

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6454650号
(P6454650)

(45) 発行日 平成31年1月23日 (2019. 1. 23)

(24) 登録日 平成30年12月21日 (2018. 12. 21)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 16/18 (2006. 01)

C O 7 K 16/18 Z N A

C O 7 K 19/00 (2006. 01)

C O 7 K 19/00

C 1 2 N 15/13 (2006. 01)

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 5/10 (2006. 01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 P 21/02 (2006. 01)

C 1 2 P 21/02

C

請求項の数 21 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-560845 (P2015-560845)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月6日 (2014. 3. 6)
 (65) 公表番号 特表2016-510736 (P2016-510736A)
 (43) 公表日 平成28年4月11日 (2016. 4. 11)
 (86) 国際出願番号 PCT/IL2014/050228
 (87) 国際公開番号 W02014/136114
 (87) 国際公開日 平成26年9月12日 (2014. 9. 12)
 審査請求日 平成29年3月2日 (2017. 3. 2)
 (31) 優先権主張番号 61/773, 431
 (32) 優先日 平成25年3月6日 (2013. 3. 6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/773, 401
 (32) 優先日 平成25年3月6日 (2013. 3. 6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 505161910
 プロタリクス リミテッド
 イスラエル, 20100 カルミエル, サ
 イエンス パーク, スヌニト ストリート
 2
 (74) 代理人 110002295
 特許業務法人森脇特許事務所
 (74) 代理人 100113044
 弁理士 木島 智子
 (74) 代理人 100117042
 弁理士 森脇 正志
 (72) 発明者 シャールティエル ヨセフ
 イスラエル国, 3657600 ティムラ
 ット, ハアロン ストリート 44

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T N F α ポリペプチド阻害剤を発現する植物細胞及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T N F ポリペプチド阻害剤を発現する植物細胞及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物であって、

前記 T N F ポリペプチド阻害剤は、対象の T N F 関連の医学的状態を治療するために使用される可溶性 T N F R フラグメントを含むと共に、前記可溶性 T N F R フラグメントが

(i) 配列番号 2 に示される T N F 受容体の T N F 結合ドメインを含む第 1 のドメインと、

(i i) 配列番号 9 に示される免疫グロブリンの F c ドメインを含む第 2 のドメインとを有するキメラポリペプチドの一部であり、

前記第 1 のドメインおよび前記第 2 のドメインがそれぞれ N 末端から C 末端へと順次、翻訳的に融合しており、

前記 F c ドメイン又はその断片は、新生児型 F c 受容体 (F c R n) の結合部位を含み、前記キメラポリペプチドが T N F に特異的に結合して T N F 活性を阻害する、経口投与用に製剤化された医薬組成物。

【請求項 2】

前記キメラポリペプチドが小胞体保留シグナルを含む第 3 のドメインをさらに含み、前記第 1 のドメイン、第 2 のドメインおよび第 3 のドメインがそれぞれ N 末端から C 末端へと順次、翻訳的に融合している、請求項 1 記載の医薬組成物。

10

20

【請求項 3】

前記 T N F ポリペプチド阻害剤は前記第 1 のドメインと N 末端で翻訳的に融合した小胞体シグナルペプチドをコードするさらなるドメインを含む、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記シグナルペプチドが植物シグナルペプチドである、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記植物シグナルペプチドが配列番号 4 に示される通りである、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記 T N F ポリペプチド阻害剤は、前記第 2 のドメインと、C 末端で翻訳的に融合した小胞体保留シグナルをコードするさらなるドメインを含む、請求項 3 から 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記小胞体保留シグナルが S E K D E L (配列番号 16) である、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記キメラポリペプチドが配列番号 7 に示される通りである、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記キメラポリペプチドが配列番号 6、7、204 または 205 に示される通りである、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記キメラポリペプチドが T N F 誘導アポトーシスを阻害することができる、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記 T N F ポリペプチド阻害剤は植物特異的グリカンを含む、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記植物特異的グリカンがコアキシロースおよびコア - (1,3) フコースからなる群から選択される、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記 T N F ポリペプチド阻害剤はシアル酸残基を欠く、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

前記 T N F ポリペプチド阻害剤は T N F 誘導アポトーシスを阻害することができる、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記植物細胞はタバコ (Nicotiana tabacum) 植物細胞である、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記タバコ (Nicotiana tabacum) 植物細胞がブライトイエロー (BY-2) 細胞である、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記植物細胞は凍結乾燥されている、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記 T N F 関連の医学的状態は炎症性疾患である、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

前記 T N F 関連の医学的状態は自己免疫疾患である、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記 T N F 関連の医学的状態は、

炎症性腸疾患、敗血症、内毒素ショック、A I D S、子宮内膜症、乾癬、心血管疾患、がん、白斑、関節炎、強直性脊椎炎、ウェゲナー病（肉芽腫症）、短腸症候群、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、C 型肝炎、喘息、悪液質、アトピー性皮膚炎、アルツハイマー病、肝性脳症、A D H D、慢性疲労症候群、疱疹状皮膚炎（デューリング病）、接触性皮膚炎、蕁麻疹（慢性突発性蕁麻疹を含む）、尋常性天疱瘡、水泡性類天疱瘡、重症筋無力症、サルコイドーシス、強皮症、高 I g E 症候群、多発性硬化症、突発性好酸球増加症候群およびアレルギーからなる群から選択される、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 21】

前記 T N F 関連の医学的状態は、

関節リウマチ、炎症性腸疾患、骨関節炎、強直性脊椎炎、尋常性乾癬、若年性特発性関節炎、クローン病、大腸炎からなる群から選択される、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、そのいくつかの実施形態で、T N F ポリペプチド阻害剤を発現する植物細胞等を含む医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

腫瘍壊死因子（T N F）は、多様な炎症性、感染性および免疫関連性の過程および疾患の調節を媒介する重要な炎症性サイトカインであり、T N F は炎症病理を担う最も重要な媒介物質であると考えられている。

【0003】

T N F は、最初に安定な三量体に配列された膜貫通タンパク質として合成され、次いで、メタロプロテアーゼ - T N F 変換酵素（T A C E）によって切断されて遍在的に発現するその同族受容体（T N F R I、p 55 および T N F R I I、p 75）に結合するホモ三量体可溶性 T N F（s T N F）を形成する、17 k D 分子量のタンパク質である。遍在性 T N F 受容体は、多種多様な T N F 媒介細胞応答の基礎を提供する。

30

【0004】

T N F は、その多くが悪液質（がんおよび A I D 患者に一般的な食欲不振につながる脂肪喪失および全身タンパク質減少）および敗血症性ショックなどの有害な結果をもたらす多種多様な細胞応答を誘導する。T N F 分泌の上昇は、糖尿病、同種移植片拒絶、敗血症、炎症性腸疾患、骨粗鬆症を含む種々のヒト疾患、多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬、乾癬性関節炎、過敏症、免疫複合体病などの多くの自己免疫疾患、ならびにマラリア、がんおよび肺線維症にさえ関係づけられている。

40

【0005】

T N F の生物学的効果は、2つの別個の受容体によって媒介される。T N F 受容体は、単核細胞からこぼれると、特異的抗体によって T N F を「掃討する」および T N A の天然阻害剤中和として作用することによって T N F レベルを低下させるので、デコイ受容体（d e c o y r e c e p t o r）が T N F 媒介毒性を調節するための共通戦略となった。

【0006】

現在までに、5種のタンパク質系 T N F 拮抗薬が臨床的使用のために米国 F D A によって承認されている：シムジア（セルトリズマブペゴル）、T N F m A b F a b ' フラグメント - P E G 接合体；レミケード（インフリキシマブ）、T N F r m A B；ヒュミ

50

ラ（アダリムマブ）、TNF α r m A B、S i m p o n i（商標）（ゴリムマブ）、抗TNFおよびエタネルセプト、ヒトIgGのFcフラグメントと融合した可溶性75 kDa TNF 受容体の融合タンパク質（E n b r e l（商標）として登録）。

【0007】

エタネルセプトは、関節リウマチ（RA）および他の関節炎適応症、例えば、若年性突発性関節炎（JIA）、乾癬および強直性脊椎炎（AS）のために示されている。関節リウマチ（RA）は、世界中で約500万人の人々に発症する慢性疾患である。世界中の適応症全体でほぼ500000人の患者がE n b r e lで治療されている。2010年のE n b r e lの売上は78億ドルであり、全抗TNF市場は240.4億ドルに達した。現在のまたは終了した、E n b r e l療法の臨床試験には、成人性呼吸促迫症候群、天疱瘡、アルツハイマー病、ベーチェット症候群、HIV、心筋梗塞、膝関節滑膜炎、ループス腎炎、扁平苔癬、全身性アミロイドーシス、坐骨神経痛、白斑、慢性疲労症候群、食欲不振、TMJ、喘息、気管支炎、糖尿病、骨髄異形成症候群などの多様な適応症が含まれる。

10

【0008】

E n b r e lは現在、哺乳動物細胞中で産生されている。生物製剤の製造への血液由来産物（血清、形質細胞媒介成分等）などのヒトまたは動物由来の原材料の使用を通じた病原体伝播のリスクを強調する、世界の複数の領域での新興病原体、最も著しくはHIV、HCV、クロイツフェルト-ヤコブ病、西ナイルウイルスおよびSARSの発生により、生物製剤の安全性が近年患者と医療従事者の両者の前面に出てきている。例えば、ウイルスの同定およびスクリーニングが普及するまで、血友病集団の約半数（！）がHIVに罹患した。

20

【0009】

近年、スクリーニングおよび検査が改善してきており、病原体伝播の恐れは減っているが、組換え製造工程中の血漿由来添加剤からのリスクがまだ残っている。特に、これらの剤は将来に血液供給で現れ、哺乳動物細胞系生物製剤の安全性に有意な影響を及ぼし得るので、未知の病原体からのリスクが重要である。具体的には、患者への累積的なリスクを増加させる注射を介した繰り返しの定期的な投与を要する生物製剤が特に懸念される。

【0010】

しかしながら、培地から動物由来成分を排除することによって、培養性能ならびにタンパク質翻訳後修飾が有意に変えられ得る。抗体分子のグリコシル化パターンはその構造健全性に影響を及ぼし得るので、その生物学的機能、物理化学的特性および薬物動態に影響を及ぼし、有効性と安全性の両方、特に免疫原性を変化させる。近年大きな発生は起こっていないが、生物製剤の製造中の血液および血漿成分への依存を減らすことがなお重要である。逆に、哺乳動物細胞培養での組換えタンパク質産生は、異物汚染により安全ではない。2009年、Genzymeは、ウイルス汚染のために本社工場を一時的に閉鎖させられた。2011年まで、Genzymeは薬物の完全な供給を回復しなかった。米国でのファブリー病患者のために唯一承認されている薬物が不足したために、ファブリー病の人々には心臓または腎臓の問題をかかえた者もあり、不足によって死亡した者さえいたかもしれない。

30

40

【0011】

非哺乳動物細胞、例えば、植物細胞培養が1つの有望な発展である。

【0012】

安全性、ウイルス感染症、免疫反応、産生収率および費用の課題に対処するために、修飾ヒトタンパク質を含む生物製剤をトランスジェニック植物中で産生することができる。米国特許第6,391,638号およびPCT WO2008/135991は、植物細胞培養から組換えポリペプチドを商業規模で産生するためのバイオリアクター装置を教示している。米国特許第7,951,557号、米国特許出願公開第10/554,387号および第11/790,991号は、植物細胞でヒトタンパク質を組換え発現するための核酸ベクターの構築および発現を教示している。PCT WO2007/010533

50

は、経腸投与するための植物細胞中での組換えヒトポリペプチドの発現を教示している。

【0013】

さらなる背景技術には、Finckらの米国特許第7,915,225号、Finckらの米国特許出願公開第13/021,545号および第10/853,479号、Liらの米国特許出願公開第11/906,600号、Warrenらの米国特許出願公開第10/115,625号ならびにGombotzらの米国特許出願公開第11/784,538号が含まれる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

10

【特許文献1】米国特許第6,391,638号

【特許文献2】PCT WO2008/135991

【特許文献3】米国特許第7,951,557号

【特許文献4】米国特許出願公開第10/554,387号

【特許文献5】米国特許出願公開第11/790,991号

【特許文献6】PCT WO2007/010533

【特許文献7】米国特許第7,915,225号

【特許文献8】米国特許出願公開第13/021,545号

【特許文献9】米国特許出願公開第10/853,479号

【特許文献10】米国特許出願公開第11/906,600号

20

【特許文献11】米国特許出願公開第10/115,625号

【特許文献12】米国特許出願公開第11/784,538号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明のいくつかの実施形態の態様によると、植物産生TNFポリペプチド阻害剤が提供される。

【0016】

本発明のいくつかの実施形態によると、TNFポリペプチド阻害剤が抗TNF抗体である。

30

【0017】

本発明のいくつかの実施形態によると、抗TNF抗体がインフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブベゴルおよびゴリムマブからなる群から選択される。

【0018】

本発明のいくつかの実施形態によると、TNFポリペプチド阻害剤がTNFに特異的に結合する可溶性TNFRフラグメントである。

【0019】

本発明のいくつかの実施形態によると、可溶性TNFRフラグメントがキメラポリペプチドの一部である。

【0020】

40

本発明のいくつかの実施形態によると、キメラポリペプチドが

(i) TNF受容体のTNF結合ドメインを含む第1のドメインと、

(ii) 免疫グロブリンのFcドメインを含む第2のドメインと

を含み、第1のドメインおよび第2のドメインがそれぞれN末端からC末端へと順次、翻訳的に融合しており、キメラポリペプチドがTNFに特異的に結合するTNFポリペプチド阻害剤である。

【0021】

本発明のいくつかの実施形態によると、キメラポリペプチドが小胞体保留シグナルを含む第3のドメインをさらに含み、第1のドメイン、第2のドメインおよび第3のドメインがそれぞれN末端からC末端へと順次、翻訳的に融合している。

50

【 0 0 2 2 】

本発明のいくつかの実施形態によると、TNF ポリペプチド阻害剤が第1のドメインとN末端で翻訳的に融合した小胞体シグナルペプチドをコードするさらなるドメインを含む。

【 0 0 2 3 】

本発明のいくつかの実施形態によると、シグナルペプチドが植物シグナルペプチドである。

【 0 0 2 4 】

本発明のいくつかの実施形態によると、植物シグナルペプチドが配列番号4に示される通りである。

10

【 0 0 2 5 】

本発明のいくつかの実施形態によると、第1のドメインが200～250アミノ酸長である。

【 0 0 2 6 】

本発明のいくつかの実施形態によると、第1のドメインがアミノ酸配列LCAP（配列番号11）およびVFCT（配列番号12）を含む。

【 0 0 2 7 】

本発明のいくつかの実施形態によると、第1のドメインがアミノ酸配列LP AQ V A F X P Y A P E P G S T C（配列番号13）をさらに含む。

20

【 0 0 2 8 】

本発明のいくつかの実施形態によると、第1のドメインが配列番号2に示される通りである。

【 0 0 2 9 】

本発明のいくつかの実施形態によると、免疫グロブリンがIgG₁である。

【 0 0 3 0 】

本発明のいくつかの実施形態によると、第2のドメインが配列番号9に示される通りである。

【 0 0 3 1 】

本発明のいくつかの実施形態によると、キメラポリペプチドが配列番号6に示される通りである。

30

【 0 0 3 2 】

本発明のいくつかの実施形態によると、キメラポリペプチドが配列番号7、204または205または214に示される通りである。

【 0 0 3 3 】

本発明のいくつかの実施形態によると、キメラポリペプチドがTNF 誘導アポトーシスを阻害することができる。

【 0 0 3 4 】

本発明のいくつかの実施形態によると、TNF ポリペプチド阻害剤が植物特異的グリカンを含む。

【 0 0 3 5 】

本発明のいくつかの実施形態によると、植物特異的グリカンがコアキシロースおよびコア - (1,3) フコースからなる群から選択される。

40

【 0 0 3 6 】

本発明のいくつかの実施形態によると、ポリペプチドが少なくとも98%の均質性まで精製されている。

【 0 0 3 7 】

本発明のいくつかの実施形態によると、TNF ポリペプチド阻害剤がTNF 誘導アポトーシスを阻害することができる。

【 0 0 3 8 】

本発明のいくつかの実施形態の態様によると、TNF ポリペプチド阻害剤をコードす

50

る核酸配列を含む単離ポリヌクレオチドが提供される。

【0039】

本発明のいくつかの実施形態によると、核酸配列のコドン使用頻度がタバコ (*Nicotiana tabacum*) について最適化されている。

【0040】

本発明のいくつかの実施形態によると、単離ポリヌクレオチドが配列番号5に示される通りである。

【0041】

本発明のいくつかの実施形態の態様によると、ポリヌクレオチドをコードする核酸配列と、植物細胞で活性なシス作用性調節エレメントとを含む核酸発現構築物が提供される。

10

【0042】

本発明のいくつかの実施形態によると、シス作用性調節エレメントがプロモーターである。

【0043】

本発明のいくつかの実施形態の態様によると、核酸構築物を含む植物細胞が提供される。

【0044】

本発明のいくつかの実施形態によると、植物細胞がタバコ (*Nicotiana tabacum*) 植物である。

【0045】

20

本発明のいくつかの実施形態によると、タバコ (*Nicotiana tabacum*) L. cv 植物細胞がブライトイエロー (BY-2) 細胞である。

【0046】

本発明のいくつかの実施形態によると、植物細胞が凍結乾燥されている。

【0047】

本発明のいくつかの実施形態の態様によると、植物細胞を含む植物細胞懸濁培養液が提供される。

【0048】

本発明のいくつかの実施形態の態様によると、有効成分としてのポリペプチドと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が提供される。

30

【0049】

本発明のいくつかの実施形態の態様によると、有効成分としての植物細胞と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が提供される。

【0050】

本発明のいくつかの実施形態の態様によると、治療を必要とする対象のTNF 関連の医学的状態を治療する方法であって、治療有効量のポリペプチドを対象に投与し、それによって対象のTNF 関連の医学的状態を治療するステップを含む方法が提供される。

【0051】

本発明のいくつかの実施形態の態様によると、治療を必要とする対象のTNF 関連の医学的状態を治療する方法であって、治療有効量の植物細胞を対象に投与し、それによって対象のTNF 関連の医学的状態を治療するステップを含む方法が提供される。

40

【0052】

本発明のいくつかの実施形態によると、ポリペプチドが対象のTNF 関連の医学的状態を治療するのに使用するものである。

【0053】

本発明のいくつかの実施形態によると、植物細胞が対象のTNF 関連の医学的状態を治療するのに使用するものである。

【0054】

本発明のいくつかの実施形態の態様によると、対象のTNF 関連の医学的状態の治療におけるポリペプチドの使用が提供される。

50

【 0 0 5 5 】

本発明のいくつかの実施形態の態様によると、対象の T N F 関連の医学的状態の治療における植物細胞の使用が提供される。

【 0 0 5 6 】

本発明のいくつかの実施形態によると、医学的状態が炎症性疾患である。

【 0 0 5 7 】

本発明のいくつかの実施形態によると、医学的状態が自己免疫疾患である。

【 0 0 5 8 】

本発明のいくつかの実施形態によると、医学的状態が関節リウマチ、強直性脊椎炎、尋常性乾癬および若年性突発性関節炎からなる群から選択される。

10

【 0 0 5 9 】

本発明のいくつかの実施形態によると、医学的状態が炎症性腸疾患である。

【 0 0 6 0 】

本発明のいくつかの実施形態によると、炎症性腸疾患が大腸炎およびクローン病からなる群から選択される。

【 0 0 6 1 】

本発明のいくつかの実施形態によると、ポリペプチドが非経口投与用に製剤化されている。

【 0 0 6 2 】

本発明のいくつかの実施形態によると、ポリペプチドが経口投与用に製剤化されている。

20

【 0 0 6 3 】

本発明のいくつかの実施形態によると、医学的状態が関節リウマチ、炎症性腸疾患、敗血症、内毒素ショック、A I D S、子宮内膜症、乾癬、心血管疾患、がん、白斑、関節炎、リウマチ性多発性関節炎、乾癬性リウマチ (p s o r i a t i c r h e u m a t i s m)、強直性脊椎炎、尋常性乾癬、若年性突発性関節炎、多関節型若年性突発性関節炎、乾癬性関節炎、ウェゲナー病 (肉芽腫症)、クローン病、短腸症候群、潰瘍性大腸炎、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D)、C 型肝炎、喘息、悪液質、アトピー性皮膚炎、アルツハイマー病、肝性脳症、A D H D、慢性疲労症候群、疱疹状皮膚炎 (デューリング病)、接触性皮膚炎、蕁麻疹 (慢性突発性蕁麻疹を含む)、尋常性天疱瘡、水泡性類天疱瘡を含む自己免疫性水疱症、重症筋無力症、肺サルコイドーシスを含むサルコイドーシス、強皮症、反応性関節炎、高 I g E 症候群、多発性硬化症および突発性好酸球増加症候群およびアレルギーからなる群から選択される。

30

【 0 0 6 4 】

本発明のいくつかの実施形態によると、ポリペプチドが非経口投与用に製剤化されている。

【 0 0 6 5 】

本発明のいくつかの実施形態によると、植物細胞が経腸投与用に製剤化されており、医学的状態が肥満、メタボリックシンドローム、糖尿病および肝臓疾患または障害でない。

【 0 0 6 6 】

本発明のいくつかの実施形態の態様によると、ポリペプチドを産生する方法であって、記載される細胞を用意するステップと、ポリペプチドを産生するように細胞を培養するステップとを含む方法が提供される。

40

【 0 0 6 7 】

本発明のいくつかの実施形態によると、方法が細胞からポリペプチドを単離するステップをさらに含む。

【 0 0 6 8 】

本発明のいくつかの実施形態によると、細胞が植物細胞培養培地中で培養された単離細胞である。

50

【0069】

本発明のいくつかの実施形態によると、培養が使い捨てバイオリアクターで行われる。

【0070】

特に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および/または科学用語は、本発明が関連する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載される方法および材料と類似または同等の方法および材料を本発明の実施形態の実施または試験に使用することができるが、例示的な方法および/または材料を以下に記載する。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が優先する。さらに、材料、方法および実施例は例示に過ぎず、必然的に限定することを意図していない。

【0071】

本発明のいくつかの実施形態を、付随する図面を参照して、単なる例として本明細書に記載する。ここで図面を詳細に具体的に参照することによって、示される特徴が例としてのものであり、本発明の実施形態の実例となる論述の目的のためのものであることが強調される。この点について、図面と共になされる説明によって、本発明の実施形態をどのように実施することができるのかが当業者に明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図1】植物組換えヒト(p r h) T N F R 2 : F c (本明細書ではP R X - 1 0 6とも呼ばれる、配列番号6)のアミノ酸配列の概略図である。B Y 2細胞中で発現させるためのp r h T N F R 2 : F c c D N Aを、T N F受容体のT N F結合部分および分泌経路へのF Cタンパク質で構成される融合ポリペプチドを標的化するためにシグナルペプチドと会合した。アミノ酸配列の色コード:シグナルペプチドを黄色に着色し; T N F受容体部分を黒色(緑色)に着色し; I g G 1のF c部分を青色に着色し; E R保留シグナルを赤色に着色する。

【図2】図2 A ~ 図2 Bは、ウエスタンブロットによるP R H T N F R 2 : F Cと市販のE n b r e 1の比較を示す図である。p r h T N F R 2 : F c (1レーン)および市販のE n b r e 1 (2レーン)を、それぞれ12%および8%のトリス-グリシンS D S - P A G Eにより、還元条件(パネルA)および非還元条件(パネルB)下で分析した。膜を抗F C抗体(上部パネル)および抗T N F R 2抗体(下部パネル)でブロットした。分子量マーカーを右レーンに示す。1レーン: P R H T N F R 2 : F C; 2レーン: 市販のE n b r e 1。

【図3】p r h T N F R 2 : F c結合活性および分子完全性についての定量的非放射性アッセイによるp r h T N F R 2 : F cおよび市販のE n b r e 1によるT N F結合を示すグラフである。T N Fに対する抗体でプレコーティングしたE L I S AプレートにT N Fと共にインキュベートし、引き続いて市販のE n b r e 1およびp r h T N F R 2 : F cを発現しているB Y 2細胞からの上清に暴露した。両試験物の連続希釈をX軸に示す。分子のF c部分をヤギ抗ヒトI g G F c H R Pで検出した。

【図4】ウエスタンブロット解析によるp r h T N F R 2 : F cの発現についての個々の細胞株のスクリーニングを示す像である。

【図5 - 1】図5 A ~ 図5 Fは、M T T生存率アッセイによるp r h T N F R 2 : F cまたは市販のE n b r e 1の存在下でのA 3 7 5細胞のT N F細胞毒性を示す像である。図5 A - 未処理培養A 3 7 5細胞; 図5 B - T N Fで処理; 図5 C - p r h T N F R 2 : F c (3 . 1 2 5 n g / m l)で処理したT N F暴露細胞; 図5 D - 市販のE n b r e 1 (3 . 1 2 5 n g / m l)で処理したT N F暴露細胞; 図5 E - p r h T N F R 2 : F c (1 0 0 n g / m l)で処理したT N F暴露細胞; 図5 F - 市販のE n b r e 1 (1 0 0 n g / m l)で処理したT N F暴露細胞。

【図5 - 2】図5 Gは、M T T生存率アッセイによるp r h T N F R 2 : F cまたは市販のE n b r e 1の存在下でのA 3 7 5細胞のT N F細胞毒性を示す棒グラフである。

【図6 - 1】図6 A ~ 図6 Fは、M T T生存率アッセイによるp r h T N F R 2 : F cまたは市販のE n b r e 1の存在下でのL 9 2 9細胞のT N F細胞毒性を示す像である

10

20

30

40

50

。図6A - 未処理培養L929細胞；図6B - TNF で処理；図6C - prh TNF R2 : Fc (3 . 1 2 5 n g / m l) で処理したTNF 暴露細胞；図6D - 市販のEn bre l (3 . 1 2 5 n g / m l) で処理したTNF 暴露細胞；図6E - prh TN F R 2 : F c (1 0 0 n g / m l) で処理したTNF 暴露細胞；図6F - 市販のEn b r e l (1 0 0 n g / m l) で処理したTNF 暴露細胞。

【図6 - 2】図6Gは、MTT生存率アッセイによるprh TNF R2 : Fcまたは市販のEn bre lの存在下でのL929細胞のTNF 細胞毒性を示す棒グラフである。

【図7】図7A ~ 図7Bは、TNBS暴露後の体重変化を示すグラフである。マウスに、TNBS誘導6時間後にprh TNF R2 : Fcを経口投与した。連続4日間、毎日体重を測定した(平均値 \pm SE)。図7A - 元の体重からの減少%で示す、TNBSによる処理4日後の平均体重減少。柱1 - 生理食塩水対照 (n = 1 5) ; 柱2 - Mock - 宿主植物対照細胞 (BY2 - ; n = 1 5) ; 柱3 - 組換えTNF R2 : Fc (用量I) を発現しているPRX - 106 - 植物細胞 (n = 1 5) ; 柱4 - 組換えTNF R2 : Fc (用量II) を発現しているPRX - 106 - 植物細胞 (n = 7) ; 柱5 - デキサメタゾン処理マウス (n = 1 0) ; 柱6 - 対照マウス (n = 5) 。図7B - 元の体重からの減少%で示す、TNBSによる処理4日後の平均体重減少。組換えTNF R2 : Fcを発現している植物細胞による経口処理によって、体重減少が減弱されたことに留意されたい。

【図8】TNF R2 : Fcを発現している植物細胞の経口投与によって、TNBS誘発結腸短縮が阻害されることを示す棒グラフである。大腸炎を有するマウスに、TNBS誘導後4日連続でTNF R2 : Fcを発現している植物細胞を経口投与し、結腸長を4日目に測定した(平均値 \pm SE)。左から右に：柱1 - 対照マウス (n = 5) ; 柱2 - 生理食塩水対照 (n = 1 5) ; 柱3 - Mock - 宿主植物対照細胞 (BY2 - ; n = 1 5) ; 柱4 - 組換えTNF R2 : Fc (用量I) を発現しているPRX - 106 - 植物細胞 (n = 1 5) ; 柱5 - 組換えTNF R2 : Fc (用量II) を発現しているPRX - 106 - 植物細胞 (n = 7) ; 柱6 - デキサメタゾン処理マウス (n = 1 0) 。

