

(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2012-502000

(P2012-502000A)

(43) 公表日 平成24年1月26日(2012.1.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/735 (2006.01)	C07K 14/735 ZNA	4B024
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02	4C084
A61P 25/02 (2006.01)	A61P 25/02	4H045
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2011-525541 (P2011-525541)	(71) 出願人	509037961 ズップレモル ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング ドイツ連邦共和国 82152 ミュンヘ ン マルティンジーテ アム クロップフ エルシュピッツ 19
(86) (22) 出願日	平成21年9月2日(2009.9.2)	(74) 代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
(85) 翻訳文提出日	平成23年4月19日(2011.4.19)	(72) 発明者	ブッケル ペーター ドイツ連邦共和国 82347 ベルンリ ート アイヒェンシュトラーセ 19
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/061359	(72) 発明者	ヤコブ ウーヴェ ドイツ連邦共和国 80339 ミュンヘ ン グルダインシュトラーセ 42
(87) 国際公開番号	W02010/026168		
(87) 国際公開日	平成22年3月11日(2010.3.11)		
(31) 優先権主張番号	08163800.9		
(32) 優先日	平成20年9月5日(2008.9.5)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B細胞媒介性多発性硬化症の治療のための物質および方法

(57) 【要約】

【解決手段】本発明は、多発性硬化症の治療に使用するためのFc 受容体 (Fc-ガンマ受容体) であって、多発性硬化症が、B細胞媒介性形態の多発性硬化症および/または自己抗体駆動形態の多発性硬化症である、Fc 受容体に関する。本発明は、多発性硬化症の治療に使用するためのFc 受容体 (Fc-ガンマ受容体) を含有する医薬組成物であって、多発性硬化症が、B細胞媒介性形態の多発性硬化症および/または自己抗体駆動形態の多発性硬化症である、医薬組成物に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多発性硬化症の治療に使用するためのFc 受容体 (Fc-ガンマ受容体) であって、多発性硬化症が、B細胞媒介性形態の多発性硬化症および/または自己抗体駆動形態の多発性硬化症である、Fc 受容体。

【請求項 2】

請求項 1 によるFc 受容体であって、多発性硬化症のB細胞媒介、および/または、自己抗体駆動形態の多発性硬化症が、以下の特徴の 1 以上を有する、Fc 受容体、

- a. 患者が静脈内免疫グロブリン (IVIG) 治療を受けている場合、多発性硬化症が改善される、および/または、
- b. 患者が抗CD20抗体治療を受けている場合、多発性硬化症が改善される、および/または、
- c. 患者が血漿交換を受けている場合、多発性硬化症が改善される、および/または、
- d. 患者が免疫吸着を受けている場合、多発性硬化症が改善される、
- e. 抗原ミエリン・オリゴ樹状細胞糖タンパク質 (MOG) に対する自己抗体の存在、および/または
- f. 抗原ミエリン・塩基性タンパク質 (MBP) に対する自己抗体の存在、および/または、
- g. アクアポリン 4 に対する自己抗体の存在。

10

20

【請求項 3】

請求項 1 または 2 によるFc 受容体であって、多発性硬化症のB細胞媒介、および/または、自己抗体駆動形態の多発性硬化症が、Fc 受容体の使用の前に、1 以上の以下の試験によって決定される、Fc 受容体、

- a. 患者が静脈内免疫グロブリン (IVIG) 治療を受けている場合に多発性硬化症が改善されるかどうかを決定する、および/または、
- b. 患者が抗CD20抗体治療を受けている場合に多発性硬化症が改善される、および/または、
- c. 患者が血漿交換を受けている場合に多発性硬化症が改善される、および/または、
- d. 患者が免疫吸着を受けている場合に多発性硬化症が改善される、
- e. 患者に、抗原ミエリン・オリゴ樹状細胞糖タンパク質 (MOG) に対する自己抗体が存在するかどうかを決定する、および/または
- f. 患者に、抗原ミエリン・塩基性タンパク質 (MBP) に対する自己抗体が存在するかどうかを決定する、および/または、
- g. 患者に、アクアポリン 4 に対する自己抗体が存在するかどうかを決定する。

30

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 によるFc 受容体であって、Fc が、Fc RI (CD64)、Fc RIIA (CD32)、Fc RIIB1 (CD32)、Fc RIIB2 (CD32)、Fc RIIC (CD32)、Fc RIIIA (CD16) およびFc RIIB (CD16) の群から選択される、Fc 受容体。

40

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 によるFc 受容体であって、受容体が膜貫通ドメインおよび/またはシグナルペプチドを欠き、可溶性である、Fc 受容体。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 によるFc 受容体であって、受容体が、PEG化によって化学的に修飾され、および/または、親和性が変化させられている、Fc 受容体。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 によるFc 受容体であって、受容体がグリコシル化されていない、Fc 受容体。

50

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 によるFc 受容体であって、受容体が、Fc RIIB/C (CD32)または Fc RIIIA/B (CD16b)である、Fc 受容体。

【請求項 9】

水溶液中の、請求項 1 ~ 8 によるFc 受容体であって、単回投与における患者への投与量が、1および20 mg/kgの間である、Fc 受容体。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 によるFc 受容体であって、受容体が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12および配列番号13の群から選択される配列を有する、Fc 受容体。

10

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 によるFcγR受容体であって、FcγRが、好ましくは配列番号5、配列番号6、配列番号7および配列番号8の群から選択される、組み換え非グリコシル化ヒト可溶性FcγRIIbである、FcγR受容体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、バイオテクノロジーおよび治療学の分野にある。本発明は、多発性硬化症の治療に使用するためのFc 受容体 (Fc-ガンマ受容体) であって、多発性硬化症が、B細胞媒介性形態の多発性硬化症および/または自己抗体駆動形態の多発性硬化症である、Fc 受容体に関する。

20

【背景技術】

【0002】

現在の仮説は、多発性硬化症 (MS) の発症機序において、T細胞が極めて重要な役割を果たすというコンセプトを支持するが、これは、当初、T細胞が、MS病変に存在する支配的なリンパ球種であるという観察に基づいていた (ウィンドハーゲン (Windhagen) ら、サイトカイン、多発性硬化症患者におけるミエリン塩基性タンパク質反応性T細胞の分泌 (Cytokine, secretion of myelin basic protein reactive T cells in patients with multiple sclerosis)、ジャーナル・オブ・ニューロイムノロジー (Journal of Neuroimmunology)、91巻:1-9頁、1998年; ハフラー (Hafler), D.A. ら、多発性硬化症患者において、ミエリン経口投与は抗原特異的TGF-β1分泌細胞を誘導する (Oral administration of myelin induces antigen-specific TGF-beta 1 secreting cells in patients with multiple sclerosis)、ニューヨーク科学アカデミー論集 (Annals of the New York Academy of Science)、835巻:120-131頁、1997年; ロヴェット-ラッケ (Lovett-Racke), A.E. ら、多発性硬化症患者における、CD28媒介性副刺激に対するミエリン塩基性タンパク質反応性T細胞の依存性減少 (Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28-mediated costimulation in multiple sclerosis patients)、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベストイゲーション (Journal of Clinical Investigation)、101巻:725-730頁、1998年)。この観察結果は、引き続きこの疾病の主要な特徴であり、多数の観察結果によって支持されている。例えば、抗ミエリンT細胞受容体 (TCR) を有する活性CD4+ヘルパーT細胞は、MS患者の脳脊髄液 (CSF) 中に存在する。加えて、MS患者のCSF中に、Th1様サイトカインのレベルの上昇が検出されて、いくつかの症例において疾病の悪化と関連していた (カラブレシ (Calabresi) ら、多発性硬化症患者のCSF由来細胞におけるサイトカインの発現 (Cytokine expression in cells derived from CSF of multiple sclerosis patients)、ジャーナル・オブ・ニューロイムノロジー、89巻:198-205頁、1998年)。

