

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5652987号
(P5652987)

(45) 発行日 平成27年1月14日(2015.1.14)

(24) 登録日 平成26年11月28日(2014.11.28)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 K	39/39	(2006.01)	A 6 1 K	39/39	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	

請求項の数 28 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-540399 (P2006-540399)	(73) 特許権者	390040420
(86) (22) 出願日	平成16年11月26日(2004.11.26)		マックス・プランク・ゲゼルシャフト・ツ ア・フェルデルング・デア・ヴィッセンシ ャフテン・エー・ファオ
(65) 公表番号	特表2008-502312 (P2008-502312A)		Max-Planck-Gesellschaft zur Foerderung der Wissenschaften e. V.
(43) 公表日	平成20年1月31日(2008.1.31)		ドイツ80539ミュンヘン、ホーフガル テンシュトラーセ8番
(86) 国際出願番号	PCT/EP2004/013450		
(87) 国際公開番号	W02005/051999	(74) 代理人	100114890
(87) 国際公開日	平成17年6月9日(2005.6.9)		弁理士 アインゼル・フェリックス＝ライ ンハルト
審査請求日	平成19年7月25日(2007.7.25)	(74) 復代理人	100188569
審判番号	不服2012-22233 (P2012-22233/J1)		弁理士 樋口 ゆう
審判請求日	平成24年11月9日(2012.11.9)		
(31) 優先権主張番号	03027000.3		
(32) 優先日	平成15年11月26日(2003.11.26)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト IgG Fc レセプター II b (FcγRIIb) に結合する物質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Fc レセプターの天然の環境においてヒトの Fc RIIb に特異的に結合し、配列番号 2 に従った Fc RIIb のアミノ酸配列のアミノ酸 27 ~ 30 を含むコンフォメーションにより識別するエピトープ (CDE) に結合することができ、Fc RIIa に対するよりも Fc RIIb により高い親和性で結合する抗体又はその Fc RIIb 結合断片 であって、前記抗体又はその Fc RIIb 結合断片 は、天然のコンフォメーションにおける人工ペプチド又はポリペプチドで動物又はトランスジェニック動物 (ヒトを除く) を免疫化することを含む方法により製造され、前記ペプチド又はポリペプチドは Fc RIIb の CDE を含有し、この CDE は環化により構造的に安定化され、かつ配列番号 2 に従った Fc RIIb のアミノ酸 27 ~ 30 を含む、抗体又はその Fc RIIb 結合断片。

【請求項 2】

少なくとも 10 倍 Fc RIIa に対するよりも Fc RIIb により高い親和性で結合する、請求項 1 記載の抗体又はその Fc RIIb 結合断片。

【請求項 3】

免疫複合体が Fc RIIb に結合することに干渉しない、請求項 1 又は 2 記載の抗体又はその Fc RIIb 結合断片。

【請求項 4】

ヒトの Fc RIIb に特異的に架橋することができる、請求項 1 から 3 までのいずれ

か1項記載の抗体又はそのFc R I I b結合断片。

【請求項5】

単量体又は多量体の状態で生じる、請求項1から4までのいずれか1項記載の抗体又はそのFc R I I b結合断片。

【請求項6】

I g G、I g E、I g M又はI g Aのクラスである、請求項1から5までのいずれか1項記載の抗体又はそのFc R I I b結合断片。

【請求項7】

単鎖抗体、二官能性及び三官能性の抗体、F a b断片、F (a b) 2断片、F v断片及びs c v断片から選択される、請求項1から6までのいずれか1項記載の抗体又はそのFc R I I b結合断片。

10

【請求項8】

請求項1から7までのいずれか1項記載の抗体又はそのFc R I I b結合断片をコードするDNA。

【請求項9】

請求項8記載のDNAを有する核酸ベクター。

【請求項10】

請求項9記載のベクターでトランスフェクションした宿主細胞。

【請求項11】

Fc R I I bに特異的に結合する物質を見出すために分子ライブラリー又はゲノムライブラリーをスクリーニングするための、配列番号2に従ったFc R I I bのアミノ酸27~30を含む、Fc R I I bのC D Eを含有するペプチドの使用であって、前記物質はFc R I I bのアミノ酸27~30に特異的に結合する使用。

20

【請求項12】

ライブラリーがペプチド、有機分子、ペプチドミメティックス又は抗体可変ドメインを含む請求項11記載の使用。

【請求項13】

ヒト細胞上のFc R I I bに特異的に結合する分子を同定するためにライブラリーをスクリーニングするための請求項11記載の使用。

【請求項14】

ペプチドは環化により構造的に安定化されている請求項11から13までのいずれか1項記載の使用。

30

【請求項15】

ペプチドが人工の及び/又はグルコシル化したアミノ酸を有する請求項11から13までのいずれか1項記載の使用。

【請求項16】

ペプチドが担体分子にコンジュゲートされている請求項11から13までのいずれか1項記載の使用。

【請求項17】

天然のコンフォメーションにおける人工ペプチド又はポリペプチドで動物又はトランスジェニック動物(ヒトを除く)を免疫化することを含み、前記ペプチド又はポリペプチドはFc R I I bのC D Eを含有し、このC D Eは環化により構造的に安定化され、かつ配列番号2に従ったFc R I I bのアミノ酸27~30を含む、請求項1から7までのいずれか1項記載の抗体又はそのFc R I I b結合断片の製造方法。

40

【請求項18】

ペプチド又はポリペプチドが人工の及び/又はグルコシル化したアミノ酸を有する請求項17記載の方法。

【請求項19】

ペプチド又はポリペプチドが担体分子にコンジュゲートされている、請求項17又は18記載の方法。

50

【請求項 2 0】

自己免疫疾患の治療及び／又は診断のために利用できる医薬組成物及び／又は診断組成物であって、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項記載の抗体又はその F c R I I b 結合断片の有効量及び医薬的に許容可能なキャリアー物質を含む医薬組成物及び／又は診断組成物。

【請求項 2 1】

自己免疫疾患の検出のための診断キットであって、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項記載の抗体又はその F c R I I b 結合断片を含む診断キット。

【請求項 2 2】

F c R I I b / I g G 相互作用の抑制剤又は活性化剤の製造のための請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項記載の抗体又はその F c R I I b 結合断片の使用。

10

【請求項 2 3】

自己免疫疾患の診断及び／又は治療のための医薬組成物及び／又は診断組成物の製造のための請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項記載の抗体又はその F c R I I b 結合断片の使用。

【請求項 2 4】

自己免疫疾患が、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、免疫性の血小板減少性紫斑病又は多発性硬化症から選択される、請求項 2 3 記載の使用。

【請求項 2 5】

アレルギーの診断及び／又は治療のための医薬組成物及び／又は診断組成物の製造のための、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項記載の抗体又はその F c R I I b 結合断片の使用。

20

【請求項 2 6】

活性化した樹状細胞及び／又はマクロファージに関連した疾病の治療のための医薬組成物及び／又は診断組成物の製造のための、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項記載の抗体又はその F c R I I b 結合断片の使用。

【請求項 2 7】

宿主対移植片疾病の治療のための医薬組成物及び／又は診断組成物の製造のための、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項記載の抗体又はその F c R I I b 結合断片の使用。

【請求項 2 8】

請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項記載の抗体又はその F c R I I b 結合断片であって、その際これらはこの F c 断片において、グリコシル化の修飾及び／又は突然変異により、前記 F c レセプターのサブセットに対する結合を促進すべく改変されている、抗体又はその F c R I I b 結合断片。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の詳細な説明

本発明は、コンフォメーションにより識別するエピトープ (C D E s) を有する新規の免疫原、及び極めて密接に関連したホモログを有するタンパク質を特異的に認識する抗体の産生のための免疫化方法に関する。特に、本発明は F c R I I b 又は F c R I I a のいずれかに特異的な抗体に関し、かつこれらは自己免疫疾患、感染症、腫瘍及びその他の免疫系が関連する症状の診断及び治療のために有利である。

40

【0002】

F c レセプター (F c R s) は、感染症に対する人体の防御において重要な役割を果たす。病原体が血液循環に到達すると、これらは抗体 (免疫グロブリン、I g s) によってオプソニン化される。これにより免疫複合体の形成を生じる。前記抗体の F c 部 は F c レセプター に結合でき、前記 レセプター は免疫系の実質的に全ての細胞上に存在する。特異的な F c R s は、全ての I g クラスに対して存在する。ギリシャ文字は、前記 レセプター が結合する I g クラスを示し、例えば F c レセプター は I g G を認識するなどである。

50

【 0 0 0 3 】

何年もの間、I g G に対する前記 F c レセプター (F c R) はエフェクター応答を引き起こすことにおいて重要な役割を果たすことが知られている (Metzger, 1992A)。これらは、発現した F c R 及び細胞の種類に依存して、病原体の中和及び抗原の提示を生じるエンドサイトーシス及び食作用、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用 (A D C C)、好中球活性化、前記抗体産生の調節、又は炎症性の媒介体の分泌を含む (Fridman et al., 1992 ; van de Winkel 及び Capel, 1993 ; Ravetch 及び Bolland, 2001)。

【 0 0 0 4 】

健康な個人における F c R s が果たす利点のある役割とは対照的に、F c R s はまたこの免疫系の刺激を、アレルギー (例えば、F c R I a により媒介される) 又は自己免疫疾患へと伝達する。更に、いくつかのウイルスは F c R s を使用して、細胞に到達するか、例えば H I V (Homsy et al., 1989) 及び デング (Littau et al., 1990) 等、又は エボラ (Yang et al., 1998) 及び 麻疹 (Ravanel et al., 1997) の場合のように F c R s を遮断することで免疫応答を減速させる。

【 0 0 0 5 】

I g G のための F c レセプター (F c R) は F c レセプターファミリーのうちで最も普及したものであり、かつ定義されたパターンで全ての免疫学的に活性のある細胞上に発現する。F c R I は単球及びマクロファージ上に構成的に発現し、好中球及び好酸球上に誘導されてよい。F c R I の生理学的な役割は未だ未知であり、というのは単球上での発現は不可欠ではないからである (Ceuppens et al., 1988)。F c R I I I (F c R I I I a) のグリコシルホスファチジルイノシトール (G P I) によりアンカーした形態は顆粒球にのみ発現する。この細胞質部が欠損しているために、細胞中へのこのシグナル伝達はその他の膜貫通タンパク質、例えば 3 型補体レセプター (C R 3) を介してのみ生じ、前記レセプターは少なくとも F c R I I I b と結合できる (Zhou et al., 1993 ; Poo et al., 1995)。F c R I I I a は単球及びマクロファージ上に主に発現するが、-鎖と呼ばれる関連したタンパク質と組み合わせてのみ発現する。F c R I I I a は、免疫性の能力のある細胞に対して最も広い分布を有するレセプターであり、主に免疫複合体のエンドサイトーシスに関連する。F c R I I I b は、F c R I I I b が唯一の I g G レセプターである B 細胞上に、及びエフェクター細胞、例えばマクロファージ、好中球、及びマスト細胞上に発現し、しかし N K 細胞及び T 細胞には発現しない。

