

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-504335

(P2008-504335A)

(43) 公表日 平成20年2月14日(2008.2.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713 Z N A	4 B 0 2 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 1
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-518555 (P2007-518555)	(71) 出願人	506417360
(86) (22) 出願日	平成17年7月4日 (2005.7.4)		クレアピリス・セラピューティクス・エス
(85) 翻訳文提出日	平成18年12月15日 (2006.12.15)		ピーエー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2005/007198		イタリア・1-10010・コルレット・
(87) 国際公開番号	W02006/002971		ジアコソ・バイオインダストリー・パーク・
(87) 国際公開日	平成18年1月12日 (2006.1.12)		ヴィア・リベス・5
(31) 優先権主張番号	60/584, 678	(74) 代理人	100064908
(32) 優先日	平成16年7月2日 (2004.7.2)		弁理士 志賀 正武
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100089037
(31) 優先権主張番号	60/646, 586		弁理士 渡邊 隆
(32) 優先日	平成17年1月26日 (2005.1.26)	(74) 代理人	100108453
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 村山 靖彦
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HMGB1 に関連する病変の治療のための核酸

(57) 【要約】

本発明は、HMGB1タンパク質によって直接的または間接的に誘導される病変の予防または治療のための、ベント型構造を有する合成二本鎖核酸または核酸アナログ分子の使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

HMGB1関連病変またはHMGB1相同タンパク質に関連する病変の予防または治療のための医薬の製造のための、HMGB1タンパク質またはHMGB1相同タンパク質に結合することができる、ペント型構造を有する合成二本鎖核酸または核酸アナログ分子の使用。

【請求項 2】

前記ペント構造を有する合成二本鎖核酸または核酸アナログ分子が、非アセチル化及び/またはアセチル化型のHMGB1に結合することができる、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記ペント構造を有する合成二本鎖核酸または核酸アナログ分子が、HMGB2、HMGB3、HM 10
G-1L10、HMG-4L、及びSP100-HMGに結合することができる、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 4】

前記二本鎖核酸または核酸アナログ分子が塩基対部分と不對部分とを有する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5】

前記二本鎖核酸または核酸アナログ分子がペントDNA構造または十字型DNA構造を有する、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 6】

前記ペント型構造が、少なくとも 1 つの曲がった構造、好ましくは 1 つの曲がった構造 20
を含む、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 7】

前記医薬が、少なくとも 1 つの天然に存在しないヌクレオチド構成ブロックを有する核酸アナログを含む、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 8】

前記天然に存在しない構成ブロックが、骨格、糖、及び核酸塩基が修飾されている構成ブロック、並びにその組み合わせから選択される、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

前記天然に存在しない構成ブロックがPNA構成ブロック及び図 3 に示される構成ブロックから選択される、請求項 8 に記載の使用。

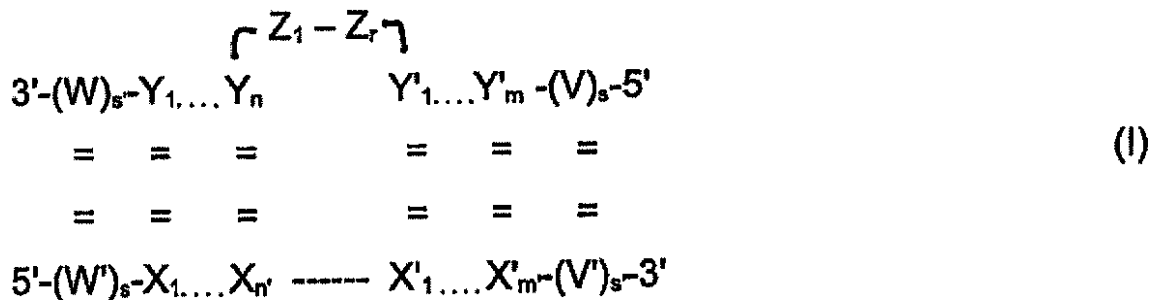
【請求項 10】

前記核酸アナログ分子が、二本鎖DNA/PNAハイブリッド分子、二本鎖DNA/LNAハイブリッド分子、二本鎖LNA/PNAハイブリッド分子、二本鎖DNA/PNAキメラ分子、二本鎖DNA/LNAキ 30
メラ分子、及び/または二本鎖LNA/PNAキメラ分子である、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 11】

前記核酸または核酸アナログ分子が、一般式(I)：

【化 1】



[式中、W、W'、X、X'、Y、Y'、V、V'、及びZは、ヌクレオチド構成ブロックまたはヌクレオチドアナログ構成ブロックから独立に選択される；

XとY、X'とY'、WとW'、及びVとV'の各々が相補的な構成ブロックであり、好ましくはワ 50

トソン-クリック塩基形成に従ってマッチングする；
 Z_1 から Z_r は、不対ヌクレオチド構成ブロックまたは不対ヌクレオチドアナログ構成ブロックの押し出されているループを表す；
 n 、 m 、 n' 、 m' は2から20の整数である；
 r は1から10の整数である；並びに
 s と s' は各々独立に0から10の整数である]
 によって表される分子である、請求項1から10のいずれか一項に記載の使用。

【請求項12】

W 、 W' 、 X 、 X' 、 Y 、 Y' 、 V 、 V' 、及び Z が、DNAヌクレオチド構成ブロック、LNAヌクレオチド構成ブロック、またはPNAヌクレオチドアナログ構成ブロック、あるいは糖、骨格、及び/または核酸塩基が修飾されているヌクレオチド構成ブロックより独立に選択される、請求項11に記載の使用。

10

【請求項13】

Z が、アデニンヌクレオチドまたはアデニンヌクレオチドアナログであり、 $r=2$ または $r=6$ である、請求項11または12に記載の使用。

【請求項14】

W 、 X 、 X' 、 Y 、 Y' 、及び V が、DNAヌクレオチド構成ブロック及び/またはLNAヌクレオチド構成ブロックであり、
 W 及び V' がPNAヌクレオチド構成ブロックであり、
 n 及び m' が2；
 n' 及び m が5；
 r が2または6；
 s が0、並びに s' が3
 である、請求項11または12に記載の使用。

20

【請求項15】

前記HMGB1関連病変及びHMGB1相同タンパク質に関連する病変が、炎症性サイトカインカスケードの活性化によって介在される病変状態である、請求項1から14に記載の使用。

【請求項16】

前記病変状態が、炎症性疾患、自己免疫疾患、全身性炎症反応症候群、器官移植後の再灌流障害、心臓血管疾患、産科及び婦人科の疾患、感染症、アレルギー及びアトピー疾患、固形及び流体腫瘍病変、移植拒絶疾患、先天性の疾患、皮膚疾患、神経疾患、悪液質、腎疾患、医原性中毒状態、代謝疾患及び特発性の疾患、並びに眼科の疾患からなる群より選択される、請求項15に記載の使用。

30

【請求項17】

炎症性サイトカインカスケードの初期の調節因子を阻害することができる少なくとも1つの更なる剤を組み合わせる、請求項1から16のいずれか一項に記載の使用。

【請求項18】

前記更なる剤が、TNF、IL-1、IL-1、IL- R_a 、IL-8、MIP-1、MIF-1、MIP-2、MIF、及びIL-6からなる群より選択されるサイトカインのアンタゴニストまたはインヒビターである、請求項17に記載の使用。

40

【請求項19】

前記更なる剤が、RAGEに対する抗体、RAGEの発現を阻害する核酸または核酸アナログ、例えばアンチセンス分子、リボザイム、若しくはRNA干渉分子、またはRAGEとHMGB1との相互作用の小さな合成分子アンタゴニストである、請求項17に記載の使用。

【請求項20】

前記更なる剤が可溶性RAGE(sRAGE)である、請求項17に記載の使用。

【請求項21】

HMGB1とToll様レセプター(TLR)、特に、TLR2、TLR4、TLR7、TLR8、及び/またはTLR9との相互作用のインヒビターであり、好ましくは、モノクローナル若しくはポリクローナル抗体、TLRの発現を阻害する核酸若しくは核酸アナログ、例えばアンチセンス分子、リボ

50

ザイム、若しくはRNA干渉分子、または1000ダルトン未満のサイズを有する合成分子である更なる剤を組み合わせる、請求項1から16のいずれか一項に記載の使用。

【請求項22】

前記更なる剤が、Toll様レセプター(TLR)、特に、TLR2、TLR4、TLR7、TLR8、及び/またはTLR9の既知のインヒビター、特にTLRの発現を阻害できる核酸または核酸アナログ、例えば、アンチセンス分子、リボザイム、若しくはRNA干渉分子である、請求項21に記載の使用。

【請求項23】

前記更なる剤が、トロンボモジュリンのN末端レクチン様ドメイン(D1)である、請求項1から16のいずれか一項に記載の使用。

10

【請求項24】

活性剤として、請求項1から14のいずれか一項に規定される二本鎖核酸または核酸アナログ分子の少なくとも1つの有効量と、任意に製薬学的に許容される担体とを含む、製薬組成物。

【請求項25】

無機酸の塩、有機酸の塩、及びカチオン性の塩から選択される、少なくとも1つの二本鎖核酸または核酸アナログ分子の製薬学的に許容される塩と、任意に付加的な物質とを含む、請求項24に記載の組成物。

【請求項26】

前記二本鎖核酸または核酸アナログ分子が、請求項17から20のいずれか一項に規定される炎症性サイトカインカスケードの初期の調節因子を阻害することができる少なくとも1つの更なる剤、及び/または請求項21若しくは23に規定される更なる剤と組み合わせられる、請求項24または25に記載の組成物。

20

【請求項27】

診断的応用のための、請求項24または25に記載の組成物。

【請求項28】

HMGB1関連病変によって、好ましくは炎症性、心臓血管、神経変性、腫瘍性、及び/または自己免疫性の病変によって影響を受けている疑いがある患者より得られる、体液、好ましくは血清及び/または血漿中のHMGB1を測定するためのキットである、請求項27に記載の組成物。

30

【請求項29】

治療的応用のための、請求項24から26のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項30】

HMGB1タンパク質に結合することができる、請求項1から14のいずれか一項に規定される合成二本鎖核酸または核酸アナログ分子の有効量を炎症性サイトカインカスケードのHMGB1による活性化に特徴付けられる状態を有する患者に投与する工程を含む、前記患者の状態を治療する方法。

【請求項31】

前記合成二本鎖核酸または核酸アナログ分子が非アセチル化及び/またはアセチル化型のHMGB1に結合することができる、請求項30に記載の方法。

40

【請求項32】

医療器具の表面に可逆的に固定化される、請求項1から14のいずれか一項に規定される合成二本鎖核酸または核酸アナログ分子の使用。

【請求項33】

前記医療器具が手術用具、移植片、カテーテル、またはステントである、請求項32に記載の使用。

【請求項34】

請求項1から14にいずれか一項に規定される合成二本鎖核酸または核酸アナログ分子で可逆的にコーティングされている医療器具。

【請求項35】

50

手術用具、移植片、カテーテル、またはステントから選択される、請求項34に記載の医療器具。

【請求項36】

請求項1から14のいずれか一項に規定される二本鎖核酸または核酸アナログ分子の少なくとも1つを含む、HMGB1関連病変によって、好ましくは炎症性、心臓血管、神経変性、腫瘍性、及び/または自己免疫性の病変によって影響を受けている疑いがある患者より得られる体液、好ましくは血清及び/または血漿中のHMGB1を測定するためのキット。

【請求項37】

非アセチル化及び/またはアセチル化型のHMGB1及び/またはHMGB1相同タンパク質が測定される、請求項37に記載のキット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、HMGB1タンパク質によって直接的または間接的に誘導される病変の予防または治療のための、ベント型構造を有する合成二本鎖核酸または核酸アナログ分子の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

