

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5818804号  
(P5818804)

(45) 発行日 平成27年11月18日 (2015.11.18)

(24) 登録日 平成27年10月9日 (2015.10.9)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

C O 7 K 16/28 (2006.01)

C O 7 K 16/28 Z N A

C O 7 K 16/46 (2006.01)

C O 7 K 16/46

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 15 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-539274 (P2012-539274)  
 (86) (22) 出願日 平成22年11月12日 (2010.11.12)  
 (65) 公表番号 特表2013-511267 (P2013-511267A)  
 (43) 公表日 平成25年4月4日 (2013.4.4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2010/067332  
 (87) 国際公開番号 W02011/061119  
 (87) 国際公開日 平成23年5月26日 (2011.5.26)  
 審査請求日 平成25年11月11日 (2013.11.11)  
 (31) 優先権主張番号 09176525.5  
 (32) 優先日 平成21年11月19日 (2009.11.19)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)  
 (31) 優先権主張番号 61/262,998  
 (32) 優先日 平成21年11月20日 (2009.11.20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 309025524  
 メルク セローノ ソシエテ アノニム  
 スイス国, ボー, 1 2 6 7 クワンサン,  
 サントル アンデュストリエル  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次  
 (74) 代理人 100117019  
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト IL-22 RA に対するヒト化抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト IL-22RA に結合するヒト化抗体であって、

- a) それぞれ配列番号 1、2 及び 3 のアミノ酸配列から成る H-CDR1、H-CDR2、及び H-CDR3 を含む重鎖可変ドメイン；及び
- b) それぞれ配列番号 4、5 及び 6 のアミノ酸配列から成る、又は、それぞれ配列番号 4、5 及び 7 のアミノ酸配列から成る L-CDR1、L-CDR2、及び L-CDR3 を含む軽鎖可変ドメイン、を含む、抗体。

【請求項 2】

- a) 重鎖可変ドメインが、それぞれ配列番号 8、9、10 及び 11 のアミノ酸配列から成るフレームワーク領域 H-FR1、H-FR2、H-FR3 及び H-FR4 を含み、
- b) 軽鎖可変ドメインが、それぞれ配列番号 12、13、14、及び 15 のアミノ酸配列から成るフレームワーク領域 L-FR1、L-FR2、L-FR3 及び L-FR4 を含む、
- 請求項 1 に記載のヒト化抗体。

【請求項 3】

- a) 重鎖可変ドメインが配列番号 16 のアミノ酸配列から成り、
- b) 軽鎖可変ドメインが配列番号 17 のアミノ酸配列から成る、
- 請求項 1 又は 2 に記載のヒト化抗体。

【請求項 4】

- a) 配列番号 18 のアミノ酸配列から成る重鎖定常領域、及び

10

20

b) 配列番号19のアミノ酸配列から成る軽鎖定常ドメイン、を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のヒト化抗体。

【請求項 5】

配列番号20のアミノ酸配列を含む又は配列番号20のアミノ酸配列から成る重鎖、及び、配列番号21のアミノ酸配列を含む又は配列番号21のアミノ酸配列から成る軽鎖を含む、ヒトIL-22RAに結合する、ヒト化抗体。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のヒト化抗体の重鎖及び軽鎖の双方をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 7】

a) 請求項 5 に記載のヒト化抗体の重鎖をコードするポリヌクレオチド、又は配列番号22を含む若しくは配列番号22から成る請求項 5 に記載のヒト化抗体の重鎖をコードするポリヌクレオチド、及びb) 請求項 5 に記載のヒト化抗体の軽鎖をコードするポリヌクレオチド、又は配列番号23を含む若しくは配列番号23から成る請求項 5 に記載のヒト化抗体の軽鎖をコードするポリヌクレオチド、を含む、発現ベクター。

【請求項 8】

請求項 6 に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項 9】

請求項 7 又は 8 に記載のベクターで形質転換された、宿主細胞。

【請求項 10】

CHO細胞である、請求項 9 に記載の宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のヒト化抗体を製造する方法であって、請求項 9 又は 10 に記載の宿主細胞を培養する工程、及び抗体を単離する工程を含む、方法。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のヒト化抗体、又は請求項 11 に記載の方法に従って製造されたヒト化抗体を含む、医薬組成物。

【請求項 13】

医薬としての使用のための、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のヒト化抗体、又は請求項 11 に記載の方法に従って製造されたヒト化抗体。

【請求項 14】

乾癬、乾癬性関節炎又はアトピー性皮膚炎の治療における使用のための、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のヒト化抗体、又は請求項 11 に記載の方法に従って製造されたヒト化抗体。

【請求項 15】

乾癬、乾癬性関節炎又はアトピー性皮膚炎の治療用医薬の調製のための、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のヒト化抗体、又は請求項 11 に記載の方法に従って製造されヒト化抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトIL-22RAに対するヒト化抗体、並びに乾癬及び乾癬性関節炎及びアトピー性皮膚炎等の他の免疫介在疾患の治療におけるその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

IL-22RA (IL22R, IL22R1, IL22RA1, CRF2-9 及びZcytor11としても知られる) は、II型サイトカイン受容体ファミリーに属し、IL-20、IL-22及びIL-24のための受容体の構成要素である。その構造的類似性のため、IL-20、IL-22及びIL-24はIL-19及びIL-26と共に、いわゆる「IL-10ファミリー」中のIL-10と結合される (Kunz S et al. 2006)。IL-10は、マクロファージ、T細胞、及び他の免疫系細胞における炎症促進性サイトカイン発現の下方制御を媒介する免疫応答の主要制御因子である (Moore KW et al. 2001)。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 3 】

インビトロにおいて (In vitro)、IL-20及びIL-24は、活性化免疫細胞によってだけでなく、ケラチノサイトによってもまた同程度に生成される。インビボ (In vivo) において、これらのサイトカインは、炎症組織において最初に発現される。IL-20及びIL-24は、2つの受容体複合体、IL-20RA/IL-20RB及びIL-22RA/IL-20RBを介して信号を送信することができる (Langer JA et al. 2004)。一部の組織、特に皮膚、生殖及び呼吸器系由来の組織、及び様々な腺は、これらのメディエーターの主要な標的であると思われる (Kunz S et al. 2006)。

## 【 0 0 0 4 】

CD4<sup>+</sup>T細胞の活性化によって上方制御される遺伝子として発見されたIL-22は、IL-10と2%のアミノ酸配列同一性を共有するため、当初はIL-10関連T細胞由来誘発因子 (IL-TIF) と命名された (Dumoutier L et al. 2000)。免疫細胞機能を制御するIL-10と異なり、IL-22は免疫系への組織応答を制御する。IL-22は様々な組織内で高発現されるIL-22RA及びIL-10RBによって形成されるヘテロ二量体受容体を介して信号を送信するが、免疫細胞上で検出不可能である。まず、IL-22はそのIL-22RA結合部位を介してIL-22RAの細胞外ドメインに結合し、続いてIL-10RBはIL-22及びIL-22RAの相互作用によって生じる領域に結合し、IL-22に高親和性を有するサイトカイン受容体複合体を形成する (Li J et al. 2004)。IL-10RBは多くの異なるT細胞型によって広範に発現されるので、IL-22RA発現は、細胞のIL-22応答性を決定する制限要素である。IL-22RAは肝臓、及び皮膚、肺、膵臓及び他の末梢組織において強く発現される (Wolk K et al. 2004; Aggarwal S et al. 2001)。異なる株化T細胞の広範なスクリーニングにより、IL-22RAを発現する細胞のみがIL-22に応答することが明らかとなり、これはIL-22シグナル伝達を媒介することができる代替受容体がないことを示している。

## 【 0 0 0 5 】

IL-22結合タンパク質 (IL-22BP; 別名IL22BP, IL22RA2, IL-22R-アルファ2, CRF2X, CRF2-S1及びCRF2-10) と呼ばれる溶解性受容体も、天然タンパク質アンタゴニストとしてIL-22に結合することができ、おそらくIL-22活性の全身制御を供する (Kotenko SV et al. 2003)。IL-22は、乾癬、乾癬性関節炎及びアトピー性皮膚炎等の、活性化T細胞の浸潤を含む、異なる慢性炎症性疾患に罹患する患者由来の病変組織で発見された。IL-22は、慢性炎症性疾患に罹患する患者の病変におけるその発現及びIL-6、IL-8及びTNF- $\alpha$ 等の炎症促進性サイトカインのその誘発のため、炎症促進性サイトカインとして最も一般的に記載される (Wolk K et al. 2004; Andoh A et al. 2005; Ikeuchi H et al. 2005; Nograles KE et al. 2009a.; Nograles KE et al. 2009b)。最近、Zheng等は、乾癬のマウスモデルにおいてIL-22がIL-23誘発性皮膚炎の媒介に重要であることを示し、これはIL-22の炎症促進機能を示している (Zheng Y et al. 2007)。ケラチノサイト過形成、特定の組織におけるケモカインの誘発及び炎症促進性サイトカイン産生を含むIL-22の生物学的作用を考えると、例えば受容体結合を妨害することによって、IL-22の活性を遮断、抑制、低減又は中和する拮抗剤の使用は、炎症部位において病原性細胞の浸潤を防止することができる。マウス抗ヒトIL-22RAモノクローナル抗体は、2005年10月21日出願のPCT国際特許出願第2006/047249号に記載された。しかしながら、マウス抗体は免疫原性を生じる可能性があり、ヒト化抗ヒトIL-22RA抗体が望ましい。ヒト化抗体は通常、ヒトの治療における使用に関してマウス抗体よりも少なくとも潜在的に3つの利点を有する: (1) エフェクター部分がヒトであるので、ヒト免疫系の他の部分とより良好に相互作用することができる (例えば、補体依存性細胞傷害(CDC)又は抗体依存性細胞傷害(ADCC)によってより効率的に標的細胞を破壊する); (2) ヒト免疫系はヒト化抗体のフレームワーク又は定常領域を異物として認識せず、従ってそのような注入抗体に対する抗体応答は全体的に異物マウス抗体に対するものより低減されるであろう; そして (3) 注入マウス抗体は、ヒトの循環においてヒト抗体の半減期よりはるかに短い半減期を有することが報告された。注入ヒト化抗体は、おそらく天然に生じるヒト抗体とより類似した半減期を有し、これにより投与容量を低減又は投与頻度を低下することが可能であろう。従って、上記を考慮して、乾癬、乾癬性

10

20

30

40

50

関節炎及びアトピー性皮膚炎等のIL-22介在炎症を治療するためのヒト化抗ヒトIL-22RA抗体が必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

第一の側面において、本発明は、ヒトIL-22RAに結合するヒト化抗体を供する。本発明のヒト化抗体は、a) 配列番号1、2及び3、それぞれのアミノ酸配列から成るH-CDR1、H-CDR2、及びH-CDR3を含む重鎖可変ドメイン、及びb) 配列番号4、5及び6、それぞれのアミノ酸配列又は配列番号4、5及び7、それぞれのアミノ酸配列から成るL-CDR1、L-CDR2、及びL-CDR3を含む軽鎖可変ドメインを含む。他の側面において、本発明は、a) 重鎖可変ドメインが、配列番号8、9、10及び11、それぞれのアミノ酸配列から成るフレームワーク領域H-FR1、H-FR2、H-FR3及びH-FR4を含み、b) 軽鎖可変ドメインが、配列番号12、13、14及び15、それぞれのアミノ酸配列から成るフレームワーク領域L-FR1、L-FR2、L-FR3及びL-FR4を含む本明細書に記載の抗体を供する。他の側面において、本発明は、a) 重鎖可変ドメインが配列番号16のアミノ酸配列から成り、b) 軽鎖可変ドメインが配列番号17のアミノ酸配列から成る本明細書に記載の抗体を供する。他の側面において、本発明は、a) 配列番号18のアミノ酸配列から成る重鎖定常領域、b) 配列番号19のアミノ酸配列から成る軽鎖定常部ドメインを含む本明細書に記載の抗体を供する。

【0007】

他の側面において、本発明は、配列番号20のアミノ酸配列を含む又はから成る重鎖及び配列番号21のアミノ酸配列を含む又はから成る軽鎖を含む、ヒトIL-22RAに結合するヒト化抗体を供する。他の側面において、本発明は、ポリヌクレオチド、例えば、本発明のヒト化抗体の重鎖をコードするDNAを供する。好ましくは、当該ポリヌクレオチドは、配列番号22を含む又はから成る。

【0008】

他の側面において、本発明は、ポリヌクレオチド、例えば、本発明のヒト化抗体の軽鎖をコードするDNAを供する。好ましくは、当該ポリヌクレオチドは、配列番号23を含む又はから成る。

【0009】

他の側面において、本発明は、ポリヌクレオチド、例えば、本発明のヒト化抗体の重鎖及び軽鎖の双方をコードするDNAを供する。他の側面において、本発明は、ベクターを供し、詳細には、a) 本発明のヒト化抗体の重鎖をコードするポリヌクレオチド、及びb) 本発明のヒト化抗体の軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを供する。

【0010】

他の側面において、本発明は、ベクターを供し、より詳細には、本発明のヒト化抗体の重鎖及び軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを供する。

【0011】

他の側面において、本発明は、宿主細胞、好ましくは、例えば、形質移入の結果として、ベクター及び特に本発明の発現ベクターを含むCHO細胞を供する。

【0012】

他の側面において、本発明は、本発明のヒト化抗体の生成方法、宿主細胞、好ましくは、本発明のCHO細胞を培養する工程、及び本発明のヒト化抗体を単離する工程を含む方法を供する。

