

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-529091

(P2005-529091A)

(43) 公表日 平成17年9月29日(2005.9.29)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00 H	4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 5
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/06	4 H O 4 5
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
// C O 7 K 14/52	C O 7 K 14/52 Z N A	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁)	

(21) 出願番号	特願2003-579881 (P2003-579881)	(71) 出願人	504361492 マーシア・ファーマ・リミテッド・ライア ビリティ・カンパニー Mercia Pharma, LLC アメリカ合衆国10583ニューヨーク州 スカースデイル、ブリュースター・ロード 111番
(86) (22) 出願日	平成15年3月24日 (2003. 3. 24)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稔
(85) 翻訳文提出日	平成16年11月25日 (2004. 11. 25)	(74) 代理人	100067035 弁理士 岩崎 光隆
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/008970	(74) 代理人	100064610 弁理士 中嶋 正二
(87) 国際公開番号	W02003/082349	(74) 代理人	100072730 弁理士 小島 一晃
(87) 国際公開日	平成15年10月9日 (2003. 10. 9)		
(31) 優先権主張番号	60/367, 591		
(32) 優先日	平成14年3月25日 (2002. 3. 25)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エオタキシン伝達炎症状態の処置および予防方法および組成物

(57) 【要約】

エオタキシンに対するもので、その生物活性を中和する自己抗体を含む、対象において活発な免疫応答を発する免疫原組成物および上記組成物を用いた処置方法。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

エオタキシンが伝達する状態についての対象の処置方法であって、エオタキシンに対する活発な免疫応答を対象において生じさせることを含む方法。

【請求項 2】

エオタキシンが伝達する状態が、喘息、アレルギーまたはアレルギー性疾患である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

活発な免疫応答が、上記状態の伝達におけるエオタキシンの影響を中和するのに十分なレベルでエオタキシンに結合している自己抗体を対象において産生させることを含む、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 4】

エオタキシンに結合する抗体を対象において産生させる免疫原性組成物で対象を免疫化することを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

免疫原性組成物が、免疫原性担体に結合したエオタキシンまたはエオタキシンの一部分を含む、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

免疫原性担体が、T細胞エピトープおよびエオタキシン由来のエピトープを含む、請求項 5 記載の方法。

20

【請求項 7】

免疫原性組成物がエオタキシンの免疫原性類似体を含む、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

免疫原性組成物がDNAワクチンである、請求項 4 記載の方法。

【請求項 9】

免疫原性タンパク質担体にカップリングしたエオタキシンまたはそのペプチドフラグメントを含む免疫原性組成物。

【請求項 10】

T細胞エピトープおよびエオタキシン由来のエピトープを含む、請求項 9 記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 11】

DT、TTまたはKLHから誘導された免疫原性担体にコンジュゲートされたエオタキシンまたはその一部分を含む、請求項 9 記載の免疫原性組成物。

【請求項 12】

エオタキシンまたはその一部分を免疫原性担体にコンジュゲートすることを含む、請求項 9 または 11 記載の組成物の製造方法。

【請求項 13】

請求項 9 記載の免疫原性組成物、医薬上許容されるアジュバントおよび医薬上許容される賦形剤を含む、治療用ワクチンとして使用される医薬処方物。

【請求項 14】

配列番号 1 ~ 38 および 42 ~ 61 に示されたペプチド配列から選択されるペプチド配列またはその混合物を含む、請求項 9 記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 15】

エオタキシンに対して免疫応答を誘発するペプチドをコード化するDNAワクチン。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

発明の背景

サイトカインは、免疫系の細胞により生産され、そこで作用するペプチドメッセンジャー分子である。それらはパラ分泌ホルモンまたは自己分泌ホルモンの性質を有し、それら

50

が細胞結合を免れ、リンパまたは血漿を通じて全身循環系に溢れ出た場合には全身的に作用し得る。サイトカインは化学的メッセンジャーとして重大な役割を演じ、正常な免疫機能にとっては不可欠なものであり、ある種の免疫系疾患において特異的サイトカインレベルは異常であり、病状を増強する。

【0002】

免疫系疾患、例えばアトピー状態、特に喘息、および自己免疫疾患では、ケモカイン類、特定クラスのサイトカイン、およびそれらのサブクラスインターロイキン類は重要な役割を演じる。組織におけるこれらのケモカインの存在およびレベルが生理学的変化を誘発し、特定疾患に苦しむ個体においてそれらが増幅および不滅化される結果、病状として認識される表現型を生じる。ケモカインは、炎症の開始および維持の伝達物質である。中和性抗ケモカイン抗体またはケモカイン受容体アンタゴニストとのケモカイン受容体相互作用を破壊することにより、炎症応答が縮小または阻害され得る。ケモカインに対する自己抗体は、ケモカイン並びに免疫系および病気に対するそれらのシグナル伝達および調節効果を有効に中和し得る。標的ケモカインに対する患者の自己抗体レベルの調節による、異常レベルのケモカインに伴う病気についての治療の概念は、事実上、体そのものの病因または病気の調節と競合し得る。

10

【0003】

病気におけるケモカイン類の重要な調節的役割により、作用モードが受容体へのケモカインの結合を遮断することである開発中の若干の生成物がもたらされる。これらの生成物の大多数は、その中に臨床試験中のものがあるが、ヒト化モノクローナル抗体(「mAb」)、非抗原性受容体アンタゴニストまたは可溶性受容体分子または類似体に基いており、それらは全て、多くの反復投与を必要とするため、理論的に言えば長期治療または予防的処置に向けたものではない。例えば、慢性関節リウマチおよび炎症性腸疾患用のヒト化抗TNFアルファmAb、および喘息処置用の幾つかのヒト化抗IL-4、抗IL-5、抗IL-8および抗IL-9mAbは開発中である。これらのヒト化mAb処置は、急性病状の短期処置についての可能性は有し得るが、それらは理論的に言えば長期維持療法には適していない。その結果、患者自身の免疫系を有効活用することにより、標的ケモカインレベルのポリクローナル自己抗体に基いた制御を展開させる治療法は、現時点では臨床試験において生成物の不利な点の多くを克服する手段として示唆されている(例えば、国際公開第00/65058号および米国特許第6093405号参照)。

20

30

【0004】

サイトカイン中和

開発中の最も関連性のあるサイトカイン中和方法は、サイトカイン受容体アンタゴニストの投与、サイトカインまたはサイトカイン受容体に対するヒト化モノクローナル抗体の投与、または受容体の切頭化形態の投与によるものであり、これらはサイトカインに結合してそれを中和する。例えば、米国特許第5912136号、同第5914110号、同第5959085号、同第6168791B1号および同第6171590B1号は全て上記方法を開示している。報告された別のサイトカイン中和方法は、サイトカイン遺伝子のコーディング配列に相補的なアンチセンス分子の使用によるものであり、その目標は遺伝子の発現を阻止することである。

40

【0005】

能動免疫化により産生された自己抗体によるサイトカイン中和は、現在病理学的状態の有望な処置方法であると考えられている(Zagury et al., 「新世代のワクチンに向かって: 抗サイトカイン治療ワクチン」、PNAS、2001年7月3日、第98巻、14号、8024-8029、Svenson et al., Journal of Immunological Methods 236(2000)1-8、Richard et al., PNAS、2000年1月18日、第97巻、2号、767-772、Dalum et al., Nature Biotechnology、第17巻、1999年7月、666-669)。サイトカイン中和に有用なワクチンは、サイトカイン分子を不活化し、それを免疫原性により製造され得る、例えば、高い循環レベルのヒトIL-6を有するトランスジェニックマウスにおいて遺伝子操作による抗原性非生物活性IL-6受容体アン

