 年 12 月 2 日出願)、および米国仮出願番号 60 / 526 , 666 号 (2003 年 12 月 2 日出願) (これらの内容は、参考として本明細書中に援用される) の利益を主張する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、アポトーシスの作用から哺乳動物を保護するためのフラジェリンの使用に関する。より詳細には、本発明は、ストレス (例えば、放射線および癌処置) への曝露から哺乳動物を保護するためのフラジェリンの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

正常細胞から腫瘍細胞への進行は、成長抑制刺激に対する耐性ならびに成長因子およびホルモンへの依存の欠如を含む、成長調節の負のメカニズムの損失に関連している。放射線または細胞傷害性薬剤に基づく従来の癌処置は、正常細胞および悪性細胞の成長制御の差異に依存する。従来の癌処置は、細胞を苛酷な遺伝毒性ストレス下に置く。これらの条件下では、大多数の正常細胞は停止するので救済されるが、腫瘍細胞は分裂し続けて死ぬ。

【0004】

しかしながら、従来の癌処置ストラテジーの性質は、正常な急速に分裂する組織またはアポトーシスを起こしやすい組織が危険に曝されるような性質のものである。これらの正常な急速に分裂する細胞に対する損傷は、癌処置の周知の副作用を引き起こす (感受性の組織: 造血、小腸、毛嚢)。このような組織の生来の感受性は、癌細胞がしばしば自殺 (アポトーシス) 機構の欠損を獲得し、そして、正常な感受性組織に死をもたらすこれらの治療手技が、癌細胞に損傷を与えない場合があるという事実によって、複雑になる。癌治療の副作用を最小にする従来の試みは、(a) 腫瘍細胞を処置に対してより感受性にする、(b) 癌治療を腫瘍細胞に対してより特異的にすること、または (c) 処置 (例えば、エリトロポイエチン、GM - CSF、および KGF) の後の正常組織の再生を促進させること、に基づく。

【0005】

癌の処置における化学療法および放射線療法に関連する副作用を軽減する治療剤の必要

10

20

30

40

50

性が、引き続き存在する。本発明は、これらの必要性を満たし、他の関連する利点を提供する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0006】

(発明の要旨)

本発明は、アポトーシスを誘発する1つ以上の処置から患者を保護する方法に関し、この方法は、NF- κ Bを誘導する薬学的に受容可能な量の薬剤を含む組成物を、患者に投与する工程を包含する。薬剤は、フラジェリンであってもTGF β であってもよく、このTGF β は潜在性TGF β であってもよい。処置は、癌処置であり得、この癌処置は化学療法であっても放射線療法であってもよい。

10

【0007】

本発明はまた、構成的に活性なNF- κ B癌に罹患している哺乳動物を処置する方法に関し、この方法は、NF- κ Bを誘導する薬学的に受容可能な量の薬剤を含む組成物を、哺乳動物に投与する工程を包含する。薬剤は、フラジェリンであってもTGF β であってもよく、このTGF β は潜在性TGF β であってもよい。薬剤は、癌の処置の前に投与されても、処置と同時に投与されても、または処置の後に投与されてもよい。処置は、化学療法であっても放射線療法であってもよい。

【0008】

本発明はまた、癌の処置に起因して正常組織に損傷を受けている哺乳動物を処置する方法に関し、この方法は、NF- κ Bを誘導する薬学的に受容可能な量の薬剤を含む組成物を、哺乳動物に投与する工程を包含する。薬剤は、フラジェリンであってもTGF β であってもよく、このTGF β は潜在性TGF β であってもよい。薬剤は、癌の処置の前に投与されても、処置と同時に投与されても、または処置の後に投与されてもよい。処置は、化学療法であっても放射線療法であってもよい。

20

【0009】

本発明はまた、ストレスに起因して正常組織に損傷を受けている哺乳動物を処置する方法に関し、この方法は、NF- κ Bを誘導する薬学的に受容可能な量の薬剤を含む組成物を、哺乳動物に投与する工程を包含する。薬剤は、フラジェリンであってもTGF β であってもよく、このTGF β は潜在性TGF β であってもよい。薬剤は、哺乳動物が罹患する疾患に対する処置の前に投与されても、処置と同時に投与されても、または処置の後に投与されてもよい。

30

【0010】

本発明はまた、哺乳動物における細胞の老化を調節する方法に関し、この方法は、NF- κ Bを誘導する薬学的に受容可能な量の薬剤を含む組成物を、哺乳動物に投与する工程を包含する。薬剤は、フラジェリンであってもTGF β であってもよく、このTGF β は潜在性TGF β であってもよい。薬剤は、哺乳動物が罹患する疾患に対する処置の前に投与されても、処置と同時に投与されても、または処置の後に投与されてもよい。

【0011】

本発明はまた、NF- κ B活性を誘導する薬剤、化学療法剤、および必要に応じて薬学的に受容可能なアジュバント、希釈剤、またはキャリアを含む薬学的組成物に関する。薬剤は、フラジェリンであってもTGF β であってもよく、このTGF β は潜在性TGF β であってもよい。

40

【0012】

本発明はまた、NF- κ Bの誘導因子についてスクリーニングする方法に関し、この方法は、疑わしい誘導因子をNF- κ Bで活性化される発現系に添加する工程、および別に、コントロールをNF- κ Bで活性化される発現系に添加する工程を包含し、これによって、NF- κ Bの誘導因子が、NF- κ Bで活性化される発現のレベルを増加させる能力によって確認される。

【0013】

50

本発明はまた、放射線の影響からこの哺乳動物を保護する方法に関し、この方法は、NF - Bを誘導する薬学的有効量の薬剤を含む組成物を、該哺乳動物に投与する工程を包含する。薬剤はフラジェリンであり得、このフラジェリンは*Salmonella*の1種に由来し得る。組成物は、放射線防護剤と組み合わせて投与され得る。放射線防護剤は抗酸化剤であり得、この抗酸化剤はアミホスチンであってもビタミンEであってもよい。放射線防護剤はまた、サイトカインであり得、このサイトカインは幹細胞因子であってもよい。

【0014】

本発明は、アポトーシスを誘発する1つ以上の処置または状態から患者を保護する方法に関し、この方法は、NF - Bフラジェリンを誘導する薬学的有効量の薬剤を含む組成物を、該患者に投与する工程を包含する。薬剤はフラジェリンであり得、このフラジェリンは*Salmonella*の1種に由来し得る。処置は癌処置であり得、この癌処置は化学療法であっても放射線療法であってもよい。状態はストレスであり得、このストレスは放射線、創傷、中毒、感染および温度ショックであり得る。

10

【0015】

本発明はまた、アポトーシスのモジュレーターについてスクリーニングする方法に関し、この方法は、疑わしいモジュレーターを細胞ベースのアポトーシス系に添加する工程、および別に、コントロールを細胞ベースのアポトーシス系に添加する工程を包含し、これによって、アポトーシスのモジュレーターが、アポトーシスの速度を変更する能力によって確認される（この疑わしいモジュレーターは、哺乳動物の寄生体に由来する）。

20

【0016】

本発明はまた、NF - Bのモジュレーターについてスクリーニングする方法に関し、この方法は、疑わしいモジュレーターをNF - Bで活性化される発現系に添加する工程、および別に、コントロールをNF - Bで活性化される発現系に添加する工程を包含し、これによって、NF - Bのモジュレーターが、NF - Bで活性化される発現率を変更する能力によって確認される（この疑わしいモジュレーターは、哺乳動物の寄生体に由来する）。寄生体は、*Salmonella*、*Mycoplasma*、および*Chlamydia*が挙げられるが、これらに限定されない種であり得る。

【0017】

本発明はまた、TGF β のモジュレーターについてスクリーニングする方法に関し、この方法は、疑わしいモジュレーターをTGF β で活性化される発現系に添加する工程、および別に、コントロールをTGF β で活性化される発現系に添加する工程を包含し、これによって、TGF β のモジュレーターが、TGF β で活性化される発現率を変更する能力によって確認される（この疑わしいモジュレーターは、哺乳動物の寄生体に由来する）。TGF β は、潜在性TGF β であってもよい。寄生体は、*Salmonella*、*Mycoplasma*、および*Chlamydia*が挙げられるが、これらに限定されない種に由来し得る。

30

【0018】

本発明はまた、p53のモジュレーターについてスクリーニングする方法に関し、この方法は、疑わしいモジュレーターをp53で活性化される発現系に添加する工程、および別に、コントロールをp53で活性化される発現系に添加する工程を包含し、これによって、p53のモジュレーターが、p53で活性化した発現の速度を変更する能力によって確認される（この疑わしいモジュレーターは、哺乳動物の寄生体に由来する）。寄生体は、*Salmonella*、*Mycoplasma*、および*Chlamydia*が挙げられるが、これらに限定されない種に由来し得る。

40

【0019】

本発明はまた、本明細書中に記載される任意のスクリーニング方法によって確認されるモジュレーターに関する。本発明はまた、本明細書中に記載されるモジュレーターを含む組成物に関する。この組成物は、薬学的に受容可能な量の本明細書中に記載されるモジュレーターを含む薬学的組成物であり得る。

50

【0020】

本発明はまた、癌を処置する方法に関し、この方法は、アポトーシスを増強するモジュレーターを含む薬学的組成物を、このような処置を必要とする被験体に投与する工程を包含する。

【0021】

本発明はまた、アポトーシスを誘発する1つ以上の処置から患者を保護する方法に関し、この方法は、アポトーシスを阻害するモジュレーターを含む薬学的組成物を患者に投与する工程を包含する。この1つ以上の処置は、癌処置であり得る。癌処置は、化学療法であっても放射線療法であってもよい。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0022】

(詳細な説明)

本発明は、ストレス(化学療法、放射線療法および放射線が挙げられるが、これらに限定されない)によって引き起こされるアポトーシスから正常細胞および組織を保護することに基づく。細胞におけるアポトーシスを制御している、以下の2つの主要な機構が存在する:p53経路(プロアポトーシス)およびNF- κ B経路(抗アポトーシス)。両経路は、腫瘍において頻繁に調節解除される:すなわち、p53は通常失われ、一方、NF- κ Bは構成的に活性になる。従って、正常細胞におけるp53の阻害およびNF- κ Bの活性化は、癌処置のようなストレスによって引き起こされる死から正常細胞を保護し得るが、腫瘍細胞はこれらの制御機構が調節解除されているので、腫瘍細胞を処置に対してより耐性にするとはならない。このことは、p53およびNF- κ Bに関する従来の見解(p53およびNF- κ Bが、それぞれ、活性化および抑制のための標的と見なされる)と矛盾する。

20

【0023】

本発明は、アポトーシスから正常細胞を保護するために、NF- κ B活性を誘導することに関する。哺乳動物におけるNF- κ B活性の誘導によって、正常細胞は、癌処置および温熱療法;放射線の有害な線量への曝露(例えば、原子力発電所、防衛産業または放射性医薬品製造の労働者、および兵士);ならびに細胞の老化で生じる、細胞性ストレスに起因するアポトーシスから保護され得る。NF- κ Bは多くの腫瘍細胞において構成的に活性であるので、NF- κ B活性の誘導は、腫瘍細胞に有益な効果をもたらすことなく、アポトーシスから正常細胞を保護し得る。一旦、正常細胞が修復されると、NF- κ B活性は正常レベルに回復され得る。NF- κ B活性は、細網内皮系(免疫系を含む)、腸の上皮、および毛包のような、放射線感受性および化学療法感受性の組織を保護するために誘導され得る。

30

【0024】

NF- κ B活性の誘導因子は、いくつかの他の用途にも用いられ得る。種々の厳しい条件(放射線、創傷、中毒、感染、老化、および温度ショックが挙げられるが、これらに限定されない)に対する哺乳動物の曝露によって引き起こされる病理学的結果および死は、プログラム細胞死(アポトーシス)の誘導または生物活性タンパク質、サイトカインの放出のような、ストレス応答の正常な生理的機構の活性から生じ得る。

40

【0025】

アポトーシスは、傷ついた細胞および遺伝学的に損傷を受けた細胞を組織から「取り除く」ために通常機能するが、一方、サイトカインは、病原体に対して生物体の防御系を動員する機能を果たす。しかしながら、重症の条件下では、両方のストレス応答機構は、単独で死因となり得る。例えば、放射線による致死は、造血系、免疫系および消化器系において生じる大規模なp53媒介性アポトーシスから生じ得る。NF- κ Bの合理的な薬理的調節により、厳しいストレス条件下での生存を増加させ得る。これらの因子の制御は、損傷した器官からの細胞の炎症応答および生死決定の両方の制御を可能にし得る。

【0026】

NF- κ Bの保護的役割は、以下をコードする同義遺伝子の転写活性化によって媒介さ

50

れる：a) 両方の主要なアポトーシス経路をブロックする抗アポトーシスタンパク質、b) HPおよび他の幹細胞の増殖および生存を誘導するサイトカインおよび成長因子、ならびにc) MnSOD(SOD-2)のようなROSを除去する強力な抗酸化タンパク質。従って、放射線防護のためのNF- κ Bの一時的な活性化によって、癌患者におけるアポトーシスの抑制のみならず、同時免疫賦活性効果(この効果は、NF- κ Bの活性化がToll様レセプターの活性化を介して到達される場合に、達成され得る)に起因して、二次癌の発生率を低減する能力をも達成することが可能であり得る。

【0027】

標的としてのNF- κ B経路の別の魅力的な特性は、候補放射線防護剤と見なされ得る多数の天然因子によるその活性化である。これらの中で、複数の病原体に関連する分子パターン(PAMP)がある。PAMPは、宿主生物中に見出されず、病原体の大集団に特徴的であり、かつ容易に変異され得ない分子である。PAMPは、Toll様レセプター(TLR)、先天性免疫のキーセンサーエレメントによって認識される。TLRは、免疫細胞の遊走および活性化を直接またはサイトカイン放出を通じて誘導することにより、免疫系の第1警告機構として作用する。TLRは、ホモおよびヘテロダイマーとしてはたらくことが公知である、I型膜タンパク質である。リガンド結合の際に、TLRは、MyD88タンパク質(大部分のTLRに不可欠なシグナル伝達アダプター)を補充する。続くシグナル伝達カスケードは、(i)NF- κ B経路の活性化、および(ii)Jun-N末端キナーゼ(JNK)を含むMAPKの活性化を含む効果をもたらす。Toll様レセプターリガンドによるNF- κ B経路の活性化は、可能性のある放射線防護剤として魅力的なりガンドを作製する。サイトカインと異なり、多くのPAMPが、TLRの活性化以外にほとんど影響がなく、従って、副作用を生じる可能性は低い。さらに、多くのPAMPはヒトに存在する。

【0028】

TLRはすべて、それらの免疫細胞活性化の機能と合致して、脾臓および末梢血白血球中で発現され、他のリンパ器官および白血球のサブセットにおいて、よりTLR特異的な発現パターンを有する。しかしながら、TLRはまた、身体の他の組織および器官中でも発現される。例えば、TLR1は遍在的に発現され、TLR5はGI上皮および内皮においても見出され、一方、TLR2、6、7および8は肺において発現されることが公知である。

【0029】

(1.定義)

本明細書中で使用される技術用語は、特定の実施形態のみを記載する目的であり、限定を意図するものではないことが理解されるべきである。本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、その内容が明らかに別のものを指示しない限り、複数の対象を包含することが留意されるべきである。

【0030】

本明細書中で使用される場合、用語「投与する」は、NF- κ B活性を誘導する薬剤の投与を記載するために使用される場合、薬剤の単回投与または複数回投与を意味する。

【0031】

本明細書中で使用される場合、用語「アナログ」は、ペプチドまたはポリペプチドの文脈中で使用される場合、アミノ酸の従来組み合わせからの1つ以上の非標準アミノ酸または他の構造変異体を含むペプチドまたはポリペプチドを意味する。

【0032】

本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、Fab、F(ab')₂、Fd、および単鎖抗体、ダイアボディー、二重特異性抗体、2官能性抗体およびそれらの誘導体を含む、IgG、IgM、IgA、IgDまたはIgEのクラスの抗体、あるいはそれらのフラグメントまたは誘導体を意味する。抗体は、所望のエピトープまたはこのエピトープに由来する配列に対して十分な結合特異性を示す、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗

10

20

30

40

50

体、アフィニティー精製した抗体、またはそれらの混合物であり得る。抗体はまた、キメラ抗体であり得る。抗体は、当該分野で公知の1つ以上の化学物質成分、ペプチド成分、またはポリペプチド成分の付着によって誘導体化され得る。抗体は、化学物質成分と結合体化され得る。

【0033】

本明細書中で使用される場合、「アポトーシス」とは、細胞小器官の完全性を保持しながらの細胞体積の漸進的な縮小；光学顕微鏡または電子顕微鏡によって観察されるようなクロマチンの凝縮（すなわち、核の凝縮）；および/または遠心沈降アッセイによって決定されるようなヌクレオソームサイズのフラグメントへのDNA切断を含む細胞死の形態をいう。細胞の膜完全性が、食細胞によるインタクトな細胞フラグメント（「アポトーシス体」）の貪食で失われる場合（例えば、膜小胞形成）、細胞死が起こる。

10

【0034】

本明細書中で使用される場合、用語「癌」は、アポトーシス刺激に対する耐性によって特徴付けられる任意の状態を意味する。

【0035】

本明細書中で使用される場合、用語「癌処置」は、当該分野で公知の癌の任意の処置（化学療法および放射線療法が挙げられるが、これらに限定されない）を意味する。

【0036】

本明細書中で使用される場合、用語「との組み合わせ」は、NF- κ B活性を誘導する薬剤の投与およびさらなる処置手段を記載するために使用される場合、この薬剤は、さらなる処置の前に投与されても、同時に投与されても、または後に投与されても、あるいはこれらの組み合わせで投与されてもよいことを意味する。

20

【0037】

本明細書中で使用される場合、用語「誘導体」は、ペプチドまたはポリペプチドの文脈中で使用される場合、一次構造（アミノ酸およびアミノ酸アナログ）以外が異なるペプチドまたはポリペプチドを意味する。例証として、誘導体は、グリコシル化（翻訳後修飾の1つの形態）されることによって異なり得る。例えば、ペプチドまたはポリペプチドは、異種の系における発現によるグリコシル化パターンを示し得る。少なくとも1つの生物活性が保持される場合、これらのペプチドまたはポリペプチドは、本発明に従う誘導体である。他の誘導体としては、共有結合的に修飾されたN末端またはC末端を有する融合ペプチドまたは融合ポリペプチド、ペグ化されたペプチドまたはポリペプチド、脂質部分を伴うペプチドまたはポリペプチド、アルキル化されたペプチドまたはポリペプチド、アミノ酸側鎖官能基を介して他のペプチド、ポリペプチドまたは化学物質に連結されるペプチドまたはポリペプチド、および当該分野で理解されるようなさらなる改変体が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0038】

本明細書中で使用される場合、用語「フラジェリン」は、任意の供給源（任意の細菌種を含むが、これらに限定されない）由来のフラジェリンを意味する。フラジェリンは、*Salmonella*の1種に由来し得る。また具体的には、前記フラジェリンのフラグメント、改変体、アナログ、ホモログ、または誘導体；およびそれらの組み合わせも企図される。本明細書中に記載される種々のフラグメント、改変体、アナログ、ホモログまたは誘導体は、野生型フラジェリンに50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%同一であり得る。

40

【0039】

本明細書中で使用される場合、用語「フラグメント」は、ペプチドまたはポリペプチドの文脈中で使用される場合、約8～約50アミノ酸長のペプチドを意味する。フラグメントは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50アミノ酸長であり得る。

50

【 0 0 4 0 】

本明細書中で使用される場合、用語「ホモログ」は、ペプチドまたはポリペプチドの文脈中で使用される場合、共通の進化上の祖先を共有するペプチドまたはポリペプチドを意味する

本明細書中で使用される場合、用語「潜在性 TGF β 」は、活性型ではない TGF β の前駆体を意味する。潜在性 TGF β は、活性 TGF β および潜在性関連ペプチド (LAP) を含む TGF β の前駆体であり得る。潜在性 TGF β はまた、潜在性 TGF β 結合タンパク質に連結した LAP を含み得る。潜在性 TGF β はまた、大きな潜在性複合体であり得る。さらに、潜在性 TGF β は、活性 TGF β への転換速度または TGF β に転換される能力が低下しているように改変された、潜在性 TGF β であり得る。改変された潜在性 TGF β は、例えば、活性 TGF β への転換を阻止するかまたは減少させる TGF β 変異体であり得る。

