

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4892132号
(P4892132)

(45) 発行日 平成24年3月7日(2012.3.7)

(24) 登録日 平成23年12月22日(2011.12.22)

(51) Int. Cl.		F I
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 47/48	(2006.01)	A 6 1 K 47/48
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 11/06	(2006.01)	A 6 1 P 11/06

請求項の数 6 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-583940 (P2000-583940)	(73) 特許権者	391015708
(86) (22) 出願日	平成11年11月17日 (1999.11.17)		ブリistol-マイヤーズ スクイブ カンパニー
(65) 公表番号	特表2002-530426 (P2002-530426A)		BRISTOL-MYERS SQUIB B COMPANY
(43) 公表日	平成14年9月17日 (2002.9.17)		アメリカ合衆国ニューヨーク州 10154 ニューヨーク パーク アベニュー 345
(86) 国際出願番号	PCT/US1999/027244	(74) 代理人	100068526
(87) 国際公開番号	W02000/031113		弁理士 田村 恭生
(87) 国際公開日	平成12年6月2日 (2000.6.2)	(74) 代理人	100100158
審査請求日	平成18年7月25日 (2006.7.25)		弁理士 鮫島 睦
(31) 優先権主張番号	60/109,872	(74) 代理人	100126778
(32) 優先日	平成10年11月24日 (1998.11.24)		弁理士 品川 永敏
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 70kD熱ショック蛋白による化合物の細胞内標的輸送

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

H s p 7 0 融合蛋白複合体を含む医薬組成物であって、該 H s p 7 0 融合蛋白複合体は第1部分と第2部分を含み、

該第1部分は SEQ ID NO: 2 または SEQ ID NO: 3 に示されるアミノ酸配列からなる H s p 7 0 蛋白のフラグメントであり；および

該第2部分は転写因子 N F - B の p 5 0 サブユニットである、医薬組成物。

【請求項2】

免疫抑制薬、抗癌剤、抗ウイルス剤、抗炎症剤、抗真菌剤、抗生物質、および抗血管超増殖化合物 (anti-vascular hyperproliferation compound) からなる群から選ばれる追加の活性化合物の少なくとも1種をさらに含有する、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

該 H s p 7 0 蛋白のフラグメントが SEQ ID NO: 2 に示されるアミノ酸配列からなる、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項4】

該 H s p 7 0 蛋白のフラグメントが SEQ ID NO: 3 に示されるアミノ酸配列からなる、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項5】

該 H s p 7 0 蛋白のフラグメントが該転写因子 N F - B の p 5 0 サブユニットに対し C - 末端にある、請求項3または4に記載の医薬組成物。

10

20

【請求項6】

該転写因子NF - Bのp50サブユニットがSEQ ID NO: 1に示される該転写因子NF - Bのp50サブユニットの残基37 - 409を含む、請求項1に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、熱ショック蛋白Hsp70を用いる、化合物の細胞内輸送(delivery)、好ましくは核内輸送に関する。

【0002】

(背景技術)

熱ショック蛋白(“Hsps”)は、蛋白合成およびホウルディング(folding)、小胞トラフィッキング(trafficking)および抗原プロセッシング(processing)およびプレゼンテーション(presentation)を含む多くの細胞内および細胞間プロセスにおいて、不可欠な役割を演じることが長く知られてきた、分子シャペロン(chaperone)蛋白のファミリーである。Hspsは、最も高度に保存される公知蛋白の1つであり、かつ蛋白-蛋白相互作用を介して多くの調節的活性を果たす。Hsp70は、熱ショック蛋白ファミリーの1メンバーである[Milner C. M. およびCampbell R. D. の「Immunogenetics」(32: 242 - 251、1990年); Genbank受入 No. M59828]。Hsp70の最も特徴のある機能の1つは、細胞間膜を横切って細胞の異なる区画室(compartments)への蛋白の転座を助成することである。

【0003】

細胞内移送活性が、HSV-1構造蛋白VP22[Elliottらの「Cell」(88: 223 - 233、1997年)]やHIV Tat蛋白[Vivesらの「J. Biol. Chem.」(272: 16010 - 16017、1997年)などのウイルス性蛋白、並びにアンテナペディア・ホメオドメイン(Antennapedia homeodomain)から誘導されるペプチド配列、線維芽細胞成長因子[Hawigerの「Curr. Opin. Immunol.」(9: 189 - 194、1997年)、および最近では神経ペプチド・ガラニン(galanin)[Poogaらの「FASEB J.」(12: 67 - 77、1998年)]に関して報告されている。蛋白基質の輸送は、これらの移送ペプチドの幾つかによっても証明されている[Phelanらの「Nature Biotechnology」(16: 440 - 443、1998年); Fawellらの「Proc. Natl. Acad. Sci.」(91: 664 - 668、1994年); Rojasらの「Nature Biotechnology」(16: 370 - 375、1998年)]。

【0004】

またHspsは、免疫応答において多くの重要な機能を果たし、過去数年にわたって、防護免疫の発生においてHspsの性質を特性決定する興味が増大しつつある。一連の研究[Romanらの「Immunology」(88: 487 - 492、1996年); Suzueらの「J. Immunol.」(156: 873 - 879、1996年)]によれば、Hsp70は担体蛋白として作用し、結合ペプチドまたは蛋白基質がエンドソーム区画室に入り、次いで外因性抗原のMHC I種プロセッシング経路に接近するのを可能ならしめることが証明された。このようなHsp70-ペプチド複合体あるいはHsp70融合蛋白による処理は、カーゴ(cargo)-特異的増殖T細胞応答を誘い出すことができる。しかしながら、マウスの免疫化に用いる癌細胞-由来Hsp70が特異的抗腫瘍CTL応答をもたらす他の実験によって[Udonoらの「J. Exp. Med.」(178: 1391 - 1396、1993年)]、Hspsは内因性MHC I種プロセッシング経路を用いていることが示唆された。

【0005】

これらのデータは、Hsp70が血漿膜を横切り、かつ無傷細胞の細胞質区画室に入ることができることを暗示した。非熱ショック依存メカニズムによる軸索細胞からのHspsの放出を報告する以前の研究[Hightowerらの「J. Cell Physiol.」(138: 257 - 266、1989年)]は、Hspファミリー膜の幾つかが一定細胞の血漿膜を横

10

20

30

40

50

切ることができるという所見を支持する。

【 0 0 0 6 】

上記の研究は、H s p 7 0 の血漿膜転座能力を暗示するものであるが、このような活性は完全には証明されていない。蛋白を血漿膜や核膜を横切って輸送するのに、H s p 7 0 を利用しうるかそうでないかは示されていない。そこで、蛋白あるいはDNAなどの化合物を細胞核に輸送して、細胞活性を調節する必要が存在する。

【 0 0 0 7 】

本発明者らは、ヒト70kD熱ショック蛋白が細胞膜を横切って転座し、素早く細胞質および核入口(entry)に達しうることを明らかにした。さらにまた、NF- Bのp50サブユニットのアミノ酸37-409 [Meyer R.らの「PNAS」(88:966-970、1991年); Genbank受入No. M58603]に縮合するH s p 7 0 ペプチドからなるキメラ蛋白も、この転座特性を示す。種々の異なるペプチドに関し細胞移入(import)活性が報告されているが、細胞内移送(transport)には一般に、特異的核局在配列("NLS")の存在が必要である。熱ショックは、熱ショック因子活性化に続いて内因性熱ショック蛋白の合成および核転座の増加を誘発することが知られているが、本発明者らは、外因性熱ショック蛋白の核局在が、前もって熱ショックなしに生じうることを明らかにした。

【 0 0 0 8 】

また本発明者らは、H s p 7 0 の移送および核局在特性が90アミノ酸C-末端フラグメントの中に保持されることを明らかにし; C-末端フラグメント並びに多くのペプチド結合ドメインを包含する大きなフラグメントを用いて、うまくいった核内移送を証明した。ここで、最初の証拠は、外因性H s p 7 0 融合蛋白の細胞膜を横切り、核入口に到達し、生物学的機能を発揮する能力の立証である。

【 0 0 0 9 】

従って、本発明の目的は、生物学的機能をもつ分子の細胞区画室および核区画室両方への輸送(delivery)のための担体を提供することである。本発明の好ましい具体例では、蛋白またはDNAなどの分子の指示された(directed)非侵襲性輸送のビヒクルとして、本明細書記載の、遺伝子発現を調節しうるH s p 7 0 またはH s p 7 0 のフラグメントである。

【 0 0 1 0 】

(発明の概要)

70kD熱ショック蛋白("H s p 7 0")は、蛋白を種々の細胞小器官にシャペロンする(chaperoning)のに必要な、高度に保存され遍在する蛋白である。本発明者らは、H s p 7 0 を細胞に外因添加すると、H s p 7 0 が容易に細胞質区画室および核区画室両方に移入するのを明らかにする。本発明者らは、化合物を細胞にシャペロンするのに、H s p 7 0 を使用できることを証明した。炎症性応答の重要な転写調節器(regulator)であるNF- Bを、核区画室に輸送するのに、H s p 7 0 を用いた。本発明者らは、C-末端H s p 7 0 ペプチドおよびNF- Bのp50サブユニットのアミノ酸37-409からなる融合蛋白が、細胞の核の中に案内され、特別にDNAと結合し、次いでカッパIg発現およびTNF産生を活性化したことを明らかにする。本発明には、遺伝子発現を調節することにより、免疫応答をコントロールするために、蛋白またはDNAの細胞質内および核輸送のビヒクルとしてH s p 7 0 の使用が含まれる。

【 0 0 1 1 】

(図面の説明)