50

タゴニストを予防接種した後のIL-6の中和を有効に立証した Ciapponi et al.、「遺伝子操作によるIL-6受容体アンタゴニストの予防接種によるインターロイキン-6(IL-6)の誘導」、Nature Biotechnology、第15巻、1997年10月、997-1001頁参照。Ciapponi et al.は、免疫または新生物疾患の上記予防接種処置が、連続非経口送達を必要とするモノクローナル抗体(mAb)または受容体アンタゴニストによる治療法を凌ぐ利点を有することを推測している。別法として、サイトカインを免疫原性担体にカップリングすることにより、それを免疫原性にさせ得る(例えば、Richard et al.、PNAS、2000年1月18日、第97巻、2号、767-772、米国特許第6455504号、米国特許第6420141号、国際公開第01/43771号および国際公開第00/64397号参照)。抗サイトカインワクチン方法は、これらの病状に関与するインターロイキンのレベルを制御することによる喘息およびアレルギー性疾患の処置について提案されている(国際公開第00/65058号および米国特許第6093405号参照)。

10

【0006】

アトピー状態：喘息、アレルギーおよびアレルギー性疾患

喘息は最も重要な医学上の問題の一つになっており、米国だけでも約1500万人の喘息患者が存在する。喘息患者の数は過去10年において50%を凌ぐ割合で増加しており、米国では毎年700000人が発病し、多くは子供である。

【0007】

ヒトは全て、肺に入ったアレルゲンに対して防御的免疫応答を生じるが、中には、喘息発作を誘発するケモカインを含む物質を放出する、アレルギー性免疫抗体IgEを産生する細胞の極度の応答を生じることにより反応する個体もある。喘息症状が少なくとも1週間に2回現れる慢性喘息は、現在2タイプの薬剤(1)炎症を鎮める医薬、例えばコルチコステロイドおよび(2)発作時に収縮した気道を開き、呼吸しやすくするためのレスキュー薬剤により処置されている。現在市販されている薬剤は、喘息症状の軽減を助けるだけで、アレルギーおよびそれに続く喘息を誘発する免疫応答を排除または抑制するわけではない。さらに、現行医薬の大多数は、頻りに服用しなければならない丸剤であるかまたは吸入器で頻りにまたは発作中に投与しなければならないものである。大部分のステロイドに基く治療のように、それらはまた、使用増加または長期使用に伴って望ましくない副作用を生じ、効力を低下させ得る。数ヶ月ごとに投与するだけでよい、喘息発作を起すアレルギー様応答を抑制または排除するワクチン型医薬が非常に望ましい。

20

30

【0008】

T-ヘルパー細胞は、免疫応答の鍵を握る機能を遂行する。一般的に、T-ヘルパー前駆体(Th-p)細胞は、各々が重要な生物学的役割を有するT-ヘルパー1(Th-1)またはT-ヘルパー2(Th-2)エフェクター細胞へ免疫応答の一部として分化する。肺へ入った抗原に反応して、個体は防御的Th-1またはアレルギー性Th-2応答を発生得る。Th-2応答の結果、IgE抗体が産生し、アレルギー症状が起こる。アレルギー性および喘息個体は、高いレベルのIgEに伴って吸入されたアレルゲンに対して極度のTh-2応答を呈する。

【0009】

喘息における気道炎症は、Th2細胞、好酸球およびマスト細胞による気道壁の浸潤を特徴とする。これらの細胞は各々、喘息を特徴づけ、各細胞型が生じる、限られた一団のサイトカインに対する応答性を示す生理学的変化の一因となっている。

40

【0010】

Th-1またはTh-2細胞へのTh-p細胞の分化は、主として種々のセットのインターロイキンケモカインから成る異なるホルモンシグナル伝達経路により伝達される。Th-2経路は、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10およびIL-13により伝達される。これらのインターロイキンは、Th-2細胞により産生され、抗体産生およびアレルギー性免疫応答に関与する他の細胞へのシグナル伝達にとって決定的なものである。エオタキシンは、好酸球を調節し、IgE抗体の産生に影響を及ぼし、アレルギー応答に

50

とって重大なものである、Th - 2シグナル伝達カスケードのかなり下方の別のケモカインである。

【0011】

現在、新たな喘息治療に向けて実質的な研究および開発努力が為されている。これらには、主としてIL - 4およびIL - 5についてのケモカイン中和療法およびヒト化抗IgE mAbでの直接遮断または恐らくIgEに対して免疫化するワクチンによるIgE抗体の中和を目指す他の戦略がある。他に、さらなる慣用的なアレルギーワクチン戦略は、特異的ペプチドアレルギー、例えばネコ鱗屑またはブタクサ花粉による免疫化または脱感作を中心としている。これらのさらなる慣用的な研究領域はまた、新たな送達方法およびアレルギー予防接種へのDNAワクチン技術の適用に向けて努力しながら存続しているが、アレルギー特異的戦略により、喘息についての一般的治療法がもたらされる訳ではない。

10

【0012】

また、非特異的Th - 1免疫応答の発生、またはTh - 1免疫応答を誘発する既知Th - 1抗原またはDNAワクチンでの免疫化によるTh - 1応答への患者のTh - 2応答のシフトに焦点を絞った一般的喘息ワクチンについてはかなりの研究努力が為されている(例えば、米国特許第6086898号参照)。アレルギーおよび自己免疫疾患についての治療法として示唆されている能動免疫化方法は、インターロイキンIL - 4およびIL - 5のレベル制御に焦点を絞っている。米国特許第6093405号は、アレルギーまたは自己免疫疾患をそれぞれ処置することを目的とする、免疫原性IL - 4またはIL - 5サイトカイン組成物での能動免疫化によるIL - 4またはIL - 5に対する免疫応答の誘導

20

【0013】

エオタキシン

エオタキシンは、好酸球特異的ケモカインであり、好酸球蓄積を刺激するかまたは好酸球を誘引する。エオタキシンは、好酸球の走化性を誘導するが、好中球、単球またはT細胞の走化性についてはあまり誘導しない。エオタキシンは、単球化学誘導タンパク質(MCP)およびマクロファージ炎症タンパク質(MIP)をも含むクラスである、ケモカインのCCサブファミリーの要員である、Van Coillie et al., Cytokine & Growth Factor Reviews, 10(1999)61 - 86; Garcia-Zepeda et al.(1996)Nat.Med., 2: 449 - 456参照。

30

【0014】

現在、エオタキシンとして分類される少なくとも3種の分子：最初に同定され、依然としてエオタキシンとして称されるエオタキシン - 1(Kitaura, M et al., J.Biol.Chem., 1996, 271; 7725 - 30およびPonath et al., J.Clin.Invest. 1996, 97: 604 - 12参照)および後で発見されたエオタキシン - 2およびエオタキシン - 3(Conroy et al. Respir Res 2001, 2: 150 - 156; Guiterrez-Ramos et al. Immunology Today, 1999年11月、第20巻、11号、500 - 504参照)が存在する。エオタキシンは、ケモカイン受容体3、CCR3に結合し、それを通じて作用するもので、比較的高い親和力で好酸球漸増を誘導する。構造およびペプチド配列およびエオタキシンをコード化する遺伝子は公知であり、受容体結合については試験され、特性確認されている(Garcia Zepeda et al. Nature Medicine, 第2巻、4号、1996年4月、449 - 456; Ye et al., The Journal of Biological Chemistry, 第275巻、35号、2000年9月1日、27250 - 27257; MayerおよびStone, The Journal of Biological Chemistry, 第276巻、17号、2001年4月27日、13911 - 13916参照)。

