

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 528886

(P2003 - 528886A)

(43)公表日 平成15年9月30日(2003.9.30)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7076		A 6 1 K 31/7076	2 G 0 5 4
	38/00	45/00	4 B 0 2 4
	45/00	A 6 1 P 3/00	4 B 0 6 4
A 6 1 P 3/00		9/00	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全178数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 571710(P2001 - 571710)

(86)(22)出願日 平成13年3月26日(2001.3.26)

(85)翻訳文提出日 平成14年9月20日(2002.9.20)

(86)国際出願番号 PCT/US01/09512

(87)国際公開番号 W001/072779

(87)国際公開日 平成13年10月4日(2001.10.4)

(31)優先権主張番号 60/192,118

(32)優先日 平成12年3月24日(2000.3.24)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 デューク・ユニバーシティ
DUKE UNIVERSITY
アメリカ合衆国27708 - 0083ノースカロライ
ナ州ダーラム、ポスト・オフィス・ボック
ス90083、オフィス・オブ・サイエンス・ア
ンド・テクノロジー

(72)発明者 クリストファー・ブイ・ニッチッタ
アメリカ合衆国27705ノースカロライナ州ダ
ーラム、パインクレスト・ロード115番

(72)発明者 ジェイムズ・ジェイ・ワッセンバーグ
アメリカ合衆国27705ノースカロライナ州ダ
ーラム、アラバマ・アベニュー1208番

(74)代理人 弁理士 青山 稔 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C R P 9 4 - リガンド相互作用の特徴付けおよびそれに関連する精製、スクリーニングおよび治療法

(57)【要約】

本発明は、リガンドと、G R P 9 4を含むH s p 9 0タンパク質の間の相互作用の特徴付けを記載し、ここで、G R P 9 4のN末端ヌクレオチド結合ドメインに結合するリガンドは、G R P 9 4を不活性形から活性形態に変換させる形態的变化を誘発し、ここでG R P 9 4のシャペロンおよびペプチド結合活性が著しく刺激される。また記載されているのは、G R P 9 4を含むH s p 9 0ペプチド結合タンパク質のリガンド相互作用の特徴付けに基づいた、G R P 9 4、およびある場合H S P 9 0の生物学的活性に関する精製、スクリーニングおよび治療法である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) GRP94タンパク質を含む複合体をGRP94を優勢に結合する結合剤と接触させ、結合剤を固相支持体に固定化させ、複合体を固相支持体に固定化する；

(b) 残りのサンプルを回収する；そして

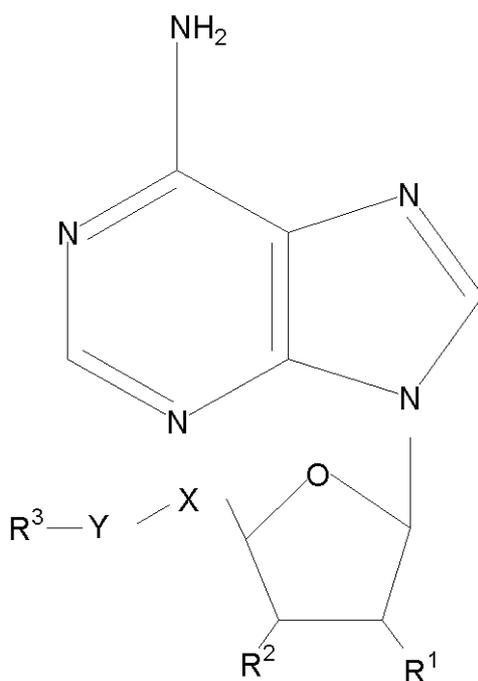
(c) 複合体を固相支持体から溶出し、溶出液中に精製複合体を得る；

ことを含む、GRP94タンパク質を精製する方法。

【請求項2】 結合剤がATPまたはADPを含まない、請求項1に記載の方法。

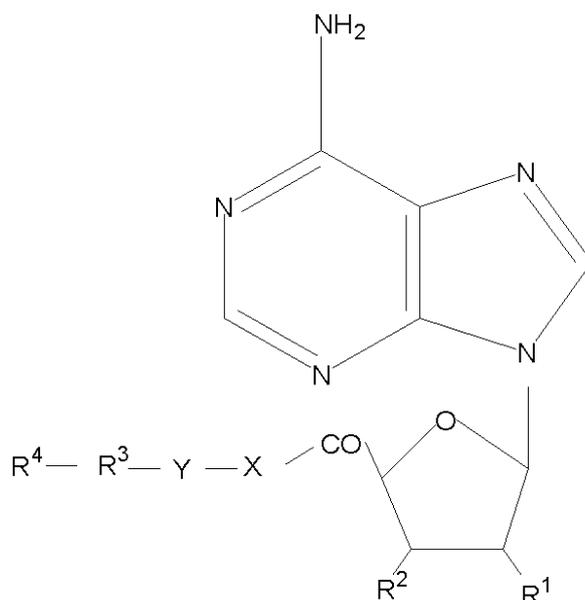
【請求項3】 結合剤が式(I)：

【化1】



または式(II)：

【化2】



〔式中、

XおよびYは同一または異なり、XおよびY = C、N、OまたはS；そしてXおよびYは水素、ヒドロキシル、または二重結合酸素を含む酸素で置換できる；
 R^1 = 水素、ヒドロキシル、 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、分枝 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル、 C_4 から C_8 アリール、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 アルコキシ、 C_1 から C_6 分枝鎖アルコキシ、 C_4 から C_8 アリールオキシ、1級、2級または3級 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級分枝鎖 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級シクロアルキルアミノ、1級、2級または3級 C_4 から C_8 アリールアミノ、 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、分枝 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、 C_1 から C_6 アルキルエステル、分枝 C_1 から C_6 アルキルエステル、 C_4 から C_8 アリールカルボン酸、 C_4 から C_8 アリールエステル、 C_4 から C_8 アリール置換 C_1 から C_6 アルキル、環中にO、NまたはSを有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、環中にO、NまたはSを有するアルキル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール；またはヒドロキシル -、アミノ -、またはハロ - 置換異形；または R^1 はハロ、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブromoまたはヨード；

R^2 = 水素、ヒドロキシル、 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、分枝 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル、 C_4 から C_8 アリール、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 アルコキシ、 C_1 から C_6 分枝鎖アルコキシ、 C_4 から C_8 アリールオキシ、1級、2級または3級 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級分枝鎖 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級シクロアルキルアミノ、1級、2級または3級 C_4 から C_8 アリールアミノ、 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、分枝 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、 C_1 から C_6 アルキルエステル、分枝 C_1 から C_6 アルキルエステル、 C_4 から C_8 アリールカルボン酸、 C_4 から C_8 アリールエステル、 C_4 から C_8 アリール置換 C_1 から C_6 アルキル、環中にO、NまたはSを有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、環中にO、NまたはSを有するアルキル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール；またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形；または R^2 はハロ、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブromoまたはヨード；

R^3 = 水素、ヒドロキシル、 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、分枝 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル、 C_4 から C_8 アリール、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 アルコキシ、 C_1 から C_6 分枝鎖アルコキシ、 C_4 から C_8 アリールオキシ、1級、2級または3級 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級分枝鎖 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級シクロアルキルアミノ、1級、2級または3級 C_4 から C_8 アリールアミノ、 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、分枝 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、 C_1 から C_6 アルキルエステル、分枝 C_1 から C_6 アルキルエステル、 C_4 から C_8 アリールカルボン酸、 C_4 から C_8 アリールエステル、 C_4 から C_8 アリール置換 C_1 から C_6 アルキル、環中にO、NまたはSを有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、環中にO、NまたはSを有するアルキ

ル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール ; またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形 ; または R^3 はハロ、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブロモまたはヨード ; そして

$R^4 = C_1$ から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル(環中に O、N または S を含むかまたは含まない)、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル(環中に O、N または S を含むかまたは含まない)、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール、環中に O、N または S を有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、環中に O、N または S を有するアルキル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、アルキル - 置換 C_4 から C_8 アロイル、またはアルキル - 置換 C_4 から C_8 アリール ; またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブロモまたはヨードである)

である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】 複合体が更に抗原性分子を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】 複合体が温血脊椎動物由来である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】 複合体が哺乳類由来である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 哺乳類がヒト、マウス、ブタ、ラット、無尾猿、有尾猿、ネコ、モルモット、ウシ、ヤギおよびウマからなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 複合体をインビトロで製造する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】 複合体を癌組織から精製する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】 複合体を、複合体で処置する脊椎動物被検体の自己の癌組織から精製する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】 複合体を、組成物で処置する第 1 脊椎動物被検体に存在する癌組織と同じタイプである第 2 脊椎動物被検体由来の癌組織から精製する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項12】 複合体を癌のタイプの腫瘍細胞系から得る、請求項9に記載の方法。

【請求項13】 癌組織が、繊維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、子宮平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺腫、乳頭状癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髓様癌、気管支原性肺癌、腎細胞癌、肝腫瘍、胆管癌、絨毛癌、セミノーム、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髓芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫瘍、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、マクログロブリン血症および重鎖病からなる群から選択される肉腫または癌腫を含む、請求項9に記載の方法。

【請求項14】 複合体を、感染性疾患の原因である病因体に感染した真核生物細胞から選択する、請求項1に記載の方法。

【請求項15】 感染性疾患がウイルス、細菌、真菌、原生動物および寄生虫からなる群から選択される病原体によるものである、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 ウイルス病原体がA型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウイルス、I型単純疱疹(HSV-I)、II型単純疱疹(HSV-II)、牛痘、ライノウイルス、エコーウイルス、ロータウイルス、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、乳頭腫ウイルス、パポーベウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス(echinovirus)、アルボウイルス、ヒュアンタウイルス(huntavirus)、コクサッキーウイルス、ムンプス・ウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、I型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-I)およびII型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-II)からなる群から選択される、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 細菌性病原体がMycobacteria、Rickettsia、Mycoplasma、NeisseriaおよびLegionellaからなる群から選択される、請求項15に記載の方

法。

【請求項18】 原生動物性病原体がLeishmania、Kokzidioa、Trypanosoma、ChlamydiaおよびRickettsiaからなる群から選択される、請求項15に記載の方法。

【請求項19】 固定化結合剤に結合した複合体を、固相を、結合剤を含む緩衝液で洗浄することにより溶出し、複合体を溶出液中に提供する、請求項1に記載の方法。

【請求項20】 請求項1に記載の方法により製造した製品。

【請求項21】 (a)GRP94および抗原性分子を含む複合体を、CRP94を優勢に結合する結合剤と接触させ、結合剤は固相支持体上に固定されており、複合体を固相支持体上に固定化させる；

(b)残りのサンプルを回収する；そして

(c)複合体を固相支持体から溶出し、溶出液中に精製複合体を得る；

(d)溶出液から抗原性分子を単離する

ことを含む、GRP94タンパク質を含む複合体と関連する抗原性分子を単離する方法。

【請求項22】 結合剤がATPまたはADPを含まない、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 GRP94含有複合体および抗原性分子が温血脊椎動物由来である、請求項21に記載の方法。

【請求項24】 GRP94含有複合体および抗原性分子が哺乳類由来である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 哺乳類がヒト、マウス、ブタ、ラット、無尾猿、有尾猿、ネコ、モルモット、ウシ、ヤギおよびウマからなる群から選択される、請求項24に記載の方法。

【請求項26】 GRP94含有複合体および抗原性分子をインビトロで製造する、請求項21に記載の方法。

【請求項27】 抗原性分子が外来性抗原性ペプチドである、請求項21に記載の方法。

【請求項28】 抗原性分子が、GRP94複合体がインビボで内因性に関連しているペプチドである、請求項21に記載の方法。

【請求項29】 GRP94含有複合体および抗原性分子を癌組織から単離する、請求項21に記載の方法。

【請求項30】 GRP94含有複合体および抗原性分子を、GRP94含有複合体および抗原性分子で処置する脊椎動物被検体の自己の癌組織から単離する、請求項29に記載の方法。

【請求項31】 GRP94含有複合体および抗原性分子を、GRP94含有複合体および抗原性分子で処置する第1脊椎動物被検体に存在する癌組織と同じタイプである第2脊椎動物被検体由来の癌組織から単離する、請求項29に記載の方法。

【請求項32】 GRP94含有複合体および抗原性分子を癌のタイプの腫瘍細胞系から得る、請求項29に記載の方法。

【請求項33】 癌組織が、繊維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、子宮平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺腫、乳頭状癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性肺癌、腎細胞癌、肝腫瘍、胆管癌、絨毛癌、セミノーム、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫瘍、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、マクログロブリン血症および重鎖病からなる群から選択される肉腫または癌腫を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項34】 抗原分子は、感染性疾患の原因である病因体に感染した真核生物細胞に存在するが、該真核生物細胞が病原体に感染していないとき、該真核生物細胞に存在しない抗原性分子ペプチドである、請求項21に記載の方法。

【請求項35】 感染性疾患がウイルス、細菌、真菌、原生動物および寄生虫からなる群から選択される病原体によるものである、請求項34に記載の方法

。

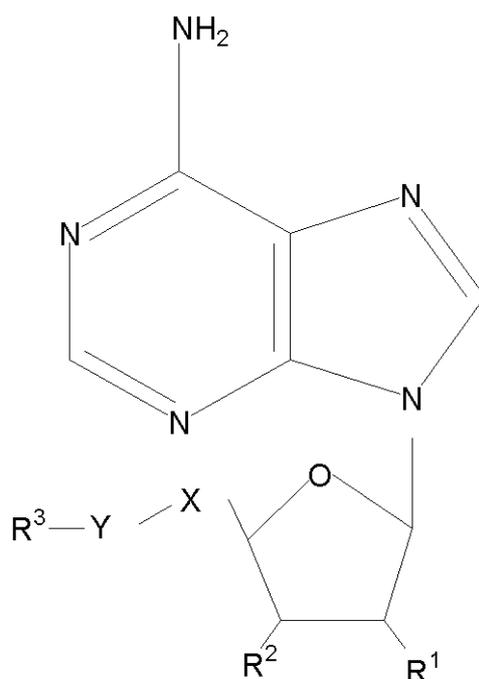
【請求項36】 ウイルス病原体がA型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウイルス、I型単純疱疹(HSV-I)、II型単純疱疹(HSV-II)、牛痘、ライノウイルス、エコーウイルス、ロータウイルス、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、乳頭腫ウイルス、パポーベウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルポウイルス、ヒュアンタウイルス、コクサッキーウイルス、ムンプス・ウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、I型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-I)およびII型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-II)からなる群から選択される、請求項35に記載の方法。

【請求項37】 細菌性病原体がMycobacteria、Mycoplasma、NeisseriaおよびLegionellaからなる群から選択される、請求項35に記載の方法。

【請求項38】 原生動物性病原体がLeishmania、Kokzidioa、Trypanosoma、ChlamydiaおよびRickettsiaからなる群から選択される、請求項35に記載の方法。

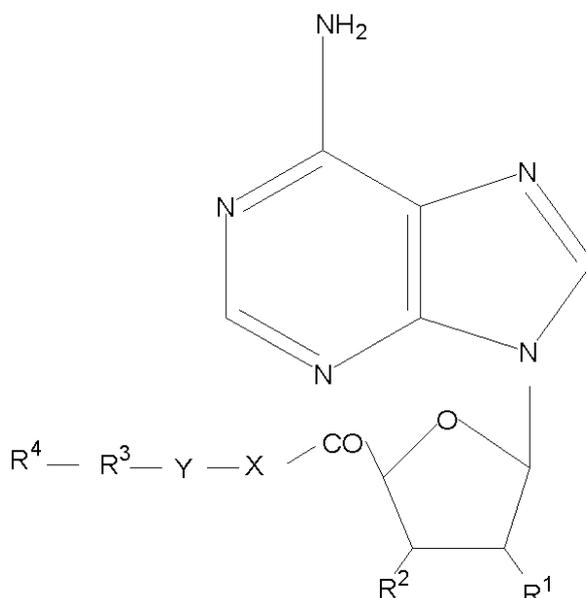
【請求項39】 結合剤が式(I)：

【化3】



または式(II)：

【化4】



〔式中、

XおよびYは同一または異なり、XおよびY = C、N、OまたはS；そしてXおよびYは水素、ヒドロキシル、または二重結合酸素を含む酸素で置換できる；
 R^1 = 水素、ヒドロキシル、 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、分枝 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル、 C_4 から C_8 アリール、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 アルコキシ、 C_1 から C_6 分枝鎖アルコキシ、 C_4 から C_8 アリールオキシ、1級、2級または3級 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級分枝鎖 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級シクロアルキルアミノ、1級、2級または3級 C_4 から C_8 アリールアミノ、 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、分枝 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、 C_1 から C_6 アルキルエステル、分枝 C_1 から C_6 アルキルエステル、 C_4 から C_8 アリールカルボン酸、 C_4 から C_8 アリールエステル、 C_4 から C_8 アリール置換 C_1 から C_6 アルキル、環中にO、NまたはSを有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、環中にO、NまたはSを有するアルキル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール；またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形；または R^1 はハロ、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブromoまたはヨード；

R^2 = 水素、ヒドロキシル、 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、分枝 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル、 C_4 から C_8 アリール、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 アルコキシ、 C_1 から C_6 分枝鎖アルコキシ、 C_4 から C_8 アリールオキシ、1級、2級または3級 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級分枝鎖 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級シクロアルキルアミノ、1級、2級または3級 C_4 から C_8 アリールアミノ、 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、分枝 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、 C_1 から C_6 アルキルエステル、分枝 C_1 から C_6 アルキルエステル、 C_4 から C_8 アリールカルボン酸、 C_4 から C_8 アリールエステル、 C_4 から C_8 アリール置換 C_1 から C_6 アルキル、環中にO、NまたはSを有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、環中にO、NまたはSを有するアルキル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール；またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形；または R^2 はハロ、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブromoまたはヨード；

R^3 = 水素、ヒドロキシル、 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、分枝 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル、 C_4 から C_8 アリール、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 アルコキシ、 C_1 から C_6 分枝鎖アルコキシ、 C_4 から C_8 アリールオキシ、1級、2級または3級 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級分枝鎖 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級シクロアルキルアミノ、1級、2級または3級 C_4 から C_8 アリールアミノ、 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、分枝 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、 C_1 から C_6 アルキルエステル、分枝 C_1 から C_6 アルキルエステル、 C_4 から C_8 アリールカルボン酸、 C_4 から C_8 アリールエステル、 C_4 から C_8 アリール置換 C_1 から C_6 アルキル、環中にO、NまたはSを有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、環中にO、NまたはSを有するアルキ

ル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール ; またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形 ; または R^3 はハロ、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブロモまたはヨード ; そして

$R^4 = C_1$ から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル(環中に O、N または S を含むかまたは含まない)、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル(環中に O、N または S を含むかまたは含まない)、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール、環中に O、N または S を有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、環中に O、N または S を有するアルキル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、アルキル - 置換 C_4 から C_8 アロイル、またはアルキル - 置換 C_4 から C_8 アリール ; またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブロモまたはヨードである)

である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 4 0】 固定化結合剤に結合した複合体を、固相を、結合剤を含む緩衝液で洗浄することにより溶出し、複合体を溶出液中に提供する、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 4 1】 請求項 2 1 に記載の方法により製造した製品。

【請求項 4 2】 (A) サンプルを GRP 9 4 を優勢に結合する結合剤と、GRP 9 4 含有複合体が結合物質と結合し、第 2 複合体を形成するのに好ましい条件下で接触させる ; そして

(b) 第 2 複合体を、結合物質に接合した標識を介して、またはその形成に続いて第 2 複合体に特異的に結合する標識試薬を介して検出する

ことを含む、GRP 9 4 を含む複合体を含むことが疑われるサンプル中の GRP 9 4 を含む複合体を検出する方法。

【請求項 4 3】 結合物質が検出可能標識と接合し、ここで検出段階 (b) が

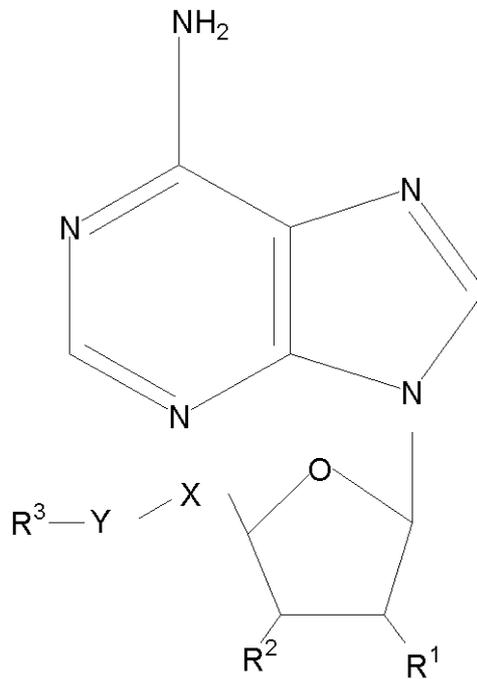
:

(i) 第2複合体を物質と結合している非結合標識結合物質から分離する；そして
(ii) 第2複合体上に存在するまたは非結合である検出可能標識を検出することを含む、請求項42に記載の方法。

【請求項44】 結合剤がATPまたはADPを含まない、請求項42に記載の方法。

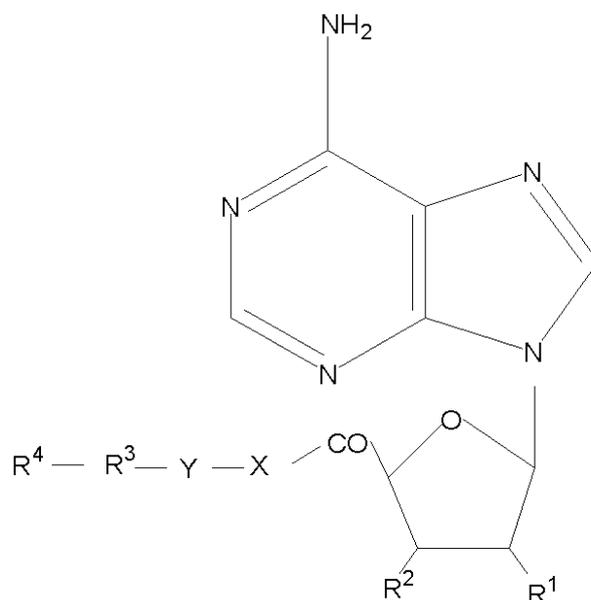
【請求項45】 結合剤が式(I)：

【化5】



または式(II)：

【化6】



〔式中、

XおよびYは同一または異なり、XおよびY = C、N、OまたはS；そしてXおよびYは水素、ヒドロキシル、または二重結合酸素を含む酸素で置換できる；

R¹ = 水素、ヒドロキシル、C₁からC₆アルキル、C₁からC₆分枝鎖アルキル、C₁からC₆ヒドロキシルアルキル、分枝C₁からC₆ヒドロキシルアルキル、C₄からC₈シクロアルキル、C₁からC₆アルケニル、分枝C₁からC₆アルケニル、C₄からC₈シクロアルケニル、C₄からC₈アリール、C₄からC₈アロイル、C₄からC₈アリール - 置換C₁からC₆アルキル、C₁からC₆アルコキシ、C₁からC₆分枝鎖アルコキシ、C₄からC₈アリールオキシ、1級、2級または3級C₁からC₆アルキルアミノ、1級、2級または3級分枝鎖C₁からC₆アルキルアミノ、1級、2級または3級シクロアルキルアミノ、1級、2級または3級C₄からC₈アリールアミノ、C₁からC₆アルキルカルボン酸、分枝C₁からC₆アルキルカルボン酸、C₁からC₆アルキルエステル、分枝C₁からC₆アルキルエステル、C₄からC₈アリールカルボン酸、C₄からC₈アリールエステル、C₄からC₈アリール置換C₁からC₆アルキル、環中にO、NまたはSを有するC₄からC₁₂ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、環中にO、NまたはSを有するアルキル - 置換またはアリール - 置換C₄からC₁₂ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール；またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形；またはR¹はハロ、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブromoまたはヨード；

R^2 = 水素、ヒドロキシル、 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、分枝 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル、 C_4 から C_8 アリール、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 アルコキシ、 C_1 から C_6 分枝鎖アルコキシ、 C_4 から C_8 アリールオキシ、1級、2級または3級 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級分枝鎖 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級シクロアルキルアミノ、1級、2級または3級 C_4 から C_8 アリールアミノ、 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、分枝 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、 C_1 から C_6 アルキルエステル、分枝 C_1 から C_6 アルキルエステル、 C_4 から C_8 アリールカルボン酸、 C_4 から C_8 アリールエステル、 C_4 から C_8 アリール置換 C_1 から C_6 アルキル、環中にO、NまたはSを有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、環中にO、NまたはSを有するアルキル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール；またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形；または R^2 はハロ、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブromoまたはヨード；

R^3 = 水素、ヒドロキシル、 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、分枝 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル、 C_4 から C_8 アリール、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 アルコキシ、 C_1 から C_6 分枝鎖アルコキシ、 C_4 から C_8 アリールオキシ、1級、2級または3級 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級分枝鎖 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級シクロアルキルアミノ、1級、2級または3級 C_4 から C_8 アリールアミノ、 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、分枝 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、 C_1 から C_6 アルキルエステル、分枝 C_1 から C_6 アルキルエステル、 C_4 から C_8 アリールカルボン酸、 C_4 から C_8 アリールエステル、 C_4 から C_8 アリール置換 C_1 から C_6 アルキル、環中にO、NまたはSを有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、環中にO、NまたはSを有するアルキ

ル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール ; またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形 ; または R^3 はハロ、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブロモまたはヨード ; そして

$R^4 = C_1$ から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル(環中に O、N または S を含むかまたは含まない)、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル(環中に O、N または S を含むかまたは含まない)、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール、環中に O、N または S を有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、環中に O、N または S を有するアルキル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、アルキル - 置換 C_4 から C_8 アロイル、またはアルキル - 置換 C_4 から C_8 アリール ; またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブロモまたはヨードである]

である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 6】 GRP 9 4 を含む複合体が更に抗原性分子を含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 7】 GRP 9 4 を含む複合体が温血脊椎動物由来である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 8】 GRP 9 4 を含む複合体が哺乳類由来である、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】 哺乳類がヒト、マウス、ブタ、ラット、無尾猿、有尾猿、ネコ、モルモット、ウシ、ヤギおよびウマからなる群から選択される、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】 (a) 第 1 容器に包含された、GRP 9 4 を優勢に結合する結合剤 ; そして

(b) 第 2 容器に包含された、結合剤から GRP 9 4 を含む複合体を溶出させるために使用する溶出緩衝液

を含む、GRP94を含む複合体またはGRP94を含む複合体と結合する抗原性分子を検出、単離または精製するためのキット。

【請求項51】 第2容器に包含された固相支持体を更に含む、請求項50に記載のキット。

【請求項52】 結合剤が固相支持体に固定化された、請求項50に記載のキット。

【請求項53】 結合剤がATPまたはADPを含まない、請求項50に記載のキット。

【請求項54】 第4容器に包含された、抗原性分子をGRP94を含む複合体から溶出するための溶出緩衝液を更に含む、請求項50に記載のキット。

【請求項55】 結合剤が検出可能標識またはインディケータを含む、請求項50に記載のキット。

【請求項56】 第5容器に包含された、検出可能標識を含む試薬またはインディケータを更に含む、請求項50に記載のキット。

【請求項57】 インディケータが放射活性標識または酵素である、請求項56に記載のキット。

【請求項58】 (a)GRP94タンパク質およびGRP94タンパク質に対するリガンドを含む試験サンプルを確立する；

(b)候補物質を試験サンプルに投与する；そして

(c)サンプル中のGRP94タンパク質とリガンドの結合における候補物質の影響を測定し、それにより、候補物質がGRP94タンパク質の生物学的活性を調節する能力を測定する

ことを含む、GRP94生物学的活性を調節する能力に関して候補物質をスクリーニングする方法。

【請求項59】 試験サンプルが更にインディケータを含み、候補物質がGRP94タンパク質の生物学的活性を調節する能力を：

(i)GRP94タンパク質とGRP94タンパク質に対するリガンドの結合における候補物質の影響によりインディケータにより産生されるシグナルを検出する；そして

(ii)コントロールサンプルと比較して産生されたシグナルの量に基づいて候補物質をGRP94タンパク質の生物学的活性の調節剤として同定することにより測定する、請求項58に記載の方法。

【請求項60】 リガンドがまたインディケータである、請求項58に記載の方法。

【請求項61】 リガンドが8-ANSである、請求項60に記載の方法。

【請求項62】 候補物質が更に候補ポリペプチドとして特徴付けられ、更に候補ポリペプチドをコードする核酸分子を精製および単離する段階を含む、請求項58に記載の方法。

【請求項63】 (a)Hsp90タンパク質および候補物質を含む試験サンプルを確立する；

(b)試験サンプルに8-ANSを投与する；そして

(c)8-ANSにより産生される蛍光シグナルを検出する；そして

(d)コントロールサンプルと比較して、8-ANSにより産生される蛍光シグナルの量に基づいて、Hsp90タンパク質の生物学的活性の活性剤として候補物質を同定する

ことを含む、Hsp90タンパク質の生物学的活性の活性剤として候補物質を同定する方法。

【請求項64】 Hsp90タンパク質がGRP94である、請求項65に記載の方法。

【請求項65】 8-ANS添加前に、Hsp90タンパク質を候補物質と、37で約1時間インキュベートすることを更に含む、請求項63に記載の方法。

【請求項66】 8-ANSを、Hsp90タンパク質とほぼ等モル量で添加する、請求項63に記載の方法。

【請求項67】 候補物質を、コントロールサンプルと比較して増加した8-ANS蛍光シグナルの検出により、Hsp90タンパク質の生物学的活性の活性剤として同定する、請求項63に記載の方法。

【請求項68】 (a)Hsp90タンパク質と候補物質を含む試験サンプル

を確立する；

(b) サンプルを熱ショックに付し、H s p 9 0 タンパク質に形態的变化を誘導する；

(c) 8 - A N S を試験サンプルに投与する；そして

(d) 8 - A N S のH s p 9 0 タンパク質への結合により産生された蛍光シグナルを検出する；そして

(e) コントロールサンプルと比較して、8 - A N S により産生される蛍光シグナルの量に基づいて、候補物質を、H s p 9 0 タンパク質の生物学的活性の阻害剤として同定する

ことを含む、候補物質をH s p 9 0 タンパク質の生物学的活性の阻害剤として同定する方法。

【請求項69】 H s p 9 0 タンパク質がG R P 9 4 である、請求項68に記載の方法。

【請求項70】 更に試験サンプルを、試験サンプルの熱ショッキングの前に37 で1時間インキュベートすることを含む、請求項68に記載の方法。

【請求項71】 熱ショッキングを50 で約15分行なう、請求項69に記載の方法。

【請求項72】 8 - A N S を、H s p 9 0 タンパク質とほぼ等モル量添加する、請求項68に記載の方法。

【請求項73】 コントロールサンプルと比較して、減少した8 - A N S により産生される蛍光シグナルの検出により、候補物質をH s p 9 0 タンパク質の生物学的活性の阻害剤として同定する、請求項68に記載の方法。

【請求項74】 H s p 9 0 タンパク質を有効量のH s p 9 0 タンパク質活性調節物質と接触させ、それにより生物学的活性を調節することを含む、H s p 9 0 タンパク質の生物学的活性を調節する方法。

【請求項75】 H s p 9 0 タンパク質がG R P 9 4 である、請求項74に記載の方法。

【請求項76】 G R P 9 4 タンパク質がインビトロサンプルである、請求項76に記載の方法。

【請求項77】 GRP94タンパク質が細胞内にある、請求項75に記載の方法。

【請求項78】 細胞が腫瘍細胞であるか、病原体に感染されている細胞である、請求項77に記載の方法。

【請求項79】 細胞が被検体内である、請求項77に記載の方法。

【請求項80】 被検体に有効量のGRP94タンパク質調節剤を投与し、それにより被検体内のGRP94タンパク質の生物学的活性の調節が達成することを含む、GRP94タンパク質の生物学的活性の調節が望まれる疾患に罹患している被検体の処置法。

【請求項81】 調節されるGRP94生物学的活性が、被検体内の免疫応答、小胞体からのタンパク質輸送、低酸素/無酸素ストレスからの回復、栄養失調からの回復、熱ストレスからの回復、またはこれらの組合せにより誘発される、請求項80に記載の方法。

【請求項82】 疾患が種々の癌、感染性疾患、小胞体からの妨害されたタンパク質輸送が関連する疾患、虚血/再灌流が関連する疾患、またはこれらの組合せである、請求項80に記載の方法。

【請求項83】 被検体に治療的または予防的有効量の精製複合体を投与することを更に含み、該複合体は該疾患に特異的な抗原性分子に結合したGRP94タンパク質を含む、請求項82に記載の方法。

【請求項84】 虚血/再灌流に関連する疾患が、心停止、アジストリーおよび持続性心室性不整脈、心臓手術、心肺バイパス手術、臓器移植、脊髄損傷、頭部外傷、卒中、血栓塞栓性卒中、出血性卒中、脳血管痙攣、低血圧、低血糖、癲癇重積症、癲癇発作、不安、精神分裂病、神経退行性疾患、アルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、または新生児ストレスに由来する、請求項82に記載の方法。

【請求項85】 細胞を、組織位置でGRP94タンパク質調節剤により処置し、それにより細胞内のGRP94活性を虚血状態に対する続く細胞性応答を変えるのに有効な程度促進する、被検体における組織位置での虚血状態に対する続く細胞性応答を変える方法。

ら C_8 シクロアルケニル、 C_4 から C_8 アリール、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 アルコキシ、 C_1 から C_6 分枝鎖アルコキシ、 C_4 から C_8 アリールオキシ、1級、2級または3級 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級分枝鎖 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級シクロアルキルアミノ、1級、2級または3級 C_4 から C_8 アリールアミノ、 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、分枝 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、 C_1 から C_6 アルキルエステル、分枝 C_1 から C_6 アルキルエステル、 C_4 から C_8 アリールカルボン酸、 C_4 から C_8 アリールエステル、 C_4 から C_8 アリール置換 C_1 から C_6 アルキル、環中にO、NまたはSを有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、環中にO、NまたはSを有するアルキル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール；またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形；または R^1 はハロ、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブromoまたはヨード；
 R^2 = 水素、ヒドロキシル、 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、分枝 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル、 C_4 から C_8 アリール、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 アルコキシ、 C_1 から C_6 分枝鎖アルコキシ、 C_4 から C_8 アリールオキシ、1級、2級または3級 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級分枝鎖 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級シクロアルキルアミノ、1級、2級または3級 C_4 から C_8 アリールアミノ、 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、分枝 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、 C_1 から C_6 アルキルエステル、分枝 C_1 から C_6 アルキルエステル、 C_4 から C_8 アリールカルボン酸、 C_4 から C_8 アリールエステル、 C_4 から C_8 アリール置換 C_1 から C_6 アルキル、環中にO、NまたはSを有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、環中にO、NまたはSを有するアルキル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール；またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形；または R^2 はハロ、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブromoまたはヨード；そ

して

R^3 = 水素、ヒドロキシル、 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、分枝 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル、 C_4 から C_8 アリール、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 アルコキシ、 C_1 から C_6 分枝鎖アルコキシ、 C_4 から C_8 アリールオキシ、1級、2級または3級 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級分枝鎖 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級シクロアルキルアミノ、1級、2級または3級 C_4 から C_8 アリールアミノ、 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、分枝 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、 C_1 から C_6 アルキルエステル、分枝 C_1 から C_6 アルキルエステル、 C_4 から C_8 アリールカルボン酸、 C_4 から C_8 アリールエステル、 C_4 から C_8 アリール置換 C_1 から C_6 アルキル、環中にO、NまたはSを有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、環中にO、NまたはSを有するアルキル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール；またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形；または R^3 はハロ、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブromoまたはヨードである]

の化合物を更に含む、請求項88に記載の組成物。

【請求項90】 治療的有效量の調節剤が約0.01mgから約10,000mgの範囲である、請求項88に記載の組成物。

【請求項91】 治療的有效量の調節剤が約0.1mgから約1,000mgの範囲である、請求項90に記載の組成物。

【請求項92】 治療的有效量の調節剤が約1mgから約300mgの範囲である、請求項91に記載の組成物。

【請求項93】 (a)真核生物細胞から、抗原性分子に非共有結合的に結合したHsp90タンパク質を含む複合体を回収し、該複合体は、該脊椎動物被検体に投与したとき、該脊椎動物被検体において免疫応答の開始に関して効果をもたらし、該真核生物細胞は、Hsp90タンパク質の活性化リガンドで処理され

ている；そして

(b)該複合体と薬学的に許容される担体を組み合わせる

ことを含む、脊椎動物被検体における免疫応答を誘導するための免疫原性組成物を調製する方法。

【請求項94】 H s p 9 0 タンパク質が G R P 9 4 または H S P 9 0 である、請求項93に記載の方法。

【請求項95】 抗原性分子が、インビボで H s p 9 0 タンパク質が内因性に関連しているペプチドである、請求項93に記載の方法。

【請求項96】 複合体を一つのタイプの癌の細胞から回収する、請求項93に記載の方法。

【請求項97】 一つのタイプの癌由来の細胞を脊椎動物被検体から単離する、請求項96に記載の方法。

【請求項98】 癌のタイプ由来の細胞が、免疫原性組成物で処置すべき脊椎動物被検体の自己の癌組織から単離する、請求項97に記載の方法。

【請求項99】 種々の癌由来の細胞が、免疫原性組成物で処置する第1脊椎動物被検体に存在する癌組織と同じタイプである第2脊椎動物被検体由来の癌組織から単離する、請求項9に記載の方法。

【請求項100】 細胞を癌の該タイプの腫瘍細胞系から得る、請求項96に記載の方法。

【請求項101】 癌が、繊維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、子宮平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺腫、乳頭状癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髓様癌、気管支原性肺癌、腎細胞癌、肝腫瘍、胆管癌、絨毛癌、セミノーム、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髓芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫瘍、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、マクログロブリン血症および重鎖病からなる群から選択される肉腫または癌

腫を含む、請求項96に記載の方法。

【請求項102】 真核生物細胞を、抗原性分子をコードする核酸構築物でトランスフェクトし、それにより抗原性分子が真核生物細胞内で発現される、請求項93に記載の方法。

【請求項103】 真核生物細胞が病原体に感染された細胞を含む、背吸光93に記載の方法。

【請求項104】 抗原性分子が感染性疾患の原因である病因体に感染した真核生物細胞に存在するが、該真核生物細胞が病原体に感染していないとき、該真核生物細胞に存在しない抗原性分子ペプチドである、請求項103に記載の方法。

【請求項105】 該病原体がウイルス、細菌、真菌、原生動物および寄生虫からなる群から選択される、請求項103に記載の方法。

【請求項106】 該ウイルス病原体がA型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウイルス、I型単純疱疹(HSV-I)、II型単純疱疹(HSV-II)、牛痘、ライノウイルス、エコーウイルス、ロータウイルス、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、乳頭腫ウイルス、パポーベウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルボウイルス、ヒュアンタウイルス、コクサッキーウイルス、ムンプス・ウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、I型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-I)およびII型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-II)からなる群から選択される、請求項105に記載の方法。

【請求項107】 該細菌性病原体がMycobacteria、Mycoplasma、NeisseriaおよびLegionellaからなる群から選択される、請求項105に記載の方法。

【請求項108】 該原生動物病原体がLeishmania、Kokzidioa、Trypanosoma、ChlamydiaおよびRickettsiaからなる群から選択される、請求項105に記載の方法。

【請求項109】 請求項93に記載の方法により製造した製品。

【請求項110】 (a)インビトロで抗原性分子およびHsp90タンパク質分子を、Hsp90タンパク質の生物学的活性の調節剤の存在下再構築し、それにより抗原性分子に非共有結合的に結合したHsp90タンパク質を含む複合

体を産生し、該複合体は、該脊椎動物に投与したとき、該脊椎動物被検体において免疫応答の開始に関して効果をもたらす；そして

(b)該複合体と薬学的に許容される担体を組み合わせる

ことを含む、脊椎動物被検体に脊椎動物被検体における免疫応答を誘導するための免疫原性組成物を調製する方法。

【請求項111】 H s p 9 0タンパク質がG R P 9 4またはH S P 9 0である、請求項110に記載の方法。

【請求項112】 抗原性分子が、インビボでH s p 9 0タンパク質が内因性に関連しているペプチドである、請求項110に記載の方法。

【請求項113】 抗原性分子が外来性抗原性ペプチドである、請求項110に記載の方法。

【請求項114】 抗原性分子が癌抗原である、請求項110に記載の方法

。

【請求項115】 癌抗原が繊維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、子宮平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺腫、乳頭状癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性肺癌、腎細胞癌、肝腫瘍、胆管癌、絨毛癌、セミノーム、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫瘍、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、マクログロブリン血症および重鎖病からなる群から選択される肉腫または癌腫を含む癌由来である、請求項114に記載の方法。

【請求項116】 抗原分子が病原体由来のペプチドである、請求項110に記載の方法。

【請求項117】 該病原体がウイルス、細菌、真菌、原生動物および寄生虫からなる群から選択される、請求項116に記載の方法。

【請求項118】 該ウイルス病原体がA型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、イ

ンフルエンザ、水痘、アデノウイルス、I型単純疱疹(HSV-I)、II型単純疱疹(HSV-II)、牛痘、ライノウイルス、エコーウイルス、ロータウイルス、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、乳頭腫ウイルス、パポーベウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルボウイルス、ヒュアンタウイルス、コクサッキーウイルス、ムンプス・ウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、I型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-I)およびII型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-II)からなる群から選択される、請求項117に記載の方法。

【請求項119】 該細菌性病原体がMycobacteria、Mycoplasma、NeisseriaおよびLegionellaからなる群から選択される、請求項117に記載の方法。

【請求項120】 該原生動物病原体がLeishmania、Kokzidioa、Trypanosoma、ChlamydiaおよびRickettsiaからなる群から選択される、請求項117に記載の方法。

【請求項121】 請求項110に記載の方法により製造した製品。

【請求項122】 (a)1個以上の抗原提示細胞をインビトロで抗原性分子に非共有結合的に結合したHsp90タンパク質を含む複合体およびHsp90タンパク質に対するリガンドで感作する；そして

(b)該1個以上の感作抗原提示細胞と薬学的に許容される担体を組み合わせることを含む、脊椎動物被検体に脊椎動物被検体における免疫応答を誘導するための免疫原性組成物を調製する方法。

【請求項123】 Hsp90タンパク質がGRP94またはHSP90である、請求項122に記載の方法。

【請求項124】 抗原性分子が、インビボでHsp90タンパク質が内因性に関連しているペプチドである、請求項122に記載の方法。

【請求項125】 抗原性分子が外来性抗原性ペプチドである、請求項122に記載の方法。

【請求項126】 抗原性分子が癌抗原である、請求項122に記載の方法。

【請求項127】 癌抗原が繊維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫

、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、子宮平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺腫、乳頭状癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髓様癌、気管支原性肺癌、腎細胞癌、肝腫瘍、胆管癌、絨毛癌、セミノーム、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髓芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫瘍、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、マクログロブリン血症および重鎖病からなる群から選択される肉腫または癌腫を含む癌由来である、請求項126に記載の方法。

