



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒト新生児型 Fc 受容体 (FcRn) へのヒト免疫グロブリン (IgG) の Fc 部分の結合を阻害することができるペプチドであって、以下の配列：

- Gly - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - X<sub>11</sub> -

(式中、

- X<sub>6</sub> は、正電荷アミノ酸、芳香族アミノ酸、正電荷芳香族アミノ酸、およびそのアナログから選択され、

- X<sub>7</sub> は、フェニルアラニンおよびフェニルアラニンアナログから選択され、

- X<sub>8</sub> および X<sub>9</sub> は、グリシン、サルコシン、アスパラギン酸、D-アミノ酸、  
アミノイソ酪酸、およびそのアナログからそれぞれ独立して選択されるか、X<sub>8</sub> は、X<sub>9</sub> と組み合わせた場合、ジペプチド模倣物を形成し、

- X<sub>10</sub> は、アミノ酸およびそのアナログから選択されるか、X<sub>10</sub> は、X<sub>9</sub> と組み合わせた場合、ジペプチド模倣物を形成し、

- X<sub>11</sub> は、チロシンおよびチロシンアナログから選択される)

を含み、

ここで、該ペプチドは 7 ~ 50 アミノ酸長の範囲であり、該ペプチドはヒト FcRn のヒト IgG への結合を阻害する、ペプチド。

## 【請求項 2】

配列：

R<sub>1</sub> - Gly - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - X<sub>11</sub> - R<sub>2</sub>

(式中、

- R<sub>1</sub> は、式：X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> -

を有し、

ここで、

- X<sub>1</sub> は、水素、アシル、およびアミノ酸保護基から選択され、

- X<sub>2</sub> は、存在しないか、アミノ酸、2 ~ 15 アミノ酸長のペプチド、およびそのアナログから選択され、

- X<sub>3</sub> は、存在しないか、X<sub>10</sub>、X<sub>12</sub>、または X<sub>13</sub> と架橋を形成することができるアミノ酸またはそのアナログから選択され、ここで、該架橋は、アミノ末端 - カルボキシ末端架橋、側鎖 - 骨格架橋、および側鎖 - 側鎖架橋から選択され、

- X<sub>4</sub> は、存在しないか、アミノ酸、2 ~ 15 アミノ酸長のペプチド、およびそのアナログから選択され、

- R<sub>2</sub> は、式：- X<sub>12</sub> - X<sub>13</sub> - X<sub>14</sub> - X<sub>15</sub>

を有し、

ここで、

- X<sub>12</sub> は、存在しないか、アミノ酸またはそのアナログであり、

- X<sub>13</sub> は、存在しないか、アミノ酸またはそのアナログであり、

- X<sub>14</sub> は、存在しないか、アミノ酸、2 ~ 15 アミノ酸長のペプチド、およびそのアナログから選択され、

- X<sub>15</sub> は、アミノ基またはカルボキシ保護基である)

を含む、請求項 1 に記載のペプチド。

## 【請求項 3】

配列：

Gly - X<sub>6</sub> - Phe - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - Tyr

を含む、請求項 1 に記載のペプチド。

## 【請求項 4】

前記ペプチドが直鎖である、請求項 3 に記載のペプチド。

## 【請求項 5】

X<sub>10</sub>、X<sub>12</sub>、または X<sub>13</sub> の少なくとも 1 つが、X<sub>3</sub> と架橋を形成することができる

10

20

30

40

50

アミノ酸またはそのアナログであり、該架橋が、アミノ末端 - カルボキシ末端架橋、側鎖 - 骨格架橋、および側鎖 - 側鎖架橋から選択される、請求項 2 に記載のペプチド。

【請求項 6】

$X_3$  が、 $X_{10}$ 、 $X_{12}$ 、または  $X_{13}$  と架橋を形成する、請求項 5 に記載のペプチド。

【請求項 7】

$X_3$  が  $X_{10}$  と架橋を形成する、請求項 6 に記載のペプチド。

【請求項 8】

$X_3$  が  $X_{12}$  と架橋を形成する、請求項 6 に記載のペプチド。

【請求項 9】

$X_3$  が  $X_{13}$  と架橋を形成する、請求項 6 に記載のペプチド。

10

【請求項 10】

アミノ酸の間に 9 個のアミノ酸が存在し、該アミノ酸が架橋を形成する、請求項 6 に記載のペプチド。

【請求項 11】

前記架橋がアミノ末端 - カルボキシ末端架橋である、請求項 6 に記載のペプチド。

【請求項 12】

前記架橋が側鎖 - 骨格架橋である、請求項 6 に記載のペプチド。

【請求項 13】

前記架橋が側鎖 - 側鎖架橋である、請求項 6 に記載のペプチド。

【請求項 14】

前記側鎖 - 側鎖架橋が、ジスルフィド架橋、エーテル架橋、チオエーテル架橋、アルケン架橋、またはアミド架橋である、請求項 13 に記載のペプチド。

20

【請求項 15】

前記側鎖 - 側鎖架橋が、

- システインとシステインとの間、
- システインとホモシステインとの間、
- システインとペニシラミンとの間、
- ホモシステインとホモシステインとの間、
- ホモシステインとペニシラミンとの間、および
- ペニシラミンとペニシラミンとの間

30

のジスルフィド架橋である、請求項 14 に記載のペプチド。

【請求項 16】

前記側鎖 - 側鎖架橋が、

- アスパラギン酸とリジンとの間、
- アスパラギン酸とオルニチンとの間、
- アスパラギン酸と 2, 4 - ジアミノ酪酸との間、 ;
- アスパラギン酸と 2, 3 - ジアミノプロピオン酸との間、
- グルタミン酸とリジンとの間、
- グルタミン酸とオルニチンとの間、
- グルタミン酸と 2, 4 - ジアミノ酪酸との間、
- グルタミン酸と 2, 3 - ジアミノプロピオン酸との間

40

のアミド架橋である、請求項 14 に記載のペプチド。

【請求項 17】

少なくとも 1 つのシステインを含む、請求項 2 に記載のペプチド。

【請求項 18】

前記少なくとも 1 つのシステインが、

- ホモシステイン、
- D - システイン、および
- ペニシラミン

から選択されるシステインアナログである、請求項 17 に記載のペプチド。

50

## 【請求項 19】

X<sub>8</sub> および X<sub>9</sub> の少なくとも 1 つが、

- グリシン、
- D - アミノ酸、
- - アミノイソ酪酸、および
- サルコシン

から選択される、請求項 1 または請求項 2 に記載のペプチド。

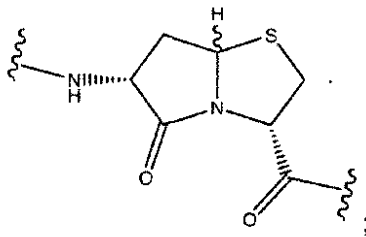
## 【請求項 20】

X<sub>8</sub> は、X<sub>9</sub> と組み合わせて、

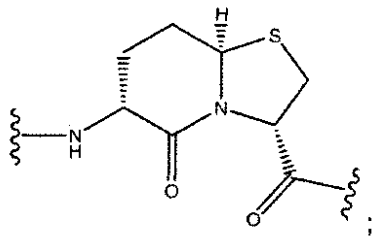
- - アラニン、
- 4 - アミノブタン酸、
- 5 - アミノペンタン酸、
- 3 - (アミノメチル)安息香酸、
- 4 - (アミノメチル)安息香酸、
- 3 - (アミノフェニル)酢酸、
- 4 - (アミノフェニル)酢酸、および

10

## 【化 1】



20



30

- 3 - アミノ - 2 - オキソ - 1 - ピペリジン - 酢酸、
- (3R) - 3 - アミノ - 2 - オキソ - 1 - ピペリジン - 酢酸、
- (3R) - 3 - アミノ - 2 - オキソ - 1 - アゼピン酢酸、
- (3R) - 3 - アミノ - 2 - オキソ - 1 - ピロリジン酢酸、
- (3R) - 3 - アミノ - 1 - カルボキシメチル - バレロラクタム、および
- 3 - アミノ - N - 1 - カルボキシメチル - 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロ - 1H - [1] - ベンゾアゼピン - 2 - オンから選択されるジペプチド模倣物を形成する、請求項 1 または請求項 2 に記載のペプチド。

## 【請求項 21】

40

少なくとも 1 つのフェニルアラニンがフェニルアラニンアナログであり、それぞれの該少なくとも 1 つのフェニルアラニンアナログが、

- トリプトファン、
- チロシン、
- 2 - アミノフェニルアラニン、
- 3 - アミノフェニルアラニン、
- 4 - アミノフェニルアラニン、
- ペンタフルオロフェニルアラニン、
- 2 - ピリジルアラニン、
- 3 - ピリジルアラニン、

50

- 4 - ニトロフェニルアラニン、
- 1 - ナフチルアラニン、
- ホモフェニルアラニン、
- フェニルグリシン、
- 2 - メチルフェニルアラニン、
- 3 - メチルフェニルアラニン、
- 4 - メチルフェニルアラニン、
- 2 - クロロフェニルアラニン、
- 3 - クロロフェニルアラニン、
- 4 - クロロフェニルアラニン、
- 3, 3 - ジフェニルアラニン、
- 4, 4' - ビフェニルアラニン、
- 4 - t - ブチルフェニルアラニン、
- シクロヘキシルアラニン、
- (4 - アミノアセチル) フェニルアラニン、
- L - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロイソキノリン - 3 - カルボン酸、
- D - - メチルフェニルアラニン、および
- L - - メチルフェニルアラニン

10

から独立して選択される、請求項 1 または請求項 2 に記載のペプチド。

【請求項 22】

少なくとも 1 つのチロシンがチロシンアナログであり、それぞれの該少なくとも 1 つのチロシンアナログが、

- フェニルアラニン、
- 4 - アミノフェニルアラニン、
- 4 - メトキシフェニルアラニン、
- ペンタフルオロフェニルアラニン、
- 2 - ピリジルアラニン、
- 3 - ピリジルアラニン、
- 4 - ピリジルアラニン、
- 4 - ニトロフェニルアラニン、
- 2 - ニトロチロシン、および
- 4 - フルオロフェニルアラニン

30

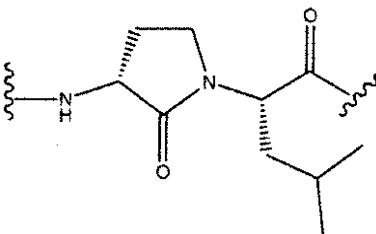
から独立して選択される、請求項 1 または請求項 2 に記載のペプチド。

【請求項 23】

X<sub>9</sub> および X<sub>10</sub> が、組み合わせられて、

- D, L - フリーディングーラクタム

【化 2】

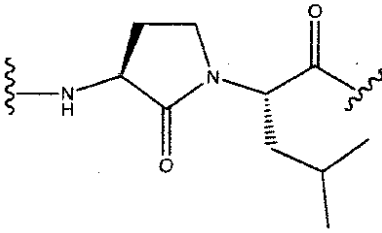


40

および

- L, L - フリーディングーラクタム

## 【化 3】



から選択されるジペプチド模倣物を形成する、請求項 1 または請求項 2 に記載のペプチド。

10

## 【請求項 2 4】

少なくとも 1 つのヒスチジンがヒスチジンアナログであり、それぞれの該少なくとも 1 つのヒスチジンアナログが、

- 2, 4 - ジアミノ酪酸、
- チアゾリルアラニン、
- 2, 3 - ジアミノプロピオン酸、
- グアニルアラニン、
- 2 - ピリジルアラニン、
- 3 - ピリジルアラニン、
- 4 - ピリジルアラニン、
- チエニルアラニン、
- オルニチン、
- リジン、
- アルギニン、
- 4 - グアニルフェニルアラニン、
- 1 - メチルヒスチジン、
- 3 - メチルヒスチジン、
- 1, 3 - ジメチルヒスチジン、
- 4 - アミノフェニルアラニン、
- 2 - ピロリジニルアラニン、
- 3 - ピベルジルアラニン、および
- 4 - ピペリジルアラニン

20

30

から独立して選択される、請求項 1 または請求項 2 に記載のペプチド。

## 【請求項 2 5】

$X_2$  が、アミノ酸、2 または 3 アミノ酸長のペプチド、およびそのアナログから選択される、請求項 2 に記載のペプチド。

## 【請求項 2 6】

$X_6$  が、リジン、オルニチン、2, 4 - ジアミノ酪酸、2, 3 - ジアミノプロピオン酸、アルギニン、グアニルアラニン、およびそのアナログから選択される正電荷アミノ酸またはそのアナログである、請求項 1 または請求項 2 に記載のペプチド。

40

## 【請求項 2 7】

$X_6$  が、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびそのアナログから選択される芳香族アミノ酸またはそのアナログである、請求項 1 または請求項 2 に記載のペプチド。

## 【請求項 2 8】

$X_6$  が、ヒスチジン、1 - メチルヒスチジン、2 - ピリジルアラニン、3 - ピリジルアラニン、4 - ピリジルアラニン、4 - アミノフェニルアラニン、4 - グアニルフェニルアラニン、チアゾリルアラニン、およびそのアナログから選択される正電荷芳香族アミノ酸である、請求項 1 または請求項 2 に記載のペプチド。

## 【請求項 2 9】

50

X<sub>6</sub> が 4 - グアニルフェニルアラニンおよびそのアナログである、請求項 28 に記載のペプチド。

【請求項 30】

X<sub>6</sub> が、ヒスチジン、3 - ピリジルアラニン、4 - ピリジルアラニン、4 - グアニルフェニルアラニン、およびそのアナログから選択される、請求項 1 または請求項 2 に記載のペプチド。

【請求項 31】

X<sub>6</sub> が、ヒスチジンおよびそのアナログから選択される、請求項 30 に記載のペプチド。

【請求項 32】

X<sub>10</sub> が、中性および疎水性アミノ酸およびそのアナログから選択される、請求項 1 または請求項 2 に記載のペプチド。

10

【請求項 33】

前記ペプチドが多量体である、請求項 1 または請求項 2 に記載のペプチド。

【請求項 34】

前記ペプチドが、二量体、三量体、または四量体である、請求項 33 に記載のペプチド。

【請求項 35】

前記ペプチドが二量体である、請求項 34 に記載のペプチド。

【請求項 36】

ヒト新生児型 Fc 受容体 (FcRn) へのヒト免疫グロブリン (IgG) の Fc 部分の結合を阻害することができるペプチドであって、

20

a) Q R F C T G H F G G L Y P C N G P (配列番号 1)、G G G C V T G H F G G I Y C N Y Q (配列番号 2)、K I I C S P G H F G G M Y C Q G K (配列番号 3)、P S Y C I E G H I D G I Y C F N A (配列番号 4)、および N S F C R G R P G H F G G C Y L F (配列番号 5) から選択されるアミノ酸配列、

b) a) と実質的に同一であるアミノ酸配列、

c) a) と 80% 同一であるアミノ酸配列、

d) a) と比較して、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの欠失変異、置換変異、または付加変異を有するアミノ酸配列、

e) 少なくとも1つのアミノ酸置換によって修飾された a) のアミノ酸配列であって、該少なくとも1つのアミノ酸が、天然に存在するアミノ酸に置換される、アミノ酸配列、

30

f) 少なくとも1つのアミノ酸置換によって修飾された a) のアミノ酸配列であって、該少なくとも1つのアミノ酸が、D - アミノ酸およびそのアナログに置換される、アミノ酸配列、

g) 少なくとも1つのアミノ酸置換によって修飾された a) のアミノ酸配列であって、該少なくとも1つのアミノ酸が、N - メチル化アミノ酸に置換される、アミノ酸配列、

h) 少なくとも1つのアミノ酸置換によって修飾された a) のアミノ酸配列であって、該少なくとも1つのアミノ酸が、天然に存在しないアミノ酸に置換される、アミノ酸配列、および

i) 少なくとも1つのアミノ酸置換によって修飾された a) のアミノ酸配列であって、該少なくとも1つのアミノ酸が、アミノ酸模倣物に置換される、アミノ酸配列を含み、

40

ここで、該ペプチドがヒト FcRn のヒト IgG への結合を阻害する、ペプチド。

【請求項 37】

前記 c) のアミノ酸配列が、a) と少なくとも 90% 同一である、請求項 36 に記載のペプチド。

【請求項 38】

請求項 36 に記載のペプチドを含む二量体。

【請求項 39】

前記二量体が、還元的アルキル化の生成物である、請求項 35 または請求項 38 に記載の二量体。

50

## 【請求項 40】

前記二量体が、各ペプチド単量体と多価リンカーとの間の反応生成物である、請求項 35 または請求項 38 に記載の二量体。

## 【請求項 41】

前記多価リンカーが、チオール酸リンカー、アルコールリンカー、およびアミンリンカーから選択される、請求項 40 に記載の二量体。

## 【請求項 42】

前記ペプチドが三量体である、請求項 36 に記載のペプチド。

## 【請求項 43】

前記ペプチドがヒト FcRn に特異的に結合する、請求項 1、請求項 2、または請求項 36 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

10

## 【請求項 44】

前記ヒト FcRn に対するペプチドの親和性が 50 fM ~ 1 mM の範囲である、請求項 43 に記載のペプチド。

## 【請求項 45】

前記ヒト FcRn に対するペプチドの親和性が 500 fM ~ 100 μM の範囲である、請求項 43 に記載のペプチド。

## 【請求項 46】

前記ヒト FcRn に対するペプチドの親和性が 5 pM ~ 1 μM の範囲である、請求項 43 に記載のペプチド。

20

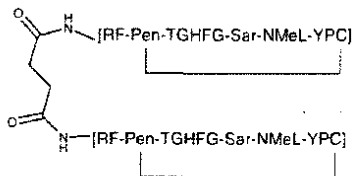
## 【請求項 47】

前記ペプチドがヒト FcRn のヒト IgG への結合を阻害し、IC<sub>50</sub> が 50 fM ~ 1 mM の範囲である、請求項 1、請求項 2、または請求項 36 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 48】

以下の構造（配列番号 319）：

## 【化 4】



30

を含むペプチド。

## 【請求項 49】

別の分子と共に請求項 1、請求項 2、または請求項 36 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含む融合物。

## 【請求項 50】

前記分子が、ポリエチレングリコール (PEG)、アルブミン、トランスフェリン、および免疫グロブリンの Fc 部分から選択される、請求項 49 に記載の融合物。

40

## 【請求項 51】

前記分子が免疫グロブリンの Fc 部分である、請求項 50 に記載の融合物。

## 【請求項 52】

前記免疫グロブリンが、IgG1、IgG2、IgG3、および IgG4 から選択される、請求項 51 に記載の融合物。

## 【請求項 53】

治療有効量の請求項 1、請求項 2、または請求項 36 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含む薬学的組成物。

## 【請求項 54】

前記治療有効量のペプチドが、ペプチドでの処置前のヒト IgG の血清濃度と比較して、

50

ヒト I g G の血清濃度を減少させることができる、請求項 5 3 に記載の組成物。

【請求項 5 5】

前記ヒト I g G の血清濃度の減少が少なくとも 5 % である、請求項 5 4 に記載の組成物。

【請求項 5 6】

前記ヒト I g G の血清濃度の減少が少なくとも 1 5 % である、請求項 5 5 に記載の組成物。

【請求項 5 7】

前記ヒト I g G の血清濃度の減少が少なくとも 2 5 % である、請求項 5 6 に記載の組成物。

【請求項 5 8】

細胞を治療有効量の請求項 1、請求項 2、または請求項 3 6 のいずれか 1 項に記載のペプチドと接触させる工程を含む、病状の調節方法。

【請求項 5 9】

前記細胞が F c R n を発現する、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

I g G の血清濃度の調整によって前記病状を調節する工程をさらに含む、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記 I g G が治療タンパク質に特異的である、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記治療タンパク質がエリスロポエチンである、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記 I g G が遺伝子治療ベクターに特異的である、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記病状が、炎症性疾患、自己免疫疾患、および癌から選択される、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記自己免疫疾患が、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性リンパ増殖性症候群 ( a l p s )、自己免疫性血小板減少性紫斑 ( a t p )、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアック病 - 疱疹性皮膚炎、慢性疲労免疫機能障害症候群 ( c f l d s )、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー、瘢痕性類天疱瘡、c R E s t 症候群、寒冷凝集素病、クローン病、デゴス病、皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、円板状狼瘡、本態性混合性クリオグロブリン血症、線維筋痛 - 線維筋炎、グレーブス病、ギラン・バレー橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病 ( I t p )、I g A 腎症、インスリン依存型糖尿病、若年性関節炎、扁平苔癬、狼瘡、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症 ( m G )、天疱瘡、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、全身強直症候群、高安動脈炎、側頭動脈炎 / 巨細胞動脈炎、移植片拒絶、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、脈管炎、白斑、およびウェゲナー肉芽腫症から選択される、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記自己免疫疾患が、水疱性類天疱瘡、特発性血小板減少性紫斑病 ( I T P )、重症筋無力症 ( M G )、天疱瘡、および移植片拒絶から選択される、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記天疱瘡が尋常性天疱瘡である、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記病状が炎症性疾患から選択される、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 9】

10

20

30

40

50

前記炎症性疾患が、喘息、潰瘍性大腸炎および炎症性腸疾患症候群、アレルギー（アレルギー性鼻炎／副鼻腔炎、皮膚アレルギー（蕁麻疹（*urticaria*）／蕁麻疹（*hives*）、血管性浮腫、アトピー性皮膚炎）、食物アレルギー、薬物アレルギー、昆虫アレルギーが含まれる）、肥満細胞症、関節炎（骨関節炎、関節リウマチ、および脊椎関節症が含まれる）から選択される、請求項 68 に記載の方法。

【請求項 70】

前記治療タンパク質が凝固因子である、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 71】

前記凝固因子が、フィブリノゲン、プロトロンビン、第 V 因子、第 V I I 因子、第 V I I I 因子、第 I X 因子、第 X 因子、第 X I 因子、第 X I I 因子、第 X I I I 因子、またはフォンウィルブランド因子から選択される、請求項 70 に記載の方法。

10

【請求項 72】

前記凝固因子が第 V I I I 因子である、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 73】

F c R n の検出方法であって、請求項 1、請求項 2、または請求項 36 のいずれか 1 項に記載のペプチドを放射性同位体、検出可能な生成物を有する酵素、フルオロフォア、化学発光化合物、磁性粒子、マイクロスフィア、ナノスフィア、ビオチン、ストレプトアビジン、およびジゴキシンから選択される検出可能な標識で標識する工程を含む、方法。

【請求項 74】

前記検出方法が診断キットを含む、請求項 73 に記載の方法。

20

【請求項 75】

ペプチド二量体の合成方法であって、固相ペプチド合成を行う第 1 の工程、該固相樹脂を 2 つの隣接ペプチドと反応して結合することができる分子で処理を行う第 2 の工程、および結合した該ペプチドを該樹脂から放出させる第 3 の工程を含む、方法。

【請求項 76】

F c R n を精製する方法であって、

( a ) 請求項 1、請求項 2、または請求項 36 のいずれか 1 項に記載のペプチドを固体支持体に固定する工程、

( b ) F c R n を含む溶液を固体支持体上の固定ペプチドと接触させる工程、および

( c ) 該固体支持体からの溶液の分離によって F c R n を精製する工程

30

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権出願

本願は、2006年2月17日に出願された米国仮特許出願第60/774,853号、および2006年6月23日に出願された米国仮特許出願第60/805,634号に対する優先権を主張する。

【0002】

発明の分野

40

本発明は、一般に、免疫調節薬分野に関する。より具体的には、本発明は、新生児型 F c 受容体 ( F c R n ) に結合して免疫グロブリン G ( I g G ) の F c 部分への F c R n の結合を阻害し、それにより、血清 I g G レベルを調整するペプチドに関する。本発明は、さらに、F c R n が血清中の I g G レベルの維持に関連する細胞機構で機能するのを防止することができる F c R n 活性のペプチドモジュレーター、かかるペプチドを含む薬物、およびかかる薬物の投与による血清中の I g G レベルの低下によって緩和することができる疾患および障害を罹患した被験体の治療方法に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

50

血清中の最も豊富な抗体アイソタイプはIgGであり、これは、病原体に対する防御の媒介ならびに組織、粘膜、および皮膚表面への免疫系成分の動員を促進するアレルギー反応および炎症反応の媒介で極めて重要な役割を果たす。Junghans, *Immunologic Research* 16(1):29(1997)。さらに、IgGは、多様な自己免疫疾患の重要な成分でもある。

#### 【0004】

正常な条件下で、IgGの血清半減期は、他の血漿タンパク質の血清半減期に関連して延長される。例えば、IgGの血清半減期は、マウスで5~7日であり、ヒトで22~23日である。Roopenianら, *J. Immunology* 170:3528(2003); Junghans and Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5512(1996)。部分的には、IgGのこの長い半減期は、Fc受容体であるFcRnへのその結合に起因する。FcRnは、Fcとして公知のIgGの定常領域に結合する。FcRnは、母親のIgGの新生児輸送受容体(neonatal transport receptor)として最初に特徴づけられたが、成人でもIgGを分解から防御するように機能する。FcRnは、飲作用したIgGに結合してIgGを分解性リソソームから防御し、これを再利用して細胞外区画に戻す。Junghans and Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5512(1996), Roopenianら, *J. Immunology* 170:3528(2003)。IgGの濃縮によって利用可能なFcRnを超えるレベルに達した場合、非結合IgGは分解機構から防御されず、最終的に血清半減期がより短くなる。Brambellら, *Nature* 203:1352(1964)。さらに、FcRnが細胞表面上に発現するにもかかわらず、多くのFcRnは細胞内に存在し、小胞体膜に会合し、IgGが細胞に飲作用された後にIgGとFcRnとの間の相互作用が細胞内で起こると考えられる。

#### 【0005】

構造的に、FcRnは、ベータ( )と呼ばれる1つの軽鎖およびアルファ( )鎖と呼ばれる1つの非共有結合重鎖から構成されるヘテロ二量体として存在する。FcRnの軽鎖(  $\alpha_2$ -ミクログロブリン(  $\alpha_2$ m)としてより公知である)はまた、主要組織適合性遺伝子複合体I(MHC I)の成分である。FcRnの  $\alpha$ 鎖は、3つのサブドメイン1、2、および3に分類される細胞外ドメイン、膜貫通領域、および比較的短い細胞質テールから構成される46kDのタンパク質である。Burmeisterら, *Nature* 372:336(1994)。

#### 【0006】

FcRnは、新生児ラットの消化管中で最初に同定され、母乳からのIgG抗体の吸収を媒介し、循環系へのその輸送を促進するように機能する。Leachら, *J. Immunology* 157:3317(1996)。FcRnはヒト胎盤からも単離されており、胎児循環系への母親のIgGの吸収および輸送を媒介する。成体では、FcRnは、上皮組織中に発現される(米国特許第6,030,613号および同第6,086,875号)(肺(Israelら, *Immunology* 92:69(1997))、腸および腎近位尿細管の上皮(Kobayashiら, *Am. J. Physiol.* (2002); *Renal Physiol.* 282:F358(2002))、ならびに鼻、膈、および胆道系の表面などであるが、これらに限定されない)。さらに、内皮細胞上のFcRnの遍在性発現は、IgGホメオスタシスのその重要性を連想させる。Wardら, *International Immunology* 15(2):187(2002); Ghetieら, *Eur. J. Immunology* 26:690(1996)。

#### 【0007】

一般に、FcRnは、IgGのFc部分への結合によるIgGの異化の拮抗によって、IgGホメオスタシスで機能する。一旦飲作用されると、IgGは、細胞内液胞中に捕捉され、酸性初期エンドソームと融合し始める。結晶学的研究により、FcRn-IgG複合体の化学量論は、2分子のFcRnに対して1分子のIgGから構成され(Burme

10

20

30

40

50

isterら, Nature 372:336(1994)、CH<sub>2</sub>およびCH<sub>3</sub>ドメインの接触面付近のIgGのFc部分で2分子の結合が起こると考えられる(Burmeisterら, Nature 372:379(1994))。エンドソーム融合事象は、リソソーム分解経路の1段階に相当し、これにより、エンドソーム内に含まれる複合生体分子が構成成分に分解または異化される。初期エンドソームの低pH環境により、IgGのFcRnへの結合およびIgGに結合した任意の抗原の放出が促進される。その結果、抗原が分解され、FcRn-IgG複合体の分解が回避され、最終的に、細胞表面に再循環し、細胞外環境の生理学的pHにより、FcRnからのIgGの放出が促進される。

【0008】

IgGホメオスタシスへのFcRnの寄与を研究するために、<sub>2</sub>mおよびFcRn重鎖をコードする遺伝子の少なくとも一部が「ロックアウト」され、その結果これらのタンパク質が発現されないようにマウスを操作した。WO02/43658; Jung Hans and Anderson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5512(1996)。これらの両ロックアウトマウス系統では、血清中のIgGの半減期および濃度は劇的に減少し、FcRn依存機構がIgGホメオスタシスに関連することが示唆される。

10

【0009】

FcRnへのIgG結合の阻害は、IgG再利用の防止によってIgG血清半減期が減少する。したがって、FcRnへのIgGの結合を遮断または拮抗する薬剤を、免疫反応に關与する障害(例えば、自己免疫疾患および炎症性疾患など)および不適切に発現したIgG抗体の存在によって特徴づけられる障害を調節、治療、または防止する方法で使用することができる。FcRnへのIgGのFcを遮断する方法の一例は、FcRnに対する遮断抗体の生成を含む。実際、FcRnのIgGとの結合を遮断することができる抗体は、FcRn重鎖ロックアウトマウス系統を使用して生成されている(特許文献1)。最近、FcRn複合体に結合するペプチドが同定された。非特許文献1; 特許文献2。しかし、現時点では、免疫反応によって特徴づけられる容態、疾患、および障害を調節、治療、または防止するために、さらなる薬剤が必要である。

20

【特許文献1】国際公開第02/43658号パンフレット

【特許文献2】米国特許第6,212,022号明細書

【非特許文献1】Kolonińら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(20):13055-60(2002)

30

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0010】

発明の要旨

したがって、本発明は、FcRnに特異的に結合してFcRnへのIgG Fcの結合を阻害し、それにより、リソソームによる分解からIgGを防御する役割でFcRnが機能するのを妨害することによってIgGが再利用されるのを防止するペプチドを提供する。例示的实施形態では、ペプチドは、FcRnに結合してFcのIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4サブクラスのFcRnへの結合を阻害する。

40

【0011】

いくつかの実施形態では、本発明のペプチドは、以下の配列:

- Gly - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - X<sub>11</sub> -

(式中、

- X<sub>6</sub>は、正電荷アミノ酸、芳香族アミノ酸、正電荷芳香族アミノ酸、およびそのアナログから選択され、

- X<sub>7</sub>は、フェニルアラニンおよびフェニルアラニンアナログから選択され、

- X<sub>8</sub>およびX<sub>9</sub>は、グリシン、サルコシン、アスパラギン酸、D-アミノ酸、アミノイソ酪酸、およびそのアナログからそれぞれ独立して選択されるか、X<sub>8</sub>は、X<sub>9</sub>と組み合わせた場合、ジペプチド模倣物を形成し、

50

-  $X_{10}$  は、アミノ酸およびそのアナログから選択されるか、 $X_{10}$  は、 $X_9$  と組み合わせた場合、ジペプチド模倣物を形成し、

-  $X_{11}$  は、チロシンおよびチロシナンalogから選択される)を含む。

【0012】

あるいは、本発明のペプチドは、以下の配列：

$R_1 - Gly - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - R_2$

(式中、

-  $R_1$  は、式： $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 -$

を有し、

ここで、

-  $X_1$  は、水素、アシル、およびアミノ酸保護基から選択され、

-  $X_2$  は、存在しないか、アミノ酸、2～15アミノ酸長のペプチド、およびそのアナログから選択され、

-  $X_3$  は、存在しないか、 $X_{10}$ 、 $X_{12}$ 、または $X_{13}$ と架橋を形成することができるアミノ酸またはそのアナログから選択され、ここで、架橋は、アミノ末端-カルボキシ末端架橋、側鎖-骨格架橋、および側鎖-側鎖架橋から選択され、

-  $X_4$  は、存在しないか、アミノ酸、2～15アミノ酸長のペプチド、およびそのアナログから選択され、

-  $X_6$ 、 $-X_7$ 、 $-X_8$ 、 $-X_9$ 、 $-X_{10}$  および  $-X_{11}$  は上記定義の通りであり、

-  $R_2$  は、式： $-X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15}$

を有し、

ここで、

-  $X_{12}$  は、存在しないか、アミノ酸またはそのアナログであり、

-  $X_{13}$  は、存在しないか、アミノ酸またはそのアナログであり、

-  $X_{14}$  は、存在しないか、アミノ酸、2～15アミノ酸長のペプチド、およびそのアナログから選択され、

-  $X_{15}$  は、アミノ基またはカルボキシ保護基である)を含み得る。

【0013】

本発明のペプチドは、典型的には、少なくとも7アミノ酸長且つ50アミノ酸長までである。本発明のペプチドは、多量体(例えば、二量体、三量体、または四量体など)として存在することができる。いくつかの実施形態では、本発明のペプチドは、飲作用により感受性が高く、より迅速にペプチドに結合することができ、その結果、腎臓による排出が少ない。本発明は、さらに、1つまたは複数の本発明のペプチドを含む薬学的組成物に関する。

【0014】

本発明のペプチドは、

a) Q R F C T G H F G G L Y P C N G P (配列番号1)、G G G C V T G H F G G I Y C N Y Q (配列番号2)、K I I C S P G H F G G M Y C Q G K (配列番号3)、P S Y C I E G H I D G I Y C F N A (配列番号4)、およびN S F C R G R P G H F G G C Y L F (配列番号5)から選択されるアミノ酸配列、

b) 1つまたは複数の配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、および配列番号5と実質的に同一であるアミノ酸配列、

c) 1つまたは複数の配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、および配列番号5と80%同一であるアミノ酸配列、

d) 1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの欠失変異、置換変異、または付加変異を有する配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、または配列番号5、

e) 少なくとも1つのアミノ酸が、天然に存在するアミノ酸に置換された、少なくとも1つのアミノ酸置換によって修飾された配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、または配列番号5、

f) 少なくとも1つのアミノ酸が、D-アミノ酸およびそのアナログに置換された、

10

20

30

40

50

少なくとも1つのアミノ酸置換によって修飾された配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、または配列番号5、

g) 少なくとも1つのアミノ酸が、N-メチル化アミノ酸に置換された、少なくとも1つのアミノ酸置換によって修飾された配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、または配列番号5、

h) 少なくとも1つのアミノ酸が、天然に存在しないアミノ酸に置換された、少なくとも1つのアミノ酸置換によって修飾された配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、または配列番号5、および

i) 少なくとも1つのアミノ酸が、アミノ酸模倣物に置換された、少なくとも1つのアミノ酸置換によって修飾された配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、または配列番号5を含み得る。

10

#### 【0015】

本発明は、さらに、FcRnに結合してIgG分子のFc部分へのFcRnの結合を防止することができる1つまたは複数の本発明のペプチドを含む治療有効量の組成物を被験体に投与する工程を含む、被験体の血清中のIgGレベルを調節する方法に関する。一定の実施形態では、本発明の方法を使用して、被験体の血清中の可溶性IgGの半減期を減少させる。本発明の組成物の投与により、被験体の血清中の可溶性IgGの半減期が、ペプチド投与前の被験体の血清中のIgGの半減期と比較して減少する。

#### 【0016】

本発明は、さらに、治療前のIgGの血清濃度と比較して、FcRnに対するIgGのFc部分の血清濃度を減少させるFcRnへのヒトIgGのFc部分の結合を阻害する方法に関する。IgGの血清濃度を減少させる方法は、FcRnに結合してIgG分子のFc部分へのFcRnの結合を防止することができる1つまたは複数の本発明のペプチドを含む治療有効量の組成物を被験体に投与する工程を含む。1つの実施形態では、ヒトIgGの血清濃度の減少は、少なくとも5%（少なくとも15%の減少または少なくとも25%のヒトIgGの血清濃度の減少など）である。

20

#### 【0017】

本発明の1つの実施形態は、FcRnに結合してIgG分子のFc部分へのFcRnの結合を防止することができる1つまたは複数の本発明のペプチドを含む治療有効量の組成物を被験体に投与する工程を含む、少なくとも1つの自己免疫疾患を有する被験体を治療する方法を提供する。本発明の別の実施形態は、FcRnに結合してIgG分子のFc部分へのFcRnの結合を防止することができる1つまたは複数の本発明のペプチドを含む治療有効量の組成物を被験体に投与することによって少なくとも1つの炎症性障害を有する被験体の治療する方法を提供する。他の実施形態では、本発明の方法を使用して、治療タンパク質または遺伝子治療ベクターに対する免疫応答を防止、治療、または調節することができる。

30

#### 【0018】

本発明のさらなる実施形態、目的、および利点を、以下の説明に記載し、説明からその一部が明らかとなるか、本発明の実施によって確認することができる。添付の特許請求の範囲で特に指摘した要素および組み合わせを用いて、本発明のこれらの実施形態、目的、および利点を実現および達成することができる。

40

#### 【0019】

前述の一般的説明および以下の詳細な説明の両方が例示および説明のみを目的とし、特許請求の範囲に記載の発明を制限しないと理解すべきである。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0020】

##### 実施形態の説明

##### 1. 定義

「親和性」は、結合相互作用の強度を示す2つの生物活性分子間の結合相互作用の特徴をいう。親和性の測定値を、解離定数( $K_D$ )として報告する。 $K_D$ は、特定の条件下で

50

生物学的に活性な分子がその結合パートナーともはや結合しなくなり始める（解離し始める）生物学的に活性な分子を含む溶液の濃度（通常、nM、pM、またはfMで報告する）である。親和性強度は、 $K_D$  値と反比例する。

