(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-542096
(P2024-542096A)
(43)公表日　令和6年11月13日(2024.11.13)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 14/705 (2006.01)		C07K	14/705	ZNA	4C076
C07K 19/00 (2006.01)		C07K	19/00		4C084
C07K 16/00 (2006.01)		C07K	16/00		4C085
C12N 15/12 (2006.01)		C12N	15/12		4H045
C12N 15/13 (2006.01)		C12N	15/13		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全36頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-526578(P2024-526578)
(86)(22)出願日　令和4年11月3日(2022.11.3)
(85)翻訳文提出日　令和6年7月1日(2024.7.1)
(86)国際出願番号　PCT/GB2022/052764
(87)国際公開番号　WO2023/079278
(87)国際公開日　令和5年5月11日(2023.5.11)
(31)優先権主張番号　2115803.5
(32)優先日　令和3年11月3日(2021.11.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(81)指定国・地域　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,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　518399081
デュセンティス バイオセラピューティクス リミテッド
英国 ウィットニー オックスフォードシャー オーエックス２９ ８エーダブリュー フリーランド ブレンヘイム レーン ９
(74)代理人　100118902
弁理士　山本 修
(74)代理人　100106208
弁理士　宮前 徹
(74)代理人　100196508
弁理士　松尾 淳一
(74)代理人　100122644
弁理士　寺地 拓己
(72)発明者　アシュフィールド，レベッカ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　新規タンパク質

(57)【要約】
本発明は、一般に、ＣＤ２００受容体に野生型ＣＤ２００よりも高い親和性で結合する変異型ＣＤ２００タンパク質に関するものであり、特に、本発明は、アミノ酸残基１３０位及び／又は１３１位に特異的変異を含む変異したＣＤ２００タンパク質に関する。本発明はまた、非ＣＤ２００タンパク質部分に直接又は任意のリンカー部分を介して融合した、本明細書で定義されるタンパク質を含む融合タンパク質、本明細書で定義されるタンパク質を含む医薬組成物、及びそれらの使用に関する。
【選択図】図１

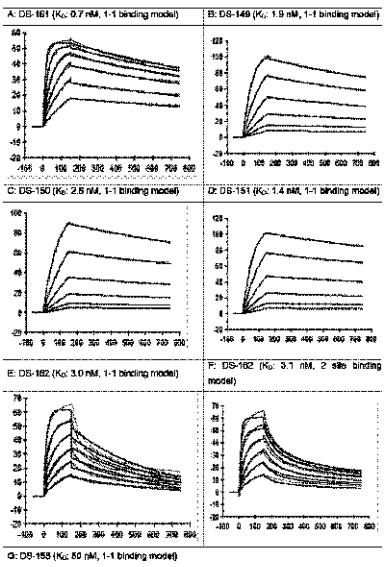


FIGURE 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の変異：
（ｉ）Ｋ１３０Ｆ；又は
（ｉｉ）Ｉ１３１Ｆ；又は
（ｉｉｉ）Ｋ１３０Ｆ及びＩ１３１Ｆ；又は
（ｉｖ）Ｋ１３０Ｆ及びＩ１３１Ｙ；又は
（ｖ）Ｋ１３０Ｙ及びＩ１３１Ｆ、
を含む変異したＣＤ２００タンパク質。
【請求項２】
１３０位及び／又は１３１位に以下の変異：
（ｉ）Ｋ１３０Ｆ；又は
（ｉｉ）Ｉ１３１Ｆ；又は
（ｉｉｉ）Ｋ１３０Ｆ及びＩ１３１Ｆ；又は
（ｉｖ）Ｋ１３０Ｆ及びＩ１３１Ｙ；又は
（ｖ）Ｋ１３０Ｙ及びＩ１３１Ｆ、
を有する、
ＱＶＱＶＶＴＱＤＥＲＥＱＬＹＴＰＡＳＬＫＣＳＬＱＮＡＱＥＡＬＩＶＴＷＱＫＫＫＡＶ
ＳＰＥＮＭＶＴＦＳＥＮＨＧＶＶＩＱＰＡＹＫＤＫＩＮＩＴＱＬＧＬＱＮＳＴＩＴＦＷＮ
ＩＴＬＥＤＥＧＣＹＭＣＬＦＮＴＦＧＦＧＫＩＳＧＴＡＣＬＴＶＹＶＱＰＩＶＳＬＨＹＫ
ＦＳＥＤＨＬＮＩＴＣＳＡＴＡＲＰＡＰＭＶＦＷＫＶＰＲＳＧＩＥＮＳＴＶＴＬＳＨＰＮ
ＧＴＴＳＶＴＳＩＬＨＩＫＤＰＫＮＱＶＧＫＥＶＩＣＱＶＬＨＬＧＴＶＴＤＦＫＱＴＶＮ
Ｋ（配列番号２６）
と少なくとも９０％の同一性を含む変異したＣＤ２００タンパク質を含む、ポリペプチド。
【請求項３】
１３０位及び／又は１３１位に以下の変異：
（ｉ）Ｋ１３０Ｆ；又は
（ｉｉ）Ｉ１３１Ｆ；又は
（ｉｉｉ）Ｋ１３０Ｆ及びＩ１３１Ｆ；又は
（ｉｖ）Ｋ１３０Ｆ及びＩ１３１Ｙ；又は
（ｖ）Ｋ１３０Ｙ及びＩ１３１Ｆ、
を有する、
ＭＥＲＬＶＩＲＭＰＦＳＨＬＳＴＹＳＬＶＷＶＭＡＡＶＶＬＣＴＡＱＶＱＶＶＴＱＤＥＲ
ＥＱＬＹＴＰＡＳＬＫＣＳＬＱＮＡＱＥＡＬＩＶＴＷＱＫＫＫＡＶＳＰＥＮＭＶＴＦＳＥ
ＮＨＧＶＶＩＱＰＡＹＫＤＫＩＮＩＴＱＬＧＬＱＮＳＴＩＴＦＷＮＩＴＬＥＤＥＧＣＹＭ
ＣＬＦＮＴＦＧＦＧＫＩＳＧＴＡＣＬＴＶＹＶＱＰＩＶＳＬＨＹＫＦＳＥＤＨＬＮＩＴＣ
ＳＡＴＡＲＰＡＰＭＶＦＷＫＶＰＲＳＧＩＥＮＳＴＶＴＬＳＨＰＮＧＴＴＳＶＴＳＩＬＨ
ＩＫＤＰＫＮＱＶＧＫＥＶＩＣＱＶＬＨＬＧＴＶＴＤＦＫＱＴＶＮＫＧＹＷＦＳＶＰＬＬ
ＬＳＩＶＳＬＶＩＬＬＶＬＩＳＩＬＬＹＷＫＲＨＲＮＱＤＲＧＥＬＳＱＧＶＱＫＭＴ（配
列番号２７）
のアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を含む、請求項２に記載のポリペプチド。
【請求項４】
請求項１～３のいずれか１項に記載のタンパク質又はポリペプチドを含み、非ＣＤ２００部分に直接又はリンカー部分を介して融合した、融合タンパク質。
【請求項５】
前記非ＣＤ２００部分が抗体又はその断片である、請求項４に記載の融合タンパク質。
【請求項６】
前記非ＣＤ２００部分がＦｃ断片である、請求項５に記載の融合タンパク質。
【請求項７】

前記Ｆｃ断片が、ヒトＩｇＧ４のＳ２２８Ｐ誘導体などのヒトＩｇＧ２又はヒトＩｇＧ４であるか、又はそれらに由来する、請求項６に記載の融合タンパク質。
【請求項８】
ＣＤ２００のアミノ酸グリシン２３２をＦｃヒンジ領域のアミノ酸１に直接融合して形成されたＦｃ融合タンパク質、又はＣＤ２００のアミノ酸グリシン２３２をＦｃヒンジ領域のアミノ酸６に直接融合して形成されたＦｃ融合タンパク質である、請求項６又は７に記載の融合タンパク質。
【請求項９】
配列番号１～２２のいずれか１つから選択される、請求項４～８のいずれか１項に記載の融合タンパク質。
【請求項１０】
ＣＤ２００受容体のモジュレーターである、請求項１～９のいずれか１項に記載のタンパク質、ポリペプチド、又は融合タンパク質。
【請求項１１】
ＣＤ２００受容体のアゴニストである、請求項１～１０のいずれか１項に記載のタンパク質、ポリペプチド、又は融合タンパク質。
【請求項１２】
請求項１～１１のいずれか１項に記載のタンパク質、ポリペプチド、又は融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。
【請求項１３】
請求項１～１２のいずれか１項に記載のタンパク質、ポリペプチド、融合タンパク質、又はポリヌクレオチド、及び担体を含む医薬組成物。
【請求項１４】
自己免疫疾患、アレルギー性疾患、神経変性、又は神経障害性疼痛の治療において使用するための、請求項１に記載のタンパク質、請求項２又は３に記載のポリペプチド、請求項４～１１のいずれか１項に記載の融合タンパク質、請求項１２に記載のポリヌクレオチド、又は請求項１３に記載の医薬組成物。
【請求項１５】
アトピー性皮膚炎、円形脱毛症、喘息、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、多発性硬化症、及び関節リウマチから選択される自己免疫疾患の治療において使用するための、請求項１に記載のタンパク質、請求項２又は３に記載のポリペプチド、請求項４～１１のいずれか１項に記載の融合タンパク質、請求項１２に記載のポリヌクレオチド、又は請求項１３に記載の医薬組成物。
【請求項１６】
糖尿病性神経障害である神経障害性疼痛の治療において使用するための、請求項１に記載のタンパク質、請求項２又は３に記載のポリペプチド、請求項４～１１のいずれか１項に記載の融合タンパク質、請求項１２に記載のポリヌクレオチド、又は請求項１３に記載の医薬組成物。
【請求項１７】
請求項１に記載のタンパク質、請求項２又は３に記載のポリペプチド、請求項４～１１のいずれか１項に記載の融合タンパク質、請求項１２に記載のポリヌクレオチド、又は請求項１３に記載の医薬組成物を被験体に投与することを含む、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、神経変性、又は神経障害性疼痛を有する被験体を治療する方法。
【請求項１８】
自己免疫疾患が、アトピー性皮膚炎、円形脱毛症、喘息、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、多発性硬化症、及び関節リウマチから選択される、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
神経障害性疼痛が糖尿病性神経障害である、請求項１７に記載の方法。
【発明の詳細な説明】