10

【 0 0 4 1 】

本明細書中で使用される場合、用語「 TGF β 」は、活性または潜在性の TGF β の任意のアイソフォーム (TGF β 1、 TGF β 2、 TGF β 3、 TGF β 4 または TGF β 5、 およびその組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない) を意味する。また具体的には、前記 TGF β アイソフォームのフラグメント、改変体、アナログ、ホモログ、または誘導体、およびそれらの組み合わせも企図される。本明細書中に記載される種々のフラグメント、改変体、アナログ、ホモログまたは誘導体は、 TGF β アイソフォームに 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または 99% 同一であり得る。

20

【 0 0 4 2 】

本明細書中で使用される場合、用語「処置する」または「処置すること」は、ある状態からの哺乳動物の保護に関する場合、その状態を予防すること、抑制すること、抑圧すること、または除去することを意味する。状態の予防は、その状態の発生前に哺乳動物に本発明の組成物を投与する工程を包含する。状態の抑制は、その状態の誘導後であるがその臨床的所見の前に、哺乳動物に本発明の組成物を投与する工程を包含する。状態の抑圧は、その状態が軽減されるかまたは維持されるように、その状態の臨床所見の後に、哺乳動物に本発明の組成物を投与する工程を包含する。状態の除去は、哺乳動物がもはやその状態を受けることのないように、その状態の臨床所見の後に、哺乳動物に本発明の組成物を投与する工程を包含する。

30

【 0 0 4 3 】

本明細書中で使用される場合、用語「腫瘍細胞」は、アポトーシス刺激に対する耐性によって特徴付けられる任意の細胞を意味する。

【 0 0 4 4 】

本明細書中で使用される場合、用語「改変体」は、ペプチドまたはポリペプチドの文脈中で使用される場合、アミノ酸の挿入、欠失、または保存的置換によってアミノ酸配列が異なるが、少なくとも 1 つの生物活性を保持するペプチドまたはポリペプチドを意味する。本発明の目的のために、「生物活性」としては、特異的抗体によって結合される能力が挙げられるが、これに限定されない。アミノ酸の保存的置換、すなわち、アミノ酸を類似の特性 (例えば、親水性、荷電領域の程度および分布) の異なるアミノ酸に置換することは、典型的に小さな変更への関与として当該分野で認識される。これらの小さな変更は、当該分野において理解されるように、1 つには、アミノ酸の疎水性親水性指標を考察することによって同定され得る。Kyte et al., J. Mol. Biol. 157, 105-132 (1982)。アミノ酸の疎水性親水性指標は、アミノ酸の疎水性および電荷の考察に基づく。類似の疎水性親水性指標のアミノ酸を置換し、かつタンパク質機能を依然として保持し得ることは、当該分野で公知である。1 つの局面において、2 の疎水性親水性指標を有するアミノ酸が置換される。アミノ酸の親水性はまた、生物学的機能を保持するタンパク質を生じる置換を明らかにするために用いられ得る。ペプチドの文脈におけるアミノ酸の親水性の考察は、そのペプチドの最大局所平均親水性 (抗原性および免疫

40

50

原性と十分に相関すると報告されている有用な手段)の算出を可能にする。米国特許第4,554,101号(本明細書中に参考として援用される)。類似の親水性値を有するアミノ酸の置換は、当該分野において理解されるように、生物活性(例えば、免疫原性)を保持するペプチドを生じ得る。1つの局面において、置換は、互いに±2以内の親水性値を有するアミノ酸で行なわれる。アミノ酸の疎水性指標および親水性値の両方は、そのアミノ酸の特定の側鎖によって影響を受ける。この観察と一致して、生物学的機能に互換性があるアミノ酸置換は、疎水性、親水性、電荷、サイズおよび他の特性によって明らかにされるように、アミノ酸(特に、これらのアミノ酸の側鎖)の相対的類似性に依存することが理解される。

【0045】

(2. 処置方法)

(a. 構成的に活性なNF-B腫瘍)

本発明は、NF-B活性を誘導する治療有効量の薬剤を含む組成物を哺乳動物に投与する工程を包含する、構成的に活性なNF-B癌に罹患する哺乳動物を処置する方法に関する。NF-B活性を誘導する薬剤は、癌処置と組み合わせて投与され得る。

【0046】

薬剤は、化学療法および放射線療法のような他の抗癌処置と同時にかまたはメトロノームのように投与され得る。用語「同時の」または「同時に」は、本明細書中で使用される場合、他の抗癌処置および本発明の化合物が、互いに48時間以内に、好ましくは24時間以内に、より好ましくは12時間以内に、なおより好ましくは6時間以内に、そして最も好ましくは3時間以内に施与されることを意味する。用語「メトロノームのように」とは、本明細書中で使用される場合、化学療法と異なる時点で、かつ、反復投与および/または化学療法レジメンに対して特定の頻度で、化合物を投与することを意味する。

【0047】

薬剤は、癌処置への曝露前の任意の時点(曝露の約48時間前、46時間前、44時間前、42時間前、40時間前、38時間前、36時間前、34時間前、32時間前、30時間前、28時間前、26時間前、24時間前、22時間前、20時間前、18時間前、16時間前、14時間前、12時間前、10時間前、8時間前、6時間前、4時間前、3時間前、2時間前、または1時間前が挙げられるが、これらに限定されない)に投与され得る。薬剤は、癌処置への曝露後の任意の時点(曝露の約1時間後、2時間後、3時間後、4時間後、6時間後、8時間後、10時間後、12時間後、14時間後、16時間後、18時間後、20時間後、22時間後、24時間後、26時間後、28時間後、30時間後、32時間後、34時間後、36時間後、38時間後、40時間後、42時間後、44時間後、46時間後、または48時間後が挙げられるが、これらに限定されない)に投与され得る。

【0048】

癌処置は、細胞傷害性薬剤または細胞増殖抑制剤、あるいはその組み合わせの投与を含み得る。細胞傷害性薬剤は、(1)DNAを複製する細胞の能力を妨げること、ならびに(2)癌細胞において細胞死および/またはアポトーシスを誘導することによって、癌細胞が増殖するのを防ぐ。細胞増殖抑制剤は、細胞増殖を調節する細胞のシグナル伝達のプロセスを調節するか、妨げるか、または阻害することによって、そして時には低い連続的レベルで作用する。

【0049】

細胞傷害性薬剤として用いられ得る化合物のクラスとしては、以下が挙げられる：アルキル化薬(ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン誘導体、スルホン酸アルキル、ニトロソ尿素およびトリアゼンが挙げられるが、これらに限定されない)；ウラシルマスタード、クロルメチン、シクロホスファミド(Cytosan(登録商標))、イホスファミド、メルファラン、クロラムブチル、ピポプロマン、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスホルアミン、プスルファン、カルマスティン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジン、およびテモゾロマイド；代謝拮抗剤(葉酸拮抗薬、ピリミジンアナロ

10

20

30

40

50

グ、プリンアナログおよびアデノシンデアミナーゼインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない)：メトトレキサート、5-フルオロウラシル、フロクスウリジン、シタラビン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、リン酸フルダラビン、ペントスタチン、およびゲムシタピン；天然物およびそれらの誘導体(例えば、ピンカアルカロイド、抗腫瘍抗生物質、酵素、リンホカインおよびエピポドフィロトキシン)：ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、プレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、アドリアマイシン、エピルピシン、イダルピシン、シトシンアラビノシド、パクリタキセル(パクリタキセルは、Taxol(登録商標)として市販されている)、ミトラマイシン、デオキシコホルマイシン、マイトマイシン-c、L-アスパラギナーゼ、インターフェロン(好ましくは、INF-)、エトポシド、およびテニポシド。

10

【0050】

他の増殖性細胞傷害性薬剤は、ナベルベン、CPT-11、アナストラゾール、レトラゾール、カペシタピン、レロキサフィン、シクロホスファミド、イホスファミド、およびドロキサフィンである。

【0051】

微小管に作用する薬剤は、細胞の有糸分裂を妨げ、その細胞毒性活性について当該分野で周知である。本発明において有用である微小管に作用する薬剤としては、アロコルヒチン(NSC406042)、ハリコンドリンB(NSC609395)、コルヒチン(NSC757)、コルヒチン誘導体(例えば、NSC33410)、ドラスタチン10(NSC376128)、マイタンシン(NSC153858)、リゾキシニン(NSC332598)、パクリタキセル(Taxol(登録商標)、NSC125973)、Taxol(登録商標)誘導体(例えば、誘導体(例えば、NSC608832)、チオコルヒチンNSC361792)、トリチルシステイン(NSC83265)、硫酸ピンブラスチン(NSC49842)、硫酸ピンクリスチン(NSC67574)、天然および合成のエポチロン(エポチロンA、エポチロンB、およびジスコデルモリドが挙げられるが、これらに限定されない(Service, (1996) Science, 274:2009を参照のこと))エストラムスチン、ノコダゾール、MAP4などが挙げられるが、これらに限定されない。このような薬剤の例はまた、Bulinski(1997) J. Cell Sci. 110:3055-3064; Panda(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10560-10564; Muhlradt(1997) Cancer Res. 57:3344-3346; Nicolaou(1997) Nature 387:268-272; Vasquez(1997) Mol. Biol. Cell. 8:973-985; and Panda(1996) J. Biol. Chem. 271:29807-29812においても記載される。

20

30

【0052】

以下のような細胞傷害性薬剤もまた適切である：エピドフィロトキシン；抗腫瘍性酵素；トポイソメラーゼインヒビター；プロカルバジン；ミトキサントロン；シスプラチンおよびカルボプラチンのようなプラチナ配位化合物；生物応答調節剤；成長抑制物質；抗ホルモン治療薬；ロイコポリン；テガフル；および造血成長因子。

【0053】

使用され得る細胞増殖抑制剤としては、ホルモンおよびステロイド(合成アナログを含む)：17-エチルエストラジオール、ジエチルスチルベストロール、テストステロン、プレドニゾン、フルオキシメステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、テストラクトン、酢酸メゲストロール、メチルプレドニソロン、メチルテストステロン、プレドニゾロン、トリアムシノロン、クロロトリアニセン、ヒドロキシプロゲステロン、アミノグルテチミド、エストラムスチン、酢酸メドロキシプロゲステロン、ロイプロリド、フルタミド、トレミフェン、ゾラデックスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0054】

他の細胞増殖抑制剤は、マトリックスメタロプロテイナーゼインヒビターのような抗血管形成物質であり、そして他のVEGFインヒビター(例えば、抗VEGF抗体ならびに

40

50

Z D 6 4 7 4 および S U 6 6 6 8 のような小分子) も含まれる。Gene tech からの抗 Her 2 抗体も利用され得る。適切な E G F R インヒビターは、E K B - 5 6 9 (不可逆インヒビター) である。E G F R に免疫特異的な I m c l o n e 抗体 C 2 2 5、および s r c インヒビターもまた含まれる。

【 0 0 5 5 】

アンドロゲン依存性の癌腫を非増殖性にするカソデックス (登録商標) (ビカルタミド、A s t r a Z e n e c a) もまた、細胞増殖抑制剤として使用するのに適している。細胞増殖抑制剤のなお別の例は、エストロゲン依存性の乳癌の増殖または成長を阻害する、抗エストロゲンのタモキシフェン (登録商標) である。細胞増殖性シグナルの伝達のインヒビターは、細胞増殖抑制剤である。代表的な例としては、上皮細胞増殖因子インヒビター、Her - 2 インヒビター、M E K - 1 キナーゼインヒビター、M A P K キナーゼインヒビター、P I 3 インヒビター、S r c キナーゼインヒビター、および P D G F インヒビターが挙げられる。

10

【 0 0 5 6 】

種々の癌 (以下が挙げられるが、これらに限定されない) は、本発明に従って処置され得る: 膀胱癌 (促進的な転移性の膀胱癌を含む)、乳癌、大腸癌 (結腸直腸癌を含む)、腎臓癌、肝臓癌、肺癌 (小細胞および非小細胞肺癌ならびに肺腺癌を含む)、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、尿生殖路の癌、リンパ系の癌、直腸癌、喉頭癌、膵臓癌 (膵外分泌腺癌を含む)、食道癌、胃癌、胆嚢癌、子宮頸癌、甲状腺癌、および皮膚癌 (扁平上皮癌を含む) を含む癌; 白血病、急性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、B 細胞リンパ腫、T 細胞性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ヘアリー細胞性リンパ腫、細網肉腫、およびパーキットリンパ腫を含む、リンパ系統の造血腫瘍; 急性および慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、骨髄性白血病、および前骨髄性白血病を含む、骨髄性系列の造血腫瘍; 星状細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、および神経鞘腫を含む、中枢神経系および末梢神経系の腫瘍; 繊維肉腫、横紋筋肉腫、および骨肉腫を含む、間葉起源の腫瘍; ならびに黒色腫、色素性乾皮症、角化棘細胞腫、精上皮腫、甲状腺濾胞状癌、および奇形癌を含む他の腫瘍。好ましい実施形態において、本発明は、胃腸管の癌を処置するために用いられる。

20

【 0 0 5 7 】

(b . 癌処置による副作用の処置)

30

本発明はまた、構成的に活性な N F - B 癌の処置に起因して正常組織に損傷を受けている哺乳動物を処置する方法に関し、この方法は、N F - B 活性を誘導する治療有効量の薬剤を含む組成物を哺乳動物に投与する工程を包含する。N F - B 活性を誘導する薬剤は、上記の癌処置と組み合わせて投与され得る。

【 0 0 5 8 】

(c . 細胞の老化の調節)

本発明はまた、哺乳動物における細胞の老化を調節する方法に関し、この方法は、N F - B 活性を誘導する治療有効量の薬剤を哺乳動物に投与する工程を包含する。N F - B 活性を誘導する薬剤は、他の処置と組み合わせて投与され得る。

【 0 0 5 9 】

40

薬剤は、他の処置の施与前の任意の時点 (施与の約 4 8 時間前、4 6 時間前、4 4 時間前、4 2 時間前、4 0 時間前、3 8 時間前、3 6 時間前、3 4 時間前、3 2 時間前、3 0 時間前、2 8 時間前、2 6 時間前、2 4 時間前、2 2 時間前、2 0 時間前、1 8 時間前、1 6 時間前、1 4 時間前、1 2 時間前、1 0 時間前、8 時間前、6 時間前、4 時間前、3 時間前、2 時間前、または 1 時間前が挙げられるが、これらに限定されない) に投与され得る。薬剤は、他の処置の施与後の任意の時点 (施与の約 1 時間後、2 時間後、3 時間後、4 時間後、6 時間後、8 時間後、1 0 時間後、1 2 時間後、1 4 時間後、1 6 時間後、1 8 時間後、2 0 時間後、2 2 時間後、2 4 時間後、2 6 時間後、2 8 時間後、3 0 時間後、3 2 時間後、3 4 時間後、3 6 時間後、3 8 時間後、4 0 時間後、4 2 時間後、4 4 時間後、4 6 時間後、または 4 8 時間後が挙げられるが、これらに限定されない) に投与

50

され得る。

【0060】

(d. ストレスの処置)

本発明はまた、ストレスに起因して正常組織に損傷を受けている哺乳動物を処置する方法に関し、この方法は、NF - B活性を誘導する治療有効量の薬剤を含む組成物を哺乳動物に投与する工程を包含する。NF - B活性を誘導する薬剤は、他の処置と組み合わせて投与され得る。ストレスは、任意の原因(放射線、創傷、中毒、感染、および温度ショックが挙げられるが、これらに限定されない)に起因し得る。

【0061】

NF - Bの誘導因子を含む組成物は、ストレスへの曝露前の任意の時点(曝露の約48時間前、46時間前、44時間前、42時間前、40時間前、38時間前、36時間前、34時間前、32時間前、30時間前、28時間前、26時間前、24時間前、22時間前、20時間前、18時間前、16時間前、14時間前、12時間前、10時間前、8時間前、6時間前、4時間前、3時間前、2時間前、または1時間前が挙げられるが、これらに限定されない)に投与され得る。NF - Bの誘導因子を含む組成物は、ストレスへの曝露後の任意の時点(曝露の約1時間後、2時間後、3時間後、4時間後、6時間後、8時間後、10時間後、12時間後、14時間後、16時間後、18時間後、20時間後、22時間後、24時間後、26時間後、28時間後、30時間後、32時間後、34時間後、36時間後、38時間後、40時間後、42時間後、44時間後、46時間後、または48時間後が挙げられるが、これらに限定されない)に投与され得る。

【0062】

(e. 放射線)

本発明はまた、放射線への曝露の影響からの細胞の保護に関する。電離放射線による正常細胞の損傷および死は、被曝細胞に対する直接放射線誘導性の損傷と、放射線誘導性のストレスに対して活性な遺伝的にプログラムされた細胞反応(自殺死またはアポトーシスを生じる)との組み合わせである。アポトーシスは、いくつかの放射線感受性の器官(すなわち、造血系および免疫系、消化管の上皮など)において生じる大量の細胞消失に重要な役割を果たし、その不全は、生物体の全体的な放射線感受性を決定する。

【0063】

電離放射線(IR)への曝露は、短期であっても長期であってもよく、単回線量としてまたは複数回線量として、全身にまたは局所的に適用され得る。従って、原発事故または軍事攻撃は、単回高線量の全身照射(時には、放射性同位元素での長期中毒が続く)への曝露を含み得る。被移植体の血液前駆体を造血器官から「取り除く」ことによって、ドナーの骨髄のために造血器官を準備する必要がある場合、骨髄移植のための患者の前処置について同じことが言える(適用される線量を厳密に制御して)。癌処置は、全身照射として適用された場合、致死線量を大幅に超える局所照射の複数回線量を含み得る。放射性同位元素での中毒または処置は、標的器官(例えば、 ^{125}I の吸入の場合、甲状腺)の放射線に対する長期の局所被曝を生じる。最終的に、生物学的作用の重症度が著しく異なる電離放射線の多くの物理的形態が存在する。

【0064】

分子および細胞レベルでは、放射線粒子は、DNA、タンパク質、細胞膜および他の巨大分子構造中に切断および架橋を生じ得る。電離放射線はまた、フリーラジカルおよび活性酸素種(ROS)を生じさせることによって、細胞成分に二次損傷を誘導する。複数の修復系(例えば、DNAの完全性および忠実度を回復するいくつかのDNA修復経路、ならびにフリーラジカルおよびROSを除去し、酸化されたタンパク質および脂質を減少させる抗酸化作用のある化学物質および酵素)が、この損傷の影響を弱める。細胞のチェックポイント系は、DNA欠損を検出し、そして損傷が修復されるかまたは成長停止もしくはプログラム細胞死(アポトーシス)に細胞を委ねるとの結論に達するまで、細胞周期進行を遅延させる。

【0065】

10

20

30

40

50

放射線は、低線量の軽度な変異原性および発癌性作用から、高線量によってほとんど瞬時に死滅させるまでの範囲で、哺乳動物生物体に損傷を与え得る。生物体の全体的な放射線感受性は、細胞代謝回転速度の高い細網内皮系、生殖器系および異なる上皮を含むいくつかの感受性の組織において発生する病理学的変化によって決定される。

【 0 0 6 6 】

死に至る 線照射の急性の病理学的結果は、異なる線量について異なり、各々の特定の線量に対する生物体の感受性の閾値を規定する特定の器官の機能不全によって決定される。従って、比較的低い線量での致死性は骨髄形成不全から生じ、一方、中程度の線量は胃腸（G I）症候群を誘導することによってより速く死滅させる。非常に高い放射線照射量は、ニューロンの変性を誘発するほとんど瞬時の死を引き起こし得る。

10

【 0 0 6 7 】

放射線の急性毒性の期間を生存する生物体は、曝露された器官（例えば、腎臓、肝臓または肺）において照射の数ヶ月後および数年後に発症する放射線誘導性の発癌および線症を含む長期の間接的な影響を受け得る。

【 0 0 6 8 】

細胞内DNAは、直接および間接的な（フリーラジカルベースの）機構によって、種々の型のDNA損傷（遺伝毒性ストレス）を引き起こすIRの主要な標的である。全ての生物体は、放射線の損傷を受けたDNAを有効に回復し得るDNA修復系を維持し；DNA修復プロセスにおけるエラーは、変異を引き起こし得る。

【 0 0 6 9 】

腫瘍は、一般に 放射線に対してより感受性であり、正常組織に対して比較的低い損傷をもたらす複数の局所的線量で処置され得る。それにもかかわらず、いくつかの場合において、正常組織の損傷は、癌処置のための 放射線の適用における限定要因である。従来3次元等角のまたはさらにより集中的なBeam C a t h送達による癌治療の間の 線照射の使用はまた、照射の蓄積作用によって引き起こされ、骨髄および胃腸（G I）管のような急速に再生する正常組織の幹細胞の損傷を誘導する、線量限定毒性も有する。

