

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 519619

(P2003 - 519619A)

(43)公表日 平成15年6月24日(2003.6.24)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード ( 参考 )
C 0 7 K 16/18		C 0 7 K 16/18	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 6 3
A 6 1 P 7/00		A 6 1 P 7/00	4 C 0 8 5
9/10		9/10	4 H 0 4 5
17/00		17/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 42数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 501251(P2001 - 501251)

(86)(22)出願日 平成12年6月7日(2000.6.7)

(85)翻訳文提出日 平成13年12月7日(2001.12.7)

(86)国際出願番号 PCT/FR00/01560

(87)国際公開番号 W000/074717

(87)国際公開日 平成12年12月14日(2000.12.14)

(31)優先権主張番号 99/07153

(32)優先日 平成11年6月7日(1999.6.7)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(31)優先権主張番号 99/16632

(32)優先日 平成11年12月29日(1999.12.29)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 ラボラトワール、フランセ、デュ、フラク  
ショヌマン、エ、デ、バイオテクノロジー  
LABORATOIRE FRANCA  
IS DU FRACTIONNEME  
NT ET DES BIOTECHN  
OLOGIES

フランス国レ、ジュリ、アブニュ、デ、ト  
ロピック、3、ゾーヌ、ダクティピテ、ド、  
コルタブフ

(72)発明者 ブーレル、ドミニク  
フランス国、59110 ラ・マドラン、アブニ  
ユ・ジェルマーン 35

(74)代理人 弁理士 佐藤 正年 ( 外 1 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫修飾活性を有する新規 I g 断片

(57)【要約】

本発明は、特定の自己免疫疾患の治療中に観察される免疫修飾効果を特にもたらすことが可能であるような I g 断片を、ヒトの多価静脈内投与免疫グロブリン ( I V I g ) から調製するための方法に関する。本発明は、 I g M , I g G F ( a b ' ) 2 もしくは D N P ハプテンに対し反応性があるが、非自己抗原に対してはまったくもしくはほとんど反応性のない I g 断片、即ちそれ自体 ( 連結断片 ) の間においてイディオタイプ型相互作用を有するか、もしくは D N P ハプテンと反応する自然抗体を含む I g 断片に関する。該断片は、特異的自己抗原に対する多重反応性を示す。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 初期多価 I g の活性と比較して濃縮レベルが 20 を越える場合に、I g M , I g G F (ab')<sub>2</sub> 及びハプテン D N P から選択された少なくとも一つの成分と反応し、尚且つ、初期多価 I g の活性と比較して濃縮レベルが 5 に満たない場合に、破傷風トキサイドもしくは H B s 抗原とは反応しないことを特徴とする I g 断片。

【請求項2】 I g G 断片又は I g M 断片からなることを特徴とする請求項 1 に記載の I g 断片。

【請求項3】 初期多価 I g の活性と比較して濃縮レベルが 40 を越える場合に、I g M , I g G F (ab')<sub>2</sub> 及びハプテン D N P から選択された少なくとも一つの成分と反応することを特徴とする請求項 1 及び 2 の何れかに記載の断片。

【請求項4】 初期多価 I g の活性と比較して濃縮レベルが 10 を越える場合に、ミオシン , アクチン , チューブリン及びミエリン塩基性タンパク質 ( M B P ) から選択された自己抗原の少なくとも一つと反応することを特徴とする請求項 1 ~ 3 の何れか一つに記載の断片。

【請求項5】 初期多価 I g の活性と比較して濃縮レベルが 20 を越える場合に、ミオシン , アクチン , チューブリン及び M B P から選択された自己抗原の少なくとも一つと反応することを特徴とする請求項 4 に記載の断片。

【請求項6】 ミオシン , アクチン , チューブリン及び M B P と反応することを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか一つに記載の断片。

【請求項7】 初期多価 I g の活性と比較して濃縮レベルが 40 を越える場合に、I g M , I g G F (ab')<sub>2</sub> 及びハプテン D N P から選択された少なくとも一つの成分と反応し、尚且つ、初期多価 I g の活性と比較して平均濃縮レベルが 20 を越える場合に、ミオシン , アクチン , チューブリン及び M B P と反応することを特徴とする請求項 1 ~ 6 の何れか一つに記載の断片。

【請求項8】 I g M 又は I g G F (ab')<sub>2</sub> と反応することを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか一つに記載の断片。

【請求項9】 ハプテン D N A と反応し、I g M 及び I g G F (ab')<sub>2</sub> とは反応しないことを特徴とする請求項 1 ~ 7 の何れか一つに記載の断片。

【請求項10】 I g断片の調製法であって、

- a) 多価I g G, 多価I g M及びDNP-リジンから選択された少なくとも一つの成分を支持体上に移植(graft)させる不溶性支持体の調製工程と、
- b) ステップa) で取得した支持体上に多価I gを吸着させる吸着工程と、
- c) I g G - I g G又はI g M - I g G間のイディオタイプ型相互作用を通じて連結している断片を回収することを目的とした、支持体に結合している免疫グロブリンの一部分に保持されているI gの溶出工程、又はDNPと相互作用する断片の溶出工程と、
- d) I g M, I g G F(ab')<sub>2</sub>又はハプテンDNPに対して反応性があり、非自己抗原に対して殆ど又は全く反応性がなく、所定の自己抗原に対して多重反応性のある断片を選択する選択工程と、
- e) 好ましくは、TEGELINE<sup>®</sup>に比べ10～50倍の有効性があり、混合培地内におけるリンパ球の増殖を阻害する活性を有する断片を選択する選択工程とを備えたことを特徴とするI g断片を調整するための方法。

【請求項11】 吸着するI gがI g G又はI g Mからなることを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項12】 多価I g又は治療用のIVI gを生産するための方法で取得した他の中間断片から、I g断片を調製することを特徴とする請求項10及び11の何れかに記載の方法。

【請求項13】 断片の調製に使用する多価I gが、I g G又はI g Mからなることを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項14】 ステップd) が、I g M, I g G F(ab')<sub>2</sub>もしくは精製に使用するハプテンDNPに対する反応性を有する抗体の濃縮レベルの測定を含むことを特徴とする請求項10～13の何れか一つに記載の方法。

【請求項15】 ステップd) が、比較対照値として濃縮レベルを採用した、破傷風トキサイド及びHBs抗原の反応性の測定を含むことを特徴とする請求項10～14の何れか一つに記載の方法。

【請求項16】 ステップd) が、特にアクチン, ミオシン, MBP及びチューブリンから選択した自己抗原群に対し実施するELISA検定を含むことを

特徴とする請求項10～15の何れか一つに記載の方法。

【請求項17】 ステップd)が、自己免疫疾患患者の血清から取得した自己抗体に関する、断片の中和活性を制御することを目的とした競合試験を含むことを特徴とする請求項10～16の何れか一つに記載の方法。

【請求項18】 ステップd)が、精製済みIgの反応を制御することを目的とした、ヒトの細胞と混合リンパ球との反応の阻害に関する検定を含むことを特徴とする請求項10～17の何れか一つに記載の方法。

【請求項19】 ステップa)が、多価IgG、多価IgM又はDNP-Lysineの不溶性支持体、それも特にSepharose<sup>R</sup>、Trisacryl<sup>R</sup>、Affiprep<sup>R</sup>もしくはAffigel<sup>R</sup>のいずれかのゲル上、もしくはCNBr、NHS又はC<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>（グルタルアルデヒド）のいずれかの塩基によって活性化されたゲル上への移植を含むことを特徴とする請求項10～18の何れか一つに記載の方法。

【請求項20】 ステップa)で取得された固体支持体上に置かれたIgが、凍結乾燥後に再溶解した多価IgGの形態で若しくは液体形態で、或いは濃度を0～3Mの範囲のNaClを含む20mMのリン酸塩緩衝液中で多価IgGを生産するための方法で取得した中間断片の形態で吸着されることを特徴とする請求項10～19の何れか一つに記載の方法。

【請求項21】 ステップb)で保持されたIgを、好ましくは2.8と4.0の間でpHを変化させ、さらに/又は緩衝液のモル濃度も変化させた条件下で、グリシン-HClもしくはヨウ化ナトリウム(NaI)などの特にカオトロップから選択したAg-Ab又はAg-DNP結合を解離させるイオンを含有する緩衝液を使用して溶出させることを特徴とする請求項10～20の何れか一つに記載の方法。

【請求項22】 4～40の範囲の温度条件下でPBS内で吸着を実施することを特徴とする請求項10～21の何れか一つに記載の方法。

【請求項23】 ステップd)において請求項1～9のいずれか一つに記載の断片を選択することを特徴とする請求項10～22の何れか一つに記載の方法。

。

【請求項24】 IgM、IgG F(ab')<sub>2</sub>及びハプテンDNPから選択し

た少なくとも一つの成分に関して反応性があり、非自己抗原に関してはほとんどもしくはまったく反応性がなく、所与の自己抗原に関しては多重反応性を有する断片を産業向けに生産するため、事前に選択した当該断片の調製に使用するパラメータを採用又は調整しながら、請求項10のステップa)、b)及びc)を実施することを特徴とする方法。

【請求項25】 請求項10～24の何れか一つに記載の方法を使用して取得できる断片。

【請求項26】 医療用生成物を調製するための、請求項1～9ならびに25の何れか一つに記載のIg断片の使用法。

【請求項27】 自己免疫疾患すなわちGVH、及び/又は移植後の拒絶反応の治療を目的とした医療用生成物を調製するための請求項26に記載の使用法。

【請求項28】 川崎病の治療、任意選択に基づいて皮質療法と併用したバードショット型脈絡網膜炎の治療及び/又は阻害剤(抗因子V I I I自己抗体)を併用した特定の血球減少病態及び/又は血友病の治療及び/又は細胞及び/又は臓器移植の拒絶反応の予防及び/又は阻害、ならびに同種異系造血細胞移植後のGVHの発症の予防及び/又は阻害を目的とした、医療用生成物を調製するための請求項26に記載の使用法。

【請求項29】 神経系疾患、それも特に成人ギランバレー症候群、慢性の脱髄炎症性多発神経障害、皮膚筋炎、筋無力症及び/又は複数の硬化症の治療を目的とした医療用生成物を調製するための、請求項26に記載の使用法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

本発明は、特に、特定の自己免疫疾患の治療中に観察される免疫修飾効果をもたらすと考えられる、ヒトの多価静脈内投与（IV）免疫グロブリンから得られたIg断片を調製するための方法に関する。本発明は、IgM、IgG F(ab')<sub>2</sub>、又はハプテンDNPに関しては反応性があるが、非自己抗原に関してはほとんどあるいはまったく反応性のないIg断片、すなわち相互にイディオタイプ型の相互作用を示すIg断片（連結断片）か、ハプテンDNPと反応する自然抗体を有するIg断片に関する。これらの断片は、所与の自己抗原に関して多重反応性を示す。

**【0002】**

IVIgの調製は、長年にわたって、複数の病態の治療に使用されてきた。その主要な適応症は、下記3種類の治療対象に分類できる。

- 一次もしくは二次免疫不全症、
- 特定の自己免疫疾患の治療、及び
- 同種異系造血細胞移植後の感染性合併症及び移植片対宿主疾患。

**【0003】**

患者の体内におけるその血漿濃度が低すぎて、ウイルス感染症や細菌感染症の発症を回避できない免疫不全症の場合、IVIgはIgGの提供を可能にする代用治療法のひとつとなる。

**【0004】**

自己免疫疾患の場合、IVIgの有効性は、複合免疫修飾効果に関連付けられる。IVIgは、骨髄移植分野で処方されており、移植後の免疫系の再建過程にある患者に対する代用治療法に該当し、移植片対宿主疾患に関して免疫修飾効果を発揮している。