【請求項128】 抗原分子が病原体由来のペプチドである、請求項122に記載の方法。

【請求項129】 該病原体がウイルス、細菌、真菌、原生動物および寄生虫からなる群から選択される、請求項128に記載の方法。

【請求項130】 該ウイルス病原体がA型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウイルス、I型単純疱疹(HSV-I)、II型単純疱疹(HSV-II)、牛痘、ライノウイルス、エコーウイルス、ロータウイルス、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、乳頭腫ウイルス、パポーベウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルボウイルス、ヒュアンタウイルス、コクサッキーウイルス、ムンプス・ウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、I型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-I)およびII型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-II)からなる群から選択される、請求項129に記載の方法。

【請求項131】 該細菌性病原体がMycobacteria、Mycoplasma、NeisseriaおよびLegionellaからなる群から選択される、請求項129に記載の方法。

【請求項132】 該原生動物病原体がLeishmania、Kokzidioa、Trypanosoma、ChlamydiaおよびRickettsiaからなる群から選択される、請求項129に記載の方法。

【請求項133】 請求項122に記載の方法により製造した製品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連特許

本出願は、その全体を出展明示により本明細書に包含させる、2000年3月24日出願の、米国特許出願第60/192,118号に基づき、優先権主張している。

【0002】

助成申請

この仕事は、NIH認可R1 DK53058により援助された。したがって、米国特許は、本発明に一定の権利を有する。

【0003】

技術分野

本発明は、リガンドの制御による分子シャペロンの調節に関する組成物および方法に関する。好ましい態様において、本発明はGRP94のリガンド相互作用の特徴づけ、およびそれに関連したスクリーニングおよび治療法に関する。

【0004】

略語の表

8 - ANS	-	1,8 - aアニリノナフタレンスルホネート
APC	-	抗原提示細胞
BiP	-	ER hsp70ホモログ
bis-ANS	-	4,4'-ジアニリノ-1,1'-ビナフチル-5,5'-ジスルホン酸
BMDC	-	樹状細胞
BN-PAGE	-	青色生ポリアクリルアミドゲル電気泳動
CEA	-	癌胚抗原
CT	-	コンピューター断層撮影
CTL	-	細胞毒性Tリンパ球
DC	-	樹状細胞
DMEM	-	ダルベッコ修飾イーグル培地

- D T H - 遅延型過敏症
- E R - 小胞体
- G A L T - 腸管関連リンパ系組織
- G R P 9 4 - 9 4 k D a のグルコース調節タンパク質、シャペロンの H s p 9 0 ファミリーの E R パラログ
- H I V - ヒト免疫不全ウイルス
- H P L C - 高速液体クロマトグラフィー
- h r - 時間
- h s p (s) - 熱ショックタンパク質
- H S P 7 0 - 7 0 k D a の熱ショックタンパク質
- H s p 9 0 - シャペロンの H s p 9 0 ファミリーの任意のメンバー
- H S P 9 0 - 9 0 k D a の熱ショックタンパク質
- H S V - 単純ヘルペスウイルス
- I F N - インターフェロン
- I g - 免疫グロブリン
- I G F - 1 - インシュリン様成長因子
- I g G - 免疫グロブリン G
- I L - インターロイキン
- M H C - 主要組織適合遺伝子複合体
- m i n - 分
- M L T C - 混合リンパ球腫瘍細胞アッセイ
- N E C A - N - エチルカルボキシアミドアデノシン
- P D I - タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ
- P S A - プロテアーゼ特異的抗原
- R S V - 呼吸器合胞体ウイルス
- R T - 室温
- S D S - P A G E - ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動
- T A P - 抗原提示複合体に関連する運搬体

T F A - トリフルオロ酢酸

T N F - 腫瘍壊死因子

【0005】

背景技術

癌および感染性疾患の処置および予防のための試みの遂行は、医学界の中の努力を代表する。癌および感染性疾患と戦うための近年の努力は、一つのタイプの癌 (a type of cancer) または感染性疾患に罹患した被検体における免疫応答を誘導または促進する試みを含む。例えば、Srivastava et al. (1998) *Immunity* 8:657-665参照。

【0006】

虚血 / 再灌流障害は、心筋梗塞、心臓血管疾患および末梢血管疾患を含む、多くの臨床的疾患における罹病率および死亡率の明白な源である。加えて、虚血 / 再灌流は移植臓器の機能および心臓血管手術に続く。Fan et al. (1999) *J Mol Med* 77:577-596参照。したがって、虚血 - 誘導損傷に対する細胞性防御機構の同定は、例えば、心臓発作、卒中および神経退行性疾患の治療、ならびに手術および移植に続く回復の改善のための目的の中心である。

【0007】

分子シャペロンのH s p 9 0クラスは、真核生物細胞中の最も豊富なタンパク質の一つである。H s p 9 0ファミリーメンバーは系統発生論的に遍在し、一方、H S P 9 0の小胞体パラログ、G R P 9 4 (g p 9 6、E R p 9 9、エンドプラスミン)は、高級植物および後生動物のみに見られる(Nicchitta (1998) *Curr Opin Immunol* 10:103-109)。タンパク質のH s p 9 0ファミリーは、新規合成タンパク質の適当な折りたたみおよびトラフィッキング (trafficking) の指示、熱ショック、酸化的ストレス、栄養的ストレスおよび他の物理的ストレスシナリオの間、細胞の保護の付与に参与することが知られている(Toft (1998) *Trends Endocrinol Metab* 9:238-243; Pratt (1998) *Proc Soc Exp Biol Med* 217:420-434)。このような条件下で、タンパク質折りたたみ、タンパク質オリゴマー集合、およびタンパク質安定性は、大いに中断できる。タンパク質構造および機能のストレス誘導不活性化の防止および逆転を助けるのが、他の分子シャペロンと協

力して、タンパク質のHSPファミリーの機能である。

【0008】

分子レベルで、タンパク質折りたたみにおけるHSP90の機能は、Hsp70、p48Hip、p60Hop、p23およびFKBP52を含むコ-シャペロンおよびアクセサリー分子のシリーズの活性を必要とすることが知られている(Prodromou et al. (1999) EMBO J 18:754-762; Johnson et al. (1996) J Steroid Biochem Mol Biol 56:31-37; Chang et al. (1997) Mol Cell Biol 17:318-325; Duina et al. (1996) Science 274:1713-1715; Chen et al. (1996) Mol Endocrinol 10:682-693; Smith et al. (1993) J Biol Chem 268:18365-18371; Dittmar et al. (1998) J Biol Chem 273:7358-7366; Kosano et al. (1998) J Biol Chem 273:3273-3279)。こでらのコ-シャペロンおよびアクセサリー分子は、HSP90との協定したおよび連続的相互作用の両方に関与し、それによりそのシャペロン活性の調節に作用する(uchner (1999) Trends Biochem Sci 24:136-141; Pratt et al. (1996) Exs 77:79-95; Pratt (1998) Proc Soc Exp Biol Med 217:420-434; Caplan (1999) Trends Cell Biol 9:262-268)。

【0009】

コ-シャペロンタンパク質のHSP90機能の制御への関与に加えて、近年の結晶学的試験は、酵母およびヒトHSP90のN-末端ドメインにおけるATP/ADP結合ポケットを同定しており、HSP90活性が、シャペロンのHsp70ファミリーに関して同定されているように、環状ATP結合および加水分解を介して調節されていることを示す(Kassenbrock & Kelly (1989) EMBO J 8:1461-1467; Flynn et al. (1989) Science 245:385-390; Palleros et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:519-523; Sriram et al. (1997) Structure 5:403-14; Prodromou et al. (1997) Cell 90:65-75; Obermann et al. (1998) J Cell Biol 143:901-910; Csermely & Kahn (1991) J Biol Chem 266:4943-4950; Csermely et al. (1993) J Biol Chem 268:1901-1907; Sullivan et al. (1997) J Biol Chem 272:8007-8012; Scheibel et al. (1997) J Biol Chem 272:18608-18613; Scheibel et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:1495-1499; Panaretou et al. (1998) EMBO J 17:4829-4836; Caplan (1999) Trends Cell Biol 9:2

62-268; Grenert et al. (1999) J Biol Chem 274:17525-17533)。

【0010】

HSP90が、ATP結合に関連するウォーカー“ A ”および“ B ”配列への明白な類似性を有するモチーフを含むことも報告されている(Csermely & Kahn (1991) J Biol Chem 266:4943-4950; Jakob et al. (1996) J Biol Chem 271:10035-10041)。これらの配列は、セリンおよびチロシンキナーゼの中に見られるコンセンサス配列と実質的に違うが、タンパク質のHsp70ファミリーに見られるATP結合配列に相同性である(Csermely & Kahn (1991) J Biol Chem 266:4943-4950)。配列予測と一致して、ATP結合、自己リン酸化活性およびATPase活性はすべてのHSP90に関して、証明されているが、これらの発見は論争が伴っていない(Csermely & Kahn (1991) J Biol Chem 266:4943-4950; Nadeau et al. (1993) J Biol Chem 268:1479-1487, Jakob et al. (1996) J Biol Chem 271:10035-10041; Grenert et al. (1999) J Biol Chem 274:17525-17533; Scheibel et al. (1997) J Biol Chem 272:18608-18613; Prodromou et al. (1997) Cell 90:65-75)。

【0011】

一部、HSP90のATPに対する非常に低い親和性のために、HSP90期の制御におけるATPの役割は、結合アデノシンヌクレオチドに関連した、酵母およびヒトHSP90のN末端ドメインの結晶学的解析まで問題のままであった(Prodromou et al. (1997) Cell 90:65-75; Obermann et al. (1998) J Cell Biol 143:901-910)。原子スケール構造観察の助けを借りて、ATP結合および加水分解に重要なアミノ酸残基を続いて同定し、分析した(Prodromou et al. (1997) Cell 90:65-75; Panaretou et al. (1998) EMBO J 17:4829-4836; Obermann et al. (1998) J Cell Biol 143:901-910)。したがって、ヒトHSP90において、アスパルテート93(GRP94のためにD128;酵母HSP90のためにD79)は、アデノシン関のプリン部分のN6基との直接水素結合を提供し、ATP結合に必須である(Prodromou et al. (1997) Cell 90:65-75; Panaretou et al. (1998) EMBO J 17:4829-4836; Obermann et al. (1998) J Cell Biol 143:901-910)。グルタメート47(GRP94のためにE82;酵母HSP90の

ためにE33)は、結合ヌクレオチドに対するその位置およびE. coli DNAジヤイレーズBのATP結合ドメインとの比較を介して、ATP加水分解において重要な触媒的役割を担うことが仮定された(Prodromou et al. (1997) Cell 90:65-75; Obermann et al. (1998) J Cell Biol 143:901-910)。酵母HSP90の続く変異誘発試験において、D7変異体がATP結合を欠失し、E47変異体がATP加水分解活性を欠失することが観察された(Obermann et al. (1998) J Cell Biol 143:901-910; Panaretou et al. (1998) EMBO J 17:4829-4836)。HSP90活性におけるこれらの残基の機能の更なる証拠として、HSP90のいずれかの変異形を含む酵母は生存不能であった(Obermann et al. (1998) J Cell Biol 143:901-910; Panaretou et al. (1998) EMBO J 17:4829-4836)。

【0012】

Hsp90 - ベースの治療および他の適用の開発における進行は、GRP94を含むHsp90タンパク質のリガンド相互作用の特徴付けの欠如により妨げられている。上記のATPのHSP90との相互作用の特徴付けにもかかわらず、GRP94に関する固有ATP結合およびATPase活性の支持の証拠は、およびHSP90に関して、GRP94 - 基質相互作用のアデノシンヌクレオチド仲介制御の分子ベースにおける明らかな一致まだ達成されていない(Jakob et al. (1996) J Biol Chem 271:10035-10041; Wearsch & Nicchitta (1997) J Biol Chem 272:5152-5156; Li and Srivastava (1993) EMBO J 12:3143-3151; Csermely et al. (1995) J Biol Chem 270:6381-6388; Csermely et al. (1998) Pharmacol Ther 79:129-168)。

【0013】

必要なものは、ついで、HSP90タンパク質、特にGRP94およびHSP90のリガンド結合ポケットにおけるリガンド相互作用の特徴付けである。このために、本発明は、リガンド - Hsp - 90シャペロン相互作用の評価のための方法を記載する。このような方法を使用して、GRP94およびHSP90の活性または不活性構造形態が本明細書に記載され、活性または不活性形態を誘導するためのいくつかの化合物の調節能力も証明する。本明細書に記載されているものはまたHsp90タンパク質の生物学的活性に関係する精製、スクリーニングお

よび治療法である。したがって、本発明は、H s p 9 0 タンパク質機能に関連する疾患の理解、診断および処置に寄与する、方法および組成物の分野における長年にわたる要求を満たす。

【0014】

本発明の要約

G R P 9 4 タンパク質を含む複合体の精製法を記載する。該方法は：(a) G R P 9 4 タンパク質を含む複合体を G R P 9 4 を優勢に結合する結合剤接触と接触させ、結合剤を固相支持体に固定化させ、複合体を固相支持体に固定化する；(b) 残りのサンプルを回収する；そして(c) 複合体を固相支持体から溶出し、溶出液中に精製複合体を得ることを含む。本発明はまた記載の方法の実施により得られる複合体を提供する。

【0015】

本発明は、G R P 9 4 タンパク質を含む複合体と関連する抗原性分子を単離する方法も記載する。該方法は、(a) G R P 9 4 および抗原性分子を含む複合体を、C R P 9 4 を優勢に結合する結合剤と接触させ、結合剤は固相支持体上に固定されており、複合体を固相支持体上に固定化させる；(b) 残りのサンプルを回収する；そして(c) 複合体を固相支持体から溶出し、溶出液中に精製複合体を得る；(d) 溶出液から抗原性分子を単離することを含む。本発明はまた記載の方法により単離した抗原性分子を提供する。

【0016】

G R P 9 4 を含む複合体を含むことが疑われるサンプル中の G R P 9 4 を含む複合体を検出する方法も記載する。該方法は(a) サンプルを G R P 9 4 を優勢に結合する結合剤と、G R P 9 4 含有複合体が結合物質と結合し、第2複合体を形成するのに好ましい条件下で接触させる；そして(b) 第2複合体を、結合物質に接合した標識を介して、またはその形成に続いて第2複合体に特異的に結合する標識試薬を介して検出することを含む。

【0017】

G R P 9 4 タンパク質および抗原性分子を含む複合体の検出、単離または精製のためのキットも記載する。

【0018】

H s p 9 0 タンパク質の生物学的活性を調節することに関する候補物質のスクリーニング法も記載する。該方法は(a) G R P 9 4 タンパク質および G R P 9 4 タンパク質に対するリガンドを含む試験サンプルを確立する；(b) 候補物質を試験サンプルに投与する；そして(c) サンプル中の G R P 9 4 タンパク質とリガンドの結合における候補物質の影響を測定し、それにより、候補物質が G R P 9 4 タンパク質の生物学的活性を調節する能力を測定することを含む。本方法において、H s p 9 0 タンパク質は G R P 9 4 タンパク質を含み得、リガンドは b i s - A N S を含み得る。

【0019】

更に記載されているのは、H s p 9 0 タンパク質の生物学的活性の活性剤として候補物質を同定する方法である。該方法は、(a) H s p 9 0 タンパク質および候補物質を含む試験サンプルを確立する；(b) 試験サンプルに 8 - A N S を投与する；そして(c) 8 - A N S により産生される蛍光シグナルを検出する；そして(d) コントロールサンプルと比較して、8 - A N S により産生される蛍光シグナルの量に基づいて、H s p 9 0 タンパク質の生物学的活性の活性剤として候補物質を同定することを含む。好ましくは、H s p 9 0 タンパク質は G R P 9 4 または H S P 9 0 を含む。

【0020】

候補物質を H s p 9 0 タンパク質の生物学的活性の阻害剤として同定する方法も提供する。該方法は(a) H s p 9 0 タンパク質と候補物質を含む試験サンプルを確立する；(b) サンプルを熱ショックに付し、H s p 9 0 タンパク質に形態的变化を誘導する；(c) 8 - A N S を試験サンプルに投与する；そして(d) 8 - A N S の H s p 9 0 タンパク質への結合により産生された蛍光シグナルを検出する；そして(e) コントロールサンプルと比較して、8 - A N S により産生される蛍光シグナルの量に基づいて、候補物質を、H s p 9 0 タンパク質の生物学的活性の阻害剤として同定することを含む。好ましくは、H s p 9 0 タンパク質は G R P 9 4 または H S P 9 0 を含む。

【0021】

g H s p 9 0 タンパク質の生物学的活性を調節する方法も記載する。該方法は、H s p 9 0 タンパク質と有効量のH s p 9 0 タンパク質活性調節物質を接触させ、それによりH s p 9 0 タンパク質の生物学的活性の調節をすることを含む。好ましくは、H s p 9 0 タンパク質はG R P 9 4 またはH S P 9 0 である。治療的有効量のH s p 9 0 タンパク質の生物学的活性の調節剤および薬学的に許容される希釈剤または媒体を含む医薬組成物も記載する。好ましくは、H s p 9 0 タンパク質はG R P 9 4 またはH S P 9 0 である。

【0022】

G R P 9 4 タンパク質の生物学的活性の調節が望まれる疾患に罹患している被検体の処置法も記載する。該方法は、被検体に有効量のG R P 9 4 タンパク質調節剤を投与し、それにより被検体内のG R P 9 4 タンパク質の生物学的活性の調節が達成することを含む。好ましくは、H s p 9 0 タンパク質はG R P 9 4 またはH S P 9 0 である。調節するH s p 9 0 生物学的活性(好ましい実施態様において - G R P 9 4 生物学的活性)は、免疫原性、小胞体からのタンパク質輸送、例えば、低酸素/無酸素ストレスに起因するストレスおよび組織損傷からの回復、栄養失調からの回復、熱ストレスからの回復、またはこれらの組合せを含む。処置する疾患は、一つのタイプの癌；感染性疾患；小胞体からの妨害されたタンパク質輸送が関連する疾患；小胞体からのタンパク質(例えば成長因子レセプター)の出口の阻害または遮断が治療的に有利である、癌のような疾患状態；虚血が関連する疾患、またはこれらの組合せを含む。本方法は更に被検体に治療的または予防的有効量の精製複合体を投与することを更に含み、該複合体は該疾患に特異的な抗原性分子に結合したG R P 9 4 タンパク質を含む。

【0023】

脊椎動物被検体における免疫応答を誘導するための免疫原性組成物を調製する方法も記載する。該方法は(a)真核生物細胞から、抗原性分子に非共有結合的に結合したH s p 9 0 タンパク質を含む複合体を回収し、該複合体は、該脊椎動物被検体に投与したとき、該脊椎動物被検体において免疫応答の開始に関して効果をもたらし、該真核生物細胞は、H s p 9 0 タンパク質の活性化リガンドで処理されている；そして(b)該複合体と薬学的に許容される担体を組み合わせること

を含む。好ましくは、H s p 9 0 タンパク質はG R P 9 4 またはH S P 9 0 である。リガンドはb i s - A N S を含み得る。

【0024】

脊椎動物被検体に脊椎動物被検体における免疫応答を誘導するための免疫原性組成物を調製する方法も記載する。該方法は(a)インビトロで抗原性分子およびH s p 9 0 タンパク質分子を、H s p 9 0 タンパク質の生物学的活性の調節剤の存在下再構築し、それにより抗原性分子に非共有結合的に結合したH s p 9 0 タンパク質を含む複合体を産生し、該複合体は、該脊椎動物に投与したとき、該脊椎動物被検体において免疫応答の開始に関して効果をもたらす；そして(b)該複合体と薬学的に許容される担体を組み合わせることを含む。好ましくは、H s p 9 0 タンパク質はG R P 9 4 またはH S P 9 0 であり、リガンドはb i s - A N S を含む。

【0025】

脊椎動物被検体に脊椎動物被検体における免疫応答を誘導するための免疫原性組成物を調製する方法も記載する。該方法は(a)1個以上の抗原提示細胞をインビトロで抗原性分子に非共有結合的に結合したH s p 9 0 タンパク質を含む複合体およびH s p 9 0 タンパク質に対するリガンドで感作する；そして(b)該1個以上の感作抗原提示細胞と薬学的に許容される担体を組み合わせることを含む。好ましくは、H s p 9 0 タンパク質はG R P 9 4 またはH S P 9 0 であり、リガンドはb i s - A N S を含む。

【0026】

したがって、G R P 9 4 および他のH s p 9 0 タンパク質の生物学的活性が関与する新規精製法、新規スクリーニング法、および新規治療法の提供が本発明の目的である。この目的は、本発明により全部または一部達成される。

【0027】

本発明の目的は先に記載しており、他の目的は添付の図面および下記の研究室実施例と関連して取った場合、先の記載から明白であろう。

【0028】

図面の簡単な説明

図1 Aは、GRP94構造状態に無関係にGRP94に結合するProdanを記載するグラフである。0.5 μ M天然または熱ショック(hs)GRP94蛍光放出波長スキャンは、5 μ M Prodanに30分暴露した後に行なった。値は、同じ濃度の熱ショックGRP94で行なったときと比較した最大蛍光を示す。実験は、360 nm(Prodan)の励起波長で行なった。全スペクトルはバックグラウンド補正した。

【0029】

図1 Bは、GRP94に結合する8-ANS、およびこのような結合のGRP94構造状態非依存性を記載するグラフである。0.5 μ M天然または熱ショック(hs)GRP94蛍光放出波長スキャンは、5 μ M 8-ANSに30分暴露した後に行なった。値は、同じ濃度の熱ショックGRP94で行なったときと比較した最大蛍光を示す。実験は372 nm(8-ANS)の励起波長で行なった。全スペクトルはバックグラウンド補正した。

【0030】

図1 Cは、GRP94に結合するbis-ANS、およびこのような結合のGRP94構造状態非依存性を記載するグラフである。0.5 μ M天然または熱ショック(hs)GRP94蛍光放出波長スキャンは、5 μ M bis-ANSに20時間暴露した後に行なった。値は、同じ濃度の熱ショックGRP94で行なったときと比較した最大蛍光を示す。実験は393 nm(bis-ANS)の励起波長で行なった。全スペクトルはバックグラウンド補正した。

【0031】

図1 Dは、GRP94に結合するbis-ANSの時間的経過を示すグラフである。値は、同じ濃度の熱ショックGRP94で行なったときと比較した最大蛍光を示す。実験は393 nm(bis-ANS)の励起波長で行なった。全スペクトルはバックグラウンド補正した。

【0032】

図2 Aは、熱ショックGRP94とのbis-ANS相互作用の動力的分析を記載するグラフである。熱ショックGRP94へのbis-ANSの結合の濃度依存性を、bis-ANS濃度(50 nM)を固定し、GRP94濃度を示すよ

うに上昇させた実験条件下で行なった。

【0033】

図2Bは、bis-ANS/GRP94結合データのKlotzプロット表記である。半分最大結合が110nM GRP94で起こる。励起波長、393nm。放出波長、475nm。

【0034】

図3は、bis-ANSおよび熱ショックがGRP94加水分解感受性を増加させることを示す、クーマシーブルー染色ゲルのデジタルイメージである。GRP94(5μg、5μM)を50μM bis-ANSと1時間、37℃でインキュベートするか、または15分、50℃で熱ショックした。サンプルをついで0.1%トリプシンで30分、37℃で消化させ、12.5%SDS-PAGEゲルで分析した。レーン1、5μgの未消化GRP94；レーン2、トリプシンとインキュベートしたコントロール天然GRP94；レーン3、トリプシンで消化したbis-ANS処理GRP94；レーン4、熱ショックし、ついでトリプシンで消化したGRP94。

【0035】

図4は、bis-ANSおよび熱ショックがGRP94多量体化を誘導することを記載する、クーマシーブルー染色ゲルのデジタルイメージである。GRP94を50℃で0-15分熱ショックするか、10倍モル量過剰のbis-ANSとインキュベートし、タンパク質の構造状態を5-18%生ブルーポリアクリルアミド勾配ゲルで分析した。GRP94 2量体、4量体、6量体および8量体の移動を示す。分子量標準は図4の右端に示す。

【0036】

図5は、天然、熱ショックおよびbis-ANS処置GRP94の円偏光二色性スペクトルが同一であることを示すグラフである。1μM GRP94天然(菱滷)；熱ショック(点線および破線)；そして2時間10μM bis-ANS処置(点線)の円偏光二色性スペクトルを示す。スペクトルは、下記実施例1-8に記載のように補正した。

【0037】

図6Aは、ラディシコール(radicol)がbis-ANS構造変化を遮断することを示す、クーマシーブル染色ゲルのデジタルイメージである。GRP94(5 μ M)を、37 °Cで0 - 500 μ M ラディシコールと1時間プレインキュベートし、続いて1時間、37 °Cで50 μ M bis-ANSとインキュベートし、トリプシン処理し、トリプシン消化パターンをSDS-PAGEにより分析する。

【0038】

図6Bは、ラディシコールが熱ショックおよびbis-ANS結合を遮断することを記載するグラフである。GRP94(0.5 μ M)を0 - 10 μ M ラディシコールと1時間プレインキュベートし、熱ショックし、続いて1 μ M bis-ANSとインキュベートした。Bis-ANS結合を、比較のためのラディシコール非存在下のbis-ANSの天然GRP94への結合と共に、分光蛍光分析により測定した。励起393 nm、放出410 - 600 nm。

【0039】

図7Aは、bis-ANSおよび熱ショックがGRP94シャペロン活性を促進することを記載するグラフである。シトレートシンターゼ酵素を0.15 μ MまでGRP94なし、1 μ M 天然GRP94、熱ショックGRP94、または2時間10 μ M bis-ANSとプレインキュベートしたGRP94を含む緩衝液に希釈し、43 °Cでのシトレートシンターゼ凝集を500 nmでの光散乱を、温度制御分光蛍光光度計でモニターした。

【0040】

図7Bは、bis-ANSおよび熱ショックがGRP94ペプチド結合活性を刺激することを示す棒グラフである。天然、熱ショック、またはbis-ANS処理GRP94を、10倍モル量過剰の¹²⁵I-VSV8ペプチドと30分、37 °Cでインキュベートした。遊離ペプチドをスピンカラムクロマトグラフィーにより除去し、結合放射活性ペプチドをガンマ計数により定量した。

【0041】

図8は、GRP94およびHsp90が異なるリガンド結合を示すことを記載する棒グラフである。GRP94へのNECAおよびATP結合は、20 nM³

H] - NECA (黒棒) または $50 \mu\text{M}$ [^3H] ATP (斜線棒) の存在下で 1 時間、4 で行なった。結合対遊離ヌクレオチドは、真空濾過により分離した。PEI 処理ガラスフィルター (S&S #32, Schleicher and Schuell of Keene, New Hampshire) を、NECA 結合アッセイに使用し、一方ニトロセルロースフィルター (S&S BA85, Schleicher and Schuell of Keene, New Hampshire) を ATP 結合の測定に使用した。示したデータは、トリプリケートの点の平均であり、非特異的リガンド結合に対して補正している。

【0042】

図9Aは、GRP94へのNECA結合の特徴付けを記載するスキャッチャード・プロットである。GRP94を増加した濃度のNECAと、1時間、4で、材料および方法に記載のようにインキュベートした。結合対遊離NECAをついで0.3%PEIで予備処理したガラスフィルターを備えた真空濾過により分離した。

【0043】

図9Bは、GRP94へのNECA結合の特徴付けを記載する飽和曲線である。曲線をGRP94 2量体濃度に関してプロットする。最大結合化学量論は、GRP94 2量体の分子当たり1分子のNECAである。

【0044】

図9Cは、NECA (黒卵型) およびラディシコール (黒方形) へのGRP94結合の化学量論を記載するグラフである。GRP94へのNECAおよびラディシコール結合は、等温滴定熱量計により評価した。GRP94は $5 \mu\text{M}$ の濃度で存在した。NECA滴定は、 $152 \mu\text{M}$ NECAストックで行ない、一方ラディシコール滴定は $115 \mu\text{M}$ ストックで行なった。ITCデータを $\mu\text{cal}/\text{秒}$ 対時間および個々の注入ピーク下の領域に関して補正し、計器ソフトウェアで測定し、プロットした。

【0045】

図10Aは、NECAの、Hsp90ファミリー阻害剤、ゲルダナマイシン() およびラディシコール() による競合アッセイを記載するグラフである。GRP94を 20nM [^3H] - NECA および漸増濃度の強合剤と 1 時間、4 で

インキュベートした。結合NECA 0.3%PEIで予備処理したガラスフィルターを備えた真空濾過により分離した。全てのデータ点はトリPLICATEの点の平均引くバックグラウンド(タンパク質非存在下のNECA結合)を示す。

【0046】

図10Bは、ATP()、ADP()およびAMP()によるNECAの競合アッセイを記載するグラフである。GRP94を、20nM ³H-NECAおよび漸増濃度の競合剤と1時間、4 でインキュベートした。結合NECAを、0.3%PEIで予備処理したガラスフィルターを備えた真空濾過により分離した。全てのデータ点はトリPLICATEの点の平均引くバックグラウンド(タンパク質非存在下のNECA結合)を示す。

【0047】

図10Cは、アデノシン()およびcAMP()によるNECAの競合アッセイを記載するグラフである。GRP94を20nM [³H]-NECAおよび漸増濃度の競合剤と1時間、4 でインキュベートした。結合NECAを、0.3%PEIで予備処理したガラスフィルターを備えた真空濾過により分離した。全てのデータ点はトリPLICATEの点の平均引くバックグラウンドを示す(タンパク質非存在下のNECA結合)。

【0048】

図11は、GRP94のアデノシン塩基へのリガンド結合特異性を記載する棒グラフである。GRP94を20nM [³H]-NECAおよび、全て50μMの最終濃度の競合剤と、1時間、4 でインキュベートし、結合対遊離NECAを、0.3%PEIで予備処理したガラスフィルターを備えた真空濾過により分離した。

【0049】

図12は、ATP、ADPおよびAMPのGRP94への結合がMg²⁺濃度に感受性であることを記載するグラフである。GRP94を、1時間、4 で50mM Tris、20nM [³H]-NECAおよび以下の濃度の競合剤の一つ：3.1×10⁻⁶M ATP、3.1×10⁻⁵M ADP、6×10⁻⁴M AMP、または3.1×10⁻⁵Mアデノシンとインキュベートした。反応を10mM

Mg(OAc)₂存在下(斜線棒)または明目上の内因性マグネシウム(黒棒)の存在下で行なった。結合対遊離NECAを、0.3%PEIで予備処理したガラスフィルターを備えた真空濾過により分離した。

【0050】

図13Aは、NECAのGRP94自己リン酸化における影響を記載する棒グラフである。1 μM GRP94(黒棒)、0.15 mM ³²PATP(6000 cpm/pmol)、10 mM Mg(OAc)₂および50 mM K-Hepes、pH 7.4)を含む25 μl反応物を、1時間、37 °Cでインキュベートした。1単位カゼインキナーゼII(斜線棒)を、上記の条件下で4 μMカゼインと共にインキュベートした。競合剤を適当なサンプルに最終濃度180 μM NECAの3.6% DMSO溶液、180 μM ラディシコールの3.6% DMSO溶液、5 μg/mlヘパリン、5 mM GTP、または3.6% DMSOで添加した。リン酸化切片を、Fujifilm MACBAS 1000(登録商標)ホスホロイメージングシステムで定量し、3つの別々の実験の平均PSL単位を示す。

【0051】

図13Bは、GRP94存在下および非存在下のATP加水分解を記載する棒グラフである。1 μM GRP94単量体、種々の濃度のMgATP(pH 7.0)および50 mM K-Hepes、pH 7.4を含む100 μl反応物を、2時間、37 °Cでインキュベートした。ATPおよびADPを、Hewlett Packard HPLCで、Partisil SAXカラムを使用して分離した。自発的ATP加水分解を、タンパク質非存在下で測定した。GRP94の存在下の加水分解を黒棒で示し、自発的加水分解を斜線棒で示す。

【0052】

図14は、GRP94のリガンド誘導形態変化を記載するグラフである。GRP94(50 μg/ml)を、10 mM Mg(OAc)₂および以下の濃度のリガンドを添加された緩衝液A中で1時間、37 °Cでインキュベートした：50 μM NECA、50 μM ゲルダナマイシン、2.5 mM ATP、または2.5 mM ADP。サンプルを295 nmの波長で励起させ、トリプトファン放出スペクトルを300 - 400 nmで記録した。全スペクトルを、緩衝液単独または緩

衝液+リガンドサンプルで得られたスペクトルを引くことにより補正した。

【0053】

発明の詳細な説明

リガンドGRP94、およびある場合、Hsp90のN末端ヌクレオチド結合ドメインに結合したリガンドは、GRP90、およびある場合、Hsp90を不活性から活性形態に変換する形態変化をもたらす、ここで、GRP、および、適当な場合Hsp90のシャペロンおよびペプチド結合活性が著しく刺激される、GRP94、適当な場合Hsp90のリガンド相互作用の特徴付けを記載する。またリガンドGRP94、およびある場合、Hsp90のN末端ヌクレオチド結合ドメインに結合したリガンドは、GRP90、およびある場合、Hsp90を不活性から活性形態に変換する形態変化を阻害し、ここで、GRP、および、適当な場合Hsp90のシャペロンおよびペプチド結合活性が著しく阻害される、GRP94、適当な場合Hsp90のリガンド相互作用の特徴付けを記載する。また、デルゲナマイシンおよびラディシコールで観察されるものと類似および/または関連する方法で、N末端ヌクレオチド結合ドメインに結合し、タンパク質活性および/またはタンパク質形態活性化を阻害する、リガンド、およびこのようなりガンドのスクリーニング法を記載する。このようなりガンドは、可能性のある抗癌治療剤として機能し得る。また本明細書に、GRP94、およびある場合、Hsp90のリガンド相互作用の特徴付けに基づいた、GRP94、およびある場合、Hsp90の生物学的活性に関する精製、スクリーニングおよび治療法も記載する。

【0054】

A. 定義

以下の用語は、当分野で定義された意味を有すると考えるが、以下の定義は、本発明の説明を容易にするために明示する。

【0055】

本明細書で使用する“抗原性分子”は、GRP94またはHSP90がインビボで内因性に関係しているペプチド(例えば、感染細胞または前癌もしくは癌組織において)、ならびに外来性抗原/免疫原(すなわち、インビボでGRP94ま

たはHSP90と複合体形成しない)またはそれらの抗原性/免疫原性フラグメントまたは誘導体を意味する。

【0056】

“生物学的活性”なる用語は、被検体中で生物学的または生理学的効果を有する分子を意味する。アジュバント活性は生物学的活性の例である。アジュバント活性を有する他の生物学的分子の製造の活性化または誘導も生物学的活性に含まれる。

【0057】

“アジュバント活性”は、抗原に対する脊椎動物被検体免疫系の応答を促進、またはそうでなければ調節する能力を有する分子を意味する。

【0058】

“免疫系”なる用語は、脊椎動物被検体における、病原体の可能性のあるものを含む抗原性分子に対する防御を提供する、非特異的および特異的カテゴリーを含む、全ての細胞、組織、システム、構造および過程を含む。当分野で既知のように、非特異的免疫系は好中球、単球、組織マクロファージ、クップファー細胞、肺胞マクロファージ、樹状細胞および小神経膠細胞のような貪食細胞を含む。特異的免疫系は、宿主内の特異的免疫性を付与する細胞および他の構造を意味する。これらの細胞に含まれるのはリンパ球、特にB細胞リンパ球およびT細胞リンパ球である。これらの細胞はまたナチュラルキラー(NK)細胞を含む。更に、Bリンパ球のような抗体産生細胞、および抗体産生細胞により産生された抗体も“免疫系”の用語に含まれる。

【0059】

“免疫応答”なる用語は、脊椎動物被検体の免疫系による、抗原または抗原決定基に対する任意の応答を意味する。例示的免疫応答は、下記に定義のような、液性免疫応答(例えば抗原特異的細胞の製造)および細胞仲介免疫応答(例えばリンパ球増殖)を含む。

【0060】

“全身性免疫応答”は、免疫系の、Bリンパ球のような細胞が発達するリンパ節 -、脾臓 -、または腸管関連リンパ系組織における免疫応答を言及することを

意図する。例えば、全身性免疫応答は、血清 I g G の製造を包含できる。更に、全身性免疫応答は、血流を循環する抗原特異的抗体、および脾臓およびリンパ節のような全身性コンパートメントにおけるリンパ球における抗原特異的細胞を意味する。

【0061】

“液性免疫”または“液性免疫応答”なる用語は、抗体分子が抗原刺激に反応して分泌される、獲得免疫の形を言及することを意図する。

【0062】

“細胞仲介免疫”および“細胞仲介免疫応答”は、犠牲細胞に接近したとき、T細胞リンパ球により提供される防御のような、リンパ球により提供される免疫学的防御を意味する。細胞仲介免疫応答はまたリンパ球増殖を含む。“リンパ球増殖”を測定するとき、特異的抗原に反応して増殖するリンパ球の能力を測定する。リンパ球増殖は、B細胞、T-ヘルパー細胞またはCTL細胞増殖を言及することを意図する。

【0063】

“CTL応答”は、特異的抗原を発現する細胞を融解し、殺す抗原特異的細胞の能力を言及することを意図する。下記のように、標準、分野認識CTLアッセイを行ない、CTL活性を測定する。

【0064】

本明細書で使用する“養子免疫治療”は、抗腫瘍反応性の細胞を、細胞が直接的または間接的に確立腫瘍の認識を仲介することを目的とし、腫瘍担持宿主に投与する、癌に特定の適応性を特異的治療的試みを言及する。

【0065】

“免疫原性組成物”は、免疫応答を誘発することができる組成物を言及することを意図する。ワクチンは、本発明に従い、“免疫原性組成物”の用語の意味の範囲に入る。

【0066】

“生物学的応答調節剤”は、抗原の提示のような、特定の刺激に対する被検体の応答を促進するか、そうでなければ調節する能力を有する分子を言及すること

を意図する。

【0067】

本明細書で使用する限り、“候補物質”および“候補化合物”なる用語は交換できるように使用され、生物学的応答調節剤として他の成分と相互作用すると考えられる物質を言及する。例えば、代表的候補化合物は完全Hsp90タンパク質、またはそれらのフラグメントと相互作用すると考えられ、続いてこのような相互作用に関して評価できる。本発明の方法を使用して研究することができる例示的候補化合物は、Hsp90タンパク質、ウイルスエピトープ、ペプチド、酵素、酵素基質、補因子、レクチン、糖、オリゴヌクレオチドまたは核酸、オリゴサッカライド、タンパク質、化学化合物小分子およびモノクローナル抗体を含むが、これらに限定されない。

【0068】

本明細書で使用する限り、“調節する”は、野生型または変異Hsp90タンパク質、好ましくは野生型または変異GRP94またはHSP90ポリペプチドの任意のまたは全ての化学的および生物学的活性または特性の増加、減少、または他の変更を意味する。本明細書で使用する“調節”は、応答の上方制御(すなわち、活性化または刺激)および下方制御(すなわち、阻害または抑制)の両方を言及する。

【0069】

本明細書で使用する限り、“アゴニスト”なる用語は、機能的Hsp90タンパク質の生物学的活性を抑制または促進する薬剤を意味する。

【0070】

本明細書で使用する限り、“アンタゴニスト”なる用語は、機能的Hsp90タンパク質の生物学的活性を減少または阻害する、または天然に存在するまたは相さした非機能的Hsp90タンパク質の生物学的活性を補うまたは増強する薬剤を意味する。

【0071】

B. 一般的考察

本明細書で使用する限り、“Hsp90タンパク質”は、最も真核生物細胞中

の豊富なタンパク質である任意の分子シャペロンのH s p 9 0クラス、およびこのようなタンパク質の生物学的活性フラグメントを言及することを意味する。“H S P 9 0タンパク質”なる用語は、イヌH S P 9 0 (GenBank Accession No. U01153)およびマウスH S P 9 0 (SwissProt Accession No. P08113)、およびそれらの生物学的に活性なフラグメントにより例示される、このクラスの個々のメンバーを言及する。H s p 9 0ファミリーメンバーは系統発生論的に遍在し、一方、H S P 9 0の小胞体パラログ、G R P 9 4 (g p 9 6、E R p 9 9、エンドプラスミン)は、高級植物および後生動物のみに見られる(Nicchitta (1998) Curr Op in Immunol 10:103-109)。タンパク質のH s p 9 0ファミリーは、新規合成タンパク質の適当な折りたたみおよびトラフィッキングの指示、熱ショック、酸化ストレス、低酸素/無酸素状態、栄養失調、他の物理的ストレスの状態の間、および、例えば、卒中および心筋梗塞のようなこのようなストレス所帯を促進する疾患または外傷の間の細胞の保護の付与に關与する。

【0072】

本明細書で使用する限り、“H s p 9 0タンパク質の結合ポケット”、“H s p 9 0結合ポケット”、“G R P 9 4結合ポケット”および“H S P 9 0結合ポケット”なる用語は交換可能に使用し、リガンドが結合する、H s p 9 0タンパク質、好ましくはG R P 9 4ポリペプチドまたはH S P 9 0ポリペプチドの領域を意味する。より更に好ましくは、G R P 9 4結合ポケットは、G R P 9 4のアミノ酸残基22 - 337を含む。

【0073】

上記のように、G R P 9 4 (g p 9 6、E R p 9 9、エンドプラスミン)は、細胞質H S P 9 0の小胞体パラログであり、それ自体、豊富な居住E R管腔タンパク質であり、発生期ポリペプチドとのその関連の観点からシャペロン機能を行なう。“G R P 9 4”および/または“G R P 9 4タンパク質”はまたG R P 9 4タンパク質の生物学的活性フラグメントである。この役割と一致して、G R P 9 4発現は、グルコース飢餓、酸化ストレスおよび重金属中毒のようなタンパク質の誤った折りたたみまたは非折りたたみを促進する負荷状態により上方制御される。E Rにおけるタンパク質折りたたみの制御におけるその役割に加えて、G

R P 9 4 は、細胞外空間から、プロフェショナル抗原提示細胞の主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスI抗原プロセッシング経路へのペプチドの細胞間トランスフィッキングにおいて機能できる。したがって、タンパク質折りたたみおよび凝集におけるホメオスタティックな役割に加えて、G R P 9 4 はMHCクラスI抗原プロセッシングおよび哺乳類細胞の提示経路の成分として機能する。

【 0 0 7 4 】

G R P 9 4 はまた免疫グロブリン、MHCクラスII分子、HSV-1糖タンパク質、チログロビン、コラーゲンおよびp185erbB2の折りたたみおよび凝集に寄与する。(Melnick et al. (1992) J Biol Chem 267:21303-21306; Melnick et al. (1994) Nature 370:373-375; Schaiff et al. (1992) J Exp Med 176:657-666; Navarro et al. (1991) Virology 184:253-264; Kuznetsov et al. (1994) J Biol Chem 269:22990-22995; Ferreira et al. (1994) J Cell Biochem 56:518-26; Chavany et al. (1996) J Biol Chem 273:4974-4977)。ポリペプチド折りたたみ基質との相互作用に加えて、G R P 9 4 はペプチドと結合し、そのサブセットは発生期MHCクラスI分子上の凝集に適している。(Srivastava et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:3407-3411; Nieland et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93:6135-6139; Wearsch & Nicchitta (1997) J Biol Chem 272:5152-5156; Ishii et al. (1999) J Immunol 162:1303-1309; Srivastava et al. (1998) Immunity 8:657-665; Sastry & Linderth (1999) J Biol Chem 274:12023-12035)。G R P 9 4 のペプチド結合活性は、CD8⁺ T細胞免疫応答を誘発する能力において役割を担う。(Udono et al. (1994) Proc Natl Acad Sci USA, 91:3077-30781; Suto & Srivastava (1995) Science 269:1585-1588; Arnold et al. (1995) J Exp Med 182:885-889; Nair et al. (1999) J Immunol 162:6426-6432; Blachere et al. (1997) J Exp Med 186:465-472; Heike et al. (1996) J Leukoc Biol 139:613-623; Srivastava et al. (1998) Immunity 8:657-665)。ペプチド結合活性は、しかし、単独で免疫原性活性をタンパク質に付与するには不十分であり、したがってG R P 9 4 は、交叉提示の必須免疫学的過程において機能できる、分子シャペロンの限定されたサブセットの一員である。(Srivastava et al. (1998) Immunity 8:657-665; Nair et al. (1999) J I

mmunol 162:6426-6432; Basu and Srivastava (1999) J Exp Med 189:797-802; Schild et al. (1999) Curr Opin Immunol 11:109-113)。