図1は、示差的H s p 7 0 摂取活性(uptake activity)を示す種々の細胞類型を示す。培養培地に10μg/mlのH s p 7 0 - FITCを加えて、各種の細胞を処理した。単球細胞のマーカーとして抗CD14-PEを、B細胞の場合は抗CD19-PEを、あるいはT細胞の場合は抗CD3-PEを用いて、ヒト末梢血球を染色した。37で1時間の培養後、細胞をPBS中で洗い、2%パラホルムアルデヒドに固定し、再度洗い、次いで共焦点レーザー走査鏡検法による可視化のためにPBS中に再懸濁した。対照として平

10

20

30

40

50

行実験に、等モル量のBSA-FITCを用いた。図1Aは70Z/3細胞+Hsp70-FITCを示し；図1Bは70Z/3細胞+BSA-FITCを示し；図1Cは抗CD14-PE+Hsp70-FITCで染色したPBLを示し；図1Dは抗CD14-PE+BSA-FITCで染色したPBLを示し；図1Eは抗CD19-PE+Hsp70-FITCで染色したPBLを示し；および図1Fは抗CD3-PE+Hsp70で染色した末梢血液T細胞を示す。

【0012】

図2は、Hsp70細胞摂取の動態を示す。図2Aは70Z/3細胞によるHsp70-FITCの摂取の動態を示す。完全RPMI中1μMのHsp70-FITCを用い、細胞を37にて各種の時間で培養した。細胞をPBS中で1回洗い、遊離のHsp70-FITCを分離し、次いでPBSに再懸濁し、蛍光計で分析した。ポイントは実験的であり、修正回帰プログラム(modified regression program)で曲線を調整した(XLfit)。図2Bは、70Z/3細胞による摂取に対するHsp70の用量効果を示す。各種濃度のHsp70-FITCを用い、細胞を37で1時間培養し、次いで(A)と同様に、洗って分析した。

10

【0013】

図3は、Hsp70-FITCの細胞内摂取がアジドによって影響を受けないが、4で抑制されたことを示す。70Z/3細胞は、未処理であるか(図3A)、あるいは37でHsp70-FITCとの培養前に0.05%のナトリウムアジドで30分間予備処理されるか(図3B)、またはHsp70-FITCの添加およびさらに4で1時間の培養に先立ち、4で30分間予備培養する(図3C)のいずれかであった。対照として37で細胞にBSA-FITCを1時間加えた(図3D)。内在化したHsp70-FITCは、トランスフェリンと共に局在しなかった。細胞を37にてHsp70-FITCおよびテキサス・レッド(Texas Red)-共役トランスフェリンの両方で1時間処理した(図3E)。

20

【0014】

図4は、融合蛋白の細胞質および核への移送を示す。NF-kBのp50サブユニットのアミノ酸37-409に融合する、Hsp70のC末端244(Hsp70/28-p50)または92(Hsp70/10-p50)のいずれかからなるFITC-標識融合蛋白を70Z/3細胞に移送した。記載の如く、70Z/3細胞を37にて、全長のHsp70-FITC(図4A)、Hsp70/28-p50-FITC(図4B)、Hsp70/10-p50-FITC(図4C)、または対照のBSA-FITC(図4D)で1時間処理した。融合細胞の細胞内局在化を、共焦点レーザー走査鏡検法で可視化した。

30

【0015】

図5は、内在化した細胞内Hsp70またはHsp70-p50が24時間までの間安定のままでいたことを明らかにする。細胞を全長のHsp70-FITC(図5A)またはHsp70/28-p50-FITC(図5B)のいずれかで処理した後、洗浄し、さらに37にて増加時間の間培養した。細胞を表示の時点で採取し、Laemliサンプル緩衝剤に溶解し、全細胞溶解産物蛋白をSDS-PAGEで分離した。ゲルを蛍光強度測定分析に付した。レーン1：未処理細胞、レーン2：チェース(chase)なし、レーン3：1時間のチェース、レーン4：2時間のチェース、レーン5：6時間のチェース、レーン6：24時間のチェース、レーン7：4日間のチェース。

40

【0016】

図6は、内在化したHsp70-p50融合蛋白がDNA-結合活性を示したことを表わす。細胞溶解および核抽出物の発生前に、70Z/3細胞を表示の如く1時間処理した。EMSAを行い、特異的なDNA結合複合体を、表示抗体によるスーパーシフト(supershift)分析で同定した。図6Aのレーン1：非刺激細胞対照、レーン2：LPS-処理、レーン3：Hsp70-p50-処理、レーン4：非標識NF-κBオリゴと競合する、Hsp70-p50-処理抽出物、レーン5：レーン4と同じ、但し、非標識八量体オリゴと競合。図6Bのレーン1：LPS-処理、レーン2：LPS-処理および抗p50で

50

スーパーシフト、レーン3：抗p65、レーン4：抗C-re1、レーン5：抗Hsp70、レーン6-10：レーン1-5と同じ、但し、Hsp70-p50を用いる処理抽出物。

【0017】

図7は、Hsp70-p50-処理細胞が活性化となり、表面カップIgを発現し、かつTNFを生成したことを示す。(図7A)70Z/3細胞を、10ng/mlのLPSまたは30μg/mlのHsp70/10-p50で一晩処理した後、洗浄し、抗カップ-FITCおよびFACS分析で染色した。(図7B)ヒト末梢血液リンパ球を5ng/mlのLPSまたは40μg/mlのHsp70/10-p50もしくはHsp70/28-p50で6時間処理し、上層液を採取し、ELISAでTNFレベルを分析した。

10

【0018】

(発明の詳細な説明)

本発明は、熱ショック蛋白Hsp70が細胞によって、細胞類型に特異的な方法で、細胞質および核の両方に内在化することを明らかにする。摂取のメカニズムは知られていないが、データから、Hsp70の結合および内在化がエネルギー依存性でかつ高能力レセプタ(high capacity receptor)を要することが示唆される。

【0019】

細胞表面-関連および分泌形態のHsp70が存在するという観察から[Multhoffらの「Cell Stress & Chaperones」(1:167-176、1996年)]から、この蛋白は多分、転写の調節による環境ストレス(ストレス要因)の細胞保護を移動させる手段として、細胞-細胞コミュニケーション(communication)において機能していることが示唆される。実際に、核内の幾つかの転写因子の転写促進ドメインとHsp70の物理的相互作用について、最近幾つかの報告がなされている。たとえば、Hsp70は、遺伝子転写の抑制をもたらす、HSF(熱ショック因子)[Shiらの「Genes Dev.」(12:654-666、1998年)]と、細胞増殖の抑制をもたらす、Wilms腫瘍抑制遺伝子[Maheswaranらの「Genes Dev.」(12:1108-1120、1998年)]の両方の転写促進ドメインに直接結合することができる。

20

【0020】

これらのデータおよび他のデータは、転写因子やことによると他の核蛋白の調節におけるHsp70の役割を暗示する。これらのデータは他のデータを補完して、Hsp70が細胞質シャペロンとして、転写因子、たとえばNF- κ B自体、並びに無数の補因子、たとえばHip、Hop、Hsp40、Hsp90、BAG-1および他の補因子と相互作用することができることを示した[Demandらの「Mol. Cell. Biol.」(18:2023-2028、1998年)]。事実、グリアおよび軸索細胞において、移出した(exported)Hsp70の放出および細胞内移動が報告され[Hightowerらの「J. Cell Physiol.」(138:257-266、1989年)]；および種々のヒト細胞系におけるHsp70の熱ショックまたはリポソーム移動による蓄積は、細胞生存を増加せしめ、かつアポトシス細胞死から保護することが示されている[Lasunskajaらの「Apoptosis」(2:156-163、1997年)]。

30

【0021】

過酷なまたはダメージ条件下の細胞からの熱ショック蛋白の放出は、隣接細胞に対する防護ストレス応答の移動の恒常性メカニズムであってよく、該隣接細胞はこのような応答にマウントする(mount)ことができない。加えて、抗腫瘍または抗ウイルス免疫を誘発するペプチド結合Hsp70分子の能力並びに記憶CTLsの発育(development)を記載する最近の報告は、これらの蛋白が抗原プレゼンテーション機能の付与により、防護的免疫応答を伝達する役割を果たしうるという考えを支持する[Blachereらの「J. Exp. Med.」(186:1315-1322、1997年)；Ciupituらの「J. Exp. Med.」(187:685-691、1998年)]。本発明者らは、内因性Hsp70(および関連ペプチドまたは蛋白)が感染またはアポトシス細胞によって環境に放出される旨述べている。これらのHsp70蛋白複合体は、その免疫能力が弱まる隣接細胞に対し

40

50

役に立つようになり、免疫応答を高めあるいは強化する刺激剤として作用する。

【 0 0 2 2 】

本発明者らは、種々の細胞類型により、外因供給 H s p 7 0 融合蛋白の有効な細胞および核摂取並びに長期の細胞内安定性を証明した。この速い安定な移送は、細胞質および核が長時間にわたって局在状態のままの場合、これらに治療剤を輸送するビヒクルとして、H s p 7 0 - 由来ペプチドの有用性に対し重要な暗示を有する。核移入プロセスの操作は特に、遺伝子発現の調節対照のますます興味のある標的となるので [Fujiharaらの「Biochem. Pharm.」(56:157-161, 1998年)]、将来、細胞内標的輸送のより効力のある手段の開発に重点が置かれると思われる。輸送システムとしてH s p 7 0の使用は、これまで記載された他の蛋白候補(candidates)に比し多くの利点を有し、
たとえば、蛋白はヒト起点のものであることから、異物(すなわち、ウイルスまたは虫)や潜在的免疫性物質を含有しないという事実が挙げられる。

10

【 0 0 2 3 】

H s p 7 0の可溶フラグメントの使用は、潜在的に免疫原性をさらに減少するだろう。H s p 7 0は高度に発現した豊富な蛋白なので、それはヒトにおいて十分に許容されると思われる、実際に、既に免疫応答の役割を演じている。さらに、我々が気付いた細胞類型 - 特異性は、より有効な調節的対照に対し、免疫システムの特定細胞に化合物を標的にするのを可能ならしめるだろう。最後に、蛋白基質の優先的かつ長命の核指示輸送は、細胞質蛋白分解からの保護を付与しうる。我々のデータは、遺伝子発現を調節し、次いで免疫抑制性または免疫刺激性コントロールを付与する分子を輸送する新規の手段として、H s p 7 0配列の潜在的な使用を支持する。