【技術分野】
【０００１】
本発明は、一般に、野生型ＣＤ２００よりもＣＤ２００受容体に高い親和性で結合する変異型ＣＤ２００タンパク質に関するものであり、特に、本発明は、アミノ酸残基１３０位及び／又は１３１位に特異的変異を含む変異したＣＤ２００タンパク質に関する。本発明はまた、非ＣＤ２００タンパク質部分に直接又は任意のリンカー部分を介して融合した、本明細書で定義されるタンパク質を含む融合タンパク質、本明細書で定義されるタンパク質を含む医薬組成物、及びそれらの使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
自己免疫疾患は、世界における慢性疾患の原因の第２位であり、米国では女性の罹患率の第１位である。２００８年の国際調査によると、米国の慢性疾患患者は、他国の患者と比較して、費用負担のために適切なケアを受けずにいる傾向が強い（Ｓｃｈｏｅｎ，Ｃ．ら（２００８）Ｈｅａｌｔｈ Ａｆｆａｉｒｓ Ｗｅｂ Ｅｘｃｌｕｓｉｖｅ、ｗ１～ｗ１６）。さらに、このような患者は、最も高い発生率の医療事故、ケアの連携の問題、及び高額な医療費の自己負担を経験する可能性が高い。
【０００３】
現在、米国自己免疫疾患協会（ＡＡＲＤＡ）は、５０００万人の米国人が自己免疫疾患に罹患していると推定している。自己免疫疾患による医療システム全体への直接的及び間接的な全費用を決定する疫学的データは不足している。しかしながら、２００１年、アメリカ国立アレルギー・感染症研究所（ＮＩＡＩＤ）のアンソニー・ファウチ所長は、自己免疫疾患の年間治療費は１０００億ドルを超えると推定した。１０００億ドルは驚異的な数字ではあるが、１００以上ある既知の自己免疫疾患のうち、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、多発性硬化症（ＭＳ）、関節リウマチ（ＲＡ）、乾癬、及び強皮症の７つのみにかかる年間費用が、疫学調査によって年間合計５１８億ドルから７０６億ドルに上ると推定されていることから、自己免疫疾患にかかる真の費用は、大幅に過小評価されている可能性が高い。さらに、これらの推定は、移植中の免疫抑制療法の費用を見落としている。
【０００４】
免疫系が健康な細胞を異物と判断して攻撃することで発症する自己免疫疾患は、治療法のない慢性状態である。自己免疫疾患は、その種類によって、１つ又は多くの異なる種類の身体組織に影響を及ぼす可能性があり、臓器の異常な成長及び臓器機能の変化を引き起こす可能性がある。免疫系の正常な制御は、免疫応答に関与する細胞によって発現されるタンパク質を含む受容体／リガンドペアによるところが大きい。しかしながら、これらの受容体／リガンドペアは、自己免疫疾患の病態を引き起こすシグナル伝達カスケードにしばしば含まれる。
【０００５】
ＯＸ－２膜糖タンパク質は、ＣＤ２００（分化抗原群２００）とも呼ばれ、様々な細胞型で発現し（Ｂａｒｃｌａｙ，Ａ．Ｎ．（１９８１）Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ４４、７２７）、免疫グロブリン遺伝子ファミリーの分子と高い相同性を有する、ＣＤ２００遺伝子によってコードされるヒトタンパク質である。この遺伝子によってコードされるタンパク質は、２つの免疫グロブリンドメインを含み、ＣＤ２００受容体（ＣＤ２００Ｒ）に結合する１型膜糖タンパク質である。
【０００６】
ＣＤ２００Ｒは骨髄系細胞（単球、マクロファージ、樹状細胞、及び好酸球）及びＴ細胞で発現している（Ｗｒｉｇｈｔら（２０００）、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ １２、２３３～２４２；Ｗｒｉｇｈｔら（２００３）、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ、１７１、３０３４～３０４６）。
【０００７】
ＣＤ２００とＣＤ２００Ｒとの会合は、骨髄球及びＴ細胞に抑制シグナルを送達し、し

たがって、免疫系の自然部門及び適応部門の両方に免疫抑制効果を及ぼす（Ｒａｈｉｍ Ｓ．Ａ．（２００５）ＡＩＤＳ、１９、１９０７～１９２５；Ｓｈｉｒａｔｏｒｉ，Ｉ．（２００５）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ、１７５、４４４１～４４４９；Ｍｉｓｓｔｅａｒ，Ｋ．ら（２０１２）、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、８６（１１）、６２４６～６２５７）。

【０００８】

ＣＤ２００Ｒアゴニストは、広範なマウス疾患モデル、例えば関節炎（Ｇｏｒｃｚｙｎｓｋｉら（２００１）Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０１、３２８～３４；Ｇｏｒｃｚｙｎｓｋｉら（２００２）Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０４、２５６～２６４）、移植片拒絶（Ｇｏｒｃｚｙｎｓｋｉら（２００２）Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ ７３、１９４８～１９５３）、妊娠の失敗（Ｇｏｒｃｚｙｎｓｋｉら（２００２）Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｐｒｏｄ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、４８、１８～２６）、接触過敏症（Ｒｏｓｅｎｂｌｕｍら（２００４）Ｂｌｏｏｄ １０３、２６９１～８）、インフルエンザ誘発肺炎（Ｓｎｅｌｇｒｏｖｅら（２００８）Ｎａｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、９、１０７４～１０８３）、及びＨＳＶ誘発炎症性病変（Ｓａｒａｎｇｉら（２００９）Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３１，３１～４０）において病態を軽減することが示されている。

【０００９】

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

【００１０】

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

【００１１】

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

【００１２】

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

【００１３】

したがって、現在利用可能な自己免疫疾患の治療に関連する問題を克服する、より低用量で改善された臨床効果を提供する必要がある。

【発明の概要】

【００１４】
本発明の第１の態様によれば、以下の変異：
（ｉ）Ｋ１３０Ｆ；又は
（ｉｉ）Ｉ１３１Ｆ；又は
（ｉｉｉ）Ｋ１３０Ｆ及びＩ１３１Ｆ；又は
（ｉｖ）Ｋ１３０Ｆ及びＩ１３１Ｙ；又は
（ｖ）Ｋ１３０Ｙ及びＩ１３１Ｆ、
を含む、変異したＣＤ２００タンパク質が提供される。
【００１５】
本発明の第２の態様によれば、非ＣＤ２００部分に直接又は任意のリンカー部分を介して融合した、本明細書で定義されるタンパク質を含む融合タンパク質が提供される。
本発明のさらなる態様によれば、本明細書で定義されるタンパク質又は融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドが提供される。
【００１６】
本発明のさらなる態様によれば、本明細書で定義されるタンパク質、ポリペプチド、又は融合タンパク質を含む医薬組成物が提供される。
本発明のさらなる態様によれば、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、神経変性、又は神経障害性疼痛の治療に使用するための、本明細書で定義されるタンパク質、融合タンパク質、又は医薬組成物が提供される。
【図面の簡単な説明】
【００１７】
【図１】高親和性ＣＤ２００－Ｆｃ（パネルＡ～Ｆ）及び野生型ＣＤ２００－Ｆｃ（パネルＧ）融合分子がヒトＣＤ２００受容体に２５℃で結合する際の結合反応並びにオフ速度を示す表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）センサーグラムを示す図である。
【図２】ＣＤ２００Ｒ発現Ｕ９３７細胞のＬＰＳ刺激によるＩＬ－６分泌阻害を示す棒グラフを示す図である。
【図３】ＣＤ２００Ｒ発現Ｕ９３７細胞のＬＰＳ刺激によるＩＬ－６分泌阻害を示す棒グラフを示す図である。
【図４】ＣＤ２００Ｒ発現Ｕ９３７細胞のＬＰＳ刺激によるＩＬ－６分泌阻害を示す棒グラフを示す図である。
【図５】ＣＤ２００Ｒ発現Ｕ９３７細胞のＬＰＳ刺激によるＩＬ－６分泌阻害を示す棒グラフを示す図である。
【図６】ＣＤ２００Ｒ発現Ｕ９３７細胞のＬＰＳ刺激によるＩＬ－６分泌阻害を示す棒グラフを示す図である。
【図７】ＣＤ２００Ｒ発現Ｕ９３７細胞のＬＰＳ刺激によるＩＬ－６分泌阻害を示す棒グラフを示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００１８】
本発明の第１の態様によれば、以下の変異：
（ｉ）Ｋ１３０Ｆ；又は
（ｉｉ）Ｉ１３１Ｆ；又は
（ｉｉｉ）Ｋ１３０Ｆ及びＩ１３１Ｆ；又は
（ｉｖ）Ｋ１３０Ｆ及びＩ１３１Ｙ；又は
（ｖ）Ｋ１３０Ｙ及びＩ１３１Ｆ、
を含む変異したＣＤ２００タンパク質が提供される。
【００１９】
本発明のさらなる態様によれば、
１３０位及び／又は１３１位に以下の変異：
（ｉ）Ｋ１３０Ｆ；又は
（ｉｉ）Ｉ１３１Ｆ；又は

（ｉｉｉ）Ｋ１３０Ｆ及びＩ１３１Ｆ；又は
（ｉｖ）Ｋ１３０Ｆ及びＩ１３１Ｙ；又は
（ｖ）Ｋ１３０Ｙ及びＩ１３１Ｆ、
を有する、
ＱＶＱＶＶＴＱＤＥＲＥＱＬＹＴＰＡＳＬＫＣＳＬＱＮＡＱＥＡＬＩＶＴＷＱＫＫＫＡＶ
ＳＰＥＮＭＶＴＦＳＥＮＨＧＶＶＩＱＰＡＹＫＤＫＩＮＩＴＱＬＧＬＱＮＳＴＩＴＦＷＮ
ＩＴＬＥＤＥＧＣＹＭＣＬＦＮＴＦＧＦＧＫＩＳＧＴＡＣＬＴＶＹＶＱＰＩＶＳＬＨＹＫ
ＦＳＥＤＨＬＮＩＴＣＳＡＴＡＲＰＡＰＭＶＦＷＫＶＰＲＳＧＩＥＮＳＴＶＴＬＳＨＰＮ
ＧＴＴＳＶＴＳＩＬＨＩＫＤＰＫＮＱＶＧＫＥＶＩＣＱＶＬＨＬＧＴＶＴＤＦＫＱＴＶＮ
Ｋ（配列番号２６）
と少なくとも９０％の同一性を有する変異したＣＤ２００タンパク質を含むポリペプチドが提供される。

【００２０】

配列番号２６のポリペプチド配列は、ＣＤ２００の細胞外ドメインの野生型ポリペプチド配列に関することが理解される。

１つの実施形態では、ポリペプチドは、
１３０位及び／又は１３１位に以下の変異：
（ｉ）Ｋ１３０Ｆ；又は
（ｉｉ）Ｉ１３１Ｆ；又は
（ｉｉｉ）Ｋ１３０Ｆ及びＩ１３１Ｆ；又は
（ｉｖ）Ｋ１３０Ｆ及びＩ１３１Ｙ；又は
（ｖ）Ｋ１３０Ｙ及びＩ１３１Ｆ、
を有する、
ＭＥＲＬＶＩＲＭＰＦＳＨＬＳＴＹＳＬＶＷＶＭＡＡＶＶＬＣＴＡＱＶＱＶＶＴＱＤＥＲ
ＥＱＬＹＴＰＡＳＬＫＣＳＬＱＮＡＱＥＡＬＩＶＴＷＱＫＫＫＡＶＳＰＥＮＭＶＴＦＳＥ
ＮＨＧＶＶＩＱＰＡＹＫＤＫＩＮＩＴＱＬＧＬＱＮＳＴＩＴＦＷＮＩＴＬＥＤＥＧＣＹＭ
ＣＬＦＮＴＦＧＦＧＫＩＳＧＴＡＣＬＴＶＹＶＱＰＩＶＳＬＨＹＫＦＳＥＤＨＬＮＩＴＣ
ＳＡＴＡＲＰＡＰＭＶＦＷＫＶＰＲＳＧＩＥＮＳＴＶＴＬＳＨＰＮＧＴＴＳＶＴＳＩＬＨ
ＩＫＤＰＫＮＱＶＧＫＥＶＩＣＱＶＬＨＬＧＴＶＴＤＦＫＱＴＶＮＫＧＹＷＦＳＶＰＬＬ
ＬＳＩＶＳＬＶＩＬＬＶＬＩＳＩＬＬＹＷＫＲＨＲＮＱＤＲＧＥＬＳＱＧＶＱＫＭＴ（配列番号２７）
のアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を含む。

