

(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2009-522344  
(P2009-522344A)

(43) 公表日 平成21年6月11日(2009.6.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H 0 4 5
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-549059 (P2008-549059)  
 (86) (22) 出願日 平成19年1月5日 (2007.1.5)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年8月13日 (2008.8.13)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2007/000029  
 (87) 国際公開番号 W02007/077454  
 (87) 国際公開日 平成19年7月12日 (2007.7.12)  
 (31) 優先権主張番号 0600168.9  
 (32) 優先日 平成18年1月5日 (2006.1.5)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)  
 (31) 優先権主張番号 11/401,321  
 (32) 優先日 平成18年4月11日 (2006.4.11)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

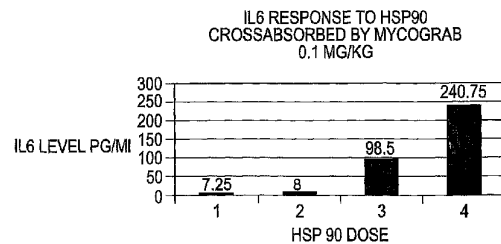
(71) 出願人 500030172  
 ニュウテック ファーマ リミテッド  
 イギリス国 サリー ジーユー16 7エ  
 スアール キャンバリー フリムリー フ  
 リムリー ビジネス パーク 200  
 (74) 代理人 100077827  
 弁理士 鈴木 弘男  
 (72) 発明者 バーニー・ジェームス・ピーター  
 イギリス国 チェシャー エスケー9 7  
 ピーワイ オールダーリー エッジ グレ  
 イストーク ドライブ 1  
 (72) 発明者 マシューズ・ルース・クリスティン  
 イギリス国 チェシャー エスケー9 7  
 ピーワイ オールダーリー エッジ グレ  
 イストーク ドライブ 1  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療用組成物

(57) 【要約】

上昇したTNF および/またはIL-6レベルを伴う状態の治療または予防用の薬物を製造するためのhsp90タンパク質の阻害剤の使用。

【選択図】 図7



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

上昇した TNF および / または IL - 6 レベルを伴う状態の治療または予防用の薬品を製造するための h s p 9 0 タンパク質の阻害剤の使用。

## 【請求項 2】

前記状態が、敗血症、SIRS または自己免疫疾患、好ましくはクローン病、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎もしくは全身性エリテマトーデスを含む、請求項 1 に記載の使用。

## 【請求項 3】

前記敗血症が、感染に起因する敗血症である、請求項 2 に記載の使用。

## 【請求項 4】

前記感染が、細菌感染または真菌感染である、請求項 3 に記載の使用。

## 【請求項 5】

前記敗血症が、真菌感染に起因しない、請求項 2 に記載の使用。

## 【請求項 6】

前記敗血症が、細菌感染に起因しない、請求項 2 または 5 に記載の使用。

## 【請求項 7】

前記敗血症が、感染に起因しない、請求項 2 に記載の使用。

## 【請求項 8】

前記 h s p 9 0 タンパク質が、アミノ酸配列 X X X L X V I R K X I V ( X は、任意のアミノ酸である ) ( 配列番号 : 6 ) を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の使用。

## 【請求項 9】

前記 h s p 9 0 タンパク質が、アミノ酸配列 X X I L X V I X X X X X ( X は、任意のアミノ酸である ) ( 配列番号 : 7 ) を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の使用。

## 【請求項 10】

前記 h s p 9 0 タンパク質が、アミノ酸配列 L K V I R K ( 配列番号 : 4 ) を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の使用。

## 【請求項 11】

前記 h s p 9 0 タンパク質が、配列番号 2 と少なくとも 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % または 9 5 % の同一性を有する、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の使用。

## 【請求項 12】

前記阻害剤が、抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載の使用。

## 【請求項 13】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、アミノ酸配列 L K V I R K ( 配列番号 : 4 ) を有するエピトープに結合することができるまたは特異的であり得る、請求項 1 2 に記載の使用。

## 【請求項 14】

前記抗体が、配列番号 : 1 の配列を含む、請求項 1 3 に記載の使用。

## 【請求項 15】

h s p 9 0 タンパク質の阻害剤を患者に投与することを含む、患者における TNF および / または IL - 6 レベルを低下させる方法。

## 【請求項 16】

前記患者が、上昇した TNF および / または IL - 6 レベルに起因する状態に罹患している、請求項 1 5 に記載の方法。

## 【請求項 17】

前記阻害剤が、抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、請求項 1 5 または 1 6 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 18】

患者における h s p 9 0 タンパク質循環レベルを判定する段階を含む、上昇した T N F および / または I L - 6 レベルを伴う患者における状態の診断方法 ( 上昇した h s p 9 0 タンパク質レベルが、その状態の存在を示す ) 。

## 【請求項 19】

患者における h s p 9 0 タンパク質循環レベルを判定する段階が、患者から採取したサンプル中の h s p 9 0 タンパク質のレベルを判定することを含む、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 20】

患者における h s p 9 0 タンパク質循環レベルを判定する段階が、抗体またはその抗原結合フラグメントを h s p 9 0 タンパク質に結合させることを含む、請求項 18 または 19 に記載の方法。

10

## 【請求項 21】

前記状態が、敗血症、S I R S または自己免疫疾患、特に、クローン病、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎もしくは全身性エリテマトーデスを含む、請求項 16 から 20 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 22】

前記敗血症が、感染に起因する敗血症である、請求項 21 に記載の方法。

## 【請求項 23】

前記感染が、細菌感染または真菌感染である、請求項 22 に記載の方法。

20

## 【請求項 24】

前記敗血症が、真菌感染に起因しない、請求項 21 に記載の方法。

## 【請求項 25】

前記敗血症が、細菌感染に起因しない、請求項 21 または 24 に記載の方法。

## 【請求項 26】

前記敗血症が、感染に起因しない、請求項 21 に記載の方法。

## 【請求項 27】

前記 h s p 9 0 タンパク質が、アミノ酸配列 X X X L X V I R K X I V ( X は、任意のアミノ酸である ) ( 配列番号 : 6 ) を含む、請求項 15 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 28】

前記 h s p 9 0 タンパク質が、アミノ酸配列 X X I L X V I X X X X X ( X は、任意のアミノ酸である ) ( 配列番号 : 7 ) を含む、請求項 15 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 29】

前記 h s p 9 0 タンパク質が、アミノ酸配列 L K V I R K ( 配列番号 : 4 ) を含む、請求項 15 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 30】

前記 h s p 9 0 タンパク質が、配列番号 2 と少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 %、90 % または 95 % の同一性を有する、請求項 15 から 29 のいずれか一項に記載の方法。

40

## 【請求項 31】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、アミノ酸配列 L K V I R K ( 配列番号 : 4 ) を有するエピトープに結合することができるまたは特異的であり得る、請求項 17 または 20 に記載の方法。

## 【請求項 32】

前記抗体が、配列番号 : 1 の配列を含む、請求項 31 に記載の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

50

本発明は、上昇したTNF および/またはIL-6レベルを伴う状態の治療的処置または予防のための薬物に関する。本発明は、患者におけるTNF および/またはIL-6レベルを低下させる方法にも関し、また上昇したTNF および/またはIL-6レベルを伴う状態を診断する方法にも関する。

【背景技術】

【0002】

敗血症は、全身性炎症反応に至ることもある重症感染によって一般に引き起こされる重篤な医学的状态である。症状としては、発熱、悪寒、倦怠感および低血圧を挙げることができる。たとえ治療を受けていても、敗血症に罹患している患者は、多数の器官の機能不全症候群または死にまでも進むことがある。

10

【0003】

感染が起こったことがわからない状況で発生する敗血症の症状も観察され、そうした症例の状態は、全身性炎症反応症候群(SIRS)として知られている。

【0004】

インターロイキン6(IL-6)は、患者における上昇したレベルが、その患者におけるより重度の感染および転帰不良と相関付けられているような感染における急性期反応の要素である。近年、上昇したIL-6レベルが敗血症およびSIRSに関連していると報告された。

【0005】

新生児において、31pg/mlの最適カットオフで、上昇したIL-6レベルは、第0日における遅発性感染症の診断のための89%の感度および91%の陰性予測値を有した(Ng等 1997)。IL-6のレベルは、グラム陽性敗血症と比較して真菌感染症の際に有意に高く(p=0.035)、真菌性敗血症によって死亡した新生児では非常に上昇したレベルであった(Ng等 2003)。外科的患者において、上昇したIL-6は、SIRSと関連付けられており(Miyaoaka等 2005)、ならびに310pg/mlのカットオフで、手術後、最初の5日間に敗血症性合併症を有した患者において、手術後敗血症性合併症を有する患者と有さない患者とを区別する際、90%の感度および58%の特異性を有する試験を可能にした(Mokart等 2005)。上昇したIL-6は、非感染性と推定されるSIRS(平均80.9pg/ml)と比較して、患者におけるSIRSおよび推定感染症(平均222.8pg/ml)に関連していた(Terregino等 2000)。

20

30

【0006】

インターロイキン6の生産は、腫瘍壊死因子(TNF-)によって、一部、誘導される。治療目的でのTNF-の中和、およびTNF-活性の代用マーカーとしてのインターロイキン6レベルの使用が、当分野において報告されている。例えば、モノクローナル抗TNF-抗体F(ab')<sub>2</sub>(Afelimomabとして知られている)の有効性および安全性の研究において、その活性は、高いインターロイキン6レベルを有する患者では顕性であり、インターロイキン6陰性の患者では不在であった(Panacek等 2004)。こうした提案された療法は、TNF-が宿主傷害性サイトカインである、およびLPS(リポ多糖類)がTNF-放出を誘発し、これが敗血症性ショックの発現を招くという理論に基づく(HehligansおよびPfeffer 2005)。この理論は、高レベルのTNF-が敗血症中に存在するという観察に基づき、この場合、患者の死は予測されるが、TNF-のレベルを患者の生存と相関させることはできない。

40

【0007】

別の研究分野により、真菌ストレスタンパク質hsp90に対する抗体を含む薬物MycoGrab(登録商標)が開発された。これは、侵襲性カンジダ症を有する患者が、その疾病から回復するとき、hsp90に血清変換するという観察に従って開発された。特許文献4は、真菌感染を治療するためのMycoGrab(登録商標)抗体とポリエン(例えば、アンフォテリシンB)の併用剤またはエキノカンジン抗真菌剤の使用を報告して

50

いる。この薬とアンフォテリシンBの併用は、臨床試験においてアンフォテリシンBとブラシーボ（食塩水）と比較したとき、抗真菌剤としてのその直接的活性、および循環hsp90を中和するその薬の能力のため、相乗効果を示したことも報告されている。Matthews等、2005は、hsp90がヒト疾病においてどのような役割を果たすかに関して報告した。

【0008】

【特許文献1】欧州特許出願公開第0406029号明細書

【特許文献2】国際公開第92/01717号パンフレット

【特許文献3】国際公開第94/04676号パンフレット

【特許文献4】国際公開第01/76627号パンフレット

10

【発明の開示】

【0009】

本発明は、hsp90タンパク質の投与が、上昇したTNF およびIL-6レベルを生じさせる、およびこの効果を(MRSAのABCトランスポーターに対する抗体を含むAurograb(登録商標)とではなく)Mycograb(登録商標)薬とhsp90の事前の交差吸収によって中和できる、という発見に基づく。

