

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5063612号

(P5063612)

(45) 発行日 平成24年10月31日(2012.10.31)

(24) 登録日 平成24年8月17日(2012.8.17)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 16/24 (2006.01)

C O 7 K 16/24 Z N A

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 Y

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 11/00 (2006.01)

A 6 1 P 9/10 1 O 1

請求項の数 5 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-545908 (P2008-545908)  
 (86) (22) 出願日 平成18年12月5日 (2006.12.5)  
 (65) 公表番号 特表2009-519348 (P2009-519348A)  
 (43) 公表日 平成21年5月14日 (2009.5.14)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/061586  
 (87) 国際公開番号 W02007/070750  
 (87) 国際公開日 平成19年6月21日 (2007.6.21)  
 審査請求日 平成21年10月21日 (2009.10.21)  
 (31) 優先権主張番号 60/749,953  
 (32) 優先日 平成17年12月13日 (2005.12.13)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/801,948  
 (32) 優先日 平成18年5月19日 (2006.5.19)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 594197872  
 イーライ リリー アンド カンパニー  
 アメリカ合衆国 インディアナ州 462  
 85 インディアナポリス リリー コー  
 ポレイト センター (番地なし)  
 (74) 代理人 100068526  
 弁理士 田村 恭生  
 (74) 代理人 100100158  
 弁理士 鮫島 睦  
 (74) 代理人 100138900  
 弁理士 新田 昌宏  
 (74) 代理人 100162684  
 弁理士 呉 英燦  
 (74) 代理人 100176474  
 弁理士 秋山 信彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗 I L - 1 7 抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：241の軽鎖可変領域ポリペプチド及び配列番号：118の重鎖可変領域ポリペプチドを含む抗 I L - 1 7 単クローン抗体。

【請求項 2】

抗体が、I g G<sub>1</sub>、I g G<sub>2</sub>、I g G<sub>3</sub>、及び I g G<sub>4</sub> からなる群より選択される重鎖定常領域を更に含む請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

薬剤として使用するための、請求項 1 または 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

関節リウマチ、炎症性腸障害、乾癬、及び多発性硬化症からなる群より選択される一種以上の症状の治療に用いるための請求項 1 または 2 に記載の抗体。

【請求項 5】

請求項 1 または 2 に記載の抗体と薬理学的に許容できる担体を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医学の分野、特にヒト I L - 1 7 に対する単クローン抗体の分野に関する。  
 本発明は、アミノ酸 D G N V D Y H (配列番号：276) を含む I L - 1 7 非線形又は高次構造抗原性エピトープに高い親和性で結合する、抗 I L - 1 7 単クローン中和抗体に関

する。本発明の抗体は、キメラ、ヒト化、若しくはヒト抗体、それら抗体の免疫複合体又はそれらの抗原結合断片でもよく、自己免疫、炎症性、細胞増殖性、及び発達障害の治療のための薬剤として有用である。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

サイトカインのIL-17ファミリーには現在、IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E、及びIL-17Fが含まれる。すべてのIL-17ファミリーメンバーは、鎖間ジスルフィド結合の形成に關与する、4つの高度に保存されたシステイン残基を有し、且つ鎖間ジスルフィド結合に關係してもよい2以上のシステイン残基を有する。IL-17ファミリーのメンバーには、他のいずれの既知サイトカインとも配列類似性がない。しかし、IL-17Aのウィルス相同体が、ヘルペスウィルスサイミリの読み取り枠13に見い出され(Yao, Z. et al., Immunity, 3: 811, 1995)、ヒトIL-17Aと72%のアミノ酸残基同一性を有する。IL-17ファミリーメンバーに対して複数の機能が報告されており、主として免疫応答の調節に關わる。

#### 【0003】

インターロイキン17(IL-17、IL-17Aとも称される)は、活性化CD4+T細胞によって主に生産される20~30kDのホモダイマー糖タンパク質であり、炎症誘発性サイトカインとして機能する。特定のIL-17ファミリーメンバーが単に「IL-17」と称される場合、そのファミリーメンバーが指すのはIL-17Aであると理解される。IL-17は、体循環中でなく炎症の部位で、活性化T細胞により分泌される。IL-17は、他の既知サイトカイン受容体との有意な配列類似性を示さない、偏在的に発現される大きなタンパク質である、IL-17Rと称されるI型膜貫通受容体に結合する。IL-17は、接着分子をアップレギュレートすること、並びに滑膜細胞、軟骨細胞、繊維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞、ケラチノサイト、及びマクロファージを含む様々な細胞型から複数の炎症性サイトカイン及びケモカインの生産を誘導することを含む、複数の生物学的性質を有する。また、IL-17は、ケモカイン遊離を誘導することで炎症部位に好中球の補充を誘導し、プロスタグランジン及びメタロプロテイナーゼの生産を刺激し、プロテオグリカン合成を阻害する。更に、IL-17は、造血前駆細胞の成熟において重要な役割を果たす。IL-17が、肺、関節軟骨、骨、脳、造血細胞、腎、皮膚及び腸を含めた異なる器官及び組織でシグナル伝達の役割を有することが立証されている。IL-17生物活性の総説については、例えば、Kolls and Linden, Immunity 21: 467-476, 2004、又はFossiez, et al., Int. Rev. Immunol. 16: 541, 1998を参照のこと。

#### 【0004】

IL-17(すなわち、IL-17A)のレベルの増加は、気道炎症、慢性関節リウマチ(「RA」)骨関節炎、骨浸食、腹腔内膿瘍及び接着、炎症性腸障害(「IBD」)、同種異系移植片拒絶、乾癬、特定の型の癌、脈管形成、アテローム性動脈硬化及び多発性硬化症(「MS」)を含む種々の症状、疾患又は障害と關連している(総説については、Witkowski, et al., Cell. Mol. Life Sci. 61: 567-579, 2004参照)。IL-17及びIL-17Rは双方とも、RA患者の滑液組織にてアップレギュレートされる。IL-17特異抗体又はIL-17に対する可溶性受容体との結合によりIL-17生物活性を阻止すると、様々な動物の関節炎モデルで炎症及び骨浸食が低減する。(Lubberts, et al., Arthritis & Rheumatism, 50: 650-659, 2004参照)。更に、IL-17は、コラーゲン基質の崩壊及び炎症並びに関節損傷に対して、IL-1非依存的な効果を有し、一方でIL-17は、TNF-との相乗作用を有して炎症を増幅する。

#### 【0005】

従って、炎症の部位でのその限局的分布を前提に、IL-17は、RA、及びTNF-などの炎症誘発性サイトカインの体循環を標的化する薬物よりも潜在的に高い安全性ブ

10

20

30

40

50

ロファイルを伴う他の炎症性疾患又は自己免疫疾患の治療に対する新規の標的であると考えられる。TNF- $\alpha$ に結合してこれを中和する、現在FDAで認可されているバイオ製品（ENBREL（登録商標）、REMICADE（登録商標）及びHUMIRA（登録商標）抗体）は、RAの徴候及び症状の低減と、RA患者のサブセットでの疾患の進行の緩徐化における有効性が示されている。しかし、すべてのRA患者が、これらのバイオ製品でのTNF- $\alpha$ 生物活性の阻害に等しく応答するわけではない。加えて、IL-17 mRNAは、多発性硬化症病変で、並びに血中の単核細胞及びMS患者の脳脊髄液中で、特に臨床症状が悪化する間に増加する。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0006】

従って、IL-17生物活性の存在によって望ましくない病理学的効果が生じるか若しくはそのような効果に寄与するような、又はIL-17生物活性の減少が望ましい治療効果に寄与するような、RA及びMS及びIBDなどの炎症性障害、細胞増殖及び発達障害、並びに自己免疫異常を含めた障害、疾患又は症状を治療するために、IL-17の活性に拮抗するか、又は中和する組成物が必要とされている。

【0007】

ヒト起源のIL-17や、ヒト以外の哺乳動物のIL-17に特異的に結合する抗IL-17中和抗体であって、これにより前臨床、及び臨床のインビボ研究にて使用できる抗体が必要とされている。更に、高い親和性でIL-17に結合し、且つ/又は遅い解離速度を有するIL-17特異抗体であって、これによって、より低い親和性でIL-17に結合し（すなわち、 $K_D$ がより高い）、且つ/又はより速い解離速度を有する抗体を用いる場合よりも、かかる抗体を用いて、有効な薬用量を最小化して、結果的に投薬回数を低減できるようにするIL-17特異抗体が必要とされている。高親和性IL-17特異抗体は、患者の静脈内でなく皮下に抗体を投与できる場合があるという点でも望ましい。最小有効薬用量で治療用の抗IL-17抗体を作製するために、IL-17生物活性のアッセイで低い $IC_{50}$ 値を示すIL-17特異抗体も必要とされている。抗体を摂取している患者によって誘起されるその抗体に対する免疫応答が最小限に低減されるような、IL-17に特異的な抗体を提供することも望ましい。本発明は、これらの要求を満たし、関連する効果をもたらす。

20

30

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の抗体は、キメラ、ヒト化、又は完全にヒトの抗IL-17単クローン抗体、及びそれらの抗原結合部分であって、IL-17アミノ酸DGNVDYH（配列番号：276）を含む非線形エピトープに結合して、IL-17若しくはその一部分に関連するインビトロ又はインビボの生物学的活性の少なくともいずれかと拮抗するか、又はこれを中和する。

【0009】

一実施形態で、本発明の抗体は、例えば本願明細書の実施例6Aに記載のようなインビトロIL-8レポーターアッセイで約1 nM、900 pM、800 pM、700 pM、600 pM、560 pM若しくは500 pM以下の、又は例えば本願明細書の実施例6Bに記載のようなインビトロGROレポーターアッセイで560 pM以下の $IC_{50}$ を有する。

40

【0010】

別の実施形態で、本発明の抗体は、ヒトIL-17に対する強い結合親和性（ $K_D$ ）すなわち、約7 pM、6.5 pM、6.0 pM、5.5 pM、5.0 pM、4.5 pM又は4.0 pM未満の結合親和性によって特徴付けられる。あるいは、本発明の抗体は、約7 pM、6.5 pM、6.0 pM、5.5 pM、5.0 pM、4.5 pM以下、又は好ましくは約4.0 pM以下の、ヒトIL-17に対する $K_D$ によって特徴付けられる。好ましくは、本発明の抗体は、 $2 \times 10^{-5} s^{-1}$ 未満の、ヒトIL-17からの $k_{off}$ 速

50

度によって更に特徴付けられる。

【 0 0 1 1 】

別の実施形態で、本発明の抗 I L - 1 7 抗体は、ヒト I L - 1 7 のみならずカニクイザル I L - 1 7 に特異的に結合する一方で、バックグラウンドを上回るレベルでマウス又はラット I L - 1 7 に結合することがないことによって特徴付けられる。加えて、本発明の抗 I L - 1 7 抗体は、ヒト I L - 1 7 (すなわち、I L - 1 7 A) に結合するが、ヒト I L - 1 7 B、C、D、E 又は F に結合しない。

