

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-543483

(P2013-543483A)

(43) 公表日 平成25年12月5日(2013.12.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00 ZNA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B064
C12P 21/02 (2006.01)	C12P 21/02 C	4B065
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 D	4C084
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 39/395 N	4C085

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 113 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-521984 (P2013-521984)
 (86) (22) 出願日 平成23年7月28日 (2011.7.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年2月26日 (2013.2.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/045768
 (87) 国際公開番号 WO2012/016073
 (87) 国際公開日 平成24年2月2日 (2012.2.2)
 (31) 優先権主張番号 61/368,465
 (32) 優先日 平成22年7月28日 (2010.7.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510089111
 グリックニック インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国, メリーランド州 212
 01, ボルティモア, スイート 501エ
 ー, ウェスト バルティモア ストリート
 801
 (74) 代理人 100079108
 弁理士 稲葉 良幸
 (74) 代理人 100109346
 弁理士 大貫 敏史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 規則的に多量体化された免疫グロブリンFc組成物を作製するための天然ヒトタンパク質断片の融合タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、免疫グロブリンFcの一連の完全な組換え型多量体化形態に関し、該多量体化形態は、免疫細胞受容体に多価の免疫グロブリンFcを提示する。融合タンパク質は、ホモ二量体画分、およびストラドマーと呼ばれる高次多量体画分の両方として存在する。ホモ二量体の画分と比較して、精製された多量体ストラドマーは、FcRに対する、より高い親和性および結合活性、ならびに遅い解離を有し、疾患の治療および予防において有用である。本発明は、IgG1 Fc領域と多量体化ドメインを直接結合させることにより、多量体化および生物活性の強化をもたらすことを実証する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) リーダー配列；
- (b) I g G 1 F c 領域；および
- (c) 多量体化ドメイン；

を含むストラドマー単位であって、前記リーダー配列が前記 I g G 1 F c 領域に直接結合し、および前記 I g G 1 F c 領域が前記多量体化ドメインに直接結合しているか、または前記リーダー配列が前記多量体化ドメインに結合し、および前記多量体化ドメインが前記 I g G 1 F c 領域に直接結合している、ストラドマー単位。

【請求項 2】

前記 I g G 1 F c 領域のアミノ酸配列が、配列番号 2 と少なくとも 80% の同一性を有する、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

【請求項 3】

前記 I g G 1 F c 領域のアミノ酸配列が、配列番号 2 と少なくとも 90% の同一性を有する、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

【請求項 4】

前記 I g G 1 F c 領域のアミノ酸配列が、配列番号 2 と少なくとも 95% の同一性を有する、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

【請求項 5】

前記 I g G 1 F c 領域のアミノ酸配列が、配列番号 2 と少なくとも 99% の同一性を有する、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

【請求項 6】

前記多量体化ドメインが、I g G 2 a ヒンジ、イソロイシンジッパー、および G P P ドメインから成る群から選択され、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することが出来る、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

【請求項 7】

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 3 と少なくとも 80% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

【請求項 8】

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 3 と少なくとも 90% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

【請求項 9】

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 3 と少なくとも 95% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

【請求項 10】

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 3 と少なくとも 99% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

【請求項 11】

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 3 と少なくとも 80% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

【請求項 12】

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 5 と少なくとも 90% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 5 と少なくとも 95% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

【請求項 14】

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 5 と少なくとも 99% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

【請求項 15】

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 26 と少なくとも 80% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

【請求項 16】

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 26 と少なくとも 90% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

【請求項 17】

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 26 と少なくとも 95% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

【請求項 18】

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 26 と少なくとも 99% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

【請求項 19】

前記多量体化ドメインが、前記 IgG1 Fc 領域のカルボキシ末端に直接結合している、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

【請求項 20】

前記多量体化ドメインが、前記 IgG1 Fc 領域のアミノ末端に直接結合している、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

【請求項 21】

前記ストラドマー単位が配列番号 4、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 27、または配列番号 28 を含む、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

【請求項 22】

前記多量体化ドメインが、前記ストラドマー単位の多量体を生成する、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

【請求項 23】

前記ストラドマー単位の多量体が高次多量体である、請求項 22 に記載のストラドマー単位。

【請求項 24】

前記多量体が、全ストラドマー組成物の少なくとも約 45% の割合で存在する、請求項 23 に記載のストラドマー単位を含むストラドマー組成物。

【請求項 25】

前記多量体が、全ストラドマー組成物の少なくとも約 55% の割合で存在する、請求項 23 に記載のストラドマー単位を含むストラドマー組成物。

【請求項 26】

前記多量体が、全ストラドマー組成物の少なくとも約 65% の割合で存在する、請求項 23 に記載のストラドマー単位を含むストラドマー組成物。

【請求項 27】

前記多量体が、全ストラドマー組成物の少なくとも約 70% の割合で存在する、請求項 23 に記載のストラドマー単位を含むストラドマー組成物。

10

20

30

40

50

- 【請求項 28】
前記多量体が、全ストラドマー組成物の少なくとも約73%の割合で存在する、請求項23に記載のストラドマー単位を含むストラドマー組成物。
- 【請求項 29】
前記 IgG1 Fc領域が FcRn、DC-SIGN、SIGN-R1またはFcRに結合することが出来る、請求項1に記載のストラドマー単位。
- 【請求項 30】
前記 FcRが FcRIIIaである、請求項1に記載のストラドマー単位。
- 【請求項 31】
少なくとも2つの請求項1に記載のストラドマー単位を含む、クラスターストラドマー 10
- 【請求項 32】
前記ストラドマーが FcRIIIaに結合する、請求項31に記載のクラスターストラドマー。
- 【請求項 33】
免疫応答を対象において調節する方法であって、前記方法が、前記対象に、有効量の請求項31に記載のクラスターストラドマーを投与することを含む、方法。
- 【請求項 34】
前記調節が樹状細胞上でのCD86の誘導を含む、請求項33に記載の方法。
- 【請求項 35】
前記調節が樹状細胞上でのCD1a発現の阻害を含む、請求項33に記載の方法。 20
- 【請求項 36】
炎症性疾患を、それを必要とする対象において治療する方法であって、前記方法が、有効量の請求項31に記載のクラスターストラドマーを投与することを含む、方法。
- 【請求項 37】
前記炎症性疾患が自己免疫疾患である、請求項36に記載の方法。
- 【請求項 38】
前記自己免疫疾患が、関節炎、多発性硬化症、I型糖尿病、自己免疫性甲状腺炎、特発性血小板減少性紫斑病、慢性炎症性多発神経炎、強皮症、自己免疫性ブドウ膜炎、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、およびアトピー性皮膚炎から成る群から選択される、請求項37に記載の方法。 30
- 【請求項 39】
前記自己免疫疾患が、提供者から受容者への臓器移植に関連する、請求項37に記載の方法。
- 【請求項 40】
前記炎症性疾患が感染症である、請求項36に記載の方法。
- 【請求項 41】
前記感染症が細菌感染症である、請求項36に記載の方法。
- 【請求項 42】
前記感染症がウイルス感染症である、請求項36に記載の方法。 40
- 【請求項 43】
前記クラスターストラドマーを、静脈内、皮下、経口、腹腔内、舌下、頬側、経皮、皮下移植により、または筋肉内に投与する、請求項36に記載の方法。
- 【請求項 44】
前記クラスターストラドマーを静脈内に投与する、請求項36に記載の方法。
- 【請求項 45】
前記クラスターストラドマーを、約0.1mg/kg~約1000mg/kgの用量で投与する、請求項36に記載の方法。
- 【請求項 46】
前記クラスターストラドマーを、約1mg/kg~約25mg/kgの用量で投与する 50

、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 47】

in vitro または *ex vivo* アッセイにおいて抗体の非特異的結合を阻止する方法であって、前記方法が、標的組織または標的細胞を、有効量の請求項 31 に記載のクラスターストラドマーを含む組成物とともにインキュベートすることを含む、方法。

【請求項 48】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 50】

前記 *in vitro* または *ex vivo* アッセイが、免疫組織化学、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、または免疫蛍光アッセイである、請求項 47 に記載の方法。

10

【請求項 51】

組成物中の内毒素レベルを減少させる方法であって、前記方法が、有効量の請求項 31 に記載のクラスターストラドマーで、組成物を処理することを含む、方法。

【請求項 52】

前記クラスターストラドマーが、前記組成物中の前記内毒素と複合する、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

前記組成物から前記ストラドマーが複合した内毒素を除去することをさらに含む、請求項 51 に記載の方法。

20

【請求項 54】

前記ストラドマーが複合した内毒素を、前記組成物から濾過により除去する、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

前記組成物が医薬組成物である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 56】

クラスターストラドマーの生産方法であって、前記方法が、配列番号 4、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 28、配列番号 24、および配列番号 27 から成る群から選択される配列を、宿主中で発現させることを含む、方法。

30

【請求項 57】

請求項 56 に記載の方法であって、以下をさらに含む、方法：

配列番号 4、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 28、配列番号 24、および配列番号 27 から成る群から選択されるストラドマーをコードする DNA を、発現ベクター中にクローニングすること；

(b) 前記発現ベクターを細菌宿主中に形質移入すること；

(c) クローン化された DNA を含むプラスミド DNA を細菌培養物から単離すること；

(d) 前記クローン化された DNA を含むプラスミド DNA を直線化すること；

40

(e) 直線化された DNA を哺乳類の細胞中に形質移入すること；

(f) 安定に形質移入された細胞のプールを得るために、陽性に形質移入された細胞を増殖させること；

(g) ストラドマータンパク質を培地から収集すること；

(h) 前記ストラドマータンパク質を精製すること；ここで前記ストラドマータンパク質は外来性配列を含まない。

【請求項 58】

前記発現ベクターが選択可能なマーカーを含む、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

前記選択可能なマーカーが、抗生物質耐性遺伝子である、請求項 58 に記載の方法。

50

- 【請求項 6 0】
前記抗生物質耐性遺伝子が、ネオマイシン耐性遺伝子である、請求項 5 9 に記載の方法。
- 【請求項 6 1】
前記哺乳類の細胞が CHO 細胞または HEK 2 9 3 細胞である、請求項 5 7 に記載の方法。
- 【請求項 6 2】
前記ストラドマータンパク質が、アフィニティークロマトグラフィーにより精製される、請求項 5 7 に記載の方法。
- 【請求項 6 3】 10
前記ストラドマーを、イオン交換クロマトグラフィーによりさらに精製する、請求項 6 2 に記載の方法。
- 【請求項 6 4】
追加の薬剤的に活性な薬剤を投与することをさらに含む、請求項 3 6 に記載の方法。
- 【請求項 6 5】
前記追加の薬剤的に活性な薬剤が、ステロイド、モノクローナル抗体、抗生物質、および抗ウイルス薬、サイトカイン、または他の方法により免疫調節物質として作用し得る薬剤を含む、請求項 6 4 に記載の方法。
- 【請求項 6 6】 20
前記ステロイドが、プレドニゾロン、コルチゾン、モメタゾン、テストステロン、エストロゲン、オキサンドロロン、フルチカゾン、ブデソニド、ベクロメタゾン、アルブテロール、またはレバルブテロール (levalbuterol) である、請求項 6 5 に記載の方法。
- 【請求項 6 7】
前記追加の薬剤的に活性な薬剤および前記クラスターストラドマーが、治療的相乗効果を示す、請求項 6 4 ~ 6 6 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 6 8】
前記 IgG 1 Fc 領域が、IgG 1 ヒンジドメインを欠く、請求項 1 に記載のストラドマー単位。
- 【請求項 6 9】 30
前記 IgG 1 Fc が、配列番号 1 9 の IgG 1 CH 2 および IgG 1 CH 3 ドメインから成る、請求項 1 に記載のストラドマー単位。
- 【請求項 7 0】
以下を含む、ストラドマー単位：
(a) リーダー配列；および
(b) 以下を含む Fc 領域：
(1) 配列番号 3 の IgG 2 ヒンジドメイン；および
(2) 配列番号 1 9 の IgG 1 の CH 2 および CH 3 ドメイン。
- 【請求項 7 1】 40
前記 IgG 2 ヒンジドメインが、前記ストラドマー単位の多量体を生成する、請求項 7 0 に記載のストラドマー単位。
- 【請求項 7 2】
配列番号 1 8 と、少なくとも 8 0 % の相同性を有する、請求項 7 0 に記載のストラドマー単位。
- 【請求項 7 3】
配列番号 1 8 と、少なくとも 9 0 % の相同性を有する、請求項 7 0 に記載のストラドマー単位。
- 【請求項 7 4】
配列番号 1 8 と、少なくとも 9 5 % の相同性を有する、請求項 7 0 に記載のストラドマー単位。
- 【請求項 7 5】 50

配列番号 18 と、少なくとも 99 % の相同性を有する、請求項 70 に記載のストラドマー単位。

【請求項 76】

前記 IgG1 Fc 領域が、FcRn、DC-SIGN、SIGN-R1 または FcR と結合することが出来る、請求項 69 に記載のストラドマー単位。

【請求項 77】

前記 Fc R が Fc RIIIIa である、請求項 76 に記載のストラドマー単位。

【請求項 78】

少なくとも 2 つの、請求項 70 に記載のストラドマー単位を含む、クラスターストラドマー。

10

【請求項 79】

前記ストラドマーが Fc RIIIIa と結合する、請求項 78 に記載のクラスターストラドマー。

【請求項 80】

免疫応答を対象において調節する方法であって、前記方法が、前記対象に、有効量の請求項 78 に記載のクラスターストラドマーを投与することを含む、方法。

【請求項 81】

前記調節が、樹状細胞上での CD86 の誘導を含む、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 82】

前記調節が、樹状細胞上での CD1a 発現の阻害を含む、請求項 80 に記載の方法。

20

【請求項 83】

炎症性疾患を、それを必要とする対象において治療する方法であって、前記方法が、有効量の請求項 31 に記載のクラスターストラドマーを投与することを含む、方法。

【請求項 84】

前記炎症性疾患が自己免疫疾患である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 85】

前記自己免疫疾患が、関節炎、多発性硬化症、I型糖尿病、自己免疫性甲状腺炎、特発性血小板減少性紫斑病、慢性炎症性多発神経炎、強皮症、自己免疫性ブドウ膜炎、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、およびアトピー性皮膚炎から成る群から選択される、請求項 84 に記載の方法。

30

【請求項 86】

前記自己免疫疾患が、提供者から受容者への臓器移植に関連する、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 87】

前記炎症性疾患が感染症である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 88】

前記感染症が細菌感染症である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 89】

前記感染症がウイルス感染症である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 90】

前記クラスターストラドマーを、静脈内、皮下、経口、腹腔内、舌下、頬側、経皮、皮下移植により、または筋肉内に投与する、請求項 83 に記載の方法。

40

【請求項 91】

前記クラスターストラドマーを静脈内に投与する、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 92】

前記クラスターストラドマーを、約 0.1 mg/kg ~ 約 1000 mg/kg の用量で投与する、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 93】

前記クラスターストラドマーを、約 1 mg/kg ~ 約 25 mg/kg の用量で投与する、請求項 83 の方法。

50

- 【請求項 9 4】
in vitro または *ex vivo* アッセイにおいて抗体の非特異的結合を阻止する方法であって、前記方法が、標的組織または標的細胞を、有効量の請求項 7 8 に記載のクラスターストラドマーを含む組成物とともに、インキュベートすることを含む、方法。
- 【請求項 9 5】
 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 9 4 に記載の方法。
- 【請求項 9 6】
 前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 9 4 に記載の方法。
- 【請求項 9 7】
 前記 *in vitro* または *ex vivo* アッセイが、免疫組織化学、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、または免疫蛍光アッセイである、請求項 9 4 に記載の方法。 10
- 【請求項 9 8】
 組成物中の内毒素レベルを減少させる方法であって、前記方法が、有効量の請求項 7 8 に記載のクラスターストラドマーで、前記組成物を処理することを含む、方法。
- 【請求項 9 9】
 前記クラスターストラドマーが、前記組成物中の前記内毒素と複合する、請求項 9 8 に記載の方法。
- 【請求項 1 0 0】
 前記ストラドマーが複合した内毒素を、前記組成物から除去することをさらに含む、請求項 9 8 に記載の方法。 20
- 【請求項 1 0 1】
 前記ストラドマーが複合した内毒素を、前記組成物から濾過により除去する、請求項 1 0 0 に記載の方法。
- 【請求項 1 0 2】
 前記組成物が医薬組成物である、請求項 1 0 0 に記載の方法。
- 【請求項 1 0 3】
 追加の薬剤的に活性な薬剤を投与することをさらに含む、請求項 8 3 に記載の方法。
- 【請求項 1 0 4】
 前記追加の薬剤的に活性な薬剤が、ステロイド、モノクローナル抗体、抗生物質、および抗ウイルス薬、サイトカイン、または他の方法により免疫調節物質として作用し得る薬剤を含む、請求項 1 0 3 に記載の方法。 30
- 【請求項 1 0 5】
 前記ステロイドが、プレドニゾロン、コルチゾン、モメタゾン、テストステロン、エストロゲン、オキサンドロロン、フルチカゾン、ブデソニド、ベクロメタゾン、アルブテロール、またはレバルブテロール (levalbuterol) である、請求項 1 0 4 に記載の方法。
- 【請求項 1 0 6】
 前記 I g G 1 F c 領域が、1 つまたは複数の変異を含む、請求項 1 に記載のストラドマー単位。
- 【請求項 1 0 7】
 配列番号 2 0、配列番号 2 1、または配列番号 2 4 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 0 6 に記載のストラドマー単位。 40
- 【請求項 1 0 8】
 配列番号 2 0 と少なくとも約 8 0 % の相同性を有する、請求項 1 0 7 に記載のストラドマー単位。
- 【請求項 1 0 9】
 配列番号 2 0 と少なくとも約 9 0 % の相同性を有する、請求項 1 0 7 に記載のストラドマー単位。
- 【請求項 1 1 0】
 配列番号 2 0 と少なくとも約 9 5 % の相同性を有する、請求項 1 0 7 に記載のストラド 50

マー単位。

【請求項 1 1 1】

配列番号 2 0 と少なくとも約 9 9 % の同一性を有する、請求項 1 0 7 に記載のストラドマー単位。

【請求項 1 1 2】

配列番号 2 1 と少なくとも約 8 0 % の同一性を有する、請求項 1 0 7 に記載のストラドマー単位。

【請求項 1 1 3】

配列番号 2 1 と少なくとも約 9 0 % の同一性を有する、請求項 1 0 7 に記載のストラドマー単位。

10

【請求項 1 1 4】

配列番号 2 1 と少なくとも約 9 5 % の同一性を有する、請求項 1 0 7 に記載のストラドマー単位。

【請求項 1 1 5】

配列番号 2 1 と少なくとも約 9 9 % の同一性を有する、請求項 1 0 7 に記載のストラドマー単位。

【請求項 1 1 6】

配列番号 2 4 と少なくとも約 8 0 % の同一性を有する、請求項 1 0 7 に記載のストラドマー単位。

【請求項 1 1 7】

配列番号 2 4 と少なくとも約 9 0 % の同一性を有する、請求項 1 0 7 に記載のストラドマー単位。

20

【請求項 1 1 8】

配列番号 2 4 と少なくとも約 9 5 % の同一性を有する、請求項 1 0 7 に記載のストラドマー単位。

【請求項 1 1 9】

配列番号 2 4 と少なくとも約 9 9 % の同一性を有する、請求項 1 0 7 に記載のストラドマー単位。

【請求項 1 2 0】

前記 I g G 1 F c 領域が、F c R n、D C - S I G N、S I G N - R 1 または F c R と結合することが出来る、請求項 1 0 7 に記載のストラドマー単位。

30

【請求項 1 2 1】

前記 F c R が F c R I I I a である、請求項 1 2 0 に記載のストラドマー単位。

【請求項 1 2 2】

少なくとも 2 つの請求項 1 0 7 に記載のストラドマー単位を含む、クラスターストラドマー。

【請求項 1 2 3】

前記ストラドマーが F c R I I I a と結合する、請求項 1 2 2 に記載のクラスターストラドマー。

【請求項 1 2 4】

免疫応答を対象において調節する方法であって、前記方法が、前記対象に、有効量の請求項 1 2 2 に記載のクラスターストラドマーを投与することを含む、方法。

40

【請求項 1 2 5】

前記調節が、樹状細胞上での C D 8 6 の誘導を含む、請求項 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記調節が、樹状細胞上での C D 1 a 発現の阻害を含む、請求項 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

炎症性疾患を、それを必要とする対象において治療する方法であって、前記方法が、有効量の請求項 1 2 2 に記載のクラスターストラドマーを投与することを含む、方法。

【請求項 1 2 8】

50

前記炎症性疾患が自己免疫疾患である、請求項 1 2 7 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記自己免疫疾患が、関節炎、多発性硬化症、I 型糖尿病、自己免疫性甲状腺炎、特発性血小板減少性紫斑病、慢性炎症性多発神経炎、強皮症、自己免疫性ブドウ膜炎、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、およびアトピー性皮膚炎から成る群から選択される、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記自己免疫疾患が、提供者から受容者への臓器移植に関連する、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記炎症性疾患が感染症である、請求項 1 2 7 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

前記感染症が細菌感染症である、請求項 1 2 7 に記載の方法

【請求項 1 3 3】

前記感染症がウイルス感染症である、請求項 1 2 7 に記載の方法

【請求項 1 3 4】

前記クラスターストラドマーを、静脈内、皮下、経口、腹腔内、舌下、頬側、経皮、皮下移植により、または筋肉内に投与する、請求項 1 2 7 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記クラスターストラドマーを、静脈内に投与する、請求項 1 2 7 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

前記クラスターストラドマーを、約 0 . 1 m g / k g ~ 約 1 0 0 0 m g / k g の用量で投与する、請求項 1 2 7 に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

前記クラスターストラドマーを、約 1 m g / k g ~ 約 2 5 m g / k g の用量で投与する、請求項 1 2 7 に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

in vitro または *ex vivo* アッセイにおいて抗体の非特異的結合を阻止する方法であって、前記方法が、標的組織または標的細胞を、有効量の請求項 1 2 2 に記載のクラスターストラドマーを含む組成物とともにインキュベートすることを含む、方法。

【請求項 1 3 9】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 3 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 0】

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 1 3 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

前記 *in vitro* または *ex vivo* アッセイが、免疫組織化学、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、または免疫蛍光アッセイである、請求項 1 3 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

組成物中の内毒素レベルを減少させる方法であって、前記方法が、有効量の請求項 1 2 2 に記載のクラスターストラドマーで、前記組成物を処理することを含む、方法。

【請求項 1 4 3】

前記クラスターストラドマーが、前記組成物中の前記内毒素と複合する、請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

前記ストラドマーが複合した内毒素を前記組成物から除去することをさらに含む、請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

前記ストラドマーが複合した内毒素を、前記組成物から濾過により除去する、請求項 1 4 4 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 4 6】

前記組成物が医薬組成物である、請求項 1 4 4 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

追加の薬剤的に活性な薬剤を投与することをさらに含む、請求項 1 2 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

前記追加の薬剤的に活性な薬剤が、ステロイド、モノクローナル抗体、抗生物質、および抗ウイルス薬、サイトカイン、または他の方法により免疫調節物質として作用し得る薬剤を含む、請求項 1 4 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

前記ステロイドが、プレドニゾロン、コルチゾン、モメタゾン、テストステロン、エストロゲン、オキサンドロロン、フルチカゾン、ブデソニド、ベクロメタゾン、アルブテロール、またはレバルブテロール (levalbuterol) である、請求項 1 4 8 に記載の方法。

10

【請求項 1 5 0】

前記リーダー配列が切断されている、請求項 1、6 9 または 1 0 6 のうちのいずれか 1 項に記載のストラドマー単位。

【請求項 1 5 1】

以下を含むストラドマー単位：(a) I g G 1 F c 領域；および (b) 多量体化ドメイン；ここで前記 I g G 1 F c 領域は、前記多量体化ドメインに直接結合している。

【請求項 1 5 2】

前記 I g G 1 F c 領域が、配列番号 2 または配列番号 1 9 を含む、請求項 1 5 1 に記載のストラドマー単位。

20

【請求項 1 5 3】

前記 I g G 1 F c 領域が、少なくとも 1 つのアミノ酸変異を含む、請求項 1 5 1 に記載のストラドマー単位。

【請求項 1 5 4】

前記多量体化ドメインが、配列番号 3、配列番号 5、および配列番号 2 6 から成る群から選択される、請求項 1 5 1 に記載のストラドマー単位。

【請求項 1 5 5】

少なくとも 2 つの、請求項 1 5 1 ~ 1 5 4 のうちのいずれか 1 項に記載のストラドマー単位を含む、クラスターストラドマー。

30

【請求項 1 5 6】

配列番号 4、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 8、配列番号 2 4、および配列番号 2 7 のストラドマー単位をコードする核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願への相互参照

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、2 0 1 1 年 7 月 2 8 日に
出願された米国特許仮出願第 6 1 / 3 6 8 , 4 6 5 号に基づく優先権を主張する。

40

【0 0 0 2】

電子的に提出された文書ファイルの説明

電子的に提出された文書ファイルの内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる：コンピューターで読み取り可能なフォーマットの配列表のコピー（ファイル名：G L I K _ 0 0 6 _ 0 1 U S _ S e q L i s t _ S T 2 5 . t x t、記録日時：2 0 1 1 年 7 月 2 6 日、ファイルサイズ 6 1 キロバイト）。

【0 0 0 3】

本発明は、一般的には、免疫学、自己免疫、炎症、および腫瘍免疫学の分野に関する。より詳細には、本発明は、天然に結合している免疫グロブリン F c 領域を含む生物学的に活性な生物模倣型分子、そのような生物模倣体を含む組成物、およびそのような生物模倣

50

体の作製および使用方法に関する。

【0004】

本発明はまた、リンパ球、NK細胞、単球由来の細胞、および単球由来の細胞と相互作用する免疫細胞を介した病理学的状態の治療および予防に関し、より詳細には、そのような治療および予防のための、結合したIgG Fc断片の安定化した機能的部分の使用に関する。

【背景技術】

【0005】

ヒト血漿由来の免疫グロブリン製品は、1950年代初期から、免疫不全症を治療するために使用されており、最近では、自己免疫疾患および炎症性疾患の治療のために、より一般的に使用されている。

10

【0006】

初期には、免疫グロブリン製品は、筋肉内注射により投与されていた。最近では、静脈内免疫グロブリン(hIVIg)が使用されており、当初は、自己免疫疾患である特発性血小板減少性紫斑病(ITP)の治療において有効であるとみられていた(Lmbach P, Barandun S, d'Apuzzo V, et al: High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. Lancet 1981 Jun 6; 1(8232): 1228-31)。ヒトIVIg(本明細書においては「hIVIg」と呼ぶ)は、一般に95%を超える無修飾IgGと、ごく少量かつ可変量の免疫グロブリンA(IgA)または免疫グロブリンM(IgM)を含むプールされたヒト血漿から製造される、無菌の、精製免疫グロブリンG(IgG)生成物の製剤である(例えば、Rutter A, Luger TA: High-dose intravenous immunoglobulins: an approach to treat severe immune-mediated and autoimmune diseases of the skin. J Am Acad Dermatol 2001 Jun; 44(6): 1010-24を参照のこと)。現在、hIVIgの1つの最も一般的な臨床使用は、慢性炎症性脱髄性多発神経炎の治療におけるものである。

20

【0007】

hIVIgが有効な臨床的治療であったが、hIVIg治療に対しては、滅菌が不十分である可能性、ウイルスおよびプリオンを含む不純物または感染病原体の存在、このプールされたヒト血液製品の入手可能性の不足、ロットごとの差異、高いコスト、腎機能に影響を与える大きなタンパク質負荷、ならびに一般的に長時間の、時には毎月連続した2日間に渡る長期の投与期間を含む、いくつかの欠点がある。とりわけ、hIVIg製剤はその免疫グロブリンA(IgA)含有量が大きく変化し得、このことは、IgAが欠乏している受容者においてはアレルギーおよびアナフィラキシー反応の原因となり得るため、懸念され得る。hIVIgの否定的な局面を鑑みて、自己免疫および炎症性疾患の治療のための改善された手段が必要であり、とりわけ、少なくとも、同等の有効性、より大きな作用強度、より短い投与時間、およびより高い純度を有する、組換えにより製造される製品の豊富な原料が必要である。

30

【0008】

さらに、広範なタイプの多様な病理学的状態が、単球、リンパ球、およびNK細胞に由来する細胞により媒介される。全てではないとしても、多数の、そのような状態における使用のための新たな治療薬および/または予防薬は、いまだ対処されていない重要な医療的必要を満たし、かつ商業的に有用となるであろう。

40

【0009】

hIVIgの免疫調節性の特性の多くは、IgG分子のFc領域に存在する。例えば、ITPのマウスモデルにおいては、無修飾のhIVIgおよびFc断片は両方とも単独で、血小板数の回復における治療的有効性を示すが、単離されたhIVIg Fab断片には治療効果がない(Samuelsson, A., Towers, T. L. & Ravetch, J.V. Anti-inflammatory Activity of hIVIg Mediated Through the Inhibitory Fc Receptor. Science 291, 484-486 (2001))。さらにFcはまた、小児期および成人の特発性血小板減少性紫斑病の両方の治療において治療的に有効であるが、hIVIgのFab断片は有効ではない(Foll

50

ea, G. et al. Intravenous plasmin-treated gamma globulin therapy in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nouv Rev Fr Hematol* 27, 5-10 (1985); Solal-Celigny, P., Bernard, J., Herrera, A. & Biovin, P. Treatment of adult autoimmune thrombocytopenic purpura with high-dose intravenous plasmin-cleaved gammaglobulins. *Scand J Haematol* 31, 39-44 (1983); Debre, M. & Bonnet, M.-C. Infusion of Fc gamma fragments for treatment of children with acute immune thrombocytopenic purpura. *Lancet* 342, 945-49 (1993); Burdach, S.E., Evers, K. & Geurson, R. Treatment of acute idiopathic thrombocytopenic purpura of childhood with intravenous immunoglobulin G: Comparative efficacy of 7S and 5S preparations. *J Pediatr* 109, 770-775 (1986))。

10

【 0 0 1 0 】

活性化型および抑制型のメンバーに識別することが出来る古典的な Fc 受容体のファミリーに加えて、主要組織適合性クラス I (MHC - I) 分子のファミリーに属する新生児の Fc - 受容体 (FcRn)、ならびに C 型レクチンのファミリーに属する SignR1 / DC - SIGN が、IgG Fc 断片と結合することが出来る (Nimmerjahn and Ravetch, *Antibody-mediated modulation of immune responses*, 免疫学的 Reviews, 236: 265-275 (2010)。さらに、免疫グロブリン Fc 分子が結合して生理的な影響を及ぼす、Fc 受容体様受容体も存在する (Davis RS. "Fc Receptor-like molecules" *Annu. Rev. Immunol.* 2007. 25:525-60)。hIVI G の治療効果は、初期においては Fc 受容体 (FcR) により媒介され、長期の寛容原性効果においては樹状細胞 (DC) - マクロファージのクロストークに依存する。ITP のマウスモデルにおいては、FcRIIa は開始段階において必須の役割を果たし、FcRIIb はエフェクター段階で必要とされる (Samuelsson, A., Towers, T.L. & Ravetch, J.V. *Anti-inflammatory Activity of hIVI G Mediated Through the Inhibitory Fc Receptor*. *Science* 291, 484-486 (2001); Siragam, V. et al. *Intravenous immunoglobulin ameliorates ITP via activating Fc receptors on dendritic cells*. *Nat Med* 12, 688 (2006))。同様に、ヒト研究は、抗 Fc 受容体抗体が難治性 ITP の治療において有効であることを示している (Clarkson, S. et al. *Treatment of refractory immune thrombocytopenic purpura with an anti-Fc gamma-receptor antibody*. *N Engl J Med* 314, 1236-1239 (1986))。重要なことに、hIVI G で処理された DC の養子免疫伝達が、ITP のマウスモデルの治療において有効であるように、長期の寛容原性効果は、細胞間の相互座用により媒介される (Siragam, V. et al. *Intravenous immunoglobulin ameliorates ITP via activating Fc receptors on dendritic cells*. *Nat Med* 12, 688 (2006))。

20

30

【 0 0 1 1 】

hIVI G の免疫調節効果が発揮されるためには、FcR の凝集が必要である。FcR の凝集は、hIVI G 中に存在する IgG 「二量体」 (全 hIVI G の 5 ~ 15%) により媒介される (Bleeker, W.K. et al. *Vasoactive side effects of intravenous immunoglobulin preparations in a rat model and their treatment with recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase*. *Blood* 95, 1856-1861 (2000))。例えば、IVI G の、公知の免疫循環の臨床的降圧効果はIVI G 中の「二量体」の存在と関連する (Kroez M et. al. *Hypotension with Intravenous Immunoglobulin Therapy: importance of pH and dimer formation*. *Biologicals* 31 (2003) 277-286.)。例えば、ITP のマウスモデルにおいて、高含有量の「二量体」 (完全ホモ二量体免疫グロブリン分子の二量体) を有する hIVI G による治療は血小板数を増加させたが、hIVI G 「単量体」 (全ホモ二量体免疫グロブリン分子) は、有効ではなかった (Teeling, J.L. et al. *Therapeutic efficacy of intravenous immunoglobulin preparations depends on the immunoglobulin G dimers: studies in experimental immune thrombocytopenia*. *Blood* 98, 1095-1099 (2001))。さらに、IgG 凝集体を除去するために、イオン交換樹脂およびポリエチレングリコールの分画が、hIVI G の製造において日常的に使用されているにもかかわらず、hIVI G の臨床的な有効性は、患者の血清中の凝集体の存在と関連する

40

50

(Augener, W., Friedman, B. & Brittinger, G. Are aggregates of IgG the effective part of high-dose immunoglobulin therapy in adult idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)? Blut 50, 249-252 (1985))。重要なことに、二量体の割合(%)は血管作用性の副作用とも相関するが、これはアセチルヒドロラーゼで治療可能である(Bleecker, W.K. et al. Vasoactive side effects of intravenous immunoglobulin preparations in a rat model and their treatment with recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase. Blood 95, 1856-1861 (2000))。

【発明の概要】

【0012】

高いタンパク質負荷、不便な患者への投薬、感染リスク、IgAアナフィラキシー、および限定された入手可能性の問題を解決すると同時に、IVIgの凝集画分の有効性を維持および強化する、IVIgに代わる選択肢が必要である。本発明は、ヒト免疫グロブリンFcおよび単一の天然の多量体化ドメイン、それを含む組成物を含む、生物学的に活性な融合タンパク質の生物模倣型分子、およびその使用方法に関する。これらの生物模倣体は、丁度これらの生物模倣体のモデルとなったhIVIgのように、限定されないが、自己免疫疾患を含む、免疫学的および炎症性障害の治療のための広範な用途を有する。さらに、これらの生物模倣体のうちのあるものは、例えば、免疫細胞の機能を試験するための免疫学的アッセイ、疾患の診断、および抗体ベースの免疫測定法でのFcの非特異的結合の阻止における使用などの、研究用試薬としての有用性も有する。さらに、本発明の生物模倣体および組成物は、hIVIgの上記の限界、および前駆生物模倣型ストラドマーの多量体化の限界を克服する優位性を有する。

【0013】

国際公開第2008/151088号は、自己免疫疾患および他の炎症性状態を含む病理学的状態の治療のために、結合された免疫グロブリンFc領域を使用して、規則的に多量体化されたhIVIgの免疫グロブリンFc生物模倣体(ストラドマーとして知られる、生物学的に活性な規則的な多量体)を作製することを開示している。参照によりその全体が組み入れられる、国際公開第2008/151088号を参照のこと。開示される分子は、制限部位および親和性タグを含む、未変性の免疫グロブリンFcと比較して外来性である配列を、免疫グロブリンFc単量体中に含むように設計された。これらの外来性の配列は、全体で、ストラドマーのアミノ酸組成物全体のごく一部を占め(約16の全アミノ酸)、分離可能かつ別個の機能、すなわちFcR結合機能および多量体化機能を有するドメインの間に配置された。一般に、立体的な制約を避けるため、または隣接するドメインの独立した機能を低下させるために、小さな結合配列を、独立した構造および/または機能を有するドメインの間に含有させることが通常行われている。しかしながら、本明細書に開示される通り、これらの短い区域を除去することにより、多量体の形成、受容体の結合、および/または全体的な生物活性の劇的な向上を提供し得る。

【0014】

一実施形態において、本発明は、リーダー配列、IgG1 Fc領域、および多量体化ドメインを含むストラドマー単位に関する。本発明のさらなる実施形態において、リーダー配列はIgG1 Fc領域に直接結合しており、IgG1 Fc領域は多量体化ドメインに直接結合している。

【0015】

別の実施形態において、本発明は、IgG1 Fc領域のアミノ酸配列が、配列番号2と少なくとも80%の相同性を有するストラドマー単位に関する。さらなる実施形態において、IgG1 Fc領域のアミノ酸配列は、配列番号2と少なくとも90%の相同性を有する。さらなる実施形態において、IgG1 Fc領域のアミノ酸配列は、配列番号2と少なくとも95%の相同性を有する。さらなる実施形態において、IgG1 Fc領域のアミノ酸配列は、配列番号2と少なくとも99%の相同性を有する。さらなる実施形態において、配列番号2のIgG1 Fc領域のアミノ酸配列は、リーダー配列および/または多量体化ドメインに直接結合している。いくつかの実施形態において、本発明のスト

ラドマー単位は、多量体化されると、Fc RIIIIaまたはDC-SIGN/SIGN-R1と結合する。

【0016】

別の実施形態において、本発明は、多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号3と少なくとも80%の同一性を有するストラドマー単位に関する。さらなる実施形態において、多量体化ドメインは、配列番号3と少なくとも90%の同一性を有する。さらなる実施形態において、多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号3と少なくとも95%の同一性を有する、本発明のストラドマー単位。さらなる実施形態において、多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号3と少なくとも99%の同一性を有する、本発明のストラドマー単位。別の実施形態において、多量体化ドメインは、ストラドマー単位を多量体化することが出来る。さらなる実施形態において、多量体化ドメインは、IgG1 Fc領域のカルボキシ末端に直接結合している。いくつかの実施形態において、多量体化ドメインは、IgG1 Fc領域のアミノ末端に直接結合している。

10

【0017】

別の実施形態において、本発明は、多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号5と少なくとも80%の同一性を有する、ストラドマー単位に関する。さらなる実施形態において、多量体化ドメインは、配列番号5と少なくとも90%の同一性を有する。さらなる実施形態において、多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号5と少なくとも95%の同一性を有する、本発明のストラドマー単位。さらなる実施形態において、多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号5と少なくとも99%の同一性を有する、本発明のストラドマー単位。別の実施形態において、多量体化ドメインは、ストラドマー単位を多量体化することが出来る。さらなる実施形態において、多量体化ドメインはIgG1 Fc領域のカルボキシ末端に直接結合している。いくつかの実施形態において、多量体化ドメインは、IgG1 Fc領域のアミノ末端に直接結合している。

20

【0018】

別の実施形態において、本発明は、多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号26と少なくとも80%の同一性を有するストラドマー単位に関する。さらなる実施形態において、多量体化ドメインは、配列番号26と少なくとも90%の同一性を有する。さらなる実施形態において、多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号26と少なくとも95%の同一性を有する、本発明のストラドマー単位。さらなる実施形態において、多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号26と少なくとも99%の同一性を有する、本発明のストラドマー単位。別の実施形態において、多量体化ドメインは、ストラドマー単位を多量体化することが出来る。さらなる実施形態において、多量体化ドメインは、IgG1 Fc領域のカルボキシ末端に直接結合している。いくつかの実施形態において、多量体化ドメインは、IgG1 Fc領域のアミノ末端に直接結合している。

30

【0019】

一実施形態において、本発明は、IgG1 Fc領域に直接結合しそのIgG1 Fc領域がIgG2ヒンジ多量体化ドメインに直接結合しているリーダー配列を含むストラドマー単位に関し、前記IgG2ヒンジは前記ストラドマー単位の多量体を生成する。一実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号4と少なくとも80%の同一性を有する。さらなる実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号4と少なくとも90%の同一性を有する。さらなる実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号4と少なくとも95%の同一性を有する。さらなる別の実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号4と少なくとも99%の同一性を有する。さらなる実施形態において、リーダー配列(配列番号1)は、成熟タンパク質から切断される。

40

【0020】

一実施形態において、本発明は、IgG1 Fc領域に直接結合しそのIgG1 Fc領域がイソロイシンジッパー多量体化ドメインに直接結合しているリーダー配列を含むストラドマー単位に関し、前記イソロイシンジッパーは前記ストラドマー単位の多量体を生

50

成する。一実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号10と少なくとも80%の同一性を有する。さらなる実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号10と少なくとも90%の同一性を有する。さらなる実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号10と少なくとも95%の同一性を有する。さらなる別の実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号10と少なくとも99%の同一性を有する。さらなる実施形態において、リーダー配列(配列番号1)は、成熟タンパク質から切断される。

【0021】

一実施形態において、本発明は、IgG1Fc領域に直接結合しそのIgG1Fc領域がGPP多量体化ドメインに直接結合しているリーダー配列を含むストラドマー単位に関し、前記GPP多量体化ドメインは前記ストラドマー単位の多量体を生成する。一実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号27と少なくとも80%の同一性を有する。さらなる実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号27と少なくとも90%の同一性を有する。さらなる実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号27と少なくとも95%の同一性を有する。さらなる別の実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号27と少なくとも99%の同一性を有する。さらなる実施形態において、リーダー配列(配列番号1)は、成熟タンパク質から切断される。

10

【0022】

一実施形態において、本発明は、IgG2ヒンジ多量体化ドメインに直接結合しそのIgG2ヒンジ多量体化ドメインが今度はIgG1Fc領域に直接結合しているリーダー配列を含むストラドマー単位に関し、前記IgG2ヒンジは前記ストラドマー単位の多量体を生成する。一実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号8と少なくとも80%の同一性を有する。さらなる実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号8と少なくとも90%の同一性を有する。さらなる実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号8と少なくとも95%の同一性を有する。さらなる別の実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号8と少なくとも99%の同一性を有する。さらなる実施形態において、リーダー配列(配列番号1)は、成熟タンパク質から切断される。

20

【0023】

一実施形態において、本発明は、イソロイシンジッパー多量体化ドメインに直接結合しそのイソロイシンジッパー多量体化ドメインが今度はIgG1Fc領域に直接結合しているリーダー配列を含むストラドマー単位に関し、前記イソロイシンジッパーは前記ストラドマー単位の多量体を生成する。一実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号9と少なくとも80%の同一性を有する。さらなる実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号9と少なくとも90%の同一性を有する。さらなる実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号9と少なくとも95%の同一性を有する。さらなる別の実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号9と少なくとも99%の同一性を有する。さらなる実施形態において、リーダー配列(配列番号1)は、成熟タンパク質から切断される。

30

40

【0024】

一実施形態において、本発明は、GPP多量体化ドメインに直接結合しそのGPP多量体化ドメインが今度はIgG1Fc領域に直接結合しているリーダー配列を含むストラドマー単位に関し、前記GPP多量体化ドメインは前記ストラドマー単位の多量体を生成する。一実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号28と少なくとも80%の同一性を有する。さらなる実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号28と少なくとも90%の同一性を有する。さらなる実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号28と少なくとも95%の同一性を有する。さらなる別の実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号28と少なくとも99%の同一性を有する。さらなる実施形態において、リーダー配列(配列

50

番号 1) は、成熟タンパク質から切断される。

【 0 0 2 5 】

別の実施形態において、本発明は、I g G 1 F c 領域に直接結合しその I g G 1 F c 領域が今度は多量体化ドメインに直接結合しているリーダー配列を含むストラドマー単位に関し、前記多量体化ドメインは前記ストラドマー単位の多量体を生成する。さらなる実施形態において、多量体化ドメインは、ストラドマー単位の高次多量体を生成する。さらなる実施形態において、得られたストラドマー組成物の少なくとも約 3 5 % は、ストラドマー単位の多量体を含む。さらなる実施形態において、得られたストラドマー組成物の少なくとも約 5 5 % は、ストラドマー単位の多量体を含む。さらなる実施形態において、得られたストラドマー組成物の少なくとも約 6 5 % は、ストラドマー単位の多量体を含む。さらなる実施形態において、得られたストラドマー組成物の少なくとも約 7 0 % は、ストラドマー単位の多量体を含む。さらなる実施形態において、得られたストラドマー組成物の少なくとも約 7 5 % は、ストラドマー単位の多量体を含む。

