

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-149664

(P2009-149664A)

(43) 公開日 平成21年7月9日(2009.7.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 N	

審査請求 有 請求項の数 16 O L 外国語出願 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2009-25648 (P2009-25648)	(71) 出願人	504322987
(22) 出願日	平成21年2月6日(2009.2.6)		ロマ リンダ ユニヴァーシティ
(62) 分割の表示	特願2004-545230 (P2004-545230) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア 923 50, ロマ リンダ, プロスペクト アヴェニュー 24888
原出願日	平成15年8月6日(2003.8.6)	(74) 代理人	100109726
(31) 優先権主張番号	60/401, 652		弁理士 園田 吉隆
(32) 優先日	平成14年8月6日(2002.8.6)	(74) 代理人	100101199
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小林 義教

(72) 発明者 エッシャー, アラン, ピー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 923
74, レッドランズ, ジェファーソン
ストリート 463

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患を予防し治療するための物質

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための物質の提供。

【解決手段】 アポトーシス誘導タンパク質 B A X をコードし、自己免疫疾患の一以上の自己抗原をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクト。具体的には、自己免疫疾患に罹っていることが疑われるか、自己免疫疾患に罹りつつあるか、又は自己免疫疾患である患者を選択し、アポトーシス誘導タンパク質 B A X をコードし、自己免疫疾患の一以上の自己抗原をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクト、又はアデノウイルスタンパク質 E 3 - G P 1 9 k をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクト、又は B C L - 2 をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクトの一以上の投薬用量を患者に投与する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一以上の自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための物質であって、アポトーシス誘導タンパク質 B A X をコードし、自己免疫疾患の一以上の自己抗原をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクトを含む物質。

【請求項 2】

一以上の自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための医薬の製造における、アポトーシス誘導タンパク質 B A X をコードし、自己免疫疾患の一以上の自己抗原をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクトの使用。

【請求項 3】

一以上の自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための医薬の製造における、アデノウイルスタンパク質 E 3 - G P 1 9 k をコードし、自己免疫疾患の一以上の自己抗原をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクトの使用。

【請求項 4】

一以上の自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための医薬の製造における、アデノウイルスタンパク質 B C L - 2 をコードし、自己免疫疾患の一以上の自己抗原をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクトの使用。

【請求項 5】

医薬が約 0 . 5 m g から約 5 m g の間の投薬単位で製造される、請求項 2 ないし 4 の何れか 1 項に記載の使用。

【請求項 6】

医薬が約 1 m g から約 4 m g の間の投薬単位で製造される、請求項 2 ないし 4 の何れか 1 項に記載の使用。

【請求項 7】

医薬が約 2 . 5 m g から約 3 m g の間の投薬単位で製造される、請求項 2 ないし 4 の何れか 1 項に記載の使用。

【請求項 8】

医薬が筋肉内投与に適した形態で製造される、請求項 2 ないし 4 の何れか 1 項に記載の使用。

【請求項 9】

医薬が静脈内投与に適した形態で製造される、請求項 2 ないし 4 の何れか 1 項に記載の使用。

【請求項 10】

患者の自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための方法において、
a) 自己免疫疾患に罹っていることが疑われるか、自己免疫疾患に罹りつつあるか、又は自己免疫疾患である患者を選択し、

b) アポトーシス誘導タンパク質 B A X をコードし、自己免疫疾患の一以上の自己抗原をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクトの一以上の投薬用量を患者に投与する、方法。

【請求項 11】

自己免疫疾患が I 型糖尿病である請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

患者の選択が、患者における抗インスリン又は抗 G A D 自己抗体あるいは抗インスリン及び G A D 自己抗体の双方の存在を同定することを含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

患者の選択が、患者における高血糖の存在を同定することを含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

患者の選択が、患者における糖尿の存在を同定することを含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

患者の選択が、患者における自己免疫疾患に対する遺伝的素因の存在を同定することを含む、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 6】

一以上の投薬用量が複数の投薬用量である、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 7】

患者への一以上の投薬用量の投与は、患者への一以上の投薬用量の筋肉内注射によりなされる、請求項 1 0 に記載の方法。

10

【請求項 1 8】

投与後に自己免疫疾患の進行について患者をモニターすることを更に含む、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 9】

患者の自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための方法において、
 a) 自己免疫疾患に罹っていることが疑われるか、自己免疫疾患に罹りつつあるか、又は自己免疫疾患である患者を選択し、
 b) アデノウイルスタンパク質 E 3 - G P 1 9 k をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクトの一以上の投薬用量を患者に投与することを含む方法。

20

【請求項 2 0】

自己免疫疾患が I 型糖尿病である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

患者の選択が、患者における抗インスリン又は抗 G A D 自己抗体あるいは抗インスリン及び G A D 自己抗体の双方の存在を同定することを含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

患者の選択が、患者における高血糖の存在を同定することを含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

患者の選択が、患者における糖尿の存在を同定することを含む、請求項 2 0 に記載の方法。

30

【請求項 2 4】

患者の選択が、患者における自己免疫疾患に対する遺伝的素因の存在を同定することを含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 5】