【 0 0 1 2 】

一実施形態で、本発明の抗 I L - 1 7 単クローン抗体は、本願明細書の下記表 3 に列挙する F a b に共に存在し、且つ表 3 に列挙する F a b におけると同じ C D R 位置で本発明の抗体に存在する、3 つの C D R 配列を含んだ軽鎖可変領域 (「 L C V R 」) ポリペプチドを含む。好ましくは、本発明の抗 I L - 1 7 単クローン抗体は、配列番号：1 7 8 ~ 2 4 3 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する L C V R ポリペプチドを含む。

10

【 0 0 1 3 】

別の実施形態で、本発明の抗 I L - 1 7 単クローン抗体は、本願明細書の下記表 2 に列挙する F a b に共に存在し、且つ表 2 に列挙する F a b におけると同じ C D R 位置で本発明の抗体に存在する、3 つの C D R を含んだ重鎖可変領域 (「 H C V R 」) ポリペプチドを含む。好ましくは、本発明の抗 I L - 1 7 単クローン抗体は、配列番号：5 6 ~ 1 2 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する H C V R ポリペプチドを含む。

【 0 0 1 4 】

20

別の実施形態で、本発明の抗 I L - 1 7 単クローン抗体は、表 3 に列挙する F a b に共に存在し、且つ表 3 に列挙する F a b におけると同じ C D R 位置で本発明の抗体に存在する、3 つの C D R を含んだ L C V R ポリペプチドを含み、更に表 2 に列挙する F a b に共に存在し、且つ表 2 に列挙する F a b におけると同じ C D R 位置で本発明の抗体に存在する、3 つの C D R を含んだ H C V R ポリペプチドを含む。好ましくは、本発明の抗体の 6 つの C D R、又はその機能性断片は、本願明細書の下記表 1 に列挙する F a b に共に存在し、且つ表 1 に列挙する F a b におけると同じ C D R 位置で本発明の抗体に存在する。

【 0 0 1 5 】

好ましい実施形態で、本発明の抗 I L - 1 7 単クローン抗体は、( i ) 配列番号：1 7 8 ~ 2 4 3 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する L C V R ポリペプチド、及び ( i i ) 配列番号：5 6 ~ 1 2 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する H C V R ポリペプチドを含む。より好ましい実施形態で、配列番号：1 7 8 ~ 2 4 3 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する L C V R ポリペプチドを含む本発明の抗体は、配列番号：5 6 ~ 1 2 1 からなる群より選択される H C V R ポリペプチドであって表 1 に列挙する F a b に存在し、当該抗体に存在する特定の L C V R を含むものを更に含む。

30

【 0 0 1 6 】

別の実施形態で、本発明の単クローン抗体は、競合抗体と、ヒト I L - 1 7 又はヒト I L - 1 7 の一部分への結合について競合できるものであり、当該競合抗体は、配列番号：2 4 1 及び 1 1 8 のアミノ酸配列を有する 2 つのポリペプチドを含む。

【 0 0 1 7 】

40

別の実施形態で、本発明の抗 I L - 1 7 単クローン抗体の L C V R は、( a ) 配列番号：1 2 2 ~ 1 4 9 ; ( b ) 配列番号：1 5 0 ~ 1 6 7、及び ( c ) 配列番号：1 6 8 ~ 1 7 7 に示す配列を有するペプチドからなる群より選択される、1 つ、2 つ又は、3 つのペプチド、好ましくは 3 つのペプチド (すなわち、3 つの前記ペプチドを含む抗体については、( a ) からのペプチド 1 つ、( b ) からのペプチド 1 つ、及び ( c ) からのペプチド 1 つ) を含む。配列番号：1 2 2 ~ 1 4 9 に示す配列を有するペプチドが本発明の抗体に存在する場合、C D R L 1 にある。配列番号：1 5 0 ~ 1 6 7 に示す配列を有するペプチドが本発明の抗体に存在する場合、C D R L 2 にある。配列番号：1 6 8 ~ 1 7 7 に示す配列を有するペプチドが本発明の抗体に存在する場合、C D R L 3 にある。

【 0 0 1 8 】

50

別の実施形態で、本発明の抗 I L - 1 7 単クローン抗体の H C V R は、( a ) 配列番号： 1 1 ~ 2 8 ; ( b ) 配列番号： 2 9 ~ 3 2、並びに ( c ) 配列番号： 3 3 ~ 5 5 及び 2 6 1 に示す配列を有するペプチドからなる群より選択される、1つ、2つ又は、3つのペプチド、好ましくは3つのペプチド(すなわち、3つの前記ペプチドを含む抗体については、( a ) からのペプチド1つ、( b ) からのペプチド1つ、及び ( c ) からのペプチド1つ)を含む。配列番号： 1 1 ~ 2 8 に示す配列を有するペプチドが前記抗体に存在する場合、C D R H 1 にある。配列番号： 2 9 ~ 3 2 に示す配列を有するペプチドが前記抗体に存在する場合、C D R H 2 にある。配列番号： 3 3 ~ 5 5 及び 2 6 1 に示す配列を有するペプチドが前記抗体に存在する場合、C D R H 3 にある。

【 0 0 1 9 】

本発明は更に、( a ) 配列番号： 1 2 2 ~ 1 4 9 ; ( b ) 配列番号： 1 5 0 ~ 1 6 7、( c ) 配列番号： 1 6 8 ~ 1 7 7、( d ) 配列番号： 1 1 ~ 2 8 ; ( e ) 配列番号： 2 9 ~ 3 2、並びに ( f ) 配列番号： 3 3 ~ 5 5 及び 2 6 1 に示す配列を有するペプチドからなる群より選択される、6つのペプチド(すなわち、( a ~ f ) の各々からの1つのペプチド)を含む抗 I L - 1 7 単クローン抗体を提供し、好ましくはそれら6つのペプチドは本願明細書の表 1 に列挙する F a b に共に存在する。配列番号： 1 2 2 ~ 1 4 9 に示す配列を有するペプチドが本発明の抗体に存在する場合、C D R L 1 にある。配列番号： 1 5 0 ~ 1 6 7 に示す配列を有するペプチドが本発明の抗体に存在する場合、C D R L 2 にある。配列番号： 1 5 0 ~ 1 6 7 に示す配列を有するペプチドが本発明の抗体に存在する場合、C D R L 3 にある。配列番号： 1 1 ~ 2 8 に示す配列を有するペプチドが前記抗体に存在する場合、C D R H 1 にある。配列番号： 2 9 ~ 3 2 に示す配列を有するペプチドが前記抗体に存在する場合、C D R H 2 にある。配列番号： 3 3 ~ 5 5 及び 2 6 1 に示す配列を有するペプチドが前記抗体に存在する場合、C D R H 3 にある。

【 0 0 2 0 】

本発明は更に、配列番号： 2 4 7、2 4 8、2 4 9、2 4 4、2 4 5 及び 2 4 6 に示す配列を有する6つのペプチドを含む抗 I L - 1 7 単クローン抗体を提供する。配列番号： 2 4 7 に示す配列を有するペプチドは、C D R L 1 にある。配列番号： 2 4 8 に示す配列を有するペプチドは、C D R L 2 にある。配列番号： 2 4 9 に示す配列を有するペプチドは、C D R L 3 にある。配列番号： 2 4 4 に示す配列を有するペプチドは、C D R H 1 にある。配列番号： 2 4 5 に示す配列を有するペプチドは、C D R H 2 にある。配列番号： 2 4 6 に示す配列を有するペプチドは、C D R H 3 にある。

【 0 0 2 1 】

本発明の抗 I L - 1 7 単クローン抗体は、無傷の(すなわち、完全長の)抗体、実質的に無傷の抗体又はその抗原結合部分(例えば、F a b 断片、F ( a b ' )<sub>2</sub> 断片又は単鎖 F v 断片)を含んでも、これからなってもよい。更に、本発明の抗体は、検出可能な標識でラベルしても、固相に固定化しても、及び/又は異種化合物(例えば、酵素、毒素若しくはポリエチレングリコール分子)と接合してもよい。

【 0 0 2 2 】

別の実施形態で、本発明は、本発明の宿主細胞(すなわち、本発明の抗体を発現する本発明のベクター(1種又は複数種)で形質転換、形質導入又は感染されている宿主細胞)を、本発明の単クローン抗体の発現に適切な条件下に維持し、これによりかかる抗体を発現させることを含む、本発明の抗 I L - 1 7 単クローン抗体を調製する方法を提供する。前記方法は、細胞から、又は好ましくは細胞の生育培地から、本発明の単クローン抗体を単離する工程を更に含んでもよい。

【 0 0 2 3 】

本発明の単クローン抗体の診断用途を企図する。1つの診断用途で、本発明は、被検試料を本発明の抗 I L - 1 7 抗体へ結合条件下に曝し、試料への抗体の特異的結合を定量することを含む、試料中の I L - 1 7 タンパク質のレベルを定量するための方法を提供する。本発明の抗 I L - 1 7 抗体は、既知量の I L - 1 7 を含む試料への当該抗体の結合によって作成される標準曲線と、試験試料の値を比較することによって試験試料中の I L - 1

10

20

30

40

50

7のレベルを定量するために使用してもよい。本発明は更に、本発明の抗体、及び好ましくは、その抗体を使用して試料中のIL-17タンパク質を検出するための説明書を含むキットを提供する。

【0024】

本発明は、本発明の抗IL-17単クローン抗体を含む組成物、好ましくは医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、薬理的に許容できる担体、賦形剤及び/又は希釈剤を更に含んでもよい。前記医薬組成物で、本発明の抗IL-17単クローン抗体は、唯一の活性成分である。好ましくは、医薬組成物は、本発明の抗IL-17単クローン抗体の均一又は実質的に均一な集団を含む。治療用途の組成物は、生理的に適合性で、無菌であり、また凍結乾燥して適切な希釈剤と共に任意に供給してもよい。

10

【0025】

本発明は、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトにおけるIL-17生物活性の少なくともいずれかを必要に応じて阻害する方法であって、治療上有効量、又はIL-17中和量の、本発明の抗IL-17単クローン抗体を当該動物に投与することを含む方法を提供する。本発明は更に、例えば、IL-17のその受容体への結合に起因するシグナル伝達の阻害など、IL-17生物活性を中和又は拮抗することによって寛解する疾患又は障害を治療する方法であって、このような治療又は予防を必要とする患者（例えば、ヒト）に、治療上有効量の、IL-17中和量の本発明の単クローン抗体を投与することを含む方法を提供する。

【0026】

20

本発明は、例えば自己免疫異常又は炎症障害又は細胞増殖障害の治療のための、哺乳動物、好ましくはヒトへの投与用の薬剤の製造で使用するための、本発明の抗IL-17単クローン抗体を具体化する。

【0027】

本発明は更に、パッケージ材と前記パッケージ材の中に収納される本発明の抗体とを含む製品であって、パッケージ材に、抗体がIL-17活性を特異的に中和するか又はその系に存在する機能性IL-17のレベルを低下させることを示す添付文書が含まれる製品を具体化する。

【0028】

本発明は更に、本発明の抗体又はその軽鎖若しくは重鎖をコードする、単離された核酸分子；前記核酸を含むベクター（1種又は複数種）であって、当該核酸が任意に、そのベクターで形質転換された宿主細胞により認識される制御配列に作動可能に連結されたもの；そのベクターを含む宿主細胞；その核酸が発現されるように宿主細胞を培養し、任意に宿主細胞培養培地から抗体を回収することを含む、本発明の抗体の生産方法を提供する。

