(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3689422号
(P3689422)
(45)発行日　平成17年8月31日(2005.8.31)　(24)登録日　平成17年6月17日(2005.6.17)

(51)Int.Cl.[7]	F I
A61K 38/00	A61K 37/02
A61K 9/12	A61K 9/12
A61P 9/10	A61P 9/10
A61P 11/00	A61P 11/00
A61P 25/00	A61P 25/00

請求項の数 32　(全 39 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平6-518313
(86)(22)出願日　平成6年2月8日(1994.2.8)
(65)公表番号　特表平8-511506
(43)公表日　平成8年12月3日(1996.12.3)
(86)国際出願番号　PCT/US1994/001405
(87)国際公開番号　WO1994/017822
(87)国際公開日　平成6年8月18日(1994.8.18)
審査請求日　平成13年2月8日(2001.2.8)
(31)優先権主張番号　08/016,918
(32)優先日　平成5年2月12日(1993.2.12)
(33)優先権主張国　米国(US)

微生物の受託番号　ATCC　CRL10052

(73)特許権者
アーヴァント　イミュノセラピューティクス　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　０２１９４　マサチューセッツ州　ニーダム　フォース　アヴェニュー　１１９
(73)特許権者
リージェンツ　オブ　ザ　ユニヴァースティ　オブ　ミネソタ
アメリカ合衆国　５５４５５　ミネソタ州　ミネアポリス　チャーチ　ストリート　１００
(74)代理人
弁理士　三好　秀和

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ｓＣＲ１およびその他の補体阻害蛋白の肺内投与

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
補体が関与する疾患または障害を医薬の肺内投与により治療するための前記医薬の製造における可溶性補体受容体１型(sCR1)蛋白の使用方法であって、前記sCR1蛋白が、補体受容体１型の１つ以上の短い共通反復配列(SCR)を含み、前記sCR1蛋白が、全長補体受容体１型の補体調節活性を示す、前記使用方法。
【請求項２】
補体が関与する肺疾患または肺障害を医薬の肺内投与により治療するための前記医薬の製造における可溶性補体受容体１型(sCR1)蛋白の使用方法であって、前記sCR1蛋白が、補体受容体１型の１つ以上の短い共通反復配列(SCR)を含み、前記sCR1蛋白が、全長補体受容体１型の補体調節活性を示す、前記使用方法。
【請求項３】
補体が関与する肺疾患または肺障害が、気管支収縮である、請求項２に記載の使用方法。
【請求項４】
アナフィラキシーまたはアナフィラキシー様反応または特発性アナフィラキシーを医薬の肺内投与により治療するための前記医薬の製造における可溶性補体受容体１型(sCR1)蛋白の使用方法であって、前記sCR1蛋白が、補体受容体１型の１つ以上の短い共通反復配列(SCR)を含み、前記sCR1蛋白が、全長補体受容体１型の補体調節活性を示す、前記使用方法。
【請求項５】

sCR1蛋白が、補体受容体１型の少なくとも１つの長い相同的反復配列(LHR)構造を含む、請求項１、２、３または４に記載の使用方法。

【請求項６】

sCR1蛋白が、補体受容体１型のLHR-A、LHR-B、LHR-C、LHR-D、SCR-29、およびSCR-30の構造モチーフを含む、請求項５に記載の使用方法。

【請求項７】

可溶性補体受容体１型蛋白が、ATCCに寄託されてCRL 10052という番号が割当てられている、プラスミドpBSCR1c/pTCSgptを担持するチャイニーズハムスター卵巣細胞DUX B11によって発現される可溶性補体受容体蛋白の特徴を有する、請求項６に記載の使用方法。

【請求項８】

補体が関与する疾患または障害が、神経学的疾患、不適切なまたは望ましくない補体活性化による障害、炎症性障害、虚血後再灌流状態、感染病、敗血症、免疫複合体疾患および自己免疫疾患からなる群から選択される、請求項１に記載の使用方法。

【請求項９】

補体が関与する疾患または障害が、血液透析合併症、超急性同種移植片拒絶反応、異種移植片拒絶反応およびインターロイキン－２療法実施中のインターロイキン－２誘発性中毒からなる群から選択される不適切なもしくは望ましくない補体活性化による障害である、請求項１に記載の使用方法。

【請求項１０】

補体が関与する疾患または障害が、心筋梗塞、バルーン血管形成術、心－肺バイパスまたは腎臓バイパスにおけるポンプ後症候群、血液透析および腎虚血からなる群から選択される虚血後再灌流状態である、請求項１に記載の使用方法。

【請求項１１】

補体が関与する肺疾患または肺障害が、呼吸困難、喀血、喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、肺気腫、および肺塞栓症および梗塞からなる群から選択される疾患である、請求項２に記載の使用方法。

【請求項１２】

補体が関与する肺疾患または肺障害が、肺炎、線維形成誘導性塵疾患、肺線維症、有機塵疾患、刺激性ガスおよび化学物質への曝露、過敏性肺炎、寄生虫症、グッドパスチャー症候群、成人呼吸促迫症候群(ARDS)および肺血管炎からなる群から選択される、請求項２に記載の使用方法。

【請求項１３】

線維形成誘導性塵疾患が、シリコン、石炭塵、ベリリウム、およびアスベストからなる群から選択される塵埃または鉱物質に曝露された結果として生じる、請求項12に記載の使用方法。

【請求項１４】

刺激性ガスまたは化学物質への曝露が、塩素、ホスゲン、二酸化硫黄、硫化水素、二酸化窒素、アンモニアおよび塩化水素からなる群から選択されるガスまたは化学物質への曝露である、請求項12に記載の使用方法。

【請求項１５】

補体が関与する肺疾患または肺障害が、肺に対する熱傷によるものである、請求項２に記載の使用方法。

【請求項１６】

補体が関与する肺疾患または肺障害が、肺に対する煙吸入熱傷である、請求項２に記載の使用方法。

【請求項１７】

気管支収縮が煙吸入の結果として生じる、請求項３に記載の使用方法。

【請求項１８】

医薬が、可溶性補体受容体１型(sCR1)蛋白および医薬的に許容される分散剤を含むエアロゾル製剤である、請求項１、２または４のいずれかに記載の使用方法。

【請求項１９】
エアロゾル製剤が、sCR1蛋白が細かく分割された粉末として存在する乾燥粉末エアロゾル製剤である、請求項18に記載の使用方法。
【請求項２０】
エアロゾル製剤が、医薬的に許容される希釈液をさらに含んでいる液体エアロゾル製剤である、請求項18に記載の使用方法。
【請求項２１】
希釈液が、滅菌水、食塩水、緩衝食塩水およびデキストロース溶液からなる群から選択される希釈剤である、請求項20に記載の使用方法。
【請求項２２】
希釈液が、pH7.0から8.0の範囲のリン酸緩衝食塩水である、請求項21に記載の使用方法。
【請求項２３】
sCR1蛋白が、補体受容体１型の長い相同的反復配列(LHR)構造モチーフを特徴とする、請求項18、19または20に記載の使用方法。
【請求項２４】
sCR1蛋白が、補体受容体１型のLHR-A、LHR-B、LHR-C、LHR-D、SCR-29およびSCR-30構造モチーフを含む、請求項23に記載の使用方法。
【請求項２５】
可溶性補体受容体１型が、ATCCに寄託されてCRL 10052という番号が割当てられている、プラスミドpBSCR1c/pTCSgptを担持するチャイニーズハムスター卵巣細胞DUX B11によって発現される可溶性補体受容体蛋白の特徴を有する、請求項24に記載の使用方法。
【請求項２６】
分散剤が界面活性剤である、請求項18に記載の使用方法。
【請求項２７】
界面活性剤が、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪酸アルコール、およびポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルからなる群から選択される、請求項26に記載の使用方法。
【請求項２８】
界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートである、請求項27に記載の使用方法。
【請求項２９】
界面活性剤の濃度が製剤重量に対して0.001重量％～４重量％である、請求項26に記載の使用方法。
【請求項３０】
補体阻害蛋白粉末が凍結乾燥された補体阻害蛋白である、請求項19に記載の使用方法。
【請求項３１】
さらに充填剤を含んでいる、請求項19に記載の使用方法。
【請求項３２】
充填剤が、ラクトース、ソルビトール、スクロースおよびマンニトールからなる群から選択される、請求項31に記載の使用方法。
【発明の詳細な説明】
本特許出願は、1993年2月12日（12,02,93）に出願した同時出願中の米国特許出願番号08/016,918の一部継続である。本発明の一部はNIH助成契約番号S07RR05869から資金を得て行われたものであり、連邦政府が本発明に対し一定の権利を有する。
１．発明の分野
本発明は、補体阻害蛋白を含んで成り、補体が関与する疾患または障害、特に肺の疾患または障害の予防的もしくは治療的処置に使用する、吸入による肺内投与のための製剤に関する。具体的には、その蛋白は補体受容体またはそのフラグメントもしくは補体受容体ファミリーに属する可溶性のもので、保存SCRモチーフを含有し、補体の活性を阻害することができるものである。さらに具体的には、本発明は、補体受容体蛋白を肺経路により投

与することで、具体的にいえば補体受容体蛋白をエアロゾル化してから吸引することで肺に直接送り込むことによって、特定の補体関連肺疾患を直接治療することに関する。本発明は、気管支収縮またはアナフィラキシー、あるいはその両者を治療するのに補体阻害蛋白を使用することにも関する。

２．発明の背景

2.1.補体系

補体系とは、ヒト正常血清中グロブリンの約10%を占める蛋白群である（L. E. フッドらによる『免疫学　第２版』The Benjamin/Cummings Publishing Co., Menlo Park, California 339頁（1984年））。補体（C）は免疫およびアレルギー反応の媒介にあたって重要な役割を果たす（H. J. ラップおよびT. ボルソスによる『補体作用の分子生物学的基礎』Appleton-Century-Crofts（Meredity）, New York（1970年））。補体成分を活性化すると、因子群が生成され、これには補体依存性疾患に伴う炎症を媒介する走化性ペプチドが含まれる。補体カスケードの連続的活性化は、抗原抗体複合体などの古典的経路を通じて、あるいは一定の細胞壁多糖類の認識が関与する二次経路によって生じうる。活性化された補体蛋白が媒介する活動としては、標的細胞の溶解、走化性、オプソニン作用、血管平滑筋およびその他の平滑筋細胞の刺激、ならびに肥満細胞脱顆粒、小血管透過性増大、白血球の定方向遊走、Bリンパ球およびマクロファージの活性化などの機能異常がある（H. N. エイゼンによる『免疫学』Harper & Row Publishers, Inc. Hagerstown, Maryland 512頁（1974年））。

蛋白分解カスケードの段階では、生物学的に活性状態の蛋白フラグメントであるアナフィラトキシンC3a、C4a、およびC5a（WHO科学グループによるWHO Tech, Rep. Ser. 606巻　5頁（1977年）およびその引用文献を参照）は、第３（C3）、第４（C4）、第５（C5）のネィティブな補体成分から放出される（T. E. ハグリによるCRC Crit. Rev. Immunol. 1巻　321頁（1981年）；H. バルトおよびA. G. ハーマンによるAgents Actions 13巻　405頁（1982年））。

2.2　補体受容体

補体受容体１（CR1）：ヒトC3b/C4b受容体は、CR1またはCD35と呼ばれ、赤血球、単球／マクロファージ、顆粒球、B細胞、一部のT細胞、脾濾胞樹枝状細胞、および糸球体有足細胞に存在する（D. T. フィーロンによるJ. Exp. Med. 152巻　20頁（1980年）；J. G. ウィルソンらによるJ. Immunol 131巻　684頁（1983年）；M. レインズらによるN. Engl. J. Med. 295巻　10頁（1976年）；M. D. カザチュキンらによるClin. Immunol. Immunopathol. 27巻　210頁（1982年））。CR1はC3b、C4bおよびiC3bと特異的に結合する。

CR1は、C3/C5転換酵素の古典的経路や第二経路を阻害し、因子ＩによるC3bおよびC4bの切断の補助因子として働くことができ、CR1は受容体として働くのに加えて補助的な調節機能も持っていることがわかる（D. T. フィーロンによるProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76巻　5867頁（1979年）；K. I. イダおよびV. ヌッセンツヴァイクによるJ. Exp. Med. 153巻　1138頁（1981年））。補体活性化の第二経路では、２分子複合体のC3b,BbはC3酵素（転換酵素）である。CR1（および高濃度では因子H）はC3bと結合することができ、またC3b,Bbの解離を促すこともできる。さらに、C3b,CR1（およびC3b,H）が形成されると、C3bは因子Ｉによる不可逆的な蛋白分解不活化を受けやすくなり、その結果として不活化されたC3b（iC3b）が生成される。補体活性化の古典的経路では、複合体C4b,2aがC3転換酵素である。

CR1（および高濃度ではC4結合蛋白のC4bp）はC4bと結合することができ、またC4b,2aの解離を促すこともできる。結合すると、C4bはC4cおよびC4d（不活化補体蛋白）に切断されることを介して因子Ｉによる不可逆的な蛋白分解不活化を受けやすくなる。

CR1は、補体受容体タイプ２（CR2）と相同性を有することがわかっている（J. J. ワイズらによるProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83巻　5639～5643頁（1986年））。CR1は、４つの長い相同反復（ロングホモロジアスリピート、long homologous repeat,LHR）に配列された複数の短い共通反復（ショートコンセンサスリピート、short consensus repeat, SCR）から成る糖蛋白である。

LHR-Dと呼ばれる大部分のC-末端LHRの後にはさらに２つのSCR、すなわち経膜（transmembrane）領域および細胞質領域が追加される（クリックスタインらによるJ. Exp. Med. 165巻　1095頁（1987年）；クリックスタインらによるJ. Exp. Med. 168巻　1699～1717頁（1988年））。赤血球CR1は、自己免疫疾患患者における循環免疫複合体の除去に関与するようであり、そのレベルはエイズの発症と関連するようでもある（稲田らによるAIDS Res. 2巻　235頁（1986年）；稲田らによるAnn. Rheu. Dis. 4巻　287頁（1989年））。

C1の４種類のアロタイプ形態が見つかっており、分子量40,000～50,000ダルトンずつの差がある。最もよく見られる２種類のアロタイプはFおよびSで、アロタイプAおよびBとも呼ばれ、それぞれ分子量は250,000ダルトンおよび290,000ダルトンであり（T. R. ダイクマンらによるProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80巻　1698頁（1983年）；W. W. ウォンらによるJ. Clin. Invest. 72巻　685頁（1983年））、珍しい２種類のほうの分子量はそれぞれ210,000ダルトンおよび290,000ダルトンである（T. R. ダイクマンらによるJ. Exp. Med. 159巻　691頁（1984年）；T. R. ダイクマンらによるJ. Immunol. 134巻　1787頁（1985年））。これらの違いは明らかに、グリコシル化の状態というよりも、むしろCR1のポリペプチド鎖の多様性を示している。というのも、それらはエンドグリコシダーゼFによる精製済み受容体蛋白の処理によっても完全に破壊はされないからであり（W. W. ウォンらによるJ. Clin. Invest. 72巻　685頁（1983年）、またグリコシル化阻害薬であるツニカマイシン存在下で受容体アロタイプを生合成したときにも認められたからである（D. M. ルブリンらによるJ. Biol. Chem. 261巻　5736頁（1986年））。CR1の４種類のアロタイプのすべてにC3b-結合活性がある（T. R. ダイクマンらによるProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80巻　1698頁（1983年）；W. W. ウォンらによるJ. Clin. Invest. 72巻　685頁（1983年）；T. R. ダイクマンらによるJ. Exp. Med. 159巻　691頁（1984年）；T. R. ダイクマンらによるJ. Immunol. 134巻　1787頁（1985年））。～250kDのアロタイプF（またはA）には４つのLHRがあり、それらはそれぞれLHR-A、-B、-C、-Dと呼ばれ、5'から3'である（ウォンらによるJ. Exp. Med. 169巻　847頁（1989年））。LHR-Aの最初の２つのSCRはそのC4bとの結合能力を決定し、LHR-Bおよび-Cのそれに相当する単位はC3bとのより高い親和性を決定する。より大きい～290Kdのアロタイプ S（またはB）には５番目のLHRがあり、これはLHR-Bの5'半分およびLHR-Aの3'半分のキメラであり、第３のC3b結合部位を含むと予想される（ウォンらによるJ. Exp. Med. 169巻　847頁（1989年））。～210kDのCR1の最も小さいアロタイプF'（またはC）は、SLE患者で多く見られ、また狼瘡（lopus）多発家族でも見られており（ダイクマンらによるJ. Exp. Med. 159巻　691頁（1984年）；ヴァン・ダインらによるClin. Exp. Immunol. 68巻　570頁（1987））、１つのLHRが欠失した結果として生じたとも考えられ、また補体フラグメントで被覆された免疫複合体と効率よく結合する能力が損なわれているのかもしれない。

