

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-516364

(P2025-516364A)

(43)公表日 令和7年5月27日(2025.5.27)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 C 0 8 4
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705		4 C 0 8 5
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00		4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全45頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-565317(P2024-565317)		(71)出願人	518399081	
(86)(22)出願日	令和5年5月5日(2023.5.5)			デュセンティス バイオセラピューティクス リミテッド	
(85)翻訳文提出日	令和6年12月18日(2024.12.18)			イギリス国ブリストル ビーエス1 6エフエル, テンプル・バック 10, ファーストフロア, スウィート 2	
(86)国際出願番号	PCT/IB2023/054721		(74)代理人	100118902	
(87)国際公開番号	WO2023/214387			弁理士 山本 修	
(87)国際公開日	令和5年11月9日(2023.11.9)		(74)代理人	100106208	
(31)優先権主張番号	2206672.4			弁理士 宮前 徹	
(32)優先日	令和4年5月6日(2022.5.6)		(74)代理人	100196508	
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)			弁理士 松尾 淳一	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV		(74)代理人	100122644	
		最終頁に続く		弁理士 寺地 拓己	
			(72)発明者	アシュフィールド, レベッカ	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 新規CD200融合タンパク質

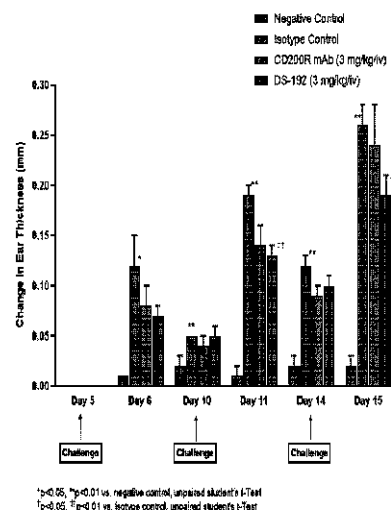
(57)【要約】

本発明は、S228P変異及び最初の5アミノ酸の欠失を含む非CD200 IgG4 Fc断片に直接融合された、野生型CD200よりも高い親和性でヒトCD200受容体に結合する、K130Y及びI131Y変異を含む変異CD200部分を含む融合タンパク質に関する。本発明はまた、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、それを含む医薬組成物、及びその使用に関する。

【選択図】図12

Fig. 12

Oxazolone AD Model Change in Ear Thickness



10

20

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) アミノ酸残基 130 位及び 131 位に、K130Y 及び I131Y である変異を含む変異 CD200 部分；並びに

(ii) IgG4 Fc 断片であり、EUNANバリングシステムに従った S228P 変異及びヒンジの最初の 5 アミノ酸の欠失を含む非 CD200 部分、を含む融合タンパク質であって、

変異 CD200 部分のグリシン 232 が、IMGT ナンバリングシステムに従ったアミノ酸 6 で非 CD200 IgG4 Fc 断片に直接融合される、前記融合タンパク質。

【請求項 2】

配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 3】

配列番号 1 のアミノ酸配列から成る、請求項 1 又は 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

変異 CD200 部分が、CD200 部分の最初の 30 アミノ酸を表す N 末端シグナル配列を含む、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

N 末端シグナル配列が、ヒト IgG 鎖シグナルペプチドである、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

N 末端シグナル配列が、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 4 に記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

N 末端シグナル配列が、細胞からの分泌前に切断される、請求項 4～7 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

CD200 受容体のモジュレーターである、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

CD200 受容体のアゴニストである、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

サイトカイン分泌を阻害する、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 12】

サイトカインが IL-6 である、請求項 11 に記載の融合タンパク質。

【請求項 13】

サイトカインが IL-8 である、請求項 11 に記載の融合タンパク質。

【請求項 14】

サイトカインが TNF α である、請求項 11 に記載の融合タンパク質。

【請求項 15】

野生型 CD200-Fc 融合タンパク質よりも高い程度まで ERK 活性化を阻害する、請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 16】

請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 17】

請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質又は請求項 15 に記載のポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチド、及び薬学的に許容される担体を含む、組成物。

【請求項 18】

自己免疫疾患、アレルギー性疾患、神経変性障害、神経障害性疼痛、炎症性障害、T h 2 誘導性気道炎症、又は糖尿病性ニューロパチーを有する対象を処置する方法であって、請求項 1 ～ 15 の融合タンパク質、請求項 16 に記載のポリヌクレオチド、又は請求項 17 に記載の組成物を対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 19】

対象が、関節リウマチ、喘息、又はアトピー性皮膚炎を有する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

対象が、神経筋系、血管系、眼、皮膚、消化管、肺、腎臓、肝臓、末梢若しくは中枢神経系、骨、軟骨、又は関節に影響を及ぼす自己免疫疾患を有する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

対象が、急性播種性脳脊髄炎 (A D E M) ; 急性壊死性出血性白質脳炎; アジソン病; 無 γ グロブリン血症; 円形脱毛症; アミロイドーシス; 強直性脊髄炎; 抗 G B M / 抗 T B M 腎炎; 抗リン脂質抗体症候群 (A P S) ; 喘息、アトピー性皮膚炎; 自己免疫性血管性浮腫; 自己免疫性再生不良性貧血; 自己免疫性自律神経障害; 自己免疫性肝炎; 自己免疫性高脂血症; 自己免疫性免疫不全; 自己免疫性内耳疾患 (A I E D) ; 自己免疫性心筋炎; 自己免疫性卵巣炎; 自己免疫性脾炎; 自己免疫性網膜症; 自己免疫性血小板減少性紫斑病 (A T P) ; 自己免疫性甲状腺疾患; 自己免疫性蕁麻疹; 軸索及び神経性ニューロパチー; バロー病; ベーチェット病; 水疱性類天疱瘡及び関連する自己免疫水疱形成疾患; 心筋症; キャッスルマン病; セリアック病 (難治性セリアック病 I I 型など) ; シャーガス病; 特発性慢性蕁麻疹; 慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー (C I D P) ; 慢性再発性多発性骨髄炎 (C R M O) ; 慢性特発性蕁麻疹; チャーグーストラウス症候群; 癰痕性類天疱瘡 / 良性粘膜天疱瘡; クローン病; コーガン症候群; 寒冷凝集素症; 先天性心伝導障害; コクサッキー心筋炎; C R E S T 病; 特発性混合クリオグロブリン血症; 脱髄性ニューロパチー; 疱疹状皮膚炎; 皮膚筋炎; デビック病 (視神経脊髄炎) ; 円板状エリテマトーデス; ドレスラー症候群; 子宮内膜症; 好酸球性食道炎; 好酸球性筋膜炎; 結節性紅斑; 実験的アレルギー性脳脊髄炎; エヴァンス症候群; 線維化肺炎; 巨細胞性動脈炎 (側頭動脈炎) ; 巨細胞性心筋炎; 糸球体腎炎; グッドパスチャー症候群; 多発血管炎性肉芽腫症 (G P A) (ウェゲナー肉芽腫症) ; 移植片対宿主病; (G v H D) ; グレーブス病; ギラン・バレー症候群; 橋本病; 溶血性貧血; ヘノッホーシェンライン紫斑病; 妊娠性疱疹; 低 γ グロブリン血症; 特発性血小板減少性紫斑病 (I T P) ; I g A ニューロパチー; I g G 4 関連硬化性疾患; 免疫調節性リポタンパク質; 封入体筋炎; 炎症性腸疾患 (I B D) ; 炎症性皮膚疾患; 間質性膀胱炎; 若年性関節炎; 若年性糖尿病 (1 型糖尿病) ; 若年性筋炎; 川崎病; ランバート・イートン症候群; 白血球破砕性血管炎; 扁平苔癬; 硬化性苔癬; 木質性角結膜炎; 線状 I g A 病 (L A D) ; ループス (S L E) ; ライム病、慢性; マクロファージ活性化症候群 (M A S) ; 肥満細胞症; メニエール病; 顕微鏡的多発血管炎; 混合性結合組織病 (M C T D) ; モーレン潰瘍; ムッハー・ハーベルマン病; 多発性硬化症; 重症筋無力症; 筋炎; ナルコレプシー; 視神経脊髄炎 (デビック) ; 好中球減少症; 眼癰痕性類天疱瘡; 視神経炎; 回帰性リウマチ; P A N D A S (溶連菌感染症関連小児自己免疫性精神神経疾患) ; 傍腫瘍性小脳変性症; 発作性夜間ヘモグロビン尿症 (P N H) ; パリー・ロンベルク症候群; パーソネジーター症候群; 扁平部炎 (周辺部ブドウ膜炎) ; 天疱瘡; 末梢性ニューロパチー; 静脈周囲性脳脊髄炎; 悪性貧血; P O E M S 症候群; 結節性多発動脈炎; 1 型、2 型、及び 3 型多腺性自己免疫症候群; リウマチ性多発筋痛症; 多発性筋炎; 心筋梗塞後症候群; 心膜切開後症候群; プロゲステロン皮膚炎; 原発性胆汁性肝硬変; 原発性硬化性胆管炎; 乾癬; 乾癬性関節炎; 特発性肺線維症; 壊疽性膿皮症; 赤芽球癆; レイノー現象; 反応性関節炎; 反射性交感神経性ジストロフィー; ライター症候群; 再発性多発性軟骨炎; 下肢静止不能症候群; 後腹膜線維症; リ

10

20

30

40

50

ウマチ熱；関節リウマチ；類肉腫症；シュミット症候群；強膜炎；強皮症；シェーグレン症候群；精液精巣自己免疫；全身硬直症候群；亜急性細菌性心内膜炎（SBE）；Susac症候群；交感性眼炎；高安動脈炎；側頭動脈炎／巨細胞性動脈炎；血小板減少性紫斑病（TTP）；トロサーハント症候群；横断性脊髄炎；1型糖尿病；潰瘍性大腸炎；未分化結合組織病（UCTD）；ブドウ膜炎；脈管炎；小胞水疱性皮膚病；又は白斑を有する、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

融合タンパク質又はポリヌクレオチドが、単独の治療剤として投与される、請求項18～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

融合タンパク質が、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、神経変性障害、神経障害性疼痛、炎症性障害、Th2誘導性気道炎症、又は糖尿病性ニューロパチーの処置のために示される1つ以上の他の医薬品と併用して投与される、請求項18～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】

融合タンパク質が、免疫抑制療法において1つ以上の免疫抑制剤又はアジュバントと併用して投与される、請求項18～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

融合タンパク質が、アザチオプリン、メトトレキサート、シクロスポリン、モノクローナル抗体、コルチコステロイド、又はそれらの組合せと併用して投与される、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

モノクローナル抗体が、バシリキシマブ、ダクリズマブ、又はムロモナブである、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

自己免疫疾患、アレルギー性疾患、神経変性障害、神経障害性疼痛、炎症性障害、Th2誘導性気道炎症、又は糖尿病性ニューロパチーの処置に使用するための、請求項1～15のいずれか1項に記載の融合タンパク質、請求項16に記載のポリヌクレオチド、又は請求項17に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2022年5月6日に出願された英国仮特許出願第GB2206672.4号の優先権を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表の説明

本願は、EFS-Webを介して提出された電子形式の配列表を含む。2023年4月27日に作成された前記配列表は、「4549-139ST26.xml」と命名され、サイズは6,646バイトである。配列表の電子形式の情報は、本願の一部であり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

発明の分野

本発明は、S228P変異及び最初の5アミノ酸の欠失を含む非CD200 IgG4Fc断片に直接融合された、野生型CD200よりも高い親和性でヒトCD200受容体に結合するK130Y及びI131Y変異を含む変異CD200部分を含む融合タンパク質に関する。本発明はまた、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、それを含む医薬組成物、及びその使用に関する。

【背景技術】

【0004】

10

20

30

40

50

自己免疫及びアレルギーを含む炎症性疾患は、世界的に慢性疾患の第2の主要な原因であり、米国では女性の罹患率の主要な原因である。2008年の国際調査によると、米国の慢性疾患患者は他国の患者と比較して、費用負担のために適切なケアを受けずにいる傾向が強い（Schoen, C.ら（2008）Health Affairs Web Exclusive、w1-w16）。さらに、このような患者は、医療事故の発生率が最も高く、ケアの連携に問題があり、医療費の自己負担が大きい。

【0005】

現在、米国自己免疫疾患協会（AARDA）は、5000万人の米国人が自己免疫疾患に罹患していると推定している。自己免疫疾患による医療システム全体への直接的及び間接的な全費用を決定する疫学的データは不足している。しかしながら、2001年、アメリカ国立アレルギー・感染症研究所（NIAID）のアンソニー・ファウチ所長は、自己免疫疾患の年間治療費は1000億ドルを超えると推定した。1,000億ドルは驚異的な数字ではあるが、自己免疫疾患にかかる真の費用は、100以上ある既知の自己免疫疾患のうち、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス（SLE）、多発性硬化症（MS）、関節リウマチ（RA）、乾癬、及び強皮症の7つのみにかかる年間費用が、疫学調査によって合計518億ドル～706億ドルに上ると推定されていることから、大きく過小評価されている可能性が高い。さらに、これらの推定は、移植中の免疫抑制療法の費用を見落としている。

【0006】

自己免疫疾患は治療法のない慢性状態で、免疫系が健康な細胞を異物と判断して攻撃することで発症する。自己免疫疾患は、その種類によって、1つ以上の異なる種類の身体組織に影響を及ぼし、臓器の異常な成長及び臓器機能の変化を引き起こす可能性がある。免疫系の正常な制御は、免疫応答に関与する細胞によって発現されるタンパク質を含む受容体／リガンドペアによるところが大きい。しかしながら、これらの受容体／リガンドペアは、自己免疫疾患の病態を引き起こすシグナル伝達カスケードに含まれている。

【0007】

OX-2膜糖タンパク質は、CD200（分化抗原群200）とも呼ばれ、様々な細胞型で発現し（Barclay, A. N.（1981）Immunology 44、727）、免疫グロブリン遺伝子ファミリーの分子と高い相同性を有する、CD200遺伝子によってコードされるヒトタンパク質である。この遺伝子によってコードされるタンパク質は、2つの免疫グロブリンを含み、CD200受容体（CD200R）に結合する1型膜糖タンパク質である。

【0008】

CD200Rは骨髄系細胞（単球、マクロファージ、樹状細胞、及び好酸球）及びT細胞に発現している（Wrightら（2000）、Immunity 12、233-242；Wrightら（2003）、J. Immunol、171、3034-3046）。

【0009】

CD200とCD200Rとの係合は、骨髄球及びT細胞に抑制シグナルを送達し、したがって、免疫系の自然免疫及び適応免疫の両方に免疫抑制効果を及ぼす（Rahim S. A.（2005）AIDS、19、1907-1925；Shiratori, I.（2005）J. Immunol、175、4441-4449；Mistear, K.ら（2012）、Journal of Virology、86（11）、6246-6257）。

【0010】

CD200Rアゴニストは、広範なマウス疾患モデル、例えば関節炎（Gorczyńskiら（2001）Clin. Immunol. 101、328-34；Gorczyńskiら（2002）Clin. Immunol. 104、256-264）、移植片拒絶（Gorczyńskiら（2002）Transplantation 73、1948-1953）、妊娠の失敗（Gorczyńskiら（2002）Am. J. Re

10

20

30

40

50

prod. Immunol.、48、18-26)、接触過敏症(Rosenblumら(2004) Blood 103、2691-8)、インフルエンザ誘発肺炎(Snelgroveら(2008) Nat. Immunol.、9、1074-1083)、及びHSV誘発炎症性病変(Sarangira(2009) Clin. Immunol. 131、31-40)において病態を軽減することが示されている。

【0011】

さらに、インフルエンザウイルスに暴露されたCD200-/-マウスは、野生型対照と比較して、肺浸潤及び肺内皮障害の増加と関連した、より重篤な疾患を発症した(Ryg iel. T. P. ら(2009) J. Immunol. 183(3)、1990-1996)。CD200-/-マウスはウイルス量を制御することができる免疫応答を誘導したことから、重篤な疾患は有益な抗ウイルス免疫応答とは対照的に、免疫応答の制御不全が原因であることが示唆された。その結果、ウイルス量が劇的に増加したにもかかわらず、ウイルス曝露の前にT細胞を枯渇させることで疾患を予防することができた。Ryg iel. T. P. ら(2009)は、インフルエンザ感染時の疾患症状の発現にはT細胞が不可欠であり、ウイルス量よりもCD200-CD200Rシグナル伝達の下方向制御の欠如が免疫病理を増大させると結論づけた。

10

【0012】

プロファイリング研究により、hCD200の発現は、多発性硬化症(Koningら(2007) Ann. Neurol. 62、504-514)、喘息増悪(Aokiら(2009) Clin. Exp. Allergy 39、213-221)、アルツハイマー病(Walkerら(2009) Exp. Neurol. 215、5-19)、原発性肥大性骨関節症(Renら(2013) Rheumatol. Int. 33(10)、2509-2512)、妊娠の失敗(Clark(2009) Am. J. Reprod. Immunol. 61、75-84)、及び毛孔性扁平苔癬(脱毛)(Harriesら(2013) J. Pathol. 231(2)、236-247)などの多様な患者集団において低下制御されていることが示されている。

20

【0013】

アゴニストCD200タンパク質は、例えば、WO2000/061171及びWO2008/089022に開示されている。文献には、免疫細胞の機能を調節するために野生型CD200分子を使用することが記載されている。本発明は、野生型CD200よりも高い親和性でCD200受容体に結合する変異型CD200タンパク質に関する。

30

【0014】

したがって、CD200経路を調節する分子を用いた治療的介入は、慢性又は断続的な(再発的な)自己免疫疾患に罹患している患者において、過剰又は不要な免疫応答を制御し、病状を軽減する手段を提供する。

