

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2002 - 543153**

(P2002 - 543153A)

(43)公表日 平成14年12月17日(2002.12.17)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
39/395		39/395	N 4 B 0 6 3
A 6 1 P 29/00		A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 4
35/00		35/00	4 C 0 8 5
37/02		37/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 21数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 615043(P2000 - 615043)

(86)(22)出願日 平成12年4月28日(2000.4.28)

(85)翻訳文提出日 平成13年10月29日(2001.10.29)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/04388

(87)国際公開番号 W000/66159

(87)国際公開日 平成12年11月9日(2000.11.9)

(31)優先権主張番号 99201350.8

(32)優先日 平成11年4月28日(1999.4.28)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(71)出願人 ファカルテイト デル ヘネ-スカンテ  
ファン デ フリエ ユニフェルジテイト  
オランダ国 1081 ベ-テ- アムステル  
ダム ファン デル プホ-ストストラ-  
ト 7

(72)発明者 ファン デン ベルグ ティモ カ-ス  
オランダ国 1081 ベ-テ- アムステル  
ダム ファン デル プホ-ストストラ-  
ト 7

(74)代理人 弁理士 安形 雄三 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗炎症及び抗腫瘍の治療に用いる細胞機能抑制方法

(57)【要約】

本発明は、温血生物の体内において抗炎症及び抗腫瘍に用いる細胞機能抑制方法であって、細胞外ドメインである S I R P を特異的に認識 (抗 S I R P 物質) することによって異常な脊髄細胞の機能を抑制する物質からなる薬剤を、当該治療に効果的な量で当該生物に投与することからなる。本発明はさらに、上述の方法において用いられる薬剤と当該薬剤の活性物質とも関する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 温血生物の体内において抗炎症及び抗腫瘍の治療に用いる細胞機能抑制方法であって、細胞外ドメインであるSIRPを特異的に認識（抗SIRP物質）し、異常な骨髄細胞の機能を阻害する物質を、前記治療に効果的な量で、前記生物に薬剤を投与することからなることを特徴とする細胞機能抑制方法。

【請求項2】 前記物質は、マクロファージの機能を抑制し、酸化窒素（NO）の生産物、活性酸素種の生産物、腫瘍壊死因子-アルファ（TNF- $\alpha$ ）の生産物の個々のマクロファージ活性テストの計測結果によって、少なくとも10の因子で活性を抑制する請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記物質は、マクロファージ分裂テストによって計測される少なくとも10個の因子によって腫瘍細胞系統のマクロファージ分裂を抑制することによって、異常な骨髄細胞の機能を抑制する請求項1に記載の方法。

【請求項4】 自己免疫疾患又は、アレルギー及び骨髄性白血病によって引き起こされる炎症から選択される病状を治療する請求項1乃至3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 前記物質は、マクロファージ食作用テストで計測される食作用の一時的な抑制によってマクロファージの機能を抑制する請求項1に記載の方法。

【請求項6】 遺伝子ターゲット治療の効率を向上させる請求項5に記載の方法。

【請求項7】 前記抗SIRP物質は、モノクローナル抗体のFabフラグメント及びそのようなフラグメントが意図したSIRP活性を保った状態で（生）化学的に修飾された生産物からなるグループから選択される請求項1乃至6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 前記抗SIRP物質は、モノクローナル抗体のFabフラグメントであるEB9又はED17、又はその前記修飾された生産物である請求項7に記載の方法。

【請求項9】 物質の使用方法であって、細胞外ドメインであるSIRPを特異的に認識（抗SIRP物質）して異常な骨髄細胞に機能を抑制する物質を、抗炎症及び抗腫瘍治療に用いる細胞機能抑制剤の製品として使用することを特徴とす

る使用方法。

【請求項10】 前記抗SIRP物質は、好ましくはED9又はEd17であるモノクローナル抗体のFabフラグメント、及び意図した抗SIRP活性が保たれた状態でそのようなフラグメントが(生)化学的に修飾された生産物からなるグループから選択される請求項9に記載の使用方法。

【請求項11】 薬剤として許容される担体及び、もし必要であれば、異常な骨髓細胞の機能を抑制する1又はそれ以上の抗SIRP物質であって、薬剤として許容される活性物質の補助物質が添加されて構成される請求項1乃至10のいずれか1項において使用される薬剤。

【請求項12】 抗SIRP物質が、好ましくはED9又はED17であるモノクローナル抗体のFabフラグメント、及び意図した抗SIRP活性が保たれた状態でそのようなフラグメント(生)が化学的に修飾された生産物からなるグループから選択される請求項11に記載の薬剤。

【請求項13】 異常な骨髓細胞の機能を抑制する抗SIRP物質であって、好ましくはED9又はED17であるモノクローナル抗体のFabフラグメント、及び意図した抗SIRP活性が保たれた状態でそのようなフラグメントが(生)化学的に修飾された生産物からなるグループから選択されることを特徴とする抗SIRP物質。

