

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5329961号
(P5329961)

(45) 発行日 平成25年10月30日(2013.10.30)

(24) 登録日 平成25年8月2日(2013.8.2)

(51) Int.Cl.	F I	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
請求項の数 3 (全 29 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-530143 (P2008-530143)	(73) 特許権者	508068342
(86) (22) 出願日	平成18年9月6日(2006.9.6)		トリニティー セラピューティクス イン
(65) 公表番号	特表2009-507077 (P2009-507077A)		コーポレイテッド
(43) 公表日	平成21年2月19日(2009.2.19)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ウエ
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/034603		ストレイク ヴィレッジ キャプスタン
(87) 国際公開番号	W02007/030475		サークル 3705
(87) 国際公開日	平成19年3月15日(2007.3.15)	(74) 代理人	100102978
審査請求日	平成21年9月4日(2009.9.4)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	60/714,180	(74) 代理人	100119507
(32) 優先日	平成17年9月6日(2005.9.6)		弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100128048
(31) 優先権主張番号	60/775,184		弁理士 新見 浩一
(32) 優先日	平成18年2月22日(2006.2.22)	(74) 代理人	100129506
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小林 智彦
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 免疫介在性神経疾患を治療するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における免疫複合体形成を阻害するための医用薬剤の製造におけるポリペプチドの使用であって、該ポリペプチドがアミノ酸配列Ala-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:16)を含む、使用。

【請求項 2】

アミノ酸配列Ala-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:16)を含む、精製されたポリペプチド。

【請求項 3】

精製されたポリペプチドを含む組成物であって、該ポリペプチドがアミノ酸配列Ala-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:16)を含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本文書は、免疫複合体形成の阻害に、より詳細には、ポリペプチドおよび他の低分子による免疫複合体形成の阻害に関する。

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、2005年9月6日に提出された米国仮出願第60/714,180号、2006年2月22日に提出された米国仮出願第60/775,184号、および2006年3月8日に提出された米国仮出願第60/779,853号による優先権を主張する。

【背景技術】

【0003】

背景

体液性免疫応答は抗原が抗体と特異的に結合した時に誘発される。抗体分子と抗原の合体は、小型で相対的に溶解性の高い免疫複合体を形成する。抗原は、ウイルス性もしくは細菌性のポリペプチドなどの外来性物質であってもよく、またはヒトの体内に通常認められるポリペプチドなどの「自己抗原」であってもよい。免疫系は通常、外来性抗原を自己抗原と識別する。しかし、この系が壊れて、免疫系が身体を攻撃して、組織または臓器系をそれらが外来性物質であるかのように破壊するようになると、「自己免疫」性疾患が起こる恐れがある。大型の免疫複合体であるほど、小型で相対的に溶解性の高い可溶性免疫複合体よりも病原性が高い。大型で相対的に溶解性の低い免疫複合体の形成は、抗体分子と抗原との相互作用、および抗体分子同士の相互作用の両方によって起こりうる。また、そのような免疫複合体は、抗原の不在下での抗体間の相互作用によっても起こりうる。

10

【0004】

抗体はウイルスまたは細菌を覆うことによって感染を防止しうるが、他の点ではそれ自体は比較的無害である。これに対して、抗体が抗原と合体し、その結果生じた免疫複合体が体内の特定のエフェクター分子と結合すると、臓器特異的な組織損傷が起こる恐れがある。エフェクター分子は、免疫複合体の病的作用を実現させることからそのように命名されている。大型で不溶性の免疫複合体の形成を阻害することにより、または免疫複合体とエフェクター分子との結合を阻害することにより、免疫複合体の組織損傷作用を防止しうると考えられる。

20

【発明の開示】

【0005】

概要

本文書は、SEQ ID NO: 2および16に示されたものなどのアミノ酸配列を有するポリペプチドが、免疫グロブリン分子の C_H2-C_H3 ドメインと特異的にかつ高い親和性で結合し、それ故に抗体および抗原を含む不溶性免疫複合体の形成を阻害し、かつそのような複合体とエフェクター分子との結合を防止することができるという発見に基づく。本文書は、そのようなポリペプチド、ならびに免疫複合体形成を阻害し、かつ筋萎縮性側索硬化症(ALS)、パーキンソン病(PD)またはアルツハイマー病(AD)といった自己免疫複合体性の障害を治療するためにポリペプチドおよび化合物を用いるための方法を提供する。

30

【0006】

1つの局面において、本文書は、対象における免疫複合体形成を阻害するための方法の特徴とする。本方法は、精製されたポリペプチドを含む組成物を対象に投与する段階を含むことができ、ポリペプチドはアミノ酸配列

(Xaa₁)_n-Cys-Ala-Xaa₂-His-Leu-

Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-(Xaa₃)_n (SEQ ID NO:35)

40

を含み、Xaa₁は任意のアミノ酸であり、Xaa₂はArg、Trp、5-HTP、TyrまたはPheであり、Xaa₃は任意のアミノ酸であり、かつnは0、1、2、3、4または5である。免疫複合体形成は筋萎縮性側索硬化症(ALS)に関連しうる。本ポリペプチドは、ALS IgG FcのFcγI、FcγIIa、FcγIIb、FcγIIIa、FcγIIIb、FcRn、mC1q、sC1q、野生型SOD1または変異型SOD1との結合を阻害することができる。本方法はさらに、前記対象をALSの臨床的または分子的な特徴に関してモニターする段階を含みうる。モニターする段階には、筋電図記録、あるいはCNS MCP-1レベル、運動ニューロンの免疫グロブリンを介したカルシウム増加、神経伝達物質の放出、または神経細胞の損傷もしくは細胞死の測定が含まれうる。免疫複合体形成はパーキンソン病(PD)に関連しうる。本ポリペプチドは、PD IgG FcのFcγI、FcγII

50

a、FcγIIb、FcγIIIa、FcγIIIb、FcRn、mC1q、sC1q、α-シヌクレイン、またはα-シヌクレインと微小管の凝集物との結合を阻害することができる。本方法はさらに、対象をPDの臨床的または分子的な特徴に関してモニターする段階を含みうる。PDの臨床的または分子的な特徴は、黒質領域におけるMCP-1の減少、または黒質中のTH+細胞の生存率の上昇でありうる。免疫複合体形成はアルツハイマー病(AD)に関連しうる。本ポリペプチドは、AD IgG FcのFcγI、FcγIIa、FcγIIb、FcγIIIa、FcγIIIb、FcRn、mC1q、sC1q、β-アミロイドペプチド、タウタンパク質、微小管、またはタウタンパク質と微小管の凝集物との結合を阻害することができる。本方法はさらに、前記対象をADの臨床的または分子的な特徴に関してモニターする段階を含みうる。

【0007】

10

本ポリペプチドはさらに、末端安定化基(terminal-stabilizing group)を含んでもよい。末端安定化基はポリペプチドのアミノ末端にあってよく、かつアミノ酸配列Xaa-Pro-Proを有するトリペプチドであってよく、Xaaは任意のアミノ酸(例えば、Ala)である。末端安定化基はポリペプチドのカルボキシ末端にあってよく、かつアミノ酸配列Pro-Pro-Xaaを有するトリペプチドであってよく、Xaaは任意のアミノ酸(例えば、Ala)である。ポリペプチドは、アミノ酸配列のアミノ末端にAspをさらに含んでもよい。

【0008】

本ポリペプチドは約10~約50アミノ酸の長さを有しうる。本ポリペプチドは、アミノ酸配列Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:2)、またはAla-

20

Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:16)

を有しうる。

【0009】

もう1つの局面において、本文書は、そのアミノ酸配列が(Xaa₁)_n-Cys-Ala-Xaa₂-His-Leu-Gly-

Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-(Xaa₃)_n (SEQ ID NO:35)

からなる精製されたポリペプチドを特徴とし、Xaa₁は任意のアミノ酸であり、Xaa₂はArg、Trp、5-HTP、TyrまたはPheであり、Xaa₃は任意のアミノ酸であり、かつnは0、1、2、3、4または5である。

30

【0010】

本文書はまた、結合した抗原を有する免疫グロブリン分子のC_H2-C_H3クレフトに対して特異的な結合親和性を有するリガンドを設計する方法も特徴とする。本方法は、以下の段階を含みうる：a) データをコンピュータに提供する段階であって、データがC_H2-C_H3クレフト内部の252、253、435および436位にあるアミノ酸残基の原子座標を含み、かつコンピュータが原子座標データから分子の原子モデルを生成できるコンピュータプログラムを有する段階；b) コンピュータを用いて、C_H2-C_H3クレフトの原子モデルを生成する段階；c) 候補化合物の原子座標を含むデータをコンピュータに対して提供する段階；d) コンピュータを用いて、C_H2-C_H3クレフト内に最適配置された候補化合物の原子モデルを生成する段階；e) 最適配置された候補化合物がC_H2-C_H3クレフト内部のアミノ酸残基と相互作用するか否かを判定する段階；およびf) 候補化合物がアミノ酸残基と相互作用する場合に、候補化合物をC_H2-C_H3クレフトに対して特異的な結合親和性を有するリガンドとして同定する段階。本リガンドは、CH₂ CH₃クレフトに対して少なくとも1μM(例えば、少なくとも100nMまたは少なくとも10nM)の結合親和性を有しうる。本リガンドは、Fcを介した免疫複合体の形成を阻害することができる。本リガンドは、FcRのCH₂ CH₃クレフトとの結合を阻害することができる。本リガンドは、C1qのCH₂ CH₃クレフトとの結合を阻害することができる。本リガンドはALS、PDまたはADを治療することができる。

40

【0011】

50

もう1つの局面において、本文書は、ALS、PDまたはADを治療するための医用薬剤の製造におけるポリペプチドの使用であって、ポリペプチドがアミノ酸配列

(Xaa₁)_n-Cys-Ala-Xaa₂-His-Leu-

Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-(Xaa₃)_n (SEQ ID NO:35)

を含み、Xaa₁は任意のアミノ酸であり、Xaa₂はArg、Trp、5-HTP、TyrまたはPheであり、Xaa₃は任意のアミノ酸であり、かつnは0、1、2、3、4または5である使用を特徴とする。

【0012】

さらにもう1つの局面において、本文書は、精製されたポリペプチドを含む組成物であって、ポリペプチドがアミノ酸配列

(Xaa₁)_n-Cys-Ala-Xaa₂-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-(Xaa₃)_n (SEQ ID

NO:35)

を含み、Xaa₁は任意のアミノ酸であり、Xaa₂はArg、Trp、5-HTP、TyrまたはPheであり、Xaa₃は任意のアミノ酸であり、nは0、1、2、3、4または5である組成物を特徴とする。

【0013】

別に定義する場合を除き、本明細書で用いるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者が一般に理解しているものと同じ意味を持つ。本発明の実施のために本明細書に記載されたものと同様または同等の方法および材料を用いることができるが、好ましい方法および材料は以下に説明するものである。本明細書で言及するすべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、それらの全体が参照により組み入れられる。対立が生じた場合には、定義を含め、本明細書が支配的であるものとする。さらに、材料、方法および例は例示のためのものであって限定を意図したものではない。

【0014】

本発明の1つまたは複数の態様の詳細は、添付の図面および以下の説明に示されている。本発明のその他の特徴、目的および利点は、その説明および特許請求の範囲によって明らかになると考えられる。

【0015】

詳細な説明

本文書は、免疫グロブリンと他の分子（例えば、エフェクターまたは他の免疫グロブリン）との相互作用が阻止されるように、免疫グロブリン分子のC_H2-C_H3クレフトと相互作用することのできるポリペプチドおよび他の化合物を提供する。そのようなポリペプチドおよび他の化合物を同定するための方法も、ポリペプチドおよび化合物を含む組成物および製造品とともに提供される。加えて、本文書は、ポリペプチドおよび化合物を、免疫複合体形成を阻害するため、ならびにALS、PDおよびADの必須なメディエーターであることが示されている膜結合型C1q (mC1q)、可溶性C1q (sC1q)、SOD1、タウタンパク質、α-シヌクレインおよびFcγR (FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa、FcγRIIIb、FcRn、およびFcγRのアイソフォームが非限定的に含まれる)などのエフェクター分子とIgG免疫複合体が結合する疾患を治療するために用いるための方法も提供する。