30

【0029】

本発明は更に、カニクイザルIL-17（配列番号：253）又はウサギIL-17（配列番号：251）をコードする単離された核酸分子；サル又はウサギの核酸によりコードされるIL-17タンパク質（それぞれ配列番号：10又は9）；前記核酸分子を含むベクター；前記ベクターを含む宿主細胞；及びカニクイザルIL-17又はウサギIL-17を生産する方法を提供する。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0030】

本発明は、キメラ、ヒト化、若しくは完全にヒトの抗IL-17単クローン抗体、又はそれらの抗原結合部分であって、インビトロ及び/又はインビボでIL-17活性の少なくともいずれかを中和できるか、又はこれと拮抗できるものを提供する。好ましくは、かかる本発明の抗体は更に、例えばインビトロIL-8レポーターアッセイ又はGROレポーターアッセイで約600若しくは560 pM未満のIC<sub>50</sub>を有すること（実施例6参照）、及び/又は、好ましくはIL-17と4 pM未満の強い結合親和性を有することの特徴とする。本発明の抗体は更に、それらがヒト及びカニクイザルIL-17（それぞれ配列番号：1及び10）に特異的に結合するが、マウス又はラットIL-17（それぞ

50

れ配列番号：7及び8)には結合しないことを特徴とする。本発明の単クローン抗体に結合する抗原性エピトープは、ヒト(及びサル)IL-17の非線形エピトープであって、IL-17の残基DGNVDYH(配列番号：276)を含む。本発明の抗体は、それを全長のIL-17に照らした場合、ペプチドDGNVDYH(配列番号：276)に接触する。

#### 定義

##### 【0031】

「IL-17」又は「IL-17A」とも称される「インターロイキン17」は、20~30kDのグリコシル化ホモダイマータンパク質である。ヒトIL-17遺伝子は、19アミノ酸のシグナル配列及び136アミノ酸の成熟セグメントを有する155アミノ酸のタンパク質をコードする。ヒトIL-17は、図2に示すように、マウス及びラットのアミノ酸IL-17配列と、それぞれ62.5%及び58%のアミノ酸配列同一性を示す。ヒトIL-17は、カニクイザルIL-17と97.4%のアミノ酸配列同一性を示す。

10

##### 【0032】

天然に存在する状態での全長の抗体は、4つのペプチド鎖、すなわち、ジスルフィド結合により相互接続される2つの重(H)鎖(完全長の場合50~70kDa)及び2つの軽(L)鎖(完全長の場合25kDa)を含んでなる免疫グロブリン分子である。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識を担う約100~110以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能を担う定常領域を規定する。

20

##### 【0033】

軽鎖は、又はに分類され、特定の定常領域によって特徴付けられる。各軽鎖は、N末端軽鎖可変領域(本願明細書では「LCVR」)、及び1つのドメイン(CL)を含んでなる軽鎖定常領域を含んでなる。重鎖は、 $\mu$ 、又はに分類され、抗体のアイソタイプをそれぞれIgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEと定義し、これらのうちのいくつかは、更に、例えばIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>及びIgA<sub>2</sub>のサブクラス(アイソタイプ)に分けられ得る。各重鎖タイプは、特定の定常領域によって特徴付けられる。各重鎖は、N末端重鎖可変領域(本願明細書では「HCVR」)及び重鎖定常領域を含んでなる。重鎖定常領域は、IgG、IgD、及びIgAについては3つのドメイン(CH1、CH2、及びCH3)；そしてIgM及びIgEについては4つのドメイン(CH1、CH2、CH3、及びCH4)を含んでなる。

30

##### 【0034】

HCVR及びLCVR領域は、超可変性の領域に更に再分割でき、これらは相補性決定領域(「CDR」と称され、フレームワーク領域(「FR」と称される、より保存された領域と共に点在している。各HCVR及びLCVRは、3つのCDR及び4つのFRを含んでなり、これらは以下の順序、すなわち、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順にアミノ末端からカルボキシ末端に配列されている。本発明の全長の抗体について、軽鎖は、好ましくは、FR4の下流に、配列番号：277に示す配列を有するポリペプチドを含む。本発明の全長の抗体について、重鎖は、好ましくは、FR4の下流に、配列番号：278に示す配列を有するポリペプチドを含む。本願明細書で、重鎖の3つのCDRは、「CDRH1、CDRH2及びCDRH3」と称され、軽鎖の3つのCDRは、「CDRL1、CDRL2及びCDRL3」と称される。CDRは、抗原と特異的相互作用を形成する残基の大部分を含む。HCVR及びLCVR領域内のCDRアミノ酸残基の番号付け及び位置決めは、周知のカバットの番号付けの規則に従う。

40

##### 【0035】

本発明の抗IL-17単クローン抗体(又は単に「本発明の抗体」)に関連して、本願明細書の「抗体」という用語は、単クローン抗体を指す。本願明細書の「単クローン抗体」は、本願明細書で明記しない限り、齧歯類、好ましくはマウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体又は完全にヒトの抗体を指す。本発明の単クローン抗体は、例えば、当該技術分野

50

でよく知られたハイブリドーマ技術や、組換え技術、ファージディスプレイ技術、合成若しくは組換え技術、又は当該技術分野で周知のこのような技術の組み合わせを使用して生産できる。本願明細書の「単クローン抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術によって生産される抗体に限定されない。「単クローン抗体」とは、単一のコピー又はクローン（例えば、真核生物、原核生物、又はファージのクローンを含む）に由来する抗体を指し、それが生産された方法に帰するものではない。「単クローン抗体」は、無傷の抗体（完全であるか全長のFc領域を含む）、実質的に無傷の抗体、又は抗原結合部分を含む抗体の一部又は断片、例えば、マウス抗体又はキメラ、ヒト化、若しくはヒト抗体のFab断片、Fab'断片又はF(ab')<sub>2</sub>断片であることができる。「Fab」断片は、軽鎖の可変及び定常ドメインと、重鎖の可変及び第1定常ドメイン(CH1)とを含む。「F(ab')<sub>2</sub>」抗体断片は、一对のFab断片を含み、それらは通常、その間のヒンジシステインによってそれらのカルボキシ末端近傍で共有結合されている。抗体断片の他の化学結合も、当該技術分野で知られている。

#### 【0036】

各々の軽鎖-重鎖の対の可変領域は、抗体の抗原結合部位を形成する。このように、無傷のIgG抗体は、2つの結合部位を有する。二機能性又は、二重特異性抗体の場合を除き、抗体の2つの抗原結合部位は同じである。本願明細書の「抗原結合部分」又は「抗原結合領域」又は「抗原結合ドメイン」は、抗原と相互作用し、当該抗原に対するその特異性及び親和性を抗体上に与えるアミノ酸残基を含む抗体分子の部分を互換的に指す。この抗体部分は、抗原結合残基の適切な高次構造を維持するのに必要な「フレームワーク」アミノ酸残基を含む。好ましくは、本発明の抗体の抗原結合領域のCDRは、完全に、又は実質的にマウス起源であり、任意に、特定のアミノ酸残基を改変して（例えば、異なるアミノ酸残基で置換するなど、例えば表2及び3参照）、抗体の特定の性質（例えば、K<sub>D</sub>、k<sub>off</sub>、IC<sub>50</sub>）が最適化される。好ましくは、本発明の抗体のフレームワーク領域は、ヒト起源、又は、実質的にヒト起源（ヒト起源の少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%）である。本発明の抗体の好ましいフレームワーク領域は、以下の配列：配列番号：262（HCVR FR1）、263（HCVR FR2）、264（HCVR FR3）、265（HCVR FR4）、266（LCVR FR1）、267（LCVR FR2）、268（LCVR FR3）、269（LCVR FR4）を有し、カバットの番号付けに従う。他の実施形態で、本発明のIL-17抗体の抗原結合領域は、ウサギ、ラット又はハムスターを含む（これらに限定することはない）他の非ヒト種に由来できる。あるいは、抗原結合領域は、ヒト配列に由来することができる。

#### 【0037】

更に、本願明細書の「単クローン抗体」は、LCVRをコードするDNAとHCVRをコードするDNAとを、リンカー配列を用いて継合することによって生産してよい、単鎖Fv断片であることができる。（Pluckthun、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、113巻、Rosenburg and Moore編、Springer-Verlag、New York、269-315頁、1994参照）。断片が特定されるか否かに関わらず、本願明細書の「抗体」なる用語には、このような断片や、単鎖型が含まれると理解される。タンパク質が、その目的とする標的（すなわち、エピトープ又は抗原）に特異的又は優先的に結合する能力を保持する限り、それは「抗体」の用語に包含される。抗体は、グリコシル化されてもされなくてもよく、いずれにせよ本発明の範囲に含まれる。

#### 【0038】

「単クローン抗体」の集団は、均一又は実質的に均一な抗体集団を指し、すなわち、集団中の少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、より好ましくは少なくとも約97%若しくは98%、又は最も好ましくは少なくとも99%の抗体が、同じ抗原又はエピトープについてELISAアッセイにて競合することになるか、更に好ましくは、抗体がアミノ酸配列で同じである。抗体は、グリコシル化され

10

20

30

40

50

てもされなくてもよく、いずれにせよ本発明の範囲に含まれる。単クローン抗体は、翻訳後修飾（例えばグリコシル化パターン）で異なってもよいが、それらが同一のアミノ酸配列を有するのであれば、均一であるとしてよい。

#### 【0039】

「変異」抗体は、本願明細書で、親抗体配列の1以上のアミノ酸残基の付加、欠失及び/又は置換に基づき、「親」抗体アミノ酸配列とアミノ酸配列が異なる分子を指す。好ましい実施形態で、変異抗体は、親抗体のCDR領域での、少なくとも1つのアミノ酸（例えば、1～約10、好ましくは2、3、4、5、6、7又は8）の付加、欠失及び/又は置換を含む。変異抗体配列に関する同一性又は相同性は、本願明細書では、配列を整列配置し、必要に応じてギャップを導入して最大パーセントの配列同一性とした後に、親抗体残基と同一である変異抗体配列のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。変異抗体は、親抗体に結合する抗原、又は好ましくはエピトープに結合する能力を保持しており、好ましくは親抗体よりも優れた少なくとも1種の性質又は生物活性を有する。例えば、変異抗体は、好ましくは、親抗体が有するよりも強い結合親和性、緩徐な解離速度、低いIC<sub>50</sub>又は抗原の生物活性の阻害能を有する。本願明細書で特に目的とされる変異抗体は、親抗体と比較して、性質又は生物活性に少なくとも約2倍、好ましくは少なくとも約5倍、10倍又は20倍の増強を示すものである。

#### 【0040】

本願明細書の「親」抗体とは、変異抗体の調製のために使用するアミノ酸配列によってコードされるものである。親抗体は、マウス起源のフレームワーク配列を有してもよいが、好ましくは、フレームワーク配列は、完全に、又は実質的にヒト起源である。親抗体は、マウス、キメラ、ヒト化、又はヒト抗体であってもよい。