【0013】

他の側面において、本発明は、医薬としての使用、特に乾癬、乾癬性関節炎又はアトピー性皮膚炎の治療における使用のための本発明のヒト化抗体を供する。

【0014】

他の側面において、本発明は、本発明のヒト化抗体を含む医薬組成物及びその医薬としての使用、特に乾癬、乾癬性関節炎又はアトピー性皮膚炎の治療における使用を供する。

【0015】

他の側面において、本発明は、乾癬、乾癬性関節炎又はアトピー性皮膚炎の治療のための医薬の製造における、本発明のヒト化抗体、又は抗体を含む医薬組成物の使用を供する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は、ヒト免疫グロブリン生殖系列カッパ可変遺伝子4-1 (IGKV4-1) とマウス 280.46.3.4 VL (280.46.3.4)との配列比較を表す。

【図2】図2は、ヒト免疫グロブリン生殖系列重鎖可変遺伝子3-66 (IGHV3-66)とマウス280.46.3.4 VH (280.46.3.4)との配列比較を表す。

【図3】図3は、ヒト免疫グロブリン生殖系列カッパ可変遺伝子4-1 (IGKV4-1) とヒト化 280.46.3.4 VLの第一のバージョン(280.VK4-1-C) との配列比較を表す。

【図4】図4は、ヒト化280.46.3.4 VHの第一のバージョン(280.VH3-66.1)とヒト免疫グロブリン生殖系列重鎖可変遺伝子3-66 (IGHV3-66) との配列比較を表す。

【図5】図5は、非変性条件下でSDSゲル上に流した、タンパク質A精製ヒト化280.46.3.4 抗体のクーマシーブルー染色の結果を表す。市販の抗TNF モノクローナル抗体である「ヒュミラ」(Adalimumab)を、標準基準として本明細書中で使用する。「マーカー」とは、図の左側に示されるkDを有する標準タンパク質分子量 (MW) マーカーである。「前」は、280.VK4-1-Cと対合した280.VH3-66-1を含み、従って軽鎖中に不対システインを含む、タンパク質A精製ヒト化280.46.3.4抗体を示す。「後」とは、280.VK4-1-Sと対合した280.VH3-66-1を含むタンパク質A精製ヒト化280.46.3.4 抗体を示す。

【図6】図6は、ヒトHepG2ヘパトーマ細胞においてSTAT3リン酸化アッセイを行い、280.VK4-1-Sと対合した280.VH3-66-1( 280.VH3-66-1/VK4-1-S) を含む、ヒトIgG1/カッパとして発現されたヒト化抗体の効力を、マウス親抗体280.46.3.4 ( 280.46.3.4)と比較した結果を表す。結果は、ヒト化抗体が遊離システインを有するマウス親抗体より1.4倍強力であることを示す。IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ257.5 pM 及び370.5 pMである。

【図7】図7は、ヒトIL-22受容体形質移入BaF3安定細胞において増殖アッセイを行い、280.VK4-1-Sと対合した280.VH3-66-1( 280.VH3-66-1/VK4-1-S) を含むヒトIgG1/カッパとして発現されたヒト化抗体の効力の、マウス親抗体280.46.3.4 ( 280.46.3.4) と比較した結果を表す。結果は、ヒト化抗体は遊離システインを含むマウス親抗体より1.7倍強力であることを示す。IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ340 pM 及び 587 pMである。

【図8】図8は、マウスIL-22受容体形質移入-BaF3安定細胞において増殖アッセイを行い、280.VK4-1-Sと対合した280.VH3-66-1を含むヒトIgG1/カッパとして発現されたヒト化抗体の効力( 280.VH3-66-1/VK4-1-S)を、マウス親抗体280.46.3.4 ( 280.46.3.4) と比較した結果を表す。結果は、ヒト化抗体が遊離システインを含むマウス親抗体より2.1倍強力であることを示す。IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ693 pM及び1473 pMである。

【図9】図9は、ヒト免疫グロブリン生殖系列重鎖可変遺伝子3-66 (IGHV3-66)とヒト化280.46.3.4 VHのバージョン4 (280.VH3-66-4)との配列比較を表す。

【図10】図10は、ヒトHepG2ヘパトーマ細胞においてSTAT3リン酸化アッセイを行い、280.VK4-1-Tと対合した280.VH3-66-4 ( 280.VH3-66-4/VK4-1-T) を含むヒトIgG1/カッパとして発現されたヒト化抗体の効力を、マウス親抗体280.46.3.4( 280.46.3.4) と比較した結果を表す。結果は、ヒト化抗体が、マウス親抗体より1.8倍強力であることを示し、IC<sub>50</sub>値はそれぞれ183.2 pM及び333.0 pMである。

【図11】図11は、ヒトIL-22受容体形質移入-BaF3安定細胞において増殖アッセイを行い、280.VK4-1-Tと対合した280.VH3-66-4 ( 280.VH3-66-4/VK4-1-T) を含むヒトIgG1/カッパとして発現されたヒト化抗体の効力を、マウス親抗体280.46.3.4 ( 280.46.3.4) と比較した結果を表す。結果は、ヒト化抗体がマウス親抗体より1.75倍強力であることを示し、IC<sub>50</sub>値はそれぞれ334 pM及び587 pMである。

【図12】図12は、マウスIL-22受容体形質移入-BaF3安定細胞において増殖アッセイを行い、280.VK4-1-Tと対合した280.VH3-66-4 ( 280.VH3-66-4/VK4-1-T)を含む、ヒトIgG1/カッパとして発現されたヒト化抗体の効力を、マウス親抗体280.46.3.4 ( 280.46.3.4

)と比較した結果を表す。結果は、ヒト化抗体はマウス親抗体より2.1倍強力であることを示し、 $IC_{50}$  値はそれぞれ687 pM及び1473 pMである。

【図13】図13は、一組の変異体のヒトIL-22RAへの結合親和性を測定することを目的としたピアコア分析の結果を表す。当該変異体は、280.VH3-66-4中のH-CDR1におけるAsp32及びH-CDR3におけるAsp96がそれぞれ変異したものである。これらの単一変異体を、ヒト化軽鎖可変ドメイン280.VK4-1-Tと対合させ、親和性測定に関して試験した。D32E: 280.VH3-66-4の32位におけるAspのGluへの変異、これによりバージョン280.VH3-66-18が作成される; D32: 親バージョン280.VH3-66-4; D32N: 280.VH3-66-4の32位におけるAspのAsnへの変異; D96E: 280.VH3-66-4の96位におけるGluのAspへの変異; D96N: 280.VH3-66-4の96位におけるAspのAsnへの変異。当該図において報告される結果は、親未変異D32 (280.VH3-66-4) と比較して、D32E変異はオン速度 (on rate) を約2倍増大し、オフ速度 (off rate) を約5倍低下したことを示す。一方、D96E変異は、負の影響を有し、親和性を約500倍低下した。

10

【図14】図14は、D32E変異体及び親未変異D32の示差走査熱量測定 (DSC) を行い、それらの熱安定性を調べた結果を表す。D32E変異体 (薄灰色線) は、親D32 (濃灰色線) より1度安定である。

【図15】図15は、ヒトHepG2ヘパトーマ細胞においてSTAT3リン酸化アッセイを行い、280.VK4-1-Tと対合した280.VH3-66-18を含む、ヒトIgG1/カップパとして発現されたヒト化抗体の効力 (280.VH3-66-18/VK4-1-T) を、マウス親抗体280.46.3.4 (280.46.3.4) と比較した結果を表す。結果は、ヒト化抗体は、マウス親抗体より約3倍強力であることを示す。 $IC_{50}$  値は、それぞれ132.5 pM及び370.5 pMである。

20

【図16】図16は、最終ヒト化VHバージョン、280.VH3-66-46と、ヒト免疫グロブリン生殖系列重鎖可変遺伝子3-66 (IGHV3-66) との配列比較を表す。

【図17】図17は、ヒト免疫グロブリン生殖系列カップパ可変遺伝子4-1 (IGKV4-1) と最終ヒト化VLバージョン、280.VK4-1-TSYとの配列比較を表す。

【図18】図18は、正常ヒトケラチノサイトにおいてSTAT3リン酸化アッセイを行い、280.VK4-1-TSY と対合した280.VH3-66-46 (280.VH3-66-46/VK4-1-TSY) を含む、ヒトIgG1/カップパとして発現されたヒト化抗体の効力を、マウス親抗体 280.46.3.4 (280.46.3.4) と比較した結果を表す。結果は、ヒト化抗体 (280.346.TSY, 実施例7を参照されたい) は、マウス親抗体よりもほぼ9倍強力であることを示し、 $IC_{50}$  値はそれぞれ60.95 pM及び541.9 pMである。

30

【図19】図19は、ヒトHepG2ヘパトーマ細胞においてSTAT3リン酸化アッセイを行い、280.VK4-1-TSYと対合した280.VH3-66-46 (280.VH3-66-46/VK4-1-TSY) を含むヒトIgG1/カップパとして発現されたヒト化抗体の効力を、マウス親抗体280.46.3.4 (280.46.3.4) と比較した結果を表す。結果は、ヒト化抗体 (280.346.TSY, 実施例7を参照されたい) はマウス親抗体よりほぼ5倍強力であることを示し、 $IC_{50}$  値はそれぞれ55.16 pM及び266.3 pMである。

【図20】図20は、ヒトIL-22 受容体形質移入-BaF3安定細胞において増殖アッセイを行い、280.VK4-1-TSYと対合した280.VH3-66-46 (280.VH3-66-46/VK4-1-TSY) を含むヒトIgG1/カップパとして発現されたヒト化抗体の効力を、マウス親抗体280.46.3.4 (280.46.3.4) と比較した結果を示す。結果は、ヒト化抗体 (280.346.TSY, 実施例7を参照されたい) はマウス親抗体より1.7倍強力であることを示し、 $IC_{50}$  値はそれぞれ317 pM及び545 pMである。

40

【図21】図21は、マウスHEPA1-6ヘパトーマ細胞においてSTAT3リン酸化アッセイを行い、280.VK4-1-TSYと対合した280.VH3-66-46 (280.VH3-66-46/VK4-1-TSY) を含むヒトIgG1/カップパとして発現されたヒト化抗体の効力を算出した結果を表す。ヒトIgG1を負の対照 (対照hIgG1) として使用する。結果は、ヒト化抗体 (280.346.TSY, 実施例7を参照されたい) は、マウスIL-22の活性を抑制することができることを示し、 $IC_{50}$  はナノモル濃度の範囲 (2,1 nM) である。

【図22】図22は、マウスIL-22受容体形質移入-BaF3安定細胞において増殖アッセイを

50

行い、280.VK4-1-TSYと対合した280.VH3-66-46 ( 280.VH3-66-46/VK4-1-TSY) を含むヒトIgG1/カップパとして発現されたヒト化抗体の効力を、マウス親抗体 280.46.3.4 ( 280.46.3.4) と比較した結果を表す。結果は、ヒト化抗体 (280.346.TSY, 実施例7を参照されたい) がマウス親抗体より6.2倍強力であることを示し、 $IC_{50}$  値はそれぞれ137 pM 及び849 pMである。

【図 2 3】図 2 3 は、競合ELISAを行い、280.346.TSYのヒトIL-22RAへの特異性を測定した結果を表す。マイクロタイタープレートにヒトIL-22RA-ECD (すなわち、IL-22RA-細胞外ドメイン) でコーティングした。競合物: ヒトインターロイキン22受容体アルファ (hIL-22RA)、ヒトIL-22結合タンパク質 (hIL-22BP)、マウスIL-22受容体アルファ (mIL-22RA)、ヒトIL-10 受容体アルファ (hIL-10R) 及びヒトIL-20 受容体アルファ (hIL-20R) の存在下で、ピオチン化280-346-TSY抗体をプレートに添加した。プレート上にコーティングされたhIL-22RAへの結合は、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンの添加によって明らかとなる。ヒト ( hIL-22RA) 及びマウス ( mIL-22RA) IL-22RAに関して測定した $IC_{50}$  値は、それぞれ18.25 pM及び149.3 pMである。280.346.TSYは、ヒトIL-22BP ( hIL-22BP)、IL-10Rアルファ ( hIL-10R) 及びIL-20Rアルファ (V hIL-20R) と交差反応性を示さない。

【図 2 4】図 2 4 は、マウスにおけるIL-22-誘発血清アミロイドAへの280-346-TSYの薬力学活性の結果を表す。組換えマウスIL-22 静脈内注射の22時間前に、280.346.TSYの異なる用量を皮下に投与した。ピヒクル対照は、皮下に投与したPBSである。IL-22投与の6時間後に採血を行った。ヒトIgG1を負の対照 (アイソタイプ対照) として使用する。血清アミロイドAを、ELISAで測定した。280-346-TSYは当該モデルにおいて有効性を示し、 $ED_{50}$  値0.5 mg/kgを供した。マンホイットニー検定を使用し、統計分析を行った: \*  $p < 0.05$  vs. アイソタイプ 対照群; \*\*\*  $p < 0.001$  vs. アイソタイプ 対照群。