**【0005】**

IVIgは、数千もの提供者から取得した血漿プールから調製する。これらの分布は、一般的母集団のサブクラス及び抗体特異性分布を反映している。したがって、IVIgは、全範囲に及ぶ自然抗体、及び外部の抗原や自己抗原を指向す

る抗体を保有する生成物と見なすことができる。

#### 【0006】

I V I g による免疫修飾に関する概念は、1981年に自己免疫血小板減少性紫斑病(AITP)におけるそれらの有効性が実証されて以来、広範に渡って発展してきた(1)。その後、I V I g は、数多くの自己免疫病態や炎症性病態に使用されてきた。I V I g の有効性が明らかに確定されている適応症のいくつか、規制当局によって公式に承認されている。これら適応症には、I V I g が動脈瘤に関する合併症を効果的に予防するAITPすなわち川崎病(2, 3)、I V I g が移植片対宿主反応を調節する同種異系造血細胞移植(4)、さらに近年に至っては、I V I g が視力を改善し、ときには皮質療法の軽減を可能にするバズホット型の脈絡網膜炎などがあげられる(5)。

#### 【0007】

専門家が正当であると考え他の適応症もある。たとえば、I V I g の投与によって即効性はあるものの多くの場合一過性の改善効果だけが認められる何種類かの血球減少性病態(6)及びそれとは逆に改善効果が長期間にわたると考えられる阻害剤(抗因子III 自己抗体)を複合投与する血友病(7, 8)などがある。反復性流産に関する結果は矛盾しており、これが特定の系における成功率を押し上げる要因となっている(9, 10)。

#### 【0008】

約10年の間に、定量的有効性基準(神経学的スコア)と定性的有効性基準(症状が改善された患者数)の両方を用いた多施設比較調査研究によって、神経学分野においてI V I g が急速に大きな発展を見せた。従って、成人ギランバレー症候群においては、I V I g は、血漿交換療法と同等の効果があるだけでなく、その寛容性はさらに高い(11, 12)。I V I g は、小児科における適応症に対する第一線の治療法として推奨されている(13)。これらは、慢性の炎症性脱髄多発神経障害(14)及び皮膚筋炎(15)において、プラセボ比較調査研究で高い効果を示している。さらにこれらは、筋無力症の急性発作(16)でも、血漿交換法と同等の効果を示すだけでなく、寛容性はさらに高い。最後になるが、プラセボ比較調査研究で、再発性/弛張性の複数の硬化症(17)における

I V I gの有効性も実証されている。

【0009】

I V I gの作用の多様性を裏付ける下記のいくつかのメカニズムが提示されている(18)。

- マクロファージ, 単球, 好中球, 及び好酸球の表面におけるFc受容体の遮断、
- 抗イディオタイプ抗体による循環自己抗体の中和、
- 補体活性化による有害な影響の阻害、
- サイトカインネットワークの調節、及び/又は、
- Tリンパ球及びBリンパ球との相互作用による免疫レパートリーの選択。

【0010】

これらのメカニズムが、I V I gの早期的効果と長期的効果の双方を裏付けると考えられる。

【0011】

I g断片(連結断片と称する)は、I V I g F(ab')<sub>2</sub>又はI g G全体がSepharoseビーズ(19, 20)に結合しているアフィニティーカラム上で精製することができる。健常者の血清中に含まれているI g Mは、自系I g GのF(ab')<sub>2</sub>断片に結合し、これらI g Gと自己抗原(21)との会合を阻害する。I g Mは、イディオタイプ型の相互作用を通じて、I g Gの自然自己反応の調節に寄与する(21)。これらのI gもしくはそれらのF(ab')<sub>2</sub>は、体外で行われた試験によって実証されているように、それらの抗原に対する自己抗体の結合を阻害する(22)。I V I gから取得した連結I g断片には、特に、相互に中和し合いイディオタイプネットワークの機能と力学を修飾できる、I g G又はI g M自己抗体に存在する抗イディオタイプ決定因子を認識する自己抗体が含まれている(23)。さらに、ハプテンDNPと反応することを特徴とするI g断片は、多重反応自然抗体及び自己反応自然抗体を含むとして記述されている(24)。

【0012】

他の文献に、連結断片の取得に関する一般原理についての記載がある。これら

の文献の中でも、抗イディオタイプ抗体を有する抗体の精製済み組成を調製するための方法に関してあり、該方法が、自己抗体のイディオタイプ決定因子を含む固体基質へのI g Gプールの吸着及び溶出にあるような、特許願WO 98 / 26086 を取り上げることができよう。

【0013】

EP 293 606には、イディオタイプ/抗イディオタイプの相互作用によって抗体Xを精製するための方法において、下記ステップで構成される方法についての記載がある。

- a) 固体支持体に対し抗体Yを付着させ、該抗体がXのイディオタイプを認識する、
- b) 抗体Xを含む標本を適切な緩衝液内の固体支持体へ接触させる、
- c) 精製済み抗体Xを溶出させ、d) これを回収する。

【0014】

WO 97 / 19113 は、特に自己免疫疾患の治療における、免疫反応の免疫修飾遺伝子としての、I g G型の抗イディオタイプのモノクロナール抗体の使用法に関する。

【0015】

現在、市販されている多価I g G、それも特に TEGELINE<sup>®</sup> (LFB、フランス)の寛容性と有効性は、特にITP、川崎病、「バードショット」型脈絡網膜炎で認められており、これらの病態に対しては製造承認が与えられている。ただし、これらの適応症では現在多量の投与が処方されており、投与方法も手がかかり、複雑である(病院における静脈内投与で、数時間を要する)。ただし、調製することによって使用の効果と便宜性をさらに高めるには、自己免疫病態で活性を示す断片の調製に問題がある。

【0016】

したがって、この発明の根底をなす目的は、同等もしくはそれ以上の有効性と高い寛容性を有する、投与量を減少できる特異的I g及び、より簡単なその投与方法を実現することにある。抗I g M、抗I g F(ab')<sub>2</sub>又は抗DNPに対しては反応性があるが、非自己抗原に関してはほとんどあるいはまったく反応性を示さ

ないようにI g プールから調製することによって、上記の問題に対処し、さらに / 又は特定の自己抗原に関して多重反応性を示す断片を調製できることが実証されている。

【0017】

説明

【0018】

このように、この発明は、特に、特定の自己免疫疾患の治療中に観察される免疫修飾効果をもたらすと考えられる、多価I V I g に含まれるI g の精製に関する。この発明は、I g M、I g G F(ab')<sub>2</sub>もしくはハプテンDNPに関して反応性があり、破傷風トキソイド及びHBs抗原（非自己抗原）に関してはほとんどあるいはまったく反応性のないI g G断片、すなわち相互にイディオタイプ型の相互作用を示すI gを有するか、自然抗体を有する断片の特徴に基づいている。

【0019】

I g断片は、相互に認識し合い、I g Mも認識し、ハプテンDNPに結合するという、このようなI gの特性を利用した、アフィニティークロマトグラフィーによって調製する。これらの断片を取得するのに使用する原材料は、多価I g M、それも特にLFB（フランス）によって調製及び発売されている多価I gから、又は治療用の多価I V I gを生産するための方法を実施したときに取得される他の中間断片から得られる。多価I V I gを調製するための一般的な方法は、基本的には下記のステップ：

- 沈殿、吸着、及び / 又は濾過、さらには限外濾過（第一の断片、“PSO1”の生産）によって提供者プールから得られる血漿の断片化、
- 酸性pHのペプシンによる処理、処方、分配、及び凍結乾燥（TEGELINE<sup>®</sup>製品の生産）で構成されるが、
- 他の処理では、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、限外濾過、中間断片（“PSO2”と称する）の生産及び加熱、限外濾過、処方ならびに分配（I V I g断片液の生産）を使用することもできる。

【0020】

この発明に関しては、「多価I g」という用語は、多価I g又はI g M全体、 $F(ab')_2$ 又は $F(ab)$ などの多価I g G断片、及び多価IVI gを生産するための方法を実施するときに取得される中間断片を意味することを目的としている。

【0021】

この発明の第一の態様は、初期多価I gの活性と比較して濃縮レベルが20を越える場合には、I g M、I g G  $F(ab')_2$ 及びハプテンDNPから選択された少なくとも一つの成分と反応するが、初期多価I gの活性と比較して濃縮レベルが5に満たない場合には、破傷風トキソイド又はHBs抗原とは反応しない、I g断片に関する。

【0022】

このI g断片は、I g G断片又はI g M断片からなってもよい。

【0023】

できれば、I g断片は、初期多価I gの活性と比較して濃縮レベルが40を越える場合には、I g M、I g G  $F(ab')_2$ 及びハプテンDNAから選択された少なくとも一つの成分と反応することが好ましい。

【0024】

この発明による断片は、初期多価I gの活性と比較して濃縮レベルが10を越える場合、できれば20を越える場合には、ミオシン、アクチン、チューブリン及びミエリン塩基性タンパク質(MBP)から選択された自己抗体の少なくとも一つとも反応し得る。

【0025】

断片が上記自己抗体の全てと反応することが、有利に働く。

【0026】

この発明による好ましい断片は、初期多価I gの活性と比較して濃縮レベルが40を越える場合には、I g M、I g G  $F(ab')_2$ 、及びハプテンDNPから選択された少なくとも一つの成分と反応し、初期多価I gの活性と比較して平均濃縮レベルが20を越える場合には、ミオシン、アクチン、チューブリン及びMBPと反応する。

## 【0027】

記載されている断片は、I g M又はI g G F(ab')<sub>2</sub>と反応し得る。これら断片は、ハプテンDNPとも反応するが、その場合には、I g M又はI g G F(ab')<sub>2</sub>とは反応しない。

## 【0028】

この発明の第二の態様は、下記のステップで構成されることを特徴とする、I g断片を調製する方法に関する。

- a) 多価I g G, 多価I g M, DNP - リジンから選択された少なくとも一つの成分を支持体上に移植するさせる不溶性支持体の調製工程と、
- b) ステップa) で取得した支持体上に多価I gを吸着させる吸着工程と、
- c) I g G - I g G又はI g M - I g G間のイディオタイプ型相互作用を通じて連結している断片を回収することを目的とした、支持体に結合している免疫グロブリンの一部分に保持されているI gの溶出工程、又はDNPと相互作用する断片の溶出工程と、
- d) I g M, I g G F(ab')<sub>2</sub>又はハプテンDNPに対して反応性があるが、非自己抗原に対して殆ど或いは全く反応性がなく、さらに/又は所定の自己抗原に対して多重反応性がある断片を選択する選択工程と、及び
- e) 好ましくは、TEGELIN<sup>®</sup>に比べ10～50倍も有効性が高く、混合培養中のリンパ球の増殖を阻害する活性を有する断片の選択。

## 【0029】

この方法では、吸着するI gは、I g GであってもI g Mであってもよい。

## 【0030】

取得するI g断片は、多価I gから、又は、治療用のIVIgを生産するための方法を使用するときに取得される他の中間断片から調製する。

## 【0031】

多価I g内には、ハプテンDNPと反応する自然抗体と、I g G又はI g M型(連結断片)の自己抗体によって発現するイディオタイプと反応し、特定の自己反応性を有する抗体がある。この発明に関しては、「連結断片」という用語は、相互に反応するかあるいは、イディオタイプ - 抗イディオタイプ間結合を通じて

I g G又はI g Mと反応する、高い割合(%)のI gを含む断片を意味することを目的としている。

【0032】

各種断片の中から、所望の特性を有する断片(複数もあり)、すなわち最も高い自己反応力価を有し最大数の自己抗原と反応する断片を判定するのに使用する技法は、それらの断片に対し、おそらくいくつかの連続ステップからなるスクリーニングを行うことにある。