#### 【0041】

本願明細書の「特異的に結合する」の用語は、特異的結合対の1つのメンバーが、その特異的結合パートナー（1又はそれ以上）以外の分子に有意に結合しない状況を指す。この用語は、例えば、本発明の抗体の抗原結合ドメインが、多くの抗原が担持する特定のエピトープに特異的な場合にも適用でき、この場合、その抗原結合ドメインを担持する特異抗体は、エピトープを担持する様々な抗原に結合できるであろう。従って、本発明の単クローン抗体は、ヒトIL-17（すなわちIL-17A）に特異的に結合するものの、ヒトIL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E、IL-17Fに特異的に結合することはない。更に、本発明の単クローン抗体は、ヒトIL-17及びカニクイザルIL-17に特異的に結合するが、ラットIL-17又はマウスIL-17に特異的に結合することはない。更に、本発明の単クローン抗体は、アミノ酸DGNVDYH（配列番号：276）を含む非線形又は高次構造ヒトIL-17エピトープに特異的に結合するが、アミノ酸DGNVDYH（配列番号：276）を含まないヒトIL-17エピトープには結合しない。

#### 【0042】

本願明細書の「優先的に結合する」の用語は、当該技術分野で利用できる技術、例えば、競合ELISA、又はBIACORE若しくはKINEXAアッセイでのK<sub>D</sub>測定によって測定すると、抗体が異なる抗原に結合するよりも少なくとも約20%上回って、好ましくは少なくとも約50%、2倍、20倍、50倍又は100倍上回って特異抗原に結合する状況を指す。抗体は、同じ抗原の中の異なるエピトープよりも、その抗原の中の1つのエピトープに優先的に結合してもよい。従って、本発明の抗体は、ウサギIL-17よりもヒトIL-17に優先的に結合する。

#### 【0043】

「エピトープ」の用語は、抗体の1以上の抗原結合領域で抗体により認識されて結合できる分子の該当部分を指す。エピトープは、アミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面群化でなることが多く、特異的な三次元構造特性と特異的な電荷特性を有する。「阻害エピトープ」及び/又は「中和エピトープ」により意図されるのは、無傷の抗原性分子に照らし、そのエピトープに特異的な抗体が結合した場合に、結果的にインビボ又は

10

20

30

40

50

インビトロ又はその分子を含む生物内で、当該分子の生物学的活性の喪失又は減少を引き起こすエピトープである。

【0044】

本願明細書の「エピトープ」の用語は更に、動物、好ましくは哺乳動物、例えばマウス又はヒトで抗原性及び／又は免疫原性活性を有するポリペプチドの一部を指す。本願明細書の「抗原性エピトープ」の用語は、当該技術分野でよく知られた方法のいずれかにより、例えば従来のイムノアッセイにより判定して抗体が特異的に結合できるポリペプチドの一部として定義される。抗原性エピトープは、必ずしも免疫原性である必要があるのではないが、免疫原性であってもよい。本願明細書の「免疫原性エピトープ」は、当該技術分野でよく知られた方法のいずれかにより判定して、動物での抗体応答を誘発するポリペプチドの一部として定義される。「非線形エピトープ」又は「高次構造エピトープ」は、エピトープに特異的な抗体が結合する抗原性タンパク質内の非隣接ポリペプチド（又はアミノ酸）を含む。

10

【0045】

「生物学的性質」若しくは「生物学的特性」の語句、又は「活性」若しくは「生物活性」の用語は、本発明の抗体に関連して、本願明細書で互換的に用いられ、限定しないが、エピトープ／抗原親和性及び特異性、インビボ又はインビトロでIL-17の活性を中和又は拮抗する能力、IC<sub>50</sub>、抗体のインビボでの安定性、並びに抗体の免疫原性が挙げられる。他の同定可能な生物学的性質又は当該技術分野で認識される抗体の特性として、例えば、交差反応性（すなわち、標的とするペプチドの非ヒト相同体との、又は普遍的に他のタンパク質若しくは組織との反応性）、及び哺乳動物細胞でタンパク質の発現量を高く保つ能力が挙げられる。前記の性質又は特性は、限定しないが、ELISA、競合ELISA、BIACORE又はKINEXA表面プラスモン共鳴分析、指値なしのインビトロ又はインビボ中和アッセイ、受容体結合、サイトカイン又は成長因子の生産及び／又は分泌、シグナル伝達、並びにヒト、霊長類又は他のいずれかの供給源を含む異なる供給源からの組織切片での免疫組織化学的手法などを含む、当該技術分野で認められた技術を用いて観察、測定、又は評価できる。

20

【0046】

本発明の抗体の活性に関し、本願明細書の「阻害する」又は「中和する」の用語は、例えば、限定しないが生物学的活性（例えば、IL-17活性）又は性質、疾病若しくは症状を含め、阻害すべき進行又は重症度を、実質的に拮抗、禁止、防止、制限、緩徐化、中断、排除、停止、又は逆転させる能力を意味する。IL-17との本発明の抗体の結合に起因する、IL-17活性の阻害又は中和は、好ましくは少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%以上である。

30

【0047】

核酸又はタンパク質（例えば、抗体）に関連して用いる場合の「単離された」の用語は、その天然の供給源にて通常付随してくる少なくとも1種の夾雑物から分離され、同定された核酸分子又はタンパク質を指す。好ましくは、「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体である。例えば、本発明の医薬組成物は、IL-17に特異的に結合し、IL-17以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない、単離された抗体を含む。

40

【0048】

本願明細書で、「カバットの番号付け」及び「カバットのラベリング」の用語は、互換的に用いる。これらの用語は、当該技術分野で認知されており、抗体の重鎖及び軽鎖可変領域の他のアミノ酸残基よりも可変的である（すなわち、超可変的な）アミノ酸残基を番号付けするシステムを指す（Kabatt, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 190: 382-93 (1971); Kabatt, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991

50

))。

#### 【0049】

ポリヌクレオチドは、それが別のポリヌクレオチドと機能的な関係に配置される場合、かかる他のポリヌクレオチドと「作動可能に連結される」。例えば、プロモーター又はエンハンサーは、それが配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作動可能に連結されている。あるペプチドが別のペプチドに「作動可能に連結されている」のは、それらをコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結されている場合、好ましくはそれらが同じ読み取り枠内にある場合である。

#### 【0050】

本明細書で互換的に用いられる「個体」「被検者」、及び「患者」の用語は、限定しないが、マウス、サル、ヒト、哺乳類の家畜、哺乳類のスポーツ動物及び哺乳類のペットを含む哺乳動物を指し、好ましくは、この用語はヒトを指す。特定の実施形態で、被検者、好ましくは哺乳動物、好ましくはヒトは、IL-17の生物活性の低減が有利に働くことになるであろう疾患又は障害又は症状によって更に特徴付けられる。

#### 【0051】

「ベクター」の用語は、核酸分子で、それに連結されている別の核酸を輸送できる核酸分子を包含し、限定しないが、プラスミド及びウィルスベクターを含む。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞にて自己複製でき、また他のベクターは、宿主細胞への導入に伴い宿主細胞のゲノム内に組み込むことができ、これによって宿主ゲノムと共に複製される。更に、特定のベクターは、それらが作動可能に連結された遺伝子の発現を導くことができる。かかるベクターは、本願明細書で、「組換え発現ベクター」(又は単に「発現ベクター」)と称され、典型的なベクターは当該技術分野でよく知られている。

#### 【0052】

本願明細書の、発現「細胞」「宿主細胞」「細胞系」及び「細胞培養」は互換的に用いられ、本発明の単離されたポリヌクレオチドのいずれか、又は本発明のHCVR、LCVR若しくは単クローン抗体をコードする配列を含む組換えベクター(1種又は複数種)のいずれかのレシピエントである個体細胞又は細胞培養を包含する。宿主細胞は、単一の宿主細胞の子孫を含み、その子孫は、自然の、偶発的な、又は計画的な変異及び/又は変化が原因となって、必ずしも元の親細胞と完全に同一(形態的に、又は全体のDNA補体として)でないことがあってもよい。宿主細胞は、本発明の単クローン抗体、又はその軽鎖若しくは重鎖を発現する組換えベクター又はポリヌクレオチドで形質転換、形質導入、又は感染された細胞を含む。本発明の組換えベクターを含む宿主細胞は、宿主染色体に安定に取り込まれているか否かに関わらず、「組換え宿主細胞」と称してもよい。本発明で用いるのに好ましい宿主細胞は、CHO細胞(例えば、ATCC CRL-9096)NS0細胞、SP2/0細胞、COS細胞(ATCC、例えば、CRL-1650、CRL-1651)及びHeLa(ATCC CCL-2)である。本発明で用いられる更なる宿主細胞には、植物細胞、酵母細胞、他の哺乳動物細胞及び原核細胞が含まれる。

#### 抗体の特徴付け

#### 【0053】

本発明は、ヒトIL-17(すなわちIL-17A)に高親和性で特異的に結合する、単離された単クローン抗体に関する。本発明の抗体は、好ましくは、キメラ、ヒト化、若しくはヒト抗体、又はそれらの抗原結合部分である。更に、本発明の抗体は、インビボ及び/又はインビトロでIL-17活性の少なくともいづれかを中和、又は拮抗する。本発明の抗IL-17単クローン抗体(その抗原結合部分を含む)の、IL-17への特異的結合により、前記抗体を、IL-17関連疾患及び障害、すなわち、IL-17の生物学的活性の阻害が有利に働く症状、疾患又は障害に対する治療薬として使用できる。

#### 【0054】

本発明の抗体が結合する抗原性IL-17エピトープは、アミノ酸ADGNVDYHMN(配列番号: 275)、より好ましくはヒトIL-17のアミノ酸DGNVDYH(配列番号: 276)を含む非線形エピトープである。前記エピトープに結合する抗体は、

マウスIL-17又はラットIL-17へのそれらの結合と比較して特異的且つ優先的に、ヒトIL-17及びカニクイザルIL-17に結合する。本発明の単クローン抗体は、マウスIL-17又はラットIL-17との結合よりもヒトIL-17に、少なくとも5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は100倍強く結合し（例えば、親和性が高い、又は特異性が強い）、より好ましくはマウスIL-17又はラットIL-17との結合よりも少なくとも150、200、250、300、350、400、450、500、550又は600倍強く、更に一層好ましくは、例えばELISAアッセイ、競合ELISAアッセイ、又はBIACORE若しくはKINEXAアッセイでの $K_D$ 値で判定して、マウスIL-17又はラットIL-17にバックグラウンドを上回るレベルで結合することがない。

10

#### 【0055】

好ましい実施形態で、本発明は、ヒトIL-17に対して強い結合親和性を保持する抗IL-17単クローン抗体、すなわち、ヒトIL-17に対し約7 pM、6.5 pM又は6 pM未満、好ましくは約5.5 pM、5 pM又は4.5 pM未満、最も好ましくは約4 pM未満の結合親和性（ $K_D$ ）で、ヒトIL-17、又はDGNVDYH（配列番号：276）を含むその一部分に結合する〔すなわち、抗体がDGNVDYH（配列番号：276）ポリペプチドに接触する〕抗IL-17単クローン抗体を提供する。あるいは、本発明の抗体は、ヒトIL-17に対して約7 pM、6.5 pM又は6 pM以下、好ましくは約5.5 pM、5 pM又は4.5 pM以下、最も好ましくは約4 pM以下の $K_D$ により特徴付けられる。抗体親和性は、本願明細書で後述する実施例に記載された、又は当該技術分野で利用可能な他の方法のとおり判定してもよい。好ましくは、前記のように強い結合親和性を保有する本発明の抗IL-17抗体は、アミノ酸ADGNVDYH MN（配列番号：275）、より好ましくはアミノ酸DGNVDYH（配列番号：276）を含む非線形ヒトIL-17エピトープにも結合し、この際、その抗体はポリペプチドDGNVDYH（配列番号：276）に接触する。