【図 2 5】図 2 5 は、乾癬のマウスモデルにおける280-346-TSYの薬力学活性の結果を表す。IL-23-誘発耳肥厚に対する280-346-TSYの有効性を測定した。マウスに500 ngの組換えヒトIL-23又はPBSを隔日に14日間注入した。全治療範囲に、280.346.TSYの異なる用量の皮下投与を行った。ピヒクル対照は、皮下に投与したPBSである。デキサメタゾン (Dexa) は、正の対照として使用する。抑制割合を9日目に算出し、これは耳介腫脹のピークに対応している。280-346-TSYは本モデルにおいて有効性を示し、 $ED_{50}$  値1.8 mg/kgを供した。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0017】

本発明を詳細に説明する前に、次の用語を定義することにより本発明の理解に役立つであろう。

##### 【0018】

本明細書において、用語「抗体」、及びその複数形「抗体」とは、とりわけ、ポリクローナル抗体、親和性精製ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ナノボディ、及びF(ab')<sub>2</sub>、Fabタンパク質分解フラグメント、及び単鎖可変領域フラグメント(scFvs) 等の抗原結合フラグメントを含む。遺伝子改変未処理抗体、又はキメラ抗体、Fvフラグメント、単鎖抗体等のフラグメント、並びに合成抗原結合ペプチド及びポリペプチドもまた含まれる。非ヒト抗体は、ヒトフレームワーク及び定常領域上に非ヒトCDRを移植すること、又は非ヒト可変ドメイン全体を取り込むことによってヒト化することができる。例えば、ヒト化抗体はヒトフレームワーク領域内に非ヒト残基を保持し、結合特性を適切に増強することができる。抗体のヒト化を介して、生物学的半減期を増長することができ、ヒトへの投与に対する有害な免疫反応に関する可能性は低減される。

##### 【0019】

本明細書において、用語「免疫グロブリン」(Ig)は、実質的に免疫グロブリン遺伝子によってコードされる1又は2以上のポリペプチドから成るタンパク質を示す。免疫グロブリンの一形態は、抗体の基本構造単位を構成する。この形態は四量体であり、免疫グロブリン鎖の2つの同一対から成り、各対は1つの軽鎖及び1つの重鎖を有する。軽鎖は、2

10

20

30

40

50

つの部分：可変ドメイン (VL) 及び定常部ドメイン (CL) を有し、定常部ドメインは軽鎖との関係で定常領域と同様に呼ぶことができる。重鎖も同様に 2 つの部分：可変ドメイン (VH) 及び定常領域 (CH) を有する。各対において、軽鎖及び重鎖可変ドメインは、共に抗原への結合に関与し、定常領域は抗体エフェクター機能に関与する。

#### 【 0 0 2 0 】

全長免疫グロブリン「軽鎖」(約25 Kd) は、N末端における可変ドメイン遺伝子(約110個のアミノ酸) 及びC末端におけるカッパ又はラムダ定常部ドメイン (それぞれC 及びC )遺伝子によってコードされる。全長免疫グロブリン「重鎖」(約50 Kd)は、可変ドメイン遺伝子(約116個のアミノ酸)及び以下で言及する他の定常領域遺伝子の1つ(約330個のアミノ酸)によって同様にコードされる。ギリシャ文字  $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\mu$ 、及び  $\delta$  によって表示される哺乳類の重鎖の5つの型が存在する。重鎖の型は、抗体のアイソタイプをIgA、IgD、IgE、IgG及びIgMとしてそれぞれ定義する。定常領域は同一のアイソタイプの全抗体において同一であるが、異なるアイソタイプの抗体では異なる。重鎖  $\kappa$ 、 $\lambda$ 、及び  $\mu$  は、3つのIg定常部ドメイン(C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, 及びC<sub>H3</sub>)、及びさらなる可動性のためのヒンジ領域から成る定常領域を有し；重鎖  $\delta$  及び  $\epsilon$  は、4つのIg 定常部ドメイン (C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub>, 及び C<sub>H4</sub>) 及びヒンジ領域から成る定常領域を有する。

#### 【 0 0 2 1 】

免疫グロブリン軽鎖又は重鎖可変ドメインは、3つの高可変領域によって断続される「フレームワーク」領域から成る。従って、用語「高可変領域」とは、抗原結合性に関与する抗体のアミノ酸残基を示す。高可変領域は、「相補性決定領域」又は「CDR」、すなわち、軽鎖可変ドメインにおけるL-CDR1、L-CDR2及びL-CDR3及び重鎖可変ドメインにおけるH-CDR1、H-CDR2及びH-CDR3由来のアミノ酸残基(Kabat et al. 1991) 及び/又は「高可変ループ」由来のアミノ酸残基(Chothia and Lesk, 1987) を含む。「フレームワーク領域」又は「FR」残基は、本明細書で定義する場合、高可変領域残基以外のそれらの可変ドメイン残基である。異なる軽鎖 (すなわち、L-FR1, L-FR2, L-FR3 及びL-FR4) 又は重鎖 (すなわち、H-FR1, H-FR2, H-FR3及びH-FR4) のフレームワーク領域の配列は、種内で相対的に保存される。従って、「ヒトフレームワーク領域」とは、天然に生じるヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域に実質的に同一(約85%以上、通常90-95%以上)であるフレームワーク領域である。構成軽鎖及び重鎖の結合フレームワーク領域である抗体のフレームワーク領域は、CDRの位置決定及び整列化に役立つ。CDRは、最初に抗原のエピトープへの結合に関与する。

#### 【 0 0 2 2 】

従って、用語「ヒト化」免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク領域及び非ヒト (通常マウス又はラット) 免疫グロブリン由来の1又は2以上のCDRを含む免疫グロブリンを示す。CDRを供する非ヒト免疫グロブリンは、「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを供するヒト免疫グロブリンは「アクセプター」と呼ばれる。定常領域は、存在する必要はないが、存在する場合、実質的にヒト免疫グロブリン定常領域と、すなわち、少なくとも約85-90%、好ましくは、約95%以上同一でなければならない。従って、エフェクター機能の調節が必要な場合の、重鎖定常領域における可能性のあるCDR及びわずかな残基を除いて、ヒト化免疫グロブリンのあらゆる部分は、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応部分と実質的に同一である。「ヒト化抗体」とは、ヒト化軽鎖可変ドメイン及びヒト化重鎖可変ドメインを含む抗体である。例えば、ヒト化抗体は、ヒトフレームワーク領域内に非ヒト残基を保持し、適切な結合特性を増強することができ且つ/又は一部のアミノ酸変異はCDR内に導入することができ、結合親和性を改善し且つ/又は免疫原性を低減し且つ/又はヒト化度を増大することができる。

#### 【 0 0 2 3 】

用語「組換え抗体」とは、アミノ酸配列が天然抗体のアミノ酸配列から変化した抗体を意味する。抗体産生において組換えDNA技術が関連するため、当該抗体は天然の抗体において確認されるアミノ酸の配列に制限される必要はなく、目的の特性を得るために抗体は再設計することができる。変異候補は多数存在し、1つのみ又は数個のアミノ酸の変化か

10

20

30

40

50



ら例えば可変ドメイン又は定常領域の完全な再設計に渡る。定常領域における変化は、補体結合（例えば、補体依存性細胞傷害、CDC）、細胞膜との相互作用及び他のエフェクター機能（例えば、抗体依存性細胞傷害、ADCC）等の特性を改善、低減又は変更するために、一般に行われてよい。可変ドメインにおける変化は、抗原結合特性を改善するために行われてよい。

#### 【 0 0 2 4 】

抗体に加えて、免疫グロブリンは、例えば、単鎖又はFv、Fab、及び (Fab')<sub>2</sub>、並びに二重特異性抗体、線状抗体 (linear antibody)、多価又は多選択性ハイブリッド抗体を含む種々の他の形態で存在することができる。本明細書において、用語「単鎖Fv」、「単鎖抗体」、「Fv」又は「scFv」とは、単一ポリペプチド鎖内の、重鎖及び軽鎖双方由来の可変ドメインを含むが、定常領域が欠如する抗体フラグメントを意味する。通常、単鎖抗体はさらに、目的の構造の形成を可能とするVH及びVLドメインとの間のポリペプチドリンカーを含み、それにより抗原結合が可能となるであろう。特定の実施形態において、単鎖抗体は、両特異的とし且つ/又はヒト化することもまたできる。「Fabフラグメント」は、1つの軽鎖並びに1つの重鎖の可変性及びC<sub>H</sub>1ドメインを含む。Fab分子の重鎖は、他の重鎖分子とジスルフィド結合を形成することができない。「Fab'フラグメント」は、1つの軽鎖、及びC<sub>H</sub>1及びC<sub>H</sub>2ドメインとの間にさらに定常領域を含む1つの重鎖を含み、2つの重鎖間に鎖間ジスルフィド結合を形成することができ、F(ab')<sub>2</sub>分子を形成することができる。「F(ab')<sub>2</sub>」とは、C<sub>H</sub>1及びC<sub>H</sub>2ドメインとの間の定常領域部分を含む2つの軽鎖及び2つの重鎖を含み、2つの重鎖間に鎖間ジスルフィド結合が形成される。一部の重要な用語を定義する場合、本発明の特定の実施形態に焦点を絞ることが可能である。

#### 【 0 0 2 5 】

本発明は、ヒト化抗ヒトIL-22RA抗体の発見に基づく。IL-22RAへの拮抗剤としてのこれらの抗体の使用は、炎症を抑制することができ、従って、活性化T細胞の浸潤を含む慢性炎症性疾患、例えば乾癬、乾癬性関節炎及びアトピー性皮膚炎等の治療において有効となり得る。本発明は、IL-22RAを認識、結合、調節及び/又は中和するヒト化抗体の使用を供する。特に、本発明は、IL-22RAを認識、結合、調節及び/又は中和するヒト化軽鎖及び重鎖可変ドメインの使用を供する。このようなヒト化軽鎖及び重鎖可変ドメインは、それぞれ、カッパ又はラムダ定常部ドメイン及び任意のアイソタイプ (IgA, IgD, IgE, IgG及びIgM) の中から選択される重鎖の定常領域に融合し、種々の宿主細胞において発現することができる。好ましくは、選択される定常領域は、IgG、より好ましくは、IgG1の定常領域である。本明細書に記載のヒト化抗IL-22RA抗体は、2005年10月21日出願のPCT国際特許出願第2006/047249号において以前に記載された、マウス抗ヒトIL-22RAモノクローナル抗体のアミノ酸配列をヒト化方法の起始点として使用して生じる。

#### 【 0 0 2 6 】

IL-22RAは、II型サイトカイン受容体であり、最初に、Zcytor11として、1998年7月30日出願のPCT国際特許出願第99/07848号に記載された。ヒトIL-22RAのアミノ酸配列を、配列番号24で示す。

#### 【 0 0 2 7 】

本発明はまた、IL-22RAポリペプチドのエピトープ関連部分 (epitope-bearing portion) 又は免疫原性エピトープ又は抗原エピトープを含む、ポリペプチドフラグメント又はペプチドに結合するヒト化IL-22RA抗体を供する。抗体のこれらのエピトープへの結合は、IL-22RAのシグナル伝達の抑制、遮断、中和、及び/又は減少を生じることとなる。

#### 【 0 0 2 8 】

本明細書に記載の抗体の活性は、IL-22RA受容体を発現する細胞の増殖及び/又は当該細胞への結合を測定する種々のアッセイを使用して、増殖を抑制又は低減するその能力によって測定することができる。特に目的は、IL-22依存性細胞における変化である。IL-22依存性となるように遺伝子操作される適した株化細胞は、BaF3株化細胞を含む。ヒト化抗IL-22RA抗体の活性はまた、本明細書の以下に記載の、BaF3増殖アッセイ、ヒトHepG2ヘパトーマ細胞又はマウスHEPA1-6ヘパトーマ細胞におけるSTAT3リン酸化アッセイ、ピアコアア

ッセイ、又は正常ヒトケラチノサイトアッセイ中で測定できる。

【 0 0 2 9 】

実施形態において、本発明のヒト化抗体は、a) 配列番号1、2及び3それぞれのアミノ酸配列から成るH-CDR1、H-CDR2、及びH-CDR3を含む重鎖可変ドメイン、及びb) 配列番号4、5及び6それぞれのアミノ酸配列又は配列番号4、5及び7それぞれのアミノ酸配列から成るL-CDR1、L-CDR2、及び L-CDR3 を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【 0 0 3 0 】

他の実施形態において、本発明は、本明細書に記載の、a) 重鎖可変ドメインが、配列番号8、9、10及び11、それぞれのアミノ酸配列から成るH-FR1、H-FR2、H-FR3及びH-FR4フレームワーク領域を含み、且つ b) 軽鎖可変ドメインが、配列番号12、13、14及び15、それぞれのアミノ酸配列から成るL-FR1、L-FR2、L-FR3及びL-FR4フレームワーク領域を含む抗体を供する。

10

【 0 0 3 1 】

他の実施形態において、本発明は、本明細書に記載の、a) 重鎖可変ドメインが配列番号16のアミノ酸配列から成り、b) 軽鎖可変ドメインが配列番号17のアミノ酸配列から成る抗体を供する。

【 0 0 3 2 】

他の実施形態において、本発明は、本明細書に記載の、a) 重鎖可変ドメインが、ヒトIgA、IgG、IgM、IgD、IgE又は任意のサブクラスの定常部から成る群から選択される重鎖定常領域、好ましくは、IgG1の重鎖定常領域に融合され、b) 軽鎖可変ドメインがk又は 、好ましくは、kのヒト免疫グロブリン軽鎖の定常部ドメインに融合される抗体を供する。