【0010】

いずれの理論による拘束も望まないが、本発明は、個体における循環hsp90タンパク質の存在が、その個体におけるTNF およびIL-6のレベルを上昇させるため、作用すると考えられる。個体におけるhsp90タンパク質の存在が、その個体におけるIL-6レベルを上昇させるように直接作用することもあり、または上昇したTNFレベルが、個体におけるIL-6のレベルを上昇させるということもある。個体における、より高いレベルのこれら2つのサイトカイン(TNF およびIL-6)の存在は、敗血症またはSIRSとして観察される炎症反応の原因となる。以下にこの理論の推論を説明する。

20

【0011】

Mycograb(登録商標)薬が、真菌hsp90タンパク質を中和することによって真菌感染を治療する際に作用することは、従来技術において報告されている。Mycograb(登録商標)抗体が特異的であるエピトープは、ヒトhsp90と共に保存されるので、Mycograb(登録商標)抗体は、必然的にヒトhsp90タンパク質にも結合し、それを中和することとなる。この結合は、本明細書の実施例1(ヒトおよび真菌hsp90へのMycograbの結合)において報告するデータによって確認された。

30

【0012】

Hsp90は、細胞壊死の際にのみ放出され、細胞アポトーシスの際には放出されない細胞内タンパク質であると考えられる(Saito等 2005)。従って、壊死性細胞がhsp90を患者における循環に放出し、その結果、患者は、微生物の陽性培養物が不在の状態に似た症状(すなわち、SIRS-全身性炎症反応症候群)を提示することとなることを提案する。真菌hsp90がヒトhsp90のダイレクトミミックとしての機能を果たす真菌性敗血症では、この状況が悪化される。この状況は、細菌性敗血症においても悪化されることがあり、この場合、細菌相同体htpGが放出され、臨床像を生じさせるまたは悪化させることがある。

40

【0013】

敗血症において、遊離hsp90/htpGは、敗血症像を生じさせることがあり、これは、今、報告するように、高レベルのインターロイキン6の誘導によって間接的に観察することができる(実施例3参照)。患者の血清中のインターロイキン6のレベルを、二重盲検、ブラシーボ対照試験で測定した。IL-6レベルの低減は、Mycograb(登録商標)で治療した群では回復と関連したが、これは、ブラシーボ群では起こらなかった。最も有意なことに、ブラシーボ群におけるカンジダに起因して死亡した患者は、永続的、高レベルのIL-6を有した。

【0014】

50

本明細書において報告するデータは、h s p 9 0 がインターロイキン 6 放出を直接もたらずので、h s p 9 0 の中和により I L - 6 放出が効率的に遮断されるという概念を支持する。h s p 9 0 を中和する遮断が、T N F - 放出を遮断することとなるので、T N F - が最も重要な分子である自己免疫疾患の治療において h s p 9 0 タンパク質の阻害は有効であるという概念も支持する。

【 0 0 1 5 】

本発明の 1 つの態様に従って、上昇した T N F および / または I L - 6 レベルを伴う状態の治療または予防用薬物を製造するための h s p 9 0 タンパク質の阻害剤の使用を提供する。

【 0 0 1 6 】

本発明のもう 1 つの態様において、患者における T N F および / または I L - 6 レベルを低下させる方法を提供し、この方法は、患者に h s p 9 0 タンパク質の阻害剤を、好ましくは、その患者の T N F および / または I L - 6 レベルを低下させるために十分な量で、投与することを含む。

【 0 0 1 7 】

一部の実施形態において、前記患者は、上昇した T N F および / または I L - 6 レベルに起因する状態に罹患している。

【 0 0 1 8 】

本発明のさらなる態様に従って、上昇した T N F および / または I L - 6 レベルを伴う患者における状態を診断する方法を提供し、この方法は、その患者における循環 h s p 9 0 タンパク質レベルを判定する段階を含み、上昇した h s p 9 0 タンパク質レベルがその状態の存在を示す。

【 0 0 1 9 】

患者体内で循環している h s p 9 0 タンパク質のレベルの判定は、患者に対して直接行うことができるが、より適便には、患者から採取したサンプル（例えば、血液サンプル）中の h s p 9 0 タンパク質のレベルを判定することによって行われる。このようにして、本診断法は、エクスピボで行われる。

【 0 0 2 0 】

前記患者は、一般には哺乳動物であり、最も好ましくはヒトである。

【 0 0 2 1 】

上昇した T N F （腫瘍壊死因子）または I L - 6 （すなわち、インターロイキン - 6）レベルを伴う状態とは、T N F または I L - 6 が、その状態に罹患している患者における正常レベルより上であるため、その状態のマーカーとしての機能をそれぞれ果たす状態である。上昇した I L - 6 レベルを伴う状態およびマーカーとしての I L - 6 の使用に関するさらなる説明は、M i y a o k a 等、2 0 0 5、M o k a r t 等、2 0 0 5、N g 1 9 9 7、N g 等、2 0 0 3、N g 等、2 0 0 4 および T e r r e g i n o 等、2 0 0 0 に提供されている。そうした状態の例としては、敗血症および S I R S（全身性炎症反応症候群）が挙げられる。上昇した T N F レベルは、例えば、自己免疫疾患、例えばクローン病、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎および全身性エリテマトーデス（S L E）に係する。

【 0 0 2 2 】

患者における T N F または I L - 6 のレベルは、例えば、実施例 2 において報告する T N F アッセイおよびインターロイキン 6 アッセイを使用して評価することができる。一部の実施形態において、その異常レベルを示す T N F または I L - 6 のレベルは、患者における正常濃度の 5、1 0 または 2 0 倍である。しかし、正常の数百倍の（例えば、1 0 0 倍）のレベルが一部の患者において観察されることに留意しなければならない。

【 0 0 2 3 】

敗血症は、感染に起因することもあり、または他の原因に起因することもあり（すなわち、S I R S）、本発明は、両方の場合を包含することを正しく認識しなければならない。一部の実施形態において、敗血症は、真菌または細菌感染の結果としてであるが、本発

10

20

30

40

50

明は、真菌または細菌感染に起因しない敗血症にも関することを理解しなければならない。

【0024】

hsp90タンパク質は、広範な生物において生産される、高度に保存されたストレスタンパク質の1ファミリーである。例えば、特許文献1は、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)のhsp90タンパク質に関して報告している。特許文献2は、コリネバクテリウム・ジュイケイウム(*Corynebacterium jeikeium*)のhsp90タンパク質に関して報告している。ホモサピエンスのhsp90タンパク質も当分野において公知であり、配列番号:3として本明細書に含まれている。従って、本発明において用いる用語「hsp90タンパク質」は、これらのタンパク質のそれぞれを含み、ならびに例えば大腸菌(*Escherichia coli*)の細菌相同体hsp90も含む。さらに、特許文献3は、異なる生物のhsp90タンパク質中に存在する多数の保存配列に関して報告している。従って、本発明は、このストレスタンパク質ファミリーに分類される任意のhsp90タンパク質に関する。一定の実施形態において、hsp90タンパク質は、ここで説明するように、さらに具体的に定義される。

10

【0025】

1つの実施形態において、hsp90タンパク質は、アミノ酸配列X X X L X V I R K X I V (Xは、任意のアミノ酸である)を含む。

【0026】

代替実施形態において、hsp90タンパク質は、アミノ酸配列X X I L X V I X X X X X (Xは、任意のアミノ酸である)を含む。

20

【0027】

上の2つのコンセンサス配列が、特許文献3に報告されていることを正しく認識しなければならず、ならびに本発明の他の実施形態では、hsp90タンパク質が、特許文献3(本明細書に参照により組み込まれている)に報告されている他のコンセンサス配列のいずれかによって定義されることを理解しなければならない。

【0028】

一部の他の実施形態において、hsp90タンパク質は、アミノ酸配列L K V I R K、好ましくはL K V I R K N I Vを含む。

30

【0029】

一部のさらなる実施形態において、hsp90タンパク質は、カンジダ・アルビカンスからのhsp90の配列、すなわち、配列番号:2と、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、または95%の同一性を有する。

【0030】

これに関して、カンジダ・アルビカンスのhsp90タンパク質の配列は、ヒトhsp90アイソフォーム2の配列と58%の同一性を有し、その結果、カンジダ・アルビカンスのhsp90タンパク質の配列との少なくとも58%同一性のレベルも、本発明によるhsp90タンパク質の1つの定義であることを正しく認識しなければならない。

【0031】

本明細書において、二配列間の「同一性」百分率は、BLASTPアルゴリズムバージョン2.2.2(Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaeffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman(1997),「Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs」, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402)を使用し、デフォルトパラメータを使用して決定される。詳細には、BLASTアルゴリズムは、URL [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)を使用してインターネット上で入手することができる。

40

50

## 【0032】

h s p 9 0 タンパク質の阻害剤は、インビボでの h s p 9 0 タンパク質の活性を低下させることができる、任意のタンパク質、ペプチド、核酸、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖または他の生体適合性産物であってもよい。さらに具体的には、前記阻害剤は、IL - 6 レベルの上昇に関する h s p 9 0 タンパク質の作用を低下させる。従って、h s p 9 0 タンパク質の阻害剤としての生体適合性産物の有効性は、その産物を有するまたは有さない患者における循環 h s p 9 0 タンパク質レベルを判定することにより、またはその産物を有するおよび有さない患者における循環 IL - 6 レベルを判定することにより、評価することができる。

## 【0033】

一部の実施形態において、前記阻害剤は、抗体またはその抗原結合フラグメントを含む。しかし、これは、本発明にとって本質的ではなく、前記阻害剤は、別のタイプの活性成分、例えば、抗生物質ゲルダナマイシン、ラジシコールもしくはノボピオシンまたは薬物シスプラチンであってもよい。

## 【0034】

抗体、それらの製造および使用は、周知であり、例えば、Harlow, E. and Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999に開示されている。

## 【0035】

抗体は、当分野において公知の標準的な方法を使用して産生させることができる。抗体の例としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、抗体の Fab フラグメント、Fab 発現ライブラリによって生産される抗体のフラグメント、および抗原結合フラグメントが挙げられる（しかし、これらに限定されない）。

## 【0036】

「抗原結合フラグメント」は、ターゲット抗原に結合することができる抗体の任意のフラグメントを含み、従って、Fab フラグメントおよび F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメントを含む。

## 【0037】

抗体は、一定範囲の宿主、例えば、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒトおよびその他において生産され得る。カンジダ属からの熱ショックタンパク質、例えば C . アルピカンスからの h s p 9 0、または免疫原性を有するその任意のフラグメントもしくはオリゴペプチドを注射することによって、それらを免疫することができる。もう1つの例として、ホモサピエンスからの熱ショックタンパク質で宿主を免疫することができる。宿主種に依存して、免疫反応を増大させるために様々なアジュバントを使用することができる。そうしたアジュバントとしては、フロイント、ミネラルゲル、例えば水酸化アルミニウム、ならびに界面活性剤、例えばリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンベットヘモシアニンおよびジニトロフェノールが挙げられるが、これらに限定されない。ヒトにおいて使用されるアジュバントの中では、BCG (カルメット - ゲラン桿菌) およびコリネバクテリウム・バルバム ( *Corynebacterium parvum* ) が特に有用である。