敗血症及び炎症の分野における最近の研究は、病理機構及び臨床的な発症及び発生に存在する事象の理解の改善を生じさせている。例えば、敗血症の初期では、バクテリアの内毒素が、前炎症サイトカイン(TNF、IL-1、及びIL-6)を放出する生来の免疫システムの細胞を刺激する。これらの初期のサイトカインは、続いてTNF、IL-1、IL-1、IL-1Ra、IL-6、IL-8等のようなサイトカインの続いて起こる放出によって介在される病的な状態を誘導する後に作用する下流の媒介物(既知のタンパク質HMGB1として同定されている)の放出を誘導し、多数のシステムの病因または致死性の全身的な炎症を誘導する(Andersson et al., 2002)。

20

【0003】

HMGB1タンパク質は、高移動度群(HMG)タンパク質のファミリーに属している。HMGタンパク質(ポリアクリルアミドゲルにおける高い電気泳動の移動度のためにその様に称されている)は、真核細胞の単離されるクロマチンと会合している最も広範に存在する非ヒストンタンパク質である。これらのタンパク質は、転写因子またはヒストンと複合体化しているDNA構造をゆがませる、曲げる、または修飾する、のいずれかを行うことによって、DNAを曲げ、環状にし、折りたたみ、及び巻くことにおいて一般化される「構造上の」役割を担う(Andersson et al., 2000; Agresti et al., 2003; Degryse et al., 2003)。高移動度群1(HMGB1)タンパク質は多くの場合において核の因子であり、特にDNAを曲げ、複数の転写複合体の結合を容易にする転写制御分子である。

30

【0004】

構造的に、HMGB1タンパク質は、214アミノ酸のうち2つのアミノ酸が全哺乳動物種において同類置換している哺乳動物の間で高度に保存された配列を有する約25kDaのタンパク質である。HMGB1は脊椎動物の核に広範に存在しており、特に線維芽細胞、ニューロン、肝細胞、グリア、並びに単球/マクロファージ、好中球、及び血小板を含む造血幹細胞由来の細胞においても認められる。HMGB1分子は3つの異なるドメイン(HMG Box A及びHMG Box Bと称される2つのDNA結合ドメイン、並びに二極性の電荷を作り出す酸性のカルボキシル末端)からなる三連構造を有する。

40

【0005】

2つのHMG Boxは非配列特異的である構造的なDNA結合エレメントとしてタンパク質の機能に参与し、ゆがんだDNA構造を認識してDNAに結合してヌクレオソームのアッセムブリー、リモデリング、及びスライディングを安定化する。A-及びB-HMG Boxの双方は高度に保存された80アミノ酸残基からなり、強く正に荷電しており、類似のL型の折りたたみ構造を有する三つの α -ヘリックスに配置される。「L」の長い腕部はN-末端伸長鎖とヘリック

50

スIIIとを含み(Andersson et al. 2002; Agresti et al., 2003; Thomas, J. O. 2001)、一方で短い腕部はヘリックスIとIIとを含む。構造-機能分析によって、HMGB1のB-boxが前炎症サイトカインドメインを含有することが明らかにされている。

【0006】

第三のドメインであるカルボキシル末端若しくは酸性末端は、30の繰り返しのアスパラギン酸とグルタミン酸残基を含有するため極端に負に荷電しており、約20の残基の塩基性領域によって前記Boxと結合する。マウス及びラットHMGB1は、この連続するC-末端の伸長に位置する2つの置換のみでヒトの形態と異なる。

【0007】

HMGB1は配列非特異的にB型構造の種類直線状の二本鎖DNAにはかなり弱く結合するが、一方で核内において、スーパーコイル状のDNA、4方向のような異常なDNA構造(十字型DNA)、パルジDNA、及びベントDNAに高いアフィニティーで結合する(Ferrari et al., 1992; Pontiggia et al., 1993)。

10

【0008】

その核の位置及び転写因子調節因子としての役割に加え、HMGB1は免疫系の活性化された細胞(単球及びマクロファージ)によって活発に放出され、または損傷した細胞若しくは壊死細胞によって受動的に放出されて、細胞外培地においても認められている(Andersson et al., 2002; Scaffidi et al., 2002; Bonaldi et al., 2002; Taniguchi et al., 2003; Palumbo et al., 2004; Friedman et al., 2003)。

【0009】

細胞外に放出されたHMGB1は強力なサイトカインとして、及び非常に強力なマクロファージ刺激因子として作用する。HMGB1はシグナル及び走化性を誘導する細胞膜に対して結合することによって直接的に作用して、ケモカイン様の機能を有し(Yang et al., 2001)、前炎症性サイトカインの発現及び分泌を上方調節することによって間接的にも作用する。このことが、細胞外HMGB1タンパク質を、強力な走化性の及び効果的な炎症性免疫応答を促進する免疫調節性のタンパク質にする。

20

【0010】

更に、HMGBタンパク質のファミリーに属し、DNAを曲げることができる他のタンパク質が細胞外培地にHMGB1と共に放出される。これらのタンパク質は、とりわけHMGB2、HMGB3、HMGB-1L10、HMGB4L、及びSP100-HMGBである。それらはHMGB1と高い相同性のアミノ酸配列を共有する。HMGB1と同様に、それらは炎症性の病変を誘導/持続し、同一のレセプターと相互作用して、相互作用の下流の経路を誘導する。

30

【0011】

正常細胞では、HMGB1は受動的及び能動的な輸送の双方によって細胞質に移動する。しかしながら、全ての培養細胞及び休息(resting)単球は核に大半のHMGB1を含有しており、このことは標準状態では移入が移出よりもより有効であることを示す。細胞はHMGB1中に豊富に存在するリジン残基をアセチル化することによって核からHMGB1を輸送しており、それによって塩基性の電荷を中和し、核移行シグナルとして機能できなくしているであろう。核のHMGB1の過剰なアセチル化は核から細胞質へのこのタンパク質の再配置(例えば、線維芽細胞において)、または分泌エンドリソソームへのその蓄積(例えば、活性化された単球及びマクロファージにおいて)及びそれに続く非古典的な小胞を介する分泌経路を介する放出への再指示を決定する。次いで、既に活性化された単球によるHMGB1の分泌が生理活性を有するリソホスファチジルコリン(LPC)によって誘導され、活性化後の数時間で単球より生産される分泌ホスホリパーゼsPLA2の作用を介してホスファチジルコリンより炎症部位でHMGB1の分泌が遅れて生じる。そのため、HMGB1の分泌は2つのシグナルによって誘導されているようであり(Bonaldi et al., 2003)、三つの段階: 1) 第1に、炎症性シグナルはHMGB1のアセチル化、及びその核から細胞質への再配置を促進し(段階1)、細胞質の分泌小胞に貯蔵し(段階2)、次いで分泌シグナル(細胞外ATPまたはリソホスファチジルコリン)がエキソサイトーシスを促進する(段階3)、を介して生じる(Andersson et al., 2002; Scaffidi et al. 2002; Bonaldi et al., 2003; Friedman et al., 2003; Gardel

40

50

la et al., 2002)。

【0012】

放出されたHMGBはRAGEレセプターに結合するリガンドの1つとして同定されている。このレセプターは大多数の細胞タイプで発現しており、主に内皮細胞、血管平滑筋細胞、単球、及びモノファージ(monophage)、並びに単核食細胞において高レベルで発現している。認識はHMGB1のC-末端が関わる。HMGB1とRAGEとの相互作用はRAGEの上方調節及びレセプター依存性のシグナルによって介在される持続性の細胞の活性化を誘導する。特に、HMGB1とRAGEとの相互作用は、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPK)、Cdc-42、p21ras、Rac、及び炎症過程に昔から関連付けられている転写因子である核移行因子 B(NF- B)を含む複数の細胞内シグナル伝達経路を活性化する(Schmidt et al., 2001)。

10

【0013】

幾つかの実験的な根拠によれば、放出されたHMGB1はToll様レセプター(TLR)のファミリーに属するレセプター(例えば、TLR2、TLR4、TLR7、TLR8、及び/またはTLR9サブクラス)にも相互作用する可能性がある。

【0014】

更に、HMGB1はトロンボモジュリンの機能性N-末端レクチン様ドメイン(D1)とも相互作用する可能性がある。循環するHMGB1を妨害及び結合するというトロンボモジュリンの機能性D1ドメインの能力のため、RAGEレセプター及びToll様レセプターとHMGB1との相互作用は妨げられる。

【0015】

in vivoで放出される際に、HMGB1は非常に強力なサイトカインであり、強力なマクロファージ刺激因子である。実際に、内毒血症の他のサイトカイン媒介物と同様に、HMGB1はヒトマクロファージ由来の多数の前炎症サイトカイン(TNF、IL-1、IL-1、IL-1Ra、IL-6、IL-8、MIP-1、及びMIP-1)のカスケードをin vitroで活性化する。そのため、HMGB1は、初期の介在物質反応が回復した後に、急性の炎症の間の末期の介在物質として振る舞い、全身の炎症の病変における重要な経路に関与する。

20

【0016】

in vitroのHMGB1に認められる前炎症効果、及び循環するHMGB1レベルとin vivoの全身的な炎症に続く病変の発生との相関関係は、このサイトカイン様分子を治療の標的とすることが比較的臨床的に価値があるはずであることを示し、HMGB1の細胞外活性の(選択的な)アンタゴニスト/インヒビターの「末期の」投与による新規な治療方法を示唆する。

30

【0017】

そのため、幾つかの試みでは、この細胞外HMGB1ケモカイン-タンパク質を妨害することが実施された。幾つかの重要な手法として、HMGB1に対する抗体の投与、RAGEに対する抗体の投与、可溶性RAGE(sRAGE)の投与、HMGB1断片(例えば、HMGB1 A Box)の投与、及びピルビン酸エチルの投与があった(Czura et al., 2003; Lotze et al., 2003)。

【0018】

HMGB1中和抗体を使用するマウスの受動免疫は、TNFのピークが過ぎた後で最初の用量の抗体を与えた場合でさえ、致死量の内毒素に対する非常に有意な、用量依存的な、及び持続的な保護を与え、臨床的な過程の末期におけるHMGB1のアンタゴニスト活性が潜在的に致死性の敗血症に対する効果的な治療方法である可能性を示唆した。

40

【0019】

他の可能性は、HMGB1 B-boxまたはRAGEを介してシグナルを伝達するその20アミノ酸の相当するコアに対するモノまたはオリゴクローナル抗体を投与することである。更に、HMGB1の2つのDNA結合ドメインの1つであるHMGB1 A-boxは、HMGB1の特異的なアンタゴニストとして同定されている：高度に精製された組換えA-boxは、病変を誘導した24時間後に最初に治療を実施した際でさえ、致死性の実験的な敗血症からマウスを保護し、HMGB1アンタゴニストが、他の既知のサイトカインに使用されるものよりも臨床的に広範に亘って成功裏に投与されている可能性があることを示唆した。HMGB1欠失変異体の構造機能分析は、HMGB1のA-boxドメインがマクロファージに対するHMGB1の飽和した結合を競争的に置換

50

し、HMGB1の活性を特異的にアンタゴナイズする。抗HMGB1抗体の保護活性に関して既に認められているように、A-boxの投与は、敗血症の外科的な誘導の24時間後に遅れて治療を開始した際ですえ、マウスを敗血症から救出する。HMGB1タンパク質に結合する抗体若しくは抗体断片、HMGB1遺伝子アンチセンス配列、及びHMGB1レセプターアンタゴニストの群から選択されるHMGB1アンタゴニストまたはインヒビターはUS 6,468,533、WO 02/074337、及びUS 2003/0144201より既知である。