#### 【0021】

本明細書中で使用される場合、用語「アミノ酸」は、カルボン酸基およびアミノ基を含む化合物をいう。例えば、アミノ酸は、構造式： $H_2N - [C(R)(R')]_n - C(O)OH$ （式中、 $n$ は1以上の整数であり、 $R$ および $R'$ は、水素およびアミノ酸側鎖から独立して選択され、 $R$ および $R'$ は共に炭素環または複素環を形成することができる）を有し得る。例えば、 $n$ が1以上である場合、式 $H_2N - [C(R)(R')] - C(O)OH$ のアミノ酸は アミノ酸であり、 $n$ が2である場合、式 $H_2N - C(R_1)(R_1') - C(R_2)(R_2') - C(O)OH$ のアミノ酸は アミノ酸であり、ここで、 $R_1$ 、 $R_1'$ 、 $R_2$ 、および $R_2'$ は、アミノ酸側鎖からそれぞれ独立して選択され、 $R$ および $R'$ または $R_2$ および $R_2'$ は共に炭素環または複素環を形成することができる。本明細書中で使用される場合、用語「アミノ酸残基」は、ペプチドまたはタンパク質の一部であり、式 $-N(H) - [C(R)(R')]_n - C(O) -$ を有するアミノ酸をいう。本明細書中で使用される場合、用語「アミノ酸側鎖」は、天然に存在するアミノ酸または合成アミノ酸由来の任意の側鎖をいう。例えば、メチルはアラニン側鎖をいうことができ、2-アミノ-1-エチルは、2,4-ジアミノブタン酸の側鎖をいうことができる。

10

#### 【0022】

アミノ酸は、任意のキラル原子にRまたはSキラリティーを有し得る。フィッシャー変換を使用して、アミノ酸がキラルである場合、アミノ酸の炭素原子のキラリティーをLまたはDとして指定する。「D-アミノ酸」は、炭素にD配置を有するアミノ酸である。特定の配置を示さない場合、当業者は、アミノ酸がL-アミノ酸であると理解するであろう。本明細書中に記載のアミノ酸はまた、ラセミ混合物、非ラセミ混合物、およびジアステレオマー混合物の形態であり得る。

20

#### 【0023】

例示的アミノ酸を、20のコードアミノ酸およびそのアナログならびに、例えば、他の -アミノ酸、 -アミノ酸、 -アミノ酸、 -アミノ酸、および -アミノ酸から選択することができる。非コードアミノ酸は、ペプチド分野で周知である（M. Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, 1st and 2nd revised ed., Springer-Verlag, New York, N.Y., (1984) and (1993) および Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., Pierce Chemical Co., Rockford, III., (1984) に記載されている非コードアミノ酸など）。コードおよび非コードアミノ酸およびアミノ酸アナログを、例えば、Novabiochem、Bachem、Sigma Chemical Co.、Advanced Chemtechから購入するか、当該分野で公知の方法を使用して合成することができる。

30

#### 【0024】

アミノ酸を、例えば、アラニン、 -アラニン、 -アミノアジピン酸、2-アミノブタン酸、4-アミノブタン酸、1-アミノシクロペンタンカルボン酸、6-アミノヘキサ酸、2-アミノヘプタン二酸、7-アミノヘプタン酸、2-アミノイソ酪酸、アミノメチルピロールカルボン酸、8-アミノ-3,6-ジオキサ-オクタン酸、アミノペリジンカルボン酸、3-アミノプロピオン酸、アミノセリン、アミノテトラヒドロピラン-4-カルボン酸、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、アゼチジンカルボン酸、ベンゾチアゾリルアラニン、ブチルグリシン、カルニチン、4-クロロフェニルアラニン、シトルリン、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルスタチン、システイン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、ジヒドロキシフェニルアラニン、ジメチルチアゾリジンカルボン酸、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、ホモセリン、ヒドロキシプロリン、イソロイシン、イソニペコチン酸、ロイシン、リジン、

40

50

メタノプロリン、メチオニン、ノルロイシン、ノルバリン、オルニチン、p - アミノ安息香酸、ペニシラミン、フェニルアラニン、フェニルグリシン、ピペリジニルアラニン、ピペリジニルグリシン、プロリン、ピロリジニルアラニン、サルコシン、セレノシステイン、セリン、スタチン、テトラヒドロピラングリシン、チエニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アロ - イソロイシン、アロ - トレオニン、2, 6 - ジアミノ - 4 - ヘキサン酸、2, 6 - ジアミノピメリン酸、2, 3 - ジアミノプロピオン酸、ジカルボキシジン (dicarboxidine)、ホモアルギニン、ホモシトルリン、ホモシステイン、ホモシスチン、ホモフェニルアラニン、ホモプロリン、および4 - ヒドラジノ安息香酸から選択することができる。

【0025】

アミノ酸は、通常、側鎖の性質によって以下の4つの群に分類される：酸性、塩基性、親水性（極性）、および疎水性（非極性）。本明細書中に記載のアミノ酸を、そのフルネームまたは対応する標準的な一文字表記もしくは三文字表記によって識別することができる。小文字の一文字表記を使用して、Dキラリティーを示す。

【0026】

「アミノ酸アナログ」は、所与のアミノ酸と共通の化学的性質、電荷、立体的特性、または他の特性を共有するアミノ酸またはアミノ酸の小分子模倣物である。例えば、アラニンアナログには、例えば、 $\alpha$  - アラニン、エチルグリシン、 $\beta$  - アミノイソ酪酸 (aminoisobutyric acid)、およびD - アラニンが含まれ、システインアナログには、例えば、ホモシステイン、D - システイン、およびペニシラミンが含まれ、フェニルアラニンアナログには、例えば、3 - フルオロフェニルアラニン、4 - メチルフェニルアラニン、フェニルグリシン、1 - ナフチルアラニン、および3, 3 - ジフェニルアラニン、4 - アミノフェニルアラニン、ペンタフルオロフェニルアラニン、2 - ピリジルアラニン、3 - ピリジルアラニン、4 - ニトロフェニルアラニン、2 - ピロリジニルアラニン、3 - ピペリジルアラニン、4 - ピペリジルアラニンが含まれ、ヒスチジンアナログには、例えば、1 - メチルヒスチジン、2, 4 - ジアミノ酪酸、チアゾリルアラニン、2, 3 - ジアミノプロピオン酸、グアニルアラニン、2 - ピリジルアラニン、3 - ピリジルアラニン、4 - ピリジルアラニン、チエニルアラニン、オルニチン、4 - グアニルフェニルアラニン、および4 - アミノフェニルアラニンが含まれる。

【0027】

本明細書中で使用される場合、用語「アミノ保護基」は、分子上のアミノ基の化学反応を防止する一方で、分子中の他の場所で化学的変化を起こすために使用することができる任意の置換基をいう。アミノ保護基を、適切な化学的条件下で除去することができる。多数のアミノ保護基が当業者に公知であり、アミノ保護基、その付加方法、およびその除去方法の例を、T. W. Green, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, New York, 1991; Chapter 7, M. Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, 1st and 2nd revised ed., Springer-Verlag, New York, N. Y. (1984) and (1993) および Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed., Pierce Chemical Co., Rockford, I I I. (1984) (その開示が、本明細書中で参考として援用される)に見出すことができる。用語「保護（一置換）アミノ」は、（一置換）アミノ窒素原子上にアミノ保護基が存在することを意味する。さらに、用語「保護カルボキシアミド」は、カルボキシアミド窒素上にアミノ保護基が存在することを意味する。かかるアミノ保護基の例には、ホルミル（「For」）基、トリチル基、フタルイミド基、トリクロロアセチル基、クロロアセチル、プロモアセチル、およびヨードアセチル基、ウレタン型封鎖基（t - ブトキシカルボニル（「Boc」）、2 - （4 - ビフェニルイル）プロピル - 2 - オキシカルボニル（「Bpsc」）、2 - フェニルプロピル - 2 - オキシカルボニル（「Poc」）、2 - （4 - キセニル）イソプロポキシカルボニル

10

20

30

40

50

、 1 , 1 - ジフェニルエチル - 1 - オキシカルボニル、 1 , 1 - ジフェニルプロピル - 1 - オキシカルボニル、 2 - ( 3 , 5 - ジメトキシフェニル ) プロピル - 2 - オキシカルボニル ( 「 D d z 」 )、 2 - ( p - トルイル ) プロピル - 2 - オキシカルボニル、 シクロペンタニルオキシカルボニル、 1 - メチルシクロペンタニルオキシカルボニル、 シクロヘキサニルオキシカルボニル、 1 - メチルシクロヘキサニルオキシカルボニル、 2 - メチルシクロヘキサニルオキシカルボニル、 2 - ( 4 - トルイルスルホニル ) - エトキシカルボニル、 2 - ( メチルスルホニル ) エトキシカルボニル、 2 - ( トリフェニルホスフィノ ) - エトキシカルボニル、 9 - フルオレニルメトキシカルボニル ( 「 F m o c 」 )、 2 - ( トリメチルシリル ) エトキシカルボニル、 アリルオキシカルボニル、 1 - ( トリメチルシリルメチル ) プロピル - 1 - エニルオキシカルボニル、 5 - ベンズイソキサリルメトキシカルボニル、 4 - アセトオキシベンジルオキシカルボニル、 2 , 2 , 2 - トリクロロエトキシカルボニル、 2 - エチニル - 2 - プロポキシカルボニル、 シクロプロピルメトキシカルボニル、 イソボルニルオキシカルボニル、 1 - ピペリジルオキシカルボニル、 ベンジルオキシカルボニル ( 「 C b z 」 )、 4 - フェニルベンジルオキシカルボニル、 2 - メチルベンジルオキシカルボニル、 - 2 , 4 , 5 , - テトラメチルベンジルオキシカルボニル ( 「 T m z 」 )、 4 - メトキシベンジルオキシカルボニル、 4 - フルオロベンジルオキシカルボニル、 4 - クロロベンジルオキシカルボニル、 3 - クロロベンジルオキシカルボニル、 2 - クロロベンジルオキシカルボニル、 2 , 4 - ジクロロベンジルオキシカルボニル、 4 - プロモベンジルオキシカルボニル、 3 - プロモベンジルオキシカルボニル、 4 - ニトロベンジルオキシカルボニル、 4 - シアノベンジルオキシカルボニル、 4 - ( デシルオキシ ) ベンジルオキシカルボニルなど ; ベンゾイルメチルスルホニル基、 ジチアスクシノイル ( d i t h i a s u c c i n o y l ) ( 「 D t s 」 )、 2 - ( ニトロ ) フェニルスルフェニル基 ( 「 N p s 」 )、 ジフェニル - ホスフィンオキシド基などのアミノ保護基が含まれる。例えば、アミノ保護基を、 B o c、 C b z、 および F m o c から選択することができる。誘導体化アミノ基がその後の反応条件に対して安定であり、且つ適切な時点で化合物の残存物を妨害することなく除去することができる限り、種々のアミノ保護基のうちの 1 つを超えるアミノ保護基を使用することができる。

10

20

30

40

#### 【 0 0 2 8 】

本明細書中で使用される場合、用語「芳香族」は、一、二、または他の多炭素環式芳香族環系をいう。芳香族基を、任意選択的に、芳香族化合物、シクロアルキル、およびヘテロシクリルから選択される 1 つまたは複数の環に融合することができる。芳香族化合物は、 5 ~ 1 4 個の環員 ( 例えば、 5 ~ 1 0 個の環員など ) を有することができる。 1 つまたは複数の水素原子を、アシル、アシルアミノ、アシルオキシ、アルケニル、アルコキシ、アルキル、アルキニル、アミノ、芳香族、アリールオキシ、アジド、カルバモイル、カルボアルコキシ、カルボキシ、カルボキシアミド、カルボキシアミノ、シアノ、シクロアルキル、二置換アミノ、ホルミル、グアニジノ、ハロ、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、ヒドロキシ、イミノアミノ、一置換アミノ、ニトロ、オキソ、ホスホンアミノ、スルフィニル、スルホンアミノ、スルホニル、チオ、チオアシルアミノ、チオウレイド、およびウレイドから選択される置換基に置換することもできる。芳香族基の制限されない例には、フェニル、ナフチル、インドリル、ピフェニル、およびアントラセニルが含まれる。

#### 【 0 0 2 9 】

本明細書中で使用される場合、用語「芳香族アミノ酸」は、芳香環構造を含む側鎖を有するアミノ酸である。芳香族アミノ酸には、例えば、ヒスチジン、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、 1 - ナフチルアラニン、および 4 - ピリジルアラニンが含まれる。

#### 【 0 0 3 0 】

「カルボキシ保護基」は、カルボン酸基を封鎖または保護しながら化合物上の他の官能基に対して反応させるために一般的に使用されるカルボン酸基のエステル誘導体の 1 つをいう。かかるカルボン酸保護基の例には、 t - ブチル、 4 - ニトロベンジル、 4 - メトキシベンジル、 3 , 4 - ジメトキシベンジル、 2 , 4 - ジメトキシベンジル、 2 , 4 , 6 -

50

トリメトキシベンジル、2, 4, 6 - トリメチルベンジル、ペンタメチルベンジル、3, 4 - メチレンジオキシベンジル、ベンズヒドリル、4, 4' - ジメトキシトリチル、4, 4', 4'' - トリメトキシトリチル、2 - フェニルプロピル、トリメチルシリル、t - ブチルジメチルシリル、フェナシル、2, 2, 2 - トリクロロエチル、- (トリメチルシリル) エチル、- (ジ(n - ブチル)メチルシリル) エチル、p - トルエンスルホニルエチル、4 - ニトロベンジルスルホニルエチル、アリル、シンナミル、1 - (トリメチルシリルメチル) - プロペニルなどの部分が含まれる。誘導体化カルボン酸がその後の反応条件に対して安定であり、且つ適切な時点で化合物の残存物を妨害することなく除去することができる限り、使用されるカルボキシ保護基種は重要ではない。これらの基のさらなる例は、E. Haslam, *Protective Groups in Organic Chemistry*, J. G. W. McOmie, Ed., Plenum Press, New York, N. Y. (1973), Chapter 5 および T. W. Greene, *Protective - Groups in Organic Synthesis*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York, N. Y. (1991), Chapter 5に見出される。関連用語「保護カルボキシ」は、上記カルボキシ保護基の1つに置換されたカルボキシ基をいう。

10

20

30

40

50

## 【0031】

「結合する」、「結合」、「および「結合した」は、2つの分子の立体的および化学的相補性に依存するポリペプチドと別の生物学的に活性な分子との間の非共有結合性相互作用をいう。ポリペプチドの立体的および化学的相補性は、特定のアミノ酸配列によって決定される。

## 【0032】

「生物学的に活性な分子」は、生物学的状況(context)(例えば、生物、細胞、またはそのin vitroモデル)における機能もしくは作用、または機能、作用、もしくは反応に対する刺激もしくは応答によって疾患または病体を治療することができるペプチド、核酸、および/または小分子(有機小分子または無機小分子など)ならびにそのフラグメントをいう。

## 【0033】

「架橋」は、ペプチド中の2つの非隣接アミノ酸、アミノ酸アナログ、または他の化学的部分の間の共有結合をいう。架橋は、例えば、骨格 - 骨格架橋、側鎖 - 骨格架橋、または側鎖 - 側鎖架橋であり得る。架橋を、新規のアミド結合、エステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、アルケン結合、またはジスルフィド結合が形成される環状化反応によって調製することができる。骨格 - 骨格架橋は、例えば、N末端およびC末端でのラクタムの形成に起因する。

## 【0034】

「環状ペプチド」は、2つの非隣接アミノ酸を架橋する細胞内結合を有するペプチドをいう。

## 【0035】

本明細書中で使用される場合、用語ペプチド「二量体」は、同一または異なり得る第1および第2のペプチド鎖を含む分子である。二量体は、さらに、2つのペプチドが共有結合する少なくとも1つの任意選択的なリンカーを含み得る。

## 【0036】

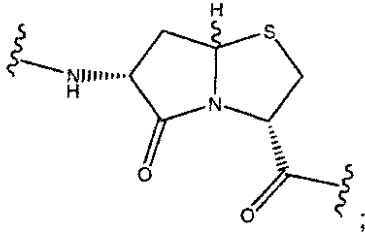
「ジペプチド模倣物」は、例えば、グリシルグリシンなどのジペプチドと構造的に類似している(例えば、実質的に等比体積であるか、実質的に類似の位置または方向を有する)。ジペプチド模倣物は、上記の構造上の制限が認識される限り、結合分子の任意の組み合わせを含むことができる。ジペプチド模倣物は、例えば、当該分野で周知の方法によって、-CH<sub>2</sub>NH-、-CH<sub>2</sub>S-、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-CH=CH-(シスおよびトランス)-COCH<sub>2</sub>-CH(OH)CH<sub>2</sub>-、および-CH<sub>2</sub>SO-から選択される架橋に任意選択的に置換される1つまたは複数のペプチド架橋を有することができる。当業者は、ジペプチド模倣物には、例えば、-ターン模倣物も含まれると認識するである

う。例えば、R. M. Friedinger, J. Med. Chem. 46: 5553 - 5566 (2003) および S. Hanessian, Tetrahedron 53: 12789 - 12854 (1997) を参照のこと。

ジペプチド模倣物の制限されない例には、

【0037】

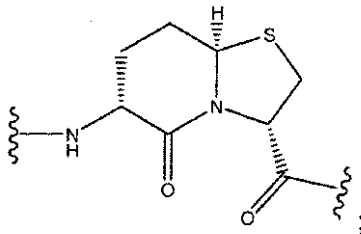
【化5】



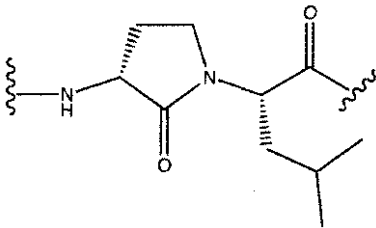
10

【0038】

【化6】

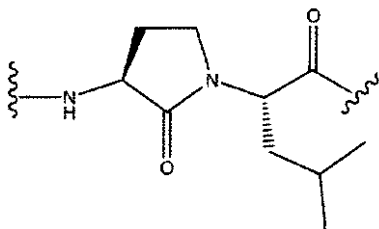


20



(D,L-フリーデインガーラクタム );

30



(L,L-フリーデインガーラクタム );

- (3S) - 3 - アミノ - 2 - オキソ - 1 - ピペリジン - 酢酸および (3R) - 3 - アミノ - 2 - オキソ - 1 - ピペリジン - 酢酸、

- (3S) - 3 - アミノ - 2 - オキソ - 1 - アゼピン酢酸および (3R) - 3 - アミノ - 2 - オキソ - 1 - アゼピン酢酸、

40

- (3S) - 3 - アミノ - 2 - オキソ - 1 - ピロリジン酢酸および (3R) - 3 - アミノ - 2 - オキソ - 1 - ピロリジン酢酸、

- (3R) - 3 - アミノ - 1 - カルボキシメチル - バレロラクタム、ならびに

- 3 - アミノ - N - 1 - カルボキシメチル - 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロ - 1H - [1] - ベンゾアゼピン - 2 - オンが含まれる。

【0039】

用語「ジスルフィド架橋」は、酸化の際に2つのアミノ酸（例えば、システイン、ペニシラミン、およびホモシステインなど）のスルフヒドリル（すなわち、チオールまたはメルカプタン）基の間に形成された共有結合をいう。ジスルフィド架橋は、同一の線状ペプ

50

チド中に含まれる2つのアミノ酸を架橋し、それにより、線状ペプチドを環状化することができる。ジスルフィド架橋を、2ペプチド間に形成し、ペプチド二量体を生成することもできる。

【0040】

「ドメイン」は、いくつかの個別の物理的特徴または役割を有するペプチド領域であり、例えば、ペプチド鎖の1つの区分から構成される独立して折り畳まれた構造が含まれる。ドメインは、同一または異なる別のドメインに結合することができる。ドメインは、ペプチドの個別の物理的特徴を有する配列を含むことができるか、その結合特性（すなわち、第2のドメインに結合することができる）を保持する物理的特徴を有するフラグメントを含むことができる。

10

【0041】

「有効用量」、「有効量」、および「治療有効量」などは、所望の生理学的変化、薬理学的変化、および/または認知変化を得るのに十分な薬剤の量をいい、この量は、患者、疾患、および治療に応じて変化し得る。この量は、特定の障害を有すると考えられる被験体の治療のための用量（この場合、障害または容態の症状を十分に緩和または改善すべきである）または予防用量（この場合、被験体の症状の出現を部分的または完全に防止するのに十分であるべきである）のいずれかであり得る。

【0042】

本明細書中で使用される場合、用語「融合」は、本発明のペプチドと別の分子（例えば、タンパク質、ペプチド、小分子、ポリマー（ポリエチレングリコールまたはポリサッカリド）、または核酸であり得る）との間の共有結合性の抱合（covalent conjugate）をいう。ペプチド-小分子融合物またはペプチド-ポリマー融合物を合成によって調製することができるのに対して、ペプチド-タンパク質融合物またはペプチド-ペプチド融合物を、化学的抱合（chemical conjugation）または適切な宿主細胞中での発現によって調製することができる。

20

【0043】

用語「調整する」、「調整（modulating）」、および「調整（modulation）」は、活性ペプチドレベルの増加または減少をいう。直接または間接的に調整することができる。

【0044】

本明細書中で使用される場合、用語「多量体」は、同一または異なり得る複数のペプチド鎖を含む分子をいう。多量体は、さらに、少なくとも2つのペプチドが共有結合する少なくとも1つの任意選択的なリンカーをさらに含むことができる。多量体は、例えば、二量体、三量体、または四量体であり得る。リンカーは、例えば、ビス-チオールリンカー、トリス-チオールリンカー、テトラチオールリンカー、ジカルボン酸リンカー、トリカルボン酸リンカー、テトラカルボン酸リンカー、アミンリンカー、トリアミンリンカー、またはテトラアミンリンカーであり得る。

30

【0045】

用語「ペプチド」は、アミド結合によって直線的にカップリングしたアミノ酸（例えば、LおよびDアミノ酸が含まれる）を含む分子をいう。ペプチドは、さらに、アミノ酸誘導体または非アミノ酸部分（例えば、ジペプチド模倣物など）を含むことができる。本発明のペプチドは、例えば、2~100、5~30、7~50、10~30、または10~50アミノ酸長（これを含む）（例えば、11~35アミノ酸長など）の範囲であり得る。ペプチドは、さらに、修飾（例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、PEG化、脂質化、または有機分子もしくは無機分子との抱合（conjugation）など）を含むことができる。

40

【0046】

本明細書中で使用される場合、「正電荷」は、pH6を超える（例えば、pH6~8、6~9、7~8、または7~9など）正電荷のアミノ酸、アミノ酸模倣物、または化学的部分をいう。例えば、正電荷アミノ酸には、リジン、アルギニン、および2,4-ジアミ

50

ノ酪酸が含まれる。

【0047】

用語「正電荷芳香族アミノ酸」は、pH6を超える（例えば、pH6～8、6～9、7～8、または7～9など）正電荷のアミノ酸をいう。例えば、正電荷芳香族アミノ酸には、ヒスチジン、4-アミノフェニルアラニン、および4-グアニルフェニルアラニンが含まれる。

【0048】

所与の配列と「実質的に同一の」アミノ酸配列は、例えば、所与の配列と、少なくとも60%、64%、70%、75%、76%、80%、82%、85%、88%、90%、94%、95%、97%、98%、または99%同一であり得る。このアミノ酸配列は、少なくとも1つのアミノ酸の短縮、欠失、置換、または付加によって所与の配列から誘導することができ、そして/または、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、または8つのアミノ酸が、付加、欠失、または置換によって所与の配列と異なり得る。

10

【0049】

「治療する」、「治療(treatment)」、および「治療(treating)」は、疾患または容態の重症度または持続時間の減少、疾患または容態に関連する1つまたは複数の症状の改善、疾患または容態を罹患した被験体への有益な効果の提供をいい、必ずしも疾患または容態を治癒したり、疾患または容態を防止したりするわけではない。

【0050】

ペプチド「三量体」は、同一または異なり得る第1、第2、および第3のペプチド鎖を含む分子である。ペプチド三量体は、さらに、少なくとも2つのペプチドが共有結合する少なくとも1つの任意選択的なリンカーをさらに含み得る。

20

【0051】

II. 本発明のペプチド

本発明のペプチドを、FcRnに対する相対的親和性およびIgGのFc部分がFcRnに結合するのを遮断する能力に基づいて評価した。FcRnに結合し、そして/またはIgGのFc部分へのFcRnの結合を遮断する能力を示すペプチドは、一定の配列の共通点または特徴を共有する。したがって、本発明の1つの実施形態は、ヒト新生児型Fc受容体へのヒトIgGのFc部分の結合を阻害することができるペプチドであって、以下の配列：

30

- Gly - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - X<sub>11</sub> -

(式中、

- X<sub>6</sub>は、正電荷アミノ酸、芳香族アミノ酸、正電荷芳香族アミノ酸、およびそのアナログから選択され、

- X<sub>7</sub>は、フェニルアラニンおよびフェニルアラニンアナログから選択され、

- X<sub>8</sub>およびX<sub>9</sub>は、グリシン、サルコシン、アスパラギン酸、D-アミノ酸、-アミノイソ酪酸、およびそのアナログからそれぞれ独立して選択されるか、X<sub>8</sub>は、X<sub>9</sub>と組み合わせた場合、ジペプチド模倣物を形成し、

- X<sub>10</sub>は、アミノ酸およびそのアナログから選択されるか、X<sub>10</sub>は、X<sub>9</sub>と組み合わせた場合、ジペプチド模倣物を形成し、

40

- X<sub>11</sub>は、チロシンおよびチロシンアナログから選択される)を含む、ペプチドを提供する。

【0052】

一定の実施形態では、ペプチドは7～50アミノ酸長の範囲であり、ヒトFcRnに結合してFcRnのヒトIgGへの結合を阻害する。

【0053】

1つの例示的实施形態では、本発明のペプチドは、配列：

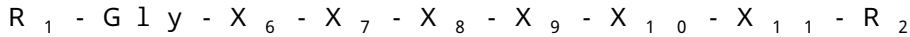
Gly - X<sub>6</sub> - Phe - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - Tyr

を含む。

【0054】

50

別の実施形態では、本発明のペプチドは、式：



(式中、

- R<sub>1</sub> は、式：X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> -

を有し、

ここで、

- X<sub>1</sub> は、水素、アシル、およびアミノ酸保護基から選択され、

- X<sub>2</sub> は、存在しないか、アミノ酸および2～15アミノ酸長のペプチドから選択され、

- X<sub>3</sub> は、存在しないか、X<sub>10</sub>、X<sub>12</sub>、またはX<sub>13</sub>と架橋を形成することができるアミノ酸から選択され、ここで、架橋は、アミノ末端-カルボキシ末端架橋、側鎖-骨格架橋、および側鎖-側鎖架橋から選択され、

- X<sub>4</sub> は、存在しないか、アミノ酸および2～15アミノ酸長のペプチドから選択され、

- X<sub>6</sub>、- X<sub>7</sub>、- X<sub>8</sub>、- X<sub>9</sub>、- X<sub>10</sub>、および- X<sub>11</sub> は、上記定義の通りであり、

- R<sub>2</sub> は、式：- X<sub>12</sub> - X<sub>13</sub> - X<sub>14</sub> - X<sub>15</sub>

を有し、

ここで、

- X<sub>12</sub> は、存在しないかアミノ酸であり、

- X<sub>13</sub> は、存在しないかアミノ酸であり、

- X<sub>14</sub> は、存在しないか、アミノ酸および2～15アミノ酸長のペプチドから選択され、

- X<sub>15</sub> は、アミノ基またはカルボキシ保護基である)によって示すことができる。

#### 【0055】

本発明のペプチドを定義するために使用される場合、用語「アミノ酸」には、アミノ酸アナログが含まれる。

#### 【0056】

1つの実施形態では、X<sub>6</sub>は、リジン、オルニチン、2,4-ジアミノ酪酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、アルギニン、グアニルアラニン、およびそのアナログから選択される正電荷アミノ酸である。別の実施形態では、X<sub>6</sub>は、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびそのアナログから選択される芳香族アミノ酸である。別の実施形態では、X<sub>6</sub>は、ヒスチジン、1-メチルヒスチジン、2-ピリジルアラニン、3-ピリジルアラニン、4-ピリジルアラニン、4-アミノフェニルアラニン、4-グアニルフェニルアラニン、チアゾリルアラニン、およびそのアナログから選択される正電荷芳香族アミノ酸である。別の実施形態では、X<sub>6</sub>は4-グアニルフェニルアラニンである。別の実施形態では、X<sub>6</sub>は、ヒスチジン、3-ピリジルアラニン、4-ピリジルアラニン、4-グアニルフェニルアラニン、およびそのアナログから選択される。

#### 【0057】

例示的ヒスチジンアナログは、ジアミノ酪酸、チアゾリルアラニン、2,3-ジアミノプロピオン酸、グアニルアラニン、2-ピリジルアラニン、3-ピリジルアラニン、チエニルアラニン、オルニチン、4-グアニルフェニルアラニン、1-メチルヒスチジン、4-アミノフェニルアラニン、2-ピロリジニルアラニン、3-ピベルジルアラニン、および4-ピペリジルアラニンから選択されるが、これらに限定されない。

#### 【0058】

例示的フェニルアラニン誘導体は、4-アミノフェニルアラニン、ペンタフルオロフェニルアラニン、2-ピリジルアラニン、3-ピリジルアラニン、4-ニトロフェニルアラニン、1-ナフチルアラニン、ホモフェニルアラニン、フェニルグリシン、2-メチルフェニルアラニン、3-メチルフェニルアラニン、4-メチルフェニルアラニン、2-クロロフェニルアラニン、3-クロロフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、3,

10

20

30

40

50

3 - ジ - フェニルアラニン、4 , 4 - ビフェニルアラニン、4 - t - ブチルフェニルアラニン、シクロヘキシルアラニン、( 4 - アミノアセチル ) - フェニルアラニン、L - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロイソキノリン - 3 - カルボン酸、D - メチルフェニルアラニン、および L - メチルフェニルアラニンから選択することができるが、これらに制限されない。

【 0 0 5 9 】

1つの実施形態では、 $X_{10}$  は、中性アミノ酸、疎水性アミノ酸、ならびにそのアナログから選択される。

【 0 0 6 0 】

1つの実施形態では、 $X_2$  は、2または3アミノ酸長のアミノ酸およびペプチドから選択される。1つの実施形態では、 $X_2$  は、少なくとも1つの疎水性アミノ酸を含む。別の実施形態では、 $X_2$  は、カルボキシ末端のアミノ酸が疎水性アミノ酸である2 ~ 15アミノ酸長のアミノ酸またはペプチドである。

10

【 0 0 6 1 】

1つの実施形態では、 $X_4$  は、カルボキシ末端アミノ酸がN - メチル化されている2 ~ 15アミノ酸長のアミノ酸またはペプチドである。

【 0 0 6 2 】

1つの実施形態では、ペプチドはリンカーである。別の実施形態では、 $X_{10}$ 、 $X_{12}$ 、または $X_{13}$ の少なくとも1つが、 $X_3$ と架橋を形成することができるアミノ酸であり、架橋が、アミノ末端 - カルボキシ末端架橋、側鎖 - 骨格架橋、および側鎖 - 側鎖架橋から選択される。1つの実施形態では、架橋は、側鎖 - 側鎖架橋であり、ジスルフィド架橋、エーテル架橋、チオエーテル架橋、アルケン架橋、またはアミド架橋であり得る。

20

【 0 0 6 3 】

1つの実施形態では、側鎖 - 側鎖架橋は、システインとシステインとの間、システインとホモシステインとの間、システインとペニシラミンとの間、ホモシステインとホモシステインとの間、ホモシステインとペニシラミンとの間、またはペニシラミンとペニシラミンとの間のジスルフィド架橋である。別の実施形態では、側鎖 - 側鎖架橋は、アスパラギン酸とリジンとの間、アスパラギン酸とオルニチンとの間、アスパラギン酸と2 , 4 - ジアミノ酪酸との間、アスパラギン酸と2 , 3 - ジアミノプロピオン酸との間、グルタミン酸とリジンとの間、グルタミン酸とオルニチンとの間、グルタミン酸と2 , 4 - ジアミノ酪酸との間、またはグルタミン酸と2 , 3 - ジアミノプロピオン酸との間のアミド架橋である。

30

【 0 0 6 4 】

1つの実施形態では、ペプチドは、ホモシステイン、D - システイン、およびペニシラミンから選択される少なくとも1つのシステイン（例えば、 $X_3$ ）またはシステインアナログを含む。

【 0 0 6 5 】

1つの実施形態では、 $X_8$  および  $X_9$  の少なくとも1つはD - アミノ酸であるか、グリシン、 $\alpha$  - アミノイソ酪酸、およびサルコシンから選択される。

【 0 0 6 6 】

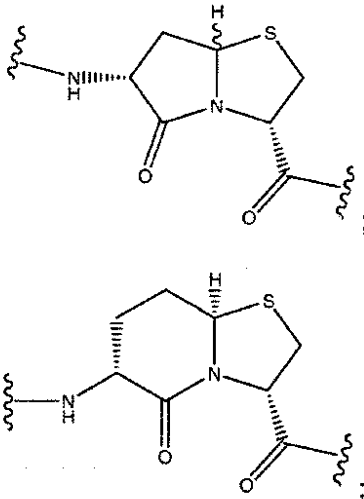
1つの実施形態では、 $X_8$  は、 $X_9$  と組み合わせて、

- $\alpha$  - アラニン、
- 4 - アミノブタン酸、
- 5 - アミノペンタン酸、
- 3 - (アミノメチル)安息香酸、
- 4 - (アミノメチル)安息香酸、
- 3 - (アミノフェニル)酢酸、
- 4 - (アミノフェニル)酢酸、

40

【 0 0 6 7 】

## 【化 7】



10

- 3 - アミノ - 2 - オキシ - 1 - ピペリジン - 酢酸、
- (3S) - 3 - アミノ - 2 - オキシ - 1 - ピペリジン - 酢酸および (3R) - 3 - アミノ - 2 - オキシ - 1 - ピペリジン - 酢酸、
- (3S) - 3 - アミノ - 2 - オキシ - 1 - アゼピン酢酸および (3R) - 3 - アミノ - 2 - オキシ - 1 - アゼピン酢酸、
- (3S) - 3 - アミノ - 2 - オキシ - 1 - ピロリジン酢酸および (3R) - 3 - アミノ - 2 - オキシ - 1 - ピロリジン酢酸、
- (3R) - 3 - アミノ - 1 - カルボキシメチル - パレロラクタム、および
- 3 - アミノ - N - 1 - カルボキシメチル - 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロ - 1H - [1] - ベンゾアゼピン - 2 - オンから選択されるジペプチド模倣物を形成する。

20

## 【0068】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、トリプトファン、チロシン、2 - アミノフェニルアラニン、3 - アミノフェニルアラニン、4 - アミノフェニルアラニン、ペンタフルオロフェニルアラニン、2 - ピリジルアラニン、3 - ピリジルアラニン、4 - ニトロフェニルアラニン、1 - ナフチルアラニン、ホモフェニルアラニン、フェニルグリシン、2 - メチルフェニルアラニン、3 - メチルフェニルアラニン、4 - メチルフェニルアラニン、2 - クロロフェニルアラニン、3 - クロロフェニルアラニン、4 - クロロフェニルアラニン、3, 3 - ジフェニルアラニン、4, 4' - ビフェニルアラニン、4 - t - ブチルフェニルアラニン、シクロヘキシルアラニン、(4 - アミノアセチル)フェニルアラニン、L - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロイソキノリン - S - カルボン酸、D - - メチルフェニルアラニン、および L - - メチルフェニルアラニンから選択される少なくとも1つのフェニルアラニンアナログを含む。

30

## 【0069】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、フェニルアラニン、4 - アミノフェニルアラニン、4 - メトキシフェニルアラニン、ペンタフルオロフェニルアラニン、2 - ピリジルアラニン、3 - ピリジルアラニン、4 - ピリジルアラニン、4 - ニトロフェニルアラニン、2 - ニトロチロシン、および4 - フルオロフェニルアラニンから選択される少なくとも1つのチロシンアナログを含む。

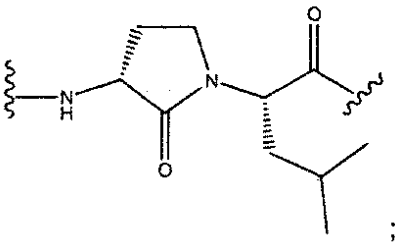
40

## 【0070】

1つの実施形態では、 $X_9$  および  $X_{10}$  が、組み合わされて、  
- D, L - フリーディングーラクタム (Friedinger's lactam)

## 【0071】

## 【化 8】



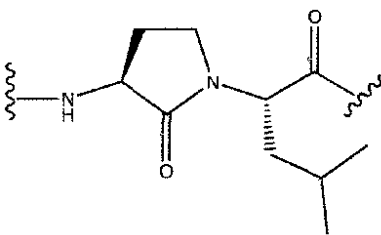
10

および

- L, L - フリーディングラクトム

【 0 0 7 2 】

## 【化 9】



20

から選択されるジペプチド模倣物を形成する。

【 0 0 7 3 】

一定の実施形態では、本発明のペプチドは、2, 4 - ジアミノ酪酸、チアゾリルアラニン、2, 3 - ジアミノプロピオン酸、グアニルアラニン、2 - ピリジルアラニン、3 - ピリジルアラニン、4 - ピリジルアラニン、チエニルアラニン、オルニチン、リジン、アルギニン、4 - グアニルフェニルアラニン、1 - メチルヒスチジン、3 - メチルヒスチジン、1, 3 - ジメチルヒスチジン、4 - アミノフェニルアラニン、2 - ピロリジニルアラニン、3 - ピペリジルアラニン、および4 - ピペリジルアラニンから選択される少なくとも1つのヒスチジンアナログを含む。

30

【 0 0 7 4 】

一定の実施形態では、架橋を形成するアミノ酸の間のアミノ酸数は、6 ~ 12 の範囲である。他の実施形態では、架橋を形成するアミノ酸の間に8個または9個のアミノ酸が存在する。

【 0 0 7 5 】

いくつかの実施形態では、本発明のペプチドは、少なくとも7アミノ酸長および50アミノ酸長ほどである。他の実施形態では、ペプチドは、11 ~ 35アミノ酸長である。

【 0 0 7 6 】

一定の実施形態では、本発明のペプチドは、多量体（二量体、三量体、または四量体など）として存在する。多量体のペプチドは、同一または異なり得る。

40

【 0 0 7 7 】

1つの実施形態では、ペプチドは、二量体（還元的アルキル化の生成物である二量体など）である。別の実施形態では、二量体は、個別のペプチド単量体と多価リンカーとの間の反応生成物である。1つの実施形態では、多価リンカーは、チオールリンカー、酸リンカー、アルコールリンカー、およびアミンリンカーから選択される。別の実施形態では、二量体は、アルキル化反応（例えば、チオールおよびアルキルハライドのアルキル化反応など）の生成物である。

