

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4334023号
(P4334023)

(45) 発行日 平成21年9月16日(2009.9.16)

(24) 登録日 平成21年7月3日(2009.7.3)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08
A 6 1 K 9/12 (2006.01)	A 6 1 K 9/12
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06

請求項の数 9 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平11-500979
(86) (22) 出願日	平成10年5月28日(1998.5.28)
(65) 公表番号	特表2002-511856(P2002-511856A)
(43) 公表日	平成14年4月16日(2002.4.16)
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/011026
(87) 国際公開番号	W01998/053846
(87) 国際公開日	平成10年12月3日(1998.12.3)
審査請求日	平成17年5月27日(2005.5.27)
(31) 優先権主張番号	08/864, 357
(32) 優先日	平成9年5月28日(1997.5.28)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	クララジェン、インコーポレイテッド アメリカ合衆国、メリーランド、カレッジ パーク、ペイント ブランチ ロード 335
(73) 特許権者	ナショナル イン스티テューツ オブ ヘルス アメリカ合衆国、メリーランド、ロックビル、 イグゼキュティブ ビルディング 6011、 スウィート 325、オフィス オブ テクノロジイ トランスファー、ディパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービス

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症および線維症状態の治療における組換えヒトウテログロビンの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組換えヒトウテログロビン (rhUG) を含む、フィブロネクチン凝集及び/又はフィブロネクチン沈着の阻害剤であって、該 rhUG はフィブロネクチンに結合し、フィブロネクチン凝集及び/又はフィブロネクチン沈着を阻害する上記阻害剤。

【請求項 2】

フィブロネクチン自己凝集、コラーゲン-フィブロネクチン凝集形成、フィブロネクチン蓄積又は原線維形成を阻害する、請求項 1 に記載の阻害剤。

【請求項 3】

前記 rhUG を 20ng/kg から 500mg/kg までの単回投与の単回投与量若しくは該単回投与の多回投与量、又は、10 グラムまでの連続点滴量、含む、請求項 1 に記載の阻害剤。

【請求項 4】

前記 rhUG が肺表面活性物質を含む組成物中に含まれる、請求項 1 に記載の阻害剤。

【請求項 5】

前記 rhUG を含む阻害剤が注射により投与されるためのものである、請求項 1 に記載の阻害剤。

【請求項 6】

前記 rhUG を含む阻害剤が気管内経路で半エーロゾルとして投与されるためのものである、請求項 1 に記載の阻害剤。

【請求項 7】

10

20

患者が線維症に罹患している又は線維症の危険性がある、請求項 1 に記載の阻害剤。

【請求項 8】

線維症が内因性ウテログロビン (UG) の欠損によって特徴付けられる、請求項 7 に記載の阻害剤。

【請求項 9】

前記線維症が肺線維症又は腎線維症である、請求項 7 に記載の阻害剤。

【発明の詳細な説明】

関連出願の他所参照

本発明は米国出願No. 08/864,357の部分継続出願であり、その開示は参照することによりここに取り入れられている。

発明の分野

本発明は、一般的に、天然ヒトウテログロビン (hUG) または組換えヒトウテログロビン (rhUG) を用いた、炎症性および線維症状態の治療に関する。UG (hUG または rhUG) の新規生理的役割および治療は明らかにされている。特に、本発明は、PLA₂s を阻害するため、および/または、フィブロンectin 沈着を予防するために hUG または rhUG を投与することによる、炎症および線維症状態の治療に関する。本発明は、更に、炎症性および線維症状態により特徴づけられる、新生児呼吸窮迫症候群 (RDS) および気管支肺異形成症 (BPD)、肺の危機的臨床状態、および糸球体腎症、腎疾患、の治療方法を提供する。

本出願に引用されている文献は、本発明が関係する従来技術に関するものであり、それぞれは参照することによりここにとり入れられている。

発明の背景

炎症および線維症状態

炎症および線維症疾患の治療の改善された治療剤の研究は、近年多くの注目を集めていた。新生児 RDS、肺表面活性物質欠損疾病、は未熟新生児における主な死因の一つであるので、特に興味を持たれる状況である。表面活性物質の導入は劇的に RDS 患者の生存を改善するが、この患者人口の多くの割合である慢性炎症および線維症疾患の発生は主要な問題である。同様に、遺伝性フィブロンectin 沈着糸球体腎症は、患者の腎臓が閉塞され血液を最早濾過しなくなるときの、腎障害の最終段階を導くことになる。腎症は、臓器を非機能的にし、結局、生命を維持することができなくなる、腎のフィブロンectin 沈着および線維化により特徴づけられる。

PLA₂ (ホスホリパーゼ A₂) は、グリセロリン脂質の Sn 2 位のエステル結合を加水分解する内因性酵素の 1 クラスであり、炎症および線維症状態に関わっている多くのタンパク質の一つである。それはまた、肺の界面活性物質リン脂質の加水分解にも関与している。ウテログロビン (CC10、CC16、CC17、尿蛋白 1、P-1、プロゲステロン結合タンパク質、PCB 結合タンパク質、クララ細胞分泌タンパク質 (CCSP)、ブラストキニン、レチノール結合タンパク質、リン脂質結合タンパク質、および 2 - ミクログロブリン、としても知られる) は、in vitro で PLA₂ の活性を阻害する。

ウテログロビンは小球状ホモ二量体タンパク質である。それは分子量 15.8 kDa を有し、しかし電気泳動ゲルにおいて、10kDa に相当する大きさとして移動する。ヒトウテログロビンは成人肺に豊富で、その総可溶性タンパク質の約 7% までを含んでいる。しかしながら、その発現は妊娠末期まで発生中のヒト胎児において完全には活性化されない。従って、前期新生児の細胞外肺分泌液は成人のそれよりもはるかに少ない UG を含んでいる。UG は、また、臍によっても発現される。

PLA₂ は、細胞のリン脂質貯蔵器からアラキドン酸 (AA) を放出するので炎症反応に臨界的役割を演じている。AA は、アラキドン酸カスケードと称される過程で、多くの強力な炎症メディエーターに代謝される。

いくつかの急性および慢性の臨床状態が、上昇した血清または局在 PLA₂ 活性により特徴づけられてきた (以下の表 1 を参照)。

臨床使用に用い得る有効な PLA₂ 阻害剤はない。今日、ほんの少しの PLA₂ 阻害剤が臨床治験に進行中であるが、しかしどれも市販が許可されるに至っていない。

10

20

30

40

50

フィブロネクチン (Fn) は、数種の異なった型で存在し、異なった組織から分泌される200kDa糖タンパク質である。Fnは必須タンパク質であり、マウスFn遺伝子の標的破壊により、胚形成に中心的役割を有することが示された。Fnは、また、炎症、細胞接着、組織再生および線維形成に基本的な役割を演じており、傷害部位に沈着される。結晶フィブロネクチン (pFn) は肝臓により分泌され、血漿中を循環する。肺においては、細胞Fn (cFn) は、炎症および傷害において分泌される。両タイプのFnは、炎症細胞および繊維芽細胞に対する走化性因子である。炎症細胞および繊維芽細胞の大多数が、肺線維症および究極の死を導くことのできる炎症症状の発現中、肺に浸潤する。高いレベルのFnが、肺の新生児RDSおよびBPD、および腎の糸球体腎症、のようなヒトの臨床状態において検出されていた。

表1、PLA₂活性と関連した臨床的状态

疾患	部位
慢性関節リウマチ	血清、関節液、WBC
膠原血管病	血清
膵炎	血清
腹膜炎	腹水及び細胞
敗血症性ショック	血清
ARDS*	血清及び歯槽液
急性腎不全	血清
自己免疫ブドウ膜炎	血清、眼房水
気管支喘息	気管支液

*成人呼吸器疾患症候群

UGの役割

精製ヒトUGのアミノ酸分析は、他の「UG様」タンパク質、例えばウサギUG、と類似しているが、同じではないことを示している。70アミノ酸のうち39が、ヒトとウサギUGの間で同一である (図1を参照)。ヒトUG/CC10、ラットCC10、マウスCC10、およびウサギUGを含む「UG様」タンパク質は、種特異的および組織特異的抗原差を、それらのin vivoでの組織分布および生化学的活性における相異と同様に、示している。UG様タンパク質は、ラット肺、ヒト尿、喀痰、血液成分、ウサギ子宮、ラットおよびヒト前立腺、およびヒト肺を含む、起源の組織および種、に関する多くの異なった文脈で記載されてきた。現時点では、これらタンパク質について生理的役割は知られていない。

長年の研究にもかかわらず、これらタンパク質のin vivoでの生化学的役割は不明確である。UG様タンパク質の間の構造的同一性がないので、タンパク質が、in vitroに基いたヒトにおいてin vivo治療機能を有しているかどうか、あるいは構造的に関連したタンパク質により表わされる他の活性を有しているかどうか、を予測するのを不可能としている。例えば、ヒトウテログロビンは、同じ測定でウサギUGが結合するプロゲステロンの量の5%より少なく結合する。ヒトUGはウサギUGの等電点 (5.4) より低い等電点 (4.6) を有する。

Strippら (1996) は、ウテログロビンの発現を除去するようにつくられたウテログロビンノックアウトマウスに関する研究を報告している。マウスは、ウテログロビン分泌顆粒の代りにわずかな細胞内構造を示すが、しかし他の表現型を有さないクララ細胞を有している。この観察は、肺機能は肺炎を伴っており、そして線維症が予想されるので非常に有意である。更に、このノックアウトマウスは、腎、膵、または生殖異常の証拠を示さなかったため、ウテログロビタンパク質は、in vivoにおいて炎症あるいは線維症を制御する有意な役割を有していないことを示している。

発明の目的

それゆえに、本発明の目的は、組換えヒトウテログロビン (rhUG)、またはその断片、または誘導体のPLA₂阻害有効量、および医薬として許容し得る担体または稀釈剤を含む、医薬組成物を提供するにある。

10

20

30

40

50

本発明の更なる目的は、組換えヒトウテログロビン、またはその断片、またはその誘導体の、フィブロネクチン結合有効量および医薬として許容される担体または稀釈剤を含む医薬組成物を提供するにある。

本発明の付加的目的は、標的適応症の治療用活性剤のPLA₂阻害またはフィブロネクチン結合有効量を含む医薬組成物を提供するにある。

更に本発明の目的は、PLA₂酵素を阻害する治療を必要とする哺乳類において、*in vivo*でPLA₂酵素を阻害する方法であって、該哺乳類に天然または組換えヒトウテログロビン、またはその断片、またはその誘導体のPLA₂阻害有効量を投与することを含む方法を提供するにある。

なお更に本発明の目的は、患者の炎症状態の治療または予防方法であって、そのような処置を必要とする患者において、天然または組換えUG、またはその断片、またはその誘導体の抗炎症有効量を投与することを含む方法を提供するにある。

本発明の目的は、患者の線維症の状態の治療または予防方法であって、そのような処置を必要とする患者において、天然または組換えUG、またはその断片、またはその誘導体のフィブロネクチン結合有効量を投与することを含む方法を提供するにある。

本発明の付加的目的は、内因性UGの欠損により特徴づけられた炎症性または線維症性状態の治療または予防方法であって、天然または組換えUG、またはその断片、またはその誘導体の補償量を投与することを含む方法を提供するにある。

本発明の更なる目的は、天然または組換えUG、またはその断片、またはその誘導体の、PLA₂阻害有効量またはフィブロネクチン結合有効量を含む化粧品組成物を提供するにある。

また、本発明の目的は、天然または組換えUG、またはその断片、またはその誘導体の、PLA₂阻害有効量またはフィブロネクチン結合有効量を含む血液補助剤を提供するにある。