【0015】

現在利用可能な自己免疫疾患の処置に関連する問題を克服し、より低用量で臨床効果を向上させる必要がある。

【発明の概要】

【0016】

40

本発明の第1の態様によれば、

(i) アミノ酸残基130位及び131位に、K130Y及びI131Yである変異を含む変異CD200部分；並びに

(ii) IgG4 Fc断片であり、EUナンバリングシステムに従ったS228P変異及びヒンジの最初の5アミノ酸の欠失を含む非CD200部分、を含む融合タンパク質であって、

変異CD200部分のグリシン232が、IMGTナンバリングシステムに従ったアミノ酸6で非CD200 IgG4 Fc断片に直接融合される、融合タンパク質が提供される。

【0017】

50

本発明のさらなる態様によれば、本明細書で定義される融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドが提供される。

さらに別の態様によれば、本明細書で定義される融合タンパク質を含む医薬組成物が提供される。

【0018】

本発明の別の態様では、医薬品の調製に使用するための、本明細書で定義される融合タンパク質、ポリヌクレオチド、又は医薬組成物が提供される。本発明の別の態様では、治療に使用するための、本明細書で定義される融合タンパク質、ポリヌクレオチド、又は医薬組成物が提供される。本発明の別の態様では、自己免疫疾患、アレルギー性疾患（例えば、関節リウマチ、喘息、又はアトピー性皮膚炎）、神経変性神経障害性疼痛、炎症性関節痛、又は糖尿病性神経障害の処置に使用するための、本明細書で定義される融合タンパク質、ポリヌクレオチド、又は医薬組成物が提供される。本発明の別の態様では、関節リウマチ、喘息、又はアトピー性皮膚炎の処置に使用するための、本明細書で定義される融合タンパク質、ポリヌクレオチド、又は医薬組成物が提供される。本発明の別の態様では、神経筋系、血管系、眼、皮膚、消化管、肺、腎臓、肝臓、末梢若しくは中枢神経系、骨、軟骨、又は関節に影響を及ぼす自己免疫疾患の処置に使用するための、本明細書に定義される融合タンパク質、ポリヌクレオチド、又は医薬組成物が提供される。

10

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1A】捕捉された変異CD200-Fc融合タンパク質(DS-118)へのヒトCD200R結合の会合相及び解離相を示すBIAcoreアッセイのセンサーグラム。

20

【図1B】捕捉された野生型CD200-Fc(DS-155)へのヒトCD200R結合の会合相及び解離相を示すBIAcoreアッセイのセンサーグラム。

【図2A】捕捉された変異CD200-Fc融合タンパク質(DS-118)へのカニクイザルCD200R1結合の会合相及び解離相を示すBIAcoreアッセイのセンサーグラム。

【図2B】捕捉された野生型CD200-Fc(DS-155)へのカニクイザルCD200R1結合の会合相及び解離相を示すBIAcoreアッセイのセンサーグラム。

【図3A】変異CD200-Fc融合タンパク質(DS-118、左パネル)又は野生型CD200-Fc(DS-155、右パネル)での処理後のU937-CD200R細胞からのLPS刺激IL-6放出の阻害を示すグラフ。

30

【図3B】変異CD200-Fc融合タンパク質(DS-118)での処理後のU937-CD200R細胞からのLPS刺激IL-8放出の阻害を示す棒グラフ。

【図3C】TNF α 放出について、Bと同様。

【図3D】変異CD200-Fc融合タンパク質(DS-118、左パネル)又は野生型CD200-Fc融合タンパク質(DS-155、右パネル)での処理後のU937-CD200R細胞におけるLPS刺激ホスホ-Erkの阻害を示す棒グラフ。阻害%は、変異融合タンパク質/CD200で処理していないU937-CD200R細胞からのLPS刺激サイトカイン放出又はU937-CD200R細胞におけるホスホ-Erkレベルを0%に設定した場合に対するものである。

40

【図4】1時間後及び4時間後に蛍光抗ヒト2次抗体を使用して可視化した、U937-CD200R細胞への変異CD200-Fc(DS-118)の結合。

【図5】DS-118による1時間の処理及びLPS+INF γ による18時間の刺激後のiPSC由来マクロファージ細胞からのIL-6放出を示すグラフ。示されたデータは、3回の独立した反復からの平均 $\pm$ SEMを表す。2元配置分散分析を行って、未処理対照と比較した有意性を測定した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

【図6】CD200ドメインにおける変異を示すDS-118の図を示す。

【図7】DS-155(野生型CD200-Fc)、DS-192(13nM CD200-Fc)、及びDS-118(1nM CD200-Fc)の用量滴定に応答したIL-6の阻害を示すグラフ。

50

【図 8】DS-118 による IL-8 の阻害を示すグラフ。エラーバーは、生物学的複製物間の標準偏差を表す。

【図 9】DS-192 による TNF α の阻害を示すグラフ。エラーバーは、生物学的複製物間の標準偏差を表す。

【図 10】抗 pERK 抗体を用いて、huCD200-Fc 融合体の存在下で、透過処理した細胞においてフローサイトメトリーによって測定された、DS-155、DS-192、及び DS-118 による ERK リン酸化の阻害を示すグラフ。

【図 11】25～36 日目に 1 日おきに測定した雄 DBA/1J マウスにおける足関節炎の臨床スコアを示すグラフ。データは平均 $\pm$ SEM として表される。 $**p < 0.01$ ； $***p < 0.001$ 対疾患 + Dexa、疾患 + DS-198、及び疾患 + DS-227、2 元配置 RM 分散分析、続いてテューキーの多重比較検定。

10

【図 12】接触過敏症のヒト化マウスモデルの 0 日目からの耳の厚さの変化を示すグラフ。示された値は、右耳と左耳の組み合わせられた値である。

【図 13】15 日目の接触過敏症のヒト化マウスモデルの組織ホモジネート中の IL-1 β サイトカインレベルを示すグラフ。データは平均 $\pm$ SEM として表される。 $\dagger p < 0.05$ 、 $\dagger\dagger p < 0.01$ 対アイソタイプ対照、対応のないスチューデント t 検定； $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 対陰性対照、対応のないスチューデント t 検定。

【図 14】15 日目の接触過敏症のヒト化マウスモデルの組織ホモジネート中の GM-CSF サイトカインレベルを示すグラフ。データは平均 $\pm$ SEM として表される。 $\dagger p < 0.05$ 、 $\dagger\dagger p < 0.01$ 対アイソタイプ対照、対応のないスチューデント t 検定； $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 対陰性対照、対応のないスチューデント t 検定。

20

【図 15】15 日目の接触過敏症のヒト化マウスモデルの組織ホモジネート中の IL-13 サイトカインレベルを示すグラフ。データは平均 $\pm$ SEM として表される。 $\dagger p < 0.05$ 、 $\dagger\dagger p < 0.01$ 対アイソタイプ対照、対応のないスチューデント t 検定； $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 対陰性対照、対応のないスチューデント t 検定。

【図 16】NHP 肺炎モデルを使用して実施した高親和性 huCD200-Fc 研究のタイムラインを示す概略図。カニクイザルを、ブタ回虫 (*Ascaris suum*) 抗原に対する既存の感受性についてスクリーニングし、0 日目に、静脈内での 20mg/kg の高親和性 huCD200-Fc (DS-118) ($n=6$)、ビヒクル対照 ($n=6$) 及び静脈内での 1mg/kg のデキサメタゾン ($n=4$) を投与した。すべての動物を、+1 日目に 5000 μ g/ml の気管支内ブタ回虫抗原で曝露した。

30

【図 17】+2 日目（曝露の 24 時間後、薬物処置の 48 時間後）にフローサイトメトリーによって測定された BAL 液中のリンパ球レベルを示すグラフ。

【図 18】曝露直前と比較した、ブタ回虫抗原曝露直後の気道抵抗の変化を示すグラフ。投与前の測定を (huCD200-Fc 投与に対して) -1 日目に、投与後の測定を +1 日目に行った。

【図 19A】U937 細胞アッセイにおいて様々な用量の DS-192 (huCD200-IgG4-Fc) と共インキュベートした場合の CD64 (Fc γ RI) Fc γ 受容体活性を認識する 100 μ g/ml 抗体を示すグラフ。

【図 19B】U937 細胞アッセイにおいて様々な用量の DS-192 (huCD200-IgG4-Fc) と共インキュベートした場合の CD64 (Fc γ RI) Fc γ 受容体活性を認識する 0 μ g/ml の抗体を示すグラフ。

40

【図 19C】U937 細胞アッセイにおいて様々な用量の DS-192 (huCD200-IgG4-Fc) と共インキュベートした場合の CD16 (Fc γ RII) Fc γ 受容体活性を認識する 100 μ g/ml の抗体を示すグラフ。

【図 19D】U937 細胞アッセイにおいて様々な用量の DS-192 (huCD200-IgG4-Fc) と共インキュベートした場合の CD16 (Fc γ RII) Fc γ 受容体活性を認識する 0 μ g/ml 抗体を示すグラフ。

【図 19E】U937 細胞アッセイにおいて様々な用量の DS-192 (huCD200-IgG4-Fc) と共インキュベートした場合の CD32 (Fc γ RII) Fc γ 受

50

容体活性を認識する100 μg/mLの抗体を示すグラフ。

【図19F】U937細胞アッセイにおいて様々な用量のDS-192 (h a C D 2 0 0 - I g G 4 F c) と共インキュベートした場合のCD32 (F c γ R I I) F c γ 受容体活性を認識する0 μg/mL抗体を示すグラフ。

【図20A】DS-118及び2つの異なるロットのDS-192の、ヒトPBMCへの結合を示すグラフ。

【図20B】DS-118及び2つの異なるロットのDS-192の、カニクイザルPBMCへの結合を示すグラフ。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明の第1の態様によれば、

(i) アミノ酸残基130位及び131位に、K130Y及びI131Yである変異を含む変異CD200部分；並びに

(ii) IgG4 Fc断片であり、EUナンバリングシステムに従ったS228P変異及びヒンジの最初の5アミノ酸の欠失を含む非CD200部分、を含む融合タンパク質であって、

変異CD200部分のグリシン232が、IMGTナンバリングシステムに従ったアミノ酸6で非CD200 IgG4 Fc断片に直接融合される、融合タンパク質が提供される。

【0021】

本発明者らは、これらのアミノ酸残基におけるCD200の細胞外ドメインにおける変異が、CD200受容体(CD200R)に対する結合親和性が増加した変異CD200部分を生じることを見出した。さらに、本明細書に記載される変異CD200部分を含む融合タンパク質は、特に、より高い臨床的有効性を有し、より低い用量での処置を提供することに関して、有意な利益を有する。

【0022】

したがって、特定の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列を含む。さらなる実施形態では、融合タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列から成る。さらなる実施形態では、融合タンパク質はDS-118である。

【0023】

配列番号1 (本明細書では「DS-118」とも呼ばれる) は、以下の配列から成る。

【0024】

10

20

30

40

50

【化 1】

QVQVVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKKKAV
SPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQNSTITFWN
ITLEDEGCYMCLENTFGFGYYSGTACLTVYVQPIVSLHY
KFSEDHLNITCSATARPAPMVFWKVPRSGIENSTVTL SHP
NGTTSVTSILHIKDPKNQVGKEVICQVLHLGTVTDFKQTV
NKGPPCP**PC**PAPEFLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQE
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

10

20

【0025】

太字のアミノ酸は、野生型CD200又はIgG4Fcに対する変異の位置を表し、下線の配列は、非CD200Fc断片を表す。

1つの実施形態では、DS-118は、ヒトIgG鎖シグナルペプチドであるN末端シグナル配列をさらに含み得る。さらなる実施形態では、N末端シグナル配列は、MEFGLSWLFLVAILKGVQC（配列番号3）のアミノ酸配列から成る。

【0026】

本明細書で使用される「CD200タンパク質」という用語は、野生型CD200タンパク質を指す。

30

本明細書で使用される「野生型」という用語は、自然界に存在するタンパク質、ペプチド、アミノ酸、及びヌクレオチドの配列を指す。例えば、本明細書で使用される「野生型CD200タンパク質」という用語は、CD200受容体（CD200R）に結合するCD200の全長アイソフォーム（UNIPROT P41217 OX2G_HUMAN）又はその任意の部分（天然に存在するタンパク質多型を含む）を指す。CD200タンパク質はまた、OX-2膜糖タンパク質として知られている。

【0027】

野生型CD200は細胞表面タンパク質であり、N末端の細胞外ドメイン、並びに短い膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを有する。細胞外ドメインは、CD200受容体などの標的受容体に結合する。1つの実施形態では、CD200タンパク質は、CD200受容体に結合するCD200の細胞外ドメイン又はその任意の部分である。

40

【0028】

本明細書で使用される「位」という用語は、アミノ酸配列中の残基番号を指し、1は最初に翻訳されたアミノ酸である。したがって、本明細書で定義されるCD200部分内のアミノ酸位置のナンバリングは、CD200部分の最初の30アミノ酸を表すN末端シグナル配列を含むアミノ酸配列（配列番号2で太字で示される）に対するものであることが理解される。

【0029】

本明細書で使用される「変異した」又は「変異型」という用語は、野生型同等物から形が変化して変異型となったタンパク質、ペプチド、アミノ酸、及びヌクレオチドの配列を

50

指す。例えば、変異した又は変異型タンパク質は、対応する野生型配列と比較した場合、アミノ酸配列及び／又はヌクレオチド配列に変化が生じている可能性があり、このような変化は変異とも呼ばれ得る。

【0030】

本明細書における「変異CD200タンパク質」及び「変異CD200部分」への言及は、野生型CD200タンパク質と類似しているがもはや同一ではなくなるように、アミノ酸配列において変異アミノ酸残基又は複数の変異アミノ酸残基を含む、CD200受容体に結合する全長CD200タンパク質又はその任意の部分を目指す。本明細書で定義される本発明の第1の態様によれば、変異CD200部分は、K130Y変異及びI131Y変異を含む。したがって、1つの実施形態では、変異は置換変異である。

10

【0031】

1つの実施形態では、融合タンパク質は、合成的に又は組換え的に作製され得る。さらなる実施形態では、融合タンパク質は、合成的に作製され得る。代替の実施形態では、融合タンパク質は、組換え的に作製され得る。

【0032】

1つの実施形態では、変異CD200部分は、野生型CD200よりも高い親和性でCD200受容体に結合する。

1つの実施形態では、変異CD200タンパク質は、CD200の細胞外ドメイン全体又はその部分を含み得る。さらなる実施形態では、変異CD200タンパク質は、シグナル配列を含む。分泌されたタンパク質は、分泌前に切断されてもよいシグナル配列を構成する、いくつかのアミノ酸をN末端に含んでいることが理解される。したがって、特定の実施形態では、変異CD200部分は、N末端シグナル配列を含む。1つの実施形態では、変異CD200タンパク質は、産生細胞から分泌される前に切断されるシグナル配列をN末端に含む。さらなる実施形態では、シグナル配列は、野生型CD200タンパク質の最初の30アミノ酸を含む。さらなる実施形態では、シグナル配列は、CD200部分の最初の30アミノ酸を表す。さらなる実施形態では、シグナル配列は配列番号3である。したがって、特定の実施形態では、融合タンパク質は、シグナル配列を含むアミノ酸を欠く、本明細書で定義される配列を含む。例えば、野生型CD200タンパク質のアミノ酸1～30を欠き、変異CD200タンパク質が、配列番号2のアミノ酸31～232に対応する配列を含む場合である。したがって、さらなる実施形態では、融合タンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列を含む。さらなる実施形態では、融合タンパク質は、配列番号1のN末端の配列番号3のアミノ酸配列から成る。

20

30

【0033】

配列番号2は、以下の配列から成る。

【0034】

40

50

【化 2】

MERLVIRMPF SHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQVVTQDE
REQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKKKAVSPENMVTFS
ENHGVVVIQPAYKDKINITQLGLQNSTITFWNITLEDEGCY
MCLFNTFGFGYYSGTACLT VYVQPIVSLHYKFSEDLNIT
CSATARPAPMVFWKVPRSGIENSTVTL SHPNGTTSVTSIL
HIKDPKNQVGKEVICQVLHLGT VTD FKQTVNKGPPCPPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP E VTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYT
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLGLGK

10

20

【0035】

太字のアミノ酸はシグナル配列を表し、強調されたアミノ酸は野生型CD200又はIgG4Fcに対する変異の位置を表し、下線の配列は非CD200Fc断片を表す。本開示はまた、開示されるタンパク質配列であるが、C末端リジンを欠くタンパク質配列、例えば、C末端リジン（K）が哺乳動物細胞からの分泌の間に切断されたタンパク質を含む。

【0036】

1つの実施形態では、配列番号2のアミノ酸配列を有する融合タンパク質は、配列番号4のポリヌクレオチドによってコードされる。遺伝暗号の縮重が存在すること、すなわち、ほとんどのアミノ酸が2つ以上のコドンによって特定されることに留意することが重要である。したがって、多数の異なるコドンが同じアミノ酸を規定するので、複数のポリヌクレオチド配列が同じアミノ酸配列をコードし得る。したがって、配列番号4は、配列番号2のアミノ酸配列を有する融合タンパク質をコードすることができるポリヌクレオチド配列の1つの例示的な並べ替えを表す。本願において記載されたすべての要素の任意の並べ替え及び組合せは、文脈が他に示さない限り、本願の記載によって開示されたものとみなされるべきである。