20

【 0 0 7 0 】

高線量では、放射線誘導性の致死は、いわゆる造血および胃腸の放射線症候群に関連する。造血症候群は、血液およびリンパ系の再生を不可能にする、造血細胞およびそれらの前駆体の損失を特徴とする。通常、感染（免疫抑制の結果）、出血および/または貧血の結果として死に至る。G I症候群は、腸管上皮における（おもに、小腸における）大量の細胞死によって引き起こされ、その後、腸壁の崩壊ならびに菌血症および敗血症による死が続く。造血症候群は通常、比較的low線量の放射線によって優勢であり、そしてG I症候群よりも遅れて死に至る。

30

【 0 0 7 1 】

従来、放射線防護剤は、代表的には抗酸化剤（合成および天然の両方）であった。より最近に、サイトカインおよび成長因子が、放射線防護剤のリストに加えられた；これらの放射線防護の機構は、感受性の組織の再生への影響を促進する結果であると考えられている。しかしながら、いくつかのサイトカインは、マンガンスーパーオキシドジスムターゼ（M n S O D）およびメタロチオネインのような、細胞の抗酸化タンパク質の発現を誘導するので、放射線防護剤の両方の群間に明瞭な機能的差異はない。

40

【 0 0 7 2 】

特定の薬剤のための保護の測定は、線量変更係数（D M FまたはD R F）によって示される。D M Fは、放射線防護剤で処置された被験体および未処置のコントロール被験体を、ある範囲の放射線量で照射し、次いで、生存またはいくつかの他のエンドポイントを比較することによって決定される。D M Fは、通常30日間の生存について計算され（L D 5 0 / 3 0薬物処置をL D 5 0 / 3 0ピヒクル処置で除算）、細網内皮系の保護を数量化する。胃腸系保護を評価するために、L D 5 0およびD M Fが6日間または7日間の生存について計算される。本明細書中に提供されるD M F値は、他に指示がない限り30日間である。

50

【 0 0 7 3 】

N F - B の誘導因子は、細胞レベルでおよび生物体全体として、強い生存促進活性を有する。致死線量を超える放射線に反応して、N F - B の誘導因子は、急性の放射線被曝による主要な死因である胃腸症候群および造血症候群の両方を阻害する。これらの特性の結果として、N F - B の誘導因子は、自然放射線事象および原発事故の影響を処置するために用いられ得る。さらに、N F - B の誘導因子は、すべての現在公知の放射線防護剤とは異なる機構で作用するので、N F - B の誘導因子は、他の放射線防護剤と組み合わせて用いられ得、それによって、電離放射線からの保護の規模を劇的に増大させ得る。

【 0 0 7 4 】

従来の放射線防護剤（例えば、フリーラジカルのスカベンジャー）とは対照的に、抗アポトーシス剤は、放射線媒介性の一次損傷を減少しなくてもよいが、一次損傷に対する活性細胞反応に関する二次事象に対して（従って、既存の防御線を補完して）作用してもよい。p 5 3（哺乳動物細胞における放射線反応の重要な媒介物質）の薬理的インヒビターであるピフィスリン - は、この新しいクラスの放射線防護剤の例である。しかしながら、p 5 3 インヒビターの活性は、細網内皮系の保護に限定され、消化管（胃腸症候群）における防護効果を有さず、従って、これらの化合物の治療的価値が減少する。より広範囲の活性を有する抗アポトーシスの医薬品が、切実に必要とされる。

【 0 0 7 5 】

N F - B の誘導因子を放射線防護剤として用いて、現在利用可能な手段（遮蔽および既存の生体保護剤の適用）によって達成可能なレベルを超えて人体の放射線抵抗性を増大させることによって、耐放射線量の程度を拡大し得、そして機内での核事故または大規模な太陽粒子線事象の場合に、乗組員生存の機会を大幅に増加させ得る。N F - B 誘導因子であるフラジェリンは、1 . 5 を越える概算の DMF（30 日間の生存）によって、現在報告されているいかなる天然化合物よりも有効である。

【 0 0 7 6 】

N F - B の誘導因子はまた、例えば中枢神経系および生殖器において、低線量照射によって引き起こされる取り替えがきかない細胞の消失を処置するのにも有用である。N F - B の誘導因子はまた、脱毛を含む、化学療法に関連する副作用を処置するために、癌化学療法の間にも用いられ得る。

【 0 0 7 7 】

1 つの実施形態において、哺乳動物は、N F - B の誘導因子を含む治療有効量の組成物を含む組成物を哺乳動物に投与する工程を包含する、放射線への曝露に対する処置を受ける。N F - B の誘導因子を含む組成物は、1 つ以上の放射線防護剤と組み合わせて投与され得る。1 つ以上の放射線防護剤は、放射線被曝の影響を処置する任意の薬剤（抗酸化剤、フリーラジカルスカベンジャーおよびサイトカインが挙げられるが、これらに限定されない）であり得る。

【 0 0 7 8 】

N F - B の誘導因子は、DNA および他の細胞構造における損傷に反応して、放射線誘導性のプログラム細胞死を阻害し得る；しかしながら、N F - B の誘導因子は、細胞での損傷に対処しなくてもよく、また変異を阻止しなくてもよい。フリーラジカルおよび活性酸素種（ROS）は、変異および他の細胞内の損傷の主要な原因である。抗酸化剤およびフリーラジカルスカベンジャーは、フリーラジカルによる損傷の予防に有効である。N F - B の誘導因子および抗酸化剤またはフリーラジカルスカベンジャーの組み合わせにより、放射線に被曝した哺乳動物に、あまり広範でない損傷、より高い生存、および健康の改善をもたらされ得る。本発明の実施において用いられ得る抗酸化剤およびフリーラジカルスカベンジャーとしては、シスチン、システアミン、グルタチオンおよびピリルピンのようなチオール類；アミホスチン（WR - 2721）；ビタミン A；ビタミン C；ビタミン E；ならびにインディアンホーリーバジル（カミメボウキ）、オリエンチンおよびバイセニンのようなフラボノイドが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0079】

NF - Bの誘導因子はまた、放射線感受性の幹細胞集団を補充および/または保護することによって放射線防護を付与するいくつかのサイトカインおよび成長因子と組み合わせて投与され得る。最小の副作用での放射線防護は、幹細胞因子(SCF、c-kitリガンド)、Flt-3リガンド、およびインターロイキン-1フラグメントであるIL-1b-rdの使用によって達成され得る。防護は、幹細胞の増殖の誘導(すべての上記サイトカイン)、および幹細胞のアポトーシスの予防(SCF)によって達成され得る。処置により、照射の前に白血球およびその前駆体の集積が可能になり、従って、照射後の免疫系のより迅速な再構成が可能になる。SCFは、1.3~1.35の範囲のDMFで、致死的に照射されたマウスを効率的に救済し、胃腸症候群に対しても有効である。Flt-3リガンドはまた、マウス(70~80%のLD100/30での30日間の生存、DMF>1.2に相当)およびウサギにおいて強力な保護を提供する(15、16)。

10

【0080】

いくつかの因子は、本来サイトカインではないが、免疫細胞の増殖を刺激し、NF - Bの誘導因子と組み合わせて用いられ得る。5 - AED(5 - アンドロステジオール)は、サイトカインの発現を刺激し、そして細菌およびウイルス感染に対する耐性を増加させるステロイドである。照射の24時間前にマウスに5 - AEDを皮下注射することにより、DMF = 1.26で生存が改善された。トリクロロ(ジオキソエチレン - O, O' -)テルル酸アンモニウム(AS - 101)のような合成物もまた、多数のサイトカインの分泌を誘導するために、かつNF - Bの誘導因子との組み合わせのために用いられ得る。

20

【0081】

成長因子およびサイトカインはまた、胃腸症候群に対する保護を提供するために用いられ得る。ケラチノサイト成長因子(KGF)は、腸粘膜における増殖および分化を促進し、そして腸陰窩における照射後の細胞生存を増加させる。造血性サイトカインおよび放射線防護剤SCFはまた、腸幹細胞の生存および関連する短期の生物体生存を増加させ得る。

【0082】

NF - Bの誘導因子は、胃腸(GI)症候群および造血症候群の両方に対する保護を提供し得る。15 Gyの全身の致死線量照射に被曝したマウスは、大部分がGI症候群で死亡したので、NF - Bの誘導因子およびGI症候群の1つ以上のインヒビターを含む組成物は、より有効であり得る。本発明の実施において用いられ得るGI症候群のインヒビターとしては、SCFおよびKGFのようなサイトカインが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0083】

NF - Bの誘導因子を含む組成物は、放射線への曝露前の任意の時点(曝露の約48時間前、46時間前、44時間前、42時間前、40時間前、38時間前、36時間前、34時間前、32時間前、30時間前、28時間前、26時間前、24時間前、22時間前、20時間前、18時間前、16時間前、14時間前、12時間前、10時間前、8時間前、6時間前、4時間前、3時間前、2時間前、または1時間前が挙げられるが、これらに限定されない)に投与され得る。NF - Bの誘導因子を含む組成物は、放射線への曝露後の任意の時点(放射線への曝露の約1時間後、2時間後、3時間後、4時間後、6時間後、8時間後、10時間後、12時間後、14時間後、16時間後、18時間後、20時間後、22時間後、24時間後、26時間後、28時間後、30時間後、32時間後、34時間後、36時間後、38時間後、40時間後、42時間後、44時間後、46時間後、または48時間後が挙げられるが、これらに限定されない)に投与され得る。

40

【0084】

(3. 薬剤)

本発明はまた、NF - B活性を誘導する薬剤に関する。薬剤は、人工的に合成された化合物であっても、天然に存在する化合物であってもよい。薬剤は、低分子量化合物、ポ

50

リペプチドまたはペプチド、あるいはそのフラグメント、アナログ、ホモログ、改変体または誘導体であってもよい。

【0085】

薬剤はまた、NF- κ Bを誘導するサイトカイン（IL2、IL6、TNFおよびTGFを含むが、これらに限定されない）であり得る。薬剤はまた、プロスタグランジンであり得る。薬剤はまた、成長因子（KGFおよびPDGFが挙げられるが、これらに限定されない）であり得る。薬剤はまた、NF- κ B活性を誘導する抗体であり得る。

【0086】

（a.フラジェリン）

1つの実施形態において、薬剤はフラジェリンであり、これは、細菌（*S. typhimurium*のような*Salmonella*の種が挙げられるが、これらに限定されない）由来であり得る。下記の実施例において示されるように、フラジェリンは、細胞レベルおよび生物体全体として強力な生存促進活性を有する。

【0087】

有益な特性を有するNF- κ Bの誘導因子（例えば、フラジェリン）のフラグメント、改変体、アナログ、ホモログ、または誘導体は、フラジェリンのドメイン構造に基づいた合理性に基づく設計によって得られ得る。*Salmonella*フラジェリンのドメイン構造は、文献に記載される（図19）。フラジェリンは、N末端およびC末端に保存ドメイン（D1およびD2）を有し、かつ中央の超可変ドメイン（D3）を有する（Samatey et al, 2001、Eaves-Pyles et al, 2001a）。*Escherichia coli*ヒンジ（ND1-2/ECH/CD2）によって分離されるアミノD1およびD2ならびにカルボキシルD1およびD2を含む組換えタンパク質での結果は、D1およびD2が、ECHエレメントに連結された場合に生物活性であることを示す。このキメラ（ヒンジ単独ではない）は、2つの腸上皮細胞株においてIBの分解、NF- κ Bの活性化、ならびにNOおよびIL-8の産生を誘導した。保存されていないD3ドメインは、鞭毛フィラメントの表面上に存在し、主要な抗原性エピトープを含む。フラジェリンの強力な炎症誘発性の活性は、高度に保存されたN末端およびC末端のD1およびD2領域に存在し得る。

【0088】

（b.NF- κ Bの寄生誘導因子）

フラジェリンの特性は、NF- κ Bのさらなるモジュレーターが寄生体中に見出され得ることを示唆している。アポトーシスの抑制に依存する多くの寄生体が存在する。なぜなら、これらの寄生体は、宿主の細胞がなければ生存できないためである。これらの生物体は、抗アポトーシス因子を分泌することにより、宿主生物において有効に存続するために適応してきた可能性がある。進行腫瘍と同様に、これらの因子を分泌する生物体は、自らの生存を増大させること、および宿主のストレス応答防御機構との衝突を解決することが可能であり得る。

【0089】

寄生生物体または共生生物体由来の抗アポトーシス因子は、何百万年という適応を経て、生存度に影響を及ぼす宿主生物体への悪影響を最小限にする。結果として、これらの因子は、さらなる改変の必要性がたとえあるにしても、ほとんどなく、そのままの状態で直接用いられても、最小限に改変して用いられてもよい。これらの因子は、化学療法および放射線療法に関連する副作用のような、ストレス媒介性のアポトーシスを処置するのに有用であり得る。

【0090】

本発明はまた、NF- κ Bのモジュレーターを同定するために寄生体をスクリーニングする方法に関する。候補モジュレーターは、ヒトまたは非ヒト霊長動物の寄生体由来であり得る。寄生体は、好ましくは宿主の細胞外寄生体である。寄生体はまた、共生体であり得る。本発明のモジュレーターが単離され得る寄生体としては、*Mycoplasma*、*Chlamydia*および*Salmonella*が挙げられるが、これらに限定されない

10

20

30

40

50

。これらのモジュレーターは、本明細書中に記載されるスクリーニング方法を用いて、ならびに生化学的および遺伝的選択アプローチによって、インビトロ試験で、細胞死保護剤で、およびインビボで、同定され得る。

【 0 0 9 1 】

(4 . 組成物)

本発明はまた、治療有効量の NF - B の誘導因子を含む組成物に関する。組成物は、当該分野で周知の方法を用いて生成され得る、薬学的組成物であり得る。上記のように、NF - B の誘導因子を含む組成物は、アポトーシスに関連する状態（放射線への曝露、癌処置からの副作用、ストレスおよび細胞老化が挙げられるが、これらに限定されない）の処置のために哺乳動物に投与され得る。組成物はまた、放射線防護剤または化学療法薬が挙げられるがこれらに限定されない、さらなる薬剤を含み得る。

10

【 0 0 9 2 】

(a . 投与)

本発明の組成物は、経口的に、非経口的に、舌下に、経皮に、直腸に、口腔粘膜に、局所的に、吸入によって、口腔投与によって、またはこれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない、任意の様式で投与され得る。非経口投与としては、静脈内、動脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、髄腔内、および関節内が挙げられるが、これらに限定されない。獣医学の使用については、組成物は、通常の獣医学の実施に従って適切に受容可能な処方物として投与され得る。獣医師は、特定の動物に最も適切な、投薬レジメンおよび投与経路を容易に決定し得る。

20

【 0 0 9 3 】

(b . 処方物)

本発明の組成物は、従来の様式で処方された錠剤またはロゼンジの形態であり得る。例えば、経口投与のための錠剤およびカプセル剤は、結合剤、フィラー、潤滑剤、崩壊剤および湿潤剤が挙げられるがこれらに限定されない、従来賦形剤を含み得る。結合剤としては、シロップ、アラビアゴム、ゼラチン、ソルビトール、トラガカントゴム、デンプンの粘質物およびポリビニルピロリドンが挙げられるが、これらに限定されない。フィラーとしては、ラクトース、糖、微結晶性セルロース、トウモロコシデンプン、リン酸カルシウム、およびソルビトールが挙げられるが、これらに限定されない。潤滑剤としては、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、滑石、ポリエチレングリコール、およびシリカが挙げられるが、これらに限定されない。崩壊剤としては、ジャガイモデンプンおよびデンプングリコール酸ナトリウムが挙げられるが、これらに限定されない。湿潤剤としては、ラウリル硫酸ナトリウムが挙げられるが、これに限定されない。錠剤は、当該分野で周知の方法に従ってコーティングされ得る。

30

【 0 0 9 4 】

本発明の組成物はまた、水性または油性の懸濁液、液剤、乳剤、シロップ剤、およびエリキシル剤が挙げられるが、これらに限定されない液体処方物であり得る。組成物はまた、使用前に水または他の適切なビヒクルで構成するための乾燥生成物として処方され得る。このような液体調製物は、懸濁剤、乳化剤、非水系ビヒクルおよび防腐剤が挙げられるが、これらに限定されない添加物を含み得る。懸濁剤としては、ソルビトールシロップ、メチルセルロース、グルコース / 糖シロップ、ゼラチン、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ステアリン酸アルミニウムゲル、および硬化食用脂が挙げられるが、これらに限定されない。乳化剤としては、レシチン、ソルビタンモノオレエート、およびアラビアゴムが挙げられるが、これらに限定されない。非水系ビヒクルとしては、食用油、扁桃油、ヤシ油、油性エステル、プロピレングリコール、およびエチルアルコールが挙げられるが、これらに限定されない。防腐剤としては、p - オキシ安息香酸メチルまたはプロピルおよびソルビン酸が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【 0 0 9 5 】

本発明の組成物はまた、坐剤として処方され得、これは、坐剤基剤（カカオバターまたはグリセリドが挙げられるが、これらに限定されない）を含み得る。本発明の組成物はま

50

た、吸入用に処方され得、これは、乾燥粉末として投与され得る形態（溶液、懸濁液、または乳剤が挙げられるが、これらに限定されない）かまたは噴霧剤（例えば、ジクロロジフルオロメタンもしくはトリクロロフルオロメタン）を用いたエアロゾルの形態であり得る。本発明の組成物はまた、クリーム、軟膏剤、ローション剤、ペースト、薬用硬膏剤、パッチ、または膜が挙げられるがこれらに限定されない、水性または非水系ビヒクルを含む、経皮処方物を処方され得る。

【0096】

本発明の組成物はまた、非経口投与（注射または連続注入による投与が挙げられるが、これらに限定されない）のために処方され得る。注射のための処方物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液、または乳濁液の形態であり得、かつ、処方剤（懸濁剤、安定剤、および分散剤が挙げられるがこれらに限定されない）を含み得る。組成物はまた、適切なビヒクル（滅菌した、発熱物質を含まない水が挙げられるが、これに限定されない）での再構成のための粉末形態で提供され得る。

10

【0097】

本発明の組成物はまた、デポ製剤としても処方され得、これは移植によってかまたは筋肉内注射によって投与され得る。これらの組成物は、適切なポリマー材料または疎水性材料とともに（例えば、受容可能な油中の乳剤として）、イオン交換樹脂とともに、あるいは難溶性誘導体として（例えば、難溶性塩として）処方され得る。

【0098】

（c. 投薬）

治療で使用するのに必要な薬剤の治療有効量は、処置される状態の性質、NF - B活性の誘導が所望される期間、ならびに患者の年齢および状態に応じて変化し、そして主治医によって最終的に決定される。しかしながら、一般に、成人のヒトの処置に使用される用量は、代表的には1日当たり0.001mg/kg ~ 約200mg/kgの範囲である。用量は、1日当たり約1μg/kg ~ 約100μg/kgであり得る。所望の用量は、単回投与で、または適切な間隔で投与される複数回投与として（例えば、1日当たり2回、3回または4回以上の小用量に分けて）、都合良く投与され得る。複数回投与は、しばしば所望されるか、または必要である。なぜなら、正常細胞におけるNF - B活性は、一旦薬剤が投与されなくなると、減少し得るからである。

20

【0099】

NF - Bの誘導因子の投薬量としては、約1μg/kg、25μg/kg、50μg/kg、75μg/kg、100μg/kg、125μg/kg、150μg/kg、175μg/kg、200μg/kg、225μg/kg、250μg/kg、275μg/kg、300μg/kg、325μg/kg、350μg/kg、375μg/kg、400μg/kg、425μg/kg、450μg/kg、475μg/kg、500μg/kg、525μg/kg、550μg/kg、575μg/kg、600μg/kg、625μg/kg、650μg/kg、675μg/kg、700μg/kg、725μg/kg、750μg/kg、775μg/kg、800μg/kg、825μg/kg、850μg/kg、875μg/kg、900μg/kg、925μg/kg、950μg/kg、975μg/kgまたは1mg/kgが挙げられるがこれらに限定されない、任意の投薬量であり得る。

30

40

【0100】

（5. スクリーニング方法）

本発明はまた、NF - B活性を誘導する因子を同定する方法に関する。NF - B活性を誘導する因子は、疑わしいNF - B活性の誘導因子をNF - Bで活性化される発現系に添加する工程、このNF - Bで活性化した発現のレベルをコントロールと比較する工程を包含する方法によって同定され得、これにより、NF - B活性の誘導因子は、NF - Bで活性化される発現系のレベルを増加させる能力によって確認される。