【0075】

HSP90は、制御のアデノシンヌクレオチド - 依存的モードを有する。加えて、アデノシンのプリン環のN7基(ヒトHSP90のN51 = GRP94のN86)およびアデノシンのプリン環のN1基(ヒトHSP90のG97 = GRP94のG130)との水仲介水素結合に關与するアミノ酸側鎖は、HSP90およびGRP94で保存されている。直接ヌクレオチド結合を仲介するアデノシンのプリン環のN6基(ヒトHSP90のL48 = GRP94のL83)もHSP90およびGRP94で保存されている。HSP90とのATP結合において、アデニンプリンのN6基は、ヌクレオチドとヌクレオチド結合ポケットの間の唯一の水素結合であり((Prodromou et al. (1997) Cell 90:65-75; Obermann et al. (1998) J Cell Biol 143:901-910)、N6置換アデノシンアナログはGRP94に結合しない。(Hutchison & Fox (1989) J Biol Chem 264:19898-903; Hutchison et al. (1990) Biochemistry 29:5138-5144)。したがって、ATP/ADP結合および加水分解は、HSP90の生物学的特性として一般に認められているが、ATP/ADPがGRP94活性の活性の調節において同様の機能で働くかどうか知られていない。ATPおよびADPは非常に低い親和性でGRP94と結合し、したがって、実験的限定は、GRP94ヌクレオチド結合ポケットでのATP/ADP相互作用を、リガンド置換アッセイを含むがこれに限定されない関節法で分析することがを必要とする。(Wearsch et al. (1998) Biochemistry 37(16):5709-5719; Csermely et al. (1995) J Biol Chem 270:6381-6388; Li & Srivastava (1993) EMBO J 12:3143-3151)。

【0076】

GRP94のペプチド結合活性は、CD8⁺ T細胞免疫応答を誘発する能力において役割を担う。ペプチド結合活性は、しかし、単独で免疫原性活性をタンパク質に付与するには不十分であり、したがってGRP94は、交叉提示の必須免疫学的過程において機能できる、分子シャペロンの限定されたサブセットの一員である。本発明が開示されるまで、ポリペプチドおよびペプチド基質の両方に関

するGRP94の活性を調節するGRP94リガンド-相互作用は、決定しなければならぬままであった。

【0077】

HSP90およびGRP94は、いくつかの抗腫瘍剤、主にラディシコールおよびゲルダナマイシンの標的の可能性が提案されている。Scheibel & Buckner (1998) *Biochem Pharm* 56:675-82。これらの化合物は、原癌遺伝子性キナーゼ、ホルモンレセプターおよびその活性折りたたみ状態および適当な細胞下位置が考えられる他のシグナル伝達タンパク質を助ける、Hsp90タンパク質の能力の阻害により作用すると考えられる。Pratt (1998) *Proc Soc Exp Biol Med* 217:420-434。

【0078】

GRP94はまたT細胞応答を誘発することが判明しており、そのペプチド結合活性の反映である(Nicchitta (1998) *Curr Opin Immunol* 10:103-109; Srivastava et al. (1998) *Immunity* 8:657-665)。GRP94-ペプチド複合体が、GRP94-結合ペプチドの抗原提示細胞上のMHCクラスI分子への交換を伴い、専門的抗原提示細胞により加工できる。抗原提示細胞は、ついで、GRP94との複合体において提示されるペプチドエピトープを示す組織に対する生CD8⁺T細胞応答と相互作用できる(Srivastava et al. (1998) *Immunity* 8:657-665)。

【0079】

今まで、まで特徴付けされていないgrp94の虚血における防護役割の可能性は、GRP94の発現が神経死に至ることが知られている間の一過性前脳虚血後の海馬において促進されるという観察により支持される(Yagita et al. (1999) *J Neurochem* 72:1544-1551)。grp94は、同様に、虚急性腎臓の後に誘導される(Kuznetsov (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8584-8589)。HSP90を含む熱ショックタンパク質は、一般に虚血に続く再灌流の酸化的ストレスの間、過発現される(Sciandra et al. (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81:4843-4847)。HSP90はまた、低酸素誘導ファクター1-aに結合することにより虚血性シグナル伝達に役割を担うはずである(Gradin et al. (1996) *Mol Cell Biol* 16

:5221-5231)。

【0080】

同様に、本発明により、GRP94およびHSP90は、感染性疾患および癌の処置に関連する化学療法、免疫療法およびワクチンの合理的標的を代表する。分子シャペロンとしてのその機能の観点から、GRP94およびHSP90は更に、臓器(腎臓、心臓、肺、肝臓)移植、脳卒中および心筋梗塞を含むが、これらに限定されない虚血性損傷において起こり得るような組織損傷および負荷の治療剤の開発の合理的標的を代表する。更に、Hsp90およびGRP94は、抗腫瘍剤設計の合理的標的を代表する。

【0081】

C. リガンド組成物

一つの実施態様において、本発明は、GRP94のリガンドとして作用する、組成物に関する。リガンドは、GRP94の精製および単離天然リガンドを含むことができ、または、本明細書に記載のスクリーニングおよび合理的医薬設計技術により同定されたような、合成化合物を含むことができる。好ましくは、リガンドは、小分子模倣物である。より好ましくは、リガンドは、GRP94生物学的活性の調節において活性を有する。したがって、このような活性を有するリガンドは、また本明細書で“調節剤”と呼ぶ。代表的リガンド組成物は、好ましくは、ラディシコール、ゲルダナマイシン、またはアデノシン誘導体に構造類似性を示すことができる、約500-1000ダルトン、多環式部分である。所望により、リガンドは疎水性である。

【0082】

代表的リガンドまたは調節剤組成物は、リガンド-GRP94相互作用の分析の高い構造分析から適当と考えて、アデノシン部分または、アデノシンの場合、2'、3'および5'位に種々の置換を有する、その構造模倣物を含む。所望により、好ましくは、親アデノシンへのカルボキサミド架橋として、親和性ベースの精製の目的で固体支持体への安定な化学架橋を促進するために、ビニル、マレイミドおよび/またはスクシンイミドエステルを含むが、これに限定されない任意のサブセット内の化学的反応基、または、アミノまたはスルフヒドリル基のよう

な固体支持体への化学結合を安定化する置換基で終わる、5'アルキル伸長を含むことができる。組成物はCRP94のリガンドとして働き、本明細書に記載の精製、スクリーニングおよび治療法において適用性を有する。

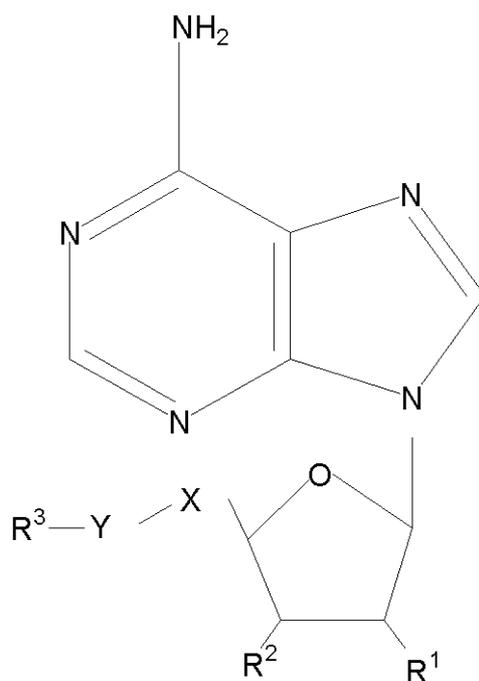
【0083】

更なるリガンドは、好ましくは、アデノシンのリボースに対応する水素結合模倣物、およびアデノシンのアデニン塩基に対応するベンズイミダゾールまたは構造関連骨格を担持する親前駆分子のコンビナトリアルケミストリーを介して同定できる。

【0084】

代表的リガンドまたは調節剤組成物は、式(I)：

【化8】



〔式中、

XおよびYは同一または異なり、XおよびY = C、N、OまたはS；そしてXおよびYは水素、ヒドロキシル、または二重結合酸素を含む酸素で置換できる；

R¹ = 水素、ヒドロキシル、C₁からC₆アルキル、C₁からC₆分枝鎖アルキル、C₁からC₆ヒドロキシアルキル、分枝C₁からC₆ヒドロキシアルキル、C₄からC₈シクロアルキル、C₁からC₆アルケニル、分枝C₁からC₆アルケニル、C₄からC₈シクロアルケニル、C₄からC₈アリール、C₄からC₈アロイル、C₄からC

₈アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 アルコキシ、 C_1 から C_6 分枝鎖アルコキシ、 C_4 から C_8 アリールオキシ、1級、2級または3級 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級分枝鎖 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級シクロアルキルアミノ、1級、2級または3級 C_4 から C_8 アリールアミノ、 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、分枝 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、 C_1 から C_6 アルキルエステル、分枝 C_1 から C_6 アルキルエステル、 C_4 から C_8 アリールカルボン酸、 C_4 から C_8 アリールエステル、 C_4 から C_8 アリール置換 C_1 から C_6 アルキル、環中にO、NまたはSを有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、環中にO、NまたはSを有するアルキル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール；またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形；または R^1 はハロ、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブromoまたはヨード；
 R^2 = 水素、ヒドロキシル、 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_1 から C_6 ヒドロキシルアルキル、分枝 C_1 から C_6 ヒドロキシルアルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル、 C_4 から C_8 アリール、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 アルコキシ、 C_1 から C_6 分枝鎖アルコキシ、 C_4 から C_8 アリールオキシ、1級、2級または3級 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級分枝鎖 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級シクロアルキルアミノ、1級、2級または3級 C_4 から C_8 アリールアミノ、 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、分枝 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、 C_1 から C_6 アルキルエステル、分枝 C_1 から C_6 アルキルエステル、 C_4 から C_8 アリールカルボン酸、 C_4 から C_8 アリールエステル、 C_4 から C_8 アリール置換 C_1 から C_6 アルキル、環中にO、NまたはSを有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、環中にO、NまたはSを有するアルキル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール；またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形；または R^2 はハロ、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブromoまたはヨード；そして

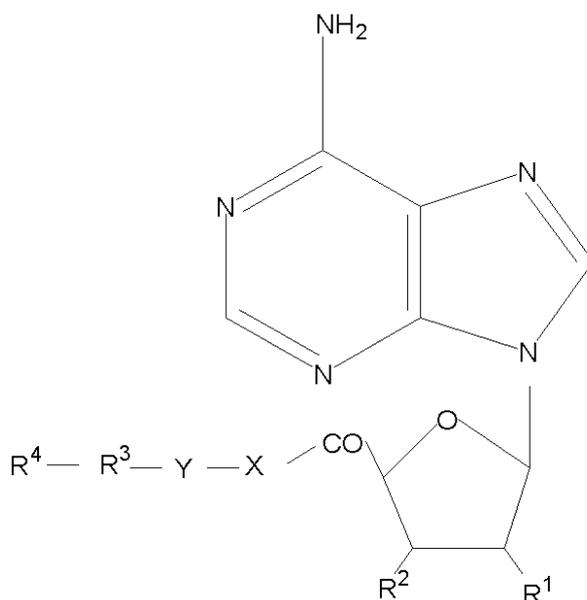
R^3 = 水素、ヒドロキシル、 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、分枝 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル、 C_4 から C_8 アリール、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 アルコキシ、 C_1 から C_6 分枝鎖アルコキシ、 C_4 から C_8 アリールオキシ、1級、2級または3級 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級分枝鎖 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級シクロアルキルアミノ、1級、2級または3級 C_4 から C_8 アリールアミノ、 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、分枝 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、 C_1 から C_6 アルキルエステル、分枝 C_1 から C_6 アルキルエステル、 C_4 から C_8 アリールカルボン酸、 C_4 から C_8 アリールエステル、 C_4 から C_8 アリール置換 C_1 から C_6 アルキル、環中にO、NまたはSを有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、環中にO、NまたはSを有するアルキル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール；またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形；または R^3 はハロ、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブromoまたはヨードである]

の化合物を含む。

【0085】

ここで、リガンド組成物は更に式(II)：

【化9】



〔式中、

XおよびYは同一または異なり、XおよびY = C、N、OまたはS；そしてXおよびYは水素、ヒドロキシル、または二重結合酸素を含む酸素で置換できる；
 R^1 = 水素、ヒドロキシル、 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_1 から C_6 ヒドロキシルアルキル、分枝 C_1 から C_6 ヒドロキシルアルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル、 C_4 から C_8 アリール、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 アルコキシ、 C_1 から C_6 分枝鎖アルコキシ、 C_4 から C_8 アリールオキシ、1級、2級または3級 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級分枝鎖 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級シクロアルキルアミノ、1級、2級または3級 C_4 から C_8 アリールアミノ、 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、分枝 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、 C_1 から C_6 アルキルエステル、分枝 C_1 から C_6 アルキルエステル、 C_4 から C_8 アリールカルボン酸、 C_4 から C_8 アリールエステル、 C_4 から C_8 アリール置換 C_1 から C_6 アルキル、環中にO、NまたはSを有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、環中にO、NまたはSを有するアルキル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール；またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形；または R^1 はハロ、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブromoまたはヨード；

R^2 = 水素、ヒドロキシル、 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、分枝 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル、 C_4 から C_8 アリール、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 アルコキシ、 C_1 から C_6 分枝鎖アルコキシ、 C_4 から C_8 アリールオキシ、1級、2級または3級 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級分枝鎖 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級シクロアルキルアミノ、1級、2級または3級 C_4 から C_8 アリールアミノ、 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、分枝 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、 C_1 から C_6 アルキルエステル、分枝 C_1 から C_6 アルキルエステル、 C_4 から C_8 アリールカルボン酸、 C_4 から C_8 アリールエステル、 C_4 から C_8 アリール置換 C_1 から C_6 アルキル、環中にO、NまたはSを有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、環中にO、NまたはSを有するアルキル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール；またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形；または R^2 はハロ、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブromoまたはヨード；

R^3 = 水素、ヒドロキシル、 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、分枝 C_1 から C_6 ヒドロキシアルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル、 C_4 から C_8 アリール、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 アルコキシ、 C_1 から C_6 分枝鎖アルコキシ、 C_4 から C_8 アリールオキシ、1級、2級または3級 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級分枝鎖 C_1 から C_6 アルキルアミノ、1級、2級または3級シクロアルキルアミノ、1級、2級または3級 C_4 から C_8 アリールアミノ、 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、分枝 C_1 から C_6 アルキルカルボン酸、 C_1 から C_6 アルキルエステル、分枝 C_1 から C_6 アルキルエステル、 C_4 から C_8 アリールカルボン酸、 C_4 から C_8 アリールエステル、 C_4 から C_8 アリール置換 C_1 から C_6 アルキル、環中にO、NまたはSを有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、環中にO、NまたはSを有するアルキ

ル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール ; またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形 ; または R^3 はハロ、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブロモまたはヨード ; そして

$R^4 = C_1$ から C_6 アルキル、 C_1 から C_6 分枝鎖アルキル、 C_4 から C_8 シクロアルキル(環中に O、N または S を含むかまたは含まない)、 C_1 から C_6 アルケニル、分枝 C_1 から C_6 アルケニル、 C_4 から C_8 シクロアルケニル(環中に O、N または S を含むかまたは含まない)、 C_4 から C_8 アロイル、 C_4 から C_8 アリール、環中に O、N または S を有する C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、 C_4 から C_8 アリール - 置換 C_1 から C_6 アルキル、環中に O、N または S を有するアルキル - 置換またはアリール - 置換 C_4 から C_{12} ヘテロ環式またはヘテロ多環式アルキルまたはアリール、アルキル - 置換 C_4 から C_8 アロイル、またはアルキル - 置換 C_4 から C_8 アリール ; またはヒドロキシル - 、アミノ - 、またはハロ - 置換異形、ここでハロはクロロ、フルオロ、ブロモまたはヨードである)

の化合物を含む。

【0086】

D. 精製法

本発明に従い、GRP94、またはある場合 HSP90 を含む複合体を、親和性クロマトグラフィーにより精製する方法が提供される。複合体は、好ましくは抗原性分子に結合した GRP94 を含む。より好ましくは、複合体は、抗原性分子に非共有結合的に結合した GRP94 を含む。一つの実施態様において、本方法は、GRP94 複合体を含むサンプルを、GRP94 を優勢に結合する結合剤と接触させ、結合剤は固相支持体上に固定されており、複合体を固相支持体上に固定化させる ; 残りのサンプルを回収する ; 複合体を固相支持体から溶出し、溶出液中に精製複合体を得ることを含む。 “GRP94 を優勢に結合する結合剤” なるフレーズは、熱ショックタンパク質を含むが、これらに限定されない、他の分子と比較して、GRP94 を優勢に結合する薬剤を意味する。

【0087】

結合剤は、好ましくはリガンド - G R P 9 4 相互作用の分析の高い構造分析から適当と考えて、アデノシン部分または、アデノシンの場合、2'、3'および5'位に種々の置換を有する、その構造模倣物を含む。所望により、好ましくは、親アデノシンへのカルボキサミド架橋として、親和性ベースの精製の目的で固体支持体への安定な化学架橋を促進するために、ビニル、マレイミドおよび/またはスクシンイミドエステルを含むが、これに限定されない任意のサブセット内の化学的反応基、または、アミノまたはスルフヒドリル基のような固体支持体への化学結合を安定化する置換基で終わる、5'アルキル伸長を含むことができる。より好ましくは、結合剤はA T PまたはA D Pを含まない。代表的結合剤は、式(I)の化合物または式(II)の化合物を含む。他の代表的結合剤は、N - エチルカルボキサミドアデノシン(N E C A)を含む。更なるリガンドは、好ましくは、アデノシンのリボースに対応する水素結合模倣物、およびアデノシンのアデニン塩基に対応するベンズイミダゾールまたは構造関連骨格を担持する親前駆分子のコンビナトリアルケミストリーを介して同定できる。

【0088】

所望により、固定化結合剤に結合した複合体を、適当な濃度の親リガンド(すなわち、結合剤)を含む緩衝液で固相支持体を洗浄することにより溶出し、溶出液中に複合体を提供する。したがって、更に結合剤または溶出リガンドを含む複合体は、また本発明により提供される。溶出リガンドについて、G M P 製造に適当な、生理食塩水および炭酸アンモニウムを含むがこれらに限定されない、適当な緩衝液中で透析することにより溶出液から除去する。

【0089】

本明細書で上記の親和性方法は、G R P 9 4 - ペプチド複合体またはG R P 9 4 単独、またはある場合、H S P 9 0 - ペプチド複合体、またはH s p 9 0 タンパク質単独を、任意の真核生物細胞から単離するのに使用できる。例えば、組織、単離細胞、または予め選択した細胞内病原体で感染させた不死化真核生物細胞系、腫瘍細胞または腫瘍細胞系を使用できる。複合体をまた、哺乳類および鳥類を含む、温血脊椎動物のような脊椎動物被検体から得ることができる。所望により、哺乳類は、ヒト、マウス、ブタ、ラット、無尾猿、有尾猿、ネコ、モルモツ

ト、ウシ、ヤギおよびウマを含むが、これらに限定されない。

【0090】

一つの実施態様において、複合体は、脊椎動物被検体に対して“自己”である；すなわち、複合体を、脊椎動物被検体の感染細胞または癌細胞または前癌細胞かのいずれかから単離する(例えば、好ましくは脊椎動物被検体の単離組織または腫瘍生検から調製する)。

【0091】

あるいは、複合体をインビトロで製造する(例えば、抗原性分子との複合体が望まれる場合)。あるいは、GRP94および/または抗原性分子を特定の脊椎動物被検体、または他から、または、特定の脊椎動物被検体または他に本来由来するクローン化GRP94を使用した組換え製造法により単離する。GRP94(またはある場合HSP90)との複合体化に使用する外来抗原およびそのフラグメントおよび誘導體(ペプチドおよび非-ペプチドの両方)は、当分野で既知のものから選択でき、および、抗体またはMHC分子に結合する能力(抗原性)または免疫応答を産生する能力(免疫原性)により当分野で既知の標準免疫アッセイにより容易に同定されるものから選択できる。GRP94および抗原性分子の複合体は、被検体の癌または前癌組織から、または癌細胞系から単離でき、またはインビトロで製造できる(外来性抗原を抗原性分子として使用する実施対応において必要なように)。

【0092】

D. 1. 抗原性 / 免疫原性成分の単離

GRP94、またはある場合HSP90を含む複合体に関連する抗原性分子を単離または精製する方法も、本発明にしたがい提供する。一つの実施態様において、方法は：GRP94および抗原性分子を含む複合体を、CRP94を優勢に結合する結合剤と接触させ、結合剤は固相支持体上に固定されており、複合体を固相支持体上に固定化させる；残りのサンプルを回収する；そして複合体を固相支持体から溶出し、溶出液中に精製複合体を得る；そして溶出液から抗原性分子を単離することを含む。

【0093】

結合剤は、好ましくはリガンド - G R P 9 4 相互作用の分析の高い構造分析から適当と考えて、アデノシン部分または、アデノシンの場合、2'、3'および5'位に種々の置換を有する、その構造模倣物を含む。所望により、好ましくは、親アデノシンへのカルボキサミド架橋として、親和性ベースの精製の目的で固体支持体への安定な化学架橋を促進するために、ビニル、マレイミドおよび/またはスクシンイミドエステルを含むが、これに限定されない任意のサブセット内の化学的反応基、または、アミノまたはスルフヒドリル基のような固体支持体への化学結合を安定化する置換基で終わる、5'アルキル伸長を含むことができる。より好ましくは、結合剤はA T PまたはA D Pを含まない。代表的結合剤は、式(I)の化合物または式(II)の化合物を含む。他の代表的結合剤は、N - エチルカルボキサミドアデノシン(N E C A)を含む。更なるリガンドは、好ましくは、アデノシンのリボースに対応する水素結合模倣物、およびアデノシンのアデニン塩基に対応するベンズイミダゾールまたは構造関連骨格を担持する親前駆分子のコンビナトリアルケミストリーを介して同定できる。

【0094】

所望により、固定化結合剤に結合した複合体を、適当な濃度の親リガンド(すなわち、結合剤)を含む緩衝液で固相支持体を洗浄することにより溶出し、溶出液中に複合体を提供する。したがって、更に結合剤または溶出リガンドを含む複合体は、また本発明により提供される。溶出リガンドについて、G M P 製造に適当な、生理食塩水および炭酸アンモニウムを含むがこれらに限定されない、適当な緩衝液中で透析することにより溶出液から除去する。

【0095】

抗原性ペプチドおよび/または成分を、G R P 9 4 - 複合体から、低pH条件下で溶出している。これらの実験条件は、ペプチドおよび/または恐らく有用な抗原決定基を含む細胞由来の抗原性成分を含む。単離したら、各抗原性ペプチドのアミノ酸配列を、慣用のアミノ酸配列決定法を使用して測定できる。このような抗原性分子について化学合成または組換え法；精製；そしてG R P 9 4、またはH S P 9 0への複合体化により、インビトロで製造できる。加えて、抗原性ペプチド配列を、4極(quadrupole)検出およびC A D - ベース配列決定と組み合わせ

せた、電子噴霧およびMALDI-TOF手段に限定されないが、これを使用した質量分析により得ることができる。

【0096】

D. 2. GRP94 - ペプチド複合体からのペプチドの溶出

いくつかの方法を、ペプチドをGRP94 - ペプチド複合体またはHSP90 - ペプチド複合体から溶出するのに使用できる。試みは、複合体を低pH緩衝液および/またはグアニジニウム/HCl (3 - 6 M)、0.1 - 1% TFAまたは酢酸中でインキュベートすることを含む。簡単に、目的の複合体をCENTRICON (登録商標) 10 アッセンブリー (Amicon of Beverly, Massachusetts) を通して遠心し、複合体とゆるく会合している低分子量物質を除去する。高分子量フラクションを、SDS-PAGEにより除去および分析でき、一方、低分子量物質はキャピラリーおよび/またはナノスケールHPLCで、0.5 mL / 分の流速で、210 / 220 nmでモニタリングしながら分画する。

【0097】

低pHプロトコールにおいて、酢酸またはトリフルオロ酢酸(TFA)を複合体に最終濃度10%(vol/vol)となるように添加し、室温または他の適当な温度で、10分インキュベートする(Van Bleek et al. (1990) Nature 348:213-216; Li et al. (1993) EMBO J 12:3143-3151)。

【0098】

得られたサンプルを、CENTRICON (登録商標) 10 アッセンブリーを通して、先に記載のように遠心する。高および低分子量フラクションを回収する。残りの巨大分子量複合体を、グアニジニウムとまたは低pHでインキュベートし、残りのペプチドを除去できる。得られた低分子量フラクションをプールし、蒸発により濃縮し、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)に溶解する。溶解物質を、マイクロボアHPLCで、流速0.5 mL / 分で分画する。ペプチドの溶出をOD 210 / 220 nmでモニターし、ペプチド含有フラクションを回収する。

【0099】

D. 3. ペプチドの配列決定および合成

溶出ペプチドのアミノ酸配列を、当分野で既知の手動または自動アミノ酸配列

決定法により決定できる。保護ペプチドの可能性のあるアミノ酸配列が決定できたら、ペプチドを任意の所望の量、慣用のペプチド合成または当分野で既知の他のプロトコールを使用して合成できる。

【0100】

被検ペプチドを、組換えDNA法を含む、ポリペプチド技術における当業者が既知の任意の技術により合成できる。固相メリフィールド・タイプ合成のような合成化学技術が、純度、抗原特異性、望ましくない副産物からの解放、合成の容易さ等の理由から好ましい。ペプチド合成の多くの方法が利用可能であり、いずれも本明細書に出展明示により包含させる、固相ペプチド合成に関してSteward et al. (1969) Solid Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co., San Francisco, California; Bodanszky, et al. (1976) Peptide Synthesis, John Wiley & Sons, Second Edition; Meienhofer (1983) Hormonal Proteins and Peptides, Vol. 2, p. 46, Academic Press, New York, New York; Merrifield (1969) Adv Enzymol 32:221296; Fields et al. (1990) Int J Peptide Protein Res 35:161214;および米国特許第4,244,946号;そして伝統的溶液合成に関してSchroder et al. (1965) The Peptides, Vol. 1, Academic Press, New York, New Yorkに見ることができる。このような合成に使用できる適当な保護基は上記文献、および、出展明示により本明細書に包含させるMcOmie (1973) Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, New York, New Yorkに記載されている。

【0101】

一般に、固相合成法は、1個以上のアミノ酸残基または適当な保護アミノ酸残基の、成長しているペプチド鎖への塩族添加を含む。通常、第1アミノ酸残基のアミノまたはカルボキシル基のいずれかが適当な、選択的に除去できる保護基で保護されている。異なる、選択的に除去できる保護基を、リジンのような反応側鎖基を含むアミノ酸に利用する。

【0102】

固相合成を例として使用して、保護または誘導体化アミノ酸を、その非保護カルボキシルまたはアミノ基を介して不活性固体支持体に結合させる。アミノまた

はカルボキシル基の保護末端をついで選択的に除去し、適当に保護された相補性(アミノまたはカルボキシル)基を有する配列における次のアミノ酸を添加し、すでに固体支持体に結合している残基とアミド結合を形成するのに適した条件下で反応させる。アミノまたはカルボキシル基の保護基をついでこの新しく添加したアミノ酸から除去し、次のアミノ酸(適当に保護されている)をついで添加する、以下同様。全ての所望のアミノ酸が適当な配列で結合した後、任意の残りの末端および側鎖保護基(および固体支持体)を連続的にまたは同時に除去し、最終直鎖ペプチドを得る。

【0103】

上記の実施例により製造した得られた直鎖ポリペプチドは、対応する環状ペプチドを形成するために反応できる、ペプチドの環化の例示的方法は、Zimmer et al. (1993) Peptides, pp. 393394, ESCOM Science Publishers, B. V.に記載されている。典型的に、tertブトキシカルボニル保護ペプチドメチルエステルをメタノールに溶解し、水酸化ナトリウム溶液を添加し、混合物を20℃で反応させてメチルエステル保護基を加水分解的に除去する。溶媒を蒸発させた後、tertブトキシカルボニル保護ペプチドを、酢酸エチルで、酸性水性溶媒から抽出する。tertブトキシカルボニル保護基を、ついでジオキサン共溶媒中の緩和な酸性条件下で除去する。このようにして得た遊離アミノおよびカルボキシ末端を有する非保護直鎖ペプチドを、その対応する環状ペプチドに、ジクロロメタンおよびジメチルホルムアミドの混合物中の直鎖ペプチドの希釈溶液を、ジシクロヘキシルカルボジイミドと、1-ヒドロキシベンズトリアゾールおよびN-メチルモルホリンの存在下で反応させることにより変換する。得られた環状ペプチドをついでクロマトグラフィーで精製する。

【0104】

得られたペプチドの精製を、ゲル浸透、分配および/またはイオン交換クロマトグラフィーを使用した分取HPLCのような慣用法を使用して達成する。適当なマトリックスおよび緩衝液の選択は、当分野で既知であり、本明細書に詳述する必要はない。

【0105】

D. 4. 検出法

GRP94、またはある場合HSP90を含む複合体を含むことが疑われるサンプル中の、このような複合体の検出法も本明細書により提供される。一つの実施態様において、本方法は：サンプルをGRP94を優勢に結合する結合剤と、GRP94含有複合体が結合物質と結合し、第2複合体を形成するのに好ましい条件下で接触させる；そして第2複合体を、結合物質に接合した標識を介して、またはその形成に続いて第2複合体に特異的に結合する標識試薬を介して検出することを含む。

【0106】

結合剤は、好ましくはリガンド - GRP94相互作用の分析の高い構造分析から適当と考えると、アデノシン部分または、アデノシンの場合、2'、3'および5'位に種々の置換を有する、その構造模倣物を含む。所望により、好ましくは、親アデノシンへのカルボキサミド架橋として、親和性ベースの精製の目的で固体支持体への安定な化学架橋を促進するために、ビニル、マレイミドおよび/またはスクシンイミドエステルを含むが、これに限定されない任意のサブセット内の化学的反応基、または、アミノまたはスルフヒドリル基のような固体支持体への化学結合を安定化する置換基で終わる、5'アルキル伸長を含むことができる。より好ましくは、結合剤はATPまたはADPを含まない。代表的結合剤は、式(I)の化合物または式(II)の化合物を含む。他の代表的結合剤は、N-エチルカルボキサミドアデノシン(NECA)を含む。更なるリガンドは、好ましくは、アデノシンのリボースに対応する水素結合模倣物、およびアデノシンのアデニン塩基に対応するベンズイミダゾールまたは構造関連骨格を担持する親前駆分子のコンビナトリアルケミストリーを介して同定できる。

【0107】

所望により、固定化結合剤に結合した複合体を、適当な濃度の親リガンド(すなわち、結合剤)を含む緩衝液で固相支持体を洗浄することにより溶出し、溶出液中に複合体を提供する。したがって、更に結合剤または溶出リガンドを含む複合体は、また本発明により提供される。溶出リガンドについて、GMP製造に適当な、生理食塩水および炭酸アンモニウムを含むがこれらに限定されない、適当

な緩衝液中で透析することにより溶出液から除去する。

【0108】

結合物質は、検出可能な標識と接合でき、この場合、検出段階は：複合体を非結合標識結合物質から分離する；そして複合体上に存在するか、非結合である検出可能ラベルを検出することを含む。

【0109】

D. 5. 精製または検出のためのキット

他の態様において、本発明は、ペプチド複合体、好ましくはGRP94複合体および抗原性分子を単離または精製するためのキットに関する。一つの実施態様において、キットはGRP94を優勢に結合する結合剤を含み、その結合剤は第1容器に包含される。結合剤は好ましくはリガンド - GRP94相互作用の分析の高い構造分析から適当と考えると、アデノシン部分または、アデノシンの場合、2'、3'および5'位に種々の置換を有する、その構造模倣物を含む。所望により、好ましくは、親アデノシンへのカルボキサミド架橋として、親和性ベースの精製の目的で固体支持体への安定な化学架橋を促進するために、ビニル、マレイミドおよび/またはスクシンイミドエステルを含むが、これに限定されない任意のサブセット内の化学的反応基、または、アミノまたはスルフヒドリル基のような固体支持体への化学結合を安定化する置換基で終わる、5'アルキル伸長を含むことができる。より好ましくは、結合剤はATPまたはADPを含まない。

【0110】

代表的結合剤は、式(I)の化合物または式(II)の化合物を含む。他の代表的結合剤は、N-エチルカルボキサミドアデノシン(NECA)を含む。更なるリガンド更なるリガンドは、好ましくは、アデノシンのリボースに対応する水素結合模倣物、およびアデノシンのアデニン塩基に対応するベンズイミダゾールまたは構造関連骨格を担持する親前駆分子のコンビナトリアルケミストリーを介して同定できる。所望により、結合剤を固相支持体に固定化でき、またはキットはまた第2容器に包含された固相支持体を含むことができる。

【0111】

キットは、更に結合剤から複合体を溶出するのに使用する溶出緩衝液を含むこ

とができ、その溶出緩衝液は第3容器に包含される。所望により、溶出緩衝液は、適当な濃度の親リガンドを含む生理食塩水を含み、複合体を溶出液中に提供する。キットは更に、GMP製造に適当な、生理食塩水および炭酸アンモニウムを含むがこれらに限定されない、緩衝液を含むことができる。キットは更に複合体から抗原性分子を輸出するのに使用する溶出緩衝液も含むことができ、その溶出緩衝液は第4容器に包含される。適当な溶出緩衝液は上記である。

【0112】

GRP94を含む複合体を検出するためにキットを使用する場合、キットに含まれる複合体は更に検出可能標識を含む試薬またはインディケーターを含むことができ、そのインディケーターは第5容器に包含される。あるいは、結合剤が検出可能標識またはインディケーターを含むことができる。インディケーターは放射活性標識または酵素を含むことができ、または本明細書に記載の他のインディケーターである。

【0113】

D. 6. GRP94 - ペプチド複合体の免疫原性の測定

精製GRP94 - 抗原性分子複合体を、当分野で既知の混合リンパ球腫瘍培養アッセイ(MLTIC)を使用して、免疫原性に関してアッセイできる。限定ではなく例示の目的で、以下の方法を使用できる。簡単に、マウスに候補GRP94 - 抗原性分子複合体を皮下注射する。他のマウスに、他のGRP94 - 抗原性分子複合体を注射するか、アッセイで陽性コントロールとして働く完全感染細胞のいずれかを注射する。マウスに2回、7 - 10日離して注射する。最後の免疫化の10日後、脾臓を除去し、リンパ球を離す。離れたリンパ球を、目的の複合体を発現する死細胞の添加によりインビトロで続いて再刺激する。

【0114】

例えば、 8×10^6 免疫脾臓細胞を、10%ウシ胎児血清含有3ml RPMI培地中で、 4×10^4 マイトマイシンC処理または γ -照射(5 - 10,000 rads)感染細胞(または、場合に応じて適当な遺伝子でトランスフェクトした細胞)で刺激できる。ある場合、33% 2次リンパ球培養上清を、T細胞成長因子の源として、Glasebrook et al. (1980) J Exp Med 151:876に記載のように

包含できる。免疫化後の一次細胞毒性T細胞応答を試験するために、脾臓細胞を刺激なしで培養できる。ある実験において、免疫化マウスの脾臓細胞を抗原性が明白な細胞で再刺激でき、細胞毒性T細胞応答の特異性を測定する。

【0115】

6日後、培養を細胞毒性に関して4時間 ^{51}Cr -放出アッセイで、Palladio et al. (1987) Cancer Res 47:5074-5079 and Blachere et al. (1993) J Immunotherapy 14:352-356に記載のように試験する。このアッセイにおいて、混合リンパ球培養を、標的細胞懸濁液に添加し、異なるエフェクター：標的(E：T)比率(通常1：1から40：1)を得る。標的細胞を、 $200\text{mCi } ^{51}\text{Cr}/\text{mL}$ 含有培養培地で 1×10^6 標的細胞を、1時間、 37°C でインキュベートすることにより予備標識する。細胞を、標識に続いて3回洗浄する。各アッセイ点(E：T比)をトリPLICATEで行ない、適当な自発的 ^{51}Cr 放出(リンパ球をアッセイに添加しない)および100%放出(細胞を界面活性剤で融解)を測定するための適当なコントロールを包含させる。細胞混合物を4時間インキュベートした後、細胞を 200g で5分の遠心によりペレット化する。上清に放出される ^{51}Cr の量をガンマカウンターで測定する。細胞毒性の割合を、試験サンプルのcpmから自発的に放出されるcpmを引き、相界面活性剤放出cpmから自発的に放出されるcpmを引いたもので割ったものとして測定する。

【0116】

MHCクラスIカスケードを遮断するために、K-44ハイブリドーマ細胞(抗MHCクラスIハイブリドーマ)由来の濃縮ハイブリドーマ上清を、試験サンプルに、12.5%の最終濃度で添加する。

【0117】

E. スクリーニング法

本明細書に記載されているのは、分子シャペロンGRP94、またはある場合HSP90における形態変化を誘発または阻害し、それによりこれらのタンパク質のシャペロンおよびペプチド結合活性を制御する、化学化合物のための分子基礎、ならびにハイスループットスクリーニングである。

【0118】

また記載されているのは、G R P 9 4 機能のアゴニストおよびアンタゴニスト (“調節剤”)を同定する目的のために容易に活用できる、G R P 9 4 構造および機能の制御のいくつかの新規の独特な態様である。G R P 9 4 発現は、栄養失調、酸化的ストレス、重金属中毒、低酸素/無酸素および虚血に関連する他の状態のような細胞性ストレスにより上方制御される。しかし本発明の開示まで、この活性の基礎を成す分子機構は未知のままであった。したがって、本明細書の記載は、熱ショックがペプチド結合およびG R P 9 4 のシャペロン活性を刺激する観察における熱ショックとの機能的関連である。増加したペプチド結合およびシャペロン活性を負うG R P 9 4 の熱ショック応答は、閉鎖形から開放、活性形へのタンパク質の形態状態の変化の結果である。

【0119】

熱ショック誘導立体変化は、抗腫瘍剤ゲルダナマイシンおよびラディシコールにより遮断でき、したがって、抗腫瘍活性の機構、すなわち、ゲルダナマイシンおよびラディシコールがG R P 9 4 形態変化、したがって、シャペロン活性を遮断する。このような阻害の機能的結果は、成長因子レセプターキナーゼのような癌原性シグナル伝達タンパク質が適切に処理されず、したがって細胞が形質転換に必要な増殖性シグナルを受け取れないことである。したがって、G R P 9 4 の形態を調節する化学化合物は、治療的利点が小胞体からのタンパク質(例えば成長因子)の出口の阻害または手段により提供できる、癌のような疾患状態の処置に使用できる。

【0120】

本発明は、以前抗腫瘍剤ゲルダナマイシンの結合部位として同定された、最近結晶化されたH S P 9 0 のN末端ドメインに結合する、およびG R P 9 4、および、ある場合H S P 9 0 の(ポリ)ペプチド結合活性に劇的なおよび実質的な増加をもたらす立体的変化を誘導する、低分子量分子の同定のための理論的および構造基礎を提供する。別の実施態様において、同定された分子は、ゲルダナマイシンおよび/またはラディシコールによる観察されるG R P 9 4 およびH S P 9 0 の調節と同様に、G R P 9 4、およびある場合H S P 9 0 の形態的活性化を阻害する。

【0121】

本発明は、GRP94およびHSP90機能の調節の機構に関する分野の現在の認知と著しく異なる。現在の観点では、分子シャペロンのHsp90ファミリーは、結合および加水分解のサイクルにより制御されると考えられている(Prodromou et al. (1997) Cell 90:65-75)。Hsp90機能のこの観点は、ATPおよびADPの結合部位を含むタンパク質の非常に保存されたN末端ドメインおよびATPおよび/またはADPとの複合体におけるドメインのX線結晶学構造を得ることができるという観察に基づく。

【0122】

本発明により、HSP90パラログGRP90の関連するおよび適切なドメインが、ATPまたはADPに特異的構造選択性を示さないことを証明するデータを提供する。機能関連試験のシリーズにおいて、出願人はATP、ADP、ゲルダナマイシンおよびラディシコールが、GRP94がシャペロン活性および/またはペプチド結合に必要な形態をとる、GRP94の能力を遮断および阻害することを更に証明している。したがって、GRP94の活性と拮抗する生理学的リガンドより、ATPおよびADPが、このシャペロンの阻害剤として作用する。

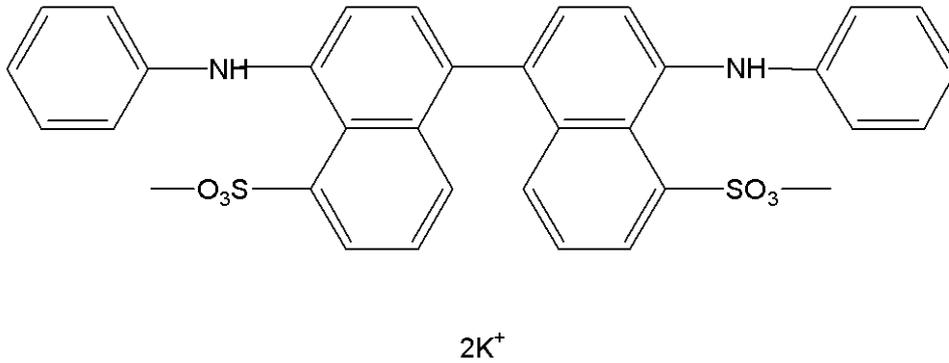
【0123】

GRP94における同定された形態変化は、アデノシンヌクレオチドに類似の構造を担持するbis-ANSが、分子シャペロンおよびペプチド結合活性の活性化を伴う、GRP94における三次元形態変化を誘発することが証明された、実施例で証明したように、GRP94のと調節サイクルの要素である。

【0124】

bis-ANSの構造

【化10】



【0125】

本発明により、また、GRP94の保存的N末端ドメインに結合する、およびA)ペプチド結合および/または分子シャペロン活性のいずれかの活性化を伴うGRP94における形態変化を誘発する、またはB)記載の形態を評価または獲得するために、GRP94の能力を遮断または阻害する低分子量化合物を定義する1級構造決定基である。本発明において、そして、タンパク質構造/機能の制御の分野の当業者に本明細書の記載を検討した後に明白なように、高等真核生物由来の細胞および組織は、2'および5'位にまだ置換基を担持するが、N6アデニンの置換基を各、アデノシンに構造類似性を担持する天然リガンド化合物を含む。

【0126】

したがって、天然リガンドならびにその模倣物は、アデノシン部分(複数もある)を担持し、アデノシン部分は、先にATP/ADP結合ポケットとして定義されたりガンドのGRP94の保存N末端ドメインへの結合において機能する。代表的リガンド組成物は、上記に式(I)および(II)として記載する。更なるリガンドは、好ましくは、アデノシンのリボースに対応する水素結合模倣物、およびアデノシンのアデニン塩基に対応するベンズイミダゾールまたは構造関連骨格を担持する親前駆分子のコンビナトリアルケミストリーを介して同定できる。