【 0 0 0 6 】

構造的には、前記 F c R s の細胞外部は、3 つ (F c R I、C D 6 4) 又は 2 つ (F c R I、F c R I I、C D 3 2 及び F c R I I I、C D 1 6) の I g 様のドメイン (約 1 0 k D a / ドメイン) からなり、従って免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。これらの細胞外ドメインに加えて、F c R s は膜貫通ドメイン、及び細胞内ドメインを有する (G P I にアンカーした F c R I I I b を除く)。これらのレセプターは相互に相同性があり、かつ F c R s 及び F c R I a のうちでのアミノ酸配列におけるこの全体的な同一性は、これらの細胞外領域において 4 0 % を超える。F c R I I I a 及び F c R I I I b はその細胞外領域において、このアミノ酸残基の 6 % のみが相違する。それにも関わらず、両者の形態は、ヒト及びマウスの I g G サブクラスに対するその結合特性 (van de Winkel 及び Capel, 1993)、及びヒト I g G s に対するこれらの異なる親和性により区別されることが可能である (Sondermann et al., 1999A)。

【 0 0 0 7 】

F c R s は高度にグリコシル化されている。多数の F c レセプターの c D N A 配列は既知であり、幾つかの可溶性の組み換え F c R が産生されている。可溶性の組み換え F c レセプターは、膜貫通領域の非存在により特徴付けられていて、シグナルペプチド及びグルコシル化が W O 0 0 / 3 2 7 6 7 に開示されている。

【 0 0 0 8 】

F c R s は、様々なアイソフォーム (F c R I a、b 1、b 2、c ; F c R I I a 1 - 2、b 1 - 3、c) 及び対立遺伝子 (F c R I I I a 1 - H R、F c R I I I a 1

10

20

30

40

50

- LR ; Fc R I I I b - NA 1、Fc R I I I b - NA 2) (v a n d e W i n k e l 及び C a p e l , 1 9 9 3) で生じる。前記の全体的に相同性のある細胞外部と比べて、この膜にまたがる及び細胞質のドメインは 8 k D a の大きさまで相違する。

【 0 0 0 9 】

前記 Fc R s は、活性性又は抑制性であるその機能に従って、2つの一般的なクラスに区分することができる。この活性性レセプターは、細胞質の16つのアミノ酸免疫系レセプターチロシンベース活性化モチーフ (I T A M) に関連し、前記モチーフは、コンセンサス配列 Y - X₂ - L / I - X₈ - Y - X₂ - L / I を有する (Isakov, 1997)。前記モチーフは、例えば Fc R I I a 中に見出される。Fc R s のその他のクラスは抑制性レセプターであり、これらは細胞質の6つのアミノ酸の抑制性のモチーフ (I T M) を有し、これはコンセンサス配列、V / I - X - Y - X₂ - V / L を有する (Isakov, 1997)。かかる抑制性の Fc R の例は Fc R I I b である。

10

【 0 0 1 0 】

I T A M 及び I T I M のモチーフを介した活性化及び抑制化はチロシンのリン酸化により作用される。その特定の細胞の種類 (前記 Fc レセプターにより活性化される) に依存して、異なるチロシンキナーゼがこれらのシグナル伝達経路に参与する (Amigorena et al., 1992)。活性性及び抑制性の Fc R s の両者は、同じ細胞上に発現されてよく、これにより免疫応答の良好な調整のために協調した、活性化及び抑制性のレセプターの機能化が可能になる。

【 0 0 1 1 】

20

Fc R I I b は2つの抑制性の活性を有する。これらのうちの1つは I T I M モチーフに依存性であり、Fc R I I b が I T A M を有するレセプター (例えば Fc R I I a) に連結する場合に生じ、これにより I T A M により誘発されたカルシウム動員及び細胞の増殖の抑制を導く。この意味するものは、カルシウム依存性の経過、例えば脱顆粒、食作用、A D C C、サイトカイン放出及び炎症誘発性の活性化、及びまた B 細胞の増殖が Fc R I I b により遮断されることである。Fc R I I b の第2の抑制性の活性は、レセプターの同族凝集 (Fc R I I b クラスタ化) を伴い、これはアポトーシス促進性のシグナルを細胞質へと配送する。前記のアポトーシス促進性のシグナルは B 細胞においてのみ報告されていて、かつ、Fc R I I b の B 細胞レセプター (B C R) への連結によって遮断されることが可能である。i n v i v o 研究では、Fc R I I b は末梢性寛容で役割を果たすことを示し、というのは Fc R I I b ノックアウトマウスは、自然発生的な自己免疫疾患を発達させるからである。その一方で、Fc R I I b は腫瘍に対する細胞毒性を下方調節することも報告されている (Clynes et al., 2000)。Fc R I I b 欠失であってかつ抗腫瘍性の抗体で処置したマウスは促進した A D C C を示し、腫瘍転移の減少を生じる一方で、Fc レセプターの活性化を欠失したマウスは、同じ抗体で処置した場合に腫瘍成長を停止させることができなかった。

30

【 0 0 1 2 】

免疫原としてタンパク質又はペプチドで動物を免疫化させることによる抗体の産生は、この分野で既知である。従来の免疫化プロトコルは、免疫原として線形のペプチドを使用し、前記ペプチドは関心のある抗原に由来する。かかる方法の不利な点は、このエピトープの三次元的な構造がしばしば完全に失われるために、この生じる抗体が高度には特異的ではないこと、又は前記抗体が関心のあるエピトープ以外のエピトープに指向する大きい割合の抗体を含んでいることである。

40

【 0 0 1 3 】

過去十年の間に、Fc レセプターを発現する細胞又は変性した Fc レセプターを使用する免疫化プロトコルは、単に変性した Fc レセプターを特異的に検出することが可能である (ウェスタンブロット) か、又は細胞系 (例えば U - 9 3 7、ラジ) 又は血液細胞上のこの関連した Fc R I I a と Fc R I I b とを識別できない抗体を生じたに過ぎない。遡ると、選択的にかつ特異的に Fc R I I b に、その天然のコンフォメーション及び/又はその天然の環境において結合する抗体又はその他の結合物質は存在しない。

50

【0014】

ペプチド又は組み換えタンパク質を抗原として伴う従来の免疫化プロトコルは、極めて高い配列同一性を有するホモログが存在するタンパク質に特異的な抗体を産生するためには良好に適するものでない。一般的に、抗体は小さい線形のペプチドを免疫原として用いて産生される。かかるペプチドは、タンパク質（エピトープが由来するタンパク質）上のエピトープの天然のコンフォメーションを代表するものでない。加えて、この免疫化した動物により産生される抗体の大多数は、この抗原がコンジュゲートする担体タンパク質のエピトープに対して、又はホモログに共通する組み換え抗原上のエピトープに対して指向する。結果として、この産生された抗体は、特異的でないか、かつ/又はこの天然のコンフォメーションにある抗原を検出することが可能でない。更に、グルコシル化部位は、関心の有るエピトープ内に局所し、これらの部位を遮閉する可能性がある。これらのエピトープをこの標的分子に見出されるそれぞれの天然のグリコシル化なしに使用する従来の免疫化プロトコルは、その天然のコンフォメーションにある抗原を認識することができない抗体を生じる。

10

【0015】

本発明の1つの目的は、免疫原として使用できる組み換えペプチド又はポリペプチドを、関心の有る抗原と緊密に関連した抗原とを識別することができる抗体を産生するために提供すること、及びかかるポリペプチド及び相応する抗体及び免疫学的な特異性を有するその他の物質を製造する方法を提供することである。

【0016】

本発明の更なる目的は、Fcレセプターサブタイプに選択的に結合でき、かつこれらを識別することができる物質であって、従って免疫疾患、特に自己免疫疾患の治療及び診断に利用できるFcレセプター結合物質として、及び腫瘍細胞に対してADCCを促進する療法の効率を促進する抗腫瘍剤として作用する物質を提供することである。

20

【0017】

本発明の更なる目的は、かかるFcRIIb結合物質、特に抗体、特に上述の特異性を有するモノクローナル抗体の産生を可能にする免疫化プロトコルを提供することである。

【0018】

本発明の発明者は、極めて緊密に関連したタンパク質及び/又はタンパク質と高い相同性を有する抗原とを識別することが可能である物質、特に抗体を開発するための新規でありかつ発明性のあるアプローチを見出した。

30

【0019】

意外にもいわゆるコンフォメーションにより識別するエピトープ(CDEs)を、抗体を産生する抗原として使用する場合に、関心の有るタンパク質に対して特異的な抗体を産生することが可能であることが見出された。

【0020】

本発明は従って、天然のコンフォメーションにおいてコンフォメーションにより識別するエピトープ(CDE)を有する人工ペプチド又はポリペプチドに関し、その際前記CDEは環化により構造的に安定化されている。

40

【0021】

本発明の目的のために、人工ペプチド又はポリペプチドは、任意の技術的な方法、例えば組み換え技術、又は有利にはペプチド合成により製造された人工ペプチド又はポリペプチドである。

【0022】

CDEはタンパク質中のエピトープであって、前記タンパク質において特異的なコンフォメーションを有するエピトープである。かかるエピトープに特異的な抗体は、タンパク質と極めて緊密に関連したホモログとを識別できる。前記CDEは、前記CDEが存在するタンパク質と、このタンパク質のホモログとで相違する少なくとも1つのアミノ酸を有する(特有残基)。前記特有残基は、この同じエピトープの一部であるべく前記タンパク

50

質の線形の配列において緊密に近接するには及ばない。本発明の利点は、本発明のペプチドがこれらエピトープの線形の配列を有するのみでなく、しかしこれら構造をも模倣することである。前記C D Eは少なくとも1つの、有利には少なくとも2つのかかる特有残基を、より有利にはかかる特有残基2つ以上を含む。C D Eは抗体のための結合部位を提示する。

【0023】

本発明のペプチドは有利には、5つ～、より有利には約8つ～、より一層有利には約10つ～、約30つまでの、より有利には20つまでの、より一層有利には約18つまでの、極めて有利には約15つまでのアミノ酸の長さを有する。

【0024】

本文脈における構造的安定化は、前記ペプチドが安定化されているので、このC D Eは可能な限りこの本来のタンパク質におけるほぼ天然の三次元コンフォメーションで存在することを意味する。構造的安定化は、種々の手段によって達成されてよい。特に、前記ペプチドは安定な三次元構造、例えばループを形成するように環化されている。前記ペプチドの安定化は、N-末端のC-末端へのカップリング、システイン架橋の形成により、又はアミノ酸側鎖の架橋により達成されてよい。擬ペプチドが形成される。