20

【 0 0 2 4 】

本発明者らは、本発明の具体例において、NF - B p 5 0サブユニットのアミノ酸37 - 409に接合したH s p 7 0のフラグメントからなる融合蛋白を開示する(ここで、該融合蛋白をH s p 7 0 - p 5 0、H s p 7 0 / 28 - p 5 0、またはH s p 7 0 / 10 - p 5 0と称す)。NF - B p 5 0ホモ二量体は一般に、C - 末端賦活ドメインの非依存に基づき、ほとんどの細胞類型においてNF - B転写抑制因子として作用すると考えられているが、本発明者らが気付いた下流の生物学的事態(events)は、転写賦活に対する融合蛋白の優勢な陰性効果を反映しなかった。H s p 7 0 - p 5 0 - 誘発転写促進が観察されることの可能な説明は多数存在する。

30

【 0 0 2 5 】

第1に、熱ショック蛋白配列、特にE E V Dドメイン自体は、転写促進活性を有しうる。H s p 7 0は、核内で熱ショック因子と結合し、E E V Dドメインによって転写促進活性を干渉することが知られている。後記実施例中のH s p 7 0配列は、NF - B p 5 0配列(S E Q I D N O : 1)のアミノ酸37 - 409に対しC - 末端でクローン化されているので、E E V Dドメインは、転写促進を付与したり、あるいは他の細胞または核の補因子と相互作用することにも潜在的に利用できる。Meyer R.らの「P N A S」(Vol. 88, 966 - 970, 1991年2月)に示される、NF - B p 5 0配列(S E Q I D N O : 1)のアミノ酸37 - 409は、

```
LPTDGPYLQILEQPKQGRFRFRVCEGPSHGGLPGASSEKNKKSYPQVKICNYV
GPAKVIQLVTNGKNIHLHAHSLVGHKCEDGICTVTAGPKDMVVGANLGLLHVTK
KKVFETLEARMTEACIRGYNPGLLVHPDLAYLQAEGGGDRQLGDREKELIRQAAL
QQTKEMDLSVVRLMFTAFLPDSTGSFTRRLEPVVSDAIYDSKAPNASNLKIVRMDR
TAGCVTGEEIYLLCDKQKDDIQIRFYEEEENGWVWEGFGDFSPDVRQFAIVF
KTPKYKDINI TKPASVFLVQLRRKSDLETSEPKPFLYPEIKDKEEVQRKRQKLMPNF
SDSFGGGSGAGAGGGGMFGSGGGGGTGSTGPGYSFPHY
```

40

である。核複合体のより綿密な分析により、転写促進活性を持つ他の可能なコンポーネントに関する糸口が得られる。

【 0 0 2 6 】

第2に、p 5 0ホモ二量体は、個々の状況で転写促進活性を簡単に示しうる。Fujitaら

50

は [「Genes Dev.」(6:775-787, 1992年)]、NF-Bサブユニットのホモおよびヘテロ二量体のインビトロでの転写賦活を試験し、幾つかの転写混合物へのp50単独添加が、重大な転写刺激をもたらすことを決定した。彼等は、この賦活を、Bモチーフ(motifs)内のヌクレオチド配列の微細構造の差異のせいと考える。おもしろいことに、このグループは、Ig配列モチーフを用いる対照に比し、p50ホモ二量体による4倍の転写刺激を観測した。これらのデータは、表面カップIg発現を分析する実験で我々が観察した賦活に符合するものである。第3に、Hsp70-p50サブユニットは、我々がまだ検出していない、DNA結合複合体に他の転写促進因子を補充しているかもしれない。

【0027】

従って、本発明には、細胞活性の調節、好ましくは細胞内の核活性、たとえば転写因子の活性の調節のため、Hsp70、またはHsp70のフラグメントの使用が含まれる。語句“核活性”には、細胞内の核酸分子の転写が含まれる。語句“調節”には、細胞活性の増強、減少、活性化または不活性化が含まれる。Hsp70蛋白またはそのフラグメントを単独で用い、細胞の細胞質および/または核への移動により、細胞活性を調節してHsp70-関連障害を処置することができる。“Hsp70-関連障害”とは、Hsp70が障害または疾患の代謝経路で調節的役割を演じるその障害または疾患状態を指称する。本発明で用いる語句“処置”とは、患者の個々の障害症状の軽減、個々の障害に関連する確認できる測定の改善、または個々の免疫応答(たとえば移植拒絶)の予防を指称する。語句“患者”とは、哺乳類、好ましくはヒトを指称する。

【0028】

加えて、本発明には、1種以上の化合物を細胞に運ぶシャペロンとして、Hsp70またはHsp70のフラグメントの使用が含まれる。Hsp70またはそのフラグメントを化合物に接合させて、複合体を形成する(ここで、“Hsp70複合体”と称し、Hsp70またはそのフラグメントと、Hsp70蛋白またはそのフラグメントに付随または接合するいずれの化合物をも含有する)。次いで、Hsp70複合体を細胞、または細胞を取巻く環境に供して、Hsp70複合体を細胞の細胞質および/または核に移送せしめる。Hsp70蛋白またはそのフラグメントに接合しうる化合物としては、これらに限定されるものでないが、蛋白、ペプチド、核酸および小分子が挙げられる。“核酸”または“ポリヌクレオチド”としては、個々のヌクレオチド並びにDNAおよびRNA配列またはそのフラグメントが挙げられる。

【0029】

Hsp70、そのフラグメント、および/または本発明のHsp70複合体で処置できる疾患状態としては、移植拒絶および自己免疫疾患、たとえば慢性関節リウマチ、多発硬化症、若年性糖尿病、喘息、および炎症性腸疾患、並びに炎症性疾患、癌、ウイルス複製疾患および血管病が挙げられる。

【0030】

たとえば、本発明のHsp70複合体および医薬組成物は、移植拒絶(たとえば腎臓、肝臓、肺、膵臓(島細胞など)、骨髄、角膜、小腸および皮膚同種移植や、心臓弁異種移植)；および自己免疫疾患、たとえば慢性関節リウマチ、多発硬化症、若年性糖尿病、喘息、炎症性腸疾患(クローン病、潰瘍性大腸炎)、狼瘡、糖尿病、重症筋無力症、乾癬、皮膚炎、湿疹、脂漏症、肺炎症、眼ぶどう膜炎、肝炎、グレーブズ病、橋本甲状腺炎、ベーチェットまたはシェーグレン症候群(乾燥眼/口)、悪性または免疫溶血性貧血、特発性副腎機能不全、多腺自己免疫症候群、糸球体腎炎、強皮症、扁平苔癬、白斑(皮膚の色素脱失)、自己免疫甲状腺炎、および肺肺炎；炎症性疾患、たとえば変形性関節症、急性膵炎、慢性膵炎、喘息および成人呼吸促進症候群の処置に、並びに癌および腫瘍、たとえば固形腫、リンパ腫および白血病；血管病、たとえば再狭窄、狭窄および関節硬化症；およびDNAおよびRNAウイルス性複製疾患、たとえばレトロウイルス病、およびヘルペスの処置に有用である。

【0031】

10

20

30

40

50

また、細胞の細胞質および/または核に輸送されるべき化合物からなるH s p 7 0複合体の少なくとも1種を含有する医薬組成物も、本発明の技術的範囲に属する。H s p 7 0複合体はそれ単独、または追加の活性化合物の少なくとも1種や医薬的に許容しうる担体、アジュバントまたはビヒクルのいずれかといっしょに投与されてよい。“追加の活性化合物”には、これらに限定されるものでないが、免疫抑制薬、抗癌剤、抗ウイルス剤、抗炎症剤、抗菌剤、抗生物質または抗血管超増殖化合物からなる群から選ばれる作用物質が含まれる。

【0032】

語句“医薬的に許容しうる担体、アジュバントまたはビヒクル”とは、本発明のH s p 7 0複合体といっしょに被検者に投与することができ、かつ該複合体の薬理活性を破壊しない担体、アジュバントまたはビヒクルを指称する。本発明の医薬組成物に使用しうる医薬的に許容しうる担体、アジュバントおよびビヒクルとしては、これらに限定されるものでないが、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、自己乳化型薬物輸送システム(“SEDDS”)たとえばd - トコフェロール・ポリエチレングリコール1000スクシネート、医薬製剤に用いる界面活性剤、たとえばTweensまたは他の類似のポリマー輸送マトリックス、血清蛋白、たとえばヒト血清アルブミン、緩衝物質、たとえばリン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物性脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩または電解質、たとえば硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイダルシリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース-ベース物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース・ナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレン-ポリオキシプロピレン-ブロックポリマー、ポリエチレングリコールおよび羊毛脂が挙げられる。

【0033】

また、本発明化合物の輸送を高めるため、 - 、 - および - シクロデキストリンなどのシクロデキストリン、または2 - および3 - ヒドロキシプロピル - - シクロデキストリンを含むヒドロキシアルキルシクロデキストリンなどの化学変性誘導体、もしくは他の可溶化誘導体も使用しうる。

【0034】

本発明組成物は、以下に記載の他の治療剤を含有してもよく、また医薬製剤の分野で周知といった技法に従い、通常の固体または液体ビヒクルまたは希釈剤、並びに所定の投与形式に適するタイプの医薬用添加成分(たとえば賦形剤、結合剤、保存剤、安定剤、フレーバー等)を用いて配合されてよい。