一以上の投薬用量が複数の投薬用量である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 6】

患者への一以上の投薬用量の投与は、患者への一以上の投薬用量の筋肉内注射によりなされる、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 7】

投与後に自己免疫疾患の進行について患者をモニターすることを更に含む、請求項 1 9 に記載の方法。

40

【請求項 2 8】

患者の自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための方法において、
 a) 自己免疫疾患に罹っていることが疑われるか、自己免疫疾患に罹りつつあるか、又は自己免疫疾患である患者を選択し、
 b) B C L - 2 をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクトの一以上の投薬用量を患者に投与することを含む方法。

【請求項 2 9】

自己免疫疾患が I 型糖尿病である、請求項 2 8 に記載の方法。

50

【請求項 30】

患者の選択が、患者における抗インスリン又は抗GAD自己抗体あるいは抗インスリン及びGAD自己抗体の双方の存在を同定することを含む、請求項29に記載の方法。

【請求項 31】

患者の選択が、患者における高血糖の存在を同定することを含む、請求項29に記載の方法。

【請求項 32】

患者の選択が、患者における糖尿の存在を同定することを含む、請求項29に記載の方法。

【請求項 33】

患者の選択が、患者における自己免疫疾患に対する遺伝的素因の存在を同定することを含む、請求項28に記載の方法。

【請求項 34】

一以上の投薬用量が複数の投薬用量である、請求項28に記載の方法。

【請求項 35】

患者への一以上の投薬用量の投与は、患者への一以上の投薬用量の筋肉内注射によりなされる、請求項28に記載の方法。

【請求項 36】

投与後に自己免疫疾患の進行について患者をモニターすることを更に含む、請求項28に記載の方法。

【請求項 37】

患者の自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための方法において、
a) 自己免疫疾患に罹っていることが疑われるか、自己免疫疾患に罹りつつあるか、又は自己免疫疾患である患者を選択し、

b) アポトシス誘導タンパク質BAXをコードし、自己免疫疾患の一以上の自己抗原をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクト、又はアデノウイルスタンパク質E3-GP19kをコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクト、又はBCL-2をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクト、又は上記ポリヌクレオチドコンストラクトの組み合わせの一以上の投薬用量を患者に投与することを含む方法。

【請求項 38】

自己免疫疾患がI型糖尿病である、請求項37に記載の方法。

【請求項 39】

患者の選択が、患者における抗インスリン又は抗GAD自己抗体あるいは抗インスリン及びGAD自己抗体の双方の存在を同定することを含む、請求項38に記載の方法。

【請求項 40】

患者の選択が、患者における高血糖の存在を同定することを含む、請求項38に記載の方法。

【請求項 41】

患者の選択が、患者における糖尿の存在を同定することを含む、請求項38に記載の方法。

【請求項 42】

患者の選択が、患者における自己免疫疾患に対する遺伝的素因の存在を同定することを含む、請求項37に記載の方法。

【請求項 43】

一以上の投薬用量が複数の投薬用量である、請求項37に記載の方法。

【請求項 44】

患者への一以上の投薬用量の投与は、患者への一以上の投薬用量の筋肉内注射によりなされる、請求項37に記載の方法。

【請求項 45】

10

20

30

40

50

投与後に自己免疫疾患の進行について患者をモニターすることを更に含む、請求項 37 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

連邦支援研究又は開発に関する説明

この発明は合衆国陸軍のナショナル・メディカル・テクノロジー・テストベッド・インクとの共同契約番号 DAMD - 17 - 97 - 2 - 7016 の米国政府支援下でなされたものである。合衆国政府はこの発明に一定の権利を有している。

【0002】

関連出願とのクロスリファレンス

本出願人は、その内容の全体を出典明示によりこの開示に取り込む 2002 年 8 月 6 日出願の「糖尿病の抑制のための方法と物質」と題された米国仮特許出願 60 / 401652 号の優先権を主張する。

【0003】

背景

自己免疫疾患は顕著なヒト罹患率と死亡率を生じる。これらの疾患には、およそ 80 の疾患、例えばリウマチ様関節炎、全身性ループス及び多発性硬化症が含まれ、米国の人口のおよそ 5% が罹っている。一つの自己免疫疾患である 1 型糖尿病は子供に最も頻繁に生じる慢性疾患であり、世界的に発生率は定常的に増加している。

一般に、1 型糖尿病の発症は、膵臓ベータ細胞により合成された自己抗原の抗原提示細胞 (APCs) による提示で始まる。この提示により、殆どは T ヘルパー 1 (Th1) 及び細胞毒性 T リンパ球により媒介される膵臓ベータ細胞が破壊され、これによってインスリン産生が失われる。

