

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-253079

(P2013-253079A)

(43) 公開日 平成25年12月19日(2013.12.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4B024
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4B064
C07K 14/81 (2006.01)	C07K 14/81	4H045
C12P 21/02 (2006.01)	C12P 21/02	C
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L 外国語出願 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-102039 (P2013-102039)	(71) 出願人	513119152
(22) 出願日	平成25年5月14日 (2013.5.14)		旭華 (上海) 生物研发中心有限公司
(31) 優先権主張番号	201210146902.7		中華人民共和国上海市碧波路518号315室
(32) 優先日	平成24年5月14日 (2012.5.14)	(74) 代理人	110001508
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		特許業務法人 津国
(31) 優先権主張番号	13/507,269	(74) 代理人	100078662
(32) 優先日	平成24年6月18日 (2012.6.18)		弁理士 津国 肇
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100131808
			弁理士 柳橋 泰雄
		(74) 代理人	100119079
			弁理士 伊藤 佐保子
		(74) 代理人	100135873
			弁理士 小澤 圭子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物学的に活性なヒト尿中トリプシンインヒビターのFc融合タンパク質並びにその調製および使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ヒト尿中トリプシンインヒビター (hUTI) と同等な生物学的活性を有するヒト尿中トリプシンインヒビターの組換えFc融合タンパク質を提供する。

【解決手段】 hUTI、約20個以下のアミノ酸の可動性ペプチドリンカー、およびヒトIgGのFcまたはその変異体 (vFc) からなる組換えhUTI-L-Fc融合タンパク質および良好な発現レベルでの前記融合タンパク質を製造するための方法であって、IgGのFc変異体は、好ましくは非溶解性であり、そして最小限の望ましくないFcにより媒介される副作用を示し、前記組換えhUTI-L-Fc融合タンパク質は、十分な生物学的活性および/または延ばされたもしくは延長された血清中半減期を示し、これにより改善された薬物動態および/または薬力学がもたらされることから、異なるまたはより少ない投与量を使用し得、および/またはより良好なまたは異なる治療効力を達成し得る。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト尿中トリプシンインヒビター (hUTI)、ペプチドリinker (L) およびヒト IgG Fc を含む hUTI - L - Fc 融合タンパク質であって、前記可動性ペプチドリinker は、長さが約 20 以下のアミノ酸を含み；そしてヒト IgG Fc は、天然 IgG Fc および Fc 変異体 (vFc) からなる群より選択される、前記 hUTI - L - Fc 融合タンパク質。

【請求項 2】

IgG Fc 変異体が非溶解性であり、そして天然 IgG Fc と比較してアミノ酸の突然変異を含む、請求項 1 の融合タンパク質。

10

【請求項 3】

ヒト IgG Fc が、ヒト IgG 1、ヒト IgG 2 およびヒト IgG 4 からなる群より選択されたヒト IgG のヒンジドメイン、CH2 ドメインおよび CH3 ドメインを含み、そして CH2 ドメインが、228 位、234 位、235 位および 331 位においてアミノ酸の突然変異を含む、請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 4】

IgG Fc 変異体が、非溶解性であり；ヒト Ig Fc が、ヒト IgG 1、ヒト IgG 2 およびヒト IgG 4 からなる群より選択されたヒト IgG のヒンジドメイン、CH2 ドメインおよび CH3 ドメインを含み；そして CH2 ドメインが 228 位、234 位、235 位および 331 位においてアミノ酸の突然変異を含む、請求項 1 の融合タンパク質。

20

【請求項 5】

前記可動性ペプチドリinker が、hUTI とヒト IgG Fc との間に存在し、そして前記可動性ペプチドリinker が、長さが 2 ~ 20 のアミノ酸を含む、請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 6】

前記可動性ペプチドリinker が、hUTI とヒト IgG Fc との間に存在し、そして前記可動性ペプチドリinker が、長さが 2 ~ 20 のアミノ酸を含み、そして前記アミノ酸が、グリシン、セリン、アラニンおよびトレオニンからなる群より選択される、請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 7】

ヒト尿中トリプシンインヒビター (hUTI)、ペプチドリinker (L) およびヒト IgG Fc を含む hUTI - L - Fc 融合タンパク質であって、前記可動性ペプチドリinker は、hUTI とヒト IgG Fc との間に存在し、そして長さが 2 ~ 20 のアミノ酸を含み、そしてグリシン、セリン、アラニンおよびトレオニンからなる群より選択され；Fc は、天然 IgG Fc と、非溶解性で天然 IgG Fc と比較してアミノ酸の突然変異を含む変異体 (vFc) からなる群より選択され；ヒト Ig Fc は、ヒンジドメイン、CH2 ドメインおよび CH3 ドメインを含み；そしてヒト IgG Fc は、Pro331Ser 突然変異を含むヒト IgG 2、Ser228Pro および Leu235Ala 突然変異を含むヒト IgG 4、並びに Leu234Val、Leu235Ala および Pro331Ser 突然変異を含むヒト IgG 1 からなる群より選択される、前記 hUTI - L - Fc 融合タンパク質。

30

40

【請求項 8】

hUTI、可動性ペプチドリinker、並びにヒンジドメイン、CH2 ドメインおよび CH3 ドメインを含むヒト IgG Fc を含む組換え融合タンパク質を製造するための方法であって、前記方法は、(a) CHO に由来する細胞株を生成する工程；(b) 組換え融合タンパク質が、24 時間の期間中に 100 万 (10⁶) 個の細胞あたり 50 μg を超える量でその増殖培地中に発現および分泌される条件下で細胞株を増殖させる工程；そして (c) 工程 b) からの発現タンパク質を精製する工程を含む、前記方法。

【請求項 9】

細胞株が、工程 (b) において、組換え融合タンパク質が 24 時間の期間中に 100 万

50

(10^6)個の細胞あたり $50\mu\text{g}$ を超える量でその増殖培地中に発現および分泌される条件下で増殖する、請求項8の方法。

【請求項10】

ヒトIgG Fcが、天然Fcと、Pro331Ser突然変異を含むヒトIgG2、Ser228ProおよびLeu235Ala突然変異を含むヒトIgG4、並びにLeu234Val、Leu235AlaおよびPro331Ser突然変異を含むヒトIgG1からなる群より選択された非溶解性の変異体Fcからなる群より選択される、請求項9の方法。

【請求項11】

ヒトIgG Fcが、天然Fcと、Pro331Ser突然変異を含むヒトIgG2、Ser228ProおよびLeu235Ala突然変異を含むヒトIgG4、並びにLeu234Val、Leu235AlaおよびPro331Ser突然変異を含むヒトIgG1からなる群より選択された変異体Fcからなる群より選択される、請求項8の方法。

10

【請求項12】

前記可動性ペプチドリンカーが、グリシン、セリン、アラニンおよびトレオニンからなる群より選択された2~20個のアミノ酸を含む、請求項8の方法。

【請求項13】

細胞株が、組換え融合タンパク質が、24時間の期間中に100万(10^6)個の細胞あたり $50\mu\text{g}$ を超える量でその増殖培地中に発現および分泌される条件下で増殖し；そして、前記組換え融合タンパク質は、モル基準でhUTIに類似した生物活性によって特徴付けられそしてこれを示し；可動性ペプチドリンカーは、hUTIとIgG Fcとの間に存在し；ヒトIgG Fcは、天然Fcと、Pro331Ser突然変異を含むヒトIgG2、Ser228ProおよびLeu235Ala突然変異を含むヒトIgG4、並びにLeu234Val、Leu235AlaおよびPro331Ser突然変異を含むヒトIgG1からなる群より選択された変異体Fcからなる群より選択され；そして前記可動性ペプチドリンカーは、グリシン、セリン、アラニンおよびトレオニンからなる群より選択された2~20個のアミノ酸を含む、請求項8の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

背景

ウリナスタチンまたはピクニンとも呼ばれるヒト尿中トリプシンインヒビター（ヒトUTIまたはhUTI）は、2つのKunitz型プロテアーゼインヒビタードメインを含むグリコシル化タンパク質である。ヒトUTIはヒト尿中および血中に見られ、分子量は約40キロダルトン(kD)である。ヒトUTIは、トリプシン、 α -キモトリプシン、プラスミン、カテプシンGおよび白血球エラスターゼを含むセリンプロテアーゼの活性に対する阻害効果などの、多くの生理的作用を有することが知られている。ヒトUTIは、また、腫瘍壊死因子(TNF- α)、インターロイキン-1(IL-1)およびインターロイキン-6(IL-6)などの炎症誘発性サイトカインの放出をダウンレギュレーションすることで免疫調節効果を示す(例えば、Park, et al. J. Korean Med. Sci., 25: 128-34, 2010; Sato et al. Jpn. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 48: 428-34, 2000; Park et al. Korean J. Anesthesiol., 58:334-337, 2010参照)。さらに、hUTIは、PDGF-Dの活性二量体(PDGF-DD)/PDGF-bbRにより媒介されるシグナル伝達を中和することによって悪性中皮腫細胞の遊走を抑制し、そして、癌細胞の増殖を阻害しそしてCXCL4およびMMP-9の発現をダウンレギュレーションすることによって乳癌異種移植ヌードマウスモデルにおける乳腺腫瘍を有意に減少させ(例えば、Yaguchi et al. Cancer Lett 288: 214-218, 2010; Sun et al. J. Int. Med. Res. 38: 967-976, 2010参照)、このことは癌療法におけるhUTIの可能性ある役割を示唆する。

