

(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2019-510737

(P2019-510737A)

(43) 公表日 平成31年4月18日(2019.4.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/735 (2006.01)	C07K 14/735 ZNA	4B029
C07K 17/00 (2006.01)	C07K 17/00	4C084
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4H045
C12M 1/40 (2006.01)	C12M 1/40 Z	
A61K 38/17 (2006.01)	A61K 38/17	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-536507 (P2018-536507)
 (86) (22) 出願日 平成29年1月13日 (2017.1.13)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年8月29日 (2018.8.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/050646
 (87) 国際公開番号 W02017/121842
 (87) 国際公開日 平成29年7月20日 (2017.7.20)
 (31) 優先権主張番号 16020009.3
 (32) 優先日 平成28年1月13日 (2016.1.13)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 506083604
 アフィリス・アクチェンゲゼルシャフト
 AFFIRIS AG
 オーストリア、アー-1030ヴィエンナ
 、カール・フェルカス・ガッセ22番
 (74) 代理人 100101454
 弁理士 山田 卓二
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
 (74) 代理人 100157956
 弁理士 稲井 史生
 (74) 代理人 100170520
 弁理士 笹倉 真奈美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高親和性 I g E 受容体アルファ鎖 (F c e R I a)

(57) 【要約】

ヒト高親和性 I g E 受容体アルファ鎖 (F c e R I a) であって、ここで、位置 43 のアミノ酸リシン (K 43) が、アラニン、セリン、チロシン、イソロイシン、ロイシン、アスパラギン、アスパラギン酸、メチオニン、フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン、グルタミン、トリプトファン、グリシンおよびバリンからなる群より選択されるアミノ酸、好ましくはアラニン、グリシン、セリンまたはチロシン、とりわけアラニンで置換されている、 F c e R I a を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト高親和性 I g E 受容体アルファ鎖 (F c e R I a) であって、ここで、位置 43 のアミノ酸リシン (K 43) が、アラニン、セリン、チロシン、イソロイシン、ロイシン、アスパラギン、アスパラギン酸、メチオニン、フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン、グルタミン、トリプトファン、グリシンおよびバリンからなる群より選択されるアミノ酸、好ましくはアラニン、グリシン、セリンまたはチロシン、とりわけアラニンで置換されている、 F c e R I a 。

【請求項 2】

配列番号 1 のアミノ酸配列を有する F c e R I a であって、ここで、位置 43 のアミノ酸リシン (K 43) が、アラニン、セリン、チロシン、イソロイシン、ロイシン、アスパラギン、アスパラギン酸、メチオニン、フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン、グルタミン、トリプトファン、グリシンおよびバリンからなる群より選択されるアミノ酸、好ましくはアラニン、グリシン、セリンまたはチロシン、とりわけアラニンで置換されている、請求項 1 に記載の F c e R I a 。

10

【請求項 3】

さらなるアミノ酸、好ましくは位置 31 のリシン (K 31)、位置 40 のアルギニン (R 40)、位置 41 のイソロイシン (I 41)、位置 42 のフェニルアラニン (F 42)、位置 44 のグリシン (G 44)、位置 45 のグルタミン酸 (E 45)、位置 142 のリシン (K 142)、位置 196 のリシン (K 196)、位置 199 のアルギニン (R 199) および位置 201 のリシン (K 201) からなる群より選択されるアミノ酸、とりわけ位置 31 のリシン (K 31)、位置 40 のアルギニン (R 40)、位置 142 のリシン (K 142)、位置 196 のリシン (K 196)、位置 199 のアルギニン (R 199) および位置 201 のリシン (K 201) からなる群より選択されるアミノ酸が置換されている、請求項 1 または 2 に記載の F c e R I a 。

20

【請求項 4】

F c e R I a が固体表面上に固定化されている、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の F c e R I a 。

【請求項 5】

アルファ鎖、ベータ鎖および 2 つのジスルフィド架橋によって連結された 2 つのガンマ鎖を含む F c e R I であって、ここで、該アルファ鎖が、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の修飾アルファ鎖である、 F c e R I 。

30

【請求項 6】

I g E 媒介性疾患の予防および / または処置における使用のための、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の F c e R I a であって、ここで、該 F c e R I a が、アフエレシスにおいて、ヒト体液、とりわけヒト血漿または血清から過剰の I g E を枯渇させるために使用される (抗 I g E 療法)、 F c e R I a 。

【請求項 7】

I g E 媒介性疾患が、アレルギー性疾患、好ましくは季節性、食物、花粉、カビ孢子、有毒植物、薬物 / 薬剤、昆虫の毒、サソリ毒または蜘蛛毒、ラテックスまたはハウスダストダニアレルギー、ペットアレルギー、アレルギー性鼻炎および結膜炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性気管支喘息、非アレルギー性喘息、チャージ・ストラウス症候群、アトピー性皮膚炎、鼻のポリープ症、木村病；接着剤、抗菌剤、香料、染髪剤、金属、ゴム成分、局所用医薬、ロジン、ワックス、艶出し剤、セメントおよび皮革に対する接触性皮膚炎；性鼻副鼻腔炎、アトピー性湿疹、I g E 関連自己免疫性疾患、好ましくは慢性 (特発性) および自己免疫性蕁麻疹、コリン作動性蕁麻疹、肥満細胞症、とりわけ皮膚肥満細胞症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、慢性または再発性特発性血管浮腫、間質性膀胱炎、アナフィラキシー、とりわけ特発性および運動誘発性アナフィラキシー、免疫療法、好酸球関連疾患、好ましくは好酸球性喘息、好酸球性胃腸炎、好酸球性中耳炎および好酸球性食道炎；リンパ腫、好ましくは胃または十二指腸の潰瘍または逆流のための抗

40

50

酸性療法の感作副作用からなる群より選択される、請求項 6 に記載の使用のための F c e R I a。

【請求項 8】

ヒト個体の血流と接触するのに適した固体担体に結合されている、請求項 6 または 7 に記載の使用のための F c e R I a。

【請求項 9】

血流または血漿流と接触することができる固体担体を含むアフレス装置であって、該固体担体が、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の F c e R I a を含むことを特徴とする、アフレス装置。

【請求項 10】

I g E 関連疾患の予防および / または処置のための、とりわけ抗 I g E 療法を行うための、予防および / または処置装置を提供するための請求項 9 に記載の装置の使用。

【請求項 11】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の F c e R I a を含む固体アフレス担体を含む、I g E 関連疾患の予防および / または処置における使用のためのキットであって、ここで、該担体が無菌かつ発熱物質不含有のカラムである、キット。

【請求項 12】

治療方法における使用、とりわけ I g E 関連疾患の予防または処置における使用のための、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の F c e R I a。

【請求項 13】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の F c e R I a および薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 14】

- リンカー分子、好ましくはペプチドリナー、とりわけ 1 から 10 個、好ましくは 2 から 5 個のアミノ酸残基からなるペプチドリナー；および / または
 - 治療分子もしくは診断分子、好ましくはモノクローナル抗体もしくは抗体フラグメント、サイトカイン、抗体様構造、細胞毒性薬もしくは阻害剤、光学トレーサー；および / または
 - 担体、好ましくは担体タンパク質、とりわけヒト血清アルブミン、トランスフェリンもしくは F c ドメイン
 に結合された、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の F c e R I a。

【請求項 15】

アレルギー性疾患、好ましくは季節性、食物、花粉、カビ孢子、有毒植物、薬物 / 薬剤、昆虫の毒、サソリ毒または蜘蛛毒、ラテックスまたはハウスダストダニアレルギー、ペットアレルギー、アレルギー性鼻炎および結膜炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性気管支喘息、非アレルギー性喘息、チャグ・ストラウス症候群、アトピー性皮膚炎、鼻のポリープ症、木村病；接着剤、抗菌剤、香料、染髪剤、金属、ゴム成分、局所用医薬、ロジン、ワックス、艶出し剤、セメントおよび皮革に対する接触性皮膚炎；性鼻副鼻腔炎、アトピー性湿疹、I g E 関連自己免疫性疾患、好ましくは慢性（特発性）および自己免疫性蕁麻疹、コリン作動性蕁麻疹、肥満細胞症、とりわけ皮膚肥満細胞症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、慢性または再発性特発性血管浮腫、間質性膀胱炎、アナフィラキシー、とりわけ特発性および運動誘発性アナフィラキシー、免疫療法、好酸球関連疾患、好ましくは好酸球性喘息、好酸球性胃腸炎、好酸球性中耳炎および好酸球性食道炎；リンパ腫、好ましくは胃または十二指腸の潰瘍または逆流のための抗酸性療法の感作副作用からなる群より選択される疾患の処置における使用のための、請求項 14 に記載の F c e R I a。

【請求項 16】

配列番号 2 または 3 の、少なくとも I g E 結合領域およびプロテアーゼ抵抗性領域を含む、請求項 1 から 4、14 および 15 のいずれか一項に記載の F c e R I a のフラグメント。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

配列番号 2 または 3 の、アミノ酸 26 ~ 205、好ましくはアミノ酸 30 ~ 193 を含む、請求項 16 に記載のフラグメント。

【請求項 18】

ヒト個体の血流と接触するのに適した固体担体に結合されている、請求項 16 または 17 に記載の F c e R I a フラグメント。

【請求項 19】

血流または血漿流と接触することができる固体担体を含むアフレス装置であって、該固体担体が、請求項 16 または 17 に記載の F c e R I a フラグメントを含むことを特徴とする、アフレス装置。

10

【請求項 20】

I g E 関連疾患の予防および/または処置のための、とりわけ抗 I g E 療法を行うための、予防および/または処置装置を提供するための請求項 19 に記載の装置の使用。

【請求項 21】

請求項 16 または 17 に記載の F c e R I a フラグメントを含む固体アフレス担体を含む、I g E 関連疾患の予防および/または処置における使用のためのキットであって、ここで、該担体が無菌かつ発熱物質不含有のカラムである、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、高親和性 I g E 受容体アルファ鎖 (F c e R I a) の改良された形態およびこれらの改良形態の使用のための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

I g E 媒介性疾患

産業社会において、アレルギーの有病率は、現在、人口の 30% に達しようとしている。アレルギーは、一般的に、アレルギー性鼻結膜炎のような軽度のものから、生活の質の強い制限を伴うアレルギー性喘息気管支炎のような重篤な状態に進行する。結果として、アレルギー性免疫応答の重要なメディエーターとして血漿 I g E を標的とする新たな治療戦略を開発するために多大な努力がなされてきた。種々の (アレルギー性) 疾患およびそれらの併存疾患における抗 I g E 臨床試験の出現により、I g E 依存性を特徴とする病状の数が増えている (Holgate 2014)。最近では、I g E が、慢性蕁麻疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性胃腸疾患および他の種々の (自己) 免疫介在状態を含む炎症性およびアレルギー関連疾患の広範囲の領域でも役割を果たすという証拠が、示されている。I g E が原因となる役割を有する、さらなる症例および徴候の証拠は、例えば過敏性腸症候群 (Pearson et al. 2015) または特発性血管浮腫 (Shroba et al. 2015) のような病状から得られる。結果として、I g E およびその下流のシグナル伝達の中心的役割は、最初に考えられたよりも広い疾患範囲のための重要な標的化目標として認識されている。

30

【0003】

重篤なアレルギー状態の典型例として、アレルギー性気管支喘息は、自然免疫系、T 細胞、上皮細胞機能および I g E の産生をもたらす B 細胞免疫間の複雑な相互作用によって制御される。I g E は、1960 年代のアレルギーの重要なメディエーターとして認識されていたため (Bennich and Ishizaka 1968)、I g E は、その臨床および分子構造の両面で広く研究されてきた。この分子の構造および生化学的特性はよく理解されており、細胞受容体、とりわけ高親和性 I g E 受容体 (F c e R I) を介するその生理的作用様式は、よく解明されている (Miller et al. 1989; Wurzburg et al. 2002; Sutton et al. 2015)。I g E 産生は、I g E 自体によって強力に制御されており (Dullaers et al. 2012)、このことは、I g E / F c e R I 経路が、アレルギー性疾患および I g E 依存性疾患における魅力的な標的化目標であることを示唆している。I g E の 1 つの特別な特徴は、F c e R I と称される高親和性 I g E 受容体、より具体的にはアルファ鎖 (他に特記され

40

50

ない限り、FcεRIαと記載される)に対する顕著に高い親和性である。該受容体は、肥満細胞および好塩基性顆粒球で主に発現されるが、抗原提示細胞でも発現される。四量体の高親和性IgE受容体は、1つのアルファ鎖、1つのベータ鎖および2つのガンマ鎖から構成され、アレルゲンまたは免疫複合体に結合したIgEの架橋時に細胞内シグナル伝達を仲介する(Galli & Tsai 2012)。従って、アレルゲンによる架橋は、肥満細胞脱顆粒によるアレルギーメカニズムの活性化、とりわけヒスタミン放出およびサイトカイン放出をもたらす。

【0004】

抗IgE療法および制限

治療用抗IgEモノクローナル抗体オマリズマブ(登録商標)(Xolair(登録商標))の臨床および市場の成功により(Licari et al. 2015; Incorvaia et al. 2014)、安価かつ広く適用可能な抗IgE療法薬に対する需要が高まっている。改善された第2世代の治療用抗体(例えばモノクローナル抗体リゲリズマブ(登録商標)、XmAB7195(登録商標)、MED14212(登録商標)、クイリズマブ(登録商標)または活性抗IgEワクチンなど)は、現在、前臨床段階、臨床開発段階および評価段階にある。

【0005】

オマリズマブ(登録商標)による受動抗IgE抗体療法の主な欠点は、数百ミリグラムまでの組換え抗体を患者に繰り返し注射する必要があるという条件で、高コストで、かつ比較的高投与量を要することである。いくつかの理由から、受動的に投与したオマリズマブ(登録商標)などの組換え生物学的製剤の高用量に関連する一般的なリスクがある: 第1に、組換え分子は、患者の免疫系によって潜在的に認識される外来配列を含む。第2に、凝集性は常にタンパク質の構造および品質とのバランスを取らなければならない。最後に、特に、オマリズマブ(登録商標)療法は現在、600IU/mlの血漿IgEを超えない重篤なコルチコイド耐性喘息患者に限定されている。ノンレスポonderに加えて、オマリズマブ(登録商標)の最大許容用量は隔週で375mgであり、重大な制限をもたらす。他の制限には、アナフィラキシーのリスク、および継続的なよく管理された処置レジメンの必要性が含まれる(Drugs.com <http://www.drugs.com/dosage/xolair.html>を参照のこと)。商品の価格は、例えばあまり重篤ではないが、最も厄介なアレルギー兆候に対する、オマリズマブ(登録商標)のより広範な使用に重大な制限を課す。例えば、400-500IU/mlの血漿IgEを有する70-80kgの患者に対する一般的な処置プロトコールは、隔週、375mgのオマリズマブ(登録商標)の抗IgE用量の皮下投与(s.c.)からなる。用量および価格のため、該薬剤は、IgEレベルが顕著に高い患者だけでなく、体重過多(heavy and overweight)の患者に対しても承認され得ない。オマリズマブ(登録商標)の使用が制限される他の理由としては、食物アレルギー、有効性もしくは患者のコンプライアンスの欠如または喘息患者のサブグループにおける単なる有効性の欠如などの何れの条件でも不利なリスク対効果比が含まれる。定義上、受動的に投与したオマリズマブ(登録商標)などの抗IgE抗体は、効果および薬力学的要件を満たすために本質的に高い用量を必要とする。オマリズマブ(登録商標)などの組換え抗体の半減期および薬物動態は、制限された枠内にあり、多くの開発努力なしには容易に改善することができない。オマリズマブ(登録商標)投薬スキームの改変により、現在の抗IgE療法の投薬制限が顕著に改善されるか、または経済的負担が軽減されることは期待できない(Lowe et al. 2015)。

【0006】

抗IgE mAbの制限を回避または軽減するために、別のIgE低下戦略の組み合わせが提案されている。それは、高IgEレベルを体外で予め枯渇低下させた後に、受動的IgE低下を行う抗IgE療法である。

【0007】

アフェレシス(apheresis)によるIgE低下の基本は、選択的アフェレシス吸着剤としてのポリクローナル抗IgE抗体の使用可能性を試験した研究者により、25年以上前に提案された(Sato et al. 1989)。これらの初期の研究における主な問題には、血漿か

10

20

30

40

50

らの I g E 枯渴の低効率だけでなく、患者の循環血中に漏出する傾向を有する吸着剤分子であるポリクローナルヤギ抗 I g E 抗体の性質から想定される安全性への懸念もあった。従って、この非ヒト吸着剤は、免疫複合体形成の可能性を伴う外来エピトープに対する免疫応答を誘導するリスクを有していた。同様に、Lebedinらは、単一特異性ウサギポリクローナル抗 I g E 抗血清およびモノクローナル抗体もしくはその F a b フラグメントを吸着剤として用いた (Lebedin et al. 1991)。ほとんどの場合、主な関心事は、担体マトリクスへの吸着剤の不十分な固定化またはタンパク質分解による切断による低い血漿枯渴効果および吸着剤 (すなわち、非ヒト抗体物質) の血漿中への漏出または流出であった。

【 0 0 0 8 】

最近では、Kerzelら (Kerzel et al. 2011) が、オマリズマブ (登録商標) 処置に通常選択されなかった顕著に高い I g E 患者であっても、抗 I g E 療法前の特異的 I g E 除去がオマリズマブ (登録商標) 療法を可能にすることを提案した。該著者らは、抗 I g E 療法前の血漿交換が、とりわけオマリズマブ (登録商標) 単独では実用的ではないとき、従来の抗 I g E 療法を補い得る臨床的組立を適用した (Kerzel et al. 2011; Kasperkiewicz et al. 2011)。このパイロット試験は、抗 I g E 処置前の I g E 特異的枯渴が、高 I g E 患者にとって有益であり得ることを示唆した。Zinkらは、アフェレシスとオマリズマブ (登録商標) との組み合わせを用いて重症のアトピー性皮膚炎患者において I g E を標的とすることが可能であることを示した (Zink et al. 2012 [Thesis] および Zink et al. 2015)。

【 0 0 0 9 】

これに関して、F c e R I 架橋活性を欠く一本鎖抗体吸着剤 (s c F v 1 2 と称される) は、従来の抗体の代替物として L u p i n e k ら (Lupinek et al. 2009) により提案された (Lupinek et al. U S 2 0 1 4 / 1 2 4 4 4 8 A 1)。Fresenius Medical Care Deutschland GmbH (臨床治験番号 NCT02096237; E S P I R A 研究; Derfler et al. 2015) による “新しい I g E 吸着剤の安全性および有効性を調べるための最初のヒト治験” (“First in Man Trial to Investigate Safety and Efficacy of the New IgE Adsorber”) という表題の最近の着想実証試験により、s c F v 1 2 が、I g E アフェレシスのための吸着剤として成功裏に適用可能でありことが実証された。“I g E n i o (登録商標)” (https://www.fresenius.com/5689_5968.htm) と名付けられた市販の吸着カラムを作製し、一価の高親和性 s c F v 1 2 吸着剤に基づいて評価した。該著者らは、I g E を 8 6 . 2 % 減少させ、皮膚試験反応性の低下およびアレルギー患者におけるアレルギー症状の減少を主張した。この特定の治験は、I g E アフェレシスと、その後の抗 I g E 処置の併用療法として設計されたものではなかった。重要なことには、外来吸着タンパク質 (例えば、一般的な抗 I g E 抗体など) が血液循環中に漏れる可能性がある場合、F c e R I 架橋のリスクを有さない最初の一価の I g E 吸着剤を用いて I g E アフェレシスの原理を検証することができた。s c F v 1 2 治験と並行して、I g E 吸着のために非ヒト種由来のポリクローナル抗体物質を用いた最初のパイロット治験と同様のヒツジ抗ヒト I g G 抗体をベースとする吸着剤 (Miltenyi 社の Therasorb - IgE と称される、製品番号 330-000-571 または 30-000-572; Morren, Clinical Trial NCT02365246) を用いる 1 5 名のアトピー性皮膚炎患者における臨床的 I g E 枯渴治験が開始された。これらの場合にも、外来の非ヒト吸着剤 (ヒツジ由来) の使用は、抗ヒツジ I g G 反応性抗体を誘導するリスクおよび患者の血液循環へのカラムからの吸着物質の放出時の F c e R I 架橋のリスクを伴っていた。