30

40

【0003】

しかし、B細胞がMSの発症および永続化に関与し得るエビデンスもまた、存在して

50

いる。例えば：

【 0 0 0 4 】

(1) MS患者のCSFにおける免疫グロブリンレベルの上昇（リンク(Link), H.ら、多発性硬化症および神経系感染症における免疫グロブリン(Immunoglobulins in multiple sclerosis and infections of the nervous system)、アーカイブス・オブ・ニューロロジ（Archives of Neurology）、25巻:326-344、1971年；リンク, H.ら、アガロースゲル電気泳動および免疫固定によって定量される、多発性硬化症におけるCSF中の免疫グロブリン類および軽鎖型オリゴクローナルバンド(Immunoglobulin class and light chain type of oligoclonal bands in CSF in multiple sclerosis determined by agarose gel electrophoresis and immunofixation)、Ann Neurol, 6(2)巻:107-110頁、1979年；ペレッツ(Perez), L.ら、多発性硬化症患者の脳脊髄液における自発的IgG分泌能を有するB細胞：局所IL-6産生依存(B cells capable of spontaneous IgG secretion in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis: dependancy on local IL-6 production)、クリニカル・エクスペリメンタル・イムノロジ（Clinical Experimental Immunology）、101巻:449-452頁、1995年）、

10

【 0 0 0 5 】

(2) MS患者のCSFにおけるオリゴクローナル・バンディング（リンク(Link), H.ら、アガロースゲル電気泳動および免疫固定によって定量される、多発性硬化症におけるCSF中の免疫グロブリン類および軽鎖型オリゴクローナルバンド(Immunoglobulin class and light chain type of oligoclonal bands in CSF in multiple sclerosis determined by agarose gel electrophoresis and immunofixation)、Ann Neurol, 6(2)巻:107-110頁、1979年）、

20

【 0 0 0 6 】

(3) MS患者のCSFにおけるκ/λの蛇行（ハウザー(Hauser), S.L.ら、多発性硬化症患者の末梢血中のクローナル的に制限されたB細胞：カッパ/ラムダ染色パターン(Clonally restricted B cells in peripheral blood of multiple sclerosis patients: kappa/lambda staining patterns)、アンナルズ・オブ・ニューロロジ（Annals of Neurology）、11巻:408-412頁、1982年）、

【 0 0 0 7 】

(4) MS患者のCSFにおける抗ミエリン抗体の存在（サン(Sun), J.H.ら、多発性硬化症におけるミエリン-オリゴデンドロサイト糖タンパク質に対するB細胞応答(B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. Journal of Immunology)、ジャーナル・オブ・イムノロジ（Journal of Immunology）、146巻:1490-1495頁、1991年）および

30

【 0 0 0 8 】

(5) MS患者のCSF由来の抗体がこれらの患者における組織損傷の全体範囲に関係することの実証（ラスマン(Lassmann), H.ら、実験的アレルギー性脳脊髄炎：脳炎誘発性Tリンパ球と脱髄性抗体とのバランスが脱髄病変のサイズおよび構造を測定する(Experimental allergic encephalomyelitis: the balance between encephalitogenic T lymphocytes and demyelinating antibodies determines size and structure of demyelinated lesions)、アクタ・ニューロパソロジー(Acta Neuropathology)、75巻:566-576頁、1988年）。

40

【 0 0 0 9 】

多数の発表において、このようなB細胞の媒介が実証されている：ボーキン(Bourquin)ら、ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジ(The journal of Immunology)、2003年、171巻:455-461頁；ストロムネス(Stromnes)ら、ネイチャー・プロトコルズ(Nature Protocols)、1巻、4号、2006年: 1810-1818頁；ストロムネスら、ネイチャー・プロトコルズ、1巻、4号、2006年: 1952-19160；オリバー(Oliver)ら、ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジ、2003年、171巻:462-468頁。

【 0 0 1 0 】

50

免疫系におけるB細胞の基本的な役割は、液性免疫応答を媒介することである。即ち、異物に結合し、それらを標識して、NK細胞およびマクロファージ等の他の免疫細胞によって体から排出する、抗体（または免疫グロブリン）と呼ばれるタンパク質を分泌することである。

【0011】

静脈内免疫グロブリン（IVIg）は、医学文献に報告された多数の臨床試験において、再発寛解型多発性硬化症における2つの重要な考察に影響することが実証されている。IVIgは、急性憎悪の頻度を低下させ、急性憎悪の強度および期間を減少させる。一見したところ、患者のサブセットでは、多発性硬化症への関与はB細胞が突出している。従って、このようなB細胞媒介性多発性硬化症患者の治療のための物質および方法を有することは有利であると思われる。

10

【0012】

IVIgは、多数のドナーからの、プールされたヒト免疫グロブリンに相当する。IVIgが自己抗体媒介性疾患を改善する正確なメカニズムは解っていない。しかし、a) IVIgの効力はFc受容体発現に依存すること、b) 自己抗体の正常免疫グロブリン（IVIg）に対する割合はシフトして、自己抗体の分解を増進すること、およびc) IVIgは、完全なヒト抗体および抗イディオタイプ抗体ネットワーク（抗体に対する抗体）を含有して、自己抗体の中和を引き起こすことが示されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0013】

本発明者らは、驚くべきことに、多発性硬化症（MS）の発症機序において、T細胞が極めて重要な役割を果たすという現在の仮説が、少なくとも完全には正しくないということを見出した。本発明者らは、B細胞媒介性形態の多発性硬化症に取り組んで、思いがけなく特別な治療法を提供することが可能となった。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、多発性硬化症の治療に使用するためのFc受容体（Fc-ガンマ受容体）であって、多発性硬化症が、B細胞媒介性形態の多発性硬化症および/または自己抗体駆動形態の多発性硬化症である、Fc受容体に関する。本発明は、多発性硬化症の治療に使用するためのFc受容体（Fc-ガンマ受容体）を含有する医薬組成物であって、多発性硬化症が、B細胞媒介性形態の多発性硬化症および/または自己抗体駆動形態の多発性硬化症である、医薬組成物に関する。

30

【0015】

Fc受容体（FcR）は、人体を感染症から防御する、重要な役割を果たす。病原体が血液循環に侵入した後、病原体は免疫グロブリン（Ig）によってオプソニン化される。得られる免疫複合体は、高親和性を有するその多結合価によって、FcRのクラスターリングにつながるFcRを持つ細胞に結合し、いくつかのエフェクター機能を引き起こす（メツガー（Metzger）、H.、1992A）。これらとしては、発現したFcR型および関連するタンパク質に依存して、病原体および抗原提示を続いて中和するエンドサイトーシス、抗体依存性細胞傷害（ADCC）、メディエーターの分泌または抗体産生の調節が挙げられる（フリッドマン（Fridman）ら、1992年；ヴァン・デ・ウィンケル（van de Winkel）およびケイペル（Capel）、1993年）。

40

【0016】

特異的なFcRは全てのIg類に対して存在し、IgGに対するものは、最も豊富であり、最も幅広い多様性を有する。IgEに対する高い親和性受容体（FcRIa）と共に、I型膜貫通タンパク質として、または可溶性形態（sFcR）で、FcRI（CD64）、FcRII（CD32）およびFcRIIIa（CD16）が存在するが、FcRIIIのグリコシルホスファチジルイノシトール・アンカー型（FcRIIIb）もまた存在する。さらに、FcRは、様々なアイソフォーム（FcRIa、b1、b2、c；FcRIIIa1-2、b1-3、c）および対立遺伝

50

子 (Fc RIIa1-HR、-LR ; FcγRIIb-NA1、-NA2) の形で存在する (ヴァン・デ・ウィンケル (van de Winkel) およびケイペル (Capel)、1993年)。全体的な相同性細胞外部分と対照的に、膜貫通ドメインと細胞質ドメインとは異なる。それらは全体的に削除されるか、8 kDaのサイズであり得る。それらは、Fc RIIaにあるような、26個のアミノ酸の免疫受容体チロシン系活性化モチーフ (ITAM)、または、シグナル伝達に關するFc RIIbにおいて、それぞれ13個のアミノ酸の阻害モチーフ (ITIM) を含有し得る (アミゴレナ (Amigorena) ら、1992年)。

【0017】

本書では、EAEは実験的自己免疫性脳脊髄炎である。

【図面の簡単な説明】

10

【0018】

【図1】完全フロインドアジュバンド (CFA) 中のラットMOG 100 μgを皮下注射して、6-8週齢のC57/BL6j系雌マウスに、0日にEAEを誘導した。0日および2日に、百日咳毒素250 ngを腹腔内投与した。マウスは、8、11および14日に最初の症状が現れた後、sFcR 200 μgで腹腔内処置した。採点法は、麻痺の程度による：0 = 麻痺なし、1 = 尾の麻痺、2 = 後肢の麻痺、3 = 前肢の麻痺、4 = 完全麻痺、5 = 死亡。