最後に、本発明の目的は、臨床試料中のウテログロビン - フィブロネクチン複合体の定量測定法を提供するにある。

発明の要約

ウテログロビンが、*in vivo*でPLA₂の阻害およびフィブロネクチン沈着および線維症の予防に中心的役割を演じていることが、今や発見された。トランスジェニックウテログロビン「ノックアウト」マウスの新しい株、および肺炎および線維症を含む新生児呼吸窮迫症候群(RDS)のサルモデルにおいて行われた実験の組み合わせは、これらの効果を表わした。本発明のウテログロビンノックアウトマウス(以下、「UK KOマウス」という)は、それぞれ初期および末期発症疾病として致死的糸球体腎症および腎実質線維症を呈した。正常マウスに外因性Fnを投与すると、腎にFn沈着が起こるが、しかしFnおよびrhUGの当量量の投与はそうでない。

*In vivo*でのPLA₂の減少がrhUGの存在下に行われた。第1の実験において、UG KOマウスの表現型は、機能的UG遺伝子を有する同腹仔におけるPLA₂活性に比較してUGの不存在下で、血清PLA₂活性が有意に上昇した。第2の実験において、RDSにかかっている、早産児サルにrhUGを投与すると肺の細胞外液のPLA₂活性を阻害することが証明された。

他の実験では、*in vitro* PLA₂はRDSの治療に使用された人工表面活性物質(典型的にはSurvanta)を破壊することができ、UGはこの破壊を阻害することができる、ことを証明した。これら実験は、UGが気管支内または静脈内投与について*in vivo*でPLA₂阻害とFn沈着を融解することを証明している。

ウテログロビンノックアウトマウスを用いた実験では、rhUGは、ウテログロビンが欠損していることが見出された、あるいはタンパク質自体が機能欠損変異を被っている状態を治療するのに使用し得ることを証明している。rhUGは、機能的内因性ウテログロビンが、循環中あるいは炎症または線維症の部位において欠失しているような炎症または線維症状態を治療または予防するのに使用され得ることが、今や見出された。血清および/または気管支肺胞洗滌検査中のhUGレベルの減少が新生児BPDをおこす危険のある早産児を含む、ある種の肺炎または線維症状態において見出された。UGは、そのような炎症および線維症状態を予防または治療するために、欠損または欠陥内因性ウテログロビンの補充に使用さ

10

20

30

40

50

れ得ることが見出された。

本発明の観点によると、本発明は炎症状態の治療を必要とする患者に対して、UGの抗炎症有効量を投与することを含むin vivoでの炎症状態の治療方法を提供する。

本発明の更なる観点によると、本発明は、in vivoで可溶性PLA₂酵素を阻害する、そのような治療を必要とする患者に、UGのPLA₂阻害有効量を患者に投与することを含む、in vivoで可溶性PLA₂酵素を阻害する方法を提供する。

本発明のなお更なる観点によると、線維症の状態の治療または予防方法であって、そのような処置を必要とする患者に、UGのフィブロネクチン結合有効量を投与することを含む方法を提供する。

本発明の更なる観点は、本発明は、UGのフィブロネクチン結合量を加えることにより繊維形成を治療または予防する方法を提供する。

更なる本発明の観点によれば、本発明は、内因性機能的UGの欠損により特徴づけられた炎症性または線維症性状態の治療または予防方法であって、そのような処置を必要とする患者に、UGの補償量を投与することを含む方法を提供する。

本発明は、また、医薬として許容される担体または希釈剤と共同して有効量のrhUGを含む医薬組成物を提供する。組成物は注射用溶液の形で、および気管支内投与用の液体または半エアロゾルであり得る。

更なる観点によれば、本発明は、UGおよび肺表面活性物質 [例えば、Survanta (ウシ肺抽出物、Abbot Labs) およびExosurf (化学的合成肺表面活性物質、Glaxo-Wellcome)] を医薬として許容し得る担体または希釈剤と共同して含む医薬組成物を提供する。

本発明は、また、rhUG、標的適応症の治療用活性物質、のPLA₂阻害またはフィブロネクチン結合有効量および担体を含む医薬組成物を包含する。rhUGのPLA₂阻害またはフィブロネクチン結合有効量は炎症を減少し、それによって活性物質の有効量が治療部位に到達することを確実にする。

別の観点において、本発明は臨床試料中のウテログロビン - フィブロネクチン複合体の定量測定であって、ウテログロビン - フィブロネクチン複合体が存在すると推定される臨床試料を抗原捕捉試薬、例えば単一特異性ウサギポリクローナル抗体、と接触させ、不溶性支持体に固定化し；抗原検出試薬、例えばフィブロネクチンに特異的な抗体、を試料に加え；そして支持体に結合した複合体の存在を、例えば、第2抗体、例えば標準的酵素反応を用いて西洋ワサビペルオキシダーゼのような酵素と結合した抗IgG抗体、を使用し、酵

素基質が色素性または蛍光性化合物に変換され、標準分光学的または蛍光装置を用いて定量する、測定法を提供する。

【図面の簡単な説明】

本発明は、更に詳細に、以下の付属する図面を参照して記述される：

図1はUG様タンパク質の配列を示す；

図2Aは、トランスジェニックUGノックアウトマウスの所定のターゲティング構造を示す；制限部位はB=BamIII、E=EcoRI、H=HindIII；

図2B - 2Dは、PCRおよびサザンプロット解析によるトランスジェニック胚の後代の遺伝子構造の検査を示す；(B) 標的ES R1細胞クローンのサザンプロット解析、図中wt = 野生型；(C) は仔の尾生検からのゲノムDNAの代表的なPCR解析を示す；表現型およびそれらの相当するPCR産物は以下のとおりである：

UG^{+/+}、304bp；UG^{+/-}、304および667bp；UG^{-/-}、667bp；(D) マウス尾ゲノムDNAのサザンプロット；図2EはRT-PCR解析によるUG^{-/-}マウスの肺組織におけるUG-mRNAの不在の確認を示す；UG^{+/+}、UG^{+/-}、およびUG^{-/-}表現型を有する同腹仔の肺組織から抽出した総RNAのRT-PCR解析；273bp RT-PCR産物は、UG^{+/+}およびUG^{+/-}の肺には検出されたが、しかしUG^{-/-}マウスでは欠けていた；図2Fはウエスタン解析によるUG^{-/-}マウスの肺におけるUGタンパク質の不在の確認を示す；肺溶解物からのタンパク質(各30 μg)を非還元条件

10

20

30

40

50

下で、4 - 20% グラディエント SDS-PAGE を用いた電気泳動により分析し、ウサギ抗マウス UG を用いて免疫プロットングにかけた；図 2 G は、細気管支上皮細胞における免疫組織化学法を用いた UG^{-/-} マウスの肺組織切片に UG が不存在であることの確認を示す；UG^{+/+} マウス（上部パネル）の細気管支上皮細胞上の暗染色は UG を示す；UG^{-/-} マウス肺（下部パネル）に免疫反応性が欠けていることに注意。

図 3 A - 3 J は、正常対 UG^{-/-} マウスからの腎切片の組織病理学的検査の比較を示し、ノックアウトマウスにのみ異常実質線維症および糸球体 Fn 沈着を示している；UG^{+/+} (A) および UG^{-/-} (B) 同腹仔からの腎切片の H & E 染色を示す；(C) 重症実質線維症の 10 ヶ月令マウスの腎切片；(D) 同じマウスの (C) と同じ腎の領域で尿細管肥厚を示す（倍率 40X、g = 糸球体；f = 線維症；t = 管）；(E) 重症腎疾患の UG^{-/-} マウスの糸球体沈着の透過型電顕（倍率 6000X）；(F) (E) における挿入部分を 60,000X に拡大、これは Fn 原線維と一致する、コラーゲン (col) および短い広範性のものを示す、長い線状の線維構造を示す；(G) ネズミ Fn 抗体を用いた UG^{+/+} マウスからの腎切片の Fn 免疫蛍光；(H) 重症腎疾患の対 UG^{-/-} マウスからの腎切片の Fn 免疫蛍光；UG^{+/+} (I) マウスおよび UG^{-/-} (J) マウスの腎切片の Mason トリクロム染色；UG^{-/-} マウス腎切片の糸球体上の青みをおびた染色はコラーゲンである（倍率約 40X）。

図 4 A は、UG^{-/-} マウスの腎においてのみ Fn 凝集の存在を示す；UG^{+/+} および UG^{-/-} マウスの血漿、腎、および肝からの Fn の免疫沈降およびウエスタンプロットング；マルチマー-Fn バンド（太線矢印）は UG^{-/-} マウスの腎溶解物にのみ検出された。

図 4 B および 4 C は in vitro での UG-Fn 複合体の形成を示す；(B) UG および Fn の当モル濃度をインキュベートし Fn または UG 抗体のいずれかと、免疫沈降し、ウエスタンプロットングにより検出した；免疫沈降は Fn（レーン 2、上パネル）および UG（レーン 2、下パネル）を含む；両パネルのレーン 1 は Fn および UG 標準品を示す；(C) ¹²⁵I-UG および Fn の当モル濃度を 4 で 1 時間インキュベートした、得られた複合体を 6% 非還元、非失活ポリアクリルアミドゲルの電気泳動により分析した；レーン 1、クーマシーブルー染色 Fn-UG ヘテロマー；レーン 2、そのオートラジオグラム。

図 4 D は正常マウスの血漿には UG-Fn 複合体が存在するが、UG^{-/-} マウスには存在しないことを示す；UG^{+/+} マウスおよび UG^{-/-} マウスからの血漿と Fn 抗体の免疫沈降および Fn 抗体および UG 抗体のウエスタンプロットング；Fn（上パネル）；UG（下パネル）；std = UG および Fn 標準。

図 4 E は、in vitro での UG による Fn 自己凝集の投与量依存性阻害を示す；種々の量の UG の不存在（レーン 2）および存在（レーン 3 - 5）における非標識 Fn と ¹²⁵I-Fn のアフィニティ架橋；UG 不存在で生じた、非常に高分子量の強度、放射性 Fn バンド（レーン 2）は、投与量依存的に減少している；レーン 1、UG および DSS の不存在での非標識 Fn と ¹²⁵I-Fn；開放矢印頭 - マルチマー-Fn；低細矢印 = 220 kDa Fn。

図 4 F は、UG による Fn - コラーゲン複合体形成の阻害を示す；UG 不存在（レーン 3）および存在（レーン 4）における非標識 Fn と ¹²⁵I-コラーゲンのアフィニティ架橋；レーン 1、クーマシーブルー染色コラーゲン I；コラーゲン I の 1 - 1 鎖およびコラーゲン I の 2 - 2 鎖；レーン 2、UG および DSS の不存在下 ¹²⁵I-コラーゲン I および非標識 Fn。

図 5 A - 5 F は、UG 不存在下においてのみの、正常および UG^{-/-} マウスの腎における Fn 沈着の免疫組織化学分析を示す；(A) Fn および UG の当モル濃度混合物を静脈内投与された野生型マウスの腎切片；(B) UG なしに (A) と同じ Fn 投与量を受けた UG^{+/+} マウス；明らかに健康な、Fn および UG の混合物を投与された UG^{-/-} マウス；(D) Fn のみ（(C) と同じ投与量）、UG なし、を投与された UG^{-/-} マウス；(E) 可溶性 hFn のみを補充した培地で増殖した培養細胞による Fn - 線維化；(F) 可溶性 hFn および UG の当モル濃度混合物を拭く培地を加えた (E) と同じ細胞培養（倍率 40X、g = 糸球体）。

図 6 A - 6 B は、臨床試料中の UG-Fn 複合体を検出するための診断検査用構成を示す。

図 7 は、UG 二量体が 8.0 kDa MWCO 透析膜を通過するが、3.5 kDa MWCO 透析膜は通過しないことを示す。

好適な実施態様の詳細な説明

10

20

30

40

50

rhUG

本発明のrhUGは、実質的に天然ヒトUGタンパク質と同じアミノ酸配列を有している。天然ヒトタンパク質のアミノ酸配列と「実質的に同じ」アミノ酸配列を有するアミノ酸配列は、天然ヒトタンパク質に少なくとも75%同一性を有するrhUGを含む。好適な実施態様において、rhUGは少なくとも85%同一性を有し、最も好適な実施態様においては、rhUGは、天然UGに少なくとも98%の同一性を有している。