【0016】

1. 免疫グロブリン

免疫グロブリンは、抗体活性を示し、かつ他の分子（例えば、抗原およびある種の細胞表面受容体）に高度の特異性を伴って結合する、血漿および他の体液中に認められるタンパク質のクラスを構成する。その構造および生物活性に基づいて、免疫グロブリンは以下の5つのクラスに分けることができる：IgM、IgG、IgA、IgDおよびIgE。IgGは体内に最も多く存在する抗体クラスである。IgMを例外として、免疫グロブリンは、いくつかの鎖内および鎖間ジスルフィド結合によって連結された4つのペプチド鎖から主として構成される。例えば、IgGは2つのポリペプチド重鎖（H鎖）および2つのポリペプチド軽鎖（L鎖）から構成され、それらはジスルフィド結合および非共有結合によって連結されて、ねじれた「Y」型の立体配置を有し、分子量が約160,000ダルトンであるタンパク質分子を形成す

10

20

30

40

50

る。平均的なIgG分子は、約4.5個の鎖間ジスルフィド結合および約12個の鎖内ジスルフィド結合を含む (Frangione and Milstein (1968) J. Mol. Biol. 33:893-906)。

【 0 0 1 7 】

免疫グロブリン分子の軽鎖および重鎖は、定常領域および可変領域から構成される (例えば、Padlan (1994) Mol. Immunol. 31:169-217を参照)。例えば、IgG1分子の軽鎖はそれぞれ可変ドメイン (V_L) および定常ドメイン (C_L) を含む。重鎖は4つのドメイン、アミノ末端の可変ドメイン (V_H) とそれに続く3つの定常ドメイン (C_H1 、 C_H2 およびカルボキシ末端の C_H3) を含む。ヒンジ領域は C_H1 ドメインと C_H2 ドメインの柔軟な接合部に対応する。完全なIgG分子のパパイン消化により、ヒンジの箇所でタンパク質分解切断が起こり、 C_H2 および C_H3 ドメインを含むFc断片、ならびにそれぞれが C_H1 、 C_L 、 V_H および V_L ドメインを含む2つの同一なFab断片が生成される。Fc断片は補体結合活性および組織結合活性を有し、一方、Fab断片は抗原結合活性を有する。

10

【 0 0 1 8 】

免疫グロブリン分子は、種々の領域を介して他のポリペプチドと相互作用することができる。例えば、抗原結合の大半は、Fab断片の V_L/V_H 領域を介して起こる。免疫学の定説では、Fc受容体 (FcR) に対する結合部位がIgG分子のヒンジ領域に認められるとされており、ヒンジ領域も重要であると考えられている (例えば、Raghavan and Bjorkman (1996) Annu. Rev. Dev. Biol. 12:181-200を参照)。しかし、より最近の証拠は、主として免疫グロブリンが単量体である (すなわち、免疫複合体を形成していない) 場合に、FcRがヒンジ領域と相互作用することを示唆している。そのような相互作用には典型的にはIg分子の234~237位にあるアミノ酸がかかわる (Wiens et al. (2000) J. Immunol. 164:5313-5318)。

20

【 0 0 1 9 】

免疫グロブリン分子は、 C_H2 - C_H3 ドメイン内部のクレフトを介して他のポリペプチドと相互作用することもできる。「 C_H2 - C_H3 クレフト」は典型的には、 C_H2 ドメイン内部の251~255位にあるアミノ酸、および C_H3 ドメイン内部の424~436位にあるアミノ酸を含む。本明細書で用いる場合、番号付けは、Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda, MD) におけるような完全なIgG分子に対するものである。他の免疫グロブリンクラスにおける対応するアミノ酸は、当業者によって容易に決定されうる。

30

【 0 0 2 0 】

C_H2 - C_H3 クレフトは、溶媒の到達性が高いことおよび主として疎水性であることの両方を特徴とするという点で特異であり、このことは露出された疎水性表面が埋没されることがこの部位での結合の重要な推進力であることを示唆する。抗原結合が起こるとIgGの C_H2 - C_H3 クレフトで三次元的な変化が起こり、特定の残基 (例えば、435位のヒスチジン) が露出されて結合を行えるようになる。抗原結合に応じて起こる三次元的な構造変化の直接的な証拠は、ヒトIgGのFc領域におけるコンフォメーション変化に対して感受性のあるモノクローナル抗体を用いた研究で見いだされている。5つのIgGエピトープが抗原結合によって変化し、うち2つはヒンジ領域内部にあり、3つは C_H2 - C_H3 クレフト内部にある (Girko ntraite et al. (1996) Cancer Biother. Radiopharm. 11:87-96)。したがって、抗原結合は、免疫グロブリンがヒンジまたはFc C_H2 - C_H3 領域を介して他の分子と結合するか否かを決定するために重要である可能性がある。

40

【 0 0 2 1 】

Fc領域は、以下のものを含む、数多くのエフェクター分子および他のタンパク質と結合することができる：

(1) FcRn -

新生児Fc受容体は全身循環中での抗体分子の半減期を決定する (Leach et al., (1996) J. Immunol. 157:3317-3322 ; Gheti and Ward (2000) Ann. Rev. Immunol. 18:739-766)。FcRnを遺伝的に欠損したマウスは、自己抗体の半減期の短縮のために、病原性自己抗体の有害な影響から防御される (Liu et al. (1997) J. Exp. Med. 186:777-783)。IgG

50

Fcに対するFcRnの唯一の結合部位がIgG Fc C_H2-C_H3クレフトであり、HIS 435は3D構造およびアラニンスキャンによってFcRnとIgG Fcとの結合に必須であることが示されている (Shields et al. (2001) JBC 276:6591-6604、およびMartin et al., (2001), Mol Cell, 7:867-877)。本明細書で提供するペプチドは高い親和性でC_H2-C_H3クレフトおよびHIS 435と結合するため、これらのペプチドは(免疫複合体を形成した) IgG FcのFcRnとの結合の直接的な阻害物質である。免疫複合体または病原性自己抗体とのFcRnの結合の阻害物質は、病原性の自己抗体および/または免疫複合体がかかわる疾患の治療において有用と考えられる。

(2) FcR -

細胞Fc受容体は体液性免疫応答と細胞介在性エフェクター系との間をつないでいる (Haman et al. (2000) J. Immunol. 164:6113-6119; Coxon et al. (2001) Immunity 14:693-704; Fossati et al. (2001) Eur. J. Clin. Invest. 31:821-831)。Fcγ受容体はIgG分子に対して特異的であり、これにはFcγRI、FcγRIIa、FcγRIIbおよびFcγRIIIが含まれる。これらのアイソタイプは、単量体のおよび免疫複合体を形成したIgGと、さまざまに異なる親和性で結合する。

(3) C1q -

古典的補体経路の第一成分はC1であり、これは血清中にC1q、C1rおよびC1sという3種のタンパク質の複合体として存在する。古典的補体経路は、C1qが、抗原と結合したIgGまたはIgMのFc領域と結合した時に活性化される。単一のFc領域に対するC1qの結合は弱いものの、C1qはFc領域のクラスターに対して強固な結合を形成する。この時点でC1はタンパク

【0022】

免疫グロブリンFc領域と他の抗体または他の因子(例えば、上記のもの)との間の相互作用を介した免疫複合体の形成を、本明細書では「Fcを介した免疫複合体形成」または「Fcを介した免疫複合体の形成」と称する。そのような相互作用を含む免疫複合体は「Fcを介した免疫複合体」と呼ばれる。Fcを介した免疫複合体には、抗原が結合したものと結合していないものの両方を含めることができ、これらは典型的には、単量体抗体に対するよりも免疫複合体を形成した抗体に対する結合特異性の方が高いC_H2-C_H3クレフト特異的リガンドを含む。

【0023】

2. 精製されたポリペプチド

本明細書で用いる場合、「ポリペプチド」とは、翻訳後修飾(例えば、リン酸化またはグリコシル化)の如何にかかわらず、任意のアミノ酸残基の鎖のことを指す。本明細書で提供するポリペプチドは、典型的には10~50アミノ酸の長さである(例えば、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45または50アミノ酸の長さ)。長さが10~20アミノ酸の間(例えば、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20アミノ酸の長さ)であるポリペプチドが特に有用な可能性がある。

【0024】

「アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸およびアミノ酸類似体であって、それらの構造が許容する場合、それらのDおよびL立体異性体のすべてのことを指す。天然アミノ酸には、アラニン(Ala)、アルギニン(Arg)、アスパラギン(Asn)、アスパラギン酸(Asp)、システイン(Cys)、グルタミン(Gln)、グルタミン酸(Glu)、グリシン(Gly)、ヒスチジン(His)、イソロイシン(Ile)、ロイシン(Leu)、リジン(Lys)、メチオニン(Met)、フェニルアラニン(Phe)、プロリン(Pro)、セリン(Ser)、トレオニン(Thr)、トリプトファン(Trp)、チロシン(Tyr)およびバリン(Val)が含まれる。非天然アミノ酸には、アゼチジンカルボン酸、2-アミノアジピン酸、3-アミノアジピン酸、β-アラニン、アミノプロピオン酸、2-アミノ酪酸、4-アミノ酪酸、6-アミノカブロン酸、2-アミノヘプタン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノイソ酪酸、2-アミノピメリン酸、2,4-ジアミノイソ酪酸、デスモシン、2,2'-ジアミノピメリン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、N-エチルグリシン、N-エチルアスパラギン、ヒドロキシリジン、ア

ロヒドロキシリジン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、イソデスモシン、アロイソロイシン、N-メチルグリシン、N-メチルイソロイシン、N-メチルバリン、ノルバリン、ノルロイシン、オルニチンおよびピペコリン酸が非限定的に含まれる。

【0025】

「類似体」とは、別のものに構造的に類似しているが、（異なる元素の原子による1つの原子の置換、または特定の官能基の存在のように）組成の点で幾分違いのある化合物のことである。「アミノ酸類似体」は、このため、天然のポリペプチド中に典型的に認められる天然に存在するアミノ酸分子と構造的に類似しているが、C末端カルボキシ基、N末端アミノ基または側鎖官能基のいずれかが別の官能基へと化学的に修飾されるように組成の点で異なっている。アミノ酸類似体には、N末端アミノ基またはそれらの側鎖基が可逆的もしくは非可逆的に化学的にブロックされた、または修飾された天然および非天然のアミノ酸が含まれ、これには例えば、メチオニンスルホキシド、メチオニンスルホン、S-(カルボキシメチル)-システイン、S-(カルボキシメチル)-システインスルホキシドおよびS-(カルボキシメチル)-システインスルホンが含まれる。アミノ酸類似体は天然に存在してもよく、または合成的に調製することもできる。アミノ酸類似体の非限定的な例には、5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)、アスパラギン酸の類似体であるアスパラギン酸-(β-メチルエステル)；グリシンの類似体であるN-エチルグリシン；および、アラニンの類似体であるアラニンカルボキサミドが含まれる。アミノ酸およびアミノ酸類似体の他の例は、Gross and Meienhofer, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Academic Press, Inc., New York (1983)に列記されている。

【0026】

ポリペプチドの立体化学は、ポリペプチド骨格のまわりのアミノ酸残基の側鎖のトポケミカル配置に関して記載されえ、これはアミノ酸残基の間のペプチド結合および結合残基のα-炭素原子によって定義される。加えて、ポリペプチド骨格は、別個の末端、そしてそれ故に方向性を有する。天然に存在するアミノ酸の大部分はL-アミノ酸である。天然に存在するポリペプチドは、主としてL-アミノ酸で構成されている。

【0027】

D-アミノ酸はL-アミノ酸の鏡像異性体であり、本明細書で「インバーソ(inverso)」ポリペプチド(すなわち、天然のペプチドに対応するものの、L-アミノ酸ではなくD-アミノ酸で構成されるペプチド)と称されるペプチドを形成することができる。「レトロ(retro)」ポリペプチドは、L-アミノ酸で構成されるものの、アミノ酸残基が天然のペプチド配列とは正反対の向きで組み立てられているアミノ酸配列を有する。

【0028】

天然に存在するポリペプチドの「レトロ-インバーソ(retro-inverso)」修飾は、天然のポリペプチド配列に対して逆の順序である、対応するL-アミノ酸のものとは正反対のα-炭素立体化学を有するアミノ酸(すなわち、D-またはD-アロ-アミノ酸の合成的組み立てを伴う。したがって、レトロ-インバーソ類似体は、逆転した末端および逆転した向きのペプチド結合を有し、その一方で、側鎖のトポロジーは天然ペプチド配列におけるものをほぼ維持している。「天然の」という用語は、部分的または完全なレトロ、インバーソまたはレトロ-インバーソ類似体の調製のための出発配列として用いられるL-アミノ酸の任意の配列のことを指す。