【 0 0 1 0 】

ポリクローナル抗体のような非ヒトタンパク質は、血清病の誘発のために受動的ワクチン療法剤としての用途には適していないことが十分に確立されている。これに関して、選択的吸着剤を用いる治療的アフェレシスにおいて、例えば、動物由来のポリクローナル抗体などの非ヒトタンパク質は、いくつかのリスクと欠点を有することが強調されなければならない: 第一に、注意深い精製および品質評価手順を要すること。第二に、それらの親和性は、スクリーニングされ合理的に最適化された組み換え吸着タンパク質の親和性より

10

20

30

40

50

も一般的に低いこと。第三に、吸着剤は、アフェレシス処置の間、患者の血液循環中に流出してはならないこと。最後に、商品のコストがアフェレシスの実用性にとって決定的な基準であること。今日では、新しい選択的吸着分子が、十分な品質で製造および精製され、かつ現実的な価格であることが前提条件である。イムノアフェレシスまたは選択的吸着剤によるアフェレシスは、一般的に、いくつかのその後の連続的アフェレシス工程で行われるため、高価な一回使用の吸着装置よりもリサイクル可能な、または再使用可能な吸着カラムが好ましい。

【0011】

これらの特徴のいくつかは、残念ながら最近提案された一本鎖の抗体ベースの吸着剤 (Lupinek et al. 2009; WO 2012 / 140214 A 1 および “IgEnio (登録商標)” ; Fresenius Medical Care https://www.fresenius.com/5689_5968.htm) では利用できない: 重要なことに、IgEnio (登録商標) は、低pH処理後には効率よく再折り畳みされないため、再利用およびリサイクルすることができない (本明細書の実施例セクションの実施例8に記載の通り (下記参照))。さらに、細菌により産生されたsCFV構築物は、それらの非ヒト構造、および血流中に流出する吸着剤の場合に抗体誘導のリスクを有する配列物質の起源であり、それらが“外来物”として認識されるため、ヒトに対して本来的に免疫原性である。結果として、IgEnio (登録商標) は、血流中に流出する際に免疫原性のリスクを有するアフェレシス用の単回使用製品として開発されてきた。sCFV12は、例えばオマリズマブ (登録商標) などの受動的治療用途のための一本鎖IgEブロッカーとして意図されていない。

10

20

【0012】

体外または体内適用のための抗体ベースのIgE結合剤の代替物:

mABまたは一本鎖抗体ベースの生体物質の代替物として、ヒト高親和性IgE受容体の組換え可溶性アルファ鎖 (FcεRIαと称される) を、治療におけるプロトタイプの高アフィンおよび特異的IgE結合分子ならびに診断薬として使用することが以前から提案されていた。重要な特徴として、FcεRIαは、潜在的に免疫原性 (すなわち非自己) の配列物質を含まない。本来、FcεRIは、IgEのヘテロ四量体受容体として好塩基球および肥満細胞上に存在するのが一般的である。文献に広く記載されているような複雑な構造ダイナミクスを有するIgEに対する一価の高親和性受容体である (概要については、Sutton et al. 2015を参照のこと)。当然、FcεRIα鎖は、正確な折り畳みおよびIgEに対する高親和性結合性の両方に必須の2つの免疫グロブリン様ドメインを含む細胞外領域に伸びる高親和性IgE膜受容体の一部として存在する (Mallamaci et al. 1993)。細菌により産生される組換えFcεRIを作製し、再折り畳みすること、または改変された特徴を有する切断型もしくは変異型変異体を作成するための、人為的方法が提案されているが、FcεRIの両ドメインは、FcεRIαの正確な折り畳みに必要であり、タンパク質の折り畳みおよびグリコシル化が、強力な、“天然の”IgE吸着剤またはブロッキング分子の候補の前提条件であることが強調される。最近、自然形態の流出したsFcεRI (sFcεRIと称される) が、ヒト血漿中に遊離形態またはIgEとの複合体形態で見いだされた。sFcεRIは、発現した受容体の表面へのIgE結合を阻止するか、または例えばオマリズマブ (登録商標) と同様に特異的なりガンド阻害に寄与する可能性がある点で、IgE経路の調節的役割を果たし得ることが提案された。しかしながら、膜に固定化されたFcεRIから遊離した天然sFcεRIの正確な生理的役割は、未だ説明されていない (Platzer et al. 2011)。

30

40

【0013】

従って、FcεRIαが、治療用途のための候補IgEブロッカーまたはIgE吸着剤として直ちに認識されたことは驚くべきことではない。Diganaら (WO 1998 / 004718 A 1) は、以前に、抗体ベースの療法 (例えば、オマリズマブ (登録商標)) の前に受動的抗IgE療法のための可溶性IgE阻害剤として用いられ得る、単量体または二量体のFcεRIα/HSA-融合構築物を提案している。Diganaらは、さらに、FcεRIベースのインビトロ診断アッセイ (例えばELISAなど) を提案している

50

。FcεRIベースの生物製剤の開発が、本質的に継続されなかった主な理由の1つは、血清アルブミンへの融合などの人工操作にも関わらず、(ヒト化された)治療用抗体の血漿半減期を達成しなかったという薬物動態挙動であった(WO1998/004718A1)。その分子サイズのために、FcεRIaの血漿半減期は、IgEブロッカーとして受動的に適用されたとき、IgGよりも短い。従って、増大したサイズを有する改変されたFcεRIaベースの構築物または別の修飾物および製剤の開発が、血漿半減期を改善するために必要とされ得る。McKenzieら(米国特許US5,985,599A)はまた、“血漿交換法”(すなわち、体外のIgE枯渇)において免疫複合体を除去するための吸着剤としてのFcεRIaまたはそのフラグメントの使用、またはIgEシグナル伝達を阻止するための一価のIgEブロッカーとしての遊離形態の使用を提案している。

10

【0014】

Huber Rらは、以前に、診断使用または治療使用のため、またはIgEを吸着するための、細菌により産生されたFcεRIaの使用を提案している(WO2000/032767A1)。治療使用または診断使用のためのFcεRIおよびその変異体を示唆する他の先行技術文献には、例えば、Gouldら(WO99/05271A1)およびHogarthら(WO96/08512A1、US8,729,247B2)が含まれる。さらに、他の国際特許出願、例えば、Siraganianら(WO89/05352A1)は、IgE受容体アルファ-サブユニット“またはそのIgE結合フラグメント”をコードするcDNAを開示しており、FcεRIaサブユニットを用いてアレルギーを処置するか、またはインビトロ診断のためのもの(entity)を産生することを提案している。その後、Robertsonら(1993)は、両ドメインを含む受容体の可溶性フラグメントよりもはるかに低い親和性でIgEに結合する第2の膜-近位ドメインのみを含む切断型受容体フラグメントが、IgEへの弱い結合にもかかわらず治療的に適用され得ることを示唆している。さらに、Yanagiharaらは、IgE合成を下方制御すると考えられて得る、1994個のヒトFcεRIa受容体の組換え可溶性フラグメントを提案した。さらに最近、Lingyun Jiaら(CN102660569A)は、FcεRIa鎖の一本鎖ドメイン変異体の使用を提案した。McKenzieの出願のように、これらの著者(CN102660569A参照)は、アフェレシスのためにFcεRIa鎖の1つの一本鎖ドメインを用いる可能性について再び示唆した。しかしながら、詳細な先行技術の構造的および機能的研究に基づいて、FcεRIaが、適切な折り畳みおよびIgEへの高親和性結合のために2つの免疫グロブリンドメインを必要とすることは、以前に十分に確立されていた(Mallamaci et al. 1993; Garman et al. 1998; Sutton et al. 2015)。これらの著者が、アフェレシスのために機能的であり、適切に折り畳まれた高親和性のFcεRIa鎖をどのように産生し得たかは明らかでなく、証明されていない。従って、この文献は、これらの一本鎖ドメインFcεRIa分子に関して実施可能には記載されていないとみなされるべきである。

20

30

【0015】

この先行技術の知見に基づいて、抗体由来IgE結合剤よりも優れたFcεRIaベースの生物製剤の主な異なる特徴は、(1)それが天然の“自己”分子であり、外来抗原物質、例えばsCFv、ナノボディまたは他の非天然の、非ヒトタンパク質配列物質を含むAB様形態として免疫系に認識されないこと、(2)そのIgE結合挙動が、IgE結合親和性を増加もしくは減少させ、または正しい折り畳みに影響を与えるような構造変化、例えば変異に厳密に依存し得ること、ならびに(3)FcεRIaが、架橋活性を欠いている、優れた高親和性一価IgE結合剤であること、であることが明らかである。本発明において、これらの利点と共に、FcεRIaは、例えば単鎖吸着剤sCFv12とは対照的に、リフォールディング挙動(実施例8(下記))において高いロバスト性を示すことが実証されている。従って、アフェレシスに適用するとき再使用可能であり、それ故に、吸着されたタンパク質材料(すなわち、IgE)が、分析および品質管理の目的で低pH処理により容易に溶離され得るという利点とコスト効率とを組み合わせ得る。このことは、実施例7および8(以下の実施例セクション参照)に示すように、変性によって溶離

40

50

後に分解される吸着剤では実現できない。FcεRIαタンパク質のさらなる側面は、その主要リガンド、すなわち可溶性IgEに加えて、FcεRIαタンパク質がまた、慢性自己免疫性蕁麻疹患者からの血漿中の抗FcεRIα-自己抗体とも結合し得て(Zubebier et al. 2000)、抗FcεRIα自己抗体およびIgEを組み合わせて体外枯渇を可能にすることである。まとめると、FcεRIαは、体外IgEおよび/または自己抗体枯渇目的で、または例えばオマリズマブ(登録商標)のような生物製剤と同様に投与される可溶性抗IgE療法剤を提供するために、優れた一価のIgE結合剤となる特徴を併せ持つ。

【0016】

選択的IgEアフェレシスのための抗体関連吸着剤形態(例えば、Sato et al. 1989, Lebedin et al. 1991 または Lupinek et al. 2009により以前に提案されたものなど)は、上記のようなFcεRIαベースの吸着剤の特徴および利点を提供しない。他方、受動的IgE標的化のためのFcεRIαベースの生物製剤を含む非経腸投与される治療剤開発は、オマリズマブ(登録商標)の成功によるだけでなく、Digant(WO1998/004718A1)により以前に実証されている組換えFcεRIα(血清アルブミン融合タンパク質でさえ)の低い血清安定性のために、数年前に中止されている。

【0017】

WO02/06298A1は、可溶性IgE受容体アルファ鎖様分子を開示している。WO96/08512A1は、改変されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを開示する。Rar(J. Biol. Chem. 264 (1989): 15323 - 15327)は、IgEに対するマウスマスト細胞受容体(FcεRI)の完全な構造を開示している。WO99/38974A1は、ウシFcεRIαに関する。WO01/21816A1は、FcεRI鎖変異体によるIgE受容体細胞表面制御の調節を開示している。Liuら(PNAS 85 (15) (1988): 5639 - 5643)は、高親和性IgE受容体に関連する構造変異体を示唆していると報告している。

【発明の概要】

【0018】

本発明の目的は、IgE関連疾患の予防および処置のための改善された手段を提供することである。

【0019】

従って、本発明は、高親和性IgE受容体の修飾されたアルファ鎖(FcεRIα)、とりわけヒトFcεRIαを提供し、ここで、位置43のアミノ酸であるリシン(K43)が、アラニン、セリン、チロシン、イソロイシン、ロイシン、アスパラギン、アスパラギン酸、メチオニン、フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン、グルタミン、トリプトファン、グリシンおよびバリンからなる群より選択されるアミノ酸、好ましくはアラニン、グリシン、セリンまたはチロシン、とりわけアラニンで置換されている。

【0020】

本発明により提供される新規のFcεRIα分子は、従来技術よりも顕著な利点を有する：それは、FcεRIαの既存の形態と比較して、顕著に高いプロテアーゼ抵抗性を有する。しかし、それは、新しい免疫原性部位を導入するものではなく、野生型(wt)FcεRIの吸着および再折り畳みおよびIgE結合特性を保存する。このことは、本発明の分子を、とりわけIgEを結合するために用いるとき、例えばIgEアフェレシスにおいて、wt FcεRIα、従来技術のmAbまたはscFvベースの抗体ベースの吸着剤を凌ぐ有用性を有する。

【0021】

本発明の分子は、プロテアーゼ抵抗性であり、再使用可能な吸着剤および器具として驚くべき性能および能力を示し、カラムに結合された場合に容易かつ効率よく再生され得て、治療効果の臨床モニタリングのために溶離物質の分析に用いられ得て、FcεRIαと血漿とのより長い接触(FcεRIαの体外および体内使用)を可能にするなど、優れた特性を有する。

10

20

30

40

50

【0022】

従って、本発明は、プロテアーゼ抵抗型のFcεRIaを初めて提供する。これは、FcεRIaの点変異が、その結合特性を機能的に改変し得るため（例えば、Mackay et al 2002および同様の論文）、プロテアーゼ抵抗性および低免疫原性を同時に提供し、かつ機能性（=IgE結合、pH抵抗性）の損失をもたらさない、わずかな特異的変異を導入することによって本発明を実現した。

【0023】

FcεRIaの位置K43でのプロテアーゼ切断部位の問題は、従来技術では認識されていなかったため、このことは特に驚くべきことである。実際に、本発明で提供されたデータは、新たに発見されたプロテアーゼ切断位置K43が、他の予測されたか、または経験的に決定された切断部位と比べて、最も関連性の高い血漿プロテアーゼ切断部位であることを示す（以下の実施例2を参照のこと）。

10

【0024】

特に、IgEアフレスシスについて、プロテアーゼに不安定なIgEを捕捉する分子（天然のFcεRIaなど）の使用は問題である。従って、FcεRIaは、分子がプロテアーゼ活性によって分解されるリスクのためにアフレスシスに用いるのに問題があるIgEを捕捉する分子である。このような分解は、IgEに対するアフレスシス装置の結合能の低下をもたらすだけでなく、これらの分解生成物がアフレスシス患者の血流を汚染する可能性があるため、重大な安全性の問題となる。本発明では、FcεRIaの新しいプロテアーゼ切断部位が検出された（位置43）。プロテアーゼ切断を排除するためのこのプロテアーゼ切断部位の改変は、本発明によるFcεRIaのより安定した形態をもたらした。IgEアフレスシスのための適切な手段を提供する問題の解決策として、本発明は、2つの本質的特徴を組み合わせたFcεRIaの改良された変異体を提供する：第1に、FcεRIaのN末端部分内の新たに認識されるタンパク質分解切断部位での切断を最小限にしなければならないと同時に、以下の実施例5、6および8に示すように、IgE結合、pH安定性および再折り畳み特性を保持するために、FcεRIaの構造を変えるべきではない。FcεRIaにプロテアーゼ抵抗性を付与するために、野生型FcεRIa配列内に通常存在しない新しいエピトープの形成を避けることが特に重要である。血液、血漿または血清中のプロテアーゼ抵抗性に加えて、本発明の改変は、新規（de novo）の免疫原性部位のリスクを最小限にするために最小の構造的変化を保証しなければならない。従って、僅かなアミノ酸変化が、非FcεRIa配列のより長い配列を含む複数の変化またはキメラFcεRIa変異よりも好ましい。同時に、FcεRIaが提供することができるのと同じ有利な溶離および再折り畳み特性を保持しなければならない。このことは、以下の実施例5、6および8に示されている。

20

30

【0025】

本発明は、FcεRIaが血漿プロテアーゼによって優先的に切断され、分子のN末端部分に位置する位置K43（UniProtによる）でプラスミンによって特異的に切断されるといふ予期されない発見に基づく。従って、本発明は、天然に存在する配列（複数可）から逸脱し、天然の対応物と比較して、増加したプロテアーゼ抵抗性を有する配列を有する新規のFcεRIaタンパク質（または、そのIgE結合フラグメント）に関する

40

【0026】

天然ヒトFcεRIaのアミノ酸配列は、

【化 1】

1 MAPAMESPTL LCVALLFFAP DGVLAVPQKP KVSLNPPWNR IFKGENVTTLT CNGNNEFEVS 60
 61 STKWFHNGSL SEETNSSLNI VNAKFEDSGE YKQHQQVNE SEPVYLEVFS DWLLLQASAE 120
 121 VVMEGQPLFL RCHGWRNWDV YKVIYYKDGE ALKYWYENHN ISITNATVED SGTYCYCTGKV 180
 181 WQLDYESEPL NITVIKAPRE KYWLQFFIPL LVVILFAVDI GLFISTQQQV TFLKIKRTR 240
 214 KGRLLNPHP KPNPKNN 257

(配列番号 1)

10

である。

【 0 0 2 7 】

本発明のヒト F c e R I a 変異体のアミノ酸配列は、

【化 2】

1 MAPAMESPTL LCVALLFFAP DGVLAVPQKP KVSLNPPWNR IFXGENVTTLT CNGNNEFEVS 60
 61 STKWFHNGSL SEETNSSLNI VNAKFEDSGE YKQHQQVNE SEPVYLEVFS DWLLLQASAE 120
 121 VVMEGQPLFL RCHGWRNWDV YKVIYYKDGE ALKYWYENHN ISITNATVED SGTYCYCTGKV 180
 181 WQLDYESEPL NITVIKAPRE KYWLQFFIPL LVVILFAVDI GLFISTQQQV TFLKIKRTR 240
 214 KGRLLNPHP KPNPKNN 257

(配列番号 2)

20

であり、ここで、位置 43 の “ X ” は、A、I、L、N、D、M、F、E、T、Q、W、G および V から選択されるアミノ酸であり得る。好ましくは、“ X ” は、A、G、S および T である；“ X ” を A とすると最も有望な結果が得られた。従って、ヒト F c e R I a に関するこの好ましい態様は、以下のアミノ酸配列を有する：

【化 3】

1 MAPAMESPTL LCVALLFFAP DGVLAVPQKP KVSLNPPWNR IFAGENVTLT CNGNNEFEVS 60
 61 STKWFHNGSL SEETNSSLNI VNAKFEDSGE YKQHQQVNE SEPVYLEVFS DWLLLQASAE 120
 121 VVMEGQPLFL RCHGWRNWDV YKVIYYKDGE ALKYWYENHN ISITNATVED SGTYCYCTGKV 180
 181 WQLDYESEPL NITVIKAPRE KYWLQFFIPL LVVILFAVDI GLFISTQQQV TFLKIKRTR 240
 214 KGRLLNPHP KPNPKNN 257

(配列番号 3)

30

【 0 0 2 8 】

注目すべきことに、実施例 3 に示されるように、K 43 での切断によって I g E 結合が損なわれる。この以前は知られていない特徴は、実施例 3 で実証されるように、組換えタンパク質と血漿との接触時に I g E 結合が減少するため、組換え F c e R I a を一般的に治療目的に用いることの有用性に重大な制限を加えている。本発明の過程で、体外枯渇または体内 I g E 特異的阻害もしくは枯渇のための F c e R I a (例えば、オマリズマブ(登録商標)など)の実際的な使用は、本発明において見いだされた K 43 における新しい切断機序のために制限されていることが認識されている。本発明で提供される切断部位に関連する重要なプロテアーゼ(複数可)は、これまでに開示された“天然”フラグメントが、その I g E 結合能を維持するために膜近位領域で切断されなければならないので、分断 s F c e R I を生成する想定される(メタロ)プロテアーゼとは明らかに異なる(Platzer et al. 2011)。重要なことに、実施例 2 - 5 において実証されるように、組み換え F c e R I が、ヒト血漿と接触することにより、プラスミンおよびトロンピンなどの血漿プロテアーゼと結合し(実施例 1 にて実証される通り)、血漿プロテアーゼ、とりわけ

40

50

ラスミンによりK43でのFcεRIαの切断が引き起こされることは、本発明において見いだされた。その結果、組換えFcεRIαは、実施例3に示すように、血液、血漿または血清と接触するとき、そのIgE結合能力を失う。

【0029】

従って、FcεRIαが血漿プロテアーゼによって位置K43で切断されるのを防ぐために、本発明は、天然FcεRIαの全ての機能的および実用的特性を維持する、FcεRIαの新規に開発されたプロテアーゼ抵抗性変異体を提供する。この新規のプロテアーゼ抵抗性FcεRIα変異体は、IgEまたは抗FcεRI自己抗体の体外枯渇（例えば、治療的アフレスシスによる）またはオマリズマブ（登録商標）に類似した可溶性IgEのIgE阻害剤としての体内使用のいずれかのために特に有益である。

10

【0030】

従って、本発明のFcεRIαは、好ましくは、配列番号1に記載のアミノ酸配列（ヒトFcεRIα）を有し、ここで、位置43のアミノ酸リシン（K43）は、アラニン（すなわち、配列番号3）、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシンおよびパリンからなる群より選択されるアミノ酸と（配列番号2になるように）置換されている。