【0033】

各種体外検定及び/又は体内検定を使用すると、ますます特化してくる基準に従って、各ステップで最も活性の高い断片を選択できる。

【0034】

したがって、この発明による方法は、所与の特徴をもつI g断片を選択するためのステップを包含し得る。

【0035】

この意味では、ステップd)は、I g M, I g G F(ab')<sub>2</sub>もしくは精製に使用するハプテンDNPに反応する抗体の濃縮レベルの測定も包含し得る。

【0036】

さらに、ステップd)は、比較対照値として濃縮レベルを利用した、破傷風トキソイドやHBs抗原に関する反応性の測定も包含し得る。

【0037】

できれば、ステップd)は、特にアクチン, ミオシン, MBP, 及びチューブリンから選択した自己抗原群で実施するELISA検定も包含することが好ましい。

【0038】

さらに、この発明による方法のステップd)は、自己免疫疾患の患者の血清から取得した自己抗体に関して断片の中和活性を制御するための競合検定、及び/又は阻害能を測定するためのヒト細胞に対する混合リンパ球反応に対する阻害検定も包含し得る。

【0039】

この混合リンパ球反応検定は、下記のステップを包含し得る。

- 提供者A及び、主要組織適合複合体(MHC)抗原に対して不適合な提供者Bからの血液標本の採取、
- フィコール上での単核細胞の精製、
- 提供者Aから取得した $2 \times 10^5$ 個の細胞の存在下における、提供者Bからの $2 \times 10^5$ 個の細胞の培養、及び
- トリチウム化チミジンの取込み測定による、試験4日目の細胞増殖の測定。

#### 【0040】

ステップa)は、不溶性支持体、それも特にSepharose<sup>R</sup>, Trisacryl<sup>R</sup>, Affiprep<sup>R</sup>又はAffigel<sup>R</sup>のいずれかのゲル上、もしくはCNBr, NHSあるいはC<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>(グルタルアルデヒド)のいずれかの基によって活性化されるゲル上への、多価IgG, 多価IgM, 又はDNP-リジンの移植にある。ステップa)で取得した個体支持体上に堆積したIgは、凍結乾燥後再溶解した多価Igの形態、あるいは多価Igを生産するための手法の使用時に取得した中間断片の形態で吸着される。堆積するIgには、IgG又はIgMが含まれている。

#### 【0041】

吸着は、4~40の範囲の温度条件下で、20mMのリン酸緩衝液又は、濃度を0~3MとすることができるNaClを含む等価緩衝液内で行うと有利に働く。

#### 【0042】

ステップb)で保持されたIgは、できれば2.8~4.0の範囲でpHを変化させることが好ましい条件下で、特にグリシン-HClもしくはヨウ化ナトリウム(NaI)などのカオトロップから選択したAg-Ab又はDNP-Ab結合を解離するイオンを含有する緩衝液を使用して、ステップc)で溶出することが好ましい。

#### 【0043】

特定の実施例では、この方法は、下記のステップを包含する。

- a) 従来からアフィニティークロマトグラフィーで使用されてきた固体支持体又はアフィニティー(免疫吸着剤)支持体上への、多価IgG、多価IgM、D

NP - リジンの移植。このような支持体は、当業者によってよく知られている。たとえば、Sepharose<sup>R</sup>、Trisacryl<sup>R</sup>、Affiprep<sup>R</sup>又はAffigel<sup>R</sup>のいずれかのゲル、あるいはCNBr、NHS、もしくはC<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>（グルタルアルデヒド）のいずれかの基によって活性化されるゲルなどをあげることができる。

b) 20 mMのリン酸緩衝液又は濃度を0 ~ 3 Mの範囲とすることができるNaClを含む等価緩衝液中における、ステップa)で取得した個体支持体上へのIgの吸着で、凍結乾燥後再溶解した多価Igの形態又は液体の形態での堆積、あるいは多価Igを生産するための方法の使用時に取得される中間断片の形態での吸着。吸着されるIgには、IgGもしくはIgMが含まれている。

c) できれば2.8 ~ 4.0の範囲でpHを変化させ、さらに/又はイオン強度も変化させた条件の下で、特にグリシン-HClもしくはヨウ素酸ナトリウム(NaI)などのカオトロープから選択したAg-Ac結合を解離するイオンを含有する緩衝液を使用し、さらに/又は開始多価Igの反応性プロファイルとは異なる反応性プロファイルを有するIg断片を取得するため、IgG-IgG、IgG-IgM、又はIg-DNP-リジン結合を破断するため別の等価の方法を使用した、ステップb)で保持されたIgの溶出。

d) IgM、IgG F(ab')<sub>2</sub>又は精製に使用するハプテンDNPもしくはTNPに対して反応性を示す抗体のELISA検定による濃縮レベルの測定、濃縮レベルを比較対照値として採用した破傷風トキソイド及びHBs抗原に関する半反応性の測定、さらには特にアクチン、ミオシン、MBP及びチューブリンから選択した自己抗原群に関する反応性の濃縮レベルの測定。

#### 【0044】

上記のように、リンパ球反応検定を包含する他のステップも、この方法に取り込むことができる。

#### 【0045】

いずれの場合も、各種カラム上に保持されない断片は、Igの初期調製のほかに、比較対照としても使用できる。

#### 【0046】

当然のことながら、この方法の特定のパラメータは、単純な日常の実験によっ

て、当業者の都合にあわせて修正してもよい。したがって、この発明は、ステップd)で事前に選択した断片の働きを示すようにパラメータを決定する、上記方法にも関する。この発明では、所望の特定の特性を有する断片を取得するのに最適なパラメータを定義し、この発明に従った産業上の方法に必要な規模でこれらのパラメータを適用する。このようなパラメータは、上記断片を特徴付けるパラメータであってもよい。したがって、この方法は、上記断片を取得するのに適していると考えられる。同様に、この発明は、IgM, IgG F(ab')<sub>2</sub>及びハプテンDNPから選択した成分に関して反応性があり、非自己抗原に関してはほとんどあるいはまったく反応性がなく、事前に選択した当該断片の調製に使用したパラメータを採用又は調整して実施することを特徴とする、所与の自己抗原に関して多重反応性のある断片の産業向け生産を目的とした手法を指向している。

【0047】

さらに、この発明の主題は、上記の手法を使用して取得できる断片にもある。

【0048】

体外検定を使用して選択したいいくつかの断片の免疫修飾特性は、自己免疫疾患及び同種異系移植後の移植片対宿主疾患(GVH)の数種類の動物モデルの体内においても判定可能である。

【0049】

関与する作用のメカニズムに従って、下記の数種類のモデルを選択した。

- T細胞を通じてあるいは抗体によりエフェクタ機能が遂行されるモデル、及び
- メカニズムがF(ab')<sub>2</sub>又はFc<sub>s</sub>との相互作用に依存するモデル。

【0050】

IVIgの投与に感受するとして記述されており、断片の有効性に関する反応をすぐに示すことができるという利点があるので、さらに、エフェクタ機能がT細胞を通じて遂行される、ラットの2種類の実験的自己免疫疾患を特に選択した(約4週間かけて、予防効果を評価した)。これらは、下記のモデルである。

- 1) ウシの網膜抗原又はその免疫優性ペプチドをルイスラットに注入することによって誘導された、実験用自己免疫ブドウ膜炎、及び

2) ウシのⅠⅠ型コラーゲンを注入することによってブラックアグーチに導入された、リウマチ性関節炎(RA)。

【0051】

いずれの場合も、疾患の重篤度を臨床試験及び/又は病理学検査によって評価し、体重の減少、注入された自己抗原に対する抗体の産生など、いくつかの生物学的パラメータを経時的に測定した。

【0052】

ⅠⅤⅠgの投与に対して感受するという記述があるので、急性GVHのラットモデルを追加した。GVHは、ルイスラットから取得した細胞を注入することによって、ハイブリッドラット(ルイス×ブラウンノルウェー)に誘導する。この疾患は、体重の減少、紅斑の有無、死亡率に従って評価する。

【0053】

主として抗体の作用に関わる自己免疫性溶血性貧血(AHA)動物モデルは、人体に観察される溶血性の病態に近い。これは、事前に脾臓摘出術を施したC3Hマウスにラットの赤血球(RBC)を注入することによって誘発する。ヒトの溶血性貧血ではⅠⅤⅠgの有効性が認められるので、この検定法は有益である。貧血の発症は、RBC数の減少及び動物の血漿中における自己のRBCに対する自己抗体の指向傾向に基づいて観察する。

【0054】

生成物TEGELINE<sup>®</sup>、多価ⅠgG、多価ⅠgM、あるいは多価Ⅰgを生産するための方法で取得した他の中間生成物の予防効果については、モデルで事前に検定を行い、投与に関する最適な条件(注入投与量、回数、間隔、経路)を判定する。選択した断片を、TEGELINE<sup>®</sup>の投与量に比べて1/5~1/20の低い投与量で注入し、自己免疫疾患の各種モデルでこれら治療の有効性を計る。

【0055】

さらに、ヒトの細胞を使用した実験モデルを利用することもできる。

【0056】

- ヒトの細胞を注入したマウスは、動物モデルで検定を使用して、事前に選択した断片の、ヒトの病的細胞に対する体内での有効性を評価するのに最適なモデ

ルであるように思える。

【0057】

原発性胆汁性肝硬変，筋無力症，橋本病と呼ばれる甲状腺炎の病態から取得した細胞のSCIDマウスへの移植はすでに成功しているので、これらの病態の各モデルを選択した。その後で、他の病態を選択することも可能である。

【0058】

次の段階では、有効であることが実証されている所定の断片の作用メカニズムに関する知識の向上を目指して、他の補体モデルを使用して、TEGELINE<sup>®</sup>をはじめとする他のIVIg由来断片を使用する適応症の対象範囲の拡大を図ることもできる。

【0059】

したがって、ステップd)は、一種類又はそれ以上の検定、それも特に上記の検定を包含してもよい。

【0060】

このように、この発明による方法では、特に、前に定義した特徴を有する断片の調製と選択が可能となる。

【0061】

一度当該断片を特定したなら、該断片を生産するための産業における方法に関連して、a)，b)，c)の各ステップのパラメータを採用することもできる。当該断片に従って適切なパラメータを事前に選択するこのような方法は、この発明の別の主題である。

【0062】

この発明の補完的態様は、前に定義した方法を使用すると取得できる断片に関する。

【0063】

ただし、この発明の説明内容は、この発明を制限するものではなく、同等の方法や同等の断片もこの発明に包含されるということに留意せねばならない。

【0064】

この発明に従った断片には、いくつかの利点があり、その中の主な利点を以下

に示す。

- 投与量の減少。提供される新規生成物が多価 I g に含有されている断片に相当するとするならば、免疫修飾特性を有する I V I g の注入量は、従来の方式で処方されている I V I g の注入量より少なくなる。有効投与量を、 $1/5 \sim 1/20$ 、もしくはそれ以上削減できる。利用可能な多価 I g で現在用いられている投与量は、 $1 \sim 2 \text{ g} / \text{kg}$  と非常に多量に及ぶので、このことはかなり有利である。
- 生成物が免疫修飾 I g 内に濃縮されていることから、維持もしくは向上する有効性。
- より優れた寛容性。低濃度では、新規生成物の寛容性が改善される。特に、現在は、たとえば、アレルギー反応などの特定の副作用を回避するため、数時間にわたって生成物を低速で注入することにより I V I g を投与するときには、特に注意を払わねばならない。
- 処方の簡潔化。投与量が少なくすむので、現在病院内で行っている静脈内投与法に代わる外来治療法を促進することができる。