また、本発明の方法に含まれるものにUGの断片または誘導体の使用がある。UGの「断片」は、天然タンパク質配列の6またはそれ以上の連続的なアミノ酸を有する天然hUGアミノ酸配列の一部を云う。用語「誘導体」は、1またはそれ以上のアミノ酸配列および/または1またはそれ以上の化学的部分、例えばアシル化剤またはスルホン化剤を付加したものを含み、但し誘導体は親分子の生物活性を保持しているものを含み、UGのペプチド類縁体を云う。

更に、本発明の方法で使用されるUGは実質的に純粋である。用語「実質的に純粋」とは、約75%ないし約100%の純度を有するUGを云う。好ましい実施態様において、UGは約90%ないし約100%の純度を有し、最も好ましい実施態様においてはUGは少なくとも95%の純度を有している。

UGの臨床使用

本発明は、別の観点において、動物またはヒトである哺乳類にUGの有効量を投与することを含む、炎症または線維症状態を治療または予防する方法を提供する。

表2、組換え型ウテログロビンの臨床的利用

(UGの特性による分類)

UGの特性	状態
UG欠損	(1) 新生児気管支肺形成異常症； (2) 血液透析合併症； (3) プレオマイシン肺； (4) 慢性閉塞性肺疾患； (5) 気腫
PLA ₂ 活性過多 (炎症)	(1) 全身性炎症； (2) 喘息； (3) 嚢胞性繊維炎； (4) 自己免疫ブドウ膜炎及び角膜移植手術を含む眼炎症； (5) 早産及び受精能 (ex vivo) を含む産科及び婦人科に関する状況；
PLA ₂ 活性過多 (免疫変調)	(1) 慢性関節リウマチ及びI型糖尿病を含む自己免疫疾患、炎症性腸疾患、及びクローン病； (2) 移植臓器拒絶
フィブロネクチン沈着	(1) 腎性繊維症 (2) 突発性肺繊維症及び肺繊維症 (3) 血管繊維症

上記の状態の非限定的一覧は、UG欠損、過剰PLA₂活性、およびフィブロネクチン沈着に関連する代表例である。

ヒトの炎症/線維症状態におけるUG欠損、PLA₂活性、およびフィブロネクチン凝集および沈着の間の官憲は以下に要約される。

新生児気管支肺異形成症 (新生児BPD)

新生児BPDは、通常呼吸窮迫症候群（RDS）の結果、新生児において肺組織の重症炎症および不可逆的線支障により特徴づけられる。しかし、この状態はまた胎便吸引症候群または感染症によっても起こる。

HUGの欠損は、肺hUGの合成が、妊娠後期に開始される、表面活性物質と共に制御されるので、この状態に関連していた。従って、重篤な早産児は表面活性物質と共にUGも欠乏している。hUG欠損は、新生児BPDにみられる炎症および線維症に関連している、増加したPLA₂活性およびFn関連線維症の原因となる。ある種の幼児は、多分過剰のPLA₂活性のゆえに、合成表面活性物質に反応しない。それゆえ、UGが新生児BPDの治療に使用され得る。

好適な投与経路は、気管内経由の直接点滴注入または全身経路である。

多臓器不全（MOF）

過剰PLA₂は、細菌性敗血症または外傷によるMOFに関連している。この状態は、急速な、多量の組織損傷および肺、腎、膵、腸、および脈管構造の臓器機能の損失を含む全身性炎症反応により特徴づけられている。最近の証拠は、全身の可溶性ホスホリパーゼA₂活性の上昇、組織細胞膜の直接溶解、および肺表面活性物質のように、必須リン脂質の加水分解、としてMOFの引き金を指摘している。臨床設定において直接PLA₂阻害を試みたが不成功であった。

MOFにおいて、内因性UGの量は、PLA₂の超活性化を無効にするには不十分であった。外因性に供給されたUGはMOFと闘うために使用することができる。

遠隔臓器不全（ROF）は、外傷または感染により、最初に影響を受けた臓器以外の臓器に対する損傷を含む。しばしば、遠隔臓器不全は、一つ以上の遠隔臓器を含み、多臓器不全となる。例えば、膵炎は、アルコール摂取、感染、または外傷、に応じた膵臓の炎症であり、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）、急性腎不全（ARF）、および全身性ショックをひきおこす。炎症性大腸疾患または腹膜炎の再発症状の発現はROF / MOFをもたらすことができる。ROF / MOFは高レベルの循環、活性化PLA₂に関連している。hUGの全身適用はROF / MOFを予防することができた。ROF / MOF患者にUGの即時注射は重症度を減じ、PLA₂仲介臓器不全およびショックを除去することができた。

膵炎

膵炎の全ての型において、全身性および局在性の両者のI型可溶性PLA₂活性の上昇を含む。膵炎は、しばしば、肺の可溶性PLA₂活性の上昇により特徴づけられる、肺動脈閉塞不全またはARDSをもたらす。それゆえ、in vivoでのI型PLA₂sの阻害剤として、UGは急性膵炎の2つの型の治療に優れた候補であり、膵炎の全ての急性型における肺動脈閉塞不全に対する予防処置として優れている。

好適な投与経路は静脈経路である。

炎症性大腸疾患

潰瘍性大腸炎、二峰巣胃炎（ditecticulitis）、およびクローン病を含む、炎症性大腸疾患はII型可溶性PLA₂の局在産生および活性の上昇により特徴づけられる。循環可溶性PLA₂活性はIBDでも上昇している。IBDでは、PLA₂活性の上昇の結果（膵炎の場合と類似する）、重症例では、肺動脈閉塞症またはARDSの原因となる。

IBDにおいて外因性UGを適応する原理は、膵炎の場合と同じである：PLA₂、Fn凝集および / または沈着の阻害による炎症反応のダウンレギュレーションおよび遠隔臓器の関与（肺および腎）を防止すること、である。

好適な投与経路は、入院患者において静脈経路である。

細菌性肺炎

細菌性肺炎が治癒した患者のBAL液は、死亡した患者よりもUGレベルが2 - 3倍高いことが示されていた。肺の細菌感染は、内因性可溶性PLA₂を過剰に活性化すると思われる。UGは、この効果を阻害または制御するために投与される。

好適な投与経路は、もし患者が挿管されていれば気管支内経路であり、またもしそうでなければ静脈経路である。

透析の合併症

透析の主な合併症血栓症、即ち自然発生凝血塊である。これらはしばしば、患者において

10

20

30

40

50

、血管への挿入部位に栓がで、治療を妨げ、ならびに虚血性、ときには生命を危うくする症状の発症の原因となる。血液透析患者の第2の問題は、透析された血液が患者の主循環に戻る近接血管の炎症および/または線維症である。近接血管の線維症は通常、透析された血液の返りに対し抵抗、または圧力、の増加として検出される。第3の問題は、血管への挿入部位の線維症と閉鎖、あるいは、ろうである。第4の問題は、促進されたアテローム性動脈硬化であり、第5番目は、Fn沈着によるのと最もよく似た、残余腎機能の喪失である。

内因性UGが処置中に透析されてしまう可能性は、これらの問題に対し説明が必要である。内因性UGの選択的除去により、循環するFnを、凝血塊形成の集中を形成して自由に凝集し、あるいは、互いにあるいは血管内腔に粘着することにより、凝集反応をおこすように刺激して赤血球細胞上に自由に沈着するように残す。トランスグルタミナーゼ(TGs)は、基底膜、皮膚および凝血塊に見出される高分子の格子を形成する役目のある酵素である。活性化されたTGs、に対する基質として競合する遊離UGが存在しないと、Fnおよびその他の凝血塊の成分は架橋する。

近接静脈および血管への挿入部位、両者の炎症および線維症、ならびに促進されたアテローム性硬化症は血管内腔中ぬいFnの沈着により説明することができる。血管内壁にフィブロネクチン沈着は血小板および白血球細胞接着を促進し、両者はPLA₂阻害がなくて悪化する。Fnの血管沈着はアテローム性斑に見出される脂肪、コレステロールおよびタンパク質の局所沈着を促進する。フィブロネクチンはアテローム性斑ならびに腎症および初期および残った腎機能に関連する腎系球体沈着の主要成分であることが知られている。それゆえ、UG投与は炎症およびフィブロネクチン沈着を減じることによってこれらの問題を減少し除くことができる。

UGの好適な投与経路は透析前、中、後の点滴である。

代りに、内因性UGの消失は、透析液にUGの添加、またはUGで透析膜をコートする、あるいはこれらの両方により予防することができる。

臓器移植

用語、「臓器」は、例えば、腎、肝、および心臓のような固体臓器、ならびに骨髄、角膜および皮膚をいう。

臓器移植拒絶には二つの形がある：急性と慢性である。急性拒絶は、PLA₂活性および移植片をしばしば破壊する炎症細胞による浸潤を含む炎症過程である。

慢性拒絶過程は、移植片を閉じ込めるアテローム性動脈硬化を含む移植片のFn-仲介線維症を包含する。それゆえ、UGの投与は、急性および慢性移植拒絶の両者の治療および予防に使用される。

好適な投与経路は注射によるものである。

臓器移植の別の面は、ドナーから分離する前の、移植中および、急性拒絶に寄与する、レシピエントの中における臓器の虚血である。虚血はPLA₂活性の上昇と組織の壊死をもたらすことが知られている。それゆえ、UGはそのような虚血の防止に使用することができる。UGの好ましい形は、点滴液として、あるいはex vivoで臓器が保存される貯蔵バッファー中としてである。

I型糖尿病の予防

I型糖尿病は自己免疫反応による膵組織の破壊からおこる。膵臓は、通常、可溶性PLA₂およびhUGを循環中に分泌する。壊死病変が、本発明のウテログロビンノックアウト(KO)マウス(以下、「UG NOマウス」という)の膵臓中に報告されている。

ウテログロビンがないと、UG KOマウスは、免疫反応の引き金を引くことができる類似の膵組織破壊を示す。それゆえ、UGはI型糖尿病のゆっくりした進行を予防または停止させるのに使用することができる。好適な投与経路は注射による。

腎症の予防および治療

UG NOにおける腎Fn沈着および線維症は、ヒトの腎症におけるFn沈着と線維症に類似している。それゆえ、UG投与は、患者の腎症の進行をII型糖尿病のようなリスクをもって、予防または遅延することができる。

10

20

30

40

50

眼炎症の予防および治療

ブドウ膜炎、網膜炎、および手術後の炎症を含む眼の炎症はPLA₂活性の増加により特徴づけられる。それゆえ、UGは眼の炎症を減じるために局所、眼内、または全身的に投与することができる。

動脈硬化症

動脈硬化症は身体中の血管の線維症肥厚である。それは脈管構造の壁におけるFn沈着により開示および/または仲介される。アテローム性硬化症は、Fn沈着に加え、コレステロール沈着を含む動脈硬化の一形態である。それゆえ、UGは、動脈硬化を予防または減少するために投与することができる。

急性腎不全

急性腎不全 (ARF) は、典型的には、可溶性PLA₂の放出および活性化をもたらす、遠隔臓器不全症、感染または直接外傷の、帰結である。ARF中の腎の損傷は、非常に重症で、炎症により促進される急性組織損傷を伴い、腎の線維症に変化し、長期的には腎機能の減少を導く。UGの抗炎症および抗線維症の特徴は、UG KOマウスにより示されたように腎に特に関連性がある。