【0025】

有利には、本発明のペプチド又はポリペプチドは、グリコシル化部分をも有する。前記ペプチドは有利には、グリコシル化したアミノ酸が、このC D Eが由来する天然のタンパク質においてグリコシル化される同じ部位で組み込まれるように産生される。有利には、このグリコシル化したアミノ酸は、N-アセチル-グルコサミン、フコース、キシロース、マンノース、及びガラクトースのコンジュゲートから選択されるが、このリストは網羅するものでない。この識別するエピトープがN-グリコシル化部位を有する場合には、この天然のグリコシル化した基質が、成功した免疫化ののちに生じる抗体により認識される可能性を促進するために、N-アセチル-グルコサミンを有するアスパラギン残基の人工コンジュゲートを前記ペプチド中に組み込んでよい。従って、O-グリコシル化部位に関しては、セリン又はトレオニン残基は、マンノース、フコース、キシロース、ガラクトース、又はN-アセチル-ガラクトサミン残基とそれぞれコンジュゲートされてよい。

【0026】

本発明のペプチド及びポリペプチドは更に、担体分子にカップリングされていてよい。かかる担体分子は有利には、ハプテン、ペプチド、ポリペプチド及びその他の免疫原から選択される。本発明のペプチドは、その他のペプチド及びタンパク質、更にはこのC D Eが由来する同じタンパク質又はその一部に接合されていてよい。

【0027】

本発明の有利な実施態様は、FcレセプターからのC D Eを有するペプチドである。本発明の発明者は意外にも、FcRIIbの細胞外部上に特異的なエピトープが存在することを見出し、これによりFcRIIbに特異的に結合する抗体の産生を可能にする。これは特に有利であり、というのはFcレセプターのファミリーは、従来の抗体を用いて識別することが困難な、尋常でなく緊密に関連したホモログを有するからである。特に、本発明は、FcRIIbに結合するがFcRIIaに結合しない物質及びこの逆も同様である物質を製造することを可能にする。同様に、このエピトープは、FcRIIaが特異的に認識されるように選択されてよい。

【0028】

特に、本発明によるペプチド又はポリペプチドは、少なくとも1つの、有利には少なくとも2つの、更に有利には少なくとも3つの、図1及び配列番号2に従ったヒトFcRIIbのアミノ酸配列の以下のアミノ酸：Gln12、Arg27、Thr29、His30、Val104、Lys127、Ser132、Asn135、Tyr160及びAla171、又は配列番号1に従ったFcRIIaのこの相応するアミノ酸を有するエピトープを有する。より有利には、本発明の目的のために有利なエピトープは、FcRIIb(図1、配列番号2)のアミノ酸配列のアミノ酸27～30、及び/又は127～

10

20

30

40

50

135、及び/又は160~171又はFcRIIaのこの相応するアミノ酸(図1)を有する。これらのペプチドは、適当な方法で、例えば図2において例示したように、環化により構造的に安定化している場合には、FcRIIbに特異的なコンフォメーションにより識別するエピトープ(CDEs)を表してよい。また、FcRIIaの相応するエピトープはFcRIIaのみに特異的に結合する抗体を産生するために使用されてよい。

【0029】

とりわけ、アミノ酸配列127-KKFSRSDPN-135及び隣接アミノ酸を有するペプチドが有利であり、というのはこれらのペプチドは、Fc断片に対するFcレセプターの結合領域内においてFcRIIbに特異的なコンフォメーションのエピトープを表すからである(W000/32767, Sondermann et al., 2000; Sondermann et al., 2001)。更に、アミノ酸配列28-RGTH-31及び隣接残基を有するペプチドは有利であり、というのはこれらがFc断片に対する結合領域を別にした結合エピトープを表すからである。また更に、このエピトープは更に、環化及び135位のグリコシル化したアスパラギン残基の組み込みにより天然の構造に適合されてよい。

【0030】

従って、本発明の有利な実施態様は、配列番号3に従ったCDEを有するペプチド又はポリペプチドである。有利には、135位のアスパラギン(配列番号2番に従って)は、N-アセチル-グルコサミンによってグリコシル化されている。有利には、図7に示したようにペプチドは、図7に示したような配列のこの最初の及び最後のアミノ酸を連結することで環化されている。

【0031】

これらの人工ペプチドは次いで、動物の免疫化のための直接的に使用できるか、又は担体タンパク質、例えばハプテン、又はペプチド又はポリペプチドに、又は理想的にはその標的タンパク質自体にカップリングしてよい。有利な実施態様において、FcRIIb又はFcRIIaからのCDE、又はかかるCDEを有するペプチドは、FcRIIb又はFcRIIaにコンジュゲートされている。

【0032】

本発明のペプチド及びポリペプチドは有利には、動物を免疫化するための免疫原として、特異的な抗体、及びこれらの特異的な抗体の配列の助けにより、更に免疫学的に特異的な物質を産生するために使用される。CDEs及びこれらを有するペプチドは、前記CDEを特異的に認識する、免疫学的に調節性の物質の産生のために使用されてよい。これは特に、FcレセプターのCDEsが選択される場合に有利であり、というのはこれらはホモログのファミリーの個々のメンバーに特異的な抗体の産生を可能にするからである。特に、FcRIIb又はFcRIIaのいずれかを認識するが、しかし両者を同時には認識しない抗体及びその他の免疫学的に調節性の物質が産生されることが可能である。本発明は、FcRIIb又はFcRIIaを特異的に認識し、かつ、これら2つのFcレセプターを識別することが可能であるだけでなく、このFcレセプターがその天然の環境中に、例えば細胞培地中に又は*in vivo*、例えば血液流中に存在する場合にも同様にすることが可能である抗体の産生を可能にする。

【0033】

CDEを、これが由来するタンパク質にカップリングさせることで、この担体タンパク質に対する背景の免疫反応は減少する。共有結合によりカップリングしたCDEによる人工的な修飾は、増加した免疫応答を生じる。これは特に、この免疫化した動物が、この免疫系により寛容されうる同様のタンパク質を発現する場合に重要である。従って、本発明のペプチドがFcRIIb又はFcRIIaのCDEを有する場合には、前記CDEは有利にはこのそれぞれのFcレセプター自体にカップリングしている。これにより抗原性を上昇させる。このカップリングは、化学的な結合又はその他の適した手段により生じてよい。

【0034】

この方法は有利には高密度のCDEsを有する免疫原を産生し、これによりこれらを異なる、即ち免疫原性の環境において提示する。この最初の免疫応答はこの標的領域(CDE)に対して指向している、前記領域は、これらがカップリングされたこの天然の構造と交差反応する抗体を産生する。これらの交差反応する抗体は、この天然の環境においてCDEをも認識する、より高度な親和性へと成熟する。

【0035】

本発明のペプチド及びCDEsは、結合する分子のための分子ライブラリー(例えば、ペプチド、有機分子、ペプチドメティックス(peptidometics)その他)、又は遺伝子によりコードされたライブラリー(例えば、抗体可変ドメインのファージディスプレイ又はその他のフレームワーク、例えばリポカリン)のスクリーニングにおいても、FcRIIb(又はFcRIIa)に特異的に結合する物質を見出すために使用されてよい。前記ペプチドは、ヒト細胞上のFcRIIa又はFcRIIbのいずれかに特異的に結合する分子のライブラリーをスクリーニングするために使用されてよい。

10

【0036】

本発明による同様のペプチドは、その他のタンパク質の、例えばレセプターの構造から抽出されてよく、前記タンパク質は相互に関連があるが、異なる機能を有するか(例えばヒトのFcRIIaに特異的な抗体は、FcRIIbを認識しないように開発されることができ、前記抗体はDibody又はTriabody中に、FcRIIbよりむしろFcRIIaにより媒介されるADCCを促進するために組み込まれてよい)、又は異なる対立遺伝子において生じる(例えば131位のFcRIIa Arg/His-多形性、又は155位のFcRIIa Phe/Val多形性)。

20

【0037】

本発明の新規ペプチドのその他の使用は、免疫学的な機能のプロモーターの抑制剤としての直接的な使用である。本発明によるペプチドは、免疫療法のために直接的に使用されてよい。

【0038】

本発明の上述したペプチドは、新規の方法により製造されてもよく、その際この方法は以下を含む：

- (a) 関心のあるタンパク質を提供、
- (b) 前記タンパク質上のCDEを同定、
- (c) 前記CDEの配列を有するペプチドを産生、
- (d) 前記CDEがその天然のコンフォメーションにあるように前記ペプチドを構造的に安定化。

30

【0039】

前記ペプチドは環化、有利にはN末端のC末端へのカップリング、システイン架橋の形成、及び/又はアミノ酸側鎖の架橋により構造的に安定化され、擬ペプチドを形成する。上述したように、前記ペプチドは有利には、関心のあるタンパク質に存在するグリコシル化部分を有するアミノ酸を使用して産生される。前記方法は有利には、付加的な工程、前記ペプチドの担体分子へのコンジュゲートを含み、前記分子は任意の上述した分子から選択される。本発明のその他の観点は、本発明の方法により得られるCDEを有するペプチド又はポリペプチドである。

40

【0040】

特異的に結合する抗体の画分を著しく上昇させるために、本発明は、関心のある抗原と緊密に関連した抗原とを識別することができる特異的に結合する物質を産生するための方法であって、その際前記方法が、動物を本発明によるペプチド又はポリペプチドで、及び/又は、関心のある抗原の正確に折りたたまれた一部で、特にFcレセプター、例えばFcRIIb又はFcRIIaに由来するペプチドで免疫化し、かつこの生じる抗原を単離し、かつ場合により前記抗体を組み換えの免疫学的に調節性の物質を産生するために使用することを含む以下の方法を提供する。

【0041】

50

抗原 A と、A との高い配列同一性を有する抗原 B とを識別する抗体を産生するために、この相違するアミノ酸は A の構造又は A のそれぞれの構造モデルにマッピングされる。この最初の配列において複数のアミノ酸により隔てられている相違するアミノ酸は、空間的に近接していてもよい。これらの相違するアミノ酸が、この天然の構造において溶媒から易到達性である場合には、これらの表面領域はコンフォメーションにより識別するエピトープ (CDE) であると見なされてよい。かかるエピトープは、環式ペプチド又はペプチドアナログにより人工的に構築されてよく、かつ極めて関連した抗原を識別する抗体の産生のためにとりわけ有利である。

【0042】

この方法の変形において、トランスジェニック動物を免疫化のために使用し、前記動物は緊密なホモログを発現すべく操作されていて、かつ後にこの標的抗原で免疫化される。ヒトFcRIIbを発現する動物は、ヒトFcRIIaで免疫化されているか、又はその逆も同様である。