#### 【0065】

さらに別の態様は、医療用生成物の調製における、この発明による I g 断片の使用法に関する。この医療用生成物は、自己免疫疾患の G V H 及び / 又は移植後の拒絶反応の治療に特に適している。

#### 【0066】

この発明による断片は、川崎病及び / 又はバードショット型脈絡網膜炎に関する任意選択に基づく皮質療法と組み合わせた治療、阻害剤（抗因子 V I I I 自己抗体）を併用した特定の血球減少病態及び / 又は血友病の治療、及び / 又は細胞移植片及び / 又は臓器移植体による拒絶反応、ならびに同種異系細胞移植後の G V H の発症の予防と阻害を目的とした、医療用生成物の調製に有用である。

#### 【0067】

この発明による断片は、さらに、神経系疾患、それも特に成人ギランバレー症候群、慢性の炎症性脱髄多発神経障害、皮膚筋炎、筋無力症及び / 又は複数の硬化症の治療を目的とした、医療用生成物の調製にも有用である。

## 【0068】

以降、以下に示す図の凡例を参照して説明する。

## 【0069】

実施例1：TEGELINE<sup>R</sup>及びAffigel固体支持体を使用した、この発明による方法

## 【0070】

多価IgGを、ゲル 1mlに対して生成物21mgの割合で、NHS-Affigelで構成されるゲルに結合させた。濃度20 mg/ml、投与量20gの多価IgGを、カラム再循環によって、22 で4時間、PBS内で2 lの免疫吸着剤に接触させた。次に、0.1M (pH3.25)のグリシン-HCLで溶出を行い、カットオフ閾値が30kDの限外濾過膜上に溶出液を濃縮した。

比濁法を使用して濃度を測定した。回収率は、溶出液では0.42%、FNAでは89%である。

開始多価IgGに比べた、この溶出液のF(ab')<sub>2</sub>に関する反応の濃縮レベルは、65である。

## 【0071】

多価IgGに比べ、濃縮されたこの断片は複数の自己抗原に関して反応性を有するが、破傷風トキソイド及びHBs抗原に関する反応性に欠落している(図1及び表1を参照)。

## 【0072】

【表1】

被験抗原	濃縮レベル		回収率 (%)	
	溶出液	FNA	溶出液	FNA
F(ab') <sub>2</sub>	65	0.3	28	26
TNP	90	0.7	39	62
トキソイド	1.8	1.1	0.8	106
HBS	2.5	1.4	1.1	132
アクチン	63.5	0.7	27	69
ミオシン	76	0.6	33	57
MBP	29	1	12	90
チューブリン	80	0.8	34	74

## 【0073】

実施例2： TEGELINE<sup>®</sup>及びNHS - Sepharose固体支持体を使用した、この発明による方法

## 【0074】

多価IgGを、1mlのゲルに対しタンパク質10mgの割合で、NHS - Sepharoseで構成されるゲルに結合した。濃度1mg/ml、投与量50gの多価IgGを、カラム再循環によって、22℃で4時間、PBS内で20mlの免疫吸着剤に接触させた。吸着されない断片、すなわちFNAを回収し、-80℃で保存した。次に、0.1Mのグリシン - HCl緩衝液(pH3.5)で溶出を行い、その溶出液を、カットオフ閾値が30kDの限外濾過膜上に遠心分離法を使用して濃縮した。IgGの濃度を比濁法により測定した。回収率は、溶出液では0.77%、FNAでは94.7%である。

## 【0075】

開始多価IgGに比べた、この溶出液のF(ab')<sub>2</sub>に関する反応の濃縮レベルは、76である。

## 【0076】

多価IgGに比べ、濃縮されたこの断片は複数の自己抗原に関する反応性を有するが、破傷風トキソイド及びHBs抗原に関する反応性に欠落している(図2

及び表2を参照)。

【0077】

【表2】

被験抗原	濃縮レベル		回収率 (%)	
	溶出液	FNA	溶出液	FNA
TNP	32	0.45	22	39
F(ab') <sub>2</sub>	76	0.2	51	22
トキソイド	1.3	1	0.9	86
HBS	4.87	1.1	3.3	96.4
アクチン	29.5	0.6	20	47
ミオシン	35	0.6	24	55
MBP	29	0.7	20	58
チューブリン	22.4	0.6	15	54

【0078】

実施例3： DNP-Lysine及びNHS-AffiPrep支持体を使用した、この発明による方法

【0079】

DNP-Lysineを、1mlのゲルに対し生成物4mgの割合で、NHS-AffiPrepで構成されるゲルに結合した。濃度50mg/ml、投与量60gの多価IgGを、カラム再循環によって、22で4時間、PBS内で2リットルの免疫吸着剤に接触させた。次に、2Mのヨウ化ナトリウム(KI)(pH7)で溶出を行った。カットオフ閾値が30kDの限外濾過膜上に濃縮させた後で、溶出液をSephadexG25カラム上でPBSを用いて脱塩した。

【0080】

濃度を比濁法により測定した。回収率は、溶出液では0.12%、及びFNAでは85%である。

【0081】

開始多価IgGに比べ、この溶出液のTNP-Ovaに関する反応の濃度レベルは239である。

【0082】

多価IgGに比べ、濃縮されたこの断片は複数の自己抗原に関する反応性を有するが、破傷風トキソイド及びHBs抗原に関する反応性に欠落している（図3及び表3を参照）。

【0083】

【表3】

被験抗原	濃縮レベル		回収率 (%)	
	溶出液	FNA	溶出液	FNA
TNP	239	0.9	23	94
F(ab') <sub>2</sub>	2.9	0.9	0.6	92
トキソイド	2.4	1	0.5	104
HBs	3.2	1	0.7	104
アクチン	117	1.1	24	120
ミオシン	83	1.2	17	129
MBP	63	1	13	102
チューブリン	137	1.5	28	152

【0084】

実施例4： ポリクローナルIgG及びNHS-Sephrose固体支持体を使用した、この発明による方法

【0085】

ヒトのポリクローナルIgM（純度90%）を、1mlのゲルに対しタンパク質10mgの割合で、NHS-Sephroseで構成されるゲルに結合した。濃度1mg/ml、投与量50gの多価IgGを、カラム再循環によって、22で4時間、PBS内で20mlの免疫吸着剤に接触させた。吸着されない断片、すなわちFNAを回収し、-80で保存した。次に、0.1Mのグリシン-HCl緩衝液（pH3.5）で溶出を行い、その溶出液を、カットオフ閾値が30kDaの限外濾過膜上に遠心分離法を使用して濃縮した。

【0086】

IgGの濃度を比濁法により測定した。回収率は、溶出液では0.20%、FNAでは98.7%である。

【0087】

開始多価 I g G に比べた、この溶出液の I g M に関する反応の濃縮レベルは、64 である。

【0088】

多価 I g G に比べ、濃縮されたこの断片は複数の自己抗原に関する反応性を有するが、破傷風トキソイド及び HBs 抗原に関する反応性に欠落している（図4及び表4を参照）。

【0089】

【表4】

被験抗原	濃縮レベル		回収率 (%)	
	溶出液	FNA	溶出液	FNA
TNP	71.5	0.5	13	44.5
I g M	64	1.2	11.4	106
F(ab') <sub>2</sub>	24.5	0.7	4.5	67
トキソイド	1.8	0.8	0.3	76
HBs	<閾値	0.8	<閾値	76
アクチン	52	0.3	9	33
ミオシン	54	0.6	10	54
MBP	39.5	0.5	7	50
チューブリン	58	0.7	10	62

【0090】

実施例5：MLCにおけるヒトのリンパ球の増殖の阻害

【0091】

提供者A及び、HLA分子に関して適合しない提供者Bから得られたリンパ球をフィコールで分離し、10%のウシ胎児血清を補給したPPMI 1640培地内でウエル一つにつき  $2 \times 10^5$  の濃度で培養した。濃度を低下させた Tegeline、TegelineのFc又はF(ab')<sub>2</sub>断片又は実施例1~4に記載した各種断片を培地に追加する。CO<sub>2</sub>雰囲気中、37℃で4日間培養した後に、 $1 \mu\text{Ci} = 37 \text{ KBq}$  のトリチウム化チミジンを添加し、最後に6時間培養を行う。増殖していることを表すヒトの細胞へのトリチウム化チミジンの取り込み量を、シン

チレーションカウンタを使用して測定する。培地に添加した各主成分の存在下で、リンパ球の増殖の阻害率(%)を提供者Aと提供者Bの混合細胞の増殖を基準として算出する。表5に、50%の細胞増殖阻害率を示すことが可能な断片もしくは生成物の投与量に関する結果を $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単位で示す。実施例1~4に掲載されている断片は、混合培地内におけるリンパ球増殖の阻害が可能で、Tegelineに比べ10~50倍も高い有効性をもつ。

【0092】

【表5】

混合培地におけるヒトのリンパ球の増殖に対するTEGELINE®及び断片による阻害

参照断片	アフィニティ 支持体	50%の増殖阻害率を示す 投与量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	
		実験1	実験2
Tegeline <sup>R</sup>	NA	160	80
Tegeline <sup>R</sup> のFc	NA	1000	NT
Tegeline <sup>R</sup> のF(ab') <sub>2</sub>	NA	NT	250
例1	AffiGel NHS Tegeline	7	NT
例2	Sepharose NHS Tegeline	5	NT
例3	AffiProp NHS DNP-Lysine	9	2
例4	Sepharose NHS IgM	2.5	—

NA=該当せず

NT=試験せず

【0093】

実施例6： 病原抗体に関する断片の競合試験

【0094】

Tegeline又は実施例2に従って調製した抗Tegeline断片、もしくは実施例3に従って調製した抗DNP断片を、DNAを塗布した精密濾過板内で紅斑性狼瘡患者から取得したビオチン化抗DNA抗体の存在下で培養した。DNAに対するビオチン化抗DNA抗体の結合の抑止率(%)を、Tegeline又は添加した断片の濃度の関数として測定した。図5に示されている結果から、抗DNP断片が、同じ濃度のTegelineに比べ、約10倍も増殖を阻害していることが明らかである。そ

の一方で、Tegeline断片は、イディオタイプ型の相互作用を確立することによって、DNAに対する病原抗体の結合を促進する。

【0095】

実施例7： 臨床における応用

【0096】

自己反応で濃縮され、自己免疫疾患の実験モデルでそれ自体効果を示す断片は、IVIgが、特に移植後の自己免疫疾患すなわちGVH及び拒絶反応において、治療作用を有することが実証されている、多数の病態の治療に使用することを目的としている。

【0097】

実施例7A： コラーゲンIIによってラットに導入された、リウマチ性関節炎の発症に対する、Tegelineに比した抗DNP断片の効果

【0098】

DNP-Lysineに結合したNHS-Affiprepで構成されたゲルからの多価IgGの溶出によって取得した自己反応で濃縮される断片(図3及び実施例3)を、コラーゲンを供与したラットに様々な投与量で腹腔腔内注射し、リウマチ性関節炎の発症を誘発した。リウマチ性関節炎に対する予防に関する断片の有効性を、同じ投与量の初期多価IgGで取得した有効性と比較した。2回の個別実験の累積結果(図6)から、DNP-Lysineに結合したNHS-Affiprepで構成されるゲルの溶出から得られた断片の、リウマチ性関節炎の発症に対する有効投与量が、Tegelineの有効投与量の10分の1未満であることは明らかである。