【 0 0 2 0 】

更に、sRAGEの投与による循環するHMGB1の飽和は、細胞のRAGEによって介在される活性の妨害を誘導し、抗RAGE抗体の投与を使用するRAGE自体の阻害によっても結果を得ることができる。

【 0 0 2 1 】

最後に、敗血症の過程における末期の同様な保護的な反応は、虚血/再灌流組織傷害及び致死性の出血性ショックの全身性の炎症を弱める安定な親油性誘導体であり、比較的無毒な食品添加物であるピルビン酸エチルの投与によって認められている。ピルビン酸エチルは、HMGB1、及びエンドトキシンに刺激されたマクロファージからの*in vitro*のTNF放出を阻害し、一方でこの病変を実験的に誘導した24時間後に投与を開始した際にも、腹膜炎に誘導された致死性の敗血症からマウスを*in vivo*で保護する。

【非特許文献1】Andersson, U., Erlandsson-Harris, H., Yang, H. and Tracey, K.J. (2002) HMGB1 as a DNA-binding cytokine *J. Leucocyte Biol.*, 72: 1084-1091

【非特許文献2】Czura, C.J., Tracey, K.J. (2003) Targeting high mobility group box 1 as a late acting mediator of inflammation *Crit. Care Med.*, 31: S46-S50

【非特許文献3】Agresti, A. and Bianchi, M.E. (2003) HMGB-proteins and gene expression *Current Opin. In Genetics and Develop.*, 13: 170-178

【非特許文献4】Degryse, B., de Virgilio, M. (2003) The nuclear protein HMGB1, a new kind of chemokine? *FEBS Letters*, 553: 11-17

【非特許文献5】Thomas, J.O. (2001) HMGB1 and 2: architectural DNA-binding proteins *Biochemical Society Transactions*, 29: 395-401

【非特許文献6】Ferrari, S., Harley, V. H., Pontiggia, A., Goodfellow, P. N., Lovell-Badge, R. and Bianchi, M. E. (1992) SRY, like HMGB1, recognizes sharp angles in DNA *The EMBO J.*, 11: 4497-4506

【非特許文献7】Pontiggia, A., Negri, A., Beltrame, M. and Bianchi, M.E. (1993) Protein HU binds specifically to kinked DNA *Mol. Biol.*, 7: 343-350

【非特許文献8】Scaffidi, P., Misteli, T. and Bianchi, M.E. (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation *Nature*, 418: 191-195

【非特許文献9】Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A. and Bianchi M.E. (2003) Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards Secretion *The EMBO Journal*, 22: 5551-5560

【非特許文献10】Taniguchi, N., Kawahara, K., Yone, K., Hashiguchi, T., Yamakuchi, M., Inoue, K., Yamada, S., Ijiri, K., Matsunaga, S., Nakajima, T., Komiya S. and Maruyama, I. (2003) High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of arthritis as a novel cytokine *Arthritis and Rheumatism*, 48:971-981

【非特許文献11】Palumbo, R., Sanpaolesi, M., De Marchis, F., Tonlorenzi, R., Colombetti, S., Mondino, A., Cossu, G. and Bianchi, M.E. (2004) Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces neoangioblast migration and proliferation *The J. of Cell Biology*, 164: 441-449

【非特許文献12】Friedman, S.G., Czura, C., J. and Tracey, K.J. (2003) The gesture life of high mobility group box 1 *Current Opinion in Clinical Nutrition and*

10

20

30

40

50

Metabolica Care, 6: 283-287

【非特許文献 1 3】Yang, H., Wang, H., and Tracey, K. J. (2001) HMGB1 rediscovered as a cytokine Shock, 15: 247-253

【非特許文献 1 4】Gardella, S., Andrei, C., Ferrera, D., Lotti, L.V., Torrisi, M.R., Bianchi, M.E. And Rubartelli, A. (2002) The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. EMBO Rep., 3: 995-1001

【非特許文献 1 5】Schmidt, A. M., Yan, S.D., Yan, S. F. and Stern, D. M. (2001) The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses J. Clin. Invest., 108: 949-955

【非特許文献 1 6】Lotze, M. T. and De Marco, R. A. (2003) Editorial overview - Dealing with death: HMGB1 as a novel target for cancer therapy Current Opinion in Investigational Drugs, 4: 1405-1409

【非特許文献 1 7】Pullerits, R., Jonsson, I. M., Verdreg, M., Bokarewa, M., Andersson, U., Erlandsson-Harris, H. and Tarkowski, A. (2003) High mobility group box chromosomal protein 1, a DNA binding cytokine, induces arthritis Arthritis and Rheumatism, 48: 1693-1700

【非特許文献 1 8】Kokkola, R., Li, J., Sundenberg, E., Aveberger, A. C., Palmblad, K., Yang, H., Tracey, K. J., Andersson, U. and Erlandsson-Harris, H. (2003) Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity Arthritis and Rheumatism, 48: 2052-2058

【非特許文献 1 9】Yan, S. D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D., Schmidt, A. M. (1996) RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease Nature, 382: 685-691

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0022】

本発明の基礎を成す課題は、HMGB-1に関連する病変(通常、本明細書ではHMGB1関連病変とも称される)の治療のための新規な剤の提供である。本発明の主題は、HMGB1タンパク質の細胞外放出によって生じるケモカイン自体によって及び/または炎症性サイトカインのカスケードによって誘導される広範な病変作用を患者の中で阻害するための、選択的なHMGB1アンタゴニスト/インヒビターとしての新規な剤の使用である。

【課題を解決するための手段】

【0023】

この課題に対する解決手段は、HMGB1タンパク質関連病変の予防または治療のための医薬の製造のための、少なくとも1つの曲がった構造を含み、HMGB1タンパク質、特に細胞外HMGB1タンパク質に結合することができる、ベント型構造を有する合成二本鎖核酸または核酸アナログ分子の使用によって提供される。ベント型構造を有する合成二本鎖核酸または核酸アナログ分子がHMGB1相同タンパク質、特に細胞外HMGB1相同タンパク質に結合することができることも本発明の範囲のうちである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

本発明と関連して、「HMGB」は非アセチル化型及び/またはアセチル化型のHMGB1を含む。同様に、「HMGB1相同タンパク質」は非アセチル化型及び/またはアセチル化型のHMGB1相同タンパク質を含む。好ましいHMGB1相同タンパク質は、HMGB2、HMGB3、HMG-1L10、HMG-4L、及び/またはSP100-HMGである。

【0025】

HMGB1の相同タンパク質は、HMGB1タンパク質のアミノ酸配列と比較して少なくとも60%

、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、更により好ましくは少なくとも90%のアミノ酸レベルで同一性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質として本発明に関連して規定されている。

【0026】

用語「同一性」は、2つの配列の1つの全アミノ酸の数によって、比較すべき2つのアミノ酸配列の同一のアミノ酸の数を割った割合の値として、本発明に関連して解される。

【0027】

HMGB1の結合能力は以下によって好ましく規定される。

(i)例えば本明細書の実施例1において示されるような、円偏光二色性(CD)試験の測定によって決定されるHMGB1タンパク質及び/または合成二本鎖核酸/核酸アナログ分子スペクトルの変化、及び/または

(ii)例えば本明細書の実施例2において示されるような、100nMの、好ましくは50nMの、より好ましくは25nMの、更に好ましくは15nMのEC₅₀値が認められることによる、BAEC細胞及び/またはBASMC細胞の増殖及び/移動の阻害能力。

【0028】

そのため、本発明の使用では、HMGB1に結合することができるペント型構造の合成二本鎖核酸または核酸アナログ分子が、非アセチル化及び/またはアセチル化型のHMGB1に好ましく結合することができる。更に、本発明の使用では、合成二本鎖核酸または核酸アナログ分子は、その非アセチル化及び/またはアセチル化型のいずれかを含む、HMGB1相同タンパク質、特にHMGB2、HMGB3、HMG-1L10、HMG-4L、及び/またはSP100-HMGに好ましく結合することができる。

【0029】

更に、本発明に関連して、HMGB1関連病変は非アセチル化及び/またはアセチル化型のHMGB1に関連する病変、あるいは非アセチル化及び/またはアセチル化型のHMGB1相同タンパク質を含む上述のHMGB1相同タンパク質、特にHMGB2、HMGB3、HMG-1L10、HMG-4L、及び/またはSP100-HMGに関連する病変を含む。

【0030】

HMGB1関連病変は、HMGB1が事実上検出不可能である通常の被験者における濃度と比較して、HMGB1タンパク質の及び/またはHMGB1相同タンパク質の濃度の増大が生物学的な流体及び組織に存在する患者における状態である。HMGB1関連病変及び/またはHMGB1相同タンパク質と関連する病変は、強力な炎症性の基礎を有する病変またはTNF- α 、IL-1、IL-6などのようなサイトカインの刺激に由来する病変、あるいは中毒、感染、やけどなどのような毒性の事象に由来する病変である。特に、高濃度のHMGB1タンパク質及び相同タンパク質は敗血症患者の血漿中、関節リウマチの患者の血漿及び滑液中、アルツハイマー病患者の脳中、黒色腫患者の血漿及び組織中、エリテマトーデス患者の血漿中、アテローム硬化性患者のアテローム硬化性プラークで認められ、測定されている。生物学的な流体及び組織のHMGB1タンパク質及び/または相同タンパク質の測定及び根拠は、例えばELISAアッセイなどによる検出を含む、当業者に既知の一般的な診断ツールによって検出されて良い。

【0031】

HMGB1タンパク質に結合することができる、好ましくは非アセチル化及び/またはアセチル化型のHMGB1に結合することができる合成二本鎖核酸または核酸アナログ分子は、好ましくは炎症性のサイトカインカスケードのHMGB1活性化によって特徴付けられる、HMGB1相同タンパク質と関連する病変を含むHMGB1関連病変である患者の状態を治療する方法において、治療上の有効量で患者に投与されて良い。本発明の方法では、HMGB1関連病変は、好ましくは非アセチル化及び/またはアセチル化型のHMGB1と、並びに非アセチル化及び/またはアセチル化型のHMGB1相同タンパク質、特にHMGB2、HMGB3、HMG-1L10、HMG-4L、及び/またはSP100-HMGと関連する病変である。

【0032】

驚くべきことに、少なくとも1つの曲がった構造を有する合成の短い二本鎖核酸または核酸アナログ分子が、細胞外の疾患に関連するHMGB1と競合する、または阻害するのである

う。好ましくは、本発明に係る二本鎖核酸または核酸アナログ分子は塩基対部分及び不對部分を有する。より好ましくは、前記核酸または核酸アナログ分子は、ベント核酸分子、十字型核酸分子、またはアナログ、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される。特に、ベント核酸分子は、本発明によれば、分子の構造内に1つ以上の曲がった構造を含む。好ましくは、前記核酸または核酸アナログ分子は1から3の曲がった構造、より好ましくは1つの曲がった構造を含む。

【0033】

本発明の好ましい実施態様によれば、前記核酸分子は二本鎖DNA分子であり、一方で前記核酸アナログ分子は、二本鎖PNA分子、二本鎖LNA分子、二本鎖DNA/PNAハイブリッド分子、二本鎖DNA/LNAハイブリッド分子、二本鎖PNA/LNAハイブリッド分子、二本鎖DNA/PNAキメラ分子、二本鎖DNA/LNAキメラ分子、及び二本鎖PNA/LNAキメラ分子からなる群より選択される天然に存在しない構成ブロックである。更に、更なる好ましい実施態様では、本発明の天然に存在しない構成ブロックは、糖、骨格、及び/または核酸塩基が修飾されたヌクレオチド構成ブロックより選択される、少なくとも1つの化学的に修飾されたヌクレオチド構成ブロックを含有する二本鎖核酸である。その様な構成ブロックの好ましい例は図3に示している。LNA修飾は、ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログの糖部分における2'-O、4'-Cメチレン橋、あるいは2'-O、5'-Cメチレン橋に導入する。本発明に関連して、LNAは、1つ以上のLNA修飾ヌクレオチドまたはLNA修飾ヌクレオチドアナログを含む、核酸または核酸アナログである。