【0029】

部分的レトロ-インバーソポリペプチド類似体とは、配列の一部のみが逆転し、かつ鏡像異性アミノ酸残基によって置換されているポリペプチドである。このような類似体のレトロ-インバーソ部分は逆転したアミノ末端およびカルボキシル末端を有するため、レトロ-インバーソ部分に隣接するアミノ酸残基をそれぞれ側鎖類似のα置換ジェミナルジアミノメタンおよびマロネートによって置換することができる。または、ポリペプチドが、全配列が逆転し、かつD-アミノ酸によって置換されている完全なレトロ-インバーソ類似体であることもできる。

【0030】

本明細書で提供されるポリペプチドのアミノ酸配列は、幾分は制約されるが、ある程度の可変性を有しうる。例えば、本明細書で提供されるポリペプチドは、典型的には、アミノ酸配列

Xaa₁-

Cys-Ala-Xaa₂-His-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Leu-Val-Trp-Cys-Xaa₆ (SEQ ID NO:1)

を含み、Xaa_nによって表される残基は可変性を呈しうる。例えば、Xaa₁が存在しなくてもよく、または任意のアミノ酸（例えば、ArgまたはAsp）でもありうる。Xaa₂は、Phe、Tyr、Trp、Arg、5-ヒドロキシトリプトファン（5-HTP）などの任意のアミノ酸、または任意の他のアミノ酸誘導体でありうる。Xaa₃は任意のアミノ酸でありうる。Xaa₄はGlyまたはAlaでありえ、一方、Xaa₅はGluまたはAlaでありうる。Xaa₁と同様に、Xaa₆は存在しなくてもよく、または任意のアミノ酸でもありうる。

10

【 0 0 3 1 】

いくつかの態様において、ポリペプチドは、アミノ酸配列

Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:2)

を含みうる。または、ポリペプチドはアミノ酸配列

Asp-

20

Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:3)

または

Asp-

Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:4)

を含みうる。いくつかの態様において、ポリペプチドはアミノ酸配列

Arg-Cys-Ala-

Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO: 5), Arg-Cys-Ala-Trp-

His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO: 6),またはArg-Cys-Ala-Phe-

30

His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:7)

を含みうる。

【 0 0 3 2 】

いくつかの態様において、ポリペプチドは、アミノ酸配列

Cys-Ala-Xaa-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys (SEQ ID NO:8)

を含むことができ、XaaはPhe、Tyr、Trp、Argまたは5-HTPでありうる。例えば、ポリペプチドは、以下のアミノ酸配列を含みうる：

Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-

40

Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:9), Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-

Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:10),および Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-

Cys-Thr (SEQ ID NO:11)

。

【 0 0 3 3 】

本明細書で提供するポリペプチドを、ポリペプチドのインビボでの存続性を助長するための安定化物質の、アミノ末端またはカルボキシ末端での付加により、インビボ使用のために修飾することができる。これは、ペプチド末端が細胞取込みの前にプロテアーゼに

50

て分解される傾向がある状況では有用な可能性がある。このようなブロッキング物質には、ポリペプチドのアミノおよび/またはカルボキシ末端残基に結合した関連性のあるまたは関連性のない付加的な配列（例えば、N末端アミノ酸に結合したアセチル基またはC末端アミノ酸に結合したアミド基）が非限定的に含まれる。このような結合は、当業者が精通している方法を用いて、化学的に、ポリペプチドの合成中に、または組換えDNA技術によって実現することができる。または、ピログルタミン酸または当技術分野で公知の他の分子などのブロッキング物質をアミノおよび/またはカルボキシ末端残基に結合させること、または、アミノ末端のアミノ基もしくはカルボキシ末端のカルボキシ基を異なる部分に置き換えることもできる。

【 0 0 3 4 】

10

アミノ末端にあるプロリンまたはXaa-Pro-Pro（例えば、Ala-Pro-Pro）配列は特に有用である（例えば、WO 00/22112を参照）。例えば、ポリペプチドは、アミノ酸配列 Xaa₁-Pro-Pro-Cys-Ala-Xaa₂-

His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:12)

を含むことができ、Xaa₁は任意のアミノ酸（例えば、Ala）であり、Xaa₂はTrp、Tyr、Phe、Argまたは5-HTPである。したがって、例えば、ポリペプチドはアミノ酸配列 Xaa₁-Pro-Pro-Cys-

Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:40), Xaa₁-Pro-

20

Pro-Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:41), または

Xaa₁-Pro-Pro-Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:42)

を含みうる。または、ポリペプチドはアミノ酸配列

Xaa₁-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ

ID NO:43), Xaa₁-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-

Cys-Thr (SEQ ID NO:17), Xaa₁-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-

Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:18), Xaa₁-Pro-Pro-Arg-Cys-Ala-Trp-His-

30

Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:19), Xaa₁-Pro-Pro-Arg-Cys-

Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:20), またはXaa₁-Pro-

Pro-Arg-Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:

21)

を含むこともある。

【 0 0 3 5 】

本明細書で提供するポリペプチドは、Pro-Pro-Xaa（例えば、Pro-Pro-Ala）配列をそのカルボキシ末端に有しうる。例えば、ポリペプチドはアミノ酸配列

40

Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Pro-Pro-Xaa (SEQ ID NO:22), Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Pro-Pro-Xaa (SEQ ID NO:23), Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Pro-Pro-Xaa (SEQ ID NO: 24), Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Pro-Pro-Xaa (SEQ ID NO:25), Asp-Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Pro-Pro-Xaa (SEQ ID NO:26), Asp-Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Pro-Pro-Xaa (SEQ ID NO:27), Arg-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Pro-Pro-Xaa (SEQ ID NO:28), Arg-Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Pro-Pro-Xaa (SEQ ID NO:29),またはArg-Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Pro-Pro-Xaa (SEQ ID NO:30)

10

を含みえ、Xaaは任意のアミノ酸でありうる。

【 0 0 3 6 】

いくつかの態様において、本明細書で提供するポリペプチドは、付加的なアミノ酸配列を、SEQ ID NO : 1に示された配列のアミノ末端、SEQ ID NO : 1に示された配列のカルボキシル末端またはその両方に含みうる。例えば、ポリペプチドはアミノ酸配列

20

Trp-Glu-Ala-Xaa₁-Cys-Ala-Xaa₂-His-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Leu-Val-Trp-Cys-Xaa₆-Lys-Val-Glu-Glu (SEQ ID NO:31)

を含むことができ、Xaa_nによって表される残基は可変性を呈しうる。SEQ ID NO : 1に示されたアミノ酸配列に関して、Xaa₁は存在しなくてもよく、または任意のアミノ酸（例えば、ArgまたはAsp）でもありえ；Xaa₂はPhe、Tyr、5-HTP、TrpまたはArgでありえ；Xaa₃は任意のアミノ酸でありえ；Xaa₄はGlyまたはAlaでありえ；Xaa₅はGluまたはAlaでありえ；かつ、Xaa₆は存在しなくてもよく、または任意のアミノ酸でもありうる。1つの態様において、ポリペプチドはアミノ酸配列

30

Trp-Glu-

Ala-Asp-Cys-Ala-Xaa-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Lys-Val-Glu-Glu (SEQ ID NO:32)

を含みえ、XaaはArg、Trp、5-HTP、TyrまたはPheである。例えば、ポリペプチドはアミノ酸配列

Trp-Glu-Ala-Asp-Cys-Ala-

Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Lys-Val-Glu-Glu (SEQ ID NO:33)

を含みうる。

40

【 0 0 3 7 】

いくつかの態様において、ポリペプチドは、アミノ酸配列

(Xaa₁)_n-Xaa₂-Cys-Ala-Xaa₃-His-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Leu-Val-Trp-Cys-

(Xaa₇)_n (SEQ ID NO:34)

からなる可能性があり、Xaaによって表される残基は可変性を呈する可能性があり、nは0から10までの整数（例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10）でありうる。例えば、Xaa₁は任意のアミノ酸でありえ；Xaa₂は存在しなくてもよく、または任意のアミノ酸（例えば、ArgまたはAsp）でもありえ；Xaa₃はPhe、Tyr、Trp、Argまたは5-HTPでありえ；Xaa₄は任意のアミノ酸でありえ；Xaa₅はGlyまたはAlaでありえ；Xaa₆はGluまたはAlaで

50

ありえ；Xaa₇は任意のアミノ酸でありえ；かつ、nは0から5まで（例えば、0、1、2、3、4または5）でありうる。または、ポリペプチドはアミノ酸配列

(Xaa₁)_n-Cys-

Ala-Xaa₂-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-(Xaa₃)_n (SEQ ID NO:35)

からなる可能性もあり、Xaa₁は任意のアミノ酸であり、Xaa₂はPhe、Trp、Tyr、Argまたは5-HTPであり、Xaa₃は任意のアミノ酸であり、かつnは0から5までの整数（例えば、0、1、2、3、4または5）である。これらの態様の範囲内にあるポリペプチドの例には、アミノ酸配列

Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-Asp-

10

Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Ala-Ala-Ala-Ala (SEQ ID

NO:36), Ala-Ala-Arg-Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-

Ala-Ala (SEQ ID NO:37), または Ala-Ala-Ala-Asp-Cys-Ala-Phe-Trp-His-Leu-Gly-

Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Ala-Ala (SEQ ID NO:38)

からなるポリペプチドが非限定的に含まれる。

【0038】

SEQ ID NO: 1~38に示されたアミノ酸配列は、典型的には2つのシステイン残基を含む。これらのアミノ酸配列を含むポリペプチドは、2つのシステイン残基間のジスルフィド結合の形成が原因で環化しうる。当業者は、複数のシステイン残基を含むペプチドが環化されているか否かを判定するために、例えば、エルマン試薬を用いることができる。いくつかの態様において、これらのシステイン残基は、ジスルフィド結合ではなくラクタム結合を形成しうる、他の天然または非天然のアミノ酸残基によって置換することができる。例えば、1つのシステイン残基をアスパラギン酸またはグルタミン酸で置換し、他のものをオルニチンまたはリジンで置換することができると考えられる。これらの組み合わせのいずれもがラクタム架橋を生じさせうると考えられる。ラクタム架橋を形成するアミノ酸を変更することにより、ポリペプチド中に2つのシステイン残基が存在するならば形成されると考えられるジスルフィド結合と長さがほぼ等しい架橋を含む、本明細書で提供するポリペプチドを作製することができる。

20

30

【0039】

本明細書で提供するポリペプチドは、アミノ酸タグを含むことができる。「タグ」とは一般に、そのタグに対する抗体との相互作用を通じて、またはそのタグを認識する他の化合物もしくは分子を通じて、すぐに使える検出または精製の手段を提供する、短いアミノ酸配列のことである。例えば、c-myc、血球凝集素、ポリヒスチジンまたはFLAG（登録商標）などのタグを、ポリペプチドの精製および検出を助けるために用いることができる。一例として、ポリヒスチジンタグを有するポリペプチドを、ヒスチジン残基のニッケルイオンに対する親和性に基づいて精製し（例えば、Ni-NTAカラムで）、ポリヒスチジンに対する抗体（例えば、Penta-His抗体；Qiagen, Valencia, CA）によるウェスタンブロットによって検出することができる。タグはポリペプチド配列内部の任意の箇所に挿入しうるが、アミノ末端またはカルボキシ末端での挿入が特に有用である。

40

【0040】

ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて設計されたペプチド模倣化合物も同じく本明細書に提供される。ペプチド模倣化合物とは、選択されたペプチドの三次元コンフォメーションと実質的に同じである三次元コンフォメーション（すなわち、「ペプチドモチーフ」）を有し、それ故に選択されたペプチドと同じまたは類似の機能を付与することのできる、合成性の非ペプチド化合物のことである。本明細書で提供するペプチド模倣化合物は、本明細書に記載するポリペプチドの任意のものを模倣するように設計することができる。

【0041】

プロテアーゼ抵抗性であるペプチド模倣化合物は特に有用である。さらに、ペプチド模

50

倣化合物が、例えば向上した細胞透過性および延長した生物学的半減期といった、治療的有用性を高める付加的な特徴を有してもよい。そのような化合物は、典型的には、部分的または完全に非ペプチド性であるが、ペプチド模倣化合物の基となったペプチド中に存在するアミノ酸残基の側基と同一または類似の側基を備えている。いくつかの種類の化学結合（例えば、エステル、チオエステル、チオアミド、レトロアミド、還元カルボニル、ジメチレンおよびケトメチレン）は、ペプチド模倣化合物の構築においてペプチド結合の有用な代替物となることが当技術分野で公知である。