30

40

50

ATGGAACGGCTGGTCATCAGAAATGCCCTTTCAGCCACCTGT
CCACCTACAGCCTCGTTTGGGTATGGCCGCGCGTGGTGCT
GTGTACAGCTCAGGTTTCAGGTGGTCACCCAGGACGAGAGA
GAGCAGCTGTATACCCCTGCCTCTCTGAAGTGCTCCCTGC
AGAAATGCTCAAGAGGCCCTGATCGTGACCTGGCAGAAAGAA
GAAGGCTGTCTCCCTGAGAACATGGTCACTTCTCTGAG
AACCAACGGCGTCTGTGATCCAGCCTGCCTACAAGGACAAGA
TCAACATCACACAGCTGGGCCTGCAGAACTCCACCATCAC
CTTTTGGAAACATCACCCCTGGAAGATGAGGGGCTGCTACATG
TGCCTGTTCAACACCTTCGGCTTCGGCTACTACTCTGGCA
CCGCTTGTCTGACCGTGTAACGTGCAGCCTATCGTGTCCT
GCACTACAAGTTCTCCGAGGATCACCTGAATATCACCTGT

T C C G C C A C C G C C A G A C C T G C T C C T A T G G T G T T T T G G A A G G
T G C C C A G A T C C G G C A T C G A G A A C A G C A C C G T G A C A C T G T C
T C A C C C T A A C G G C A C C A C C T C C G T G A C C T C C A T C C T G C A C
A T C A A G G A C C C C A A G A A T C A A G T G G G C A A A G A A A G T G A T C T
G T C A G G T C C T G C A C C T G G G C A C A G T G A C C G A T T T C A A G C A
G A C C G T G A A C A A G G G A C C T C C T T G T C C T C C A T G T C C G G C G
C C A G A A T T T C T C G G C G G A C C C T C T G T G T T C C T G T T T C C T C
C A A A G C C T A A G G A C A C C C T G A T G A T C T C T C G G A C C C C T G A
A G T G A C C T G C G T G G T G G T G G A T G T G T C T C A A G A G G A C C C C
G A G G T G C A G T T C A A T T G G T A C G T G G A C G G C G T G G A A G T G C
A C A A C G C C A A G A C C A A G C C T A G A G A G G A A C A G T T C A A C T C
C A C C T A C A G A G T G G T G T C C G T G C T G A C C G T G C T G C A C C A G
G A T T G G C T G A A C G G C A A A G A G T A C A A G T G C A A G G T G T C C A
A C A A G G G C C T G C C T T C C A G C A T C G A A A A G A C C A T C T C C A A
G G C T A A G G G C C A G C C T C G G G A A C C T C A G G T T T A C A C C C T G
C C T C C A A G C C A A G A G G A A A T G A C C A A G A A C C A G G T G T C C C
T G A C C T G C C T G G T C A A G G G C T T C T A C C C T T C C G A C A T T G C
C G T G G A A T G G G A G T C C A A T G G C C A G C C T G A G A A C A A C T A C
A A G A C C A C A C C T C C T G T G C T G G A C T C C G A C G G C T C C T T C T
T T C T G T A C T C T C G C C T G A C C G T G G A C A A G T C T A G G T G G C A
A G A G G G C A A C G T G T T C T C C T G C T C T G T G A T G C A C G A G G C C
C T G C A C A A C C A C T A C A C C C A G A A G T C C C T G T C T C T G T C C C
T G G G C A A G T G A T G A (配列番号4)。

10

20

30

40

50

【0037】

タンパク質、ペプチド、及びアミノ酸、並びにヌクレオチドの配列に関連して本明細書で使用される「部分」という用語は、機能的、すなわち標的に結合する断片及び誘導体を指す。

【0038】

本明細書で使用される「断片」という用語は、受容体などのその標的を認識し結合するタンパク質、ペプチド、アミノ酸、又はヌクレオチドの配列の一部を指す。

本明細書で使用される「誘導体」及び「変異体」という用語は、野生型同等物と少なくとも70%（75%、80%、85%、90%、95%、又は99%など）の配列類似性を有し、同様に機能する、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、又はヌクレオチドの配列を指す。したがって、変異体は、野生型の誘導体であってもよい。

【0039】

本明細書で使用される「アミノ酸残基」という用語は、重合体鎖中の単量体単位、すなわちタンパク質中の単一アミノ酸を指す。

本明細書に提示されるデータによって示すように、本発明の変異CD200タンパク質／部分は、野生型CD200タンパク質よりもCD200受容体に対してより強固に結合し、受容体上でより長い滞留時間を示す。

【0040】

融合タンパク質

本明細書に定義される本発明の第1の態様によれば、非CD200部分に融合された本明細書に定義される変異CD200タンパク質／部分を含む融合タンパク質が提供される。

【0041】

本明細書で使用される「融合タンパク質」という用語は、当技術分野で周知であり、例えば米国特許第5,434,131号及び第5,637,481号に記載の方法を使用して連結された1つ以上のアミノ酸配列、ペプチド、及び／又はタンパク質を指す。これにより連結されたアミノ酸配列、ペプチド、又はタンパク質は、1つの融合タンパク質を形

成する。

【0042】

いくつかの実施形態では、本明細書で定義される変異CD200タンパク質／部分は、C末端で非CD200部分に融合される。したがって、1つの実施形態では、N末端からC末端への融合タンパク質の配向は、変異CD200部分－非CD200 Fc断片である。したがって、さらなる実施形態では、融合タンパク質の配向は、変異CD200部分－IgG4 Fc断片である。別の実施形態では、N末端からC末端への融合タンパク質の配向は、シグナル配列－変異CD200部分－非CD200 Fc断片である。したがって、さらなる実施形態では、融合タンパク質の配向は、シグナル配列－変異CD200部分－IgG4 Fc断片である。

10

【0043】

本明細書で使用される「非CD200部分」という用語は、CD200受容体に特異的に結合せず、変異CD200タンパク質のその標的への結合を妨害しない分子、ペプチド、又はタンパク質を指し得る。例としては、免疫グロブリン(Ig)定常領域若しくはその部分、又は非CD200部分が、合成分子、例えばPEGである融合タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0044】

1つの実施形態では、前記非CD200部分は抗体断片である。特定の実施形態では、前記非CD200部分はFc断片である。したがって、本明細書に記載された変異したCD200融合タンパク質は、変異型CD200－Fcとも呼ぶことができる。さらなる実施形態では、Fc断片は哺乳動物由来、例えばヒト又はサル由来であり、例えば、ヒンジ、CH2、及びCH3領域を含むヒトC(γ)1である。特に、Fc断片はヒンジ領域を含む。Fc断片は、本発明の変異したCD200タンパク質の血清中半減期を増加させるという利点を提供し、さらに、CD200タンパク質を2量化することにより、結合活性を増加させ、作動性シグナル伝達を可能にする。エフェクター機能を低下させるためにFc領域を変異させてもよいことは、当業者には理解される(例えば、US5,637,481及びUS6,132,992を参照)。

20

【0045】

1つの実施形態では、Fc断片はIgG4 Fc断片である。

さらなる実施形態では、非CD200部分は、1つ以上のアミノ酸残基の変異を含む抗体Fc断片である。したがって、特定の実施形態では、非CD200部分はIgG4 Fc断片であり、S228P変異を含み、前記変異の位置はEUナンバリングシステムに従う。したがって、1つの実施形態では、非CD200 Fc断片は、ヒトIgG4のS228P誘導体である。S228P変異は、抗体におけるFabアーム交換を防止する。したがって、本明細書に記載されるFc断片におけるS228P変異の存在は、インビロ及びインビトロの両方で融合タンパク質の安定性を増大させ、治療有効性及び製造可能性の改善をもたらす可能性が高い。さらなる実施形態では、非CD200 IgG4 Fc断片は、最初の5アミノ酸、例えば、前記IgG4 Fc断片のヒンジ領域の最初の5アミノ酸の欠失を含む。したがって、1つの実施形態では、非CD200部分はIgG4 Fc断片であり、EUナンバリングシステムに従ったS228P変異及びヒンジの最初の5アミノ酸の欠失を含む。さらなる実施形態では、非CD200部分は、IgG4 Fc断片であり、S228P及びFcヒンジ領域の最初の5アミノ酸の欠失を含む。

30

40

【0046】

1つの実施形態では、融合タンパク質は、変異CD200部分の非CD200 Fc断片への直接融合によって形成される。したがって、そのような融合は、変異CD200部分と非CD200 Fc断片との間にリンカー配列を含まないことが理解される。例えば、変異CD200部分のアミノ酸グリシン232は、Fcヒンジ領域のアミノ酸1に直接融合され得る。別の実施形態では、融合タンパク質は、変異CD200部分のアミノ酸グリシン232の、IgG4 Fc断片のアミノ酸6への直接融合によって形成される(この場合、Fcヒンジ領域の最初の5アミノ酸は、本明細書において前に記載されたように

50

欠失される)。さらなる実施形態では、直接融合は、変異CD200部分のアミノ酸グリシン232の、前記IgG4Fc断片のFcヒンジ領域のアミノ酸6への融合である。したがって、1つの実施形態では、変異CD200部分のグリシン232は、Fcヒンジ領域のアミノ酸6で非CD200Fc断片に直接融合される。これらの実施形態によれば、前記融合物のFc断片中の位置は、IMGTナンバリングシステムに従う。IgG4Fc断片ヒンジ領域のアミノ酸6への変異CD200部分のそのような直接融合は、リンカー配列を含む融合タンパク質と比較して、CD200Rへの強力な結合に影響を及ぼすことなく、得られる融合タンパク質の安定性を増大させる。この結果は、リンカー配列を含むFc融合タンパク質について以前に報告されたデータを考慮すると驚くべきことである。

10

【0047】

この説明のために、前記非CD200部分がFc断片である場合、非CD200部分内の変異に関して本明細書で使用される「位置」という用語は、EUNナンバリングシステムに従ったアミノ酸配列における残基番号を意味する。したがって、本明細書で引用するFc断片のアミノ酸の変異残基位置は、EUNナンバリングシステムに従った位置に関することが理解される。さらに、Kabatt、Aho、IMGT、Chothia、及びMartin (enhanced Chothia) などのFc断片配列中の残基のナンバリングのために開発された他のナンバリングシステムを代わりに利用してもよいことが理解される。変異CD200部分が非CD200Fc断片に融合される点に関して本明細書で使用される場合、「位置」は、IMGTナンバリングシステムに従ったFc断片内の残基番号を指す。したがって、Fc断片ヒンジのアミノ酸の残基位置は、IMGTナンバリングシステムによるその位置に関連することが理解される。したがって、Fc断片内の変異の本明細書におけるナンバリングは、EUNナンバリングシステムを指し、ヒンジアミノ酸のナンバリングは、IMGTナンバリングシステムを指す。いくつかの実施形態では、変異CD200部分のグリシン232は、EUNナンバリングシステムに従った、Fc断片のIgG4重鎖のアミノ酸224で非CD200Fc断片に直接融合される。

20

【0048】

本発明のタンパク質は、好ましくは、CD200-Fc融合タンパク質又はその任意の部分をコードする核酸配列を組換え発現ベクターに挿入し、発現を促進する条件下で組換え発現系において核酸配列を発現させることにより、組換えDNA法によって産生される。したがって、1つの実施形態では、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはさらに、pCDNA3.1などのベクターを含む。1つの実施形態では、融合タンパク質は、1つ以上の制限酵素部位に隣接する。別の実施形態では、CD200-Fc融合タンパク質又はその任意の部分をコードする核酸配列は、融合クローニングを使用して組換え発現ベクターに挿入される。したがって、さらなる実施形態では、CD200-Fc融合タンパク質又はその任意の部分をコードする核酸は、その末端に、CD200-Fc融合タンパク質をコードする核酸と12～21塩基対/ヌクレオチドのベクターとの間の重複、例えば、15塩基対の重複又は20塩基対の重複などの、線状化ベクターの末端のものに相補的な核酸配列を含む。

30

【0049】

本発明のさらなる態様によれば、本明細書で定義される融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドが提供される。本開示は、本明細書で定義されるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、並びにタンパク質を産生するための、及び/又は治療目的のためのそのような核酸の使用を含む。そのようなポリヌクレオチドは、本明細書で定義されるタンパク質をコードするDNA及びRNA分子(例えば、mRNA、自己複製RNA、自己増幅mRNAなど)を含むことができる。本発明によって提供されるタンパク質をコードする核酸配列は、cDNA断片及び短いオリゴヌクレオチドリンカーから、又は一連のオリゴヌクレオチドから組み立てられて、組換え発現ベクターに挿入され、組換え転写ユニットで発現させることができる合成遺伝子を提供することができる。1つの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号1のアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする。さ

40

50

らなる実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号1のアミノ酸配列から成る融合タンパク質をコードする。さらなる実施形態では、ポリヌクレオチドは、DS-118をコードする。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする。さらなる実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸配列から成る融合タンパク質をコードする。例示的なポリヌクレオチド配列は、配列番号4に提供される。

【0050】

組換え発現ベクターは、哺乳動物、微生物、ウイルス、又は昆虫遺伝子に由来する適切な転写又は翻訳調節エレメントと作動可能に連結された、変異したCD200をコードする合成又はcDNA由来核酸断片を含む。そのような調節エレメントは、転写プロモーター、転写を制御する任意のオペレーター配列、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、並びに転写及び翻訳の終結を制御する配列を含む。通常、複製起点によって与えられる宿主での複製能力、及び形質転換体の認識を容易にするための選択遺伝子をさらに組み込むこともできる。

10

【0051】

治療的使用

CD200タンパク質とCD200受容体との間の相互作用は、CD200受容体に対するCD200の低い親和性をもたらす速い解離（「オフ」）速度という特徴があるため、本発明は治療において特に適用が可能である。したがって、本明細書に提示されるように、CD200受容体に対する変異型CD200タンパク質及びその部分を含む融合タンパク質の親和性を増加させることは、より強力な特性を有する医薬組成物の製造において使用することができる。

20

【0052】

さらに、組換えタンパク質の製造コストは高く、高い親和性を有する変異型CD200タンパク質／その部分を含む融合タンパク質は、治療効果を得るために野生型又は変異していないCD200タンパク質よりも有意に低い用量で医薬組成物に使用することができる。したがって、変異型CD200タンパク質／その部分を含む融合タンパク質の使用は、臨床的により有効であることに加えて、より費用効果が高い可能性がある。

【0053】

本発明のさらなる態様によれば、本明細書で定義される融合タンパク質を含む医薬組成物が提供される。1つの実施形態では、医薬組成物は、配列番号1のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。さらなる実施形態では、医薬組成物は、配列番号1のアミノ酸配列から成る融合タンパク質を含む。さらなる実施形態では、医薬組成物はDS-118を含む。

30

【0054】

1つの実施形態では、本明細書で定義される変異CD200タンパク質又は融合タンパク質は、CD200受容体のモジュレーターである。本明細書で使用される「モジュレーター」という用語は、変化をもたらす物質を指し、例えば、タンパク質のモジュレーターは、前記タンパク質の活性の増加又は減少をもたらすことができる。本発明の変異したCD200タンパク質及び融合タンパク質の特性を考慮すると、これらはCD200受容体のアゴニストであり、したがって、自己免疫疾患の処置において有用であると考えられる。したがって、さらなる実施形態では、本明細書で定義される変異したCD200タンパク質又は融合タンパク質は、CD200受容体のアゴニストである。

40

【0055】

したがって、本発明のさらなる態様によれば、自己免疫疾患の治療において使用するための、本明細書で定義される融合タンパク質又は本明細書で定義される組成物が提供される。

【0056】

本明細書で使用される「自己免疫疾患」又は「自己免疫異常」という用語は、互換的に使用され、自己細胞及び／又は組織、あるいは移植された細胞及び／又は組織に対する不

50

適切又は望ましくない免疫反応から生じる望ましくない状態を指す。「自己免疫疾患」又は「自己免疫異常」という用語は、体液性免疫応答又は細胞性免疫応答によって媒介されるかを問わず、そのような状態を含むことを意味する。

【0057】

代替の実施形態では、アレルギー性疾患の処置において使用するための、本明細書で定義される融合タンパク質又は本明細書で定義される医薬組成物が提供される。本明細書で使用される「アレルギー」又は「アレルギー性疾患」という用語は、互換的に使用され、主にT H 2細胞の活性から発症するTヘルパー2 (T H 2) 駆動性の疾患を指す。アレルギー性疾患の例としては、慢性アレルギー性疾患 (枯草熱又はアレルギー性鼻炎など)、アレルギー性接触皮膚炎、季節性アレルギー、アナフィラキシー、及び食物アレルギーが挙げられる。

10

【0058】

本明細書で定義される変異型C D 2 0 0タンパク質／部分を含む融合タンパク質は、野生型又は変異していないC D 2 0 0タンパク質を含む融合タンパク質よりも高い効率で活性化免疫細胞を不活性化することができる。

【0059】

1つの実施形態では、自己免疫疾患は、神経筋系、血管系、眼、皮膚、消化管、肺、腎臓、肝臓、末梢神経系若しくは中枢神経系、骨、軟骨、又は関節に影響を及ぼす自己免疫疾患から選択される。