## 【0038】

h s p 9 0 熱ショックタンパク質またはその任意のフラグメントまたはオリゴペプチドに対するモノクローナル抗体は、培養での連続細胞系統による抗体分子の生産に備える任意の技術を使用して、調製することができる。これらとしては、ハイブリドーマ技術、ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術、および EBV - ハイブリドーマ技術 ( Koehler 等 . , 1975 , *Nature* , 256 : 495 - 497 ; Kosbor 等 . , 1983 , *Immunol . Today* 4 : 72 ; Cote 等 . , 1983 , *PNAS USA* , 80 : 2026 - 2030 ; Cole 等 . , 1985 , *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* , Alan R . Liss Inc

10

20

30

40

50

., New York, pp. 77 - 96) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0039】

加えて、「キメラ抗体」の生産のために開発された技術、適切な抗原特異性および生物活性を有する分子を得るためのヒト抗体遺伝子へのマウス抗体遺伝子のスプライシングを使用することができる (Morrisson 等., 1984, PNAS USA, 81: 6851 - 6855; Neuberger 等., 1984, Nature, 312: 604 - 608; Takeda 等., 1985, Nature, 314: 452 - 454)。あるいは、当分野において公知の方法を使用して、一本鎖抗体の生産について記載された技術を、hsp90熱ショックタンパク質特異的一本鎖抗体の生産に適応させることができる。関連した特性を有するが、別のイディオタイプの組成の抗体を、ランダムコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリから鎖シャッフリングによって産生させることができる (Burton, D. R., 1991, PNAS USA, 88: 11120 - 11123)。

10

【0040】

抗体は、リンパ球集団におけるインビボ生産の誘導によって、または組換え免疫グロブリンライブラリもしくは高特異的結合試薬のパネルをスクリーニングすることによって産生することもできる (Orlandi 等., 1989, PNAS USA, 86: 3833 - 3837; Winter, G. 等., 1991, Nature, 349: 293 - 299)。

【0041】

抗原結合フラグメントも産生させることができ、例えば、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、抗体分子のペプシン消化によって産生ことができ、およびFabフラグメントは、それらのF(ab')<sub>2</sub>フラグメントのジスルフィド結合を還元することによって産生させることができる。あるいは、Fab発現ライブラリを構築して、所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメントの迅速で容易な同定を可能にすることができる (Huse 等., 1989, Science, 256: 1275 - 1281)。

20

【0042】

所望の特異性を有する抗体を同定するためのスクリーニングには、様々なイムノアッセイを用いることができる。確立された特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかを使用する、競合結合アッセイまたはイムノラジオメトリックアッセイについての非常に多数のプロトコルが、当分野において周知である。そうしたイムノアッセイは、一般に、hsp90熱ショックタンパク質またはその任意のフラグメントもしくはオリゴペプチドとその特異的抗体との複合体形成の測定を含む。2つの非干渉性hsp90熱ショックタンパク質エピトープに特異的なモノクローナル抗体を利用する、2サイトモノクローナルベースイムノアッセイを使用してもよいが、競合結合アッセイも利用してもよい (Maddox 等., 1983, J. Exp. Med., 158: 1211 - 1216)。

30

【0043】

有利には、前記抗体または抗原結合フラグメントは、アミノ酸配列LKVI R K、好ましくはLKVI R KNIVを有するエピトープに結合することができる、または特異的であり得る。

40

【0044】

一部の実施形態において、前記抗体は、Myco grab (登録商標)の抗体成分の配列、すなわち、配列番号: 1を含む。

【0045】

本診断法においてhsp90タンパク質のレベルを判定するために、一部の実施形態では、hsp90タンパク質(またはその抗原結合フラグメント)に結合することができる抗体が使用される。前記抗体または抗原結合フラグメントを、例えば、蛍光タグに結合させて、hsp90タンパク質への結合、および従って、存在するhsp90タンパク質のレベル(濃度または絶対量)を視覚化することができる。hsp90タンパク質に関して

50

上で説明した抗体も、こうして本診断法において使用することができる。

【0046】

診断すべき状態が病原性感染である、本診断法の一部のさらなる実施形態では、その感染の原因である種も決定する。これを行うことができる1つの方法は、hsp90タンパク質のカルボキシ末端に存在する種特異的エピトープの配列を決定することによる。例えば、真菌種カンジダ・アルビカンスは、種特異的エピトープにペプチド配列DEPAGEを有し（配列番号：2のアミノ酸残基695から700を参照のこと）、従って、このエピトープに特異的な抗体の結合は、感染性病原体としてのカンジダ・アルビカンスの存在を示す。

【0047】

しかし、本診断法は、病原体による感染に起因する状態の診断に限定されないことに留意しなければならない。実際、本診断法は、存在する病原体なしに発生するSIRSなどの状態において、特に有用である。

【0048】

本発明の薬物を製造するために使用することができる方法は、周知である。例えば、薬物は、hsp90タンパク質の阻害剤に加えて、医薬的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含むことがある（Remington's Pharmaceutical Sciences and US Pharmacopoeia, 1984, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA）。当業者は、例えば、単純な用量応答実験の使用により、患者に投与すべき薬物の正確な用量（すなわち、医薬的に許容される用量）を容易に決定することができる。抗体または抗原結合フラグメントである薬物の場合、0.1から10mg/体重1kgまたは0.5から5mg/体重1kgの範囲の投薬量が好ましく、1mg/kg付近の投薬量が、特に好ましい。本薬物は、経口投与することができる。

【0049】

配列表の簡単な説明

配列番号：1は、Mycograb（登録商標）の抗体成分のアミノ酸配列である。

【0050】

配列番号：2は、カンジダ・アルビカンスからのhsp90ストレスタンパク質のアミノ酸配列である。

【0051】

配列番号：3は、ヒトhsp90 アイソフォーム2タンパク質のアミノ酸配列である。

【0052】

配列番号：4は、配列番号：1の抗体が特異的な、hsp90におけるエピトープのアミノ酸配列である。

【0053】

配列番号：5は、隣接アミノ酸残基を伴う配列番号：4のエピトープのアミノ酸配列である。

【0054】

配列番号：6は、hsp90上のエピトープのコンセンサス配列である。

【0055】

配列番号：7は、hsp90上のエピトープのコンセンサス配列である。

【0056】

配列番号：8は、実施例において使用したPCRプライマー配列である。

【0057】

配列番号：9は、実施例において使用したPCRプライマー配列である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0058】

実験

10

20

30

40

50

## 【実施例 1】

## 【0059】

ターゲットエピトープ L K V I R K、ヒトおよび真菌 h s p 9 0、への M y c o g r a b 結合の実証

M y c o g r a b (登録商標)の、当初は対抗させた h s p 9 0の中からの L K V I R K - ペプチド (配列番号 4) への、ならびにカンジダ・アルピカンスおよびヒト h s p 9 0 からの相同体を代表する配列から誘導した h s p 9 0の組換えバージョンへの結合を、実時間 B i a c o r e 分析を用いて実証した。加えて、L K V I R K - ペプチドへの結合に対する温度の影響を調査した。

## 【0060】

## 材料および方法

S e n s o r C h i p S A へのビオチン化 L K V I R K ペプチドの固定化は、10 m M H e p e s、150 m M N a C l、0.005% T w e e n 20 および 3.4 m M E D T A、p H 7.4 からなる H B S - E P 緩衝液を 20  $\mu$  l / 分の流量で 2 つの隣接するフローセル上に継続的に流すことによって行った非共有結合性捕捉によるものであった。カンジダ・アルピカンス h s p 9 0 は、10 m M 酢酸ナトリウム p H 4.0 に対して透析し、それを、アミノカップリングを用いて C M - 5 C h i p の表面に共有結合させた。ヒト h s p 9 0 (1.15 m g / m l) は、10 m M 酢酸ナトリウム p H 4.0 で 1 : 50 希釈し、アミノカップリングを用いて C M - 5 C h i p の表面に共有結合させた。

## 【0061】

M y c o g r a b (登録商標)は、特許文献 4 (特に、11 および 12 頁参照) (これは、本明細書に参照により組み込まれている)に記載されているとおり調査した。

## 【0062】

## 結果

1 濃度系列の M y c o g r a b (登録商標)のそれらのペプチドへの結合を分析した結果を図 1 に示す。B i a c o r e 評価ソフトウェアを使用してそれを分析した。リガンドと分析物との 1 : 1 結合のラングミュアモデルにより、結合曲線の良好なフィットが得られ、 $k_a$  (会合速度定数)は、 $2.26 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  であると算定され、 $k_d$  (解離速度定数)は、 $6.47 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  であった。 $K_D$  (解離定数)は、 $2.86 \times 10^{-8} \text{ M}$  であり、これは、結合が数日という長い半減期を有することを意味した。

## 【0063】

観察された速度定数 ( $K_{obs}$ ) を M y c o g r a b (登録商標)の濃度に対してプロットして、M y c o g r a b (登録商標)サンプル中の凝集または溶解性の問題の存在について検査した。この結果、凝集が論点にならないことを明示する直線を得た。

## 【0064】

カンジダ h s p 9 0 への結合の場合、1 : 1 のラングミュアモデルにより、結合曲線の良好なフィットが得られ、 $k_a$  (会合速度定数)は、 $373 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  であると算定され、 $k_d$  (解離速度定数)は、 $2.67 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  であった。この結果を図 2 に示す。 $K_D$  (親和定数、 $k_a$  と  $k_b$  の比)は、 $7.17 \times 10^{-7} \text{ M}$  であった。このフィットのカイ値は、1.58 であった (2 未満は、良好なフィットであった)。

## 【0065】

この実験に用いた濃度範囲での M y c o g r a b (登録商標)サンプルに伴う凝集または溶解性の問題を除外するために、 $K_{obs}$  を濃度に対してプロットし、その結果、凝集の証拠がないサンプルを示す直線を得た。

## 【0066】

ヒト h s p 9 0 への結合の場合 (その結果を図 3 に示す)、1 : 1 のラングミュアモデルにより、結合曲線の良好なフィットが得られた。このモデルでは、 $k_d$   $3.21 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  で、 $k_a$  が  $981 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  と算定された。 $K_D$  は、 $3.27 \times 10^{-6} \text{ M}$  と算定され、このフィットのカイ値は、0.82 であった。

10

20

30

40

50

## 【0067】

MycoGrab (登録商標) サンプルにおける凝集または溶解性の問題を除外するために、 $k_{obs}$  を濃度に対してプロットした。この結果、凝集の証拠がないことを明示する直線を得た。

## 【0068】

この系では温度変化に伴ってペプチドへのMycoGrab (登録商標) の結合プロフィールの明瞭な変化があった。この結果を図4に示す。図4は、オーバーレイした参照を引いたセンサーグラムにおいて、温度上昇に伴って最大RU値が増加したことを明示している。その結合を飽和点に外挿すると、温度が高いほど、チップの表面に結合したMycoGrab (登録商標) が多かった。この温度系列の最低点、10から25 で、5から20 RUの範囲のRmaxの小さな増加があった。37 で、応答の有意な増加があり、Rmaxは118 RUに増加した。解離曲線の検定は、解離速度定数が、温度に関係なく比較的一定のままであることを示した。