【0042】

本明細書で提供するポリペプチドと免疫グロブリン分子との間の相互作用は、典型的には、免疫グロブリンの C_H2-C_H3 クレフトを通じて起こる。このような相互作用は物理的接近によって発生し、例えば、疎水性相互作用によって媒介される。免疫グロブリン分子に対するポリペプチドの「結合親和性」とは、ポリペプチドと免疫グロブリンとの間の相互作用の強さのことを指す。結合親和性は典型的には、 $K_d = k_{off}/k_{on}$ として算出される平衡解離定数（ K_d ）として表わされ、式中、 k_{off} = 反応の速度論的解離定数であり、 k_{on} = 反応の速度論的会合定数である。 K_d は濃度として表わされ、低い K_d 値（例えば、100nM未満）ほど親和性が高い。免疫グロブリン分子と相互作用しうるポリペプチドは、典型的には、免疫グロブリンの C_H2-C_H3 クレフトに対して少なくとも1 μ M（例えば、少なくとも500nM、少なくとも100nM、少なくとも50nM、または少なくとも10nM）の結合親和性を有する。

【0043】

本明細書で提供するポリペプチドは、抗原に結合されている免疫グロブリン分子、および単量体免疫グロブリンに対して、実質的に等しい親和性で結合することができる。または、ポリペプチドが、抗原に結合されている免疫グロブリン分子に対して、単量体免疫グロブリンに対するよりも高い結合親和性（例えば、少なくとも10倍、少なくとも100倍または少なくとも1000倍高い結合親和性）を有することもできる。Fab領域に対する抗原結合によって免疫グロブリン分子のFc領域内部に起こるコンフォメーション変化が、親和性の違いに関与している可能性が高い。結合型および非結合型のNC6.8 Fab（ネズミのモノクローナル抗体からの）の結晶構造により、非抗原/抗体複合体の結晶では、Fab重鎖の尾部が、結合型Fabにおける位置と比較して19オングストローム変位していることが示されている（Guddat et al. (1994) J. Mol. Biol. 236:247-274）。Fab領域のC末端尾部は無傷の抗体においてFc領域と連結しているため、この推移は C_H2-C_H3 クレフトのコンフォメーションに影響を及ぼすと予想される。さらに、無傷の免疫グロブリンのいくつかの三次元構造の検討により、Fab重鎖とFc C_H2-C_H3 クレフトとの間の直接的な物理的連結が明らかにされている（Harris et al. (1997) Biochemistry 36:1581-1597 ; Sapphire et al. (2001) Science 293:1155-1159）。

【0044】

単量体（すなわち、非結合型）IgGおよび免疫複合体を形成したIgGの C_H2-C_H3 クレフトの分子モデル化により、単量体Fcの C_H2-C_H3 クレフトが閉鎖状の立体配置を有し、それが決定的に重要なアミノ酸残基（例えば、His 435；例えば、O'Brien et al. (1994) Arch. Biochem. Biophys. 310:25-31 ; Jefferies et al. (1984) Immunol. Lett. 7:191-194 ; およびWest et al. (2000) Biochemistry 39:9698-9708を参照）に対する結合を妨げうることが明らかにされている。しかし、免疫複合体を形成した（抗原が結合した）IgGは、より開かれた立体配置を有し、それ故にリガンド結合をより導きやすい。例えば、免疫複合体を形成したIgGに対するRFの結合親和性は、単量体IgGに対するRFの結合親和性よりもはるかに大きい（Corper et al. (1997) Nat. Struct. Biol. 4:374 ; Sohi et al. (1996) Immunol. 88:636）。本明細書で提供するポリペプチドについても典型的には同じことが成り立つ。

【0045】

本明細書で提供するポリペプチドは免疫グロブリン分子の C_H2-C_H3 クレフトと結合しうるため、それらは免疫グロブリンのFc領域に対する他の因子（例えば、FcRn、FcR、C1q、ヒストン、MBP、SOD1および他の免疫グロブリン）の相互作用を阻止するために有用な可

10

20

30

40

50

能性があり、それ故にFcを介した免疫複合体形成を阻害しうる。「阻害する」とは、ポリペプチドの非存在下における免疫複合体形成のレベルと比較して、ポリペプチドの存在下で、Fcを介した免疫複合体形成が低下することを意味する。このような阻害はインビトロ（例えば、試験管内）またはインビボ（例えば、個体の内部）のいずれでも起こりうる。免疫複合体形成のレベルを評価するためには任意の適した方法を用いることができる。多くのそのような方法が当技術分野で公知であり、これらのいくつかが本明細書に記載されている。

【0046】

本明細書で提供するポリペプチドは、典型的には、IgG Fcとペプチドが1:2という化学量論比で、単量体様式で免疫グロブリン分子のC_H2-C_H3クレフトと相互作用する（すなわち、1つの免疫グロブリン分子のみと相互作用し、このため2つまたはそれ以上の免疫グロブリン分子をともに結び付けることはない）。このため、Fc領域を通じての他の免疫グロブリン分子との相互作用は、ポリペプチドの存在によって妨げられる。Fcを介した免疫複合体形成の阻害は、例えば、本明細書に記載したポリペプチドの存在下または存在下で、IgG分子を標識免疫グロブリン分子（例えば、蛍光的または酵素（ELISA）的に標識したFc受容体またはC1q）とともにインキュベートして、免疫複合体の中に組み入れられた標識免疫グロブリンの量を測定することによって、インビトロで評価することができる。以下に考察するように、免疫複合体形成を検出するために適した他の方法を用いることもできる。

【0047】

3. ポリペプチドの調製および精製

本明細書で提供するポリペプチドは、さまざまな方法によって產生することができ、その多くは当技術分野で周知である。例として、限定的ではないが、ポリペプチドを、天然の供給源から（例えば、単離された細胞、組織または体液から）の抽出によって、ポリペプチドをコードする組換え核酸の発現によって（例えば、以下に述べるように）、または化学合成（例えば、固相合成、またはABIペプチド合成装置；Applied Biosystems, Foster City, CAを用いた合成を含む、当技術分野で周知の他の方法により）によって入手することができる。レトロ-インバーソポリペプチド類似体を合成するための方法（Bonelli et al. (1984) Int. J. Peptide Protein Res. 24:553-556；およびVerdini and Viscomi (1985) J. Chem. Soc. Perkin Trans. I:697-701）および部分的レトロ-インバーソペプチド類似体の固相合成のためのいくつかの工程も記載されている（例えば、欧州特許第EP 0097994号を参照）。

【0048】

本文書は、本明細書に記載したポリペプチドをコードする、単離された核酸分子を提供する。本明細書で用いる場合、「核酸」とは、RNAおよびDNAの両方を指し、これにはcDNA、ゲノムDNAおよび合成（例えば、化学合成）DNAが含まれる。核酸は二本鎖でも一本鎖（すなわち、センスまたはアンチセンスの一本鎖）でもよい。

【0049】

核酸に言及して本明細書で用いられる「単離された」という用語は、その由来となった生物体の天然に存在するゲノム中でそれと直に隣接している（一方は5'端側に、もう一方は3'端側に）配列のいずれとも直に隣接していない、天然に存在する核酸を指す。核酸に関して本明細書で用いられる「単離された」という用語はまた、任意の天然に存在しない核酸配列も、そのような天然に存在しない配列は天然に存在せず、天然に存在するゲノム中で直に隣接する配列を有しないことから、含む。

【0050】

単離された核酸は、例えば、天然に存在するゲノム中のDNA分子と通常直に隣接している核酸配列の1つが除去されているかまたは欠如しているDNA分子でありうる。したがって、単離された核酸には、他の配列とは独立している別個の分子として存在するDNA分子（例えば、化学合成された核酸、またはPCRもしくは制限エンドヌクレアーゼ処理によって生じたcDNAもしくはゲノム断片）、ならびにベクター、自律複製性プラスミド、ウイルス

(例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルスまたはヘルペスウイルス)中に、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNA中に組み入れられているDNAが、非限定的に含まれる。加えて、単離された核酸には、ハイブリッド核酸または融合核酸の一部である組換えDNA分子のような操作された核酸も含まれる。例えば、cDNAライブラリーもしくはゲノムライブラリー、またはゲノムDNA制限消化物を含むゲル切片の内部の数百または数百万もの他の核酸の中に存在する核酸は、単離された核酸とはみなされない。

【0051】

本明細書に記載の核酸を含むベクターもまた提供される。本明細書で用いる場合、「ベクター」とは、挿入されたセグメントの複製を引き起こすために、別のDNAセグメントを挿入することのできる、プラスミド、ファージまたはコスミドなどのレプリコンのことである。本明細書で提供するベクターは、好ましくは、ヌクレオチドが、発現制御配列と機能的に連結された、開始メチオニンを有するポリペプチドをコードする発現ベクターである。本明細書で用いる場合、「機能的に連結される」とは、発現制御配列が関心対象のコード配列の発現を有効に制御するように、遺伝子コンストラクト中に組み入れられていることを意味する。「発現制御配列」は、別のDNA配列の転写および翻訳を制御および調節するDNA配列であり、「発現ベクター」は、ベクター中に組み入れられた該当のDNAセグメントが転写および翻訳されるように発現制御配列を含むベクターである。コード配列は、RNAポリメラーゼがコード配列をmRNAへと転写する場合に、細胞内で転写および翻訳制御配列と「機能的に連結され」かつその「制御下に」あり、続いてそれはコード配列によってコードされるタンパク質へと翻訳される。

【0052】

関心対象のポリペプチドをコードする単離された核酸分子を、該当のコード配列ならびに適切な転写/翻訳制御シグナルを含む発現ベクターにサブクロニングするためには、当業者に周知の方法を用いることができる。例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); および Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, New York (1989)を参照されたい。発現ベクターは、本明細書に記載するように、種々の系において用いることができる(例えば、細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞)。適した発現ベクターの例には、例えば、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随 30
伴ウイルスに由来する、プラスミド性およびウイルス性ベクターが非限定的に含まれる。非常にさまざまな適した発現ベクターおよび系が市販されており、これにはpETシリーズの細菌発現ベクター(Novagen, Madison, WI)、Adeno-X発現系(Clontech)、Baculogoldバキュロウイルス発現系(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA)およびpCMV-Tagベクター(Stratagene, La Jolla, CA)が含まれる。

【0053】

本明細書に記載のポリペプチドをコードする発現ベクターを、ポリペプチドを産生するために用いることができる。ポリペプチドの小規模または大規模産生のために用いる発現系には、以下のものが非限定的に含まれる: 細菌などの微生物(例えば、本明細書に記載の核酸分子を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発 40
現ベクターによる形質転換を受けた大腸菌(*E. coli*)および枯草菌(*B. subtilis*)); 本明細書に記載の核酸分子を含む組換え酵母発現ベクターによる形質転換を受けた酵母(例えば、*S. セレビシエ*(*S. cerevisiae*)); 本明細書に記載の核酸分子を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)に感染させた昆虫細胞系; 組換えウイルス発現ベクター(例えば、タバコモザイクウイルス)による感染もしくは本明細書に記載の核酸分子を含む組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)による形質転換を受けた植物細胞系; または哺乳動物細胞のゲノム(例えば、メタロチオネインプロモーター)もしくは哺乳動物ウイルス(例えば、アデノウイルス後期プロモーターおよびサイトメガロウイルスプロモーター)由来のプロモーターを本明細書に記載の核酸とともに含む組換え発現コンストラクトを有する哺乳動物細胞系(例えば、初代細胞、またはCO 50

S細胞、CHO細胞、HeLa細胞、HEK 293細胞および3T3 L1細胞などの不死化細胞株)。

【0054】

本明細書で用いる「精製されたポリペプチド」という用語は、天然に存在しない対応物（例えば、ペプチド模倣物）を持たないか、もしくは化学合成されており、それ故に他のポリペプチドが混入していないポリペプチド、または天然に付随する他の細胞成分（例えば、他の細胞タンパク質、ポリヌクレオチドまたは細胞成分）から分離もしくは精製されているポリペプチドのことを指す。典型的には、ポリペプチドは、それに天然に付随するタンパク質および天然に存在する有機分子を除いた割合が乾燥重量比で少なくとも70%である場合に「精製されている」とみなされる。このため、精製されたポリペプチドの調製物は、例えば、乾燥重量比で少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも99%がポリペプチドである。本明細書で提供するポリペプチドを精製するために適した方法には、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、免疫沈降、サイズ排除クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーが含まれる。精製の程度は、以下のものを非限定的に含む、任意の適した方法によって測定することができる：カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィー。

10

【0055】

4. 化合物のモデル化、設計および同定の方法

本文書はまた、免疫グロブリン分子の C_H2-C_H3 クレフトと結合することができ、それ故にFcを介した免疫複合体形成の阻害物質として役立つ化合物の設計、モデル化および同定のための方法も提供する。そのような化合物を本明細書では「リガンド」とも称する。本明細書で提供する方法によって設計、モデル化および同定された化合物は、典型的には C_H2-C_H3 クレフトを通じて免疫グロブリン分子と相互作用することができ、かつ、免疫グロブリンの C_H2-C_H3 クレフトに対して少なくとも $1\mu M$ （例えば、少なくとも500nM、少なくとも100nM、少なくとも50nMまたは少なくとも10nM）の結合親和性を典型的に有する。そのような化合物は一般に、免疫複合体を形成した免疫グロブリン分子に対して、単量体免疫グロブリン分子に対するよりも高い結合親和性（例えば、少なくとも10倍、少なくとも100倍または少なくとも1000倍高い結合親和性）を有する。