【0101】

候補因子は、ライブラリー（すなわち、化合物の収集物）内に存在し得る。このような

50

因子は、例えば、発現ライブラリー内のDNA分子によってコードされ得る。候補因子は、馴化培地または細胞抽出物中に存在する。他のこのような因子としては、「小分子」として当該分野で公知の化合物が挙げられ、この小分子は、 10^5 ダルトン未満、好ましくは 10^4 ダルトン未満、そしてさらにより好ましくは 10^3 ダルトン未満の分子量を有する。このような候補因子は、複数の所定の化学反応に従って調製される合成因子（例えば、ペプチド）を含む、コンビナトリアルライブラリーのメンバーとして提供され得る。このようなライブラリーの多様な組み合わせが、確立された手順に従って調製され得、そして候補因子のライブラリーのメンバーが、本明細書中に記載されるように同時にまたは連続的にスクリーニングされ得ることが、当業者に理解される。

【0102】

スクリーニング方法は、インピトロアッセイ、細胞ベースのアッセイおよびインピボアッセイを含む種々の型式で実施され得る。任意の細胞が、細胞ベースのアッセイで用いられ得る。好ましくは、本発明での使用のための細胞としては、哺乳動物細胞、より好ましくはヒトおよび非ヒト霊長動物細胞が挙げられる。細胞ベースのスクリーニングは、NF-Bの活性化のための代理マーカーを発現する遺伝子改変された腫瘍細胞を用いて行なわれ得る。このようなマーカーとしては、細菌ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼおよび変異型緑色蛍光タンパク質（EGFP）が挙げられるが、これらに限定されない。代理マーカーの発現量は、当該分野で標準の技術（比色定量、発光定量および蛍光定量が挙げられるが、これらに限定されない）を用いて測定され得る。

【0103】

疑わしいモジュレーターが、例えば混合によって細胞に添加される条件は、アポトーシスまたはシグナル伝達を妨害する他の調節化合物が本質的に存在しない場合に、細胞がアポトーシスまたはシグナル伝達を受け得る条件である。有効な条件としては、細胞増殖を可能にする適切な培地、温度、pHおよび酸素条件が挙げられるが、これらに限定されない。適切な培地は、代表的には、成長因子ならびに同化可能な炭素源、窒素源およびリン酸塩源、ならびに適切な塩、鉱物、金属および他の栄養素（例えば、ビタミン）を含む固体または液体培地であり、かつ細胞がアポトーシスまたはシグナル伝達を示し得るよう培養され得る有効な培地を含む。例えば、哺乳動物細胞について、培地は、10%ウシ胎仔血清を含むダルベッコ改変イーグル培地を含み得る。

【0104】

細胞は、組織培養フラスコ、試験管、マイクロタイター皿、およびペトリ皿が挙げられるがこれらに限定されない、種々の容器中で培養され得る。培養は、細胞に適した温度、pHおよび二酸化炭素含量で行なわれる。このような培養条件はまた、当該分野の技術の範囲内にある。

【0105】

疑わしいモジュレーターを細胞に添加する方法としては、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、細胞発現（すなわち、裸の核酸分子、組換えウイルス、レトロウイルス発現ベクターおよびアデノウイルス発現を含む発現系を用いて）、イオン対形成剤の使用および細胞透過化処理のための界面活性剤の使用が挙げられる。

【0106】

本発明は、以下の非限定的な実施例によって例証される複数の局面を有する。

【実施例】

【0107】

（実施例1）

（P53欠失は、マウスにおけるGI症候群の進行を加速した）

哺乳動物の電離放射線（IR）による死の根本原因は、放射線量に依存する。9~10 Gy以下の線量では、マウスは、おもに致死的な骨髓欠乏性造血（HP）症候群により、12~20日後に死ぬ。この線量では、照射されたマウスは、骨髓移植によって致死から救済され得る。15 Gyを超える線量を受けた動物は、処置後7~12日の間（造血症候群によってこれらの動物が殺傷され得る前）に、損傷と小腸-胃腸（GI）症候群との合

10

20

30

40

50

併症により死ぬ (Gudkov & Komarova 2003)。HP 症候群および GI 症候群の両方の場合において、組織の致死損傷は、大規模な p53 依存性のアポトーシスに起因する (Potten 1992、Merritt 1994、Cui et al 1995、Potten et al 1994)。この観察により、本発明者らは以前に、p53 が放射線誘発性の死の決定要因であり得ることを示唆し得た。一貫して、p53 欠損マウスは、HP 症候群によって死に至らしめる放射線量に対して耐性であり (Westphal et al 1997、Komarov et al 1999)、6~11 Gy の放射線を受ける野生型の動物の死亡率は、小分子 p53 インヒビターであるピフィスリン (PFT) による p53 の一時的な薬理的阻害によって低減され得る (Komarov et al 1999)。遺伝毒性ストレスに対して組織を感作する因子としての p53 の定義は、実験的な化学療法または放射線の結果として生じる脱毛 (脱毛症) の p53 依存性を実証することによってさらに強化された (Botchkarev et al、2000)。従って、以前の観察に基づいて、p53 がより高線量の IR の後の致死性の GI 症候群の発症に重要な役割を果たし続けることが予想され得る。驚くべきことに、p53 欠損は、致死性の胃腸症候群を引き起こす、より高線量の IR に対してマウスを感作する (図 11)。IR の後の p53 欠損上皮の陰窩における継続的な細胞増殖は、損傷を受けた陰窩の細胞の促進的な死および絨毛の急速な破壊と関連する。p53 は、小腸の陰窩に成長停止を誘導し、それによって腸の完全性を維持することによって (図 12)、生存を延長する。従って、p53 のプロアポトーシス機能は造血症候群を促進し、一方、p53 の成長停止機能は胃腸症候群の発症を遅らせる。

10

20

【0108】

小腸における細胞集団の動態は、非常に詳細に分析されている。腸の上皮における細胞増殖は、幹細胞および初期増殖性前駆体が位置する陰窩に限定される。2、3 回の細胞分裂の後、既に分化した陰窩幹細胞の子孫は、絨毛の先端で脱落させられる絨毛を持ち上げる。マウスの小腸において、細胞の全「運行 (trip)」(増殖区画から絨毛の先端へ) は、通常 3~5 日の間かかる (Potten 1992、Potten et al 1997、Booth et al 2002、Somosy et al 2002)。放射線に対する小腸の反応は、病理形態学的レベルで十分に検討されてきたが、一次事象を含む GI 致死の正確な原因は、依然として不明瞭なままである。死は、上皮陰窩細胞の損傷および続いて起こる絨毛の裸出 (結果として、流体および電解質平衡異常、菌血症および内毒素血症を引き起こす) の直接の結果として生じ得る。炎症および間質の応答のほかに、内皮細胞機能不全が、死亡率に寄与する重要な因子であるようである (Potten et al 1997、Somosy et al 2002)。要約すると、IR 誘導性の HP 症候群からの保護方法と同程度に有効であることを示された p53 の薬理的抑制は、GI 症候群に対しては (有害ではないにしても) 役に立たない。従って、別の機構 (例えば、NF- κ B の活性化および引き続く細胞死の阻害) に依存する小腸の上皮の放射線防護への代替アプローチを開発することが必要である。

30

【0109】

(実施例 2)

(Salmonella 感染は NF- κ B を活性化する)

40

Salmonella 感染は、強力な IKK および NF- κ B 活性化ならびに炎症誘発性遺伝子プログラムの活性化を引き起こす (Elewaut et al、1999)。従来の研究から、腸上皮細胞の約 30~40% は、培養腸上皮細胞における代表的な Salmonella 感染の間に感染することが示唆される (Valdivia et al、1996)。本発明者らは、いかにして約 30% の宿主細胞の細菌感染が、TNF 処置の用量のようにほぼ全ての宿主細胞において NF- κ B の活性化に相当する NF- κ B の DNA 結合活性を生じさせ得るかという問題に取り組むことにした。

【0110】

この現象を詳細に試験するために、HT29 細胞を、プラスミド pFM10.1 (これは、Salmonella ssaH プロモーターの制御下で緑色蛍光タンパク質 (GF

50

P) をコードし、一旦細菌が宿主細胞に侵入した場合にのみ機能する (Valdivia et al, 1997) で形質転換した野生型 *S. typhimurium* で、50 の MOI で 1 時間、感染させたかまたは偽感染させた。 *Salmonella* に侵入された細胞は、GFP 発現の直接蛍光顕微鏡観察によって検出した。 p65 (RelA) 局在化を、FITC 結合体化口バ抗ウサギ抗体で検出されるウサギ抗 p65 抗体の間接的な免疫蛍光検査法によってモニターした。 DAPI は核を染色するために用いた。

【0111】

図 1 A において見られるように、GFP 発現は、細胞の約 30 ~ 40 パーセントに生じる。次に本発明者らは、未処理 (偽感染) 細胞、 *Salmonella* 感染細胞または TNF (10 ng/ml) で刺激された細胞における NF- κ B サブユニット p65 (RelA) の局在化を試験した。 P65 (RelA) は未処理の細胞の細胞質に局在化したのに対し、 p65 (RelA) は *Salmonella* 感染細胞または TNF 処理細胞の核に局在化した (図 1 B)。これらの結果から、たとえ少数の細胞のみが感染したとしても、 *Salmonella* 感染は実質的に全ての細胞における NF- κ B を活性化することを示している。

【0112】

(実施例 3)

(フラジェリンは NF- κ B を活性化する)

培養中の腸上皮細胞の *Salmonella* 感染は、およそ 30% の感染しか引き起こさなかったが、ほぼ全ての細胞において NF- κ B の活性化を引き起こしたので、本発明者らは、NF- κ B の活性化が、侵入プロセスによってではなく、細菌構成成分または細菌によって産生される産物の宿主細胞認識に応答したものであると予想した。侵入自体は、以前に考えられていたように (16)、炎症誘発性の遺伝子プログラムの活性化に必要なではないことが実証されている。この可能性を調べるために、未処理かまたは 20 分間煮沸したかのいずれかの滅菌濾過された *S. dublin* 培養液を用いて HT29 腸上皮細胞をチャレンジし、そして NF- κ B の DNA 結合活性を、曝露の 45 分後に調製した全細胞抽出物 (WCE) の電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA) によってモニターした (3, 40)。両方の条件下での培養液に対して NF- κ B の強力な活性化が観察されたことから、活性化因子は熱安定性であることが示された。

【0113】

未変性の滅菌濾過された濃縮培養液を、続いて DNase、RNase、プロテイナーゼ K で処理したか、または 100 kDa のセントリコンフィルター上で粗くサイズ分画した。次いで、多様に処理した培養液を用いて HT29 腸上皮細胞をチャレンジし、45 分後に WCE を調製し、そして NF- κ B の DNA 結合活性を EMSA によって分析した (図 2 A)。示されるように、 *S. typhimurium* 1103 によるかまたは培養液 (上清) への曝露による HT29 細胞の直接感染は、NF- κ B の DNA 結合活性を誘導し、一方、活性誘導因子は、プロテアーゼ消化に感受性であることが見出され、かつ 100 kDa フィルターによって保持された (図 2 A)。NF- κ B 誘導活性の同一性をさらに決定するために、滅菌濾過された濃縮ブロス培養物を、Superose 12 ゲル透過クロマトグラフィー (図 2 B) および陰イオン交換クロマトグラフィー (図 2 C) によって分画した。クロマトグラフィー画分のアリコートを用いて HT29 細胞において NF- κ B を活性化する能力についてアッセイし、そして EMSA によって分析した。クーマシーブルー染色したゲル (図 2 B、上部パネル) から見られるように、NF- κ B の DNA 結合活性の増加 (図 2 B、下方パネルのレーン 4 ~ 6) は、およそ 55 kDa のタンパク質の存在量の増加と一致した。POROS HQ マトリックス上の陰イオン交換クロマトグラフィーおよび図のように漸増する塩勾配を用いる結合タンパク質の溶出 (図 2 C) により、NF- κ B の DNA 結合を誘導する活性が、存在量の増加した 55 kDa タンパク質を含むクロマトグラフィー画分に一致することを示した (図 2 C の上部パネルおよび示さないデータ)。図 2 C において観察された溶出画分を、分取用の 12% SDS-PAGE ゲル上で濃縮して分画し、B1 ~ B6 に相当するバンドをゲルから切り出し、これらのタ

10

20

30

40

50

ンパク質を溶出し、沈殿させ、再生し、そしてHT29細胞を刺激するために使用した。これらの細胞由来の全細胞抽出物を、EMSAによってNF- κ BのDNA結合を誘導する活性についてアッセイし、そして55kDaタンパク質に相当するバンド2(B2)(図2Cの下方パネル)のみがNF- κ BのDNA結合活性を誘発し得、一方、塩勾配の初めまたは終わりからの緩衝液は、NF- κ BのDNA結合活性を活性化できなかった。

【0114】

ゲルのタンパク質バンドB1~B6に相当するタンパク質およびブランク領域を、ペプチド配列決定のためにさらに処理した。B2に相当するタンパク質のトリプシン消化およびエレクトロスプレーイオントラップLC/MSによる分析により、21個のペプチドのアミノ酸配列を同定した。フラジェリン(21個のペプチドによる75パーセントの有効範囲)は、NF- κ BのDNA結合活性の誘導と一致するタンパク質として明白に同定された(図3)。

【0115】

(実施例4)

(フラジェリンは腸上皮細胞においてNF- κ Bを活性化するのに必要とされる)

フラジェリンが実際に、腸上皮細胞を直接細菌感染に曝露した後かまたは病原性*Salmonella*の濾過した培養液に曝露した後にNF- κ Bの活性化の誘発を引き起こした因子であったか否かを決定するために、本発明者らは、無鞭毛の*E. Coli* DH5、病原性*S. dublin* 2229株、同質遺伝子的*S. dublin* 2229 SopE⁻変異体、同質遺伝子的*S. dublin* 2229 SopB⁻変異体、同質遺伝子的*S. dublin* 2229 二重SopE⁻/SopB⁻変異体(SE1SB2株)、*S. typhimurium* 1103株、および同質遺伝子的*S. typhimurium* fliC⁻::Tn10挿入変異体(86株)および*S. typhimurium* 1103同質遺伝子的二重変異体fliC⁻/fliJB⁻から、感染性細菌および煮沸して濾過した培養液を調製した。SopEは、宿主細胞中に注入されて細胞骨格の再構成ならびに結果としてのMAPK経路、SAPK経路およびNF- κ B経路の活性化を惹起する小さなRho GTPase Rac1およびCdc42のための交換因子としてはたらくタンパク質をコードする、病原性*Salmonella*バクテリオファージであり(7、15)、一方、SopBは、イノシトールリン酸ホスファターゼとして機能し、細胞骨格の再構成に関与し、そして宿主細胞の塩素イオン分泌を刺激する、*Salmonella*タンパク質である(44)。細菌および培養液を用いてHT29腸上皮細胞をチャレンジし、WCE抽出物を45分後に調製し、そしてNF- κ BのDNA結合活性についてEMSAによって分析した。*Salmonella*株はNF- κ Bを活性化し得、一方、フラジェリンを産生しない*Salmonella*株(示されるようなfliCおよびfliC⁻/fliJB⁻変異体)はNF- κ Bも活性化しなかった(図4AおよびB)。*E. Coli* DH5は無鞭毛であり、フラジェリンを産生せず、NF- κ Bを活性化しない。本発明者らはまた、*S. dublin*の直接感染が、図4Aにおいて観察されるように、*S. typhimurium*よりも常に高い程度までNF- κ Bを活性化する一方で、両方の種からの培養液が、NF- κ Bをほとんど等しく十分に活性化したことに、多くの実験によって気づいた(図4B)。この違いは、おそらく*S. dublin*が、感染の間に*S. typhimurium*よりも多くのフラジェリンを細胞培養培地へ放出することによると本発明者らは考える。なぜなら、*S. dublin*および*S. typhimurium*の両方からフラジェリンを精製し、そしてクロマトグラフィーで精製した同量のフラジェリンを添加することにより、類似のNF- κ B活性化プロフィールを生じたからである。注目すべきは、単一の第I相フラジェリンfliC⁻::Tn10挿入変異体で観察されたNF- κ Bのごくわずかな活性化(図4AおよびBの最終レーンの隣)(これはおそらく、第II相フラジェリン(fliJB⁻から)の極めて制限された発現による)と比較して、二重フラジェリン遺伝子変異体はNF- κ Bを活性化することが完全に不可能なことであるが、ここで遺伝学的に用いられた*Salmonella*の株は、フラジェリン産生の相をシフトできないかまたはめったにシフトしない。フラジェリンは、腸

10

20

30

40

50

上皮細胞の直接感染の際にNF- κ B経路の活性化に必要であるようなので、フラジェリンはまた、腸上皮細胞の病原性*Salmonella*感染の際に活性化される他の主要な分裂促進的なストレス活性化シグナル伝達経路の主要な決定要因でもあり得る可能性があるようであった。腸上皮細胞の直接*Salmonella*感染は、JNK活性化を生じ(8)、そしてまたIKKによるNF- κ Bの活性化も生じる(3)。

【0116】

(実施例5)

(フラジェリンは、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ、ストレス活性化プロテインキナーゼおよびIKKシグナル伝達経路の活性化を誘発する)

腸上皮細胞は管腔表面の侵入に対する見張りとしてはたらし、そしてIL-8のようなケモカイン遺伝子およびマクロファージ化学誘引剤タンパク質1(MCP1)炎症誘発性サイトカイン遺伝子(例えば、TNF、IL-1およびIL-6)の産生によって、この領域へのエフェクター免疫細胞の誘引を調整する(1、4~6)。これらの遺伝子の発現は、MAPK、SAPKおよびIKKシグナル伝達経路によるシグナルの伝達にตอบสนองして活性化される転写因子の作用に主として依存する。NF- κ Bは、炎症誘発性遺伝子プログラムの中核的なレギュレーター/アクチベーターと考えられるので、本発明者らは、野生型*Salmonella*での腸上皮細胞の感染または精製フラジェリンに対する腸上皮細胞の曝露による腸上皮細胞の感染と比較して、*Salmonella*の非フラジェリン産生変異株がMAPK、SAPKおよびIKKシグナル伝達経路の活性化に及ぼす影響を試験するために決定した。野生型*S. typhimurium*でのHT29細胞の感染は、JNKおよびIKKのそれぞれの基質であるGST-cJun1-79およびGST-IB1-54を用いて、JNKおよびIKKについての免疫プロット(IB)分析または抗体特異的免疫キナーゼアッセイ(KA)における活性化表示リン特異的抗体を用いて決定されるように、MAPK ERK1および2、SAPK p38およびJNKおよびIKKの活性化を生じた(図5)。興味深いことには、MAPK刺激は、45分から活性化の減退が始まるので本来一過性であるが、p38、JNKおよびIKK活性は、1時間にわたって経時的に増加する。図4で見られるように、fliC⁻/fliJB⁻二重変異体*Salmonella*はまた、IKKおよびNF- κ B活性を誘導しなかった(図5に示されるように)。驚くべきことに、fliC⁻/fliJB⁻二重変異体*Salmonella*は、SAPK p38およびJNKを誘導せず、MAPKをわずかに短時間(15分間)活性化した。SopEおよびSopE2のような他の*Salmonella*タンパク質は、小さなGTPアーゼRacおよびCdc42を活性化し得、かつこれらのRhoファミリーのGTPアーゼは、JNKおよびp38の活性化と関連しているが(7、8、14、15)、フラジェリン陰性株では機能しないようなので、この結果は不可解である。

【0117】

fliC⁻/fliJB⁻二重変異体*Salmonella*は、ゲンタマイシン保護/侵入アッセイによって決定されるように、野生型*Salmonella*株と比較してHT29細胞に侵入できなかった。フラジェリンfliC⁻/fliJB⁻二重変異体は、HT29細胞に侵入する能力において4桁の差異を示した。この点をさらに実証するために、本発明者らは、野生型*Salmonella*またはfliC⁻/fliJB⁻二重変異体*Salmonella*(134株)のいずれかでHT29細胞を感染させ、両方の株を、プラスミドpFM10.1(これは、*Salmonella* ssaHプロモーターの制御下でGFPをコードし、一旦細菌が宿主細胞に侵入した場合にのみ機能する(10、36))で形質転換した。野生型*Salmonella*は、HT29細胞を明らかに感染させ得たが(GFP、図5B)、一方、フラジェリン変異細菌は、GFP発現の欠如によって証明されるように(図5B)、HT29細胞に侵入できなかった。フラジェリンは十分であるか否か、または他の細菌的に産生されるタンパク質が侵入に必要であるか否かを決定するために、本発明者らは、精製フラジェリンまたは滅菌濾過された培養液あるいは両方の組み合わせのいずれかを、*Salmonella* fliC⁻/fliJB⁻二重変異体で