10

【0034】

前記二本鎖核酸または核酸アナログ分子は、少なくとも1つの追加の部分に末端位を介して好適に接合されて良い。この追加の部分は、標的部分、薬力学的特性を修飾することができる部分などであって良い。例えば、前記部分は、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、炭化水素、脂質、ポリ(アルキレン)グリコール(例えばポリエチレングリコール)のような新水性若しくは疎水性ポリマー、ビタミン、またはそれらの組み合わせから選択されて良い。

20

【0035】

前記合成二本鎖核酸は、最も好ましくはベント二重鎖核酸分子、またはアナログ、あるいはそれらの組み合わせである。本発明のベント二重鎖核酸分子は、2つの相補的な核酸鎖及び/または核酸アナログ鎖からなる。各鎖は4から80ヌクレオチド構成ブロック、好ましくは6から40ヌクレオチド構成ブロック、最も好ましくは8から20ヌクレオチド構成ブロックの長さを有する。第1の相補的な鎖は、第2の相補的な鎖よりも、好ましくは1から10ヌクレオチド構成ブロック長く、不對ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログ構成ブロックの少なくとも1つの押し出されたループを形成する。

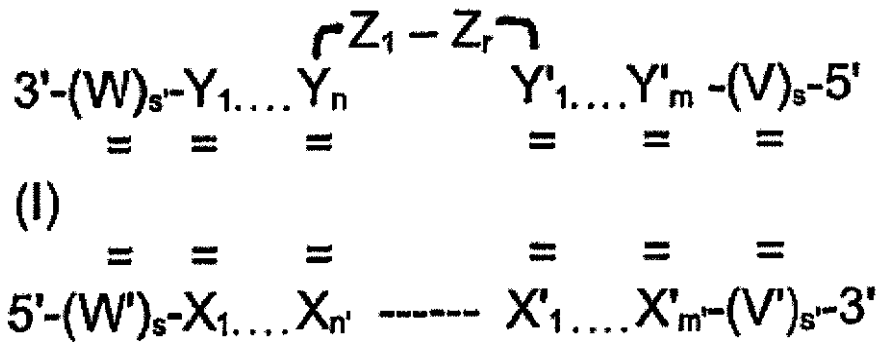
30

【0036】

本発明によれば、HMGB1タンパク質、特に細胞外HMGB1タンパク質に結合するために使用されるベント核酸分子またはベント核酸アナログ分子は、好ましくは以下の一般式Iによって表される。

【0037】

【化1】



10

【0038】

式中、W、W'、X、X'、Y、Y'、V、V'、及びZは、ヌクレオチド構成ブロックまたはヌクレオチドアナログ構成ブロックから独立に選択される。式Iでは、XとY、X'とY'、WとW'、及びVとV'の各々が相補的な構成ブロックであり、好ましくはワトソン-クリック塩基形成に従ってマッチングする。Z₁-Z_rはベントDNA分子の角度を規定し、不對ヌクレオチド構成ブロック及び/または不對ヌクレオチドアナログ構成ブロックからなる押し出されたループを表す。n、m、n'、m'は2から20の、好ましくは3から10の整数であり；rは1から10の整数（または1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であって良い）、好ましくは2から8または4から8の整数、より好ましくはr=2、3、4、5、または6であり、最も好ましくはr=2またはr=6であり；並びにsとs'は各々の場合において独立に0から10の整数、好ましくは0から5の整数である。

20

【0039】

式(I)の化合物の末端位で、ヌクレオチド構成ブロックまたはヌクレオチドアナログ構成ブロックが、分解(例えば、必要とする被験者に対する投与における酵素分解)を防止または減少する可能性がある橋構造を形成してよい。

【0040】

式(I)の化合物の末端位で、1つ以上の上述の追加の部分(例えば、アミノ酸、ペプチド、新水性若しくは疎水性ポリマーなど、及びそれらの組み合わせ)が、ヌクレオチド構成ブロックに、またはヌクレオチドアナログ構成ブロックに添加されて良い。特異的な追加の部分に依存して、この事が式(I)の化合物の溶解度及び薬力学プロファイルを改善し、並びに免疫原性を減少/無効にする可能性がある。

30

【0041】

W、W'、X、X'、Y、Y'、V、V'、及びZは、好ましくはDNA構成ブロック、PNA構成ブロック、LNA構成ブロック、または糖及び/若しくは骨格修飾核酸構成ブロックである。

【0042】

好ましくは、Z₁-Z_rは、アデニン塩基を有するヌクレオチド構成ブロックを少なくとも部分的には表し、より好ましくは、各Z₁-Z_rはアデニンヌクレオチド構成ブロックである。特に好ましい実施態様では、本発明のベント核酸分子構造の1つの相補鎖状のループは二本鎖から突出している2つのアデニンのループ、または6つのアデニンのループである。

40

【0043】

本発明の更なる得に好ましい実施態様では、ベント核酸アナログ分子は16-mer及び10-merの配列の各々からなる2つのキメラ鎖から構成され、各鎖の3'末端上の最後の三つのヌクレオチドはPNA構成ブロックである。そのため、好ましい核酸分子は一般式(I)によって表され、式中、W'、X、X'、Y、Y'、及びVはDNAヌクレオチド構成ブロック及び/またはLNAヌクレオチド構成ブロックであり、ZはアデニンヌクレオチドまたはLNA修飾ヌクレオチドであり、W及びV'はPNAヌクレオチド構成ブロックであり、n及びm'は2、n'及びmは5、rは2または6、sは0であり、s'は3である(図1Dではr=6であり、図9ではr=2、CT406である)。

50

【 0 0 4 4 】

本発明に係るペント核酸分子またはペント核酸アナログ分子の好ましい例を、図 1 及び図 9 に示す。

【 0 0 4 5 】

具体的な例では、式(1)の化合物は以下の配列を有する2つのDNA鎖からなるペント二重鎖核酸分子(CT401)によって表される。

【 0 0 4 6 】

24-mer 3' OH-GTTGCATTGAAAAAATTTCTTAGG-5' OH
18-mer 5' OH-CAACGTAAC-----AAAGAATCC-3' OH

【 0 0 4 7 】

他の具体的な例では、式(1)の化合物は以下の配列を有する2つのDNA鎖からなるペント二重鎖核酸分子(CT402)によって表される。

【 0 0 4 8 】

22-mer 3' OH-GTTGCATTGAAAATTTCTTAGG-5' OH
18-mer 5' OH-CAACGTAAC----AAAGAATCC-3' OH

【 0 0 4 9 】

更なる他の具体的な例では、式(1)の化合物は以下の配列の2つのDNA鎖からなるペント二重鎖核酸分子(CT403)によって表される。

【 0 0 5 0 】

20-mer 3' OH-GTTGCATTGAATTTCTTAGG-5' OH
18-mer 5' OH-CAACGTAAC--AAAGAATCC-3' OH

【 0 0 5 1 】

更なる具体的な例では、式(1)の化合物はDNA/PNAキメラ二重鎖(CT405)からなるペント二重鎖核酸分子によって表される。大文字はヌクレオチド構成ブロックを表し、小文字はPNA構成ブロックを表す。

【 0 0 5 2 】

24-mer COOH-gttGCATTGAAAAAATTTCTTAGG-5' OH
18-mer 5' OH-CAACGTAAC-----AAAGAA_{tcc}-COOH

【 0 0 5 3 】

更なる他の具体的な例では、式(1)の化合物はDNA/PNAキメラ二重鎖(CT406)からなるペント二重鎖核酸分子によって表される。大文字はヌクレオチド構成ブロックを表し、小文字はPNA構成ブロックを表す。

【 0 0 5 4 】

20-mer COOH-gttGCATTGAATTTCTTAGG-5' OH
18-mer 5' OH-CAACGTAAC--AAAGAA_{tcc}-COOH

【 0 0 5 5 】

本発明によれば、HMGB1タンパク質、特に細胞外HMGB1タンパク質に結合する十字型核酸分子または十字型核酸アナログ分子は4つの核酸鎖及び/または核酸アナログ鎖からなる。これら4つの鎖は相補的にハイブリダイズする部分を有し、ハイブリダイズする部分の間で一本鎖が0から4、好ましくは0から1の不对ヌクレオチド構成ブロックまたはヌクレオチドアナログ構成ブロックを含む。前記4つの鎖は対になって十字型構造の分子を形成する。本発明に係る十字型分子の好ましい例を図 2 に示す。本発明の特に好ましい実施態様では、前記十字型構造は少なくとも1つの天然に存在しないヌクレオチド構成ブロックを含み、例えば4つの鎖の各々が、各鎖の3'末端及び/または5'末端上の少なくとも1つ、好ましくは2つまたは3つのヌクレオチドが天然に存在しない、例えばPNA構成ブロックであるDNA配列鎖であるような十字型キメラ構造である。

【 0 0 5 6 】

HMGB1タンパク質に結合するために本発明で使用される十字型核酸分子の具体的な例では、十字型DNA分子(CT400)は以下に示す4つのDNA鎖の配列からなる。

【 0 0 5 7 】

10

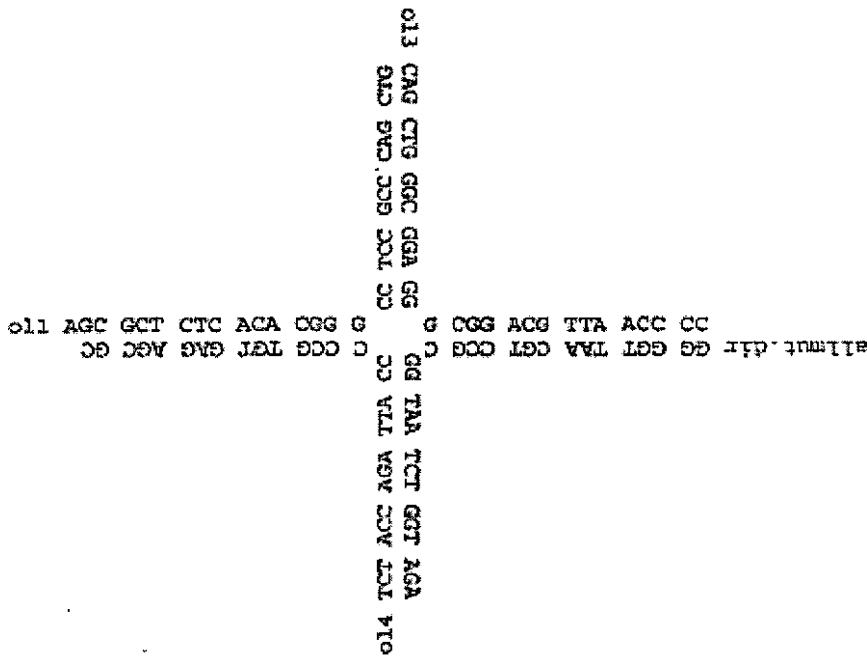
20

30

40

50

【化2】



10

20

```

011: AGC GCT CTC ACA CCG GCC TCC GCC CAG CTG
013: CAG CTG GGC GGA GGG CCG ACG TTA ACC CC
allmut.dir: GG GGT TAA CGT CCG CCG TAA TCT GGT AGA
014: TCT ACC AGA TTA CCC CCG TGT GAG AGC GC
  