【0004】

1 型糖尿病に対する多くの予防的及び治療的アプローチ法では、例えば自己抗原を専ら送達させるワクチンを投与するか、又はサイトカインのような免疫系の直接のエフェクターを投与して、免疫系を誘発して病原性自己反応性リンパ球を欠失させ、不活性化させ又は抑えることによってベータ細胞の破壊の防止が試みられている。しかし、現在利用できる DNA をベースとするワクチンは疾患予防には完全には効果的ではなく、これらのワクチンの幾つかの使用は疾患予防よりむしろ自己免疫の誘導又は増強に関連している。また、サイトカインの使用は顕著な罹患率を伴う。

従って、これらの不具合を伴わないワクチンを使用する自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための新規な方法が必要である。更に、これらの不具合を伴わないワクチンを使用する 1 型糖尿病を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための新規な方法が必要である。

【0005】

概要

本発明の一実施態様によれば、一以上の自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための物質が提供される。該物質は、アポトーシス誘導タンパク質 BAX をコードし、自己免疫疾患の一以上の自己抗原をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクトを含む。

本発明の他の実施態様によれば、一以上の自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための医薬の製造における、アポトーシス誘導タンパク質 BAX をコードし、自己免疫疾患の一以上の自己抗原をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクトの使用が提供される。

【0006】

本発明の他の実施態様によれば、一以上の自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための医薬の製造における、アデノウイルスタンパク質 E3 - GP19k をコードし、自己免疫疾患の一以上の自己抗原をコードするポリヌクレオチド配列を含むポ

10

20

30

40

50

リヌクレオチドコンストラクトの使用が提供される。

本発明の他の実施態様によれば、一以上の自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための医薬の製造における、 B C L - 2 をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクトの使用が提供される。

【 0 0 0 7 】

一実施態様では、医薬は約 0 . 5 m g から約 5 m g の間の投薬単位で製造される。他の実施態様では、医薬は約 1 m g から約 4 m g の間の投薬単位で製造される。他の実施態様では、医薬は約 2 . 5 m g から約 3 m g の間の投薬単位で製造される。他の実施態様では、医薬は筋肉内投与に適した形態で製造される。他の実施態様では、医薬が静脈内投与に適した形態で製造される。

10

【 0 0 0 8 】

本発明の他の実施態様によれば、患者の自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための方法が提供される。該方法は、自己免疫疾患に罹っていることが疑われるか、自己免疫疾患に罹りつつあるか、又は自己免疫疾患である患者を選択し；アポトーシス誘導タンパク質 B A X をコードし、自己免疫疾患の一以上の自己抗原をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクト、又はアデノウイルスタンパク質 E 3 - G P 1 9 k をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクト、又は B C L - 2 をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクト、又は上記ポリヌクレオチドコンストラクトの組み合わせの一以上の投薬用量を患者に投与することを含む。

20

【 0 0 0 9 】

一実施態様では、自己免疫疾患は I 型糖尿病である。他の実施態様では、患者の選択は、患者における抗インスリン又は抗 G A D 自己抗体あるいは抗インスリン及び G A D 自己抗体の双方の存在を同定することを含む。他の実施態様では、患者の選択は、患者における高血糖の存在を同定することを含む。他の実施態様では、患者の選択は、患者における糖尿の存在を同定することを含む。他の実施態様では、患者の選択は、患者における自己免疫疾患に対する遺伝的素因の存在を同定することを含む。

【 0 0 1 0 】

他の実施態様では、一以上の投薬用量は複数の投薬用量である。他の実施態様では、患者への一以上の投薬用量の投与は、患者への一以上の投薬用量の筋肉内注射によりなされる。他の実施態様では、該方法は、投与後に自己免疫疾患の進行について患者をモニターすることを更に含む。

30

本発明のこれら等の特徴、側面及び利点は次の説明、添付の特許請求の範囲及び図面を参照してより良好に理解される。

【 0 0 1 1 】

[説明]

本発明の一実施態様によれば、一以上の自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための物質が提供される。本発明の他の実施態様によれば、一以上の自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための方法が提供される。一実施態様では、自己免疫疾患は 1 型糖尿病である。好適な実施態様では、本方法はワクチンである本発明の物質を使用することを含む。本発明の物質及び方法は自己抗原の送達のみを使用するのではなく、従来の方法におけるように免疫系の直接のエフェクターである分子を使用するのでもない。代わりに、本発明は自己免疫疾患を抑制可能な一以上のタイプの細胞のアポトーシスを防止するためにワクチンを使用する。自己免疫疾患を抑制可能なこれら一以上のタイプの細胞はなお生理的及び免疫調節を受けるので、自己免疫を誘導し又は抑制する危険性が、幾種かの従来の方法と比較して本方法によって大きく減少する。更に、本発明は、サイトカインのような免疫系の直接エフェクターである物質を投与することを含んでいないので、本発明はそのような免疫系の直接的エフェクターに伴う副作用を生じない。更に好適には、主としてプラスミド D N A を含む遺伝的ワクチンは比較的 low cost で生産することができ、保存のための「コールド鎖(cold chain)」を必要としない。従っ