20

#### 【0056】

一実施形態で、本発明の抗体は、ヒトIL-17に対し $5 \times 10^{-5}$ 、 $4 \times 10^{-5}$ 、 $3 \times 10^{-5}$ 又は $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 未満の解離速度（ $k_{off}$ ）を有する。好ましい実施形態で、前記のようにヒトIL-17に対して強い結合親和性を保有することを特徴とする（約7 pM又は6 pM未満、好ましくは約5 pM又は4.5 pM未満、最も好ましくは約4 pM未満の $K_D$ ）本発明の抗体は、ヒトIL-17に対し $5 \times 10^{-5}$ 、 $4 \times 10^{-5}$ 、 $3 \times 10^{-5}$ 又は $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 未満の解離速度（ $k_{off}$ ）も有し、そして更に一層好ましくはアミノ酸ADGNVDYH MN（配列番号：275）、より好ましくはヒトIL-17のアミノ酸DGNVDYH（配列番号：276）を含む非線形ヒトIL-17エピトープにも結合する。

30

#### 【0057】

別の実施形態で、本発明の抗体は、例えば、インビトロIL-8レポーターアッセイにて、1 nM、900 pM、800 pM、700 pM、650 pM、600 pM、560 pM、550 pM若しくは500 pM未満の、又はGROレポーターアッセイにて約560 pM未満の $IC_{50}$ を有する（実施例6参照）。好ましい実施形態で、本発明の抗体は、前記のようにヒトIL-17に対して強い結合親和性を保有することを特徴とし（約7 pM又は6 pM未満、好ましくは約5 pM又は4.5 pM未満、最も好ましくは約4 pM未満の $K_D$ ）、例えば、インビトロIL-8レポーターアッセイにて、1 nM、900 pM、800 pM、700 pM、650 pM、600 pM、560 pM、550 pM若しくは500 pM未満の、又はGROレポーターアッセイにて約560 pM未満の $IC_{50}$ も有し、より一層好ましくは、ヒトIL-17に対し $5 \times 10^{-5}$ 、 $4 \times 10^{-5}$ 、 $3 \times 10^{-5}$ 又は $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 未満の解離速度（ $k_{off}$ ）も有し、そして更に一層好ましくは、ヒトIL-17のアミノ酸DGNVDYH（配列番号：276）を含む非線形ヒトIL-17エピトープにも結合し、この際、その抗体はDGNVDYH（配列番号：276）ポリペプチドに接触する。

40

50

## 【0058】

最も好ましい本発明の実施形態は、配列番号：279からなる軽鎖アミノ酸配列、及び配列番号：280からなる重鎖アミノ酸配列を含む抗IL-17抗体である。好ましくは、この抗体は、2つの同一の軽鎖及び2つの同一の重鎖を含む。好ましくは、配列番号：279に示すアミノ酸配列を有する軽鎖は、配列番号：281（シグナル配列を含む）又は配列番号：283（シグナル配列を含まない）に示す配列を含む核酸によってコードされる。好ましくは、配列番号：280に示すアミノ酸配列を有する重鎖は、配列番号：282（シグナル配列を含む）又は配列番号：284（シグナル配列を含まない）に示す配列を含む核酸によってコードされる。

## 【0059】

単クローン抗体（「mAb」）は、当該技術分野において広く知られているハイブリドーマ法（例えば、Kohler et al., Nature, 256:495, 1975参照）を使用して作製してもよいし、又は組換えDNA法（例えば、米国特許第4816567号におけるもの）によって作製してもよい。通常、ハイブリドーマは、好適な不死細胞系（例えば、SP2/0などの骨髓腫細胞系）を、免疫化した動物の抗体産生細胞と融合することにより生産できる。抗体生産細胞、好ましくは脾臓又はリンパ節のものは、目的とする抗原で免疫化した動物から得られる。融合細胞（ハイブリドーマ）は、選択培養条件を用いて単離し、限界希釈によってクローニングできる。ハイブリドーマ細胞の生育培地を、抗原に対して指向した単クローン抗体の生産についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生産されるmAbの結合特異性は、免疫沈降によつて、又はラジオイムノアッセイ若しくはELISAなどのインビトロ結合アッセイによって判定する。所望の結合性を有する抗体を生産する細胞は、好適なアッセイによって選択できる。このような単離及びスクリーニングのための方法は、当該技術分野で知られている。

## 【0060】

ヒト抗体又は人工抗体を含む本発明の抗体を生産又は単離する好適な他の方法を使用でき、かかる方法として、例えば、ライブラリーから組換え抗体（例えば、単鎖Fv又はFab）を選択する方法、又はヒト抗体のレパートリーを生産できる遺伝子導入動物（例えば、マウス）の免疫化による方法（例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551-2555, 1993; Jakobovits et al., Nature, 362:255-258, 1993; 米国特許第5545806号及び5545807号参照）が挙げられる。

## 【0061】

単鎖抗体、及びキメラ、ヒト化、又は霊長類化した（CDR移植した）抗体や、キメラ又はCDR移植単鎖抗体等で、異なる種に由来する部分を含むものもまた、本発明、そして「抗体」の用語に包含される。これらの抗体の様々な部分は、従来の技術によって化学的に、合成により共に継合でき、又は遺伝子工学技術を使用して、隣接タンパク質として調製できる。例えば、キメラ、又はヒト化した鎖をコードする核酸を発現して、隣接タンパク質を生産できる。例えば、米国特許第4816567号；欧州特許第125023 B1号；米国特許第4816397号；欧州特許第120694 B1号；WO 86/01533号；欧州特許第194276 B1号；米国特許第5225539号；欧州特許第239400 B1号及び米国特許第5585089号及び第5698762号を参照のこと。

## 【0062】

加えて、キメラ、ヒト化、霊長類化、又は単鎖抗体の断片を含む、抗体の機能性断片（すなわち、抗原結合断片）も生産でき、本発明の範囲に含まれる。好ましい機能性断片は、対応する全長抗体の抗原結合性機能を保持している。特に好ましい機能性断片は、哺乳動物の成熟IL-17、好ましくはヒトIL-17に特有の1以上の機能又は生物活性（結合活性、シグナル伝達活性及び/又は細胞応答の刺激若しくは阻害など）を阻害する能力を保持している。例えば、一実施形態で、機能性断片は、成熟IL-17とその受容体

10

20

30

40

50

との相互作用を阻害でき、且つ／又は受容体が媒介する１以上の機能を阻害できる。

#### 【００６３】

ヒトIL-17に結合できる抗体部分には、限定しないが、Fv、Fab、Fab'及びF(ab')<sub>2</sub>断片が含まれ、本発明に包含される。このような断片は、酵素切断によって、又は組換え技術によって生産できる。例えば、無傷の抗体のパパイン又はペプシン切断で、Fab又はF(ab')<sub>2</sub>断片を、それぞれ作製できる。抗体のパパイン消化で、「Fab」断片と称される２つの同一の抗原結合断片が生産され、各々が抗原結合部位を備えている。Fab断片は、軽鎖の定常ドメイン、及び重鎖の第１定常ドメイン(CH1)を含む。ペプシン処理で、２つの抗原結合部位を有し、やはり抗原を架橋できるF(ab)<sub>2</sub>断片が生じる。

10

#### 【００６４】

Fvは、完全な抗原認識、及び結合部位を含む、最小の抗体断片である。この領域は、密接に非共有的に会合している、１つの重鎖可変ドメインと１つの軽鎖可変ドメインとのダイマーからなる。この配置において、各可変ドメインの３つのCDRが相互作用して、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>ダイマーの表面上の抗原結合部位を規定する。６つのCDRがまとまって、抗体に抗原結合特異性を与える。宿主細胞にて共発現された場合に、Fv内の非共有結合したHCVR及びLCVRドメインが解離する傾向を解消するために、柔軟で適切な長さのポリペプチドで、HCVRのC-末端をLCVRのN-末端に、又はLCVRのC-末端をHCVRのN-末端に、のいずれかにて連結させた単鎖Fv断片(scFv)を構築できる。一般的に用いられるリンカーは、１５残基の(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>ペプチドである。sFvの総説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、１１３巻、Rosenburg and Moore編、Springer-Verlag, New YorkのPluckthun、２６９-３１５頁(１９９４)を参照されたい。抗体は、１以上の終止コドンが天然の終止部位の上流に導入されている抗体遺伝子を用いて、種々の切欠型に生産することもできる。例えば、F(ab')<sub>2</sub>重鎖部分をコードするキメラ遺伝子は、重鎖のCH<sub>1</sub>ドメイン及びヒンジ領域をコードするDNA配列を含むように設計できる。

20

#### 【００６５】

ファージディスプレイ(Matthews DJ and Wells JA, Science, 260:1113-7, 1993), リボソームディスプレイ(Hanes, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:14130-5, 1998), バクテリアディスプレイ(Samuelson P., et al., Journal of Biotechnology, 96:129-54, 2002)、又は酵母ディスプレイ(Kieck M.C., et al., Protein Engineering, 10:1303-10, 1997)などの濃縮技術を用いた、ライブラリーからの抗体断片の選択が、古典的なハイブリドーマ技術に代わる成功例であることが立証されている(総説: Little M. et al., Immunology Today, 21:364-70, 2000)。

30

#### 変異抗体

#### 【００６６】

IL-17に対して産生させたマウス単クローン抗体又はヒト抗体(例えば、遺伝子導入マウスにて生産)が、親抗体であってもよい。親抗体は、例えばPCR突然変異誘発などの当該技術分野で利用可能な方法を使用して、抗体のキメラ、ヒト化型、又はその抗体の他の変異型を作出すべく更に改変してもよい。このようなキメラ、ヒト化、又は他の変異抗体は、更なる変異又は突然変異誘発のための親抗体として利用してもよい。本発明の親抗体は、目的の性質(例えば、結合親和性(K<sub>D</sub>低下)、IC<sub>50</sub>、特異性、優先的結合など)の存在についてスクリーニングし得る変異抗体を作出すべく、例えばCDRドメイン(１又は複数、表２及び３参照)内で突然変異を誘発させてもよい。好ましくは、変異抗体での目的の性質には、親抗体でのその性質を凌ぐ改良がなされる。アミノ酸置換の変異抗体が好ましく、親抗体分子の少なくとも、１、２、３、４、５、６、７、８、９又

40

50

は10のアミノ酸残基が除去されて、異なる残基がその位置に挿入される。置換による突然変異誘発に対して最も目的とされる部位は、1以上のCDR領域であるが、FRの改変も企図される。保存的アミノ酸置換が好ましいが、より実質的な変化をもたらす、非保存的なアミノ酸の変更を導入してもよく、その結果生じる抗体を、目的の性質についてスクリーニングしてもよい。