CR1のナチュラルに発生する可溶性の形態が、正常なヒトおよび一定のSLE患者の血漿で確認されている（ユーンらによるJ. Immunol. 134巻　3332～3338頁（1985年））。その構造および機能の特徴は赤血球（細胞表面）CR1に構造的にも機能的にも似ている。フルケードら（J. Exp. Med. 168巻　1255～1270頁（1988年））も、C4b結合領域を含有するCR1の分泌形態を生成すると予想されるヒトCR1転写単位に、代わりのポリアデニル化部位を認めている。

CR1の幾つかの可溶性フラグメントも、組換えDNAの手法により、発現しているDNAから経膜領域を除くことによって生成されている（フィーロンらによる国際公開公報、WO 89/09220（1989年10月5日）；フィーロンらによる国際公開公報、WO 91/05047（1991年4月18日））。可溶性CR1フラグメントは、含んでいる領域により機能的に活性状態であり、C3bまたはC4bあるはその両者と結合し、因子Ｉの補助因子活性を有していた。このような構造のために、in vitroでは好中球酸化バースト（neutrophil oxidative burst)、補体媒介溶血、およびC3aやC5aの産生などの補体活性化による結果が生じるのを阻害した。可溶性の構造であるsCR1/pBSCR1cもまた、in vivoで逆受動アルツス反応における活性を示し（フィーロンらによる前掲（1989年）；フィーロンらによる前掲（1991年）；イーらによる前掲1991年））、虚血性心筋梗塞後の炎症および壊死を抑制し（フィーロンらによる前掲

（1989年）；フィーロンらによる前掲（1989年）；ワイズメンらによるScience 249巻 146～151頁（1990年））、移植後の生存率を増大させた（プルイットおよびボリンガーによるJ. Surg. Res. 50巻 350頁（1991年）；プルイットらによるTransplantation 52巻 868頁（1991年））。

CR2：補体受容体タイプ２（CR2、CD21）は、15ないし16のSCRから成る細胞外領域、24アミノ酸の経膜領域、および34アミノの酸細胞質領域から成る経膜リン蛋白（transmembrane phosphoprotein）である（ムーラらによるProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84巻 9194～9198頁（1987年）ワイズらによるJ. Exp. Med. 167巻 1047～1066頁（1988年））。可溶性組換えCR2を電子顕微鏡で調べたところ、CR1と同じく長く伸びた非常に柔軟な分子で、その輪郭は長さ39.6ナノメーター×3.2ナノメーターと推定され、SCRはそれぞれ長さ2.4ナノメーターの小環をしている（ムーアらによるJ. Biol. Chem. 34巻 20576～20582頁（1989年））。

COS細胞においてCR2の欠失または置換突然変異体を発現させる真核発現ベクターを使った組換えDNA実験を利用して、CR2のリガンド結合部位が分子の２つのN-末端SCRに局在することが確認されている（ロウェルらによるJ. Exp. Med. 170巻 1931～1946頁（1989年））。iC3bおよびC3dgなどのC3リガンドの多価形態のCR2は、細胞表面に結合することにより、B細胞の活性化をもたらす（メルチャーらによるNature 317巻 264～267頁（1985年）；ボンサックらによるJ. Immunol. 141巻 457～463頁（1988年）；カーターらによるJ. Immunol. 143巻 1755～1760頁（1988年））。

組換え可溶性CR2の１形態がすでに生成されている（ムーアらによるJ. Biol. Chem. 264巻 20576～20582頁（1989年））。可溶性CR1系と相似して、可溶性CR2は、受容体の経膜領域と細胞質領域を含まないが、細胞外領域全体を含有する発現ベクターからの組換え系で生成された。この組換えCR2は、Kd＝27.5mMで1:1複合体としてC3dgと結合する、またKd＝3.2nMで1:1複合体としてエプスタイン－バー蛋白gp350/220と結合すると報告されている（ムーアらによるJ. Viol. Chem. 264巻 20576～20582頁（1989年））。

CR3：第３の補体受容体であるCR3も、iC3bと結合する。iC3bがCR3に結合すると、炎症が生じている間に補体を活性化する内皮細胞に対する好中球の付着が促進される（マークスらによるNature 339巻 314頁（1989年））。CR3は食作用にも関与しており、この作用ではiC3bに被覆された粒子は好中球またはマクロファージによって巻き込まれる（ライトらによるJ. Exp. Med. 156巻 1149頁（1982年））；ライトらによるJ. Exp. Med. 158巻 1338頁（1983年））。

CR4：CR4（CD11）も、白血球付着に関与するようである（岸本らによるAdv. Immunol. 46巻 149～182頁）。

2.3. ヒト疾患におけるCR1の異常

全身性エリテマトーデス（SLE）患者の赤血球ではCR1の発現が減少することが、複数地域の研究者によって報告されている。たとえば日本（宮川らによるLancet 2巻 493～497頁（1981年）；箕田らによるArthr. Rheum. 27巻 1329～1335頁（1984年））、米国（イイダらによるJ. Exp. Med. 155巻 1427～1438頁（1982年）；ウィルソンらによるN. Engl. J. Med. 307巻 981～986頁（1982年））、およびヨーロッパ（ウォルポートらによるClin. Exp. Immunol. 59巻 547頁（1985年）；ジュヴェンらによるComplement 3巻 88～96頁（1986年）；ホルムらによるClin. Exp. Immunol. 63巻 41～48頁（1986年））からの報告がある。CR1の数は、血清中免疫複合体濃度、血清中C3d濃度、および赤血球に結合したC3dgの量と反比例することもわかっており、これはおそらく補体を活性化する免疫複合体の取込みおよび赤血球において「無害な傍観者」として沈積されることを示している（ロスらによるJ. Immunol. 135巻 2005～2014頁（1985年）；ホルムらによるClin. Exp. Immunol. 63巻 41～48頁（1986年）；ウォルポートらによるClin. Exp. Immunol. 59巻 547頁（1985年））。

SLEにおける補体受容体発現の異常は、赤血球のCR1に限定されているわけではない。SLE患者では、好中球の総細胞CR1およびBリンパ球の血漿膜CR1が相対的に減少することもわかっている（ウィルソンらによるArthr. Rheum. 29巻 739～747頁（1986年））。

赤血球中CR1の相対的減少は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染患者（F. A. タウスクらによるJ. Clin. Invest. 78巻　977～982（1986年））、およびらい腫らい（F. A. タウスクらによるJ. Invest. Dermat. 85巻　58s～61s（1985年））でも認められている。
補体の活性化は、炎症を含む病的状態にも伴って見られる。クローン病の腸の炎症は、単核および多形核白血球のリンパ球性浸潤を特徴とする。最近では（アーレンシュテットらによるNew Engl. J. Med. 322巻　1345～1349頁（1990年））、クローン病患者の空腸液中の補体C4濃度が健常対照に比べて高くなっていることが認められた。そのほかに補体系が炎症に関与している病的状態としては、熱傷（火傷、凍傷）（ゲルファンドらによるJ. Clin. Invest. 70巻　1170頁（1982年）；デムリングらによるSurgery 106巻　52～59頁（1989年））、血液透析（デピッシュらによるKidney Inst. 37巻　696～706頁（1990年）；小島らによる日本腎臓学会誌　31巻　91～97頁（1989年）、および心-肺バイパスにおけるポンプ後症候群（post pump syndrome）がある（チェノヴェスらによるComplement Inflamm. 3巻　152～165頁（1981年）；チェノヴェスらによるComplement 3巻　152～165頁（1986年）；サラマらによるN. Engl. J. Med. 318巻　408～414頁（1988年））。
補体および白血球の双方が、成人呼吸促迫症候群（adult respiratory distress syndrome）の病因に関係すると報告されている（ジロウらによるClin Exp. Immunol. 79巻　151～157頁（1990年）；ラングロワらによるHeart Lung 18巻　71～84頁（1989年））。補体系活性化は、敗血症における致死的合併症の発症に関与していると示唆されており（ハックらによるAm. J. Med. 86巻　20～26頁（1989年））、また免疫複合体誘発性脈管炎（コクレインによるSpringer Seminar Immunopathol. 7巻　263頁（1984年））、糸球体腎炎（クザーらによるKidney Inst. 29巻　879頁（1985年））、溶血性貧血（シュライバーおよびフランクによるJ. Clin. Invest. 51巻　575頁（1972年））、重症筋無力症（レノンらによるJ. Exp. Med. 147巻　973頁（1978年）；ビーセッカーおよびゴメスによるJ. Immunol. 142巻　2654頁（1989年））、II型コラーゲン誘発性関節炎（ワトソンおよびタウンズによるJ. Exp. Med. 162巻　1878頁（1985年））、ならびに実験的アレルギー性および超急性異種移植拒否反応（クネヒテルらによるJ. Heart Transplant 4巻　5号　541頁（1985年）；グットマンによるTransplantation 17巻　383頁（1974年）；アダチらによるTrans. Proc. 19巻　1号　1145頁（1987年））など自己免疫疾患の動物モデルで組織損傷を引き起こしている。組換えIL-2による免疫療法中に補体を活性化すると、IL-2治療で認められる毒性および副作用が重度になるようである（ジスらによるJ. Immunol. 144巻　2419頁（1990年））。
補体は、免疫複合体が関与する疾患でも役割を果たしていると思われる。免疫複合体は多くの病的状態で認められており、その状態としては慢性関節リウマチまたはSLEなどの自己免疫疾患、エイズなどの血液悪性疾患（テイラーらによるArthrisits Rheum. 26巻　736～744頁（1983年）；稲田らによるAIDS Research 2巻　235～247頁（1986年））、ならびに自己抗体または補体活性化もしくはその両者が関わる障害（ロスらによるJ. Immunol. 135巻　2005～2014頁（1985年））があるが、これらに限定されない。
溶解性CR1を使って補体活性化を阻害することには、多数の動物モデルで成功している（B. P. モートらによるAmer. Review of Respiratory Disease 145巻　A845頁（1992年）；M. S. ムリガンらによるJ. Immunol. 148巻　1479～1485頁（1992年）；C. G. イェーらによるJ. Immunol. 146巻　250～256頁（1991年）；ワイズマンらによるScience 249巻　146～151頁（1990年）；プルイットらによるTransplantation 52巻　5号　868～873頁（1991年）；プルイットおよびボリンガーによるJ. Surg. Res. 50巻　350～355頁（1991年）；ラビノビッチらによるJ. Immunol. 149巻　1744～1750頁（1992年））。
ワイズマンらによる研究（Science 249巻　146～151頁）で、sCR1によって酵母細胞壁成分、ザイモサンにより活性化されたヒト血清中でC3aおよびC5aの生成を90%抑えられることが実証されている。ワイズマンらは（前掲（1990年））、ラットを対象にsCR1を使用して、補体活性化を阻害し、心筋梗塞による損傷を軽減するのにも成功している。sCR1は、逆アルツス反応（イェーらによるJ. Immunol. 146巻　250～256頁（1991年））および超急性異種移植拒絶反応（プルイットらによるTransplnatation 52巻　868～873頁（1991年

））の補体に依存する過程を阻害するようでもある。最近のデータ（モートらによるAmer. Rev. Respiratory Disease 145巻　A845頁（1992年）では、sCR1はブタでの心肺バイパス実験モデルという補体の活性化が実証されている状況で、補体活性化を防ぐのに有用であることが示唆されている。
現在、動物への投与経路としては静脈を通じての非経口的投与、筋注または皮下注が好ましいとされており、また治療有効量のsCR1を全身に送り込むのに実際的な唯一の方法とされてきている。
2.4.　肺損傷における補体の不確かな役割
急性炎症性損傷における補体の役割については、幾つかのモデルを使って研究されてきている（M. S. ムリガンらによるJ. Immunol. 148巻　1479～1485頁（1992年））。ラットでIgGまたはIgA免疫複合体のいずれかが肺内に沈積すると、血管内皮細胞および肺胞上皮細胞の双方に急性肺損傷を生じる（M. S. ムリガンらによるJ. Immunol. 148巻　3086～3092頁（1992年））。実験モデルからは、免疫複合体誘発性肺損傷では損傷を完全に発現させるために補体が必要であることがわかる（M. S. ムリガンによる前掲（1992年））。補体を阻害すると、腸虚血によりもたらされた遠隔肺損傷の重症度が軽減される（ヒルらによるJ. Immunol. 149巻　5号　1723～1728頁（1992年））。
煙吸入気道熱傷は、主要熱傷性外傷における重要な共同病因である。不完全燃焼で発生する有害化学物質は、曝露された気道に直接損傷を与えるだけでなく、走化性因子を活性化し、そのために白血球が活性化されたりプロスタノイドが産生されたりすることもある。活性化された多形核白血球は、煙吸入後の進行性気道炎症における重要なエフェクターと考えられている（バサダーらによるSurg. 104巻　208～215頁（1988年））。後に肺水腫を伴う気道損傷は、肺の酸素化状態を悪くし、肺の感染しやすさを増大させ、そのために罹患率および死亡率が高くなる。喫煙後の生理学的変化は補体活性化によるものだということが示されてはいるが（ロビンズらによるAm. J. Physiol. 260巻　L254～259頁（1991年）；小林らによるArch. Env. Health 43巻　371～374頁（1988年）；キューらによるClin. Immunol. Immunopath. 43巻　73～81頁（1987年））、煙吸入気道熱傷における補体活性化の役割はまだ明らかになっていない。さらに、以前のある研究で、ヒツジモデルではコブラ毒因子を事前投与しても煙吸入後の肺損傷は緩和せず、肺の防御機構に悪影響が生じたことが示されている（島津らによるU. S. Army Inst. for Lung. Res. Ann. Res. progress Report for FY 1988 276～87頁（1988年））。コブラ毒因子は、補体を活性化しかつ消耗させるものであるが、一過性の低酸素血症および肺高血圧症も誘発した。
補体系の活性化について調べる研究は、補体系を操作するのに適当なツールがないことが障害となってきた。これまでの多くの研究は、試薬としてコブラ毒因子（CVF）を利用して補体系を活性化し、この方法で動物の損なわれていない補体成分を消耗させ、補体系が働かないようにしてきた。しかし、補体系をCVFで消耗させる過程では、補体系が大量に活性化され、それに伴ってC3b、アナフィラトキシンC3aおよびC5a、ならびに膜侵襲複合体など補体系活性化の生物学的に活性な産物すべてが合成される（ゴールドシュタインによる「補体：生物学的活性産物」ガリンら編『炎症、根本原理と臨床の関係　第２版』Raven Press, New York（1992年））。このような実験では、観察された効果は補体系が働くなったという事実によるのではなく、むしろ補体系がそれ以前に活性化されたためであるかもしれないので、ここから得られるデータは信頼できない。したがって、CVFを使用したこれらの実験の解釈は不確かであり、前記のモデル、あるいはアナフィラキシーなど他の条件における補体の役割を評価する信頼に足る方法というものはない。
2.5.　蛋白治療薬のエアロゾル化
最近、蛋白およびペプチド薬を鼻腔内、消化器または直腸内吸収などの非侵襲的経路によりデリバリーすることが注目されてきている（V. H. L. リーによるCrit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 5巻　69頁（1988年）；V. H. L. リーによるJ. Controlled Release 13巻　213頁（1990年）；V. H. L. リー編『ペプチドおよび蛋白薬のデリバリー』Marcel Dekker, New York（1991年）；A. G. ド・ボアーらによるJ. Controlled Release 13巻　241頁（1990年））。肺経路を通じてまたは肺循環を通じて通過中にデリバリーされる蛋

白がどうなるかに特に焦点を当てた研究も中にはある（M. N. ギルスピーらによるJ. Pharm. Ther. 232巻　675頁（1985年）；ブラリーらによるJ. Immunol. 121巻　926～929頁（1978年）；ブラリーらによるJ. Clinical. Invest. 63巻　1103～1109頁（1979年）；ダンセンらによるChest 75巻（2号　増補）276～278頁（1979年）；ウィルビーおよびウィルビーによるJ. Immunol. 119巻　2137～2146頁（1977年）；ウィルビーらによるLab. Invest. 40巻　399～414頁（1979年）；シェンキンらによるJ. Immunol. 124巻　1763～1772頁（1980年））。

一部では、蛋白の肺デリバリーの領域におけるこれらの研究が、噴霧療法でより大きな生理活性蛋白をデリバリーするための液体エアロゾル用製剤の開発につながっている（R. C. ハバードらによるAnnals. Int. Med. 111巻　206頁（1989年）；J. オースヴァインおよびJ. パッテオンによる「蛋白のエアロゾル化」『呼吸器薬剤デリバリーに関するシンポジウム講演集II』Keystone Co. （1990年）；R. J. デブスらによるJ. Immunol. 140巻　3482頁（1988年））。たとえば、組換えヒト成長因子をネブライザーによりラットに投与し、成長速度を測定して生物学的利用性を評価している（オースヴァインによる前掲（1990年））。ハバードら（前掲）は、α-抗トリプシンを肺にデリバリーすることが全身への循環に有効であることを示した。さらに、インスリンのエアロゾル吸入によるデリバリーが、糖尿病患者にとって有効な治療製剤であるとの報告がある（F. M. ウィグレイによるDiabetes 20巻　552頁（1971年））。