【図9】TNF R2 : Fcを発現している植物細胞の経口投与によって、TNBS誘発大腸炎の肉眼的特徴が改善されたことを示す棒グラフである。実験の終点での対照ラットおよび処理ラットの合計肉眼的炎症スコア (Wall aceスコア) (平均値 \pm SE) 。柱1 - 対照マウス (n = 5) ; 柱2 - 生理食塩水対照 (n = 1 5) ; 柱3 - Mock - 宿主植物対照細胞 (BY2 - ; n = 1 5) ; 柱4 - 組換えTNF R2 : Fc (用量I) を発現しているPRX - 106 - 植物細胞 (n = 1 5) ; 柱5 - 組換えTNF R2 : Fc (用量II) を発現しているPRX - 106 - 植物細胞 (n = 7) ; 柱6 - デキサメタゾン処理マウス (n = 1 0) 。

【図10】図10A ~ 図10Cは、サイトカイン抗体アレイによって測定されるTNF R2 : Fcを発現している植物細胞の経口投与によって処理したマウスの血清サイトカイン含量を示す棒グラフである。Mock - 宿主植物対照細胞 (BY2 -) (n = 1 5) ならびに組換えTNF R2 : Fcタンパク質用量I (n = 1 5) および用量II (n = 7) を発現している植物細胞で処理した群の血清を回収し、サイトカイン磁気Luminoxアッセイに供した。TNBS - 生理食塩水対照 (n = 1 5) ; Mock - 宿主植物対照細胞 (BY2 - ; n = 1 5) ; 組換えTNF R2 : Fc (用量I) を発現しているPRX - 106 - 植物細胞 (n = 1 5) ; 組換えTNF R2 : Fc (用量II) を発現しているPRX - 106 - 植物細胞 (n = 7) ; デキサメタゾン処理マウス (n = 1 0) ; 対照マウス (n = 5) 。

【図11】図11A ~ 図11Bは、サイトカイン抗体アレイによる血清サイトカイン含量を示す図である。図11A - Mock - 宿主植物対照細胞 (BY2 -) (n = 1 5) ならびに組換えTNF R2 : Fcタンパク質用量I (n = 1 5) および用量II (n = 7) を発現している植物細胞で処理した群の血清をプールし、回収し、サイトカイン抗体アレイ分析に供した。図11B - アレイのサイトカイン定量化。結果は、PRX - 106による処理によって顆粒球コロニー刺激因子G - CSF、マクロファージコロニー刺激因子 (M - CSF) などの炎症メディエーターのレベルが低下したことを示し、血流からの骨髓由

10

20

30

40

50

来細胞の全身動員を低下させることにより全身性炎症が減少することを潜在的に示している。

【図12】組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞で処理した動物の脾臓Treg集団の増殖を示す棒グラフである。TNBS誘発大腸炎中にPRX-106で処理したBalb/cマウスの脾臓をCD4+CD25+Foxp3+の割合について分析した。バーはSEを示す。柱1-生理食塩水対照(n=15);柱2-Mock-宿主植物対照細胞(BY2-;n=15);柱3-組換えTNFR2:Fc(用量I)を発現しているPRX-106-植物細胞(n=15);柱4-組換えTNFR2:Fc(用量II)を発現しているPRX-106-植物細胞(n=7);柱5-デキサメタゾン処理マウス(n=10);柱6-対照マウス(n=5)。

10

【図13】図13A~図13Bは、DSS暴露後の体重変化を示すグラフである。大腸炎を有するマウスに、DSS誘導24時間後に連続7日間TNFR2:Fcを発現している植物細胞を経口投与し、マウスの体重を測定した(平均値±SE)。図13A-元の体重からの減少%で示す、DSSによる処理10日後の平均体重減少。柱1-生理食塩水対照(n=10);柱2-Mock-宿主植物対照細胞(BY2-;n=10);柱3-組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞を経口投与(n=10);柱4-対照マウス(n=5)。図13B-元の体重からの減少%で示す、DSSによる処理後10日間の平均体重減少。組換えTNFR2:Fcを発現しているPRX-106-植物細胞による経口処理によって、体重減少が減弱されたことに留意されたい。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。

20

【図14】図14A~図14Bは、TNFR2:Fcの経口投与によってDSS誘発大腸短縮が阻害されたことを示す図である。大腸炎を有するマウスに、DSS誘導後連続7日間組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞を経口投与し、結腸長を10日目に測定した(平均値±SE)。図14A-柱1-生理食塩水対照(n=10);柱2-Mock-宿主植物対照細胞(BY2-;n=10);柱3-組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞(n=10);柱4-対照マウス(n=5)。図14B-DSS大腸炎の誘発10日後の結腸の代表的な写真。

【図15】図15A~図15Cは、処理マウスから得た結腸のサイトカインプロファイルのグラフ表示である。柱1-生理食塩水対照を受けたDSS処理マウス(n=10);柱2-Mock-宿主植物対照細胞(BY2-;n=10)を受けたDSS処理マウス;柱3-30μg組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞を受けたDSS処理マウス(n=10);柱4-対照未処理マウス(n=5)の結腸から採取したエキソピボ培養パンチ生検によるサイトカイン分泌。

30

【図16】図16A~図16Cは、サイトカイン抗体アレイによって定量した血清サイトカイン含量のグラフ表示である。Mock-宿主植物対照細胞(BY2-)(n=15)および組換えTNFR2:Fcタンパク質を発現している植物細胞(n=10)で処理したマウスの血清を回収し、サイトカイン磁気Luminexassayに供した。柱1-生理食塩水対照(n=10);柱2-Mock-宿主植物対照細胞(BY2-;n=10);柱3-組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞の経口投与(n=10);柱4-対照マウス(n=5)。*P<0.05。

40

【図17】図17A~図17Bは、組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞の経口投与による治療的処置によって、DSS誘発大腸炎の重症度が減少することを示す図である。図17A-代表的な組織切片を、倍率40倍および100倍でH&E染色後に顕微鏡で調べた。像は、1群当たり少なくとも7匹のマウスを表す。図17B-組織学的大腸炎スコアに対する組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞の経口投与の効果を決定した。白色四角-組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞(n=7)、灰色四角-Mock-宿主植物対照細胞(BY2-;n=10)、黒色四角-生理食塩水対照(n=8)。**P<0.01、***P<0.001。

【図18】ラット血清中のTNFR2:Fcの薬物動態を示す棒グラフである。組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞の経口投与を、自由摂食によって開始した。ラッ

50

ト (n = 6) は組換え TNFR2 : Fc を発現している植物細胞を受けた。陰性対照は同体積の宿主 BY2 (-) 植物を受けた。

【図 19】経管栄養により組換え TNFR2 : Fc を発現している植物細胞を経口投与した後のラット血清中の TNFR2 : Fc の薬物動態を示す棒グラフである。ラット (n = 6) は組換え TNFR2 : Fc を発現している植物細胞を受けた。陰性対照は同体積の宿主 BY2 (-) 植物を受けた。

【図 20】質量スペクトルによって解明された PRX - 106 配列 (配列番号 6) を示す図である (緑色は 84 . 8 % 被覆度を示す)。

【発明を実施するための形態】

【0073】

本発明は、そのいくつかの実施形態で、キメラポリペプチド、同ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、同ポリペプチドを発現する細胞および同ポリペプチドを産生する方法に関する。

【0074】

本発明の少なくとも 1 つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明はその適用において以下の説明に示されるまたは実施例によって例示される詳細に必ずしも限定されないことを理解すべきである。本発明は他の実施形態が可能である、または種々の方法で実施もしくは実行することができる。

【0075】

TNF は炎症反応を促進し、これが今度は炎症、がんおよび自己免疫障害に関連する臨床的問題の多く、例えば、関節リウマチ、強直性脊椎炎、クローン病、短腸症候群、乾癬、化膿性汗腺炎および難治性喘息を引き起こす。これらの障害はしばしば、TNF 阻害剤を用いて治療される。過去 10 年間にわたって、FDA は主要な適応症を治療するための TNF 阻害剤としていくつかの組換えタンパク質を承認しており、その中にはエタネルセプト、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブベゴルおよびゴリムマブがある。

【0076】

哺乳動物細胞系での組換えタンパク質の産生は、細胞脆弱性および細胞の複雑な栄養要求性およびウイルスまたはプリオンによる最終産物の汚染の可能性によって妨害される。

【0077】

エタネルセプトは、関節リウマチ、多関節型若年性発症性関節炎、尋常性乾癬、乾癬性関節炎および強直性脊椎炎などのいくつかの炎症状態のために必要とされる腫瘍壊死因子 (TNF) 遮断薬である。エタネルセプトは、チャイニーズハムスター卵巢哺乳動物細胞発現系で組換え DNA 技術によって産生される。

【0078】

本発明を実施する間、本発明者らは植物細胞でのエタネルセプト (以下、prh TNFR2 : Fc) の組換え発現用の発現ベクターを構築し、タバコ細胞をベクターによって形質転換し、細胞培養物から触媒活性タンパク質を単離した。発現した組換えタンパク質はその TNF 結合活性を保持しており、アポトーシス調節活性によって証明されるように好ましい触媒活性を示した。

【0079】

したがって、本発明の態様によると、植物産生 TNF ポリペプチド阻害剤が提供される。

【0080】

本明細書で使用される「TNF ポリペプチド阻害剤」は、TNF に結合し、以下：(a) TNFR、好ましくは内因性 (すなわち、個体または宿主に固有の) 細胞膜結合型 TNFR；(b) TNFR の細胞外ドメイン；および / または (c) TNFR の TNF 結合ドメイン (細胞外ドメインの一部であり得る) のいずれかを含む TNF と TNF 受容体 (TNFR) の結合に反映される TNF 活性を阻害および / または妨害するポリペプチドを指す。具体的な実施形態によると、TNF と受容体の結合の阻害は、少なく

10

20

30

40

50

とも50%、例えば、50~100%、50~95%、60~90%または70~90%にさえなる。

【0081】

TNF 阻害剤には、それだけに限らないが、TNF および抗TNF 抗体に特異的に結合する可溶性TNFR（すなわち、非膜結合型）またはその一部（断片）が含まれる。

【0082】

本明細書で使用される場合、TNF 阻害剤の「生物学的活性」は、TNF に結合し、TNF が以下：（a）TNFR、好ましくは内因性、細胞膜結合型TNFR；（b）TNFRの細胞外ドメイン；および（c）TNFRのTNF 結合ドメイン（細胞外ドメインの一部であり得る）のいずれかと結合するのを阻害および/または妨害することである。TNF 阻害剤は、その例が本明細書で提供される、TNF 活性およびその阻害を測定するための当技術分野で知られているアッセイを用いて生物学的活性を示すことができる。

【0083】

本明細書で使用される場合、「TNF 受容体ポリペプチド」および「TNFR」という用語は、TNF に結合することができる（いずれかの種、例えば、ヒトの）TNFRに由来するポリペプチドを指す。II型TNFR（またはp75 TNFRまたはTNFRII）およびI型TNFR（またはp55 TNFRまたはTNFRI）の2種の異なる細胞表面TNFRが記載されている。成熟全長ヒトp75 TNFRは約75~80キロダルトン（kD）の分子量を有する糖タンパク質である。成熟全長ヒトp55 TNFRは約55~60kDの分子量を有する糖タンパク質である。本発明の好ましいTNFRポリペプチドは、TNFRI型および/またはTNFRII型に由来する。例示的な受託番号を以下で提供する。具体的な実施形態によると、TNFRは、特異的に、例えば、 10^{-5} M未満のKdでTNF に結合することができる。

【0084】

具体的な実施形態によると、可溶性TNFR断片がキメラポリペプチドの一部である。

【0085】

「キメラポリペプチド」または「融合ポリペプチド」は、天然に生じるのとは異なる位置の領域を含むポリペプチドである。これらの領域は通常は別のタンパク質に存在して、キメラもしくは融合ポリペプチドとまとめられてもよいし、またはこれらの領域は通常は同じタンパク質中に存在するが、キメラもしくは融合ポリペプチド中で新たな配置に置かれてもよい。キメラまたは融合ポリペプチドは、直鎖にせよ分岐にせよ、TNFRポリペプチドの重合体型で生じてもよい。

【0086】

本明細書で使用される場合、TNFRの「細胞外ドメイン」は、TNFRのアミノ末端とTNFR膜貫通領域のアミノ末端との間に見られるTNFRの部分の部分を指す。TNFRの細胞外ドメインがTNF に結合する。

【0087】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書において任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すために互換的に使用される。これらの用語はまた、修飾された、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化または標識成分の抱合を受けたアミノ酸ポリマーも包含する。

【0088】

TNF ポリペプチド阻害剤の具体例としては、それだけに限らないが、それぞれキメラヒト-マウス抗TNF モノクローナル抗体および完全ヒト抗TNF モノクローナル抗体からなるインフリキシマブ（Remicade（商標））およびアダリムマブ（Humira（商標））が挙げられる。本教示により使用することができる抗TNF 抗体の別の例としては、ゴリムマブ（Simpsoni（商標））およびセルトリズマブペゴル（Cimzia（商標））が挙げられ、後者はペグ化抗体であるので、組換えポリペプチド

産生後の修飾を要する。

【0089】

この定義には、その範囲下の市販のエタネルセプト（以下でさらに記載する）およびレネルセプト（p55sTNF-R I-IgG1からなるキメラポリペプチド）を含むキメラポリペプチドも含まれる。このようなキメラポリペプチドを以下でさらに記載する。

【0090】

したがって、具体的な実施形態によると、TNF ポリペプチド阻害剤が、
(i) TNF 受容体のTNF 結合ドメインを含む第1のドメインと、
(ii) 免疫グロブリンのFcドメインを含む第2のドメインと
を含むキメラポリペプチドであって、前記第1のドメインおよび前記第2のドメインがそれぞれN末端からC末端へと順次、翻訳的に融合しており、キメラポリペプチドがTNF に特異的に結合するキメラポリペプチドである。

10

【0091】

本明細書で使用される場合、「植物産生」という用語は、それだけに限らないが、キメラポリペプチドおよびキメラポリペプチドそれ自体のグリコシル化パターンを含む調製中の宿主細胞不純物を含む、植物発現に関連する化学的サインを指す。

【0092】

使用される場合、「TNF」という用語は、全身性炎症に關与するサイトカインであり、急性期反応を刺激するサイトカインのグループの一員である腫瘍壊死因子（TNF、カケキシンまたはカケクチン）を指す。TNF は活性化マクロファージ（M1）によって主に産生されるが、CD4+リンパ球、NK細胞およびニューロンのような多くの他の細胞型によっても産生され得る。このタンパク質はTNF A遺伝子によってコードされ、Refseq番号：NP_000585を有する。このタンパク質は炎症反応を刺激することが知られている（炎症性サイトカイン）。

20

【0093】

例えば、第1のドメインはTNF受容体（TNFR）の少なくともTNF結合ドメインで構成される。第1のドメインは可溶性タンパク質である。したがって、具体的な実施形態によると、第1のドメインおよびキメラポリペプチド全体でさえ膜に固定されていない可溶性タンパク質である。

【0094】

TNFRの可溶性型には、単量体、融合タンパク質（「キメラタンパク質」とも呼ばれる）、二量体、三量体またはより高次の多量体が含まれ得る。本発明の特定の実施形態では、可溶性TNFR誘導体が75kDa TNFRまたは55kDa TNFRを模倣し、インビボでTNF に結合するものである。本発明の可溶性TNFR模倣体は、TNFR p55もしくはp75またはこれらの断片に由来し得る。p55およびp75以外のTNFRも例えば、WO99/04001に記載されているTNFRのように本明細書に記載されている種々の医学的障害を治療するための可溶性TNFRを誘導するのに有用である。TNFR模倣体を構築するために使用される可溶性TNFR分子には、例えば、野生型TNFRの膜貫通領域を欠き、TNF に結合することができる少なくとも20個のアミノ酸を有する野生型TNFRの類似体または断片が含まれる。TNFRのこのような可溶性型は、細胞表面で受容体とTNF について競合するので、TNF が細胞に結合するのを阻害し、それによってTNF が生物学的活性を示すのを防ぐ。可溶性TNFRとTNF の結合は、ELISAまたは任意の他の簡便なアッセイを用いて定量することができる。

30

40

【0095】

具体的な実施形態によると、第1のドメインがTNFR2（例えば、AAA36755）に由来する。

【0096】

本発明の実施形態によると、第1のドメインが200～250アミノ酸長である。

【0097】

50

具体的な実施形態によると、第1のドメインがアミノ酸配列 L C A P (配列番号 11) および V F C T (配列番号 12) を含む。

【0098】

具体的な実施形態によると、第1のドメインがアミノ酸配列 L P A Q V A F X P Y A P E P G S T C (配列番号 13) または L P A Q V A F T P Y A P E P G S T C (配列番号 17) を含む。

【0099】

具体的な実施形態によると、第1のドメインが配列番号 2 (配列番号 1 によってコードされる) に示される通りである。

【0100】

本明細書で使用される場合、「免疫グロブリンの F c ドメイン」は、典型的には重鎖の少なくとも2つの定常ドメイン (例えば、当技術分野で定義されているような C H 2 および C H 3 ドメイン) を含む、抗体の重鎖の領域を指す。F c ドメインは、例えば、パパイニンによる抗体の消化によって、二量体型で得ることができる。ジスルフィド結合によって接続された F c ドメインポリペプチドの二量体が抗体の「尾」領域を形成する。当技術分野で知られているように、抗体のあるクラスの F c ドメインは多量体型であり得る。したがって、F c ドメインは場合により単量体、場合により二量体および場合により多量体である。場合により、本明細書に記載されるポリペプチドは二量体型、F c 二量体を含むポリペプチド、または多量体型、F c 多量体を含むポリペプチドである。

【0101】

F c ドメインは、野生型 F c ドメイン (すなわち、抗体で天然に生じるドメイン) の修飾型、例えば、野生型 F c ドメインと少なくとも90%の相同性、場合により少なくとも95%の相同性、および場合により少なくとも98%の相同性を有するポリペプチドを包含する。修飾 F c ドメインは、例えば、国際特許出願 W O 9 7 / 3 4 6 3 1 および W O 9 6 / 3 2 4 7 8 に記載されている。

【0102】

場合により、野生型 F c を、本発明の実施形態で必要とされない構造的特徴または生物学的活性を提供する部位を除去するために修飾する。このような部位の例としては、ジスルフィド結合形成、選択された宿主細胞との不適合性、選択された宿主細胞での発現時の N 末端不均一性、グリコシル化、補体との相互作用、F c 受容体 (新生児型 F c 受容体以外) との結合、および / または抗体依存性細胞傷害性に影響を及ぼすまたは関与する残基が挙げられる。

【0103】

本発明の実施形態によるポリペプチドは F c ドメインの断片を含んでもよい。場合により、断片は、上に定義される F c ドメインの少なくとも20%、場合により少なくとも50%、および場合により少なくとも80%を含む。

【0104】

F c ドメインまたはその断片は、場合により新生児型 F c 受容体 (F c R n) の結合部位を含む。経腸経路を介してキメラポリペプチドを投与する場合に、これが特に重要である。

【0105】

一実施形態によると、F c ドメインまたはその断片の第1のドメインへの付着により、第1のドメインそれ自体よりも長いインビボ半減期を有するポリペプチドが得られる。これは、第1のドメインそれ自体と比べて、長い F c ドメインの血清半減期 (F c R n との結合を介した F c の回収により得る) および / または糸球体濾過による血流からのクリアランスを減少させる大きいポリペプチドのサイズにより得る。別の実施形態によると、得られたポリペプチドは第1のドメインそれ自体と比べて低下した免疫原性を有する。

【0106】

任意の実施形態によると、F c ドメインまたはその断片がヒト F c ドメイン (例えば、ヒト抗体に由来する) またはその断片である。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 7 】

例示的な実施形態によると、F c ドメイン（またはその断片）がI g G（例えば、I g G 1）F c ドメイン（またはその断片）である。

【 0 1 0 8 】

具体的な実施形態によると、第2のドメインが配列番号9（配列番号8によってコードされる）に示される通りである。

【 0 1 0 9 】

したがって、キメラポリペプチドの第2のドメインは、定常免疫グロブリンドメインの少なくとも一部、例えば、定常重鎖免疫グロブリンドメインまたは定常軽鎖免疫グロブリンドメインを含む。好ましくは、第2のドメインが定常重鎖免疫グロブリンドメインの少なくとも一部を含む。定常重鎖免疫グロブリンドメインは、好ましくはC H 2 およびC H 3 ドメインと、場合によりヒンジ領域の少なくとも一部とを含むF c 断片である。免疫グロブリンドメインはI g G、I g M、I g DもしくはI g E免疫グロブリンドメインまたはこれらに由来する修飾免疫グロブリンドメインであり得る。好ましくは、第2のドメインが定常I g G免疫グロブリンドメインの少なくとも一部を含む。I g G免疫グロブリンドメインは、I g G 1、I g G 2、I g G 3もしくはI g G 4ドメインまたは米国特許第5,925,734号に記載されているような修飾ドメインから選択され得る。免疫グロブリンドメインがエフェクター機能を示してもよい。しかしながら、いくつかの実施形態では、修飾された、例えば、少なくとも部分的に欠失したエフェクター機能を有する修飾免疫グロブリンドメインが使用され得る。したがって、例えば、受容体。

【 0 1 1 0 】

本発明の実施形態によると、第1のドメインおよび第2のドメインのキメラ融合により、配列番号10を有するエタネルセプト（Immunex）が形成される。

【 0 1 1 1 】

第1のドメインおよび第2のドメインの種の起源が治療される対象にしたがって選択されることが認識されるだろう。したがって、具体的な実施形態によると、第1のドメインおよび第2のドメインがヒト起源のものである、またはヒト対象に投与した場合に免疫原性反応をもたらさないように修飾される。

【 0 1 1 2 】

本明細書で使用される場合、「エタネルセプト」および「Enbrel（商標）」は、Immunex Corporationによって商業的に入手可能なTNFR2：Fcを示すために互換的に使用される。エタネルセプトは、ヒトI g G 1のFc部分と結合したヒト75キロダルトン（p75）腫瘍壊死因子受容体（TNFR）の細胞外リガンド結合部分からなる二量体融合ポリペプチドである。エタネルセプトのFc成分はヒトI g G 1の定常重鎖2（C H 2）ドメイン、定常重鎖3（C H 3）ドメインおよびヒンジ領域を含むが、定常重鎖1（C H 1）ドメインは含まない。

【 0 1 1 3 】

本発明の別の実施形態によると、

（i）TNF受容体のTNF結合ドメインを含む第1のドメインと、

（ii）免疫グロブリンのFcドメインを含む第2のドメインと、

（iii）小胞体保留シグナルを含む第3のドメインと

を含むキメラポリペプチドであって、

第1のドメイン、第2のドメインおよび第3のドメインがそれぞれN末端からC末端へと順次、翻訳的に融合しており、TNFに特異的に結合するキメラポリペプチドが提供される。

【 0 1 1 4 】

したがって、本発明のこの態様によると、キメラタンパク質が、小胞体に保持されるように発現される。

【 0 1 1 5 】

本明細書で使用される場合、「小胞体保留シグナルペプチド」という用語は、ポリペプ

10

20

30

40

50

チドのN末端またはC末端に存在すると、ポリペプチドをゴルジ装置から回収し、小胞体に保持させるペプチド配列を指す(RayonらJournal of Experimental Botany、第49巻、第326号、1463~1472頁、1998; およびNeumannらAnnals of Botany、2003; 92:167~180参照)。一実施形態では、小胞体保留シグナルペプチドがHDEL(配列番号14)、KDEL(配列番号15)またはSEKDEL(配列番号16)である。

【0116】

言及されるように、第1のドメインおよび第2のドメイン(および存在する場合には第3のドメイン)は、それぞれN末端からC末端へと順次、翻訳的に融合している。これは、第1のドメインが第2のドメインに対してN末端に位置し(第1のドメインのカルボキシ末端が第2のドメインのN末端と翻訳的に融合している)、第2のドメインが第3のドメインのN末端に位置している(第2のドメインのカルボキシ末端が第3のドメインのN末端と翻訳的に融合している)ことを意味する。したがって、第2のドメインはN末端で第1のドメインおよびC末端で第3のドメインによって事実上はさまれている。概略的提示は以下の通りである: 第1のドメイン>第2のドメイン(>第3のドメイン)がN末端からC末端へと規則的に配向している(図1参照)。ドメイン間の結合は直接的であっても、ペプチドリinkerなどのリンカーを用いて間接的であってもよい。

【0117】

分子が、第1のドメインの上流に(N末端に)配向し、これに翻訳的に融合している小胞体シグナル配列をコードする追加のドメインをさらに含んでもよい。

【0118】

本明細書で使用される場合、「小胞体(ER)シグナルペプチド」は、分泌経路に向けられた新たに合成されたタンパク質の大部分のN末端に存在する短(例えば、5~30アミノ酸長)ペプチドであるシグナル配列、リーダー配列またはリーダーペプチドを指す。

【0119】

具体的な実施形態によると、ERシグナルペプチドが植物タンパク質由来である(から得られる)。

【0120】

具体的な実施形態によると、小胞体シグナルペプチドがニコチアナ・ブルムバギニフォリア(N. plumbaginifolia)カルレティキュリンタンパク質のものである。

【0121】

さらなる具体的な実施形態によると、ニコチアナ・ブルムバギニフォリア(N. plumbaginifolia)カルレティキュリンタンパク質のシグナルペプチドが配列番号4に示される通りであり、配列番号3の核酸配列によってコードされる。

【0122】

本明細書で使用される場合、「N末端で翻訳的に融合した」または「C末端で翻訳的に融合した」という用語は、典型的には組換え発現の結果としてのペプチド結合を介した指示されたペプチドとそれぞれのドメインのN末端またはC末端アミノ酸の共有結合を指す。

【0123】

具体的な実施形態によると、キメラポリペプチドが配列番号6に示される通りである。

【0124】

具体的な実施形態によると、キメラポリペプチドが配列番号7、204または205または214に示される通りである。

【0125】

言及されるように、本発明の組換えキメラタンパク質は植物細胞で産生される。

【0126】

阻害ポリペプチドを発現するために、本明細書に記載されるキメラポリペプチドをコードする核酸配列を含む単離ポリヌクレオチドを「植物核酸発現構築物」に結合する。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 7 】

本明細書で使用される場合、「植物核酸発現構築物」という用語は、本発明のいくつかの実施形態の核酸と、宿主植物細胞中で核酸の転写を指示するための少なくとも1つのプロモーターとを含む核酸構築物を指す。適当な形質転換手法のさらなる詳細を本明細書において以下に提供する。

【 0 1 2 8 】

本発明のいくつかの実施形態によると、本発明の核酸配列と、植物宿主細胞中で核酸配列の転写を指示するためのプロモーターとを含む核酸発現構築物が提供される。

【 0 1 2 9 】

本明細書で使用される場合、「核酸配列」という用語は、RNA配列、相補的ポリヌクレオチド配列(cDNA)、ゲノムポリヌクレオチド配列および/または複合ポリヌクレオチド配列(例えば、上記の組み合わせ)の形態で単離および提供される一本鎖または二本鎖核酸配列を指す。

【 0 1 3 0 】

本明細書で使用される場合、「相補的ポリヌクレオチド配列」という句は、逆転写酵素または任意の他のRNA依存性DNAポリメラーゼを用いてメッセンジャーRNAの逆転写から生じる配列を指す。その後、このような配列を、DNA依存性DNAポリメラーゼを用いてインビボまたはインビトロで増幅することができる。

【 0 1 3 1 】

本明細書で使用される場合、「ゲノムポリヌクレオチド配列」という句は、染色体に由来する(から単離される)配列を指すので、これは染色体の隣接部分を表す。

【 0 1 3 2 】

本明細書で使用される場合、「複合ポリヌクレオチド配列」という句は、少なくとも部分的に相補的であり、少なくとも部分的にゲノムである配列を指す。複合配列は、本発明のポリペプチドをコードするのに必要ないくつかのエクソン配列ならびにその間に挿入するいくつかのイントロン配列を含むことができる。イントロン配列は、他の遺伝子のものを含む任意の源のものであってよく、典型的には保存されたスプライシングシグナル配列を含む。このようなイントロン配列は、シス作用性発現調節エレメントをさらに含んでもよい。