40

【0002】

さらに、hUTIは、種々の組織上でのトリプシンのタンパク質分解作用を抑制するよ

50

うに作用し、そして局所的な抗炎症作用を奏功することが示されている。リスクの高い患者における全身麻酔の症例において使用する場合、hUTIの静脈内注入は、多くの臓器に対する灌流を改善し、そして炎症応答を減少させることができる。それ故、hUTIは、急性膵炎、全身性炎症反応症候群、循環機能不全、播種性血管内凝固(DIC)および多臓器不全を含む、急性炎症性疾患に対して適応される(例えば、Jong In Han, Korean J. Anesthesiol., 58: 325-327, 2010参照)。

【0003】

動物モデルの研究においては、hUTIは、エンドトキシン誘発性ショック並びに肝虚血再灌流障害に対して防御作用を有することが報告されている(例えば、Inoue et al. Expert Opin. Investig. Drugs, 19:513-20, 2010; Wu et al. Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int., 8:53-58, 2009参照)。臨床研究においては、hUTIとチモシン-1との組合せ使用により、重度の敗血症患者の生存率が増加した(例えば、Li et al. J. Intensive Care Med., 24:47-53, 2009参照)。別の臨床研究においては、hUTIは、SARSウイルスによって誘発された急性肺損傷(ALI)または急性呼吸促進症候群(ARDS)を処置するのに効果的であることが示された(例えば、US Patent No. 7,470,666参照)。

【0004】

ヒトの尿から精製されたhUTIに対する商標名である「Miraclid」は、1985年に日本の持田製薬によって初めて市販された。「Miraclid」は、急性膵炎およびショックによって引き起こされる急性循環不全の処置に対する薬物として臨床効力を実証した。他の類似した製品が、Techpool Biopharma、中国(「注射用ウリナスタチン」)、Han Lim Pharmaceutical、韓国(ウリスチン(Ulistin))、Kolon Pharmaceutical、韓国(ウスタチン(Ustatin))およびYu Young Pharmaceutical、韓国(スタチン(Statin))によって製造されている。日本および中国においては、hUTIは、急性膵炎、播種性血管内凝固(DIC)およびショック、例えば出血性ショック、敗血症ショック、外傷性ショックおよび熱傷ショックの処置のための薬物として広く使用されている。

【0005】

市場におけるhUTIの製薬等級の製品は、ヒトの尿から精製される。この出発物質の供給は予測不可能であり得、そしてヒト病原体による可能性ある汚染は危険である。組換えDNA技術の使用により、rhUTIが酵母において産生され、そして精製された物質は、in vitroにおいてトリプシン阻害活性を有することが示された。酵母における組換えhUITタンパク質の発現は、55mg/Lという低いレベルであると報告されている(例えば、Jian-qiu Wang et al, Protein Expr. Purif., 60:127-31, 2008; US Patent No. 5,407,915参照)。さらに、酵母細胞において産生された組換えタンパク質は、異なる翻訳後修飾を受ける傾向があり、これによりin vivoにおける潜在的に減少した効力および/または治療タンパク質に対する免疫応答をトリガーするなどの望ましくない副作用がもたらされる。従って、酵母に由来するrhUITタンパク質は、生物学的治療薬のための良好な候補ではないだろう(Brooks SA, Mol. Biotechnol., 28:241-55, 2004)。

【0006】

複雑な翻訳後修飾を行なえるということが、大半の生物学的治療薬が哺乳動物の細胞培養液において製造される主な理由である。実際に、アルブミン(Recombunin(登録商標)、Novozymes Biopharmaによって製造)および速効型インスリンアナログ(Humalog(登録商標)、Eli Lillyによって製造)などのほんのわずかなバイオ医薬品タンパク質が簡単な修飾を受けるので、それらを酵母を使用して製造することができる。一般に、哺乳動物細胞において産生された組換えタンパク質は十分に折り畳まれそして適切にグリコシル化されている。しかしながら、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞におけるrhUITの発現は、細胞培養液中において広範なタンパク質凝集物を生じることが報告され、結果として活性の低下につながる。タンパク質凝集物は、非天然のジスルフィド結合を通して共有結合的に架橋していることが示された(例えば、Seefeldt MB et al. Protein Sci., 13:2639-50, 2004参照)。

【0007】

健康な志願者においては、注射から0から3時間後までの間の静注(i.v.) hUTIの血漿中半減期は約33分間であり、注射されたhUTIの約90%の消失を占める。その後の4時間の間に、よりゆっくりとした第2相が観察され、半減期は約2時間であった。注射から7時間後、遊離hUTIの僅か1%しか血漿中に留まらなかった(例えば、Jonsson-Berling et al. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 51:549-57, 1991参照)。ラットにおける臓器組織分布研究は、腎臓がhUTIの分解および排泄のための主要な部位であることを示した。さらに、免疫組織化学的技術を使用した、正常および悪性のヒト組織におけるhUTIの分布および局在は、腎臓の近位尿細管におけるhUTIを見出した(例えば、Yoshida et al. Cancer, 64:860-9, 1989参照)。

10

【0008】

hUTIのクリアランスに關与する詳細な機序は依然として不明であるが、腎臓が、hUTI異化の主要な部位であるようである。循環中のhUTIの半減期を延長するために、hUTIの分子量を増加させることにより、腎臓を通しての排出を減速させることができる。このようなアプローチは長時間作用型医薬品の設計においてとられており、例えばEPOに余分なN-グリコシル化部位を付加(Aranesp(登録商標)、Amgenによって製造)、またはG-CSFにPEG分子を付加(Neulasta(登録商標)、Amgenによって製造)などがある。hUTIのC末端にヒトIgGFcまたはその変異体を付加することによって、得られたUTI-Fc分子はより大きな分子量を有するだけでなく、血漿中のヒトIgGFcに關するより長い半減期を示すだろう。

20

【0009】

IgGクラスの免疫グロブリンは、ヒト血液中において最も豊富なタンパク質の1つである。その循環半減期は21日間もの長さには達し得る。融合タンパク質は、IgGのFc領域を、別のタンパク質のドメイン(例えば種々のサイトカインおよび可溶性レセプター)と組み合わせると報告されている(例えば、Capon et al., Nature, 337:525-531, 1997; Chamow et al., Trends Biotechnol., 14:52-60, 1996); U.S. Pat. Nos. 5,116,964および5,541,087参照)。融合タンパク質の原型は、IgGFcのヒンジ領域におけるシステイン残基を通して連結されたホモダイマータンパク質であり、その結果として、CH1ドメインおよび軽鎖を含まないIgG分子に類似した分子が得られる。構造的相同性に因り、Fc融合タンパク質は、in vivoにおいて、類似のアイソタイプを有するヒトIgGと同等な薬物動態プロファイルを示す。このアプローチは、いくつかの治療的に重要なサイトカイン、例えばEPO、G-CSF、および可溶性レセプター、例えばTNF-RcおよびIL-5-Rcに適用されている(例えば、US Patent Nos., 5,349,053および7,232,668参照)。それ故、本発明において開示または記載したようなヒトIgG(IgG1、IgG2、IgG4)タンパク質のFc部分に連結されたhUTIを含む融合タンパク質を製造することによって、hUTIの循環半減期を延ばすもしくは改変するおよび/またはその生物学的活性を増加/改変することが望ましい。また、異なるおよび/またはより望ましい臨床特性および/または薬学的特性を示す、hUTIに代わるこのような製品を生産することが望ましくそして本発明の一部である。

30

【0010】

さらに、大半の報告されているFc融合タンパク質分子において、ヒンジ領域が、Fc領域とアミノ末端のサイトカインまたは可溶性レセプターとの間のスペーサーとして作用し、よって分子のこれらの2つの部分が別々に機能することを可能とする(例えば、Ashkenazi et al., Current Opinion in Immunology, 9:195-200, 1997参照)。それ故、このようなスペーサーとして作用する適切なリンカーを有することが望ましくそして本発明の一部であり、これにより両方のUTIDメインが、セリンプロテアーゼと独立して相互作用することができる。

40

【0011】

ヒト免疫グロブリンのFc領域は、病原体の排除のための免疫防御において重要な役割を果たす。IgGのエフェクター機能は、2つの主要な機序を通してFc領域によって媒

50

介される：(1)細胞表面Fcレセプター(FcRs)への結合により、食作用による病原体の摂取または抗体依存性細胞傷害(ADCC)経路を介したキラー細胞による溶解が起こり得るか、あるいは(2)第1補体成分C1のC1q部分への結合により、補体依存性細胞傷害(CDC)経路が開始され、病原体の溶解が起こる。4つのヒトIgGアイソタイプの中で、IgG1およびIgG3が、FcRへの結合において効果的である。FcRへのIgG4の結合親和性は、IgG1またはIgG3よりも約1ケタ低く、一方、FcRへのIgG2の結合は検出未満である。ヒトIgG1およびIgG3は、また、C1qへの結合および補体カスケードの活性化においても効果的である。ヒトIgG2は補体と弱くしか結合せず、そしてIgG4は、補体カスケードを活性化する能力が極めて不十分であるようである(例えば、Jefferis et al., Immunol. Rev., 163:59-76, 1998参照)。治療使用においては、hUTI-L-Fcが種々のプロテアーゼに結合する場合、融合タンパク質のFc領域が、細胞表面に結合したプロテアーゼを有する細胞の溶解または除去を引き起こすエフェクター機能を媒介するかまたはしないかは決定的または重要ではないだろう。従って、ここで開示した本発明から、hUTI-FcのFc領域は、天然IgGFcまたは非溶解性のFc変異体であり得ることが明らかである。上で考察したように、天然IgGFcは、種々のレベルのエフェクター機能を媒介する。これに対し、非溶解性のFcは、エフェクター機能をトリガーするためのFcRsおよびC1qへの結合に関して不活性である。非溶解性Fcを得るためには、天然Fc領域の特定のアミノ酸を、エフェクター機能の減弱化のために突然変異させなければならない。