本願明細書の第２章での文献の引用または参照は、それらの引例が本発明で利用できる従来技術であると解釈してはならない。

３．発明の概要

本発明は、補体が関与する疾患または障害の治療のために吸入により補体阻害蛋白を肺に投与することに関する。より具体的には、本発明は、補体受容体１（CR1）を吸入により肺に投与することに焦点を当てている。したがって、本発明は、補体を阻害するのに有効な補体阻害蛋白、さらに具体的にいえばCR1蛋白、ならびに分散剤をある程度の量含んで成るエアロゾル製剤を提供する。１実施例では、補体阻害蛋白、より具体的にいうとCR1蛋白を、液体エアロゾル製剤の形で提供することができる。この代わりに、補体阻害蛋白、より具体的にいうとCR1蛋白を乾燥粉末エアロゾル製剤の形で提供することができる。好ましい実施例では、CR1は可溶性CR1（sCR1）である。

ここで「補体阻害蛋白」というときには、現在の技術で知られているこれらの補体阻害蛋白のフラグメント、誘導体および類似体を含むが、ただし、当該フラグメント、誘導体または類似体は補体阻害活性を有することを条件とする。

さらに本発明は、補体が関与する疾患または障害を持つ者に対して、全身的補体活性を阻害するのに有効な補体阻害蛋白をある程度の量で肺に投与することを含んで成る補体が関与する全身性の疾患または障害の治療方法に焦点を当てている。また本発明は、補体が関与する肺疾患または肺障害を持つ者に対して、補体活性を阻害するのに有効な補体阻害蛋白をある程度の量で肺に投与することを含んで成る補体が関与する肺疾患または肺障害の治療方法を提供する。

本発明はさらに、アナフィラキシー患者に対して補体活性を阻害するのに有効な補体阻害蛋白をある程度の量で投与することを含んで成るアナフィラキシー治療法を提供する。１実施例では、補体阻害蛋白を非経口的に投与することができる。補体阻害蛋白を肺に投与できればさらに好ましい。アナフィラキシーを伴う気管支収縮の治療には、肺内投与が特に適応となる。

本発明はそのうえ、気管支収縮患者に対して補体活性を阻害するのに有効な補体阻害蛋白をある程度の量で投与することを含んで成る気管支収縮治療法を提供する。１実施例では、補体阻害蛋白を非経口的に投与することができる。補体阻害蛋白を肺に投与できればさらに好ましい。アナフィラキシー、喘息、その他肺を刺激したり肺に傷害を与えるような事柄を伴う気管支収縮の治療には、肺内投与が特に適応となる。

本発明は、患者に補体阻害蛋白を投与すると、肺に関連する疾患または傷害の補体関連作用を調節することができるという重要かつ驚くべき発見に基づいている。この発見により

、補体阻害蛋白の肺内投与、すなわち肺に直接投与することによって、血管外空間に良い影響を及ぼすだけでなく、全身にも良い作用をもたらすことが認められた。
本発明はさらに、補体活性化がアナフィラキシー、ならびに気管支収縮のアナフィラキシー症状および血圧変化（低血圧）に関与しているという発見にも一部で基づいている。
本発明のもう１つの発見として、補体阻害蛋白は気管支収縮を緩和もしくは予防できるということもある。
本発明の特に大きな利点は、吸入療法は注射器などコントロールした装置を使わず、しかも迅速で一般に受け入れられるところから便利だという点である。もう１つの利点は、補体阻害因子は自己投与することができる点である。補体阻害療法を必要とする者は補体阻害蛋白を非経口的に投与することのできる訓練を受けた医療専門家の近くにいることは少ないので、この点は重要である。たとえば、こうした事態の例としては、抗原に起因する、より具体的にいえばアレルゲンに曝露されたことによるアナフィラキシーがある。シリコン、石炭塵、ベリリウムまたはアスベストなどのような塵埃や鉱物質に曝露されやすい産業現場、塩素、ホスゲン、二酸化硫黄、硫化水素、二酸化窒素、アンモニア、塩化水素などの苛性化学物質およびガスに曝露されやすい工業や職業もその例である。煙または熱気を吸入して肺組織に損傷を受ける危険のある消防士なども同じである。
本発明のさらなる利点として、補体系が関与する損傷を受ける危険性のある者が本発明の製剤、すなわち補体阻害蛋白、好ましくはCR1蛋白を含有する製剤を予防的に使用することができるという点が挙げられる。以下に示すある例では、補体阻害蛋白を予防的に投与してもほとんどもしくはまったく悪影響がないこと、しかも投与を受けた者はその後、補体関連損傷から保護されることが実証されている。
したがって本発明は、補体関連疾患または障害、特に肺の補体関連疾患または障害の治療および予防的処置のために、補体受容体蛋白ならびにその類似体または誘導体を提供する。
個々の実施例では、本発明者は可溶性補体受容体タイプ１が、気管支収縮、低血圧の緩和、またアナフィラキシーで見られる循環血小板数の減少緩和に有効であることを実証している。
したがって本発明では、sCR1の他の非経口的投与経路に代わる有効な非侵襲的投与経路を提供する製剤をもたらしている。エアロゾル化してから吸入することで、補体受容体蛋白を肺にデリバリーすることができる。
本発明は、どの補体受容体蛋白、あるいは可溶性補体受容体も含めてそのフラグメント、誘導体または類似体を使っても実現できる。本発明の好ましい実施例では、補体阻害蛋白はCR1であり、さらに好ましいのは可溶性CR1（sCR1）である。最も望ましいのは、可溶性CR1蛋白が、ATCCに寄託され、CRL 10052という番号が割り当てられているチャイニーズハムスター卵巣細胞DUX B11に保有されているプラスミドpBSCR1/pTCSgptの特徴を有することである。

４．図の簡単な説明

図１．　受動感作したモルモット（実験群１；A～C）または能動感作したモルモット（実験群２；D～F）における肺コンプライアンス（A、D）、気道抵抗（B、E）および全身血圧（C、E）のオボアルブミン（卵アルブミン）誘発性変化に対して15mg/kgのsCR1が及ぼす影響。オボアルブミンは時刻０の時点で、受動感作動物には176μg/kgを、能動感作動物には300μg/kgを静注した。値は、PBS（ビヒクル）またはsCR1のいずれかを事前投与した4～5匹の動物における反応の平均±S.E.で表す。*は当該期間についてp＜0.05であることを示す。
図２．　受動感作したモルモット（実験群１；AおよびB）または能動感作したモルモット（実験群２；CおよびD）における循環白血球（A、Ｃ）または血小板（B、D）のオボアルブミン誘発性変化に対して15mg/kgのsCR1が及ぼす影響。値は、3～5匹の動物における反応の平均±S.E.で表す。アステリスク（*）は、PBS（ビヒクル）投与動物に比べてsCR1投与動物では循環血球の抗原誘発性変化に統計学的に有意な（p＜0.05）差が見られることを示す。

図３．　能動感作したモルモット（実験群３）における肺コンプライアンス（A）、気道抵抗（B）および全身血圧（C）のオボアルブミン誘発性変化に対して105mg/kgのsCR1累積投与が及ぼす影響。オボアルブミンは時刻０の時点で、2mg/kgを静注された。値は、PBS（ビヒクル）またはsCR1のいずれかを事前投与した9匹の動物における反応の平均±S.E.で表す。アステリスク（*）は当該期間にp＜0.05であることを示す。

図４．　能動感作したモルモットの血圧変化に対するsCR1およびPBS（ビヒクル）の影響。オボアルブミンまたはウシ血清アルブミンを時刻０の時点で2mg/kgの用量で静注した。オボアルブミンまたはウシ血清アルブミンのいずれかを負荷したモルモット（それぞれ、実験群３および実験群４）に、sCR1またはPBS（ビヒクル）を累積用量105mg/kgになるように投与した。値は4～9匹の動物から得たデータの平均±S.E.で表す。

図５．　循環血小板（A）または白血球（B）のオボアルブミンまたはウシ血清アルブミンにより誘発された変化に対するsCR1またはPBSの影響。オボアルブミンまたはウシ血清アルブミンは、時刻０の時点で2mg/kgの用量で投与した。オボアルブミンまたはウシ血清アルブミンのいずれかを負荷したモルモット（それぞれ、実験群３および実験群４）に、sCR1またはPBSを累積用量105mg/kgになるように投与した。値は4～9匹の動物から得たデータの平均±S.E.で表す。アステリスク（*）は、PBS（ビヒクル）投与動物に比べてsCR1投与動物では循環血球のオボアルブミン誘発性変化に統計学的に有意な（p＜0.05）差が見られることを示す。

図６．　モルモットのヒスタミンに対する応答への105mg/kgのsCR1累積投与の影響（実験群４）。値は、ウシ血清アルブミン負荷およびヒスタミン応答性の評価に先立ってPBS（ビヒクル）またはsCR1のいずれかを投与した動物４匹で測定したコンプライアンス（A）および抵抗性（B）を平均±S.E.で表す。

図７．　モルモットのブラジキニンに対する反応への105mg/kgのsCR1累積投与の影響（実験群４）。値は、ウシ血清アルブミン負荷およびヒスタミン、その後のブラジキニンに対する応答性の評価に先立ってPBS（ビヒクル）またはsCR1のいずれかを投与した動物４匹で測定した値の平均±S.E.で表す。

図８．　オボアルブミン負荷したモルモットにおけるC3転換に対する105mg/kgのsCR1累積投与の影響。実験群３のsCR1およびPBS（ビヒクル）を投与したモルモットから得られたデータ。時刻０の時点でオボアルブミン（2mg/kg）を負荷した。酵素活性化補体（YAC）を陽性対照とした。

図９．　モルモットにおける血漿sCR1濃度（実験群３および４）。値は、オボアルブミン負荷動物7匹またはウシ血清アルブミン負荷動物4匹で測定した値の平均±S.E.で表す。sCR1は－24時間、－3時間および－5分の時点で、オボアルブミンまたは血清アルブミンは時刻０の時点で投与した。

図10.　噴霧食塩液（10 A）吸入後の対照モルモット、あるいは5mg/mlのsCR1含有噴霧食塩液（10 B）を７分間吸入後の実験群モルモットの気管断面。ウサギポリクロナール抗sCR1抗体を使った免疫組織化学染色によりsCR1を視覚化した。sCR1は吸入後の気管粘膜に局在し、灰色の背景に対して黒い染色部分として見られる。

図11.　噴霧食塩液（11 A）吸入後の対照モルモット、あるいは5mg/mlのsCR1含有噴霧食塩液（11 B）を7分間吸入後の実験群モルモットの肺断面。ウサギポリクロナール抗sCR1抗体を使った免疫組織化学染色によりsCR1を視覚化した。sCR1は、灰色の背景に対して黒い染色部分として見られる。sCR1は肺に存在し、気管支、細気管支、肺胞管および終末気泡に沈着していた。

５．発明の詳細な説明

本発明は、全身性補体活性化に関連する疾患および障害を、補体阻害蛋白、あるいはそのフラグメント、誘導体または類似体を肺経路で投与することで治療する方法に関し、そこで補体阻害蛋白は補体活性化に伴う１つ以上の活性化を阻害する作用を持つものである。本発明はさらに、補体阻害蛋白を気道に直接投与することを介して補体が関連する肺疾患を治療する。特定の実施例では、本発明はsCR1を吸入することで肺に可溶性補体受容体蛋白を直接投与して、補体が関連する疾患を治療する。また、sCR1を非経口投与あるいは吸

入することによって、気管支収縮またはアナフィラキシーあるいはその両者を治療する。
本発明の発明者は、可溶性補体受容体タイプ１を能動感作したモルモットに投与したところ、抗原によって誘発される肺の動的コンプライアンスの低下および肺血管抵抗性の増大が阻害されることを発見している。sCR1を投与すると、抗原負荷に対する血圧上昇反応も短縮され、また血圧低下反応も見られなくなる。このようにして本発明の発明者は、補体が気管支収縮ならびにアナフィラキシーに伴う血圧変化にとって欠かせないものであることを明らかにしている。
さらに、これらの研究から、血管外部位で重要な補体活性化が生じており、その部位にはsCR1を肺内投与すれば容易に到達できることが明らかになっている。そこで本発明の発明者は、肺に補体受容体蛋白を直接投与することを提供しており、これは不適切な補体活性化の局所的影響および全身的影響の双方を治療するのに有効である。
１つの実施例では、本発明は肺内投与経路を介して補体が関連する肺障害を治療することを提供する。sCR1の全身投与に、有効な別の非侵襲的方法である製剤が提供される。エアロゾル化してから吸入することで、補体受容体蛋白のデリバリーが肺で達成できる。
本発明は、受容体蛋白のフラグメントまたは可溶性補体受容体を含めたその誘導体を使って実行できる。本発明の好ましい実施例では、sCR1の蛋白骨格には、LHR-A、LHR-B、LHR-C、LHR-D、SCR29、および経膜領域の最初のアラニン残基までを含むSCR30領域を含有する。本発明の別の実施例では、上記のsCR1蛋白のLHR-A領域が欠けている。
このようにして本発明は、補体が関連する疾患または障害の治療に有用な補体阻害蛋白の治療用製剤および予防用製剤を提供する。本発明の方法および製剤について以下に詳しく述べる。
ここで「肺内投与」というのは、本発明の製剤を吸入により肺を介して投与することを言う。
ここで「吸入」というのは、肺胞に空気を吸い込むことを言う。特定の例では、息を吸いながら本発明の製剤を自己投与することによって、あるいはたとえばレスピレータを付けている患者であればレスピレータを介して投与することによって吸い込む。本発明の製剤に関して「吸入」という用語を使う場合、これは「肺内投与」と同義である。
ここでいう「非経口的」とは、補体阻害蛋白を腸以外によって体内に導入することであり、とりわけ静注内（i.v.）、動脈内（i.a.）、腹腔内（i.p.）、筋肉（i.m.）、胃内、および皮下（s.c.）といった経路を指す。
ここでいう「エアロゾル」とは、空気中懸濁のことである。特に、エアロゾルとは本発明の製剤を粒子化し、空気に懸濁することを指す。本発明に従えば、エアロゾル製剤は、吸入または肺内投与のためにエアロゾル化、すなわち粒子化して空気中に懸濁するのに適した補体阻害蛋白を含んでいる製剤である。
ここで「全身性」というときには、肺から離れているか生体全体を含む疾患または障害、あるいは原発部位を指す。したがってここでは肺に関して「局所的」という用語を使用する。
ここでいう補体が関与する疾患または障害とは、たとえば傷害または損傷の結果として生じる不適切な補体活性化状態である。ここで「疾患」および「障害」という場合には最も一般的な意味で用いており、あらゆる状況、疾患、傷害、外傷、損傷、病的状態、その他現在の技術で有害もしくは病的な生理学的状態を含む用語を指す。一般に、補体活性化が伴うか、または他の原因から起こる。したがって本発明は、疾患または傷害の補体が媒介する要素の治療または予防に向けられている。
より明確にするために、補体阻害蛋白、エアロゾル製剤、ならびに治療および予防の方法に関する章に分けて本発明について詳しく説明する。

5.1 補体阻害蛋白

本発明の対象範囲となる補体阻害蛋白には、補体蛋白に結合してその機能を阻害し、また補体活性を阻害することができるあらゆる蛋白が入る。このような補体蛋白としては、補体成分C3bおよびC4bに対する受容体である補体受容体タイプ１（CR1）、C3dに対する受容体である補体受容体タイプ２（CR2）、iC3bに対する受容体である補体受容体タイプ３（C

R3）、iC3bに対して特異的な補体受容体タイプ４（CR4）、iC3b、C3dg、およびC3dのC3d部分に特異的な補体受容体タイプ５（CR5）、C5a受容体（C5a-R）、ならびにC3aおよびC4aに対する受容体があるが、これらには限定されない。好ましい側面として、本発明は保存された短い共通反復（SCR）モチーフを含む補体調節蛋白のファミリーに属するものも含む。SCRモチーフは、補体受容体タイプ１ならびにその他の複数のC3/C4-結合蛋白に見られ、後者の代表的なものとしてはCR2、因子H、C4-結合蛋白（C4-BP）、膜補助因子蛋白（MCP）、および崩壊促進因子（DAF）がある。因子H、C4-BP、CR2、およびDAFの遺伝子は、「補体活性化調節部（RCA）」と呼ばれている染色体１上の領域にマップされる（D. フルケードらによるAdvances in Immunol. 45巻　381～416頁（1989年））。これら補体活性化調節部の個別の類似体は、1992年11月11日に発表されたアトキンソンらによるEPO公開公報0 512 733 A2号に載っている。

