

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年8月7日 (07.08.2008)

PCT

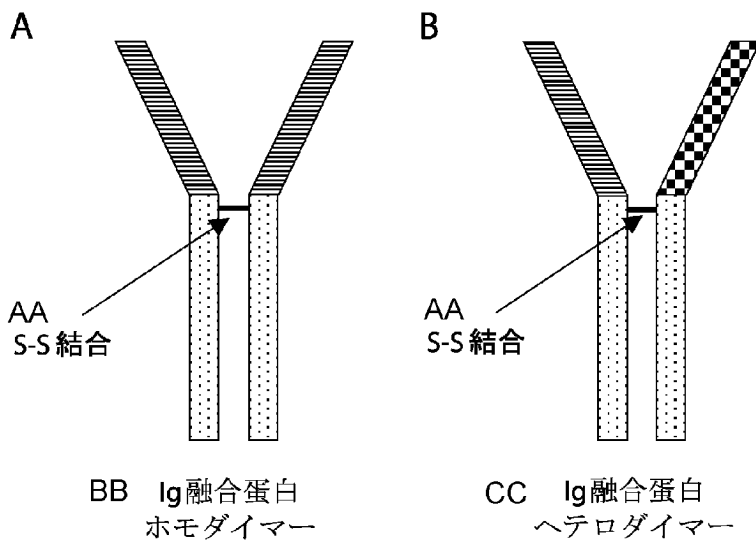
(10) 国際公開番号
WO 2008/093756 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 19/00 (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) *C07K 14/715* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/051457
- (22) 国際出願日: 2008年1月30日 (30.01.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願2007-018681 2007年1月30日 (30.01.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立
 大学法人新潟大学 (NIIGATA UNIVERSITY) [JP/JP];
 〒9502181 新潟県新潟市五十嵐二の町 8 0 5 0 番地
 Niigata (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 埴 晴雄
 (HANAWA, Haruo) [JP/JP]; 〒9518520 新潟県新潟市
 中央区旭町通 1 番町 7 5 4 番地 新潟大学医歯学総
 合研究科内 Niigata (JP).
- (74) 代理人: 牛木 護 (USHIKI, Mamoru); 〒1050001 東京
 都港区虎ノ門一丁目 1 4 番 1 号 郵政福祉琴平ビル
 3 階 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: BIOLOGICAL PREPARATION

(54) 発明の名称: 生物学的製剤



AA... S-S BOND

BB... Ig-FUSED PROTEIN HOMODIMER

CC... Ig-FUSED PROTEIN HETERODIMER

(57) Abstract: It is intended to develop a heterodimer by which a complex of receptor and/or ligand-binding proteins of different molecular species with a ligand can be formed. A heterodimer consisting of a first subunit containing the extracellular domain of the IL-1 receptor type II and a first chemical part and a second subunit containing the extracellular domain of IL-1 receptor accessory protein and a second chemical part, wherein the first chemical part and the second chemical part make the first subunit and the second subunit to associate together to thereby form a complex capable of binding to an IL-1 ligand, is provided. The above-described heterodimer contains a polypeptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:34 or 37, etc. and another polypeptide having an amino acid sequence represented by any of SEQ ID NOS:43 to 47 and the above-described IL-1 receptor accessory protein Ig-fused protein is characterized by containing a polypeptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:35 or 38, etc. and another polypeptide

having an amino acid sequence represented by any of SEQ ID NOS:43 to 47, etc. in some cases.

(57) 要約: 異なる分子種の受容体及び/又はリガンド結合蛋白と、リガンドとの複合体が形成できるようなヘテロダイマーを開発すること。本発明は、IL-1受容体タイプIIの細胞外ドメインと第1化学的部分とを含む第1サブユニットと、IL-1受容体アクセソリー蛋白の細胞外ドメインと第2化学的部分とを含む第2サブユニットとからなり、第1化学的部分と第2化学的部分とは、第1サブユニットと第2サブユニット

[続葉有]

WO 2008/093756 A1



- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,

KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

トとを会合させて、I L-1リガンドに結合可能な複合体を形成させる、ヘテロダイマーを提供する。本発明のヘテロダイマーは、配列番号34又は37に列挙されるアミノ酸配列のポリペプチド等と、配列番号43ないし47のいずれかに列挙されるアミノ酸配列のポリペプチド等を含み、前記I L-1受容体アクセソリープロテインI g融合蛋白は、配列番号35又は38に列挙されるアミノ酸配列のポリペプチド等と、配列番号43ないし47のいずれかに列挙されるアミノ酸配列のポリペプチド等を含むことを特徴とする場合がある。

明 細 書

生物学的製剤

技術分野

[0001] 本発明は、生物学的製剤、特に、リガンド抑制作用を有する受容体-Ig融合蛋白ヘテロダイマーを有効成分として含む生物学的製剤に関する。

背景技術

[0002] Ig融合蛋白ホモダイマーの構造(図1A)をとる薬は、TNF受容体Ig融合蛋白ホモダイマーであるエタネルセプト(非特許文献1)、CTLA-4Ig(非特許文献2)、LFA3Ig(非特許文献3)など、いくつか考案され、実用化されているものもある。これらの薬のように、免疫関連蛋白(サイトカインや増殖因子など)の機能を抑制したり促進したりする薬は、さまざまな病気の治療薬になる可能性があり、その適応症となる疾患は今後さらに広がる可能性がある。

非特許文献1:A. F. Suffredini, D. Reda, S. M. Banks, M. Tropea, J. M. Agosti, and R. Miller, Effects of recombinant dimeric TNF receptor on human inflammatory responses following intravenous endotoxin administration, J Immunol.155 (1995)5038-5045.

非特許文献2:D. J. Lenschow, Y. Zeng, J. R. Thistlethwaite, A. Montag, W.Brady, M. G. Gibson, P. S. Linsley, and J. A. Bluestone, Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg, Science.257 (1992)789-792.

非特許文献3:G. R. Majeau, W. Meier, B. Jimmo, D. Kioussis, and P. S. Hochman, Mechanism of lymphocyte function-associated molecule 3-Ig fusion proteins inhibition of T cell responses. Structure/function analysis in vitro and in human CD2 transgenic mice, J Immunol.152 (1994)2753-2767.

[0003] しかし、その効果の程度と薬の種類には限界があり、今後新たな薬の開発が期待されている。

[0004] 本発明者らも、疾患動物モデルを用いた実験で、いくつかの免疫関連蛋白と免疫グロブリン(Ig)との融合蛋白ホモダイマーの構造をとる蛋白の治療実験を行ってきた

。その中で、CTLA-4Ig、IL-13Ig、IL-22Igなどいくつかの蛋白が心筋炎ラットに効果があると報告してきた。しかし、より多彩で、より強力な効果を持つ治療薬が開発されるべきではないかと考えた。さまざまな病態形成に大きく関わるサイトカインや増殖因子に対する強力な阻害薬が開発できれば、さまざまな治療薬が期待できる。

[0005] サイトカインや増殖因子を阻害するには、前述したTNF受容体Ig融合蛋白ホモダイマーであるエタネルセプトのように、受容体とIgとの融合蛋白が効果的なことがある。その原因の1つは、IgがFcRn受容体と結合することにより血液中での半減期が長くなることであると考えられる。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 一方、サイトカインや増殖因子の受容体にはサイトカインや増殖因子のリガンドの存在下でリガンドと高親和性のヘテロダイマー受容体との複合体を形成する場合がある。このような複合体は、より多彩で、より強力な効果を持つ、リガンド抑制作用を有することが期待される。そこで、異なる分子種の受容体及び／又はリガンド結合蛋白と、リガンドとの複合体が形成できるようなヘテロダイマーを開発する必要がある。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明は、IL-1受容体タイプII蛋白の細胞外ドメインと第1化学的部分(chemical moiety)とを含む第1サブユニットと、IL-1受容体アクセソリープロテインの細胞外ドメインと第2化学的部分とを含む第2サブユニットとからなり、第1化学的部分と第2化学的部分とは、第1サブユニットと第2サブユニットとを会合させて、IL-1リガンドに結合可能な複合体を形成させる、ヘテロダイマーを提供する。

[0008] 本発明のヘテロダイマーにおいて、前記IL-1受容体タイプII蛋白の細胞外ドメインは、配列番号34又は37に列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号34又は37に列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、IL-1リガンドと結合するポリペプチドかからなり、前記IL-1受容体アクセソリープロテインの細胞外ドメインは、配列番号35又は38に列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号35又は38に列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペ

プチドであって、IL-1リガンドと結合するポリペプチドかからなる場合がある。

- [0009] 本発明のヘテロダイマーにおいて、第1及び第2化学的部分のうち少なくとも1つはポリヌクレオチド又はポリペプチドの場合がある。
- [0010] 本発明のヘテロダイマーにおいて、第1及び第2化学的部分は、ともに免疫グロブリン重鎖のヒンジ領域を含む場合がある。
- [0011] 本発明のヘテロダイマーにおいて、第1及び第2化学的部分は、配列番号43ないし47のいずれかに列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号43ないし47のいずれかに列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、ヒンジ機能を有するポリペプチドかを含む場合がある。
- [0012] 本発明のヘテロダイマーにおいて、第1化学的部分は、配列番号48ないし52のいずれかに列挙されるアミノ酸配列と、配列番号53ないし57のいずれかに列挙されるアミノ酸配列とを有するポリペプチドか、配列番号48ないし52のいずれかに列挙されるアミノ酸配列と、配列番号53ないし57のいずれかに列挙されるアミノ酸配列とに対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、FcRn受容体と結合するポリペプチドかを含む場合がある。
- [0013] 本発明のヘテロダイマーにおいて、第2化学的部分は、配列番号48ないし52のいずれかに列挙されるアミノ酸配列と、配列番号53ないし57のいずれかに列挙されるアミノ酸配列とを有するポリペプチドか、配列番号48ないし52のいずれかに列挙されるアミノ酸配列と、配列番号53ないし57のいずれかに列挙されるアミノ酸配列とに対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、FcRn受容体と結合するポリペプチドかを含む場合がある。
- [0014] 本発明のヘテロダイマーにおいて、第1サブユニットは、配列番号34又は37に列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号34又は37に列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、IL-1リガンドと結合するポリペプチドかと、配列番号36、39、40、41又は42のいずれかに列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号36、39、40、41又は42のいずれかに列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又

は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、ヒンジ機能を有し、かつ、FcRn受容体と結合するポリペプチドかを含み、第2サブユニットは、配列番号35又は38に列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号35又は38に列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、IL-1リガンドと結合するポリペプチドか、配列番号36、39、40、41又は42のいずれかに列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号36、39、40、41又は42のいずれかに列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、ヒンジ機能を有し、かつ、FcRn受容体と結合するポリペプチドかを含む場合がある。

[0015] 本発明のヘテロダイマーにおいて、第1及び／又は第2サブユニットは特異的結合タグを含む場合がある。

[0016] 本発明のヘテロダイマーにおいて、前記特異的結合タグは、配列番号1ないし3のいずれかのアミノ酸配列からなる場合がある。

[0017] 本発明のヘテロダイマーにおいて、第1サブユニットは、配列番号25、27又は28に列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドであり、第2サブユニットは、配列番号26又は29に列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドである場合がある。

[0018] 本発明は、前記本発明のヘテロダイマーを有効成分とすることを特徴とする医薬品組成物を提供する。

[0019] 本発明の医薬品組成物は自己免疫疾患の治療薬の場合がある。

[0020] 本発明の医薬品組成物において、前記自己免疫疾患は膠原病の場合がある。

[0021] 本発明の医薬品組成物において、前記膠原病は、関節リウマチ及び／又は全身性エリテマトーデス及び／又は全身性強皮症の場合がある。

[0022] 本発明は、本発明のヘテロダイマーを生産するためのキットを提供する。前記キットは、第1サブユニットをコード化するポリヌクレオチドを含む発現ベクターと、第2サブユニットをコード化するポリヌクレオチドとを含む発現ベクターとを含む。第1サブユニットは、配列番号34又は37に列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号34又は37に列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、IL-1リガンドと結合するポリペプチドか、

配列番号43ないし47のいずれかに列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号43ないし47のいずれかに列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、ヒンジ機能を有するポリペプチドかを含む。第2サブユニットは、配列番号35又は38に列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号35又は38に列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、IL-1リガンドと結合するポリペプチドか、配列番号43ないし47のいずれかに列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号43ないし47のいずれかに列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、ヒンジ機能を有するポリペプチドかを含む。

[0023] 本明細書で用いられるところの「ヘテロダイマー」とは、相異なる2個のサブユニットが会合した分子集合体をいう。本発明のヘテロダイマーはIL-1リガンドに結合することができる。

[0024] 本明細書で用いられるところの「サブユニット」とは、本発明のヘテロダイマーの構成要素であって、ポリペプチドと、該ポリペプチドに連結した化学的部分(chemical moiety)とからなる。

[0025] 本明細書で用いられるところの「化学的部分(chemical moiety)」とは、ポリペプチド、ポリヌクレオチドの他、糖、脂質、その他の化合物を含む。本発明の化学的部分は、2つのサブユニットを特異的に会合させることができるいずれかの化学物質であって、それぞれのサブユニットに共有結合により連結される化学物質をいう。

[0026] 本明細書で用いられるところの「蛋白質」、「蛋白」又は「ポリペプチド」とは、2個以上のアミノ酸がペプチド結合で連結した化合物をいう。前記「ヘテロダイマー」、「サブユニット」、「蛋白質」、「蛋白」又は「ポリペプチド」は、メチル基、チオール基、リン酸、糖鎖、及び/又は、その他の共有結合による修飾を含む場合がある。