【0060】

さらなる実施形態では、自己免疫疾患は、急性播種性脳脊髄炎 (A D E M) ; 急性壊死性出血性白質脳炎; アジソン病; 無γグロブリン血症; 円形脱毛症; アミロイドーシス; 強直性脊髄炎; 抗G B M / 抗T B M腎炎; 抗リン脂質抗体症候群 (A P S) ; 喘息、アトピー性皮膚炎; 自己免疫性血管性浮腫; 自己免疫性再生不良性貧血; 自己免疫性自律神経障害; 自己免疫性肝炎; 自己免疫性高脂血症; 自己免疫性免疫不全; 自己免疫性内耳疾患 (A I E D) ; 自己免疫性心筋炎; 自己免疫性卵巣炎; 自己免疫性脾炎; 自己免疫性網膜症; 自己免疫性血小板減少性紫斑病 (A T P) ; 自己免疫性甲状腺疾患; 自己免疫性蕁麻疹; 軸索及び神経性ニューロパチー; バロー病; ベーチェット病; 水疱性類天疱瘡及び関連する自己免疫水疱形成疾患; 心筋症; キャッスルマン病; セリアック病 (難治性セリアック病I I型など) ; シャーガス病; 特発性慢性蕁麻疹; 慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー (C I D P) ; 慢性再発性多発性骨髄炎 (C R M O) ; 慢性特発性蕁麻疹; チャーグーストラウス症候群; 瘢痕性類天疱瘡 / 良性粘膜天疱瘡; クローン病; コーガン症候群; 寒冷凝集素症; 先天性心伝導障害; コクサッキー心筋炎; C R E S T病; 特発性混合クリオグロブリン血症; 脱髄性ニューロパチー; 疱疹状皮膚炎; 皮膚筋炎; デビック病 (視神経脊髄炎) ; 糖尿病性ニューロパチー; 円板状エリテマトーデス; ドレスラー症候群; 子宮内膜症; 好酸球性食道炎; 好酸球性筋膜炎; 結節性紅斑; 実験的アレルギー性脳脊髄炎; エヴァンス症候群; 線維化肺肺炎; 巨細胞性動脈炎 (側頭動脈炎) ; 巨細胞性心筋炎; 糸球体腎炎; グッドパスチャー症候群; 多発血管炎性肉芽腫症 (G P A) (以前はウェゲナー肉芽腫症と呼ばれていた) ; 移植片対宿主病; (G v H D) ; グレーブス病; ギランバレー症候群; 橋本病; 溶血性貧血; ヘノッホーシェーンライン紫斑病; 妊娠性疱疹; 低γグロブリン血症; 化膿性汗腺炎 (H i d r a d e n i t i s s u p p o r a t i v a) (H S) ; 特発性血小板減少性紫斑病 (I T P) ; I g Aニューロパチー; I g G 4関連硬化性疾患; 免疫調節性リポタンパク質; 封入体筋炎; 炎症性腸疾患 (I B D) ; 炎症性皮膚疾患; 間質性膀胱炎; 若年性関節炎; 若年性糖尿病 (1型糖尿病) ; 若年性筋炎; 川崎病; ランバートーイトン症候群; 白血球破碎性血管炎; 扁平苔癬; 硬化性苔癬; 木質性角結膜炎; 線状I g A病 (L A D) ; ループス (S L E) ; ライム病、慢性; マクロファージ活性化症候群 (M A S) ; 肥満細胞症; メニエール病; 顕微鏡的多発血管炎; 混合性結合組織病 (M C T D) ; モーレン潰瘍; ムッハーハーベルマン病; 多発性硬化症; 重症筋無力症; 筋炎; ナルコレプシー; 視神経脊髄炎 (デビック) ; 好中球減少症; 眼瘢痕性類天疱瘡; 視神経炎; 回帰性リウマチ; P A N D A S (溶連菌感染症関連小児自

20

30

40

50

己免疫性精神神経疾患)；傍腫瘍性小脳変性症；発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH)；掌蹠膿疱症(PPP)；パリー-ロンベルク症候群；パーソンネジ-ターナー症候群；扁平部炎(周辺部ブドウ膜炎)；天疱瘡；末梢性ニューロパチー；静脈周囲性脳脊髄炎；悪性貧血；POEMS症候群；結節性多発動脈炎；1型、2型、及び3型多腺性自己免疫症候群；リウマチ性多発筋痛症；多発性筋炎；心筋梗塞後症候群；心膜切開後症候群；プロゲステロン皮膚炎；原発性胆汁性肝硬変；原発性硬化性胆管炎；乾癬；乾癬性関節炎；特発性肺線維症；壊疽性膿皮症；赤芽球瘍；レイノー現象；反応性関節炎；反射性交感神経性ジストロフィー；ライター症候群；再発性多発性軟骨炎；下肢静止不能症候群；後腹膜線維症；リウマチ熱；関節リウマチ；類肉腫症；シュミット症候群；強膜炎；強皮症；シェーグレン症候群；精液精巣自己免疫；全身硬直症候群；亜急性細菌性心内膜炎(SBE)；Susac症候群；交感性眼炎；高安動脈炎；側頭動脈炎／巨細胞性動脈炎；血小板減少性紫斑病(TTP)；トロサー-ハント症候群；横断性脊髄炎；1型糖尿病；潰瘍性大腸炎；未分化結合組織病(UCTD)；ブドウ膜炎；脈管炎；小胞水疱性皮膚病；白斑；及びウェゲナー肉芽腫症(現在、多発血管炎性肉芽腫症(GPA)と呼ばれている)から選択される1つ以上の自己免疫疾患である。

10

【0061】

代替の実施形態では、神経変性の治療において使用するための、本明細書で定義されるタンパク質若しくは融合タンパク質又は本明細書で定義される組成物が提供される。

さらなる代替の実施形態では、神経障害性疼痛及び炎症性関節痛の処置に使用するための、本明細書で定義されるタンパク質若しくは融合タンパク質又は本明細書で定義される組成物が提供される。

20

【0062】

本発明のさらなる態様によれば、本発明の融合タンパク質を、少なくとも1つの自己免疫疾患、アレルギー性疾患、神経変性、神経障害性疼痛、炎症性関節痛、又は糖尿病性ニューロパチーを有する対象に投与することを含む、対象における自己免疫疾患、アレルギー性疾患(例えば、関節リウマチ、喘息、又はアトピー性皮膚炎)、神経変性、神経障害性疼痛、炎症性関節痛、又は糖尿病性ニューロパチーを処置する方法が提供される。

【0063】

本発明のタンパク質又は融合タンパク質は、単独の治療剤として投与することができるか、又は自己免疫疾患、アレルギー性疾患(例えば、慢性関節リウマチ、喘息、又はアトピー性皮膚炎)、神経変性、神経障害性疼痛、炎症性関節痛、又は糖尿病性ニューロパチーの処置のための1つ以上の他の化合物(又は治療)との併用療法で投与することができることが理解される。

30

【0064】

したがって、本発明のさらなる態様によれば、本明細書で定義される融合タンパク質を、1つ以上の治療薬と組み合わせて含む医薬組成物が提供される。

自己免疫疾患、アレルギー性疾患(例えば、関節リウマチ、喘息、又はアトピー性皮膚炎)、神経変性、神経障害性疼痛、炎症性関節痛、又は糖尿病性ニューロパチーの処置のために、本発明の融合タンパク質は、1つ以上の他の薬剤と、より具体的には、免疫抑制療法において1つ以上の免疫抑制剤又はアジュバントと組み合わせて有利に使用され得る。

40

【0065】

本発明の化合物と一緒に(同時又は異なる時間間隔で)投与することができる治療薬又は治療法の例としては、アザチオプリン、メトトレキサート、シクロスポリン、モノクローナル抗体(例えば、バシリキシマブ、ダクリズマブ、及びムロモナブ)、及びコルチコステロイドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0066】

本発明の組合せに存在する治療薬の各々は、個々に異なる用量スケジュール及び異なる経路で投与することができる。さらに、2つ以上の各々の用法用量は異なってもよく、各々は、同時に投与することができ、又は異なる時間に投与することができる。当業者

50

であれば、一般的な知識を通じて、使用する投与計画及び併用療法を理解している。例えば、本発明のタンパク質又は融合タンパク質は、既存の併用投与計画に従って投与される1つ以上の薬剤と組み合わせて使用することができる。

【0067】

一般に、本明細書に開示されたタンパク質は、薬理学的に適切な賦形剤又は担体と一緒に精製された形態で利用される。典型的には、これらの賦形剤又は担体は、生理食塩水及び／又は緩衝媒体を含む、水性又はアルコール性／水性溶液、エマルジョン又は懸濁液を含む。非経口ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース、及び塩化ナトリウム、並びに乳酸リンゲルが挙げられる。ポリペプチド複合体を懸濁液中に保持することが必要な場合、適切な生理学的に許容されるアジュバントは、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、及びアルギン酸塩などの増粘剤から選択され得る。

10

【0068】

本発明による医薬組成物の投与経路は、当業者に一般的に知られているもののいずれであってもよい。免疫療法を含むがこれに限定されない治療のために、本発明のタンパク質は、標準的な技術に従ってあらゆる患者に投与することができる。投与は、非経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、経皮、肺経路を介する、例えば、鼻腔内若しくは吸入、例えば、鼻腔内若しくは吸入、また、適切には、頭蓋内（例えば、中枢神経系脳室への i . c . v . 又は脊髄への i . t . ）などのカテーテルによる直接注入を含む、任意の適切な様式によるものであってもよい。投与量及び投与頻度は、患者の年齢、性別、及び状態、他の薬剤の同時投与、禁忌及び臨床医が考慮すべき他のパラメータによって異なる。

20

【0069】

本発明のタンパク質は、保存のために凍結乾燥し、使用前に適切な担体中で再構成することができる。この技術は効果的であることが示されており、凍結乾燥及び再構成技術として知られているものを用いることができる。凍結乾燥及び再構成によって活性を様々な程度に低下させることができ、それを補うためにレベルを上方調整しなければならない可能性があることは、当業者には理解される。

【0070】

本明細書に記載されるすべての実施形態は、本発明のすべての態様に適用されてもよく、その逆もまた同様であることが理解される。

30

本発明の他の特徴及び利点は、本明細書に提供される説明から明らかになる。しかしながら、様々な変更及び修正が当業者に明らかになるので、本発明の好ましい実施形態を示す説明及び特定の実施例は、例示としてのみ与えられることを理解されたい。以下の研究及びプロトコルは、本明細書に記載の方法の実施形態を示すものである。

【実施例】

【0071】

実施例 1： 変異型及び野生型 CD200-Fc 分子の産生

遺伝子合成及びクローニング

I g G 4 S 2 2 8 P F c の遺伝子合成（C H O 発現のためにコドン最適化された）を、Gene Artで行った。この構築物を、融合クローニングを使用してプラスミド p C D N A 3 . 1 にクローニングして、ベクター骨格を生成した。この骨格に、N 末端シグナル配列を含む U n i P r o t P 4 1 2 1 7 8 （O X 2 G _ _ H u m a n ）の変異体又は野生型ヒト C D 2 0 0 残基 1 ~ 2 3 2 をコードするコドン最適化 D N A 配列を、I g G 4 S 2 2 8 P F c の N 末端に挿入して、C D 2 0 0 のアミノ酸グリシン 2 3 2 の F c 領域への直接融合を作製した。配列は双方向で確認された。

40

【0072】

ギガブレップ

配列確認されたプラスミドを大腸菌 D H 5 α 細胞に形質転換した。各標的タンパク質の単一コロニーを選択し、アンピシリンを含む 1 0 . 0 m L の L B に接種した。各変異体又は野生型構築物を、ギガスケール D N A 調製のために 8 0 0 m L の C i r c l e g r o w

50

培地中に継代培養した。DNAを、Endotoxin Free Quanta Giga Kitを使用して単離した。

【0073】

タンパク質発現

CD200-Fcタンパク質は、ポリエチレンジイミン（PEI）を使用して、CHO-3E7細胞への発現プラスミドの一過性トランスフェクションによって生成した。簡潔には、CD-Forti CHO培地中で37℃に維持された密度 4.0×10^6 細胞/mLの250mL培養物を、1:5の比でPEIを使用して2mg/Lのプラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、培養物を32℃にシフトし、細胞に10%フィードC、グルタミン、グルコース、及び0.5M酪酸ナトリウムを供給して、タンパク質発現を増強した。バッチをモニタリングし、過剰発現されたCD200-Fcを含有する上清を、7日目に約75%の生存率で回収した。濾過した上清をタンパク質精製に供した。

10

【0074】

タンパク質精製

すべての精製手順は4℃で行った。培養回収物を、AKTA Pureプラットフォーム上、3mL/分の流速で、50mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl pH7.4で予め平衡化したMab Select SuReアフィニティークラム（5mL）にロードした。カラムを平衡化緩衝液で洗浄し、20mM酢酸ナトリウム、150mM NaCl pH3.5を使用して結合タンパク質を溶出した。溶出液を10v/v% 1M Tris pH8.0で中和し、SDS-PAGEによって分析した。CD200-Fcを含有する画分をプールし、5mLに濃縮し、AKTA Pureプラットフォーム上でゲル濾過クロマトグラフィー（HiLoad 16/600 Superdex-200 pgカラム）に供した。タンパク質を、50mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl pH7.4緩衝液系中で1.2mL/分で処理し、画分に回収した。SDS-PAGEによって分析されるようなCD200-Fc2量体を含有する画分をプールし、Amicon Ultra Centrificon（10kDa分子量カットオフ）を使用して1.33mg/mL（UV280nmで測定）に濃縮した。精製した材料をSEC-HPLC、LC-MS、及びEndoSafe LALカートリッジ試験に供して、それぞれタンパク質純度、分子量、及び内毒素含有量を評価した。最終試料を-80℃で保存した。

20

30

【0075】

実施例2：野生型及び変異型CD200-Fcタンパク質の結合解析

BIAcore実験はSyngene International Ltd.が行った（Biocon Park、Plot No2&3、Bommasandra Industrial Area、Bommasandra-Jigani Link Road、Bangalore-560099、India）。

【0076】

アッセイ原理

BIAcore装置は、光学的手法である表面プラズモン共鳴（SPR）を使用して、相互作用する2つの分子、この場合はCD200受容体（CD200R）に結合するCD200-Fcの結合特性を測定する。この技術では、チップ（センサー）上に捕捉された2つの相互作用分子のうち、第2の分子が溶液中で固定化されたパートナーの上を流れる場合、1つの分子の屈折率の変化を測定する。これらの実験では、CD200-Fcをチップ（センサー）表面に固定化し、水性緩衝液中の連続フロー条件下で、捕捉されたCD200-Fcの上にCD200Rを注入した。CD200R結合後のCD200-Fc屈折率の変化をリアルタイムで測定し、その結果を応答単位（RU）対時間でプロットしてセンサーグラムを作成した。

40

【0077】

装置及び試薬

実験はGE Healthcare BIAcore T200で行った。ヒト、カニ

50

クイザル、及びマウスのCD200Rタンパク質は、Creative Biomartから購入した（CD200R1-320H、CD200R1-3483C、CD200R1-3280M）。すべての測定は2度繰り返して行った。

【0078】

プロトコル

ヒトCD200構築物については、抗ヒトFc（GE Healthcare）を、製造業者の指示に従ってCytivaキット（BR100839）を使用して、アミンカップリングによってBIAcore CM5センサーチップ（Cytiva、BR100530）上に共有結合的に固定化し、8,000～11,000RUの固定化を標的とした。CD200-Fcタンパク質をランニング緩衝液（1×HBS-EP+pH7.4（Cytiva BR100669）、3mM EDTA及び0.05v/v%界面活性剤P20を含有するHEPES緩衝生理食塩水pH7.4中で0.5μg/mL～4μg/mLに希釈し、60秒の安定化時間で、固定化抗ヒトIgG Fc上に10μL/分で25～100秒間流した。35～250RUのCD200-Fcが捕捉され、より高いRUをカニクイザルCD200R結合実験に使用した。ヒトCD200R又はカニクイザルCD200Rを、緩衝液ブランク（0nM）と共に、ランニング緩衝液中で5つ以上の濃度（予想される親和性に応じて）に段階希釈し（3倍希釈）、捕捉リガンド上に30～50μL/分の流速で120秒間流し、続いてランニング緩衝液中で120～360秒間解離させた。分析温度は25℃であった。続いて、3M MgCl₂を30～90秒間、30μL/分の流速で流して表面を再生し、その後、60秒、ランニング緩衝液を流して表面を安定化させた。

【0079】

マウスCD200構築物については、ランニング緩衝液中で1μg/mLに希釈したmCD200R-Fc（Creative Biomart CD200R1-458M）を、固定化抗ヒトIgG Fc上に流し、CD200単量体を連続的に希釈して捕捉CD200R上に流した。他の詳細は上記の通りである。

【0080】

データ分析： 実験センサーグラムをBIAevaluationソフトウェア（GE Healthcare）で分析した。得られた曲線を、R_{max}及びRIを局所パラメータとして設定することによって1：1ラングミュア結合モデルに適合させた。標準的なパラメータ（例えば、リガンド濃度、時間）を使用した反応速度式を反復カーブフィッティングに使用した。適合の近さは、BIAevaluationソフトウェアにおいて製造業者によって提供されるアルゴリズムによって決定し、χ²値がR_{max}の10%未満であり、U値が15以下である場合にデータを受け入れた。

【0081】

【表1】

表1： BIAcore実験の過程で使用される試薬

シリアル番号	製品説明	供給業者	カタログ番号
1	ヒト抗体捕捉キット	Cytiva	BR100839
2	Series S Sensor Chip CM5	Cytiva	BR100530
3	組換えヒト CD200R、His-タグ	Creative Biomart	CD200R1-320H
4	組換え CynoCD200R、His-タグ	Creative Biomart	CD200R1-3483C
5	組換えヒト CD200、Fc-タグ	Creative Biomart	CD200-165H

【0082】

結果

結果（表 2 及び図 1 A ～ 1 B）は、本発明の変異 CD 200-Fc タンパク質（DS-118）が、野生型 CD 200-Fc（DS-155）よりも約 137 倍高い親和性でヒト CD 200 受容体に結合することを示す。表 2 にて一覧にしたオフ速度及び図 1 A ～ 1 B に示したセンサーグラムは、機能的細胞アッセイにおける効率的なアゴニズムと適合する速度である、DS-118 のオフ速度及び受容体上の半減期を実証する。さらに、表 3 及び図 2 A ～ 2 B の結果は、DS-118 がカニクイザル CD 200 R（cyno CD 200 R）に結合することができ、この融合タンパク質を標準的な毒性学的プロトコルで評価することが可能になることを示す。