好適な投与経路は注射または全身投与によるものである。

全体として、以下に挙げる非限定的な状態の一覧はPLA₂および/またはフィブロネクチン沈着の阻害に関連したものであり、それらの各々は、本発明の方法による治療または予防の候補である：

- 関節/骨： 関節リウマチ； 20
- 自己免疫： 関節リウマチ、多発性硬化症、I型糖尿病、ブドウ膜炎、乾癬、全身性紅斑性狼瘡 (SLE)、およびクローン病；
- 脾： 脾炎；
- 腹膜： 腹膜炎、虫垂炎；
- 血管性/全身性： 敗血症ショック；膠原血管病、動脈硬化症、アテローム性硬化症、アナフィラキシーショック、住血吸虫症、および外傷誘発ショック；
- 腎性： 急性腎不全、腎の細菌感染、腎ガンによる炎症、化学療法または抗体療法による線維症の予防、糖尿病性腎症の予防、突発性腎症の予防および/または治療；
- 肝： 肝炎、ウイルス性肝炎、および肝硬変；
- 膀胱： 膀胱炎、尿道の炎症、尿管の炎症、および間質性膀胱炎； 30
- 生殖性/女性： 膣炎、炎症性経管、骨盤肉炎症性疾患、子宮の炎症 (卵管炎)、子宮内膜炎、膣カンジダ症、および輸卵管の炎症または線維症；
- 生殖性/男性： 陰茎炎症、前立腺炎症、精管および精嚢の炎症、精巣の炎症、および精管、精巣上体、および前立腺の炎症；
- 眼： ブドウ膜炎、網膜炎、外傷、化学薬品または煙りによる火傷、CMV網膜炎による眼炎症、結膜炎 (細菌感染)、ウイルス感染、感染剤による眼の炎症、白内障摘出、レーザー手術、角膜移植、ガンの摘出を含む眼手術後の眼炎症、網膜芽細胞腫 (ガン) による眼の炎症、放射線曝露による眼の炎症、アレルギー反応による眼の炎症；
- 心臓： 心内膜炎；
- 肺： 気管支喘息、ARDS、肺炎、突発性肺線維症、化学療法 (ブレオマイシン、メトトレキセート) による肺線維症、環境科学物質 (アスベスト、クリーニング液、汚染物質、例えば自動車排気ガス中のダイオキシン、PCB類) の曝露による肺線維症、煙吸入、溺れから回復中の肺炎、および新生児RDS； 40
- 消化管： 炎症性大腸疾患、大腸炎、クローン病、二峰巣胃炎、新生児壊死性全腸炎、感染性剤による炎症、ロタウイルス、ポリオウイルス、HIV、胃潰瘍、胃食道逆流症、および扁桃炎；
- 痔：
- 移植： 炎症または線維症および拒絶を制御するため、臓器または組織の移植手術後に投与；
- 耳： 中耳炎；および 50

皮膚： 乾癬、発疹、アレルギー性および皮膚炎、強皮症、接触皮膚炎、薬物性皮膚炎（ツタウルシ、ウルシ、およびPCB類、塩素、アンモニア、クリーニング剤、毒性物質への曝露による）。

更に、UGは、単独または上記した疾病状態の治療または予防に典型的に使用される、その他の活性物質または組成物と組み合わせて投与される。そのような活性物質または組成物は、限定はされないが、ステロイド、非ステロイド性抗炎症剤（NSAIDs）、化学療法剤、鎮痛剤、免疫療法剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、ワクチン、免疫抑制剤、造血増殖因子、ホルモン、サイトカイン、抗体、抗血栓剤、心臓血管薬、または排卵誘発剤、を含む。その他含まれるものには、経口耐性薬（oral tolerance drugs）、ビタミンおよびミネラルである。

10

更に、UGは、他の治療薬または予防薬でそのような薬物による炎症または免疫反応を抑制するために注射または投与される部位における炎症を抑制するための担体としても投与することができる。これに関しては、UGは、標的適応症に対する活性成分の有効量を投与すればよい。

UGは、また、創傷治癒、または皮膚炎症反応の間におこる線維症、瘢痕、またはケロイド形成を制限するのに使用する化粧品組成物として投与される。

更に、UGは血液補充剤、即ち合成または寄付されたヒト血液への添加物として使用される。

最後に、UGは、精子、in vitro受精卵、およびヒトおよび他の動物における母体子宮に移す前の胚に、加えることによって人工的授精率を増加するために使用することができる。本発明は、PLA₂およびフィブロンネクチン関連状態の予防または治療におけるUGの使用に関する。疾病状態の予防に関しては、「予防」は、感受性のある、または強力に感受性のある集団における疾病の展開を予防する、またはその重症度あるいは進行を制限することを云い、これに対して用語「治療」は疾病または病的状態の改善を云う。

20

UGは、静脈内に、また、新生児RDS / BPDおよび成人RDSの治療の場合には、気管内挿管を経て液体または半エーロゾルの型で投与される。他の可能な投与経路は局所、眼、皮膚、経皮、肛門、全身、筋肉内、遅崩壊性、経口、経膈、十二指腸内、腹腔内、および結腸内を含む。そのような組成物は、投与量を投与を必要とする主体または患者に、医学、栄養学あるいは獣医学分野の当業者によく知られた技術により、年齢、性、体重、および特定の主体または患者の状態、および投与経路を考慮して投与することができる。本発明の組成物は制御放出製剤で投与することもできる。組成物は、他の活性剤と共に、または連続して、再び、年齢、性、体重、および特定の主体または患者の状態、および投与経路を考慮して投与することができる。

30

本発明の組成物の例としては、経口投与用の可食性組成物、例えば、カプセル、錠剤、ピルのような固体または液体の剤型、口、鼻、肛門、膈等開口部のための類似の液体製剤、懸濁液、シロップ、またはエリキシル剤のような製剤；および滅菌懸濁液またはエマルジョンのような非経口、皮下、皮内、筋肉内、または静脈内投与（例えば、注射投与）用製剤、を含む。しかしながら、組成物中の有効成分は、血流中に投与されたとき、血液タンパク質の沈殿により凝固が生じるようなタンパク質と複合体をつくる可能性があるため、当業者はこの点を考慮すべきである。

40

そのような組成物において、UGは、滅菌水、生理食塩水、グリコース、DMSO、エタノール、その他のような適当な担体、稀釈剤、あるいは添加剤と混合することができる。UGは、両構成するため、例えば、等張液、生理食塩水、グルコース、またはDMSOバッファー中で凍結乾燥の形態として提供することができる。ある種の生理食塩溶液中ではrhUGはいくらか沈殿が見られた；この観察は、本発明化合物を単離する手段として、例えば「塩析」操作により、使うことができる。

更に、本発明は、また、UGが提供されるキットを包含する。キットは、適当な担体、稀釈剤または添加剤を含む分離された収納函を含む。キットは、共同または段階投与のための、上にあげた状態の悪い効果を減じるあるいは緩和する付加薬剤を含むことができる。付加薬剤は、別の函またはUGと混合して提供することができる。更に、キットは混合、ある

50

いは成分の合わせ方、および/または投与方法についての指示を含むこともできる。

本発明は、また、内因性機能的UGの欠損により特徴づけられる炎症または線維症状態を治療または予防する方法であって、そのような処置を必要とする患者に、UGの補償量を投与することを含む方法を意図している。用語「補償量」は、総UG（内因性機能的UGおよび外因性UG）からその正常範囲内の局所肺あるいは全身濃度をもたらすに必要なUGの量を意味する。より特異的には、内因性UGの局所肺濃度の正常範囲は約 $> 50 \mu\text{g UG} / \text{mg}$ アルブミンまたは $> 50 \mu\text{g} / \text{l}$ である。血清UG濃度の正常範囲は $> 15 \mu\text{g} / \text{l}$ である。

本発明の組成物は、予期した目的、即ち、PLA₂類の選択的阻害および炎症の減少および/または線維症状態においてフィブロネクチンの凝集および/または沈着を緩和するために、フィブロネクチンの結合と云う所望の効果をj得るためのUGの血漿または組織レベルを増加させる目的、を達成するために有効な量の天然および/または組換えhUGを含む。組成物は、医薬として許容される担体または希釈剤と共に、実質的に純粋な天然および/または組換えヒトUGの有効量を含む。

更なる面において、本発明の組成物は医薬として許容される担体または希釈剤と共に、天然および/または組換えhUGおよび肺表面活性物質の有効量を含む。PLA₂活性および/またはフィブロネクチン沈着の阻害に十分なUGの肺への局所気管支内投与は、実質的に純粋なUGを単回または多回投与において $0.2 \mu\text{g} / \text{kg}$ ないし $500\text{mg} / \text{kg}$ タンパク質の範囲である。

UGは通常、単回または多回投与量で、 $20\text{ng} / \text{kg}$ ないし $500\text{mg} / \text{kg}$ の単回量、あるいは10gまでの連続点滴で投与される。天然および/または組換えhUGは、人工肺表面活性物質、例えばSurvanta、と共に、気管支内経路で投与される。UGおよびSurvanta ($5\text{ml} / \text{kg}$) は、一緒に投与され、UGは、治療的に機能を保持しつつ、表面活性物質とは結合しない。肺表面活性物質は、一般的に、約10 - 90重量%の量、更に、普通は約20 - 80重量%で組成物中に存在する。表面活性物質は、その非常に低表面張力によって肺の内表面全体に広がり、UGを運ぶ。PLA₂活性および/またはフィブロネクチン沈着を阻害するに十分な静脈内注射を経るUGの全身投与には、実質的に純粋な天然および/または組換えhUGをタンパク質 $0.5 \mu\text{g}$ ないし数グラムの連続点滴投与量で、延長された時間(日)を必要とする。

注射および半エーロゾル気管支内デリバリーに適した剤型は、天然および/または組換えhUGの水溶液と粘度調節剤および安定剤を含む。

ここで使われる用語、「PLA₂阻害有効量」はPLA₂活性を阻害し、患者の組織または身体の炎症を減じあるいは緩和するUGの量を意味する。用語「フィブロネクチン結合有効量」はフィブロネクチンに結合してその凝集および/または沈着を減じ、線維化または線維症を予防または減少するUGの量を意味する。ここで使用される用語、「抗炎症量」は組織または身体において炎症を減じまたは緩和する量を意味する。典型的には、炎症および線維症状態の治療のために成人に投与されたUGの量は、一回に $0.2 \mu\text{g} / \text{kg}$ ないし $500\text{mg} / \text{kg}$ 、あるいは数グラムで延長された期間にわたって投与される。新生児には、新生児RDSの治療において、典型的には、一回投与で $50\text{ng} / \text{kg}$ ないし $100\text{mg} / \text{kg}$ 、あるいは10gまでであり、連続して、延長された時までの範囲である。連続点滴投与の有効かつ安全な速さは $50\text{ng} / \text{kg} / \text{時}$ から $500\text{mg} / \text{kg} / \text{時}$ の間である。

実施例

本発明は、以下の非限定的実施例を参照して更に記載される。部および%は、特に断らない限り重量基準である。

実施例 1 : In vivo実験

組換えヒトUGはMantileら(1993)の方法により得た。

P. cyanocephalus種の雄1頭および雌1頭、体重約400グラム、それぞれは妊娠142日で帝王切開により出産された。これはRDSの確立されたモデルである(Coalson, J.J., et al. Baboon Model of BPD. II: Pathologic features, Exp. Mol. Pathol. 37: 335-350 (1982))

分娩後、新生仔をケタミン($10\text{mg} / \text{k}$)で麻酔し、2.5mm直径の気管内管で挿管した。血液ガスおよび圧力は、経皮的に橈骨動脈に入れた動脈ラインを経てモニターした。深部静脈ラインを経皮的に伏在静脈につけ、それを通して液体、抗生物質、および薬物を投与した