【図2】完全フロインドアジュバンド (CFA) 中のラットMOG 100 μgを皮下注射して、6-8週齢のSJL系雌マウスに、0日にEAEを誘導した。0日および2日に、百日咳毒素250 ngを腹腔内投与した。マウスは、9、12および15日に最初の症状が現れた後、sFcR 200 μgで腹腔内処置した。採点法は、麻痺の程度による：0 = 麻痺なし、1 = 尾の麻痺、2 = 後肢の麻痺、3 = 前肢の麻痺、4 = 完全麻痺、5 = 死亡。

20

【発明を実施するための形態】

【0019】

発明の詳細な説明

本発明は、多発性硬化症の治療に使用するためのFc 受容体 (Fc-ガンマ受容体) であって、多発性硬化症が、B細胞媒介性形態の多発性硬化症および/または自己抗体駆動形態の多発性硬化症であるFc 受容体に関する。

【0020】

多発性硬化症のB細胞媒介、および/または、自己抗体駆動形態の多発性硬化症は、1以上の以下の特徴を有する：(a) 患者が静脈内免疫グロブリン (IVIg) 治療を受けている場合、多発性硬化症が改善される、および/または、(b) 患者が抗CD20抗体治療を受けている場合、多発性硬化症が改善される、および/または、(c) 患者が血漿交換を受けている場合、多発性硬化症が改善される、および/または、(d) 患者が免疫吸着を受けている場合、多発性硬化症が改善される、(e) 抗原ミエリン・オリゴ樹状細胞糖タンパク質 (MOG) に対する自己抗体の存在、および/または、(f) 抗原ミエリン・塩基性タンパク質 (MBP) に対する自己抗体の存在、および/または、(g) アクアポリン4に対する自己抗体の存在。

30

【0021】

デヴィック病はMSに類似しており、体の免疫系がミエリンで包まれた神経細胞を攻撃する。標準的なMSとは異なり、この攻撃は、免疫系のT細胞によって媒介されるとは考えられず、NMO-IgGと呼ばれる抗体によると考えられている。これらの抗体は、星状細胞の細胞膜中のアクアポリン4と呼ばれるタンパク質を標的とし、これは、細胞膜を通過する水を輸送するためのチャネルとして働く。

40

【0022】

好ましい態様において、多発性硬化症のB細胞媒介、および/または、自己抗体駆動形態の多発性硬化症は、Fc 受容体の使用の前に、1以上の以下の試験によって決定される：(a) 患者が静脈内免疫グロブリン (IVIg) 治療を受けている場合、多発性硬化症が改善されるかどうかを決定する試験、および/または、(b) 患者が抗CD20抗体治療を受けている場合、多発性硬化症が改善される、および/または、(c) 患者が血漿交換を受けている場合、多発性硬化症が改善される、(d) 患者が免疫吸着を受け

50

ている場合、多発性硬化症が改善される、(e) 患者に、抗原ミエリン・オリゴ樹状細胞糖タンパク質 (MOG) に対する自己抗体が存在するかどうかを決定する試験、および/または、(f) 患者に、抗原ミエリン・塩基性タンパク質 (MBP) に対する自己抗体が存在するかどうかを決定する試験、および/または、(g) アクアポリン 4 に対する自己抗体が存在するかどうかを測定する試験。好ましくは2つの試験の選択が実施され、より好ましくは3つの試験の選択が実施され、より好ましくは4つの試験の選択が実施される。

【0023】

抗CD20治療の一例はリツキシマブである。これはモノクローナル抗体である。残念なことに、これは、存在するタンパク質、即ち、ポリペプチドがリツキシマブの代わりに使用された場合に改善し得る、重篤な副作用を有する。

10

【0024】

血漿交換の間、先ず、血液は、針または予め埋め込まれたカテーテルを通して体から取り出される。次に、細胞分離機により、血液から血漿を除去する。通常、3手順を使用して、血液から血漿を分離する：

【0025】

不連続的フロー遠心分離：

静脈カテーテルラインが1本必要である。代表的には、一度に300 mlバッチの血液が抜かれ、遠心分離して、血液細胞から血漿を分離する。

【0026】

連続フロー遠心分離

静脈ラインを2本使用する。この方法は、連続的に血漿をスピンドアウトすることが可能であるため、体から一度に抜かれる必要のある血液容量がわずかに少ない。

20

【0027】

血漿濾過

静脈ラインを2本使用する。標準的な血液透析装置を使用して、血漿を濾過する。この連続工程に必要な、体から一度に抜かれる血液は、100 ml未満である。

【0028】

免疫吸着の間、患者の血液は、追加の身体 (corporal) 親和性クロマトグラフィーカラムによって、免疫グロブリンから除去される。

30

【0029】

それぞれの方法は、有利点および不利点を有する。慣用の血漿交換において、血漿分離の後、血液細胞は治療を受けている人に戻され、一方、抗体を含有する血漿は、先ず処置され、次に、患者に戻される。(血漿交換において、除去された血漿は廃棄され、患者は、置換ドナー血漿またはタンパク質を添加した生理食塩水を供給される。) 一般的に、処置の間、血液が凝固しないように保つ薬物 (抗凝固剤) が患者に投与される。血漿交換は、特定の疾患における療法として使用される。

【0030】

血漿交換の重要な使用の1つは、自己免疫疾患の療法にある。しかし、この方法は、患者には非常に負担である。

40

【0031】

国際特許2008/017363号には、B細胞媒介を試験する手段が開示されている。ここでは、特に、MOGおよびアクアポリン4に対する自己抗体を検出する手段が開示される。国際特許2008/017363号は、参照することによって組み込まれる。

【0032】

本発明の好ましい態様において、FcR受容体はヒト由来である。本発明によるFc受容体は、好ましくは、Fc RI (CD64)、Fc RIIA (CD32)、Fc RIIB1 (CD32)、Fc RIIB2 (CD32)、Fc RIIC (CD32)、Fc RIIIA (CD16) およびFc RIIB (CD16) の群から選択される。

【0033】

50

Fc RIIB1 (CD32)およびFc RIIB2 (CD32)は、いわゆるアイソフォームであり、即ち、アイソフォーム1および2である。

【0034】

本発明によれば、可溶性Fc受容体の調製は、原核細胞または真核細胞で行われる。また、真核細胞でも行われ得る。原核細胞で行われる場合（欧州特許EP-B1 1 135 486号参照）、組み換えタンパク質を含有する不溶性封入体が形成され、その中に含有されるタンパク質の再生前に、他の細胞成分から封入体を分離することにより精製が促進される。封入体に含有される本発明によるFcRの再生は、主に、知られている方法により行われる。原核細胞における調製、封入体の製造およびそれによって得られる組み換え可溶性Fc受容体の利点により、非常に純粋で、特に非常に均質のFcR製剤を得ることが可能になる。また、グリコシル化を行わないことから、得られる生成物は非常に均質である。しかし、いくつかの場合では、グリコシル化が望ましいことがある。

10

【0035】

宿主細胞は、FcRをコードするか有するポリヌクレオチドまたはベクターを用いて、遺伝子操作する。本発明の目的のために使用し得る宿主細胞としては、制限しないが、例えば、FcRをコードするポリヌクレオチド分子を含有する、組み換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換し得る、バクテリア（例えば、大腸菌および枯草菌）等の原核細胞；例えば、本発明のポリヌクレオチド分子、即ちFcRをコードするポリヌクレオチド分子を含有する、組み換え酵母菌発現ベクターで形質転換し得る、酵母菌（例えば、サッカロミセス属およびピチア属）等の単純な真核細胞；例えば、本発明のポリヌクレオチド分子を含有する組み換えウイルス発現ベクター（例えば、パキユロウイルス）に感染し得る、例えばHi5細胞のSf9等の、昆虫細胞系；例えばプラスミドで注入し得る、アフリカツメガエル卵母細胞；例えば、組み換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワー・モザイク・ウイルス（CaMV）またはタバコ・モザイク・ウイルス（TMV））に感染し得るか、またはFcRまたは変異体ヌクレオチド配列を含有する組み換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換し得る、植物細胞系；または、哺乳類細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、HEK293、VERO、HeLa、MDCK、Wi38、Swiss 3T3およびNIH 3T3細胞）であって、例えば、プロモーターであって、哺乳類細胞のゲノム由来のプロモーター（例えば、メタロチオネイン・プロモーター）、哺乳類ウイルス由来のプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター、CMV IEおよびワクシニア・ウイルス7.5Kプロモーター）、または細菌細胞由来のプロモーター（例えば、Tetレプレッサー結合が、Tet On-Offシステムにおいて使用される）を含有する、組み換え発現構造物で形質転換し得る、哺乳類細胞系が挙げられる。また、宿主細胞として、哺乳類から直接得られ、プラスミドベクターで形質転換するか、ウイルスベクターを感染した、初代または二次細胞も有用である。本発明のポリヌクレオチドを導入するために使用される宿主細胞および各ベクターによって、ポリヌクレオチドは、例えばクロモゾームまたはミトコンドリアDNA中に組み込み得るか、または、染色体外、例えばエピソームに維持され得るか、または、細胞中に一時的にのみ含まれ得る。