【0035】

本発明のH s p 7 0複合体の少なくとも1種を含有する医薬組成物は、たとえば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤または粉剤などの形状での経口投与；舌下投与；バツカル剤投与；皮下、静脈内、筋肉内または胸骨内注射または注入技法(たとえば殺菌注射用水性または非水性溶液または懸濁液)などによる非経口投与；吸入噴射などによる鼻腔投与；クリームまたは軟膏などの形状での局所投与；または坐剤などの形状での直腸投与で、また非毒性の医薬的に許容しうるビヒクルまたは希釈剤を含有する投与単位製剤で投与することができる。

【0036】

本発明の医薬組成物は、たとえば即座放出または長期放出に適する形状で投与しうる。即座放出または長期放出は、本発明化合物を含有する適当な医薬組成物の使用により、あるいは特に長期放出の場合、皮下埋没物または浸透ポンプなどの器具の使用によって達成されうる。また本発明H s p 7 0複合体は、リポソームで投与されてもよい。

【0037】

経口投与用組成物の具体例として、たとえば嵩を付与する微結晶セルロース、懸濁剤としてのアルギン酸またはアルギン酸ナトリウム、増粘剤としてのメチルセルロース、および当該分野で公知の甘味剤またはフレーバーを含有しうる懸濁液；およびたとえば微結晶セ

10

20

30

40

50

ルロース、リン酸二カルシウム、スターチ、ステアリン酸マグネシウムおよび/またはラクトースおよび/または当該分野で公知の他の賦形剤、結合剤、増量剤、崩壊剤、希釈剤および潤滑剤を含有しうる即座放出錠剤が挙げられる。

【0038】

また本発明化合物は、舌下および/またはバツカル剤投与により口腔内に投与しうる。成形錠剤、圧縮錠剤または凍結乾燥錠剤が、使用しうる具体的な剤形である。具体的な組成物としては、本発明のH s p 7 0複合体を速溶解希釈剤、たとえばマンニトール、ラクトース、スクロースおよび/またはシクロデキストリンと配合したものが挙げられる。

【0039】

またかかる配合物に、高分子量賦形剤、たとえばセルロース(アビセル(avicel))またはポリエチレングリコール(PEG)を含ませてもよい。さらにまた、かかる配合物は、粘膜密着性を助成する賦形剤、たとえばヒドロキシプロピルセルロース(HPC)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)、カルボキシメチルセルロース・ナトリウム(SCMC)、無水マレイン酸コポリマー(たとえばGantrez)、および放出をコントロールする作用物質、たとえばポリアクリル酸コポリマー(たとえばCarbopol 934)も含有しうる。また、加工や使用を容易にするため、潤滑剤、グライダント(glidants)、フレーバー、着色剤および安定剤を加えてもよい。

【0040】

鼻腔エアロゾルまたは吸入投与用組成物の具体例として、たとえばベンジルアルコールまたは他の適当な保存剤、バイオアベイラビリティを高める吸収促進剤、および/または当該分野で公知の他の可溶化または分散剤を含有しうる食塩水溶液が挙げられる。

【0041】

非経口投与用組成物の具体例として、たとえばマンニトール、1,3-ブタンジオール、水、リンゲル液、等張性塩化ナトリウム溶液などの適当な非毒性の非経口投与に許容しうる希釈剤または溶剤、または合成モノもしくはジグリセリドを含む他の適当な分散または湿潤および懸濁剤やオレイン酸を含む脂肪酸を含有しうる注射用溶液または懸濁液が挙げられる。本発明で用いる語句“非経口”としては、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、動脈内、滑液包内、胸骨内、鞘内、傷内および頭側内の注射または注入技法が包含される。

【0042】

直腸投与用組成物の具体例として、たとえば常温で固体であるが、直腸腔内で液化および/または溶解して薬物を放出する、ココアバター、合成グリセリドエステルまたはポリエチレングリコールなどの適当な非刺激性賦形剤を含有しうる坐剤が挙げられる。局所投与用組成物の具体例として、局所担体、たとえばPlastibase(ポリエチレンでゲル化した鉱油)が挙げられる。

【0043】

本発明のH s p 7 0複合体の“治療上有効な”量は、当業者によって決定することができ、かつ具体的には、成人(ヒト)の場合で1日当たり約0.1~100mg/体重(Kg)の活性化化合物となる投与量が挙げられ、1日当たり単一用量または2~3回の個々の分割用量で投与しうる。個々の被検者のいずれの場合も、特定の投与用量および投与の頻度は適宜に変動でき、かつ特定使用化合物の活性、該化合物の代謝安定性および作用長さ、被検者の種、年齢、体重、全般的な健康状態、性別およびダイエット、投与の形式および時間、排泄速度、薬物組合せ、および個々の症状のひどさを含む種々の要因に左右されることが理解されるだろう。処置に好ましい被検体は、動物、最も好ましくは哺乳類、たとえばヒトである。

【0044】

“治療上有効量”とは、所望の結果、たとえば患者の個々の障害の症状の軽減、個々の障害に関連する確認できる測定の改善、または個々の免疫応答の予防を達成するのに必要な量を意味する。

【0045】

10

20

30

40

50

個々の被検者のいずれの場合も、特定の投与用量および投与の頻度は適宜に変動でき、かつ特定使用化合物の活性、該化合物の代謝安定性および作用長さ、被検者の種、年齢、体重、全般的な健康状態、性別およびダイエット、投与の形式および時間、排泄速度、薬物組合せ、および個々の症状のひどさを含む種々の要因に左右されることが理解されるだろう。処置に好ましい被検体は、動物、最も好ましくは哺乳類、たとえばヒトである。

【 0 0 4 6 】

本発明の H s p 7 0 複合体は、その 1 種または 2 種以上の混合物単独、または他の適当な治療剤、たとえば抗炎症薬、抗増殖薬、化学療法剤および免疫抑制薬と組合せて使用しうる。

【 0 0 4 7 】

次に挙げる実施例は、本発明の具体例の例示であって、いかなる点でも本発明の技術的範囲を制限するものではない。前記または後記の本発明で引用する参考文献はいずれも、そっくりそのまま、ここに導入する。

【 0 0 4 8 】

組換え H s p 7 0 の製造

以下に示す方法を用いて、組換え H s p 7 0 を作成し； H s p 7 0 融合蛋白は、公表配列に符号するプライマー (primers) を用い、かつ原核生物発現ベクター、 P r o E x H t a (ライフ・テクノロジーズ・インコーポレイテッド) への指示クローニング (directed cloning) を可能ならしめる制限エンドヌクレアーゼ部位を有する、ヒト H s p 7 0 D N A 配列の P C R 増幅法によって生成した。 N F - B p 5 0 配列は、公表 p 5 0 配列に符号するプライマーを用い同様にして発生し、および同じ発現ベクターにおいて (5 ' to) H s p 7 0 配列の上流にクローン化された。

【 0 0 4 9 】

クローニング・ベクターは、金属カラム上の発現蛋白の精製に用いる 6 x H i s t a g を有した。 D N A を細菌宿主に形質転換し、 I P T G を用いて蛋白発現を誘発した。通常の親和性精製技法を用いて、可溶の発現した融合蛋白を精製した後、次の実験に用いた。

【 0 0 5 0 】

実施例 1

H s p 7 0 - 仲介移送は細胞類型に特異的である

外因添加 H s p 7 0 の細胞内局在化を調べるため、我々は全長 H s p 7 0 を蛍光標識し、それが各種の細胞類型によって内在化されうるかを試験する。細胞を最終濃度 1 0 μ g / m l の H s p 7 0 - F I T C (または対照として B S A - F I T C) で 1 時間処理し、次いで共焦点レーザー走査鏡検法に先立ち、洗浄および固定する。細胞内 H s p 7 0 - F I T C のほとんどは均一に、ネズミの p r e - B 7 0 Z / 3 細胞の核および細胞質に局在したのに対し、 B S A - F I T C の移入はごくわずかであった (図 1 A および 1 B)。

【 0 0 5 1 】

我々はまた、ヒトの末梢血液単球による H s p 7 0 - F I T C のかなりの摂取を観察したが、 T 細胞はそうでなかった (図 1 C - 1 F)。おもしろいことに、末梢血液単球の染色パターンは、細胞質および核を通じて均一であることが少なくないが、それは時々、斑点状染色で特徴づけられ、細胞質内の小胞局在をほのめかしていることに気づいた。本発明者らは、 P B L s の特定の染色パターンがドナーによって変動することを認識したが、これは細胞賦活の状態が外因性 H s p 7 0 の摂取効率または細胞内局在で役割を演じうることを暗示する。

【 0 0 5 2 】

この仮説に一致して、我々は、静止する末梢血液 B 細胞が摂取に対し抵抗するが、それらは抗 C D 4 0 + 抗 I g 抗体と共に、インビトロの 4 8 時間の賦活後に蛋白を移送するよう誘発されうることを認識した。この B 細胞賦活の方法は、種々の分染および増殖関連遺伝子の発現をもたらすことが知られている。これに対し、抗 C D 3 および抗 C D 2 8 による抹消血液 T 細胞の賦活は、 H s p 7 0 移送に影響を及ぼさなかった。 Jurkat T 細胞系または H e L a 線維芽細胞系による細胞内摂取は見られなかったが、 2 つの完熟 B 細胞系

10

20

30

40

50

: R A J I および R J A B により有効な摂取を観察した。

【 0 0 5 3 】

さらに我々は、2つの単球細胞系：T H P - 1 および U 9 3 7 によるわずかな細胞質摂取を認め、それは高濃度 (1 0 0 μ g / m l) の H s p 7 0 - F I T C との長期 (6 ~ 2 4 時間) 培養後のみである。我々が述べる B 細胞 - および単球 - 特異的 H s p 7 0 移送活性は、抗原プレゼンテーションにおいて H s p 7 0 熱ショック・ファミリーメンバーに対し役割を提案する報告に一致するが [Manara らの「Blood」(8 2 : 2 8 6 5 - 2 8 7 1、1 9 9 3 年) ; Vanbuskirk らの「J. Exp. Med.」(1 7 0 : 1 7 9 9 - 1 8 0 9、1 9 8 9 年)]、それはこれらの細胞が一般に、抗原提示細胞として機能すると考えられるからである。