【0031】

FcεRIα鎖は、好ましくは、（実施例4に示されるように）吸着剤の繰り返しまたは長期使用を可能にするためにタンパク質を完全にプロテアーゼ非感受性にする1つの最もわずかな配列修飾を含むべきである。このFcεRIαの最も好ましい変異体は、K43A43変異体（配列番号3）が実施例の部分に例示されている。しかしながら、K43部位の3つのアミノ酸のN末端または2つのアミノ酸のC末端内で、追加のまたは別の修飾を用いることも可能であるが、あまり好ましくない。正に荷電したK43切断部位を取り囲むプラスミン基質部位コンセンサス内で、K43のプラスミン感受性を低下させるために、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンを除く他のアミノ酸によるF42単独でまたは他の置換との組合せで置換することも可能である。他の置換基と組み合わせ、または加えて、K43のプラスミン感受性も低下させる荷電アミノ酸またはプロリンまたはシステインでI41を置換することも可能である。他の置換と組み合わせ、またはこれに加えて、例えばBackes et al. 2000およびHervio et al. 2000のような、以前のプラスミン基質コンセンサス部位研究に基づいて、K43でプラスミン感受性を低下させるために、アルギニン、スレオニン、パリン、グリシン、リジン、フェニルアラニンおよびイソロイシンを除く他のアミノ酸にR40を変更することも可能である。上記の置換と組み合わせ、またはこれに加えて、プラスミン基質認識を低下させるために、グリシン、アルギニン、リシンまたはセリン以外の他のアミノ酸にG44を変更することも可能であるが、あまり好ましくない。この領域の進化的保存性（上記のzoo-アライメントを参照のこと）およびBackes et al. 2000, Yuan et al. 2009またはHervio et al. 2000により示唆されるプラスミン基質部位コンセンサスによると、例えば、上記のようにK43に隣接する1つまたは複数の隣接アミノ酸をN末端またはC末端で変化させることによってタンパク質分解的切断を減少させることが可能である。

20

30

40

【0032】

Backes et al. 2000, Hervio 2000 et al. またはYuan et al. 2009によって提案されたようなプラスミン基質コンセンサス配列に関する知識にもかかわらず、いくつかのプロテアーゼコンセンサス部位があるが、K43部位は、同定された他の部位よりも特に強力に切断される（実施例2参照）ことを示す、本発明の実施例2において実証されたように、プラスミン消化は、一次配列に依存するだけでなく、基質の構造的接近性に大きく依存することに留意することが重要である。これは、可能性のある切断部位の全てが等しく接近可能であるわけではないことを示す。加えて、基質認識は、翻訳後修飾にも依存する。

【0033】

しかしながら、K43の隣接アミノ酸の変化または組み合わせの変化とは対照的に、最

50

も好ましい置換 K 4 3 A 4 3 は僅かであり、実施例 5 - 7 に示されるように F c e R I a 分子の全ての所望の物理化学的特性を維持しながら、実施例 4 に示されるように完全消化阻害の本質的利点を提供する。同時に、この置換は、プロテアーゼ抵抗性 F c e R I a に対する免疫原性を最小化する。まとめると、親和性（すなわち、結合および解離速度）、pH 安定性および折り畳み特性を失わないように、野生型 F c e R I a 構造をできるだけ“天然”のままにすることが好ましい。

【0034】

また、最も好ましい置換は、F c e R I a の抗原性または構造的変化を導入しない僅かな K 4 3 A 4 3 置換である。

【0035】

本発明のデータは、K 4 3 切断部位が最も重要なプロテアーゼ切断部位であることを示しているが、他のプロテアーゼ切断部位が開示または想定されているので、さらなるアミノ酸置換が導入されてもよい。例えば、F c e R I a 分子をこれらの部位での切断に対しても抵抗性にする、またはこの分子の他の特性を改善することができる。好ましくは、さらなるアミノ酸が、位置 3 1 のリシン（K 3 1）、位置 4 0 のアルギニン（R 4 0）、位置 4 1 のイソロイシン（I 4 1）、位置 4 2 のフェニルアラニン（F 4 2）、位置 4 4 のグリシン（G 4 4）、位置 4 5 のグルタミン酸（E 4 5）、位置 1 4 2 のリシン（K 1 4 2）、位置 1 9 6 のリシン（K 1 9 6）、位置 1 9 9 のアルギニン（R 1 9 9）、および位置 2 0 1 のリシン（K 2 0 1）から選択されるアミノ酸、とりわけ、位置 3 1 のリシン（K 3 1）、位置 4 0 のアルギニン（R 4 0）、位置 1 4 2 のリシン（K 1 4 2）、位置 1 9 6 のリシン（K 1 9 6）、位置 1 9 9 のアルギニン（R 1 9 9）、および位置 2 0 1 のリシン（K 2 0 1）（全ての番号付けは、上記の配列番号 1 から 3 を参照しており、実施例セクションで言及した UniProt Sequence P12319 に対応している）からなる群より選択されるアミノ酸で置換される。もちろん、F c e R I a の特性を改善するが、本発明によるプロテアーゼ抵抗性ならびに F c e R I a の機能的特徴、とりわけ効率的に I g E に結合し、新しいエピトープの導入を回避し、そしてアフェレシス吸着剤を変性によってリサイクルするときに正確に再折り畳みする特徴を維持することが知られている他の改変体もまた、導入されてよい。

【0036】

本発明のプロテアーゼ抵抗性 F c e R I 変異体は、好ましくはアフェレシス吸着手段として用いられるため、本発明の F c e R I a 変異体の I g E 結合フラグメントはまた有益であり、本発明で提供される。そのフラグメントに関しても、本発明は、主として、ヒトの側面に関する。従って、全タンパク質としての F c e R I a の記載に関して、フラグメントの側面もまた、とりわけヒト F c e R I a に関係している。

【0037】

本発明のフラグメントのアフェレシス使用は重要であるため、本発明による特に適切なフラグメントは、免疫グロブリン結合ドメイン 1（アミノ酸 3 0 - 1 1 0）および 2（アミノ酸 1 1 1 - 1 9 3）を含んでいなければならない。両免疫グロブリン結合ドメインは、正確な折り畳みに必須であり、適切な結合のために存在しなければならない。もちろん、本発明の任意のフラグメントもまた、配列番号 2 または 3 の位置 4 3 に対応するアミノ酸位置にプロテアーゼ抵抗性パリエーションを含まなければならない。アミノ酸 5 1 - 9 3 および 1 3 2 - 1 7 6 は、必須ジスルフィド架橋を含み、適切な折り畳みに適している。最後に、アミノ酸位置 4 6、6 7、7 5、9 9、1 6 0、1 6 5、1 9 1 は、グリコシル化部位（G l c N A c）を含み、それ故に、適切な折り畳みおよび安定性にも関係する。

【0038】

従って、顕著な安定性および天然の折り畳みも示す本発明の好ましいフラグメントは、配列番号 1 のアミノ酸 2 6 ~ 2 0 5、好ましくはアミノ酸 3 0 ~ 1 9 3 を含む。

【0039】

位置 K 4 3 に N 末端および C 末端それぞれに隣接する 8 個までのアミノ酸の領域内の配

10

20

30

40

50

列類似性の保存は、この領域の構造的および機能的保存を示す（以下の、選択された種からの F c e R I a N末端配列の部分的アライメントを参照のこと）。従って、この段階でプロテアーゼ感受性を不活性化するために、特に K 4 3 の N 末端および C 末端の 4 アミノ酸位置までを囲む、プロテアーゼコンセンサス配列内のアミノ酸置換を最小にすることが好ましい。しかしながら、同時に、構造変化による新しいエピトープの形成のリスクを最小にするか、または I g E 結合挙動を減少させることが必要である。このリスクを最小にするために、K 4 3 を、他の哺乳動物種に見出されるような、例えばモルモット（E；グルタミン酸）またはマウスおよびラット（T；スレオニン）に存在する、親水性/極性/塩基性または酸性のホモログ残基で置換することが好ましい。しかしながら、いくつかの非ヒト霊長動物種またはブタに見られるような R（アルギニン）による最も保存的な置換は、以下にさらに述べるように、アルギニンがプラスミンコンセンサスの一部であることが知られているため、有効なプロテアーゼ抵抗性を提供しない（例えば、Bakes et al 2000 参照）。

10

【 0 0 4 0 】

ヒト F c e R I a の K 4 3 部位（下線部）をカバーする N 末端 F c e R I a 配列の種アライメント（もちろん、用語“ K 4 3 ”は常に他の非ヒト種の対応する位置に関連する）：

【表 1】

Pig	-----AVIQESQVSLNPPWNRIFRGENVTLTCIGNYSLEN	
Otolemur	-----LEAIRQSILSLNPQWNRIFKGENVTLNCRDNFFEV	
Mouse	-----LCLALLFMSLDVILT-ATEKSVLTLDPPIRIFTEGKVTLSYCGNNHLQM	
Rat	-----LCLALVLISLGVMLT-ATQKSVVSLDPPWIRILTGDKVTLICNGNNSSQM	
Dog	MPASMGGPALLWLIALLLSSPGVMSS-DTLKPTVSMNPPWNTILKDDSVTLTCIGNNSLEV	
Guinea	MAAAVYGSALLWLIALLLFSPDGMM-ATQKSVLSLNPPWYRVFERDNVTLTCNKNLTED	
nomascus	MAPAMESPTLLCVALLEFFAPDVLT-VPQKPMVSLNPPWNRIFKGENVTLTCNGNFFEV	
pongo	MAPAMESPTLLCVALLEFFAPDGVLA-VPQKPMVSLNPPWNRIFKGENVTLTCNGNFFEV	10
Human	MAPAMESPTLLCVALLEFFAPDGVLA-VPQKPKVSLNPPWNRIFKGENVTLTCNGNFFEV	
gorilla	MAPAMESPTLLCVALLEFFAPDGVLA-VPQKPMVSLNPPWNRIFKGENVTLTCNGNFFEV	
masca	MAPAMESPTLLCVALLEFFAPDGVLA-VPQKPTVSLNPPWNRIFKGENVTLTCNGSNFFEV	
saimiri	MAPLVESPTLLCVALLEFFAPDGMLA-APQKLMISLNPPWNRIFKGENVTLTCNGNFFEV	
callithrix	MAPLMESPTLLCVALLEFFAPDGVLA-ALQKPTVSLNPPWNRIFKGENVTLTCNGNLYEV	
Rabbit	MPTGMGGPILLCIAFLLESFDPGTLA-VMLKSVVSLYPPWNRIFRGEAVTLTCNGDKSLDD	
Myotis	MSTSMGGPALLWVALLLFS-----AWKSMMSLNPPWNRIFRGENVTLTCNGNNSLDV	
Pteropus	MSTSMGGPALLWLIALLLFSPDGMSAEANWKSVMVSLNPPWNRIFRGENVTLTCNGNKSPEV	
Cow	----MGAPALLWLIALLLFSPDGMSA-AIWKSKVSLNPPWRKILKGDVTLTCGTINGSSSED	20
Orcinus	MPTAMGTPALLWLIALLLFSPDGISA-AIWRKSVSLNPPWNRIFRGENVTLTCGGNNSHED	
	. : : * * : : : ** : * . :	

凡例 (アミノ酸特性に対するカラーコード):

RED (赤) : 小さい (小さい+ 疎水性 (芳香族基 -Yを含む))

BLUE (青) : 酸性

MAGENTA (マゼンタ) : 塩基性 - H

GREEN (緑) : ヒドロキシル + スルフヒドリル + アミン + G

Pig:ブタ、Otolemur:ガラゴサル、Mouse:マウス、Rat:ラット、Dog:イヌ、Guinea:モルモット、
 nomascus:テナガザル、pongo:オランウータン、Human:ヒト、gorilla:ゴリラ、masca:マスカ、
 saimiri:リスザル、callithrix:マーモセット、Rabbit:ウサギ、Myotis:コウモリ、Pteropus:
 オオコウモリ、Cow:ウシ、Orcinus:シャチ

【 0 0 4 1】

従って、本発明は、一般的に、ヒト以外の全ての同種の F c e R I a 種に適用可能である。しかしながら、本発明の最も好ましい態様は、上に既に記載した通り、ヒト F c e R I a 種の K 4 3 変異体である。このことは、外来 (すなわち、非自己) の治療タンパク質に対する免疫応答を避けるために、治療タンパク質中の他の種由来の相同配列の使用を可能な限り厳密に回避することが今日の当分野の技術水準であるという事実によってさらに強まる。従って、これは、例えば初期世代のマウス/ヒトキメラ治療抗体においてみられるような、A D A (=抗薬物抗体) を誘導するリスクを有するために、ヒトにおいて、非ヒト F c e R I a 鎖を治療目的 (すなわち、注射可能またはアフレスス吸着剤のいずれかとして) で使用することは望ましくない。さらに、非ヒト起源からの治療タンパク質のヒトにおける治療的使用は、例えば非ヒト F c e R I a 配列のようないくつかのアミノ酸置換を含む外来タンパク質に対する T 細胞寛容 (tolerance) は期待できないため、T 細胞エピトープを介した T 細胞誘導のリスクを有する。

【 0 0 4 2】

F c e R I 配列中の K 4 3 を置換することによるプロテアーゼ抵抗性 F c e R I a 変異体の提供は、F c e R I a 配列を設計する全く新しいアプローチである。第 1 に、同種の

いずれも、この領域においてこのようなプロテアーゼ抵抗性の置換を有するヒト配列を含まない。第2に、FcεRIa配列の以前の設計提案のいずれも、プロテアーゼ切断を妨げるような置換を提供しない。これは、現在のFcεRIa分子が画期的な技術革新を具現し、(例えば、WO 02/06298 A1、WO 96/08512 A1、Raら(J. Biol. Chem. 264 (1989): 15323-15327)、WO 99/38974 A1、WO 01/21816 A1、Liuら(PNAS 85 (15) (1988): 5639-5643)に記載されるFcεRIa分子のような)先行技術に開示されている全てのFcεRIa配列とは顕著に異なるためである。

【0043】

本発明のFcεRIaは、好ましくは、例えばIgEの表面捕捉が可能ないように固体表面上に固定化される。該固体表面は、ポリペプチド分子(例えば、マイクロビーズ、微粒子、フィルター、ガラス、シリコン、金属、金属合金、アノード、ポリマー、ナイロンまたはプラスチック)を固定することができる表面であり得る。そのような固体表面材料およびかかる材料にFcεRIaを結合させる方法は、当業者に十分に利用可能である;先行技術における天然FcεRIaに用いられる全ての材料および方法は、本発明によって用いられ得る。

10

【0044】

別の側面により、本発明は、IgE媒介性疾患の予防および/または処置に用いるための本発明のFcεRIaに関し、ここで、FcεRIaは、アフエレシスにおいて、ヒト体液、とりわけヒト血漿または血清から過剰のIgEを枯渇させるために用いられる(抗IgE療法)。

20

【0045】

本発明のFcεRIaは、天然FcεRIaについて示唆され実施された医学的/治療的/診断的使用のために使用されてもよく、とりわけ天然の折り畳みおよび完全な機能性を維持しながら、プロテアーゼ抵抗性および構造的に天然のままであるという、本発明の利点を提供する。

【0046】

従って、本発明のFcεRIaは、アレルギー性疾患、好ましくは季節性、食物、花粉、カビ孢子、有毒植物、薬物/薬剤、昆虫毒素、サソリ毒素または蜘蛛毒素、ラテックスまたはハウスダストダニアレルギー、ペットアレルギー、アレルギー性鼻炎および結膜炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性気管支喘息、非アレルギー性喘息、チャージ・ストライウス症候群、アトピー性皮膚炎、鼻のポリープ症、木村病;接着剤、抗菌剤、香料、染髪剤、金属、ゴム成分、局所用医薬、ロジン、ワックス、艶出し剤、セメントおよび皮革に対する接触性皮膚炎;性鼻副鼻腔炎、アトピー性湿疹、IgE関連自己免疫性疾患、好ましくは慢性(特発性)および自己免疫性蕁麻疹、コリン作動性蕁麻疹、肥満細胞症、とりわけ皮膚肥満細胞症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、慢性または再発性特発性血管浮腫、間質性膀胱炎、アナフィラキシー、とりわけ特発性および運動誘発性アナフィラキシー、免疫療法、好酸球関連疾患、好ましくは好酸球性喘息、好酸球性胃腸炎、好酸球性中耳炎および好酸球性食道炎;リンパ腫、好ましくは胃または十二指腸の潰瘍または逆流のための抗酸性療法の感作副作用の予防または治療のための薬剤の製造のために用いられ得る。

30

40

【0047】

本発明によって、本発明のFcεRIaの有効量が、それを必要とする患者、とりわけヒト患者(現在の治療的使用の中心にいるヒト)に投与される(例えば、注射可能な、経口的に、または他の非経腸的に送達される治療剤として投与される)。

【0048】

本発明のFcεRIaの利点は、それを、IgE関連疾患の患者の血液中のIgE含量を低下させるアフエレシス技術に特に適したものとする。従って、FcεRIaは、好ましくは、ヒト個体の血流との接触に適した固体担体に結合される。

【0049】

従って、本発明の別の側面は、血流または血漿流と接触することができる固体担体を含

50

むアフェレシス装置に関し、該固体担体が、本発明の F c e R I a を含むことを特徴とする装置に関する。

【0050】

アフェレシス装置の適切な使用はまた、pHショックによって行われ得るリサイクル（溶離）を必要とするので、好ましい吸着剤はpH抵抗性でなければならず、すなわち、F c e R I a 分子は、その親和性および特異性が妨げられないように正確に再折り畳みされるべきである。

【0051】

本発明の F c e R I a は、好ましくは共有結合、配向/方向性固定化により（とりわけ、例えばシステインのチオール基、リシンの第一級アミン、人為的に導入されたアルデヒドなどのような分子上の1つの定義された反応基により）、アフェレシスマトリックス担体（すなわち、固体担体）上に効果的に固定化され得る。タンパク質上の側鎖基の官能化については、例えば、任意の組換えタンパク質に対する一般的な応用が列挙されている（van Vughtら、2014を参照のこと）。固定化の過程で、例えば、固定化タンパク質の負の機能的結果を可能な限り防ぐために注意を払わなければならないことも明らかである。例えば、機能的に関連するシステインまたはリシンが、そのような固定化の過程で十分に保護されていることは明らかである。

10

【0052】

I g E 関連疾患を有する患者の血液から除去すべき I g E を含む（体外）血流または血漿流を、本発明のアフェレシス装置に導き、固体表面上で本発明の F c e R I a 変異体分子に I g E を結合させることにより該 I g E を特異的に除去する。

20

【0053】

本発明の装置には、好ましくは担体として滅菌の、および発熱物質を含まないカラムが含まれる。

【0054】

本発明により、アフェレシスまたは血漿アフェレシスとは、患者の血液が、1つの特定の成分を分離し、残りを循環系に戻す装置を通過する医療技術と定義される。本発明により、アフェレシスを用いて、本発明で提供される F c e R I a 分子の使用により血漿から I g E 分子を分離する。本発明により、アフェレシス装置は、血流または血漿流と接触させることができ、かつ I g E に結合する受容体としての本発明の F c e R I a 変異体を有する、固体カラムを含む。滅菌の、および発熱物質を含まないカラムは、好ましくは、アフェレシス担体として用いられる。本明細書中、“カラム”は、タンパク質が化学的に結合され得るマトリックス材料を有する形状のモジュールとして定義される。

30

【0055】

好ましくは、固体担体のマトリックス材料は、セファロース^(商標)、デキストラン、アガロースまたはセルロースのような炭水化物ベースの材料である。他の好適なマトリックス材料には、ガラス製、またはポリメタクリレート、ポリスチレンおよびポリアミドなどの合成ポリマー製の、ビーズ、繊維および膜またはフィルムなどのオートクレーブ可能なマトリックスが含まれる。ビーズが使用される場合、該ビーズの直径は、アフェレシスの液相が循環できる限り、限定されない。しかしながら、流動抵抗を小さくするためには、直径50~3000 μm、とりわけ200~3000 μmのビーズを用いることが好ましい。マトリックス材料は、米国特許第5,817,528号による滅菌溶液による予備洗浄および低温でのさらなるスチーム処理により、あるいは当業者に知られている何らかの他の技術によって滅菌される。次いで、滅菌した発熱物質を含まないマトリックス材料は、米国特許第5,817,528号に記載されているような臭化シアン溶液を用いたインキュベーションまたは当業者に知られている他の任意の技術によって活性化される。次いで、インキュベーションにより所望の抗原結合分子を該カラムにカップリングさせる。あるいは、US 5,817,528 Aに記載のように、抗原結合分子を1,1'-カルボニルジイミダゾールと共にインキュベートするか、または当業者に公知の任意の他の技術により、活性化およびカップリングを同時に達成することもできる。カップリング法が一旦終