。動物は自動制御赤外線加温器に保ち、標準時間サイクルで通気し、圧力制御ベンチレーターで湿度を保ち、36 - 37 に保持した。最初の設定は、FiO₂1.0、速度40 / 分、I/E比 1 : 1.5、終末呼気陽圧 (PHEP) 4 cm H₂O、および最大吸気圧 (PIP) は適正な胸部可動域に必要なようにした。FiO₂は1.0に保ち、PIPはPaCO₂を40 ± 10トルに保持するよう制御した。血液ガス、ヘマトクリット、電解質、プロトロンビン時間、部分トロンボプラスチン時間、およびdextrostixは1時間毎にモニターした。試験のため採取した血液は大人のヒヒのヘパリン処理血液で容積測定のため入れ替えた。静注液は10cc / kg / 時で電解質を投与し、心拍数が180回 / 分を超えた時に必要により増加した。炭酸二ナトリウム (2 meq / kg) を塩基欠乏が - 10を超えた時に投与した。アンピシリン (50mg / kg / 日、2回に分別して投与) およびゲンタマイシン (5mg / kg / 日、2回に分別して投与) を実験期間中連続的に投与した。

10

1 動物は表面活性物質プラスPBS (処置No. 1) を投与し、2 番目の動物は (処置No. 2) 表面活性物質プラス 1 mg / kgのrhUGの2回投与をした。使用した表面活性物質はSurvanta (Ross Labs) で、これは、ウシ肺組織由来、リン脂質に加え表面活性物質アポタンパク質BおよびCを含む表面活性物質製剤である。最初のrhUGの投与は表面活性物質と共に与え、2回目は最初から4時間後に投与した。動物は、動脈血液ガス、電解質およびEKGをモニターした。表面活性物質治療を開始後50時間後に屠殺した。肺を24および48時間にプロテアーゼ阻害剤を含むPBS (PMSF、10 μg / mlロイペプチン、10 μg / mlペプスタチンおよびバシトラシン) で洗浄した。PLA₂活性を測定するまで - 80 に凍結した。総タンパク質はBradford法 (BioRad) で測定した。肺洗浄液中のPLA₂活性をLevinらの方法 (1986 ; 上

20

表3、UGの in vivoテストの結果

処置番号	時間	肺洗浄PLA ₂ 活性 (c c p m / 1 0 μ g タンパク質)
1	24時間	3030
	48時間	2607
2	24時間	1739
	48時間	996

30

上記のデータは2測定値の平均である。結果は、rhUGの気管内投与がin vivoでPLA₂を阻害することを示している。表面活性物質およびrhUGを投与された動物は、rhUGなしに表面活性物質を投与された動物と比較して肺洗浄液中のPLA₂活性は認め得る位低かった。データは、表面活性物質と共にrhUGを投与することが、表面活性物質リン脂質を保護するのに有益であることを確認している。

実施例 2 : In vitroでの可溶性PLA₂による人工表面活性物質の加水分解の阻害

rhUGはin vitroで可溶性PLA₂による人工表面活性物質の加水分解を阻害する。Survantaはウシ肺由来の人工表面活性物質であり、RDSの未熟児および成人のRDS (ARDS) の治療に使われる。I群可溶性PLA₂、即ちブタ、豚臓PLA₂ (Boehringer Mannheim) によるSurvantaの加水分解は、基質として、蛍光ホスファチジルコリン基質 (Cayman Chemicals) と競合して、産物としてアラキドン酸を生成する能力によって特徴づけられる。

40

SurvantaはI群可溶性PLA₂によりin vitroで分解される基質である。Survantaはヒト肺の細胞外液に見出されるPLA₂によりin vitroで急速に分解される。RhUGはin vitroでSurvantaの分解を阻害する。

実施例 3 : UGノックアウトマウスの作成

トランスジェニックUG KOマウスを、哺乳動物生理におけるウテログロビンの役割を決める目的、およびいくつかの炎症臨床状態における治療剤としてUGに対するモデルを作りだす目的で創造した。第一の段階は、内因性ネズミウテログロビン遺伝子を標的にし翻訳する適当なDNAベクターを構築することであった。エキソン3を含む3.2kb BamHI - EcoRI DNA断片、および129/SVJマウス株 (Ray、1993) からのウテログロビン遺伝子のフランキング

50

配列を、Leiら(1996)に記載のpPNWベクターの相当する部位にサブクローニングした。エキソン2の0.9kb断片を含む部分およびその上流配列をPCRで増幅した[プライマー、Primer-L(イントロン1から):5'-TTC CAA GGC AGA ACA TTT GAG AC-3'; Primer-R(エキソン2から):5'-TCT GAG CCA GGG TTG AAA GGC-3'と共に]配列には遺伝子ターゲットベクターに方向選択的にサブクローニングするため、末端にNotIおよびXhoI制限酵素部位を入れた。この構築において、27アミノ酸をコードするExon 2の79bpが除かれた。PCR断片はpPNW中のネオマイシン耐性をコードする遺伝子上流におき、遺伝子ターゲットベクター、pPNWUGを作成した。ベクターは図2Aに示す。ここで、PGK-neoカセットはウテログロビン遺伝子を阻害し、タンパク質コード配列を分解する。

pPNWUG遺伝子ターゲットベクターをNotIで直線化し、Nagy, A., et al. PNAS 90:8424(1993)に従ってES R1細胞に電気穿孔した。電気穿孔した細胞をガンシクロビルおよびG-418選択を行い156クローンを得た。サザンブロット(DNA)解析で、156クローン中3個の相同組換えから、図2Bに示すように、野生型ウテログロビンアレレの5.1kb HindIII断片、および8.2kb HindIII断片を同定した。これらのES R1クローンをCapecchi, Science 244: 1288(1989)に従ってC57BL/6の尾胞に注射した。異なったキメラ作成者の系統から伝わったマウスの2つの異なる系統が生成した。標的ウテログロビン遺伝子座をもつヘテロ接合体の子(UG^{+/-})を交配し、子孫の遺伝子型をPCRで解析し(図2Cに示す)同じくサザンブロット(図2Dに示す)で解析した。

実施例4: UG遺伝子ノックアウトおよびネズミUG(mUG)タンパク質の不存在の証明

ホモ接合ノックアウトマウス(UG^{-/-})は検出し得るmUGを有していないことを証明するため、ウテログロビン遺伝子ターゲットマウスを、肺を含むいくつかの臓器でmUG-mRNAおよびmUGの発現をテストした。実験方法は研究所動物福祉および使用委員会により認可された。全RNAsを、UG^{+/+}、UG^{+/-}およびUG^{-/-}マウスの異なる臓器から単離した。mUG-mRNAを検出するため逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を使用した。標的分子はmUG特異的プライマー、mPr(5'-ATC TTG CTT ACA CAG AGG ACT TC-3')を用いて逆転写した、そして生じたcDNAをPCRプライマーmPrおよびmPl(5'-ATC GCC ATC ACA ATC ACT GT-3')を用いて増幅した。PCR産物をUG遺伝子配列のエキソン-2由来のオリゴヌクレオチドプローブ、mPp(5'-ATC AGA GTC TGG TTA TGT GGC ATC C-3')と共にハイブリダイズ(hybridized)した。マウスGAPDH RT-PCRで使用したプライマーおよびプローブは以下のとおりである:mGAPDH-r(5'-GGC ATC GAA GGT GGA AGA GT-3'); mGAPDH-l(5'-ATG GCC TTC CGT GTT CCT AC-3'); mGAPDH-p(5'-GAA GGT GGT GAA GCA GGC ATC TGA GG-3')。図2Eは、mUG-mRNAはUG^{+/+}、およびUG^{+/-}の肺には検出されたが、UG^{-/-}マウスには検出されなかったことを示す。類似のデータ(示さない)は、mUG-mRNAはUG^{-/-}マウスの前立腺または子宮には存在しないが、しかし完全なウテログロビン遺伝子のマウスには存在することを示している。

肺のmUGタンパク質の免疫沈降およびウエスタンブロット解析は、図2Fに示したように、同様な結果を与えた。UG^{+/+}、およびUG^{-/-}マウスの腎、肝、および肺から得た組織溶解物を、2mMフェニルメチルスルフォニルフルオリドおよびアプロチニン、ロイペプチン、およびペプスタチンA、各20μg/mlを含有するバッファー(10mM Tris-HCl、pH7.5、1% Triton X-100、0.2%デオキシコール酸、150mM NaCl、5mM EDTA)にホモジナイズすることにより調製した。ホモジネート(homogenates)を17,500xgで、4、30分間遠心分離し、記載された方法(E. Harlow and D. Lane, Antibodies; a laboratory manual, 1st Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988)により、組織溶解物または血漿タンパク質(1mg/ml)をネズミFnに対するウサギ抗体と共に免疫沈降反応を行った(1:100希釈)。精製ネズミFn(mFn)およびrhUG(Mantile, G. et al., J. Biol. Chem. 267: 20343(1993))の共免疫沈降反応をmFnとrhUGの等モルを10%グリセロール、50mM Tris-HCl、pH7.5、250mM NaCl、4.3mMリン酸ナトリウムの存在下で、4、1時間、インキュベート(incubating)し、次いで抗mFn抗体(1:100希釈)を加えることにより行った。抽出組織タンパク質(30μg)または免疫沈降物の等しい量が、還元条件下、4-20%または6%SDSポリアクリルアミドゲル、次いでネズミFn(1:2000

10

20

30

40

50

稀釈)またはUG(1:2000稀釈)に対するウサギ抗体のウエスタンブロッティングにより証明された。UG^{-/-}マウスからの組織または体液にはmUGは検出されなかったが、UG^{+/+}およびUG^{+/-}マウスからの組織はmUGタンパク質を含有していた。

最後に、UG^{-/-}の肺の組織病理学検査では、細気管支上皮細胞のmUG特異的免疫染色のみが欠けていた。UG^{+/+}、UG^{+/-}およびUG^{-/-}マウスからの肺組織をブアン液(Bouin's fluid)または10%中性緩衝ホルマリン固定液で固定し、パラフィンに包埋し4-6ミクロンの切片とした。それらをヘモトキシリン・エオジン(H&E)染色した。選択した組織は、コラーゲン検出にMassonトリクロム法、フィブリンにはPTAH、あるいはアミロイドタンパク質にはコンゴレッドにより染色した。MUGおよびmFnの免疫組織化学検出には、VectastainウサギElite ABCキット(Vector Laboratories)を使用した。mUGに対するウサギ抗体(CytImmune)は、mUGアミノ酸配列(Lys28からThr49、特に、KPFNPGSDLQNGTQLKRLVDT)に相当する合成ペプチド(Peptide Technologies, Inc.)を使用することにより上昇した。mFn(GIBCO BRL)に対するウサギ抗体は1:1000の稀釈で使用し、mUGに対する抗体は1:500で使用した。

これら、3つの結果はホモ接合体ウテログロビンノックアウトマウス、UG^{-/-}、はmUGタンパク質、あるいはタンパク質の検出し得る片を欠損していることが確認された。