10

20

30

40

50

チャレンジしたHT29細胞に添加し、侵入についてアッセイした。腸上皮細胞は、精製フラジェリンおよび/または培養液とfliC⁻/fliJB⁻二重変異株²との試験されたすべての組み合わせを用いても侵入されなかった。SopE、SopE2およびSipAまたは細菌インターナリゼーションの開始に重要な役割を果たす他のSipタンパク質(7、14、15、45、46)のような細菌的に産生されるタンパク質を送達するために、フラジェリン遺伝子とIII型分泌系の有効性との間に直接的な因果関係があるとは考えられない。さらに、腸上皮細胞におけるp65(RelA)の核局在化を刺激するフラジェリンの有効性を評価するために、本発明者らは、精製フラジェリンでHT29細胞をチャレンジし、間接免疫蛍光法を用いてp65(RelA)局在化を試験し、そしてほぼすべての細胞においてp65(RelA)の核局在化を見出した(図5Bに示されるように)。

10

【0118】

示されるような曝露後の種々の時間でWCEを調製し、NF- κ BのDNA結合活性についてEMSAでアッセイした場合、HT29細胞の時間依存性様式でのTNF(10ng/ml)処理について観察された結果(図6A)と同様に、精製フラジェリン(0.5 μ g/ml)は、HT29細胞においてNF- κ Bを強力に活性化した。MAPKおよびp38キナーゼの活性化をモニターするために活性化特異的リン抗体を用いた、これらの同じ抽出物におけるMAPK、SAPKおよびIKKシグナル伝達経路の分析(図6B)、またはJNKおよびIKK活性についての抗体特異的免疫沈降キナーゼアッセイにより、JNKおよびIKK活性は1時間までずっと増加していたが、p38およびMAPK(ERK1および2)活性は30分でピークに達し、1時間までに著しくより低いレベルに低下し始めたことが示された(図6Bに示されるように)。精製フラジェリン曝露に应答する腸上皮細胞におけるMAPK、SAPKおよびIKKのシグナル伝達分子である、ERK1&2、p38、JNKおよびIKKの活性化プロフィールは、野生型Salmonellaに感染した腸上皮細胞における活性化プロフィールと著しく類似していた(図5A)。これらの観察から、本発明者らは、ここで試験したシグナル伝達経路(MAPK、SAPKおよびIKK)の一時的な活性化(Salmonella感染における初期事象を反映する)が、フラジェリンに対する腸上皮細胞の認識および应答によってほとんど排他的に決定されると結論する。

20

【0119】

本発明者らは、有鞭毛のSalmonellaまたは無鞭毛のSalmonella感染に対するフラジェリン単独の影響を区別するために、腸上皮細胞における炎症誘発性サイトカイン遺伝子発現の一時的なパターンに対する精製フラジェリンおよびSalmonellaに存在するフラジェリンの影響をさらに検討することにした。HT29細胞を、未処理のままか、TNF(10ng/ml)で刺激したか、またはフラジェリン(0.5 μ g/ml)で刺激したか、あるいは野生型Salmonella typhimuriumまたはSalmonella fliC⁻/fliJB⁻二重変異体(50のMOIで)で感染させた。処理または感染後の示された時間の後に、HT29細胞を氷冷PBS中に収集し、細胞ペレットをトリゾール中に溶解し、RNAを精製し、そして第1鎖cDNAを調製するのに用いた(実験手順を参照のこと)。cDNAのアリコートを用いて、IL-1、IL-8、TNF、MCP1および β -アクチン遺伝子特異的プライマー(注文に応じて入手可能な配列)を用いる半定量的RT-PCR反応に用い、そして産物を、エチジウムブロマイドを含む1.2%アガロースゲル上で分画した。公知のNF- κ B標的遺伝子IL-1、IL-8、TNFおよびMCP1の発現は、TNFまたは精製フラジェリン曝露に应答して増加した(図6C)。野生型Salmonella感染はまた、これらの同じ遺伝子の活性化も生じたが、TNFおよびMCP1の発現は、相対的に一過性であり、感染直後に生じた。Salmonella fliC⁻/fliJB⁻二重変異体は、IL-1、IL-8およびTNF発現を誘導できなかったが、MCP1発現は、野生型Salmonellaによって誘導されるレベルよりも低いレベルであるが誘導され、そしてまた、MCP1の発現は本質的に一過性ではなく、時間経過を通

30

40

50

じて継続した(9時間)(図6C)。 - アクチンの発現レベルは、比較のための内部標準としての機能を果たした。興味深いことに、NF- κ Bの標的遺伝子ではないIL-1は、すべての処理によるHT29細胞チャレンジにตอบสนองして刺激された。明らかに、Salmonella fljB二重変異体は、IL1発現を生じる他の未知のシグナル伝達経路を活性化し得る。

【0120】

(実施例6)

(フラジェリンは、MyD88依存性の様式でNF- κ BのDNA結合を活性化する) フラジェリンは、炎症誘発性遺伝子の活性化と一致して必須のシグナル伝達経路を活性化し得、この活性が、TNFのようなサイトカイン(これに対する機能的細胞表面レセプターが存在する全ての細胞を活性化する)の作用によく似ていた(図1および図5Cにおけるp65[RelA]核局在化を参照のこと)、本発明者らは、フラジェリン曝露にตอบสนองしてNF- κ B経路を活性化するToll様レセプター(公知の病原体パターン認識レセプター)の能力を試験することにした。この仮説を試験するために、本発明者らは、ドミナントネガティブMyD88(アミノ酸152~296)(47)を発現するアデノウイルスがHT29細胞におけるフラジェリン媒介性のNF- κ B活性化に及ぼす影響を試験した。MyD88は、IL-1レセプターおよび公知のすべてのTLRによって利用されるアダプタータンパク質であり、これは、細胞質のシグナル伝達ドメインによってIL-1と同源性を共有し、NF- κ B経路の即時の活性化に必要である(48、49)。HT29細胞におけるDN-MyD88の発現は、IL-1またはフラジェリン曝露(NF- κ BのTLR媒介性の活性化の作用と一致している)にตอบสนองしてEMS A分析によってアッセイされるNF- κ BのDNA結合活性の活性化をブロックした。この可能性をさらに検討するために、本発明者らは、最初に野生型MyD88' / 'およびTLR2' / ' / TLR4' / ' MEF(S. Akira(Univ. of Osaka, JA)からの寄贈)を用いてMyD88の役割を確認し、そしてフラジェリンまたは直接の野生型Salmonella感染にตอบสนองしかつNF- κ Bの活性化を生じるTLRのうちの2つの潜在的な役割を調べた(図7)。野生型Salmonella感染は、野生型MEFおよびTLR欠損MEF(レーン2および15)の両方においてNF- κ Bを強力に活性化するが、この活性化は、MyD88欠損MEF(レーン10)において若干不完全である。3つの型すべての細胞を、濃縮して滅菌濾過した野生型S. dublinまたは二重SopE' / SopB' 同質遺伝子的変異体S. dublinのSE1SB2株の培養液でチャレンジすると、野生型MEFおよびTLR2 / 4二重欠損細胞においてNF- κ Bが活性化されたが、MyD88欠損細胞においてNF- κ Bは活性化されなかった(レーン11および12をレーン3、4、6、7、16および17と比較する)。NF- κ Bは、精製フラジェリン(0.5 μ g / ml)に曝露することによって野生型MEFにおいて強力に活性化され、従って、これらの実験においてLPSがNF- κ Bの活性化に関与する可能性が除外される。NF- κ B活性化の主要な誘因としてのLPSの除外は、TLR2 / 4二重欠損MEFの強力な活性化(レーン16および17)によってもたらされる。TLR2および4は、細菌のリポペプチド、ペプチドグリカン、特定のLPSおよびグラム陰性LPSにそれぞれตอบสนองする(50~52)。IL-1刺激により、IL-1およびフラジェリン媒介性のシグナルの伝達におけるMyD88の機能要件を確認した。

【0121】

フラジェリン認識においてTLRが果たし得る役割をさらに規定するために、本発明者らは、フラジェリン曝露に対して通常ほとんどตอบสนองしない細胞においてNF- κ Bを活性化する過剰発現TLRの能力についてアッセイした。精製フラジェリンにわずかにตอบสนองする細胞を選択することにより、フラジェリンが使用するシグナル伝達成分およびアダプターが存在しかつ有効であること、ならびにこの制限因子はフラジェリンにตอบสนองするレセプターのみである可能性が高いことを保証した。本発明者らは、HeLa細胞およびHEK293T細胞がIL-1刺激にตอบสนองしてNF- κ BのDNA結合活性を活性化したが、フラジェリン曝露にตอบสนองしてはほとんど活性化しなかったことを見出し、そしてHEK29

10

20

30

40

50

3 T細胞の方がトランスフェクション効率が高いため、HEK 293 T細胞を選択してさらに使用する。アミノ末端FLAGエピトプタグ化TLR 1~9 (R. Medzhitov (Yale Univ.) およびR. Ulevitch (TSRI) からの親切な寄贈) (42、43) を、2xNF- β 依存性プロモーター駆動ルシフェラーゼレポーター遺伝子とともに一過性トランスフェクションしてHEK 293 T細胞中で過剰発現させ、未処理、フラジェリン(0.5 μ g/ml)またはTNF (10 ng/ml)に应答するルシフェラーゼの発現を測定した。TLR 5は、その発現が細胞のフラジェリンチャレンジに顕著に应答した唯一のTLRであった(表1)。

【0122】

TLR 5はフラジェリンがNF- β を活性化するのを媒介するTLRであるという可能性をさらに確定するために、本発明者らは、TIRドメインに保存されたトリプトファンに対する各TLRのカルボキシル部分の欠失によるドミナントネガティブなシグナル伝達変異体を構築した。IL-1レセプターにおける類似の変異は、NF- β 活性化を引き起こすそのレセプターの能力を抑制する(54、55)。各々のDN-TLRを逆クローニングTLR 5 (AS-TLR 5)と共に、哺乳動物の発現ベクターpCDNA3.1 (Invitrogen)にクローニングした。変異体タンパク質はすべて十分に発現された。各DN-TLRの哺乳動物発現ベクターおよび空の発現ベクターを、2xNF- β Lucと共に、フラジェリンに非常によく应答するHT 29細胞中に、以前に記載したように(3)トランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞は、未処理のままか、TNF (10 ng/ml)で刺激したか、または精製フラジェリン(0.5 μ g/ml)で刺激した。レポーター遺伝子発現は、トランスフェクトされた細胞のTNF刺激に应答するDN-TLR発現によって影響されないことが観察された(図8A);しかし、DN-TLR 5またはアンチセンスTLR 5構築物のいずれかの発現のみが、フラジェリン媒介性のレポーター遺伝子活性化をそれぞれほぼ50%および25%阻害し(図8B)、一方、DN-TLR 2もまた、フラジェリン媒介性のレポーター発現を軽度阻害することが見出された。これらの結果は、TLR 5が、フラジェリンの細胞表面認識に関与し、NF- β 活性化を引き起こすシグナル伝達経路を開始することを示唆する。NF- β 依存性のレポーター遺伝子活性化に対するDN-TLR 2の影響は、非特異的であり得る。なぜなら、DN-TLR 2の発現は、他のDN-TLRと比較して、TNF媒介性のレポーター活性化も阻害したからである。DN-TLR 2はまた、TLR 2およびTLR 5の両方が共有し得る未知のアダプタータンパク質について競合し得る。いずれにしても、TLR 2およびTLR 4は、図7に示された結果によって、フラジェリン媒介性のNF- β 活性化に必要でないことが示された。

【0123】

(実施例7)

(フラジェリン媒介性のNF- β の活性化は、TLRのサブセットの発現の増加を引き起こす)

S. typhimuriumまたは精製フラジェリンでの腸上皮細胞の刺激は、炎症誘発性の遺伝子プログラムの活性化を引き起こした(図6C)。本発明者らは、TLR遺伝子の発現もフラジェリン刺激細胞において変更されるか否かを調べることにした。HT 29細胞を精製フラジェリン(0.5 μ g/ml)で処理し、刺激の3時間後に未処理細胞および処理細胞から全RNAを単離し、このRNAを用いて第1鎖cDNAを作製した。無刺激の細胞またはフラジェリン刺激細胞から調製したTLRおよび第1鎖cDNAの各々に対する遺伝子特異的プライマーを用いる半定量的RT-PCRを使用してDNA産物を生成し、このDNA産物を、エチジウムブロマイドを含む1.2%アガロースゲル上で分画した。TLR 2、3および7は、フラジェリン刺激の後に発現が増加した(図9)。他のTLRの発現パターンは、内部存在量コントロールとしての役割を果たす-アクチン発現と変わりがなかった。

【0124】

TLR 5は、フラジェリンに十分に应答しない細胞において発現される。本研究等(2

10

20

30

40

50

2、33)により、TLR5を、フラジェリンがNF- κ Bを活性化するのを媒介する有望なTLRであると確認した。以前の報告では、TLR5の機能を確認するために用いた細胞中のTLR5の存在または存在量に関する決定を行わなかった(22、33)。本発明者らは、フラジェリンによるチャレンジに应答しないかまたは不十分に应答する細胞において、TLR5タンパク質が存在しないかまたは大幅に減少したかを決定することにした。多くの細胞株におけるTLR5の存在量を、TLR5特異的抗体を用いる免疫プロット分析によって試験し、そしてこれらの細胞から調製されたWCEにおいて、精製フラジェリンがNF- κ BのDNA結合活性を誘導する能力と比較した。腸上皮細胞株T84およびHT29を、肺腺癌細胞株A549、ヒト子宮頸部腺癌細胞株HeLa、ラージT抗原HEK293Tを発現するヒト胚腎臓細胞株、および膠芽腫細胞株T98Gと同様に用いた。TLR5タンパク質は、TLR5特異抗体を用いた免疫プロットによって試験されたすべての細胞株において検出された(図10A)。T84細胞は最も高い存在量を示したが、他の細胞株の発現レベルは類似しており、2倍より大きくは異ならないように見えた(図10A)。無刺激の細胞、TNF α およびフラジェリン刺激細胞におけるNF- κ BのDNA結合活性を、各細胞型から調製したWCEのEMSAアッセイによって分析した(図10B)。HT29およびA549細胞は、フラジェリンおよびTNF α 刺激に対して強力に应答したが、一方、HeLa、293TおよびT98G細胞は、フラジェリン刺激に対してほとんど应答しない(HeLa、293T)か、または全く应答しなかった(T98G)。NF- κ BのDNA結合複体の信頼性は、p65特異的抗体を用いて、NF- κ BのDNA:タンパク質複合体をスーパーシフトさせて決定した。興味深いことには、TLR5を発現するいくつかの細胞は、全く应答しないかまたは非常に不十分に应答する。これは、原形質膜でのレセプターの存在の欠如および細胞内局在化、これらの細胞株のTLR5遺伝子における不活化または有害な変異、あるいは必要な補助レセプターまたはアダプタータンパク質の欠如または低い存在量のいずれかに起因し得る(TLR4およびその補助レセプター/アダプターMD2(30、56、57)についていくつかの細胞における場合と同様に)。IL-1は、試験した全ての細胞株においてNF- κ BのDNA結合活性を活性化し得るので、NF- κ Bに対するMyD88の下流のシグナル伝達装置がインタクトであるように見える。

【0125】

(実施例8)

(組換えフラジェリンの単離)

組換えフラジェリンがNF- κ Bを誘導し得たことを確認するために、NF- κ B応答性のルシフェラーゼ(Luc)を担持するレポーター細胞を用いて、活性について試験した。レポーター構築物は、Hsp70の最小プロモーターと結合したE-セレクチンプロモーター由来の3つのNF- κ B結合部位を含んでおり、NF- κ Bの検出に慣例的に用いられる。ルシフェラーゼ活性は、培地中へのフラジェリンの添加の6時間後に細胞溶解物中で測定した。TNF α を陽性コントロールとして用いた。代表的な実験の結果を図13に示し、組換えフラジェリンがNF- κ Bを活性化し得ることを示す。

【0126】

(実施例9)

(フラジェリンは、IR誘導性のGI症候群によって引き起こされるマウスの死を遅延させる)

上記のように、フラジェリンはNF- κ Bの強力なアクチベーターであり、アポトーシス死のインヒビターとして作用し得ると考えられる。NF- κ Bを誘導し得るサイトカインが放射線防護剤として作用するので、本発明者らは、フラジェリンもまた放射線防護剤として機能し得るか否かを試験した。

【0127】

15 Gyの放射線でのマウスの全身照射により、胃腸管の放射線誘導性の損傷の従来モデルを提供するGI症候群から8日以内に死に至る(上記参照)。フラジェリンがIRから胃腸上皮を保護し得るか否かを試験するために、本発明者らは、15 Gyの放射線

10

20

30

40

50

の後のマウス死亡率の動態に対する静脈内注射したフラジェリンの影響を試験した。本発明者らは、ある範囲のフラジェリン用量（そのすべてが、文献から調査した最も高い耐線量（ $300 \mu\text{g}/\text{マウス}$ 、E a y e s - P y l c s T e t a l、2001b）よりも著しく低かった）を用いた。照射を処置の4時間後に行った。代表的な実験の結果を図14に示す。予想通り、コントロール照射マウス（静脈内にPBSを投与した）は、処置後5～8日の間に死んだが、一方、フラジェリンを投与した動物は、顕著により長く生存した；動物の生存の延長は、フラジェリンの用量と相関した。照射後7日目の小腸の病理形態学的分析により、フラジェリン処置群とコントロール群との間の劇的な差異が明らかになる（図15）。 $0.2 \text{ mg}/\text{kg}$ のフラジェリンの静脈内、腹腔内および皮下送達の後には 13 Gy の照射を行うと、類似の保護度が得られ、85～90%のマウスの30日間の生存をもたらした（データは示さず）。最適な投薬実験のために、本質的には上記のように実験を行なったが、但し、 13 Gy 照射を用い、送達経路を変化させた。

10

【0128】

(実施例10)

(フラジェリンは、致死的なIR誘導性の造血症候群からマウスを救済する)

本発明者らは、次に、致死的なGI毒性を生じ得ない、より低い放射線量（通常、 11 Gy 以下）によって実験的に誘導される、HP症候群によるマウスのIR誘導性の死に対して、フラジェリンが効果を有するか否かを試験した。実験は、上記の実験（図14および15）と同様に行ったが、但し、マウスは 15 Gy の代わりに 10 Gy を受け、この線量は、コントロール群において13日目までに100%の致死を引き起こした（図16）。

20

フラジェリン処置群（ $5 \mu\text{g}/\text{マウス}$ ）は、この線量のIRからの完全な防護を示し、このことは、フラジェリン媒介性の放射線防護が、GIのみならずHPのIR誘導性症候群に対しても作用することを示す。

【0129】

(実施例11)

(フラジェリンの防護効果に対する時間依存性)

処置の時間に対するフラジェリンの放射線防護活性の依存性を評価するために、 13 Gy の線照射前の異なる時間にマウスに注射した。このような実験うち1つの結果を、図17に示す。得られた結果から、フラジェリンは、処置の1～4時間前に注射した場合、 13 Gy からの放射線防護剤として有効であるが、照射の24時間前に注射した場合、もはや有効ではないことを示す。

30

【0130】

処置の時間に対するフラジェリンの放射線防護活性の依存性を評価するために、線照射の瞬間に対するいくつかの時点でマウスに注射した。 $5 \mu\text{g}/\text{マウス}$ （ $0.2 \text{ mg}/\text{kg}$ ）のCBLB-501、またはコントロールマウスについては $5 \mu\text{g}/\text{マウス}$ （ $0.2 \text{ mg}/\text{kg}$ ）の細菌RNAポリメラーゼの腹腔内注射を用いて、本質的に上に説明したように実験を行った。実験をNIHスイスマウスシステムで行なった。この結果は、フラジェリン-501が、処置の1時間または2時間前に注射された場合、 13 Gy 照射後に約90%生存をもたらすことを示す（図17）。明確にするために1時間前のグラフのみを示すが、両方の時点（1時間前および2時間前）とも同様の程度および動態の生存が得られる。4時間の時点では、やや低い防護を示す。照射の24時間前に注射されたフラジェリンは、 13 Gy が誘導する死に対して防護効果を有さなかった。