10

【 0 0 5 4 】

細胞 H s p 7 0 摂取の細胞類型特異性および誘発性は、H s p 7 0 蛋白の必要表面または核レセプタの示差的発現を反映しうる。細胞外 H s p 7 0 の結合および内在化に必要と思われる表面蛋白を調べる研究が、現在進行中である。

【 0 0 5 5 】

実施例 2

H s p 7 0 細胞摂取の動態

我々は次に、7 0 Z / 3 細胞による H s p 7 0 摂取の時間経過および用量影響を調べた。5 \times 1 0 ⁵ 細胞を 3 7 にて、1 μ g / m l の H s p 7 0 - F I T C と共に、1 0 分 ~ 4 8 時間の増加時間にわたって培養する。非混和 (unincorporated) H s p 7 0 - F I T C を P B S で洗った後、細胞内および細胞 - 関連蛍光を蛍光分析で定量する。これらの実験から、我々は、以下の事項を決定した。すなわち、内在化プロセスが遅いようであるが、それは最大内在化が 6 ~ 8 時間まででは達せず (図 2 A)、その時間の後、摂取の速度が少し低下し、かつ 2 日間までの培養中、一定のまままでとどまるためである。

20

【 0 0 5 6 】

用量範囲を試験するため、我々は H s p 7 0 - F I T C の量を変化させ、1 時間培養の時間と処理細胞を選んだ。我々の分析から、細胞内蛍光の強度は、細胞外 H s p 7 0 の濃度を 1 0 0 μ g / m l (1 . 4 μ M) まで増加させるにつれて増大し、かつ該強度は細胞を 0 . 1 μ g / m l の如く低いレベルで処理したときでも検出しうる (図 2 B、1 . 4 n M) ことが認められた。

30

【 0 0 5 7 】

我々は、以下の事項を決定した。すなわち、細胞外濃度 1 μ M の H s p 7 0 - F I T C による細胞の処理は、1 p l / 細胞の容量を仮定すれば、1 時間の培養後に 7 0 0 n M の細胞内濃度をもたらす。この摂取効率は、他のペプチド配列の場合に報告されたものに匹敵する [Phelan らの「Nature Biotechnology」(1 6 : 4 4 0 - 4 4 3、1 9 9 8 年)]。H s p 7 0 - F I T C の摂取は、高能力レセプター仲介摂取メカニズムを示す、我々が用いた濃度範囲 (3 5 n M ~ 1 μ M) において飽和できなかった (not saturable)。さらに、内在化は 1 0 倍過剰の非標識 H s p 7 0 による予備培養によってブロックできなかった。

【 0 0 5 8 】

実施例 3

H s p 7 0 - 仲介細胞内移送のメカニズム

移送のメカニズムを調べるため、H s p 7 0 の移入を各種条件下で検討した。全長 H s p 7 0 蛋白をナトリウムアジド 0 . 0 5 % の存在下、P B L s で移送したが、細胞を 4 で培養すると、移送活性は完全に根絶し、これは H s p 7 0 - 仲介移送に対しエネルギー依存コンポーネントの存在を暗示する。

40

【 0 0 5 9 】

これらのデータは、トランスフェリンを用いる共同内在化実験に結びつき、トランスフェリンおよび H s p 7 0 の蓄積が両 7 0 Z / 3 細胞 (図 3 E) およびヒト P B L s の分離した細胞内区画室で起こることが明らかになり、これはこのメカニズムが従来のエンドサイ

50

トーシスを要しないことを暗示した。

【0060】

実施例4

外因性NF - B - C末端Hsp70融合蛋白は、核に指示できる

転写因子NF - Bのp50サブユニットに、244(SEQ ID NO:2)または92(SEQ ID NO:3)アミノ酸Hsp70C末端ポリペプチドが融合してなる2種の融合蛋白を産生して、他の蛋白基質を細胞に指示するHsp70ペプチドの能力を検討した。

【0061】

244アミノ酸ポリペプチドは、下記の配列を有する。

10

【化1】

PLSLGLETAG GVM TALIKRN STIPTKQTQI FTTYSDNQPG VLIQVYEGER
AMTKDNNLLG RFELSGIPPA PRGVPQIEVT FDIDANGILN VTATDKSTGK
ANKITITNDK GRLSKEEIER MVQEAKEYKA EDEVQRERVS AKNALESYAF
NMKSAVEDEG LKGKISEADK KKVLDKCQEV ISWLDANTLA EKDEFEHKRRK
ELEQVCNPII SGLYQGAGGP GPGGFGAQQP KGGSGSGPTI EEVD

【0062】

92アミノ酸ポリペプチドは、下記の配列を有する。

20

【化2】

KSAVEDEGLK GKISEADKKK VLDKCQEVIS WLDANTLAEK DEFEHKRRKEL
EQVCNPIISG LYQGAGGPGP GGFGAQQPKG GSGSGPTIEE VD

【0063】

両FITC - 共役融合蛋白を細胞に外因添加すると、両融合蛋白は70Z/3細胞(図4)およびPBLs(データ図示せず)の細胞質および核に入り、動態および特異性はHsp70ペプチド単独に類似した。この移送は、安定かつ飽和不可であり、重大な蛋白分解を伴わずに起った。FITC - Hsp70の最大摂取は、共焦点鏡検法およびSDS - PAGE分析で判定されるように、30分鼓動後で、非混和蛋白の洗出(washout)および37の培養後の24時間安定状態のままであった。蛋白安定性を評価するため、洗浄および96時間以内の37のチェースに先立ち、細胞を10μg/ml FITC - 共役全長Hsp70またはHsp70/28 - p50により1時間鼓動させる。

30

【0064】

Laeppiサンプル緩衝剤中細胞溶解で全細胞抽出物を産生せしめ、蛋白をSDS - PAGEで分離する。ゲルを蛍光強度測定による分析に付した結果、24時間以内の培養後の全細胞抽出物において、~75kD融合蛋白並びに全長Hsp70自体(その蛍光標識化合物によって内因性Hsp70と区別できる)の両方の存在が認められ、寸法の測定できるほどの変化はなくあるいは低分子量分解生成物の出現もなかった(図5)。これらのデータは、細胞内の標的Hsp70が細胞によって保持され、しかも重大な分解もなく、かつ

40

【0065】

実施例5

移送されたNF - B p50は、DNA - 結合活性を示す

内在化した融合蛋白が機能的活性を保有するかどうかに取り組むため、我々は、Hsp70 - p50融合蛋白 - 処理細胞の核抽出物について、その特定カップDNA配列に結合する能力を試験した。我々は以下の事項を認めることができた。すなわち、精製した融合蛋白はカップDNAに結合することができ(データ図示せず)、このことは、p50サブユニットがHsp70配列の存在によって、立体配座的に損傷されないことを暗示する。70Z/3細胞を、100ng/mlのLPS、10μg/mlのHsp70/10 - p5

50

0 または H s p 7 0 / 2 8 - p 5 0 で 1 時間処理した後、核抽出物を調製し、ゲルシフト・アッセイを行なう。

【 0 0 6 6 】

我々は、DNA 結合活性が細胞による核撮取後に融合蛋白によって保持されることを認識したが、これは、移入プロセスが重大な分解あるいは活性の損失をもたらさないことを示す(図 6 A)。この DNA 結合活性は特異的であるが、それは、複合体が過剰の非標識 NF - B 配列と競合するが、八量体配列とは競合しないためである(図 6 A)。我々は、異なる融合蛋白で処理した細胞からの核抽出物により異なる複合体が形成されるのを認め; さらにそれらの複合体は、L P S - 誘発内因性 NF - B によって形成される複合体とは異なった。スーパーシフト実験において、我々は以下の事項を観察した。すなわち、抗 p 5 0 抗体は、融合蛋白 - 処理細胞から、予想の如く、DNA - 結合複合体の全体をほとんど移動させることができ、これによって、融合蛋白は、主にホモ二量体として、DNA に結合しているようであることが確認される(図 6 B)。

10

【 0 0 6 7 】

また我々は、抗 p 6 5 および抗 H s p 7 0 (カルボキシ - 末端 4 アミノ酸 E E V D に対して指示)抗体両方との培養時に、特定複合体における検出できる減少を観察したが、これは組換え H s p 7 0 - p 5 0 サブユニットに加えて内因性 p 6 5 サブユニットの存在を示す。これに対し、対照 L P S - 処理細胞からの核抽出物は、p 5 0 および p 6 5 サブユニットの両方を含む複合体を形成し、そしてスーパーシフトのパターンは、融合蛋白で処理した細胞と異なった。これらのデータは、異なる蛋白 / DNA 複合体の形成を示し、かつ融合蛋白が DNA に直接結合し、単に内因性 NF - B を賦活していなかったことを暗示する。

20

【 0 0 6 8 】

実施例 6

H s p 7 0 - p 5 0 融合蛋白は、表面カップ I g 発現および TNF 産生を賦活する

H s p 7 0 - p 5 0 融合蛋白による細胞の処理は、潜在的に、細胞中の NF - B DNA 結合部位と相互作用する複合体の形成をもたらさるので、我々は NF - B 経路の下流生物学的事態を評価することに決めた。我々は、各種細胞の H s p 7 0 - p 5 0 融合蛋白による処理が、NF - B によって正常に調節される幾つかの炎症性および免疫応答の賦活をもたらすことを観察した。マウス 7 0 Z / 3 p r e - B 細胞の H s p 7 0 / 1 0 - p 5 0 融合蛋白による処理は、表面上の高レベルのカップ I g 軽鎖を誘発するのに、L P S と同じ位有効であることが認められた(図 7 A)。