【 0 0 7 8 】

1つの実施形態では、実施例15に記載のように、ペプチドを樹脂上で合成し、次いで

50

、多価リンカー（例えば、酸またはアミン多価リンカーなど）との反応によって多量体化（例えば、二量体化）する。

【0079】

いくつかの実施形態では、本発明のペプチドは、少なくとも2つの上記修飾を含む。

【0080】

一定の実施形態では、本発明のペプチドは、

a) Q R F C T G H F G G L Y P C N G P (配列番号1)、G G G C V T G H F G G I Y C N Y Q (配列番号2)、K I I C S P G H F G G M Y C Q G K (配列番号:3)、P S Y C I E G H I D G I Y C F N A (配列番号4)、および N S F C R G R P G H F G G C Y L F (配列番号5) から選択されるアミノ酸配列、および

10

b) 1つまたは複数の配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、および配列番号5と実質的に同一のアミノ酸配列を含む。

【0081】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、1つまたは複数の配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、および配列番号5と少なくとも64%、少なくとも70%、少なくとも76%、少なくとも82%、少なくとも88%、少なくとも94%、または100%同一のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、本発明のペプチドは、少なくとも1つまたは5つもの欠失、置換、または付加変異を有する配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、または配列番号5を含むことができる。本発明の全てのペプチドは、I g GへのヒトFcRnの結合を阻害する。

20

【0082】

いくつかの実施形態では、本発明のペプチドは、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換によって修飾された配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、または配列番号5を含むことができる。一定の実施形態では、本発明のペプチドは、アミノ酸が天然に存在するアミノ酸に置換された、少なくとも1つのアミノ酸置換によって修飾された配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、または配列番号5を含むことができる。いくつかの実施形態では、本発明のペプチドは、アミノ酸がD-アミノ酸に置換された、少なくとも1つのアミノ酸置換によって修飾された配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、または配列番号5を有することができる。いくつかの実施形態では、本発明のペプチドは、アミノ酸がN-メチル化アミノ酸に置換された、少なくとも1つのアミノ酸置換によって修飾された配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、または配列番号5を有し得る。いくつかの実施形態では、本発明のペプチドは、アミノ酸が天然に存在しないアミノ酸に置換された、少なくとも1つのアミノ酸置換によって修飾された配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、または配列番号5を有し得る。一定の実施形態では、本発明のペプチドは、アミノ酸がアミノ酸模倣物に置換された、少なくとも1つのアミノ酸置換によって修飾された配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、または配列番号5を有し得る。

30

【0083】

あるいは、本発明のペプチドは、FcRnに結合し、それにより、I g G分子のFc部分へのFcRnの結合を阻害することができる表1から選択されたアミノ酸配列を含むことができる。本発明は、さらに、表1に列挙した配列の変異型(variant)を含むペプチドを含む。この変異型には、短縮(少なくとも1つの表1のペプチドと少なくとも68%、72%、76%、80%、84%、88%、92%、または96%同一のペプチド)が含まれるが、これらに限定されない。変異型には、アミノ酸が、天然に存在するアミノ酸、天然に存在しないアミノ酸、アミノ酸アナログ、またはアミノ酸模倣物に置換された、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む表1に列挙した配列を含むペプチドが含まれる。

40

【0084】

表1

【0085】

50

【表 1】

配列番号 6	AGQRFCTGHFGGGLYPCNGPGTGGGK
配列番号 7	AGGGCVTGHFGGIYCNTQGTGGGK
配列番号 8	AGKIICSPGHFGGMYCQKGTTGGGK
配列番号 9	AGPSYCIEGHIDGIYCFNAGTGGGK
配列番号 10	AGNSFCRGRPGHFGGCYLFGTGGGK

10

1つの実施形態では、本発明のペプチドは、1、2、3、4、5、6、またはそれを超える保存的アミノ酸置換を有する、表1に列挙したアミノ酸配列を含むことができる。別の実施形態では、本発明のペプチドは、1、2、3、4、5、6、またはそれを超える天然に存在するアミノ酸に置換された、表1に列挙したアミノ酸配列を含むことができる。

## 【0086】

いくつかの実施形態では、本発明のペプチドは、1、2、3、4、5、6、またはそれを超える天然に存在しないアミノ酸に置換された、表1に列挙したアミノ酸配列を含むことができる。別の実施形態では、本発明のペプチドは、1、2、3、4、5、6、またはそれを超えるN-メチル化アミノ酸に置換された、表1に列挙したアミノ酸配列を含むことができる。別の実施形態では、本発明のペプチドは、1、2、3、4、5、6、またはそれを超えるD配置のアミノ酸に置換された、表1に列挙したアミノ酸配列を含むことができる。さらに別の実施形態では、本発明のペプチドは、1、2、3、4、5、6、またはそれを超えるアミノ酸模倣物に置換された、表1に列挙したアミノ酸配列を含むことができる。

20

## 【0087】

本発明の例示的实施形態を以下に提供する。これらの実施形態の多くは、1つまたは複数のアミノ酸置換を含むように修飾された表1に列挙したアミノ酸配列を含む。これらの実施形態は適切な置換の例を提供する一方で、ペプチドの生物活性を破壊しない他の置換が本発明に含まれることを理解すべきである。

30

## 【0088】

1つの例示的实施形態では、本発明のペプチドは、6位でのシステインからペニシラミンへの置換および12位でのグリシンからサルコシンへの置換によって修飾された配列番号6のアミノ酸配列を含む(アミノ酸の位置は、配列番号6のアミノ酸ナンバリングに基づく)。別の実施形態では、ペプチドは、6位でのシステインからペニシラミンへの置換および13位でのロイシンからN-メチルロイシンへの置換によって修飾された配列番号6のアミノ酸配列を含む。

## 【0089】

別の実施形態では、本発明のペプチドは、6位でのシステインからペニシラミンへの置換、11位および12位の両グリシンのそれぞれ1つの(3R)-アミノ-1-カルボキシメチル-2-バレロラクタムへの置換、および13位でのロイシンからN-メチルロイシンへの置換によって修飾された配列番号6のアミノ酸配列を含むことができる。

40

## 【0090】

1つの実施形態では、本発明のペプチドは、6位でのシステインからペニシラミンへの置換、12位でのグリシンからサルコシンへの置換、および13位でのロイシンからN-メチルロイシンへの置換によって修飾された配列番号6のアミノ酸配列を含むことができる。別の実施形態では、本発明のペプチドは、6位でのシステインからペニシラミンへの置換、11位および12位の両グリシンのそれぞれ1つの(3R)-アミノ-1-カルボキシメチルカプロラクタムへの置換、および13位でのロイシンからN-メチルロイシンへの置換によって修飾された配列番号6のアミノ酸配列を含むことができる。

50

## 【0091】

1つの実施形態では、本発明のペプチドは、6位でのシステインからペニシラミンへの置換、9位でのヒスチジンから3-ピリジルアラニンへの置換、12位でのグリシンからサルコシンへの置換、および13位でのロイシンからN-メチルロイシンへの置換によって修飾された配列番号6のアミノ酸配列を含むことができる。別の実施形態では、本発明のペプチドは、6位でのシステインからペニシラミンへの置換、9位でのヒスチジンから4-グアニルフェニルアラニンへの置換、12位でのグリシンからサルコシンへの置換、および13位でのロイシンからN-メチルロイシンへの置換によって修飾された配列番号6のアミノ酸配列を含むことができる。さらに別の実施形態では、本発明のペプチドは、6位でのシステインからペニシラミン(penicillamine)への置換、9位でのヒスチジンから4-ピリジルアラニンへの置換、12位でのグリシンからサルコシンへの置換、および13位でのロイシンからN-メチルロイシンへの置換によって修飾された配列番号6のアミノ酸配列を含むことができる。

10

## 【0092】

一定の実施形態では、本発明のペプチドは、多量体(二量体、三量体、または四量体など)として存在し得る。多量体のペプチドは、同一または異なり得る。ペプチドを、上記および下記の実施例に記載のように多量体化することができる。

## 【0093】

1つの実施形態では、FcRnに対する本発明のペプチドの親和性は、50 fM ~ 1 mMの範囲の値の $K_D$ によって示されるであろう。別の実施形態では、本発明のペプチドの親和性は、50 fM ~ 100  $\mu$ Mの範囲の値、50 fM ~ 1 nMの範囲の値、または1 pM ~ 1 nMの範囲の値で示されるであろう。別の実施形態では、少なくとも1つの本発明のペプチドを含む組成物は、IgGの血清濃度を調整するであろう。1つの実施形態では、本発明のペプチドは、IgG定常領域とも特異的に相互作用するFcRnの少なくとも1つのアミノ酸への結合によって、IgG定常領域のFcRnへの結合を遮断することができる。

20

## 【0094】

## III. 本発明のペプチドの作製方法

## 1. 一般的な本発明のペプチドの合成方法

本発明のペプチドを、当該分野で周知の技術を使用して合成することができる。例えば、完全に天然に存在するアミノ酸から構成される本発明のペプチドを、ペプチドをコードするポリヌクレオチドを使用して、細胞中で組換えによって合成することができる。例えば、Sambrookら, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) および Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989) を参照のこと。あるいは、本発明のペプチドを、固相合成などの公知の合成方法を使用して合成することができる。合成技術は、当該分野で周知である。例えば、Merrifield, Chemical Polypeptides, Katsoyannis and Panayotis eds. pp. 335-61 (1973); Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 (1963); Davisら, Biochem. Intl. 10: 394 (1985); Finnら, The Proteins (3d ed.) 2: 105 (1976); Eriksonら, The Proteins (3d ed.) 2: 257 (1976) を参照のこと。W.C. Chan and P.D. White eds. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach Oxford University Press Inc. New York (2000) および米国特許第3,941,763号に記載のように、標準的なFmoc/tBuプロトコールを使用することができる。あるいは、本発明のキメラタンパク質を、組換え方法と合成

30

40

50

方法との組み合わせを使用して合成することができる。一定の適用では、組換え方法、合成方法、または組換え方法と合成方法との組み合わせのいずれを使用することが有利であり得る。

【0095】

2. 本発明のペプチドのペプチドアナログの合成方法。

【0096】

本明細書中で使用される場合、20種の従来のアミノ酸およびその略称は、慣習適用法に従う。Immunology - A Synthesis, 2<sup>nd</sup> Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass (1991)を参照のこと。従来の20種のアミノ酸の立体異性体(例えば、D-アミノ酸)、非天然アミノ酸( -、 - 二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、N-メチルアミノ酸、乳酸、および他の非慣習的アミノ酸も、本発明のポリペプチドに適切な成分であり得る。非慣習的アミノ酸には、以下が含まれる: アミノイソ酪酸、3-アミノ-1-カルボキシメチルバレロラクタム、4-グアニル-フェニルアラニン、5-アミノペンタン酸、4-ヒドロキシプロリン、 -カルボキシグルタマート、 -N、N、N-トリメチルリジン、 -N-アセチルリジン、O-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリジン、 -N-メチルアルギニン、ペニシラミン、サルコシン、および他の類似のアミノ酸およびイミノ酸(例えば、4-ヒドロキシプロリン)。本明細書中で使用される、ポリペプチド表記法では、標準的な使用法および慣習にしたがって、左側がアミノ末端であり、右側がカルボキシ末端である。

10

20

【0097】

保存的アミノ酸置換は、天然に存在しないアミノ酸残基を含むことができ、この残基は、典型的には、生物系における合成よりもむしろ化学的ペプチド合成によって組み込まれる。これらには、ペプチド模倣物およびアミノ酸部分の他の逆転形態または逆位形態が含まれる。

【0098】

天然に存在する残基を、一般的な側鎖の性質に基づいて以下のクラスに分類することができる。

【0099】

- 1) 疎水性: ノロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- 2) 中性で親水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;
- 3) 酸性: Asp、Glu;
- 4) 塩基性: His、Lys、Arg;
- 5) 鎖の方向に影響を及ぼす残基: Gly、Pro; および
- 6) 芳香族: Trp、Tyr、Phe。

30

【0100】

例えば、非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーの別のクラスとの交換を含み得る。

【0101】

かかる変化では、一定の実施形態にしたがって、アミノ酸の疎水性親水性指標を考慮することができる。各アミノ酸は、その疎水性および電荷の特性に基づいて疎水性親水性指標が割り当てられている。指標を以下に示す: イソロイシン(+4.5)、バリン(+4.2)、ロイシン(+3.8)、フェニルアラニン(+2.8)、システイン/シスチン(+2.5)、メチオニン(+1.9)、アラニン(+1.8)、グリシン(-0.4)、トレオニン(-0.7)、セリン(-0.8)、トリプトファン(-0.9)、チロシン(-1.3)、プロリン(-1.6)、ヒスチジン(-3.2)、グルタミン酸(-3.5)、グルタミン(-3.5)、アスパラギン酸(-3.5)、アスパラギン(-3.5)、リジン(-3.9)、およびアルギニン(-4.5)。

40

【0102】

50

タンパク質への生物学的相互作用機能の付与におけるアミノ酸疎水性親水性指標の重要性は、当該分野で理解されている。K y t e r a , J . M o l . B i o l . 1 5 7 : 1 0 5 - 1 3 1 ( 1 9 8 2 ) 。一定のアミノ酸を類似の疎水性親水性指標またはスコアを有する他のアミノ酸に置換することができ、且つ依然として類似の生物活性を保持することが公知である。疎水性親水性指標に基づいた変化では、一定の実施形態では、その疎水性親水性指標が  $\pm 2$  内であるアミノ酸置換を含める。一定の実施形態では、 $\pm 1$  以内のアミノ酸を含め、一定の実施形態では、 $\pm 0.5$  以内のアミノ酸を含める。

【0103】

特に、作製された生物学的に機能的なタンパク質またはペプチドを特定のタンパク質標的への結合で使用することを意図する場合、同類のアミノ酸の置換を、親水性に基づいて有効に行うことができることも当該分野で理解される。

10

【0104】

以下の親水性値 ( h y d r o p h i l i c i t y v a l u e ) が、これらのアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン (+ 3 . 0 )、リジン (+ 3 . 0 )、アスパラギン酸 (+ 3 . 0  $\pm$  1 )、グルタミン酸 (+ 3 . 0  $\pm$  1 )、セリン (+ 0 . 3 )、アスパラギン (+ 0 . 2 )、グルタミン (+ 0 . 2 )、グリシン ( 0 )、トレオニン ( - 0 . 4 )、プロリン ( - 0 . 5  $\pm$  1 )、アラニン ( - 0 . 5 )、ヒスチジン ( - 0 . 5 )、システイン ( - 1 . 0 )、メチオニン ( - 1 . 3 )、バリン ( - 1 . 5 )、ロイシン ( - 1 . 8 )、イソロイシン ( - 1 . 8 )、チロシン ( - 2 . 3 )、フェニルアラニン ( - 2 . 5 )、およびトリプトファン ( - 3 . 4 )。類似の親水性値に基づいた変化では、一定の実施形態では、その親水性値が  $\pm 2$  以内のアミノ酸であるアミノ酸の置換を含め、一定の実施形態では、 $\pm 1$  以内のアミノ酸を含め、一定の実施形態では、 $\pm 0.5$  以内のアミノ酸を含める。

20

【0105】

当業者は、周知の技術を使用して、本明細書中に記載のポリペプチドの適切な変異型を決定することができるであろう。一定の実施形態では、当業者は、活性に重要であると考えない領域のターゲティングによって活性を破壊することなく補充することができる分子の適切な領域を同定することができる。一定の実施形態では、類似のポリペプチド間で保存される分子の残基および部分を同定することができる。一定の実施形態では、生物活性または構造に重要であり得る領域でさえ、生物活性を破壊することなく、またはポリペプチド構造に有害な影響を及ぼすことなく保存的アミノ酸置換に供することができる。

30

【0106】

さらに、当業者は、活性または構造に重要な類似のペプチド中の残基を同定する構造 - 機能研究を再検討することができる。かかる比較を考慮して、類似のペプチド中の活性または構造に重要なアミノ酸に相当するペプチド中のアミノ酸の重要性を予想することができる。当業者は、かかる予想される重要なアミノ酸残基の化学的に類似のアミノ酸の置換を選択することができる。

【0107】

当業者はまた、類似のペプチド中の構造に関して、三次元構造およびアミノ酸配列を分析することができる。当業者は、所望の各アミノ酸残基に単一のアミノ酸置換を含む試験変異型を生成することができる。次いで、変異型を、当業者に公知の活性アッセイを使用してスクリーニングすることができる。かかる変異型を使用して、適切な変異形に関する情報を収集することができる。例えば、特定のアミノ酸残基の変化によって活性が破壊されるか、望ましくなく減少するか、不適切になることを発見した場合、かかる変化を有する変異型を回避することができる。言い換えれば、かかる日常的試験から収集した情報に基づいて、当業者は、単独または他の変異と組み合わせたさらなる置換を回避すべきアミノ酸を容易に決定することができる。

40

【0108】

一定の実施形態によれば、アミノ酸置換は、以下：( 1 ) タンパク質分解に対する感受性を減少し、( 2 ) 酸化に対する感受性を減少し、( 3 ) 生物機能に関連する結合親和性

50

を変化させ、そして/または(4)かかるポリペプチドに対して他の物理化学的性質または機能的性質を付与または修飾するアミノ酸置換であり得る。一定の実施形態によれば、単一または複数のアミノ酸置換(一定の実施形態では、保存的アミノ酸置換)を、天然に存在する配列に行うことができる(一定の実施形態では、ドメインの外側のポリペプチドの一部に行い、分子内接触を形成することができる)。一定の実施形態では、保存的アミノ酸置換は、典型的には、親配列の構造特性を実質的に変化させないかもしれない(例えば、置換アミノ酸は、親配列で起こるヘリックスの損傷または親配列を特徴づける他の二次構造型を破壊する傾向があるべきではない)。当該分野で認識されているペプチドの二次構造および三次構造の例は、Proteins, Structures and Molecular Principles, Creighton, Ed, W. H. Freeman and Company, New York (1984); Introduction to Protein Structure, C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991); および Thorntonら, Nature 354: 105 (1991)に記載されている。

10

20

30

40

50

#### 【0109】

一定の実施形態では、アミノ酸誘導体は、共有結合性の修飾(ポリマー、脂質、または他の有機部分もしくは無機部分との化学結合が含まれるが、これらに限定されない)を含む。一定の実施形態では、化学修飾された特異的結合剤は、化学修飾されていない特異的結合剤より長い循環半減期を有し得る。一定の実施形態では、化学修飾された特異的結合剤は、所望の細胞、組織、および/または器官に対して改善されたターゲティング能力を有し得る。一定の実施形態では、誘導体特異的結合剤は、1つまたは複数の水溶性ポリマー(ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレングリコール、またはポリプロピレングリコールが含まれるが、これらに限定されない)を結合するように共有結合性に修飾される。例えば、米国特許第4,640,835号、同第4,496,689号、同第4,301,144号、同第4,670,417号、同第4,791,192号、および同第4,179,337号を参照のこと。一定の実施形態では、特異的結合剤の誘導体は、1つまたは複数のポリマー(モノメトキシ-ポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ-(N-ビニルピロリドン)-ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)およびポリビニルアルコールが含まれるが、これらに限定されない)およびかかるポリマーの混合物を含む。

#### 【0110】

##### 3. 本発明のペプチドアナログの合成方法

ペプチドアナログは、テンプレートペプチドに類似の性質を有する非ペプチド薬として製薬産業で一般に使用されている。これらの非ペプチド化合物型は、「ペプチド模倣物(peptide mimetics)」または「ペプチド模倣物(peptidomimety)」と命名されている。Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15: 29 (1986); Veber and Freidinger, TINS p. 392 (1985); および Evansら, J. Med. Chem. 30: 1229 (1987)(本明細書中で参考として援用される)。かかる化合物は、しばしば、コンピュータ化した分子モデリングを使用して構築される。治療的に有用なペプチドに構造が類似のペプチド模倣物を使用して、類似の治療効果または予防効果を得ることができる。一般に、ペプチド模倣物は、パラダイムポリペプチド(すなわち、生化学的性質または薬理学的活性を有するが(ヒト抗体など)、当該分野で周知の方法によって、-CH<sub>2</sub>NH-、-CH<sub>2</sub>S-、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-CH=CH-(シスおよびトランス)、-COCH<sub>2</sub>-、-CH(OH)CH<sub>2</sub>-、および-CH<sub>2</sub>SO-から選択される結合に任意選択的に置換される1つまたは複数のペプチド結合を有するポリペプチド)に構造が類似している。コンセンサス配列の1つまたは複数のアミノ酸の同型のD-アミノ酸への体系的置換(

例えば、D-リジンへのL-リジンの置換)を使用して、一定の実施形態では、より安定なペプチドを生成することができる。さらに、コンセンサ配列または実質的に同一のコンセンサ配列変異型を含む制約されたペプチドを、当業者に公知の方法(例えば、ペプチドを環状化する分子内ジスルフィド架橋を形成することができる内部システイン残基の付加など)によって生成することができる(Rizo and Gierasch, Ann. Rev. Biochem. 61: 387 (1992)) (本明細書中で参考として援用される)。

#### 【0111】

ペプチドの二量体化またはオリゴマー化により、所与の受容体に対するペプチド配列のアビディティを増大することができる。例えば、Johnsonら, Chem. Biol. 12: 939 (1997)を参照のこと。本発明のペプチドの二量体およびより高次の多量体を、当該分野で周知の種々の方法を使用して合成することができることが想定される。二量体または多量体を、連続ペプチド配列として、自動化ペプチド合成機によって直接合成することができる。あるいは、ペプチド多量体を、多価リンカー部分との各ペプチド単量体との反応によって合成することができる。例えば、Rose, J. Am. Chem. Soc. 116: 30 (1994)を参照のこと。別の例として、「多抗原ペプチド」(MAP)の合成などのペプチド配列の合成前の分岐リンカー基の組み込みによってペプチド多量体を合成することができる。D. Posnettら, J. Biol. Chem. 263: 1719 (1988)。本発明は、これらのペプチド二量体の新規の形成方法を提供し、この方法は、固相樹脂ビーズ上の隣接するペプチドが相互に反応して、ペプチドN末端に連結された二量体を形成するように、ペプチドのN末端を樹脂上でリンカー分子(例えば、コハク酸など)と反応させる工程を含む。その後の樹脂からの切断により、N末端結合ペプチド二量体を得られる。

#### 【0112】

##### 4. 本発明のペプチドの発現のための発現ベクターの構築

本発明のペプチドをコードする核酸を、当該分野で公知の標準的方法(例えば、自動化DNA合成機(Biosearch, Applied Biosystemsから市販の合成機など))によって合成することができる。さらなる核酸合成方法が当該分野で公知である。例えば、米国特許第6,015,881号、同第6,281,331号、同第6,469,136号を参照のこと。本発明のペプチドの組換え産生のために、ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を、適切な発現ベクター(すなわち、挿入されるコード配列の転写および翻訳に必要なエレメント、RNAウイルスベクターの場合には、複製および翻訳に必要なエレメントを含むベクター)に挿入する。本発明のペプチドをコードする核酸を、ベクターの適切な読み枠中に挿入する。

#### 【0113】

形質転換で使用されるベクターは、通常、形質転換体を同定するために使用される選択マーカーを含むであろう。細菌系では、これには、アンピシリンまたはカナマイシンなどの抗生物質耐性遺伝子が含まれ得る。培養哺乳動物細胞中で用いる選択マーカーは、ネオマイシン、ハイグロマイシン、およびメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与する遺伝子を含む。選択マーカーは、増幅可能な選択マーカーであり得る。1つの増幅可能な選択マーカーは、DHFR遺伝子またはDHFR cDNAである。Simonsen and Levinson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2495 (1983)。選択マーカーは、Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA (1986))によって概説されており、選択マーカーの選択は、十分に当業者のレベルの範囲内である。選択マーカーを、目的の遺伝子として細胞中の個別のプラスミドに同時に導入することもできるか、同一プラスミドに導入することができる。同一プラスミドで選択マーカーおよび目的の遺伝子が、異なるプロモーターまたは同一のプロモーターの調節下にあり得る場合、後者の配置により、バイシストロン性メッセージが得られる。この構築物型は、当該分野で周知である(例えば、米国特許第4,713,33

10

20

30

40

50

9号)。

【0114】

発現系中の発現エレメントは、その強度および特異性で変化する。使用する宿主/ベクターに応じて、多数の適切な転写および翻訳エレメント(構成性プロモーターおよび誘導性プロモーターが含まれる)のいずれかを、発現ベクターで使用することができる。例えば、細菌系でクローニングする場合、バクテリオファージのpL、pLac、ptrp、およびptac(ptrp-lacハイブリッドプロモーター)などの誘導性プロモーターを使用することができる。昆虫細胞系でクローニングする場合、バキュロウイルス多面体プロモーターなどのプロモーターを使用することができる。植物細胞系でクローニングする場合、植物細胞ゲノム由来のプロモーター(例えば、熱ショックプロモーター、RUBISCOの小サブユニットのプロモーター、クロロフィルa/b結合タンパク質のプロモーター)または植物ウイルス由来のプロモーター(例えば、CaMVの35S RNAプロモーター、TMVのコートタンパク質プロモーター)を使用することができる。哺乳動物細胞系でクローニングする場合、哺乳動物細胞ゲノム由来のプロモーター(例えば、メタロチオネインプロモーター)または哺乳動物ウイルス由来のプロモーター(例えば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)を使用することができる。発現構築物の複数のコピーを含む細胞株を生成する場合、SV40、BPV、およびEBVベースのベクターを、適切な選択マーカーと共に使用することができる。

10

【0115】

植物発現ベクターを使用する場合、線状または非環状化形態の目的のキメラタンパク質をコードする配列の発現を、多数のプロモーターによって駆動することができる。例えば、CaMVの35S RNAおよび19S RNAプロモーターなどのウイルスプロモーター(Brissonら, Nature 310:511-514(1984))またはTMVのコートタンパク質プロモーター(Takamatsuら, EMBO J. 6:307-311(1987))を使用することができる。あるいは、RUBISCOの小サブユニットなどの植物プロモーター(Coruzziら, EMBO J. 3:1671-1680(1984); Broglieら, Science 224:838-843(1984))または熱ショックプロモーター(例えば、ダイズhsp17.5-Eまたはhsp17.3-B(Gurleyら, Mol. Cell. Biol. 6:559-565(1986))を使用することができる。これらの構築物を、Tiプラスミド、Riプラスミド、植物ウイルスベクター、直接DNA形質転換、微量注入、エレクトロポレーションなどを使用して、植物細胞に導入することができる。Weissbach & Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VII, pp. 421-463(1988)およびGrierson & Corey, Plant Molecular Biology, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9(1988)。

20

30

【0116】

目的のキメラタンパク質を産生するために使用することができる1つの昆虫発現系では、オートグラフィア・カリフォルニア(Autographa californica)核多汗症ウイルス(AcNPV)を、外来遺伝子を発現するためのベクターとして使用する。このウイルスは、ヨトウガ細胞中で成長する。コード配列を、ウイルスの非必須領域(例えば、多面体遺伝子)にクローニングし、AcNPVプロモーター(例えば、多面体プロモーター)の調節下におくことができる。コード配列の首尾のよい挿入により、多面体遺伝子が不活化され、非閉塞性(non-occluded)組換えウイルス(すなわち、多面体遺伝子によってコードされるタンパク質コートが欠くウイルス)が産生される。次いで、これらの組換えウイルスを使用して、ヨトウガ細胞に感染させ、挿入遺伝子を発現させる(例えば、Smithら, J. Virol. 46:584(1983); 米国特許第4,215,051号を参照のこと)。この発現系のさらなる例を、Ausube

40

50

ら, eds., Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience (1989)に見出すことができる。

【0117】

本発明のペプチドを発現するために使用することができる別の系は、「GS発現系」とも呼ばれるグルタミン合成酵素遺伝子発現系である(Lonza Biologies PLC, Berkshire UK)。この発現系は、米国特許第5,981,216号に詳述されている。

【0118】

哺乳動物宿主細胞では、多数のウイルスベースの発現系を使用することができる。発現ベクターとしてアデノウイルスを使用する場合、コード配列を、アデノウイルス転写/翻訳調節複合体(例えば、後期プロモーターおよび三者間(tripartite)リーダー配列)にライゲーションすることができる。次いで、このキメラ遺伝子を、*in vitro*または*in vivo*組換えによってアデノウイルスゲノムに挿入することができる。ウイルスゲノムの非必須領域(例えば、E1領域またはE3領域)への挿入により、感染宿主中で生存可能であり、且つペプチドを発現することができる組換えウイルスが得られる。例えば、Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655(1984)を参照のこと。ワクシニア7.5Kプロモーターも使用することができる。例えば、Mackettら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7415(1982); Mackettら, J. Virol. 49:857(1984); Panicallら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4927(1982)を参照のこと。

10

20

【0119】

5. 適切な標的細胞中での本発明のペプチドの発現

発現ビヒクルを、適切な標的細胞にトランスフェクションまたは同時トランスフェクションして、本発明のポリペプチドを発現することができる。当該分野で公知のトランスフェクション技術には、リン酸カルシウム沈殿(Wiglerら, Cell 14:725(1978))、エレクトロポレーション(Neumannら, EMBO, J. 1:841(1982))、およびリポソームベースの試薬が含まれるが、これらに限定されない。種々の宿主発現系を使用して、本明細書中に記載のキメラタンパク質を発現することができる(原核細胞および真核細胞の両方が含まれる)。これらには、適切なコード配列を含む組換えバクテリオファージDNAまたはプラスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌(例えば、大腸菌)などの微生物、適切なコード配列を含む組換え酵母または真菌発現ベクターで形質転換された酵母または糸状菌、適切なコード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、パキユロウイルス)に感染された昆虫細胞系、適切なコード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルスまたはタバコモザイクウイルス)に感染されたか、組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換された植物細胞系、動物細胞系(哺乳動物細胞(例えば、CHO、Cos、HeLa細胞)が含まれる)が含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【0120】

6. 本発明のペプチドを含む融合分子の合成方法

いくつかの実施形態では、本発明のペプチドは、本発明のペプチドおよび融合パートナーを含む融合タンパク質として存在する。1つの実施形態では、融合パートナーは、1つまたは複数の半減期の延長、安定性、本発明のペプチドの輸送の増強などの性質を付与し、そして/または*in vivo*または*in vitro*での効率を強化することができる。

【0121】

さらに、本発明の非相同ポリペプチドを、免疫グロブリン(IgG)の定常ドメインの一部と組み合わせて、キメラポリペプチドを得ることができる。これらの特定の融合分子は、精製を容易にし、*in vivo*での半減期の増加が認められる。これは、例えば、

50

ヒトCD4 - ポリペプチドの第1の2つのドメインおよび哺乳動物免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質で認められる。欧州特許第0 394 827号、Traunckerら, Nature, 331: 84 - 86 (1988)。IgG部分に起因するジスルフィド結合した二量体構造を有する融合分子は、いくつかの場合、例えば、単量体ポリペプチドまたはポリペプチドフラグメントのみよりも他の分子の結合および中和で有効であり得る。例えば、Fountoulakisら, J. Biochem. 270: 3958 - 3964 (1995)を参照のこと。

#### 【0122】

本発明は、上記の任意のペプチドの融合分子をコードするポリヌクレオチドも提供する。このポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの転写のための調節配列も含むベクターの一部であり得る。本発明は、さらに、上記の任意の融合分子、任意のこれらのペプチドの融合分子をコードするポリヌクレオチド、または任意のこれらのペプチドの融合分子をコードするポリヌクレオチドおよびポリヌクレオチドの転写のための調節配列を含むベクターを含む宿主細胞を提供する。本発明は、なおさらに、任意の融合分子または上記ヌクレオチド、および/または上記の任意のベクターまたは宿主細胞、ならびに緩衝液または薬学的に許容可能なキャリアを含む組成物を提供する。

10

#### 【0123】

##### a. 抗体Fcドメインを含む融合物

1つの実施形態では、本発明のペプチドを、IgGのFcドメインと抱合して、その循環半減期を増加させることができる。一定の実施形態では、ペプチドを、Fcドメインに共有結合する。Fc免疫グロブリンドメインを含むキメラタンパク質を組換えおよび半合成的に作製する方法は、当業者に周知である。例えば、アルデヒドをペプチド誘導体に組み込み、FcのN末端に選択性のある還元的アルキル化反応を使用して、Fcタンパク質と反応させることができる。Kinstler, Adv. Drug Del. Rev. 54: 477 (2002)。あるいは、ペプチドチオエーテルを、N末端システイン残基を保有するFcと反応させることができる。Dawson and Kent, Ann. Rev. Biochem. 69: 923 (2000)。

20

#### 【0124】

かかるペプチド - Fc融合誘導体は、Fcドメインを介したFcRnのさらなる2つの結合部位の付加によってIgG - FcRn相互作用を遮断する能力が増加し得る。かかるペプチド - Fc融合物はまた、ペプチド分解を防御し、それにより、ペプチドのin vivo効率を増強することができる。例えば、Fountoulakisら, J. Biochem., 270: 3958 - 3964 (1995)に記載のように、IgG部分に起因するジスルフィド結合二量体構造を有する融合タンパク質はまた、本発明のペプチドよりも他の分子に対する結合および中和に高い効率を示し得る。

30

#### 【0125】

本発明のペプチドがIgG Fcドメインとの融合タンパク質の一部である実施形態では、ヒトIgFcは、ヒトIgG (ヒトIgG1、IgG2、およびIgG4など)のヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含むことができる。米国特許第6,900,292号に記載のように、本発明はまた、本発明のペプチドおよび変異Fcポリペプチドまたは変異Fcポリペプチドのフラグメントを含む融合分子であって、変異FcがPro331Ser変異したヒトIgG2のヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含む、融合分子を提供する。

40

#### 【0126】

本発明のペプチドとの抱合に適切なFcドメインには、そのエフェクター効果 (抗体依存性細胞傷害性および補体依存性細胞傷害性が含まれる) を弱めるためにFc領域の選択された位置に変異アミノ酸を有するFcドメインが含まれる。例えば、Pro331Ser変異を有するFc<sub>2</sub>変異型は、天然のFc<sub>2</sub>よりも補体活性が低く、FcRに結合しない。IgG4 Fcは、補体カスケードの活性化を欠き、FcRに対する結合親和性は、もっとも活性なアイソタイプIgG1の結合親和性よりも約一桁低い。1つの実

50

施形態では、本発明のペプチドを、天然のFc<sub>4</sub>と比較して最小のエフェクター機能を示すLeu235Ala変異を有するFc<sub>4</sub>変異型に抱合する。別の実施形態では、本発明のペプチドを、天然のFc<sub>1</sub>よりも低いエフェクター機能も示すLeu234Val、Leu235Ala、およびPro331Ser変異を有するFc<sub>1</sub>変異型に抱合する。

#### 【0127】

##### b. アルブミンを含む融合物

一定の実施形態では、本発明のペプチドを、アルブミン結合部分に抱合することができる。かかるアルブミン結合部分-ペプチド抱合物は、より長いin vivo半減期を有することができ、したがって、所望の治療効果を達成するためにより低いペプチド用量しか必要としない。Chuangら, Pharm. Res. 19: 569 (2002); 米国特許第6,685,179号。したがって、本発明の1つの実施形態は、アルブミン、アルブミンの1つまたは複数のフラグメント、アルブミンに結合するペプチド、および/またはアルブミンに結合した脂質または他の分子と抱合する分子を含むアルブミン融合パートナーと共に本発明のペプチドを含む融合分子を提供する。

10

#### 【0128】

アルブミンを含む融合タンパク質の作製方法は、当該分野で公知である。例えば、疎水性芳香族キャッピング試薬によって修飾されたペプチドは、アルブミンと非共有結合し、ウサギ中のペプチドの半減期を延長することが示されている。Zobelら, Bioorg. Med. Chem. Lett. 13: 1513 (2003)。別の例として、チオール反応基で修飾したペプチドは、血清アルブミン上の単一の遊離システイン残基に共有結合することが示されている。Kimら, Diabetes 52: 751 (2003)。

20

#### 【0129】

##### c. ペグ化部分を有する融合物

1つの実施形態では、本発明のペプチドを、モノまたはポリ(例えば、2~4)PEG部分を含むようにペグ化することができる。当該分野で公知の任意のペグ化反応によってペグ化を行うことができる。ペグ化タンパク質生成物の調製方法は、一般に、(a)本発明のペプチドが1つまたは複数のPEG基に結合するようになる条件下で、ポリペプチドをポリエチレングリコール(PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体など)と反応させる工程、および(b)反応生成物を得る工程を含む。一般に、至適な反応条件を、公知のパラメーターおよび所望の結果に基づいて、個別に決定する。

30

#### 【0130】

当業者が利用可能なPEG結合方法は多数存在し、例えば、欧州特許第0401384号; Malikら, Exp. Hematol., 20: 1028-1035 (1992); Francis, Focus on Growth Factors, 3(2): 4-10 (1992); 欧州特許第0154316号; 欧州特許第0401384号; WO92/16221号; およびWO95/34326号に記載されている。例えば、本発明のペプチドのペグ化工程を、反応性ポリエチレングリコール分子とのアシル化反応またはアルキル化反応によって行うことができる。

#### 【0131】

したがって、本発明のペプチドには、1つまたは複数のPEG基がアシル基またはアルキル基を介して結合したペグ化ペプチドが含まれる。かかるペプチドを、モノペグ化またはポリペグ化することができる(例えば、2~6個または2~5個のPEG基を含むペプチド)。PEG基を、一般に、アミノ酸の-または-アミノ基でペプチドに結合するが、PEG基を、適切な反応条件下でPEG基に結合するようになるのに十分に反応性を示すペプチドの任意のアミノ基に結合することができることも意図される。

40

#### 【0132】

アシル化によるペグ化は、一般に、ポリエチレングリコール(PEG)の活性エステル誘導体と本発明のペプチドとの反応を含む。アシル化反応のために、選択されるポリマーは、典型的には、単一の反応性エステル基を有する。任意の公知またはその後に見られ