肺内投与を実現するには、補体受容体蛋白、その類似体または誘導体の形態が重要であることは、当業者であれば理解できるだろう。本発明には、組織に容易に吸収され、急激に代謝されないよう保護され、半減期が長くなっている補体阻害蛋白の形態が含まれている。吸収効率をよくすることができる蛋白製剤の修飾としては、プロドラッグの使用、一次構造の化学的修飾、リポソームその他の被包物質への蛋白組込み、および化学的吸収増強剤と補体阻害蛋白の同時投与といった方法があるが、これらには限定されない（L. L. ウェアリーによるCrit. Rev. in Ther. Drug Carrier Systems 8巻　4号　333頁（1991年））。補体阻害蛋白の代謝を最小限に抑え、それによって有効蛋白量を増大させる修飾法としては、前記のような化学的修飾、酵素阻害薬の同時投与、またはポリマーへの共有結合的な結合があるが、これらには限定されない（L. L. ウェアリーによる前掲（1991年））。その他に、半減期を長くしたり吸収性を多様化するような蛋白修飾法としてはグリコシル化があるが、これは組換え蛋白生成における培養条件の影響を受けることがあり（あるいは、細菌における発現では完全に避けられることもある）、すでに合成または発現されている蛋白の化学的または酵素的修飾によっても影響を受けることがある。

本発明は、特にC3b/C4b受容体（CR1）に焦点を当てている。CR1遺伝子およびそのコードされた蛋白は、1989年10月5日に発行された国際特許公開公報WO 89/09220に載っており、「ヒトC3b/C4b受容体（CR1）」と題されている。

CR1遺伝子およびそのコードされた蛋白が入手できたならば、現在わかっている技術をいくつでも使って遺伝子またはそのコードされた蛋白を修飾することができる。本発明では、このようなCR1関連フラグメント、誘導体および類似体を含むことになっている。本発明の製剤で使用するCR1関連フラグメント、誘導体および類似体は、現在の技術で知られている様々な方法で生成することができる。その生成のための操作は、遺伝子レベルで行うこともできれば、蛋白レベルで行うこともできる。たとえば、クローン化したCR1遺伝子を現在の技術でわかっている数々の戦略のいずれかで修飾することができる（T. マニアチスによる『分子クローニング　実験室マニュアル』Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York（1982年））。CR1配列は、制限エンドヌクレアーゼを使って適当な部位で切断し、その後で希望に応じて酵素的修飾を行い、単離してin vitroで結合することができる。誘導体、類似体、またはCR1に関連するペプチドをコードする遺伝子を生成するにあたっては、修飾した遺伝子がCR1と同じ翻訳読取り枠組みの範囲内にあり、希望するCR1特異活性をコードする遺伝子領域において翻訳停止信号によって妨害されることがないように注意しなければならない。

さらに、CR1遺伝子をin vitroまたはin vivoのいずれでも突然変異させて、翻訳の開始または停止あるいはその双方の配列を作製または破壊したり、コード領域の変異を作製するか、新しい制限エンドヌクレアーゼ部位を形成するかもしくは既存の部位を破壊して、in vitroでのさらなる修正を容易にすることができる。現在の技術で知られている突然変異誘発のいかなる技術でも使用することができ、たとえばin vitro部位志向突然変異（C. ハッチンソンらによるJ. Biol. Chem. 253巻　6551頁（1978年））、TABXリンカー（Pharmacia）などがあるが、これらには限定されない。

CR1配列の操作は蛋白レベルで行うこともできる。現在の技術で知られている多数の化学

的修飾法を実行でき、たとえば臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、$NaBH_4$による特異的化学的な切断、ツニカマイシン存在下におけるアセチル化、ホルミル化、酸化、還元、代謝的合成などがあるが、これらには限定されない。

CR1のヌクレオチド配列の特異的修飾は、複数のLHR-B配列を有する蛋白をコードする配列をもたらす組換えDNA手法によって行うことができる。たとえば、1991年4月18日に発表された国際特許公開公報WO 91/05047を参照のこと。このような修飾によって、免疫障害または炎症性障害などの機能に伴うC3bに結びついた障害の範囲が変わる。たとえば、希望する活性を呈する完全長のCR1またはそのフラグメントおよび関連分子を治療目的で使用し、その因子Ｉ補助因子としての作用能により補体を阻害して補体成分C3bまたはC4bの不可逆的不活性化を促進したり（D. T. フィーロンによるProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76巻　5867頁（1979年）；K. イイダおよびV. ヌッセンツヴァイクによるJ Exp. Med. 153巻　1138頁（1981年））、あるいは第二のまたは古典的なC3またはC5転換酵素を阻害する能力により補体を阻害することができる。

CR1の配列に、特異的にきちんと定義されたLHRまたはSCRの組み合わせを含有する部分を作ることもできる。これらの化合物の活性は、完全長CR1分子のうち特異的活性を含む部分を選択することによって予測できる。こうしてできたフラグメントには、親分子の機能が少なくとも１つは含まれているはずである。このような機能としては、遊離体もしくは複合体でのC3bまたはC4bあるいはその両者の結合、食作用の促進、補体調節、免疫刺激、因子Ｉ補助因子としての作用能、補体成分C3bまたはC4bの不可逆的不活性化の促進（D. T. フィーロンによるProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76巻　5867頁（1979年）；K. イイダおよびV. ヌッセンツヴァイクによるJ Exp. Med. 153巻　1138頁（1981年））、免疫複合体クリアランスによる作用もしくは第二のまたは古典的なC3またはC5転換酵素を阻害する能力による作用、あるいはその両者などがあるが、これらには限定されない。

さらに、類似体およびCR1関連ペプチドを化学的に合成することができる。たとえば、希望する作用（たとえばC3bまたはC4bあるいはその両者の結合、免疫刺激、補体調節、等々）を媒介するCR1の部分に相当するペプチドを、ペプチド合成装置を使って合成することができる。

個々の実施例では、CR1配列に加えて非CR1配列の部分を含有する分子から成る融合蛋白をコードする核酸配列を生成できる。たとえば、国際特許公開公報WO 91/05047を参照のこと。そこでCR1のさらなる修飾としては、他の分子に付着したCR1 LHRまたはSCR配列を有するキメラ分子の生成があるが、この目的はその結果としてできるキメラの可溶性、薬理またはクリアランスに影響を及ぼすことである。このようなキメラは、遺伝子レベルで融合蛋白として生成することもできれば、蛋白レベルで化学的に生成した誘導体として生成することもできる。免疫グロブリン鎖の部分を含むキメラ分子には、Fabまたは$(Fab')_2$分子を含有できるが、これは蛋白分解切断によって、あるいは重鎖のヒンジ領域の後に停止コドンを導入してキメラ蛋白の免疫グロブリン部分の非補体活性化イソタイプのF_c領域を削除し、それにより補体活性化複合体のF_c受容体媒介クリアランスをもたらすことによって生成される。キメラの生成に利用できる分子としてはこの他に血清アルブミン、ヘパリンまたは免疫グロブリンなどの蛋白、ポリエチレングリコールまたはポリオキシエチル化ポリオールのようなポリマー、あるいはたとえばポリエチレングリコールを使った誘導により抗原性を低減するように修飾した蛋白などがあるが、これらには限定されない。適した分子は現在の技術で知られており、たとえば、米国特許4,745,180号、4,766,106号および4,847,325号、ならびにここで引用している参考文献に述べられている。生物学的化合物の誘導体またはそのフラグメントを形成するのに利用できる分子としてはこの他に、蛋白Aまたは蛋白Gがある（1987年9月24日に公表され「蛋白Gと同一のIgG特異性を有する蛋白を生成する方法および手段」と題する国際特許公開公報WO 87/05631；ビヨルクらによるMol. Immunol. 24巻　1113～1122頁（1987年）；ガスらによるEMBO J. 5巻　1567～1575頁（1986年）；ニグレンらによるJ. Molecular Recognition 1巻　69～74頁（1988年））。

CR1蛋白は、クロマトグラフィー（たとえばイオン交換クロマトグラフィー、アフィニテ

ィークロマトグラフィー、サイジングカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度の相違（differencial solubility）、その他蛋白の精製に使用する標準的技法などの標準的な方法により分離し、精製することができる。補体受容体蛋白がそれを生成している細胞から運び出されるものであれば、蛋白精製のために特に効果のある方法として次のようなものがある。蛋白を含有する細胞培養基を、a）陽イオン交換クロマトグラフィー、b）硫酸アンモニウム沈殿、c）疎水性相互作用クロマトグラフィー、d）陰イオン交換クロマトグラフィー、e）さらに陽イオン交換クロマトグラフィー、そしてf）サイズ排除クロマトグラフィーにこの順でかける。

好ましい実施例では、本発明は可溶性CR1分子に関する。ここでいう可溶性CR1分子とは、発現時には膜蛋白として細胞表面上にないCR1蛋白の部分のことである。具体的な例としては、経膜領域を本質的に欠いているCR1分子は可溶性CR1分子である。本発明の特異的実施例では、経膜領域を欠いているCR1分子をコードするように発現ベクターを構築することができ（たとえば大部分のC-末端SCRによってコードされたアルギニンのカルボキシル末端の削除によって）、その結果、可溶性CR1フラグメントが生成される。１つの実施例では、このようなフラグメントは遊離体もしくは複合体の形で、C3bまたはC4bあるいはその両者と結合する能力を維持できる。具体的な実施例では、このような可溶性CR1はもはや因子Ｉ補助因子活性を持っていないことがある。

CR1の一部のまたはすべての結合部位を持っている可溶性構造物も想定されている。このような構造物は補体の活性化および補体に依存する細胞の活性化を阻害する。たとえば特定の実施例では、たとえばin vitroでの古典的補体媒介溶血、古典的C5a産生、古典的C3a産生、または好中球酸化バーストを阻害する能力によって実証されるように、希望する機能活性を保持するような可溶性CR1分子を利用することができる。１つの実施例では、このようなフラグメントは遊離体または複合体の形で、C3bまたはC4bあるいはその両者を結合する能力を保持できる。こうして産生されたsCR1分子には、LHR-A、LHR-B、LHR-C、LHR-D、SCR29、SCR30、および経膜領域の最初のアラニン残基までを含有することができる。

本発明の好ましい側面として、可溶性CR1蛋白は、ATCCに寄託され、CRL 10052という番号が割り当てられているチャイニーズハムスター卵巣細胞DUX B11に保有されているプラスミドpBSCR1/pTCSgptの特徴を有する。

さらに特異な実施例では、CR1分子のLHR-A領域を欠いたCR1分子を生成することができる。そのためには、経膜領域およびSCR1～7を欠いたCR1分子をコードするように発現ベクターを構築することができ、その結果、二次経路を選択的に阻害すると予想される可溶性CR1フラグメントが生成される。

可溶性補体受容体タイプ１（sCR1）およびそれを調製するための過程は、国際特許公開公報WO 89/09220（1989年10月5日）およびWO 91/05047（1991年4月18日）に開示されている。

一度、上述の可溶性CR1の発現ベクターおよび遺伝子産物が利用できるようになると、可溶性CR1蛋白を分離し、精製するための多くの技法が使用できる。

本発明の補体阻害蛋白は、現在の技術で知られている技法を使って定量分析し、その補体阻害活性を実証することができる。このような定量分析法としては、以下に挙げるような補体活性化阻害能および補体由来ペプチドの生成を選択的に阻害する能力のin vitro試験があるが、これらには限定されない。

（ｉ）赤血球の補体媒介溶解（溶血）の阻害の測定。

（ii）C5aおよびC5a des Argの形成阻害能の測定、もしくはC3aまたはC3a des Argの形成阻害能の測定、あるいはその両者。

どの補体阻害蛋白、あるいはそのフラグメント、誘導体、または類似体、特にCR1蛋白で、補体受容体に伴う活性のいずれか１つを有するものは、本願の範囲に入る。補体受容体タイプ１に通常伴う作用については、現在の技術で十分報告されており、たとえば以下のようなものがあるが、これらの作用や分析評価には限定されない。1989年10月5日にWO89/09220として公表され、「ヒトC3b/C4b受容体（CR1）」と題する国際特許出願番号PCT/US89/01358；ワイズマンらによるScience 249巻　146～151頁（1990年）；D. T. フィーロン

およびW. W. ウォンによるAnn. Rev. Immunol. 1巻 243頁（1989年）；D. T. フィーロンによるProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76巻 5867頁（1979年）；K. イイダおよびV. ヌセンツヴァイクによるJ. Exp. Med. 153巻 1138頁（1981年）；クリックシュタインらによるJ. Exp. Med. 165巻 1095頁（1987年）；ワイスらによるJ. Esp. Med. 167巻 1047～1066頁（1988年）；ムーアらによるProc. Natl. Acad. Sci. 84巻 9194頁（1987年）；ムーラらによるJ. Biol. Chem. 264巻 205～276頁（1989年）。たとえば可溶性CR1蛋白については、このような作用としてはin vitroで好中球酸化バーストを阻害する能力、補体媒介溶血を阻害する能力、C3aまたはC5aあるいはその両者の産生を阻害する能力、C3bまたはC4bあるいはその両者を結合させる能力、因子Ｉ補助因子活性を示す能力、およびC3またはC5あるいはその両者の転換酵素活性を阻害する能力がある。

5.2. 補体受容体蛋白の肺内デリバリー

本発明は、薬理成分および治療用製剤を気道にデリバリーするために考案されている幅広い装置で使用するための補体阻害蛋白含有製剤を企図するものである。本発明の好ましい投与経路はアエロゾルまたは吸入形式のものである。本発明の補体阻害蛋白は、分散剤と組み合わせることによって、乾燥粉末としてあるいは希釈液を使った溶液または懸濁液としてのエアロゾル製剤の形で投与することができる。

ここでいう「分散剤」とは、蛋白のエアロゾル化または肺組織における蛋白の吸収、あるいはその両者を助ける薬剤のことである。分散剤は薬理学的に受け入れられるものであることが好ましい。ここで「薬理学的に受け入れられる」とは、動物ないし特にヒトでの使用を、連邦政府または州政府の規制当局によって承認されているか、もしくは米国薬局方またはその他の一般に認められている薬局方に列挙されていることを意味する。適当な分散剤は現在の技術でよく知られており、界面活性剤やこれに類似したものが含まれるが、これらには限定されない。たとえば、液体エアロゾルを形成する溶液の微粒子化によって生じる蛋白の界面誘発性凝集を減らすために現在の技術で一般によく使われている界面活性剤を使用することができる。このような界面活性剤の例としては、ポリオキシエチレン脂肪酸エステルおよびアルコール、ならびにポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルがあるが、これらには限定されない。使用する界面活性剤の量は変わりうるが、一般に製剤の重量に対して0.001～4重量％の範囲になるだろう。特定の場合には、界面活性剤はポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート（ツイーン80）またはソルビタントリオレエートである。適当な界面活性剤は現在の技術でよく知られており、好ましい性質に基づいて、特定の製剤、補体阻害蛋白の濃度、希釈液（液体製剤の場合）または粉末の形態（乾燥粉末製剤の場合）等々に応じて選択することができる。

さらに、補体阻害蛋白の選択、希望する治療効果、肺組織の質（たとえば病気の肺か健康な肺か）、その他多数の要因に応じて、液体製剤または乾燥製剤に以下に述べるような追加成分を含めることができる。

液体エアロゾル製剤は、補体阻害蛋白および分散剤を生理的に受け入れられる希釈液に溶解して含有する。本発明の乾燥粉末エアロゾル製剤は、細かく分割した固形の状態の補体阻害蛋白および分散剤を含有する。液体または乾燥粉末のいずれのエアロゾル製剤でも、製剤はエアロゾル化しなければならない。すなわち、エアロゾル化した薬剤が現実に肺胞に到達するよう確保するために、液体または個体の粒子にしなければならない。一般に質量動的直径中央値を5マイクロメーター以下にして、薬剤粒子が肺胞に到達するようにする（L. L. ウェアリーによるCrit. Rev. in Ther. Drug Carrier Systems 8巻 333頁（1991年））。ここで「エアロゾル粒子」とは、肺内投与に適した、すなわち肺胞に十分到達する液体粒子または個体粒子のことを言う。この他に重要な問題としては、デリバリー装置の構築、製剤内の追加成分、および粒子の特性がある。薬剤の肺内投与のこうした側面については現在の技術でよく知られており、製剤の取扱い、エアロゾル化法およびデリバリー装置の構築に要するのは、現在の通常の技術の１つで最も日常的に実験されているものである。

デリバリー装置の構築に関しては、本発明の実現には現在の技術で知られているあらゆる形態のエアロゾル化を利用することができ、たとえば液体製剤の噴霧化、微粒子化または

ポンプエアロゾル化、および乾燥粉末製剤のエアロゾル化があるが、これらには限定されない。固形製剤の投与に専用に設計されたデリバリー装置を考えている。液体製剤または乾燥粉末製剤のエアロゾル化にあたっては、噴射剤を必要とすることが多くなる。噴射剤は、現在の技術で一般に用いられているどの噴射剤でもよい。有用な噴射剤の例としては、クロロフルオロカーボン、ヒドロフルオロカーボン、ヒドロクロロフルオロカーボン、あるいはトリフルロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクトトテトラフルオロエタノールおよび1,1,1,2-テトラフルオロエタンなどの炭化水素、およびその組み合わせが挙げられるが、これらには限定されない。