40

50

て、本発明に係る物質及び方法は自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するために使用するのに経済的かつ実用的である。更に、本発明に係る遺伝子ワクチンは、生物の遺伝子材料を直接改変し、これはタンパク質をベースとするワクチンとは異なり、生物の免疫系によって天然エピトープが加工されることを意味する。本発明の物質と方法を以下に詳細に説明する。

【0012】

本明細書において使用される場所では、「自己免疫疾患」という用語は、生物自身の免疫系による正常細胞又は組織の部分的又は全体的な破壊による双方の疾患を含み、また生物に移植されて、生物自身の免疫系によって、例えば島細胞移植、又は部分的又は全体的器官移植のように、欠陥があるか欠如した細胞又は組織の代わりをする細胞又は組織の破壊を含む。

10

この明細書において使用される「含む(comprise)」及びその変形、例えば「含んでいる(comprising)」及び「含む(comprises)」という用語は、他の添加剤、成分、完全体、又は工程を排除することを意図しない。

【0013】

一実施態様では、本発明は、一以上の自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するために個々に、連続して又は同時に使用できる3種の物質を含む。3種の物質の一つは、アポトーシス誘導タンパク質BAXをコードし、自己免疫疾患の一以上の自己抗原をコードする、配列番号：1のポリヌクレオチド配列を含むDNAコンストラクトである。3種の物質のもう一つは、小胞体中のMHC-I分子上の抗原提示を防止する、アデノウイルスタンパク質E3-GP19kをコードする配列番号：2のポリヌクレオチド配列を含むDNAコンストラクトである。3種の物質のもう一つは、本明細書において BCL-2と命名されたBCL-2の切断型をコードする配列番号：3のポリヌクレオチド配列を含むDNAコンストラクトである。

20

【0014】

本明細書を参照して当業者が理解するように、アポトーシス誘導タンパク質BAX、アデノウイルスタンパク質E3-GP19k及び BCL-2をコードするポリヌクレオチド配列のように、本明細書に開示されたポリヌクレオチド配列に対して特定の配列が付与されているが、本発明は、翻訳されたアミノ酸配列に変化を引き起こさない任意の他の配列、並びに、翻訳されたアミノ酸配列に変化を引き起こすがその変化は本明細書において考えられている用途にそれを不適にするように翻訳アミノ酸配列の機能に実質的に影響を及ぼすことはない任意の配列を含む。

30

【0015】

しかして、図1には、本発明に係る3種の物質の概略図が示されている。これから分かるように、各物質はプラスミドDNAコンストラクトを含む。物質Aは、1型糖尿病の自己抗原である分泌型グルタミン酸デカルボキシラーゼのような、自己免疫疾患のための自己抗原をコードするポリヌクレオチドを含み、BAXをコードする配列番号：1のポリヌクレオチドが続くプラスミドコンストラクトを含む。物質Bは、自己免疫疾患の自己抗原をコードするポリヌクレオチドを含まず、E3-GP19kをコードする配列番号：2のポリヌクレオチドを含むプラスミドコンストラクトを含む。物質Cは、自己免疫疾患の自己抗原をコードするポリヌクレオチドを含まず、アポトーシス誘導タンパク質BCL-2の切断型をコードする配列番号：3のポリヌクレオチドを含むプラスミドコンストラクトを含む。図中、「CMV」はサイトメガロウイルスプロモーターエレメントを表し、「pA」はポリアデニル化部位を表し、「IRES」は配列番号：4のEMCVウイルスの内部リボソーム結合部位を表す。

40

【0016】

本発明の効果を実証するために、15のプラスミドを構築しワクチンとして使用した。各コンストラクトをベクターpND2中にクローン化した。しかして、図2には、自己免疫疾患の予防、その発症の遅延又は治療のためのその効能について検査した15種のプラスミドの模式図が示されている。これから分かるように、各プラスミドは、各形質移入細

50

胞における双方のオープンリーディングフレームの発現を確実にするために同じプロモーター (CMVp) のプラスミド転写制御下に置いた。BCL-2 をコードする cDNA を含むこれらプラスミドの構築中に、cDNA の大きなサイズのためにプラスミドの欠失が生じたことが分かった。従って、bc1-2 と命名した bc1-2 の切断型を用いてプラスミドを構築した。図 2 に示すように、上記プラスミドは、細胞質 GAD をコードする cDNA、配列番号：5 (プラスミド 1)；分泌型 GAD (SGAD)，配列番号：6，(プラスミド 2)；コントロール分泌型ルシフェラーゼ，配列番号：7，(プラスミド 3)；切断型ヒト抗アポトーシスタンパク質 BCL-2 (BCL-2)，配列番号：3，(プラスミド 4)；抗アポトーシスタンパク質 BAX，配列番号：1，(プラスミド 5)；E3-GP19k，配列番号：2，(プラスミド 6)；細胞質 GAD，配列番号：5、分泌型 GAD，配列番号：6 2、及び分泌型ルシフェラーゼ，配列番号：7 を BCL-2，配列番号：3 と組み合わせたもの(それぞれ、プラスミド 7 - 9)；細胞質 GAD，配列番号：5、分泌型 GAD，配列番号：6、及び分泌型ルシフェラーゼ，配列番号：7 を BAX，配列番号：1 と組み合わせたもの(それぞれ、プラスミド 10 - 12)；及び細胞質 GAD，配列番号：5、分泌型 GAD，配列番号：6、及び分泌型ルシフェラーゼ，配列番号：7 を E3-GP19k，配列番号：2 と組み合わせたもの(それぞれプラスミド 13 - 15) を含んでいた。