10

【0043】

特に有利な観点において、本発明は、Fcレセプターの天然の環境においてFcRIIbに又はFcRIIaに特異的に結合することが可能である、FcRIIbに結合する抗体又はその断片又は誘導体を提供する。かかる抗体断片又は誘導体は、FcRIIb及びFcRIIaの緊密に関連したホモログを天然の環境で、例えば細胞培地中で、又は*in vivo*で識別できる。

【0044】

有利な実施態様において、前記FcRIIb結合抗体又はその断片又は誘導体 (又はFcRIIa結合抗体又はその断片又は誘導体) は、FcRIIb (又はFcRIIa) に特異的に結合するのみでなく、FcRIIb (FcRIIa) の天然の結合パートナー、例えばIgG抗体が結合することを妨げる。

20

【0045】

本発明のその他の有利な実施態様において、この特異的な抗FcRIIb (又は抗FcRIIa) 抗体は、非遮断性であり、かつFcレセプター/Fc断片相互作用部位から遠位のエピトープ (例えば、アミノ酸28~31の付近のN末端ドメインのエピトープ) を認識する。遮断性の抗体とは対照的にこれらの抗体は、レセプターの免疫複合体へのレセプターの結合が損なわれないという利点を有する。これにより、免疫複合体による前記レセプターの活性化が完全なままであり、かつ付加的なレセプターはこの活性化を促進するために動員されることが可能である。

30

【0046】

従って、IgG結合に依存せずにこれらのFcレセプターの天然の機能を調節することが可能である。例えば、前記抗体又はその断片又は誘導体は、前記Fcレセプターに架橋することが可能であるように選択されてよい。かかる方法により、前記レセプターは活性化される。有利には、本発明の前記抗体又はその断片又は誘導体は、免疫複合体がFcRIIb又はFcRIIaに結合することに干渉しない。

【0047】

その一方で、前記抗体又はその断片又は誘導体は、これがヒトFcRIIa又はFcRIIbの生理学的な機能を抑制するように選択されてよい。

40

【0048】

本発明の抗体又はその誘導体又は断片は有利には、FcRIIaに対するよりもFcRIIbに対してより高い親和性で結合する。前記抗体又はその断片又は誘導体は、FcRIIbに、少なくとも5倍、有利には少なくとも10倍、より有利には少なくとも100倍、更により有利には少なくとも1000倍、一層有利には少なくとも10000倍、最も有利には少なくとも100000倍、より有利には少なくとも 10^6 倍、より有利には少なくとも 10^7 倍、より有利には少なくとも 10^8 倍、より有利には少なくとも 10^9 倍、より有利には少なくとも 10^{10} 倍、より有利には少なくとも 10^{11} 倍、より有利には少なくとも 10^{12} 倍、FcRIIaに対するよりもより高い親和性で結合する

50

。又は、前記抗体又はその断片又は誘導体は、Fc RIIaに、少なくとも5倍、有利には少なくとも10倍、より有利には少なくとも100倍、更により有利には少なくとも1000倍、一層有利には少なくとも10000倍、最も有利には少なくとも100000倍、より有利には少なくとも 10^6 倍、より有利には少なくとも 10^7 倍、より有利には少なくとも 10^8 倍、より有利には少なくとも 10^9 倍、より有利には少なくとも 10^{10} 倍、より有利には少なくとも 10^{11} 倍、より有利には少なくとも 10^{12} 倍、Fc RIIbに対するよりもより高い親和性で結合する。特異的なFcレセプターに対する5、10、100、100又は更には1000000倍より密な結合が、Fc RIIbを超えて血小板上でのFc RIIaの十分により高い発現レベルを克服するために必要である。

10

【0049】

前記抗体又はその断片又は誘導体は、単量体又は多量体の状態で生じてよい。

【0050】

前記抗体又はその断片又は誘導体は、Fcレセプター分子に、この細胞表面上でのこれらに対する架橋あり又はなしで結合することが可能であってよい。有利には、前記抗体又はその断片又は誘導体は、Fc RIIa又はFc RIIbに架橋できるように多量体である。又は、前記抗体又はその断片又は誘導体は単量体であり、ヒトFc RIIbに対するIgGの結合を遮断できるか、しかし有利にはFc RIIbに架橋することが可能ではない。

【0051】

本発明の前記抗体又はその断片又は誘導体は、このFc断片において、グリコシル化の修飾及び/又は突然変異により、前記Fcレセプターのサブセットに対する結合を促進すべく改変されていてもよい。

20

【0052】

本発明の前記抗体又はその断片又は誘導体は、有利には、上述のCDE及び/又はペプチド、特に図1及び配列番号2に従ったヒトFc RIIbのアミノ酸であって、以下から選択されたアミノ酸：Gln12、Arg27、Thr29、His30、Val104、Lys127、Ser132、Asn135、Tyr160及びAla171、又は配列番号1に従ったFc RIIaのこの相応するアミノ酸の1つ又はそれ以上を有するCDE及び/又はペプチドに結合することができる。より有利には、前記物質は、Fc RIIbのアミノ酸配列(図1、配列番号2)のアミノ酸27~30及び/又は127~135及び/又は160~171を含むエピトープ又はFc RIIaの相応するエピトープに結合する。

30

【0053】

同様に、Fc RIIbを認識しないヒトのFc RIIaに特異的な抗体が開発されることができ、これはDiabody又はTriabody中に、Fc RIIbよりむしろFc RIIaにより媒介されるADCCを促進するために組み込まれてよい。

【0054】

前記抗体又はその断片又は誘導体は、任意の天然の、人工の、又は組み換えにより産生された、Fc RIIbの上述のエピトープに結合できる領域を有する物質であってよい。有利には、この領域は特異的にFc RIIbに結合する抗体の相補性決定領域(CDRs)を有する。より有利には、前記CDRは図5及び6に描写した配列を有する。

40

【0055】

この記載したCDRsは、その他の選択されたFcレセプター又はレセプター群のためのこれらの特異性又は新規の特異的な又は汎抗体(pan antibody)(又は結合分子)の設計を更に改善するための変形のベースであってよい。無作為の又は部位特異的突然変異、関連した配列のスクリーニング、及び知識又は構造に基づいた設計を含む方法が既知である。

【0056】

有利には、前記抗体又はその断片又は誘導体は、1つの又は両方の、配列番号5及び配

50

列番号7に従った可変軽鎖領域及び可変重鎖領域、及びノ又は配列番号9及び11に従った可変軽鎖領域及び可変重鎖領域を含む。最も有利には、前記抗体はC E 5、又はG B 3である。

【0057】

モノクローナル抗体が有利である。有利には、これは、I g G、I g E、I g M又はI g Aのアイソタイプを有する抗体又はその断片又は誘導体である。有利には、前記抗体はヒトの又はヒト化しているか、しかしその他の起源、例えば動物起源、特にマウス又はラクダ起源であってもよい。前記抗体は様々な形態、例えば単鎖抗体、二官能性、又は三官能性、又は多官能性の抗体、F a b断片又はF a b₂断片、又は抗体全体として存在してよく、前記抗体においてこのF c断片はF cレセプター又は補体に対して改変した親和性を有する。これはF a b断片、F (a b)₂断片、又はF v断片、又はs c v断片であってもよい。

10

【0058】

前記抗体又はその断片又は誘導体は、C D R sの配列、又はこの提供された配列に対して50%より高く、有利には70%より高く、より有利には90%より高く、更に有利には95%より高く関連している、同様の配列を含む特異的な結合領域を有する、組み換えにより産生されたポリペプチド又はポリペプチドアナログであってよい。これらの配列は、F cレセプターの抑制剤の設計のための開始点であってもよい。従って、ペプチド模倣体もまた、この提供されたC D R sの配列モチーフを使用するか又は模倣する本発明の一部である。

20

【0059】

その他の有利な実施態様において、前記抗体又はその断片又は誘導体は、アンチカリン(a n t i c a l i n e)又はリポカリン変異体又はその他の抗体の代理物である。

【0060】

この得られた抗体又はその断片又は誘導体は、エフェクター分子、例えば関心のある抗原、抗体、抗体断片、マーカー分子、細胞毒性物質、立体的にかさばっている遮断物質及び連結分子及び連結物質にカップリングされていてよい。

【0061】

本発明のその他の観点は、核酸、上述した本発明のペプチド及びノ又は抗体又はその断片又は誘導体をコードする核酸を含有するベクター及び宿主細胞である。

30

【0062】

本発明による抗体又はその断片又は誘導体から、このタンパク質をコードする核酸配列が得られる。有利には、前記配列は可変領域、有利には上述の、F c R I I bのエピトープに結合するC D R sをコードする。最も有利には、前記核酸配列は、図5及び6に従った配列の1つ又はそれ以上に従ったC D R sをコードする。有利には、前記核酸は、モノクローナル抗体、C E 5又はG B 3の配列をコードする。

【0063】

前記核酸配列は、図5及び6に従ったタンパク質の発現のためのベクター中に挿入されていてよく、このベクターも本発明の観点の1つである。前記ベクターは、上述の核酸配列が配置されたベクターの制御下にあるプロモーターを有する。前記ベクターは、原核生物又は真核生物の発現ベクターであってよく、その際前記組み換え核酸は単独で、又はその他のペプチド又はタンパク質又はD N A - ワクチン接種に適したベクターに融合して発現される。

40

【0064】

本発明は上述したベクターでトランスフェクションされた宿主細胞をも提供する。前記宿主細胞は任意の細胞、原核細胞又は真核細胞であってよい。

【0065】

本発明は更に、F cレセプターが媒介したシグナル伝達に関連した疾病の治療のために利用できる医薬組成物であって、本発明による抗体又はその断片又は誘導体の有効量及び医薬的に許容可能なキャリアー物質を含む医薬組成物を提供する。

50

【 0 0 6 6 】

本発明は更に、自己免疫疾患及び/又は癌の検出のための診断キットであって、本発明による抗体又はその断片又は誘導体及び/又は、本発明において説明されたエピトープの1つを含むか又は示す本発明による組み換えペプチド又はポリペプチド、及び場合によりマーカー試薬、キャリアー試薬及び/又は適した容器を含む診断キットを提供する。

【 0 0 6 7 】

グリコシル化されていない正確に折りたたまれたFc-レセプター、例えば大腸菌に由来しかつ説明したエピトープで修飾されたFcレセプターでの免疫化は意外にも、血液細胞上及び細胞培地中で発現した、天然のFcレセプターを特異的に認識する抗体を生じる(図3及び図4)。

10

【 0 0 6 8 】

本発明のその他の観点は、FcRIIbに特異的に結合する能力により特徴付けられた抗体の産生方法であって、その際前記方法は：

(a) 正確に折りたたまれたFcRIIb分子又はその一部を、少なくとも一部の細胞外ドメイン(コンフォメーションエピトープ)、そのコンジュゲート体、又はその他の担体分子(例えばKLH、BSA)とのコンジュゲート体を含む免疫原として提供し、