10

【 0 0 2 6 】

さらなる実施形態において、一実施形態において、本発明は、リーダー配列、1つまたは複数の変異を有する I g G 1 F c 領域、および多量体化ドメインを含む、ストラドマー単位に関する。本発明のさらなる実施形態において、リーダー配列は、1つまたは複数の変異を有する I g G 1 F c 領域に直接結合しており、1つまたは複数の変異を有する I g G 1 F c 領域は、多量体化ドメインに直接結合している。

【 0 0 2 7 】

一実施形態において、本発明は、ストラドマー単位のアミノ酸配列が配列番号 2 0 を含む、ストラドマー単位に関する。さらなる実施形態において、本発明は、配列番号 2 0 を含む少なくとも 2 つのストラドマー単位を含む、クラスターストラドマーに関する。さらなる実施形態において、リーダー配列 (配列番号 1) は、成熟タンパク質から切断される。

20

【 0 0 2 8 】

一実施形態において、本発明は、ストラドマー単位のアミノ酸配列が配列番号 2 4 を含む、ストラドマー単位に関する。さらなる実施形態において、本発明は、配列番号 2 4 を含む少なくとも 2 つのストラドマー単位を含む、クラスターストラドマーに関する。さらなる実施形態において、リーダー配列 (配列番号 1) は、成熟タンパク質から切断される。

30

【 0 0 2 9 】

一実施形態において、本発明は、ストラドマー単位のアミノ酸配列が配列番号 2 1 を含む、ストラドマー単位に関する。さらなる実施形態において、本発明は、配列番号 2 1 を含む少なくとも 2 つのストラドマー単位を含む、クラスターストラドマーに関する。さらなる実施形態において、リーダー配列 (配列番号 1) は、成熟タンパク質から切断される。

【 0 0 3 0 】

一実施形態において、本発明は、多量体化ドメインに直接結合しているリーダー配列を含むストラドマー単位に関し、前記多量体化ドメインは、I g G 1 ヒンジドメインを欠く I g G 1 F c 領域に直接結合しており、前記多量体化ドメインは前記ストラドマー単位の多量体を生成する。別の実施形態において、本発明は、多量体化ドメインに直接結合しているリーダー配列を含むストラドマー単位に関し、前記多量体化ドメインは F c R と結合することが出来る I g G 1 F c の一部に直接結合しているか、または I g G 1 F c の一部に直接結合している前記多量体化ドメインはともに F c R と結合することが出来る。

40

【 0 0 3 1 】

一実施形態において、本発明は、多量体化ドメインに直接結合しその多量体化ドメインが今度は I g G 1 ヒンジ、C H 2 および C H 3 ドメインから成る I g G 1 F c 領域に直接結合しているリーダー配列を含むストラドマー単位に関し、前記多量体化ドメインは前

50

記ストラドマー単位の多量体を生成する。

【0032】

一実施形態において、本発明は、多量体化ドメインに直接結合しその多量体化ドメインが今度は I g G 1 C H 2 および C H 3 ドメインから成る I g G 1 F c 領域に直接結合しているリーダー配列を含むストラドマー単位に関し、前記多量体化ドメインは前記ストラドマー単位の多量体を生成する。

【0033】

一実施形態において、本発明は、I g G 1 C H 2 および I g G 1 C H 3 ドメインに直接結合している I g G 2 ヒンジを含む F c 領域に、直接結合しているリーダー配列を含むストラドマー単位に関し、前記 I g G 2 ヒンジは、前記ストラドマー単位の多量体を生成する。一実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号 18 と少なくとも 80% の相同性を有する。さらなる実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号 18 と少なくとも 90% の相同性を有する。さらなる実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号 18 と少なくとも 95% の相同性を有する。さらなる別の実施形態において、ストラドマー単位のアミノ酸配列は、配列番号 18 と少なくとも 99% の相同性を有する。さらなる実施形態において、リーダー配列（配列番号 1）は、成熟タンパク質から切断される。

【0034】

一実施形態において、本発明は、多量体化ドメインに直接結合している I g G 1 F c 領域を含むストラドマー単位に関する。一実施形態において、I g G 1 F c 領域は、配列番号 2 と少なくとも約 80%、または少なくとも約 90%、または少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% の相同性を有する。別の実施形態において、I g G 1 F c 領域は、配列番号 19 と少なくとも約 80%、または少なくとも約 90%、または少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% の相同性を有する。さらなる実施形態において、I g G 1 F c 領域は、1つまたは複数の変異を含む。一実施形態において、多量体化ドメインは、配列番号 3 と少なくとも約 80%、または少なくとも約 90%、または少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% の相同性を有する。別の実施形態において、多量体化ドメインは、配列番号 5 と少なくとも約 80%、または少なくとも約 90%、または少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% の相同性を有する。一実施形態において、多量体化ドメインは、配列番号 26 と少なくとも約 80%、または少なくとも約 90%、または少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% の相同性を有する。一実施形態において、多量体化ドメインは、I g G 1 F c 領域の N 末端に直接結合している。別の実施形態において、多量体化ドメインは、I g G 1 F c 領域の C 末端に直接結合している。

【0035】

一実施形態において、本発明は、少なくとも 2 つのストラドマー単量体を含むクラスターストラドマーに関し、前記ストラドマー単量体はそれぞれ、I g G 1 F c 領域に直接結合しその I g G 1 F c 領域が今度は多量体化ドメインに直接結合しているリーダー配列を含む。さらなる実施形態において、クラスターストラドマーは F c R I I I a と結合する。さらなる実施形態において、クラスターストラドマーは F c R I I I b と結合する。

【0036】

別の実施形態において、本発明は、対象に対して免疫応答を調節する方法に関し、前記方法は、前記対象に、少なくとも 2 つのストラドマー単量体を含む有効量のクラスターストラドマーを投与することを含み、前記ストラドマー単量体はそれぞれ、I g G 1 F c 領域に直接結合しその I g G 1 F c 領域が今度は多量体化ドメインに直接結合しているリーダー配列を含む。さらなる実施形態において、クラスターストラドマーは F c R I I I a と結合する。さらなる実施形態において、クラスターストラドマーは F c R I I I b と結合する。さらなる実施形態において、免疫応答の調節は、未成熟の樹状細胞上での C D 8 6 の誘導を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 7 】

さらなる実施形態において、免疫応答の調節は、抗体産生の減少を伴う、ある特定のメモリーB細胞の選択的アポトーシスに関連する。さらなる実施形態において、調節は、抗体産生の減少を伴う、活性化されたメモリーB細胞の選択的アポトーシスに関連する。別の実施形態において、免疫調節は、抗体依存性の細胞傷害活性の増加につながる、NK細胞の調節であってもよい。さらなる別の実施形態において、免疫応答の調節は、CD8およびCD11cを発現している細胞個体群の増加を招き得る。さらなる別の実施形態において、免疫調節は、炎症誘発性サイトカイン、または自己免疫疾患において一般に上昇するIL-6およびIL-8などのサイトカインの減少につながり得る。別の実施形態において、免疫調節は、NKT細胞の活性化ならびにTGF- β の分泌および切断につながり得る。

10

【 0 0 3 8 】

さらなる実施形態において、本発明は、炎症性疾患または自己免疫疾患を、それを必要とする対象において治療する方法に関し、前記方法は、少なくとも2つのストラドマー単位を含む有効量のストラドマーを投与することを含み、前記ストラドマー単位はそれぞれ、IgG1Fc領域に直接結合しそのIgG1Fc領域が今度は多量体化ドメインに直接結合しているリーダー配列を含むか、あるいは、多量体化ドメインに直接結合しその多量体化ドメインが今度はIgG1Fc領域に直接結合しているリーダー配列を含む。さらなる実施形態において、炎症性疾患は自己免疫疾患である。さらなる実施形態において、自己免疫疾患は、関節リウマチ、多発性硬化症、I型糖尿病、自己免疫性甲状腺炎、特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫性貧血症、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、強皮症、全身性エリテマトーデス、乾癬、炎症性腸疾患、自己免疫性ブドウ膜炎、ANCA陽性脈管炎、セリアック病、天疱瘡、皮膚筋炎(dermatopolymyositis)、グッドパスチャー病、重症筋無力症、グレーブス病、川崎病、鎌状赤血球クリーゼ、およびアトピー性皮膚炎から成る群から選択される。さらなる実施形態において、自己免疫疾患は、提供者から受容者への臓器移植に関連する。さらなる実施形態において、自己免疫疾患は、古典的には自己免疫疾患として特徴づけられてはいないが、免疫系の細胞が重要な役割を果たす疾患、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、骨減少症、および骨粗鬆症である。

20

【 0 0 3 9 】

さらなる実施形態においては、ストラドマーを、静脈内、皮下、経口、経鼻、腹腔内、舌下、頬側、経皮、皮下移植により、または筋肉内に投与する。一実施形態において、クラスターストラドマーは静脈内に投与される。本発明のストラドマーの強化された有効性ゆえに、いくつかの実施形態においては、ストラドマーを、前身の分子および/またはIVIgと比較して低用量で静脈内に投与してもよい。一実施形態においては、クラスターストラドマーを、約0.01mg/Kg~約1000mg/Kg用量で、静脈内に投与する。さらなる実施形態においては、クラスターストラドマーを、約0.1mg/Kg~約100mg/Kgで静脈内に投与する。さらなる実施形態においては、クラスターストラドマーを、約0.5mg/Kg~約50mg/Kgで静脈内に投与する。さらなる実施形態においては、クラスターストラドマーを、約1mg/Kg~約25mg/Kgで静脈内に投与する。さらなる実施形態においては、クラスターストラドマーを、約5mg/Kg~約15mg/Kgで静脈内に投与する。一実施形態においては、クラスターストラドマーを皮下に投与する。本発明のストラドマーの強化された有効性ゆえに、いくつかの実施形態においては、ストラドマーを、前身の分子および/またはIVIgと比較して低用量で、皮下に投与してもよい。一実施形態においては、クラスターストラドマーを、約0.01mg/Kg~約1000mg/Kgの用量で、皮下に投与する。さらなる実施形態においては、クラスターストラドマーを、約0.2mg/Kg~約150mg/Kgで皮下に投与する。さらなる実施形態においては、クラスターストラドマーを、約0.5mg/Kg~約80mg/Kgで皮下に投与する。さらなる実施形態においては、クラスターストラドマーを、約2mg/Kg~約50mg/Kgで皮下に投与する。さらなる実施形態

30

40

50

においては、クラスターストラドマーを、約 5 mg / Kg ~ 約 30 mg / Kg で皮下に投与する。

【0040】

一実施形態においては、クラスターストラドマーを移植可能なデバイスに共有結合的に固定して投与する。一実施形態においては、クラスターストラドマーを縫合系に固定する。別の実施形態においては、クラスターストラドマーを移植片またはステントに固定する。別の実施形態においては、クラスターストラドマーを心臓弁、整形外科用の関節置換、または埋め込まれた電子リードに固定する。別の実施形態においては、クラスターストラドマーを、移植可能なマトリックスに固定し、およびその内部に埋め込む。好ましい実施形態においては、クラスターストラドマーを、移植可能なハイドロゲルに固定し、およびその内部に埋め込む。一実施形態において、ハイドロゲルは、デキストラン、ポリビニルアルコール、ナトリウムポリアクリレート、またはアクリレートポリマーから成る。さらなる実施形態においては、免疫細胞が流入して固定されたクラスターストラドマーと相互作用し、次いで循環に戻ることを可能にするのに十分大きな孔径を有するハイドロゲルに、クラスターストラドマーを固定して投与する。さらなる実施形態において、ハイドロゲルの孔径は 5 ~ 50 ミクロンである。好ましい実施形態において、ハイドロゲルの孔径は 25 ~ 30 ミクロンである。

10

【0041】

さらなる実施形態においては、1つまたは複数の追加の医薬品および/または治療薬の投与前、投与中、投与後に、ストラドマーを投与する。さらなる実施形態において、追加の薬剤的に活性な薬剤は以下を含む：ステロイド；生物学的抗自己免疫薬、例えば、モノクローナル抗体、融合タンパク質、または抗サイトカイン；非生物学的抗自己免疫薬；免疫抑制剤；抗生物質；および抗ウイルス薬；サイトカイン；または他の方法により免疫調節物質として作用し得る薬剤。さらなる実施形態において、ステロイドは、プレドニゾン、プレドニゾロン、コルチゾン、デキサメタゾン、モメタゾン、テストステロン、エストロゲン、オキサンドロロン、フルチカゾン、ブデソニド、ベクロメタゾン、アルブテロール、またはレバルブテロール (levalbuterol) である。さらなる実施形態において、モノクローナル抗体は、インフリキシマブ、アダリムマブ、リツキシマブ、トシリズマブ、ゴリムマブ、オフアツムマブ、LY2127399、ベリムマブ (belimumab)、ベルツズマブ (veltuzumab)、またはセルトリズマブである。さらなる実施形態において、融合タンパク質は、エタネルセプト (Etanercept)、またはアバタセプトである。さらなる実施形態において、抗サイトカイン生物製剤は、アナキンラである。さらなる実施形態において、抗リユーマチ性の非生物学的薬は、シクロホスファミド、メトトレキサート、アザチオプリン、ヒドロキシクロロキン、レフルノミド、ミノサイクリン、有機金化合物、フォスタマチニブ (fostamatinib)、トファシチニブ (tofacitinib)、エトリコキシブ、またはスルファサラジンである。さらなる実施形態において、免疫抑制剤はシクロスポリン A、タクロリムス、シロリムス、ミコフェノール酸モフェチル、エベロリムス、OKT3、抗胸腺細胞グロブリン、パシリキシマブ、ダクリズマブ、またはアレムツズマブである。さらなる実施形態においては、化学療法薬の投与前、投与中、または投与後に、ストラドマーを投与する。さらなる実施形態においては、ストラドマーおよび追加の治療薬は、一緒に投与された場合、治療的相乗効果を示す。一実施形態においては、追加の治療薬の投与前に、ストラドマーを投与する。別の実施形態においては、追加の治療薬の投与と同時に、ストラドマーを投与する。さらなる別の実施形態においては、追加の治療薬の投与後に、ストラドマーを投与する。

20

30

40

【0042】

さらなる別の実施形態において、本発明は、感染症を、それを必要とする対象において治療する方法に関し、前記方法は、少なくとも2つのストラドマー単位を含む有効量のクラスターストラドマーを投与することを含み、前記ストラドマー単位はそれぞれ、IgG1Fc領域に直接結合しそのIgG1Fc領域が今度は多量体化ドメインに直接結合しているリーダー配列を含むか、あるいは、多量体化ドメインに直接結合しその多量体化

50

ドメインが今度はI g G 1 F c領域に直接結合しているリーダー配列を含む。さらなる実施形態において、感染症は細菌感染症である。さらなる別の実施形態において、感染症はウイルス感染症である。さらなる実施形態において、感染症は細菌性敗血症またはウイルス性敗血症である。さらなる実施形態においては、クラスターストラドマーを、静脈内、皮下、経口、経鼻、腹腔内、舌下、頬側、経皮、皮下移植により、または筋肉内に投与する。一実施形態においては、クラスターストラドマーを、静脈内に投与する。一実施形態においては、クラスターストラドマーを、静脈内に投与する。一実施形態においては、クラスターストラドマーを、約0.01mg/Kg~約1000mg/Kgの用量で投与する。さらなる実施形態においては、クラスターストラドマーを、約0.1mg/Kg~約100mg/Kgで投与する。さらなる実施形態においては、クラスターストラドマーを、約0.5mg/Kg~約50mg/Kgで投与する。さらなる実施形態においては、クラスターストラドマーを、約1mg/Kg~約25mg/Kgで投与する。さらなる実施形態においては、クラスターストラドマーを、約5mg/Kg~約15mg/Kgで投与する。

10

20

30

40

50

【0043】

別の実施形態においては、ヒト、非ヒト霊長類（例えばサル、ヒヒ、およびチンパンジー）、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、ブタ、ウサギ、ヤギ、シカ、ヒツジ、フェレット、アレチネズミ、モルモット、ハムスター、コウモリ、トリ（例えばニワトリ、シチメンチョウ、およびアヒル）、魚、および爬虫類を、種特異的なまたはキメラのストラドマー分子で治療するために、クラスターストラドマーを投与する。さらなる別の実施形態において、ヒトは成人または小児である。さらなる別の実施形態においては、自己免疫疾患を予防するために、クラスターストラドマーを投与する。さらなる実施形態においては、伴侶動物および家畜におけるワクチン関連の自己免疫状態を予防するために、クラスターストラドマーを投与する。

【0044】

さらなる別の実施形態において、本発明は、*in vitro*または*ex vivo*アッセイにおいて抗体の非特異的な結合を阻止する方法に関し、前記方法は標的組織または標的細胞を、少なくとも2つのストラドマー単位を含む有効量のクラスターストラドマーを含む組成物とともにインキュベートすることを含み、前記ストラドマー単位はそれぞれ、I g G 1 F c領域に直接結合しそのI g G 1 F c領域が今度は多量体化ドメインに直接結合しているリーダー配列を含むか、あるいは、多量体化ドメインに直接結合しその多量体化ドメインが今度はI g G 1 F c領域に直接結合しているリーダー配列を含む。一実施形態において、抗体はモノクローナル抗体である。別の実施形態において、抗体はポリクローナル抗体である。一実施形態において、*in vitro*または*ex vivo*アッセイは、免疫組織化学、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、または免疫蛍光アッセイである。さらなる実施形態において、クラスターストラドマーは、標的組織または細胞の種に対して種特異的である

【0045】

さらなる別の実施形態において、本発明は、少なくとも2つのストラドマー単位を含む有効量のクラスターストラドマーで、組成物中の内毒素レベルを減少させる方法に関し、前記ストラドマー単位はそれぞれ、I g G 1 F c領域に直接結合しそのI g G 1 F c領域が今度は多量体化ドメインに直接結合しているリーダー配列を含むか、あるいは、多量体化ドメインに直接結合しその多量体化ドメインが今度はI g G 1 F c領域に直接結合しているリーダー配列を含む。さらなる実施形態において、クラスターストラドマーは組成物中の内毒素と複合する。さらなる実施形態において、方法は、ストラドマーが複合した内毒素を、組成物から除去することを含む。一実施形態においては、ストラドマーが複合した内毒素を、濾過により組成物から除去する。一実施形態において、組成物は医薬組成物である。

【0046】

一実施形態において、本発明は、以下を含む、クラスターストラドマーの生産方法に関

する：I g G 1 F c 領域に直接結合しそのI g G 1 F c 領域が今度は多量体化ドメインに結合しているリーダー配列、または多量体化ドメインに直接結合しその多量体化ドメインがI g G 1 F c 領域に直接結合しているリーダー配列を含むストラドマー単位を発現させること、ここで前記多量体化ドメインは形質移入された細胞から前記ストラドマー単位の多量体を生成する；配列番号4、配列番号8、配列番号9、配列番号10または配列番号18のストラドマーをコードするDNA配列を発現ベクター中にクローニングすること；前記発現ベクターを細菌宿主中に形質移入すること；配列番号4、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号18のストラドマーをコードするDNAを含むプラスミドDNAを細菌培養物から単離すること；配列番号4、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号18のストラドマーをコードするDNAを含むプラスミドDNAを直線化すること；直線化されたDNAを哺乳類の細胞中に形質移入すること；安定に形質移入された細胞のプールを得るために陽性に形質移入された細胞を増殖させること；培地からストラドマータンパク質を収集すること；およびストラドマータンパク質を精製すること；ここで前記ストラドマータンパク質は外来性配列を含まない。一実施形態において、発現ベクターは、選択可能なマーカーを含む。さらなる実施形態において、選択可能なマーカーは抗生物質耐性遺伝子である。さらなる実施形態において、抗生物質耐性遺伝子は、ネオマイシン耐性遺伝子である。一実施形態において、哺乳類の細胞は、CHO細胞、HEK293細胞、PER.C6細胞、CAP細胞、またはタンパク質の生産に使用される、他の商業上適切な哺乳類の細胞である。一実施形態においては、アフィニティークロマトグラフィーにより、ストラドマータンパク質を精製する。さらなる実施形態においては、ゲルろ過によりタンパク質をさらに精製する。さらなる実施形態においては、イオン交換クロマトグラフィーにより、タンパク質をさらに精製する。さらなる実施形態においては、疎水性相互作用クロマトグラフィーにより、タンパク質をさらに精製する。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1a】図1は、本発明の好ましいストラドマーの模式図である。図1aはG045cストラドマーの模式図である。

【図1b】図1bはG045oldストラドマーの模式図である。

【図1c】図1cはG046ストラドマーの模式図である。

【図1d】図1dはG019ストラドマーの模式図である。

【図1e】図1eはG028ストラドマーの模式図である。

【図1f】図1fはG051ストラドマーの模式図である。

【図1g】図1gはG089ストラドマーの模式図である。

【図1h】図1hはG096ストラドマーの模式図である。

【図2a】図2aは、第一世代ストラドマー化合物と、本発明の直接天然に結合しているストラドマー化合物の間の多量体化能力の差異を示す、タンパク質ゲルの図である。

【図2b】図2bは、第一世代ストラドマーの化合物と、本発明の直接天然に結合しているストラドマー化合物との、多量体/単量体形成の比較図である。

【図3】図3は、コラーゲン誘発関節炎の重症度において、外来性の配列を含む先のストラドマー化合物(M045old)の効果と比較した、本発明の直接天然に結合しているストラドマー(M045c)の、より大きな効果を示す図である。

【図4】図4は、コラーゲン誘発関節炎において、プレドニゾンとともに投与された際に、本発明の直接天然に結合しているストラドマー化合物が有する相乗効果を示す図である。

【図5】図5は、I g G 2 a 対照と比較した、本発明のM046、M045、M019およびM028化合物の、Fc R I I I a、Fc R I I I bおよびS I G N - R 1 に対する強化された結合親和性を示す図である。

【図5-1】同上。

【図6a】図6は、本発明の化合物の(a)Fc R I I I bおよびFc R I I I a、な

らびに (b) SIGN-R1 に対する強化された結合親和性を示す図である。M045 F1 は、ストラドマーのより高い分子量の多量体画分であり、M045 F2 はストラドマーのより低い分子量の多量体画分である。M045 F3 は、ストラドマーのホモ二量体画分である。

【図6a-1】同上。

【図6b】同上。

【図7】図7は、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の重症度における、直接天然に結合しているストラドマーM045cの効果を示す図である。

【図8】図8は、ストラドマーが、IgG1 Fc対照と比較して、抗Fc R抗体のFc Rに対する結合をより効果的に阻止することを示す図である。

【図9】図9は、コラーゲン誘発関節炎マウスモデルの重症度における、天然に結合しているストラドマーM045c、M019、M028、M046およびM051の効果を示す図である。

【図10】図10のAは、G075ストラドマーのFc RIIaに対する増加した結合、およびG075ストラドマーのFc RIIaおよびFc RIIbに対する減少した結合を示す図である。図10のBは、G076ストラドマーのFc RIIaおよびFc RIIbに対する増加した結合親和性、およびG076ストラドマーのFc RIIaに対する減少した結合を示す図である。

【図11】図11は、IVIgおよびアルブミン対照と比較した、以下におけるM051の効果を示す図である：(A)ラットにおける実験的自己免疫性神経炎 (EAN) に関連する体重減少；(B)EANラットにおける臨床スコア；(C)EANラットにおける臀部振幅；(D)EANラットにおける足首振幅；および(E)EANラットにおける運動神経伝導速度。

【図11-1】同上。

【図12】図12は、IVIgおよびアルブミン対照と比較した、以下におけるM045cの効果を示す図である：(A)ラットにおける実験的自己免疫性神経炎 (EAN) に関連する体重減少；(B)EANラットにおける臨床スコア；(C)EANラットにおける臀部振幅；(D)EANラットにおける足首振幅；および(E)EANラットにおける運動神経伝導速度。

【図12-1】同上。

【図13】図13は、コラーゲン誘発関節炎の重症度において、ビヒクル対照およびM045c陽性対照と比較して、天然に結合している本発明のストラドマーM075(A)、M096(B)、およびM098(C)はより高い効果を示すが、M076(A)は示さないことを表す。

【発明を実施するための形態】

【0048】

本発明の詳細な説明

本明細書に記載のhIVIg代替化合物の合理的分子設計に対するアプローチには、免疫学的に活性な生物模倣体の組換えおよび/または生化学的創製が含まれる。こうした生物模倣体は、この目標の達成を目的として以前に説明されている分子と比較して、多量体化の効率が驚くほど高く、結果としてFc受容体への結合効率が高い。こうした代替化合物は、例えば自己免疫疾患、炎症性疾患、癌、敗血症などの治療に対する有用性がある。また、天然の免疫グロブリンと比べてFc受容体との結合親和性に優れることから、抗体ベースのイムノアッセイ、ならびに医薬組成物および実験用組成物からのエンドキシン除去において、Fc阻害試薬としての有用性も有する。以下、具体的な代表的実施形態と併せて各実施形態を詳細に説明する。

【0049】

本明細書において、特許請求の範囲および/または明細書での「含む (comprising)」という表現とともに「a」または「an」という語を使用する場合、「1つ」を意味することもあるが、「1つ以上」、「少なくとも1つ」、および「1つまたは1

10

20

30

40

50

つより多い」の意味にもなる。

【0050】

本明細書で使用する場合、「生物模倣型」、「生物模倣型分子」、「生物模倣型化合物」、および関連する用語は、例えばプールh I V I G、モノクローナル抗体、または抗体のFc断片など、他の化合物の機能を模して人間が作製した化合物を指す。「生物学的に活性な」生物模倣体とは、天然に生じる対応物と同一または類似の生物活性を有する化合物をいう。「天然に生じる」とは、生体に通常見られる分子またはその一部分を意味する。また、実質的に自然に発生することも意味する。「免疫学的に活性な」生物模倣体とは、天然に生じる免疫学的に活性な分子、例えば抗体、サイトカイン、インターロイキン、および当該技術分野において周知の他の免疫学的な分子と同一または類似の免疫学的活性を示す生物模倣体をいう。好ましい実施形態では、本発明の生物模倣体は、本明細書で定義されるストラドマーである。

10

【0051】

「直接結合(する)」とは、制限酵素認識部位、クローニング断片などの介在配列または外来性配列がない状態で、2つの配列が接続することを意味する。当業者であれば、多量体化能力が実質的に影響を受けない限り、「直接結合(する)」はアミノ酸の追加または除去を包含することを理解するであろう。

【0052】

「相同」とは、所定の核酸配列またはアミノ酸配列の配列全体の同一性を意味する。例えば「80%相同」とは、所定の配列が、クレームされている配列と約80%の同一性を共有し、挿入、欠失、置換、およびフレームシフトを含み得ることを意味する。当業者であれば、挿入および欠失を考慮に入れて配列アライメントを行い、ある配列の長さ全体の同一性を決定できることを理解するであろう。

20

【0053】

本発明の免疫学的に活性な生物模倣体は、IgGのFc領域の1つ以上の免疫調節活性を持つように設計され、少なくとも(i)FcRn、DC-SIGN、SIGN-R1、および/またはFcRI、FcRII、FcRIII、FcRIVを含むFcRに結合できる第1のFc領域と、(ii)FcRn、DC-SIGN、SIGN-R1、および/またはFcRI、FcRII、FcRIII、FcRIVを含むFcRに結合できる第2のFc領域と、を有する。本発明の免疫学的に活性な化合物は、特に、ホモ二量体の多量体である。各ホモ二量体が、FcRn、DC-SIGN、SIGN-R1、および/またはFcRに結合する能力を有する。したがって、免疫学的に活性な生物模倣体が多量化されると、この生物模倣体は、FcRn、DC-SIGN、SIGN-R1、および/またはFcRに結合する能力をそれぞれ有する、少なくとも2つのホモ二量体を含む。

30

【0054】

以下の段落では、本発明による生物模倣体の構成単位を構造と機能の両面で定義した上で、生物模倣体自体について定義する。しかしながら、上述したように、本発明の生物模倣体が各々少なくとも2つのFc領域を有する点に留意することが最初に有用となる。Fc領域は、最低でも、2つのペプチド鎖またはアーム(単量体)を含む二量体ポリペプチド(または、より大きなポリペプチドの二量体領域)であり、この2つのペプチド鎖またはアームが会合して、機能的Fc受容体結合部位を形成する。したがって、本明細書で論じる個々の断片およびドメインの機能的形態は、概して、二量体(または多量体)の形で存在する。本明細書で論じる個々の断片およびドメインの単量体は、単一の鎖またはアームであるが、必ず第2の鎖またはアームと会合して機能的な二量体構造を形成する。

40

【0055】

Fc断片

「Fc断片」とは、免疫グロブリンのカルボキシ末端に定常的に見られるタンパク質領域またはタンパク質の折り畳み構造を表すのに用いられる専門用語である。Fc断片は、不完全かつ不十分なプロセスであるパイン消化等の酵素消化を通じて、モノクローナ

50

ル抗体の F a b 断片から単離可能である (Mihaesco C and Seligmann M. Papain Digestion Fragments Of Human IgM Globulins. Journal of Experimental Medicine, Vol 127, 431-453 (1968) を参照のこと)。F c 断片は、F a b 断片 (抗原結合ドメインを含む) と共にホロ抗体 (本明細書では完全抗体を意味する) を構成する。F c 断片は、抗体重鎖のカルボキシ末端部分からなる。F c 断片の鎖は各々約 220 ~ 265 アミノ酸長であり、鎖同士がジスルフィド結合で連結されることが多い。また、F c 断片は、1つ以上の独立した折り畳み構造または機能的サブドメインを含むことが多い。特に、F c 断片は Fc 領域を包含する。Fc 領域とは、本明細書では F c 受容体と結合する最小構造と定義される。単離された F c 断片は、2つの F c 断片単量体 (例えば、抗体重鎖の2つのカルボキシ末端部分; 本明細書でさらに定義する) が二量体化されたもので構成される。2つの F c 断片単量体が会合すると、得られる F c 断片は F c 受容体結合活性を有する。

10

【0056】

F c 部分断片

「F c 部分断片」とは、抗体の F c 断片全体には満たないが、F c 断片と同じ活性 (F c 受容体結合活性を含む) を有するに足る十分な構造を保持したドメインをいう。したがって、F c 部分断片では、F c 部分ドメインの派生元の抗体のアイソタイプによって、ヒンジ領域の一部または全部、C H 2 ドメインの一部または全部、C H 3 ドメインの一部または全部、および/または C H 4 ドメインの一部または全部が欠如している場合がある。F c 部分断片の一例として、I g G 3 の上側、コア、および下側のヒンジ領域および C H 2 ドメインを含む分子が挙げられる (Tan, LK, Shopes, RJ, Oi, VT and Morrison, SL, Influence of the hinge region on complement activation, Clq binding, and segmental flexibility in chimeric human immunoglobulins, Proc Natl Acad Sci USA. 1990 January; 87(1): 162-166)。よって、この例の F c 部分断片は、I g G 3 の F c 断片に存在する C H 3 ドメインが欠如している。F c 部分断片の別の例として、I g G 1 の C H 2 ドメインと C H 3 ドメインを含む分子が挙げられる。この例の F c 部分断片は、I g G 1 に存在するヒンジドメインが欠如している。F c 部分断片は、2つの F c 部分断片単量体で構成される。本明細書でさらに定義するように、このような2つの F c 部分断片単量体が会合すると、得られる F c 部分断片は F c 受容体結合活性を有する。

20

【0057】

Fc 領域

本明細書で使用する場合、「Fc 領域」とは、F c 受容体 (F c R) と結合可能であるか F c 受容体 (F c R) に結合される、(大型のポリペプチドの場合) 最小領域、または (単離されたタンパク質の場合) 最小のタンパク質折り畳み構造を表す語である。F c 断片と F c 部分断片のどちらでも、Fc 領域は、F c 受容体との分子結合を可能にする最小結合領域である。Fc 領域は、F c 受容体と結合する別個のポリペプチドに限定されることもあるが、F c 断片の一部または全部となり得ること、また F c 部分断片の一部または全部となり得ることも自明であろう。本発明で使用する「Fc 領域」という用語は、当業者であれば、2つ以上の Fc 領域を意味することを認識するであろう。Fc 領域は、2つの Fc 領域単量体で構成される。本明細書でさらに定義するように、このような2つの Fc 領域単量体が会合すると、得られる Fc 領域は F c 受容体結合活性を有する。このように、F c 領域は、F c 受容体と結合できる二量体構造である。

30

40

【0058】

F c 部分ドメイン

本明細書で使用する場合、「F c 部分ドメイン」は、Fc 領域の一部を表す。F c 部分ドメインは、免疫グロブリンの異なるクラスおよびサブクラスの個々の重鎖定常領域ドメイン (例えば、C H 1 ドメイン、C H 2 ドメイン、C H 3 ドメイン、C H 4 ドメイン) およびヒンジ領域を含む。よって、本発明のヒト F c 部分ドメインは、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A 1、I g A 2、I g D、および I g E の C H 1 ドメイン、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A 1、I g A 2、I g D、および I g E の C H 2 ドメイン、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M

50

、I g A 1、I g A 2、I g D、およびI g EのC H 3ドメイン、I g MおよびI g EのC H 4ドメイン、ならびにI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A 1、I g A 2、I g D、およびI g Eのヒンジ領域を含む。他の種における対応するF c部分ドメインは、その種に存在する免疫グロブリンおよびその呼称によって異なる。好ましくは、本発明のF c部分ドメインは、I g G 1のC H 1ドメイン、C H 2ドメイン、およびヒンジドメイン、ならびにI g G 2のヒンジドメインを含む。本発明のF c部分ドメインは、これらのドメインとヒンジの2つ以上の組み合わせをさらに含むこともできる。しかしながら、本発明の個々のF c部分ドメインおよびその組み合わせは、F c Rと結合する能力が欠如している。したがって、F c部分ドメインとその組み合わせは、Fc領域に満たない。F c部分ドメイン同士が連結して、F c受容体結合活性を有するペプチドを形成し、よってFc領域となることができる。本発明では、F c部分ドメインをFc領域と共に構成単位として使用して、本明細書で定義される本発明の生物模倣体を創製する。各々のF c部分ドメインは、2つのF c部分ドメイン単量体で構成される。このような2つのF c部分ドメイン単量体が会合すると、F c部分ドメインが形成される。

10

20

30

40

50

【0059】

上述したように、F c断片、F c部分断片、Fc領域、およびF c部分ドメインの各々は、二量体のタンパク質またはドメインである。したがって、これらの分子の各々は2つの単量体で構成され、この2つの単量体が会合して、二量体のタンパク質またはドメインを形成する。以上で、ホモ二量体の形態の特徴と活性について論じた。以下では、単量体ペプチドについて説明する。

【0060】

F c断片単量体

本明細書で使用する場合、「F c断片単量体」とは、単一鎖のタンパク質であって、別のF c断片単量体と会合しているときにF c断片を含む、単一鎖タンパク質をいう。よって、F c断片単量体は、ホロ抗体のF c断片を構成する抗体重鎖のうちの1つのカルボキシ末端部分である（例えば、I g Gのヒンジ領域、C H 2ドメイン、およびC H 3ドメインを含む重鎖の連続部分など）。一実施形態では、F c断片単量体は、少なくとも、ヒンジ領域の1本の鎖（ヒンジ単量体）と、C H 2ドメインの1本の鎖（C H 2ドメイン単量体）と、C H 3ドメインの1本の鎖（C H 3ドメイン単量体）とを含み、これらが連続的に連結してペプチドを形成する。別の実施形態では、F c断片単量体は、少なくとも、ヒンジ領域の1本の鎖と、C H 2ドメインの1本の鎖と、C H 3ドメインの1本の鎖と、C H 4ドメインの1本の鎖（C H 4ドメイン単量体）とを含み、これらが一続きに連結してペプチドを形成する。一実施形態では、C H 2ドメイン、C H 3ドメイン、およびヒンジドメインは、異なるアイソタイプに由来する。特定の実施形態では、F c断片単量体は、I g G 2のヒンジドメイン、およびI g G 1のC H 2ドメインとC H 3ドメインを含む。

【0061】

Fc領域単量体

本明細書で使用する場合、「Fc領域単量体」は、単一鎖のタンパク質であって、別のFc領域単量体と会合しているときにFc領域を含む、単一鎖タンパク質を表す。2つのFc領域単量体が会合して、1つのFc領域が形成される。Fc領域単量体単独では、Fc領域の片側しか含まないため、F c受容体と結合できない。以前に説明されているFc領域単量体（例えば、国際公開第2008/151088号の図17と図18を参照）と異なり、本発明のF cとメイン単量体は外来性配列を含まない。代わりに、本発明のFc領域単量体（配列番号2）は、一方の末端（例えば、F c単量体のN末端）でリーダー配列（配列番号1）と直接結合し、他方の末端（例えば、F c単量体のC末端）で多量体化ドメイン（配列番号3）と直接結合する。得られる配列番号4のストラドマー単量体を、本明細書ではG 0 4 5 cと称する。別の実施形態では、Fc領域単量体はI g G 2のヒンジドメインを含み、I g G 1のC H 2ドメインとC H 3ドメインは、N末端でリーダー配列（配列番号1）と直接結合する。得られる配列番号18のストラドマー単量体を、本明細書

ではG051と称する。あるいは、多量体化ドメイン（配列番号3）をFc領域単量体（配列番号2）のアミノ末端に配置することができる。得られる配列番号8のストラドマー単量体を、本明細書ではG019と称する。あるいは、多量体化ドメインは、配列番号3の代わりに配列番号5を含むことができ、この多量体化ドメインをFc領域単量体のカルボキシ末端に配置して、配列番号10を得ることができる。または、この多量体化ドメインをFc領域単量体のアミノ末端に配置して、配列番号9を得ることもできる。これらのストラドマーを、本明細書では、それぞれG046、G028と称する。

【0062】

Fc部分ドメイン単量体

本明細書で使用する場合、「Fc部分ドメイン単量体」とは、単鎖のタンパク質であって、別のFc部分ドメイン単量体と会合しているときにFc部分ドメインを含む、単鎖タンパク質を表す。2つのFc部分ドメイン単量体が会合して、1つのFc部分ドメインが形成される。

10

【0063】

ストラドマー

特定の実施形態では、本発明の生物模倣体はストラドマーを含む。ストラドマーとは、2つ以上のFc受容体、好ましくは2つ以上のFc受容体と結合できる生物模倣型化合物であり、より好ましくは、Fc領域と比べて著しく向上した結合を示す生物模倣型化合物であり、最も好ましくは、結合活性の解離が低速な特性を示す生物模倣型化合物である。好ましい実施形態では、本発明のストラドマーは、NK細胞などのエフェクター細胞、未成熟樹状細胞、およびその他の単球由来細胞のFcRn、DC-SIGN、SIGN-R1、および/またはFc受容体と結合するのに用いられる。一実施形態では、Fc受容体は低親和性Fc受容体である。ストラドマーは、シリアル、クラスター、コア、Fc断片という、4つの異なる物理的コンホメーションを取り得る。本発明のストラドマーは、好ましくはクラスターストラドマーである。明らかになることであるが、上述したFc断片、Fc部分断片、Fc領域、およびFc部分ドメインを利用して、様々なストラドマーコンホメーションが構築される。さらに、同じく上述されている個々のFc領域単量体およびFc部分ドメイン単量体が最初に生成され、その後自己会合して本発明のストラドマーである二量体構造を形成する。

20

【0064】

本明細書で使用する場合、「ストラドマー二量体」は、2つのストラドマー単量体だけで構成される特定の形態のストラドマーをいう。一実施形態では、ストラドマー二量体は、関連するストラドマー単量体の自己凝集によって形成される分子である。別の実施形態では、ストラドマー二量体中のストラドマー単量体は、本明細書に定義されるストラドマー単量体間結合を介して物理的に連結される。「多量体ストラドマー」は、ストラドマー単量体の自己凝集により形成されるか、あるいは、本明細書に定義されるストラドマー単量体間結合を介して形成される、3つ以上のストラドマーで構成される。

30

【0065】

ストラドマー単量体

本明細書で使用する場合、「ストラドマー単量体」あるいは「ストラドマー単位」という用語は、少なくとも第2のストラドマー単量体と会合しているとき、少なくとも2つのFc領域を含むポリペプチドを形成する、単一の連続的ペプチド分子を指す。好ましい実施形態では、会合した2つのストラドマー単量体でクラスターストラドマーが構成される。しかしながら、クラスターストラドマーは、3つ以上のストラドマー単量体を含んでもよい。ストラドマー単量体は、ストラドマー単量体間結合で会合してストラドマーを形成することもあれば、自己凝集でストラドマーを形成することもある。

40

【0066】

ストラドマー単量体は、別のストラドマー単量体と会合してストラドマーを形成すると、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、またはそれより多くのFc領域を形成するアミノ酸配列を有することができる。ストラドマー単量体

50

はさらに、別のストラドマー単量体と会合してストラドマーを形成すると、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、またはそれより多くのFc部分ドメインを形成するアミノ酸配列を有することができる。

【0067】

ストラドマーにおいてFc領域およびFc部分ドメインを形成するストラドマー単量体の領域は、ストラドマー単量体分子の連続した領域がカルボキシ末端からアミノ末端に並んでいるだけでよい。ストラドマー単量体を含む特定のFc領域単量体やFc部分ドメイン単量体の配置は、重要ではないが、2つのストラドマー単量体の会合時に2つの機能的Fc領域が形成される配置でなければならない。好ましい実施形態では、本発明のストラドマーは、IgG1のFc単量体(配列番号2)のN末端とリーダー配列(配列番号1)のC末端の間に直接的な結合を含み、かつ、IgG1のFc(配列番号2)のC末端と、多量体化ドメインIgG2ヒンジ(配列番号3)、イソロイシンジッパー(配列番号5)、またはGPPドメイン(配列番号26)との間に直接的な結合を含み、それぞれ、配列番号4のG045cストラドマー、配列番号10のG046ストラドマー、配列番号27のG089ストラドマーを形成する(表1)。別の好ましい実施形態では、本発明のストラドマーは、リーダー配列(配列番号1)のC末端と、多量体化ドメインIgG2ヒンジ(配列番号3)、イソロイシンジッパー(配列番号5)、またはGPPドメイン(配列番号26)のN末端との間に直接的な結合を含み、かつ、多量体化ドメイン(配列番号3、5、または26)とIgG1のFcのN末端との間に直接的な結合を含み、それぞれ、配列番号8のG019ストラドマー、配列番号9のG028ストラドマー、配列番号28のG096ストラドマーを形成する(表1)。あるいは、リーダー配列(配列番号1)と多量体化ドメイン(配列番号3)のN末端の間に直接的な結合を含み、かつ、多量体化ドメイン(配列番号3)のC末端とIgG1のFc部分ドメイン(IgG1のCH2部分とCH3部分を含む)のN末端との間に直接的な結合を含み、配列番号18のG051ストラドマーを形成する(表1)。

10

20

<p>G 0 4 6 (配列番号 1 0)</p>	<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGS IKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGER G</p>	10
<p>G 0 5 1 (配列番号 1 8)</p>	<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGERKCCVECP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK.</p>	20
<p>G 0 7 5 (配列番号 2 0)</p>	<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKERKC CVECP C P.</p>	30

<p>G076 (配列番号21)</p>	<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTY<u>A</u>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKERKC CVECPCP.</p>	10
<p>G096 (配列番号28)</p>	<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGGPPGPPGPPGPP GPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPP PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	20
<p>G098 (配列番号24)</p>	<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYN<u>A</u>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGPPG PPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPP</p>	30
<p>G089 (配列番号27)</p>	<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGPPG PPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPP</p>	40