10

20

30

40

50

【0012】

ヒトおよびマウスのIgGアイソタイプのアミノ酸配列を比較することによって、CH2ドメインのN末端近くのFc部分が、IgGFcのFcRsへの結合において役割を果たすことに参与している。234位から237位のモチーフの重要性が、遺伝子工学された抗体を使用して実証された(例えば、Duncan et al., Nature, 332:563-564, 1988参照)。アミノ酸残基のナンバリングは、Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, United States Department of Health and Human Services, 1991)に記載のEUインデックスに従う。4つのヒトIgGアイソタイプの中で、IgG1およびIgG3がFcRsに最も良く結合し、そしてLeu234-Leu-Gly-Gly237の配列を共有する(IgG3は図1に示されていない)。より低い親和性でFcRsに結合するIgG4においては、この配列は1つのアミノ酸置換、すなわち234位のLeuに対してPheを含む。FcRsに結合しないIgG2においては、2つの置換と1つの欠失があり、Val234-Ala-Gly237となる(図1)。FcRへのFcの結合を最小限にし、従ってADCC活性を最小限にするために、IgG4におけるLeu235をAlaによって置換した(例えば、Hutchins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:11980-11984, 1995参照)。IgG1は、このモチーフにおいて、IgG2からの配列であるPro233-Val-Ala235を用いてGlu233-Leu-Leu235を置換することによって改変された。この置換により、マウスにおいてターゲット細胞を枯渇させるFcRにより媒介される能力を欠失したIgG1変異体を得られた(例えば、Isaacs et al., J. Immunol., 161:3862-3869, 1998参照)。

【0013】

FcRおよびC1qへの両方の結合に重要であると思われる第2の部分は、ヒトIgGのCH2ドメインのカルボキシ末端近くに位置している(例えば、Duncan et al., Nature, 332:738-740, 1988参照)。4つのヒトIgGアイソタイプの中で、この部分内で置換を示すのはただ2つのアミノ酸残基のみである：IgG4におけるSer330およびSer331は、IgG1、IgG2およびIgG3に存在するAla330およびPro331に置き換わっている(図1)。Ser330の存在は、FcRまたはC1qへの結合に影響を及ぼさない。IgG1におけるPro331をSerによって置換すると、IgG1がC1qに結合する能力は実質的に消失し、一方、Ser331をProによって置換すると、IgG4の補体結合活性は部分的に回復した(例えば、Tao et al., J.

Exp. Med., 178:661-667, 1993; Xu et al., J. Biol. Chem., 269:3469-3474, 1994参照)。

【0014】

本発明者らは、天然ヒトIgG Fcの他に、少なくとも3つの他のFc変異体(vFc)を、本発明のhUTI-Fc融合タンパク質の産生のために設計および/または使用することができることを発見した(図1)。ヒトIgG2 FcはFc Rに結合しないが、弱い補体活性を示す。Pro331Ser突然変異を有するFc2変異体は、天然Fc2よりも低い補体活性を有するはずであるが、依然としてFc Rへは結合しない。IgG4 Fcは補体カスケードの活性化において不十分であり、そしてFc Rへの結合親和性は、最も活性なアイソタイプであるIgG1よりも約1ケタ低い。Ser228ProおよびLeu235Ala突然変異を有するFc4変異体は、天然Fc4と比較して最小のエフェクター機能を示すはずである。Leu234Val、Leu235AlaおよびPro331Ser突然変異を有するFc1変異体もまた、天然Fc1よりもはるかに低いエフェクター機能を示す。本発明者らは、また、これらのFc変異体、並びにヒトIgG(IgG1、IgG2、IgG4)からの天然Fcは全て、hUTI-Fc融合タンパク質の調製に適していることを発見する。循環半減期を損なうことなく、または望ましくないコンフォメーション変化を全く引き起こすことなく、非溶解性Fcまたは天然Fcの調製のために他の置換を導入し得ることも可能である。

10

【0015】

本発明において、hUTIの組換え融合タンパク質は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株から誘導された細胞株によって産生される。rhUTI-Fc融合タンパク質は、類似の宿主細胞を使用してrhUTIの細胞培養液中に存在すると報告されたタンパク質凝集物を含むことなく、細胞培養液から容易に精製される(例えば、Seefeldt M B et al. Protein Sci., 13:2639-50, 2004参照)。in vitroにおける生物学的活性に関してhUTIと比較した場合、hUTIとFc部分との間に適切なペプチドリンカーを有するhUTI融合タンパク質(hUTI-L-Fc)は、モル基準でhUTIと同等な活性を保持する。これらの分子のFc部分は、長時間の血清中半減期を示すことが知られているので、この長時間作用型の医薬品の投与頻度計画を減少させることができ、より良好に管理することができ、そして/またはより望ましい血清中レベルが維持される。

20

【0016】

本発明には多くの利点があり、これは、以下に開示および考察したように、特に当業者には明らかであろう。哺乳動物細胞培養液におけるrhUTIと比較して、rhUTI-L-Fcのより簡単な精製プロトコールおよびより高い産生収率は、製造コストを実質的に低下させることができる。血清中におけるhUTI-L-Fc融合タンパク質の異なるおよび/または高い活性並びに異なるおよび/または延長された存在は、異なるまたは低い投与量、並びに異なるまたはより低頻度の注射をもたらし得る。血清中の薬物濃度の変動がより少ないことは、また、改善された安全性および耐容性を意味する。それ故、非溶解性Fc変異体または天然Fcを含むhUTI-L-Fc融合タンパク質は、急性膵炎、播種性血管内凝固(DIC)およびショックに関連した種々の容態の管理に有意に貢献する。

30

40

【0017】

発明の要約

本発明の1つの局面は、hUTI-L-Fc融合タンパク質に関する。このhUTI-L-Fc融合タンパク質は、hUTI、ペプチドリンカー(Lによって示す)およびヒト天然FcまたはIgG Fc変異体(両方共にFcによって示す)を含む。長さが約20以下、より好ましくは約2~20アミノ酸の可動性ペプチドリンカーを使用することが好ましく、そして前記可動性ペプチドリンカーは、グリシン、セリン、アラニンおよびトレオニンからなる群より選択された2つ以上のアミノ酸を含む。IgG Fc変異体は非溶解性であり、そして天然IgG Fcと比較してアミノ酸の突然変異を含む。

【0018】

50

本発明の別の態様は、ヒトIgFcが、ヒトIgG1、IgG2およびIgG4などのヒトIgGのヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含むことである。好ましくは、CH2ドメインは、228位、234位、235位および331位（EUN numberingシステムによって定義）においてアミノ酸の突然変異を含む。これらのアミノ酸の突然変異は、Fcのエフェクター機能を減弱するように作用すると考えられる。

【0019】

本発明のさらに別の態様において、CHOに由来する細胞株などの哺乳動物細胞株からこのような組換え融合タンパク質を製造または産生するための方法を開示する。トランスフェクションされた細胞株を、組換え融合タンパク質が24時間の期間中に100万個の細胞あたり50μg、好ましくは100μgを超える量でその増殖培地に発現および分泌される条件下で増殖させる。これらのrhUTI-L-Fc融合タンパク質は、rhUTIと比べて、モル基準で、in vitroにおける高い生物学的活性、および望ましくない副作用を伴うことなく延長された血清中半減期によって特徴付けられそしてこれを示し、これにより改善された薬物動態および薬力学がもたらされ、従って、類似の効力を達成するためにより少ない投与量およびより少ない注射回数が必要となる。

10

【0020】

本発明のさらなる態様は、hUTI、可動性ペプチドリンカーおよびヒトIgGFc（変異体形および天然形からなる群より選択される）を含む組換え融合タンパク質を製造するための方法を提供し、前記方法は、(a) CHOに由来する細胞株を生成する工程；(b) 組換え融合タンパク質が、24時間の期間中に100万（ 10^6 ）個の細胞あたり50μg、好ましくは100μgを超える量でその増殖培地に発現および分泌される条件下で細胞株を増殖させる工程；そして(c) 工程b)からの発現タンパク質を精製する工程を含み、組換え融合タンパク質は、モル基準で、hUTIと類似した、同じくらい高い、またはより高い生物学的活性によって特徴付けられそしてこれを示す。この場合、好ましくは、約20個以下、しかし好ましくは2個より少なくはなく、より好ましくは20から2個であるアミノ酸を含む可動性ペプチドリンカーが、hUTIとヒトIgGFc（変異体形および天然形からなる群より選択される）との間に存在し；そして可動性ペプチドリンカーは、グリシン、セリン、アラニンおよびトレオニンからなる群より選択された2つ以上のアミノ酸を含み；そしてヒトIgGFc（天然形または変異体のいずれか）は、ヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含む。Fcの変異体形は、Pro331Ser突然変異を含むヒトIgG2、Ser228ProおよびLeu235Ala突然変異を含むヒトIgG4、並びにLeu234Val、Leu235AlaおよびPro331Ser突然変異を含むヒトIgG1からなる群より選択される。

20

30

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1は、ヒトIgG1、IgG2、IgG4およびその変異体のヒンジ領域およびCH2領域のアミノ酸配列アラインメントを示す。アミノ酸228位、234～237位および330～331位という3つの部分を比較する。変異体のアミノ酸の突然変異を太字のイタリック体で示す。アミノ酸残基についてはEUN numberingシステムを使用する。