【0083】

【表 2】

表 2： ヒト CD 200 R に対する野生型及び変異 CD 200-Fc 融合分子の
表面プラズモン共鳴（SPR）親和性（ K_D ）及び動態パラメータ（ k_a 、 k_d 、 $t_{1/2}$ ）

ID	変異	Fc	k_a (1/Ms)*	k_d (1/s)*	K_D (nM)*	$t_{1/2}$ (s)
DS-155	野生型	IgG4 S228P	1.83E+05	3.26E-02	178.7	21.14
DS-118	K130Y, I131Y	IgG4 S228P	2.31E+05	3.04E-04	1.3	2272.35

* k_a (1/Ms)、 k_d (1/s)、及び K_D (nM) は、2 回の実行の平均値である。

【0084】

【表 3】

表 3： Cyno CD 200 R に対する野生型及び変異 CD 200-Fc 融合分子の
表面プラズモン共鳴（SPR）親和性（ K_D ）及び動態パラメータ（ k_a 、 k_d 、 $t_{1/2}$ ）

ID	変異	Fc	k_a (1/Ms)*	k_d (1/s)*	K_D (nM)*	$t_{1/2}$ (s)
DS-155	野生型	IgG4 S228P	6.06E+04	5.86E-02	971	11.78
DS-118	K130Y, I131Y	IgG4 S228P	1.86E+05	3.80E-02	205.7	18.16

* k_a (1/Ms)、 k_d (1/s)、及び K_D (nM) は、2 回の実行の平均値である。

【0085】

実施例 3： 野生型及び変異型 CD 200-Fc タンパク質の細胞結合及び細胞活性化アッセイ

アッセイ原理

DS-118 のアゴニスト活性を実証するために、ヒト単球細胞株 U937（ATCC、CRL 1539）にヒト CD 200 R の cDNA を形質導入した。これらの細胞からの IL-6 を含むサイトカイン産生は、PMA で刺激し、次いで LPS で刺激することにより誘導した。

【0086】

細胞株の構築

シグナル配列を含む全長ヒト CD 200 R 遺伝子を、EF1 α プロモーターの下流の pCDH-EF1-ヒト CD 200 R-IRES-Puro レンチベクター（System Biosciences）にクローニングした。発現構築物を含有するレンチウイルス粒子を 293TN 産生細胞中で産生させ、PEG-it 試薬（System Biosciences）を使用して、製造業者の指示に従って濃縮した。

【 0 0 8 7 】

U937ヒト単球不死化細胞株に、Transducx及びMax Enhancer 試薬 (System Biosciences) を使用して、製造者の指示に従って、5～200の範囲のMOIでレンチウイルス粒子を形質導入した。形質導入されたU937細胞を、a) ビューロマイシン (第1の最適化されたビューロマイシン濃度を有する) を使用して選択し、b) フローサイトメトリーによって選別して、安定なポリクローナルCD200R発現株を生成した。CD200Rの発現は、フローサイトメトリーに加えてウエスタンブロットによって確認した。

【 0 0 8 8 】

サイトカイン放出 (IL-6、IL-8、及びTNF α 阻害) アッセイ

1 ウェルあたり50,000個のU937-CD200R細胞を96ウェルプレートに播種し、100nM PMAで72時間分化させた。分化後、PMA含有培地を新鮮な培地と交換し、2時間インキュベートした。CD200-Fc構築物をウェルに添加し、1時間インキュベートし、次いで、10ng/mL LPSの添加によって細胞を活性化し、さらに24時間インキュベートした。上清を回収し、市販のELISAキットを使用してELISAアッセイによりIL-6、IL-8、又はTNFについてアッセイした。

【 0 0 8 9 】

pERK阻害アッセイ

1 ウェルあたり50,000個のU937-CD200R細胞を24ウェルプレートに播種した。次いで、Fcブロックを30分間添加し、続いてCD200-Fc (DS-155又はDS-118) を添加し、37℃でさらに2時間インキュベートした。次いで、細胞をPMA (10nM) で20分間誘導した。インキュベーション後、細胞を迅速に収集し、1250rpmで5分間遠心分離した。上清を捨て、100 μ Lの固定緩衝液をペレットに添加し、4℃で15分間インキュベートした。次いで、細胞を1 $\times$ PBS+2% FBSで1回洗浄し、100 μ Lの90%メタノールで5分間ボルテックスしながら透過処理し、続いて1 $\times$ PBS+2% FBSでさらに洗浄した。1:1000の比の抗pERK抗体を45分間添加し、次いで2次抗体を4℃でさらに30分間添加した。細胞を再度洗浄し、フローサイトメーターでデータを取得した。

【 0 0 9 0 】

【 表 4 】

表4: pERKアッセイに使用する試薬

シリアル番号	試薬	製造業者	カタログ番号
1.	ヒト BD Fc ブロック	BD Biosciences	564220
2.	PMA	Sigma Aldrich	P1585
3.	ホスホ-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (E10) マウス mAb	Cell Signalling	9106S
4.	ヤギ抗ヒト IgG 2次抗体	Abcam	Ab98596
5.	固定緩衝液	BD Biosciences	554655

【 0 0 9 1 】

細胞結合

U937細胞を、50 μ LのFACS緩衝液 (1 $\times$ PBS+2% FBS) を用いて、試験あたり10万個の細胞密度で再懸濁した。

【 0 0 9 2 】

構築物処理（50 μL）を、FACS緩衝液で3倍希釈して10 μg/mLから開始して10濃度まで行い、37℃で1時間、4時間、及び24時間インキュベートした。各時点の終わりに、細胞を収集し、洗浄した。10 μg/mLの抗ヒト2次抗体を添加し、4℃で30分間インキュベートした。インキュベーション後に細胞を洗浄し、4℃で20分間染色して生存率を確認した（1 μLの色素／細胞100万個／1×PBS 1 mL）。細胞を洗浄し、固定緩衝液（試験あたり100 μL）で4℃にて20分間固定した。インキュベーション後、細胞を洗浄し、フローサイトメーターでのデータ取得のためにペレットをFACS緩衝液（試験あたり100 μL）に再懸濁した。

【0093】

24時間の時点で、CD200-Fcタンパク質による処理を、細胞培養培地を用いて行った。洗浄ステップ＝200 μLのFACS緩衝液の添加及び1400 RPMでの遠心分離。

【0094】

【表5】

表5：細胞結合アッセイに使用する試薬

シリアル番号	試薬	製造業者	カタログ番号
1.	ヒト BD Fc ブロック	BD Biosciences	564220
2.	Violet 細胞増殖色素	ThermoFisher Scientific	C34557A
3.	ヤギ抗ヒト IgG 2次抗体	Abcam	Ab98596
4.	固定緩衝液	BD Biosciences	554655
5.	RPMI 1640 培地 (ATCC 改変)	Gibco	A1049101

【0095】

結果

図3A～3Dに示されるデータは、DS-118が、LPS刺激IL-6（図3A）、IL-8（図3B）、及びTNFα（図3C）分泌を濃度依存的に阻害することができることを実証する。図3Aに見られるように、DS-118は、野生型CD200-Fc融合タンパク質（DS-155）よりも高い程度までLPS刺激IL-6放出を阻害し、DS-118は、DS-155の0.18 μg/mLのIC50と比較して、0.01 μg/mLのIC50でIL-6放出を阻害する。さらに、図3Dは、DS-118が、野生型CD200-Fc融合タンパク質（DS-155）よりも高い程度まで、LPS刺激ERK活性化（ホスホ-ERK/pERK）を阻害する能力を示す。

【0096】

図4は、CD200R発現U937細胞への変異型DS-118 CD200-Fcタンパク質の結合を示す。このデータは、すべての時点でCD200R発現細胞へのDS-118の良好な結合を示す。

【0097】

実施例4：野生型及び変異型CD200-Fc融合タンパク質のマクロファージ活性化アッセイ

マクロファージ分化

1つの対照iPSC株であるBIONi010-Cを、Censo Biotechnologiesによる独自のプロトコルを使用してマクロファージ前駆細胞に分化させた。細胞は、フローサイトメトリー（Censo Biotechnologies）を使用して標準的な手順に従って品質管理した。次いで、マクロファージ前駆体を、処理、刺激及びアッセイの前に7日間、マクロファージに成熟させた。

【0098】

処理及び刺激

成熟マクロファージを、刺激を加える1時間前に、ある濃度範囲のDS-118でさらに18時間処理した（表6）。刺激後、細胞をサイトカイン放出アッセイに使用した。DS-118を、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の最高濃度で1:3希釈に使用して、合計6つの濃度を達成した。

【0099】

【表6】

表6：マクロファージ活性化アッセイに使用する刺激

刺激	作業濃度
LPS + INF γ	1 ng/ml + 25 ng/ml

10

【0100】

サイトカイン放出（IL-6 HTRF）

上記のような処理及び刺激の後、上清を回収し、新しいプレートに移した。試料をアッセイの日まで -80°C で保存した。IL-6は、Cisbio HTRFキット（62H IL06PEG）を使用して、製造業者の指示に従って測定し、BMG ClarioSTARプレートリーダーを使用して測定した。バックグラウンド蛍光を除去し、標準曲線を使用して結果を補間することによって分析を行った。すべてのデータを平均 $\pm$ SEMとして示し、2元配置分散分析を行って統計的有意性を評価した。対照は、刺激を受けたが化合物処理を受けなかったウェル（未処理）、及びベースラインのサイトカイン放出を示すために刺激も処理も受けなかったウェル（非刺激）を含んだ。

20

【0101】

結果

図5は、DS-118が、濃度依存的にiPSC由来マクロファージからのLPS刺激性IL-6放出を阻害することができることを示す。

【0102】

実施例5：高親和性CD200-Fcタンパク質プロトコル

結合は、上記実施例2と同様の技術を使用して試験した。

【0103】

ヒトCD200構築物は、シグナルペプチド及び細胞外ドメインを含有するUniprot P41217-1のアミノ酸1~232を使用した。変異番号は、シグナルペプチドを含む完全なUniprot配列を指す。ヒトCD200-Fc融合物は、DS-118、DS155、及びDS-192についてIgG4-Fc（P01861由来）を使用し、CD200はヒンジの残基6（IMGTナンバリング）に融合し、CD200はG3SG4Sリンカーを介してヒンジの残基1に融合した。IgG4変異S228P、M428L、及びN434Sは、EU抗体ナンバリングシステムを指す。

40

【0104】

データ解析

この方法は、MOEソフトウェア（CCG Inc）内にスク립トされた親和性予測プロトコルの使用及びRosetta（Creative Commons）の使用を含んだ。改善された結合親和性を付与すると予測される15の得られた変異を、SPR（表面プラズモン共鳴）によるCD200Rに対する結合親和性の測定のために、単量体CD200-Fc融合タンパク質として個々に発現させた。

【0105】

単量体CD200タンパク質についての K_D 及び結合半減期のSPR測定を、固定化C

50

D200-Fc (huCD200) 上に流したCD200R、又は固定化CD200R (muCD200) 上に流したHisタグCD200の少なくとも5つの希釈物を用いて、25℃で k_a 及び k_d から計算した。得られた曲線を、 R_{max} 及びRIを局所パラメータとして設定することによって1:1ラングミュア結合モデルに適合させた。標準的なパラメータ(例えば、リガンド濃度、時間)を使用した反応速度式を反復カーブフィッティングに使用した。ヒトDS-118、DS-155、及びDS-192はIgG4融合物であり、マウスDS-131及びDS-169はSPRに使用されるマウス単量体であり、DS-198及びDS-227は対応するCD200-Fc (IgG2a) Fc融合物である。同日に実施した2回の実験の平均を標準偏差と共に示す。CD200タンパク質の残基ナンバリングは、小胞体への挿入中に切断されるシグナルペプチドを含有するプレタンパク質を指す。

10

【0106】

結果

本発明の変異型タンパク質は、野生型及び多くの他の試験した変異型よりも高い結合親和性を示した。表7は、野生型(IgG4融合体)の約179 nMと比較した、K130Yの約13 nMの親和性定数(K_D)を示す。

【0107】

表7に示すように、1つの変異を有するCD200バリエーション(DS-192)は、ヒトCD200Rに対する親和性の増加をもたらし、結合半減期は21秒から約3分に増加した。複数の変異を有する本発明のCD200バリエーション(DS-118)は、驚くべきことに、約1 nMまでの高い親和性をもたらし、野生型から130倍を超える親和性の増加を示し、結合半減期は21秒から約38分まで増加した。単量体結合について親和性を測定したところ、データは、2量体Fc融合フォーマットがさらなる機能的結合活性を付与することを示唆した。

20

【0108】

30

40

50

【表 7】

表7： ヒト、NHP、及びマウス受容体に結合するCD200変異体の動態データ

タンパク質 ID	変異	ヒト CD200R		ヒト CD200R1L		Cyno CD200R1		マウス CD200R1	
		K _D (nM)	T _{1/2} (s)	K _D	T _{1/2} (s)	K _D	T _{1/2} (s)	K _D	T _{1/2} (s)
ヒトCD200バリエーション									
DS-155	DS-192, DS-118 に対する 野生型対照	178.7 ±6.1	21.1	検出された 結合なし		971.1 ± 117.3	11.8	検出された 結合なし	
DS-192	K130Y	12.5 ± 0.2	185.9	検出された 結合なし		459.4 ± 143.8	19.2	検出された 結合なし	
DS-118	K130Y, H131Y	1.3 ± 0.1	2272.4	検出された 結合なし		205.7 ± 2.2	18.2	検出された 結合なし	
マウスCD200バリエーション									
DS-198	野生型	nd	nd	nd	nd	nd	nd	584.0 ±56.6	17.3
DS-227	H82Y, T125I	nd	nd	nd	nd	nd	nd	43.3 ± 4.9	117.6
* nd は、実施しなかったことを意味する。									

【0109】

ヒトCD200Rへの親和性は低いものの、すべての構築物においてカニクイザルCD200R1への結合が検出されたが、表7に示すように、ヒトCD200R1L又はマウスCD200R1への結合は検出されなかった。

【0110】

実施例6： 高親和性マウスCD200-Fcのインビトロ概念実証

マウスCD200Rとの交差反応性が欠如しているために、マウスCD200-CD200R1インシリコモデルを、公表された結晶構造に基づいて生成し、自己免疫のマウスモデルにおけるインビトロ概念実証実験のために高親和性サロゲートCD200-Fcタンパク質を操作した。

【0111】

プロトコル

マウスCD200構築物は、シグナルペプチド及び細胞外ドメインを含有するUniprot O54901を使用した。変異番号は、シグナルペプチドを含む完全なUniprot配列を指す。

【0112】

タンパク質は、ポリエチレンイミン（PEI）を使用して、pcDNA3.1ベースの発現プラスミドをCHO-3E7細胞に一過性トランスフェクションすることによって生成した。トランスフェクションの24時間後、培養物を32℃にシフトし、10%フィードC、グルタミン、グルコース、及び0.5M酪酸ナトリウムを供給し、上清を7日目に回収し、濾過した。精製は、AKTA Pureプラットフォーム上、3mL／分の流速で、50mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl pH7.4で予め平衡化したMabSelect Sure 5mLアフィニティーカラム（Cytiva）を使用して4℃で実施した。カラムを平衡化緩衝液で洗浄し、20mM酢酸ナトリウム、150mM

NaCl pH 3.5 を使用して結合タンパク質を溶出した。溶出液を 10 v / v % 1 M Tris pH 8.0 で中和し、SDS-PAGE によって分析した。プールした画分を 5 mL に濃縮し、AKTA Pure プラットフォーム上でゲル濾過クロマトグラフィー (HiLoad 16 / 600 Superdex-200 pg カラム) に供した。タンパク質を、50 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl pH 7.4 緩衝液系中で 1.2 mL / 分で処理した。タンパク質を含有する画分をプールし、Amicon Ultra Centrificon (10 kDa 分子量カットオフ) を使用して 1.33 mg / mL (UV 280 nm で測定) に濃縮した。精製した材料を SEC-HPLC、LC-MS 及び EndoSafe LAL カートリッジ試験に供して、それぞれタンパク質純度、分子量、及び内毒素含有量を評価した。マウス CD200-His タンパク質を、標準的な方法を使用して Ni-NTA アガロース樹脂で精製した。すべてのタンパク質を -80 °C で保存した。親和性を、上記の実施例 2 と同様の技術を使用して研究した。

10

【0113】

結果

表 7 に示すように、バリエーション H82Y、T125I の組合せの単量体結合親和性は 43 nM であり、マウス IgG2a Fc ドメインを含有する野生型構築物よりも約 14 倍高い。

【0114】

実施例 7：高親和性ヒト CD200-Fc のインビトロ概念実証

インシリコ法を使用して同定されたヒト CD200-Fc (huCD200-Fc) タンパク質を、高レベルのヒト CD200R を発現するように操作された LPS 活性化前単球性ヒト骨髓性白血病細胞 (U937) からのサイトカイン放出を阻害するそれらの能力について試験した。

20

【0115】

プロトコル

細胞株の構築、サイトカイン阻害試験、及び細胞結合試験を、上記の実施例 3 と同様の技術を使用して行った。

【0116】

huCD200-Fc タンパク質の ERK リン酸化を阻害する能力を試験するために、U937-CD200R 細胞を PMA で 20 分間誘導し、DS-155、DS-192、及び DS-118 による ERK リン酸化の阻害を、抗 pERK 抗体を用いて透過処理した細胞においてフローサイトメトリーによって測定した。