【0068】

明確にするための一例として、当業者であれば、本発明のストラドマー分子を、それぞれ選択点突然変異を伴うか伴わずに、Fc領域単量体とFc部分ドメイン単量体の様々な組み合わせ（ただし、少なくとも2つのFc領域単量体を形成する組み合わせ）をコードするポリヌクレオチド分子を調製することで構築できることを理解するであろう。このようなポリヌクレオチド分子（例えば、配列番号4、8、9、10、または18のストラドマーをコードするポリヌクレオチド）を、発現ベクターに挿入してもよく、この発現ベクターを用いて細菌の個体群を形質転換し、あるいは哺乳類細胞の個体群をトランスフェクトすることができる。次いで、形質転換した細菌またはトランスフェクトした哺乳類細胞を適当な培養条件下で培養することにより、ストラドマー単量体を生成できる。例えば、ジェネテシス/G418を用いて細胞を選択することにより、安定的にトランスフェクトされた細胞プールを存続するクローン細胞株を樹立できる。あるいは、例えばG045c（配列番号4）、G019（配列番号8）、G028（配列番号9）、G046（配列番号10）、またはG051（配列番号18）などの本発明のストラドマーをコードするDNAを用いて、CMVプロモーターの制御下で、細胞を一時的にトランスフェクトすることもできる。その後、発現したストラドマー単量体は、ストラドマー単量体の自己凝集時、またはストラドマー単量体間結合を用いたストラドマー単量体の会合時に、機能的ストラドマーを形成できる。次いで、例えばタンパク質Aカラムまたはタンパク質Gカラムを用いた親和性カラムクロマトグラフィーにより、発現したストラドマーを細胞培養液から精製できる。本発明は、同一のアミノ酸配列を有するストラドマー単量体同士、実質的に類似のアミノ酸配列を有するストラドマー単量体同士、または異なる配列を有するストラドマー単量体同士の会合を通じて形成されるストラドマーの両方を包含する。後者の実施形態では、ストラドマーをなす複数のストラドマー単量体のアミノ酸配列は、2つ以上の機能的Fc R結合部位が形成されるような類似度であればよい。

10

20

【0069】

本発明の方法で作製したG045c（配列番号4）は、クレームされているリーダー配列（配列番号1）の配列がIgG1のFc（配列番号2）のN末端と直接結合し、このIgG1のFcの末端を介してさらに、IgG2ヒンジ多量体化ドメイン（配列番号3）と直接結合したものを含むものであるが、配列番号6、7に示すIgG1のFc単量体の制限部位のような外来性配列（以前は機能的に重要とは考えられていなかった配列）を含む以前の分子に見られた多量体形成と比較して、このG045cは、驚くべきことに、より高次の多量体形成をもたらした。実際、得られたG045cストラドマー調製物の約74%が多量体を含むのに対し、単量体を含んでいるのは、この組成物のわずか26%であった。このことは、外来性配列を有する分子を含む調製物と対照的である。外来性配列を含む調製物の場合、組成物のわずか約27%が多量体を含み、72%は単量体として存在する。さらに、配列番号4のストラドマー単量体で生成された高次の多量体は、以前に説明されているストラドマーを含む以前の外来性配列と比較して、驚くほど優れた効力を有していた。したがって、本発明の一実施形態では、多量体化ドメインは、ストラドマー単位の高次多量体を生成する。さらなる実施形態では、得られるストラドマー組成物の少なくとも約35%は、ストラドマー単位の多量体を含む。さらなる実施形態では、得られるストラドマー組成物の少なくとも約55%は、ストラドマー単位の多量体を含む。さらなる実施形態では、得られるストラドマー組成物の少なくとも約65%は、ストラドマー単位の多量体を含む。さらなる実施形態では、得られるストラドマー組成物の少なくとも約70%は、ストラドマー単位の多量体を含む。さらなる実施形態では、得られるストラドマー組成物の少なくとも約75%は、ストラドマー単位の多量体を含む。

30

40

【0070】

上記で示したように、Fc領域は、FcRn、DC-SIGN、SIGN-R1、および/またはFc受容体に結合する能力により機能の面から定義できる。本発明の化合物は、IgG2a対照群よりはるかに高い親和性で、FcRIIa、FcRIIb、および/またはSIGN-R1を含む同族受容体に結合する（図5および図6）。結果と

50

して、Fc 領域をなす Fc 部分ドメインに応じて、Fc 領域の特定のアミノ酸配列が変化する。しかしながら、本発明の一実施形態では、Fc 領域は、免疫グロブリン分子のヒンジ領域と CH2 ドメインを含む。さらなる好ましい実施形態では、Fc 領域は、免疫グロブリン分子のヒンジ領域、CH2 ドメイン、および CH3 ドメインを含む。さらなる実施形態では、Fc 領域は、免疫グロブリン分子のヒンジ領域、CH2 ドメイン、CH3 ドメイン、および CH4 ドメインを含む。さらに別の実施形態では、Fc 領域は、免疫グロブリン分子のヒンジ領域、CH2 ドメイン、および CH4 ドメインを含む。さらなる好ましい実施形態では、Fc 領域は、CH2 ドメインと CH3 ドメインを含む。好ましい実施形態では、Fc 領域は、IgG1 のヒンジ、CH2 ドメイン、および CH3 ドメインを含む (配列番号 2)。別の好ましい実施形態では、Fc 領域は、IgG1 の CH2 ドメインおよび CH3 ドメインを含む (配列番号 19)。

10

20

30

40

50

【0071】

ストラドマー単量体間結合

本発明の生物模倣型化合物に見られる別個の結合として、本発明のストラドマーをなす 2 つ以上の個々のストラドマー単量体間に発生する「ストラドマー単量体間結合」がある。ドメイン結合が、生物模倣型化合物の個々のストラドマー単量体を含む Fc 領域単量体同士や部分 Fc 領域単量体同士を連結する働きをする短いアミノ酸配列であるのに対し、ストラドマー単量体間結合は、生物模倣型化合物をなす 2 つ以上の個々のストラドマー単量体を連結する働きをする。ストラドマー単量体間結合は、個々のストラドマー単量体を安定して会合できるのであれば、任意の結合でよい。いくつかの実施形態では、ストラドマー単量体間結合は、ストラドマー単量体間の共有結合であり得る。あるいは、ストラドマー単量体間のストラドマー単量体間結合は、直接的な化学的架橋による結合であり得る。好ましい実施形態では、ストラドマー単量体構造は、Fc 領域単量体間の自然な自己凝集特性を利用して、自己会合性ストラドマーを生成する。このような実施形態の一部では、この自己凝集は、自然の中で通常見られるジスルフィド共有結合なしで発生する。理論に拘束されるものではないが、例えば無傷の IgG1 は、ヒンジ領域に 2 つのシステイン結合を有するのに対し (Dorai H. Role of inter-heavy and light chain disulfide bonds in the effector functions of human immunoglobulin IgG1. *Molecular Immunology*. 29;12, 1992, 1487-1491; Meulenbroek AJ and Zeijlemaker WP. Human IgG Subclasses: Useful diagnostic markers for immunocompetence. ISBN 90-5267-011-0)、G045 の IgG1 ヒンジ、IgG1 の CH2 ドメイン、および IgG1 の CH3 ドメインは、単量体間結合を示さない。すなわち G045 では、すべての単量体間結合は IgG2 ヒンジドメインの C 末端で発生する。他の実施形態では、個々のストラドマー単量体間にジスルフィド結合が形成されて、ストラドマーが形成される。ジスルフィド結合は、天然の Fc 領域単量体配列に生じるシ

ステイン残基、または部位特異的突然変異誘発によって Fc 領域単量体に取り込まれたシステイン残基のいずれかを利用して、生物模倣型分子をなす Fc 領域単量体のシステイン残基間に形成される。また、このような自然の自己凝集特性を利用して、ストラドマー多量体の個々のストラドマー単量体間にストラドマー単量体間結合を形成することもできる。好ましい実施形態では、ストラドマー単量体間結合を形成するシステイン残基は、G045 の成熟タンパク質の IgG2 ヒンジドメインの位置 236、237、240、および 243 にある。好ましい実施形態では、ストラドマー単量体間結合を形成するシステイン残基は、G051 の成熟タンパク質の IgG2 ヒンジドメインの位置 4、5、8、および 11 にある。別の実施形態に含まれるストラドマー単量体間結合では、個々のストラドマー単量体をなすアミノ酸配列に部位特異的突然変異誘発により導入されたシステイン残基間に、ジスルフィド結合が形成される。

【0072】

上述したように、好ましい実施形態では、ストラドマーを形成するストラドマー単量体間結合は、ストラドマー単量体の自己凝集によって生じる結合である。一実施形態では、ストラドマーをなす 2 つのストラドマー単量体は同一のペプチドであるため、ストラド

マーをなす2つの個々のストラドマー単量体は、配列が同一である。しかしながら、当業者であれば、他の実施形態に含まれるストラドマーでは、ストラドマー単量体のアミノ酸配列が互いに異なることを理解するであろう。

【0073】

2つのストラドマー単量体は、例えば、ストラドマー単量体における同一のFc部分ドメイン単量体間に対合が生じるように平行に整列配置させることで、ストラドマーを形成することができる。しかしながら、本発明はまた、同一でないFc部分ドメイン単量体間で対合が生じる実施形態や、ストラドマー単量体の同一のFc部分ドメイン単量体間で対合が生じるが、2つのストラドマー単量体のアライメントがずれている実施形態も含む。

10

【0074】

クラスターストラドマー

「クラスターストラドマー」とは、中心部分である「頭部」と2つ以上の「脚部」とを有する放射状の形態をした生物模倣体であり、それぞれの脚部が、少なくとも1つのFc受容体を結合できる1つ以上のFc領域を含むため、2つ以上のFc受容体に結合できる生物模倣体が形成される。それぞれのクラスターストラドマーは、各々「クラスターストラドマー単位」と呼ばれる複数の二量体タンパク質で構成される。各クラスターストラドマー単位は、多量体化領域と、少なくとも1つの機能的Fc領域を含む「脚部」領域とで構成される。多量体化領域は、別のクラスターストラドマー単位と多量体化すると、クラスターストラドマー単位の「頭部」となる。脚部領域は、各脚部領域のFc領域と同じ数のFc受容体と結合できる。このように、クラスターストラドマーは、2つ以上のFc受容体と結合して、結合親和性と結合活性を増加させることのできる生物模倣型化合物である。

20

【0075】

多量体化領域は、二量体タンパク質をさらに多量体化させるペプチド配列であってもよく、あるいは、二量体タンパク質の多量体化を促進するグリコシル化であってもよい。ペプチドの多量体化領域の例として、IgG2のヒンジ、IgEのCH2ドメイン、イソロイシンジッパー、コラーゲンのグリシン-プロリン-プロリン繰返し(「GPP」)、およびジンクフィンガーが挙げられる。グリコシル化がペプチドの多量体化に及ぼす影響については、当技術分野において詳細に説明されている(例えば、Role of Carbohydrate in Multimeric Structure of Factor VIII/V on Willebrand Factor Protein. Harvey R. Galnick, Sybil B. Williams and Margaret E. Rick. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 80, No. 9, [Part 1: Biological Sciences] (May 1, 1983), pp. 2771-2774; Multimerization and collagen binding of vitronectin is modulated by its glycosylation. Kimie Asanuma, Fumio Arisaka and Haruko Ogawa. International Congress Series Volume 1223, December 2001, Pages 97-101)。

30

【0076】

多量体化領域は、ペプチドを二量体化または多量体化させるペプチド配列であってもよく、IgG2のヒンジ、IgEのCH2ドメイン、イソロイシンジッパー、コラーゲンGPP、およびジンクフィンガーを含む。当技術分野で知られているように、ヒトIgG2のヒンジ領域は共有結合二量体を形成できる(Yoo, E.M. et al. J. Immunol. 170, 3134-3138 (2003); Salfeld Nature Biotech. 25, 1369-1372 (2007))。IgG2の二量体形成は、C-C結合によるIgG2のヒンジ構造を介してなされる可能性がある(Yoo. et al., 2003)。このことは、ヒンジ構造が単独で二量体形成を介在できることを示唆している。しかし、ヒト血清に見られるIgG2二量体は、量に限りがある。ホモ二量体の二量体として存在するIgG2の量は、IgG2全体の10%未満と概算されている(Yoo et al. 2003)。さらに、ホモ二量体の二量体を越えたIgG2の多量体化ドメインの定量的証拠は存在しない(Yoo et al. 2003)。すなわち、天然のIgG2がヒト血清において高次の多量体を形成したという発見はなされていない。したがって、本明細書に

40

50

提示する結果は、I g G 2 ヒンジを含むストラドマー（すなわち G 0 4 5 c、G 0 1 9、および G 0 5 1）が高次の多量体に存在するという点で、特に驚くべきことである。また、I g G 2 ヒンジが可変かつ動的であるヒト血清中の天然 I g G 2 とは異なり、G 0 4 5 c は、より安定度の高い多量体を形成することが示され、非還元 SDS - PAGE ゲル、分析超遠心、および湿度 1 0 0 %、温度 3 7 °C での 3 ヶ月間の安定性実験により証明された。さらに、I g G 2 ヒンジを含むストラドマー調製物の量が、ヒト血清の I g G 2 に見られる 1 0 % という数字より著しく多いことも、驚くべきことである。例えば、G 0 4 5 c の調製物において、ホモ二量体の二量体を含む多量体の量は約 6 7 % である。

【 0 0 7 7 】

ヒト I g G 2 のヒンジ単量体のアミノ酸配列は、E R K C C V E C P P C P（配列番号 3）である。配列番号 3 の 4 つのシステインのいずれか 1 つの突然変異が、ストラドマーの多量体化の大幅減少と関連している可能性がある。I g G 2 ヒンジ単量体の C - X - X - C 部分が 2 つある。よって、本発明のストラドマー単量体は、I g G 2 のヒンジ単量体の 1 2 のアミノ酸からなる完全な配列を含むこともあれば、4 つのアミノ酸からなるコアと Fc 領域単量体のどちらか一方または両方を含むこともある。コア構造の X - X は任意のアミノ酸でよいが、好ましい実施形態では、X - X 配列は V - E または P - P である。当業者であれば、I g G 2 のヒンジ単量体は、コアの 4 つのアミノ酸からなる構造に加えて、ヒンジ配列の任意の部分（I g G 2 のヒンジ配列全部と、I g G 2 の C H 2 および C H 3 ドメイン単量体配列の一部または全部を含む）で構成されてよいことを理解するであろう。理論に拘束されるものではないが、I g G 2 のヒンジ多量体化ドメインは、ストラドマー単量体の任意の部分と相互作用することにより多量体を形成できる。すなわち、あるストラドマー単量体の I g G 2 ヒンジが、天然 I g G 1 の F c と比べて F c 受容体との機能的結合が大きい状態を保持しながら、別のストラドマー単量体の I g G 2 ヒンジと結合して、ホモ二量体の二量体、またはより高次の多量体を形成できる。あるいは、あるストラドマー単量体の I g G 2 ヒンジドメインが、天然 I g G 1 の F c と比べて F c 受容体との機能的結合が大きい状態を保持しながら、別のストラドマー単量体の I g G 1 ヒンジと結合して、ホモ二量体の二量体、またはより高次の多量体を形成できる。また、あるストラドマー単量体の I g G 2 ヒンジドメインが、天然 I g G 1 の F c と比べて F c 受容体との機能的結合が大きい状態のまま、I g G 1 の Fc 領域の別の部分、すなわち別のストラドマー単量体の C H 2 ドメインまたは C H 3 ドメインと結合して、ホモ二量体の二量体、またはより高次の多量体を形成することも可能である。

【 0 0 7 8 】

ロイシンジッパーおよびイソロイシンジッパーを、多量体化領域として使用することもできる。ロイシンジッパーおよびイソロイシンジッパー（コイルドコイルドメイン）は、タンパク質の二量体、三量体、および四量体の形成を促進することが知られている（Harbury et al. Science 262:1401-1407 (1993); O'Shea et al. Science 243 :538 (1989)）。イソロイシンジッパーが三量体を形成する生来の傾向を利用して、クラスターストラドマーを生成できる。

【 0 0 7 9 】

当業者であれば、様々なタイプのロイシンジッパーおよびイソロイシンジッパーを利用できることを理解するであろうが、好ましい実施形態では、説明されている通り（Morris et al., Mol. Immunol. 44:3112-3121 (2007) ; Harbury et al. Science 262:1401-1407 (1993)）に改変された G C N 4 転写調節因子由来のイソロイシンジッパーを使用する：G G G S I K Q I E D K I E E I L S K I Y H I E N E I A R I K K L I G E R G H G G G（配列番号 5）。このイソロイシンジッパー配列は、Fc 領域単量体の多量体化に使用可能なくつかの配列のうちの一つにすぎない。配列番号 5 に示す配列全体を用いてもよいが、この配列の下線を付した部分が、本発明のクラスターストラドマーで使用できるイソロイシンジッパーのコア配列を表している。このように、本発明のストラドマー単量体は、イソロイシンジッパーのアミノ酸からなる完全な配列を含むものでよく、または、2 8 のアミノ酸からなるコアおよび 1 つ以上の Fc 領域単量体を含むものでよい。

また、当業者であれば、イソロイシンジッパーは、28のアミノ酸からなるコア構造と、ジッパーの任意の部分とで構成されていてよく、よって28以上のアミノ酸で構成されるが、完全な配列未満であってもよいことを理解するであろう。

【0080】

GPPは、ヒトコラーゲンに見られるアミノ酸配列であり、コラーゲタンパク質：タンパク質結合を発生させる。当業者であれば、多量体化ドメインとして様々なタイプのGPP繰返しを使用できることを理解するであろうが、好ましい実施形態では、(Fan et al FASEB Journal 3796 vol 22 2008 に記載されている)グリシン-プロリン-プロリンの繰返しを使用する(配列番号26)。このグリシン-プロリン-プロリン繰返し配列は、Fc領域単量体の多量体化に利用可能なくつかの配列のうちの1つにすぎない。配列番号26に示す配列全体を使用できるが、長さの異なる繰返しを用いてFc領域単量体を多量体化することも可能である。同様に、GPP繰返しの中に異なるアミノ酸を含む繰返しで置き換えてもよい。

10

【0081】

本明細書に開示されるストラドマーおよび他の生物模倣型分子は、様々な種のいずれに由来していてもよいと理解される。実際、本発明の任意の1種類の生物模倣型分子におけるFc領域またはFc部分ドメインを、複数の(例えば、2、3、4、5、またはそれよりも多くの)種の免疫グロブリンから誘導できる。しかしながら、単一の種から誘導するのがより一般的である。また、本明細書に開示の方法(例えば、治療方法)のいずれも、任意の種に適用できることが理解されるであろう。一般に、対象となっている種に適用される生物模倣体の構成要素はすべて、その種に由来する。しかしながら、すべての成分の種が異なる生物模倣体、または、すべての成分が(該当する方法の適用対象である種を含む、もしくは含まない)複数の種に由来する生物模倣体を使用することも可能である。

20

【0082】

本発明によるストラドマーおよび他の生物模倣体のFc領域およびFc部分ドメインをなす特定のCH1、CH2、CH3、CH4ドメイン、およびヒンジ領域は、免疫グロブリンのサブクラス、およびその派生元である生物の両方について、独立して選択できる。したがって、本明細書に開示されるストラドマーおよび他の生物模倣体は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA1、IgD、IgE、およびIgM、マウスIgG2a、またはイヌIgAもしくはIgBなどの様々な免疫グロブリンタイプに独立して由来するFc領域および部分Fc領域を含むことができる。好ましくは、ヒトの治療法の場合、本発明のFc領域はヒトIgG1アイソタイプのドメインである。同様に、種特異的またはキメラのストラドマー分子を生成するためには、各Fc領域および部分Fc領域は、様々な種に由来するものであってよく、好ましくは、非ヒト霊長類(例えばサル、ヒヒ、チンパンジーなど)、ヒト、ネズミ、クマネズミ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、ブタ、ウサギ、ヤギ、シカ、ヒツジ、フェレット、アレチネズミ、モルモット、ハムスター、コウモリ、鳥類(例えばニワトリ、シチメンチョウ、アヒルなど)を含む哺乳類の種、魚類、および爬虫類に由来する。

30

【0083】

個々のFc領域および部分Fc領域は、ヒト化されていてもよい。当業者であれば、様々なFc領域および部分Fc領域から、様々なタイプの機能が得られることを理解するであろう。例えば、FcRはIgG免疫グロブリンと特異的に結合し、他のクラスの免疫グロブリンとはあまり結合しない。このため、複数のFc受容体との結合能を有するストラドマーを設計しようとする当業者であれば、IgGの十分に特徴付けされたFc受容体結合配列(下側のIgGヒンジ領域および/またはIgGのCH2ドメインとCH3ドメインの結合配列を含む)を少なくとも組み込んだストラドマーFc領域を設計するであろう。また、当業者であれば、特定のIgドメインを用いることは、IgAの点滴に付随するアナフィラキシーなどの様々な有害な結果を伴い得ることも理解するであろう。本明細書に開示する生物模倣体は、一般に、このような影響を回避するように設計すべきであるが、特定の状況では、このような影響が望ましい場合もある。

40

50

【0084】

また、本発明は、天然に生じるFc領域またはFc部分ドメインのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸を有するFc領域およびFc部分ドメインを含むストラドマーも包含する。本発明の生物模倣型化合物に含めるのに好ましいFc領域は、ホロFc受容体、またはFcRの可溶性細胞外ドメイン部分のどちらかに対して測定可能な特異的結合親和性を有する。多数のFc領域およびFc領域単量体の一次アミノ酸配列およびX線結晶学的構造を、当技術分野において利用できる。例えば、Woof JM, Burton DR. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. Nat Rev Immunol. 2004 Feb;4(2):89-99を参照のこと。Fc受容体結合能のある代表的なFc領域として、ヒトIgG1由来のFc領域(配列番号2)が挙げられる。これらの天然配列については、機能的配列の部位特異的突然変異マッピングを含め、詳しい構造機能解析がなされている。当業者であれば、これらの過去の構造機能研究および利用可能な結晶学データに基づき、Fc領域のFcR受容体結合能を保ちつつ、機能的Fc領域配列変異体を設計できる。例えば、システイン残基を付加して単量体間のジスルフィド結合を増強したり、これを欠失させてストラドマーのホモ二量体間の相互作用を変化させたりできる。

10

【0085】

アミノ酸の変化は、Fc領域の配列全体に見られてよく、あるいは、Fc領域を含む特定のFc部分ドメインに分離されていてもよい。本発明のストラドマーおよび他の生物模倣体に用いられるFc領域の機能的変異体は、天然のFc領域と少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する。同様に、本発明のストラドマーおよび他の生物模倣体に用いられるFc部分ドメインの機能的変異体は、天然のFc部分ドメインと少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する。

20

【0086】

本発明のFc断片単量体、Fc部分断片単量体、ストラドマー単量体、および他の単量体の作製に際してFc領域単量体の機能的変異体を使用することも、本発明に包含され、当業者であればこれを理解するであろう。Fc領域単量体の機能的変異体は、天然のFc領域単量体配列と少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する。

30

【0087】

同様に、本発明のFc断片単量体、Fc部分断片単量体、Fc領域単量体、ストラドマー単量体、および他の単量体の作製に際してFc部分ドメイン単量体の機能的変異体を使用することも、本発明に包含される。Fc部分ドメイン単量体の機能的変異体は、天然のFc部分ドメイン単量体配列と少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する。

【0088】

アミノ酸が変化することにより、Fc受容体に対するストラドマーの結合親和性が増減することもあれば、変化しないこともある。好ましくは、このようなアミノ酸の変化は保存的アミノ酸置換であるが、このような変化には、欠失、付加、および他の置換が含まれる。保存的アミノ酸置換は一般に、以下の群内での変化を含む。グリシンおよびアラニン；バリン、イソロイシン、およびロイシン；アスパラギン酸およびグルタミン酸；アスパラギン、グルタミン、セリン、およびトレオニン；リジン、ヒスチジン、およびアルギニン；フェニルアラニンおよびチロシン。加えて、アミノ酸が変化すること、例えばシステイン残基を付加することにより、多量体化の強度を増強できる。

40

【0089】

アミノ酸の変化は、Fc領域多型をもたらす天然由来のアミノ酸変化であってよい。あるいは、例えば部位特異的突然変異によりアミノ酸変化を導入してもよい。Fc領域がその受容体結合機能と生物活性を保持する限り、アミノ酸変化はFc領域内のどこで発生してもよい。好ましい実施形態では、多型または突然変異の結果として、受容体結合が亢進

50

され、かつ/または多量体化もしくは生物学的機能が亢進される。この多型/突然変異は、好ましくは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) に示される E U インデックスによるアミノ酸位置 233 ~ 435 の 1 つ以上で発生する。これらのアミノ酸位置における具体的な多型/突然変異は当技術分野でよく知られており、例えば Shields, et al. (2001) “High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for Fc RI, Fc RII, Fc RIII and FcRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the Fc R, ” J. Biol. Chem., 276(9):6591-6601 (この文献は、参照により全体が本明細書に組み入れられる) に記述されている。

【0090】

好ましい実施形態では、この多型/突然変異は、IgG1のFcの位置233、234、235、236、237、238、239、253、254、255、256、258、264、265、267、268、269、270、272、276、280、285、286、288、290、293、295、296、297、298、301、303、305、307、309、311、312、315、317、322、326、327、329、330、331、332、333、334、337、338、339、360、362、376、378、380、382、392、414、415、424、430、433、434、435、および/または436の1つ以上のアミノ酸置換を含む。

さらなる実施形態では、この多型/突然変異は、IgG1のFcの位置233、234、235、236、237、238、239、253、254、255、256、258、264、265、267、268、269、270、272、276、280、285、286、288、290、293、295、296、297、298、301、303、305、307、309、311、312、315、317、322、326、327、329、330、331、332、333、334、337、338、339、360、362、376、378、380、382、392、414、415、424、430、433、434、435、および/または436の2つ以上のアミノ酸置換を含む。

さらなる実施形態では、この多型/突然変異は、IgG1のFcの位置233、234、235、236、237、238、239、253、254、255、256、258、264、265、267、268、269、270、272、276、280、285、286、288、290、293、295、296、297、298、301、303、305、307、309、311、312、315、317、322、326、327、329、330、331、332、333、334、337、338、339、360、362、376、378、380、382、392、414、415、424、430、433、434、435、および/または436の3つ以上のアミノ酸置換を含む。

さらなる実施形態では、この多型/突然変異は、IgG1のFcの位置233、234、235、236、237、238、239、253、254、255、256、258、264、265、267、268、269、270、272、276、280、285、286、288、290、293、295、296、297、298、301、303、305、307、309、311、312、315、317、322、326、327、329、330、331、332、333、334、337、338、339、360、362、376、378、380、382、392、414、415、424、430、433、434、435、および/または436の3つより多いアミノ酸置換を含む。

【0091】

「機能的変異体」という用語は、本明細書で使用する場合、参照配列と同じ生物学的効果を介在できる(ポリペプチドの場合)か、参照配列がコードするポリペプチドと同じ生物学的効果を介在できるポリペプチドをコードする(ポリヌクレオチドの場合)、相同性に関して参照配列と関連する配列を指す。例えば、本明細書に記載のいずれの生物模倣体の機能的変異体も、指定の相同性または同一性を有し、単球またはDCの免疫調節ができると考えられる。機能的配列変異体には、ポリヌクレオチドとポリペプチドの両方が含まれる。配列同一性は通常、BLAST 2.0 (Basic Local Align

10

20

30

40

50

ment Search Tool)をデフォルトのパラメータ、すなわちフィルタ - オン、スコア行列 - B L O S U M 6 2、ワードサイズ - 3、E 値 - 1 0、ギャップコスト - 1 1, 1、およびアライメント - 5 0 で用いて評価される。

【 0 0 9 2 】

上記から、本発明のストラドマーには、(a)天然に生じるFc 領域のみを有するストラドマー、(b)天然に生じるFc 領域と、アミノ酸配列が変化したFc 領域との混合物を有するストラドマー、および(c)アミノ酸配列が変化したFc 領域のみを有するストラドマー、が含まれることが理解されるであろう。アミノ酸配列の変化したストラドマーに唯一必要とされることは、天然に生じる配列を有するFc 領域を含む対応するストラドマーが2つ以上のFc R受容体と結合する能力の、少なくとも25% ; 30% ; 40% ; 50% ; 60% ; 70% ; 80% ; 90% ; 95% ; 96% ; 97% ; 98% ; 99% ; 99.5% ; もしくは100%、またはそれより多くを有することである。

10

【 0 0 9 3 】

本発明のストラドマーに生じる上述のFc R受容体結合部位の配列を遺伝子操作により変化させ、天然配列と比べて親和性と結合能が変化した結合部位を、予測に従って誘導することができる。例えば、Fc RI I bに対する生物模倣型化合物のFc 領域結合を低減する一方で、Fc RI I I aとの結合を増大させるように、特定の残基を変化させることができる。h I g GのFc R受容体結合配列に関する突然変異誘発ベースの広範な構造機能解析の一例が、Robert L. Shields, et al. High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for Fc RI, Fc RII, Fc RIII, and FcRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the Fc R. J. Biol. Chem., Feb 2001; 276: 6591-6604 である。マウスI g GのFc (m I g GのFc)でも同様の研究が行われている。当業者であれば、種ごとの天然I g GのFc 領域の構造相同性と一次配列相同性に基づき、ヒトI g GのFc およびマウスI g GのFcの構造 - 機能に関する広範な知識を、本発明の生物模倣型化合物におけるすべての天然Fc R受容体結合部位配列の合理的な突然変異誘発に適用して、特定のFc R受容体特異性および結合親和性を有する結合部位を設計するであろう。

20

【 0 0 9 4 】

天然Fc 領域のアミノ酸配列の組成に加えて、Fc 領域の糖質含有量も、Fc 領域の構造およびFc Rとの結合相互作用に重要な役割を果たすことが知られている。例えば、Robert L. Shields, et al. Lack of Fucose on Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human Fc RIII and Antibody-dependent Cellular Toxicity. J. Biol. Chem., Jul 2002; 277: 26733-26740 (doi:10.1074/jbc.M202069200); Ann Wright and Sherie L. Morrison. Effect of C2- Associated Carbohydrate Structure on IgE Effector Function: Studies with Chimeric Mouse-Human IgG1 Antibodies in Glycosylation Mutants of Chinese Hamster Ovary Cells. J. Immunol, Apr 1998; 160: 3393-3402 を参照のこと。糖質含有量は、例えば、特定の細胞系を含む特定のタンパク質発現系を用いるか、またはインビトロの酵素修飾を用いて制御できる。したがって、本発明は、ドメインの取得元のホロ抗体本来の糖質含有量を有するFc 領域を含むストラドマー、および、糖質含有量が変化した生物模倣型化合物を含む。別の実施形態では、ストラドマーの多量体成分は、同じストラドマーのホモ二量体成分とはグリコシル化パターンが異なるという特徴を有する。好ましい実施形態では、多量体に含まれるグリコシル化パターンがFc R受容体結合を亢進するように、ストラドマーを濃縮する。

30

40

【 0 0 9 5 】

Fc 部分ドメインのポリペプチド鎖に加えて、多量体化領域、あるいはグリコシル化変化により、Fc 領域のコンホメーションの変化が生じ、Fc R受容体へのFc 領域の結合が亢進され得る。よって、ポリペプチドに対する変更が非常に小さく見えても、複数のFc R受容体の結合を増強できるストラドマー、あるいは、複数のFc R受容体との結合能が低下したストラドマーを作製することもできる。

【 0 0 9 6 】

50

部分ドメインおよび部分断片

当業者はさらに、本発明の実施形態で用いられるFc領域およびFc部分ドメインが全長バージョンでなくてもよいことを認識するであろう。すなわち、本発明は、本発明のストラドマーおよび他の生物模倣体をなす特定のFc領域単量体およびFc部分ドメイン単量体のアミノ末端、カルボキシ末端、または中程からアミノ酸が欠如した、Fc領域単量体およびFc部分ドメイン単量体の使用を包含する。

【0097】

例えば、Fc受容体に対するヒトIgG免疫グロブリンの結合部位が説明されている(例えばRadaev, S., Sun, P., 2001. Recognition of Immunoglobulins by Fc Receptors. *Molecular Immunology* 38, 1073-1083; Shields, R.L. et. al., 2001. High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for FcRI, FcRII, FcRIII, and FcRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the FcR. *J. Biol. Chem.* 276 (9), 6591-6604 など)。こうした知識に基づき、これらの免疫グロブリンのFc領域からアミノ酸を除去して、Fc領域と受容体の間の結合相互作用に及ぼす影響を判断できる。よって、本発明は、Radaev, S., Sun, P., 2001 に定義されている下側ヒンジおよびCH2の位置233~338を包含するアミノ酸の、少なくとも約90%を有するIgGのFc領域を包含する。

10

【0098】

本発明のIgG免疫グロブリンのFc部分ドメインは、ヒンジ領域の全部または一部、CH2ドメインの全部または一部、およびCH3ドメインの全部または一部を含む。

20

【0099】

ヒンジ領域の一部、CH2ドメインの一部、またはCH3ドメインの一部のみを有するIgGのFc部分ドメインは、Fc部分ドメイン単量体から構築される。よって、本発明は、ヒンジ領域のN末端またはヒンジ領域のC末端に由来するIgGのヒンジ領域単量体を含む。これらの単量体は、例えば、ヒンジ領域の5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、または62個のアミノ酸(IgG1では最大15、IgG2では最大12、IgG3では最大62、IgG4では最大12)を含み得る。

30

【0100】

また、本発明は、CH2ドメインのN末端またはCH2ドメインのC末端に由来するIgGのCH2ドメイン単量体も含む。よって、これらの単量体は、例えば、CH2ドメインの5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、または110個のアミノ酸(IgG1およびIgG3の場合は最大110、IgG2およびIgG4では最大109)を含み得る。

40

【0101】

本発明はさらに、CH3ドメインのN末端またはCH3ドメインのC末端に由来するIgGのCH3ドメイン単量体も含む。よって、これらの単量体は、例えば、CH3ドメインの5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45

50

、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、または107個のアミノ酸(IgG1およびIgG3の場合は最大106、IgG2およびIgG4では最大107)を含み得る。

【0102】

上記から、本発明の様々な実施形態が、(a)全長Fc領域を含有するストラドマー、(b)全長Fc領域とFc部分ドメインの混合物を含有するストラドマー、および(c)Fc部分ドメインを含有するストラドマー、を含むことが理解されるであろう。これらの実施形態の各々において、ストラドマーはさらにCH1ドメインを含むことができる。本明細書で説明するように、本発明のストラドマーの各実施形態において、ストラドマーは2つ以上のFc受容体と結合する能力を有する。

10

【0103】

ストラドマーおよびストラドマー単量体の好ましい実施形態

「FcR」および「Fc受容体」という用語は、本明細書で使用する場合、Nimmerjahn F and Ravetch JV. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity*. 2006 Jan; 24(1):19-28 で説明され、または下記に定義されるように、免疫細胞表面に発現するタンパク質のFc受容体ファミリーの各メンバーを含む。本明細書に記載の「FcR」という用語は、FcRI、RII、およびRIIIファミリーのすべてのメンバーを包含することを意図している。Fc受容体は、低親和性のFc受容体と高親和性のFc受容体とを含み、ヒトにおける例として、FcRI(CD64); FcRII(CD32)およびそのアイソタイプおよびアロタイプであるFcRIIaLR、FcRIIaHR、FcRIIb、およびFcRIIc; FcRIII(CD16)およびそのアイソタイプであるFcRIIIaおよびFcRIIIbが挙げられるが、これらに限定されない。当業者であれば、本発明が、例えばDavis, et al. (2004) "Differential B cell expression of mouse Fc receptor homologs," *Int. Immunol.*, 16(9):1343-1353 に説明されているようなFcRおよびFcR相同体と結合する化合物を含み、本発明が、まだ発見されていないと考えられる未来のFcRおよび関連のアイソタイプとアロタイプに適用されることを認識するであろう。

20

30

【0104】

hIVIGが新生児Fc受容体(「FcRn」と結合し、これを完全に飽和させることや、FcRnのこのような競合的阻害がhIVIGの生物活性で重要な役割を果たす可能性があることは、すでに説明されている(Mechanisms of Intravenous Immunoglobulin Action in Immune Thrombocytopenic Purpura. F. Jin, J. Balthasar. *Human Immunology*, 2005, Volume 66, Issue 4, Pages 403-410 など)。Fc受容体と強く結合する免疫グロブリンは、少なくともある程度はFcRnとも結合するため、当業者であれば、複数のFc受容体と結合できるストラドマーはFcRnとも結合し、FcRnを完全に飽和し得ることを認識するであろう。

40

【0105】

「FcRxに特異的に結合できる」とは、本明細書で使用する場合、FcR(例えば、FcRIII)への結合をいう。特異的な結合とは、一般に、後に結合アッセイにおいて過剰量の未標識リガンドで置換可能な標識リガンドの量と定義される。しかしながら、このことは、当技術分野において十分に確立された他の特異的結合の評価手段を除外するものではない(例えば、Mendel CM, Mendel DB, 'Non-specific' binding. The problem, and a solution. *Biochem J*. 1985 May 15;228(1):269-72)。当技術分野でよく知られている様々な方法、例えば、(BIACORE(登録商標)を通じて市販されている)表面プラズモン共鳴(SPR)技術や、(ForteBio(登録商標)を通じて市販されている)バイオレイヤー干渉法により、特異的結合を測定して、免疫学的に活

50

性な生物模倣体の会合定数と解離定数の両方を特徴付けすることができる (Asian K, Lakowicz JR, Geddes C. Plasmon light scattering in biology and medicine: new sensing approaches, visions and perspectives. *Current Opinion in Chemical Biology* 2005, 9:538-544)。

【 0 1 0 6 】

「凝集した天然 I g G の免疫学的活性」とは、免疫系が I g G 凝集体に曝露したときに、免疫系の機能に影響を及ぼす多量体化 I g G の特性をいう。天然の多量体化 I g G の具体的な特性としては、F c R に対する特異的結合の変化、免疫細胞表面での F c R の架橋、または、抗体依存性細胞障害 (A D C C)、貪食 (A D C P)、補体結合といった多量体化 I g G のエフェクター機能が挙げられる (例えば、Nimmerjahn F, Ravetch JV . The anti-inflammatory activity of IgG: the intravenous IgG paradox. *J Exp Med.* 2007; 204:11-15; Augener W, Friedman B, Brittinger G. Are aggregates of IgG the effective part of high-dose immunoglobulin therapy in adult idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)? *Blut.* 1985;50:249-252; Arase N, Arase H, Park SY, Ohno H, Ra C, Saito T. Association with FcRgamma is essential for activation signal through NKR-PI (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells. *J Exp Med.* 1997;186:1957-1963; Teeling JL, Jansen- Hendriks T, Kuijpers TW, et al. Therapeutic efficacy of intravenous immunoglobulin preparations depends on the immunoglobulin G dimers: studies in experimental immune thrombocytopenia. *Blood.* 2001;98 : 1095- 1099; Anderson CF, Mosser DM. Cutting edge: biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol.* 2002; 168:3697-3701; Jefferis R, Lund J. Interaction sites on human IgG-Fc for Fc R: current models. *Immunology Letters.* 2002;82:57; Banki Z, Kacani L, Mullauer B, et al. Cross-Linking of CD32 Induces Maturation of Human Monocyte - Derived Dendritic Cells Via NF- {kappa} B Signaling Pathway. *J Immunol.* 2003;170:3963-3970; Siragam V, Brine D, Crow AR, Song S, Freedman J, Lazarus AH. Can antibodies with specificity for soluble antigens mimic the therapeutic effects of intravenous IgG in the treatment of autoimmune disease? *J Clin Invest.* 2005;115:155-160 を参照のこと)。

これらの特性は通常、ホモ二量体 I g G の特性と比較することにより評価される。

【 0 1 0 7 】

「天然に生じる複数の凝集 I g G 免疫グロブリンの F c 受容体架橋またはエフェクター機能に匹敵するか、これよりも優れている」とは、本明細書で使用する場合、ストラドマーの F c 受容体架橋アッセイ値が、h I V I G の類似の用量または濃度を用いて達成される値の約 7 0 % 以上であることを意味する。いくつかの実施形態では、このアッセイ値は、h I V I G を用いて達成されるアッセイ値の少なくとも標準誤差の範囲内である。他の実施形態では、このアッセイ値は、同用量の h I V I G の値の 1 1 0 % 以上である。F c R 架橋に関するアッセイは当業者によく知られている (例えば、Nimmerjahn and Ravetch, (2008) “Fc receptors as regulators of immune responses, ” *Nature Reviews Immunology*, 8:34-47 を参照のこと)。

【 0 1 0 8 】

高次の多量体が免疫応答の調節において有効であることが判明したが、本発明者らは、驚くべきことに、ホモ二量体も有効な免疫調節因子であることを発見した。理論に拘束されるものではないが、ホモ二量体は、インビボで高次の多量体を形成できると確信される。本発明者らは、本来は純粋なホモ二量体の集団が、低レベルの血液またはウシ胎仔血清の存在下で多量体化できることを多量体化実験により発見した。したがって、ホモ二量体画分より高次多量体の方が、免疫応答の調節における効果が大きい、本発明の天然に連結したストラドマーのホモ二量体画分も、低レベルの血液または血清の存在下でのホモ二量体の多量体化に部分的に起因して、有効な免疫調節因子となる可能性がある。したがって、本発明者らのいう「高次の多量体」とは、被検体に注入される前に溶液中でホモ二量体を超えて形成される多量体だけでなく、インビボでホモ二量体を超えて形成される多

量体も意味する。

【0109】

「免疫調節活性」、「免疫応答の調節」、「免疫系の調節」および「免疫調節」とは、ある細胞型内での細胞型の成熟、または他の細胞型への細胞型の成熟を含め、1つ以上の免疫細胞の活性、能力、および相対数を変えることで免疫系を変化させることを意味する。例えば、未成熟単球の免疫調節によって、成熟単球、樹状細胞、マクロファージ、または破骨細胞（いずれも未成熟単球に由来する）が増加した、大きな個体群が得られることがある。別の例では、メモリーB細胞の免疫調節により、特定のメモリーB細胞の選択的アポトーシスが得られ、それに付随して特定の抗体の産生が減少することがある。別の例では、NK細胞の免疫調節により、抗体依存性細胞障害が亢進されることがある。別の例では、免疫調節活性により、本来は高レベルで発現しない表現型の細胞、例えばCD8⁺/CD11c⁺細胞の個体群が増大することがある。別の例では、免疫調節活性により、炎症促進性のサイトカインや通常は自己免疫疾患で増加するサイトカイン、例えばIL-6、IL-8が減少することがある。別の例では、免疫調節活性により、NK細胞が活性化し、続いてTGF- β の分泌と切断が生じることがある。例えば、免疫細胞受容体は、免疫学的に活性な生物模倣体による結合を受けて、細胞内シグナル伝達を活性化し、別途「活性化免疫調節」と呼ばれる様々な免疫細胞変化を誘導することがある。受容体の活性化を防ぐ封鎖免疫細胞受容体も「免疫調節」の範囲に包含されるが、これらの封鎖免疫受容体は、別途「阻害免疫調節」と呼ばれることもある。

10

【0110】

樹状細胞の調節では、例えば樹状細胞の表面にCD86および/またはCD1aの発現を誘導することにより、T細胞に対する抗原提示を促進または阻害することができる。CD1aはMHC-クラスI関連の糖タンパク質であり、抗原提示細胞（特に樹状細胞）の表面に発現する。CD1aは、T細胞に対する脂質抗原の提示に関与する。CD86も抗原提示細胞の表面に発現し、T細胞に共刺激を与える。CD86は、T細胞表面のCD28、CTLA-4双方に対するリガンドであり、それぞれに活性化シグナルと阻害シグナルを送る。したがって、CD86とその同族受容体の発現レベルにより、寛容または特定の免疫応答を誘発するかどうかが決まる。好ましい実施形態では、本発明のストラドマーは、抗原提示細胞（特に樹状細胞）の表面にCD86およびCD1aの発現を誘導することに部分的に起因して、免疫応答を調節することができる。