【００２１】

配列番号２７のポリペプチド配列は、ＣＤ２００の全長野生型ポリペプチド配列に関することが理解される。

本発明者らは、特定のアミノ酸残基（ｉ）～（ｖ）でのＣＤ２００の変異が、ＣＤ２００受容体（ＣＤ２００Ｒ）への結合親和性を増大させた変異型ＣＤ２００を産生することを見出した。さらに、本発明者らは、３０００秒を超えないような、ＣＤ２００受容体上での短い滞留時間と高親和性結合を示す分子とを組み合わせると、最適な効果が得られることを見出した。さらに、本明細書に記載の変異したＣＤ２００タンパク質は、特に、より高い臨床効果及び低用量での治療を提供するという点で、大きな利点を有する。

【００２２】

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

本明細書で使用される「野生型」という用語は、自然界に存在するタンパク質、ペプチド、アミノ酸、及びヌクレオチド配列を表す。例えば、本明細書で使用される「野生型ＣＤ２００タンパク質」という用語は、ＣＤ２００受容体に結合するＣＤ２００の任意の全長アイソフォーム（ＵＮＩＰＲＯＴ　Ｐ４１２１７　ＯＸ２Ｇ＿ＨＵＭＡＮ）又はその任意の部分（天然に存在するタンパク質多型を含む）を表す。ＣＤ２００タンパク質はまた、ＯＸ－２膜糖タンパク質として知られている。

【００２３】
野生型ＣＤ２００は、細胞表面タンパク質であり、Ｎ末端の細胞外ドメイン、並びに短い膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを有する。細胞外ドメインは、ＣＤ２００受容体などの標的受容体に結合する。１つの実施形態では、ＣＤ２００タンパク質は、ＣＤ２００受容体に結合するＣＤ２００の細胞外ドメイン又はその任意の部分である。
【００２４】
本明細書で使用される「位置」という用語は、アミノ酸配列中の残基番号を表し、１は最初に翻訳されたアミノ酸である。
本明細書で使用される「変異した」又は「変異」という用語は、野生型同等物から形態が変化して変異型となったタンパク質、ペプチド、アミノ酸、及びヌクレオチド配列表す。例えば、変異した又は変異型タンパク質は、対応する野生型配列と比較した場合、アミノ酸配列及び／又はヌクレオチド配列に変化が生じている可能性があり、このような変化は変異とも呼ばれ得る。
【００２５】
本明細書で使用される「変異したＣＤ２００タンパク質」という用語は、野生型ＣＤ２００タンパク質と類似しているがもはや同一ではないように、アミノ酸配列において変異したアミノ酸残基又は複数の変異したアミノ酸残基を含む、ＣＤ２００受容体に結合する全長ＣＤ２００タンパク質又はその任意の部分を表す。
【００２６】
１つの実施形態では、変異したＣＤ２００タンパク質は、合成的又は組換え的に作製することができる。さらなる実施形態では、変異したＣＤ２００タンパク質は、合成的に作製することができる。代替実施形態では、変異したＣＤ２００タンパク質は、組換え的に作製することができる。
【００２７】
１つの実施形態では、変異したＣＤ２００タンパク質は、野生型ＣＤ２００よりも高い親和性でＣＤ２００受容体に結合する。
１つの実施形態では、変異したＣＤ２００タンパク質は、生物学的又は化学的に活性な非ＣＤ２００成分をその中に、又はそれに結合して含み得る。
【００２８】
１つの実施形態では、変異したＣＤ２００タンパク質は、可溶性（すなわち循環性）でもよく、又は表面に結合してもよい。さらなる実施形態では、変異したＣＤ２００タンパク質は、可溶性である。代替実施形態では、変異したＣＤ２００タンパク質は、表面に結合している。
【００２９】
１つの実施形態では、変異したＣＤ２００タンパク質は、ＣＤ２００の細胞外ドメイン全体又はその部分を含むことができる。さらなる実施形態では、変異したＣＤ２００タンパク質は、シグナル配列を含む。分泌されたタンパク質は、分泌前に切断されてもよいシグナル配列を構成する、いくらかのアミノ酸をＮ末端に含んでいることが理解される。したがって、特定の実施形態では、変異したＣＤ２００タンパク質は、産生細胞から分泌前に切断されるシグナル配列をＮ末端に含む。さらなる実施形態では、シグナル配列は、野生型ＣＤ２００タンパク質のアミノ酸１６～３５位から選択される任意の位置で切断することができる。１つの実施形態では、シグナル配列は、野生型ＣＤ２００タンパク質の最初の２８アミノ酸を含む。代替実施形態では、シグナル配列は、野生型ＣＤ２００タンパク質の最初の２９アミノ酸を含む。さらなる代替実施形態では、シグナル配列は、野生型ＣＤ２００タンパク質の最初の３０アミノ酸を含む。さらなる代替実施形態では、シグナル配列は、野生型ＣＤ２００タンパク質の最初の３１アミノ酸を含む。さらなる代替実施形態では、シグナル配列は、野生型ＣＤ２００タンパク質の最初の３２アミノ酸を含む。したがって、特定の実施形態では、変異したＣＤ２００タンパク質は、シグナル配列を含むアミノ酸を欠く、本明細書で定義される配列を含む。例えば、野生型ＣＤ２００タンパク質のアミノ酸１～３０を欠く場合、変異したＣＤ２００タンパク質は、本明細書で定義

される任意の配列のアミノ酸３１～２３２に対応する配列を含む。
【００３０】
タンパク質、ペプチド、及びアミノ酸、並びにヌクレオチド配列に関連して本明細書で使用される「部分」という用語は、機能的、すなわち標的に結合する断片及び誘導体を表す。
【００３１】
本明細書で使用される「断片」という用語は、受容体などのその標的を認識し結合するタンパク質、ペプチド、アミノ酸、又はヌクレオチド配列の一部を表す。
本明細書で使用される「誘導体」及び「変異体」という用語は、野生型同等物と少なくとも７０％（７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、又は９９％など）の配列類似性を共有し、同様に機能する、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、又はヌクレオチド配列を表す。したがって、変異体は、野生型同等物の誘導体であってもよい。
【００３２】
本明細書で使用される「アミノ酸残基」という用語は、重合体鎖中の単量体単位、すなわちタンパク質中の単一アミノ酸を表す。
本明細書で使用される「少なくとも９０％の同一性」という用語は、配列同一性又は配列相同性を共有する配列を表す。適切な例としては、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の同一性が挙げられる。
【００３３】
１つの実施形態では、タンパク質は、アミノ酸配列中に存在する１つ以上の変異、例えば１～１５個の変異をさらに含む。
１つの実施形態では、変異したＣＤ２００タンパク質は、Ｋ１３０Ｆの一置換変異を含む。この一置換変異を含む変異したタンパク質の具体例は、ＤＳ－１７５、ＤＳ－１６１、ＤＳ－１７４、及びＤＳ－２１３として本明細書に記載されている。
【００３４】
代替実施形態では、変異したＣＤ２００タンパク質は、Ｉ１３１Ｆの一置換変異を含む。この一置換変異を含む変異したタンパク質の具体例は、ＤＳ－２１５、ＤＳ－１６２、ＤＳ－２１６及びＤＳ－２１４として本明細書に記載されている。
【００３５】
代替実施形態では、変異したＣＤ２００タンパク質は、Ｋ１３０Ｆ及びＩ１３１Ｆの二重置換変異を含む。この二重置換変異を含む変異したタンパク質の具体例は、ＤＳ－２１７、ＤＳ－１５０、ＤＳ－２１８及びＤＳ－２２０として本明細書に記載されている。
【００３６】
代替実施形態では、変異したＣＤ２００タンパク質は、Ｋ１３０Ｆ及びＩ１３１Ｙの二重置換変異を含む。この二重置換変異を含む変異したタンパク質の具体例は、ＤＳ－１６４、ＤＳ－１５１、ＤＳ－１６３、ＤＳ－２１９、ＤＳ－１６７及びＤＳ－１６５として本明細書に記載されている。
【００３７】
代替実施形態では、変異したＣＤ２００タンパク質は、Ｋ１３０Ｙ及びＩ１３１Ｆの二重置換変異を含む。この二重置換変異を含む変異したタンパク質の具体例は、ＤＳ－２２１、ＤＳ－１４９、ＤＳ－２２２及びＤＳ－２２３として本明細書に記載されている。
【００３８】
図１及び表４に示すように、本発明の変異したＣＤ２００タンパク質は、ＣＤ２００受容体に、野生型ＣＤ２００タンパク質よりも強固に結合し、受容体上でより長い滞留時間を示す。
【００３９】
融合タンパク質
本発明の第２の態様によれば、非ＣＤ２００部分に直接又は任意のリンカー部分を介して融合した、本明細書で定義されるタンパク質を含む融合タンパク質が提供される。
【００４０】

例えば、リンカー部分は、１～１５個のアミノ酸、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、又は１５個のアミノ酸を含むペプチドである。

【００４１】

本明細書で使用される「融合タンパク質」という用語は、当技術分野で周知であり、例えば米国特許第５，４３４，１３１号及び第５，６３７，４８１号に記載されている方法を使用して一緒に連結された１つ以上のアミノ酸配列、ペプチド、及び／又はタンパク質を表す。これにより連結されたアミノ酸配列、ペプチド、又はタンパク質は、１つの融合タンパク質を形成する。

【００４２】

１つの実施形態では、本明細書のタンパク質は、Ｃ末端で非ＣＤ２００部分に直接又は任意のリンカー部分を介して融合される。

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

【００４３】

１つの実施形態では、当該非ＣＤ２００部分は、抗体又はその断片である。さらなる実施形態では、当該非ＣＤ２００部分は、Ｆｃ断片である。したがって、本明細書に記載されている変異したＣＤ２００融合タンパク質は、変異型ＣＤ２００－Ｆｃと呼ぶこともできる。さらなる実施形態では、Ｆｃ断片は、哺乳動物由来、例えばヒト又はサル由来であり、例えば、ヒンジ、ＣＨ２、及びＣＨ３領域を含むヒトＣ（γ）１である。Ｆｃ断片は、本発明の変異したＣＤ２００タンパク質の血清中半減期を増加させるという利点を提供し、さらに、ＣＤ２００タンパク質を二量体化することにより、結合活性を増加させ、作動性シグナル伝達を可能にする。エフェクター機能を低下させるためにＦｃ領域を変異させてもよいことは、当業者には理解される（例えば、ＵＳ５，６３７，４８１及びＵＳ６，１３２，９９２を参照）。