10

【0017】

全プラスミドを生成し、PCR を使用してオープンリーディングフレームを増幅させ、増幅産物を DNA 配列決定後に調べ、変異がないことを見出した。ついで、各コンストラクトを用いて、細胞可溶化物の免疫プロット分析のためにサル COS-7 細胞を一過性にトランスフェクトしたところ、正しいサイズの遺伝子産物がコードされていることが確認された(データは示さず)。

20

【0018】

次に、非肥満糖尿病 (NOD) マウスに対する上記 15 種のプラスミドの効果を次のようにして決定した。まず、プラスミド DNA を、Qiagen Endofree キット (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, US) を用いて単離し、15 種のプラスミド DNA のそれぞれ 300 μ g を、15 匹の 4 - 5 週齢の雌 NOD マウス群に筋肉内注射した。300 μ g の用量は、生物体の体重を基にしたヒトの臨床状態に関連した用量として選択した。糖尿病の発症は、尿及び血糖分析を使用して 35 週齢までモニターした。マウスは、血糖値が 2 日連続して 300 mg/dl を超え、高レベルの糖尿について陽性であると検査で分かった後に糖尿病であると考えた。

30

【0019】

これらの実験結果により次のことが実証された。35 週齢の糖尿病の動物の割合は、プラスミド 1 - 3 をワクチン接種したマウスに対して 73 - 93%、プラスミド 4 又は 7 - 9 をワクチン接種したマウスに対して 60 - 67%、プラスミド 5 及び 10 - 12 をワクチン接種したマウスに対して 47 - 85%、プラスミド 6 及び 13 - 15 をワクチン接種したマウスに対して 53 - 73% の範囲であった。コントロール動物(ワクチン接種していないもの)は約 93% の糖尿病の発生率であった。従って、300 μ g のプラスミドベクターだけ又は抗原だけをコードする 300 μ g のプラスミドベクター、つまりプラスミド 1 - 3 の投与は、糖尿病の有意な抑制を示さなかった。プラスミド 6 - 9 及び 11 をワクチン接種したマウスは未処置のマウスと比較すると統計的に有意な糖尿病の抑制結果を示した(プラスミド 7 に対して $P < 0.05$ 、プラスミド 9 に対して $P < 0.02$)。また、pND2 - E3 - GP19k，プラスミド 6 又は pND2 - SGAD55 - BAX，プラスミド 11 を接種されたマウスは、プラスミド pND2 - GAD65，プラスミド 1 又は pND2 - GAD65 - BAX，プラスミド 10 を接種されたマウスと比較すると、35 週齢で有意に減少した糖尿病発症率を示し ($P < 0.04$)、pND2 - GAD65 - BCL2，プラスミド 7 又は pND2 - SGAD55 - BCL2，プラスミド 8 を接種されたマウスは、pND2 - GAD65，プラスミド 1 を接種されたマウスと比較すると、有意に減少した糖尿病を示した ($P < 0.05$)。糖尿病の抑制は島炎症の減少を伴っ

40

50

ていた(データ示さず)。これらの結果を以下に更に詳細に開示する。

【0020】

b c l - 2を含むプラスミド、つまりプラスミド4及び7 - 9をワクチン接種したマウスは、同時発現した抗原にかかわらず糖尿病発症の4 - 5週の遅延を、また同時発現した抗原にかかわらず35週齢で糖尿病発症の減少(ワクチン未接種マウスの約93%と比較して60 - 67%)を示した。従って、G A D自己抗原の同時発現は作用を抑制しなかった。

B A Xを含むプラスミド、つまりプラスミド5及び10 - 12をワクチン接種したマウスは、s g a d 5 5 - b a x , プラスミド11以外は、糖尿病の抑制を示さなかった。プラスミド11をワクチン接種したマウスは、b a x , プラスミド5だけを含むプラスミドをワクチン接種した他のマウスと同様な時点で糖尿病を発症しはじめたが、プラスミド11をワクチン接種した35週齢のマウスにおける糖尿病の発症は、未ワクチン接種コントロールマウスに対する93%の発症と比較して僅か47%であった($p < 0.05$)。