20

【0056】

本明細書で提供する化合物は、典型的には、単量体様式で免疫グロブリン分子の C_H2-C_H3 クレフトと相互作用する（すなわち、1つの免疫グロブリン分子のみと相互作用し、このため2つまたはそれ以上の免疫グロブリン分子を一緒に結び付けることはない）。化合物と免疫グロブリン分子との間の相互作用には、典型的には、免疫グロブリンの252、253、435および436位にあるアミノ酸残基が関わる（番号はKabat、前記による）。本明細書に記載の化合物と C_H2-C_H3 クレフトとの間の相互作用は、他の因子（例えば、FcR、FcRn、ヒストン、MBP、RF、タウタンパク質、 α -シヌクレイン、SOD1およびC1q）の C_H2-C_H3 クレフトとの結合を阻止することにより、化合物が、Fcを介した免疫複合体の形成を阻害できるようにしている。

30

【0057】

本明細書で提供する方法によって同定される化合物は、例えば、本明細書に記載したもののようなポリペプチドでありうる。または、化合物は、免疫グロブリン分子の C_H2-C_H3 クレフトと特異的に結合できる任意の適した種類の分子である可能性もある。

40

【0058】

「モデル化」とは、三次元構造情報および受容体-リガンド相互作用のモデルに基づく、受容体-リガンド構造/機能の量的および/または質的な分析のことを意味する。これには、従来の数値に基づく分子動力学およびエネルギー最小化モデル、インタラクティブコンピュータグラフィックモデル、修正型分子力学モデル、ディスタンスジオメトリー（distance geometry）ならびに他の構造に基づく制約モデルが含まれる。モデル化は典型的にはコンピュータを用いて行われ、公知の方法を用いてさらに最適化することができる。

【0059】

抗原が結合した免疫グロブリン分子の C_H2-C_H3 クレフトと特異的に（すなわち、高い親

50

和性で)結合するリガンドを設計する方法は典型的にはコンピュータベースであり、原子モデルを生成できるプログラムを有するコンピュータの使用を伴う。Fc C_H2-C_H3クレフトと相互作用しうるリガンドを設計するためには、X線結晶学データを用いるコンピュータプログラムが特に有用である。例えば、RasMolなどのプログラムを、C_H2-C_H3クレフトの三次元モデルを生成するため、および/またはリガンド結合に関与する構造を決定するために用いることができる。INSIGHT (Accelrys, Burlington, MA)、GRASP (Anthony Nicholls, Columbia University)、Dock (Molecular Design Institute, University of California at San Francisco) およびAuto-Dock (Accelrys)などのコンピュータプログラムは、さらなる操作を可能にし、かつ新たな構造を導入する能力を与える。

【0060】

方法には、例えば、コンピュータに対して、Fcを介した免疫複合体中の免疫グロブリン分子のC_H2-C_H3クレフト内部のアミノ酸残基(例えば、クレフトの252、253、435および436位にあるアミノ酸残基)に関する原子構造座標を提供する段階、コンピュータを用いてC_H2-C_H3クレフトの原子モデルを生成する段階、候補化合物の原子構造座標をさらに提供して、C_H2-C_H3クレフト内部に最適配置された化合物の原子モデルを生成する段階、ならびに化合物がクレフトの252、253、435および436位にあるアミノ酸残基と相互作用する場合に候補化合物を関心対象のリガンドとして同定する段階が含まれうる。コンピュータに対して提供されるデータが、252、253、435および436位のほかの位置にあるアミノ酸残基の原子座標を含むこともできる。「最適配置された」とは、候補化合物と、C_H2-C_H3クレフトの252、253、435および436位にあるアミノ酸残基との間の疎水性相互作用を最適化するように配置されていることを意味する。

【0061】

または、免疫グロブリン分子のC_H2-C_H3クレフトに対する特異的な結合親和性を有するリガンドを設計するための方法は、そのメモリ中にクレフトの原子モデルが保存されているコンピュータを利用することもできる。候補化合物の原子座標をコンピュータに提供し、最適配置された候補化合物の原子モデルを生成することができる。本明細書に記載した通り、候補化合物は、例えば、化合物がクレフトの252、253、435および436位にあるアミノ酸残基と相互作用するならば、免疫グロブリン分子のC_H2-C_H3クレフトに対して特異的な結合親和性を有するリガンドとして同定されうる。単量体(抗原が結合していない)IgG Fcは、下部ヒンジ領域などのIgG Fc C_H2-C_H3クレフトとは異なる部位に結合し(Wines et al., 2000, 164:5313-5318)、一方、免疫複合体を形成した(抗原が結合した)IgG FcのFcγIIaとの結合は、3D構造によってIgG Fc C_H2-C_H3境界クレフトのみと結合することが示されているIgMリウマチ因子(RF-AN)によって阻害される(Sohi et al., (1996), Immunology, 88:636-641およびCorper et al., (1997), Nature Structural Biology, 4(5):374-381)。可溶性FcγIIaは、免疫複合体を形成したIgG FcのRF-ANとの結合を阻害する(しかし、免疫複合体を形成していない単量体はそうでない)ことから(Wines et al., (2003), Immunology, 109:246-254)、本明細書に記載のペプチドのようにIgG Fc C_H2-C_H3クレフトと結合する阻害物質は、免疫複合体を形成した(抗原が結合した)IgG FcのFcγRとの結合を阻害する。

【0062】

本明細書で提供する化合物を、本明細書に記載の化合物の構造情報から、構造に基づく設計/モデル化の他の手法を用いてインタラクティブに設計することもできる(例えば、Jackson (1997) Seminars in Oncology 24:L164-172; およびJones et al. (1996) J. Med. Chem. 39:904-917を参照)。

【0063】

例えば、免疫グロブリン分子のC_H2-C_H3クレフト内に空間的および優先的(すなわち、高い親和性を伴って)に適合させてコンピュータモデル化し、続いてそのような化合物をFcを介した免疫複合体形成を阻害する能力に関してインビトロまたはインビボでスクリーニングすることによって候補化合物を特徴づけることにより、化合物およびポリペプチドを同定することもできる。このようなインビトロおよびインビボのスクリーニングのため

に適した方法には、本明細書に記載するものが含まれる。

【0064】

5. 組成物および製造品

本文書は、Fcを介した免疫複合体形成の異常（例えば、Fcを介した免疫複合体の過剰産生）によって起こる病状を治療するための方法を提供する。これらの方法において、本明細書に記載のポリペプチドおよび化合物は、Fcを介した免疫複合体形成を調節することによって緩和されうる疾患または障害（例えば、ALS、PDまたはAD）を有する対象（例えば、ヒトまたは別の哺乳動物）に対して投与されて、免疫複合体を形成したIgG Fcの、例えば、mC1q、sC1q、FcγR、ヒストン、MBP、タウタンパク質、α-シヌクレイン、SOD1およびFcRnとの結合を阻害することができる。典型的には、1つまたは複数のポリペプチドまたは化合物を、免疫複合体形成と関連のある疾患または病状を有する疑いのある、それであると診断された、またはそれに対するリスクがある対象に対して投与することができる。組成物は、1つまたは複数の本明細書に記載のポリペプチドおよび化合物を含みうる。例えば、C_H2-C_H3結合性ポリペプチドを、薬学的に許容される担体または希釈剤と組み合わせ、特定の疾患の性質、その重症度および対象の全般的状態に応じて変化する量および期間にて投与することができる。典型的には、ポリペプチドは、阻害量（すなわち、ポリペプチドが接触した細胞または組織における免疫複合体の産生を阻害するのに十分な量）で投与することができる。また、本明細書に記載のポリペプチドおよび方法を、例えば、免疫複合体の異常な産生または過剰産生のリスクのある対象（例えば、移植レシピエント）における免疫反応性を最小化するために、予防的に用いることもできる。

【0065】

Fcを介した免疫複合体形成を阻害するポリペプチドの能力は、例えば、治療の前および後の対象における免疫複合体レベルを測定することによって評価することができる。組織または生物試料における免疫複合体レベルを測定するためには、当技術分野で周知のものを含む、さまざまな方法を用いることができる。対象が研究動物である場合には、例えば、関節中の免疫複合体レベルを、安楽死の後の免疫染色によって評価することができる。また、阻害性ポリペプチドの有効性を、血清試料中の循環免疫複合体のレベルを測定するといった直接的な方法によって評価することもできる。または、生きている対象におけるポリペプチドの有効性を評価するために間接的な方法を用いることもできる。例えば、免疫複合体形成の低下を、免疫介在性神経変性疾患の、またはALS、PDもしくはADのインビトロもしくはインビボモデルの、臨床的改善から推測することができる。

【0066】

治療用組成物の製剤化およびその後の投与のための方法は、当業者に周知である。投薬は一般に、治療しようとする疾患状態の重症度および反応性に依存し、治療過程は数日間ないし数カ月間にわたって、または治癒がもたらされるまで、もしくは疾病状態の軽減が達成されるまで続く。当業者は、最適な投与量、投薬方法および反復頻度をルーチンに決定する。最適な投与量は個々のポリペプチドの相対的効力に応じて異なり、一般に、インビトロおよびインビボの動物モデルで有効であると見いだされたEC50に基づいて推定される。典型的には、投与量は体重1kg当たり0.01 μg ~ 100gであり、1日に1回もしくはそれ以上、週2回、毎週、毎月またはさらに低い頻度で投与することができる。治療の奏効後には、疾患状態の再発を防止するために患者は維持療法を受けることが望ましい。

【0067】

本文書は、本明細書に記載のポリペプチドおよび/または化合物を含む薬学的組成物および製剤を提供する。本文書はまた、本明細書に記載のポリペプチドを、免疫複合体形成（例えば、ALS、PDまたはADと関連のある免疫複合体形成）を低下させるための医用薬剤の製造に用いるための方法も提供する。本明細書で提供するポリペプチドに、取込み、分配および/または吸収を補助するために、他の分子、分子構造、あるいは、例えばリポソーム、ポリエチレングリコール、受容体標的分子または経口用、直腸用、局所用もしくは他の製剤などの化合物の混合物を、混合、封入、結合または他の様式で随伴させることができる。

【 0 0 6 8 】

「薬学的に許容される担体（本明細書では「賦形剤」とも称する）とは、1つまたは複数の治療用化合物（例えば、 $C_{H2}-C_{H3}$ 結合性ポリペプチド）を対象に送達するための、薬学的に許容される溶媒、懸濁化剤または任意の他の薬理学的に不活性な媒体のことである。薬学的に許容される担体は液体でも固体でもよく、所定の薬学的組成物の治療用化合物の1つまたは複数および任意の他の成分と組み合わせる時に、所望の嵩、粘稠度ならびに他の妥当な輸送特性および化学特性を得るために、計画している投与様式に念頭において選択することができる。アミノ酸と有害な反応をしない典型的な薬学的に許容される担体には、例えば以下が含まれるが、それらには限定されない：水；食塩水；結合剤（例えば、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（例えば、ラクトースおよび他の糖、ゼラチンまたは硫酸カルシウム）；潤滑剤（例えば、デンプン、ポリエチレングリコールまたは酢酸ナトリウム）；崩壊剤（例えば、デンプンまたはデンプングリコール酸ナトリウム）；および湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）。

10

【 0 0 6 9 】

本明細書で提供する薬学的組成物は、局所治療または全身治療のいずれが望まれるかに応じて、および治療しようとする領域に応じて、さまざまな方法によって投与することができる。投与は例えば、局所的（例えば、皮内、舌下、眼または鼻腔内）；肺（例えば、粉末またはエアロゾルの吸入または吹入）；経口；または非経口的（例えば、皮下、髄腔内、脳心室内、筋肉内もしくは腹腔内注射による、または静脈内点滴による）。投与は急速（例えば、注射による）でもよく、またはある期間にわたってもよい（例えば、緩徐な注入または徐放性製剤の投与による）。中枢神経系内の組織を治療するためには、 $C_{H2}-C_{H3}$ 結合性ポリペプチドを、好ましくは血液脳関門を越えてのポリペプチドの浸透を促すことができる1つまたは複数の作用物質とともに、注射または注入によって脳脊髄液中に投与することができる。