20

30

【0111】

単球の成熟の調節とは、単球から成熟DC、マクロファージ、または破骨細胞への分化をいう。分化を調節することにより、成熟の速度または方向付けを加速し、かつ/または分化中の単球数を増加させることができる。あるいは、分化速度および/または分化中の細胞数に関して、分化を縮小させることもできる。

【0112】

「単離された」ポリペプチドまたはペプチドという語は、本明細書で使用する場合、天然に生じる対応物を持たないかポリペプチドもしくはペプチド、または、膵臓、肝臓、脾臓、卵巣、精巣、筋肉、関節組織、神経組織、胃腸組織、乳房組織、もしくは腫瘍組織（乳癌組織など）などの組織、あるいは血液、血清または尿などの体液において、自然な状態でこれに付随する成分から分離もしくは精製されたポリペプチドもしくはペプチドを指す。一般に、ポリペプチドまたはペプチドは、自然に会合しているタンパク質および他の天然に生じる有機分子が乾燥重量で少なくとも70%欠如している場合に、「単離された」とみなされる。好ましくは、本発明のポリペプチド（またはペプチド）の調製物は、乾燥重量で本発明のポリペプチド（ペプチド）の少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも99%である。化学的に合成されるポリペプチドまたはペプチドは、その本質上、自然な状態でこれに付随する成分から分離されるため、合成ポリペプチドまたはペプチドは「単離された」ものである。

40

【0113】

本発明の単離されたポリペプチド（またはペプチド）は、例えば、天然源からの（例

50

えば組織または体液からの)抽出;このポリペプチドまたはペプチドをコードする組換え核酸の発現;または化学合成によって得られる。天然発生の源とは異なる細胞系から産生されたポリペプチドまたはペプチドは、天然の状態でこれに付随する成分を必然的に欠いているため、「単離された」ものである。好ましい実施形態では、本発明の単離されたポリペプチドは、リーダーペプチド(配列番号1)、I g G 1のFc単量体(配列番号2もしくは配列番号19)およびI g G 2のヒンジ多量体化ドメイン(配列番号3)、イソロイシン多量体化ドメイン(配列番号5)、またはG P P多量体化ドメイン(配列番号26)に対応する配列のみを含み、タンパク質のクローニングまたは精製に役立つ可能性のあるさらなる配列(すなわち、誘導された制限酵素認識部位または精製タグ)を一切含まない。単離の度合いまたは純度については、カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはH P L C分析などの任意の適当な方法で測定できる。

10

【0114】

医薬組成物

本明細書に記載のストラドマー組成物の投与は、一般的な任意の経路、すなわち経口的、非経口的、または局所的になされる。代表的な経路として、経口、経鼻、頬側、直腸内、腔内、点眼、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、動脈内、腫瘍内、脊髄、くも膜下腔内、関節内、動脈内、くも膜下、舌下、口腔粘膜、経気管支、リンパ管、子宮内、皮下、腫瘍内、植込み型デバイス上(縫合系など)もしくは植込み型デバイス内(植込み型ポリマーなど)に統合、硬膜内、皮質内、または経皮が挙げられるが、これらに限定されない。このような組成物は通常、本明細書に記載の薬剤的に許容可能な組成物として投与される。好ましい実施形態では、単離されたストラドマーを静脈内投与または皮下投与する。

20

【0115】

「薬剤的に許容可能な担体」という語は、本明細書で使用する場合、あらゆる溶媒、分散媒、皮膜剤、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤などを含む。薬剤的活性物質にこのような媒体や作用剤を用いることは、当技術分野において周知である。従来の媒体または作用剤の使用については、本発明のベクターまたは細胞と不適合である場合を除き、従来の任意の媒体または作用剤を治療用組成物に使用することが企図されている。補助的な活性成分を組成物に組み込むこともできる。

【0116】

本発明のストラドマー組成物は、中性または塩の形態で製剤してよい。薬剤的に許容可能な塩の例として、塩酸、リン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸を用いて形成される酸付加塩(タンパク質の遊離アミノ基との間で形成)が挙げられる。遊離カルボキシル基との間で形成される塩も、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは水酸化第二鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から誘導できる。

30

【0117】

必要量のストラドマーを上列記した他の様々な成分と一緒に適当な溶媒に入れた後、濾過滅菌することで、無菌注射剤が調製される。通常、ベースとなる基本分散媒や上に列挙した他の必要な成分を含有する滅菌媒体に様々な滅菌有効成分を組み込むことにより、分散液が調製される。無菌注射剤を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、有効成分に所望の成分を加えたものを事前に滅菌濾過溶液とし、その溶液から粉末を得る真空乾燥法および凍結乾燥法である。

40

【0118】

さらに、ある実施形態は、経口投与に適したストラドマー組成物であり、不活性希釈剤を伴うか伴わずに、薬剤的に許容可能な担体で提供される。この担体は、吸収可能または食用であるべきであり、液体、半固体すなわちペースト、または固体の担体を含む。従来の媒体、作用剤、希釈剤、または担体の使用については、それに含まれるストラドマー調製物のレシピエントまたは治療効果にとって有害である場合を除き、本発明の方法を実施する際に使用する経口投与可能なストラドマーに用いることは適正である。担体または希釈剤の例として、脂、油、水、生理食塩溶液、脂質、リボソーム、樹脂、結合剤、注入

50

剤など、またはこれらの組み合わせが挙げられる。「経口投与」という用語は、本明細書で使用する場合、経口投与、頬側投与、経腸投与、胃内投与を含む。

【0119】

一実施形態では、簡便かつ実地的な任意の方法、すなわち溶液、懸濁液、乳化、混合、カプセル化、マイクロカプセル化、吸収などによって、ストラドマー組成物と担体を組み合わせる。このような手法は、当業者にとっては常法である。

【0120】

特定の実施形態では、粉末状のストラドマー組成物を、半固体または固体の担体と組み合わせるか十分に混合する。混合は、粉碎などの簡便な任意の方法で実施できる。組成物が治療活性を失う（すなわち胃で変性する）のを防ぐ目的で、混合過程で安定化剤を加えることも可能である。経口投与可能な組成物に使用する安定剤の例として、緩衝液、胃酸分泌に対するアンタゴニスト、グリシンおよびリジンなどのアミノ酸、デキストロース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、ラクトース、スクロース、マルトース、ソルビトール、マンニトールなどの糖質、タンパク分解酵素阻害剤などが挙げられる。より好ましくは、経口投与する組成物の場合、安定剤に、胃酸分泌に対するアンタゴニストを含めることもできる。

10

【0121】

さらに、半固体または固体の担体と組み合わせた経口投与用のストラドマー組成物をさらに、ハードもしくはソフトゼラチンカプセル、錠剤、または丸剤に製剤することも可能である。より好ましくは、ゼラチンカプセル、錠剤、または丸剤を腸溶コーティングする。腸溶コーティングは、pHが酸性の胃内または小腸上部での組成物の変性を防止する。米国特許第5,629,001号を参照のこと。小腸に到達すると、小腸内の塩基性pHによってコーティングが溶解し、組成物が放出されて、パイエル板M細胞などの腸細胞と相互作用できるようになる。

20

【0122】

別の実施形態では、粉末状のストラドマー組成物を、内部に免疫学的に活性な生物模倣体を封入するナノ粒子、あるいは免疫学的に活性な生物模倣体が結合するナノ粒子を作り出す材料と組み合わせるか十分に混合する。各ナノ粒子のサイズは100ミクロン以下である。ナノ粒子は、免疫学的に活性な生物模倣体の胃腸吸収を可能にし、経口的に生物が利用できるようにするのに必要な粘膜付着特性を有してよい。

30

【0123】

別の実施形態では、粉末状の組成物を、安定化剤を使用するか使用せずに、液体担体すなわち水または生理食塩溶液と組み合わせる。

【0124】

使用できる特定のストラドマー製剤は、免疫学的に活性な生物模倣型タンパク質を、カリウムを含有しない低張リン酸緩衝液に加えた溶液であり、この緩衝液の組成は以下のとおりである。6 mMのリン酸二水素ナトリウム一水和物、9 mMのリン酸水素ナトリウム七水和物、50 mMの塩化ナトリウム、pH 7.0 ± 0.1 。低張緩衝液中の免疫学的に活性な生物模倣型タンパク質の濃度は、10マイクログラム/ml ~ 100ミリグラム/mlの範囲にあってよい。この製剤は、任意の投与経路、例えば静脈内などの経路で投与できるが、これに限定されない。

40

【0125】

さらに、半固体の担体と組み合わせられる局所投与用のストラドマー組成物を、さらにクリームまたはゲル軟膏に製剤することも可能である。ゲル軟膏を形成するのに好ましい担体は、ゲルポリマーである。本発明のゲル組成物の製造に使用する好ましいポリマーとして、カーボポール、カルボキシメチルセルロース、プルロニックポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。具体的には、皮膚表面または皮下の疾患を治療するための皮膚への塗布用に、0.5% ~ 5% w t / 容量の強度で、粉末状Fc多量体組成物と、Carbopol 980などの重合剤を含有する水性ゲルとを組み合わせる。「局所投与」という用語は、本明細書で使用する場合、皮膚、表皮、皮下、または粘膜表面への塗布を含

50

む。

【 0 1 2 6 】

さらに、ストラドマー組成物を、皮下または真皮下植込み用のポリマーに製剤することもできる。植込み可能な薬剤注入ポリマー用の好ましい製剤は、一般に安全と認められている薬剤であり、例として架橋デキストラン (Samantha Hart, Master of Science Thesis, “Elution of Antibiotics from a Novel Cross-Linked Dextran Gel: Quantification” Virginia Polytechnic Institute and State University, June 8, 2009)、デキストラン - チラミン (Jin, et al. (2010) Tissue Eng. Part A. 16(8):2429-40)、デキストラン - ポリエチレングリコール (Jukes, et al. (2010) Tissue Eng. Part A., 16(2):565-73)、デキストラン - グルタルアルデヒド (Brondsted, et al. (1998) J. Controlled Release, 53:7-13) が挙げられる。当業者であれば、ポリマー内またはヒドロゲル内にストラドマーを組み込んで固定し、細孔サイズを所望の直径に調節することにより、多くの類似のポリマーおよびヒドロゲルを形成できることを認識するであろう。

10

【 0 1 2 7 】

製剤後、投与製剤に適合する方法で、かつ症候の改善または矯正につながる治療有効量で、溶液を投与する。製剤は、体内摂取可能な溶液、薬物放出カプセルなどの様々な形態で容易に投与される。治療する被検体の状態に応じて、投与量がいくらか変動する可能性がある。投与の責任者は、いかなる場合でも、個々の被検体に適切な用量を判断することができる。さらに、ヒトに投与する場合、調製物は、FDA 生物学的製剤評価研究センターの基準が要求する滅菌性、一般的安全性、および純度の基準を満たす。

20

【 0 1 2 8 】

投与経路は、治療対象の疾患の性質と部位によって必然的に変化し、例えば、皮内投与、経皮投与、真皮下投与、非経口投与、経鼻投与、静脈内投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、皮下投与、経皮投与、気管内投与、腹腔内投与、腫瘍内投与、灌流投与、洗浄投与、直接注射、および経口投与が投与経路に含まれ得る。

【 0 1 2 9 】

「非経口投与」という用語は、本明細書で使用する場合、腸からの吸収を伴わずに化合物が被検体に吸収される、あらゆる投与形態を含む。本発明に用いられる代表的な非経口投与として、筋肉内投与、静脈内投与、腹腔内投与、腫瘍内投与、眼内投与、経鼻投与、または関節内投与が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【 0 1 3 0 】

加えて、別の医薬品の投与前、投与中、または投与後に、本発明のストラドマーを任意に投与してもよい。例えば、本発明のストラドマー組成物とプレドニゾロンを同時投与したところ、驚くべきことに、ストラドマー組成物またはプレドニゾロンを単独で投与した場合と比べて、相乗的に優れた結果を達成することが判明した (図3を参照)。

【 0 1 3 1 】

以下、様々な医薬製剤カテゴリーと、適応があれば代表的な具体的疾患に対する好ましい投与経路の具体例を挙げる。

【 0 1 3 2 】

頬側または舌下崩壊錠：狭心症、結節性多発動脈炎。

40

【 0 1 3 3 】

静脈内：特発性血小板減少性紫斑病、封入体筋炎、IgM - M蛋白血症を伴う脱髄性ニューロパチー、壊疽性筋膜炎、天疱瘡、脱疽、皮膚筋炎、肉芽腫、リンパ腫、敗血症、再生不良性貧血、多臓器不全、多発性骨髄腫および意義不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、炎症性ミオパチー、血栓性血小板減少性紫斑病、筋炎、貧血、腫瘍症、溶血性貧血、脳炎、脊髄炎、特にヒトT細胞性白血病ウイルス1型関連の脊髄症、白血病、多発性硬化症および視神経炎、喘息、表皮壊死融解症、ランバート・イートン症候群、重症筋無力症、神経障害、ブドウ膜炎、ギラン・バレー症候群、移植片対宿主病、全身硬直症候群、抗Y_o抗体陽性傍腫瘍性小脳変性症、腫瘍随伴脳脊髄症および抗Hu抗体陽性感覚性ニューロパチー、全身性血管炎、全身性エリテ

50

マトーデス、自己免疫性糖尿病性ニューロパチー、急性特発性自律神経ニューロパチー、フォクト・小柳・原田症候群、多巣性運動ニューロパチー、抗ノグM1を伴う下位運動ニューロン症候群、脱髄、膜性増殖性糸球体腎炎、心筋症、川崎病、関節リウマチおよびエバンス症候群IM-ITP、CIDP、MS、皮膚筋炎、重症筋無力症、筋ジストロフィー。「静脈内投与」という用語は、本明細書で使用する場合、本発明の化合物または組成物を静脈注射または点滴によって体循環に送達するためのあらゆる手法を含む。

【0134】

皮膚用のゲル、ローション、クリーム、またはパッチ：尋常性白斑、帯状疱疹、ざ瘡、口唇炎。

【0135】

直腸坐薬、ゲル、または点滴：潰瘍性大腸炎、痔の炎症。

【0136】

丸剤、トローチ、カプセルとして、または腸溶コーティングでの経口：クローン病、セリアック病、過敏性腸症候群、炎症性肝疾患、バレット食道。

【0137】

皮膚内：てんかん、アルツハイマー病、多発性硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病。

【0138】

腹腔内注入またはインプラント：子宮内膜症。

【0139】

腔用ゲルまたは坐薬：細菌性膣症、トリコモナス膣炎、または膣真菌症。

【0140】

医療器具：冠動脈ステント、人工関節に塗布。

【0141】

本明細書に記載のストラドマーは、体重1kgあたり約0.01mg～約300mg、特に体重1kgあたり0.01mg～約1000mgの投与量で投与でき、少なくとも1日に1回、1週間に1回、2週間に1回、または1ヶ月に1回投与できる。第1の投与段階が、第2の投与段階の約0.1%～約300%を含む二相性の投与計画を用いてよい。

【0142】

ストラドマーの治療応用

合理的設計ならびにインビトロおよびインビボでの検証結果に基づき、本発明のストラドマーは、自己免疫疾患を治療するための重要な生物薬剤として機能し、また、癌、炎症性疾患の生物免疫療法などの他の様々な状況で免疫機能を調節するための重要な生物製剤として機能する。本明細書に記載の免疫学的に活性な生物模倣体を用いた治療に適した病態としては、自己免疫性血球減少症、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、ギラン・バレー症候群、重症筋無力症、抗第V I I I因子自己免疫疾患、皮膚筋炎、血管炎、およびブドウ膜炎など、現在の常法でh I V I Gによって治療されている病態またはh I V I Gが臨床的に有用であることが見出されている病態(F. G. van der Meche, P. I. Schmitz, N. Engl. J. Med. 326, 1123 (1992); P. Gajdos et al, Lancet i, 406 (1984); Y. Sul tan, M. D. Kazatchkine, P. Maisonneuve, U. E. Nydegger, Lancet ii, 765 (1984); M. C. Dalakas et al., N. Engl. J. Med. 329, 1993 (1993); D. R. Jayne, M. J. Davie s, C. J. Fox, C. M. Black, C. M. Lockwood, Lancet 337, 1137 (1991); P. LeHoang, N. Cassoux, F. George, N. Kullmann, M. D. Kazatchkine, Ocul. Immunol. Inflamm. 8, 49 (2000)を参照)、ならびに、モノクローナル抗体が使用可能であるか、すでにモノクローナル抗体が臨床利用されている癌または炎症性疾患の病態が挙げられる。本発明の主題である化合物によって有効に治療できる状態に含まれるものとして、サイトカインネットワークのバランスが崩れた炎症性疾患、病原性自己抗体または自己攻撃性T細胞による自己免疫障害、慢性再発性の自己免疫性、炎症性、または感染性疾患もしくは感染過程の急性期または慢性期が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0143】

加えて、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、心筋梗塞、脳卒中、B型肝炎、C型肝炎、ヒト免疫不全ウイルス関連炎症、副腎白質ストロフィー、および、てんかん疾患（特にラスムッセン症候群、ウエスト症候群、およびレノックス・ガストー症候群を含むウイルス感染後脳炎と関連すると考えられている病態）などの炎症性要素を持つ他の病態でも、ストラドマーを用いた治療の恩恵が得られる。

【0144】

本明細書に記載の単離されたストラドマーを用いる治療法への一般的なアプローチは、何らかの疾患または状態を有する被検体に、単離された免疫学的に活性な生物模倣体の有効量を投与して治療を実施することである。いくつかの実施形態では、疾患または状態を、サイトカインネットワークのバランスが崩れた炎症性疾患、病原性自己抗体または自己攻撃性T細胞による自己免疫障害、慢性再発性の疾患または過程の急性期または慢性期、という大まかなカテゴリーに分けることができる。

10

【0145】

「治療する」および「治療」という語は、本明細書で使用する場合、被検体の疾患もしくは状態、または疾患もしくは状態の症候が改善するように、本発明のストラドマーの治療有効量を被検体に投与することをいう。改善とは、疾患もしくは状態、または疾患もしくは状態の症候が改善または矯正されることである。改善は、観察可能または測定可能な改善であってよく、あるいは、被検体が健康な状態であるという全体的な感覚の改善であってよい。よって、当業者であれば、治療によって病状が改善することはあるが、完全に治癒するわけではないことを認識する。具体的には、被検体の改善は、以下のうちの1つ以上を含む場合がある。炎症の減少；C反応性タンパク質などの炎症性検査マーカーの減少；自己抗体などの自己免疫マーカー、血小板数、白血球数、もしくは赤血球数の改善、発疹もしくは紫斑の減少、脱力感、しびれ、もしくは刺痛の減少、高血糖症患者での血糖値の上昇、関節痛、炎症、腫脹、もしくは壊変の減少、腹痛および下痢の頻度と量の低下、狭心症の減少、組織炎症の減少、または発作頻度の低下のうちの1つ以上に該当することから明らかな自己免疫の減少；癌腫瘍量の低下、腫瘍が進行するまでの時間の増大、癌疼痛の減少、生存率の増加もしくは生活の質の改善；または骨粗鬆症の進行の遅滞もしくは改善。

20

30

【0146】

「治療有効量」という用語は、本明細書で使用する場合、疾患または状態の症候の改善または矯正をもたらす量をいう。

【0147】

「予防」とは、本明細書で使用する場合、疾患の症候の完全な予防、疾患の症候の発症遅延、または後に発症する疾患の症候の重篤度の低下を意味し得る。

【0148】

「被検体」という用語は、本明細書で使用する場合、本明細書に記載の方法に従って本発明のストラドマーを投与する対象である、任意の哺乳類の被検体を意味するものとする。特定の実施形態では、本開示の方法は、ヒト被検体の治療に用いられる。また、本開示の方法を、非ヒト霊長類（サル、ヒヒ、チンパンジーなど）、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、ブタ、ウサギ、ヤギ、シカ、ヒツジ、フェレット、アレチネズミ、モルモット、ハムスター、コウモリ、鳥類（ニワトリ、シチメンチョウ、アヒルなど）、魚類および爬虫類の治療に用いて、種特異的またはキメラのストラドマー分子を生成することもできる。

40

【0149】

特に、本発明のストラドマーを使用して治療し得る状態の例として、鬱血性心不全（CHF）、血管炎、酒さ、ざ瘡、湿疹、心筋炎および他の心筋症状、全身性エリテマトーデス、糖尿病、脊椎症、滑膜線維芽細胞、および骨髄間質；骨減少症；パジェット病、骨巨細胞腫；多発性骨髄腫；乳癌；廃用性骨減少症；栄養不良、歯周病、ゴーシェ病、ラン

50

ゲルハンス細胞組織球症、脊髄損傷、急性化膿性関節炎、骨軟化症、クッシング症候群、単骨性線維性骨異形成症、多骨性線維性骨異形成症、歯周組織再建、および骨折；サルコイドーシス；溶骨性の骨癌、肺癌、腎臓癌および直腸癌；骨転移、骨疼痛管理、および腫瘍随伴体液性高カルシウム血症、強直性脊椎炎、および他の脊椎関節症；移植拒絶、ウイルス感染、造血器腫瘍および腫瘍様症状、例えば、ホジキンリンパ腫；非ホジキンリンパ腫（パーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫／慢性リンパ球性白血病、菌状息肉腫、マントル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、有毛細胞白血病、およびリンパ形質細胞性白血病）、B細胞急性リンパ芽球性白血病／リンパ腫およびT細胞急性リンパ芽球性白血病／リンパ腫を含むリンパ球前駆細胞の腫瘍、胸腺腫、末梢性T細胞白血病や成人T細胞白血病／T細胞リンパ腫および大顆粒リンパ球性白血病を含む成熟T細胞およびNK細胞の腫瘍、ランゲルハンス細胞組織球症、急性骨髄性白血病（成熟型AML、未分化型AML、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病、および急性単球性白血病を含む）、骨髄異形成症候群、慢性骨髄増殖性疾患（慢性骨髄性白血病を含む）などの骨髄性腫瘍、中枢神経系の腫瘍、例えば、脳腫瘍（神経膠腫、神経芽細胞腫、星状細胞腫、髄芽腫、上衣腫、および網膜芽細胞腫）、固体腫瘍（上咽頭癌、基底細胞癌、膵臓癌、胆管の癌、カポジ肉腫、精巣癌、子宮癌、膣癌または子宮頸癌、卵巣癌、原発性肝癌または子宮体癌、脈管系の腫瘍（血管肉腫および血管外皮腫））、または他の癌が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0150】

本明細書における「癌」とは、無秩序な細胞成長を典型的特徴とする哺乳動物の生理学的状態を指すか、または、こうした状態を表す。癌の例として、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫（脂肪肉腫、骨原性肉腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、線維肉腫、粘液肉腫、軟骨肉腫を含む）、神経内分泌腫瘍、中皮腫、脊索腫、滑膜腫、神経鞘腫、髄膜腫、腺癌、黒色腫、および白血病、またはリンパ系腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。このような癌のさらに特定の例として、扁平上皮癌（上皮の扁平上皮癌など）、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌および肺扁平上皮癌、小細胞肺癌腫を含む肺癌、腹膜の癌、肝細胞癌、胃腸癌を含む胃の癌または胃癌、膵臓癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌、肛門癌、陰茎癌、精巣癌、食道癌、胆道の腫瘍、ユーイング腫瘍、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性肺癌、腎細胞癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胚性癌、ウィルムス腫瘍、精巣腫瘍、肺癌腫、膀胱癌腫、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、ワルデンストローム・マクログロブリン血症、骨髄異形成疾患、重鎖病、神経内分泌腫瘍、神経鞘腫、および他の癌腫ならびに頭頸部癌が挙げられる。

20

30

【0151】

本発明のストラドマーは、自己免疫疾患の治療に使用できる。「自己免疫疾患」という用語は、本明細書で使用する場合、80を超える疾患および状態からなる多様な群を指す。これらの疾患および状態はいずれも、背景にある問題は、身体の免疫系がその身体自身を攻撃することである。自己免疫疾患は、結合組織、神経、筋肉、内分泌系、皮膚、血液、呼吸器系、および消化器系を含む、あらゆる主要な体組織に影響を及ぼす。自己免疫疾患の例として、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、多発性硬化症、重症筋無力症、1型糖尿病が挙げられる。

40

【0152】

本発明の組成物および方法を用いて治療可能な疾患または状態として、血液免疫学的プロセスが挙げられ、これには、特発性血小板減少性紫斑病、同種免疫性／自己免疫性血小板減少症、後天性免疫性血小板減少症、自己免疫性好中球減少症、自己免疫性溶血性貧血、パルボウイルスB19関連赤血球形成不全、後天性抗第VII因子自己免疫疾患、

50

後天性フォンウィルブランド病、多発性骨髄腫および意義不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症、敗血症、再生不良性貧血、赤芽球瘵、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、新生児溶血性疾患、免疫介在性好中球減少症、血小板輸血不応状態、新生児輸血後紫斑病、溶血性尿毒症症候群、全身性血管炎、血栓性血小板減少性紫斑病、またはエバンス症候群が含まれるが、これらに限定されない。

【0153】

また、上記の疾患または状態として神経免疫学的プロセスが挙げられ、これには、ギラン・バレー症候群、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、IgM-M蛋白血症を伴う脱髄性ニューロパチー、ランパート・イトン症候群、重症筋無力症、多巣性運動ニューロパチー、抗/ GM1抗体を伴う下位運動ニューロン症候群、脱髄、多発性硬化症および視神経炎、全身硬直症候群、抗体Y₀抗体陽性傍腫瘍性小脳変性症、腫瘍随伴脳脊髄症、抗Hu抗体陽性感覚性ニューロパチー、てんかん、脳炎、脊髄炎、特にヒトT細胞性白血病ウイルス1型関連の脊髄症、自己免疫性糖尿病性ニューロパチー、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、または急性特発性自律神経ニューロパチーが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0154】

また、上記の疾患または状態として、リウマチ性疾患プロセスが挙げられ、これには、川崎病、関節リウマチ、フェルティ症候群、ANCA陽性血管炎、特発性多発性筋炎、皮膚筋炎、抗リン脂質症候群、再発性自然流産、全身性エリテマトーデス、若年性特発性関節炎、レイノー病、CREST症候群、またはブドウ膜炎が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0155】

また、上記の疾患または状態として、皮膚免疫学的疾患プロセスが挙げられ、これには、中毒性表皮壊死融解症、脱疽、肉芽腫、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、落葉状天疱瘡を含む自己免疫性で皮膚水疱を呈する疾患、尋常性白斑、連鎖球菌毒素ショック症候群、強皮症、びまん性皮膚硬化型強皮症および限局皮膚硬化型強皮症を含む全身性強皮症またはアトピー性皮膚炎（特にステロイド依存性）を含むが、これらに限定されない。

【0156】

また、上記の疾患または状態として、筋骨格免疫学的疾患プロセスが挙げられ、これには、封入体筋炎、壊疽性筋膜炎、炎症性ミオパチー、筋炎、抗デコリン（BJ抗原）ミオパチー、傍腫瘍性壊死性ミオパチー、X連鎖性空胞性ミオパチー、ペナシラミン誘導多発性筋炎、アテローム性動脈硬化症、冠動脈疾患、または心筋症が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0157】

また、上記の疾患または状態として、胃腸免疫学的疾患プロセスが挙げられ、これには、悪性貧血、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、セリアック病、疱疹状皮膚炎、原因不明肝硬変、反応性関節炎、クローン病、ホイップル病、潰瘍性大腸炎、または硬化性胆管炎が含まれるが、これらに限定されない。

【0158】

上記の疾患または状態として、移植片対宿主病、抗体による移植片拒絶、骨髄移植後拒絶、感染症後の炎症、リンパ腫、白血病、腫瘍症、喘息、抗細胞抗体の存在する1型糖尿病、シェーグレン症候群、混合性結合組織病、アジソン病、フォークト・小柳・原田症候群、膜性増殖性糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、橋本甲状腺炎、ウェゲナー肉芽腫症、顕微鏡的多発動脈炎、チャグ・ストラウス症候群、結節性多発動脈炎、または多臓器不全も挙げられる。

40

【0159】

別の実施形態では、本明細書に記載のストラドマーを体外循環回路（priming system）に利用して、患者から血液を抜き、約半時間から約3時間の時間をかけて一時的にストラドマーと接触させた上で、患者の体内に戻すこともできると考えられる。この形態の細胞療法では、患者自身のエフェクター細胞を、エキソピボで固定されたス

50

トラドマーに曝露する。これにより、エフェクター細胞のストラドマーへの曝露を通じてエフェクター細胞を調節する。その後、調節後のエフェクター細胞を含む血液を点滴で患者に戻す。このような体外循環回路は、臨床および治療上の多くの応用を有すると考えられる。

【0160】

本明細書に開示のストラドマーは、多様な状況下で免疫系応答の変更に容易に適用して、免疫応答プロファイルの特定の変化に影響を与えることができる。被検体における免疫応答の変更または調節とは、免疫応答の比または構成要素を増加、減少、または変化させることをいう。例えば、FcRと相互作用するように設計されたストラドマーとFcRの適切な組み合わせを標的することにより、サイトカインの産生または分泌レベルの増減を所望の通りに行うことができる。また、抗体の産生量の増減、2つ以上のサイトカインまたは免疫細胞受容体の比の変更、あるいは別のタイプのサイトカインまたは抗体の産生もできる。また、免疫応答は、FcRを発現する免疫細胞のエフェクター機能でもあり、これには、本明細書に開示される免疫学的に活性な生物模倣体では調節されない免疫応答と比較した場合の、単球マクロファージ系細胞の潜在的な食作用の増加または減少、破骨細胞の機能の亢進または低減、抗原提示細胞(DCなど)による抗原提示の増加または減少、NK細胞の機能の亢進または低減、B細胞の機能の亢進または低減が含まれる。

【0161】

好ましい実施形態では、癌、自己免疫疾患、または炎症性疾患を有する被検体の免疫応答が変更される。この実施形態は、被検体の免疫応答を変更する治療有効量の、本明細書に記載のストラドマーを投与するステップを含む。理想的には、この介入によって、被検体の疾患または状態を治療する。変更される免疫応答は、応答の増減であってよく、IL-6、IL-10、IL-8、IL-23、IL-7、IL-4、IL-12、IL-13、IL-17、TNF- α 、およびIFN- γ のいずれかのレベルを含むサイトカインレベルの変更を伴ってよい。好ましい実施形態では、治療に反応してIL-6またはIL-8が減少する。特に好ましい実施形態では、治療に反応してIL-6とIL-8が減少する。しかしながら、本発明は、説明されている生物模倣体の特定の作用機序に限定されない。変更される免疫応答が、被検体における自己抗体レベルの変更であってもよい。また、変更される免疫応答が、被検体における自己攻撃性T細胞レベルの変更であってもよい。

【0162】

例えば、自己免疫疾患でTNF- α の産生量を低下させると、治療効果が得られる場合がある。これを実用化したものに、抗TNF- α 抗体療法(例えばREMICADE(登録商標))があり、尋常性乾癬、関節リウマチ、乾癬性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、および強直性脊椎炎を治療できることが臨床的に証明されている。これらの自己免疫疾患にはそれぞれ異なる原因があるが、炎症および免疫細胞活性に関連する疾患過程の鍵になる免疫学的要素は共通している。TNF- α の産生を低減するように設計されたストラドマーは、これらの自己免疫疾患でも同様に有効であり、他の自己免疫疾患でも同様に有効であり得る。また、変更される免疫応答プロファイルは、被検体自身の組織を標的している自己抗体などの抗体の産生を低減する直接または間接的な調節であってよく、あるいは被検体における自己攻撃性T細胞レベルの変更であってもよい。例えば、多発性硬化症は、インターフェロン療法で治療され得る自己反応性T細胞が関係する自己免疫障害である。例えば、Zafranskaya M, et al., Interferon-beta therapy reduces CD4+ and CD8+ T-cell reactivity in multiple sclerosis, Immunology 2007 May;121(1):29-39 -Epub 2006 Dec 18 を参照のこと。自己反応性T細胞レベルを低下させるストラドマー設計も同様に多発性硬化症に有効であり、自己反応性T細胞が関係する他の自己免疫疾患にも有効であり得る。

【0163】

本明細書に記載のストラドマーを使用して、樹状細胞、マクロファージ、破骨細胞、単球、もしくはNK細胞を含む免疫細胞由来の共刺激分子の発現を調節でき、または、こ

これらの同じ免疫細胞で分化、成熟を阻害し、インターロイキン - 12 (I L - 12) を含むサイトカイン分泌を阻害でき、あるいは、インターロイキン - 10 (I L - 10) もしくはインターロイキン - 6 (I L - 6) を含むサイトカイン分泌を亢進できる。当業者であれば、免疫学的に活性な生物模倣体に免疫細胞を曝露し、免疫細胞 (樹状細胞、マクロファージ、破骨細胞、または単球) の機能の調節を測定することにより、免疫学的に活性な生物模倣体の効力を確認できるであろう。一実施形態では、免疫細胞を免疫学的に活性な生物模倣体にインビトロで曝露し、細胞表面受容体の量またはサイトカイン産生量を測定するステップをさらに含む。ここでは、細胞表面受容体の量またはサイトカイン産生量の変化が、免疫細胞機能の調節を表す。別の実施形態では、自己免疫疾患のモデル動物において、免疫細胞を免疫学的に活性な生物模倣体にインビボで曝露し、自己免疫疾患の改善の度合いを評価するステップをさらに含む。

【 0 1 6 4 】

固定 (f i x e d) F c を用いる方法

F c : F c 受容体 (F c R すなわち I g G の F c に対する F c 受容体) 相互作用の役割と、その F c が免疫グロブリン内で生物学的に固定化されることの h I V I G の機能に対する重要性を理解するため、本発明者らは、固定状態の組換え I g G 1 の F c 断片 (r F C F) と、ヒンジ - C H 2 - C H 3 ドメインを含む可溶状態の組換え I g G 1 の F c 断片 (s F c) の両方で、単球が未成熟樹状細胞 (i D C) に分化する過程で h I V I G が単球の機能におよぼす影響を比較した。

【 0 1 6 5 】

顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F) およびインターロイキン - 4 (I L - 4) にて培養した単球を、固定化 r F C F および固定化 h I V I G に曝露し、低用量の可溶性 h I V I G には曝露せずにおいたところ、細胞表面での C D 8 6 の発現が亢進され、C D 1 I c の発現が遅延し、C D I a の発現が抑制された。さらに、これらの変化は、プラスチック表面の r F C F の非特異的タンパク質固定化に続発するものではないと予想される。その理由は、可溶性熱凝集 (s H A) h I V I G 、 s H A r F C F 、あるいは高用量 h I V I G (多量体 F を含有することが認められている) が、固定化 r F C F で観察された変化に似た変化を誘発したからである。

【 0 1 6 6 】

これと一致して、本発明者らのデータは、固体、半固体、またはゼラチン状の支持体の表面に固定化した h I V I G に i D C を曝露した場合に、免疫寛容を調整できる D C の独特な個体群 (高 C D 8 6 、低 C D I a) が得られ、免疫グロブリン G (I g G) F c 断片の機能的部分を含む固定化分子が、h I V I G の模倣薬として、局所的炎症および全身性炎症、ならびに i D C などの単球由来細胞 (M D C) が直接的または間接的に介在している多種多様な他の病態の治療に有用となり得ることを示している。さらに、動物 (ヒト患者など) の体内に移植されるか体に付着され、本明細書では「コーティング装置」と表される装置に、I g G の F c 断片の機能的部分を含む分子を用いて I g G の F c の機能的部分を固定化すると、このような装置に対する炎症反応を (予防できないにしても) 減少させることが可能である。あるいは、移植された装置の表面または内部に塗布された固定ストラドマーと免疫細胞が接触して、免疫細胞が変化してから体循環に入るように免疫細胞に影響を及ぼすことにより、全身性疾患を治療することも可能である。

【 0 1 6 7 】

本発明は、単球由来細胞 (M D C) の活性を阻害する方法を提供する。この方法は、細胞を、F c 試薬が結合した支持体を含む組成物と接触させることを含む。接触は、インビトロ、インビボ、またはエキソビボで可能である。あるいは、細胞は、動物内にあってよい。この動物は、単球由来細胞介在性状態 (M D C M C) に罹患しているか、これを発症するリスクのある動物であり得る。M D C は、例えば、樹状細胞、マクロファージ、単球、または破骨細胞であり得る。[0 0 2 6 0] また、本発明は、治療方法または予防方法を提供する。本方法は、F c 試薬が結合した支持体を含有する組成物を、M D C M C に罹患しているか発症リスクのある動物に投与することを含む。

【 0 1 6 8 】

本発明のストラドマーが、インビボで固定されたFc試薬となることも可能である。本発明者らがいう「インビボで固定されたFc試薬」とは、細胞、すなわち血小板の表面にインビボで固定されたFcを意味する。本発明のストラドマーは、FcRを発現する血小板に効率よく塗布され、塗布後の血小板は、除去されるまで生体に寛容を誘発することが観察されている。驚くべきことに、本発明のストラドマーは、FcRを発現する血小板の割合に対して効率的に結合することが観察された。ITPにおいて、ova：抗ova凝集複合体およびRBC：抗RBC凝集複合体が寛容を誘発し、血小板破壊を防止することから、ストラドマーが塗布されたこのような血小板は、生体において寛容を誘発し得る。このことは、本発明のストラドマーが免疫調節機能を発揮する別の作用機序となり得る。

10

【 0 1 6 9 】

ストラドマー内に含まれる天然の免疫グロブリンFcと比較して、Fc受容体に対するストラドマーの結合親和性ははるかに高いことから、本発明のストラドマーが、インビボで固定された免疫グロブリンFc対照試薬となることも可能である。本発明者らがいう「インビボで固定された免疫グロブリンFc対照試薬」とは、細胞の表面にインビボで固定されたストラドマーを意味し、この細胞には単球、樹状細胞、T細胞、調節性T細胞、T細胞、および血小板が含まれるが、これらに限定されない。ストラドマーは、Fc受容体などの細胞表面受容体に結合することにより、他の免疫グロブリンがこれらの受容体に結合するのを阻止する。フローサイトメトリーなどの研究アッセイおよび臨床診断では、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体が使われている。本発明の重要な側面は、免疫グロブリンFcと結合し得るFc受容体および他の細胞表面受容体に対して、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のFc成分が非特異的に結合するのを防止することである。

20

【 0 1 7 0 】

本明細書で使用する場合、「単球由来細胞介在性状態(MDCMC)」という用語は、単球由来細胞の活性に直接的または間接的に、部分的または全体的に起因する、あるいは単球由来細胞によって産生された因子に直接的または間接的に、部分的または全体的に起因する病態を指す。単球由来細胞の例として、単球、マクロファージ、指状嵌入樹状細胞(本明細書では広義に、樹状突起様細胞および濾胞樹状様細胞を含む「樹状細胞」と呼ぶ)(成熟および未成熟)、破骨細胞、小膠様細胞、単球由来インスリン産生膵島様細胞、単球由来未成熟肥満細胞、および単球由来微小粒子があげられるが、これらに限定されない。

30

【 0 1 7 1 】

固定Fcを用いる方法に関して、「Fc試薬」という用語は、免疫グロブリンIg(IgG)Fc断片の機能的部分を1つ以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、18、20個、またはそれより多く)含む分子または分子複合体を指す。IgGのFc断片は、IgG分子の互いに結合した2つのIgG重鎖のC末端部分からなり、互いに結合した両方の重鎖のヒンジ領域、CH2ドメイン、およびCH3ドメインからなる。「IgGのFc断片の機能的部分」は、互いに結合した両方の重鎖のヒンジ領域、CH2ドメイン、および任意で、CH3ドメインの(N末端から)最初の50個のアミノ酸のうち全部または一部(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、または49個)からなる。ヒトでは、(a)IgG1のヒンジ領域は15個のアミノ酸を含み、CH2ドメインは110個のアミノ酸を含み、CH3ドメインは106個のアミノ酸を含む；(b)IgG2のヒンジ領域は12個のアミノ酸を含み、CH2ドメインは109個のアミノ酸を含み、CH3ドメインは107個のアミノ酸を含む；(c)IgG3のヒンジ領域は62個のアミノ酸を含み、CH2ドメインは104個のアミノ酸を含み、CH3ドメ

40

50

インは106個のアミノ酸を含む；(d) IgG4のヒンジ領域は12個のアミノ酸を含み、CH2ドメインは109個のアミノ酸を含み、CH3ドメインは107個のアミノ酸を含む。

【0172】

野生型IgG分子と同様に、上記のFc試薬では、IgG重鎖由来の2つのポリペプチド鎖は通常同一であるが、必ずしも同一でなくてよい。このため、Fc試薬は、IgG分子全体、非免疫グロブリン由来ポリペプチドに結合したIgG分子全体、IgGのFc断片、非免疫グロブリン由来ポリペプチドに結合したIgGのFc断片、IgGのFc断片の機能的部分、非免疫グロブリン由来ポリペプチドに結合したIgGのFc断片の機能的部分、またはこれらのいずれかの多量体（例えば、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、または十量体）であり得るが、これらに限定されない。また、上記のFc試薬の定義に含まれる限り、Fc試薬は、上記のストラドマーおよびストラドボディであってもよい。

10

【0173】

固定Fcでは、Fc試薬の免疫グロブリン重鎖成分は、野生型アミノ酸配列を有してもよく、あるいは、野生型アミノ酸配列であるが、アミノ酸置換は20個以下（例えば、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1個以下）とすることもできる。このような置換は、好ましくは保存的置換であるが、必ずしも保存的置換でなくてよい。保存的变化は、一般に、以下の群内での変化を含む。グリシンおよびアラニン；バリン、イソロイシンおよびロイシン；アスパラギン酸およびグルタミン酸；アスパラギン、グルタミン、セリンおよびトレオニン；リジン、ヒスチジンおよびアルギニン；フェニルアラニンおよびチロシン。

20

【0174】

本発明の「Fc試薬」は、Fc試薬のIgG重鎖成分の派生元のIgG分子（基準IgG分子）が対象Fc受容体と結合する能力の、少なくとも25%（例えば、少なくとも30%；40%；50%；60%；70%；80%；90%；95%；98%；99%；99.5%；もしくは100%またはそれ以上）を有する。「Fc試薬」が2タイプ以上のIgG分子に由来する重鎖成分を有する場合、基準IgG分子は、対象の関連Fc受容体に最大の結合活性で結合するIgG分子である。

【0175】

本明細書で使用する場合、「固定Fc」とは、以下で定義される「支持体」に結合したFc試薬をいう。「固定Fc」、「結合Fc」および「安定化Fc」は、同義語である。固定Fcは、支持体に付着したFcの機能的部分（Fcの機能的部分を含むポリペプチドを含むが、これに限定されない）で構成される。固定Fcの例として、支持体へのFcの直接結合およびポリマーを介した間接結合；単離されたIgGFc全体の取り込み；IgGFcの機能ドメインのみの取り込み；あるいは、抗体、ストラドマー、またはストラドボディなどの大きなポリペプチドの一部としてのIgGFc全体またはIgGFcの機能ドメイン全体の取り込みが挙げられる。[00267]固定Fcに適用される場合、「支持体」という用語は、固体、半固体、またはゼラチン状の物質を指す。支持体は、動物の体内に埋め込むか、または動物の体表面に付着（もしくは接着）させることができる。支持体には、例えば液体またはガス状の成分が含まれるが、支持体の少なくとも一部は、固体、半固体、またはゼラチン状である。したがって、支持体は、水性溶媒には実質的に不溶であるが、非水性溶媒には可溶の物質であってもよい。このような物質の例として、脂質（リン脂質など）、脂肪酸、および他の脂溶性で水性溶媒不溶性の化合物が挙げられる。このことから、支持体にリボソームが含まれることは明らかであろう。支持体は多孔性であっても非多孔性であってもよい。特定の実施形態では、支持体は、支持体が埋め込まれているか付着もしくは接着されている表面および/または身体に対して不活性である。