40

50

【0015】

好酸球は、ぜん虫寄生体感染に対する体のTh-2型免疫防御の主成分の一つであり、感染個体の血液および組織に蓄積される。好酸球はカチオン性タンパク質の顆粒を含み、脱顆粒時それらは細胞環境へ放出され、侵入しているぜん虫に損傷を与える。アトピー状態、例えば喘息および慢性アレルギー疾患は、アレルギー性非ぜん虫刺激因子に対する優勢なTh-2型免疫応答を特徴とする。喘息および慢性アレルギー疾患の患者における肺の炎症は、好酸球の肺および気管支粘膜における浸潤および蓄積を特徴とする。ぜん虫感染の不存在下でのこれらの状態においては、脱顆粒時の好酸球カチオン性タンパク質の放出が周辺の細胞に損傷を与える。結果として、エオタキシンは、アトピー状態の処置および予防および特に喘息およびアレルギー疾患の治療について可能性のある標的として認識されている。米国特許第5993814号および同第6031080号およびPCT公開WO95/07985、WO97/00960、WO97/12914およびWO99/10534は、エオタキシンに対する抗体を含む様々なエオタキシンアゴニストおよびアンタゴニストの治療における使用について示唆している。国際公開第01/66754号は、受動免疫化方法においてエオタキシンが介する状態の処置を目的とする抗エオタキシンヒト抗体CAT212および213およびそのフラグメントの生産および使用について開示している。

10

【0016】

エオタキシンが作用する受容体、CC、CKR3またはCXCR3受容体は、既に特性確認されており(国際公開第97/41154号および米国特許第6171590B1号参照)、この受容体のアゴニストおよびアンタゴニストはまた治療について示唆されている(米国特許第6271347号参照)。米国特許第6171590B1号は、受容体から誘導された免疫原性オリゴペプチドが治療効果を目的として受容体に対する能動免疫化で使用され得ることを示唆している。しかしながら、上記で示した出版物または特許のうち、治療方法としてエオタキシン自体に対する能動免疫化を示唆しているものや、上記能動免疫療法に有用な免疫原性組成物を開示しているものは無い。

20

【0017】

発明の要約

本発明は、サイトカインエオタキシンを標的とするワクチン製品およびエオタキシン介在好酸球蓄積により生じる炎症状態、例えば喘息およびアレルギー疾患および他のアトピー状態について、ヒトを含む動物対象を処置するためのそれらの使用に関するものである。ワクチンまたは免疫原性製品は、種々の免疫原型および送達方法を採用し、単独または他の治療薬と合わせて使用され得る。

30

【0018】

抗原性ペプチドに基づく製品は、不活性および免疫原性にされた修飾エオタキシンを用いて処方され得る。ある種の実施態様において、免疫原は、少なくとも1個のエオタキシン受容体アンタゴニストまたはアゴニスト、または免疫原性担体にコンジュゲートされたエオタキシン由来のエピトープを含む。エオタキシンまたはエオタキシン模擬物質から誘導された免疫原は、当業界でよく知られている方法を用いて構築され、実験動物、例えばマウスまたはウサギにおいて免疫応答を誘導するのに使用され得る。産生した抗体は、臨床開発に最適なエピトープ選択を先導するものとして、インビトロで受容体に結合しているエオタキシンを中和する能力についてスクリーニングされ得る。DNAに基づく製品は、抗原性ペプチド生成物をコード化し、処置対象において生産させるDNAワクチン製品を含んでおり、免疫化対象においてエオタキシンに対する免疫応答を誘導する。特定製品の設計は、一次免疫応答が求められる標的組織および主として発生する免疫応答のタイプにより異なる。

40

【0019】

免疫原性組成物は、エオタキシンを免疫中和(immunoneutralize)する、すなわちエオタキシン活性をダウンレギュレーションしてエオタキシン介在好酸球蓄積を低減化させることにより炎症状態を改善するのに十分なレベルでエオタキシンに対し対象または患者にお

50

いて自己抗体応答を誘導する。免疫原は、免疫原性担体にカップリングされたエオタキシン配列または模擬物質の部分を含む組合わせペプチド免疫原または上記組合わせペプチド免疫原をコード化するDNAワクチンを含み得る。

【0020】

一実施態様では、エオタキシンに存在するエピトープまたはその免疫模擬物質である特異的ペプチド配列を、免疫原性担体にカップリングさせて抗エオタキシン免疫原を製造させる。免疫原は、適切な処方物、例えば油中水エマルジョンで注射により対象に投与されることにより、エオタキシンに対して中和する抗体を産生させる体液性免疫応答を誘導する。免疫応答は、ブースター用量の抗エオタキシン免疫原の投与により持続される期間維持され得る。適切な免疫原性担体は、タンパク質またはタンパク質トキシド、例えばジフテリアトキシド(DT)または破傷風トキシド(TT)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、インフルエンザウイルス血球凝集素などを含み得る。特異的ペプチド配列は、二官能性架橋剤とのコンジュゲーションを介して免疫原性担体にカップリングされる。別法として、特異的ペプチドは、特異的B細胞エピトープおよびT細胞エピトープを担う合成ヘテロ官能性免疫原性ペプチドとして、適切なT細胞エピトープ配列(複数も可)と連繋して合成されることにより、所望のエオタキシン標的フラグメントに対する持続的免疫原性応答を誘導し得る。特異的ペプチド配列は、当業界で公知の方法を用いてインビトロで、またはベクターDNAによる予防接種後にインビボでタンパク質を発現させるのに適切なプラスミドベクターを用いることにより融合タンパク質としてT細胞エピトープと連繋して発現され得る。

10

20

【0021】

本発明はまた、エオタキシン介在好酸球蓄積に随伴する状態の処置方法であって、本発明免疫原性組成物によるエオタキシンに対する対象の能動免疫化を含む方法に関するものである。本発明処置方法は、抗エオタキシンワクチンを用いた能動免疫化に加えて他の薬剤による対象の処置をも含む治療法を包含する。

【0022】

発明の詳細な記載

本発明は、エオタキシン介在好酸球蓄積を特徴とする状態の処置に有用な組成物を提供する。喘息および慢性アレルギー疾患が最も一般的であるこれらのアトピー状態には、アトピー性皮膚状態、例えば乾癬および他の状態、例えば好酸球性潰瘍性大腸炎がある。これらの状態の各々において、好酸球は、エオタキシン誘導好酸球漸増を通してかなりの程度罹患組織で蓄積する。高レベルの好酸球が罹患組織に慢性的に存在すると、時間をかけて進行し、不可逆的となり得る顕著な組織損傷が加えられる。先行技術の治療法は、エオタキシン効果の伝達について遂行されているものであり、小分子アンタゴニストによるCCR受容体に対するケモカインの作用の遮断、ヒトまたはヒト化モノクローナル抗体での受動免疫化によるエオタキシンレベルの低減化、またはCCR受容体自体に対する受動または能動免疫化に向けられている。小分子および受動免疫化方法は、反復投与を必要とし、患者コンプライアンスという観点についての欠点を有する。さらに、反復治療の結果として投与されたmAbに対する中和性抗体の誘導により、慢性疾患の長期処置についてのmAbによる受動免疫療法の有効性がひどく損なわれ得る(Adair, F., Drug Discovery World, 2002年夏、53-59頁)。他方、CCR3受容体自体に対する能動免疫化は、受容体への他のCCケモカインの結合を妨害し得るため、予想されず、意図されなかった生物学的結果を生じ得る。

30

40

【0023】

本発明は、能動免疫化に有用であり、ヒト対象を含む動物対象においてエオタキシン自体に対する持続的免疫応答を誘導し得る免疫原性組成物を提供することにより先行技術の短所を克服するものである。エオタキシンに対して対象で誘導される自己抗体は、好ましくは他のCCケモカイン、例えばMIP、MCP、エオタキシン-2またはエオタキシン-3と強くは交差反応しない。本発明による様々な免疫原は、特定状態の処置に最適である特異的免疫原を選択するため、興味の対象である病気または炎症状態に適切な動物モデ