```

【0058】

驚くべきことに、本発明の二本鎖核酸分子及び核酸アナログ分子はHMGB1タンパク質及び/またはHMGB1相同タンパク質に対する結合に関して高い能力を示す。

30

【0059】

そのため、本発明は炎症性サイトカインカスケードによって介在される細胞外HMGB1に関連する病変の予防または治療のための上述の核酸化合物の使用に関する。

【0060】

本発明を使用して有利に治療され得る状態の制限しない例として、以下のカテゴリー：炎症性疾患、自己免疫疾患、全身性炎症反応症候群、器官移植後の再灌流障害、心臓血管疾患、産科及び婦人科の疾患、感染症、アレルギー及びアトピー疾患、固体及び液体腫瘍病変、移植拒絶疾患、先天性の疾患、皮膚疾患、神経疾患、悪液質、腎疾患、医原性中毒状態、代謝疾患及び特発性の疾患、並びに眼科の疾患に分類されるHMGB1-ケモカインによって、及び炎症性サイトカインのHMGB1誘導カスケードによって誘導される広範な病変状態が含まれる。

40

【0061】

特に、炎症性疾患及び自己免疫疾患に属する病変は、慢性関節リウマチ/セロネガティブ関節症、変形性関節症、炎症性腸疾患、クローン病、全身性エリテマトーデス、虹彩眼炎(iridoevelitis)/ブドウ膜炎、視神経炎、特発性肺線維症、全身性脈管炎/ヴェーゲナー肉芽腫症、サルコイドーシス、精巣炎/精管切除反転法を含む。全身炎症反応は、敗血症症候群(グラム陽性敗血症、グラム陰性敗血症、培養陰性敗血症、真菌敗血症、好中球減少性熱病、尿路性敗血症、敗血性結膜炎を含む)、髄膜炎菌血症、外傷性出血、火傷、電離放射線曝露、急性及び慢性膵炎、成人呼吸困難症候群(ARDS)、前立腺炎を含む。再灌流障害は、心臓後部の症候群及び虚血性再灌流障害を含む。心臓血管疾患はアテローム性

50

動脈硬化症、腸梗塞、心停止症候群、心筋梗塞、うっ血性心不全、及び再狭窄を含む。産科及び婦人科の疾患は、早産、子宮内膜症、流産、及び不妊症を含む。感染症は、HIV感染/HIV神経障害、肺血性髄膜炎、B及びC型肝炎ウイルス感染、ヘルペスウイルス感染、肺血性関節炎、腹膜炎、喉頭蓋炎、E. coli O157:H7、溶血性尿毒症症候群/特発性血小板減少性紫斑病、マラリア、デング出血熱、リーシュマニア病、ライ病、トキシックショック症候群、連鎖球菌性筋炎、ガス壊疽、ヒト型結核菌、トリ型結核菌群、ニューモシスティスカリニ肺炎、骨盤腹膜炎、精巣炎/精巣上体炎、レジオネラ属、ライム病、インフルエンザA、エプスタイン-バーウイルス、サイトメガロウイルス、ウイルス関連ヘミアファゴサイティック(hemiphagocytic)症候群、ウイルス脳炎/無菌髄膜炎を含む。アレルギー及びアトピー疾患は、喘息、アレルギー性鼻炎、湿疹、アレルギー性接触皮膚炎、アレルギー性結膜炎、過敏性肺炎を含む。悪性疾患(固体及び液体腫瘍病変)は、腫瘍性の疾患、黒色腫、ALL、AML、CML、CLL、ホジキン病、非ホジキン病性リンパ腫、カボージ肉腫、結腸直腸癌、鼻咽頭癌、悪性組織球増殖症、及び悪性疾患の新生物随伴症候群/高カルシウム症を含む。移植疾患は、器官移植拒絶及び対宿主性移植片病を含む。先天性の疾患は、嚢胞性線維症、家族性血球貪食性リンパ組織球症、及び鎌状赤血球貧血を含む。皮膚疾患は、乾癬、乾癬性関節炎、及び脱毛を含む。神経疾患は、神経変性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、偏頭痛、アミロイド関連病変、プリオン病/クロイツフェルト-ヤコブ病、大脳梗塞、及び末梢神経障害を含む。腎疾患は、ネフローゼ症候群、血液透析、及び尿毒症を含む。医原性中毒状態は、OKT3治療、抗CD3治療、サイトカイン治療、化学療法、放射線療法、及び長期のサリチレート中毒を含む。代謝及び特発性の疾患は、ウィルソン病、血色素症、 α -1抗トリプシン欠乏症、糖尿病、橋本甲状腺炎、骨粗鬆症、視床下部-下垂体-副腎軸評価、及び原発性胆汁性肝硬変を含む。眼科の疾患は緑内障、網膜症、及びドライアイを含む。

【0062】

更に、本発明を使用して有利に治療され得る病変は、多数の機能不全症候群、筋ジストロフィー、肺血性髄膜炎、アテローム性動脈硬化症、急性または虚血性腸炎、憩室炎、喉頭蓋炎、アカラシア、胆肝炎、腸炎、ホウィップル病、喘息、アレルギー、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、免疫複合体病、器官壊死、枯草熱、敗血症、内毒素ショック、超高熱、好酸球性肉芽腫、肉芽腫症、サルコイドーシス、肺血性流産、膣炎、前立腺炎、尿道炎、気腫、鼻炎、肺炎、細気管支炎、塵肺病、胸膜炎、静脈洞炎、インフルエンザ、RSウイルス(respiratory syncytial virus)感染、播種性菌血症、カンジダ症、フィラリア症、アメーバ症、包虫嚢胞、皮膚筋炎、火傷、日焼け、蕁麻疹、いぼ、膨疹、血管炎、脈管炎、心内膜炎、心膜炎、心筋炎、動脈炎、血栓性静脈炎、結節性動脈周囲炎、リウマチ熱、セリアック病、脳炎、脳塞栓症、ギヤン-バレー症候群、神経炎、神経痛、脊髄損傷、麻痺、ブドウ膜炎、関節炎、関節痛、骨髄炎、筋膜炎、パジェット病、痛風、歯周病、滑膜炎、重症筋無力症、グッドパスチャー症候群、バブセット症候群(Babsett's syndrome)、強直性脊椎炎、パーガー病(Barger's disease)、ルティエ症候群(Retier's syndrome)、水疱性皮膚炎(水疱性類天疱瘡)、天疱瘡様、及び尋常性天疱瘡様壊死性腸炎を含む。

【0063】

本発明の更なる態様では、上述の核酸または核酸アナログ分子の使用は炎症性サイトカインカスケードの初期の調節因子を阻害することができる少なくとも1つの更なる剤と組み合わせる。好ましくは、この更なる剤はTNF、IL-1 β 、IL-1 α 、IL-1Ra、IL-8、MIP-1 α 、MIF-1 α 、MIF-2、MIF、及びIL-6からなる群より選択されるサイトカインのアゴニストまたはインヒビターである。例えば、本発明の核酸分子と組み合わせて使用される更なる剤は、好ましくはRAGEに対する抗体、RAGEの発現を阻害することができる核酸または核酸アナログ分子、例えばアンチセンス分子、リボザイム、若しくはRNA干渉分子、またはRAGE若しくは可溶性RAGE(sRAGE)とHMGB1との相互作用の小さい合成分子アンタゴニストである。RAGEとHMGB1との相互作用の小さい合成分子アンタゴニストは、好ましくは1000ダルトン未満の分子量を有する。前記小さい合成分子アンタゴニストは、好ましくは、非アセ

10

20

30

40

50

チル化型及び/またはアセチル化型のHMGB1、並びに非アセチル化型及び/またはアセチル化型のHMGB1相同タンパク質、特にHMGB2、HMGB3、HMG-1L10、HMG-4L、及び/またはSP100-HMGとRAGEとの相互作用を阻害する。

【0064】

他の実施態様では、本発明の核酸または核酸アナログと組み合わせて使用される更なる剤は、HMGB1とToll様レセプター(TLR)(例えば、TLR2、TLR4、TLR7、TLR8、及び/またはTLR9)との相互作用のインヒビターであり、前記インヒビターは、例えば、モノクローナル若しくはポリクローナル抗体、TLRの発現を阻害することができる核酸若しくは核酸アナログ(例えばアンチセンス分子、リボザイム、若しくはRNA干渉分子)、または好ましくは1000ダルトン未満のサイズを有する合成分子であって良い。前記インヒビターは、Toll様レセプター(TLR)、例えば、TLR2、TLR4、TLR7、TLR8、及び/またはTLR9の既知のインヒビターであって良い。前記インヒビターは、非アセチル化型及び/またはアセチル化型のHMGB1、並びに非アセチル化型及び/またはアセチル化型のHMGB1相同タンパク質、特にHMGB2、HMGB3、HMG-1L10、HMG-4L、及び/またはSP100-HMGとToll様レセプターとの相互作用を好ましく阻害する。

10

【0065】

更なる他の実施態様では、本発明の核酸または核酸アナログと組み合わせて使用される更なる剤はトロンボモジュリンの機能性のN末端レクチン様ドメイン(D1)である。トロンボモジュリンのD1ドメインは、非アセチル化型及び/またはアセチル化型の放出されたHMGB1、並びに放出されたHMGB1相同タンパク質、特にHMGB2、HMGB3、HMG-1L10、HMG-4L、及び/またはSP100-HMGを妨害することができ、それらとRAGE及びToll様レセプターとの相互作用を妨げる。トロンボモジュリンのD1ドメインは、プロテアーゼ耐性にするために変異されても、または天然のものであっても良い。

20

【0066】

本発明の二本鎖核酸または核酸アナログ分子は製薬組成物として通常投与される。前記投与は既知の方法、例えば注射、特に静脈内、筋肉内、皮下、若しくは腹腔内の注射、または輸液によって、経口、局所的、鼻内、吸入、エアロゾル、または直腸の適用などによって実施されて良い。前記投与は局所的または全身的であって良い。

【0067】

そのため、本発明は、製薬学的な担体とともに、少なくとも1つの上述の二本鎖核酸または核酸アナログ分子を活性剤として含有する製薬組成物にも関する。前記組成物は診断的または治療的応用に使用されて良い。診断的または治療的応用に関して、前記組成物は、溶液、例えば注射溶液、クリーム、軟膏、錠剤、または懸濁物などの形態であって良い。前記担体は任意の適切な製薬学的な担体であって良い。

30

【0068】

少なくとも1つの本発明の製薬組成物中の二本鎖核酸または核酸アナログ分子は、好ましくはHMGB1タンパク質に結合することができ、より好ましくは非アセチル化及び/またはアセチル化型のHMGB1に結合することができる。

【0069】

本発明の製薬組成物は、無機酸、例えば塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、リン酸、メタリン酸、及び硝酸の塩など、並びに有機酸の塩、例えば酢酸、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、マロン酸、安息香酸、及びスルホン酸などの塩を含む、少なくとも1つの二本鎖核酸または核酸アナログ分子の製薬学的に許容される塩も含んで良い。更に、少なくとも1つの二本鎖核酸または核酸アナログ分子が、アルカリカチオン(例えばリチウム、ナトリウム、及び/またはカリウムカチオン)、アルカリ土類カチオン(例えばマグネシウム、カルシウム、及び/またはバリウムカチオン)、アンモニウムカチオン、並びに有機カチオン、例えば脂肪族及び芳香族残基によって置換されているアンモニウムカチオンを含む、製薬学的に許容されるカチオンと製薬学的に許容される塩を形成してよい。更に、アミノ酸が少なくとも1つの二本鎖核酸または核酸アナログ分子と共に塩を形成してよい。当業者は、本発明の製薬組成物の調製のための適切な製薬学的に許容される塩を知っている