【００４４】

いくつかの実施形態では、ヒトＦｃドメインは、グリコシル化を除去するための、及び／又はＦｃ－γ受容体結合を減少させるための変異を含む。いくつかの実施形態では、ヒトＦｃドメインは、変異Ｎ２９７Ｑ、Ｎ２９７Ａ、又はＮ２９７Ｇを含み、いくつかの実施形態では、ヒトＦｃドメインは、２３４位及び／又は２３５位、例えばＬ２３５Ｅ、若しくはＬ２３４Ａ及びＬ２３５Ａ（ＩｇＧ１において）、又はＦ２３４Ａ及びＬ２３５Ａ（ＩｇＧ４において）で変異を含み、いくつかの実施形態では、ヒトＦｃドメインは、変異Ｖ２３４Ａ、Ｇ２３７Ａ、Ｐ２３８Ｓ、Ｈ２６８Ｑ／Ａ、Ｖ３０９Ｌ、Ａ３３０Ｓ、若しくはＰ３３１Ｓ、又はそれらの組合せを含むＩｇＧ２　Ｆｃドメインである（すべてＫａｂａｔ、ＥＵナンバリングに従う）。いくつかの実施形態では、ヒトＦｃドメインはそれぞれ、ヒトＩｇＧ１定常領域変異Ｌ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ（「ＬＡＬＡ」）又はヒトＩｇＧ１定常領域変異Ｌ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ／Ｐ３２９Ｇ（「ＬＡＬＡＰＧ」）を含む。操作されたヒトＦｃドメインのさらなる例は、当業者に公知である。少なくとも１つのアミノ酸の変異がＦｃ機能の低下をもたらすＩｇ重鎖定常領域アミノ酸の例としては、重鎖定常領域のアミノ酸２２８、２３３、２３４、２３５、２３６、２３７、２３９、２５２、２５４、２５６、２６５、２７０、２９７、３１８、３２０、３２２、３２７、３２９、３３０、及び３３１の変異が挙げられるが、これらに限定されない（Ｋａｂａｔ、ＥＵナンバリングに従う）。変異したアミノ酸の組合せの例も当技術分野で公知であり、限定されるものではないが、例えばアミノ酸２３４、２３５、及び３３１の変異の組合せ、例えば２３４、２３５、及び３２９の組合せ、例えばＬ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、及びＰ３３１Ｓ、又はアミノ酸３１８、３２０、及び３２２の組合せ、例えばＥ３１８Ａ、Ｋ３２０Ａ、及びＫ３２２Ａが挙げられる。

【００４５】
操作されたＦｃドメインのさらなる例としては、Ｆ２４３Ｌ／Ｒ２９２Ｐ／Ｙ３００Ｌ／Ｖ３０５Ｉ／Ｐ３９６　ＩｇＧ１；Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ　ＩｇＧ１；Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ／Ａ３３０Ｌ　ＩｇＧ１；Ｓ２９８Ａ／Ｅ３３３Ａ／Ｋ３３４Ａ；一方の重鎖では、Ｌ２３４Ｙ／Ｌ２３５Ｑ／Ｇ２３６Ｗ／Ｓ２３９Ｍ／Ｈ２６８Ｄ／Ｄ２７０Ｅ／Ｓ２９８Ａ　ＩｇＧ１；及び対向する重鎖では、Ｄ２７０Ｅ／Ｋ３２６Ｄ、Ａ３３０Ｍ／Ｋ３３４Ｅ　ＩｇＧ；Ｇ２３６Ａ／Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ　ＩｇＧ１；Ｋ３２６Ｗ／Ｅ３３３Ｓ　ＩｇＧ１；Ｓ２６７Ｅ／Ｈ２６８Ｆ／Ｓ３２４Ｔ　ＩｇＧ１；Ｅ３４５Ｒ／Ｅ４３０Ｇ／Ｓ４４０Ｙ　ＩｇＧ１；Ｎ２９７Ａ又はＮ２９７Ｑ又はＮ２９７Ｇ　ＩｇＧ１；Ｌ２３５Ｅ　ＩｇＧ１；Ｌ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ　ＩｇＧ１；Ｆ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ　ＩｇＧ４；Ｈ２６８Ｑ／Ｖ３０９Ｌ／Ａ３３０Ｓ／Ｐ３３１Ｓ　ＩｇＧ２；Ｖ２３４Ａ／Ｇ２３７Ａ／Ｐ２３８Ｓ／Ｈ２６８Ａ／Ｖ３０９Ｌ／Ａ３３０Ｓ／Ｐ３３１Ｓ　ＩｇＧ２；Ｍ２５２Ｙ／Ｓ２５４Ｔ／Ｔ２５６Ｅ　ＩｇＧ１；Ｍ４２８Ｌ／Ｎ４３４Ｓ　ＩｇＧ１；Ｓ２６７Ｅ／Ｌ３２８Ｆ　ＩｇＧ１；Ｎ３２５Ｓ／Ｌ３２８Ｆ　ＩｇＧ１などが挙げられる。いくつかの実施形態では、操作されたＦｃドメインは、Ｎ２９７Ａ　ＩｇＧ１、Ｎ２９７Ｑ　ＩｇＧ１、及びＳ２２８Ｐ　ＩｇＧ４から成る群より選択される１つ以上の置換を含む。

【００４６】
１つの態様では、Ｆｃバリアントを含む本開示のポリペプチドは、非修飾抗体と比較して、Ｆｃ受容体、例えばＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩＡ、ＦｃγＲＩＩＩＡに対する親和性の低下を示す。１つの態様では、Ｆｃバリアントを含むポリペプチドは、野生型ポリペプチドの親和性よりも少なくとも９５％、少なくとも９０％、少なくとも８０％、少なくとも７０％、少なくとも６０％、少なくとも５０％、少なくとも４０％、少なくとも３０％、少なくとも２０％、少なくとも１０％、少なくとも５％、又は少なくとも１％低いＦｃ受容体に対する親和性を示す。１つの態様では、本開示のＦｃバリアントを含むポリペプチドは、Ｆｃγ結合において７００倍を超える減少、又はＦｃγ結合において３，５００倍を超える減少を示す。

【００４７】
いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＥ、又はＩｇＭのバリアントＦｃ領域を含む。特定の実施形態では、抗体は、エフェクター機能が低下したアグリコシル化抗体である。特定の実施形態では、ＩｇＧ１のバリアントＦｃ領域は、（ａ）Ｌｅｕ２３４位でのアラニンによるアミノ酸置換、（ｂ）Ｌｅｕ２３５位でのアラニンによるアミノ酸置換、（ｃ）Ｐｒｏ３２９位でのグリシンもしくはアルギニンによるアミノ酸置換、（ｄ）Ａｓｎ２９７位でのアラニンによるアミノ酸置換、（ｅ）Ａｓｎ２９７位でのグルタミンによるアミノ酸置換、（ｆ）Ａｓｎ２９７位でのグリシンによるアミノ酸置換、又は（ｇ）（ａ）～（ｆ）の任意の組合せを含む。特定の実施形態では、ＩｇＧ２のバリアントＦｃ領域は、（ｇ）Ｓｅｒ２２８位でのプロリンによるアミノ酸置換、（ｈ）Ｐｒｏ３２９位でのグリシンもしくはアルギニンによるアミノ酸置換、又は（ｉ）（ｇ）及び（ｈ）の両方を含む。特定の実施形態では、ＩｇＧ４のバリアントＦｃ領域は、（ｊ）Ｓｅｒ２２８位でのプロリンによるアミノ酸置換、（ｋ）Ｌｅｕ２３５位でのアラニンもしくはグルタミン酸によるアミノ酸置換、（ｌ）Ｐｒｏ３２９位でのグリシン若しくはアルギニンによるアミノ酸置換、又は（ｍ）（ｊ）～（ｌ）の任意の組合せを含む。

【００４８】
１つの実施形態では、Ｆｃ断片は、ヒトＩｇＧ２若しくはヒトＩｇＧ４であるか、又はそれらに由来する。
さらなる実施形態では、非ＣＤ２００部分は、１つ以上のアミノ酸残基の変異を含む抗体Ｆｃ断片である。したがって、さらなる実施形態では、Ｆｃ断片は、ヒトＩｇＧ４のＳ２２８Ｐ誘導体である。

【００４９】

１つの実施形態では、融合タンパク質は、ＣＤ２００のアミノ酸グリシン２３２とＦｃヒンジ領域のアミノ酸１との直接融合によって形成されたＦｃ融合タンパク質である。
代替実施形態では、融合タンパク質は、ＣＤ２００のアミノ酸グリシン２３２とＦｃヒンジ領域のアミノ酸６との直接融合によって形成されたＦｃ融合タンパク質である。（この場合、Ｆｃヒンジの最初の５アミノ酸が欠失している）。

【００５０】

この説明のために、非ＣＤ２００部分がＦｃ断片である場合、非ＣＤ２００部分に関して本明細書で使用される「位置」という用語は、ＥＵナンバリングシステムに従ったアミノ酸配列における残基番号を表す。したがって、本明細書で引用するＦｃ断片のアミノ酸の残基位置は、ＥＵナンバリングシステムに従った位置に関することが理解される。さらに、Ｋａｂａｔ、Ａｈｏ、ＩＭＧＴ、Ｃｈｏｔｈｉａ、及びＭａｒｔｉｎ（ｅｎｈａｎｃｅｄ　Ｃｈｏｔｈｉａ）などのＦｃ断片配列中の残基のナンバリングのために開発された他のナンバリングシステムを代わりに利用してもよいことが理解される。例えば、本明細書でＦｃヒンジ領域に言及する場合、ＩＭＧＴナンバリング（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ／ＩＭＧＴＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃＣｈａｒｔ／Ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ／Ｈｕ＿ＩＧＨＧｎｂｅｒ．ｈｔｍｌ）によって定義されるアミノ酸位置１、又はＥＵナンバリングシステムによって定義されるアミノ酸位置２１６から始まるＦｃドメインの領域を表すことが意図される。

【００５１】

本発明の融合タンパク質の具体例は、配列番号１～２２として表１に例示されている。
１つの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号１～２２のいずれか１つから選択される。さらなる実施形態では、融合タンパク質は、配列番号１～１６及び１９～２２のいずれか１つから選択される。

【００５２】

【表１－１】

表１： 本発明の特定の融合タンパク質

変異体の番号	CD200の変異	Fc	CD200-Fc接合	全長融合タンパク質配列（CD200及びFcを含む）
DS-215	I131F	IgG2	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸6	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQVVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKKKAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQNSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFGK**F**SGTACLTVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFWKVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQVGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGVECPP**P**CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号1）
DS-162	I131F	IgG2	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸1	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQVVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKKKAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQNSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFGK**F**SGTACLTVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFWKVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQVGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGERKCCVECP**P**CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号2）
DS-175	K130F	IgG2	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸6	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQVVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKKKAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQNSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFG**F**ISGTACLTVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFWKVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQVGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGVECPP**P**CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号3）

【００５３】

【表１－２】

変異体の番号	CD200の変異	Fc	CD200-Fc接合	全長融合タンパク質配列(CD200及びFcを含む)
DS-161	K130F	IgG2	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸1	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQVVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKKKAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQNSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFG**F**ISGTACLTVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFWKVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQVGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGERKCCVECP**P**CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号4）
DS-217	K130F I131F	IgG2	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸6	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQVVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKKKAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQNSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFG**FF**SGTACLTVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFWKVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQVGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGVECP**P**CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号5）
DS-150	K130F I131F	IgG2	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸1	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQVVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKKKAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQNSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFG**FF**SGTACLTVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFWKVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQVGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGERKCCVECP**P**CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号6）