50

ルで製造および分析され得る。喘息および他のアレルギー疾患に適切な動物モデルは、当業界ではよく知られている(Humbles et al., J.Exp.Med., 第186巻、4号、1997年8月18日、601-612、Corry et al., J.Exp.Med., 第183巻、1996年1月、109-117、Foster et al., J.Exp.Med., 第183巻、1996年1月、195-201、Lukacs et al., Am.J.Respir. Cell Mol.Bio., 第10巻、526-532、1994参照)。

【0024】

本発明免疫原は、当然、エオタキシンに対する特異性および結合親和力が十分に高い抗体を含む対象において免疫応答を誘導することにより、エオタキシンの生物活性を中和または調節することができる。さらに、誘導される抗エオタキシン抗体の力価は、当然、対象における高レベルのエオタキシンを低下させ、アトピー状態に冒されている組織に対し好酸球の漸増を縮小させるのに十分なものである。本発明の抗エオタキシン免疫原性組成物で対象または患者を能動免疫化することにより、エオタキシンと反応する自己抗体のレベルが対象で維持され、アレルギー反応中における好酸球漸増が阻止または改善され得る。この抗エオタキシン自己抗体レベルは、本発明免疫原性組成物のブースター投与により維持され得るため、当然、治療剤レベルのかなりの変動を呈し、患者コンプライアンスにとってあまり有利ではないことを欠点とする小分子エオタキシンアンタゴニストまたは受動抗エオタキシン免疫化で得られるものと比べて慢性的病状の制御について優れた防御力を提供する。さらに、mAbの受動免疫化は、反復投与時にターゲティングされたmAbに対する中和性抗体を発現させ易く、長期処置についてのそれらの有効性は制限されている。

10

20

【0025】

成熟ヒトエオタキシンは、開裂されて74アミノ酸の成熟タンパク質を解離し、ほぼ8.4 kDaの分子量となる23アミノ酸親水性アミノ末端配列を含む97アミノ酸前駆体タンパク質から誘導される(米国特許第6403782号、国際公開第99/10534号、国際公開第97/00960号、Ye et al., Journal of Biological Chemistry, 第275巻、35号、2000年9月1日、27250-27257、Garcia-Zepeda et al., Nature Medicine, 第2巻、4号、1996年4月、449-456、Ponath et al., J.Clin.Invest., 第97巻、3号、1996年2月、604-612、Mayer et al., Journal Biological Chemistry, 第278巻、17号、2001年4月27日、13911-13916参照)。成熟ヒトエオタキシンのアミノ酸配列(配列番号1)は以下の通りである(各アミノ酸残基について1文字コードを使用)：

30

GPASVPTTCC¹⁰ FNLNRKIPL²⁰ QRLESYRRIT³⁰ SGKCPQKAVI⁴⁰
FKTKLAKDIC⁵⁰ ADPKKKWVQD⁶⁰ SMKYLDQKSP⁷⁰ TPKP⁷⁴

【0026】

エオタキシンは通常免疫原性ではない。興味の対象であるエピトープに対応するペプチド自体またはペプチドのフラグメントは、当業界で熟知されている方法により免疫原性にされ得る。使用され得る一方法は、エオタキシン生物活性を失ってはいるが、免疫原形態であり、動物またはヒト対象において抗エオタキシン中和性抗体を誘導し得る不活性エオタキシンまたは不活性エオタキシンフラグメントを製造することである。不活性ではあるが免疫原性のエオタキシンまたはそのフラグメントの製造に有用であり得る若干の化学的、物理的および免疫学的処置が知られている(例えば、米国特許第6093405号；Zagury et al., PNAS, 2001年7月3日、第98巻、14号、8024-8029；Gringeri et al., Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome and Human Retrovirology, 第20巻、4号、1999年4月1日；Ciapponi et al., Nature Biotechnology, 1997年10月、第15巻、997-1001；Raaberg et al., Pediatric Research, 第37巻、2号、1995、169-174；Raaberg et al., Pediatric Research, 第37巻、2号、1995、175-181；Gringeri et al., Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 第7巻、7号、1994、978-988；Zagury et al., Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 第5巻、7号、1992、67

40

50

6 - 6 8 1 参照)。

【0027】

エオタキシンまたはそのフラグメントはまた、公知方法により、ペプチドまたはフラグメントを免疫原性担体タンパク質またはタンパク質トキソイド、例えばジフテリアトキソイド(DT)、破傷風トキソイド(TT)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、BCG、OVAなどにカップリングさせることにより免疫原性または他の点で生物学的不活性にされ得る(例えば、米国特許第6217881号、同第6132720号、同第5891992号、同第5609870号、同第5607676号、同第5468494号、同第5023077号および同第4201770号およびRichard et al., PNAS, 2000年1月18日、第97巻、2号、767-772; Svenson et al., Journal of Immunological Methods, 236(2000)、1-8; Dalum et al., Nature Biotechnology, 第17巻、1999年7月、666-669; Gonzalez et al., Annals of Oncology, 9:431-435、1998、およびDalum et al., The Journal of Immunology, 1996、157:4796-4804参照)。別法として、不活性ではあるが免疫原性である修飾エオタキシン変異型または形態は、国際公開第00/65058号および国際公開第95/05849号に開示された方法を用いることにより、エオタキシンと連繋してTヘルパーエピトープを導入することにより製造され得る。

【0028】

エオタキシンフラグメントコンジュゲート免疫原

本発明の一実施態様は、免疫原性タンパク質担体、例えばDTまたはTTにコンジュゲートされている、エオタキシン分子上の所望のエピトープに対応するエオタキシンペプチドフラグメントを含むことにより、雑多な(promiscuous)T細胞エピトープを提供し、長い抗体応答についての免疫記憶を可能にするコンジュゲート免疫原に関するものである。上記免疫原をヒトまたは動物対象に投与することにより、エオタキシンに対する能動体液性免疫応答を発現させ得る。本発明の一実施態様は、免疫原性担体タンパク質、例えばDTにコンジュゲートされることにより免疫原性にされた全ヒトエオタキシン分子を含む。本発明の他の実施態様は、免疫原性担体タンパク質にコンジュゲートされた短いエオタキシンペプチドフラグメントを含む。コンジュゲートは、一エピトープまたは複数のエピトープを含むほぼ4~50アミノ酸残基のペプチドを用いて構築され得、対象において抗体を誘導し、対象に存在するエオタキシン分子に存在するエピトープと交差反応させる。次いで、エピトープを含む上記一ペプチドまたは複数ペプチドを、一定範囲のペプチド対担体タンパク質モル比でタンパク質担体にコンジュゲートする。ペプチドは、免疫原性タンパク質に直接コンジュゲートされ得るか、またはペプチドスペーサー配列を組込んで、担体分子からの所望のエピトープを伸長させることにより、抗原提示細胞に対するその提示を促し、所望のエピトープの免疫原性を高め得る。担体へのペプチドのコンジュゲーションをホモ二官能性またはヘテロ二官能性架橋剤により実施することにより、所望のエピトープ含有ペプチドを担体タンパク質に結合させる。二官能性架橋剤の選択は、ペプチドにおける官能部分の利用能により異なる。これらのカップリング方法についての化学作用は、当業界ではよく知られており、米国特許第6132720号、同第5609870号および同第5468494号、およびChemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, S.S.Wong(1991)CRCプレス、インコーポレイテッドの開示に示されている。

【0029】

別法として、免疫原性エオタキシンペプチドは、選択されたエオタキシンエピトープを一T細胞エピトープまたは複数エピトープと連繋させて製造することにより、選択されたB細胞エピトープ(エオタキシンから誘導)をT細胞エピトープと共に提示して、免疫化対象において持続免疫応答を提供するように合成ペプチド化学により構築され得る。