40

50

。

【0070】

本発明の製薬組成物は、高分子の物質(例えば、ポリエチレングリコール(PEG))、デンプン、ゼラチン、ペクチン、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、エチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、脂質、アミノ酸、シクロデキストリン、糖、及び糖アルコール(例えば、ラクトース、サッカロース、グルコース、マンニトール、ソルビトール)、乳化剤、並びに希釈剤などを含む、当業者に既知の一般的な付加的な物質を賦形剤として更に含んで良い。

【0071】

本発明は、HMGB1関連病変によって、好ましくは炎症性、心臓血管、神経変性、腫瘍性、及び/または自己免疫性の病変によって影響を受けている疑いがある患者より得られる身体内の流体、好ましくは血清及び/または血漿中のHMGB1を測定するための、少なくとも1つの上述の二本鎖核酸または核酸アナログ分子を含むキットにさらに関する。前記キットは上述の製薬組成物も含んで良い。

10

【0072】

本発明のキットは、非アセチル化及び/またはアセチル化型のHMGB1の測定に好ましく関する。更に、本発明のキットは、非アセチル化及び/またはアセチル化型のHMGB1相同タンパク質、特にHMGB2、HMGB3、HMG-1L10、HMG-4L、及び/またはSP100-HMGの測定に関して良い。

【0073】

更に、本発明の二本鎖核酸または核酸アナログ分子は医療器具の表面に可逆的に固定化されて良い。かくして前記医療器具は、特に医療器具の表面または医療器具の表面のコーティング層に前記核酸または核酸アナログ分子を結合、埋め込み、及び/または吸着させて本発明の分子を可逆的に積載して良い。医療器具と体液とが接触した後に、可逆的に固定化された化合物が遊離する。従って、前記医療器具は本発明の分子を溶出する薬剤送達装置として働き、前記薬剤の送達動力学が調節され、例えば調節されたまたは持続する薬剤の送達を提供する。医療器具のコーティング技術は当業者によく知られている。

20

【0074】

そのため、本発明の更なる態様は、医療器具の表面に可逆的に固定化される本発明の合成二本鎖核酸または核酸アナログ分子の使用である。好ましくは、前記医療器具は、手術用具、移植片、カテーテル、またはステント、例えば血管形成のためのステントである。最も好ましくは、本発明に係る医療器具は薬剤溶出ステント(DES)である。

30

【0075】

本発明の更なる他の態様は、本発明に係る二本鎖核酸または核酸分子で可逆的にコーティングされた医療器具である。

【0076】

更に、本発明は以下の図面及び実施例により詳細に説明する。

【実施例】

【0077】

(実施例1)

円偏光二色性(CD)によるタンパク質結合実験

本発明の異なるベント及び十字型構造のものによるタンパク質の結合について試験するために、CD試験を実施した。全てのCDスペクトルを、1cmの厚みの水晶の円柱状キュベット(Jasco)を使用して、NesLab RTE111サーマルコントローラユーティリティーを備えているJasco J710 分光偏光計で収集した。20nm/分のスキャン速度、1nmの帯域幅、1nmの分解能を常に使用した。使用される実験条件の例として、ベントDNA二重鎖のHMGB1に対する結合の場合を議論する。

40

【0078】

第1の実験では、上述のベント二重鎖核酸分子CT401を使用した。前記二重鎖を等モル量の双方の鎖を水に加え、その溶液を90 で5分間加熱し、溶液を室温(R.T.)に冷却するこ

50

とで調製した。前記CDスペクトルによって、予想されるような二本鎖から押し出されたアデニループを有するDNA二重鎖の形成を確認した。タンパク質HMGB1のCDスペクトルを記録し、構造の完全性をチェックした。このサンプルに、過剰のHMGB1タンパク質を添加して、CDスペクトルを再び記録した。複合体のスペクトルは、CDスペクトルの280nmバンドにおける減少(おそらくアデニループ付近の二本鎖部の小さな開き)によって明らかにされたDNA塩基の小さなアンスタッキング、並びにアデニループに由来する220nmポジティブバンドにおける相当する変化によって明らかにされるアデニループの構造の強い変化(おそらく前記タンパク質の存在下におけるDNAの曲がりによって誘導された)を誘導する前記タンパク質の相互作用を明らかに示した。タンパク質+DNAのサンプルのスペクトルはHMGB1と二重鎖DNAのスペクトルの正規化した合計とは異なるために、CDスペクトルにおいて認められた効果は強いHMGB1-DNA相互作用による可能性がある。図4は得られる円偏光二色性スペクトルを示し、暗青色の線(図4の凡例中のCT401を示す)はDNA二重鎖化合物のスペクトルを表し、黒線(図4の凡例中のCOMPを示す)はHMGB1-ベントDNA複合体のスペクトルを表し、黒色の破線(図4の凡例中のSUMを示す)はHMGB1タンパク質及び二重鎖DNA化合物のスペクトルの正規化した合計を表す。

10

【0079】

(実施例2)

上記の構造的な分類に属する合成分子がin vitroでウシ大動脈内皮細胞(BAEC)のHMGB1に誘導される増殖及び移動の活性を阻害できるか調べるために、2つの生物学的なアッセイ、増殖アッセイ及び走化性アッセイ、をCT401(DNAベント誘導体)及びCT400(DNA十字型誘導体)の存在下または非存在下で実施した。

20

【0080】

増殖アッセイ

Palumbo et al., (2004)によって記載されるように増殖アッセイを実施した。

【0081】

BAEC細胞(ウシ大動脈内皮細胞)を6ウェルプレート(10^5 細胞/ウェル)に播種して、20% FCSを添加したRPMI培地中で増殖させた。24時間後、血清を含まないRPMIで前記培地を置き換え、次いで16時間飢餓状態にして細胞集団を同調させた。媒体(ネガティブコントロールまたは基礎的な増殖)または30ng/ml (1nM)のHMGB1(バクテリアで作製)を10または100nMの試験化合物(血清を含まない培地に溶解及び希釈した)の存在下または非存在下に添加した。ベントDNA CT401を使用して実施したアッセイは、18merの鎖とその相補鎖とからなる直線状のオリゴDNA(図5の凡例にAと示される)を使用して実施した。同様に、十字型DNA CT400を使用して実施したアッセイを二重鎖DNA(図7の凡例において各々AZ及びBZと示される)及び対照化合物として一本鎖DNA(図7の凡例においてSSと示される)でも実施した。各実験点は3回繰り返した測定の平均 \pm 標準偏差(SD)を表す。前記実験は三回繰り返した。BAEC細胞増殖を示される時間でプレートより細胞を剥離して、顕微鏡下でトリパンブルー排除細胞を計数することで測定した。本発明のベントDNA化合物及び十字型DNA化合物によるBAEC細胞のHMGB1誘導増殖活性の阻害を図5及び図7に各々示す。

30

【0082】

上述のプロトコルに従う更なるアッセイにおいて、ベント分子であるCT401、CT402、CT403、CT405、及びCT406が、HMGB1によって誘導されるBAEC細胞の増殖を濃度依存的に阻害/アンタゴナイズすることが示された。前記ベントDNA分子であるCT401、CT402、及びCT403は、 ~ 10 nM、 ~ 30 nM、及び < 10 nMの EC_{50} を各々示し、対照の直線状二重鎖DNA CT404は示さなかった(図10/表1)。ベントDNA/PNA二重鎖であるCT405及びCT406は < 10 nMの EC_{50} を示し、対照化合物であるCT407は効果を有さなかった(表1参照)。

40

【0083】

更なる実験では、本発明の特異的な化合物の存在下におけるBASC(ウシ大動脈平滑筋細胞)の増殖を試験した(Palumbo et al., 2004に記載されているプロトコル)。BASC細胞を6ウェルプレートに播種して(10^5 細胞/ウェル)、20% FCSを添加したRPMI培地で増殖させた。24時間後、血清を含まないRPMIで前記培地を置き換え、次いで細胞を16時間飢餓状態に

50

して細胞集団を同調させた。媒体(ネガティブコントロールまたは基礎的な増殖)または25 ng/ml(1nM)のHMGB1(バクテリアで作製)を、上述のように溶解した本発明の化合物の存在下または非存在下に添加した。各実験点は3回繰り返した測定の平均 \pm SDを表す。前記実験は3回繰り返した。示される時間(培養の1、2、3、及び4日目)でプレートから細胞を剥離し、顕微鏡下でトリパンブルー排除細胞を計数することによって、BASMC細胞増殖を測定した。BASMCの増殖の濃度依存的な阻害が、本発明のペント分子において認められた($EC_{50} < 10nM$)。直線状の対照化合物は効果を有さなかった。

【0084】

走化性アッセイ

特にPalumbo et al., (2004)に記載されているような、よく知られているプロトコルを使用して、走化性アッセイを実施した。

【0085】

修飾されたボイデンチャンパー(modified Boyden chamber)を、5-8 μ mの細孔サイズを有するフィルターと共に使用し、ブタの皮膚由来のゼラチンタイプA(5 μ g/ml)で処理した。血清を含まないDMEMにBAEC細胞(ウシ大動脈内皮細胞)を再懸濁して、40,000細胞のサンプルをボイデンチャンパーの上のウェルに添加した。試験される分子を同じ血清を含まない培地に溶解及び希釈して、前記チャンパーの下のウェルに添加した；HMGB1(バクテリアで作製)濃度は1nMであり、試験化合物は10-100nMであった。ペントDNA CT401で実施したアッセイを、対照化合物として上述した直線状の二重鎖DNAを使用しても実施した。37 \pm 0.5 で4時間細胞移動させ、次いで、細胞を上部の表面から掻き取り、フィルターをエタノール中で固定化及び修飾したギムザ染色(Accustain, Sigma)の溶液で染色した。全ての実験は3つの複製で少なくとも2回実施した。本発明のペントDNA化合物及び十字型DNA化合物によるBAEC細胞のHMGB1に誘導される移動活性の阻害を図6及び8に各々示す。図6及び8に示されるように、結果は平均 \pm SDのフィルター毎10高倍率視野で計数した細胞数であり、対照の数倍より多く表されている。ランダムな細胞移動、すなわち化学誘引物質の非存在下における移動を100%の任意の値として与えた。処理の2つの比較のためにスチューデントのt試験、または試薬濃度の増加に伴う処理の評価のためにANOVAモデルを使用して統計的な分析を実施した。

【0086】

上述のプロトコルによる更なるアッセイでは、前記ペント分子CT401、CT402、CT403、CT405、及びCT406は、nMの濃度範囲で既にHMGB1に誘導されるBAEC細胞の移動を濃度依存的に阻害/アンタゴナイズするが、一方で対照の二重鎖DNAであるCT404は阻害/アンタゴナイズしなかった。前記ペントDNA分子CT401は $\sim 3nM$ の EC_{50} を示した。CT402及びCT403の EC_{50} は $< 3nM$ であった(図11/表1)。更に、HMGB1に誘導されるBAEC細胞の移動に対する濃度依存的な阻害/アンタゴニスト効果は、nMの濃度範囲で本発明のペントDNA/PNAキメラ二重鎖CT405及びCT406において認めることができたが、一方で対照としてのキメラ直線状二重鎖CT407は阻害/アンタゴニスト効果を示さない(図12)。CT405の EC_{50} 値は $\sim 5nM$ である。CT406の EC_{50} 値は3nMである(表1参照)。

【0087】

更なる実験では、本発明の特定の化合物の存在下におけるBASMC(ウシ大動脈平滑筋細胞)の走化性を試験した(Palumbo et al., 2004に記載のプロトコル)。修飾されたボイデンチャンパーを、5-8 μ mの細孔サイズを有するフィルターと共に使用し、コラーゲンI(0.5M酢酸中に100 μ g/ml)とフィブロネクチン(10 μ g, Roche社)とを使用して処理した。血清を含まないDMEMにおいてBASMC(ウシ大動脈平滑筋細胞)を培養し、20,000-40,000細胞のサンプルをボイデンチャンパーの上のウェルに添加した。