【0127】

リガンドの結合は、シャペロンのおよびペプチド結合活性の活性化を伴う形態変化を誘発する。更に、天然リガンドの合成は、タンパク質折りたたみの効率およびERへの凝集の混乱を誘発する状態により刺激されるようである。これらの状態は、熱ショック、酸化的ストレス、栄養失調、オリゴサッカライド合成の混

乱および発生期糖タンパク質への共有結合的凝集および過剰なレベルの重金属の存在を含むが、これらに限定されない。

【0128】

シャペロン活性およびゲルダナマイシンおよびラディシコール作用の機構の測定におけるGRP94構造変化の機能的役割の発見と同時に、GRP94(または別法として、HSP90)の形態状態をアッセイする単純で速い方法を本明細書に記載する。この方法の好ましい実施態様は、小合成蛍光プローブ、bis-ANSの、GRP94の開放、または活性形態への優先的結合に基づく。bis-ANS結合は、プローブ蛍光強度に劇的な増加を産生する。bis-ANSは、本明細書で、GRP94の熱ショック誘導形態変化の非常に感受性のインディケータとして同定されている。更に、bis-ANS自体、ペプチド結合およびシャペロン機能の活性化に必要なGRP94における形態変化を誘発できる。したがって、bis-ANSは、GRP94活性化のアゴニストおよび活性化の相対的状态のインディケータの両方である。bis-ANSは、これらの変化をゆっくりした時間で誘導し、それにより熱ショック-様形態変化のインデューサーならびに他の化合物により誘導される形態変化のプローブとして使用できる。逆に、そして、実施例に記載のように、bis-ANSは、熱ショック-誘導形態変化を遮断する化合物の同定に使用できる。実際、本発明のスクリーニングシステムは、GRP94/HSP90を介して作用することが既知の二つの抗腫瘍剤であるラディシコールおよびゲルダナマイシンが、これらのタンパク質が機能に必要な形態に変換するのを遮断できることを示す。

【0129】

この方法の他の好ましい実施態様は、関連合成蛍光プローブ、8-ANSを使用する。8-ANSはまたGRP94の活性形態への優勢的結合を示す。しかし、bis-ANSと異なり、8-ANSはインディケータとしてのみ作用し、アゴニスト活性を欠く。8-ANSはまたGRP94調節剤の発見のスクリーニングアッセイに有用である。

【0130】

したがって、本発明により、生物学的活性を調節する能力に関して候補物質を

スクリーニングする方法が提供される。スクリーニング法は、GRP94の天然または内因性リガンド(複数もある)の同定にも使用する。

【0131】

一つの実施態様において、候補物質は、GRP94の生物学的活性を、GRP94への結合または分子間相互作用により調節できる可能性のある物質である。“調節する”なる用語は、GRP94の任意のまたは全ての生物学的活性または特性の増加、減少、または他の変更を意味する。したがって、GRP94の天然または内因性リガンド(複数もある)は、また“候補物質”である。天然または内因性リガンド(複数もある)を含むことが疑われる生物学的サンプルも“候補物質”である。小分子および小分子のコンビナトリアルライブラリーも候補“物質”である。本明細書に記載のスクリーニングアッセイにより同定される候補物質は、GRP94生物学的活性を調節する能力を有する。このような候補物質は、GRP94の生物学的活性の調節が望まれる疾患および状態の処置に、および本明細書に記載の精製およびスクリーニング法に有用性がある。

【0132】

本発明は、したがって、分子シャペロンGRP94、またはある場合HSP90における形態変化を誘導または阻害し、それによりこれらのタンパク質のシャペロンおよびペプチド結合を阻害する、化学化合物の分子基礎およびハイスループットスクリーニングに関する。

【0133】

E. 1. 一般的スクリーニング法

GRP94および/またはHSP90生物学的活性を調節する能力に関して候補物質をスクリーニングする方法が、本明細書により提供される。一つの実施態様において、本方法は(a)GRP94タンパク質およびGRP94タンパク質に対するリガンドを含む試験サンプルを確立する；(b)候補物質または候補物質を含むことが疑われるサンプルを試験サンプルに投与する；そして(c)試験サンプル中のGRP94タンパク質とリガンドの結合における候補物質の影響を測定し、それにより、候補物質がGRP94タンパク質の生物学的活性を調節する能力を測定することを含む。

【0134】

試験サンプルは更にインディケーターを含むことができる。“インディケーター”なる用語は、暗対明検出、蛍光または化学ルミネッセンス分光測光法、シンチレーション分光法、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)、比色分析等のような標準検出技術を使用して容易に検出できる化学種または化合物を言及することを意図する。代表的インディケーター化合物は、したがって、蛍光原性または蛍光化合物、化学ルミネッセンス化合物、比色化合物、UV/VIS吸収化合物、放射性核種およびこれらの組合せを含むが、これらに限定されない。好ましい実施態様において、リガンドは更にインディケーターを含む。より好ましい実施態様において、リガンド/インディケーターは1,8-アニリノナフタレンスルホネート(8-ANS)を含む。

【0135】

候補物質がGRP94および/またはHSP90生物学的活性を調節する能力は、任意の適当な方法で測定できる。例えば、候補物質がGRP94および/またはHSP90生物学的活性を調節する能力は:(i)GRP94および/またはHSP90とGRP94および/またはHSP90に対するリガンドの結合における候補物質の影響によりインディケーターにより産生されるシグナルを検出する;そして(ii)コントロールサンプルと比較して産生されたシグナルの量に基づいて候補物質をGRP94および/またはHSP90の生物学的活性の調節剤として同定することにより測定できる。

【0136】

好ましい実施態様において、単純および有効な蛍光ベースのスクリーニング法が、その活性を担うGRP94の形態変化の阻害剤および活性剤を同定するために提供される。本方法は、ロボット利用および非常に高処理量のシステムの両方に容易に修正できる。

【0137】

したがって、一つの実施態様において、本発明のスクリーニング法は、Hsp90タンパク質の生物学的活性の活性剤として候補物質を同定することに関する。好ましい実施態様において、Hsp90タンパク質はGRP94またはHSP

90である。本方法はHsp90タンパク質および候補物質を含む試験サンプルを確立する；試験サンプルに8-ANSを投与する；そして8-ANSにより産生される蛍光シグナルを検出する；そしてコントロールサンプルと比較して、8-ANSにより産生される蛍光シグナルの量に基づいて、Hsp90タンパク質の生物学的活性の活性剤として候補物質を同定することを含む。

【0138】

本方法は、更に、8-ANS添加前に、Hsp90タンパク質を候補物質と、37で約1時間インキュベートすることを更に含む。所望により、8-ANS Hsp90タンパク質とほぼ等モル量で添加することができる。加えて、候補物質コントロールサンプルと比較して増加した8-ANS蛍光シグナルの検出により、Hsp90タンパク質の生物学的活性の活性剤として同定する。

【0139】

他の実施態様において、本発明のスクリーニング法は、Hsp90タンパク質の生物学的活性の阻害剤として候補物質を同定することに関する。本方法は、Hsp90タンパク質と候補物質を含む試験サンプルを確立する；試験サンプルを熱ショックに付し、Hsp90タンパク質に形態的变化を誘導する；8-ANSを試験サンプルに投与する；8-ANSのHsp90タンパク質への結合により産生された蛍光シグナルを検出する；コントロールサンプルと比較して、8-ANSにより産生される蛍光シグナルの量に基づいて、候補物質を、Hsp90タンパク質の生物学的活性の阻害剤として同定することを含む。好ましい実施態様において、Hsp90タンパク質はGRP94またはHSP90である。

【0140】

所望により、本方法は更に試験サンプルを、試験サンプルの熱ショックの前に37で1時間インキュベートすることを含む。熱ショックを50で約15分行なうことができる。好ましくは、8-ANSを、Hsp90タンパク質とほぼ等モル量添加する。候補物質はまたコントロールサンプルと比較して、減少した8-ANSにより産生される蛍光シグナルの検出により、Hsp90タンパク質の生物学的活性の阻害剤として同定できる。

【0141】

E. 2. 細胞ベースのスクリーニングアッセイ

本発明のスクリーニングアッセイはまた候補物質が、GRP94のようなHsp90タンパク質の生物学的活性を調節、すなわち、阻害または促進する、および好ましくは、それにより穂愈的細胞内のGRP94のようなHsp90タンパク質の生物学的活性を調節する、候補物質の能力の測定も含み得る。本発明のポリペプチドを含むことが既知の天然に存在する細胞か、上記に明示のような形質転換の工程に従い製造した形質転換細胞である。試験サンプルは、更にHsp90ポリペプチドを発現する細胞または細胞計を含むことができる；本発明はまた例示法において使用するのに適した組換え細胞系も意図する。このような細胞は哺乳類、またはヒトであり得、またはそれらは酵母を含むが、これに限定されない他の生物由来であり得る。

【0142】

代表的アッセイは、天然Hsp90リガンド(複数もある)を含む、Hsp90または他のHsp90仲介細胞性工程に重要なHsp90相互作用遺伝子を効率的に同定する、遺伝的スクリーニングアッセイおよび酵母2ハイブリッドスクリーニングのような分子生物学的スクリーニングを含む。酵母2ハイブリッドシステムは記載され(Chien et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:9578-9582)、商品としてClontech (Palo Alto, California)から入手可能である。したがって、本発明のスクリーニングアッセイの一つの実施態様により、候補物質を更にポリペプチドとして特徴付けし、スクリーニング法は更に候補ポリペプチドをコードする核酸分子の精製および単離の段階を含むことができる。

【0143】

したがって、高等真核生物の細胞における、GRP94および/またはHSP90リガンドの定常状態およびストレス誘発産生を仲介する酵素も本発明により調節できる。このような異化酵素も天然Hsp90リガンド(例えば、天然GRP94またはHSP90リガンド)の定常状態レベルの増加を誘発し、それにより、Hsp90タンパク質、好ましくはGRP94のシャペロンおよびペプチド結合活性の構造的および機能的活性化の誘発を導く、化合物の設計のための適当なおよび合理的な標的を示す。

【0144】

スクリーニングアッセイは、GRP94のようなHsp90タンパク質の生物学的活性の調節の試験に適切な条件下に細胞を提供できる。これらの実験は、pH、温度、張性、適切な代謝因子の存在(例えば、例えばCa⁺⁺のような金属イオン、成長因子、インターロイキン、またはコロニー刺激因子)、およびグリコシル化またはプレニル化のようなポリペプチドへの適切な修飾を含むが、これらに限定されない。本発明のポリペプチドは、原核生物または真核生物細胞で発現および利用できる。宿主細胞はまたレセプターを見ることができると細胞フラクションに分画もできる。例えば、ポリペプチドを発現する細胞を、核、小胞体、液胞、または細胞の膜表面に分画できる。米国特許第5,837,479号；第5,645,999号；第5,786,152号；第5,739,278号；および第5,352,660号も例示的スクリーニングアッセイを記載し、各々のその全体の内容を出展明示により本明細書に包含させる。

【0145】

E. 3. ハイスループットスクリーニング

本発明のスクリーニング法の他の実施態様において、Hsp90ポリペプチド(例えば、ヒトGRP94)またはその活性フラグメントまたはオリゴペプチドは、任意の種々のハイスループット医薬スクリーニング技術における化合物のライブラリーのスクリーニングに使用できる。このようなスクリーニングに用いるフラグメントは、溶液中に遊離し、固体支持体付着し、細胞表面に負われ、または細胞内に位置し得る。Hsp90ポリペプチド、好ましくはGRP94ポリペプチド、試験する候補物質の間の結合複合体の形成は、本明細書に記載のように測定できる。

【0146】

E. 4. 合理的医薬設計

合理的医薬設計によりHsp90タンパク質の調節剤を同定する方法も本発明により提供される。本方法は、Hsp90タンパク質、好ましくはGRP94の構造をベースにした基質結合部位におけるアミノ酸と非共有結合的結合を形成する、Hsp90タンパク質の可能性のある調節剤を設計する；調節剤を合成する

；そして可能性のある調節剤がH s p 9 0タンパク質の活性を調節するかどうかを測定することを含む。調節剤は当分野で既知の方法により合成し得る。調節剤がH s p 9 0タンパク質の生物学的活性を調節する調節剤であるかの測定は、本明細書に記載のスクリーニング法により成すか、または当分野で既知の他のスクリーニング法により成す。これが、“合理的”医薬設計の方法である。

【0147】

更なる代表的合理的医薬設計技術は、その全体を出展明示により本明細書に含ませる米国特許第5,834,228号および第5,872,011号に記載されている。

【0148】

したがって、合理的医薬設計によるH s p 9 0タンパク質の調節剤の同定法が、本発明により提供される。本方法は、H s p 9 0タンパク質の結晶構造をベースにした基質結合部位におけるアミノ酸と非共有結合的結合を形成する、H s p 9 0タンパク質の可能性のある調節剤を設計する；調節剤を合成する；そして可能性のある調節剤がH s p 9 0タンパク質の活性を調節するかどうかを測定することを含む。調節剤は当分野で既知の方法により合成し得る。調節剤がH s p 9 0タンパク質の生物学的活性を調節する調節剤であるかの測定は、本明細書に記載のスクリーニング法により成すか、または当分野で既知の他のスクリーニング法により成す。好ましい実施態様において、H s p 9 0タンパク質はGRP94である。

【0149】

F. H s p 9 0生物学的活性の調節

H s p 9 0タンパク質が、人体の本質的に全ての細胞に見られ、多くの異なる細胞性タンパク質のプロセッシングならびに免疫系への腫瘍および外来抗原の提示に関与するため、本発明のスクリーニング法により同定された化合物(“リガンド組成物”または“調節剤”と呼ぶ)は、治療およびワクチン開発において広範囲の価値を有する。代表的リガンド組成物または調節剤は、本明細書に式(I)として上記である。アデノシンに構造的に似てない調節剤も提供され、上記の合理的医薬設計およびコンビナトリアルスクリーニング法により設計および/また

は同定されるものを含む、

【0150】

好ましい実施態様において、Hsp90調節剤は、Hsp90タンパク質における形態変化を誘導する。より更に好ましくは、Hsp90タンパク質活性調節剤は、本明細書に記載のスクリーニングアッセイに従い同定される。調節剤は、GRP94のようなHsp90タンパク質の生物学的活性を調節できる。GRP94およびHSP90の抗原提示活性に関連して、その活性剤をインビトロで適用し、これらの特異的ペプチドエピトープをプロセッシングする組織または侵襲性生物に対するワクチンの製造のためのこれらのタンパク質のペプチド充填の助けとなることができる。GRP94/HSP90生物学的活性の活性剤を、癌患者から抽出した腫瘍細胞に提供し、細胞の致死的不活性化の前にこの腫瘍細胞の抗原性を増加させ、免疫刺激剤として体内に再注入できる。GRP94/HSP90生物学的活性の活性剤は、その場で腫瘍の抗原性を増加するために、脊椎動物に直接投与できる。GRP94/HSP90生物学的活性の活性剤はまた細菌、ウイルスまたは体内寄生虫に対する抗体的作用も、適応できる免疫系により、細菌、ウイルスまたは寄生虫の抗原性およびその認識を増加させることにより、有することができる。GRP94/HSP90生物学的活性の活性剤は、更に、特異的抗腫瘍、抗ウイルス、または抗細菌エピトープを示すコンビナトリアルライブラリーからペプチドを同定するための更なるスクリーニングに使用できる。GRP94およびHSP90のシャペロン活性に関連して、その活性剤はまた虚血状態に由来する細胞性損傷を軽減または予防する。

【0151】

GRP94/HSP90機能の阻害剤は、抗腫瘍活性を有することができる。GRP94/HSP90機能の阻害剤はまたその感染状態におけるウイルスまたは細菌タンパク質のプロセッシングを緩衝し、これらの感染の進行を遅くできる。GRP94/HSP90機能の阻害剤は、また脊椎動物被検体に、移植組織拒絶反応を軽減するために、または関節リウマチおよび全身性エリテマトーデスのような自己免疫疾患の進行を遅くするために、組織の抗原性を減少するために投与できる。GRP94活性の阻害剤はまた小胞体からのタンパク質(例えば成長

因子レセプター)の出口の阻害または遮断により、癌のような疾患の処置に使用できる。

【0152】

本発明により調節するGRP94のようなHsp90タンパク質の生物学的活性は、抗原性分子との複合体の形成における活性の充填、被検体における免疫応答の誘発；被検体における一つのタイプの癌の処置または予防；特に、一つのタイプの癌または感染性疾患に関する抗原提示細胞(APC)の感作；そして小胞体に沿ったタンパク質輸送の促進を含むが、これらに限定されない。

【0153】

Hsp90タンパク質の他の調節できる生物学的活性は、心停止、アジストリーおよび持続性心室性不整脈、心臓手術、心肺バイパス手術、臓器移植、脊髄損傷、頭部外傷、卒中、血栓塞栓性卒中、出血性卒中、脳血管痙攣、低血圧、低血糖、癲癇重積症、癲癇発作、不安、精神分裂病、神経退行性疾患、アルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、または新生児ストレスを含むが、これらに限定されない虚血/再灌流の状態に起因する細胞性損傷の予防または期限を含む。この場合、リガンドは内因性Hsp90タンパク質を、Hsp90タンパク質の係蹄的活性化の促進により調節できる。好ましくは、リガンドを、本明細書に記載のスクリーニングまたは合理的薬剤設計法により同定し、それはGRP94またはHSP90の調節に関連する。

【0154】

F. 1 GRP94 - 抗原性分子複合体のインビトロ製造

本発明により、GRP94のようなHsp90タンパク質の抗原性分子への複合体が、インビトロでHsp90タンパク質活性調節剤を使用して産生する。糖業者に認識されるように、本明細書に記載の方法により単離した、化学的合成した、または組換え的に製造したペプチドを、種々の天然に精製したまたは組換えHsp90タンパク質と、インビトロで再構築し、例えば、免疫原性非共有結合的GRP94 - 抗原性分子複合体を産生できる。あるいは、外来性抗原または抗原性/免疫原性フラグメントまたはそれらの誘導体を、本発明の免疫治療的または予防的ワクチンに使用するためのHsp90タンパク質と非共有結合的に複合

体かできる。複合体を次いで適当な方法を使用して精製でき、好ましくは、上記の本発明に記載の親和性精製を介して精製する。

【0155】

代表的試みにおいて、抗原性分子(1 μ g)およびGRP94(9 μ g)を混合し、約5 抗原性分子：1 GRP94モル比を得る。次いで、混合物を15分から3時間、4 から45 で、GRP94と定量的に等モルのbis-ANSと、20mM リン酸ナトリウム、pH 7.2、350mM NaCl、3mM mgCl_2 および1mM pフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)を含むもののような適当な結合緩衝剤中、インキュベートする。調節物を、CENTRICON(登録商標)10アッセンブリー(Amicon of Beverly, Massachusetts)を通して遠心し、非結合ペプチドを除去する。ペプチドとGRP94の会合を、SDS-PAGEによりアッセイできる。更なる代表的試みは、実施例に記載する。

【0156】

複合体形成に続き、免疫原性GRP94-抗原性分子複合体を、所望により、インビトロで、例えば、本明細書に記載の混合リンパ球腫瘍細胞アッセイ(MLTC)でアッセイできる。免疫原性複合体を単離したら、それらは所望により、更に、本明細書に記載の好ましい投与プロトコールおよび賦形剤を使用して、動物モデルで特徴付けできる。

【0157】

F. 1. 1 外来性抗原性分子

それらの抗原または抗原性部分は、抗体またはMHC分子に結合する能力(抗原性)または免疫応答を産生する能力(免疫原性)により当分野で既知の標準免疫アッセイにより容易に同定されるものから、GRP94のようなHsp90タンパク質との複合体形成に使用するための抗原性分子として選択できる。疫原性または抗原性を、抗体への結合の検出により測定するために、放射免疫アッセイ、ELISA(酵素免疫測定法)、“サンドイッチ”免疫アッセイ、免疫放射定量測定法、ゲル内沈降反応、免疫拡散アッセイ、インビボ免疫アッセイ(例えば、コロイド状金、酵素、または放射性同位体標識を使用した)、ウェスタンブロット

、免疫沈降反応、凝集アッセイ(例えば、ゲル凝集アッセイ、赤血球凝集アッセイ)、補体固定アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテインAアッセイおよび免疫電気泳動アッセイ等のような技術を使用した競合的および非競合的アッセイ系を含むが、これらに限定されない、当分野で既知の種々の免疫アッセイを使用できる。

【0158】

一つの実施態様において、抗体結合は一次抗体上の標識の検出により検出する。他の実施態様において、一次抗体を、一次抗体への二次抗体または試薬の結合の検出により検出する。更なる実施態様において、二次抗体を標識する。免疫アッセイにおける結合の検出に関する分野で多くの方法および技術が既知であり、使用できる。免疫原性の検出のための一つの実施態様において、T細胞仲介応答を、標準法、例えば、インビトロ細胞毒性アッセイまたはインビボ遅延型過敏症アッセイにより検出できる。

【0159】

抗原性分子として使用するために恐らく有用である抗原またはその誘導体は、また、病原体感染の中和における抗原の関与(Norrby (1985) "Summary" in Vaccines 85, Lerner et al. (eds.), pp. 388-389, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York)、タイプまたはグループ特異性、被検体の抗血清または免疫細胞における認識、および/または抗原に特異的な抗血清または免疫細胞の防御的効果の証明のような、種々の基準により同定できる。加えて、病原体による疾患の処置または予防が望まれる場合、抗原がコードするエピトープは、好ましくは、抗原性変異を同時に、または種々の同じ病原体の異なる単離物を全く示さないか、ほんのわずかししか示すべきではない。

【0160】

好ましくは、癌を処置または予防することが望ましい場合、既知の腫瘍特異的抗原またはそれらのフラグメントまたは誘導体を使用する。例えば、このような腫瘍特異的または腫瘍関連抗原は、K S 1 / 4 p a n - 癌腫抗原((Perez & Walker (1990) J Immunol 142:3662-3667; Bumal (1988) Hybridoma 7(4):407-415) ; 卵巣癌腫抗原(C A 1 2 5)(Yu et al. (1991) Cancer Res 51(2):468-475) ;

プロスタティク・アシッド・ホスフェート(Tailer et al. (1990) *Nuc Acids Res* 18(16):4928) ; 前立腺特異的抗原(Henttu & Vihko (1989) *Biochem Biophys Res Comm* 160(2):903-910; Israeli et al. (1993) *Cancer Res* 53:227-230) ; 黒色腫 - 関連抗原 p 9 7 (Estin et al. (1989) *J Natl Cancer Inst* 81(6):445-446) ; 黒色腫抗原 g p 7 5 (Vijayasardahl et al. (1990) *J Exp Med* 171(4):1375-1380) ; 高分子量黒色腫抗原(Natali et al. (1987) *Cancer* 59:55-63)および前立腺特異的膜抗原を含むが、これらに限定されない。具体的実施態様において、ある腫瘍に特異的な、抗原またはそれらのフラグメントまたは誘導体を、GRP 94のようなHsp90タンパク質との複合体形成、続く腫瘍を有する被検体への投与に使用する。

【0161】

好ましくは、ウイルス疾患の処置または予防が望まれる場合、既知のウイルスのエピトープを含む分子を使用する。例えば、このような抗原性エピトープは、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウイルス、I型単純疱疹(HSV-I)、II型単純疱疹(HSV-II)、牛痘、ライノウイルス、エコーウイルス、ロータウイルス、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、乳頭腫ウイルス、パポーベウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス(echinovirus)、アルボウイルス、ヒュアンタウイルス(huntavirus)、コクサッキーウイルス、ムンプス・ウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、I型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-I)およびII型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-II)を含むが、これらに限定されないウイルスから調製できる。好ましくは、細菌感染の処置または予防が望まれる場合、既知の細菌のエピトープを含む分子を使用する。例えば、このような抗原性エピトープは、Mycobacteria、Mycoplasma、NeisseriaおよびLegionellaを含むが、これらに限定されない細菌から調製できる。

【0162】

好ましくは、原生動物感染の処置または予防が望まれる場合、既知の原生動物のエピトープを含む分子を使用する。例えば、このような抗原性エピトープは、Leishmania、KokzidioaおよびTrypanosomaを含むが、これらに限定されない原生動物から調製できる。好ましくは、寄生虫感染の処置または予防が望まれる場合

、既知の寄生虫のエピトープを含む分子を使用する。例えば、このような抗原性エピトープは、ChlamydiaおよびRickettsiaを含むが、これらに限定されない寄生虫から調製できる。

【0163】

F. 1. 2. MHC複合体からのペプチド

候補免疫原性または抗原性ペプチドは、内因性Hsp90 - ペプチド複合体から上記のように、または続いて抗原性分子として使用するための内因性MHC - ペプチド複合体から、インビトロでGRP94のようなHsp90タンパク質に複合体化することにより単離できる。MHC分子からの恐らく免疫原性であるペプチドの単離は、当分野で既知であり、したがって本明細書に詳述しない。その内容を出展明示により本明細書に包含させるFalk et al. (1990) Nature 348:248-251; Rotzsche et al. (1990) Nature 348:252-254; Elliott et al. (1990) Nature 348:191-197; Falk et al. (1991) Nature 351:290-296; Demotz et al. (1989) Nature 343:682-684; Rotzsche et al. (1990) Science 249:283-287参照。簡単に、MHC - ペプチド複合体を、慣用の免疫親和性方法により単離できる。ペプチドを次いでMHC - ペプチド複合体から、約0.1% TFAのアセトニトリル溶液の存在下、複合体をインキュベートすることにより単離溶出できる。溶出ペプチドを、本明細書に記載のようにHPLCにより分画および精製できる。

【0164】

F. 2. Hsp90生物学的活性を調節するための治療法

本発明の治療法は、GRP94のようなHsp90タンパク質の生物学的活性を調節、すなわち、阻害または促進する物質を必要とする被検体に投与することを含む。代表的物質は、また“リガンド組成物”または“調節剤”と呼ぶが、本明細書に記載されており(例えば、式(I)の化合物)本明細書に明示の任意のスクリーニングアッセイによりまた同定できる。その方法は、有効量のHsp90調節剤を投与することによる、Hsp90タンパク質の生物学的活性の調節が必要な疾患に罹患している被検体の処置法を含む。好ましくは、Hsp90タンパク質はGRP94である。より好ましくは、調節剤は、Hsp90タンパク質の形

態変化を誘導する。より更に好ましくは、調節剤を本明細書に記載のスクリーニングアッセイにより同定する。

【0165】

“調節する”なる用語により、Hsp90タンパク質の活性を、処置する疾患の状態に依存して促進または阻害し、1個または数個のGRP94を含むHsp90タンパク質に影響できる物質を意味する。投与は、癌、感染性疾患および虚血性状態を含むがこれらに限定されない、GRP94/HSP90-仲介機構により悪化し得る疾患の処置を提供できる。

【0166】

多くの実施態様において本発明により処置する被検体は、望ましくはヒト被検体であるが、本発明の原則は、本発明が、“被検体”なる用語に包含することを意図する、無脊椎動物および、哺乳類を含む全ての脊椎動物に関して有効であることを示すことは理解されよう。これは、Hsp90タンパク質の系統発生的偏在性質の観点から特に当てはまる。更に、哺乳類は、癌または感染性疾患の処置または予防が望まれる任意の哺乳類種、特に、農業的および家畜的哺乳動物種を含むと理解されよう。

【0167】

本発明の方法は、特に温血脊椎動物の処置に有用である。したがって、本発明は哺乳類および鳥類に関する。

【0168】

より具体的に、意図されるのはヒトのような哺乳類、ならびに絶滅の危機に瀕しているために重要な(シベリアンタイガーのような)、ヒトのために経済的に重要な(ヒトが消費するために農家で飼育されている動物)および/または社会的に重要な(ペットとしてまたは動物園で飼育)哺乳類、例えば、ヒト以外の食肉動物(ネコおよびイヌのうのような)、スワイン(ブタ、ホッグおよびイノシシ)、反芻動物(畜牛、牡牛、ヒツジ、キリン、シカ、バイソンおよびラクダ)、および馬の処置である。また、意図されるのは、絶滅の危機に瀕している、動物園にいる、ならびに家禽である種類の鳥の処置を含む鳥の処置、およびより特には、ヒトにとってまた重要であるため、家畜化された家禽、すなわち、七面鳥、鶏、アヒル、

ガチョウ、ホロホロチョウ等のような飼鳥類である。したがって、意図されるのは、家畜化スワイン(ブタおよびホッグ)、反芻動物、馬、飼鳥類等を含むが、これらに限定されない家畜の処置である。

【0169】

一つの実施態様において、リガンド組成物または調節剤を、H s p 9 0 タンパク質(好ましくはG R P 9 4 またはH S P 9 0)および抗原性分子を含む複合体と関連して投与する。好ましくは、被検体に対して“自己”である;すなわち、複合体を、被検体の感染細胞または癌細胞または前癌細胞かのいずれかから単離する(例えば、好ましくは被検体の単離組織または腫瘍生検から調製する)。より好ましくは、複合体を、本明細書に上記の本発明の精製法により精製する。

【0170】

あるいは、複合体をインビトロで製造する(例えば、外来性抗原性分子との複合体が望まれる場合)。あるいは、H s p 9 0 タンパク質(好ましくはG R P 9 4 またはH S P 9 0)および/または抗原性分子を特定の被検体、または他から、または、特定の脊椎動物被検体または他に本来由来するクローン化H s p 9 0 タンパク質(好ましくはG R P 9 4 またはH S P 9 0)を使用した組換え製造法により単離する。H s p 9 0 タンパク質との複合体化に使用する外来性抗原およびフラグメントおよび誘導體(ペプチドおよび非-ペプチドの両方)は、当分野で既知のものから選択でき、および、抗体またはM H C 分子に結合する能力(抗原性)または免疫応答を産生する能力(免疫原性)により当分野で既知の標準免疫アッセイにより容易に同定されるものから選択できる。H s p 9 0 タンパク質(好ましくはG R P 9 4 またはH S P 9 0)および抗原性分子の複合体は、被検体の癌または前癌組織から、または癌細胞系から単離でき、またはインビトロで製造できる(外来性抗原を抗原性分子として使用する実施対応において必要なように)。好ましくは、複合体を、本明細書に上記の本発明の精製法により精製する。

【0171】

本発明はまた、G R P 9 4 生物学的活性調節剤に関連して、G R P 9 4 および腫瘍に特異的な抗原分子を含む複合体を投与した後に、腫瘍に特異的なM H C クラス I 限定C D 8 +細胞毒性Tリンパ球の被検体による産生を測定することを含

む、被検体、好ましくはヒト被検体におけるインビボ腫瘍拒絶を測定する方法も提供する。好ましくは、GRP94はヒトGRP94を含む。本発明の免疫原性GRP94-ペプチド複合体は、GRP94および被検体で免疫応答を誘発できるペプチドを含む任意の複合体を含む。ペプチドは、好ましくはGRP94と非共有結合的に会合している。

【0172】

Hsp90タンパク質は被検体に対して異質遺伝的であり得るが(例えば、処置する第1脊椎動物被検体に存在する癌組織と同じタイプである第2脊椎動物被検体の癌組織から単離)、好ましい実施態様において、Hsp90タンパク質は、投与する被検体の自己である(由来する)。Hsp90タンパク質および/または抗原性分子は、天然源から精製でき、化学的に合成でき、または組換え的に製造できる。好ましくは、複合体および/または抗原性分子を、本明細書に上記の本発明の精製法により精製する。本発明は、実験的腫瘍モデルにおいてペプチド複合体に非共有結合的に結合するHsp90タンパク質の最適量を評価し、データを外挿することによる、ヒト癌免疫治療のための投与量の決定法を提供する。具体的に、動物で概算した有効量の5倍増加を超えない倍率を、ヒト被検体における癌免疫治療またはワクチン摂取の最適処方として使用する。好ましくは、Hsp90タンパク質はGRP94である。

【0173】

本発明は、宿主固体の免疫能力を促進し、感染減に対する特異的免疫性、または前新生物および新生物細胞に対する特異的免疫性を誘発する、組成物の組合せを提供する。本明細書の治療的レジメおよび医薬組成物を下に記載する。これらの組成物は、感染性疾患の発症および進行を予防し、腫瘍細胞の発症を予防し、腫瘍細胞の増殖および進行を阻害し、このような組成物が感染性疾患および癌免疫治療における特異的免疫を誘導できることを示す。例えば、Hsp90-抗原性分子複合体を、カルレティキュリンのような他の複合体、および抗原分子と組み合わせる本発明の方法により投与できる。

【0174】

したがって、本発明は被検体における癌の予防および処置法を提供する。代表

的方法は、治療的有効量のH s p 9 0調節剤(好ましくはG R P 9 4調節剤)を必要とする被検体に投与することを含む。このような被検体は、癌に罹患しているか、癌の発症の危険性がある被検体を含むが、これらに限定されない。本方法に用いることができる代表的調節剤は、G R P 9 4機能(H s p 9 0)機能を阻害できるリガンドを含む。このようなリガンドは、本明細書に記載のスクリーニング方法を使用して設計および同定し、したがって、抗腫瘍剤、および/または抗新生物剤として使用する。これらの活性剤の特徴付けは、本明細書に記載のおよび当分野で既知の方法により達成できる。

【0175】

別の態様において、本発明方法は、H s p 9 0タンパク質および直接関係のある抗原性分子を、宿主個体の免疫能を刺激し、前新生物および/または新生物細胞に対する特異免疫を誘導する調節剤と共に含む複合体を投与することを含む。好ましくは、H s p 9 0タンパク質はG R P 9 4である。

【0176】

ここで使用されている「前新生物」細胞は、正常から新生物形態へのトランジション状態にある細胞を包含し、形態学的証拠については、分子生物学試験による立証が漸増的に進んでおり、前新生物が多段階を通じて発達することを示している。非新生物細胞増殖は、一般に過形成、化生、または非常に著しくは形成異常により構成される(上記の異常な増殖状態の概説については、Robbins & Angel I (1976) Basic Pathology, 2d Ed., pp. 68-79, W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania参照)。

【0177】

過形成は、構造または機能の顕著な変化は存在しない、組織または臓器における細胞数の増加を伴う細胞増殖抑制形態である。ほんの一例として、子宮内膜過形成は、子宮内膜癌に先行することが多い。化生は、ある型の成熟または完全分化細胞が別の型の成熟細胞に置き換わる細胞増殖抑制形態である。化生は、上皮または結合組織細胞に発生し得る。異型性化生は、幾分異常な化生上皮を伴う。形成異常は、癌の前兆であることが多く、主に上皮から見出される。これは、個々の細胞の均一性および細胞の構造的方向性の喪失を伴う、非新生物細胞増殖

の最も異常な形態である。形成異常細胞は、異常に大きな、濃く染色された核を有し、多態性を呈することが多い。形成異常は、特徴として慢性的な刺激または炎症が存在するところに発生し、子宮頸部、呼吸通路、口腔および胆嚢で見出されることが多い。前新生物病変は新生物へ進行し得るが、それらはまた長期間安定したまま残存し得、特に刺激因子が除去された場合または病変がその宿主による免疫学的攻撃に負けた場合には、後退することさえあり得る。

【0178】

本発明の治療法および医薬組成物は、追加的アジュバントまたは生物応答修飾因子、例えば限定されるわけではないが、サイトカイン類IFN- α 、IFN- β 、IL-2、IL-4、IL-6、TNFまたは免疫細胞に作用する他のサイトカインと共に使用され得る。本発明のこの態様によると、調節剤と共にHsp90タンパク質および抗原性分子を含む複合体は、これらのサイトカイン類の1種またはそれ以上との組み合わせ治療で投与される。好ましくは、Hsp90タンパク質はGRP94である。

【0179】

本発明はまた、家族の病歴または環境的危険因子故に癌のリスクが高い個体へのHsp90タンパク質および抗原性分子および調節剤から成る複合体の投与に関するものである。好ましくは、Hsp90タンパク質はGRP94である。

【0180】

天然GRP94リガンドの定常状態およびストレス誘発による生成を仲介する高等真核生物の細胞における酵素もまた、本発明に従い変調され得る。特に、上記異化酵素は、変調に適した合理的な標的を代表するもので、天然GRP94リガンドの定常状態レベルの増加を誘発することにより、ここに開示されたGRP94のシャペロンおよびペプチド結合活性の構造的および機能的活性化の誘発を導く。

【0181】

タンパク質ミスフォールディング(折りたたみ違い)障害は、限定されるわけではないが、嚢胞性線維症、家族性高コレステロール血症、色素性網膜炎および1-抗トリプシンミスフォールディングを含む多様な遺伝的疾患状態の共通構成

要素である。従って、分子シャペロンのH s p 9 0群の活性を変調する化合物は、本発明治療方法に従って使用されることにより、病状を識別するタンパク質折りたたみの欠陥を除去し、細胞の小胞体からのタンパク質輸送を向上させ得る。すなわち、G R P 9 4の配座を変調する化合物を用いることにより、小胞体への、または小胞体からのタンパク質輸送における欠陥から生じる病状が処置され得る。G R P 9 4活性を排除する化合物は、疾患状態、例えば癌の処置に使用され得、その場合治療効果は小胞体からのタンパク質(例、成長因子)の出口を遮断することにより提供され得る。逆に、G R P 9 4活性を促進する化合物は、小胞体からのタンパク質輸出を高めることにより治療効果があげられ得る病気の処置に使用され得る。

【0182】

本発明はまた、限定されるわけではないが、心停止、不全収縮および持続的心室不整脈、心臓手術、心肺バイパス手術、臓器移植、脊椎損傷、頭部外傷、卒中、出血性発作、血栓塞栓症発作、脳血管痙攣、低血圧症、低血糖症、てんかん重積持続状態、てんかん発作、不安、精神分裂病、神経変性疾患、アルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮側索硬化症(A L S)、または新生児ストレスを含む虚血/再灌流状態から生じる細胞損傷の予防または改善用化合物の投与に関するものである。一態様において、H s p 9 0リガンドを含む組成物は、H s p 9 0タンパク質の立体配座的活性化を促進すべく投与され、それにより損傷後の回復または虚血に伴う病的状態の兆候に直接関連のあるその細胞防御機能が促進される。別の態様では、H s p 9 0リガンドを含む組成物の投与により、被検体におけるある組織位置での虚血状態に対する後続細胞応答が改変され得る。その組織位置にある細胞をH s p 9 0タンパク質リガンドと接触させることにより、細胞におけるH s p 9 0活性は虚血状態に対する後続細胞応答の改変に有効な程度まで高められる。好ましくは、治療組成物は、ここに開示されたスクリーニングまたは合理的な薬剤設計方法により同定されたりガンドを含む。また好ましくは、治療組成物は、G R P 9 4またはH S P 9 0の活性を変調する。

【0183】

F . 3 . 用量摂取法

この発明の医薬組成物における有効成分の実際の用量レベルは、特定被検体にとって望ましい治療応答を達成するのに有効な活性化合物(複数も可)の量が投与されるように変えられ得る。選択された用量レベルは、特定化合物の活性、投与経路、処置されている状態の重症度および処置されている被検体の状態および以前の病歴により異なる。しかしながら、所望の治療効果の達成に要求されるよりも低いレベルの化合物用量から開始し、所望の効果が達成されるまで徐々に用量を増やすことも、当業界の専門技術の範囲内に含まれる。所望ならば、有効一日用量は、投与目的に応じて多用量、例えば一日当たり2～4回の個別用量に分割され得る。しかしながら、特定被検体に関する具体的用量レベルは、体重、全般的健康状態、食餌療法、投与の時間および経路、他の薬剤との組み合わせおよび処置されている特定疾患の重症度を含む様々な因子により異なることが理解されるはずである。

【0184】

調節剤の投与に関する用量範囲は、調節剤の形態およびその効力により異なり、本明細書でさらに記載されているように、所望の効果を生じさせるのに十分な程度大量である。用量は、有害な副作用、例えば過粘稠度症候群、肺水腫、うっ血性心疾患などを誘発するほど多量にすべきではない。一般的に、用量は、患者の年齢、状態、性別および病気の程度により変化し、当技術分野の一熟練者により決定され得る。また用量は、何らかの合併症の事象がある場合には個々の医師により調節され得る。

【0185】

治療組成物は、単位用量として投与され得る。本発明方法で使用される治療組成物に関して「単位用量」の語が使用されているとき、それは、被検体にとっての単位用量として適した物理的に独立した単位を包含し、各単位は、必要とされる希釈剤、すなわち担体または賦形剤と共に所望の治療効果を生じさせるように計算された活性物質の予め定められた量を含有する。

【0186】

組成物は、用量製剤と適合し得る方法および治療有効量で投与される。投与される量は、処置される被検体、被検体系の有効成分利用能、および所望される治

療効果の程度により異なる。投与される必要がある有効成分の正確な量は、開業医の判断により異なり、各個体に特有なものである。しかしながら、全身適用に適した用量範囲は本明細書に開示されており、投与経路により異なる。適当な投与体制もまた変化し得るが、初回投与後後続注射または他の投与方法による1またはそれ以上の時間間隔での反復用量を典型的な特徴とする。別法として、インビボ治療について特定された範囲での血中濃度を維持するのに十分な連続静脈注入も実施され得る。

【0187】

治療有効量は、処置されている被検体におけるH s p 9 0タンパク質(好ましくはG R P 9 4)生物活性の測定可能な変調を誘発するのに十分な調節剤の量、すなわちH s p 9 0タンパク質生物活性変調量である。H s pタンパク質生物活性の変調は、ここに開示されたスクリーニング方法を用いて、実施例に開示された方法により、または当業界の熟練者には公知である他の方法により測定され得る。

【0188】

調節剤の効力は変化し得るため、“治療有効”量も変化し得る。しかしながら、本検定方法により示されたところによると、当業界の熟練者によれば、この発明の候補調節剤の効力および有効性は容易に評価され、従って治療体制も調節され得る。H s p 9 0タンパク質(好ましくはG R P 9 4)生物活性の調節剤は、ここに開示されたスクリーニング方法を含む様々な方法および技術により評価され得る。

【0189】

好ましい調節剤は、1マイクロモル(μM)未満、好ましくは0.1 μM 未満、およびさらに好ましくは0.01 μM 未満の調節剤濃度での溶解状態でH s p 9 0タンパク質と実質的に結合する能力を有する。「実質的に」とは、調節剤の存在下における変調により生物活性の少なくとも50パーセント低減化が観察されることを意味し、そして50%低減化はここでは「IC50値」と称する。

【0190】

一態様において、調節剤の治療有効量は、一日当たりそれぞれ約0.01 mg

～約10000mgの範囲であり得る。別法として、調節剤の治療有効量は、一日当たりそれぞれ約0.1mg～約1000mgの範囲であり得る。別法として、調節剤の治療有効量は、一日当たりそれぞれ約1mg～約300mgの範囲であり得る。好ましい態様において、調節剤の治療有効量は、それぞれ一日当たり体重1kgにつき約15mgから、一日当たり体重1kgにつき約35mgの範囲であり得る。

【0191】

マウスにおいて腫瘍退縮を誘発するペプチド複合体と非共有結合的に結合した最低用量の熱ショックタンパク質は、体重20-25gのマウス一匹につき10および25マイクログラム間である(25mg/25g=1mg/kgに等しい)ことが実験的腫瘍モデル(Blachereら、1993)において確立された。慣用的方法は、体重および表面積に基づいてヒト用量に外挿する。例えば、体重に基いたヒト用量の慣用的外挿方法は次の要領で実施され得る。すなわち、マウス用量をヒト用量に変換するための変換係数は、1kg当たりのヒト用量=1kg当たりのマウス用量×12であるため(Freireich et al. (1966) Cancer Chemotherap Rep 50:219-244)、体重70kgのヒトにおけるHsp90-ペプチド複合体の有効用量は、当然1mg/kg÷12×70、すなわち約6mg(5.8mg)となる。