40

【0131】

興味深いことには、 10 Gy の線照射の24時間前のフラジェリンの投与は、100%の防護をもたらした。マウスにおける 13 Gy 照射は、主としてGI症候群による死を誘導するが、 10 Gy 誘導性の死は、おもに造血症候群によって媒介される。従って、 10 Gy 照射からのこのような長期の防護は、フラジェリンおよび/または長寿命の二次サイトカインによって誘導される造血幹細胞の増殖および生存の増強によって媒介され得る。

【0132】

50

(実施例12)

(フラジェリンについてのLD_{50/30}、LD_{50/7}およびDMFの決定)

本発明者らは、フラジェリンについての放射線量依存的な防護の評価を得た。上に示されるように(図17)、フラジェリンでの処置は、10Gyの線照射(この線量は、造血症候群による死を引き起こす)に対する100%の防護および13Gy(造血症候群およびGI症候群の両方による死を引き起こす)での90%の30日間生存に十分であった。フラジェリン5μg/マウス(0.2mg/kg)を用い、照射の1時間前に腹腔内注射して、上述のように実験を行なった。

【0133】

しかしながら、15Gyでは、100%の7日間の生存の後、13日後に遅延死が続き(0%の30日間の生存)、一方、コントロール群は、7日目までにGI症候群に完全に屈した(図18)。

【0134】

【化1】

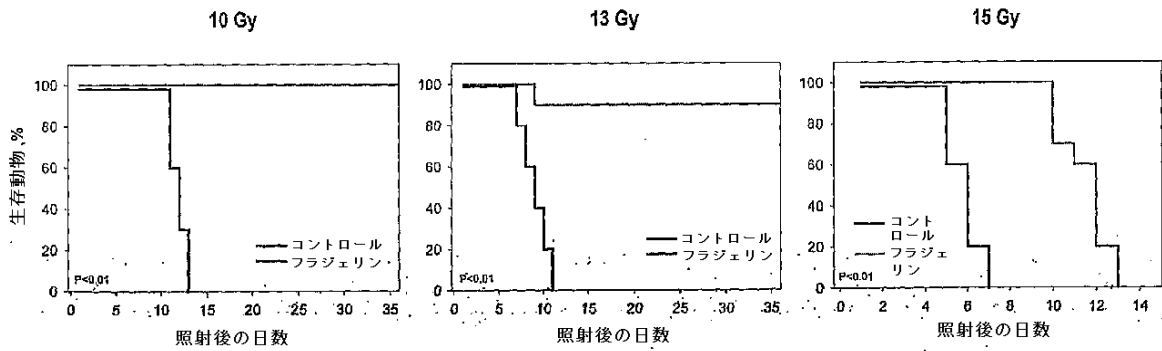


図8. 10Gy、13Gyおよび15Gyの全身γ放射線に対するマウス感受性に対するCBLB501の影響；詳細については本文を参照のこと。

15Gy照射後のCBLB-501処置群の死亡率の動態は、造血症候群によって引き起こされる死を示唆する、10Gyでのコントロール群の死亡率の動態によく似ている。これらの結果により、フラジェリンは、LD_{50/30}が約13.5~14Gyであり、DMF₃₀が約1.75~1.8であると評価される。この放射線防護の程度は、報告されたいかなる天然化合物よりも顕著に高い。

【0135】

10

20

30

【表 1】

表 1

TLR5はフラジェリンに応答し、NF- κ Bを活性化する

293T細胞は、空のベクター（pCDNA3.1）または個々の列挙された野生型TLR対立遺伝子で、6ウェル皿に3連でトランスフェクトされた。細胞を未処理のままか（無刺激）、TNF α （10ng/ml）またはフラジェリン（1 μ g/ml）で刺激した。NF- κ Bレポーター活性を、コントロールのRenillaシフェラーゼ活性に対する発現の正規化によって調整し、そして発光量比を、処理細胞におけるレポーター遺伝子活性/無刺激の細胞におけるレポーター遺伝子活性として算出した。NDは未決定である。

| | 無刺激 | TNF | FltC |
|------|-----|------|------|
| ベクター | 1 | 13.5 | 4.9 |
| TLR1 | 1.7 | ND | 5.1 |
| TLR2 | 1.6 | ND | 5.3 |
| TLR3 | 1.5 | ND | 5.0 |
| TLR4 | 1.8 | ND | 5.4 |
| TLR5 | 1.6 | ND | 9.2* |
| TLR7 | 1.5 | ND | 5.2 |
| TLR8 | 1.4 | ND | 5.0 |
| TLR9 | 1.5 | ND | 5.1 |

【図面の簡単な説明】

【0136】

【図1】図1は、Salmonella感染症が、非感染の細胞においてさえもNF- κ Bの核局在化を引き起こすことを示す。HT29細胞をカバーガラス上で増殖させ、そして偽感染させたか、未処理のままか、Salmonella typhimuriumで感染させたか、またはTNF（10ng/ml）で処理した。パネルA：HT29細胞を、感染した宿主細胞内でのみ活性なssaHプロモーターからGFPを発現するSalmonella typhimuriumのSJW1103G株で、100のMOIで感染させたか、または偽感染させた。細胞を、明視野顕微鏡法（BF）を用いて撮影し、そして図のようにGFPまたはDAPI染色を検出するために免疫蛍光法を用いて撮影した。感染した細胞を明らかにするために、画像を組み合わせた（オーバーレイ）。パネルB：HT29細胞を、未処理のままか、Salmonella typhimuriumの1103株で感染させたか、またはTNFで処理した。示されるような種々の条件下でのNF- κ B p65（RelA）の局在化を、間接免疫蛍光法によってモニターした。細胞を明視野顕微鏡法（BF）によって可視化し、細胞核をDAPIで染色し、そしてp65（RelA）をFITCで可視化した。DAPI染色は、組み合わせ（オーバーレイ）の可視化をより識別しやすくするために、赤に擬似着色した。

【図2】図2は、Salmonella培養液中のタンパク質因子が、NF- κ B活性化

を引き起こすことを示す。パネルA：100倍濃縮した*Salmonella dublin*培養液を示されるように処理するか、または感染性の細菌を示されるように使用して、HT29細胞をチャレンジした。NF- κ BのDNA結合活性を、処理の45分後に調製した全細胞抽出物から、EMSAによってアッセイした。NF- κ BのDNA：タンパク質複合体の信頼性を、p65 (RelA)特異的抗体スーパーシフトおよびp50特異的抗体スーパーシフトを用いて決定した。パネルB：濃縮した*Salmonella dublin*培養液(IN)を、Superose12カラム上のゲルパーミエーションによるクロマトグラフィーに付した。溶出されたタンパク質画分を、10%のSDS-PAGE上の分画によって分析し、クーマシーブルー(CB)染色によって可視化した。クロマトグラフィー用の分子量マーカーおよびゲル上の分子量マーカーを示す：図のような各画分のアリコートを用いてHT29細胞を刺激し、そして：得られたWCEを、NF- κ BのDNA結合活性についてEMSAによって分析した。パネルC：濃縮した*Salmonella dublin*培養液(IN)を、POROS HQマトリックス上の陰イオン交換クロマトグラフィーによるクロマトグラフィーに付した。タンパク質を、図のように増加するNaCl勾配で溶出し、10%のSDS-PAGE上で分析し、そしてクーマシーブルー(CB)染色によって可視化した。図のような各画分のインプットおよびアリコートを用いてHT29細胞を刺激し、得られたWCEを、NF- κ BのDNA結合活性についてEMSAによって分析した。2連の10%SDS-PAGEゲルから単離したゲルのタンパク質バンドB1~B6およびブランク部分に相当する溶出物質を、最初と最後のNaCl緩衝液の濃度勾配からの緩衝液サンプルとともに用いてHT29細胞を刺激し、得られたWCEを、NF- κ BのDNA結合活性についてEMSAによって分析した。

【図3】図3は、*Salmonella*培養液中のNF- κ B活性化因子が、質量分析によって同定されるように、フラジェリンであることを示す。トリプシンで消化したバンド2のマイクロキャピラリーHPLCタンデム質量分析。*Salmonella*ペプチドに相当するピークを番号付けし、そして、そのピークが右に相当する番号付きペプチド配列と同定される。

【図4】図4は、フラジェリン変異体がNF- κ Bを活性化できないことを示す。パネルA：非感染細胞(UN)から、50のMOIで図のような野生型*E. coli* DH5、野生型*Salmonella dublin*またはSopE⁻変異体、SopB⁻変異体、SopE⁻/SopB⁻二重変異体、野生型*Salmonella typhimurium* 1103株、fliC⁻変異体(fliC::Tn10)、fliC⁻/fliJ⁻二重変異体でのHT29細胞の直接感染の45分後に調製されるWCEにおけるNF- κ BのDNA結合活性についてのEMSAアッセイ。パネルB：図のように、非感染細胞(UN)から、または野生型細菌および変異体細菌からの滅菌濾過された濃縮培養液でのHT29細胞のチャレンジの45分後に調製されるWCEにおけるNF- κ BのDNA結合活性についてのEMSAアッセイ。

【図5】図5は、フラジェリンが、*Salmonella*感染の間の複数のシグナル伝達経路を活性化するのに必要であり、そしてNF- κ Bの核局在化を引き起こすことを示す。パネルA：HT29細胞を、図のように、未処理のままか、TNF (10 ng/ml)またはアニソマイシン[An] (20 μ g/ml)/PMA (12.5 ng/ml)の混合物で15分間刺激したか、あるいは野生型(WT)*Salmonella typhimurium* 1103株または*Salmonella typhimurium*の二重fliC⁻/fliJ⁻変異体134株で感染させた。WCEを、指示された時間に、またはTNF処理細胞については10分に、またはアニソマイシン/PMA処理細胞については15分に調製し、そしてこのWCEを、NF- κ BのDNA結合活性を分析するためにEMSAにおいて使用したか、あるいはIKKおよびJNKキナーゼのそれぞれの基質GST-I β 1-54およびGST-cJun1-79に対する活性を測定するために抗IKK抗体または抗JNK抗体を用いる免疫キナーゼ活性(KA)において使用した(図のように)。各抽出物由来の等量(40 μ g)のタンパク質の免疫プロット(IB)分析は、SDS-PAGEゲル上で分画し、PVDF膜に移し、そして図のようにバル

10

20

30

40

50

クのIKK、JNK、ERKおよびp38を検出するために、示した抗体でプローブした。活性化ERKおよびp38を検出するためにERKおよびp38に対するリン特異的抗体を用いる免疫ブロット分析を示す。パネルB：フラジェリン変異体*Salmonella*がHT29細胞に感染できないこと、およびHT29細胞の精製フラジェリン刺激が間接免疫蛍光法によって決定されるようにNF- κ B核p65(Re1A)局在化を引き起こすことを示す、免疫蛍光法。カバーガラス上で増殖したHT29細胞を示す処理の画像は、図1AおよびBにおけるものと本質的に同じである。DAPI染色の擬似着色を使用して、DAPI染色された核およびp65核局在化の両方の可視化を増強した。

【図6】図6は、精製フラジェリンが、野生型*Salmonella*感染のシグナル伝達経路および炎症誘発性遺伝子発現を模倣する、腸上皮細胞におけるシグナル伝達経路および炎症誘発性遺伝子発現を活性化することを示す。HT29細胞を、未処理のままか、TNF(10ng/ml)またはアニソマイシン[An](20 μ g/ml)/PMA(12.5ng/ml)の混合物で10分間処理したか、あるいはフラジェリン(1 μ g/ml)で指示された時間処理した。WCEを調製し、そしてこのWCEを、NF- κ BのDNA結合活性についてEMSAによって分析し、活性化を検出するためにERKまたはp38に対するリン特異的抗体を用い、そして図のようにバルクキナーゼの存在量を検出するために図5Aに記載されるようにキナーゼ特異的抗体を用いて、免疫キナーゼ活性(KA)または免疫ブロット分析によって分析した。パネルA：NF- κ BのDNA結合活性を検出するためのEMSA。パネルB：図5AにおけるようなIKK、JNK、ERKおよびp38キナーゼ活性およびタンパク質存在量を検出するための免疫ブロットアッセイおよびキナーゼアッセイ。パネルC：未処理の細胞、野生型のおよびフラジェリン二重変異体の*Salmonella typhimurium*感染した細胞、TNF(10ng/ml)またはフラジェリン(1mg/ml)で刺激された細胞の炎症誘発性遺伝子発現の半定量的RT-PCR。HT29細胞を、示された処理の後で示された時間に回収し、そして単離されたRNAを用いて、IL1 β 、IL1 α 、IL-8、TNF、MCP1および β -アクチンに対する遺伝子特異的プライマーを用いるRT-PCR反応において続いて使用される第1鎖cDNAを作製した。 β -アクチンは、発現パターンを正規化するための標準物として使用した。得られたPCR産物を2%アガロースゲル上で分画し、そしてエチジウムブロマイド染色によって可視化した。

【図7】図7は、フラジェリン媒介性のNF- κ Bの活性化がMyD88依存性であることを示す。感染性の野生型*Salmonella dublin*(100のMOI)、IL-1(20ng/ml)、精製フラジェリン(1 μ g/ml)(図に示されるように)、野生型*Salmonella dublin*およびSopE Δ /SopB Δ 二重変異体*Salmonella dublin*のSE1SB2株(S2、図に示されるように)由来の滅菌濾過して濃縮した100kDaフィルター保持上清(spt)を用いて、図のように野生型、MyD88 Δ / Δ ノックアウトまたはTLR2 Δ / Δ /TLR4 Δ / Δ /ダブルノックアウトMEFをチャレンジした。WCEを処理の45分後に調製し、そしてNF- κ BのDNA結合活性を分析するためにEMSAによって試験した。IL-1(20ng/ml)を陽性コントロールとして用いて、MyD88機能をモニターした。

【図8】図8は、TLR5がフラジェリン媒介性のNF- κ Bレポーター遺伝子活性を阻害することを示す。HT29細胞を、示されたDN-TLR哺乳動物の発現ベクターまたはアンチセンスTLR5(AS-TLR5)(2 μ g/ウェル)、2xNF- κ BLucレポーター遺伝子(100ng/ウェル)、空のベクターpCDNA3.1DNAで4 μ gの総DNA/ウェルに調整された正規化のためのpRL-TKRenillaルシフェラーゼ(50ng/ウェル)を用いて、6ウェル皿において3連でトランスフェクトした。パネルA：無刺激の細胞(明るい陰影付け)およびTNF(10ng/ml)処理細胞(暗い陰影付け)における、2xNF- κ BLucレポーター遺伝子の発光量比。溶解物を刺激の12時間後に調製した。代表的な実験の結果が示される。パネルB：図8AにおけるようにトランスフェクトされたHT29細胞をフラジェリン(1 μ g/ml)で処理し、そして細胞溶解物を図8Aにおけるように調製して分析した。代表的な実験

10

20

30

40

50

の結果が示される。

【図9】図9は、腸上皮細胞のフラジェリン刺激がTLR遺伝子のサブセットの活性化を引き起こすことを示す。HT29細胞は、フラジェリン(1mg/ml)で刺激され、そしてRNAは、3時間後にトリゾールを用いて単離され、第1鎖cDNAを作製するために用いられた。示されるような各TLRについて、遺伝子特異的プライマーを用いて生成されたRT-PCR産物が描写される。 - アクチンは、発現パターンの正規化のための標準として用いられた。

【図10】図10は、TLR5が多数の細胞型において発現され、そしてフラジェリンに対して可変性の応答を有すること示す。パネルA：全細胞抽出物を無刺激のT84、HT29、A549、HeLa、293TおよびT98G細胞から調製して8%のSDS-PAGEゲル上で分画し、タンパク質をPVDF膜に移して免疫ブロット分析(IB)のために抗TLR5抗体でプローブした。タンパク質負荷を抗アクチン抗体でプローブすることによって試験した。パネルB：HT29、A549、HeLa、293TおよびT98G細胞を、未処理のままか(-)、フラジェリン(F)またはTNF(T)で処理し、WCEを45分後に調製し、そしてEMSAで使用してNF- κ BのDNA結合活性をモニターした。NF- κ Bバンドシフトの信頼性は、p65(RelA)特異的抗体との複合体のスーパーシフトで試験した。

【図11】図11は、p53欠失がマウスにおけるGI症候群の進行を加速させたことを示す。パネルA：PFT(10mg/kg)の腹腔内注射は、放射線の単回の9Gy線量および分割累積放射線量の12.5Gy(5x2.5Gy)からC57B1/6Jマウス(他に示されない限り、以下で6~8週齢雄が用いられた)を保護する。PFTは、IRの単回の12.5Gy線量および25Gy線量で処置されたマウスの生存に影響しない(代表的な実験の結果を示す; Shepherd 4000 Cesium 137供給源を毎分4Gyの線量率で用いた)。パネルB：野生型マウスおよびp53ヌルC57B1/6Jマウスは、低(10Gy)および高(15Gy)線量の放射線に対する相対感度が異なる：野生型マウスは、p53ヌルマウスと比較して、10Gyに対してより感受性であったが、15Gyに対してより耐性であった。パネルC：11Gyの全身線照射で処置したマウスに、野生型マウスまたはp53ヌル同系C57B1/6Jマウス由来の 1.5×10^7 個の骨髓細胞を12時間後に注射した。(この線量は、再構成されていないコントロール群のマウスにおいて100%の死亡率を引き起こす)。2ヶ月後、造血の完全な回復後に、動物は、15Gyの全身放射線で処置され、骨髓におけるp53の状態が異なる2群の間で死亡率に差異を示さなかった。パネルD：15Gyの放射線の示された時点での野生型マウスおよびp53ヌルマウスの小腸に対する傷害の動態を比較することにより、p53ヌルマウス(ヘマトキシリン-エオシン染色したパラフィン切片; 125倍の倍率)において促進された損傷を示す。24時間のパネルは、陰窩の部分(重症のアポトーシス)がp53欠乏性の上皮においてではなく野生型の上皮において明らかである場合、TUNEL染色のイメージを含む。

【図12】図12は、野生型マウスおよびp53ヌルマウスの小腸における細胞増殖および生存の動態を示す。パネルA：IRで処置後の野生型マウスおよびp53ヌルマウスの腸における増殖速度の比較。(左)15Gyの放射線で処置されたかまたは未処置の、 ^{14}C -チミジン(1匹当たり10 μ Ci)を腹腔内に注射された、4週齢の野生型マウスおよびp53ヌルマウスの全身切片(1.7倍の倍率)のオートラジオグラフ(Westphal et al, 1997)。矢印は腸を指す。(右)15Gyの放射後の異なる時点での野生型マウスおよびp53ヌルマウスの小腸におけるBrdU取り込みの比較。マウスを屠殺する2時間前にBrdU(50mg/kg)を注射し、そして免疫染色を前述のように行った(Watson & Pritchard, 2000)。96時間のパネルのフラグメントは、より高い倍率(x400)で示される。パネルB：15Gyの放射後の異なる時点での野生型マウスおよびp53ヌルマウスの小腸における陰窩当たりのBrdU陽性細胞の数の比較。3匹の動物を各時点につき分析し、5つの回腸断面を各動物から調製し、微視的に分析して、陰窩および絨毛の数を評価した。陰窩中のBr

10

20

30

40

50

d U陽性細胞の数を、200倍の倍率下で無作為な5視野において計数し(100~30個の陰窩)、そしてBrdU陽性細胞の平均数をプロットした。パネルC: 15 Gyの放射後の異なる時点の間の野生型マウスおよびp53ヌルマウスの小腸におけるBrdU標識細胞の数および位置のトレース。BrdUを照射の30分前に注射し、そしてマウスを示した時点で屠殺した。標識細胞の陰窩から絨毛までの遊走の加速、続いて急速な消失が、p53ヌルマウスにおいて観察された。

【図13】図13は、組換えフラジェリンが、NF- κ Bを活性化可能であることを示す。

【図14】図14は、フラジェリンが放射線からマウスを保護する能力を試験する代表的な実験を示す。C56BL/6マウス(6週齢雄、1群当たり10匹の動物)に、PBS中の2.0 μ g (0.1 mg/kg)または5 μ g (0.25 mg/kg)のフラジェリンを静脈内に注射した。4時間後に、マウスを15 Gyで照射し、そしてマウスの生存を毎日モニターした。

【図15】図15は、0.25 mg/kgのフラジェリンを静脈内に注射されたかまたはされずに15 Gyの放射線で処置されたマウスの小腸上皮の組織学的切片(HE染色された)を示す。コントロールマウスにおける陰窩および絨毛の完全な破壊は、フラジェリン処置動物由来の組織のほぼ正常な形態とは対照的である。