本発明の好ましいものとしてのエアロゾル装置は定量噴霧式吸入器である。定量噴霧式吸入器を使うと、投与の度に用量が変化せず、いつでも一定の用量を投与できる。このような定量噴霧式吸入器は、液体または乾燥粉末のいずれのエアロゾル製剤でも利用できる。定量噴霧式吸入器は現在の技術でよく知られているものである。

補体阻害蛋白が肺に到達したならば、今度は製剤に依存する多数の要因が薬剤の吸収に影響する。補体阻害蛋白の循環濃度を一定にする必要がある補体関連疾患または障害の治療にあたっては、エアロゾル粒子の大きさ、エアロゾル粒子の形、感染症や肺疾患または塞栓症の有無が蛋白の吸収に影響しうることがわかるだろう。ここで述べる製剤のそれぞれについて、一定の潤滑剤、吸収増強剤、蛋白安定剤または懸濁剤を使用するのが適当である。これらの追加薬剤の選択は、目的によって異なってくる。補体阻害蛋白の局所デリバリーが望ましいかそれを追求する場合には、吸収増大といった変数はそれほど問題でなくなる。

さらに別の実施例では、本発明のエアロゾル製剤に、補体阻害蛋白に加えて他の有効成分を含めることができる。好ましい実施例でのそのような有効成分とは肺疾患の治療に使用するものである。たとえばこのような追加有効成分として、気管支拡張薬、抗ヒスタミン薬、エピネフリン、その他喘息の治療に有用な類似のものが挙げられるが、これらには限定されない。別の実施例では、たとえば肺炎の治療のために抗生物質を追加有効成分とすることもできる。好ましい実施例での抗生物質はペンタミジンである。

一般に、本発明の補体阻害蛋白、またはそれらのフラグメント、あるいはその類似体もしくは誘導体は、エアロゾルの形でほ乳類の体重1kgあたり0.01mgから最高約100mgの範囲の量で導入する。特定の実施例では、用量は１日あたりの投与量である。現在よく使われている技術で、本発明のエアロゾル製剤中の補体阻害蛋白の濃度に基づいてこの用量に相当するエアロゾルの容積または重量を容易に決定することができる。この代わりに、投与すべき容積に適当な用量の補体阻害蛋白を有するエアロゾル製剤を調製してもよく、これも現在の通常の技術で容易に実行できる。補体が関わる全身性疾患または障害の吸入治療では用量が高くなり、補体が関わる肺疾患または障害では用量が低くなるのも明らかである。なぜならば、蛋白を肺に投与したならば、肺における補体阻害蛋白の局所濃度はより高くなるからである。補体阻害蛋白を肺に直接投与すると使用する補体阻害蛋白が少なくてすみ、したがって費用および望ましくない副作用の双方を抑えることができるのが、本発明の利点である。

製剤は、疾患の適応に応じて一回投与または反復投与のいずれで投与してもよい。予防用製剤または治療用製剤の正確な使用量は、疾患の病期および重症度、患者の身体状態、その他多数の要因によって決まるが、これは現在の技術でわかるだろう。

高圧定量噴霧吸入器および乾燥粉末吸入器などのエアロゾルデリバリーシステムについては、S. P. ニューマンによる「エアロゾルと肺」（S. W. クラークおよびD. ダビア編　197～22頁）に開示されており、本発明と組み合わせて利用することができる。

補体阻害蛋白の吸入による投与には、リポソーム製剤が特に有効かもしれないと考えている。長期投与が望ましい場合には特にこのことがあてはまる（ウェアリーによるCrit. Rev. in Ther. Drug Carrier Systems 8巻　333頁（1991年）を参照）。

5.2.1.　液体エアロゾル製剤

本発明は、補体関連疾患または障害の患者を治療するのに使うためのエアロゾル製剤および剤形を提供する。一般にこのような剤形には１ないし複数の補体阻害蛋白、あるいはそ

のフラグメント、誘導体または類似体が薬理学的に受け入れられる希釈液に溶解されて入っている。薬理学的に受け入れられる希釈液としては、滅菌水、食塩液、緩衝食塩液、デキストロース溶液、その他類似のものがあるが、これらには限定されない。特定の実施例における本発明で利用しうる希釈液または本発明の薬理学的製剤はリン酸緩衝食塩液、もしくは一般にpH7.0～8.0の緩衝食塩液、あるいは水である。

本発明の液体エアロゾル製剤には、任意の成分として薬理学的に受け入れられる担体、希釈液、可溶化剤または乳化剤、界面活性剤および賦形剤を含めることができる。

本発明の液体エアロゾル製剤は、標準的にはネブライザーで使用することになる。ネブライザーは、圧縮空気で動かすものでも超音波によるものでもよい。現在の技術で知られているどのネブライザーでも本発明とともに使用することができ、この種のものとしてはMallinckrodt, Inc.（ミズーリ州セントルイス）のUltravent、Marquest Medical Products（コロラド州イングルウッド）のAcorn IIネブライザーがあるが、これらには限定されない。この他に本発明と組み合わせて使用するとよいネブライザーについては、米国特許4,624,251号（1986年11月25日）、3,703,173号（1972年11月21日）、3,561,444号（1971年2月9日）、および4,635,627号（1971年1月13日）に述べられている。

製剤には担体を含むこともある。担体は、循環系内で可溶性であり、しかも当該担体を治療用処方の一部として患者に注入することが現在の技術で受け入れられるという意味で生理学的に受け入れられる高分子化合物である。担体は循環器系内で比較的安定しており、血漿でのクリアランス半減期が許容しうるものであることが望ましい。このような高分子化合物としては、大豆レシチン、オレイン酸およびソルビタントリオレエートがあり、ソルビタントリオレエートが好ましいが、これらには限定されない。

本実施例の製剤には、蛋白の安定化のため、あるいは浸透圧調節のために有用なその他の製剤を含んでもよい。このような薬剤の例としては、塩化ナトリウムや塩化カリウムなどの塩、ならびにグルコース、ガラクトース、マンノースなどの炭水化物、およびそれに類似するものが挙げられるが、これらには限定されない。

5.2.2 エアロゾル乾燥粉末製剤

本製剤は、細かく分割された粉末形態での補体阻害蛋白および分散剤から成る乾燥粉末吸入製剤として使用することも考えている。補体阻害蛋白の形態は、一般に凍結乾燥粉末とする。考えられている阻害蛋白の凍結乾燥形態は、標準的な技術によって得ることができる。

別の実施例では、乾燥粉末製剤は１ないし複数の補体阻害蛋白、分散剤、さらには充填剤を含有する細かく分割された乾燥粉末を含んで成る。本製剤と組み合わせて使用するのによい充填剤としては、ラクトース、ソルビトール、スクロースまたはマンニトールがあり、装置から粉末を分散させやすくする量を用いる。

5.3 補体阻害蛋白による肺の治療法

本発明の補体阻害蛋白は、補体が媒介するもしくは補体が関連する疾患または障害で、肺内投与が望ましいもの、あるいは肺が関与する疾患または障害の予防または治療のための処置に役立つ。本発明では、補体を阻害するような量の蛋白を全身にデリバリーするに十分な量の蛋白、もしくは補体を阻害する量の蛋白を肺に局所デリバリーするだけに十分な量の蛋白のいずれかの量を肺内投与することを考えている。本発明ではさらに、気管支収縮の治療のため、あるいはアナフィラキシー（アナフィラキシーに伴う気管支収縮も含めて）の治療のために、補体阻害蛋白を非経口投与もしくは肺内投与することを考えている。現在の技術に精通している者であれば、全身デリバリーを目標とするか局所デリバリーを目標とするかは、治療しようとする適応症によって決まることがわかるだろう。

個々の症例における治療有効量は、熟練した臨床家の知識の範囲内である様々な要因によって決まる。このような要因としては、治療対象者の身体条件、治療対象の病状の重症度、治療しようとする疾患または障害、その他がある。一般に、不適切な補体活性に伴う１ないし複数の症状に統計学的に有意な緩和をもたらすのが、本発明の対象範囲とする治療である。以下に述べる動物実験での結果に基づくと、ヒトを含めた大部分のほ乳類については、肺内デリバリーのための投与量は約0.01mg/kgから100mg/kgとなる。

補体阻害蛋白、あるいはより好ましくは本発明の製剤を、予防的または治療的な処置を必要とする者に投与できることを考えている。ここで「者（患者）」というのは、動物、より好ましくはほ乳類、最も好ましくはヒトである。

5.3.1 全身作用をねらった補体阻害蛋白の肺内投与

補体阻害蛋白をデリバリーして当該蛋白の血漿中濃度を上昇させ、不適切な補体活性が関与する疾患または障害、すなわち肺外適応症を治療することが想定されている。全身または循環血レベルでの補体調節蛋白を必要とする補体が関与する疾患または障害については、前記の2.2ならびに下記の表Ｉに詳しく述べる。

表 I

補体が関与する全身性疾患および障害

神経学的障害

多発性硬化症

脳卒中

外傷性脳損傷

パーキンソン病

不適切または望ましくない補体活性の障害

血液透析合併症

超急性同種移植拒絶反応

異種移植拒絶反応

インターロイキン-2療法実施中のIL-2誘発性中毒

炎症性障害

自己免疫疾患の炎症

クローン病

成人呼吸促迫症候群

火傷または凍傷を含む熱傷

虚血後再潅流状態

心筋梗塞

バルーン血管形成術

心-肺バイパスまたは腎臓バイパスにおけるポンプ後症候群

血液透析

腎虚血

大動脈再建術施行後の腸間膜動脈再潅流

感染症または敗血症

免疫複合体疾患および自己免疫疾患

慢性関節リウマチ

全身性エリテマトーデス（SLE）

ループス腎炎

増殖性腎炎

糸球体腎炎

溶血性貧血

重症筋無力症

特に、現行の投与経路で治療できる疾患については、前記の2.2で説明している。特定の実施例では、火傷または心筋梗塞誘発性外傷のために広範な領域の組織の破壊を伴う疾患、およびショック症候群としても知られる成人呼吸促迫症候群（ARDS）を、有効量の補体阻害蛋白を肺内投与することで治療できる。

疾患または障害の治療のための本発明の好ましい実施例に基づいた可溶性CR1の有効量は、0.01～100mg/kgという用量範囲であり、0.1～10mg/kgが好ましい。ここで補体が関与する疾患または障害の治療のための補体阻害蛋白の有効量とは、補体活性を全身的に阻害するのに有効な量のことである。肺内への経路で投与して循環血中可溶性CR1がそのようなレベルになる投与量を想定している。投与は、蛋白吸入による一回投与で行っても、反復投与で行ってもよい。

5.3.2 局所作用を得るための補体阻害蛋白の肺内投与

本発明の別の実施例では、補体が関与する疾患または障害を、当該疾患が肺への局所的損傷として現れるときに、補体阻害蛋白を気道を通じてデリバリーすることで治療する。この種の補体関連疾患および障害を表IIに列挙する。

表Ⅱ

補体が関与する肺の疾患および障害

疾患

呼吸困難

喀血

ARDS

喘息

慢性閉塞性肺疾患（COPD）

肺気腫

肺塞栓および梗塞

肺炎

感染性

吸引性

線維形成誘導性塵疾患

不活性塵埃および鉱物質：たとえば、シリコン、石炭塵、ベリリウム、アスベスト。ただしこれらには限定されない。

肺線維症

有機塵疾患

化学的損傷（たとえば、刺激性ガスおよび化学物質）

塩素

ホスゲン

硫化水素

二酸化窒素

アンモニア

塩化水素

煙吸入熱傷

熱傷

火傷

凍傷

喘息

アレルギー

気管支収縮

喘息のその他の原因　たとえば刺激原

その他

過敏性肺炎

寄生虫病

グッドパスチャー症候群

肺血管炎

免疫複合体関連炎症

先に指摘したように、肺の疾患または障害の治療には補体阻害蛋白の肺内投与が好ましい。なぜならば、より高い局所濃度で補体阻害蛋白をデリバリーでき、血管外空間において補体阻害蛋白が有意な量で局在し、また補体阻害蛋白の全身作用を制限するかもしくは最小限に抑えられるからである。

本発明の製剤を、煙吸入損傷の予防または治療に利用できるようにすることを特に考えている。

5.3.3. 気管支収縮治療への補体阻害蛋白の利用

以下の例で示すように、本発明の補体阻害蛋白は気管支収縮の治療に利用することができる。補体阻害蛋白は、気管支収縮治療のために全身投与することができ、また非経口的投与経路、すなわち腹腔内、静脈内、口周囲、皮下、筋内、動脈内、等々の経路で投与することがより好ましい。好ましい実施例では、補体阻害蛋白を肺内経路で投与して気管支収縮を治療することができる。補体阻害蛋白の肺内投与については、先に説明したとおりである。

気管支収縮は、多数の状況または障害が原因で生じうる。たとえば、喘息、特にアレルギー性喘息、アナフィラキシー、特に免疫媒介アナフィラキシー、慢性閉塞性肺疾患、および様々な非特異的刺激物または肺傷害、たとえば前記の表IIで「疾患」、「化学的損傷」、「煙吸入熱傷」、「有機塵疾患」、「繊維形成誘導性塵疾患」、「煙吸入熱傷」および「熱傷」という項目に挙げられているものがあるが、これらには限定されない。補体阻害蛋白の全身投与または肺内投与を、煙吸入の結果として生じる気管支収縮の予防的または治療的処置に利用できるようにすることを特に考えている。

5.3.4. アナフィラキシー治療への補体阻害蛋白の利用

特異的実施例では、補体阻害蛋白をアナフィラキシー、特に高度免疫アナフィラキシーの治療に利用できる。アナフィラキシーとは、患者がすでに過敏になっている物質に曝露されることによってもたらされる全身性免疫反応である。このような反応は予期されずに生じるもので、生命を脅かすこともある。アナフィラキシーはたいてい、抗原に曝露されて数分から数時間以内に生じる。多くの蛋白およびポリペプチドがアナフィラキシーをもたらしうる（たとえば、リヒテンシュタインおよびフォーチによる『今日のアレルギーおよび免疫学における療法』B. C. Decker Inc., Philadelphia特に79頁を参照）。

本発明のもう１つの側面として、アナフィラキシー様反応または特発性アナフィラキシーの処置のために、補体阻害蛋白を予防的または治療的に投与することができる。アナフィラキシー様反応または特発性アナフィラキシーでは、アナフィラキシーの場合と同じ物質または類似の物質が非免疫的に放出される。このような反応はたいてい様々な治療薬または診断用薬、たとえば放射線検査で使用する造影剤などに曝露されたときに生じる。アナフィラキシー様反応をもたらすことが知られている薬剤としては、アセチルサリチル酸、非ステロイド系抗炎症薬、クラーレ、麻酔薬、マンニトールおよびヨウ化放射性造影剤があるが、これらには限定されない。

アナフィラキシー、あるいはアナフィラキシー様反応や特発性アナフィラキシーの予防または治療のために、補体阻害蛋白を全身投与することができ、またアナフィラキシーの治療には非経口的投与経路、すなわち腹腔内、静脈内、口周囲、皮下、筋内、動脈内、等々の経路で投与するのがより好ましい。好ましい実施例では、アナフィラキシー治療のために、特にアナフィラキシーに伴う気管支収縮の治療のために、補体阻害蛋白を肺内経路で投与することができる。気管支収縮に加えて、補体阻害蛋白を投与すると血圧の変化、循環血中血小板数減少、およびアナフィラキシーに伴うショックを緩和もしくは予防することができる。補体阻害蛋白の肺内投与については、先に説明したとおりである。

下記の特定の例では、受動免疫または能動免疫された対象で抗原誘発により生じたアナフ

ィラキシーの症状が可溶性CR1により軽減または排除されている。特定の実施例では、sCR1は腹腔内投与または静注あるいはその双方を行っている。

5.4 本発明の製剤を評価するための動物モデル

本発明の好ましい側面として、本発明の補体阻害蛋白または製剤は、以下のモデル系でアナフィラキシーに関連する補体活性の阻害に有効であることがわかっている。モルモットを完全フロイントアジュバントに入ったオボアルブミンで能動感作する（下記の例６を参照）。７匹程度の動物２群を使用する。群１は対照群で、これにはリン酸緩衝食塩液を投与する。群２には補体阻害蛋白、たとえば可溶性CR1を投与する。動物は－１時間目にたとえばペントバルビタールまたはケタミン／キシラジンでもよいが、これを使って麻酔し、気管支収縮および血圧を測定する計器を取り付ける。－7分の時点で動脈血試料を採取する。採血量は0.5mlが適当である。－5分の時点でPBSまたは補体阻害蛋白、特にsCR1を（たとえばツイーン20といった界面活性剤などの分散剤が入った溶液にして）、エアロゾル化してから約3mlを約3分かけて吸入投与する。エアロゾル化するには、DeVilbiss Porta Sonic Nebulizerなどのネブライザーを使用する。エアロゾル製剤の肺内投与中には、気管支収縮および血圧を測定するためのコンプライアンスおよび抵抗の記録装置が妨害されるはずである。－2分の時点で、コンプライアンスおよび抵抗の記録を再開する。－1分の時点で血液試料を採取する。時刻０の時点で、オボアルブミンを非経口的に、より好ましくは吸入により投与する。たとえば、ツイーン20に溶解した1%オボアルブミン溶液を、DeVilbiss Model 65 Ultrasonic Nebulizerを使って呼吸気流計およびポンプを通じて12秒間かけて噴霧化できる。オボアルブミンの量（またはその濃度）は、十分な反応を引き起こすように高くしたり低くしたりできる。血液試料は＋2分、＋7分および＋20分の時点で採取し、コンプライアンスおよび抵抗は継続的に測定する。実験完了後に、気管支肺胞洗浄液（BLA）を（約15ml）採取し、BAL細胞をカウントする。BAL上清を調べて補体阻害蛋白、たとえばsCR1の濃度および蛋白含有量を明らかにする。血液試料を使って循環白血球数および血小板数を求める。血球分類計数（differential blood count）を行い、ヘマトクリット値を求める。血漿試料を調べてC3転換レベル（補体活性の測定値）および補体阻害蛋白、たとえばsCR1のレベルを明らかにする。