【 0 1 3 3 】

本発明のいくつかの実施形態によると、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列が植物中での発現のために最適化されている。このような配列修飾の例としては、それだけに限らないが、対象となる植物種中で典型的に見られるものにより近接したG/C含量の変化、およびコドン最適化と一般的に呼ばれる植物種中で変則的に見られるコドンの除去が挙げられる。一実施形態では、ポリペプチド、例えば、キメラポリペプチドをコードする核酸配列のコドン使用頻度が、タバコ(Nicotiana tabacum)またはベンサミアナタバコ(Nicotiana benthamiana)について最適化されている。

【 0 1 3 4 】

「コドン最適化」という句は、対象となる植物中でのコドン使用頻度に接近する構造遺伝子またはその断片中で使用するための適当なDNAヌクレオチドの選択を指す。そのため、最適化遺伝子または核酸配列は、植物中で統計学的に好ましいまたは統計学的に支持されるコドンを利用するために野生型または天然遺伝子のヌクレオチド配列が修飾された遺伝子を指す。ヌクレオチド配列は、典型的には例えば、Sardanaら(1996、Plant Cell Reports 15:677~681)に記載されている任意の適当な手順を用いて決定される植物種中での発現について最適化されたDNAレベルおよびコード領域で試験される。この方法では、コドン使用頻度の標準偏差、コドン使用頻度の偏りの程度が、高度に発現している植物遺伝子の使用頻度に対する野生型遺伝子の各コドンの使用頻度の二乗比例偏差を最初に見つけ、引き続いて平均二乗偏差を計算することによって計算され得る。使用される式は、 $1SDCU = n = 1N[(Xn - Yn)/Y$

10

20

30

40

50

$n \leq N$ (X_n は高度に発現している植物遺伝子中のコドン n の使用頻度を指し、 Y_n は対象となる遺伝子中のコドン n の使用頻度を指し、 N は対象となる遺伝子中のコドンの総数を指す) である。双子葉植物の高度に発現している遺伝子からのコドン使用頻度の表は、Murray (1989、Nucleic Acids Res. 17: 477~498) のデータを用いて編集されている。

【0135】

特定の植物細胞型にとって好ましいコドン使用頻度にしたがって核酸配列を最適化する1つの方法は、日本のNIAS (農業生物資源研究所) DNAバンクを通してコドン使用頻度データベースでオンライン提供される (ハイパーテキスト転送プロトコル: `//WorldWideWeb(dot)kazusa(dot)or(dot)jp/codon/`) ものなどのコドン最適化表を、いかなる余分な統計計算を行うこともなく、直接使用することに基づく。コドン使用頻度データベースは、いくつかの異なる種についてのコドン使用頻度表を含み、各コドン使用頻度表はGenbankに存在するデータに基づいて統計学的に決定されている。

【0136】

このようなコドン最適化表を用いて特定の種 (例えば、イネ) で各アミノ酸について最も好ましいまたは最も支持されるコドンを決めることによって、対象となるタンパク質をコードする天然ヌクレオチド配列をその特定の植物種についてコドン最適化することができる。これは、特定の種のゲノム中で統計学的出現率が低いコドンを統計学的により支持されるアミノ酸に関して対応するコドンで置き換えることによって行われる。しかしながら、1つまたは複数のあまり支持されないコドンを選択して既存の制限部位を欠失させて、潜在的に有用な接合部 (セグメントを切断およびスプライシングして正しい全長配列を作成することができるようなシグナルペプチドまたは終結カセット、内部部位を付加するための5' および3' 末端) で新たな部位を作成する、またはmRNA安定性もしくは発現に悪影響を及ぼし得るヌクレオチド配列を排除してもよい。

【0137】

所望のコードヌクレオチド配列は、いずれの修飾にも先立って既に、特定の植物種で統計学的に支持されるコドンに相当するいくつかのコドンを含み得る。そのため、野生型ヌクレオチド配列のコドン最適化は、所望のヌクレオチド配列中で、どのコドンが特定の植物に関して統計学的に支持されないのかを決定するステップと、特定の植物のコドン使用頻度表にしたがってこれらのコドンを修飾してコドン最適化誘導体を作成するステップとを含み得る。修飾ヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質が対応する天然または野生型遺伝子によってコードされるタンパク質よりも高いレベルで産生される限り、修飾ヌクレオチド配列が植物コドン使用頻度について完全にまたは部分的に最適化され得る。コドン使用頻度を変化させることによる合成遺伝子の構築は、例えば、PCT特許出願第93/07278号に記載されている。

【0138】

したがって、具体的な実施形態によると、配列番号5に示されるタバコ (*Nicotiana tabacum*) 最適化配列が提供される。

【0139】

本発明のいくつかの実施形態によると、ポリペプチド、例えば、キメラポリペプチドをコードする核酸配列が、植物プロモーター配列などの植物細胞中で活性なシス作用性調節配列と作動可能に連結している。

【0140】

調節配列が連結しているコード配列に対する調節効果 (例えば、コード配列の発現に対する効果) を及ぼすことができる場合に、コード核酸配列は調節配列 (例えば、プロモーター) と「作動可能に連結している」。

【0141】

任意の適当なプロモーター配列が本発明の核酸構築物によって使用され得る。好ましくは、プロモーターが構成的プロモーター、組織特異的または誘導性プロモーターである。

【 0 1 4 2 】

本明細書で使用される場合、「植物で発現可能な (p l a n t - e x p r e s s i b l e) 」という句は、植物細胞、組織または器官、好ましくは単子葉もしくは双子葉植物細胞、組織または器官での発現を少なくとも誘導する、与える、活性化するまたは強化することができる、そこに付加されるまたはその中に含まれる任意の追加の調節エレメントを含むプロモーター配列を指す。このようなプロモーターは構成的、すなわち、複数の組織中で高レベルの遺伝子発現を指示することができる、組織特異的、すなわち、特定の組織（複数可）で遺伝子発現を指示することができる、誘導性、すなわち、刺激の下で遺伝子発現を指示することができる、またはキメラ、すなわち、少なくとも2つの異なるプロモーターの部分で形成されてもよい。

10

【 0 1 4 3 】

本発明のいくつかの実施形態の方法に有用な好ましいプロモーターの例を表 I、I I、I I I および I V に提示する。

【 0 1 4 4 】

【表 1】

表I
本発明のいくつかの実施形態の実施に使用するための
例示的な構成的プロモーター

遺伝子源	発現パターン	参考文献
アクチン	構成的	McElroyら、Plant Cell、 2:163～171、1990
CAMV 35S	構成的	Odellら、Nature、 313:810～812、1985
CaMV 19S	構成的	Nilssonら、Physiol.Plant 100:456～462、1997
GOS2	構成的	de Paterら、Plant J Nov;2(6):837～44、1992
ユビキチン	構成的	Christensenら、Plant Mol.Biol.18:675～689、 1992
イネシクロフィリン	構成的	Bucholzら、Plant Mol Biol.25(5)837～43、1994
トウモロコシH3ヒストン	構成的	Lepetitら、 Mol.Gen.Genet.231:276～ 285、1992
アクチン2	構成的	Anら、Plant J.10(1):107 ～121、1996

20

30

40

【 0 1 4 5 】

【表 2 - 1】

表II

本発明のいくつかの実施形態の実施に使用するための
例示的な種子に好ましいプロモーター

遺伝子源	発現パターン	参考文献
種子特異的遺伝子	種子	Simonら、Plant Mol.Biol.5:191、1985;Scofieldら、J.Biol.Chem.262:12202、1987;Baszczynskiら、Plant.Mol.Biol.14:633、1990。
ブラジルナッツアルブミン	種子	Pearsonら、Plant.Mol.Biol.18:235～245、1992。
レグミン	種子	Ellisら、Plant.Mol.Biol.10:203～214、1988
グルテリン(イネ)	種子	Takaiwaら、Mol.Gen.Genet.208:15～22、1986;Takaiwaら、FEBS Letts.221:43～47、1987
ゼイン	種子	Matzkeら、Plant.Mol.Biol.143:323～32 1990
napA	種子	Stalbergら、Planta 199:515～519、1996
コムギLMWおよびHMW、グルテニン-1	胚乳	Mol.Gen.Genet 216:81～90、1989;NAR 17:461～2
コムギSPA	種子	Albaniら、Plant Cell、9:171～184、1997
コムギa、bおよびgグリアジン	胚乳	EMBO3:1409～15、1984
オオムギltrlプロモーター	胚乳	
オオムギB1、C、Dホルデイン	胚乳	Theor Appl Gen 98:1253～62、1999;Plant J 4:343～55、1993;Mol.Gen.Genet 250:750～60、1996
オオムギDOF	胚乳	Menaら、The Plant Journal、116(1):53～62、1998
Biz2	胚乳	EP99106056.7
合成プロモーター	胚乳	Viente-Carbajosaら、Plant J.13:629～640、1998
イネプロラミンNRP33	胚乳	Wuら、Plant Cell Physiology 39(8)885～889、1998
イネ-グロブリンGlb-1	胚乳	Wuら、Plant Cell Physiology 39(8)885～889、1998

【 0 1 4 6 】

【表 2 - 2】

イネOSH1	胚	Satoら、 Proc.Nati.Acad.Sci.USA、93:8117 ～8122
イネ α - グロブリン REB/OHP-1	胚乳	Nakaseら Plant.Mol.Biol.33:513～ S22、1997
イネADP-グルコースPP	胚乳	Trans Res 6:157-68、1997
トウモロコシESR遺伝子 ファミリー	胚乳	Plant J 12:235-46、1997
ソルガム γ -カフィリン	胚乳	PMB 32:1029-35、1996
KNOX	胚	Postma-Haarsmaら、 Plant.Mol.Biol.39:257～71、1999
イネオレオシン	胚およびアリュ ーロン(aleuton)	Wuら、J.Biochem.、123:386、 1998
ヒマワリオレオシン	種子(胚および乾 燥種子)	Cumminsら、 Plant.Mol.Biol.19:873～876、1992

10

【 0 1 4 7 】

【表 3】

20

表III

本発明の実施に使用するための例示的な花特異的プロモーター

遺伝子源	発現パターン	参考文献
AtPRP4	花	www.dotsalusdotmediumdotedu/mmg/tierney/html
カレン(chalene)シン ターゼ	花	Van der Meerら、Plant Mol.Biol.15、95～109、1990。
LAT52	葯	Twelら Mol.Gen Genet.217:240～345(1989)
アペタラ-3	花	

30

【 0 1 4 8 】

【表 4 - 1】

表IV
本発明の実施に使用するための代替イネプロモーター

プロモーター番号	遺伝子	発現
PR00001	メタロチオネインMte	胚の移動層+カルス
PR00005	推定βアミラーゼ	胚の移動層
PR00009	推定セルロースシンターゼ	根で弱い
PR00012	リパーゼ(推定)	
PR00014	トランスフェラーゼ(推定)	
PR00016	ペプチジルプロリルシス-ト ランスイソメラーゼ(推定)	
PR00019	未知	
PR00020	prpタンパク質(推定)	
PR00029	ノデュリン(推定)	
PR00058	プロテイナーゼ阻害剤Rgpi9	種子
PR00061	βエクспанシンEXPB9	若い花で弱い
PR00063	構造タンパク質	若い組織+カルス+胚
PR00069	キシロシダーゼ(推定)	
PR00075	プロラミン10Kda	胚乳で強い
PR00076	アレルゲンRA2	胚乳で強い
PR00077	プロラミンRP7	胚乳で強い
PR00078	CBP80	
PR00079	デンプン分枝酵素I	
PR00080	メタロチオネイン様ML2	胚の移動層+カルス
PR00081	推定カフェオイル-CoA3-0メ チルトランスフェラーゼ	シュート
PR00087	プロラミンRM9	胚乳で強い
PR00090	プロラミンRP6	胚乳で強い
PR00091	プロラミンRP5	胚乳で強い
PR00092	アレルゲンRA5	

【表 4 - 2】

PR00095	推定メチオニンアミノペプチダーゼ	胚	10
PR00098	ras関連GTP結合タンパク質		
PR00104	β エクспанシンEXPB1		
PR00105	グリシンリッチプロテイン		
PR00108	メタロチオネイン様タンパク質(推定)		
PR00110	RCc3 ストロングルート (strong root)		20
PR00111	ウクラシアニン(uclacyanin)3 様タンパク質	分岐中心/シュート分裂 組織で弱い	
PR00116	26Sプロテアソーム調節粒子 非ATPアーゼサブユニット 11	分裂組織特異的で極めて 弱い	
PR00117	推定40Sリボソームタンパク 質	胚乳で弱い	
PR00122	クロロフィルa/lc-結合タン パク質前駆体(Cab27)	シュートで極めて弱い	
PR00123	推定プロトクロロフィリド レダクターゼ	葉で強い	30
PR00126	メタロチオネインRiCMT	分岐中心/シュート分裂 組織で強い	
PR00129	GOS2	強く構成的	
PR00131	GOS9		
PR00133	キチナーゼCht-3	分裂組織特異的で極めて 弱い	
PR00135	α -グロブリン	胚乳で強い	40
PR00136	アラニンアミノトランスフ ェラーゼ	胚乳で弱い	

【 0 1 5 0 】

【表 4 - 3】

PR00138	サイクリンA2		
PR00139	サイクリンD2		
PR00140	サイクリンD3		
PR00141	シクロフィリン2	シュートおよび種子	
PR00146	スクロースシンターゼ SS1(オオムギ)	中程度で構成的	10
PR00147	トリプシン阻害剤ITR1(オオ ムギ)	胚乳で弱い	
PR00149	イントロンを含むユビキチ ン2	強く構成的	
PR00151	WSI18	胚およびストレス	
PR00156	HVA22ホモログ(推定)		20
PR00157	EL2		
PR00169	アクアポリン	若い植物において中程 度で構成的	
PR00170	高移動度タンパク質	強く構成的	
PR00171	可逆的グリコシル化タンパ ク質RGP1	弱く構成的	
PR00173	サイトゾルMDH	シュート	30
PR00175	RAB21	胚およびストレス	
PR00176	CDPK7		
PR00177	Cdc2-1	分裂組織で極めて弱い	
PR00197	スクロースシンターゼ3		
PRO0198	OsVP1		
PRO0200	OSH1	若い植物の分裂組織で 極めて弱い	40
PRO0208	推定クロロフィラーゼ		

【 0 1 5 1 】

【表 4 - 4】

PRO0210	OsNRT1	
PRO0211	EXP3	
PRO0216	リン酸輸送体OjPT1	
PRO0218	オレオシン18kd	アリュースロン+胚
PRO0219	イントロンを含まないユビ キチン2	
PRO0220	RFL	
PRO0221	トウモロコシUBI δ イントロ ン	検出されず
PRO0223	グルテリン-1	
PRO0224	プロラミンRP6プロモータ ーの断片	
PRO0225	4xABRE	
PRO0226	グルテリンOSGLUA3	
PRO0227	BLZ-2_短(オオムギ)	
PRO0228	BLZ-2_長(オオムギ)	

10

20

【 0 1 5 2 】

本発明のいくつかの実施形態の核酸構築物は、適当な選択マーカーおよび/または複製起点をさらに含むことができる。本発明のいくつかの実施形態によると、利用される核酸構築物は、大腸菌（*E. coli*）（構築物は適当な選択マーカーおよび複製起点を含む）で増殖することができ、細胞中での増殖とも両立するシャトルベクターである。本発明による構築物は、例えば、プラスミド、バクミド、ファージミド、コスミド、ファージ、ウイルスまたは人工染色体であり得る。

30

【 0 1 5 3 】

本発明のいくつかの実施形態の核酸構築物を利用して植物細胞を安定的にまたは一過的に形質転換することができる。安定な形質転換では、核酸が植物ゲノムに組み込まれ、それによってこれが安定で遺伝性の形質を表す。一過的な形質転換では、外因性ポリヌクレオチドが形質転換細胞によって発現されるが、ゲノムに組み込まれず、それによって一過的な形質を表す。

【 0 1 5 4 】

したがって、本発明のいくつかの態様によると、本発明の核酸構築物を含む単離細胞が提供される。

40

【 0 1 5 5 】

本明細書で使用される場合、「単離細胞」という用語は、自然の環境、例えば、植物から少なくとも部分的に分離された細胞を指す。いくつかの実施形態では、単離細胞が全植物の植物細胞である。いくつかの実施形態では、単離細胞が植物細胞、例えば、培養植物細胞である。

【 0 1 5 6 】

本明細書で使用される「植物」という用語は、全植物、植物の祖先および子孫、ならびに種子、シュート、茎、根（塊茎を含む）を含む植物の一部、ならびに植物細胞、組織お

50

よび器官を包含する。植物は、懸濁培養液、胚、分裂組織領域、カルス組織、葉、配偶体、胞子体、花粉および小胞子を含むいずれの形態であってもよい。本発明の方法に特に有用な植物には、上科緑色植物、特に、アカシア属 (*Acacia*) の種、カエデ属 (*Acer*) の種、マタタビ属 (*Actinidia*) の種、トチノキ属 (*Aesculus*) の種、アガチス・オーストラリス (*Agathis australis*)、アルビジア・アマラ (*Albizia amara*)、アルソフィラ・トリカラー (*Alsophila tricolor*)、ウシクサ属 (*Andropogon*) の種、ラッカセイ属 (*Arachis*) の種、ピンロウジュ (*Areca catechu*)、アステリア・フラグランサ (*Astelia fragrans*)、アストラガルス・キケル (*Astragalus cicer*)、バイキアエア・ブルリユガ (*Baikiaea plurijuga*)、カバノキ属 (*Betula*) の種、アブラナ属 (*Brassica*) の種、オヒルギ (*Bruguiera gymnorhiza*)、ブルケア・アフリカーナ (*Burkea africana*)、ブテア・フロンドサ (*Butea frondosa*)、カダバ・ファリノーサ (*Cadaba farinosa*)、カリアンドラ属 (*Calliandra*) の種、チャノキ (*Camellia sinensis*)、ダンドク (*Canna indica*)、トウガラシ属 (*Capsicum*) の種、センナ属 (*Cassia*) の種、セントロエマ・ブベスケンス (*Centroema pubescens*)、カコオメレス属 (*Chacoomeles*) の種、ニッケイ (*Cinnamomum cassia*)、コーヒーノキ (*Coffea arabica*)、コロフォスペルムム・モパネ (*Colophospermum mopane*)、コロニア・バリ

10

20

30

40

50

リア (*Coronilla varia*)、コトネアスター・セロティナ (*Cotonaster serotina*)、サンザシ属 (*Crataegus*) の種、キュウリ属 (*Cucumis*) の種、イトスギ属 (*Cupressus*) の種、シルバー・ファーン (*Cyathea dealbata*)、マルメロ (*Cydonia oblonga*)、スギ (*Cryptomeria japonica*)、オガルカヤ属 (*Cymbopogon*) の種、シルバー・ファーン (*Cyathea dealbata*)、マルメロ (*Cydonia oblonga*)、ダルベルギア・モネタリア (*Dalbergia monetaria*)、ダバリア・ディバリカタ (*Davallia divaricata*)、ヌスビトハギ属 (*Desmodium*) の種、ディクソニア・スクアロサ (*Dicksonia squarosa*)、ジベテロポゴン・アンプレクテンス (*Dibeteropogon amplexans*)、ジオクレア属 (*Dioclea*) の種、フジマメ属 (*Dolichos*) の種、ドリクニウム・レクタム (*Dorycnium rectum*)、エキノクロア・ピラミダリス (*Echinochloa pyramidalis*)、エーラフィア属 (*Ehraffia*) の種、シコクビエ (*Eleusine coracana*)、エラグレスチス属 (*Eragrostis*) の種、デイゴ属 (*Erythrina*) の種、ユーカリ属 (*Eucalyptus*) の種、ユークレア・シンペリー (*Euclea schimperii*)、ユーラリア・ピロサ (*Eulalia villosa*)、ソバ属 (*Pagopyrum*) の種、フェイジョア・セロウィアナ (*Feijoa sellowiana*)、フラガリア属 (*Fragaria*) の種、フレミングア属 (*Flemingia*) の種、フレイシネチア・バンクスリ (*Fleycinetia banksii*)、ゲンノショウコ (*Geranium thunbergii*)、イチヨウ (*Ginkgo biloba*)、グリシン・ジャバニカ (*Glycine javanica*)、グリリシディア属 (*Gliricidia*) の種、ワタ (*Gossypium hirsutum*)、グレビレア属 (*Grevillea*) の種、グイボウルティア・コレオスベルマ (*Guibourtia coleosperma*)、イワオウギ属 (*Hedysarum*) の種、ヘマフィア・アルチシマ (*Hemaffhia altissima*)、ヘテロポゴン・コントフス (*Heteropogon contofus*)、オオムギ (*Hordeum vulgare*)、ヒパーレニア・ルフア (*Hyperrhena rufa*)、オトギリソウ (*Hypericum erectum*)、ヒペフェリア・ディソルテ (*Hypeffhelia dissolute*)

)、インディゴ・インカルナタ (*Indigo incarnata*)、アヤメ属 (*Iris*) の種、レプタルレナ・ピロリフォリア (*Lettarrhena pyrolifolia*)、ハギ属 (*Lespedeza*) の種、レトウカ属 (*Lettuca*) の種、ギンネム (*Leucaena leucocephala*)、ロウデチア・シンプレクス (*Loudetia simplex*)、ロトヌス・バイネスリ (*Lotonus bainesli*)、ミヤコグサ属 (*Lotus*) の種、マクロチロマ・アクシラレ (*Macrotyloma axillare*)、リンゴ属 (*Malus*) の種、キャッサバ (*Manihot esculenta*)、アルファルファ (*Medicago sativa*)、メタセコイア (*Metasequoia glyptostroboides*)、ムサ・サビエンタム (*Musa sapientum*)、タバコ属 (*Nicotiana*) の種、オノブリス属 (*Onobrychis*) の種、オルニソプス属 (*Ornithopus*) の種、イネ属 (*Oryza*) の種、ペルトフォルム・アフリカヌム (*Peltophorum africanum*)、チカラシバ属 (*Pennisetum*) の種、アボカド (*Persea gratissima*)、ペチュニア属 (*Petunia*) の種、インゲンマメ属 (*Phaseolus*) の種、カナリーヤシ (*Phoenix canariensis*)、フォルミウム・クッキアヌム (*Phormium cookianum*)、カナメモチ属 (*Photinia*) の種、ピセア・グラウカ (*Picea glauca*)、マツ属 (*Pinus*) の種、エンドウ (*Pisum sativum*)、ポドカルプス・トタラ (*Podocarpus totara*)、ポゴナルスリア・フレッキイ (*Pogonarthria fleckii*)、ポゴナフリア・スクアロサ (*Pogonaffhria squarrosa*)、ポプラ属 (*Populus*) の種、プロソピス・キネラリア (*Prosopis cineraria*)、ベイマツ (*Pseudotsuga menziesii*)、プテロロビウム・ステラツム (*Pterolobium stellatum*)、セイヨウナシ (*Pyrus communis*)、カシ属 (*Quercus*) の種、ラフィオレプシス・ウンベラータ (*Rhaphiolepis umbellata*)、ロパロスチリス・サピダ (*Rhopalostylis sapida*)、ルス・ナタレンシス (*Rhus natalensis*)、リベス・グロッサラリア (*Ribes grossularia*)、スグリ属 (*Ribes*) の種、ニセアカシア (*Robinia pseudoacacia*)、バラ属 (*Rosa*) の種、キイチゴ属 (*Rubus*) の種、ヤナギ属 (*Salix*) の種、スキザクリウム・サングイネウム (*Schyzachyrium sanguineum*)、シアドピチス・ベフィシラタ (*Sciadopitys vefficillata*)、セコイア (*Sequoia Sempervirens*)、セコイアデンドロン (*Sequoiadenron giganteum*)、モロコシ (*Sorghum bicolor*)、ホウレンソウ属 (*Spinacia*) の種、スポロボルス・フィムブリアツス (*Sporobolus fimbriatus*)、スチブルス・アロペクロイデス (*Stiburus alopecuroides*)、スチロサントス・フミリス (*Stylosanthos humilis*)、タデハギ属 (*Tadehagi*) の種、ラクウショウ (*Taxodium distichum*)、テメダ・トリアンドラ (*Themeda triandra*)、ジャジクソウ属 (*Trifolium*) の種、コムギ属 (*Triticum*) の種、アメリカツガ (*Tsuga heterophylla*)、スノキ属 (*Vaccinium*) の種、ソラマメ属 (*Vicia*) の種、ブドウ (*Vitis vinifera*)、ワトソニア・ピラミダタ (*Watsonia pyramidata*)、オランダカイウ (*Zantedeschia aethiopica*)、トウモロコシ (*Zeamays*)、アマランス、アーティチョーク、アスパラガス、ブロッコリー、芽キャベツ、キャベツ、セイヨウアブラナ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、カラードグリーン、アマ、ケール、レンズマメ、アブラナ、オクラ、タマネギ、ジャガイモ、イネ、ダイズ、ワラ、サトウダイコン、サトウキビ、ヒマワリ、トマト、カボチャ、チャ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、ライムギ、エンバク、ラッカセイ、エンドウマメ、レンズマメおよびアルファルファ、ワタ、ナタネ、セイヨウアブラナ、コショウ、ヒマワリ、タバコ、ナ

ス、ユーカリ、樹木、観葉植物、多年生牧草および飼料作物を含むリストから選択される飼料もしくはマメ科牧草、観葉植物、食用作物、樹木または灌木を含む単子葉植物および双子葉植物に属する全ての植物が含まれる。あるいは、藻類または他の非緑色植物を本発明の方法に使用することができる。

【0157】

本発明のいくつかの実施形態によると、植物または植物細胞がアオウキクサ植物、細胞または小結節である。アオウキクサ（単子葉植物のウキクサ科またはアオウキクサ属のメンバー）植物またはアオウキクサ小結節培養物を、アグロバクテリウム媒介遺伝子導入、弾道照射または電気穿孔を含むいくつかの方法のいずれか1つによって対象となるヌクレオチド配列を含む遺伝子カセットで効率的に形質転換することができる。ポリペプチドの商業的産生に有用なアオウキクサ細胞の分子工学法およびアオウキクサ発現系の詳細な説明は、当技術分野で知られている（例えば、全て参照により本明細書に完全に組み込まれる、Stompらの米国特許第6,040,498号および第6,815,184号、ならびにDickeyらの第8,022,270号参照）。

【0158】

本発明のいくつかの実施形態によると、本発明の方法によって使用される植物または植物細胞が、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、ラッカセイ、ジャガイモ、ゴマ、オリーブの木、パーム油、バナナ、ダイズ、ヒマワリ、セイヨウアブラナ、サトウキビ、アルファルファ、アワ、マメ科（マメ、エンドウマメ）、アマ、ルピナス、ナタネ、タバコ、ポプラおよびワタなどの作物植物または作物植物の細胞である。

【0159】

さらなる実施形態によると、植物細胞には、タバコ細胞、アグロバクテリウム・リゾゲネス（*Agrobacterium rhizogenes*）で形質転換された根細胞、セロリ細胞、ショウガ細胞、西洋ワサビ細胞およびニンジン細胞が含まれる。一実施形態では、タバコ細胞がそれだけに限らないが、タバコ（*Nicotiana tabacum*）L. cv ブライトイエロー（BY-2）細胞などのタバコ細胞株からのものである。植物細胞は、それだけに限らないが、固体表面（例えば、プラスチック培養容器もしくはプレートなど）または懸濁での培養を含むいずれかの種類の適当な培養法によって培養され得る。BY-2およびニンジン細胞などのいくつかの細胞を懸濁で培養および成長させることができることに留意する。植物細胞を懸濁培養するのに適した装置および方法は、例えば、国際特許出願PCT IL2008/000614に記載されているように、当技術分野で知られている。さらに別の実施形態では、細胞がそれだけに限らないが、ベンサミアナタバコ（*Nicotiana benthamiana*）を含む全タバコ植物または植物組織の細胞である。

【0160】

外来遺伝子を単子葉植物と双子葉植物の両方に導入する種々の方法が存在する（Potrykus, I., *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, *Plant. Mol. Biol.* (1991) 42: 205~225; Shimamotoら、*Nature* (1989) 338: 274~276）。