20

30

40

【0036】

FcyRIIbの配列において、3つの可能なN-グリコシル化部位が見ついている。3つの部位は全て、分子の表面上にあり、接近可能である。それらは、両ドメインのEIFループ（N61およびN142）中、および、C-末端ドメインのストランドE（N135）上に位置する。哺乳類細胞から単離されたFcRは、高度にグリコシル化される。FcRはインビボでグリコシル化されることから、発現系を選ぶことが望ましい場合があり、これによりタンパク質が正確にグリコシル化される。結果として、本発明のFcRをコードするポリヌクレオチドを、高等真核細胞中、特に哺乳類細胞、例えばCOS、CHO、BHK、HEK293、VERO、HeLa、MDCK、Wi38、Swiss 3T3またはNIH 3T3細胞中に導入することが好ましい。

50

【0037】

好ましくは、本発明によるFc 受容体は、膜貫通ドメインおよび/またはシグナルペプチドが欠けており、可溶性である。Fc RIII等の可溶性形態のFc受容体 (sFcR) は、B細胞成長および免疫グロブリン産生のアイソタイプ特異的制御を媒介する。骨髄腫のマウスモデルにおいて、sFcRは腫瘍細胞の成長および免疫グロブリン産生を抑制する (ミュラー (Muller) ら、1985年; ローマン (Roman) ら、1988年; テイラウド (Teilaud) ら、1990年)。さらに、sFcRは、ヒトIgG分泌骨髄腫細胞の培養物の表面のIgGに結合し、腫瘍細胞成長およびIgG分泌の抑制をもたらす。これらの細胞をsFcRにより長く曝すことにより、腫瘍細胞の細胞溶解を起こす (フーパー (Hoover) ら、1995年)。

10

【0038】

Fc 受容体ポリペプチドは、上述したもののいずれでもあり得るが、10以下 (例えば、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1以下) の同類置換を有し得る。同類置換は当業界で知られており、代表的には、例えば、ある極性アミノ酸の別の極性アミノ酸での置換およびある酸性アミノ酸の別の酸性アミノ酸での置換が挙げられる。従って、同類置換としては、好ましくは、以下の群のアミノ酸内の置換が挙げられる: グリシン、アラニン、バリン、プロリン、イソロイシン、およびロイシン (非極性、脂肪族側鎖); アスパラギン酸およびグルタミン酸 (負に荷電した側鎖); アスパラギン、グルタミン、メチオニン、システイン、セリンおよびトレオニン (極性非荷電側鎖); リシン、ヒスチジンおよびアルギニン; およびフェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシン (芳香族側鎖); およびリシン、アルギニンおよびヒスチジン (正に荷電した側鎖)。所与の置換の効果、例えばpKI等に対する効果を如何に決定するかは、当業界ではよく知られている。1以上の同類置換を有するポリペプチドに要することは、本発明による変化していないFc 受容体の活性の少なくとも50% (例えば、少なくとも: 55%; 60%; 65%; 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95%; 98%; 99%; 99.5%; または100%またはそれ以上) の活性を有することのみである。

20

【0039】

ポリペプチドおよびペプチドの両者は、適宜のポリペプチドまたはペプチドをコードするヌクレオチド配列を用いる、標準的なインビトロの組み換えDNA技術およびインビボ遺伝子組み換えによって製造し得る。当業者によく知られた方法を使用して、関連するコード化配列および適宜の翻訳/転移コントロールシグナルを含有する発現ベクターを構築し得る。例えば、サムブルック (Sambrook) ら、分子クローニング: 実験マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual) (第2版 [コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、ニューヨーク、1989年])、およびオスベル (Ausubel) ら、分子生物学における現在のプロトコル (Current Protocols in Molecular Biology) [グリーン・パブリッシング・アソシエーツ・アンド・ウィリー・インターサイエンス (Green Publishing Associates and Wiley Interscience)、ニューヨーク、1989年] に記載された技術を参照のこと。

30

【0040】

本発明のポリペプチドおよび断片、即ち、単離したポリペプチドとしては、上述のものであるが、インビボでの関連するポリペプチドの生存を促進するために、遮断薬の添加によりアミノ-および/またはカルボキシ末端をインビボ使用のために修飾したのも含まれる。このことは、ペプチド末端が、細胞取り込みの前に、プロテアーゼによって分解される傾向にあるような状況において、有用であり得る。このような遮断薬としては、制限しないが、投与されるペプチドのアミノおよび/またはカルボキシル末端残基に結合し得る、追加の同族または非同族のペプチド配列を挙げ得る。このことは、ペプチド合成の間に化学的に、または、平均的技術を有する技術者によく知られている方法による組み換えDNA技術によって、達成し得る。

40

【0041】

もう一つの方法として、ピログルタミン酸または当業界で知られている他の分子等

50

の遮断剤がアミノおよび/またはカルボキシル末端残基に結合し得るか、アミノ末端のアミノ基またはカルボキシル末端のカルボキシル基が異なる部分と置換し得る。同様に、ペプチドは、投与前に、薬学的に許容される「担体」タンパク質に、共有結合または非共有結合的に結合し得る。

【0042】

本書で使用される「単離された」ポリペプチドまたはペプチド断片とは、例えば、舌、膵臓、肝臓、脾臓、卵巣、睾丸、筋肉、関節組織、神経組織、胃腸組織または腫瘍組織等の組織、または血液、血清、または尿等の体液において、自然発生的な同等物を有しないか、自然に随伴する成分から分離または精製された、ポリペプチドまたはペプチド断片をいう。代表的には、ポリペプチドまたはペプチド断片は、タンパク質および自然に結合する他の自然発生的有機分子を含まず、乾燥重量で少なくとも70%である場合に、「単離された」と見なす。好ましくは、本発明のポリペプチド（またはそのペプチド断片）の製剤は、本発明のポリペプチド（またはそのペプチド断片）が乾燥重量でそれぞれ、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも99%である。従って、例えば、ポリペプチド x の製剤は、ポリペプチド x が、乾燥重量で少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも99%である。化学的に合成されたポリペプチドは、その性質上、自然に随伴する成分から分離されることから、合成ポリペプチドは「単離されて」いる。

10

【0043】

本発明の単離されたポリペプチド（またはペプチド断片）は、例えば、天然物（例えば、組織または体液）からの抽出によって；ポリペプチドをコードする組み換え核酸の発現によって；または、化学合成によって、得ることが可能である。天然で由来する源と異なる細胞系で産生されるポリペプチドが「単離される」が、これは、ポリペプチドは必然的に、ポリペプチドに自然に随伴する成分を含まないからである。単離度または純度は、例えば、カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC分析等の、あらゆる適宜の方法によって測定し得る。