【0088】

上述のように化合物を溶解した。HMGB-1(ウシ胸腺由来)の濃度は25ng/mlであり、fMLPの濃度は0.1 μ Mであった。37 \pm 0.5 で一晩細胞移動させ、次いで細胞を掻き取り、フィルターをメタノール中で固定化して、20%メタノール中の10%クリスタルバイオレットの溶液中で染色した。全ての実験を3つの複製で少なくとも2回実施した。結果はフィルター毎

10

20

30

40

50

の10高倍率視野で計数した細胞数の平均 \pm -SDであり、対照の数倍より多く表された。ランダムな細胞移動、すなわち、化学誘引物質の非存在下における移動は100%の任意の値で与えられた。処理の2つの比較のためにスチューデントのt試験、または試薬濃度の増加に伴う処理の評価のためにANOVAモデルを使用して統計的な分析を実施した。BASMCの移動の濃度依存的な阻害が本発明のペント分子において認められた($EC_{50} < 3nM$)。直線状の対照の分子は効果を有さなかった。

【0089】

(実施例3)

37におけるヒト血清中のペント核酸及び核酸アナログの安定性

本発明に係る二本鎖DNA-PNAキメラ分子であるCT406(図9参照)の安定性を、CT406の配列と一致する二本鎖DNAであるCT403と比較して、ヒトの血清中で試験した(図9参照)。

10

【0090】

7 μ M CT406(UV検出によって確認)を純粋なヒトの血清において37で培養した。CT406の分解に従って、未分解の分子に相当するHPLCピークエリアの減少を、血清中の異なるインキュベーション時間の後で確認した。異なる注入容量による不正確性を避けるために、前記ピークエリアを全HPLCプロフィールエリアの割合として表した。

【0091】

CT406の非直線回帰分析曲線($R^2=0.99$)が、補間法によって、9時間の50%の分解時間を与えた。37度で12時間後、未消化のCT406は全体の41%であった(図13参照)。

【0092】

20

対照的に、CT403は40分の半減期を有し、1時間35分度に完全に分解された。

【0093】

(実施例4)

マウスLPS-誘導内毒血症の逆転

36のオスの7から8週齢のBALB/cマウスをCharles River社(Calco, Italy)より購入し、使用の数日前に気候順化させた。実験の当日、全てのマウスにLD70-90用量(10mg/kg、右鼠径領域の腹腔内)のリポポリサッカリド(大腸菌由来のLPS、染色剤0111:B4、0.9%の滅菌生理食塩水に溶解)を与えた。LPSの注射の12及び20時間後に、リン酸緩衝生理食塩水に溶解したCT406(2.73mg/kg、腹腔内、10ml/kg、左鼠径領域において)を18のマウスに与え、等量の媒体(対照)を残る18のマウスに与えた。CT406の選択された用量は、BAEC(ウシ大動脈内皮細胞)細胞のHMGB1に誘導される増殖に対するin vitroの IC_{50} ($\sim 10nM$)のちょうど25倍に一致する。死亡数を観察し、48時間まで1日に二回記録した。結果を図14に示す。観察時間の最後(48時間)に、CT406を投与された18のマウスのうちの7のマウスが生存しており、18の対照のマウスのうち3のみが生存した。

30

【0094】

【表 1】

結果の一覧表：HMGB1に誘導された細胞移動及び増殖において測定された
ベントDNA及びDNA/PNAキメラのEC50

	CT 化合物	走化性 EC50 (nM)	増殖 EC50 (nM)
ベントDNA	CT401	~ 3	~ 10
	CT402	< 3	~ 30
	CT403	< 3	< 10
	CT404 (直線状DNA、 ネガティブコントロール)	n.d.	n.d.
ベントDNA/PNA	CT405	~ 5	< 10
	CT406	3	< 10
	CT407 (直線状DNA/PNAキメラ、 ネガティブコントロール)	n.d.	n.d.

n.d. = 測定不可能

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図 1】本発明に係る、ベント核酸分子またはベント核酸アナログ分子の構造の例。黒色の
大文字は天然のオリゴヌクレオチド配列を表し、赤色の文字はPNA塩基配列を表す。(A)
：ベントDNA二重鎖；(B)：ベントPNA二重鎖；(C)及び(D)：ベントDNA/PNAキメラ二重鎖；
(E)：ベントDNA/PNAハイブリッド二重鎖。

【図 2】本発明に係る、十字型核酸分子または十字型核酸アナログ分子の構造の例。黒色の
大文字は天然に存在するオリゴヌクレオチド配列を表し、赤色の文字はPNA配列を表す
。(A)：十字型DNA；(B)：十字型PNA；(C)：十字型DNA/PNAキメラ；(D)：十字型DNA/PNAハ
イブリッド。

【図3】天然に存在しない化学的に修飾されたヌクレオチド構成ブロックの例であり、文字「B」はヌクレオチド塩基を表す。

【図4】1)二重鎖から押し出されたポリアデニンループを有するベント二重鎖DNA(CT401 暗青色)、2)HMGB1-ベントDNA(CT401)複合体(COMP 黒色)、及び3)HMGB1のスペクトルとベント二重鎖DNA(CT401)との正規化した合計(SUM 黒色の破線)の円偏光二色性スペクトル。

【図5】本発明のベントDNA CT401を使用して実施された増殖アッセイの結果を表す図。ベントDNA CT401はHMGB1によって誘導されたBAEC細胞の増殖を濃度依存的に阻害/アンタゴナイズするが、対照の直線状二重鎖DNA(A)はしない。

【図6】本発明のベントDNA CT401を使用して実施された走化性アッセイの試験の結果を表す図。ベントDNA CT401はnMの濃度範囲で既にHMGB1によって誘導されたBAEC細胞の移動を濃度依存的に阻害/アンタゴナイズするが、対照の二重鎖DNAはしない。

【図7】本発明の十字型DNA CT400を使用して実施した増殖アッセイの結果を表す図。十字型DNA CT400はHMGB1によって誘導されたBAEC細胞の増殖を濃度依存的に阻害/アンタゴナイズするが、対照の二重鎖DNA(AZ及びBZ)及び一本鎖のDNA(SS)はしない。

【図8】本発明の十字型DNA CT400を使用して実施した走化性アッセイの結果を表す図。十字型DNA CT400は、HMGB1によって誘導されたBAEC細胞の移動を濃度依存的に阻害/アンタゴナイズし、その活性はnMの範囲でも存在する。

【図9】ベント核酸分子CT401、CT402、及びCT403、または核酸アナログを含むベント分子CT405及びCT406の構造。直線状の二重鎖CT404及びCT407を対照として使用する。大文字はヌクレオチド構成ブロックを表し、小文字はPNA構成ブロックを表す。

【図10】本発明のベントDNA分子CT401、CT402、及びCT403、並びに曲がっていない対照のDNA CT404を使用して実施した増殖アッセイの結果を表す図。ベントDNA分子CT401、CT402、及びCT403は、HMGB1によって誘導されたBAEC細胞の増殖を濃度依存的に阻害/アンタゴナイズするが、対照の直線状二重鎖DNA CT404はしない。

【図11】本発明のベントDNA分子CT401、CT402、及びCT403、並びに曲がっていない対照のDNA CT404を使用して実施した走化性アッセイの結果を表す図。ベントDNA分子CT401、CT402、及びCT403は、nMの濃度範囲において既にHMGB1によって誘導されたBAEC細胞の移動を濃度依存的に阻害/アンタゴナイズするが、対照の二重鎖DNA CT404はしない。

【図12】本発明のベントDNA/PNAキメラ二重鎖CT405及びベントDNA分子CT401、並びに対照のキメラ直線状二重鎖CT407を使用して実施した走化性アッセイの結果を表す図。ベントDNA/PNAキメラ二重鎖CT405及びベントDNA分子CT401は、nM範囲で既にHMGB1によって誘導されるBAEC細胞の移動を濃度依存的に阻害/アンタゴナイズするが、対照のCT407はしない。

【図13】31におけるヒト血清中のCT406の安定性を表す図であり、CT406は9時間の半減期を示す。12時間のインキュベート後、未変化のCT406は全体量の41%である。