【0161】

外因性DNAを植物ゲノムDNAに安定に組み込ませる原則法は2つの主要な手法を含む：

(i) アグロバクテリウム媒介遺伝子導入：Kleeら（1987）*Annu. Rev. Plant. Physiol.* 38: 467~486; KleeおよびRogers、*Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*、第6巻、*Molecular Biology of Plant Nuclear Genes*、Schell, J. および Vasil, L. K. 編、Academic Publishers、サンディエゴ、カリフォルニア（1989）2~25頁; Gatenby、*Plant Biotechnology*、Kung, S. および Arntzen, C. J. 編、Butterworth Publishers、ボス

10

20

30

40

50

トン、マサチューセッツ州(1989)93~112頁。

(ii) 直接DNA取り込み: DNAのプロトプラストへの直接取り込みの方法を含むPaszkowskiら、Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants、第6巻、Molecular Biology of Plant Nuclear Genes、Schell, J. および Vasil, L. K. 編、Academic Publishers、サンディエゴ、カリフォルニア(1989)52~68頁; Toriyama, K. ら(1988) Bio/Technology 6: 1072~1074。植物細胞の短い電気ショックによって誘導されるDNA取り込み: Zhangら Plant Cell Rep. (1988) 7: 379~384。Frommら Nature (1986) 319: 791~793。微粒子銃による植物細胞または組織へのDNAインジェクション、Kleinら Bio/Technology (1988) 6: 559~563; Macabeら Bio/Technology (1988) 6: 923~926; Sanford、Physiol. Plant. (1990) 79: 206~209; マイクロピペットシステムの使用による: Neuhausら、Theor. Appl. Genet. (1987) 75: 30~36; Neuhaus および Spangenberg、Physiol. Plant. (1990) 79: 213~217、細胞培養液、胚またはカルス組織のガラス繊維または炭化ケイ素ウィスカ形質転換、米国特許第5,464,765号または発芽花粉によるDNAの直接インキュベーション、DeWetら、Experimental Manipulation of Ovule Tissue、Chapman, G. P. および Mantell, S. H. および Daniels, W. 編、Longman、ロンドン、(1985)197~209頁および Ohta、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83: 715~719。

【0162】

アグロバクテリウム系は、植物ゲノムDNAに組み込まれる規定のDNAセグメントを含むプラスミドベクターの使用を含む。植物組織の接種法は植物種およびアグロバクテリウム送達システムによって異なる。広く使用されている手法は、全植物分化を開始するための優れた源を提供する任意の組織外植片によって行うことができるリーフディスク法である。例えば、Horschら、Plant Molecular Biology Manual A5、Kluwer Academic Publishers、Dordrecht (1988) 1~9頁を参照されたい。追加の手法は、真空浸潤と組み合わせてアグロバクテリウム送達システムを使用する。アグロバクテリウムシステムは、トランスジェニック双子葉植物の作成で特に実行可能である。

【0163】

植物細胞に直接DNAを導入する種々の方法が存在する。電気穿孔では、プロトプラストを強電場に短時間暴露する。マイクロインジェクションでは、極めて小さなマイクロピペットを用いて、DNAを細胞に直接機械的に注入する。微粒子銃では、DNAを硫酸マグネシウム結晶またはタングステン粒子などの微小発射体(microprojectile)に吸着させ、微小発射体を細胞または植物組織中に物理的に加速させる。

【0164】

安定な形質転換後に、植物の繁殖を実施する。植物の繁殖の最も一般的な方法は種子によるものである。しかしながら、種子繁殖による再生は、種子がメンデルの法則によって支配される遺伝的分散にしたがって植物により産生されるために、ヘテロ接合性により作物の均一性を欠くという欠点を有する。基本的に、各種子は遺伝的に異なり、各々が自身の特異的な形質を有して成長する。そのため、再生された植物が親トランスジェニック植物と同一の形質および特徴を有するように形質転換植物を作成することが好ましい。そのため、形質転換植物の迅速で、一貫した再生を提供するマイクロプロパゲーションによって形質転換植物を再生することが好ましい。

【0165】

マイクロプロパゲーションは、選択された親植物または栽培品種から切除された組織の

単一片から新世代植物を成長させる方法である。この方法により、融合タンパク質を発現する好ましい組織を有する植物を大量再生することが可能になる。產生された新世代植物は、元の植物と遺伝的に同一であり、その特徴の全てを有する。マイクロプロパゲーションにより、短期間で高品質の植物材料を大量に產生することが可能になり、元のトランスジェニックまたは形質転換植物の特徴を保存した選択された栽培品種の迅速な増殖がもたらされる。植物をクローニングすることの利点は、植物増殖の速度ならびに產生される植物の品質および均一性である。

【0166】

マイクロプロパゲーションは、段階間での培養培地または成長条件を変化させることを要する多段階手順である。したがって、マイクロプロパゲーション法は、4つの基本的段階を含む：1段階、初期組織培養；2段階、組織培養増殖；3段階、分化および植物形成；および4段階、温室培養およびハードニング(hardening)。1段階において、初期組織培養中、組織培養を確立し、汚染物質がないことを保証する。2段階において、十分な数の組織試料を產生して產生目標を達成するまで、初期組織培養を増殖する。3段階において、2段階で成長した組織試料を分割し、個々の小植物に成長させる。4段階において、形質転換小植物を、植物を自然環境で育てることができるよう植物の光耐性を徐々に高めるハードニングのために温室に移す。

【0167】

本発明のいくつかの実施形態によると、トランスジェニック植物が葉細胞、分裂組織細胞または全植物の一過的形質転換によって作成される。

【0168】

一過的形質転換は、上記直接DNA導入法のいずれかまたは修飾植物ウイルスを用いたウイルス感染によって行うことができる。

【0169】

植物宿主を形質転換するのに有用なことが示されているウイルスには、CaMV、タバコモザイクウイルス(TMV)、ブロムモザイクウイルス(BMV)およびインゲンマメモザイクウイルス(BVまたはBCMV)が含まれる。植物ウイルスを用いた植物の形質転換は、米国特許第4,855,237号(インゲンマメ黄斑モザイクウイルス;BGV)、EP-A67,553(TMV)、特開昭63-14693(TMV)、EPA194,809(BV)、EPA278,667(BV)；およびGluzman, Yら、Communications in Molecular Biology: Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク、172~189頁(1988)に記載されている。植物を含む多くの宿主で外来性DNAを発現するのに使用するための偽ウイルス粒子がWO87/06261に記載されている。

【0170】

本発明のいくつかの実施形態によると、一過的形質転換に使用されるウイルスが無毒性であるので、成長速度の低下、モザイク、輪点、葉巻、黄化、条斑、痘形成、腫瘍形成および窪みなどの重度の症状を引き起こすことができない。適当な無毒性ウイルスは天然無毒性ウイルスまたは人工弱毒ウイルスであり得る。ウイルス弱毒化は、それだけに限らないが、亜致死性加熱、化学処理を含む当技術分野で周知の方法を用いて、または例えば、KuriharaおよびWatanabe(Molecular Plant Pathology 4:259~269、2003)、Gal-onら(1992)、Atreyaら(1992)ならびにHuetら(1994)によって記載されているような定方向突然変異誘発技術によって行うことができる。

【0171】

適当なウイルス株は、例えば、アメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)などの利用可能な供給源からまたは感染植物からの単離によって得ることができる。感染植物組織からのウイルスの単離は、例えば、FosterおよびTattlor編「Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to

10

20

30

40

50

Transgenic Resistance (Methods in Molecular Biology (Humana Press)、第81巻)、Humana Press、1998によって記載されているような当技術分野で周知の技術によって行うことができる。手短かに言えば、高濃度の適当なウイルスを含んでいると考えられる感染植物の組織、好ましくは若葉および花弁を緩衝液（例えば、リン酸緩衝液）に粉碎してその後の接種に使用することができるウイルス感染汁液を得る。

【0172】

植物中で非ウイルス性核酸配列を導入および発現するための植物RNAウイルスの構築は、上記参考文献ならびにDawson, W. O.ら、Virology (1989) 172: 285~292; Takamatsuら EMBO J. (1987) 6: 307~311; Frenchら Science (1986) 231: 1294~1297; Takamatsuら FEBS Letters (1990) 269: 73~76; および米国特許第5,316,931号により示されている。

10

【0173】

ウイルスがDNAウイルスである場合、ウイルス自体に適当な修飾をすることができる。あるいは、外来性DNAを有する所望のウイルスベクターを構築しやすくするために、ウイルスを最初に細菌性プラスミドにクローニングすることができる。次いで、ウイルスをプラスミドから切除することができる。ウイルスがDNAウイルスである場合、細菌性複製起点をウイルスDNAに結合させることができ、次いでこれが細菌によって複製される。このDNAの転写および翻訳により、ウイルスDNAにキャプシド形成するコートタンパク質が産生される。ウイルスがRNAウイルスである場合、ウイルスを一般的にcDNAとしてクローニングし、プラスミドに挿入する。次いで、プラスミドを使用して構築物の全てを作成する。次いで、プラスミドのウイルス配列を転写し、ウイルス遺伝子を翻訳してウイルスRNAにキャプシド形成するコートタンパク質を産生することによって、RNAウイルスを産生する。

20

【0174】

一実施形態では、野生型コートタンパク質コード配列がウイルスポリヌクレオチドから欠失し、植物宿主中で発現し、組換え植物ウイルスポリヌクレオチドをパッケージングし、組換え植物ウイルスポリヌクレオチドによる宿主の全身感染を確保することができる、非野生型植物ウイルスコートタンパク質コード配列および非野生型プロモーター、好ましくは非野生型コートタンパク質コード配列のサブゲノムプロモーターが挿入された植物ウイルスポリヌクレオチドが提供される。あるいは、タンパク質が産生されるように非野生型ポリヌクレオチド配列を中に挿入することによってコートタンパク質遺伝子を不活性化させてもよい。組換え植物ウイルスポリヌクレオチドが1つまたは複数の追加の非野生型サブゲノムプロモーターを含んでもよい。各非野生型サブゲノムプロモーターは、植物宿主中で隣接遺伝子またはポリヌクレオチド配列を転写または発現することができるが、互いにおよび野生型サブゲノムプロモーターにより組み換えることはできない。2つ以上のポリヌクレオチド配列を含める場合、非野生型（外来性）ポリヌクレオチド配列を野生型植物ウイルスサブゲノムプロモーターまたは野生型と非野生型植物ウイルスサブゲノムプロモーターに隣接して挿入してもよい。非野生型ポリヌクレオチド配列をサブゲノムプロモーターの制御下、宿主植物中で転写または発現させて所望の産物を産生する。

30

40

【0175】

第2の実施形態では、組換え植物ウイルスポリヌクレオチドが、非野生型コートタンパク質コード配列の代わりに野生型コートタンパク質コード配列が非野生型コートタンパク質サブゲノムプロモーターの1つに隣接して配置されることを除いて第1の実施形態のように提供される。

【0176】

第3の実施形態では、野生型コートタンパク質遺伝子とそのサブゲノムプロモーターに隣接しており、1つまたは複数の非野生型サブゲノムプロモーターがウイルスポリヌクレオチドに挿入された組換え植物ウイルスポリヌクレオチドが提供される。挿入された非野

50

生型サブゲノムプロモーターは、植物宿主中で隣接遺伝子を転写または発現することができるが、互いにおよび野生型サブゲノムプロモーターにより組み換えることはできない。非野生型ポリヌクレオチド配列を、サブゲノムプロモーターの制御下、宿主植物中で転写または発現させて所望の産物を産生するように、非野生型サブゲノム植物ウイルスプロモーターに隣接して挿入してもよい。

【0177】

第4の実施形態では、組換え植物ウイルスポリヌクレオチドが、野生型コートタンパク質コード配列が非野生型コートタンパク質コード配列によって置き換えられていることを除いて第3の実施形態のように提供される。

【0178】

ウイルスベクターを組換え植物ウイルスポリヌクレオチドによってコードされるコートタンパク質によってキャプシド形成して組換え植物ウイルスを作成する。組換え植物ウイルスポリヌクレオチドまたは組換え植物ウイルスを使用して適当な宿主植物を感染させる。組換え植物ウイルスポリヌクレオチドは宿主中で複製する、宿主中で全身拡散する、および宿主中で外来遺伝子（複数可）（外因性ポリヌクレオチド）を転写または発現して所望のタンパク質を産生することが可能である。

【0179】

ウイルスを植物に接種する技術は、FosterおよびTaylor編「Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance (Methods in Molecular Biology (Humana Press), 第81巻)」、Humana Press、1998; MaramoroschおよびKoprowski編「Methods in Virology」7巻、Academic Press、ニューヨーク1967~1984; Hill, S. A.「Methods in Plant Virology」、Blackwell、オックスフォード、1984; Walkey, D. G. A.「Applied Plant Virology」、Wiley、ニューヨーク、1985; ならびにKadoおよびAgrawa編「Principles and Techniques in Plant Virology」、Van Nostrand-Reinhold、ニューヨークに見出すことができる。

【0180】

上記に加えて、本発明のポリヌクレオチドをクロロプラストゲノムに導入し、それによってクロロプラスト発現を可能にすることもできる。

【0181】

外因性核酸配列をクロロプラストのゲノムに導入する技術が知られている。この技術は以下の手順を含む。最初に、植物細胞を化学的に処理して細胞1個当たりのクロロプラストの数を約1個に減らす。次いで、少なくとも1個の外因性ポリヌクレオチド分子をクロロプラストに導入することを目的として、微粒子銃を介して外因性ポリヌクレオチドを細胞に導入する。クロロプラストに固有の酵素によって容易に行われる相同組換えを介してクロロプラストのゲノムに組み込み可能になるように外因性ポリヌクレオチドを選択する。このために、核酸配列は、対象となる遺伝子に加えて、クロロプラストのゲノムに由来する少なくとも1つのポリヌクレオチドストレッチを含む。さらに、外因性ポリヌクレオチドは、選択後にクロロプラストゲノムのコピーの全てまたは実質的に全てが外因性ポリヌクレオチドを含むことを確認する連続的選択手順によって作用する選択マーカースを含む。この技術に関するさらなる詳細は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,945,050号および第5,693,507号に見られる。したがって、ポリペプチドは、クロロプラストのタンパク質発現系によって産生され、クロロプラストの内膜に組み込まれ得る。

【0182】

本発明のいくつかの実施形態によると、本方法が、核酸を発現している植物細胞を成長させるステップをさらに含む。植物細胞はいずれの所望の植物細胞であってもよい。植物

10

20

30

40

50

細胞は、培養細胞、培養組織もしくは培養器官中の細胞、または植物中の細胞であり得る。いくつかの実施形態では、植物細胞が培養細胞または培養組織もしくは培養器官中の細胞である。さらなる実施形態では、植物細胞が遺伝子転移に使用される任意の種類の植物である。植物細胞は全植物の一部として、あるいは植物細胞培養で成長させることができる。

【0183】

本発明のいくつかの態様によると、植物細胞を植物細胞懸濁培養で成長させる。本明細書で使用される場合、「懸濁培養」という用語は、生物から離れた細胞の成長を指す。懸濁培養は液体培地（「懸濁培地」）を用いて促進することができる。懸濁培養は、液体栄養培地中での細胞の成長を指すことができる。本発明の植物細胞を植物細胞懸濁培養で成長させるのに適した方法および装置は、例えば、あたかも本明細書に完全に示されているかのように全てがこれにより参照により組み込まれる PCT WO 2008 / 135991、米国特許第 6,391,683 号、米国特許出願公開第 10 / 784,295 号；国際特許出願公開 PCT WO 2004 / 091475、WO 2005 / 080544 および WO 2006 / 040761 号に詳細に記載されている。

10

【0184】

したがって、本発明は、本発明の組換えポリペプチドを産生するための、核酸配列を発現している植物または植物培養物を包含する。核酸配列によってコードされるキメラポリペプチドのレベルは、いったん植物細胞または全植物中で発現すると、活性アッセイ、キメラポリペプチドに特異的に結合することができる抗体（例えば、本発明のいくつかの実施形態によるキメラポリペプチドについては、抗 TNF R2 および抗 Fc を用いる、以下の実施例の節参照）を用いたウエスタンブロット、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、放射免疫測定法（RIA）、免疫組織化学、免疫細胞化学、免疫蛍光法などの当技術分野で周知の方法によって測定することができる。

20

【0185】

核酸配列から転写された RNA の植物中のレベルを測定する方法は当技術分野で周知であり、これには例えば、ノーザンブロット解析、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）解析（定量的、半定量的またはリアルタイム RT-PCR を含む）および RNA インサイツハイブリダイゼーションが含まれる。

【0186】

本発明のいくつかの実施形態によると、本発明の発現した組換えキメラポリペプチドが植物細胞中でグリコシル化され、植物特異的グリカン残基を有する 1 つまたは 2 つまたは 3 つまたはそれ以上のグリカン構造を有するキメラポリペプチドが得られる。したがって、本発明のいくつかの実施形態によると、本発明の発現ベクターを発現している細胞が、1 つ、2 つ、3 つまたはそれ以上のアンテナに配列された種々の量のグリカン構造を有するキメラポリペプチドを産生する。全ての構造がコア（1,3）フコース、（1,2）キシロースおよび / または GlcNAc 残基に加えて、2 個の GlcNAc および 1 個のマンノースのコア構造ならびに種々の異なる量のマンノースを含み得る。構造は、コア構造に加えて、少なくとも 1 個、場合により少なくとも 2 個、場合により少なくとも 3 個または場合により少なくとも 4 個以上のマンノース残基を有する高マンノース型；または各グリカン上にマンノースと他のグリカン型の両方を有する複合型、または高マンノースと複合アンテナの両方を有するハイブリッド型であり得る。

30

40

【0187】

他の実施形態では、本発明の発現ベクターを発現している細胞が、少なくとも 1 個、場合により少なくとも 2 個、場合により少なくとも 3 個または場合により少なくとも 4 個以上のコアキシロース残基を有するポリペプチドを産生する。さらに他の実施形態では、本発明の発現ベクターを発現している細胞が、少なくとも 1 個、場合により少なくとも 2 個、場合により少なくとも 3 個または場合により少なくとも 4 個以上のコア（1,3）フコース残基を有するポリペプチドを産生する。一実施形態では、本発明の発現ベクターを発現している細胞が、少なくとも 1 個の露出したマンノース残基、少なくとも 1 個のコ

50

アキシロース残基および少なくとも1個の - (1 , 3) フコース残基を有するポリペプチドタンパク質を産生する。なおさらなる実施形態では、本発明の発現ベクターを発現している細胞が、外側マンノース糖上に少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個またはそれ以上の末端N - アセチルグルコサミン置換を有するポリペプチドを産生する。

【 0 1 8 8 】

具体的な実施形態によると、ポリペプチド阻害剤、例えば、キメラポリペプチドがシアル酸残基を欠く。なおさらに具体的な実施形態によると、ポリペプチドが少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%またはそれ以上の複合グリカンを含む。具体的な実施形態によると、ポリペプチドが40 ~ 70%の複合グリカンを含む。

【 0 1 8 9 】

細胞から分泌された植物細胞発現阻害ポリペプチドの精製により、例えば、p r h T N F R : F cを含む高度に精製された組成物が得られる。したがって、いくつかの実施形態では、ポリペプチドタンパク質が少なくとも98%の均質性まで精製されている。したがって、精製調製物は、少なくとも85%、少なくとも87%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも91.5%、少なくとも92%、少なくとも92.5%、少なくとも93%、少なくとも93.1%、少なくとも93.2%、少なくとも93.3%、少なくとも93.4%、少なくとも93.5%、少なくとも93.6%、少なくとも93.7%、少なくとも93.8%、少なくとも93.9%、少なくとも94%、少なくとも94.5%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、少なくとも95.0 ~ 99.8%の範囲または100%純度の純度によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドの純度がHPLCによって測定される。

【 0 1 9 0 】

いくつかの実施形態では、植物発現ポリペプチド調製物が、それだけに限らないが、核酸およびポリヌクレオチド、アミノ酸、オリゴペプチドおよびポリペプチド、グリカンおよび他の炭水化物、脂質などの植物宿主細胞由来の不純物を含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞由来の不純物が酵素などの生物学的に活性な分子を含む。他の実施形態では、植物発現ポリペプチド組成物が植物 - N - アセチルヘキソサミニダーゼを含む。宿主細胞がタバコ細胞またはタバコ細胞株細胞である場合、植物 - N - アセチルヘキソサミニダーゼがタバコ - N - アセチルヘキソサミニダーゼである。

【 0 1 9 1 】

さらなる実施形態では、植物 - N - アセチルヘキソサミニダーゼが不活性化植物 - N - アセチルヘキソサミニダーゼである。植物 - N - アセチルヘキソサミニダーゼの不活性化は、物理的手段、化学的手段または生化学的手段によって行うことができる。物理的不活性化は、加熱、凍結、乾燥等によって行うことができる。化学的不活性化は、極度のpH、化学変性、側鎖、グリカン、アミノ酸の付加または除去等によって行うことができる。生化学的不活性化には、それだけに限らないが、可逆的または不可逆的阻害剤による阻害が含まれる。例示的な - N - アセチルヘキソサミニダーゼ阻害剤には、N - アセチル - D - グルコサミンおよび - メチル - N - アセチルグルコサミンなどの最終産物阻害剤、ならびに米国特許出願第2010016386号、第20110237631号、第20100087477号および第20120046337号に開示されている化合物などの選択的阻害剤が含まれる。植物 - N - アセチルヘキソサミニダーゼを阻害および/または不活性化する好ましい方法は、植物発現ポリペプチドの構造的および機能的完全性を有効に保存もするものであることが認識される。

【 0 1 9 2 】

いくつかの実施形態では、植物 - N - アセチルヘキソサミニダーゼがポリペプチドを含む組成物を加熱することによって不活性化される。植物 - N - アセチルヘキソサミニダーゼ阻害および/または活性化に適した温度には、37 ~ 60 の範囲内で2 ~ 5、1

10

20

30

40

50

0、20、30、40、50、60分またはそれ以上の期間加熱することが含まれる。植物 - N - アセチルヘキソサミニダーゼの有効な阻害および/または不活性化が、高温では急速に、および低温の範囲ではゆっくり達成されることが認識される。いくつかの実施形態では、植物発現ポリペプチド組成物が45～55の範囲で2～10分間加熱される。いくつかの実施形態では、阻害/不活性化により、植物 - N - アセチルヘキソサミニダーゼの20、30、40、50、60、70、80%またはそれ以上の不活性化がもたらされる。

【0193】

本発明のポリペプチドは、TNF 関連の医学的状態の治療に利用される。

【0194】

「治療する」という用語は、病態（疾患、障害もしくは状態）の発生を阻害、予防もしくは停止すること、および/または病態の低減、寛解もしくは退行を引き起こすことを指す。当業者であれば、種々の方法論およびアッセイを使用して病態の発生を評価することができ、同様に、種々の方法論およびアッセイを使用して病態の低減、寛解または退行を評価することができることを理解するであろう。

【0195】

本明細書で使用される場合、「予防する」という用語は、疾患、障害または状態が、疾患のリスクがあるが、疾患を有するとまだ診断されていない対象で生じるのを避けることを指す。

【0196】

本明細書で使用する場合、「TNF 関連の医学的状態」は、TNF 活性が対象での医学的状態および/または関連症状の発症、進行に関連する医学的状態を指す。

【0197】

したがって、それを必要とする細胞、組織、器官、動物または対象のTNF 関連の医学的状態疾患には、それだけに限らないが、肥満、免疫関連疾患、心血管疾患、感染性疾患、悪性疾患または神経性疾患（WO 0212502 参照）の少なくとも1つが含まれる。

【0198】

TNF 関連の医学的状態の具体例としては、それだけに限らないが、関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、ウェゲナー病（肉芽腫症）、クローン病、炎症性腸疾患、大腸炎、短腸症候群、潰瘍性大腸炎、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、C型肝炎、子宮内膜症、喘息、悪液質、乾癬およびアトピー性皮膚炎が挙げられる。本発明の阻害ポリペプチド、例えば、キメラポリペプチドによって治療することができる追加の疾患または障害には、その関連部分が参照により本明細書に組み込まれる、WO 00/62790、WO 01/62272 および米国特許出願公開第2001/0021380号、米国特許第7,648,702号に記載されているものが含まれる。

【0199】

TNF 関連の医学的状態の追加の例としては、それだけに限らないが、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、全身型若年性関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、胃潰瘍、血清反応陰性関節症、骨関節炎、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、短腸症候群、全身性エリテマトーデス、抗リン脂質症候群、虹彩毛様体炎/ブドウ膜炎/視神経炎、突発性肺線維症、全身性血管炎/ウェゲナー肉芽腫症、サルコイドーシス、精巣炎/精管復元術、アレルギー性/アトピー性疾患、喘息、アレルギー性鼻炎、湿疹、アレルギー性接触性皮膚炎、アレルギー性結膜炎、過敏性肺炎、移植、臓器移植拒絶、移植片対宿主病、全身性炎症反応症候群、敗血症症候群、グラム陽性菌敗血症、グラム陰性菌敗血症、培養陰性敗血症、真菌性敗血症、好中球減少性発熱、尿路性敗血症、髄膜炎菌血症、外傷/出血、火傷、電離放射線暴露、急性膵炎、成人呼吸促迫症候群、関節リウマチ、アルコール誘発性肝炎、慢性炎症性病態、サルコイドーシス、クローン病態、鎌状赤血球貧血、糖尿病、腎症、アトピー性疾患、過敏反応、アレルギー性鼻炎、花粉症、通年性鼻炎、結膜炎、子宮内膜症、喘息、蕁麻疹、全身性アナフィラキシー、皮膚炎、悪性貧血、溶血性疾患、血小

10

20

30

40

50

板減少症、いずれかの器官または組織の移植片拒絶、腎移植拒絶、心臓移植拒絶、肝臓移植拒絶、脾臓移植拒絶、肺移植拒絶、骨髄移植（BMT）拒絶、皮膚同種移植拒絶、軟骨移植拒絶、骨移植拒絶、小腸移植拒絶、胎児胸腺移植片拒絶、副甲状腺移植片拒絶、いずれかの器官または組織の異種移植片拒絶、同種移植片拒絶、抗受容体過敏反応、グレーブス病、レイノー病、B型インスリン抵抗性糖尿病、喘息、重症筋無力症、抗体媒介性細胞傷害、III型過敏反応、全身性エリテマトーデス、POEMS症候群（多発性神経障害、臓器肥大、内分泌疾患、モノクローナル免疫グロブリン血症および皮膚症状症候群）、多発性神経障害、臓器肥大、内分泌疾患、モノクローナル免疫グロブリン血症、皮膚症状症候群、抗リン脂質抗体症候群、天疱瘡、強皮症、混合性結合組織病、突発性アジソン病、糖尿病、慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、白斑、血管炎、MI心臓切開術後症候群、IV型過敏症、接触性皮膚炎、過敏性肺炎、同種移植片拒絶、細胞内生物による肉芽腫、薬物感受性、代謝性/突発性、ウィルソン病、ヘモクロマトーシス、 α_1 アンチトリプシン欠損症、糖尿病性網膜症、橋本甲状腺炎、骨粗鬆症、視床下部-下垂体-副腎系評価、原発性胆汁性肝硬変、甲状腺炎、脳脊髄炎、悪液質、嚢胞性線維症、新生児慢性肺疾患、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、家族性血球貪食性リンパ組織球症、皮膚科学的状態、乾癬、脱毛症、ネフローゼ症候群、腎炎、糸球体腎炎、急性腎不全、血液透析、尿毒症、毒性、子癇前症、okt3療法、抗cd3療法、サイトカイン療法、化学療法、放射線療法（例えば、それだけに限らないが、無力症、貧血、悪液質などを含む）、慢性サリチル酸中毒などの免疫関連疾患が挙げられる。例えば、それぞれ参照により全体が組み込まれる、Merck Manual、第12～第17版、Merck & Company、Rahway, NJ（1972、1977、1982、1987、1992、1999）、Pharmacotherapy Handbook、Wellsら編、第2版、AppletonおよびLange、Stamford, Conn.（1998、2000）を参照されたい。本発明はまた、それだけに限らないが、心機能不全症候群（cardiac stunsyndrome）、心筋梗塞、うっ血性心不全、発作、虚血発作、出血、動脈硬化、粥状動脈硬化、再狭窄、糖尿病性動脈硬化性疾患、高血圧、動脈性高血圧、腎血管性高血圧、失神、ショック、心血管系の梅毒症、心不全、肺性心、原発性肺高血圧症、不整脈、異所性心房搏動、心房粗動、心房細動（持続性または発作性）、灌流後症候群、心肺バイパス炎症反応、無秩序型または多源性心房頻脈、規則的狭QRS頻脈、特異性不整脈、心室細動、ヒス束不整脈、房室ブロック、脚ブロック、心筋虚血障害、冠動脈疾患、狭心症、心筋梗塞、心筋症、拡張型うっ血型心筋症、拘束型心筋症、心臓弁膜症、心内膜炎、心膜疾患、心臓腫瘍、大動脈瘤および末梢動脈瘤、大動脈解離、大動脈の炎症、腹大動脈およびその支流の閉塞、末梢血管障害、閉塞性動脈障害、末梢動脈硬化性疾患、閉塞性血栓血管炎、機能性末梢動脈障害、レイノー現象および病、先端チアノーゼ、先端紅痛症、静脈疾患、静脈血栓、静脈瘤、動静脈瘻、リンパ浮腫、口唇浮腫、不安定狭心症、再灌流傷害、ポストポンプ症候群（post pump syndrome）、虚血再灌流傷害などの少なくとも1つを含む、細胞、組織、器官、動物または患者の少なくとも1つの心血管疾患を治療する方法も提供する。