40

50

了すると、それに結合した抗体を有するマトリックス材料をよく洗浄し、シアン酸エステル、無菌性および発熱性について試験する。カラムに固定化される吸着分子の量およびカラムのサイズは制限されない。カップリングしたマトリックス材料についても、全結合タンパク質、および該結合タンパク質の結合活性について試験する。次いで、カップリングしたマトリックス材料を、無菌条件下で滅菌し、発熱物質を除去したシラン処理済ガラス容器に充填して、滅菌の、かつ発熱物質を含まないタンパク質結合カラムを形成する。アフレス装置を通過する流量は、回路のチューブの内径を適切に選択することによって、または補助ポンプを使用することによって制御され得る（US 4, 770, 774 A）。本発明のカラムは、使用後に吸収された I g E を溶出することによって繰り返し使用され得て、リサイクルされ得る。

10

【0056】

本発明のアフレス装置は、必要に応じて、さらなる I g E 結合分子（例えば、抗体、天然の F c e R I a または他の公知の I g E 結合分子など）を含んでよい。しかしながら、本発明の F c e R I a 分子のプロテアーゼ抵抗性のために、これらの分子を唯一の分子種として（または利用可能であれば、他のプロテアーゼ抵抗性 I g E 結合分子と共に）用いることが最も好ましい。

【0057】

本発明はまた、I g E 関連疾患を予防および/または処置するための、とりわけ抗 I g E 療法を行うための、予防および/または治療装置を提供することを目的とする本発明のアフレス装置の使用に関する。

20

【0058】

別の側面により、本発明は、本発明の F c e R I a を含む固体アフレス担体を含む I g E 関連疾患の予防および/または処置における使用を目的とするキットであって、ここで、該担体が、滅菌かつ発熱物質を含まないカラムであるキットに関する。

【0059】

該キットは、患者から採血し、その血液（低減された量の I g E を含む）を患者に戻すための接続手段および運搬手段、本発明の F c e R I 変異体を有する固体表面上に血液または血漿を送り込むためのポンピング手段、ならびに患者の処置前、処置中および処置後の（例えば、その後のアフレスカラムの再生過程においても）、血流または血漿流速およびアフレス性能（吸着など）を制御するための適切な制御装置をさらに含んでよい。

30

【0060】

本発明はまた、とりわけ I g E 関連疾患の予防または処置における使用のための、および/または I g E 関連疾患の予防または処置のための医薬の製造における使用のための、本発明の F c e R I a に関する。

【0061】

本発明の対象は、さらなる I g E 低下療法、例えば上記の“抗 I g E 療法および制限”に記載の抗 I g E 療法、とりわけ、例えば Kerzel et al., 2011 に記載の、抗 I g E 抗体（オマリズマブ（登録商標）など）に血漿交換を適用する併用療法と組み合わせるのに特に適している。

40

【0062】

I g E アフレスのための本発明の F c e R I a 変異体の使用は、特に好ましい態様であるが、本発明の F c e R I a 分子は、天然の F c e R I a または天然 F c e R I a を含む組成物について先行技術において示唆および実施される（治療または診断）目的の何れかのための使用であり得る。例えば、本発明の F c e R I a は、（例えば、静脈内（i . v . ）、筋肉内（i . m . ）、皮下（s . c . ）、ポンプ、経皮、吸入などの生物学的治療剤の送達に使用される注射、経口送達または他の任意の非経腸経路により）投与される生物学的治療剤として用いられ得る。従って、本発明はまた、本発明の F c e R I a および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物に関する。

【0063】

50

好ましくは、本発明の医薬組成物はさらに、組成物が投与される患者において、本発明の F c e R I a 変異体の半減期を増加させる薬剤を含む。そのような半減期増加剤の例は、当業者に知られている。例としては、ヒト血清アルブミン (H S A) または P E G 基の導入 (“ P E G 化 ”) である。

【 0 0 6 4 】

別の側面により、本発明は、プロテアーゼ含有サンプル、とりわけ血漿サンプルまたは I g E 含有および膜 I g E 含有組織および細胞における I g E 検出用のリサイクル可能なプローブとしての本発明の F c e R I a の使用に関する。本発明のプロテアーゼ抵抗性 F c e R I a 変異体は、例えば、サンプルを、一般的な B i a c o r e 設定のように並行ではなく順次に測定しなければならないとき、変性 / 再生によってリサイクルすることができる。アフエシスに関して、変性後の重要性または再使用可能性もまた、このようなプローブ用途に関係する。本発明のプローブは、サンプル中のプロテアーゼによって、または変性 / 再生を含む後のリサイクル工程によって傷つかない。一旦 I g E が捕捉され測定されると、I g E は、本発明の F c e R I a を傷つけることなく変性によって放出される。(例えば s c F v 1 2 とは対照的に機能性を失うことなく) 再生後、以下の例 (例えば、図 7 A 参照) に示すように、次の測定を実行し得る。

10

【 0 0 6 5 】

I g E (好ましくは、血漿および他の全てのプロテアーゼ含有サンプル由来) を検出するプローブとしての、本発明のプロテアーゼ抵抗性 F c e R I a の適用は、任意の捕捉 / 検出ベースの方法に適用することができる。従って、本発明のプローブを E L I S A (酵素結合免疫吸着アッセイ) または S P R (表面プラズモン共鳴; B i a c o r e) アッセイで使用することが特に好ましい。

20

【 0 0 6 6 】

診断またはバイオマーカー分析の目的のための I g E もしくは膜 I g E 含有組織または体液およびコンパートメントのインビボ検出を可能にするフルオロフォアと組み合わせた分子イメージングトレーサーとしての、本発明のプロテアーゼ抵抗性 F c e R I a の適用は、本発明の好ましい使用である。標識された F c e R I a は、光学的インビボイメージングによく適した比較的小さいトレーサーを表す。一般的に、より小さいトレーサーは、Oliveira 2015によって詳細に記載されるような分子イメージングの利点を提供する。

30

【 0 0 6 7 】

さらに、本発明のプロテアーゼ抵抗性 F c e R I a は、例えば、二機能性 m A B またはモジュラーシステムのためにいくつかの機能を組み合わせる幾つかの他の最先端の生物製剤の一部として、現代の治療薬として、より洗練された (多) 機能性構築物の一部として提供され得る。従って、本発明のプロテアーゼ抵抗性 F c e R I a はまた、体内または体外の治療および診断または画像化目的のための複合体または多機能性構築物の一部として使用することもできる。組み換え融合タンパク質として、それは二機能性または多機能性タンパク質の一部であり得て、それにより、一般的技術に従って、機能的ドメインは、Chen et al. 2013により記載されるような不活性な柔軟性または剛性のペプチドリンカーを介して、互いに遺伝子的に融合され得る。かかるリンカーおよび結合ドメインは、安定性、溶解性、発現収率、生物学的活性、抗原性および薬物動態に影響を及ぼし得る。かかるリンカーはまた、制御された活性化または標的細胞もしくは組織への送達を達成するために、例えば治療的機能の局所活性化またはインビボ画像化のために必要とされるようなインサイチュでの特異的標識活性化を提供するために、インビボで切断可能であるように設計され得る。

40

【 0 0 6 8 】

F c e R I a と組み合わせることができる機能的ドメインのプロトタイプの例は、ヒト血清アルブミンである。これは Digan らによって最初に提案された (W O 1 9 9 8 / 0 0 4 7 1 8 A 1) 。好ましい選択肢として、トランスフェリンまたは F c ドメインを用いて、生物製剤の薬力学的挙動を調節することもできる。一般的な技術によれば、F c e R I a は、他の機能性タンパク質またはペプチド物質、例えば、サイトカイン (一般的に、Bo

50

otz & Neri 2015に記載される通り、“イムノサイトカイン”と称される)、あるいはSpiess et al 2015に広く記載されている抗体様構造体に、遺伝子的または化学的に連結またはヘテロ二量体化され得る。二重または多特異性治療剤の設計のための新たに作成されたフォーマットには、(抗体、抗体フラグメントまたは抗体様構造体の例として)ナノボディ、(タンデム型) s c F v ' s、(四価の二重特異性のタンデム型) I g G、二重標的化ドメイン、B i T E ' s、T r i o m a b ' s、D A R T ' s、D V D - I g、I g G - フィノマーなどが含まれる。現在臨床評価中の一般的なフォーマットについて詳しいレビューは、Spiess et al. 2015に記載されている。それらの技術的な柔軟性に基つき、そのようなフォーマットは、F c e R I aに新しい複数の治療的機能を提供し、それらを組み合わせるために、F c e R I aとの融合タンパク質として使用され得る。従って、本発明のF c e R I aは、(以下の機能性分子群の各々の1以上)にカップリングされてよい:

- リンカー分子、好ましくはペプチドリリンカー、とりわけ1 ~ 10個、好ましくは2 ~ 5個のアミノ酸基からなるペプチドリリンカー; および/または
- 治療分子もしくは診断分子、好ましくはモノクローナル抗体もしくは抗体フラグメント、サイトカイン、抗体様構造体、細胞毒性剤、好ましくは毒素もしくは細胞毒性薬、光学トレーサー; および/または
- 担体、好ましくは担体タンパク質、とりわけヒト血清アルブミン、トランスフェリンもしくはF cドメイン。

【0069】

この側面の好ましい態様により、本発明のプロテアーゼ抵抗性F c e R I aは、I g EスイッチしたB細胞などのI g E B細胞受容体発現細胞を標的とするための抗体薬物複合体(ADC)治療剤と同様の方法で用いられ得る。これにより、これらの細胞を死滅もしくは(細胞周期)停止させるか、または最終的にI g Eを低下させる阻害シグナル伝達を提供する。ADC治療剤は、一般的に、Peters & Brown, 2015に記載されるように、機能的活性剤、特に細胞毒性剤を特定の標的細胞に送達するための抗癌剤として使用される。従って、本発明のF c e R I aは、少なくとも1つの細胞毒性剤と化学的に、または遺伝子的に結合されている。この結合した分子は、例えばI g E B細胞受容体を発現する細胞を標的とするのに好適であり、それ故に、I g E B細胞受容体を発現する細胞を死滅させるまたは抑制することにより最終的にI g Eを産生する血漿細胞数が減少し、それにより患者における可溶性I g Eレベルが低下するという事実に基づいて、上記のようなアレルギーまたは他のI g E関連疾患の処置に必要なようなI g E低下を可能にする。あるいは、稀少癌形態のようなI g E B細胞受容体を発現する他の細胞もまた、抗体薬物複合体法と同様の方法でF c e R I a薬物複合体によって標的化され得る。本発明のF c e R I aとそのようなさらなる(機能的)分子との組み合わせは、好ましくはI g E B細胞受容体を発現する細胞に対して細胞傷害剤を特異的に標的化するための本発明のF c e R I aを含むADC様物質(Peters & brown, 2015によって定義される)として見なされ得る。

【0070】

上記の問題および側面は、本発明のF c e R I aフラグメントについても同様に適用される。従って、本発明は、本発明のF c e R I aフラグメントにも関し、ここで、該F c e R I aフラグメントは、ヒト個体の血流との接触に適する固体担体にカップリングされている。

【0071】

本発明のフラグメントは、好ましくは、アフエレシス装置に適用される。従って、本発明は、血流または血漿流と接触することができる固体担体を含むアフエレシス装置であって、該固体担体が本発明のF c e R I aフラグメントを含むことを特徴とするアフエレシス装置にも関する。従って、本発明はまた、I g E関連疾患を予防および/または処置するための、とりわけ抗I g E療法を実行するための、予防および/または処置装置を提供するための、本発明のF c e R I aフラグメント含有装置の使用にも関する。本発明はま

た、本発明の F c e R I a フラグメントを含む固体アフェレシス担体を含む I g E 関連疾患の予防および/または処置における使用のためのキットであって、ここで、該担体は、滅菌かつ発熱物質を含まないカラムである、キットにも関する。

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図1】図1は、F c e R I a によるプラスミンの共沈を示す。

【図2】図2は、集められたヒト血清(A)およびプラスミン(B)と組換え F c e R I a とのインキュベーション/消化を示す。

【図3】図3は、野生型またはプロテアーゼ抵抗性 A 4 3 - F c e R I a 吸着剤をプラスミンとともにインキュベートするとき、I g E 枯渇が異なる程度まで減少することを示す。

10

【図4】図4は、野生型受容体消化ピークが30分に現れるのに対して(灰色線)、組換え A 4 3 - F c e R I a の変異体であるプロテアーゼ抵抗性変異体(黒線)には切断産物が完全に存在しないことを示す塩基ピーククロマトグラムを示す。

【図5】図5は、A 4 3 - F c e R I a に結合する I g E の計算された E C 5 0 値 (F c e R I a 、 A 4 3 - F c e R I a および S c F v 1 2 のそれぞれについて、24.5 ng/ml、34.4 ng/ml および 42.8 ng/ml) および曲線形状が、w t - F c e R I a または s c F v 1 2 と同様に、F c e R I a 配列の位置 4 3 での K A 変化が負の効果を示さないことを証明することを示す。

【図6】図6は、I g E は、(F c e R I a および s c F v 1 2 のビーズへの等価固定化、その後のインビトロでの I g E 吸着による) p H 3 . 4 処理により F c e R I a からほぼ完全に溶離され得るが、一方、I g E は、S c F v 1 2 から遊離されなかったことを示す。

20

【図7】図7は、血清の有無に関わらず再生性能を示す；プロテアーゼ抵抗性 F c e R I a 吸着剤に対する血清環境の安定化/再生効果は、血清再生を伴わない状態(図7B)と比較して、血清再生(図7A)による I g E 結合能の中程度の低下に反映される。

【発明を実施するための形態】

【0073】

本発明は、2つの本質的特徴を組み合わせた改良された F c e R I a の変異体を提供する：第1に、F c e R I a の N 末端部分内の新たに認識されるタンパク質分解切断部位での切断は解除されるが、同時に、F c e R I a の構造は、I g E 結合性、pH 安定性および再折り畳み特性を保持するために変化させない(実施例5、6および8で証明される通り)。F c e R I a プロテアーゼ抵抗性を付与するために、野生型(wt) F c e R I a 配列内に通常は存在しない新たなエピトプの形成を避けることが特に重要である。血中、血漿中または血清中のプロテアーゼ抵抗性に加えて、本発明の改変は、新規の免疫原性部位のリスクを最小化するために、構造変化がないかまたは最小限であることを保証しなければならない。同時に、w t F c e R I を提供することができるのと同じ有利な溶離および再折り畳み特性を保持するはずである(実施例5、6および8で証明される通り)。

30

【0074】

F c e R I と血漿プロテアーゼとの間の物理的結合は、実施例1にて見出された。F c e R I a の N 末端部分における血漿プロテアーゼ感受性部位の同定は、実施例2において実証され説明されている。実施例3は、組換え F c e R I a のタンパク質分解切断が、I g E 阻害(例えば、治療用 I g E ブロッカーとして使用されるとき)または体外 I g E 除去(例えば、選択的 I g E 吸着剤として使用されるとき)に有害な I g E 結合低減をもたらすことを示す。この実施例では、切断された F c e R I 吸着剤が、F c e R I a の N 末端ドメインが有効な I g E 結合に必要な部分を含むことを示す先の機能的/構造的研究によって確認される吸着効率の損失を被ることが示されている(Mallamaci et al. 1993)。本発明は、新しいプロテアーゼ感受性部位(K43と称する)の現在の知見および I g E 結合に対するその機能的関連性の評価に基づいて、実施例4および5で実証される通り

40

50

、 F c e R I a 吸着剤を K 4 3 におけるプロテアーゼ消化に対してプロテアーゼ抵抗性にして、血液、血漿または血清との接触を維持するのを可能にするという技術的解決法を提供する。実施例 5 および 6 は、プロテアーゼ抵抗性 F c e R I a が、従来技術の s c F v 1 2 (Lupinek et al. 2009 および U S 2 0 1 4 / 1 2 4 4 4 8 A 1) と比較したとき、それと匹敵する I g E 結合および吸着特性を有することを実証する。しかしながら、s c F v 1 2 とは対照的に、プロテアーゼ抵抗性 F c e R I a 吸着剤は、s c F v 1 2 よりも高い p H 安定性を示し、例えばアフレスシスにおいて、使用時に溶離 / 再生およびリサイクルが可能となる。実施例 7 および 8 は、従来技術の単鎖抗体吸着剤 s c F v 1 2 が、低 p H でのその分解のために I g E 溶離後にリサイクルできないことを示している。しかしながら、コストを節約するために 1 つのカラムを複数回使用できるようにするためには、実施例 8 に示すように吸着分子を不可逆的に損傷または変性することなく溶離（例えば、低 p H による）および再生を可能にするアフレスシスカラムを提供することが重要である。実際に、本発明のプロテアーゼ抵抗性 F c e R I a 吸着剤はまた、治療的アフレスシスによって抗 F c e R I 自己抗体を枯渇させることができる。このような自己抗体は、例えば、慢性自己免疫蕁麻疹などの病状において見いだされ得る (Zuberbier et al. 2000) 。この特徴は、抗 I g E 抗体または抗体の誘導体、例えば例えば S c F v または F a b などに基づく I g E 吸着剤によっては提供されない。最も重要なことには、本発明は、分子の I g E 結合および再折り畳みを変化させない F c e R I a 配列の僅かな修飾を提供する。免疫系に“非自己”の、新しい抗原構造を提示するリスクは、プロテアーゼ切断を完全に無効にするために、1 つの小型の非荷電アミノ酸が用いられ得るという事実によって最小限に抑えられる。従って、本発明のプロテアーゼ抵抗性 F c e R I a は、体外治療処置、例えば選択的 I g E アフレスシスまたは自己抗体の枯渇などだけでなく、血流への受動的投与のための（例えば、非経腸、経口または他の一般的に使用される投与経路によって）投与された治療薬を産生するための基礎としても使用することができる。

10

20

30

40

【 0 0 7 5 】

まとめると、本発明は、その機能性および p H 安定性を維持しつつ、かつ天然 F c e R I a 構造を改変するリスクを有する“外来”アミノ酸置換によって誘導される免疫原性のリスクを最小限に抑えながら、血漿プロテアーゼによる消化に対して抵抗性である F c e R I a 鎖の人為的修飾に関する。従って、新規のプロテアーゼ抵抗性 F c e R I a 変異体は、I g E 結合が必要とされる治療用途における F c e R I a 鎖の使用の利点を提供する。

【 実施例 】

【 0 0 7 6 】

実施例

実施例 1 : F c e R I a と血漿プロテアーゼとの結合

組換え F c e R I a は、いくつかの血漿タンパク質、例えば、プラスミノーゲンまたはプロトロンビンなどの血清プロテアーゼと共沈する。この関連性は、F c e R I a が、血液、血漿または血清との接触中にこれらのプロテアーゼによって切断されることを可能にする。表 1 . 1 は、以下の材料および方法で説明するように、ヒト血清とインキュベートした組換え F c e R I a の共沈において同定されたタンパク質を列挙する。