10

## 【0069】

MycoGrab (登録商標) は、LKVIKKペプチドを代表するペプチドに緊密に結合した。その会合速度定数 ( $k_a$ ) は、 $2.26 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  であり、それが結合したとき、 $6.47 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  の解離速度定数 ( $k_d$ ) が示すように、そのターゲットと強く相互作用した。得られた $K_D$ は、 $2.86 \times 10^{-8} \text{ M}$ であり、これは、その結合が数日という長い半減期を有することを意味した。

## 【0070】

カンジダ・アルピカンスからのhsp90およびヒトhsp90へのMycoGrab (登録商標) の結合についての $K_D$ は、それぞれ、 $7.17 \times 10^{-7} \text{ M}$ および $3.27 \times 10^{-6} \text{ M}$ であった。MycoGrab (登録商標) は、単離されたペプチドと比較される、hsp90タンパク質についての明瞭な全体的に低い会合速度を、 $2.26 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (ペプチド) と比較される $k_a$   $373 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (カンジダhsp90) および $981 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (ヒトhsp90) で明示した。しかし、 $2.67 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (カンジダHsp90) および $3.21 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  (ヒトhsp90) の天然相互作用系についての $k_d$ は、両方とも、結合の際、LKVIKKペプチドについてのも ( $6.47 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) と同様に強い相互作用 (長い半減期) を惹起する。

20

30

## 【0071】

天然hsp90は、約80 kDaの相当大きな高分子であり、これは、MycoGrab (登録商標) が指定された時間枠内で特定の結合部位に到達する確率を減少させ、従って、 $k_a$ を減少させる。hsp90の高分子構造は、単独での単離されたペプチドと比較して、エピトープの静電環境を有意に修飾する。しかし、首尾よくドッキングされると、MycoGrab (登録商標) は、エピトープの状況に関係なく十分に相互作用を維持することとなり、その結果、3つの異なる試験系について同様の $k_d$ 特性が生じる。

## 【0072】

温度が高いほど、ペプチドへのMycoGrab (登録商標) の結合が増加した。患者においてMycoGrab (登録商標) が使用される温度である37 で、最高の結合が観察された。MycoGrab (登録商標) は、ヒト免疫系によって最適化される構造に基づくので、その結合は、体温で最も有効であると予測された。

40

## 【実施例2】

## 【0073】

マウスモデルにおけるインターロイキン6の誘導

この実験は、精製されたカンジダhsp90の注射後のマウスにおけるTNF- およびインターロイキン6の生産を測定するために計画した。注射前の15分間、37 でのMycoGrabとの交差吸収によりこの現象を中和する能力も試験した。

## 【0074】

材料および方法

50

## カンジダHsp90タンパク質のクローニングおよび発現

カンジダHsp90タンパク質をクローニングし、発現させるために、DNeasy (商標) スピカラム (Qiagen) をその製造業者のインストラクションに従って使用して調製したカンジダゲノムDNAから、直接、コーディング配列をPCR増幅した。使用したオリゴヌクレオチドは、Sigma genosysによって合成した5'-ATGGCTGACGCAAAAGTTG-3' (配列番号: 8) および5'-ATCAACTTCTTCCATAGCAG-3' (配列番号: 9) であった。Taq DNAポリメラーゼ (Invitrogen) を使用して増幅を行い、それによって、発現ベクターpYES2.1/V5-His-TOPO (登録商標) (Invitrogen) に、直接、ライゲーション依存的にクローニングすることができ、発現されたHsp90タンパク質にGAL1プロモータの制御下でC末端融合His<sub>6</sub>-タグを付加させた。そのクローニングミックスを大腸菌発現株TOP10F' (Invitrogen) に形質転換し、SDS-PAGE、およびモノクローナル抗His-タグペルオキシダーゼコンジュゲート抗体 (Sigma) を使用する免疫プロット法を用いて、組換え体を同定した。得られたプラスミドはpHsp1と呼んだ。

## 【0075】

## カンジダHsp90タンパク質の精製

6-His-タグHsp90タンパク質の過発現のために、S.c.EasyComp (商標) キット (Invitrogen) をその製造業者の指示方法に従って使用して、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 株INVSc1をpHsp1で形質転換した。INVSc1 (pHsp1) を、10mlのSC-U増殖培地 (0.67% イースト・ナイトロジェン・ベース (SIGMA cat. Y-0626)、0.19% 酵母合成ドロップアウト培地サプリメント、ウラシル不含 (SIGMA cat. Y-1501)、2% ラフィノース) 中で一晩、増殖させた。遠心分離 (5000g、10分 4) によって細胞を回収し、そのペレットを10mlのSc-U誘導培地 (0.67% イースト・ナイトロジェン・ベース (SIGMA cat. Y-0626)、0.19% 酵母合成ドロップアウト培地サプリメント、ウラシル不含 (SIGMA cat. Y-1501)、2% ガラクトース) 中で洗浄した。洗浄した細胞を10mlのSC-U誘導培地に再懸濁させ、1LのSC-U誘導培地を添加し、さらに24時間、30での振盪で増殖させた。遠心分離 (10000g、10分 4) によって細胞を回収し、20mlの破碎緩衝液 (50mM リン酸ナトリウム、pH7.4、5% グリセロール、1mM PMSF) に再懸濁させ、French Pressing (2トン、1回) によって破碎した。さらなる遠心分離段階 (10000g、10分、室温) によって、不溶性材料を除去した。その細胞溶解物は、500mM 尿素の添加で緩衝調整し、そのpHをpH8.0に調整した。

## 【0076】

固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー (IMAC) を使って、そのHsp90タンパク質を精製した。15ml ニッケル充填済IMACカラムを5カラム容量 (CV) の平衡緩衝液 (500mM 尿素、100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH8.0) で平衡させた。その後、その緩衝調整細胞溶解物をカラム適用した。そのカラムを5CVの平衡緩衝液で洗浄し、続いて5CVの洗浄緩衝液 (500mM 尿素、100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH8.0、50mM イミダゾール) で洗浄した。そのHsp90タンパク質を3CVの溶離緩衝液 (500mM 尿素、100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH8.0、500mM イミダゾール) でカラムから溶出させた。すべての画分をSDS-PAGEによって分析した。そのゲルを下に示す。

## 【0077】

## 抗体源

Mycograb (登録商標) は、hsp90に対するヒト組換え抗体フラグメントである。それが結合するエピトープは、ヒトhsp90と真菌hsp90の間で保存されている。Aurograb (登録商標) は、MRSAからのABCトランスポータータンバ

ク質に対するヒト組換え抗体である。A u r o g r a b (登録商標)の製法は、W O - A - 0 3 / 0 4 6 0 0 7 (これは、本明細書に参照により組み込まれている)に開示されている。

**【0078】**

## 注射のための実験的プロトコル

週齢6~8週で、通常は24gと30gの間の体重の雌C D - 1マウスを使用した。それぞれの実験の24時間前にマウスを計量した。h s p 9 0およびM y c o g r a b (登録商標)およびA u r o g r a b (登録商標)の濃度は、マウスの体重を基に、0.1、0.5、1.0および10mg/kgと算定した。対照サンプルは、滅菌P B S (h s p 9 0用)および滅菌調合緩衝液(500mM 尿素、200mM アルギニン p H 9 . 5) (M y c o g r a b (登録商標)用)であった。併用する場合、注射前、15分間、37 でh s p 9 0とM y c o g r a b (登録商標)を交差吸収させた。

10

**【0079】**

すべてのマウスを41のサーモヒーティングボックス内に入れた。適切なサンプルをマウスに外側尾静脈経由で静脈内注射し、それらのマウスを、餌および水を自由に得られるケージに戻した。指定の時点で、マウスに終末麻酔をかけた(ハロタン使用)。心臓への滅菌針(心臓穿刺)を用いて血液を採取し、頸部脱臼によってマウスを殺した。

**【0080】**

血液サンプルを3000rpmで10分間スピンし、滅菌ピペットを使用して血清を吸引した。血清サンプルは、試験のために必要になるまで、-20 で保管した。

20

**【0081】**

## T N F - アッセイ

これらは、マウス値のためのB D O p t E I A (商標) C a t a l o g u e N u m b e r 5 5 5 2 6 8 (B D B i o s c i e n c e s P h a r m i n g e n S a n D i e g o U S A)に従って行った。それぞれの場合、その製造業者のインストラクションに従って反応を行った。それぞれのアッセイ実行の際、標準曲線が必要であった。すべてのサンプルおよび標準物質を二重反復で実行した。

**【0082】**

コーティング緩衝液中で希釈した(推奨希釈については、ロット固有の分析証明書を参照のこと)、100μl/ウエルの捕捉抗体で、E L I S A プレートにコーティングした。そのプレートを封止し、一晚、4 でインキュベートした。それらのウエルを吸引し、洗浄緩衝液で3回、洗浄した。最後の洗浄の後、プレートを逆さにし、吸い取り紙で吸い取った。それらのプレートを200μl/ウエルのアッセイ希釈物で、1時間、室温でブロックした。それらのプレートを前のおりに3回、洗浄した。T N F - 標準物質は、下記のとおり調製した。

30

**【0083】**

室温に温めた後、それらの解凍標準物質を1mlの脱イオン水で再構成し、15分間、平衡させた後、ボルテックスして混合した。ストック標準物質から1000pg/mlの標準物質を調製した(希釈インストラクションは、ロット固有の分析証明書に基づく)。このストックから、アッセイ希釈剤を使用して1000pg/mlから15.6pg/mlの2倍希釈物を調製した。アッセイ希釈剤は、陰性対照として使用した。

40

**【0084】**

100μlの各標準物質、サンプルおよび対照を適切なウエルに添加した。そのプレートを封止し、2時間、室温でインキュベートした。利用できる血清の容量が少ないため、マウス血清をアッセイ希釈剤で1/2希釈した。そのプレートを前のおり洗浄したが、合計5回洗浄した。検出に必要な容量の抗体をアッセイ希釈剤に添加し、ボルテックスして混合した。使用直前、必要容量の酵素試薬をその溶液に添加し、ボルテックスして混合した。

**【0085】**

100μlの作業用検出抗体を各ウエルに添加した。そのプレートを封止し、1時間、

50

室温でインキュベートした。そのプレートを前のとおり洗浄したが、合計7回洗浄した。

【0086】

基質は、100  $\mu$ lをそれぞれのウェルに添加する直前に、等容量の基質Aおよび基質Bを添加することによって調製した。そのプレートを暗所で30分間、インキュベートした。50  $\mu$ lの停止溶液をそれぞれのウェルに添加することによって反応を停止させた。そのプレートを450 nmで読み取った。それらのサンプルについてのTNF-濃度を標準曲線から決定した。

【0087】

インターロイキン6アッセイ

これらは、ヒト血清のためのBD OptEIA (商標) Reagent Set B Catalogue Number 550534およびマウス値のためのBD OptEIA (商標) Catalogue Number 555240 (BD Biosciences Pharmingen San Diego USA)に従って行った。それぞれの場合、その製造業者のインストラクションに従って反応を行った。それぞれのアッセイ実行の際、標準曲線が必要であった。すべてのサンプルおよび標準物質を二重反復で実行した。