【0021】

E 3 - g p 1 9 kを含むプラスミド、つまりプラスミド6及び13 - 15をワクチン接種したマウスは、同時発現された抗原に応じて、糖尿病発症に広範な差異を示した。自己抗原を含まないでE 3 - g p 1 9 k を含むプラスミドをワクチン接種したマウスは4 - 5週遅れて糖尿病を発症させ始め、35週齢で糖尿病の減少を示した(コントロールの未ワクチン接種コントロールマウスの93%に対して53%) ($p < 0.05$)。自己抗原と共にE 3 - g p 1 9 k を含むプラスミド、つまりプラスミド13 - 15をワクチン接種したマウスは、糖尿病の発症遅延化と35週齢での糖尿病動物の発症率の双方について作用を抑制した。

ついで、免疫応答を、G A D特異的E L I S p o t分析及び血清抗G A D I g GアイソタイプのE L I S Aを使用して特徴づけして、本発明の物質の投与による糖尿病抑制には炎症T h 1様活性の抑制及び抗炎症T h 2様応答の上方制御が伴うかどうかを調べた。

【0022】

E L I S p o tアッセイは次のようにして実施した。糖尿病発症時点又は非糖尿病動物の観察期間の終わりにマウスから脾細胞を単離した。ついで、その細胞を組換えG A Dタンパク質で刺激し、標準的な製造者プロトコルに従ってI F N - (T h 1様活性について)、及びI L - 4 (T h 2様活性について)を分泌する細胞数をカウントした。ついで、G A D刺激のない状態でサイトカインを分泌する細胞数を減算し、結果を分析した。I F N - に対しては、データは、E 3 - G P 1 9 kのみをコードするプラスミド6、又はB C L - 2のみ又は抗原と共にそれをコードするプラスミド4及び7 - 9による糖尿病の抑制にはG A D特異的活性の抑制が伴うことを明白に示している。従って、E 3 - 1 9 k及びB C L - 2はベータ細胞に対する自己反応性を抑制することができる免疫応答を誘発し得た。驚いたことに、S G A D 5 5 - B A Xの組み合わせはT h 1様活性を有意には抑制しなかったようである。更に、糖尿病を抑制しなかったS G A D 5 5単独で、G A D特異的T h 1様応答を抑制した。

【0023】

I L - 4については、データは、E 3 - G P 1 9 kだけをコードするプラスミド6(糖尿病抑制)、S G A D 5 5及びE 3 - 1 9 kをコードするプラスミド13(糖尿病抑制なし)、及びS G A D 5 5及びB C L - 2のプラスミド8(糖尿病抑制)を接種されたマウスに対してG A D特異的活性の増加を示している。よって、T h 2様活性の増加には、T h 1様活性減少又は疾患抑制が常に伴うとは限らなかった。

E L I S Aは次のようにして実施した。動物の血清を、T h 1様及びT h 2様活性をそれぞれ示す抗G A D I g G 2 a , b及びI g G 1アイソタイプのE L I S Aに使用した。抗G A D I g G 2 a , bのE L I S Aは、B C L - 2をコードするプラスミドD N Aの3種のプラスミド4、8及び9が、未ワクチン接種コントロールマウスとではなく、B A Xをコードするプラスミド5と比較した場合、T h 1様活性の有意な減少を示したこ

10

20

30

40

50

とを示している。抗GAD IgG1のELISAは、プラスミド5及び10-12のBAXをコードする全てのプラスミドDNAがTh2様活性の低下を生じることを示している。

【0024】

これらのデータを総合すると、第一に、アポトーシス誘導タンパク質をコードするプラスミドcDNAのbaxを、自己抗原の分泌型をコードするポリヌクレオチドを含むワクチンのような、自己免疫疾患を予防する遺伝子ワクチンのための分子アジュバントとして使用することができることが分かる。第二に、E3-GP19kをコードするか又は切断型BCL-2だけをコードするプラスミドcDNAは自己免疫疾患を抑制し得たが、E3-GP19kをコードするか又は切断型BCL-2を自己抗原と組み合わせてコードするプラスミドcDNAは効果が少なかった。

10

【0025】

本発明の一実施態様では、自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療する方法が提供される。その方法は、自己免疫疾患に罹っていることが疑われるか、自己免疫疾患に罹りつつあるか、又は自己免疫疾患である患者を選択することを先ず含む。その選択は、この明細書を参照して当業者が理解するところの標準的な方法を使用して行うことができる。例えば、自己免疫疾患が糖尿病である場合、選択は、患者における抗インスリン又は抗GAD自己抗体あるいは抗インスリン及び/又はGAD自己抗体の双方の存在、増加する高血糖の存在、糖尿の存在、糖尿病に対する遺伝的素因の存在、又はこれらの一以上を同定することによって、行うことができる。

20

【0026】

ついで、本発明に係るプラスミドコンストラクトの一以上の投薬用量を患者に投与する。つまり、BAXをコードし、自己免疫疾患の自己抗原をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドコンストラクト、又はE3-GP19kをコードするポリヌクレオチドを含むが自己免疫疾患の自己抗原をコードするポリヌクレオチドを含まないプラスミドコンストラクト、又は抗アポトーシスタンパク質BCL-2の切断型をコードするポリヌクレオチド配列を含むが自己免疫疾患の自己抗原をコードするポリヌクレオチドを含まないプラスミドコンストラクトを患者に投与する。好適な実施態様では、本発明に係る二種のプラスミドコンストラクトが生物体に投与される。特に好適な実施態様では、本発明に係る3種全てのプラスミドコンストラクトが生物体に投与される。