【 0 0 7 7 】

【表 2】

Accession 名	名称	MASCOTスコアD	MASCOTスコアE	MASCOTスコアF	ペプチドD	ペプチドE	ペプチドF	SC [%]D	SC [%]E	SC [%]F
AIAT_HUMAN	アルファ1-アンチトリプシン	0	98,9	0	0	5	0	0	6,9	0
IGHA1_HUMAN	免疫グロブリンA鎖C領域	0	217,9	0	0	14	0	0	26,3	0
CO4B_HUMAN	補体 C4-B	280,2	0	0	17	0	0	6,8	0	0
A2MG_HUMAN	アルファ2-マクログロブリン	61,9	499	0	3	23	0	3,6	15,9	0
FHR1_HUMAN	補体因子H-関連タンパク質1	110,4	0	0	4	0	0	10,6	0	0
HPT_HUMAN	ヘパトグロビン	0	207,1	0	0	12	0	0	18,7	0
CFAH_HUMAN	補体因子H	1038,6	813	0	48	33	0	29,5	23	0
GELS_HUMAN	ゲルズリン	114,2	55,3	0	5	3	0	7,9	1,9	0
TBA1C_HUMAN	チューブリンα-1C鎖	45,7	0	0	2	0	0	6,5	0	0
APOH_HUMAN	β-2-リポタンパク質1	0	60,3	0	0	3	0	0	11,6	0
APOE_HUMAN	アポリipoprotein E	741,9	627,2	0	39	23	0	51,7	41,3	0
TRFE_HUMAN	セロトランスフェリン	0	699,2	0	0	38	0	0	31,7	0
AIAG1_HUMAN	α-1-酸性糖タンパク質1	0	68,7	0	0	4	0	0	11,4	0
HBB_HUMAN	ヘモグロビンサブユニットβ	0	178,8	0	0	8	0	0	49,7	0
LBP_HUMAN	リポタンパク質結合タンパク質	144,4	85,5	0	10	8	0	7,7	7,7	0
APOB_HUMAN	アポリipoprotein B-100	36,8	44,4	0	2	3	0	0,8	0,8	0
LAC3_HUMAN	免疫グロブリンC鎖	0	177,9	0	0	12	0	0	58,5	0
IGHM_HUMAN	免疫グロブリンC鎖	0	187,3	0	0	9	0	0	14,8	0
PLF4_HUMAN	血小板因子4	87,4	0	0	5	0	0	34,7	0	0
CERU_HUMAN	セロロプラスミン	0	114,1	0	0	7	0	0	7,5	0
CLUS_HUMAN	クラスリン	279,2	88,4	0	8	4	0	14,3	6,5	0
CXCL7_HUMAN	血小板活性化タンパク質	89,4	77,3	0	3	2	0	14,8	14,8	0
PLMN_HUMAN	プラスミノゲン	441,1	174,8	0	23	10	0	19,3	8,4	0
IGKC_HUMAN	免疫グロブリンC鎖	48,9	155,6	0	6	16	0	32,1	48,1	0
VTNC_HUMAN	ビトロネクチン	394	429,8	0	27	21	0	20,1	20,1	0
APOA2_HUMAN	アポリipoprotein A-II	60,2	137,1	0	2	8	0	21	46	0
APOA1_HUMAN	アポリipoprotein A-I	1192,2	1054,5	0	74	66	0	70,4	73	0
IGHG1_HUMAN	免疫グロブリンG鎖1領域	214,2	421,7	0	14	28	0	23	37,3	0
HEMO_HUMAN	ヘモグロビン	0	212	0	0	10	0	0	17,7	0
HRIG_HUMAN	ヒスチンリッチ糖タンパク質	642,8	549,1	0	42	30	0	32,6	26,1	0
TSP1_HUMAN	トロンボスペクティン-1	41,7	0	0	4	0	0	2,4	0	0
IGHG2_HUMAN	免疫グロブリンG鎖2領域	0	250,8	0	0	11	0	0	23,6	0
ITIH4_HUMAN	インターα-5-トリプティンインヒビター-重鎖H4	84,6	0	0	4	0	0	4,2	0	0
IGHG3_HUMAN	免疫グロブリンG鎖3領域	0	289,2	0	0	15	0	0	21,2	0
CO4A_HUMAN	補体 C4-A	0	259,7	0	0	17	0	0	6,6	0
THRB_HUMAN	トロロンピン	129,3	82,8	0	7	6	0	10,6	8,8	0
SAA4_HUMAN	血清アミロイドA4-プロテイン	51,6	47,6	0	2	2	0	15,4	13,1	0

10

20

30

40

表 1

【0078】

結果として、少なくとも2つの関連するプロテアーゼ、すなわちプラスミノゲン/プ

50

ラスミンおよびプロトロンビン/トロンピンは、ヒト血清とのインキュベーションにより組換えFcεRIαと結合する。このことは、血中に投与されるか、またはアフェレシスの吸着剤として適用されたとき、FcεRIαタンパク質の望ましくないタンパク質分解切断および分解の可能性を示唆する。実施例2および3の結果は、FcεRIαが、タンパク質分解的に切断されて、IgE結合に実際に支障を来すことを示している。

【0079】

図1は、10 μg/mlでのインキュベーション時のFcεRIαによるプラスミン(Sigma P1867)の共沈が、血清インキュベーションで同定されたような吸着剤と血漿プロテアーゼ(複数可)との直接的な物理的相互作用の証拠を提供することを示す(表1参照)。共沈したプラスミンをウェスタンブロット分析によって分析した；レーンには、以下のものを充填した：M、タンパク質マーカー；レーンP、プラスミン；レーン1、FcεRIα(ビーズ上に50 μg) + 1 μg プラスミン；レーン2、FcεRIα + 100 ng プラスミン；レーン3、HSA + 1 μg プラスミン；レーン4、HSA + 100 ng プラスミン。血清共沈試験の結果と一致して、共沈したプラスミンは、HSAでコーティングされた対照ビーズ(レーン3および4)とは対照的に、組換えFcεRIαでコーティングされたビーズ(レーン1)を用いたとき、25 kDバンドとして現れ得る。FcεRIαとプラスミンとのインビトロでの結合は、表1(上記)に示す通り、血清共沈法の結果を裏付けている。

10

【0080】

材料および方法：

20

組換えFcεRIαの発現および精製：

HEK293フリースタイル細胞(Invitrogen R790-07)を、適切な培地(Invitrogen 12338-026)中の125 mlおよび250 mlのフラスコ中、回転下(180 rpm)、37 °Cで増殖させた。2日毎に1:3 ~ 1:5のスプリットによって、2 × 10⁶細胞/mlの最大細胞密度となるように細胞を維持した。トランスフェクションのために、30 μgのプラスミドDNA、30 μlのMAX試薬(Invitrogen 16447-100)および1 mlのOptiMem(Invitrogen 31983-062)を含む30 mlの培地中で処理する前に、該細胞を5 × 10⁵細胞/mlで24時間スプリットした。組換えFcεRIαを、真核発現ベクターpTT5(NRC National Research Council Canada)のEcoRIとBamHIとの間にクローニングした。構築物は、GenBank配列BAA75054.1に由来するシグナルペプチドと、それに続くアミノ酸20(本明細書中全ての番号付けは、UniProt配列P12319に従う)から始まり、FcεRIαの細胞外領域と、それに続くスパーおよび標準的なNi-NTA精製のための6個のHisをカバーするアミノ酸205までのUniProt配列P12319[FCERA_HUMAN]から構成された。前洗浄後、1 mlのNi²⁺-NTAアガロースビーズ(Qiagen 30210)および2-5 mlの予め濃縮した細胞培養上清を、2 mlのTalon gravity カラム(Takara 635696)に適用し、6 × HIS洗浄緩衝液(50 mM リン酸緩衝液、300 mM NaCl、5 mM イミダゾール、pH 8)で数回洗浄した。溶出は、非変性条件下(製造業者のプロトコールQiagen 30210に従う)で、6 × HIS溶出緩衝液(50 mM リン酸緩衝液、300 mM NaCl、150 mM イミダゾール、pH 8)を用いて行った。溶出液を、AMICON-ULTRA-15-遠心フィルター(10K)(Millipore；カタログ番号：UFC801024)を用いて100-200 μlに濃縮し、6 mlのPBSで3回洗浄し、100-150 μlに再度濃縮し、免疫沈降に用いた。

30

40

【0081】

組換えFcεRIαとヒト血清とのインキュベーションにおける共沈した血漿プロテアーゼの検出。

吸着剤でコーティングされたビーズ(Bioclon FG-102)を、50 μlの17ヒト血清ミックス、または50 μlのIgE枯渇血清ミックスのいずれかと、または50 μlのPBSと共に21時間、27 °Cにて、900 rpmで振盪しながら、インキュベートした。

50

インキュベーション後、ビーズをPBS/0.1% BSA/0.5% Tweenで3回洗淨し、PBSで3回洗淨した。

【0082】

タンパク質を固定化したビーズを、15 mMのDTT (Roth、#6908.3) を含む重炭酸アンモニウム緩衝液 (ABC緩衝液; Acros有機物カタログ番号1066-33-7) と混合し、56 で45分間インキュベートして、ジスルフィド結合を還元した。100 mMのABC中のヨードアセトアミド (Sigma # I1149-5G) を加え、混合物を暗所で30分間インキュベートして、システインのカルバミドメチル化を行った。ビーズを100 mMのABC緩衝液で2回洗淨し、5 µgのトリプシン (Promega #90058) と共に一晩インキュベートした。消化したサンプルを、水性溶媒として0.1%ギ酸を用いてBioBasic C18カラム (BioBasic-18、150x0.32 mm、5 µm、Thermo Scientific) に充填した。5%のB (溶媒A: 0.1% FA水溶液、ACCN中0.1% FA) から32%のBへの勾配を35分間適用し、その後、32%のBから75%のBへの勾配を15分間適用して、6 µL/分の流速で、大きなペプチドの溶出を容易にした。検出を、陽イオンのDDAモード (= 溶出ピークのMSMSモードへの切り替え) で標準ESI供給源を備えたQTOF MS (Bruker maXis 4G ETD) を用いて行った。MS-スキャンを記録し (範囲: 150-2200 Da)、断片化のために6個の最高ピークを選択した。装置の校正 (キャリブレーション) を、ESIキャリブレーション混合物 (Agilent) を用いて実施した。データファイルは、(Data Analysis、Brukerを用いて) GPMを用いてMS/MSイオン検索を実行するのに適するmgfファイルに変換された。GPMは、タンパク質識別データを分析して表示するためのウェブベースのオープンソースユーザインタフェースである (<http://human.thegpm.org>)。このインタフェースは、タンパク質配列に割り当てられたタンデム質量分析データの連のウェブブラウザページビューを作成する。同定されたタンパク質のうち、トリプシンと同一の理論上の切断部位を有する2種のプロテアーゼ (すなわち、プロトロンピンおよびプラスミノゲン) が同定されている (Perkins et al. 1999参照)。トリプシン消化がプロテアーゼ切断部位を同定するためのアプローチを妨害した可能性があるため、代替消化 (Gluc、Roche、#1104781700) を実施して、ペプチドを放出させた。表1は、同定されたタンパク質をそれらのMASCOTスコア (http://www.matrixscience.com/help/scoring_help.html) と共にそれぞれ示す。MASCOTスコアが高いほど、検出されたタンパク質と理論的なタンパク質スペクトルとがよく一致している。スコアは、PBSサンプルに対してランク付けされた (MASCOTスコア3)。(MS法の詳細については、Botelho et al. 2010を参照のこと)。

【0083】

プラスミンの共沈:

FceRIaでコーティングされたビーズ (Bioclone FG-102) を、50 µlのヒト血清ミックス (実施例1の通り) 中または50 µlのPBS中で、21時間、900 rpmで振盪しながら、37 にてインキュベートし、次いでPBSで4回洗淨した。還元、S-アルキル化、Gluc消化および質量分光分析のプロトコルは、実施例1に記載の通りに行った。組換えFceRIaタンパク質を、製造業者のプロトコルに従い、ビーズ1 ml当たり1 mgのタンパク質で、1 µmのBcMagヨードアセチル活性化磁気ビーズ (Bioclone FG-102) に結合させた。8 mg/mlのシステインでブロッキング後、ビーズをPBS+0.5% Tweenで3回洗淨した。1xプラスミン消化緩衝液 (0.1 M Tris-HCl、2 mM EDTA、pH 8) をビーズに添加し、次いで、37 にて1時間、示されたプラスミン濃度でインキュベートした。ウェスタンブロット分析のために、ビーズをPBSで3回洗淨し、PBS+0.1% Tweenで3回洗淨した後、LDS緩衝液 (Invitrogen カタログ番号NP0007) およびサンプル還元剤 (Invitrogen カタログ番号NP0009) を添加した。95 で10分間変性させた後、サンプルをNuPAGE Novex 4-12% Bis Trisゲル (Invitrogen NP0322BOX) に負荷し、2時間/70 Vで泳動した。ゲルを、QUICK-TRANSF

ER SYSTEM (Biorad、設定：標準、混合MW、1.3 A、25 V、7分)を用いて膜にプロットし、PBS-T (1 x PBS、0.1% Tween 20)中、1%の脱脂粉乳で2時間、RT (室温)にてブロッキングした。膜を4 でインキュベートすることにより、プラスミンの検出を、PBS-T中、1:5000のマウス抗プラスミノゲン (R&D System、MAB1939)を用いて行った。PBS-Tで30分間洗浄後、1:10000希釈した抗マウスHRPO (Jackson、カタログ番号115-035-068)を、TBS-T中に2時間加え、その後、TBS-Tで最終洗浄し、Clarity ウェスタン ECL 基質 (BioRad 170-5060)により検出した。膜を検出スクリーン (UVP Bioluminescence Imaging Systems、AutoChemi System)に、1~10分間暴露した。

【0084】

実施例2：血漿プロテアーゼによるFcεRIαの切断

FcεRIα (UniProt配列P12319に基づく番号付け)を、血清およびプラスミンとのインキュベーションにより切断した。プロテアーゼ感受性が、組換えFcεRIαを種々の炎症状態の患者に由来する集められたヒト血清と共にインキュベートしたとき観察されたが、PBSと共にインキュベートしたときは観察されなかった。K43での強力な消化のピークが同定された (図2A)。プラスミンインキュベーション (表2.1および表2.2)は、プラスミンが血漿プロテアーゼの優先的な候補である証拠を提供し、K43を、同定された他の切断部位と比較したとき、FcεRIα配列の最も感受性の高いプロテアーゼ切断部位として同定した。

【0085】

組換えwtFcεRIαの位置K43 (図2Bにおいて、ペプチドKと示される)は、優先的に切断されたが、プラスミン切断部位K31、R40、K201、R199、K196およびK142 (図2Bにおいて、ペプチド1-8と示される)は、図2Bに示す通り、37にて1時間、プラスミンとインキュベートしたとき、より低度で切断された。従って、K43は、表2.1および表2.2にまとめられるように、FcεRIαの主要な血漿プロテアーゼ超感受性部位として定義される。重要なことに、N末端領域 (プロテアーゼ感受性K43部位を含む)は、例えば、FcεRIαの構造/機能の考察を提供するために種々の欠失およびキメラ受容体変異体を用いて試験したMallamaciら (1993)の文献に記載の通り、FcεRIαによる適切なIgE結合に関連することが既に示されている。図2Aは、ベースピーククロマトグラム (x軸=時間; y軸=ピーク強度)に示されるように、組換えFcεRIαの血清インキュベーションが未処理FcεRIα (黒線)と比較して消化産物 (灰色線)を生じたことを示す。従って、FcεRIαの消化は、ヒト血清の存在下でのみ起こり、PBS中では起こらなかった。図2Bは、この血清プロテアーゼ活性がプラスミンによって少なくとも部分的に寄与していることを示している。なぜなら、12.5 μg/mlのプラスミンでの組換えFcεRIαの処理により、予期しないことに、K43切断に関連する“ペプチドK” (図2Bに示す通り)が、ベースピーククロマトグラムにおいてより高いピークシグナルを提供したので、他の残基 (例えば、ペプチド1~8など)よりもプロテアーゼ切断に対してより感受性であったことが示されたからである。他の8つの同定されたプラスミン切断部位は、先行技術文献に従い (例えばBackes et al. 2000, Yuan et al 2009またはHervio et al 2000参照)、プラスミン

【0086】

従って、FcεRIα血漿または血清-プロテアーゼ安定性を改善するために、Yuan et al. 2009またはBackes et al. 2000などにより記載されているような、以前に同定されたプラスミンに対する基質特異性と一致する、プラスミンなどのプロテアーゼによる基質

10

20

30

40

50

部位認識を顕著に低下させるアミノ酸変化を導入することが必要である。しかしながら、本発明で同定された最も感受性が高くかつ関連する切断部位、すなわちK43において、実施例2に記載されるように、プロテアーゼに対する基質部位特異性を低下させることが最も重要である。また、K31、R40、K142およびK196、R199およびK201を含む、同定されたより感受性の低いプラスミン切断部位を、単独でまたは組み合わせて置換することは可能ではあるが、それほど好ましくない。一般に、位置43のリシン（すなわち、K43）を、他のアミノ酸（プラスミンの基質部位認識モチーフに属するアルギニンおよびヒスチジンを除く）に変化させると、プラスミン開裂が正電荷アミノ酸を必要とすることが知られているため、K43でプラスミン切断感受性を阻害することができる。しかしながら、プラスミン切断部位での正に荷電したアミノ酸の置換は、FcεRIの折り畳みまたはIgE親和性を変化させるリスクが増すため、FcεRIa機能およびリサイクル可能性に影響を及ぼさない修飾を導入することが最も好ましい。1つの基質認識配列のいくつかの残基を同時に変異させることが可能である。しかしながら、誤って導入される可能性のある望ましくないネオエピトープまたは構造変化のリスクを伴うかもしれない先験的構造変化を最小にすることが好ましい。また、O結合型またはN結合型のオリゴ糖の望ましくない付加を可能にする外来アミノ酸を導入することも望ましくない。

10

20

30

40

50

【0087】

従って、アラニン（A43）による最も好ましい置換は、望ましくない免疫原性のリスクを最小にするために選択された。A43変異したプロテアーゼ抵抗性のFcεRIa（A43-FcεRIaと示される）を、そのタンパク質構造および物理化学的特性に関して可能な限り“天然”のものとして維持するため、A43は、実施例2で実証されているように、FcεRIa血漿/血清-プロテアーゼ抵抗性を供する最も好ましい置換として選択された。アラニン置換は、望ましくない免疫原性、固定化の困難性またはIgE結合の変化をもたらし得る予期せぬ構造変化を導入しない。ネガティブな例として、システインは、予期しない分子間または分子内のジスルフィド架橋を引き起こし得るが、一方、プロリンは、この領域における柔軟なキック帯形成に起因する構造的アーチファクトを引き起こし得る。アルギニン置換は、例えば、それが、プラスミンまたは他のプロテアーゼの基質認識部位に対応するので、少なくとも一部分の消化を提供し得る（例えば、Backes et al 2000参照）。実施例8は、低pHによる溶離後の適切な再折り畳みの必要性および重要性を実証する。

【0088】

プラスミン切断部位は、リシンまたはアルギニンの存在（上記の種の比較と一致する）または時には切断位置のヒスチジンに依存するだけでなく、Backes et al. 2000およびYuan et al 2009によって以前に探索された基質認識配列にも依存する。例として、プラスミン切断部位の位置での必須の正に荷電したアミノ酸と組み合わせて、位置-3のLys、位置-1のチロシン、トリプトファンまたはフェニルアラニンの富化（これは、上記の相同性アラインメントに従って一貫して見出される）は、該部位がプロテアーゼによって構造的に接近可能である限り、基質認識のためのコンセンサスを構成することができる。Yuan et al. 2009はさらに、プラスミン切断部位の位置-3でのアミノ酸の69%が非極性（Backes et al. これらの位置で、リシン、バリン、イソロイシンまたはフェニルアラニンを提案した）であり、位置-2でのアミノ酸の85%が極性であり、位置-1でのアミノ酸の81%が非極性であることを提案した。加えて、Hervio et al. 2000は、バリンが位置-2で富化される一方、セリンが位置+1で富化されることを示唆し、このことは、かかる置換が、FcεRIaのK43切断コンセンサス内で有利ではないことを示唆した。タンパク質構造、切断部位の接近可能性およびグリコシル化のような近くの翻訳後修飾は、プロテアーゼ切断に対する感受性にとって必須の役割を果たす。これは、本発明によって、K43が、表2.2に示すように最も感受性の高いプラスミン切断部位である理由を説明することができる。

【0089】

実施例3からの結果に基づき、K43は、上記に列挙されたいくつかの他の比較的関連

性の低いプラスミン切断部位とは対照的に、実際に最も関連性の高いプラスミン切断部位であることが明らかとなった。従って、本発明の主要な目的は、K43切断部位をプロテアーゼ非感受性にするることである。同時に、FcεRIαの構造的および機能的性質を低下させることなく、FcεRIαの構造および機能を維持しなければならない。治療用アフレスリスによる対外IgE枯渇のため、または血流への受動的投与のためにプロテアーゼ抵抗性FcεRIαを用いるとき、IgE結合を低下させる（新たな）抗原性部位または機能的変化を避けることが重要である。

【0090】

表2.1: 12.5 μg/mlのプラスミンによる組換えFcεRIαのインビトロでの消化により、第4列に示されるような、他のペプチドからのピーク面積と比較したとき、ペプチドKのより高いピーク面積がもたらされる。図2Aに示されるようにヒト血漿とのインキュベーション後に同定されたリシンK43切断は、示されたように他の残基よりもプロテアーゼ開裂に対してより感受性であることが判明した。