20

【 0 0 3 3 】

他の実施形態において、重鎖定常領域は、抗体エフェクター機能（例えば、抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び補体依存性細胞傷害（CDC））を調整、低減又は抑制する一部のアミノ酸変異を含む。

【 0 0 3 4 】

他の実施形態において、本発明は、a) 配列番号18のアミノ酸配列から成る重鎖定常領域、及び b) 配列番号19のアミノ酸配列から成る軽鎖定常部ドメインを含む、本明細書に記載の抗体を供する。

【 0 0 3 5 】

他の実施形態において、本発明は、配列番号20のアミノ酸配列を含む又はから成る重鎖及び配列番号21のアミノ酸配列を含む又はから成る軽鎖を含むヒトIL-22RAに結合するヒト化抗体を供する。

30

【 0 0 3 6 】

本明細書に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド(DNA及びRNAを含む)の調製方法は、当技術分野で周知である。全RNAは、グアニジンイソチオシアネート抽出、続くCsCl勾配における遠心分離による単離を使用して調製することができる(Chirgwin JM et al. 1979)。ポリA(+) RNAは、Aviv 及びLederの方法(Aviv H et al. 1972)を使用して全RNAから調製される。相補DNA(cDNA)は、周知の方法を使用してポリ(A+) RNAから調製される。選択的に、ゲノムDNAは単離することができる。続いてIL-22RA抗体をコードするポリヌクレオチドは、例えば、ハイブリダイゼーション又はPCRによって同定及び単離される。

40

【 0 0 3 7 】

本明細書で開示される抗体は、組換え技術、化学合成、クローニング、核酸連結、又はそれらの組み合わせ等の当技術分野で周知の技術によって生成することができる。実施形態において、本発明の抗体は、組換え技術、例えば、適した宿主細胞における対応する核酸の発現によって生成される。生成されたポリペプチドは、グリコシル化されてもされなくてもよく、又は使用の宿主細胞型に依存した他の翻訳後修飾を含んでもよい。多くの書籍及びレビューによって、ベクター及び原核又は真核宿主細胞を使用して組換えタンパク質をどのようにクローニングし生成するかが教示されている。

【 0 0 3 8 】

50

従って、本発明のさらなる実施形態は、上記又は下記のいずれかの抗体又はその部分をコードする単離核酸分子、又はその相補鎖又は縮重配列である。この点について、用語「核酸分子」とは、デオキシリボ核酸(例えば、DNA、cDNA、gDNA、合成DNA等)、リボ核酸(例えば、RNA)及びペプチド核酸(PNA)を含むあらゆる異なる核酸型を含み、これらに限定されない。好適な実施形態において、核酸分子は、二本鎖DNA分子又はcDNA分子等のDNA分子である。用語「単離」とは、通常天然源において結合された核酸分子を、少なくとも1つの混入核酸分子から同定且つ分離することを意味する。単離され核酸分子は、自然において見られる形態又は状態以外である。従って、特定の核酸分子が天然の細胞において存在する場合、単離された核酸分子はそれから区別される。変性配列は、同一アミノ酸配列をコードする任意のヌクレオチド配列を参照ヌクレオチド配列として指定するが、遺伝暗号縮重によって生じる異なるヌクレオチド配列を含む。

10

**【0039】**

他の実施形態において、核酸分子(ポリヌクレオチドとも呼ばれる)は本発明のヒト化抗体の重鎖をコードし、他のポリヌクレオチドは本発明のヒト化抗体の軽鎖をコードする。

**【0040】**

好適な実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号22を含む又はから成る本発明のヒト化抗体の重鎖をコードする。

**【0041】**

好適な実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号23を含む又はから成る本発明のヒト化抗体の軽鎖をコードする。

20

**【0042】**

好適な実施形態において、特有のポリヌクレオチドは、本発明のヒト化抗体の重鎖及び軽鎖双方をコードする。

**【0043】**

本発明のさらなる実施形態は、任意の上記又は下記の抗体又はその部分をコードするDNAを含むベクターである。ベクターは、任意の原核又は真核細胞において機能する、組込み又は自己複製性の、任意のクローニング又は発現ベクターであってよい。特に、ベクターは、プラスミド、コスミド、ウイルス、ファージ、エピソーム、人工染色体等とすることができる。ベクターは、重鎖及び軽鎖双方のコード配列、又は軽鎖及び重鎖のコード配列のいずれかを含むことができる。ベクターが重鎖及び軽鎖双方のコード配列を含む場合、重鎖及び軽鎖はそれぞれ操作可能にプロモーターに結合され得る。プロモーターは、重鎖と軽鎖に関して同一又は異なるものとしてすることができる。重鎖及び軽鎖はまた、1つの単一プロモーターに操作可能に結合させることができ、この場合、重鎖及び軽鎖のコード配列は、好ましくは、配列内リボソーム進入部位(IRES)によって分離することができる。真核細胞遺伝子発現に適したプロモーターは、例えば、マウス又はヒトサイトメガロウイルス(CMV)、マウス双方向性CMVプロモーター又はラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター等の、ウイルス遺伝子由来のプロモーターであり、それらは当業者に周知である。ベクターは、調節エレメント、プロモーター、ターミネーター、エンハンサー、選択マーカー、複製開始点、インスレーター等を含むことができる。適した核酸配列は、種々の手順によってベクターに挿入することができる。一般に、DNAは、当技術分野で周知の技術を使用して適した制限酵素部位に挿入される。1又は2以上のこれらの要素を含む適したベクターの作成は、当業者に周知の標準核酸連結技術を使用する。

30

40

**【0044】**

本発明のさらなる実施形態は、組換え宿主細胞であり、当該細胞は上記核酸分子/ポリヌクレオチド又はベクターを含む。宿主T細胞は、原核又は真核細胞とすることができる。原核細胞の例は、大腸菌(E.coli)等の細菌を含む。真核細胞の例は、任意の初代培養細胞又は株化細胞(例えば、3T3, Vera, HEK293, TN5等)を含む、酵母細胞、植物細胞、哺乳類細胞及び昆虫細胞である。グリコシル化タンパク質の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物由来である。有効な哺乳類株化宿主細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣細胞

50

(CHO)及びCOS細胞を含む。本発明の特に好適なホ乳類細胞は、CHO細胞である。上記のように、本発明の抗体は、組換え技術、化学合成、クローニング、核酸連結、又はそれらの組み合わせ等の当技術分野で周知の任意の技術によって生成することができる。

【0045】

従って、本発明の他の実施形態は、核酸分子の発現が可能な条件下で本発明の組換え宿主細胞を培養する工程、及び生成されたポリペプチドを回収/単離する工程を含む、本発明の抗体の生成方法である。生成されたポリペプチドは、グリコシル化することが可能でも可能でなくてもよく、使用される宿主細胞型に依存的な他の翻訳後修飾を含んでよい。本発明の抗体を生成する方法は、抗体を医薬組成物に製剤する工程をさらに含むことができる。

10

【0046】

従って、本発明のさらなる実施形態は、本発明のヒト化抗体を含む医薬組成物である。好ましくは、当該医薬組成物は、緩衝剤、安定剤、界面活性物質等のさらなる賦形剤を含むことができる。本発明の医薬組成物は、乾癬及び乾癬性関節炎及びアトピー性皮膚炎等の他の免疫介在疾患の診断、予防、及び/又は治療（局所又は全身）において有用である。

【0047】

本発明との関連の中で用語「治療」とは、疾患の発症後の病理学的発達の低減、減少、低下又は減衰を含む、疾患の進行に任意の有益な効果を示す。

【0048】

本発明の医薬組成物は、医薬として許容される担体と共に投与することができる。

20

【0049】

用語「医薬として許容される」とは、有効成分の生物学的活性の有効性に干渉せず、投与した宿主に有毒でない任意の担体を含むことを意味する。例えば、非経口的投与に関して、有効タンパク質は、生理食塩水、ブドウ糖溶液、血清アルブミン及びリンゲル液等のビヒクル中に注射用単位剤形に製剤することができる。

【0050】

他の側面において、本発明は、医薬としての使用のための本発明の医薬組成物を供する。他の側面において、本発明は、本発明の医薬組成物を患者に投与する工程を含む、患者における疾患の治療方法を供する。好ましくは、疾患は乾癬、乾癬性関節炎及びアトピー性皮膚炎から選択される。

30

【0051】

他の側面において、本発明は、医薬としての使用のための本発明のヒト化抗体を供する。他の側面において、本発明は、患者における疾患の治療方法であって、本発明のヒト化抗体を患者に投与する工程を含む方法を供する。好ましくは、疾患は乾癬、乾癬性関節炎及びアトピー性皮膚炎から選択される。他の側面において、本発明は、乾癬、乾癬性関節炎又はアトピー性皮膚炎の治療用医薬の調製のための本発明のヒト化抗体の使用を供する。

【0052】

本発明の第一の使用において、本発明の医薬組成物は、肺に投与される。

40

【0053】

本発明の第二の使用において、本発明の医薬組成物は、鼻腔内に投与される。

【0054】

本発明の第三の使用において、本発明の医薬組成物は、吸入により投与される。

【0055】

本発明の第四の使用において、本発明の医薬組成物は、経口的に投与される。

【0056】

本発明の第五の使用において、本発明の医薬組成物は、静脈内に又は筋肉内に投与される。

【0057】

50

好適な実施形態における本発明の使用で、本発明の医薬組成物は皮下に投与される。

【0058】

本発明の医薬組成物は、上記経路のいずれか1つに従って毎日又は隔日に投与される。

【0059】

非経口的（例えば、静脈内、皮下、筋肉内）投与に関して、本発明の医薬組成物は、医薬として許容される非経口的ビヒクル（例えば、水、生理食塩水、ブドウ糖溶液）及び等張性を維持する添加剤（例えば、マンニトール）又は化学安定剤（例えば、保存剤及び緩衝剤）と組み合わせて、溶液、懸濁液、乳濁液又は凍結乾燥粉末として製剤することができる。製剤は、一般的に使用される技術によって滅菌される。

【0060】

本発明の医薬組成物の有効成分は、種々の方法で個体に投与することができる。投与経路は、皮内、経皮（例えば、徐放製剤で）、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、硬膜外、局所、経口、エアロゾル投与、鼻腔内経路又は吸入経路を含むことができる。例えば上皮又は内皮組織を通した吸収、又はインビボ（*In vivo*）において発現且つ分泌される活性剤を生じる、活性剤をコードするDNA分子が患者に（例えば、ベクターを介して）投与される遺伝子治療による、他の投与の治療上効果的な経路を使用することができる。さらに、本発明の医薬組成物は、医薬として許容される界面活性物質、賦形剤、担体、希釈剤及びビヒクル等の生物学的に活性な薬剤の他の成分と共に投与することができる。

【0061】

個体に投与される投与量は、薬物動態特性、投与経路、患者の状態及び特性（性別、年齢、体重、健康、サイズ）、症状の程度、併用治療、治療頻度及び目的とする効果を含む種々の要因によって変更可能である。

【0062】

本発明の抗体は、目的の使用及び/又は生産方法に従って選ぶことができる他の代替形態で、生成、製剤、投与又は使用可能である。有用な複合物又は複合体はまた、薬物送達有効性に関して薬剤を改良するために生成することができる。この目的のために、本明細書に記載の抗体は、ポリエチレングリコール及び他の天然又は合成ポリマー等の分子との有効複合物又は複合体の形態とすることができる（Harris JM et al. 2003）。この点について、本発明は、ポリマーに結合された、化学修飾された抗体を意図する。典型的には、ポリマーは水溶性であり、生理環境等の水性環境において複合物は沈殿しない。さらに、ポリマーの混合物を複合物の生成のために使用することができる。治療に使用される複合物は、医薬として許容される水溶性のポリマー部分を含むことができる。適した水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール（PEG）、モノメトキシ-PEG、アリアルオキシ-PEG、炭酸ビススクシンイミジルPEG、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール（例えば、グリセロール）、ポリビニルアルコール、デキストラン、セルロース、又は他の炭水化物系ポリマーを含む。適したPEGは、例えば5,000、12,000、20,000及び25,000を含み、分子量約600～約60,000を有してよい。複合物はまた、水溶性ポリマーのような混合物を含むことができる。複合物の例は、上記開示の任意の抗体及びそのN末端に結合したポリアルキルオキシド部分を含む。PEGは、1つの適したポリアルキルオキシドである。例として、本明細書で開示される任意の抗体は、PEGで修飾することができ、これは「ペグ化」として周知の方法である。ペグ化は、当技術分野で周知の任意のペグ化反応によって行うことができる（Francis GE et al. 1998）。例えば、ペグ化は、反応性ポリエチレングリコール分子とのアシル化反応又はアルキル化反応によって行うことができる。好ましくは、これらの修飾は全てヒトIL-22RAを結合する抗体の能力に著しい影響を及ぼさない。

【0063】

本発明はまた、上記の抗体と機能的に同等であるヒトIL-22RAに対する組換えヒト化抗体を含む。安定性及び/又は治療上有効性を改善する修飾ヒト化抗体もまた含まれる。修飾抗体の例は、アミノ酸残基の保存置換、及び抗原結合有用性を著しく有害に変更しないアミノ酸の1又は2以上の欠失又は付加を有するものを含む。置換は、1又は2以上のア

10

20

30

40

50

ミノ酸残基の変更又は修飾から、治療上有用性が維持される限り領域の完全な再設計にわたる。本発明のヒト化抗体は、翻訳後に修飾（例えば、アセチル化及びリン酸化）又は合成的に修飾（例えば、標識基の付着）することができる。本願の方法によってデザインされるヒト化抗体は、抗原結合性又は他の免疫グロブリン機能に実質的に影響しないさらなる保存アミノ酸置換を有することが可能であることが理解される。

【0064】

本発明のヒト化抗体は、修飾誘導体を含むことができる。例えば、誘導体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化（phosphorylation）、アミド化、周知の保護/遮断基による誘導体化、タンパク質切断、細胞リガンド又は他のタンパク質等への結合によって修飾されたヒト化抗体を含むがこれらに限定されない。さらに、誘導体は、1又は2以上の非古典的及び/又は非天然のアミノ酸を含むことができる。本発明のヒト化抗体のインビボ（In vivo）における半減期は、特定のアミノ酸残基をFc領域とFcRn受容体との間の相互作用に關与するように修飾（例えば、置換、欠失又は付加）することによって増長することができる。

【0065】

本明細書中の全引用文献は、学術論文又は要約、公開又は未公開の米国又は外国特許出願、発行の米国又は外国特許又は他の引用文献を含み、これらはその全体が参照により本明細書に組み込まれ、引用文献に示される全てのデータ、表、図及びテキストを含む。さらに、引用文献中の全体的な内容もまた、その全体が参照により組み込まれる。

【0066】

特定の実施形態の前述の記載から、本発明の一般的性質は十分に明らかとなり、当技術分野内の知識（本明細書に記載の引用文献の内容を含む）を適用することによって、過度の実験なしに、本発明の一般概念から逸脱することなく、様々な応用にこのような特定の実施形態を容易に修飾する及び/又は適合させることができるであろう。従って、このような適合及び修飾は、本明細書に示される教示及び指針に基づき、開示の実施形態の均等物の範囲内であることを意図するものである。本明細書中の表現及び用語は説明することを目的とし、限定することを目的とするものではないことと理解されたい。

【実施例】

【0067】

実施例1: ヒト化工程のための出発抗体の選択

2005年10月21日に出願の国際特許出願第2006/047249号の実施例18に記載の5つの雑種細胞によって発現されたマウス抗ヒトIL-22RAモノクローナル抗体を、ヒト化工程の開始点として使用するものを選択するために比較した。選択に関して最も重要な判断基準は、ヒトIL-22RAに対する高親和性、マウスIL-22RAとの交差反応性、IL-22BPとの交差反応性の欠如及びヒトIL-22RAに対する拮抗薬活性の欠如であった。唯一1つの抗体が上記の全判断基準を満たし（データ未開示）、すなわちそれは、280.46.3.4（ATCC特許寄託受託番号PTA-6284）と呼ばれる雑種細胞によって発現された抗体であって、マウスIgG1/カッパ抗体である。

【0068】

このマウス抗ヒトIL-22RAモノクローナル抗体（以下「マウス280.46.3.4」と呼ぶ）の重鎖及び軽鎖（それぞれVH及びVL）の可変ドメインの特定のアミノ酸配列を、配列番号25及び26でそれぞれ記載する。

【0069】

実施例2: 再形成ヒト化 280.46.3.4 可変ドメインのデザイン

A. フレームワーク配列のための相同ヒト生殖系列の選択

IMGT-GENEデータベース（Giudicelli V. et al. 2005）を使用して、全体配列（フレームワーク及びCDR）がマウス280.46.3.4 VLと高いパーセント同一性を示すヒト生殖系列カッパ軽鎖可変ドメインを、アミノ酸配列の比較によって同定した。マウス280.46.3.4 VLは、ヒト免疫グロブリン生殖系列カッパ可変遺伝子4-1（IGKV4-1）と最も相同であり、同一性82.2%を示した（101個の内、83個のアミノ酸残基；図1）。従って、配列番号27に記載

のIGKV4-1を、CDR-移植のためのヒトフレームワークアクセプター配列として選択した。マウス 280.46.3.4 VHに関して、高いパーセント同一性のヒト生殖系列は、IMGT-GENEデータベースを使用して同定されなかった。ヒト免疫グロブリン生殖系列重鎖可変遺伝子1-46 (IGHV1-46) ヒト生殖系列を、60.2%同一性 (98個の中、59個のアミノ酸残基)の最も高い相同性を有するものとして同定した。しかしながら、配列番号28に記載のIGHV3-66を、最も低い相同性 (50.0%同一性, 98個の中、49個のアミノ酸残基 ; 図2)を有するにもかかわらず、その配列は様々な重要なフレームワーク位置においてマウス280.46.3.4 VHの配列に近似し、従って良好な安定性を提供する可能性が高いので、ヒトフレームワークアクセプター配列として効率的に選択した。

【 0 0 7 0 】

10

## B. フレームワーク領域におけるアミノ酸置換

### B.1 軽鎖

ヒト化280.46.3.4 VLに関するデザインにおける次の工程は、マウス280.46.3.4 VL由来のCDRを、ヒト生殖系列IGKV4-1由来のフレームワーク領域 (FR)に結合することであった。マウスJ遺伝子の代わりに、免疫グロブリンカッパ結合1ヒト生殖系列遺伝子(IGKJ1)を使用した。配列番号29に記載の、再形成ヒト化280.46.3.4 VL (280.VK4-1-C) の第一のバージョンで、ヒトFRにおいて変化はなく、すなわち、FR中のマウス残基はいずれも構造上重要でないと思われた。IGKV4-1とヒト化280.46.3.4 VLの第一のバージョン(280.VK4-1-C)との配列比較を図3に示す。

【 0 0 7 1 】

20

### B.2 重鎖

ヒト化280.46.3.4 VHに関するデザイン工程における次の工程は、マウス280.46.3.4 VH由来のCDRをヒト生殖系列IGHV3-66由来のFRに結合することである。配列番号30に記載の、再形成ヒト化 280.46.3.4 VH の第一のバージョン (280.VH3-66.1) において、ヒトフレームワーク領域において12個の変化がもたらされた(図4)。ヒトFRにおける12個の変化は、27、28、29、30、48、49、67、69、70、71、73及び78位に存在した (表1中のナンバリングを参照されたい)。

【 0 0 7 2 】

表 1. ヒト化280.46.3.4 VHのデザインに繋がるアミノ酸配列の配列比較

第一列 (Kabat ナンバリング) は、Kabatの残基番号を供する(Kabat et al. 1991)。FR及びCDRは、重鎖可変ドメインのフレームワーク領域 (H-FR1, H-FR2, H-FR3, 及びH-FR4) 及び4つのFRを分離する3つのCDRを有する相補性決定領域 (H-CDR1, H-CDR2, 及びH-CDR3) を同定する。第二列(Chothia ナンバリング)は、ChothiaのCDR定義の残基番号を供する (Al-Lazikani et al. 1997)。第三列 (マウス280.46.3.4 VH) は、マウス280.46.3.4の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を供する。第四列 (IGHV3-66)は、CDR-移植にヒトアクセプターフレームワークとして使用される、ヒト免疫グロブリン生殖系列重鎖可変遺伝子3-66 (受入番号IMGT X92218) のアミノ酸配列を供する。第五列(ヒト化 280.VH3-66-46) は、マウス280.46.3.4 VHの最終のヒト化バージョンのアミノ酸配列を供し、下線が付された残基は、ヒト生殖系列IGHV3-66と異なるアミノ酸を示す。

【 0 0 7 3 】

30

40

【表 1】

Kabat ナンバリング	Chothia ナンバリング	マウス 280.46.3.4 VH	IGHV3-66	ヒト化 280.VH3-66-46
(H-FR1) 1	1	E	E	E
2	2	V	V	V
3	3	Q	Q	Q
4	4	L	L	L
5	5	Q	V	V
6	6	Q	E	E
7	7	S	S	S
8	8	G	G	G
9	9	P	G	G
10	10	E	G	G
11	11	L	L	L
12	12	V	V	V
13	13	R	Q	Q
14	14	P	P	P
15	15	G	G	G
16	16	T	G	G
17	17	S	S	S
18	18	V	L	L
19	19	K	R	R
20	20	I	L	L
21	21	S	S	S
22	22	C	C	C
23	23	K	A	A
24	24	A	A	A
25	25	S	S	S
26	(H-CDR1) 26	G	G	G
27	27	Y	F	Y
28	28	S	T	S
29	29	L	V	I
(H-FR1) 30	30	T	S	I
(H-CDR1) 31	31	A	S	A
32	(H-CDR1) 32	D	N	E
33	33	Y	Y	Y
34	34	M	M	M
(H-CDR1) 35	35	N	S	N
(H-FR2) 36	36	W	W	W

10

20

30

40



【表 2】

Kabat ナンバリング	Chothla ナンバリング	マウス 280.46.3.4 VH	IGHV3-66	ヒト化 280.VH3-66-46
37	37	V	V	V
38	38	K	R	R
39	39	Q	Q	Q
40	40	S	A	A
41	41	P	P	P
42	42	E	G	G
43	43	E	K	K
44	44	S	G	G
45	45	L	L	L
46	46	E	E	E
47	47	W	W	W
48	48	I	V	I
(H-FR2) 49	49	G	S	<u>G</u>
(H-CDR2) 50	50	E	V	<u>E</u>
51	51	I	I	I
52	(H-CDR2) 52	N	Y	<u>N</u>
52A	52A	P	-	<u>P</u>
53	53	S	S	S
54	54	T	G	<u>I</u>
55	55	G	G	G
56	(H-CDR2) 56	T	S	<u>I</u>
57	57	T	T	T
58	58	T	Y	<u>I</u>
59	59	Y	Y	Y
60	60	N	A	<u>N</u>
61	61	Q	D	<u>Q</u>
62	62	K	S	<u>K</u>
63	63	F	V	<u>E</u>
64	64	E	K	K
(H-CDR2) 65	65	A	G	G
(H-FR3) 66	66	K	R	R
67	67	A	F	F
68	68	T	T	T
69	69	L	I	I
70	70	T	S	S
71	71	V	R	<u>V</u>

10

20

30

40

【表 3】

Kabat ナンバリング	Chothla ナンバリング	マウス 280.46.3.4 VH	IGHV3-66	ヒト化 280.VH3-66-46
72	72	D	D	D
73	73	Q	N	<u>Q</u>
74	74	S	S	S
75	75	S	K	K
76	76	N	N	N
77	77	T	T	T
78	78	A	L	<u>A</u>
79	79	Y	Y	Y
80	80	L	L	L
81	81	Q	Q	Q
82	82	L	M	M
82A	82A	T	N	N
82B	82B	S	S	S
82C	82C	L	L	L
83	83	T	R	R
84	84	S	A	A
85	85	E	E	E
86	86	D	D	D
87	87	S	T	T
88	88	A	A	A
89	89	V	V	V
90	90	Y	Y	Y
91	91	Y	Y	Y
92	92	C	C	C
93	93	A	A	A
(H-FR3) 94	94	R	R	R
(H-CDR3) 95	(H-CDR3) 95	F		F
96	96	D		D
97	97	A		A
98	98	Y		Y
99	99			F
100	100	F	F	-
101	101	D	D	D
(H-CDR3) 102	(H-CDR3) 102	Y	Y	Y
(H-FR4)103	103	W	W	W
104	104	G	G	G

10

20

30

40

【表 4】

Kabat ナンバリング	Chothia ナンバリング	マウス 280.46.3.4 VH	IGHV3-66	ヒト化 280.VH3-66-46
105	105	Q	Q	Q
106	106	G	G	G
107	107	T	T	T
108	108	T	L	L
109	109	V	V	V
110	110	T	T	T
111	111	V	V	V
112	112	S	S	S
(H-FR4)113	113	S	S	S

10

## 【 0 0 7 4 】

H-FR1中の27、28、29及び30位において、ヒト生殖系列IGHV3-66に存在するアミノ酸は、マウス280.46.3.4 VHにおけるそれらの位置において確認されるアミノ酸に変化した。これらの位置はH-FR1内に存在するようデザインされるにもかかわらず (Kabatナンバリング; 表1)、26から30位は、VHのH-CDR1ループを形成する構造ループの一部である。従って、これらの位置におけるアミノ酸は抗原への結合に直接関与する可能性がある。実際、27～30位は、Chothiaによって定義されるH-CDR1に関してカノニカル構造の一部である (表1)。

20

## 【 0 0 7 5 】

H-FR2の48及び49位において、ヒト生殖系列IGHV3-66に存在するアミノ酸(それぞれ、バリン及びセリン)は、マウス 280.46.3.4 VHにおけるそれらの位置に見られるアミノ酸(それぞれ、イソロイシン及びグリシン; 表 1) に変化した。これらの2つの残基は、非常にH-CDR2に近接し、CDR ループの微細構造に影響する。

30

## 【 0 0 7 6 】

H-FR3の67、69、70、73及び78位において、ヒト生殖系列IGHV3.66に存在するアミノ酸(それぞれ、フェニルアラニン、イソロイシン、セリン、アスパラギン及びロイシン)は、マウス280.46.3.4 VHにおけるそれらの位置に見られるアミノ酸 (それぞれ、アラニン、ロイシン、スレオニン、グルタミン及びアラニン; 表1) に変化した。これらの5つの残基は、VL及びVHドメインのパッキングにおいて重要であり、大概抗体の全体の安定性に影響する。