【００５４】

【表１－３】

変異体の番号	CD200の変異	Fc	CD200-Fc接合	全長融合タンパク質配列(CD200及びFcを含む)
DS-164	K130F I131Y	IgG2	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸6	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQ NSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFG**FY**SGTACL TVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFW KVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQ VGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGVECP**P**CPAP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK（配列番号7）
DS-151	K130F I131Y	IgG2	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸1	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQ NSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFG**FY**SGTACL TVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFW KVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQ VGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGERKCCVECP **P**CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPM LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号8）
DS-221	K130Y I131F	IgG2	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸6	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQ NSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFG**YF**SGTACL TVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFW KVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQ VGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGVECP**P**CPAP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK（配列番号9）

【００５５】

【表１－４】

変異体の番号	CD200の変異	Fc	CD200-Fc接合	全長融合タンパク質配列(CD200及びFcを含む)
DS-149	K130Y I131F	IgG2	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸1	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQ NSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFG**YF**SGTACL TVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFW KVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQ VGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGERKCCVECP **P**CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPM LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号10）
DS-216	I131F	IgG4 S228P	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸6	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQ NSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFGK**F**SGTACL TVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFW KVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQ VGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGPPCP**P**CPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK（配列番号11）
DS-214	I131F	IgG4 S228P	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸1	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQ NSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFGK**F**SGTACL TVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFW KVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQ VGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGESKYGPPCP **P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK（配列番号12）

【００５６】

【表１－５】

変異体の番号	CD200の変異	Fc	CD200-Fc接合	全長融合タンパク質配列（CD200及びFcを含む）
DS-174	K130F	IgG4 S228P	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸6	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQ NSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFG**F**ISGTACLT VYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFWK VPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQV GKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGPPCP**P**CPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK（配列番号13）
DS-213	K130F	IgG4 S228P	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸1	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQ NSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFG**F**ISGTACLT VYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFWK VPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQV GKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGESKYGPPCP**P** CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK（配列番号14）
DS-163	K130F I131Y	IgG4 S228P	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸6	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQ NSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFG**FY**SGTACL TVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFW KVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQ VGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGPPCP**P**CPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK（配列番号15）

【００５７】

【表１－６】

変異体の番号	CD200の変異	Fc	CD200-Fc接合	全長融合タンパク質配列（CD200及びFcを含む）
DS-219	K130F I131Y	IgG4 S228P	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸1	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQ NSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFG**FY**SGTACL TVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFW KVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQ VGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGESKYGPPCP **P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK（配列番号16）
DS-167	K130F I131Y	IgG4 S228P L235E P329G	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸6	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQ NSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFG**FY**SGTACL TVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFW KVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQ VGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGPPCP**P**CPAP EF**E**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL**G**SSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK（配列番号17）
DS-165	N95Q N103Q N110Q K130F I131Y N157Q N181Q N190Q	IgG4 S228P	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸6	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKI**Q**ITQLGLQ **Q**STITFW**Q**ITLEDEGCYMCLFNTFGFG**FY**SGTACL TVYVQPIVSLHYKFSEDHL**Q**ITCSATARPAPMVFW KVPRSGIE**Q**STVTLSHP**Q**GTTSVTSILHIKDPKNQ VGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGPPCP**P**CPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK（配列番号18）

【００５８】

【表１－７】

変異体の番号	CD200の変異	Fc	CD200-Fc接合	全長融合タンパク質配列（CD200及びFcを含む）
DS-218	K130F I131F	IgG4 S228P	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸6	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQ NSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFG**FF**SGTACL TVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFW KVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQ VGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGPPCP**P**CPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK（配列番号19）
DS-220	K130F I131F	IgG4 S228P	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸1	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQ NSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFG**FF**SGTACL TVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFW KVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQ VGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGESKYGPPCP **P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK（配列番号20）
DS-222	K130Y I131F	IgG4 S228P	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸6	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQ NSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFG**YF**SGTACL TVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFW KVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQ VGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGPPCP**P**CPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK（配列番号21）

【００５９】

【表１－８】

変異体の番号	CD200の変異	Fc	CD200-Fc接合	全長融合タンパク質配列（CD200及びFcを含む）
DS-223	K130Y I131F	IgG4 S228P	CD200のアミノ酸232－Fcヒンジのアミノ酸1	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQ NSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFG**YF**SGTACL TVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFW KVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQ VGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGESKYGPPCP **P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK（配列番号22）

【００６０】

野生型ＣＤ２００－Ｆｃ融合タンパク質の具体例は、配列番号２３～２５として表２に例示されている。

【００６１】

【表２】

表２： 野生型ＣＤ２００－Ｆｃ融合タンパク質

DS-155	野生型	IgG4 S228P	CD200の アミノ酸232－ Fcヒンジの アミノ酸6	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQ NSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFGYYSGTACL TVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVF WKVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKN QVGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGPPCPPCP APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLGS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK（配列番号23）
DS-156	野生型	IgG2	CD200の アミノ酸232－ Fcヒンジの アミノ酸6	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQ NSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFGKISGTACL TVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVF WKVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKN QVGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGVECPPCP APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK（配列番号24）
DS-226	野生型	IgG2	CD200の アミノ酸232－ Fcヒンジの アミノ酸1	MERLVIRMPFSHLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQ VVTQDEREQLYTPASLKCSLQNAQEALIVTWQKK KAVSPENMVTFSENHGVVIQPAYKDKINITQLGLQ NSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFGKISGTACL TVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVF WKVPRSGIENSTVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKN QVGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKGERKCCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTP PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号25）

【００６２】

本発明のタンパク質は、好ましくは、変異したＣＤ２００タンパク質又はその任意の部分をコードする核酸配列を組換え発現ベクターに挿入し、発現を促進する条件下で組換え発現系において核酸配列を発現させることにより、組換えＤＮＡ法によって産生される。したがって、１つの実施形態では、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはさらに、ｐｃＤＮＡ３．４などのベクターを含む。１つの実施形態では、融合タンパク質は、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩ及び／又はＸｈｏ　Ｉなどの１つ以上の制限酵素部位と隣接している。さらなる実施形態では、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩ及びＸｈｏ　Ｉ制限部位と隣接している。

【００６３】
１つの実施形態では、融合タンパク質は、Ｂａｍ　ＨＩなどの１つ以上の制限酵素部位を含む。
本発明のさらなる態様によれば、本明細書で定義されるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、並びにタンパク質を産生するため及び／又は治療目的のためのそのような核酸の使用が提供される。そのようなポリヌクレオチドは、本明細書で定義されるタンパク質をコードするＤＮＡ及びＲＮＡ分子（例えば、ｍＲＮＡ、自己複製ＲＮＡ、自己増幅ｍＲＮＡなど）を含むことができる。本発明によって提供されるタンパク質をコードする核酸配列は、ｃＤＮＡ断片及び短いオリゴヌクレオチドリンカーから、又は一連のオリゴヌクレオチドから組み立てられて、組換え発現ベクターに挿入され、組換え転写ユニットで発現させることができる合成遺伝子を提供することができる。
【００６４】
組換え発現ベクターは、哺乳動物、微生物、ウイルス、又は昆虫遺伝子に由来する適切な転写又は翻訳調節エレメントと作動可能に連結された、変異したＣＤ２００をコードする合成又はｃＤＮＡ由来核酸断片を含む。そのような調節エレメントは、転写プロモーター、転写を制御する任意のオペレーター配列、適切なｍＲＮＡリボソーム結合部位をコードする配列、並びに転写及び翻訳の終結を制御する配列を含む。通常、複製起点によって与えられる宿主での複製能力、及び形質転換体の認識を容易にするための選択遺伝子をさらに組み込むこともできる。
【００６５】
治療的使用
ＣＤ２００タンパク質とＣＤ２００受容体との間の相互作用は、ＣＤ２００受容体に対するＣＤ２００の低い親和性をもたらす速い解離（「オフ」）速度という特徴があるため、本発明は治療において特に適用される。したがって、本明細書で示されるように、ＣＤ２００受容体に対する変異型ＣＤ２００タンパク質の親和性を高めることは、より強力な特性を有する医薬組成物の製造に使用することができる。
【００６６】
さらに、組換えタンパク質の製造コストは高く、高い親和性を有する変異型ＣＤ２００タンパク質は、治療効果を得るために野生型又は変異していないＣＤ２００タンパク質よりも有意に低い用量で医薬組成物に使用することができる。したがって、変異型ＣＤ２００タンパク質を使用することは、臨床的により有効であるだけでなく、コスト的にもより有効である可能性がある。
【００６７】
本発明のさらなる態様によれば、本明細書で定義されるタンパク質、ポリペプチド、若しくは融合タンパク質、又はタンパク質、ポリペプチド、若しくは融合タンパク質をコードする核酸を含む医薬組成物が提供される。
【００６８】
１つの実施形態では、本明細書で定義される変異したＣＤ２００タンパク質、ポリペプチド、又は融合タンパク質は、ＣＤ２００受容体のモジュレーターである。本明細書で使用される「モジュレーター」という用語は、変化をもたらす物質を表し、例えば、タンパク質のモジュレーターは、当該タンパク質の活性の増加又は減少をもたらすことができる。本発明の変異したＣＤ２００タンパク質及び融合タンパク質の特性を考慮すると、これらはＣＤ２００受容体のアゴニストであると考えられ、したがって、自己免疫疾患の治療において有用であると考えられる。したがって、さらなる実施形態では、本明細書で定義される変異したＣＤ２００タンパク質、ポリペプチド、又は融合タンパク質は、ＣＤ２００受容体のアゴニストである。
【００６９】
したがって、本発明のさらなる態様によれば、自己免疫疾患の治療において使用するための、本明細書で定義されるタンパク質、ポリペプチド、若しくは融合タンパク質、又は本明細書で定義される組成物が提供される。