50

た反応性 PEG 分子を使用して、ペグ化反応を行うことができる。適切な活性化 PEG エステルの例は、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) にエステル化された PEG である。本明細書中で使用される場合、アシル化には、本発明のペプチドと PEG などのポリマーとの間の以下の結合型が含まれることが意図されるが、これらに限定されない：アミド、カルバマート、およびウレタンなど。例えば、Chamow, Bioc conjugate Chem., 5:133-140 (1994) を参照のこと。反応条件を、ペグ化分野で公知の任意の条件またはその後に関与された条件から選択することができるが、本発明のペプチドを不活化する温度、溶媒、および pH などの条件を回避すべきである。

#### 【0133】

アシル化によるペグ化により、一般に、本発明のポリペグ化ペプチドが得られる。結合基はアミドであり得る。得られた生成物を、実質的に（例えば、95%超）、モノ、ジ、またはトリペグ化のみ行うことができる。しかし、使用した特定の反応条件に応じて、より高いペグ化度を有するいくつかの種を形成することができる。必要に応じて、より精製されたペグ化種を、標準的な精製技術（特に、透析、塩析、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィ、ゲル濾過クロマトグラフィ、および電気泳動が含まれる）によって混合物（特に、未反応種）から分離することができる。

10

#### 【0134】

アルキル化によるペグ化は、還元剤の存在下で PEG の末端アルデヒド誘導体を本発明のペプチドと反応させる工程を含む。還元的アルキル化反応のために、選択されたポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有すべきである。例示的な反応性 PEG アルデヒドは、水安定性を示すポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドまたはそのモノ C1 ~ C10 アルコキシまたはアリーロキシ誘導体である。例えば、米国特許第 5,252,714 号を参照のこと。

20

#### 【0135】

##### 7. 生物学的に発現した本発明のペプチドの精製

使用した発現系に応じて、発現した本発明のペプチドを、当該分野で十分に確立された手順（例えば、アフィニティクロマトグラフィ、サイズ排除クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ）によって単離する。

#### 【0136】

発現ベクターは、組換えによって産生されたキメラタンパク質を容易に精製可能なタグをコードすることができる。例には、ハイブリッドタンパク質が産生されるように本発明のペプチドをコードする DNA を lac z コード領域とインフレームでベクターにライゲーションするベクター pUR278 (Ruthers, EMBO J. 2:1791 (1983)) が含まれるが、これらに限定されない。pGEX ベクターを使用して、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) タグとの本発明のキメラタンパク質を発現することができる。これらのタンパク質は、通常可溶性であり、グルタチオン-アガロースビーズへの吸着およびその後の遊離グルタチオンの存在下での溶離によって細胞から容易に精製することができる。ベクターは、精製後にタグを容易に除去するための切断部位（トロンピンまたは第 Xa 因子プロテアーゼまたは PreScission Protease (登録商標) (Pharmacia, Peapack, N.J.)) を含む。

30

40

#### 【0137】

生成効率を増加させるために、酵素切断部位によって分離された複数の本発明のペプチド単位をコードするようにポリヌクレオチドをデザインすることができる。得られたポリペプチドを切断して（例えば、適切な酵素での処理による）、ペプチド単位を回収することができる。これにより、単一のプロモーターによって駆動されるペプチドの収率を増加させることができる。適切なウイルス発現系で使用する場合、mRNA によってコードされる本発明の各ペプチドの翻訳を、例えば、配列内リボゾーム進入部位 (IRES) によって転写物内で内部的に指示する。したがって、多シストロン性構築物は、単一の巨大な多シストロン性 mRNA の転写を指示し、それにより、複数の各ポリペプチドの翻訳を指示する。このアプローチは、ポリタンパク質の産生および酵素的プロセッシングを排除し、

50

単一プロモーターによって駆動される本発明のペプチドの収率を有意に増加させることができる。

【0138】

本発明のペプチドをコードするDNA構築物を含む宿主細胞を、適切な成長培地（すなわち、細胞成長に必要な栄養素を含む培地）中で成長させることができる。細胞成長に必要な栄養素には、炭素源、窒素源、必須アミノ酸、ビタミン、ミネラル、および成長因子が含まれ得る。任意選択的に、培地は、仔ウシ血清またはウシ胎児血清を含むことができる。1つの実施形態では、培地は、実質的にIgGを含まない。成長培地は、一般に、例えば、DNA構築物上の選択マーカーによって補完されるかDNA構築物と同時トランスフェクションされる薬物選択性または必須栄養素の欠乏によってDNA構築物を含む細胞を選択する。培養した哺乳動物細胞を、一般に、市販の血清含有培地または無血清培地（例えば、MEM、DMEM）中で成長させる。使用した特定の細胞株に適切な培地の選択は、当業者のレベルの範囲内である。

10

【0139】

本発明のペプチドを、トランスジェニック動物（外来遺伝子をそのゲノムに組み込んだげっ歯類、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、または他の非ヒト動物など）中で産生することができる。この遺伝子が生殖系列組織中に存在するので、この遺伝子は親から子孫へ受け継がれる。外因性遺伝子を、単細胞胚に導入する（Brinsterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438, 1985）。トランスジェニック動物の産生方法は、当該分野で公知であり、免疫グロブリン分子を産生するトランスジェニック動物が含まれる。Wagnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6376 (1981); McKnightら、Cell 34:335 (1983); Brinsterら、Nature 306:332 (1983); Ritchieら、Nature 312:517 (1984); Baldassarreら、Theriogenology 59:831 (2003); Roblら、Theriogenology 59:107 (2003); Malassagneら、Xenotransplantation 10(3):267 (2003)。

20

【0140】

8. FcRnに結合してFcRn-IgG相互作用を遮断するペプチドをスクリーニングおよび発見する方法

30

FcRnへのペプチド結合を、ファージディスプレイライブラリーを使用して同定することができる。ファージディスプレイライブラリーを、Smith and Petrenko, Chem. Rev. 87:391 (1997)に記載のように容易に生成することができる。あるいは、ファージディスプレイライブラリーを、供給元（例えば、Dyax Corp. (Cambridge, MA) など）から得ることができる。スクリーニング条件に応じて、種々の異なる性質を有するファージを同定することができる。FcRnに結合する（したがって、IgGとFcRn結合を競合する）ペプチドを同定するために、FcRnへの結合およびIgGとの競合についてファージライブラリーをスクリーニングすることができる。任意選択的に、ファージライブラリーの1つまたは複数の別の受容体とのインキュベーションによって別の受容体に結合するペプチドをライブラリーから排除することができる。したがって、別の受容体に結合したファージは、所望のファージプールから枯渇するであろう。FcRnに結合することができるファージクローンのDNAの配列決定により、FcRnに結合してIgG-FcRn結合を阻害することができるペプチドを同定することができる。

40

【0141】

FcRn結合ペプチドを同定するための他の方法の例には、以下が含まれる：mRNAディスプレイ（Roberts and Szostak, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 94:12297 (1997)、細胞ベースのディスプレイ（Boder and Wittrup, Nat. Biotechnol. 15:553 (1997)、および合成ペプチドライブラリー（Lam, Nature 354:82 (1997)）。

50

1) ; Houghten ら , Nature 354 : 84 ( 1991 ) ) 。

【 0142 】

9 . FcRn に結合して IgG : FcRn 相互作用を遮断するペプチドのアッセイ方法  
 多数の方法を使用して、ペプチドまたはペプチド模倣物が FcRn に結合して FcRn  
 : IgG 相互作用を遮断する能力を評価することができる。例えば、表面プラズモン共鳴  
 ( SPR ) は、結合事象を評価するための当該分野で周知の方法である ( Biacore  
 AB , Uppsala , Sweden ) 。この方法を使用して、一方の結合パートナー  
 ( FcRn または IgG ) を、SPR センサチップ上に固定し、他方の結合パートナーが  
 チップ上を通過し、得られたシグナルをモニタリングする。同一実験では、IgG と FcRn  
 との間の相互作用の競合物質として評価すべきペプチドが、チップ上を通過する。シ  
 グナルの任意の減少を、ペプチドが FcRn と IgG との間の相互作用を遮断する能力の  
 指標と解釈することができる。

10

【 0143 】

IgG : FcRn 相互作用の可能性のあるペプチドインヒビターの他のアッセイ方法も  
 、当該分野で周知である。かかる方法の1つは、96 ウェルプレート形式での IgG 競合  
 アッセイである。この例示的アッセイでは、96 ウェルプレート上の可溶性ヒト FcRn  
 を、IgG および試験ペプチドに曝露する。抗 IgG 抗体および標準的 ELISA 視覚化  
 試薬によって検出された残存する結合 IgG により、ペプチドが FcRn - IgG 相互作  
 用を遮断する能力の指標が得られる。

【 0144 】

ヒト FcRn をコードする DNA でトランスフェクションした細胞においてもペプチド  
 が IgG - FcRn 結合を遮断する能力を果たし、その細胞表面上でヒト FcRn を発現  
 することができる細胞株を開発することができる。IgG - FcRn 結合のペプチドイン  
 ヒビターが蛍光標識された IgG 分子と競合する結合競合アッセイを適用することができ  
 る。細胞に結合した残存 IgG レベルを、例えば、標準的な蛍光標示式細胞分取器 ( FA  
 CS ) を使用して測定することができる。

20

【 0145 】

d . 本発明のペプチドの使用

本発明のペプチドは、FcRn に結合して IgG 定常領域の Fc 部分の FcRn への結  
 合を阻害し、それにより、本発明のペプチドの非存在下での IgG の異化と比較して Ig  
 G の異化が増加する。例示的実施形態では、IgG 定常領域は、IgG 1、IgG 2、I  
 gG 3、または IgG 4 サブクラスに由来する。特定の実施形態では、IgG 定常領域は  
 、IgG 1、IgG 2、または IgG 4 サブクラスに由来する。したがって、本発明のペ  
 プチドは、IgG の異化の増加が望ましい任意の疾患または容態の治療に有用である。例  
 えば、本発明のペプチドを使用して、自己免疫疾患、炎症性障害、炎症が病因の心血管疾  
 患 (例えば、動脈硬化)、移植片拒絶、および / または移植片対宿主疾患 (GVHD) を  
 治療することができる。本発明のペプチドを使用して、患者または生体サンプル (例  
 えば、体液、組織または細胞サンプル、細胞培養物上清) 中の FcRn を検出することもでき  
 る。本発明のペプチドを使用して、生体サンプル (例  
 えば、体液、組織または細胞サン  
 プル、細胞培養物上清) から FcRn を精製することもできる。

30

40

【 0146 】

したがって、本発明は、治療有効量の本発明のペプチドを投与する工程を含む、不適切  
 に発現した IgG 抗体または望ましくない量またはレベルの IgG によって特徴づけられ  
 る病状を調節する方法を提供する。1つの実施形態では、病態は、炎症性疾患、自己免疫  
 疾患、および癌から選択される。他の実施形態では、本発明は、IgG の血清濃度の調整  
 による病態の調節方法を提供する。一定の実施形態では、本発明の方法を使用して、治療  
 タンパク質 (例えば、エリスロポエチン、リソソーム蓄積酵素、または凝固因子 (例  
 えば、フィブリノゲン、プロトロンビン、第 V 因子、第 V I I 因子、第 V I I I 因子、第 I X  
 因子、第 X 因子、第 X I 因子、第 X I I 因子、第 X I I I 因子、またはフォンウィルブラ  
 ンド因子など) など) に対する免疫反応を、治療、防止、または調節することができる。

50

他の実施形態では、本発明の方法を使用して、遺伝子治療ベクターに対する免疫反応を治療、防止、または調節することができる。

【0147】

1. 自己免疫疾患

本発明のペプチドを使用して、自己免疫疾患（円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性リンパ増殖性症候群（ALPS）、自己免疫性血小板減少性紫斑（ATP）、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアック病 - 疱疹性皮膚炎、慢性疲労免疫機能障害症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー、瘢痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素病、クローン病、デゴス病、皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、円板状狼瘡、本態性混合性クリオグロブリン血症、線維筋痛 - 線維筋炎、グレーブス病、ギラン・バレー橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA腎症、インスリン依存型、若年性関節炎、扁平苔癬、狼瘡、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症（MG）、天疱瘡、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、全身強直症候群、高安動脈炎、側頭動脈炎 / 巨細胞動脈炎、移植片拒絶、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、脈管炎、白斑、およびウェゲナー肉芽腫症が含まれるが、これらに限定されない）を治療することができる。

10

20

【0148】

1つの実施形態では、自己免疫疾患は、水疱性類天疱瘡、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、重症筋無力症（MG）、天疱瘡（例えば、尋常性天疱瘡）、および移植片拒絶から選択される。

【0149】

別の実施形態では、本発明のペプチドを、免疫抑制のためのステロイドと組み合わせて使用することができる。

【0150】

2. 炎症性障害

本発明のペプチドを使用して、炎症性障害（喘息、潰瘍性大腸炎、および炎症性腸疾患症候群、アレルギー（アレルギー性鼻炎 / 副鼻腔炎、皮膚アレルギー（蕁麻疹 / 蕁麻疹、血管性浮腫、アトピー性皮膚炎）、食物アレルギー、薬物アレルギー、昆虫アレルギーが含まれる）、肥満細胞症、関節炎（骨関節炎、関節リウマチ、および脊椎関節症が含まれる）が含まれるが、これらに限定されない）を治療することができる。

30

【0151】

3. 治療タンパク質の投与が必要な疾患または容態

頻繁に、治療タンパク質の投与を必要とする疾患または容態では、被験体は、治療タンパク質に対して抗体を構築し、それにより、治療タンパク質のその意図する治療目的での利用を妨害する。したがって、本発明のペプチドを治療タンパク質と組み合わせて使用して、IgGレベル（IgG抗体は、治療タンパク質の生物学的利用能の減少を担う）の減少によって治療タンパク質の利点を強化することができる。

40

【0152】

したがって、1つの実施形態は、細胞を治療有効量の本明細書中に開示の任意のペプチドを接触させる工程であって、凝固因子が、フィブリノゲン、プロトロンビン、第V因子、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子、第XIII因子、またはフォンウィルブランド因子から選択される、接触させる工程を含む、凝固因子に対する免疫応答に起因する容態、疾患、または障害を調節、治療、または防止する方法を提供する。この方法を使用して、例えば、血友病Aまたは血友病Bを罹患した患者における凝固因子に対する免疫応答を調節、治療、または防止することができる。1つの実施形態では、本発明のペプチドは、第VII因子インヒビターを遮断する。

50

別の実施形態では、本方法を使用して、例えば、真性赤血球系無形成（PRCA）を罹患した患者における治療エリスロポエチンに対する免疫応答を調節、治療、または防止することができる。

#### 【0153】

##### 4. 遺伝子療法を必要とする疾患または容態

疾患または容態の治療のための遺伝子療法の首尾のよい実施の障害となるものには、導入遺伝子によってコードされる治療タンパク質に特異的な抗体の構築および導入遺伝子の送達に使用されるベクターも含まれる。したがって、本発明のペプチドを遺伝子療法と組み合わせることで投与して、IgGレベルの減少によってコードされる治療タンパク質の利点を強化することができる。これらの方法は、特に、IgG抗体が遺伝子療法ベクターまたはコードされる治療タンパク質の生物学的利用能の減少を担う状況で有用である。遺伝子療法ベクターは、例えば、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターであり得る。遺伝子療法を使用して治療することができる疾患には、嚢胞性線維症、血友病、PRCA、筋ジストロフィ、またはリソソーム蓄積症（例えば、ゴーシェ病およびファブリー病など）が含まれるが、これらに限定されない。

10

#### 【0154】

##### 5. FcRnのin Vivo画像化および検出

本発明のペプチドを、FcRnを検出するためのアッセイで使用することもできる。いくつかの実施形態では、アッセイは、本発明のペプチドのFcRnとの結合を検出する結合アッセイである。これらのアッセイでは、FcRnまたは本発明のペプチドのいずれかを固定することができ、その一方で、他方（FcRnまたは本発明のペプチドのいずれか）が固定化した結合パートナー上を通過する。FcRnまたは本発明のペプチドのいずれかを、検出可能に標識することができる。適切な標識には、放射性同位体（ $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{137}\text{Cs}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{223}\text{Ra}$ 、 $^{241}\text{Am}$ 、 $^{244}\text{Cm}$ 、および $^{99\text{m}}\text{Tc-MDP}$ が含まれるが、これらに限定されない）；検出可能な生成物を有する酵素（例えば、ルシフェラーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびガラクトシダーゼなど）；蛍光剤および蛍光標識（例えば、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルアルデヒド、およびフルオレサミン）；蛍光発光金属（例えば、EDTAなどの金属キレート基によって本発明のペプチドに結合した $^{152}\text{Eu}$ または他のランタニド系）；化学発光化合物（例えば、ルミノール、イソルミノール、テロマトリック（theromatic）アクリジニウムエステル、アクリジニウム塩、イミダゾール、およびシュウ酸エステル）；および生体発光化合物（例えば、ルシフェリンまたはエクオリン（緑色蛍光タンパク質）、および特定の結合分子（例えば、磁性粒子、マイクロスフィア、ナノスフィア、発光量子ドットナノ結晶などが含まれる。

20

30

#### 【0155】

あるいは、例えば、検出可能に標識して、シグナルを増幅することができる第2段階の抗体または試薬を含む特異的結合対を使用することができる。例えば、本発明のペプチドを、ビオチンに抱合することができ、西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合ストレプトアビジンを、第2段階の試薬として添加することができる。ジゴキシンおよび抗ジゴキシンにより、別の適切な結合部位が得られる。他の実施形態では、第2段階の抗体を、ペルオキシダーゼの存在下で変色する基質と組み合わせたペルオキシダーゼなどの酵素に抱合することができる。本発明のペプチドとFcRnとの間の結合の有無を、種々の方法（解離した細胞のフローサイトメトリー、顕微鏡法、X線撮影法、蛍光光度法、発色検出、蛍光体画像化、フィルム上の化学発光の検出、およびシンチレーションカウンティングが含まれる）によって決定することができる。かかる試薬およびその使用方法は、当該分野で周知である。

40

#### 【0156】

in vivo診断への適用のために、FcRnの発現によって少なくとも一部を特徴

50

づけることができる特定の組織またはさらに特定の細胞傷害を、十分な量の標識した本発明のペプチドの投与によって画像化することができる。

【0157】

*in vivo* 組織画像化に適切な広範な種々の金属イオンは、試験され、臨床的に利用されている。放射性同位体を使用した画像化のために、以下の特徴が一般に望ましい：(a) 被験体に対して低線量、(b) 核医学的手順を短期間に行うことが可能な高光子収量、(c) 十分な量の産生能力、(d) 許容可能な費用、(e) 投与準備が簡潔なこと、および(f) その後に患者を隔離する必要がないこと。これらの特長により、一般に、以下が得られる：(a) 最も重篤な器官への被爆が5 rad未満であること、(b) 注入から数時間以内に単一画像を得ることができること、(c) 粒子の放出によって放射性同位体が崩壊しないこと、(d) 同位体を容易に検出できること、および(e) 半減期が4日未満であること(Lamb and Kramer, "Commercial Production of Radioisotopes for Nuclear Medicine", In Radiotracers For Medical Applications, Vol. 1, Rayudu (Ed.), CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 17-62)。1つの実施形態では、金属は、テクネチウム-99mである。

10

【0158】

したがって、本発明は、放射性を示す金属を含む本発明の少なくとも1つのペプチドを含む有効量の組成物を被験体に投与する工程および放射性金属の崩壊から得たシンチグラフィ画像を記録する工程を含む、被験体の内部領域の画像を得る方法を提供する。同様に、本発明は、常磁性を示す金属を含む本発明の少なくとも1つのペプチドを含む有効量の組成物を被験体に投与する工程および被験体の内部領域のMR画像を記録する工程を含む、被験体の内部領域の磁気共鳴(MR)画像の画質を高める方法を提供する。

20

【0159】

本発明によって提供される他の方法は、金属を含む本発明の少なくとも1つのペプチドを含む有効量の組成物を被験体に投与する工程および被験体の内部領域の超音波画像を記録する工程を含む、被験体の内部領域の超音波画像の画質を高める方法を含む。本願では、金属は、任意の非毒性重金属イオンであり得る。金属を含むペプチド組成物を被験体に投与する工程および被験体の内部領域のX線画像を記録する工程を含む、被験体の内部領域のX線画像の画質を高める方法も提供する。放射性非毒性重金属イオンを使用することができる。

30

【0160】

本発明のペプチドを、米国特許第5,326,856号に記載のキレート剤などのキレート剤に結合することができる。次いで、ペプチド-キレート剤複合体を放射性標識して、IgGレベルの調節を含む疾患または容態の診断または治療のための造影剤を提供することができる。本発明のペプチドを、画像化または放射線療法で使用する放射性標識ペプチドの作製のために、米国特許第5,449,761号に開示の方法で使用することもできる。

【0161】

6. 投与および治療様式

本発明のペプチドを、静脈内、皮下、筋肉内、経口、舌下、口腔内、舌下、鼻腔内、直腸、膈内、または肺経路を介して投与することができる。本発明のペプチドを生体高分子内に埋め込むか結合して、所望の部位にキメラタンパク質を徐放することができる。

40

【0162】

本発明のペプチドの用量は、治療される疾患または容態、疾患または容態の重症度、被験体(その性別、年齢、体重、および所望の結果が含まれる)、および特に使用した投与経路に応じて変化するであろう。投薬量は、0.1から100,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重の範囲であり得る。1つの実施形態では、用量範囲は1~10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  である。別の実施形態では、用量範囲は、10~1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  である。別の実施形態では

50

、用量範囲は、100～500 μg/kgである。本発明のペプチドを、連続的または特定の間隔で投与することができる。in vitroアッセイを使用して、至適な用量範囲および/または投与スケジュールを決定することができる。当業者は、用量応答曲線を確立する日常的試験によって他の有効投薬量を容易に決定することができる。例えば、IgGレベルの増加または減少に必要な本発明のペプチドの量を、in vivo実験から計算することができる。当業者は、用量レベルは、特定の化合物の機能、症状の重症度、および副作用に対する被験体の感受性に依りて変化できると容易に認識し、当業者は、種々の手段によって所与の化合物の好ましい投薬量を容易に決定する。例えば、本発明のペプチドの用量を計算するために、当業者は、特定の使用薬剤に依りて、所望の効果をj得るのに必要な量に関する容易に利用可能な情報を使用することができる。

10

#### 【0163】

##### 7. 薬学的組成物

本発明はまた、少なくとも1つの本発明のペプチドおよび薬学的に許容可能なキャリアまたは賦形剤を含む薬学的組成物に関する。適切な薬学的キャリアの例は、Remington's Pharmaceutical Sciences by E.W. Martinに記載されている。賦形剤の例には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、イネ、小麦粉、石灰、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、およびエタノールなどが含まれ得る。組成物はまた、pH緩衝試薬および湿潤剤または乳化剤を含むことができる。

20

#### 【0164】

経口投与のために、薬学的組成物は、従来手段によって調製された錠剤またはカプセルの形態を取ることができる。組成物を、液体、例えば、シロップまたは懸濁液として調製することもできる。液体は、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体、または硬化食用脂肪）、乳化剤（レシチンまたはアカシア）、非水性ビヒクル（例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、または分留植物油）、および防腐剤（例えば、メチルまたはプロピル-p-ヒドロキシベンゾアートまたはソルビン酸）を含むことができる。調製物はまた、香味物質、着色料、および甘味剤を含むことができる。あるいは、組成物を、水または別の適切なビヒクルでの構成のための乾燥生成物として存在することができる。

30

#### 【0165】

口腔内および舌下投与のために、組成物は、従来のプロトコールにしたがった錠剤または口ゼンジの形態を取ることができる。

#### 【0166】

吸入投与のために、本発明で使用される化合物を、適切な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロメタン、二酸化炭素、または他の適切な気体）を含む加圧パックまたは噴霧器（例えば、PBSを含む）由来のエアゾールスプレーの形態で都合よく送達する。加圧エアゾールの場合、投薬単位を、バルブによって一定量を送達させることによって決定することができる。化合物とラクトースまたはデンプンなどの適切な粉末基剤との粉末混合物を含む、吸入器または空気吸入器で用いる例えばゼラチンのカプセルおよびカートリッジを処方することができる。

40

#### 【0167】

ボラス注射による非経口投与（すなわち、静脈内または筋肉内）のための薬学的組成物を処方することができる。注射用処方物は、単位投薬形態（例えば、防腐剤を添加したアンプルまたは複数回投与用容器）で提供することができる。組成物は、懸濁液、溶液、または油性もしくは水性ビヒクルの乳濁液などの形態を取ることができ、懸濁剤、安定剤、および/または分散剤などの処方剤（formulatory agent）を含む。あるいは、有効成分は、適切なビヒクル（例えば、無発熱物質水）での構成のための粉末形態であり得る。

#### 【0168】

50

例えば、カカオバターまたは他のグリセリドなどの従来の座剤用基剤を含む座剤または貯留浣腸剤としての直腸投与用の薬学的組成物を処方することもできる。

【0169】

本発明のペプチドを、米国特許第5,326,856号に記載のキレート剤などのキレート剤に結合することができる。次いで、ペプチド-キレート剤複合体を放射性標識して、IgGレベルの調節を含む疾患または容態の診断または治療のための造影剤を提供することができる。本発明のペプチドを、放射線療法で使用する放射性標識ペプチドの作製のために、米国特許第5,449,761号に開示の方法で使用することもできる。

【0170】

8. FcRnの精製

本発明のペプチドを使用して、FcRnを精製することもできる。いくつかの実施形態では、ペプチドを、適切なクロマトグラフィマトリックスに共有結合させて、有効なFcRn分離担体を形成する。次いで、FcRnを含む溶液を、クロマトグラフィ担体を通して、固定化結合パートナーにFcRnを非共有結合させる。FcRnを含む溶液は、体液、組織または細胞サンプル、細胞培養物上清などの生体サンプルに由来し得る。適切な溶液で固定化ペプチド:FcRn複合体を洗浄して夾雑物を除去し、次いで、適切な溶離液を使用してクロマトグラフィマトリックスからFcRnを放出させることによってFcRnを精製する。

10

【0171】

本発明のペプチドを、当業者に周知の多数の化学的アプローチを使用して、適切なクロマトグラフィマトリックスに結合することができる。例えば、本発明のペプチドを、適切な反応基(チオール、アミン、カルボン酸、アルコール、アルデヒド、アルキルハライド、N-アルキル-マレイミド、N-ヒドロキシ-スクシニミジルエステル、エポキシド、ヒドロキシルアミン、ヒドラジドなど)を含むマトリックスに結合することができる。

20

【0172】

他の実施形態では、本発明のペプチドを、適切なクロマトグラフィマトリックスに共有結合する化学的部分またはペプチド配列を含むように修飾することができる。例えば、ペプチドを、ピオチン部分で修飾し、アビジンタンパク質を含むクロマトグラフィマトリックスに非共有結合させることができる。あるいは、修飾ペプチドを、FcRn溶液とインキュベーションし、得られた混合物を、適切なクロマトグラフィマトリックスを通過させて、FcRn:ペプチド複合体を単離することができる。

30

【0173】

アフィニティ精製のためのペプチドの類似の使用例を、Kelleyら, "Development and Validation of an Affinity Chromatography Step Using a Peptide Ligand for cGMP Production of Factor VIII", In Biotechnology and Bioengineering, Vol. 87, No. 3, Wiley InterScience, 2004, pp. 400-412および米国特許第6,197,526号に見出すことができる。

40

【実施例】

【0174】

実施例は、純粋に本発明の例示を意図し、したがって、本発明を決して制限しないと見なすべきであり、上記考察の本発明の詳細な態様および実施形態も記載する。実施例は、下記の実験が実施した全てまたは唯一の実験であることを示すこと意図しない。使用した数字(例えば、量、温度など)に関して確実に正確であるように努力したが、いくつかの実験誤差および偏差を考慮すべきである。他で示さない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏であり、圧力は大気圧または大気圧付近である。

【0175】

実施例1:可溶性ヒトFcRn(shFcRn)の発現

文献に記載のように、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞中でグルタミン合成

50

酵素発現系を使用して、可溶性ヒトFcRn cDNAをクローニングし、発現し、精製した。米国特許第5,623,053を参照のこと。ヒトFcRnのタンパク質配列中のアミノ酸274位の後に終止コドン配置して、膜貫通領域を除去した。

#### 【0176】

実施例2：ヒトFcRnでのHEK293細胞のトランスフェクション

ヒト胎児由来腎臓(HEK)293細胞(ATCC, Manassas, VA)を、製造者の推奨するプロトコールに従って、Superfectトランスフェクション試薬(Qiagen, Valencia, CA)を使用してトランスフェクションした。図1に示す全長FcRn cDNA構築物(C.M. Storyら, J. Exp. Med. 180:2377-2381(1994), N.E. Simisterら, Eur. J. Immunol. 26:1527-1531(1996))を、プラスミドベクターとしてのpcDNA6(Invitrogen, Carlsbad, CA)に最初にクローニングして、FcRn発現ベクターFcRn:pcDNA6を生成した。図1にも示したヒト<sub>2</sub>m cDNA構築物を、プラスミドベクターとしてのpcDNA3(Invitrogen)に最初にクローニングし、ヒト<sub>2</sub>m発現ベクター<sub>2</sub>m:pcDNA3を生成した(D. Gussowら, J. Immunol. 139:3132-3138(1987))。

10

#### 【0177】

トランスフェクション前日に、HEK293細胞を、 $0.5 - 2.5 \times 10^6$ 細胞/100mm皿で播種し、cDMEM中にて37°Cおよび5%CO<sub>2</sub>で16時間インキュベーションした。cDMEMの組成は以下を含む：1L DMEM(Invitrogen番号11995-065)、10mLの1M HEPES(pH7.55)、10mL MEMアミノ酸溶液(Invitrogen番号11130-051)、10mL MEM非必須アミノ酸溶液(Invitrogen番号11140-050)、10mLの100mMピルビン酸ナトリウム(Invitrogen番号11360-070)、10mLのペニシリンストレプトマイシン液(Invitrogen番号15140-148)、10mL L-グルタミン溶液(Invitrogen番号25030-081)、1mLの2-メルカプトエタノール溶液を含む55mMダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水(DPBS)(Invitrogen番号21985-023)、100mL熱失活ウシ胎児血清(FBS)(Invitrogen)。トランスフェクション当日、5μgのFcRn:pcDNA6構築物および5μgの<sub>2</sub>m:pcDNA3 cDNAを、290μLのDMEM(Invitrogen)に添加した。溶液を数秒間混合し、遠心分離した。次いで、60μLのSuperfectトランスフェクション試薬(Qiagen)をDNA溶液に添加し、10秒間ボルテックスした。DNA/Superfect溶液を、室温で5~10分間インキュベーションし、その間に、細胞含有皿由来の培地を吸引し、細胞を4mLのPBSで1回洗浄した。DNA/Superfectの5~10分間のインキュベーション後、3mLの完全成長培地(cDMEM)をDNA/Superfect溶液に添加し、溶液を混合し、その直後に100mm皿中の細胞に添加した。

20

30

#### 【0178】

細胞を、DNA/Superfect溶液と37°Cおよび5%CO<sub>2</sub>で2~3時間インキュベーションした。DNA/Superfect溶液を含む培地を細胞から除去し、細胞を、PBSで3回洗浄し、新鮮なcDMEMを細胞に添加した。48時間のインキュベーション後、培地を、免疫プロット分析によって評価して、FcRn/<sub>2</sub>m複合体の一過性発現が起こっているかどうかを決定した。さらに、細胞を、1:4の比率で、抗生物質としての250μg/Lゲネチシン(Invitrogen)およびプラスチジン耐性の安定なトランスフェクタントについて選択するための5μg/Lプラスチジンを含むcDMEMに継代した。抗生物質の選択の4週間後、生存細胞を、1細胞/ウェルの密度で96ウェル組織培養プレートに播種した。最後に、12クローンを選択し、それぞれ拡大し、FcRnおよび<sub>2</sub>mについての免疫プロット分析によって発現についてチェックした。この分析により、FcRnおよび<sub>2</sub>m発現293クローン11が最も高い発現

40

50

レベルを示すことが同定され、これを、次のアッセイで使用した。

【0179】

実施例3：FcRn-IgGインヒビターについてのファージライブラリーのスクリーニング

FcRnへのIgG Fc部分の結合を阻害することができるペプチドを、Dyax Corp. (Cambridge, MA) から販売されている繊維状ファージディスプレイライブラリーのスクリーニングによって同定した。より具体的には、以下の3つのライブラリーを組み合わせ使用した：TN-9-IV、TN10-X、TN-11-I、およびTN-12-Iをスクリーニングで使用した。各ライブラリー中に含まれる各生存ファージの総数を、Dyaxプロトコールに記載のように、ライブラリーを大腸菌中で発現させ、クローン希釈でプレートした場合の各ライブラリーについて確立した形質転換体数によって反映させた。TN-9-IV、TN10-X、TN-11-I、およびTN-12-Iの形質転換体数は、それぞれ、 $3.2 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $2.7 \times 10^9$ 、および $1.4 \times 10^9$ であった。所与の体積中の生存ファージの絶対数を言及するための別の方法は、単位体積あたりのプラーク形成単位(pfu)の染色による方法である。

10

【0180】

A. ファージスクリーニングで使用した緩衝液

FcRn結合ペプチドのスクリーニングのために以下の緩衝液を使用した。

【0181】

1. NZCYMブロス：10g NZアミン-A；5g塩化ナトリウム、5g Bacto酵母抽出物(Difco)、1g Casアミノ酸、1g硫酸マグネシウム無水物粉末：成分を、800mLの水に溶解し、1N水酸化ナトリウムでpH7.5に調整し、水で総体積を1Lにし、20分間オートクレーブする。

20

【0182】

2. 結合緩衝液(BB)：PBS(pH6)+10mMEDTA.C.NZCYM-T：NZCYMブロス+12.5μg/mLテトラサイクリン。

【0183】

3. HBSS-E：ハンクス平衡塩溶液(Invitrogen)+10mMEDTA(Invitrogen)。

【0184】

4. MinA塩：10.5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(二塩基性リン酸カリウム)、4.5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(一塩基性リン酸カリウム)；1.0g(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(硫酸アンモニウム)、および0.5gクエン酸ナトリウムを1L水に溶解する。

30

【0185】

5. LBブロス：10g Bactotripton、5g Bacto酵母抽出物、10g塩化ナトリウムを、1L水に溶解し、20分間オートクレーブする。

【0186】

6. CBS(pH2)：50mMクエン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム：緩衝液をHClでpH2にし、濾過滅菌する。

【0187】

7. LB寒天：30g Bactotripton、15g Bacto酵母抽出物、30g塩化ナトリウムを3Lの水に溶解し、20分間オートクレーブする。

40

【0188】

8. LB軟寒天：20g Bactotriptonファン、10g Bacto酵母抽出物、20g塩化ナトリウム、14g Bacto寒天をボイルせずに穏やかに加熱しながら2Lの水に溶解した。

【0189】

9. TE緩衝液：10mM Tris、1mMEDTA(pH7)

B. スクリーニングプロトコール：ラウンド1

各ライブラリーの約100のランダムライブラリー等価物をその力価に応じてプールし

50

た。これは、以下を意味していた：24  $\mu\text{L}$ のTN9 - IV ( $1.3 \times 10^{10}$  pfu /  $\mu\text{L}$ )、12.5  $\mu\text{L}$ のTN10 - X ( $1.6 \times 10^{10}$  pfu /  $\mu\text{L}$ )、225  $\mu\text{L}$ のTN11 - I ( $1.2 \times 10^9$  pfu /  $\mu\text{L}$ )、および48.7  $\mu\text{L}$ のTN12 - I ( $2.9 \times 10^9$  pfu /  $\mu\text{L}$ )を、189  $\mu\text{L}$  PBS、75  $\mu\text{L}$ の氷冷17%ポリエチレングリコール (PEG) (平均分子量：8000 Da, Sigma - Aldrich, St. Louis, MO)、および75  $\mu\text{L}$ の3M塩化ナトリウムと混合し、氷上で30分間インキュベーションした。293クローン11細胞 (実施例2) の1つのT75フラスコを、HBSS - Eと1:3の比率で分割した。細胞を、1mL微量遠心管に移し、冷結合緩衝液で1回洗浄し、上清を除去した。細胞を、ファージと回転版上にて4で1.5時間インキュベーションした。インキュベーション後、細胞を、1mLの氷冷BBで5回洗浄し、各回に1400rpmで2分間遠心分離した。強力に結合したファージを、66  $\mu\text{M}$ ヒトIgG (Calbiochem, San Diego, CA)の添加によって溶離し、BBに透析した。ファージ - IgGミックスを、細胞と4で1時間インキュベーションした。遠心分離工程後 (1400rpmで2分間のスピン)、細胞ペレットを、最初に200  $\mu\text{L}$ の66  $\mu\text{M}$  IgGで洗浄し、遠心分離し (1400rpmで2分間のスピン)、最終回は100  $\mu\text{L}$  IgGで洗浄した。IgG洗浄物をIgG溶離物と合わせ、最終体積500  $\mu\text{L}$ となった。下記のように、溶離物中のファージの力価を測定し (titered)、増幅した。

#### 【0190】

##### C. ファージ力価

ファージ溶液を、100倍に希釈した。典型的には、2  $\mu\text{L}$ のファージ溶液を、198  $\mu\text{L}$ のNZCYMプロスに連続様式で添加して、 $10^{-10}$ まで希釈した。希釈したファージを、XL1 Blue MRF'大腸菌細胞の培養物に添加し、XL1 Blue MRF'大腸菌細胞を対数期まで成長させ、A600での光学密度 (600nmでのUV吸光度)を0.5に到達させた。培養物を、室温で10分間インキュベーションした。その後、0.5mLの感染細胞を、約55の3.5mLのmolten top寒天 (LBプロスとLB寒天との50/50混合物)に添加し、標準的な寒天プレートに広げ、37で一晚インキュベーションした。30~300個のプラークを含むプレートから力価を計算した。 $10^{-8}$ ファージ希釈物からプレートした50プラークを含むプレートについて、計算を以下のように行うであろう：50プラーク / 500  $\mu\text{L}$ 感染細胞  $\times$  感染中の10倍希釈物  $\times 10^8$ 倍ファージ希釈物 =  $10^8$ ファージ形成単位 /  $\mu\text{L}$ 。