【0030】

また、免疫原性エオタキシンペプチドを組換えDNA技術により構築することにより、所望のエオタキシンフラグメントがT細胞エピトープ(複数も可)に必要なDNA配列と連繋してコード化されるプラスミドベクターを製造し、それによってT細胞エピトープ(複

数も可)と共に選択されたB細胞エプトープ(エオタキシンから誘導)を含む融合タンパク質が製造され得る。融合タンパク質は、細胞培養/発酵技術を用いてインビトロで発現され得るか、またはDNAワクチンとして使用され、免疫化対象においてエオタキシン特異的持続的免疫応答を提供し得る。

【0031】

本発明のある種の実施態様において、成熟ヒトエオタキシン配列について言うと、分子のアミノ末端先端部からのアミノ酸残基1~45のペプチドフラグメントおよびカルボキシル末端先端部を構成する残基54~74のフラグメントが、本発明免疫原コンジュゲートの構築に有用である。免疫原性コンジュゲートは、同一ペプチドフラグメントまたは同じ免疫原性担体にコンジュゲートされた異なるペプチドフラグメントに存在し得る1個またはそれ以上の異なるエオタキシンエプトープを含み得る。本発明のコンジュゲート免疫原は、当業界で熟知されている方法を用いて上記成分と共に医薬上許容される賦形剤中でアジュバントまたは他の免疫刺激薬剤により処方され得る、(Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach, (1995) PowellおよびNewman編、プレナム・プレス(ニューヨーク)、Aucouturier et al., Vaccine 19(2001)2666-2672参照)。

10

【0032】

本発明の免疫原は、処方物および所望の免疫応答(粘膜、全身、組織特異的など)により異なり得る、若干の異なる投与経路(鼻腔内、経口、筋肉内または皮下注射など)により、一対象、一投与につきほぼマイクログラム~ミリグラムの範囲における免疫原の様々な投薬量で投与され得る。本発明のペプチドコンジュゲートワクチンは、一投与につきペプチドコンジュゲート約0.1マイクログラム~10ミリグラムの用量で適切な処方物での筋肉内注射により投与され得る。処置の目標はエオタキシンの生物活性を中和する抗体を誘導することであると理解した上で、投薬量は、処置されている状態および免疫原に対する患者の応答性に基いて担当医師により調節される必要があり得る。一患者当たりの用量摂取法は、患者の罹患組織におけるエオタキシン濃度レベルおよび免疫原に反応して患者において誘導される抗エオタキシン抗体力価により変動し得る。本発明免疫原はまた、エオタキシンに対する活発な免疫応答を維持するためにブースター摂取法に従って患者に投与され得る。

20

【0033】

抗エオタキシン免疫原はまた、他の医薬または抗炎症剤による処置プログラムで投与され得る。例えば、喘息またはアトピー性慢性アレルギー疾患の症例では、罹患組織におけるエオタキシンレベルおよび好酸球蓄積を制御およびダウンレギュレーションするように本発明の抗エオタキシンワクチンにより患者を能動免疫化し得、それと同時に例えば過度のアレルギー刺激因子により誘発された急性の発作に応じてレスキュー医薬または抗喘息または抗アレルギー剤を投与する。組合わせ処置で有用な上記追加薬剤には、コルチコステロイド、クロモグリエート、抗炎症剤、COX-2阻害剤、ロイコトリエン(受容体)アンタゴニスト、キサントリン、抗ヒスタミン剤および気管支拡張剤が含まれ得る。

30

【0034】

本発明免疫原の構築に有用な若干のエオタキシンペプチドフラグメントは以下の通りである：GPASVP(配列番号2)、GPASVPT(配列番号3)、GPASVPTT(配列番号4)、GPASVPTTC(配列番号5)、GPASVPTTCC(配列番号6)、GPASVPTTCCF(配列番号7)、GPASVPTTCCFN(配列番号8)、GPASVPTTCCFNL(配列番号9)、GPASVPTTCCFNLA(配列番号10)、GPASVPTTCCFNLAN(配列番号11)、GPASVPTTCCFNLANR(配列番号12)、GPASVPTTCCFNLANRK(配列番号13)、GPASVPTTCCFNLANRKI(配列番号14)、GPASVPTTCCFNLANRKIP(配列番号15)、GPASVPTTCCFNLANRKIPL(配列番号16)、GPASVPTTCCFNLANRKIPLQ(配列番号17)、FNLANR(配列番号18)、FNLANRK(配列番号19)、FNLANRKI(配列番号20)、FNLANRKIP(配列番号21)、FNLANRKIPL(配列番号22)、KKKWVQDSMKYLDQKSP

40

50

T P K P (配列番号 23)、K K W V Q D S M K Y L D Q K S P T P K P (配列番号 24)、
 K W V Q D S M K Y L D Q K S P T P K P (配列番号 25)、W V Q D S M K Y L D Q K S
 P T P K P (配列番号 26)、V Q D S M K Y L D Q K S P T P K P (配列番号 27)、Q D
 S M K Y L D Q K S P T P K P (配列番号 28)、D S M K Y L D Q K S P T P K P (配列
 番号 29)、S M K Y L D Q K S P T P K P (配列番号 30)、M K Y L D Q K S P T P K
 P (配列番号 31)、K Y L D Q K S P T P K P (配列番号 32)、Y L D Q K S P T P K P
 (配列番号 33)、L D Q K S P T P K P (配列番号 34)、D Q K S P T P K P (配列番号
 35)、Q K S P T P K P (配列番号 36)、K S P T P K P (配列番号 37)および S P T
 P K P (配列番号 38)。ペプチドは、当業界でよく知られている合成または組換え技法に
 より製造され得る。また、当業者であれば、ペプチドフラグメントのアミノ酸配列に修飾
 を加えることにより、対象においてエオタキシンに対する免疫応答の誘導に寄与する能力
 を維持しながら、その免疫原性を高めるかまたはフラグメントの他の特性を付与または向
 上させ得ることは理解しているはずである。上記修飾は、例えばアミノ酸残基の誘導体化
 により、または特定アミノ酸を別のものに置換することにより、または当業界で公知の他
 の方法により加えられ得る。

【0035】

特定動物対象ではエオタキシン生物活性を呈しないペプチドミメティクスまたは免疫模
 擬物質はまた、コンジュゲート免疫原を構築するのにも使用され得る。ペプチドミメティ
 クスは、本質的にそれ自体免疫原性ではあり得ないが、免疫原性ペプチドにカップリング
 することにより免疫原性にされ得る。ある種の実施態様において、ペプチドミメティクス
 は、他の哺乳類エオタキシン分子、例えばマウスまたはモルモットエオタキシンから誘導
 され得る(米国特許第 6031080 号および同第 5993814 号参照)。

【0036】

エオタキシンペプチドフラグメントまたは免疫模擬物質は、免疫原性タンパク質担体に
 直接コンジュゲートされ得るか、または別法としてペプチドスペーサー配列を組込ませて
 、担体分子からの所望のエピトープを伸長させることにより、抗原提示細胞へのその提示
 を促進し、それによって所望のエピトープの免疫原性を高め得る。様々なペプチドスペ
 ーサーが使用され得る。米国特許第 5609870 号および同第 5468494 号は、ペプ
 チドスペーサーおよび興味の対象であるペプチド、さらには本発明コンジュゲート免疫原
 の構築に有用であり得る免疫原性タンパク質担体、例えば D T または T T へのスペーサー
 のコンジュゲート方法を開示している。ペプチドスペーサー；S S P P P P C (配列番号
 39)、R P P P P C (配列番号 40)および L P P P P C (配列番号 41)は、本発明のエ
 オタキシンペプチドフラグメントに使用され得る。スペーサーペプチドを、エオタキシン
 ペプチドフラグメントのアミノ末端またはカルボキシル末端先端部に組込むことにより、
 免疫原性タンパク質にカップリングされているペプチド、例えば以下のものが製造され得
 る：