【表3】

表2.1

	K43	K31	R40	K201	R199
	ペプチド K	ペプチド1	ペプチド2	ペプチド3	ペプチド4
	VPQKPKVSLNPPWNRIFK	VPQKPK	VSLNPPWNR	VWQLDYESEPLNITVIKAPR EK	VWQLDYESEPLNITVIKAPR
1 9μg プラスミン	2,730,826	1,782,028	865,859	2,091,161	5,327,327
2 4.5μg プラスミン	11,124,410	1,491,372	765,320	1,348,071	2,614,062
3 2.5μg プラスミン	12,498,755	1,044,909	568,157	489,095	1,131,376
4 1.25μg プラスミン	9,497,856	510,133	158,103	92,852	1,882,462

	K196	K142	HSA-K10	HSA-K20
	ペプチド5	ペプチド6	ペプチド7	ペプチド8
	VWQLDYESEPLNITVIK	WFMNGSLSEETNSSLNIVNAKFEDSGEYK	EKYWLQGGGSDAHKSEVAHR	FKDLGEENFK
1 9μg プラスミン	5,365,536	569,716	1,093,384	2,072,889
2 4.5μg プラスミン	3,444,632	374,063	790,074	1,384,042
3 2.5μg プラスミン	1,257,202	169,755	528,529	814,968
4 1.25μg プラスミン	164,452	63,976	246,700	230,108

【0091】

表2.2: 8種の異なるペプチドのピーク面積を比較して、ペプチドKとペプチド1、2、3等との間の比としてそれぞれ表した。過剰なプロテアーゼ濃度（第1列）は、全ての組み合わせの間で同様の比を示したが、より低いプロテアーゼ濃度（第4列）は、異なる切断部位間の有意な差異をもたらし、それ故に、K43部位がより低い濃度で優先的に切断されることが確認された。血清プロテアーゼ切断と一致して、K43は、図2Aからの予想外の発見を裏付ける、他の同定された切断部位よりもプラスミン切断に対してより感受性であった。従って、FcεRIαの治療的使用のためのより高いプロテアーゼ安定性を達成するために、FcεRIαのプロテアーゼ抵抗性変異体を提供することが望ましい。

。

【表 4】

表 2. 2

	K43	K31	R40	K201	R199
	ペプチド K	ペプチド 1	ペプチド 2	ペプチド 3	ペプチド 4
	VPQKPKVSLNPPWNRIFK	VPQKPK	VSLNPPWNR	VWQLDYESEPLNITVIKAPR EK	VWQLDYESEPLNITVIKAPR
1 9 μ g プラスミン		1.53	3.15	1.31	0.51
2 4.5 μ g プラスミン		7.46	145.36	8.25	4.26
3 2.5 μ g プラスミン		11.96	22.00	25.55	11.05
4 1.25 μ g プラスミン		18.62	60.07	102.29	5.05

	K196	K142	HSA-K10	HSA-K20
	ペプチド 5	ペプチド 6	ペプチド 7	ペプチド 8
	VWQLDYESEPLNITVIK	WFHNGSLSEETNSSLNIVNAKFEDSGEYK	EKYWLQGGGSDAHKSEVAHR	FKDLGEENFK
1 9 μ g プラスミン	0.51	4.79	2.50	1.32
2 4.5 μ g プラスミン	3.23	29.74	14.08	8.04
3 2.5 μ g プラスミン	9.94	73.63	23.65	15.34
4 1.25 μ g プラスミン	57.75	148.46	38.50	41.28

10

【0092】

材料および方法：

F c e R I a でコーティングされたビーズ (Bioclone FG-102) を、50 μ l のヒト血清混合物 (実施例 1 に記載のように) と共に、または 50 μ l の P B S 中、37 $^{\circ}$ C にて 21 時間、900 r p m で振盪しながら、インキュベートし、その後、P B S で 4 回洗浄した。還元、S - アルキル化、G l u C 消化および質量分光分析のプロトコールを、実施例 1 と同様に行った。

20

【0093】

インビトロでのプラスミン消化。

組換え F c e R I a タンパク質を、50 m M N H ₄ A c 緩衝液 ~ p H 8 中、0 . 1 2 5 単位の P N G a s e F (R o c h e # 0 6 5 3 8 3 5 5 1 0 3) と共に、37 $^{\circ}$ C にて一晩インキュベートすることにより脱グリコシル化した。タンパク質溶液を、プラスミン反応緩衝液 (0 . 1 M T r i s - H C l 、 2 m M E D T A 、 p H 8) で希釈することにより終濃度 1 μ g / μ L にした。反応混合物を、4 つの異なるプラスミン濃度 (1 . 2 5 - 9 μ g) で、37 $^{\circ}$ C にて 1 時間、インキュベートした。99 $^{\circ}$ C にて 5 分間の熱不活性化により、消化を停止させた。B i o B a s i c C 1 8 カラムへのサンプル充填および質量分光分析を、実施例 1 と同様に行った。

30

【0094】

実施例 3 : プロテアーゼ消化 F c e R I a に対する I g E 結合の低下

ビーズ固定化吸着タンパク質のプラスミン消化による F c e R I a およびプロテアーゼ抵抗性 A 4 3 - F c e R I a の I g E 結合能 (% で表す ; 図 3 参照) 。 F c e R I a の I g E 結合能は、プロテアーゼ抵抗性 A 4 3 - F c e R I a と比較したとき、プラスミン暴露後に顕著に減少し、それ故に、w t 構築物の感受性の増加を示した。

【0095】

図 3 は、野生型 (w t) またはプロテアーゼ抵抗性 A 4 3 - F c e R I a 吸着剤をプラスミンと共にインキュベートしたとき (それぞれ黒線および灰色線) 、 I g E 枯渇が異なる程度まで減少することを示す。高濃度のプラスミンとのインキュベーション後、w t 吸着剤の I g E 枯渇能は 2 3 % (最初の 5 0 n g I g E のうち、1 2 n g に相当) に減少するが、一方で、プロテアーゼ抵抗性変異体 A 4 3 - F c e R I a の枯渇能は、およそ 6 0 % で維持された。x 軸は、固定化された吸着剤を消化するために用いられるプラスミンの量 (μ g) を示し、y 軸は、相対的 I g E 枯渇能を示す。結論として、野生型 F c e R I a 吸着剤のプラスミン消化は、用量依存的にその I g E 枯渇能を低下させ、それにより、タンパク質分解および I g E 結合能から吸着分子を保護することの重要性を強調する。

40

【0096】

材料および方法：

組換え野生型 F c e R I a および A 4 3 - F c e R I a タンパク質を、製造業者のプロ

50

トコールに従って、ビーズ1ml当たり、1-2mgのタンパク質で、1 μ m BcMag ヨードアセチル活性化磁性ビーズ (Bioclone FG-102) に結合させた。8mg/mlのシステインでブロッキングした後、ビーズをPBS+0.5% Tween (PBS-T) で3回洗浄した。同じ量(18 μ g)のFcεRIα結合ビーズを、RT/900rpmで1時間、1xプラスミン消化緩衝液(0.1M Tris-HCl、2mM EDTA、pH8)中、9 μ g/3 μ g/1 μ gおよびw/oプラスミン(Sigma P1867)と共にインキュベートした。PBS-Tで3回洗浄後、5 μ g/mlのIgEを添加したPBS-T中、20%のヒト血清溶液を、RT/900rpmで1時間、被覆ビーズとともにインキュベートした。IgEマスターミックスのIgE含有量は、吸着剤のIgE枯渇効率を決定するために、ビーズインキュベーション前後それぞれのELISAによって測定した。ELISA EC50およびプラスミン処理した吸着剤で枯渇させた後の上清に残った推定IgE量から、相対枯渇能を計算した。

【0097】

IgE結合アッセイ:

IgE結合を、ELISAプレート上に2 μ g/mlのBSW17マウス抗ヒトIgE抗体(NBS-C 0910-1-100)50 μ lをコーティングし、その後ブロッキングし(1xPBS/1%BSAブロッキング緩衝液)、そしてRTで1時間、“ビーズインキュベーション前後のIgEサンプル”と共にインキュベートして、ELISAにより測定した。その後、IgE検出のために、1 μ g/mlの抗IgE-HRPo mAb(Novus Biologicals NBP1-74934)を、RTで1時間インキュベートし、次いで、標準ABTS(Merck 8.22287.100)反応を行った(OD405で測定)。EC50を、非線形回帰曲線フィッティングモデル(Graphpad(登録商標))に基づいて計算した。

【0098】

実施例4:プロテアーゼ抵抗性FcεRIα変異体の作製

主なプロテアーゼ感受性K43部位のプラスミンによる切断を防ぐために、正に荷電した切断部位を、上記の実施例2に記載のように、プラスミンのタンパク質基質特異性に関する知識に基づいて、アミノ酸位置43の小さい非荷電部位、例えばアラニン、グリシン、セリンまたはチロシンに交換することが必要であった。これに対して、これらのアミノ酸は望ましくないタンパク質折り畳みアーチファクト(例えば、予測できないジスルフィド結合による)を提供し得るか、またはエピトープに参加する一般的な傾向のためにそれらが望ましくないネオエピトープを提供し得るため、位置K43を荷電芳香脂肪族アミノ酸またはシステインで交換することは望ましくない。例えば、プロリンまたはグリシンは、エピトープ領域における屈曲または可撓性が形成されている可能性があるため、Singhら(2013)によって以前に決定されたように、コアエピトープ構造に頻繁に関与することが知られている。そのようなネオエピトープは、アフレスシス処理の間に吸着タンパク質を放出することにより該生体に関連するようになり、吸着タンパク質の人工ネオエピトープに対する望ましくない抗体の誘導をもたらす。不適切なタンパク質折り畳みおよび望ましくないネオエピトープの出現の可能性を最小限に抑えながら、同時に折り畳みおよび抗原性についての最小限の構造変化を可能にするために、K43部位を、最も優先的に、アラニンまたはセリンもしくはチロシンのような別の小さなアミノによって、あるいは可能ではあるが、あまり好ましくはないグリシンによって突然変異誘発することが必要である。最も好ましい実例としては、K43 A43変異が実施例2に示され、この置換が、FcεRIαの最小の構造変化のためにIgE吸着の完全な機能性を保持しながら、同時にプロテアーゼ抵抗性を提供することが実証されている。異なる部位における多くの他の突然変異(例えばMackay et al 2002参照)とは対照的に、本発明の最も好ましいK43 A43修飾は、タンパク質を血漿プロテアーゼ抵抗性にするのを除いて、FcεRIαの機能的特性を変化させない。さらに、この置換は、実施例2および4に示されるように、哺乳動物の発現系による組換えFcεRIαの沈降傾向に影響を及ぼさない。K43 A43変異は、実施例5-7に示されるように、IgE結合および変性/リサイクル後の適切な再折り畳みを維持しながら、K43でのプロテアーゼ切断からの保護を提供す

10

20

30

40

50

る。この部位における構造変化および抗原性のリスクを最小限に抑えるために、周囲のアミノ酸（すなわち、K 43のN末端またはC末端の4つまでのアミノ酸位置）を置換または欠失することは可能であるが望ましくなく、不要である。

【0099】

実用性を証明するために、位置K 43でプラスミンによって切断することができないA 43 - F c e R I a吸着変異体を構築した。プロテアーゼ抵抗性吸着剤は、アフェレシス中の血清への吸着剤フラグメントの望ましくない流出のリスクの低下と併せて増大した安定性、より長い耐久性、または投与された生物学的治療剤として適用されたときの分解傾向の低下をもたらす。同時に、改善された吸着剤A 43 - F c e R I aは、実施例6に示されるようにI g Eに対する高い親和性を維持する。

10

【0100】

図4は、野生型受容体消化ピークが30分に現れるのに対して（灰色線）、組換えA 43 - F c e R I aの変異体であるプロテアーゼ抵抗性変異体（黒線）において切断産物が完全に存在しないことを示す塩基ピーククロマトグラムを示す。

【0101】

材料および方法：

分析は、実施例2に記載のように、プロテアーゼ抵抗性A 43 - F c e R I aとプラスミンとのインキュベーション後の質量分析によって行った。

【0102】

実施例5：A 43 - F c e R I aは、F c e R I aの特性を変化させず、s c F v 12よりもその利点を維持する（E L I S A）

20

プロテアーゼ抵抗性A 43 - F c e R I a吸着剤は、捕捉E L I S AによるI g E結合を比較するとき、野生型F c e R I aまたは先行技術の一本鎖抗体s c F v 12（W O 2 0 1 2 / 1 4 0 2 1 4 A 1）と比較した場合にI g Eと同様の親和性、アビディティ（Avidity）および特異性を有する。プレートを捕捉抗体でコーティングし、S c F v 12およびF c e R I aトランスフェクト細胞に由来するH E K細胞精製組換えタンパク質をブロックした後、コーティングしたタンパク質を、R Tにて1時間、インキュベートした。1 μ g / mlのI g E（N B S - C 0 9 1 1 - 0 - 1 0 0）を、R Tにて1時間捕捉し、1 μ g / mlの抗I g E - H R P O m A B（Novus Biologicals N B P 1 - 7 4 9 3 4）を用いて、R Tにて1時間、I g E結合を検出した。図5は、計算されたE C 5 0値（F c e R I a、A 43 - F c e R I aおよびS c F v 12それぞれについて、24.5 ng / ml、34.4 ng / mlおよび42.8 ng / ml）およびA 43 - F c e R I aへのI g E結合の曲線形状は、F c e R I a配列の位置43でのK A変異の負の効果を示さない、w t - F c e R I aまたはs c F v 12と同様であることを示す。

30

【0103】

実施例6：可溶性I g Eに対するA 43 - F c e R I a、F c e R I aおよびs c F v 12の同等の親和性

I g E / F c e R I aおよびI g E / S c F v 12相互作用の親和性および動態。両組換えF c e R I a変異体（すなわち、w tおよびA 43変異体）のK Dおよび結合/解離動態は、高度に同等であり（K D ~ 4 x 1 0 e - 1 0）、実施例6、表3を参照すると、位置43でのA A - 交換がI g E結合能または質に影響を及ぼさないことが示されている。表3において、3つの構築物の各々について計算されたK Dと共に、オンレート値およびオフレート値が列挙されている。S c F v 12結合動態は、F c e R I a結合動態とは異なる。

40

【表5】

	WT-FcεRIα	A43-FcεRIα	ScFv12
ka (1/MS)	1,10E+06	1,30E+06	4,11E+05
kd(1/s)	5,20E-04	4,92E-04	1,64E-04
KD	4,73E-10	3,79E-10	4,00E-10

表3

【0104】

10

FcεRIα変異体について、オンレートは、scFv12 (ka値 ~ 4 × 10⁵) と比較して、より速かった (ka値 ~ 1 × 10⁶)。同時に、解離速度は、scFv12 (kd ~ 1,6 × 10⁻⁴) と比較したとき、FcεRIα変異体 (kd値 ~ 5 × 10⁻⁴) においてより速かった。反対に、IgE結合のオフレートは、scFv12と比較したとき、FcεRIαについて増加した。原則として、これは、カラムへのより速いIgE吸着が望まれる治療的アフェレシス設定に影響を与える可能性がある。注目すべきことに、より速いオフレートは、臨床アフェレシスにおける流速について、およびアフェレシスカラムの固体支持マトリックス上の吸着剤分子の必要なコーティング密度について、吸着剤のリサイクル (実施例7で実証されているように) に対する顕著な実際的な影響を有する。あるいは、例えば、IgEブロッキングのための生物学的治療剤として

20

【0105】

材料および方法：

HBS-EP (0.01 M HEPES、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.005% (v/v) 界面活性剤 P20 (pH 7.4) (GE Healthcare カタログ番号 BR-1001-88) 中で 2 μg/ml まで希釈したビオチニル化抗 Tag-mAb (Abcam ab10241) の 200 μl 注入に続いて 20 μl の 50 mM NaOH を 3 回注入することにより、ストレプトアビジン (SA) センサーチップ (GE Healthcare Biacore、カタログ番号 BR-1000-32) の表面を調製して、フローセル4上に捕捉するための ~ 2500 RU の固定化レベルが得られた。1 mM D-ビオチン (Sigma # 47868) の 2 回の連続した 100 μl 注入により、遊離 SA 結合部位を飽和させた。フローセル3を遊離 D-ビオチンで飽和させ、対照セルとして用いた。100 RU の IgE 結合の最大応答を得るために必要とされる、FcεRIα変異体および scFv12 の捕捉レベルを、それぞれ 75 RU および 80 RU と算出した。従って、FcεRIα、A43-FcεRIα および scFv12 を HBS-EP で希釈し、90 RU の固定化レベルに達するまで、フローセル3および4 (30 μl/分) に注入した。ランニングバッファの注入で10分の安定化後、それぞれ 75 RU および 80 RU の最終捕捉レベルが得られた。最後に、FcεRIα、A43-FcεRIα および scFv12 の、2 倍増加濃度 (出発濃度、0.5 nM; 最大濃度、64 nM) で HBS-EP ランニング緩衝液を用いて希釈した IgE (NBS-C0911-0-100) との個々の相互作用を、30 μl/分の

30

40

【0106】

実施例7：FcεRIαは、低pH処理に抵抗性であり、それ故に、臨床IgEアフェレシスにおける吸着/溶離のリサイクルおよび品質モニタリングが可能になる。

ビーズ上に FcεRIα および scFv12 を等しく固定化した後、インピトロで Ig

50

E吸着させると、I g Eはp H 3 . 4 処理によってF c e R I aからほぼ完全に溶離することができ、一方で、I g Eは図6に示すようにS c F v 1 2からは放出されなかった。図6のy軸は、溶出前および溶出後のビーズ上で測定されたI g Eシグナル(それぞれ黒色バーおよび白色バー)を示す。x軸は、使用した固定化吸着剤をそれぞれ示す。この結果は、実施例6に示されるように、s c F v 1 2と比較したときのF c e R I aの短いオフレートと一致する。低p Hはs c F v 1 2を分解し得るため(実施例8に示されるように)、s c F v 1 2は、s c F v 1 2ベースのアフェレシスカラムが、一回のみ使用するよう設計されているという製造業者の注記(https://www.fresenius.com/5689_5968.htm)と一致して、低p H条件下でのI g E吸着には適していないと結論づけられる。一本鎖ベースの吸着剤に対するF c e R Iベースの吸着剤のこの予期されない利点は、高価なアフェレシスカラムのリサイクルおよび再利用のための重要な実用的側面を表す。さらに、吸着剤を分解することなく、各アフェレシスサイクル後に、溶離したI g Eまたは自己抗体物質の正確な定量化は、処置効果をモニタリングするための極めて重要な臨床的数値を提供し得る。本発明により、F c e R Iベースの吸着剤は、この側面を容易にするが、p H感受性のs c F vベースの吸着剤は容易にしない。

10

20

30

40

50

【0107】

材料および方法：

組換えF c e R I aおよびS c F v 1 2タンパク質は、1 μ mのB c M a gヨードアセチル活性化磁気ビーズ(Bioclone FG-102)に、製造業者のプロトコールに従って、1 m lのビーズ当たり1 m gのタンパク質で結合させた。1 μ g / m lのマウス抗F c e R I抗体(Acris SM2251PS)および5 0 μ lの0 . 4 μ g / m lヤギのマウスI g G H R P Oを検出用に用いて、ビーズ上への等量のタンパク質ローディングをビーズE L I S Aにより評価した。8 m g / m lのシステインでブロッキングした後、ビーズをP B S + 0 . 5 % T w e e nで3回洗浄した。5 μ g / m lのI g EをスパイクしたP B S - T中の2 0 %ヒト血清溶液を、コーティングビーズと共に1時間 / 室温 / 9 0 0 r p mでインキュベートした。ビーズを3 0 0 μ lのP B S - Tで3回洗浄し、I g Eを1 0 0 m Mのグリシン緩衝液(p H 3 . 4)で溶出して、0 . 5 M T r i s (p H 8)で中和した。溶出前および溶出後のビーズ上のI g E量を確認するために、ビーズE L I S Aを行った。ビーズE L I S Aのために、ビーズをP B S - Tで3回洗浄し、ブロッキング緩衝液(P B S - 1 % B S A)で1時間 / R T / 9 0 0 r p mでブロッキングした。5 0 μ lの1 μ g / m l I g E (NBS-C0911-0-100)をビーズに添加し、1時間 / R T / 9 0 0 r p mでインキュベートした。ビーズをP B S - 0 . 5 % T w e e nで3回洗浄し、1 μ g / m lの抗I g E - H R P O m A B (Novus Biologicals NBP1-74934)と共にインキュベートし、その後、4 0 5 n mで標準A B T S (Merck 8.22287.100)反応検出を行った。