#### 【0191】

その後のファージELISAおよび配列決定分析のために必要な場合、ファージプラークを含む各寒天プラグを、オートクレーブしたパスツールピペットで選別した。プラグを、96ウェル滅菌丸底組織培養プレート (Greiner)に分注し、これに、100  $\mu\text{L}$  / ウェルのTEを添加した。ファージを、37で2時間または4で一晚プラークから溶離した。

#### 【0192】

##### D. ファージ増幅

XL1 blue MRF'大腸菌細胞の培養物を、NZCYMプロス - T中で、飽和一晚培養物の100倍希釈物から培養物のA600での光学密度が0.5に到達するまで成長させた。細胞を、3500rpmで15分間の遠心分離によって濃縮し、その後、MinA塩に最初の体積の1/20に再懸濁した。選択ラウンド後に細胞から溶離したファージを、MinA塩で最終体積1mLに希釈し、1mLの濃縮細菌培養物に添加した。37の水浴中での15分間のインキュベーション後、ファージ - 細胞ミックスを、2mL  $2 \times$  NZCYMプロスに添加し、NZCYM + 50  $\mu\text{g}$  / mLアンピシリンを含む巨大なNUNCプレート上に乾燥するまで広げた。プレートを、37で14~18時間インキュベーションした。一晚で形成されたコロニーを、20mLのPBSの存在下で、拡大棒 (spreading bar) を使用して穏やかに掻き取った。PBS含有細菌およびファージを、遠心管に回収した。プレート上に残存した細菌を、10mL PBSの存

10

20

30

40

50

在下で再度掻き取った。最後の10 mLのPBSリンスをプレートに適用し、掻き取った全ての物質と共にプールした。細菌細胞を、遠心分離(3500 rpmで15分間)によってペレット化し、透明な上清を別の遠心管にデキャントし、再度明澄化し、最後に再度デキャントした。次いで、体積0.15 mLの17%PEG+3M NaClを上清に添加し、混合し、4で一晚保存した。遠心分離(8500 x gで30分間)によって沈殿ファージを回収した後、上清をデキャントした。ファージペレットを、小体積のPBSに再懸濁し、短時間のスピンによって明澄化し、体積0.15の17%PEG+3M NaClで再度沈殿させた。最終ファージペレットをPBSに再懸濁し、次の選択ラウンドのために調製物中で力価を測定した。

#### 【0193】

##### E. ラウンド2

1 mLの結合緩衝液にたった10個のランダムライブラリー等価物が希釈されるように、増幅したファージライブラリーを希釈した。非トランスフェクション293細胞のT75フラスコの1/3を、冷結合緩衝液で1回洗浄した。FcRnを発現しなかった細胞に結合することができるペプチドを発現したライブラリーからのファージの除去を含むサブトラクション工程を、15分間の非トランスフェクション細胞とのファージのインキュベーションによって2回行った。上清を回収した。次いで、293クローン11細胞のT75フラスコの1/3を、冷結合緩衝液で1回洗浄し、ファージと回転子中にて4で1.5時間インキュベーションした。1 mL冷結合緩衝液を使用して、細胞を5回洗浄および遠心分離し(1400 rpmで2分間のスピン)、強く結合したファージを、ファージ-細胞-IgG混合物の4で1時間のインキュベーションによって200 µLの66 µMヒトIgG(結合緩衝液中で透析)で溶離した。遠心分離後(1400 rpmで2分間のスピン)、上清を回収し、ペレットを200 µLの66 µM IgGで洗浄し、その後、100 µLの66 µM IgGで洗浄した。以下の標識ファージ力価およびファージ増幅の項に記載のように、溶離液中のファージの力価を測定し、増幅した。

#### 【0194】

##### F. ラウンド3

本ラウンドを、上のラウンド2に記載のように行った。ラウンド3の完了後、溶離液中のファージの力価を測定し、ファージELISAを使用して、IgG-FcRnインヒビターについてアッセイした。

#### 【0195】

##### G. ファージELISA

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって以下の工程を行い、FcRnに結合することができるペプチドをコードするファージを同定した。第1に、以下の溶液を調製した。

緩衝液A: PBS + 0.1% Tween + 0.5% BSA。

緩衝液B: 100 mM MES (pH 5.5) + 150 mM NaCl + 0.1% Tween。

緩衝液C: 50 mM MES (pH 6.0) + 150 mM NaCl + 0.1% Tween。

FcRnに結合する能力を証明するファージの増殖のためのXL1 blue MRF'大腸菌培養物を、一晚培養物の100倍希釈物からA600での光学密度が0.5になるまで成長させた。次いで、上記のように調製した10 µLの各ファージ溶離物を、96ウェルプレートのウェル中の30 µLのXL1 blue MRF'大腸菌細胞に添加し、室温で15分間インキュベーションした。次いで、50 µg/mLのアンピシリンを含む130 µLのNZCYMプロスを各ウェルに添加し、37で一晚インキュベーションした。

#### 【0196】

ストレプトアビジンコーティングされたBSAブロッキングしたマイクロタイタープレート(Pierce)を、200 µL/ウェルの緩衝液Aでのリンスおよび1 mg/mL

10

20

30

40

50

のビオチン化可溶性ヒトFcRn（実施例4、第A項）を含む緩衝液Aと4 で一晚コーティングすることによって調製した。FcRn含有緩衝液を破棄し、プレートを緩衝液Cで2回リンスした。次いで、70 $\mu$ Lの緩衝液Bをプレートの各ウェルに添加し、その後に30 $\mu$ Lのファージ含有細菌培養物を添加した。室温で1時間後、プレートを、200 $\mu$ Lの緩衝液Cで5回洗浄した。次いで、HRP抱合抗M13抗体（Amersham Pharmacia）の10000倍希釈物を含む100 $\mu$ Lの緩衝液Cを、各ウェルに添加した。プレートを、室温で1時間インキュベーションした。次いで、プレートを緩衝液Cで9回洗浄し、1ステップTMB（KPL）で発色させ、5～15分後に2M硫酸で発色を停止させ、Spectra Max Plusプレートリーダー（Molecular Devices）にて450nmで読み取った。

10

## 【0197】

## H. ファージDNAのPCR増幅

TE中のプラークから溶離したファージを、製造者の説明書（Promega）にしたがってPCR Core System IIキットの使用によって配列決定のために増幅させた。次いで、5mLの溶離ファージを、200 $\mu$ Mの各dNTP、500nMのプライマー3PCRUP（5'-CGGCGCAACTATCGGTATCAAGCTG-3'）（配列番号11）、500nMのプライマー3PCRDN（5'-CATGTACCGTAACACTGAGTTTCGTC-3'）（配列番号12）、1 $\times$ Taq DNAポリメラーゼ緩衝液（10 $\times$ :500mM KCl、25 の100mM Tris-HCl（pH9.0）、1% Triton X-100、15mM MgCl<sub>2</sub>）、1.25単位のTaq DNAポリメラーゼ酵素を含む反応混合物に添加した。反応物を、MJ Research PCT-200サーマルサイクラーの以下のプログラムに供した：94 で5分；94 で15秒間、55 で30秒間、および72 で60秒間からなる30サイクル、その後の72 で7分間。得られた産物を、製造者の説明書にしたがってQiaQuick PCR Prepキット（Qiagen）を使用して精製し、A260での吸光度によって定量し、プライマー3SEQ-80（5'-GATAAACCGATACAATTAAAGGCTCC-3'）（配列番号13）を使用して配列決定した。

20

## 【0198】

3ラウンドのスクリーニング後に増幅したファージの配列決定により、図1に示したアミノ酸配列をコードするDNA配列が明らかとなった。これらの「ファージヒット」を集合的に使用して、コンセンサスペプチド配列を同定し、以下のアミノ酸配列によって定義した：G-H-F-G-G-X-Y（配列番号14）。

30

## 【0199】

## 実施例4：ペプチド-IgG競合ELISA

繊維状ファージディスプレイライブラリーのスクリーニング由来の本発明のペプチドもFcRnへのIgGの結合を妨害することができるかどうかを決定するために、以下のELISAアッセイを考案し、実施した。

## 【0200】

## A.shFcRnのビオチン化

可溶性ヒトFcRn（shFcRn）を含むTris緩衝液を、2回（それぞれ、2LのPBS（pH8.0）で3時間）透析した。shFcRnの回収量を、280nmでの吸光度の測定によって決定した。shFcRn濃度を、吸光度の読み取り値 $\times$ shFcRnの減衰係数（ $=85880\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ）によって得た。透析したshFcRnの2倍モル過剰のSulfo-NHS-LC-ビオチン（Invitrogen, Carlsbad, CA）での4 で2時間の処理によって、ShFcRnのビオチン化を行った。その後、shFcRn-Sulfo-NHS-LC-ビオチン反応混合物を、2Lの冷PBSで2回透析し、その後に別の吸光度の読み取りを行って残存タンパク質の濃度を決定した。ビオチン化shFcRnを、必要になるまで0.1%アジ化ナトリウムを使用して4 で保存した。

40

50

## 【0201】

## B. ペプチド - IgG 競合 ELISA アッセイ

BSA (Pierce, Rockford, IL) でブロッキングした 96 ウェル ReactiBind ニュートラビジンコーティングプレートを、200  $\mu$ L / ウェルの緩衝液 A (緩衝液 A: PBS (pH 7.4) (Gibco, 14040)、0.5% BSA (無 IgG)、0.05% Tween-20) で 2 回洗浄した。ウェルを、100  $\mu$ L / ウェルの 1  $\mu$ g / mL ビオチン化 - shFcRn を含む緩衝液 A でコーティングした。プレートをシールし、37 で 2 時間インキュベーションした。その後、プレートを、200  $\mu$ L / ウェルの緩衝液 B (緩衝液 B: 100 mM MES (pH 6)、150 mM NaCl、0.5% BSA (無) IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)、0.05% Tween-20) で洗浄した。次いで、50  $\mu$ L / ウェルの 6 nM ヒト IgG (Calbiochem, San Diego, CA) を含む緩衝液 B および 50  $\mu$ L / ウェルの種々のペプチド競合物 (種々の濃度) を添加し、その結果、ウェル中の IgG の最終濃度は 3 nM であった。混合するために、プレートを 2 分間震盪し、シールし、37 で 2 時間インキュベーションした。インキュベーション後、液体をプレートから吸引し、100  $\mu$ L / ウェルのペルオキシダーゼ抱合ヤギ抗ヒト IgG F(ab') フラグメント特異的 F(ab')<sub>2</sub> フラグメント (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) を含む緩衝液 B を添加した。プレートに蓋をし、室温で 30 分間インキュベーションし、200  $\mu$ L / ウェルの氷冷緩衝液 B で 4 回洗浄した。SureBlue TMB 基質溶液 (100  $\mu$ L / ウェル、KPL, Gaithersburg, MD) を添加し、プレートを発色するまでプレートを室温でインキュベーションし、これに 5 ~ 10 分かかった。一旦発色すると、100  $\mu$ L / ウェルの TMB 停止溶液 (KPL, Gaithersburg, MD) を添加し、450 nm での吸光度を測定した。データを、吸光度対 50% 阻害濃度を誘導するためのペプチド濃度 (IC<sub>50</sub> 値) としてプロットした。

10

20

## 【0202】

## 実施例 5: ペプチド - IgG 競合 FACS アッセイ

繊維状ファージディスプレイライブラリーのスクリーニング由来の本発明のペプチドも細胞上の FcRn への IgG の結合を妨害するかどうかを決定するための実施例 4 に記載の ELISA アプローチの使用に加えて、以下の蛍光標示式細胞分取 (FACS) アッセイを考案し、実施した。

30

## 【0203】

## A. Alexa-Fluor-488 を使用した Synagis (登録商標) の標識

製造者の推奨するプロトコールにしたがって Alexa Fluor 488 Protein Labeling Kit (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用して、ヒト化 IgG1 (Synagis (登録商標), MedImmune, Gaithersburg, MD) を標識した。簡潔に述べれば、50  $\mu$ L の 1 M 重炭酸ナトリウム (pH 9.0) を、500  $\mu$ L の 2 mg / mL の IgG の PBS 溶液に添加した。このタンパク質溶液を、Alexa Fluor 488 スクシニミジルエステル (乾燥粉末) に添加し、室温で 1 時間インキュベーションした。キットの構成要素であるカラム (Bio-Rad BioGel P-30 Fine サイズ排除精製樹脂) を使用したサイズ排除クロマトグラフィによってタンパク質を精製した。サンプルをカラムにロードし、PBS で溶離した。第 1 の有色バンドは、標識タンパク質を含んでいた。溶離した IgG の 280 nm および 494 nm の吸光度の測定によって標識度を決定した。タンパク質のモル濃度を、以下の式を使用して決定した: タンパク質濃度 (M) = 「A<sub>280</sub> - (A<sub>494</sub> × 0.11) × 希釈係数」 / 203, 000。さらに、タンパク質 1 モルあたりの色素のモル数を導くために使用した式を以下であった: = A<sub>494</sub> × 希釈係数 / 71, 000 × タンパク質濃度 (M)。典型的には、IgG 1 モルあたり 4 ~ 7 モルの Alexa-Fluor 488 が組み込まれた。

40

## 【0204】

50

## B. 293クローン11細胞を使用したIgG-ペプチド競合FACSアッセイ

アッセイの準備において、5 µg/mL プラスチジンおよび250 µg/mL G418 (Gibco, Carlsbad, CA) を含む完全DMEM培地 (Gibco, Carlsbad, CA) 中のHEK293クローン11細胞 (実施例2) をスピンドウンし、緩衝液C (緩衝液C: 10 mM EDTA (Gibco) を含むダルベッコPBS (Gibco, Carlsbad, CA) ) 中に $3 \times 10^6$  細胞/mLの濃度で再懸濁した。細胞 (0.1 mL) を、96ウェルアッセイプレートの各ウェルにピペティングし、プレートを、Sorvall RT7ベンチトップ遠心分離機を使用して、2600 rpmで5分間遠心分離した。上清を穏やかにデカントし、プレートをペーパータオル上で拭き取った。種々の濃度で緩衝液C中に溶解したペプチド競合物 (90 µL) をプレートに添加し、マルチチャンネルピペットを使用して混合した。10 µLのAlexa 488標識Synagis (登録商標) をプレート上の各ウェルに添加し、その結果、Alexa 488標識Synagis (登録商標) の最終濃度は100 nMであった。プレートをフォイルで包み、氷上に1時間置き、その後Sorva II RT7ベンチトップ遠心分離機中にて2600 rpmで5分間遠心分離し、100 µLの緩衝液Cで1回洗浄し、第2の遠心分離ステップを行った。細胞を、200 µLの緩衝液Cに再懸濁し、Beckman Coulter EPICS XLフローサイトメーターで分析した。

10

## 【0205】

実施例6: 表面プラズモン共鳴 (SPR) を使用したペプチドの平衡結合定数 ( $K_D$ ) の決定方法

20

Biacore (BIA applications Handbook, version AB, section 4.2, Biacore AB, Uppsala, Sweden) によって推奨されるように、1-エチル-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドヒドロクロリド (EDC) (Biacore AB, Uppsala, Sweden) およびN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) (Biacore AB, Uppsala, Sweden) を含むカップリング反応によって、CM5 センサチップ (Biacore AB, Uppsala, Sweden) のデキストラン表面に可溶性ヒトまたはカニクイザルFcRnを架橋するために以下のステップを行った。FcRnタンパク質を、50 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.5) (Biacore AB, Uppsala, Sweden) 中で10~30 µg/mLの濃度に希釈し、これを使用して、センサチップ上の一方のフローセルをコーティングした。FcRnフローセル上の残存部位を、1 M エタノールアミン塩酸塩 (pH 8.5) (Biacore AB, Uppsala, Sweden) でブロックした。コントロールフローセルを、基準サブトラクションのためにエタノールアミンでブロックした。単量体ペプチドの分析のために、FcRnを、際集密度4000~5000反応単位 (RU) にコーティングした。ペプチド二量体の分析のために、FcRnを、2000~2500 RUの密度にコーティングした。BIA CORE 3000装置 (Biacore AB Uppsala, Sweden) を使用して、全てのSPRを測定した。pH 6またはpH 7.4のいずれかで行う測定のために、50 mM リン酸塩、100 mM 塩化ナトリウム、0.01% 界面活性剤P20 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) 中で実験を行った。

30

40

## 【0206】

## A. 単量体ペプチドの結合定数の代表的な決定手順

10個のペプチドの2倍希釈物を、20 µL/分の速度で2分間、FcRn-CM5チップに注入した。緩衝液を使用して、ペプチドをチップから2.5分間解離させた。HBS-P緩衝液 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) の30 µL/分の速度での30秒間の注入を使用して、任意の残存ペプチドをチップから除去した。センサグラムを作成し、BiaEVALソフトウェアバージョン3.1 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) を使用して分析した。各注入で認められた平衡RUを、濃度に対してプロットした。BiaEVALソフトウェア中に含まれる定常状態アフィニティモデルを使用したプロットの分析によって、平衡 $K_D$ 値を導いた。

50

## 【0207】

B. 二量体ペプチドの結合定数の代表的な決定手順

10個のペプチドの2倍希釈物を、30 $\mu$ L/分の速度で10分間、FcRn-CM5チップに注入した。緩衝液を使用して、ペプチドをチップから10分間解離させた。50mM Tris-塩酸塩、100mM NaCl、0.01%界面活性剤P20(pH9.0)を含む溶液の100 $\mu$ L/分での2回60分の注入を使用して、任意の残存ペプチドをチップから除去した。

## 【0208】

センサーグラムを作成し、BiaEvalソフトウェアバージョン3.1(Biacore AB, Uppsala, Sweden)を使用して分析した。各注入で認められた平衡RUを、濃度に対してプロットした。BiaEvalソフトウェア中に含まれる定常状態アフィニティモデルを使用したプロットの分析によって、平衡 $K_D$ 値を導いた。

10

## 【0209】

実施例7:ジスルフィド結合を含む単量体ペプチドの合成

フリットガラス丸底フラスコを使用した手作業またはAdvanced Chemtech 396-omega合成機(Advanced Chemtech, Louisville, KY)の使用のいずれかによる固相ペプチド合成を使用して、単量体を合成した。切断の際にC末端アミドを得るためのRinkアミド樹脂(Novabiochem, San Diego, CA)またはPAL-PEG-PS(Applied Biosystems, Foster City, CA)と組み合わせて、標準的なFmoc/tBuプロコールを使用した(W.C.Chan and P.D.White eds., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach Oxford University Press Inc. New York (2000))。カップリング試薬は、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ェート(HBTU)およびN-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)(Novabiochem, San Diego, CA)であった。塩基は、ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)であり、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)は溶媒であった(EM Science, Kansas City, MO)。典型的な合成サイクルは、20%ピペリジンを含むDMFを使用した2 $\times$ 10分間の脱保護工程、HOBT/HBTUを使用した2 $\times$ 30分間のアミノ酸カップリング、および無水酢酸/HOBTを使用した10分間のキャッピング工程を含んでいた。95%トリフルオロ酢酸、2.5%エタンジオール、1.5%トリイソプロピルシラン、および1%水での2時間の処理によってペプチドを樹脂から切断し、氷冷エーテルで沈殿させ、遠心分離し、エーテルで3回トリチュレートした(trituration)。

20

30

## 【0210】

酢酸:水の4:1混合物(EM Science, Kansas City, MO)中の1mg/mLの濃度へのペプチドの溶解によって、粗システイン含有ペプチドをその対応するジスルフィドに酸化した。10モル当量のヨウ素(1M水溶液、Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を溶液に添加し、反応混合物を室温で1時間混合した。透明な溶液が得られるまで1Mチオ硫酸ナトリウム(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を連続的に添加することによって反応を停止させた。反応混合物を真空下で濃縮し、その後、250mm $\times$ 21.2mm Phenomenex(Torrence CA)C18カラムを備えたWaters Prep600逆相HPLCシステム(Millford, MA)を使用して精製した。HPLC精製工程のために選択した溶離液は、0.1%(w/v)TFAを含む水におけるアセトニトリルの勾配であった。適切な画分を回収し、プールし、凍結乾燥した。ペプチドの同一性および純度を、250mm $\times$ 2mmカラム(Phenomenex, Torrence, CA)と組み合わせ、エレクトロスプレー質量分析器(Mariner ES-MS)(Applie

40

50

d Biosystems, Foster City, CA) を接続した逆相分析 HPLC によって確認した。

【0211】

表2は、ヒトFcRnに対する高い親和性およびIgG-FcRn相互作用を遮断する能力を有するペプチドを同定するために使用したペプチド発現ライブラリーのスクリーニング由来の元のファージペプチド配列を列挙している。第1列は、ペプチド識別番号を含む。第2列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第3列は、実施例4に概説したIgG競合ELISAによって決定された各ペプチドのIC<sub>50</sub>を含む。第4列および第5列は、それぞれ、実施例6に概説したBiacore分析によってpH6およびpH7.4で決定した各ペプチドのK<sub>D</sub>を含む。

10

【0212】

表2：元のファージペプチド配列

【0213】

【表2】

	配列	IC <sub>50</sub> μM	K <sub>D</sub> (pH 6) μM	K <sub>D</sub> pH 7.4 μM
配列番号 6	AGQRFCTGHFGLGPCNGPGTGG GK	36	5.7	45
配列番号 7	AGGGCVTGHFGGIYCNTQGTGGGK	33	5.2	34.7
配列番号 8	AGKIICSPGHFGGMYCQKGTGGG K	64	22	78
配列番号 9	AGPSYCIEGHIDGIYCFNAGTGGGK	49	8.8	76
配列番号 10	AGNSFCRGRPGHFGGCGYLFGTGG GK	33	9.4	93

20

表3は、配列番号6のペプチドの短縮を列挙している。ヒトFcRnに対するこれらのペプチドの結合パラメーターに及ぼす短縮の影響を示す。第1列は、ペプチド識別番号を含む。第2列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第3列は、実施例4に概説したIgG競合ELISAによって決定された各ペプチドのIC<sub>50</sub>を含む。第4列および第5列は、それぞれ、実施例6に概説したBiacore分析によってpH6およびpH7.4で決定した各ペプチドのK<sub>D</sub>を含む。

30

【0214】

表3：配列番号6の短縮

【0215】

【表3】

	配列	IC <sub>50</sub> μM	K <sub>D</sub> (pH 6) μM	K <sub>D</sub> pH 7.4 μM
配列番号 6	AGQRFCTGHFGLGPCNGPGTGGGK	36	5.7	45
配列番号 1	QRFCTGHFGLGPCNGP	26	5.1	30
配列番号 17	CTGHFGLGPCNGP	239	34	nd
配列番号 18	QRFCTGHFGLGPC	27	4.2	26
配列番号 19	CTGHFGLGPC	110	20	320
配列番号 20	TGHFGLGPC	>250	>250	nd
配列番号 21	RFCTGHFGLGPCNGP	24	2.9	78
配列番号 22	FCTGHFGLGPCNGP	67	11	120
配列番号 23	QRFCTGHFGLGPCNG	34	4.6	69
配列番号 24	QRFCTGHFGLGPCN	31	6.1	73

40

表4は、単一のアミノ酸がアラニンに置換された(アラニンスキャン)配列番号1由来のペプチドおよびペプチドアナログを列挙している。ヒトFcRnに対するこれらのペプチドの結合パラメーターに及ぼす置換の影響を示す。第1列は、ペプチド識別番号を含む。第2列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第3列は、実施例4に概説したIgG競合

50

E L I S A によって決定された各ペプチドの  $IC_{50}$  を含む。第 4 列および第 5 列は、それぞれ、実施例 6 に概説した B i a c o r e 分析によって pH 6 および pH 7.4 で決定した各ペプチドの  $K_D$  を含む。

表 4 . 配列番号 1 のアラニンスキャン

【 0 2 1 6 】

【 表 4 - 1 】

	配列	$IC_{50}$ $\mu M$	$K_D$ (pH 6) $\mu M$	$K_D$ pH 7.4 $\mu M$
配列番号 1	QRFCTGHFGGLYPCNGP	26	5.1	30
配列番号 25	QAFCTGHFGGLYPCNGP	23	7.7	nd

10

【 0 2 1 7 】

【 表 4 - 2 】

配列番号 26	QRACTGHFGGLYPCNGP	95	28	nd
配列番号 27	QRFCAHFGGLYPCNGP	30	4.9	nd
配列番号 28	QRFCTAHFGGLYPCNGP	>125	>250	nd
配列番号 29	QRFCTGAHFGGLYPCNGP	>125	>250	nd
配列番号 30	QRFCTGHAGGLYPCNGP	>125	>250	nd
配列番号 31	QRFCTGHFAGLYPCNGP	>125	230	200
配列番号 32	QRFCTGHFGALYPCNGP	>125	120	110
配列番号 33	QRFCTGHFGGAYPCNGP	107	26	81
配列番号 34	QRFCTGHFGGLAPCNGP	>125	>250	nd
配列番号 35	QRFCTGHFGGLYACNGP	96	14	100
配列番号 36	QRFCTGHFGGLYPCAGP	30	8	nd

20

表 5 は、配列番号 1 由来のペプチドおよびシステインのシステイン誘導体への置換を行ったペプチドアナログを列挙している。ヒト F c R n に対するこれらのペプチドの結合パラメーターに及ぼす置換の影響を示す。第 1 列は、ペプチド識別番号を含む。第 2 列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第 3 列は、実施例 4 に概説した I g G 競合 E L I S A によって決定された各ペプチドの  $IC_{50}$  を含む。第 4 列および第 5 列は、それぞれ、実施例 6 に概説した B i a c o r e 分析によって pH 6 および pH 7.4 で決定した各ペプチドの  $K_D$  を含む。

30

表 5 . 配列番号 1 のシステイン誘導体

【 0 2 1 8 】

【 表 5 】

	配列 ( 配列番号 1 & 37-47)	$IC_{50}$ $\mu M$	$K_D$ (pH 6) $\mu M$	$K_D$ pH 7.4 $\mu M$
配列番号 1	QRF-C-TGHFGGLYP-C-NGP	26	5.1	30
ペプチド番号 27	QRFCTGHFGGLYP-hC-NGP	21	3.9	
ペプチド番号 28	QRF-hC-TGHFGGLYP-hC-NGP	20	3.8	
ペプチド番号 29	QRF-c-TGHFGGLYP-C-NGP	>125	150	
ペプチド番号 30	QRF-C-TGHFGGLYP-c-NGP	125	31	
ペプチド番号 31	QRF-c-TGHFGGLYP-c-NGP	>500	200	
ペプチド番号 32	QRF-Pen-TGHFGGLYP-C-NGP	2	0.25	
ペプチド番号 33	QRF-C-TGHFGGLYP-Pen-NGP	18	2.7	
ペプチド番号 34	QRF-Pen-TGHFGGLYP-Pen-NGP	2	0.37	
ペプチド番号 69	QRF-Pen-TGHFGGLYP-hC-NGP	2	0.31	
ペプチド番号 70	QRF-hC-TGHFGGLYP-Pen-NGP	16	2.1	
ペプチド番号 295	QRF-Pen-TGHFG-p-LYP-Pen-NGP	1.6	0.28	

40

\* " P e n " = L - ペニシラミン ; " h C " = L - ホモシステイン ;

表 6 は、配列番号 1 および単一のアミノ酸が N - メチルアミノ酸に置換されたペプチド番号 3 2 由来のペプチドを列挙している。ヒト F c R n に対するこれらのペプチドの結合パラメーターに及ぼす置換の影響を示す。第 1 列は、ペプチド識別番号を含む。第 2 列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第 3 列は、実施例 4 に概説した I g G 競合 E L I S A

50

によって決定された各ペプチドの  $IC_{50}$  を含む。第4列および第5列は、それぞれ、実施例6に概説した *Biacore* 分析によって pH 6 および pH 7.4 で決定した各ペプチドの  $K_D$  を含む。

表6. 配列番号1およびペプチド番号32のN-メチルスキャン

【0219】

【表6】

	配列 (配列番号 1 & 48-60)	$IC_{50}$ $\mu M$	$K_D$ (pH 6) $\mu M$	$K_D$ pH 7.4 $\mu M$
配列番号 1	QRFCTGHFGGLYPCNGP	26	5.1	30
ペプチド番号 196	QRFC-NMeAla-GHFGGLYPCNGP	169	18	
ペプチド番号 32	QRF-Pen-TGHFGGLYP-C-NGP	2	0.25	
ペプチド番号 108	QRF-Pen-T-Sar-HFGGLYP-C-NGP	>125	88	
ペプチド番号 192	RF-Pen-TG-NMeHis-FGGLYPC	>250	nd	
ペプチド番号 110	QRF-Pen-TGH-NMePhe-GGLYPCNGP	>125	>250	
ペプチド番号 111	QRF-Pen-TGHF-Sar-GLYPCNGP	27	2	
ペプチド番号 112	QRF-Pen-TGHFG-Sar-LYPCNGP	0.9	0.11	
ペプチド番号 113	QRF-Pen-TGHFGG-NMeLeu-YPCNGP	1.6	0.086	
ペプチド番号 114	QRF-Pen-TGHFGGL-NMeTyr-PCNGP	>125	92	
ペプチド番号 146	RF-Pen-TGHFGG-NMeLeu-YPCNGP	2.1	0.059	0.28
ペプチド番号 147	RF-Pen-TGHFG-Sar-YPCNGP	1.0	0.058	0.35
ペプチド番号 187	QRF-Pen-TGHFG-Sar-NMeLeu-YPCNGP	0.42	0.046	0.23
ペプチド番号 235	RF-Pen-TGHFG-Sar-NMeLeu-YPC	0.49	0.031	0.17

10

20

\* Sar = サルコシン、NMeAla = N-メチルアラニン、「NMe」接頭辞は、N-メチルアミノ酸を示す。

【0220】

表7は、ペプチド番号32由来ペプチド誘導体の短縮を列挙している。ヒトFcRnに対するこれらのペプチドの結合パラメーターに及ぼす短縮の影響を示す。第1列は、ペプチド識別番号を含む。第2列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第3列は、実施例4に概説した *IgG* 競合 *ELISA* によって決定された各ペプチドの  $IC_{50}$  を含む。第4列および第5列は、それぞれ、実施例6に概説した *Biacore* 分析によって pH 6 および pH 7.4 で決定した各ペプチドの  $K_D$  を含む。

30

表7. ペプチド番号32の短縮

【0221】

【表7】

	配列 (配列番号 61-69)	$IC_{50}$ $\mu M$	$K_D$ (pH 6) $\mu M$	$K_D$ pH 7.4 $\mu M$
ペプチド番号 32	QRF-Pen-TGHFGGLYPCNGP	2	0.25	1.2
ペプチド番号 82	F-Pen-TGHFGGLYPC	1.7	0.31	5
ペプチド番号 83	NH <sub>2</sub> -F-Pen-TGHFGGLYPC	3.1	0.29	12
ペプチド番号 99	RF-Pen-TGHFGGLYPC	2.0	0.17	3.4
ペプチド番号 141	QRF-Pen-TGHFGpLYPC	1.5	0.19	
ペプチド番号 142	RF-Pen-TGHFGpLYPC	1.5	0.14	
ペプチド番号 143	F-Pen-TGHFGpLYPC	1.7		
ペプチド番号 144	RF-Pen-TGHFGpLYPCNGP	1.5		
ペプチド番号 145	F-Pen-TGHFGpLYPCNGP	3.1		

40

\* 「Pen」 = L-ペニシラミン。

【0222】

表8は、ペプチド番号32由来ペプチドおよび種々のアミノ酸およびアミノ酸誘導体と置換された（通常は、配列：Gly-Gly-Leuが存在する）ペプチドアナログを列挙している。第1列は、ペプチド識別番号を含む。第2列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第3列は、実施例4に概説した *IgG* 競合 *ELISA* によって決定された各ペプチドの  $IC_{50}$  を含む。

50

ドの  $IC_{50}$  を含む。第 4 列および第 5 列は、それぞれ、実施例 6 に概説した Biacore 分析によって pH 6 および pH 7.4 で決定した各ペプチドの  $K_D$  を含む。

表 8 . ペプチド番号 32 の Gly - Gly - Leu のアナログ

【 0 2 2 3 】

【 表 8 - 1 】

ペプチド番号	配列 (配列番号 70-98)	$IC_{50}$ $\mu M$	$K_D$	$K_D$
			(pH 6) $\mu M$	pH 7.4 $\mu M$
ペプチド番号 32	QRF-Pen-TGHF-GG-LYP-C-NGP	2	0.25	1.2
ペプチド番号 40	QRF-Pen-TGHF-G-p-LYPCNGP	1.4	0.23	1.1
ペプチド番号 41	QRF-Pen-TGHF-G-r-LYPCNGP	8.1	0.83	8.8
ペプチド番号 42	QRF-Pen-TGHF-G-h-LYPCNGP	12	2	20
ペプチド番号 43	QRF-Pen-TGHF-G-i-LYPCNGP	18	2.2	41
ペプチド番号 44	QRF-Pen-TGHF-G-f-LYPCNGP	13	1.7	100
ペプチド番号 45	QRF-Pen-TGHF-G-y-LYPCNGP	13	1.5	31
ペプチド番号 46	QRF-Pen-TGHF-G-Aib-LYPCNGP	2.4	0.48	5.3
ペプチド番号 47	QRF-Pen-TGHF-d-G-LYPCNGP	3.1	0.58	4.9

10

【 0 2 2 4 】

【 表 8 - 2 】

ペプチド番号 48	QRF-Pen-TGHF-p-G-LYPCNGP	5	0.79	21
ペプチド番号 49	QRF-Pen-TGHF-r-G-LYPCNGP	4.1	0.31	
ペプチド番号 50	QRF-Pen-TGHF-h-G-LYPCNGP	3.6	0.41	
ペプチド番号 51	QRF-Pen-TGHF-l-G-LYPCNGP	9.4	2.6	
ペプチド番号 52	QRF-Pen-TGHF-f-G-LYPCNGP	2.8	0.51	
ペプチド番号 53	QRF-Pen-TGHF-y-G-LYPCNGP	3.2	0.32	
ペプチド番号 54	QRF-Pen-TGHF-Aib-G-LYPCNGP	17	5.2	
ペプチド番号 74	QRF-Pen-TGHF-G-a-LYPCNGP	2	0.48	12
ペプチド番号 75	QRF-Pen-TGHF-a-G-LYPCNGP	4.5	0.49	4.5
ペプチド番号 148	QRF-Pen-TGHF-a-a-LYPCNGP	4.5	0.45	
ペプチド番号 149	QRF-Pen-TGHF-a-p-LYPCNGP	3.7	0.43	
ペプチド番号 150	QRF-Pen-TGHF-f-p-LYPCNGP	5.9	0.72	
ペプチド番号 151	QRF-Pen-TGHF-f-a-LYPCNGP	4.3	0.41	
ペプチド番号 152	QRF-Pen-TGHF-p-p-LYPCNGP	21	3.3	
ペプチド番号 153	QRF-Pen-TGHF-f-G-NMeLeu-YPCNGP	1.3	0.24	
ペプチド番号 154	QRF-Pen-TGHF-a-G-NMeLeu-YPCNGP	3.2	0.23	
ペプチド番号 155	QRF-Pen-TGHF-f-G-P-YPCNGP	39	18.3	
ペプチド番号 202	QRF-Pen-TGHF-p-P-LYPCNGP	>250	>100	
ペプチド番号 203	QRF-Pen-TGHF-f-P-LYPCNGP	22	3.8	
ペプチド番号 189	QRF-Pen-TGHF-a-Sar-LYPCNGP	1.7	0.19	

20

30

\* 「Sar」 = サルコシン、「Aib」 = アミノイソ酪酸。

【 0 2 2 5 】

表 9 は、ペプチド番号 32 由来ペプチドおよび種々のアミノ酸およびアミノ酸誘導体と置換された（通常は、配列：Arg - Phe - ペニシラミンが存在する）ペプチドアナログを列挙している。第 1 列は、ペプチド識別番号を含む。第 2 列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第 3 列は、実施例 4 に概説した IgG 競合 ELISA によって決定された各ペプチドの  $IC_{50}$  を含む。第 4 列および第 5 列は、それぞれ、実施例 6 に概説した Biacore 分析によって pH 6 および pH 7.4 で決定した各ペプチドの  $K_D$  を含む。

40

表 9 . ペプチド番号 32 の Arg - Phe - Pen のアナログ

【 0 2 2 6 】

【表 9】

	配列 (配列番号 99-102)	IC <sub>50</sub> μM	K <sub>D</sub> (pH 6) μM	K <sub>D</sub> pH 7.4 μM
ペプチド番号 32	QR-F-Pen-TGHFGGLYPCNGP	2	0.25	1.2
ペプチド番号 96	QR-I-Pen-TGHFGGLYPCNGP	11.4	1.8	
ペプチド番号 97	QR-Y-Pen-TGHFGGLYPCNGP	2.4	0.31	
ペプチド番号 98	QR-W-Pen-TGHFGGLYPCNGP	1.5	0.29	

表 10 は、ペプチド番号 32 由来ペプチドおよび種々のアミノ酸およびアミノ酸誘導体と置換された（通常は、配列：ペニシラミン - T h r - G l y が存在する）ペプチドアナログを列挙している。第 1 列は、ペプチド識別番号を含む。第 2 列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第 3 列は、実施例 4 に概説した I g G 競合 E L I S A によって決定された各ペプチドの I C<sub>50</sub> を含む。第 4 列および第 5 列は、それぞれ、実施例 6 に概説した B i a c o r e 分析によって pH 6 および pH 7.4 で決定した各ペプチドの K<sub>D</sub> を含む。

表 10 . ペプチド番号 32 の P e n - T h r - G l y のアナログ

【 0 2 2 7 】

【表 10】

	配列 (配列番号 103-106)	IC <sub>50</sub> μM	K <sub>D</sub> (pH 6) μM	K <sub>D</sub> pH 7.4 μM
ペプチド番号 32	QRF-Pen-I-GHFGGLYPCNGP	2	0.25	1.2
ペプチド番号 296	QRF-Pen-H-GHFGGLYPCNGP	3	0.15	0.96
ペプチド番号 195	QRF-Pen-G-GHFGGLYPCNGP	7.7	0.76	
ペプチド番号 213	QRF-Pen-(NMeAla)-GHFGGLYPCNGP	5.5	1.0	