10

【0088】

コーティング緩衝液中で希釈した (推奨希釈については、ロット固有の分析証明書を参照のこと)、100  $\mu$ l / ウェルの捕捉抗体で、ELISAプレートをコーティングした。そのプレートを封止し、一晚、4でインキュベートした。それらのウェルを吸引し、洗浄緩衝液で3回、洗浄した。最後の洗浄の後、プレートを逆さにし、吸い取り紙で吸い取った。それらのプレートを200  $\mu$ l / ウェルのアッセイ希釈物で、1時間、室温でブロックした。それらのプレートを前のとおり3回、洗浄した。IL-6標準物質は、下記のとおり調製した：

20

室温に温めた後、それらの解凍標準物質を1mlの脱イオン水で再構成し、15分間、平衡させた後、ボルテックスして混合した。ストック標準物質から1000 pg/mlの標準物質を調製した (希釈インストラクションは、ロット固有の分析証明書に基づく)。このストックから、アッセイ希釈剤を使用して1000 pg/mlから15.6 pg/mlの2倍希釈物を調製した。アッセイ希釈剤は、陰性対照として使用した。

30

【0089】

100  $\mu$ lの各標準物質、サンプルおよび対照を適切なウェルに添加した。そのプレートを封止し、2時間、室温でインキュベートした。利用できる血清の容量が少ないため、マウス血清をアッセイ希釈剤で1/2希釈した。そのプレートを前のとおり洗浄したが、合計5回洗浄した。検出に必要な容量の抗体をアッセイ希釈剤に添加し、ボルテックスして混合した。使用直前、必要容量の酵素試薬をその溶液に添加し、ボルテックスして混合した。

【0090】

100  $\mu$ lの作業用検出抗体を各ウェルに添加した。そのプレートを封止し、1時間、室温でインキュベートした。そのプレートを前のとおり洗浄したが、合計7回洗浄した。

【0091】

基質は、100  $\mu$ lをそれぞれのウェルに添加する直前に、等容量の基質Aおよび基質Bを添加することによって調製した。そのプレートを暗所で30分間、インキュベートした。50  $\mu$ lの停止溶液をそれぞれのウェルに添加することによって反応を停止させた。そのプレートを450 nmで読み取った。それらのサンプルについてのIL-6濃度を標準曲線から決定した。

40

【0092】

実験1

精製したhsp90を1 mg/kgおよび10 mg/kgでマウスに注射し、2匹のマウスを0、15、30、60および120分で、および10 mg/kgについては、加えて、1440分で犠牲にした。TNF-およびインターロイキン6レベルを、上で説明

50

したとおり測定した。

【 0 0 9 3 】

結果

p g / m l で T N F - レベルを示す結果を表 1 にまとめる。

【 0 0 9 4 】

【表 1】

時間 (分)	1mg/kg				10mg/kg			
	HSP 90	HSP 90	HSP 90	HSP 90	HSP 90	HSP 90	HSP 90	HSP 90
	マウス 1	マウス 2	平均	sd	マウス 1	マウス 2	平均	sd
0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	11	80	45.5	48.8	66	192	129	89.1
30	319	447	383	90.5	485	1083	784	422.8
60	941	562	751.5	267.9	>2000	>2000	>2000	0
120	265	21	143	172.5	ND	428 <sup>a</sup>	428	0
1440	ND	ND			0	0	0	0

10

<sup>a</sup>マウス 1 匹だけ

T N F - のレベルは、低濃度でも、高濃度でも、h s p 9 0 の投与に应答して増加し、6 0 分でピークであった。高い用量の h s p 9 0 を投与した後ほど、应答は大きかった。

20

【 0 0 9 5 】

p g / m l でインターロイキン 6 レベルを示す結果を表 2 にまとめる。

【 0 0 9 6 】

【表 2】

時間 (分)	1mg/kg				10mg/kg			
	HSP 90	HSP 90	HSP 90	HSP 90	HSP 90	HSP 90	HSP 90	HSP 90
	マウス 1	マウス 2	平均	sd	マウス 1	マウス 2	平均	sd
0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	15	7.5	10.6	8	62	35	38.2
30	556	41	483.5	102.5	500	556	528	39.6
60	1321	1297	1309	16.9	1760	>2000	1880	169.7
120	731	1	366	516.2	ND	1793	1793 <sup>a</sup>	0
1440	ND	ND			0	0	0	0

30

<sup>a</sup>マウス 1 匹だけ

これらの結果は、3 0 分後に検出可能な应答を明示しており、これは 6 0 分でピークに達し、高いほうの用量では 1 4 4 0 分で検出不能であった。高い用量の h s p 9 0 を投与した後ほど、应答は大きかった。

40

【 0 0 9 7 】

実験 2

マウスに次のいずれかを静脈内注射した。

- 1 . 1 m g / k g M y c o g r a b
- 2 . 1 m g / k g A u r o g r a b
- 3 . 1 m g / k g H S P 9 0
- 4 . 調合緩衝液

50

5. 1 mg / kg Mycograb と交差吸収 (37 °C で 15 分) させた 1 mg / kg HSP90

マウスを 1 時間および 2 時間の時点で殺した。それぞれの時点で二重重複で試験し、TNF- $\alpha$  およびインターロイキン 6 を測定した。

【0098】

結果

pg / ml で TNF- $\alpha$  濃度を示す結果を表 3 にまとめる。

【0099】

【表 3】

	1 時間 マウス 1	1 時間 マウス 2	2 時間 マウス 1	2 時間 マウス 2
Mycograb	0.1	5	16	55
Aurograb	34	67	46	184
HSP90	454	534	7	22
調合緩衝液	6	36	43	29
交差吸収させたもの	455	166	130	102

10

20

TNF- $\alpha$  のレベルは、調合緩衝液、Mycograb および Aurograb の注射によってわずかに上昇した。HSP90 への応答は顕著であり、1 時間でピークに達した。Mycograb との交差吸収は、1 時間の時点ではわずかな効果しか有さず、2 匹のマウスにおけるそのレベルは、2 時間の時点でのほうが高かった。

【0100】

pg / ml で IL-6 濃度を示す結果を表 4 にまとめる。

【0101】

【表 4】

	1 時間 マウス 1	1 時間 マウス 2	2 時間 マウス 1	2 時間 マウス 2
Mycograb	15	12	23	24
Aurograb	9	9	2	40
HSP90	1660	2223	28	28
調合緩衝液	4	4	7	9
交差吸収させたもの	420	287	25	30

30

40

インターロイキン 6 のレベルは、調合緩衝液、Mycograb および Aurograb の注射による影響を受けなかった。HSP90 への応答は顕著であり、1 時間でピークに達した。Mycograb との交差吸収は、1 時間の時点でのインターロイキン 6 のレベルを減少させた。

【0102】

実験 3

注射前 15 分間、37 °C で、Mycograb (0 ~ 1 mg / kg) と交差吸収させた

50

、またはさせていない、様々な濃度の h s p 9 0 ( 0 ~ 1 m g / k g ) を約 2 5 g で 1 5 匹の C D - 1 マウスに注射した。すべてのマウスを 1 時間の時点で殺し、I L - 6 レベルをモニターした。

【 0 1 0 3 】

実験 4

注射前 1 5 分間、3 7 で、M y c o g r a b ( 0 ~ 1 m g / k g ) と交差吸収させた、またはさせていない、様々な濃度の h s p 9 0 ( 0 ~ 1 m g / k g ) を約 2 5 g で 1 5 匹の C D - 1 マウスに注射した。すべてのマウスを 1 時間の時点で殺し、I L - 6 レベルをモニターした。

【 0 1 0 4 】

実験 5

注射前 1 5 分間、3 7 で、M y c o g r a b ( 0 ~ 1 m g / k g ) と交差吸収させた、またはさせていない、様々な濃度の h s p 9 0 ( 0 ~ 1 m g / k g ) を約 2 5 g で 3 0 匹の C D - 1 マウスに注射した。すべてのマウスを 1 時間の時点で殺し、I L - 6 レベルをモニターした。

【 0 1 0 5 】

結果

実験 3、4 および 5 からの結果を表 5 および図 6 から 9 にまとめる。図 6 は、h s p 9 0 への I L - 6 応答を示し、図 7 は、0 . 1 m g / k g の濃度の M y c o g r a b ( 登録商標 ) と交差吸収させたときの h s p 9 0 への I L - 6 応答を示し、図 8 は、0 . 5 m g / k g の濃度の M y c o g r a b ( 登録商標 ) と交差吸収させたときの h s p 9 0 への I L - 6 応答を示し、および図 9 は、1 m g / k g の濃度の M y c o g r a b ( 登録商標 ) と交差吸収させたときの h s p 9 0 への I L - 6 応答を示す。

【 0 1 0 6 】

10

20

【表 5】

		実験 3(n=1)	実験 4(n=1)	実験 5(n=1)		IL-6 レベル(pg/ml)	
HSP 90 (mg/kg)	Mycograb (mg/kg)	IL-6 (pg/ml)				平均	標準偏差
0	0	3	4	ND	ND	3.5	0.7
0	0.1	19	3	4	3	7.3	7.8
0	0.5	8	8	9	6	5.8	4.0
0	1	5	12	6	6	7.3	3.2
0.1	0	12	16	0.5	18	11.6	7.8
0.1	0.1	10	10	9	12	8	5.4
0.1	0.5	34	3	6	2	11.3	15.3
0.1	1	12	53	37	50	38	18.7
0.5	0	88	84	190	350	178	124.7
0.5	0.1	161	66	133	34	98.5	58.6
0.5	0.5	47	245	41	39	93	101.4
0.5	1	103	111	41	58	78.3	34.1
1	0	654	657	80	340	432.8	278.3
1	0.1	359	296	170	138	240.8	104.2
1	0.5	328	352	123	126	232.3	124.8
1	1	205	556	48	227	259	213.4

10

20

30

40

50

これらの結果は、注射した h s p 9 0 の漸増用量 0、0.1、0.5 および 1 m g / k g が、I L - 6 の漸増誘導をもたらしたことを明示した。これは、注射前に 0.1、0.5 または 1 m g / k g の M y c o g r a b と h s p 9 0 を交差吸収させることによって、一部、阻害された。この効果は、より高い h s p 9 0 注射用量 ( 0.5 および 1 m g / k g ) で最も顕著であり、原シグナルの 43.8 ~ 59.9 % に減少した。

## 【 0 1 0 7 】

## 実施例 1 および 2 からの結論

上記は、h s p 9 0 のマウスへの注射が、T N F - およびインターロイキン 6 のレベルの上昇を誘導することを実証するものであった。これは、侵襲性カンジダ症を有する患者における高い I L - 6 レベルと一致し、ならびに I L - 6 がその応答を生じさせる分子であることを明示している。I L - 6 のレベルの上昇は、部分的に用量依存的な様式で M y c o g r a b ( 登録商標 ) との事前交差吸収によって逆行されたが、A u r o g r a b ( 登録商標 ) によってはされなかった。