【図14】ベントDNA分子CT406を使用したマウスにおけるLPS誘導内毒血症試験の結果を表す図。

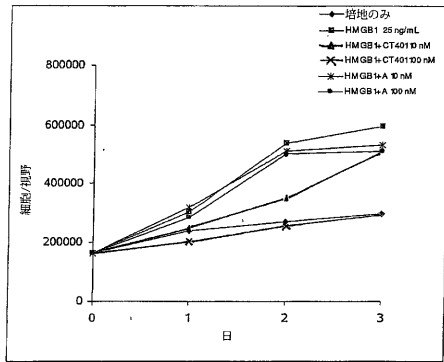
10

20

30

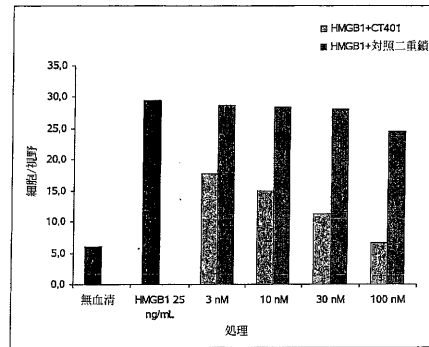
【 図 5 】

Figure 5



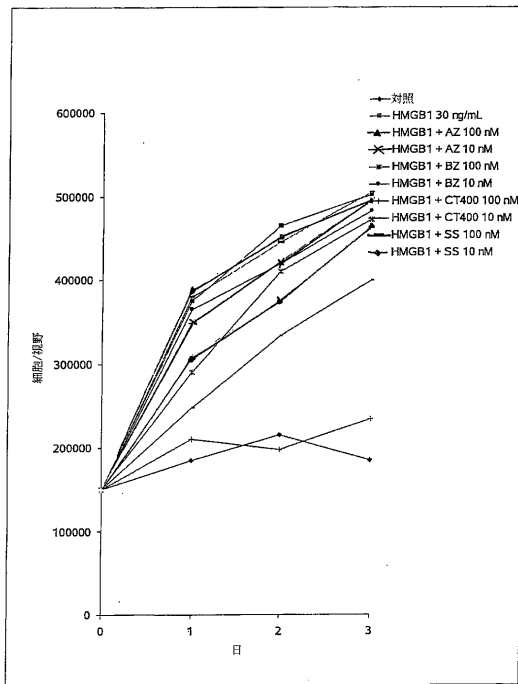
【 図 6 】

Figure 6



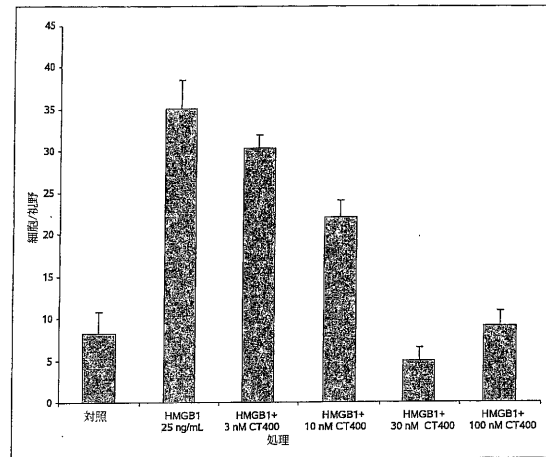
【 図 7 】

Figure 7

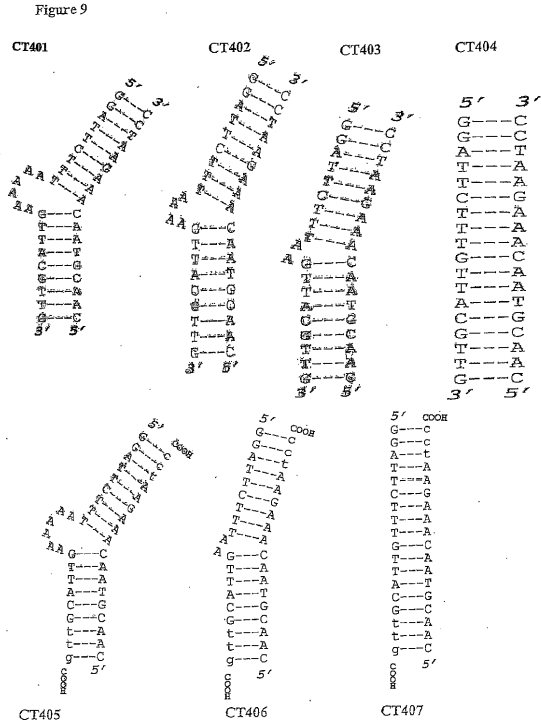


【 図 8 】

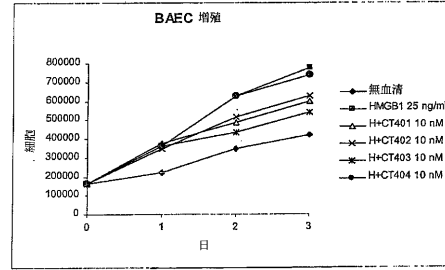
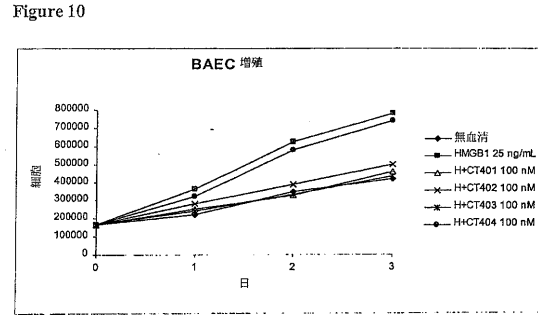
Figure 8



【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】

走化性アッセイ:

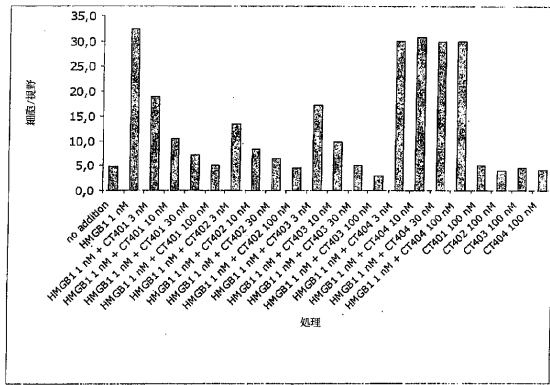


Figure 11

【 図 12 】

走化性アッセイ:

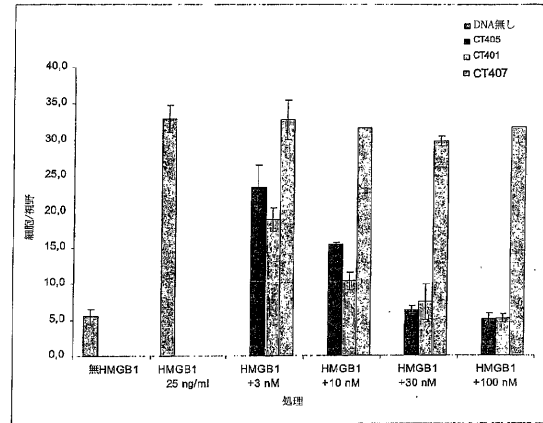
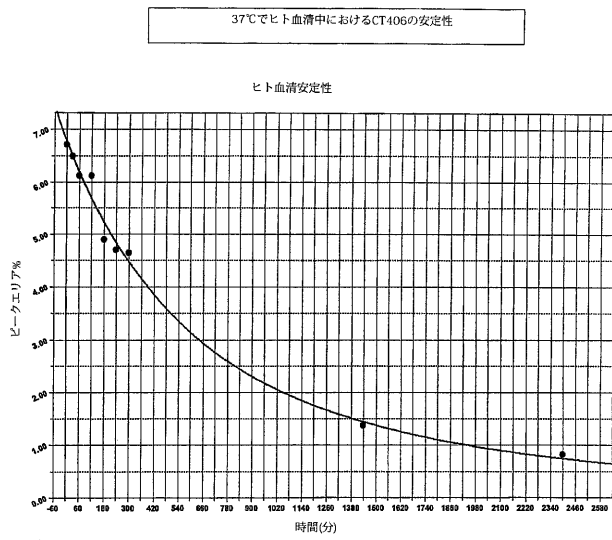


Figure 12

【 図 1 3 】

Figure 13

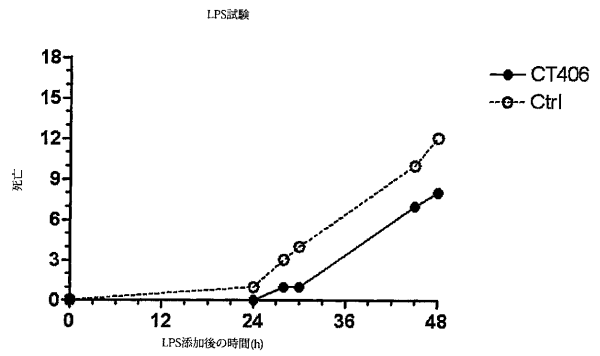


HPLCデータ :

時間(分)	ピークエリア%	半減期: 9 h	At 12 h: 前CT406の41%が未消化
0	6.70		
30	6.48		
60	6.12		
120	6.12		
180	4.89		
240	4.70		
300	4.63		
1440	1.36		
2400	0.82		

【 図 1 4 】

Figure 14



【 配 列 表 】

2008504335000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/007198

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/713		
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) A61K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/074337 A (BIO3 RESEARCH S.R.L; BIANCHI, MARCO, E; BONALDI, TIZIANA; SCAFFIDI, PA) 26 September 2002 (2002-09-26) page 1, line 26 - page 2, line 5 claim 2	1,24
Y	WO 2004/046345 A (CRITICAL THERAPEUTICS, INC; NEWMAN, WALTER; O'KEEFE, THERESA, L) 3 June 2004 (2004-06-03) page 3, line 3 - page 4, line 2; claims 19,26 page 13, line 24 - page 14, line 7 ----- -/--	1-37
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts 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. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 December 2005		Date of mailing of the international search report 16/01/2006
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Engl, B

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/007198

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MÜLLER S; BIANCHI M; KNAPP S.: "Thermodynamics of HMGB1 interaction with duplex DNA" BIOCHEMISTRY, vol. 40, no. 34, 2001, pages 10254-10261, XP002359280 the whole document	1-37
A	WO 94/09158 A (UNIVERSITY RESEARCH CORPORATION) 28 April 1994 (1994-04-28) the whole document	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP2005/007198

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02074337	A	26-09-2002	AU 2002247977 A2	03-10-2002
			CA 2439530 A1	26-09-2002
			CN 1537014 A	13-10-2004
			EP 1368060 A1	10-12-2003
			IT MI20010562 A1	16-09-2002
			JP 2004523579 T	05-08-2004
			US 2004136979 A1	15-07-2004

WO 2004046345	A	03-06-2004	AU 2003294488 A1	15-06-2004
			CA 2506328 A1	03-06-2004
			EP 1569684 A2	07-09-2005

WO 9409158	A	28-04-1994	AT 256200 T	15-12-2003
			AU 5442194 A	09-05-1994
			CA 2146859 A1	28-04-1994
			DE 69333350 D1	22-01-2004
			DE 69333350 T2	27-05-2004
			EP 0672188 A1	20-09-1995

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 L 29/00 (2006.01)	A 6 1 L 29/00	B
A 6 1 L 31/00 (2006.01)	A 6 1 L 31/00	B
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

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

(72) 発明者 ドメニコ・ジ・パロン

イタリア・I - 1 0 1 2 9・トリノ・コルソ・ロッセリ・6 6

(72) 発明者 マルコ・エ・ピアンキ

イタリア・I - 2 0 0 6 8・ペスキエラ・ボッロメオ・ヴィアレ・アブルッジ・4 / C

(72) 発明者 エンリコ・エンメ・ブッチ

イタリア・I - 8 0 1 3 4・ナポリ・コルソ・ウンベルト・ウン・3 5

(72) 発明者 シルヴァノ・フメロ

イタリア・I - 1 0 0 1 5・イヴレア・ヴィア・デレ・ジェルマネ・1 1

(72) 発明者 マルゲリータ・ヴァレンテ

イタリア・I - 0 4 0 2 3・フォルミア・ヴィア・フォッソ・デリ・ウリヴィ・(番地なし)

(72) 発明者 ロベルト・サピオ

イタリア・I - 8 4 0 9 2・ベリッジ・ヴィア・ベネヴェント・2

(72) 発明者 ドメニカ・ムスメチ

イタリア・I - 8 1 0 3 0・サンタルピノ・ヴィア・デイ・ラヴォラトリ・1 0

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA05 CA09 HA12 HA20

4C081 AC08 AC09 BB06 CE02 DC03

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA01 ZA33 ZA36

ZA81 ZA89 ZB11 ZB13 ZB26 ZB35

专利名称(译)	用于治疗与HMGB1相关的病变的核酸		
公开(公告)号	JP2008504335A	公开(公告)日	2008-02-14
申请号	JP2007518555	申请日	2005-07-04
[标]申请(专利权)人(译)	克莱尔拓扫描治疗SpA公司		
申请(专利权)人(译)	Kureabirisu治疗, SpA公司		
[标]发明人	ドメニコジバロン マルコエビアンキ エンリコエンメブッチ シルヴァノフメロ マルゲリータヴァレンテ ロベルトサピオ ドメニカムスメチ		
发明人	ドメニコ・ジ・バロン マルコ・エ・ビアンキ エンリコ・エンメ・ブッチ シルヴァノ・フメロ マルゲリータ・ヴァレンテ ロベルト・サピオ ドメニカム・スメチ		
IPC分类号	A61K31/713 A61P43/00 A61P29/00 A61P37/00 A61P9/00 A61P37/08 A61P35/00 A61P17/00 A61P27/02 A61P13/12 A61L29/00 A61L31/00 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	A61K31/713 A61P9/00 A61P13/12 A61P17/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00 C12N15/115 C12N2310/16 C12N2310/3181 C12N2310/52		
FI分类号	A61K31/713.ZNA A61P43/00.111 A61P29/00 A61P37/00 A61P9/00 A61P37/08 A61P35/00 A61P17/00 A61P27/02 A61P13/12 A61L29/00.B A61L31/00.B G01N33/53.D C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA05 4B024/CA09 4B024/HA12 4B024/HA20 4C081/AC08 4C081/AC09 4C081/BB06 4C081/CE02 4C081/DC03 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA33 4C086/ZA36 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB26 4C086/ZB35		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	60/584678 2004-07-02 US 60/646586 2005-01-26 US		
其他公开文献	JP2008504335A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及具有弯曲形状结构的合成双链核酸或核酸类似物分子在预防和治疗由HMGB1蛋白直接或间接诱导的病理学中的用途。

$$3'-(W)_s-Y_1 \dots Y_n \quad \overset{\lceil Z_1 - Z_r \rceil}{Y'_1 \dots Y'_m}-(V)_s-5'$$

$$= = = \quad = = =$$

(I)

$$= = = \quad = = =$$

$$5'-(W')_s-X_1 \dots X_n \quad \text{-----} \quad X'_1 \dots X'_m-(V')_s-3'$$