## 【 0 0 7 7 】

H-FR3における71位において、ヒト生殖系列IGHV3-66に存在するアルギニンは、マウス280.46.3.4 VHのその位置に見られるバリンに変化した。位置71は、Chothia に定義されるH-CDR2に関してカノニカル構造の一部である(表1)。この位置におけるバリンに対するアルギニンの置換は、おそらくH-CDR2 ループの配置を非常に破壊するであろう。

40

## 【 0 0 7 8 】

実施例3: 軽鎖のCDR1における遊離システインの除去

Kabat位置32の軽鎖CDR1 (L-CDR1)中に不対システインが存在し(表2におけるナンバリングを参照されたい)、それは280.VK4-1-C と対合した280.VH3-66-1を含むヒト化280.46.3.4 抗体の発現及び精製中に、高次の共有結合性凝集構造と結合されている(データ未開示)。

## 【 0 0 7 9 】

表 2. ヒト化280.46.3.4 VLのデザインに通じるアミノ酸配列の配列比較

50

第一列 (Kabat & Chothiaナンバリング)は、Kabat (Kabat et al. 1991) 及びChothia (Al-Lazikani et al. 1997) の残基番号を供する。FR及びCDRは、軽鎖可変ドメインのフレームワーク領域(L-FR1, L-FR2, L-FR3, 及びL-FR4)、及び4つのFRを分離する3つのCDRを有する相補性決定領域 (L-CDR1, L-CDR2, 及びL-CDR3) を同定する。第二列 (マウス 280.46.3.4 VL) は、マウス280.46.3.4の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を供する。第三列 (IGKV4-1)は、CDR-移植のためにヒトアクセプターフレームワークとして使用される、ヒト免疫グロブリン生殖系列カッパ可変遺伝子4-1 (受入番号IMGT Z00023) のアミノ酸配列を供する。第四列 (ヒト化280.VK4-1-TSY)は、マウス 280.46.3.4 VLの最終最適化ヒト化バージョンのアミノ酸配列を供し、下線が付された残基はヒト生殖系列IGKV4-1と異なるアミノ酸を示す。

【 0 0 8 0 】

【表 5】

Kabat & Chothia ナンバリング	マウス 280.46.3.4 VL	IGKV4-1	ヒト化 280.VK4-1-TSY
(L-FR1) 1	D	D	D
2	I	I	I
3	V	V	V
4	M	M	M
5	T	T	T
6	Q	Q	Q
7	S	S	S
8	P	P	P
9	S	D	D
10	S	S	S
11	L	L	L
12	A	A	A
13	V	V	V
14	S	S	S
15	V	L	L
16	G	G	G
17	E	E	E
18	K	R	R
19	V	A	A
20	T	T	T
21	M	I	I
22	S	N	N
(L-FR1) 23	C	C	C

【表 6】

Kabat & Chothia ナンバリング	マウス 280.46.3.4 VL	IGKV4-1	ヒト化 280.VK4-1-TSY
(L-CDR1) 24	K	K	K
25	S	S	S
26	S	S	S
27	Q	Q	Q
27A	S	S	S
27B	L	V	L
27C	L	L	L
27D	Y	Y	Y
27E	S	S	S
27F	S	S	S
28	N	N	N
29	Q	N	Q
30	K	K	K
31	N	N	N
32	C	Y	I
33	L	L	L
(L-CDR1) 34	A	A	A
(L-FR2) 35	W	W	W
36	Y	Y	Y
37	Q	Q	Q
38	Q	Q	Q
39	K	K	K
40	P	P	P
41	G	G	G
42	Q	Q	Q
43	S	P	P
44	P	P	P
45	K	K	K
46	L	L	L
47	L	L	L
48	I	I	I
(L-FR2) 49	Y	Y	Y
(L-CDR2) 50	W	W	W
51	A	A	A
52	S	S	S
53	S	T	S

10

20

30

40

【表 7】

Kabat & Chothla ナンバリング	マウス 280.46.3.4 VL	IGKV4-1	ヒト化 280.VK4-1-TSY
54	R	R	R
55	E	E	E
(L-CDR2) 56	S	S	S
(L-FR3) 57	G	G	G
58	V	V	V
59	P	P	P
60	D	D	D
61	R	R	R
62	F	F	F
63	T	S	S
64	G	G	G
65	S	S	S
66	G	G	G
67	S	S	S
68	G	G	G
69	T	T	T
70	D	D	D
71	F	F	F
72	T	T	T
73	L	L	L
74	T	T	T
75	I	I	I
76	S	S	S
77	S	S	S
78	V	L	L
79	K	Q	Q
80	T	A	A
81	E	E	E
82	D	D	D
83	L	V	V
84	A	A	A
85	V	V	V
86	Y	Y	Y
87	Y	Y	Y
(L-FR3) 88	C	C	C
(L-CDR3) 89	Q	Q	Q

10

20

30

40

【表 8】

Kabat & Chothia ナンバリング	マウス 280.46.3.4 VL	IGKV4-1	ヒト化 280.VK4-1-TSY
90	Q	Q	Q
91	Y	Y	Y
92	F	Y	Y
93	S	S	S
94	Y	T	<u>Y</u>
95	P	P	P
96	F		F
(L-CDR3) 97	T		T
(L-FR4) 98	F		F
99	G		G
100	S		Q
101	G		G
102	T		T
103	K		K
104	L		V
105	E		E
106	I		I
(L-FR4) 107	K		K

## 【 0 0 8 1 】

遊離システインを除去するために、配列番号31に記載のヒト化軽鎖、280.VK4-1-Sの第二バージョンを、システインが突然変異によりセリンとなるようにデザインし、コンストラクトした。当該突然変異は、サイズ及び親水性に関して生じ得る最も保存的な変化である。タンパク質A精製の後、SDSゲル上のシステイン非含有の抗体(すなわち、280.VK4-1-Sと対合した280.VH3-66-1を含むヒト化280.46.3.4 抗体) の特性は、システインを含む抗体(すなわち、280.VK4-1-Cと対合した280.VH3-66-1を含むヒト化 280.46.3.4 抗体)より特徴的に見えた(図5)。より特徴的な特性は、遊離システインを含む(280.VK4-1-C; 図5中の「前」) 抗体と比較して、不對システイン非含有の抗体(280.VK4-1-S; 図5中の「後」) 中に副生物より正確に結合された重鎖及び軽鎖が存在することを意味する。

## 【 0 0 8 2 】

280.VK4-1-Sと対合した280.VH3-66-1を含む、ヒトIgG1/カップとして発現されたヒト化抗体の効力を、3つの異なる細胞アッセイにおいて評価した:

1) ヒトHepG2ヘパトーマ細胞におけるSTAT3リン酸化アッセイ。HepG2ヒトヘパトーマ細胞株をATCC (American Type Culture Collection)から得て、24-ウェルプレート中で組換えヒトIL-22で刺激した。中和抗体の段階希釈をEC<sub>80</sub>のIL-22と混合し、20分間細胞に添加した。HepG2可溶化液をCell Signaling から購入したPathScan Phospho-STAT3 Sandwich ELISA Kit中で試験し、試験抗体のIC<sub>50</sub> 値を測定した。このHepG2アッセイにおいて、ヒト化抗体は、280.46.3.4 雑種細胞 (ATCC特許寄託番号PTA-6284) から精製された遊離システインを含むマウス親抗体より1.4倍効能が高いことが確認された。IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ257.5 pM及び370.5 pMであった (図6)。

## 【 0 0 8 3 】

2) BaF3 細胞における増殖アッセイ。BaF3株化細胞にヒトIL-22受容体鎖(IL-22RA及びIL-10RB)を両方形質移入し、96-ウェルプレート中で組換えヒトIL-22と培養した。中和抗体の段階希釈を細胞に添加し、BaF3増殖への効果をトリチウム標識したチミジン取り込み測定によって測定した。このヒトIL-22受容体形質移入-BaF3安定株化細胞アッセイにおいて、ヒト化抗体は、280.46.3.4雑種細胞(ATCC特許寄託番号PTA-6284)から精製された遊離システインを含むマウス親抗体より、1.7倍強力であることが分かった。IC<sub>50</sub>値はそれぞれ340及び587 pMであった(図7)。

【0084】

3) BaF3細胞における増殖アッセイ。BaF3株化細胞にマウスIL22受容体鎖(IL-22RA及びIL-10RB)両方を形質移入し、96-ウェルプレート中で組換えマウスIL-22と培養した。中和抗体の段階希釈を細胞に添加し、BaF3増殖における効果をトリチウム標識チミジン取り込み測定によって測定した。このマウスIL-22受容体形質移入-BaF3安定株化細胞アッセイにおいて、ヒト化抗体は、280.46.3.4雑種細胞(ATCC特許寄託番号PTA-6284)から精製された遊離システインを含むマウス親抗体より、2.1倍強力であることが分かった。IC<sub>50</sub>値はそれぞれ693及び1473 pMであった(図8)。

【0085】

結論として、L-CDR1における遊離システインの変異は、280.VK4-1-Sと対合した280.VH3-66.1を含むヒト化280.46.3.4抗体の生物物理学的特性だけでなく、由来マウス280.46.3.4抗体と比較してヒト及びマウスIL-22RA双方に対する効力もまた劇的に改善した。

【0086】

実施例4: L-CDR1における脱アミドモチーフの除去及びヒト化280.46.3.4 VHにおけるヒト化(humanness)度の増大

抗体を、例えば脱アミド、異性化、加水分解、ジスルフィドスクランブル、ベータ-除去、酸化及び付加物形成等の種々の化学修飾及び/又は分解反応に供することができる。分解の主要な加水分解機構は、特に直ちにグリシン又はセリンが続く、アスパラギンの脱アミドを含むことができる。L-CDR1におけるシステインのセリンによる置換は、脱アミド候補部位を構成するNSモチーフを作るため、除去されるべきである。このNSモチーフを破壊しようと、一連の変異体を構築した(データ未開示)。最良の全体変異はセリンからスレオニンへの変化であることが分かった。配列番号32に記載のこの変異軽鎖可変ドメイン(280.VK4-1-T)は、ヒト化280.46.3.4 VHのバージョン4(280.VH3-66-4; 以下を参照されたい)と対合し、細胞ベースのアッセイにおいて抑制効力に関して評価した。

【0087】

ヒト化280.46.3.4 VHのバージョン4(280.VH3-66-4)において、残基70(表1)は、この位置において確認されるヒト生殖系列残基に、つまりスレオニンからセリンへ突然変異がなされた。H-CDR2の最後の2つの残基、64及び65位におけるグルタミン酸及びアラニン(表1)もまた、それらの位置において見られるヒト生殖系列残基、リジン及びグリシンにそれぞれ突然変異された。全体的に、配列番号33に記載のヒト化280.46.3.4 VHのバージョン4(280.VH3-66-4)は、H-CDR2に位置するこれらの残基の2つを有するバージョン1(280.VH3-66-1)と比較してヒト生殖系列残基をさらに3つ有する(図4と比較した図9)。

【0088】

280.VK4-1-Tと対合した280.VH3-66-4を含む、ヒトIgG1/カッパとして発現されたヒト化抗体の効力を、上記の実施例3の通り、3つの異なる細胞アッセイにおいて評価した:

1) HepG2アッセイにおいて、ヒト化抗体は、280.46.3.4 雑種細胞(ATCC特許寄託番号PTA-6284)から精製されたマウス親抗体より1.8倍強力であることが分かった。IC<sub>50</sub>値は、それぞれ183.2及び333.0 pMであった(図10)。

2) ヒトIL-22受容体形質移入-BaF3安定株化細胞アッセイにおいて、ヒト化抗体は、280.46.3.4 雑種細胞(ATCC特許寄託番号PTA-6284)から精製したマウス親抗体より1.75倍強力であることが分かった。IC<sub>50</sub>値は、それぞれ334及び587 pMであった(図11)。

3) マウスIL-22受容体形質移入BaF3安定株化細胞アッセイにおいて、ヒト化抗体は、28

10

20

30

40

50



0.46.3.4雑種細胞 (ATCC 特許寄託番号PTA-6284) から精製したマウス親抗体より2.1倍強力であることが分かった。IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ687及び1473 pMであった(図12)。

【0089】

実施例5: ヒト化280.46.3.4 VHのCDR1におけるKabat残基32のAspからGluへの変異は、親和性を増大し、安定性を改善する。

抗体は、例えば脱アミド、異性化、加水分解、ジスルフィドスクランブル、ベータ-除去、酸化及び付加物形成等の種々の化学修飾及び/又は分解反応に供することができる。分解の主要な加水分解性機構は、アスパラギン酸(Asp) 異性化を含むことができる。この問題を防止するために、H-CDR1におけるAsp32及びH-CDR3におけるAsp 96がそれぞれ280.VH3-66-4において変異された一組の変異体を作成した。続いてこれらの単一変異体を上記のヒト化軽鎖可変ドメイン280.VK4-1-Tと対合させ、生じるNiNTA精製Fab抗体フラグメントをピアコアによって親和性測定に関して試験した。H-CDR1の32位におけるAspからGluへの変異を含むVHを、バージョン18又は280.VH3-66-18と呼び、それは配列番号34に記載される。図13に示すヒトIL-22RAへの結合を測定するピアコア分析の結果は、親未変異D32 (280.VH3-66-4) と比較して、D32E変異はオン速度 (on rate) を約2倍増大し、オフ速度 (off rate) を約5倍低下したことを示す。一方、D96E変異は、負の影響を有し、約500倍まで親和性を低下した。変異体D32Eは、示差走査熱量測定 (DSC) によって分析する場合、親D32抗体より1度安定であるように見える (図14)。全体的に、D32E変異は最終重鎖ヒト化バージョン18 (280.VH3-66-18) の特性を非常に改善すると結論付けることができる。