" N M e A l a " = N 末端アラニン。

【 0 2 2 8 】

表 11 は、ペプチド番号 187 由来ペプチドおよび種々のアミノ酸およびアミノ酸誘導体と置換された（通常は、配列：P h e - G l y - サルコシンが存在する）ペプチドアナログを列挙している。第 1 列は、ペプチド識別番号を含む。第 2 列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第 3 列は、実施例 4 に概説した I g G 競合 E L I S A によって決定された各ペプチドの I C<sub>50</sub> を含む。第 4 列および第 5 列は、それぞれ、実施例 6 に概説した B i a c o r e 分析によって pH 6 および pH 7.4 で決定した各ペプチドの K<sub>D</sub> を含む。

表 11 . ペプチド番号 187 の P h e - G l y - S a r のアナログ

【 0 2 2 9 】

【表 1 1】

ペプチド番号	配列 (配列番号 107-119)	IC <sub>50</sub> μM	K <sub>D</sub>	K <sub>D</sub>
			(pH 6) μM	pH 7.4 μM
187	QRF-Pen-TGHF- <u>G</u> -Sar-NMeLeu- YPCNGP	0.42	0.046	0.23
188	QRF-Pen-TGHF- <u>a</u> -Sar-NMeLeu- YPCNGP	6.5	0.73	
235	RF-Pen-TGHF- <u>G</u> -Sar-NMeLeu-YPC	0.49	0.031	0.17
217	RF-Pen-TGHF- <u>i</u> -Sar-NMeLeu-YPC	11	1.4	
218	RF-Pen-TGHF- <u>y</u> -Sar-NMeLeu-YPC	>50	13	
219	RF-Pen-TGHF- <u>j</u> -Sar-NMeLeu-YPC	4	0.47	
220	RF-Pen-TGHF- <u>w</u> -Sar-NMeLeu-YPC	11	2.7	
240	RF-Pen-TGHF- <u>i</u> -Sar-NMeLeu-YPC	71	4.8	
241	RF-Pen-TGHF- <u>s</u> -Sar-NMeLeu-YPC	23	1.1	
242	RF-Pen-TGHF- <u>d</u> -Sar-NMeLeu-YPC	33	2.6	
243	RF-Pen-TGHF- <u>n</u> -Sar-NMeLeu-YPC	29	2.1	
244	RF-Pen-TGHF- <u>e</u> -Sar-NMeLeu-YPC	6.4	0.58	
245	RF-Pen-TGHF- <u>g</u> -Sar-NMeLeu-YPC	4.5	0.36	

\* 「S a r」 = サルコシン、「A i b」 = アミノイソ酪酸。

## 【0230】

表 1 2 は、ペプチド番号 3 2 由来ペプチドおよび種々のアミノ酸およびアミノ酸誘導体と置換された（通常は、配列：H i s - P h e - G l y が存在する）ペプチドアナログを列挙している。第 1 列は、ペプチド識別番号を含む。第 2 列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第 3 列は、P h e アナログ側鎖の化学構造を示す。列 4 は、実施例 4 に概説した I g G 競合 E L I S A によって決定された各ペプチドの I C<sub>50</sub> を含む。第 5 列は、実施例 6 に概説した B i a c o r e 分析によって pH 6 で決定した各ペプチドの K<sub>D</sub> を含む。



















表 1 2 . ペプチド番号 3 2 の H i s - P h e - G l y のアナログ

## 【0231】

10









20

【表 1 2 - 1】

ペプチド番号	配列 (配列番号 120-145)	Phe アナログ の側鎖	IC <sub>50</sub> μM	K <sub>D</sub> (pH 6) μM	
ペプチド番号 32	QRF-Pen-TGH-F-GGLYPCNGP		2	0.25	
ペプチド番号 55	QRF-Pen-TGH-(4-アミノ-Phe)-GGLYPCNGP		13	1	
ペプチド番号 56	QRF-Pen-TGH-(4-メキシ-Phe)-GGLYPCNGP		100	18	
ペプチド番号 57	QRF-Pen-TGH-(ペンタフルオロ-Phe)-GGLYPCNGP		120	70	10
ペプチド番号 58	QRF-Pen-TGH-(2-ピリジルアラニン)-GGLYPCNGP		90	1.2	
ペプチド番号 59	QRF-Pen-TGH-(3-ピリジルAla)-GGLYPCNGP		60	19	
ペプチド番号 60	QRF-Pen-TGH-(4-ニトロ-Phe)-GGLYPCNGP		>125	84	
ペプチド番号 61	QRF-Pen-TGH-(1-ナフチルアラニン)-GGLYPCNGP		13	2.2	
ペプチド番号 62	QRF-Pen-TGH-(2-ナフチルアラニン)-GGLYPCNGP		90	11	
ペプチド番号 88	QRF-Pen-TGH-(2-MePhe)-GGLYPCNGP		1	0.20	20
ペプチド番号 89	QRF-Pen-TGH-(3-MePhe)-GGLYPCNGP		4.1	0.67	
ペプチド番号 90	QRF-Pen-TGH-(4-MePhe)-GGLYPCNGP		1.7	0.20	
ペプチド番号 92	QRF-Pen-TGH-(ホE-Phe)-GGLYPCNGP		80	7.8	
ペプチド番号 93	QRF-Pen-TGH-(Cha)-GGLYPCNGP		31	4.5	
ペプチド番号 94	QRF-Pen-TGH-(PheNHAc)-GGLYPCNGP		>125	270	
ペプチド番号 95	QRF-Pen-TGH-W-GGLYPCNGP		26	2.7	30
ペプチド番号 102	QRF-Pen-TGH-(フェニル Gly)-GGLYPCNGP		>125	>250	
ペプチド番号 103	QRF-Pen-TGH-(Tic)-GGLYPCNGP	 X=アミノ酸の骨格窒素	>125	>250	

【 0 2 3 2 】

【表 1 2 - 2】

ペプチド番号	104	QRF-Asp-TGH-(2MePhe)-GGLYP-Lys-NGP <sup>1</sup>		11
ペプチド番号	221	RF-Pen-TGH-(2-Cl-Phe)-GGLYPC		4
ペプチド番号	222	RF-Pen-TGH-(3-Cl-Phe)-GGLYPC		3.7
ペプチド番号	223	RF-Pen-TGH-(4-Cl-Phe)-GGLYPC		43
ペプチド番号	224	RF-Pen-TGH-(3,3-Di-Phe)-GGLYPC		32
ペプチド番号	225	RF-Pen-TGH-(4,4-Bi-Phe)-GGLYPC		>125
ペプチド番号	226	RF-Pen-TGH-(4-t-ブチル-Phe)-GGLYPC		>125
ペプチド番号	267	RF-Pen-TGH-((D/L)-ペンタメチル Phe)-G-Sar-NMeLeu-YPC		16

10

\* 「Sar」 = サルコシン ; 「NMeLeu」 = N末端ロイシン、

<sup>1</sup>SYN927は、Asp側鎖とLys側鎖との間のアミド結合によって環状化されている。

【0233】












表13は、単一のアミノ酸がチロシンに置換された種々のペプチドおよびペプチドアナログを列挙している。ヒトFcRnに対するこれらのペプチドの結合パラメーターに及ぼす置換の影響も示す。第1列は、ペプチド識別番号を含む。第2列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第3列は、Tyrアナログ側鎖の化学構造を示す。第4列は、実施例4に概説したIgG競合ELISAによって決定された各ペプチドのIC<sub>50</sub>を含む。第5列および第6列は、それぞれ、実施例6に概説したBiacore分析によってpH6およびpH7.4で決定した各ペプチドのK<sub>D</sub>を含む。

20

表13. チロシン置換

【0234】

【表13】

配列番号	配列 (配列番号 1 & 146-155)	Tyr アナログの 側鎖	IC <sub>50</sub> μM	K <sub>D</sub> (pH 6) μM	K <sub>D</sub> pH 7.4 μM
配列番号 1	QRFCTGHFGGL-Y-PCNGP		26	5.1	30
ペプチド番号 26	QRFCTGHFGGL-F-PCNGP		>125	230	
ペプチド番号 32	QRF-Pen-TGHFGGL-Y-PCNGP		2	0.25	1.2
ペプチド番号 63	QRF-Pen-TGHFGGL-(4-アミノ-Phe)-PCNGP		110	34	
ペプチド番号 64	QRF-Pen-TGHFGGL-(4-メトキシ-Phe)-PCNGP		120	31	
ペプチド番号 65	QRF-Pen-TGHFGGL-(ペンタフルオロ-Phe)-PCNGP		>125	72	
ペプチド番号 66	QRF-Pen-TGHFGGL-(2-ピリジルAla)-PCNGP		>125	120	
ペプチド番号 67	QRF-Pen-TGHFGGL-(3-ピリジルAla)-PCNGP		92	34	
ペプチド番号 68	QRF-Pen-TGHFGGL-(4-ニトロ-Phe)-PCNGP		122	180	
ペプチド番号 87	QRF-Pen-TGHFGGL-(2-ニトロ-Tyr)-PCNGP		>125	290	
ペプチド番号 140	QRF-Pen-TGHFGGL-(4-フルオロ-Phe)-PCNGP		26	2.2	24

30

40

50

表 1 4 は、ペプチド番号 3 2 由来ペプチドおよび種々のアミノ酸およびアミノ酸誘導体と置換された（通常は、配列：G l y - L e u が存在する）ペプチドアナログを列挙している。第 1 列は、ペプチド識別番号を含む。第 2 列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第 3 列は、実施例 4 に概説した I g G 競合 E L I S A によって決定された各ペプチドの I C <sub>50</sub> を含む。第 4 列および第 5 列は、それぞれ、実施例 6 に概説した B i a c o r e 分析によって p H 6 および p H 7 . 4 で決定した各ペプチドの K <sub>D</sub> を含む。

表 1 4 . ペプチド番号 3 2 の G l y - L e u のアナログ

【 0 2 3 5 】

【表 1 4】

ペプチド番号	配列 ( 配列番号 156-164)	I C <sub>50</sub> μM	K <sub>D</sub>	K <sub>D</sub>
			(pH 6) μM	pH 7.4 μM
ペプチド番号 32	QRF-Pen-TGHFGG-L-YPCNGP	2	0.25	1.2
ペプチド番号 84	QRF-Pen-TGHFGG-H-YPCNGP	6.5	0.38	2.5
ペプチド番号 101	QRF-Pen-TGHFGG-I-YPCNGP	3.4	0.34	
ペプチド番号 115	QRF-Pen-TGHFGG-E-YPCNGP	4.1	0.40	
ペプチド番号 116	QRF-Pen-TGHFGG-W-YPCNGP	1.7	0.17	
ペプチド番号 117	QRF-Pen-TGHFGG-M-YPCNGP	7.7	0.44	
ペプチド番号 118	QRF-Pen-TGHFGG-L-YPCNGP	8.6	0.80	
ペプチド番号 237	RF-Pen-TGHFGG-W-YPC	2.8	0.14	
ペプチド番号 238	QRF-Pen-TGHFG-Sar-W-YPCNGP	1.0	0.068	

10

表 1 5 は、ペプチド番号 3 2 由来ペプチドおよびグリシンおよびロイシンが共にジペプチド模倣物と置換された（通常は、配列：G l y - L e u が存在する）ペプチドアナログを列挙している。第 1 列は、ペプチド識別番号を含む。第 2 列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第 3 列は、配列中の X の同一性についての説明を示す。第 4 列は、X と指定されたアナログの化学構造を示す。第 5 列は、実施例 4 に概説した I g G 競合 E L I S A によって決定された各ペプチドの I C <sub>50</sub> を含む。第 6 列は、実施例 6 に概説した B i a c o r e 分析によって p H 6 で決定した各ペプチドの K <sub>D</sub> を含む。

表 1 5 . ペプチド番号 3 2 の G l y - L e u でペプチド模倣アナログ

【 0 2 3 6 】

【表 1 5】

ペプチド番号	配列 ( 配列番号 165-167)	X の説明	X の構造	I C <sub>50</sub>	K <sub>D</sub>
				μM	(pH 6) μM
ペプチド番号 32	QRF-Pen-TGHFG-X-YPCNGP	Gly-Gly-Leu		2.0	0.25
ペプチド番号 216	QRF-Pen-TGHFG-X-YPCNGP	L,L- フリーデインガー ラクタム		19	
ペプチド番号 194	QRF-Pen-TGHFG-X-YPCNGP	D,L- フリーデインガー ラクタム		4.9	

30

実施例 8 : ヒスチジンアナログを含むペプチドの合成

40

以下の修飾ヒスチジンアナログを除く単量体ペプチドジスルフィドの合成について実施例 7 に記載のように、修飾ヒスチジンアナログ（表 1 6 ）を合成した。ペプチド番号 9 9 に対する完全に保護されたペプチドアナログを含む樹脂を非希釈ヨウ化メチル中で 1 5 時間懸濁することによってペプチド番号 2 5 9 を合成した。上記のように樹脂をジクロロメタンで洗浄し、ペプチドを樹脂から切断し、酸化し、H P L C によって精製して、モノメチル化ヒスチジンペプチド（ペプチド番号 2 5 9 ）を得た。

【 0 2 3 7 】

ペプチド番号 9 9 に対する完全に保護されたペプチドアナログを含む樹脂を非希釈ヨウ化メチル中で 7 2 時間懸濁することによってペプチド番号 2 6 0 を合成した。上記のように樹脂をジクロロメタンで洗浄し、ペプチドを樹脂から切断し、酸化し、H P L C によ

50

て精製して、ジメチル化ヒスチジンペプチド（ペプチド番号260）を得た。

【0238】

ペプチド番号248に対する完全に保護されたペプチドアナログを含む樹脂を窒素下でジクロロメタンに懸濁することによってペプチド番号269を合成した。10モル当量の2,4,6-トリ-tert-ブチルピリジン（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）を懸濁液に添加し、その後に、5モル当量のメチル-トリフルオロメタン-スルホナート（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）を添加した。震盪しながら反応を4時間進行させ、最初にジクロロメタンでリンスし、その後にジメチルホルムアミドでリンスし、最後に、ジクロロメタンで再度リンスした。記載のようにペプチドを樹脂から切断し、酸化し、HPLCによって精製して、N-メチル-チアゾリウムペプチド（ペプチド番号269）を得た。

10

【0239】

33%エタノール、10%アセトニトリル、10%N,N-ジメチルホルムアミドを含む100mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）中での30当量の硫酸銅、30当量のアスコルビン酸、および10当量のアジ化ナトリウムでのペプチド番号261の処理によってペプチド番号271を合成した。反応を2時間進行させ、上記のように混合物をHPLCによって精製して、ペプチド（ペプチド番号271）を含む1,2,3-トリアゾール側鎖を得た。

【0240】

表16は、単一のアミノ酸がヒスチジンに置換された種々のペプチドおよびペプチドアナログを列挙している。ヒトFcRnに対するこれらのペプチドの結合パラメーターに及ぼす置換の影響も示す。第1列は、ペプチド識別番号を含む。第2列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第3列は、Hisアナログ側鎖の化学構造を示す。第4列は、実施例4に概説したIgG競合ELISAによって決定された各ペプチドのIC<sub>50</sub>を含む。第5列および第6列は、それぞれ、実施例6に概説したBiacore分析によってpH6およびpH7.4で決定した各ペプチドのK<sub>D</sub>を含む。

20

表16. ヒスチジン置換







【0241】

【表 16 - 1】

配列 (配列番号 1 & 168-196)		His アナログ の側鎖	IC <sub>50</sub> μM	K <sub>D</sub> (pH 6) μM	K <sub>D</sub> pH 7.4 μM	
配列番号 1	QRFCTG- <u>H</u> -FGGLYPCNGP		26	5.1	30	
ペプチド番号 36	QRFCTG- <u>Dab</u> -FGGLYPCNGP		>125	211		
ペプチド番号 32	QRF-Pen-TG- <u>H</u> -FGGLYP-C-NGP		2	0.25	1.2	
ペプチド番号 91	QRF-Pen-TG- <u>Thz</u> -FGGLYPCNGP		44	7.9	21	10
ペプチド番号 109	QRF-Pen-TG- <u>Dap</u> -FGGLYPCNGP		>125	>100		
ペプチド番号 297	QRF-Pen-TG- <u>Dap( グアノル )</u> -FGGLYPCNGP		54	13	16	
ペプチド番号 138	QRF-Pen-TG-(1Me) <u>His</u> -FGGLYPCNGP		3.4	0.74	14	
ペプチド番号 139	QRF-Pen-TG- <u>Dab</u> -FGGLYPCNGP		64	7.3	8.4	
ペプチド番号 192	RF-Pen-TG- <u>NMeHis</u> -FGGLYPC		>250	nd	nd	
ペプチド番号 248	RF-Pen-TG- <u>Thz</u> -FG-Sar-NMeL-YPC		1.6	.84	1.1	20
ペプチド番号 249	RF-Pen-TG- <u>2ピリジル</u> Ala-FG-Sar-NMeL-YPC		6.2	.33	0.41	
ペプチド番号 250	RF-Pen-TG- <u>3ピリジル</u> Ala-FG-Sar-NMeL-YPC		1.2	.064	0.26	
ペプチド番号 251	RF-Pen-TG- <u>チエニル</u> Ala-FG-Sar-NMeL-YPC		45	2	3	
ペプチド番号 253	RF-Pen-TG- <u>Dab</u> -FG-Sar-NMeL-YPC		16	1.2	1.2	
ペプチド番号 254	RF-Pen-TG- <u>Orn</u> -FG-Sar-NMeL-YPC		12	1.3	1.2	
ペプチド番号 255	RF-Pen-TG- <u>Lys</u> -FG-Sar-NMeL-YPC		40	1.3	1.1	
ペプチド番号 256	RF-Pen-TG- <u>Arg</u> -FG-Sar-NMeL-YPC		5.5	0.5	0.5	30
ペプチド番号 257	RF-Pen-TG- <u>4グアノル</u> Phe-FG-Sar-NMeL-YPC		1.7	0.074	0.073	
ペプチド番号 258	RF-Pen-TG- <u>4 アミノ</u> Phe-FG-Sar-NMeL-YPC		4.6	0.22	1.1	
ペプチド番号 259	RF-Pen-TG- <u>His(Me)</u> -FGGLYPC		2.9	0.14	0.38	
ペプチド番号 260	RF-Pen-TG- <u>His(Me)2</u> -FGGLYPC		4.4	0.19	0.46	
ペプチド番号 261	RF-Pen-TG- <u>プロピル</u> Gly-FG-Sar-NMeLeu-YPC		160	13	11	
ペプチド番号 262	RF-Pen-TG-( <u>2-ピロリジン</u> Ala)-FG-Sar-NMeLeu-YPC		150	8.4	13	40

【 0 2 4 2 】

【表 16 - 2】

ペプチド番号 263	RF-Pen-TG-(3-ピペリジニル Ala)-FG-Sar-NMeLeu-YPC		6.3	0.66	0.86
ペプチド番号 264	RF-Pen-TG-(4-ピペリジニル Ala)-FG-Sar-NMeLeu-YPC		85	5.2	6.4
ペプチド番号 265	RF-Pen-TG-FG-Sar-NMeLeu-YPC		27	3.3	4.2
ペプチド番号 266	RF-Pen-TG-AFG-Sar-NMeLeu-YPC	CH <sub>3</sub>	>100	9.9	13
ペプチド番号 268	RF-Pen-TG-(4-ピリジニル Ala)-FG-Sar-NMeLeu-YPC		1.3	0.067	0.28
ペプチド番号 269	RF-Pen-TG-Thz(Me)-FG-Sar-NMeL-YPC-CONH <sub>2</sub>		2.4	0.11	0.11
ペプチド番号 271	RF-Pen-TG-トリアゾリル Ala-FG-Sar-NMeL-YPC		5.7	0.32	0.36

10

実施例 9 : Gly - Gly のペプチド模倣物を含むペプチドの合成

全ての Gly - Gly アミノ酸模倣物 (表 17) を、その Fmoc - アミノ保護アミノ酸として組み込み、これは、他で示さない限り、市販のものである (Chem - Implex, Wood Dale, IL)。3 (R) - 3 - アミノ - 2 - オキソ - 1 - ピペリジン - 酢酸を含むペプチドを、R. M. Freidinger ら, J. Org. Chem. 47 : 104 - 109 (1982) に記載のプロトコールにしたがったペプチド番号 227 への 3 (R) - 3 - アミノ - 2 - オキソ - 1 - ピペリジン - 酢酸の N - Fmoc 誘導体の組み込みによって合成した。3 (R) - 3 - アミノ - 2 - オキソ - 1 - ピロリジン酢酸を含むペプチドを、R. M. Freidinger ら, J. Org. Chem. 47 : 104 - 109 (1982) に記載のプロトコールにしたがったペプチド番号 214 への 3 (R) - 3 - アミノ - 2 - オキソ - 1 - ピロリジン酢酸の N - Fmoc 誘導体の組み込みによって合成した。5, 5 - 二環式ジペプチド模倣物を含むペプチドを、全て D - アミノ酸を使用したことを除いて N. L. Subasinghe ら, J. Med. Chem. 36 : 2356 - 2361 (1993) に記載のプロトコールにしたがったペプチド番号 197 またはペプチド番号 198 への 5, 5 - 二環式ジペプチド模倣物の組み込みによって合成した。6, 5 - 二環式ジペプチド模倣物を含むペプチドを、全て D - アミノ酸を使用したことを除いて F. A. Etkorn ら, J. Am. Chem. Soc. 116 : 10412 (1994) に記載のプロトコールにしたがったペプチド番号 204 への 6, 5 - 二環式ジペプチド模倣物の組み込みによって合成した。(D, L) - フリーディングーラクタムを含むペプチドを、D - メチオニンの代わりに L - メチオニンを使用したことを除いて R. M. Freidinger ら, J. Org. Chem. 47 : 104 - 109 (1982) に記載のプロトコールにしたがったペプチド番号 216 への (D, L) - フリーディングーラクタムの組み込みによって合成した。

20

30

【0243】

表 17 は、配列番号 1 由来ペプチドおよび種々のアミノ酸およびアミノ酸誘導体と置換された (通常は、2 つの隣接するグリシン (Gly - Gly) が存在する) ペプチドアナログを列挙している。第 1 列は、ペプチド識別番号を含む。第 2 列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第 3 列は、実施例 4 に概説した IgG 競合 ELISA によって決定された各ペプチドの IC<sub>50</sub> を含む。第 4 列および第 5 列は、それぞれ、実施例 6 に概説した Biacore 分析によって pH 6 および pH 7.4 で決定した各ペプチドの K<sub>D</sub> を含む。

40

表 17 . 配列番号 1 の Gly - Gly のアナログ

【0244】

【表 17】

	配列 (配列番号 & 197-201)	IC <sub>50</sub> μM	K <sub>D</sub> (pH 6) μM	K <sub>D</sub> pH 7.4 μM
配列番号 1	QRFCTGHFG <u>G</u> LYPCNGP	26	5.1	30
ペプチド番号 22	QRFCTGHF- <u>α</u> -GLYPCNGP	48	10	137
ペプチド番号 23	QRFCTGHFG- <u>α</u> -LYPCNGP	57	12	184
ペプチド番号 24	QRFCTGHF- <u>α-α</u> -LYPCNGP	69	22	>250
ペプチド番号 25	QRFCGHF- <u>betaAla</u> -LYPCNGP	>125	>250	nd
ペプチド番号 35	QRFCTGHF- <u>Apa</u> -LYPCNGP	>125	220	nd

10

「beta-Ala」 = -アラニン；「Apa」 = 5-アミノペンタン酸。

## 【0245】

表18は、ペプチド番号99由来ペプチドおよび2つのグリシンが共にペプチド模倣物と置換された（通常は、配列：Gly-Glyが存在する）ペプチドアナログを列挙している。第1列は、ペプチド識別番号を含む。第2列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第3列は、配列中のXと指定したペプチド模倣アナログの同一性についての説明を示す。第4列は、Xと指定されたアナログの化学構造を示す。第5列は、実施例4に概説したIgG競合ELISAによって決定された各ペプチドのIC<sub>50</sub>を含む。第6列は、実施例6に概説したBiacore分析によってpH6で決定した各ペプチドのK<sub>D</sub>を含む。

20

表18．ペプチド番号99のGly-Glyでのペプチド模倣アナログ

## 【0246】

【表 18 - 1】

	配列 (配列番号 202-219)	Xの説明	Xの構造	IC <sub>50</sub> μM	K <sub>D</sub> (pH 6) μM
ペプチド番号 99	RF-Pen-TGHF-X-LYPC	Gly-Gly		2.0	0.17
ペプチド番号 134	RF-Pen-TGHF-X-LYPC	4- アミノメチル-安息 香酸		>125	
ペプチド番号 135	RF-Pen-TGHF-X-LYPC	(3- アミノメチル)-安息 香酸		57	
ペプチド番号 136	RF-Pen-TGHF-X-LYPC	4-アミノフェニル酢酸		>125	
ペプチド番号 137	RF-Pen-TGHF-X-LYPC	3-アミノフェニル酢酸		14	
ペプチド番号 178	RF-Pen-TGHF-X-LYPC	3-アミノ-2-オキシ-1 -ピペリジニン-酢酸		0.66	0.16
ペプチド番号 179	RF-Pen-TGHF-X-LYPC	3-アミノ-2-オキシ -1-ピペリジニン-酢酸		7.2	0.67
ペプチド番号 193	RF-Pen-TGHF-X-LYPC	(3S)-3-アミノ- 2-オキシ-1-ピペ リジン-酢酸		7.3	
ペプチド番号 80	RF-Pen-TGHF-X-LYPC	3-アミノ-N-1-カ ルボキシメチル-2, 3 , 4, 5-テトラヒドロ -1H-[1]ベンズア ゼピン-2-オン		159	
ペプチド番号 181	RF-Pen-TGHF-X-LYPC	3-アミノ-N-1-カ ルボキシメチル-2, 3, 4, 5-テトラヒドロ-1 H-[1]ベンズアゼピン -2-オン		1.2	
ペプチド番号 197	RF-Pen-TGHF-X-LYPC	5, 5-二環式シバ プチド模倣物		13	0.99

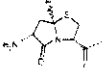
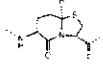
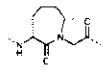
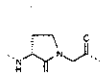
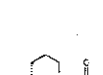
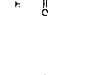
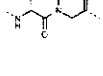
10

20

30

【 0 2 4 7 】

【表 18 - 2】

ペプチド番号 198	RF-Pen-TGHF-X-LYPC	5,5-二環式ジペプチド模倣物		23		
ペプチド番号 204	RF-Pen-TGHF-X-LYPC	6,5-二環式ジペプチド模倣物		2.2	0.32	
ペプチド番号 205	RF-Pen-TGHF-X-LYPC	3(S)-3-アミノ-2-オキソ-1-アゼピリン酢酸		0.64	0.103	
ペプチド番号 214	RF-Pen-TGHF-X-LYPC	3(S)-3-アミノ-2-オキソ-1-ピロリジン酢酸		2.3	0.28	10
ペプチド番号 227	RF-Pen-TGHF-X-NMeLeu-YPC	(3R)-3-アミノ-1-カルボキシメチルピロラクトム		0.53	0.043	
ペプチド番号 228	RF-Pen-NMeAla-GHF-X-NMeLeu-YPC	(3R)-3-アミノ-1-カルボキシメチルピロラクトム		1.1	0.145	
ペプチド番号 239	RF-Pen-TGHF-X-NMeLeu-YPC	(3S)-3-アミノ-2-オキソ-1-アゼピリン酢酸		0.62	0.044	20

## 実施例 10 : ラクトム架橋を介して環状化したペプチドの合成

ラクトム環状化ペプチド(表 19)を、以下のアミノ酸を種々のシステインとの置換基として使用したことを除いて上記の実施例 7 に概説の固相ペプチド合成によって合成した: Fmoc-Lys(Aloc)-OH、Fmoc-Orn(Aloc)-OH、Fmoc-Dab(Aloc)-OH、および Fmoc-Dap(Aloc)-OH、Fmoc-Glu(Oallyl)-OH、および Fmoc-Asp(Oallyl)-OH (Bachem, Torrance, CA)。樹脂上での完全に保護されたペプチドを生成するためのプロセスの完了後、樹脂を、ジクロロメタン中で膨潤させ、窒素でパージし、0.1モル当量のテトラキス-(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)および30モル当量のフェニルシラン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)で処理し、反応を3時間進行させた。樹脂を最初にジクロロメタンで洗浄し、DMFで洗浄し、最後に1%(v/v)トリエチルアミンおよび1%(w/v)ジエチルジチオカルバミン酸のDMF溶液でさらに5回洗浄した。DMFでのさらなる洗浄工程後、樹脂をベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスホネート(PyBOP)(Novabiochem, San Diego CA)およびDIEAで16時間処理した。実施例 7 に記載のように、ペプチドを樹脂から切断し、精製した。

## 【0248】

表 19 は、ラクトム架橋を介して各ペプチドが環状化されると考えられるシステイン残基のアミノ酸およびアミノ酸アナログへのアミノ酸置換を有する本発明の種々のペプチドを列挙している。ヒトFcRnに対するこれらのペプチドの結合パラメーターに及ぼす置換の影響も示す。第 1 列は、ペプチド識別番号を含む。第 2 列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第 3 列は、実施例 4 に概説した IgG 競合 ELISA によって決定された各ペプチドの IC<sub>50</sub> を含む。第 4 列および第 5 列は、それぞれ、実施例 6 に概説した Biacore 分析によって pH 6 および pH 7.4 で決定した各ペプチドの K<sub>D</sub> を含む。

表 19 . ラクトム環状化ペプチド

## 【0249】

【表 19 - 1】

ペプチド番号	配列 (配列番号 220-246)	IC <sub>50</sub> μM	K <sub>D</sub>	K <sub>D</sub>
			(pH 6) μM	pH 7.4 μM
ペプチド番号 38	QRF- <u>Asp</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Dab</u> -NGP	68	17	150
ペプチド番号 39	QRF- <u>Asp</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Lys</u> -NGP	10	1.2	12
ペプチド番号 72	QRF- <u>Dab</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Glu</u> -NGP	81	4.8	nd
ペプチド番号 73	QRF- <u>Lys</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Glu</u> -NGP	33	1.2	nd
ペプチド番号 76	QRF- <u>Glu</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Lys</u> -NGP	100	27	320
ペプチド番号 77	QRF- <u>Glu</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Dab</u> -NGP	86	22	210
ペプチド番号 78	QRF- <u>Glu</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Dap</u> -NGP	71	9.6	81
ペプチド番号 79	QRF- <u>Asp</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Dap</u> -NGP	32	4.5	30
ペプチド番号 80	QRF- <u>Lys</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Asp</u> -NGP	60	10	52
ペプチド番号 81	QRF- <u>Dab</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Asp</u> -NGP	31	8.4	45
ペプチド番号 85	QRF- <u>Asp</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Orn</u> -NGP	16	2.7	nd
ペプチド番号 86	QRF- <u>Glu</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Orn</u> -NGP	80	15	nd
ペプチド番号 107	QRF- <u>Asp</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Lys</u> -NGP	>125	>250	nd
ペプチド番号 105	QRF- <u>Asp</u> -TGHF <del>G</del> -a-LYP- <u>Lys</u> -NGP	12	2.1	nd
ペプチド番号 106	QRF- <u>Asp</u> -TGHF <del>G</del> -a-GLYP- <u>Lys</u> -NGP	17	3.7	nd
ペプチド番号 123	<u>Asp</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Lys</u> -NGP	47		

10

【 0 2 5 0 】

【表 19 - 2】

ペプチド番号 124	F- <u>Asp</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Lys</u> -NGP	22		
ペプチド番号 125	RF- <u>Asp</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Lys</u> -NGP	9.4		
ペプチド番号 126	QRF- <u>Asp</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Lys</u> -NGP	13		
ペプチド番号 127	QRF- <u>Asp</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Lys</u> -N	7.6		
ペプチド番号 128	QRF- <u>Dap</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Asp</u> -NGP	120		
ペプチド番号 129	QRF- <u>Dap</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Glu</u> -NGP	>125		
ペプチド番号 130	QRF- <u>Orn</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Asp</u> -NGP	120		
ペプチド番号 131	QRF- <u>Orn</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Glu</u> -NGP	30		
ペプチド番号 132	RF- <u>Asp</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Lys</u>	11	0.90	
ペプチド番号 133	QRF- <u>Asp</u> -TGHF <del>G</del> GLYP- <u>Lys</u>	13	0.90	
ペプチド番号 159	QRF- <u>Asp</u> -TGHF <del>G</del> -p-LYP- <u>Lys</u> -NGP	15	1.2	

20

<sup>1</sup> 下線のアミノ酸の側鎖間にアミド結合が存在する；D a b = 1, 3 - ジアミノ酪酸、D a p = 1, 2 - ジアミノプロピオン酸；O r n = オルニチン。

【 0 2 5 1 】

30

実施例 11：直鎖ペプチドアナログの合成

直鎖ペプチドアナログを、表 20 および 21 に記載のようにジスルフィド形成アミノ酸が置換されることを除いて実施例 7 に記載のように合成した。

【 0 2 5 2 】

表 20 は、本発明の配列番号 1 由来の直鎖ペプチドおよびペプチドアナログを列挙している。ヒト F c R n に対するこれらのペプチドの結合パラメーターも示す。第 1 列は、ペプチド識別番号を含む。第 2 列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第 3 列は、実施例 4 に概説した I g G 競合 E L I S A によって決定された各ペプチドの I C<sub>50</sub> を含む。第 4 列および第 5 列は、それぞれ、実施例 6 に概説した B i a c o r e 分析によって pH 6 および pH 7.4 で決定した各ペプチドの K<sub>D</sub> を含む。

40

表 20 . 配列番号 1 の直鎖アナログ

【 0 2 5 3 】

【表 20 - 1】

配列 (配列番号 1 & 247-273)	IC <sub>50</sub> μM	K <sub>D</sub> (pH 6) μM	K <sub>D</sub> pH 7.4 μM	
配列番号 1	QRFCTGHFGGLYPCNGP	26	5.1	30
ペプチド番号 71	QRF-S-TGHFGGLYP-S-NGP	>125	230	
ペプチド番号 156	QRF-V-TGHF-G-p-LYP-A-NGP	>250		
ペプチド番号 157	QRF-V-TGHF-G-p-LYP-A-NGP	195	16	
ペプチド番号 58	QRF-V-TGHF-G-p-LYP-A-NGP	>250		
ペプチド番号 162	QRF-L-TGHF-G-p-LYP-A-NGP	>250		
ペプチド番号 163	QRF-I-TGHF-G-p-LYP-A-NGP	>250		
ペプチド番号 164	QRF-F-TGHF-G-p-LYP-A-NGP	>250		
ペプチド番号 165	QRF-Y-TGHF-G-p-LYP-A-NGP	>250		
ペプチド番号 166	QRF-W-TGHF-G-p-LYP-A-NGP	>250		
ペプチド番号 167	QRF-V-TGHF-G-p-LYP-V-NGP	93		

10

【0254】

【表 20 - 2】

ペプチド番号 168	QRF-V-TGHF-G-p-LYP-L-NGP	100		
ペプチド番号 169	QRF-V-TGHF-G-p-LYP-I-NGP	72	15	
ペプチド番号 170	QRF-V-TGHF-G-p-LYP-F-NGP	>250		
ペプチド番号 171	QRF-V-TGHF-G-p-LYP-Y-NGP	150		
ペプチド番号 172	QRF-V-TGHF-G-p-LYP-W-NGP	150		
ペプチド番号 173	QRF-V-TGHF-G-p-V-YP-A-NGP	>250		
ペプチド番号 174	QRF-V-TGHF-G-p-I-YP-A-NGP	94		
ペプチド番号 175	QRF-V-TGHF-G-p-F-YP-A-NGP	200		
ペプチド番号 176	QRF-V-TGHF-G-p-Y-YP-A-NGP	230		
ペプチド番号 177	QRF-V-TGHF-G-p-W-YP-A-NGP	52	5.8	96
ペプチド番号 190	QRF-V-TGHF-G-p-W-YP-I-NGP	49	4.2	
ペプチド番号 209	RF-V-TGHF-G-p-W-YP	>125		
ペプチド番号 210	RF-V-TGHF-G-p-W-YP-A-NGP	100	10	
ペプチド番号 211	F-V-TGHF-G-p-W-YPA	100	8	
ペプチド番号 212	V-TGHF-G-p-W-YP-A	>250		
ペプチド番号 236	RF-V-TGHF-G-Sar-NMeLeu-YP-A	37	1.85	9
ペプチド番号 246	RF-V-TGHF-G-p-W-YPA	60	3.6	

20

<sup>1</sup> 「Sar」 = サルコシン、「NMeLeu」 = N - メチルロイシン。

30

【0255】

表 21 は、種々のペプチド模倣アナログが置換された（通常は、グリシン - サルコシン配列 (Gly - Sar) が存在する）ペプチド番号 236 由来ペプチドを列挙している。第 1 列は、ペプチド識別番号を含む。第 2 列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第 3 列は、配列中の X と指定したペプチド模倣アナログの同一性についての説明を示す。第 4 列は、X と指定されたペプチド模倣アナログの化学構造を示す。第 5 列は、実施例 4 に概説した IgG 競合 ELISA によって決定された各ペプチドの IC<sub>50</sub> を含む。第 6 列は、実施例 6 に概説した Biacore 分析によって pH 6 で決定した各ペプチドの K<sub>D</sub> を含む。

表 21 . ペプチド番号 236 の Gly - Gly での線状ペプチド模倣アナログ

40

【0256】

【表 2 1 - 1】

ペプチド番号	配列 (配列番号 274-283)	Xの説明	Xの構造	IC <sub>50</sub> μM	K <sub>0</sub> (pH 6) μM
ペプチド番号 236	RF-V-TGHF-X-NMeLeu-YPA	Gly-Sar		37	1.85
ペプチド番号 182	RF-V-TGHF-X-LYPA	3-アミノ-2-オキソ-1-ピペリジノン-酢酸		38	3.3
ペプチド番号 183	RF-V-TGHF-X-LYPA	3-アミノ-2-オキソ-1-ピペリジノン-酢酸		>250	
ペプチド番号 184	RF-V-TGHF-X-LYPA	3-アミノ-N-1-カルボキシメチル-2,3,4,5-テトラヒドロ-1H-[1,1'-ベンズアゼピソ]-2-オン		>250	