【0200】

TNF 関連の医学的状態の追加の例としては、それだけに限らないが、急性または慢性細菌感染症、細菌、ウイルスおよび真菌感染症を含む急性および慢性の寄生または感染性過程、HIV感染症/HIV神経障害、髄膜炎、肝炎（A型、B型もしくはC型など）、敗血症性関節炎、腹膜炎、肺炎、咽頭蓋炎、大腸菌O157:h7、溶血性尿毒症症候群/血栓溶解血小板減少性紫斑病、マラリア、デング出血熱、リーシュマニア症、ハンセン病、毒素性ショック症候群、連鎖球菌性筋炎、ガス壊疽、結核菌（Mycobacterium tuberculosis）、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセルラーレ（Mycobacterium avium intracellulare）、ニューモシスチス・カリニ肺炎、骨盤内炎症性疾患、精巣炎/精巣上体炎、レジオネラ（Legionella）、ライム病、インフルエンザa、エプスタイン-バーウイルス、ウイルス関連血球貪食症候群、ウイルス性脳炎/無菌性髄膜炎などの感染性疾患が挙げら

10

20

30

40

50

れる。

【0201】

TNF 関連の医学的状態の追加の例としては、それだけに限らないが、白血病、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、B細胞、T細胞またはFAB ALL、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、有毛細胞白血病、骨髄異形成症候群（MDS）、リンパ腫、ホジキン病、悪性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、カボジ肉腫、結腸直腸癌、膀胱癌、上咽頭癌、悪性組織球症、腫瘍随伴症候群／悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症、固形腫瘍、腺癌、肉腫、悪性黒色腫、血管腫、転移性疾患、がん関連骨吸収、がん関連骨痛などの悪性疾患が挙げられる。

10

【0202】

TNF 関連の医学的状態の追加の例としては、それだけに限らないが、神経変性疾患、多発性硬化症、片頭痛、AIDS痴呆症候群、多発性硬化症および急性横断性脊髄炎などの脱髄疾患、皮膚脊髄系の病変などの錐体外路および小脳障害；基底核の障害または小脳障害；ハンチントン舞蹈症および老年舞蹈病などの運動過剰；CNSドーパミンを遮断する薬物によって誘発されるものなどの薬物誘発性運動障害；パーキンソン病などの無動運動障害；進行性核上性麻痺；小脳の構造的病変；脊髄性運動失調、フリードライヒ失調症、小脳皮質変性、複数系変性（Mencel、Dejerine-Thomas、Shi-DragerおよびMachado-Joseph）などの脊髄小脳変性；全身障害（レフサム病、無リボタンパク血症、運動失調、毛細血管拡張およびミトコンドリア多系障害）；多発性硬化症、急性横断性脊髄炎などの脱髄コア障害；ならびに神経性筋萎縮（筋萎縮性側索硬化症、乳児脊髄筋萎縮および若年性脊髄性筋萎縮症などの前角細胞変性）；アルツハイマー病；中年のダウン症候群；びまん性レビー小体病；レビー小体型の老年痴呆；ウェルニッケ-コルサコフ症候群；慢性アルコール中毒；クロイツフェルト-ヤコブ病；亜急性硬化性全脳炎、ハラーフォルデン-シュパッツ病；およびパンチドランカーなどの神経疾患が挙げられる。

20

【0203】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、病態を患っている任意の年齢の哺乳動物、例えば、ヒトを含む。具体的な実施形態によると、この用語は、病態を発症するリスクのある個体を包含する。

30

【0204】

対象への経腸投与に備える場合、生物学的に活性なヒト組換えポリペプチドを発現している植物細胞を有効な全身送達システムとして使用することができることが示されている（WO2007/010533参照）。したがって、いくつかの実施形態では、ポリペプチド（例えば、キメラポリペプチド）を、ポリペプチドを発現している形質転換植物細胞と薬学的に許容される担体とを含む経口または経腸送達用の医薬組成物に製剤化することができる。いくつかの実施形態では、医薬組成物の形質転換植物細胞が凍結乾燥植物細胞である。

【0205】

本明細書で使用される場合、「経腸投与」という句は、直腸内投与、結腸投与、腸投与（近位または遠位）および胃投与などの消化管のいずれかの部分を通した投与を指す。いくつかの実施形態では、経腸投与が経口投与を指す。

40

【0206】

本教示が本発明のポリペプチド（例えば、キメラポリペプチド）を発現している植物細胞の粘膜投与も対象にしていることが認識される。

【0207】

細胞を固体として製剤化しても、液体として製剤化してもまたは粉末として製剤化してもよい。いくつかの実施形態では、細胞が再懸濁した凍結乾燥細胞である。

【0208】

したがって、いくつかの実施形態では、ポリペプチド（例えば、キメラポリペプチド）

50

を、ポリペプチドを発現している形質転換植物細胞と、薬学的に許容される担体とを含む経口または経腸送達用の医薬組成物に製剤化することができる。いくつかの実施形態では、医薬組成物の形質転換植物細胞が凍結乾燥植物細胞であるが、新鮮なもの（非凍結乾燥細胞）の使用も本明細書で企図される。

【0209】

凍結乾燥前に細胞を洗浄して成長培地中に存在し得る細胞片を除去してもよい。

【0210】

細胞を凍結乾燥に備えている時に、細胞を維持培地でインキュベートして細胞の代謝過程を減少させることがしばしば望ましい。

【0211】

（必要ではないが）植物細胞を典型的に培養する室温または温度で前処理を行うことができる。取扱いやすくするためおよびほとんどの植物細胞が室温でかなり安定であるので、前処理をおよそ室温（20）で行う。前処理工程中に安定剤を培地に直接添加し、必要に応じて補充することができる。

【0212】

前処理は、1種または複数の浸透圧剤の存在下で細胞をインキュベートすることを含んでもよい。有用な浸透圧剤の例としては、糖類および糖類誘導体などの糖、プロリンおよびプロリン誘導体などのアミノまたはイミノ酸、あるいはこれらの剤の組み合わせが挙げられる。さらに有用な糖および糖誘導体のいくつかにはフルクトース、グルコース、マルトース、マンニトール、ソルビトール、スクロースおよびトレハロースがある。浸透圧剤は細胞をその後の凍結乾燥に備える濃度で利用する。

【0213】

凍結乾燥は、真空蒸発によって細胞の水分含量を低下させることを目的としている。真空蒸発は、細胞を減少した気圧の環境に置くことを含む。所望の水除去率に応じて、約-30~-50の間の温度で作動する減少した周囲圧力は、100 Torr、1 Torr、0.01 Torrまたはそれ以下であり得る。具体的な実施形態によると、-40に凍結し、次いで、真空を0.1 mbarの圧力まで一晩印加することによって、細胞を凍結乾燥する。次いで、細胞を-10に加熱して、全ての氷含量が昇華および蒸発するようにする。減圧条件下で、細胞内の水の最大60~95%を除去することができるように水蒸発率を増加させる。

【0214】

具体的な実施形態によると、凍結乾燥により、細胞から水の60%、70%、80%超、具体的には90%、91%、92%、93%、94%、95%または98%超が除去される。具体的な実施形態によると、最終的な水分含量が約5~10%、5~8%または6~7%である。

【0215】

したがって、経口剤形を、経口栄養形態として（例えば、タンパク質を37超で加熱することおよび圧縮することを含む変性条件に暴露しない限り）、完全食として、溶解するための粉末として、例えば、健康飲料、溶液、バーのジュース、ミルクシェイク、ヨーグルト飲料、スムージーもしくは大豆系飲料を含むソフトドリンクなどの既製飲料、場合により低カロリーのものとして提供してもよいし、または焼いた製品、シリアルバー、乳製品バー、スナック食品、朝食シリアル、ミューズリー、アメ、タブレット、クッキー、ビスケット、クラッカー（米菓など）、チョコレートおよび乳製品などの任意の種類の食物に分散してもよい。

【0216】

炎症性腸疾患の治療における、キメラポリペプチドを発現している植物細胞の使用が注目される。植物の細胞壁が、胃および小腸を移動している間にキメラポリペプチドを保護すると予期される。多糖類が消化される結腸では、植物細胞がその内容物を放出すると予期されるので、p r h T N R F : F c が利用可能となりそのサイトカインリガンドに結合する。さらに、p r h T N R F 2 : F c はヒト I g G 1 の F c セグメントを有する

10

20

30

40

50

キメラタンパク質である。粘膜障壁を裏打ちする上皮単層では、FcRn受容体がFcに結合することによってIgG分子を経細胞輸送する。そのため、prh TNRF:Fcも上皮障壁を横切って上皮の漿膜側のサイトカインリガンドに結合することができる。

【0217】

本教示が、肥満、メタボリックシンドローム、糖尿病および肝疾患または障害に直接関連する医学的状态を治療するための経腸投与によるポリペプチド（例えば、キメラポリペプチド）を発現している植物細胞の使用を除外することが認識される。

【0218】

メタボリックシンドロームは、アテローム動脈硬化性心血管疾患（ASCVD）の発症を直接促進するように思われる代謝起源の一群の相互関係のある危険因子 - 代謝危険因子である。メタボリックシンドロームの患者は、2型糖尿病、メタボリックシンドロームの複数要素を発症するリスクも高い。これらの基準は具体的な要素によっていくぶん変化するが、一般に、これらには根底にある危険因子と代謝危険因子の両方の組み合わせが含まれる。代謝危険因子の最も広く認識されているものは、アテローム性脂質異常症、血圧上昇および血漿グルコース上昇である。これらの特徴を有する個体は、一般的に血栓形成促進状態および炎症誘発状態も示す。アテローム性脂質異常症は、血清トリグリセリドおよびアポリポタンパク質B（アポB）の上昇、小LDL粒子増加、ならびにHDLコレステロール（HDL-C）のレベル低下を含むリポタンパク質異常の集合からなる。入手可能なデータによると、メタボリックシンドロームが本当に症候群、すなわち、ASCVD危険因子の群化であるが、おそらく2つ以上の原因を有するものであることが示唆されている。

【0219】

具体的な実施形態によると、肝疾患または障害が肝炎、肝硬変、肝がん、肝毒性、慢性肝疾患、脂肪性肝疾患および非アルコール性脂肪性肝炎（NAFLD）からなる群から選択される。

【0220】

具体的な実施形態によると、肝毒性がアセトアミノフェン、NSAIDs、グルココルチコイド、イソニアジド、ヒ素、化学療法、四塩化炭素および塩化ビニルからなる群から選択される化学剤によって誘発される。

【0221】

具体的な実施形態によると、糖尿病がI型糖尿病、II型糖尿病およびLADA病からなる群から選択される。

【0222】

あるいはまたはさらに、本発明のいくつかの実施形態のキメラポリペプチドをそれ自体または適当な担体もしくは賦形剤と混合した医薬組成物で生物に投与することができる。

【0223】

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」は、生理学的に適した担体および賦形剤などの他の化学成分を含む本明細書に記載される1種または複数の有効成分の調製物を指す。医薬組成物の目的は、化合物の生物への投与を容易にすることである。

【0224】

本明細書において、「有効成分」という用語は、生物学的効果の責任があるキメラポリペプチドまたは同ポリペプチドを発現する細胞を指す。

【0225】

以下で、互換的に使用され得る「生理学的に許容される担体」および「薬学的に許容される担体」という句は、有意な刺激を生物に引き起こさず、投与された化合物の生物学的活性および特性を抑止しない担体または希釈剤を指す。アジュバントがこれらの句に含まれる。

【0226】

本明細書において、「賦形剤」という用語は、有効成分の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性物質を指す。賦形剤の例としては、限定されないが、炭

10

20

30

40

50

酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖および多種のデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油ならびにポリエチレングリコールが挙げられる。

【0227】

薬物を製剤化および投与するための技術は、参照により本明細書に組み込まれる、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、Mack Publishing Co.、Easton、PA、最新版に見出され得る。

【0228】

適当な投与経路には、例えば、経口、経腸、経粘膜、特に経鼻、腸、または筋肉内、皮下および髄内注射ならびに髄腔内、直接脳室内、心室内、例えば、右もしくは左心室内腔、通常の冠動脈、静脈内、腹腔内、鼻腔内もしくは眼内注射を含む非経口送達が含まれ得る。

10

【0229】

本発明の医薬組成物は、非経口投与、すなわち、皮下、筋肉内、静脈内、腹腔内、脳脊髄内、関節内、関節滑液嚢内および/または髄腔内に特に有用である。非経口投与は、ボラス注射または持続注入によることができる。注射用の医薬組成物を単位剤形、例えば、保存剤を添加したアンプルまたは複数回用量容器で提供することができる。さらに、いくつかの近年の薬物送達手法が開発されており、本発明の医薬組成物は、これらの新規な方法、例えば、Inject-ease (商標)、Genject (商標)、GenPen (商標)などのペン型注射器ならびにMedijector (商標)およびBiojector (商標)などの無針装置を用いて投与するのに適している。

20

【0230】

医薬組成物をデポー製剤として製剤化することもできる。このような長時間作用型製剤を、埋め込み（例えば、皮下もしくは筋肉内）または筋肉内注射によって投与することができる。したがって、例えば、製剤を適当なポリマーもしくは疎水性材料（例えば、許容される油中のエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂を用いて、あるいは難溶性誘導体、例えば、難溶性塩として修飾してもよい。

【0231】

本発明のいくつかの実施形態の医薬組成物を、当技術分野で周知の方法、例えば、従来の混合、溶解、造粒、糖衣作製、研和、乳化、カプセル化、封入または凍結乾燥法によって製造してもよい。

30

【0232】

したがって、本発明のいくつかの実施形態により使用するための医薬組成物を、有効成分を薬学的に使用することができる調製物に加工するのを容易にする賦形剤および助剤を含む1種または複数の生理学的に許容される担体を用いて従来様式で製剤化してもよい。適切な製剤は選択する投与経路に依存する。

【0233】

注射用に、医薬組成物の有効成分を水溶液、好ましくはハンクス液、リンゲル液または生理学的塩緩衝液などの生理学的に適合性の緩衝液に製剤化してもよい。経粘膜投与用に、浸透する障壁に適した浸透剤を製剤に使用する。このような浸透剤は当技術分野で一般的に知られている。

40

【0234】

経口投与用に、有効成分を当技術分野で周知の薬学的に許容される担体と組み合わせることによって、医薬組成物を製剤化することができる。このような担体により、医薬組成物を患者による経口摂取のための錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などとして製剤化することが可能になる。経口用途の薬学的調製物は、固体賦形剤を用いて、場合により得られた混合物を粉碎し、所望であれば適当な助剤を添加した後に顆粒の混合物を加工して錠剤または糖衣錠コアを得ることによって作製することができる。適当な賦形剤は、特に、ラクトース、スクロース、マンニトールもしくはソルビトールを含む糖；例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、イネデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガントガム、メチルセルロース、ヒド

50

ロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース調製物；および／またはポリビニルピロリドン（PVP）などの生理学的に許容されるポリマーなどの充填剤である。所望であれば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天またはアルギン酸もしくはアルギン酸ナトリウムなどのその塩などの崩壊剤を添加してもよい。

【0235】

糖衣錠コアに適切なコーティングを提供する。この目的のために、場合によりアラビアガム、タルク、ポリビニルピロリドン、カーボボールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化チタン、ラッカー溶液および適当な有機溶媒または溶媒混合物を含んでもよい濃縮糖溶液を使用してもよい。同定または異なる組み合わせの活性化化合物用量を特徴付けるために、染料または顔料を錠剤または糖衣錠コーティングに添加してもよい。

10

【0236】

経口的に使用することができる医薬組成物には、ゼラチンでできたプッシュフィットカプセル（push-fit capsule）、ならびにゼラチンおよびグリセロールまたはソルビトールなどの可塑剤でできた軟密閉カプセルが含まれる。プッシュフィットカプセルは、ラクトースなどの充填剤、デンプンなどの結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤および場合により安定剤との混和で有効成分を含んでもよい。軟カプセルでは、有効成分を脂肪油、流動パラフィンまたは液体ポリエチレングリコールなどの適当な液体に溶解または懸濁させてもよい。さらに、安定剤を添加してもよい。経口投与用の全ての製剤は、選択される投与経路に適した投与量であるべきである。

【0237】

20

口腔内投与用に、組成物は従来様式で製剤化された錠剤またはロゼンジ剤の形態をとってもよい。

【0238】

鼻吸入による投与用に、本発明のいくつかの実施形態により使用するための有効成分を適当な噴霧剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタンまたは二酸化炭素を使用した加圧パックまたはネブライザーからのエアゾールスプレー投与の形態で簡便に送達する。加圧エアゾールの場合、弁を用意して計量された量を送達することによって、用量単位を決定してもよい。例えば、化合物とラクトースまたはデンプンなどの適当な粉末基剤の粉末混合物を含む、ディスペンサーに使用するためのゼラチンのカプセルおよびカートリッジを製剤化してもよい。

30

【0239】

本明細書に記載される医薬組成物を、例えば、ボーラス注射または持続注入による非経口投与用に製剤化してもよい。注射用の製剤を、例えば、場合により保存剤を添加したアンプルまたは複数回用量容器中の単位剤形で提供してもよい。組成物は懸濁剤、液剤または油性もしくは水性ビヒクル中の乳剤であってもよく、懸濁化剤、安定剤および／または分散剤などの調合剤を含んでもよい。

【0240】

非経口投与用の医薬組成物には、水溶性形態の活性調製物の水溶液が含まれる。さらに、有効成分の懸濁液を適当な油性または水性注射懸濁液として調製してもよい。適当な親油性溶媒またはビヒクルには、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチル、トリグリセリドもしくはリポソームなどの合成脂肪酸エステルが含まれる。水性注射懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランなどの懸濁液の粘度を増加させる物質を含んでもよい。場合により、懸濁液が、適当な安定剤または有効成分の溶解度を増加させて高濃縮溶液の調製を可能にする剤を含んでもよい。

40

【0241】

あるいは、有効成分が、使用前に適当なビヒクル、例えば、滅菌、パイロジェンフリー水溶液によって構成するための粉末形態であってもよい。

【0242】

本発明のいくつかの実施形態の医薬組成物を、例えば、カカオ脂または他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤を用いて、坐剤または停留浣腸などの経腸組成物に製剤化してもよ

50

い。

【0243】

本発明のいくつかの実施形態の文脈で使用するのに適した医薬組成物には、有効成分が意図した目的を達成するのに有効な量含まれている組成物が含まれる。より具体的には、治療有効量とは、障害の症状を予防、軽減もしくは改善する、または治療対象の生存期間を延長するのに有効な有効成分（キメラポリペプチド）の量を意味する。

【0244】

治療有効量の決定は、特に本明細書に提供される詳細な開示に照らして、十分に当業者の能力の範囲内にある。

【0245】

本発明の方法に使用されるいずれの調製物についても、治療上有容量または用量をインビトロアッセイおよび細胞培養アッセイから最初に推定することができる。例えば、所望の濃度または力価を達成する用量を動物モデルで製剤化することができる。このような情報をを用いてヒトで有用な用量をより正確に決定することができる。

【0246】

本明細書に記載される有効成分の毒性および治療有効性を、インビトロ、細胞培養または実験動物で標準的な薬学的手順によって決定することができる。インビトロおよび細胞培養アッセイならびに動物試験でこれらから得られたデータをヒトに使用するための投与量の範囲を処方するのに使用することができる。投与量は使用する剤形および利用する投与経路に応じて変化し得る。正確な処方、投与経路および投与量は、患者の状態に照らして個々の医師によって選択され得る（例えば、Fingler、1975、「The Pharmacological Basis of Therapeutics」、第1章1頁参照）。

【0247】

投与量および間隔を個々に調節して生物学的効果を誘導または抑制するのに十分な（最小有効濃度、MEC）有効成分のキメラポリペプチド（標的組織）レベルを提供してもよい。MECは、各調製物によって変化するが、インビトロデータから推定することができる。MECを達成するのに必要な投与量は、個体の特徴および投与経路に依存する。検出アッセイを用いて血漿濃度を測定することができる。

【0248】

治療する状態の重症度および反応性に応じて、投薬は、治療経過が数日～数週間または治癒がもたらされるもしくは疾患状態の減少が達成されるまで続く、単一または複数投与となり得る。

【0249】

投与する組成物の量は、当然、治療している対象、苦痛の重症度、投与様式、処方する医師の判断等に依存する。

【0250】

一実施形態では、1成人用量当たりの有効キメラポリペプチド量が約1～500mg/m²または約1～200mg/m²または約1～40mg/m²または約5～25mg/m²に及ぶ。あるいは、その量が2～500mg/用量、2～100mg/用量または約10～80mg/用量に及び得るフラット用量（flat dose）を投与してもよい。

【0251】

一実施形態では、1成人用量当たりの有効キメラポリペプチド量が約1～500mg/m²または約1～200mg/m²または約1～40mg/m²または約5～25mg/m²である。あるいは、その量が約2～500mg/用量、2～100mg/用量または約10～80mg/用量に及び得るフラット用量を投与してもよい。

【0252】

別の実施形態では、1成人用量範囲当たりの有効キメラポリペプチド量が約0.0002mg/kg～2mg/kg、約0.002～2mg/kg、約0.02～2mg/kg

10

20

30

40

50

、約 0.2 ~ 2 mg / kg、約 0.002 ~ 0.2 mg / kg、約 0.0002 ~ 1 mg / kg、約 0.002 ~ 0.1 mg / kg、約 0.002 ~ 0.02 mg / kg、約 0.002 ~ 0.01 mg / kg、約 0.002 ~ 0.008 mg / kg、約 0.02 ~ 0.1 mg / kg、約 0.001 ~ 0.05 mg / kg、約 0.001 ~ 0.01 mg / kg、約 0.01 ~ 1 mg / kg、約 0.01 ~ 15 mg / kg、約 0.005 ~ 1 mg / kg、約 0.01 ~ 5 mg / kg、約 0.005 ~ 0.01 mg / kg または約 0.05 ~ 0.1 mg / kg である。具体的な実施形態によると、これらの用量範囲を、キメラタンパク質を発現している植物細胞などの経口投与に使用する。

【0253】

具体的な実施形態によると、1 成人用量当たりの有効キメラポリペプチド量が約 0.002 ~ 0.2 mg / kg に及ぶ。具体的な実施形態によると、この用量範囲を、キメラタンパク質を発現している植物細胞などの経口投与に使用する。

10

【0254】

あるいは、その量が約 2 ~ 500 mg / 用量、2 ~ 100 mg / 用量または約 10 ~ 80 mg / 用量に及び得るフラット用量を投与してもよい。具体的な実施形態によると、この用量範囲を、キメラタンパク質を発現している植物細胞などの経口投与に使用する。

【0255】

具体的な実施形態によると、0.01 ~ 100 mg、0.1 ~ 100 mg、0.1 ~ 50 mg、0.1 ~ 20 mg、0.1 ~ 10 mg、0.1 ~ 5 mg のフラット用量を投与する。具体的な実施形態によると、この用量範囲を、キメラタンパク質を発現している植物細胞などの経口投与に使用する。

20

【0256】

具体的な実施形態によると、フラット用量が約 0.1 ~ 10 mg である。具体的な実施形態によると、この用量範囲を、キメラタンパク質を発現している植物細胞などの経口投与に使用する。

【0257】

具体的な実施形態によると、経口用量を毎日投与する。用量を 1 日の間の数回の投与に分けてもよい（例えば、1 日 2 ~ 4 回）。用量を 2 日に 1 回、1 週間に 2 回、1 週間に 3 回、2 週間に 1 回、毎週用量でまたは数週間（例えば、2 ~ 8）離して投与することもできる。

30

【0258】

具体的な実施形態によると、用量を 1 週間当たり 2 回以上投与する場合、例示的な用量範囲は前記用量範囲と同じかそれより低く、1 週間に 2 回以上投与する（例えば、25 ~ 100 mg / 用量）。別の実施形態では、注射による投与に許容される用量が 80 ~ 100 mg / 用量を含む、あるいは 80 mg / 用量を含む。

【0259】

用量を小児および乳児用に修正してもよい。

【0260】

用量を 2 週間に 1 回、毎週用量でまたは数週間（例えば、2 ~ 8）離して投与することができる。具体的な実施形態によると、キメラポリペプチドを一般的に単回皮下（SC）注射によって 25 mg で投与する。

40

【0261】

多くの例で、所望の改善度を誘導するためにはより長期間の治療が必要となり得るが、最大約 100 mg の医薬組成物の 1 週間に 1 ~ 3 回、少なくとも 3 週間の期間にわたる用量によって、患者の状態の改善が得られる。不治の慢性状態については、レジメンを無期限に継続してもよい。小児科患者（4 ~ 17 歳）については、適当なレジメンは、注射による 0.4 mg / kg ~ 5 mg / kg の本発明のキメラポリペプチドの用量を 1 週間に 1 回または複数回投与することを含む。

【0262】

別の実施形態では、本発明の医薬製剤をバルク製剤に調製し、よって、医薬組成物の成

50

分を、投与に必要とされるより多くなるよう調整し、投与前に適切に希釈することが企図される。

【0263】

本発明のいくつかの実施形態の組成物を、所望であれば、有効成分を含む1または複数の単位剤形を含んでもよいFDA承認キットなどのパックまたはディスペンサー装置で提供してもよい。パックは、例えば、ブリストアパックなどの金属またはプラスチック箔を含んでもよい。パックまたはディスペンサー装置に投与についての指示を添えてもよい。パックまたはディスペンサーに、医薬品の製造、使用または販売を規制する政府機関により規定された形態の容器に伴う通知が収容されてもよく、該通知は組成物の形態またはヒトもしくは動物投与の政府機関による承認を反映する。このような通知は、例えば、処方薬について米国食品医薬品局によって承認されているラベルまたは承認された製品挿入物であってもよい。適合性の医薬担体に製剤化された本発明の調製物を含む組成物を、適当な容器に調製、配置し、上にさらに詳述されているように指示された状態の治療についてラベルを付してもよい。水性医薬組成物中のポリペプチドの濃度は広範囲にわたって変化し得るが、一般的には水性製剤の約0.05~約20000 µg/ミリリットル(µ/ml)の範囲内にある。

10

【0264】

植物細胞を含む注目に値する剤形は、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、リン、ビタミンDおよびビタミンKの1種または複数などの添加剤を含んでもよい。適当な1日量はカルシウム0.1mg~3.6g、好ましくは320~530mgである。一般に、本発明の栄養製剤または医薬品中のビタミンおよびミネラルの1日投与量は保健当局によって推奨される投与量の25~100重量%である。食物繊維も本発明の組成物の成分となり得る。サプリメントのさらなる成分には、特に身体能力を改善するための健康利点を有することが知られている任意の生理活性化合物または抽出物が含まれ得る。

20

【0265】

一般的に、単位剤形は、抗酸化剤(例示的な実施形態は上に提供される)をさらに含んでもよい。別の実施形態では、抗酸化剤が薬学的に許容される抗酸化剤である。別の実施形態では、抗酸化剤がビタミンE、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、3およびカロテンからなる群から選択される。