#### 【0067】

親抗体の置換変異体を作製するために好都合な方法は、ファージディスプレイを使用する親和性成熟である。簡単に説明すると、親抗体をコードするポリヌクレオチド分子を1以上のCDR領域内で変異させ、置換が所望される各アミノ酸残基で、可能なアミノ酸置換をすべて生じさせる。こうして作製される抗体変異体は、各粒子内にパッケージングされたM13の遺伝子III産物との融合体として糸状ファージ粒子から一価でディスプレイされる。ファージディスプレイされた変異抗体は次いで、それらの生物学的活性（例えば、結合親和性、特異性、IC<sub>50</sub>）についてスクリーニングされる。修飾に対する候補のCDR領域部位を同定するために、アラニン走査変異誘発を実施して、有意に抗原結合に關与するCDR領域残基を同定できる。

#### 【0068】

あるいは、又は更に、抗原抗体複合体の結晶構造を分析して抗体とIL-17との接触点を同定するのが有益な場合がある。このような接触残基及び隣接残基は、本願明細書に詳説した、又は当該技術分野で知られた技術による置換に対する候補である。あるいは、又は更に、少なくとも1つのCDRをコードする1つ以上のポリヌクレオチド分子に、ランダムな突然変異誘発又は点突然変異誘発を施してもよい。突然変異誘発は、可変領域内のフレームワーク領域にCDRを作動可能に連結させた状態、又はCDRが他の可変領域配列と独立した状態のいずれかで、1以上の位置にて実施し、その後、改変したCDRを、組換えDNA技術を用いて可変領域に戻してもよい。このような変異抗体が作製されれば、変異体のパネルを目的の性質又は活性についてのスクリーニングに付し、1以上の関連アッセイで優れた性質を示す抗体を、更なる開発のために選択してもよい。

#### 【0069】

本発明の抗IL-17抗体の適切な高次構造の維持に関係しないシステイン残基のいずれも、（通常セリンで）置換し、分子の酸化安定性を改良して異常な架橋を防止してもよい。逆に、システイン結合（1又は複数）を抗体に付加して、その安定性を改良してもよい（特に、抗体がFv断片などの抗体断片である場合）。

#### 【0070】

抗体の別のタイプのアミノ酸変異では、抗体の本来のグリコシル化パターンを改変する。改変によって意味するのは、抗体に認められる1以上の炭化水素部分の削除、及び/又は親抗体に存在しない1以上のグリコシル化部位の付加である。抗体のグリコシル化は、概してN結合型又はO結合型のいずれかである。N結合型とは、アスパラギン残基の側鎖への、炭化水素部分の付着を指す。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリン、及びアスパラギン-X-スレオニン（Xはプロリン以外のいずれかのアミノ酸である）は、アスパラギン側鎖に対する炭化水素部分の酵素的付着のための認識配列である。よって、ポリペプチドでのこれらトリペプチド配列のいずれか存在により、潜在的グリコシル化部位が作出される。O結合型のグリコシル化は、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの糖のうちの1つの、ヒドロキシアミノ酸への、最も一般的にはセリン又はスレオニンへの付着を指すが、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンを使用してもよい。

#### 【0071】

抗体へのグリコシル化部位の付加は、それが前記トリペプチド配列（N結合型グリコシル化部位用）の1以上を含むようにアミノ酸配列を改変することによって好都合に成し遂げられる。改変は、本来の抗体の配列に対する1以上のセリン又はスレオニン残基（O結合型グリコシル化部位用）の付加、又はそれによる置換によってなされてもよい。

#### 配列

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 2 】

本発明の好ましい単クローン抗体は、配列番号： 1 7 8 ~ 2 4 3 からなる群より選択される配列を有するペプチドを含む L C V R、及び / 又は配列番号： 5 6 ~ 1 2 1 からなる群より選択される配列を有するペプチドを含む H C V R を含む。好ましい実施形態で、本発明の抗体は、配列番号： 1 7 8 ~ 2 4 3 からなる群より選択される配列を有するペプチドを含む L C V R を含み、更に、配列番号： 5 6 ~ 1 2 1 からなる群より選択される配列を有するペプチドを含む H C V R を含むものであって、本発明の抗体に存在する H C V R 及び L C V R は共に、表 1 列挙する F a b 内に存在する。例えば、配列番号： 1 7 8 のアミノ酸配列を有する L C V R ポリペプチドを含む本発明の抗体は、好ましくは配列番号： 5 6、6 0、6 8 ~ 9 3 及び 9 5 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む H C V R ポリペプチドを更に含む。

10

## 【 0 0 7 3 】

更に、配列番号： 2 4 1 のアミノ酸配列を有する L C V R ポリペプチドを含む本発明の抗体は、好ましくは配列番号： 1 1 8 及び 1 0 6 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む H C V R ポリペプチドを更に含む。当業者は、本発明の抗体が、本願明細書で表 1 に列挙した H C V R 及び L C V R の特定の配列に限定されず、本発明の抗 I L - 1 7 抗体に存在する場合に、抗原結合能、並びに親抗体の少なくとも 1 つの他の機能的性質（例えばエпитープ特異性、I L - 1 7 への結合についての親抗体との競合能、ヒト I L - 1 7 への結合に対する I C<sub>50</sub> 及び / 又は K<sub>D</sub> 若しくは k<sub>off</sub> 値）が保持又は改善される、これらの配列の変異体も含むことを認めるであろう。更に、本発明の単クローン抗体は、競合単クローン抗体によってヒト I L - 1 7（又は D G N V D Y H（配列番号： 2 7 6）を含むその一部分）への結合を競合的に阻害されるものであり、当該競合単クローン抗体は、配列番号： 2 4 1（L C V R）及び 1 1 8（H C V R）に示すアミノ酸配列を有する 2 つの ポリペプチドを含む。抗体間のこのような競合的阻害は、当該技術分野のアッセイ、例えば競合 E L I S A アッセイによって測定してもよい。

20

## 【 0 0 7 4 】

好ましくは、前記定義の競合抗体と競合する本発明の抗体は、ヒト I L - 1 7 に特異的に結合するが、ヒト I L - 1 7 B、I L - 1 7 C、I L - 1 7 D、I L - 1 7 E 又は I L - 1 7 F に結合しないことによって更に特徴付けられる。加えて、この抗体は、ヒト I L - 1 7 及びカニクイザル I L - 1 7 に特異的に結合するが、バックグラウンドを上回るレベルでラット I L - 1 7 又はマウス I L - 1 7 に結合しないことによって更に特徴付けられる。より好ましくは、配列番号： 2 4 1 及び 1 1 8 に示すアミノ酸配列を含む競合抗体と、ヒト I L - 1 7 への結合について競合する本発明の抗体は、アミノ酸 D G N V D Y H（配列番号： 2 7 6）を含むヒト I L - 1 7 非線形エпитープへの結合によって更に特徴付けられる。更に一層好ましくは、配列番号： 2 4 1 及び 1 1 8 に示すアミノ酸配列を含む競合抗体と、ヒト I L - 1 7 への結合について競合する本発明の抗体は、約 7 p M、6 . 5 p M 若しくは 6 p M 未満、好ましくは約 5 . 5 p M、5 p M 若しくは 4 . 5 p M 未満、最も好ましくは約 4 p M 未満の、ヒト I L - 1 7 に対する K<sub>D</sub> を有することによって更に特徴付けられ、且つ / 又は、好ましくはインビトロ I L - 8 レポーターアッセイで、7 0 0 p M、6 5 0 p M、6 0 0 p M、5 6 0 p M、5 5 0 p M 若しくは 5 0 0 p M 未満の I C<sub>50</sub> によって、又はインビトロ G R O レポーターアッセイで約 5 6 0 p M 未満の I C<sub>50</sub> によって特徴付けられ、且つ / 又はヒト I L - 1 7 に対して  $5 \times 10^{-5}$ 、 $4 \times 10^{-5}$ 、 $3 \times 10^{-5}$  又は  $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  未満の解離速度（k<sub>off</sub>）を有する。

30

40

## 【 0 0 7 5 】

一実施形態で、本発明の抗 I L - 1 7 抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を有し、重鎖可変領域は、以下のアミノ酸配列：C D R H 1（配列番号： 2 4 4）、C D R H 2（配列番号： 2 4 5）、及び C D R H 3（配列番号： 2 4 6）を有する C D R 領域を含み、且つ / 又は、軽鎖可変領域は、以下のアミノ酸配列：C D R L 1（配列番号： 2 4 7）、C D R L 2（配列番号： 2 4 8）、及び C D R L 3（配列番号： 2 4 9）を有する C D R 領域を含む。好ましくは、本発明の抗体の 6 つの C D R は、本願明細書の表 1 に列挙され

50

る F a b におけるように、共に存在する。更に一層好ましくは、重鎖 C D R は、以下のフレームワーク配列：配列番号：262のFR1、配列番号：263のFR2、配列番号：264のFR3及び配列番号：265のFR4と関連しており、軽鎖 C D R は、以下のフレームワーク配列：配列番号：266のFR1、配列番号：267のFR2、配列番号：268のFR3及び配列番号：269のFR4と関連しており、ここでアミノ末端からの順序は、FR1 - C D R 1 - FR2 - C D R 2 - FR3 - C D R 3 - FR4である。

【0076】

本発明の抗 I L - 17 抗体は、配列番号：11～28からなる群より選択される配列を含む C D R H 1、並びに／又は配列番号：29～32からなる群より選択される配列を含む C D R H 2、並びに／又は配列番号：33～55及び261からなる群より選択される配列を含む C D R H 3を含んでいる H C V Rを含むことが、更に企図される。別の実施形態で、本発明の抗 I L - 17 抗体は、配列番号：122～149からなる群より選択される配列を含む C D R L 1、及び／又は配列番号：150～167からなる群より選択される配列を含む C D R L 2、及び／又は配列番号：168～177からなる群より選択される配列を含む C D R L 3を含んでいる L C V Rを含む。好ましい実施形態で、本発明の抗 I L - 17 抗体は、配列番号：11～28からなる群より選択される配列を含む C D R H 1、並びに／又は配列番号：29～32からなる群より選択される配列を含む C D R H 2、並びに／又は配列番号：33～55及び261からなる群より選択される配列を含む C D R H 3を含んでいる H C V Rを含み、更に、配列番号：122～149からなる群より選択される配列を含む C D R L 1、及び／又は配列番号：150～167からなる群より選択される配列を含む C D R L 2、及び／又は配列番号：168～177からなる群より選択される配列を含む C D R L 3を含んでいる L C V Rを含む。

【0077】

本発明の C D R を含む組成物は通常、抗体重鎖若しくは軽鎖配列、又はその実質部分となり、ここで C D R は、カバット番号付けに合わせた位置に配置される。重鎖と軽鎖の各鎖に対する3つの C D R 領域は、以下の式：FR1 - C D R 1 - FR2 - C D R 2 - FR3 - C D R 3 - FR4によって表される隣接配列として、フレームワーク領域内に設けられる。前記順序の C D R を有する隣接配列として配置される場合、重鎖又は軽鎖FR1、FR2、FR3及びFR4は、併合して抗体の完全なフレームワーク領域を形成する。好ましくは、本発明の抗体のフレームワーク領域は、ヒト起源、又は実質的にヒト起源（すなわち、約80、82、85、87、90、92、95、97%を上回る）である。

【0078】

ヒトでの治療用途のためのヒト化抗体において、フレームワーク配列は、好ましくは、全体的に、又は実質的にヒト起源である。好ましくは、本発明のヒト化、ヒト、又はキメラ抗体の軽鎖フレームワーク領域は、配列番号：266のFR1、配列番号：267のFR2、配列番号：268のFR3及び配列番号：269のFR4を含む。好ましくは、本発明のヒト化、ヒト、又はキメラ抗体の重鎖フレームワーク領域は、配列番号：262のFR1、配列番号：263のFR2、配列番号：264のFR3及び配列番号：265のFR4を含む。例えば、本発明の抗体126のL C V Rの好ましい実施形態は、本願明細書の表1、2及び3に示すとおり、N末端から順に、配列番号：266のFR1、配列番号：131のC D R 1、配列番号：267のFR2、配列番号：167のC D R 2、配列番号：268のFR3、配列番号：168のC D R 3、及び配列番号：269のFR4のポリペプチドを含む。全体のL C V R配列で、ヒト 定常領域に作動可能に連結されたものは、配列番号：274に示すとおりである。更に、本発明の抗体126のH C V Rの好ましい実施形態は、N末端から順に、配列番号：262のFR1、配列番号：26のC D R 1、配列番号：262のFR2、配列番号：30のC D R 2、配列番号：264のFR3、配列番号：52のC D R 3、及び配列番号：265のFR4を含む。全体のH C V R配列で、ヒト I g G<sub>4</sub> F c 領域に作動可能に連結されたものは、配列番号：273に示すとおりである。

【0079】

一実施形態で、本発明の抗 IL - 17 抗体において、全て又は一部の可変領域が本願明細書の配列番号で示す特定の配列により限定されているもの（表 1 ~ 3 参照）は、インビボ又はインビトロでヒト IL - 17 活性の少なくともいずれかを拮抗又は中和する、キメラ、ヒト化若しくは完全にヒトの抗体、又はその抗原結合部分であることにより、更に特徴付けられる。本発明の抗 IL - 17 抗体で、全て又は一部の可変領域が本願明細書の配列番号で示す特定の配列により限定されているものは、ヒト IL - 17 に特異的に結合するが、ヒト IL - 17 B、IL - 17 C、IL - 17 D、IL - 17 E 又は IL - 17 F に結合しないことによって更に特徴付けられる。加えて、本発明の抗体は、ヒト IL - 17 及びカニクイザル IL - 17 に特異的に結合するが、バックグラウンドを上回るレベルでラット IL - 17 又はマウス IL - 17 に結合しないことによって更に特徴付けられる。より好ましくは、このような抗体は、アミノ酸 D G N V D Y H（配列番号：276）を含むヒト IL - 17 非線形エピトープへの結合によって更に特徴付けられ、この際、その抗体は配列番号：276 のポリペプチドに接触する。更に一層好ましくは、かかる抗体は、約 7 pM、6.5 pM 若しくは 6 pM 未満、好ましくは約 5.5 pM、5 pM 若しくは 4.5 pM 未満、最も好ましくは約 4 pM 未満の、ヒト IL - 17 に対する  $K_D$  を有することによって更に特徴付けられ、且つ / 又は、好ましくはインビトロ IL - 8 レポーターアッセイで、700 pM、650 pM、600 pM、560 pM、550 pM 若しくは 500 pM 未満の  $IC_{50}$ 、又はインビトロ G R O レポーターアッセイで約 560 pM 未満の  $IC_{50}$  によって特徴付けられ、且つ / 又はヒト IL - 17 に対して  $5 \times 10^{-5}$ 、 $4 \times 10^{-5}$ 、 $3 \times 10^{-5}$  又は  $2 \times 10^{-5} s^{-1}$  未満の解離速度 ( $k_{off}$ ) を有する。

#### 抗体発現

##### 【0080】

本発明は、本発明の抗 IL - 17 単クローン抗体又はその一部分を発現する細胞系にも関する。本発明の単クローン抗体を生産する細胞系の作出及び単離は、当該技術分野で知られた標準的な技術を使用して成し遂げることができる。好ましい細胞系として、COS、CHO、SP2/0、NS0、及び酵母（ATCC、American Type Culture Collection, Manassas, VA などの公的な貯蔵所から入手可能）が挙げられる。

##### 【0081】

原核及び真核発現系（酵母、バキュロウイルス、植物、哺乳動物及び他の動物細胞、遺伝子導入動物並びにハイブリドーマ細胞など）や、ファージディスプレイ発現系を含め、多種多様な宿主発現系を使用して、本発明の抗体を発現させることができる。好適な細菌発現ベクターの一例は pUC119 であり、好適な真核発現ベクターは、減弱化した dhfr 選択系を有する改良 p cDNA 3.1 ベクターである。他の抗体発現系が、当該技術分野で知られており、これらも本願明細書で企図される。

##### 【0082】

本発明の抗体は、免疫グロブリン軽鎖及び重鎖遺伝子の宿主細胞での組換え発現によって調製できる。組換えにより抗体を発現させるには、軽鎖及び / 又は重鎖が宿主細胞にて発現されるように、抗体の免疫グロブリン軽鎖及び / 又は重鎖をコードする DNA 断片を担持する 1 以上の組換え発現ベクターで宿主細胞の形質転換、形質導入、感染等を行う。重鎖及び軽鎖は、1 つのベクターにてそれらに作動可能に連結した異なるプロモーターから独立して発現させてもよく、あるいは、重鎖及び軽鎖は、2 つのベクター（1 つは重鎖を発現し、1 つは軽鎖を発現する）にてそれらに作動可能に連結した異なるプロモーターから独立して発現させてもよい。任意に、重鎖及び軽鎖は、異なる宿主細胞にて発現されてもよい。好ましくは、組換え抗体は宿主細胞が培養される培地に分泌され、その培地から、抗体を回収又は精製できる。標準的な組換え DNA 方論を用いて抗体重鎖及び軽鎖遺伝子を得、これらの遺伝子を組換え発現ベクターに組み込み、そのベクターを宿主細胞に導入する。このような標準的な組換え DNA 技術は、例えば、Sambrook, Fritsch, and Maniatis (編)、Molecular Cloning; A

Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Ausubel, et al (編) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, 1989に記載されている。

【0083】

HCV R領域をコードする単離されたDNAは、重鎖定常領域(CH1、CH2及びCH3)をコードする別のDNA分子に、HCV RをコードするDNAを作動可能に連結することによって、全長の重鎖遺伝子に変換できる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当該技術分野で知られている。例えば、Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)を参照のこと。例えば、標準的なPCR増幅によって、これらの領域を包含するDNA断片を得ることができる。重鎖定常領域は、いずれの型(例えば、IgG、IgA、IgE、IgM若しくはIgD)、クラス(例えばIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>及びIgG<sub>4</sub>)、又はサブクラス定常領域及びそのいずれのアロタイプ変異体であることもできる(カバット(前出)に記載)。あるいは、抗原結合部分は、Fab断片、Fab'断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fd又は単鎖Fv断片(scFv)であることができる。Fab断片重鎖遺伝子の場合、HCV RをコードするDNAを、重鎖CH1定常領域のみをコードする別のDNA分子に作動可能に連結してもよい。

【0084】

LCVR領域をコードする単離されたDNAは、軽鎖定常領域(CL)をコードする別のDNA分子に、LCVRをコードするDNAを作動可能に連結することによって、全長の軽鎖遺伝子に(Fab軽鎖遺伝子にでも)変換してもよい。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、当該技術分野で知られている。例えば、カバット(前出)を参照のこと。標準的なPCR増幅によって、これらの領域を包含するDNA断片を得ることができる。軽鎖恒常部は、又は定常領域であることができる。

【0085】

scFv遺伝子を作成するために、HCV RをコードするDNA断片、及びLCVRをコードするDNA断片は、LCVR領域とHCV R領域とを可撓性リンカーで継合してHCV R及びLCVR配列を隣接単鎖タンパク質として発現できるように、可撓性リンカー(例えば、アミノ酸配列(Gly<sub>4</sub>-セリン)<sub>3</sub>)をコードする別の断片に作動可能に連結させる。例えば、Bird, et al., Science 242: 423-6, 1988; Huston, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83, 1988; McCafferty, et al., Nature 348: 552-4, 1990を参照のこと。

【0086】

一実施形態で、本発明は、ベクター(限定しないが好ましくは、プラスミド、組換え発現ベクター、酵母発現ベクター、又はレトロウイルス発現ベクター)で、本発明の抗IL-17単クローン抗体をコードするポリヌクレオチドを含むものを提供する。あるいは、本発明のベクターは、本発明のLCVRをコードするポリヌクレオチド、及び/又はHCV Rをコードするポリヌクレオチドを含む。LCVR及びHCV Rの双方をコードする配列が同じベクターに存在する場合、それらは独立して、各々が作動可能に連結している別々のプロモーターから転写されてもよい。LCVR及びHCV Rをコードする配列が同じベクターに存在し、それらは両者が作動可能に連結している1つのプロモーターから転写されるのであれば、LCVRがHCV Rに対して5'にあっても、又はLCVRがHCV Rに対して3'にあってもよく、更に、ベクターのLCVR及びHCV Rコード領域は、いかなるサイズ又は内容のリンカー配列によって分離されてもよく、好ましくは、存在する場合このようなリンカーは、配列内リボソーム進入部位をコードするポリヌクレオチドである。

## 【 0 0 8 7 】

本発明の抗体を発現させるために、前記のようにして得た部分的又は全長の軽鎖及び／又は重鎖をコードするDNAは、遺伝子が転写及び翻訳制御配列に作動可能に連結されるように、発現ベクターに挿入される。発現ベクター及び発現制御配列は、使用する発現宿主細胞と適合するように選択される。抗体軽鎖遺伝子及び抗体重鎖遺伝子は、別々のベクターに挿入でき、又は、より一般的には、両遺伝子を同じ発現ベクターに挿入する。抗体遺伝子は、標準的な方法によって発現ベクターに挿入する。加えて、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗IL-17単クローン抗体軽鎖及び／又は重鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードできる。抗IL-17単クローン抗体軽鎖及び／又は重鎖遺伝子は、シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端に、作動可能に枠内に連結されるように、ベクター内にクローニングできる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンのシグナルペプチド、又は異種シグナルペプチドであることができる。

10

## 【 0 0 8 8 】

抗体重鎖及び／又は軽鎖遺伝子に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞での抗体鎖遺伝子（単数種又は複数種）の発現を制御する調節配列を担持する。「調節配列」の用語には、抗体鎖遺伝子（単数種又は複数種）の転写又は翻訳を制御する、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現制御エレメント（例えばポリアデニル化シグナル）を必要に応じて含むことを意図する。調節配列の選択を含む発現ベクターは、形質転換すべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどの要因に応じて設計してもよい。哺乳動物の宿主細胞発現のために好ましい調節配列として、サイトメガロウィルス（CMV）、シミアンウィルス40（SV40）、アデノウィルス（例えば、アデノウィルス主要後期プロモーター（AdMLP））及びポリオーマウィルスに由来する、プロモーター及び／又はエンハンサーなどの、哺乳動物細胞で高レベルのタンパク質発現を導くウィルスエレメントが挙げられる。