[0027] 本明細書で用いられるところの「サブユニット」とは、本発明のヘテロダイマーの構成要素となるポリペプチドをいう。本発明の第1及び第2サブユニットは、それぞれ、第1及び第2化学的部分を含む。第1サブユニットと第2サブユニットとは、第1サブユニットに含まれる第1化学的部分と第2サブユニットに含まれる第2化学的部分との間

の相互作用によって会合することができる。会合した第1サブユニット及び第2サブユニットが本発明のヘテロダイマーを構成する。本発明の第1サブユニットは、インターロイキン-1受容体タイプII(IL-1RII)の細胞外ドメインか、その誘導体又は変異体かの蛋白を含み、インターロイキン-1リガンドのいずれかと結合することができる。本発明の第2サブユニットは、インターロイキン-1受容体アクセソリープロテイン(IL-1RAcP)の細胞外ドメインか、その誘導体又は変異体かの蛋白を含み、インターロイキン-1リガンドのいずれかと結合することができる。

[0028] 本発明の第1及び第2化学的部分が、ポリペプチドの場合には、例えば、免疫グロブリン重鎖のヒンジ領域の他、ロイシンジッパー領域、Znフィンガー領域を含むがこれらに限定されない同一ポリペプチド同士で会合するものがある。また、相異なる2種類のポリペプチドの間で会合するものには、例えば、細菌Staphylococcus aureus菌由来のプロテインAと免疫グロブリン重鎖Fc領域との組合せが代表的であるが、酵母菌その他におけるtwo-hybrid systemによってスクリーニングすることができる。また、Swiss Institute of Bioinformaticsが運営するインターネット上のExpASy Proteomics Server(<http://kr.expasy.org/>)で公開されるデータベースで検索することができる。第1及び第2化学的部分がポリヌクレオチドの場合には、塩基配列の相補性に基づいて2重らせん構造を形成することにより、第1及び第2サブユニットを会合させることができる。また、第1及び第2化学的部分のうち一方がポリヌクレオチドで、他方が、該ポリヌクレオチドと特異的に結合するポリペプチドの場合や、一方が糖鎖で、他方が、該糖鎖を認識するレクチン蛋白質の全部又は一部の場合がある。さらに、第1及び第2化学的部分のうち一方が酵素基質又はその誘導体で特異的な阻害物質であって、他方が当該酵素又はその活性中心を含む部分の場合がある。さらに、第1及び第2化学的部分のうち一方がビオチンで、他方がアビジンの全部又は一部の場合がある。第1及び第2化学的部分には、サブユニットの会合に影響を与えないか、あるいは、IL-1リガンドとの複合体形成に有利なようにサブユニットの立体的な配向の自由度を与えるためのリンカーを含む場合がある。

[0029] 本明細書で用いられるところの「融合蛋白」とは、複数の遺伝子に由来する蛋白の全部又は一部が連結した1本のポリペプチドをいう。例えば、本明細書で用いられる

ところの「IL-1受容体タイプII Ig融合蛋白」とは、インターロイキン-1受容体タイプII(IL-1RII)の細胞外ドメイン等に加えて、免疫グロブリン重鎖の少なくともヒンジ領域を更に含む第1サブユニットをいう。本明細書で用いられるところの「IL-1受容体アクセソリープロテインIg融合蛋白」とは、インターロイキン-1受容体アクセソリープロテインの細胞外ドメイン等に加えて、免疫グロブリン重鎖の少なくともヒンジ領域を更に含む第2サブユニットをいう。前記免疫グロブリン重鎖は、ヒンジ領域に加えて、重鎖定常ドメイン(CH)のうち、CH2及び/又はCH3ドメインをさらに含む場合がある。

[0030] 本発明で用いられるところの「IL-1受容体タイプII Ig融合蛋白」及び「IL-1受容体アクセソリープロテインIg融合蛋白」は、同じ動物種のIL-1受容体タイプIIを含む融合蛋白と、IL-1受容体アクセソリープロテインを含む融合蛋白とのヘテロダイマーの場合もあるが、異なる動物種のIL-1受容体タイプIIを含む融合蛋白と、IL-1受容体アクセソリープロテインを含む融合蛋白とのヘテロダイマーの場合もある。本発明の融合蛋白に含まれる免疫グロブリン重鎖由来の部分は全て同じ動物種及び/又は同じアイソタイプに属する場合もあるが、異なる動物種及び/又は異なるアイソタイプに属する場合もある。本発明のヘテロダイマーは、異なる動物種及び/又は異なるアイソタイプ由来の免疫グロブリンの相同性の高い部分でキメラ状に連結したポリペプチドを含む場合がある。

[0031] 本明細書で用いられるところの「第1化学的部分」及び「第2化学的部分」は、融合蛋白に連結された状態で相互作用して、第1化学的部分を含む融合蛋白である第1サブユニットと、第2化学的部分を含む融合蛋白である第2サブユニットとを会合させる。第1化学的部分と第2化学的部分とは、さまざまな蛋白質に由来するポリペプチドの場合がある。

[0032] 本明細書で用いられるところの「ヒンジ機能」とは、免疫グロブリンのヒンジ領域が関与する機能のうち、2本のポリペプチドを会合させる機能をいう。本発明のヒンジ機能は、非還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により2本のポリペプチドが会合した2量体が検出されるかどうかにより決定することができる。

[0033] 本明細書で用いられるところの「FcRn受容体」とは、抗体Fc領域と結合する細胞

表面受容体であって、新生児型(neonatal)のものをいう。FcRn受容体は、弱酸性で最も抗体との親和性が高く中性及びアルカリ性では抗体の親和性が低い特徴があり、細胞内に取り込まれた抗体が酸性のリソソームでの分解を免れて血液循環にリサイクルされる機構に参与する。本発明においてFcRn受容体との結合は、表面プラズモン共鳴法のプローブ表面に不動化させた本発明のヘテロダイマーに含まれる免疫グロブリン部分が、pH6.0では同種のFcRn受容体蛋白質の可溶性断片と結合するが、pH7.4では結合しないかどうかによって決定することができる。

[0034] 本明細書で用いられるところの「IL-1リガンド」とは、IL-1アルファ、IL-1ベータ、IL-1受容体アンタゴニスト(IL-1Ra)と、これらの前駆体及び／又は誘導体とを含むが、これらに限定されない、多機能性の向炎症性サイトカインであるインターロイキン-1ファミリーのリガンドであって、配列番号16又は19に列挙されるラット又はヒトのIL-1受容体タイプIIか、配列番号17又は20に列挙されるラット又はヒトのIL-1受容体アクセソリープロテインかと結合することができる可溶性蛋白質をいう。本発明のIL-1リガンドは、ヒト及びラットを含むがこれらに限定されない哺乳類に由来する場合がある。

[0035] 本明細書で用いられるところの「IL-1受容体タイプII」とは、前記IL-1リガンドと結合できるIL-1受容体ファミリーのメンバーの受容体である。IL-1受容体タイプIIは、IL-1ベータとの結合親和性がIL-1アルファ又はIL-1Raとの結合親和性より高く、細胞内ドメインが、ヒトで29個のアミノ酸残基、ラットで35個のアミノ酸残基からなり、GTPase様配列がなく、IL-1リガンドが細胞外ドメインに結合しても細胞内へのシグナル伝達が起こらない点でIL-1受容体タイプIと異なる。本発明のIL-1受容体タイプIIは、配列番号30又は32に列挙されるラット又はヒトのIL-1受容体タイプII(シグナルペプチドを除く成熟膜蛋白)か、配列番号34又は37に列挙されるラット又はヒトIL-1受容体タイプIIの細胞外ドメインかを含むがこれらに限定されない、哺乳類の膜蛋白又はその可溶性断片の全部又は一部をいう。

[0036] 本明細書で用いられるところの「IL-1受容体アクセソリープロテイン」は、IL-1タイプIとの同一性が高いIL-1受容体ファミリーのメンバーであって、IL-1受容体タイプIが共存するときには前記IL-1リガンドのうちIL-1アルファ又はIL-1ベータと

結合するが、IL-1受容体タイプIが存在しないときにはIL-1アルファ及びIL-1ベータとは結合しない特徴がある。本発明のIL-1受容体アクセソリープロテインは、配列番号31又は33に列挙されるラット又はヒトのIL-1受容体アクセソリープロテイン(シグナルペプチドを除く成熟膜蛋白)か、配列番号35又は38に列挙されるラット又はヒトIL-1受容体アクセソリープロテインの細胞外ドメインかを含むがこれらに限定されない、哺乳類の膜蛋白又はその可溶性断片の全部又は一部をいう。

[0037] 本明細書で用いられるところの「特異的結合タグ」とは、所望の機能を有するポリペプチドを遺伝子組み換えによって調製する際に、前記所望の機能を有するポリペプチドとペプチド結合で連結した融合タンパク質として発現させることにより、形質転換体からの発現タンパク質の分離、精製又は検出をより容易に行うことを可能にするために、他のタンパク質、多糖類、糖脂質、核酸及びこれらの誘導體、樹脂、シリコーン等と特異的に結合するポリペプチドである。本発明の特異的結合タグは、配列番号1に列挙されるラットGRO (Growth Related Oncogene) / CINC (Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractants) 2アルファのN末端タグ、配列番号2に列挙されるラットGRO / CINC 2アルファC末端タグ、配列番号3に列挙されるアミノ酸配列のグルカゴンタグの他、Hisタグ、mycタグ、HAタグ、インテインタグ等が含まれるが、これらに限定されない。本発明の特異的結合タグは、配列番号1に列挙されるラットGRO / CINC 2アルファのN末端タグ、配列番号2に列挙されるラットGRO / CINC 2アルファC末端タグ、配列番号3に列挙されるアミノ酸配列のグルカゴンタグの場合がある。本明細書で用いられるところの「特異的結合タグ」は、本発明の融合蛋白のN末端、C末端及び又はその中間のいずれかの部位に1種類または2種類以上組み合わせて連結される場合がある。

[0038] 本明細書で用いられるところの「発現ベクター」は、大腸菌その他の細菌における薬剤耐性を有する遺伝子組換えベクターであって、本発明のIL-1受容体タイプII Ig融合蛋白をコード化するポリヌクレオチド及び/又はIL-受容体アクセソリープロテインIg融合蛋白をコード化するポリヌクレオチドを挿入して、IL-1受容体タイプII Ig融合蛋白及びIL-受容体アクセソリープロテインIg融合蛋白を、無細胞条件下、又は、原核細胞又は真核細胞内で発現させ、2量体として細胞外に分泌させることが

できるベクターをいう。好ましい原核細胞は大腸菌であり、好ましい真核細胞は、酵母菌、昆虫細胞、鳥類細胞、哺乳類細胞である。好ましいベクターは、プラスミドベクターpCAGGSであるが、該ベクターはSV40ウイルスの複製開始点の配列を含むため、SV40ウイルスのラージT抗原を発現する霊長類細胞、例えば、COS1細胞又はCOS7細胞におけるコピー数が多くなるので有利である。また、pCAGGSにはサイトメガロウイルスIE(immediate early)エンハンサー及びニワトリベータアクチン遺伝子のプロモーターを含むので哺乳類で非常に強い転写活性を有する。

[0039] 本発明の医薬品組成物は、本発明のヘテロダイマーの他に、賦形剤、その他の製剤に通常用いられる物質や、薬剤の患部又は作用部位への送達に必要なカプセル等への充填、ポリエチレングリコール等の付加等が行われる場合がある。

[0040] 本発明のヘテロダイマーは、IL-1リガンド、特に、IL-1アルファによる向炎症性の反応を抑制する作用を奏する。培養細胞にIL-1アルファを投与する場合には、MCP (Monocyte Chemotactic Protein) -1、MIP (Macrophage Inflammatory Protein) -2及び/又はPGES (Prostaglandin E synthase) 遺伝子の発現量を増大させる。IL-1リガンドはさまざまな細胞タイプの細胞で共通の作用を示すので、培養細胞でIL-1応答が抑制されるとき、個体レベルでもIL-1の応答が抑制される蓋然性は高い。

発明の効果

[0041] 本発明のヘテロダイマーは、IL-1リガンド、特に、IL-1アルファによる向炎症性細胞応答を抑制する効果を奏する。そのため、本発明のヘテロダイマーは、IL-1の作用機序を解明するための研究用試薬として用いることを特徴とすることができる。また、本発明のヘテロダイマーを有効成分とする本発明の医薬品組成物は、重症な自己免疫疾患、中でも、関節リウマチや全身性エリテマトーデス、全身性強皮症に代表される膠原病の臨床治療薬として用いることができる。また、IL-1リガンドが関与する、その他の疾患の臨床治療薬として用いることができる。

図面の簡単な説明

[0042] [図1]Ig融合蛋白ホモダイマーとIg融合蛋白ヘテロダイマーの構造を示す模式図。

[図2]pCAGGS-IL-1RII Ig GRO2アルファ-C1. 0 μ g とpCAGGS-GRO2アルファ-N I

L-1RAcp Ig glu0.5 μ gをCOS7細胞に遺伝子導入した3日後の培養上清に含まれる蛋白の濃度を求める計算式と模式図。

[図3]図4ないし6のラットNRK49F細胞を用いたIL-1に対する抑制効果実験の培養条件を示す模式図。

[図4]MCP-1遺伝子の発現量を用いてIL-1受容体タイプII Ig融合蛋白及びIL-1受容体アクセソリープロテインIg融合蛋白によるIL-1刺激の抑制効果を示すグラフ。