30

【 0 0 6 9 】

加えて、L P S - 誘発賦活と異なり、融合蛋白 - 誘発表面カップ発現は、細胞の処理に先立ち、蛋白の 3 0 分の 6 5 熱変性によってなくなったが、これによって、賦活には無傷(intact)蛋白が必要であることが確認される。H s p 7 0 / 2 8 - p 5 0 の場合にも、同様な結果が得られた(データ示さず)。TNF 産生は、これも NF - B によって大いに調節される炎症性応答の他の例であった。

【 0 0 7 0 】

我々は、内在化した融合蛋白も、ヒト末梢血液リンパ球により TNF 産生を誘発しうることを観察した(図 7 B)。新たに単離した P B L s を L P S または H s p 7 0 - p 5 0 と共に 6 時間培養し、その時間後、上層液を集め、E L I S A によりサイトカイン・レベルを試験する。再度我々は、融合蛋白が TNF 産生の誘発に L P S と同様有効であることを認識し、かつ融合蛋白の熱変性がその効果をなくすことを示すことにより、無傷蛋白が賦活の原因をなすことを実証した。

40

【 0 0 7 1 】

上述の実施例で、以下に示す実験手順を用いた。

H s p 7 0 - p 5 0 融合蛋白の発現と精製:

NF - B p 1 0 5 サブユニット蛋白のアミノ酸 1 - 4 0 6 に対応するヌクレオチド配列を用い、2 つの p 5 0 融合蛋白を作る。この配列は、DNA 結合ドメインおよび r e l 相

50

同性ドメインを含有する。H s p 7 0 の長さが異なる 2 つの融合蛋白を用いた。2 つの H s p 7 0 配列は共に、C - 末端から由来され、末端 2 7 6 または 7 3 5 ヌクレオチドを含有し、これらは 1 0 k D (上記の 9 2 アミノ酸ポリペプチド) および 2 8 k D (上記の 2 4 4 アミノ酸ポリペプチド) 蛋白フラグメントに相当する。1 0 k D または 2 8 k D H s p 7 0 蛋白が p 5 0 蛋白に C - 末端融合し、得られる融合蛋白はそれぞれ、H s p 7 0 / 1 0 - p 5 0 または H s p 7 0 / 2 8 - p 5 0 を示す。クローニング、発現および精製のため、製造業者の推奨規格に従って、原核生物発現ベクター P r o E X H T (M D、ガイサーズブルグの L i f e T e c h n o l o g i e s) を用いた。

【 0 0 7 2 】

共焦点レーザー走査鏡検法：

細胞を典型的に、3 7 °C にて 1 0 μ g / m l の F I T C - 共役蛋白でまたはテキストの指示通りに 1 時間処理した後、P B S 中で洗浄、2 % パラホルムアルデヒド中で固定、さらに P B S 中で洗浄、次いでモレキュラー・ダイナミクス・レーザーシャープ (M o l e c u l a r D y n a m i c s L a s e r S h a r p) ソフトウェアおよびアドービ・フォトショップ (A d o b e P h o t o s h o p) を用いる共焦点鏡検法で可視分析を行なう。

10

【 0 0 7 3 】

移入した H s p 7 0 - p 5 0 融合蛋白のウエスタンブロット分析：

細胞を 3 7 °C にて F I T C - 共役蛋白で 1 時間処理し、P B S 中で洗い、これを核抽出物の調製に用いる。S D S - P A G E で蛋白等量に分ける。ゲルを酢酸中に固定し、蛍光計とイメージ・クアント (I m a g e Q u a n t) ソフトウェアで蛍光分析に付す。

20

【 0 0 7 4 】

電気泳動移動度シフト測定法：

確立したプロトコルの改変を用いて、7 0 Z / 3 細胞から核抽出物を調製する [T e p p e r らの「J. Immunol.」(1 5 5 : 2 4 2 7 - 2 4 3 6、1 9 9 5 年)]。Bradford アッセイで蛋白濃度を判定し、N F - κ B (5 ' G A T C C G A G G G G A C T T T C C G C T G G G G A C T T T C C A G G 3 ' (S E Q I D N O : 4)) または八量体 (5 ' T G T C G A A T G C A A A T C A C T A G A A 3 ' (S E Q I D N O : 5)) オリゴヌクレオチド (W I、マジソンの P r o m e g a) を、[γ - ³²P] A T P および T 4 キナーゼでエンド標識する。オリゴヌクレオチド・プローブとの結合反応の条件は、前記の記載と同じ。スーパーシフト・アッセイは、N F - κ B p 5 0、p 6 5 および C - R e l 1 ポリクローナル抗体 (C A、サンタ・クルツの S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y) および H s p 7 0 抗体を用い以下の手順で行なう。すなわち、核抽出物を反応緩衝剤中、3 μ l の抗体と共に 3 0 分間予備培養し、次いで標準操作に従って、ゲル遅延アッセイをし続ける。非標識 N F - κ B および八量体オリゴヌクレオチドを用い、競合実験を行なう。サンプルを生 (n a t i v e) の 6 % ポリアクリルアミドゲルにて分析し、オートラジオグラフを作る。

30

【 0 0 7 5 】

免疫蛍光検査アッセイ (F A C S)：

7 0 Z / 3 細胞を、3 0 μ g / m l の H s p 7 0 / 1 0 - p 5 0 融合蛋白または 1 0 0 n g / m l の L P S で処理し、3 7 °C で一夜培養する。次いで細胞を P B S 中で洗い、そして F I T C - 共役抗カッパ抗体で染色する前に、2 % パラホルムアルデヒド中に固定する。さらに P B S 洗浄後、細胞を F A C S T A R にて画像化および分析に付す。

40

【 0 0 7 6 】

T N F α アッセイ：

ヒト末梢血液リンパ球を前記と同様に単離し、4 0 μ g / m l の H s p 7 0 融合蛋白または L P S で 6 時間処理する。上層液を集め、E L I S A (M A、ケンブリッジの G e n z y m e) で T N F α を分析する。

本発明について明瞭および理解を目的として具体的例示および実施例によりある程度詳細に説明したが、特許請求の範囲に基づく技術的範囲内で、一定の変更や改変を成しうるとは明らかであろう。

50

【 0 0 7 7 】

配列表

<110> Bristol-Myers Squibb Company

<120> INTRACELLULAR TARGETED DELIVERY OF COMPOUNDS BY 70 KD HEAT SHOCK PROTEIN

<130> 176961

10

<150> US 60/109,872<151> 1998-11-24

<160> 5

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 373

<212> PRT

<213> Homo Sapien

20

<400> 1

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

30

65 70 75 80
 His Cys Glu Asp Gly Ile Cys Thr Val Thr Ala Gly Pro Lys Asp Met
 85 90 95
 Val Val Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile Leu His Val Thr Lys Lys Lys
 100 105 110
 Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met Thr Glu Ala Cys Ile Arg Gly
 115 120 125
 Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Pro Asp Leu Ala Tyr Leu Gln Ala
 130 135 140
 Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Gly Asp Arg Glu Lys Glu Leu Ile
 145 150 155 160
 Arg Gln Ala Ala Leu Gln Gln Thr Lys Glu Met Asp Leu Ser Val Val
 165 170 175
 Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro Asp Ser Thr Gly Ser Phe Thr
 180 185 190
 Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp Ala Ile Tyr Asp Ser Lys Ala
 195 200 205
 Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val Arg Met Asp Arg Thr Ala Gly
 210 215 220
 Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr Glu Glu Glu Glu Asn Gly Gly
 245 250 255
 Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser Pro Thr Asp Val His Arg Gln
 260 265 270
 Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys Asp Ile Asn Ile Thr
 275 280 285
 Lys Pro Ala Ser Val Phe Val Gln Leu Arg Arg Lys Ser Asp Leu Glu
 290 295 300

10

20

Thr Ser Glu Pro Lys Pro Phe Leu Tyr Tyr Pro Glu Ile Lys Asp Lys
 305 310 315 320
 Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg Gln Lys Leu Met Pro Asn Phe Ser Asp
 325 330 335
 Ser Phe Gly Gly Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Gly Met Phe
 340 345 350
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Thr Gly Pro Gly Tyr
 355 360 365
 Ser Phe Pro His Tyr
 370

10

- <210> 2
- <211> 244
- <212> PRT
- <213> Homo Sapien

<400> 2
 Pro Leu Ser Leu Gly Leu Glu Thr Ala Gly Gly Val Met Thr Ala Leu
 1 5 10 15
 Ile Lys Arg Asn Ser Thr Ile Pro Thr Lys Gln Thr Gln Ile Phe Thr
 20 25 30
 Thr Tyr Ser Asp Asn Gln Pro Gly Val Leu Ile Gln Val Tyr Glu Gly
 35 40 45
 Glu Arg Ala Met Thr Lys Asp Asn Asn Leu Leu Gly Arg Phe Glu Leu
 50 55 60
 Ser Gly Ile Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Val Thr
 65 70 75 80
 Phe Asp Ile Asp Ala Asn Gly Ile Leu Asn Val Thr Ala Thr Asp Lys
 85 90 95

20

Ser Thr Gly Lys Ala Asn Lys Ile Thr Ile Thr Asn Asp Lys Gly Arg
100 105 110
Leu Ser Lys Glu Glu Ile Glu Arg Met Val Gln Glu Ala Glu Lys Tyr
115 120 125
Lys Ala Glu Asp Glu Val Gln Arg Glu Arg Val Ser Ala Lys Asn Ala
130 135 140
Leu Glu Ser Tyr Ala Phe Asn Met Lys Ser Ala Val Glu Asp Glu Gly
145 150 155 160
Leu Lys Gly Lys Ile Ser Glu Ala Asp Lys Lys Lys Val Leu Asp Lys
165 170 175
Cys Gln Glu Val Ile Ser Trp Leu Asp Ala Asn Thr Leu Ala Glu Lys
180 185 190
Asp Glu Phe Glu His Lys Arg Lys Glu Leu Glu Gln Val Cys Asn Pro
195 200 205
Ile Ile Ser Gly Leu Tyr Gln Gly Ala Gly Gly Pro Gly Pro Gly Gly
210 215 220
Phe Gly Ala Gln Gly Pro Lys Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro Thr Ile
225 230 235 240
Glu Glu Val Asp