別の実施例では、煙吸入気道熱傷の治療に関する本発明の補体阻害蛋白および製剤の有効性を試験することができる。現在の技術で、煙吸入気道熱傷のモデルは多数知られている。たとえば、温度を600℃と一定に保ち、気流を一定にしたるつぼ炉で、ポリテトラフルオロエチレンなどの燃料を熱分解して煙を発生させることができる。煙を酸素と混合し、ラットなどの動物に適当な時間、たとえば20分間、煙を曝露させる。sCR1などの補体阻害蛋白を有効量で予防的に投与したり、あるいは煙曝露後に投与した動物の間で群比較を行うことができる。sCR1は下記の例で述べるように非経口的に投与したり、肺内投与することができる。

以下の例を参照すると本発明をさらによく理解できるが、これらは単に例を示すためのものであり、本発明を限定するためのものではない。

６．例：補体受容体１（CR1）による感作モルモットにおける気管支収縮の軽減

全身性アナフィラキシーでは、生命を脅かす気管支収縮の他にも重大な血圧低下反応が見られ、不整脈を伴うことが多い。補体系活性化産物は、全身性アナフィラキシーのメディエーターの可能性もある。本例では、可溶性補体受容体１（sCR1）を使ってモルモットにおける補体の古典的経路および第二経路の活性を阻害できること、また抗原であるオボアルブミンで受動感作もしくは能動感作したモルモットに抗原を静注したときに誘発される気管支収縮および血圧の変化が予防されることを示す。

6.1. 材料および方法

6.1.1. 呼吸および血圧の測定

先に述べているように（リーガルおよびベルによるInt. Archs. Allergy Appl. Immun. 84巻 414～423頁（1987年））、ペントバルビタール（25mg/kg腹腔内注）で麻酔した雄モルモット（ハートリー・モルモット、Harlan Sprague-Dawley, Inc. インディアナ州インディアナポリス、またはSasco, Inc. ネブラスカ州オマハ）に人工呼吸器を付け、肺抵抗

および動的肺コンプライアンスを継続的に測定した。気管内気流はフライシュ呼吸気流計で測定し、肺内外圧較差は胸膜腔に挿入した針により測定した。気管内気流および肺内外圧較差のいずれも、オンライン肺力学コンピュータ（モデル6、Buxco Electronicsコネチカット州シャロン）に入力し、このコンピュータでアムデュールおよびミードの方法（Am. J. Physiol. 192巻　364～370頁（1958年））を使って肺抵抗および動的肺コンプライアンスを算出した。平均動脈血圧は、Statham PM23Db圧力トランスデューサを使って大腿動脈を通じてモニターした。頸静脈に挿入したカニューレで薬剤を投与し、また頸動脈に挿入したカニューレを使って血液試料を採取した。動物を15～20分間安静にさせた後に実験操作を開始した。タキフィラキシーを生じるので、各動物に抗原は１回しか投与しなかった。結果は、オボアルブミン（OA）またはウシ血清アルブミン（BSA）を加える前の対照となるコンプライアンス、抵抗または血圧の値に対する変化率（％）の平均±S.E.で表す。OAまたはBSA注入後、20分間にわたってデータを取った。6秒ごとの各群の動物に関する変化率（％）平均反応を図にプロットする。わかりやすくするために、標準誤差を示す棒は一部の選択時点についてのみ示した。ヒスタミンまたはブラジキニンへの反応性に対するsCR1の影響を評価する研究では、作動薬を1分ごとに用量を増やしながら投与し、各用量についての最大変化率（％）を求めた。

6.1.2.　能動感作および受動感作

モルモット（200～300g）に、生理食塩液（NSS）中オボアルブミン（5mg/ml）に等容積の完全フロインドアジュバントを混ぜて作った乳濁液0.4mlを第０日、２日および４日に腹腔内注して能動感作した。能動感作したモルモットに対して、21～34日に抗原を静注し、攻撃誘発した。その時、動物の体重は350～450gになっていた。

受動感作のために、オボアルブミンで免疫化したモルモットのプールした血清試料からオボアルブミンに対するIgG抗体を得た。またオボアルブミンに対するIgG-タイプ抗体およびIgE-タイプ抗体は、先に述べられているように（リーガルによるJ. Pharmacol. Exp. Ther. 228巻　116～120頁（1984年））、蛋白A-セファロースカラムを通過させて分離した。簡単に言うと、オボアルブミンに対するIgG抗体およびIgE抗体の双方を含有する血清を蛋白A-セファロースカラムを通過させた。抗体、ならびにカラムを通過した他の血清成分は、受動的皮膚アナフィラキシーにおける熱易変性、および14日以上モルモットの皮膚に持続的に存在することから、IgE-タイプ抗体であると特定した。カラムに結合した細胞親和性抗体は、受動的皮膚アナフィラキシーにおける熱安定性およびモルモットの皮膚に持続的に存在しないことから、IgGと特定した。IgG分画は、IgG_1およびIgG_2の組合わさったものであった（リーガルによる前掲（1984年））。

IgG抗体は、食塩液で透析し、後に使用するまでアリコートに分けて－70℃で保存した。モルモットを受動感作するには、体重225～300gのモルモットに実験の12～24時間前にエーテル麻酔してIgG 1.6mg/kgを心臓内注した。

6.1.3.　C3転換の測定

C3転換は、ストロングおよびワトキンスが述べている（J. Immunol. Methods 29巻　293～297頁（1979年））免疫固定化技術を使って評価した。血漿試料（1μl）をAgarose Universal Electrophoresisフィルム（Corning Medical米国カリフォルニア州パロアルト）上のあらかじめカットした装填スリットに入れ、EDTAを含有するCorning Universalバルビタール緩衝液を使ってフィルムあたり30mAで90分間電気泳動した。電気泳動した後、ヤギ抗モルモットC3のIgG分画に浸した酢酸セルロース・ストリップ（Cooper Biomedical米国ペンシルバニア州イーストチェスター）で覆い、室温で１時間インキュベートした。それからフィルムを通常の生理食塩液で洗浄し、圧迫して乾燥させ、クーマシーブルーで染色した。酵母活性化補体（YAC）の試料を各ゲルに入れて陽性対照、すなわちC3転換がすでにわかっている試料として利用した。YACは次のようにして調製した。パン酵母をまずNSS中、250mg/mlで30分間煮沸して加熱不活化し、それから25mg/mlで正常モルモット血清と37℃で60分間インキュベートした。12,000×gで45分間遠心分離して酵母を除き、上清（YAC）をアリコートし、－70℃で保存した。

6.1.4.　血漿中sCR1濃度の測定

血漿試料中のsCR1濃度は、先に述べられている方法で（ムリガンらによるJ. Immunol. 148巻　1479～1485頁（1992年））二重ポリクロナールビーズ酵素イムノアッセイにより定量した。

6.1.5.　末梢血球の定量

動脈血試料はエチレンジアミン４酢酸（EDTA）で被覆した試験管に採集した。血球計数器を使い、標準的な手順で白血球および血小板の総数を調べた。

6.1.6.　材料

ヒスタミンジヒドロクロライド、オボアルブミン（グレードＶ）、ウシ血清アルブミン（因子Ｖ）およびブラジキニンの酢酸塩はSigma Chemical（ミズーリ州セントルイス）から入手した。LHR A、B、CおよびDならびにSCR29および30を含有するが、経膜領域および細胞質領域とを欠く可溶性補体受容体１（sCR1）は、前記のとおりである（5.1）。sCR1は、リン酸緩衝食塩液（PBS）中で5.96または5.08mg/mlの濃度で調製した。sCR1は、すでに述べられている方法で（ワイズマンらによるScience 249巻　146～151頁（1990年））、組換え技術を用いて調製し、リムルス定量分析（Limulus assay）により求めたところ、エンドトキシンはを0.24単位／ml以下であった。

6.1.7.　実験計画および統計学的分析

本研究では、４種類の異なる実験群を作った。すなわち、1）受動感作し、オボアルブミン176μg/kgを負荷する2分前にsCR1を15mg/kg静注したモルモット、2）能動感作し、オボアルブミン300μg/kgを負荷する2分前にsCRを15mg/kg静注したモルモット、3）能動感作し、オボアルブミン2mg/kgを負荷する前にsCR1を累積投与量105mg/kgで腹腔内注および静注したモルモット、および4）能動感作し、ウシ血清アルブミン（BSA）2mg/kgを負荷する前に、sCR1を累積投与量105mg/kgで腹腔内注および静注したモルモットである。sCR1を累積投与量105mg/kgで投与する動物については次のように投与を実施した。抗原またはBSA負荷の24時間前に、sCR1を60mg/kgまたはPBSを10.1ml/kg腹腔内注し、抗原負荷5分前にsCR1を20mg/kgまたはPBSを3.3ml/kg静注した。４つの実験群のすべてで、sCR1またはPBSの静注の１ないし２分前に、さらに抗原またはBSA負荷の1分前に動脈血試料を採取した。抗原負荷後も動脈血試料２ないし３件を採取し、C3転換および血漿sCR1濃度の評価、末梢血細胞の定量に使用した。

コンプライアンス、抵抗または血圧の変化率（％）の経時的な差を明らかにするために、両側ｔ検定としては分散が等しいことを前提としないサタースウェイトの近似法（シュネデカーおよびコクランによる『統計学的方法　第７版』Iowa State University Press: Ames, Iowa（1980年））を採用した。分散の反復測定分析法を用いて、sCR1がヒスタミンまたはブラジキニンに対する反応に影響を及ぼしたかどうか、あるいは血漿sCR1濃度にOA負荷動物とBSA負荷動物で差があるかどうかを調べた。OAがもたらす循環血球の変化にsCR1が有意な影響を及ぼしたかどうかを調べるには、対応のあるデータのスチューデントの両側ｔ検定を採用し、対数変換した値を使って分散を安定させた。どの検定でも有意水準はp＝0.05とした。

6.2.　結果

6.2.1.　能動感作および受動感作におけるOAに対する反応に15mg/kgのsCR1が及ぼす影響

能動感作したモルモットおよび受動感作したモルモットの双方で、OA負荷の2分前に一回静注したsCR1（15mg/kg）の影響を調べた（図１）。受動感作したモルモットにOA負荷をすると（実験群１）、抵抗が大きく増大し、コンプライアンスは大きく低下した。一過性の血圧上昇状態が見られた後、急激に血圧が低下した。20分後までには、血液試料は心臓穿刺しなければ得られなくなった。sCR1を15mg/kg投与しても、受動感作したモルモットでは抗原に対する反応に有意な影響を及ぼさなかった。

能動感作したモルモットに大量のオボアルブミンを使用して（実験群２）、コンプライアンスおよび抵抗の変化が受動感作したモルモットの場合と同じくらい大きくなるようにした。能動感作したモルモットにOA負荷をすると、受動感作したモルモットで見られたのと同程度の気管支収縮が生じた。ただし、血圧反応はそれほど劇的ではなかった。一過性の血圧上昇状態の後で、血圧は中程度の低下しか示さなかった。能動感作したモルモットに

sCR1 15mg/kgを静注したところ、OAにより誘発されるコンプライアンス低下はごくわずかに減少し、血圧反応の血圧上昇相は著しく短くなり、血圧低下反応は見られなかった。可溶性CR1を投与しても、PBS投与動物と比較したベースラインのコンプライアンス、抵抗または血圧に有意な変化は生じなかった。

受動感作したモルモットにOA負荷をしたところ、循環白血球数は急激に減少し、循環血小板数はごくわずかしか変化がなく、心血管／肺には劇的な変化が見られた（図２）。可溶性CR1を投与しても、受動感作動物ではOAによって誘発される循環血球の変化には変わりがなかった。能動感作したモルモットでは、OAを負荷すると循環血中の白血球数および血小板数の双方とも劇的な減少を示した。可溶性CR1の投与により、能動感作したモルモットではOAによって誘発される循環血小板数の減少が有意に軽減され、この循環血小板数低下が補体活性化に依存するものであることがわかった。可溶性CR1を投与してもsCR1投与前（－5分）の血球数をOA負荷直前（－1分）の血球数と比較して求めたベースラインの循環白血球数および血小板数に有意な影響は生じなかった。

6.2.2. 能動感作したモルモットにおけるOA、BSA、ヒスタミンおよびブラジニキンに対する反応にsCR1の累積投与が及ぼす影響

能動感作したモルモットを使った我々の最初の実験で、sCR1を投与するとOA負荷に対する血圧上昇反応が短縮されることがわかったので、その後の継続実験ではOA負荷前24時間にわたってより高い用量のsCR1を投与することにした。ラットを使った予備実験で、sCR1をより高い用量で反復投与すると血管外に分子が分布することがわかった。そこで能動感作したモルモットに、OA負荷前24時間にわたってsCR1を累積投与量105mg/kgになるように腹腔内注および静注で投与し、OA負荷に対する反応を評価した（実験群３）。これらの能動感作したモルモットにはより高い用量でOAを負荷して、抗原に対する血圧低下反応もより大きくなるようにした。図３を見てわかるように、sCR1はOAによって引き起こされるコンプライアンスの低下および抵抗の上昇を有意に阻害した。OAに対する血圧上昇反応は短縮し、血圧低下反応はなくなった。さらに、PBS投与動物９匹中５匹ではOA負荷が致命的となったが、sCR1を投与した動物では９匹すべてが20分間の実験の間生存し続けた。

PBSまたはsCR1のいずれかで前処理した能動感作モルモット群に、対照としてBSA負荷を行った（実験群４）。実験群３および４で－5分の時点で可溶性CR1を静注しても、PBSを投与した対照で生じた変化に比べて、ベースラインのコンプライアンス、抵抗、血圧、循環白血球数または血小板数に有意な変化はなかった。OAまたはBSA添加時点でのコンプライアンス、抵抗、血圧、循環白血球数および血小板数の初期値にも差はなかった。BSA負荷後には、コンプライアンスおよび抵抗の変化はごくわずかであり、PBSまたはsCR1を静注した後27分間にわたりモニターしたところ、ベースラインからの変動は±5%未満であった（データは示さない）。BSAを負荷した動物における血圧の変動はより顕著であった（図４）。能動感作したモルモットに累積投与量が105mg/kgになるようにsCR1または対照PBSを注入してからBSAを負荷したところ、BSA負荷後20分間にわたるモニター中に血圧が上昇した。このように緩慢な血圧上昇は、sCR1を投与してOAを負荷した動物で見られた変化と区別できない。sCR1を投与してOAを負荷した動物でも、モルモットに抗原を静注負荷したときに特徴的である一過性の血圧上昇相が見られた。PBSを投与してBSAを負荷した動物でも緩慢な血圧上昇が認められた。したがって、この緩慢な血圧上昇はsCR1自体の影響によるものではなかった。

sCR1 105mg/kgの累積投与がOAおよびBSAによって引き起こされる循環血球の変化に及ぼす影響についても調べた（実験群３および４）。図５を見てわかるように、PBSまたはsCR1を投与した動物にBSAを負荷すると、循環血球数の変化はごくわずかであった。ただし、能動感作したモルモットに2mg/kgのOAを負荷すると、循環白血球数も血小板数もともに急激に減少した。可溶性CR1は、OA負荷後のどの時点でも循環血小板数の減少を有意に阻害し、またOA負荷の2分後および7分後には白血球数の減少を有意に阻害した。より高用量の105mg/kgのsCR1を投与しても、15mg/kg静注の場合に比べてOAによって引き起こされる血小板数減少の阻害作用は大きくはならなかった（図２）。

実験群４では、BSAに対する反応をモニターした後で、モルモットにヒスタミンを負荷し

、高度に膨張させてコンプライアンスおよび抵抗をベースライン値に戻してからブラジキニンを負荷した。図６を見てわかるように、ヒスタミンに対する気管支収縮作用には、sCR1を投与しても影響がなかった。ヒスタミンは血圧も20～30％低下させたが、これについてもsCR1投与は影響しなかった（データは示さない）。ブラジキニンはヒスタミンよりもさらに著しく血圧を低下させる作用があるので、ブラジキニンに対するsCR1投与の影響も調べた。可溶性CR1を投与しても、ブラジキニンを２回連続投与した結果引き起こされる血圧低下に有意な影響はなかった（図７）。ブラジキニンはこのような投与量では有意な気管支収縮ももたらすが、コンプライアンスの低下および抵抗の増大にsCR1による有意な影響はなかった（データは示さない）。