実施例5:ウテログロビンノックアウトマウスの表現型

UG^{+/-}マウスの交雑種に生まれた179マウスの内、46(26%)は+ / +、90(50%)は+ / -、および43(24%)はUG^{-/-}遺伝子型であって、破壊されたmUG座はメンデル様式に従って遺伝すること、UG^{+/+}、UG^{+/-}およびUG^{-/-}マウスは出生時等しく生存能力があることを示している。しかし、UG^{-/-}マウスは悪液質、重症タンパク尿、および深い体重損失に関連した低カルシウム血症により特徴づけられる、進行性疾病を展開する新規な表現型を呈した。タンパク尿は、異常に高いアルブミンおよびその他の血清タンパク質が尿中に排泄される状態である。それは糸球体機能不全および腎不全を示唆する。冒された動物の腎の(上記に肺の場合について記載したように)組織病理学的検査は、図3に示すように劇症腎糸球体疾病を表わしている。UG^{+/+}マウスの糸球体と比較すると、UG^{-/-}マウスのそれは低細胞性であり、大量の好酸性タンパク性沈着を有している。UG^{-/-}マウスの致命的な腎疾病の経過は、初期発症(4-5週令)または遅延発症(10ヶ月令)であった。最初4週令には健康に見えたこれらのUG^{-/-}マウスは、2ヶ月令時に巣状糸球体沈着を有していた。約10ヶ月令において、これらのマウスは、初期発症で死亡したマウスに類似して著しい悪液質を有していた。ヘテロ接合体はUG^{+/-}マウスで観察された腎疾患の温和な形態を有していた。遅発症疾患のマウスの腎の組織病理は、初期発症疾患と同じく重症腎糸球体病ばかりでなく、著しい腎実質の線維症および尿管肥厚を有していた(図3を参照)。UG^{-/-}マウスにおいては優勢な病状が腎に見出されたが、組織病理学的研究で、血管指向性に見える膵の壊死優勢な病巣領域を見出した。更に、アポトーシス小体を示唆する胸腺および脾臓構造中に病巣領域が見出された。興味あることには、膵臓はmUG遺伝子を発現する、そしてこの臓器は、また、I群細胞外PLA₂の豊富な起源である。と云うのは、これは原的に消化酵素であり、その活性化は組織損傷の原因となる。

ウテログロビンタンパク質は免疫調節および抗炎症性質を有しているため、そして反応性アミロイドーシスは炎症に反応して発症することが知られているので、mUG欠如マウスにおける糸球体沈着はアミロイドタンパク質であるようである。反応性アミロイドーシスは、アミロイドタンパク質および免疫複合体の沈着により特徴づけられる。UG^{-/-}マウスにおける腎沈着の同定は、腎切片の免疫組織化学により開始された。UG^{-/-}およびUG^{+/+}マウスの腎切片をコンゴレッド染色し、偏光下で観察した。アミロイドタンパク質はこの検査で陽性複屈折を与える;しかし、UG^{-/-}マウスの糸球体は明らかに陰性であった。UG^{-/-}マウスの糸球体のIgA、IgGまたはIgM免疫複合体の免疫蛍光研究および主要なアミロイドタンパク質の存在での免疫組織化学分析は、また、陰性であった。従って、UG^{-/-}マウスの糸球体沈着はアミロイドタンパク質も免疫複合体も有していなかった、それゆえ、炎症反応の結果とは言えない。

実施例6:UG^{-/-}腎におけるFnおよびコラーゲンの検出

UG^{-/-}マウスの腎沈着を、その構造および形態を解明するため透過型電子顕微鏡で観察した。糸球体病変を有するUG^{-/-}マウスからの腎をホルマリン固定し、エポキシ樹脂に包埋した。薄切片を電子顕微鏡下で観察するために酢酸ウランおよびクエン酸鉛で染色した。電顕写真は6000Xまたは60,000Xのいずれかで行った。沈着は一次的に2つのタイプの原繊維構造を含んでいた：比較的多くはない長い筋のある原繊維の1型、他は短い拡散した、豊富な型（図3Eおよび3F）。コラーゲンおよびフィブロネクチンのようなECMタンパク質は、類似の繊維構造を生産するので、UG^{-/-}マウスの糸球体沈着はこれらのタンパク質を含有しているであろう。

糸球体沈着を、次に、抗mFn抗体を用いて免疫蛍光法により分析した。ホルマリン固定標識切片を、ウサギ抗mFnおよびEITC複合ヤギ抗ウサギIgGを用いて免疫蛍光に使用した。同様に、免疫蛍光研究をmFn、コラーゲンIおよびIII、ピトロネクチン、ラミニン、およびオステオポンチンに特異的な抗体を用いて、行った。エピフルオレセンス (epifluorescence) をZeiss Axiophot microscopeを用い写真に撮った。野生型マウスの腎糸球体中のFn特異性免疫蛍光は可視的に検出されなかった（図3G）、UG^{-/-}同腹仔の糸球体のそれは強力であった（図3H）。Massonトリクロム染色を用いたとき、UG^{+/+}マウスの糸球体は陰性であった（図3I）、そしてUG^{-/-}のそれは（図3J）陽性であった。このことは糸球体沈着中にコラーゲンの存在を示唆している。コラーゲンIおよびコラーゲンIII特異的抗体を用いた、免疫蛍光はこの結果を確認した。Fnは他の細胞内マトリックス (ECM) タンパク質と相互作用することが知られているので、我々は、UG^{+/+}およびUG^{-/-}マウスの糸球体にラミニン、ピトロネクチンおよびオステオポンチンの存在を、免疫蛍光により試験した。結果は陰性であった。

実施例7：UG^{-/-}マウスの腎はFnを過剰生産しない

Fnの過剰生産が、腎糸球体に沈着するためであることを調べるために、UG^{-/-}およびUG^{+/+}マウスの腎、肺、および肝のFn-mRNAの相対量をRT-PCRおよび濃度法で調べた。結果は、Fn-mRNAの相対量がUG^{-/-}およびUG^{+/+}動物で必然的に同じであることを示している。それゆえ、Fn-mRNAの過剰生産はUG^{-/-}マウスの糸球体におけるFn沈着の原因ではなさそうである。そこで我々は、UG^{-/-}およびUG^{+/+}マウスの血漿、腎、および肝のFnタンパク質を還元下でSDS-PAGE、およびウエスタンブロッティングにより調べた。野生型マウスの血漿、腎および肝に、220kD Fn種のみが検出された；しかしUG^{-/-}マウスの血漿および肝溶解物は220kD Fnバンドを示したので、腎溶解物は別のはっきりした、共有結合したマルチマーのFnバンドを含んでいた（図4A）。

実施例8：UG^{-/-}マウスの上昇した血清PLA₂活性

現時点の概念に基いて、Fn-マトリックス組み立ての初期段階および繊維化は、少なくとも1細胞表面においては、インテグリンの活性化およびFnの自己凝集を含むと考えられている。UGは強力な可溶性ホスホリパーゼA₂ (sPLA₂)、免疫経路の重要な酵素、の阻害剤であるので、UG^{-/-}マウスにmUGの欠損は、糸球体腎炎、炎症性腎疾患、の展開に寄与すると考えられる。それゆえ、血清PLA₂活性を、年、性、体重、にあわせてUG^{+/+} (n = 3) およびUG^{-/-}マウス (n = 3) で調べた。動物は屠殺し、各試料の血清PLA₂活性をPLA₂測定キット (Cayman Chemical) を用いて、3度、製造者の指示書に従って測定した。血清中タンパク質濃度はBradford assay (Bio Rad) で測定し、PLA₂の比活性を計算した。UG^{-/-}マウス [36 + 3.3 (SEM)] の血清PLA₂比活性 (μモル/分/mgタンパク) は、UG^{+/+}マウス [18 + 2.8 (SEM)] よりも有意に高かった (p < 0.05)。これらの結果は、高いPLA₂活性はリゾホスファチジン酸 (LPA) 産生の増加を導き、従ってUG^{-/-}マウスのインテグリン活性化および、Fn-自己凝集を促進する可能性があげられる。

実施例9：in vitroでのウテログロビンおよびフィブロネクチンの相互作用

ウテログロビンがどのようにしてFn自己組み立てを予防するのかを更に理解するために、in vitroでのmFn-Fn相互作用を破壊するrhUGの能力をしらべた。RhUGとmFnの等モル濃度をタンパク結合またはその他の作用を起こさせるためにインキュベートし、抗Fn抗体で免疫沈降させ、免疫沈降を還元条件下でSDS-PAGEにより解析した。前に述べたように、mFnあるいはmUG抗体のいずれかのウエスタンブロッティングで各タンパク質を検出した。結

10

20

30

40

50

果は、rhUGでフィブロネクチン γ は共免疫沈降することを示した(図4B)。これらの結果を確認するため、 ^{125}I -rhUGをmFnとインキュベートし、複合体を6%ポリアクリルアミドゲルを用い、非失活、非還元条件下で、電気泳動により解析した(図4C)。オートラジオグラム中のFn-UGヘテロマーの検出(レーン2)はin vitroでUGと作用した可溶性Fnを示している。Fn-UGヘテロマー化がin vivoでおこるかどうかを確かめるため、UG $^{+/+}$ およびUG $^{-/-}$ マウスの血漿を、rhUGと交叉反応しない抗mFn抗体と免疫沈降した(図4D)。抗mFn抗体は、UG $^{+/+}$ の血漿のmFnおよびrhUGの療法と共沈殿するが、しかしUG $^{-/-}$ マウスのときはしなかった。このことはFn-UGヘテロマーがUG $^{+/+}$ マウスの血漿に存在することを示唆している。それゆえ、Fn-UG複合体はin vitroで生じた単にアーチファクトでなく、血清中に自然に生じるものである。

10

Fnに結合するUGの特異性と親和性をしらべるために、 ^{125}I -Fnを非標識FnとUG存在、不存在でインキュベートした。複合体はジスクシンイミド基質(DSS)と親和交叉結合した。ヒトFn(hFn)でコートした24穴プレートを用い(Collaborative Biomedical Products)、 $3\ \mu\text{l}$ の ^{125}I -Fn(比活性 $6\ \text{mCi}/\text{mg}$ 、ICN Biomedicals)をUGまたはFn(10^{-2} - $10^{-6}\ \text{M}$)、 $500\ \mu\text{l}$ HBSS中の存在、不存在下で、室温、2時間インキュベートした。UG抗体とFnのSDS-PAGEおよびウエスタンブロッティングではUGコンタミを検出することはできなかった。放射能標識複合体をPBSで2回洗滌し、 $1\ \text{N}$ -NaOHに可溶化し、 $1\ \text{N}$ HClで中和、放射能をガンマカウンターで測定した。別の実験で、 ^{125}I -hFn($3\ \mu\text{l}$)を $20\ \mu\text{l}$ ($1\ \mu\text{g}/\text{ml}$)マウスFn、 $40\ \mu\text{l}$ HBSS中、pH7.6で、還元rhUG(5 - $500\ \mu\text{g}$)の増加する濃度を存在または非存在で、室温、2時間インキュベートした。試料は $0.20\ \text{mM}$ DSS、室温、20分、架橋させ、SDS - 試料バッファ中で5分ボイルし、4 - 20%SDSポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、オートラジオグラフを行った。UGがないと、 ^{125}I -Fnは高分子、放射性複合体を非標識Fnと共に形成した。しかし、UGがあると、Fn - Fn凝集の形成はUG濃度依存的に阻害された(図4E)。UGに対するFnの結合親和力とFn自体に対するそれとの間に差があるかをしらべるため、結合試験を ^{125}I -Fnを非標識Fnとインキュベートし、UGの濃度を変えて多穴プレートに固定化する実験を行った。別の実験で、非標識、固定Fnと ^{125}I -Fnの結合実験を非標識可溶性Fnの種々の濃度を変えて行った。両タイプの結合の実験からのデータのScatchard解析は解離定数(kds)、Fnに結合するUGは $13\ \text{nM}$ 、Fn自体の結合は $176\ \text{nM}$ の直線を示した。これらの結果はFnに対する相対的に高いUGの結合親和性のゆえに、UGは効果的にFn自己凝集を妨げる。放射性ヨード(^{125}I) - コラーゲンIを、UGの存在、非存在下に、非標識Fnとインキュベートするアフィニティ - クロスリンク実験をFnについて上記したのと同様に行った。失活または非失活 ^{125}I - コラーゲンI(比活性 $65.4\ \text{mCi}/\text{mg}$) $15\ \mu\text{l}$ を、Fnと還元UG($250\ \mu\text{g}$)の存在、非存在下に、インキュベートし、アフィニティ - クロスリンクし、電気泳動し、オートラジオグラフを行った。結果はUGは高分子量 ^{125}I - コラーゲン-Fn凝集を妨げる(図4F)。