【請求項14】 異常な骨髓細胞の機能を抑制し、SIRと反応する物質を検出する方法であって、

1. 膜においてSIRPを発現する細胞系統を提供し、
2. 前炎症性サイトカインの生産を刺激し、
3. 前記刺激された細胞系統に関係した物質に接触し、
4. 炎症性の媒介物質の生産における変化を計測するステップからなることを特徴とする方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

本発明は、温血生物の体において、抗炎症及び抗腫瘍の治療に用いる細胞機能阻害方法に関する。本発明はさらに、上述の方法に用いる薬剤と、当該薬剤の活性物質とにも関する。

**【0002】**

温血生物の体における炎症は、特に人間においては、数々の疾患や障害の原因となり、生死を脅かすものとなる場合すらある。それで、炎症性疾患を処置する効果的治療方法を見出すことは、すでに何十年も臨床医の1つの主要な挑戦となっている。慢性関節リウマチ、多発性硬化症、糸球体腎炎、糖尿病及びぜんそくのような種々の炎症性の疾患は、不必要な免疫反応による結果である。たとえば、「免疫反応の操作」(「免疫生物学」第3版； C. A. ジェーンウェイ、P. トラヴァーズ； 出版 カレントバイオロジー/ガーランド/チャーチル リヴィングストン 1997； 13章)と題する最近の調査において示されるように、現在の免疫障害の処置は、ほとんどすべてが経験により数々の天然及び人工の化合物をスクリーニングすることによって同定された免疫抑制剤を使用することを原点としている。この調査によると、これらの薬剤は、3つの種類に分類することができるかもしれない。すなわち、コルチコステロイド系の薬剤、細胞増殖抑制剤、菌類及び細菌による誘導体である。この調査において、これらの薬剤の作用はすべて非常に広範であり免疫反応の防護機能を阻害すると同時に有害なものである。実際、理想的な免疫抑制剤は、細胞損傷に係る免疫反応の特異的部位をターゲットとする薬剤であろう。

**【0003】**

結果的にこの調査によると、抗体そのものが、それらのみごとな特異性ゆえに特異的な免疫反応を阻害する治療において最高の可能性を提供し得る。そのような免疫抑制モノクローナル抗体はターゲット細胞の機能を阻害する。それらの免疫抑制が見込まれる可能性はすでに確証されている。しかしながら、主に、正確なターゲットが同定されないという事実に基づいて、それらの抗体が抗炎症剤として広く一般に使用されることはないであろう。

## 【0004】

本発明の目的は、既存の抗炎症及び抗腫瘍の薬剤と比較して優れた治療的特性を有する薬剤を投与することにより、温血生物の体内における抗炎症又は抗腫瘍による治療用として、ターゲット細胞の機能を制御又は阻害する方法を提供することにある。そのような治療に使用される薬剤には、例えば、毒性が無いこと、ホストの抵抗における副作用が無いこと、非ターゲット組織及び器官に対する薬剤物質による負担を高度に選択的に避けることといった、様々な要求が課される。

## 【0005】

本発明によると、細胞外ドメインであるSIRP (=シグナル制御たんぱく質) (抗SIRP物質) を特異的に認識して、異常な脊髄細胞の機能を阻害する物質を、治療に効果的な量で、薬剤の構成として投与することからなる方法によって、上述に明示した目的を達成することができる。本発明の方法に基づく薬剤を用いることにより、高い選択性及び、特に自己免疫疾患やアレルギーや腫瘍といった炎症性疾患の処置において効果的な治療が達成される。

## 【0006】

よく知られる脊髄細胞の例はマクロファージであり、これは骨髄中の骨髄性前駆細胞を分離して成熟した集団から絶えず補充される。これによって体のすべての組織中のマクロファージについて持続的な有用性が確保され、感染した場合の速くて効果的な応答が可能となる。しかしながら、いくらかの状況においてマクロファージは益となる役割を演じるわけではなく、病状を引き起こし得る。慢性関節リウマチ、多発性硬化症、糸球体腎炎等のような自己免疫疾患、及びぜんそくのようなアレルギーの種類における炎症の誘導及び/又は持続に活性化したマクロファージが重要な役割を演じ、その結果、(一般に慢性の)臨床的症状の土台を形成する。加えて、いくらかの状況下においては、骨髄性前駆細胞は病状の原因となり得る、すなわち、それらの前駆細胞の無制限の増殖は、いくらかの悪性腫瘍、特に骨髄性白血病の原因となる。

## 【0007】

国際特許出願公開WO97/48723号は、とりわけ、病状又はシグナルト

ランスダクション (s . t . ) 経路における異常を有する有機体を扱う方法に関し、前記 s . t . 経路には、とりわけ S I R P ポリペプチドと天然の結合の組との間の相互関係を含み、前記相互関係 (請求項 25) の促進又は妨害するステップからなる。これはさらに詳細には W O 9 7 / 4 8 7 2 3 号の 3 7 頁の 5 - 2 7 頁で説明されている。S I R P 物質と天然の結合の組との間の相互関係、及びその相互関係による影響 (促進又は阻害) と因果的に結びつく本出願を基礎とする発明の方法に基づいて異常な脊髄細胞の機能の阻害することについては示されていない。

#### 【0008】

さらには、特に、本発明の方法において用いられる抗 S I R P 物質はマクロファージの機能を阻害する特徴があるが、マクロファージ活性テストと称される以下の各測定によると少なくとも 10 のファクターによってそれらの活性を抑制する。すなわち、酸化窒素 (NO) の生産量、活性酸素種、特に過酸化物 (例えば、 $H_2O_2$ ) の生産量、腫瘍ネクロシス因子 - アルファ (TNF) の生産量である。マクロファージ活性を測定する上述のテストは、後述の実施例 2 において詳細を示す。上述の 3 つのテストのすべてについて、本発明の方法にもとづいて用いられる物質は上述の顕著な効果を有する。したがって、これらのテストは本発明の範囲内において他の化合物から区別する便利な道具である。

#### 【0009】

シグナル制御たんぱく質 (S I R P) は、S . アダムス 他 イムノロジージャーナル 161 : 1853 - 1859 (1998) における最近の開示によると、膜間糖たんぱく質であって、チロシンキナーゼレセプターを通してシグナルを阻害するが、生理学的機能を有することについてはこの時点では知られていなかった。S I R P はマクロファージ、単球、顆粒球、及び樹状細胞、及びニューロンのような骨髄性細胞の表面上に選択的に表れる。本発明の方法によって用いられる活性物質は、例えば、ポリペプチド主鎖又は低分子量物質を有するたんぱく様物質のようないくつかの化合物であり得る。本発明によると、これらの物質は以下の条件を満たすべきである。すなわち、

(1) 上述のアダムス 他による発表に示される方法のテストに基づいて、(細

胞外ドメインである) S I R Pを特異的に認識し、さらに

(2) 上述の3つのテストに基づいてマクロファージ活性を抑制する。

【0010】

上述したように、骨髄性前駆細胞の機能は病状の原因となり得る、すなわち、骨髄前駆細胞の無制限の増殖又は分裂は骨髄性白血病、悪性腫瘍の原因となる。本発明の方法に基づいて用いられる上述の抗S I R P物質は、マクロファージ腫瘍細胞系統の分裂を強力に抑制することにより、異常な骨髄性細胞の機能をも阻害し得ることがわかっている。さらに具体的には、この細胞分裂の抑制は、マクロファージ分裂テスト(実施例2)と称される例証において、少なくとも10に達する因子によることもわかっている。したがって、効果的な量の当該抗S I R P物質からなる薬剤は、抗腫瘍治療において首尾よく用いられ、特に骨髄性白血病においては、細胞外ドメインであるS I R Pへのこれらの物質の選択的結合が効果的であり、骨髄性細胞分裂を選択的に制御するので有効である。

【0011】

骨髄性細胞の上述の機能は、特にマクロファージについては、活性及び分裂のみならず、食作用の現象をも含み、それは他の有機体又は他の粒子の取り込みである。例えば、遺伝子ターゲット抗腫瘍治療のような遺伝子ターゲット治療の場合、遺伝子を封入したベクター小片(運搬手段)は異なる細胞又は組織を標的とするが、マクロファージの食作用の潜在能力が、重要な遺伝子の効果的な運搬に対する主要な障壁となる。本発明の方法はそのような遺伝子ターゲット治療における用途についても考慮に入れられる。もし、これらの治療において上述の抗S I R P物質からなる薬剤が伴われる場合、マクロファージの食作用の一般経路が阻害される結果、一時的に食作用が阻害され、その結果としてそれらの治療における当該効力が顕著に向上する。この遺伝子ターゲット治療における固有の性質は、本発明にもとづく活性物質を非常に治療用に有用なものとするが、これは、実施例2におけるマクロファージ食作用テストと称される実験結果中から理解できる。

【0012】

さらに具体的には、本発明の方法にもとづいて使用される抗S I R P物質は、

好ましい具体例において、モノクローナル抗体のF a bフラグメント、及び抗S I R P活性が含まれるようにそのようなフラグメントを(生)化学的に修飾した物質からなるグループから選択されることが特徴となる場合がある。適切な実施例において、当該F a bフラグメントのそのような修飾物質は、NH - アシル化物質、遊離したメルカプトグループからなるS - Sを減少させた物質、等であり、意図した活性を含むように提供される。

#### 【0013】

モノクローナル抗体E D 9及びE D 17のF a bフラグメント、ならびにそれの上述の修飾物質は、本発明の治療方法を極めて保証するものであることがわかっており、これはヒトへの適応として数々の適切な細胞培養実験から結論し得ることである。これらの実験は添付の実施例において記述される。これらの実験の結果、抗S I R P物質は、本発明の方法に用いられるのに特に適する性質を有していることが明白である。

#### 【0014】

上述のモノクローナル抗体E D 9及びE D 17は、上述におけるアダムス 他の発表において、それらはラットS I R Pの選択的認識(抗S I R P活性)はもちろん、例えば、マクロファージのような骨髄性細胞によっても選択性を示すことを述べている。これらの著者達は、これらのモノクローナル抗体をマクロファージに結合させることは酸化窒素(NO)を誘導することを見出した。これは実に全く驚きであり、本発明の発明者達は、F a bフラグメントの同じモノクローナル抗体であるE D 9及びE D 17がマクロファージに結合した後、逆の効果、すなわち、酸化窒素の生産を抑制するというを示すことを発見した。これは、抗S I R P物質の本発明の意図した使用においてこの効果は正確に適切である。

#### 【0015】

本発明はさらに、上述で示されるように、抗炎症及び抗腫瘍治療において細胞機能を阻害するために用いられる薬剤にも関する。本発明の構成に基づいたそのような薬剤には、薬剤として許容される担体に加えて、もし望まれるならば、異常な骨髄性細胞の機能を阻害する抗S I R P物質の活性要素として一又はそれ以

上の薬剤として許容される補助物質を含む。固体又は液体の上述の担体、ならびに適切な補助物質は、薬学的に良く知られているものである。

#### 【0016】

好ましい具体例においては、本発明に基づく上述の薬剤は、モノクローナル抗体のFabフラグメントであって好ましくはED9又はED17と、意図した抗SIRP活性が保たれた状態でそのようなフラグメントを(生)化学的に修飾した物質とからなるグループから選択される抗SIRP物質で構成される。

#### 【0017】

さらには、本発明は、異常な骨髄性細胞の機能を阻害する抗SIRP物質にも関し、当該抗SIRP物質は、モノクローナル抗体のFabフラグメントであって、好ましくはED9又はED17と、意図した抗SIRP活性が保たれた状態でそのようなフラグメントを(生)化学的に修飾した物質とからなるグループから選択される。

#### 【0018】

最後に、本発明はSIRPと相互作用をして異常な骨髄性細胞の機能を阻害する物質を検出する方法にも関し、当該方法は、

1. 膜においてSIRPを発現する細胞系統を提供し、
2. 前炎症性サイトカインの生産を刺激し、
3. 当該刺激された細胞系統に関係した物質に接触し、
4. 炎症性の媒介物質の生産における変化を計測する

ステップから構成される。

#### 【0019】

当該テストにおける細胞系統は、好ましくはヒト由来である。SIRPは細胞系統で通常発現されるであろう。しかしながら、SIRPがコード化された遺伝子又はその細胞外ドメインのような一部の挿入によっても発現が達成されるに違いない。本方法においては、キメラたんぱく質を発現する細胞系統(例えば、ラット-ヒト、マウス-ヒト)が同様に用いられてもよい。炎症における媒介物質は、 $H_2O_2$ 、NO、例えばTNF-、IL-6、IL-8のような前炎症性

サイトカイン、又は前炎症性サイトカインの発現及び/又は分泌を生じさせる経路における中間体が知られている。スクリーニング方法において用いられる細胞系統はLFS又はIFN-gのようなマクロファージ活性化分子によって前炎症性サイトカインの生産を刺激され得る。

【0020】

本発明は、以下に特定する実施例を参照することでさらに詳細が示される。

【0021】

(実施例1)

ED9及びED17のFabフラグメントの準備。

【0022】

始めのED9及びED17のモノクローナル抗体についてはダモーゼオウ 他ルーコサイト バイオロジー ジャーナル 46:556-564(1989)及び49:434-441(1991)に示される。これらの抗体のFabフラグメントはパパイン-解離消化によって得られる。この目的において、パパイン溶液は、PBS緩衝液(PBS中に0.02M EDTA及び0.02M システインを含む)1mlあたり0.1mgのパパインを含み、PBS中には同量(1mg/ml)の抗体を溶質として添加される。この混合液は、37℃でインキュベートされ、一定時間の後、時系列を形成するように決定され、0.03Mのヨードアセトアミド溶液添加(110µlのインキュベートした混合液中に20µl 0.3M ヨードアセトアミドを添加)によって反応が止められる。この混合液はさらにpH8.0、0.4Nである2lのPBSに対して透析される。この溶液はプロテインAセファロースカラムでクロマトグラフィーにかけられ、減圧下で5mlに濃縮され、Superose 12カラムによってクロマトグラフィーにかけられる。50kDのフラクションが回収され、非還元SDS-PAGE<sup>®</sup>で純度が制御される。ED9及びED17のFabフラグメント溶液はこのようにして得られ、実施例2において示されるような細胞培養実験において用いられる。

【0023】

(実施例2)

## 細胞培養実験

### マクロファージ活性テスト

腹腔内洗浄によって得られたラットの腹腔内マクロファージであるラットマクロファージ細胞系統NR8383 (アダムス 他 1998) が、2%仔牛血清及び2mMグルタミン、100U/mlペニシリン及び100 $\mu$ g/mlストレプトマイシンを含むRPMI-1640培地 $0.25 \times 10^6$ 細胞数/mlの濃度で培養される。マクロファージの活性刺激物(100ng/mlのリポポリサッカライド(LPS)、又は20U/mlのガンマ-インターフェロン(INF-g))は、抗SIRP Fabフラグメント(ED9又はED17; 40 $\mu$ g)又はコントロールFabフラグメント(OX41、アダムス 他 1998; 40 $\mu$ g/ml)の存在下(又は非存在下)で添加される。18~20時間の細胞培養後、上澄み(500gで7分の遠心分離によって細胞から分離される)が回収される。上澄み中のNO生産物は、グリース試薬(ディング 他(1998)、イムノロジージャーナル 141:2407)を用いて測定され $\text{NaNO}_2$ を用いて検量線が作成される。TNF、IL1及びIL6は、述べられている(ピンセント 他(1996)、グリア 17:94;ランクゾウスキ 他(1997)、フィジオロジーアメリカンジャーナル 273:R1870)酵素結合性免疫吸着アッセイによって計測される。この結果は、図1の表に示される。

### 【0024】

### マクロファージ食作用テスト

$0.5 \times 10^6$ のラット腹腔内マクロファージは、10%仔牛血清及び2mMグルタミン、100U/mlペニシリン及び100 $\mu$ g/mlストレプトマイシンを含むRPMI-1640培地で、24穴細胞培養プレートの個々において培養され、1~1.5時間、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>の環境下で付着させる。この後、細胞は2xで洗浄され、0.5ml HEPES(25mM)-2 $\mu$ g 酸化LDL(低密度リポタンパク質)、2 $\mu$ g アセチル化LDL(両方:FITCラベルした;分子プローブ)、1 $\mu$ gラテックスビーズ(FITCラベルした;分子プローブ)、2 $\mu$ gザイモサン処理した血清(FITCラベルした)、又は5

%の新鮮なラット血清を加えたラットミエリン(DiIラベルした)を含むRPMI緩衝液でインキュベートされる。これらのインキュベーションは、抗SIRP Fabフラグメント(ED9又はED17; 40 µg/ml)又はコントロールFabフラグメント(OX41; 40 µg/ml)の存在下で行われる。1.5時間後、細胞は洗浄され、結合しない粒子が除去され、細胞は5 mM EDTAを含むPBSによるインキュベーションによって遊離され、FACSscanで個々の細胞の蛍光強度の平均が計測される。値は食作用コントロールの百分率としてプロットされ、図2に示される。FITC及びDiIは蛍光色素であって、当該技術分野で良く知られているものである。

#### 【0025】

##### マクロファージ分裂テスト

ラットのマクロファージ細胞系統NR8383(アダムス 他 1998)が、2%仔牛血清及び2 mMグルタミン、100 U/mlペニシリン及び100 µg/mlストレプトマイシンを含むRPMI-1640培地で、96穴細胞培養プレート中で、 $0.25 \times 10^6$ 細胞数/mlの濃度で培養される。これは、抗SIRP Fabフラグメント(ED9又はED17; 40 µg/ml)又はFabフラグメント(OX41; 40 µg/ml)の存在下(又は非存在下)で行われる。24時間後、 $^3\text{H}$ -チミジン(1 µCi/穴)が添加され、さらに6時間インキュベートされる。細胞は細胞回収器を用いて回収され、細胞に取り込まれた放射能はマイクロプレートリーダーによって確認される。この平均結果については下記の表1に示される。

#### 【0026】

【表1】 骨髄NR8383細胞分裂の抗SIRP Fabフラグメント(ED17)による阻害。

処理	平均値(c.p.m)	SD(標準偏差)
コントロール	132783	2730
ED17 Fab	6845	197
OX41 Fab	154889	8528

結果

上記のすべての実験において、ED9 FabとED17 Fabとを互いに比較することができるので、記載されている結果は1つの活性物質が限定される。ED9及びED17 Fabフラグメントの効果を評価するために、ヒトの骨髓細胞及び/又は炎症性の細胞について予測できるように細胞培養実験は動物細胞を用いて行われる。マクロファージ活性テスト(図1)においては、炎症媒介物質である活性酸素種(ROSとして $H_2O_2$ )、酸化窒素(NO)及び前炎症性サイトカインTNFの生産物に対する効果について調べられる。ED9 FabはROS、NO及びTNFの生産物を強く抑制(図面にはない)するのに対して、関係のないOX41 Fabフラグメントにはその効果が無いことが見てとれる。腹腔内マクロファージの食作用に対するED9及びED17 Fabフラグメントの効果を評価して分析することはマクロファージ食作用テストにおいて示される。見てとれるように(図2)、ED17 Fabは、ミエリン+血清、ジモサン処理された血清、ラテックスビーズ及び、酸化又はアセチル化された低密度リポ蛋白質を含む様々な粒子の食作用を強く抑制する。コントロールのOX41 Fabフラグメントにはそのような効果はまた見られない。骨髓細胞分裂に対するED9又はED17の効果についての試験においては、NR8383細胞が分析され、マクロファージ分裂テストにおいて示される。表1に示されるように、ED17は分裂を強力に阻害するのに対して(チミジンの取り込みによって分析)、OX41 Fabにおいては限られた効果しか有さない。

#### 【0027】

##### 考察及び結果

総合すると、これらの結果は抗体ED9又はED17のFabフラグメントは、重複するSIRP(アダムス 他 1998)の抗原決定基に対して方向付けられ、活性と、マクロファージの食作用と、骨髓細胞の細胞分裂とを抑制する可能性がある。他の抗体のFabフラグメントについては、異なったSIRP抗原決定基(OX41)に対して方向づけられるような、このような効果は見られない。これらの性質によってSIRPの細胞外ドメインは(1)抗炎症治療及び(2)骨髓性白血病の抗腫瘍治療におけるターゲットとされる。加えて、(3)SIRPライゲーションを介した一時的な食作用の抑制によって、遺伝子治

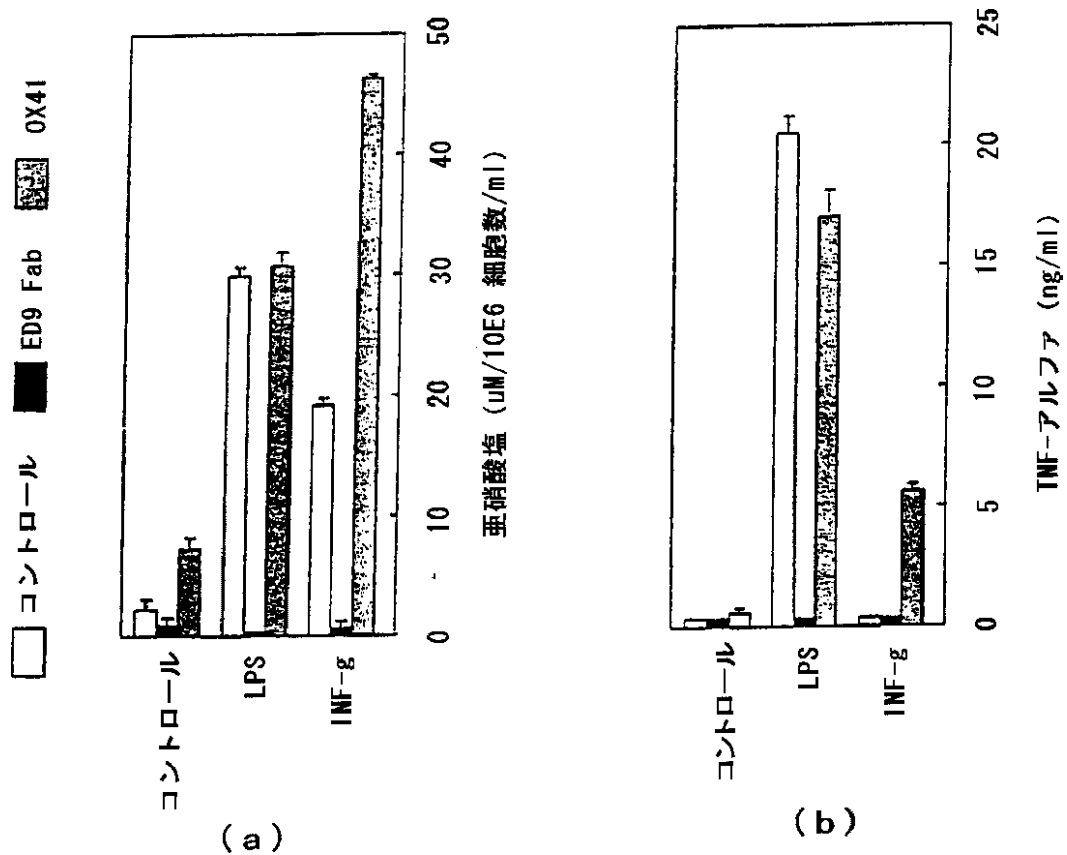
療における効率の向上を助けることができる。

【図面の簡単な説明】

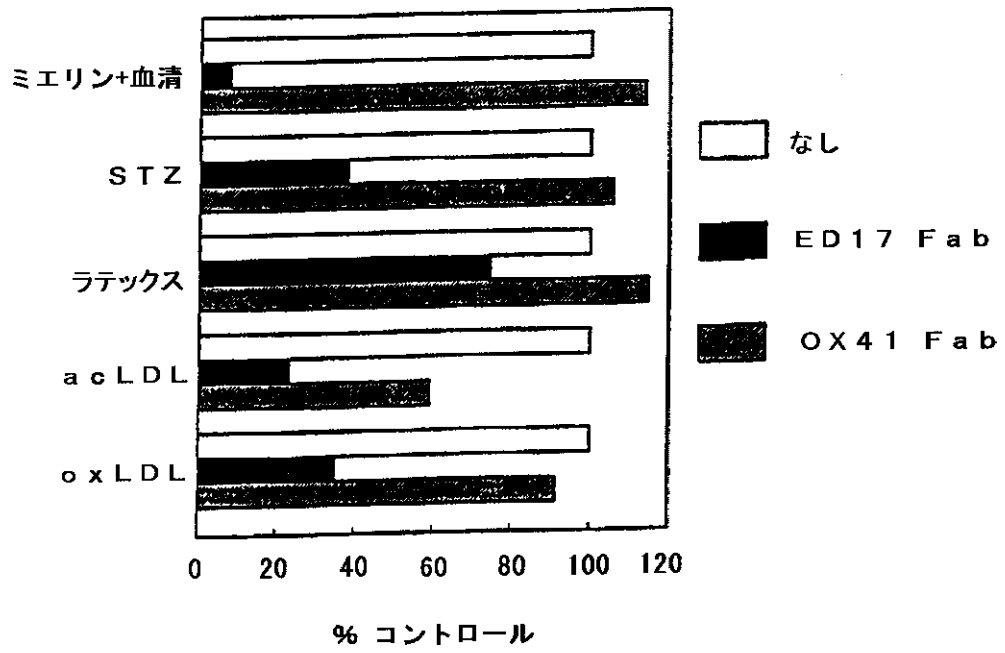
【図1】 NR8383マクロファージ中でLPS(100ng/ml)又はINF-(20U/ml)によって誘導された抗SIRP Fabフラグメント(ED9)による、(a)NO及び(b)TNFの生産物の阻害。

【図2】 ミエリン+血清、ジモサン処理された血清、ラテックスビーズ、及び、酸化又はアセチル化された低密度リポ蛋白質を含む様々な粒子の腹腔内マクロファージによる食作用の抗SIRP Fabフラグメント(ED17)による阻害。

【図1】



【図2】



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年5月2日(2001.5.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 温血生物の体内において、抗炎症の治療及び骨髄性白血病の処置に用いる細胞機能抑制方法であって、

細胞外ドメインであるSIRPを特異的に認識(抗SIRP物質)して、異常な骨髄細胞の機能を抑制する物質で構成される薬剤を、前記治療に効果的な量で前記生物に投与し、前記抗SIRP物質は、モノクローナル抗体のFabフラグメント、及び意図した抗SIRP活性が保たれた状態でそのようなフラグメントが(生)化学的に修飾された生産物からなるグループから選択されることを特徴とする細胞機能抑制方法。

【請求項2】 自己免疫疾患又はアレルギーによって引き起こされる炎症から選択される病状を治療する請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記物質が、マクロファージ食作用テストで計測される、一時的な食作用の抑制によってマクロファージの機能を抑制して、遺伝子ターゲット治療の効率を向上させる請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記抗SIRP物質が、モノクローナル抗体のFabフラグメントであるED9又はED17、又はその前記修飾された生産物である請求項1及び3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 物質の使用方法であって、細胞外ドメインであるSIRPを特異的に認識(抗SIRP物質)して異常な骨髄細胞の機能を抑制する物質を、抗炎症及び抗腫瘍の治療に用いる細胞機能抑制剤の製品として使用し、前記抗SIRP物質は、好ましくはED9又はED17であるモノクローナル抗体のFabフラグメント、及び意図した抗SIRP活性が保たれた状態でそのよ

うなフラグメントが(生)化学的に修飾された生産物からなるグループから選択されることを特徴とする使用方法。

【請求項6】 請求項1乃至5のいずれか1項で使用される薬剤であって、  
薬剤として許容される担体及び、もし必要であれば、異常な骨髄細胞の機能を抑制する抗SIRP物質の活性物質として、薬剤として許容される1又はそれ以上の補助物質が添加され、  
前記抗SIRP物質は、好ましくはED9又はED17であるモノクローナル抗体のFabフラグメント、及び意図した抗SIRP活性が保たれた状態でそのようなフラグメントが(生)化学的に修飾された生産物からなるグループから選択されることを特徴とする薬剤。