【0192】

この方法は体重ではなくある種の代謝および排出機能との良好な相関関係を達成するため(Shirkey (1965) JAMA 193:443)、薬剤用量はまた、体表面積1平方メートル当たりのミリグラム数で与えられる。さらに、体表面積は、Freireichらにより(1966)Cancer Chemotherap Rep 50:219-244に記載された通り成人および子供並びに異なる動物種における薬剤用量の共通分母として使用され得る。簡単に述べると、同等のmg/m²(平方メートル)用量として所定の種におけるmg/kg用量を表すためには、用量に適当なkm係数を乗じる。成人の場合、100mg/kgは100mg/kg×37kg/m²=3700mg/m²に等しい。

【0193】

国際公開番号WO95/24923、WO97/10000、WO97/10002およびWO98/34641並びに米国特許第5750119、5830464および5837251号は、各々熱ショックタンパク質および抗原性分子の精製複合体の用量を提供しており、これらの各文献の全内容は出典明示により本明細書の一部とする。簡単に述べると、そして本発明に適用されている通り、ヒト被検体については約10マイクログラム～約600マイクログラムの範囲に含まれるHsp90タンパク質(好ましくはGRP94)-抗原性分子複合体の量が投与され、好ましいヒト用量は25gマウスに使用されるのと同じ、すなわち10-100マイクログラムの範囲内である。本発明により提供されるヒト被検体におけるHsp90タンパク質(好ましくはGRP94)-ペプチド複合体に関する用量は、約50～5000マイクログラムの範囲であり、好ましい用量は100マイクログラムである。

【0194】

一連の好ましい態様およびより好ましい態様では、Hsp90-ペプチド複合体は、約50マイクログラム未満の量で投与される。この場合、Hsp90タンパク質(好ましくはGRP94)-ペプチド複合体は、好ましくは約5～約49マイクログラムの範囲の量で投与される。好ましい態様において、GRP94-ペプチド複合体は、約10マイクログラム未満の量で投与される。この場合、GRP94-ペプチド複合体は、好ましくは約0.1～約9.0マイクログラムの範囲の量で投与される。さらに好ましくは、GRP94-ペプチド複合体は、約0.5～約2.0マイクログラムの範囲の量で投与される。本発明の一態様によると、調節剤も投与されるときには低用量の複合体の投与が容易となり、好ましい。

【0195】

上記で列挙された用量は、好ましくは約4-6週間の期間週に1回実施され、そして投与方法または部位は、好ましくは各投与ごとに変えられる。好ましい例では、各投与部位を連続的に変えながら皮下投与が実施される。例えば、同じ日に半用量が一部位に与えられ、他の半用量が他の部位に与えられ得る。

【0196】

別法として、投与方法は連続的に変えられる。例えば、週単位の注射は、皮下

、筋肉内、静脈内または腹腔内経路で次々と実施される。4 - 5 週間後、さらなる注射は、好ましくは1ヶ月の期間にわたって2週間隔で実施される。後の注射は月ごとに実施され得る。後の注射のペースは、被検体の臨床経過および免疫治療に対する応答性により修正され得る。

【0197】

F.4. 癌に対する免疫応答に関する治療組成物

抗原性分子に結合した(例、GRP94 - 好ましくは非共有結合的に結合した)Hsp90タンパク質を含む組成物を投与することにより、複合抗原性分子に対する(そして好ましくはHSP90タンパク質に対するものではない)有効な特異的免疫応答が誘発される。好ましい態様では、ペプチドとのHsp90タンパク質の非共有結合複合体を製造し、本発明に従い同じくHsp90タンパク質生物活性調節剤により処置された癌患者から得られた腫瘍細胞から術後に精製する。好ましいHsp90タンパク質はGRP94である。さらに好ましい態様において、複合体は、上記で開示された通り、本発明のアフィニティー精製方法を用いて精製される。

【0198】

ここに記載された方法によると、Hsp90(例、GRP94)またはMHC抗原と内在的に複合体形成している免疫原性または抗原性ペプチドは、抗原性分子として使用され得る。例えば、異なる腫瘍抗原(例、チロシナーゼ、gp100、メラニン-A、gp75、ムチン類等)およびウイルスタンパク質、例えば限定されるわけではないが、免疫不全ウイルスI型(HIV-I)、ヒト免疫不全ウイルスII型(HIV-II)、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウイルス、I型単純ヘルペスウイルス(HSV-I)、II型単純ヘルペスウイルス(HSV-II)、牛痘、ライノウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、呼吸シンシチアルウイルス(RSV)、乳頭腫ウイルス、パポバウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルボウイルス、フタウイルス、コクサッキーウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルスおよびポリオウイルスのタンパク質に対する細胞傷害性T細胞応答を刺激する上記ペプチドが製造され得る。抗原性分子がインビボでGRP94と非共有結合的に複合体形

成しているペプチドである態様においては、複合体は、細胞から単離されるか、または別法として、GRP94および抗原性分子の各々の精製製品からインビトロで製造され得る。上記で開示された通り、本発明のアフィニティー精製方法を用いて複合体はさらに精製され得る。

【0199】

別の実施態様において、癌(例、腫瘍)の抗原または感染源(例、ウイルス性抗原、細菌性抗原等)は、天然供給源から精製により、化学合成により、または組換え手法により得られ、そしてインビトロ方法、例えばここに記載された方法を通してGRP94と複合体形成され得る。複合体はまた、上記で開示された通り、本発明のアフィニティー精製方法を用いてさらに精製され得る。

【0200】

F. 5. 製剤

本発明によると、調節剤および抗原性分子複合体は、癌または感染性疾患の処置または予防を目的として被検体へ投与するための医薬製剤に製剤化され得る。本発明に従い製造された複合体を含む組成物は、適合性のある医薬用担体中で製剤化され、適応疾患(例、癌または感染性疾患)の処置用に製造、パッケージ化、およびラベル貼付が為され得る。

【0201】

調節剤または複合体が水溶性である場合、それは適当な緩衝液、例えばリン酸緩衝食塩水または他の生理学的に適合し得る溶液中で製剤化され得る。別法として、調節剤または生成した複合体の水性溶媒に対する溶解度が乏しい場合、それは、非イオン性界面活性剤、例えばトウィーン(登録商標)またはポリエチレングリコールにより製剤化され得る。すなわち、化合物およびそれらの生理学的に許容し得る溶媒は、吸入または通気(口または鼻を通す)による投与または経口、頬、非経口、直腸投与用に、または腫瘍の場合には直接固体腫瘍へ注射するように製剤化され得る。

【0202】

経口投与の場合、医薬製剤は、液体形態、例えば溶液、シロップまたは懸濁液であり得るか、または水または他の適当な賦形剤により使用前に再構成するため

の薬剤製品として提供され得る。上記液体製剤は、医薬的に許容し得る添加物、例えば懸濁剤(例、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体または硬化食用脂)、乳化剤(例、レシチンまたはアラビアゴム)、非水性賦形剤(例、扁桃油、油状エステル類、または分別植物油)、および保存剤(例、メチルまたはプロピル-p-ヒドロキシベンゾエートまたはソルビン酸)による慣用的手段により製造され得る。医薬組成物は、例えば、医薬的に許容し得る賦形剤、例えば結合剤(例、前ゼラチン化トウモロコシ澱粉、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース)、充填剤(例、ラクトース、微晶性セルロースまたはリン酸水素カルシウム)、滑沢剤(例、ステアリン酸マグネシウム、タルクまたはシリカ)、崩壊剤(例、ジャガイモ澱粉またはグリコール酸澱粉ナトリウム)または湿潤剤(例、ラウリル硫酸ナトリウム)による慣用的手段により製造された錠剤またはカプセルの形態をとり得る。錠剤は、当業界で公知の方法によりコーティングされ得る。経口投与用製剤は、活性化合物の放出制御をもたらすように適当に製剤化され得る。

【0203】

頬投与の場合、組成物は、慣用的方法で製剤化された錠剤またはトローチ剤の形態をとり得る。吸入による投与の場合、本発明に従い使用される化合物は、好都合には加圧パックからのエアロゾル噴霧装置またはネブライザーの形態で送達され、適当な推進剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適当なガスの使用を伴う。加圧エアロゾルの場合、用量単位は、弁を設けて計量された量を送達することにより決定され得る。例えば、吸入器または注入器で使用されるゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物および適当な粉末基剤、例えばラクトースまたは澱粉の粉末混合物を含むように製剤化され得る。

【0204】

組成物は、注射による、例えばボラス注射または連続注入による非経口投与に製剤化され得る。注射用製剤は、保存剤が添加された、単位用量形態、例えばアンプルまたは多用量容器で提供され得る。組成物は、油状または水性賦形剤中懸濁液、溶液またはエマルジョンといった形態をとり得、調合剤、例えば懸濁

、安定および/または分散剤を含み得る。別法として、有効成分は、使用前における適当な賦形剤、例えば滅菌発熱物質不含有水による構成用の粉末形態であり得る。

【0205】

化合物はまた、直腸用組成物、例えば慣用的坐薬基剤、例えばココアバターまたは他のグリセリドを含む、例えば坐剤または停留浣腸で製剤化され得る。

【0206】

前記の製剤に加えて、化合物はまた、デポー形製剤として製剤化され得る。上記長時間作用性製剤は、移植(例えば、皮下または筋肉内)によるかまたは筋肉内注射により投与され得る。すなわち、例えば、化合物は、適当なポリマー性または疎水性材料(例えば、許容し得る油中エマルジョンとして)またはイオン交換樹脂により、または低可溶性誘導体として、例えば低可溶性塩として製剤化され得る。リポソームおよびエマルジョンは、親水性薬剤用送達賦形剤または担体のよく知られた例である。

【0207】

組成物は、所望ならば、有効成分を含有する1個またはそれ以上の単位用量形態を含み得るパックまたはディスペンサー装置で提供され得る。パックは、例えば金属またはプラスチックホイル、例えばブリスターパックを含み得る。パックまたはディスペンサー装置には、投与に関する使用説明書が添付され得る。

【0208】

本発明はまた、本発明の治療法を実施するためのキットを提供する。上記キットは、1個またはそれ以上の容器中に、治療または予防有効量の調節剤および/または抗原性分子複合体の医薬的に許容し得る形態を含む。本発明キットのガラス瓶中の調節剤および抗原性分子複合体は、医薬的に許容し得る溶液の形態であり、例えば滅菌食塩水、デキストロース溶液または緩衝液、または他の医薬的に許容し得る滅菌液との組み合わせであり得る。別法として、調節剤または複合体は、凍結乾燥または乾燥され得る。この場合、キットは、所望によりさらに容器中に、好ましくは無菌である、医薬的に許容し得る溶液(例、食塩水、デキストロース溶液等)を含んでいてもよく、調節剤複合体を再構成することにより、注

射用溶液が形成される。

【0209】

別の態様において、さらに本発明のキットは、調節剤または複合体を注射するための、好ましくは滅菌形態でパッケージ化された、針または注射器、および/またはパッケージ化アルコールパッドを含む。臨床医または被検体による抗原性分子複合体の投与に関する使用説明書も所望により含まれることがある。

【0210】

G. 標的感染性疾患

本発明方法により処置または予防され得る感染性疾患は、限定されるわけではないが、ウイルス、細菌、真菌、原生動物および寄生虫を含む感染源により誘発される。感染性疾患に罹患した被検体の処置が要望される本発明の一態様では、上記アフィニティー精製方法を用いることにより、例えば一細胞系の感染性微生物により感染した細胞または被検体からGRP94-ペプチド複合体が単離される。

【0211】

本発明方法により処置または予防され得るウイルス性疾患には、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウイルス、I型単純ヘルペスウイルス(HSV-I)、II型単純ヘルペスウイルス(HSV-II)、牛痘、ライノウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、呼吸シンシチアルウイルス(RSV)、乳頭腫ウイルス、パポバウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルボウイルス、フンタウイルス、コクサッキーウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、ヒト免疫不全ウイルスI型(HIV-I)およびヒト免疫不全ウイルスII型(HIV-II)があるが、これらに限定されるわけではない。

【0212】

本発明方法により処置または予防され得る細菌性疾患は、限定されるわけではないが、Mycobacteria、Mycoplasma、NeisseriaおよびLegionellaを含む細菌により誘発される。

【0213】

本発明方法により処置または予防され得る原生動物疾患は、限定されるわけではないが、Leishmania、KokzidioaおよびTrypanosomaを含む原生動物により誘発される。本発明方法により処置または予防され得る寄生虫疾患は、限定されるわけではないが、ChlamydiaおよびRickettsiaを含む寄生虫により誘発される。

【0214】

H. 標的癌

本発明方法により処置または予防され得る癌には、限定されるわけではないが、ヒト肉腫および癌腫、例えば線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、軟骨腫、血管肉腫、内皮肉腫(endotheliosarcoma)、リンパ管肉腫(Lymphangiosarcoma)、リンパ管内皮腫(Lymphangi endotheliosarcoma)、骨膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原生癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣癌、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、例えば急性リンパ性白血病および急性骨髄性白血病(骨髄性、前骨髄性、骨髄単球性、単球性および赤白血病)、慢性白血病(慢性骨髄性(顆粒球性)白血病および慢性リンパ性白血病)、および真性赤血球増加症、リンパ腫(ホジキン病および非ホジキン病)、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症およびH鎖病があるがこれらに限定されるわけではない。

【0215】

一実施態様において、癌は転移性である。別の実施態様では、癌に罹患した被検体は、本発明によるGRP94-抗原性分子複合体およびGRP調節剤投与前に抗癌治療(例、化学療法照射)を受けているという理由により免疫抑制されている。

【0216】

I. 養子免疫療法との組み合わせ

養子免疫療法とは、場合によって、直接的または間接的に腫瘍細胞および/または抗原性成分への特異免疫を免疫細胞に仲介させ、または腫瘍を退縮させ、または感染性疾患の処置を行うという目的で上記細胞が宿主に投与される、癌または感染性疾患を処置するための治療方法を包含する。本明細書に記載された本発明方法によると、GRP94生物活性調節剤と共に抗原性(または免疫原性)分子と好ましくは非共有結合的に複合体を形成したGRPによりAPCを感作し、養子免疫療法で使用する。

【0217】

本発明の一態様によると、所望の投与経路を用いる、GRP-94ペプチド複合体およびGRP生物活性調節剤の投与による治療は、GRP94-抗原性分子複合体および調節剤により感作されたAPCを用いる養子免疫療法と組み合わせられる。感作されたAPCは、GRP94-ペプチド複合体および調節剤と同時に、またはGRP94-ペプチド複合体および調節剤の投与の前および後に投与され得る。さらに、投与方法は、限定されるわけではないが、例えば皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮内または粘膜経路に変えられ得る。

【0218】

I. 1. マクロファージおよび抗原提示細胞の入手

限定されるわけではないが、マクロファージ、樹状細胞およびB細胞を含む抗原提示細胞は、Inaba (1992) J Exp Med 176:1693-1702に記載された通り、好ましくはヒト末梢血または骨髄からの幹および始原細胞からのインビトロ製造により得られる。

【0219】

APCは、当業界で公知の様々な方法のいずれかにより得られる。好ましい態様では、ヒトマクロファージが使用され、ヒト血液細胞から得られる。限定ではなく例として、マクロファージは次の要領で得られる。単核細胞を、フィコール-ハイパーク勾配遠心分離により被検体(好ましくは処置される被検体)の末梢血から単離し、被検体自身の血清または他のAB+ヒト血清によりプレコーティングされた組織培養皿に播種する。細胞を37℃で1時間インキュベーションし、次いで非付着細胞をピペットにより除去する。皿に残った付着細胞に、リン酸緩

衝食塩水中冷(4℃)1ミリモルEDTAを加え、皿を室温で15分間放置する。細胞を採取し、RPMI緩衝液で洗浄し、RPMI緩衝液に懸濁する。増加した数のマクロファージは、マクロファージ-コロニー刺激因子(M-CSF)と37℃でインキュベーションすることにより得られる。増加した数の樹状細胞は、Inabaら(1992)により詳述されている通り顆粒球-マクロファージ-コロニー刺激因子(GM-CSF)とインキュベーションすることにより得られる。

【0220】

I.2.GRP94-ペプチド複合体によるマクロファージおよび抗原提示細胞の感作

複合体および調節剤とインビトロで細胞をインキュベーションすることにより、抗原性分子に(好ましくは非共有結合的に)結合したGRPでAPCを感作する。好ましくは15分~24時間37℃でGRP94複合体および調節剤とインビトロでインキュベーションすることにより、APCをGRP94および抗原性分子の複合体で感作する。限定ではなく例として、 4×10^7 マクロファージは、1mLの普通のRPMI培地中、1mL当たり10マイクログラムのGRP94-ペプチド複合体または1mL当たり100マイクログラムのGRP94-ペプチド複合体およびGRP94-ペプチド複合体に関して等量の調節剤と37℃で15分~24時間インキュベーションされ得る。細胞を3回洗浄し、被検体における注射に好都合な濃度(例、 $1 \times 10^7 / \text{mL}$)で、好ましくは滅菌された生理学的媒質に再懸濁する。好ましくは、感作APCが注射される被検体は、もともとAPCが単離された被検体である(自己具体例)。

【0221】

所望により、感作APCが例えば抗原特異的な、I型限定細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を刺激する能力は、CTLを刺激して腫瘍壊死因子を放出させるそれらの能力および上記CTLの標的として作用するそれらの能力によりモニターされ得る。

【0222】

I.3.感作APCの再注入

感作APCは、慣用的な臨床方法により、被検体に好ましくは静脈内経路で全

身的に再注入される。これらの活性化細胞は、優先的に自己被検体への全身投与により再注入される。被検体は、被検体の状態により、一般的には約 10^6 ~約 10^{12} 感作マクロファージを受け入れる。摂取法によって、被検体は、所望によりさらに適当な用量の生物学的応答修飾因子、例えば限定されるわけではないが、サイトカイン類、IFN- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6、TNFまたは他のサイトカイン成長因子を受け入れ得る場合もある。

【0223】

J. 自己具体例

Hsp90タンパク質の特異的免疫原性は、Hsp90タンパク質自体ではなく、それらに結合したペプチドに由来する。免疫原性が本発明による調節剤により高められた癌ワクチンとしてGRP94-ペプチドの自己複合体の使用に関する本発明の好ましい態様では、癌免疫療法に対する最も克服し難いハードルの二つが回避されている。第一は、実験動物の癌同様、ヒトの癌は抗原的に異なるという可能性である。すなわち、本発明の態様において、GRP94シャペロン、抗原性ペプチドは、それらが誘導される癌細胞のものであるため、このハードルが回避される。

【0224】

第2に、癌免疫治療に対する最新方法は、癌細胞系のCTL認識エピトープ決定に集中している。この方法は、癌に対する細胞系およびCTLの利用能を必要とする。これらの試薬は、圧倒的比率のヒトの癌には利用できない。すなわち、好ましくは免疫原性が本発明調節剤により高められた、GRP94およびペプチドの自己複合体に関する本発明の態様では、癌免疫療法は、細胞系またはCTLの利用能に依存しないし、また癌細胞の抗原性エピトープの明確な限定を必要ともしない。これらの利点により、ペプチド複合体に非共有結合した自己Hsp90タンパク質(例、GRP94)は、癌に対する誘引的で新規な免疫原となっている。

【0225】

K. 原発性および転移性新生物疾患の予防および処置

何故本発明により提供される免疫療法が癌患者における使用に望ましいかにつ

いては多くの理由がある。第一に、癌患者が免疫抑制され、麻酔を用いた手術および後続の化学療法が免疫抑制を悪化させ得る場合、手術前期間に適当な免疫療法を施すことにより、この免疫抑制は阻止または打ち消され得る。これによって、感染性合併症がほとんど誘発され得ず、創傷治癒が加速され得る。第二に、腫瘍体積は術後最小であり、免疫治療は最もこの状況において有効であると思われる。第三の理由は、腫瘍細胞が手術時に循環系へ流れ込み、この時点で適用された有効な免疫治療がこれらの細胞を排除するという可能性である。

【0226】

本発明の予防および治療方法は、手術前、手術時または術後における癌患者の免疫能を高め、そして癌細胞に対する腫瘍特異的免疫性を誘導することを目指すもので、これに伴う目標は癌の阻止であり、さらに最終的臨床的目標は全体的な癌退縮および根絶である。

【0227】

L . H s p 9 0 タンパク質 - 抗原性分子複合体による癌予防および免疫治療中における効果のモニター

新生物疾患の発現および進行に対する G R P 9 4 - 抗原性分子複合体による免疫治療の効果は、当業界の熟練者に公知のいずれかの方法によりモニターされ得、それらの方法には、限定されるわけではないが、1)細胞免疫性の評価としての遅延型過敏症、2)インビトロでの細胞溶解性Tリンパ球の活性、3)腫瘍特異的抗原、例えば癌胎児性(C E A)抗原のレベル、4)例えばコンピューター断層撮影(C T)スキャン技術を用いた腫瘍形態の変化、5)危険度の高い個体における特定癌に関する危険性の推定的生物マーカーのレベルの変化、および6)ソノグラムを用いた腫瘍の形態における変化の測定がある。

【0228】

遅延型過敏症皮膚試験。遅延型過敏症皮膚試験は、抗原に対する全体的免疫能および細胞免疫性において大きな価値がある。一群の一般的皮膚抗原に対して反応し得ないことを、アネルギーと呼ぶ(Sato et al. (1995) Clin Immunol Pathol 74:35-43)。皮膚試験法の適切な技術は、抗原が、4 で無菌貯蔵され、光線から防御され、使用直前に再構成されることを必要とする。25 - または27 -

ゲージ針を用いると、抗原の皮下ではなく皮内投与が確実に行われる。抗原の皮内投与の24および48時間後、最大規模の紅斑および硬化が定規で測定される。所定の抗原または抗原群に対する低活性は、より高濃度の抗原を用いた試験により、または不明瞭な環境での中間濃度による反復試験により確認される。

【0229】

細胞溶解性Tリンパ球のインビトロ活性。フィコール-ハイパーク遠心分離勾配技術により単離された 8×10^6 末梢血由来Tリンパ球を、10%胎児牛血清を含む3mlのRPMI培地中 4×10^4 マイトマイシンC処理腫瘍細胞で再刺激する。実験によっては、33%2次混合リンパ球培養上清またはIL-2を、T細胞成長因子の供給源として培養培地に含ませることもある。

【0230】

免疫化後の細胞溶解性Tリンパ球の初回応答を測定するために、刺激因子である腫瘍細胞を伴わずにT細胞を培養する。他の実験では、T細胞を抗原的に異なる細胞により再刺激する。6日後、培養物を、4時間 ^{51}Cr -放出検定法において細胞傷害性について試験する。標的の自然 ^{51}Cr 放出は、20%未満のレベルに達するべきである。抗MHC I型遮断活性の場合、W6/32ハイブリドーマの10倍濃縮上清が、約12.5%の最終濃度で試験に加えられる(Heike et al. (1994) J Immunotherapy 15:165-174)。

【0231】

腫瘍特異的抗原のレベル。全腫瘍について特有な腫瘍抗原を検出することは可能ではあり得ないが、多くの腫瘍は正常細胞とそれらを区別する抗原を見せる。モノクローナル抗体試薬は、抗原の単離および生化学的特性確認を可能にし、そして非形質転換細胞と形質転換細胞の区別および形質転換細胞の細胞系統の明確な限定に関して診断する上で非常に貴重である。最も明確に特性確認されたヒト腫瘍関連抗原は、腫瘍胎児抗原である。これらの抗原は胚形成中に発現されるが、正常成熟組織には存在しないかまたは非常に検出困難である。始原型抗原は、癌胎児性抗原(CEA)、正常成熟結腸細胞ではなく胎児消化管ヒト結腸癌細胞で見出される糖蛋白質である。CEAは結腸癌細胞から流出し、血清中に見出されるため、血清におけるこの抗原の存在は、結腸癌について被検体をスクリーニン

グするのに使用され得ると当初は考えられていた。しかしながら、他の腫瘍、例えば膵臓および乳癌に罹患した被検体もまた、高い血清レベルのCEAを有する。従って、治療が行われている癌患者におけるCEAレベルの降下および上昇をモニターすることは、腫瘍の進行および処置に対する応答を予測するのに有用であることが判った。

【0232】

幾つかの他の腫瘍胎児抗原も、ヒト腫瘍を診断およびモニターするのに有用であり、例えばアルファ-フェトプロテイン、すなわち胎児肝臓および卵黄嚢細胞により通常分泌されるアルファ-グロブリンは、肝臓および生殖細胞腫瘍を有する被検体の血清から見出され、病状に関わる事項として使用され得る。

【0233】

コンピューター断層撮影(CT)スキャン。CTは、依然として癌の正確な病期分類技術の選択候補である。CTは、転移検出を目的とする他のいずれかのイメージング技術より感度および特異性が高いことが判明した。

【0234】

推定的生物マーカーの測定。特異的な癌の危険度に関する推定的生物マーカーのレベルを測定することにより、ペプチド複合体に非共有結合したGRP94の効果モニターする。例えば、前立腺癌に関する危険度が高い個体では、血清前立腺特異的抗原(PSA)が、Brawer et al. (1992) J Urol 147:841-845およびCatalona et al. (1993) JAMA 270:948-958により記載された方法により測定されるか、または結腸直腸癌の危険がある個体では、CEAが上記要領で測定され、そして乳癌の危険性が高い個体では、エストラジオールの16-β-ヒドロキシル化が、Schneider et al. (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79:3047-3051に記載された方法により測定される。上記で引用された参考文献は、出典明示により本明細書の一部とする。

【0235】

ソノグラム。ソノグラムは、依然として癌の正確な病期分類技術の他の選択候補である。

【0236】

M. 虚血に伴う標的疾患 / 外傷

本発明は、Hsp90活性変調が所望されている被検体にHsp90タンパク質調節剤を投与することを含む虚血誘発損傷の処置および予防方法を提供する。ここで使用されている「虚血」の語は、組織への血流の欠乏である。失血は、酸素およびグルコース両方の欠乏を特徴とし、その結果虚血性壊死または梗塞に至る。すなわち、「虚血」の語は、酸素欠乏および栄養素欠乏の両状態を包含する。特定血管領域への血流の欠乏は、「焦点虚血」と称される。組織または身体全体への血流の欠乏は、「全体的虚血」と称される。

【0237】

本発明は、限定されるわけではないが、心停止、不全収縮および持続的心室不整脈、心臓手術、心肺バイパス手術、臓器移植、脊椎損傷、頭部外傷、卒中、血栓塞栓症発作、出血性発作、脳血管痙攣、低血圧症、低血糖症、てんかん重積持続状態、てんかん発作、不安、精神分裂病、神経変性疾患、アルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮側索硬化症(ALS)、新生児ストレス、および虚血性脳損傷を予防または改善する神経保護剤組成物が指示され、有用であり、推奨されるかまたは処方される状態を含む、虚血 / 再灌流の状態から生じる細胞損傷を改善するための治療組成物および方法を提供する。

【0238】

虚血 / 再灌流の破壊作用は、細胞死そして最後には臓器機能不全に至る有害な事象のカスケードとして現れる。虚血誘発細胞死の根底にある代謝事象には、ATP枯渇によるエネルギー減退、細胞性アシドーシス、グルタミン酸放出、カルシウムイオン流入、膜リン脂質分解の刺激および後続の遊離脂肪酸蓄積、および遊離基変性がある。さらに、アポトーシス細胞死とは対照的に、虚血誘発細胞死は、最遠位細胞領域の変性、および細胞体および核の後続の進行的変性を特徴とする(Yamamoto et al. (1986) Brain Res 384:1-10; Yamamoto et al. (1990) Acta Neuropathol 80:487-492)。この変性プロフィールと一致して、拡張したプロセスを担う細胞、例えばニューロン細胞は、虚血損傷に対して特に感受性がある。特定の理論に従って制限される意図はないが、これらの観察結果は、細胞内輸送およびタンパク質利用能がストレスに対する細胞応答の必須要素であり、そ

してさらに、虚血応答に関する標的として、Hsp90タンパク質を含む、上記機能の分子成分を包含することを示唆している。

【0239】

すなわち、一態様において、本発明は、中枢神経系虚血の処置に関するものである。中枢神経系虚血の例には、脳虚血および脊柱虚血がある。「脳虚血」は、通常、動脈を閉塞する血餅(血栓)または他の事態(塞栓)の結果として、脳における動脈または脳に至る動脈における血流の中断または低減化である。

【0240】

虚血誘発性損傷の予防または改善を目的とする本発明治療組成物は、Hsp90タンパク質リガンドを含む。好ましくは、上記調節剤は、内在性Hsp90タンパク質の活性構造的立体配座を促進または安定化させる。また好ましくは、Hspリガンドは、GRP94またはHSP90の活性を変調する。細胞保護剤作用を有する組成物の望ましい特性には、次のものが含まれる。すなわち、(1)経口または注射可能経路による容易な投与(例、それが処置すべき組織へ治療有効量で到達するように、胃、腸または血管系ではあまり分解されない)、(2)虚血発作後の投与時における治療活性(例、効力)、および(3)認知障害、運動能力の崩壊、鎮静、興奮性亢進、ニューロン空胞形成および心臓血管活性の障害を含む副作用が最小限または全く無いこと。

【0241】

Hsp90タンパク質リガンドを含む組成物は、虚血状態を誘発する外傷または他の事象直後に投与され得る。別法として、かかる組成物は、限定されるわけではないが神経変性疾患を含む進行性疾患の検出後連続的または断続的に投与され得る。さらに別の態様において、かかる組成物は、後続の虚血状態の予防またはそれからの回復を改善するために投与され得る。どの場合にしても、有効な用量および投与プロファイルは、例えばTacchini et al. (1997) *Hepatology* 26(1):186-191および米国特許第4968671号、第5504090号および第5733916号に開示された通り、虚血状態の動物モデルにおける測定を指向した上記標準的実験を用いて測定され得る。実例としての動物モデルは本明細書で後述されている。

【0242】

別の態様において、本発明は、移植前における組織の処置に関するものである。上記組織は、ドナー体から摘出後完全に脈管遮断される。Hsp90タンパク質リガンドを含む治療組成物は、移植された組織の回復および健康を促進し得る。かかる化合物をドナーまたは移植組織に供給するための幾つかの方法は、当業界では公知であり、例えば限定されるわけではないが、臓器獲得前のドナー被検体に対する臓器保存および健康を促進する治療組成物の投与、治療組成物による摘出臓器の灌流、および組織移植の前、それと同時またはその後における移植レシピエントへの組成物の投与が含まれる。Mizoe et al. (1997) J Surg Res 73(2):160-165および米国特許第5066578号、第5756492号および第6080730号参照。

【0243】

さらに別の態様において、Hsp90タンパク質調節剤を含む組成物は、虚血状態の不存在下において被検体に反復供給され得、それにより後続の虚血状態に耐える被検体の能力が高められる。本発明のHsp90リガンドを含む治療組成物は、かかる細胞保護剤効果を提供し得る。好ましくは、虚血耐性の誘導が意図された治療組成物の用量は、例えば、Chen et al. (1996) J Cereb Blood Flow Metab 16:566-577および米国特許第5504090号および第5733916号に開示された通り、緩やかな虚血状態をもたらす。

【0244】

M. 1. 虚血のインビボモデル

Hsp90タンパク質調節剤を含む組成物の治療能力を評価するための、虚血性損傷および疾患の多様なモデルが利用可能である。下記動物モデルに加えて、Massa et al. (1996) "The Stress Gene Response in Brain", Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews, pp. 95-158, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pennsylvania、およびそこに引用されている参考文献も参照。当業界の熟練者であれば、開示された通り別のモデルも使用され得ることを認めるはずである。治療能力を評価するためには、候補化合物が、例えば、血流回復の直後または30分後に腹腔内的に与えられる単一用量として投与され得る。

【0245】

一過性全体的脳虚血。米国特許第5571840号は、心臓停止のイヌモデルについて開示している。このモデルに従い、成犬に麻酔をかけ、機械的に肺換気することにより、外科用麻酔および角膜反射の抑制を維持する。停止前および蘇生後少なくとも1時間吐き出されたCO₂圧および食道温度は安定状態で維持される。2本の静脈カテーテル：一方は蘇生薬剤投与用に左外側頸静脈を通して右心房へ通され、そして他方は液体投与用に左大腿静脈の筋枝へ挿入される。動脈血圧は、液体投与用に左大腿静脈の筋枝に設置されたカテーテルを通して測定される。動脈血圧は、左大腿動脈の筋枝に設置されたカテーテルを通して測定される。皮下円板電極を設置することにより、心電図(ECG)をモニターする。

【0246】

停止前および回復中に、各動物に対し静脈内経路により水分補給する。全てのカテーテルおよび電気導線を皮下経路を通して、イヌの皮および液圧/電気スイベルに後で連結するため皮膚の背側肩甲骨中間領域から出す。拍動および平均動脈血圧(MAP)、ECGおよび終期呼気CO₂は、6チャンネルのオシログラフで連続的に記録され得る。外科用器具設置の終結時、麻酔を停止し、換気を室内空気により続行する。角膜反射が見えたとき、10-15秒、60Hz、2ミリ秒矩形波の刺激を左心室心外膜に送達することにより、心臓を細動させる。換気を停止し、ECG、MAPおよび心臓の直接観察により循環系停止を確認する。9分の適温心室細動後、換気を復活し、直接心臓マッサージで75mmHgを越えるMAPを維持する。自発呼吸が起こるまで機械換気を続行するが、6時間より長くは続けない(典型的には30分間のみ)。

【0247】

卒中の状態は、脳への主動脈の閉塞により模倣され得る。一モデルでは、Karp iak et al. (1989) Ann Rev Pharmacol Toxicol 29:403, Ginsberg & Busto (1989) Stroke 20:1627および米国特許第6017965号でさらに開示されている通り、左右総頸動脈閉塞がアレチネズミで行なわれる。簡単に述べると、頸動脈をクランプで締めることにより、脳への血流を7分間中断させる。これらの実験経過中、動物の核心体温を37℃に維持することにより、低体温反応を阻止する

。

【0248】

永続的焦点脳虚血。脳虚血の別のモデルでは、Karpiak et al. (1989) *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 29:403, Ginsberg & Busto (1989) *Stroke* 20:1627, Chen et al. (1996) *Mol Endocrinol* 10:682-693、および米国特許第76017965号で開示されている通り、ラットにおいて中大脳動脈を閉塞させる。このモデルによると、小片の縫合糸を頸動脈から中大脳動脈の領域へ通すことにより、中大脳動脈は永続的に閉塞される。核心体温を37に維持する。このモデルは、さらに制限された脳梗塞を誘発し、それによって異なる種類の発作(焦点血栓症発作)を模倣するという点でアレチネズミにおける左右総頸動脈閉塞とは異なる

。

【0249】

一過性焦点脳虚血。ラットにおける焦点脳虚血の別のモデルでは、小片の縫合糸を頸動脈から中大脳動脈の領域へ通すことにより、中大脳動脈を一時的に閉塞させる。2時間の虚血期間後、縫合糸を抜き取る。核心体温を37に維持する

。

【0250】

焦点脳虚血の追加的モデルには、限定されるわけではないが、光化学的誘発焦点脳血栓形成法、血餅塞栓形成法、ミクロスフェア塞栓形成法および関連方法がある。McAuley (1995) *Cerebrovasc Brain Metab Review* 7:153-180参照。

【0251】

腎臓虚血。フェノバルビタール(50 mg / kg)により成熟雄ラットに麻酔をかけ、ラットの体温を36 - 37間に維持する。Kuznetsov (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8584-8589に開示されている通り、15分間(軽症の虚血)または45分間(重症の虚血)左腎動脈をクランプで締めることにより虚血を誘発し、次いで5時間再灌流する。

【0252】

M.2. 虚血のインビトロモデル

上皮虚血の細胞培養モデル。イヌ腎臓(MDCK)細胞を、5%胎児牛血清を補

ったダルベッコ最少必須培地で増殖させる。ラット甲状腺(PCC13)細胞を、Grollman et al. (1993) J Biol Chem 268:3604-3609に記載された5%子牛血清およびホルモン混合物を補ったクーン修飾ハムF-12培地(セントルイスのシグマ、ミズーリ)で増殖させる。培養されたMDCKまたはPCC13細胞に対し、Ramachandran & Gottlieb (1961) Biochim Biophys Acta 53:396-402で開示されている通り、ミトコンドリア酸化的リン酸化の特異的阻害剤である、アンチマイシンAで処理することにより酸化的代謝の阻害を行う。別法として、またはさらに、グルコースの非加水分解性類似体である、2-デオキシグルコースで細胞を処理することにより、解糖的代謝が阻止され得る。Bacalioa et al. (1994) J Cell Sci 107:3301-3313, Mandel et al. (1994) J Cell Sci 107:3315-224、およびKuznetsov (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93:8584-8589参照。

【0253】

酸素およびグルコース枯渇の細胞培養モデル。15%新生子牛血清(GibcoBRL of Gaithersburg, Maryland)を含むハムF-10培地において、チャイニーズハムスター卵巢(CHO)細胞を増殖させる。細胞(15ml)を1ml当たり150000細胞の密度でT25フラスコ(Corning of Acton, Massachusetts)に播種し、約48時間後密集レベル下状態での実験用に使用する。グルコース剥奪を達成するため、グルコースを伴わずに製造されたF-10培地に15%血清を加えることにより、部分的グルコース欠乏ブロスが生成される。インキュベーション中、シグマグルコース比色検定キットを用いて測定され得るところによると、細胞は約20時間後に残存グルコースを使用する。さらに24時間のインキュベーション後、グルコース剥奪細胞を採取する。

【0254】

酸素欠乏を達成するため、Anderson & Matovcik (1977) Science 197:1371-1374およびSeip & Evans (1980) J Clin Microbiol 11:226-233で先に報告されている通り、完全培地における(または50%追加グルコースを含む完全培地における)培養物を密閉されたブルーアージャー(Baltimore Biological Laboratory, Microbiology Systems of Baltimore, Maryland)に入れ、4-7%二酸化炭素雰囲気中水素発生装置を用いることにより、嫌気的生活を開始させた。ジャーの

酸素濃度を100分で<0.4%に減少させ、非攪拌溶液中細胞深度で酸素濃度を計算すると、30分以内では環境値の1%以内であると算出される。かかる算出法は、Gerweck et al. (1979) Cancer Res 39:966-972記載の方法に従い為され得る。水素および酸素からの水蒸気の形成により、嫌気的生活の開始後直ちに培養培地において約38.6 までの短時間(約15分)の温度上昇が誘発される。この上昇は熱ショック応答の誘発には不十分である。

【0255】

酸素欠乏は、メチレンブルー指示薬溶液を用いて証明され得る。この溶液は、嫌気的生活開始の5-6時間後に無色(酸素の不存在を示す)になる。一定グルコース濃度(1g/L)は、嫌気的生活開始の24時間前および直前に培地を変えることにより維持され得る。

【0256】

脳虚血の細胞培養モデル。単離されたニューロンは、成長許容性基質を含む単層、例えば精製成長促進因子の固定化単層で培養され得、上記単層はL1糖蛋白質のコラーゲン、フィブロネクチンを含む。方法の一例として、本質的には例えば米国特許第5932542号で記載された通り、ニューロン(生後2-7日)をトリプシン処理により解離する。ニューロンを成長促進因子でコーティングしたウェルに加えた後、単一濃度または増加濃度の候補組成物を加える。ニューロンを一夜(約16時間)37 で培養し、次いでニューライト発芽後成長を測定する。低酸素/酸素欠乏は、上記要領で達成され得る。次いで、虚血状態にされ、候補治療組成物が投与された細胞のニューライト発芽後成長は、治療組成物の投与を伴わずに同じく虚血状態にされた対照細胞でのニューライト発芽後成長と比較され得る。

【0257】

海馬におけるグルタミン酸誘導酸化的傷害性の細胞培養モデル。グルタミン酸塩またはエステル(グルタメート)は、脳における主要な興奮伝達物質であり、てんかんの病因およびてんかん活性においてある一定の役割を演じると考えられている。異なる種類のてんかんおよびてんかんの臨床的に異なる形態に関連性のある行動的影響を含む多様なインビボモデルが知られている。グルタミン酸誘導酸

化的傷害性のインビトロモデルもまた公知であり、方法の一例は本明細書に記載されている。マウス海馬細胞系(Davis & Maher (1994) Brain Res 652(1):169-173)を、10%胎児牛血清(Atlanta, GeorgiaのAtlanta Biologicals)含有ダルベッコ修飾イーグル培地(GibcoBRL of Gaithersburg, Maryland)で維持する。HT 22細胞を1ウェル当たり20000細胞で96ウェルプレートに播種し、通常の増殖培地で一夜37℃で培養する。グルタミン酸誘導酸化的傷害性は、2-10ミリモルのグルタメートまたはNMDAの投与により誘発される。さらなる方法は、Su et al. (1998) J Mol Cell Cardiol 30(3):587-598; Xiao et al. (1999) J Neurochem 72:95-101および米国特許第6017965号に開示されている。

【0258】

M.3. 虚血または他のストレス状態後の回復に関する検定法

本明細書に開示された治療組成物の効果を調べることにより、これらの動物モデルにおける細胞損傷を緩和および/または打ち消す可能性のある治療戦略が決定され得る。具体例としては、限定するわけではないが、下記で開示されている治療効力の評価測定法がある。

【0259】

神経学的評価検定法。神経学的障害および回復は、米国特許第5571840号に開示されている通り、意識、呼吸、脳神経活性、脊髄神経活性および運動機能の注意深い観察を表す標準化スコアを用いてモニターされ得る。観察者間の変動性は、各神経学的機能の詳細な記載を顧慮することにより解決され得る。認知、感覚および運動障害の追加的検定法は、米国特許第6017965号に開示されている。

【0260】

梗塞サイズ検定法。本明細書に開示されている候補化合物の効力もまた、虚血状態にされた動物への組成物投与後における梗塞サイズを測定することにより評価され得る。虚血状態開始後の選択された時点(複数も可)で、上記の動物を殺し、当業界で熟知されている方法に従い、興味の対象である組織に適した常用的組織研究用に処理する。画像処理ソフトウェア(例、Edmonds, WashingtonのBio Sc

an OPTIMAS)を用いると、梗塞体積の正確な算出が簡易化され得る。

【0261】

細胞変性に関する分子マーカーの検出。別の態様では、損傷した組織は、抗原、例えばA β - 50、tau、A2B5、神経フィラメント、ニューロン特異的エノラーゼ、および米国特許第6046381号に開示されている神経変性に特有な他の抗原を認識する抗体による免疫標識により脳断片において同定され得る。免疫標識細胞は、共焦画像のコンピューター援用半定量的分析法を用いて定量され得る。

【0262】

細胞生存能検定法。虚血のインビトロモデルを使用するとき、細胞生存能は、Hansen et al. (1989) Electrophoresis 10:645-652に記載されている通り細胞が3-(4,5-ジメチルジアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT)を代謝する能力を測定することにより評価され得る。簡単に述べると、10 μ lのMTT溶液(5 mg/ml)を96ウェルプレートにおいて細胞培養物に加え、そして細胞を37°Cで4時間通常の増殖培地で維持する。次いで、可溶化溶液(100 μ l、50%ジメチルホルムアミドおよび20%ドデシル硫酸ナトリウム、pH4.8)を、96ウェルプレートの個々のウェルに入れた各培養物に直接加える。室温で一夜インキュベーション後、吸光度を測定する。