20

30

実施例10：rhUGによる糸球体hFn沈着のin vivo阻害

rhUGが、Fn凝集から腎糸球体を防御するかどうかを試験するため、可溶性ヒトFn(hFn)のみ、あるいは等モル濃度のrhUGを混じたhFnをUG $^{+/+}$ および明らかに健康なUG $^{-/-}$ 同腹仔にヒトFn($500\ \mu\text{g}/150\ \mu\text{l}$ PBS)を2ヶ月令、約22g、UG $^{+/+}$ および健康、UG $^{-/-}$ マウスの尾静脈に投与した。同様に、対照マウスをhFn $500\ \mu\text{g}$ と等モル濃度のrhUGまたはアルブミン($150\ \mu\text{l}$ PBS中)の混合物を注射した。最終注射24時間後に、マウスを屠殺し、種々の臓器をホルマリンバッファで固定した。腎その他の臓器の組織切片を単一特異性抗hFn抗体(GIBCO BRL; クローン1)およびFTCC複合ウサギ抗マウスIgG(Cappel)と免疫蛍光によりしらべた。別の実験で、UG $^{+/+}$ マウスにhFnのみ $1\ \text{mg}/150\ \mu\text{l}$ PBSを1日1回、3連続日、注射した。

40

注射したヒトFnの原理は外因性ネズミFnと投与したhFnの間を区別することができることにある。hFnの静注と種々の組織における免疫組織化学的検出の方法は、記載した。

hFnとrhUGの混合物(1:1モル比)あるいはhFnのみ注射した野生型UG $^{+/+}$ マウスの糸球体におけるヒトFn免疫蛍光は類似していた(図5Aおよび5B)。しかし、hFnとUGの混合物を注射したUG $^{-/-}$ マウスは糸球体中で少しばかりhFn特異的免疫蛍光を示した(図5C)

50

。それに対し、Fnのみを投与したものは強い免疫蛍光を示した(図5D)。hFnおよびBSAの混合物の投与は、対照として、防御効果は示さなかった。

このUG防御効果はUG^{+/+}マウスにFnを大量に投与すれば克服できるかをしらべるために、1頭当りhFn 1mgを毎日、3連続日投与した。UG^{+/+}マウスに低濃度のhFn(500µg/動物)静注は効果がなかったが(図5A)、高投与量(3mg/動物)の投与は、著しい蓄積を示した。それゆえ、UGは糸球体Fn沈着を予防し、そして、UG^{-/-}マウスと反対にUG^{+/+}マウスは、内因性UGの存在のゆえに可溶性Fnの蓄積に対する高いしきい値を有している。

実施例 1 1 : 組織培養細胞におけるrhUGによる線維症およびFnマトリックス組立の阻害

UGがFn線維症化とマトリックス組み立てを予防するかどうかを、典型的なin vitro組織培養測定において、決めるために、マウス胚繊維芽細胞を可溶性hFnのみあるいはhFnとrhUGの等モル濃度の混合物を含む培地に培養した。培養細胞(CRL6336、ATCC)のFnマトリックス組み立ておよび繊維化は記載に従った。hFnのみで処理した培養の細胞にみられる繊維化の程度はhFnおよびrhUGの混合物をくわえたもの(図5F)と比較して高かった(図5E)

実施例 1 2 : 臨床試料中のUG-Fn複合体の検出

血清、BAL液、および喀痰のような体液の臨床試料中のUG-Fn複合体の検出は、ヒト疾病におけるこの複合体の役割を決めるのに重要である。UG-Fn複合体の検出用の液体相診断測定が開発され、測定フォーマットは図6に示される。捕捉抗体、固体支持体に共有結合で結合、はヒトタンパク質に対してあげられた単特異的ウサギポリクローナルである。固体支持体yはビーズ、例えば磁気ビーズ、チューブ、ELSAプレート、であり得る。固体支持体は、種々の試料のより一致した結果を得るために各結合反応の後に洗滌ステップを実行するための柔軟性を与える。検出抗体はFnに特異的であり、多くの市販品から得られる。抗IgG抗体は西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)のような酵素に結合し、分子鎖の一端で抗FnIgGを検出するのに使用される。この検出は、標準的酵素反応で行われ、酵素基質は色素源または蛍光化合物に変換され、それが分光測定器またはフロリメーター(Amersham)により定量される。この測定の検出限界は、試料液ml当りUG-Fn複合体500µgである。

実施例 1 3 : ウテログロビン欠損症

hUGの一過性だが急性欠損は、血液透析、腹膜透析および連続透析(CRRT)を含む臨床透析として知られる、血液浄化技術により作り出される。全ての臨床透析は、血液以外の尿素のような化学代謝物、2-ミクログロブリンのような小タンパク質、を含む有毒体廃棄物を濾過する半透膜の使用を包含する。

UGは極端に小型のタンパク質であり、SDS-PAGEで異常な移動をすることで知られ、真の分子量が15.7kDaにも拘わらず分子量約10-13kDaに相当する。それゆえ、UGダイマーは、透析実験において、10-13kDaとして行動することが予想される。驚くべきことに、ダイマーは非常に小型なので、8.0kDa MWCO透析膜を通過することが見出された。UGは、また、14.0kDa MWCO透析膜を通過する。

これら実験に使用された透析膜の組成は、もし同じでないなら、臨床透析用として製造され使用された大多数の膜の組成と類似している。それらは再生セルローズまたはセルローズアセテートからなる。

本実験では、2つの部分精製(1つは>90%純度、他は約70%純度)rhUG細胞溶解物の1.0mlアリコート、バッファー添加物なしに、非緩衝50mM酢酸アンモニウム1000mlに対して、3サイズの透析チューブを使用して透析した、膜サイズは、3.5kDa、8.0kDa、および14.0kDa(Spectra/Por; Thomas Scientific)である。48時間にわたる、透析で各試料に対し4回バッファーをとりかえて、全て室温で行った(約25-27°C)。各透析チューブは、直接チューブに簡単に圧力をかけ(圧搾する)、漏れを観察することにより、初めと終わりに漏れをチェックした。その結果、漏れはなかった。チューブは両端を二重にクランプし、漏れに対して更に安全を講じた。

図7は、これらの結果のSDS-PAGE分析を示す。90%純度前透析試料は、レーン1、2、3、の3つの透析後試料近辺に、レーン7、8に示した。UGダイマーは、8.0kDa MWCO膜で透析した試料に示されるレーンには最早存在しない。これらの結果は、部分的に精製した

10

20

30

40

50

UG調製物の別のバッチで、後に、確認された。

本発明は、現在最も実際的であり好ましい実施態様であると考えられていることに関連して記載されているが、本発明は、開示された実施態様に限定されるべきでなく、逆に、付属する請求項の精神と範囲内に含まれる種々の変形例および等価の配列をカバーすることを、意図していることが理解されるべきである。

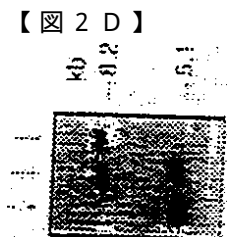
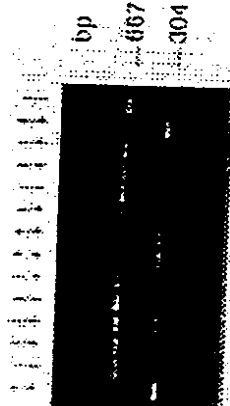
参考文献

1. Levin, S.W.ら、Life Sci. 38: 1813-1819 (1986) ;
2. Singh, G.ら、Biochem. Biophys. Acta 1039: 348-355 (1990) ;
3. Mantile, G.ら、J. Biol. Chem. 268: 20343-20351 (1990) ;
4. Singh, G.ら、J. Histochem. Cytochem. 36: 73-80 (1987) 10
5. Bernard, A.ら、Clin. Chem. 38: 434-435 (1992) ;
6. Dhanireddy, R.ら、Pediatric Res. 23: 463A (1988) ;
7. Dhanireddy, R.ら、Pediatric Res. 33: 323A (1993) ;
8. Piomelli, D.ら、Op. In Cell Biol. 5: 274-280 (1993) ;
9. Krishnan, R.S.ら、Science 158: 490-492;
10. Beier, H. Verhandl Deut. Zool. Ges. Heiderberg (1968) ;
11. Umland, T.C.ら、Nature Struct. Biol. 1: 538-545 (1994) ;
12. Hard, T.ら、Nature Struct. Biol. 2: 9380989 (1995) ;
13. Umland, T.C.ら、Nature Stuct. Biol. 2: 919-922 (1995) ;
14. Stripp, B.R.ら、Am. T. Physio. 271 (Lung Cell. Mol. Physiol. 15) : L656-L664 20
(1996) ;
15. Lesur, O.ら、Am. T. Respir. Crit. Care Med. 152: 290-297 (1995) ;
16. Glaser, K.B., Adv. Pharmacol. 32: 31-66 (1995) ;
17. Tykka, H.T.ら、Scand. J. Gastroenterol. 20: 5-12 (1985) ;
18. Sheuer, W., Klin. Wochenschr. 67: 153-159 (1989) ;
19. Barnes, H.J.ら、J. Mol. Biol., Feb. 23, 1996
20. Aoki, A.ら、Mol. Hum. Reprod. 2: 419-497 (1996) ;
21. Anderson and Kurkland, Microbiological Reviews 54: 198-210 (1990) ;
22. Miele, L.ら、J. Biol. Chem. 265: 6427-6435 (1990) ;
23. Coalson, J.J.ら、Exp. Mol. Pathol. 37: 355-360 (1982) ; 30
24. Nagy, A.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 8424 (1993) ;
25. Capecchi, M.R., Science, 244: 1288 (1989)
26. Harlow, E. and Lane D. Antibodies: A Laboratory Manuel, 1st Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988;
27. Mantile, G.ら、J. Biol. Chem. 267: 20343 (1993) ;
28. Ruoslahti, E. Ann Rev. Biochem. 57: 375 (1988) ;
29. R.O. Hynes, Fibronectins, New York: Springer-Verlag (1990) ;
30. Chernousor, M.A.ら、J. Biol. Chem. 266: 10857 (1991) ;
31. Zhang, Qら、J. Cell. Biol. 127: 1447 (1994) ;
32. Wu, C.ら、Cell 83: 715 (1995) ; 40
33. Zhang, Q.ら、J. Biol. Chem. 271: 33284 (1996) ;
34. Border, W.A.ら、J. Clin. Invest. 90: 1 (1992)
35. Peri, Aら、J. Clin. Invest. 92: 2099 (1995) ;
36. Peri, Aら、J. Clin. Invest. 96: 343 (1995) ;
37. Oh, E.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78: 3218 (1981) ;
38. Mosher, D.F.ら、Curr, Biol. 4: 810 (1992) .