【００７０】
本明細書で使用される「自己免疫疾患」又は「自己免疫異常」という用語は、互換的に使用され、自己細胞及び／若しくは組織、又は移植された細胞及び／若しくは組織に対する不適切又は不必要な免疫反応から生じる望ましくない状態を表す。「自己免疫疾患」又は「自己免疫異常」という用語は、体液性免疫応答又は細胞性免疫応答によって媒介されるかどうかを問わず、そのような状態を含むことを意味する。
【００７１】
代替実施形態では、アレルギー性疾患の治療において使用するための、本明細書で定義されるタンパク質、ポリペプチド、若しくは融合タンパク質、又は本明細書で定義される組成物が提供される。本明細書で使用される「アレルギー」又は「アレルギー性疾患」という用語は、互換的に使用され、主にＴＨ２細胞の活性から発症するＴヘルパー２（ＴＨ２）駆動性の疾患を表す。アレルギー性疾患の例としては、慢性アレルギー性疾患（枯草熱又はアレルギー性鼻炎など）、アレルギー性接触皮膚炎、季節性アレルギー、アナフィラキシーの治療及び予防、並びに食物アレルギーが挙げられる。
【００７２】
本明細書で定義される変異型ＣＤ２００タンパク質を含む融合タンパク質は、野生型又は変異していないＣＤ２００タンパク質を含む融合タンパク質よりも高い効率で活性化免疫細胞を不活性化することができる。
【００７３】
１つの実施形態では、自己免疫疾患は、神経筋系、血管系、眼、消化管、肺、腎臓、肝臓、末梢神経系若しくは中枢神経系、骨、軟骨、又は関節に影響を及ぼす自己免疫疾患から選択される。
【００７４】
さらなる実施形態では、自己免疫疾患は、急性散在性脳脊髄炎（ＡＤＥＭ）；急性壊死性出血性白質脳炎；アジソン病；無ガンマグロブリン血症；円形脱毛症；アミロイドーシス；強直性脊椎炎；抗ＧＢＭ／抗ＴＢＭ腎炎；抗リン脂質抗体症候群（ＡＰＳ）；喘息，アトピー性皮膚炎；自己免疫性血管性浮腫；自己免疫性再生不良性貧血；自己免疫性自律神経障害；自己免疫性肝炎；自己免疫性高脂血症；自己免疫性免疫不全；自己免疫性内耳疾患（ＡＩＥＤ）；自己免疫性心筋炎；自己免疫性卵巣炎；自己免疫性膵炎；自己免疫性網膜症；自己免疫性血小板減少性紫斑病（ＡＴＰ）；自己免疫性甲状腺疾患；自己免疫性蕁麻疹；軸索型神経細胞ニューロパチー；バロー病；ベーチェット病；水疱性類天疱瘡及び関連自己免疫性水疱形成疾患；心筋症；キャッスルマン病；セリアック病（難治性２型セリアック病など）；シャーガス病；特発性慢性蕁麻疹；慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー（ＣＩＤＰ）；慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）；慢性再発性多発性骨髄炎（ＣＲＭＯ）；慢性特発性蕁麻疹；チャーグストラウス症候群；瘢痕性類天疱瘡／良性粘膜類天疱瘡；クローン病；コーガン症候群；寒冷凝集素症；先天性心伝導障害；コクサッキー性心筋炎；ＣＲＥＳＴ病；特発性混合クリオグロブリン血症；脱髄性ニューロパチー；疱疹状皮膚炎；皮膚筋炎；デビック病（視神経脊髄炎）；円板状ループス；ドレスラー症候群；子宮内膜症；好酸球性食道炎；好酸球性筋膜炎；結節性紅斑；実験的アレルギー性脳脊髄炎；エヴァンス症候群；線維化肺胞炎；巨細胞性動脈炎（側頭動脈炎）；巨細胞性心筋炎；糸球体腎炎；グッドパスチャー症候群；多発血管炎性肉芽腫症（ＧＰＡ）（以前はウェゲナー肉芽腫症と呼ばれていた）；移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）；グレーブス病；ギランバレー症候群；橋本脳炎；橋本病；溶血性貧血；ヘノッホシェーンライン紫斑病性腎炎；妊娠性疱疹；低ガンマグロブリン血症；特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）；ＩｇＡニューロパチー；ＩｇＧ４関連硬化性疾患；免疫調節性リポタンパク質；封入体筋炎；炎症性腸疾患（ＩＢＤ）；炎症性皮膚疾患；間質性膀胱炎；若年性関節炎；若年性糖尿病（１型糖尿病）；若年性筋炎；川崎病；ランバートイートン症候群；白血球破砕性血管炎；扁平苔癬；硬化性苔癬；木質性角結膜炎；線状ＩｇＡ病（ＬＡＤ）；全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）；ライム病、慢性；マクロファージ活性化症候群（ＭＡＳ）；肥満細胞症；メニエール症候群；顕微鏡的多発血管炎；混合性結合組織病（ＭＣＴＤ）；モーレン潰瘍

；ムッハハーベルマン病；多発性硬化症；重症筋無力症；筋炎；ナルコレプシー；視神経脊髄炎（デビック病）；好中球減少症；眼瘢痕性類天疱瘡；視神経炎；回帰性リウマチ；ＰＡＮＤＡＳ（溶連菌感染症関連小児自己免疫性精神神経疾患）；傍腫瘍性小脳変性症；発作性夜間ヘモグロビン尿症（ＰＮＨ）；パリーロンベルク症候群；パーソネジターナー症候群；扁平部炎（周辺部ブドウ膜炎）；天疱瘡；末梢性ニューロパチー；静脈周囲性脳脊髄炎；悪性貧血；ＰＯＥＭＳ症候群；結節性多発動脈炎；多腺性自己免疫症候群１型、２型及び３型；リウマチ性多発筋痛症；多発性筋炎；心筋梗塞後症候群；心膜切開後症候群；プロゲステロン皮膚炎；原発性胆汁性肝硬変；原発性硬化性胆管炎；乾癬；乾癬性関節炎；特発性肺線維症；壊疽性膿皮症；赤芽球癆；レイノー現象；反応性関節炎；反射性交感神経性ジストロフィー；ライター症候群；再発性多発性軟骨炎；下肢静止不能症候群；後腹膜線維症；リウマチ熱；関節リウマチ；類肉腫症；シュミット症候群；強膜炎；強皮症；シェーグレン症候群；精液及び精巣の自己免疫；全身硬直症候群；亜急性細菌性心内膜炎（ＳＢＥ）；Ｓｕｓａｃ症候群；交感性眼炎；高安動脈炎；側頭動脈炎／巨細胞動脈炎；血小板減少性紫斑病（ＴＴＰ）；トロサハント症候群；横断性脊髄炎；１型糖尿病；潰瘍性大腸炎；未分化結合組織疾患（ＵＣＴＤ）；ブドウ膜炎；脈管炎；小胞水疱性皮膚病；白斑；及びウェゲナー肉芽腫症（現在では多発血管炎性肉芽腫症（ＧＰＡ）と呼ばれる）から選択される１つ以上の自己免疫疾患である。

【００７５】

さらなる実施形態では、自己免疫疾患は、アトピー性皮膚炎、円形脱毛症、喘息、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、多発性硬化症、及び関節リウマチから選択される１つ以上の自己免疫疾患である。

【００７６】

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

【００７７】

代替実施形態では、神経障害性疼痛の治療において使用するための、本明細書で定義されるタンパク質、ポリペプチド、若しくは融合タンパク質、又は本明細書で定義される組成物が提供される。さらなる実施形態では、糖尿病性神経障害などの神経障害性疼痛の治療において使用するための、本明細書で定義されるタンパク質、ポリペプチド、若しくは融合タンパク質、又は本明細書で定義される組成物が提供される。

【００７８】

本発明のさらなる態様によれば、被験体における自己免疫疾患、アレルギー性疾患、神経変性、又は神経障害性疼痛の治療方法であって、少なくとも１つの自己免疫疾患、アレルギー性疾患、神経変性、又は神経障害性疼痛を有する被験体に、本発明のタンパク質、ポリペプチド、又は融合タンパク質を投与することを含む方法が提供される。

【００７９】

本発明のタンパク質、ポリペプチド、又は融合タンパク質は、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、神経変性、又は神経障害性疼痛を治療するために、単独の治療薬として投与することができ、又は１つ以上の他の化合物（又は治療法）との併用療法で投与することができることが理解される。

【００８０】

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

【００８１】

自己免疫疾患、アレルギー性疾患、神経変性、又は神経障害性疼痛を治療するために、本発明のタンパク質、ポリペプチド、又は融合タンパク質は、１つ以上の他の薬剤、より詳細には、免疫抑制療法における１つ以上の免疫抑制剤又はアジュバントと組み合わせて有利に使用することができる。

【００８２】
本発明の化合物と一緒に（同時又は異なる時間間隔で）投与することができる治療薬又は治療法の例としては、アザチオプリン、メトトレキサート、シクロスポリン、モノクローナル抗体（バシリキシマブ、ダクリズマブ、及びムロモナブ）、及びコルチコステロイドが挙げられるが、これらに限定されない。
【００８３】
本発明の組合せに存在する各々の治療薬は、個々に異なる用量スケジュール及び異なる経路で投与することができる。さらに、２つ以上の各々の用法用量は異なっていてもよく、各々は、同時に投与することができ、又は異なる時間に投与することができる。当業者であれば、一般的な知識を通じて、使用する投与計画及び併用療法を理解している。例えば、本発明のタンパク質、ポリペプチド、又は融合タンパク質は、既存の併用投与計画に従って投与される１つ以上の他の薬剤と組み合わせて使用することができる。
【００８４】
一般に、本明細書に開示されたタンパク質は、薬理学的に適切な賦形剤又は担体と一緒に精製された形態で利用される。典型的には、これらの賦形剤又は担体は、生理食塩水及び／又は緩衝媒体を含む、水溶液若しくはアルコール／水溶液、エマルジョン、又は懸濁液を含む。非経口ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンゲルブドウ糖、ブドウ糖、及び塩化ナトリウム、並びに乳酸加リンゲル液が挙げられる。ポリペプチド複合体を懸濁状態に保つために必要であれば、適切な生理学的に許容されるアジュバントは、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、及びアルギン酸塩などの増粘剤から選択することができる。
【００８５】
本発明による医薬組成物の投与経路は、当業者に一般的に公知のもののいずれであってもよい。免疫療法を含むがこれに限定されない治療のために、本発明のタンパク質は、標準的な技術に従ってあらゆる患者に投与することができる。投与は、非経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、経皮、肺経路を介して、又は適切にはカテーテルによる直接注入を含む、任意の適切な様式で行うことができる。投与量及び投与頻度は、患者の年齢、性別、及び状態、他の薬剤の同時投与、禁忌、及び臨床医が考慮すべき他のパラメータによって決まる。
【００８６】
本発明のタンパク質は、保存のために凍結乾燥し、使用前に適切な担体中で再構成することができる。この技術は効果的であることが示されており、当技術分野で公知の凍結乾燥及び再構成技術を用いることができる。凍結乾燥及び再構成によって活性を様々な程度に低下させる可能性があり、それを補うためにレベルを上方調整しなければならない可能性があることは、当業者には理解される。
【００８７】
以下の研究及びプロトコルは、本明細書に記載の方法の実施形態を示すものである。
【実施例】
【００８８】
実施例１：　変異型及び野生型ＣＤ２００－Ｆｃ分子の産生遺伝子合成
Ｎ末端シグナル配列を含むＵｎｉｐｒｏｔ　Ｐ４１２１７８（ＯＸ２Ｇ＿Ｈｕｍａｎ）の変異型又は野生型ヒトＣＤ２００の残基１～２３２をコードするＤＮＡ配列を、ＣＤ２００のアミノ酸グリシン２３２をＦｃヒンジ領域のアミノ酸１に、又はＦｃヒンジ領域のアミノ酸６に直接融合して（後者の場合、Ｆｃヒンジの最初の５アミノ酸は欠失している）、変異型又は野生型ＩｇＧ２又はＩｇＧ４　ＦｃにＣ末端で融合した。遺伝子合成は、野生型及び変異型の構築物についてＧｅｎｅＡｒｔで行った。
【００８９】
発現構築物は、５’Ｈｉｎｄ　ＩＩＩ及び３’Ｘｈｏを有する、哺乳動物発現ベクターｐｃＤＮＡ３．４を使用して作製した。Ｆｃドメイン交換を容易にするために、内部Ｂａｍ