[図5]MIP-2遺伝子の発現量を用いてIL-1受容体タイプII Ig融合蛋白及びIL-1受容体アクセソリープロテインIg融合蛋白によるIL-1刺激の抑制効果を示すグラフ。

[図6]PGES遺伝子の発現量を用いてIL-1受容体タイプII Ig融合蛋白及びIL-1受容体アクセソリープロテインIg融合蛋白によるIL-1刺激の抑制効果を示すグラフ。

[図7]MCP-1遺伝子の発現量を用いてIL-1受容体タイプII Ig融合蛋白及びIL-1受容体アクセソリープロテインIg融合蛋白のヘテロダイマーによるIL-1(0.5ng/mL=0.0282ピコモル/mL)刺激の抑制の用量-反応関係を示すグラフ。

[図8A]図9のNRK49F細胞を用いたIL-1に対する抑制効果実験の培養条件を示す模式図。

[図8B]図9のNRK49F細胞を用いたIL-1に対する抑制効果実験の培養条件を示す模式図。

[図9]MCP-1遺伝子の発現量を用いてIL-1受容体タイプII Igヒンジ領域融合蛋白及びIL-1受容体アクセソリープロテインIgヒンジ領域融合蛋白のヘテロダイマーによるラットIL-1アルファ刺激の抑制効果を示すグラフ。

[図10]MCP-1遺伝子の発現量を用いてIL-1受容体タイプII Ig融合蛋白及びIL-1受容体アクセソリープロテインIg融合蛋白のヘテロダイマーによるラットNRK49F細胞に対するヒトIL-1刺激の抑制効果を示すグラフ。

発明を実施するための最良の形態

[0043] 以下に示す実施例によって本発明をより詳細に説明するが、これらの実施例は本

発明の詳細な説明のために一例として示すものであり、これらの実施例によって本発明の範囲が制限されると理解するべきではない。

実施例 1

[0044] (実験方法及び結果)

(実験1)

2つの受容体Ig融合蛋白遺伝子ベクターを遺伝子導入したときに産生される受容体-Ig融合蛋白ホモダイマーと受容体-Ig融合蛋白ヘテロダイマー(図1)の濃度比に対する実験を行った。

[0045] まず、配列番号12に列挙されるアミノ酸配列のIL-1受容体タイプII Ig融合蛋白をコード化するポリヌクレオチドを組み込んだプラスミド(pCAGGS-IL-1RII Ig GRO2アルファ-C)と、配列番号13に列挙されるアミノ酸配列のIL-1受容体アクセソリープロテイン(Acp)Ig融合蛋白をコード化するポリヌクレオチドを組み込んだプラスミド(pCAGGS-GRO2アルファ-N IL-1RAcp Ig glu)とをCOS7細胞に遺伝子導入したときに培養上清中に産生されるホモダイマーとヘテロダイマーとの割合に関する実験を行った。

[0046] pCAGGSのEcoRI制限酵素部位に、N末端にGRO2アルファを、C末端にグルカゴン(glucagon)を結合したIL-1受容体アクセソリープロテイン Ig融合蛋白遺伝子をPCRにて合成した後組み込み、pCAGGS-GRO2アルファ-N IL-1RAcp Ig gluを作成した。ここで、この融合蛋白は、N端側にGRO/CINC2アルファのシグナルペプチドとRat GRO/CINC2アルファ ELISAキットの一方の抗体のエピトープであるGRO/CINC2アルファN端側のペプチドRELRCQCLKTLPRVD(配列番号1)が組み込まれている。C端側にはGLU RIAキットの抗体のエピトープであるグルカゴンの19-29アミノ酸AQDFVQWLMNT(配列番号3)が組み込まれている。

[0047] 同様にpCAGGSのEcoRI制限酵素部位に、C末端にGRO2アルファを結合したIL-1受容体タイプII Ig融合蛋白遺伝子をPCRにて合成した後組み込み、pCAGGS-IL-1RII Ig GRO2アルファ-Cを作成した。ここで、この融合蛋白遺伝子は、C端側にはラットGRO/CINC2アルファ ELISAキットのもう一方の抗体のエピトープであるGRO/CINC2アルファC端側のペプチドKIIQKLLKSDKS(配列番号2)が組み込まれ

ている。

[0048] COS7細胞を6穴のプレートに10%FBSを添加したRPMI1640培養液にてコンフルエント直前まで培養し、2mLの培養液あたりFugene6(ロシュ社)3 μ Lを用いて、それぞれのプラスミドを表1に示すような割合でトランスフェクションし、3日後の培養上清を採取し、該培養上清中に分泌された融合蛋白の濃度を測定した。蛋白濃度の測定にはGRO-2アルファ蛋白はRat GRO/CINC2アルファ ELISAキット(IBL社)、グルカゴン濃度はGLU RIAキット(第一ラジオアイソトープ研究所)を用いた。それぞれの濃度の測定値と分子量とからモル濃度を計算した。ここで、Rat GRO/CINC2アルファ ELISAキットは、GRO/CINC2アルファのN端側のペプチドRELRCQCLKTLPRVD(配列番号1)と、C端側のペプチドKIIQKLLKSDKS(配列番号2)とにそれぞれ特異的に結合する2つの抗体によるサンドイッチ法を用いる測定キットである。前記2つの抗体のうち前者の抗体は酵素標識され、後者の抗体は固相に不動化されている。培養上清を添加すると、配列番号12に列挙されるアミノ酸配列のIL-1受容体タイプII Ig融合蛋白を含む2量体蛋白質が後者の抗体と結合して不動化されるが、不動化された2量体蛋白質のうち配列番号13に列挙されるアミノ酸配列のIL-1受容体アクセソリープロテインIg融合蛋白とのヘテロダイマーのみが前者の抗体と結合する。GLU RIAキットはグルカゴンの19-29番目のアミノ酸AQDFVQWLMNT(配列番号3)を認識する抗体によって検出するRIAキットである。

[0049] [表1]

遺伝子導入に用いたプラスミドの量	GR02 α の濃度 (pmol/ml)	グルカゴンの濃度 (pmol/ml)
IL-1RII 0.5 μ g + IL-1Racp 0.5 μ g	0.0153	2.167
IL-1RII 0.5 μ g + IL-1Racp 1.0 μ g	0.0155	2.233
IL-1RII 0.5 μ g + IL-1Racp 2.0 μ g	0.0124	2.466
IL-1RII 1.0 μ g + IL-1Racp 0.5 μ g	0.0302	4.479
IL-1RII 1.0 μ g + IL-1Racp 1.0 μ g	0.0199	2.242
IL-1RII 1.0 μ g + IL-1Racp 2.0 μ g	0.0225	2.851

[0050] 結果は表1に示すように、最も蛋白濃度の高値であったのはpCAGGS-IL-1RII IgG

RO-2アルファ-C 1.0 μ g + pCAGGS-GRO2アルファ-N IL-1RAcp Ig glu 0.5 μ gの時であった。これは図2に示すような構造の蛋白濃度を示すと考えられ、図2に示すような計算よりGRO2アルファ-N IL-1RAcp Ig gluのホモダイマーの濃度とIL-1RII Ig GRO2アルファ-CとGRO2アルファ-N IL-1RAcp Ig gluのヘテロダイマーの濃度は約7:4:1の割合であると考えられた。

[0051] 以下、図2に示した計算を簡単に説明する。ラットGRO/CINC2アルファ ELISAキットで測定した濃度は0.0302 pmol/mL、GLU RIAキットで測定した濃度は4.479 pmol/mLであった。そこで、IL-1RII Ig GRO2アルファ-CとGRO2アルファ-N IL-1RAcp Ig gluのヘテロダイマーの濃度をx pmol/mL、GRO2アルファ-N IL-1RAcp Ig gluのホモダイマーの濃度をy pmol/mLとすると、図2のような方程式が成り立ち、 $x = 0.0302$ pmol/mL、 $y = 2.224$ pmol/mLとなり、1:74となる。

実施例 2

[0052] (実験2)

NRK49F細胞を用いたIL-1に対するIg融合蛋白ホモダイマー及びIg融合蛋白ヘテロダイマーの抑制効果に対する実験を行った。

[0053] (a) IL-1抑制実験に用いるためのIg融合蛋白ホモダイマーとIg融合蛋白ヘテロダイマーの作成

IL-1RII Ig GRO2アルファ-CとGRO2アルファ-N IL-1RAcp Ig gluのヘテロダイマーは実験1の様にして作成した培養上清を、セントリコン 遠心式フィルターユニット・ウルトラセルYM-30(ミリポア社)を用いて8倍濃縮し、以下に示すIL-1抑制実験に用いた。またIL-1に対するIg融合蛋白ホモダイマーであるIL-1RII Ig glu融合蛋白(配列番号10)のホモダイマーとIL-1RAcp Ig glu融合蛋白(配列番号11)のホモダイマーを作成するために、以下のようなプラスミドを作成した。一つはpCAGGSのEcoRI制限酵素部位に、C末端にグルカゴンを結合したIL-1受容体タイプII Ig融合蛋白遺伝子をPCRにて合成した後組み込み、pCAGGS-IL-1RII Ig gluを作成し、もう一つは同様にpCAGGSのEcoRI制限酵素部位に、C末端にグルカゴンを結合したIL-1受容体アクセソリープロテインIg融合蛋白遺伝子をPCRにて合成した後組み込み、pCAGGS-IL-1RAcp Ig gluを作成した。ヘテロダイマー作成時と同様に、COS7

細胞を6穴のプレートに2mLの10%FBSを添加したRPMI1640培養液にてコンフルエント直前まで培養し、Fugene6 (ロシュ社) 3 μ Lをとともにそれぞれの単一のプラスミドを1.5 μ g用いたトランスフェクションを行い、IL-1RAcp Ig gluホモダイマーとIL-1RII Ig gluホモダイマーをそれぞれ産生・分泌させ、3日後に培養上清を採取した。これらはヘテロダイマーと同様に、セントリコン遠心式フィルターユニット・ウルトラセルYM-30を用いて8倍濃縮し、以下に示すIL-1抑制実験に用いた。

[0054] (b) NRK49F細胞を用いたIL-1に対する抑制効果実験

線維芽細胞ではIL-1に反応し、MCP-1、MIP-2及びPGESの遺伝子発現が増強することが知られている(Chang H, Hanawa H, Liu H, Yoshida T, Hayashi M, Watanabe R, Abe S, Toba K, Yoshida K, Elnaggar R, Minagawa S, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J, Aizawa Y. Hydrodynamic-based delivery of an interleukin-22-Ig fusion gene ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. *J Immunol.*2006;177:3635-43.)。そこで、ラット腎臓線維芽細胞株のNRK49F細胞を用いて、前記(a)で作成したIg融合蛋白ホモダイマー及びIg融合蛋白ヘテロダイマーと、大腸菌で産生された組換えラットIL-1アルファ(1)とを加え、そのIL-1抑制効果をMCP-1、MIP-2及びPGESの遺伝子発現量を測定することによって検討した。

[0055] NRK49F細胞を用いたIL-1に対する抑制効果実験の条件は、以下の通りである(図3ないし6)。

- (1) IL-1リガンドと、トランスフェクションしたCOS7細胞の培養液との両方とも添加せずに培養する。
- (2) 0.5ng/mL(終濃度)IL-1アルファは添加するが、トランスフェクションしたCOS7細胞の培養液は添加しない。
- (3) 0.5ng/mL(終濃度)IL-1アルファと、何も組み込んでいないpCAGGSを1 μ gトランスフェクションしたCOS7細胞の培養液200 μ Lとを添加する。
- (4) 0.5ng/mL(終濃度)IL-1アルファと、IL-1RAcp Ig glu融合蛋白をコード化するポリヌクレオチドをpCAGGSに組み込んだpCAGGS-IL-1RAcp Ig gluコンストラクトを1 μ gトランスフェクションしたCOS7細胞の培養液200 μ Lとを添加する。

(5) 0.5 ng/mL (終濃度) IL-1アルファと、IL-1RII Ig glu融合蛋白をコード化するポリヌクレオチドをpCAGGSに組み込んだpCAGGS-IL-1RII Ig glu 1 μ gコンストラクトをトランスフェクションしたCOS7細胞の培養液200 μ Lとを添加する。

(6) 0.5 ng/mL (終濃度) IL-1アルファと、pCAGGS-IL-1RII Ig gluコンストラクトを1 μ gトランスフェクションしたCOS7細胞の培養液100 μ Lと、pCAGGS-IL-1RAcp Ig gluコンストラクトを1 μ gトランスフェクションしたCOS7細胞の培養液100 μ Lとを添加する。

(7) 0.5 ng/mL (終濃度) IL-1アルファと、pCAGGS-IL-1RII Ig GRO2アルファ-Cコンストラクト0.5 μ g及びpCAGGS-GRO2アルファ-N IL-1RAcp Ig gluコンストラクト0.5 μ gのコ・トランスフェクションによってホモダイマー及びヘテロダイマーを含むと考えられるCOS7細胞の培養液200 μ Lとを添加する。

[0056] この時、実験1の結果より、IL-1RII Ig GRO-2アルファ-C融合蛋白とGRO2アルファ-N IL-1RAcp Ig glu融合蛋白とのヘテロダイマーは、GRO2アルファ-N IL-1RAcp Ig glu融合蛋白のホモダイマーの濃度の1/74で、かなり低濃度と考えられる。