6.2.3. C3転換

可溶性CR1は明らかにOAによって引き起こされる気管支収縮および低血圧を阻害し、したがってこれらの事象で補体活性化が重要なステップであることがわかった。OA負荷後に補体系活性化が実証できるかどうかを明らかにするために、我々は検出可能なC3転換の有無を評価した。補体活性化の過程では、補体成分C3は酵素C3転換酵素によって切断されC3a（9.1kDA）とC3b（180kDa）のフラグメントになる。切断産物C3bは、その後酵素作用によりさらに分解され、C3bi、C3c、およびC3dgなどのフラグメントになる。動物から得た試料を電気泳動して無変化のC3分子を切断産物のC3b、C3bi、等々から分離し、次いでモルモットC3に対する抗体を使ってプローブすると、２つの大きなバンドが明らかになった。すなわち、無変化のC3分子および様々なC3切断産物から成るより広いバンドであった（ストロングおよびワトキンスによるJ. Immunol. Methods 29巻　293～297頁（1979年））。このようにして、補体の活性化を示す「C3転換」もしくはC3分子の切断を推定することができる。図８に、PBS投与動物１匹およびsCR1投与動物１匹での結果を示す。能動感作したモルモットに2mg/kgのOAを負荷したところ（実験群３）、PBS事前投与動物で調べた３時点（OA負荷の2、7および20分後）のすべてでC3転換が検出可能であった。調べたPBS投与動物７匹中６匹では、OA負荷後の全時点においてC3転換の証拠が認められたのに対して、sCR1投与動物７匹中で認められたのは０匹であった。PBSまたはsCR1のいずれを投与したモルモットでもOA負荷前にはC3転換が検出可能であり、またsCR1投与した動物ではOA負荷後に検出可能であった。

能動感作し、15mg/kgのsCR1を投与してから300μg/kgのOAを負荷したモルモットでもC3転換について評価した（実験群２）。これらの動物では、OA負荷の2分後にはC3転換は検出できなかったが、OA負荷の20分後にはPBS投与動物５匹のすべてにおいてC3転換が明らかに認められ、一方sCR1投与動物５匹中では認められたのは０匹であった。したがって、能動感作したモルモットにOA負荷するとC3転換で評価されるように補体系の活性化が生じる。BSA負荷した動物では、PBS投与またはsCR1投与のいずれであれ、どの時点においてもC3転換は検出されなかった（実験群４）。

6.2.4. 血漿中sCR1濃度

どの実験群でもPBSを事前投与した動物では、血漿中にsCR1は検出できなかった。sCR1 15mg/kgを静注したモルモット（実験群１および２）における可溶性CR1濃度を表IIIに示す。受動感作したモルモットでも能動感作したモルモットでも、血漿中sCR1濃度は同程度であった。ただし、血圧上昇反応に影響が見られたのは能動感作したモルモットだけであった。

累積投与量105mg/kgでsCR1の投与を受けたモルモットにおける血漿中sCR1濃度を図９に示す。OA負荷動物とBSA負荷動物とで反復測定ANOVAにより比較したが、可溶性CR1濃度に有意な差はなかった。能動感作してから15mg/kgのsCR1を静注した動物（実験群２、表III）あるいは105mg/kgのsCR1の投与を受けた動物（実験群３、図９）とでOA負荷の2分後および20分後の血漿中sCR1濃度を比較した。OA負荷の20分後には血漿sCR1濃度に有意な差が見られたが、OA負荷の2分後では差は見られなかった。

表Ⅲ

能動感作したモルモットおよび受動感作したモルモットにおける血漿中sCR1濃度。－2分の時点で15mg/kgのsCR1を静注し、時刻0の移転でOAを負荷した（実験群1および2）。値は4～5回の実験の平均±S.E.。

感作	各時点でのsCR1濃度（μg/ml）			
	－5分	2分	5分	20分
能動	N.D.	--	254.2±37.5	265.7±29.4
受動	N.D.	354.4±10.3	--	239.7±22.2

N.D.＝検出不能

6.3. 考察

本研究の結果から、補体阻害蛋白は抗原誘発性アナフィラキシーを軽減する効果があることが明らかにわかる。特に、sCR1は気管支収縮、血圧低下、循環血小板減少などのアナフィラキシーのもたらす多くの作用を緩和もしくは予防することがわかっている。さらに、以下でより詳しく追求するが、本研究はアナフィラキシーに補体系が明らかに関与していることを示した最初の研究である。

アナフィラキシーは呼吸器と心血管系の双方に重篤な結果をもたらす。全身性アナフィラキシーでは、生命を脅かす気管支収縮に加えて、重大な血圧低下反応も生じる。気管支収縮および低血圧にいたるまでにどのような順序で事象が生じていくのかを知ることは、アナフィラキシー治療のための合理的な治療処方を考えるにあたって重要である。我々の研究では、sCR1分子を用いた補体系活性化の阻害により、能動感作したモルモットのアナフィラキシー・モデルで抗原により引き起こされる気管支収縮反応が緩和されるだけでなく血圧低下反応が予防されることが実証されている。これらの結果から、補体系活性化は気管支収縮反応に寄与しており、また血圧低下反応にとって欠かせないものであることがわかる。さらに研究からは、アナフィラキシー反応は、抗原によって誘発される事象における補体系活性化のための役割と一致する時間経過で補体活性化を伴うことも実証されている。

本発明の例では、sCR1分子を使ってアナフィラキシーの症状、特に気管支収縮を軽減することに成功している。可溶性CR1は、C3およびC5の切断および補体系活性化の過程継続を担当するC3およびC5転換酵素複合体のC3bおよびC4bサブユニットに逆結合することによって、補体の活性化を妨げる。結合するとsCR1は、C3およびC5転換酵素の触媒サブユニットを置換するとともに、血漿プロテアーゼ因子1によるC3bおよびC4bの蛋白分解的不活性化をもたらす。

sCR1によりアナフィラキシーの症状が阻害されることは、補体活性が抗原誘発性事象で重要であることの証左となる。補体系の活性化は関与しうる多くの生物活性産物を生成し（ゴールドスタインによる前掲（1992年））、これには、C3のオプソニンフラグメント、アナフィラトキシン（C3a、C4a、C5a）、白血球増加因子C3e、因子Bのフラグメント、および膜侵襲複合体C5b-9などがある。アナフィラトキシンC3a/C5aはモルモットに注入するとアナフィラキシーに似た症状が現れることで知られている。したがって、これらは抗原誘発性の気管支収縮および血圧変化を媒介するための補体系活性化の関連産物である可能性がある。ただし、補体系活性化の別の成果、すなわち膜侵襲複合体はアラキドン酸の代謝も刺激し（モルガンによるBiochem. J. 264巻　1～14頁（1989年））、アナフィラキシー様反応を媒介しうる生物活性物質の源となりうる。

これらの研究から、sCR1はヒスタミンまたはブラジキニンに対する心血管系および呼吸器系の反応能を変化させないことがわかっており、一般には心血管系および呼吸器系の反応性を阻害するのではないことが示唆される。

これらの研究では、能動感作したモルモットでは抗原負荷後にC3転換が起こったことも実証されている。C3転換は、溶血複合体の総活性を測定するよりも補体活性化のより感度のよい指標であるが、C3aまたはC5aの生成を測定するのに比べるとまだはるかに感度が悪い。C3転換が検出できなくても有意な補体活性化が生じていることがありうる。そうはいうものの、我々の研究では抗原負荷からわずか2分後の重篤な気管支収縮および血圧変化が生じているときに、すでにC3転換の存在が実証されている。

これらの研究では、２種類の異なるモルモット・アナフィラキシー・モデルで補体系活性化の役割を調べてきた。１つのモデル（実験群１）では、モルモットを抗オボアルブミンIgG1抗体およびIgG2抗体を合わせたもので受動感作した。もう一方のモデルでは、完全フロインドアジュバントを使ってオボアルブミンに対してモルモットを能動感作させた。リチャーソンの研究では（J. Lab. Clin. Med. 79巻　745～757頁（1972年））、オボアルブミンおよび完全フロインドアジュバントで感作させると、抗オボアルブミンIgG1抗体およびIgG2抗体の両者が生成され、したがって低用量のオボアルブミンで感作しただけでも主として抗オボアルブミンIgG1抗体が産生されることが実証されている。チェンらの研究では（Fed. Proc. 46巻　931頁（1987年））、能動感作をすると受動感作に比べて循環血中IgG濃度がより高くなることが示されている。我々の研究で受動感作中に注入したIgG抗体の総量は高度免疫した動物の血清0.5ml未満中のIgGの量であったところから、このことは予想されることである。２つのモデルによって、同じような生理学的反応をもたらすのに必要な抗原の投与量は異なった。タキフィラキシーが生じるので、すなわち抗原を一回投与した後では動物が抗原負荷に対して応答しなくなるので、用量反応曲線は求めなかった。受動感作であれ能動感作であれ、いずれのモルモット・モデルでも抗原を負荷すると強い気管支収縮が起こり、一過性の血圧上昇が見られた後で血圧低下が生じた。

循環血球数に対する抗原の影響も、２種類のモルモット・アナフィラキシー・モデルによって違っていた。受動感作したモルモットでは、抗原を負荷しても循環血小板数に有意な変化は生じなかった。このモデルでは明らかに、抗原誘発性気管支収縮および血圧変化は循環血小板数に対する影響とは独立して生じていた。それとは対照的に、能動感作したモルモットでは、抗原を負荷すると循環血小板数ならびに白血球数も減少した。可溶性CR1を投与すると、抗原誘発性血圧上昇相は有意に短縮し、また抗原誘発性循環血小板数減少も軽減された。血小板の変化に劇的な影響があったことから、血漿中のsCR1濃度がこの部位に作用するに十分なものであったことがわかった。

sCR1を一回静注した初期の研究では、抗原誘発性反応はPBS投与動物に比べてやや小さかったが、その差は有意ではなかった。そこで、sCR1をより高用量で抗原負荷の前24時間にわたって投与する研究を開始した。15mg/kgを一回投与した場合でも累積投与量105mg/kgとなるように投与した場合でも、抗原負荷時点での血漿中sCR1濃度は同じようなものであった。ただし、105mg/kgの累積投与の場合は、抗原誘発性のコンプライアンス低下および抵抗増大が明らかに阻止され、抗原に対する血圧低下反応は認められなかった。我々の対照研究でも、累積投与量105mg/kgでsCR1を投与しても、ヒスタミンまたはブラジキニンを

外から投与したときに引き起こされる気管支収縮反応あるいは血圧低下反応のいずれも阻止されなかった。したがって、sCR1はこれらの用量ではモルモットにおける心血管系／呼吸器系反応を非特異的に変化させるようには働いていなかった。これらの研究から、血管外部位で重要な補体活性化が生じていることも示唆されている。これらの血管外部位は、たとえば吸入など、sCR1の肺内直接投与の標的として特に注目される。

これらの研究は、アナフィラキシーの能動感作モルモット・モデルにおいて抗原誘発性気管支収縮および血圧変化において、補体活性化が欠くことのできないステップであることを確かな証拠とともに示した最初のものである。明らかに補体活性化が起こっており、活性化を妨害すると抗原誘発性事象が緩和される。またこの研究は、アナフィラキシーの機序が、採用したモデル系に応じて有意に変化する点にも注意を喚起している。したがって、今後はアナフィラキシーの異なる機序およびメディエーターについての研究を続けていくことが重要であり、補体系はそのようなメディエーターの源として注目するに値する。

７．例：モルモット・モデルにおける可溶性補体受容体１（sCR1）のエアロゾル投与

7.1　材料および方法

モルモット（200～300g）に、第０、２、および４日に完全フロインドアジュバントに溶解したオボアルブミン（1mg）を腹腔内投与して能動感作した。21日目に、感作したモルモットにsCR1を噴霧化してから吸入投与した（噴霧化したsCR1の5mg/mlの溶液または食塩液を気管チューブにより7～14分間曝露）。sCR1投与開始から30分後に、モルモットに噴霧化したOAを吸入負荷した（2.5%溶液を1分間）。肺抵抗、動的肺コンプライアンス、および平均動脈血圧を、前記6.1.1.に述べたように継続測定した。動脈血試料中の白血球総数および血小板数を調べた。sCR1投与により抵抗および血圧に影響が見られた。

7.1.1　呼吸および血圧の測定

肺抵抗、動的肺コンプライアンス、および平均動脈血圧は、前記6.1.1.に述べたように継続測定した。動物は15～20分間安静にさせてから実験操作を開始した。結果はオボアルブミン（OA）を加える前のコンプライアンス、抵抗または血圧の対照値からの変化率（%）の平均±S.E.で表す。OA吸入後に、20分間にわたりデータを収集した。

7.1.2.　能動感作

モルモット（200～300g）に、生理食塩液（NSS）中オボアルブミン（5mg/ml）に等容積の完全フロインドアジュバントを混ぜて作った乳濁液0.4mlを第０日、２日および４日に腹腔内注して能動感作した。能動感作したモルモットに第21日に抗原を吸入負荷した。OAの2.5%溶液を噴霧化し、１分間吸入させた。噴霧化は超音波ネブライザー（DeVillebiss Porta-Sonicペンシルバニア州ソマーセット）を使って行った。

7.1.3.　末梢血球の定量

動脈血試料はエチレンジアミン４酢酸（EDTA）で被覆した試験管に採集した。血球計数器を使い、標準的な手順で白血球総数および血小板数を調べた。

7.1.4.　材料

オボアルブミン（グレードＶ）はSigma Chemical（ミズーリ州セントルイス）から入手した。LHR A、B、CおよびDならびにSCR29および30を含有するが、経膜領域および細胞質領域を欠く可溶性補体受容体１（sCR1）は、前記のとおりである（5.1）。sCR1は、リン酸緩衝食塩液（PBS）中で5.08mg/mlの濃度に調製した。sCR1は、すでに述べられている方法で（ワイズマンらによるScience 249巻　146～151頁（1990年））、組換え技術を用いて調製し、リムルス定量分析（Limulus assay）により求めたエンドトキシンは0.254単位/mlであった。

7.1.5.　実験計画および統計学的分析

本試験では２種類の実験群を用いた。OAを負荷する30分前に、１群にはsCR1をエアロゾルで投与し、他の群には食塩液を投与した。sCR1の5mg/ml溶液または食塩液を噴霧化して10分間モルモットに曝露した。

いずれの実験群でも、sCR1またはPBSのエアロゾル投与をする前、ならびにOA負荷の１分前に動脈血試料を採取した。抗原負荷後にも２ないし３件の動脈血試料を採取し、末梢血球の定量を行った。

コンプライアンス、抵抗または血圧の変化率（％）の経時的な差を明らかにするために、両側ｔ検定としては分散が等しいことを前提としないサタースウェイトの近似法（シュネデカーおよびコクランによる『統計学的方法　第７版』Iowa State University Press: Ames, Iowa（1980年））を採用した。OAがもたらす循環血球の変化にsCR1が有意な影響を及ぼしたかどうかを調べるには、対応のあるデータのスチューデントの両側t検定を採用し、対数変換した値を使って分散を安定させた。どの検定でも有意水準はp＝0.05とした。

7.2. 結果

能動感作したモルモットにOAを負荷すると、抵抗は大きく増大し、コンプライアンスは大きく低下した。一過性の血圧上昇相が見られた後で、血圧は急激に低下した。sCR1をエアロゾルで投与すると、肺抵抗の増大が軽減し、また血圧低下相の程度が小さくなった。能動感作したモルモットにOAをエアロゾルで負荷すると、循環白血球数が急激に低下し、循環血小板数も減少した。sCR1をエアロゾル投与すると、OAによってもたらされる循環血球または血小板数の変動に変化はなかった。

８．例：吸入後のsCR1の組織局在性

モルモットに噴霧化したsCR1食塩水溶液（5mg/ml）を7分間吸入させた後に、sCR1の組織局在性を調べた。対照動物には噴霧化した食塩液を吸入させた。sCR1は、ホルマリン固定したパラフィン切片上にウサギポリクロナール抗sCR1抗体を使って免疫組織化学的に視覚化した。sCR1は肺空間全体にわたって存在し、気管、気管支、細気管支、肺胞管および終末肺胞に沈着していた。

8.1. 材料および方法

8.1.1. sCR1の投与

人工呼吸器を付け、麻酔をかけた（ケタミン30mg/kg筋注、キシラジン2.5m/kg筋注）雄モルモット（ハートリー・モルモット、Harlan Sprague-Dawley, Inc. インディアナ州インディアナポリス、またはSasco, Inc. ネブラスカ州オマハ）に、噴霧化したsCR1の食塩水溶液（5mg/ml）を7分間吸入投与した。対照動物には噴霧化した食塩液を吸入させた。動物は安楽死させ、肺をホルマリン中に保存した。