20

【 0 0 7 0 】

$C_{H2}-C_{H3}$ 結合性ポリペプチドの局所投与のための製剤には、例えば、無菌または非無菌の水溶液、アルコールなどの一般的な溶媒中にある非水性溶液、または液体もしくは固形の油基中の溶液が含まれる。このような溶液は、緩衝剤、希釈剤および他の適した賦形剤を含んでもよい。局所投与のための薬学的組成物および製剤には、経皮的パッチ、軟膏、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、滴剤、坐薬、噴霧薬、液剤および粉剤が含まれる。鼻内噴霧薬は特に有用であり、例えば、ネブライザーまたは別の鼻内噴霧デバイスによって投与することができる。吸入器による投与も特に有用である。従来の薬学的担体、水性、粉末または油性の基剤、増粘剤などが必要である場合も、または望ましい場合もある。

30

【 0 0 7 1 】

経口投与のための組成物および製剤には、例えば、粉剤または顆粒剤、水もしくは非水性媒質中にある懸濁液もしくは溶液、カプセル剤、サシェまたは錠剤が含まれる。このような組成物は、増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、崩壊剤または結合剤も組み込むことができる。

40

【 0 0 7 2 】

非経口的、髄腔内または脳心室内投与のための組成物および製剤には無菌水溶液が含まれ、これは緩衝液、希釈剤および他の適した賦形剤（例えば、浸透促進剤、担体化合物および他の薬学的に許容される担体）も含むことができる。

【 0 0 7 3 】

薬学的組成物には、溶液、乳液、水性懸濁液およびリポソーム含有製剤が非限定的に含まれる。これらの組成物は、例えば、あらかじめ調製された液体、自己乳化性固体および自己乳化性半固体を含む、種々の成分から作製することができる。乳濁液は多くの場合、2つの不混和性液相をよく混合して相互に分散させた二相系である；一般に、乳濁液は油中水（w/o）型または水中油型（o/w）である。乳濁液製剤は、製剤化の容易さならびに

50

溶解、吸収および生物学的利用能の能力を理由として、治療薬の経口送達のために広く用いられている。

【0074】

リポソームは、親油性材料で形成された膜、および送達しようとする組成物を含む水性内容物を有する小胞である。リポソームは、薬物送達の見地から、それらが提供する作用の特異性および持続時間のために特に有用な可能性がある。リポソーム組成物は、例えば、ホスファチジルコリン、ジミリスティルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジミリスティルホスファチジルグリセロールまたはジオレオイルホスファチジルエタノールアミンから形成することができる。LIPOFECTIN（登録商標）（Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA）およびEFFECTENE（商標）（Qiagen, Valencia, CA）を含む、数多くの親油性物質が市販されている。

10

【0075】

本明細書で提供するポリペプチドはさらに、ヒトを含む動物に対する投与後に、生物活性のある代謝産物またはその残分を提供する（直接的または間接的に）ことのできる、任意の薬学的に許容される塩、エステル、またはそのような塩のエステル、または任意の他の化合物を包含する。したがって、例えば、本明細書で提供されるのは、ポリペプチドの薬学的に許容される塩、プロドラッグ、およびそのようなプロドラッグの薬学的に許容される塩、および他の生物学的等価物である。「プロドラッグ」は、不活性型として調製され、体内または細胞内で内因性酵素または他の化学物質の作用および/または条件によって活性型（すなわち、薬物）に変換される治療薬のことを示す。「薬学的に許容される塩」という用語は、本明細書に記載のポリペプチドの生理的および薬学的に許容される塩（すなわち、望ましくない毒物学的影響を及ぼすことなく、親ポリペプチドの所望の生物活性を保っている塩）のことを指す。薬学的に許容される塩の例には、陽イオン（例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、またはスペルミンなどのポリアミン）と形成された塩；無機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸または硝酸）と形成された酸付加塩；および有機酸（例えば、酢酸、クエン酸、シュウ酸、パルミチン酸またはフマル酸）と形成された塩が非限定的に含まれる。

20

【0076】

本明細書に記載のポリペプチドを含む薬学的組成物には、動物の皮膚へのポリペプチドの効率的な送達を促進する浸透促進剤を組み込むこともできる。浸透促進剤は、親油性薬物および非親油性薬物の両方の細胞膜を通しての拡散を向上させることができる。浸透促進剤は、5つの幅広いカテゴリーのうち1つに属するものと分類されうる。すなわち、表面活性剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテルおよびポリオキシエチレン-20-セチルエーテル）；脂肪酸（例えば、オレイン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸およびステアリン酸）；胆汁酸塩（例えば、胆汁酸、デヒドロコール酸およびデオキシコール酸）；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、クエン酸およびサリチレート）；および非キレート性非表面活性剤（例えば、不飽和環状尿素）である。または、阻害性ポリペプチドをイオントフォレシスを介して送達することもでき、これは電荷を利用してポリペプチドを皮膚を通るように「駆動する」経皮パッチを伴う。

30

40

【0077】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、（a）1つまたは複数のポリペプチド、および（b）異なる機序によって働く1つまたは複数の他の作用物質を含みうる。例えば、非ステロイド性抗炎症薬および副腎皮質ステロイドを非限定的に含む抗炎症薬、ならびにリビピリン（ribivirin）、ビダラビン、アシクロビルおよびガンシクロビルを非限定的に含む抗ウイルス薬を、本明細書で提供する組成物中に含めることができる。他の非ポリペプチド性剤（例えば、化学療法薬）も、本明細書で提供する組成物の範囲に含まれる。このような組み合わせられた化合物は一緒に用いることもでき、または逐次的に用いることもできる。

【0078】

50

組成物はさらに、薬学的組成物中に従来より認められる他の補助的成分を含むことができる。すなわち、組成物はまた、適合性のある薬学的活性のある材料、例えば、鎮痒薬、収斂薬、局麻剤もしくは抗炎症薬、または本明細書で提供する組成物のさまざまな剤形を物理的に製剤化する上で有用なそのほかの材料、例えば色素、香味剤、保存料、抗酸化剤、乳白剤、増粘剤および安定化剤も含むことができる。さらに、組成物を助剤、例えば、潤滑剤、保存料、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼすための塩、緩衝剤、着色剤、香味料および芳香性物質と混合することもできる。しかし、添加する場合に、このような材料が本明細書で提供する組成物の内部のポリペプチド成分の生物活性を不必要に妨害すべきではない。製剤は必要であれば滅菌することができる。

【0079】

10

薬学的製剤は単位剤形として便利に提示することができ、これは製薬産業で周知の従来の技法に従って調製することができる。このような技法には、有効成分（例えば、本明細書で提供する $C_{H2}-C_{H3}$ 結合性ポリペプチド）を所望の薬学的担体または賦形剤と会合させる段階が含まれる。典型的には、製剤は、有効成分を液体担体または微細固体担体またはその両方と均質に緊密に会合させ、続いて、必要であれば生成物を成形することによって調製することができる。製剤は必要であれば滅菌することができるが、その場合、滅菌の方法は、製剤中に含まれるポリペプチドの有効性を妨害しないことを条件とする。

【0080】

本明細書で提供する組成物は、考えられる多くの剤形の任意のものに製剤化することができ、これには錠剤、カプセル剤、液体シロップ剤、軟ゲル、坐薬および浣腸剤などがあるが、これらには限定されない。組成物を水性、非水性または混合性の媒質中にある懸濁液として製剤化することもできる。水性懸濁液はさらに、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび/またはデキストランを含む、懸濁液の粘性を高める物質を含むことができる。懸濁液は安定化剤を含むこともできる。

20

【0081】

本明細書で提供する $C_{H2}-C_{H3}$ 結合性ポリペプチドをパッケージ化用の材料と組み合わせ、Fcを介した免疫複合体形成を低下させるためのキットとして販売することができる。製造品を製造するための構成要素および方法は周知である。製造品は、以上のセクションで詳述されたポリペプチドおよび化合物の1つまたは複数を併せ持つことができる。加えて、製造品がさらに、例えば、免疫複合体形成の低下または免疫複合体形成の低下のモニターのための緩衝剤または他の調整用試薬を含んでもよい。Fcを介した免疫複合体形成を低下させることに関して本ポリペプチドがいかに有効であるかを記した説明書をこのようなキットに含めることができる。

30

【0082】

6. Fcを介した免疫複合体形成を阻害するために $C_{H2}-C_{H3}$ 結合性ポリペプチドを用いるための方法

$C_{H2}-C_{H3}$ 結合性ポリペプチドを、Fcを介した免疫複合体形成に関するインビトロアッセイに用いることができる。このような方法は、例えば、 $C_{H2}-C_{H3}$ クレフト結合性ポリペプチドがFcを介した免疫複合体形成を阻止する能力を評価するために有用である。インビトロ方法は、例えば、本明細書で提供するポリペプチドの存在下または非存在下で、免疫グロブリン分子（例えば、抗原が結合した免疫グロブリン分子）をエフェクター分子（例えば、mC1q、sC1q、FcR、FcRnまたは別の抗体）と接触させる段階、および各試料における免疫複合体形成のレベルを決定する段階を含みうる。免疫複合体形成のレベルは、例えば、クーマシーブルー染色もしくは銀染色を用いたポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、または免疫共沈降によって評価することができる。このような方法には、当業者に公知のものが含まれる。また、本明細書で提供する方法を、対象における免疫複合体形成を阻害するため、および、Fcを介した免疫複合体形成を阻害することによって対象における自己免疫性疾患を治療するために用いることもできる。このような方法は、例えば、本明細書で提供するポリペプチドのいずれか、または本明細書で提供するポリペプチドのいずれかを含む組成物を対象に対して投与する段階を含みうる。例えば、ある方法は、個体に

40

50

対して、アミノ酸配列

Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:10)

を含むポリペプチドを含む組成物を投与する段階を含みうる。または、ある方法は、対象に対して、アミノ酸配列

Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-

Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:2), または Ala-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-

Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:16)

を含むポリペプチドを投与する段階を含みうる。

【0083】

本明細書で提供する方法は、例えばPD、ALSまたはADを有する対象を治療するために用いることができる。これらの病状、およびFcを介した免疫複合体形成の関与については本明細書に記載されている。これらの神経変性疾患はすべて、細胞内タンパク質/封入体、異常な微小管および活性化ミクログリア（CNSマクロファージ）の凝集を特徴とし、それらは通常、選択的な神経細胞死の発生およびこれらの疾患のそれぞれの臨床症状の発現に先立って起こる。ALSは、免疫複合体を形成したIgG Fcのスーパーオキシドジスムターゼ-1 (SOD1) として知られる酵素との結合、細胞タンパク質の凝集、異常な微小管、ミクログリアの活性化および最終的には運動ニューロンの死滅を特徴とする。PDは、免疫複合体を形成したIgG Fcの α -シヌクレインとの結合、細胞タンパク質の凝集、異常な微小管、ミクログリアの活性化および最終的にはSN TH+細胞の死滅を特徴とする。ADは、免疫複合体を形成したIgG Fcのタウタンパク質/微小管との結合、異常な微小管の形成/凝集、ミクログリアの活性化およびコリン作動性皮質ニューロンの選択的死滅を特徴とする。例えば、Henkel et al. (2004) Ann. Neurol. 55:221-235; Morrison et al. (2000) Exp. Neurol. 165:207-220; Orr et al. (2005) Brain 128:2665-2674; およびBouras et al. (2005) Brain Res. Brain Res. Rev. 48:477-487を参照のこと。このことは、これらの3種の疾患では特異的なニューロンが冒され、異なるタンパク質が関与しているものの、基本的な神経免疫病理は類似している可能性があることを示唆する (Couillard et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:9626-9630; およびTrojanowski et al. (1993) Brain Pathol. 3:45-54)。

【0084】

方法は、このような治療を必要とする対象を同定するため、および/または、治療された個体を症状もしくは免疫複合体形成のレベルの低下に関してモニターするための段階も含むことができる。例えば、ALSは、CNSにおけるMCP-1レベルを測定することにより、筋電図記録により、または、ALSと診断された個体の進行もしくは衰弱を測定するために有用な任意の他の客観的もしくは主観的な検査（例えば、神経科医または他の医師による評価）によってモニターすることができる。