30

【0027】

好適な実施態様では、プラスミドコンストラクトは複数の投薬用量で投与される。他の好適な実施態様では、用量は約0.001mg/Kgから約10mg/Kgの間である。他の好適な実施態様では、用量は約0.01mg/Kgから約1mg/Kgの間である。他の好適な実施態様では、用量は約0.05mg/Kgである。好適な実施態様では、ヒト成人のための好適な用量は約0.5mgから5mgの間である。好適な実施態様では、ヒト成人のための好適な用量は約1mgから4mgの間である。好適な実施態様では、ヒト成人のための好適な用量は約2.5mgから3mgの間である。他の好適な実施態様では、用量は約2回から約10回、毎週投与される。特に好適な実施態様では、用量は毎週4回投与される。他の特に好適な実施態様では、用量は1回のみ投与される。

40

【0028】

投与は好適な経路によって行うことができる。好適な実施態様では、経路は筋肉内又は静脈内である。

また、本方法は、投与後に自己免疫疾患の進行について患者をモニターすることを含む。

【実施例1】

【0029】

糖尿病の予防

本発明によれば、患者における糖尿病の発症が例えば次のようにして遅延されるか予防される。先ず、患者が、循環抗インスリン及び抗GAD自己抗体の存在に基づいて選択さ

50

れる。ついで、患者に、SGAD，配列番号：6をコードし、アポトーシス誘導タンパク質BAXをコードしている配列番号：1のポリヌクレオチド配列、又はアデノウイルスタンパク質E3-GP19kをコードしている配列番号：2のポリヌクレオチド配列、又はBCL-2をコードする配列番号：3のポリヌクレオチド配列を含む0.05mg/Kgのプラスミドコンストラクトが筋肉内注射される。注射は、循環抗インスリン及び抗GAD自己抗体レベルをモニターしながら3週間の間毎週繰り返される。循環抗インスリン及び抗GAD自己抗体のレベルが正常値に戻ったときに治療が終了する。

【0030】

本発明は、ある好ましい実施態様を参照しながらかなり詳細に検討したが、他の実施態様も可能である。従って、添付の特許請求の範囲はこの開示に含まれる好適な実施態様の説明に限定されるべきではない。

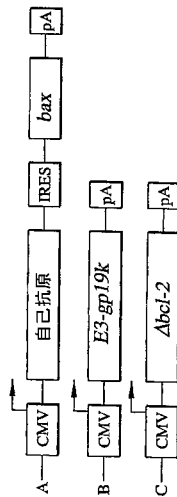
【図面の簡単な説明】

【0031】

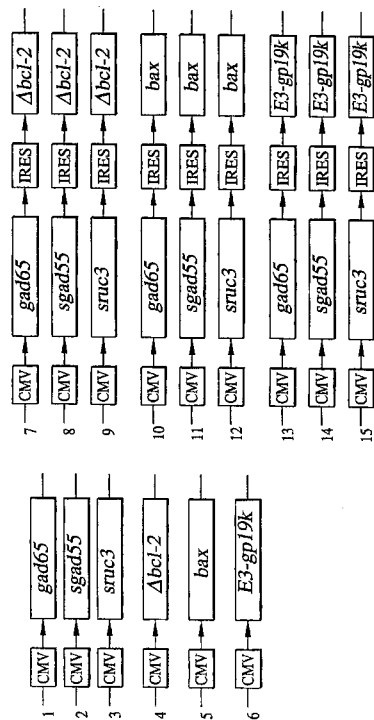
【図1】図1は本発明の3種の物質の概略図である。

【図2】図2は本発明の方法に従って自己免疫疾患の予防、その発症の遅延化又は治療におけるその効能を検査した15種のプラスミドの概略図である。

【図1】



【図2】



【配列表】

2009149664000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成21年2月9日(2009.2.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

患者において一以上の自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための医薬において、プロモーター及びアデノウイルスタンパク質を唯一コードするポリヌクレオチド配列を含むプラスミドを含んでなり、該プラスミドによりコードされる唯一のアデノウイルスタンパク質がE3-GP19kであることを特徴とし、該患者のTh1様免疫応答を下方制御する免疫応答を引き起こすための医薬。

【請求項2】

0.5mgから5mgの間の投薬用量であることを特徴とする、請求項1に記載の医薬。

【請求項3】

筋肉内投与又は静脈内投与の形態であることを特徴とする、請求項1又は2に記載の医薬。

【請求項4】

複数の投薬用量で使用されるものであることを特徴とする、請求項1から3のいずれか一に記載の医薬。

【請求項5】

前記患者が、自己免疫疾患に罹っていることが疑われるか、自己免疫疾患に罹りつつあるか、又は自己免疫疾患に罹っていることを特徴とする、請求項1から4のいずれか一に記載の医薬。