【0266】

別の実施形態では、単位剤形が生物学的に活性なタンパク質またはペプチドのエンハンサーをさらに含む。別の実施形態では、単位剤形が生物学的に活性なタンパク質またはペプチドの補因子をさらに含む。

30

【0267】

別の実施形態では、本発明の単位剤形が医薬品グレードの界面活性剤をさらに含む。界面活性剤は当技術分野で周知であり、特に、Handbook of Pharmaceutical Excipients(Raymond C Rowe、Paul J SheskeyおよびSian C Owen編、著作権Pharmaceutical Press、2005)に記載されている。別の実施形態では、界面活性剤が当技術分野で知られている任意の他の界面活性剤である。

40

【0268】

別の実施形態では、本発明の単位剤形が医薬品グレードの乳化剤または乳化剤(emulgator)(軟化薬)をさらに含む。乳化剤または乳化剤(emulgator)は当技術分野で周知であり、特に、Handbook of Pharmaceutical Excipients(同上)に記載されている。乳化剤および乳化剤(emulgator)の非限定的な例にはEmulgin、Emulgin B1 PH、Emulgin B2 PH、硬化ヒマシ油、セトステアリルアルコールおよびセチルアルコールがある。別の実施形態では、乳化剤または乳化剤(emulgator)が当技術分野で知られている任意の他の乳化剤または乳化剤(emulgator)である。

【0269】

50

別の実施形態では、本発明の単位剤形が医薬品グレードの安定剤をさらに含む。安定剤は当技術分野で周知であり、特に、Handbook of Pharmaceutical Excipients（同上）に記載されている。別の実施形態では、安定剤が当技術分野で知られている任意の他の安定剤である。

【0270】

別の実施形態では、本発明の単位剤形がアルギニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸およびヒスチジンからなる群から選択されるアミノ酸をさらに含む。別の実施形態では、アルギニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸およびヒスチジンの類似体および修飾版がそれぞれ「アルギニン」、「リジン」、「アスパラギン酸」、「グルタミン酸」および「ヒスチジン」に含まれる。別の実施形態では、アミノ酸がリボヌクレアーゼまたは他の活性分子の追加の保護を提供する。別の実施形態では、アミノ酸が生物学的に活性なタンパク質またはペプチドと標的細胞の相互作用を促進する。別の実施形態では、アミノ酸が単位剤形の油成分に含まれる。

【0271】

別の実施形態では、本発明の単位剤形が、マトリックス担体単位剤形が混合された1種または複数の薬学的に許容される賦形剤をさらに含む。別の実施形態では、賦形剤が1種または複数の追加の多糖を含む。別の実施形態では、賦形剤が1種または複数のワックスを含む。別の実施形態では、賦形剤が単位剤形に所望の味覚を提供する。別の実施形態では、賦形剤が薬物稠度、ならびにゲルカプセルまたは硬ゼラチンカプセルなどの最終剤形に影響を及ぼす。

【0272】

賦形剤の非限定的な例としては、消泡剤（ジメチコン、シメチコン）；抗菌性保存剤（塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、ブチルパラベン、塩化セチルピリジニウム、クロロブタノール、クロロクレゾール、クレゾール、エチルパラベン、メチルパラベン、メチルパラベンナトリウム、フェノール、フェニルエチルアルコール、酢酸フェニル水銀、硝酸フェニル水銀、安息香酸カリウム、ソルビン酸カリウム、プロピルパラベン、プロピルパラベンナトリウム、安息香酸ナトリウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、ソルビン酸、チメロサル、チモール）；キレート剤（エデト酸二ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸および塩、エデト酸）；コーティング剤（カルボキシメチルセルロースナトリウム、酢酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、エチルセルロース、ゼラチン、医薬品糊薬、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メタクリル酸コポリマー、メチルセルロース、ポリエチレングリコール、ポリ酢酸ビニルフタレート、シェラック、スクロース、二酸化チタン、カルナウバロウ、微結晶ワックス、ゼイン）；着色剤（カラメル、赤、黄、黒またはブレンド、酸化第二鉄）、錯化剤（エチレンジアミン四酢酸および塩（EDTA）、エデト酸、ゲンチシン酸エタノールアミド、硫酸オキシキノリン）；乾燥剤（塩化カルシウム、硫酸カルシウム、二酸化ケイ素）；乳化剤および/または可溶化剤（アカシア、コレステロール、ジエタノールアミン（補助剤）、モノステアリン酸グリセリル、ラノリンアルコール、レシチン、モノ-およびジ-グリセリド、モノエタノールアミン（補助剤）、オレイン酸（補助剤）、オレイルアルコール（安定剤）、ポロキサマー、ステアリン酸ポリオキシエチレン50、ポリオキシシル35ヒマシ油、ポリオキシシル40硬化ヒマシ油、ポリオキシシル10オレイルエーテル、ポリオキシシル20セトステアリルエーテル、ステアリン酸ポリオキシシル40、ポリソルベート20、ポリソルベート40、ポリソルベート60、ポリソルベート80、プロピレングリコールジアセテート、プロピレングリコールモノステアレート、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノオレエート、ソルビタンモノパルミテート、ソルビタンモノステアレート、ステアリン酸、トロラミン、乳化ろう）；香味剤および芳香剤（アネトール、ベンズアルデヒド、エチルバニリン、メントール、サリチル酸メチル、グルタミン酸ナトリウム、オレンジ花精油、ハッカ、ハッカ油、ハッカスピリット、ローズオイル、強ローズ水、チモール、トルーバルサムチンキ、バニラ、バニラチンキ、

バニリン) ; 湿潤剤 (グリセリン、ヘキシレングリコール、プロピレングリコール、ソルビトール) ; ポリマー (例えば、酢酸セルロース、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、アクリルポリマーおよびコポリマー) ; 懸濁化および/または増粘剤 (アカシア、寒天、アルギン酸、モノステアリン酸アルミニウム、ベントナイト、精製ベントナイト、マグマベントナイト、カルボマー 934 p、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム 12、カラゲナン、微結晶およびカルボキシメチルセルロースナトリウムセルロース、デキストリン、ゼラチン、グアーガム、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、メチルセルロース、ペクチン、ポリエチレンオキシド、ポリビニルアルコール、ポビドン、アルギン酸プロピレングリコール、二酸化ケイ素、コロイド状二酸化ケイ素、アルギン酸ナトリウム、トラガント、キサンタンガム) ; 甘味剤 (アスパルテーム、デキストレート (dextrate)、ブドウ糖、賦形剤ブドウ糖、フルクトース、マンニトール、サッカリン、サッカリンカルシウム、サッカリンナトリウム、ソルビトール、溶液ソルビトール、スクロース、圧縮糖、粉砂糖、シロップ) が挙げられる。このリストは排他的となることを意図しておらず、その代わりに、本発明の経口投薬単位剤形に使用され得る賦形剤のクラスおよび特定の賦形剤を単に表すものである。

10

【0273】

保存剤、キレート剤、起泡剤、天然または人工甘味剤、香味剤、着色剤、矯味剤、酸味剤、乳化剤、増稠剤、懸濁化剤、分散剤または湿潤剤、抗酸化剤などから選択されるもののいずれかを含む従来の添加剤を本発明の組成物に含めてもよい。香味剤を本発明の組成物に添加して、投与レジメンの遵守を助けることができる。典型的な香味剤には、それだけに限らないが、パインアップル、オレンジ、レモン、ミント、ベリー、チョコレート、バニラおよびメロンの天然もしくは合成エッセンス、油および/または抽出物が含まれる。

20

【0274】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は $\pm 10\%$ を指す。

【0275】

「含む (comprises)」、「含んでいる (comprising)」、「含む (includes)」、「含んでいる (including)」、「有している (having)」という用語およびこれらの活用形は「～に限らないが含んでいる」を意味する。

30

【0276】

「～からなっている」という用語は「～を含んでおりこれに限る」を意味する。

【0277】

「～から本質的になっている」という用語は、追加の成分、ステップおよび/または部品が、請求されている組成物、方法または構造の基本的および新規な特徴を実質的に変更しない場合にのみ、組成物、方法または構造が追加の成分、ステップおよび/または部品を含んでもよいことを意味する。

【0278】

本明細書で使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈上別段の意味を有することが明らかな場合を除き、複数の言及を含む。例えば、「化合物」または「少なくとも1種の化合物」という用語は、その混合物を含む、複数の化合物を含み得る。

40

【0279】

本出願の全体にわたって、本発明の種々の実施形態が範囲形式で提示され得る。範囲形式の記載は便宜および簡潔さのために過ぎず、発明の範囲に対する変更できない限定と解釈されるべきでないことを理解すべきである。したがって、範囲の記載を具体的に開示されている全ての可能な部分範囲ならびにその範囲内の個々の数値を有するとみなすべきである。例えば、1～6などの範囲の記載は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、

50

3～6等などの具体的に開示されている部分範囲ならびにその範囲内の個々の数、例えば、1、2、3、4、5および6を有するとみなすべきである。範囲の広さにかかわらずこれを適用する。

【0280】

数値範囲を本明細書で示す場合にはいつでも、示されている範囲内の任意の引用されている数字（分数または整数）を含むものとする。第1の指示数と第2の指示数と「の間に及んでいる／及ぶ」および第1の指示数「から」第2の指示数「に及んでいる／及ぶ」という句は、本明細書において互換的に使用され、第1の指示数および第2の指示数ならびにその間の全ての分数および整数を含むものとする。

【0281】

本明細書で使用される場合、「方法」という用語は、それだけに限らないが、化学、薬理学、生物学、生化学および医学分野の専門家によって知られている、または既知の様式、手段、技術および手順から容易に開発される様式、手段、技術および手順を含む、所与の課題を達成するための様式、手段、技術および手順を指す。

【0282】

明確にするために、別々の実施形態の文脈で記載されている本発明の特定の特徴を単一の実施形態で組み合わせて提供してもよいことが認識される。逆に、簡潔にするために、単一の実施形態の文脈で記載されている本発明の種々の特徴を別々にまたは任意の適当な部分組み合わせてまたは本発明の任意の他の記載されている実施形態に適するように提供してもよい。実施形態がその要素がないと実施不能でない限り、種々の実施形態の文脈で記載されている特定の特徴を、その実施形態の必須の特徴とみなすべきでない。

【0283】

上に描写され、以下の特許請求の範囲の節で請求される本発明の種々の実施形態および態様は、以下の実施例で実験的裏付けを見出す。

実施例

【0284】

上記説明と一緒にあって、非限定的様式で本発明のいくつかの実施形態を示す以下の実施例をここで参照する。

【0285】

一般的に、本明細書で使用される命名法および本発明で利用される実験室手順は、分子、生化学、微生物学および組換えDNA技術を含む。このような技術は文献に完全に説明されている。例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」Sambrookら、(1989)；「Current Protocols in Molecular Biology」第I～III巻Ausubel, R. M. 編(1994)；Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley and Sons、ボルティモア、メリーランド(1989)；Perbal、「A Practical Guide to Molecular Cloning」、John Wiley & Sons、ニューヨーク(1988)；Watsonら、「Recombinant DNA」、Scientific American Books、ニューヨーク；Birrenら(編)「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」、第1～4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク(1998)；米国特許第4,666,828号；第4,683,202号；第4,801,531号；第5,192,659号および第5,272,057号に示されている方法論；「Cell Biology: A Laboratory Handbook」、第I～III巻 Cellis, J. E. 編(1994)；「Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique」Freshney、Wiley-Liss、N. Y. (1994)、第3版；「Current Protocols in Immunology」第I～III巻 Coligan, J. E. 編(1994)；

10

20

30

40

50

Stitesら(編)、「Basic and Clinical Immunology」(第8版)、Appleton & Lange、ノーウーク、CT(1994) ; MishellおよびShiige(編)、「Selected Methods in Cellular Immunology」、W. H. Freeman and Co.、ニューヨーク(1980)を参照されたい; 利用可能な免疫測定法は特許および科学文献に広範に記載されている、例えば、あたかも完全に本明細書に示されているように、全て参照により組み込まれる、米国特許第3,791,932号; 第3,839,153号; 第3,850,752号; 第3,850,578号; 第3,853,987号; 第3,867,517号; 第3,879,262号; 第3,901,654号; 第3,935,074号; 第3,984,533号; 第3,996,345号; 第4,034,074号; 第4,098,876号; 第4,879,219号; 第5,011,771号および第5,281,521号; 「Oligonucleotide Synthesis」Gait, M. J. 編(1984); 「Nucleic Acid Hybridization」Hames, B. D. およびHiggins, S. J. 編(1985); 「Transcription and Translation」Hames, B. D. およびHiggins, S. J. 編(1984); 「Animal Cell Culture」Freshney, R. I. 編(1986); 「Immobilized Cells and Enzymes」IRL Press、(1986); 「A Practical Guide to Molecular Cloning」Perbal, B.、(1984)および「Methods in Enzymology」第1~317巻、Academic Press; 「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」、Academic Press、サンディエゴ、CA(1990); Marshakら、「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」CSHL Press(1996)を参照されたい。他の一般参考文献は本文書の全体にわたって提供される。その中の手順は当技術分野で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。その中に含まれる全ての情報は参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例1】

【0286】

材料および実験手順

発現構築物および発現

prh TNFR2:FcをコードするcDNAをGENEART AG(Regensburg、ドイツ)によって最適化および合成した。コドン使用頻度をタバコ(Nicotiana tabacum)遺伝子のコドンバイアスに適合させた。IgG1部分をFc IgG1重鎖定常領域[ヒト(Homo sapiens)]受託番号AEV43323からクローニングした。

【0287】

最適化過程中、以下のシス作用性配列モチーフを回避した: 内部TATAボックス、chi部位およびリボソーム侵入部位、ATリッチまたはGCリッチ配列ストレッチ、RNA不安定化エレメント(「キラーモチーフ」)、反復配列およびRNA二次構造、スプライスドナー(潜在性)およびアクセプター部位、分岐点。さらに、極めて高い(>80%)または極めて低い(<30%)GC含量の領域を回避した。結果として生じるDNA配列は配列番号1に示される通りである。コードポリペプチドは配列2に示される通りである。野生型cDNA配列に、ニコチアナ・ブルムバギニフォリア(N. plumbaginifolia)カルレティキュリンタンパク質からのシグナルペプチド(例えば、小胞体標的シグナルペプチド)を遺伝子のN末端に付加して、prh TNFR2:Fcの分泌経路に対する効率的な標的化を可能にし、次いで、いったんタンパク質が小胞体に転移したら、シグナルペプチダーゼによってポリペプチドから切断する(配列番号3、配列番号4は、それぞれERシグナルペプチドのDNAおよびペプチド配列を表す)。さらに、

ER 保留シグナル S E K D E L を遺伝子の C 末端に付加した。このシグナルにより、ゴルジ装置から ER へのタンパク質回収および ER への局在化が可能になる。全コード配列 (シグナルペプチド - p r h T N F R 2 : F c - S E K D E L) は配列番号 5 によってコードされ、コードポリペプチドは配列番号 6 に示される通りである。切断後に結果として生じるタンパク質は配列番号 7、204 または 205 または 214 (p r h T N F R 2 : F c - S E K D E L) に示される通りである。

タバコ (N . t a b a c u m) B Y 2 細胞での安定な発現

【0288】

外来遺伝子を植物細胞ゲノムに導入するために、アグロバクテリウム媒介形質転換が広く使用されている。この手法を用いて、外来遺伝子およびその調節エレメントからなる T - D N A 分子を植物ゲノムにランダムに導入する。組込み部位ならびに遺伝子挿入のコピー数を制御することができないので、形質転換プロセスによって、導入遺伝子発現が種々のレベルである細胞で構成される高度に不均一なトランスジェニック「プール」が得られる。その後、このトランスジェニック「プール」をクローン単離に使用する。形質転換プロセスにより、それぞれが個々の形質転換イベントを表す多数の単一細胞株が確立し、そこから最高発現レベルの外来遺伝子を有するクローンを選択する。p r h T N F R 2 : F c について、p r h T N F R 2 : F c カセット (図 1 配列番号 7 および 8) を有するプラスミドを用いて形質転換を行った。結果として、組換えタンパク質が細胞の小胞体 (E R) を標的化する。p r h T N F R 2 : F C - E R 発現ベクターによる B Y 2 細胞の形質転換を、以下の通りアグロバクテリウム・ツメファシエンス (A g r o b a c t e r i u m t u m e f a c i e n s) 媒介植物形質転換手順によって行った: B Y 2 (プライトイエロー 2) 懸濁培養液を、p r h T N F R 2 : F C 遺伝子およびネオマイシンホストトランスフェラーゼ (N P T I I) 選択遺伝子を持つベクターを有するアグロバクテリウム・ツメファシエンス (A g r o b a c t e r i u m t u m e f a c i e n s) と 48 時間共培養した。その後、細胞を 50 m g / L のカナマイシンおよび 250 m g / L のセフォタキシムを補充した培地に維持した。N P T I I 遺伝子はカナマイシンに対する耐性を与えるので、N P T I I 陽性 B Y 2 細胞のみがこの選択培地で生き残る。植物細胞はセフォタキシムに耐性であるので、この抗生物質を用いてアグロバクテリウムを選択的に死滅させた。

【0289】

最適発現クローンのスクリーニング

個々の細胞株を選択するために、高度希釈細胞懸濁液のアリコートを固体 B Y - 2 培地 (T o s h i y u k i N a g a t a & F u m i K u m a g a i M e t h o d s i n C e l l S c i e n c e 21:123~127、1999) に散布した。次いで、小さなカルスが発生するまで、細胞を成長させた。次いで、各カルスを液体培地に再懸濁した。次いで、細胞をサンプリングし、p r h T N F R 2 : F C について評価した。約 500 個の細胞株を変性条件下ウエスタンブロットによってスクリーニングした (図 4)。高い発現レベルの株を同じ方法によってさらに再分析して p r h T N F R 2 : F C 産生クローンの最高発現クローンを選択した。

【0290】

ゲル電気泳動:

ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) により、電界上でタンパク質をそのサイズにしたがって分離する。洗剤 S D S の存在下でタンパク質は、その分子量の対数の一次関数として移動する。S D S - P A G E 上での p r h T N F R 2 : F C の移動パターンおよび同定を、市販の分子量標準タンパク質 (N e w E n g l a n d B i o L a b s ; カタログ番号 P 7 7 0 8 S) および C H O 細胞で発現した市販の哺乳動物細胞由来 E n b r e 1 (E n t a n e r c e p t ; W y e t h) と比較した。p r h T N F R 2 : F C を、 - メルカプトエタノールを含む還元試料緩衝液または野生型抽出緩衝液のいずれかによって細胞から抽出した。野生型抽出上清を分析前に非還元試料緩衝液と混合した。予備混合電気泳動トリス - グリシン - S D S 泳動緩衝

液 (Bio-Rad Laboratories) と共に Criterion (商標) 細胞縦型電気泳動装置 (Bio-Rad Lab.) を用いて電気泳動を行った。電気泳動後、タンパク質をポリアクリルアミドゲルからタンパク質結合ニトロセルロース膜 (iBlot (商標)) に移した。0.1% Tween 20 を含む 5% ミルク緩衝液を用いて膜を室温で 1 時間ブロッキングした。分子の Fc 部分を同定するために、HRP に抱合したヤギ抗ヒト IgG (カタログ番号 109-035-098、Jackson.) を使用した。TNFR2 を検出するために、ウサギ抗 TNFR1 (ID: ab109853、Abcam)、引き続いてヤギ抗ウサギ HRP (カタログ番号 111-035-003、Jackson) を使用した。ECL 検出キット (Pierce) を用いて検出を行った。prh TNFR2: FC の免疫反応性を市販の Enbrel (Entanercept; Wyeth) の免疫反応性と比較した。Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories) を用いてバンドを検出した。

10

【0291】

質量分析によるアミノ酸配列決定

prh TNFR2: FC を、イスラエル工科大学 (Haifa、イスラエル) の Smoller Proteomics Center で配列決定解析のために送る。タンパク質をゲルから抽出し、2.8 mM DTT で還元し (60 で 30 分間)、100 mM 重炭酸アンモニウム中 8.8 mM ヨードアセトアミドで修飾し (暗所、室温で 30 分間)、1:50 の酵素対基質比で修飾トリプシン (Promega) またはキモトリプシンを含む 10% ACN および 10 mM 重炭酸アンモニウム中において 37 で一晩消化する。得られたペプチドの 3% を、Reprosil 逆相材料 (Dr Maisch GmbH、ドイツ) を充填した 0.075 X 200 mm 溶融シリカキャピラリー (J&W) での逆相クロマトグラフィーによって分離した。ペプチドを 5 ~ 45% の線形 60 分勾配および水中 95% アセトニトリルと 0.1% ギ酸で 15 分間、0.25 µl / 分の流量で溶出する。完全 MS スキャン、引き続いて最初の MS スキャンから選択された 7 つの最も優勢なイオンの衝突誘起解離 (CID) を繰り返し用いて、ポジティブモードのイオントラップ質量分析計 (Orbitrap、Thermo) によってオンライン質量分析を行う。

20

【0292】

具体的な配列に対して Sequest 3.31 ソフトウェア (J. Eng および J. Yates、University of Washington and Finnigan、サンノゼ) を用いて質量分析データを分析する。

30

【0293】

グリコシル化分析

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞と植物細胞系で産生される糖タンパク質間の大きな違いは、グリコシル化プロファイルおよびグリカン構造である。予備的分析を行って、タンパク質に結合している種々の N 結合型グリカン構造を特徴付けた。これらの結果を市販の Enbrel で見られる N - グリコシル化プロファイルの結果と比較する。O - 結合型グリカンの存在およびグリカン部位分析を決定する。

【0294】

40

prh TNFR2: FC および市販の Enbrel の試料を還元し、アルキル化し、SDS - PAGE で分離する。トリプシン消化、引き続いて prh TNFR2: FC については PNGase A または PNGase F 消化 (それぞれ、全タンパク質の約 80% および約 20%) を、および市販の Enbrel については PNGase F 消化のみを用い、約 75 kDa のタンパク質バンド (タンパク質合計約 200 µg) をグリカン分析用にとる。トリプシン、引き続いて PNGase A による消化によって全ての N 結合型グリカンが遊離し、PNGase F による消化によって 1 - 3 コアフコース (植物中で見られる) を含むものを除いた全てのグリカンが遊離する。遊離グリカンを抽出し、洗浄し、次いで、蛍光試薬アントラニルアミド (2 - アミノベンズアミド、2AB) を用いて標識し、引き続いて過剰な 2AB を除去する。分析法には、蛍光検出器 (330 nm 励起、4

50

20 nm 発光) に連結された順相アミド系カラム (Tosoh TSK Amide-80 カラム) を用いる Waters HPLC システムでのグリカンの分離が含まれる。種々のエキソグリコシダーゼによる連続消化、引き続いて追加の HPLC 分析によって、標識グリカンパールの配列決定を達成する。種々のエキソグリコシダーゼによる連続消化を用いることによって、グリカン構造およびその相対量のプロファイルについての追加の情報が得られる。prh TNFR2 : FC から遊離したグリカンに行われるエキソグリコシダーゼ消化は、1 - 2、3、4 および 6 N - アセチルグルコサミン (GlcNAc) を除去する JBH (タチナタマメ - N - アセチルヘキソサミニダーゼ)、1 - 2、6 > 3 マンノースを除去する JBM (タチナタマメマンノシダーゼ)、ならびに 1 - 6 および 1 - 3 コアフコースを除去する BKF (ウシ精巢フコシダーゼ) によるものである。蛍光標識により、全消化グリカンプール中の種々のグリカン構造の分布の半定量分析が可能になる。次いで、ギ酸アンモニウムおよびアセトニトリルからなる勾配溶媒流を用いて、固有のグリカン結合によって、増加する大きさの順にグリカン进行分離する。個々のグリカンの保持時間を部分的加水分解デキストラン断片の標準ミックスの保持時間と比較して、グルコース単位 (GU) のラダーを得る。グリカンを標準および外部データベース (http://glycobasedotnibrt.dti.tosoh.co.jp/database/show_glycobasedotaction) との比較に基づいてその GU 値によりピークに割り当てる。最終的な割り当ておよび相対ピーク面積を PNGアーゼ A 消化のクロマトグラムから計算する。

【0295】

酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)

結合 ELISA : TNF 結合 ELISA は、市販の TNF 検出 ELISA キット (ヒト TNF - ; Hycult Biotech Inc. 番号 HK307) と市販の抗ヒト IgG 抗体 (ヤギ抗ヒト IgG FC 特異的 HRP ; Sigma) の組み合わせである。このアッセイは prh TNFR2 : FC 結合活性についての定量的非放射性アッセイである。この結合 ELISA により、TNFR と IgG ドメインの両方を含む機能的 (TNF に結合することができる) 分子を検出することが可能になる。

【0296】

TNF に対する抗体でプレコーティングした ELISA プレートに TNF (60 ng/ml, Sigma) と共に室温で 1 時間インキュベートした。各 ELISA ステップ間に、プレートを市販の洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。市販の Enbre1 および prh TNFR2 : FC を発現している BY2 細胞からの上清 (連続希釈) を ELISA プレート上室温で 2 時間インキュベートした。ヤギ抗ヒト IgG Fc HRP を 1 : 1000 希釈し、プレート上室温で 1 時間インキュベートした。TMB を HRP の基質として使用した。比色反応を 10 % HCL によって停止し、吸光度を 450 nm で測定した。

【0297】

A375 細胞での TNF 誘導アポトーシスの防止

A375 細胞 (ヒト黒色腫細胞) を培養培地 (ATCC、番号 30 - 2002、10 % FBS を補充) 中で懸濁培養した。10⁴ 個 / ウェルの細胞を 96 ウェルアッセイプレートに蒔き、アッセイ培地 (ATCC、番号 30 - 2002、5 % FBS を補充) で一晩インキュベートした。組換え TNF (2 ng/ml、ProSpec、Rehovot、イスラエル) を異なる濃度 (1.562 ~ 100 ng/ml) の prh TNFR2 : FC または市販の Enbre1 (Entanercept ; Wyeth) の存在下 37 °C で 2 時間インキュベートした。インキュベーション後、混合溶液をアクチノマイシン D (0.8 μg/ml) の存在下で A375 細胞に添加し、加湿インキュベーター中 37 °C、5 % CO₂ でさらに 24 時間インキュベートし、MTT アッセイ (Sigma カタログ番号 M5655) によってアポトーシスの定量化を決定した。プレートを 570 ~ 650 nm で読み取り、TNF 誘導細胞毒性の阻害 (%) を計算した。

【実施例 2】

【0298】

タンパク質分析

p r h T N F R 2 : F C を還元条件 (図 2 A) および非還元条件 (図 2 B の野生型抽出) 下で分析した。抗 F c 抗体 (上のパネル) および抗 T N F R 2 抗体 (下のパネル) を用いて、p r h T N F R 2 : F C (1 レーン) および市販の E n b r e l (2 レーン) を検出した。2 種のタンパク質は、おそらくは植物細胞発現酵素と哺乳動物細胞発現酵素との間のグリコシル化パターンの差のために、移動特性のわずかな差を示す。

【 0 2 9 9 】

p r h T N F R 2 : F c (P P X - 1 0 6) を発現している B Y 2 細胞の溶解液の連続希釈を市販の E n b r e l と比較することによって、市販の E n b r e l と p r h T N F R 2 : F C の両方による T N F 結合を調べた。p r h T N F R 2 : F C 連続希釈は、市販のタンパク質と類似の用量反応結合パターンを示す (図 3 参照)。タンパク質発現によるトランスジェニック細胞株の選択をウエスタンブロット法によって行った。したがって、個々の細胞株の選択を可能にするために、高度希釈細胞懸濁液のアリコート固体 B Y - 2 培地に散布した。次いで、小さなカルスが発生するまで、細胞を成長させた。次いで、各カルスを液体培地に再懸濁した。次いで、細胞をサンプリングし、還元条件下での抽出、引き続いて産生標的タンパク質のウエスタンブロット同定 (抗 F C 抗体) によって p r h T N F R 2 : F C 発現レベルについて評価した (図 4)。発現したタンパク質の機能性を、T N F 誘導アポトーシスを防止する能力によって確立した。具体的には、T N F 活性を、転写阻害剤、アクチノマイシン D の存在下で特定の細胞株の細胞死を誘導する能力によって測定することができる。T N F の中和タンパク質とのプレインキュベーションによって、受容体 (T N F - R 1 および T N F - R 2) との結合が防止され、それによってサイトカイン効果が阻害され、T N F 誘導細胞死が防止される。M T T アッセイによる細胞生存率の定量化により、T N F 細胞毒性についての細胞内活性アッセイが提供される。結果を黒色腫細胞 A 3 7 5 については図 5 A ~ 図 5 G に、L 9 2 9 線維芽細胞については図 6 A ~ 図 6 G に示す。