20

【0044】

本発明によるFc 受容体は、PEG化および/または遺伝子工学によって、化学的に修飾（改良）され得る。

30

【0045】

知られている研究方法としては、追加的グリコシル化部位の供給が挙げられる（例えば、国際特許WO 91/05867号、同WO 94/09257号および同WO 01/81405号参照）。このような修飾された類似体は、少なくとも1つの追加的N-結合および/またはO-結合した炭水化物鎖を有し得る。半減期を改善する他の試みとして、種々の長さのポリエチレングリコール残基（PEG）のアミノ酸骨格への添加を挙げ得る（例えば、国際特許WO 00/32772号、同WO 01/02017号、同WO 03/029291号参照）。分子は、酸化、硫酸化、リン酸化、PEG化またはそれらの組み合わせによってさらに修飾された、少なくとも1つのN-結合および/またはO-結合したオリゴ糖で修飾し得る（国際特許WO 2005/025606号参照）。これら全ての研究方法は、本発明の変化形の半減期を延長するために同等に用いることが可能であり、従って、本発明によるFc 受容体の好ましい態様において、修飾は、酸化、硫酸化、リン酸化、オリゴ糖の添加またはそれらの組み合わせよりなる群から選択される。さらにN-結合またはO-結合したオリゴ糖の添加が望まれる場合、追加的グリコシル化部位を導入することによって、それらオリゴ糖を導入することが可能である。また、タンパク質は、親和性が変化させられていることも好ましい。

40

【0046】

本発明の1つの様相の実施において、本発明の受容体を含む医薬組成物は、十分なレベルの活性を提供するあらゆる経路で、哺乳類に投与し得る。この医薬組成物は、全身的または局所的に投与し得る。このような投与は、非経口的、経粘膜的、例えば

50

、経口的、経鼻的、経直腸的、経膈的、舌下の、粘膜下のまたは経皮的であり得る。好ましくは、投与は非経口的であり、例えば、静脈内または腹腔内注射により、また、制限しないが、動脈内、筋肉内、経皮および皮下投与も挙げられる。本発明の医薬組成物を局所的に投与する場合、治療する器官または組織中に直接注射し得る。神経系を治療する場合、この投与経路としては、制限しないが、脳内、心室内、脳室内、くも膜下腔内、脳槽内、脊髄内および/または脊髄周囲経路の投与が挙げられ、これらは頭蓋内および脊椎内用の針、およびポンプ装置を有するか、または有しないカテーテルを使用し得る。

【0047】

また、受容体は、グリコシル化し得る。

10

【0048】

最も好ましくは、受容体は、Fc RIIA/B/C (CD32)およびFc RIIIA/B (CD16b)の群から選択される。また、本発明は、それらのアイソフォームおよび一般的に本書に特許請求されるFcRのアイソフォームに関する。

【0049】

好ましい態様において、医薬組成物は、多発性硬化症を治療するための投与単位形態のFcR受容体ポリペプチドを含み、ここで多発性硬化症は、B細胞媒介性形態の多発性硬化症および/または自己抗体駆動形態の多発性硬化症であり、かつ単回投与における患者への投与量は1および20 mg/kgの間、好ましくは2および10 mg/kgの間、より好ましくは25および5 mg/kgの間、さらにより好ましくは2.5および5 mg/kgの間である。

20

【0050】

医薬組成物は、さらに、1以上の以下の物質、洗浄剤および/または糖を含み得る。好ましい洗浄剤はツイーン20である。好ましい糖はマンニトールである。

【0051】

本発明によるFc 受容体は、好ましくは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12および配列番号13の群から選択される配列を有する。これらは表1に概説する。

【0052】

本発明によるFc 受容体は、好ましくは、前記配列の細胞外ドメインのみを含む(可溶性形態の受容体)。前記ドメインは、配列アラインメントから知られており、X線結晶学によって構造的に特徴付けられ、十分に成長した受容体の最初の2つ(CD16、CD32)または最初の3つ(CD64)のIgG様部分を含む(ゾンダーマン(Sondermann) P.、カイザー(Kaiser) J.、ヤコブ(Jacob) U.、免疫複合体認識のための分子基盤: Fc受容体構造の比較(Molecular basis for immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures)、J. Mol. Biol. 2001年、309巻、737-749頁)。

30

【0053】

【表 1】

表 1

<p>ヒト</p> <p>FCγRIA</p> <p>(配列番号 1)</p>	<p>MWFLTLLLLWVPVDGQVDTTKAVIT</p> <p>LQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLP</p> <p>SSSTQWFLNGTATQTSTPSY</p> <p>RITSASVNDSEYRCQRGLSGRSDP</p> <p>IQLEIHRGWLLLQVSSRVFTEGEPL</p> <p>ALRCHAWKDKLVYNVLYYRN</p> <p>GKAFKFFHWNSNLTILKTNISHNGT</p> <p>YHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFP</p> <p>APVLNASVTSPLLEGNLVTL</p> <p>SCETKLLLQRPLQLYFSFYMGSKT</p> <p>LRGRNTSSEYQILTARREDSGLYWC</p> <p>EAATEDGNVLKRSPELELQV</p> <p>LGLQLPTPVWFHVLFYLAVGIMFLV</p> <p>NTVLWVTIRKELKRKKKWDLEISLD</p> <p>SGHEKKVISSLQEDRHLEEE</p> <p>LKCQEQKEEQLEQEGVHRKEPQGAT</p>	<p>配列番号 14</p> <p>ATGTGGTTCTTGACAACTCTGCTCCTTTGGGTTCCA</p> <p>GTTGATGGGCAAGTGGACACCACAAAGGCAGTGATC</p> <p>ACTTTGCAGCCTCCATGGGTGAGCGTGTTCCAAGAG</p> <p>GAAACCGTAACCTTGCACTGTGAGGTGCTCCATCTG</p> <p>CCTGGGAGCAGCTCTACACAGTGGTTTCTCAATGGC</p> <p>ACAGCCACTCAGACCTCGACCCCGAGCTACAGAATC</p> <p>ACCTCTGCCAGTGTCAATGACAGTGGTGAATACAGG</p> <p>TGCCAGAGAGGTCTCTCAGGGCGAAGTGACCCATA</p> <p>CAGCTGGAAATCCACAGAGGCTGGCTACTACTGCAG</p> <p>GTCTCCAGCAGAGTCTTACGGAAGGAGAACCTCTG</p> <p>GCCTTGAGGTGTCATGCGTGGAAGGATAAGCTGGTG</p> <p>TACAATGTGCTTTACTATCGAAATGGCAAAGCCTTT</p> <p>AAGTTTTTCCACTGGAATTCTAACCTCACCATTCTG</p> <p>AAAACCAACATAAGTCACAATGGCACCTACCATTGC</p> <p>TCAGGCATGGGAAAGCATCGCTACACATCAGCAGGA</p> <p>ATATCTGTCACTGTGAAAGAGCTATTTCCAGCTCCA</p> <p>GTGCTGAATGCATCTGTGACATCCCCACTCCTGGAG</p> <p>GGGAATCTGGTCACCCTGAGCTGTGAAACAAAGTTG</p> <p>CTCTTGAGAGGCTGGTTTGCAGCTTTACTTCTCC</p> <p>TTCTACATGGGCAGCAAGACCTGCGAGGCAGGAAC</p> <p>ACATCCTCTGAATACCAAATACTAACTGCTAGAAGA</p> <p>GAAGACTCTGGGTTATACTGGTGCAGGCTGCCACA</p> <p>GAGGATGGAAATGTCTTAAGCGCAGCCCTGAGTTG</p> <p>GAGCTTCAAGTGCTTGGCCTCCAGTTACCAACTCCT</p> <p>GTCTGGTTTCATGTCTTTTCTATCTGGCAGTGGGA</p> <p>ATAATGTTTT</p> <p>TAGTGAACACTGTTCTCTGGGTGACAATACGTAAAG</p> <p>AACTGAAAAGAAAGAAAAGTGGGATTTAGAAATCT</p> <p>CTTTGGATTCTGGTCATGAGAAGAAGGTAATTTCCA</p> <p>GCCTTCAAGAAGACAGACATTTAGAAGAAGAGCTGA</p> <p>AATGTCAGGAACAAAAGAAGAAGAGCTGCAGGAAG</p> <p>GGGTGCACCGGAAGGAGCCCCAGGGGGCCACGTAG</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
<p>ヒト</p>	<p>MWFLTLLLLWGWLLLQVSSRVFMEG</p> <p>EPLALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGK</p>	<p>配列番号 15</p> <p>ATGTGGTTCTTGACAACTCTGCTCCTTTGGGGCTGG</p>	