30

40

【0176】

支持体は、例えば、ナイロン、テフロン（登録商標）、ダクロン、ポリ塩化ビニル、

50

PEU (ポリ(エステルウレタン))、PTFE (ポリテトラフルオロエチレン)、PMA (メタクリル酸メチル)PEEK、熱可塑性エラストマー、X線不透過性ポリマー、ポリエーテルスルホン、シリコン、ポリカーボネート、ポリウレタン、ポリイソブチレンおよびその共重合体、ポリエステル、ポリオレフィン、ポリイソブチレン、エチレン-オレフィン共重合体、アクリルポリマーおよび共重合体、ビニルハライドポリマーおよび共重合体(ポリ塩化ビニル、ポリビニルエーテル、ポリビニルメチルエーテル、ポリビニリデンハライド、ポリフッ化ビニリデン、ポリ塩化ビニリデンなど)、ポリアクリロニトリル、ポリビニルケトン、ポリビニル芳香族、ポリスチレン、ポリビニルエステル、ポリ酢酸ビニル、ビニル単量体の共重合体、ビニル単量体とオレフィンの共重合体、エチレン-メタクリル酸メチル共重合体、アクリロニトリル-スチレン共重合体、ABS樹脂、エチレン-酢酸ビニル共重合体、ポリアミド、ナイロン66、ポリカプロラクトン、アルキド樹脂、ポリオキシエチレン、ポリイミド、ポリエーテル、エポキシ樹脂、レーヨン-トリアセテート、セルロース、酢酸セルロース、セルロースブチレート、セルロースアセテートブチレート、セロファン、硝酸セルロース、プロピオン酸セルロース、セルロースエーテル、カルボキシメチルセルロース、コラーゲン、キチン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ乳酸-ポリエチレンオキシド共重合体、ポリシロキサン、置換ポリシロキサン、エチレン酢酸ビニル共重合体、ポリオレフィンエラストマー、EPDMゴム、およびこれらの組み合わせなどの合成ポリマーを含有してよく、これらの合成ポリマーで作製されていてもよい。

10

【0177】

20

また、支持体は、ステンレス鋼、白金、イリジウム、チタン、タンタル、ニッケル-チタン合金、もしくはコバルトクロム合金などの金属または金属合金を含有してよく、これらで作製されていてもよい。さらに、支持体は、動物組織または動物組織産物(例えば、組織または臓器の移植片)を含むか、こうした組織または組織産物自体であってよい。この動物組織は、例えば骨(骨化骨(osteogenic bone)など)または軟骨であり得る。さらに、支持体は、コラーゲンやケラチンなどのタンパク質を含むことができる。また、支持体は、無細胞組織マトリックスなどの組織マトリックスであってよく、またはこれを含有してよい。微粒子および非微粒子の無細胞マトリックスについては、例えば米国特許第5,336,616号および第6,933,326号(この開示内容全体が参照により本明細書に組み入れられる)に詳細に説明されている。また、支持体は、動物細胞(例えば、線維芽細胞、間葉系幹細胞などの組織修復細胞)であっても、こうした動物細胞を含んでいてもよく、例えば植毛プラグであり得る。支持体は、アガロースなどの多糖を含有でき、あるいは多糖自体であり得る。さらに、支持体は塩であるか、または塩を含有してもよく、好ましくは、比較的不溶性の塩(例えば硫酸カルシウム)であるか、これを含有する。支持体は、ゲルまたはクリームであってもよい。さらに、支持体はシリコンまたはシラスティックを含有してよい。また、支持体は、絹、綿、羊毛などの天然繊維を含有してもよい。

30

【0178】

加えて、支持体は植込み型の医療器具であり得る。例えば、ステント(例えば、冠動脈ステントなどの血管ステント;気管内ステントまたは経鼻ステントなどの気道ステント;胆管ステントまたは膵管ステントなどの消化管ステント;尿管ステントなどの尿道ステント)、あるいは外科用縫合糸(例えば、絹縫合糸、腸線縫合糸、ナイロン、プラスチック、もしくは金属の縫合糸)または止血鉗子(例えば、動脈瘤クリップ)であり得る。支持体は、例えば、人工股、人工股関節、人工膝、人工膝関節、人工肩、人工肩関節、人工指関節もしくは足趾関節、骨接合板、骨釘、骨癒合不全用インプラント、椎間板インプラント、骨セメント、または骨セメントスペーサであり得る。また、動静脈シャント、植込み型リード、ペースメーカー、人工心臓、心臓補助装置、人工内耳、植込み型除細動器、脊髄神経刺激装置、中枢神経系刺激装置、または末梢神経移植片であってもよい。他の支持体として、義歯または歯冠がある。

40

【0179】

50

他の実施形態では、支持体は、大血管血栓フィルタ装置もしくはケージ、経皮装置、皮膚パッチもしくは粘膜下パッチ、または植込み型薬剤送達装置であり得る。また、支持体は、大血管グラフトであり得、この場合の血管は、例えば、頸動脈、大腿動脈、または大動脈である。さらに、支持体は、皮下インプラント、角膜移植片、眼内レンズ、またはコンタクトレンズであり得る。

【0180】

支持体は、シート、ビーズ、メッシュ、粉末粒子、撚糸、ビーズ、または繊維の形態であり得る。また、支持体は、固体、半固体、またはゼラチン状物質を含有でき、あるいは、こうした物質自体であり得る。

【0181】

また、支持体は、FcRを発現する細胞であり得る。好ましくは、支持体は血小板である。

【0182】

本発明において有用なポリマーは、好ましくは、特に体内への装置の挿入時または植込み時に、生体安定性および生体適合性があり、体組織への刺激のないポリマーである。

【0183】

Fc試薬は、様々な方法で支持体に塗布（すなわち固定または安定化）できる。例えば、疎水性相互作用などによりFc試薬を付着した状態に維持する支持体の表面に、Fc試薬を直接塗布することができる。以下、ポリマーの使用を伴う他のいくつかの方法論（(a)～(e)）を挙げる：

(a) Fc試薬を混和性ポリマーブレンドと混合し、続いてこれを植込み型の合成材料の表面に積層することで、Fc試薬を安定させる。ポリマーブレンドを生成するのに当技術分野で日常的に用いられている単量体として、PLMA [ポリ(メタクリル酸ラウリル)]；PEG [ポリエチレングリコール]、PEO [ポリエチレンオキシド]；アルキル官能化メタクリレートポリマーPMMA、PEMA、PPMA、およびPBMA；イタコン酸塩；フマル酸塩；およびスチレン系樹脂が挙げられる。

(b) ポリマーアンダーコート層またはナノメートル寸法のフィルムを支持体表面に付着させた後、Fc試薬をポリマーアンダーコート層またはナノメートル寸法のフィルムに付着させることで、Fc試薬を安定させる。

(c) ポリマー単量体の薄膜を植込み型の支持体表面に貼り付けた後、単量体を重合させる。このような単量体の例として、メタン、テトラフルオロエチレン、ベンゼン、メタノール、エチレンオキシド、テトラグリム、アクリル酸、アリルアミン、メタクリル酸ヒドロキシエチル、N-ビニルピロリジノン、メルカプトエタノールが挙げられる。続いて、得られた単量体にFc試薬を付着させる。

(d) Fc試薬に付着するタンパク質、例えばタンパク質Aまたはアルブミンを支持体に塗布することで、Fcを支持体の表面で安定させる。

(e) 植込み型の合成材料に結合して、安定化したFcを均一に配向させる疎水性アミノ酸の鎖を、Fc試薬にタグ付けすることが可能である。

【0184】

本発明の方法は、任意の動物種に適用可能であり、作製するFc試薬のIgG由来部分の派生元であるIgG分子も、任意の動物種に由来してよい。当然、関連の動物種は、IgG分子またはIgG様分子が発生する動物種である。通常、本方法が適用される種と、本方法で使われるFc試薬のIgG由来部分の元となる動物種は、同じである。しかしながら、これらは必ずしも同じでなくてよい。関連の動物種は、好ましくは哺乳動物であり、ヒト、非ヒト霊長類（例えば、サル、ヒヒ、チンパンジー）、ウマ、ウシ科の動物（例えば、去勢されていない雄牛、雌牛、去勢された雄牛）、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウサギ、アレチネズミ、ハムスター、ラット、マウスが含まれるが、これらに限定されない。哺乳類以外の種の例として、鳥類（例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル）および魚類が挙げられる。

【0185】

10

20

30

40

50

「治療する」、「治療」、および「予防」という用語は、固定Fcを使用した場合の、ストラドマーに関する上記の意味と同じ意味を有する。

【0186】

固定FcがFc試薬を塗布した植込み型装置である場合、当技術分野において周知の方法を用いて、該当する被検体の関連の臓器または組織または体表面への装置の植込み、付着、または接着を行うことができる。また、固定Fcが、例えば懸濁液や粉末として製剤される場合、ストラドマーの場合について上述されているように製剤し投与することができる。

【0187】

本発明の固定Fc試薬は、以下を含む状態の治療または予防に使用できる。癌、鬱血性心不全(CHF)、血管炎、酒さ、ざ瘡、湿疹、心筋炎、および他の心筋症状、全身性エリテマトーデス、糖尿病、脊椎症、滑膜線維芽細胞、および骨髄間質；骨減少症；バジエット病、肥大型骨形成；廃用性骨減少症；栄養不良、歯周病、ゴーシェ病、ランゲルハンス細胞組織球症、脊髄損傷、急性化膿性関節炎、骨軟化症、クッシング症候群、単骨性線維性骨異形成症、多骨性線維性骨異形成症、歯周組織再建および骨折、骨疼痛管理、および腫瘍随伴体液性高カルシウム血症、強直性脊椎炎、および他の脊椎関節症；移植拒絶およびウイルス感染。ただし、これらに限定されない。

10

【0188】

すべての自己免疫疾患は、一部または全体がMDCMDであり得る。「自己免疫疾患」という用語は、本明細書で使用する場合、80を超える慢性病からなる多様な群を指す。これらの疾患はいずれも、背景にある問題は、身体の免疫系がその身体自身を攻撃することである。自己免疫疾患は、結合組織、神経、筋肉、内分泌系、皮膚、血液、呼吸器系、および消化器系を含む、あらゆる主要な体組織に影響を及ぼす。

20

【0189】

上記の自己免疫疾患または状態として、血液免疫学的プロセスが挙げられ、これには、特発性血小板減少性紫斑病、同種免疫性/自己免疫性血小板減少症、後天性免疫性血小板減少症、自己免疫性好中球減少症、自己免疫性溶血性貧血、パルボウイルスB19関連赤血球形成不全、後天性抗第VII因子自己免疫疾患、後天性フォンウィルブランド病、多発性骨髄腫および意義不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症、敗血症、再生不良性貧血、赤芽球痺、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、新生児溶血性疾患、免疫介在性好中球減少症、血小板輸血不応状態、新生児輸血後紫斑病、溶血性尿毒症症候群、全身性血管炎、血栓性血小板減少性紫斑病、またはエバンス症候群が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0190】

上記の自己免疫疾患または状態として、神経免疫学的プロセスが挙げられ、これには、ギラン・バレー症候群、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、IgM-M蛋白血症を伴う脱髄性ニューロパチー、ランバート・イートン症候群、重症筋無力症、多巣性運動ニューロパチー、抗/GM1抗体を伴う下位運動ニューロン症候群、脱髄、多発性硬化症および視神経炎、全身硬直症候群、抗体Yo抗体陽性傍腫瘍性小脳変性症、腫瘍随伴脳脊髄症、抗Hu抗体陽性感覚性ニューロパチー、てんかん、脳炎、脊髄炎、特にヒトT細胞性白血病ウイルス1型関連の脊髄症、自己免疫性糖尿病性ニューロパチー、または急性特発性自律神経ニューロパチーが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0191】

上記の自己免疫疾患または状態として、リウマチ性疾患プロセスが挙げられ、これには、川崎病、関節リウマチ、フェルティ症候群、ANCA陽性血管炎、特発性多発性筋炎、皮膚筋炎、抗リン脂質症候群、再発性自然流産、全身性エリテマトーデス、若年性特発性関節炎、レイノー病、CREST症候群、またはブドウ膜炎が含まれるが、これらに限定されない。

【0192】

上記の自己免疫疾患または状態として、皮膚免疫学的疾患プロセスが挙げられ、これ

50

には、中毒性表皮壊死融解症、脱疽、肉芽腫、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、および落葉状天疱瘡を含む自己免疫性で皮膚水疱を呈する疾患、尋常性白斑、連鎖球菌毒素ショック症候群、強皮症、びまん性皮膚硬化型強皮症および限局皮膚硬化型強皮症を含む全身性強皮症またはアトピー性皮膚炎（特にステロイド依存性）を含むが、これらに限定されない。

【0193】

上記の自己免疫疾患または状態として、筋骨格免疫学的疾患プロセスが挙げられ、これには、封入体筋炎、壊疽性筋膜炎、炎症性ミオパチー、筋炎、抗デオリン（BJ抗原）ミオパチー、傍腫瘍性壊死性ミオパチー、X連鎖性空胞性ミオパチー、ペナシラミン誘導多発性筋炎、アテローム性動脈硬化症、冠動脈疾患、または心筋症が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0194】

上記の自己免疫疾患または状態として、胃腸免疫学的疾患プロセスが挙げられ、これには、悪性貧血、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、セリアック病、疱疹状皮膚炎、原因不明肝硬変、反応性関節炎、クローン病、ホイップル病、潰瘍性大腸炎、または硬化性胆管炎が含まれるが、これらに限定されない。

【0195】

上記の自己免疫疾患または状態として、移植片対宿主病、抗体による移植片拒絶、骨髄移植後拒絶、感染症後の炎症、リンパ腫、白血病、腫瘍症、喘息、抗細胞抗体の存在する1型糖尿病、シェーグレン症候群、混合性結合組織病、アジソン病、フォークト・小柳・原田症候群、膜性増殖性糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、橋本甲状腺炎、ウェゲナー肉芽腫症、顕微鏡的多発動脈炎、チャージ・ストラウス症候群、結節性多発動脈炎、または多臓器不全が挙げられる。

20

【0196】

本明細書における「癌」とは、無秩序な細胞成長を典型的特徴とする哺乳動物の生理学的状態を指すか、または、こうした状態を表す。癌の例として、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫（脂肪肉腫、骨原性肉腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、線維肉腫、粘液肉腫、軟骨肉腫を含む）、骨巨細胞腫、神経内分泌腫瘍、中皮腫、脊索腫、滑膜腫、神経鞘腫、髄膜腫、腺癌、黒色腫、および白血病、またはリンパ系腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。このような癌のさらに特定の例として、扁平上皮癌（上皮の扁平上皮癌など）、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌および肺扁平上皮癌、小細胞肺癌腫を含む肺癌、腹膜の癌、肝細胞癌、胃腸癌を含む胃の癌または胃癌、膵臓癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌、肛門癌、陰茎癌、精巣癌、食道癌、胆道の腫瘍、ユーイング腫瘍、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性肺癌、腎細胞癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胚性癌、ウィルムス腫瘍、精巣腫瘍、肺癌腫、膀胱癌腫、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、ワルデンストローム・マクログロブリン血症、骨髄異形成疾患、重鎖病、神経内分泌腫瘍、神経鞘腫および他の癌腫、頭頸部癌、急性骨髄性白血病（成熟型AML、未分化型AML、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病、および急性単球性白血病を含む）、骨髄異形成症候群、慢性骨髄増殖性疾患（慢性骨髄性白血病を含む）などの骨髄性腫瘍、中枢神経系の腫瘍、例えば、脳腫瘍（神経膠腫、神経芽細胞腫、星状細胞腫、髄芽腫、上衣腫、および網膜芽細胞腫）、固体腫瘍（上咽頭癌、基底細胞癌、膵臓癌、胆管の癌、カボジ肉腫、精巣癌、子宮癌、腔癌または子宮頸癌、卵巣癌、原発性肝癌または子宮体癌、脈管系の腫瘍（血管肉腫および血管外皮腫）、造血器腫瘍および腫瘍様症状、例えば、ホジキンリンパ腫；非ホジキンリンパ腫（パーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫/慢性リンパ球性白血病、菌状息肉腫、マントル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B

30

40

50

細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、有毛細胞白血病、およびリンパ形質細胞性白血病)、B細胞急性リンパ芽球性白血病/リンパ腫およびT細胞急性リンパ芽球性白血病/リンパ腫を含むリンパ球前駆細胞の腫瘍、胸腺腫、末梢性T細胞白血病や成人T細胞白血病/T細胞リンパ腫および大顆粒リンパ球性白血病を含む成熟T細胞およびNK細胞の腫瘍、溶骨性の骨癌、および骨転移が挙げられる。

【0197】

本明細書で使用する場合、「単球由来細胞介在性疾患(MDCMD)を発症するリスクのある」被検体とは、MDCMDを発症する素因、すなわちMDCMDを発症する遺伝的素因を有する被検体、あるいはMDCMDにつながり得る条件に曝露された被検体である。「MDCMDに罹患している疑いのある」被検体とは、MDCMDの1つ以上の症候を有する被検体である。上記から、「MDCMDを発症するリスクのある」被検体と、「MDCMDに罹患している疑いのある」被検体はいずれも、関心の対象である種に含まれる個体ではないことは明らかであろう。

10

【0198】

上記の方法のいずれにおいても、MDCMCは支持体によって引き起こされるものである可能性があり、Fc試薬がMDCMCを防止または寛解する働きをする。

【0199】

免疫学的アッセイでの応用

本明細書に開示されている免疫学的に活性な生物模倣体を用いて免疫学的アッセイを実施し、免疫学的に活性な生物模倣体の設計時の調節の対象である免疫細胞の機能を試験することができる。

20

【0200】

低親和性Fc受容体経路を通じたシグナル伝達では、細胞表面での受容体の凝集と架橋が必要とされる。こうした凝集および架橋のパラメータに適合するには、抗原特異的標的とのFab結合が生じ、続いて応答細胞の表面上でFc領域と低親和性FcR間の相互作用が生じることが前提にされている。この状況において、抗体は、1. エピトープ特異的標的とのFab相互作用/エピトープ特異的標的の遮断、2. FcとFcRとの相互作用、という2通りの経路で細胞応答を誘発する可能性を有する。こうした知見にもかかわらず、インビボで使用されるモノクローナル抗体を用いた大多数の治療研究に対する現在の対照は、観察される機能的効果に対する寄与因子としてのFc:Fc受容体間の相互作用の可能性に十分に対処できていない。現在、交絡変数としてのFc:FcR相互作用を排除するための複数の戦略が使用されている。例えば、一部の研究では、エピトープ特異性は保持するがFc領域は欠如しているScv(単一鎖可変領域)またはFab断片を使用している。このアプローチは、試薬の半減期が短く、シグナル伝達を誘導する可能性に限りがあるという点で制約がある。他の研究では、Fc断片に融合する受容体またはリガンドで構成される融合タンパク質を使用している。この種のアプローチは、Fab特異的な作用を、受容体リガンド相互作用を有する場合に観察される作用と区別するには役立つが、Fcが介在する作用を効果的に制御するものではない。動物モデルにおける抗体ベースの治療法の評価でも、無関係のFab結合部位を有するアイソタイプ対照抗体を使用する場合がある。このような選択は、同じアイソタイプの抗体同士では、Fab結合特異性や親和性にかかわらず機能が類似していると推定されることを論理的根拠としている。しかしながら、こうした無関係のアイソタイプ対照を用いることには、次のような根本的な欠陥がいくつかある。

30

40

【0201】

1. これらの抗体のFab断片がリガンドまたは抗原エピトープと結合できない場合、Fc受容体の架橋が欠如するため、Fc断片は低親和性FcR相互作用を通じたシグナル伝達を刺激しないことが予想される。したがって、観察される実験抗体と対照抗体の間の機能的差異の原因が、FcRを架橋する手段を欠いたエピトープ特異的標的とのFab相互作用にあると正確に判断することはできない。

【0202】

50

2. これらのアイソタイプが、親抗体とは糖型が異なるか、または個々の糖型の相対比率が異なる細胞で産生される場合、F a b 親和性が同じでも、低親和性 F c R と高親和性 F c R の両方に対する結合が変化する。

【0203】

この問題を克服する完璧な対照は存在しないが、1つの選択肢として、親抗体と同じ細胞で産生されるアイソタイプ特異的ストラドマーを、実験抗体が標的とするエピトープの発現レベルに比例した用量で投与することが挙げられる。例えば、ラットにおいて産生されるエピトープ特異的抗体の適切な対照は、エフェクター細胞の表面で F c 受容体を凝集できるラットアイソタイプ特異的なストラドマーであると考えられる。

【0204】

一般に、免疫学的に活性な有効量の生物模倣体に免疫細胞を曝露して、公知の方法で免疫細胞の活性を調節し、この免疫調節を試験化合物または試験分子と比較して、試験化合物に類似の免疫調節活性があるか否かを判断する。

【0205】

別の実施形態では、本明細書に記載され、また当業者に知られている様々な免疫学的アッセイにおいて、熱凝集ストラドマーおよび凝集免疫グロブリンを実験室対照用の試薬として使用することができる。

【0206】

免疫学的アッセイは、インビトロのアッセイでもインビボのアッセイでもよく、種が同一または同一ではないストラドマーを使用し、ヒト免疫細胞または非ヒト免疫細胞を用いて実施できる。一実施形態では、免疫学的に活性な有効量の生物模倣体を用いて免疫細胞の活性を調節し、この調節と、試験化合物による免疫細胞の調節とを比較することにより、免疫学的アッセイを実施する。ストラドマーは、他の化合物の免疫学的作用を試験するアッセイにおいて、陽性対照試薬として機能することができる。このアッセイでは、混合リンパ球反応を使用するなどして受容体発現レベル、サイトカイン放出、および機能の変化を測定することにより、エフェクター細胞の F c 受容体結合および機能的応答に関して、ストラドマーとの比較により対象のモノクローナル抗体の作用を比較できる。このようにして、モノクローナル抗体と部分的に類似した応答が (F a b が欠如した) ストラドマーから得られる場合、モノクローナル抗体の作用は、ある部分では、その F a b の特異性によるものではなく、エフェクター細胞上の複数の F c 受容体の結合および架橋の一般的な作用によるものであることが分かる。

【0207】

種特異的かつアイソタイプ特異的抗体の生物活性の一部または全部が、種特異的かつアイソタイプ特異的ストラドマーによって複製されれば、観察される生物活性のうち、種特異的かつアイソタイプ特異的ストラドマーに起因する部分を、F c - F c 受容体活性が担っていることは明らかである。よって、種特異的かつアイソタイプ特異的ストラドマーは、観察される生物活性が、試験抗体の F a b 部分と、複数の F c 受容体と結合し架橋する分子の F c 部分の非特異的作用のどちらかに起因しているか否か、起因している場合はどの程度なのかを判断する目的で、潜在的な治療抗体を評価する上で有用である。

【0208】

本発明のストラドマーは、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、免疫組織化学検査、免疫蛍光アッセイといった抗体ベースのイムノアッセイの実施中に、F c 受容体の非特異的結合を阻止する上でも有用である。従来、このようなアッセイでは、試験抗体と同じ種の非特異的抗体を用いて、F c 受容体への非特異的結合を阻止している。本発明のストラドマーは、各々が複数の F c R 結合部位を持つため、使用するストラドマーを大幅に減らせるという点で、従来 F c 阻止手段に優る利点を提供する。加えて、例えば、種の一一致した I g G 対照では、死滅細胞と非特異的に結合することがよくあるが、本発明のストラドマーは抗体の F a b 抗原結合部分がないため、このような結合は見られない。

【0209】

本発明のストラドマーは、驚くべきことに、非常に高い親和性でエンドトキシンと結

10

20

30

40

50

合することが見出された。標準のエンドトキシン除去キットおよびカラムでは、密に結合したエンドトキシンの有意な割合をストラドマーから除去することができない。したがって、クレームされている組成物は、エンドトキシンの結合プールとして機能する上で有用であり、医薬調製物と実験調製物の双方で、有用なエンドトキシン除去ツールとなり得る。このことは、エンドトキシンとストラドマーの間で形成される複合体が、医薬調製物または医薬組成物から効率的にエンドトキシンを除去するに足る十分に高い親和性を持つという点で、有益である。一実施形態では、エンドトキシン - ストラドマー複合体を、ろ過により組成物から除去する。

【0210】

本明細書に引用されているすべての参考文献は、参照によりその全体が組み入れられる。

10

【実施例】

【0211】

実施例1 ストラドマーの生成および精製

HEK293F細胞（インビトロジェン社（Invitrogen）、カリフォルニア州、カールスバッド）またはチャニーズハムスター卵巣細胞（CHO）を、G045/M045およびG051の安定な発現のために使用した。HEK293FまたはCHO細胞を、タンパク質発現のスケールアップのために懸濁液中で増殖させた。

【0212】

G045c（配列番号4）、G045old（配列番号7）、G051（配列番号18）、G019（配列番号8）、G028（配列番号9）、G046（配列番号10）、G075（配列番号20）、G076（配列番号21）、G096（配列番号28）、G098（配列番号24）、G089（配列番号27）、または前述のストラドマーの対応するマウス配列をコードする遺伝子を、G045またはG051の高レベルの発現を促進するためのCMVプロモーターの転写制御下で、ネオマイシン耐性遺伝子、例えばインビトロジェン社（Invitrogen）（カリフォルニア州、カールスバッド）製のpcDNA3.3を含むベクター中にクローニングした。形質移入のためのプラスミドDNAを、内毒素非含有プラスミドDNA単離キット（Nucleobond、マシレイ・ナゲル社（Macherey-Nagel））を使用して、細菌培養物から単離した。プラスミドDNAをコードするG045c/G045old、およびG051を制限酵素で直線化し、293-F細胞またはCHO細胞中に形質移入した。形質移入後、G045c、G045oldまたはG051を発現している陽性細胞をジェネテシン/G418で選択し、形質移入された細胞のプールを得た。クローンの細胞株を得るため、安定に形質移入された細胞のプールを、96ウェルプレート中、1~2細胞/ウェルまで希釈し、そこから安定な細胞株の単細胞クローンを得た。単細胞クローンをELISAにより、タンパク質発現に対してスクリーニングした。単細胞クローンを成長させ、G045c、G045old、G051、G019、G028、G046、G075、G076、G096、G098、またはG089タンパク質を、分泌タンパク質として培地から収集した

20

30

【0213】

一過性形質移入により、G045c、G045old、G051、G019、G028、G046、G075、G076、G096、G098、またはG089タンパク質を生産するために、タンパク質の高レベルの発現を確実にするためのCMVプロモーターの制御下で、HEK293細胞またはCHO細胞を、G045c、G045old、G051、G019、G028、G046、G075、G076、G096、G098、またはG089タンパク質をコードするDNAで形質移入した。形質移入はいくつかの市販されている形質移入試薬のうちの一つで実施した。G045c、G045old、G051、G019、G028、G046、G075、G076、G096、G098、またはG089分泌タンパク質を、細胞培養培地から、形質移入の4~5日後に収集した。

40

【0214】

一過性に形質移入された細胞または安定な細胞株のどちらか由来の細胞培養培地を、0

50

． 22 μ m フィルターを使用して濾過し、1 容量の結合緩衝剤 (20 mM リン酸ナトリウム pH 7.2 + 150 mM NaCl) で pH 7.2 まで調節し、HiTrap Mabselect タンパク質 A 親和性カラム上で、AKTAXpress 精製システム (ジューライフサイエンス社 (GE life sciences)) を使用して、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。0.1 M のクエン酸ナトリウム pH 3.3 中での溶出後、緩衝剤交換のために、HiPrep 26/20 脱塩カラム上で、タンパク質を精製した。

【0215】

さらなる精製のために、G045c、G045old、G051、G019、G028、G046、G075、G076、G096、G098、または G089 タンパク質を、50 mM トリス-HCl pH 7.5 + 150 mM NaCl 中の、HiLoad Superdex 200 ゲルろ過カラム (ジューライフサイエンス社 (GE Lifesciences)) 上でのゲルろ過により精製し、続いて Mono S イオン交換カラム (ジューライフサイエンス社 (GE Lifesciences)) 上で精製した。イオン交換精製は、20 mM MES 緩衝剤 pH 6 中、0 ~ 1 M の NaCl の濃度勾配で実施した。クロマトグラフィーの後、透析によりタンパク質を PBS に調整した。得られた G045c ストラドマーの模式図を図 1 に示す。

10

【0216】

得られた G045c タンパク質の多量体化能力を試験するために、同一濃度の、上述の方法により生成された G045c、および国際公開第 2008/151088 号に前述される方法により生成され、かつ外来性のクロニング配列を含む G045old を含む、10% ポリアクリルアミドゲルを泳動した。驚くべきことに、外来性断片の除去は、G045old と比較して、G045c における多量体化の劇的な増加をもたらし、G045c は、G045old と比較して、非常により高い濃度のより高次の多量体を示した。(図 2A を参照のこと)

20

【0217】

G045c と比較した G045old における多量体形成を、Gel-Doc IT 画像化システムを使用して分析した。ゲル写真の密度走査に続き、各ゲルバンド中のタンパク質の量を評価した。驚くべきことに、G045old 試料中の多量体形成は約 27.9% と推定されたのに対し、天然に結合しているストラドマーを生成するための外来性断片の除去は、総タンパク質量の約 73.8% と推定される、有意により高い、G045c 試料中の多量体形成をもたらした。(図 2B を参照のこと)。

30

【0218】

実施例 2：関節炎のマウスモデルにおける、M045old と比較した M045c の強化された有効性

コラーゲン誘発関節炎における、M045old の有効性と比較した M045c の有効性の評価を実施した。0 日目および 21 日目に、DBA1/J マウスを、フロイント不完全アジュバント (シグマ社 (Sigma)、Cat # 5506) で乳化した 4 mg/ml 溶液と合わせた Type I I ウシコラーゲン (コンドレックス社 (Chondrex, Inc.)、Cat . 20021) で免疫した。マウスの体重を毎週計測し、関節炎の徴候を毎日点数化した。各足を点数化し、全ての 4 つのスコアの合計を関節炎指標 (AI) として記録した。最大の可能な AI は、以下の通り 16 であった：0 = 目に見える関節炎の影響なし、1 = 1 つの指の浮腫および / または紅斑、2 = 2 つの関節の浮腫および / または紅斑、3 = 2 を超える関節の浮腫および / または紅斑 4 = 四肢変型および関節の強直を含む、足および指全体の重症な関節炎。22 日目 (治療 0 日目) から開始し、コラーゲン免疫マウスのうちの 10 匹を、平均 AI (3.3) に基づいて治療群に分類し、10 匹の無病マウスを無病群と指定した。関節炎指標を 14 治療日の間測定し、その後マウスを安楽死させた。陽性対照群として、マウスのうち 10 匹を平均 AI (3.3) に基づいて治療群に分類し、10 ml/kg のプレドニゾロンを、毎日経口で投与した。M045c または M045old の治療群として、マウスのうち 20 匹を平均 AI (3.3) に基づいて治療群に分類し

40

50

、4日ごとに(0日目、4日目、8日目、および12日目)、400 μ gのM045cまたはM045old(17.4mg/kg)を投与した。

【0219】

M045cで治療したマウスは、M045oldで治療したマウスと比較して、ほぼすべての試験点において、統計的により低い重症度の疾患を有した。(図3を参照のこと)。従って、リーダー配列とIgG1Fcの間の16アミノ酸クローニング断片の除去は、より多くの多量体形成のみならず、炎症性疾患に対する有効性の増加をももたらす。

【0220】

コラーゲン誘発関節炎における、M045c、M019、M028、M046およびM051の有効性の評価を同様に実施し、プレドニゾロンの有効性と比較した。上述のとおり、マウスにおいてCIAを誘導し、CIA誘導後22日目から、400 μ gのM045、M019、M028、M046またはM051の毎週2回の静脈内投与、または毎日10mg/kgのプレドニゾロンによるマウスの治療を開始し、上述のとおりAIを2週間計測した。試験されるストラドマーのうちの各々を投与されたマウスは、PBSで治療した対照よりも、統計的により低い重症度の疾患を有した(図9を参照のこと)。

10

【0221】

実施例3：関節炎のマウスモデルにおけるM045およびプレドニゾロンの相乗効果

コラーゲン誘発関節炎モデルにおける、低用量プレドニゾロンと組み合わせたM045cの有効性の評価を実施した。簡単に説明すると、0日目および21日目に、DBA1/Jマウスを、フロイント不完全アジュバント(シグマ社(Sigma)、Cat#5506)で乳化した4mg/ml溶液と合わせたTypeIIウシコラーゲン(コンドレックス社(Chondrex, Inc.)、Cat.20021)で免疫した。マウスの体重を毎週計測し、関節炎の徴候を毎日点数化した。各足を点数化し、全ての4つのスコアの合計を関節炎指標(AI)として記録した。最大の可能なAIは、以下の通り16であった：0=目に見える関節炎の影響なし、1=1つの指の浮腫および/または紅斑、2=2つの関節の浮腫および/または紅斑、3=2を超える関節の浮腫および/または紅斑、4=四肢変型および関節の強直を含む、足および指全体の重症な関節炎。22日目(治療0日目)から開始し、コラーゲン免疫マウスのうちの10匹を、平均AI(3.3)に基づいて治療群に分類し、10匹の無病マウスを無病群と指定した。関節炎指標を14治療日の間測定し、その後マウスを安楽死させた。陽性対照群として、マウスのうち10匹を平均AI(3.3)に基づいて治療群に分類し、10ml/kgのプレドニゾロンを、毎日経口で投与した。M045c治療群として、マウスのうち10匹を平均AI(3.3)に基づいて治療群に分類し、4日ごとに(0日目、4日目、8日目、および12日目)、400 μ gのM045cまたはM045old(17.4mg/kg)を投与した。プレドニゾロンおよびM045c間の相乗効果を測定するために、1つの群は2mg/kgの低用量プレドニゾロンで毎日治療し、1つの群は200 μ g/容量の低用量M045cの4日ごとの投与で治療し、および1つの群には、2mg/kgの低用量プレドニゾロン+200 μ g/容量の低用量M045cを4日ごとに投与した。

20

30

【0222】

高用量プレドニゾロン(10mg/kg)は、単一の薬剤として、コラーゲン誘発関節炎の改善において有効であったが、低用量プレドニゾロン(2mg/kg)は、ごくわずかに有効なだけであった。さらに、低用量M045c(200 μ g/容量、または9.1mg/kg)もまた、治療していない対照と比較して、疾患重症度の低減において有効ではなかった。しかしながら、驚くべきことに、低用量M045cと組み合わせた低用量プレドニゾロンで治療したマウスは、プレドニゾロンおよびM045c単独の治療群と比較して、相乗効果的な(追加的、という以上の)疾患重症度の低下を示した。(図4を参照のこと)。

40

【0223】

実施例4：マウス受容体に対するIgG2A、M045、M046、M028、M019およびG051の結合分析

50

Fc RIIIA、Fc RIIBおよびSIGN-R1受容体を、それぞれ560、500、および1000RUまで、アミン固定化を使用してCM4チップ上に固定化し、タンパク質のサイズを補った。M045c（配列番号11）、M046（配列番号15）、M019（配列番号13）およびM028（配列番号14）を、HBSS-EP泳動用緩衝液中、500nMから1.9nMまで連続的に希釈し、20 μ l/分で180秒、注入した。1MのMgClを100 μ l/分で10秒間注入することにより、再生を達成し、続いて泳動用緩衝液で短時間洗浄した。T100評価用ソフトウェアを使用してKDを算出した。

【0224】

マウスFc R3AおよびFc R2bに対して、マウスIgG2a Fcホモ二量体は、試験されるストラドマーのうちの各々と比較して、より低い親和性およびより速い解離速度で結合する。マウスSIGN-R1に対して、マウスIgG2a Fcホモ二量体は、感知できるほどには結合しないのに対し、選択的ストラドマーは、様々な程度まで会合し、ゆっくり解離する。（図5を参照のこと）。

10

【0225】

M045c画分をこのモデルにおいて評価した。Aktaxpressタンパク質精製システムおよびGE HiLoad16/60 Superdex200 prep gradeカラムを使用して、最初にM045Fをゲル分画した。画分1（M045F1）は、サイズに基づく多量体の分離後、M045多量体の最も高い分子量の成分を含む。M045F2はより低い分子量を有する多量体成分であり、M045F3はストラドマーのホモ二量体画分である。他の画分またはIgG2a Fc対照と比較して、マウスFc RIIIA、Fc RIIB（図6aを参照）、およびSIGN-R1（図6bを参照）に対する結合親和性は最も高く、M045F1に対する解離速度は遅い。

20

【0226】

G051の結合を評価するために、Octet96 Red Instrument（フォルテバイオ社（ForteBio）、カリフォルニア州、メンローパーク）上で、製造者の指示（Data Acquisition User Guide 6.4 ForteBio）に従って、バイオレイヤー干渉法（biolayer Interferometry）アッセイを実施した。マウスタンパク質の結合分析のために、HisタグされたマウスFc RII（アールアンドディーシステム社（R&D system）、cat#1460-CD）およびFc RIII（アールアンドディーシステム社（R&D system）、cat#1960）を、1X動態解析緩衝剤（kinetic analysis buffer）（フォルテバイオ社（ForteBio）、cat#18-5032）中、10 μ g/mlで、抗ペンタHisバイオセンサー（フォルテバイオ社（ForteBio）、cat#18-5077）に、別々にロードした。ヒトタンパク質の結合分析のために、HisタグされたヒトFc RIIb（アールアンドディーシステム社（R&D system）、cat#1875-CD）およびFc RIIIA（アールアンドディーシステム社（R&D system）、cat#4325-Fc）を、1X動態解析緩衝剤（kinetic analysis buffer）（フォルテバイオ社（ForteBio）、cat#18-5032）中、10 μ g/mlで、抗ペンタHisバイオセンサー（フォルテバイオ社（ForteBio）、cat#18-5077）に、別々にロードした。センサーチップのロード後、1X動態解析緩衝剤（kinetics analysis buffer）中の、単量体の画分（多様な濃度にわたる）または多量体の画分（多様な濃度にわたる）のどちらかの配合物にチップを移動することによりタンパク質の会合を測定し、センサーチップを1X動態緩衝剤（kinetics buffer）に移動することにより解離を測定した。分析結果は記載される通りであった（Data Analysis User Guide 6.4ForteBio）。分析結果を上述のとおり標準化し、ホモ二量体に50kDの分子量を割り当て、すべての他のタンパク質配合物に150kDを割り当てた。

30

40

【0227】

表2は、M051のより大きなストラドマー多量体画分は、より小さな多量体画分よりも、より高い親和性および結合活性で結合しかつより遅く解離し、より小さな多量体画分は、ホモ二量体画分よりも、より高い親和性および結合活性で結合しかつより遅く解離す

50

ることを示す。

【表 2】

表 2

試料	KD	Kon	Kdis	Rmax	R2	画分
M051	6.55E-9	8.53E+5	5.59E-3	0.394	0.987	
M051単量体	9.59E-7	7.24E+5	6.94E-1	0.373	0.985	2A11
M051二量体	1.25E-8	1.45E+6	1.81E-2	0.4129	0.987	2H10
M051三量体	3.36E-9	1.28E+6	4.28E-3	0.5093	0.996	3E12
M051四量体	1.39E-9	1.56E+6	2.04E-3	0.567	0.996	3H4
M051多量体	1.77E-9	4.19E+6	1.15E-4	0.6237	0.998	4F4

10

【0228】

G001 (陰性 IgG1 Fc) と比較した G045 または G051 の結合動態を評価するために、上述のとおり、Octet 96 Red Instrument 上で、バイオレイヤー干渉法 (biolayer Interferometry) アッセイを実施した。G045 および G001 の、ヒト Fc RIIb、Fc RIIa (F および V 変異体の両方)、カニクイザル Fc RIIa、カニクイザル Fc RIIb および カニクイザル Fc RII に対する結合を測定した。G045 は、G001 と比較して、試験される受容体のうちの各々に対する、有意により高い結合親和性を有し、より遅い解離、および結合活性の証拠を伴う。(表 3 および 4 を参照のこと)。

20

【表 3】

表 3

受容体	タンパク質	KD	kon	kdis	R max	R2
ヒト Fc γ RIIb	G045	1.42E-9	7.99E+5	1.14E-3	0.7166	0.999
ヒト Fc γ RIIIa (F)	G045	1.22E-9	6.20E+5	7.567E-4	0.7507	0.999
ヒト Fc γ RIIIa (V)	G045	2.95E-10	6.07E+5	1.79E-4	0.9182	0.999
カニクイザル Fc γ RIIb	G045	1.19E-9	7.56E+5	8.81E-4	0.7125	0.999
カニクイザル Fc γ RIIIa	G045	2.58E-10	6.17E+5	1.59E-4	1.0356	0.999
マウス Fc γ RIIb	G045	5.42E-10	1.21E+6	6.56E-4	0.4555	0.998
マウス Fc γ RIII	G045	8.00E-10	1.03E+6	8.23E-4	0.519	0.998

30

40

【表 4】
表 4

受容体	タンパク質	KD	kon	kdis	R max	R2
ヒト Fc γ RIIb	G001	1.31E-6	6.86E+5	8.99E-1	0.19	0.986
ヒト Fc γ RIIIa (F)	G001	2.43E-6	1.11E+5	2.69E-1	0.383	0.990
ヒト Fc γ RIIIa (V)	G001	1.14E-6	1.18E+5	1.35E-1	0.7265	0.995
カニクイザル Fc γ RIIb	G001	2.04E-6	3.94E+5	8.06E-1	0.3456	0.988
カニクイザル Fc γ RIIIa	G001	9.15E-7	1.24E-5	1.14E-1	0.837	0.995
マウス Fc γ RII*	G001	1.51E-6	2.56E+5	3.87E-1	0.1173	0.963*
マウス Fc γ RIII*	G001	4.18E-6	1.18E+5	4.91E-1	0.1026	0.904*

10

20

【0229】

同様に、G051およびG001の、ヒトFcRIIb、およびFcRIIIaに対する結合を測定した。G051は、G001と比較して、試験される受容体のうちの各々に対する、有意により高い結合親和性を有し、より遅い解離および結合活性の証拠を伴う。(表5を参照のこと)。

表 5

【表 5】
表 5

タンパク質	受容体	KD	Kon	Kdis	Rmax	R2
G001	Fc γ RIIb	2.99E-06	3.72E+05	1.11E+00	0.3152	0.986
G001	Fc γ RIIIa	6.77E-07	1.64E+05	1.11E-01	0.6535	0.991
G051	Fc γ RIIb	4.39E-08	7.10E+05	3.12E-02	0.2868	0.991
G051	Fc γ RIIIa	2.30E-08	2.83E+05	6.50E-03	0.886	0.996

30

40

【0230】

実施例 5 : 天然に結合しているストラドマー化合物はITPの治療/予防において有効である

特発性血小板減少性紫斑病(ITP)におけるストラドマーの効果を解明するために、ITPの予防的マウスモデルにおいて、ストラドマーを試験した。血小板上のインテグリン受容体を覆う、マウスインテグリン抗IIb抗体に暴露した後、低血小板数を誘導した。簡単に説明すると、1日目に、採血および血小板数測定に続き、8週齢のC57BL/6マウス(チャールズリバー社(Charles River))に、ストラドマーまたは対照を尾静脈注射した。2日目に、採血および血小板数測定に続き、血小板の減少を誘導するために、200 μ lのリン酸緩衝食塩水中2 μ gの抗体の濃度で腹腔内注射により投与すること

50

を前提として、マウスを MWR e g 3 0 (B D ファーミンジェン社 (B D Pharmingen)、c a t # 5 5 3 8 4 7) で治療した。血小板数測定のための採血および MWR e g 3 0 の注射を、3日目、4日目、および5日目にも継続した。I V I G 陽性対照を、2日目から5日目に毎日投与した。血小板数は、D r e w S c i e n t i f i c H e m a v e t 9 5 0 血球計数器で測定した。M 0 4 5 c およびその画分を、2日目に一回投与した。血液は、尾静脈に切れ目を入れることにより採取し、凝固を防ぐためにクエン酸塩緩衝剤と混合した。