40

【図2】図2は、hUTI-L-vFc₂のヌクレオチド配列（配列番号1）および推定アミノ酸配列（配列番号2）を示す。アミノ酸残基1～19のペプチドは、hUTIのリーダーペプチドである。成熟タンパク質は、hUTI（アミノ酸残基20～162）、ペプチドリンカー（アミノ酸残基163～178）およびFc₂変異体（アミノ酸残基179～401）を含む。

【図3】図3は、hUTI-L-vFc₄のヌクレオチド配列（配列番号3）および推定アミノ酸配列（配列番号4）を示す。アミノ酸残基1～19のペプチドはhUTIのリーダーペプチドである。成熟タンパク質はhUTI（アミノ酸残基20～162）、ペプチドリンカー（アミノ酸残基163～178）およびFc₄変異体（アミノ酸残基179～407）を含む。

50

【図4】図4は、hUTI-L-vFc 1のヌクレオチド配列（配列番号5）および推定アミノ酸配列（配列番号6）を示す。アミノ酸残基1～19のペプチドはhUTIのリーダーペプチドである。成熟タンパク質はhUTI（アミノ酸残基20～162）、ペプチドリンカー（アミノ酸残基163～178）およびFc 1変異体（アミノ酸残基179～405）を含む。

【図5】図5は、発現プラスミドPCDNA3-hUTI-L-vFcの図解を示す。プラスミドは、示されているように、9,063bps長であり、hCMVプロモーター-エンハンサー、融合タンパク質遺伝子、DHFRおよびネオマイシン選択遺伝子などを含む。

【図6】図6は、hUTI-L-vFc 2融合タンパク質を分泌している組換え細胞株を使用した、振とうフラスコ中の細胞増殖および累積タンパク質濃度を示す。最終タンパク質濃度は、15日目に3g/Lに近づいた。

【図7】図7は、トリプシン阻害剤としてヒトの尿から精製されたhUTI（Techpool）またはCHO細胞上清からのrhUTI-L-vFc 2融合タンパク質を使用した、in vitroにおける生物学的アッセイを示す。hUTIのIC50は 81.5 ± 6.0 nMであり、そしてrhUTI-L-vFc 2のIC50は 70.9 ± 1.5 nMである。

【図8】図8は、セルレインにより誘発されたマウス急性膵炎モデルにおける、rhUTI-L-vFcおよびhUTIの生物学的活性を示す。対照（グループA）と比較して、hUTIは、1mg/kgの投与量で、血清中アミラーゼレベルの増加に対して全く効果を示さなかった（グループB）。40mg/kg（または $1 \mu\text{mol/kg}$ ）というはるかに高い投与量においては、hUTIは血清中アミラーゼの増加に対して8%の阻害効果を示した（グループC）。3mg/kg（または $0.027 \mu\text{mol/kg}$ ）においては、hUTI-L-vFcは、血清中アミラーゼの増加に対して26%の阻害効果を示した（ $p < 0.005$ 、グループD）。30mg/kgにおいては、阻害は53%とはるかに高くあり続けた（ $p < 0.001$ 、グループE）。グループDにおけるrhUTI-L-vFcの投与量は、グループCにおけるhUTIより30倍少なかったが、血清中アミラーゼレベルに対する阻害効果は有意により良好であった。

【図9】図9は、10%還元SDS-PAGE上でのヒトの尿から精製されたhUTI（Techpool）および精製されたrhUTI-L-vFc 2融合タンパク質を示す。

【0022】

発明の詳細な説明

本発明は、hUTI、ペプチドリンカー（L）およびヒトIgGFc（天然形または変異体形のいずれか）を含む、ヒト尿中トリプシンインヒビター（hUTI）-L-Fc融合タンパク質に関する。この融合タンパク質において、可動性ペプチドリンカーは約20以下のアミノ酸長を含み；そしてFcは、天然ヒトIgGFcおよびFc変異体（vFc）から選択される。2から約20アミノ酸長の可動性ペプチドリンカー（L）を使用することがより好ましく、そして可動性ペプチドリンカーは、グリシン、セリン、アラニンおよびトレオニンからなる群より選択された2つ以上のアミノ酸からなるまたは含む。IgGFc変異体は非溶解性であり、そして天然IgGFcと比較してアミノ酸の突然変異を含む。

【0023】

本発明には多くの利点がある。血清中におけるhUTI-L-Fc融合タンパク質の高い活性および/または延長した存在は、より少ない投与量並びにより低頻度の注射をもたらし得る。血清中の薬物濃度の変動がより少ないことは、また、改善された安全性および耐容性を意味する。それ故、非溶解性Fc変異体または天然Fcを含むhUTI-L-Fc融合タンパク質は、急性膵炎、播種性血管内凝固（DIC）およびショックに関連した種々の容態の管理に有意に貢献する。

【0024】

本発明者らは、天然ヒトIgGFcの他に、少なくとも3つのFc変異体（vFc）を、hUTI-L-Fc融合タンパク質の産生のために使用し、hUTI-L-Fc融合

10

20

30

40

50

タンパク質に取り込み、および/またはhUTI-L-Fc融合タンパク質の産生へと別様に設計することができることを見出した(図1)。ヒトIgG2FcはFcRには結合しないが、弱い補体活性を示す。Pro331Ser突然変異を有するFc2変異体は、天然Fc2よりも弱い補体活性を有するはずであるが、依然としてFcRには結合しない。IgG4Fcは補体カスケードを活性化するには不十分であり、そしてFcRへのその結合親和性は、最も活性のあるアイソタイプであるIgG1よりも約1ケタ低い。Ser228ProおよびLeu235Ala突然変異を有するFc4変異体は、天然Fc4と比較して最小のエフェクター機能を示すはずである。Leu234Val、Leu235AlaおよびPro331Ser突然変異を有するFc1変異体もまた、天然Fc1よりもはるかに低いエフェクター機能を示す。本発明者らは、これらのFc変異体、並びにヒトIgG(IgG1、IgG2、IgG4)からの天然Fcは全て、UTI融合タンパク質の調製に適していることを発見する。循環半減期を損なうことなく、または望ましくないコンフォメーション変化を全く引き起こすことなく、非溶解性Fcまたは天然Fcの調製のために他の置換を導入し得ることも可能である。

10

20

30

40

50

【0025】

本発明により、hUTIとヒトIgGFcとの間に存在する付加されたペプチドリンカーは、hUTI-L-Fc分子のin vitroにおける生物学的活性に2つの方法で貢献することが発見される：(1)hUTI上のプロテアーゼ結合部位からFc領域を離しておく、および/または(2)一方のUTIDメインを、他方のUTIDメインから遠ざける。このようにして、両方のUTIDメインがプロテアーゼと独立的に相互作用し得ることが可能である。本発明では、長さが約20以下のアミノ酸の可動性ペプチドリンカー(L)が好ましい。より好ましくは、ペプチドリンカー(L)は少なくとも2アミノ酸長を有するべきである。さらに、グリシン、セリン、アラニンおよびトレオニンからなる群より選択された2つ以上のアミノ酸を含むペプチドリンカーを使用することがさらにより好ましい。

【0026】

また本発明によると、hUTIの組換え融合タンパク質は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株から誘導された細胞株によって産生された。マウス急性膵炎疾病モデルにおけるin vivoでの生物学的活性に関してhUTIと比較した場合、組換えhUTI-L-Fcは、モル基準で、hUTIよりもはるかにより効果的であるようであった。ラットにおいては、組換えhUTI-L-Fcの半減期はhUTIよりもはるかに長いことが観察された。この長時間作用型の医薬品を製造することによって、投与頻度を減少させるおよび/または投与頻度を管理する選択肢を提供することが可能となり得、そして高い血清中レベルを維持し得る。

【0027】

本発明のために、上で考察したCHO由来細胞株などの哺乳動物細胞株から本明細書において開示した組換え融合タンパク質を製造または産生するための方法を開示する。トランスフェクションされた細胞株を、組換え融合タンパク質が24時間の期間中に100万個の細胞あたり50μgを超える量で、好ましくは100μgを超える量でその増殖培地に発現および分泌される条件下で増殖させる。これらのrhUTI-L-Fc融合タンパク質は、hUTIと比べて、モル基準で、in vitroにおける良好なおよび/または高い生物学的活性、並びに多くの望ましくない副作用を伴うことなく延ばされた血清中半減期によって特徴付けられそしてこれを示し、これにより改善された薬物動態および薬力学がもたらされる。従って、類似の効力を達成するためにより少ない投与量およびより少ない注射回数が必要となる。または代替的にもしくは組み合わせて、異なる投与計画および/または異なる注射管理の方法が可能となり得る。

【0028】

本発明のさらなる態様は、hUTI、可動性ペプチドリンカーおよびヒトIgGFc(変異体形および天然形を含む)を含む組換え融合タンパク質を製造するための方法を提供し、前記方法は、(a)CHOに由来する細胞株を生成する工程；(b)組換え融合タ

ンパク質が、24時間の期間中に100万(10⁶)個の細胞あたり50μg、好ましくは100μgを超える量でその増殖培地に発現および分泌される条件下で細胞株を増殖させる工程；そして(c)工程b)からの発現タンパク質を精製する工程を含み、組換え融合タンパク質は、モル基準で、hUTIと同じくらい高い生物学的活性によって特徴付けられそしてこれを示す。この場合、好ましくは、約20個以下であるが、しかし2個より少なくはないアミノ酸を含む可動性ペプチドリンカーが、rhUTIとヒトIgGFc(変異体形および天然形を含む)との間に存在し；そして可動性ペプチドリンカーは、グリシン、セリン、アラニンおよびトレオニンからなる群より選択された2つ以上のアミノ酸を含み；そして、ヒトIgGFc(天然形または変異体形のいずれか)は、ヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含む。Fcの変異体形は、Pro331Ser突然変異を含むヒトIgG2、Ser228ProおよびLeu235Ala突然変異を含むヒトIgG4、およびLeu234Val、Leu235AlaおよびPro331Ser突然変異を含むヒトIgG1からなる群より選択される。

10

【0029】

実施例1. hUTI-L-vFc 2融合タンパク質をコードする遺伝子の調製

ヒトUTIのリーダーペプチドおよび成熟タンパク質をコードする遺伝子を新規に合成した。得られた約500bp長のDNAフラグメントを、pUC57などのホールディングベクター(holding vector)のEcoRV制限酵素部位に挿入することにより、p hUTIプラスミドを得た。hUTI遺伝子の配列はDNAシーケンスによって確認された。

20

【0030】

リンカーペプチドおよびヒトIgG2のFc変異体領域(Pro331Ser突然変異を含むFc 2)をコードする遺伝子を新規に合成した。得られたFc 2のDNAフラグメントは、リンカーペプチド、並びに、Fc 2 Pro331Ser変異体(vFc 2)(Fc 2の331位のProをSerを用いて置換した)を含むIgG2のヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインの配列を含んだ。リンカーペプチドは、16アミノ酸のGly-Serペプチドリンカーをコードする配列を含んだ。得られた約700bp長のDNAフラグメントをpUC19などのホールディングベクターのBamHIおよびEcoRI部位に挿入することによりpL-vFc 2プラスミドを得た。遺伝子の配列はDNAシーケンスによって確認された。

30

【0031】

hUTI-L-vFc 2融合遺伝子を調製するために、hUTIフラグメントをSpeIおよびBamHIを用いてp hUTIプラスミドから切り出し、そしてアガロースゲル電気泳動によって精製した。その後、精製されたフラグメントを、pL-vFc 2プラスミド中のペプチドリンカーの5'末端に挿入することにより、p hUTI-L-vFc 2プラスミドを得た。融合遺伝子は、hUTI、Gly-SerペプチドリンカーおよびFc 2変異体遺伝子を含む。

【0032】

hUTIとFc部分との間の(およびその両方に化学的に結合した)ペプチドリンカー、好ましくは可動性リンカーの存在は、hUTIDメインの可動性を増加させ、そしてその生物学的活性を増強する。本発明では、約20以下のアミノ酸長のペプチドリンカーが好ましい。1つのアミノ酸も本発明の範囲内にあるが、約20から約2のアミノ酸長の可動性ペプチドリンカーを有することが好ましい。グリシン、セリン、アラニンおよびトレオニンからなる群より選択された2つ以上のアミノ酸を含むペプチドリンカーを好ましくは使用することができる。ペプチドリンカーの例は、GlyGlyGlyGlySerなどのGly-Serペプチド構築ブロックを含む。図2は、hUTI、16アミノ酸ペプチドリンカー(GlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlySer)およびFc 2 Pro331Ser変異体をコードする配列を含む融合遺伝子と、その対応するアミノ酸配列を示す。図3は、hUTI-L-vFc 4(Ser228ProおよびLeu235Ala突然変異を有するFc 4)についての融合遺伝子および対応するアミノ酸配列

40

50

を示す。図4は、hUTI-L-vFc 1 (Leu234Val、Leu235Ala およびPro331Ser突然変異を有するFc 1) についての融合遺伝子および対応するアミノ酸配列を示す。

【0033】

実施例2 . hUTI-Fcのための発現ベクターの構築

その後、hUTI-L-vFc 融合タンパク質をコードする完全遺伝子を、pCDNA3 (Invitrogen) などの哺乳動物発現ベクターのHindIIIおよびEcoRI部位に挿入した。図5に示したように、最終発現ベクタープラスミドpCDNA3-hUTI-L-vFc は、哺乳動物細胞における高レベルの発現に必要とされるサイトメガロウイルス初期遺伝子プロモーター-エンハンサーを含む。前記プラスミドは、また、細菌におけるアンピシリン耐性、および哺乳動物細胞におけるG418耐性を付与するための選択マーカ-を含む。さらに、この発現ベクターは、宿主細胞にDHFR遺伝子発現が欠損している場合に、メトトレキサート(MTX)の存在下でhUTI-L-vFc 融合遺伝子およびDHFR遺伝子の同時増幅を可能とするジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR) 遺伝子を含む(例えば、U.S. Pat. No. 4,399,216参照)。

【0034】

実施例3 . トランスフェクションされた細胞株における融合タンパク質の発現

pCDNA3-hUTI-L-vFc 発現ベクタープラスミドを使用して哺乳動物宿主細胞株をトランスフェクションすることにより、融合タンパク質の発現を達成した。安定した高いレベルの発現のために好ましい宿主細胞株は、DHFR酵素を欠損したCHO細胞である(例えば、U.S. Pat. No. 4,818,679参照)。好ましいトランスフェクション法は電気穿孔法である。リン酸カルシウム共沈降法、リポフェクタミン2000を含む他の方法も使用することができる。電気穿孔法のために、PvuIを用いて鎖状化した20 μ gのプラスミドDNAを、電場250Vおよび静電容量960 μ Fdに設定されたGenePulserエレクトロポレーター(Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)を使用してキュベット中の2~5 \times 10⁷個の細胞に加えた。トランスフェクションから2日後、培地を、0.8mg/mlのG418を含む増殖培地と交換した。選択薬に対して耐性のあるトランスフェクション体を、抗ヒトIgGFcELISAを使用して融合タンパク質の分泌について試験した。発現された融合タンパク質の定量も、抗hUTIELISAによって行なわれた。高レベルのFc融合タンパク質を産生するウェルを、96ウェル組織培養プレート上での限界希釈によってサブクローニングした。

【0035】

より高いレベルの融合タンパク質の発現を達成するために、MTX薬物によって阻害され得るDHFRの遺伝子を使用することによって同時増幅を行なった。漸増濃度のMTXを含む増殖培地中において、トランスフェクションされた融合タンパク質の遺伝子をDHFR遺伝子と同時増幅させた。1 μ g/mlまでのMTXを含む培地中で増殖することのできるトランスフェクション体を、再度、限界希釈によってサブクローニングした。サブクローニングされた細胞株を、分泌率を測定することによってさらに分析した。24時間あたり100万個の細胞あたり100 μ gを超える分泌率レベルを生じたいくつかの細胞株を、無血清増殖培地を使用して懸濁培養に適応させた。1つの細胞株を、15日間かけて振とうフラスコを使用して100ml中で増殖させた。図6は、約3g/Lの融合タンパク質の累積濃度を示す。5から10日目に、最大生存細胞密度は、1mlあたり約600万個の細胞に留まった。これらの条件下で、分泌率は、24時間あたり100万個の細胞あたり約50 μ gであると計算される。馴化培地を、融合タンパク質の精製のために使用した。

【0036】

実施例4 . 融合タンパク質の精製および特徴付け

融合タンパク質を含む馴化培地を、1N NaOHを用いて滴定してpH7~8とし、そして0.45ミクロンのニトロセルロースフィルターを通してろ過した。ろ液を、リン酸緩衝食塩水(PBS)中で平衡化したProsepAカラムにロードした。融合タンパク質をProsepAに結合させた後、素通り画分を廃棄した。カラムを、280nmにお

10

20

30

40

50

けるODが0.01未満となるまでPBSを用いて洗浄した。その後、結合した融合タンパク質をpH3.75の0.1Mクエン酸緩衝液を用いて溶出した。0.4容量の1M K_2HPO_4 を用いて中和した後、精製されたタンパク質を含む画分をプールし、そしてPBSに対して透析した。その後、前記溶液を0.22ミクロンのニトロセルロースフィルターを通してろ過し、そして-70℃で保存した。10%還元SDS-PAGE分析によって示されているように(図9)、精製されたhUTI-L-vFcタンパク質の分子量は、約55kDであると推定された。類似した条件下で、ヒトの尿から精製されたhUTI (Techpool)の分子量は38kDであるようであった。融合タンパク質を、標準としてBSAを使用してBCAタンパク質アッセイによって定量した。

【0037】

実施例5 . in vitroにおける生物学的活性のアッセイ

トランスフェクション体の上清または精製されたタンパク質におけるUTIの生物学的活性を、標準的な手順に従って残留トリプシン活性を決定することによってアッセイした(例えば、Kakade et al Cereal Chem., 46:518-526, 1969参照)。基質としてBAPNA (N-ベンゾイル-L-アルギニン4-ニトロアニリド塩酸塩、Sigma-Aldrich)および酵素としてブタトリプシン(Sigma-Aldrich)を使用することによって改変を行なった。20μlの希釈されたhUTIタンパク質、精製されたhUTI-L-vFc、またはトランスフェクション体の上清、5μlのトリプシン(2.94g/L $CaCl_2$ を含む1mM HCl中の100mg/ml溶液)を含む反応混合物は、0.2Mトリエタノールアミン緩衝液で125μlの容量に調整された。混合物を振とうしながら37℃で20分間かけてインキュベーションした後、5μlのBAPNA(25mgを最小容量のDMSOに溶解し、そして0.2Mトリエタノールアミン緩衝液を用いて10mg/mlの最終濃度に調整した)を混合物に加え、そして37℃で振とうしながらさらに20分間かけてインキュベーションを続けた。その後、反応を、30μlの30%(v/v)氷酢酸の添加によって終了させた。ブランクおよびトリプシン対照を同時に行なった。405nmにおける吸光度を記録した。図7は、hUTI (Techpool)または精製されたrhUTI-L-vFc融合タンパク質の正規化された活性、対、hUTI (Techpool)または精製されたrhUTI-L-vFc融合タンパク質のモル(nM)濃度での濃度を示す。これらの条件下で、IC50は、hUTIについては 81.5 ± 6.0 nMであり、そして精製されたrhUTI-L-vFc融合タンパク質については 70.9 ± 1.5 nMであると推定された。

【0038】

実施例6 . マウス疾病モデルにおけるin vivoでの生物学的活性

精製されたrhUTI-L-vFcタンパク質のin vivoでの生物学的活性を、セルレインを用いて誘発された広く受け入れられている急性膵炎マウスモデルを使用して試験した。セルレインを用いての注射から24時間後に、マウスは、急性膵炎の生化学的、組織学的、および免疫組織化学的証拠を発達させる。血清中のアミラーゼ、リパーゼ、TNF- α およびIL-1などの生化学的マーカーが上昇した。免疫組織化学的染色法を使用して、白血球接着分子、血管内皮増殖因子およびアポトーシス関連タンパク質のレベルが、これらのマウスにおいて増大することが判明した(例えば、Ding et al, Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int., 9:645-650, 2010; Galuppo et al, Br J. Pharmacol., 162:1186-1201, 2011参照)。本発明者らの実験においては、血清中アミラーゼ活性を、急性膵炎の重度の指標として追跡した。

【0039】

30匹の8週令の雄C57BL/6マウス(20~22g)(SLAC Laboratory, Shanghai)を、1群あたり6匹の5つの群に無作為に分けた。マウスを15時間かけて断食させた後、各群に、1時間間隔で6回、50μg/kgのセルレインを腹腔内注射した。上のようなセルレイン注射を受けたマウスにおいては、アミラーゼ濃度は最後の注射後に急速に増加し、3時間後にピークに達した。その後、レベルはゆっくりと減少し、そして24時間後に基線に戻った。この観察は、最後のセルレインの注射から1時間後が、hUTIまた

10

20

30

40

50

は r h U T I - L - v F c による処置の効力を評価する最善の時であることを示した。

【 0 0 4 0 】

セルレインの初回および5回目のそれぞれの注射後、マウスに、その尾静脈を通して、ヒトの尿から精製された h U T I (Techpool) または r h U T I - L - v F c を注射した。図 8 に示したように、B 群および C 群のマウスを、それぞれ、1 mg/kg および 4 0 mg/kg の h U T I を用いて処置し；D 群および E 群のマウスを、それぞれ、3 mg/kg および 3 0 mg/kg の r h U T I - L - v F c を用いて処置した。A 群のマウスは、等容量の食塩水を受けた対照として作用した。セルレインの最後の注射後、2 0 0 μ l の血液試料を、マウスからその眼窩を通して種々の時点で回収した。試料を 1 0 分間かけて 6 0 0 0 rpm で遠心分離し、そして血清を、アッセイを実施するまで - 7 0 °C で保存した。アッセイを製造業者の指示に従って日立 7 0 6 0 自動化学分析装置 (Hitachi 7060 Automatic Chemistry Analyzer) で実施した。アミラーゼの濃度を、1 リットルあたりの国際単位で表現した。

10

【 0 0 4 1 】

対照 (A 群) と比較して、h U T I は、1 mg/kg の投与量においては、血清中アミラーゼ濃度の増加に対して全く効果を示さなかった (B 群)。4 0 mg/kg というのはるかに高い投与量においては、h U T I は、血清中アミラーゼの増加に対して 8 % の阻害効果を示した (C 群)。しかしながら、h U T I - L - v F c を用いての処置は、対照 (A 群) と比較して血清中アミラーゼ濃度を有意に減少させた。h U T I - L - v F c は、3 mg/kg において、血清中アミラーゼの増加に対して 2 6 % の阻害効果を示した ($p < 0 . 0 0 5$)。3 0 mg/kg においては、阻害は、5 3 % とはるかにより効果的であるようであった ($p < 0 . 0 0 1$)。単量体 r h U T I - L - v F c および h U T I の推定分子量をそれぞれ 5 5 k D および 3 8 k D として使用することによってモル濃度をさらに計算した (図 9)。それ故、4 0 mg/kg または 1 μ mol/kg の h U T I は 8 % の阻害効果を有し、一方、3 mg/kg または 0 . 0 2 7 μ mol/kg の r h U T I - L - v F c は、血清中アミラーゼ濃度の増加に対して 2 6 % の阻害効果を有した。モル基準で、r h U T I - L - v F c の投与量は、h U T I よりも 3 0 倍少なく、しかしながら血清中アミラーゼに対する阻害ははるかにより効果的であった。これらの結果は、r h U T I - L - v F c が、これらのマウスにおける急性膵炎を処置する上で h U T I よりもより効果的であることを確認した。

20

【 0 0 4 2 】

実施例 7 . ラットにおける血清中半減期

S D ラット (SLAC Laboratory, Shanghai) に、尾静脈を通して、精製された h U T I - L - v F c の 1 回投与量 (2 mg/kg) を注射した。種々の時間間隔で血液試料を回収し、そして 6 0 0 0 rpm で 1 0 分間かけて遠心分離にかけた。アッセイを実施するまで血漿上清を - 7 0 °C で保存した。血清中濃度を、E L I S A によって、ポリクローナルヤギ抗ヒト I g G F c 抗体およびセイヨウワサビペルオキシダーゼ標識マウス抗 h U T I 抗体を使用して試験した。h U T I - L - v F c の半減期は 9 1 0 分間と推定され、これに対して h U T I については 1 8 2 分間であった。それ故、h U T I - L - v F c の半減期は、ラットにおいて、h U T I と比較して有意に延長されている。

30

【 図 1 】

	アミノ酸の位置
ヒト IgG のアイソタイプ	228.....234 235 236 237.....330 331
G1	Pro.....Leu Leu Gly Gly.....Ala Pro
G2	Pro.....Val Ala Gly.....Ala Pro
G4	Ser.....Phe Leu Gly Gly.....Ser Ser
G1 変異体	Pro..... Val Ala Gly Gly.....Ala Ser
G2 変異体	Pro.....Val Ala Gly.....Ala Ser
G4 変異体	ProPhe Ala Gly Gly.....Ser Ser

【 図 2 】

```

1           M R S L G A L L L L L S A C L A
1 gctagccgcccaccATGAGGAGCCTCGGGGCCCTGCTCTTGCTGCTGAGCGCCTGCCTGG
17  V S A A V L P Q E E E G S G G G Q L V T
61 CGGTGAGCGCTGCTGTGCTACCCCAAGAAGAGGAAGGATCAGGGGGTGGGCAACTGGTAA
37  E V T K K E D S C Q L G Y S A G P C M G
121 CTGAAGTCACCAAGAAAGAAGATTCCCTGCCAGCTGGGCTACTCGGCCGGTCCCTGCATGG
57  M T S R Y F Y N G T S M A C E T F Q Y G
181 GAATGACCAGCAGGTATTTCTATAATGGTACATCCATGGCCTGTGAGACTTTCCAGTACG
77  G C M G N G N N F V T E K E C L Q T C R
241 GCGGCTGCATGGGCAACGGTAACAACCTCGTCACAGAAAAGGAGTGTCTGCAGACCTGCC
97  T V A A C N L P I V R G P C R A F I Q L
301 GAACTGTGGCGGCCTGCAATCTCCCCATAGTCCGGGGCCCCTGCCGAGCCTTCATCCAGC
117 W A F D A V K G K C V L F P Y G G C Q G
361 TCTGGGCATTTGATGCTGTCAAGGGGAAGTGCCTCTTCCCCTACGGGGGCTGCCAGG
137 N G N K F Y S E K E C R E Y C G V P G D
421 GCAACGGGAACAAGTTCTACTCAGAGAAGGAGTGCAGAGAGTACTGCGGTGTCCCTGGTG
157 G D E E L L G S G G G S G G G S G G G
481 ATGGTGATGAGGAGCTGCTGGGATCCGGTGGCGGTTCGGTGGAGGCGGAAGCGGCGGTG
177 G S V E C P P C P A P P V A G P S V F L
541 GAGGATCAGTCGAGTCCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCTTCC
197 F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V
601 TCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGC
217 V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G V
661 TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
237 E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V
721 TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTC AACAGCACGTTCCGTG
257 V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C K
781 TGGTCAGCGTCTCACC GTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCA
277 V S N K G L P A S I E K T I S K T K G Q
841 AAGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGC
297 P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q
901 AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACC
317 V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E
961 AAGTACAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG
337 S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G
1021 AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACG
357 S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V
1081 GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
377 F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S
1141 TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
397 L S P G K *
1201 CCCTGTCTCCGGGTAAATGAgattc