10

【0257】

【表 2 1 - 2】

ペプチド番号 185	RF-V-TGHF-X-LYPA	3-アミノ-N-1-カルボキシメチル-2,3,4,5-テトラヒドロ-1H-[1,1'-ベンズアゼピソ]-2-オン		57	3.1
ペプチド番号 186	RF-V-TGHF-X-LYPA	3-アミノフェニル酢酸		>250	
ペプチド番号 191	QRF-V-TGHF-X-WYPINGP	3-アミノ-2-オキソ-1-ピペリジノン-酢酸		nd	333
ペプチド番号 206	RF-V-TGHF-X-LYPA	5,5-二環式シペプチド模倣物		>250	
ペプチド番号 207	RF-V-TGHF-X-LYPA	6,5-二環式シペプチド模倣物		>125	20
ペプチド番号 208	RF-V-TGHF-X-LYPA	3(S)-3-アミノ-2-オキソ-1-アゼピソ酢酸		23	2.3

20

30

<sup>1</sup> 「Sar」 = サルコシン、「NMeLeu」 = N-メチルロイシン。

【0258】

実施例 12 : 還元的アルキル化によるペプチド二量体の合成

ペプチド二量体(表 2 2)を、ペプチドアルデヒドおよびペプチドアミン(N)またはカルボキシ(C)末端アミンの還元的アルキル化によって生成した。

【0259】

ペプチドN末端アミンを、単量体ペプチドジスルフィドの合成についての実施例 7 に記載のように合成した。

【0260】

ペプチドC末端アミンを、合成工程で 1,2-ジアミノエタン樹脂(Novabiochem, San Diego, CA)を使用したことを除いて単量体ペプチドジスルフィドの合成についての実施例 7 に記載のように合成した。その結果として、樹脂からの切断によってC末端エチルアミンが得られた。

40

【0261】

ペプチドN末端アルデヒド(図 2)を、DIEAを含むDMFの存在下における 5 当量の無水コハク酸(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)とのN末端アミノ酸の非保護アミンの 2 時間の反応によって合成した。PyBOPおよびDIEAの存在下での 2,2-ジメチル-1,3-ジオキソランメタミン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)とのその後の 2 時間の反応により、保護ジオール樹脂を得

50

た。次いで、樹脂からのペプチドの切断、その後の単量体ペプチドジスルフィドの合成についての実施例 7 に記載のシステインの酸化および精製により、ペプチドジオールを得た。ジオールを 33% 酢酸に溶解後、2 当量の過ヨウ素酸ナトリウム (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) を添加し、反応を 5 分間進行させた。反応混合物を、20 当量 (ジオールに関して) のエチレングリコール (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) で反応を停止させ、10 分後、粗反応混合物を水で 3 倍に希釈し、0.1% TFA を含む水中でのアセトニトリルの漸増勾配を使用して C18 Sep - Pak カラム (Waters Corp., Milford, MA) で精製した。ペプチドアルデヒドを凍結乾燥させ、実施例 7 に記載の液体クロマトグラフィ (Applied Biosystems, Foster City, CA) 後に質量分析 (Mariner ES - MS) による分析に供した。

10

## 【0262】

ペプチド C 末端アルデヒドを、Fmoc - 1 - アミノ - 2, 3 - プロパンジオール - 2' - クロロトリチル樹脂 (Novabiochem, San Diego, CA) を Rink アミド樹脂の代わりに使用することを除いて、単量体ペプチドジスルフィドの合成について実施例 7 に記載のように合成した。したがって、得られたペプチド樹脂は、マスキング下 C 末端ジオールを含んでいた。樹脂からの切断後、上の N 末端アルデヒドについて記載のように、ジオールをアルデヒドに酸化した。

## 【0263】

ペプチド番号 275 などのラクタム環状化ペプチドを合成するためのペプチド単量体を、ラクタム架橋によって環状化されたペプチドを合成するための上の実施例 10 に記載の方法にしたがって合成した。それにより、樹脂上で Asp - Lys 環状化を行い、その後樹脂から切断した。

20

## 【0264】

2% 酢酸を含む DMF 中での濃度 40 mg / mL の 1 当量のアミン含有ペプチドとの 1 当量のペプチドアルデヒドの反応によってペプチド二量体を合成した (図 3)。60 分後、2 当量のシアノ水素化ホウ素ナトリウム (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) を添加し、反応物を 1 時間震盪した。反応混合物を、水で 10 倍に希釈し、HPLC によって精製し、実施例 7 に記載のように、液体クロマトグラフィ (Applied Biosystems, Foster City, CA) 後の質量分析 (Mariner ES - MS) によって分析した。

30

## 【0265】

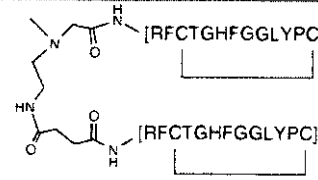
表 22 は、還元的アルキル化によって合成された本発明の二量体ペプチドを列挙している。第 1 列は、ペプチド識別番号を含む。第 2 列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第 3 列は、実施例 4 に概説した IgG 競合 ELISA によって決定された各ペプチドの IC<sub>50</sub> を含む。第 4 列および第 5 列は、それぞれ、実施例 6 に概説した Biacore 分析によって pH 6 および pH 7.4 で決定した各ペプチドの K<sub>D</sub> を含む。第 6 列は、実施例 5 に概説した競合的 IgG 結合 FACS 分析によって決定した各ペプチドの IC<sub>50</sub> を含む。

表 22 . 還元的アルキル化によって合成された二量体および三量体

40

## 【0266】

【表 2 2 - 1】

ペプチド番号	配列 (配列番号 284-295)	IC <sub>50</sub>	K <sub>D</sub>	K <sub>D</sub>	IC <sub>50</sub>
		nM	pH	pH	nM
276		370 0	56	7.4 0	12,90 S

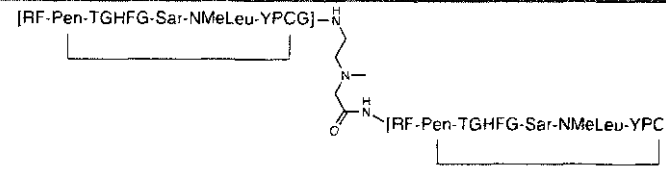
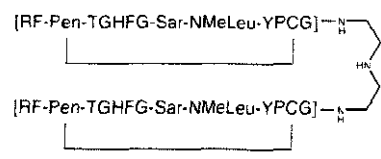

【 0 2 6 7 】

【表 2 2 - 2】

ペプチド番号 215		30	6.6		
ペプチド番号 230		7.2	<0.5	0.46	10
ペプチド番号 231		30	2.9		
ペプチド番号 247		6			20
ペプチド番号 270		2.6	<0.5	<0.8	4
ペプチド番号 272		2.8	<0.5	<0.8	5
ペプチド番号 273		2.1	<0.5	<0.9	4
ペプチド番号 274		17			40

【 0 2 6 8 】

【表 2 2 - 3】

ペプチド番号 277		6.3		
ペプチド番号 278		4.4		
ペプチド番号 275		44	1.6	9.1

10

20

30

40

50

X = 3 ( r ) - 3 - アミノ - 1 - カルボキシメチル - バレロラクタム。

## 【 0 2 6 9 】

実施例 1 3 : チオールリンカーおよびプロモアセチル化ペプチドによるペプチド二量体の合成

ペプチド二量体 ( 表 2 3 ) も、チオールリンカーとのプロモアセチル化ペプチドの反応によって合成した。プロモアセチル化ペプチドを、DMF 中での 4 当量のプロモアセチルプロミド ( Sigma - Aldrich , St . Louis , MO ) および 8 当量の DIEA ( Sigma - Aldrich , St . Louis , MO ) との保護ペプチド樹脂の遊離 - アミノ基の反応によって合成した ( 図 4 ) 。 1 時間後、実施例 7 に記載のように樹脂を DMF で洗浄し、その後に DCM によって洗浄し、樹脂から切断した。ビス - チオールリンカーを使用してラクタム環状化ペプチドを二量体化した場合、プロモアセチル化工程前に樹脂上での環状化工程を行った。ビス - チオールリンカーを使用してジスルフィド含有ペプチドを二量体化した場合、実施例 7 に記載のように切断後にヨウ素酸化工程を行った。

## 【 0 2 7 0 】

ビス - チオールリンカーを、DMF 中における 2 当量の PyBOP ( Novabiochem , San Diego , CA ) および DIEA の存在下での 2 当量の N , N - ビス ( N ' - Fmoc - 3 - アミノプロピル ) グリシンヘミ硫酸カリウム ( Chem - Impex , Wood Dale , IL ) との NH<sub>2</sub> - Gly - 2 - クロロトリチル樹脂 ( Novabiochem , San Diego , CA ) の 18 時間の反応によって合成した ( 図 4 ) 。 Fmoc 保護基を、20% ピペリジンを含む DMF での 10 分間で 2 回の処理によって除去した。いくつかのリンカー化合物のために、-アラニンもスペーサー単位として組み込んだ。Fmoc - - Ala - OH ( Novabiochem ) を、上記のように PyBOP および DIEA を使用して樹脂にカップリングした。Fmoc 保護基を、20% ピペリジンを含む DMF を使用して除去し、別の - アラニンスペーサー単位を挿入したか、2 当量の N - スクシニミジル - S - アセチルチオプロピオナート ( SATP ; Pierce , Rockford , IL ) および 4 当量の DIEA との遊離 N 末端アミン樹脂の 18 時間の反応によってビス - チオールリンカーを組み込んだ。

## 【 0 2 7 1 】

その後、1 mL の DMF および 0 . 4 mL の緩衝液 A ( 緩衝液 A : 1 M ヒドロキシルアミン塩酸塩 ( Sigma - Aldrich , St . Louis , MO ) 、 40 mM リン酸ナトリウム ( pH 7 . 5 ) 、 50 mM EDTA ( Sigma - Aldrich , St . Louis , MO ) ) を含む脱気溶液との 0 . 05 mmol のペプチド樹脂の 18 時間の反応によって S - アセチル保護基を除去した。樹脂を DMF で洗浄し、その後に DCM

で洗浄し、2% トリイソプロピルシランを含む50% TFAのDCM溶液を15分間使用して樹脂から切断した。実施例7に記載のように粗リンカーを処理し、精製した。

【0272】

10%水および50% 100mMリン酸ナトリウム(pH7.5)を含むDMF中における2当量のプロモアセチル化N末端ペプチドとの1当量の精製ビス-チオールリンカーの反応によって、ビス-チオールを使用してペプチド二量体を生成した(図4)。18時間後、粗反応混合物を、実施例7に記載のように逆相HPLCカラムによって精製した。

【0273】

SATPで誘導体化したペプチドとのプロモアセチル化ペプチドの反応によって、ペプチド番号122を合成した(図5)。簡潔に述べれば、遊離N末端アミンを有する粗ペプチド樹脂を、2当量のSATPとDMF中で2時間反応させた。S-アセチル保護基を上記のように除去し、その後樹脂から切断し、上記のように精製した。

10

【0274】

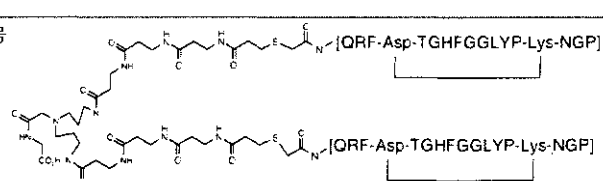
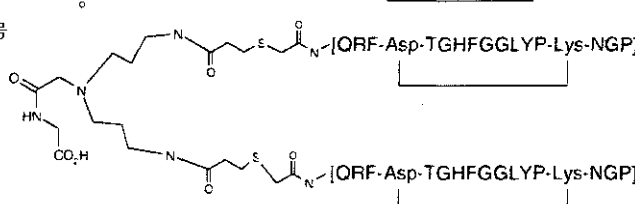
表23は、チオールリンカーによって合成された本発明の二量体ペプチドを列挙している。第1列は、ペプチド識別番号を含む。第2列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第3列は、実施例4に概説したIgG競合ELISAによって決定された各ペプチドのIC50を含む。第4列および第5列は、それぞれ、実施例6に概説したBiacore分析によってpH6およびpH7.4で決定した各ペプチドのKDを含む。第6列は、実施例5に概説した競合的IgG結合FACS分析によって決定した各ペプチドのIC50を含む。

20

表23. チオールリンカーを使用して合成された二量体

【0275】

【表23-1】

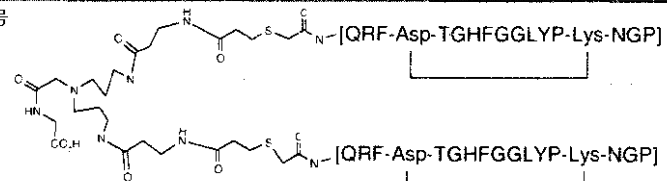
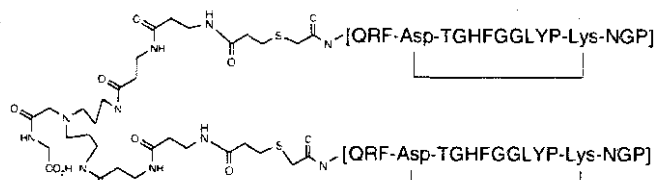
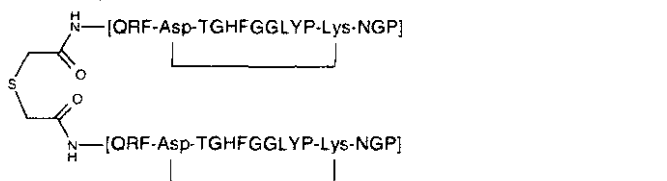
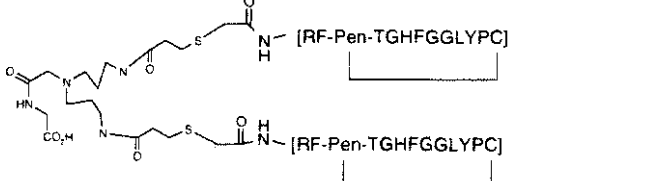
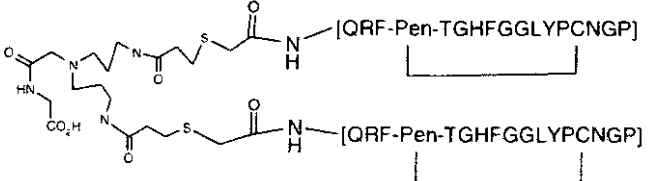
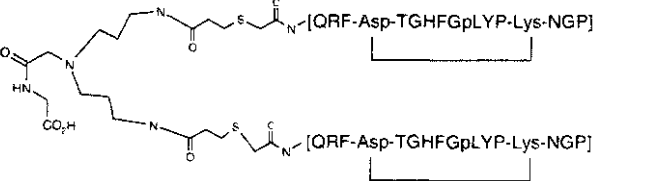
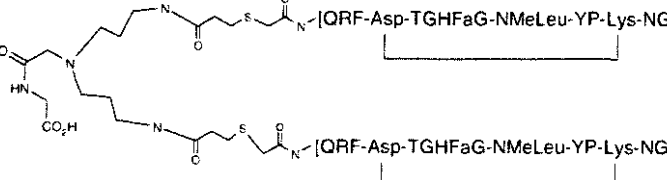
ペプチド番号	配列 (配列番号 296-304)	IC <sub>50</sub>	K <sub>D</sub>	K <sub>D</sub>	IC <sub>50</sub>
		nM	pH 6 nM	pH 7.4 nM	nM FACS
100		760	6	130	
119		900	7	150	

30

【0276】

40

【表 2 3 - 2】

ペプチド番号		240 0	7	150	
ペプチド番号		130 0	8	160	10
ペプチド番号		970	6	120	
ペプチド番号		100			20
ペプチド番号		90			
ペプチド番号		120 0	7.9	19 0	30
ペプチド番号		190 0	7.2	17 0	

<sup>1</sup> Pen = ペニシラミン、Suc = コハク酸、Sar = サルコシン、p = D - プロリン、X = (3R) - 3 - アミノ - 1 - カルボキシメチル - バレロラクタム、NMeLeu = N - メチルロイシン。

## 【0277】

実施例 14 : 還元的アルキル化によるペプチド三量体 : ペプチド番号 247

ペプチドアルデヒドおよびペプチドアミノ N 末端アミンの還元的アルキル化によってペプチド三量体 (表 22) を生成した。

## 【0278】

N 末端を二官能性アミンリンカー (ビス - アミノプロピルグリシン (BAPG ; Sigma - Aldrich, Stl. Louis, MO) から購入した Bis - Fmoc - BAPG として使用) などでキャッピングし、その後にサルコシンをカップリングすること

40

50

を除いて単量体ペプチドジスルフィドの合成について実施例7に記載のように単量体ペプチドN末端アミンを合成した。ペプチドN末端アルデヒド(図2)を、実施例12に記載のように合成した。2%酢酸を含むDMF中での濃度40mg/mLの1当量のアミン含有ペプチドとの2当量のペプチドアルデヒドの反応によってペプチド三量体を合成した(図3など)。60分後、4当量のシアノ水素化ホウ素ナトリウム(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を添加し、反応物を1時間震盪した。反応混合物を、水で10倍に希釈し、HPLCによって精製し、実施例7に記載のように、液体クロマトグラフィ(Applied Biosystems, Foster City, CA)後の質量分析(Mariner ES-MS)によって分析した。

#### 【0279】

実施例15:二価酸およびアミンリンカーを使用したペプチド二量体の合成

二官能性酸リンカーとの2つの樹脂上のペプチド単量体のN末端の反応または二官能性アミンリンカーを含む樹脂上でペプチドを合成し、それにより、2つの樹脂上のペプチド単量体のC末端を繋留することのいずれかによって、アミン結合ペプチド二量体(表24)を生成した。

#### 【0280】

N末端結合ペプチド二量体を、以下を除いて、単量体ペプチドジスルフィドの合成について実施例7に記載のように合成した:ペプチドを樹脂から切断する前に、2つのペプチド単量体のN末端を、二官能性酸リンカーに連結する。例えば、1当量のPyBOPおよび2当量のDIEAの存在下における0.5当量のコハク酸(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)とのペプチド番号235に類似のペプチド配列を含むペプチド樹脂の反応によってペプチド番号283を合成した。これにより、樹脂上にそのN末端を介したアミド結合によって共有結合した隣接ペプチドが得られる。

#### 【0281】

HPLC精製前にペプチドジスルフィドを酸化しないことを除き、実施例7に記載のように、得られたペプチド二量体を樹脂から切断し、精製した。精製した還元ペプチドを、20%DMSOを含む10mMリン酸ナトリウム(pH7.5)中にて約0.1mg/mLに溶解し、室温で3日間混合した。この酸化工程により、二量体の2つの単量体間とは対照的に、二量体の1つのペプチド単量体内にジスルフィド結合が形成される。反応混合物をペプチド濃度0.05mg/mLに水で希釈して、0.1%TFAを含む水中の漸増勾配のアセトニトリルを使用したC18 Sep-Pakカラム(Waters Corp., Milford, MA)で精製した。ペプチド二量体を凍結乾燥させ、実施例7に記載のように、液体クロマトグラフィ(Applied Biosystems, Foster City, CA)後の質量分析(Mariner ES-MS)によって分析した(図6を参照のこと)。ペプチド番号283の場合、ジスルフィド結合パターンを、トリプシンでのペプチドの30分間の消化、その後の得られたペプチドのLCMSによる分析によって確認した。トリプシンは、アルギニン残基およびリジン残基の後を切断することが公知であり、ペプチド番号283をアルギニン-フェニルアラニン結合で切断する。ペプチド番号283のLCMSの主な生成物は、NH<sub>2</sub>-[Phe-Phe-Pen-Thr-Gly-His-Phe-Gly-Sar-NMeLeu-Tyr-Pro-Cys]-CONH<sub>2</sub>(ジスルフィド)(LCMS:M+H=1355.6Da)であり、これは、ペプチド番号283のジスルフィド結合が各13アミノ酸ペプチド単量体の間に形成されることを示す。

#### 【0282】

ペプチド配列がペプチド番号32に類似し、使用した二価酸リンカーがエチレングリコール-ビス(コハク酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)であり、カップリング反応のためにPyBOPを使用しなかったことを除いてペプチド番号283のようにペプチド番号201を合成した。

#### 【0283】

使用した二価酸リンカーがビス-dPEG6-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル

10

20

30

40

50

(Quanta Biodesigns Ltd.) であり、カップリング反応のために PyBOP を使用しなかったことを除いて、ペプチド番号 279 をペプチド番号 283 のように合成した。

【0284】

ペプチド - 樹脂を大過剰の無水コハク酸 (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) で処理し、それにより、樹脂上の全ペプチドの N 末端がコハク酸塩キャッピングされることを除いて、ペプチド番号 281 をペプチド番号 283 のように合成した。この樹脂を、1 当量の PyBOP および 2 当量の DIEA の存在下にて 0.5 当量の N, N' - ジメチルエチレンジアミン (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) で処理した。その後の切断、精製、および酸化工程を、ペプチド番号 283 と同様に行った。

10

【0285】

使用した二価酸リンカーが N - メチル - イミノジ酢酸 (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) であったことを除いて、ペプチド番号 282 をペプチド番号 283 のように合成した。

【0286】

使用した二価酸リンカーが 3, 3 - ジメチルグルタル酸 (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) であったことを除いて、ペプチド番号 284 をペプチド番号 283 のように合成した。

【0287】

使用した二価酸リンカーが Boc - Asp (OH) - OH (Novabiochem, San Diego, CA) であったことを除いて、ペプチド番号 285 をペプチド番号 283 のように合成した。

20

【0288】

使用した二価酸リンカーが Boc - Glu (OH) - OH (Novabiochem, San Diego, CA) であったことを除いて、ペプチド番号 286 をペプチド番号 283 のように合成した。

【0289】

ペプチド合成前に二官能性アミンリンカーを樹脂にカップリングすることを除いて、C 末端結合ペプチド二量体を、単量体ペプチドジスルフィドの合成について実施例 7 に記載のように合成した。これにより、アミド結合によって共有結合したその C 末端とのペプチド二量体を得られる。例えば、ペプチド番号 280 を、最初の樹脂への Fmoc - Lys (Fmoc) - OH (Novabiochem, San Diego, CA) のカップリングおよびその後のアミノ酸のカップリングによってペプチド番号 235 に類似の配列を得られることによって合成した。これにより、樹脂上で合成される場合、2 つのペプチド鎖が共有結合する。N 末端結合二量体について上記のように、得られたペプチド二量体を、樹脂から切断し、精製し、酸化する (図 7 を参照のこと)。

30

【0290】

グリシン残基 (Gly) をペプチド番号 235 配列と分岐リジンリンカーとの間に挿入することを除いて、ペプチド番号 287 をペプチド番号 280 のように合成した。

40

【0291】

2 つのリシン残基 (Gly - Gly) をペプチド番号 235 配列と分岐リジンリンカーとの間に挿入することを除いて、ペプチド番号 288 をペプチド番号 280 のように合成した。

【0292】

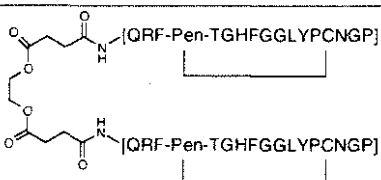
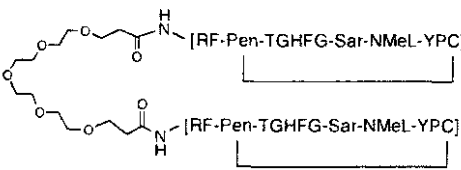
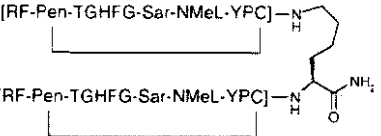
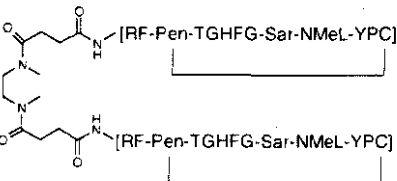
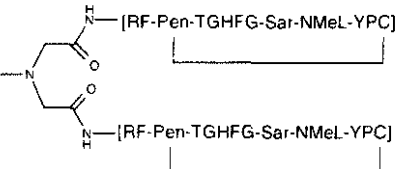
表 24 は、アミド結合を使用して合成した本発明の二量体ペプチドを列挙している。第 1 列は、ペプチド識別番号を含む。第 2 列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第 3 列は、実施例 4 に概説した IgG 競合 ELISA によって決定された各ペプチドの IC<sub>50</sub> を含む。

表 24 . アミドリナーを使用して合成した二量体

50

【 0 2 9 3 】

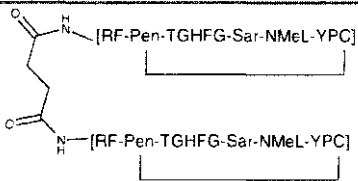
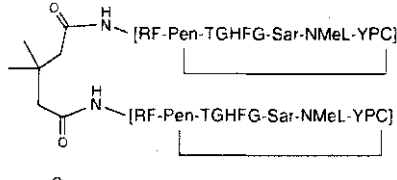

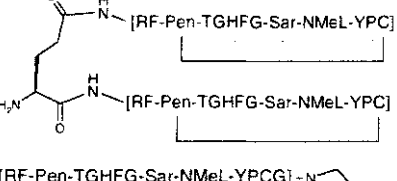
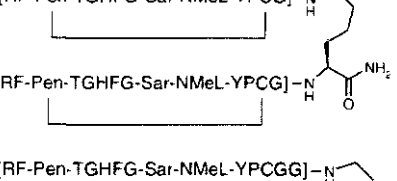
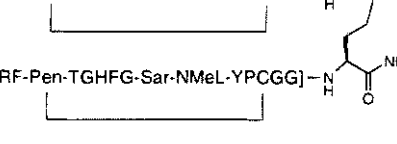
【 表 2 4 - 1 】

		配列 ( 配列番号 305-315)	IC <sub>50</sub> nM	
ペプチド番号 201			26	
ペプチド番号 279			7	10
ペプチド番号 280			25	
ペプチド番号 281			5.2	20
ペプチド番号 282			4.7	

【 0 2 9 4 】

30

【表 2 4 - 2】

ペプチド番号 283		3.3	
ペプチド番号 284		8.5	10
ペプチド番号 285		4.6	
ペプチド番号 286		5.6	20
ペプチド番号 287		20	
ペプチド番号 288		16	

30

<sup>1</sup> Pen = ペニシラミド、Sar = サルコシン、NMeLeu = N - メチルロイシン。

## 【0295】

実施例 16：還元的アルキル化によるペプチド - Fc 融合物の合成

ペプチド N 末端アルデヒドであるペプチド番号 252、ペプチド番号 229、およびペプチド番号 232 (表 25) を、実施例 12 に記載のように合成した。3 つ全てのペプチド - Fc 融合物を、以下の同一のプロトコールを使用して生成した (図 8)。CysFc (N 末端システインを有する Fc ドメイン) および 4 . 5 当量のペプチドアルデヒドを、氷上で 80 mM 酢酸ナトリウム (pH 5 . 5) 中で 1 時間インキュベーションした。シアノ水素化ホウ素ナトリウムを最終濃度 20 mM まで添加し、反応物を 4 で 16 時間インキュベーションした。反応混合物を SDS - PAGE によって分析して、主に単一のペプチドが Fc タンパク質に付加されていることを確認した。タンパク質混合物を PBS で 2 回透析し、*in vitro* プロテアゼ活性についてアッセイした (表 25)。ペプチド番号 252 - Fc の場合、タンパク質を、TG32B マウス IgG 異化モデルにおいても評価した (図 15)。米国特許出願公開番号 US 2005 / 0027109 号 (CysFc 生成の開示が本明細書中で参考として援用される) に記載のように CysFc を生成することができる。

40

## 【0296】

表 25 は、CysFc およびアルデヒド - ペプチドを使用して合成した本発明のペプチド - Fc 融合タンパク質を列挙している。第 1 列は、ペプチド - Fc 融合物の識別番号を含む。第 2 列は、ペプチドのアミノ酸配列を含む。第 3 列は、実施例 4 に概説した IgG

50

競合ELISAによって決定された各ペプチドのIC<sub>50</sub>を含む。

表25. ペプチド-Fc融合物

【0297】

【表25】

配列 <sup>1</sup>		IC <sub>50</sub> nM
CysFc		
ペプチド番号 229-Fc		210
ペプチド番号 232-Fc		2
ペプチド番号 252-Fc		3
		39

<sup>1</sup> Pen = ペニシラミド、Sar = サルコシン、NMeLeu = N - メチルロイシン。

【0298】

#### 実施例17: トランスジェニックマウス

トランスジェニックマウスを、The Jackson Laboratory in Bar Harbor, ME Roopenian博士から入手した。内因性マウスFcRnおよび $\mu_2m$ 遺伝子を、相同組換えによる外来ポリヌクレオチド配列の挿入によって不活化し、ヒトFcRnおよびヒト $\mu_2m$ 遺伝子と一過性に置換した(muFcRn(-/-)、mu $\mu_2m$ (-/-)、+huFcRn、+hu $\mu_2m$ )。これらのマウスを、系統名TG32Bという。

【0299】

実施例18: 5mg/kgおよび10mg/kgで使用したTG32BマウスにおけるヒトIgG異化に及ぼすペプチド番号270の影響

t = 0時間(T<sub>0</sub>)で成体TG32Bマウスに500mg/kgのヒトIgG(MP Biomedicals, Irvine, CA)を静脈内注射した。24, 48, 72, 96、および120時間後、マウスに5mg/kgまたは10mg/kgペプチド番号270のいずれかを静脈内注射した。15mM酢酸ナトリウムを含むビクルPBS(pH 5)を使用して、各時点でコントロール注射を行った。全時点の注射前および168時間後に血液サンプルを採取した。血清を調製し、ELISAを行うまで-20で保存した(図9)。

【0300】

IgG Fcドメイン特異的ELISAを使用して、各時点での血清中のヒトIgGレベルを検出した。簡潔に述べれば、30μLのヤギ抗ヒトIgG(Pierce, Rockford, IL)の10μg/mLストック溶液を、6mLの0.05M重炭酸ナトリウム(pH 9.6)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)で希釈した。96ウェルプレートを、50μL/ウェルのこの溶液でコーティングし、37で1時間インキュベーションした。コーティング溶液を除去し、PBST(0.05% Tween-20を含むリン酸緩衝化生理食塩水)で1回洗浄した。次いで、200μL/ウェ

ルの2%ウシ血清アルブミン(BSA)ストック溶液を含むPBSを添加し、プレートを37で1時間インキュベーションした。ウェルを、PBSTで3回洗浄し、50ng/mLのhIgG1から出発する2.5倍希釈の実施によって、三連で検量線を作成した。次いで、100 $\mu$ Lの標準溶液またはサンプル溶液のいずれかをウェルに添加し、プレートを37で1時間インキュベーションした。PBSTでさらに3回洗浄し、その後100 $\mu$ Lのヤギ抗ヒトIgG[Fc]-HRP抱合物(Pierce, Rockford, IL)の10,000倍希釈物の2%BSAを含むPBSを添加した。プレートを、37で1時間インキュベーションし、その後PBSTで洗浄し、100 $\mu$ LのTMB一成分基質(BioFX, Owings Mills, MD)を各ウェルに添加した。5分後に各ウェルへの100 $\mu$ Lの0.25M硫酸の添加によって発色を止めた。各ウェルの450nmでのUV吸収を測定し、検量線を使用して、血清IgG濃度対実験期間のプロットを導いた。

10

## 【0301】

実施例19: TG32BマウスにおけるヒトIgG異化に及ぼすペプチド番号231、ペプチド番号274、およびペプチド番号252-Fcの影響

t = 0時間(T<sub>0</sub>)で成体TG32Bマウスに500mg/kgのヒトIgG(MP Biomedicals, Irvine, CA)を静脈内注射した。24、48、および72時間後、マウスに1mg/kgのペプチド番号231、1mg/kgペプチド番号274、または20mg/kgのペプチド番号252-Fcのいずれかを静脈内注射した。15mM酢酸ナトリウム(pH5)を使用して、各時点でコントロール注射を行い、これを全注射のビヒクルとしての機能を果たした。全時点の注射前および30、96、144時間後に血液サンプルを採取した。血清を調製し、ELISAを行うまで-20で保存した。

20

## 【0302】

各時点での血清中のヒトIgG濃度を、実施例18に記載のように決定した(図15)。

## 【0303】

実施例20: カニクイザルにおけるヒトIgG異化ならびに内因性IgG、IgM、およびアルブミンに及ぼすペプチド番号270の影響

0時間で平均体重が4.8kgの成体カニクイザルに、IV用量が5mg/kgのビオチン化ヒトIgG(MP Biomedicals, Irvine, CA)を静脈内注射した。24、48、72、および96時間後、動物に、1mL/分の速度で10mg/kgのペプチド番号270または同体積のビヒクル(30mM酢酸ナトリウム(pH5))のいずれかを静脈内注射した。120時間後、動物CO6215を、10mg/kgのペプチド番号270で5回処置した。全注射前、120、168、192、244時間後、および30日後に血液サンプルを採取した。血清を調製し、ELISAを行うまで-20で保存した(図10~12)。

30

## 【0304】

ビオチン-hIgGトレーサーを、ストレプトアビジン-Fc特異的ELISAを使用して検出した。ストレプトアビジンコーティングプレート(Pierce, Rockford, IL, cat # 15121)を、PBST(リン酸緩衝化生理食塩水+0.05% Tween-20)で3回洗浄した。血清サンプルおよび標準物質を、PBSSB(PBS+2%BSA)で希釈した。1.56ng/mL~200ng/mLの範囲で検量線を作成した。希釈サンプル(100 $\mu$ L)または標準物質を各ウェルに添加し、室温で2時間インキュベーションした。その後、ウェルを、PBST(300 $\mu$ L/ウェル)で3回洗浄した。ヤギ抗ヒトFc-HRP(Pierce, Rockford, IL, Cat # 31416)をPBSSBで25,000倍に希釈し、100 $\mu$ L/ウェルを添加し、プレートを室温で30分間インキュベーションした。プレートをPBST(300 $\mu$ L/ウェル)で3回洗浄し、100 $\mu$ L/ウェルのBioFX Supersensitive TMB基質(BioFX, Owings Mills, MD)を使用して、室温で約5分間

40

50

発色させた。100  $\mu$ L / ウェルの 0.25 M 硫酸の添加によって反応物の発色を停止させ、各ウェルの 450 nm の吸光度を測定した。

#### 【0305】

内因性カニクイザル IgG を、異化の ELISA プロトコールを使用して検出した。第 1 に、ウサギ抗サル IgG を、コーティング緩衝液 (コーティング緩衝液 = 1 炭酸塩 - 重炭酸塩カプセル、Sigma - Aldrich, St. Louis, MO cat # C - 3041 (100 mL に溶解)) で 2  $\mu$ g / mL に希釈した。次に、96 ウェルプレート (Costar / Corning) を、100  $\mu$ L / ウェルの 2  $\mu$ g / mL ウサギ抗サル IgG (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) でコーティングし、37 で 1 時間インキュベーションした。プレートを PBST (0.05% Tween - 20 を含む PBS) で 4 回洗浄し、200  $\mu$ L / ウェルの PBSB (1% BSA を含む PBS; 10% BSA を含む PBS ストックから希釈; KPL) で 37 で 1 時間ブロッキングした。プレートを、PBST で再度 4 回洗浄した。血清サンプルおよび標準物質を、PBSB で希釈した。2000 ng / mL ~ 1.9 ng / mL のサル IgG (Antibodies Incorporated, Davis, CA) の範囲で検量線を作成した。次いで、100  $\mu$ L / ウェルの各サンプルを、37 で 1 時間インキュベーションした。プレートを PBST で 3 回洗浄した。100  $\mu$ L / ウェルのウサギ抗サル IgG - HRP (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) の PBSB での 30,000 倍希釈物を添加し、37 で 1 時間インキュベーションした。プレートを PBST で 3 回洗浄し、100  $\mu$ L / ウェルの SureBlue TMB 基質 (KPL, Gaithersburg, MD) を使用して室温で約 5 分間発色させた。100  $\mu$ L / ウェルの TMP 停止溶液 (KPL, Gaithersburg, MD) で発色反応を停止させ、各ウェルの 450 nm での吸光度を測定した。

10

20

#### 【0306】

内因性カニクイザル血清アルブミンを、以下の ELISA プロトコールを使用して検出した。第 1 に、ウサギ抗サル血清アルブミンを、コーティング緩衝液 (コーティング緩衝液 = 1 炭酸塩 - 重炭酸塩カプセル、Sigma - Aldrich, St. Louis, MO cat # C - 3041 (100 mL に溶解)) で 5  $\mu$ g / mL に希釈した。次に、96 ウェルプレート (Costar / Corning) を、100  $\mu$ L / ウェルの 5  $\mu$ g / mL ウサギ抗サル血清アルブミン (Nordic Immunology, The Netherlands, cat # RAMon / Alb) でコーティングし、37 で 1 時間インキュベーションした。プレートを PBST (0.05% Tween - 20 を含む PBS) で 4 回洗浄し、300  $\mu$ L / ウェルの 5% 魚類ゼラチン (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO cat # G - 7765) ストック溶液を含む PBS を使用して 37 で 1 時間ブロッキングした。プレートを、PBST で再度 4 回洗浄した。血清サンプルおよび標準物質を、PBSB で希釈した。200 ng / mL ~ 0.39 ng / mL のサル血清アルブミン (Nordic Immunology, The Netherlands, cat # MonAlb Batch # 6082) の範囲で検量線を作成した。次いで、100  $\mu$ L / ウェルの各サンプルを、37 で 1 時間インキュベーションした。プレートを PBST で 6 回洗浄した。100  $\mu$ L / ウェルのヤギ抗ヒトアルブミン - HRP 抱合物 (Academy Bio - Medical, Inc., Houston, TX, cat # AL10H - G1a) の PBSB での 30,000 倍希釈物を添加し、37 で 1 時間インキュベーションした。プレートを PBST で 6 回洗浄し、100  $\mu$ L / ウェルの SureBlue TMB substrate (KPL, Gaithersburg, MD) を使用して、室温で約 5 分間発色させた。100  $\mu$ L / ウェルの TMP 停止溶液 (KPL, Gaithersburg, MD) で発色反応を停止させ、各ウェルの 450 nm での吸光度を測定した (図 13)。