[0057] NRK49F細胞の培養及びIL-1刺激に対する応答の測定は以下のとおりの手順で行った。NRK49F細胞を6穴のプレートに10%FBSと非必須アミノ酸とを添加したDMEM培養液にてコンフルエント直前まで培養し、1.8 mLの新しい培養液に交換した後、0.5 ng/mL (終濃度)の大腸菌で産生された組換えラットIL-1アルファ(ペプロテック社)と、前記(a)で説明したとおりに調製された融合蛋白のヘテロダイマー及び/又はホモダイマー蛋白質fを含む培養上清濃縮液を加えた(図3)。同じ条件下の実験は3穴ずつ行った。24時間後にそれぞれのNRK49F細胞からトリゾル(Trizol、インビトロジェン社)にてRNAを抽出し、さらにランダムプライマーとマウスモロニー白血病ウィルス逆転写酵素(インビトロジェン社)を用いてcDNAを合成した。MCP-1(センスプライマー、5'-ctgtctcagccagatgcagttaat-3'(配列番号4);アンチセンスプライマー、5'-tatgggtcaagttcacattcaaag-3'(配列番号5))、MIP-2(センスプライマー、5'-agctcctcaatgctgtactggt-3'(配列番号6);アンチセンスプライマー、5'-gttagccttgctttgttcagtat-3'(配列番号7))及びPGES(センスプライマー、5'-gtgatggagaacagccaggt-3'(配列番号8);アンチセンスプライマー、5'-gaggaccacaggaaatgtatc-3'(

配列番号9))についてPCR増幅装置を用いて定量的PCRを行った。PCR反応の陽性対照サンプルとして、それぞれのプライマーを用いて作成したPCR産物をpGEM-Tイージーベクター(pGEM-T easy vector、プロメガ社)に組み込み、マグエクストラクタープラスミドキット(MagExtractor plasmid kit、Toyobo社)にてプラスミドを精製し用いた。

- [0058] 結果は以下のとおりである。MCP-1、MIP-2及びPGESの遺伝子発現量は、いずれも、IL-1により顕著に増大した。その増大は、ホモダイマーを含む培養液を添加すると若干抑制された。しかし、ホモダイマーに比べてはるかに低濃度しか含まれないと考えられるヘテロダイマーを含む培養液では、IL-1で顕著に増大した遺伝子発現量はほぼ完全に抑制された(図4ないし6、図中の(1)～(7)は図3の条件を示す。)。つまり、ヘテロダイマーはホモダイマーに比べて非常に強力なIL-1抑制作用を有することが示された。

実施例 3

- [0059] (実験3)

実験1で説明したとおり、ラットGRO/CINC2アルファ ELISAキットで測定することにより、ヘテロダイマーの濃度を定量することができた。そこで、図4ないし6に示した実験でNRK49F細胞を刺激するのに用いたときと同じ濃度のIL-1アルファについて異なる濃度のヘテロダイマーによる抑制作用の用量-反応関係を調べる実験を以下のとおり行った。なお、図4ないし6に示した実験でNRK49F細胞を刺激するのに用いたIL-1アルファの重量濃度(0.5ng/mL)は、IL-1アルファの分子量が約17700であるから、0.0282pmol/mLのモル濃度に相当する。

- [0060] 結果を図7に示す。驚くべきことに、ヘテロダイマーは、IL-1アルファの20分の1のモル濃度でもほぼ完全にIL-1刺激を抑制した。これは、本発明のヘテロダイマーが、単にIL-1リガンドと溶液中で等モル反応で結合することによりIL-1刺激を抑制するのではなく、何か別の作用機序で抑制していることを強く示唆する結果である。

実施例 4

- [0061] (実験4)

次に、ヘテロダイマーを構成するそれぞれの融合蛋白のうち、免疫グロブリン由来

の部分へヘテロダイマーを形成するのに最小限必要なヒンジ領域だけを残した場合の抑制効果を調べた。

- [0062] NRK49F細胞を用いたIL-1に対する抑制効果実験の条件は、以下の通りである(図8A、8B及び9)。以下の(A)ないし(L)では、それぞれの融合蛋白のC末端にグルカゴントグが含まれており、グルカゴントグを有する融合蛋白の濃度の測定を実験1と同様の手順で行うことによって、最終濃度が全て2.8 pmol/mLになるように調製してNRK49F細胞に添加した。
- [0063] (A)ないし(F)は、COS7細胞の培養液中のグルカゴントグの最終濃度を全て2.8 pmol/mLになるように調製した培養液を200 μ L添加する点を除いて、それぞれ図3の(1)ないし(6)と同じである。
- [0064] (G)0.5 ng/mL(終濃度)IL-1アルファと、pCAGGS-IL-1RII Ig gluコンストラクト0.5 μ gと、pCAGGS-IL-1RAcp Ig gluコンストラクト0.5 μ gとをコ・トランスフェクションしたCOS7細胞の培養液中のグルカゴントグの最終濃度を全て2.8 pmol/mLになるように調製したものとを含む培養液を200 μ L添加する。
- [0065] (H)0.5 ng/mL(終濃度)IL-1アルファと、配列番号34に列挙されるラットIL-1受容体タイプIIの細胞外ドメインのC末端に配列番号3に列挙されるグルカゴントグが連結したIL-1RII glu融合蛋白をコード化するポリヌクレオチドをpCAGGSに組み込んだpCAGGS-IL-1RII gluコンストラクトを1 μ gトランスフェクションしたCOS7細胞の培養液中のグルカゴントグの最終濃度を全て2.8 pmol/mLになるように調製したものとを含む培養液を200 μ L添加する。
- [0066] (I)0.5 ng/mL(終濃度)IL-1アルファと、配列番号35に列挙されるラットIL-1受容体アクセソリープロテインの細胞外ドメインのC末端に配列番号3に列挙されるグルカゴントグが連結したIL-1RAcp glu融合蛋白をコード化するポリヌクレオチドをpCAGGSに組み込んだpCAGGS-IL-1RAcp gluコンストラクトを1 μ gトランスフェクションしたCOS7細胞の培養液中のグルカゴントグの最終濃度を全て2.8 pmol/mLになるように調製したものとを含む培養液を200 μ L添加する。
- [0067] (J)0.5 ng/mL(終濃度)IL-1アルファと、pCAGGS-IL-1RII gluコンストラクトを1 μ gトランスフェクションしたCOS7細胞の培養液中のグルカゴントグの最終濃度を全

て1.4 pmol/mLになるように調製したものと、CAGGS-IL-1RAcp gluコンストラクトを1 μ gトランスフェクションしたCOS7細胞の培養液中のグルカゴンの最終濃度を全て1.4 pmol/mLになるように調製したものを含む培養液を200 μ L添加する。

[0068] (K)0.5 ng/mL(終濃度)IL-1 α と、pCAGGS-IL-1RII gluコンストラクト0.5 μ gとCAGGS-IL-1RAcp gluコンストラクト0.5 μ gとをコトランスフェクションしたCOS7細胞の培養液中のグルカゴンの最終濃度を2.8 pmol/mLになるように調製したものを含む培養液を200 μ L添加する。

[0069] (L)0.5 ng/mL(終濃度)IL-1 α と、配列番号14に列挙されるラットIL-1受容体タイプIIの細胞外ドメイン、ラット免疫グロブリンヒンジ領域及びグルカゴンからなるIL-1RII Ig-hinge glu融合蛋白をコード化するポリヌクレオチドをpCAGGSに組み込んだpCAGGS-IL-1RII Ig-hinge gluコンストラクト0.5 μ gと、配列番号15に列挙されるラットIL-1受容体アクセソリープロテインの細胞外ドメイン、ラット免疫グロブリンヒンジ領域及びグルカゴンからなるIL-1RAcp Ig-hinge glu融合蛋白をコード化するポリヌクレオチドをpCAGGSに組み込んだpCAGGS-IL-1RAcp Ig-hinge gluコンストラクト0.5 μ gとをコトランスフェクションしたCOS7細胞の培養液中のグルカゴンの最終濃度を2.8 pmol/mLになるように調製したものを含む培養液を200 μ L添加する。

[0070] 結果を図9に示す。図9は、条件(B)で処理されたNRK49F細胞で発現するMCP-1遺伝子の発現量を100%として、各条件でのMCP-1遺伝子の発現量を棒グラフで示したものである。図9に示すとおり、条件(G)及び(L)でヘテロダイマーを含む培養液を添加すると、IL-1リガンドによる刺激が顕著に抑制された。また、(L)の免疫グロブリンヒンジ領域だけを含む融合蛋白より(G)の免疫グロブリンヒンジ領域からCH2及びCH3ドメインまで含む融合蛋白の方が抑制作用が強力であった。これらの結果から、融合蛋白に連結したペプチドタグの種類に関係なくヘテロダイマーを形成すればIL-1抑制作用を奏することが明らかになった。また、免疫グロブリンのヒンジ領域だけの融合蛋白のヘテロダイマーよりも、CH2及びCH3ドメインも含む融合蛋白のヘテロダイマーの方がIL-1抑制作用が強いことから、CH2及びCH3ドメインもIL-1抑制作用に関与することが示唆される。

実施例 5

[0071] (実験5)

本発明のヘテロダイマーが動物種を超えてIL-1抑制作用を有するかどうかを調べるために、実験2の条件(7)と同様の実験をラットIL-1アルファの代わりに大腸菌で産生された組換えヒトIL-1アルファ(ペプロテック社)を用いて行った。すなわち、pCAGGS-IL-1RII Ig GRO2アルファ-Cコンストラクト0.5 μ g及びpCAGGS-GRO2アルファ-N IL-1RAcp Ig gluコンストラクト0.5 μ gのコ・トランスフェクションしたCOS7細胞の培養液中のヘテロダイマーのモル濃度をラットGRO/CINC2アルファ ELISAキットを用いて定量した。異なる濃度のラット由来のヘテロダイマーと、0.5ng/mL(終濃度)ヒトIL-1アルファとを含む培養液をNRK49F細胞に添加してIL-1抑制作用をMCP-1遺伝子の発現量によって定量化した。

[0072] 図10に結果を示す。図10は、0.0282pmol/mLのヒトIL-1アルファで刺激したNRK49F細胞におけるMCP-1遺伝子の発現量を100%として、各条件でのMCP-1遺伝子の発現量を棒グラフで示したものである。図10に示すとおり、ラット由来の融合蛋白のヘテロダイマーはヒトIL-1アルファに対しても抑制作用を奏した。これは、本発明のヘテロダイマーがラットという動物種だけに限定してIL-1抑制作用を奏するのではなく、種差を超えてヒトにおいてもIL-1抑制作用を奏することを示す。

[0073] (考察)

今回IL-1の抑制効果で示したように、受容体-Ig融合蛋白ヘテロダイマーは、そのリガンドに対して、強力な抑制効果が期待できる可能性があり、このような構造を持つ多様な生物学的製剤は、自己免疫疾患やその他の疾患に対して、臨床的に有用であると考えられる。

[0074] 本明細書に添付する配列表の概要は以下のとおりである。

配列番号

- 1 GRO2 alpha-N ペプチド RELRCQCLKT LPRVD
- 2 GRO2 alpha-C ペプチド KIIQKLLKSD KS
- 3 glucagon ペプチド AQDFVQWLMN T
- 4 MCP-1 sense primer ヌクレオチド ctgtctcagc cagatgcagt taat

- 5 MCP-1 antisense primer ヌクレオチド tatgggtcaa gttcacatc aaag
- 6 PIP-2 sense primer ヌクレオチド agctcctcaa tgetgtactg gt
- 7 PIP-2 antisense primer ヌクレオチド gttagccttg cctttgttca gtat
- 8 PGES sense primer ヌクレオチド gtgatggaga acagccaggt
- 9 PGES antisense primer ヌクレオチド gaggaccacg aggaaatgta tc
- 10 ラットIL-1RII Ig glu ペプチド
- 11 ラットIL-1RAcp Ig glu ペプチド
- 12 ラットIL-1RII Ig GRO2 alpha-C ペプチド
- 13 ラットGRO2 alpha-N IL-1RAcp Ig glu ペプチド
- 14 ラットIL-1RII Ig-hinge glu ペプチド
- 15 ラットIL-1RAcp Ig-hinge glu ペプチド
- 16 ラットIL-1RII全長 P43303: 1-416 ペプチド
- 17 ラットIL-1RAcp全長 Q63621: 1-570 ペプチド
- 18 ラットIg HG1 CH1-hinge-CH3 P20759: 1-326 ペプチド
- 19 ヒトIL-1RII全長 P27930: 1-398 ペプチド
- 20 ヒトIL-1RAcp全長 Q9NPH3: 1-570 ペプチド
- 21 ヒトIg HG1 CH1-hinge-CH3 P01857: 1-330 ペプチド
- 22 ヒトIg HG2 CH1-hinge-CH3 P01859: 1-326 ペプチド
- 23 ヒトIg HG3 CH1-hinge-CH3 P01860: 1-290 ペプチド
- 24 ヒトIg HG4 CH1-hinge-CH3 P01861: 1-327 ペプチド
- 25 ラットIL-1RII Ig glu (シグナルペプチドP43303: 1-13無) ペプチド
- 26 ラットIL-1RAcp Ig glu (シグナルペプチドQ63621: 1-20無) ペプチド
- 27 ラットIL-1RII Ig GRO2 alpha-C (シグナルペプチドP43303: 1-13無) ペプチド
- 28 ラットIL-1RII Ig-hinge glu (シグナルペプチドP43303: 1-13無) ペプチド
- 29 ラットIL-1RAcp Ig-hinge glu (シグナルペプチドQ63621: 1-20無) ペプチド
- 30 ラットIL-1RIIシグナルペプチド無 P43303:14-416 ペプチド
- 31 ラットIL-1RAcpシグナルペプチド無 Q63621: 21-570 ペプチド

32	ヒトIL-1RIIシグナルペプチド無	P27930: 14-398	ペプチド
33	ヒトIL-1RAcpシグナルペプチド無	Q9NPH3:21-570	ペプチド
34	ラットIL-1RII細胞外ドメイン	P43303:14-355	ペプチド
35	ラットIL-1RAcp細胞外ドメイン	Q63621: 21-367	ペプチド
36	ラットIg HG1 ヒンジ-CH3	P20759: 98-326	ペプチド
37	ヒトIL-1RII細胞外ドメイン	P27930: 14-343	ペプチド
38	ヒトIL-1RAcp細胞外ドメイン	Q9NPH3: 21-367	ペプチド
39	ヒトIg HG1 ヒンジ-CH3	P01857: 99-330	ペプチド
40	ヒトIg HG2 ヒンジ-CH3	P01859: 99-326	ペプチド
41	ヒトIg HG3 ヒンジ-CH3	P01860: 12-290	ペプチド
42	ヒトIg HG4 ヒンジ-CH3	P01861: 99-327	ペプチド
43	ラットIg HG1 ヒンジ	P20759: 98-112	ペプチド
44	ヒトIg HG1 ヒンジ	P01857: 99-110	ペプチド
45	ヒトIg HG2 ヒンジ	P01859: 99-110	ペプチド
46	ヒトIg HG3 ヒンジ	P01860: 12-73	ペプチド
47	ヒトIg HG4 ヒンジ	P01861: 99-110	ペプチド
48	ラットIg HG1 CH2	P20759: 113-219	ペプチド
49	ヒトIg HG1 CH2	P01857: 111-223	ペプチド
50	ヒトIg HG2 CH2	P01859: 111-219	ペプチド
51	ヒトIg HG3 CH2	P01860: 74-183	ペプチド
52	ヒトIg HG4 CH2	P01861: 111-220	ペプチド
53	ラットIg HG1 CH3	P20759: 220-326	ペプチド
54	ヒトIg HG1 CH3	P01857: 224-330	ペプチド
55	ヒトIg HG2 CH3	P01859: 220-326	ペプチド
56	ヒトIg HG3 CH3	P01860: 184-290	ペプチド
57	ヒトIg HG4 CH3	P01861: 221-327	ペプチド

請求の範囲

- [1] IL-1受容体タイプII蛋白の細胞外ドメインと第1化学的部分とを含む第1サブユニットと、IL-1受容体アクセソリー蛋白の細胞外ドメインと第2化学的部分とを含む第2サブユニットとからなり、
第1化学的部分と第2化学的部分とは、第1サブユニットと第2サブユニットとを会合させて、IL-1リガンドに結合可能な複合体を形成させることを特徴とする、ヘテロダイマー。
- [2] 前記IL-1受容体タイプII蛋白の細胞外ドメインは、配列番号34又は37に列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号34又は37に列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、IL-1リガンドと結合するポリペプチドかからなり、
前記IL-1受容体アクセソリー蛋白の細胞外ドメインは、配列番号35又は38に列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号35又は38に列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、IL-1リガンドと結合するポリペプチドかからなることを特徴とする、請求項1に記載のヘテロダイマー。
- [3] 第1及び第2化学的部分のうち少なくとも1つはポリヌクレオチド又はポリペプチドであることを特徴とする、請求項1又は2に記載のヘテロダイマー。
- [4] 第1及び第2化学的部分は、ともに免疫グロブリン重鎖のヒンジ領域を含むことを特徴とする、請求項4に記載のヘテロダイマー。
- [5] 第1及び第2化学的部分は、配列番号43ないし47のいずれかに列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号43ないし47のいずれかに列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、ヒンジ機能を有するポリペプチドかを含むことを特徴とする、請求項3に記載のヘテロダイマー。
- [6] 第1化学的部分は、配列番号48ないし52のいずれかに列挙されるアミノ酸配列と、配列番号53ないし57のいずれかに列挙されるアミノ酸配列とを有するポリペプチドか、配列番号48ないし52のいずれかに列挙されるアミノ酸配列と、配列番号53ない

し57のいずれかに列挙されるアミノ酸配列とに対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、FcRn受容体と結合するポリペプチドかを含むことを特徴とする、請求項1ないし4のいずれかに記載のヘテロダイマー。

[7] 第2化学的部分は、配列番号48ないし52のいずれかに列挙されるアミノ酸配列と、配列番号53ないし57のいずれかに列挙されるアミノ酸配列とを有するポリペプチドか、配列番号48ないし52のいずれかに列挙されるアミノ酸配列と、配列番号53ないし57のいずれかに列挙されるアミノ酸配列とに対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、FcRn受容体と結合するポリペプチドかを含むことを特徴とする、請求項1ないし5のいずれかに記載のヘテロダイマー。

[8] 第1サブユニットは、

配列番号34又は37に列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号34又は37に列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、IL-1リガンドと結合するポリペプチドかと、

配列番号36、39、40、41又は42のいずれかに列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号36、39、40、41又は42のいずれかに列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、ヒンジ機能を有し、かつ、FcRn受容体と結合するポリペプチドかを含み、

第2サブユニットは、

配列番号35又は38に列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号35又は38に列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、IL-1リガンドと結合するポリペプチドかと、

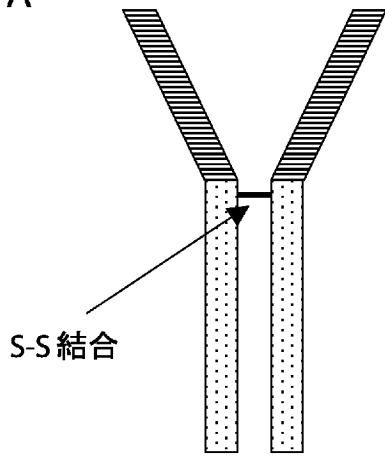
配列番号36、39、40、41又は42のいずれかに列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号36、39、40、41又は42のいずれかに列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、ヒンジ機能を有し、かつ、FcRn受容体と結合するポリペプチドかを含むことを特徴とする、請求項3に記載のヘテロダイマー。

- [9] 第1及び／又は第2サブユニットは、特異的結合タグを含むことを特徴とする、請求項1ないし7のいずれかに記載のヘテロダイマー。
- [10] 前記特異的結合タグは、配列番号1ないし3のいずれかのアミノ酸配列からなることを特徴とする、請求項8に記載のヘテロダイマー。
- [11] 第1サブユニットは、配列番号25、27又は28に列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドであり、
第2サブユニットは、配列番号26又は29に列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドであることを特徴とする、請求項9に記載のヘテロダイマー。
- [12] 請求項1ないし10のいずれかに記載のヘテロダイマーを有効成分とすることを特徴とする医薬品組成物。
- [13] 自己免疫疾患の治療薬であることを特徴とする、請求項11に記載の医薬品組成物。
- [14] 前記自己免疫疾患は膠原病であることを特徴とする、請求項12に記載の医薬品組成物。
- [15] 前記膠原病は、関節リウマチ及び／又は全身性エリテマトーデス及び／又は全身性強皮症であることを特徴とする、請求項13に記載の医薬品組成物。
- [16] 配列番号34又は37に列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号34又は37に列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、IL-1リガンドと結合するポリペプチドかと、
配列番号43ないし47のいずれかに列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号43ないし47のいずれかに列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、ヒンジ機能を有するポリペプチドかを含む、第1サブユニットをコード化するポリヌクレオチドを含む発現ベクターと、
配列番号35又は38に列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配列番号35又は38に列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、IL-1リガンドと結合するポリペプチドかと、
配列番号43ないし47のいずれかに列挙されるアミノ酸配列のポリペプチドか、配

列番号43ないし47のいずれかに列挙されるアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも80、85又は90%であるアミノ酸配列のポリペプチドであって、ヒンジ機能を有するポリペプチドかを含む、第2サブユニットをコード化するポリヌクレオチドとを含む発現ベクターとを含むことを特徴とする、ヘテロダイマーを生産するためのキット。

[図1]

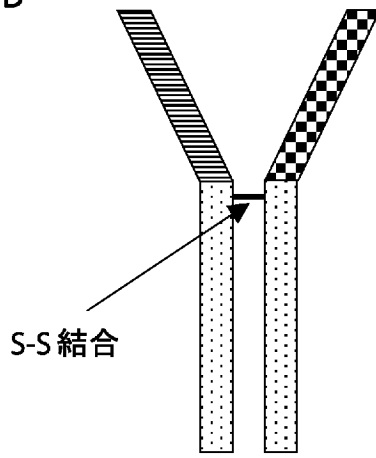
A



S-S結合

Ig融合蛋白
ホモダイマー

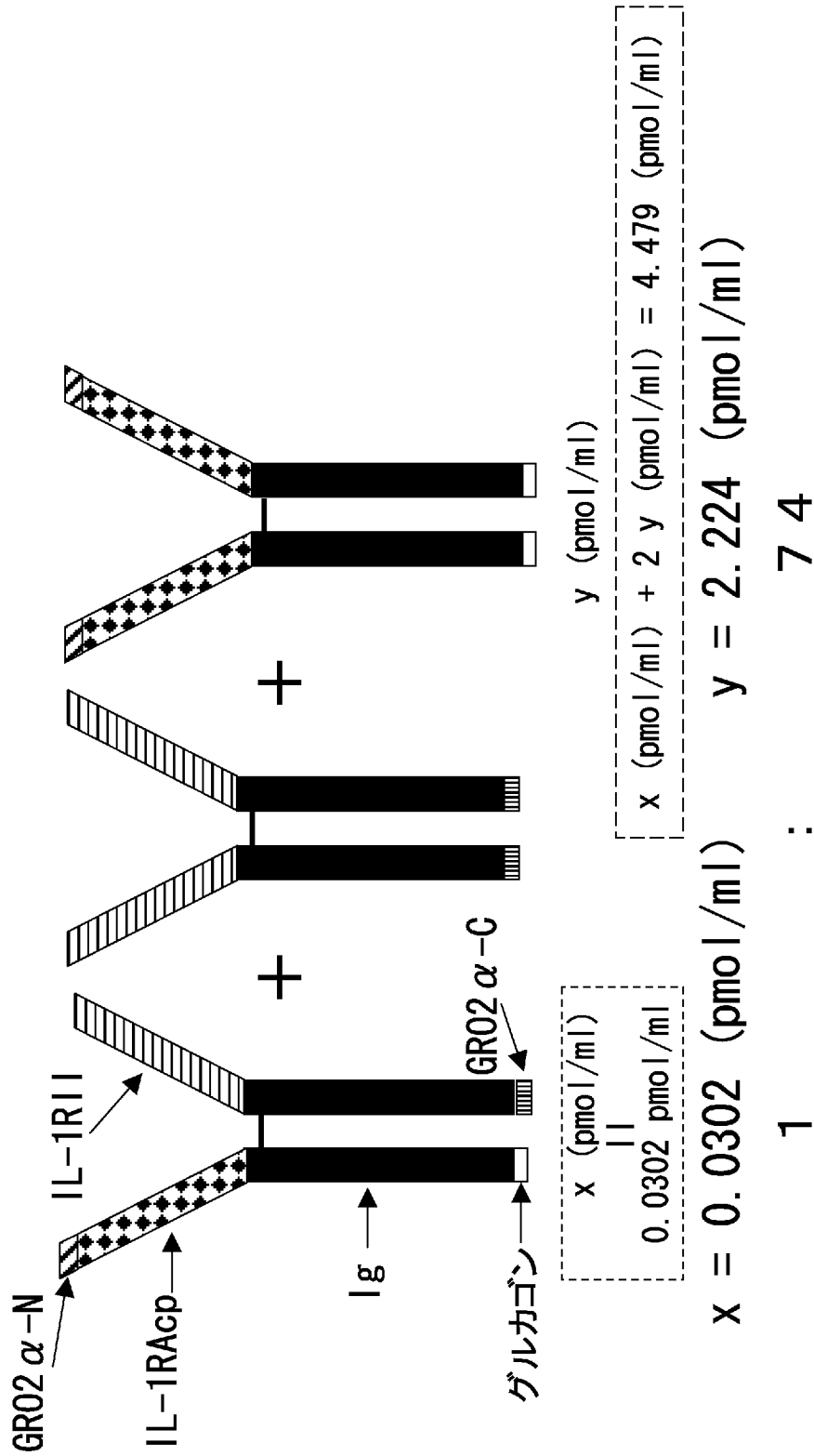
B



S-S結合

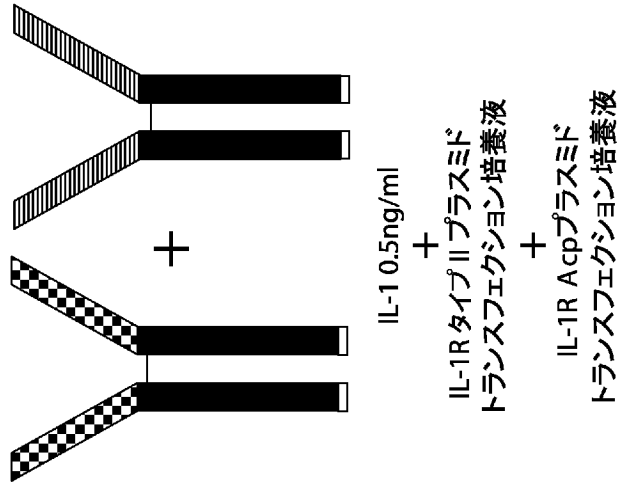
Ig融合蛋白
ヘテロダイマー

[図2]



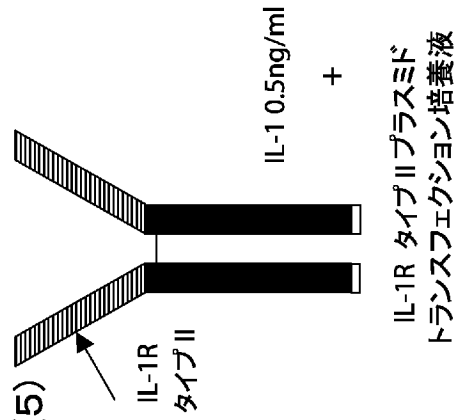
[図3]

(6)

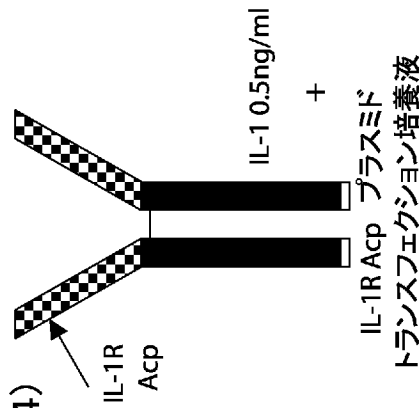


- (1) IL-1 なし + トランスフェクション培養液 添加なし
- (2) IL-1 0.5ng/ml + トランスフェクション培養液 添加なし
- (3) IL-1 0.5ng/ml + コントロールプラスミドトランスフェクション培養液

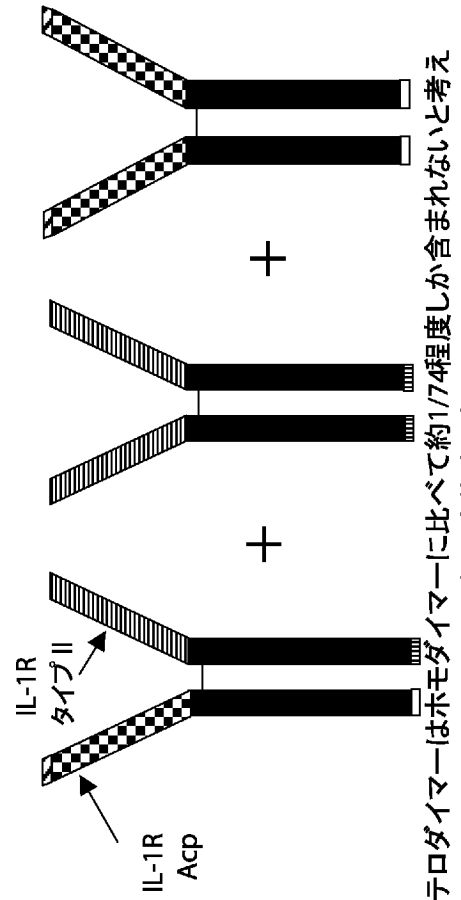
(5)



(4)

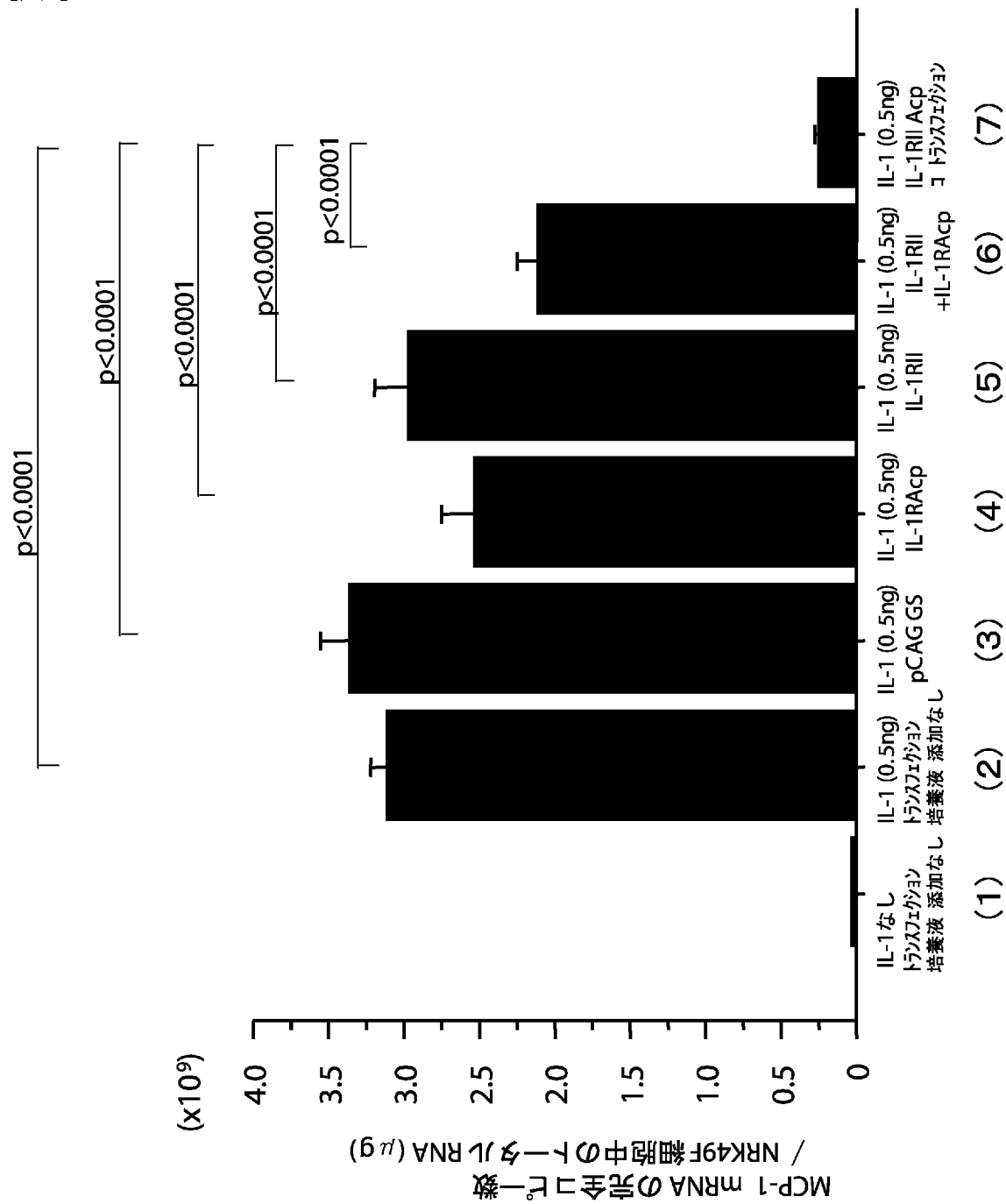


(7)

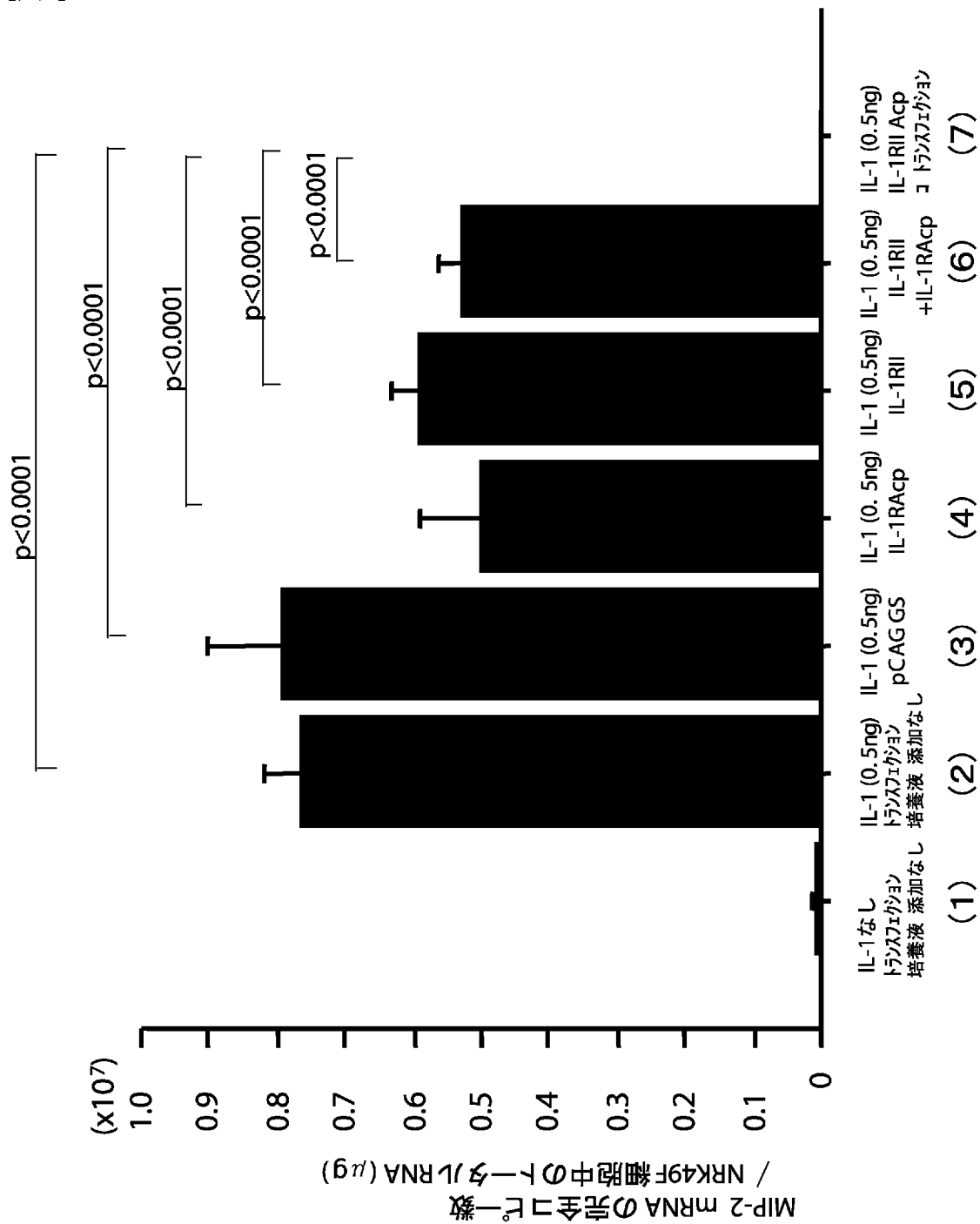


ヘテロダイマーはホモダイマーに比べて約1/7程度しか含まれないと考えられる培養液である

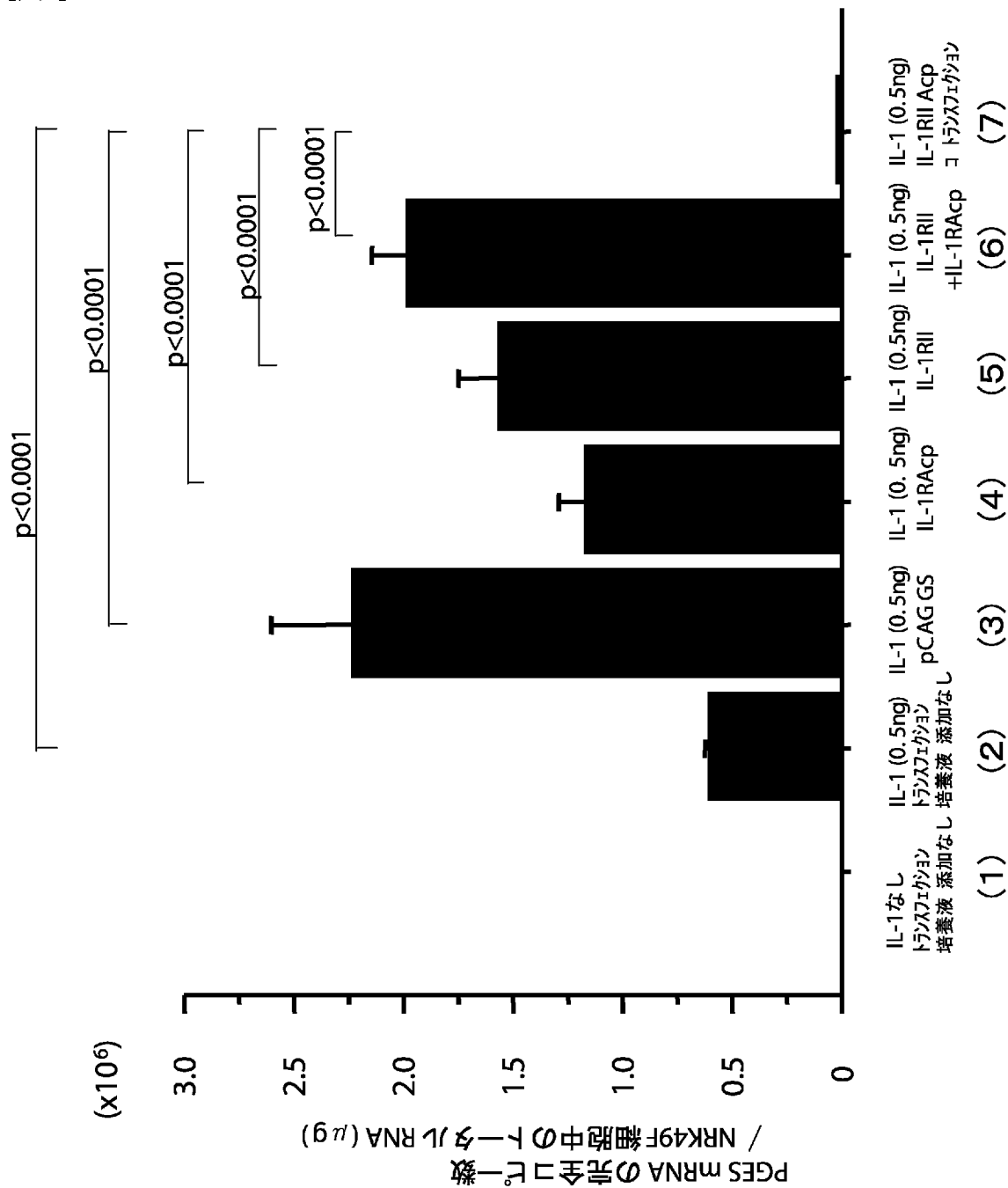
[図4]



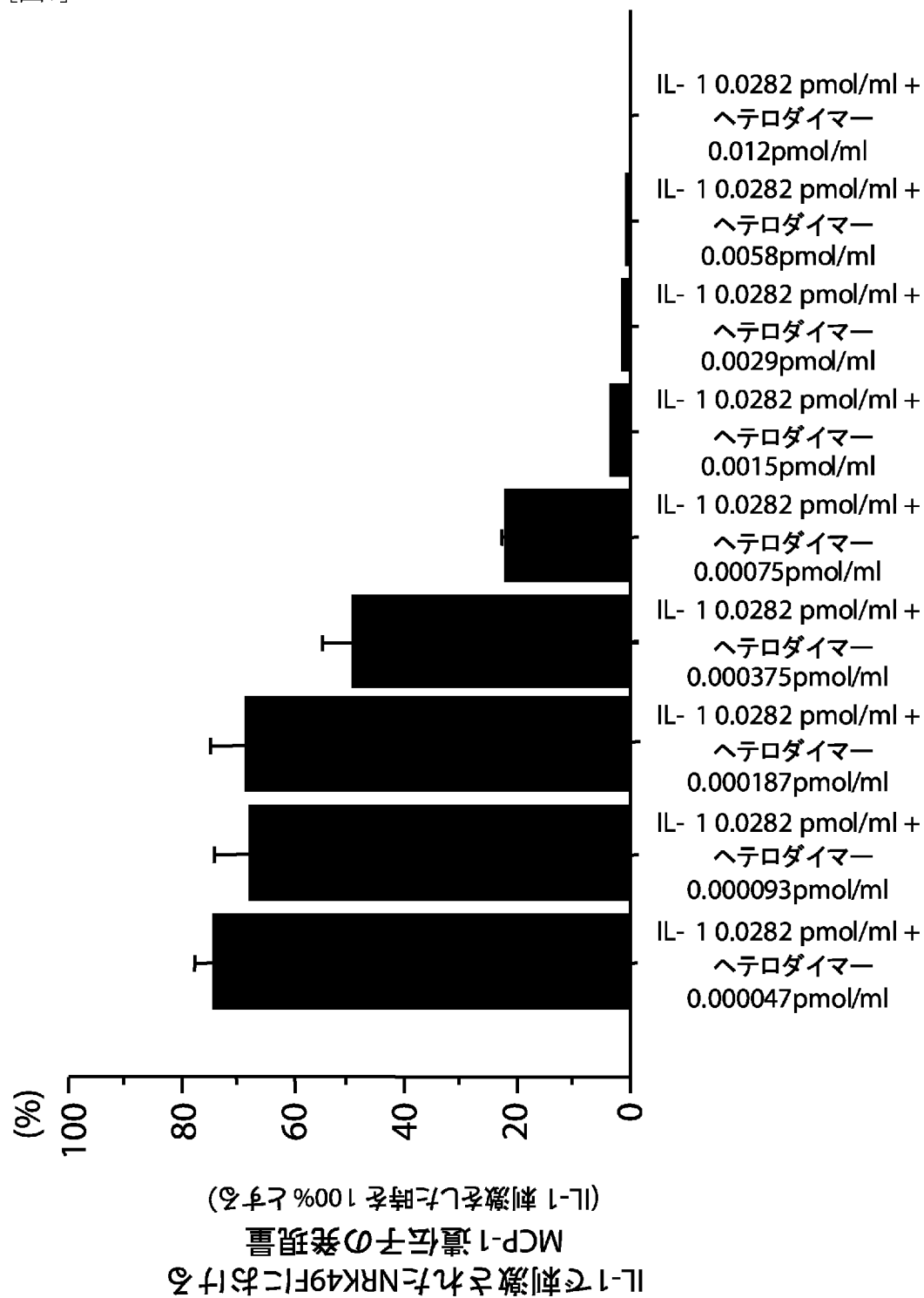
[図5]



[図6]

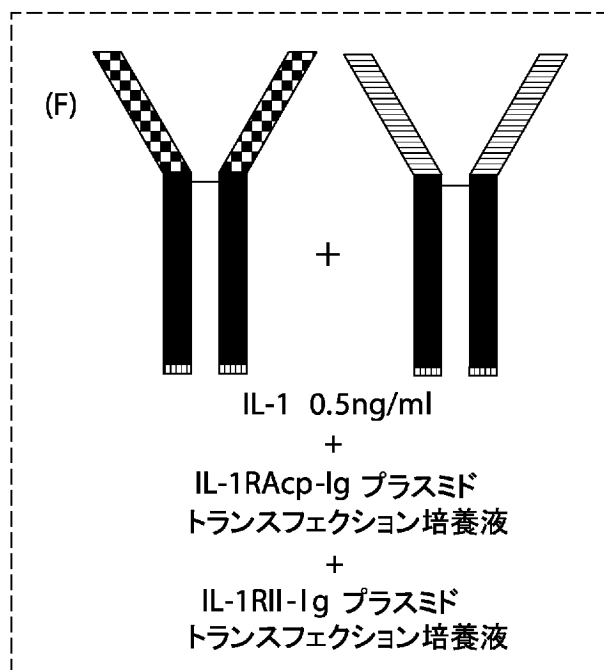
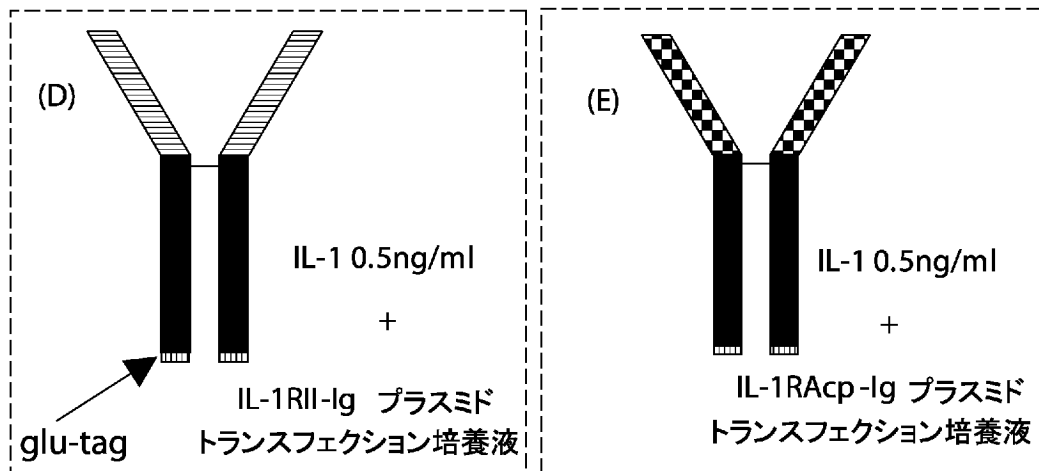


[図7]

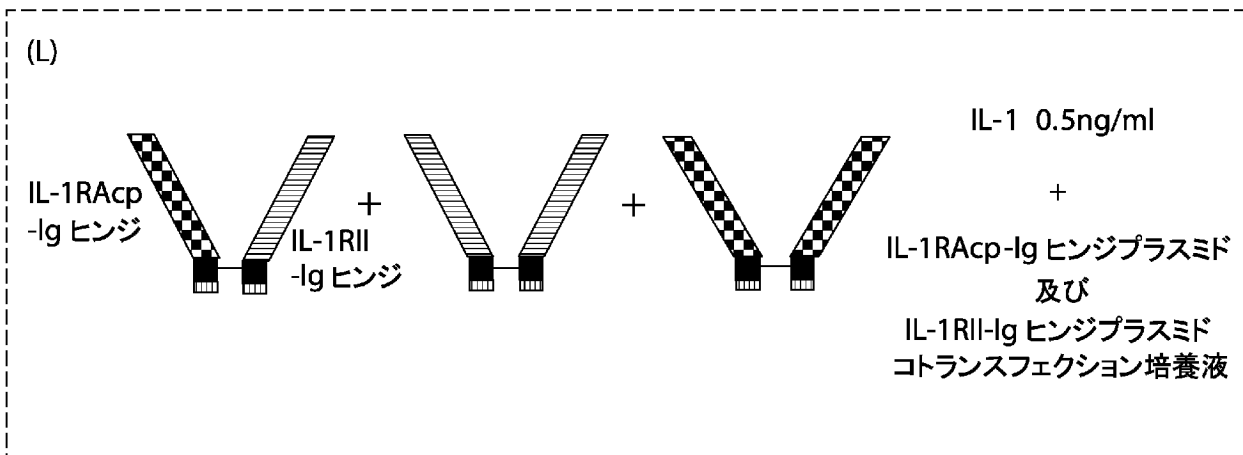
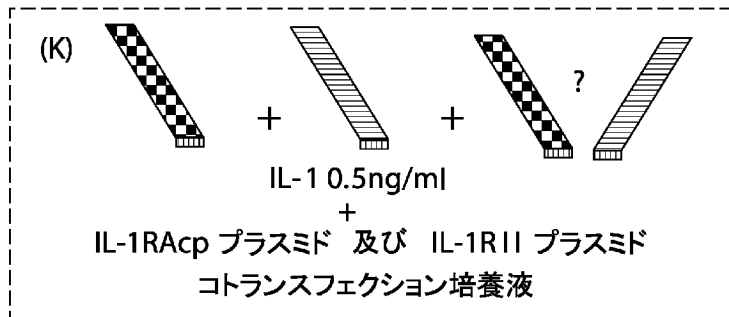
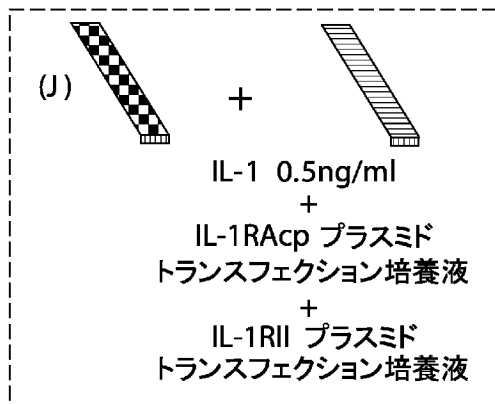
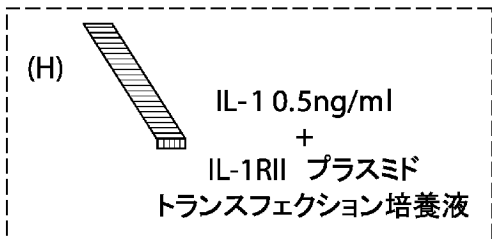
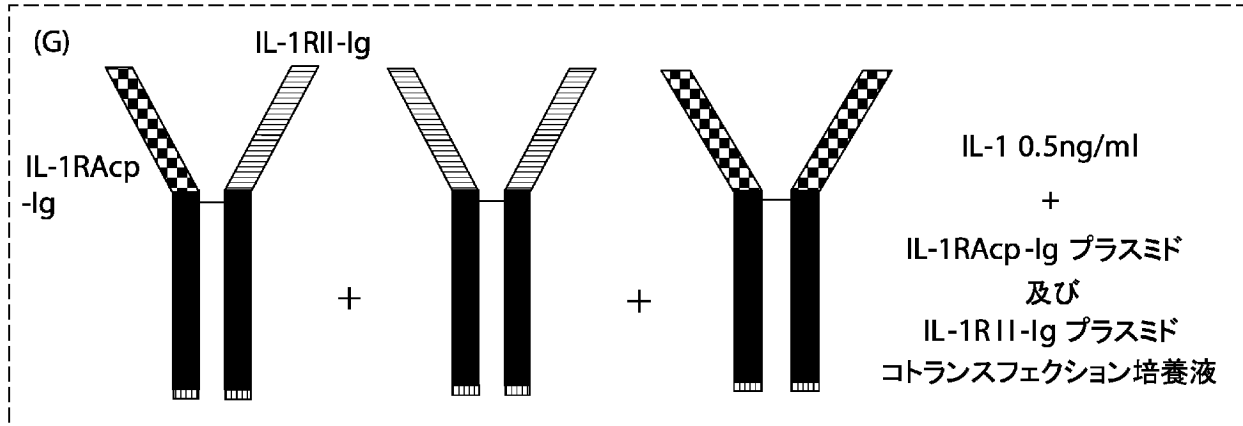