【0231】

薬剤治療なしの I T P 対照および I g G 2 a F c 対照の両方と比較して、M 0 4 5 c はこのモデルにおいて有意に防御的であり、I V I G 予防的治療、および MWR e g 3 0 の注射 (i n s u l t) を受けなかったマウスの両方と競合する (図 7 を参照のこと)。M 0 4 5 c 画分を、実施例 4 に記載される通りに作製した。M 0 4 5 画分 1 は、このモデルにおいて、薬剤治療なしの I T P 対照と比較して有意に防御的であるのに対し、M 0 4 5 画分 3 は防御的ではない。

10

【0232】

実施例 6：天然に結合しているストラドマー複合体による内毒素複合体の除去

内毒素を除去するために、目的のタンパク質を含む内毒素含有タンパク質溶液を、内毒素結合性ストラドマーを溶液に混合した後に、1容量の結合緩衝剤 (2 0 m M リン酸ナトリウム p H 7 . 2 + 1 5 0 m M N a C l) で p H 7 . 2 に調整した。内毒素を除去するために、タンパク質を含む溶液を、アフィニティークロマトグラフィーカラム (H i T r a p M a b s e l e c t プロテイン A 親和性カラム、G E ライフサイエンシズ社 (G E Life Sciences)) に適用する。ストラドマーが結合した内毒素は親和性カラムに結合し、精製された、内毒素を含まないタンパク質が、素通り画分に溶出する。

20

【0233】

内毒素を捕捉するための、ストラドマー使用に代替するアプローチにおいては、タンパク質 A でコーティングされた磁気ビーズ (ニューイングランドバイオラプス社 (N e w E n g l a n d B i o L a b s)、マサチューセッツ州) を、内毒素含有タンパク質溶液中に、内毒素結合性ストラドマーとともに混合し、ストラドマーが結合した内毒素は、磁気分離により除去される。

30

【0234】

実施例 7：免疫学的アッセイにおける F c ブロッキングのための、天然に結合しているストラドマー複合体の使用

抗体ベースの研究ツールおよび臨床検査薬の感受性および特異性の改善。抗体の研究および臨床検査薬の有用性は、非特異的結合性により限定される。これは、例えば、モノクローナルまたはポリクローナル抗体の F c 部分の、免疫細胞および腫瘍を含む細胞上の高親和性 F c 受容体および他の F c 結合受容体に対する結合により、または抗体で覆われた抗体凝集体または細胞凝集体の、低親和性 F c 受容体に対する結合により、起こり得る。

【0235】

F c 受容体の、特異的な抗 F c 受容体抗体との相互座用を阻止するストラドマーの能力を実証するために、フローサイトメトリーを実施し、徐々に用量を増加したヒトストラドマー G 0 4 5 c を、特異的な細胞上に存在することが知られている F c R に対する抗 F c R 抗体の結合を阻止する能力に関して、I g G 1 F c のホモ二量体の単量体である G 0 0 1 と比較した。ストラドマーは、I g G 1 F c 対照と比較して、抗 F c R 抗体の F c R に対する結合を効果的に阻止し、そのためには濃度に依存するということが判明した。(図 8 を参照のこと)。

40

【0236】

F c 受容体および免疫グロブリン F c 領域に結合する他の受容体に対するその非常に高い結合親和性ゆえに、ストラドマーは、特異的な抗 F c 受容体モノクローナル抗体の結合および相互座用の阻止においてさえ、驚くほど有効である。従ってストラドマーは、

50

研究ツール環境および臨床検査薬環境の両方において、投与された抗体の非特異的な抗体結合を減少させるために、対照試薬として有用である。

【0237】

実施例8：天然に結合しているストラドマー化合物は、実験的自己免疫性神経炎の治療において有効である

M045cおよびM051の、それぞれの場合においてIVIgおよびアルブミンに対するものと比較した有効性の評価を、実験的自己免疫性神経炎(EAN)ラットモデルにおいて実施した。マウスEANモデルは、ヒト急性炎症性脱髄性多発ニューロパチーの、広範に使用されている動物モデルである。簡単に説明すると、45匹のLewisラットを完全なウシ末梢神経ミエリンで免疫し、3つの群にランダムに分類した。一般的には9日目または10日目に始まる体重減少である、臨床的欠陥の発症時に、治療群あたり15匹のラットを、IVIg(1g/体重1kg)、M045(20mg/kg)またはM051(17.5mg/kg)、もしくはアルブミンで治療し、全てのラットに、連続して2日間、2用量を静脈投与した。すべての薬剤を、尾静脈注射により、静脈内に投与した。

10

【0238】

EANラットを、臨床的、電気生理学的、および組織学的に評価した。臨床的な疾患重症度を、毎日の臨床的な格付けおよび体重変化により評価した。電気生理学的研究には、複合筋活動電位(CMAPs)の振幅および運動神経伝導速度(MCV)の検査も含まれた。疾患のピークの15日目に、各群から5匹のラットを屠殺し、坐骨神経を収集し、病理組織学的変化を分析した。治療の有効性を、IVIgおよびアルブミン群、ならびに組換え型M045cまたはM051およびアルブミン群の間で比較した。

20

【0239】

試験されるストラドマーM045cを投与されたラットは、アルブミンで治療された対照よりも、有意的により重症度の低い疾患を有した(図12を参照のこと)。アルブミンで治療されたEANラットは、IVIgで治療されたラット(15匹中1匹)、およびM045cで治療されたラット(15匹中0匹)と比較して、より高い死亡率(15匹中4匹)を呈した。M045cおよびIVIgによる治療を受けた動物は、有意に、より顕著ではない体重減少を示した。IVIgおよびM045cで治療されたラットには、運動神経伝導速度(MCV)および末梢部および基部のCMAP振幅の両方において、アルブミンで治療されたラットと比較して、統計的に有意な改善があった。アルブミンで治療されたラットは、IVIgまたはM045cで治療されたラットと比較して、坐骨神経におけるより重症な軸索の欠陥および活性化軸索変性を示した。従って、ストラドマーM045cは、アルブミンと比較して、臨床のゴールドスタンダードであるIVIgが示す有効性と競合する、死亡率、体重、臨床的、電気生理学的および病理組織学的な有効性を、IVIgの用量の約2%で実証した。

30

【0240】

試験群あたり11匹のラットで行った別の実験において、試験されるストラドマーM051を投与されたラットは、アルブミンで治療された対照よりも、統計的により重症度の低い疾患を有した。(図11を参照のこと)。この研究において、M051群での4匹に対して、対照(アルブミン)群では11匹中7匹の動物が死亡した。IVIgまたはM051のどちらかを投与されたラットは、アルブミン対照を投与されたラットと比較して、有意により少ない体重減少を示した。IVIgまたはM051のどちらかを投与されたラットは、アルブミン対照を投与されたラットと比較して、臨床スコアにおける有意な改善を示した。IVIgまたはM051による治療後、MCVおよびCMAP振幅の両方において、統計的に有意な改善があった。従って、ストラドマーM051は、アルブミンと比較して、臨床のゴールドスタンダードであるIVIgが示す有効性と競合する、有意な、死亡率、体重、臨床的、および電気生理学的有効性を、IVIgの用量の約2%で実証した。

40

【0241】

50

実施例 9 : Fc 変異を含む天然に結合しているストラドマー化合物は、Fc R に対する強化された結合を示し、関節炎のマウスモデルの治療において有効である。

Fc 変異体含有ストラドマーである、G 0 7 5 (配列番号 2 0) および G 0 7 6 (配列番号 2 1) の、Fc R I I I a、Fc R I I I b および Fc R I I I a に対する結合を、実施例 4 において上述されるとおり、B i a c o r e 結合アッセイにより実施した。G 0 7 5 は、Fc R I I I a に対する結合の増加、および Fc R I I I a および Fc R I I I b に対する結合の減少を示し、一方 G 0 7 6 は、Fc R I I I a に対する結合の減少、および Fc R I I I a および Fc R I I I b に対する結合の増加を示した。(図 1 0 A および B を参照のこと)。

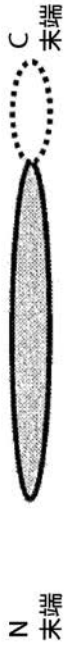
【 0 2 4 2 】

次に、Fc 変異体含有ストラドマー、M 0 7 5 (配列番号 2 2)、M 0 7 6 (配列番号 2 3) および M 0 9 8 (配列番号 2 5) の関節炎のマウスモデルにおける有効性の評価を、上述の実施例 3 で実施された通りに決定した。Fc 変異体含有ストラドマーを、ビヒクルおよび M 0 4 5 c と比較した。M 0 9 8 および M 0 7 5 の両方が、C I A の進行の阻害において有意により有効であり、一方、M 0 7 6 ストラドマーは有効ではなかった。(図 1 3 A および B を参照のこと)。個々の Fc - Fc R 結合を変化させることが知られている、または補体依存性細胞傷害を変化させる、免疫グロブリン Fc の他の変異が、I g G 1 Fc を含み、Fc 受容体に多価の I g G 1 Fc を提示するストラドマーに対して、同様に相補的であることが期待される。

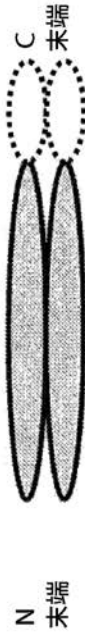
【 図 1 a 】

図 1 a

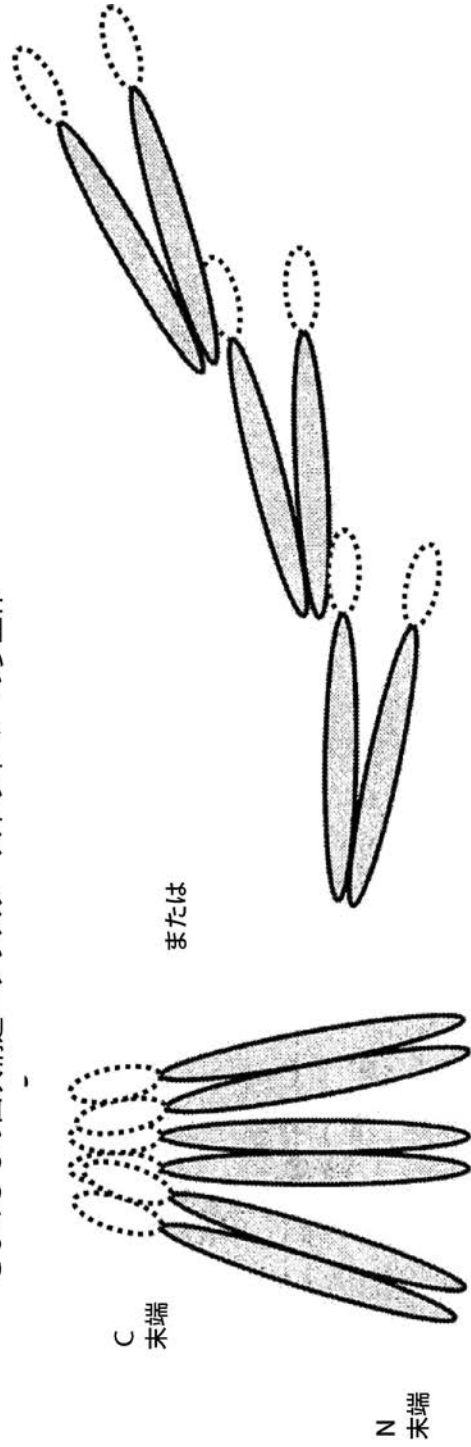
G045cの一次構造



G045の二次構造=クラスターストラドマーのホモ二量体



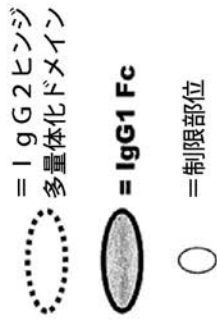
G045cの四次構造=クラスターストラドマーの多量体



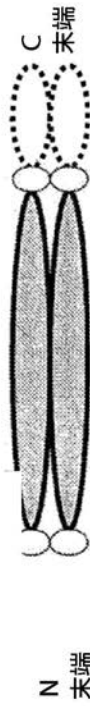
【 図 1 b 】

図 1 b

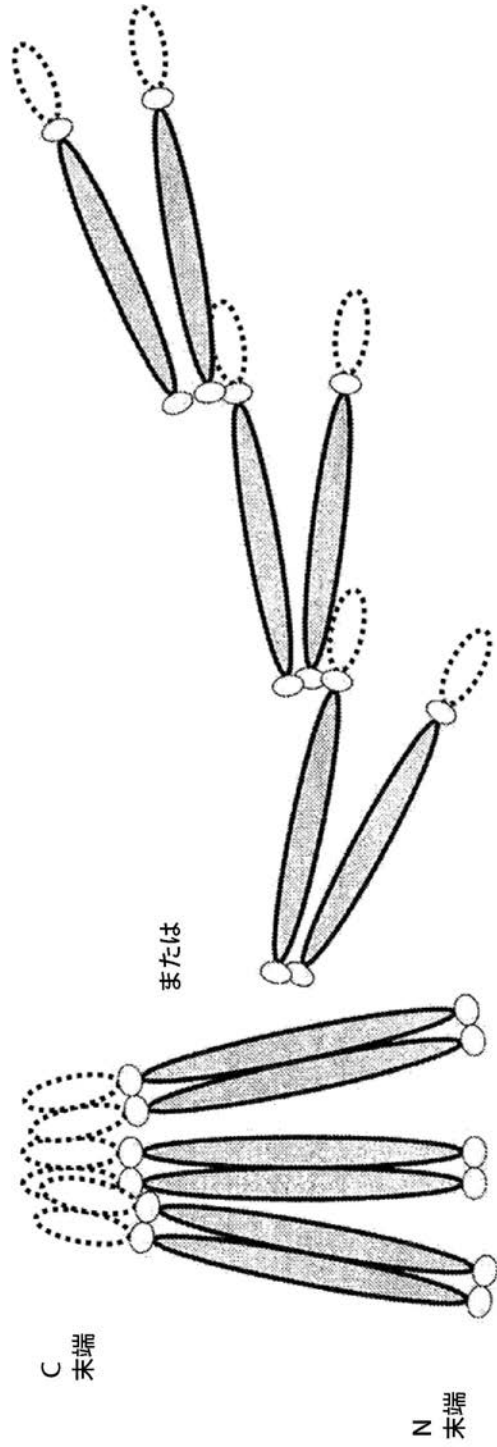
G04501dの一次構造



G04501dの二次構造=クラスターストラドマーのホモ二量体



G045の四次構造=クラスターストラドマーの多量体



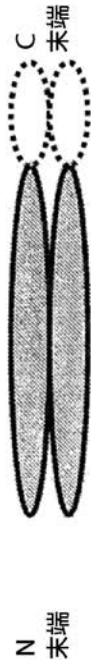
【 図 1 c 】

図 1 c

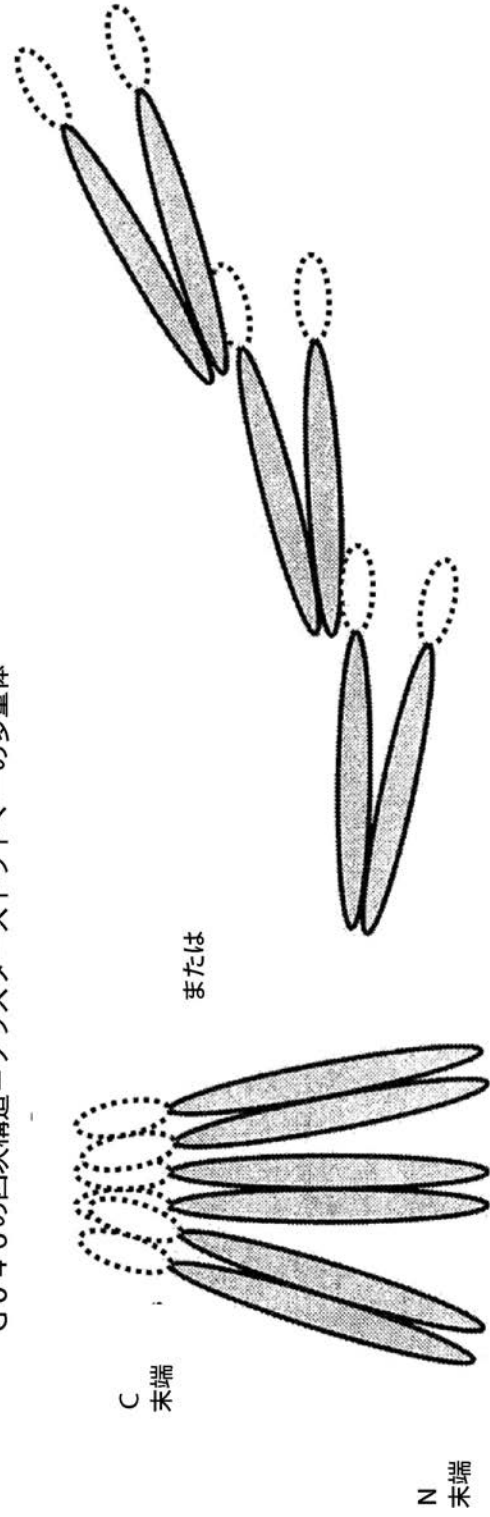
G046の一次構造



G046の二次構造=クラスターストラドマーのホモ二量体



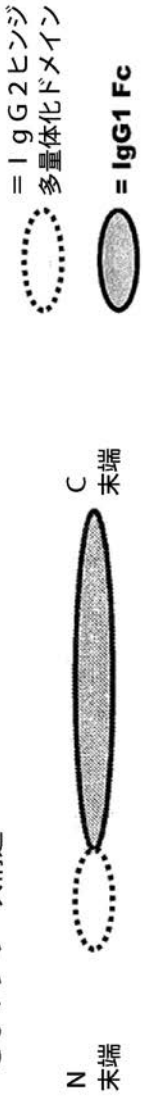
G046の四次構造=クラスターストラドマーの多量体



【 図 1 d 】

図 1 d

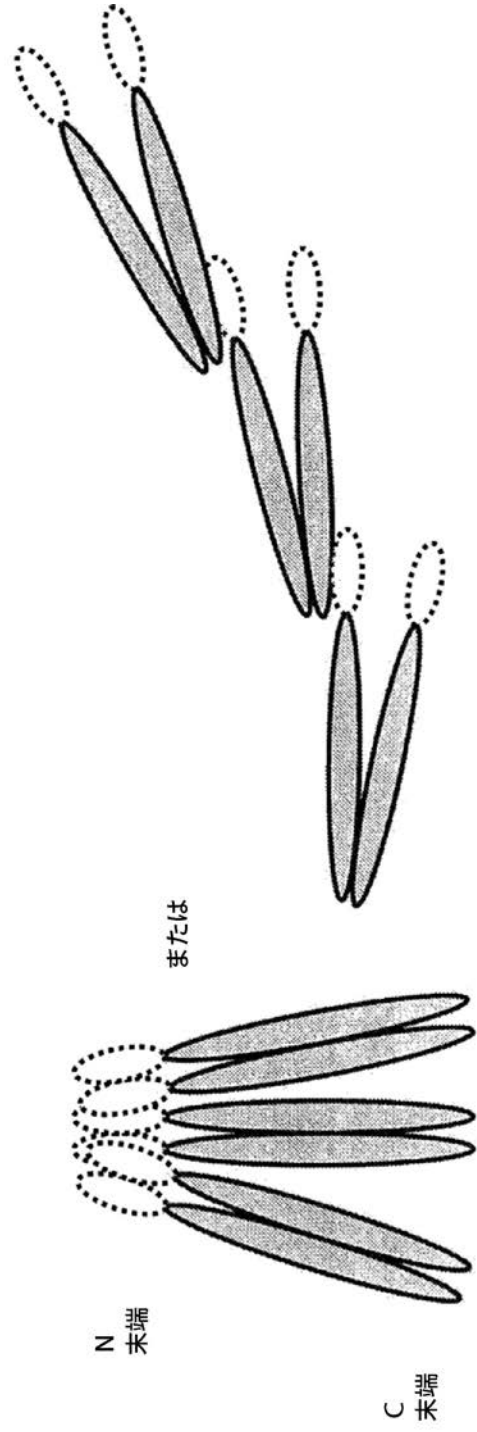
G019の一次構造



G019の二次構造=クラスターストラドマーのホモ二量体



G019の四次構造=クラスターストラドマーの多量体



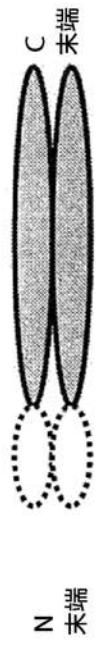
【 図 1 e 】

図 1 e

G028の一次構造



G028の二次構造=クラスターストラドマーのホモ二量体



G028の四次構造=クラスターストラドマー (商標) の多量体

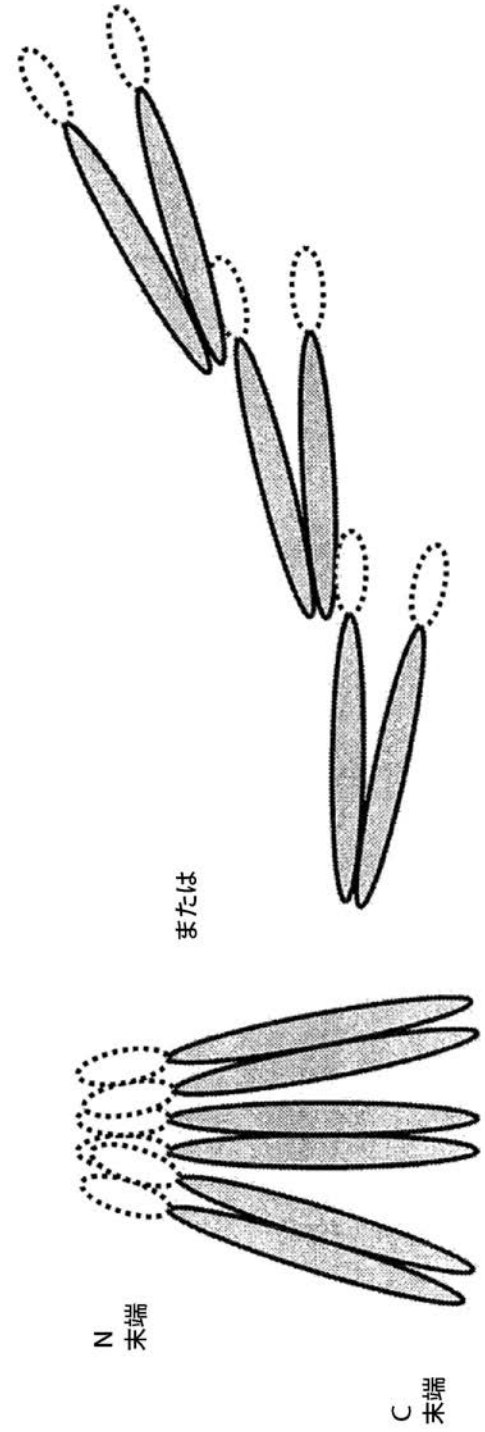


図 1 f

G051の一次構造



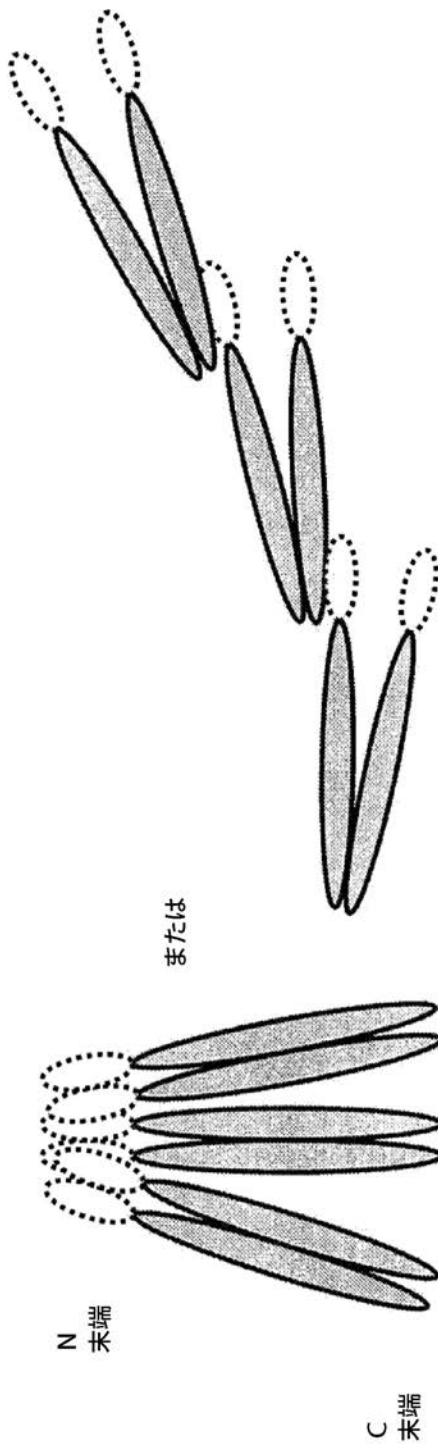
○ = IgG2ヒンジ
多量体化ドメイン

● = IgG1 CH2およびCH3

G051の二次構造=クラスターストロマー



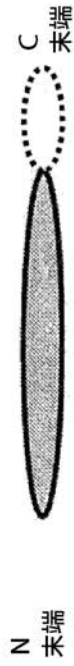
G051の四次構造=クラスターストロマーの多量体



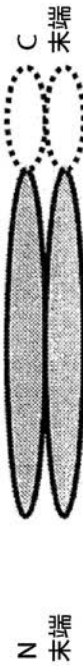
【 図 1 g 】

図 1 g

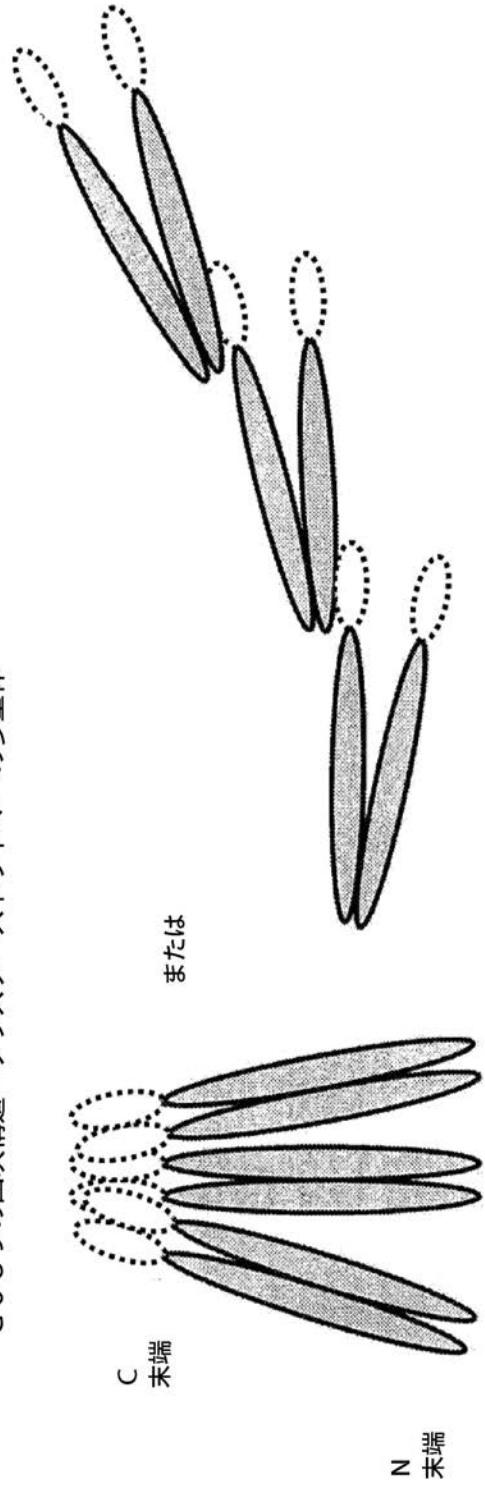
G089の一次構造



G089の二次構造=クラスターストロドマー



G089の四次構造=クラスターストロドマーの多量体



【 図 1 h 】

図 1 h

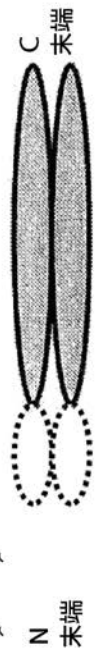
G096の一次構造



=GPP多量体化
ドメイン

= IgG1 Fc

G096の二次構造=クラスターストロドマー



G096の四次構造=クラスターストロドマーの多量体

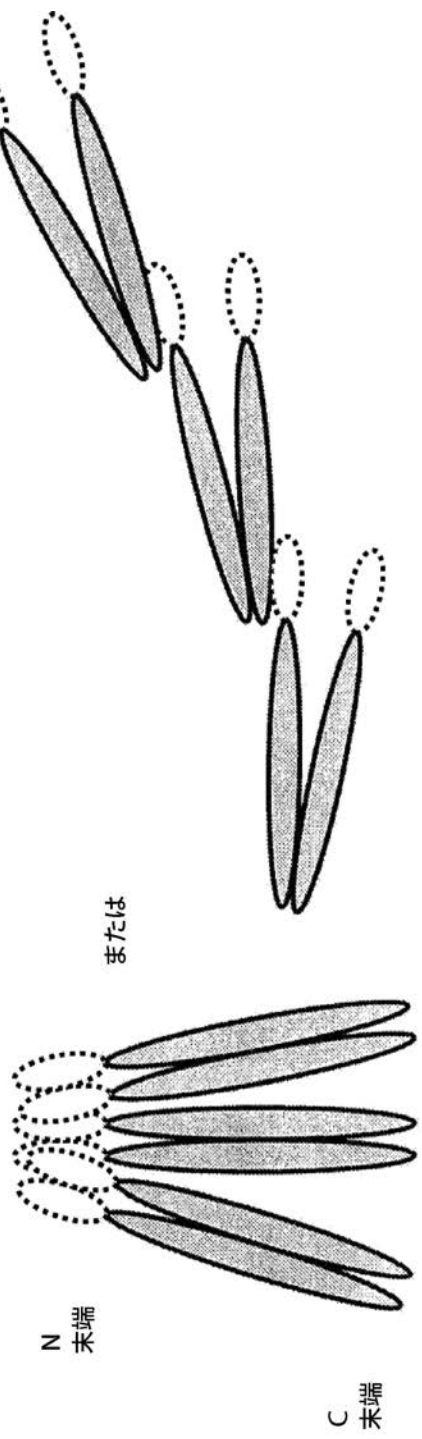
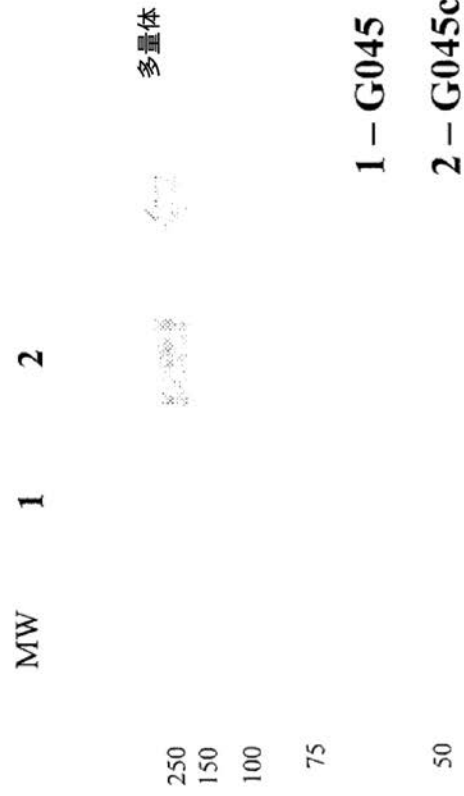


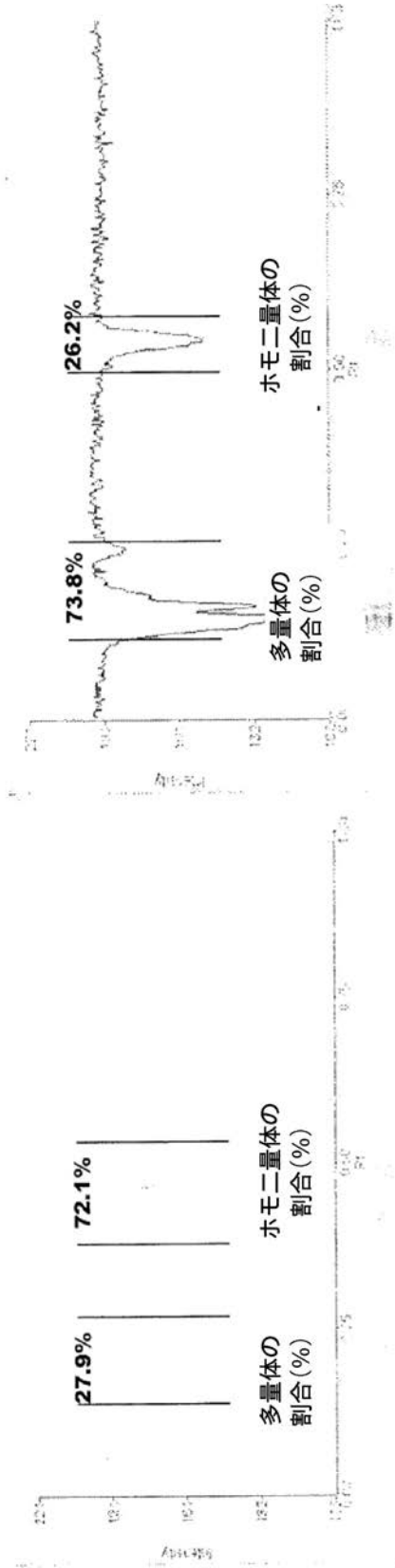
図 2 a



【 図 2 b 】

図 2 b

総タンパク質量の割合 (%)

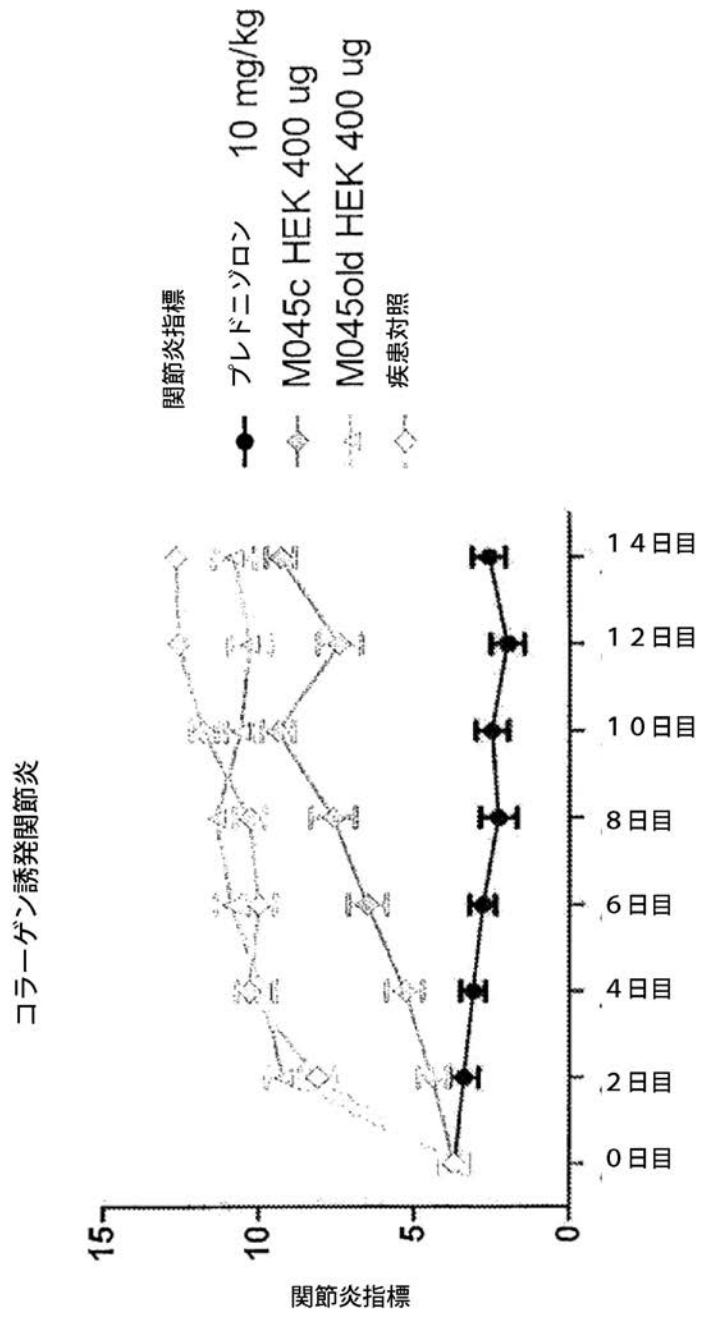


G045old

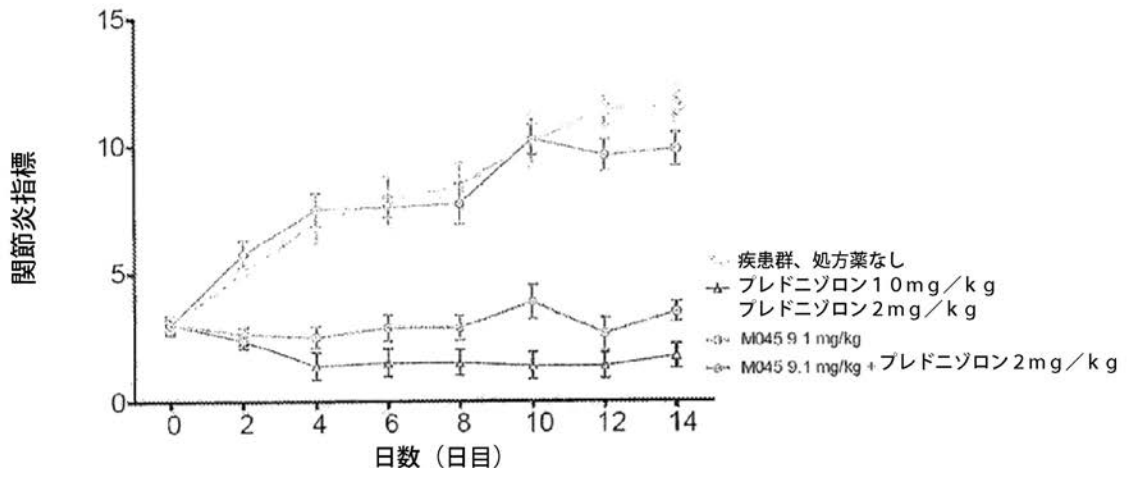
G045c

【 図 3 】

図 3

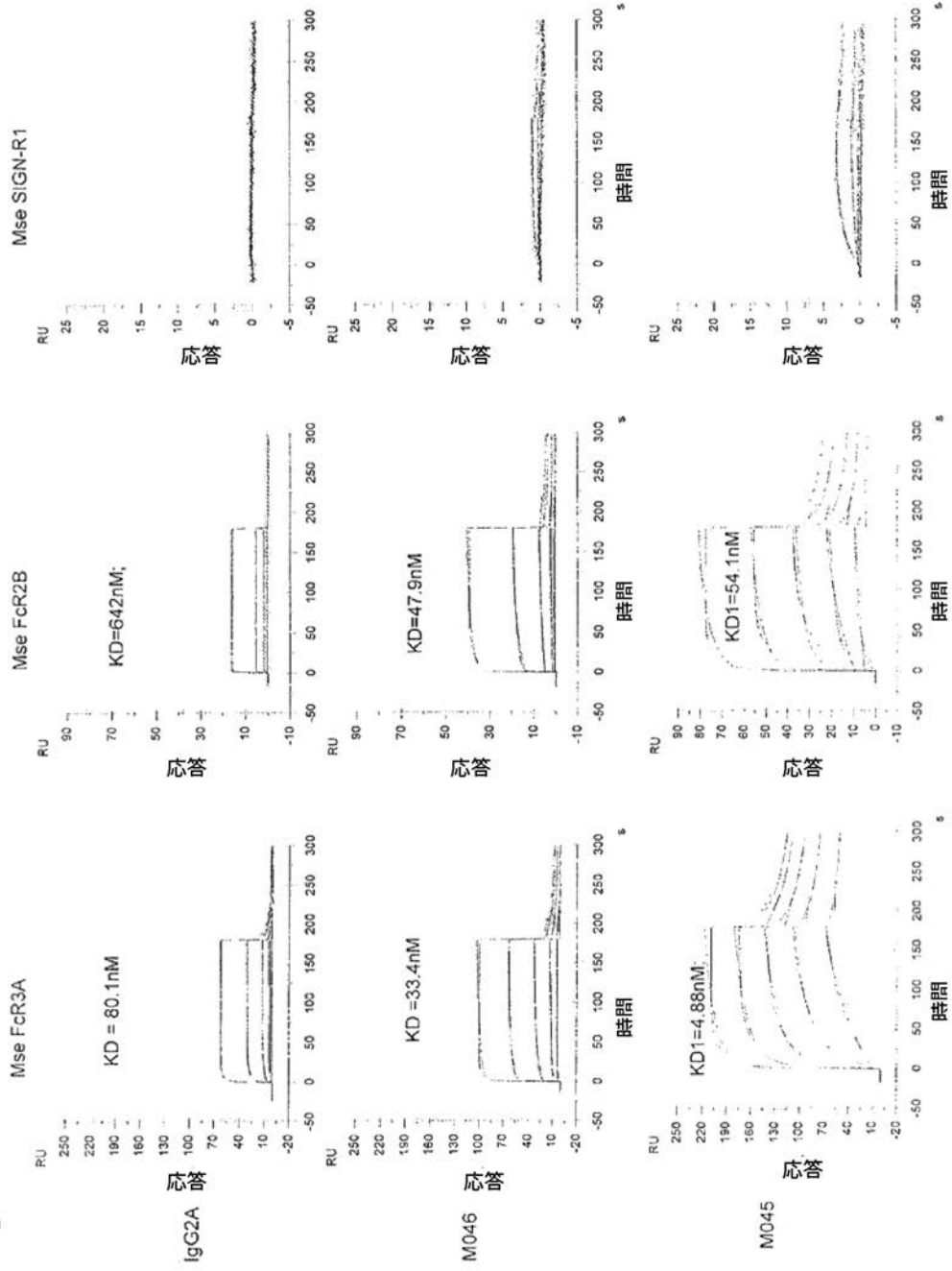


【 図 4 】
図 4



【 図 5 】

図 5



【 図 5 - 1 】

図 5 - 1

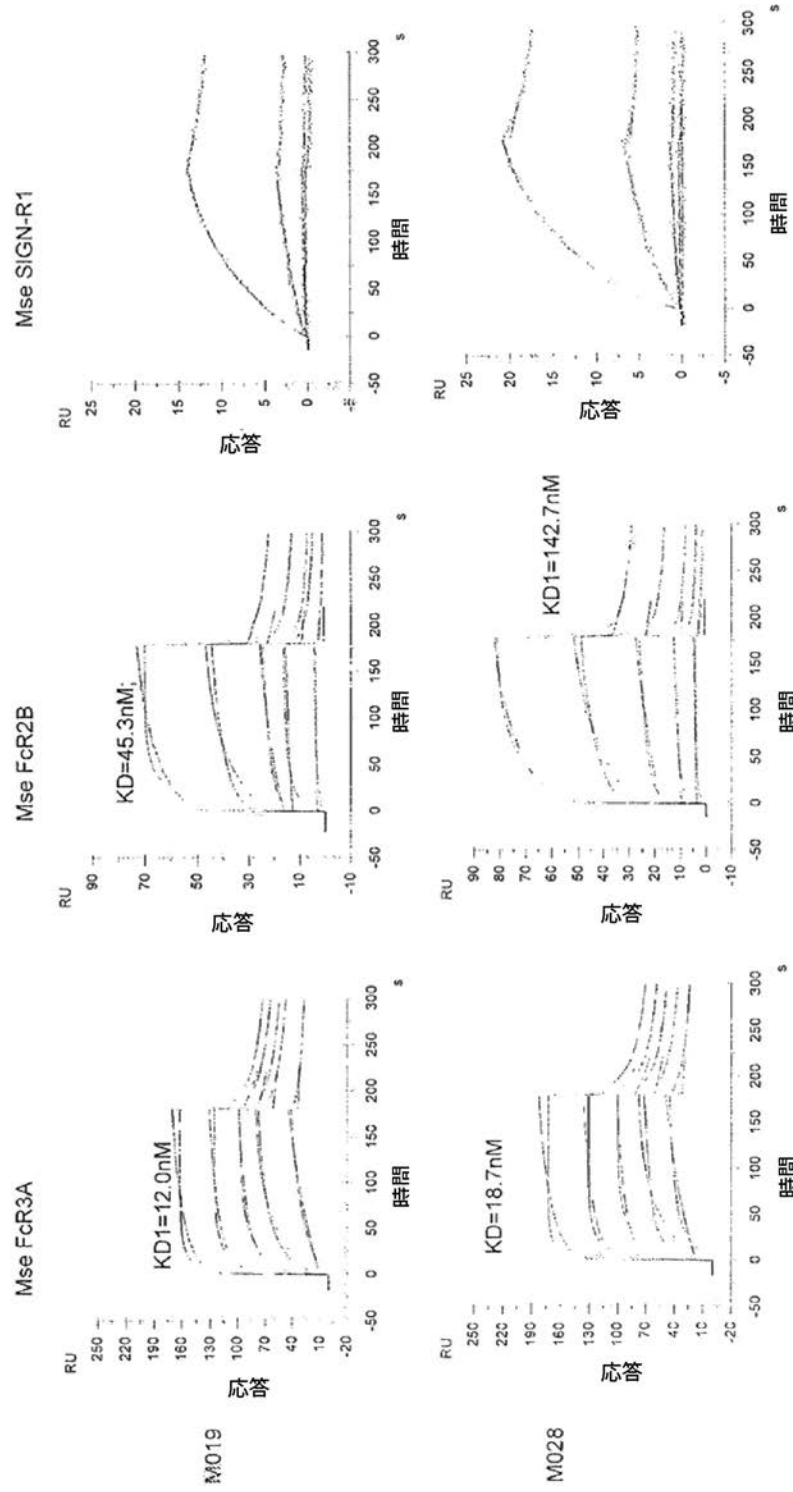
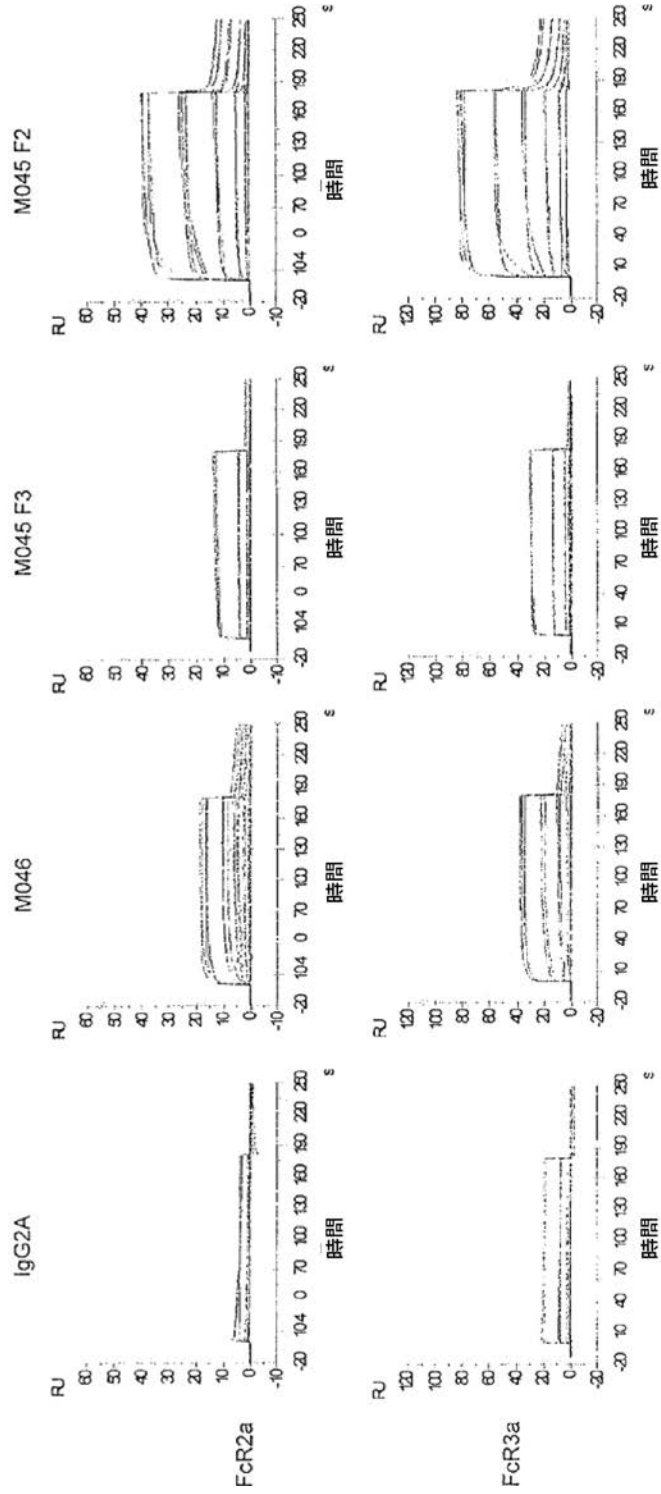