【図16】図16は、10 Gyの全身放射線に対するマウスの感受性に及ぼすフラジェリンの影響を示す。

【図17】図17は、13 Gy(左)および10 Gy(右)の全身放射線に対するマウスの感受性に及ぼす、照射前の示した時間に静脈内注射したフラジェリンの影響を示す。

【図18】図18は、10、13および15 Gyの全身放射線に対するマウスの感受性に及ぼすフラジェリンの影響を示す。

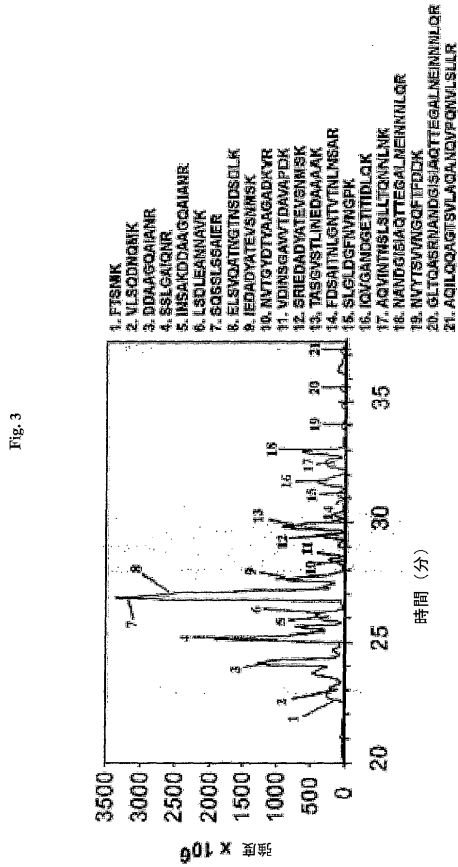
【図19】図19は、細菌性フラジェリンのドメイン構造を示す。F41のCaバックボーントレース、疎水性コア分布および構造情報。ドメインD1、D2a、D2bおよびD3を規定する4つの異なる疎水性コア。すべての疎水性側鎖原子は、Ca主鎖と共に示される。側鎖原子は色分けされる: Ala、黄色; Leu、IleまたはVal、橙色; PheおよびTyr、紫色(炭素原子)および赤色(酸素原子)。c、フラジェリンのアミノ酸配列中の種々の構造上の特色の位置および領域。上から下に: F41フラグメント(青色); 3つの葉状折り畳み構造(folium fold)(茶色); α -ヘリックス(黄色)、 β -構造(緑色)、および γ -回旋(紫色)を含む二次構造分布; 50番目の残基ごとのチックマーク(青色); ドメインD0、D1、D2およびD3; プロトエレメント内の軸方向サブユニット接触領域(シアン); 十分に保存されたアミノ酸配列(赤色)および可変領域(スミレ色); 異なる高次コイルのエレメントを生成するF41中の点変異を示す。下部の文字は、変異体エレメント: L(D107E、R124A、R124S、G426A)、L型直鎖; R(A449V)、R型直鎖; C(D313Y、A414V、A427V、N433D)、curly33の形態を示す。(Samatey et al、Nature 2001)。

10

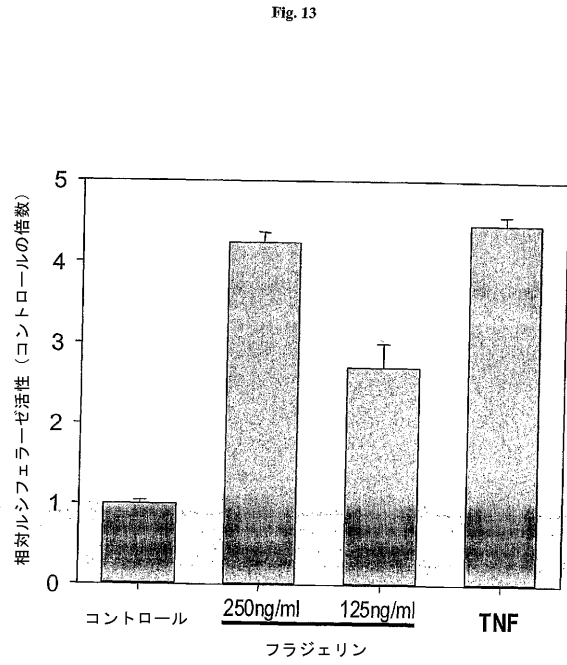
20

30

【 図 3 】

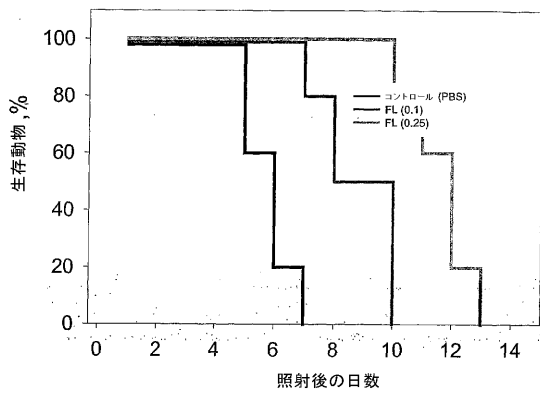


【 図 1 3 】



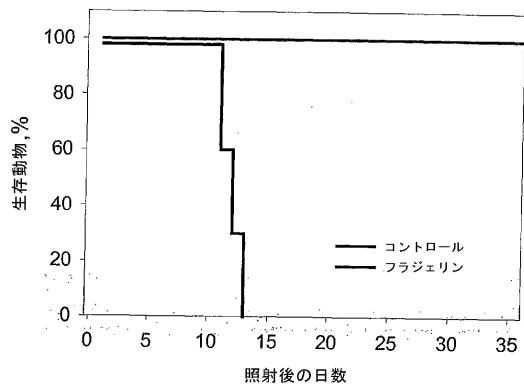
【 図 1 4 】

Fig. 14



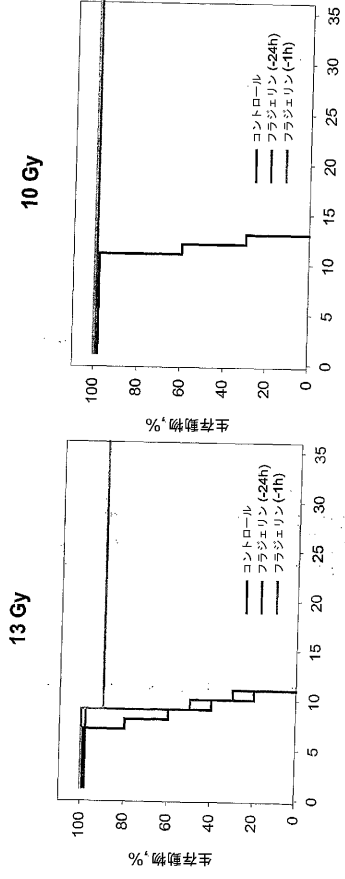
【 図 1 6 】

Fig. 16



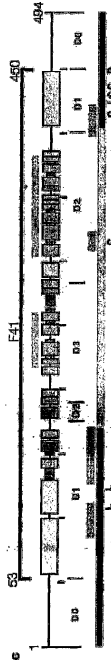
【 図 17 】

Fig.17



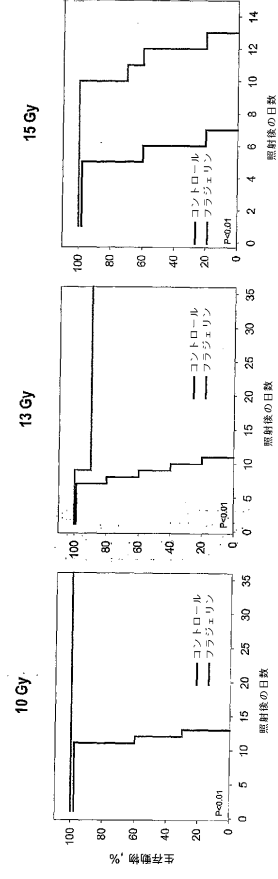
【 図 19 】

Fig.19

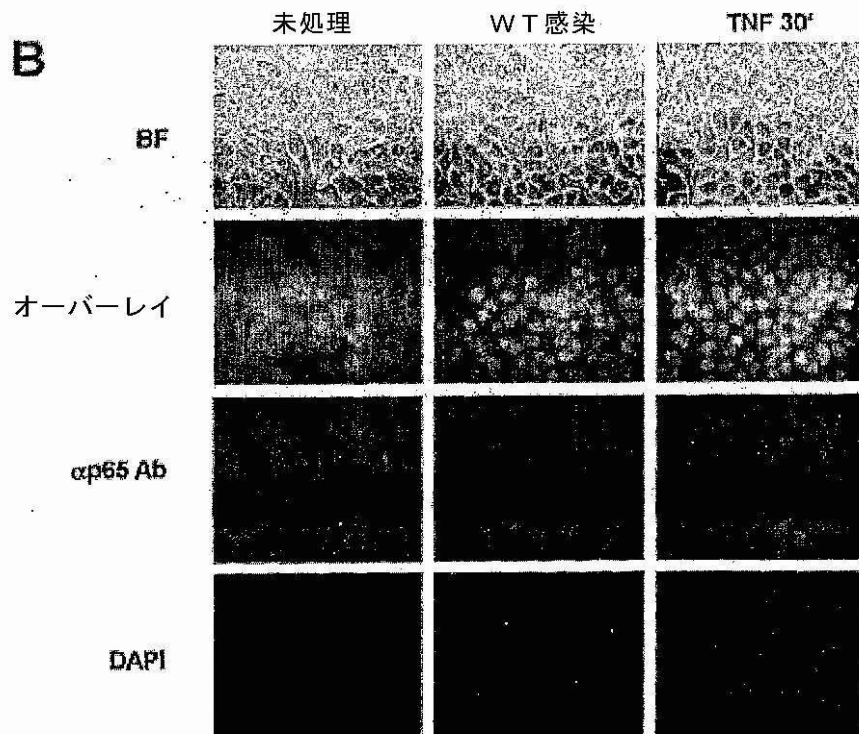
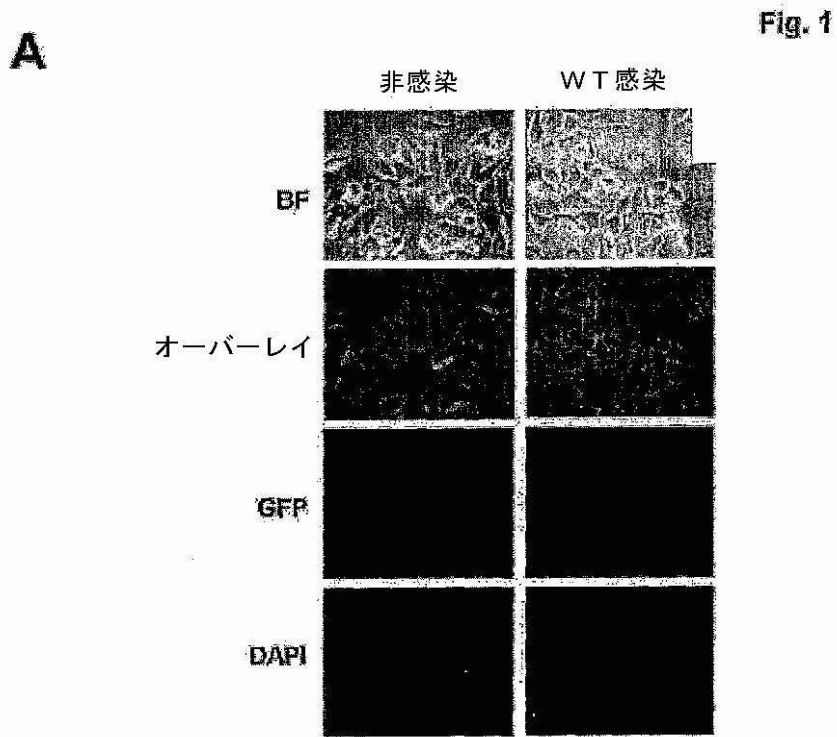