8.1.2. 免疫ペルオキシダーゼ染色法

ホルマリン固定した肺組織を脱パラフィンしてから再水化した。ウサギ抗sCR1抗血清（T Cell Sciences, Inc. マサチューセッツ州ケンブリッジ）およびVECTASTAIN Elite ABCキット（Vector Labsカリフォルニア州バーリンガム）を使って切片をsCR1について染色した。一次抗体は1:300の希釈度で用いた。メチルグリーンの1%（w/v）メタノール溶液で0.5～2分間インキュベートして、切片を対比染色した。

8.2. 結果

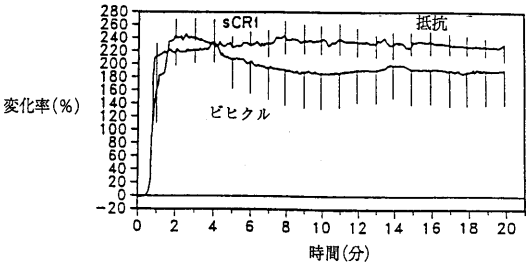
sCR1は肺空間全体にわたって存在し、気管、気管支、細気管支、肺胞管および終末肺胞に沈着していた。図ではsCR1は黒く染色され、対比染色した組織は灰色に見える。図10AおよびBはモルモットの気管横断面で、10Aは噴霧化した食塩液吸入後の対照動物、10Bは5mg/mlのsCR1を含有する噴霧化した食塩溶液を７分間吸入した後の実験群動物のものである。図10から、sCR1は吸入後は気管粘膜に局在することが、灰色の背景に対して黒く染色した部分として現れていることからわかる。

図11AおよびBはモルモットの肺の横断面で、11Aは噴霧化した食塩液吸入後の対照動物、11Bは5mg/mlのsCR1を含有する噴霧化した食塩溶液を７分間吸入した後の実験群動物のものである。sCR1はウサギポリクローナル抗sCR1抗体を使って免疫組織化学的染色をして視覚化した。図11Bでは、sCR1は灰色の背景に対して黒く染色した部分として見られる。sCR1は肺全域にわたって存在し、気管支および細気管支、肺胞管および終末肺胞に沈着していた。図11Aでは、同じ領域にsCR1は見られない。

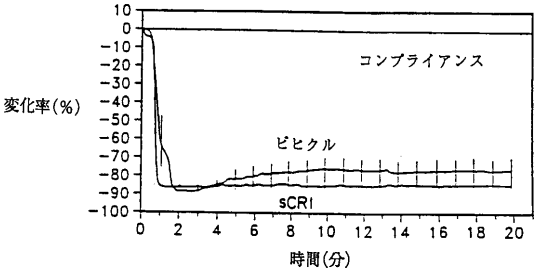
本発明はここに述べた特異的な実施例の範囲に限定されるものではない。実際のところ、この技術に精通した者であれば、これまでの説明と添付した図から、ここで述べたものに加えて発明の様々な改良が明瞭になるだろう。そのような改良は、ここに添付する特許請求の範囲の中に含まれるものである。

ここでは様々な発表論文または公報を引用しており、その開示全体を、参照文献として引用する。

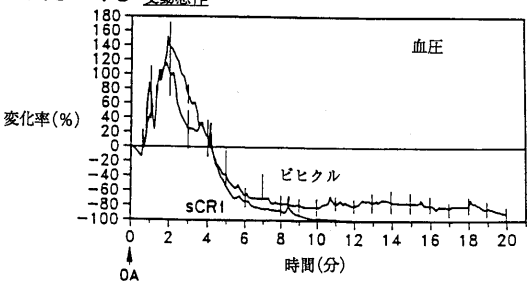
【図１Ａ】
FIG−1A 受動感作



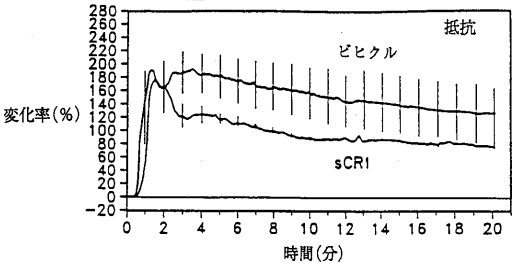
【図１Ｂ】
FIG−1B 受動感作



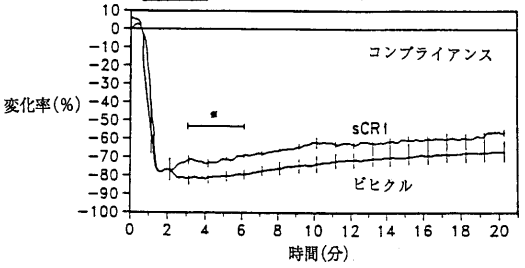
【図１Ｃ】
FIG−1C 受動感作



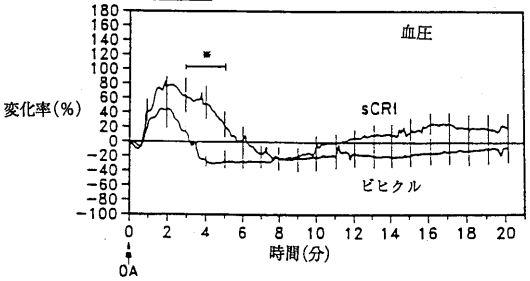
【図１Ｄ】
FIG−1D 能動感作



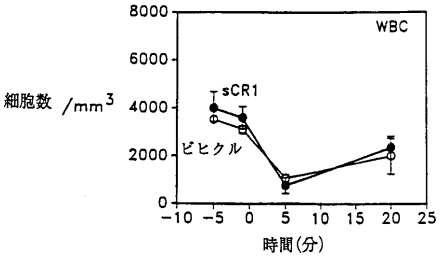
【図１Ｅ】
FIG-1E 能動感作



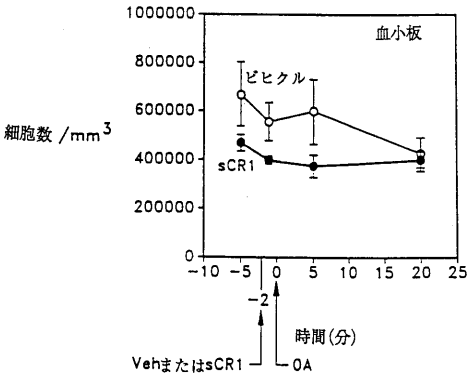
【図１Ｆ】
FIG-1F 能動感作



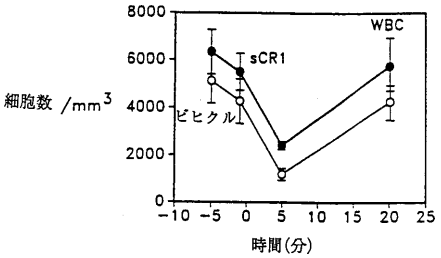
【図２Ａ】
FIG-2A 受動感作



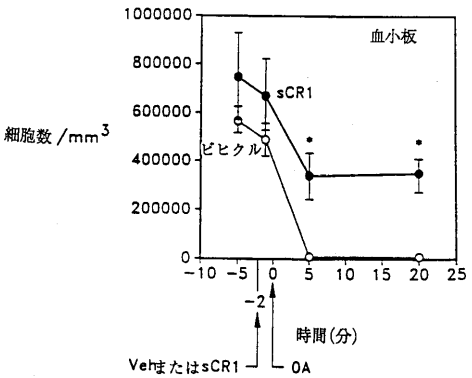
【図２Ｂ】
FIG-2B 受動感作



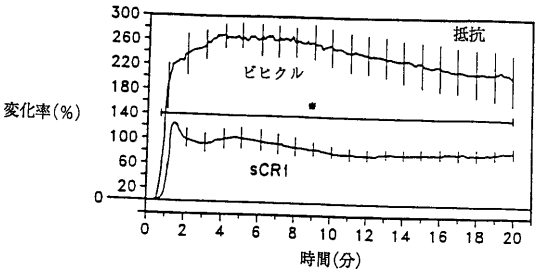
【図２Ｃ】
FIG-2C 能動感作



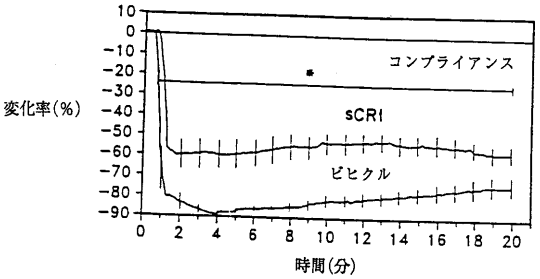
【図２Ｄ】
FIG-2D 能動感作



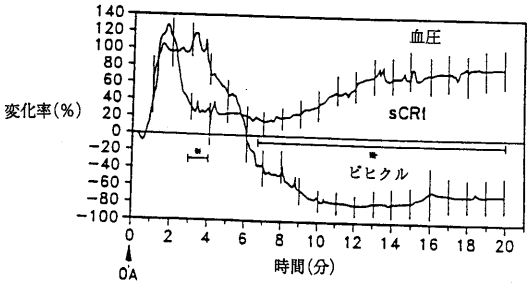
【図３Ａ】
FIG-3A



【図３Ｂ】
FIG-3B



【図３Ｃ】
FIG-3C



【図４】

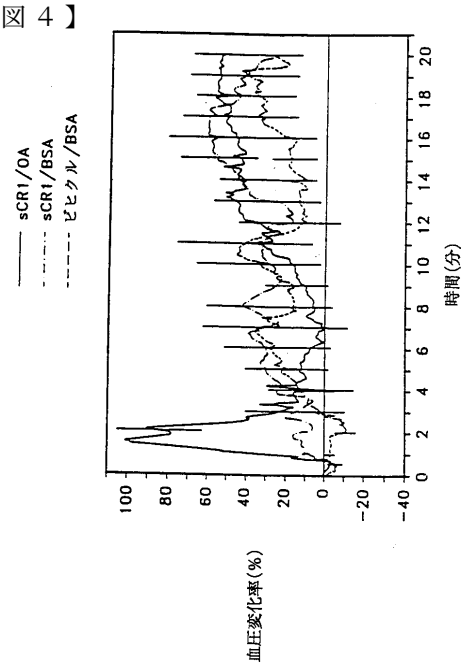
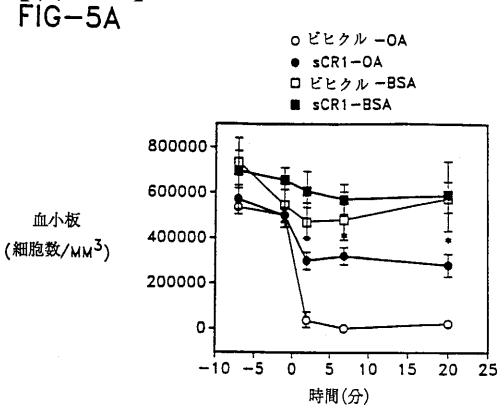
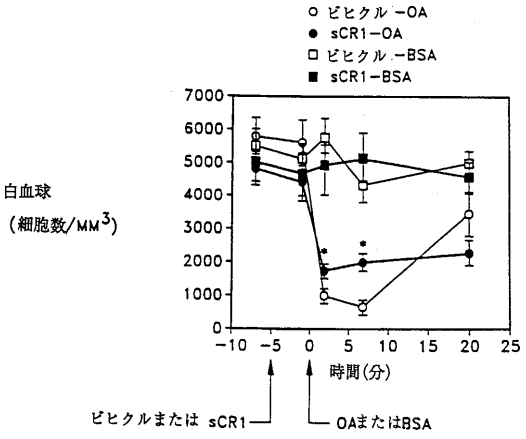


FIG-4

【図５Ａ】
FIG-5A



【図５Ｂ】
FIG-5B



【図６Ａ】

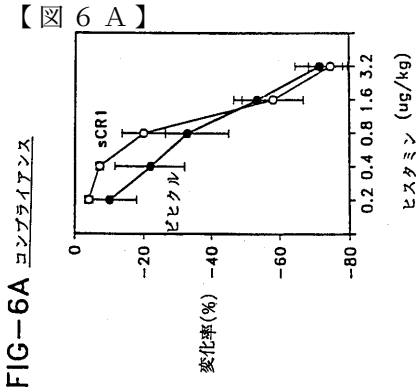


FIG-6A コンプライアンス

【図６Ｂ】

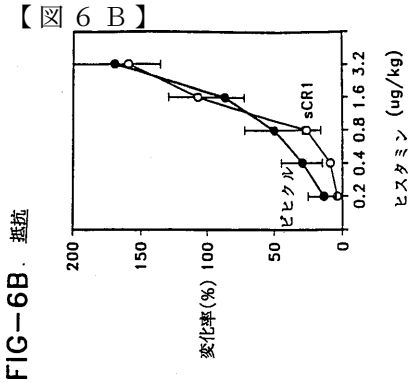
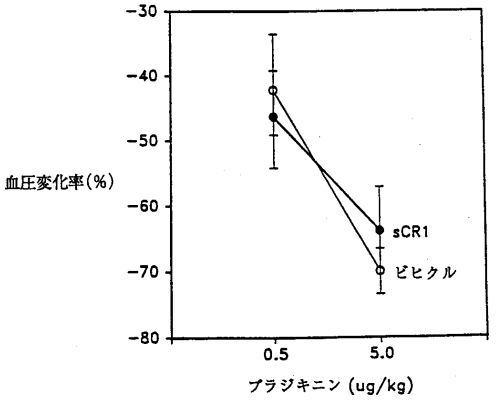


FIG-6B 抵抗

【図７】
FIG−7



【図８】

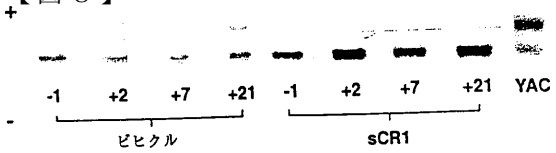
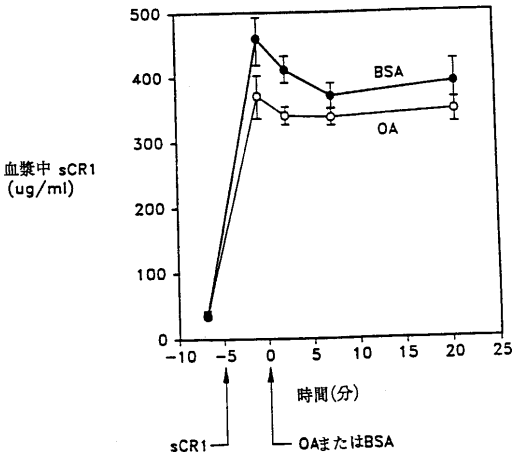


FIG. 8

【図９】
FIG−9



【図１０Ａ】

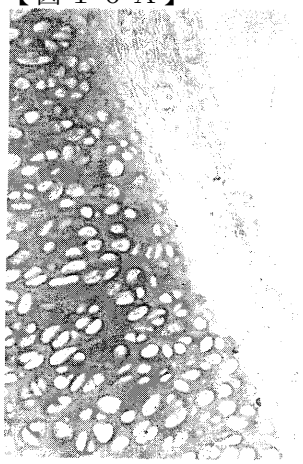


FIG. 10A

【図１０Ｂ】

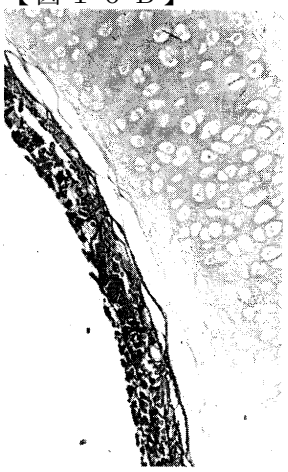


FIG. 10B

【図１１Ａ】



FIG. 11A

【図１１Ｂ】



FIG. 11B

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI	
Ａ６１Ｐ 29/00	Ａ６１Ｐ 29/00	
Ａ６１Ｐ 31/00	Ａ６１Ｐ 31/00	
Ａ６１Ｐ 37/00	Ａ６１Ｐ 37/00	
Ｃ１２Ｎ 15/09	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ａ

(72)発明者 レヴィン、ジェイムズ エル.
アメリカ合衆国 ０２１８１ マサチューセッツ州 ウエルズリー ショウ ロード ５
(72)発明者 リーガル、ジーン エフ.
アメリカ合衆国 ５５８０３ ミネソタ州 ダルース サセックス アヴェニュー ２１２９
(72)発明者 トース、キャロル エイ.
アメリカ合衆国 ０２６７ マサチューセッツ州 シャロン アップランド ロード ２４

審査官 内田 俊生

(56)参考文献 特表平０４－５０１５０２（ＪＰ，Ａ）
Klin. Wochenschr., 1991, Vol.69, Nos.21-23, pp.1009-1011
Clin. Exp. Immunol., 1991, Vol.86, Suppl.1, pp.43-46
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, Vol.86, No.2, pp.680-684

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
A61K 38/00 - 38/58