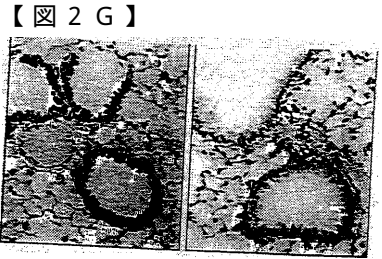
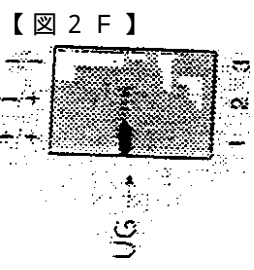
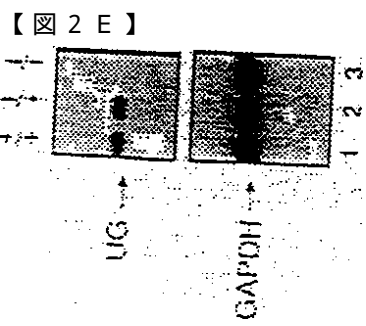
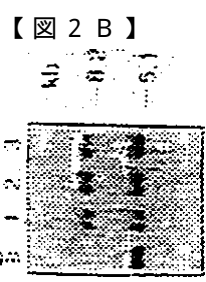
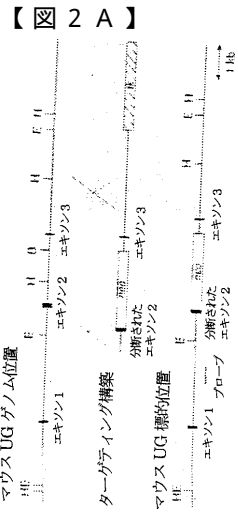
CC10 kDa: 1 EICPSFQRVIEITLLMDTPSSYEAMELFSFDIMREAGAQLKKLVDTLPQKPRESIKLMKIAQSSLCN 70
 ICP F VIE LL TPSSYE F PD M AG Q KK D LPO RE I KL EKI S LC
 GICPRFAIVIEIENLLGTPSSYEISLKEFEFDDTKKDGQMKKVLDSLPQTIREINKLTKIKVKSPLC

Utg: ICP F V E LL S YEA F P D AG QLK LVDLPQ R I KL EKI S LC
 DICPGFLQVLEALLGSESYEAALKPFNPASDLQMG7QLKRLVDTLPQETRIINIVKLTEKILTSPLCEQDLRV

ラット CC10: ICP F V E LL M S Y A F P D AG QLK LVDLPQ R I KL EKI S LC
 MAUS CC10: DICPGFLQVLEALLMESEGVASLKPFNPASDLQMG7QLKRLVDTLPQETRIINIMKLTEKILTSPLCKQDLRF



比較のため、アミノ酸残基は、ヒトタンパク質と同じ位置に見出された残基に相当する一次配列を上に示した。これら配列は遺伝子バンクに寄託されたヌクレオチド配列の翻訳により予想された。これらタンパク質は分泌タンパク質であり、翻訳され、プロセッされたN末端シグナルはこの比較のために編集された。



【図 3 A】



【図 3 C】



【図 3 B】



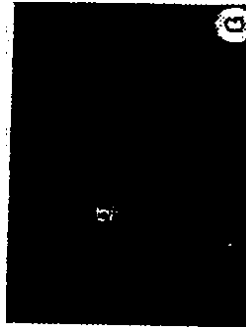
【図 3 D】



【図 3 E】



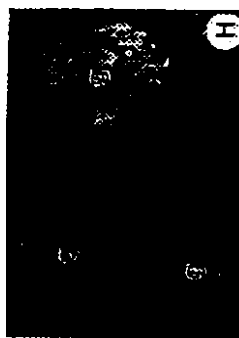
【図 3 G】



【図 3 F】



【図 3 H】



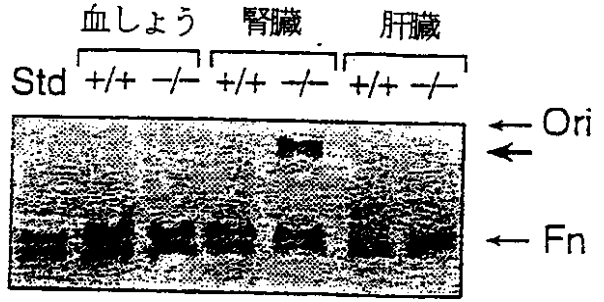
【図 3 I】



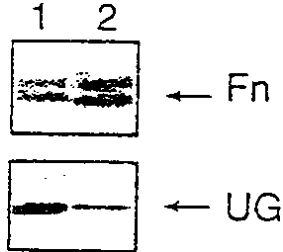
【図 3 J】



【図 4 A】



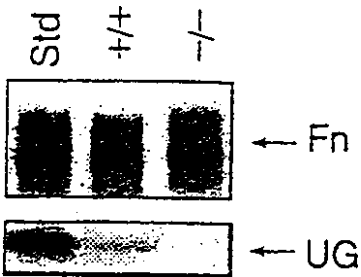
【図 4 B】



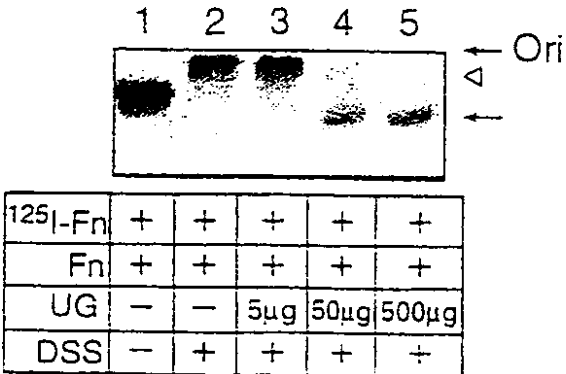
【図 4 C】



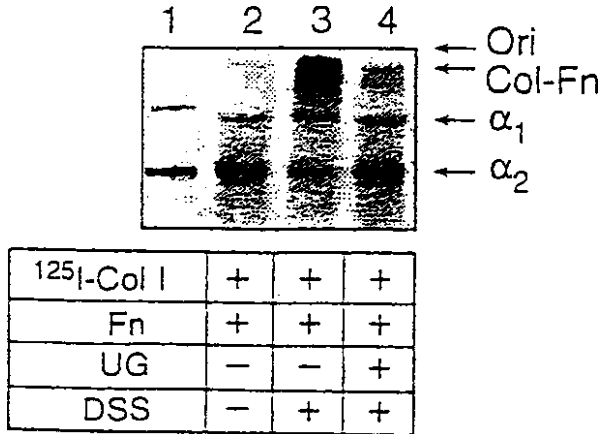
【図 4 D】



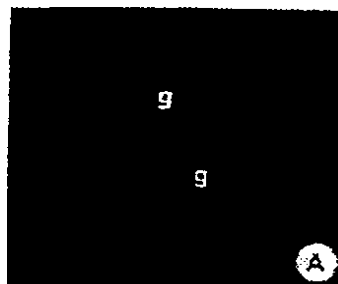
【図 4 E】



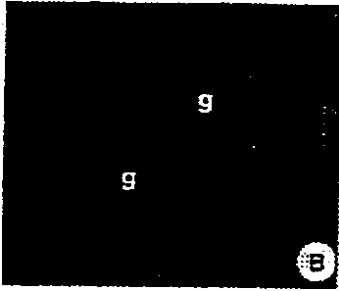
【図 4 F】



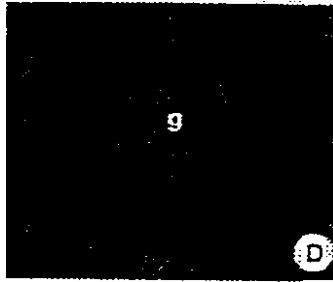
【図 5 A】



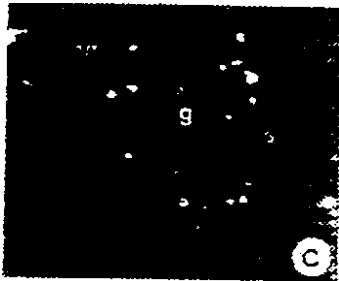
【図 5 B】



【図 5 D】



【図 5 C】



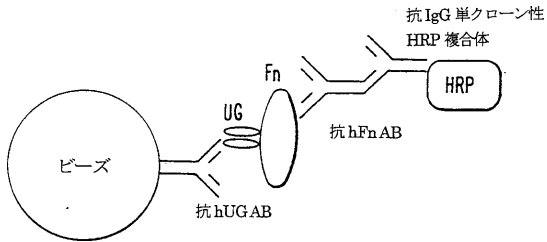
【図 5 E】



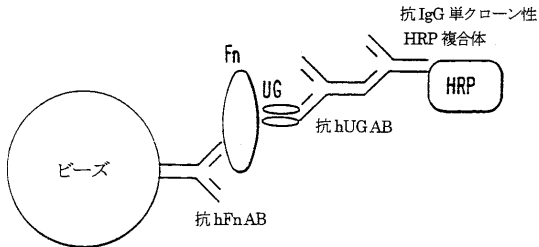
【図 5 F】



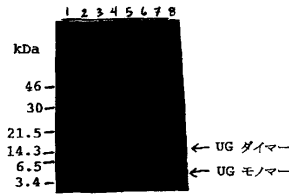
【図 6 A】



【図 6 B】



【図 7】



ウテログロビンの透析のSDS-PAGE解析及び還元と変性の組み合わせによる同定。レーン1は、記載したように透析した～95%純度のrhUGサンプルで、3.5 kDa MWC0の膜を使用し、透析チューブの中に残った物質を供したものである。レーン3は、記載したように透析した～70%純度のrhUGサンプルで、3.5 kDa MWC0の膜を使用し、透析チューブの中に残った物質を供したものである。レーン2は、8.0 kDa MWC0の膜を使用して透析した同じく～70%純度のrhUGサンプルであり、透析チューブの中に残った物質を供したものである。レーン4はタンパク質のサイズマーカーである。レーン5は、レーン1の透析前のサンプルであり、レーン6は同じサンプルに還元剤DTTを加えたもので、UGモノマーの間のシステイン結合を壊すために加えたものである。レーン7はレーン2及び3の透析前のサンプルであり、レーン8は同じサンプルにDTTを加えたものである。比較しやすいように、すべてのレーン及びサンプルは同じ量(15マイクロリットル)を用いた。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 13/12 (2006.01) A 6 1 P 13/12
 A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00

(74)代理人

弁理士 浅村 皓

(74)代理人

弁理士 浅村 肇

(74)代理人

弁理士 池田 幸弘

(74)代理人

弁理士 長沼 暉夫

(72)発明者 ピロン、アブリル、エル

アメリカ合衆国 メリーランド、ガイザースバーグ、ランプリング ロード 1 1 3 3 3

(72)発明者 ムクヘルジー、アニル、ピー

アメリカ合衆国 メリーランド、ブルックビル、ピー、オー、ボックス 1 3 6

(72)発明者 ズアング、ゾニジアン

アメリカ合衆国 メリーランド、ロックビル、チャンティリー コート 1 0

審査官 横井 宏理

(56)参考文献 国際公開第 9 6 / 0 4 0 6 5 7 (W O , A 1)

特表平 0 3 - 5 0 2 1 9 7 (J P , A)

MORENO, J.J., Antiflammins: Endogenous Nonapeptides With Regulatory Effect on Inflammation, General Pharmacology, 1 9 9 7 年 1 月, Vol.28, No.1, p.23-26

CHAN, C-C., et al., Effects of Antiinflammins on Endotoxin-Induced Uveitis in Rats, Archives of Ophthalmology, 1 9 9 1 年 2 月, Vol.109, p.278-281

DIERYNCK, I., et al., The human Clara cell protein;: biochemical and biological characterisation of a natural immunosuppressor, Multiple Sclerosis, 1 9 9 6 年 7 月, Vol.1, No.6, p.385-387

GUY, J., et al., SURFACTANT-PRODUCING RABBIT PULMONARY ALVEOLAR TYPE II CELLS SYNTHESIZE AND SECRETE AN ANTIINFLAMMATORY PROTEIN, UTEROGLOBIN, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 1 9 9 2 年 1 2 月 1 5 日, Vol.189, No.2, p.662-669

MUKHERJEE, A.B., et al., Regulation of Extracellular Phospholipase Activity: Implications for Inflammatory Diseases, DNA AND CELL BIOLOGY, 1 9 9 2 年, Vol.11, No.3, p.233-243

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 38/00

A61K 9/00 - 12

A61P 11/00 - 06

A61P 13/00 - 12

A61P 43/00

MEDLINE(STN)

BIOSIS(STN)

EMBASE(STN)

CAPLUS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMII)