

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-531716

(P2019-531716A)

(43) 公表日 令和1年11月7日 (2019.11.7)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12 Z N A	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/00	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/435 (2006.01)	C 0 7 K 14/435	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 52 頁) 最終頁に続く		

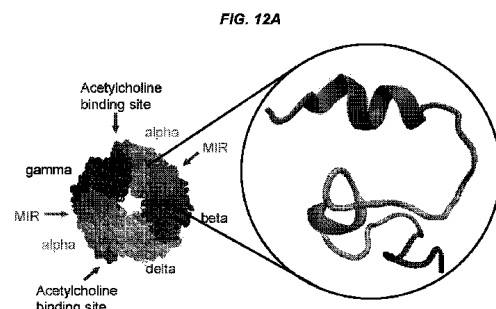
(21) 出願番号	特願2019-513015 (P2019-513015)	(71) 出願人	506115514 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ カリフォルニア アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 6 0 7 - 5 2 0 0, オークランド, フラン クリン ストリート 1 1 1 1, 1 2 番 フロア
(86) (22) 出願日	平成29年9月7日 (2017.9.7)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成31年4月19日 (2019.4.19)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/050521	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号	W02018/049053	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日	平成30年3月15日 (2018.3.15)		
(31) 優先権主張番号	62/384, 896		
(32) 優先日	平成28年9月8日 (2016.9.8)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 重症筋無力症を診断および治療するためのペプチドおよびその使用

(57) 【要約】

本発明は、対象における重症筋無力症を検出するためのまたはその重症度を判定するための組成物および方法を提供する。本発明はまた、対象における重症筋無力症を予防または治療するための組成物および方法も提供する。いくつかの態様において、本組成物はペプチドであり、該ペプチドは、アセチルコリン受容体の主要免疫原性領域に結合するモノクローナル抗体に結合し、かつ、いくつかの場合には病原性抗体結合部位をブロックする。他の態様において、該ペプチドは抗体重鎖断片をさらに含む。また、重症筋無力症を検出するためまたはその重症度を判定するための、および重症筋無力症を予防または治療するためのキットも提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列

SEHETRLVAX₁LFZ₁LKWNPX₂DYGGX₃KKIHZ₂LX₄YTGH (SEQ ID NO:31)

と、

SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対する、X₁、X₂、X₃、およびX₄からなる群より選択される2つまたはそれ以上の位置におけるアミノ酸修飾と

を含む、単離されたペプチドであって、X₁、X₂、X₃、およびX₄が、独立して選択されたアミノ酸であり、かつ、Z₁およびZ₂が、独立して選択されたアミノ酸を含む個別の長さのリンカー配列である、該単離されたペプチド。

10

【請求項 2】

SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対する前記アミノ酸修飾がX₁およびX₂に存在する、請求項1に記載のペプチド。

【請求項 3】

X₁がNであり、X₂がAであり、Z₁の長さが4個であり、かつ、Z₂の長さが2個である (SEQ ID NO:2)、請求項2に記載のペプチド。

【請求項 4】

SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対する前記アミノ酸修飾がX₁およびX₃に存在する、請求項1に記載のペプチド。

【請求項 5】

X₁がNであり、X₃がIであり、Z₁の長さが4個であり、かつ、Z₂の長さが2個である (SEQ ID NO:3)、請求項4に記載のペプチド。

20

【請求項 6】

SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対する前記アミノ酸修飾がX₁およびX₄に存在する、請求項1に記載のペプチド。

【請求項 7】

X₁がNであり、X₄がDであり、Z₁の長さが4個であり、かつ、Z₂の長さが2個である (SEQ ID NO:4)、請求項6に記載のペプチド。

【請求項 8】

SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対する前記アミノ酸修飾がX₃およびX₄に存在する、請求項1に記載のペプチド。

30

【請求項 9】

前記アミノ酸配列がSEQ ID NO:5ではない、請求項8に記載のペプチド。

【請求項 10】

SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対する前記アミノ酸修飾がX₁、X₃、およびX₄に存在する、請求項1に記載のペプチド。

【請求項 11】

X₁がNであり、X₃がIであり、X₄がDであり、Z₁の長さが4個であり、かつ、Z₂の長さが2個である (SEQ ID NO:6)、請求項10に記載のペプチド。

【請求項 12】

SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対する前記アミノ酸修飾がX₁、X₂、X₃、およびX₄に存在する、請求項1に記載のペプチド。

40

【請求項 13】

X₁がNであり、X₂がAであり、X₃がIであり、X₄がDであり、Z₁の長さが4個であり、かつ、Z₂の長さが2個である (SEQ ID NO:7)、請求項12に記載のペプチド。

【請求項 14】

アセチルコリン受容体 (AChR) の主要免疫原性領域 (MIR) に結合する抗体に結合する、請求項1に記載のペプチド。

【請求項 15】

インティン-キチン結合ドメインタグをさらに含む、請求項1に記載のペプチド。

50

【請求項 16】

ヘキサヒスチジンタグをさらに含む、請求項1に記載のペプチド。

【請求項 17】

前記ペプチドにコンジュゲートされている抗体重鎖断片をさらに含む、請求項1に記載のペプチド。

【請求項 18】

前記抗体がヒト免疫グロブリンGである、請求項17に記載のペプチド。

【請求項 19】

前記重鎖断片のヒンジ領域が、前記ペプチドのC末端にコンジュゲートされている、請求項17に記載のペプチド。

【請求項 20】

請求項1に記載のペプチドまたは複数の該ペプチドを含む、組成物。

【請求項 21】

薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項20に記載の組成物。

【請求項 22】

前記複数のペプチドが、少なくとも2、3、4、または5つの異なるペプチドを含む、請求項20に記載の組成物。

【請求項 23】

請求項1に記載のペプチドまたは複数の該ペプチドと固体支持体とを含む、キット。

【請求項 24】

前記固体支持体が、マルチウェルプレート、ELISAプレート、マイクロアレイ、チップ、ビーズ、多孔質ストリップ、またはニトロセルロースフィルターである、請求項23に記載のキット。

【請求項 25】

前記ビーズがキチンを含む、請求項24に記載のキット。

【請求項 26】

前記ペプチドまたは複数の該ペプチドが、前記固体支持体上に固定化されている、請求項23に記載のキット。

【請求項 27】

前記複数のペプチドが、アセチルコリン受容体(AChR)の主要免疫原性領域(MIR)に結合する同じ抗体または異なる抗体に結合する、請求項23に記載のキット。

【請求項 28】

使用説明書をさらに含む、請求項23に記載のキット。

【請求項 29】

請求項1に記載の単離されたペプチドをコードする、単離された核酸。

【請求項 30】

対象由来の生体試料中において、請求項1に記載のペプチドまたは複数の該ペプチドに結合する抗体の有無を検出する段階であって、該ペプチドまたは複数の該ペプチドに結合する抗体の存在によって、重症筋無力症(MG)の存在またはその重症度の増大が示される、該段階

を含む、該対象におけるMGを検出するためのまたはその重症度を判定するための方法。

【請求項 31】

前記抗体が、アセチルコリン受容体(AChR)の主要免疫原性領域(MIR)に結合する、請求項30に記載の方法。

【請求項 32】

前記ペプチドまたは複数の該ペプチドが、SEQ ID NO:2、3、4、6、および7からなる群より選択される、請求項30に記載の方法。

【請求項 33】

前記対象から前記試料を得る段階をさらに含む、請求項30に記載の方法。

【請求項 34】

10

20

30

40

50

前記試料が全血、血清、または血漿である、請求項30に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記ペプチドまたは複数の該ペプチドが固体支持体に結合されている、請求項30に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記固体支持体が、マルチウェルプレート、ELISAプレート、マイクロアレイ、チップ、ビーズ、多孔質ストリップ、またはニトロセルロースフィルターである、請求項35に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記ビーズがキチンを含む、請求項36に記載の方法。

10

【請求項 3 8】

前記抗体が、ウェスタンブロット、ドットブロット、ELISA、ラジオイムノアッセイ法、免疫沈降、電気化学発光、免疫蛍光、FACS解析、またはマルチプレックスビーズアッセイ法によって検出される、請求項30に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記試料を対照と比較する、請求項30に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記対照が、MGを有していない対象から得られる、請求項39に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記対照が、MGの症状を発症する前またはMGに対する治療を受けた後の前記対象から得られる、請求項39に記載の方法。

20

【請求項 4 2】

請求項1に記載のペプチドまたは複数の該ペプチドの治療有効量を対象に投与する段階であって、該ペプチドまたは複数の該ペプチドが、該対象において循環している抗体に結合して中和複合体を形成し、それによって重症筋無力症(MG)を予防または治療する、該段階を含む、該対象におけるMGを予防または治療するための方法。

【請求項 4 3】

前記循環している抗体が、アセチルコリン受容体(AChR)の主要免疫原性領域(MIR)に結合する、請求項42に記載の方法。

30

【請求項 4 4】

前記ペプチドまたは複数の該ペプチドが、SEQ ID NO:2、3、4、6、および7からなる群より選択される、請求項42に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記ペプチドまたは複数の該ペプチドが、AChRのMIRに結合する抗体を産生するメモリーB細胞を不活化するかまたはその数を低減させる、請求項42に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記対象がMGの症状を示している、請求項42に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記対象を治療することがMGの症状の減少をもたらす、請求項46に記載の方法。

40

【請求項 4 8】

前記対象から中和複合体を除去する段階をさらに含む、請求項42に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記中和複合体が、親和性血漿フェレーシスによって除去される、請求項48に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記ペプチドまたは複数の該ペプチドが、静脈内に、筋肉内に、またはそれらの組み合わせで投与される、請求項42に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2016年9月8日に出願された米国特許仮出願第62/384,896号に対する優先権を主張し、その開示は、参照によってその全体が全ての目的のために本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

重症筋無力症(MG)は、アセチルコリン受容体(AChR)への抗体媒介性の攻撃が原因の、シナプス後膜折りたたみ構造の破壊と神経筋接合部におけるAChR密度の減少とをもたらす慢性的の神経筋自己免疫疾患である。AChRの喪失は、全身の筋脱力をもたらし、しばしば四肢においてもたらす。他の症状は、眼瞼下垂(垂れ下がった眼瞼)および複視(物が二重に見える)を含む。MGは、呼吸を制御する筋肉が侵されたときに致命的となり得る。MGは、500万~2億人が罹患すると推定されており、毎年新たに300~3000万人が診断されている。

【0003】

残念なことに、MGの治療法はない。MGに対する複数の治療法が使用可能であるが、使用可能な治療選択肢は、重大な有害副作用を伴う。したがって、MGのための新しい治療法および予防的手段が必要とされている。本発明は、この要求を満たし、また関連する利点も提供する。

【発明の概要】

【0004】

発明の簡単な概要

一局面において、本発明は、アミノ酸配列

SEHETRLVAX₁LFZ₁LKWNPX₂DYGGX₃KKIHZ₂LX₄YTGH (SEQ ID NO:31)

と、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対する、X₁、X₂、X₃、およびX₄からなる群より選択される2つまたはそれ以上の位置におけるアミノ酸修飾とを含む、単離されたペプチドであって、X₁、X₂、X₃、およびX₄が、独立して選択されたアミノ酸であり、かつ、Z₁およびZ₂が、独立して選択されたアミノ酸を含む個別の長さのリンカー配列である、単離されたペプチドを提供する。

【0005】

いくつかの態様において、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸修飾がX₁およびX₂に存在する。いくつかの場合には、X₁はNであり、X₂はAであり、Z₁の長さは4個であり、かつ、Z₂の長さは2個である(SEQ ID NO:2)。他の態様において、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸修飾がX₁およびX₃に存在する。いくつかの場合には、X₁はNであり、X₃はIであり、Z₁の長さは4個であり、かつ、Z₂の長さは2個である(SEQ ID NO:3)。いくつかの他の態様において、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸修飾がX₁およびX₄に存在する。いくつかの場合には、X₁はNであり、X₄はDであり、Z₁の長さは4個であり、かつ、Z₂の長さは2個である(SEQ ID NO:4)。いくつかの態様において、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸修飾がX₃およびX₄に存在する。いくつかの場合には、アミノ酸配列は、SEQ ID NO:5ではない。

【0006】

いくつかの他の態様において、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸修飾がX₁、X₃、およびX₄に存在する。いくつかの場合には、X₁はNであり、X₃はIであり、X₄はDであり、Z₁の長さは4個であり、かつ、Z₂の長さは2個である(SEQ ID NO:6)。さらに他の態様において、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸修飾がX₁、X₂、X₃、およびX₄に存在する。いくつかの場合には、X₁はNであり、X₂はAであり、X₃はIであり、X₄はDであり、Z₁の長さは4個であり、かつ、Z₂の長さは2個である(SEQ ID NO:7)。

【0007】

他の態様において、ペプチドは、アセチルコリン受容体(AChR)の主要免疫原性領域(MIR)に結合する抗体に結合する。なお他の態様において、ペプチドは、インテイン-キチン結

10

20

30

40

50

合ドメインタグをさらに含む。いくつかの態様において、ペプチドは、ヘキサヒスチジンタグをさらに含む。いくつかの他の態様において、ペプチドは、ペプチドにコンジュゲートされている抗体重鎖断片をさらに含む。いくつかの場合には、抗体は、ヒト免疫グロブリンGである。他の場合には、重鎖断片のヒンジ領域が、ペプチドのC末端にコンジュゲートされる。

【0008】

別の局面において、本発明は、本発明のペプチドまたは複数の該ペプチドを含む組成物を提供する。

【0009】

いくつかの態様において、組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。他の態様において、複数のペプチドは、少なくとも2、3、4、または5つの異なるペプチドを含む。

【0010】

さらに別の局面において、本発明は、本発明のペプチドまたは複数の該ペプチドと固体支持体とを含むキットを提供する。別の局面において、本発明は、本発明の単離されたペプチドをコードする単離された核酸を提供する。

【0011】

いくつかの態様において、固体支持体は、マルチウェルプレート、ELISAプレート、マイクロアレイ、チップ、ビーズ、多孔質ストリップ、またはニトロセルロースフィルターである。いくつかの場合には、ビーズは、キチンを含む。他の態様において、ペプチドまたは複数の該ペプチドは、固体支持体上に固定化される。いくつかの他の態様において、複数のペプチドは、アセチルコリン受容体(AChR)の主要免疫原性領域(MIR)に結合する同じ抗体または異なる抗体に結合する。なお他の態様において、キットは、使用説明書をさらに含む。

【0012】

別の局面において、本発明は、対象における重症筋無力症(MG)を検出するためのまたはその重症度を判定するための方法を提供し、該方法は、対象由来の生体試料中において、本発明のペプチドまたは複数の該ペプチドに結合する抗体の有無を検出する段階であって、ペプチドまたは複数の該ペプチドに結合する抗体の存在によって、MGの存在またはその重症度の増大が示される、段階を含む。

【0013】

いくつかの態様において、抗体は、アセチルコリン受容体(AChR)の主要免疫原性領域(MIR)に結合する。他の態様において、ペプチドまたは複数の該ペプチドは、SEQ ID NO:2、3、4、6、および7からなる群より選択される。

【0014】

いくつかの他の態様において、方法は、対象から試料を得る段階をさらに含む。いくつかの場合には、試料は、全血、血清、または血漿である。

【0015】

特定の態様において、ペプチドまたは複数の該ペプチドは、固体支持体に結合される。いくつかの場合には、固体支持体は、マルチウェルプレート、ELISAプレート、マイクロアレイ、チップ、ビーズ、多孔質ストリップ、またはニトロセルロースフィルターである。いくつかの場合には、ビーズは、キチンを含む。いくつかの他の態様において、抗体は、ウェスタンブロット、ドットブロット、ELISA、ラジオイムノアッセイ法、免疫沈降、電気化学発光、免疫蛍光、FACS解析、またはマルチプレックスビーズアッセイ法によって検出される。

【0016】

他の態様において、試料を対照と比較する。いくつかの場合には、対照は、MGを有していない対象から得られる。他の場合には、対照は、MGの症状を発症する前またはMGに対する治療を受けた後の対象から得られる。

【0017】

別の局面において、本発明は、対象における重症筋無力症(MG)を予防または治療するた

10

20

30

40

50

めの方法を提供し、該方法が、本発明のペプチドまたは複数の該ペプチドの治療有効量を対象に投与する段階であって、ペプチドまたは複数の該ペプチドが、対象において循環している抗体に結合して中和複合体を形成し、それによってMGを予防または治療する、段階を含む。

【0018】

いくつかの態様において、循環している抗体は、アセチルコリン受容体(AChR)の主要免疫原性領域(MIR)に結合する。他の態様において、ペプチドまたは複数の該ペプチドは、SEQ ID NO:2、3、4、6、および7からなる群より選択される。なお他の態様において、ペプチドまたは複数の該ペプチドは、AChRのMIRに結合する抗体を産生するメモリーB細胞を不活化するかまたはその数を低減させる。

10

【0019】

他の態様において、対象は、MGの症状を示している。いくつかの場合には、対象を治療することは、MGの症状の減少をもたらす。なお他の態様において、方法は、対象から中和複合体を除去する段階をさらに含む。いくつかの場合には、中和複合体は、親和性血漿フェレーシスによって除去される。他の態様において、ペプチドまたは複数の該ペプチドは、静脈内に、筋肉内に、またはそれらの組み合わせで投与される。

【0020】

本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明および図面から当業者に明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

20

【0021】

【図1】シビレエイ(Torpedo)アセチルコリン受容体(AChR)の主要免疫原性領域(MIR)の立体像を示しており、 α サブユニットの細胞外ドメイン(ECD)のコリー-ポーリング-コルタン(CPK)空間充填モデルを表している。MIRは、AChRの α サブユニット上のECDの上部に位置する。

【図2】シビレエイ39MIR(SEQ ID NO:9)、マウス39MIR(SEQ ID NO:10)、およびヒト39MIR(SEQ ID NO:8)のペプチド配列を示す。上部に示されるアミノ酸位置番号は、SEQ ID NO:28に示されるAChR α サブユニットアミノ酸配列のものに対応する。3つの不連続 α サブユニットセグメント(アミノ酸1~12、65~79、および110~115に対応する)は、下線を引いたアミノ酸によって表されるリンカーによって連結されている。

30

【図3】4つのモノクローナル抗体(mAb 35、mAb 132A、mAb 198、および抗キチン結合ドメインmAb)と6つのペプチド-インティン-キチン結合ドメイン(IChBD)融合タンパク質(6つのペプチドは、シビレエイ39MIR(SEQ ID NO:9)、ヒト39MIR(SEQ ID NO:8)、K10Nヒト39MIR突然変異体(SEQ ID NO:19)、D70Aヒト39MIR突然変異体(SEQ ID NO:20)、V75Iヒト39MIR突然変異体(SEQ ID NO:21)、およびQ111Dヒト39MIR突然変異体(SEQ ID NO:22)である)との間の結合を図示しているウェスタンブロットを示す。ペプチド-IChBD融合タンパク質に吸着したキチンビーズをSDS-PAGEゲル上に流し、ニトロセルロース膜に転写し、そして、4つのmAbでアッセイした。