30

【0117】

結果

図 7 に示すように、高親和性 (1 nM) DS-118 は、野生型 DS-155 よりも強力な IL-6 放出の阻害を示し、13 nM DS-192 については中間の効力が観察された。図 8 に示すように、DS-118 について IL-8 の阻害が観察された。図 9 に示すように、13 nM DS-192 について TNF- α の阻害が観察された。図 10 に示すように、ERK リン酸化の阻害は CD200 親和性と相関する。

【0118】

40

図 19A ~ 19F に示すように、Fc γ 受容体を認識する抗体は、インビトロで DS-192 の活性を阻害せず、これは、Fc ドメインがこの特定のアッセイ系における阻害活性において重要な役割を果たさないことを示唆する。

【0119】

実施例 8：高親和性 CD200-Fc のインビボ概念実証

高親和性マウス CD200-Fc のインビボ概念実証

マウスモデルを使用して、より高い親和性のマウス CD200-Fc タンパク質が、予防的投薬を用いて、マウスコラーゲン誘導性関節炎 (CIA) モデルにおける臨床スコアを減少させることを示した。

【0120】

50

マウスは、4つの潜在的なCD200受容体であるCD200R1～CD200R4を有し、その少なくとも1つは活性化されている可能性があり、CD200R1は、ヒトCD200Rのホモログである。トランスジェニックマウスにおいてCD200又はCD200R1のいずれかをノックアウトすると、多くの自己免疫状態のモデル、例えば、脱毛症、関節炎、IBD25、及びブドウ膜網膜炎において、症状が悪化したり早期発症が誘発されたりする。

【0121】

患者試料を用いた齧歯類モデルにおけるCD200Rアゴニズムは、インビトロで当技術分野において公知であり、CD200-Fc融合タンパク質を用いて以前に達成されており、これは、ヒトCD200-Fc融合タンパク質が炎症性疾患のための療法として使用され得ることを示唆した。他の細胞表面免疫受容体と同様に、CD200Rに対するCD200の親和性は低く（高ナノモル範囲）、したがって理想的なヒト治療薬は、最適な効力のために親和性増強を必要とする。Fcドメインは抗体様血清半減期をもたらし、2量体フォーマットは結合活性を増加させ、受容体架橋を可能にする。動物モデルデータは、Fcドメインの配列が、最適な有効性を有するマウスIgG2a Fc融合物と関連していることを示し、これは、おそらく、Fcγ受容体に結合して、細胞間相互作用の形成を促進し、結合活性をさらに増加させることによる。抗体依存性細胞傷害もまた、CD200R1発現細胞を除去することによって、寄与し得る。したがって、インビボマウスモデルを使用して、野生型CD200-Fcタンパク質と比較したマウス高親和性CD200-Fcタンパク質の効力を試験した。

【0122】

プロトコル

野生型(DS-198)及びより高い親和性(DS-227)のマウスCD200-Fcタンパク質を、症状発症の直前に投薬を開始することによって、CIAモデルを使用して試験した。関節炎は、1日目にCFA(完全フロイントアジュバント)中のウシII型コラーゲンの皮内注射、続いて21日目に不完全フロイントアジュバントのブースター注射によって、雄DBA/Jマウスにおいて惹起した。22日目に、動物を体重に基づいて無作為化し、3mg/kgのマウスIgG2aアイソタイプ対照抗体、DS-198(野生型muCD200-Fc)又はDS-227(高親和性43nM muCD200-Fc)を36日目まで3日に1回注射し、陽性対照群には、経口0.5mg/kgデキサメタゾンを毎日投与した。足関節炎の臨床スコア(盲検評価)を、25～36日目に1日おきに測定した。図11に示すデータは、平均±SEMとして示される。* $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 対疾患+Dexa、疾患+DS-198、及び疾患+DS-227。2元配置RM分散分析、続いてテューキーの多重比較検定。

【0123】

結果

図11に示すように、より高い親和性のCD200-FcであるDS-227は、3mg/kgの選択された用量で、野生型(DS-198)よりも臨床スコアを減少させることにおいて有意により強力であった。

【0124】

実施例9：高親和性DS-192を使用した概念実証研究

上記の高親和性マウスCD200-Fc研究(CIAマウス研究)のインビボ概念実証の結果に基づいて、インビボ概念実証研究を実施して、高親和性ヒトCD200-Fc融合タンパク質であるDS-192を試験した。ヒトリンパ球及び骨髄細胞の両方を移植することができる(huNOG-EXLマウスを作製するため)NOG-EXLマウスを使用して、オキサゾロン誘導性接触過敏症のヒト化モデルを設計した。

【0125】

プロトコル

雌NOG-EXLマウスにヒト細胞を移植し、20～21週齢のCD45⁺細胞の%に基づいて無作為化した(-1日目)。0日目に、マウスをオキサゾロン(アセトン：アル

10

20

30

40

50

コール 1 : 4 中の $100\mu\text{L}$ の $3\text{w}/\text{v}\%$ オキサゾロン) の腹部適用で感作し、5、10、及び 14 日目に、 $20\mu\text{L}$ の $2\text{w}/\text{v}\%$ オキサゾロン (アセトン : アルコール 1 : 4) を各耳に局所適用 ($10\mu\text{L}/\text{側}$) して曝露した。前感作 huNOG-EXL マウスの片耳に、各曝露と同じ日に投与される DS-192 (huCD200-Fc 、 13nM) 又は CD200R アゴニスト (CD200R-mAb) を用いて、オキサゾロン曝露を繰り返した。アイソタイプ対照抗体、 CD200R アゴニスト抗体及び高親和性 huCD200-Fc (DS-192) を、オキサゾロン曝露の 5、10、及び 14 日目の 4 時間前に $3\text{mg}/\text{kg}$ で静脈内投与した。耳の厚さを、曝露の直前及び各曝露の 24 時間後に測定し、15 日目に、パンチ生検を、マルチプレックスによるサイトカイン分析のために採取した。

10

【0126】

結果

図 12 に示すように、耳の厚さの変化 (炎症反応の代用) は、有意な減少をもたらさなかった CD200R-mAb とは対照的に、アイソタイプ対照と比較して、2 回目及び 3 回目の曝露の翌日に DS-192 によって有意に減少した。さらに、図 13、14、及び 15 に示すように、耳組織における IL-1 、 GM-CSF 、及び IL-13 の有意な減少が、 DS-192 処置マウスにおいて研究の終わりに観察された。したがって、結果は、高親和性 CD200-Fc が接触過敏症のヒト化マウスモデルにおいて優れた効力を有することを示した。 DS-192 は DS-118 よりも CD200 親和性が有意に低いため、これらの利点を外挿すると、アレルギー性疾患及び皮膚炎症性障害の処置に DS-118 を使用する場合に、より大きな有効性を示す。

20

【0127】

実施例 10 : 最も高い親和性の DS-118 を使用した概念実証研究

本発明の Fc 融合タンパク質 DS-118 の図を図 6 に示す。

プロトコル

この研究は、図 16 に示すように、 NHP においてブタ回虫 (回虫) 誘発性肺炎症を有するカニクイザルを使用して実施した。

【0128】

このモデルは Th2 駆動性であり、喘息に対する薬物の有効性を評価するために当技術分野において以前に使用されている。カニクイザルを、ブタ回虫抗原に対する既存の感受性についてスクリーニングし、0 日目に、 $20\text{mg}/\text{kg}$ の高親和性 huCD200-Fc (DS-118) ($n=6$)、ビヒクル対照 ($n=6$)、及び $1\text{mg}/\text{kg}$ のデキサメタゾン ($n=4$) を投与した。すべての動物を、+1 日目に $5000\mu\text{g}/\text{mL}$ の気管支内ブタ回虫抗原で曝露し、 BAL 液中のリンパ球レベルを、+2 日目 (曝露の 24 時間後、薬物処置の 48 時間後) にフローサイトメトリーによって測定し、ブタ回虫抗原曝露の直後の気道抵抗の変化を、曝露の直前の気道抵抗と比較した。

30

【0129】

投与前の測定を (huCD200-Fc 投与に対して) -1 日目に、投与後の測定を +1 日目に行った。各時点 (投与前、0.25 時間、0.5 時間、1 時間、4 時間、8 時間、24 時間、3 日目、5 日目、7 日目、10 日目、12 日目、14 日目、21 日目、28 日目) で、各動物から撓側皮静脈又は伏在静脈から少なくとも 0.8mL の血液を採取した。投与の最初の 1 時間以内に採取された試料については、 ± 1 分が許容可能であった。残りの時点については、予定時間の 5% 以内に採取された試料が許容可能である。血液試料 + 凝固剤を含有するチューブを室温で 30~60 分間保存した後、 4°C で 10 分間、 $1500\times g$ で遠心分離した。次いで、血清試料をドライアイス上で急速に凍結させ、分析まで -60°C 以下で保存した。タンパク質濃度を ELISA によって決定した。96 ウェル ELISA プレート、炭酸-重炭酸緩衝液中の $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ヤギ抗ヒト IgG で 4°C にて一晚コーティングした。洗浄及びブロッキング後、段階希釈した血漿試料を添加し、ビオチン標識ヤギ抗ヒト IgG ($0.0625\mu\text{g}/\text{mL}$) を検出抗体として使用した。 HRP -ストレプトアビジン及び TMB 基質を発色のために使用した。約 5~10 分後に

40

50

2 M H C l を添加して反応を停止させた。マイクロプレート分光光度計を使用して 4 5 0 n m 及び 5 4 0 n m で吸光度を読み取った。試料の O D 値を標準曲線に代入して、血漿抗体濃度を得た。この方法の検出限界は 1 n g / m L である。血清濃度を、P h o e n i x W i n N o n l i n (商 標) ソフトウェア (バージョン 8 . 1 、 P h a r s i g h t 、 M o u n t a i n V i e w 、 C A) を使用することによって非コンパートメント薬物動態解析に供した。線形 / 対数台形法則を、P K パラメータを得る際に適用した。半減期は、C m a x の 1 % 未満のデータを用いずに計算し、A U C _ % E x t r a p _ o b s が 2 0 % より大きいのか又は R s q _ a d j u s t e d が 0 . 9 未満である場合、半減期は正確ではなかった。

【 0 1 3 0 】

10

結果

図 1 7 に示すように、最終感作の前日の D S - 1 1 8 投与は、ビヒクル対照と比較して、4 8 時間後の B A L 液中の浸潤リンパ球数の有意な減少をもたらした。図 1 8 に示すように、感作後の気道抵抗 (R L) の減少があったが、これは有意には達しなかった。したがって、データは、高親和性 C D 2 0 0 - F c が、気道炎症の非ヒト霊長類 (N H P) モデルにおいて、気管支肺胞洗浄 (B A L) 液中の細胞浸潤を実質的に減少させたことを示す。

【 0 1 3 1 】

実施例 1 1 : 最も高い親和性の D S - 1 1 8 を使用するインビトロ結合研究

ヒト又はカニクイザル P B M C における高親和性 C D 2 0 0 - F c 融合タンパク質 D S - 1 1 8 の結合を試験するための研究を行った。

20

【 0 1 3 2 】

プロトコル

P B M C 細胞を、5 0 μ L の F A C S 緩衝液 (1 × P B S + 2 % F B S) を用いて、アッセイポイントあたり 1 0 万個の細胞密度で再懸濁した。5 0 μ L 中の h u C D 2 0 0 - F c の希釈物を、F A C S 緩衝液を用いて 1 0 μ g / m L から開始して 3 倍希釈で 1 0 濃度まで添加し、3 7 ° C で 1 時間インキュベートした。各時点の終わりに、細胞を収集し、洗浄した (2 0 0 μ L の F A C S 緩衝液の添加及び 1 4 0 0 R P M で遠心分離) 。1 0 μ g / m L の抗ヒト 2 次抗体 (A b c a m A b 9 8 5 9 6) を過剰の F c ブロック (I n n o v e x B i o s c i e n c e s n o . N B 3 0 9) と共に添加し、4 ° C で 3 0 分間インキュベートした。インキュベーション後に細胞を洗浄し、4 ° C で 2 0 分間染色して生存率を確認した (1 μ L の色素 / 細胞 1 0 0 万個 / 1 × P B S 1 m L 、 T h e r m o F i s h e r C 3 4 5 5 7 A) 。細胞を洗浄し、固定緩衝液 (試験あたり 1 0 0 μ L 、 B D S c i e n c e s 5 5 4 6 5 5) で 4 ° C にて 2 0 分間固定した。インキュベーション後、細胞を洗浄し、フローサイトメーターでのデータ取得のためにペレットを F A C S 緩衝液 (試験あたり 1 0 0 μ L) に再懸濁した。

30

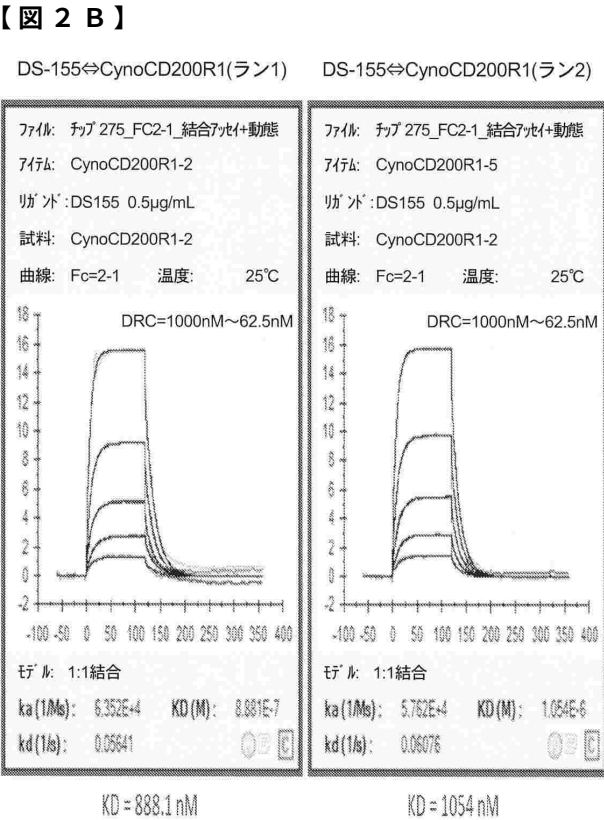
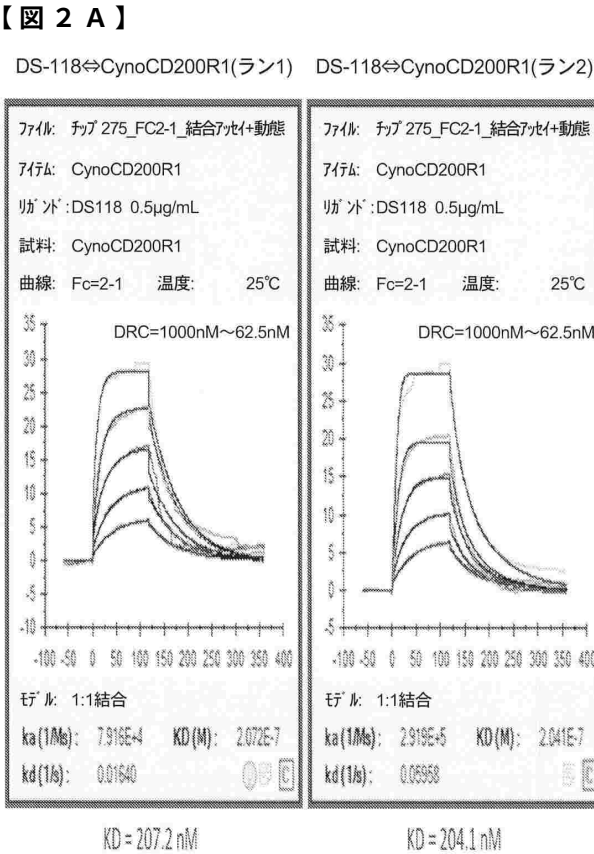
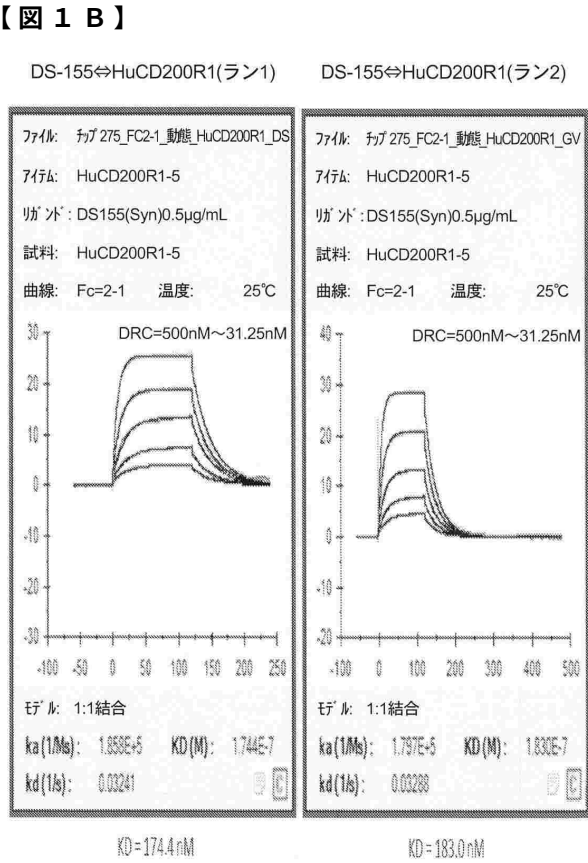
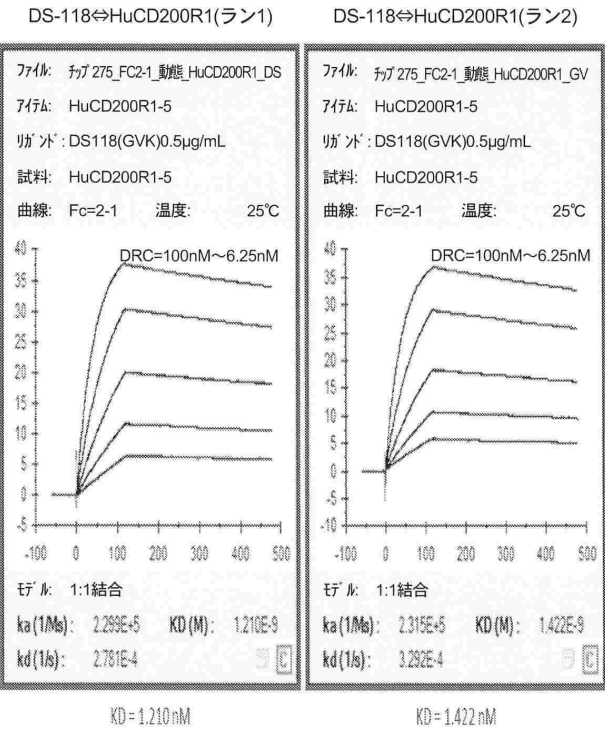
【 0 1 3 3 】

結果

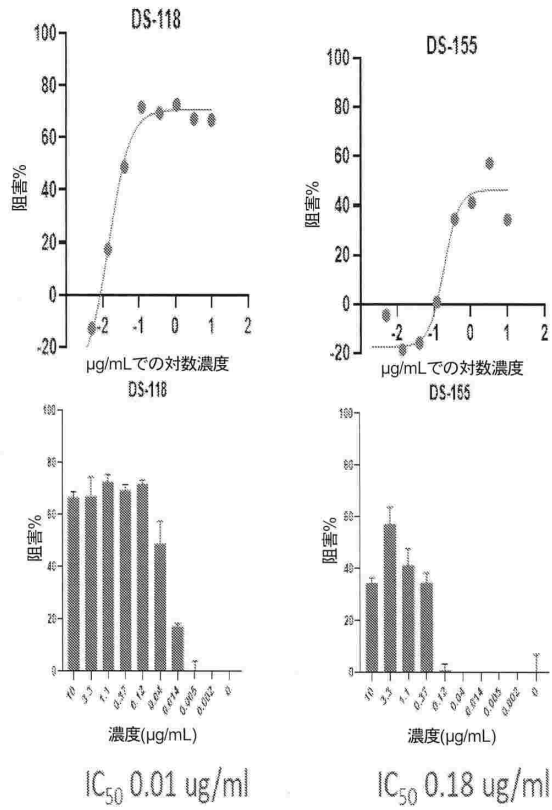
図 2 0 A ~ 2 0 B に示すように、ヒト及びカニクイザル P B M C への結合は、用量依存的であった。

40

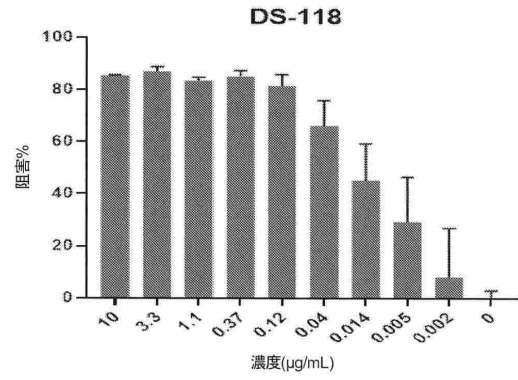
【図面】
【図 1 A】



【図 3 A】



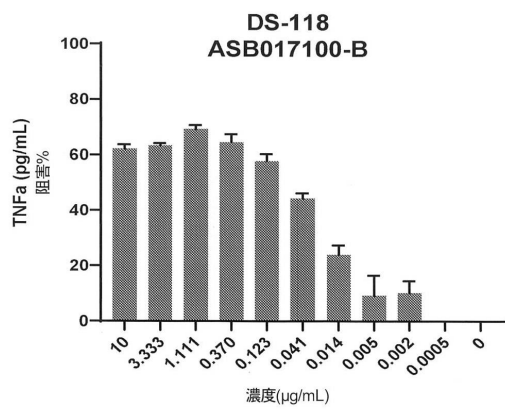
【図 3 B】



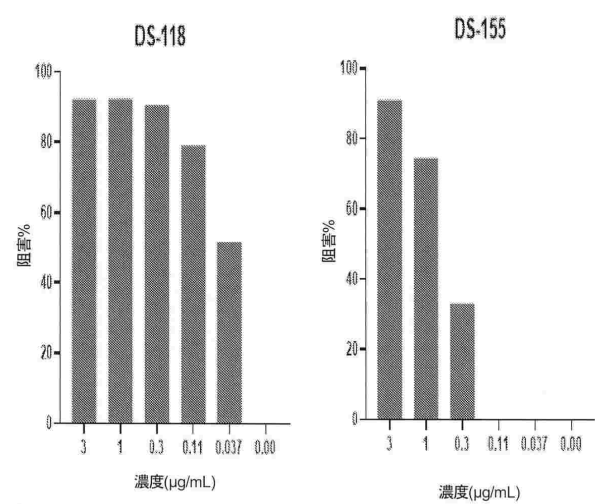
10

20

【図 3 C】



【図 3 D】

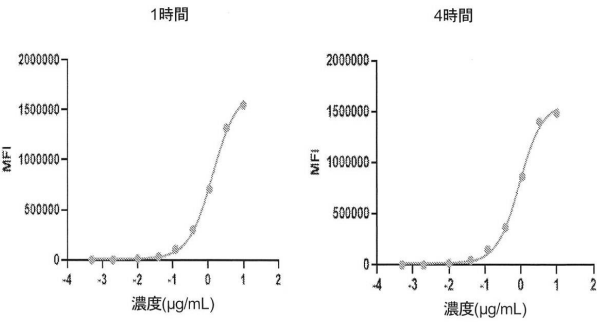


30

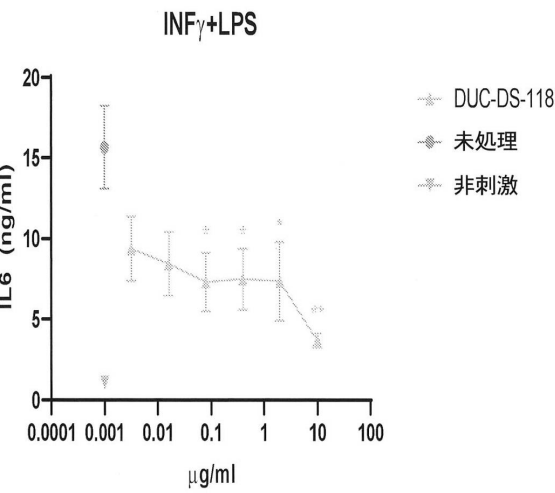
40

50

【図 4】

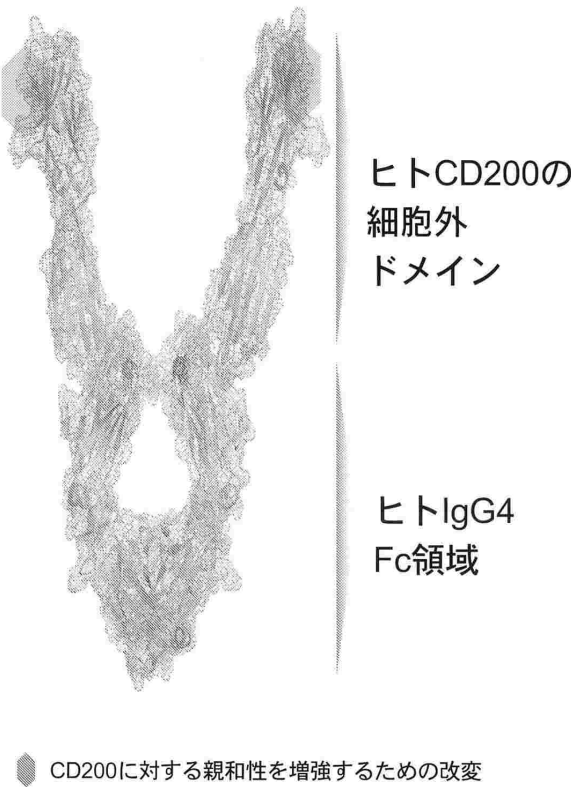


【図 5】

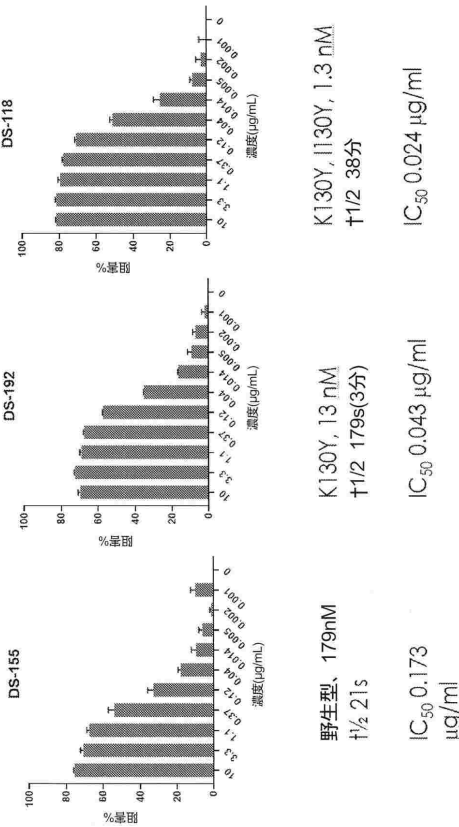


10

【図 6】



【図 7】



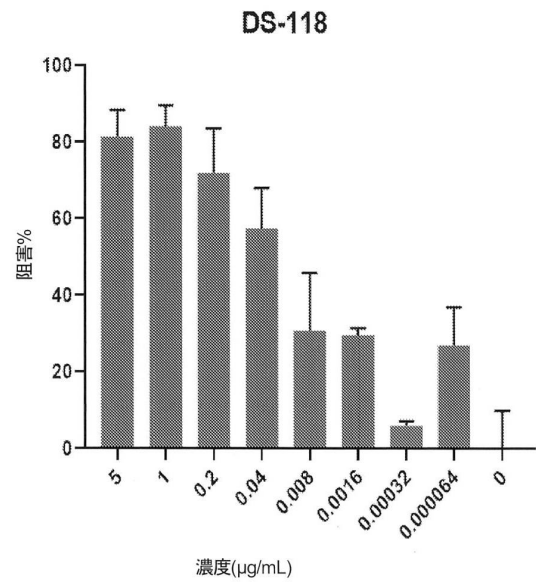
20

30

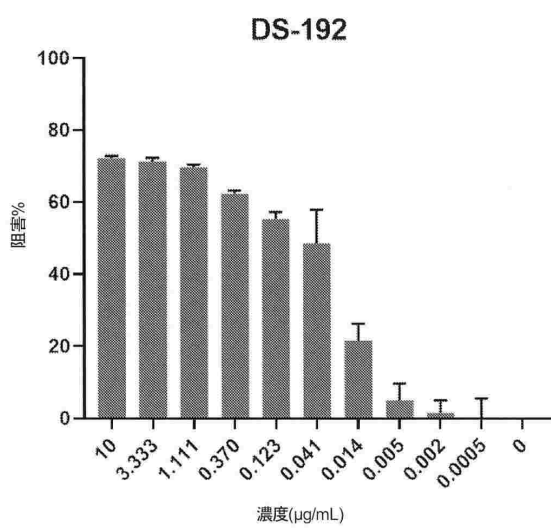
40

50

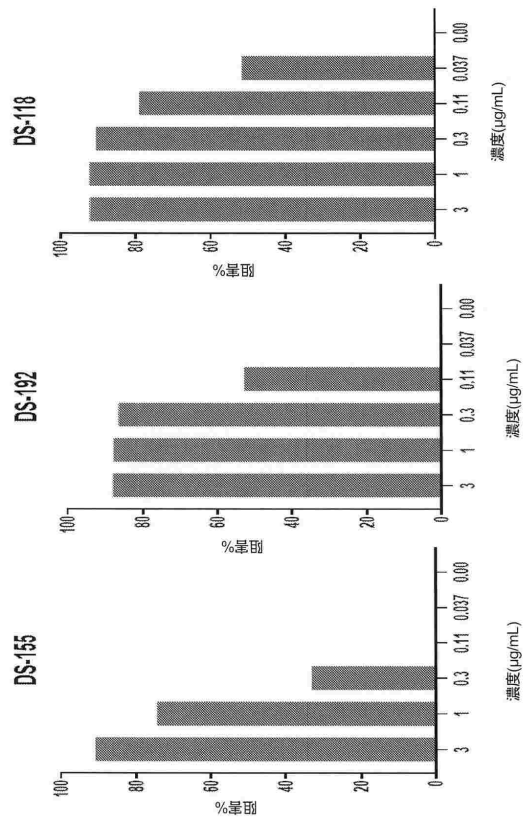
【図 8】



【図 9】

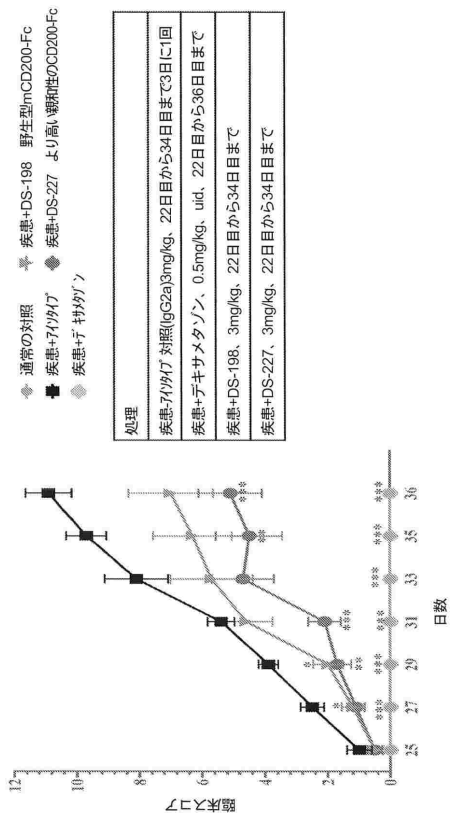


【図 10】



【図 11】

CIAモデル、野生型対より高い親和性のOCD200-Fc



10

20

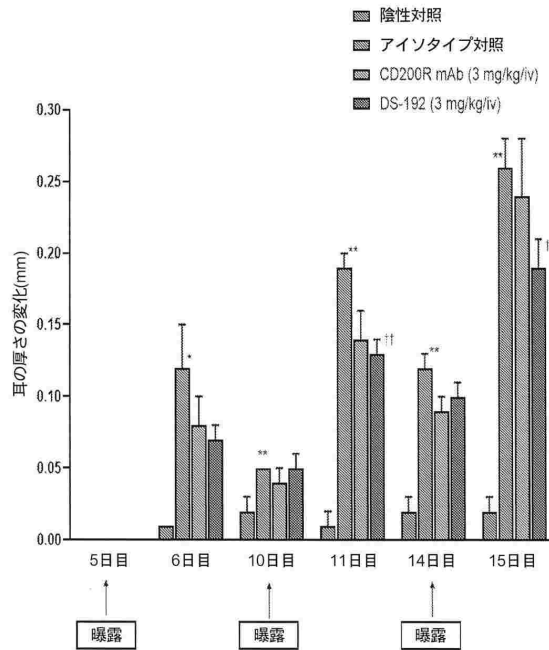
30

40

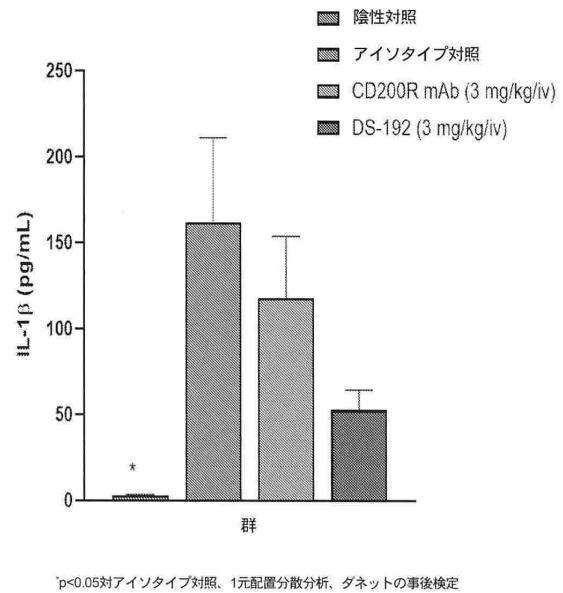
50

【図 1 2】

オキサゾロンADモデルの耳の厚さの変化



【図 1 3】

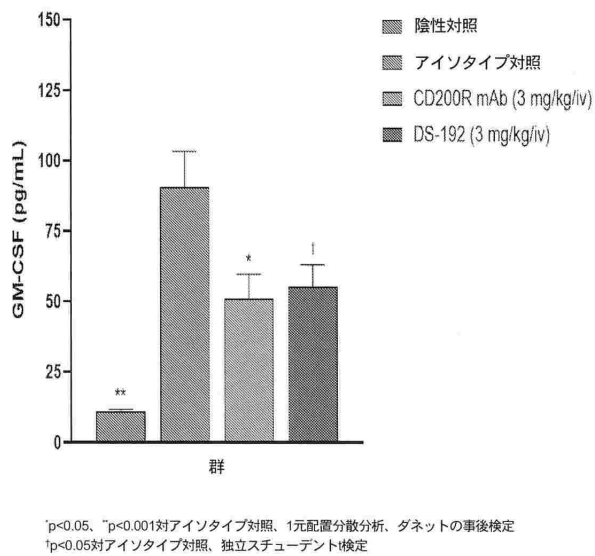
IL-1 β (モデルの終わりでのサイトカインの変化)