【請求項6】

前記自己免疫疾患がI型糖尿病である、請求項1から5のいずれか一に記載の医薬。

【請求項7】

前記患者が、抗インスリン又は抗GAD自己抗体あるいは抗インスリン及び抗GAD自己抗体の双方の存在が同定された患者であることを特徴とする、請求項1から6のいずれか一に記載の医薬。

【請求項8】

前記患者が、高血糖の存在が同定された患者であることを特徴とする、請求項1から6のいずれか一に記載の医薬。

【請求項9】

前記患者が、糖尿の存在が同定された患者であることを特徴とする、請求項1から6のいずれか一に記載の医薬。

【請求項10】

前記患者が、自己免疫疾患に対する遺伝的素因の存在が同定された患者であることを特徴とする、請求項1から5のいずれか一に記載の医薬。

【請求項11】

自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための医薬において、プロモーターと、アデノウイルスタンパク質E3-GP19kをコードするポリヌクレオチド配列とを含むプラスミドを含んでなることを特徴とする医薬。

【請求項12】

プラスミドが、1)アポトーシス誘導タンパク質BAX及び一以上の自己免疫疾患の自

己抗原、及び2)配列番号3に記載の核酸配列を有する切断型BCL-2 (BCL-2)からなる群から選択した一以上のタンパク質をコードする一以上のポリヌクレオチド配列を更に含む、請求項11に記載の医薬。

【請求項13】

自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための医薬の製造方法であって、プロモーターと、アデノウイルスタンパク質E3-GP19kをコードするポリヌクレオチド配列とを含むプラスミドをそこに含有せしめることを含む方法。

【請求項14】

プラスミドが、1)アポトーシス誘導タンパク質BAX及び一以上の自己免疫疾患の自己抗原、及び2)配列番号3に記載の核酸配列を有する切断型BCL-2 (BCL-2)からなる群から選択した一以上のタンパク質をコードする一以上のポリヌクレオチド配列を更に含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

プロモーターとアデノウイルスタンパク質E3-GP19kとを含むプラスミドの、自己免疫疾患を予防し、その発症を遅延させ又は治療するための医薬の製造における使用。

【請求項16】

プラスミドが、1)アポトーシス誘導タンパク質BAX及び一以上の自己免疫疾患の自己抗原、及び2)配列番号3に記載の核酸配列を有する切断型BCL-2 (BCL-2)からなる群から選択した一以上のタンパク質をコードする一以上のポリヌクレオチド配列を更に含む、請求項15に記載の使用。

フロントページの続き

(72)発明者 リー, フェンチャン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 3 5 4 - 2 7 3 2 , ローマ リンダ, ユニバーシティ
- アベニュー 2 4 5 3 0 , 1 0号室

Fターム(参考) 4C084 AA13 MA66 NA14 ZB022

4C085 AA03 BA77 BB50 CC08 EE01 GG03

【 外国語明細書 】

2009149664000001.pdf

2009149664000002.pdf

2009149664000003.pdf

2009149664000004.pdf

专利名称(译)	预防和治疗自身免疫疾病的物质		
公开(公告)号	JP2009149664A	公开(公告)日	2009-07-09
申请号	JP2009025648	申请日	2009-02-06
申请(专利权)人(译)	罗马琳达盐湖城		
[标]发明人	エッシャーアランピー リーフェンチャン		
发明人	エッシャー, アラン, ピー. リー, フェンチャン		
IPC分类号	A61K39/00 A61K48/00 A61P37/06 A61P3/10 G01N33/53 A61K38/17 C07H21/04 C07K14/075 C07K14/47 C12N5/00		
CPC分类号	A61K38/1709 A61K39/0008 A61K48/005 A61K2039/53 A61K2039/55516 A61P3/10 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P43/00 A61K48/00 C07K14/005 C07K14/4713 C07K14/4747 C12N2710/10322 C12N2840/203 C12N5/00 C12N15/00 C12N15/87		
FI分类号	A61K39/00.H A61K48/00 A61P37/06 A61P3/10 G01N33/53.N		
F-TERM分类号	4C084/AA13 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB022 4C085/AA03 4C085/BA77 4C085/BB50 4C085/CC08 4C085/EE01 4C085/GG03		
优先权	60/401652 2002-08-06 US		
其他公开文献	JP5123226B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种预防，延迟或治疗自身免疫性疾病的物质。编码凋亡诱导蛋白BAX的多核苷酸构建体，其包含编码自身免疫疾病的一种或多种自身抗原的多核苷酸序列。具体地，选择怀疑患有自身免疫疾病，患有自身免疫疾病或患有自身免疫疾病的患者，并编码凋亡诱导蛋白BAX。包含编码一种或多种自身抗原的多核苷酸序列的多核苷酸构建体，或包含编码腺病毒蛋白E3-GP19k的多核苷酸序列的多核苷酸构建体，或包含编码ΔBCL-2的多核苷酸序列的多核苷酸。向患者施用一剂或多剂构建体。[选择图]无