## 【 実施例 3 】

## 【 0 1 0 8 】

## 患者治験

2 つの治験を行った。第一の治験は、21 人の患者の動員を含む予備的治験 ( パイロットスタディーと呼ぶ ) であり、第二の調査は、欧州および米国から 139 人の患者が登録し、117 人が、修正包括解析集団に存する検証的治験 ( 検証スタディーと呼ぶ ) であった。両方の治験は、二重盲検であり、無作為化されており、ならびに侵襲性カンジダ症が培養物で確認された患者において、M y c o g r a b ( 登録商標 ) を加えた脂質会合アンフォテリシン B が、プラシーボを加えたアンフォテリシン B より優れているかどうかを判定するために行った。患者は、アンフォテリシン B の脂質会合製剤、加えて、5 日コース

の Myco grab (登録商標) または プラシーボ を受けた。組み入れ基準としては、治験治療の開始の3日以内の臨床的に有意な部位からのカンジダの増殖に加えて、試験開始時の活性感染の臨床的証拠が挙げられた。有効性主要評価項目は、第10日までの治療への全応答(臨床的および菌学的解消)であった。

#### 【0109】

材料および方法

登録

登録されるには、患者は、18歳以上でなければならず、前3日以内に臨床的に有意な部位からの1つ以上の陽性カンジダ培養物、加えて、試験開始時に以下の徴候の少なくとも1つを有さなければならなかった：高体温[ $>38$  ]、低体温[ $<36$  ]、頻脈[ $>110$  /分]、低血圧[平均血圧 $<70$  mmHg]、高白血球数[ $>11000$  / $mm^3$ ]、左方移動、昇圧薬の必要、または進行中の感染性疾患経過に見合った他の異常。有意な部位としては、血液培養、および/または通常は無菌の深部からの培養が挙げられる。

10

#### 【0110】

治験手順

登録後、患者を、12時間ごとに5日間、静脈内 Myco grab (登録商標) (体重kg当たり1mg) または プラシーボ (食塩水) のいずれかを受けるようにランダムに割付けた。加えて、それぞれの患者を最低10日間、製造業者の推奨用量の Abelcet (1日に5mg/kg) または Ambisome (1日に3mg/kg) で治療した。患者および治験担当者は、その治験を通して、その条件を知らないままであった。全身性抗真菌療法薬を除けば、他の併用薬物はセンサリングしなかった。

20

#### 【0111】

菌学的応答と臨床応答の両方を有効性の評価に用いた。治験薬(Myco grab(登録商標)またはプラシーボ)を5日間(第1~5日)与え、第2、3、4、5、6、8および10日、または感染の徴候および症状が解消され、培養物が繰り返し陰性になるまで、培養物を採取した。治療に対する臨床応答を第4、5、6、8、10および33日に評価し、10日までは、毎日、前の24時間の疾患経過を評価した。臨床応答の評価は、地元の治験担当者が行い、カンジダ感染症に起因すると考えられるすべての徴候および症状が解消された場合は完了と考えた。血液学、臨床化学、凝固プロフィールおよび尿検査を、スクリーニング時および第1、2、4、6および10日に行った。

30

#### 【0112】

有効性の評価

主要有効性エンドポイントは、第10日での治療への全応答であり、これは、治験薬の最終投与およびL-アンフォテリシンでの最低治療期間の5日後であった。予後良好な全応答は、カンジダ症のすべての徴候および症状の解消ならびに培養物で確認された根絶を伴う、完全な臨床的および菌学的応答と定義した。カンジダ症の進行または悪化がない部分的改善は、予後不良と分類した。

#### 【0113】

従って、患者を、感染症が解消された者(「治癒者」と呼ぶ)およびされなかったもの(「失敗」と呼ぶ)に細分した。3ヶ月の時点で生存していた患者を「生存者」と呼び、これは、第10日までに十分な応答をしなかった数人の患者を含んでいた。

40

#### 【0114】

さらなる亜集団は、死亡した患者(「全死」と呼ぶ)であり、これをカンジダによる死亡者(「カンジダ死」と呼ぶ)およびカンジダ感染症によらないもの(「非カンジダ死」と呼ぶ)に細分した。カンジダによる死亡は、治験担当者が、カンジダが死に有意に寄与したと述べた死亡と定義し、持続カンジダ症の臨床的証拠、剖検証拠、および/または血液培養陽性の48時間以内の死があった(Pappas等 2003)。

#### 【0115】

インターロイキン6レベル

50

これらは、上で説明したとおりに測定した。血清は、治験開始時（第1日）および中間点（第3日）およびMycograbまたは食塩水療法最終日（第6日）に、様々な数の患者から得ることができた。これらを、パイロットスタディーからのものなのか、または検証スタディーからのものなのかによって解析し、その後、2つのデータセットを組み合わせ、メタ解析表（検証/パイロット）を作成した。

#### 【0116】

統計解析

平均値

異なる患者群からの平均値を、 $P < 0.05$ のカットオフでマン・ホイットニー検定法によって比較した（Graph Pad InStat version 3.0）。第1日からの平均結果を第3および6日と比較し、第3日からの結果を第6日と比較した。

10

#### 【0117】

予測分析

死亡した患者の場合、高レベルのインターロイキン6の活性によりカンジダによるまたはカンジダでない死亡からの死を予測することができることを、受容体動作特性曲線（Bewick等、2004）によって検査した。これは、第1日の初期の高いインターロイキン6レベルが、後の死を予測するかどうか、およびこれが、カンジダ死亡により死ぬ患者と非カンジダ死亡により死ぬ患者とで異なるのかどうかの疑問に答えるために、死亡した患者におけるレベルと、生存者におけるレベルとを比較するものであった。プラシーボ群の場合、循環hs p 90が存続するため、これは、高いインターロイキン6のよ

20

#### 【0118】

Mycograb（登録商標）を用いて死亡した検証/パイロット患者についての第1日の平均レベルは、 $235 \pm 327 \text{ pg/ml}$ であり、これは、プラシーボ群 $225 \pm 307 \text{ pg/ml}$ と類似していた（表8および11）。

#### 【0119】

結果

平均の比較

これらを表にまとめた。表6～8は、Mycograb（登録商標）群の結果をまとめたものである。

30

#### 【0120】

表6に示す結果は、第1日からの結果を第3および6日からの結果と比較したとき、すべての患者におけるおよび治癒群におけるパイロット群について、統計学的に有意な減少を明示した。

#### 【0121】

表7に示す結果は、第1日からの結果を第6日からの結果と比較したとき、すべての患者におけるおよび生存者群における検証群について、統計学的に有意な減少を明示した。

40

#### 【0122】

表8に示す結果は、第1日からの結果を第3および6日からの結果と比較したとき、すべての患者、第10日に治癒していた患者におけるおよび生存者群における検証/パイロット群について、統計学的に有意な減少を明示した。

#### 【0123】

表9から11は、プラシーボ群におけるレベルに統計学的に有意な変化がないことを示した。

#### 【0124】

【表 6】

Mycograb(登録商標)群についてのハ・イロツステイの結果

Mycograb 群	ハ・イロツステイ									第1日対第3日	第1日対第6日	第3日対第6日
	平均	SD	数	平均	SD	数	平均	SD	数			
	第1日			第3日			第6日			P値	P値	P値
ハ・イロツ	460	529	8	44	30	6	67	35	8	0.008	0.0209	NS
ハ・イロツ 治癒、第10日	684	568	5	40	28	3	65	40	5	0.0357	0.0079	NS
ハ・イロツ 失敗、第10日	87	55	3	48	38	3	70	34	3	NA	NA	NA
ハ・イロツ 全死 (すべて非カンダ)	255	205	2	47	20	2	37	14	2	NA	NA	NA

10

【 0 1 2 5 】

【表 7】

Mycograb(登録商標)群についての検証ステイの結果

Mycograb 群	検証ステイ									第1日対第3日	第1日対第6日	第3日対第6日
	平均	SD	数	平均	SD	数	平均	SD	数			
	第1日			第3日			第6日			P値	P値	P値
検証	212	318	52	134	224	47	100	140	50	NS	0.0208	NS
検証 治癒、第10日	187	302	43	120	219	41	98	139	42	NS	NS	NS
検証 失敗、第10日	331	328	9	229	254	6	114	159	8	NS	NS	NS
検証 全死	233	338	24	164	307	22	134	191	22	NS	NS	NS
検証 非カンダ死	232	354	22	170	313	21	137	195	21	NS	NS	NS
検証 カンダ死	243	10	2	37	0	1	54	0	1	NA	NA	NA
生存者 検証	194	286	28	107	109	25	74	75	28	NS	0.0306	NS

20

【 0 1 2 6 】

【表 8】

Mycograb(登録商標)群についての検証ハ・イロツステイの結果

Mycograb 群	検証およびハ・イロツステイ									第1日対第3日	第1日対第6日	第3日対第6日
	平均	SD	数	平均	SD	数	平均	SD	数			
	第1日			第3日			第6日			P値	P値	P値
検証ハ・イロツ	245	350	60	124	213	53	96	131	58	0.0064	0.0028	NS
検証ハ・イロツ 治癒、第10日	239	364	48	114	212	44	94	131	47	0.0335	0.04	NS
検証ハ・イロツ 失敗、第10日	270	301	12	169	221	9	102	136	11	NS	NS	NS
検証ハ・イロツ 全死	235	327	26	154	295	24	126	184	24	NS	NS	NS
検証ハ・イロツ 非カンダ死	234	341	24	159	301	23	129	188	23	NS	NS	NS
検証 カンダ死 (ハ・イロツはカンダ死を 含まない)	243	10	2	37	0	1	54	0	1	NA	NA	NA
生存者 検証ハ・イロツ	253	372	34	98	104	29	74	70	34	0.0361	0.0075	NS

40

【 0 1 2 7 】

【表 9】

ブラスナー群についてのハ・イロツスグデーの結果

ブラスナー群	ハ・イロツスグデー									第1日対第3日	第1日対第6日	第3日対第6日
	平均	SD	数	平均	SD	数	平均	SD	数			
	第1日			第3日			第6日			P値	P値	P値
ハ・イロツ	337	174	8	337	513	8	174	151	8	NS	NS	NS
ハ・イロツ 治愈、第10日	317	247	3	55	40	3	122	72	3	NS	NS	NS
ハ・イロツ 失敗、第10日	349	148	5	506	604	5	205	185	5	NS	NS	NS
ハ・イロツ 全死	395	121	4	608	646	4	229	205	4	NS	NS	NS
ハ・イロツ 非カンダ死	221	0	1	46	0	1	91	0	1	NA	NA	NA
ハ・イロツ カンダ死	454	44	3	795	644	3	275	224	3	NS	NS	NS

10

【0128】

【表 10】

ブラスナー群についてのハ・イロツスグデーの結果

ブラスナー群	ハ・イロツスグデー									第1日対第3日	第1日対第6日	第3日対第6日
	平均	SD	数	平均	SD	数	平均	SD	数			
	第1日			第3日			第6日			P値	P値	P値
ハ・イロツ	337	174	8	337	513	8	174	151	8	NS	NS	NS
ハ・イロツ 治愈、第10日	317	247	3	55	40	3	122	72	3	NS	NS	NS
ハ・イロツ 失敗、第10日	349	148	5	506	604	5	205	185	5	NS	NS	NS
ハ・イロツ 全死	395	121	4	608	646	4	229	205	4	NS	NS	NS
ハ・イロツ 非カンダ死	221	0	1	46	0	1	91	0	1	NA	NA	NA
ハ・イロツ カンダ死	454	44	3	795	644	3	275	224	3	NS	NS	NS