【0263】

別法として、細胞生存能は、Choi et al. (1987) J Neurosci 7:357および米国特許第6017965号に開示されている通り瀕死の細胞から放出される細胞質酵素である、乳酸デヒドロゲナーゼの放出を測定することにより評価され得る。

【0264】

ニューロン成長検定法。上記の神経虚血の細胞培養モデルは、標識ニューロン突起の視覚的検査、およびHorch et al. (1999) Neuron 23:353-364 and McAllister et al. (1997) Neuron 18:767-778に開示されているニューロン突起(例、樹状突起および棘突起)の長さ、密度および動態(ダイナミズム)の定量により

評価され得る。

【0265】

別の態様において、分子マーカーは、固定された脳組織断片におけるニューライト成長の評価に使用され得る。例えば、虚血の動物モデルから摘出された脳断片は、MAP-2 (神経細胞本体および樹状突起のマーカー) およびシナプトフィシン (シナプス前部終末のマーカー) を認識する抗体を用いて標識され得る。標識された断片は、共焦顕微鏡で調べられ、共焦画像のコンピューター援用半定量的分析を用いて詳細に記録され得る。MAP-2 免疫標識樹状突起またはシナプトフィシン免疫標識終末が占める神経網の面積は、定量され、総画像面積のパーセンテージとして表され得る。Masliah et al. (1992) Exp Neurol 136:107-122 and Toggas et al. (1994) Nature 367:188-193参照。

【0266】

追加的なニューロン成長検定方法は、Doherty et al. (1995) Neuron 14:57-66, Schnell et al. (1990) Nature 343:269-272、米国特許第5250414号および第5898066号、および国際PCT公開WO99/61585に開示されている。

【0267】

N. タンパク質輸送障害

タンパク質ミスフォールディング障害は、限定されるわけではないが、嚢胞性線維症、家族性高コレステロール血症、色素性網膜炎および1-アンチトリプシンミスフォールディングを含む多様な遺伝的疾患状態の共通要素である。すなわち、Hsp90群の分子シャペロンの活性を変調する化合物は、病状を同定するタンパク質折りたたみの欠陥を打ち消すことまたは細胞の小胞体からのタンパク質輸送を高めることを目的とする本発明治療方法に従い使用され得る。すなわち、GRP94の立体配座を変調する化合物は、小胞体へのまたは小胞体からのタンパク質輸送における欠陥から生じる病状を処置するのに使用され得る。GRP94活性を排除する化合物は、小胞体からのタンパク質(例、成長因子)の出口を遮断することにより治療上の恩恵が受けられる病的状態、例えば癌の処置に使用され得る。逆に、GRP94活性を促進する化合物は、小胞体からのタンパク

質輸送を高めることにより治療上の恩恵が受けられ得る疾患の処置に使用され得る。

【0268】

タンパク質輸送の誤調節を評価するためには、表皮成長因子受容体(EGF-R)レベルおよび/または細胞内局在性を測定するモデルシステムが使用され得る(Supino-Rosin et al. (2000) J Biol Chem 275(29):21850-21855)。例えば、ベンゾキノンアンサマイシニングルダナマイシンは、2種のHsp90分子シャペロン(Hsp90およびGRP94)を標的とし、それらの活性を阻害することにより、その後続のタンパク質分解を遮断および促進する。グルダナマイシン処理にตอบสนองして、EGF-Rは、原形質膜へ行き来できなくなり、細胞はEGFによる刺激に不応性になる。

【0269】

(実施例)

下記の実施例には、本発明の好ましい態様の説明が含まれている。下記実施例のある種の態様は、本発明を實踐する上で充分役立つことが本発明者らにより見出されるかまたは予測されている技術および方法に関して記載されている。これらの実施例は、発明者らの標準的な実験室の常套手段の使用を通して実例として挙げられている。本開示内容および当業界の熟練者の一般的レベルを考えると、当業界の熟練者であれば、下記実施例が例として挙げられているに過ぎず、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、多様な変化、修正および改変が用いられ得ることは認めるはずである。

【0270】

実施例1-8

GRP94分子シャペロン活性のリガンド仲介活性化

Hsp90シャペロンのアミノ末端ドメインは、Hsp90阻害剤グルダナマイシンおよびラディシコールと結合するアデノシンヌクレオチド結合性ポケットを含む。下記実施例1-8は、ヌクレオチド結合性部位と相互作用する環境感受性発蛍光団である、bis-ANS(1-1'ビス(4-アニリノ-5-ナフタレンスルホン酸))が、GRP94のアデノシンヌクレオチド結合性ドメインに結合

し、そのペプチド結合性および分子シャペロン活性を活性化することを立証している。熱ショックと同様、bis-ANSは、GRP94機能を活性化し、ラディシコールにより阻害されるGRP94における三次立体配座変化を誘発する。bis-ANS結合性部位としてのN-末端ヌクレオチド結合性ドメインの確認は、bis-ANS-標識GRP94プロテアーゼ消化産物の配列決定により達成された。これらのデータは、GRP94のリガンド依存的アロステリック調節を確認するもので、GRP94機能のリガンド仲介調節用モデルを示唆している。

【0271】

実施例1-8の材料および方法

材料。蛍光性プローブは、モレキュラー・プローブス(ユージーン、オレゴン)から入手された。bis-ANS濃度は、385nmでの吸光度により測定された($\epsilon_{385} = 16790 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 、水中)。クエン酸シンターゼ(E.C.4.1.3.7)は、Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany)から購入された。ラディシコールは、国立癌研究所(Frederick, Maryland)のレン・ネッカーズ博士から入手された。ペプチドVSV8(RGYVYQGL-配列番号1)は、チャペル・ヒル・ペプチド・シンセシス・ファシリティーにおけるユニバーシティー・オブ・ノースカロライナ(Chapel Hill, North Carolina)により合成された。Na^[125I]は、アマーシャム・ファルマシア(Piscataway, New Jersey)から購入された。他の試薬は全て、特記しない場合シグマ・ケミカル・カンパニー(St. Louis, Missouri)から入手された。GRP94は、Wearsch & Nicchitta (1996b) Biochemistry 35:16760-16769に記載された要領でブタ膵臓から精製された。GRP94の濃度は、280nmでの吸光度により測定された(1mg/ml = 1.18A₂₈₀)。

【0272】

発蛍光団結合反応。示された円偏光二色性およびクエン酸シンターゼ凝集実験を除き、結合反応は全て、緩衝液A(110ミリモルKOA_c、20ミリモルNaCl、2ミリモルMg(OA_c)₂、25ミリモルK-HEPES pH7.2、100マイクロモルCaCl₂)中に行なわれた。蛍光性プローブおよびラディシ

コールストックは、最終濃度5ミリモルのジメチルホルムアミド中で製造された。全検定法について、実験条件と同一の溶媒希釈液での対照反応は、いかなる溶媒作用についても補正するように遂行された。指示されている場合、GRP94には、15分間50℃水浴中におけるインキュベーション、次いで37℃への冷却により熱ショックを与えた。

【0273】

蛍光性測定。発光スペクトルは、光子計数方式で稼動するフルオロマックス(商標)分光蛍光計(SPEX Industries Inc. of Edison, New Jersey)において得られた。スペクトルを記録し、DM3000fオペレーティングソフトウェア、バージョン2.1(SPEX Industries Inc. of Edison, New Jersey)により処理した。放射スキャンについては、スリット幅を1nmに設定した。励起波長は次の通りであった：プロダン、360nm、ANS、372nm、bis-ANS、393nm、トリプトファン、295nm。スペクトルは全てバックグラウンド補正された。

【0274】

円偏光二色性測定。AVIV Associates 62DS(商標)円偏光二色性分光計(AVIV Associates of Lakewood, New Jersey)において遠紫外CD分光測定法を遂行した。37℃で1mm経路長石英キュベットにおいて試料を分析した。緩衝液Aは関連性のあるスペクトル領域において許容し得ないダイノード電圧を生じるため、GRP94試料(1マイクロモル)を標準リン酸緩衝食塩水溶液中で製造した。スペクトルを得る前、GRP94を、37℃で2時間10マイクロモルのbis-ANSとインキュベーションした。スペクトルを300~195nmで記録した。GRP94の θ_{222} 含有量を、222nmでのモル楕円率から算出した。Myers および Myers & Jakoby (1975) J Biol Chem 250:3785-3789参照。

【0275】

タンパク質分解の立体配座解析。タンパク質のトリプシン消化および後続のSDS-PAGE分析により、GRP94の立体配座状態を評価した。単純なタンパク質分解実験を行うため、10 μ lの0.5mg/ml GRP94ストックを、予め熱ショックを加えるかまたは加えないで、1 μ lのbis-ANSおよび

／またはラディシコールストック溶液と合わせ、37℃で指示された時間インキュベーションした。次いで、試料を0.1%トリプシンと合わせ、37℃で30分間消化した。等量のSDS-PAGE試料緩衝液を加え、試料を液体窒素中で急速冷凍させた。ゲル分析の直前、試料を解凍し、5分間沸騰させた。次いで、試料を12.5%SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離した。ゲルを固定し、クーマシーブルーで染色した。経時的実験を行うため、トリプシン処理の直前に0.5ml G-25セファデックス(商標)スピンカラムにおけるゲル濾過により過剰の遊離bis-ANSを除去した。

【0276】

bis-ANS結合部位の同定。Sharma et al. (1998) J Biol Chem 273(25):15474-78およびSeale et al. (1998) Methods Enzymol 290:318-323に記載されたbis-ANS光分解方法に従い、GRP94へのbis-ANSの共有結合的取込みにより、GRP94のbis-ANS結合領域を同定した。簡単に述べると、50µgのGRP94を、最終体積100µlで50マイクロモルのbis-ANSと合わせ、366nmハンドヘルドUVランプ(Ultra-violet Products, Inc. of San Gabriel, California)により15分間氷上で光架橋させた。光架橋後、GRP94-bis-ANS複合体を37℃で1時間トリプシンにより消化した。次いで、20ミリモルの重炭酸アンモニウムにおける連続アセトニトリル/水勾配を用いたC-18逆相HPLCによりトリプシン誘導限界消化産物を分離し、UV吸光度(220nm)および蛍光放射(励起418nm、放射498nm)により逐次検出した。現れた主要蛍光ピークを集め、Applied Biosystems PROCISE(PROCISE、商標)モデル492自動タンパク質シーケンサーにおけるエドマン分解法により対応するペプチドを配列決定した。

【0277】

ネイティブ・ブルー電気泳動。Schagger et al. (1994) Anal Biochem 217:220-230による記載に従い、ブルーネイティブ・ポリアクリルアミドゲル電気泳動(BN-PAGE)によりGRP94のオリゴマー状態を検定した。GRP94に熱ショックを加えるか、これを指示された時間10倍モル過剰のbis-ANSに暴露した。次いで、試料を15%グリセリンに溶かし、カソード緩衝液中0.

0.2%クーマシー・ブリリアントブルーと共に5-18%勾配ゲルへローディングした。ゲルを4で電気泳動にかけ、クーマシーブルーで染色し、脱色し、乾燥した。

【0278】

クエン酸シンターゼ凝集検定法。Buchner et al. (1998) Methods Enzymol 290:323-338に記載された方法により、クエン酸シンターゼの熱による凝集に対するGRP94の作用を検定した。タンパク質を全く含まないか、GRP94(1マイクロモル)を含む試料を、40ミリモルのHEPES pH7.5中0.2%DMFまたは10マイクロモルのbis-ANSと37で2時間インキュベーションした。次いで、試料を5分間43に温め、43にサーモスタットで調温した分光蛍光計に入れた。次いで、クエン酸シンターゼを0.15マイクロモルの最終濃度になるまで加え、酵素の熱による凝集の後光散乱が行なわれた。励起および放射波長は、2nmスリット幅で両方とも500nmであった。クエン酸シンターゼ凝集の時間経過を1000秒間追跡した。

【0279】

GRP94へのペプチド結合。ヨードビーズ(IODOBEADS、商標)方法(Pierce Chemical Co. of Chicago, Illinois)によりVSV8のヨウ素化を行い、そして取り込まれていない $[^{125}\text{I}]$ をSEP-PAK(商標)C18逆相カートリッジにおける分画により除去した。ヨウ素化ペプチドを非標識ペプチドと混合することにより、6.0 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ の最終比活性が得られた。GRP94(4.7 μg 、最終濃度0.5マイクロモル)を、37で3.5時間100 μL の緩衝液A中0.1%DMFにおいて等モル量のbis-ANSとインキュベーションした。次いで、試料をさらに30分間37でインキュベーションするか、または15分間50で熱ショックを加え、37で15分間回復させた。10倍モル過剰の $[^{125}\text{I}]$ VSV8を加え(最終濃度5マイクロモル)、混合物を37で30分間インキュベーションした。bis-ANS分解を阻止するためインキュベーションは全て暗所で行なわれた。次いで、75 μg のBSAで予め遮断しておいた1.2mLセファデックス(商標)G-75スピンカラムで試料を溶離し、 $[^{125}\text{I}]$ をガンマ計数法により定量した。

【0280】

実施例1

GRP94への極性感受性蛍光プローブの結合

GRP94の立体配座調節に関する最近の研究により、熱ショックに応じて起こり、ペプチド結合活性の活性化に伴う三次構造変化が確認された。Wearsch et al. (1998) *Biochemistry* 37(16):5709-16, Sastry & Linderoth (1999) *J Biol Chem* 274:12023-12035参照。熱ショック誘発立体配座変化と一致して、GRP94は、疎水性ドメインに優先的に結合する環境感受性蛍光プローブ、例えばナイルレッドの高い結合性を表す(Wearsch et al., 1998)。GRP94は、著しい疎水性を有する2つのドメイン、C-末端会合ドメインおよび高度保存N-末端領域を含み、これはHsp90ゲルダナマイシンおよびアデノシンヌクレオチド結合部位に対応する。Stebbins et al. (1997) *Cell* 89:239-250; and Prodromou et al. (1997) *Cell* 90:65-75参照。

【0281】

GRP94活性の熱ショック依存的活性化に関する構造的基礎を特性検定するため、天然および熱ショックGRP94と極性感受性発蛍光団の相互作用を調べた。Rosen & Weber (1969) *Biochemistry* 8:3915-3920; Weber & Farris (1979) *Biochemistry* 18:3075-3078; Takashi et al. (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* 74:2334-2338; Shi et al. (1994) *Biochemistry* 33:7536-7546で検討されているところによると、試験された3種のプローブ、プロダン(6-プロピオニル-2-(ジメチルアミノ)ナフタレン)、8-ANS(1,8-アニリノナフタレンスルホネート)およびbis-ANS(ビス(1,8-アニリノナフタレンスルホネート))は、タンパク質の疎水性部位に結合し、非極性環境への導入時に実質的な蛍光スペクトル変化をうける構造的に関連したプローブである。次の実験プロトコルを使用した。GRP94を37℃に温め、37℃に維持するかまたは50℃で15分間熱ショックを与え、次いで37℃でインキュベーションした。それに続いて、プローブストックをGRP94ストックに加え、放射スペクトルを30分後37℃で記録した。

【0282】

図1 Aに描かれている通り、天然または加熱ショックGRP94の存在下におけるプロダンの放射最大値は本質的に同一であったことから、プロダンは、熱ショックGRP94により現れた疎水性結合ポケット(複数も可)とは相互作用しないことを示していた。反対に、構造的に関連したプローブ、8-ANSは、天然GRP94との弱い相互作用を示すが、熱ショック後には強く結合する(図1 B)。

【0283】

GRP94とbis-ANSの相互作用は複雑であり、明白な時間依存性を示していた。図1 Cおよび1 Dに描かれている通り、天然GRP94への初めのbis-ANS結合は二相性であり、bis-ANSの存在下での長期インキュベーション後、熱ショックGRP94により見られたのと類似した発蛍光団結合レベルが観察された。これらのデータは、GRP94への最大bis-ANS結合性が緩慢な構造的トランジションを必要としたことを示唆している。さらにこのトランジションは、GRP94におけるbis-ANS誘発立体配座変化および/または立体配座状態のbis-ANS依存的安定化が天然タンパク質により低頻度で接近したことを示唆している。

【0284】

実施例2

熱ショックGRP94へのbis-ANS結合の分析

GRP94に関するbis-ANSの親和力を測定するため、bis-ANSを増加濃度の熱ショックGRP94に加え、蛍光スペクトルを測定し、そして475 nmでの放射強度をGRP94濃度の関数としてプロットした(図2 Aおよび2 B)。この一連の実験で使用された実験条件下では、GRP94へのbis-ANS結合は、bis-ANSに対して20倍モル過剰のGRP94モノマーでほぼ最大であり、半最大結合は110ナノモルGRP94で観察された(図2 B)。重要なことに、これらのデータは、bis-ANSが飽和状態で熱ショックGRP94に結合すること、およびGRP94へのbis-ANS結合部位(複数も可)がbis-ANSに関して類似した相対親和力を表したことを示している。

【0285】

実施例3

GRP94へのbis-ANS結合の構造的的重要性

長期インキュベーション期間後、天然GRP94に結合したbis-ANSの放射スペクトルは、熱ショックGRP94に結合したbis-ANSの放射スペクトルとの実質的類似性を有する。熱ショックはGRP94における安定した三次立体配座変化を誘発することが知られているため(Wearsch et al. (1998) Biochemistry 37(16):5709-16)、これらのデータは、GRP94へのbis-ANSの結合により、熱ショックにตอบสนองして生じる場合と類似した立体配座変化が誘導または安定化されることを示唆している。bis-ANS追加時に見られるGRP94立体配座が熱ショック後に観察されるのと類似しているか否かを測定するため、bis-ANS/GRP94複合体に関する一連の構造試験が遂行された。

【0286】

一連の実験において、天然、熱ショックおよびbis-ANS処理GRP94のタンパク質分解パターンが調べられた。図3A、レーン2および3に示されている通り、低レベルのトリプシンとの天然GRP94のインキュベーションにより、Stebbins et al. (1997); Prodromou et al. (1997) Cell 90:65-75; Wearsch & Nicchitta (1996b) Biochemistry 35:16760-16769に記載された通り、タンパク質の既知構造ドメインを表す、2種の主要なタンパク質分解産物が生成される。対照的に、bis-ANS処理または熱ショックGRP94のタンパク質分解により、主要なタンパク質分解産物の回収は実質的に低減化され、SDS-PAGE移動度の高いタンパク質分解フラグメントの多様なアレイが付随して現れる。HSP90の熱ショックまたはbis-ANS処理後、本質的に同一のタンパク質分解パターンが観察された。

【0287】

これらのデータは、GRP94へのbis-ANS結合が、熱ショックにตอบสนองして生じる場合と類似した立体配座でGRP94を誘導または安定化させるという証拠を提供していることから、熱ショックまたはリガンド(bis-ANS)結

合により容易に接近および/または安定化され得るGRP94立体配座状態が存在することを示唆している。

【0288】

実施例4

GRP94四量体および二次構造に対するbis-ANS結合の影響

組織から精製された場合、GRP94は、Wearsch & Nicchitta (1996a) Prot Express Purif 7(1):114-21; Nemoto et al. (1996) J Biochem 120:249-256によって記載されているようなホモ二量体として存在する。しかし、熱ショックを与えると、GRP94はWearsch et al. (1998) Biochemistry 37:5709-5719に記載のようにより高分子量複合体を形成する。bis-ANSのGRP94構造への影響をさらに特徴付けるために、天然GRP94、熱ショックGRP94、bis-ANS処理GRP94に関するオリゴマー化状態を、Schaggerら(1994)により記述のブルーネガティブポリアクリルアミドゲル電気泳動(BN-PAGE)技術によってアッセイした。これらの実験において、GRP94をbis-ANSまたは短い熱ショックを与えてインキュベートし、次に37℃でインキュベートした。次いで、当該サンプルを、BN-PAGEによって分析した。図4に見られるように、熱ショックまたはbis-ANS処理をしないと、大部分のGRP94はみかけの分子量が約200kDaの二量体として存在する。しかし、熱ショックに暴露すると、四量体、六量体および八量体の比較的速い形成を引起した(図4、レーン2-4)。GRP94を10倍モル過剰のbis-ANSとインキュベーションすると、熱ショックに対して見られる構造に似たGRP94の四量体構造における変化を誘導した(図4、レーン4、5)。これらのデータにより、bis-ANSは熱ショックへの応答の際に生じるそれに類似するGRP94における構造遷移を誘導または安定させるという仮説に対しさらなる指示を与える。

【0289】

bis-ANS依存性形態的变化の性質においてさらなる洞察を得るために、GRP94を、熱ショックに供するか、もしくはbis-ANSにより処理し、遠紫外線CDスペクトルを得た(図5)。図5に示したように、天然、熱ショック

および bis-ANS 処理 GRP94 に対する CD スペクトルは同一であり、 bis-ANS 結合は GRP94 の二次構造を変えるものではないことを示した。

【0290】

実施例 5

ラディシコール阻害温度および bis-ANS 誘導 GRP94 形態的变化

ラディシコール、即ち大環状抗生物質は、HSP90 の高保存性 N 末端ヌクレオチド結合ポケットに結合し、HSP90 機能を遮断する (Sharma et al. (1998) Oncogene 16(20):2639-45; Roe et al. (1999) J Med Chem 42:260-266)。ラディシコールの結合が GRP94 の構造力学に影響するかどうかを測定するために、下記実験を行った。GRP94 を、ラディシコールの濃度を増加させてインキュベートし、熱ショックを与え、冷却し、トリプシンで消化した。その後、サンプルの SDS-PAGE 分析をすると、ラディシコールの存在下に、天然 GRP94 とラディシコール処理、熱ショック処理 GRP94 との間のタンパク質分解パターンにおける類似点によりアッセイした場合、GRP94 が熱ショック誘導構造遷移を受け得ないということを示した。また、ラディシコールによる HSP90 の熱ショックで誘導される構造遷移に関する類似阻害を観察した。

【0291】

ラディシコールが、bis-ANS 依存性 GRP94 構造遷移を阻害し得るかどうかを決定するために、GRP94 をラディシコールの濃度を増加させてインキュベートし、次いで bis-ANS を添加し、当該サンプルを 1 時間インキュベートした。サンプルを、続いてトリプシンで消化し、このタンパク質分解パターンを SDS-PAGE によって測定した。図 6 A に図示されるように、ラディシコールは、bis-ANS が 10 倍モル過剰に存在する場合に、bis-ANS 依存性 GRP94 形態的变化を効率的に阻害する。

【0292】

図 6 A に示した実験はラディシコールが bis-ANS-依存性構造状態の出現を阻害することができることを示したが、GRP94 への bis-ANS 結合がラディシコール処理によって遮断されるかどうかを測定することが必要である。そのため下記実験を行った。GRP94 をラディシコール濃度を増加させながら

インキュベートし、次いで、有効な bis-ANS 結合を誘発するのに十分な条件下で熱処理し、bis-ANS 結合をアッセイした。図6Bに示したように、用量依存様式でラディシコールは、熱処理 GRP94 に結合する bis-ANS を阻害した。

【0293】

ラディシコールそれ自身が熱ショック誘導した形態的变化を遮断するために、これらのデータは、bis-ANS 作用に関する2つのモデルを示す。一つのモデルにおいては、bis-ANS はヌクレオチド結合ドメインに結合し、観察された形態的变化を直接的に誘発する。即ち、アデノシンヌクレオチド結合ポケットに結合することによってラディシコールは、bis-ANS-依存的形態的变化を阻害することが予測されよう。別のモデルにおいては、オープンもしくは閉鎖状態として任意に引用されるように、GRP94 は、2つの形態的状态間で相互交換する。オープン状態では、bis-ANS が結合し、それによりオープン形態は安定化されるが、一方、ラディシコール結合が閉鎖形態を温度感受性様式において安定化させる。両モデルに対して、N末端アデノシンヌクレオチド結合ドメインへの bis-ANS 結合が予測され、次いで試験した。

【0294】

実施例6

N末端アデノシンヌクレオチド/ラディシコール/ゲルダナマイシン結合ドメインへの bis-ANS の結合

bis-ANS が GRP94 の形態を変化させ得ることを決定したので、GRP94 への bis-ANS 結合部位を同定するために標的化した。Sharma et al. (1998) J Biol Chem 273(25):15474-78 and Seale et al. (1998) Methods Enzymol 290:318-323に記載のように、bis-ANS のUV光による照射により、タンパク質結合部位中ヘプローブの共有結合を可能にした。Materials and Methodsに記載のように、GRP94 を過剰の bis-ANS と組合せて、氷上で15分間光架橋した。続いて、GRP94 をトリプシンで消化し、HPLCにより蛍光ペプチドを精製し、標識ペプチドの配列を、エドマンシーケンシングによって決定した。主な合成蛍光ペプチドは、配列 Y S Q F I N F P I Y V (配列番号

2)を与え、これをGRP94のN末端ドメインの残基271-281にマッピングした。このセグメントは、アミノ酸210-222からのヒトHSP90配列HSQFIGYPITLFV(配列番号3)と相同性であり、アデノシンヌクレオチド/ゲルダナマイシン/ラディシコール結合ドメインのC末端領域とオーバーラップしている(Stebbins et al. (1997) Cell 89:239-250; Prodromou et al. (1997) Cell 90:65-75).

【0295】

実施例7

GRP94シャペロン活性を活性化するbis-ANS

GRP94におけるbis-ANS依存性形態的变化が機能的に重要であるかどうかを測定するために、Jakob et al. (1995) J Biol Chem 270:7288-7294 and Buchner et al. (1998) Methods Enzymol 290:323-338に記載のように、天然GRP94、熱ショックGRP94およびbis-ANS処理GRP94の分子シャペロン活性を、熱凝集アッセイにおいて評価した。これらの実験において、クエン酸シンターゼの凝集を、緩衝液、天然GRP94、熱ショックGRP94または2時間bis-ANSで前もって暴露されたGRP94存在下でアッセイした。GRP94の実験的処理に従って、反応を43で平衡化し、次いでクエン酸シンターゼを添加し、光拡散により示したように凝集を測定した。

【0296】

GRP94の非存在下に、クエン酸シンターゼは、急速な温度凝集をうけ、図7Aに示した実験条件下、15分間以内で安定レベルに達した。天然GRP94の存在下では、凝集の程度は低く、これは少なくとも一つの天然GRP94分子群の分画が、活性形態で存在することを示唆するものである。これらの実験的条件下で、約50%のクエン酸シンターゼが凝集した。これらの実験で使用したGRP94濃度で、化学量論的相互作用を考えると、これらの結果は、おおよそ8%の天然GRP94が活性形態で存在することを示す。熱ショックまたはbis-ANS処理GRP94の存在下、クエン酸シンターゼの温度凝集は全く検出できなかった(図7A)。これらのデータは、基質タンパク質に結合するためのGRP94の能力が、前もっての熱ショックもしくはbis-ANS処理によ

って増強することを示し、熱ショックもしくはb i s - A N S 結合によって誘発されたG R P 9 4 形態が、分子の活性状態を示していることを示唆するものである。

【0297】

実施例8

G R P 9 4 へのペプチド結合活性を活性化するb i s - A N S

b i s - A N S 処理の、G R P 9 4 のペプチド結合活性への影響を評価するために、G R P 9 4 をb i s - A N S もしくは短い熱ショックのどちらかにより処理した。次いで、10倍モル過剰の $[^{125}\text{I}]\text{-VSV8}$ を添加し、混合物を30分間、37℃でインキュベートした。遊離ペプチドを、SEPHADEX(登録商標)G75スピнкаラムクロマトグラフィーにより結合ペプチドから分離し、こ
当該結合ペプチドをガンマ計測法により定量した。図7Bに示したように、b i s - A N S によるG R P 9 4 処理は、G R P 9 4 のペプチド結合活性を顕著に増強し、天然タンパク質を超える約4~5倍の刺激を得た。同様の条件下で、熱ショックを与えたG R P 9 4 は約10倍の結合の刺激を提示した。図7Aおよび7Bに示したこのデータから、b i s - A N S が、顕著に増強された分子シャペロンおよびペプチド結合活性を示すG R P 9 4 形態を誘発もしくは安定化することが明らかとなった。

【0298】

実施例1-8の要約

実施例1-8は、b i s - A N S が保存されたG R P 9 4 のN末端アデノシンヌクレオチド結合ドメインに結合し、顕著に増加した分子シャペロンおよびペプチド結合活性を示す三量体形態的变化を誘発することを示している。G R P 9 4 へのb i s - A N S の結合は、初期の急速結合段階、続く緩慢な伸長結合段階を有する二段階である。これらのデータに従って、オープン状態で参照されるように、b i s - A N S は、G R P 9 4 形態に結合し、低い発生量のG R P 9 4 形態を安定化させる。このモデルにおいて、G R P 9 4 分子シャペロンおよびペプチド結合活性は、そのような形態的变化に密接に結合している。一方、制御リガンドがない場合、いかなる特定の理論もしくは法によって束縛されることは出願人の

意思ではないが、この形態への接近は、内因性構造的変動による時間および温度依存性様式でおこると考えられる。例えばゲルダナマイシンおよびラディシコールなどの阻害的リガンドは、閉鎖もしくは不活性な形態(conformation)にあるGRP94に結合し、そして安定化することによって機能する。

【0299】

要約すると、実施例1-8は、分子シャペロンおよびペプチド結合活性の著しい活性化に伴うGRP94におけるリガンド誘発形態的变化の同定を開示する。熱ショック活性化とbis-ANS結合の後のGRP94形態との類似性は、GRP94構造および活性がN末端アデノシヌクレオチド結合ドメインに結合するリガンドによって制御することができるという、bis-ANSリガンド状態におけるタンパク質の形態が生理学上適切であるという結論を支持するものである。

【0300】

実施例9-13

HSP90シャペロン、GRP94のアデノシヌクレオチド結合ドメインにおけるアロステリックなリガンド相互作用

実施例9-13では、GRP94およびHSP90がアデノシンを基にしたリガンドとのそれらの相互作用の点で異なるということを開示する。GRP94は、アデノシン誘導体N-エチルカルボキシアミド-アデノシン(NECA)の飽和可能な結合高親和性を示したが、一方HSP90は示さなかった。NECA置換アッセイにおいて、GRP94はATP、ADP、AMP、アデノシンおよびcAMPについて弱い結合親和性を示した。GRP94ATPアーゼ活性は存在するが、ATP濃度に関して飽和しえない、そのため、従来の酵素的基準によって特徴付けることができない。GRP94へのNECA結合に関する放射性リガンドおよび熱量研究は、ヌクレオチド結合ドメインへのリガンド結合は、アロステリックな制御下で存在することを明らかにした。即ち、GRP94は、リガンドを基にしたアロステリック機構により、そしてATP以外の調節性アデノシンを基にしたリガンド(類)により制御される。

【0301】

実施例9-13に関する材料および方法

GRP94、BiPおよびHSP90の精製

GRP94を、Wearsch & Nicchitta (1996a) Prot Express Purif 7:114-121によって記載されたように、下記修飾を加え、ブタ膵臓の粗ミクロソームから精製した。ミクロソームを、最初に単離した後、0.25Mシュクロース、20mM KOAc、25mM K-Hepes、pH7.2、5mM Mg(OAc)₂の10倍希釈物によって洗浄し、続いて、遠心分離(30分、40K rpm、4、Ti50.2ローター)によって再単離した。単離した粗ミクロソームからのルーメンの内容物を開放するために、ミクロソームを、5mM CHAPSを添加して浸透性にし、このルーメン内容物を遠心分離(2時間、45,000 RPMで(4、Ti50.2ローター))により単離した。

【0302】

BiPを下記方法で精製した。ブタ膵臓の粗ミクロソームから得たルーメンのタンパク質分画を、直列で結合させた1ml ADP-アガロースおよび1ml ATP-アガロース(Sigma Chemical Co. of St. Louis, Missouri)カラムにより、一晚循環させた。次いで、このカラムを2 x 5mlの350mM NaCl、25mM Tris、pH7.8、5mM Mg²⁺を含有する緩衝液で洗浄し、BiPを、ヌクレオチド親和性カラムから10mM ATPおよびADPを加えた3 x 5mlの同緩衝液で溶出した。分画物を含有するBiPを、SDS-PAGEで同定し、2x4Lの緩衝溶液A(110mM KOAc、20mM NaCl、25mM K-Hepes、pH7.2、2mM Mg(OAc)₂、0.1mM CaCl₂)に対して透析した。次いで、タンパク質サンプルを、緩衝溶液Aで平衡化したSUPERDEX(登録商標)26/60カラム(Amersham Pharmacia Biotech of Piscataway, New Jersey)に重層し、BiP含有分画をSDS-PAGEによって再び同定し、プールし、遠心分離による限外濾過(CENTRICON-30(登録商標); Amicon of Beverly, Massachusetts)によって濃縮した。

【0303】

HSP90を下記のようにラット肝臓サイトソルから精製した。サイトソルを、30%硫酸アンモニウムで調整し、60分間氷上で攪拌した。この溶液を、1

5分間、Sorvall SS34ローターにおいて20,000 x gで遠心分離し、この上清を回収し、0.22 µmフィルターで濾過した。この濾過した上清に、プロテアーゼ阻害剤(1 µg/ml ペプスタチン、1 µg/ml ロイペプチン、20 µg/ml SBTI および 0.5 mM PMSF)を加え、フェニル-SUPEROSE™ HR10/10カラム(Amersham Pharmacia Biotech of Piscataway, New Jersey)に重層した。洗浄後、この結合タンパク質を、10 mM Tris/HCl、pH 7.5、1 mM EGTA、0.5 mM DTT中30-0%の飽和硫酸アンモニウムの濃度勾配で溶出し、その画分を含有するHSP90をSDS-PAGEによって同定した。次いで、HSP90含有分画をプールし、2 x 3時間、2 Lの低い塩の緩衝液(10 mM NaCl、25 mM Tris、pH 7.8)で透析した。次いで、透析サンプルを0.22 µmフィルターで濾過し、低い塩の緩衝液で平衡化したMONO-Q(商標)HR10/10カラム(Amersham Pharmacia Biotech of Piscataway, New Jersey)においた。このカラムを、25 mM Tris、pH 7.8中、10 mM-750 mM NaClの濃度勾配で溶出した。HSP90含有分画を、SDS-PAGEによって同定し、プールした。

【0304】

さらなる精製を、緩衝液B(10 mM NaH₂PO₄、pH 6.8、10 mM KCl および 90 mM NaCl)で平衡化した4 mL ヒドロキシアパタイトカラム(Bio-Rad HTP of Hercules, California)にMONO-Q(商標)のプールを用いて達成した。ヒドロキシアパタイトカラムを、10 mM NaH₂PO₄から250 mM NaH₂PO₄の濃度勾配で溶出し、HSP90分画をSDS-PAGEによって同定した。225 mM NaH₂PO₄、10 mM KCl および 90 mM NaCl中のHSP90プールを、遠心分離の限外濾過(CENTRICON(登録商標)30; Amicon, Beverly, Massachusetts)によって濃縮し、-80 °Cで貯蔵した。

【0305】

[³H]-NECA結合アッセイ

9 µgのGRP94を、氷上で、終体積250 µlのpH 7.5の50 mM Tris中に、20 nM [³H]-NECA(Amersham Pharmacia Biotech of Piscataway, New Jersey)と共に様々な濃度の競合剤を用いてインキュベートした。記載

の結合反応は、緩衝液C(10mM Tris, pH 7.5, 50mM KCl、5mM MgCl₂、2mM DTT、0.01%NP-40、20mM Na₂MoO₄)または50mM トリス、pH7.5、10mM Mg(OAc)₂のいずれかで行った。結合対遊離[³H]-NECAを、0.3% ポリエチレンイミン(Sigma Chemical Co. of St. Louis, Missouri)で前処理した#32ガラスファイバーフィルター(Schleicher and Schuell of Keene, New Hampshire)上の結合反応の真空濾過によってアッセイした。真空濾過は、Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, New Jersey)のパキューム・フィルトレーション・マニフォールド(vacuum filtration manifold)によって行った。

【0306】

フィルターを、3 x 4 mlの氷冷50mM Tris、pH7.5で手早く洗浄し、5mLのシンチレーション液(SAFETYSOLVETM RPI of Mt. Prospect, Illinois)におき、ボルテックスし、液体シンチレーション分光計によって計測した。GRP94に結合する[³H]-NECAに関する速度論的パラメーターを測定した実験では、NECAの化学的濃度および比活性を、非標識NECAの添加により調整した。全結合反応をトリPLICATEし、バックグラウンド値の控除によって訂正し、GRP94を欠く結合反応を測定した。

【0307】

ATP結合アッセイ

6 μgのGRP94、BiPおよびHSP90を氷上で1時間緩衝液B中の50 μM γZ[³²P]ATP(1000 μCi/μmol) (Amersham Pharmacia Biotech of Piscataway, New Jersey)インキュベートした。ニトロセルロースフィルター(BA85)(Schleicher & Schuell of Keene, New Hampshire)を、使用する前に緩衝液B中に個々に湿らし、結合対遊離[³²P]-ATPを真空濾過によって分離した。濾過物を3x2 mLの氷冷緩衝液Bで洗浄し、5 mLのシンチレーション液におき、ボルテックスし、計測した。

【0308】

等温滴定熱量測定

等温熱量測定実験を、MSC熱量計(MicroCal Inc. of Northampton, Massach

usetts)を用いて25℃で行った。NECA結合パラメーターを決定するために、2つの5μM注入を、続いて152μMNECAストックから23回の10μL注入にかけた。この反応チャンバー(1.3mL)は5μMGRP94を含有した。必要な訂正を、緩衝液中のタンパク質溶液およびリガンド溶液への緩衝液添加から得られる希釈熱を控除することによって行った。次いで、訂正データをORIGIN(商標)ソフトウェア(Microcal Software, 1998)に相応させて、結合パラメーターをえた。ラディシコール結合パラメーターを、5μMのGRP94および115μMのラディシコールによる類似様式で得た。

【0309】

リン酸化アッセイ

GRP94自己リン酸化に関してアッセイするために、1μMGRP94を-[³²P]ATP(6000cpm/pmol)(Amersham Pharmacia Biotech of Piscataway, New Jersey)でインキュベートして、冷ATPで希釈し、10mM Mg(OAc)₂および50mM K-Hepes、pH7.4を含有する緩衝液中終濃度0.15mMATPを得た。カゼインキナーゼアッセイについて、カゼインキナーゼIIの1ユニットを4μMカゼインの添加により上記のようにインキュベートした。競合剤を、その適当なサンプルに添加して、3.6%DMSO中180μMNECA、3.6%DMSO中180μMラディシコール、5μg/mlヘパリン、5mMGTPまたは3.6%DMSOの最終濃度を得た。37℃、1時間で25μL反応混合物をインキュベートし、10%トリクロロ酢酸を添加して停止した。サンプルを10%SDS-PAGEゲルによって分析し、リン酸化種をFuji MACBAS1000(登録商標)ホスホリン酸システム(Fuji Medical Systems of Stamford, Connecticut)を用いて定量した。

【0310】

ATPase アッセイ

1μMGRP94モノマーからなる100μL反応物、様々な濃度のMgATP(pH7.0)および50mM K-Hepes、pH7.4を、2時間、37℃でインキュベートした。次いで、サンプルをCENTRICON(登録商標)-30(Amicon of Beverly, Massachusetts)、10,000rpm、4℃で回転させてヌク

レオチドからタンパク質を分離した。終濃度50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、pH 7.0 および4 μM AMP、pH 7.0を添加し、上記サンプルを希釈し、15,200 rpm、5分間4 で遠心分離した。次いで、100 μL の上清をPARTISIL (登録商標) SAXカラム(Alltech of Deerfield, Illinois)で、Series 1050 Hewlett Packard HPLC systemを用いて分画した。ヌクレオチドの溶出を、最初の10分間は、移動相の150 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、pH 5.2、1.2 ml/分を用いて、次いで、その溶出の残余分については300 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、pH 5.2、2 ml/分の速度でステップグラジエント溶出によって行った。このプロトコールにおいて、ADPおよびATPは、7分間でADPおよび12分間でATPを溶出することにより十分分割した。ピーク高値は加水分解率およびADP形成の計算で用いた。自発加水分解物をGRP94を欠いた対のインキュベーションにおいて各々ATP濃度で測定した。AMPを内部標準として同等のサンプル負荷物に関して対照するために使用した。

【0311】

トリプトファン蛍光

トリプトファンの蛍光測定を、励起および放出の両方に対して1 nmにセットしたスリット幅を持つFLUOROMAX (登録商標) スペクトル蛍光分析器 (Spex Industries, Inc. of Edison, New Jersey) で実施した。サンプルを295 nmの波長で励起し、放出スペクトルを300-400 nmで記録した。全てのスペクトルを緩衝液または緩衝液プラスリガンドサンプルの控除により修正した。GRP94 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を10 mM Mg(OAc)₂ とリガンドの次の濃度 (50 μM NECA、50 μM ゲルダナマイシン、2.5 mM ATP または 2.5 mM ADP) を加えた緩衝液A中で1時間37 でインキュベートした。次いで、サンプルを室温に冷却し、石英キュベットに移し、スペクトルを集めた。対照実験では、遊離のトリプトファンの蛍光は、いずれかのアッセイリガンドの存在によっても顕著には影響しなかった。

【0312】

実施例9

アデノシンを基にしたリガンド結合特性と異なるHSP90タンパク質

HSP90およびGRP94が明瞭なアデノシン-リガンド結合特性および相対的なNECAおよびGRP94、HSP90およびBiPのおよびATP結合活性を示すかどうかを測定するために、小胞体Hsp70パラログを比較した(図8)。これらのアッセイにおいて、精製したGRP94、HSP90またはBiPを氷上、60分間、20nm^[3H]-NECA存在下でインキュベートし、遊離NECAに対する範囲を真空濾過によって決定した。図8にあきらかなように、GRP94は容易に検出する^[3H]-NECA結合活性を提示する一方、^[3H]-NECA結合は、HSP90またはBiPでは検出されなかった。類似実験では、HSP90への^[3H]-NECA結合を、Sullivanら(1997)によって記載されたATP結合に関連するHSP90構造を安定化すると知られているモリブデートおよびNP-40の存在下に評価した。これらの条件下、HSP90への^[3H]-NECA結合はまた観察されなかった。

【0313】

ATP結合をアッセイした場合、BiPは予測されたATP結合活性を示し、一方でATP結合はHSP90またはGRP94に対して観察されなかった。下記に示したように、HSP90へのATP結合を検出することができないことはおそらくATPに関するHSP90の低い親和性の結果である(Prodromou et al. (1997) Cell 90:65-75; Scheibel et al. (1997) J Biol Chem 272:18608-18613)。要約すると、これらのデータはGRP94およびHSP90が、アデノシンを基にしたリガンドNECAに結合するためのそれらの能力において異なることを示し、GRP94に関するアデノシンヌクレオチド結合ポケットのリガンド特異性はHSP90のそれと異なることを示唆している。

【0314】

実施例10

GRP94に対するNECA結合の速度論的分析

ヒトGRP94の^[3H]-NECA結合の速度論的分析を、図9Aおよび9Bに示した。200nMのK_d値でGRP94への^[3H]-NECA結合は飽和し、0.5mol^[3H]-NECA/molのGRP94モノマー結合速度を示した。これらの値は、Hutchison et al. (1990) Biochemistry 29:5138-5144によって胎盤のG

GRP94 (アデノチシ(adenotin))で観察されたものと類似している。Hillの結合データのプロットは、1.2のスロープが与えられ、これはGRP94への $[^3\text{H}]$ -NECA結合が共同的でないことを示す。