S S P P P P C K K K W V Q D S M K Y L D Q K S P T P K P (配列番号 42)、
 K K K W V Q D S M K Y L D Q K S P T P K P S S P P P P C (配列番号 43)、
 C P P P P S S K K K W V Q D S M K Y L D Q K S P T P K P (配列番号 44)、
 K K K W V Q D S M K Y L D Q K S P T P K P C P P P P S S (配列番号 45)、
 G P A S V P T T C C F N L A N R K I P L S S P P P P C (配列番号 46)、
 S S P P P P C G P A S V P T T C C F N L A N R K I P L (配列番号 47)、
 C P P P P S S G P A S V P T T C C F N L A N R K I P L (配列番号 48)、および
 G P A S V P T T C C F N L A N R K I P L S S P P P P C (配列番号 49)。

【0037】

典型的には、スペーサー配列は、エピトープ含有ペプチドフラグメントの製造中に合成
 ペプチド化学により特異的エオタキシン配列に組込まれる。特に、若干の親水性配列を伴
 う配列を含み、分子の表面に提示されると思われるエオタキシンフラグメントは、本発明
 に特に有用である。これらには、例えば S G K C P Q K A V I S S P P P P C (配列番号
 50)、C P P P P S S S G K C P Q K A V I (配列番号 51)、F K T K L A K D I C S

S P P P P C (配列番号 5 2)、C P P P P S S F K T K L A K D I C (配列番号 5 3)、A D P K K K W V Q D S S P P P P C (配列番号 5 4)およびC P P P P S S A D P K K K W V Q D (配列番号 5 5)がある。

【 0 0 3 8 】

一実施態様では、架橋剤の使用による担体タンパク質、例えばD TおよびT Tへの特異的エオタキシンフラグメントのコンジュゲーションを容易にするために、トレオニン残基による置換により天然配列からシステイン残基を排除することが望ましい。それによって、架橋工程中における潜在的に有害な副反応を排除しながらも、ペプチドフラグメントの流体力学的品質は保持される。例としては、S G K T P Q K A V I S S P P P P C (配列番号 5 6)、C P P P P S S S G K T P Q K A V I (配列番号 5 7)、F K T K L A K D I T S S P P P P C (配列番号 5 8)、C P P P P S S F K T K L A K D I T (配列番号 5 9)、A D P K K K W V Q D S S P P P P C (配列番号 6 0)およびC P P P P S S A D P K K K W V Q D (配列番号 6 1)がある。

10

【 0 0 3 9 】

抗エオタキシン免疫原は、免疫原性担体にコンジュゲートされた一ペプチドフラグメント、例えばD Tにコンジュゲートされた配列G P A S V P T T C C F N L A N R K I P L (配列番号 1 6)のペプチドフラグメントの一またはそれ以上のコピーを含み得る。他の実施態様では、2またはそれ以上の異なるペプチドフラグメントを同一免疫原性担体へコンジュゲートすることにより、対象においてエオタキシン上の2またはそれ以上のエピトープに指向した抗体により活発な免疫応答が誘導され得る。上記免疫原は、例えば、D Tにコンジュゲートされたペプチド配列G P A S V P T T C C F N L A N R K I P L (配列番号 1 6)およびK K K W V Q D S M K Y L D Q K S P T P K P (配列番号 2 3)の各々の多数コピーを含み得る。

20

【 0 0 4 0 】

別の実施態様において、処方物は、エオタキシン上の2またはそれ以上のエピトープに指向した抗体により対象において活発な免疫応答を誘導するように、2またはそれ以上の異なるペプチド免疫原性担体コンジュゲートを用いて製造され得る。例えば、投与される組成物は、2種の異なる免疫原構築物、すなわち担体にコンジュゲートされた一特異的エピトープを含む第一構築物と、担体の他分子にコンジュゲートされた第二の異なるエピトープを含む第二構築物とを併用した混合処方物である。上記免疫原処方物は、例えばペプチド配列D Tコンジュゲート：D TにコンジュゲートされたG P A S V P T T C C F N L A N R K I P L (配列番号 1 6)およびD TにコンジュゲートされたK K K W V Q D S M K Y L D Q K S P T P K P (配列番号 2 3)の各々の多数コピーを含み得る。

30

【 0 0 4 1 】

免疫原性タンパク質担体へのペプチドのコンジュゲーション方法は、当業界では公知である。例えば、トレオニン置換エオタキシンエピトープフラグメント：S G K T P Q K A V I S S P P P P C (配列番号 5 6)、F K T K L A K D I T S S P P P P C (配列番号 5 8)、A D P K K K W V Q D S S P P P P C (配列番号 6 0)は、ヘテロ二官能性架橋剤を介してD TまたはT T担体タンパク質にコンジュゲートされ得る。これらのエオタキシンフラグメントの一つまたはそれ以上は、ヘテロ二官能性架橋剤、例えばN-(イブシロンマレイミドカプロイルオキシ)-スクシンイミドエステル(EMCS)またはその水溶性類似体スルホ-EMCSとの反応によりD TまたはT Tに架橋している。この実施態様では、D TまたはT Tを、まず、トキシイドにおけるアミノ基にあるスクシニミジルエステルを介してヘテロ二官能性架橋剤と反応させる。この反応は、好ましくは室温で約1~3時間にわたってpH 6.5 ± 0.3で実施される。例えば5:1、10:1、15:1のマレイミジル基対担体タンパク質の比は、トキシイド(D Tまたは他の担体タンパク質)を適切な過剰の架橋剤と反応させることにより達成される。実際のモル過剰のクロスリンカーは、滴定により決定される。滴定中トキシイド1モル当たり組込まれたマレイミドのモル数は、マレイミジル-トキシイドとスルフヒドリル化合物、例えばシステインまたはベータメルカプトエタノールとの後続反応により決定され得る。マレイミジル トキシ

40

50

イドと反応したスルフヒドリル化合物の量は、残留スルフヒドリル化合物とビス ジチオ ニトロベンゾエートの反応により間接的に容易に決定される。ダイアフィルトレーションまたはゲル浸透クロマトグラフィーにより過剰の架橋剤を除去後、マレイミジル トキソイドを、その末端スルフヒドリル基を介して、活性化トキソイドのマレイミジル部分に対して1 : 1モル過剰のエオタキシン スペーサーペプチドと反応させる。トキソイドへのペプチドのこのコンジュゲーションは、好ましくは室温で約3 ~ 6時間かけてpH 6.0 ± 0.3で実施される。別法として、マレイミジル - トキソイドへのペプチドのこのコンジュゲーション反応は、室温で一晩反応させることにより実施され得る。容器中でマレイミド基を含む架橋剤とのコンジュゲーション反応を実施するのが好ましいものであり得る。ペプチドとの反応後、過剰のペプチドは、ダイアフィルトレーションまたはゲル浸透クロマトグラフィーによりリン酸緩衝食塩水(pH 7.2 ± 0.2)中へと除去される。

【0042】

エオタキシン トキソイドコンジュゲートは、個々に処方するか、または最終処方物において2またはそれ以上のエピトープ特異的コンジュゲートを提供すべく混合するのに適切な単一物体として製造され得る。別法として、2個またはそれ以上のエオタキシン 特異的ペプチドのカップリングでは、それらの末端スルフヒドリル基を介して単一マレイミジル トキソイド調製物にカップリングさせ得る。これは、活性化トキソイドの利用可能なマレイミジル部分に対して合わせて1 : 1モル過剰のエオタキシン特異的ペプチドの混合物とマレイミジル トキソイドを反応させることにより実施される。それによって、多重エオタキシン特異的エピトープをもつ単一トキソイドコンジュゲートが達成される。