(b) 哺乳類を(a)の免疫原で免疫化し、公知の方法により抗体を産生し、

(c) この生じる抗体又はこの抗体を産生する細胞を単離する

ことを含む抗体の産生方法である。

【 0 0 6 9 】

前記抗体は有利にはモノクローナル抗体である。

20

【 0 0 7 0 】

CDRsはその他の免疫グロブリンクラス(例えば、IgM、IgE、IgG1~IgG4)又はその他の足場(例えばリポカリン変異体、ラクダ抗体)、又は突然変異したか又は誘導体化された分子(例えば、改変されたFc断片を有する操作された抗体)に接合されていてよい。

【 0 0 7 1 】

上述の方法は、動物の免疫化のためのビヒクルを製造するために使用されてよく、FcRIIbに対する増加した特異性の抗血清を生じ、前記抗血清は、単離したB細胞と骨髄腫細胞との融合後、FcRIIbに特異的な抗体を産生する増加した割合を有するハイブリドーマ細胞を生じる。

30

【 0 0 7 2 】

本発明による抗体又はその断片又は誘導体は、免疫系に関連する症状の治療及び/又は診断のための医薬品の製造のために利用できる。有利には、これらの症状は自己免疫疾患又は癌である。

【 0 0 7 3 】

本発明の薬物により治療されてよい疾患は、関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、Rieter's症候群、乾癬、多発性硬化症、エリテマトーデスを含むがこれらに限定されない。

【 0 0 7 4 】

本発明の物質を使用して診断されるか又は治療されることが可能な自己免疫疾患は、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、多発性硬化症、特発性血小板減少性紫斑病及び宿主対移植片疾患を含むがこれらに限定されない。

40

【 0 0 7 5 】

意外にも、本発明者らにより、ある特定の免疫学的な経過をFcRIIbに結合する物質を使用することでin vivoで促進することが可能であることが見出された。特に、本発明のかかる物質を、細胞に対するFcRIIbのシグナル伝達の特異的に遮断するために使用することが可能でありそしてこれにより個人の免疫応答を増加させる。これは使用細胞に対するADCCの増加のために使用されてよい。実施においては、前記のFcRIIb結合物質を、治療性の抗体と共にアジュバントとして与える。前記の治療

50

性の抗体によりオプソニン化された抗原（例えば腫瘍細胞）により活性化したマクロファージ又はB細胞へと伝達される抑制性シグナルは遮断され、この宿主の免疫系は標的の抗原の戦いにおいてより有効である。これは、直接的に、FcRIIbを発現する腫瘍細胞（例えばB細胞リンパ腫）をラベル化することによる、又はこのFcRIIbに結合する物質をアジュバントとして用いることによる、既知の治療性の抗体を使用する全てのアプローチにおいてであってよく、従って宿主のADCCに依存する。

【0076】

この既知の治療性の抗体は、ハーセプチン^(R)、リツキサン^(R)、IC14、PANOREXTM、IMC-225、VITAXINTM、Campath 1H/LDP-03、LYMPHOVIDETM、及びZEVLINTMを含むがこれらに限定されない。これらはまた、以下の癌の抗原：MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、N-アセチルグルコサミン転移酵素、p15、 β -カテニン、MUM-1、CDK-4、HER-2/neu、ヒトパピローマウイルスE6、ヒトパピローマウイルスE7及びMUC-1に結合する抗体をも含む。

10

【0077】

特定のリンパ腫においてB細胞又はマスト細胞は変換される。前記抗体又はその断片又はその誘導体はこれら細胞の表面上でFcRIIbに架橋することが可能であり、これらは排除のために前記細胞をラベル化するが、しかし付加的に抑制性及びアポトーシス促進性のシグナルをこれら細胞に伝達する。この効果はこれまでの治療性の抗体のアプローチの改良であり、前記アプローチはこの宿主のADCCに完全に依存する（例えばリツキサン）。

20

【0078】

Fcレセプターに架橋するか又は遮断する同じ抗体は、宿主対移植片疾病又はアミロイドに関連した疾病の治療のために使用されてよい。

【0079】

同じFcRIIbを遮断及び/又は架橋する構築体は、アレルギー治療のためマスト細胞を抑制するために使用してよい。

【0080】

前記抗体又はその断片又は誘導体は、IgEにカップリングされていてよい（例えば、IgE分子に図5又は6に示したCDRsを移すことにより）。この場合には前記IgEはマスト細胞が発現したFcRにより結合し、そしてFcRIIbに特異的なCDRsはFcRIのITAMに、FcRIIbのITIMで架橋する。再度、抑制性及び/又はアポトーシス性のシグナルがマスト細胞に伝達され、これはアレルギーの治療において利用できる。

30

【0081】

前記抗体又はその断片又は誘導体（例えば、図5及び6に示された配列の誘導体）は、自己免疫疾患の治療のために使用されてよい。

【0082】

かかる物質はB細胞、樹状細胞及び活性化した顆粒球（例えばマクロファージ）を抑制し、これにより免疫刺激性の媒介体の減少した産生、及び抗体産生と同様に抗原提示の減少を生じる（例えば樹状細胞及びマクロファージに対して、T細胞動員の減少を生じる）。まとめると、抗体産生及び前記免疫系の再刺激のフィードバックループは抑制される。

40

【0083】

有利には、この抗FcRIIb又はFcRIIaは、前記レセプターのFc断片の結合に干渉しない。このようにして、Fcレセプターの通常の機能は、抗体の遮断とは対照的に維持され、かつ更なるレセプターの付加的な動員による細胞の活性化を促進する。

【0084】

その一方で、特異的な抗FcRIIa抗体又はその断片は、抗原をこのレセプターに向けて指向させるためにdiabodyにおいて使用されてよいが、又はこれらの抗体の断片は免疫複合体の取り込みを抑制するために、例えばITPの治療のために使用されて

50

よい。

【 0 0 8 5 】

前記 C D R s は単独で又は組み合わせて、F c R I I a / I g G 相互作用又は F c R I I b / I g G 相互作用の特異的な抑制剤の産生のために使用されてよい。かかる抑制剤の産生のために、誘導体又はペプチド模倣体と同様に非天然アミノ酸を使用してよい。

【 0 0 8 6 】

前記抑制剤は次いで、結晶構造の産生のために、又は構造に基づいた設計のために、又は進化的手法のための対象のために使用されてよい。更なる使用は、進化的手法による図 5 又は 6 に示された配列からの改変した配列の産生である（例えば無作為の又は部位特異的突然変異又は構造に基づいた設計）。

【 0 0 8 7 】

特に、F c レセプターの抑制剤は、この選択した F c レセプターに関する上述の特異性を減少させるか又は促進させるために使用してよい。この終わりに、前記の特異的な抗体、特に G B 3 及び C E 5 の C D R s において F c R I I b に対するこれらの特異性を促進するか低めるために改変を実施してよい。

【 0 0 8 8 】

本発明のペプチド及びポリペプチド及び物質、特に抗体又はその断片又は誘導体は、免疫系に関わる症状、特に自己免疫疾患、有利には、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、免疫性の血小板減少性紫斑病又は多発性硬化症から選択された症状の治療及び / 又は診断のための医薬品の製造のために利用できる。更に、本発明のペプチド及び抗体又はその断片又は誘導体は、癌及び / 又はアレルギーの診断及び / 又は治療において利用できる。m A b s C E 5 又は G B 3 又はその誘導体又は断片は特に、自己免疫疾患、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、特発性血小板減少性紫斑病、関節リウマチ、及び癌、特にリンパ腫又は白血病の治療のために利用できる。

【 0 0 8 9 】

m A b s C E 5 又は G B 3 又はその誘導体又は断片は、癌の治療のために、その他の治療薬、有利には生物学的治療薬（例えば、抗体）との組み合わせにおいて使用されてもよい。

【 0 0 9 0 】

本発明により産生された抗体又はその誘導体又は断片は、癌の治療及び / 又は診断のために、有利にはその他の治療薬、有利には生物学的治療薬（例えば、更なる抗体）との組み合わせにおいて使用できる。前記抗体又はその断片又は誘導体は次いで有利にはアジュバントとして使用される。

【 0 0 9 1 】

本発明の抗体又はその断片又は誘導体の更なる使用は、宿主対移植片疾病の治療のための、アミロイドに関連した疾病の治療のための、又はワクチン接種の効果を増加させるため、又は活性化した樹状細胞及び / 又はマクロファージに関連した疾病の治療のための医薬組成物及び / 又は診断組成物の製造のための使用を含む。

【 0 0 9 2 】

二重特異性の抗体中の特異的な抗 F c R I I a 断片を含む抗体又はその断片又は誘導体を、抗原を血小板による輸送及び / 又は肝臓及び脾臓の食作用系による取り込みに向けて指向させるために使用することも可能である。有利には、前記抗体又はその断片又は誘導体は、I T P の治療のための特異的な抗 F c R I I a 抗体又はその断片である。

【 0 0 9 3 】

図及び配列表の説明

図 1 :

ヒト F c R I I b 及び F c R I I a の細胞外ドメインの配列アラインメント。相違するアミノ酸を囲った。

【 0 0 9 4 】

図 2 :

10

20

30

40

50

リボン表示における F c R I I b の構造。特有残基を、ボール及び棒で示し、可能性のあるグリコシル化部位をより大きな球として示した。矢印は可能性のある抽出可能な副次構造（エプトープ 1 及び 2）を指し示し、特異的な F c R I I b - 抗血清に向けた免疫化プロトコルの改善のために及び引き続きアイソフォームに特異的なモノクローナル抗体の産生のためにハットは人工的に産生されている。

【 0 0 9 5 】

図 3 :

左図：ラジ細胞（F c R I I b 陽性及び F c R I I a 陰性）の、マウスの免疫前血清（マイナス）、免疫化工程後に得られた抗血清（抗血清）及び汎性の F c R I I - m A b A T 1 0（Greenman et al., 1991）を用いた F A C S 測定の結果。右図：U - 9 3 7 細胞（F c R I I a 陽性及び F c R I I b 陰性）に対する蛍光ラベル。この抗血清は、特異的な抗体の存在を示す細胞とわずかに反応するだけである。

【 0 0 9 6 】

図 4 :