【 実施例 3 】

【 0 3 0 0 】

p r h T N F R 2 : F C は炎症性腸疾患 (I B D) を抑制する

炎症性腸疾患 (I B D) は、遺伝、免疫および環境因子によって媒介される慢性腸炎症状態である。毎年、人口の約 0 . 2 ~ 0 . 3 % が I B D と診断されている。I B D は、消化管 (G I T) 内の慢性または再発性の免疫活性化および炎症の傾向によって特徴付けられる。この疾患は 2 つの症状を有する：クローン病 (C D)、口から肛門までの G I T のいずれかの位置に潜在的に関与する慢性炎症、および潰瘍性大腸炎 (U C)、直腸で発症し、近位に拡大して結腸の変化する範囲に発症する炎症性障害。C D は、中でもサイトカイン I L - 1 2、I F N - および T N F を過剰産生する T H 1 免疫細胞応答によってより制御される。他方で、U C は T H 2 免疫細胞応答によって主に制御される。

【 0 3 0 1 】

P R X 1 0 6 は、中でも T H 1 免疫細胞応答に関与する炎症で過剰産生されるサイトカインの可溶性受容体である。P R X 1 0 6 は、炎症の他のモデル (関節リウマチ) で静脈内注射すると、極めて有効であることが示された。P R X 1 0 6 は、B Y 2 植物細胞において P r o t a l i x の P r o C e l l E x (商標) システムで過剰発現する。植物細胞であるので、B Y 2 は胃および小腸を移動している間、P R X 1 0 6 を保護することができる細胞壁を有する。多糖が消化される結腸で、植物細胞はその内容物を放出するので、P R X 1 0 6 は自由にそのサイトカインリガンドに結合できるようになる。さらに、P R X 1 0 6 はヒト I g G 1 の F c セグメントを有するキメラタンパク質である。粘膜障壁を裏打ちする上皮単層では、F c R n 受容体が F c と結合することによって I g G 分子を経細胞輸送する。そのため、P R X 1 0 6 も上皮障壁を横切って上皮の漿膜側のサイトカインリガンドに結合することができる。

【 0 3 0 2 】

I B D モデルは 5 つの主要なグループに分類される：化学的誘発モデル、細胞移入モデ

ル、自然発症モデル、先天性（自然遺伝子突然変異）モデルおよび遺伝子組換えモデル。最も広く使用される化学的誘発モデルでは、大腸炎を、ハプテン修飾自己タンパク質／管腔抗原に対するT細胞媒介反応を誘導すると考えられている共有結合反応性試薬TNBS／オキサゾロンの直腸内投与によって誘発する。DSSモデルでは、マウスを数日間、基底陰窩の結腸上皮細胞に直接的に毒性であると思われるDSS（デキストラン硫酸ナトリウム）を補充した飲料水に供する。疾患重症度を3つの主要な臨床徴候（体重減少、下痢および直腸出血）をスコア化することによって評価する。マウスモデルTNBS（実施例3A）およびDSS（実施例3B）を用いてインビボでキメラポリペプチドを発現している植物細胞の治療有効性を決定する。

【0303】

（実施例3A）

インビボトリニトロベンゼン - スルホン酸（TNBS）モデルで証明されるようにPRX106発現細胞はIBDの症状を軽減するのに有効である。

【0304】

材料および方法

倫理声明 - 全ての手順を実験動物の管理と使用に関する指針にしたがって厳密に行った。

【0305】

動物

雄Balb/cマウス、8～9週齢を全ての実験に使用した。各実験群は5～10匹のマウスを含んでいた。マウスはHarlan Laboratories、イスラエルから購入した。実験を開始する数日前に全てのマウスをSPFフリー部屋（自然細菌叢）に移した。

【0306】

TNBS誘導

TNBSの直腸導入によってTNBSをマウスに誘導した[M. F. Neurath, I. Fussら: *J. exp. Med.* 182, 1281～1290 (1995)]。暴露7日前にエタノール中1% TNBS 100 μLをマウスの腹部の毛を剃った皮膚上に塗ることによって、マウスを感作した。暴露の日に、マウスに、カテーテルを介して結腸の内腔にゆっくり注射して1% TNBS (Sigma Aldrich) 120 μLを与えた。TNBS処理後、タンパク質5 μg（用量I）およびタンパク質30 μg（用量II）に相当するPRX-106を発現しているBY-2細胞；同じ経口投与体積のPRX-106発現細胞のBY-2（-）対照細胞；および生理食塩水で、マウスを0日目から4日目まで毎日経口（PO）処理した。TNBS対照マウスはPBSのみを受けた。これらの動物の体重を1日1回監視した。0日目の体重から各日の体重を減じることによって体重減少を計算した。実験後、動物を屠殺し、解剖した。5日目に、血液試料を心臓穿刺によって回収し、凝固させ、次いで、遠心分離して血清サイトカインレベルを測定するための血清を得た（Curryら *Cell Immunol.* 2013, 282 (1); 66～70）。実験は、3つの別々の実験で1群につき5～15匹のマウスで行い；結果は全ての実験で同じパターンに従った。

【0307】

組換え植物細胞の経口投与

組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞の経口投与を、TNBSの投与6時間後に開始した。マウスは350～500 μLに再懸濁した組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞を受けた。陰性対照は組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞の代わりに、同じ経口投与体積の宿主Mock植物細胞を受けた。経口投与は経管栄養によって行った。さらに2つの対照は未処理マウスおよび生理食塩水を受けたTNBS処理マウスであった。

【0308】

サイトカインプロファイルの分析

10

20

30

40

50

製造業者の指示 (R & D Systems、ミネアポリス、MN、米国) にしたがって ELISA キットを用いて、サイトカイン TNF - および IL - 10 の血清レベルを測定した。

【 0309 】

抗体アレイ

製造業者のマニュアルにしたがって、マウスサイトカイン抗体アレイ (R & D Systems、ミネアポリス、MN、米国) を用いて、サイトカイン含量の血清定性測定を行った。

【 0310 】

免疫組織化学

パラフィン包埋結腸組織切片 (5 μ m) を脱パラフィンし、再水和し、洗浄し、3 % H_2O_2 中でインキュベートし、ブロッキングした (Bar Sela ら 2006)。スライドを IkB - pSer32 / Ser36 抗体 (Abcam) と共にインキュベートした。DAB 基質キット (Thermo Scientific) または Zymed AEC 基質キット (Zymed Laboratories) を用いて発色させ、引き続いて Mayer のヘマトキシリンで対比染色した。一次抗体を添加していない対照は、全てのケースで低い背景染色しか示さないまたは背景染色を示さなかった。Bar - Sela ら Histopathology . 2006 ; 49 : 188 ~ 193 にしたがってブロッキングを行った。

【 0311 】

フローサイトメトリー

RPMI 1640 培地のマウスから脾臓を採取した。脾臓をカミソリの刃で方形切断し、引き続いて 40 μ m ナイロンフィルター (BD Falcon) に通過させることによって細胞懸濁液を調製した。脾細胞を抗マウス CD4 (R & D Systems、ミネアポリス、MN、米国) および抗マウス CD25 (R & D Systems、ミネアポリス、MN、米国) と共にインキュベートした。次いで、細胞を固定し、4 で 20 分間透過処理し、次いで、透過処理緩衝液に希釈した抗マウス Foxp3 (Mouse Regulatory T cell 3 - Color Flow kit、R & D Systems、ミネアポリス、MN、米国) と共に 30 分間インキュベートした。10000 個の CD4⁺ 細胞を FACS によって分析した。

【 0312 】

肉眼的結腸損傷

Wallace 肉眼的スコア化システム [W. Vermeulen、J. G. de Man、S. Nullens、P. A. Pelckmans、B. Y. de Winter および T. G. Moreels、"The use of colonoscopy to follow the inflammatory time course of TNBS colitis in rats"、Acta Gastro-Enterologica Belgica、第 74 巻、第 2 号、304 ~ 311 頁、2011] を用いて結腸の肉眼的外観を評価した。このスコア化システムでは、炎症を、潰瘍化、炎症および疾患の程度に基づいて 0 から 10 の以下のスケールで評価する：0 = 粘膜の正常な様相、1 = 潰瘍化のない限局性充血、2 = 潰瘍化、3 = 1 つの部位での腸壁の肥厚を伴う潰瘍化、4 = 2 つ以上の部位の潰瘍化および腸壁の肥厚、5 = 主な損傷部位が結腸の長さに沿って 2 cm 未満広がる、および 6 ~ 10 = 損傷が 2 cm 超広がる (スコアは損傷組織 1 センチメートル毎に 1 増加する)。

【 0313 】

結果

組換え TNFR2 : Fc を発現している植物細胞の経口投与により、TNBS 投与開始 4 日後に監視される TNBS 誘導体重減少が改善された (図 7A ~ 図 7B)。

【 0314 】

結腸長を TNBS 処理マウスの結腸炎症の形態的指標として測定し、短い結腸は炎症状

10

20

30

40

50

態を示す。図 8 に示されるように、TNBS で処理したマウスの結腸長は、対照マウスと比べて有意に短縮した。処理群 (prTNFR2 : Fc を発現している細胞の経口投与) の結腸長は、TNBS 処理群のものより有意に長かった。

【0315】

組換えTNFR2 : Fc を発現している植物細胞の経口投与により、TNBS 誘発大腸炎の肉眼的特徴も改善された。結腸の肉眼検査により、非処理結腸と比べて減少した結腸損傷重症度が示された (図 9)。

【0316】

組換えTNFR2 : Fc を発現している植物細胞の経口投与により、TNBS 誘発大腸炎を有するマウスの炎症性サイトカインの発現が低下した (図 10A ~ 図 10C)。TNBS 大腸炎と関連した炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインの血清レベルに対する処理の効果を評価した。TNFR2 : Fc 処理群のほとんどで、炎症性サイトカイン IL-6 および TNF- α の発現レベルが低下し、抗炎症性サイトカイン IL-10 の発現レベルが上昇したことに留意されたい。

【0317】

図 11A ~ 図 11B は、組換えTNFR2 : Fc を発現している植物細胞の経口投与による処理により、顆粒球コロニー刺激因子 G-CSF、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) などの炎症メディエーターのレベルが低下することを示し、血流からの骨髓由来細胞の全身動員を低下させることにより全身性炎症が減少されることを潜在的に示した。

【0318】

近年、IL-17 産生 Th17 細胞および CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg 細胞の発生および機能の不均衡が、IBD を含む自己免疫疾患において重要な役割を果たすことが証明されている。CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺としても知られている Treg 細胞は、活性化免疫細胞で抑制効果を開始することによって、末梢性トレランスの維持および免疫応答の制御に関与している。本分析は、TNFR2 : Fc を発現している植物細胞の経口投与により、脾臓での機能的調節性 T (Treg) 細胞の集団が拡大されることを示している (図 12)。

【0319】

上記結果を結論付けることにより、組換えTNFR2 : Fc を発現している植物細胞の経口投与が、TNBS 誘発大腸炎を改善する抗炎症剤となることが証明される。

【0320】

結果：

(実施例 3B)

インビボデキストラン硫酸ナトリウム誘発 (DSS 誘発) モデルで証明されるように PRX106 発現細胞は IBD の症状を軽減するのに有効である。

IBD のデキストラン硫酸ナトリウム誘発 (DSS 誘発) マウスモデルを炎症性腸疾患に有効な化合物に使用する。これは、下痢、血便、体重減少、粘膜潰瘍および大腸の短縮などのヒト UC で観察される症状と類似の症状を有する実験急性潰瘍性大腸炎モデルである。

【0321】

倫理声明

全ての手順を実験動物の管理と使用に関する指針にしたがって厳密に行った。

【0322】

動物

雄 C67 / B1 マウス、8 ~ 9 週齢を全ての実験に使用した。各実験群は 10 匹のマウスを含んでいた。マウスは Harlan Laboratories、イスラエルから購入した。実験を開始する数日前に全てのマウスを SPF フリー部屋 (自然細菌叢) に移した。

【0323】

DSSで処理し、その後組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞を経口投与したマウスの大腸炎の誘発および評価

通常の飲料水中1.5%(wt/vol)のDSS(試薬グレートDSS塩;分子質量=36~50kD;MP Biomedicals)5日間の投与、引き続いて通常の水消費5日間によって大腸炎を誘発させた。組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞、ペクターのみを含むMock細胞または対照処理(生理食塩水)を経口投与する毎日の処理をDSS誘発24時間後に開始し、7日間行った。パンチ生検および組織学的スコアによってDSS処理5日後に結腸炎症を評価した。動物の体重を1日1回監視し、0日目の体重から毎日の体重を減じることによって体重減少を計算した。実験後、動物を屠殺し、解剖し、未処理結腸と比較した結腸長測定により結腸短縮を評価した。血液試料を心臓穿刺によって採取し、凝固させ、次いで、遠心分離して血清サイトカインレベルを測定するための血清を得た。

10

【0324】

組換え植物細胞の経口投与:

組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞の経口投与をDSS投与24時間後に開始した。マウスは、生理食塩水500μlに懸濁した組換えTNFR2:Fc(タンパク質30μgを含む)を発現している植物細胞を受けた。陰性対照は、組換えTNFR:Fcを発現している植物細胞に相当する体積の宿主Mock植物細胞を受けた。さらに2つの対照群は、生理食塩水を投与したDSS処理マウスおよび未処理マウスであった。経口投与は経管栄養によって行った。

20

【0325】

結腸炎症の分析

パラフィン包埋結腸組織切片を光学顕微鏡検査のためにヘマトキシリンおよびエオシンで染色して結腸損傷および炎症を評価した。結腸全体からの試料を処理条件について盲検の病理学者によって病理学的に分析した。炎症の程度、陰窩損傷、炎症を伴う面積の割合および炎症の深さを含むスコア化システムを使用した。

【0326】

パンチ生検

マウス結腸に抗生物質を含むPBSを3回流し、縦軸に沿って開いた。その後、4mm²のパンチ生検を得て、抗生物質を補充したRPMI-1640培地で24時間インキュベートした。上清を回収し、サイトカイン発現について評価するまで-20℃に保った。製造業者のマニュアル(R&D Systems、ミネアポリス、MN、米国)にしたがってMagnetic Luminescence Screening Assayを用いて結腸外植片による馴化培地でのサイトカイン含量の定性測定を行った。

30

【0327】

サイトカインプロファイルの分析

製造業者の指示(R&D Systems、ミネアポリス、MN、米国)にしたがってMagnetic Luminescence Screening Assayを用いて、サイトカインTNF-α、IL-6およびIL-10の血清レベルを測定した。

【0328】

結果

40

1. 組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞の経口投与によりDSS誘導体重減少が改善した

【0329】

DSS投与後毎日体重を監視した(図13A~図13B)。わかるように、組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞によるマウスの経口処理によって、DSSによって誘導された体重減少が減弱した。

【0330】

2. 組換えTNFR2:Fcを発現している植物細胞の経口投与によりマウスのDSS誘発大腸炎が抑制された

50

短結腸をDSS処理マウスの結腸炎症の形態学的指標として使用することができる
ことが確立されているので、結腸長を測定した。図14A～図14Bに示されるように、DSS
で処理したマウスの結腸長は、対照マウスと比べて有意に短縮した。組換えTNFR2
:Fcを発現している植物細胞の経口投与群の結腸長は、DSS処理群の結腸長より有意
に長かった。

【0331】

3．DSS大腸炎後の腸炎症性サイトカインに対する組換えTNFR2 :Fcを発現して
いる植物細胞の経口投与の効果

図15は、組換えTNFR2 :Fcを発現している植物細胞による経口処理後の腸炎症
性サイトカインの統計学的に有意な減少を示している。

10

【0332】

4．組換えTNFR2 :Fcを発現している植物細胞の経口投与により、DSS誘発大腸
炎を有するマウスの炎症性サイトカインの発現が低下した

DSS大腸炎と関連する炎症性サイトカインの産生に対する組換えTNFR2 :Fcを
発現している植物細胞の経口投与の効果を評価した。図16に示されるように、DSSは
血清中でのIL-6およびTNF- α などの炎症性サイトカインのタンパク質発現を誘導
したが、組換えTNFR2 :Fcを発現している植物細胞の経口投与により、炎症性サイ
トカインの宿主タンパク質分泌が抑制された。これらの結果は、組換えTNFR2 :Fc
を発現している植物細胞の経口投与により、DSS誘発大腸炎モデルで炎症性サイトカ
インの産生が阻害されることを指摘した。

20

【0333】

5．結腸炎症の指標としての病理組織学的検査

結腸炎症の重症度を組織学的検査によってさらに評価した(図17)。DSS投与後、
結腸は貫壁性炎症および炎症細胞の激しい浸潤を示した。この細胞流入は、潰瘍化、杯細
胞の喪失、および結腸の全体にわたる陰窩の著しい破壊に関連する。記録では、TNFR
2 :Fcを発現している植物細胞による経口処理によって、DSS誘発大腸炎の組織学的
特徴が著しく改善した。結腸の組織学的検査により、DSSおよびMock処理結腸と比
べて、組換えTNFR2 :Fcを発現している植物細胞を経口投与した処理マウスの結腸
で結腸損傷重症度が低下することが示された。

30

【0334】

結論として、本研究は、IBDを改善する能力を有する抗炎症剤としての組換えTNF
R2 :Fcを発現している植物細胞経口投与の役割を支持する。

【実施例4】

【0335】

組換えTNFR2 :Fcを発現している植物細胞の摂食後の種々の時点でのラット血漿
中の組換えTNFR2 :Fcタンパク質薬物動態プロファイルの評価

【0336】

材料および方法

動物

ラット(SD、雌/9～10週齢/n=6)を20時間の絶食に供し、次いで、組換え
TNFR2 :Fc(PRX-106)を発現している細胞および宿主BY2(-)を与え
た(自由摂食)。摂食から2時間後、摂食量を測定した。若い哺乳ラット(SD、雄およ
び雌/16日齢/n=6)を3時間絶食させ、組換えTNFR2 :Fc(PRX-106
)を発現している細胞および宿主BY2(-)細胞を(経管栄養により)与えた。

40

【0337】

TNFR2プロファイルの分析

血液試料を各時点(例えば、0、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間および24
時間)で回収し、凝固させ、次いで、遠心分離して血清を得た。ヒトTNFR1の血清
レベルを製造業者の指示(R&D Systems、ミネアポリス、MN、米国)にした
がってELISAキットを用いて測定した。

50

【0338】

結果

血清中のTNFR2:Fcレベルを図18に示す。結果は、タンパク質を発現している植物細胞の経口投与後の血漿中のTNFR2:Fcレベルの上昇を示している。血清中のTNFR2:Fcレベルは8時間で検出され、24時間でまだ検出可能であった。宿主BY2(-)を与えられたラットの血清中のTNFR2:Fcレベルは検出不能であった。

【0339】

次いで、実験に、TNFR2:Fcを発現している植物細胞の摂食後の種々の時点での哺乳ラット血漿中の組換えTNFR2:Fcタンパク質薬物動態プロファイルの分析を続けた。血清中のTNFR2:Fcレベルを図19に示す。結果は、TNFR2:Fcの経口投与後の血漿中のTNFR2:Fcレベルの有意な上昇を示している。血漿中のTNFR2:Fcレベルは4時間でピークになった。おそらく、成体ラットに対して増加した哺乳ラットの血清中のTNFR2:Fcのレベルは、哺乳ラットの腸でのFcNRの発現によるものであった。宿主BY2(-)を与えられたラットの血清中のTNFR2:Fcレベルは検出不能であった。

【実施例5】

【0340】

マウスにおける毒性学試験

【0341】

方法

動物

雄および雌のSDラット(Harlan Laboratories、イスラエル)、試験開始時に8週齢を標準的な実験室条件に入れた。試験開始時の平均体重は、およそ雄6.8gおよび雌6.3gであった。これらの動物に市販の齧歯動物の食餌(Teklad Certified Global 18% Protein Dietカタログ番号:2018SC)を与え、オートクレーブし、酸性化した飲料水(pH2.5~3.5の間)を自由に入手できるようにした。

【0342】

試験設計

4つの群、1群当たり12匹のラット(6匹の雄および6匹の雌)を含む3つの投与群と1群当たり6匹のラット(3匹の雄および3匹の雌)を含む対照群を割り当てた。各性で、対照群は希釈緩衝液(0.2Mマンニトール)を受け、3つの処理群はTNFR2:Fc0.1、0.5および1mg/Kg体重の用量レベルのTNFR2:Fcを発現している細胞を受けた。細胞を要求される発現タンパク質量にしたがって分割した。各アリコート在市販の齧歯動物の食餌の粉末30gおよび希釈緩衝液と混合してペレットを作成した。対照ペレットは希釈緩衝液および市販の齧歯動物の食餌の粉末のみで作った。全ての動物に14日間ペレットを毎日経口で与えた。試験中、死亡率および全身の臨床観察を行い、体重を毎日監視した。二酸化炭素吸入による浅麻酔後の試験終了時(15日目)、全ての動物の後眼窩静脈叢から3つの血液試料を採取し、その後、動物を屠殺し、病理学を実施し、選択した器官を採取した。

【0343】

結果

14日間の安全性試験の間、有害臨床症状は記録されなかった。全ての血液パラメータは正常範囲内にあり、有意な逸脱はなかった。体重増加は持続的で正常であり、群間(処理または対照)で有意な差はなかった。細胞発現は安全であり、有害効果に耐えているようには見えなかった。生化学的パラメータまたは臨床症状に対する効果は見られなかった。肉眼での剖検観察では病理学的所見は明らかにならなかった。瀕死状態または重度の苦痛状態にある動物は見られなかった。重度の疼痛または体重減少を呈する動物は観察されなかった。

【実施例6】

【0344】

P R X - 1 0 6 の配列決定

エドマン分解によるN末端配列決定

A l p h a l y s e (デンマーク) u a i n f、A B I P r o c i s e 4 9 4 シーケンサーで分析を行った。この手順は、エドマン分解化学によってタンパク質およびペプチドのN末端アミノ酸配列を決定する。エドマン分解は、アミノ酸残基を一度に1個切断し、クロマトグラフィーによって同定する循環的手順である。ここに循環的手順の3つのステップがある。ステップ1で、P I T C 試薬がアルカリ条件下でN末端アミノ基と結合する。ステップ2で、N末端残基が酸性媒体で切断される。ステップ3で、P I T C 結合残基がフラスコに移され、P T H 残基に変換され、H P L C クロマトグラフィーによって同定される。次いで、次のN末端残基を同定するために次のサイクルが開始される。

10

【0345】

結果：

配列は L P A Q V (配列番号 1 8) と決定された。

【0346】

質量分析検出器と連結した逆相 H P L C によるアミノ酸配列の検証

S m o l e r P r o t e o m i c s C e n t e r (イスラエル工科大学、H a i f a、イスラエル) で配列決定を行った。質量分析検出器と連結した逆相 H P L C を用いて分析を行った。

【0347】

20

方法

タンパク質分解

分析試料を 8 M 尿素、1 0 0 m M 重炭酸アンモニウム (A B C) に再懸濁し、引き続いて 2 . 8 m M D T T で還元し (6 0 で 3 0 分間)、暗所中、周囲温度でさらに 3 0 分間 1 0 0 m M A B C 中 8 . 8 m M ヨードアセトアミドで修飾した。2 M 尿素、2 5 m M A B C 中 1 : 5 0 の酵素対基質比で修飾トリプシン (P r o m e g a) を用いて、タンパク質を 3 7 で一晩消化した。

【0348】

質量分析

トリプシンまたはキモトリプシンペプチドを、ステージチップ (自家製 C 1 8) を用いて脱塩し、残留緩衝液を蒸発させ、ペレットを 0 . 1 % (v / v) ギ酸に再懸濁した。得られたペプチド 2 0 n g を、R e p r o s i l 逆相材料 (D r M a i s c h G m b H、ドイツ) を充填した 0 . 0 7 5 X 2 0 0 m m ヒューズドシリカキャピラリー (J & W) での逆相液体クロマトグラフィーによって分解した。ペプチドを 5 ~ 4 5 % の線形 6 0 分勾配、引き続いて水中 9 5 % アセトニトリルと 0 . 1 % ギ酸で 1 5 分間、0 . 2 5 μ L / 分の流量で溶出した。全 M S スキャン、引き続いて最初の M S スキャンから選択された 7 つの最も優勢なイオンの衝突誘起解離 (C I D) を繰り返し用いて、ポジティブモードのイオントラップ質量分析計 (O r b i t r a p、T h e r m o) によってオンライン質量分析を行った。具体的なタンパク質由来のデータベースを用いて D i s c o v e r ソフトウェアバージョン 1 . 3 ソフトウェアを用いて質量分析データを分析した。

30

40

【0349】

結果

配列をエタネルセプト配列のペプチド配列と比較した。同定された配列を以下の表 V に提示する。基準配列の 8 4 . 8 % 被覆度が提示される (緑色、図 2 0 参照)。

【0350】

【表 5 - 1】

表V-トリプシンによる消化後に同定されたペプチド(配列番号19~203)

WQQGnVFScSVMHEALHnHYTQK	
WQQGNVFScSVMHEALHNHYTqK	
GFYPSDIAVEWESNGqPENnYKT	
qYNSTYRVSVLTVLHqDWLNGK	
WQqGNVFScSVMHEALHNHYTqKS	
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKc	
VVSVLTVLHqDWLnGKEYK	10
SqHTqPTPEPSTAPSTSFLLPmGPSPPAEGSTGDEPK	
WQQGnVFScSVMHEALHNHY	
ScDKTHTcPPcPAPELLGGPSVFLFPPKPKD	
GQPREPqVYTLPPSREEMTK	
GFYPSDIAVEWESNGQPEnNYKT	
LPAqVAFTPYAPEPGSTcR	
EALHnHYTqK	
qNRITcRPGWYcALSKQEGcR	
WQQGNVFScSVmHEALHnHYTQK	
SqHTQPTPEPSTAPSTSFLLPmGPSPPAEGSTGDEPK	20
GQPREPqVYTLPPSREEmTK	
GFYPSDIAVEWESnGQPENNYK	
SqHTQPTPEPSTAPSTSFLLPmGPSPPAEGSTGDEPK	
VVSVLTVLHQDWLnGK	
TYTqLWNWVPEcLScGSRCSSDqVETQAcTR	
WQQGNVFScSVMHEALHNHYTQK	
GFYPSDIAVEWESnGQPEnnYKT	
VVDVSHEDPEVK	
PSTSFLLPmGPSPPAEGSTGDEPK	
LPAQVAFTPYAPEPGSTcR	30
TTPPVLDSDGSFFL	
LSLSPGK	
EPQVYTLPPSREEMTKN	
SmAPGAVHLPQ	
TTPPVLDSDGSFFLYSK	
WQQGNVFScSVmHEALHNHYTQK	
SMAPGAVH	
SVmHEALHNHYTQK	
VVSVLTVLH	
SQHTQPTPEPSTAPSTSFLLPmGPSPPAEGSTGDEPK	40
GQPREPQVY	
AQVAFTPYAPEPGSTcR	
cAPLRK	