図 6 a



【 図 6 a - 1 】

図 6 a - 1

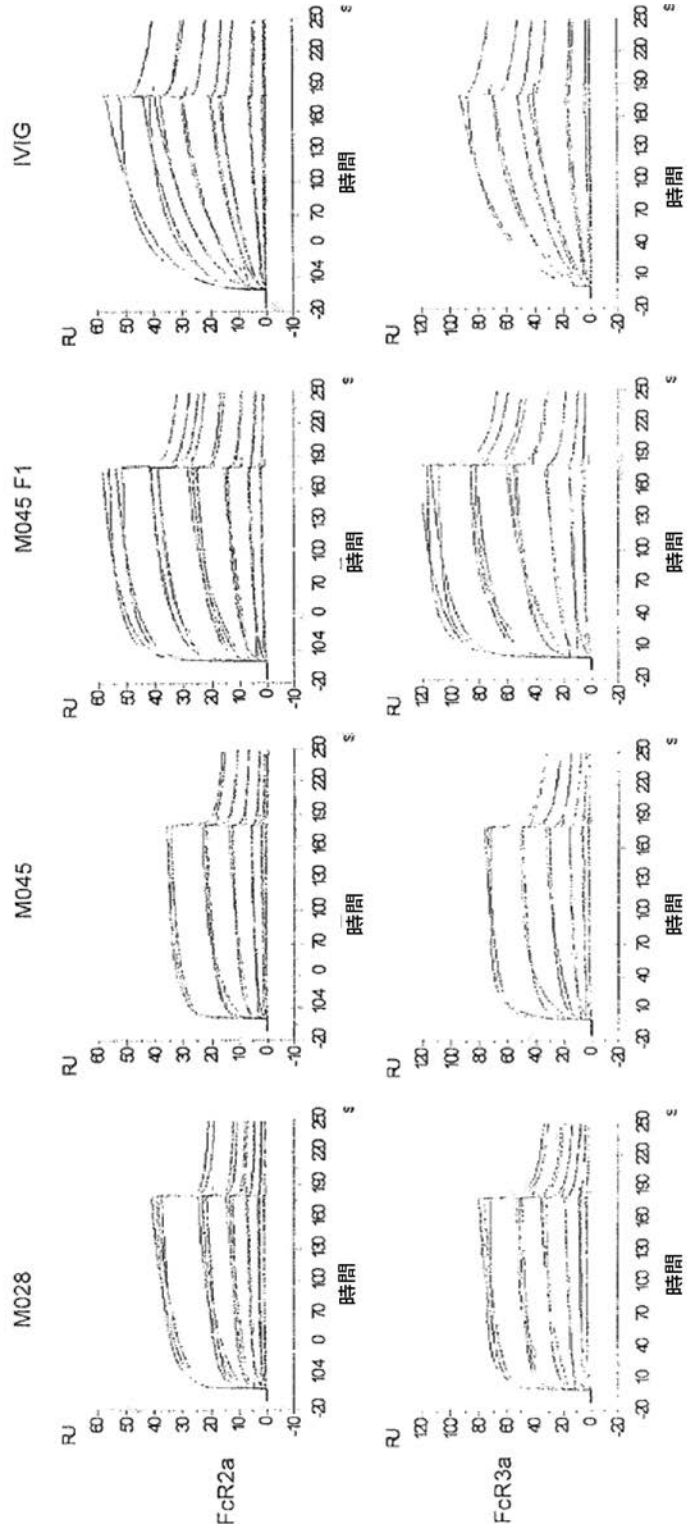
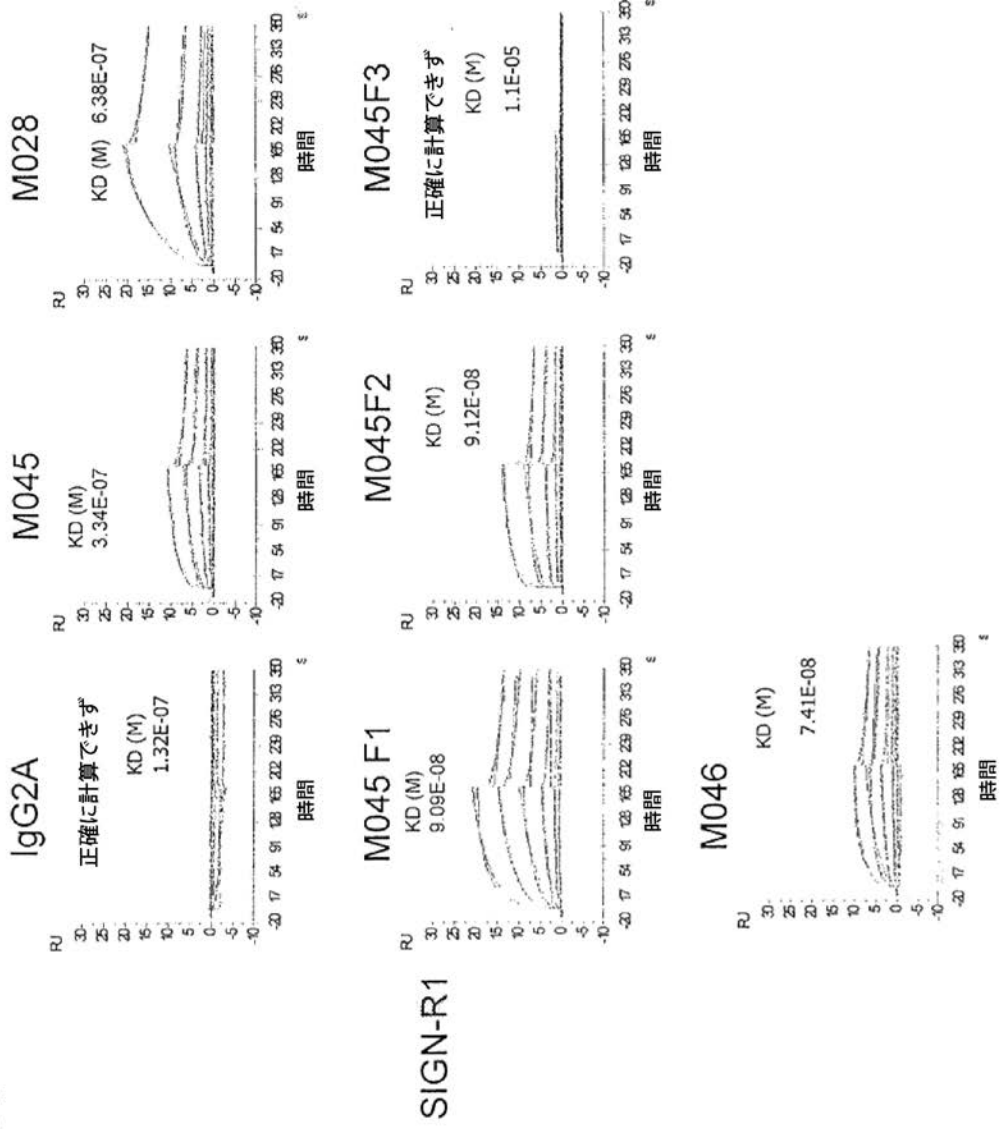


図 6 b



【 図 7 】

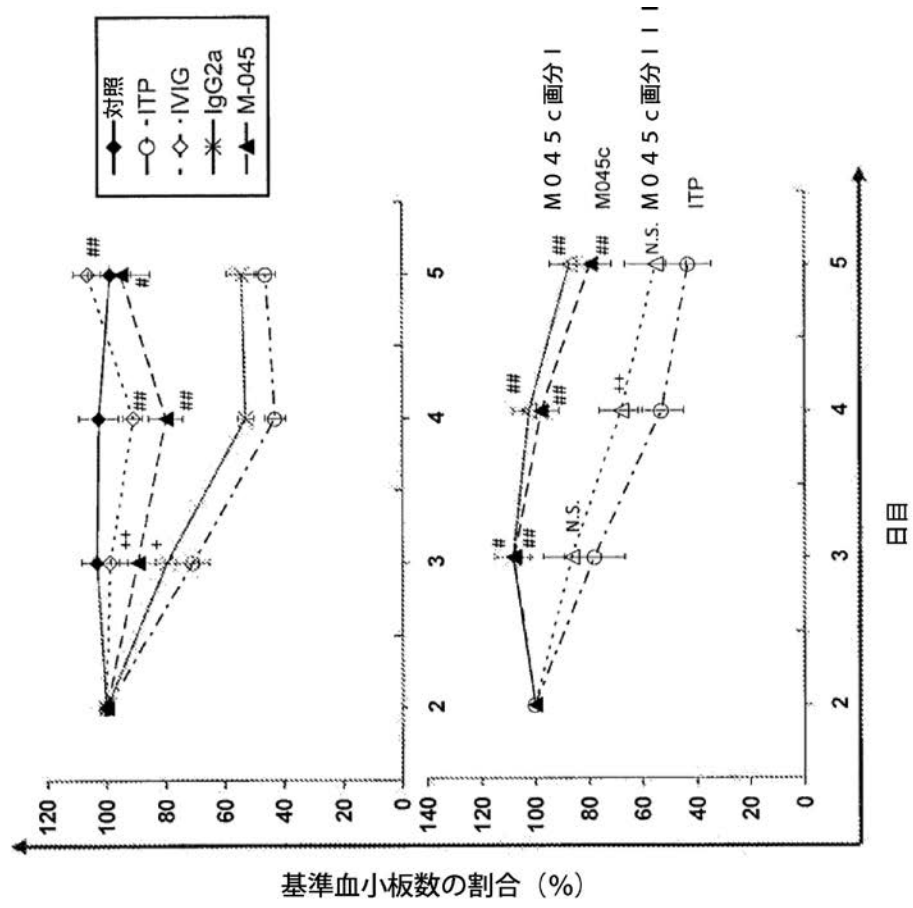
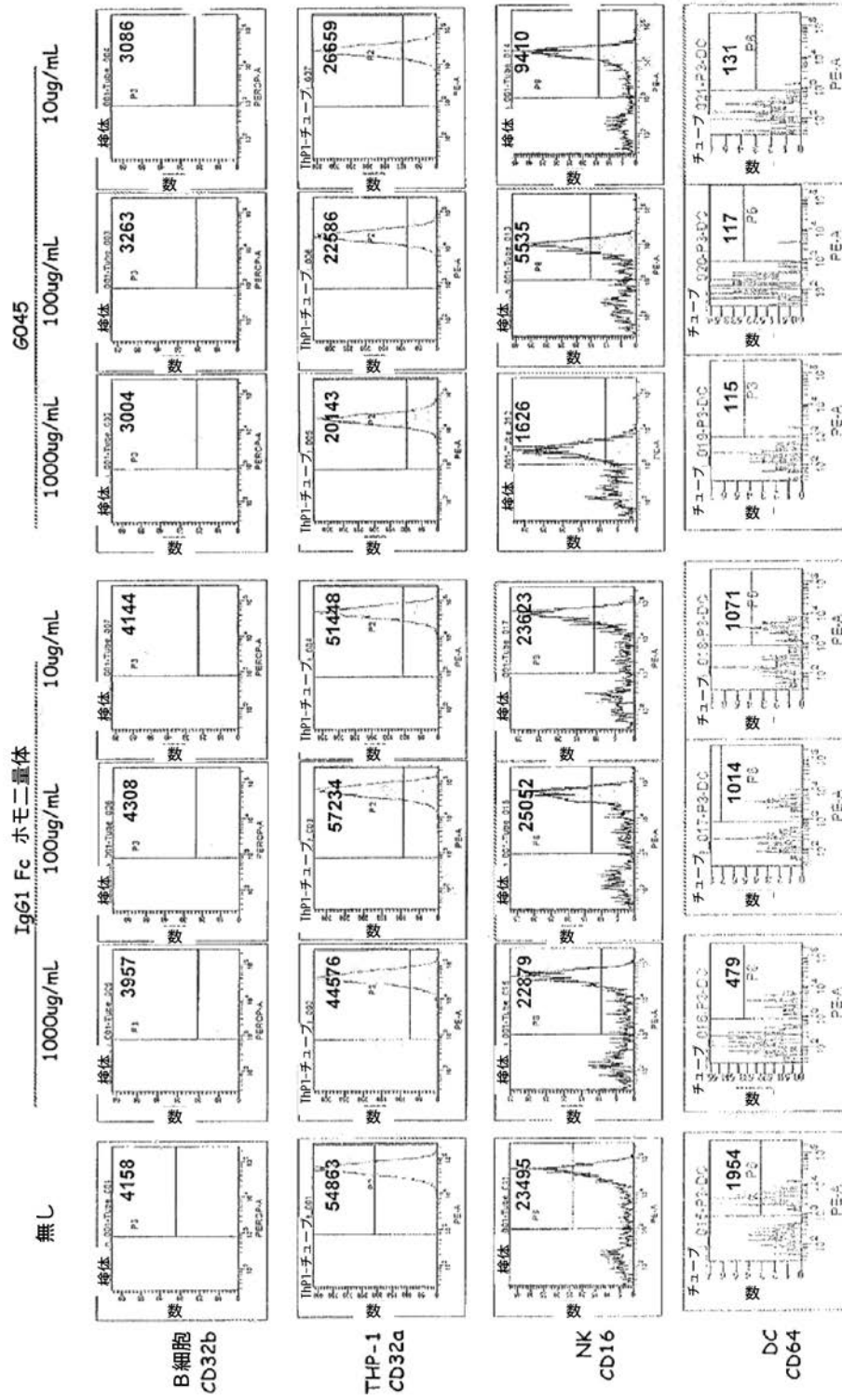


図 7

【 図 8 】

図 8



【 図 9 】

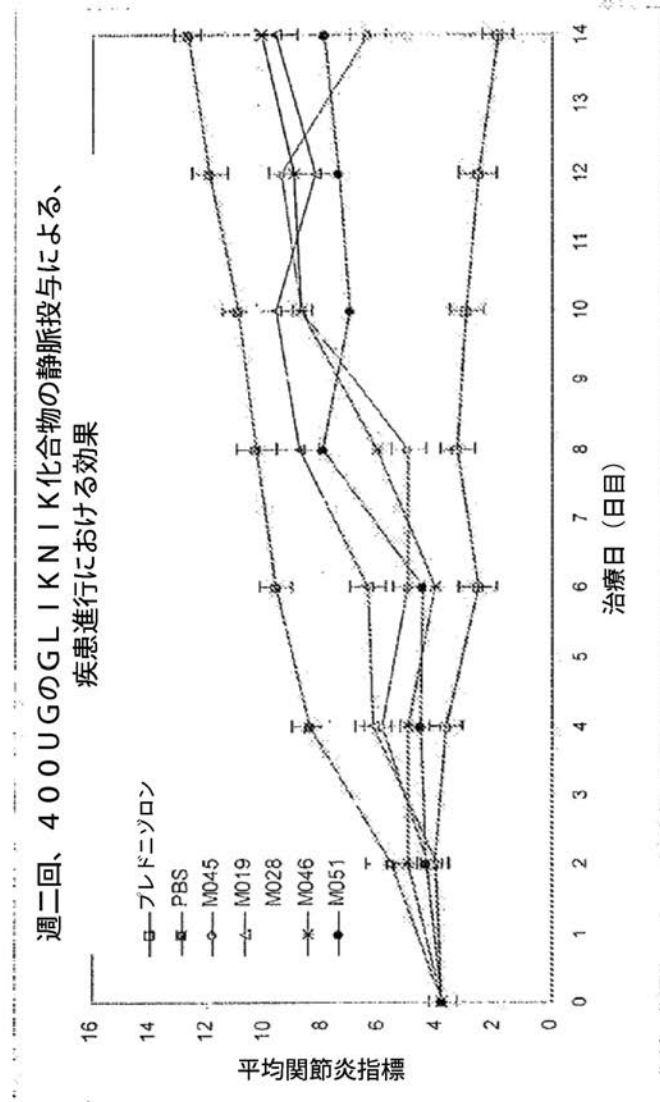
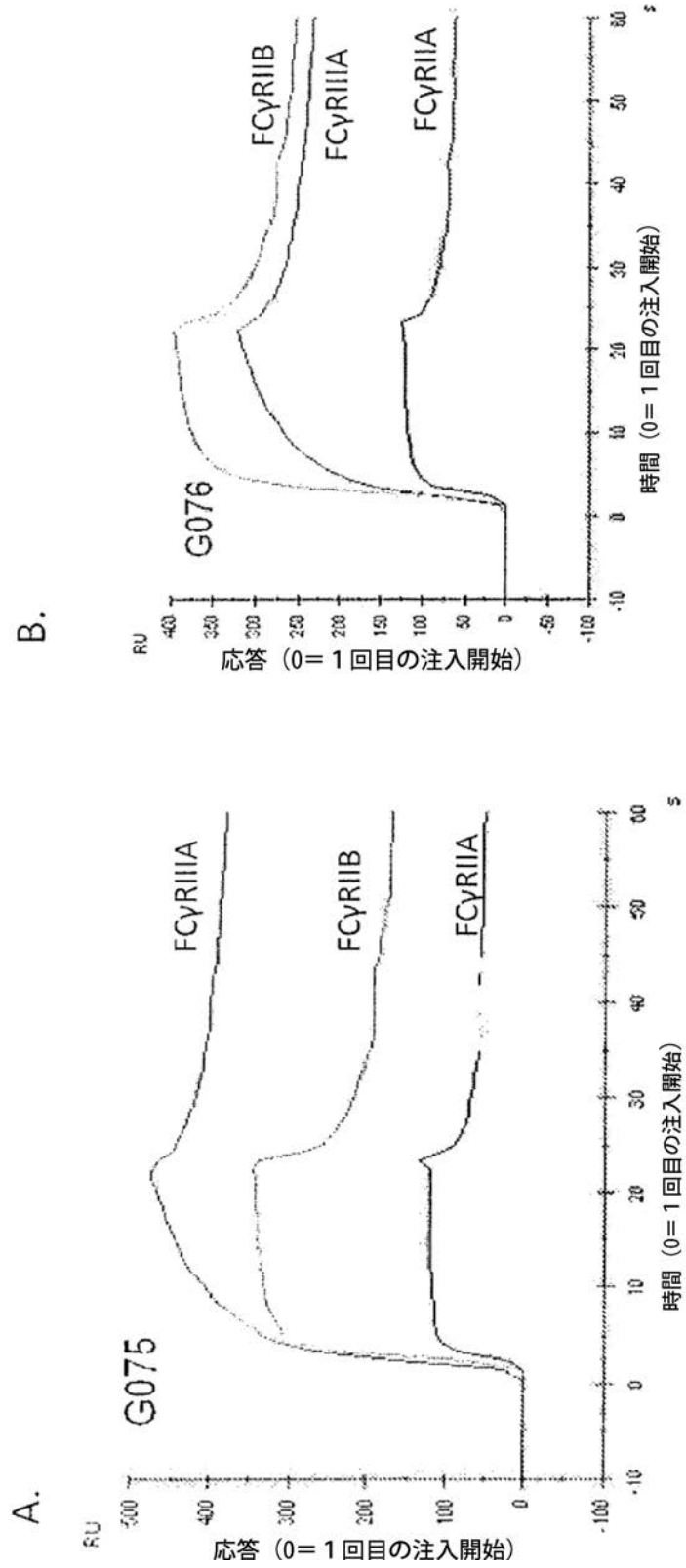


図9

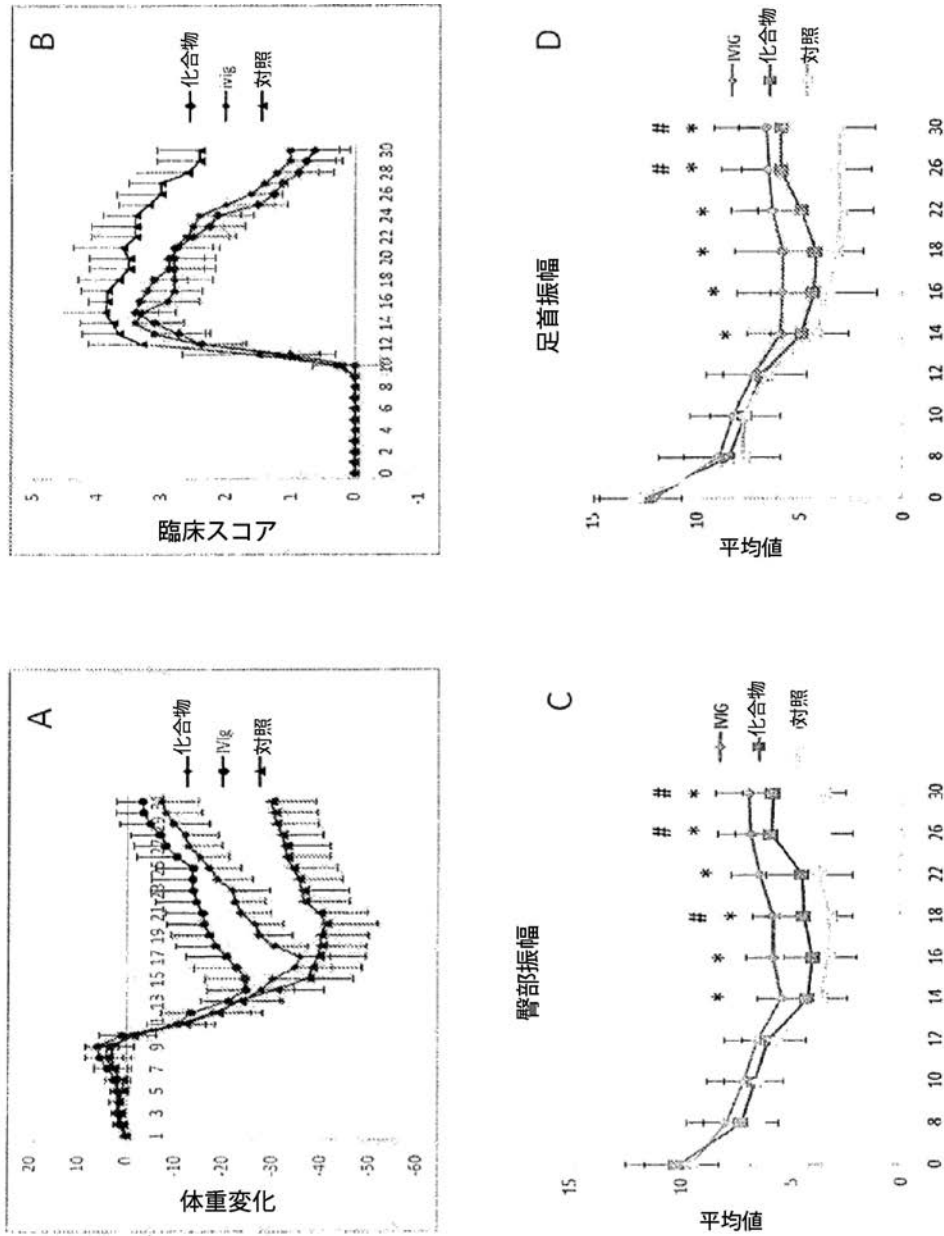
【 図 1 0 】

図 1 0



【 図 1 1 】

図 1 1



【 図 1 1 - 1 】

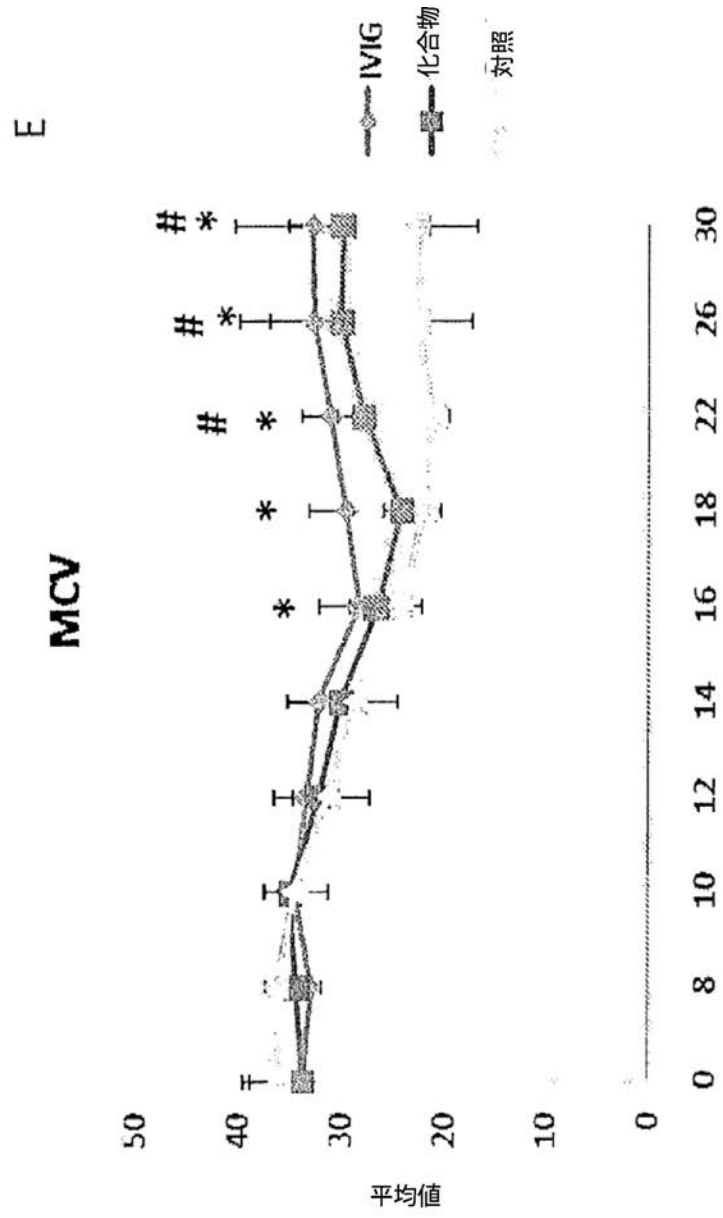
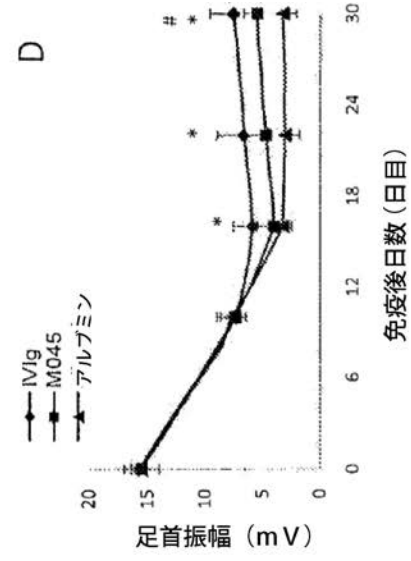
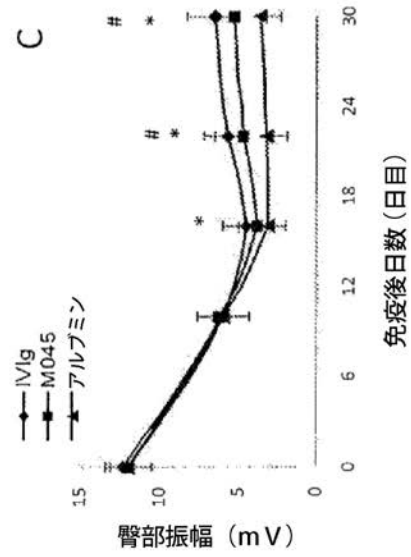
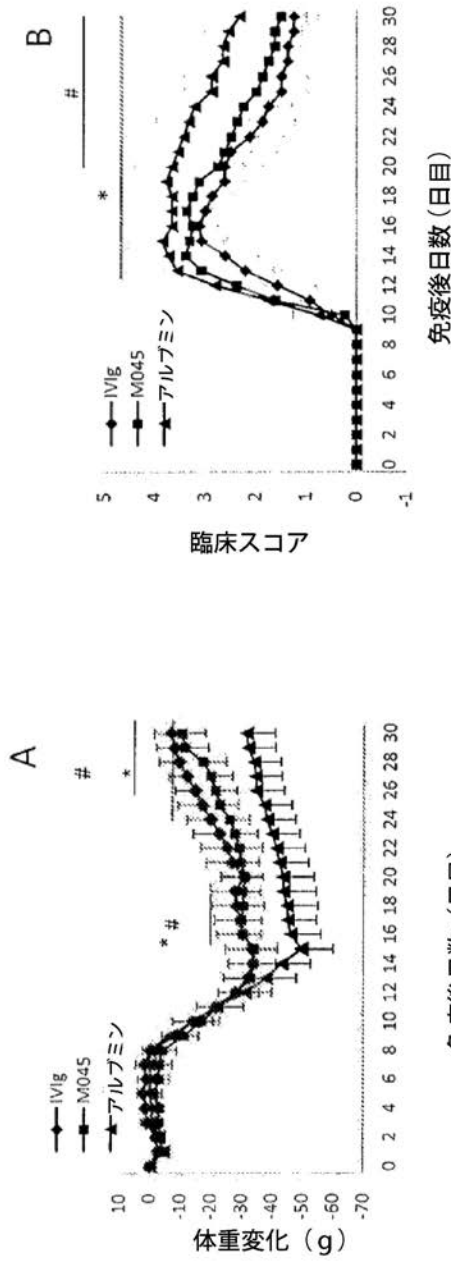


図 1 1 - 1

【 図 1 2 】

図 1 2



【 図 1 2 - 1 】

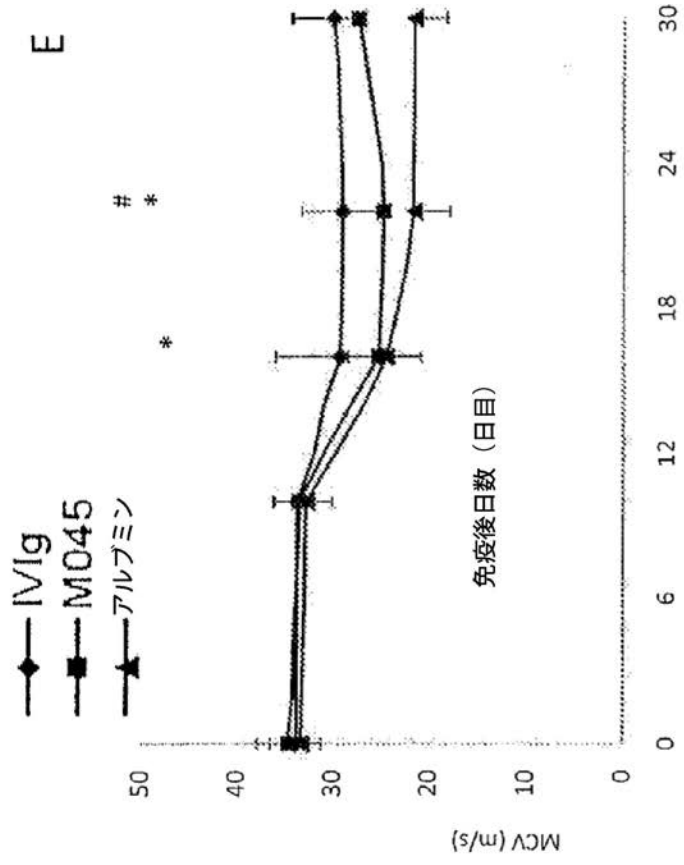
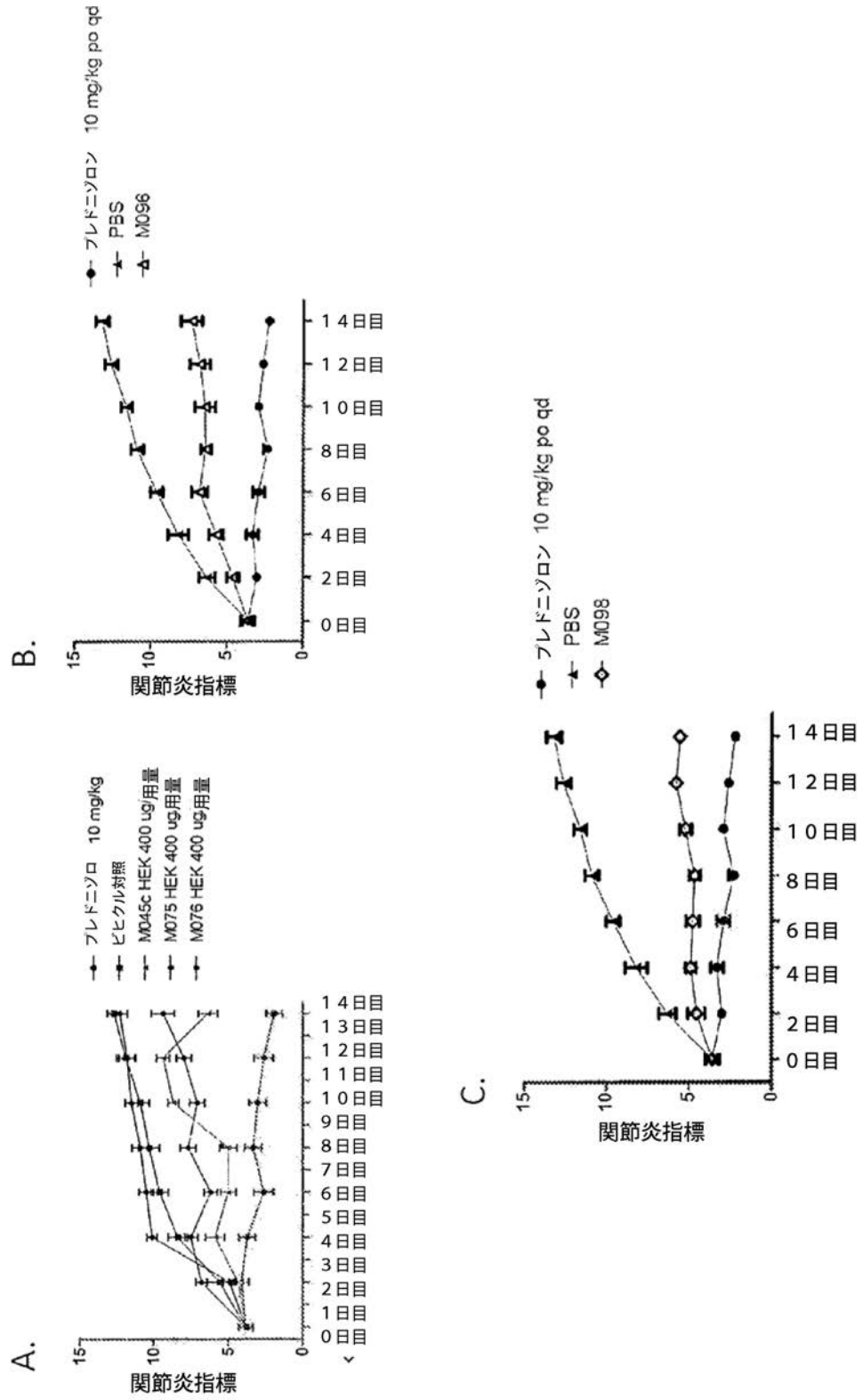


図 1 2 - 1

【 図 1 3 】

図13



【 配 列 表 】

2013543483000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 25 年 3 月 28 日 (2013.3.28)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) リーダー配列；
- (b) I g G 1 F c 領域；および
- (c) 多量体化ドメイン；

を含むストラドマー単位であって、

前記リーダー配列が前記 I g G 1 F c 領域に直接結合し、および前記 I g G 1 F c 領域が前記多量体化ドメインに直接結合しているか、または

前記リーダー配列が前記多量体化ドメインに結合し、および前記多量体化ドメインが前記 I g G 1 F c 領域に直接結合している、ストラドマー単位。

【請求項 2】

前記 I g G 1 F c 領域が、配列番号 2 と約 90% の同一性を有する、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

【請求項 3】

前記 I g G 1 F c 領域が、I g G 1 の C H 2 および C H 3 ドメインを含む、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

【請求項 4】

前記 I g G 1 F c 領域が、配列番号 19 と少なくとも約 90% の同一性を有する、前記請求項に記載のストラドマー単位。

【請求項 5】

前記多量体化ドメインが、I g G 2 ヒンジである、前記請求項に記載のストラドマー単位。

【請求項 6】

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 3 と約 90% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、前記請求項に記載のストラドマー単位。

【請求項 7】

前記多量体化ドメインが、前記 I g G 1 F c 領域のアミノ末端または前記 I g G 1 F c 領域のカルボキシ末端に直接結合している、前記請求項に記載のストラドマー単位。

【請求項 8】

前記ストラドマー単位が、配列番号 4、配列番号 8、または配列番号 18 を含む、前記請求項に記載のストラドマー単位。

【請求項 9】

前記多量体化ドメインが、前記ストラドマー単位の多量体を生成する、前記請求項に記載のストラドマー単位。

【請求項 10】

前記ストラドマー単位の多量体が、高次多量体である、前記請求項に記載のストラドマー単位。

【請求項 11】

前記多量体が、全ストラドマー組成物の約 45%、または約 55%、または約 65%、または約 65%、または約 70%、または約 73% の割合 (%) で存在する、前記請求項に記載のストラドマー単位を含むストラドマー組成物。

【請求項 12】

前記 I g G 1 F c 領域が、F c R n、D C - S I G N、S I G N - R 1 または F c R に結合することが出来る、前記請求項に記載のストラドマー単位。

【請求項 13】

少なくとも 2 つの前記請求項に記載のストラドマー単位を含む、クラスターストラドマー。

【請求項 14】

免疫応答を調節するための、前記請求項に記載のクラスターストラドマーの使用であって、前記使用が、有効量の前記クラスターストラドマーを対象に投与することを含む、使用。

【請求項 15】

炎症性疾患を治療するための、前記請求項に記載のクラスターストラドマーの使用であって、前記使用が、有効量の前記クラスターストラドマーを対象に投与することを含む、使用。

【請求項 16】

前記炎症性疾患が、
多巣性運動ニューロパチー、アルツハイマー病、敗血症、関節炎、多発性硬化症、I型糖尿病、自己免疫性甲状腺炎、特発性血小板減少性紫斑病、慢性炎症性多発神経炎、強皮症、自己免疫性ブドウ膜炎、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、およびアトピー性皮膚炎、もしくは提供者から受容者への臓器移植に関連する疾患；または
感染症、細菌感染症、もしくはウイルス感染症から選択される疾患である、
請求項 15 に記載の使用。

【請求項 17】

in vitro または *ex vivo* アッセイにおいて抗体の非特異的結合を阻止する方法であって、前記方法が、標的組織または標的細胞を、有効量の前記請求項に記載のクラスターストラドマーを含む組成物とともにインキュベートすることを含む、方法。

【請求項 18】

クラスターストラドマーの生産方法であって、前記方法が、配列番号 4、配列番号 8、または配列番号 18 から成る群から選択される配列を、宿主中で発現させることを含む、方法。