通常血清（ネガティブコントロール）、F c R I I b - C D E（126 ~ 137）で免疫化したマウスの抗血清、m A b A T 1 0、又は本発明を用いて産生した特異的なモノクローナル抗体 G B 3 のいずれかで、インキュベーションしたヒトの血液の F A C S 分析。a）：細胞の大きさ（F S C - H）及び細分性（S S C - H）の観点における血液試料のドットプロット分析。観察した領域、R 1、R 2、R 3 はそれぞれリンパ球（B 細胞及び T 細胞）、単球及び顆粒球を含む。b）前記細胞の蛍光強度は、リンパ球を代表する領域 R 1 において見出された。汎性の F c R I I b m A b A t 1 0、m A b G B 3 及び抗血清は、前記 F c R I I b 陽性の B 細胞を染色したが、F c R I I 陰性の T 細胞は認識されなかった。c）前記細胞の蛍光強度は、単球 / マクロファージを代表する領域 R 2 において見出された。ポジティブコントロールとは対照的に m A b A T 1 0 及び抗血清 m A b G B 3 は F c R I I a 陽性の単球を認識しなかった。d）前記細胞の蛍光強度は、顆粒球を代表する領域 R 3 において見出された。ポジティブコントロールとは対照的に m A b A T 1 0 及び抗血清 m A b G B 3 は F c R I I a 陽性の顆粒球を認識しなかった。

【 0 0 9 7 】

図 5 :

クローニングされた抗体 G B 3 の可変領域。囲み枠の領域は C D R s を示す一方で、下線を引いた末端部はプライマーによって導入されるクローニング人為産物のために異なるかもしれない。a）軽鎖の可変領域；b）重鎖の可変領域。

【 0 0 9 8 】

図 6 :

クローニングされた抗体 C E 5 の可変領域。囲み枠の領域は C D R s を示す一方で、下線を引いた末端部はプライマーによって導入されるクローニング人為産物のために異なるかもしれない。a）軽鎖の可変領域；b）重鎖の可変領域。

【 0 0 9 9 】

図 7 :

免疫化及び F c R I I b に特異的な抗体の産生のために使用したグリコペプチド C D E（126 ~ 137）。

【 0 1 0 0 】

図 8 :

特異的な抗マウス F c R I I b 抗体での S J L マウスの免疫化。S J L j を 2 0 0 μ g の M O G で、0 日目に免疫化した。抗 F c R I I 抗体での処置（5 0 μ g / 週の用量）を 5 日目に開始した。この臨床スコアを毎日観察し、一群につき 8 匹のマウスの平均として示す。

【 0 1 0 1 】

配列番号 1 F c R I I a のアミノ酸配列（図 1 に示したとおり）。

【 0 1 0 2 】

配列番号 2 F c R I I b のアミノ酸配列 (図 1 に示したとおり) 。

【 0 1 0 3 】

配列番号 3 グリコペプチド C D E (1 2 6 - 1 3 7) の配列。

【 0 1 0 4 】

配列番号 4 m A b G B 3 の可変軽鎖領域の核酸配列。

【 0 1 0 5 】

配列番号 5 m A b G B 3 の可変軽鎖領域の相応するアミノ酸配列。

【 0 1 0 6 】

配列番号 6 m A b G B 3 の可変重鎖領域の核酸配列。

10

【 0 1 0 7 】

配列番号 7 m A b G B 3 の可変重鎖領域の相応するアミノ酸配列。

【 0 1 0 8 】

配列番号 8 m A b C E 5 の可変軽鎖領域の核酸配列。

【 0 1 0 9 】

配列番号 9 m A b C E 5 の可変軽鎖領域の相応するアミノ酸配列。

【 0 1 1 0 】

配列番号 1 0 m A b C E 5 の可変重鎖領域の核酸配列。

【 0 1 1 1 】

配列番号 1 1 m A b C E 5 の可変重鎖領域の相応するアミノ酸配列。

20

【 0 1 1 2 】

実施例

実施例 1

シクロ - [N - - (2 - アセチルアミノ - デオキシ - 2 - - グルコピラノシル) - A s n ^{1 3 8} , G l y ^{1 4 1}] - (1 2 9 - 1 4 1) - F c R I I b 2 , C D E (1 2 6 - 1 3 7) の合成。

標準的なアミノ酸誘導体は A l e x i s (Laeufelfingen, Switzerland) から、A s n (N - - 3 , 4 , 6 , - トリ - O - アセチル - 2 - アセチルアミノ - デオキシ - 2 - - グルコピラノシル) - O H のフルオレニルメトキシカルボニル誘導体 (F m o c) は Merck-Novabiochem (Darmstadt, Germany) から、及び予備負荷したクロロトリチル樹脂は Pepchem (Tuebingen, Germany) からである。試薬及び溶媒は市販で入手可能な最高品質のものであり、更なる精製なしに使用した。分析逆相 H P L C を、対称 C ₁₈ カラム (5 μ M , 3 . 9 × 1 5 0 mm , W a t e r s) を用いて W a t e r s 装置 (Eschborn, Germany) において直線勾配溶出により実施した： (1) 0 ~ 1 0 0 % の A 1 5 分間、又は (2) 0 ~ 3 0 % の A 2 0 分間、5 0 % までの A 5 分間、及び 1 0 0 % の A 更に 5 分間、(1 . 5 ml / 分の流速及び 2 1 0 nm での UV 検出) 。この一对の溶出系は (A) アセトニトリル / 2 % H ₃ P O ₄ (9 0 : 1 0) 及び (B) アセトニトリル / 2 % H ₃ P O ₄ (5 : 9 5) 。分取逆相 H P L C を、Abimed 装置 (Langenfeld, Germany) で、N u c l e o s i l C ₁₈ P P N (5 μ m , 1 0 0 , 1 0 × 2 5 0 mm , Macherey-Nagel, Duren, Germany) 及びアセトニトリル中の 0 . 0 8 % のトリフルオロ酢酸 (T F A) (A) 及び水中の 0 . 1 % の T F A の勾配を使用して、1 0 ml / 分の流量で実施した。2 % の A に 7 分間、4 0 % までの A 5 0 分間、及び 7 0 % までの A 更に 5 分間。E S I - M S スペクトルを Perkin-Elmer SCIEX API 165 三重四重極スペクトロメーターで記録した。L C - M S を、N u c l e o s i l C ₁₈ c o l u m n (5 μ m , 1 0 0 , 1 × 2 5 0 mm , Macherey-Nagel) で、水中の 0 . 1 % T F A 及びアセトニトリル中の 0 . 0 8 % の T F A の線形勾配を用いて (流量 : 3 0 μ l / 分 ; 2 1 0 nm での検出) 実施した。

30

40

【 0 1 1 3 】

a) 固相ペプチド合成

線形ペプチド前駆体を、手法により F m o c - G l y - クロロトリチル樹脂 (2 3 2 mg , 0 . 1 3 mmol) で、F m o c / t e r t - ブチル (t B u) 化学の標準的な方法

50

に従い合成した。前記 Fmoc 基を、各工程で 2 回の連続した処理 (3 及び 20 分間) により、N-メチルピロリドン (NMP) 中の 20% のピペリジンで開裂した。Fmoc-Ser(tBu)-OH 及び Fmoc-Phe-PH に関しては二重カップリング (2 × 1 h) を、NMP 中の Fmoc-アミノ酸 / 2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (HBTU) / N-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT) / N,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) (4 : 4 : 4 : 8 eq) で適用し、この際前記グリコシル化 Asn 誘導体を、NMP 中の Fmoc-アミノ酸 (1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)-トリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (PyBOP) / HOBT / DIEA (2 : 2 : 2 : 5 eq) を用いて一重カップリングにより導入した。この反応は、カイザー試験により確認して 5 時間後に完了した。無水酢酸 / DIEA (1 : 1.3 eq) でのカップリング工程を、鎖伸長の前に 10 分間実施した。残りのアミノ酸誘導体 (Arg を、Arg-2, 2, 4, 6, 7-ペンタメチル-ジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル [Pbf] 誘導体として導入した) でのアシル化のために、再度二重カップリング (2 × 1.5 h) を、NMP 中の Fmoc-アミノ酸 / HBTU / HOBT / DIEA (6 : 6 : 6 : 12 eq) で使用した。

10

【0114】

b) 側鎖保護ペプチドの開裂

側鎖保護した線形ペプチドを樹脂から、前記ペプチド樹脂を 5 ml のジクロロメタン (DCM) 中の 1% TFA で 3 分間処理することで開裂した。この濾過物を、薄層クロマトグラフィ (TLC) (CH₃Cl / MeOH / H₂O, 8 : 3 : 1) により、1 ml のメタノール中の 10% ピリジンの添加の前に分析した。この TFA 処理を、前記濾過物に対する TLC コントロールがネガティブになるまで繰り返した (全体で 4 つの処理)。最後に、前記樹脂を DCM 及びトリフルオロエタノールで洗浄し、ペプチド回収を向上させた。このペプチド含有濾過物及び最後の洗浄物を一緒にして、低体積に濃縮した。この残留物を MeOH で希釈し、この生成物を氷冷水で沈殿させた。この粗生成物を濾過により回収し (270 mg, 80% 収率)、分析 HPLC (勾配 1) 及び ESI-MS により特性決定した。7.5 : 2.0 の比にある主ピーク (t_R 9.5 分間; ESI-MS : m/z = 2520 [M+H]⁺; Mr 2519.0 C₁₂₀H₁₈₈N₂₀O₃₆S に対し計算) 及び副ピーク (t_R 9.3 分間; ESI-MS : m/z = 2478 [M-42+H]⁺) はそれぞれ、期待した生成物及び副生成物に相応することが見出された。この質量差は、1 つのアセチル保護基の、Asn (Ac3AcNH-Gln) からの欠失のためであった。

20

30

【0115】

c) 環化

骨格環化を、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) 中の 0.9 mM のペプチド濃度で、PyBOP / HOBT / DIEA (1.5 : 1.5 ; 3.5 eq) の存在下で達成した。この塩基を、1 時間にわたり一部ずつ添加した。この線形ペプチドから環形への変換は、分析 HPLC により観察され、2.5 h 後に完了した。この反応混合物を乾燥させ、この残留物を破碎し、氷冷したジエチルエーテルで洗浄して、DMF の痕跡量を TFA 開裂の前に除去した。

40

【0116】

d) 前記側鎖保護基の開裂

酸不安定性の側鎖保護基を、前記環式ペプチドを氷冷した 10 ml の TFA / トリイソプロピルシラン (TISH) / H₂O (90 : 5 : 5) 中に溶解することで除去した。2 h の振盪後、前記 TFA を減圧下で除去し、この油性残留物を、少量の MeOH で希釈し、この粗生成物を氷冷したジエチルエーテルで沈殿させた。この沈殿物を遠心分離により回収し、複数回氷冷したエーテルで洗浄し、最後に水を除いて凍結乾燥させた。前記粗グリコペプチドは、このトリアセチル化の形態に加え LC-MS によればジアセチル誘導体及びモノアセチル誘導体により汚染されているが、これを MeOH 中に懸濁し、NaOM