10

20

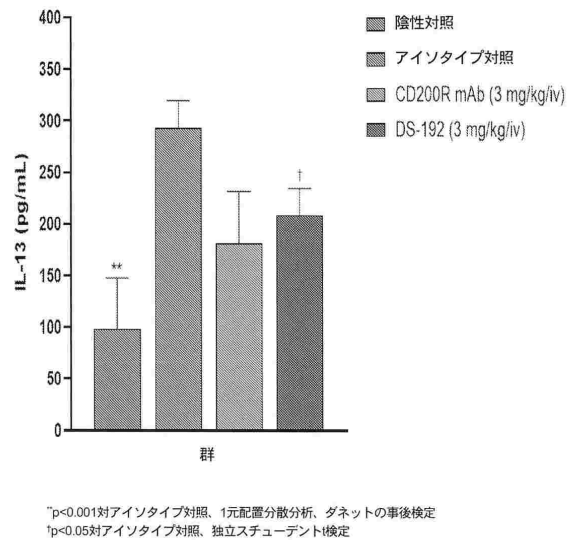
【図 1 4】

GM-CSF(モデルの終わりでのサイトカインの変化)



【図 1 5】

IL-13(モデルの終わりでのサイトカインの変化)

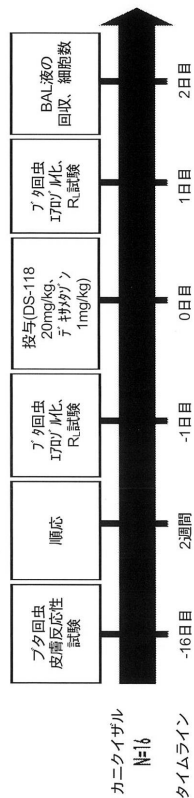


30

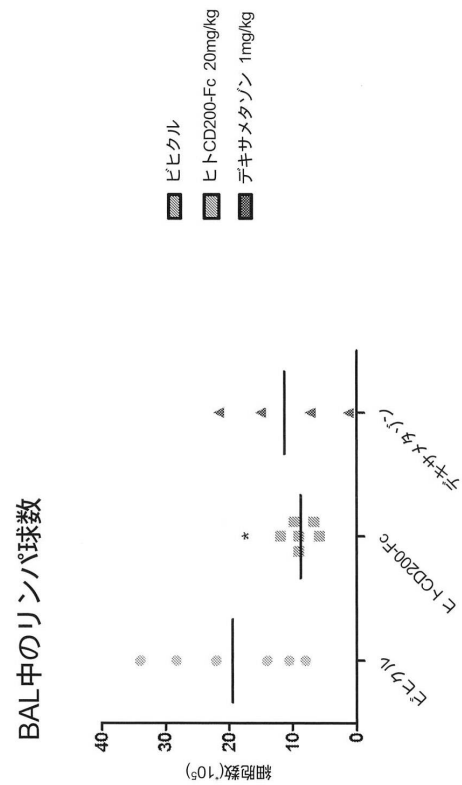
40

50

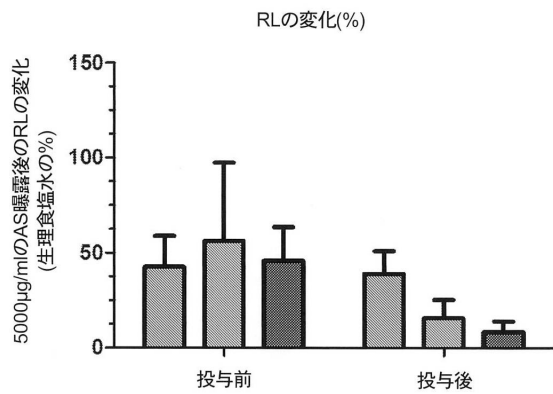
【図 1 6】



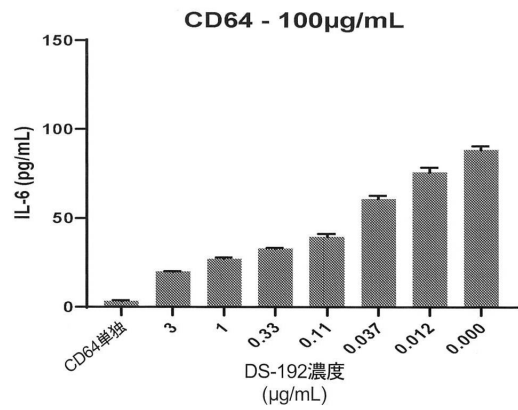
【図 1 7】



【図 1 8】



【図 1 9 A】



10

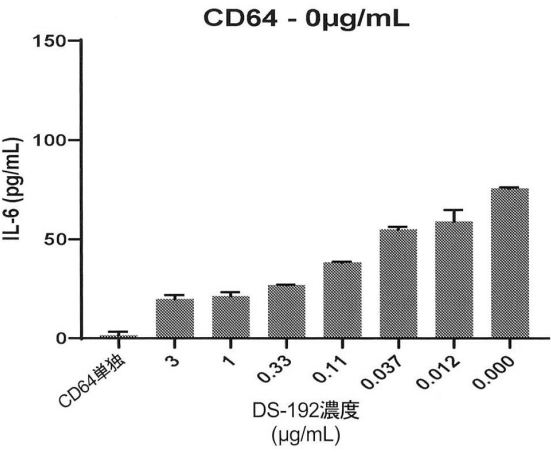
20

30

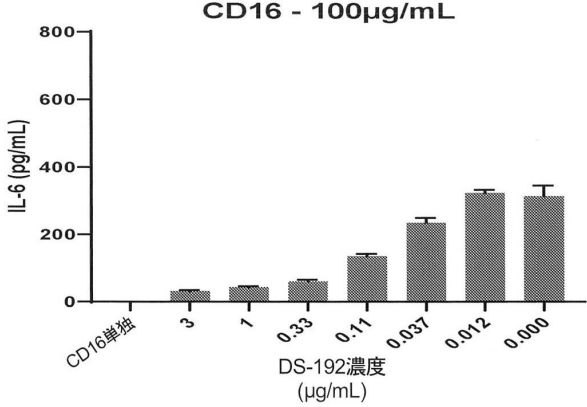
40

50

【図 1 9 B】

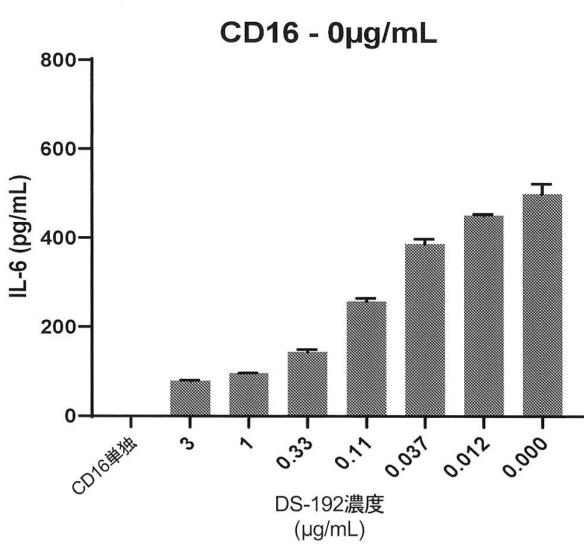


【図 1 9 C】

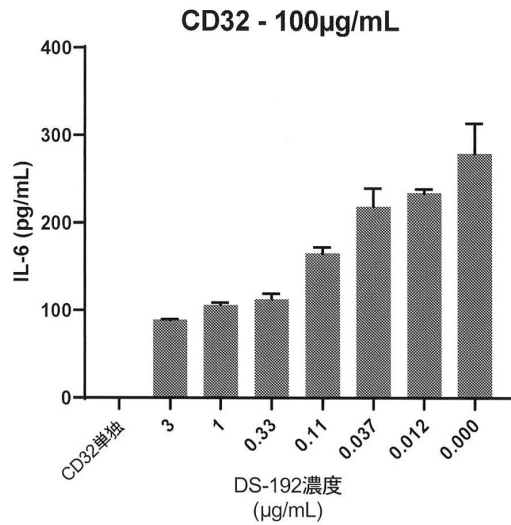


10

【図 1 9 D】



【図 1 9 E】



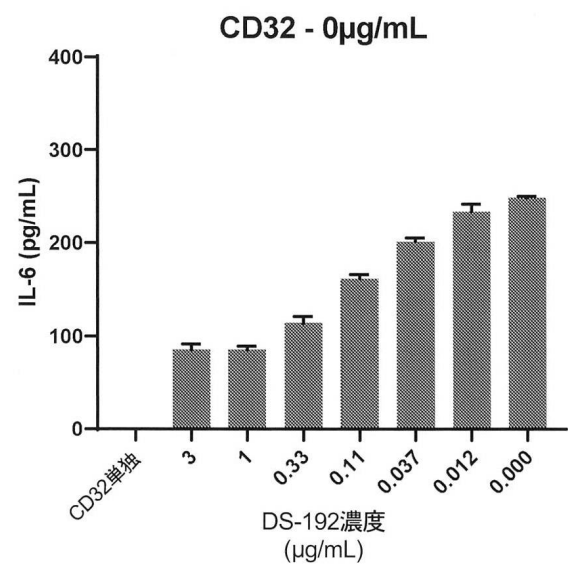
20

30

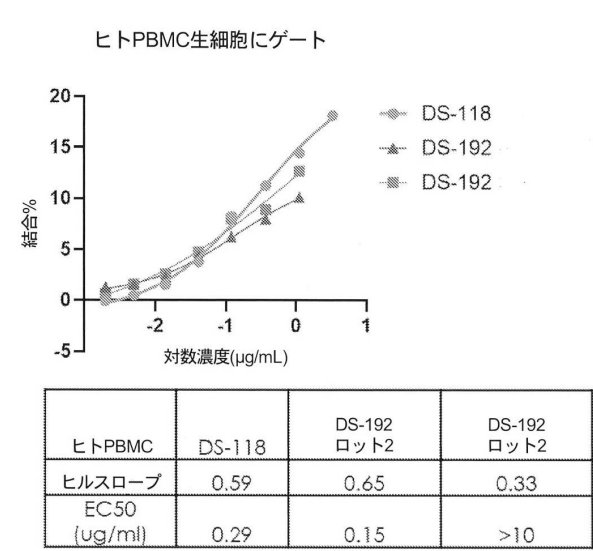
40

50

【図 1 9 F】

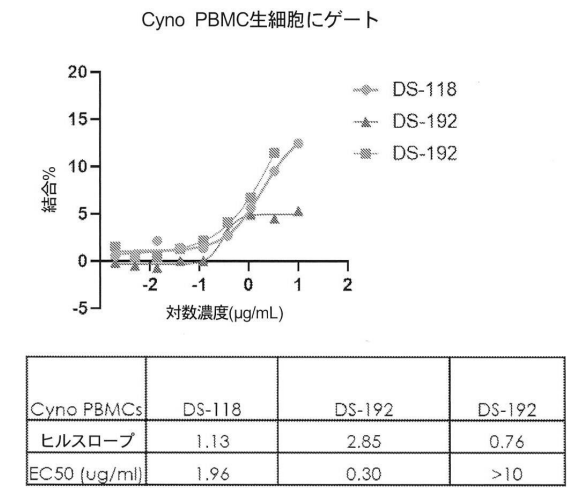


【図 2 0 A】



10

【図 2 0 B】



20

30

【配列表】

202551636400001.xml

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2023/054721

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/705 A61K38/00 A61K38/17 A61P37/02 A61P37/06 ADD.		
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) C07K 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 practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017/194941 A1 (DUCENTIS BIOTHERAPEUTICS LTD [GB]) 16 November 2017 (2017-11-16) examples 1,2 claims 1-17	1-27
A	OMID VAFA ET AL: "An engineered Fc variant of an IgG eliminates all immune effector functions via structural perturbations", METHODS, vol. 65, no. 1, 17 July 2013 (2013-07-17), pages 114-126, XP055191082, NL ISSN: 1046-2023, DOI: 10.1016/j.ymeth.2013.06.035 abstract page 115, left-hand column, paragraph 2	1-27
----- -/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 application or patent 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 1 August 2023		Date of mailing of the international search report 08/08/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Tudor, Mark

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2023/054721

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VALEICH JAMIE ET AL: "Taking the Hinge off: An Approach to Effector-Less Monoclonal Antibodies", ANTIBODIES, vol. 9, no. 4, 50, 23 September 2020 (2020-09-23), pages 1-14, XP093069017, DOI: 10.3390/antib9040050 abstract page 2, paragraph 2 page 12, paragraphs 2,3 -----	1-27
A	JOHN-PAUL SILVA ET AL: "The S228P Mutation Prevents in Vivo and in Vitro IgG4 Fab-arm Exchange as Demonstrated using a Combination of Novel Quantitative Immunoassays and Physiological Matrix Preparation", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 290, no. 9, 27 February 2015 (2015-02-27), pages 5462-5469, XP055299482, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M114.600973 abstract page 5463, left-hand column, lines 4-7 -----	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2023/054721

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2023/054721

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017194941 A1	16-11-2017	AU 2017264825 A1	15-11-2018
		BR 112018073280 A2	19-03-2019
		CA 3023601 A1	16-11-2017
		CN 109219614 A	15-01-2019
		EA 201892554 A1	30-04-2019
		EP 3455247 A1	20-03-2019
		IL 262846 A	31-12-2018
		JP 6997767 B2	04-03-2022
		JP 2019518788 A	04-07-2019
		KR 20190003761 A	09-01-2019
		KR 20230025937 A	23-02-2023
		SG 11201809677X A	29-11-2018
		US 2019367580 A1	05-12-2019
		WO 2017194941 A1	16-11-2017
		ZA 201807079 B	31-07-2019

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/13 (2006.01)
A 6 1 K 38/16 (2006.01)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 K 38/13 (2006.01)
A 6 1 K 31/52 (2006.01)
A 6 1 K 31/519 (2006.01)
A 6 1 K 31/573 (2006.01)
A 6 1 P 37/02 (2006.01)
A 6 1 P 37/06 (2006.01)
A 6 1 P 37/08 (2006.01)
A 6 1 P 25/28 (2006.01)
A 6 1 P 25/04 (2006.01)
A 6 1 P 25/02 (2006.01)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)
A 6 1 P 11/00 (2006.01)
A 6 1 P 19/02 (2006.01)
A 6 1 P 17/00 (2006.01)
A 6 1 P 11/06 (2006.01)
A 6 1 P 9/00 (2006.01)
A 6 1 P 27/02 (2006.01)
A 6 1 P 1/04 (2006.01)
A 6 1 P 13/12 (2006.01)
A 6 1 P 1/16 (2006.01)
A 6 1 P 19/08 (2006.01)
A 6 1 P 25/00 (2006.01)
A 6 1 P 7/00 (2006.01)
A 6 1 P 17/14 (2006.01)
A 6 1 P 7/10 (2006.01)
A 6 1 P 7/06 (2006.01)
A 6 1 P 3/06 (2006.01)
A 6 1 P 27/16 (2006.01)
A 6 1 P 15/00 (2006.01)
A 6 1 P 1/18 (2006.01)
A 6 1 P 5/14 (2006.01)
A 6 1 P 17/04 (2006.01)
A 6 1 P 21/00 (2006.01)
A 6 1 P 13/10 (2006.01)
A 6 1 P 3/10 (2006.01)
A 6 1 P 21/04 (2006.01)
A 6 1 P 25/20 (2006.01)
A 6 1 P 25/18 (2006.01)
A 6 1 P 17/06 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/13
A 6 1 K 38/16
A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 39/395 W
A 6 1 K 38/13
A 6 1 K 31/52
A 6 1 K 31/519
A 6 1 K 31/573
A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 37/02
A 6 1 P 37/06
A 6 1 P 37/08
A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 25/04
A 6 1 P 25/02
A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 19/02
A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 11/06 1 0 1
A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 11/06
A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 13/12
A 6 1 P 1/16
A 6 1 P 19/08
A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 7/00
A 6 1 P 17/14
A 6 1 P 7/10
A 6 1 P 7/06
A 6 1 P 3/06
A 6 1 P 27/16
A 6 1 P 15/00
A 6 1 P 1/18
A 6 1 P 5/14
A 6 1 P 17/04
A 6 1 P 21/00
A 6 1 P 13/10
A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 21/04
A 6 1 P 25/20
A 6 1 P 25/18
A 6 1 P 17/06
A 6 1 P 43/00 1 0 5

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,
 ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C
 O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I
 R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW
 ,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL
 ,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW
 イギリス国ブリストル ビーエス 1 6 エフェル, テンプル・バック 1 0, ファーストフロア,
 スウィート 2, ケア・オブ・デュセンティス バイオセラピューティクス リミテッド

F ターム (参考) 4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 BA41 BA44 CA53

F ターム (参考)

DA11 DC50 NA05 NA14 ZA011 ZA021 ZA051 ZA081 ZA151 ZA211
ZA331 ZA341 ZA361 ZA511 ZA551 ZA591 ZA661 ZA751 ZA811 ZA831 ZA891
ZA921 ZA941 ZA961 ZB021 ZB071 ZB081 ZB111 ZB131 ZB151 ZB211 ZB212
ZC061 ZC331 ZC351 ZC412 ZC541
4C085 AA14 AA33 BB36 BB42 CC23 EE01 EE03
4C086 AA01 CB07 CB09 DA10 MA02 MA04 NA05 ZB21 ZC41
4H045 AA10 AA30 BA41 CA40 DA50 DA75 EA20 FA74 GA22 GA26