【0108】

実施例8：I g E吸着剤の低p H処理および血清を伴うまたは伴わない再生

アフェレシスにおける吸着効率をモニタリングするためには、血漿パラメーターを測定する必要があるだけでなく、吸着された物質についての定量的な情報を提供することも必要である。分析目的のために分解する必要のない臨床診療のための吸着剤を提供することが好ましい。F c e R I aは、これらの基準を満たしており、臨床診療における吸着効率をモニタリングするためのI g Eまたは可能性のある自己抗体(例えば、慢性自己免疫性蕁麻疹に見出だされる)の溶離を可能にする。従って、アフェレシスサイクルの間に実際的な変性条件を適用するには強すぎない吸着剤を提供することが必要である。これは、吸着剤が、例えば低p H処理などの過酷な条件下で、その結合能力を失うことなく、溶離後に再生する能力を有する場合にのみ達成することができる。同時に、そのような吸着カラムの使用者は、例えば、捕捉されたI g Eまたは自己抗体物質の臨床目的および有効性評価の定量化を可能にするために、捕捉された材料がリサイクル後どの程度放出されたかを確認しなければならない。先行技術のs c F v 1 2吸着剤に対する野生型およびプロテアーゼ抵抗性F c e R I a吸着剤の再生能を試験するために、これらの吸着剤のI g E結合能を、数サイクルの変性 / 再生後に直接比較した。1 0 0 m Mのグリシンp H 1 . 8の反

復注射は、図7Aに示すように、両FcεRIα吸着剤のIgE結合能を適度に低下させたが、ScFv12のIgE結合能は<15%に劇的に低下した。さらに、この実験は、プロテアーゼ抵抗性を提供する修飾が、FcεRIαベースの吸着剤に対するpH感受性またはIgE結合能に何ら不利益を与えないことを確認する。図7Bは、数サイクルにわたって吸着剤の能力を維持するために、生理的条件下での変性/再生条件の重要性を裏付けるBiacoreチップ(血清注射なし)上の穏やかな酸性条件(pH3)下でのIgE結合の相対的損失を示す。プロテアーゼ抵抗性FcεRI吸着剤に対する血清環境の安定化/再生効果は、図7Bに示す血清再生のない条件と比較して、図7A(血清再生を伴う)においてIgE結合能の中程度の低下に反映される。実施例7の結果と一致して、これらの条件のいずれも、pH3またはpH1.8のIgEの溶離後の先行技術のscFv12吸着剤を再生できなかった。その改善された安定性のために、A43-FcεRIαは、野生型FcεRIαまたはscFv12のリサイクル可能な代替物として提案されている。本発明は、各アフレスシサイクルの後に改善された商品コストおよび容易化された吸着効力のモニタリングを提供する。より一般的には、A43-FcεRIαはまた、注射用生物学的治療剤(の成分)として意図されるとき、改善された血液、血漿または血清プロテアーゼ安定性も提供する。

【0109】

材料および方法：

Biacoreを用いた血清注射の有無における、pH3での繰り返し再生後のIgE結合能の相対的損失。

チオール-リガンド-カップリングを、製造者の指示(GE-Healthcare BR-1005-57から購入したチオールカップリングキット)に従って実施した。簡潔には、CM5センサーチップ(GE Healthcare Biacore、BR1000-12)の個々のフローセル(Fc)の表面を、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)およびN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)の1:1混合物を35μl注入し、次いで、50mMホウ酸ナトリウム緩衝液(pH8.5)に溶解した80mMの2-(2-ピリジニルジチオ)エタンアミン塩酸塩(PDEA)を35μl注入した。リガンドを、50mMの酢酸ナトリウムpH4.5に溶解した10μg/mlの濃度で、約1200RUのレベルまで注入した。チップ表面は、約1000RUの最終的な固定化レベルをもたらす50mMのL-システインを35μl注入することにより飽和した。固定化されたリガンドの順序：Fc1：K43del-FcεRIα(すなわち、アミノ酸1-37からの欠失を有する陰性対照)；Fc2：(野生型)FcεRIα；Fc3：(プロテアーゼ抵抗性)A43-FcεRIα；Fc4：scFv12(すなわち、先行技術の一価IgE吸着剤)。ランニングバッファーとしてHBS-EPを用いて、5μl/分の流速で完全な固定化手順を実施した。固定化後、IgE結合後の100mMのグリシンpH3の反復注射を用いて、リガンドに対するIgE結合能の安定性を評価した。従って、図7に示すように、100mMのグリシンpH3(=サイクル1)を20μl注入した後、Fc2、3および4の飽和レベルに達するまで、IgE(10μg/ml)を注入した。次いで、再び600μlのIgE(10μg/ml)および2x5μlの100mMグリシンpH3を注入した(=サイクル2)。3回目のIgE/再生サイクルは、200μlのIgE(10μg/ml)および5μlの100mMグリシンpH3(=サイクル3)を含み、4回目のIgE/再生サイクルは、100μlのIgE(10μg/ml)および5μlの100mMグリシンpH3を含んだ。最大IgE結合能を各サイクルについて評価した。各リガンド/フローセルについての最大IgE結合能の参照減算RU(Fc2-1、3-1、4-1)を、各フローセル上の100mMグリシンpH3での最初の再生前の飽和レベルに対して正規化し、図7A/7Bにパーセントで示す。流速および緩衝液を、実施例6と同様のものを用いた。

【0110】

血清を用いてpH3で反復再生した後のIgE結合能の相対的損失。

チップの固定化を、非血清条件について上記のように行った。固定化後、600μlの

IgE (10 µg/ml)、その後50 µlの健常ドナー由来の純粋なヒト血清を注入し、10 µlの100 mMグリシンpH 1.8を用いて再生を行った。600 µlのIgE (10 µg/ml)および10 µlの100 mMグリシンpH 1.8それぞれを用いたさらに2回の連続したIgE/再生-注入サイクルを行い、最大IgE結合能を評価した。各リガンド/フローセルの最大IgE結合能を、各フローセル上の100 mMグリシンpH 1.8での最初の再生前胃の飽和レベルに対して正規化し、パーセントで示した。固定化後の全ての注入を、HBS-E Pをランニング緩衝液および希釈緩衝液として用いて30 µl/分の流速で行った。

【0111】

実施例9：組換えFcεRIaを用いるIgEアフェレシスのインビボ適用

体外IgE枯渇のための選択的IgE吸着剤としての組換えFcεRIaの有用性を実証するために、80 µgのヒトIgE (NBS-C0911-0-100)を、6匹のWistarラットの血流に完的に埋め込まれたカニューレを介して注入した。治療アフェレシスのこの前臨床モデルでは、4匹の動物を、FcεRIa結合CIMモノリスカラム (BIA Separations #34003)を有するアフェレシス装置に繋ぎ、そして2匹の対照ラットをMock (空の)カラムを有するアフェレシス装置に繋いだ。アフェレシス時間、流速および濾過血漿容量を、表4に示す。

【0112】

【表6】

動物	濾過血漿容量 (ml)	アフェレシス時間(分)	流速 (µl/分)	溶出液中のIgE (µg)
FcεRI-Rat-S 37	8,92	75	120	6,83
FcεRI-Rat-S 47	10,31	75	120-150	16,24
FcεRI-Rat-S 49	8,77	75	120	21,43
FcεRI-Rat-S 50	8,44	60	150	9,96

表4

【0113】

このインビボでの設定 (例えばWallukat et al. 2012に既報の通り)を用いて、最後のカラムに示すように、6 µgから21 µgの間のIgE (アフェレシスカラムからの“mock-rats”溶出液のバックグラウンドシグナルを差し引いた後)を溶出させることができる。結論として、このことは、FcεRIaが、アフェレシスのためのインビボモデルにおける末梢血からの体外IgE枯渇のために用いられ得ることを初めて実証する。注射可能な治療剤として用いるための先行例に加えて、これは、治療的使用におけるFcεRIaの有用性を裏付けるものである。

【0114】

材料および方法：

体重が250 gまでのWistarラットを1週間馴化させた。動脈および静脈カテーテルは、アフェレシスセッションが始まる1週間前に慢性的に移植された。使用したカラムは、CIMモノリスカラム (BIA Separations 313.7175)であり、製造業者のプロトコールに従ってFcεRIaとカップリングさせた。ブロッキングのために、0.5 Mのリン酸Na緩衝液 (pH 8.0)中の100 mMのシステインを用いた。最後に、3.5 mgのタンパク質を1 mlカラムに結合させた (BIA Separationsプロトコールに従って)。2匹の動物がmockカラムで処理した対照群を構成し、4匹の動物を示したように“処置群” (FcεRIaカラム)に用いた。体重を、カニューレの移植から、アフェレシス後まで、週2~3回定期的に測定した。血漿中のIgE濃度を実施例3に記載のようにELISAによって測定した。観察後、動物を麻酔し (セボラン)、心臓穿刺により血漿を採取し、さらなる分析のために凍結した。アフェレシス設定：IgE適用の5分前に、ラットから血清を採取した。0時点で、80 µgのヒトIgE (NBS-C0911-0

- 100) を各動物に適用した。I g E 適用の 15 分 / 20 分 / 25 分後に、血漿 I g E 測定のために血液サンプルを採取した。I g E 注射の 30 分後、動物をアフレスカラムに接続し、アフレススを流速に応じて 60 - 75 分間行った。血液サンプルを、手順中のアフレスス開始の 30 分後およびアフレスス後のいくつかの時点で採取した。

【0115】

本発明の好ましい態様は、以下のとおりである：

1. 高親和性 I g E 受容体アルファ鎖 (F c e R I a)、とりわけヒト F c e R I a であって、ここで、位置 43 のアミノ酸リシン (K 43) が、アラニン、セリン、チロシン、イソロイシン、ロイシン、アスパラギン、アスパラギン酸、メチオニン、フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン、グルタミン、トリプトファン、グリシンおよびバリンからなる群より選択されるアミノ酸、好ましくはアラニン、グリシン、セリンまたはチロシン、とりわけアラニンで置換されている、F c e R I a。

2. 配列番号 1 のアミノ酸配列を有する F c e R I a であって、ここで、位置 43 のアミノ酸リシン (K 43) が、アラニン、セリン、チロシン、イソロイシン、ロイシン、アスパラギン、アスパラギン酸、メチオニン、フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン、グルタミン、トリプトファン、グリシンおよびバリンからなる群より選択されるアミノ酸、好ましくはアラニン、グリシン、セリンまたはチロシン、とりわけアラニンで置換されている、態様 1 に記載の F c e R I a。

3. さらにアミノ酸、好ましくは位置 31 のリシン (K 31)、位置 40 のアルギニン (R 40)、位置 41 のイソロイシン (I 41)、位置 42 のフェニルアラニン (F 42)、位置 44 のグリシン (G 44)、位置 45 のグルタミン酸 (E 45)、位置 142 のリシン (K 142)、位置 196 のリシン (K 196)、位置 199 のアルギニン (R 199) および位置 201 のリシン (K 201) からなる群より選択されるアミノ酸、とりわけ位置 31 のリシン (K 31)、位置 40 のアルギニン (R 40)、位置 142 のリシン (K 142)、位置 196 のリシン (K 196)、位置 199 のアルギニン (R 199) および位置 201 のリシン (K 201) からなる群より選択されるアミノ酸が置換されている、態様 1 または 2 に記載の F c e R I a。

4. F c e R I a が固体表面上に固定化されている、態様 1 から 3 のいずれかに記載の F c e R I a。

5. アルファ鎖、ベータ鎖および 2 つのジスルフィド架橋によって連結された 2 つのガンマ鎖を含む F c e R I であって、ここで、該アルファ鎖が、態様 1 から 4 のいずれかに記載の修飾アルファ鎖である、F c e R I。

6. I g E 媒介性疾患の予防および / または処置における使用のための、態様 1 から 4 のいずれかに記載の F c e R I a であって、ここで、該 F c e R I a が、アフレススにおいて、ヒト体液、とりわけヒト血漿または血清から過剰の I g E を枯渇させるために使用される (抗 I g E 療法)、F c e R I a。

7. I g E 媒介性疾患が、アレルギー性疾患、好ましくは季節性、食物、花粉、カビ孢子、有毒植物、薬物 / 薬剤、昆虫の毒、サソリ毒または蜘蛛毒、ラテックスまたはハウスダストダニアレルギー、ペットアレルギー、アレルギー性鼻炎および結膜炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性気管支喘息、非アレルギー性喘息、チャグ・ストラウス症候群、アトピー性皮膚炎、鼻のポリープ症、木村病；接着剤、抗菌剤、香料、染髪剤、金属、ゴム成分、局所用医薬、ロジン、ワックス、艶出し剤、セメントおよび皮革に対する接触性皮膚炎；性鼻副鼻腔炎、アトピー性湿疹、I g E 関連自己免疫性疾患、好ましくは慢性 (特発性) および自己免疫性蕁麻疹、コリン作動性蕁麻疹、肥満細胞症、とりわけ皮膚肥満細胞症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、慢性または再発性特発性血管浮腫、間質性膀胱炎、アナフィラキシー、とりわけ特発性および運動誘発性アナフィラキシー、免疫療法、好酸球関連疾患、好ましくは好酸球性喘息、好酸球性胃腸炎、好酸球性中耳炎および好酸球性食道炎；リンパ腫、好ましくは胃または十二指腸の潰瘍または逆流のための抗酸性療法の感作副作用からなる群より選択される、態様 6 に記載の使用のための F c e R I a。

10

20

30

40

50

8. ヒト個体の血流と接触するのに適した固体担体に結合されている、態様6または7に記載の使用のためのFcεRIa。

【0116】

9. 血流または血漿流と接触することができる固体担体を含むアフェレシス装置であって、該固体担体が、態様1から4のいずれかに記載のFcεRIaを含むことを特徴とする、アフェレシス装置。

10. 担体が無菌かつ発熱物質不含有のカラムであることを特徴とする、態様9に記載の装置。

11. IgE結合分子をさらに含むことを特徴とする、態様9または10に記載の装置。

12. IgE関連疾患の予防および/または処置のための、とりわけ抗IgE療法を行うための、予防および/または処置装置を提供するための、態様9から11のいずれかに記載の装置の使用。

13. 態様1から4のいずれかに記載のFcεRIaを含む固体アフェレシス担体を含む、IgE関連疾患の予防および/または処置における使用のためのキットであって、ここで、該担体が無菌かつ発熱物質不含有のカラムである、キット。

14. 治療方法における使用、とりわけIgE関連疾患の予防または処置における使用のための、態様1から4のいずれかに記載のFcεRIa。

15. 注射可能な生物学的治療剤としての、態様14に記載の使用のためのFcεRIa。

16. さらにIgE低下療法と組み合わせて用いられる、態様14または15に記載の使用のためのFcεRIa。

17. 態様1から4のいずれかに記載のFcεRIaおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

18. 組成物が投与される患者において半減期を増加させる薬剤をさらに含む、態様17に記載の医薬組成物。

19. 半減期を増加させる薬剤が、ヒト血清アルブミン(HSA)またはPEG化などの化学修飾である、態様18に記載の医薬組成物。

20. サンプル、とりわけ血漿サンプルを含むプロテアーゼにおけるIgE検出のためのリサイクル可能なプローブとしての、態様1から4のいずれかに記載のFcεRIaの使用。

21. 該プローブが、ELISAまたはSPRアッセイにおいて用いられる、態様20に記載の使用。

【0117】

22. - リンカー分子、好ましくはペプチドリナー、とりわけ1から10個、好ましくは2から5個のアミノ酸残基からなるペプチドリナー; および/または

- 治療分子もしくは診断分子、好ましくはモノクローナル抗体もしくは抗体フラグメント、サイトカイン、抗体様構造、細胞毒性薬もしくは阻害剤、光学トレーサー; および/または

- 担体、好ましくは担体タンパク質、とりわけヒト血清アルブミン、トランスフェリンもしくはFcドメイン

に結合された、態様1から4のいずれかに記載のFcεRIa。

23. FcεRIaが細胞毒性薬と結合されている、態様22に記載のFcεRIa。

24. アレルギー性疾患または他のIgE媒介性疾患の処置における使用のための、態様22または23に記載のFcεRIaであって、ここで、FcεRIaが、IgE B細胞受容体発現細胞へ細胞毒性薬もしくは阻害剤を送達して、これらの細胞のIgE産生血漿細胞への分化を阻止するために用いられる、FcεRIa。

25. アレルギー性疾患、好ましくは季節性、食物、花粉、カビ孢子、有毒植物、薬物/薬剤、昆虫の毒、サソリ毒または蜘蛛毒、ラテックスまたはハウスダストダニアレルギー、ペットアレルギー、アレルギー性鼻炎および結膜炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性気管支喘息、非アレルギー性喘息、チャグ・ストラウス症候群、アトピー性皮膚炎、

10

20

30

40

50

鼻のポリープ症、木村病；接着剤、抗菌剤、香料、染髪剤、金属、ゴム成分、局所用医薬、ロジン、ワックス、艶出し剤、セメントおよび皮革に対する接触性皮膚炎；性鼻副鼻腔炎、アトピー性湿疹、I g E 関連自己免疫性疾患、好ましくは慢性（特発性）および自己免疫性蕁麻疹、コリン作動性蕁麻疹、肥満細胞症、とりわけ皮膚肥満細胞症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、慢性または再発性特発性血管浮腫、間質性膀胱炎、アナフィラキシー、とりわけ特発性および運動誘発性アナフィラキシー、免疫療法、好酸球関連疾患、好ましくは好酸球性喘息、好酸球性胃腸炎、好酸球性中耳炎および好酸球性食道炎；リンパ腫、好ましくは胃または十二指腸の潰瘍または逆流のための抗酸性療法の感作副作用からなる群より選択される疾患の処置における使用のための、態様 2 2 から 2 4 のいずれかに記載の F c e R I a。

10

2 6 . 配列番号 2 または 3 の、少なくとも I g E 結合領域およびプロテアーゼ抵抗性領域を含む、態様 1 から 2 5 のいずれかに記載の F c e R I a のフラグメント。

2 7 . 配列番号 2 または 3 の、アミノ酸 2 6 ~ 2 0 5、好ましくはアミノ酸 3 0 ~ 1 9 3 を含む、態様 2 6 に記載のフラグメント。

2 8 . ヒト個体の血流と接触するのに適した固体担体に結合されている、態様 2 6 または 2 7 に記載の F c e R I a フラグメント。

2 9 . 血流または血漿流と接触することができる固体担体を含むアフエレシス装置であって、該固体担体が、態様 2 6 または 2 7 に記載の F c e R I a フラグメントを含むことを特徴とする、アフエレシス装置。

3 0 . I g E 関連疾患の予防および / または処置のための、とりわけ抗 I g E 療法を行うための、予防および / または処置装置を提供するための、態様 2 9 に記載の装置の使用。

20

3 1 . 態様 2 6 または 2 7 に記載の F c e R I a フラグメントを含む固体アフエレシス担体を含む、I g E 関連疾患の予防および / または処置における使用のためのキットであって、ここで、該担体が無菌かつ発熱物質不含有のカラムである、キット。

【 0 1 1 8 】

参考文献：

Backes et al.; Synthesis of positional-scanning libraries of fluorogenic peptide substrates to define the extended substrate specificity of plasmin and thrombin . Nat Biotechnol. 2000 Feb;18(2):187-93. Erratum in: Nat Biotechnol 2000 May;18(5):559. PubMed PMID:10657126

30

Bennich & Ishizaka et al.; Immunoglobulin E. A new class of human immunoglobulin. Immunochemistry. 1968 Jul;5(4):327-8. PubMed PMID: 4103909

Bootz F, Neri D. Immunocytokines: a novel class of products for the treatment of chronic inflammation and autoimmune conditions. Drug Discov Today. 2015 Oct 23. Review. PMID: 26526566

Botelho et al.; Top-down and bottom-up proteomics of SDS-containing solutions following mass-based separation. J Proteome Res. 2010 Jun 4;9(6):2863-70. doi: 10.1021/pr900949p. PubMed PMID: 20377267.

40

Chen et al. Fusion protein linkers: property, design and functionality. Adv Drug Deliv Rev. 2013 Oct;65(10):1357-69. Review. PMID: 23026637

Derfler et al.; Effective and safe in vivo IgE-depletion by a novel IgE-adsorber (IgEnio), EAACI Online Library, Jun 6, 2015; 103776

Digan et al.; Patent WO 1998/004718 A1

50

Dullaers et al.; The who, where, and when of IgE in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2012, 129(3):635-45. PubMed PMID: 22168998.