10

20

- <210> 3
- <211> 92
- <212> PRT
- <213> Homo Sapien

<400> 3
Lys Ser Ala Val Glu Asp Glu Gly Leu Lys Gly Lys Ile Ser Glu Ala
1 5 10 15

Asp Lys Lys Lys Val Leu Asp Lys Cys Gln Glu Val Ile Ser Trp Leu
 20 25 30
 Asp Ala Asn Thr Leu Ala Glu Lys Asp Glu Phe Glu His Lys Arg Lys
 35 40 45
 Glu Leu Glu Gln Val Cys Asn Pro Ile Ile Ser Gly Leu Tyr Gln Gly
 50 55 60
 Ala Gly Gly Pro Gly Pro Gly Gly Phe Gly Ala Gln Gly Pro Lys Gly
 65 70 75 80
 Gly Ser Gly Ser Gly Pro Thr Ile Glu Glu Val Asp
 85 90

10

<210> 4
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<400> 4
 gatccgaggg gactttccgc tggggacttt ccagg 35

<210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

20

<400> 5
 tgtcgaatgc aaatcactag aa 22

【図面の簡単な説明】

【図1】 示差的Hsp70 摂取活性を示す種々の細胞類型を示し、図1Aは70Z/3細胞+Hsp70-FITC；図1Bは70Z/3細胞+BSA-FITC；図1Cは抗CD14-PE+Hsp70-FITCで染色したPBL；図1Dは抗CD14-PE+BSA-FITCで染色したPBL；図1Eは抗CD19-PE+Hsp70-FITCで染色したPBL；図1Fは抗CD3-PE+Hsp70で染色した末梢血液T細胞を示す。 30

【図2】 Hsp70細胞摂取の動態を示し、図2Aは70Z/3細胞によるHsp70-FITCの摂取の動態；図2Bは70Z/3細胞による摂取に対するHsp70の用量効果を示す。