【0090】

280.IGKV4-1-Tと対合した280.VH3-66.18を含むヒトIgG1/カッパとして発現されたヒト化抗体の効力を、HepG2細胞アッセイにおいて評価した。図15に示す結果は、ヒト化抗体(280.VH3-66.18/VK4-1-T)が、280.46.3.4 雑種細胞(ATCC特許寄託番号PTA-6284) から精製されたマウス親抗体よりほぼ3倍強力であることを示す。IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ132.5及び370.5 pMであった。

【0091】

実施例6: ヒト化程度の増大

#### A. 重鎖

親マウス280.46.3.4と比較して、一連の変異体はヒト化 280.46.3.4の親和性、効力及び安定性を増大したので、最終ヒト化バージョンのヒト化を増大しようとデザインした。当該目的は、マウス親起源の多くのフレームワーク残基を可能な限り、対応するヒト生殖系列IGHV3-66残基に変異することであった。この工程中、発明者は残基Ala 67及びLeu 69の、残基Phe及びIleそれぞれへの変異を成功することができた(表1)。彼らはまた、ヒト生殖系列IGHV3-66に存在するバリンの代わりに29位のイソロイシンの導入が、熱安定性に正の効果をもたらすことを見出した(データ未開示)。Ile 29はヒト生殖系列 IGHV3-66 (val 29)のこの位置において通常見られる残基ではないという事実にもかかわらず、活性の損失のない安定性へのその正の効果のため、配列番号16に記載の最終ヒト化VHバージョン46 (280.VH3-66-46)においてそれを取り込むことに決定した。ヒト生殖系列IGHV3-66との、最終ヒト化VHバージョン、280.VH3-66-46の配列比較は、9個のマウスフレームワーク残基が保持されたことを示す(図16及び表1)。

【0092】

#### B. 軽鎖

ヒト化軽鎖において、全フレームワーク残基がヒトであるので、CDR残基を生殖系列化する (germlining) 可能性を検討した。マウスCDR残基内の一連の変異体を、個々のCDR残基を等価な位置において見られるヒト生殖系列IGKV4-1残基に変異することによってコンストラクトした。変異体を示差走査熱量測定及びピアコアによって、熱安定性及び親和性それぞれに関してスクリーニングした。L-CDR3の92位におけるPhe (表2)は、ヒト生殖系列IGKV4-1のこの位置に存在するTyr残基と取り換えることができ、この時熱安定性は摂氏1度高くなり親和性の低下はないことが分かった。280.VK4-1-TSYと呼ばれるこの最適化ヒト化VL配列は、配列番号17に記載される。図17に示されるヒト生殖系列 IGKV4-1とのその

配列比較は、それらの配列はたった5つの位置において異なるので、280.VK4-1-TSYがフレームワーク及びCDR残基を含む全生殖系列 IGKV4-1配列と非常に高い同一性有することを示す(図17及び表2)。

【0093】

上記ヒト化抗体は全て、特定の重鎖可変ドメインを配列番号18に記載の定常領域へ結合、及び特定の軽鎖可変ドメインを配列番号19に記載の定常部ドメインへ結合することによって生成した。これらの定常領域は一例として使用され、抗体の結合親和性及び特異性は可変ドメインに属するので、容易に異なるものと取り換えることができることに留意されたい。上記のFabsについて、それらは配列番号18に記載の配列の第一重鎖定常部ドメイン(CH1)及び配列番号19に記載の軽鎖定常部ドメインを含む。

10

【0094】

実施例に記載の異なるヒト化抗体及びFabsは、2つの異なるプロモーターの制御下で重鎖及び軽鎖をコードするcDNAを含む単一発現ベクターを使用して、CHO細胞において生成した。

【0095】

実施例7: ヒトIL-22RA発現細胞アッセイにおける、280.VK4-1-TSY VLと対合したヒト化280.VH3-66-46 VHの効力

280.IGKV4-1-TSYと対合した280.VH3-66.46を含むヒト IgG1/カッパとして発現されたヒト化抗体の効力を、3つの異なる細胞アッセイにおいて評価した。

用語「280.346.TSY」とは、重鎖及び軽鎖定常領域に関係なく、280.IGKV4-1-TSYと対合した280.VH3-66.46を含む、抗ヒトIL-22RAヒト化抗体を示すために以下において使用される。

20

1) 正常ヒトケラチノサイトにおけるSTAT3リン酸化アッセイ。正常ヒトケラチノサイトをBiopredic International から得て、96-ウェルプレート中で組換えヒトIL-22で刺激した。中和抗体の段階希釈をEC<sub>80</sub>のIL-22と混合し、20分間細胞に添加した。ケラチノサイト可溶化液をCell Signalingから購入したPathScan Phospho-STAT3 Sandwich ELISA Kit 中で試験し、試験抗体のIC<sub>50</sub> 値を測定した。この正常ヒトケラチノサイトアッセイにおいて、280.346.TSYは、280.46.3.4雑種細胞(ATCC特許寄託番号PTA-6284) から精製したマウス親抗体よりほぼ9倍強力であることが分かった。IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ60.95及び541.9 pMであった(図18)。

30

【0096】

2) HepG2細胞におけるSTAT3リン酸化アッセイ。HepG2ヒトヘパトーマ株化細胞をATCC (American Type Culture Collection) から得て、24-ウェルプレート中で組換えヒトIL-22で刺激した。中和抗体の段階希釈をEC<sub>80</sub>のIL-22と混合し、20分間細胞に添加した。HepG2可溶化液を、Cell Signalingから購入したPathScan Phospho-STAT3 Sandwich ELISA Kit 中で試験し、試験抗体のIC<sub>50</sub> 値を測定した。このHepG2アッセイにおいて、280.346.TSYは、280.46.3.4雑種細胞(ATCC特許寄託番号 PTA-6284) から精製したマウス親抗体よりほぼ5倍強力であることが分かった。IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ55.16及び266.3 pMであった(図19)。

【0097】

40

3) BaF3 細胞における増殖アッセイ。BaF3株化細胞に、ヒトIL-22 受容体鎖(IL-22RA 及びIL-10RB) 両方を形質移入し、96-ウェルプレート中で組換えヒトIL-22で培養した。中和抗体の段階希釈を細胞に添加し、トリチウム標識チミジン取り込み測定によってBaF3増殖への効果を測定した。このヒトIL-22受容体形質移入-BaF3安定株化細胞アッセイにおいて、280.346.TSYは、280.46.3.4雑種細胞(ATCC特許寄託番号PTA 6284) から精製したマウス親抗体より1.7倍強力であることが分かった。IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ317及び545 pMであった(図20)。

【0098】

特定の280.346.TSYの重鎖及び軽鎖定常領域のアミノ酸配列を、配列番号18及び19にそれぞれ記載し、当該特定の280.346.TSYの重鎖及び軽鎖全体のアミノ酸配列を配列番号20

50

及び21にそれぞれ記載する。

【 0 0 9 9 】

実施例8: マウスIL-22RA発現細胞アッセイにおけるヒト化280.346.TSYの効力

280.346.TSY の効力を、2つの異なる細胞アッセイにおいて評価した:

1) HEPA1-6 細胞におけるSTAT3リン酸化アッセイ。HEPA1-6 マウスヘパトーマ株化細胞をDSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) から得て、96ウェルプレート中で組換えマウスIL-22で刺激した。中和抗体の段階希釈を $EC_{80}$ のIL-22と混合し、20分間細胞に添加した。ヒトIgG1を対照として使用した。HEPA1-6可溶化液をCell Signaling から購入したPathScan Phospho-STAT3 Sandwich ELISA Kit中で試験し、試験抗体の $IC_{50}$  値を測定した。このHEPA1-6 細胞アッセイにおいて、280.346.TSYは、マウスIL-22の活性を抑制することが分かった。 $IC_{50}$  は、ナノモル濃度の範囲であった(2,1 nM; 図21)。

10

【 0 1 0 0 】

2) BaF3 細胞における増殖アッセイ。BaF3株化細胞にマウスIL-22 受容体鎖 (IL-22RA及びIL-10RB) の両方を形質移入し、96-ウェルプレート中で組換えマウスIL-22で培養した。中和抗体の段階希釈を細胞に添加し、BaF3増殖への効果をトリチウム標識チミジン取り込み測定によって測定した。このマウスIL-22 受容体形質移入-BaF3安定株化細胞アッセイにおいて、280.346.TSYは、280.46.3.4雑種細胞(ATCC特許寄託番号PTA 6284) から精製したマウス親抗体より6.2倍強力であることが分かった。 $IC_{50}$  値は、それぞれ137及び849 pMであった (図22)。

20

【 0 1 0 1 】

実施例9: 競合ELISAによるIL-22RA関連タンパク質に対する280.346.TSYの結合選択性

競合ELISAを使用して280.346.TSYの特異性及び結合親和性を測定した。マイクロタイタープレートをヒトIL-22RA-ECD (すなわち、IL-22RA-細胞外ドメイン) でコーティングした。ビオチン化280-346-TSY抗体を、競合物: ヒトインターロイキン22 受容体アルファ (hIL-22RA)、ヒトIL-22結合タンパク質 (hIL-22BP)、マウスIL-22受容体アルファ (mIL-22RA)、ヒトIL-10受容体アルファ (hIL-10R) 及びヒトIL-20受容体アルファ (hIL-20R) の存在下でプレートに添加した。プレート上にコーティングしたhIL-22RAへの結合を、ペルオキシダーゼ複合ストレプトアビジンの添加によって明らかにした。組換えヒト及びマウスIL-22RAに関する測定した $IC_{50}$ 値は、それぞれ18.25 pM及び149.3 pMであった(図23)。モノクローナル抗体は、組換えヒトIL-22BP、IL-10R、及びIL-20Rと交差反応性を示さなかった。

30

【 0 1 0 2 】

実施例10: KinExA及びピアコアによるKd測定によって評価したIL-22RA 相同分子種に対する280-346-TSYの交差反応性。

280-346-TSYのKdを、ピアコア及びKinExA 装置の両方を使用して評価した。ヒト及び異なる種 (ラット, マウス, イヌ, アカゲザル, カニクイザル及びマーモセット)において見られる相同遺伝子配列のIL-22RA細胞外ドメイン (ECD)を、HEK-293細胞中で生成し、6 His tag を使用してNiNTA-精製した。280-346-TSY抗体は、試験したIL-22RAのヒト及びサル3種全てに対してナノモル以下の親和性を有する。それは、マウスに対してナノモル親和性を有し、ヒトへの親和性と比較して約100倍低い親和性であり、且つラットIL-22RAに対してマイクロモル親和性を有した (表3)。

40

【 0 1 0 3 】

表 3. ヒトIL-22RA-ECD及びその相同分子種への280-346-TSYモノクローナル抗体のKd親和性の測定。

【 0 1 0 4 】

【表 9】

IL-22RA-ECD	Kd KinExA	Kd Biacore
ヒト	~28.5 pM	~150 pM
マウス	~4.85 nM	~20 nM
ラット	~587 nM	~1 $\mu$ M
アカゲザル	~137 pM	ND
カニクイザル	~64.5 pM	ND
マーモセット	~38.5 pM	400 pM
イヌ	不検出 (ND)	100 nM

10

## 【0105】

実施例11: マウスにおけるIL-22-誘発血清アミロイドAへの280-346-TSYの有効性

280-346-TSYの薬力学活性を、オスBalb/cマウスにおいてIL-22-誘発血清アミロイドA上で測定した。異なる用量の280.346.TSYをマウスに皮下投与し、22時間後組換えマウスにIL-22を静脈内注射した。ビヒクル対照は、皮下にPBSを10 ml/kgで投与した。

## 【0106】

20

イソフルラン麻酔下でマウスに100  $\mu$ g/kgのIL-22を後眼窩神経叢中に投与した。IL-22注射の6時間後に、イソフルラン麻酔下で心穿刺によって採血を行った。ヒトIgG1を負の対照(アイソタイプ対照)として使用した。血清アミロイドAを、ELISA (Biosource)によって測定した。280-346-TSYは、ED<sub>50</sub> 値0.5 mg/kgを供した。マンホイットニー検定を使用し、統計分析を行った: \*  $p < 0.05$  vs. アイソタイプ対照群; \*\*\*  $p < 0.001$  vs. アイソタイプ対照群 (図24)。

## 【0107】

実施例12: マウスにおけるIL-23-誘発性耳炎症への280-346-TSYの有効性

280-346-TSYの薬力学活性を乾癬のマウスモデルにおいて測定した。メスC57BL/6マウスにおけるIL-23-誘発性耳肥厚への280-346-TSYの有効性を試験した。Zheng Y等記載のように(Nature 2007)、マウスに、全体積20  $\mu$ l中の500 ngの組換えヒト IL-23又はPBSを隔日に14日間注入した。異なる用量の280.346.TSYを、組換えIL-23の最初の投与前に第一の用量を、そしてその後隔日に皮下に投与した。ビヒクル対照として、皮下に10 ml/kgでPBSを投与する。デキサメタゾン(Dexa)を正の対照として使用した。9日目に抑制割合を算出し、これは耳介腫脹のピークに対応する。280-346-TSYは、ED<sub>50</sub> 値1.8 mg/kgを供する (図25)。