【0099】

実施例7B： オスNODマウスにシクロフォスファミドを導入した、糖尿病の発症に対する抗Tegeline断片及び抗DNP断片の効果

【0100】

生まれたてのオスのNODマウスに対し、1週間に3回、4週間にわたって、1mg/子マウスの投与量でTegelineを、また0.1mg/子マウスの投与量で抗Tegeline断片又は抗DNP断片をそれぞれ注入する。糖尿病は、2週間間隔でのシクロフォスファミド(200mg/kg)の2回の注入することによ

て、週齢8週で発症させる。図7からは、治療していないマウス群(68%)に比べ、糖尿病のマウスの割合(%) (血糖値が3g/lより高いマウス)が、Tegelineを注入したNODマウス群(14%)と抗DNP断片を注入したマウス群(21%)では大幅に減少していることが明らかであるが、抗Tegeline断片を注入したマウス群ではそのような現象は観察されない。

#### 【0101】

これらの適応症は対象外ではなく、対象として取り込むことができる。該断片は、所望の適応症に従って、凍結乾燥形態又は液体形態でパッケージングして静脈内投与するか、又は別の経路(IP, ID, IM)で投与するのに適した薬品伝達体を用いて処方する。

#### 【0102】

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1A】

TEGELINEを使用して取得した断片(TEGELINEを移植したAffigel基剤の固体支持体)の特性についての評価。

この断片を調製するための方法におけるパラメータについては、実施例1に詳細な説明がある。

FNAは、吸着されない断片を意味している。

図はIgG F(ab')<sub>2</sub>に関する特異的反応を表している。

##### 【図1B】

TEGELINEを使用して取得した断片(TEGELINEを移植したAffigel基剤の固体支持体)の特性についての評価。

この断片を調製するための方法におけるパラメータについては、実施例1に詳細な説明がある。

FNAは、吸着されない断片を意味している。

図は自己抗原に関する反応を表している。

##### 【図1C】

TEGELINEを使用して取得した断片(TEGELINEを移植したAffigel基剤の固体支持体)の特性についての評価。

この断片を調製するための方法におけるパラメータについては、実施例1に詳細な説明がある。

FNAは、吸着されない断片を意味している。

図はIgG F(ab')<sub>2</sub>に関する特異的反応を表している。

【図1D】

TEGELINEを使用して取得した断片（TEGELINEを移植したAffigel基剤の固体支持体）の特性についての評価。

この断片を調製するための方法におけるパラメータについては、実施例1に詳細な説明がある。

FNAは、吸着されない断片を意味している。

図は自己抗原に関する反応を表している。

【図2A】

TEGELINEを使用して取得した断片（NHS-Sepharose基剤の固体支持体）の特性の評価。

この断片を調製するための方法におけるパラメータについては、実施例2に詳細な説明がある。

図はIgG F(ab')<sub>2</sub>に関する特異的反応を表している。

【図2B】

TEGELINEを使用して取得した断片（NHS-Sepharose基剤の固体支持体）の特性の評価。

この断片を調製するための方法におけるパラメータについては、実施例2に詳細な説明がある。

図は自己抗原に関する反応を表している。

【図2C】

TEGELINEを使用して取得した断片（NHS-Sepharose基剤の固体支持体）の特性の評価。

この断片を調製するための方法におけるパラメータについては、実施例2に詳細な説明がある。

図はIgG F(ab')<sub>2</sub>に関する特異的反応を表している。

## 【図2D】

TEGELINEを使用して取得した断片（NHS-Sepharose基剤の固体支持体）の特性の評価。

この断片を調製するための方法におけるパラメータについては、実施例2に詳細な説明がある。

図は自己抗原に関する反応を表している。

## 【図3A】

TEGELINEを使用して取得した断片（DNP-Lysineを使用したNHS-AffiPrep基剤の固体支持体）の特性の評価。

この断片を調製するための方法におけるパラメータについては、実施例3に詳細な説明がある。

図はIgG F(ab')<sub>2</sub>に関する特異的反応を表している。

## 【図3B】

TEGELINEを使用して取得した断片（DNP-Lysineを使用したNHS-AffiPrep基剤の固体支持体）の特性の評価。

この断片を調製するための方法におけるパラメータについては、実施例3に詳細な説明がある。

図は自己抗原に関する反応を表している。

## 【図3C】

TEGELINEを使用して取得した断片（DNP-Lysineを使用したNHS-AffiPrep基剤の固体支持体）の特性の評価。

この断片を調製するための方法におけるパラメータについては、実施例3に詳細な説明がある。

図はIgG F(ab')<sub>2</sub>に関する特異的反応を表している。

## 【図3D】

TEGELINEを使用して取得した断片（DNP-Lysineを使用したNHS-AffiPrep基剤の固体支持体）の特性の評価。

この断片を調製するための方法におけるパラメータについては、実施例3に詳細な説明がある。

図は自己抗原に関する反応を表している。

【図4A】

TEGELINEを使用して取得した断片（I g Mを移植したNHS-Sepharose基剤の固体支持体）の特性の評価。

この断片を調製するための方法におけるパラメータについては、実施例4に詳細な説明がある。

図はI g Mに関する特異的反応を表している。

【図4B】

TEGELINEを使用して取得した断片（I g Mを移植したNHS-Sepharose基剤の固体支持体）の特性の評価。

この断片を調製するための方法におけるパラメータについては、実施例4に詳細な説明がある。

図は自己抗原に関する反応を表している。

【図4C】

TEGELINEを使用して取得した断片（I g Mを移植したNHS-Sepharose基剤の固体支持体）の特性の評価。

この断片を調製するための方法におけるパラメータについては、実施例4に詳細な説明がある。

図はI g Mに関する特異的反応を表している。

【図4D】

TEGELINEを使用して取得した断片（I g Mを移植したNHS-Sepharose基剤の固体支持体）の特性の評価。

この断片を調製するための方法におけるパラメータについては、実施例4に詳細な説明がある。

図は自己抗原に関する反応を表している。

【図5】

TEGELINE又は、DNAと紅斑性狼瘡患者の血清から取得した抗DNA抗体との間の結合を阻害する断片の能力評価。

競合試験の実験条件については、実施例6に説明がある。

47-2 EN (抗DNP)、 47-4 EN (抗DNP)、 Tegeline、  
46-8 EA (抗Tegeline)、 46-9 EA (抗Tegeline)

。

【図6】

コラーゲンIIによってラットに導入されたリウマチ性関節炎の発症に対する、Tegelineと比較した抗DNP断片の予防効果の評価。

この図は、DNP-LYSINE断片に伴う関節炎スコアの展開を表している

。

疾患の導入法と、さらに生成物の投与方法については、実施例7Aに記載がある。

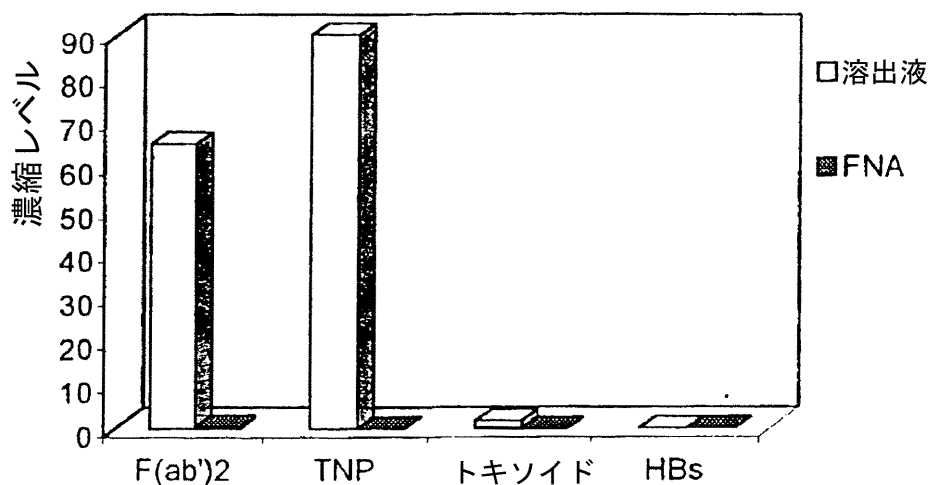
【図7】

図7：オスのNODマウスにシクロフォスファミドによって導入された糖尿病の発症に対する、Tegelineと比較した抗DNP断片の予防効果の評価。

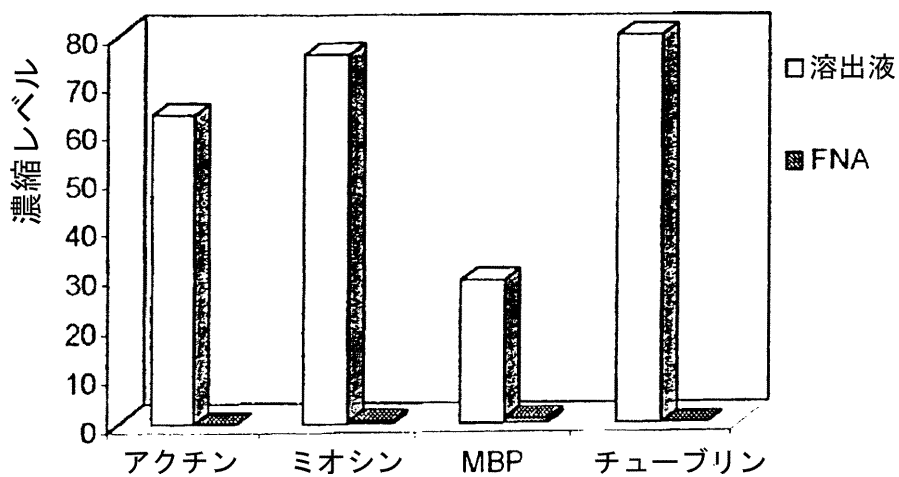
疾患の導入法と、さらに生成物の投与方法については、後出の実施例7Bに記載がある。

イディオタイプ型の相互作用で他のIgGと会合するという特性を有する、IgGに濃縮された断片を調製し、それら断片の活性を評価するための方法については、後出の実施例に詳細な説明がある。