【請求項7】 好ましくはED9又はED17であるモノクローナル抗体のFabフラグメント、及び意図した抗SIRP活性が保たれた状態でそのようなフラグメントが(生)化学的に修飾された生産物からなるグループから選択されることを特徴とする、異常な骨髄細胞機能を抑制する抗SIRP物質。

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.  
 PCT/EP 00/04388

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC 7	A61K39/395	C07K16/28 A61P35/00 A61P29/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 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, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 99 40940 A (SARFATI MARIE) 19 August 1999 (1999-08-19) page 2, line 10 - line 11 page 3, line 20 - line 29 page 4, line 4 - line 28 page 9, line 20 - line 22 page 11, line 4 - line 7 page 13, line 11 - line 28 page 13, line 11; claims 1-12	1-6, 9, 11, 14
X	WO 97 48723 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 24 December 1997 (1997-12-24) page 13, line 11; claim 25 page 37, line 5 - line 27	11
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt 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		Date of mailing of the international search report
26 September 2000		04/10/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Fernandez y Branias,F

2

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 00/04388

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ADAMS S ET AL: "Signal-regulatory protein is selectively expressed by myeloid and neuronal cells" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (15 AUG 1998) VOL. 161, NO. 4, PP. 1853-1859., XP002117547 cited in the application the whole document	1-14
A	VEILLETTE A. ET AL: "High expression of inhibitory receptor SHPS-1 and its association with protein-tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 35, - 1998 pages 22719-22728, XP002117548 the whole document	1-14
A	ADAMS, SUSAN (I) ET AL: "Signal regulatory protein (SIRP): A novel macrophage signalling receptor." IMMUNOLOGY, (DEC., 1998) VOL. 95, NO. SUPPL. 1, PP. 48. MEETING INFO.: 6TH ANNUAL CONGRESS OF THE BRITISH SOCIETY FOR IMMUNOLOGY HARROGATE, ENGLAND, UK DECEMBER 1-4, 1998, XP002117549 abstract	1-14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 00/04388

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 9940940 A	19-08-1999	AU 2508499 A	30-08-1999
W0 9748723 A	24-12-1997	AU 3457497 A	07-01-1998
		CA 2259122 A	24-12-1997
		EP 0914452 A	12-05-1999
		US 6004791 A	21-12-1999

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト <sup>7</sup> (参考)	
A 6 1 P	37/08	A 6 1 P	37/08	
C 1 2 Q	1/02	C 1 2 Q	1/02	
G 0 1 N	33/15	G 0 1 N	33/15	Z
	33/50		33/50	Z
	33/53		33/53	D
	33/577		33/577	B

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ダイクストラ クリスティアン ディエドライク  
オランダ国 1081 ベ-テ-アムステルダム ファン デル プホ-ストストラ-ト 7

Fターム(参考) 2G045 AA40 CA11 CB01 DA36 DA77  
DA78 FB03  
4B063 QA05 QQ08 QQ13 QQ20 QQ89  
QR48 QR77 QR80 QS28  
4C084 AA17 ZB071 ZB111 ZB131  
ZB212 ZB261  
4C085 AA14 BB11 BB41 DD63 EE01

专利名称(译)	抑制细胞功能以治疗抗炎和抗肿瘤的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002543153A</a>	公开(公告)日	2002-12-17
申请号	JP2000615043	申请日	2000-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	文件病历伊藤德尔亨过扫描的歌声洒满面包车统一费尔迪泰特		
申请(专利权)人(译)	Fakaruteito德尔Henesukante胡安德穿插统一费尔迪泰特		
[标]发明人	ファンデンベルグティモカース ダイクストラクリスティアンディエドライク		
发明人	ファン デン ベルグ ティモ カース ダイクストラ クリスティアン ディエドライク		
IPC分类号	G01N33/50 A61K39/395 A61K45/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K16/18 C07K16/28 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P29/00 C07K16/18 C07K2317/55 C07K2317/77		
FI分类号	A61K45/00 A61K39/395.N A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/577.B		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CA11 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/DA78 2G045/FB03 4B063/QA05 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ20 4B063/QQ89 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS28 4C084/AA17 4C084/ZB071 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZB212 4C084/ZB261 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/BB41 4C085/DD63 4C085/EE01		
优先权	1999201350 1999-04-28 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明是用于抑制温血生物体内的抗炎和抗肿瘤的细胞功能的方法，其中异常脊髓细胞通过特异性识别胞外域SIRP（抗SIRP物质）而起作用。包括向生物体施用包含抑制物质的药物 本发明还涉及上述方法中使用的药物和该药物的活性物质。