【0085】

パーキンソン病 -

PDの臨床症状は、黒質 (SN) として知られる脳の区域におけるドーパミン作動性ニューロンの死滅に起因する。過剰反応性の免疫系が、初期の障害に反応してサイトカイン（例えば、インターロイキン-1および腫瘍壊死因子）を産生することによってPDの永続化に役割を果たし、それがさらに脳内の細胞を傷害している可能性がある。PD個体からの免疫グロブリンは、SN細胞の病因に寄与することが示されている (Chen et al. (1998) Arch. Neurol. 55:1075-1080)。Fc γ RはヒトPD IgGの受動的移入によって誘発されるPDマウスモデルにおいて必須であるように見える。これはFc γ Rのノックアウトによりミクログリア活性化およびドーパミン細胞死の両方からマウスが防御できたことが理由である (He et al. (2002) Exp. Neurol. 176:322-327; およびLe et al. (2001) J. Neurosci. 21:8447-8455)。体液（抗体）性免疫はPDの免疫病因にかかわると考えられている。活性化ミク

10

20

30

40

50

ログリアは遺伝性および特発性（孤発性）PDの両方において活性化Fc γ Rを発現し、これは神経細胞IgG、主としてIgG1によるミクログリアFc γ Rの活性化と一致する（Orr et al., 前記）。さらに、SN細胞は、微小管病理を引き起こす α -シヌクレインタンパク質凝集物の蓄積が原因で、PDの対象において選択的に死滅する。 α -シヌクレインはSN特異的IgG1と共存し、このことは α -シヌクレインが免疫複合体を形成したIgGと相互作用していることを示している。

【0086】

筋萎縮性側索硬化症 -

ALSは上位および下位運動ニューロン（MN）の変性を伴う壊滅的な疾患であり、最終的には1～5年以内に呼吸不全による死亡を招く。ALS患者からのIgG免疫複合体は、マウスにおいてALS様の病変を誘発しうる。IgG Fc γ RはALSの免疫病理に必須であるように思われる（Mohamed et al. (2002) J. Neurosci. Res. 69:110-116；およびEngelhardt et al. (2005) Acta Neurol. Scand. 112:126-133；およびZhao et al. (2003) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 63:964-977）。ALS症例のうち家族性（遺伝性）「fALS」のものは10%未満である。ヒトの全ALS症例のうち約2%は、SOD1をコードする遺伝子における100種を上回る公知の変異に起因する（Alexianu et al. (2001) Neurol. 57:1282-1289）。ヒトのSOD1変異、例えばSOD1 G93Aに関してトランスジェニックであるマウスは、IgG、Fc γ Rおよび活性化ミクログリアの増加の出現を伴う免疫反応性を呈し、これは運動ニューロン（MN）の損失、ならびにヒトALSの臨床的および組織病理学的な進行に一致する臨床徴候に先立って起こる。全ALS症例のうち90%以上は孤発性「sALS」であり、公知の遺伝的基盤もなく、SOD1または微小管のいずれかと関連のある公知の変異も有しない（Valentine et al. (2005) Ann. Rev. Biochem. 74:563-593；およびGarcia et al. (2006) Neurobiol. Dis. 21:102-109）。

【0087】

樹状細胞、単球走化性タンパク質-1（MCP-1）および活性化ミクログリア/ミクロファージは、fALSおよびsALSの脊髄で見いだされている（Henkel et al., 前記）。免疫複合体を形成したIgG（しかし、免疫複合体を形成していない単量体IgG、またはIgGのF(ab')₂断片ではそうでない）は、免疫複合体を形成したIgG Fc γ Rの結合および活性化を通じてMCP-1 mRNA発現を10倍に増加させており（Hora et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1745-1749）、このことは、fALSおよびsALSの症例の両方において、免疫複合体を形成したIgGがFc γ R（周囲のミクログリア上にある可能性が非常に高い）を介してMCP-1を活性化することを示唆する。

【0088】

アルツハイマー病 -

伝統的な科学的見解は、血液脳関門（BBB）によって脳へのIgGが排除されるため、IgGを含む免疫グロブリンは脳に到達不可能であるというものである。しかし、炎症性神経疾患により、または正常な脳老化の結果として、IgGが機能不全のBBBを通して脳内に入る恐れがある。IgG Fcは、細胞Fc γ R（例えば、Fc γ RIおよびFc γ RIII）を介したADの免疫病原因への関与が考えられているミクログリアを活性化することができる。免疫細胞化学実験により、老化した脳内でIgG免疫反応性である同じ錐体ニューロン内にFc γ RIが示されており、このことはIgG Fcのニューロン内への浸透におけるこれらの受容体の役割を示唆する。ニューロン内のIgG Fcはタウタンパク質と結合することが示されている。タウタンパク質は微小管の正しい重合に必須であることが示されているため、IgG Fc（しかしIgG Fab断片はそうでない）のタウタンパク質および微小管自体との結合は、微小管の異常な重合を引き起こす可能性がある。このため、IgG Fcのニューロン内への浸透は、脆弱な皮質ニューロンのサブセットにおける神経変性の初期段階に関与している可能性がある（Reider et al. (2003) NeuroReport 14:117-121；Bouras et al., 前記；およびEngelhardt et al. (2000) Arch. Neurol. 57:681-686）。ADの免疫病理におけるFc γ Rの役割は、ADでの老人斑におけるFc γ R+ミクログリアの活性化に見いだすことができる（Peress et al. 1993 J. Neuroimmunol. 48:71-79）。

【0089】

本発明を以下の実施例においてさらに説明するが、これらは特許請求の範囲に記載された本発明の範囲を限定するものではない。

【0090】

実施例

実施例1 - C_H2-C_H3クレフトに対するリガンド結合を測定するためのインビトロアッセイ

本明細書で提供するポリペプチドおよび化合物による、免疫複合体を形成したIgG FcのFcR、FcRn、C1q、 α -シヌクレイン、SOD1およびタウタンパク質などの因子との結合の競合阻害を実証するために、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)および二重免疫拡散法を伴うインビトロアッセイを用いた。

10

【0091】

標準的なELISAでは、抗原を合成樹脂製マイクロウェル上に免疫吸着させる。ブロッキングおよび洗浄の後に、抗原に対する特異性を有する一次抗体をマイクロウェルに添加する。もう1回の洗浄相の後に、一次抗体を対象とし、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)などの酵素マーカーを結合させた二次抗体をマイクロウェルに添加する。もう1回の洗浄サイクルの後に、適切な酵素基質を添加する。抗原/一次抗体/二次抗体/HRP結合物が形成されれば、結合した酵素が基質との発色化学反応を触媒し、それがマイクロプレートまたは分光光度計によって読み取られる。抗原および二次抗体/HRP結合物のレベルを標準化することにより、一次抗体の力価(可変)が確定される。標準的なELISAシステムでは、一次抗体は、Fabアームに位置するその相補性決定領域(CDR)を通して抗原と結合する。同様に、二次抗体/HRP結合物はそのCDR Fab領域を通して一次抗体と結合する。HRPは二次抗体のFc領域と結合されているため、直接的なFc結合は極めて限定的であるか無効化される。

20

【0092】

この理由から、Fc領域の、免疫複合体を形成したIgG Fcと結合するリガンドとの結合を評価するために、「逆ELISA」法を用いた。これらのアッセイでは、酵素(HRP)を二次抗体のFc部分と共有結合させなかった。その代わりに、あらかじめ形成させたペルオキシダーゼ-ウサギ(またはマウス)抗ペルオキシダーゼIgG(「PAP」複合体)という免疫複合体を用いた。このため、HRPは抗原および酵素の両方のマーカーの役目を果たすが、Fc領域をブロックすることはない。この逆ELISAシステムにおいて、Fc C_H2-C_H3クレフト結合性リガンド(例えば、精製ヒトC1q)をマイクロウェルプレートと結合させた。競合物の非存在下では、PAP複合体が固定化リガンドと結合し、HRPとその基質との間の反応によってシグナルが生じた。このシグナルは、PAPの固定化リガンドとの結合を阻害した、本明細書で提供したもののようなポリペプチドおよび化合物によって低下した。

30

【0093】

実施例2 - C1q結合の阻害

1ml蒸留水中で2 μ lのウサギ抗ペルオキシダーゼ抗体(Sigma Chemicals, St. Louis, MO)を50 μ lのペルオキシダーゼ(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)と混合することによってPAP複合体を形成させた。PAP(100 μ l)は、100 μ lのペプチドまたはヒトC1q(Quidel Corp., San Diego, CA)とともに1時間ブレインキュベートした。続いて、C1q/PAPおよびペプチド/PAP混合物(100 μ l)を、C1qをコーティングしたプレートとともに30分間インキュベートした。洗浄の後に、プレートを2-2'-アジノビス-3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホネート(ATBS; Quidel Corp.)とともに15分間インキュベートし、405nmで読み取った。結果は表1に示されている。

40

【0094】

【表 1】

ペプチド	SEQ ID NO:	OD 405 nm
DCAWHLGELVWCT	2	1.100
APPCARHLGELVWCT	14	0.567
DCAFHLGELVWCT	3	0.859
APPDCAWHLGELVWCT	16	0.389
APPCAFHLGELVWCT	15	0.983
APPCAWHLGELVWCT	13	1.148
C1q (陰性対照)	-	0.337
陽性対照	-	2.355

10

【0095】

APPDCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO: 16) は、C1qの結合の最大の阻害をもたらし、これはC1q自体とほぼ等しかった。ペプチドAPPCARHLGELVWCT (SEQ ID NO: 14) はその次に優れた結果を与えた。

【0096】

実施例3 - FcR結合の阻害

ひとたび逆ELISAプロトコルをC1qアッセイを用いて確立したところで、FcγIIa、FcγIIbおよびFcγIIIをC1qの代わりに用いるアッセイを再びデザインした。高精製FcγIIa、FcγIIbおよびFcγIIIを合成樹脂製マイクロウェル上に免疫吸着させた。FcγR逆ELISAシステムを最適化した後に、精製FcγRに対する免疫複合体の結合を阻害する能力を調べるために、本明細書に記載のポリペプチドを用いる競合阻害実験を実施した。

20

【0097】

Falconマイクロタイタープレートを、高精製FcγIIa、FcγIIbおよびFcγIIIの1:10希釈物でコーティングし、24時間インキュベートした。プレートを洗浄し、続いて5×BSAブロッキング溶液 (Alpha Diagnostic International, San Antonio, Texas) で24時間ブロックした。PAP免疫複合体は実施例2の通りに形成させた。PAP (100 μl) を100 μlのペプチドとともに1時間プレインキュベートした。PAP/ペプチド混合物をFcγRでコーティングしたプレートに添加し、1時間インキュベートした。洗浄の後に、プレートをABTS基質とともに15分間インキュベートし、405nmで読み取った。結果は表2に示されている。

30

【0098】

【表 2】

ペプチド	SEQ ID NO:	FcγIIa	FcγIIb	FcγIII
DCAWHLGELVWCT	2	0.561	0.532	0.741
APPCARHLGELVWCT	14	0.956	0.768	0.709
DCAFHLGELVWCT	3	0.660	0.510	0.810
APPDCAWHLGELVWCT	16	0.509	0.496	0.670
APPCAFHLGELVWCT	15	0.605	0.380	0.880
APPCAWHLGELVWCT	13	0.658	0.562	0.530
陽性対照	-	1.599	1.394	1.588

40

【0099】

ペプチドAPPDCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO: 16) は、PAPに対するFcR結合の最大の阻害をもたらし、その次がペプチドDCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO: 2) であった。

【0100】

実施例4 - 免疫複合体を形成したIgGのwtおよび変異型SOD1との結合の阻害

PAP複合体を実施例2に記載した通りに形成させた。PAP (100 μl) を100 μlのペプチドとともに1時間プレインキュベートし、対照 (200 μlのPAP) も1時間インキュベートした。100 μlのPAPまたはPAP/ペプチドを、0.8 μg/mlのヒトwtSOD1 (Sigma-Aldrich) またはアポ (Cu、Zn非含有) 単量体変異型SOD1 C57S (mSOD1C57S) により24時間かけてコーティ

50

ングしたFalconマイクロタイタープレートに添加した。1時間後に、PAPまたはペプチド/PAP混合物（100 μ l）を、wt SOD1またはmSOD1C57Sでコーティングしたプレートに60分間にわたって添加した。洗浄の後に、プレートをATBSとともに15分間インキュベートし、405nmで読み取った。結果は表3に示されている。

【0101】

【表3】

ペプチド	SEQ ID NO:	wt SOD1	mSOD1C57S
DCAWHLGELVWCT	2	0.292	0.592
APPDCAWHLGELVWCT	16	0.277	0.226
陽性対照	-	2.900	2.924

10

【0102】

ペプチドAPPDCAWHLGELVWCT（SEQ ID NO：16）は、PAPに対するwt SOD1またはmSOD1C57S結合の最大の阻害をもたらし、その次がペプチドDCAWHLGELVWCT（SEQ ID NO：2）であった。