【0043】

ある種の実施態様では、エオタキシン上の多重エピトープに対する免疫応答を免疫化対象で誘導することにより、標的エオタキシンの潜在的に相乗的な結合および中和が誘発され得る。適切なエピトープ配列は、特異的エオタキシンエピトープへの抗体結合間における妨害についての見込みを低減化するように、標的分子において互いに充分離れた配列から選択される。エオタキシンエピトープの上記組み合わせの一実施態様は、以下のエオタキシンおよびエオタキシン類似体配列を含む：ADPKKKWVQDSSPPPPC(配列番号60)またはCPPPPSSADPKKKWVQD(配列番号61)と組み合わせたSGKTPQKAVISSPPPPC(配列番号56)またはCPPPPSSSGKTPQKAVI(配列番号57)。

【0044】

エオタキシン特異的トキソイドコンジュゲートの免疫原提示に適切な処方物には、限定されるわけではないが、アルミニウムまたはアルヒドロゲルへの吸着、微粒子またはナノ粒子を含む、リポソーム、マイクロソームまたは類似マイクロスフェア内での封入、多相エマルションおよびマイクロエマルションを含む、水中油または油中水エマルションがある。可能性のある他の適切な処方物には、この場合、好ましいエオタキシン特異的トキソイドコンジュゲートである、含まれている抗原に対する免疫応答を刺激し得るアジュバント性を有するブロック コポリマーによる調製物が含まれる。

【0045】

本発明の一実施態様は、油中水エマルションの水相へのエオタキシン特異的トキソイドコンジュゲートの処方物を含む。エオタキシン特異的トキソイドコンジュゲートの滅菌濾過(0.1 ~ 0.2 μm)水溶液を、水油混合物のホモジナイゼーション時に安定した油中水エマルションを提供するのに十分な乳化剤を含む適切な滅菌濾過(0.2 μm)油性混合物と合わせる。ターミナル濾過、加熱殺菌または照射により滅菌され得ない、滅菌エマルションを含む医薬処方物の無菌処方および充填の実施に有用な層流フードまたは適切な滅菌アイソレーター内での感染予防手順として乳化工程は実施される。

【0046】

水対油混合物は、50 : 50 ~ 10 : 90の範囲で変動し得るが、好ましくは40 : 60 ~ 20 : 80水対油の範囲である。好ましい油中水エマルション製造というこの目的に適した油 / 乳化剤混合物は、SEPPIC、SA(パリ、フランス国)から入手されるモン

タニド製品シリーズから得られる。さらに、乳化工程中に最終エマルションの水相へ水溶性アジュバントをさらに組込むのが望ましいことであり得る(Adams, A. Synthetic Adjuvants, 1985, ジョン・ワイリー・アンド・サンズ、ニューヨーク)。適切なアジュバントの例としては、キル(Quill)A、QS21またはムラミルジペプチド(ノル-MDP)がある。

【0047】

抗エオタキシンDNAワクチン

本発明の別の実施態様では、上記エオタキシンペプチドフラグメントをコード化する核酸配列を含み、さらにTヘルパー細胞エピトープをコード化する核酸配列を含むDNA構築物は、DNAワクチンとして使用される。上記DNAワクチンの構築、処方および投与方法は、当業界では公知であり、本発明のエオタキシンペプチドエピトープに適合される、国際公開第00/65058号、国際公開第98/31398号、Donnelly et al., 1997、Annu.Rev.Immunol. 15: 617-648およびDonnelly et al., 1997、Life Sciences 60: 163-172参照。

10

【0048】

参考文献の引用

この明細書全体を通じて様々な出版物および特許文書が参考文献として引用されている。これらの各参考文献については出典明示により援用する。

【配列表】

20

MERPH.001.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Mercia Pharma LLC

<120> Methods and Compositions for Treating and Preventing Eotaxin Mediated Inflammatory Conditions

<130> MERPH.001

<150> US 60/367,591

<151> 2002-03-25

<160> 61 10

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 74

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu Ala Asn Arg
1 5 10 15

Lys Ile Pro Leu Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Lys Cys Pro Gln Lys Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Ala Lys Asp
35 40 45 20

Ile Cys Ala Asp Pro Lys Lys Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Lys Tyr
50 55 60

Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro
65 70

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220> 30

<223> Eotaxin epitope

<400> 2

Gly Pro Ala Ser Val Pro
1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

MERPH.001.ST25.txt

<223> Eotaxin epitope

<400> 3

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr
1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Eotaxin epitope

10

<400> 4

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Eotaxin epitope

<400> 5

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys
1 5

20

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Eotaxin epitope

<400> 6

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys
1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Eotaxin epitope

<400> 7

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe
1 5 10

30

MERPH.001.st25.txt

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Eotaxin epitope

<400> 8

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn
 1 5 10

<210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Eotaxin epitope

<400> 9

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu
 1 5 10

<210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Eotaxin epitope

<400> 10

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Eotaxin epitope

<400> 11

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu Ala Asn
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

10

20

30

MERPH.001.ST25.txt

<223> Eotaxin epitope

<400> 12

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu Ala Asn Arg
1 5 10 15

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Eotaxin epitope

<400> 13

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu Ala Asn Arg
1 5 10 15

10

Lys

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Eotaxin epitope

<400> 14

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu Ala Asn Arg
1 5 10 15

20

Lys Ile

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Eotaxin epitope

<400> 15

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu Ala Asn Arg
1 5 10 15

30

Lys Ile Pro

<210> 16

MERPH.001.ST25.txt

<211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Eotaxin epitope

<400> 16

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu Ala Asn Arg
 1 5 10 15

Lys Ile Pro Leu
 20

10

<210> 17
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Eotaxin epitope

<400> 17

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu Ala Asn Arg
 1 5 10 15

Lys Ile Pro Leu Gln
 20

20

<210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Eotaxin epitope

<400> 18

Phe Asn Leu Ala Asn Arg
 1 5

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Eotaxin epitope

<400> 19

Phe Asn Leu Ala Asn Arg Lys
 1 5

MERPH.001.ST25.txt

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Eotaxin epitope

<400> 20

Phe Asn Leu Ala Asn Arg Lys Ile
 1 5

10

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Eotaxin epitope

<400> 21

Phe Asn Leu Ala Asn Arg Lys Ile Pro
 1 5

<210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Eotaxin epitope

<400> 22

Phe Asn Leu Ala Asn Arg Lys Ile Pro Leu
 1 5 10

<210> 23
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Eotaxin epitope

30

<400> 23

Lys Lys Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Lys Tyr Leu Asp Gln Lys Ser
 1 5 10 15

Pro Thr Pro Lys Pro
 20

<210> 24
 <211> 20
 <212> PRT

MERPH.001.ST25.txt

<213> Artificial

<220>

<223> Eotaxin epitope

<400> 24

Lys Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Lys Tyr Leu Asp Gln Lys Ser Pro
 1 5 10 15

Thr Pro Lys Pro
 20

<210> 25

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Eotaxin epitope

<400> 25

Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Lys Tyr Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr
 1 5 10 15

Pro Lys Pro

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Eotaxin epitope

<400> 26

Trp Val Gln Asp Ser Met Lys Tyr Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro
 1 5 10 15

Lys Pro

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Eotaxin epitope

<400> 27

Val Gln Asp Ser Met Lys Tyr Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys
 1 5 10 15

10

20

30

MERPH.001.ST25.txt

Pro

<210> 28
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Eotaxin epitope

<400> 28

Gln Asp Ser Met Lys Tyr Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro
 1 5 10 15

10

<210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Eotaxin epitope

<400> 29

Asp Ser Met Lys Tyr Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro
 1 5 10 15