Galli & Tsai; IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med.* 2012;18(5):693-704. doi: 10.1038/nm.2755. Review. PubMed PMID: 22561833

Garman et al.; Crystal structure of the human high-affinity IgE receptor. *Cell.* 1998 Dec 23;95(7):951-61. PubMed PMID: 9875849.

10

Gould et al.; Patent WO 99/05271 A1

Hervio LS, et al.; Negative selectivity and the evolution of protease cascades: the specificity of plasmin for peptide and protein substrates. *Chem Biol.* 2000 7(6):443-53. PubMed PMID: 10873836.

Hogarth et al.; Patent WO 96/08512 A1, US 8,729,247 B2 (Austin Research Institute)

Holgate; *World Allergy Organ J.* 2014 Jul 29;7(1):17. doi: 10.1186/1939-4551-7-17. eCollection 2014. Review. PMID: 25097719

20

Huber et al.; Patent WO 2000/032767 A1

Incorvaia et al.; Omalizumab, an anti immunoglobulin E antibody: state of the art. *Drug Des Devel Ther.* 2014 Feb 7;8:197-207. doi: 10.2147/DDDT.S49409. eCollection 2014. PubMed PMID: 24532966; PubMed Central PMCID: PMC3923619.

Kasperkiewicz et al.; Improvement of treatment-refractory atopic dermatitis by immunoabsorption: a pilot study. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Jan;127(1):267-70, 270.e1-6. doi: 10.1016/j.jaci.2010.07.042. Epub 2010 Oct 20. PubMed PMID: 20970174.

30

Kerzel et al.; Plasmapheresis prior to omalizumab administration in a 15-year-old boy with severe asthma and very high IgE levels: sustained effect over 2 years. *Klein Padiatr.* 2011 Nov;223(6):356-9. doi: 10.1055/s-0031-1287824. Epub 2011 Oct 19. PubMed PMID: 22012605.

Lebedin et al.; Ex vivo removal of IgE in atopic asthma by extracorporeal plasmapheresis (EPIA): development of a clinical adsorbent. *Int J Artif Organs.* 1991 Aug;14(8):508-14. PubMed PMID:1937940.

40

Licari et al.; The discovery and development of omalizumab for the treatment of asthma. *Expert Opin Drug Discov.* 2015;10(9):1033-42. doi: 10.1517/17460441.2015.1048220. Epub 2015 May 15. PubMed PMID: 25979110.

Lingyun Jia et al.; Patent CN 102660569 A

Lowe et al.; Revision of omalizumab dosing table for dosing every 4 instead of

50

- 2 weeks for specific ranges of bodyweight and baseline IgE. Regul Toxicol Pharmacol. 2015 Feb;71(1):68-77. doi:10.1016/j.yrtph.2014.12.002. Epub 2014 Dec 8. PubMed PMID: 25497995.
- Lupinek et al.; Trimolecular complex formation of IgE, Fc epsilon RI, and a recombinant nonanaphylactic single-chain antibody fragment with high affinity for IgE. J Immunol. 2009 Apr 15;182(8):4817-29. doi: 10.4049/jimmunol.0800726. PubMed PMID: 19342660.
- Lupinek et al.; WO 2012/140214 A1; Patent US 2014/0124448 A1 10
- Mackay et al.; Mutagenesis within human Fc epsilon RI alpha differentially affects human and murine IgE binding. J Immunol. 2002 Feb 15;168(4):1787-95. PubMed PMID: 11823511.
- Mallamaci et al.; Identification of sites on the human Fc epsilon RI alpha subunit which are involved in binding human and rat IgE. J Biol Chem. 1993 Oct 15;268(29):22076-83. PubMed PMID: 8408065.
- McKenzie et al.; Patent US 5,985,599 A 20
- Miller et al.; Expression of high-affinity binding of human immunoglobulin E by transfected cells. Science. 1989 Apr 21;244(4902):334-7. PubMed PMID: 2523561.
- Oliveira S; Considerations on the Advantages of Small Tracers for Optical Molecular Imaging. J Mol Biol & Mol Imaging. 2015;2(2): 1016.
- Pearson et al.; J. Immunoglobulin E in irritable bowel syndrome: another target for treatment? A case report and literature review. Therap Adv Gastroenterol. 2015 Sep;8(5):270-7. doi: 10.1177/1756283X15588875. Review. PubMed PMID: 26327917; PubMed Central PMCID:PMC4530434. 30
- Perkins et al.; Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis. 1999 Dec;20(18):3551-67. PubMed PMID: 10612281.
- Peters C and Brown S. Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. Biosci Rep. 2015 Jun 12;35(4). Review. PMID: 26182432
- Platzer et al., Soluble IgE receptors-elements of the IgE network. Immunology Letters [2011, 141(1):36-44] 2012/01, PubMed PMID:21920387 40
- Robertson; Phage and Escherichia coli expression of the human high affinity immunoglobulin E receptor alpha-subunit ectodomain. Domain localization of the IgE-binding site. J Biol Chem. 1993 Jun 15;268(17):12736-43. PubMed PMID:8509408.
- Sato et al.; Specific removal of IgE by therapeutic immunoadsorption system. J Immunol Methods. 1989 Mar 31;118(2):161-8. PubMed PMID: 2647856.
- Shroba et al.; J. Current treatment options for idiopathic angioedema. Ann Allergy 50

gy Asthma Immunol. 2015 Sep 1. pii: S1081-1206(15)00522-0. doi: 10.1016/j.anai.2015.07.023. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26341649.

Singh et al.; Improved method for linear B-cell epitope prediction using antigen's primary sequence. PLoS One. 2013 May 7;8(5):e62216. doi: 10.1371/journal.pone.0062216. Print 2013. PubMed PMID: 23667458; PubMed, Central PMCID: PMC3646881.

Siraganian et al.; Patent WO 89/05352 A1

Spieß C et al. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol Immunol. 2015 Oct;67(2 Pt A):95-106. Review. PMID: 25637431 10

Sutton et al.; Structure and dynamics of IgE-receptor interactions: Fc RI and CD23/Fc RII. Immunol Rev. 2015 Nov;268(1):222-35. doi: 10.1111/imr.12340. Review. PubMed PMID: 26497523.

Van Vught R et al.; Site-specific functionalization of proteins and their applications to therapeutic antibodies. Comput Struct Biotechnol J. 2014 Feb 14;9:e201402001. doi: 10.5936/csbj.201402001. eCollection 2014. Review. PubMed PMID: 24757499; PubMed Central PMCID: PMC3995230. 20

Wallukat et al.; The first aptamer-apheresis column specifically for clearing blood of FcεR1-receptor autoantibodies. Circ J. 2012;76(10):2449-55. Epub 2012 Jul 27. PubMed PMID: 22850243.

Wurzberg et al.; Structural insights into the interactions between human IgE and its high affinity receptor FcεpsilonR1. Mol Immunol. 2002 May;38(14):1063-72. Review. PubMed PMID: 11955598. 30

Yanagihara et al.; Recombinant soluble form of the human high-affinity immunoglobulin E (IgE) receptor inhibits IgE production through its specific binding to IgE-bearing B cells. J Clin Invest. 1994 Nov;94(5):2162-5. PubMed PMID: 7525655; PubMed Central PMCID:PMC294671.

Yuan et al.; The serine protease plasmin cleaves the amino-terminal domain of the NR2A subunit to relieve zinc inhibition of the N-methyl-D-aspartate receptors. J Biol Chem. 2009 May 8; 284(19):12862-73. doi: 10.1074/jbc.M805123200. Epub 2009 Feb 24. PubMed PMID: 19240037 40

Zink et al.; Targeting IgE in Severe Atopic Dermatitis with a Combination of Immunoabsorption and Omalizumab. Acta Derm Venereol. 2015 Jun 10. doi: 10.2340/00015555-2165. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26059424

Zink Alexander; Pilotstudie zur experimentellen Kombinationstherapie von Ig-Apherese und Omalizumab bei schwerem Atopischem Ekzem mit erhöhten IgE-Spiegeln, 2012, PhD Thesis <https://mediatum.ub.tum.de/doc/1085022/1085022.pdf>

Zuberbier T, Henz BM, Fiebiger E, Maurer D, Stingl G. Anti-FcεpsilonR1α serum autoantibodies in different subtypes of urticaria. Allergy. 2000 Oct; 55(10):9 50

51-4. PubMed PMID: 11030376.

【 図 1 】

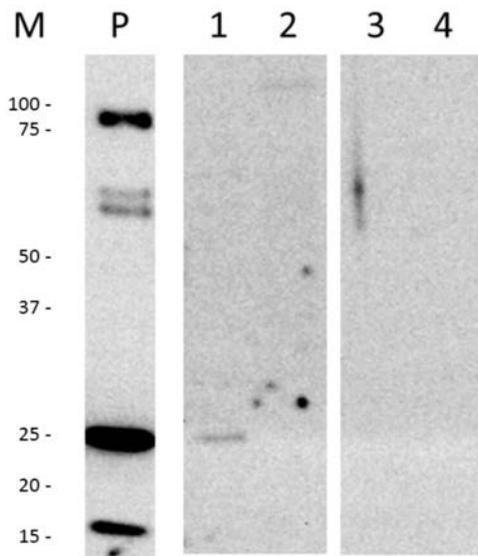


Fig. 1

【 図 2 - 1 】

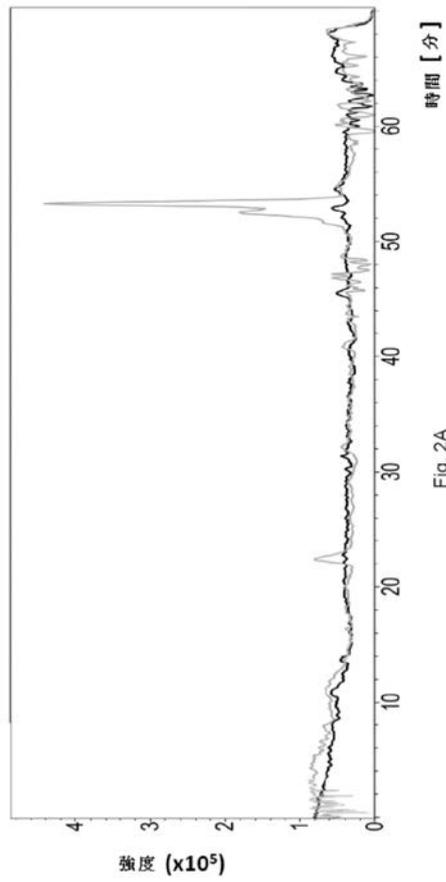


Fig. 2A

【 図 2 - 2 】

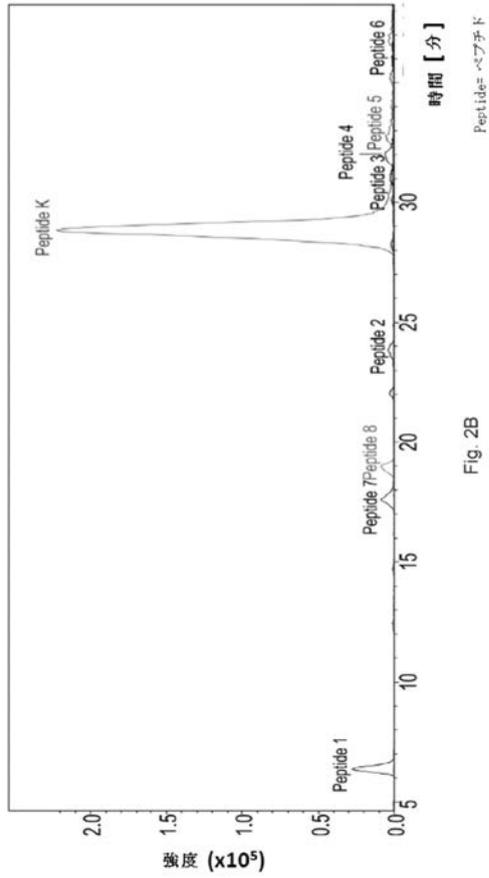


Fig. 2B

【 図 3 】

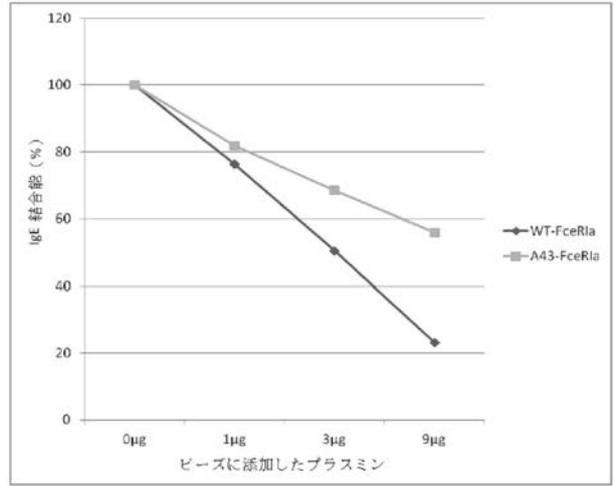


Fig. 3

【 図 4 】

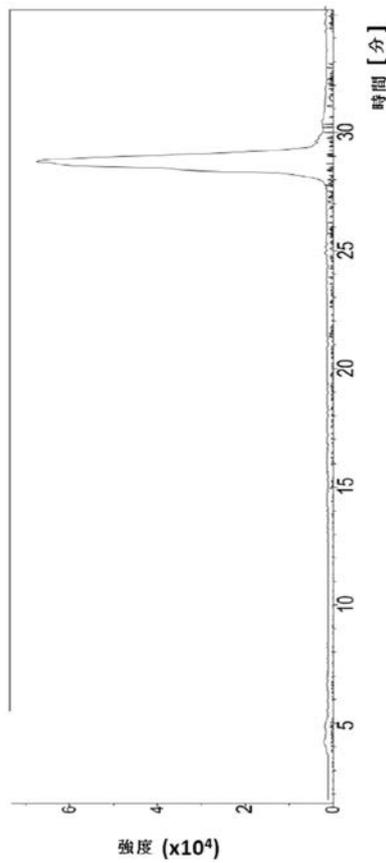


Fig. 4

【 図 5 】

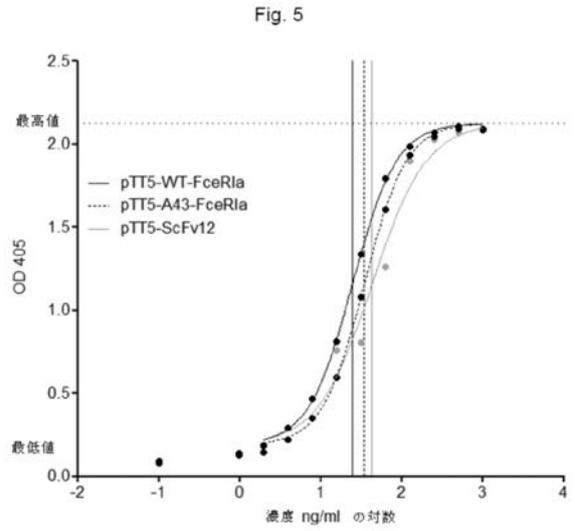


Fig. 5

【 図 6 】

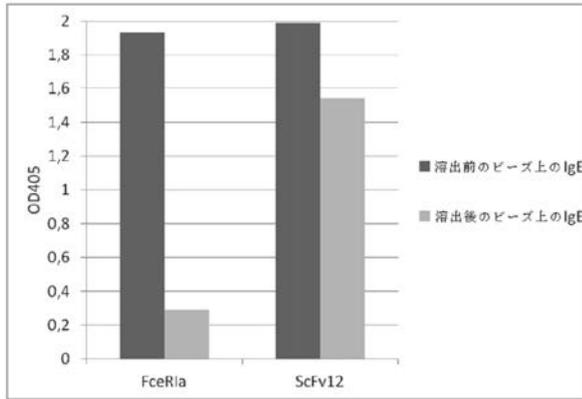


Fig. 6

【 図 7 】

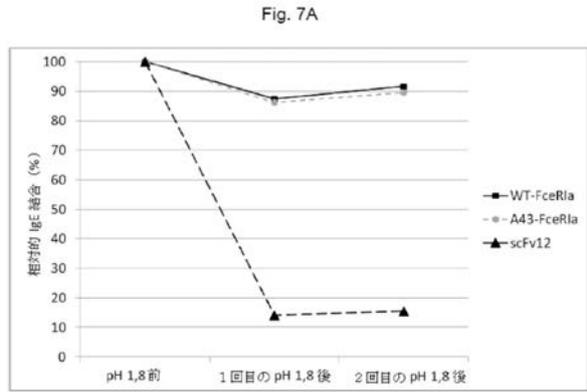


Fig. 7A

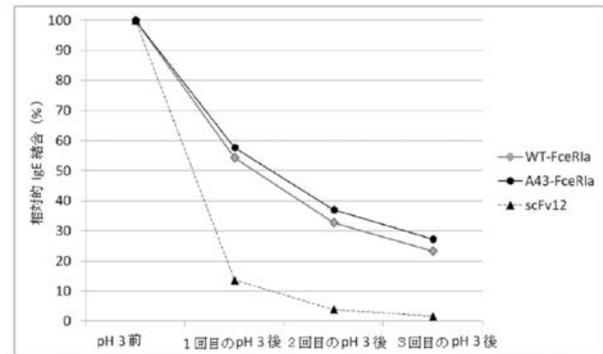


Fig. 7B

【 配 列 表 】

2019510737000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2017/050646

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/050646

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K14/735 C12N15/00 A61M1/34 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N A61M		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/08512 A1 (AUSTIN RESEARCH INST CANCER AN [AU]; HOGARTH PHILLIP MARK [AU]; MCKENZ) 21 March 1996 (1996-03-21) cited in the application the whole document in particular, page 32 -----	1-21
A	MICHAEL A MALLAMACI ET AL: "Identification of Sites on the Human FcεR1α Subunit Which Are Involved in Binding Human and Rat IgE*", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, 15 October 1993 (1993-10-15), pages 22076-22083, XP055352783, the whole document in particular, pages 22079-22080 ----- -/-	1-21
<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 application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 9 March 2017		Date of mailing of the international search report 27/03/2017
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 Pérez-Mato, Isabel

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/050646

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>M. D. HULETT ET AL: "Fine Structure Analysis of Interaction of Fc RI with IgE", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 19, 7 May 1999 (1999-05-07), pages 13345-13352, XP055352855, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.274.19.13345 the whole document in particular, pages 13347-13350 -----</p>	1-21
A	<p>WO 02/06298 A1 (HYSEQ INC [US]; ARTERBURN MATTHEW [US]; BOYLE BRYAN J [US]; HALEY VICE) 24 January 2002 (2002-01-24) the whole document in particular, SEQ ID NO:5 and 6, page 3-5, 30, 37 and 56 -----</p>	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/050646

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9608512	A1	21-03-1996	CA 2198248 A1	21-03-1996
			EP 0773960 A1	21-05-1997
			EP 1612223 A2	04-01-2006
			JP H10508463 A	25-08-1998
			US 5985599 A	16-11-1999
			WO 9608512 A1	21-03-1996

WO 0206298	A1	24-01-2002	AU 7345601 A	30-01-2002
			WO 0206298 A1	24-01-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
C 0 7 K 14/765	(2006.01)	C 0 7 K	14/765	
C 0 7 K 14/79	(2006.01)	C 0 7 K	14/79	
C 0 7 K 5/04	(2006.01)	C 0 7 K	5/04	
C 0 7 K 7/06	(2006.01)	C 0 7 K	7/06	
C 0 7 K 16/00	(2006.01)	C 0 7 K	16/00	
C 0 7 K 14/52	(2006.01)	C 0 7 K	14/52	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, G T, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY , MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72) 発明者 オスカー・スムルツカ
オーストリア 1 0 3 0 ヴィエナ、カール - ファルカス - ガッセ 2 2 番、アフィリス・アクチェンゲ
ゼルシャフト内

(72) 発明者 マルヴァ・モスタゲーア
オーストリア 1 0 3 0 ヴィエナ、カール - ファルカス - ガッセ 2 2 番、アフィリス・アクチェンゲ
ゼルシャフト内

F ターム(参考) 4B029 BB11 CC01 DG10
4C084 AA02 BA01 BA08 BA22 BA23 CA53 NA03 NA05 ZB131 ZB132
ZC421 ZC422
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA11 BA12 BA13 BA14 BA15
BA41 BA60 CA40 CA42 DA01 DA50 DA70 DA75 DA76 EA20
EA23 EA24 FA10 FA74