30

## 【0108】

【表 10】

配列番号	配列の説明
1	H-CDR1 (AEYMN)
2	H-CDR2 (EINPSTGTTTYNQKFKG)
3	H-CDR3 (FDAYFDY)
4	L-CDR1 (KSSQSLLYSSNQKNTLA)
5	L-CDR2 (WASSRES)
6	L-CDR3 (QQYYSYPFT)
7	代替 L-CDR3 (QQYFSYPFT)
8	H-FR1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSIT)
9	H-FR2 (WVRQAPGKGGLEWIG)
10	H-FR3 (RFTISVDQSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR)
11	H-FR4 (WGQGTLVTVSS)
12	L-FR1 (DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC)
13	L-FR2 (WYQQKPGQPPLLIY)
14	L-FR3 (GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC)

10

20

【表 1 1】

配列番号	配列の説明
15	L-FR4 (FGQGTKVEIKR)
16	最終ヒト化VH (280. VH3-66-46)
17	最終ヒト化VL (280. VK4-1-TSY)
18	特定の280. 346. TSYの重鎖定常領域
19	特定の280. 346. TSYの軽鎖定常部ドメイン
20	特定の280. 346. TSYの重鎖
21	特定の280. 346. TSYの軽鎖
22	特定の280. 346. TSYの重鎖をコードするcDNA
23	特定の280. 346. TSY軽鎖をコードするcDNA
24	ヒトIL-22RAのアミノ酸配列
25	マウス280. 46. 3. 4の重鎖可変ドメイン
26	マウス280. 46. 3. 4の軽鎖可変ドメイン
27	免疫グロブリンカッパ可変性4-1 (IGKV4-1)
28	免疫グロブリン重鎖可変性3-66 (IGHV3-66)
29	ヒト化280. 46. 3. 4 VLの第一のバージョン (280. VK4-1-C)
30	ヒト化280. 46. 3. 4 VHの第一のバージョン (280. VH3-66. 1)
31	ヒト化280. 46. 3. 4 VLの第二のバージョン (280. VK4-1-S)
32	ヒト化280. 46. 3. 4 VLの第三のバージョン (280. VK4-1-T)
33	ヒト化280. 46. 3. 4 VHのバージョン4 (280. VH3-66-4)
34	ヒト化280. 46. 3. 4 VHのバージョン18 (280. VH3-66-18)

10

20

【 0 1 0 9 】

参考文献

30

【 0 1 1 0 】

## 【表 1 2】

1. Aggarwal S, Xie MH, Maruoka M, Foster J, Gurney AL. Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22. *J. Interferon Cytokine Res.* 2001; 21: 1047-53.
2. Al-Lazikani B, Lesk AM, Chothia C. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol.* 1997; 273(4): 927-48.
3. Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, Fujino S, Deguchi Y, Araki Y, Tsujikawa T, Kitoh K, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi A et al. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 10 2005; 129: 969-84.
4. Aviv H and Leder P. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972; 69(6): 1408-12.
5. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18(24): 5294-9.
6. Chothia C and Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 1987; 196: 901-917. 20
7. Dumoutier L, Van Roost E, Colau D, Renauld JC. Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as a hepatocyte-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 10144-49.
8. Francis GE, Fisher D, Delgado C, Malik F, Gardiner A, Neale D. PEGylation of cytokines and other therapeutic proteins and peptides: the importance of biological optimisation of coupling techniques. *Int J Hematol.* 1998; 68(1): 1-18.
9. Giudicelli V, Chaume D, Lefranc MP. IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33: D256-61. 30
10. Harris JM and Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2(3): 214-21.
11. Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, Nojima Y. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 1037-46.
12. Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1991 40
13. Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Esterova E, Dickensheets H, Donnelly RP, Pestka S. Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. *J Immunol.* 2001; 166: 7096-7103.

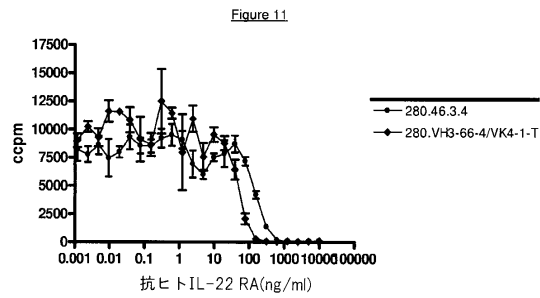
## 【表 1 3】

14. Kunz S, Wolk K, Witte E, Witte K, Doecke WD, Volk HD, Sterry W, Asadullah K, Sabat R. Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs. *Experimental Dermatology* 2006; 15: 991-1004.
15. Langer JA, Cutrone EC, Kotenko S. The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions. *Cytokine & Growth Factor Review* 2004; 15: 33-48.
16. Li J, Tomkinson KN, Tan X, Wu P et al. Temporal associations between interleukin 22 and the extracellular domains of IL-22R and IL-10R2. *Int Immunopharmacol.* 2004; 4(5):693-708. 10
17. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19: 683-765.
18. Nograles KE, Brasington RD, Bowcock AM. New insights into the pathogenesis and genetics of psoriatic arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2009a; 5(2): 83-91.
19. Nograles KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, Ramon M, Bergman R, Krueger JG, Guttman-Yassky E. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2009b; 123(6): 1244-52. 20
20. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004; 21: 241-54.
21. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007; 445: 648-51.
22. WO 2006/047249
23. WO 99/07848 30

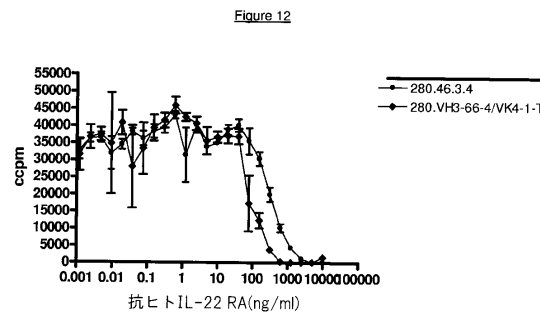




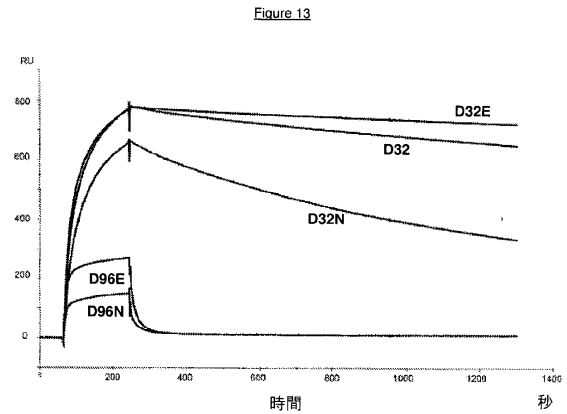
【図 1 1】



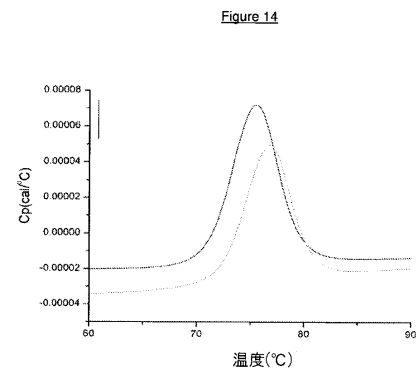
【図 1 2】



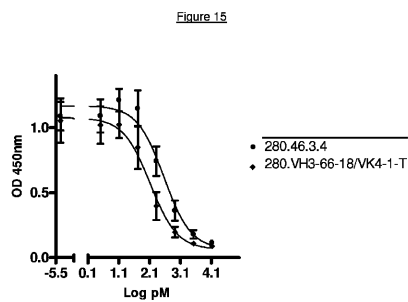
【図 1 3】



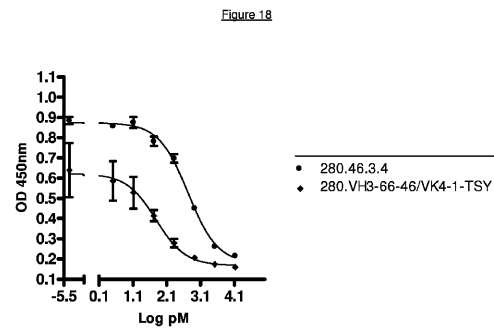
【図 1 4】



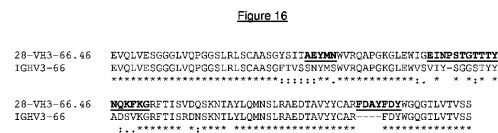
【図 1 5】



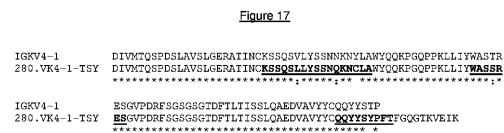
【図 1 8】



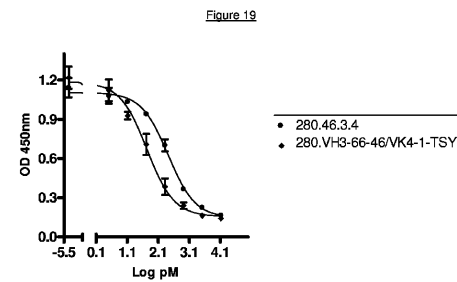
【図 1 6】



【図 1 7】

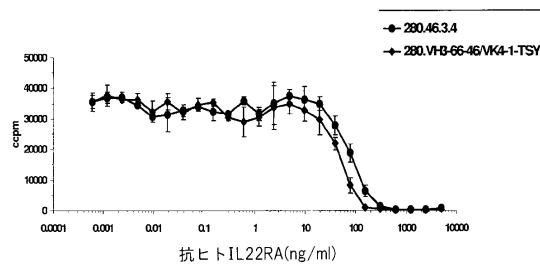


【図 1 9】



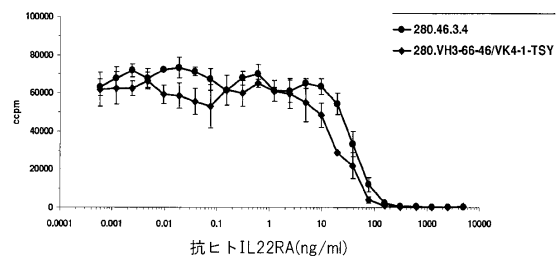
【図 20】

Figure 20



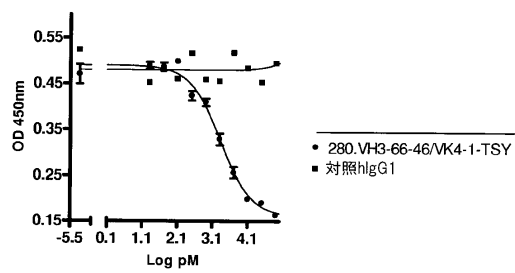
【図 22】

Figure 22



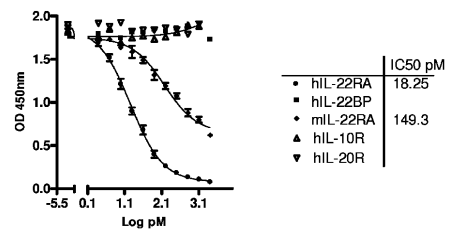
【図 21】

Figure 21



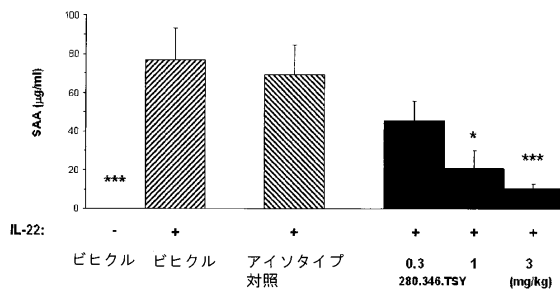
【図 23】

Figure 23



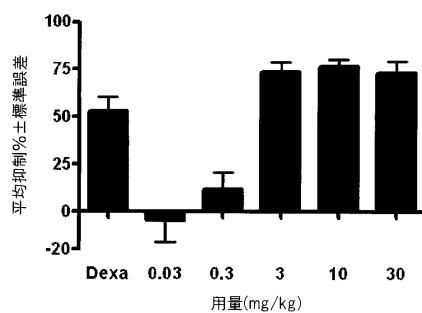
【図 24】

Figure 24



【図 25】

Figure 25



【配列表】

0005818804000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>5/00</i>	<i>1 0 1</i>
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i>	<i>21/08</i>	
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>N</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>17/06</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>17/06</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>19/02</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>19/02</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>17/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>17/00</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>37/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>37/08</i>	

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(72)発明者 ローラント ベックマン

オーストリア国, アー - 1 1 9 0 ウィーン, ツェントホーフガッセ 3 5 / 4

(72)発明者 キャロライン ジョンソン - リーガー

フランス国, エフ - 7 4 8 0 0 サン シックス, ルート デ リュシュ, 6 0 3

審査官 竹内 祐樹

(56)参考文献 特表 2 0 0 8 - 5 1 7 9 2 2 ( J P , A )

J. Mol. Biol., 1995, 254(3), pp.392-403

J. Mol. Biol., 1996, 263(4), pp.551-567

J. Biol. Chem., 2003, 278(44), pp.43496-43507

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

*C 1 2 N* 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0*C 0 7 k* 1 6 / 0 0 - 1 9 / 0 0*C A p l u s* / *M E D L I N E* / *B I O S I S* ( *S T N* )