<p>FCγRIB (配列番号 2)</p>	<p>AFKFFHWNSNLTKTNISH NGTYHCSGMGKHRYTSAGISQYTVK GLQLPTPVWFHVLFLYLAVGIMFLVN TVLWVTIRKELKRKKKWNLE ISLDSGHEKKVISSLQEDRHLEEEL KCQEQKEEQLEQEGVHRKEPQGAT</p>	<p>CTACTACTGCAGGTCTCCAGCAGAGTCTTCATGGAA GGAGAACCTCTGGCCTTGAGGTGTCATGCGTGGAAG GATAAGCTGGTGTACAATGTGCTTTACTATCGAAAT GGCAAAGCCTTTAAGTTTTTCCACTGGAATTC AAC CTCACCATTCTGAAAACCAACATAAGTCACAATGGC ACCTACCATTGCTCAGGCATGGGAAAGCATCGCTAC ACATCAGCAGGAATATCACAATACACTGTGAAAGGC CTCCAGTTACCAACTCCTGTCTGGTTTTCATGTCTCTT TTCTATCTGGCAGTGGGAATAATGTTTTTAGTGAAC ACTGTTCTCTGGGTGACAATACGTAAAGAACTGAAA AGAAAAGAAAAAGTGAATTTAGAAATCTCTTTGGAT TCTGGTCATGAGAAGAAGGTAATTTCCAGCCTTCAA GAAGACAGACATTTAGAAGAAGAGCTGAAATGTCAG GAACAAAAAGAAGAACAGCTGCAGGAAGGGGTGCAC CGGAAGGAGCCCCAGGGGGCCACGTAG</p>	10
<p>ヒト FCγRIB (配列番号 3)</p>	<p>MWFLTTLTLLWVPVDGQVDTTKAVIT LQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLP SSSTQWFLNGTATQTSTPSY RITSASVNDSEYRCQRGLSGRSDP IQLEIHRGWLLLQVSSRVFMEGEPL ALRCHAWKDKLVYNVLYRN GKAFKFFHWNSNLTKTNISHNGT YHCSGMGKHRYTSAGISQYTVKGLQ LPTPVWFHVLFLYLAVGIMFL VNTVLWVTIRKELKRKKKWNLEISL DSGHEKKVISSLQEDRHLEEELKCQ EQKEEQLEQEGVHRKEPQGAT</p>	<p>配列番号 16 ATGTGGTTCCTTGACAACTCTGCTCCTTTGGGTTCCA GTTGATGGGCAAGTGGACACCACAAAGGCAGTGATC ACTTTGCAGCCTCCATGGGTGAGCGTGTCCAAGAG GAAACCGTAACCTTGCACTGTGAGGTGCTCCATCTG CCTGGGAGCAGCTCCACACAGTGGTTTTCTCAATGGC ACAGCCACTCAGACCTCGACCCCCAGCTACAGAATC ACCTCTGCCAGTGTCAATGACAGTGGTGAATACAGG TGCCAGAGAGGTCTCTCAGGGCGAAGTGACCCATA CAGCTGGAAATCCACAGAGGCTGGCTACTACTGCAG GTCTCCAGCAGAGTCTTCATGGAAGGAGAACCTCTG GCCTTGAGGTGTCATGCGTGGAAGGATAAGCTGGTG TACAATGTGCTTTACTATCGAAATGGCAAAGCCTTT AAGTTTTTCCACTGGAATTC AACCTCACCATTCTG AAAACCAACATAAGTCACAATGGCACCTACCATTGC TCAGGCATGGGAAAGCATCGCTACACATCAGCAGGA ATATCACAATACACTGTGAAAGGCCTCCAGTTACCA ACTCCTGTCTGGTTTTCATGTCTCTTTCTATCTGGCA GTGGGAATAATGTTTTTAGTGAACACTGTTCTCTGG GTGACAATACGTAAAGAACTGAAAAGAAAAGAAAAG TGGAATTTAGAAATCTCTTTGGATTCTGGTCATGAG AAGAAGGTAATTTCCAGCCTTCAAGAAGACAGACAT</p>	20
			30
			40

		<p>acacgtgccg gactggccag accagcctca gagaccctgt gcatctgact gtgctttctg agtggctggt gctccagacc cctcacctgg agttccagga gggagaaacc atcgtgctga ggtgccacag ctggaaagac aagcctctgg tcaaggtcac attcttcocag aatggaaaat ccaagaaatt ttcccgttcg gatcccaact tctccatccc acaagcaaac cacagtccca gtgggtgatt accactgcac aggaaaaaat agggtacac cctgtactca tccaagcct gtggaccatc actgttcaaa gctccccaac ttcttcaagg atggggga</p>	10
<p>ヒト FCγRIIB アイソフォーム 3 (配列番号 7)</p>	<p>MGILSFLPVLATESDWADCKSPQPW GHMLLWTAVLFLAPVAGTPAAPPKA VLKLEPQWINVLQEDSVTLT CRGTHSPESDSIQWFHNGNLIPTHT QPSYRFKANNNDSEYTCQTGQTSL SDPVHLTVLSEWLVLQTPHL EFQEGETIVLRCHSWKDKPLVKVTF FQNGKSKKFSRSDPNFSIPQANHS SGDYHCTGNIGYTLYSSKPV TITVQAPSSSPMGIIVAVVTGIAVA AIVAVALIYCRKKRISANPTNPD EADKVGAEANTITYSLLMHPD ALEEPDDQRI</p>	<p>配列番号 20 ATGGGAATCCTGTCATTCTTACCTGTCTTGCCACT GAGAGTGACTGGGCTGACTGCAAGTCCCCCAGCCT TGGGGTCATATGCTTCTGTGGACAGCTGTGCTATTC CTGGCTCCTGTTGCTGGGACACCTGCAGCTCCCCCA AAGGCTGTGCTGAAACTCGAGCCCCAGTGGATCAAC GTGCTCCAGGAGGACTCTGTGACTCTGACATGCCGG GGGACTCACAGCCCTGAGAGCGACTCCATTCAAGTGG TTCCACAATGGGAATCTCATTCCCACCCACACGCAG CCCAGCTACAGGTTCAAGGCCAACAACAATGACAGC GGGGAGTACACGTGCCAGACTGGCCAGACCAGCCTC AGCGACCCTGTGCATCTGACTGTGCTTTCTGAGTGG CTGGTGCTCCAGACCCCTCACCTGGAGTTCCAGGAG GGAGAAACCATCGTGCTGAGGTGCCACAGCTGGAAG GACAAGCCTCTGGTCAAGGTCACATTCTTCCAGAAT GGAAAATCCAAGAAATTTTCCCGTTCCGATCCCAAC TTCTCCATCCCACAAGCAAACCACAGTACAGTGGT GATTACCACTGCACAGGAAACATAGGCTACACGCTG TACTCATCCAAGCCTGTGACCATCACTGTCCAAGCT CCCAGCTCTTACCAGATGGGGATCATTGTGGCTGTG GTCACTGGGATTGCTGTAGCGGCCATTGTTGCTGCT GTAGTGGCCTTGATCTACTGCAGGAAAAGCGGATT TCAGCCAATCCCCTAATCCTGATGAGGCTGACAAA GTTGGGGCTGAGAACAACAATCACCTATTCACTTCTC ATGCACCCGGATGCTCTGGAAGAGCCTGATGACCAG</p>	20 30 40