[図8A]

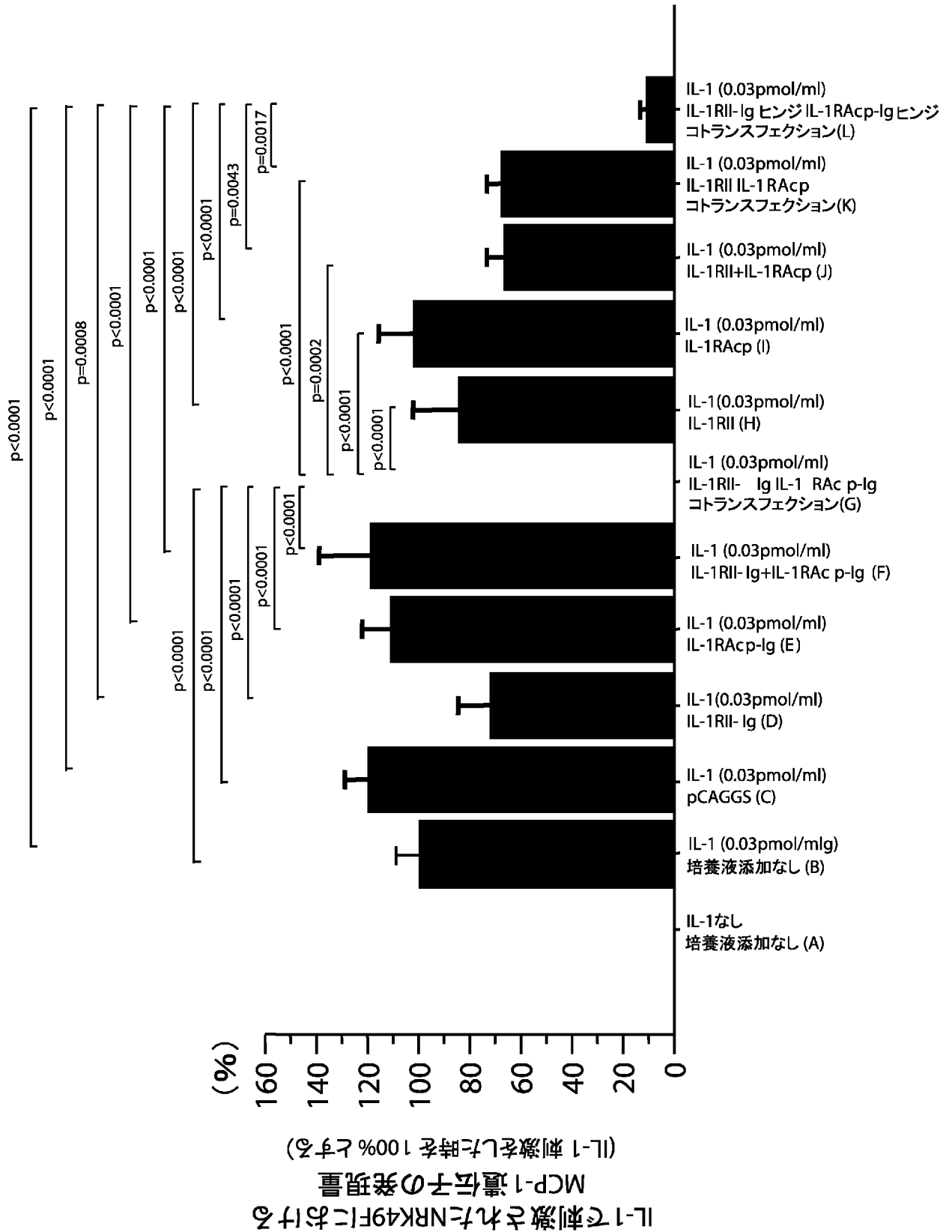
- (A) IL-1 (-) + トランスフェクション培養液 (-)
 (B) IL-1 0.5ng/ml + トランスフェクション培養液 (-)
 (C) IL-1 0.5ng/ml + 対照プラスミドトランスフェクション培養液 (+)



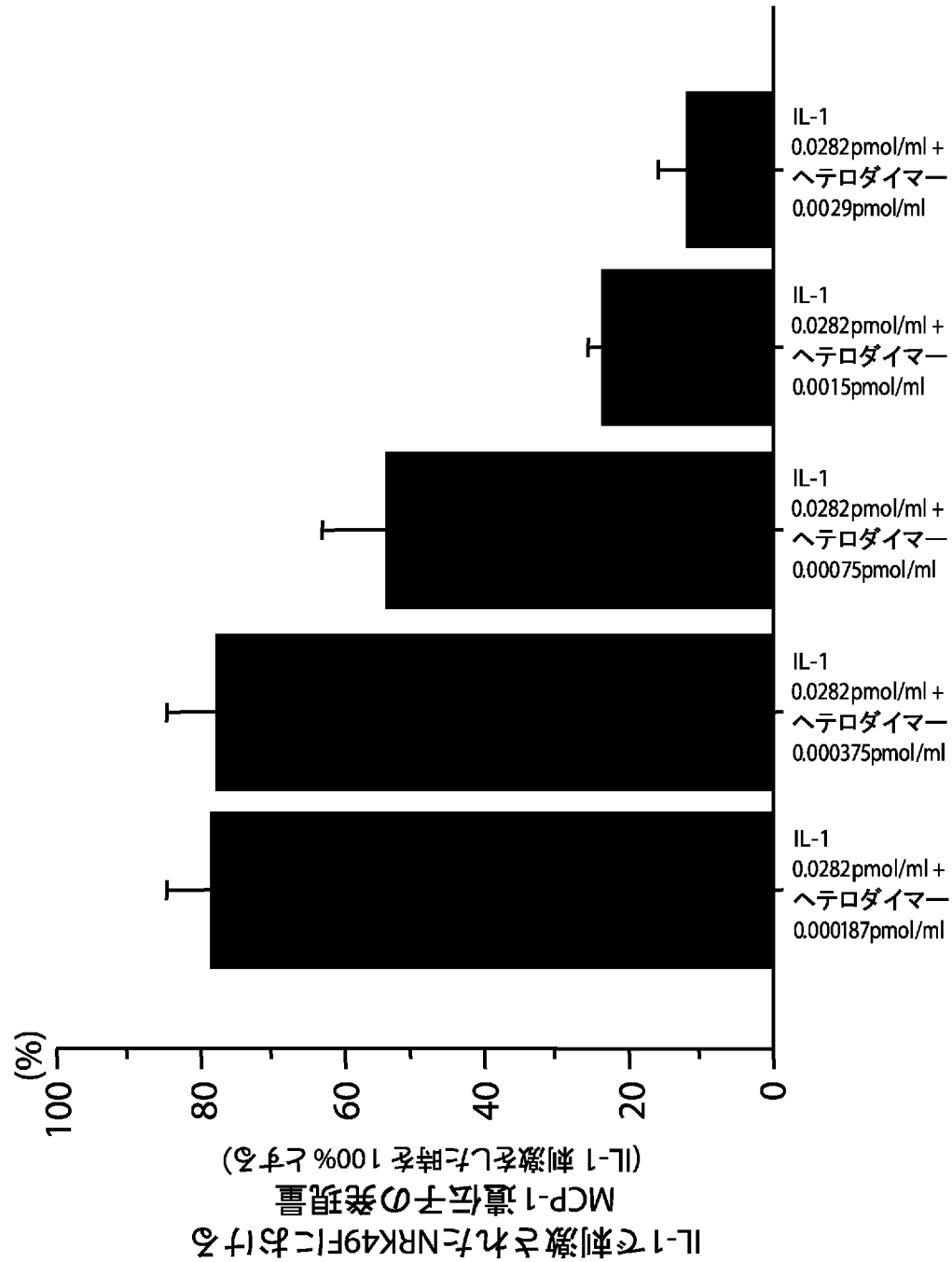
[図]8B



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/051457

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K19/00(2006.01) i, A61K38/00(2006.01) i, A61K39/395(2006.01) i, A61P29/00(2006.01) i, A61P37/02(2006.01) i, A61P37/06(2006.01) i, C07K14/715(2006.01) i, C07K16/00(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) i 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) C07K19/00, A61K38/00, A61K39/395, A61P29/00, A61P37/02, A61P37/06, C07K14/715, C07K16/00, C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CA (STN), SwissProt/PIR/Geneseq, JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Charles A. Dinarello, Setting the cytokine trap for autoimmunity., Nature Medicine(2003), Vol. 9, No. 1, p. 20-22	1-16
Y	WO 2005/117945 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.), 15 December, 2005 (15.12.05), Par. No. [0033] & US 2005/272655 A1 & CA 2568352 A1 & EP 1750746 A1 & JP 2008-501716 A	1-16
Y	US 2005/0197293 A1 (CALAPRICE D), 08 September, 2005 (08.09.05), Par. No. [0036] & US 2003/143697 A1 & US 6927044 B2	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 February, 2008 (18.02.08)		Date of mailing of the international search report 26 February, 2008 (26.02.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/051457

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/076673 A2 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.), 20 July, 2006 (20.07.06), Par. No. [0024] & WO 2006/076673 A3	1-16
Y	WO 2000/018932 A2 (REGENERON PHARM INC.), 06 April, 2000 (06.04.00), Claims; Figs.8, 19 & EP 1115876 A2 & US 2002/0012962 A1 & JP 2002-525119 A & US 2002/0164690 A1 & US 2003/0104567 A1 & EP 1405915 A1	1-16
Y	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accessin No. P43303, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?1170532:OLDID:2020317 >, 01-NOV-1995 uploaded[retrieved on 15 Feb 2008], BRISTULF J., et al., Definition: INTERLEUKIN-1 RECEPTOR, TYPE II PRECURSOR (IL-1R-2)	1-16
Y	Changlu Liu, et al., Rat homolog of mouse interleukin-1 receptor accessory protein: cloning, localization and modulation studies., Journal of Neuroimmunology (1996), Vol.66, No.1-2, p.41-48	1-16

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C07K19/00(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, C07K14/715(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C07K19/00, A61K38/00, A61K39/395, A61P29/00, A61P37/02, A61P37/06, C07K14/715, C07K16/00, C12N15/09</p>														
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <p>日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2008年 日本国実用新案登録公報 1996-2008年 日本国登録実用新案公報 1994-2008年</p>														
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), CA(STN), SwissProt/PIR/Geneseq, JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)</p>														
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>Charles A. Dinarello, Setting the cytokine trap for autoimmunity., Nature Medicine(2003), Vol. 9, No. 1, p. 20-22</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2005/117945 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 2005.12.15, 【0033】段落 & US 2005/272655 A1 & CA 2568352 A1 & EP 1750746 A1 & JP 2008-501716 A</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2005/0197293 A1 (CALAPRICE D) 2005.09.08, [0036]段落 & US 2003/143697 A1 & US 6927044 B2</td> <td>1-16</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	Y	Charles A. Dinarello, Setting the cytokine trap for autoimmunity., Nature Medicine(2003), Vol. 9, No. 1, p. 20-22	1-16	Y	WO 2005/117945 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 2005.12.15, 【0033】段落 & US 2005/272655 A1 & CA 2568352 A1 & EP 1750746 A1 & JP 2008-501716 A	1-16	Y	US 2005/0197293 A1 (CALAPRICE D) 2005.09.08, [0036]段落 & US 2003/143697 A1 & US 6927044 B2	1-16
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号												
Y	Charles A. Dinarello, Setting the cytokine trap for autoimmunity., Nature Medicine(2003), Vol. 9, No. 1, p. 20-22	1-16												
Y	WO 2005/117945 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 2005.12.15, 【0033】段落 & US 2005/272655 A1 & CA 2568352 A1 & EP 1750746 A1 & JP 2008-501716 A	1-16												
Y	US 2005/0197293 A1 (CALAPRICE D) 2005.09.08, [0036]段落 & US 2003/143697 A1 & US 6927044 B2	1-16												
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献</p>														
<p>国際調査を完了した日</p> <p>18.02.2008</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>26.02.2008</p>													
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>高 美葉子</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>	<p>4 N 9 8 3 9</p>												

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2006/076673 A2 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 2006.07.20, [0024] 段落 & WO 2006/076673 A3	1 - 16
Y	WO 2000/018932 A2 (REGENERON PHARM INC) 2000.04.06, 請求項, Fig.8, Fig.19 & EP 1115876 A2 & US 2002/0012962 A1 & JP 2002-525119 A & US 2002/0164690 A1 & US 2003/0104567 A1 & EP 1405915 A1	1 - 16
Y	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accessin No. P43303, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?1170532:OLDID:2020317 >, 01-NOV-1995 uploaded[retrieved on 15 Feb 2008], BRISTULF J., et al., Definition: INTERLEUKIN-1 RECEPTOR, TYPE II PRECURSOR (IL-1R-2)	1 - 16
Y	Changlu Liu, et al., Rat homolog of mouse interleukin-1 receptor accessory protein:cloning, localization and modulation studies., Journal of Neuroimmunology (1996), Vol. 66, No. 1-2, p. 41-48	1 - 16