50

eを有する部分量で見かけpH > 10に達するまで30分間処理した。前記反応をHPLCにより観察し、3.5時間後に、氷酢酸の添加によりpH < 5になるまで急冷した。この混合物を乾燥させ、この固形物をMeOH中に懸濁し、氷冷したジエチルエーテルで再沈殿させた。この沈殿物を濾過により回収し、かつ水を除いて凍結乾燥させた。この粗生成物を分取HPLCにより精製し、この環式グリコペプチドを凍結乾燥物として単離した；収率：20%収率(0.13mmolの開始樹脂負荷に基づいて)；HPLC：>95% (t_R 勾配2で7.37分間)；ESI-MS：m/z = 1642.8 [M+H]⁺；M = 1641.8 Da (C₇₁H₁₀₈N₂₀O₂₅に対して計算して)。

【0117】

Fc RIIb - CDE (126 ~ 137)を産出するためのCDE (126 ~ 137)の、Fc RIIbに対するカップリング

10

100μlのヒトの可溶性Fc RIIb (10.6mg/ml)を1490μlの50mMのホウ酸(pH 10)及び410μlの前記グリコペプチドCDE (126 ~ 137) (2mg/ml)に添加し、室温で緩やかに攪拌した。100μlの0.3%グルタルアルデヒド溶液をゆっくりと添加し、100μlの1Mグリシンを添加する前にこの全体の混合物をまた2時間RTで攪拌した。この生じるFc RIIb - CDE (126 ~ 137)をまた30分間攪拌し、次いでPBSで透析し濃縮した。

【0118】

実施例2

Fc RIIb - CDE (126 ~ 137)での免疫化

20

メスの六週齢のC57B1/6マウスを腹腔内で、2週間毎に、100μlの完全フロイントアジュバント(CFA、Sigma/Deisenhofen, Germany)中の50μgのFc RIIb - CDE (126 ~ 137)のエマルジョンで3回免疫化した。この最後の免疫化後3週間マウスは、50μgのFc RIIb - CDE (126 ~ 137)でブーストさせた：3日後、脾臓をこの動物から除去し、この抽出した細胞と骨髄腫細胞との融合を、Bazin, 及びLemieux, 1989に従って実施した。

【0119】

実施例3

前記ハイブリドーマのFc RIIb - CDE (126 ~ 137)特異性に関するスクリーニング

30

ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンの存在下で成長できるクローンを単離し、この上清をELISAアッセイにおいて試験し、その際Fc RIIb - CDE (126 ~ 137)を、マイクロタイタープレート上で1ウェルにつき120ngのsFc RIIa/bでプレコートした(100μlのPBS中で、20、12時間)。このプレートを洗浄し、PBS/T (PBS/0.2%のTween 20、30分間)でインキュベートした。100μlのそれぞれのハイブリドーマを、前記ウェルに添加した(100μl、90分間)。このプレートをブロッキングバッファーで、PBS/T中で希釈した100μlのペルオキシダーゼラベル化ヤギ抗マウスIgG + IgM抗体(Dianova, Hamburg/Germany)を添加する前に3回洗浄した。90分間のインキュベーション及びPBS/Tでの引き続き洗浄後、100μlの基質バッファー(0.2Mクエン酸/リン酸バッファー、pH 5.2、4mg/mlのo-フェニレンジアミン、0.024%(v/v)の過酸化水素)を前記ウェルに添加した。この反応を50μkの8N硫酸の添加により停止させ、490nmでの吸光度をELISAリーダーで測定した。

40

【0120】

このアッセイにおいて陽性であったクローンをフローサイトメトリー(FACS)で、1試料当たり10⁵のラジ細胞(ATCC CCL-86)を用いて試験し、前記細胞はヒトFc RIIbを強力に発現する。100μlのハイブリドーマ上清での30分間の氷上でのインキュベーション後、前記細胞を1mlのRPMI/10%FCSで洗浄し、遠心分離(400×g、4、5分間)により沈殿させた。100μlのFITCラベル化したヤギ抗ヒト抗体(Dianova, Hamburg/Germany)を添加した。30分間の氷上でのイ

50

ンキュベーション後前記細胞を洗浄し (RPMI / 10% FCS)、フローサイトメトリー (FACSsort, Becton Dickinson, Heidelberg/Germany) にかけた。この蛍光の中央値を、5000個のカウントした細胞に対して、各試料に対して決定した。前記アッセイにおいて陽性であったハイブリドーマ上清を同様のアッセイに、Fc RII aを強力に発現するU-937細胞 (ATCC CRL-1593.2) を用いて受けさせ、前記ハイブリドーマのFc RII b特異性を決定する。この両方の細胞系に対するポジティブコントロールとして、汎性のFc RII - mAb AT10 (Greenman et al., 1991) を使用した。

【0121】

実施例 4

特異的な抗マウスFc RII抗体を用いたS/JLマウスの免疫化

S/JLマウスを、200 µgのMOGで免疫化し、実験的自己免疫脳脊髄炎 (EAE)、多発性硬化症の樹立した動物モデルを誘発させた。特異的な抗マウスFc RII抗体 (50 µg / 週) を用いた一群につき8匹のマウスの予防性の、また同様に治療性の (データ示さず) 処置は、この疾病の症状 (臨床スコア) を著しく減少させた (0 = 健康、1 = 軽い麻痺、2 = 中間的な麻痺、3 = 強力に麻痺、4 = 完全に麻痺、5 = 死)。この結果は図8に示した。

【0122】

参考文献

【0123】

10

20

【表 1】

- Amigorena, S., Bonnerot, C., Drake, J.R., Choquet, D., Hunziker, W., Guillet, J.G., Webster, P., Sautès, C., Mellman, I., Fridman, W.H. (1992), Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes, *Science* 256, 1808-1812.
- Bazin, R. and Lemieux, R. (1989), Increased proportion of B cell hybridomas secreting monoclonal antibodies of desired specificity in cultures containing macrophage-derived hybridoma growth factor (IL-6). *J. Immunol. Methods* 116, 245-249. 10
- Ceuppens, J.L., Baroja, M.L., van Vaeck, F., Anderson, C.L. (1988), Defect in the membrane expression of high affinity 72kD Fc γ receptors on phagocytic cells in four healthy subjects, *J. Clin. Invest.* 82, 571-578.
- Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., Ravetch, J.V. (2000), Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytotoxicity against tumour targets. *Nature Medicine* 6, No. 4, 443-446. 20
- Engelhardt, W., Geerds, C., Frey, J. (1990), Distribution, inducibility and biological function of the cloned and expressed human γ Fc receptor II, *Eur. J. Immunol.* 20, 1367-1377.
- Fridman, W.H., Bonnerot, C., Daeron, M., Amigorena, S., Teillaud, J.-L., Sautès, C. (1992), Structural bases of Fc γ R functions, *Immunol. Rev.* 125, 49-76.
- Fridman, W.H., Teillaud, J.-L., Bouchard, C., Teillaud, C., Astier, A., Tartour, E., Galon, J., Mathiot, C., Sautès, C. (1993), Soluble Fc γ receptors, *J. Leukocyte Biol.* 54, 504-512. 30
- Greenman, J., Tutt, A.L., George, A.J., Pulford, K.A., Stevenson, G.T., Glennie, M.J. (1991), Characterization of a new monoclonal anti-Fc gamma RII antibody, AT10, and its incorporation into a bispecific F(ab')₂ derivative for recruitment of cytotoxic effectors. *Mol. Immunol.* 28, 1243-1254.
- Homsy, J., Meyer, M., Tateno, M., Clarkson, S., Levy, J.A. (1989), The Fc and not CD4 receptor mediates antibody enhancement of HIV infection in human cells, *Science* 244, 1357-1360. 40

【表 2】

- Isakov N. (1997), ITIMs and ITAMs. The Yin and Yang of antigen and Fc receptor-linked signaling machinery. *Immunol Res.* 16, 85-100.
- Littaua, R., Kurane, I. and Ennis, F.A. (1990), Human IgG FcγR II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection, *J. Immunol.* 144, 3183-3186.
- Metzger, H. (1992A), Transmembrane signaling: The joy of aggregation, *J. Immunol.* 149, 1477-1487. 10
- Metzger, H. (1992B), The receptor with high affinity for IgE, *Immunol. Rev.* 125, 37-48.
- Poo, H., Kraus, J.C., Mayo-Bond, L., Todd, R.F., Petty, H.R. (1995), Interaction of FcγRIIIB with complement receptor type 3 in fibroblast transfectants: evidence from lateral diffusion and resonance energy transfer studies, *J. Mol. Biol.* 247, 597-603.
- Ravel, K., Castelle, C., Defrance, T., Wild, T.F., Charron, D., Lotteau, V., Rabourdincombe, C. (1997), Measles virus nucleocapsid protein binds to FcγRII and inhibits human B cell antibody production. *J. Exp. Med.* 186, 269-278. 20
- Ravetch, J. V. and Bolland, S. (2001), IgG Fc Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 275-290.
- Sondermann, P., Jacob, U., Kutscher, C., Frey J. (1999A), Characterization and crystallization of soluble human Fcγ receptor II (CD32) isoforms produced in insect cells. *Biochemistry.* 38, 8469-8477. 30
- Sondermann, P. and Jacob, U. (1999B), Human Fcγ receptor IIb expressed in *E. coli* reveals IgG binding capability. *Biol Chem.* 380, 717-721.
- Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U. (2000), The 3.2Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-FcγRIII complex. *Nature* 406, 267-273.
- Sondermann P, Kaiser J, Jacob U. (2001), Molecular basis for immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures. *J Mol Biol.* 309, 737-749. 40

【 0 1 2 5 】

【表 3】

van de Winkel, J.G.J. and Capel, P.J.A. (1993), Human IgG Fc receptor heterogeneity: Molecular aspects and clinical implications, *Immunol. Today* 14, 215-221.

Yang, Z., Delgado, R., Xu, L., Todd, R.F., Nabel, E.G., Sanchez, A., Nabel, G.J. (1998), Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins, *Science* 279, 983-984.

Zhou, M.-J., Todd, R.F., van de Winkel, J.G.J., Petty, H.R. (1993), Cocapping of the leukoadhesin molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-associated antigen-1 with FcγRIII on human neutrophils. Possible role of lectin-like interactions, *J. Immunol.* 150, 3030-3041.