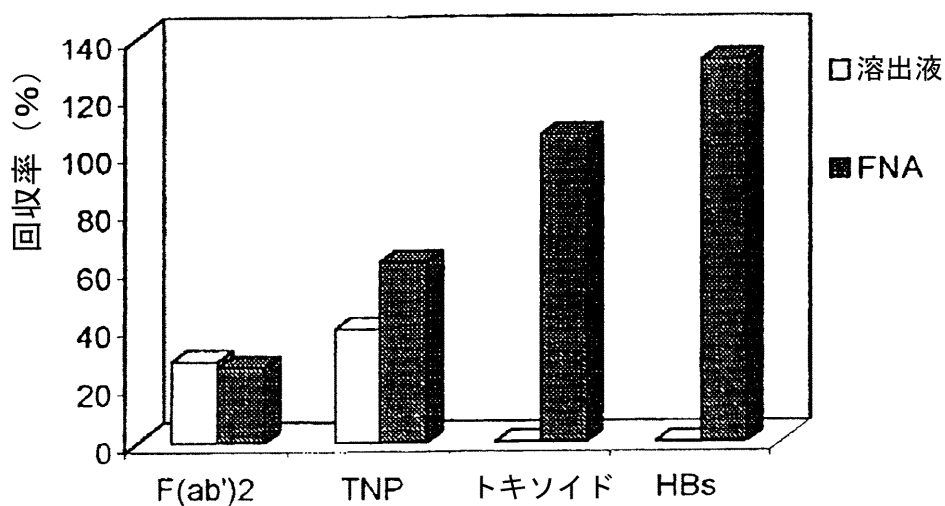
【図1A】



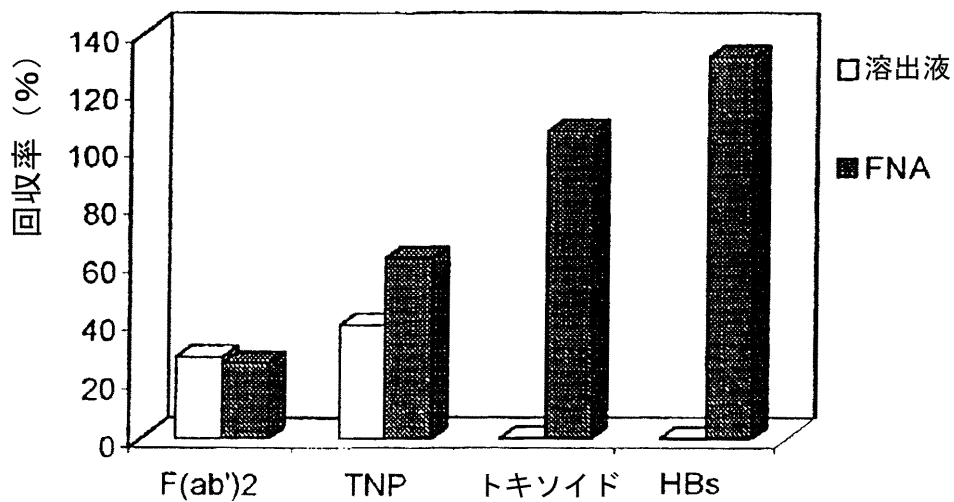
【図1B】



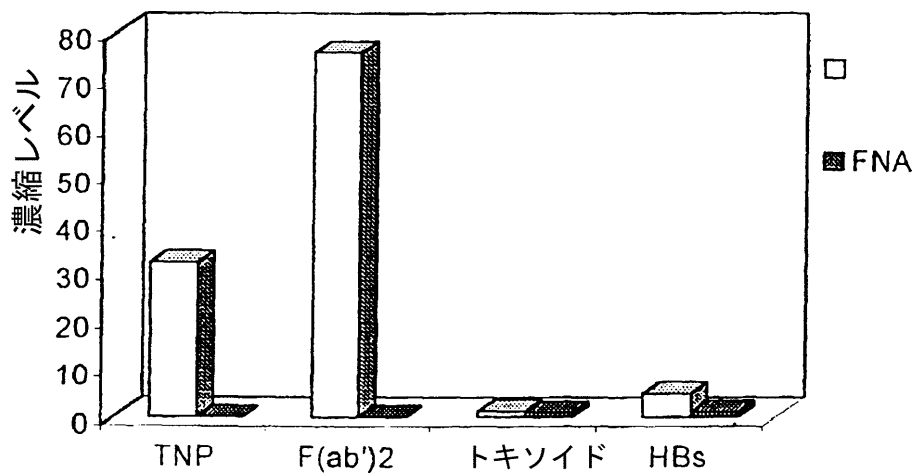
【図1C】



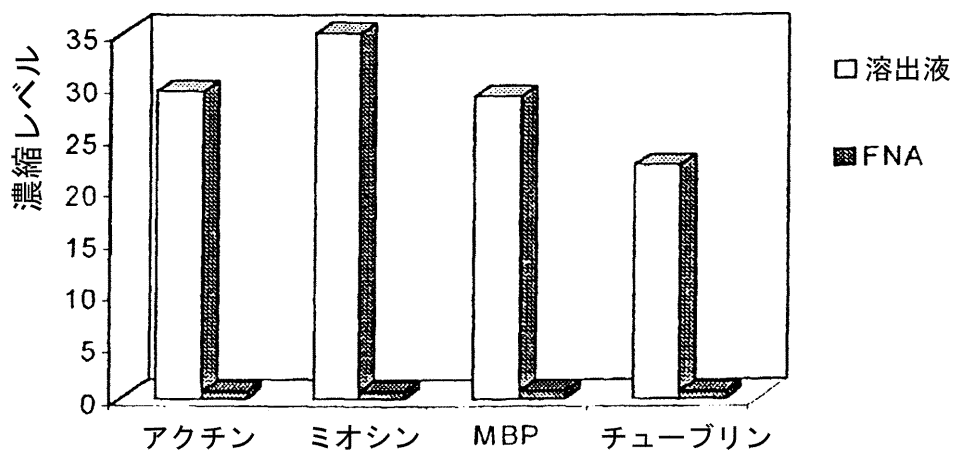
【図1D】



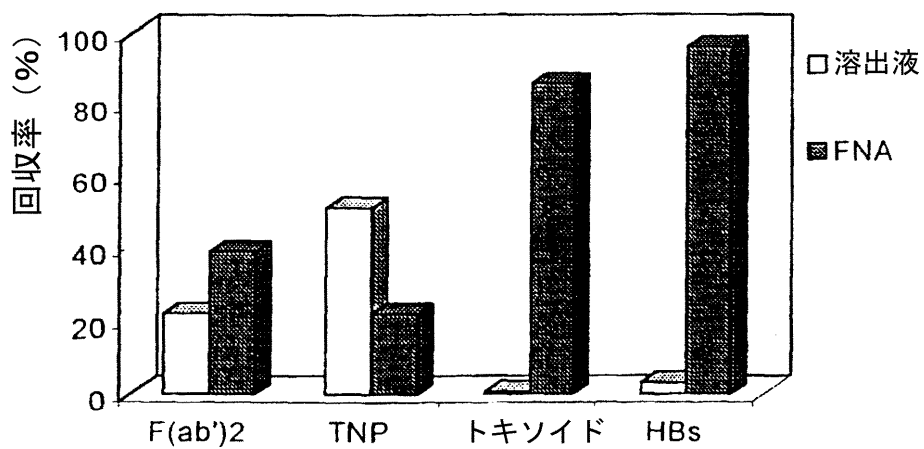
【図2A】



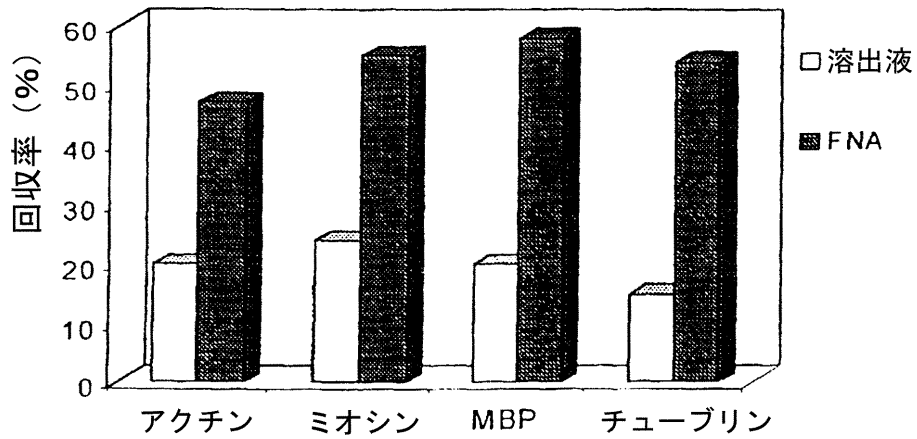
【図2B】



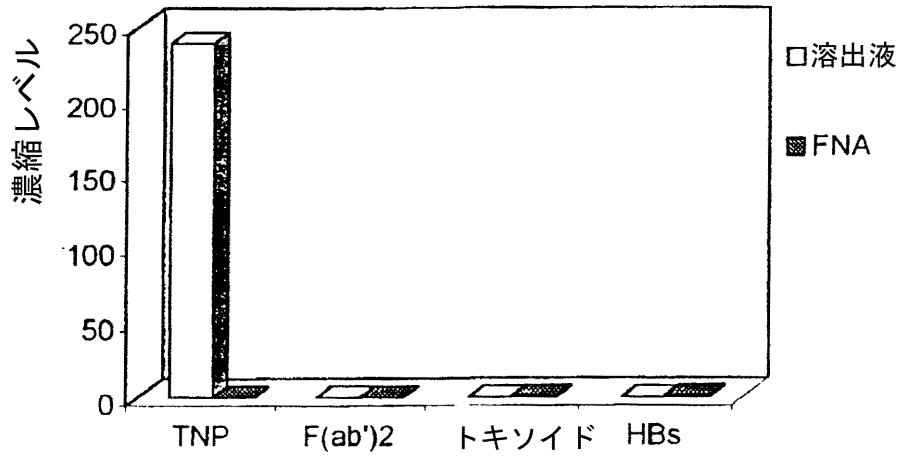
【図2C】



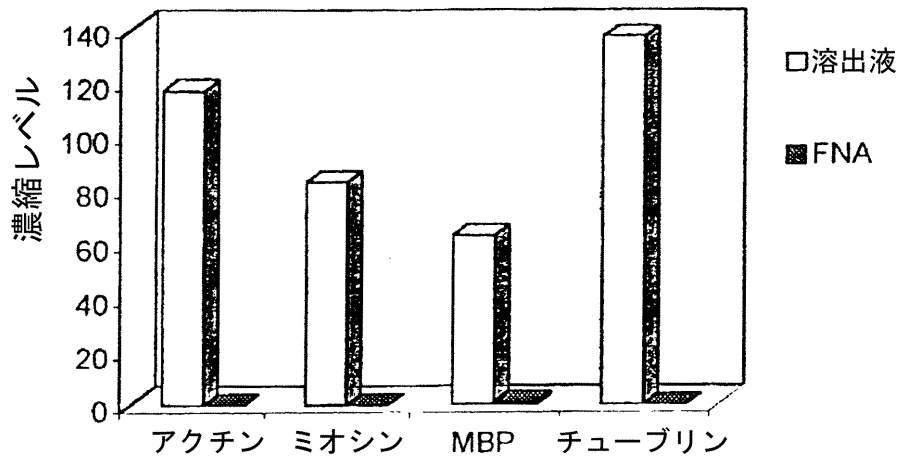
【図2D】



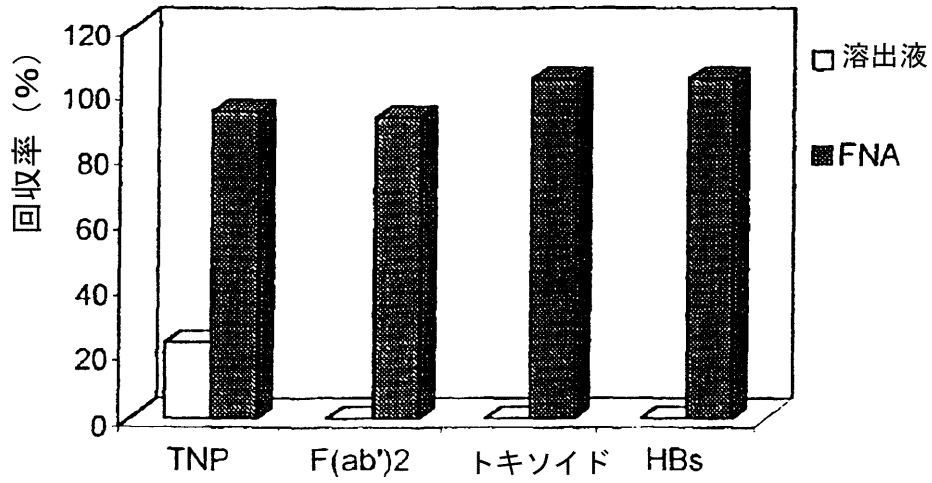
【図3A】



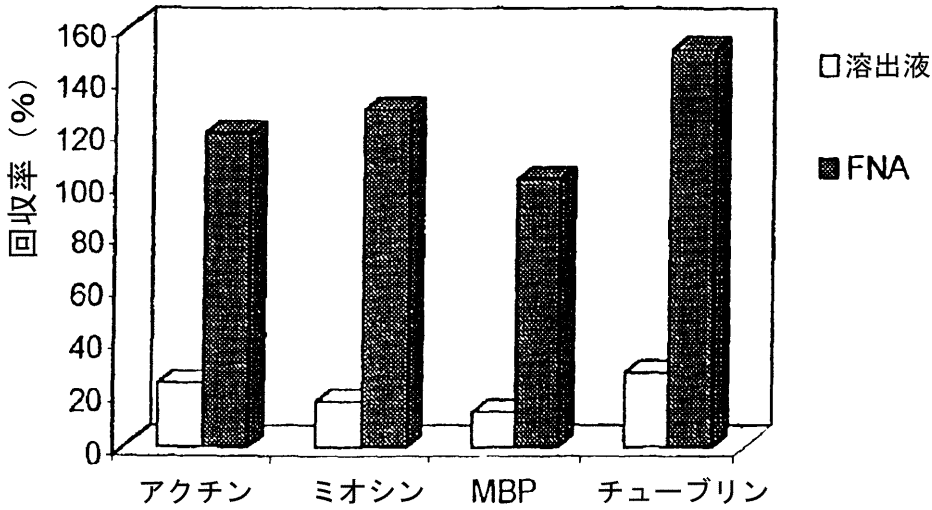
【図3B】



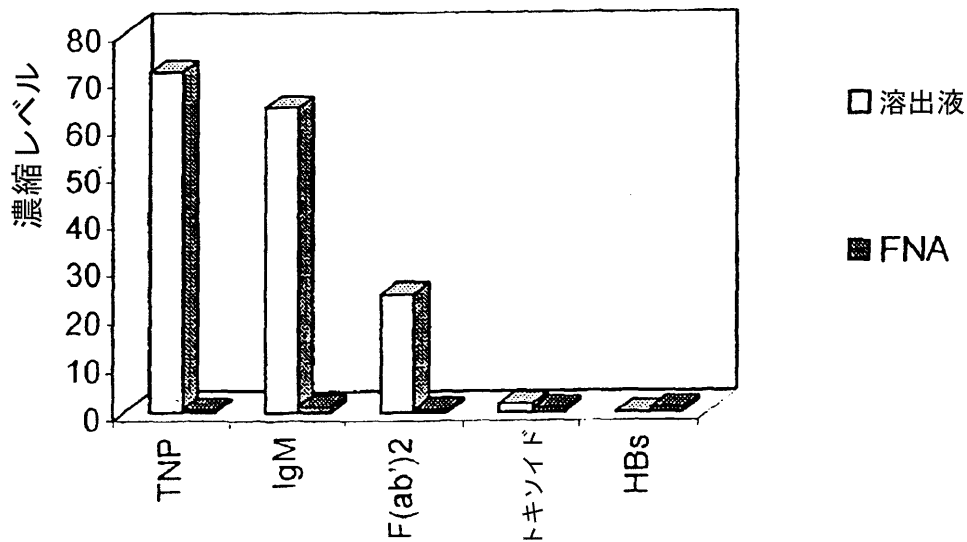
【図3C】



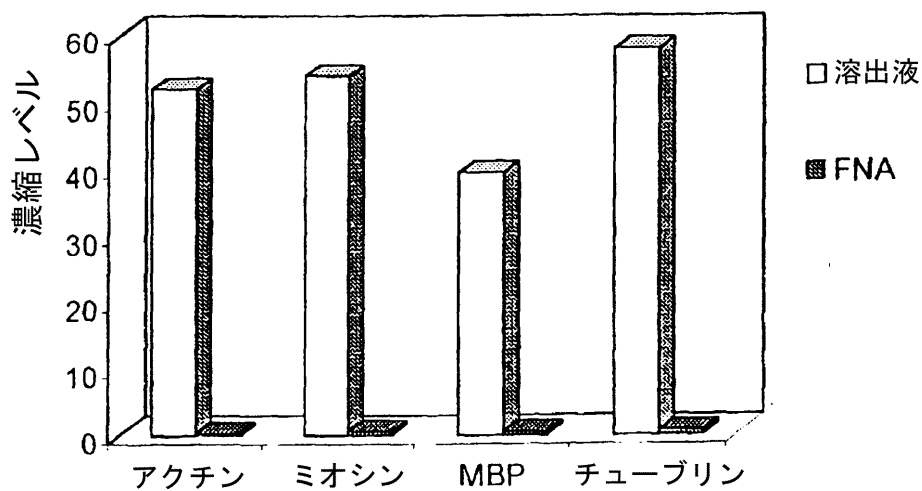
【図3D】



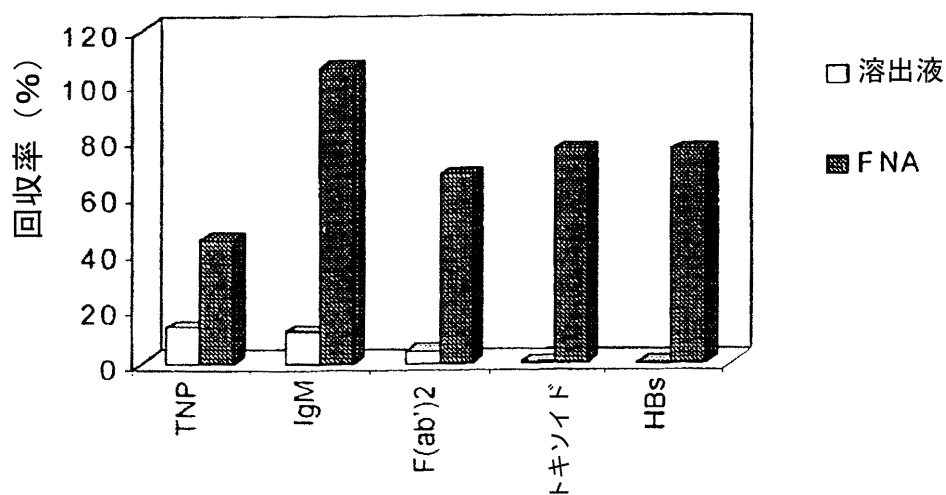
【図4A】



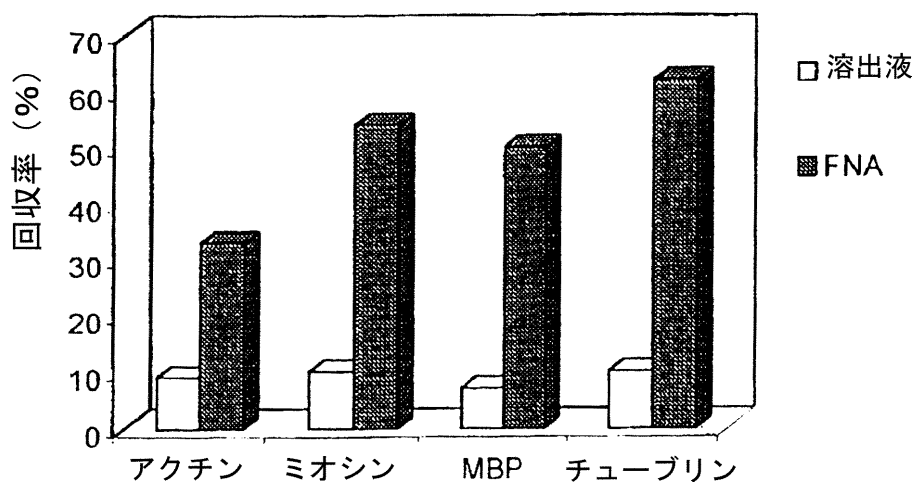
【図4B】



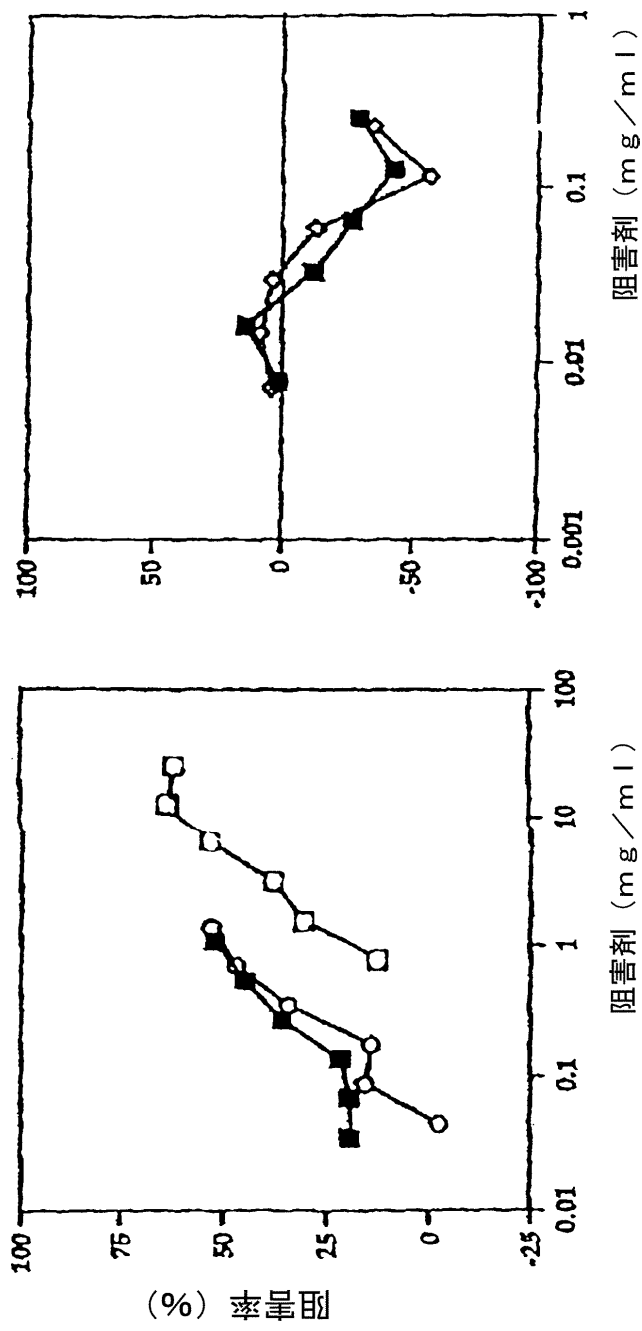
【図4C】



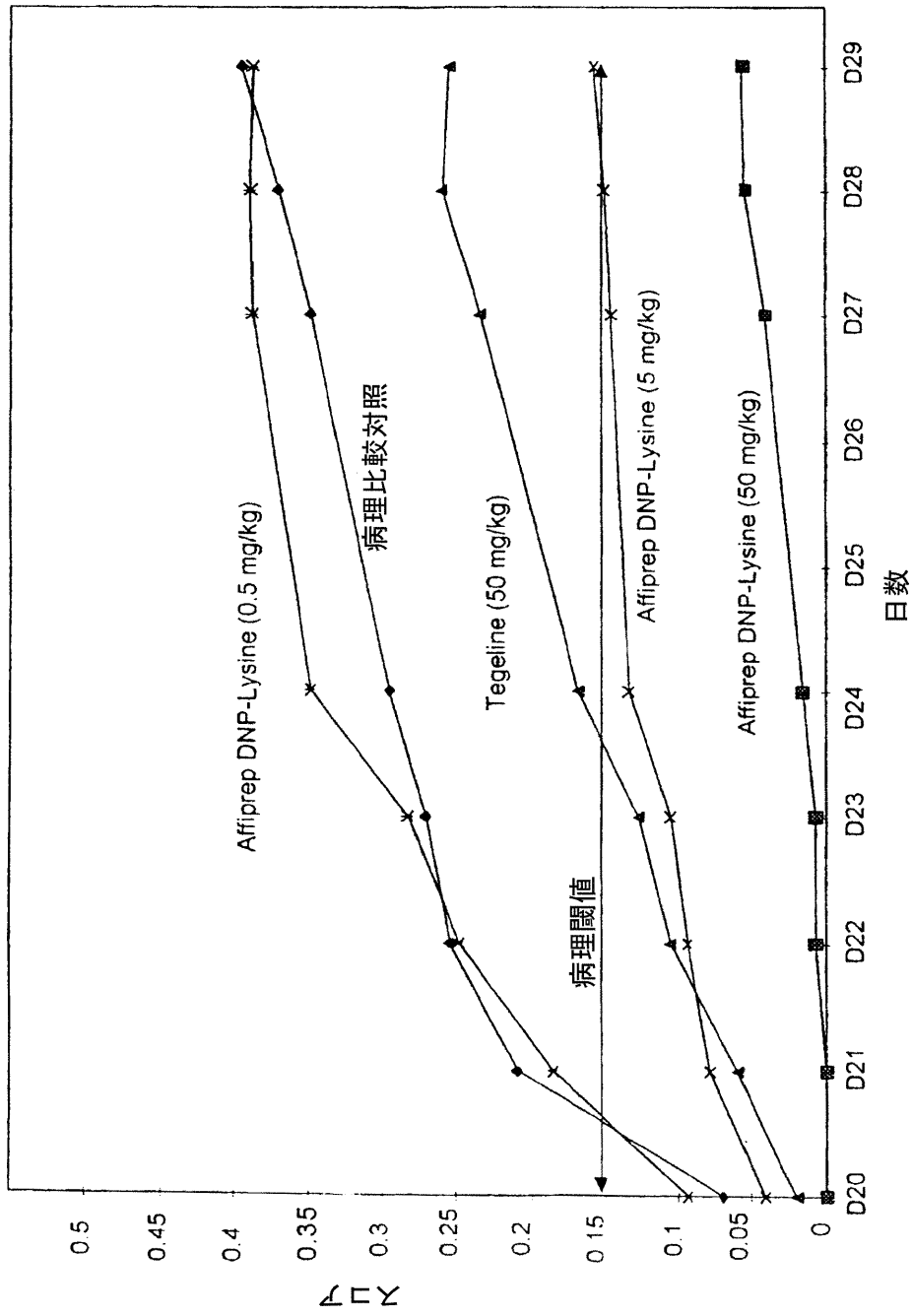
【図4D】



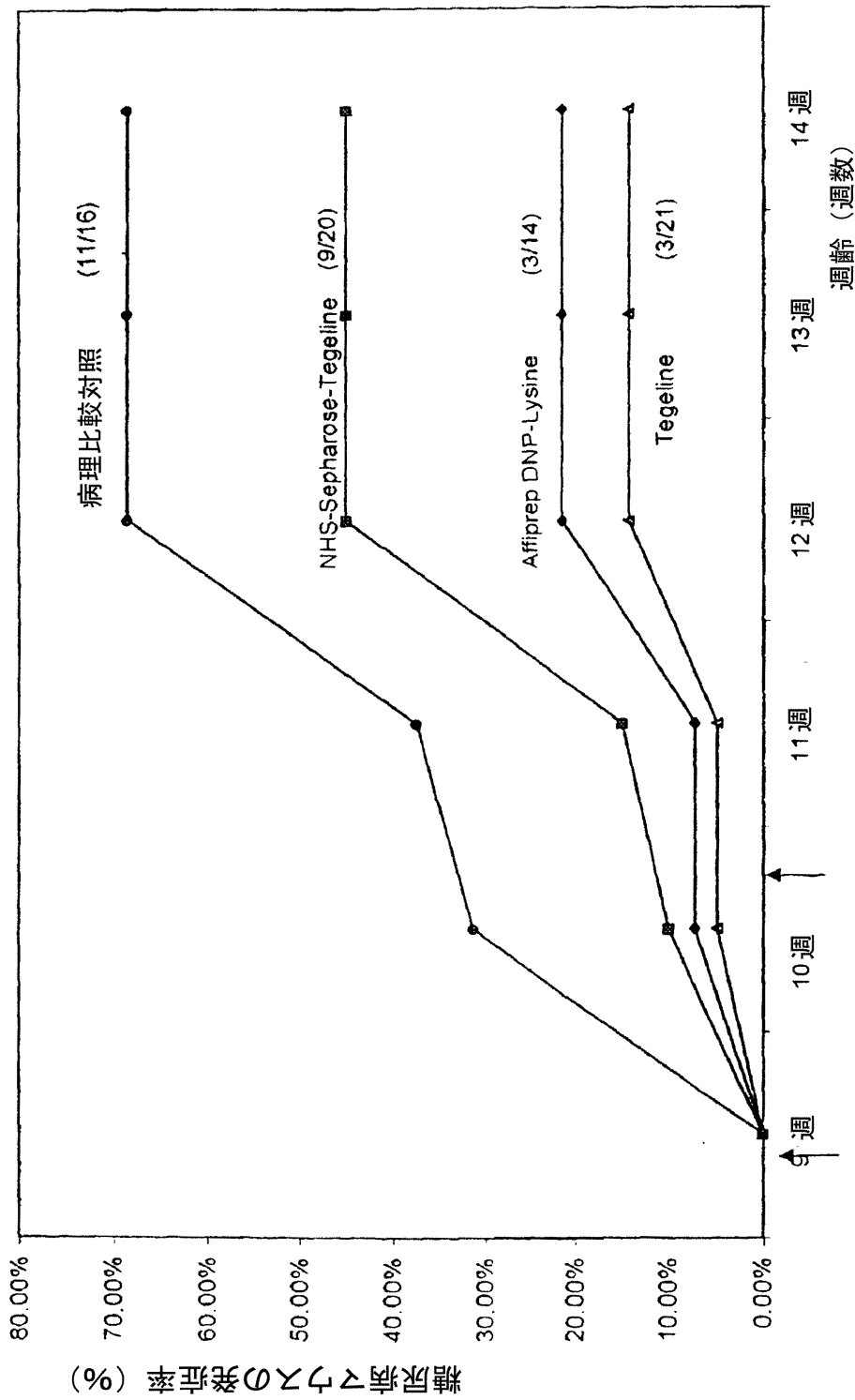
【图5】



【图6】



【図7】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/FR 00/01560
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/395 C07K16/42 C07K16/06 C07K16/18 C07K1/22 A61P37/06		
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 7 A61K C07K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DIETRICH G ET AL: "A V region-connected autoreactive subfraction of normal human serum immunoglobulin G." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1992 JUL) 22 (7) 1701-6., XP000877158 page 1702, left-hand column, line 20 -right-hand column, line 49 page 1703, right-hand column, line 3 - line 9; figure 1 table 2 page 1705, left-hand column, line 43 -right-hand column, line 30 --- -/--	1-29
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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 6 September 2000		Date of mailing of the international search report 19/09/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Le Flao, K