【 0 3 5 1 】

【表 5 - 2】

EPQVYTLPPSREEmTKnQVSLTcLVK

SmAPGAVH

VSVLTVLHQD

LFPPKPK

GSFFLYSK

IcTcRPGWY

SQHTQPTPEPS

SVLTVLHQDWLnGKEYK

QVETQAcTR

SLSLSPGK

SDGSFFLYSK

KALPAPIEK

ALPAPIEK

AVcTSTSPTR

SQHTQPTPEPSTAPSTF

QVSLTcLVK

LREYYDQTAqmcSKcSPGQHAK

WQQGNVFSVMHEALH

DTLmISR

PmGPSPPAEGSTGDEPK

THTcPPcPAPELLGGPSVF

DTLMISR

SDQVETQAcTR

KcRPGFGVAR

WYVDGVEVHNAK

YVDGVEVHNAK

TTPPVLDSDGSFF

THTcPPcPAPELLGGPSVFLFPPKPK

PSPPAEGSTGDEPK

SLSLSPGKSEK

MAPGAVHLPQPVSTR

VDGVEVHNAK

ScDKTHTcPPcPAPELLGGPSVF

VSVLTVLHQDWLNGK

SLSLSPGKSEK

PPcPAPELLGGPSVFLFPPKPK

SFFLYSK

FNWYVDGVEVHNAK

FLLPMGPSPPAEGSTGDEPK

DAVcTSTSPTR

NQVSLTcLVK

NqVSLTcLVKG

SLSPGKSEK

TPEVTcVVVDVSHEDPEVK

LREYYDQTAQM

【 0 3 5 2 】

10

20

30

40

【表 5 - 3】

GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	
FNWYVDGVEVHN	
VVSVLTVLHQDWLN	
SQHTQPTPEPSTAPST	
RTPEVTcVVVDVSHEDPEVK	
SLSLSPGKS	
LSPGKSEKDEL	
LPQPVSTR	
TTPPVLDSDGSFFLY	10
TSDTVcDScEDSTYTQLWN	
ALPAQVAFTPYAPEPGSTcR	
EEQYNSTYR	
ScDKTHTcPPcPAPELLGGPSVFLFPPKPK	
cSPGQHAKVFcTK	
TPEVTcVVVDVSHED	
SMAPGAVHLPQPV	
TcRPGWYcALSK	
TcPPcPAPELLGGPSVFLFPPKPK	
TSDTVcDScEDSTYTQLWNWVPEcLScGSR	20
LcAPLRK	
SPPAEGSTGDEPK	
WVPEcLScGSR	
GPSPPAEGSTGDEPK	
SSDQVETQAcTR	
EEQYnSTYR	
VAFTPYAPEPGSTcR	
PGWYcALSK	
cRPGFGVAR	
ScSVmHEALHnHYTqK	30
VVSVLTVLHQDWLNGKEYK	
LcAPLR	
EPQVYTLPPSREEMTKnQVSLTcLVK	
LLPMGPSPPAEGSTGDEPK	
SQHTQPTPEPSTAPSTSFLLPmGPSPPAEGSTGDEPK	
SLSLSPGKSE	
EEMTKNqV	
SVMHEALHNHYTQK	
SQHTQPTPEPSTAPSTSFLLPmGPSPPAEGSTGDEPK	
ScDK	40
EEmTKnQVSLTcLVKG	
LREYDQTAQmccSK	
cSSDqVETQAcTR	
EPQVYTLPPSREEMTK	
NQVSLTcLVKG	
cSSDQVETQAcTR	

【 0 3 5 3 】

【表 5 - 4】

nQVSLTcLVK	
TKPREEQYNSTYR	
PAQVAFTPYAPEPGSTcR	
SLSLSPGKSEKDEL	
AFTPYAPEPGSTcR	
APGAVHLPQPVSTR	
SDGSFFLYSKLTVDK	
THTcPPcPAPELLG	
VVSVLTVLHQDWLn	10
EPQVYTLPPSR	
SmAPGAVHLPQPVSTR	
GQPREPQVYTLPPSREEmTK	
TPYAPEPGSTcR	
EVTcVVVDVSHEDPEVK	
TKPREEQYnSTYR	
VSnKALPAPIEK	
LREYYDQTAQMccSK	
FTPYAPEPGSTcR	
SMAPGAVHLPQPVSTR	20
GPSVFLFPPKPK	
VVSVLTVLHQDWLnGKEYK	
SQHTQPTPEPSTAPS	
SMAPGAVHLPQPVSTR	
AVHLPQPVSTR	
GQPREPQVYTLPPSR	
PGAVHLPQPVSTR	
TLMISR	
KNqVSLTcLVKGFYPSDIAVEWESNGqPENnYK	
LREYYDQTAQMcc	30
SmAPGAVHLPQPV	
LPAPIEK	
EYYDQTAQMccSK	
NWVPEcLScGSR	
SLSPGKSEKDEL	
IcTcRPGWYcALSK	
SMAPGAVHLPQPVST	
EYYDQTAQMccSK	
ASMDAVcTSTSPTR	
SQHTQPTPEPSTAPSTS	40
TLPPSREEMTK	
SQHTQPTPEPSTAPSTSFL	
TLmISR	
EPQVYTLPPSREEmTK	
GQPREPQVYTLPPSREEMTK	

【 0 3 5 4 】

【表 5 - 5】

TPEVTcVVVDVSHEDPEVKFN

ScDKTHTcPPcPAPELLG

GFYPSDIAVEWESNGqPENnYK

AKGQPREPQVYTLPPSR

LREYYDQTAQMcc

LPmGPSPPAEGSTGDEPK

ScSVMHEALHNHYTQK

FNWYVDGVEVHnAK

PMGPSPPAEGSTGDEPK

SMAPGAVHLPqPVSTR

SMAPGAVHLPQ

LPMGPSPPAEGSTGDEPK

10

20

【 0 3 5 5 】

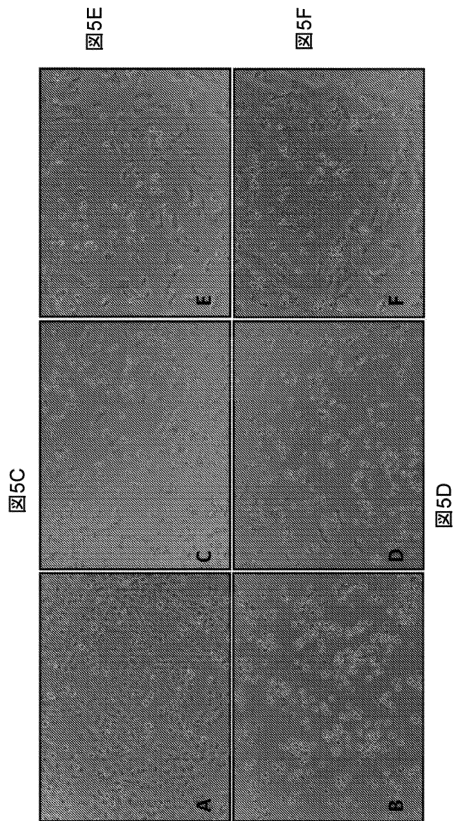
本発明をその具体的な実施形態と併せて記載してきたが、多くの変更、修正および変形が当業者に明らかであることが明白である。したがって、添付の特許請求の範囲の精神および広範な範囲に入る全てのこのような変更、修正および変形を包含することを意図している。

30

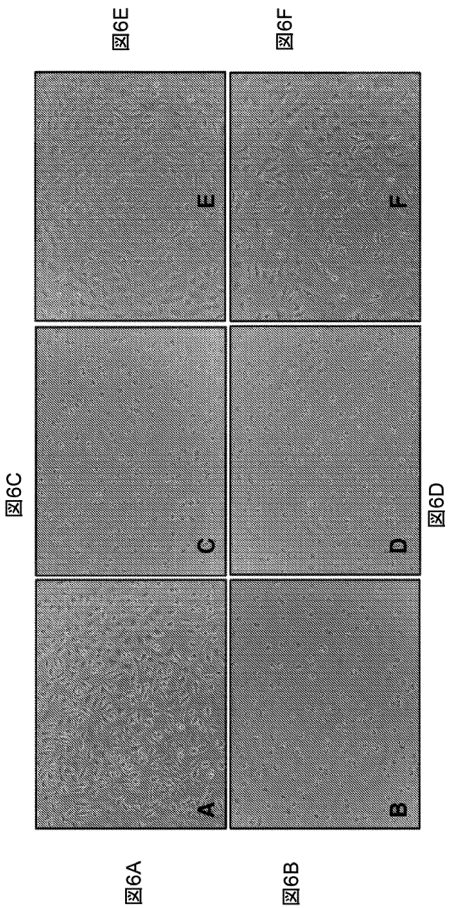
【 0 3 5 6 】

本明細書で言及される全ての刊行物、特許および特許出願は、あたかも各個々の刊行物、特許または特許出願が参照により本明細書に組み込まれることが具体的かつ個別的に示されているのと同程度に参照により全体が明細書に組み込まれる。さらに、本明細書でのいずれの参考文献の引用または同定も、このような参考文献が本発明に対する先行技術として利用可能であることの自認と解釈すべきでない。節の見出しが使用されるという点で、これらの見出しを必然的に限定的と解釈すべきでない。

【図 5 - 1】



【図 6 - 1】



【図 5 - 2】

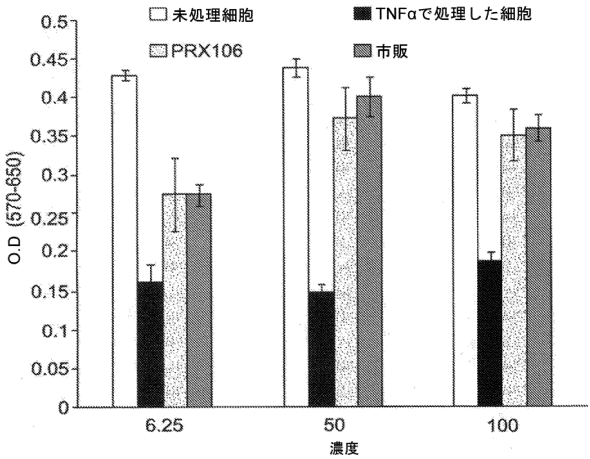


図5G

【図 6 - 2】

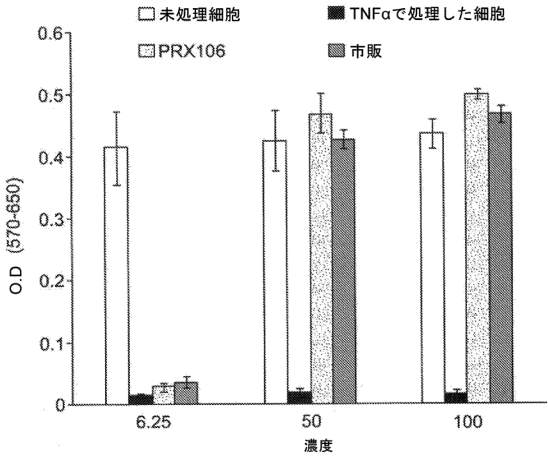
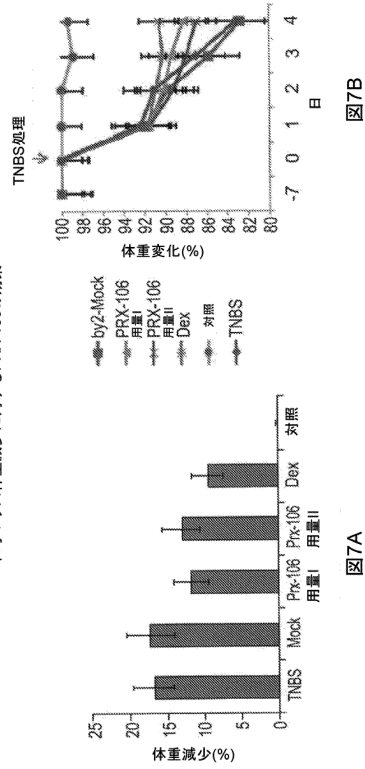


図6G

【図 7】

平均マウス体重減少に対するPRX-106の効果



【図 9】

結腸損傷の肉眼的スコア化

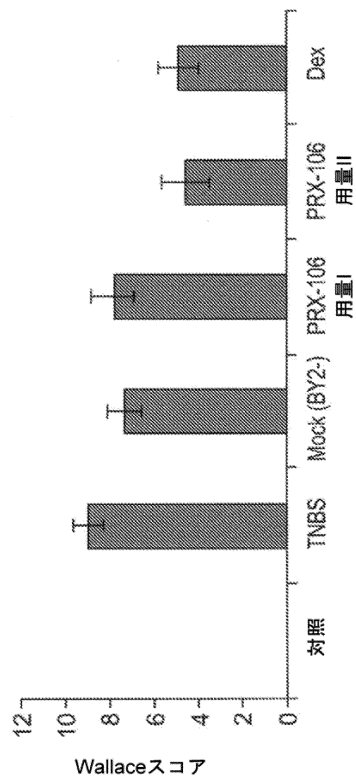


図9

【図 8】

結腸長

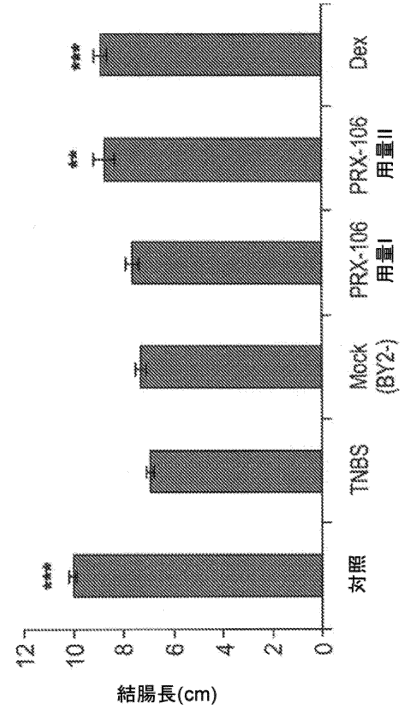
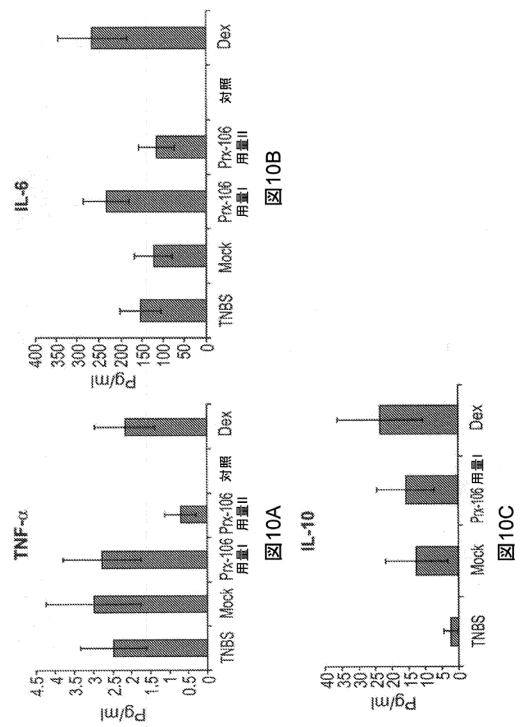
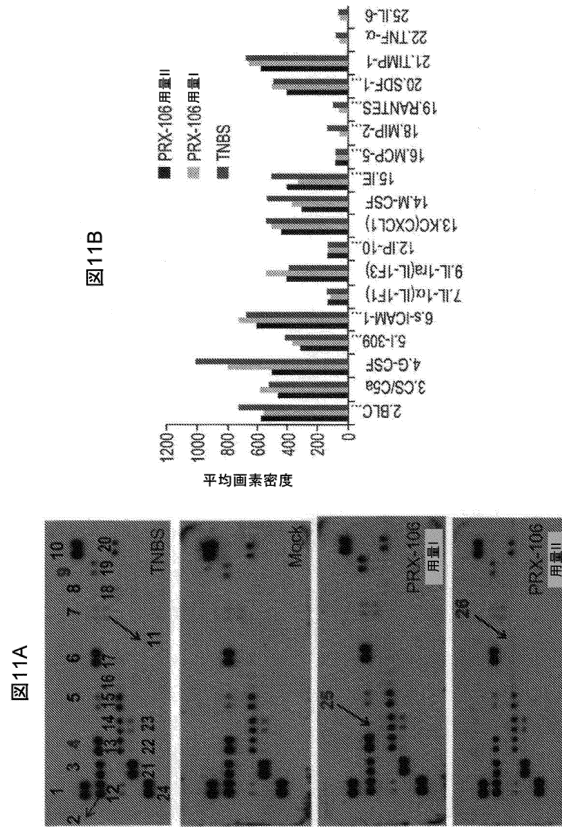


図8

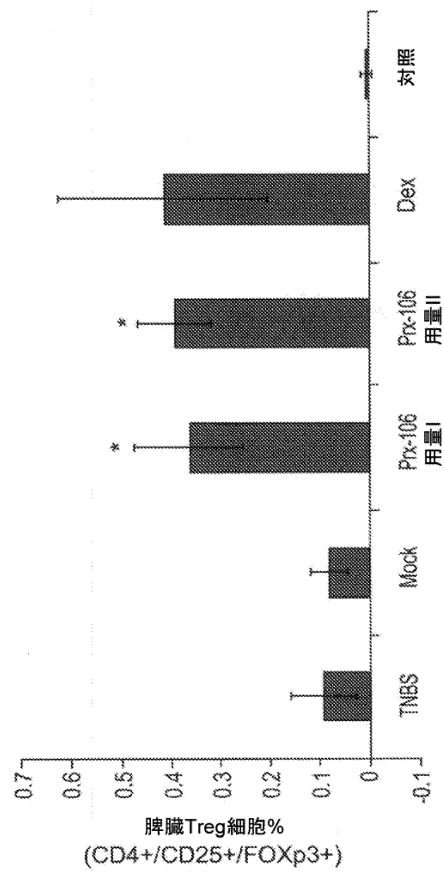
【図 10】



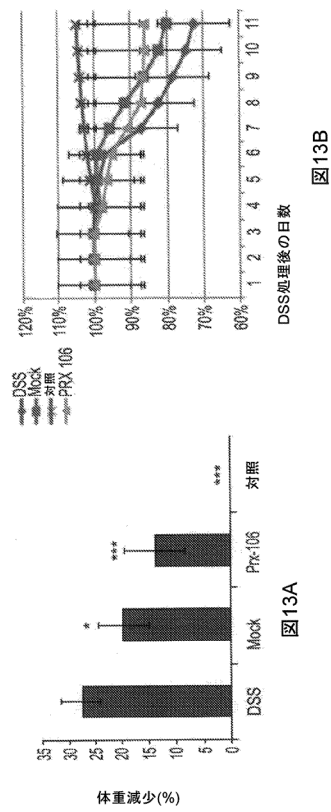
【図 1 1】



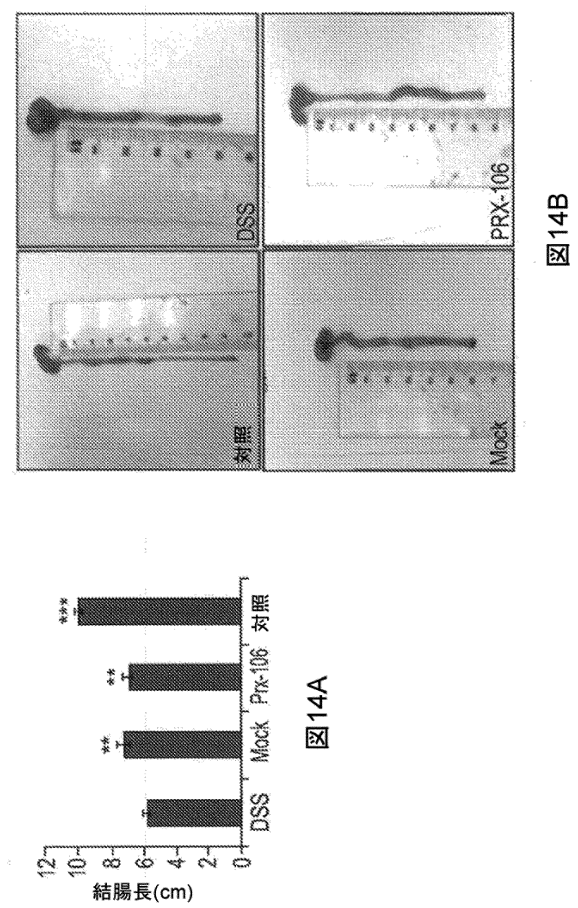
【図 1 2】



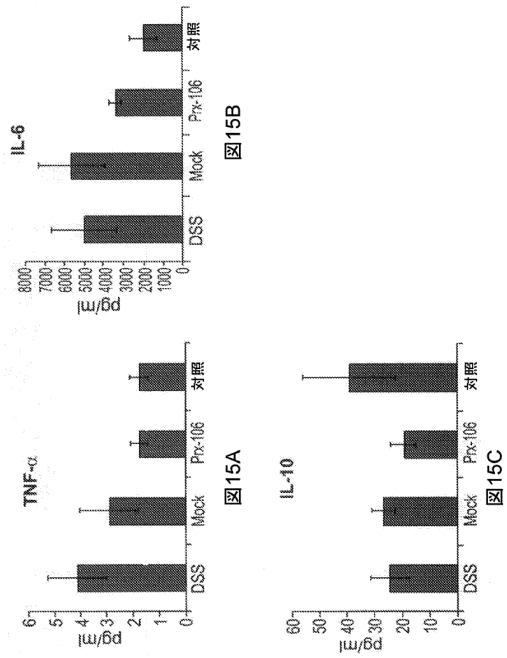
【図 1 3】



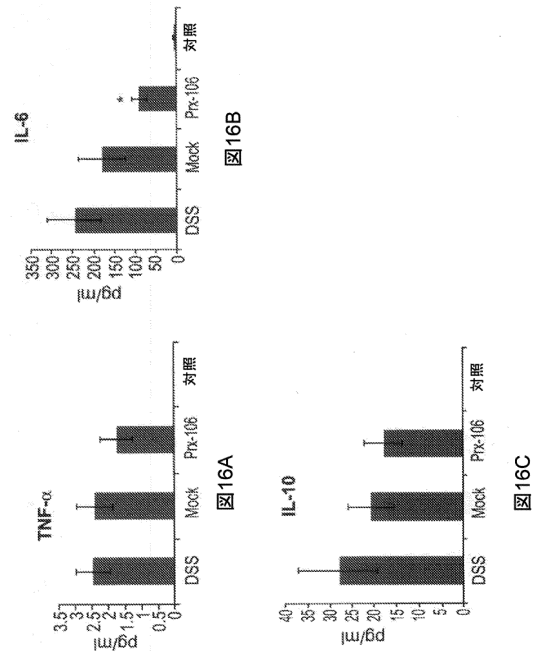
【図 1 4】



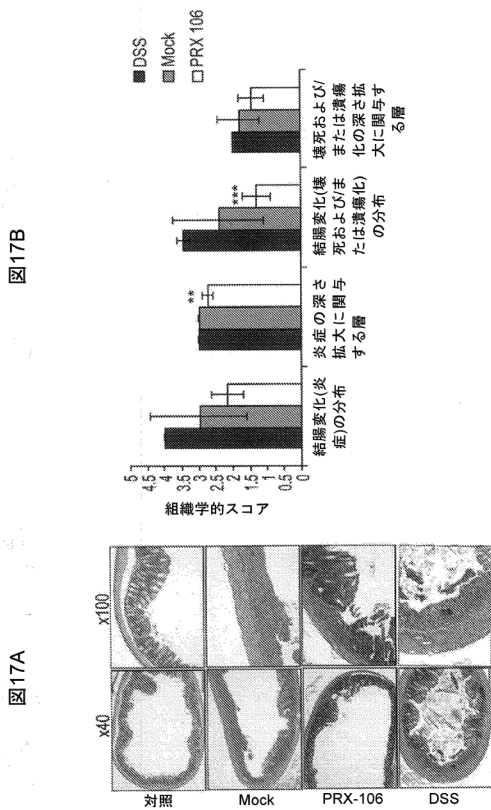
【図15】



【図16】



【図17】



【図18】

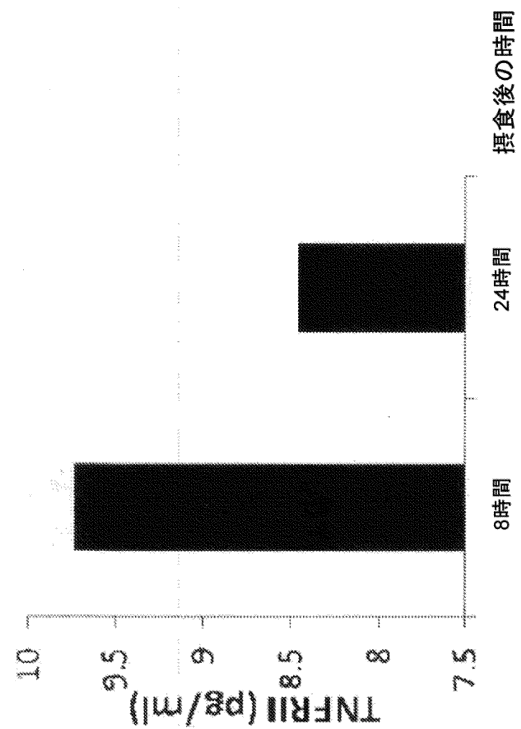


図18

【図 19】

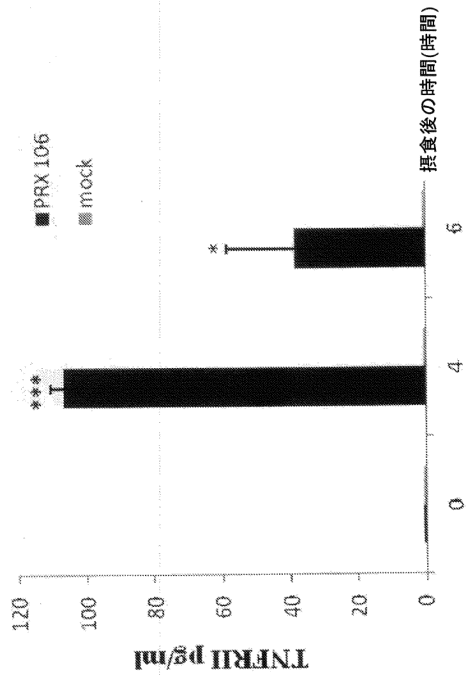


図19

C カルバミドマタリ(C)
D 脱アミド化(Q,N)
O 酸化(M)

【図 20】

1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101
1	MATORRAPS SULLITVSL LVAIVISALPA QVHETPYARE POSTORREY YODIADQGS KCSPOHAY FCIKTSOTYC DSCGISTYQ LUNWTECLS CGRCSDDV									
111	C	DD	C	C	C	C	C	C	C	C
	ETQACQEN RYTORRQY CALSODGOL LKWLKQOP GEFARFSTE TSDVCKPCA POTENITSS TDICRPHQIC NWVA PQGAS MCAVJSTSP TSMJGKTH									
221	D	D	D	O	C	C	C	C	O	C
	LPQVNSTRO HQYTFREFT APSTRELPW GSPFAEGST GDEPKGKAT HTDPCPCARE LLQOSVIFL PPKAQTLMI SRTPENTOW VOISHEPELV KFWWJQDIE									
331	D	DD	D	D	C	D	D	O	DD	C
	VHNKTPARE EQNSTYRW SULTLHQQW LNETCKVYK SNALAPAE TTISKAGOP REPQVILPP GREEMYNQW SLTQVQRY PSDIAJQVES HQPEVNYAT									
441	DD C O D D									
	TPPYLDQDS FELYSKLYD TSQKQONIF SCSNHNEH WYTKNSLSL SPHSEKDE									

図20

【配列表】

0006454650000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	C 0 7 K	14/705	
A 6 1 K	38/17	(2006.01)	A 6 1 K	38/17	
A 6 1 K	36/81	(2006.01)	A 6 1 K	36/81	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	15/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/08	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/00	
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
			A 6 1 P	3/00	
			A 6 1 P	21/04	

- (72)発明者 ハナニア ユーリ
イスラエル国, 2 1 9 9 0 3 4 カルミエル, シュデマ ストリート 1 1 0 / 2
- (72)発明者 キズナー タリ
イスラエル国, 2 0 1 7 0 0 0 ドアー - ナ ミスガフ, イシュフ アツモン - セゲフ, ドゥチフ
ァト ストリート 3 7 3
- (72)発明者 アリエル タミ
イスラエル国, 2 0 1 7 9 0 0 ミスガフ, マノフ ストリート 7
- (72)発明者 ジンジス - ヴェリツキ スヴェトラーナ
イスラエル国, 2 6 0 3 6 0 0 キルヤト - モツキン, ナオミ シェメル ストリート 8 / 6

審査官 福澤 洋光

- (56)参考文献 特表2007-520196(JP, A)
国際公開第2012/098537(WO, A1)
国際公開第2012/125720(WO, A1)
特表2006-518601(JP, A)
Head-to-tail fusions of camelid antibodies can be expressed in planta and bind in rumen fluid., Biotechnol Appl Biochem., 2009年, Vol.53, p.111-122

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0

C07K 1/00 - 19/00

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

UniProt/GeneSeq

PubMed