20

30

【0129】

【表 11】

ブラスナー群についての検証ハ・イロツスグデーの結果

ブラスナー群	検証およびハ・イロツスグデー									第1日対第3日	第1日対第6日	第3日対第6日
	平均	SD	数	平均	SD	数	平均	SD	数			
	第1日			第3日			第6日			P値	P値	P値
検証ハ・イロツ	188	243	65	200	369	56	166	277	62	NS	NS	NS
検証ハ・イロツ 治愈、第10日	122	137	32	133	326	29	108	219	31	NS	NS	NS
検証ハ・イロツ 失敗、第10日	251	303	33	273	405	27	224	318	31	NS	NS	NS
検証ハ・イロツ 全死	252	290	25	347	449	20	304	401	24	NS	NS	NS
検証ハ・イロツ カンダ死	397	353	12	557	575	9	397	456	11	NS	NS	NS
検証ハ・イロツ 非カンダ死	119	120	13	176	218	11	226	346	13	NS	NS	NS
生存者 検証ハ・イロツ	147	202	40	119	293	36	79	83	38	NS	NS	NS

40

50

予測分析

Mycograb (登録商標)を用いて死亡した検証/パイロット患者についての第1日の平均レベルは、 $235 \pm 327$  pg/mlであり、これはブラシーボ群  $225 \pm 307$  pg/mlと類似していた(表8および11)。Mycograb (登録商標)についての生存者  $253 \pm 327$  pg/mlに関する平均値は、ブラシーボ群についての  $147 \pm 202$  pg/mlよりわずかに高かった。

【0130】

結果の比較は、Graph Pad Prism 4 Softwareを使用して感度のパイロット対1-特異性により生成したAUROC(曲線下面積)(表12参照)に基づくものであった。

【0131】

【表12】

インターロイキン6についての受容体動作測定曲線

コンパレーター群	AUROC	標準誤差	P	95%信頼区画	
				より低い結合	より高い結合
Mycograb:全死対生存者	0.5202	0.08060	0.7945	0.3622	0.6782
ブラシーボ:全死対生存者	0.5960	0.07610	0.1956	0.4468	0.7452
ブラシーボ:カンジダ死対生存者	0.7552	0.07937	0.007827	0.5996	0.9108
ブラシーボ:非カンジダ死対生存者	0.5510	0.1002	0.5838	0.3544	0.74775

結論

理想的な試験は、1のAUROCを有するが、任意の推量は、0.5のAUROCを有する。このデータは、Mycograb(登録商標)群についての低い予測値(0.5202)を明示した。これは、Mycograb(登録商標)によるhsP90の中和(転帰改変における高いインターロイキン6の影響を打ち消すことを意味する)と一致する。ブラシーボ群における非カンジダ死を生存者と比較したとき、同様の失敗(0.5510)が見られた。カンジダによる死の場合、この状況は変わり、AUROC値は0.7552であった。これは、循環hsP90を中和するMycograb(登録商標)不在の状態での高いインターロイキン6が、カンジダに起因する死のはるかに高い機会を招くことを明示していた。

【実施例4】

【0132】

サイトカイン放出の研究

サイトカイン放出とhsP90およびMycograb(登録商標)への暴露との関連をさらに特性付けするために、白血球の応答を研究した。

【0133】

方法

それぞれの健常なボランティアからの20mlのヘパリン加新鮮血液サンプルを、等容量の組織培養培地と共に50ml遠心管に入れた。4mlのヒストパク(Histopaque)をそれぞれの15ml遠心管に添加し、8mlの血液/培養培地ミックスをそのヒストパクに添加した。それらのサンプルを400gで30分間、遠心分離し、リンパ球を除去した。組織培養培地を補給してその管内の容量を40mlにし、細胞を洗浄し、計数し、 $5 \times 10^5$ 細胞/mlで組織培養培地に再懸濁させた。遠心分離後の1.5mlの細胞懸濁液を0時間サンプルとして使用した。3mlの細胞懸濁液を6ウェル組織培養プレートのそれぞれのウェルに入れ、試験試薬を添加した。インキュベーションは、37、5%CO<sub>2</sub>で4時間および24時間であった。各時点で1.5mlの上清を一晚、4で保管した後、サイトカインTNF-、IL-6について試験し、24時間の時点でTNF-を試験した。Mycograb(上で説明したとおり調合したもの)の濃度は、1mg/kgのMycograb(登録商標)を受ける患者の血清中、C<sub>MAX</sub>に近い4μg/mlであった。

【0134】

試験品

5人の健常なボランティア(HV6~HV10)から血液を採取し、単球を調合緩衝液

10

20

30

40

50

(6  $\mu$ l/ml) hsp90 (50 ng/ml) Mycograb (登録商標) (4  $\mu$ g/ml) および hps90 (50 ng/ml) に暴露した。

【0135】

結果

結果を表13から16にまとめた。これは、TNF- のレベルが、4時間後、hsp90に反応してわずかに、および24時間後、Mycograbではなくhsp90(登録商標)に反応して有意に上昇したことを明示した。24時間の時点で、hsp90に対する反応は、Mycograb(登録商標)より、尚、大きかった。INF- のアッセイは、24時間の時点ですべて陰性であった。

【0136】

結論

この研究により、非常に低レベル(50 ng/ml)のhsp90は、TNF- とIL-6の両方を誘導できるが、INF- を誘導できないことを確認した。4  $\mu$ g/mlのMycograbへの反応は、はるかに低かった。

【0137】

【表13】

4時間の時点でのTNF- $\alpha$  pg/mL

	4時間の時点でのTNF- $\alpha$ pg/ml						
	HV6	HV7	HV8	HV9	HV10	平均	SD
調合緩衝液	0	0	0	0	0	0	0
Hsp 90	4.1	0	1.6	2	20.3	5.6	8.3
Mycograb(登録商標)	0	1.3	0	1.3	5.3	1.58	2.2

【0138】

【表14】

24時間の時点でのTNF- $\alpha$  pg/mL

	24時間の時点でのTNF- $\alpha$ pg/ml						
	HV6	HV7	HV8	HV9	HV10	平均	SD
調合緩衝液	0	0	0	0	0	0	0
Hsp 90	40	9.4	11.6	21.7	61.6	28.9	21.9
Mycograb(登録商標)	4.1	1.33	4.1	3.3	10.4	4.6	3.4

【0139】

【表15】

4時間の時点でのIL-6 pg/mL

	4時間の時点でのIL-6 pg/ml						
	HV6	HV7	HV8	HV9	HV10	平均	SD
調合緩衝液	0	0	0	0	0	0	0
Hsp 90	74	146	195	115	682	242.4	249.7
Mycograb (登録商標)	44	103	184	5	211	109.4	88.2

【0140】

【表 16】

## 24時間の時点での IL-6 pg/ml

	24時間の時点での IL-6 pg/ml						
	HV6	HV7	HV8	HV9	HV10	平均	SD
調合緩衝液	0	0	0	0	0	0	0
Hsp 90	521	267	581	500	1029	579.6	278.1
Mycograb(登録商標)	121	279	627	70	401	299.6	225.0

## 参考文献

- Bewick, V. 等. Critical Care December 2004 Vol 8 No 6, 508 - 512 10
- Hehlhans, T. 等. Immunology, 115, 1 - 20
- Matthews, R. C. 等. Current Molecular Medicine 2005, 5, 403 - 411
- Miyaoka, K. 等. Journal of Surgical Research 125, 144 - 150 (2005)
- Mokart, D. 等. British Journal of Anaesthesia 94 (6) : 767 - 773 (2005)
- Ng, P. C. 等. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. 1997; 77; 221 - 227 20
- Ng, P. C. 等. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. 2003; 88; 209 - 213
- Ng, P. C. 等. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. 2004; 89; 229 - 235
- Panacek, E. A. 等. Crit Care Med 2004 Vol. 32, No. 11; 2173 - 2182
- Saito, K. 等. Experimental Cell Research 2005
- Terregino, C. A. 等. Annals of Emergency Medicine, 35:1, Jan 2000; 26 - 34 30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0141】

【図1】固定化ペプチドに対する異なる濃度のMycograb(登録商標)の注射からの結合曲線のグラフを示す。

【図2】カンジダhsp90に対する異なる濃度のMycograb(登録商標)の注射からの結合曲線のグラフを示す。

【図3】固定化ヒトhsp90に対する1濃度系列のMycograb(登録商標)からの結合曲線のグラフを示す。

【図4】異なる温度でのLKVIK - ペプチドへのMycograb(登録商標)の結合を示すセンサーグラムのグラフを示す。 40

【図5】組換えhsp90のIMAC精製のゲル分析の画像を示す。ゲルのレーンは、次のとおりである：レーン1 - フロースルー；レーン2 - 洗浄1a；レーン3 - 洗浄1b；レーン4 - 洗浄1c；レーン5 - 洗浄1d；レーン6 - 洗浄1e；レーン7 - 溶離1a；およびレーン8 - 溶離1b。

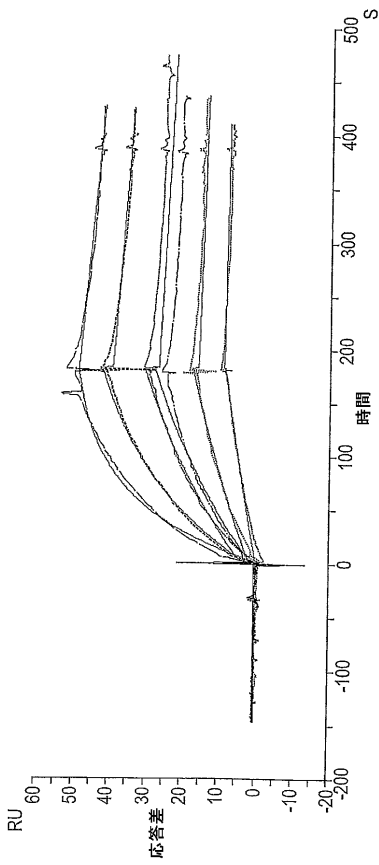
【図6】Mycograb(登録商標)による交差吸収のないhsp90に対するマウス応答のグラフを示す。

【図7】0.1mg/kgの濃度のMycograb(登録商標)による交差吸収を伴うhsp90に対するマウス応答のグラフを示す。

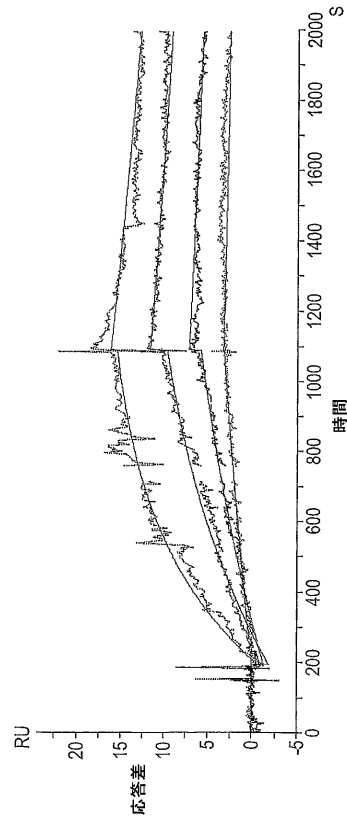
【図8】0.5mg/kgの濃度のMycograb(登録商標)による交差吸収を伴うhsp90に対するマウス応答のグラフを示す。 50