30

40

#### 【0307】

内因性カニクイザル IgM を、以下の ELISA プロトコールを使用して検出した。第 1 に、ヤギ抗サル IgM 抗体を、コーティング緩衝液 (コーティング緩衝液 = 1 炭酸塩 -

50

重炭酸塩カプセル、Sigma-Aldrich, St. Louis, MO cat# C-3041 (100 mLに溶解))で5 µg/mLに希釈した。次に、96ウェルプレート(Costar/Corning)を、100 µL/ウェルの5 µg/mLヤギ抗サルIgM (KPL, Gaithersburg, MD, cat# 071-11-031)でコーティングし、37 °Cで1時間インキュベーションした。プレートをPBST (0.05% Tween-20を含むPBS)で4回洗浄し、200 µL/ウェルのPBSSB (1% BSAを含むPBS; 10% BSAを含むPBSストックから希釈; KPL)を使用して37 °Cで1時間ブロッキングした。プレートを、PBSTで再度4回洗浄した。血清サンプルおよび標準物質を、PBSSBで希釈した。2000 ng/mL ~ 15.6 ng/mLのサルIgM (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, cat# 2001301)の範囲で検量線を作成した。次いで、100 µL/ウェルの各サンプルを、37 °Cで1時間インキュベーションした。プレートをPBSTで4回洗浄した。100 µL/ウェルのヤギ抗サルIgM-HRP抱合物(RDI, Concord, MA, cat# 617103007)のPBSSBでの: 10,000倍希釈物を添加し、37 °Cで1時間インキュベーションした。プレートをPBSTで4回洗浄し、100 µL/ウェルのSureBlue TMB substrate (KPL, Gaithersburg, MD)を使用して、室温で約5分間発色させた。100 µL/ウェルのTMP停止溶液(KPL, Gaithersburg, MD)で発色反応を停止させ、各ウェルの450 nmでの吸光度を測定した(図14)。

#### 【0308】

実施例21: 種々の投与スケジュールを使用した、TG32BマウスにおけるヒトIgG異化に及ぼすペプチド番号270の影響

t = 0時間(T<sub>0</sub>)で、成体TG32Bマウスに500 mg/kgのヒトIgG (MP Biomedicals, Irvine, CA)を静脈内注射した。4匹のマウスからなる第1の群に、t = 24時間で、5 mg/kgのペプチド番号270を静脈内注射し、4匹のマウスからなる第2の群に、t = 24および72時間で、5 mg/kgのペプチド番号270を静脈内注射し、4匹のマウスからなる第3の群に、t = 24、48、72、96時間で、2.5 mg/kgのペプチド番号270を静脈内注射した。さらなるマウス群を使用して、15 mM酢酸ナトリウム(pH 5)を含むビヒクルPBSを用いて各時点でコントロール注射を行った。全時点の注射前および168時間後に血液サンプルを採取した。血清を調製し、実施例18のようにELISAを行うまで-20 °Cで保存した(図16)。

#### 【0309】

実施例22: さらなるTG32Bマウス実験

TG32Bマウスにおいてペプチド番号270を使用してさらなる実験を行った。実施例18と同一の実験デザインを使用して、ペプチド番号270が皮下(SC)および腹腔内(IP)投与経路を使用したIgG異化速度の加速に有効であることが見出された。24時間後から出発した5 mg/kgのペプチド番号270の5日間の毎日の投与により、ペプチド番号270の皮下(SC)および腹腔内(IP)注射後にIgGの半減期が56時間に減少することが見出された。これらの半減期は、80~100時間のIgG半減期を示す典型的なコントロールよりも有意に短い。さらに、hIgG濃度は、コントロール群と比較して、ペプチド番号270を使用した168時間後に56% (SC)および66% (IP)減少した。

#### 【0310】

実施例18に記載の実験プロトコールを使用して、TG32Bマウスにおけるペプチド番号230も試験した。ヒトIgGの静脈内注射から24時間後に、5 mg/kgのペプチド番号230の毎日の静脈内(IV)注射を全部で5回行った。hIgGの半減期は、92時間のコントロール群の半減期と比較して、39時間に減少した。さらに、hIgG濃度は、コントロール群と比較して、168時間後に76%減少した。

#### 【0311】

10

20

30

40

50

3日間の毎日のペプチド投与と比較したペプチド単回投与の影響を評価するようにデザインした2つの実験において、ペプチド番号230も試験した。実施例18に記載の実験プロトコールを使用して、ヒトIgGのIV注射の24時間後、第1の動物群を、5mg/kgペプチド番号230単回IV投与で処置し、第2の動物群を、5mg/kgペプチド番号230の3日間の連続する毎日のIV投与を行った。120時間後、ペプチド番号230の単回投与により、マウス中のhIgG濃度は41%減少した。ペプチド番号230の3日間の毎日の投与を行ったマウス群では、120時間後にhIgG濃度は61%減少した。

【0312】

実施例23：TG32BマウスにおけるヒトIgG異化に及ぼすペプチド番号283の影響

t = 0時間 (T<sub>0</sub>) で、成体TG32Bマウスに500mg/kgのヒトIgG (MP Biomedicals, Irvine, CA) を静脈内注射した。24、48、72、および96時間後、マウスに、0.5、1、2.5、5、または10mg/kgのペプチド番号283のいずれかを静脈内注射した。15mM酢酸ナトリウム (pH5) を使用して、各時点でコントロール注射を行い、これを全注射のビヒクルとしての機能を果たした。全時点の注射前および120時間後、168時間後、および30日後に血液サンプルを採取した。血清を調製し、ELISAを行うまで - 20 で保存した。

【0313】

各時点での血清中のヒトIgG濃度を、実施例18に記載のように決定した (図17)。

【0314】

実施例24：ペグ化ペプチド番号289の合成

ペプチド番号285を、10mMリン酸緩衝液 (pH7.4) に溶解し、1当量のPEG<sub>30kDa</sub>-スクシニミジルエステル (NOF Corp, Japan, Sunbright MEGC-30TS) で18時間処理した。粗反応混合物を、実施例7に記載のようにC4カラム (Jupiter, Phenomenex) で精製し、凍結乾燥させ、および陽イオン交換クロマトグラフィ (Fractoprep SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cat No. 1.17972, EMD Chemicals Inc, Gibbstown, NJ) で再度精製し、それにより、ペプチドが10mM酢酸ナトリウム (pH5) 中の樹脂に結合し、樹脂を10mM酢酸ナトリウム (pH5) で洗浄し、ペプチドを、100mM塩化ナトリウムを含む10mM酢酸ナトリウム (pH5) で溶離した。ペプチド溶離物を、1%酢酸に対して透析し、凍結乾燥させた。精製したペプチドを、SDS-PAGEによって分析して約50kDaのペプチド染色バンドが認められ、HPLCにより、残存する遊離ペプチドが存在しないことが証明された (図18)。

表26：ペプチド番号285のペグ化アナログ

【0315】

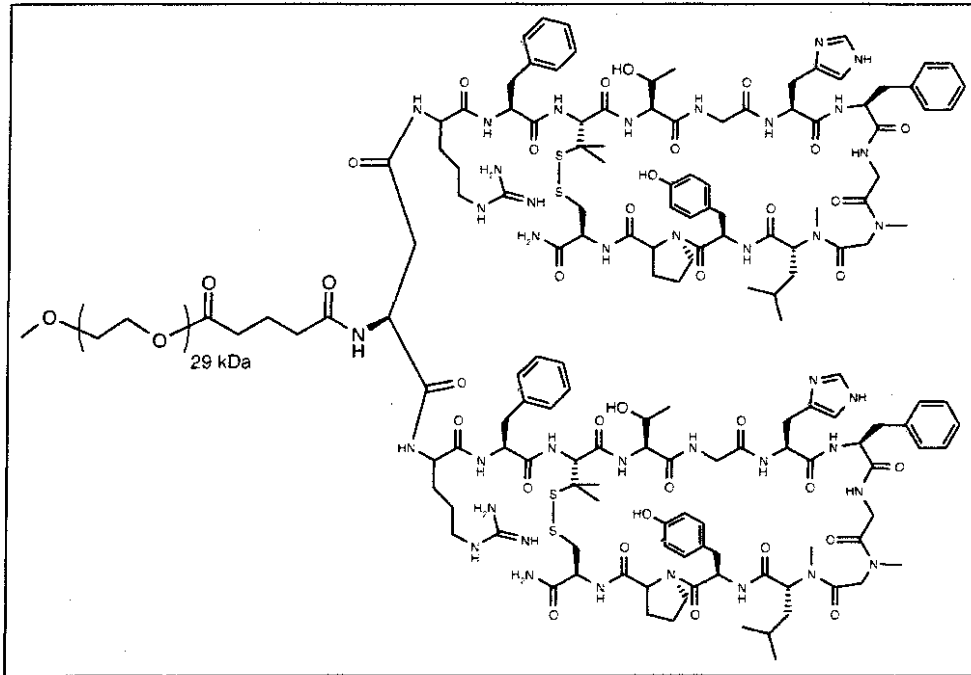
10

20

30

【表 2 6】

配列		IC <sub>50</sub> nM
ペプチド番号 289	以下を参照のこと	18



実施例 25 . T G 3 2 B マウスにおけるヒト I g G 異化に及ぼすペプチド番号 2 8 9 の影響

t = 0 時間 ( T<sub>0</sub> ) で、成体 T G 3 2 B マウスに 5 0 0 m g / k g のヒト I g G ( M P B i o m e d i c a l s , I r v i n e , C A ) を静脈内注射した。2 4 時間後、マウスに、2 5 m g / k g のペプチド番号 2 8 9 を静脈内注射した。2 4、4 8、7 2、9 6、1 2 0、および 1 6 8 時間後に血液サンプルを採取した。血清を調製し、E L I S A を行うまで - 2 0 で保存した。各時点での血清中のヒト I g G 濃度を、実施例 1 8 に記載のように決定した ( 図 1 9 ) 。

【 0 3 1 6 】

実施例 2 6 : カニクイザルにおける h I g G 異化ならびに内因性 I g G、I g M、およびアルブミンに及ぼすペプチド番号 2 8 3 の影響

1 8 頭のカニクイザルを、それぞれ 3 頭の動物からなる 6 つの群に分け、t = - 3 日に、全動物に 5 m g / k g ビオチン化ヒト I g G ( M P B i o m e d i c a l ) で処置した。t = 0 から出発して、以下の投与計画にしたがって、動物をペプチド番号 2 8 3 で 4 週間処置した : 1 ) 1 m g / k g で 3 回 / 週の静脈内投与、2 ) 1 m g / k g で 1 回 / 週の皮下投与、3 ) 1 m g / k g で 3 回 / 週の皮下投与、4 ) 5 m g / k g で 3 回 / 週の静脈内投与、5 ) 5 m g / k g で 1 回 / 週の皮下投与、6 ) 5 m g / k g で 3 回 / 週の皮下投与。群 4 の最後のペプチド投与が 1 6 日目であったことに留意のこと。3 日前、1 5 日前、1 日目、2 日目、3 日目、4 日目、5 日目、7 日目、9 日目、1 1 日目、1 4 日目、1 6 日目、1 8 日目、2 1 日目、2 3 日目、2 5 日目、2 8 日目、3 0 日目、3 2 日目、3 5 日目、4 2 日目、4 9 日目、7 7 日目に血清サンプルを採取した。ビオチン化ヒト I

g G、内因性 I g G、およびアルブミンの濃度を、実施例 20 に記載のように決定し、図 20 ~ 24 に示した。

【0317】

本明細書は、明細書内に引用した引例の教示に照らして最も完全に理解される。本明細書内の実施形態は、本発明の実施形態を例示し、本発明の範囲を制限すると解釈すべきではない。当業者は、多数の他の実施形態が本発明に含まれることを容易に認識する。本開示で引用した全ての刊行物および特許は、その全体が参考として援用される。参考として援用される資料が本明細書と矛盾するか一致しない範囲については、明細書は任意のかかる資料より優先される。本明細書中の任意の引例の引用は、かかる引例が本発明の先行技術であることを承認しているわけではない。

10

【0318】

他で示さない限り、本明細書中（特許請求の範囲が含まれる）で使用された成分および反応条件などの量を示す全ての数値は、全ての場合に、用語「約」で修飾されると理解すべきである。したがって、他で示さない限り、数値のパラメータは近似値であり、本発明によって得られることが求められる所望の性質に応じて変化し得る。少なくとも特許請求の範囲の範囲への均等論の適用を制限することは意図しておらず、各数値のパラメータを、有効数字および日常的な端数計算に照らして解釈すべきである。

【0319】

他で示さない限り、一連の要素に先行する用語「少なくとも」は、一連の要素中の各要素に対して言及していると理解される。当業者は、日常の実験しか用いずに、本明細書中に記載の発明の特定の実施形態の多数の等価物を認識するか確認することができる。かかる等価物は、以下の特許請求の範囲に含まれることが意図される。

20

【図面の簡単な説明】

【0320】

【図1】図1は、ヒト全長 F c R n およびヒト  $\beta$ 2ミクログロブリン ( $\beta$ 2 m) 読み取り枠 (ORF) の cDNA 配列を示す。

【図2】図2は、N末端アルデヒドペプチド単量体（配列番号319）の合成の概要を示す。

【図3】図3は、還元的アルキル化によるペプチド二量体の合成の概要を示す。例として、ペプチド番号270の合成を示す。

30

【図4】図4は、ペプチドおよびプロモアセチル化ペプチドを含むビス-チオールリンカーの使用によるペプチド二量体の合成の概要を示す。例としてペプチド番号100の合成を示す。ペプチド配列上に配置した水平方向の括弧は、架橋の存在を示す（配列番号320）。

【図5】図5は、ペプチドおよびプロモアセチル化ペプチドを含むチオールリンカーを使用したペプチド二量体の合成を示す。例としてペプチド番号122の合成を示す。ペプチド配列上に配置した水平方向の括弧は、架橋の存在を示す（配列番号320）。

【図6】図6は、リンカーを含む二価酸を使用したペプチド二量体の合成を示す。例としてペプチド番号283の合成を示す。ペプチド配列下に配置した水平方向の括弧は、架橋の存在を示す（配列番号321）。

40

【図7】図7は、リンカーを含むアミンを使用したペプチド二量体の合成を示す。例としてペプチド番号280の合成を示す。ペプチド配列下に配置した水平方向の括弧は、架橋の存在を示す（配列番号321）。

【図8】図8は、ペプチドアルデヒドおよびタンパク質 C y s F c を使用したペプチド - F c 融合物の合成を示す。例としてペプチド番号252 - F c の合成を示す。ペプチド配列下に配置した水平方向の括弧は、架橋の存在を示す。

【図9】図9は、T G 3 2 B マウス（ヒト F c R n およびヒト  $\beta$ 2 m を発現するが、マウス F c R n または  $\beta$ 2 m を発現しないように操作されたマウス）におけるヒト I g G 異化の動態学を示す。

【図10】図10は、カニクイザルにおけるビオチン化ヒト I g G の異化動態学がペプチ

50

ド番号 270 の静脈内注射後に加速されることを示す。

【図 1 1】図 1 1 は、ペプチド番号 270 の静脈内注射後のカニクイザルにおける内因性 I g G の血清レベルを示す。

【図 1 2】図 1 2 は、内因性カニクイザル I g G レベルを  $T_0$  レベルに対して規準化した図 1 1 に示す結果を示す。

【図 1 3】図 1 3 は、ペプチド番号 270 の静脈内注射後のカニクイザルにおける内因性血清アルブミンレベルを示す。

【図 1 4】図 1 4 は、ペプチド番号 270 の静脈内注射後のカニクイザルにおける内因性 I g M レベルを示す。

【図 1 5】図 1 5 は、ペプチド番号 231、ペプチド番号 274、およびペプチド番号 252 - F c の静脈内注射後の T G 3 2 B マウスにおけるヒト I g G 異化の動態学を示す。

10

【図 1 6】図 1 6 は、ペプチド番号 270 の静脈内注射後の T G 3 2 B マウスにおけるヒト I g G 異化の動態学を示す。

【図 1 7】図 1 7 は、ペプチド番号 283 の静脈内注射後の T G 3 2 B マウスにおけるヒト I g G 異化の動態学を示す。

【図 1 8】図 1 8 は、4 ~ 20 % T r i s - G l y ゲルでの精製ペプチド番号 289 の S D S - P A G E 分析によるペプチド番号 289 の分子量を示す。レーン 1 は、分子量マーカーを含む。レーン 2 は、非抱合 P E G <sub>30kDa</sub> 出発物質を含む。レーン 3 は、粗反応混合物を含む。レーン 4 は、精製ペプチド番号 289 を含む。

【図 1 9】図 1 9 は、ペプチド番号 289 の静脈内注射後の T G 3 2 B マウスにおけるヒト I g G 異化の動態学を示す。

20

【図 2 0】図 2 0 は、5 m g / k g ペプチド番号 283 の静脈内注射後のカニクイザルにおけるビオチン化ヒト I g G 異化の動態学を示す。

【図 2 1】図 2 1 は、1 m g / k g ペプチド番号 283 の静脈内注射後のカニクイザルにおけるビオチン化ヒト I g G 異化の動態学を示す。

【図 2 2】図 2 2 は、カニクイザルにおける I g G 濃度に及ぼすペプチド番号 283 ( 5 m g / k g ) の影響を示す。

【図 2 3】図 2 3 は、カニクイザルにおける I g G 濃度に及ぼすペプチド番号 283 ( 1 m g / k g ) の影響を示す。

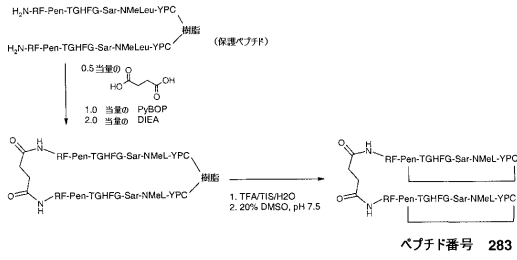
【図 2 4】図 2 4 は、カニクイザルにおけるアルブミン濃度に及ぼすペプチド番号 283 ( 5 m g / k g 、 3 回 / 週、 i v ) の影響を示す。

30



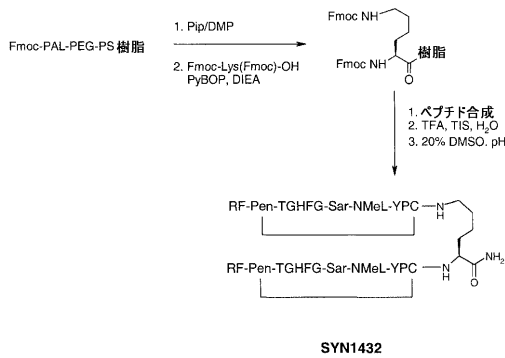
【 図 6 】

FIGURE 6



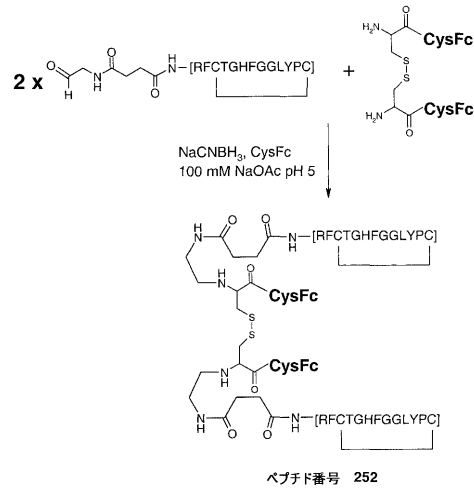
【 図 7 】

FIGURE 7



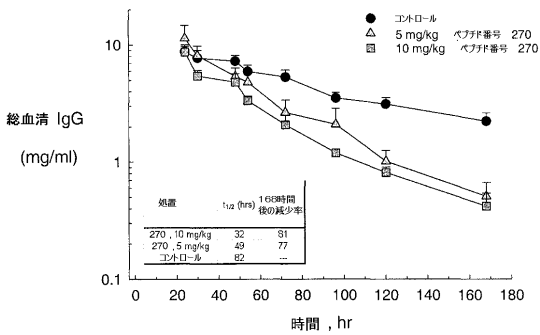
【 図 8 】

FIGURE 8



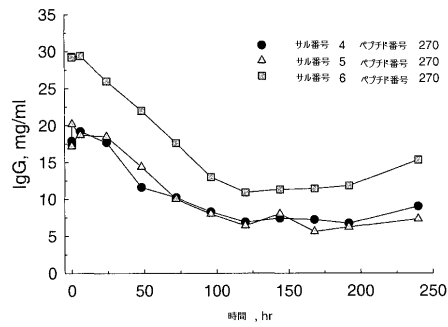
【 図 9 】

FIGURE 9



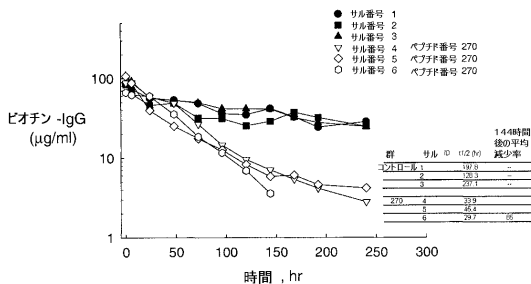
【 図 11 】

FIGURE 11



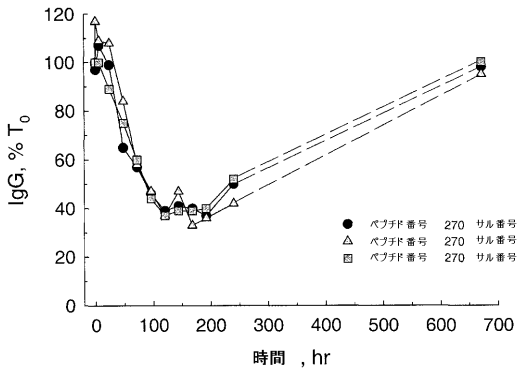
【 図 10 】

FIGURE 10



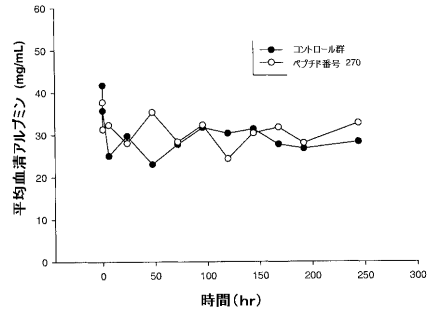
【 図 1 2 】

FIGURE 12



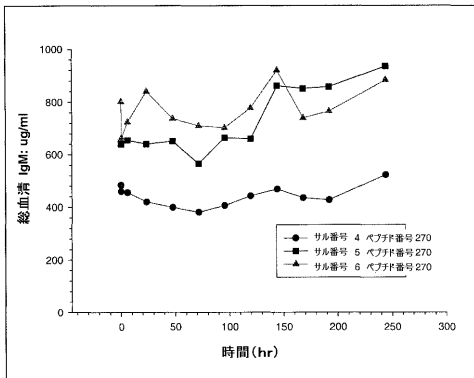
【 図 1 3 】

FIGURE 13



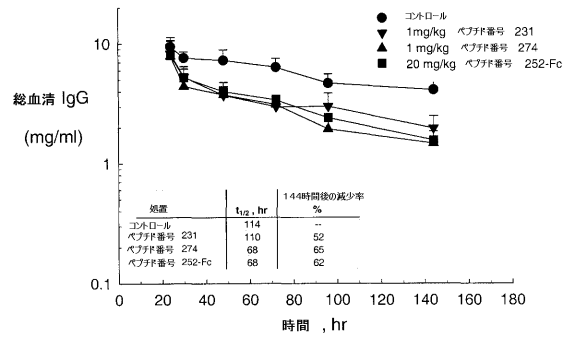
【 図 1 4 】

FIGURE 14



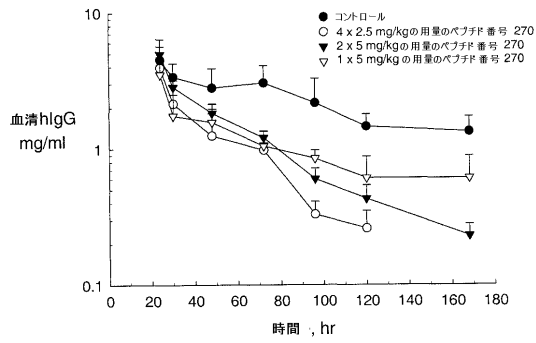
【 図 1 5 】

FIGURE 15



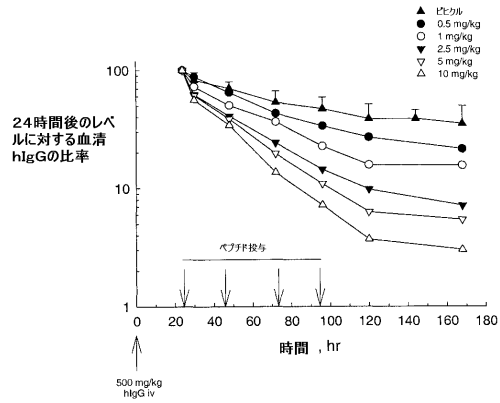
【 図 1 6 】

FIGURE 16



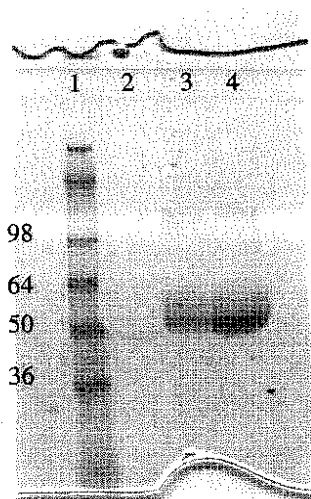
【 図 1 7 】

FIGURE 17



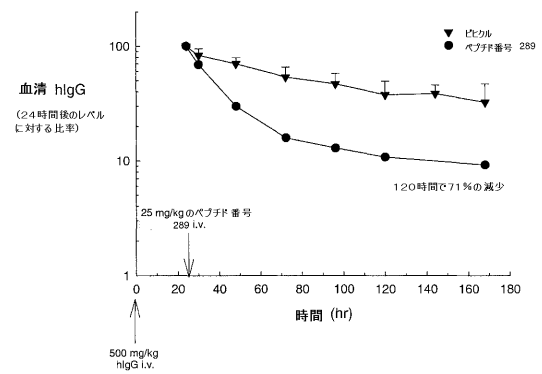
【 図 1 8 】

FIGURE 18



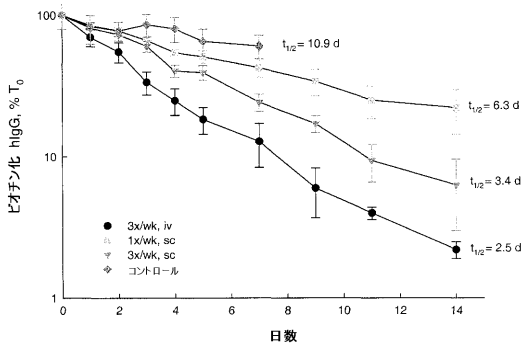
【 図 1 9 】

FIGURE 19



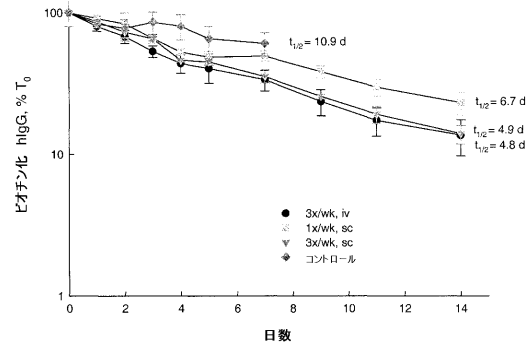
【 図 2 0 】

FIGURE 20



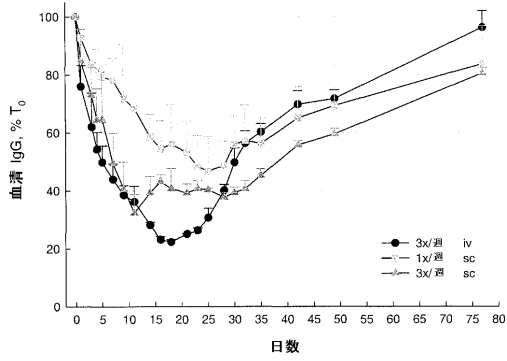
【 図 2 1 】

FIGURE 21



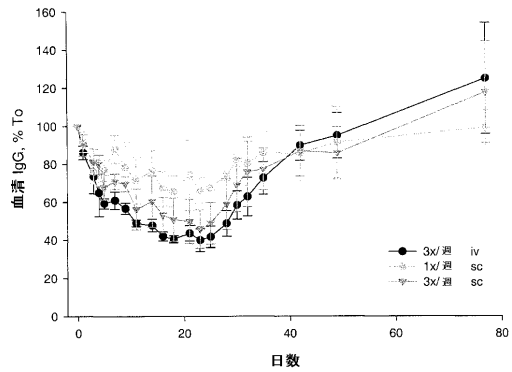
【 図 2 2 】

FIGURE 22



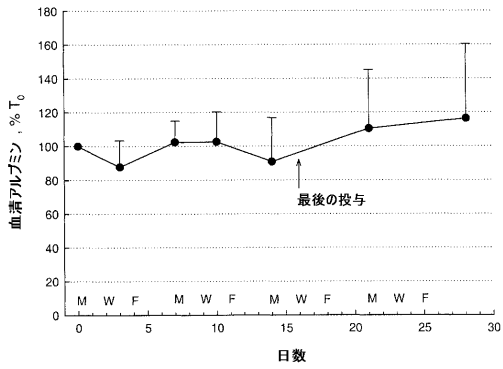
【 図 2 3 】

FIGURE 23



【 図 2 4 】

FIGURE 24



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成20年10月31日 (2008.10.31)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2009527499000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/062349

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/435		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
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, CHEM ABS Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BAIN, J. D. ET AL: "Site-specific incorporation of non-natural residues into peptides: effect of residue structure on suppression and translation efficiencies" TETRAHEDRON, 47(14-15), 2389-400 CODEN: TETRAB; ISSN: 0040-4020, 1991, XP002450045 page 2392, paragraph 2	1
X	DAWSON, NICOLA F. ET AL: "Chemical synthesis, characterization and activity of RK-1, a novel .alpha.-defensin-related peptide" JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE, 6(1), 19-25 CODEN: JPSIEI; ISSN: 1075-2617, 2000, XP002450046 figure 1	1
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		"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
"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	"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
"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	"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.
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
21 November 2007	03/12/2007	
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. 81 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Petri, Bernhard	

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/062349

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/000213 A2 (FORSCHUNGSVERBUND BERLIN EV [DE]; KLUSSMANN ENNO [DE]; ROSENTHAL WALTE) 5 January 2006 (2006-01-05) page 54; compound 288	1
X	US 5 888 512 A (CLAYBERGER CAROL A [US] ET AL) 30 March 1999 (1999-03-30) column 9; compounds AW.68 98-113; sequence 13	1

5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2007/062349

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the International application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- a sequence listing
- table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- on paper
- in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- contained in the International application as filed
- filed together with the International application in electronic form
- furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2007/062349**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:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.  Claims Nos.: 2-35  
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:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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:

see additional sheet

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 an 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.:  
1, 48
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.:

**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 Application No. PCT/US2007/062349

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## Continuation of Box II.1

Claim 48 is ambiguous. The structure depicted as drawing relates to a particular dimer of the cyclic peptide RF"Pen"TGHFG"Sar""NMeL"YPC. Seq.Id.No. 319 however relates to the monomer in linearized form with positions 3, 9, 10 unspecified. As Seq.Id.No. 319 is broader the search has been carried out on Seq.Id.No. 319.

## Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 2-35.

Claims 1-35 and claims 43-47, 49-74, 76 (all in part) relate to peptides defined by a Markush type formula (i.e. claim 1). The ISA is unable to extract from the disclosure as filed a significant structural element that is shared by all the alternatives as covered by the formula of claim 1 (see International search and preliminary examination guidelines PCT/GL/ISP/1 10.17, see also below item IV). As a consequence there is lack of unity and each of the individual peptides theoretically resulting from the defined permutations is to be formulated as separate invention. In view however, of the resulting sheer amount of peptides and in absence of any individual molecules claimed no reasonable definition of inventions and/or groups of inventions is possible. A possible grouping according to the individual peptides as disclosed in description starting from Table 2 onwards would have been a reasonable possibility if these compounds would have been the subject of any of the dependent claims. Since amendment during search phase however, is not possible (Article 19 PCT) this may possibly be pursued only during upcoming regional phases.

The initial phase of the search for subject-matter of claim 1 revealed a very large number of documents relevant to the issue of novelty of claim 1. In fact more than 250 documents were found in Chemical Abstracts database that disclose molecules falling under the structural criteria of claim 1, i.e. one of the sequence alternatives in the range of 7 to 50 amino acids sequence length. The ISA has arbitrarily selected 4 exemplary documents pertinent to the issue of novelty.

Due to the multiplicity of still further alternatives in the dependent claims and in absence of any possibility of a reasonable grouping into unitary groups of inventions the ISA was unable to determine subject-matter for which protection might legitimately be sought that could form the basis of a meaningful complete search for the subject-matter of the dependent claims. (Article 17(2) PCT, PCT Guidelines 9.19).

For these reasons, taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search no complete search has been carried out for claims 1-35 and claims 43-47, 49-74, 76 (all in part as far as relating back to one of claims 1-35). In particular no search has been carried out for any of the specific features of the dependent claims.

International Application No. PCT/US2007 /062349

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

International Application No. PCT/US2007/062349

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: Claims 1-35; 43-47, 49-74, 76 (in part)

Peptides according to claim 1.

Invention 2-6: Claims 36-42; 43-47, 49-74, 76 (in part)

Peptides according to Seq.Id.Nos. 1, 2, ... , 5, respectively

Invention 7: Claims 48

Peptide according to claim 48/Seq.Id.No. 319

Invention 8: Claim 75

Method for forming peptide dimers according to claim 75

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
**PCT/US2007/062349**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006000213 A2	05-01-2006	CA 2571350 A1 DE 102004031579 A1 EP 1763537 A2	05-01-2006 09-02-2006 21-03-2007
US 5888512 A	30-03-1999	NONE	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K	1/22 (2006.01)	C 0 7 K 1/22	
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P	7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P	7/02 (2006.01)	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P	7/10 (2006.01)	A 6 1 P 7/10	
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 3
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	1 0 1
A 6 1 P	17/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/04	
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
		A 6 1 P 43/00	1 1 1
		G 0 1 N 33/53	D

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

- (72)発明者 メゾ, アダム アール.  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 1, ウォルサム, モントクレア アベニュー 1 5
- (72)発明者 マクドネル, ケビン エー.  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 1, ウォルサム, デール ストリート 3 0 5
- (72)発明者 ヘヒアー, クリスティーナ タン エー.  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 2 3 0 9, ニスカユナ, マイロン ストリート 1 4 0 3
- (72)発明者 カストロ, アルフレッド  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 9 0, ウィンチェスター, ワイルドウッド ストリート 4 3

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA14 BA01 BA02 BA17 BA18 BA19 NA05 ZA222  
ZA332 ZA342 ZA412 ZA532 ZA542 ZA552 ZA592 ZA681 ZA702 ZA752  
ZA892 ZA912 ZA922 ZA942 ZA962 ZB071 ZB092 ZB112 ZB132 ZB152  
ZB222 ZB262 ZC062 ZC422  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA01 BA17 BA51 EA22 EA50 FA33 GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009527499A5</a>	公开(公告)日	2010-04-08
申请号	JP2008555527	申请日	2007-02-16
申请(专利权)人(译)	圣马丁尼克斯制药公司		
[标]发明人	メゾアダムアール マクドネルケビンエー ヘヒアークリスティーナタンエー カストロアルフレッド		
发明人	メゾ, アダム アール. マクドネル, ケビン エー. ヘヒアー, クリスティーナ タン エー. カストロ, アルフレッド		
IPC分类号	C07K7/08 C07K14/00 C07K19/00 C07K16/00 C07K1/04 C07K1/22 A61K38/00 A61P1/04 A61P1/00 A61P1/16 A61P7/06 A61P7/02 A61P7/10 A61P9/10 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P17/04 A61P19/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P3/10 A61P25/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/04 A61P37/08 A61P43/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00 C07K14/70535 C07K14/70539 G01N2333/70535		
FI分类号	C07K7/08.ZNA C07K14/00 C07K19/00 C07K16/00 C07K1/04 C07K1/22 A61K37/02 A61P1/04 A61P1/00 A61P1/16 A61P7/06 A61P7/02 A61P7/10 A61P9/10 A61P9/10.103 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/00.101 A61P17/02 A61P17/06 A61P17/04 A61P19/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P3/10 A61P25/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/04 A61P37/08 A61P43/00.111 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA14 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/NA05 4C084/ZA222 4C084/ZA332 4C084/ZA342 4C084/ZA412 4C084/ZA532 4C084/ZA542 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA681 4C084/ZA702 4C084/ZA752 4C084/ZA892 4C084/ZA912 4C084/ZA922 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZB071 4C084/ZB092 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB222 4C084/ZB262 4C084/ZC062 4C084/ZC422 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA01 4H045/BA17 4H045/BA51 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA33 4H045/GA26		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/774853 2006-02-17 US 60/805634 2006-06-23 US		
其他公开文献	JP2009527499A		

#### 摘要(译)

本发明涉及与人FcRn结合并抑制IgG的Fc部分与FcRn结合从而调节血清IgG水平的肽。所公开的组合物和方法可用于例如治疗自身免疫疾病和炎症性疾病。本发明还涉及使用方法和制备本发明肽的方法。本发明涉及通过特异性结合FcRn抑制IgG Fc与FcRn结合的方法，从而通过干扰保护IgG不被溶酶体降解的功能来阻止IgG起作用，防止肽的发生。在一个示例性实施方案中，肽结合FcRn并抑制Fc与IgG1，IgG2，IgG3或IgG4亚类的FcRn的结合。