ＨＩを導入した。
【００９０】
Ｍｉｄｉ　Ｐｒｅｐ
受領後、凍結乾燥したＣＤ２００－Ｆｃ標的タンパク質（野生型及び変異型ＣＤ２００－Ｆｃタンパク質の両方）のＤＮＡ構築物を５０μｌのＭＱに懸濁し、ＤＨ５α細胞を形質転換した。各標的タンパク質の単一コロニーを選択し、アンピシリンを含む５．０ｍｌのＬＢに接種した。次いで、確認のために２．０ｍｌの培養物からＤＮＡを単離し、アガロースゲル電気泳動で分離した。ＤＮＡをＨｉｎｄ　ＩＩＩ及びＸｈｏＩで消化することによって構築物を確認した。各変異型又は野生型構築物を１００ｍｌのＬＢに培養し、中規模ＤＮＡを調製した。ＤＮＡはｐｕｒｅｌｉｎｋ　Ｈｉｐｕｒｅ　ｐｌａｓｍｉｄ　ｍｉｄｉｐｒｅｐ　ｋｉｔを使用して単離した。
【００９１】
タンパク質発現
ＣＤ２００－Ｆｃ標的タンパク質は、サーモフィッシャー・ギブコ（商標）ＥｘｐｉＣＨＯ（商標）発現システムを使用して、２５ｍｌの培養容量で製造者の指示に従って産生した。発現したＣＤ２００－Ｆｃを含む培地上清を回収し、使用するまで－８０℃で保存した。
【００９２】
タンパク質精製
５３ｍｌのＳｅｐｈａｄｅｘＧ２５を充填したＨｉｐｒｅｐ脱塩カラム（ＸＫ２６／１０）を使用して緩衝液交換を行い、アフィニティーカラム精製のため培地を調整した。脱塩カラムをＡＫＴＡエクスプローラープラットフォーム上でバッファーＡ（２０ｍＭリン酸ナトリウム　ｐＨ７．４を含む１５０ｍＭ　ＮａＣｌ）で平衡化した。３０ｍｌの清澄化した培養液を、直列に接続した２本の脱塩カラムに１ｍｌ／分の速度でロードした。タンパク質は２ｍｌ／分の速度で溶出され、フラクションとして回収した。最大の吸光度及びｐＨ７．４～７．２を示すフラクションをプールした。より低いｐＨを示すフラクションは除外した。脱塩後、サンプルを希釈して野生型又は変異型ＣＤ２００－Ｆｃ上清を約４５ｍｌとした。精製手順はすべて４℃にて氷上で行った。
【００９３】
カラムを１０カラム容量のバッファーＡ（１０ｍｌの２０ｍＭリン酸ナトリウム　ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ）で洗浄した。ＣＤ２００－Ｆｃタンパク質を、２０ｍＭリン酸ナトリウム　ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ及び１００ｍＭクエン酸緩衝液　ｐＨ３．５を使用し、直線勾配で１０カラム容量にわたるｐＨ７．４～３．５の勾配で溶出した。タンパク質の二量体型を含むＣＤ２００－Ｆｃフラクション（約１０３ｋＤａと計算）を回収した。１０ｋＤａカットオフのＡｍｉｃｏｎ　ｕｌｔｒａ　ｃｅｎｔｒｉｃｏｎを使用してタンパク質緩衝液を交換し、タンパク質を約１ｍｇ／ｍｌに濃縮した。
【００９４】
実施例２：　野生型及び変異型ＣＤ２００－Ｆｃ分子の結合解析
Ｂｉａｃｏｒｅ実験はＳｙｎｇｅｎｅ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｌｔｄ．が行った（Ｂｉｏｃｏｎ　Ｐａｒｋ、Ｐｌｏｔ　Ｎｏ２＆３、Ｂｏｍｍａｓａｎｄｒａ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ　Ａｒｅａ、Ｂｏｍｍａｓａｄｒａ－Ｊｉｇａｎｉ　Ｌｉｎｋ　Ｒｏａｄ、Ｂａｎｇａｌｏｒｅ－５６００９９、Ｉｎｄｉａ）。
【００９５】
アッセイ原理
ＢＩＡｃｏｒｅ装置は、光学的手法である表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）を使用して、２つの相互作用分子、この場合はＣＤ２００受容体（ＣＤ２００Ｒ）に結合する野生型ＣＤ２００－Ｆｃ又はＣＤ２００－Ｆｃ変異体の結合特性を測定する。この技術では、チップ（センサー）上に捕捉された２つの相互作用分子のうち、第２の分子が溶液中で捕捉されたパートナーの上を流れる場合、１つの分子の屈折率の変化を測定する。これらの実験では、ＣＤ２００－Ｆｃをチップ（センサー）表面上に固定化し、水性緩衝液中の連続フ

ロー条件下で、捕捉されたＣＤ２００－Ｆｃの上にＣＤ２００Ｒを注入した。ＣＤ２００Ｒ結合後のＣＤ２００－Ｆｃ屈折率の変化をリアルタイムで測定し、その結果を応答単位（Ｒｕ）対時間でプロットしてセンサーグラムを作成した。

【００９６】

装置及び試薬

実験はＧＥヘルスケアＢＩＡｃｏｒｅ　Ｔ２００で行った。表３は、アッセイの開発及び実施に使用した試薬の詳細である。

【００９７】

【表３】

表３：　ＢＩＡｃｏｒｅ実験の過程で使用した試薬

シリアル番号	製品概要	製造者	カタログ番号
1	ヒト抗体捕捉キット	GEヘルスケア	BR1008-39
2	組換えヒトCD200R、Hisタグ	Creative Biomart	CD200R1-320H
3	組換えヒトCD200、Fcタグ	Creative Biomart	CD200-165H
4	組換えマウスCD200タンパク質、Fcキメラ	Creative Biomart	CD200-982M
5	トランスツズマブ	ロシュ	N/A

【００９８】

ＣＤ２００－Ｆｃの固定化

ＧＥヘルスケアのキットを使用し、製造者の指示に従って、抗ヒトＦｃをアミンカップリングによりＢＩＡｃｏｒｅ　ＣＭ５センサーチップ上に共有結合で固定化した。最大固定化目標を１００００～１５０００ＲＵに設定した。フローセル１は、チップ表面への非特異的結合の差引きを可能にするため、リガンドを固定化していない参照として使用した。ＦｃリガンドをＢＩＡｃｏｒｅランニング緩衝液（ＨＢＳ－ＥＰ＋：２ｍＭ　ＥＤＴＡ及び０．０５％界面活性剤Ｐ－２０を含む１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水）で０．５μｇ／ｍＬに希釈した。最後の固定化ステップでは、野生型ＣＤ２００－Ｆｃ、変異型ＣＤ２００－Ｆｃ及び非関連対照タンパク質（ハーセプチン／トラスツズマブ）を、最小２５０応答単位（ＲＵ）を生じる濃度で、チップ上（それぞれフローセル２、３、４を使用）に１２０秒間通過させ、続いてランニング緩衝液中で１２０秒間表面を安定化させた。ＣＤ２００Ｒの濃度ごとにＣＤ２００－Ｆｃの捕捉手順を繰り返した。

【００９９】

ＣＤ２００－Ｆｃ結合チップ表面上のＣＤ２００Ｒの通過

Ｆｃタグタンパク質の捕捉後、ＣＤ２００Ｒ（異なる濃度）を、捕捉したＣＤ２００－Ｆｃ及び対照タンパク質上に１２０秒間流し（結合を観察するため）、続いてランニング緩衝液で１２０秒間流した（解離を観察するため）。次いで、チップ表面を１０ｍＭグリシン・ＨＣｌ（ｐＨ２）を使用して３０秒間再生し（流速３０μｌ／分）、続いて、次のサイクルの前にＢＩＡｃｏｒｅランニング緩衝液で６０秒間表面を安定化させた。すべてのＣＤ２００Ｒ濃度は、以下の濃度、１μＭ、５００ｎＭ、２５０ｎＭ、１２５ｎＭ、６２．５ｎＭ、３１．２５ｎＭ、１５．６ｎＭ、及び０ｎＭで２通り実行した。

【０１００】

データ解析

応答単位又は共鳴単位（Ｒｕ）対時間としてプロットしたセンサーグラムで結果を表し

た。実験のセンサーグラムを、ＢＩＡｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェアバージョン１．０（ＧＥヘルスケア）で解析した。ＤＳ－１６２を除くすべてのＣＤ２００－Ｆｃ融合分子のカーブフィッティングを、１：１のラングミュア結合モデルを使用して行った。ＤＳ－１６２の曲線は、１：１の結合モデルにはうまく適合しなかった。ＤＳ－１６２の結果を適合させるために、１：１結合モデル及び２状態結合モデルの両方を使用した。ＤＳ－１６２センサーグラムの解離相は、１：１結合モデルよりも２状態結合モデルの方がよく適合することが見出された（図１、パネルＥ～Ｆ）。標準的なパラメータ（例えば、リガンド濃度、時間）を使用した反応速度式を反復カーブフィッティングに使用した。適合度の近さは、ＢＩＡｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェアバージョン１．０で製造者が提供するアルゴリズムによって決定した。

【０１０１】

結果

結果（表４及び図１）は、変異したＣＤ２００－Ｆｃタンパク質が、野生型ＣＤ２００－Ｆｃよりも１６～７０倍高い親和性でヒトＣＤ２００受容体に結合することを示している。表４で作表したオフ速度及び図１に示したセンサーグラムは、受容体のオフ速度及び半減期の範囲を示す。特に、ＤＳ－１６１及びＤＳ－１６２は、ＣＤ２００受容体に対する高親和性結合と、機能的細胞アッセイにおける効率的なアゴニズムに適合するオフ速度とを兼ね備えている。

【０１０２】

【表４】

表４：　２５℃でのヒトＣＤ２００受容体に対する野生型及び操作されたＣＤ２００－Ｆｃ融合分子の表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）親和性（K_D）及び動的パラメータ（k_a、k_D、ｔ１／２）

ＩＤ	変異	Ｆｃ	ｋａ (1/Ms)	ｋＤ (1/s)	ＫＤ (nM)	t1/2 (秒)
DS-155	野生型	IgG4 S228P	5.43E+05	2.51E-02	50	28
DS-161	K130F	IgG2	8.38E+05	5.93E-04	0.7	1169
DS-162[1]	I131F	IgG2	1.90E+06	4.74E-03	3.0	146
DS-162[2]	I131F	IgG2	2速度が計算	2速度が計算	3.0	t1/2なし
DS-150	K130F, I131F	IgG2	8.75E+04	2.26E-04	2.6	3073
DS-149	K130Y, I131F	IgG2	131500	0.000228501	1.9	3033
DS-151	K130F, I131Y	IgG2	1.28E+05	1.81E-04	1.4	3829

[1] 1:1結合モデル

[2] 2状態結合モデル

【０１０３】

実施例３：　ＣＤ２００Ｒ発現Ｕ９３７細胞のＬＰＳ刺激後のＩＬ－６分泌阻害

ＣＤ２００－Ｆｃタンパク質のアゴニスト活性を示すために、ヒト単球細胞株Ｕ９３７（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ１５３９）を、ヒトＣＤ２００ＲのｃＤＮＡでトランスフェクトした。これらの細胞からのＩＬ－６を含むサイトカイン産生は、ＰＭＡで刺激し、次いでＬＰＳで刺激することにより誘導できる。