【0315】

構造的に、GRP94はWearsch & Nicchitta (1996a) *Prot Express Purif* 7:114-121; Wearsch & Nicchitta (1996b) *Biochemistry* 35:16760-16769; Nemoto et al. (1996) *J Biochem* 120:249-256)によって記載されたような同一サブユニットの二量体として存在する。2つのサブユニットが同一であるとすれば、結合飽和での50%リガンド占有率は予測しなかった。GRP94からのNECAの分離速度は急速(Huttemann et al. (1984) *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 325:226-33)であり、そのため観察された分画占有レベルは、遊離対結合 $[^3\text{H}]$ -NECAを分離するために使用した方法の人工産物を反映することができると考えられる。

【0316】

ハーフサイト占有値の精密度を評価するために、NECA-GRP94相互作用の速度論を等温滴定の熱量測定、即ち結合および遊離リガンドの物理学的分離を必要としない方法によって評価した。これらの実験において、図9Cで説明されているが、NECAについてGRP94の結合速度論およびラディシコールを測定した。ラディシコールは、高い親和性(19 nm)を有するHSP90のN末端ヌクレオチド結合ポケットと結合するHSP90関数の抗生物質阻害剤であり、Roe et al. (1999) *J Med Chem* 42:260-266によって提案されるような2 molラディシコール/mol HSP90二量体の予測された結合速度である。等温滴定熱量測定によるGRP94へのNECA結合分析により、GRP94二量体(図9C)の1.1 mol NECA/molの結合速度を得た。

【0317】

対照的に、ラディシコールは、図9Cに示したような2 molラディシコール/mol GRP94二量体の化学量論で結合する。これらのデータは、全ラディシコールが、天然GRP94二量体に存在する2つのヌクレオチド結合部位の完全な占有率を達成し得るが、他のリガンド、例えばNECAなどは、GRP94に対す

る1つの特定の部位に結合するか、さらなるリガンド結合を防御する対の部位における形態的变化を誘導する1つのヌクレオチド結合部位に結合することを示す。

【0318】

実施例11

GRP94のヌクレオチド結合ポケットへのリガンド結合の特異性

NECAがGRP94上の1つの特定部位に結合するか、もしくはN末端アデノシンヌクレオチド結合ポケットのハーフサイトの占有を示すかどうかを決定するために、実験は、最初にNECAがアデノシンヌクレオチド結合ポケットに結合するかどうかを決定するために行った。 $[^3\text{H}]$ -NECA競合アッセイをゲルダナマイシンおよびラディシコールによって行ったが、両化合物はHSP90のヌクレオチド結合ポケットに高い親和性で結合すると知られている(Roe et al. (1999) J Med Chem 42:260-266, Lawson et al. (1998) J Cell Physiol 174:170-8)。図10Aに示したこのデータは、ことを示している。ゲルダナマイシンおよびラディシコールは両方とも、GRP94に対する結合に対して $[^3\text{H}]$ -NECAと競合し、従って加えて高い相対的な親和性をもってし、下記のランク順ラディシコール>ゲルダナマイシンにおいて競合する。

【0319】

Wearsch & Nicchitta (1997) J Biol Chem 272:5152-5156に記載のように、GRP94に対するATPの安定な結合を検出することは困難である。Prodromouら(1997) Cell 90:65-75によってHSP90について報告されたように($K_d = 132 \mu\text{M}$)、GRP94がATPに対して類似したそして非常に低い親和性を示すならば、ATP結合が通常の技術で検出し得ることはおそらくありえない。しかし、NECAに対するGRP94の高い親和性を想定すれば、NECAのヌクレオチド結合ドメインとの潜在的相互作用は、競合的な置換アッセイによって解決し得る。GRP94のヌクレオチド結合特異性を測定するために、GRP94に結合するNECAと競合するATP、ADPまたはAMPの能力を試験した。これらの実験において、GRP94を、ATP、ADPまたはAMPの漸増濃度下で20 nM $[^3\text{H}]$ -NECAとインキュベートし、相対的な $[^3\text{H}]$ -NECA結

合を真空濾過によって測定した。ノーマナル($80 \mu\text{M}$) Mg^{2+} の存在下で、ATP、ADPおよびAMPがGRP94への結合に対して $[\text{}^3\text{H}]\text{-NECA}$ と効率的に競合することを観察した。

【0320】

3つのポイントがこれら実験からの明確である。1つめは、GRP94に結合するNECAが、ゲルダナマイシン、ラディシコールおよびアデノシンヌクレオチドによって効果的に阻害されるため、NECAがGRP94の同類のN末端アデノシンヌクレオチド結合ドメインに結合すると結論づけることが可能である(図10A)。2つめは、ATP、ADPおよびAMPに対するこのGRP94の相対的親和性は非常に低かった(図10B)。従って、 $[\text{}^3\text{H}]\text{-NECA}$ 結合の50%阻害にはATPの約1000倍モル過剰が必要であった。3つめは、HSP90のアデノシンヌクレオチド結合ポケットにおけるアデノシンおよびアデノシンのリボゾーム部分の確立された分子相互作用に関して見ると、NECAに対するGRP94の相対的に高い結合親和性は、リガンドに対する主たる選択がアデノシン部分を基にしてなされることが考えられる。この理由について、別のアデノシンを持つリガンドのN末端ヌクレオチド結合ポケットとの相互作用を試験した(図10C)。これらのデータは、ADPについて観察されたことに近似する相対的置換活性によってcAMPおよび遊離アデノシンも、GRP94のN末端アデノシンヌクレオチド結合ポケットに結合するということを示した。

【0321】

このデータがGRP94が普通でない広い特異性をもってアデノシン、アデノシン誘導体およびアデノシンヌクレオチドを結合することを示したため、これらの結合現象についてのヌクレオシド特異性を確認するためにさらなる研究を行った。図11に示した実験において、 $[\text{}^3\text{H}]\text{-NECA}$ 競合的置換アッセイを用いて、ヌクレオシド塩基特異性を直接的に指向した。GRP94はATPおよびデオキシATPの両方を結合し得るが、GTP、CTPまたはUTPに対する結合がほとんどまたは全く観察されなかった。そのため、GRP94のヌクレオチド結合ポケットは、アデノシンを持つリガンドのその選択において厳密であるように見える。

【0322】

NECA競合アッセイにおいて示したように、ATPおよびADPに対する相対的親和性の比較において、GRP94のATP/ADP結合特性およびHSP90について以前報告されたものとの間に明白な違いを記載した。GRP94に関して、ATPがADP以上に8倍高い効率でNECA結合を競合することがわかった。対照的に、HSP90のN末端ドメインは、ATPに対して観察された親和性(Prodromou et al. (1997) Cell 90:65-75)よりも4倍高い親和性でADPを結合した。Mg²⁺がHSP90 N末端ヌクレオチド結合ドメインの組替体形態に結合するATP/ADPに対して必須であることが、Prodromou et al. (1997) Cell 90:65-75 and Obermann et al. (1998) J Cell Biol 143:901-910によって示されていたので、この差異はアッセイ緩衝液中にMg²⁺イオンを欠くことによるものであるということを仮定した。

【0323】

この仮定を、NECA、アデノシン、ATP、ADPおよびAMPに対するGRP94の相対的親和性を過剰なMg²⁺存在下もしくは非存在下で比較した実験において試験した(図12)。これらの実験において、過剰なMg²⁺はGRP94へのNECAまたはアデノシンの結合に対して影響はないが、Mg²⁺はATP、ADPおよびAMPの結合を顕著に刺激したということを観察した。これらのデータは、HSP90のN末端ドメインへのATP/ADP結合に必要とされるような および ホスフェートとのMg²⁺相互作用を同定する最近の結晶構造データと一致した。Prodromou et al. (1997) Cell 90:65-75を参照されたい。しかし、HSP90 N末端ドメインとは異なり、MgATPおよびMgADPは、ほぼ同一の相対的親和性を有するGRP94に結合した。また、過剰なMg²⁺の存在がGRP94に対するcAMPおよびゲルダナマイシンの相対的結合親和性に対して影響しなかったことに注目すべきである。

【0324】

実施例12

自己リン酸化およびATP加水分解に対するヌクレオチドの必要性

ヌクレオチド結合ポケットへの結合が、観察されたGRP94自己リン酸化活

性に直接的に関与するかどうかを試験するために、GRP94に結合するATPの阻害剤としてNECAおよびラディシコールを使用した。自己リン酸化活性に関するデータを図13Aに示した。この研究において、GRP94の自己リン酸化活性を、NECA、ラディシコール、ヘパリンおよびGTPの存在下にアッセイした。ヘパリンおよびGTPは、GRPの精製調製物中にカゼインキナーゼII様の混合物を記載していた以前の研究(Wearsch & Nicchitta (1997) J Biol Chem 272:5152-5156; Riera et al. (1999) Mol Cell Biochem 191:97-104; and Ramakrishnan et al. (1997) J Cell Physiol 170:115-29)を基にして含めた。同じような論理によって、GRP94キナーゼ活性に対するこれらの化合物の相対的効果を、精製カゼインキナーゼIIと、精製カゼインで測定されたカゼインキナーゼII活性とを平行して比較した。

【0325】

図13Aで示されたこのデータから明白なように、GRP94のN末端ヌクレオチド結合ドメインに結合するNECAまたはラディシコールのどちらも、GRP94由来のまたはカゼインキナーゼII活性を溶媒のバックグラウンドイかに顕著に阻害しなかった。NECAおよびラディシコールの相対的に高い疎水性のため、これらの化合物を含有するインキュベーションには、それ自身がGRP94由来のおよびカゼインキナーゼII活性の両方を顕著に低下させるリガンド溶媒である高濃度のジメチルスルホキシドを含んでいた。ヘパリンおよびGTPは、GRP94由来のおよびカゼインキナーゼII活性を非常に弱くした。要約すると、N末端アデノシンヌクレオチドGRP94結合ポケットへのヌクレオチドの接近を阻害することは、GRP94自己リン酸化活性を顕著に阻害するものではない。

【0326】

ATP結合および加水分解のサイクルが、HSP90活性の調節において機能していることおよびGRP94がATPase活性を示すという知見は、GRP94およびHSP90が実際類似メカニズムによって調節されるということを示唆する。さらにこの示唆を評価するために、GRP94のATPase活性をATP濃度の関数としてアッセイした(図13B)。2つのポイントは、観察されたデー

タからすぐに明らかである。第一に、ATPase活性は飽和を示さなかった； V_{max} に対する証拠を得ることはできず、そのため、酵素的機能についての従来の基準(即ち、 $K_m/K_{cat}/V_{max}$)を適用できなかった。第二に、ATPase活性の絶対的な大きさが非常に小さなファクターによってATP加水分解の自発的速度を超えた。観察されたATPase活性は、NECAによる阻害に対して感受性であり、そのためN末端ヌクレオチド結合ドメインへのATPの結合に対して生じるのかもしれない。

【0327】

実施例13

GRP94へのアデノシンヌクレオチド結合の構造的結果

GRP94へのATP結合の機能的相関性を同定することができなかったので、GRP94構造に対するATP、ADP、NECAおよびゲルダナマイシンの影響を評価した。これらの研究では、GRP94のトリプトファン放出スペクトルを、提示リガンドと複合化してGuilbault (1967) Fluorescence: Theory, Instrumentation, and Practice, Marcel Dekker, Inc., New York, New Yorkによって記載された技術に従って三量体構造状態のものさしとして試験した。図14に示したように、高濃度のATPまたはADPは、GRP94トリプトファンの蛍光スペクトルにおいてほぼ同じ変化を引き出した。驚くべきことに、ATPまたはADPの存在下において、トリプトファンの蛍光がゲルダナマイシンの存在下で観察したように低下した。これらのデータは、ATPおよびADPが阻害性のリガンドゲルダナマイシンの存在下において生じる現象と似た形態的变化を引き出し、そしてトリプトファンの蛍光によって評価されたようにATPおよびADP結合状態におけるGRP94の構造は本質的に同一であることを示した。対照的に、NECAの添加は、トリプトファンの蛍光を増加した。これは、リガンドが、GRP94において異なる構造状態を引き出し得るということを示すものである。実施例1~8の上記に示したように、GRP94構造におけるそのような変化は、GRP94シャペロン機能に対する劇的な効果を持ち得る。

【0328】

実施例9-13の要約

実施例9～13で、HSP90パラログGRP94およびHSP90は、アデノシンヌクレオチドとの明確な構造的かつ機能的相互作用を示すということを開示した。HSP90は異なり、GRP94は置換アデノシン誘導体、例えばN-エチルカルボキシアミドアデノシン(NECA)と特異的な、高い親和性結合相互作用を示す。そのような相互作用を分析すると、GRP94のN末端ATP/ADP結合ドメインの占有状態が、2つの同一サブユニットの間でコミュニケーションする。この結論は、飽和状態ではNECAがGRP94に1mol NECA: mol GRP94二量体の化学量論で結合するという観察から描かれた。NECAとは対照的に、GRP94の阻害的なりガンド、ラディシコールは2mol: mol GRP94の化学量論で結合する。即ち、アデノシンヌクレオチド結合ポケットの関連する構造的部分は、GRP94とHSP90との間で保存されているが、2つの結合部位のこのリガンド特異性は異なる。即ち、特別に機構的理論によって束縛することを我々は望まなかったが、N末端アデノシンヌクレオチド結合ポケットへのリガンド結合の特異性は、その結合ポケットに対するドメインのCおよびN末端によって影響するということが想像され、そこにはHSP90およびGRP94の間の重要な配列の相異が同定され得た。

【0329】

従来のリガンド結合研究(図9)および等温滴定量測定から得られたこのデータの両方により、GRP94は1mol NECA: mol GRP94二量体の化学量論でNECAを結合するというを示した。さらに、競合研究は、GRP94に結合するNECAが全体として、ゲルダナマイシン、ラディシコール、ATPおよびADP(図10A-10C)によって競合するというを示しており、それはNECAが保存N末端アデノシンヌクレオチド結合ドメインに結合することを示す。GRP94が1分子あたり2つのそのような部位を含む(Wearsch & Nichitta (1996b) *Biochemistry* 35:16760-16769)ので、そのため、GRP94サブユニットは1つの部位占有を付与するためお互いにコミュニケーションすることになる。

【0330】

HSP90タンパク質に対する天然リガンドとしてATPおよびADPの同定

が、N末端の高度保存ヌクレオチド結合ポケットを同定する結晶学的研究を基にしており(Prodromou et al. (1997) Cell 90:65-75)、またATP/ADP結合に関与するアミノ酸がインビボでHSP90機能に必須であるという相補的なイン・ビボの研究(Obermann et al. (1998) J Cell Biol 143:901-910; Panaretou et al. (1998) EMBO J 17:4829-4836)、そして最後にはHSP90タンパク質がATPase活性(Grenert et al. (1999) J Biol Chem 274:17525-17533; Nadeau et al. (1993) J Biol Chem 268:1479-1487; Obermann et al. (1998) J Cell Biol 143:901-910)を提示することを示す研究を基にしている。2つのタンパク質のN末端ヌクレオチド結合ポケットにおける高いホモロジーにもかかわらず、HSP90およびGRP94は、NECA結合活性において異なるということは、ATP加水分解を触媒する2つのタンパク質の能力において差異が存在することを示唆する。実際、GRP94 ATPase活性がそのような低い親和性相互作用に対して適当なATP濃度で調べると、GRP94 ATPase活性は自発的加水分解の速度をわずかに越え、そしてさらに重要なことは、ATP濃度を増加させても飽和しないということが観察された。

【0331】

保存されたドメインの結合特性のさらなる研究は、それがアデノシンヌクレオチド間の低い選択性を提示し、ATP、dATP、ADP、AMP、cAMPおよび遊離アデノシンを結合するということを示した。これらのデータとその他のデータを基にして、GRP94構造を、リガンド介在構造的調節を基にしたATP/ADP以外のアデノシンを持つリガンドによってアロステリックな様式で制御されている。

【0332】

まだ未確認の何らかのコファクターの非存在下での精製タンパク質によって示されるGRP94依存性ATP加水分解は非酵素的であり、GRP94機能の調節に寄与していないようである。GRP94に対する生理学上のリガンドとしてATPおよびADPの挙動を混合させるのは次のような観察である。第一に、ATPまたはADPのどちらも、Wearsch & Nicchitta (1997) J Biol Chem 272:5152-5156に記載されたようにGRP94活性を調節することを示されなかった。

第二に、NECAおよびラディシコールへの非感受性のため、GRP94自己リン酸化活性は、N末端ヌクレオチド結合ドメインに対するアデノシンヌクレオチド結合を反映しない(図13)。第三番目に、おそらく最も重要であろうが、ATP、ADPおよび阻害剤ゲルダナマイシンは、GRP94において類似の形態的变化を引き起こす。興味深いことに、NECAの存在下では、ATP、ADPまたはゲルダナマイシンの存在下では生じるものとは異なる形態的变化が観察された(図14)。ゲルダナマイシンの存在下で観察されるように、これらのデータはGRP94に結合し、不活性構造におけるタンパク質を安定化するATPおよびADPと一致した。

【0333】

これらのデータを評価する際、ATPase活性に対する酵素的基準および形態学的なデータを同定することできないことが、ATP/ADPは、ATP/ADPとのその相互作用に対する速度論および熱力学的基礎を実質的に変化させる同定されていないGRP94と相互作用する補助タンパク質かまたは生理学的なりガンドとして機能するATP/ADP以外のアデノシンを基にしたリガンド、のいずれかが阻害剤として機能することを示す。このリガンドは、例えば、無酸素症、栄養欠乏または熱ショックなどの細胞ストレスの時間中に生成し、GRP94機能を活性化する。このリガンドは、実質的に基質(ポリ)ペプチドとの相互作用を変えるGRP94における形態的变化を誘発する。

【0334】

引用文献

以下に挙げる引用文献ならびに明細書に記載の引用文献は、それらが本明細書で用いられる方法、技術および/または組成物の背景を補い、説明し、提供するか、それらを教示する程度に本明細書に出展明示により包含させる。

【0335】

Anderson & Matovcik (1977) Science 197:1371-1374.

Arnold et al. (1995) J Exp Med 182:885-889.

Bacalhoa et al. (1994) J Cell Sci 107:3301-3313.

Basu & Srivastava (1999) J Exp Med 189:797-802.

- Blachere et al. (1993) *J Immunotherapy* 14:352-356.
- Blachere et al. (1997) *J Exp Med* 186:1315-1322.
- Bodanszky et al. (1976) *Peptide Synthesis*, 2nd Ed. John Wiley & Sons.
- Brawer et al. (1992) *J Urol* 147:841-845.
- Buchner et al. (1998) *Methods Enzymol* 290:323-338.
- Buchner (1999) *Trends Biochem Sci* 24:136-141.
- Bumal (1988) *Hybridoma* 7(4):407-415.
- Caplan (1999) *Trends Cell Biol* 9:262-268.
- Catalona et al. (1993) *JAMA* 270:948-958.
- Chadli et al. (1999) *J Biol Chem* 274:4133-4139.
- Chang et al. (1997) *Mol Cell Biol* 17:318-25.
- Chavany et al. (1996) *J Biol Chem* 271:4974-4977.
- Chen et al. (1996) *Mol Endocrinol* 10:682-693.
- Chen et al. (1996) *J Cereb Blood Flow Metab* 16:566-577.
- Chien et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9578-9582.
- Choi et al. (1987) *J Neurosci* 7:357.
- Csermely & Kahn (1991) *J Biol Chem* 266:4943-4950.
- Csermely et al. (1995) *J Biol Chem* 270:6381-6388.
- Csermely et al. (1993) *J Biol Chem* 268:1901-1907.
- Csermely et al. (1998) *Pharmacol Ther* 79:129-168.
- Davis & Maher (1994) *Brain Res* 652(1):169-173.
- Demotz et al. (1989) *Nature* 343:682-684.
- Dittmar et al. (1998) *J Biol Chem* 273:7358-7366.
- Doherty et al. (1995) *Neuron* 14:57-66.
- Duina et al. (1996) *Science* 274:1713-1715.
- Elliott et al. (1990) *Nature* 348:191-197.
- Falk et al. (1991) *Nature* 351:290-296.
- Falk et al. (1990) *Nature* 348:248-251.
- Fan et al. (1999) *J Mol Med* 77:577-596.

- Ferreira et al. (1994) *J Cell Biochem* 56:518-26.
- Fields et al. (1990) *Int J Peptide Protein Res* 35:161214.
- Flynn et al. (1989) *Science* 245:385-390.
- Freireich et al. (1966) *Cancer Chemotherap Rep* 50:219-244.
- Gerweck et al. (1979) *Cancer Res* 39:966-972.
- Ginsberg & Busto (1989) *Stroke* 20:1627.
- Glasebrook et al. (1980) *J Exp Med* 151:876.
- Gradin et al. (1996) *Mol Cell Biol* 16:5221-5231.
- Grenert et al. (1999) *J Biol Chem* 274:17525-17533.
- Grollman et al. (1993) *J Biol Chem* 268:3604-3609.
- Hansen et al. (1989) *Electrophoresis* 10:645-652.
- Hebert et al. (1996) *EMBO J* 15:2961-2968.
- Hebert et al. (1997) *J Cell Biol* 139:613-623.
- Heike et al. (1996) *J Leukoc Biol* 60:153-8.
- Heike et al. (1994) *J Immunotherapy* 15:165-174.
- Henttu & Vihko (1989) *Biochem Biophys Res Comm* 160(2):903-910.
- Horch et al. (1999) *Neuron* 23:353-364.
- Hutchison et al. (1990) *Biochemistry* 29:5138-5144.
- Hutchison & Fox (1989) *J Biol Chem* 264:19898-19903.
- Huttemann et al. (1984) *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 325:226-233.
- Inaba (1992) *J Exp Med* 176:1693-1702.
- Ishii et al. (1999) *J Immunol* 162:1303-1309.
- Israeli et al. (1993) *Cancer Res* 53:227-230.
- Jakob et al. (1995) *J Biol Chem* 270:7288-7294.
- Jakob et al. (1996) *J Biol Chem* 271:10035-10041.
- Johnson et al. (1996) *J Steroid Biochem Mol Biol* 56:31-37.
- Karpiak et al. (1989) *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 29:403.
- Kassenbrock & Kelly (1989) *EMBO J* 8:1461-1467.
- Kosano et al. (1998) *J Biol Chem* 273:32973-32979.

- Kuznetsov et al. (1994) *J Biol Chem* 269:22990-22995.
- Kuznetsov (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8584-8589.
- Lawson et al. (1998) *J Cell Physiol* 174:170-178.
- Li & Srivastava (1993) *EMBO J* 12:3143-3151.
- Li et al. (1993) *EMBO J* 12:3143-3151.
- Mandel et al. (1994) *J Cell Sci* 107:3315-224.
- Masliah et al. (1992) *Exp Neurol* 136:107-122.
- Massa et al. (1996) "The Stress Gene Response in Brain" in *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews*, pp. 95-158, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pennsylvania.
- McAllister et al. (1997) *Neuron* 18:767-778.
- McAuley (1995) *Cerebrovasc Brain Metab Review* 7:153-180.
- McOmie (1973) *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, New York, New York.
- Meienhofer (1983) *Hormonal Proteins and Peptides Vol. 2*, pp. 46, Academic Press, New York, New York.
- Melnick et al. (1992) *J Biol Chem* 267:21303-21306.
- Melnick et al. (1994) *Nature* 370:373-375.
- Merrifield (1969) *Adv Enzymol* 32:221296.
- Microcal Software (1998) *MicroCal ORIGIN™*, MicroCal Inc., Northhampton, Massachusetts.
- Mitchell et al. (1998) *Eur J Immunol* 28:1923-1933.
- Mizoe et al. (1997) *J Surg Res* 73(2):160-165.
- Myers & Jakoby (1975) *J Biol Chem* 250:3785-3789.
- Nadeau et al. (1993) *J Biol Chem* 268:1479-1487.
- Nair et al. (1999) *J Immunol* 162:6426-6432.
- Natali et al. (1987) *Cancer* 59:55-63.
- Navarro et al. (1991) *Virology* 184:253-264.
- Nemoto et al. (1996) *J Biochem* 120:249-256.

- Nicchitta (1998) *Curr Opin Immunol* 10:103-109.
- Nieland et al. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6135-6139.
- Norrby (1985) "Summary" in *Vaccines 85*, Lerner et al. (eds.), pp. 388-389, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Obermann et al. (1998) *J Cell Biol* 143:901-910.
- Ortmann et al. (1997) *Science* 277:1306-1309.
- Palladino et al. (1987) *Cancer Res* 47:5074-5079.
- Palleros et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5719-5723.
- Panaretou et al. (1998) *EMBO J* 17:4829-4836.
- Perez & Walker (1990) *J Immunol* 142:3662-3667.
- Pratt (1998) *Proc Soc Exp Biol Med* 217:420-434.
- Pratt et al. (1996) *Exs* 77:79-95.
- Prodromou et al. (1999) *EMBO J* 18:754-762.
- Prodromou et al. (1997) *Cell* 90:65-75.
- Ramachandran & Gottlieb (1961) *Biochim Biophys Acta* 53:396-402.
- Ramakrishnan et al. (1997) *J Cell Physiol* 170:115-29.
- Riera et al. (1999) *Mol Cell Biochem* 191:97-104.
- Robbins & Angell (1976) *Basic Pathology*, 2nd Ed., pp. 68-79, W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania.
- Roe et al. (1999) *J Med Chem* 42:260-266.
- Rose et al. (1987) *Biochemistry* 26:6583-6587.
- Rosen & Weber (1969) *Biochemistry* 8:3915-3920.
- Rotzsche et al. (1990) *Nature* 348:252-254.
- Rotzsche et al. (1990) *Science* 249:283-287.
- Sadasivan et al. (1996) *Cell* 5:103-114.
- Sastry & Linderoth (1999) *J Biol Chem* 274:12023-12035.
- Sato et al. (1995) *Clin Immunol Pathol* 74:35-43.
- Schagger et al. (1994) *Anal Biochem* 217:220-230.
- Schaiff et al. (1992) *J Exp Med* 176:657-666.

- Scheibel & Buckner (1998) *Biochem Pharm* 56:675-82.
- Scheibel et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1495-1499.
- Scheibel et al. (1997) *J Biol Chem* 272:18608-18613.
- Schild et al. (1999) *Curr Opin Immunol* 11:109-113.
- Schnell et al. (1990) *Nature* 343:269-272.
- Schroder et al. (1965) *The Peptides*, Vol. 1, Academic Press, New York, New York.
- Schroder et al. (1965) *JAMA* 193:443.
- Sciandra et al. (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81:4843-4847.
- Seale et al. (1998) *Methods Enzymol* 290:318-323.
- Seip & Evans (1980) *J Clin Microbiol* 11:226-233.
- Sharma et al. (1998) *J Biol Chem* 273:15474-15478.
- Sharma et al. (1998) *Oncogene* 16:2639-2645.
- Shi et al. (1994) *Biochemistry* 33:7536-7546.
- Shirkey (1965) *JAMA* 193:443.
- Smith et al. (1993) *J Biol Chem* 268:18365-18371.
- Sriram et al. (1997) *Structure* 5:403-414.
- Srivastava et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3407-3411.
- Srivastava et al. (1998) *Immunity* 8:657-665.
- Srivastava et al. (1994) *Immunogenetics* 39:93-98.
- Stebbins et al. (1997) *Cell* 89:239-250.
- Steinman (1991) *Annu Rev Immunol* 9:271-294.
- Steward et al. (1969) *Solid Phase Peptide Synthesis*, W. H. Freeman Co., San Francisco, California.
- Su et al. (1998) *J Mol Cell Cardiol* 30(3):587-598.
- Sullivan et al. (1997) *J Biol Chem* 272:8007-8012.
- Supino-Rosin et al. (2000) *J Biol Chem* 275(29):21850-21855.
- Suto & Srivastava (1995) *Science* 269:1585-1588.
- Tacchini et al. (1997) *Hepatology* 26(1):186-191.

Tailer et al. (1990) Nuc Acids Res 18(16):4928.

Takashi et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:2334-2338.

Tamura et al. (1997) Science 278:117-120.

Toft (1998) Trends Endocrinol Metab 9:238-243.

Toggas et al. (1994) Nature 367:188-193.

Udono et al. (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:3077-81.

米国特許第 4,244,946 号

米国特許第 4,968,671 号

米国特許第 5,066,578 号

米国特許第 5,250,414 号

米国特許第 5,352,660 号

米国特許第 5,504,090 号

米国特許第 5,645,999 号

米国特許第 5,571,840 号

米国特許第 5,733,916 号

米国特許第 5,739,278 号

米国特許第 5,747,332 号

米国特許第 5,750,119 号

米国特許第 5,756,492 号

米国特許第 5,786,152 号

米国特許第 5,830,464 号

米国特許第 5,834,228 号

米国特許第 5,837,251 号

米国特許第 5,872,011 号

米国特許第 5,898,066 号

米国特許第 5,932,542 号

米国特許第 6,017,965 号

米国特許第 6,046,381 号

米国特許第 6,080,730 号

- Van Bleek et al. (1990) Nature 348:213-216.
- Vijayasardahl et al. (1990) J Exp Med 171(4):1375-1380.
- Wearsch & Nicchitta (1996a) Prot Express Purif 7:114-121.
- Wearsch & Nicchitta (1996b) Biochemistry 35:16760-16769.
- Wearsch & Nicchitta (1997) J Biol Chem 272:5152-5156.
- Wearsch et al. (1998) Biochemistry 37:5709-5719.
- Weber (1991) Adv Protein Chem 41:1-36.
- Weber & Farris (1979) Biochemistry 18:3075-3078.
- WO 95/24923
- WO 97/10000
- WO 97/10002
- WO 98/34641
- WO 99/26966
- WO 99/61585
- Xiao et al. (1999) J Neurochem 72:95-101.
- Yagita et al. (1999) J Neurochem 72:1544-1551.
- Yamamoto et al. (1986) Brain Res 384:1-10.
- Yamamoto et al. (1990) Acta Neuropathol 80:487-492.
- Yu et al. (1991) Cancer Res 51(2):468-475.
- Zimmer et al. (1993) Peptides, pp. 393394, ESCOM Science Publishers, B. V.

【0336】

本発明の種々の詳細が、本発明の範囲から逸脱することなく変えることができることは理解されよう。更に、前記の記載は、説明の目的のみであり、限定の目的ではない - - 本発明は特許請求の範囲によって定義される。

【図面の簡単な説明】

【図1A】 GRP94構造状態に無関係にGRP94に結合するProdanを記載するグラフである。0.5 μM天然または熱ショック(hs)GRP94蛍光放出波長スキャンは、5 μM Prodanに30分暴露した後に行なった

。値は、同じ濃度の熱ショックGRP94で行なったときと比較した最大蛍光を示す。実験は、360nm(Prodan)の励起波長で行なった。全スペクトルはバックグラウンド補正した。

【図1B】 GRP94に結合する8-ANS、およびこのような結合のGRP94構造状態非依存性を記載するグラフである。0.5μM天然または熱ショック(hs)GRP94蛍光放出波長スキャンは、5μM 8-ANSに30分暴露した後に行なった。値は、同じ濃度の熱ショックGRP94で行なったときと比較した最大蛍光を示す。実験は372nm(8-ANS)の励起波長で行なった。全スペクトルはバックグラウンド補正した。

【図1C】 GRP94に結合するbis-ANS、およびこのような結合のGRP94構造状態非依存性を記載するグラフである。0.5μM天然または熱ショック(hs)GRP94蛍光放出波長スキャンは、5μM bis-ANSに20時間暴露した後に行なった。値は、同じ濃度の熱ショックGRP94で行なったときと比較した最大蛍光を示す。実験は393nm(bis-ANS)の励起波長で行なった。全スペクトルはバックグラウンド補正した。

【図1D】 GRP94に結合するbis-ANSの時間的経過を示すグラフである。値は、同じ濃度の熱ショックGRP94で行なったときと比較した最大蛍光を示す。実験は393nm(bis-ANS)の励起波長で行なった。全スペクトルはバックグラウンド補正した。

【図2A】 熱ショックGRP94とのbis-ANS相互作用の動力的分析を記載するグラフである。熱ショックGRP94へのbis-ANSの結合の濃度依存性を、bis-ANS濃度(50nM)を固定し、GRP94濃度を示すように上昇させた実験条件下で行なった。

【図2B】 bis-ANS/GRP94結合データのKlotzプロット表記である。半分最大結合が110nM GRP94で起こる。励起波長、393nm。放出波長、475nm。

【図3】 bis-ANSおよび熱ショックがGRP94加水分解感受性を増加させることを示す、クーマシーブルー染色ゲルのデジタルイメージである。GRP94(5μg、5μM)を50μM bis-ANSと1時間、37℃でイン

キュベートするか、または15分、50℃で熱ショックした。サンプルをついで0.1%トリプシンで30分、37℃で消化させ、12.5%SDS-PAGEゲルで分析した。レーン1、5μgの未消化GRP94；レーン2、トリプシンとインキュベートしたコントロール天然GRP94；レーン3、トリプシンで消化したbis-ANS処理GRP94；レーン4、熱ショックし、ついでトリプシンで消化したGRP94。

【図4】 bis-ANSおよび熱ショックがGRP94多量体化を誘導することを記載する、クーマシーブルー染色ゲルのデジタルイメージである。GRP94を50℃で0-15分熱ショックするか、10倍モル量過剰のbis-ANSとインキュベートし、タンパク質の構造状態を5-18%生ブルーポリアクリルアミド勾配ゲルで分析した。GRP94 2量体、4量体、6量体および8量体の移動を示す。分子量標準は図4の右端に示す。

【図5】 天然、熱ショックおよびbis-ANS処置GRP94の円偏光二色性スペクトルが同一であることを示すグラフである。1μM GRP94天然(菱滷)；熱ショック(点線および破線)；そして2時間10μM bis-ANS処置(点線)の円偏光二色性スペクトルを示す。スペクトルは、下記実施例1-8に記載のように補正した。

【図6A】 ラディシコール(radicol)がbis-ANS構造変化を遮断することを示す、クーマシーブルー染色ゲルのデジタルイメージである。GRP94(5μM)を、37℃で0-500μM ラディシコールと1時間プレインキュベートし、続いて1時間、37℃で50μM bis-ANSとインキュベートし、トリプシン処理し、トリプシン消化パターンをSDS-PAGEにより分析する。

【図6B】 ラディシコールが熱ショックおよびbis-ANS結合を遮断することを記載するグラフである。GRP94(0.5μM)を0-10μM ラディシコールと1時間プレインキュベートし、熱ショックし、続いて1μM bis-ANSとインキュベートした。bis-ANS結合を、比較のためのラディシコール非存在下のbis-ANSの天然GRP94への結合と共に、分光蛍光分析により測定した。励起393nm、放出410-600nm。

【図7A】 bis-ANSおよび熱ショックがGRP94シャペロン活性を促進することを記載するグラフである。シトレートシンターゼ酵素を $0.15\ \mu\text{M}$ までGRP94なし、 $1\ \mu\text{M}$ 天然GRP94、熱ショックGRP94、または2時間 $10\ \mu\text{M}$ bis-ANSとブレインキュベートしたGRP94を含む緩衝液に希釈し、43 °Cでのシトレートシンターゼ凝集を $500\ \text{nm}$ での光散乱を、温度制御分光蛍光光度計でモニターした。

【図7B】 bis-ANSおよび熱ショックがGRP94ペプチド結合活性を刺激することを示す棒グラフである。天然、熱ショック、またはbis-ANS処理GRP94を、10倍モル量過剰の ^{125}I -VSV8ペプチドと30分、37 °Cでインキュベートした。遊離ペプチドをスピンカラムクロマトグラフィーにより除去し、結合放射活性ペプチドをガンマ計数により定量した。

【図8】 GRP94およびHsp90が異なるリガンド結合を示すことを記載する棒グラフである。GRP94へのNECAおよびATP結合は、 $20\ \text{nM}$ [^3H]-NECA(黒棒)または $50\ \mu\text{M}$ [^{32}P]ATP(斜線棒)の存在下で1時間、4 °Cで行なった。結合対遊離ヌクレオチドは、真空濾過により分離した。PEI処理ガラスフィルター(S&S #32, Schleicher and Schuell of Keene, New Hampshire)を、NECA結合アッセイに使用し、一方ニトロセルロースフィルター(S&S BA85, Schleicher and Schuell of Keene, New Hampshire)をATP結合の測定に使用した。示したデータは、トリプリケートの点の平均であり、非特異的リガンド結合に対して補正している。

【図9A】 GRP94へのNECA結合の特徴付けを記載するスキャッチャード・プロットである。GRP94を増加した濃度のNECAと、1時間、4 °Cで、材料および方法に記載のようにインキュベートした。結合対遊離NECAをついで0.3% PEIで予備処理したガラスフィルターを備えた真空濾過により分離した。

【図9B】 GRP94へのNECA結合の特徴付けを記載する飽和曲線である。曲線をGRP94 2量体濃度に関してプロットする。最大結合化学量論は、GRP94 2量体の分子当たり1分子のNECAである。

【図9C】 NECA(黒卵型)およびラディシコール(黒方形)へのGRP94

結合の化学量論を記載するグラフである。GRP94へのNECAおよびラディシコール結合は、等温滴定熱量計により評価した。GRP94は5 μ Mの濃度で存在した。NECA滴定は、152 μ M NECAストックで行ない、一方ラディシコール滴定は115 μ Mストックで行なった。ITCデータを μ cal/秒対時間および個々の注入ピーク下の領域に関して補正し、計器ソフトウェアで測定し、プロットした。

【図10A】 NECAの、Hsp90ファミリー阻害剤、ゲルダナマイシン()およびラディシコール()による競合アッセイを記載するグラフである。GRP94を20 nM [3 H]-NECAおよび漸増濃度の強合剤と1時間、4 でインキュベートした。結合NECAを0.3% PEIで予備処理したガラスフィルターを備えた真空濾過により分離した。全てのデータ点はトリプリケートの点の平均引くバックグラウンド(タンパク質非存在下のNECA結合)を示す。

【図10B】 ATP()、ADP()およびAMP()によるNECAの競合アッセイを記載するグラフである。GRP94を、20 nM 3 H-NECAおよび漸増濃度の競合剤と1時間、4 でインキュベートした。結合NECAを、0.3% PEIで予備処理したガラスフィルターを備えた真空濾過により分離した。全てのデータ点はトリプリケートの点の平均引くバックグラウンド(タンパク質非存在下のNECA結合)を示す。

【図10C】 アデノシン()およびcAMP()によるNECAの競合アッセイを記載するグラフである。GRP94を20 nM [3 H]-NECAおよび漸増濃度の競合剤と1時間、4 でインキュベートした。結合NECAを、0.3% PEIで予備処理したガラスフィルターを備えた真空濾過により分離した。全てのデータ点はトリプリケートの点の平均引くバックグラウンドを示す(タンパク質非存在下のNECA結合)。

【図11】 GRP94のアデノシン塩基へのリガンド結合特異性を記載する棒グラフである。GRP94を20 nM [3 H]-NECAおよび、全て50 μ Mの最終濃度の競合剤と、1時間、4 でインキュベートし、結合対遊離NECAを、0.3% PEIで予備処理したガラスフィルターを備えた真空濾過により分離した。

【図12】 ATP、ADPおよびAMPのGRP94への結合が Mg^{2+} 濃度に感受性であることを記載するグラフである。GRP94を、1時間、4で50mM Tris、20nM [3H]-NECAおよび以下の濃度の競合剤の一つ： $3.1 \times 10^{-6}M$ ATP、 $3.1 \times 10^{-5}M$ ADP、 $6 \times 10^{-4}M$ AMP、または $3.1 \times 10^{-5}M$ アデノシンとインキュベートした。反応を10mM $Mg(OAc)_2$ 存在下(斜線棒)または明目上の内因性マグネシウム(黒棒)の存在下で行なった。結合対遊離NECAを、0.3%PEIで予備処理したガラスフィルターを備えた真空濾過により分離した。

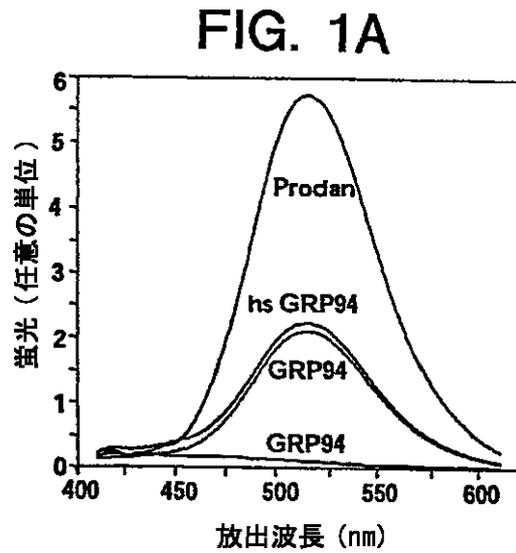
【図13A】 NECAのGRP94自己リン酸化における影響を記載する棒グラフである。1 μM GRP94(黒棒)、0.15mM $-^{32}P$ ATP(6000cpm/pmol)、10mM $Mg(OAc)_2$ および50mM K-Hepes、pH 7.4)を含む25 μl 反応物を、1時間、37でインキュベートした。1単位カゼインキナーゼII(斜線棒)を、上記の条件下で4 μM カゼインと共にインキュベートした。競合剤を適当なサンプルに最終濃度180 μM NECAの3.6%DMSO溶液、180 μM ラディシコールの3.6%DMSO溶液、5 $\mu g/ml$ ヘパリン、5mM GTP、または3.6%DMSOで添加した。リン酸化切片を、Fujifilm MACBAS1000(登録商標)ホスホイメージングシステムで定量し、3つの別々の実験の平均PSL単位を示す。

【図13B】 GRP94存在下および非存在下のATP加水分解を記載する棒グラフである。1 μM GRP94単量体、種々の濃度の $MgATP$ (pH 7.0)および50mM K-Hepes、pH 7.4を含む100 μl 反応物を、2時間、37でインキュベートした。ATPおよびADPを、Hewlett Packard HPLCで、Partisil SAXカラムを使用して分離した。自発的ATP加水分解を、タンパク質非存在下で測定した。GRP94の存在下の加水分解を黒棒で示し、自発的加水分解を斜線棒で示す。

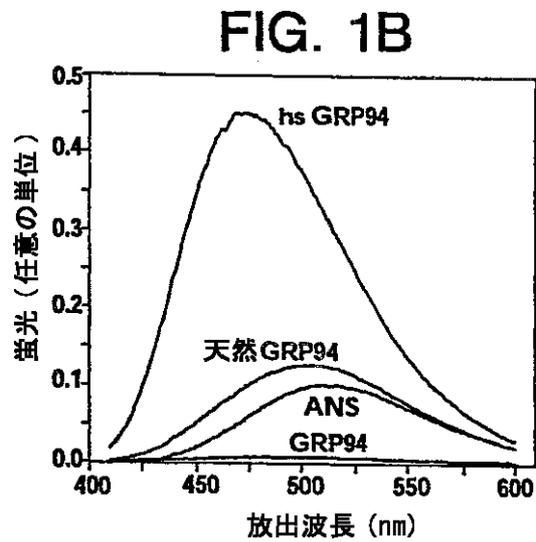
【図14】 GRP94のリガンド誘導形態変化を記載するグラフである。GRP94(50 $\mu g/ml$)を、10mM $Mg(OAc)_2$ および以下の濃度のリガンドを添加された緩衝液A中で1時間、37でインキュベートした： $50 \mu M$ NECA、 $50 \mu M$ ゲルダナマイシン、 $2.5 mM$ ATP、または 2.5

mM ADP。サンプルを295 nmの波長で励起させ、トリプトファン放出スペクトルを300 - 400 nmで記録した。全スペクトルを、緩衝液単独または緩衝液 + リガンドサンプルで得られたスペクトルを引くことにより補正した。