10

【図面の簡単な説明】

【0126】

【図1】図1はヒトFcRIIb及びFcRIIaの細胞外ドメインの配列アラインメントを示す図である。

20

【図2】図2はリボン表示におけるFcRIIbの構造を示す図である。

【図3】図3はラジ細胞(FcRIIb陽性及びFcRIIa陰性)(左図)又はU-937細胞(FcRIIa陽性及びFcRIIb陰性)(右図)のFACS測定を示す図である。

【図4】図4は通常の血清(ネガティブコントロール)、FcRIIb-CDE(126~137)で免疫化したマウスの抗血清、mAb AT10、又は特異的なモノクローナル抗体GB3のいずれかで、インキュベーションしたヒトの血液のFACS分析を示す図である。

【図5】図5はクローニングされた抗体GB3の変領域を示す図である。

【図6】図6はクローニングされた抗体CE5の変領域を示す図である。

30

【図7】図7は免疫化及びFcRIIbに特異的な抗体の産生のために使用したグリコペプチドCDE(126~137)を示す図である。

【図8】図8は特異的な抗マウスFcRIIb抗体でのSJLマウスの免疫化を示す図である。

【 図 1 】

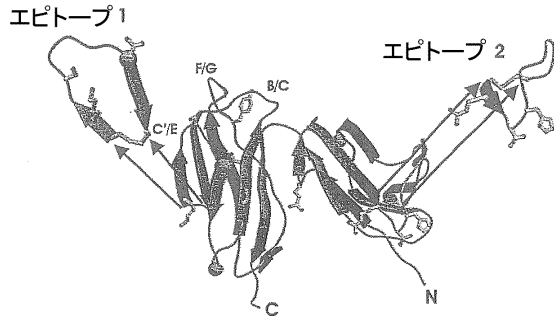
Figure 1:

```

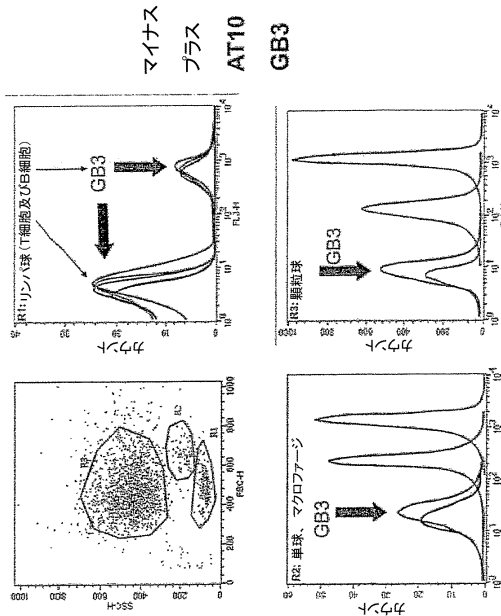
1      10     20     30     40     50     59
FcyRIIa AAPPKAVLKLEPQWVWVNLQEDSVTLTCTGASPESDSIQWFMHGNLIPZTPQPSYRFKAN
FcyRIIb AAPPKAVLKLEPQWVWVNLQEDSVTLTCTGASPESDSIQWFMHGNLIPZTPQPSYRFKAN
.....
60     70     80     90     100    110    119
FcyRIIa NNDSCGYTCQCTGQISLSDPVLHVLVLSWVILQTFHLEFQGSSTLRLACHSNKDKPLVYVT
FcyRIIb NNDSCGYTCQCTGQISLSDPVLHVLVLSWVILQTFHLEFQGSSTLRLACHSNKDKPLVYVT
.....
120    130    140    150    160    170
FcyRIIa FFQNGKSKFSPRSDPQFSPISIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLSSKPFVITVQSP
FcyRIIb FFQNGKSKFSPRSDPQFSPISIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLSSKPFVITVQSP
.....

```

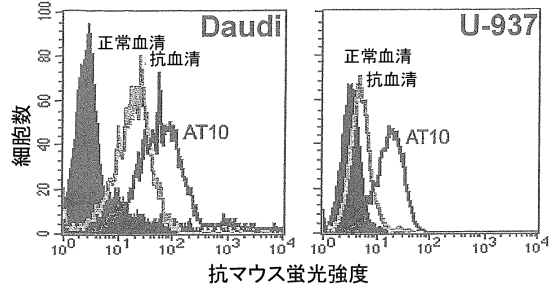
【 図 2 】



【 図 4 】



【 図 3 】



【 図 5 】

a) mAb GB3の可変鎖領域:

```

agaattcaagctgacccagctctccatccctccttattctgcctctctgggagaagagctcagt
R I Q L T Q S P S S L S A S L G E R V S
ctcactgtcgggcaagtcaggaattagtggttacttaagctggcttcagcagaaaacca
L T C R A S Q E I S G Y L S W L Q Q K P
CDR1
gatggaactattaaacgcctgatctacgcccacatccgctttagattctgggtccccaaaa
D G T I K R L I Y A T S A L D S G V P K
CDR2
aggttcagtgccagtggtgtgggtcaaattattctcaccatcagcagccttgagctct
R F S G S G S G S N Y S L T I S S L E S
gaagatttgcagactattactgtctacaatagctaattatccgtacacgcttcggagggg
E D F A D Y Y C L Q Y A N Y P Y T F G G
CDR3
gggaccaaagctg
G T K L

```

b) mAb GB3の可変鎖領域:

```

gtgcagctgcagcagctctggacctgagctggtgaagcctgggcttcagtgaaagatttcc
V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S
tgcaaggctctcggctacacctcactgactactatatactgggtgaaacagtggtcct
C K A S G Y T F T D Y I Y W V K Q W P
CDR1
ggacagggacttgagtgattggaaggattttcctggaactggtaactactactacaat
G Q G L E W I G W I F P G T G N T Y Y N
CDR2
gaaaacttcaaggacaaggccacacttactatagatgacctccagcacagcctacagt
E N F K D K A T L T I D R S S S T A Y M
CDR2 (contd.)
ttgctggcagcctgacctctgaggactctgggtctatttctgtattggtccgitttgct
L L G S L T S E D S A V Y F C Y G P F A
CDR3
tactggggccaa
Y W G Q
CDR3

```

【 図 6 】

mAb CE5 の可変重鎖領域 :

```

tcacaggaatcaggaacctgacctggtggcgccctcacagagcctgtccatcacatgcaccgtct
L Q E S G F G L V A P S Q S L S I T C T V
cagggttctcattaacggcctatggtgtaaacctgggttcgccagcctccaggaagggtctgg
S G F S L T G Y G V N W V R Q P P G K G L
          CDR1
agtggctgggaatgatttgggtgatggaacacagactataattcagctctcaaatccagac
E W L G M I W G D G N T D Y N S A L K S R
          CDR2
tgagcatcagcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagctctgcacactg
L S I S K D N S K S Q V F L K M N S L H T
          CDR3
atgacacagccaggtactactgtgccagagagagattataggcttgactactgggccaag
D D T A R Y Y C A R E R D Y R L D Y W G Q
          CDR3
ggaccacagtcaccgtctcctcag
G T T V T V S S

```

mAb CE5 の可変軽鎖領域 :

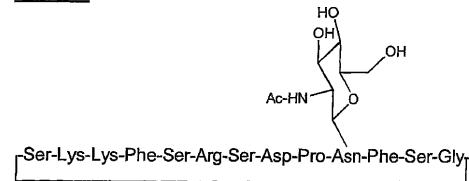
```

ggactcaccacactctccagcctccctttctgctctgtgggagaactgtcaccatcacatgt
E L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T C
cgagcaagtgggaatttcacaattatttagcatggtatcagcagaacagggaaaatctcc
R A S G N I H N Y L A W Y Q Q K Q G K S P
          CDR1
cagctcctggtctattatacaacaaccttagcagatggtgtgccatcaaggtcagtgccagt
Q L L V Y N T T P L A D G V P S R F S G S
          CDR2
ggatcaggaacacaatattctctcaagatcaacagcctgcaacctgaagattttgggagttat
G S G T Q Y S L K I N S L Q P E D F G S Y
          CDR3
tactgtcaacatttttggagtactcctcggacattcggtgagggagccaagctcga
Y C Q H F W S T P R T F G G G T K L E
          CDR3

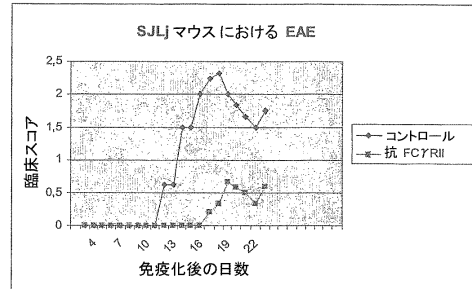
```

【 図 7 】

Figure 7:



【 図 8 】



【 配列表 】

0005652987000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	7/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/00
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/06
A 6 1 P	19/00 (2006.01)	A 6 1 P	19/00
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00 1 0 1
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/08
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 1
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 D

(74)代理人 100099483

弁理士 久野 琢也

(72)発明者 ローベルト フーバー

ドイツ連邦共和国 ゲルメリング シュレジーア シュトラーセ 1 3

(72)発明者 ペーター ゾンダーマン

ドイツ連邦共和国 クライリング マルガレーテンシュトラーセ 5 4アー

(72)発明者 ウーヴェ ヤーコブ

ドイツ連邦共和国 ミュンヘン グルダインシュトラーセ 4 2

(72)発明者 ケルスティン ヴェント

オーストリア国 ヴィーン エネンケルシュトラーセ 8 / 3 0

(72)発明者 カブレーレ キアラ

ドイツ連邦共和国 レーゲンスブルク シュヴァーベルヴァイザーヴェーク 2 2

(72)発明者 ルイス モロダー

ドイツ連邦共和国 マルティンスリート アレクサンダー - フレミング - シュトラーセ 1 0デー

合議体

審判長 郡山 順

審判官 三原 健治

審判官 今村 玲英子

(56)参考文献 特表2002-531086(JP,A)

J. Biol. Chem., Vol. 278, No. 34 (2003) p. 32335 - 323

43

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

PubMed

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE(STN)

WPI

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDream2)

专利名称(译)	与人IgGFc受体IIb (FcγRIIb) 结合的物质		
公开(公告)号	JP5652987B2	公开(公告)日	2015-01-14
申请号	JP2006540399	申请日	2004-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	马普科技促进协会		
申请(专利权)人(译)	马克斯 - 普朗克 - GESELLSCHAFT 楚-Feruderungu 德维托里奥·森沙夫十ER-FAO		
当前申请(专利权)人(译)	马克斯 - 普朗克 - GESELLSCHAFT 楚-Feruderungu 德维托里奥·森沙夫十ER-FAO		
[标]发明人	ローベルトフーバー ペーターゾンダーマン ウーヴェヤーコプ ケルスティンヴェント カブレレーキアラ ルイスモロダー		
发明人	ローベルト フーバー ペーター ゾンダーマン ウーヴェ ヤーコプ ケルスティン ヴェント カブレレー キアラ ルイス モロダー		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/00 A61K39/39 A61K39/395 A61K45/00 A61P7/00 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53 C07K14/735		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P25/28 A61P29/00 C07K14/70535 C07K16/283 C07K2317/34		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61K39/39 A61K39/395.N A61K45/00 A61P7/00 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P25/28 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00.111 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/08 G01N33/53.D		
优先权	2003027000 2003-11-26 EP		
其他公开文献	JP2008502312A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及携带构象区分表位 (CDE) 的新型免疫原和用于产生特异性识别具有非常密切相关的同源物的蛋白质的抗体的免疫方法。特别地，本发明涉及对FcγRIIb或FcγRIIa特异的抗体。

【図3】