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 00/01560
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JORDAN S C ET AL: "Posttransplant therapy using high-dose human immunoglobulin (intravenous gammaglobulin) to control acute humoral rejection in renal and cardiac allograft recipients and potential mechanism of action." TRANSPLANTATION, (1998 SEP 27) 66 (6) 800-5., XPO00877173 abstract	26-29
A	PACHECO-GARCIA U ET AL: "Altered pattern of connectivity in serum immunoglobulins from pemphigus vulgaris patients." SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1999 APR) 49 (4) 424-30., XPO00877174 abstract	26-29
P,A	FLAN B.: "Fractionation technique and biochemical properties of IV Ig! TECHNIQUE DE FRACTIONNEMENT ET PROPRIETES BIOCHIMIQUES DES IMMUNOGLOBULINES INTRAVEINEUSES (IGIV)." SANG THROMBOSE VAISSEaux, (OCT. 1999) 11/SPEC. ISS. (45-51). , XPO00939133 abstract	10

1

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーム(参考)
A 6 1 P	21/04	A 6 1 P	
	25/00		
	37/06		
C 0 7 K	1/04	C 0 7 K	
C 1 2 N	15/09	C 1 2 Q	
C 1 2 Q	1/02	G 0 1 N	A
G 0 1 N	30/26		R
	30/48		J
	30/88		D
	33/53		A
	33/531		A
	33/531	C 1 2 N	A
(81)指定国	OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	ブリリー - ロセ、マルタン フランス国、94210 ラ・バレン、ケ・ デ・ボヌワユ 115		
(72)発明者	ダンノート、フレデリク フランス国、91870 ブワシー - レ - セク、 レ・ロトワール、リュ・デ・ドゥーダン 4		
(72)発明者	リロション、ジャッキー フランス国、91650 プロワレ、リュ・ デ・ヴィンス 7		
Fターム(参考)	4B024 AA01 BA40 HA20 4B063 QA05 QQ08 QR48 QS33 4C085 AA13 BB31 BB36 CC22 DD35 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75 EA22 GA22		

专利名称(译)	具有免疫调节活性的新型Ig片段		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003519619A</a>	公开(公告)日	2003-06-24