<p>アイソフォーム 1 (配列番号 9)</p>	<p>AAPPKAVLKLEPQWINVLQEDSVTL TCRGTHSPESDSIPWFHNGNLIPTH TQPSYRFK ANNNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLT VLSEWLVLQTPHLEFQEGETIVLRC HSWKDKPL VKVTEFFQNGKSKKFSRSDPNFSIPQ ANSHSHSGDYHCTGNIQYTYLSSKPV TITVQAPS SSPMGIIVAVVTGIAVAAIIVAAVVA LIYCRKKRISANSTDPVKAAQFEPP GRQMIAIR KRQPEETNNDYETADGGYMTLNPRA PTDDDKNIIYLTLPNDHVNSNN</p>	<p>tggacagctg tgctattcct ggctcctggt gctgggacac ctgcagctcc cccaaaggct gtgctgaaac tcgagcccca gtggatcaac gtgctccaag aggactctgt gactctgaca tgccggggga ctcacagccc tgagagcgac tccattccgt ggttccacaa tgggaatctc attcccaccc acacgcagcc cagctacagg ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc agcagccctg tgcactctgac tgtgctttct gagtggctgg tgctccagac cctcaccctg gagttccagg agggagaaac catcgtgctg aggtgccaca gctggaagga caagcctctg gtcaaggtea cattcttcca gaatggaaaa tccaagaaat tttcccgttc ggatcccaac ttctccatcc cacaagcaaa ccacagtcac agtggtgatt accactgcac aggaaacata ggctacacgc tgtactcacc caagcctgtg accatcactg tccaagctcc cagctcttca ccgatgggga tcattgtggc tgtggcact gggattgctg tagcggccat tgttgcctgct gtagtggcct tgatctactg caggaaaaag cggatttcag ccaattccac tgatcctgtg aaggctgccc aatttgagcc acctggacgt caaatgattg ccatcagaaa gagacaacct gaagaaacca acaatgacta tgaacacagct gacggcggct acatgactct gaaccccagg gcacctactg acgatgataa aaacatctac ctgactcttc ctcccaacga ccattgtcaac agtaataact aa</p>	<p>10 20 30</p>
<p>ヒト FCγRIIC アイソフォーム 2 (配列番号 10)</p>	<p>MGILSFLPVLATESDWADCKSPQPW GHMLLWTAVLFLAPVAGTP AAPPKAVLKLEPQWINVLQEDSVTL TCRGTHSPESDSIPWFHNGNLIPTH</p>	<p>配列番号 23 atgggaatcc tgtcattctt acctgtcctt gccactgaga gtgactgggc tgactgcaag tccccacgc cttggggtea tatgcttctg tggacagctg tgctattcct ggctcctggt gctgggacac ctgcagctcc cccaaaggct</p>	<p>40</p>

	<p>TQPSYRFK</p> <p>ANNNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLT</p> <p>VLSEWLVLQTPHLEFQEGETIVLRC</p> <p>HSWKDKPL</p> <p>VKVTFFQNGKSKKFSRSDPNFSIPQ</p> <p>ANHSHSGDYHCTGNIGYTLYSSKPV</p> <p>TITVQAPS</p> <p>SSPMGIIVAVVTGIAVAIIVAAVVA</p> <p>LIYCRKKRISANSTDPVKAQFEML</p> <p>SCTHLDVK</p>	<p>gtgctgaaac tcgagcccca gtggatcaac</p> <p>gtgctccaag aggactctgt gactctgaca</p> <p>tgccggggga ctcacagccc tgagagcgac</p> <p>tccattccgt ggttccacaa tgggaatctc</p> <p>attcccaccc acacgcagcc cagctacagg</p> <p>ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag</p> <p>tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc</p> <p>agcgaccctg tgcactctgac tgtgctttct</p> <p>gagtggctgg tgctccagac cctcaccctg</p> <p>gagttccagg agggagaaac catcgtgctg</p> <p>aggtgccaca gctggaagga caagcctctg</p> <p>gtcaaggtea cattcttcca gaatggaaaa</p> <p>tccaagaaat tttcccgttc ggatcccaac</p> <p>ttctccatcc cacaagcaaa ccacagtcac</p> <p>agtggtgatt accactgcac aggaaacata</p> <p>ggctacacgc tgtactcacc caagcctgtg</p> <p>accatcactg tccaagctcc cagctcttca</p> <p>ccgatgggga tcattgtggc tgtggctact</p> <p>gggattgctg tagcggccat tgttctgct</p> <p>gtagtggcct tgatctactg caggaaaaag</p> <p>cggatttcag ccaattccac tgatcctgtg</p> <p>aaggctgcc aatttgagat gctttcctgc</p> <p>accacctgg acgtcaaatg a</p>	<p>10</p> <p>20</p>
<p>ヒト</p> <p>FCγRIIC</p> <p>アイソフォーム 3</p> <p>(配列番号 11)</p>	<p>MGILSFLPVLATESDWADCKSPQPW</p> <p>GHMLLWTAVLFLAPVAGTP</p> <p>AAPPKAVLKLEPQWINVLQEDSVTL</p> <p>TCRGTHSPESDSIPWFHNGNLIPTH</p> <p>TQPSYRFK</p> <p>ANNNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLT</p> <p>VLSEWLVLQTPHLEFQEGETIVLRC</p> <p>HSWKDKPL</p> <p>VKVTFFQNGKSKKFSRSDPNFSIPQ</p>	<p>配列番号 24</p> <p>atgggaatcc tgtcattctt acctgtcctt</p> <p>gccactgaga gtgactgggc tgactgcaag</p> <p>tccccccagc cttggggtea tatgcttctg</p> <p>tggacagctg tgctattcct ggctcctggt</p> <p>gctgggacac ctgcagctcc cccaaaggct</p> <p>gtgctgaaac tcgagcccca gtggatcaac</p> <p>gtgctccaag aggactctgt gactctgaca</p> <p>tgccggggga ctcacagccc tgagagcgac</p> <p>tccattccgt ggttccacaa tgggaatctc</p> <p>attcccaccc acacgcagcc cagctacagg</p> <p>ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag</p> <p>tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc</p> <p>agcgaccctg tgcactctgac tgtgctttct</p>	<p>30</p> <p>40</p>

	<p>ANHSHSGDYHCTGNIGYTLYSSKPV TITVQAPS SSPMGIIVAVVTGIAVAAIIVAAVVA LIYCRKKRISATWTSNDCHQKETT</p>	<p>gagtggctgg tgctccagac ccctcacctg gagttccagg agggagaaac catcgtgctg aggtgccaca gctggaagga caagcctctg gtcaaggtca cattcttcca gaatggaaaa tccaagaaat tttccogttc ggatcccaac ttctccatcc cacaagcaaa ccacagtcac agtggtgatt accactgcac aggaaacata ggctacacgc tgtactcacc caagcctgtg accatcactg tccaagctcc cagctcttca ccgatgggga tcattgtggc tgtggctact gggattgctg tagcggccat tgttgcctgct gtagtggcct tgatctactg caggaaaaag cggatttcag ccacctggac gtcaaatgat tgccatcaga aagagacaac ctga</p>	10
<p>ヒト FCγRIIIA (配列番号 12)</p>	<p>MGGGAGERLFTSSCLVGLVPLGLRI SLVTCPLQCGIMWQLLLPTALLLLV SAGMRTEDELPKAVVFLEPQW YRVLEKDSVTLKCGAYSPEPNSTQ WFHNESSLISQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDFVQLEV HIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH SWKNTALHKVTYLLQNGKGRKYFHHN SDFYIPKATLKDSGSYFCRG LFGSKNVSSETVNIITITQGLAVSTI SSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTG LYFSVKTNIRSSTRDWKDHK FKWRKDPQDK</p>	<p>配列番号 25 ATGGGTGGAGGGGCTGGGGAAAGGCTGTTTACTTCC TCCTGTCTAGTCGGTTTGGTCCCTTTAGGGCTCCGG ATATCTTTGGTGACTTGTCCACTCCAGTGTGGCATC ATGTGGCAGCTGCTCCTCCCAACTGCTCTGCTACTT CTAGTTTCAGCTGGCATGCGGACTGAAGATCTCCCA AAGGCTGTGGTGTTCCTGGAGCCTCAATGGTACAGG GTGCTCGAGAAGGACAGTGTGACTCTGAAGTGCCAG GGAGCCTACTCCCCTGAGGACAATTCCACACAGTGG TTTCACAATGAGAGCCTCATCTCAAGCCAGGCCTCG AGCTACTTCATTGACGCTGCCACAGTCGACGACAGT GGAGAGTACAGGTGCCAGACAAACCTCTCCACCCTC AGTGACCCGGTGCAGCTAGAAGTCCATATCGGCTGG CTGTTGCTCCAGGCCCTCGGTGGGTGTTCAAGGAG GAAGACCCTATTACCTGAGGTGTACAGCTGGAAG AACACTGCTCTGCATAAGGTACATATTTACAGAAT GGCAAAGGCAGGAAGTATTTTCATCATAATTCTGAC TTCTACATTCAAAAGCCACACTCAAAGACAGCGGC TCCTACTTCTGCAGGGGGCTTTTTGGGAGTAAAAAT GTGTCTTCAGAGACTGTGAACATCACCATCACTCAA GGTTTGGCAGTGTCAACCATCTCATCATTCTTTCCA CCTGGGTACCAAGTCTCTTTCTGCTTGGTGATGGIA CTCCTTTTTGCAGTGGACACAGGACTATATTTCTCT</p>	20 30 40