【請求項 19】

以下をさらに含む、請求項 18 に記載の方法：

- (a) 配列番号 4、配列番号 8、または配列番号 18 から成る群から選択されるストラドマーをコードする DNA を、発現ベクター中にクローニングすること；
- (b) 前記発現ベクターを細菌宿主中に形質移入すること；
- (c) クローン化された DNA を含むプラスミド DNA を細菌培養物から単離すること；
- (d) 前記クローン化された DNA を含むプラスミド DNA を直線化すること；
- (e) 直線化された DNA を哺乳類の細胞中に形質移入すること；
- (f) 陽性に形質移入された細胞を増殖させて安定的に形質移入された細胞のプールを得ること；
- (g) ストラドマータンパク質を培地から回収すること；
- (h) 前記ストラドマータンパク質を精製すること；ここで前記ストラドマータンパク質は外来性配列を含まない。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0046】

一実施形態において、本発明は、以下を含む、クラスターストラドマーの生産方法に関する：IgG1 Fc 領域に直接結合しその IgG1 Fc 領域が今度は多量体化ドメインに結合しているリーダー配列、または多量体化ドメインに直接結合しその多量体化ドメインが IgG1 Fc 領域に直接結合しているリーダー配列を含むストラドマー単位を発現させること、ここで前記多量体化ドメインは形質移入された細胞から前記ストラドマー単位の多量体を生成する；配列番号 4、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10 または配列番号 18 のストラドマーをコードする DNA 配列を発現ベクター中にクローニングする

こと；前記発現ベクターを細菌宿主中に形質移入すること；配列番号4、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号18のストラドマーをコードするDNAを含むプラスミドDNAを細菌培養物から単離すること；配列番号4、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号18のストラドマーをコードするDNAを含むプラスミドDNAを直線化すること；直線化されたDNAを哺乳類の細胞中に形質移入すること；安定に形質移入された細胞のプールを得るために陽性に形質移入された細胞を増殖させること；培地からストラドマータンパク質を収集すること；およびストラドマータンパク質を精製すること；ここで前記ストラドマータンパク質は外来性配列を含まない。一実施形態において、発現ベクターは、選択可能なマーカを含む。さらなる実施形態において、選択可能なマーカは抗生物質耐性遺伝子である。さらなる実施形態において、抗生物質耐性遺伝子は、ネオマイシン耐性遺伝子である。一実施形態において、哺乳類の細胞は、CHO細胞、HEK293細胞、PER.C6細胞、CAP細胞、またはタンパク質の生産に使用される、他の商業上適切な哺乳類の細胞である。一実施形態においては、アフィニティークロマトグラフィーにより、ストラドマータンパク質を精製する。さらなる実施形態においては、ゲルろ過によりタンパク質をさらに精製する。さらなる実施形態においては、イオン交換クロマトグラフィーにより、タンパク質をさらに精製する。さらなる実施形態においては、疎水性相互作用クロマトグラフィーにより、タンパク質をさらに精製する。

請求項1

- (a) リーダー配列；
- (b) IgG1 Fc領域；および
- (c) 多量体化ドメイン；

を含むストラドマー単位であって、前記リーダー配列が前記IgG1 Fc領域に直接結合し、および前記IgG1 Fc領域が前記多量体化ドメインに直接結合しているか、または前記リーダー配列が前記多量体化ドメインに結合し、および前記多量体化ドメインが前記IgG1 Fc領域に直接結合している、ストラドマー単位。

請求項2

前記IgG1 Fc領域のアミノ酸配列が、配列番号2と少なくとも80%の同一性を有する、請求項1に記載のストラドマー単位。

請求項3

前記IgG1 Fc領域のアミノ酸配列が、配列番号2と少なくとも90%の同一性を有する、請求項1に記載のストラドマー単位。

請求項4

前記IgG1 Fc領域のアミノ酸配列が、配列番号2と少なくとも95%の同一性を有する、請求項1に記載のストラドマー単位。

請求項5

前記IgG1 Fc領域のアミノ酸配列が、配列番号2と少なくとも99%の同一性を有する、請求項1に記載のストラドマー単位。

請求項6

前記多量体化ドメインが、IgG2aヒンジ、イソロイシンジッパー、およびGPPドメインから成る群から選択され、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することが出来る、請求項1に記載のストラドマー単位。

請求項7

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号3と少なくとも80%の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項6に記載のストラドマー単位。

請求項8

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号3と少なくとも90%の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項6に記載のストラドマー単位。

請求項 9

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 3 と少なくとも 95% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

請求項 10

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 3 と少なくとも 99% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

請求項 11

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 3 と少なくとも 80% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

請求項 12

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 5 と少なくとも 90% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

請求項 13

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 5 と少なくとも 95% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

請求項 14

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 5 と少なくとも 99% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

請求項 15

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 26 と少なくとも 80% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

請求項 16

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 26 と少なくとも 90% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

請求項 17

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 26 と少なくとも 95% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。。

請求項 18

前記多量体化ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 26 と少なくとも 99% の同一性を有し、かつ前記ストラドマー単位を多量体化することができる、請求項 6 に記載のストラドマー単位。

請求項 19

前記多量体化ドメインが、前記 I g G 1 F c 領域のカルボキシ末端に直接結合している、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

請求項 20

前記多量体化ドメインが、前記 I g G 1 F c 領域のアミノ末端に直接結合している、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

請求項 21

前記ストラドマー単位が配列番号 4、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 27、または配列番号 28 を含む、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

請求項 22

前記多量体化ドメインが、前記ストラドマー単位の多量体を生成する、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

請求項 2 3

前記ストラドマー単位の多量体が高次多量体である、請求項 2 2 に記載のストラドマー単位。

請求項 2 4

前記多量体が、全ストラドマー組成物の少なくとも約 4 5 % の割合で存在する、請求項 2 3 に記載のストラドマー単位を含むストラドマー組成物。

請求項 2 5

前記多量体が、全ストラドマー組成物の少なくとも約 5 5 % の割合で存在する、請求項 2 3 に記載のストラドマー単位を含むストラドマー組成物。

請求項 2 6

前記多量体が、全ストラドマー組成物の少なくとも約 6 5 % の割合で存在する、請求項 2 3 に記載のストラドマー単位を含むストラドマー組成物。

請求項 2 7

前記多量体が、全ストラドマー組成物の少なくとも約 7 0 % の割合で存在する、請求項 2 3 に記載のストラドマー単位を含むストラドマー組成物。

請求項 2 8

前記多量体が、全ストラドマー組成物の少なくとも約 7 3 % の割合で存在する、請求項 2 3 に記載のストラドマー単位を含むストラドマー組成物。

請求項 2 9

前記 I g G 1 F c 領域が F c R n、D C - S I G N、S I G N - R 1 または F c R に結合することが出来る、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

請求項 3 0

前記 F c R が F c R I I I a である、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

請求項 3 1

少なくとも 2 つの請求項 1 に記載のストラドマー単位を含む、クラスターストラドマー。

請求項 3 2

前記ストラドマーが F c R I I I a に結合する、請求項 3 1 に記載のクラスターストラドマー。

請求項 3 3

免疫応答を対象において調節する方法であって、前記方法が、前記対象に、有効量の請求項 3 1 に記載のクラスターストラドマーを投与することを含む、方法。

請求項 3 4

前記調節が樹状細胞上での C D 8 6 の誘導を含む、請求項 3 3 に記載の方法。

請求項 3 5

前記調節が樹状細胞上での C D 1 a 発現の阻害を含む、請求項 3 3 に記載の方法。

請求項 3 6

炎症性疾患を、それを必要とする対象において治療する方法であって、前記方法が、有効量の請求項 3 1 に記載のクラスターストラドマーを投与することを含む、方法。

請求項 3 7

前記炎症性疾患が自己免疫疾患である、請求項 3 6 に記載の方法。

請求項 3 8

前記自己免疫疾患が、関節炎、多発性硬化症、I 型糖尿病、自己免疫性甲状腺炎、特発性血小板減少性紫斑病、慢性炎症性多発神経炎、強皮症、自己免疫性ブドウ膜炎、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、およびアトピー性皮膚炎から成る群から選択される、請求項 3 7 に記載の方法。

請求項 3 9

前記自己免疫疾患が、提供者から受容者への臓器移植に関連する、請求項 3 7 に記載の

方法。

請求項 4 0

前記炎症性疾患が感染症である、請求項 3 6 に記載の方法。

請求項 4 1

前記感染症が細菌感染症である、請求項 3 6 に記載の方法。

請求項 4 2

前記感染症がウイルス感染症である、請求項 3 6 に記載の方法。

請求項 4 3

前記クラスターストラドマーを、静脈内、皮下、経口、腹腔内、舌下、頬側、経皮、皮下移植により、または筋肉内に投与する、請求項 3 6 に記載の方法。

請求項 4 4

前記クラスターストラドマーを静脈内に投与する、請求項 3 6 に記載の方法。

請求項 4 5

前記クラスターストラドマーを、約 0 . 1 m g / k g ~ 約 1 0 0 0 m g / k g の用量で投与する、請求項 3 6 に記載の方法。

請求項 4 6

前記クラスターストラドマーを、約 1 m g / k g ~ 約 2 5 m g / k g の用量で投与する、請求項 3 6 に記載の方法。

請求項 4 7

in vitro または *ex vivo* アッセイにおいて抗体の非特異的結合を阻止する方法であって、前記方法が、標的組織または標的細胞を、有効量の請求項 3 1 に記載のクラスターストラドマーを含む組成物とともにインキュベートすることを含む、方法。

請求項 4 8

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 4 7 に記載の方法。

請求項 4 9

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 4 7 に記載の方法。

請求項 5 0

前記 *in vitro* または *ex vivo* アッセイが、免疫組織化学、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、または免疫蛍光アッセイである、請求項 4 7 に記載の方法。

請求項 5 1

組成物中の内毒素レベルを減少させる方法であって、前記方法が、有効量の請求項 3 1 に記載のクラスターストラドマーで、組成物を処理することを含む、方法。

請求項 5 2

前記クラスターストラドマーが、前記組成物中の前記内毒素と複合する、請求項 5 1 に記載の方法。

請求項 5 3

前記組成物から前記ストラドマーが複合した内毒素を除去することをさらに含む、請求項 5 1 に記載の方法。

請求項 5 4

前記ストラドマーが複合した内毒素を、前記組成物から濾過により除去する、請求項 5 3 に記載の方法。

請求項 5 5

前記組成物が医薬組成物である、請求項 5 3 に記載の方法。

請求項 5 6

クラスターストラドマーの生産方法であって、前記方法が、配列番号 4、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 8、配列番号 2 4、および配列番号 2 7 から成る群から選択される配列を、宿主中で発現させることを含む、方法。

請求項 5 7

請求項 5 6 に記載の方法であって、以下をさらに含む、方法：

配列番号 4、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 28、配列番号 24、および配列番号 27 から成る群から選択されるストラドマーをコードする DNA を、発現ベクター中にクローニングすること；

(b) 前記発現ベクターを細菌宿主中に形質移入すること；

(c) クローン化された DNA を含むプラスミド DNA を細菌培養物から単離すること；

(d) 前記クローン化された DNA を含むプラスミド DNA を直線化すること；

(e) 直線化された DNA を哺乳類の細胞中に形質移入すること；

(f) 安定に形質移入された細胞のプールを得るために、陽性に形質移入された細胞を増殖させること；

(g) ストラドマータンパク質を培地から収集すること；

(h) 前記ストラドマータンパク質を精製すること；ここで前記ストラドマータンパク質は外来性配列を含まない。

請求項 5 8

前記発現ベクターが選択可能なマーカーを含む、請求項 5 7 に記載の方法。

請求項 5 9

前記選択可能なマーカーが、抗生物質耐性遺伝子である、請求項 5 8 に記載の方法。

請求項 6 0

前記抗生物質耐性遺伝子が、ネオマイシン耐性遺伝子である、請求項 5 9 に記載の方法。

請求項 6 1

前記哺乳類の細胞が CHO 細胞または HEK 293 細胞である、請求項 5 7 に記載の方法。

請求項 6 2

前記ストラドマータンパク質が、アフィニティークロマトグラフィーにより精製される、請求項 5 7 に記載の方法。

請求項 6 3

前記ストラドマーを、イオン交換クロマトグラフィーによりさらに精製する、請求項 6 2 に記載の方法。

請求項 6 4

追加の薬剂的に活性な薬剤を投与することをさらに含む、請求項 3 6 に記載の方法。

請求項 6 5

前記追加の薬剂的に活性な薬剤が、ステロイド、モノクローナル抗体、抗生物質、および抗ウイルス薬、サイトカイン、または他の方法により免疫調節物質として作用し得る薬剤を含む、請求項 6 4 に記載の方法。

請求項 6 6

前記ステロイドが、プレドニゾロン、コルチゾン、モメタゾン、テストステロン、エストロゲン、オキサンドロロン、フルチカゾン、ブデソニド、ベクロメタゾン、アルブテロール、またはレバルブテロール (levalbuterol) である、請求項 6 5 に記載の方法。

請求項 6 7

前記追加の薬剂的に活性な薬剤および前記クラスターストラドマーが、治療的相乗効果を示す、請求項 6 4 ~ 6 6 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

請求項 6 8

前記 IgG1 Fc 領域が、IgG1 ヒンジドメインを欠く、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

請求項 6 9

前記 IgG1 Fc が、配列番号 19 の IgG1 CH2 および IgG1 CH3 ドメインから成る、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

請求項 7 0

以下を含む、ストラドマー単位：

(a) リーダー配列 ; および

(b) 以下を含む F c 領域 :

(1) 配列番号 3 の I g G 2 ヒンジドメイン ; および

(2) 配列番号 1 9 の I g G 1 の C H 2 および C H 3 ドメイン。

請求項 7 1

前記 I g G 2 ヒンジドメインが、前記ストラドマー単位の多量体を生成する、請求項 7 0 に記載のストラドマー単位。

請求項 7 2

配列番号 1 8 と、少なくとも 8 0 % の相同性を有する、請求項 7 0 に記載のストラドマー単位。

請求項 7 3

配列番号 1 8 と、少なくとも 9 0 % の相同性を有する、請求項 7 0 に記載のストラドマー単位。

請求項 7 4

配列番号 1 8 と、少なくとも 9 5 % の相同性を有する、請求項 7 0 に記載のストラドマー単位。

請求項 7 5

配列番号 1 8 と、少なくとも 9 9 % の相同性を有する、請求項 7 0 に記載のストラドマー単位。

請求項 7 6

前記 I g G 1 F c 領域が、F c R n、D C - S I G N、S I G N - R 1 または F c R と結合することが出来る、請求項 6 9 に記載のストラドマー単位。

請求項 7 7

前記 F c R が F c R I I I a である、請求項 7 6 に記載のストラドマー単位。

請求項 7 8

少なくとも 2 つの、請求項 7 0 に記載のストラドマー単位を含む、クラスターストラドマー。

請求項 7 9

前記ストラドマーが F c R I I I a と結合する、請求項 7 8 に記載のクラスターストラドマー。

請求項 8 0

免疫応答を対象において調節する方法であって、前記方法が、前記対象に、有効量の請求項 7 8 に記載のクラスターストラドマーを投与することを含む、方法。

請求項 8 1

前記調節が、樹状細胞上での C D 8 6 の誘導を含む、請求項 8 0 に記載の方法。

請求項 8 2

前記調節が、樹状細胞上での C D 1 a 発現の阻害を含む、請求項 8 0 に記載の方法。

請求項 8 3

炎症性疾患を、それを必要とする対象において治療する方法であって、前記方法が、有効量の請求項 3 1 に記載のクラスターストラドマーを投与することを含む、方法。

請求項 8 4

前記炎症性疾患が自己免疫疾患である、請求項 8 3 に記載の方法。

請求項 8 5

前記自己免疫疾患が、関節炎、多発性硬化症、I 型糖尿病、自己免疫性甲状腺炎、特発性血小板減少性紫斑病、慢性炎症性多発神経炎、強皮症、自己免疫性ブドウ膜炎、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、およびアトピー性皮膚炎から成る群から選択される、請求項 8 4 に記載の方法。

請求項 8 6

前記自己免疫疾患が、提供者から受容者への臓器移植に関連する、請求項 8 4 に記載の方法。

請求項 8 7

前記炎症性疾患が感染症である、請求項 8 3 に記載の方法。

請求項 8 8

前記感染症が細菌感染症である、請求項 8 3 に記載の方法。

請求項 8 9

前記感染症がウイルス感染症である、請求項 8 3 に記載の方法。

請求項 9 0

前記クラスターストラドマーを、静脈内、皮下、経口、腹腔内、舌下、頬側、経皮、皮下移植により、または筋肉内に投与する、請求項 8 3 に記載の方法。

請求項 9 1

前記クラスターストラドマーを静脈内に投与する、請求項 8 3 に記載の方法。

請求項 9 2

前記クラスターストラドマーを、約 0 . 1 m g / k g ~ 約 1 0 0 0 m g / k g の用量で投与する、請求項 8 3 に記載の方法。

請求項 9 3

前記クラスターストラドマーを、約 1 m g / k g ~ 約 2 5 m g / k g の用量で投与する、請求項 8 3 の方法。

請求項 9 4

in vitro または *ex vivo* アッセイにおいて抗体の非特異的結合を阻止する方法であって、前記方法が、標的組織または標的細胞を、有効量の請求項 7 8 に記載のクラスターストラドマーを含む組成物とともに、インキュベートすることを含む、方法。

請求項 9 5

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 9 4 に記載の方法。

請求項 9 6

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 9 4 に記載の方法。

請求項 9 7

前記 *in vitro* または *ex vivo* アッセイが、免疫組織化学、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、または免疫蛍光アッセイである、請求項 9 4 に記載の方法。

請求項 9 8

組成物中の内毒素レベルを減少させる方法であって、前記方法が、有効量の請求項 7 8 に記載のクラスターストラドマーで、前記組成物を処理することを含む、方法。

請求項 9 9

前記クラスターストラドマーが、前記組成物中の前記内毒素と複合する、請求項 9 8 に記載の方法。

請求項 1 0 0

前記ストラドマーが複合した内毒素を、前記組成物から除去することをさらに含む、請求項 9 8 に記載の方法。

請求項 1 0 1

前記ストラドマーが複合した内毒素を、前記組成物から濾過により除去する、請求項 1 0 0 に記載の方法。

請求項 1 0 2

前記組成物が医薬組成物である、請求項 1 0 0 に記載の方法。

請求項 1 0 3

追加の薬剤的に活性な薬剤を投与することをさらに含む、請求項 8 3 に記載の方法。

請求項 1 0 4

前記追加の薬剤的に活性な薬剤が、ステロイド、モノクローナル抗体、抗生物質、および抗ウイルス薬、サイトカイン、または他の方法により免疫調節物質として作用し得る薬剤を含む、請求項 1 0 3 に記載の方法。

請求項 1 0 5

前記ステロイドが、プレドニゾロン、コルチゾン、モメタゾン、テストステロン、エストロゲン、オキサンドロロン、フルチカゾン、ブデソニド、ベクロメタゾン、アルブテロール、またはレバルブテロール (levalbuterol) である、請求項 104 に記載の方法。

請求項 106

前記 IgG1 Fc 領域が、1つまたは複数の変異を含む、請求項 1 に記載のストラドマー単位。

請求項 107

配列番号 20、配列番号 21、または配列番号 24 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 106 に記載のストラドマー単位。

請求項 108

配列番号 20 と少なくとも約 80% の同一性を有する、請求項 107 に記載のストラドマー単位。

請求項 109

配列番号 20 と少なくとも約 90% の同一性を有する、請求項 107 に記載のストラドマー単位。

請求項 110

配列番号 20 と少なくとも約 95% の同一性を有する、請求項 107 に記載のストラドマー単位。

請求項 111

配列番号 20 と少なくとも約 99% の同一性を有する、請求項 107 に記載のストラドマー単位。

請求項 112

配列番号 21 と少なくとも約 80% の同一性を有する、請求項 107 に記載のストラドマー単位。

請求項 113

配列番号 21 と少なくとも約 90% の同一性を有する、請求項 107 に記載のストラドマー単位。

請求項 114

配列番号 21 と少なくとも約 95% の同一性を有する、請求項 107 に記載のストラドマー単位。

請求項 115

配列番号 21 と少なくとも約 99% の同一性を有する、請求項 107 に記載のストラドマー単位。

請求項 116

配列番号 24 と少なくとも約 80% の同一性を有する、請求項 107 に記載のストラドマー単位。

請求項 117

配列番号 24 と少なくとも約 90% の同一性を有する、請求項 107 に記載のストラドマー単位。

請求項 118

配列番号 24 と少なくとも約 95% の同一性を有する、請求項 107 に記載のストラドマー単位。

請求項 119

配列番号 24 と少なくとも約 99% の同一性を有する、請求項 107 に記載のストラドマー単位。

請求項 120

前記 IgG1 Fc 領域が、FcRn、DC-SIGN、SIGN-R1 または FcR と結合することが出来る、請求項 107 に記載のストラドマー単位。

請求項 121

前記 FcR が FcRIIIa である、請求項 120 に記載のストラドマー単位。

請求項 1 2 2

少なくとも 2 つの請求項 1 0 7 に記載のストラドマー単位を含む、クラスターストラドマー。

請求項 1 2 3

前記ストラドマーが F c R I I I a と結合する、請求項 1 2 2 に記載のクラスターストラドマー。

請求項 1 2 4

免疫応答を対象において調節する方法であって、前記方法が、前記対象に、有効量の請求項 1 2 2 に記載のクラスターストラドマーを投与することを含む、方法。

請求項 1 2 5

前記調節が、樹状細胞上での C D 8 6 の誘導を含む、請求項 1 2 4 に記載の方法。

請求項 1 2 6

前記調節が、樹状細胞上での C D 1 a 発現の阻害を含む、請求項 1 2 4 に記載の方法。

請求項 1 2 7

炎症性疾患を、それを必要とする対象において治療する方法であって、前記方法が、有効量の請求項 1 2 2 に記載のクラスターストラドマーを投与することを含む、方法。

請求項 1 2 8

前記炎症性疾患が自己免疫疾患である、請求項 1 2 7 に記載の方法。

請求項 1 2 9

前記自己免疫疾患が、関節炎、多発性硬化症、I 型糖尿病、自己免疫性甲状腺炎、特発性血小板減少性紫斑病、慢性炎症性多発神経炎、強皮症、自己免疫性ブドウ膜炎、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、およびアトピー性皮膚炎から成る群から選択される、請求項 1 2 8 に記載の方法。

請求項 1 3 0

前記自己免疫疾患が、提供者から受容者への臓器移植に関連する、請求項 1 2 8 に記載の方法。

請求項 1 3 1

前記炎症性疾患が感染症である、請求項 1 2 7 に記載の方法。

請求項 1 3 2

前記感染症が細菌感染症である、請求項 1 2 7 に記載の方法

請求項 1 3 3

前記感染症がウイルス感染症である、請求項 1 2 7 に記載の方法

請求項 1 3 4

前記クラスターストラドマーを、静脈内、皮下、経口、腹腔内、舌下、頬側、経皮、皮下移植により、または筋肉内に投与する、請求項 1 2 7 に記載の方法。

請求項 1 3 5

前記クラスターストラドマーを、静脈内に投与する、請求項 1 2 7 に記載の方法。

請求項 1 3 6

前記クラスターストラドマーを、約 0 . 1 m g / k g ~ 約 1 0 0 0 m g / k g の用量で投与する、請求項 1 2 7 に記載の方法。

請求項 1 3 7

前記クラスターストラドマーを、約 1 m g / k g ~ 約 2 5 m g / k g の用量で投与する、請求項 1 2 7 に記載の方法。

請求項 1 3 8

i n v i t r o または *e x v i v o* アッセイにおいて抗体の非特異的結合を阻止する方法であって、前記方法が、標的組織または標的細胞を、有効量の請求項 1 2 2 に記載のクラスターストラドマーを含む組成物とともにインキュベートすることを含む、方法。

請求項 1 3 9

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 3 8 に記載の方法。

請求項 1 4 0

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 1 3 8 に記載の方法。

請求項 1 4 1

前記 *in vitro* または *ex vivo* アッセイが、免疫組織化学、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、または免疫蛍光アッセイである、請求項 1 3 8 に記載の方法。

請求項 1 4 2

組成物中の内毒素レベルを減少させる方法であって、前記方法が、有効量の請求項 1 2 2 に記載のクラスターストラドマーで、前記組成物を処理することを含む、方法。

請求項 1 4 3

前記クラスターストラドマーが、前記組成物中の前記内毒素と複合する、請求項 1 4 2 に記載の方法。

請求項 1 4 4

前記ストラドマーが複合した内毒素を前記組成物から除去することをさらに含む、請求項 1 4 2 に記載の方法。

請求項 1 4 5

前記ストラドマーが複合した内毒素を、前記組成物から濾過により除去する、請求項 1 4 4 に記載の方法。

請求項 1 4 6

前記組成物が医薬組成物である、請求項 1 4 4 に記載の方法。

請求項 1 4 7

追加の薬剤的に活性な薬剤を投与することをさらに含む、請求項 1 2 7 に記載の方法。

請求項 1 4 8

前記追加の薬剤的に活性な薬剤が、ステロイド、モノクローナル抗体、抗生物質、および抗ウイルス薬、サイトカイン、または他の方法により免疫調節物質として作用し得る薬剤を含む、請求項 1 4 7 に記載の方法。

請求項 1 4 9

前記ステロイドが、プレドニゾロン、コルチゾン、モメタゾン、テストステロン、エストロゲン、オキサンドロロン、フルチカゾン、ブデソニド、ベクロメタゾン、アルブテロール、またはレバルブテロール (levalbuterol) である、請求項 1 4 8 に記載の方法。

請求項 1 5 0

前記リーダー配列が切断されている、請求項 1、6 9 または 1 0 6 のうちのいずれか 1 項に記載のストラドマー単位。

請求項 1 5 1

以下を含むストラドマー単位：(a) IgG1 Fc 領域；および (b) 多量体化ドメイン；ここで前記 IgG1 Fc 領域は、前記多量体化ドメインに直接結合している。

請求項 1 5 2

前記 IgG1 Fc 領域が、配列番号 2 または配列番号 1 9 を含む、請求項 1 5 1 に記載のストラドマー単位。

請求項 1 5 3

前記 IgG1 Fc 領域が、少なくとも 1 つのアミノ酸変異を含む、請求項 1 5 1 に記載のストラドマー単位。

請求項 1 5 4

前記多量体化ドメインが、配列番号 3、配列番号 5、および配列番号 2 6 から成る群から選択される、請求項 1 5 1 に記載のストラドマー単位。

請求項 1 5 5

少なくとも 2 つの、請求項 1 5 1 ~ 1 5 4 のうちのいずれか 1 項に記載のストラドマー単位を含む、クラスターストラドマー。

請求項 1 5 6

配列番号 4、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 8、配列番号 2 4、および配列番号 2 7 のストラドマー単位を

コードする核酸。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US 11/45768
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 16/28; A61K 39/395 (2011.01) USPC - 530/391.1, 424/179.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C07K 16/28; A61K 39/395 (2011.01) USPC - 530/391.1, 424/179.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8) - C07K 16/28; A61K 39/395 (2011.01), USPC - 530/391.1, 424/179.1: keyword search, as below Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPTO PubWest (databases: PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB), Thompson Innovation (core patent databases from 01.01.1982 - 2.20.1012), Google Scholar -- Search Terms: Block, Olsen, stradomer, IgG1, Fc, multimerization, isoleucine, leucine, zipper, fc-gamma-R11a, domain, region, sequence, Gliknk		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/151088 A9 (STROME et al.) 11 December 2008 (11.12.2008) para [0012]; [0082]; [0013]; [0014]; [0125]; [0126]; [0127]; [0301]; [0015]; [0082]; [0321]; Table 3; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 61	1-10, 19, 20a, 20b, 22-30, 68, 69, 76, 77, 106, 150
A	US 2009/0136485 A1 (CHU et al.) 28 May 2009 (28.05.2009)	1-10, 19, 20a, 20b, 22-30, 68, 69, 76, 77, 106, 150
A	US 2009/0117133 A1 (ARNASON et al.) 7 May 2009 (07.05.2009)	1-10, 19, 20a, 20b, 22-30, 68, 69, 76, 77, 106, 150
L	WO 2008/151088 A9 (STROME et al.) 11 December 2008 (11.12.2008) - Sequence data file provided to verify cited sequences.	1-10, 19, 20a, 20b, 22-30, 68, 69, 76, 77, 106, 150
X,P	US 2010/0239633 A1 (STROME et al.) 23 September 2010 (23.09.2010)	1-10, 19, 20a, 20b, 22-30, 68, 69, 76, 77, 106, 150
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 February 2012 (21.02.2012)		Date of mailing of the international search report 08 MAR 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/45768

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+: claims 1-30, 68, 69, 76, 77, and 150, directed to a stradomer unit comprising: a) a leader sequence; b) an IgG1 Fc domain; and c) a multimerization domain; wherein the leader sequence is directly linked to the IgG1 Fc domain and wherein the IgG1 Fc domain is directly linked to the multimerization domain; or wherein the leader sequence is directly linked to the multimerization domain, and the multimerization domain is directly linked to the IgG1 Fc domain; wherein the multimerization domain is selected from the group consisting of: an IgG2a hinge, an isoleucine zipper and a GPP domain and is capable of multimerizing said stradomer units; wherein the first invention is limited to: a) the sequence of the IgG1 Fc domain is up to 99% homologous to SEQ ID NO: 2; the multimerization domain is limited to an IgG2a hinge comprising a sequence up to 99% homologous to SEQ ID NO: 3 (in other words, wherein the stradomer unit comprises SEQ ID NO: 4, as in claim 20); (limited to SEQ ID NOs: 2-4)

- Please see extra sheet for continuation -

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-10, 19-30, 68, 69, 76, 77, 106 and 150.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/45768

Continuation of Box III: Lack of Unity of Invention

(Applicants may opt for additional sequences to be searched by specifying the SEQ ID NO: and paying an additional invention search fee for each elected sequence). (claims 1-10, 19-30, 68, 69, 76, 77, 106 and 150 will be searched under the first invention with no additional elections).

Group II: claims 31-32, directed to a cluster stradomer comprising at least two stradomer units as in claim 1.

Group III: claims 33-35, directed to a method of modulating an immune response in a subject, comprising administering to the subject an effective amount of a cluster stradomer comprising at least two stradomer units as in claim 1.

Group IV: claims 36-46, directed to a method of treating inflammatory disease in a subject, comprising administering an effective amount of a cluster stradomer comprising at least two stradomer units as in claim 1.

Group V: claims 47-55, and 138-141, directed to a method for blocking nonspecific binding of antibodies in an in vitro or ex vivo assay, comprising incubating target tissue or target cells with a composition comprising an effective amount of a cluster stradomer comprising at least two stradomer units as in claim 1 or as in claim 107.

Group VI+: claims 56-67, directed to a method for producing a cluster stradomer, comprising expressing a sequence selected from SEQ ID NOs: 4, 8-10, 18, 20, 21, 24, 27 and 28 in a host; wherein the first invention is limited to SEQ ID NO: 4. (applicants may opt for additional sequences to be searched by paying an additional invention search fee for each elected sequence).

Group VII: claims 70-75, 78-82, and 94-102, directed to a stradomer unit comprising: a) a leader sequence; and b) an Fc domain comprising: i) the IgG2 hinge domain of SEQ ID NO: 3; and ii) the CH2 and CH3 domains of IgG1 of SEQ ID NO: 19.

Group VIII: claims 83-93 and 103-105, directed to a method of treating inflammatory disease in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of a cluster stradomer comprising at least two stradomer units as in claim 1.

Groups IX+: claims 106-121, directed to a stradomer unit, wherein the IgG1 Fc domain contains one or more mutations; further wherein the unit comprises an amino acid sequence selected from SEQ ID NOs: 20, 21 or 24; wherein the first invention is limited to SEQ ID NO: 20 (claims 106-111, 120 and 121). (applicants may opt for additional sequences to be searched by paying an additional invention search fee for each elected sequence).

Group X: claims 122 and 123, directed to a cluster stradomer comprising at least two stradomer units as in claim 107.

Group XI: claims 124-126, directed to a method of modulating an immune response in a subject, comprising administering to the subject an effective amount of a cluster stradomer comprising at least two stradomer units as in claim 107.

Group XII: claims 127-137 and 147-149, directed to a method of treating inflammatory disease in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of a cluster stradomer comprising at least two stradomer units as in claim 107.

Group XIII: claims 142-146, directed to a method for reducing endotoxin levels in a composition, comprising treating the composition with an effective amount of a cluster stradomer comprising at least two stradomer units as in claim 107.

Group XIV: claims 151-155, directed to a stradomer unit comprising: a) an IgG1 Fc domain and b) a multimerization domain, wherein the IgG1 Fc domain is directly linked to the multimerization domain.

Groups XV+: claim 156, directed to a nucleic acid encoding a stradomer unit; wherein the stradomer unit amino acid sequence is selected from SEQ ID NOs: 4, 8-10, 18, 20, 21, 24, 27, and 28; wherein the first invention is limited to SEQ ID NO: 4 (applicants may opt for additional sequences to be searched by paying an additional invention search fee for each elected sequence).

The inventions listed as Groups I+ - XV+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of each of the Groups are indicated above. Groups I+ are directed to a stradomer comprising a leader sequence, not required by the claims of Group XIV. Group II is directed to a cluster stradomer comprising at least two stradomer units as in Groups I+, not required by the claims of Groups I+ (As will be shown below, the common technical features of the claims of Groups I+ do not, in themselves, improve upon the prior art). The same relationship between Groups I+ and II is found for Groups IX+ relative to Group X. Groups IX+ themselves are directed to a stradomer unit, wherein the IgG1 Fc domain contains one or more mutations, not required by the claims of Groups I+. Groups III and XI are both directed to methods of modulating an immune response in a subject in need thereof using different stradomers - technical elements not shared by any other groups. Groups IV and XII are both directed to a method of treating inflammatory disease in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of a cluster stradomer comprising at least two stradomer units; wherein each Group uses a different specific stradomer structure - technical features not shared by any other Groups. Groups V+ are directed to methods of producing a stradomer by expressing a nucleic acid encoding said stradomer in a host, which, as will also be shown below, does not improve upon the prior art. Groups XV+ share the common technical element of being directed to nucleic acids encoding a stradomer, which as will also be shown below, does not improve upon the prior art.

- Please see next extra sheet -

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/45768

Continuation of: First Extra Sheet: Box III: Lack of Unity of Invention

The only common technical element shared by all of the above groups is that they are related to stradamers. This common technical element, and the above listed common technical elements do not represent an improvement over the prior art of WO 2008/151088 A9 to Strome et al., which discloses "cluster stradamers comprising two or more multimerized cluster stradamer units, wherein each of the cluster stradamer units comprises a multimerizing region and at least one Fc domain, wherein each of the cluster stradamer units comprises two associated cluster stradamer unit monomers, wherein each of the cluster stradamer unit monomers comprises a multimerizing region monomer and at least one Fc domain monomer...wherein the multimerizing regions of the two or more cluster stradamer units multimerize to form the cluster stradamer (para [0024]); at least one of the Fc domains comprises an IgG1 hinge...an IgG1 CH2 domain...an IgG1 CH3 domain (para [0027]); wherein the multimerizing region is selected from the group consisting of an IgG2 hinge, an IgE CH2 domain, a leucine or isoleucine zipper and a zinc finger (para [0025]); wherein each stradamer monomer may comprise a leader sequence (IgK signal sequence - IgG1 Fc fragment - IgG1 Fc fragment; para [0082]); further wherein "a trained artisan will recognize that a cluster stradamer unit may itself comprise a serial stradamer (containing two or more Fc domains) along with a multimerizing region"(para [00127]). Additionally, although Strome does not specifically recite wherein the domains are directly linked to each other, Strome teaches wherein a 'domain linkage' may be used (para [0114]) between some domains, but not others. The use of a linkage is, therefore, taught to be optional by Strome, which specifically limits where it may be applied, but does not require said use. Strome further describes, without specifically reciting the term "methods", the generation of the stradamers (para [0296]) including expression in host cells (para [00299]); as well as the use of Fc regions comprising sequence variations from the wild type (para [0151], [0152]). Further, although Strome does not explicitly recite an embodiment comprising a cluster stradamer comprising at least two units comprising the above elements, Strome teaches wherein the cluster stradamers comprise two or more multimerized cluster stradamer units (para [0024]). It would have been obvious to a person skilled in the art that the units could have comprised any variations of the configurations possible for cluster stradamer units, as taught by Strome, including those comprising the characteristics described above. Furthermore, Strome teaches methods for treating conditions (para [00278]) including immune diseases (para [00279]) and inflammatory conditions (para [00284], [00286]) using the stradamers. Although Strome does not explicitly specify using an effective amount for treatment of a subject in need thereof, it would have been obvious to a person skilled in the art to administer treatments for a disease to those in need thereof, and to use a sufficient amount of the treatment agent to be effective. Furthermore, Strome teaches a sequence comprising Applicants' SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 2 - 100% homology) and Applicants' SEQ ID NO: 3 - (SEQ ID NO: 11 - 100% homology), wherein the SEQ ID NO: 3 is described as a hinge region, and SEQ ID NO: 2 is an IgG1 Fc domain (see desc. for SEQ ID NO: 1 in the sequence listing, which includes both the nucleic acid and amino acid sequences). Although Strome does not explicitly recite a sequence comprising SEQ ID NO: 2, followed immediately by SEQ ID NO: 11, it would have been obvious to a person skilled in the art to use the teaching of Strome to select the different sequences taught by Strome for each component of the stradamer molecules to construct specific examples thereof, wherein SEQ ID NO: 2 is the first IgG1 Fc region specified by Strome, and SEQ ID NO: 11 is the first multimerization (IgG2 hinge) region described by Strome. It would have been obvious to a person skilled in the art to select the first two specific sequences taught by Strome to produce a specific example of a cluster stradamer, essentially comprising SEQ ID NO: 4. In a likewise manner, although Strome does not explicitly disclose the equivalent of Applicants' SEQ ID NO: 20, Strome teaches both a sequence 100% homologous to the N-terminal portion of the sequence (SEQ ID NO: 51 - note: homology is not identity. While 98.8% identical, the three substitution mutations in SEQ ID NO: 51: vs. Applicants' SEQ ID NO: 20 comprise conservative, or homologous, mutations, affecting a 100% homologous sequence) as well as the c-terminal multimerization sequence (SEQ ID NO: 11). It therefore would have been obvious to a person skilled in the art to use the sequences for mutated cluster stradamers taught by Strome to produce a sequence at least 99% homologous to SEQ ID NO: 20 by attaching a sequence taught by Strome to the first multimerization region sequence taught by Strome. Therefore, the inventions of Groups I - XV+ lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

This ISA will establish the ISR for the first group mentioned, specifically, Group I claims 1-30, 68, 69, 76, 77, 106, and 150; limited to SEQ ID NOs: 2-4 without additional fees. In order for additional inventions to be examined, applicants must designate with specificity the particular Groups and sequence(s) or sequence combination(s) to be searched and the appropriate examination fees must be paid for each additional Group and sequence combination to be searched.

(Note: For the purpose of the search and opinion, claim 64 has been considered to depend from claim 56, and not claim 36, as stated. Further, claim 156 has been considered to read as follows: A nucleic acid encoding the stradamer unit of SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27; making the claim consistent with earlier claims (56, 57) regarding the use of the optional for the sequences.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 R	4 H 0 4 5
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 S	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Y	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
	A 6 1 P 31/12	
	G 0 1 N 33/53 Y	
	C 0 7 K 14/47	
	C 1 2 N 5/00 1 0 2	

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

(72)発明者 ブロック, デーヴィッド エス.

アメリカ合衆国, メリーランド州 2 1 2 0 1, ボルティモア, スイート 5 0 1エー, ウェスト
バルティモア ストリート 8 0 1, グリックニック インコーポレイテッド 内

(72)発明者 オルセン, ヘンリック

アメリカ合衆国, メリーランド州 2 1 2 0 1, ボルティモア, スイート 5 0 1エー, ウェスト
バルティモア ストリート 8 0 1, グリックニック インコーポレイテッド 内

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA61 CA01 EA04 GA11 HA01
4B064 AG26 BJ12 CA10 CA19 CC24 CE11 CE12 DA01
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
4C084 AA19 MA02 MA16 MA17 MA23 MA24 MA28 MA32 MA34 MA35
MA36 MA37 MA38 MA43 MA52 MA56 MA57 MA63 MA66 NA05
NA14 ZA01 ZA53 ZA89 ZA94 ZA96 ZB07 ZB08 ZB11 ZB13
ZB33 ZB35 ZC35 ZC75
4C085 AA13 AA14 CC22 DD62 EE01 EE03 GG01 GG02 GG03 GG04
GG06 GG08 GG10
4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA40 DA75 EA22 EA24 EA27 EA28
FA74 GA23 GA26

专利名称(译)	天然人蛋白质片段的融合蛋白，用于制备规则多聚化的免疫球蛋白Fc组合物		
公开(公告)号	JP2013543483A	公开(公告)日	2013-12-05
申请号	JP2013521984	申请日	2011-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	格利克尼克股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	格里克尼克公司		
[标]发明人	ブロックデーヴィッドエス オルセンヘンリック		
发明人	ブロック,デーヴィッド エス. オルセン,ヘンリック		
IPC分类号	C07K19/00 C12N15/09 C12P21/02 A61K39/395 A61K45/00 A61P43/00 A61P37/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P3/10 A61P7/04 A61P17/00 A61P37/02 A61P21/04 A61P37/08 A61P31/04 A61P31/12 G01N33/53 C07K14/47 C12N5/10		
CPC分类号	A61K39/395 A61K2039/505 C07K16/00 C07K2317/35 C07K2317/52 C07K2317/92 C07K2319/30 C07K2319/73 A61K31/573 A61K45/06 A61P37/00 C07K2319/735 A61K2300/00 C07K14/47		
FI分类号	C07K19/00.ZNA C12N15/00.A C12P21/02.C A61K39/395.D A61K39/395.N A61K39/395.R A61K39/395.S A61K39/395.Y A61K45/00 A61P43/00.121 A61P37/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P3/10 A61P7/04 A61P17/00 A61P37/02 A61P21/04 A61P37/08 A61P31/04 A61P31/12 G01N33/53.Y C07K14/47 C12N5/00.102		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B064/AG26 4B064/BJ12 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE11 4B064/CE12 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/MA16 4C084/MA17 4C084/MA23 4C084/MA24 4C084/MA28 4C084/MA32 4C084/MA34 4C084/MA35 4C084/MA36 4C084/MA37 4C084/MA38 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA53 4C084/ZA89 4C084/ZA94 4C084/ZA96 4C084/ZB07 4C084/ZB08 4C084/ZB11 4C084/ZB13 4C084/ZB33 4C084/ZB35 4C084/ZC35 4C084/ZC75 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC22 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA22 4H045/EA24 4H045/EA27 4H045/EA28 4H045/FA74 4H045/GA23 4H045/GA26		
优先权	61/368465 2010-07-28 US		
其他公开文献	JP2013543483A5 JP5826270B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一系列完整的重组多聚化形式的免疫球蛋白Fc，其多聚化形成向免疫细胞受体呈递多价免疫球蛋白Fc。融合蛋白以同型二聚体级分和称为stradomer的高级多聚体级分存在。与同源二聚体的比例相比，纯化的多聚体载体对Fc R具有更高的亲和力和结合活性，以及缓慢的解离，并且可用于治疗和预防疾病。本发明证明IgG1Fc区和多聚化结构域的直接结合导致多聚化和增强生物活性。

ストロドマー	配列
G045c (配列番号4)	METD T L L L W V L L L W V P G S T G E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K E R K C C V E C P P C P
G019 (配列番号8)	M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G E R K C C V E C P P C P E P K S C D K T H T C P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
G028 (配列番号9)	M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G G G S I K Q I E D K I E E I L S K I Y H I E N E I A R I K K L I G E R G H G G G S E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K