【0103】

SOD1は特定の条件下で過酸化水素およびABTSを基質として用いるため（Elam et al. (2003) J. Biol. Chem. 278:21032-21039；およびYim et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:4099-4105）、0.05mg/mlのwt SOD1または0.050mg/mlのペルオキシダーゼ（Sigma-Aldrich）を、上記のSOD免疫複合体結合アッセイに用いるABTS基質に添加した。5分間のインキュベーションの後にプレートを405nmで読み取った。結果は表4に示されている。

20

【0104】

【表4】

酵素	0.05 mg/ml wt SOD1	0.050 mg/ml ペルオキシダーゼ	基質 のみ
過酸化水素/ABTS 基質	0.063	3.432	0.061

【0105】

以上を総合すると、これらのデータは、免疫複合体を形成したIgFcのwtSOD1およびmSOD1C57Sの両方に対する結合がペプチド2および16によって阻害され、ペプチド16が最も優れた阻害を与えることを示している。ペプチド2および16はIgG Fc C_H2-C_H3クレフトのみと結合するため、免疫複合体を形成したIgG Fc C_H2-C_H3クレフトはwtSOD1およびmSOD1S57Sの両方と結合することになる。表4に示されているように、100倍のwt SODは、表3にまとめた実験に用いたABTS基質のOD読み取り値に影響を及ぼさなかった。

30

【0106】

実施例5 - 免疫複合体を形成したIgGのwt α -シヌクレインとの結合の阻害

1ml蒸留水中で2 μ lのウサギ抗ペルオキシダーゼ抗体（Sigma）を50 μ lのペルオキシダーゼ（Sigma）と混合してPAP複合体を形成させた。PAP（100 μ l）は100 μ lのペプチドとともに1時間ブレインキュベートした。対照PAP（200 μ l）も1時間インキュベートした。100 μ lのPAPまたはPAP/ペプチドを、167 μ g/mlのヒトwt α -シヌクレイン（Sigma-Aldrich）によって24または48時間かけてコーティングしたFalconマイクロタイタープレートに添加し、プレートを60分間インキュベートした。洗浄の後に、プレートをATBSとともに30分間インキュベートし、続いて405nmで読み取った。結果は表5に示されている。

40

【0107】

【表 5】

ペプチド	SEQ ID NO:	Wt
		α -シヌクレイン
DCAWHLGELVWCT (24時間)	2	0.111
APPDCAWHLGELVWCT (24時間)	16	0.088
陽性対照	-	1.433
ABTS 基質のみ		0.061
DCAWHLGELVWCT (48時間)	2	0.152
APPDCAWHLGELVWCT (48時間)	16	0.136
α -シヌクレイン陽性対照 (48時間)	-	2.934

10

【0108】

ペプチドAPPDCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO: 16) は、PAPに対する α -シヌクレイン結合の最大の障害をもたらし、その次がペプチドDCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO: 2) であった。

【0109】

実施例6 - インビトロ系におけるALS抗体の障害

本明細書に記載の障害物質を用いたFcRおよびC1qのブロッキングが、ALSに関連したMN細胞損傷およびMN細胞死を軽減しうるか否かを判定するために、ミクログリアおよび運動ニューロン (MN) を含む細胞培養物をZhao et al. (J. Neuropath. Exp. Neurol. (2004) 63:964-977) に記載された通りに調製した。ALS IgG (1または2 μ g/ml) を、本明細書に記載のFcRおよびC1q結合障害物質 (例えば、SEQ ID NO: 2および16に示されたアミノ酸配列を有するポリペプチド) の存在下または非存在下で、ミクログリア/MN細胞培養物に添加した。ミクログリア活性化アッセイは、炎症誘発性サイトカインTNF- α の量を測定することによって行われる。免疫複合体を形成したIgG障害物質の存在下および非存在下におけるMNの生存を判定するために、抗p75および/または抗CFAP抗体を用いる免疫細胞化学的MN染色を行う。MNに対して細胞毒性があることが知られているグルタミン酸を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定する。

20

【0110】

実施例7 - インビボモデルにおける免疫複合体を形成したALS IgG Fcの障害

13-17週齢のC57B 1/6 $\times$ 129SvEvマウスに対して、ALS患者から調製したIgG (40mg) (Mohamed et al. (2002) J. Neurosci. Res. 69:110-116) の腹腔内 (i.p.) 注射を、本明細書に記載のポリペプチド障害物質のi.p.注射とともに、またはそれを伴わずに行う。MNにおけるALS IgGの超微細構造検出、細胞内カルシウム放出および神経筋接合部でのアセチルコリン放出を、対照マウスおよび処置マウスにおけるALS様症状をモニターするために用いる。または、Fc γ RIIbノックアウトマウスを用いる。これらのマウスを利用した実験により、関節リウマチ (RA) または全身性エリテマトーデス (SLE) の臨床徴候が、ヒトRAまたはSLE血清の受動的投与によって誘発されることが示されている (Petkova et al. (2006) J. Exp. Med. 203(2):275-280)。このため、Fc γ RIIbRノックアウトマウスに対するALS陽性血清の投与が、本明細書に記載の障害物質の存在下および非存在下で、ALSを受動的に誘発させるために用いられる。

30

40

【0111】

実施例8 - インビトロモデルにおける免疫複合体を形成したPD IgG Fcの障害

本明細書に記載の障害物質が、PDの臨床的免疫病理と関連のあるドーパミン作動性細胞の細胞破壊を防止しうるか否かを判定するための実験を行う。ドーパミン作動性細胞株MES 23.5は、精製マウスミクログリアを用いて調製される (Le et al. (2001) J. Neurosci. 21:8447-8455)。精製された免疫複合体を形成したPD IgGを調製し、本明細書に記載のFcR障害物質の存在下または非存在下で細胞培養物に添加する。免疫複合体を形成したIgG Fcに対する α -シヌクレインの結合も、実施例5に記載した方法に従って測定する。

【0112】

実施例9 - インビボモデルにおける免疫複合体を形成したPD IgG Fcの障害

50

本明細書に記載の阻害物質が、PD IgGのミクログリアFcγRとの結合を防止し、それ故に、PDと関連のある主要な病理学的病変であるSNドーパミン作動性細胞の破壊を防止するか否かを判定するためにインビボ実験を行う。PD IgGを上記の通りに調製し（He et al., 前記）、20 μlをマウスSN内に定位的に注射する。FcγIIbノックアウトマウスも、受動的に導入されたPDのインビボモデルとして、阻害物質の存在下または非存在下で用いられる。

【0113】

実施例10 - FcγR阻害物質を用いた、インビボモデルにおけるコリン作動性ニューロンのAD IgGを介した傷害の阻害

ADは、前脳基底部におけるコリン作動性ニューロン（CN）の損失を特徴とする進行性の神経変性疾患である。成体雌性Sprague-Dawleyラットの前脳基底部へのAD IgGの定位的注射は、ヒトAD患者におけるCN変性の特徴であるChAT免疫染色CN細胞の有意な減少を引き起こすことが示されている（Engelhardt et al. (2000) 前記）。このため、本明細書に記載のFcγR阻害物質が、ADに認められる変性免疫病理を招くFcγRMクログリアの活性化およびIgG FcのCN細胞内への内部移行を防止するか否かを判定するためにインビボ実験を行う。FcγIIbノックアウトマウスも、受動的に導入されたADのインビボモデルとして、阻害物質の存在下または非存在下で用いられる。

【0114】

実施例11 - 免疫複合体を形成したIgGのwtタウとの結合の阻害

1ml蒸留水中にて2 μlのウサギ抗ペルオキシダーゼ抗体を50 μlのペルオキシダーゼと混合することによってPAP複合体を形成させた。PAP（100 μl）は100 μlのペプチドとともに1時間ブレインキュベートした。対照PAP（200 μl）も1時間インキュベートした。100 μlのPAPまたはPAP/ペプチドを、16.7 μg/mlのヒトwtタウタンパク質（441残基；Sigma-Aldrich）によって24時間かけてコーティングしたFalconマイクロタイタープレートに添加した。1時間後に、PAPまたはペプチド/PAP混合物（100 μl）を、タウでコーティングしたプレートに添加し、60分間インキュベートした。洗浄の後に、プレートをATBSとともに15分間インキュベートし、405nmで読み取った。結果は表6に示されている。

【0115】

【表6】

ペプチド	SEQ ID NO:	Wtタウタンパク質
DCAWHLGELVWCT	2	0.322
APPDCAWHLGELVWCT	16	0.059
陽性対照	-	0.695
陰性対照（基質のみ）	-	0.060

【0116】

ペプチドAPPDCAWHLGELVWCT（SEQ ID NO：16）は、PAPに対するヒトwtタウタンパク質の結合の最大の阻害をもたらし、その次がペプチドDCAWHLGELVWCT（SEQ ID NO：2）であった。

【0117】

実施例12 - 免疫複合体を形成したIgGのwt β-アミロイドペプチドとの結合の阻害

Aβペプチドの種々の断片はADの疾病特徴であるアミロイド斑の原因となっており、これらのAβ断片はミクログリア活性化およびそれに続くAD神経病理を誘発するように思われる。このため、Aβ 1-40を免疫複合体に対する結合に関して検討するため、および本明細書に記載の阻害物質がPAP免疫複合体のAβペプチドとの結合を阻害するか否かを判定するために実験を行った。1ml蒸留水中にて2 μlのウサギ抗ペルオキシダーゼ抗体を50 μlのペルオキシダーゼと混合することによってPAP複合体を調製した。PAP（100 μl）は100 μlのペプチドとともに1時間ブレインキュベートした。対照PAP（200 μl）も1時間インキュベートし、100 μlのPAPまたはPAP/ペプチドを、配列Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys

-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val (SEQ ID NO : 39) を有するヒトwt β アミロイドペプチド1-40 (アミロイド前駆タンパク質 (APP) 断片1-40 ; Sigma-Aldrich) 33 μ g/ml によって24時間かけてコーティングしたFalconマイクロタイタープレートに添加した。PAPまたはペプチド/PAP混合物を、 β -アミロイドペプチドでコーティングしたプレート上で60分間インキュベートした。洗浄の後に、プレートをATBSとともに15分間インキュベートし、405nmで読み取った。結果は表7に示されている。

【 0 1 1 8 】

【表 7】

ペプチド	SEQ ID NO:	Wt 1-40 β -アミロイド ペプチド
DCAWHLGELVWCT	2	0.151
APPDCAWHLGELVWCT	16	0.885
陽性対照	-	3.278
陰性対照 (基質のみ)	-	0.061

10

【 0 1 1 9 】

ペプチドDCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO : 2) は、PAPに対するヒトwt β アミロイドペプチドの結合の最大の阻害をもたらし、その次がペプチドAPPDCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO : 16) であった。

【 0 1 2 0 】

20

その他の態様

本発明をその詳細な説明とともに説明してきたが、以上の説明は本発明を例示するためのものであって、その範囲を限定するものではなく、それは添付する特許請求の範囲によって規定されることが理解される必要がある。その他の局面、利点および変更は以下の特許請求の範囲に含まれる。

【配列表】

0005329961000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 25/28 (2006.01) A 6 1 P 25/28
 C 0 7 K 7/08 (2006.01) C 0 7 K 7/08 Z N A

(31)優先権主張番号 60/779,853

(32)優先日 平成18年3月8日(2006.3.8)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(72)発明者 ボディー ニール エム.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 アグラ ヒルズ ロードサイド ドライブ 2 8 9 1 8

(72)発明者 ボディー レニー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 アグラ ヒルズ ジョン ドンソン ドライブ 5 4 4 2

(72)発明者 アルトマン エリオット

アメリカ合衆国 ジョージア州 アセンズ グレート オーク ドライブ 2 1 0

審査官 川寄 洋祐

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 0 8 7 7 6 5 (U S , A 1)

DeLano WL et al., Convergent solutions to binding at a protein-protein interface., Science, 2 0 0 0 年 2 月 1 8 日, Vol.287 no.5456, pp.1279-1283

Riederer IM et al., Human immunoglobulins and Fc fragments promote microtubule assembly via tau proteins and induce conformational changes of neuronal microtubules in vitro., Neuroreport., 2 0 0 3 年 1 月 2 0 日, Vol.14 no.1, pp.117-121

Hamano Y et al., Immune complex and Fc receptor -mediated augmentation of antigen Presentation for in Vivo Th Cell Responses, The Journal of Immunology, 2 0 0 0 年, Vol.164, pp.6113-6119

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0

A 6 1 P 2 1 / 0 4

A 6 1 P 2 5 / 1 6

A 6 1 P 2 5 / 2 8

A 6 1 P 3 7 / 0 2

A 6 1 P 4 3 / 0 0

C 0 7 K 7 / 0 8

C A / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)