20

<210> 30
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Eotaxin epitope

<400> 30

Ser Met Lys Tyr Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro
 1 5 10

<210> 31
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Eotaxin epitope

<400> 31

Met Lys Tyr Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro
 1 5 10

30

<210> 32

MERPH.001.ST25.txt

<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Eotaxin epitope

<400> 32

Lys Tyr Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro
1 5 10

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Eotaxin epitope

<400> 33

Tyr Asp Leu Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro
1 5 10

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Eotaxin epitope

<400> 34

Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro
1 5 10

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Eotaxin epitope

<400> 35

Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro
1 5

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Eotaxin epitope

10

20

30

MERPH.001.ST25.txt

<400> 36

Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro
1 5<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial<220>
<223> Eotaxin epitope

<400> 37

10

Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro
1 5<210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial<220>
<223> Eotaxin epitope

<400> 38

Ser Pro Thr Pro Lys Pro
1 5

20

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial<220>
<223> Spacer peptide

<400> 39

Ser Ser Pro Pro Pro Cys
1 5<210> 40
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial<220>
<223> Spacer Peptide

<400> 40

Arg Pro Pro Pro Pro Cys
1 5

30

<210> 41

MERPH.001.ST25.txt

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Spacer peptide
 <400> 41
 Leu Pro Pro Pro Pro Cys
 1 5

<210> 42
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Spacer/Eotaxin epitope.
 <400> 42

10

Ser Ser Pro Pro Pro Cys Lys Lys Lys Trp Val Gln Asp Ser Met
 1 5 10 15

Lys Tyr Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro
 20 25

<210> 43
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Eotaxin epitope/Spacer
 <400> 43

20

Lys Lys Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Lys Tyr Leu Asp Gln Lys Ser
 1 5 10 15

Pro Thr Pro Lys Pro Ser Ser Pro Pro Pro Cys
 20 25

<210> 44
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> spacer/Eotaxin epitope
 <400> 44

30

Cys Pro Pro Pro Pro Ser Ser Lys Lys Lys Trp Val Gln Asp Ser Met
 1 5 10 15

MERPH.001.ST25.txt

Lys Tyr Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro
20 25

<210> 45
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Eotaxin epitope/Spacer

<400> 45

Lys Lys Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Lys Tyr Leu Asp Gln Lys Ser
1 5 10 15

10

Pro Thr Pro Lys Pro Cys Pro Pro Pro Ser Ser
20 25

<210> 46
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Eotaxin epitope/Spacer

<400> 46

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu Ala Asn Arg
1 5 10 15

20

Lys Ile Pro Leu Ser Ser Pro Pro Pro Pro Cys
20 25

<210> 47
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Spacer/Eotaxin epitope

<400> 47

Ser Ser Pro Pro Pro Pro Cys Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys
1 5 10 15

30

Cys Phe Asn Leu Ala Asn Arg Lys Ile Pro Leu
20 25

<210> 48
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial

MERPH.001.ST25.txt

<220>

<223> Spacer/Eotaxin epitope

<400> 48

Cys Pro Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys
1 5 10 15

Cys Phe Asn Leu Ala Asn Arg Lys Ile Pro Leu
20 25

<210> 49

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Eotaxin epitope/Spacer.

<400> 49

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu Ala Asn Arg
1 5 10 15

Lys Ile Pro Leu Ser Ser Pro Pro Pro Pro Cys
20 25

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Eotaxin epitope/Spacer

<400> 50

Ser Gly Lys Cys Pro Gln Lys Ala Val Ile Ser Ser Pro Pro Pro Pro
1 5 10 15

Cys

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Spacer/Eotaxin epitope

<400> 51

Cys Pro Pro Pro Pro Ser Ser Ser Gly Lys Cys Pro Gln Lys Ala Val
1 5 10 15

MERPH.001.ST25.txt

Ile

<210> 52
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Eotaxin epitope/Spacer

<400> 52

Phe Lys Thr Lys Leu Ala Lys Asp Ile Cys Ser Ser Pro Pro Pro Pro
 1 5 10 15

10

Cys

<210> 53
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Spacer/Eotaxin epitope

<400> 53

Cys Pro Pro Pro Pro Ser Ser Phe Lys Thr Lys Leu Ala Lys Asp Ile
 1 5 10 15

20

Cys

<210> 54
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Eotaxin epitope/Spacer

<400> 54

Ala Asp Pro Lys Lys Lys Trp Val Gln Asp Ser Ser Pro Pro Pro Pro
 1 5 10 15

30

Cys

<210> 55
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

MERPH.001.ST25.txt

<220>

<223> spacer/Eotaxin epitope

<400> 55

Cys Pro Pro Pro Pro Ser Ser Ala Asp Pro Lys Lys Lys Trp Val Gln
1 5 10 15

Asp

<210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Eotaxin epitope/Spacer

<400> 56

Ser Gly Lys Thr Pro Gln Lys Ala Val Ile Ser Ser Pro Pro Pro Pro
1 5 10 15

Cys

<210> 57

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> spacer/Eotaxin epitope

<400> 57

Cys Pro Pro Pro Pro Ser Ser Ser Gly Lys Thr Pro Gln Lys Ala Val
1 5 10 15

Ile

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Eotaxin epitope/Spacer

<400> 58

Phe Lys Thr Lys Leu Ala Lys Asp Ile Thr Ser Ser Pro Pro Pro Pro
1 5 10 15

MERPH.001.ST25.txt

Cys

<210> 59
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Spacer/Eotaxin epitope

<400> 59

Cys Pro Pro Pro Pro Ser Ser Phe Lys Thr Lys Leu Ala Lys Asp Ile
 1 5 10 15

10

Thr

<210> 60
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Eotaxin epitope/Spacer

<400> 60

Ala Asp Pro Lys Lys Lys Trp Val Gln Asp Ser Ser Pro Pro Pro Pro
 1 5 10 15

20

Cys

<210> 61
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Spacer/Eotaxin epitope

<400> 61

Cys Pro Pro Pro Pro Ser Ser Ala Asp Pro Lys Lys Lys Trp Val Gln
 1 5 10 15

30

Asp

【手続補正書】

【提出日】平成17年2月14日(2005.2.14)

【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】

2005529091000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/08970		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : A61K 51/00, 39/385, 39/35, 31/70; C07K 14/00, C07H 21/04; C12P 21/06, 21/04 US CL : 424/1.41, 193.1, 278.1; 530/403, 351; 536/23.5; 435/69.1, 69.7 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) U.S. : 424/1.41, 193.1, 278.1; 530/403, 351; 536/23.5; 435/69.1, 69.7				
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 practicable, search terms used) MEDLINE, WEST				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	JOSE, P.J. Eotaxin: Cloning of an Eosinophil Chemoattractant Cytokine and Increased mRNA Expression in Allergen-Challenged Guinea-Pig Lungs Biochemical and Biophysical Research Communications November 1994, Vol 205, No. 1, pages 788-794, see entire document.	1-15		
Y	GARCIA-ZEPEDA, E.A. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia Nature Medicine April 1996, Vol 2, No. 4, pages 449-456, see entire document.	1-15		
Y	JOSE, P.J. Eotaxin: A Potent Eosinophil Chemoattractant Cytokine Detected in a Guinea Pig Model of Allergic Airways Inflammation J. Exp. Med. March 1994, Vol. 179, pages 881-887, see entire document.	1-15		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent 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 </td> <td style="vertical-align: top;"> "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 </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 30 June 2003 (30.06.2003)		Date of mailing of the international search report 19 AUG 2003		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Valerie Bell-Harris</i> Laurie Scheiner Telephone No. (703) 308-0196		

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,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,M W,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ディミトリオス・ティ・ドリバス

アメリカ合衆国 1 0 5 8 3 ニューヨーク州スカーズデイル、ブリュースター・ロード 1 1 1 番

Fターム(参考) 4C084 AA13 NA14 ZA592 ZB132

4C085 AA03 BB11 EE01

4H045 AA30 CA40 DA01 EA20 EA31