【図9】 1mg/kgの濃度のMycograb（登録商標）による交差吸収を伴うhsp90に対するマウス応答のグラフを示す。

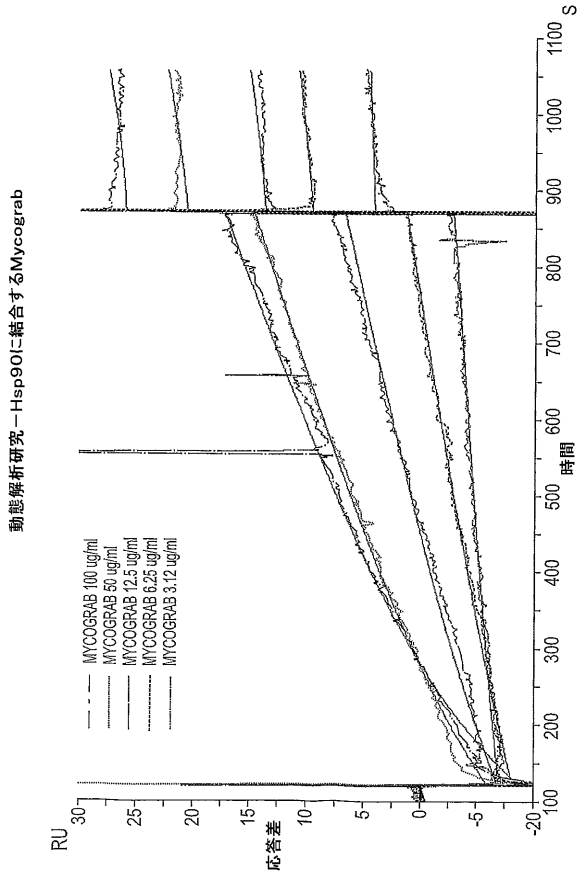
【図1】



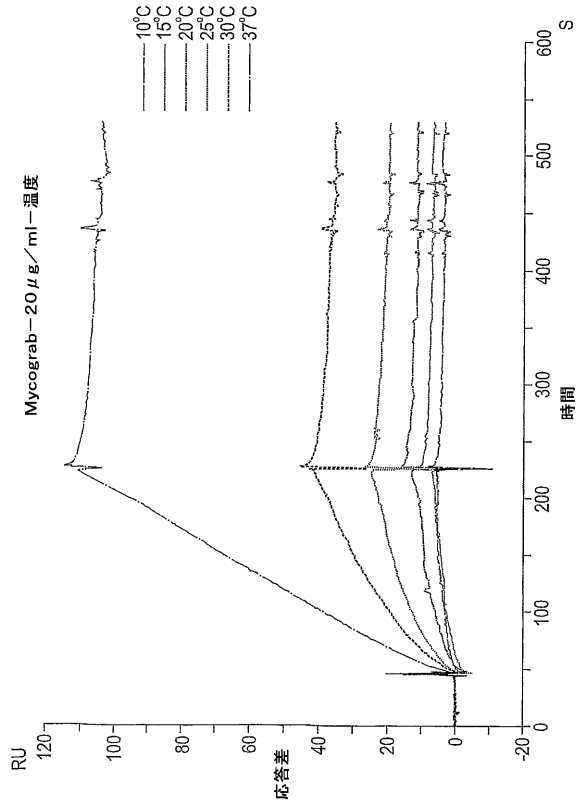
【図2】



【 図 3 】

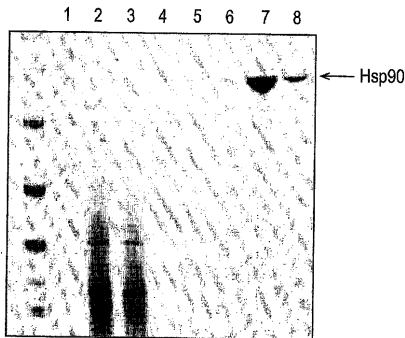


【 図 4 】

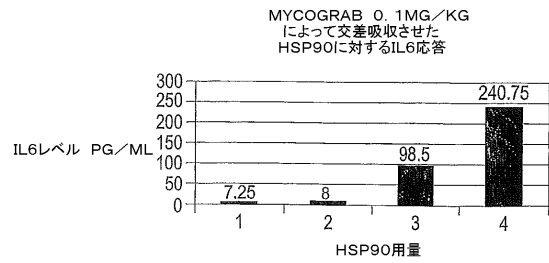


【 図 5 】

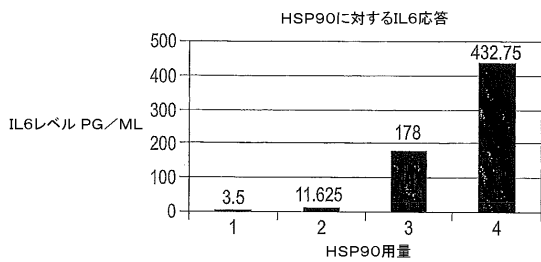
FIG. 5



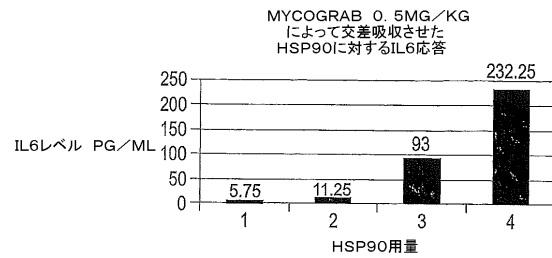
【 図 7 】



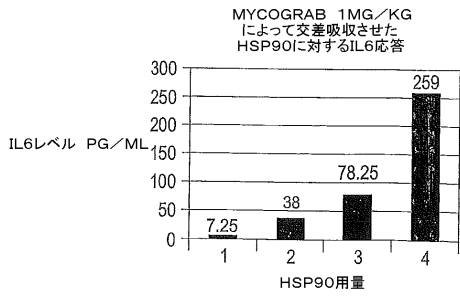
【 図 6 】



【 図 8 】



【 図 9 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2007/000029

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/395 A61P31/00		
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 A61P		
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, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MATTHEWS R C ET AL: "Human recombinant antibody to HSP90: a natural partner in combination therapy." CURRENT MOLECULAR MEDICINE JUN 2005, vol. 5, no. 4, June 2005 (2005-06), pages 403-411, XP009085275 ISSN: 1566-5240 the whole document	1-32
X	WO 01/76627 A1 (NEUTEC PHARMA PLC [GB]; BURNIE JAMES P [GB]) 18 October 2001 (2001-10-18) cited in the application	1-18
Y	page 32 - page 40 ----- -/-	1-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 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. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  15 June 2007		Date of mailing of the international search report  27/06/2007
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  Winger, Rudolf

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2007/000029

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/000300 A (VERNALIS CAMBRIDGE LTD [GB]; CANCER REC TECH LTD [GB]; INST OF CANCER) 6 January 2005 (2005-01-06) claims 1,23	1,2,15, 16
X	WO 02/02123 A (UNIV BOSTON [US]; STREHLOW DAVID [US]) 10 January 2002 (2002-01-10) claims 5,9,11	1,2,15, 16
X	CONROY S E ET AL: "Detection of autoantibodies to the 90 kDa head shock protein in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases" BRITISH JOURNAL OF RHEUMATOLOGY, vol. 33, no. 10, 1994, pages 923-926, XP008066162 ISSN: 0263-7103 the whole document	19-32
Y	BURNIE J P ET AL: "Defining antibody targets in Streptococcus oralis infection" INFECTION AND IMMUNITY 1996 UNITED STATES, vol. 64, no. 5, 1996, pages 1600-1608, XP001153567 ISSN: 0019-9567 page 1605	1-32

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/GB2007/000029**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 15-32 are directed to a method of treatment of the human/animal body and diagnostic methods, respectively, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2007/000029

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0176627	A1	18-10-2001	AU 4089001 A	23-10-2001
			BR 0109846 A	03-06-2003
			CA 2401836 A1	18-10-2001
			CN 1420786 A	28-05-2003
			EP 1267925 A1	02-01-2003
			JP 2003530357 T	14-10-2003
			NO 20024815 A	02-12-2002
			NZ 520899 A	24-03-2005
			PL 358394 A1	09-08-2004
			US 2003180285 A1	25-09-2003
WO 2005000300	A	06-01-2005	EP 1638555 A1	29-03-2006
			US 2006235058 A1	19-10-2006
WO 0202123	A	10-01-2002	AU 7156701 A	14-01-2002

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P</b>	<b>1/04</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 37/06
<b>A 6 1 P</b>	<b>19/02</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 1/04
<b>A 6 1 P</b>	<b>29/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 19/02
<b>A 6 1 P</b>	<b>37/02</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00 1 0 1
<b>A 6 1 P</b>	<b>31/10</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 37/02
<b>G 0 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 31/10
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53 D
<b>C 0 7 K</b>	<b>14/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A
			C 0 7 K 14/00

(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, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA80 CA04 CA20 DA12 EA04 GA11 GA19 HA03  
 4C084 AA17 NA14 ZA662 ZA682 ZA962 ZB082 ZB152 ZB322 ZB352 ZC412  
 4C085 AA13 AA14 BB11 CC22 CC23 DD62 GG08  
 4H045 BA09 BA14 CA40 EA22 EA52 FA74

专利名称(译)	治疗用组成物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009522344A</a>	公开(公告)日	2009-06-11
申请号	JP2008549059	申请日	2007-01-05
申请(专利权)人(译)	牛科技有限公司制药		
[标]发明人	バーニー・ジェームス・ピーター マシュー・ブルース・クリスティン		
发明人	バーニー・ジェームス・ピーター マシュー・ブルース・クリスティン		
IPC分类号	A61K45/00 A61K39/395 A61P43/00 A61P31/04 A61P37/06 A61P1/04 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/02 A61P31/10 G01N33/53 C12N15/09 C07K14/00		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/04 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00 C07K16/14 C07K2317/21 G01N33/564 G01N2333/525 G01N2333/5412		
FI分类号	A61K45/00.ZNA A61K39/395.D A61K39/395.N A61P43/00.111 A61P31/04 A61P37/06 A61P1/04 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P37/02 A61P31/10 G01N33/53.D C12N15/00.A C07K14/00		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/HA03 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA962 4C084/ZB082 4C084/ZB152 4C084/ZB322 4C084/ZB352 4C084/ZC412 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/GG08 4H045/BA09 4H045/BA14 4H045/CA40 4H045/EA22 4H045/EA52 4H045/FA74		
代理人(译)	铃木 弘男		
优先权	2006000168 2006-01-05 GB 11/401321 2006-04-11 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

hsp90蛋白抑制剂在制备用于治疗或预防涉及TNF $\alpha$ 和/或IL-6水平升高的病症的药物中的用途。