【０１０４】

ウェル当たり５０，０００個のＵ９３７細胞を９６ウェルプレートに播種し、１００ｎＭ　ＰＭＡで７２時間インキュベートした後、分化させた。分化後、ＰＭＡを含む培地を新鮮なアッセイ培地に交換し、処理前にさらに２時間インキュベートした。次いで、ＣＤ２００－Ｆｃ構築物（野生型対照としてＤＳ－２２６を含む）を細胞培養に添加し、１時間インキュベートした。細胞を１００ｎｇ／ｍｌのＬＰＳで刺激し、さらに２４時間インキュベートした。最終インキュベーション後、細胞上清（１：１０に希釈）を回収し、ＥＬＩＳＡアッセイを使用してＩＬ－６分泌を定量した。

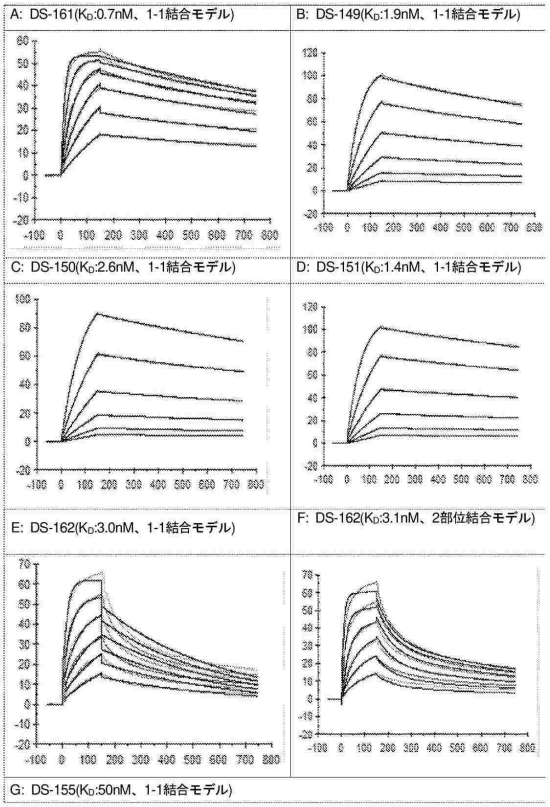
【０１０５】

図２～７は、ＣＤ２００－Ｆｃ構築物によるＩＬ－６分泌の濃度依存的阻害を示している。

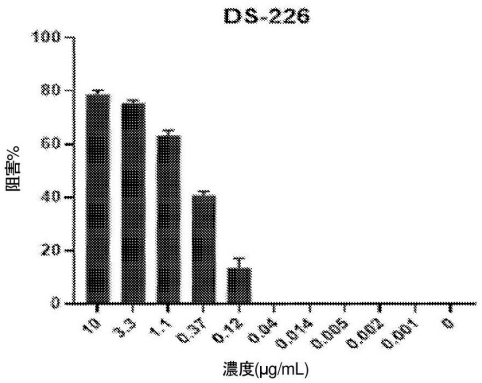
示されたデータは、ＣＤ２００－Ｆｃ構築物が濃度依存的にＬＰＳ刺激によるＩＬ－６分泌を阻害できることを示している。

【図面】

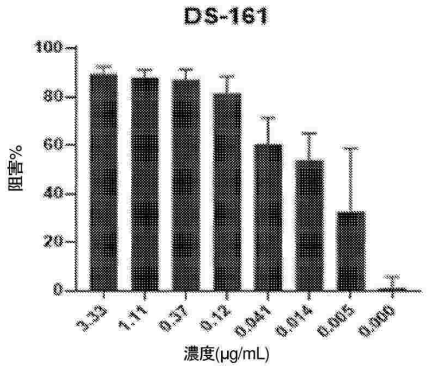
【図１】



【図２】

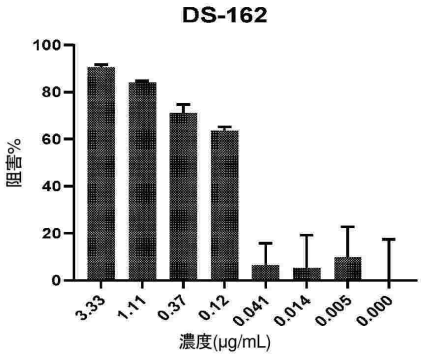


【図３】

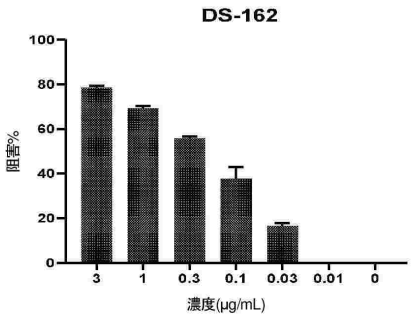

DS-161
阻害%
100
80
60
40
20
0
3.33
1.11
0.37
0.12
0.041
0.014
0.005
0.000
濃度(μg/mL)

【図４】

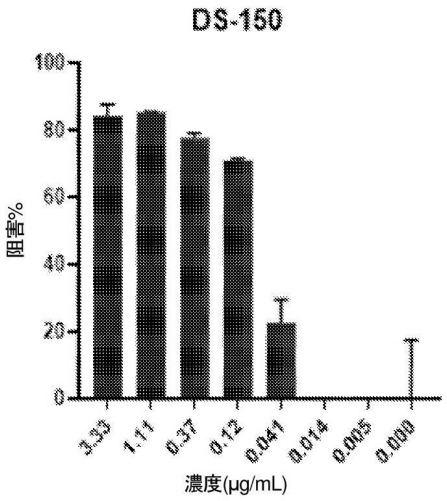
A


DS-162
阻害%
100
80
60
40
20
0
3.33
1.11
0.37
0.12
0.041
0.014
0.005
0.000
濃度(μg/mL)

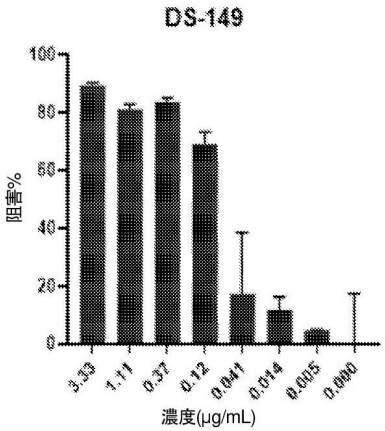
B


DS-162
阻害%
100
80
60
40
20
0
3
1
0.3
0.1
0.03
0.01
0
濃度(μg/mL)

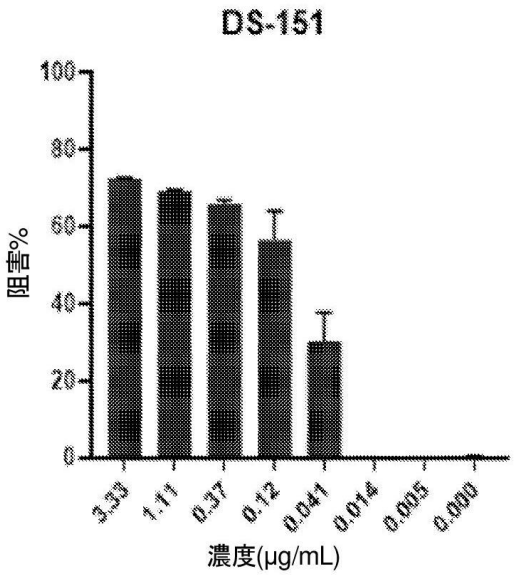
【図５】


DS-150
阻害%
100
80
60
40
20
0
3.33
1.11
0.37
0.12
0.041
0.014
0.005
0.000
濃度(μg/mL)

【図６】


DS-149
阻害%
100
80
60
40
20
0
3.33
1.11
0.37
0.12
0.041
0.014
0.005
0.000
濃度(μg/mL)

【図７】



【配列表】

2024542096000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2022/052764

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/705 A61K38/00 A61P37/02
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 A61P A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UniProt [Online] 28 March 2018 (2018-03-28), "CD200 molecule", XP002808314, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:A0A2K5EKJ9 Database accession no. A0A2K5EKJ9	1,10-12
Y	abstract	4-8, 13-19
A		2,3,9

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 December 2022	12/01/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Tudor, Mark

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2022/052764

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE NCBI [Online] NCBI; 18 June 2017 (2017-06-18), BioProject: PRJNA282745: "OX-2 membrane glycoprotein isoform X1 [Aotus nancymaae]", XP002808315, retrieved from NCBI accession no. XP_012319453 Database accession no. XP_012319453	1,10-12
Y	abstract	4-8, 13-19
A		2,3,9

X	DATABASE NCBI [Online] NCBI; 28 June 2017 (2017-06-28), BioProject: PRJNA282745: "OX-2 membrane glycoprotein isoform X2 [Aotus nancymaae]", XP002808316, retrieved from NCBI accession no. XP_012319454 Database accession no. XP_012319454	1,10-12
Y	abstract	4-8, 13-19
A		2,3,9

Y	WO 2017/194941 A1 (DUCENTIS BIOTHERAPEUTICS LTD [GB]) 16 November 2017 (2017-11-16) page 4, lines 20-26 page 8, paragraph 1 page 10, paragraph 3 - page 11, paragraph 1 examples 1,2 claims 1-17	4-8, 13-15, 17,18

Y	MIRIAM HERNANGOMEZ ET AL: "CD200R1 agonist attenuates glial activation, inflammatory reactions, and hypersensitivity immediately after its intrathecal application in a rat neuropathic pain model", JOURNAL OF NEUROINFLAMMATION, vol. 13, no. 1, 18 February 2016 (2016-02-18), XP055647631, DOI: 10.1186/s12974-016-0508-8 abstract page 10, left-hand column, paragraph 2 - page 12, left-hand column, paragraph 1	16,19

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2022/052764

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2022/052764

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

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/62*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ	
Ａ６１Ｐ	*25/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00		
Ａ６１Ｐ	*25/28*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/28		
Ａ６１Ｐ	*37/08*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/08		
Ａ６１Ｐ	*37/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06		
Ａ６１Ｐ	*17/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00		
Ａ６１Ｐ	*17/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/14		
Ａ６１Ｐ	*11/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/06		
Ａ６１Ｐ	*1/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/04		
Ａ６１Ｐ	*11/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00		
Ａ６１Ｐ	*37/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02		
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	１０１	
Ａ６１Ｐ	*19/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02		
Ａ６１Ｋ	*38/17*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/17		
Ａ６１Ｋ	*47/68*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/68		
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｖ	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

イギリス国オックスフォードシャー オーエックス２９・８エイダブリュー，ウィットニー，フリーランド，ブレナム・レーン ９，ケア・オブ・デュセンティス バイオセラピューティクス リミテッド

(72)発明者 ハクスリー，フィリップ
イギリス国オックスフォードシャー オーエックス２９・８エイダブリュー，ウィットニー，フリーランド，ブレナム・レーン ９，ケア・オブ・デュセンティス バイオセラピューティクス リミテッド

Ｆターム（参考） 4C076 AA94 CC01 CC04 CC07 CC15 CC16 CC41 EE59
4C084 AA02 AA03 BA01 BA41 MA66 NA05 NA12 NA14 ZA021 ZA022 ZA591 ZA592 ZA661 ZA662 ZA891 ZA892 ZA961 ZA962 ZB071 ZB072 ZB081 ZB082 ZB131 ZB132 ZB151 ZB152
4C085 AA33 BB36 BB42
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20 FA74 GA26