【図4】シビレエイ39MIR(SEQ ID NO:9)およびヒト39MIR(SEQ ID NO:8)のペプチド配列、ならびに8つの突然変異体シビレエイ39MIR(N10K(SEQ ID NO:11)、L12F(SEQ ID NO:12)、R66K(SEQ ID NO:13)、A70D(SEQ ID NO:14)、I75V(SEQ ID NO:15)、R79H(SEQ ID NO:16)、D111Q(SEQ ID NO:17)、およびK115H(SEQ ID NO:18))のペプチド配列を示す。上部に示されるアミノ酸位置番号は、SEQ ID NO:28に示されるAChR α サブユニットアミノ酸配列のものに対応する。3つの不連続 α サブユニットセグメント(アミノ酸1~12、65~79、および110~115に対応する)は、下線を引いたアミノ酸によって表されるリンカーによって連結されている。

40

【図5】5つのモノクローナル抗体(mAb 35、mAb 132A、mAb 198、mAb 334、および抗キチン結合ドメインmAb)と9つのペプチド-IChBD融合タンパク質(9つのペプチドは、シビレエイ39MIR(SEQ ID NO:9)および8つのシビレエイ39MIR突然変異体:N10K(SEQ ID NO:11)、L12F(SEQ ID NO:12)、R66K(SEQ ID NO:13)、A70D(SEQ ID NO:14)、I75V(SEQ ID NO:15)、R79

50

H(SEQ ID NO:16)、D111Q(SEQ ID NO:17)、およびK115H(SEQ ID NO:18)である)との間の結合を図示しているウェスタンブロットを示す。ペプチド-ICHBD融合タンパク質に吸着したキチンビーズをSDS-PAGEゲル上に流し、ニトロセルロース膜に転写し、そして、5つのmAbでアッセイした。

【図6】ヒト39MIR(SEQ ID NO:8)ペプチドおよび4つの突然変異体ヒト39MIRペプチド(K10N(SEQ ID NO:19)、D70A(SEQ ID NO:20)、V75I(SEQ ID NO:21)、およびQ111D(SEQ ID NO:22))の配列を示す。上部に示されるアミノ酸位置番号は、SEQ ID NO:28に示されるAChR α サブユニットアミノ酸配列のものに対応する。3つの不連続 α サブユニットセグメント(アミノ酸1~12、65~79、および110~115に対応する)は、下線を引いたアミノ酸によって表されるリンカーによって連結されている。

10

【図7】4つのモノクローナル抗体(mAb 35、mAb 132A、mAb 198、および抗キチン結合ドメインmAb)と8つの-ICHBD融合タンパク質(8つのペプチドは、シビレエイ39MIR(SEQ ID NO:9)、ヒト39MIR(SEQ ID NO:8)、K10N/D70Aヒト39MIR二重突然変異体(SEQ ID NO:23)、K10N/V75Iヒト39MIR二重突然変異体(SEQ ID NO:24)、K10N/Q111Dヒト39MIR二重突然変異体(SEQ ID NO:25)、V75I/Q111Dヒト39MIR二重突然変異体(SEQ ID NO:5)、K10N/V75I/Q111Dヒト39MIR三重突然変異体(SEQ ID NO:26)、およびK10N/D70A/V75I/Q111Dヒト39MIR四重突然変異体(SEQ ID NO:27)である)との間の結合を図示しているウェスタンブロットを示す。ペプチド-ICHBD融合タンパク質に吸着したキチンビーズをSDS-PAGEゲル上に流し、ニトロセルロース膜に転写し、そして、4つのmAbでアッセイした。

【図8】図8Aおよび8Bは、シビレエイとマウスのMIRの比較を示す。図8Aは、シビレエイ由来の α サブユニットのECDの立体像を示す。図8Bは、マウス由来の α サブユニットのECDの立体像を示す。

20

【図9】図9Aおよび9Bは、シビレエイとマウスの核MIRの比較を示す。核は、アミノ酸67~76に対応し、暗い陰影で示される。図9Aは、シビレエイ由来の α サブユニットのECDの立体像を示す。図9Bは、マウス由来の α サブユニットのECDの立体像を示す。

【図10】図10Aおよび10Bは、シビレエイとマウスとの間で異なるアミノ酸の位置(ラベルを付けて暗い陰影で示される)を表しているシビレエイおよびMIRの比較を示す。図10Aは、シビレエイ由来の α サブユニットのECDの立体像を示す。図10Bは、マウス由来の α サブユニットのECDの立体像を示す。

【図11】様々なヒト血清試料に対する4つのペプチドのドットブロットを示す。試料を、正常な対象(すなわち、重症筋無力症(MG)の診断なし)またはMGと診断された対象のいずれかから得た。試料を、シビレエイ39MIRペプチド(SEQ ID NO:9)、ヒト39MIRペプチド(SEQ ID NO:8)、K10N/V75I/Q111Dヒト39MIR三重突然変異体(SEQ ID NO:26)、またはK10N/D70A/V75I/Q111Dヒト39MIR四重突然変異体(SEQ ID NO:27)と接触させた。

30

【図12】図12Aおよび12Bは、本発明の組成物を示す。図12Aは、本発明のペプチド(SEQ ID NO:27)およびAChRのMIRの構造との関連性を示す。図12Bは、抗体Fcドメインにコンジュゲートされたペプチドを示す。

【図13】mAb 132Aおよび198のペプチド-Fcコンジュゲート(ヒトIgG抗体Fcドメイン+ヒンジにコンジュゲートされたSEQ ID NO:27(キメラ)、8(ヒト)および9(シビレエイ)のペプチド)への結合を図示しているウェスタンブロットを示す。

40

【図14】図14Aおよび14Bは、本発明のペプチド-FcコンジュゲートがMGを予防または治療することができる異なる方法を示す。図14Aは、本発明のコンジュゲートが病原性抗体の結合部位をブロックすることができることを示す。図14Bは、コンジュゲートが、病原性mAbの製造に関与するB細胞を不活化し、その数を低減させることができる様々な機序を示す。

【発明を実施するための形態】

【0022】

発明の詳細な説明

I. 序論

ニコチン性アセチルコリン受容体(AChR)は、神経筋接合部のシナプス後膜襞の稜に高密

50

度で発現される。AChRは、アセチルコリンに結合する細胞外ドメイン(ECD)を有する290 kDaの膜内在性タンパク質である。重症筋無力症(MG)は、神経筋接合部(NMJ)のタンパク質成分に指向される病原性抗体のB細胞指向型でT細胞調節性の産生によって発症する自己免疫疾患である。多くの場合、抗体の標的は、AChRである。抗AChR抗体のAChRへの結合は、シナプス後膜折りたたみ構造の免疫系破壊および同時に起こる受容体密度の喪失を開始する。

【0023】

本発明は、部分的に、AChRの主要免疫原性領域(MIR)に結合する病原性抗体に結合することができるペプチドの設計に基づいている。該ペプチド、該ペプチドおよび抗体断片を含むコンジュゲート、ならびにその使用法は、MGを検出するためにまたはその重症度を判定するために、ならびに、MGを予防および治療するために有用である。

10

【0024】

II. 定義

他に具体的な指示のない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。加えて、本明細書に記載の方法または材料と類似または等価な任意の方法または材料を本発明の実施において使用することができる。本発明の意図に関して、以下の用語が定義される。

【0025】

他に具体的な指示のない限り、アミノ酸修飾の位置は、ニコチン性AChR α サブユニットのアミノ酸配列内の位置を指す。一例として、細胞外ドメインのゴマフシビレエイ(*Torpedo californica*)ニコチン性AChR α サブユニットアミノ酸1~161についての配列がSEQ ID NO:28に提供される。非限定例として、「Q111」修飾は、通常は参照配列(例えば、ヒト配列)内のQである、ニコチン性AChR α サブユニット内の第111番アミノ酸に対応するアミノ酸が、修飾されていることを意味する。修飾は、Q以外の任意のアミノ酸への置換、挿入、または欠失を含むことができる。同様に、「Q111D」修飾は、通常は参照配列(例えば、ヒト配列)内のQである、ニコチン性AChR α サブユニット内の第111番アミノ酸に対応するアミノ酸が、アミノ酸Dで置換されていることを意味する。

20

【0026】

用語「1つの(a)」、「1つの(an)」、または「その(the)」は、本明細書において使用される場合、1つのメンバーを伴う局面を含むだけでなく、1より多いメンバーを伴う局面も含む。例として、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、その文脈が他のことを明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「細胞(a cell)」への言及は、複数のそのような細胞を含み、そして、「作用物質(the agent)」への言及は、当業者に公知の1つまたは複数の作用物質などへの言及を含む。

30

【0027】

用語「約」および「およそ」は、一般に、測定の性質または精度を前提とした、測定される量に対する許容される誤差の程度を意味するものとする。典型的には、例示的な誤差の程度は、所与の値または値の範囲の20パーセント(%)以内、好ましくは10%以内、より好ましくは5%以内である。代替的に、特に生物学的系においては、用語「約」および「およそ」は、所与の値の一桁以内、好ましくは5倍以内、より好ましくは2倍以内にある値を意味し得る。本明細書に与えられる数値的数量は、他に明記のない限り、近似であり、このことは、明示的に記載されていないときに、用語「約」または「およそ」が推察され得ることを意味している。

40

【0028】

用語「対象」、「個体」、および「患者」は、本明細書において互換的に使用され、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトを指す。哺乳動物は、ネズミ、ラット、類人猿、ヒト、家畜、競技用動物、およびペットを含むが、これらに限定されない。また、インビボで得られるかまたはインビトロで培養される生物学的実体の組織、細胞およ

50

びそれらの子孫も想定される。

【0029】

用語「重症度」は、疾患重症度(例えば、重症筋無力症の重症度)の文脈で使用されるとき、非限定例として、身体検査で観察可能である1つまたは複数の徴候または症状を指すことができる。例えば、重症度は、筋脱力の定性的または定量的測定値を指すことができる。重症度はまた、どれほど多くの筋肉または体組織が筋脱力を示しているかを指すこともできる。さらに、重症度はまた、その疾患に起因する他の後遺症を指すこともできる。例えば、息切れの発生は、息切れが発生する前と比較した重症度の増大として解釈することができる。別の非限定例として、重症度は、1つまたは複数の測定可能値を反映することができる。例えば、血中酸素濃度、心拍数、血圧、臨床検査の結果(例えば、試料中の抗体または他のバイオマーカーの存在)、レントゲン写真または他の画像検査結果、およびエレクトロミエログラム読影を全て、疾患重症度の指標として使用することができる。さらに別の非限定例として、重症度は、徴候、症状、または他の観察可能もしくは測定可能な現象がどれだけ速く変化するかによって、および/または、その変化が永続的であるか一時的であるかどうかによって判定してもよい、あるいは、徴候、症状、または他の観察可能もしくは測定可能な現象がどれだけ速く変化するかに、および/または、その変化が永続的であるか一時的であるかどうかに関連付けてもよい。疾患重症度を判定するための方法および基準は、当業者に公知であろう。

10

【0030】

本明細書において使用される場合、用語「投与すること」は、対象への、経口投与、局所接触、坐剤としての投与、静脈内、腹腔内、筋肉内、病巣内、髄腔内、鼻腔内、または皮下投与を含む。投与は、非経口および経粘膜(例えば、頬側、舌下、口蓋、歯肉、鼻、膣、直腸、または経皮)を含む任意の経路による投与である。非経口投与は、例えば、静脈内、筋肉内、動脈内、皮内、皮下、腹腔内、心室内、および頭蓋内を含む。他の送達様式は、リポソーム製剤、静脈内注入、経皮パッチなどの使用を含むが、これらに限定されない。

20

【0031】

用語「治療すること」は、治療上の有益性および/または予防上の有益性を非限定的に含む、有益または所望の結果を得るためのアプローチを指す。治療上の有益性とは、治療中の1つまたは複数の疾患、病態、もしくは症状の任意の治療上関連性のある改善、またはそれらに及ぼす効果を意味する。治療上の有益性はまた、治療中の1つまたは複数の疾患、病態、または症状の治癒をもたらすことを意味することもできる。予防上の有益性については、特定の疾患、病態、もしくは症状を発症するリスクのある対象に、または、疾患の生理学的症状の1つまたは複数を経験している対象に、疾患、病態、もしくは症状がまだ顕在化していなくとも、組成物を投与してよい。

30

【0032】

用語「有効量」または「十分量」は、有益または所望の結果をもたらすのに十分なペプチド、核酸、または組成物の量を指す。治療有効量は、治療されている対象および病状、対象の体重および年齢、病状の重症度、投与様式などの1つまたは複数に応じて変動し得るが、当業者はこれを容易に決定することができる。具体的な量は、選ばれた特定の作用物質、標的細胞タイプ、対象における標的細胞の場所、遵守すべき投薬レジメン、他の化合物と組み合わせて投与されるかどうか、投与のタイミング、およびそれが担持される物理的送達系の1つまたは複数に応じて変動し得る。

40

【0033】

本明細書における意図に関して、有効量は、当技術分野において公知であるような考慮事項によって決定される。その量は、重症筋無力症を患っている対象において所望の治療効果を達成するのに有効でなければならない。所望の治療効果は、例えば、重症筋無力症に関連する望ましくない症状の寛解、そのような症状が生じる前のこれら発現の予防、重症筋無力症に関連する症状の進行の緩徐化、重症筋無力症に関連する筋機能の低下の緩徐化、重症筋無力症によって引き起こされる任意の不可逆的損傷の緩徐化もしくは制限、重

50

症筋無力症の重症度の低下もしくはその治癒、または生存率の改善もしくは重症筋無力症からのより急速な回復の提供を含み得る。さらに、予防的処置の状況下では、その量はまた、重症筋無力症の発症を予防するのに有効であり得る。

【0034】

有効量は、とりわけ、治療すべき疾患の種類および重症度ならびに治療レジメンに依存する。有効量は、典型的には、適切に設計された治験(用量範囲研究)において決定され、そして、当業者は、有効量を決定するためにそのような試験をどのように適正に遂行すればよいか知っていよう。一般に知られている通り、有効量は、分子(例えば、ペプチド)のその標的に対する親和性、体内のその分布プロファイル、種々の薬理学的パラメーター(例えば、体内の半減期)と望ましくない副作用との間の関係性、ならびに年齢および性別などの他の因子を含む、種々の因子に依存する。

10

【0035】

用語「薬学的に許容される担体」は、活性剤の細胞、生物、または対象への投与を助ける物質を指す。「薬学的に許容される担体」は、本発明の組成物に含めることができ、かつ、患者に対して有意な有害毒性学的効果を引き起こさない、担体または賦形剤を指す。薬学的に許容される担体の非限定例は、水、NaCl、通常の生理食塩水、乳酸リンゲル液、通常スクロース、通常グルコース、結合剤、充填剤、崩壊剤、平滑剤、コーティング剤、甘味料、香料および着色剤、リポソーム、分散媒、マイクロカプセル、陽イオン性脂質担体、等張剤および吸収遅延剤などを含む。担体はまた、安定性、無菌性および等張性を備えた製剤を提供するための物質(例えば、抗菌性保存剤、酸化防止剤、キレート剤および緩衝剤)、微生物の作用を防止するための物質(例えば、抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸など)または食用香味を備えた製剤を提供するための物質などであってもよい。いくつかの場合には、担体は、標的細胞または組織へのペプチドの送達を容易にする作用物質である。当業者は、他の薬学的担体が本発明において有用であることを認識するだろう。

20

【0036】

用語「重症筋無力症(MG)」は、身体の複数の領域に進行性の筋脱力を引き起こし、かつ、少なくとも部分的に、神経筋接合部のタンパク質成分に指向される病原性抗体のB細胞指向型でT細胞調節の産生に起因する、自己免疫疾患を指す。特に、その抗体の多くは、神経筋接合部におけるニコチン性アセチルコリン受容体(AChR)に結合し、その結果、シナプス後膜折りたたみ構造の破壊および同時に起こるAChR密度の喪失をもたらす。シナプス後膜構造の破壊およびAChR密度の低減は、神経伝達物質シグナルに応答する筋肉の能力の減少または完全な喪失に導く。

30

【0037】

MGの初期症状は、一般的に、外眼筋の脱力に起因する。一般的な初期症状は、複視(すなわち、物が二重に見える)および眼瞼下垂(すなわち、眼瞼を上げることが困難)を含む。一般的な初期症状はまた、延髄筋の脱力の発生による、咀嚼困難、嚥下困難、および窒息も含む。脱力は、その後、他の顔面筋、首、腕、脚、および胴体へと進行し、物体を持ち上げる、歩行する、頭を上げる、および発語の困難などの症状を引き起こす。最終的に、筋脱力は、患者が呼吸困難になる時点まで進行し得、いくつかの場合には、呼吸系を発症する。場合によっては、MGは、死をもたらす。

40

【0038】

MGを診断することは、詳細な治療歴を得ること、注意深い身体検査を実施すること、特定の筋肉の電気刺激への応答を評価するためのエレクトロミオグラムを得ること、臨床検査(例えば、血液検査)、およびCT画像検査を含むことができる。

【0039】

用語「シビレエイ(Torpedo)」は、一般的に「シビレエイ(electric rays)」、「シビレエイ(torpedo rays)」、または「シビレエイ(torpedo)」とも呼ばれる、エイの属を指す。AChRは、例えばゴマフシビレエイにおいて、幅広く研究されている。シビレエイの他の種は、トルペド・アデネンシス(Torpedo adenensis)、トルペド・アレキサンドリンシス(

50

Torpedo alexandrinensis)、トルペド・アンダーソニ(Torpedo andersoni)、トルペド・パウコタエ(Torpedo bauchotae)、トルペド・フスコマキュラタ(Torpedo fuscomaculata)、トルペド・マッケイアナ(Torpedo mackayana)、トルペド・マルモラータ(Torpedo marmorata)、トルペド・ミクロディスカス(Torpedo microdiscus)、トルペド・パンセラ(Torpedo panthera)、トルペド・セミペラギカ(Torpedo semipelagica)、トルペド・シナスペルシシ(Torpedo sinuspersici)、トルペド・スージィ(Torpedo suessii)、およびトルペド・トルペド(Torpedo torpedo)を含むが、これらに限定されない。

【0040】

用語「アセチルコリン受容体(AChR)」は、神経伝達物質アセチルコリンの結合に応答する膜内在性タンパク質を指す。AChRは、ムスカリン性AChRとニコチン性AChRの二群に大別される。ムスカリン性AChRは、セカンドメッセンジャーシグナル伝達を介してイオンチャネルを活性化し、Gタンパク質結合受容体である。ムスカリン性AChRは、副交感神経系の節後線維から放出されるアセチルコリンによって刺激される、主要エンド-受容体(main end-receptor)として機能する。ムスカリン性AChRはまた、節後神経の回復においても機能し(過分極および緩徐脱分極、ニコチン性AChRによって容易になる速い脱分極とは対照的)、そして、神経支配組織に見いだされ(例えば、ムスカリン性AChRは、汗腺に見いだされる)、中枢神経系全体にわたってシナプス前とシナプス後の両位置に分布している。ムスカリン性AChRは、5つのタイプ(M₁、M₂、M₃、M₄、およびM₅)を含むが、特定の状況に応じて他の分類体系が使用される。

【0041】

ニコチン性AChRは、アセチルコリンへの応答に加えてニコチンを含む薬物にも応答するリガンド開口型イオンチャネルである、Cys-ループタンパク質である。ニコチン性AChRは、末梢神経系において少なくとも2つの重要な役割を果たす。第一の役割は、ニコチン性AChRが、交感神経系および副交感神経系のシナプス前細胞からシナプス後細胞へ信号を伝えることである。第二の重大な末梢神経系の役割は、ニコチン性AChRが、骨格筋に見いだされ、筋収縮に必要な信号を受け取ることであり、このことによって、ナトリウム、カリウム、およびカルシウムが、所与のチャネルにおけるサブユニットの特定の組み合わせに応じて、開口チャネルを通過できるようになる。典型的には、チャネル開口時に、ナトリウムが細胞内に流入し、そして、カリウムが細胞から流出し、これらの陽イオンの正味の内向きフラックスを生じる。カルシウムのニコチン性AChR通過は、他の神経伝達物質の放出、およびセカンドメッセンジャーシグナル伝達を介した他のプロセス(例えば、遺伝子調節プロセス)の活性化に導き得る。

【0042】

ニコチン性AChRは、約290 kDaの分子質量を有し、中央孔の周囲に対称的に配列された5つのサブユニットを含む(例えば、図12Aに図示されるシビレエイの例を参照のこと)。脊椎動物では、ニコチン性AChRは、筋肉型受容体または神経型受容体のいずれかとして分類される。神経型受容体は、12の異なるサブユニット: $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 9$ 、 $\alpha 10$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、および $\beta 4$ の様々なホモマーおよびヘテロマーの組み合わせを含むことができる。神経筋接合部に見いだされる筋肉型受容体について、その受容体の胚型は、2:1:1:1比で存在する α 、 β 、 γ 、および δ サブユニットを含み、成体型は、2:1:1:1比で存在する $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 δ 、および ϵ サブユニットを含む。

【0043】

用語「主要免疫原性領域(MIR)」は、ニコチン性AChRを標的とする抗体の結合部位として一般的に役立つ、ニコチン性AChR α サブユニットの細胞外ドメインの領域を指す。MIRは、典型的には、タンパク質フォールディング後に物理的に近接して配列される α サブユニットの3つの不連続セグメントを含む。一非限定例として、MIRは、ニコチン性AChR α サブユニットのアミノ酸1~12、65~79、および110~115を含むことができる。

【0044】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、本明細書において互

10

20

30

40

50

換的に使用され、アミノ酸残基の1つのポリマー、またはアミノ酸残基の複数のポリマーの集合体を指す。この用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマーおよび天然に存在しないアミノ酸ポリマーだけでなく、1つまたは複数のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工的な化学模倣体であるアミノ酸ポリマーに適用される。

【0045】

用語「アミノ酸」は、天然に存在する α -アミノ酸およびそれらの立体異性体、ならびに非天然(天然に存在しない)アミノ酸およびそれらの立体異性体を含む。アミノ酸の「立体異性体」は、L-アミノ酸またはD-アミノ酸などのアミノ酸の鏡像異性体を指す。例えば、天然に存在するアミノ酸の立体異性体は、天然に存在するアミノ酸の鏡像異性体、すなわち、D-アミノ酸を指す。

【0046】

天然に存在するアミノ酸は、遺伝子コードによってコードされているもの、ならびにその後修飾されるアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタミン酸およびO-ホスホセリンである。天然に存在する α -アミノ酸は、非限定的に、アラニン(Ala)、システイン(Cys)、アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)、フェニルアラニン(Pha)、グリシン(Gly)、ヒスチジン(His)、イソロイシン(Ile)、アルギニン(Arg)、リシン(Lys)、ロイシン(Leu)、メチオニン(Met)、アスパラギン(Asn)、プロリン(Pro)、グルタミン(Gln)、セリン(Ser)、トレオニン(Thr)、バリン(Val)、トリプトファン(Trp)、チロシン(Tyr)、およびそれらの組み合わせを含む。天然に存在する α -アミノ酸の立体異性体は、非限定的に、D-アラニン(D-Ala)、D-システイン(D-Cys)、D-アスパラギン酸(D-Asp)、D-グルタミン酸(D-Glu)、D-フェニルアラニン(D-Phe)、D-ヒスチジン(D-His)、D-イソロイシン(D-Ile)、D-アルギニン(D-Arg)、D-リシン(D-Lys)、D-ロイシン(D-Leu)、D-メチオニン(D-Met)、D-アスパラギン(D-Asn)、D-プロリン(D-Pro)、D-グルタミン(D-Gln)、D-セリン(D-Ser)、D-トレオニン(D-Thr)、D-バリン(D-Val)、D-トリプトファン(D-Trp)、D-チロシン(D-Tyr)、およびそれらの組み合わせを含む。

【0047】

非天然(天然に存在しない)アミノ酸は、非限定的に、天然に存在するアミノ酸と同様に機能する、L-立体配置またはD-立体配置のいずれかのアミノ酸類似体、アミノ酸模倣体、合成アミノ酸、N-置換グリシン、およびN-メチルアミノ酸を含む。例えば、「アミノ酸類似体」は、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基に結合している α 炭素を有するが修飾されたR(すなわち、側鎖)基または修飾されたペプチド骨格を有する、非天然アミノ酸、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムである。「アミノ酸模倣体」は、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが天然に存在するアミノ酸と同様に機能する化合物を指す。

【0048】

アミノ酸は、本明細書において、IUPAC-IUB生化学命名法委員会(Biochemical Nomenclature Commission)によって承認されているそれらの一般的に公知の3文字表記によって言及しても、1文字表記によって言及してもよい。例えば、L-アミノ酸は、本明細書において、その一般的に公知の3文字表記(例えば、L-アルギニンについてArg)によって表示しても、大文字の1文字アミノ酸表記(例えば、L-アルギニンについてR)によって表示してもよい。D-アミノ酸は、本明細書において、その一般的に公知の3文字表記(例えば、D-アルギニンについてD-Arg)によって表示しても、小文字の1文字アミノ酸表記(例えば、D-アルギニンについてr)によって表示してもよい。

【0049】

アミノ酸配列に関して、当業者は、コードされた配列中の単一アミノ酸またはごく一部のアミノ酸を変更、付加、または欠失させる、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列に対する個々の置換、付加、または欠失が、この変更が化学的に類似したアミノ酸でのアミノ酸の置換をもたらす場合に、「保存的に修飾されたバリエーション」であることを認識するであろう。化学的に類似したアミノ酸は、非限定的に、L-アミノ酸などの天然に

10

20

30

40

50

存在するアミノ酸、D-アミノ酸などの天然に存在するアミノ酸の立体異性体、ならびに、アミノ酸類似体、アミノ酸模倣体、合成アミノ酸、N-置換グリシン、およびN-メチルアミノ酸などの非天然アミノ酸を含む。

【0050】

機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的置換表は、当技術分野において周知である。例えば、置換は、脂肪族アミノ酸(例えば、G、A、I、L、またはV)がその群の別のメンバーで置換されるようになされてよい。同様に、C、S、T、M、N、またはQなどの脂肪族の極性非電荷基が、その群の別のメンバーで置換されてよく;そして、塩基性残基、例えば、K、R、またはHは、互いに置換されてよい。いくつかの態様において、酸性側鎖を有するアミノ酸、例えば、EまたはDが、それぞれ、その非電荷のカウンターパート、例えば、QまたはNで置換されてよく;逆もまた同様である。以下の8つの群の各々は、互いに保存的置換である他の例示的なアミノ酸を含有する:

- (1) アラニン(A)、グリシン(G);
 - (2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E);
 - (3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q);
 - (4) アルギニン(R)、リシン(K);
 - (5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V);
 - (6) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W);
 - (7) セリン(S)、トレオニン(T);および
 - (8) システイン(C)、メチオニン(M)
- (例えば、Creighton, Proteins, 1993を参照のこと)。

【0051】

用語「アミノ酸修飾」は、1つまたは複数のアミノ酸の置換、欠失、または挿入を指す。

【0052】

用語「核酸」、「ヌクレオチド」または「ポリヌクレオチド」は、デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)およびそれらの一本鎖、二本鎖または多本鎖のいずれかの形態のポリマーを指す。この用語は、一本鎖、二本鎖もしくは多本鎖のDNAもしくはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、または、プリン塩基および/もしくはピリミジン塩基、または他の天然の、化学的に修飾された、生化学的に修飾された、非天然の、合成もしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むポリマーを含むが、これらに限定されない。特に限定のない限り、この用語は、参照核酸と類似した結合特性を有し、かつ、天然に存在するヌクレオチドと同様に代謝される天然のヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸を包含する。他に指示のない限り、特定の核酸配列はまた、明示的に示されている配列だけでなく、保存的に修飾されたそのバリエーション(例えば、縮重コドン置換)、オルソログ、および相補的配列も暗黙のうちに包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された(または全ての)コドンの第三の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することによって達成してもよい(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991), Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985)、および Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。核酸という用語は、遺伝子、遺伝子によってコードされるcDNA、およびmRNAと互換的に使用される。

【0053】

用語「ペプチドをコードするヌクレオチド配列」または「遺伝子」は、ペプチド鎖の産生に参与するDNAのセグメントを意味し、それは、遺伝子産物の転写/翻訳および転写/翻訳の調節に参与するコード領域の前後の領域(リーダーおよびトレーラー)、ならびに個々のコードセグメント(エキソン)の間の介在配列(イントロン)を含む。

【0054】

用語「中和複合体」は、抗体がその抗原(例えば、AChRのMIR)に結合することから防止/阻害/ブロックする、ペプチドに結合した抗体を含む複合体を指す。

【0055】

用語「親和性血漿フェレーシス」は、対象の血漿からの有害な作用物質(例えば、病因物質)の除去のための体外血液浄化手順を指す。

【0056】

「配列同一性のパーセンテージ」は、比較ウィンドウにわたって2つの最適に整列された配列を比較することによって決定され、ここで、比較ウィンドウにおける配列の部分(例えば、本発明のペプチド)は、この2つの配列の最適アライメントについて、付加または欠失を含まない参照配列と比較した場合に、付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含み得る。パーセンテージは、同一のアミノ酸残基が両方の配列に生じる位置の数を決定してマッチした位置の数を得て、マッチした位置の数を比較ウィンドウにおける位置の総数で割り、その結果に100を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。

10

【0057】

用語「同一性パーセント」または「配列同一性パーセント」は、2つまたはそれ以上のポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列を説明する文脈において、同じであるかまたは同じである特定のパーセンテージのアミノ酸残基またはヌクレオチド(例えば、関心対象のペプチドのバリエーション)を有する2つまたはそれ以上の配列または部分配列を指す。以下の配列比較アルゴリズムのうちの1つを使用してまたは手動アライメントおよび目視検査によって測定する際に、比較ウィンドウまたは指定された領域にわたって最大の一致になるように比較および整列したとき、ペプチドまたはポリヌクレオチドが、参照配列に対して、少なくとも約80%の配列同一性、好ましくは少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するとき、そのような配列は、「実質的に同一」と言われる。ポリヌクレオチド配列に関して、この定義はまた、試験配列の相補体も指す。好ましくは、少なくとも約6、7、もしくは8アミノ酸長である領域にわたって、またはより好ましくは、少なくとも6~25もしくは少なくとも6~12アミノ酸長である領域にわたって、同一性が存在する。

20

【0058】

配列比較のために、典型的には、1つの配列が参照配列として働き、それに対して試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用したとき、試験配列および参照配列をコンピューターに入力し、必要であれば、サブ配列座標を指定し、そして、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトプログラムパラメーターを使用することができ、または、別のパラメーターを指定することができる。その後、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメーターに基づき、参照配列に対する試験配列の配列同一性パーセントを計算する。核酸およびタンパク質の配列比較のために、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズム、ならびに以下に考察されるデフォルトパラメーターが使用される。

30

【0059】

比較のための配列のアライメントの方法は、当技術分野において周知である。比較のための配列の最適なアライメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同性アライメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)の類似法のための探索によって、これらのアルゴリズムのコンピューター化実装(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIのGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)によって、または手動アライメントおよび目視検査によって遂行することができる(例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)を参照のこと)。

40

【0060】

配列同一性パーセントを決定するためおよび配列類似性を判定するために好適なアルゴリズムの追加の例は、Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410およびAltschul et al. (1977) Nucleic Acid Res. 25: 3389-3402にそれぞれ記載されている、BLAS

50

TアルゴリズムおよびBLAST 2.0アルゴリズムである。BLAST解析を実行するためのソフトウェアは、国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information)のウェブサイトncbi.nlm.nih.govから公的に入手可能である。このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さのワードと整列させたときに、ある程度の正の値の閾値スコアTとマッチするかまたはそれを満たすクエリ配列中の長さWの短いワードを同定することによって、高スコア化配列ペア(HSP)を最初に同定することを含む。Tは、隣接ワードスコア閾値と称される(Altschul et al., 上記を参照)。これらの開始隣接ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見いだす検索を開始するためのシードとして働く。次いで、ワードヒットは、累積アライメントスコアが増加できる限り、各配列に沿って両方向に延長される。累積スコアは、ヌクレオチド配列については、パラメーターM(一对のマッチ残基についてのリワード(reward)スコア; 常に>0)およびN(ミスマッチ残基についてのペナルティスコア; 常に<0)を使用して計算される。アミノ酸配列については、累積スコアを計算するためにスコア化マトリックスが使用される。ワードヒットの各方向への延長は、累積アライメントスコアがその最大達成値から量Xだけ外れたとき; 累積スコアが1つまたは複数の負のスコア化残基アライメントの蓄積によってゼロもしくはそれ未満になったとき; または、いずれかの配列が終わりに達したときに、停止される。BLASTアルゴリズムパラメーターW、T、およびXは、アライメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列用)は、デフォルトとして、ワードサイズ(W)28、期待値(E)10、M=1、N=-2および両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列については、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、ワードサイズ(W)3、期待値(E)10、およびBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用する(例えば、Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)を参照のこと)。

【0061】

BLASTアルゴリズムはまた、2つの配列間の類似性の統計分析も実施する(例えば、Karlin and Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 90:5873-5787 (1993)を参照のこと)。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの尺度は、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間のマッチが偶然起こる確率の指標を提供する、最小合計確率(P(N))である。例えば、試験核酸を参照核酸と比較した際の最小合計確率が約0.2未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合、核酸は、参照配列と類似していると見なされる。

【0062】

2つの核酸配列またはペプチドが実質的に同一であることの指標は、第一の核酸によってコードされるペプチドが第二の核酸によってコードされるペプチドに対する抗体と免疫学的に交差反応性であることである。したがって、ペプチドは、典型的には、例えば、2つのペプチドが保存的置換だけ異なる場合に、第二のペプチドと実質的に同一である。2つの核酸配列が実質的に同一であることの別の指標は、以下に記載の通り、2つの分子またはそれらの相補体がストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズすることである。2つの核酸配列が実質的に同一であることのさらに別の指標は、同じプライマーを使用して配列を増幅させることができることである。

【0063】

III. 態様の詳細な説明

A. 単離されたペプチド

一局面において、本発明は、アミノ酸配列

SEHETRLVAX₁LFZ₁LKWNPX₂DYGGX₃KKIHZ₂LX₄YTGH (SEQ ID NO:31)

を含む単離されたペプチドを提供する。いくつかの態様において、ペプチドは、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対する、X₁、X₂、X₃、およびX₄からなる群より選択される2つまたはそれ以上の位置におけるアミノ酸修飾をさらに含み、ここで、X₁、X₂、X₃、およびX₄は、独立して選択されたアミノ酸であり、かつ、Z₁およびZ₂は、独立して選択されたアミノ酸を含む個別の長さのリンカー配列である。例えば、アミノ酸修飾は、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に関して、X₁およびX₂、X₁およびX₃、X₁およびX₄、X₂およびX₃

、 X_2 および X_4 、 X_3 および X_4 、 X_1 、 X_2 、および X_3 、 X_1 、 X_2 、および X_4 、 X_1 、 X_3 、および X_4 、 X_2 、 X_3 、および X_4 、または X_1 、 X_2 、 X_3 、および X_4 において行うことができる。

【0064】

リンカー Z_1 および Z_2 は、独立して選択されたアミノ酸を含む。アミノ酸は、任意のアミノ酸であることができる。好ましい態様において、 Z_1 および Z_2 は、アミノ酸GおよびSを含む。いくつかの場合には、 Z_1 は、アミノ酸配列GGGSを含む。他の場合には、 Z_2 は、アミノ酸配列GSを含む。いくつかの場合には、 Z_1 および Z_2 は、同じ長さのものである。他の場合には、 Z_1 および Z_2 は、異なる長さのものである。各リンカーの長さは、任意の長さであることができる。いくつかの態様において、リンカーは、約1~10(すなわち、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10)アミノ酸長である。他の態様において、リンカーは、約10~30(すなわち、約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30)アミノ酸長である。なお他の態様において、リンカーは、約30~100(すなわち、約30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、または100)アミノ酸長である。

10

【0065】

いくつかの態様において、ペプチドは、SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列に対する、K10、D22、V27、およびQ35からなる群より選択される2つまたはそれ以上の位置におけるアミノ酸修飾を含み、ここで、K10、D22、V27、およびQ35は、該ペプチド内の位置を表す。

【0066】

いくつかの態様において、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸修飾が X_1 および X_2 に存在する。いくつかの場合には、 X_1 はNであり、 X_2 はAであり、 Z_1 の長さは4個であり、かつ、 Z_2 の長さは2個である(SEQ ID NO:2)。他の態様において、SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸修飾が位置K10およびD22に存在し、ここで、K10およびD22は、このペプチド内の位置を表す。いくつかの場合には、ペプチドは、SEQ ID NO:23に示されるアミノ酸配列を含む。

20

【0067】

いくつかの態様において、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸修飾が X_1 および X_3 に存在する。いくつかの場合には、 X_1 はNであり、 X_3 はIであり、 Z_1 の長さは4個であり、かつ、 Z_2 の長さは2個である(SEQ ID NO:3)。他の態様において、SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸修飾が位置K10およびV27に存在し、ここで、K10およびV27は、このペプチド内の位置を表す。いくつかの場合には、ペプチドは、SEQ ID NO:24に示されるアミノ酸配列を含む。

30

【0068】

いくつかの態様において、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸修飾が X_1 および X_4 に存在する。いくつかの場合には、 X_1 はNであり、 X_4 はDであり、 Z_1 の長さは4個であり、かつ、 Z_2 の長さは2個である(SEQ ID NO:4)。他の態様において、SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸修飾が位置K10およびQ35に存在し、ここで、K10およびQ35は、このペプチド内の位置を表す。いくつかの場合には、ペプチドは、SEQ ID NO:25に示されるアミノ酸配列を含む。

40

【0069】

いくつかの態様において、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸修飾が X_3 および X_4 に存在する。他の態様において、SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸修飾が位置V27およびQ35に存在し、ここで、V27およびQ35は、このペプチド内の位置を表す。いくつかの場合には、ペプチドのアミノ酸配列は、SEQ ID NO:5ではない。

【0070】

いくつかの態様において、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸修飾が X_1 、 X_3 、および X_4 に存在する。いくつかの場合には、 X_1 はNであり、 X_3 はIであり、 X_4 はDであり、 Z_1 の長さは4個であり、かつ、 Z_2 の長さは2個である(SEQ ID NO:6)。他の態様に

50

において、SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸修飾が位置K10、V27、およびQ35に存在し、ここで、K10、V27、およびQ35は、このペプチド内の位置を表す。いくつかの場合には、ペプチドは、SEQ ID NO:26に示されるアミノ酸配列を含む。

【0071】

いくつかの態様において、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸修飾が X_1 、 X_2 、 X_3 、および X_4 に存在する。いくつかの場合には、 X_1 はNであり、 X_2 はAであり、 X_3 はIであり、 X_4 はDであり、 Z_1 の長さは4個であり、かつ、 Z_2 の長さは2個である (SEQ ID NO:7)。他の態様において、SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸修飾が位置K10、D22、V27、およびQ35に存在し、ここで、K10、D22、V27、およびQ35は、このペプチド内の位置を表す。いくつかの場合には、ペプチドは、SEQ ID NO:27に示されるアミノ酸配列を含む。特定の場合には、ペプチドは、SEQ ID NO:29に示されるアミノ酸配列からなることはない。

10

【0072】

いくつかの態様において、ペプチドは、SEQ ID NO:1、2、3、4、6、および7に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに対して、少なくとも約80%の配列同一性 (例えば、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性) を有する。いくつかの態様において、ペプチドは、SEQ ID NO:1、2、3、4、6、および7に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに対して、少なくとも約90%の配列同一性 (例えば、少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性) を有する。いくつかの態様において、ペプチドは、SEQ ID NO:1、2、3、4、6、および7に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに対して、少なくとも約95%の配列同一性 (例えば、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性) を有する。特定の態様において、リンカー配列 (例えば、 Z_1 および/または Z_2 リンカー配列) は、配列同一性パーセントを決定するときに考慮されない。

20

【0073】

いくつかの態様において、ペプチドは、SEQ ID NO:1、2、3、4、6、および7に示されるアミノ酸配列のいずれか1つを含むかまたはそれからなるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ペプチド (例えば、単離されたペプチド) は、SEQ ID NO:1、2、3、4、6、および7に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに対して、100%の配列同一性を有する。いくつかの態様において、ペプチド (例えば、単離されたペプチド) は、SEQ ID NO:1、2、3、4、6、および7に示されるアミノ酸配列のいずれか1つからなるアミノ酸配列を含む。特定の態様において、リンカー配列 (例えば、 Z_1 および/または Z_2 リンカー配列) は、配列同一性パーセントを決定するときに考慮されない。

30

【0074】

いくつかの態様において、ペプチドは、SEQ ID NO:23、24、25、26、27、および30に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに対して、少なくとも約80%の配列同一性 (例えば、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性) を有する。いくつかの態様において、ペプチドは、SEQ ID NO:23、24、25、26、27、および30に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに対して、少なくとも約90%の配列同一性 (例えば、少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性) を有する。いくつかの態様において、ペプチドは、SEQ ID NO:23、24、25、26、27、および30に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに対して、少なくとも約95%の配列同一性 (例えば、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性) を有する。特定の態様において、リンカー配列 (例えば、 Z_1 リンカー配列、例えばGGGSおよび/または Z_2 リンカー配列、例えばGS) は、配列同一性パーセントを決定するときに考慮されない。

40

【0075】

いくつかの態様において、ペプチドは、SEQ ID NO:23、24、25、26、27、および30に示されるアミノ酸配列のいずれか1つを含むかまたはそれからなるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ペプチド (例えば、単離されたペプチド) は、SEQ ID NO:23、24、

50

25、26、27、および30に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに対して、100%の配列同一性を有する。いくつかの態様において、ペプチド(例えば、単離されたペプチド)は、SEQ ID NO:23、24、25、26、27、および30に示されるアミノ酸配列のいずれか1つからなるアミノ酸配列を含む。特定の態様において、リンカー配列(例えば、Z₁リンカー配列、例えばGGGSおよび/またはZ₂リンカー配列、例えばGS)は、配列同一性パーセントを決定するときに考慮されない。

【0076】

いくつかの態様において、ペプチドは、SEQ ID NO:1、2、3、4、6、7、23、24、25、26、27、および30に示されるアミノ酸配列のいずれか1つの少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個の連続アミノ酸を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、SEQ ID NO:1、2、3、4、6、7、23、24、25、26、27、および30のいずれか1つに示される通りの少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個の連続アミノ酸を含むかまたはそれからなるアミノ酸配列を含む。

【0077】

いくつかの態様において、ペプチドは、約6~約50(例えば、約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50)アミノ酸長である。いくつかの態様において、ペプチドは、約30~約40(例えば、約30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40)アミノ酸長である。特定の態様において、ペプチドは、約39アミノ酸長である。いくつかの態様において、ペプチドは、少なくとも約50アミノ酸長(例えば、少なくとも約50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100アミノ酸長、またはそれ以上)である。

【0078】

いくつかの態様において、ペプチドは、アセチルコリン受容体(AChR)の主要免疫原性領域(MIR)に結合する抗体に結合する。いくつかの場合には、AChRは、ニコチン性AChRである。なお他の態様において、ペプチドは、インテイン-キチン結合ドメインタグをさらに含む。いくつかの態様において、ペプチドは、ポリヒスチジンタグをさらに含む。いくつかの場合には、ポリヒスチジンタグは、ヘキサヒスチジンタグである。

【0079】

いくつかの態様において、ペプチドは、ペプチドにコンジュゲートされている1つまたは複数の抗体または抗体断片をさらに含む。抗体またはその断片は、1つまたは複数の軽鎖、重鎖、その断片、またはそれらの組み合わせを含むことができる。重鎖ドメインまたは領域の任意の断片または組み合わせを、可変ドメイン(V_H)、ヒンジ領域、および定常(C_H1、C_H2、およびC_H3)ドメインを含むペプチドにコンジュゲートさせることができる。特定の場合には、抗体断片のヒンジ領域が、ペプチドのC末端にコンジュゲートされる。他の場合には、抗体断片は、重鎖のヒンジ領域、C_H2ドメイン、およびC_H3ドメインを含む。特定の場合には、抗体断片は、ヒトIgG重鎖のヒンジ領域ならびにC_H2およびC_H3ドメインを含む。いくつかの場合には、抗体または抗体断片は、1つまたは複数のFcドメイン、1つまたは複数のFabドメイン、またはそれらの組み合わせを含む。

【0080】

あらゆる動物由来の抗体またはその断片を、本発明のペプチドにコンジュゲートさせることができる(例えば、ウサギ、ヤギ、トリ、マウス、ラット、爬虫類、サメ、霊長類、ヒト)。好ましい態様において、1つまたは複数の抗体またはその断片は、ヒトである。いくつかの場合には、抗体またはその断片は、ヒトIgA、IgD、IgE、IgG、IgM、またはそれらの組み合わせ由来である。特定の場合には、抗体またはその断片は、ヒトIgG由来である。

【0081】

B. 単離された核酸

別の局面において、本発明は、本明細書に記載の単離されたペプチドをコードする単離された核酸を提供する。いくつかの態様において、核酸は、SEQ ID NO:1、2、3、4、6、7

、23、24、25、26、27、および30に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに対して、少なくとも約80%の配列同一性(例えば、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性)を有するペプチドをコードする。いくつかの態様において、核酸は、SEQ ID NO:1、2、3、4、6、7、23、24、25、26、27、および30に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに対して、少なくとも約90%の配列同一性(例えば、少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性)を有するペプチドをコードする。いくつかの態様において、核酸は、SEQ ID NO:23、24、25、26、27、および30に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに対して、少なくとも約95%の配列同一性(例えば、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性)を有するペプチドをコードする。特定の態様において、リンカー配列(例えば、Z₁リンカー配列、例えばGGGSおよび/またはZ₂リンカー配列、例えばGS)は、配列同一性パーセントを決定するときに考慮されない。いくつかの場合には、核酸によってコードされるペプチドのアミノ酸配列は、SEQ ID NO:5ではない。他の場合には、核酸によってコードされるペプチドのアミノ酸配列は、SEQ ID NO:29ではない。

10

【0082】

いくつかの態様において、核酸は、SEQ ID NO:1、2、3、4、6、7、23、24、25、26、27、および30に示されるアミノ酸配列のいずれか1つの少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個の連続アミノ酸を含むペプチドをコードする。いくつかの態様において、核酸は、SEQ ID NO:1、2、3、4、6、7、23、24、25、26、27、および30のいずれか1つに示される通りの少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個の連続アミノ酸を含むかまたはそれからなるアミノ酸配列を含むペプチドをコードする。

20

【0083】

本発明はまた、本明細書に提供される単離された核酸を含むベクター、本明細書に提供されるベクターを含む宿主細胞、および本明細書に提供される核酸によってコードされるペプチドも提供する。ベクターは、好適な宿主細胞中での発現を達成するための好適な転写および/または翻訳調節エレメント(例えば、発現を制御する配列)に機能的に連結されたペプチドコード核酸を含むことができる。調節エレメントは、哺乳動物、微生物、ウイルスまたは昆虫遺伝子に由来してよく、例えば、プロモーター、エンハンサー、転写および翻訳開始配列、終結配列、複製起点、ならびにリーダーをコードする配列および輸送配列を含む。所望の宿主細胞中での最適な発現のために好適な調節エレメントが選択される。有用な発現ベクターは、当業者に公知の方法によって構築することができ、また市販されている。例示的な組換えウイルスベクターは、レトロウイルス、パルボウイルス、デンスウイルスおよびバキュロウイルスベクターを含む。

30

【0084】

前記ベクターは、本明細書に提供される核酸に機能的に連結された強力な構成的または誘導性プロモーターを含むことができる。好適なプロモーターは、当業者に周知でかつ容易に入手可能であり、例えば、細菌、酵母、ウイルス、哺乳動物、および昆虫プロモーターを含む。例示的な発現ベクターは、哺乳動物細胞と適合可能なベクターである。

【0085】

前記宿主細胞は、本明細書に提供される通りのベクターまたは単離された核酸を含むことができる。宿主細胞は、細菌、酵母、昆虫または哺乳動物細胞を含む原核生物または真核生物であり得る。場合によっては、宿主細胞は、植物細胞であることができる。いくつかの態様において、宿主細胞は、植物、昆虫または哺乳動物細胞である。単離された核酸またはベクター、例えば、発現ベクターは、形質転換、トランスフェクションおよび感染を含む当業者に公知の方法によって宿主細胞に導入してよい。例えば、トランスフェクションは、リポソーム媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム媒介性トランスフェクション、裸のDNAトランスフェクション、マイクロインジェクションまたはエレクトロポレーションなどの任意の公知の方法によって達成してよい。原核生物細胞に好適な形質転換法は、例えば、Cohen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69:2110 (1972)に記

40

50

載されている。真核生物宿主細胞の形質転換は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000)に記載されている。単離された核酸またはベクターを含有する宿主細胞は、ベクターを複製するおよび関心対象のペプチドをコードする核酸を発現させるために、または単離された核酸を複製および発現させるために有用である。

【0086】

C. 組成物

別の局面において、本発明は、本発明のペプチドまたは複数の該ペプチドを含む組成物を提供する。いくつかの態様において、組成物は、本明細書に記載の単離されたペプチドのいずれか1つを含む。他の態様において、組成物は、本明細書に提供されるペプチドのいずれかの2つまたはそれ以上を含む。例えば、組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の異なるペプチドを含んでよい。非限定例として、組成物は、SEQ ID NO:2、3、4、6、7、23、24、25、26、27に示されるアミノ酸配列を含むペプチド、またはそれらの組み合わせを含んでよい。いくつかの態様において、組成物は、本発明のペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含む。

10

【0087】

他の態様において、本発明の組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。薬学的組成物の製剤化は、一般に、当技術分野において公知である(例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)を参照のこと)。微生物汚染に対する予防は、様々な抗菌剤および抗真菌剤の1つまたは複数の添加を通して達成することができる。

20

【0088】

投与に好適な薬学的形態は、滅菌水溶液または分散液および滅菌注射液または分散液の即時調製用の滅菌粉末を含む。典型的な担体は、例えば、水緩衝水溶液(すなわち、生体適合緩衝液)、エタノール、ポリオール、例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、それらの好適な混合物、界面活性剤、および植物油を含有する溶媒または分散媒体を含む。

【0089】

滅菌は、濾過、または抗菌剤もしくは抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸もしくはチメロサールの添加を非限定的に含む、当技術分野で認識されている技術によって達成することができる。さらに、糖または塩化ナトリウムなどの等張剤を対象の組成物に組み入れてよい。

30

【0090】

本発明のペプチドおよび/または組成物を含有する滅菌注射液の生産は、化合物を必要量、適切な溶媒中に、必要に応じて上に挙げた様々な成分と共に組み入れ、続いて、滅菌(例えば、濾過滅菌)することによって達成される。滅菌粉末を得るために、上の滅菌溶液は、必要に応じて、真空乾燥または凍結乾燥される。

【0091】

いくつかの態様において、本明細書に提供されるペプチドおよび/または組成物は、投与、例えば、経口、鼻、局所、または非経口投与用に、投与の容易さおよび投与量の均一性のため単位剤形で製剤化される。単位剤形は、本明細書において使用される場合、対象、例えば、治療すべきヒトまたは他の哺乳動物にとって単一投与量として適する物理的に不連続な単位を指し、各単位は、必要な薬学的担体と組み合わせて所望の治療効果を生み出すように計算された所定量の活性材料を含有する。いくつかの場合には、より濃縮された剤形を調製してよく、それからより希薄な単位剤形が生産されてよい。より濃縮された剤形は、したがって、実質的により多い、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍、またはそれ以上のペプチドおよび/または組成物の量を含有すると考えられる。

40

【0092】

そのような剤形を調製するための方法は、当業者に公知である(例えば、上記のREMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCESを参照のこと)。剤形は、典型的には、従来の薬学的担体

50

または賦形剤を含み、他の薬剤、担体、佐剤、希釈剤、組織浸透増強剤、可溶化剤などを追加で含んでよい。適切な賦形剤を、当技術分野において周知の方法によって、特定の剤形および投与経路に適合させることができる(例えば、上記のREMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCESを参照のこと)。

【0093】

好適な賦形剤の例は、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アカシアゴム、リン酸カルシウム、アルギン酸塩、トラガカント、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、食塩水、シロップ、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、およびCarbopolなどのポリアクリル酸、例えば、Carbopol 941、Carbopol 980、Carbopol 981などを含むが、これらに限定されない。剤形は、タルク、ステアリン酸マグネシウム、および鉱油などの平滑剤;湿潤剤;乳化剤;懸濁化剤;安息香酸メチル-、エチル-、およびプロピル-ヒドロキシ(すなわち、パラベン)などの保存剤;無機および有機の酸および塩基などのpH調整剤;甘味料;および香味料を追加で含むことができる。剤形はまた、生分解性ポリマービーズ、デキストラン、およびシクロデキストリン包接複合体を含んでもよい。

【0094】

いくつかの態様において、投与のための組成物は、カプセル剤、カシェ剤または錠剤などの経口送達ビヒクルであってよく、その各々は、患者に正確な増分用量を提供するために所定量のペプチドを含有する。経口送達ビヒクルは、例えば、ペプチドと口腔および上部胃腸管との接触を回避するのに有用であり得る。経口投与のために、治療有効用量は、錠剤、カプセル剤、乳剤、懸濁剤、液剤、シロップ剤、スプレー剤、トローチ剤、粉剤、および持続放出製剤の形態であることができる。経口投与のための好適な賦形剤は、薬学的等級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、滑石、セルロース、グルコース、ゼラチン、スクロース、炭酸マグネシウムなどを含む。

【0095】

いくつかの態様において、治療有効用量は、丸剤、錠剤、またはカプセル剤の形態を取り、したがって、剤形は、本明細書に記載のペプチドおよび/または組成物と一緒に、以下のいずれかを含有することができる:ラクトース、スクロース、リン酸二カルシウムなどの希釈剤;デンプンまたはその誘導体などの崩壊剤;ステアリン酸マグネシウムなどの平滑剤;ならびにデンプン、アカシアゴム、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、セルロースおよびその誘導体などの結合剤。

【0096】

いくつかの態様において、好適な担体は、組成物、例えばペプチドを口腔および上部胃腸管(GI)からマスクし、投与の間のこれらの領域における局所的な掻痒/膨化反応を低減または防止する。例えば、担体は、1つまたは複数の脂質、多糖またはタンパク質構成成分を含有してよい。場合によっては、担体は、食用産物である。

【0097】

局所投与のために、治療有効用量は、乳剤、ローション剤、ゲル剤、フォーム剤、クリーム剤、ゼリー剤、液剤、懸濁剤、軟膏、および経皮パッチの形態であることができる。吸入による投与のために、本明細書に記載のペプチドおよび/または組成物を、乾燥粉末としてまたは液体形態で噴霧器を介して送達することができる。エアロゾル製剤を、ジクロロジフルオロメタンなどの圧縮可能な噴射剤に入れることができる。非経口投与のために、治療有効用量は、滅菌注射液および滅菌包装粉剤の形態であることができる。好ましくは、注射液は、約4.5~約7.5のpHで製剤化される。

【0098】

治療有効用量はまた、凍結乾燥形態で提供することもできる。そのような剤形は、投与の前に再構成するための緩衝剤、例えば重炭酸塩を含んでもよく、その緩衝剤を、例えば水で再構成するために、凍結乾燥剤形に含めてもよい。凍結乾燥剤形は、好適な血管収縮

剤、例えばエピネフリンをさらに含んでよい。凍結乾燥剤形は、注射器中に、再構成された剤形を個体に直ちに投与できるように場合により再構成用の緩衝剤と共に包装されて、提供することができる。

【0099】

いくつかの態様において、治療有効用量は、他の成分、例えば、抗アレルギー薬、例えば抗ヒスタミン剤、ステロイド剤、気管支拡張剤、ロイコトリエン安定剤および肥満細胞安定剤をさらに含んでよい。好適な抗アレルギー薬は、当技術分野において周知である。

【0100】

D. キット

別の局面において、本発明は、本発明のペプチドまたは複数の該ペプチドと固体支持体とを含むキットを提供する。キットは、対象における重症筋無力症を検出するためにまたはその重症度を判定するために有用である。キットはまた、対象における重症筋無力症を予防または治療するためにも有用である。

【0101】

これらの様々な方法を実施するための材料および試薬を、該方法の遂行を容易にするためにキット中に提供することができる。本明細書において使用される場合、用語「キット」は、プロセス、アッセイ法、分析、または操作を容易にする物品の組み合わせを含む。特に、本発明のペプチドまたは組成物を含むキットは、例えば診断、予後予測、治療などを含む広範な用途に使用できる。

【0102】

いくつかの態様において、キットは、SEQ ID NO:2、3、4、6、7、23、24、25、26、27に示されるアミノ酸配列を含むペプチド、およびそれらの組み合わせを含む。他の態様において、キットは、少なくとも1つのペプチド(例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のペプチド)を含む。いくつかの他の態様において、キット中の1つまたは複数のペプチドは、ペプチドまたは複数の該ペプチドにコンジュゲートされている抗体またはその断片をさらに含む。

【0103】

他の態様において、キット中の複数のペプチドは、同じ抗MIR抗体(すなわち、AChRのMIRに結合する抗体)に結合する。特定の態様において、複数のペプチドは、異なる抗MIR抗体に結合する。

【0104】

いくつかの態様において、固体支持体は、マルチウェルプレート、ELISAプレート、マイクロアレイ、チップ、ビーズ、多孔質ストリップ、またはニトロセルロースフィルターである。いくつかの場合には、ビーズは、キチンを含む。他の態様において、ペプチドまたは複数のペプチドを固体支持体上に固定化することができる。固定化は、共有結合または非共有結合による固定化であることができる。いくつかの態様において、固定化は、1つまたは複数のペプチドに特異的に結合する捕捉抗体を介する固定化である。ある特定の場合には、キット中の固体支持体は、1つまたは複数の固定化されたペプチドと共に調製されて提供される。

【0105】

キットは、化学試薬ならびに他の成分を含有することができる。加えて、本発明のキットは、非限定的に、キット使用者に対する説明書、試料回収および/または精製用の装置および試薬、生成物回収および/または精製用の装置および試薬、試料管、ホルダー、トレイ、ラック、ディッシュ、プレート、溶液、緩衝液または他の化学試薬、標準化、正規化に使用すべき好適な試料、および/または対照試料を含むことができる。また、本発明のキットを、簡便な貯蔵および安全な輸送のために、例えば蓋付きの箱に包装することもできる。

【0106】

いくつかの態様において、キットはまた、1つまたは複数のペプチドに結合する抗MIR自己抗体の存在を検出するために使用される標識二次抗体も含む。二次抗体は、免疫グロブ

10

20

30

40

50

リンの異なるクラスまたはアイソタイプIgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEの定常または「C」領域に結合する。通常、IgG定常領域に対する二次抗体、例えば、IgGサブクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4)の1つに対する二次抗体などがキット中に含まれる。二次抗体を、フルオロフォア(例えば、フルオレセイン、フィコエリスリン、量子ドット、ルミネックスビーズ、蛍光ビーズ)、酵素(例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ)、放射性同位体(例えば、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{125}I)、または化学発光部分を含む、任意の直接的または間接的に検出可能な部分で標識することができる。標識シグナルを、ビオチンとビオチン結合部分(例えば、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン)との複合体を使用して増幅させることができる。蛍光標識抗ヒトIgG抗体は、Molecular Probes, Eugene, ORから市販されている。酵素標識抗ヒトIgG抗体は、Sigma-Aldrich, St. Louis, MOおよびChemicon, Temecula, CAから市販されている。

【0107】

前記キットは、固体支持体と対象由来の生体試料とを接触させるための説明書、および、抗体の存在または閾値レベルを超える抗体のレベルを重症筋無力症の存在または重症度と相関付けるための説明書をさらに含んでよい。

【0108】

いくつかの態様において、キットはまた、抗体の検出のための陰性および陽性の対照試料を含有する。いくつかの場合には、陰性対照試料は、重症筋無力症を有していない個体または個体の群から得られる。他の場合には、陽性対照試料は、重症筋無力症を有する個体または個体の群から得られる。いくつかの態様において、キットは、試験生体試料中の定量された抗体レベルの評価を支援する、試料中の抗体の滴定曲線(titrated curve)の作成のための試料を含有する。

【0109】

E. 重症筋無力症を検出するためのまたはその重症度を判定するための方法

他の局面において、本発明は、対象における重症筋無力症(MG)を検出するためのまたはその重症度を判定するための方法を提供し、該方法は、対象由来の生体試料中において、本発明のペプチドまたは複数の該ペプチドに結合する抗体の有無を検出する段階であって、ペプチドまたは複数の該ペプチドに結合する抗体の存在によって、MGの存在またはその重症度の増大が示される、段階を含む。いくつかの態様において、複数のペプチドは、2個またはそれ以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の)異なるペプチドを含む。いくつかの場合には、複数のペプチドは、SEQ ID NO: 2、3、4、6、7、23、24、25、26、27に示されるアミノ酸配列、またはそれらの組み合わせを含む。

【0110】

いくつかの態様において、ペプチドは、AChRのMIRに結合する抗体に結合する。いくつかの場合には、AChRは、ニコチン性AChRである。ある特定の場合には、異なるペプチドの各々が、同じ抗MIR抗体に結合し、例えば、異なるペプチドの全てが、AChRのMIRに結合する同じ抗体に結合する。他の場合には、異なるペプチドの各々が、異なる抗MIR抗体に結合する。

【0111】

特定の態様において、方法は、対象から試料を得る段階をさらに含む。対象から得られる生体試料に関して、抗体を含有する任意の流体試料を使用することができる。非限定例として、生体試料は、全血、血清、血漿、尿、唾液、または脳脊髄液(CSF)であってよい。1つまたは複数の異なる体液を、1つまたは複数のペプチドに特異的に結合する抗体について評価することができる。

【0112】

いくつかの態様において、生体試料中の抗体のレベルまたは力価が、閾値レベルまたは力価と比較される。閾値レベルまたは力価より大きい、生体試料中の抗体のレベルまたは力価によって、対象がMGを有する可能性またはMGの重症度の増大を示す可能性の増大が示される。同様に、閾値レベルまたは力価より小さい、生体試料中の抗体のレベルまたは力価によって、対象がMGを有することまたはMGの重症度の増大を示すことは示されない。

【0113】

生体試料(例えば、対象から得られる流体)中の抗体の存在を、MGの症状の発症前後に判定することができる。抗体の存在を、必要または所望に応じて、1回または1回より多い判定をしてよい。いくつかの態様において、抗体の有無または定量された抗体レベルは、毎週、毎月、年に数回(例えば、年に2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12回、またはそれ以上)、または多かれ少なかれ度々、適宜評価される。

【0114】

いくつかの態様において、抗体の存在は、試験試料(すなわち、対象由来の生体試料)を対照試料と比較することなしに判断される。他の態様において、試験試料を対照と比較する。対照は、異なる時点の同じ個体由来であることができる。いくつかの場合には、対照は、MGの症状を発症する前の対象から得られる。他の場合には、対照は、MGの症状を発症した後および/またはMGに対する治療を受けた後の対象から得られる。

10

【0115】

前記対照はまた、抗体の存在またはMGの症状もしくは診断について公知の状態にある異なる個体由来であることもできる。対照はまた、抗体の存在またはMGの症状もしくは診断について公知の状態にある個体の集団からの計算値であることもできる。対照は、陽性対照であっても陰性対照であってもよい。いくつかの態様において、対照は、別の個体または個体の集団(例えば、MGを有していない個体または個体の集団)由来の陰性対照である。対照試料の公知の状態が抗体について陰性である場合、陰性対照試料よりも高い、試験試料中の抗体レベルによって、対象がMGを有することまたはMGの重症度の増大を示すことが示される。陰性対照試料と比較して類似している、試験試料中の抗体レベルによって、対象がMGを有していないことまたはMGの重症度の増大を示さないことが示される。

20

【0116】

いくつかの態様において、対照は、別の個体もしくは個体の集団由来の陽性対照であるか、または、対照は、所定の閾値レベルの抗体を反映する。対照試料の公知の状態が抗体について陽性である場合、陽性対照試料中と類似したまたは陽性対照試料中より高い、試験試料中の抗体レベルによって、対象がMGを有することまたはMGの重症度の増大を示すことが示される。陽性対照試料と比較して低い、試験試料中の抗体レベルによって、対象がMGを有していないことまたはMGの重症度の増大を示さないことが示される。

【0117】

対照試料または対照値と試験試料との間の相違は、検出されさえすれば十分である。いくつかの態様において、試験試料中の抗体レベルの増大、ひいてはMGの存在またはMGの重症度の増大は、抗体レベルが、陰性または前回測定した対照と比較して、少なくとも例えば、10%、25%、50%、1倍、2倍、3倍、4倍、またはそれ以上のときに判定される。

30

【0118】

抗体は、当技術分野において公知の任意の方法を使用して検出することができる。例示的な方法は、非限定的に、ウェスタンブロット、ドットブロット、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ法(RIA)、免疫沈降、免疫蛍光、FACS解析、電気化学発光、およびマルチプレックスビーズアッセイ法(例えば、ルミネックスまたは蛍光マイクロビーズを使用)を含む。

40

【0119】

いくつかの態様において、抗体を検出するために使用されるペプチドまたは複数の該ペプチドを固体支持体上に固定化することができる。固体支持体は、例えば、マルチウェルプレート、マイクロアレイ、チップ、ビーズ、多孔質ストリップ、またはニトロセルロースフィルターであることができる。いくつかの場合には、ビーズは、キチンを含む。固定化は、共有結合または非共有結合による固定化であることができる。いくつかの態様において、固定化は、標的エピトープに特異的に結合する捕捉抗体を介する固定化である。

【0120】

抗体の検出のために、試料を、本明細書に記載のペプチドの1つまたは複数と、抗体のペプチドへの特異的結合を可能にするのに十分な条件下(例えば、時間、温度、試料の濃

50

度)でインキュベートすることができる。1つまたは複数のペプチドを固体支持体に結合させることができる。例えば、1つまたは複数のペプチドを、試料に、約0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0時間、または一晩、約8、10、12、14、または16時間曝露させることができる。しかしながら、インキュベーション時間は、例えば、1つまたは複数のペプチドの組成物、1つまたは複数の抗体の組成物、試料の希釈、およびインキュベーションのための時間に多かれ少なかれ依存することができる。インキュベーションは、通常、室温(約25℃)または生体温度(約37℃)で行われ、冷蔵庫内(約4℃)で行うことができる。二次抗体の添加前の未結合試料を除去するための洗浄は、公知の免疫測定法に従って行われる。

【0121】

標識された二次抗体は、一般に、本明細書に記載のペプチドの1つまたは複数に結合している試料中の抗体を検出するために使用される。二次抗体は、免疫グロブリンの異なるクラスまたはアイソタイプIgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEの定常または「C」領域に結合する。通常、IgG定常領域に対する二次抗体が本方法において使用される。また、IgGサブクラス、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4に対する二次抗体も本方法に用いることができる。二次抗体を、フルオロフォア(例えば、フルオレセイン、フィコエリスリン、量子ドット、ルミネックスビーズ、蛍光ビーズ)、酵素(例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ)、放射性同位体(例えば、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{125}I)または化学発光部分を含む、任意の直接的または間接的に検出可能な部分で標識することができる。標識シグナルを、ビオチンとビオチン結合部分(例えば、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン)との複合体を使用して増幅させることができる。蛍光標識抗ヒトIgG抗体は、Molecular Probes, Eugene, ORから市販されている。酵素標識抗ヒトIgG抗体は、Sigma-Aldrich, St. Louis, MOおよびChemicon, Temecula, CAから市販されている。

【0122】

試料中の抗体の有無または示差的存在の検出の方法は、二次抗体の標識の選択に一致する。例えば、本明細書に記載のペプチドの1つまたは複数が免疫ブロット法に好適な膜基板に転写される場合、標識酵素が使用される場合にはデジタル撮像装置を、または放射性同位体標識が使用される場合にはx線フィルム現像装置を使用して、検出可能シグナル(すなわち、ブロット)を定量することができる。別の例では、本明細書に記載のペプチドの1つまたは複数がマルチウェルプレートに転写される場合、蛍光、化学発光、および/または比色シグナルを検出および定量することができる自動プレートリーダーを使用して、検出可能シグナルを定量することができる。そのような検出の方法は、当技術分野において周知である。

【0123】

一般的な免疫測定技術は、当技術分野において周知である。パラメーターの最適化のための指針は、例えば、Wu, Quantitative Immunoassay: A Practical Guide for Assay Establishment, Troubleshooting, and Clinical Application, 2000, AACC Press; Principles and Practice of Immunoassay, Price and Newman, eds., 1997, Groves Dictionaries, Inc.; The Immunoassay Handbook, Wild, ed., 2005, Elsevier Science Ltd.; Ghindilis, Pavlov and Atanassov, Immunoassay Methods and Protocols, 2003, Humana Press; Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, 1998, Cold Spring Harbor Laboratory Press; および Immunoassay Automation: An Updated Guide to Systems, Chan, ed., 1996, Academic Pressに見いだすことができる。

【0124】

ある特定の態様において、抗体の存在またはその存在の増大は、対象由来の生体試料を本明細書に記載のペプチドの1つまたは複数と接触させる免疫測定法において、検出可能シグナル(例えば、ブロット、蛍光、化学発光、色、放射能)によって示される。この検出可能シグナルを、対照試料由来シグナルまたは閾値と比較することができる。いくつかの態様において、試験試料中の抗体の検出可能シグナルが、対照試料中の抗体のシグナルまたは所定の閾値と比較して少なくとも約10%、20%、30%、50%、75%より大きいとき、存在の増大が検出され、そして、MGの存在またはその重症度の増大が示される。いくつかの態

様において、試験試料中の抗体の検出可能シグナルが、対照試料中の抗体のシグナルまたは所定の閾値と比較して少なくとも約1倍、2倍、3倍、4倍、またはそれ以上のとき、存在の増大が検出され、そして、MGの存在またはその重症度の増大が示される。

【0125】

いくつかの態様において、抗体測定の結果は、有形媒体中に記録される。例えば、本診断アッセイ法(例えば、抗体の存在または存在の増大の観察)およびMGの重症度の増大またはその存在があるか否かの診断の結果を、例えば、紙または電子媒体(例えば、録音テープ、コンピューターディスク、CD、フラッシュドライブなど)に記録することができる。

【0126】

他の態様において、方法は、診断を患者(すなわち対象)に提供する段階をさらに含む。

10

【0127】

F. 重症筋無力症を予防または治療するための方法

別の局面において、本発明は、対象における重症筋無力症(MG)を予防または治療するための方法を提供し、該方法は、本発明のペプチドまたは複数の該ペプチドの治療有効量を対象に投与する段階であって、ペプチドまたは複数の該ペプチドが、対象において循環している抗体に結合して中和複合体を形成し、それによってMGを予防または治療する、段階を含む。特定の態様において、循環している抗体は、アセチルコリン受容体(AChR)の主要免疫原性領域(MIR)に結合する。いくつかの場合には、AChRは、ニコチン性AChRである。特定の場合には、ペプチドまたは複数の該ペプチドは、抗体結合部位に結合してそれをブロックする。

20

【0128】

いくつかの態様において、複数のペプチドは、2個またはそれ以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上)の異なるペプチドを含む。いくつかの場合には、複数のペプチドは、SEQ ID NO: 2、3、4、6、7、23、24、25、26、27に示されるアミノ酸配列、またはそれらの組み合わせを含む。ある特定の場合には、異なるペプチドの各々が、同じ抗MIR抗体に結合し、例えば、異なるペプチドの全てが、AChRのMIRに結合する同じ抗体に結合する。他の場合には、異なるペプチドの各々が、異なる抗MIR抗体に結合する。

【0129】

特定の態様において、対象に投与されるペプチドまたは複数の該ペプチドは、ペプチドまたは複数の該ペプチドにコンジュゲートされている1つまたは複数の抗体またはその断片をさらに含む。抗体またはその断片は、1つまたは複数の軽鎖、重鎖、その断片、またはそれらの組み合わせを含むことができる。重鎖ドメインまたは領域の任意の断片または組み合わせを、可変ドメイン(V_H)、ヒンジ領域、および定常(C_H1 、 C_H2 、および C_H3)ドメインを含むペプチドにコンジュゲートさせることができる。特定の場合には、抗体断片のヒンジ領域が、ペプチドのC末端にコンジュゲートされる。他の特定の場合には、抗体断片は、重鎖のヒンジ領域、 C_H2 ドメイン、および C_H3 ドメインを含む。いくつかの場合には、抗体またはその断片は、1つまたは複数のFcドメイン、1つまたは複数のFabドメイン、またはそれらの組み合わせを含む。

30

【0130】

抗体断片を本発明のペプチドにコンジュゲートさせること(例えば、ヒンジ領域ならびに C_H2 および C_H3 ドメインを含むIgG重鎖断片を本発明のペプチドにコンジュゲートさせること)は、ペプチドのバイオアベイラビリティを延長させるために有用であることができる。加えて、実施例2および図14Bに考察される通り、ペプチド-抗体断片コンジュゲートは、例えば補体活性化、抗体依存性細胞媒介性毒性、誘導性アポトーシス、またはそれらの組み合わせによって、病原性抗MIR抗体の産生に参与するB細胞を不活化および/またはその数を低減させるために有用である。

40

【0131】

いくつかの態様において、治療されている対象は、MGの1つまたは複数の症状を示している。いくつかの場合には、対象を治療することは、MGの1つまたは複数の症状の減少ま

50

たは消失をもたらす。

【0132】

いくつかの態様において、抗体を含有する生体液を対象から取り出し、本明細書に記載のペプチドの1つまたは複数と接触させることができる。他の態様において、本明細書に記載のペプチドの1つまたは複数を対象に投与して、抗体とそれらのAChR標的との間の結合をブロックし、それによって抗体を中和することができ、そして、生体液中に存在する中和された複合体が親和性血漿フェレーシスなどの体外治療を使用して除去される。非限定例として、本発明のペプチドまたは複数の該ペプチドを、対象に、静脈内に、筋肉内に、髄腔内に、またはそれらの組み合わせで投与することができる。

【0133】

いくつかの態様において、対象由来の生体液を、固体支持体上に固定化されたペプチドの1つまたは複数と接触させる。固体支持体は、例えば、マルチウェルプレート、ELISAプレート、マイクロアレイ、チップ、ビーズ、カラム、多孔質ストリップ、膜、またはニトロセルロースフィルターであることができる。ビーズは、キチンを含むことができる。固定化は、共有結合または非共有結合による固定化であることができる。いくつかの態様において、固定化は、標的ペプチドエピトープに特異的に結合する捕捉抗体を介する固定化である。固体支持体に結合したペプチドは、生体液中の抗体を捕捉する固定相を形成し、これによって、病原性抗AChRまたは抗MIR抗体のレベルが低減または排除された生体液を固体支持体から分離して、すなわち移動相として、対象に戻すことが可能となる。

【0134】

いくつかの態様において、エクスピボで処理される生体液は、血漿であり、そして、抗体が、当技術分野において周知のプロセスである血漿フェレーシスによって除去される。血漿を、1つまたは複数の固定化されたペプチドを有する固体支持体と接触させる。血漿中の抗体は、固定化されたペプチドに結合する。次いで、抗体のレベルが低減または排除された血漿が対象に戻される。

【0135】

抗体のエクスピボ除去は、MGの症状を発症するかまたはその診断を受ける前後の対象に対して行うことができる。抗体を対象から排除または低減させるために、必要に応じて、1回、2回、3回、4回、またはそれ以上の回数、エクスピボ抗体除去プロセスを実施することができる。抗体のエクスピボ除去を、適宜、毎日、毎週、隔週、毎月、隔月実施することができる。いくつかの態様において、対象中の抗体のレベルがモニタリングされ、そして、抗体の存在が所定の閾値レベルを上回った場合にエクスピボ抗体除去が実施される。エクスピボ抗体除去は、適宜、1、2、3、4、5、10、12、15、20、30、40、または50週間、またはそれより長いもしくはより短い期間にわたって行うことができる。例えば、抗体のエクスピボ除去は、抗体のレベルが所定の閾値レベルを下回った場合に中断することができる。

【実施例】

【0136】

IV. 実施例

本発明は、具体的な実施例によってより詳細に記載される。以下の実施例は、例証の目的のためだけに提供され、決して本発明を限定することを意図していない。当業者は、本質的に同じ結果をもたらすように変更または改変することができる種々の重要でないパラメーターを容易に認識するだろう。

【0137】

実施例1. 病原性抗MIR抗体に結合するためのおよび重症筋無力症を治療するためのペプチドの作製

この実施例は、ニコチン性アセチルコリン受容体(AChR)の主要免疫原性領域(MIR)に対する抗体に結合するペプチドの作製を説明し、かつ、該ペプチドの一部が、ヒト重症筋無力症(MG)患者から得られる血清試料中の病原性抗MIR抗体に結合することができることを示す。

【0138】

序論

ニコチン性アセチルコリン受容体(AChR)の主要免疫原性領域(MIR)は、自己免疫重症筋無力症(MG)を有する患者における多くの病原性抗体(Ab)の標的である。この疾患は、シナプス後膜折りたたみ構造の破壊および同時に起こるAChR密度の喪失をもたらす(1、2)。シビレエイAChR(TAChR)の2D結晶アレイに結合したモノクローナルAb(mAb)35の単鎖Fvおよび/またはFab断片の電子顕微鏡写真は、MIRが2つのAChR α サブユニットの各々の細胞外領域の上部に存在することを明らかにしている(3)。このMIRは、シビレエイおよび/またはデンキウナギの電気器官AChRに対してラットで産生されたmAbの重複エピトープの一群からなる(4~6)。これらのmAbの多くは、ヒトを含む多くの異なる種のAChRと交差反応する(7、8)。抗TAChR mAbであるmAb 132Aの結合は、古典的な抗MIR指向mAbであるmAb 35によって競合的に阻害される(9)。シビレエイまたはデンキウナギの電気器官AChRに対して産生されたmAbの大部分がこの領域に指向され、互いの結合を相互に阻害するという理由で、MIRは、大きな関心をかき立てた(10、11)。加えて、これらのmAbのいくつかは、静脈内注射によって筋無力症症状をナイーブなラットに受動的に伝達させる際に特に有効であると考えられる。その領域はまた、折りたたまれ組み立てられたAChR中に存在しているという問題を提示するが、ウェスタンブロットにおいて特定のAChRサブユニットに結合するmAbによって検出されることはほとんどない。しかしながら、mAb 132Aは、ウェスタンブロットにおいてTAChR α サブユニットに結合し、その結果として、TAChR α サブユニットの3つの不連続セグメント： α (1~12)、 α (65~79)、および α (110~115)へのそのエピトープのマッピングにかなり有用であることが証明された(9)。TAChRのアンウィンの4Å 3Dモデルでのこれらのセグメントの位置決めは(12)、それらが互いに近接していることを示す(図1)。 α (1~12)は、N末端の α -ヘリックスの一部であり、そして、それは、MIRの核セグメント(13)である α (65~79)の隣に位置する。 α (65~79)は、2つのコイル/ β -ストランド脚部 α (65~68)と α (75~79)との間に位置する、短いヘリックス α (69~74)からなる。 α (65~79)は、 β -ターンである α (110~115)を覆っている(12)。 α (1~12)および α (65~79)は、エピトープ認識として機能すると考えられるが、一方で、 α (110~115)は、 α (1~12)/ α (65~79)複合体を安定化させる構造アンカーとしての役割を果たすと考えられる(9)。

【0139】

実験的自己免疫重症筋無力症(EAMG)およびヒトMG血清における、MIRに対して指向されたAbの病原性能のため、シビレエイMIRのシビレエイ39アミノ酸(aa)MIRペプチド模倣体(39MIR)を合成および特性評価した。模倣体は、フレキシブルなGGGSおよびGSアミノ酸リンカーによって連結されたAChRの3つの不連続セグメントからなり、インティン-キチン結合ドメイン(ICBD)のアミノ末端に融合される(14)。この模倣体は、132AとAChRそれ自体の複合体の K_d (3.4×10^{-10} M)とは対照的に、mAb 132Aに K_d 2.1×10^{-10} Mで結合する。このペプチド構築物はまた、ビオチン化mAb 132AのシビレエイAChRへの結合をブロックするEAMG血清中のMIR指向Abの全てに吸着することができた(14)。別の融合タンパク質が、ヒトおよびラットIgG抗体重鎖のヒンジのN末端に連結した39MIR C末端で改変されている(15)。また、これらの構築物を治療的に使用して、EAMG血清においてMIR指向Abを中和することもでき、またはヒトホモログを使用して、MG血清においてMIR指向Abを中和することもできる。

【0140】

哺乳動物39MIRホモログもまた生産されている。哺乳動物MIR模倣体を製造する最初の試みは、EAMG血清において抗TAChR MIR mAbおよび抗TAChR MIR Abによって認識されたシビレエイ39MIRの対応する位置に、ラット/マウスおよびヒト配列を配置することを包含した。ラット/マウスおよびヒト39MIRは、シビレエイ α サブユニット由来のものと同じラット/ヒト α サブユニットの3つのセグメント： α (1~12)、 α (65~79)、および α (110~115)を組み込んでいる。シビレエイペプチドと同じく、これらは、フレキシブルなGGGSおよびGSリンカーによって連結される。ペプチドホモログを、ICBDタグに融合し、破壊された大

腸菌(E.coli)からキチンビーズへの吸着によって親和性精製した。ヒトホモログは、シビレエイ39MIR配列とは異なる8つのアミノ酸を含有するが、一方で、ラットホモログは7つだけ含有する(図2)。

【0141】

AChR MIRは、シビレエイと哺乳動物との間で進化的に保存されている。シビレエイおよびヒト α サブユニットは、80%の配列類似性を有する(16)。また、ヒトとシビレエイとのMIR模倣体セグメント: α (1~12)、 α (65~79)、および α (110~115)において76%の配列類似性もある。発電器官AChRに対して産生されたいくつかのMIR指向mAbは、他の種由来のAChRと交差反応する(11)。例えば、mAb 35は、シビレエイ、ウシ、およびヒト由来の受容体と交差反応する(8、17、18)。加えて、ラットにおいてシビレエイの発電器官AChRに対して産生されたmAb 132Aは、シビレエイMIRに結合し、マウスおよびヒト組織の神経筋接合部(NMJ)を染色し、ナイーブなラットに注射すると疾患を引き起こす(7,17)。追加的に、EAMGラットは、ラットMIRに結合するAbを産生する(17~20)。

【0142】

mAb 35および132Aの両方がヒトおよびラット/マウスAChRを認識するという証拠があるにもかかわらず、ヒト39MIRは、mAb 35にも132Aにも結合しない(4,7)。mAb結合の喪失の原因となるアミノ酸を同定するために、シビレエイとヒトの39MIR間で異なる位置でアミノ酸置換を行い、そして、抗MIR mAb 35、132A、198、334、および371Aの結合に及ぼす置換の効果を試験した。mAb 35、132A、およびmAb 198の結合を示す2つのシビレエイ/ヒトキメラ39MIRを設計した。加えて、キメラ模倣体はまた、EAMG血清およびヒトMG血清由来のAbにも結合し、かつ、抗MIR Abを中和するだけでなく病原性抗MIR Abの産生に関与するメモリーB細胞も標的化するヒトおよびラットIgG重鎖を有する偽性抗イディオタイプAb構築物の生産に使用することもできる。

【0143】

結果

1. ヒト39MIRペプチド模倣体はmAb 198によって認識されるがmAb 35および132Aによって認識されない

シビレエイ(SEQ ID NO:9)およびヒト(SEQ ID NO:8)39MIRは、それらのそれぞれの α サブユニットの α (1~12)、 α (65~79)、および α (110~115)セグメントをGSリンカーで連結することによって製造した。これらの2つのMIR模倣体を、キチンビーズ上でのペプチド回収を可能にするIChBDタグを有する融合タンパク質として、大腸菌において発現させた。これらの2つのペプチドは、互いに8つのアミノ酸だけ異なる(図2)。両方の模倣体をmAb 198で調べた。ヒト筋肉AChRで免疫化されたラットに由来したmAb 198は、哺乳動物ならびにシビレエイのMIRに結合するMIR指向mAbである(13,21)。それはまた、EAMGをラットに受動的に伝達させることができ、ウェスタンブロットにおいてネイティブな組み立てられたAChRと α -サブユニット断片の両方に結合する(22,23)。mAb 198は、ウェスタンブロットにおいてシビレエイおよびヒトのMIRペプチド模倣体に結合する(図3)。しかしながら、mAb 198は、ヒトMIR模倣体によりも約50倍強くシビレエイ模倣体に結合する(図3)。

【0144】

図3を再び参照すると、ウェスタンブロットにおいてヒト39MIRがmAb 35によっても132Aによっても全く認識されないことが分かる。しかしながら、両方のmAbが、組み立てられたシビレエイAChRおよびヒトを含む様々な種のAChRに結合し(7)、ナイーブなラットに疾患を伝達する。この結果は、おそらくヒト39MIR模倣体が、ウェスタンブロットフォーマットにおいてシビレエイ39MIRとはわずかに異なって、AChRにおいて組み立てられたヒトMIRよりわずかに異なって折りたたまれることを示唆している。この考えの裏付けはまた、4 Å AChR構造から選り取られたシビレエイ39MIR模倣体由来の3つのMIRセグメント(12)と、 α -ブンガロトキシシンと複合体化したマウス α サブユニット細胞外ドメインの1.97 ÅのX線構造から選り取られた3つのセグメントとの構造の比較からも得られる。マウス39MIRは、ヒト39MIRと共通してシビレエイからの8つのアミノ酸置換のうちの7つを有する。コンパクトな折りたたみの差異があるにもかかわらず、差異はまた、2つの構築物中の特定の

側鎖の配置に観察することもできる。例えば、チロシン72は、シビレエイMIRのセグメントの中央から顕著に突出しているのに対して、マウスMIRでは対応するセグメント中の対応する残基は完全に埋没している。

【0145】

2. シビレエイ39MIRとヒト39MIRの間のアミノ酸置換の効果

シビレエイAChR MIR模倣体とヒトAChR MIR模倣体の間の個々のアミノ酸置換の効果を調査するために、各々アミノ酸がヒト配列からシビレエイ配列へ置換されている8つのペプチドを調製した。シビレエイMIRにおける単一のアミノ酸置換は、N10K(SEQ ID NO:11)、L12F(SEQ ID NO:12)、R66K(SEQ ID NO:13)、A70D(SEQ ID NO:14)、I75V(SEQ ID NO:15)、R79H(SEQ ID NO:16)、D111Q(SEQ ID NO:17)、およびK115H(SEQ ID NO:18)であった。配列アライメントを図4に示す。各々IChBDタグに結合したこれらのペプチドを、大腸菌抽出物由来のキチンビーズ上で回収し、図5に表示するウェスタンブロットでの5つのmAbにおいて染色のために、SDS-PAGEゲル上に流し、ニトロセルロースに転写した。結合に及ぼす効果を表1に示す。

【0146】

mAb 35、132A、および334は全て、抗発電器官AChR MIR指向mAbである。精製されたヒトAChRに対して産生されたmAb 198は、MIR模倣体と同程度に哺乳動物およびシビレエイMIRに結合した(14,22,23)。ラット抗フルオレセインmAbであるmAb 147Gは、陰性対照としての役割を果たし、ブロットにおいて何にも結合しない。

【0147】

図5のウェスタンブロット(表1もまた参照のこと)では、mAb 35が、I75Vにも、D111Qにも、K115Hペプチドにも結合しなかったことが分かる。mAb 35は、シビレエイ39MIRへの結合と比べて、L12F(1.42×)およびR79H(1.91×)ペプチドへの結合の改善ならびにN10K(0.29×)およびR66K(0.62×)ペプチドへの結合の減少を示した。A70Dへの結合(0.93×)は、比較的未変化のままであった。

【0148】

mAb 132Aは、mAb 132Aのシビレエイ39MIRへの結合と比べて、N10K(0.03×)、A70D(0.20×)、I75V(0.07×)、D111Q(0.07×)およびK115H(0.40×)ペプチドへの実質的に弱まった結合、ならびにR66K(1.55×)およびR79H(1.65×)ペプチドへのより強い結合を示した(表1)。L12Fへの結合(1.10×)は、比較的未変化のままであった。

【0149】

mAb 198は、N10K (0.82×)、I75V(0.16×)およびD111Q(0.16×)ペプチドへの結合の減少、ならびに他の5つのキメラ点突然変異ペプチドへのかなり均一な結合を示した(表1)。

【0150】

mAb 334は、N10K (0.59×)、L12F(0.88×)、I75V(0.03×)、D111Q(0.02×)、およびK115H(0.42×)ペプチドへの弱まった結合、R66K(2.75×)およびR79H(2.40×)ペプチドへのより強い結合、ならびにA70D(1.04×)ペプチドへの未変化の結合を示した(表1)。陰性対照であるmAb 147Gは、いずれのペプチドにも結合しなかった。

【0151】

N10K、I75V、およびD111Q置換は、MIR指向mAb結合の最も一貫した障害をもたらした。A70D置換は、他のmAbの結合に影響を及ぼすことなく、mAb 132Aの結合に主に影響を及ぼした。K115H置換はまた、mAb 35、132A、およびmAb 334の結合を害したが、mAb 35結合は完全に無効化された。

【0152】

3. 最適化されたシビレエイ/ヒトキメラ39MIRペプチド

アミノ酸のmAb結合への寄与を同定するためならびに発電器官mAb 132Aおよび35の結合を改善するために、ヒト39MIRペプチドを、類似のシビレエイ配列に対応するアミノ酸置換を4つの位置で誘導するよう点突然変異させて、K10N、D70A、V75I、およびQ111Dペプチド(それぞれ、SEQ ID NO:19、20、21、および22)をもたらした(図6)。ヒト39MIRの単一点突然変異させたペプチドの3つ(K10N(0.01)、V75I(0.03)、およびQ111D(0.06))は、mAb 35

10

20

30

40

50

結合を回復させたが、シビレエイ39MIRペプチドと比較して非常に低いレベルであった。D70A突然変異させたヒト39MIRは、ヒト39MIRへのmAb 35結合を回復させることができなかった。これらの突然変異体ペプチドはいずれもmAb 132結合を回復させなかった。ヒト39MIRは、元々mAb 198によって認識された。しかしながら、K10N(13×)、V75I(40×)、およびQ111D(35.7×)突然変異は、ヒト39MIRへのその結合と比較してmAb 198結合を大きく改善させた。D70A突然変異体へのmAb 198結合は、ヒト39MIRへの結合と同等であった。まとめると、これらの単一点突然変異は、mAb結合の喪失の原因とならない。全ての突然変異のまたは突然変異のうちのいくつかの組み合わせがmAb結合の喪失の原因となる可能性が高い。

【0153】

また、MIR指向mAbへの結合について様々な二重突然変異体を試験した。K10N/D70A(SEQ ID NO:23)、K10N/V75I(SEQ ID NO:24)、K10N/Q111D(SEQ ID NO:25)、およびV75I/Q111D(SEQ ID NO:5)突然変異体は全て、mAb 35、132A、およびmAb198との結合を回復させた(図7および表2)。

【0154】

K10N//V75I/Q111D突然変異体(SEQ ID NO:26)を製造して、位置70におけるDアミノ酸の寄与を試験した。ヒト39MIRは、mAb 35によっても132Aによっても認識されなかったのに対して、この三重突然変異体は、シビレエイ39MIRと比較したとき、mAb 35(2.97×)および132A(2.46×)の両方への改善された結合を示した。三重突然変異体はまた、シビレエイ39MIRよりも良好にmAb 198(2.52×)に結合し、ヒト39MIRと比較して28×の改善をもたらした。驚くべきことに、この三重突然変異体は、mAbとの結合において、4つ(すなわち、K10N、D70A、V75I、およびQ111D)の突然変異全てを含有する突然変異体ペプチドよりも良好であった。

【0155】

三重突然変異体と同じく、K10N/D70A/V75I/Q111D突然変異体(SEQ ID NO:27)は、mAb 35(1.70×)およびmAb 132A(0.99×)への結合を回復させた。それはまた、mAb 198認識に対しても改善され、ヒト39MIRと同程度の11×だけ結合を改善させた(図7)。K10N//V75I/Q111D三重突然変異体は、MIR指向mAb 35、132A、および198への結合について非常に最適化されたペプチドであると考えられた。結果を表2にまとめる。

【0156】

4. ヒトMG血清における抗体のペプチド認識

シビレエイ39MIR、ヒト39MIR、K10N/V75I/Q111D三重突然変異体、およびK10N/D70A/V75I/Q111D四重突然変異体ペプチドのHisタグ化バリエーションを発現させ、ヒトMG血清試料中の抗体への結合を調べた。ペプチドを膜上にドットブロットし、本発明者らのヒトMG血清ライブラリー中の抗体への結合を調べた。シビレエイ39MIRおよびヒト39MIRペプチドは、MG血清試料中のいずれの抗体にも結合しなかった。しかしながら、K10N//V75I/Q111DおよびK10N/D70A/V75I/Q111D Hisタグ化ペプチドの両方は、ヒト血清中の抗体に結合した。驚くべきことに、本発明者らの病原性mAbライブラリーへより高い親和性を有していた三重突然変異体(SEQ ID NO:26)は、1つのMG血清試料中の抗体に唯一結合したが、一方で、四重突然変異体ペプチド(SEQ ID NO:27)は、本発明者らのヒトMG血清試料の全てにおいて抗体に結合することができた。Hisタグ化ペプチドはいずれも正常ヒト血清試料中のいずれの抗体にも結合しなかった(図11)。三重突然変異体ペプチド(SEQ ID NO:26)は、mAb 35、mAb 132A、およびmAb 198に全体的に良好に結合したが、四重突然変異体ペプチド(SEQ ID NO:27)は、MG血清中の抗体との結合について良好であった。そのペプチドがMG血清試料中の病原性MIR指向mAbに結合することができることは、これらがMGの治療のための治療的潜在力を有することを示す。

【0157】

シビレエイおよび哺乳動物のMIR構造は、mAb認識に影響を及ぼすのに十分に異なり得る。シビレエイMIRおよび哺乳動物MIRの検査は、重要なMIRアミノ酸の配向および接近性においていくつかの特筆すべき差異を示す。シビレエイαサブユニット由来の3つのMIRセグ

10

20

30

40

50

メントは、マウス由来のものよりも緩く詰められており、そして、シビレエイN末端ヘリックスは、マウスN末端ヘリックスの場合よりもクラスターから突出している(図8)。核MIRセグメントをAChR α (67~76)にマッピングした(5,13)。このアミノ酸のクラスターは共に、シビレエイとマウスの両構造において密に詰められており、かつ、表面接近可能である。しかしながら、MIRにおけるそれらの構造配列はかなり異なる。核MIRは、MIR指向mAb認識に必須である。シビレエイ核MIRは、ECDにおいてより一層中央に位置しているが、一方で、マウス核MIRは、マウスECD構造においてより上部に位置する(図9)。核MIRにおけるこの差異は、ヒト39MIRへのmAb 35および132A結合の欠如が主要因であり得る。

【0158】

進化的に保存されたMIRは、mAb 198がシビレエイ39MIRおよびヒト39MIRに結合することができたという知見と相関する。MIRペプチド模倣体は、アミノ酸の差異があるにもかかわらず、mAb 198によって認識されるエピトープを提示する構造へと再び折りたたまれる。mAb 198と異なり、mAb 35およびmAb 132Aは、ヒトラット39MIR模倣体のいずれにも結合しなかった。両方のmAbは、哺乳動物のシナプスに結合し、ナイーブなラットにおいてEAMGの受動伝達を引き起こし、それで、これらは、ネイティブな折りたたまれ組み立てられた哺乳動物のAChRにおいて哺乳動物MIRに結合する(7,17,20)。完全に異なるエピトープの代わりに、mAbは、シビレエイとヒトのMIR間で異なる残基に対して異なる優先度を有し得る。これらは、重要な接触を妨害することができる。また、ヒトMIR模倣体は、シビレエイMIR模倣体よりも安定である代替的なよりコンパクトな構造を採用し、その結果として、mAb 35および132Aが認識する準安定状態を提示しない可能性がある。

【0159】

mAb 35およびmAb 132Aの両方は、TACHRに結合し、かつ、ラット/マウスおよびヒトのシナプスに結合するが、このことは、シビレエイ発電器官だけでなく哺乳動物の神経筋接合部にもそれらのエピトープが存在していることを示唆している(7)。両方のmAbがシビレエイMIR模倣体に結合したがヒトMIR模倣体には結合しなかったという事実は、驚くべきことであった。ある特定の重要な残基の配向に小さいが重要な差異がある可能性が高く、そして、これらの残基の表面露出の喪失が、一方のmAbにとって重要であるが他方にとってはそうでない可能性がある。