【図3】 Hsp70-FITCの細胞内摂取がアジドによって影響を受けないが、4で抑制されることを示す。 40

【図4】 融合蛋白の細胞質および核への移送を示す。

【図5】 内在化した細胞内Hsp70またはHsp70-p50が24時間までの間安定のままでいたことを示す。

【図6】 内在化したHsp70-p50融合蛋白がDNA-結合活性を示したことを明らかにする。

【図7】 Hsp70-p50-処理細胞が活性化となり、表面カップIgを発現し、かつTNFを生成したことを示す。

【 1 A】

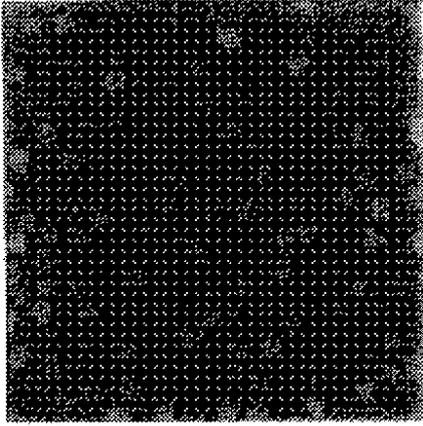


FIG. 1A

【 1 B】

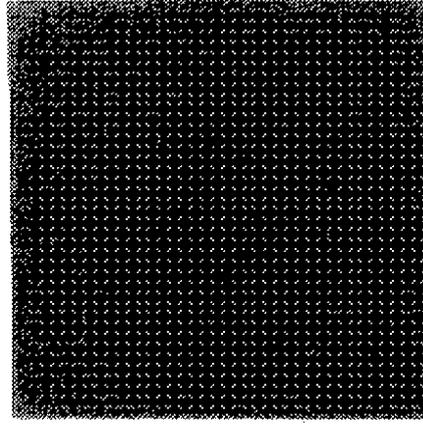


FIG. 1B

【 1 C】

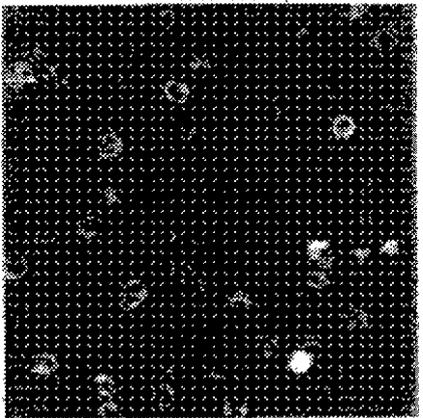


FIG. 1C

【 1 D】

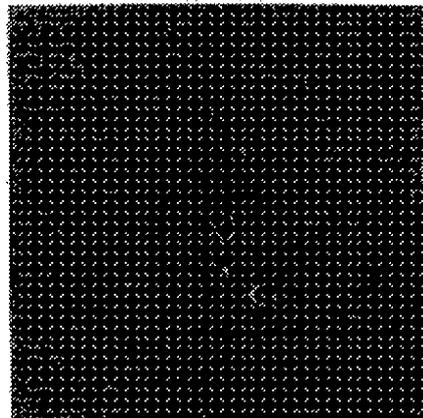


FIG. 1D

【 図 1 E 】

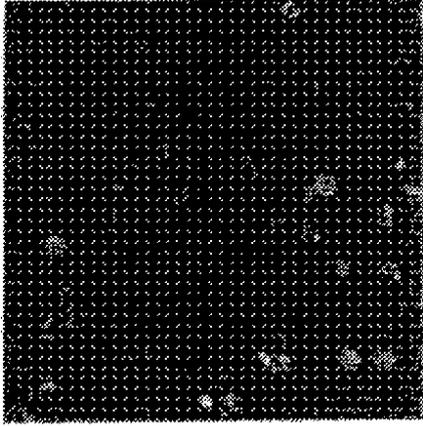


FIG. 1E

【 図 1 F 】

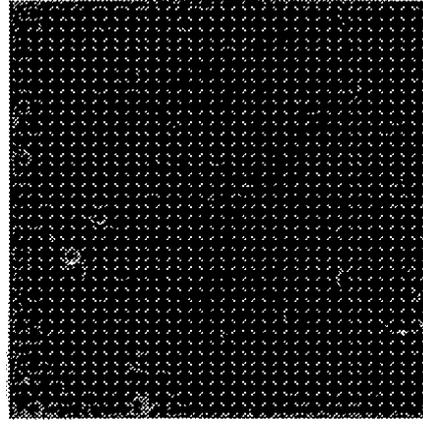


FIG. 1F

【 図 2 】

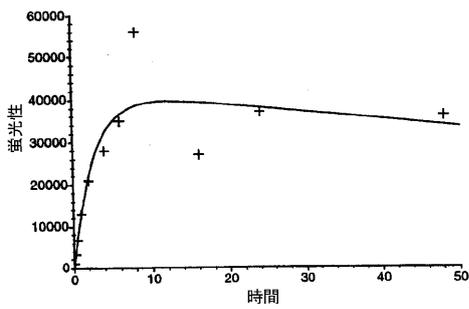


FIG. 2A

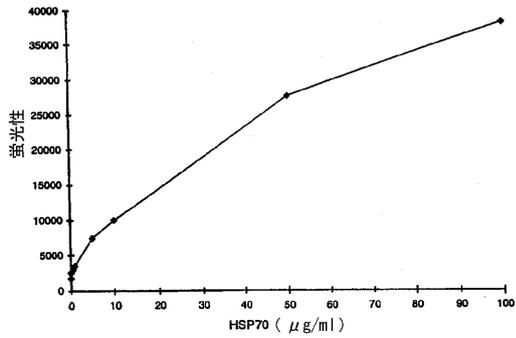


FIG. 2B

【 図 3 A 】

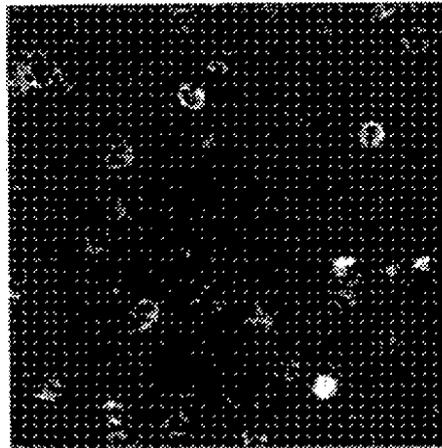


FIG. 3A

【 3 B】

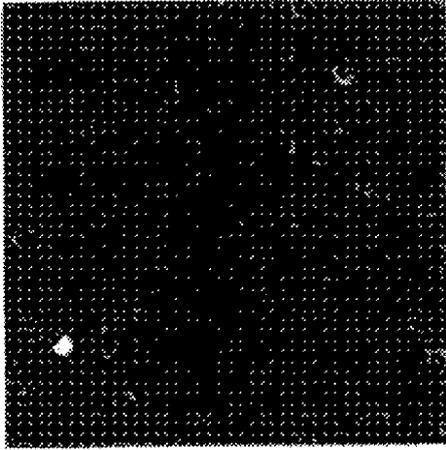


FIG. 3B

【 3 C】

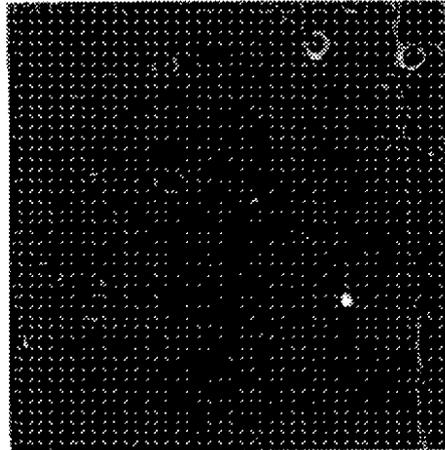


FIG. 3C

【 3 D】

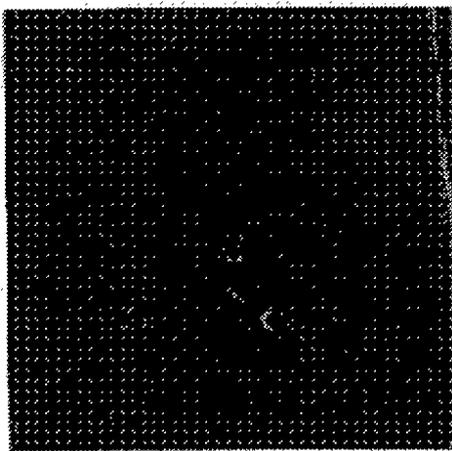


FIG. 3D

【 3 E】

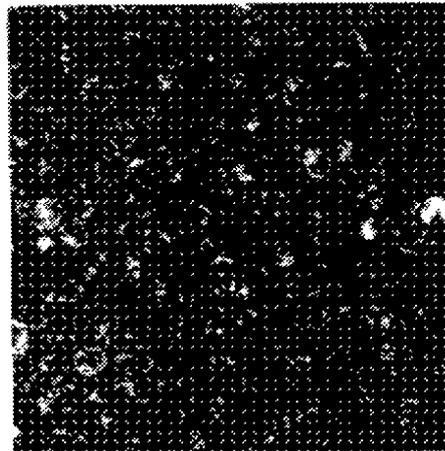


FIG. 3E

【 4 A】

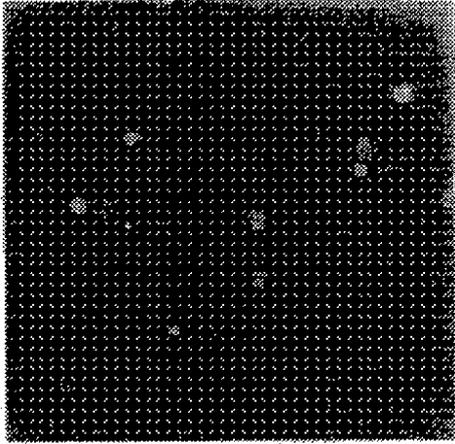


FIG. 4A

【 4 B】

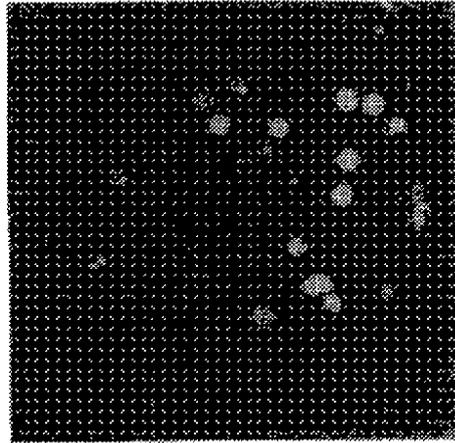


FIG. 4B

【 4 C】

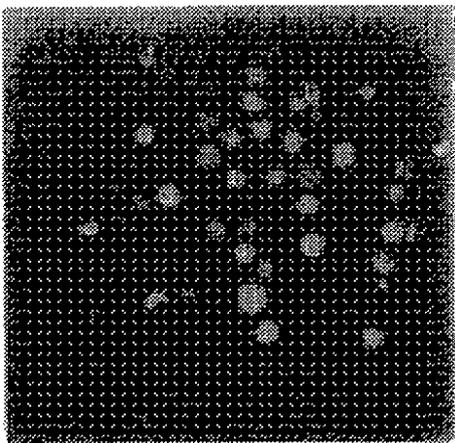


FIG. 4C

【 4 D】

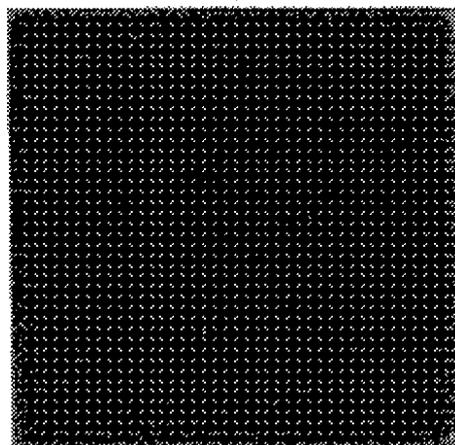
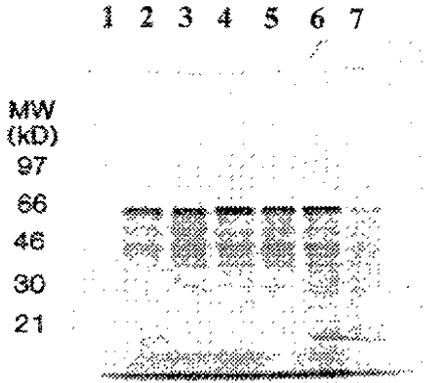


FIG. 4D

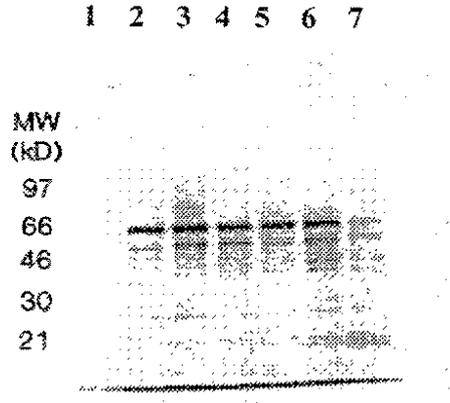
【 図 5 A 】

FIG. 5A



【 図 5 B 】

FIG. 5B



【 図 6 】

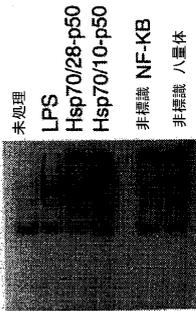


FIG. 6A

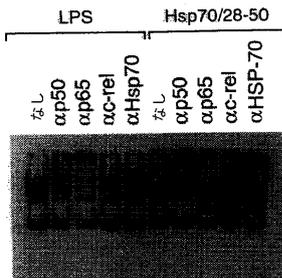


FIG. 6B

【 図 7 A 】

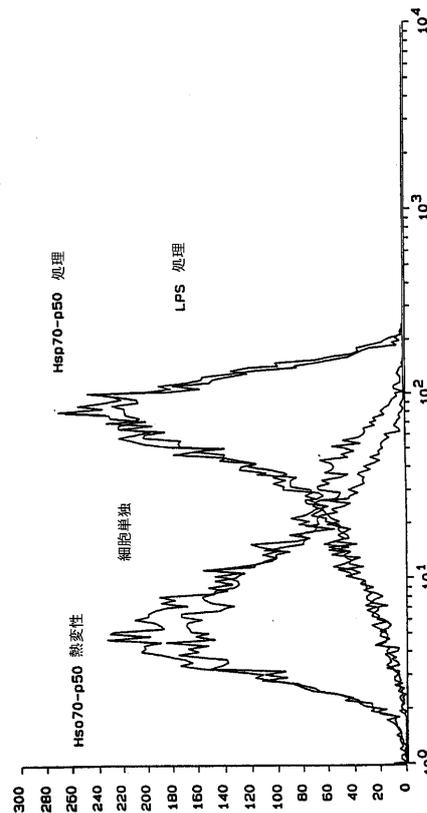


FIG. 7A

【 7 B 】

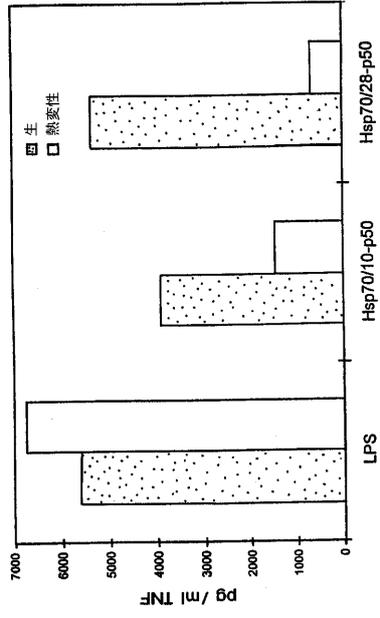


FIG. 7B

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 19/02 (2006.01)		A 6 1 P 19/02
A 6 1 P 29/00 (2006.01)		A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 29/00 1 0 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		A 6 1 P 35/00
		C 1 2 N 15/00 Z N A A

(74)代理人 100150500

弁理士 森本 靖

(74)代理人 100156111

弁理士 山中 伸一郎

(72)発明者 シェリ・エム・フジハラ

アメリカ合衆国 9 4 5 7 9 カリフォルニア州サン・レアンドロ、ベイポイント・アベニュー 1 5 6
9 8 番

(72)発明者 スティーブン・ジー・ナドラー

アメリカ合衆国 0 8 5 4 0 ニュージャージー州プリンストン、ニール・コート 1 6 4 番

審査官 福井 悟

(56)参考文献 国際公開第 9 8 / 0 2 3 7 3 5 (W O , A 1)

特表平 0 8 - 5 1 0 7 5 6 (J P , A)

Journal of experimental medicine , 1997, Vol.186, No.8 , pages 1315-1322

Journal of experimental medicine , Mar. 1998, Vol.187, No.5 , pages 685-691

Journal of biological chemistry , 1989, Vol.264, No.30 , pages 18019-18023

Proc Natl Acad Sci USA , 1991, Vol.88, No.3 , pages 966-970

J Cell Biol , 1989, Vol.109, No.5 , pages 1947-1962

細胞工学 , 1992, Vol.11, No.3 , pages 179-184

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 38/00

A61K 47/00-47/48

A61K 9/00-9/72