【図1A】



【図1B】



【図1C】

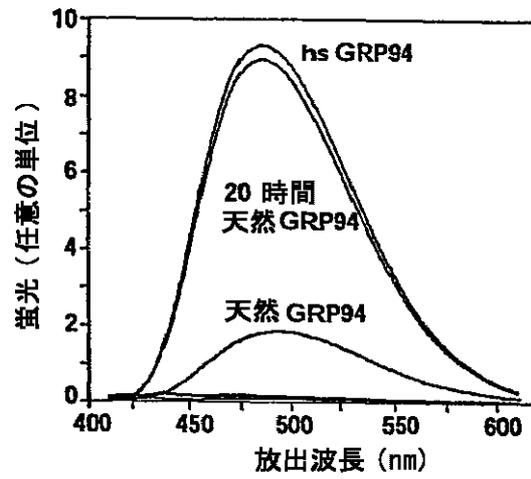


FIG. 1C

【図1D】

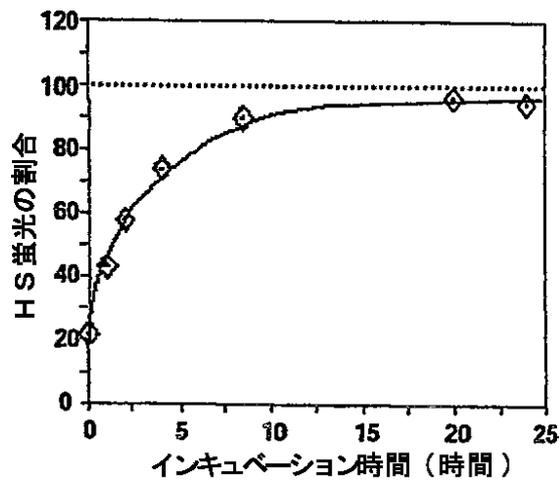
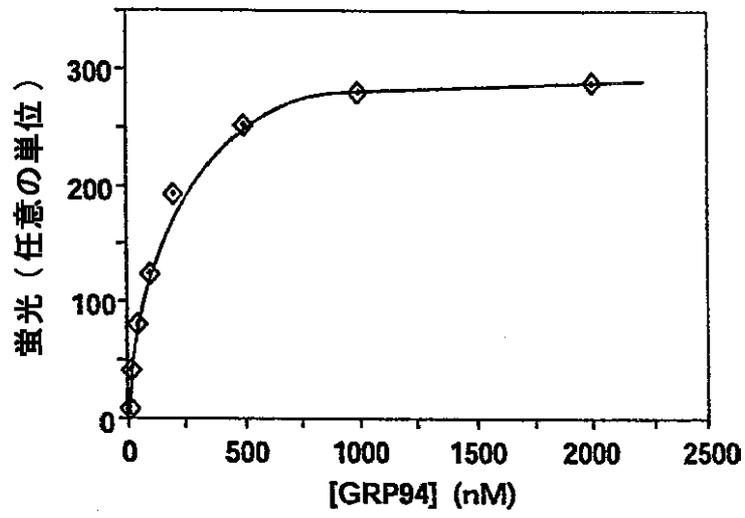


FIG. 1D

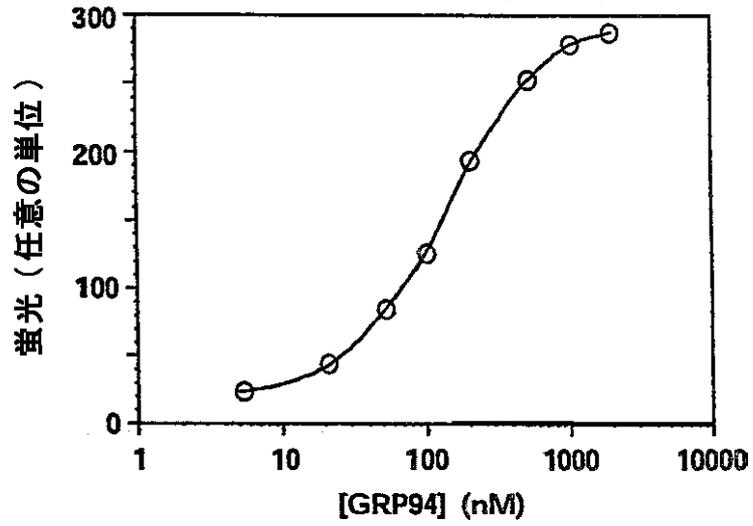
【図2A】

FIG. 2A



【図2B】

FIG. 2B



【図3】

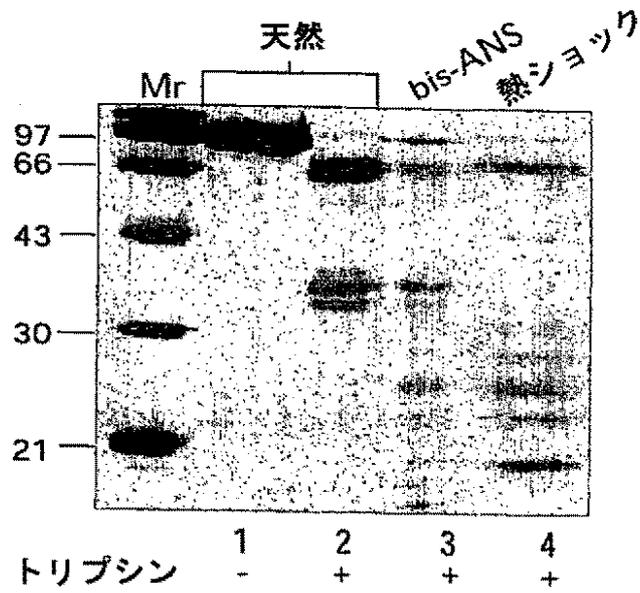
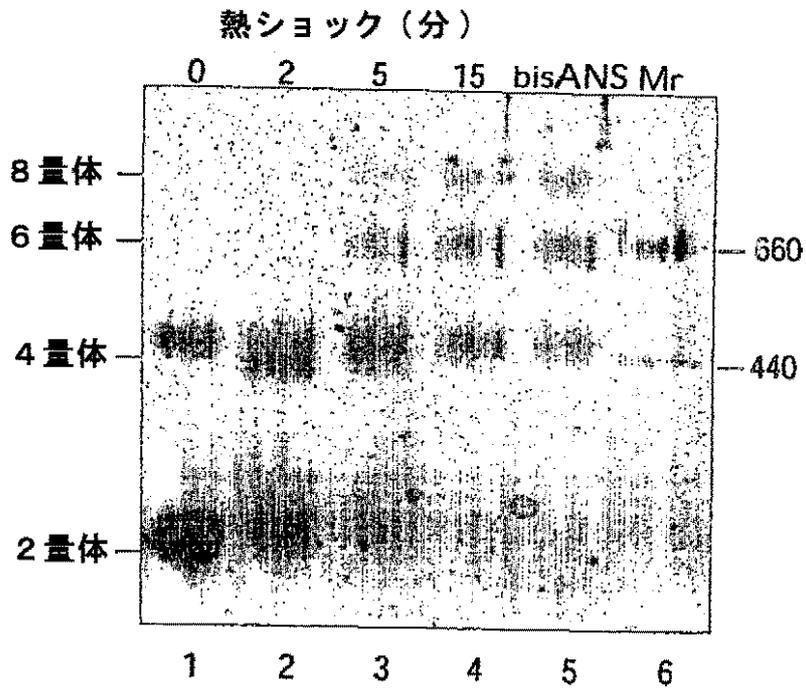


FIG. 3

【図4】



【図5】

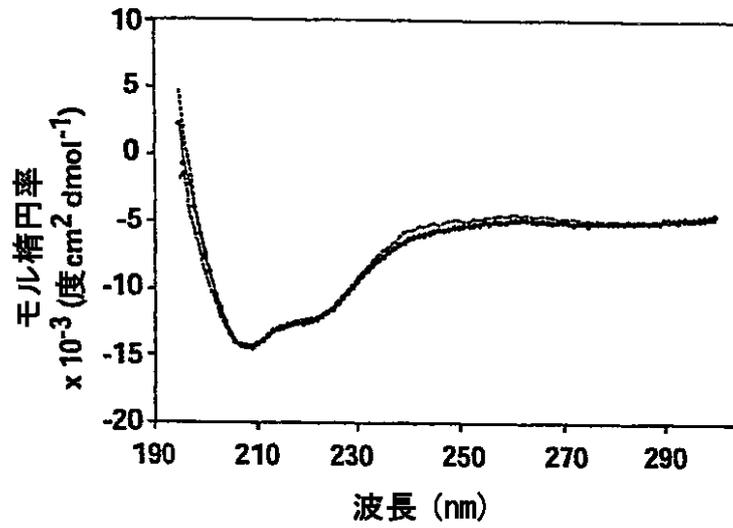


FIG. 5

【図6A】

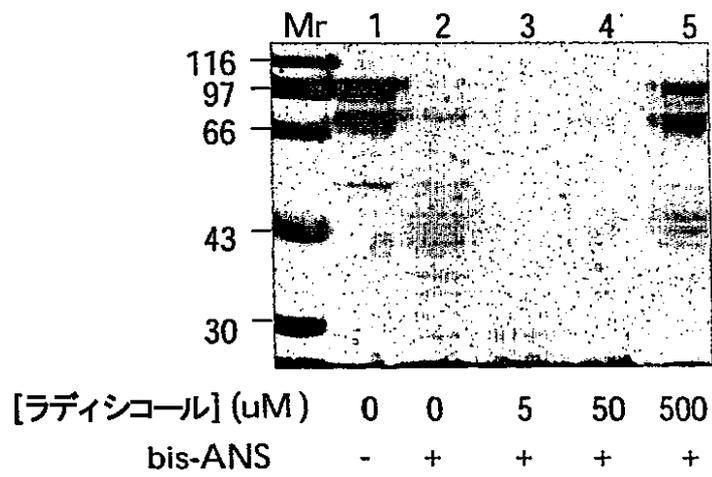


FIG. 6A

【図6B】

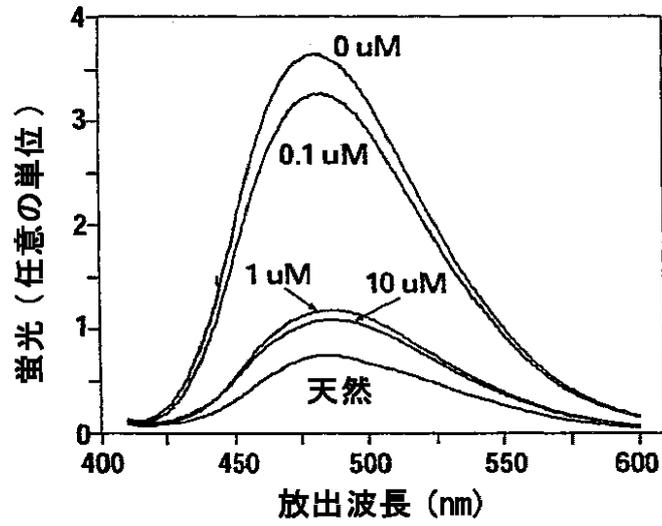


FIG. 6B

【図7A】

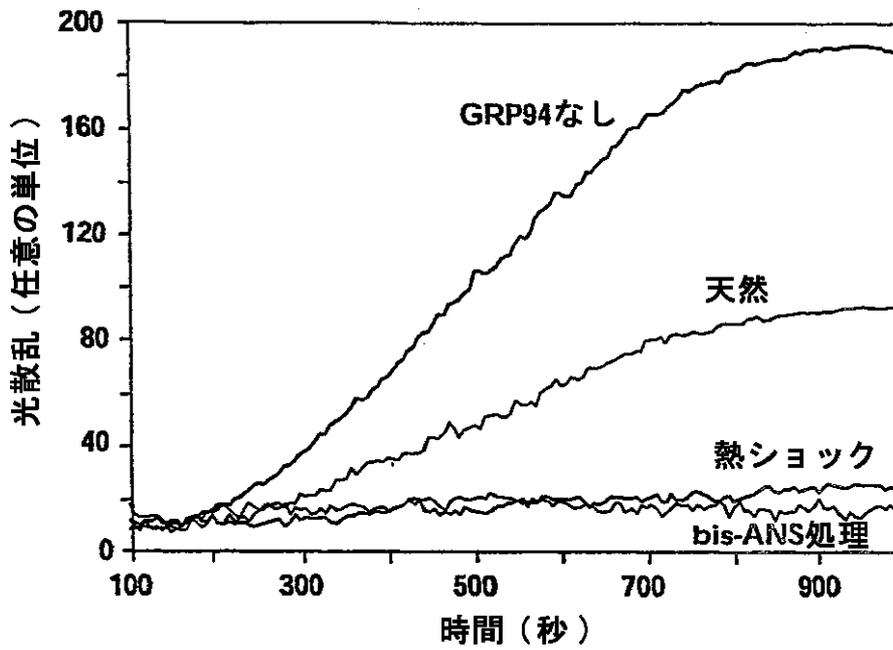


FIG. 7A

【図7B】

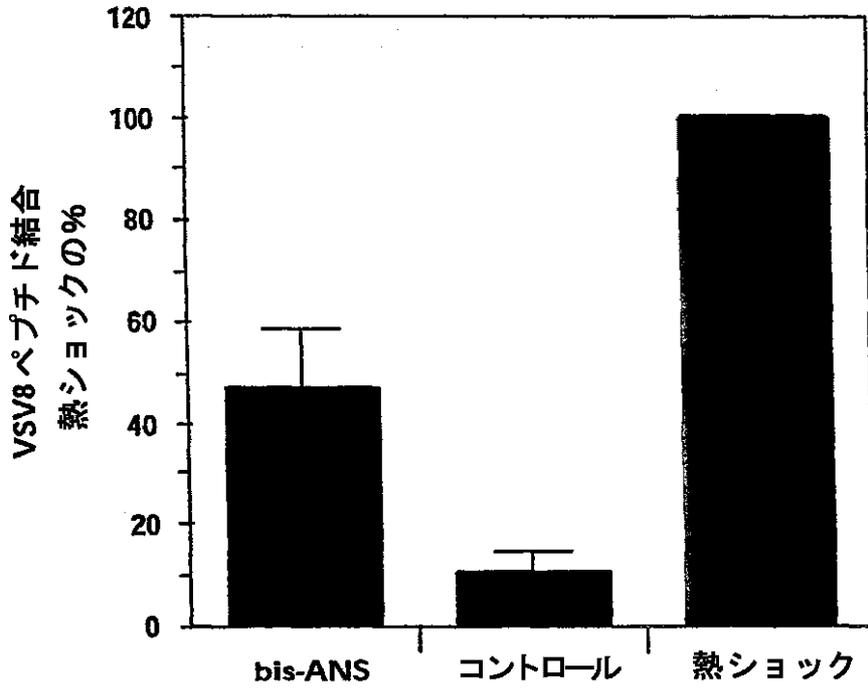


FIG. 7B

【図8】

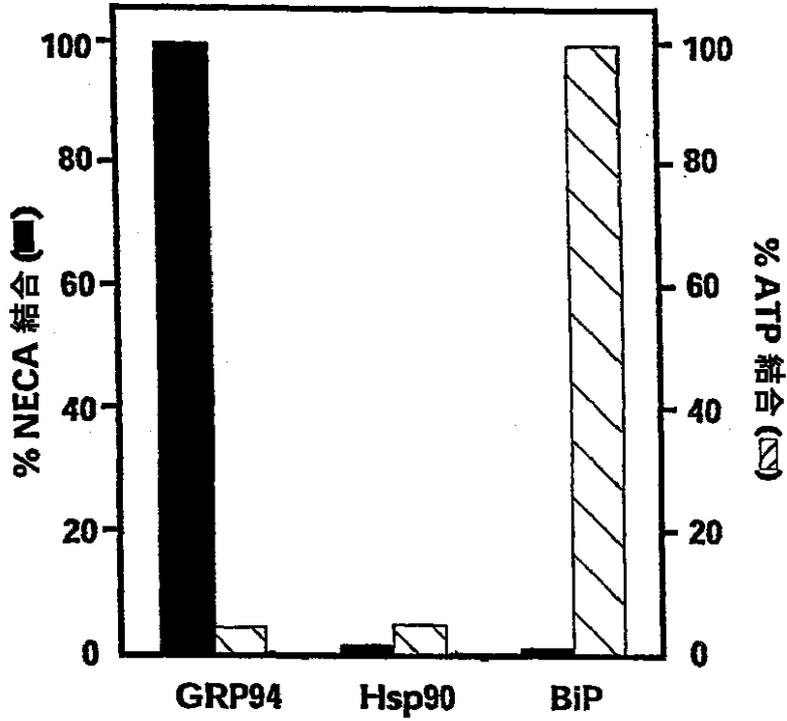


FIG. 8

【図9A】

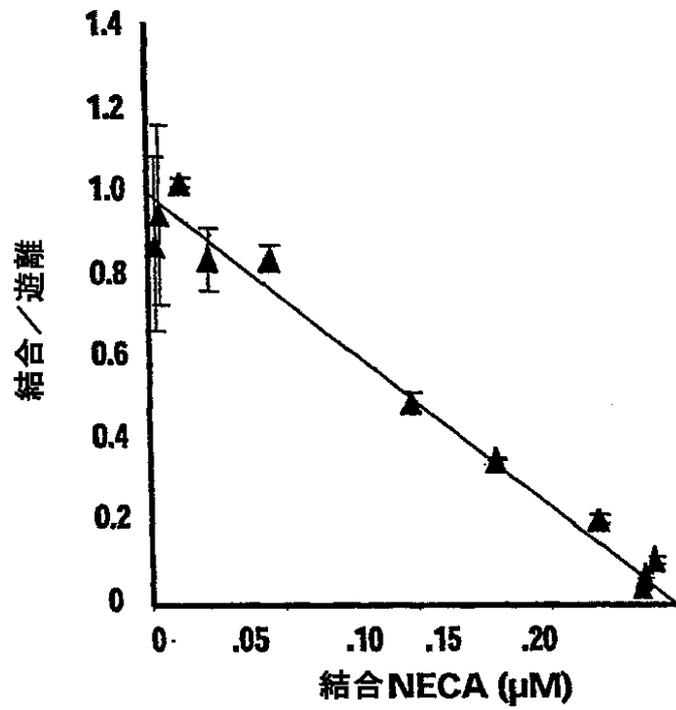


FIG. 9A

【図9B】

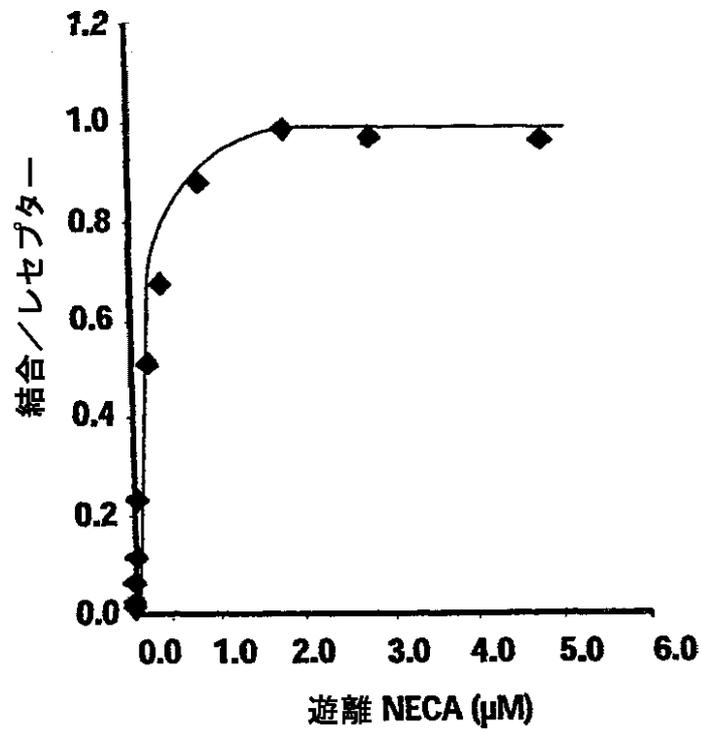


FIG. 9B

【図9C】

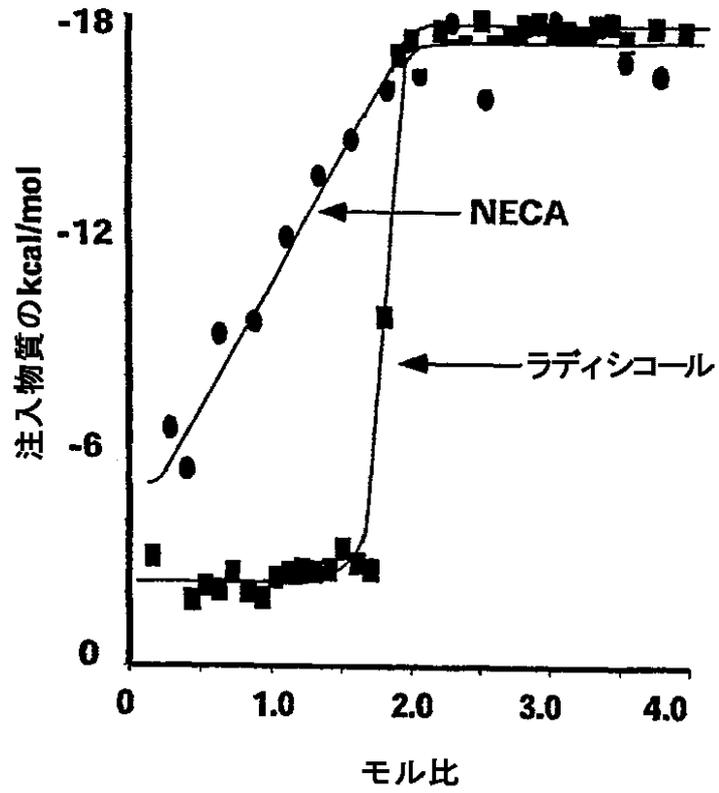


FIG. 9C

【図10A】

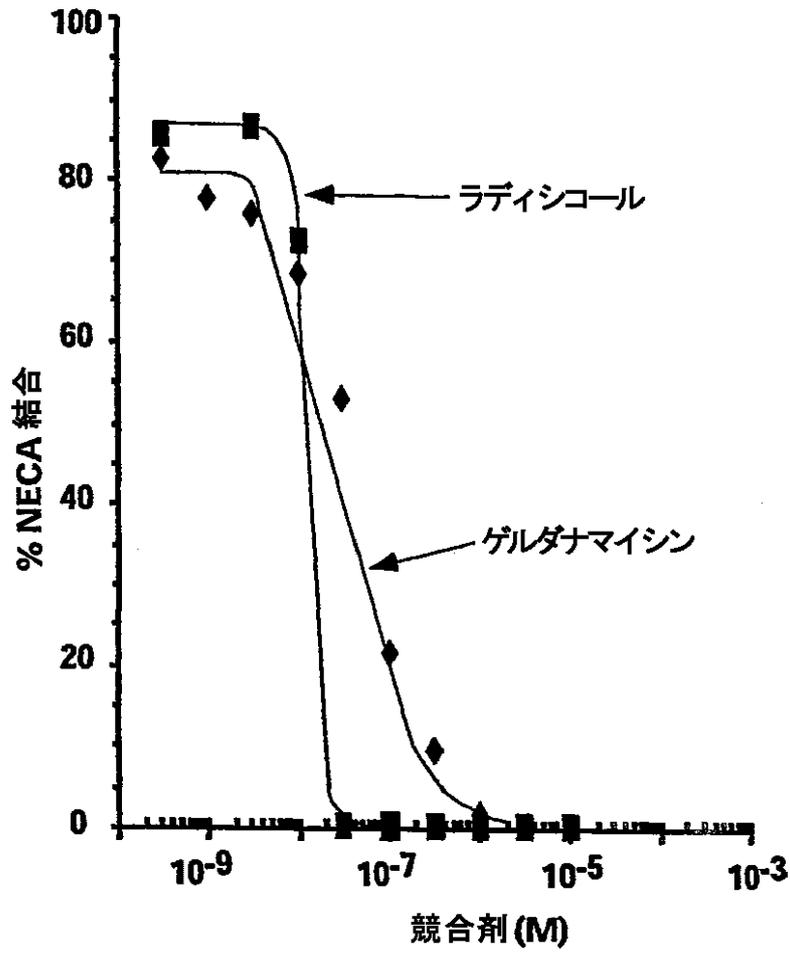


FIG. 10A

【図10B】

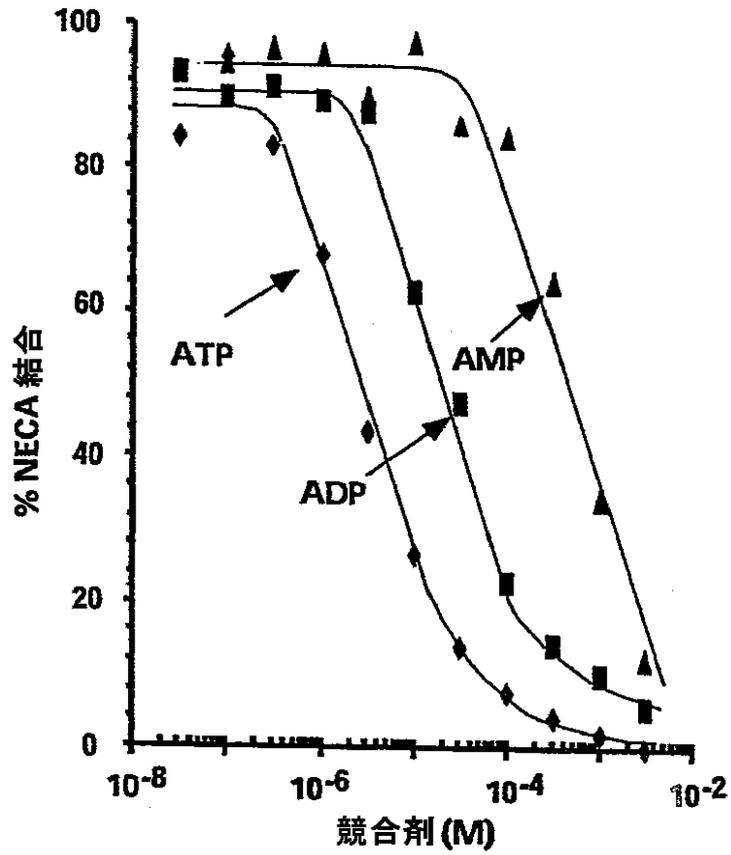


FIG. 10B

【図10C】

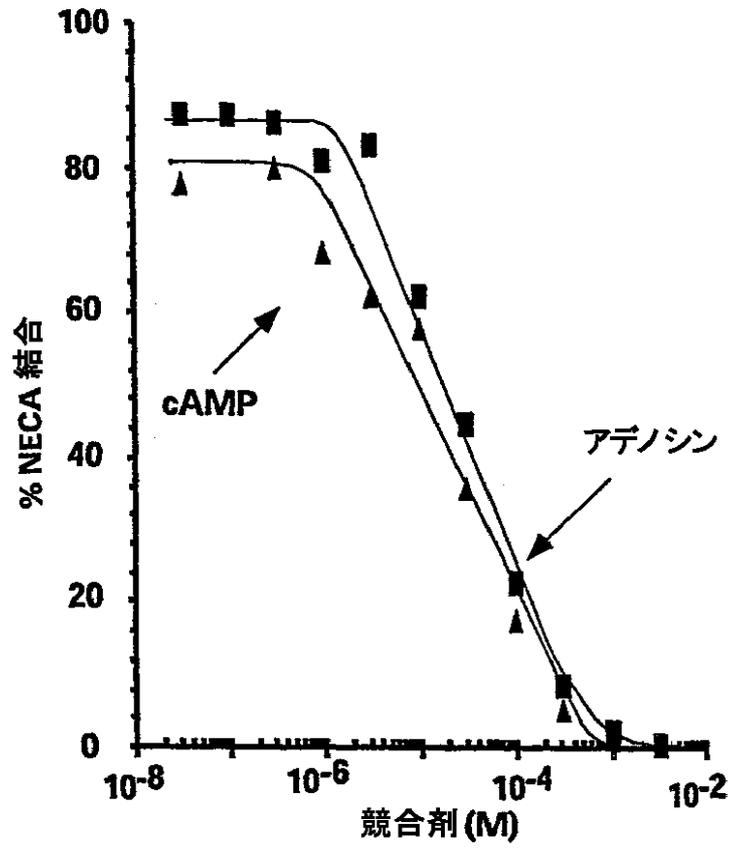


FIG. 10C

【図11】

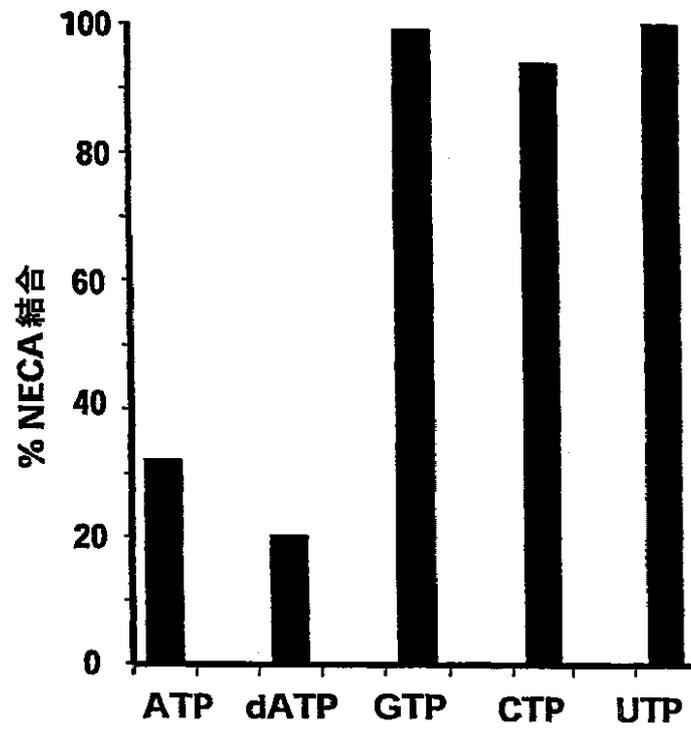


FIG. 11

【図12】

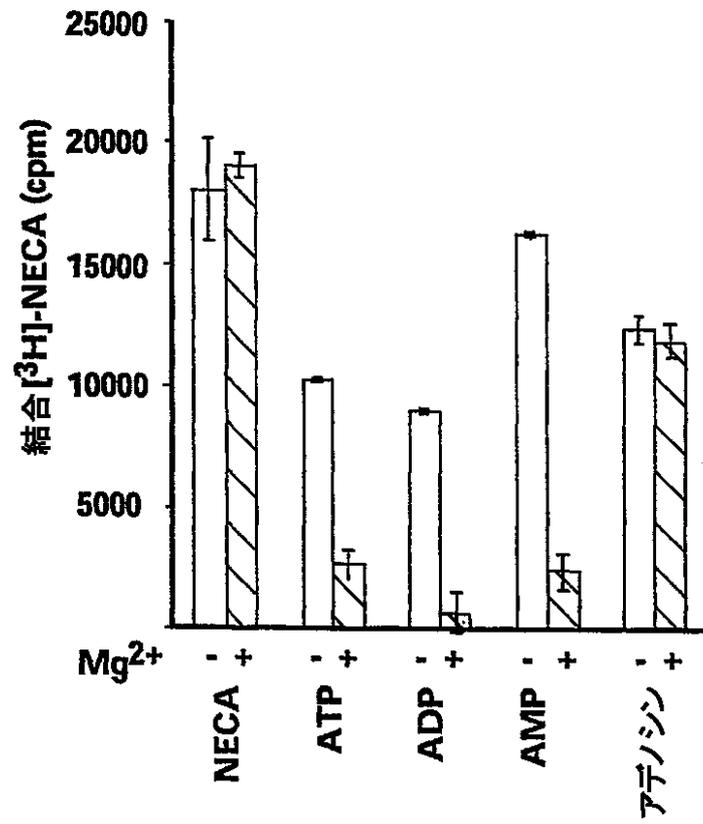


FIG. 12

【図13A】

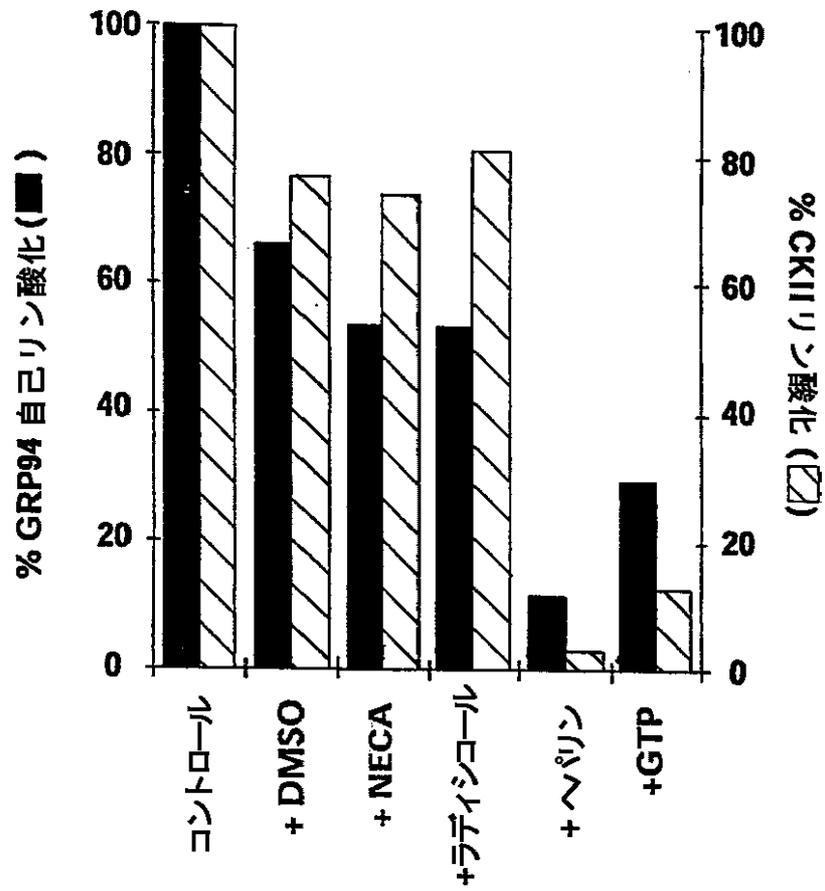


FIG. 13A

【图13B】

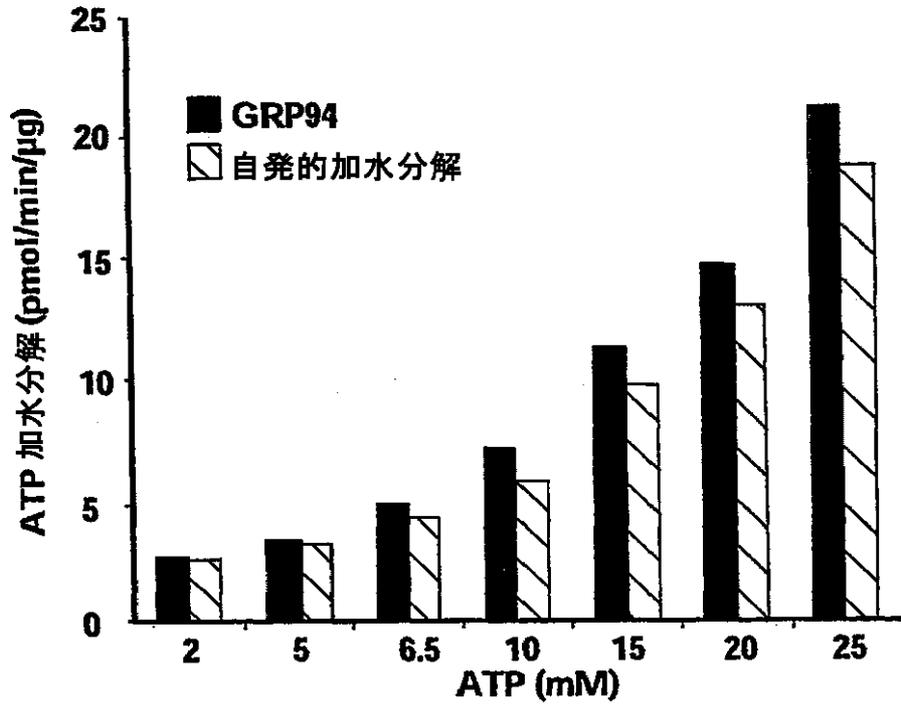


FIG. 13B

【図14】

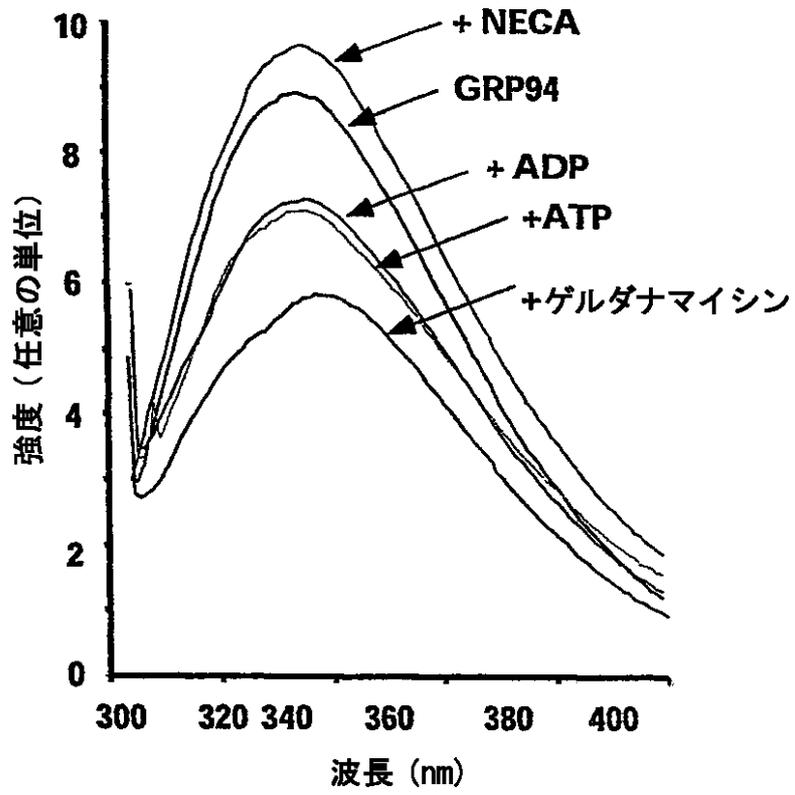


FIG. 14

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/09512
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07K 14/00 US CL : 530/350 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/350 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PRATT, W.B. 'The hsp90-based Chaperone System: Involvement in Signal Transduction from a Variety of Hormone and Growth Factor Receptors.' In: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Blackwell Science, Inc., April 1998, Vol. 217, No. 4, pages 420-434.	1-133
A	OBERMANN W.M. et al. In Vivo Function of Hsp90 is Dependent on ATP Binding and ATP Hydrolysis. Journal of Cell Biology. November 1998, Vol. 143, No. 4, pages 901-910.	1-133
A	FANG Y. et al. Hsp90 Regulates Androgen Receptor Hormone Binding Affinity in Vivo. J. Biol. Chem. November 1996, Vol. 271, No. 45, pages 28697-28702.	1-133
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 MAY 2001		Date of mailing of the international search report 06 JUL 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer TERRY J. DEY DAVID LUKTON PARALEGAL SPECIALIST Telephone No. (703) TECHNOLOGY CENTER 1600

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 P	9/00	A 6 1 P	4 C 0 8 6
	9/10		4 H 0 4 5
	31/00		
	35/00		
	37/04		
	43/00		
			1 0 5
C 0 7 K	1/22	C 0 7 K	
C 1 2 N	15/09	C 1 2 P	A
C 1 2 P	21/02		C
		G 0 1 N	C
			Z
G 0 1 N	21/78		Z
	33/15		D
	33/50		
	33/53		Z
	33/566		A
	33/58		
		C 1 2 N	
		A 6 1 K	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

- (72)発明者 メレディス・エフ・エヌ・ロサー
 アメリカ合衆国27705ノースカロライナ州
 ダーラム、コーンウッド・ドライブ2623番
- (72)発明者 ロビン・シー・リード
 アメリカ合衆国27705ノースカロライナ州
 ダーラム、アパートメント・イー、コロニー・ロード3088番

Fターム(参考) 2G045 BB05 BB10 BB14 BB29 BB46
BB50 DA36 FB01 FB03 FB05
FB06 FB08 FB12 GC15
2G054 CA23 EA03
4B024 AA01 BA36 CA02 DA01 DA02
DA11 DA12 HA01
4B064 AG01 AG31 CA19 CE12 DA01
DA05 DA14
4C084 AA02 AA06 AA17 BA44 DC50
NA14 ZA36 ZB09 ZB26 ZB31
ZC21
4C086 AA01 EA18 MA02 MA06 NA14
ZA36 ZB09 ZB26 ZB31 ZC21
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA40 DA86 EA28 EA29 FA74
GA26

专利名称(译)	CRP 94-配体相互作用的表征和相关的纯化，筛选和治疗		
公开(公告)号	JP2003528886A	公开(公告)日	2003-09-30
申请号	JP2001571710	申请日	2001-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	杜克大学		
申请(专利权)人(译)	杜克大学		
[标]发明人	クリストファー・ブイニッチタ ジェームズ・ジェイ・ワッセンバーグ メレディス・エフ・エヌ・ロサー ロビン・シー・リード		
发明人	クリストファー・ブイニッチタ ジェームズ・ジェイ・ワッセンバーグ メレディス・エフ・エヌ・ロサー ロビン・シー・リード		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7076 A61K38/00 A61K45/00 A61P3/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/04 A61P43/00 C07K1/22 C07K14/47 C12N15/09 C12P21/02 G01N21/78 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/58		
CPC分类号	A61K38/00 A61P3/00 A61P31/00 A61P35/00 C07K14/47		
FI分类号	C07K14/47 A61K31/7076 A61K45/00 A61P3/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/04 A61P43/00 A61P43/00.105 C07K1/22 C12P21/02.A C12P21/02.C G01N21/78.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/58.Z C12N15/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/BB05 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB29 2G045/BB46 2G045/BB50 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB06 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/CA23 2G054/EA03 4B024/AA01 4B024/BA36 4B024/CA02 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/HA01 4B064/AG01 4B064/AG31 4B064/CA19 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA05 4B064/DA14 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA36 4C084/ZB09 4C084/ZB26 4C084/ZB31 4C084/ZC21 4C086/AA01 4C086/EA18 4C086/MA02 4C086/MA06 4C086/NA14 4C086/ZA36 4C086/ZB09 4C086/ZB26 4C086/ZB31 4C086/ZC21 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA29 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	60/192118 2000-03-24 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明描述了配体与含有GRP94的Hsp90蛋白之间相互作用的特征，其中与GRP94的N末端核苷酸结合结构域结合的配体将GRP94从其无活性形式转化为其活性形式。它诱导形态变化，导致GRP94的分子伴侣和多肽结合活性受到明显刺激。还描述了基于Hsp90肽结合蛋白（包括GRP94）的配体相互作用的特征，对GRP94以及某些情况下为HSP90的生物学活性进行纯化，筛选和治疗的方法。