【0160】

シビレエイとヒトのMIR間の8つのアミノ酸差異は、模倣体がmAb 35および132Aによって認識できないようになるには十分であった(図3)。少数のアミノ酸がmAbエピトープを決定し、そして、これらの重要なアミノ酸における変化は、mAb結合に影響を及ぼすことができる。例えば、K10、I75、およびD111は、試験したmAbの全てにとって重要であると考えられ、その理由は、それらの相同ヒトアミノ酸への置換が、発電器官AChRに対して最初に産生されたmAbの大幅に減少した結合を引き起こしたためである。追加的に、I75およびD111突然変異はまた、mAb 35による突然変異模倣体への結合の完全な喪失ももたらした。

【0161】

I75VおよびD111Q突然変異ペプチドは、MIR指向mAb結合に対して最も劇的な全体効果を有していた。ヒト39MIRを、最も有害な点突然変異の各々で復帰突然変異させた。しかしながら、単一復帰突然変異はいずれもmAb 132A結合を回復させなかったが、一方で、K10N、V75I、およびQ111D突然変異は、mAb 35結合を回復させた。単一点突然変異は、ヒト39MIRと比較してmAb 198結合を改善させた。一方で、個々にはそれらの突然変異は、mAb結合を大きく回復させはしなかったが、対突然変異は、mAb 35および132Aへの結合を回復させ始めた。K10N/V75I/Q111D突然変異体は、シビレエイ39MIRと比較してmAb 35および198への改善された結合を示した。K10N/D70A/V75I/Q111D突然変異体は、シビレエイ39MIRと比較して抗MIR mAb結合を改善しなかった。位置70でのアラニンは、mAb結合を低減させる。アスパラギン酸からの正電荷は、mAb結合にとって重要であると考えられる。一方で、単一置換はmAb 132A結合を回復させなかったが、2つまたはそれ以上の置換の組み合わせは、部分的なmAb結合を回復させることができた。V75I突然変異のmAb結合に及ぼす効果は、驚くべきことであった。突然変異は、疎水性アミノ酸がわずかに大きい疎水性アミノ酸へ

と移行した小さな変化であった。K10NおよびD70A置換は共に、ヒト39MIRから電荷を取り除く。

【0162】

（表1）図5のウェスタンブロットの概要。数値は、シビレエイ39MIRと比べた結合の倍率変化を表す。「-」は結合なしを示す。

突然変異体	mAb 35	mAb 132A	mAb 198	mAb 334
シビレエイ 39MIR	1.00	1.00	1.00	1.00
N10K	0.29	0.03	0.82	0.59
L12F	1.42	1.10	0.90	0.88
R66K	0.62	1.55	1.03	2.75
A70D	0.93	0.20	1.08	1.04
I75V	-	0.06	0.16	0.03
R79H	1.91	1.65	0.97	2.40
D111Q	-	0.07	0.16	0.02
K115H	-	0.40	1.07	0.42

10

20

30

【0163】

（表2）図7のウェスタンブロットの概要。数値は、シビレエイ39MIRと比べた結合の倍率変化を表す。「-」は結合なしを示す。

突然変異体	mAb 35	mAb 132A	mAb 198
シビレエイ 39MIR	1.00	1.00	1.00
ヒト 39MIR	-	-	0.09
K10N/D70A	0.31	0.16	0.72
K10N/V75I	1.10	1.25	1.79
K10N/Q111D	2.31	1.07	1.19
V75I/Q111D	0.92	3.34	2.71
K10N/V75I/Q111D	2.97	2.46	2.52
K10N/D70A/V75I/Q111D	1.70	0.99	0.99

10

20

【 0 1 6 4 】

（表 3）単一置換ヒト 39MIR 突然変異体による結合の概要。数値は、シビレエイ 39MIR と比べた結合の倍率変化を表す。「-」は結合なしを示す。

突然変異体	mAb 35	mAb 132A	mAb 198
シビレエイ 39MIR	1.00	1.00	1.00
ヒト 39MIR	-	-	0.02
K10N	0.01	-	0.23
D70A	-	-	0.02
V75I	0.03	-	0.65
Q111D	0.06	-	0.59

30

【 0 1 6 5 】

参照文献

1. Lindstrom, J.M., *Acetylcholine receptors and myasthenia*. Muscle Nerve, 2000. **23**(4): p. 453-77.
2. Richman, D.P., et al., *Effector mechanisms of myasthenic antibodies*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **681**: p. 264-73.
3. Beroukhi, R. and N. Unwin, *Three-dimensional location of the main immunogenic region of the acetylcholine receptor*. Neuron, 1995. **15**(2): p. 323-31.
4. Conti-Tronconi, B., S. Tzartos, and J. Lindstrom, *Monoclonal antibodies as probes of acetylcholine receptor structure. 2. Binding to native receptor*. Biochemistry, 1981. **20**(8): p. 2181-91. 10
5. Papadouli, I., et al., *Antigenic role of single residues within the main immunogenic region of the nicotinic acetylcholine receptor*. Biochem J, 1990. **269**(1): p. 239-45.
6. Tzartos, S.J., et al., *Main immunogenic region of Torpedo electroplax and human muscle acetylcholine receptor: localization and microheterogeneity revealed by the use of synthetic peptides*. J Neurochem, 1990. **54**(1): p. 51-61. 20
7. Gomez, C.M., et al., *Monoclonal hybridoma anti-acetylcholine receptor antibodies: antibody specificity and effect of passive transfer*. Ann N Y Acad Sci, 1981. **377**: p. 97-109.

8. Tzartos, S.J., M.E. Seybold, and J.M. Lindstrom, *Specificities of antibodies to acetylcholine receptors in sera from myasthenia gravis patients measured by monoclonal antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(1): p. 188-92.
9. Morell, S.W., et al., *Structural characterization of the main immunogenic region of the Torpedo acetylcholine receptor*. Mol Immunol, 2014. **58**(1): p. 116-31.
10. Tzartos, S.J. and J.M. Lindstrom, *Monoclonal antibodies used to probe acetylcholine receptor structure: localization of the main immunogenic region and detection of similarities between subunits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(2): p. 755-9. 10
11. Tzartos, S.J., et al., *Mapping of surface structures of electrophorus acetylcholine receptor using monoclonal antibodies*. J Biol Chem, 1981. **256**(16): p. 8635-45.
12. Unwin, N., *Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution*. J Mol Biol, 2005. **346**(4): p. 967-89.
13. Tzartos, S.J., et al., *Localization of the main immunogenic region of human muscle acetylcholine receptor to residues 67-76 of the alpha subunit*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(9): p. 2899-903. 20
14. Trinh, V.B., A.J. Foster, and R.H. Fairclough, *Design, synthesis, and characterization of a 39 amino acid peptide mimic of the main immunogenic region of the Torpedo acetylcholine receptor*. Mol Immunol, 2014. **59**(1): p. 79-90.
15. Trinh, V.B., *Therapeutic peptide mimics of the acetylcholine receptor main immunogenic region for treating myasthenia gravis*. 2013, (Doctoral dissertation). Retrieved from ProQuest Dissertations and Theses. (Accession Order No. 1449416596). 30
16. Boulter, J., et al., *Isolation of a clone coding for the alpha-subunit of a mouse acetylcholine receptor*. J Neurosci, 1985. **5**(9): p. 2545-52.
17. Gomez, C.M. and D.P. Richman, *Monoclonal anti-acetylcholine receptor antibodies with differing capacities to induce experimental autoimmune myasthenia gravis*. J Immunol, 1985. **135**(1): p. 234-41. 40
18. Richman, D.P., et al., *Monoclonal anti-acetylcholine receptor antibodies can cause experimental myasthenia*. Nature, 1980. **286**(5774): p. 738-9.

19. Lindstrom, J.M., et al., *Pathological mechanisms in experimental autoimmune myasthenia gravis. II. Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia gravis in rats with anti-acetylcholine receptor antibodies.* J Exp Med, 1976. **144**(3): p. 739-53.

20. Tzartos, S., et al., *Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia gravis by monoclonal antibodies to the main immunogenic region of the acetylcholine receptor.* J Neuroimmunol, 1987. **15**(2): p. 185-94.

21. Fostieri, E., D. Beeson, and S.J. Tzartos, *The conformation of the main immunogenic region on the alpha-subunit of muscle acetylcholine receptor is affected by neighboring receptor subunits.* FEBS Lett, 2000. **481**(2): p. 127-30.

22. Barchan, D., et al., *Modulation of the anti-acetylcholine receptor response and experimental autoimmune myasthenia gravis by recombinant fragments of the acetylcholine receptor.* Eur J Immunol, 1998. **28**(2): p. 616-24.

23. Venkatesh, N., et al., *Prevention of passively transferred experimental autoimmune myasthenia gravis by a phage library-derived cyclic peptide.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 761-6.

【 0 1 6 6 】

実施例2. 重症筋無力症の治療のためのFc-融合タンパク質

この実施例は、重症筋無力症(MG)の予防または治療に好適な、本発明のペプチドおよび抗体Fcドメインを含む融合タンパク質の設計および作製を示す。

【 0 1 6 7 】

序論

MG患者の血清中の抗アセチルコリン受容体(AChR)抗体(Ab)の70パーセントまたはそれ以上が、AChRの主要免疫原性領域(MIR)に指向される。図12Aに示す通り、シビレエイおよびヒトMIRペプチド(それぞれSEQ. ID NO:8および9)の対を組み合わせ、本発明のペプチド(SEQ ID NO:27)を設計した。このペプチドは、ラット由来の抗MIRモノクローナル抗体(mAb)ならびにMG患者血清中のAbのごく一部に結合する。

【 0 1 6 8 】

結果

キメラシビレエイ-ヒトペプチド(SEQ ID NO:27)を抗体Fcドメインに融合してコンジュゲートを改変した(図12B)。図13中のウェスタンブロットは、シビレエイおよびヒトに基づくペプチド-Fcコンジュゲート(すなわち、抗体Fcドメインに融合されたSEQ ID NO:8および9のペプチドを含むコンジュゲート)が病原性mAb 132Aおよび198に結合しなかったが、一方で、キメラペプチド-Fcコンジュゲート(すなわち、抗体Fcドメインに融合されたSEQ ID NO:27のペプチドを含むコンジュゲート)が両方のmAbを認識してそれに結合したことを示す。このことは、キメラコンジュゲートがMG患者血清中の病原性Abに結合してそれを中和することができることを示す。

【 0 1 6 9 】

これらの結果は、本発明のペプチド-Fcコンジュゲート(例えば、抗体Fcドメインに融合されたSEQ ID NO:27のペプチド)がMGを予防または治療するために有用であることを示す。病原性抗MIR Abに結合してその結合部位をブロックすることができる認識ドメインとして作用することに加えて(図14A)、コンジュゲートはまた、MGにおける病原性抗MIR Abの産生の原因となるメモリーB細胞上のB細胞受容体を標的化することもできる(図14B)。その構築物は、それらのB細胞に結合して、補体活性化によって、抗体依存性細胞媒介性の

細胞傷害殺傷によって、またはB細胞受容体をFcγRIIb受容体へ架橋することによってそれらの免疫系破壊を誘導し、したがってアポトーシスを誘導することができる。したがって、コンジュゲートは、全ての適応免疫応答を低下させるよりも病原性Ab応答だけを抗原特異的に不活化するのに有用である。

【0170】

V. 例示的な態様

本明細書で開示される対象に従って提供される例示的な態様は、特許請求の範囲および以下の態様を含むが、これらに限定されない。

1. アミノ酸配列

SEHETRLVAX₁LFZ₁LKWNPX₂DYGGX₃KKIHZ₂LX₄YTGH (SEQ ID NO:31)

10

と、

SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対する、X₁、X₂、X₃、およびX₄からなる群より選択される2つまたはそれ以上の位置におけるアミノ酸修飾と

を含む、単離されたペプチドであって、X₁、X₂、X₃、およびX₄が、独立して選択されたアミノ酸であり、かつ、Z₁およびZ₂が、独立して選択されたアミノ酸を含む個別の長さのリンカー配列である、該単離されたペプチド。

2. SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対する前記アミノ酸修飾がX₁およびX₂に存在する、態様1のペプチド。

3. X₁がNであり、X₂がAであり、Z₁の長さが4個であり、かつ、Z₂の長さが2個である (SEQ ID NO:2)、態様2のペプチド。

20

4. SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対する前記アミノ酸修飾がX₁およびX₃に存在する、態様1のペプチド。

5. X₁がNであり、X₃がIであり、Z₁の長さが4個であり、かつ、Z₂の長さが2個である (SEQ ID NO:3)、態様4のペプチド。

6. SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対する前記アミノ酸修飾がX₁およびX₄に存在する、態様1のペプチド。

7. X₁がNであり、X₄がDであり、Z₁の長さが4個であり、かつ、Z₂の長さが2個である (SEQ ID NO:4)、態様6のペプチド。

8. SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対する前記アミノ酸修飾がX₃およびX₄に存在する、態様1のペプチド。

30

9. 前記アミノ酸配列がSEQ ID NO:5ではない、態様8のペプチド。

10. SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対する前記アミノ酸修飾がX₁、X₃、およびX₄に存在する、態様1のペプチド。

11. X₁がNであり、X₃がIであり、X₄がDであり、Z₁の長さが4個であり、かつ、Z₂の長さが2個である (SEQ ID NO:6)、態様10のペプチド。

12. SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に対する前記アミノ酸修飾がX₁、X₂、X₃、およびX₄に存在する、態様1のペプチド。

13. X₁がNであり、X₂がAであり、X₃がIであり、X₄がDであり、Z₁の長さが4個であり、かつ、Z₂の長さが2個である (SEQ ID NO:7)、態様12のペプチド。

14. アセチルコリン受容体 (AChR) の主要免疫原性領域 (MIR) に結合する抗体に結合する、態様1~13のいずれかのペプチド。

40

15. インテイン-キチン結合ドメインタグをさらに含む、態様1~14のいずれかのペプチド。

16. ヘキサヒスチジンタグをさらに含む、態様1~15のいずれかのペプチド。

17. 前記ペプチドにコンジュゲートされている抗体重鎖断片をさらに含む、態様1~16のいずれかのペプチド。

18. 前記抗体がヒト免疫グロブリンGである、態様17のペプチド。

19. 前記重鎖断片のヒンジ領域が、前記ペプチドのC末端にコンジュゲートされている、態様17または18のペプチド。

20. 態様1~19のいずれかのペプチドまたは複数の該ペプチドを含む、組成物。

50

21. 薬学的に許容される担体をさらに含む、態様20の組成物。
22. 前記複数のペプチドが、少なくとも2、3、4、または5つの異なるペプチドを含む、態様20または21の組成物。
23. 態様1～19のいずれかのペプチドまたは複数の該ペプチドと固体支持体とを含む、キット。
24. 前記固体支持体が、マルチウェルプレート、ELISAプレート、マイクロアレイ、チップ、ビーズ、多孔質ストリップ、またはニトロセルロースフィルターである、態様23のキット。
25. 前記ビーズがキチンを含む、態様24のキット。
26. 前記ペプチドまたは複数の該ペプチドが、前記固体支持体上に固定化されている、態様23～25のいずれかのキット。 10
27. 前記複数のペプチドが、アセチルコリン受容体(AChR)の主要免疫原性領域(MIR)に結合する同じ抗体または異なる抗体に結合する、態様23～26のいずれかのキット。
28. 使用説明書をさらに含む、態様23～27のいずれかのキット。
29. 態様1～19のいずれかの単離されたペプチドをコードする、単離された核酸。
30. 対象由来の生体試料中において、態様1～19のいずれかのペプチドまたは複数の該ペプチドに結合する抗体の有無を検出する段階であって、該ペプチドまたは複数の該ペプチドに結合する抗体の存在によって、重症筋無力症(MG)の存在またはその重症度の増大が示される、該段階を含む、該対象におけるMGを検出するためのまたはその重症度を判定するための方法。 20
31. 前記抗体が、アセチルコリン受容体(AChR)の主要免疫原性領域(MIR)に結合する、態様30の方法。
32. 前記ペプチドまたは複数の該ペプチドが、SEQ ID NO:2、3、4、6、および7からなる群より選択される、態様30または31の方法。
33. 前記対象から前記試料を得る段階をさらに含む、態様30～32のいずれかの方法。
34. 前記試料が全血、血清、または血漿である、態様30～33のいずれかの方法。
35. 前記ペプチドまたは複数の該ペプチドが固体支持体に結合されている、態様30～34のいずれかの方法。
36. 前記固体支持体が、マルチウェルプレート、ELISAプレート、マイクロアレイ、チップ、ビーズ、多孔質ストリップ、またはニトロセルロースフィルターである、態様35の方法。 30
37. 前記ビーズがキチンを含む、態様36の方法。
38. 前記抗体が、ウェスタンブロット、ドットブロット、ELISA、ラジオイムノアッセイ法、免疫沈降、電気化学発光、免疫蛍光、FACS解析、またはマルチプレックスビーズアッセイ法によって検出される、態様30～37のいずれかの方法。
39. 前記試料を対照と比較する、態様30～38のいずれかの方法。
40. 前記対照が、MGを有していない対象から得られる、態様39の方法。
41. 前記対照が、MGの症状を発症する前またはMGに対する治療を受けた後の前記対象から得られる、態様39の方法。
42. 態様1～19のいずれかのペプチドまたは複数の該ペプチドの治療有効量を対象に投与する段階であって、該ペプチドまたは複数の該ペプチドが、該対象において循環している抗体に結合して中和複合体を形成し、それによって重症筋無力症(MG)を予防または治療する、該段階を含む、該対象におけるMGを予防または治療するための方法。 40
43. 前記循環している抗体が、アセチルコリン受容体(AChR)の主要免疫原性領域(MIR)に結合する、態様42の方法。
44. 前記ペプチドまたは複数の該ペプチドが、SEQ ID NO:2、3、4、6、および7からなる群より選択される、態様42または43の方法。
45. 前記ペプチドまたは複数の該ペプチドが、AChRのMIRに結合する抗体を産生するメモリーB細胞を不活化するかまたはその数を低減させる、態様42～44のいずれかの方法。 50

46. 前記対象がMGの症状を示している、態様42～45のいずれかの方法。
47. 前記対象を治療することがMGの症状の減少をもたらす、態様46の方法。
48. 前記対象から中和複合体を除去する段階をさらに含む、態様42～47のいずれかの方法。
49. 前記中和複合体が、親和性血漿フェレーシスによって除去される、態様48の方法。
50. 前記ペプチドまたは複数の該ペプチドが、静脈内に、筋肉内に、またはそれらの組み合わせで投与される、態様42～49のいずれかの方法。

【0171】

本明細書に記載の実施例および態様が、例証を目的としているにすぎないこと、ならびに、それに照らして様々な修飾または変更が、当業者に示唆され、本出願および添付の特許請求の範囲の精神および権限内に含まれるべきことが理解される。本明細書に引用される全ての刊行物、特許、特許出願、および配列参照番号は、参照によってその全体が全ての目的のために本明細書に組み入れられる。