```


【 図 3 】

```

1           M R S L G A L L L L L S A C L A
1 gctagccgcccaccATGAGGAGCCTCGGGGCCCTGCTCTTGCTGCTGAGCGCCTGCCTGG
17  V S A A V L P Q E E E G S G G G Q L V T
61 CGGTGAGCGCTGCTGTGCTACCCCAAGAAGAGGAAGGATCAGGGGGTGGGCAACTGGTAA
37  E V T K K E D S C Q L G Y S A G P C M G
121 CTGAAGTCACCAAGAAAGAAGATTCTGCCAGCTGGGCTACTCGGCCGGTCCCTGCATGG
57  M T S R Y F Y N G T S M A C E T F Q Y G
181 GAATGACCAGCAGGTATTTCTATAATGGTACATCCATGGCCTGTGAGACTTCCAGTACG
77  G C M G N G N N F V T E K E C L Q T C R
241 GCGGCTGCATGGGCAACGGTAACAACCTTCGTACAGAAAAGGAGTGTCTGCAGACCTGCC
97  T V A A C N L P I V R G P C R A F I Q L
301 GAACTGTGGCGGCCTGCAATCTCCCCATAGTCCGGGGCCCCTGCCGAGCCTTCATCCAGC
117 W A F D A V K G G K C V L F P Y G G C Q G
361 TCTGGGCATTTGATGCTGTCAAGGGGAAGTGCCTCTTCCCCTACGGGGGCTGCCAGG
137 N G N K F Y S E K E C R E Y C G V P G D
421 GCAACGGGAACAAGTTCTACTCAGAGAAGGAGTGCAGAGAGTACTGCGGTGTCCCTGGTG
157 G D E E L L G S G G G S G G G G S G G G
481 ATGGTGATGAGGAGCTGCTGGGATCCGGTGGCGGTTCCGGTGGAGGCGGAAGCGGCGGTG
177 G S E S K Y G P P C P P C P A P E F A G
541 GAGGATCAGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCCAGCACCTGAGTTCGCGG
197 G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T
601 GGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTTCTATGATCTCCCGGA
217 P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N
661 CCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCA
237 W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F
721 ACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
257 N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G
781 TCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACG
277 K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I
841 GCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCA
297 S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E
901 TCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGG
317 E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D
961 AGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCG
337 I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
1021 ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCTC
357 V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R
1081 CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAGGCTAACCGTGACAAAGAGCA
377 W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y
1141 GGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT
397 T Q K S L S L S L G K *
1201 ACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGAgaattc

```

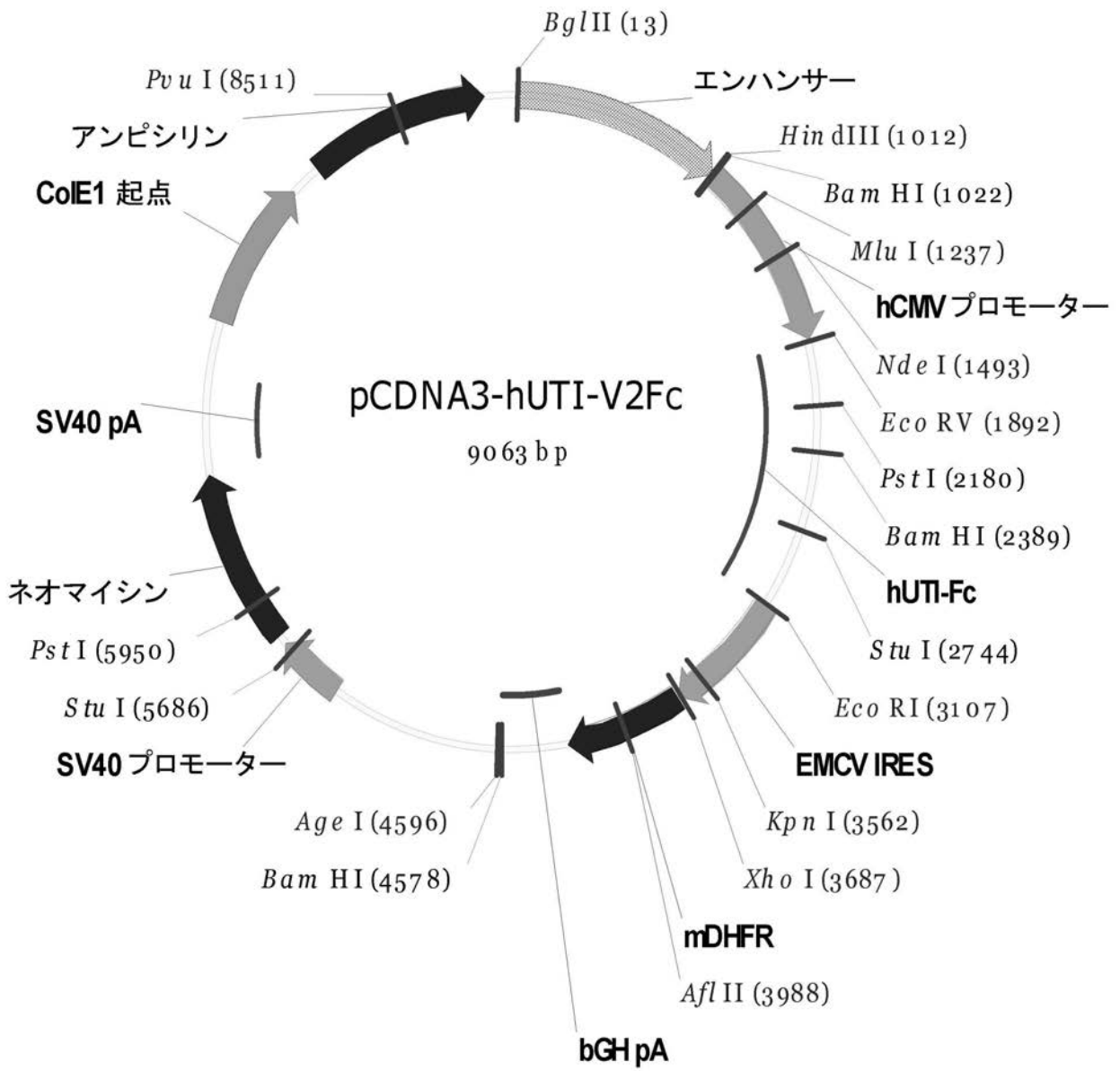
【 図 4 】

```

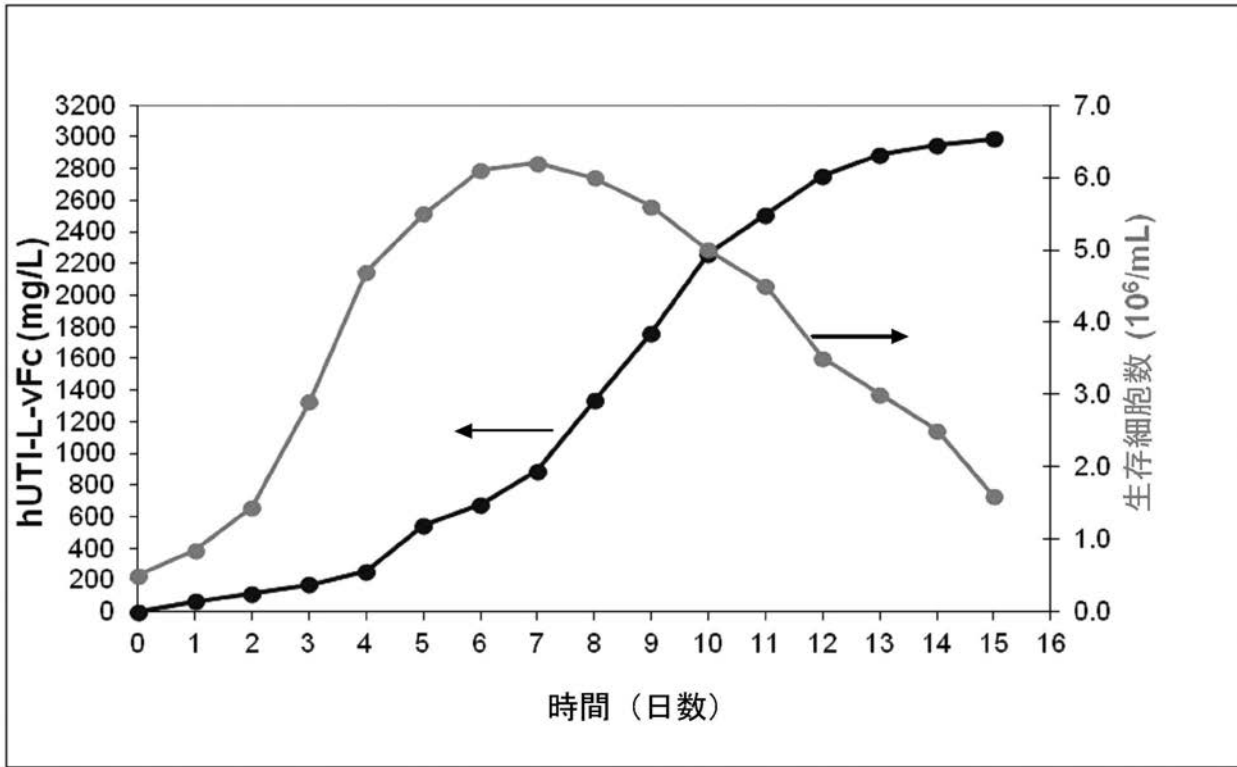
1           M R S L G A L L L L L S A C L A
1 gctagccgcccaccATGAGGAGCCTCGGGGCCCTGCTCTTGCTGCTGAGCGCCTGCCTGG
17  V S A A V L P Q E E E G S G G G Q L V T
61 CGGTGAGCGCTGCTGTGCTACCCCAAGAAGAGGAAGGATCAGGGGGTGGGCAACTGGTAA
37  E V T K K E D S C Q L G Y S A G P C M G
121 CTGAAGTCACCAAGAAAGAAGATTCTGCCAGCTGGGCTACTCGGCCGGTCCCTGCATGG
57  M T S R Y F Y N G T S M A C E T F Q Y G
181 GAATGACCAGCAGGTATTTCTATAATGGTACATCCATGGCCTGTGAGACTTTCAGTACG
77  G C M G N G N N F V T E K E C L Q T C R
241 GCGGCTGCATGGGCAACGGTAACAACCTTCGTACAGAAAAGGAGTGTCTGCAGACCTGCC
97  T V A A C N L P I V R G P C R A F I Q L
301 GAACTGTGGCGGCCTGCAATCTCCCCATAGTCCGGGGCCCTGCCGAGCCTTCATCCAGC
117 W A F D A V K G K C V L F P Y G G C Q G
361 TCTGGGCATTTGATGCTGTCAAGGGGAAGTGCCTCTTCCCCACGGGGGCTGCCAGG
137 N G N K F Y S E K E C R E Y C G V P G D
421 GCAACGGGAACAAGTTCTACTCAGAGAAGGAGTGCAGAGAGTACTGCGGTGTCCCTGGTG
157 G D E E L L G S G G G S G G G S G G G
481 ATGGTGATGAGGAGCTGCTGGGATCCGGTGGCGGTTCCGGTGGAGGCGGAAGCGCGGTG
177 G S D K T H T C P P C P A P E V A G G P
541 GAGGATCAGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGTCGCGGGGGGAC
197 S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E
601 CGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACACCTG
217 V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y
661 AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTCAACTGGT
237 V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S
721 ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
257 T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E
781 GCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
277 Y K C K V S N K A L P A S I E K T I S K
841 AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCA
297 A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L
901 AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGC
317 T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A
961 TGACCAAGAACCAGGTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
337 V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L
1021 CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCTCCCGTGC
357 D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q
1081 TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC
377 Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q
1141 AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC
397 K S L S L S P G K *
1201 AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGAgaattc

```

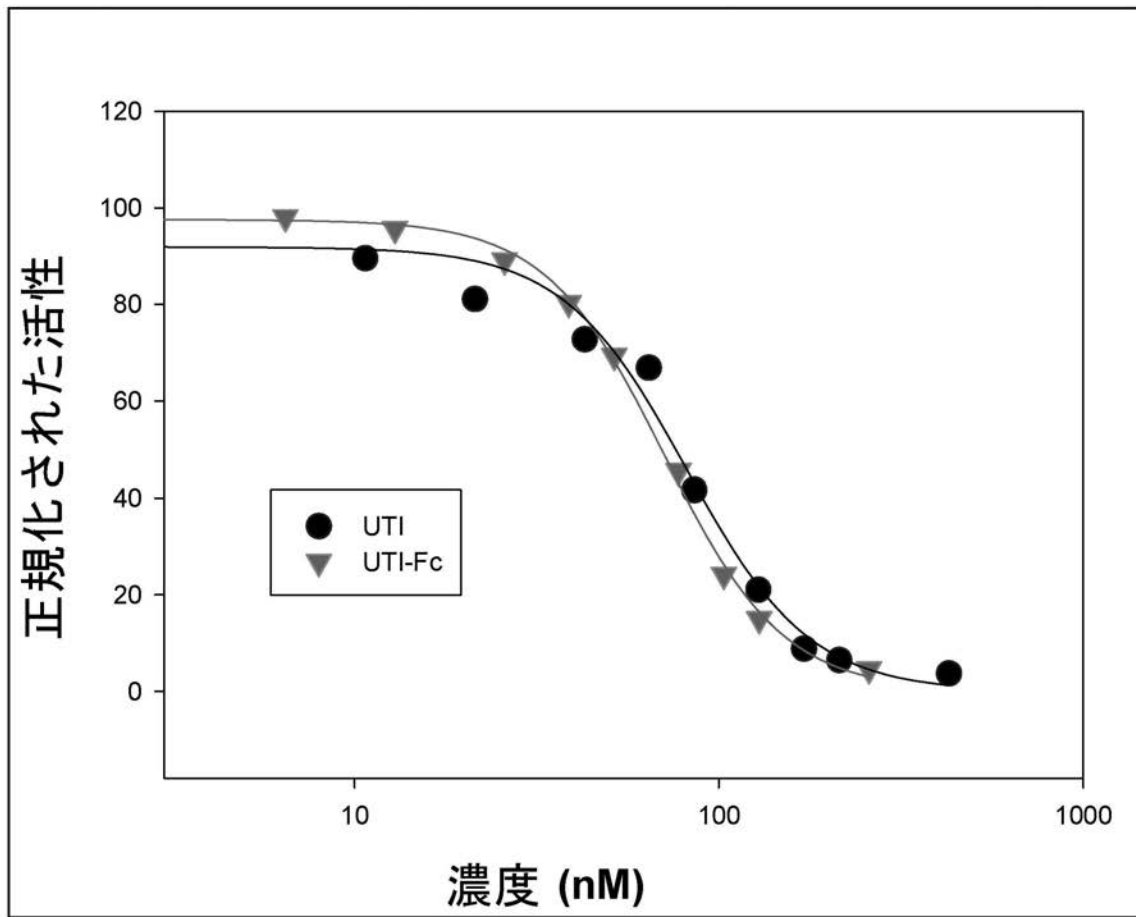
【 図 5 】



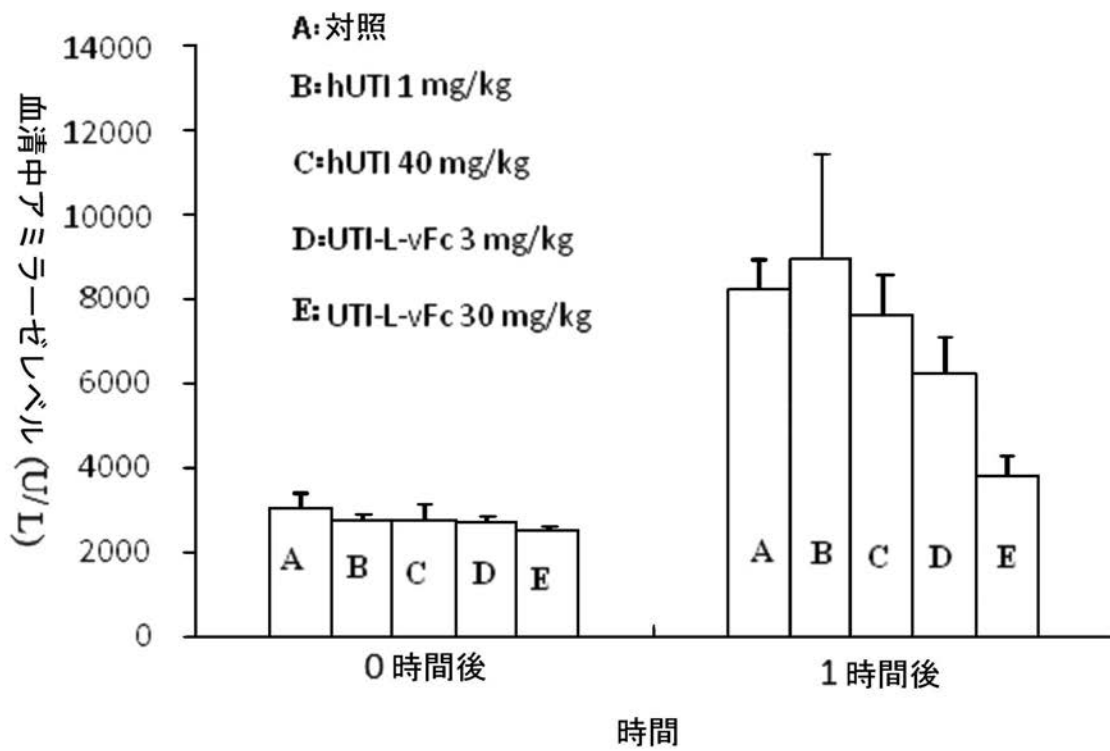
【 図 6 】



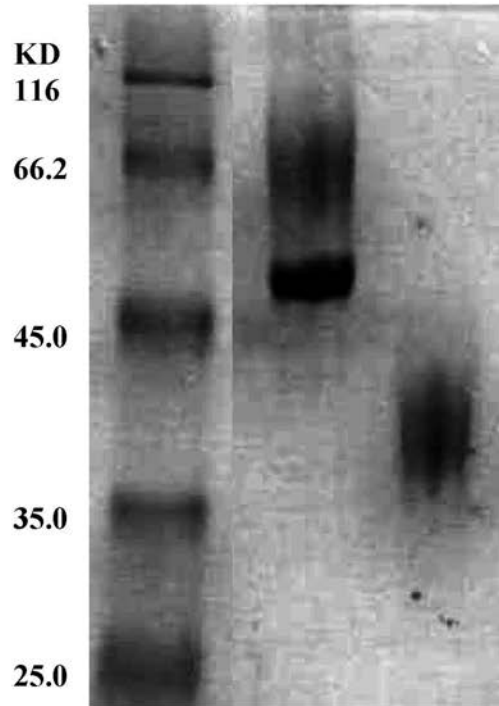
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 配列表 】

2013253079000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成25年7月12日 (2013.7.12)

【 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 】 変更

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2013253079000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	9/99 (2006.01)	C 1 2 N	9/99	

(74)代理人 100116528

弁理士 三宅 俊男

(74)代理人 100122736

弁理士 小國 泰弘

(74)代理人 100122747

弁理士 田中 洋子

(74)代理人 100132540

弁理士 生川 芳徳

(74)代理人 100146031

弁理士 柴田 明夫

(74)代理人 100141357

弁理士 鈴木 音哉

(72)発明者 李強

中華人民共和国上海市碧波路518号315室

(72)発明者 孫乃超

中華人民共和国上海市碧波路518号315室

(72)発明者 周若芸

中華人民共和国上海市碧波路518号315室

(72)発明者 武棟棟

中華人民共和国上海市碧波路518号315室

(72)発明者 劉瑞賢

中華人民共和国上海市碧波路518号315室

(72)発明者 金宜慧

中華人民共和国上海市碧波路518号315室

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA19 BA61 CA07 DA02 EA04

4B064 AG23 AG26 CA10 CA19 CC09 CC24 DA01

4H045 AA10 AA11 AA20 BA10 BA41 CA44 DA56 DA75 EA22 FA74

【外国語明細書】

2013253079000001.pdf