申请号	JP2001501251	申请日	2000-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	法国血液分割暨生化制品实验室		
申请(专利权)人(译)	LABORATOIRES 捻, 法语, 杜, Furakushonuman等, 德, 生物技术		
[标]发明人	ブーレルドミニク ブリリー-ロセマルタン ダンノートフレデリク リクシオンジャッキー		
发明人	ブーレル、ドミニク ブリリー-ロセ、マルタン ダンノート、フレデリク リクシオン、ジャッキー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P7/00 A61P9/10 A61P17/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 B01J20/281 C07K1/04 C07K16/06 C07K16/18 C07K16/42 C07K16/44 C12N15/09 C12Q1/02 G01N30/26 G01N30/88 G01N33/531 G01N30/48		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P17/00 A61P21/04 A61P25/00 C07K16/065 C07K16/4283 C07K16/44 Y10S424/81 Y10S435/965 Y10S436/822 Y10S436/824 Y10S530/868		
FI分类号	C07K16/18 A61K39/395.D A61P7/00 A61P9/10 A61P17/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P37/06 C07K1/04 C12Q1/02 G01N30/26.A G01N30/48.R G01N30/88.J G01N33/53.D G01N33/531.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA40 4B024/HA20 4B063/QA05 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QS33 4C085/AA13 4C085/BB31 4C085/BB36 4C085/CC22 4C085/DD35 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA22 4H045/GA22		
优先权	1999007153 1999-06-07 FR 1999016632 1999-12-29 FR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了从人多价静脉内免疫球蛋白 (IVIg) 制备Ig片段的方法, 其能够特异性地产生在治疗某些自身免疫疾病期间观察到的免疫调节作用。关于方法。本发明提供了IgM, IgG F (ab')<sub>2</sub>或DNP半抗原, 但对非自身抗原, 即在它们自身(连接的片段)之间没有反应性或几乎没有反应性。在与DNP半抗原反应的天然抗体中或与之发生的独特型相互作用。该片段表现出对特定自身抗原的多重反应性。

被験抗原	濃縮レベル		回収率 (%)	
	溶出液	FNA	溶出液	FNA
F(ab') <sub>2</sub>	65	0.3	28	26
TNP	90	0.7	39	62
トキソイド	1.8	1.1	0.8	106
HBS	2.5	1.4	1.1	132
アクチン	63.5	0.7	27	69
ミオシン	76	0.6	33	57
MBP	29	1	12	90
チューブリン	80	0.8	34	74