【0172】

非公式の配列表

(表4) ペプチド配列

SEQ ID NO:	配列	注記
1	SEHETRLVAKLFZ ₁ LKWNPPDDYGGVKKIHZ ₂ LQYTGH	ヒト MIR (可変リンカー)
2	SEHETRLVANLFZ ₁ LKWNPPADYGGVKKIHZ ₂ LQYTGH	ヒト MIR 二重突然変異体 (K10N/D70A) (可変リンカー)
3	SEHETRLVANLFZ ₁ LKWNPPDDYGGIKKIHZ ₂ LQYTGH	ヒト MIR 二重突然変異体 (K10N/V75I) (可変リンカー)
4	SEHETRLVANLFZ ₁ LKWNPPDDYGGVKKIHZ ₂ LDYTGH	ヒト MIR 二重突然変異体 (K10N/Q111D) (可変リンカー)
5	SEHETRLVAKLFGGGSLKWNPPDDYGGIKKIHGSLDYTG	ヒト MIR 二重突然変異体 (V75I/Q111D)
6	SEHETRLVANLFZ ₁ LKWNPPDDYGGIKKIHZ ₂ LDYTGH	ヒト MIR 三重突然変異体 (K10N/V75I/Q111D) (可変リンカー)
7	SEHETRLVANLFZ ₁ LKWNPPADYGGIKKIHZ ₂ LDYTGH	ヒト MIR 四重突然変異体 (K10N/D70A/V75I/Q111D) (可変リンカー)
8	SEHETRLVAKLFGGGSLKWNPPDDYGGVKKIHGSLQYTGH	ヒト 39MIR
9	SEHETRLVANLLGGGSLRWNPPADYGGIKKIRGSLDYTGK	シビレエイ 39MIR
10	SEHETRLVAKLFGGGSLKWNPPDDYGGVKKIHGSLDYTG	マウス 39MIR
11	SEHETRLVAKLLGGGSLRWNPPADYGGIKKIRGSLDYTGK	シビレエイ 39MIR 単一突然変異体 (N10K)
12	SEHETRLVANLFGGGSLRWNPPADYGGIKKIRGSLDYTGK	シビレエイ 39MIR 単一突然変異体 (L12F)
13	SEHETRLVANLLGGGSLKWNPPADYGGIKKIRGSLDYTGK	シビレエイ 39MIR 単一突然変異体 (R66K)
14	SEHETRLVANLLGGGSLRWNPPDDYGGIKKIRGSLDYTGK	シビレエイ 39MIR 単一突然変異体 (A70D)
15	SEHETRLVANLLGGGSLRWNPPADYGGVKKIRGSLDYTGK	シビレエイ 39MIR 単一突然変異体 (I75V)
16	SEHETRLVANLLGGGSLRWNPPADYGGIKKIHGSLDYTGK	シビレエイ 39MIR 単一突然変異体 (R79H)
17	SEHETRLVANLLGGGSLRWNPPADYGGIKKIRGSLQYTGH	シビレエイ 39MIR 単一突然変異体 (D111Q)
18	SEHETRLVANLLGGGSLRWNPPADYGGIKKIRGSLDYTG	シビレエイ 39MIR 単一突然変異体 (K115H)
19	SEHETRLVANLFGGGSLKWNPPDDYGGVKKIHGSLQYTGH	ヒト 39MIR 単一突然変異体 (K10N)
20	SEHETRLVAKLFGGGSLKWNPPADYGGVKKIHGSLQYTGH	ヒト 39MIR 単一突然変異体 (D70A)
21	SEHETRLVAKLFGGGSLKWNPPDDYGGIKKIHGSLQYTGH	ヒト 39MIR 単一突然変異体 (V75I)
22	SEHETRLVAKLFGGGSLKWNPPDDYGGVKKIHGSLDYTG	ヒト 39MIR 単一突然変異体 (Q111D)

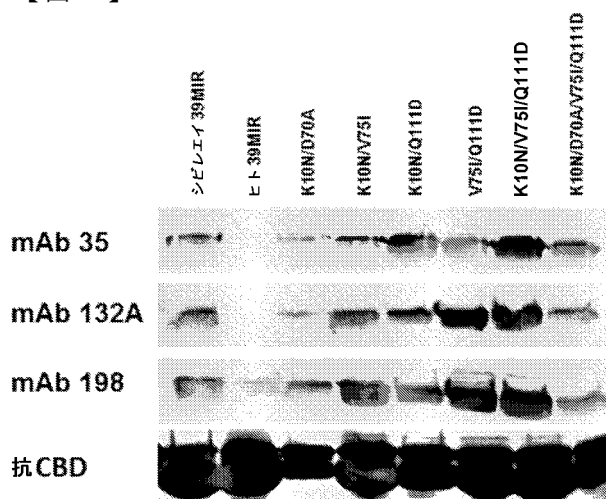
10

20

30

40

【図 7】

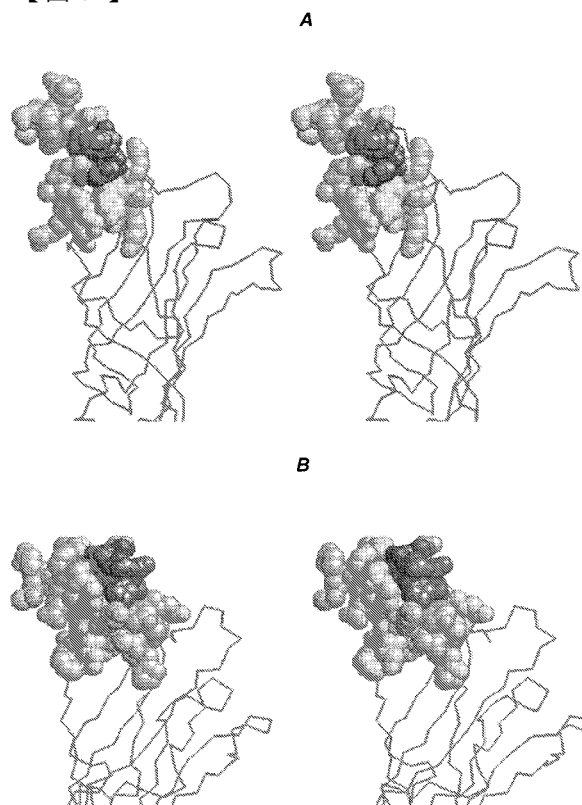


【图 6】

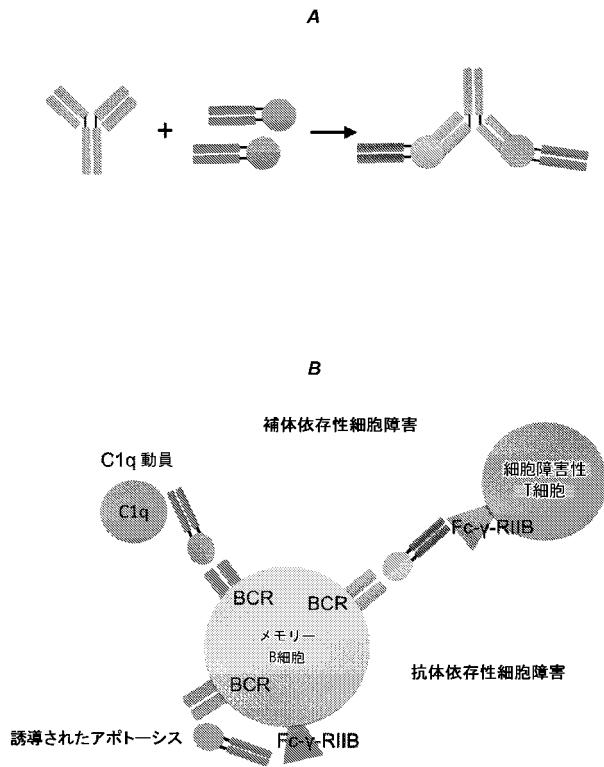
1	12	65	79	110	115	
SEHETRLVAKLF	FGGGS			GS	LQYTGH	E T
SEHETRLVANLF	GGGS			GS	LQYTGH	K10N
SEHETRLVAKLF	GGGS			GS	LQYTGH	D70A
SEHETRLVAKLF	GGGS			GS	LQYTGH	V75I
SEHETRLVAKLF	GGGS			GS	LQYTGH	Q111D

【图 8】

【图 9】



【図 1 4】



【手続補正書】

【提出日】 令和1年5月13日 (2019.5.13)

【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】

[2019531716000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 17/50521
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 14/705, C07K 19/00 (2018.01) CPC - C07K 14/4756		
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)		
See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
See Search History Document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Trinh. Therapeutic Peptide Mimics of the Acetylcholine Receptor Main Immunogenic Region For Treating Myasthenia Gravis. Ph.D. Thesis. University of California, Davis. ProQuest Dissertations Publishing 2013. 3596961 [retrieved on 06 March 2018 from https://search.proquest.com/openview/a8759b2b1e0067172424af23dbcef05a/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y] pg 62, Fig 12 and its legend; pg 74, Fig 15 and its legend	1-3, 14-22, 29
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 March 2018		Date of mailing of the international search report 03 APR 2018
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/50521

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☐ forming part of the international application as filed:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter. 1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter. 1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter. 1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of 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/US 17/50521

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I+, claims 1-22, 29, directed to an isolated peptide comprising SEQ ID NO:31, a composition comprising thereof, and a nucleic acid encoding thereof. The peptide of SEQ ID NO: 31 will be searched to the extent that the peptide encompasses SEQ ID NO: 2. It is believed that claims 1-3, 14-22, 29 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the peptide encompasses SEQ ID NO: 2. Additional peptide(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected peptide(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a peptide encompassing SEQ ID NO: 6, i.e., claims 1, 10, 11, 14-22, 29.

Group II, claims 23-28, directed to a kit comprising a peptide of claim 1 and a solid support. ***** See Supplemental Sheet to continue *****

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 14-22, 29, restricted to SEQ ID NO: 2

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/50521

In Continuation of Box III. Observations where unity of invention is lacking:

Group III+, claims 30-41, directed to detecting autoantibodies in a sample from a subject by binding them to a peptide of claim 1. Group III+ will be searched upon payment of additional fees. The method may be searched, for example, to the extent that the peptide encompasses SEQ ID NO: 2. It is believed that claims 30-41 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched to the extent that the peptide encompasses SEQ ID NO: 2 upon payment of additional fees and election as such. Additional peptide(s) will be searched upon the payment of additional fees and election as such. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected peptide(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Another exemplary election would be a method comprising detecting autoantibodies by binding them to a peptide encompassing SEQ ID NO: 6, i.e., claims 30-41.

Group IV+, claims 42-50, directed to administering a peptide of claim 1 to the subject. Group IV+ will be searched upon payment of additional fees. The method may be searched, for example, to the extent that the peptide encompasses SEQ ID NO: 2. It is believed that claims 42-50 encompass this invention, and thus these claims will be searched to the extent that the peptide encompasses SEQ ID NO: 2 upon payment of additional fees and election as such. Additional peptide(s) will be searched upon the payment of additional fees and election as such. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected peptide(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Another exemplary election would be a method comprising administering a peptide encompassing SEQ ID NO: 6, i.e., claims 42-50.

The inventions listed as Group I+, II, III+ and IV+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special feature of each invention of Group I+ is a specific modification of SEQ ID NO:31 recited therein.

The inventions of Group II share the special technical feature of a kit comprising a solid support that is not required by Groups, I+, III+, IV+.

The inventions of Group III+ share the special technical feature of detecting autoantibodies in a sample from a subject that is not required by Groups I+, II, or IV+.

The inventions of Group IV+ share the special technical feature of administering a peptide of claim 1 to the subject that is not required by Groups I+, II, or III+.

The inventions of Groups I+, Group II, Group III+, and Group IV+ share the technical feature of a peptide of claim 1 (SEQ ID NO:31). The inventions of Group III+ share the technical feature of a method of claim 30. However, these shared technical features do not represent an improvement over prior art as being anticipated by a Ph.D. Thesis titled "Therapeutic Peptide Mimics of the Acetylcholine Receptor Main Immunogenic Region For Treating Myasthenia Gravis" by Trinh (University of California Davis 2013) (hereinafter "Trinh").

Trinh discloses an isolated peptide of SEQ ID NO:31 (pg 62, Figure 12. Amino acid sequence of Torpedo 39MIR, rat/mouse 39MIR, and human 39MIR; SEHETRLVAKLFGGSKRWNPDDYGGVKKIHGSLQYTGH Human), wherein X1 is K, Z1 is GGG, X2 is D, X3 is V, Z2 is GS, X4 is Q).

Trinh also discloses a method for detecting myasthenia gravis (MG) in a subject (pg 51, Fig 11 and its legend, "MIR peptide mimic removes Abs from EAMG [experimental autoimmune myasthenia gravis] serum"; pg 56, "by running EAMG serum over a column containing the 39MIR-ICBD/Chitin beads, we are able to remove all MIR-directed Abs from the EAMG serum. The 39MIR-ICBD appears to contain most of the overlapping epitopes that make up the native MIR and is structurally promiscuous enough to bind the MIR-directed Abs in an EAMG serum"). As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the inventions.

The inventions of Group IV+ share the technical feature of a method of claim 42. However, this shared technical feature does not represent an improvement over prior art as being obvious over Trinh, as above.

Trinh discloses 39MIR-Fc fusion protein (pg 112, Figure 34. 39MIR-Fc protein, and its legend, "The 39MIR-Fc protein covalently links the 39MIR to the N-terminus of the hinge of the rat IgG2b or human IgG1 CH2-CH3 heavy chain domains. This protein will potentially recognize the BCR of the B-cells that are responsible for the production of anti-MIR Abs in MG, and label them for immune mediated destruction with the clustered Fc components on those B-cells").

Trinh does not specifically disclose a method for preventing or treating myasthenia gravis (MG) in a subject by administering to the subject a therapeutically effective amount of said 39MIR-Fc fusion protein. However, one of ordinary skill in the art at the time of the invention would have been motivated to do so, because Trinh discloses that "[i]n light of the pathogenic potential of MIR directed Abs, the ability to recognize these Abs, neutralize their combining sites, remove them from EAMG serum of affected animals, and curtail production of those Abs would be a very specific therapy for MG" (pg 52; see also pg 56, "Removal of the MIR-directed Abs can potentially remove a major pathogenic component from MG serum. This offers the possibility of a highly antigen-targeted therapy for MG compared to current treatments that work to globally suppress the immune system. By adapting the mimic to an Fc construct (Chapter 4), one may be able to eliminate the memory B-cells specific for production of the pathogenic anti-MIR Abs in a MG patient's immune system repertoire selectively introducing immune tolerance to this pathogenic/immunogenic site. This strategy may prove useful in therapeutic interventions to remove pathogenic Abs in other Ab-mediated autoimmune diseases"). As the technical feature would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention, this cannot be considered special technical feature that would otherwise unify the inventions.

Therefore, the inventions of Groups I+, II, III+, and IV+ lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	21/04
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53 N
G 0 1 N	33/543	(2006.01)	G 0 1 N	33/543 5 0 1 A
G 0 1 N	33/544	(2006.01)	G 0 1 N	33/544 Z

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

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

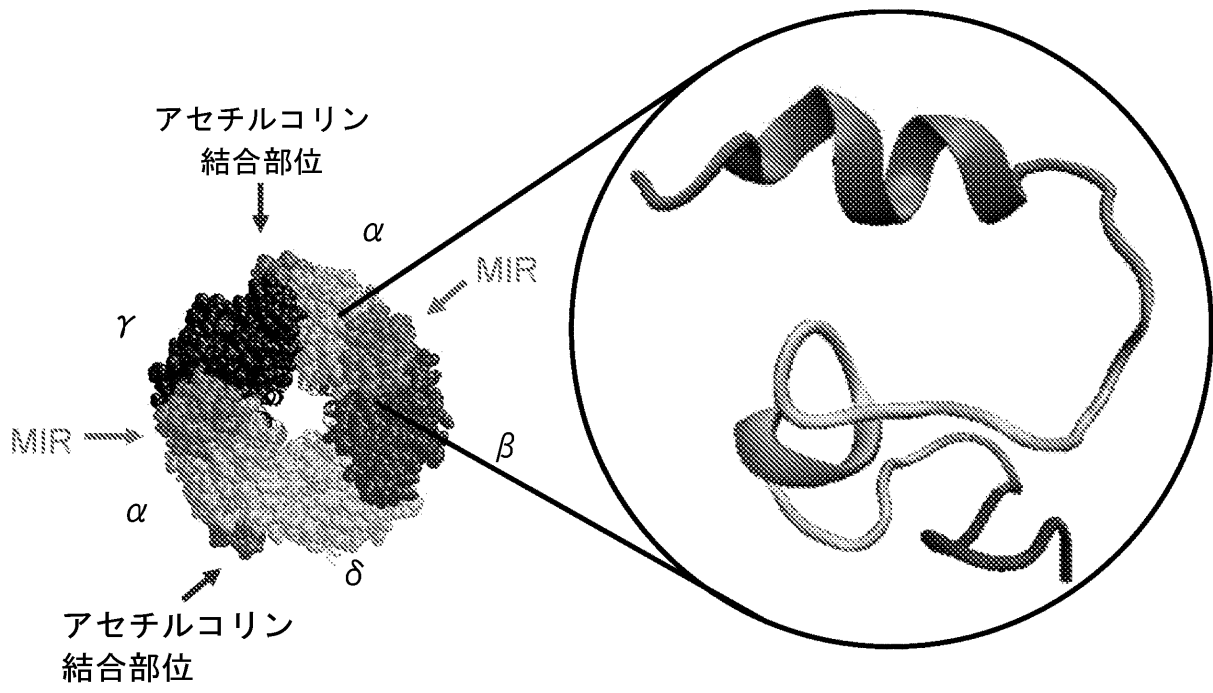
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 フェアクラフ ロバート エイチ.
アメリカ合衆国 9 4 6 0 7 カリフォルニア州 オークランド フランクリン ストリート 1
1 1 1 トゥウェルフス フロア ケア オブ ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ
オブ カリフォルニア

(72)発明者 チン ヴービー.
アメリカ合衆国 9 4 6 0 7 カリフォルニア州 オークランド フランクリン ストリート 1
1 1 1 トゥウェルフス フロア ケア オブ ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ
オブ カリフォルニア

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA19 BA23 CA62 CA70 MA66 MA67
NA14 ZA941 ZA942
4H045 AA10 AA30 BA10 DA75 DA86 EA20 EA50

【要約の続き】



专利名称(译)	肽及其在重症肌无力的诊断和治疗中的用途		
公开(公告)号	JP2019531716A	公开(公告)日	2019-11-07
申请号	JP2019513015	申请日	2017-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
发明人	フェアクラフ ロバート エイチ. チン ヴ ビー.		
IPC分类号	C12N15/12 C07K14/00 C07K14/435 C07K16/18 C07K19/00 A61K38/16 A61P21/04 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/544		
CPC分类号	A61K38/00 A61P21/04 A61P37/06 C07K14/70571 C07K14/71 C07K2319/00 C07K2319/21 C07K2319 /30 A61K47/6849 C07K14/47 G01N33/564 G01N33/6857 G01N2800/10 G01N2800/2835		
FI分类号	C12N15/12.ZNA C07K14/00 C07K14/435 C07K16/18 C07K19/00 A61K38/16 A61P21/04 G01N33/53.N G01N33/543.501.A G01N33/544.Z		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA19 4C084/BA23 4C084/CA62 4C084 /CA70 4C084/MA66 4C084/MA67 4C084/NA14 4C084/ZA941 4C084/ZA942 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	62/384896 2016-09-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于检测受试者中重症肌无力或确定其严重程度的组合物和方法。本发明还提供了用于预防或治疗受试者重症肌无力的组合物和方法。在一些实施方案中，该组合物是结合结合至乙酰胆碱受体的主要免疫原性区域的单克隆抗体的肽，并且在某些情况下具有病原性抗体结合位点。块 在其他实施方案中，该肽进一步包含抗体重链片段。还提供了用于检测重症肌无力或确定其严重程度以及预防或治疗重症肌无力的试剂盒。

FIG. 12A