		GTGAAGACAAACATTCGAAGCTCAACAAGAGACTGG AAGGACCATAAATTTAAATGGAGAAAGGACCCTCAA GACAAATGA
ヒト FC γ RIIIB (配列番号 13)	MWQLLLPTALLLLVLSAGMRTE Δ LPK AVVFLEPQWYSVLEKDSVTLKQGA YSPEDNSTQWFHNENLISSQ ASSYFIDAATVNDSEYRCQTNLST LSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFE EDPIHLRCHSWKNTALHKVT YLQNGKDRKYFHHNSDFHIPKATLK DSGSYFCRGLVGSKNVSSETVNITI TQGLAVSTISSFSPPGYQVS FCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNI	配列番号 26 ATGTGGCAGCTGCTCCTCCCAACTGCTCTGCTACTT CTAGTTTCAGCTGGCATGCGGACTGAAGATCTCCCA AAGGCTGTGGTGTTCCTGGAGCCTCAATGGTACAGC GTGCTTGAGAAGGACAGTGTGACTCTGAAGTGCCAG GGAGCCTACTCCCCTGAGGACAATTCCACACAGTGG TTTCACAATGAGAACCTCATCTCAAGCCAGGCCTCG AGCTACTTCATTGACGCTGCCACAGTCAACGACAGT GGAGAGTACAGGTGCCAGACAAACCTCTCCACCCTC AGTGACCCGGTGAGCTAGAAGTCCATATCGGCTGG CTGTTGCTCCAGGCCCTCGGTGGGTGTTCAAGGAG GAAGACCCTATTACCTGAGGTGTCACAGCTGGAAG AACACTGCTCTGCATAAGGTACATATTTACAGAAT GGCAAAGACAGGAAGTATTTTCATCATAATTCTGAC TTCCACATTTCCAAAAGCCACACTCAAAGATAGCGGC TCCTACTTCTGCAGGGGGCTTGTGGGAGTAAAAAT GTGTCTTCAGAGACTGTGAACATCACCATCACTCAA GGTTTGGCAGTGTCAACCATCTCATCATTCTCTCCA CCTGGGTACCAAGTCTCTTTCTGCTTGGTGATGGTA CTCCTTTTTGCAGTGGACACAGGACTATATTTCTCT GTGAAGACAAACATTTGA

10

20

30

40

50

【 0 0 5 4 】

好ましいFcRは、以下の核酸によってコードされる：

【 0 0 5 5 】

ヒトFc RIA (配列番号1) は、配列番号14による配列によってコードされる。

ヒトFc RIB (配列番号2) は、配列番号15による配列によってコードされる。

ヒトFc RIB (配列番号3) は、配列番号16による配列によってコードされる。

ヒトFc RIla (配列番号4) は、配列番号17による配列によってコードされる。

ヒトFc ARIIBアイソフォーム1 (配列番号5) は、配列番号18による配列によってコードされる。

ヒトFc RIIBアイソフォーム2 (配列番号6) は、配列番号19による配列によってコードされる。

ヒトFc RIIBアイソフォーム3 (配列番号7) は、配列番号20による配列によってコードされる。

ヒトFc RIIBアイソフォーム4 (配列番号8) は、配列番号21による配列によってコードされる。

ヒトFc RIICアイソフォーム1 (配列番号9) は、配列番号22による配列によってコードされる。

ヒトFc RIICアイソフォーム2 (配列番号10) は、配列番号23による配列によってコードされる。

ヒトFc RIICアイソフォーム3 (配列番号11) は、配列番号24による配列によってコードされる。

ヒトFc RIIIA (配列番号12) は、配列番号25による配列によってコードされる。

ヒトFc RIIIB (配列番号13) は、配列番号26による配列によってコードされる。

【0056】

Fc Rは、好ましくは配列番号5、配列番号6、配列番号7および配列番号8の群から選択される、組み換え非グリコシル化ヒト可溶性Fc RIIbであることが好ましい。

【実施例】

【0057】

生物学的活性化合物である、組み換えヒト可溶性Fc RIIb分子を、遺伝子組み換え大腸菌の発酵によって封入体中に製造する。

【0058】

sFc RIIbは、sFc RIIbの発現に最適化されたcDNA配列で形質転換した大腸菌株B L21 (DE3) において発酵することにより製造する。

【0059】

sFc RIIbは、4つのシステインを含有し、Cys26-Cys68位およびCys107-Cys151位の間に2つの分子内ジスルフィド結合を形成する。N-末端配列は、真核細胞シグナルペプチダーゼのコンセンサス配列に対応する。C-末端は、SER-SER-PROモチーフ後に終止コドンを導入することによって産生した。さらなる修飾は導入しなかった。

【0060】

sFc RIIbの分子量は、天然の状態では19,688.9であり、還元状態で19,692.9である。

【0061】

医薬品成分の製造方法の要旨を表2に示す。

【0062】

【表2】

表2

WCB 1バイアル
<i>E. coli</i> 細胞物質の発酵
<i>E. coli</i> 細胞物質の採取
封入体の単離
封入体からのsFc γ RIIbのリフォールディング
バルク材料を得るためのsFc γ RIIbの精製
-80°CでのsFc γ RIIbバルクの保存

10

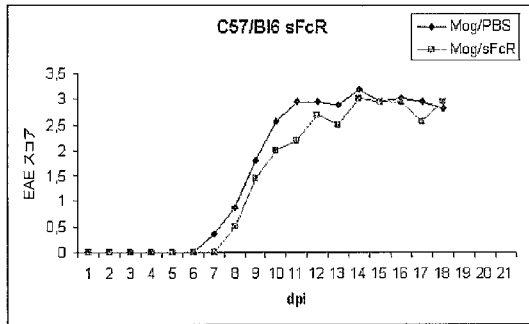
20

30

40

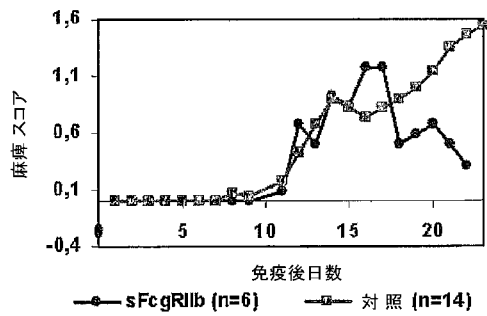
【 図 1 】

図1



【 図 2 】

図2



【 配列表 】

201250200000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2009/061359
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/17		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, 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	US 2005/175998 A1 (NAKAHARA JIN [JP] ET AL) 11 August 2005 (2005-08-11) the whole document	1-11
A	SCHAEFER B ET AL: "Sa.31. Targeting Fcgamma Receptors in the Treatment of Multiple Sclerosis" CLINICAL IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 119, 1 January 2006 (2006-01-01), pages S115-S116, XP024911490 ISSN: 1521-6616 [retrieved on 2006-01-01] the whole document	1-11
-/--		
<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. "B" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 March 2010		Date of mailing of the international search report 01/04/2010
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 Engl, Brigitte

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2009/061359

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TORKILDSEN O; VEDELER C A; NYLAND H I; MYHR K -M: "Fc gamma R and multiple sclerosis: an overview" ACTA NEUROLOGICA SCANDINAVICA, vol. 113, no. Suppl. 183, 2006, pages 61-63, XP009110961 ISSN: 0001-6314 the whole document	1-11
A	WO 2008/091682 A (ZYMOGENETICS INC [US]; ELLSWORTH JEFFREY L [US]) 31 July 2008 (2008-07-31) the whole document	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/061359

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005175998 A1	11-08-2005	WO 03011337 A1	13-02-2003
		JP 4214249 B2	28-01-2009
		US 2007178083 A1	02-08-2007
WO 2008091682 A	31-07-2008	AU 2008209436 A1	31-07-2008
		CA 2676098 A1	31-07-2008
		EP 2124994 A2	02-12-2009
		US 2008219978 A1	11-09-2008

フロントページの続き

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, 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, LY, MA, MD, ME, 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, ST, 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 BA63 CA02 DA06 EA04 GA11
4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 NA14 ZA02 ZA021 ZA022
4H045 AA10 BA09 CA40 DA50 EA22 FA74