【 図 18 】

Fig.18



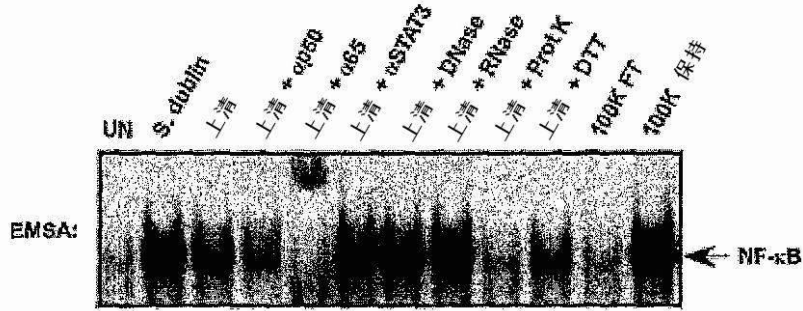
【図1】



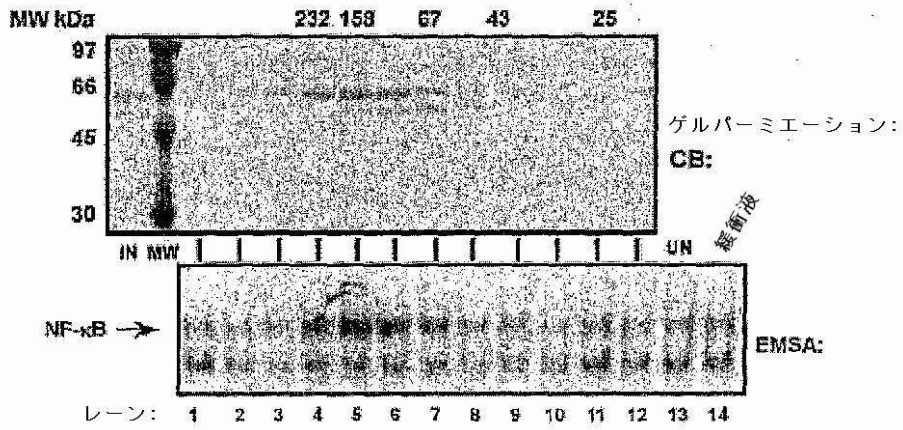
【 図 2 】

Fig. 2

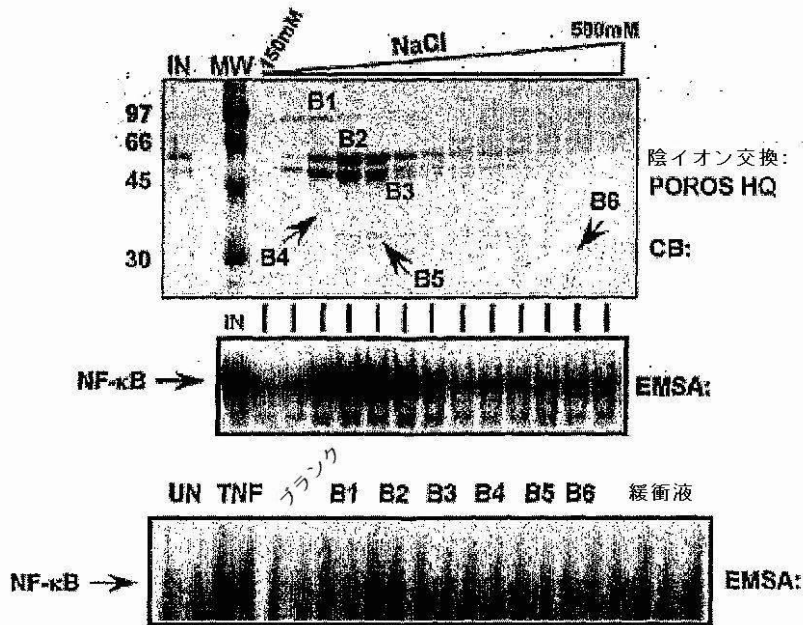
A



B



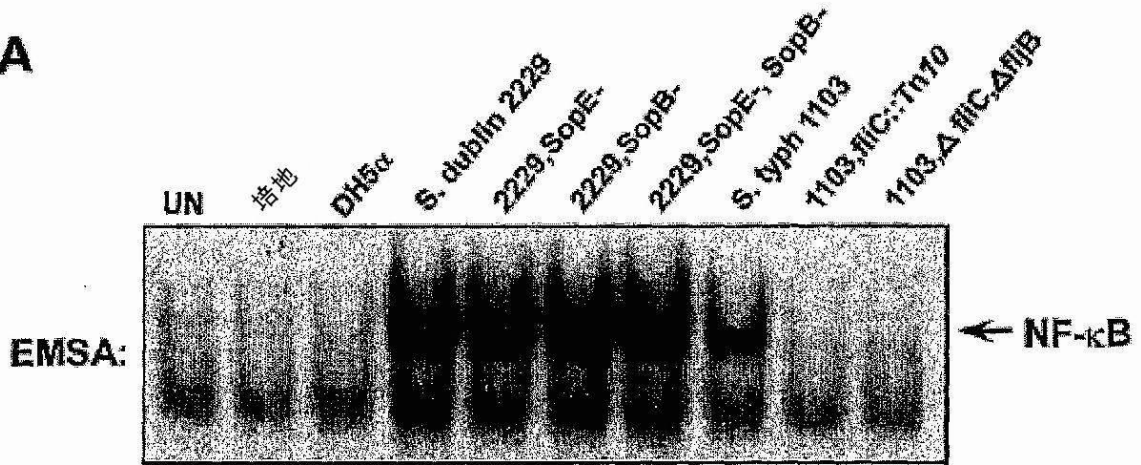
C



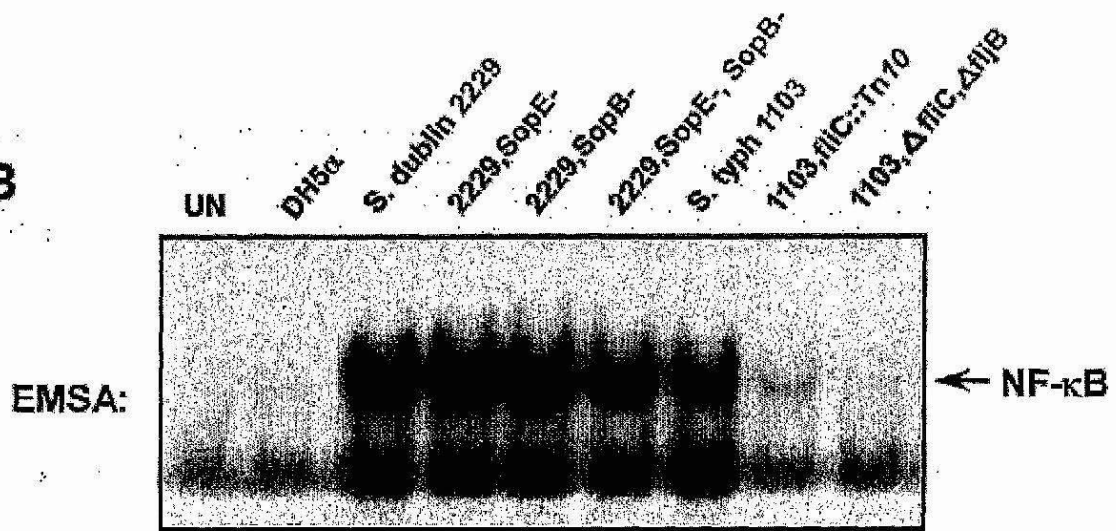
【 図 4 】

Fig. 4

A

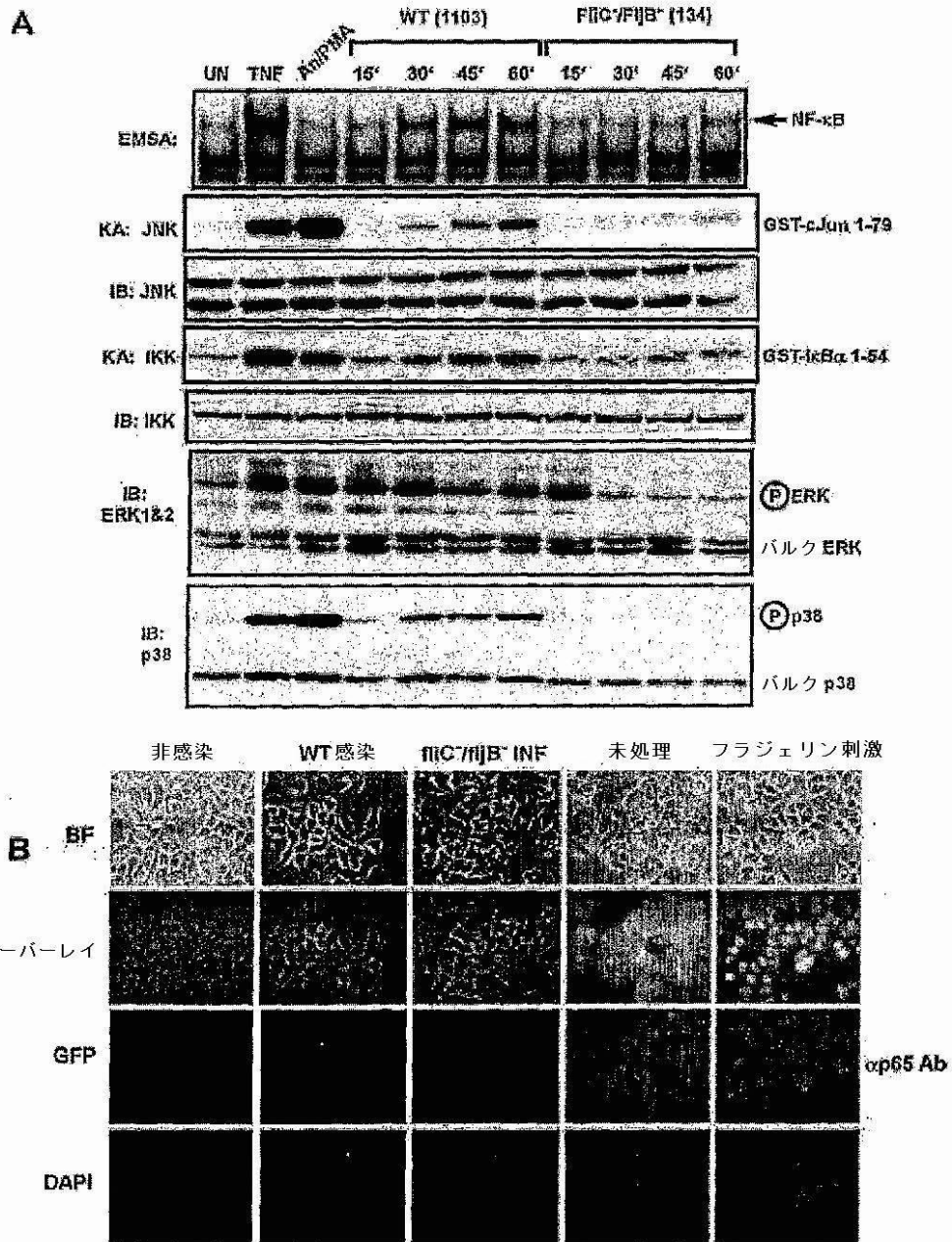


B



【 図 5 】

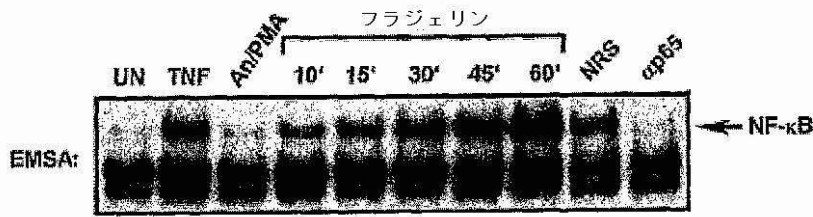
Fig. 5



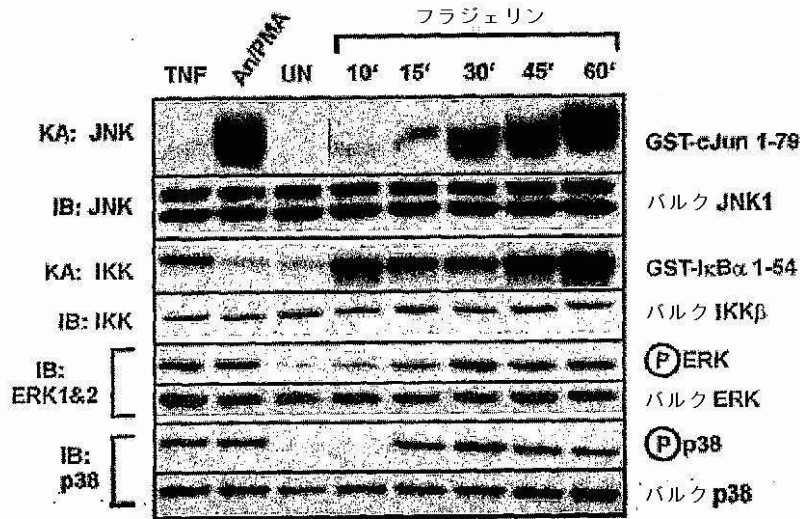
【 図 6 】

A

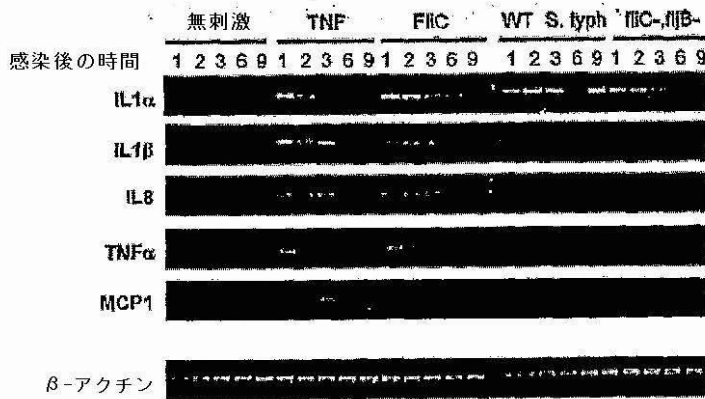
Fig. 6



B



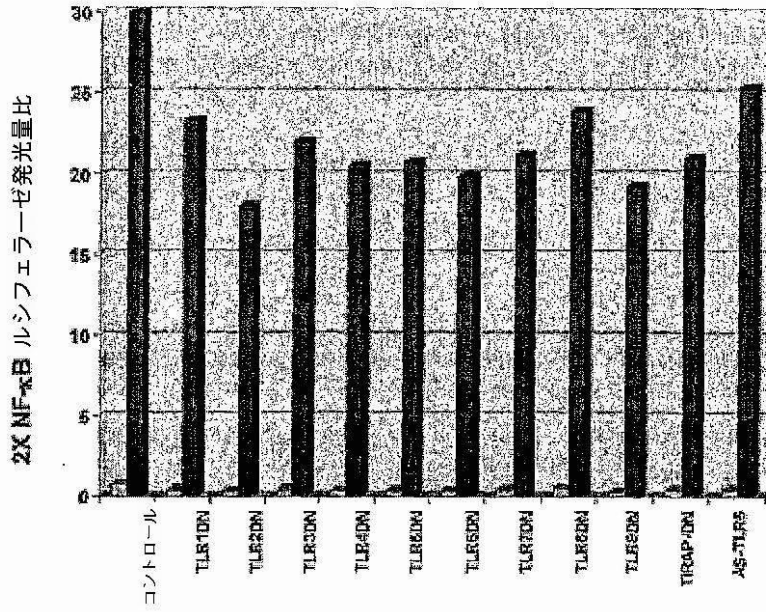
C



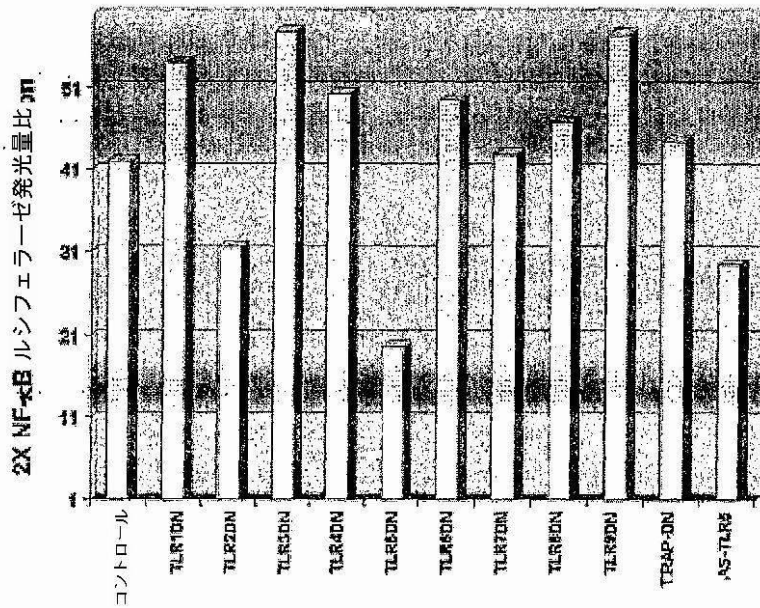
【 図 8 】

Fig. 8

A



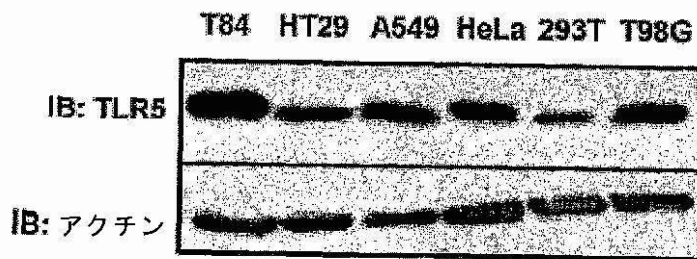
B



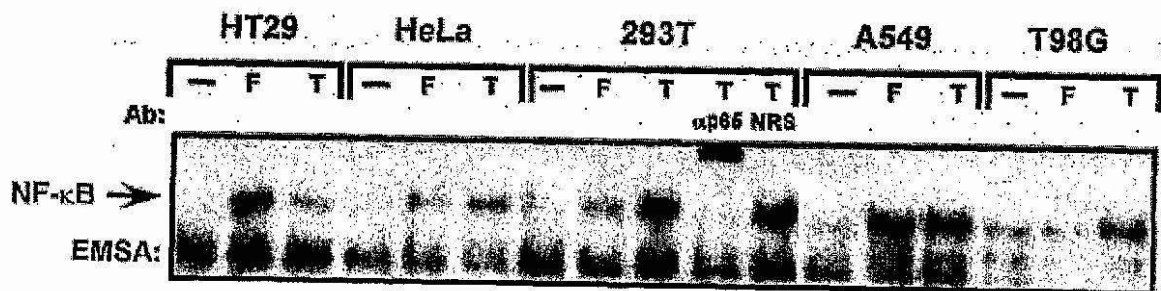
【 図 10 】

Fig. 10

A

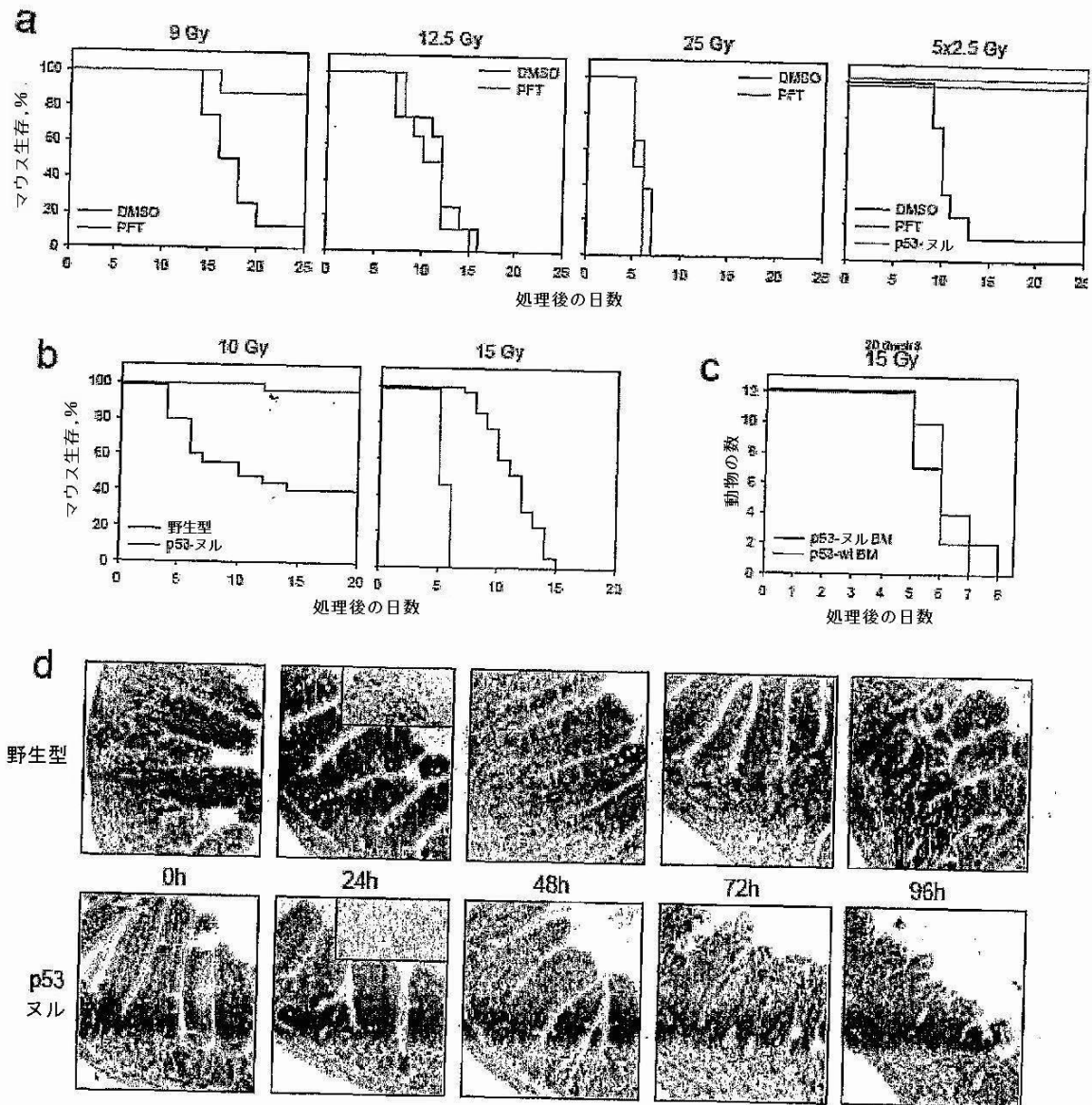


B



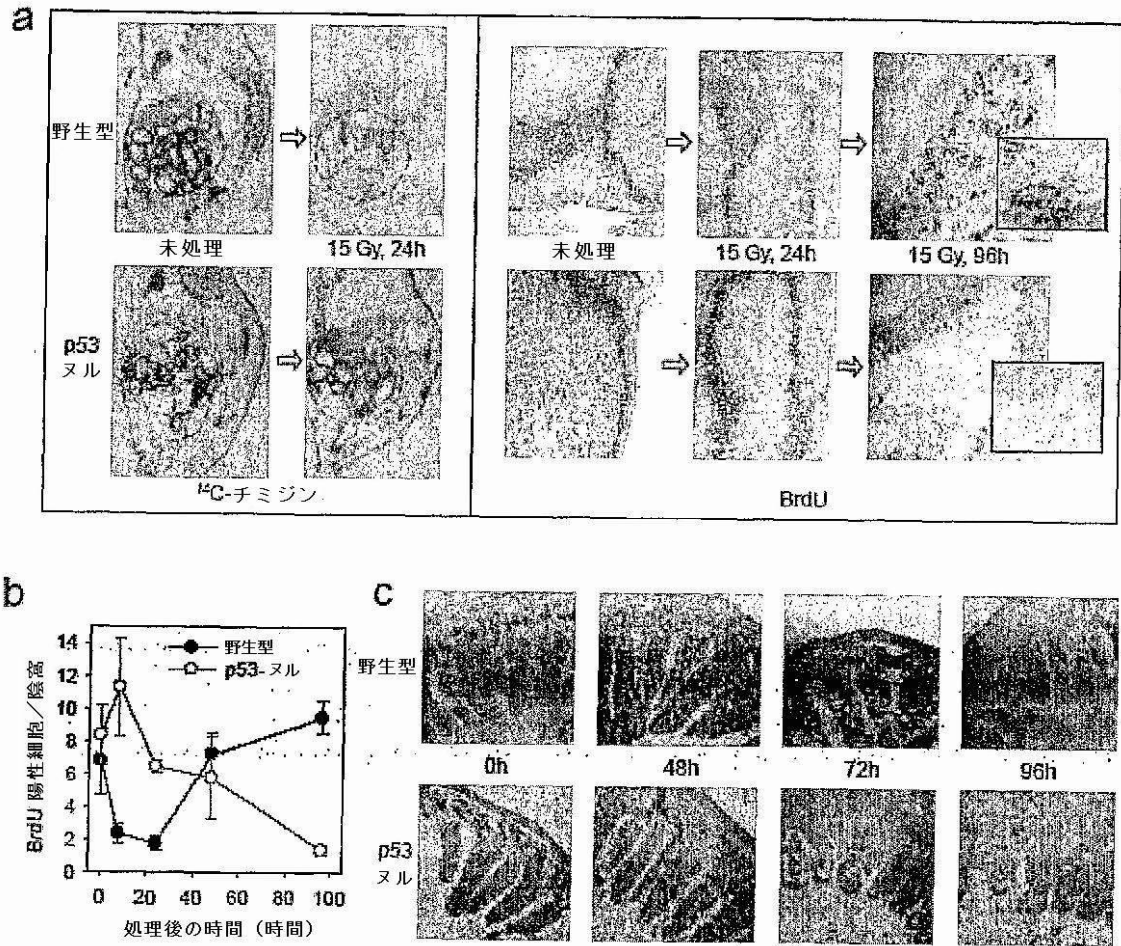
【 図 1 1 】

Fig. 11



【 図 1 2 】

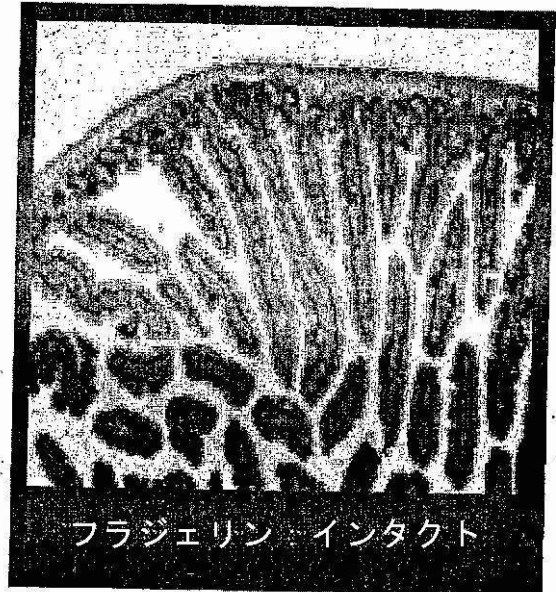
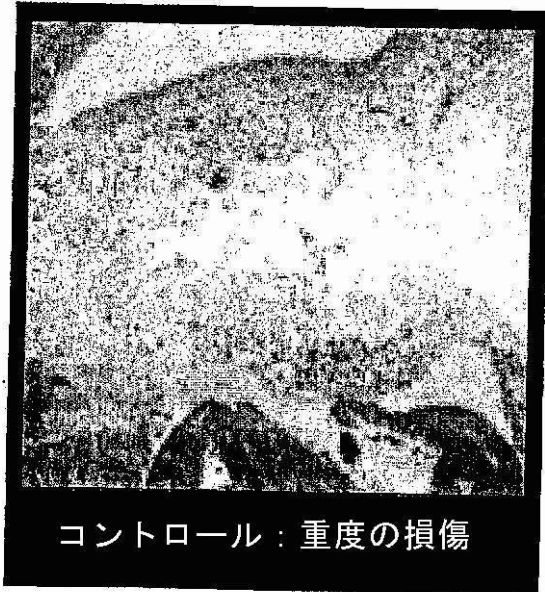
Fig. 12



【図15】

Fig. 15

小腸（7日目）



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/526,666

(32)優先日 平成15年12月2日(2003.12.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/526,460

(32)優先日 平成15年12月2日(2003.12.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 グッドコフ, アンドレイ ブイ.

アメリカ合衆国 オハイオ 44044, ゲイツ ミル, ブラックベリー レーン 7800

審査官 菊池 美香

(56)参考文献 Military Medicine, 2002年, Vol.167, No.2 Suppl, p.51-53

Radiation Research, 2002年, Vol.158, No.1, p.101-109

The Journal of Immunology, 2001年, Vol.167, No.12, p.7009-7016

The Journal of Immunology, 2001年, Vol.166, No.2, p.1248-1260

Journal of Radiation Research, 2002年, Vol.43, No.Supple., p.S239-S244

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

A61K 38/00

A61K 31/355

A61K 31/661

A61K 35/74

A61P 43/00

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)