20

## 【 0 0 8 9 】

抗体重鎖及び／又は軽鎖遺伝子並びに調節配列に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、1以上の選択可能なマーカー遺伝子、及び宿主細胞にてベクターの複製を調節する配列（例えば、複製の起点）などの付加的な配列を担持してもよい。選択可能なマーカー遺伝子は、そのベクターが導入されている宿主細胞の選択を容易にする。例えば、一般的には、選択可能なマーカー遺伝子は、そのベクターが導入されている宿主細胞に、G418、ハイグロマイシン、又はメトトレキセートなどの薬物に対する抵抗性を与える。好ましい選択可能なマーカー遺伝子として、ジヒドロ葉酸還元酵素（dhfr）遺伝子（メトトレキセート選択／増幅で、dhfr陰性宿主細胞にて使用するため）、ネオ遺伝子（G418選択用）、及びグルタミン合成酵素（GS）陰性細胞系（NS0など）での選択／増幅用のグルタミン合成酵素が挙げられる。

30

## 【 0 0 9 0 】

軽鎖及び／又は重鎖の発現のために、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、DEAE-デキストランを用いたトランスフェクション、形質導入、感染等の標準的な技術によって、重鎖及び／又は軽鎖をコードする発現ベクター（単数種又は複数種）が宿主細胞内に導入される。原核、又は真核宿主細胞のいずれかにて本発明の抗体を発現するのは理論的に可能であるが、真核細胞が好ましく、最も好ましくは哺乳動物の宿主細胞である。その理由は、このような細胞が、適切に折り畳まれ、免疫学的に活性な抗体をより構築及び分泌しやすいためである。本発明の組換え抗体を発現するために好ましい哺乳動物宿主細胞として、チャイニーズハムスター卵巣（CHO細胞）[例えばKauffman and Sharp, J. Mol. Biol. 159: 60121, 1982に記載のDHFR選択可能マーカーと共に用いる、Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-20, 1980に記載のdhfr陰性CHO細胞を含む]、NS0骨髓腫細胞、COS細胞及びSP2/0細胞が挙げられる。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳動物宿主細胞に導入する場合、宿主細胞での抗体の発現ができる、より好ましくは当該技術分野で知られ

40

50

た適切な条件下に宿主細胞が生育される培地への抗体の分泌ができるのに十分な時間、宿主細胞を培養することによって抗体を生産する。抗体は、標準的な精製方法を使用して宿主細胞及び／又は培地から回収できる。

#### 【 0 0 9 1 】

宿主細胞は、無傷の抗体の一部分又は断片、例えば、F a b 断片又はs c F v分子を、従前の技術によって生産するために用いることもできる。上記手順への変更が本発明の範囲に含まれることは、当業者によって理解されるであろう。例えば、本発明の抗体の軽鎖又は重鎖のいずれかをコードするDNAで宿主細胞をトランスフェクトするのが望ましい場合もある。組換えDNA技術を用いて、I L - 1 7 に結合するのに必要でない軽鎖及び重鎖の片方又は双方をコードするDNAのいくつか又は全てを除去してもよい。このような切欠DNA分子から発現される分子も、本発明の抗体に包含される。

10

#### 【 0 0 9 2 】

本発明は、本発明の核酸分子を含む宿主細胞を提供する。好ましくは、本発明の宿主細胞は、本発明の核酸分子を含む1以上のベクター又は構築体を含む。本発明の宿主細胞は、本発明のベクターが導入された細胞であり、このベクターは、本発明の抗体のL C V Rをコードするポリヌクレオチド、及び／又は本発明のH C V Rをコードするポリヌクレオチドを含む。本発明はまた、2つの本発明のベクターが導入されている宿主細胞を含み、その1つは本発明の抗体のL C V Rをコードするポリヌクレオチドを含み、そして1つは本発明の抗体に存在するH C V Rをコードするポリヌクレオチドで、各々プロモーター配列に作動可能に連結されたものも提供する。宿主細胞型として、哺乳動物、細菌、植物、及び酵母細胞が挙げられる。好ましくは、宿主細胞は、C H O細胞、C O S細胞、S P 2 / 0細胞、N S 0細胞、酵母細胞、又はいずれかの好ましい細胞型の誘導体若しくは子孫である。

20

#### 【 0 0 9 3 】

本発明の抗体の組換え発現に好ましい系では、抗体重鎖及び抗体軽鎖の双方をコードする組換え発現ベクターを、d h f r 陰性C H O細胞に、例えば、リン酸カルシウムを介するトランスフェクションによって導入する。組換え発現ベクター内で、抗体重鎖及び軽鎖遺伝子は、遺伝子の高レベルの転写を駆動するために、エンハンサー／プロモーター調節エレメント（例えば、S V 4 0、C M V、アデノウィルス等に由来するもの、C M Vエンハンサー／A d M L Pプロモーター調節エレメント、又はS V 4 0エンハンサー／A d M L Pプロモーター調節エレメントなど）に、各々作動可能に連結される。組換え発現ベクターは、d h f r 遺伝子も担持し、これにより、ベクターでトランスフェクトされているC H O細胞を、メトトレキセート選択／増幅を用いて選択できる。選択した宿主細胞形質転換体を培養して、抗体重鎖及び軽鎖を発現させ、無傷の抗体を培地から回収する。標準的な分子生物学技術を用いて組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクトして形質転換体を選択し、宿主細胞を培養して、培地から抗体を回収する。本発明の抗体、又はそれらの抗原結合部分は、ヒト免疫グロブリン遺伝子に対して遺伝子導入された動物（例えば、マウス）にて発現できる（例えば、T a y l o r , e t a l . , N u c l e i c A c i d s R e s . 2 0 : 6 2 8 7 - 9 5 , 1 9 9 2 参照）。

30

#### 【 0 0 9 4 】

一旦発現されれば、無傷の抗体、それらのダイマー、個々の軽鎖及び重鎖、又は本発明の他の免疫グロブリンフォームを、硫酸沈殿、イオン交換、親和性、逆相、疎水的相互作用カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等を含む当該技術分野の標準的手法に従って精製できる。医薬用途には、少なくとも約90%、92%、94%又は96%の均一性の、実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、98~99%以上の均一性が最も好ましい。所望どおり部分的又は均一に精製されれば、それらペプチドは次いで、本願明細書で示すように治療的又は予防的に用いてもよい。

40

#### キメラ抗体

#### 【 0 0 9 5 】

本願明細書で「キメラ抗体」の用語には、一価、二価、又は多価免疫グロブリンが含ま

50

れる。一価キメラ抗体は、キメラ軽鎖とのジスルフィド架橋で会合したキメラ重鎖によって形成されるダイマーである。二価キメラ抗体は、少なくとも一つのジスルフィド架橋で会合した2つの重鎖 - 軽鎖ダイマーによって形成されるテトラマーである。

#### 【0096】

抗体のキメラ重鎖は、IL-17に特異的な非ヒト抗体の重鎖に由来する抗原結合領域を含み、これはCH1若しくはCH2などの、ヒト、若しくは実質的にヒト（若しくは抗原結合領域が由来するものとは異なる種）の重鎖定常領域の少なくとも一部分に、又は好ましくは全長の重鎖定常領域に作動可能に連結される。ヒトに用いられる抗体のキメラ軽鎖は、ヒト、若しくは実質的にヒト（若しくは抗原結合領域が由来するものとは異なる種）の軽鎖定常領域（CL）の少なくとも一部分に、又は好ましくは全長の軽鎖定常領域に作動可能に連結される、IL-17に特異的な非ヒト抗体の軽鎖に全体的又は実質的に由来する抗原結合領域を含む。同じか又は異なる可変領域結合特異性のキメラ重鎖及び軽鎖を有する抗体、断片又は誘導体を、個々のポリペプチド鎖の適切な会合によって既知の方法の工程に従い調製することもできる。

10

#### 【0097】

この方法で、キメラ重鎖を発現する宿主は、キメラ軽鎖を発現する宿主と別々に培養され、そして免疫グロブリン鎖は別々に回収、次いで会合される。あるいは、宿主を同時に培養でき、それらの鎖を培地中で自発的に会合させ、その後構築された免疫グロブリン又は断片を回収する。キメラ抗体を生産するための方法は、当該技術分野で知られている（例えば、米国特許第6284471号；第5807715号；第4816567号；及び第4816397号参照）。

20

#### ヒト化抗体

#### 【0098】

好ましくは、治療目的に使用する予定の本発明の抗体は、それを治療剤として使用するはずの哺乳動物が治療抗体に対する免疫応答を誘発することになる可能性を低減するように、その哺乳動物に由来するフレームワーク及び定常領域（それが抗体内に存在する程度に）の配列を有するものとされよう。ヒト化抗体は、それらが治療用途に貴重であると考えられ、齧歯類抗体で頻繁に観察されるヒト抗マウス抗体反応を回避するので、特に好都合である。加えて、ヒト化抗体で、抗体のエフェクター部分はヒト起源であるので、それはヒト免疫系の他の部分とよりよく相互作用し得る（例えば、補体依存性の細胞毒性又は抗体依存性の細胞毒性によって、標的細胞をより効率よく破壊する）。また、注射されたヒト化抗体は、例えばマウス抗体の場合よりも、天然に存在するヒト抗体により近い半減期を有し得るので、与える用量をより低く且つより少ない回数にできる。本願明細書の「ヒト化抗体」という用語は、異なる起源の抗体の部分を含み、少なくとも1つの部分がヒト起源である抗体を指す。例えば、ヒト化抗体は、必要な特異性を備えた非ヒト（マウスなど）起源の抗体由来の部分と、ヒト起源の抗体由来の部分とを含むことができ、これらは、従来の技術によって化学的に（例えば合成により）共に継合するか、又は遺伝子工学技術を用いて、隣接ポリペプチドとして調製できる。

30

#### 【0099】

好ましくは、「ヒト化抗体」は、非ヒト抗体（好ましくはマウス単クローン抗体）起源の、又は実質的に非ヒト抗体起源のCDRを有し、一方フレームワーク及び定常領域は存在する程度に（又はその大部分若しくは実質的な部分、すなわち少なくとも約90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%）、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン領域に（例えば、International ImmunoGenetics Database参照）、又はその組換え若しくは変異型に存在する核酸配列情報によってコードされ、これは当該抗体がヒト細胞で生産されるか否かを問わない。

40

#### 【0100】

ヒト化抗体のCDRは、それらの起源たる非ヒト親抗体のCDRから改変又は至適化して、所望の性質（例えば、特異性、親和性及び/又は優先的結合性）を生じさせてもよい。改変又は至適化したCDRは、親CDRと比較して、6つのCDRドメイン内に好まし

50

くは合計約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 のアミノ酸置換、付加、及び / 又は欠失を有してもよい。例えば、表 2 及び 3 の下線及び太字印刷の C D R のアミノ酸の位置は、表 2 及び 3 の F a b 1 に示すように C D R から改変されている位置である。あるいは、マウス抗体 2 3 2 1 を、本発明の抗体の C D R の比較用の親抗体としてもよい。

#### 【 0 1 0 1 】

非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化型には、無傷の抗体、実質的に無傷の抗体、抗原結合部位を含む抗体の一部分、又は F a b 断片、F a b ' 断片、F ( a b ' )<sub>2</sub>、若しくは単鎖 F v 断片を含む抗体の一部分が含まれる。ヒト化抗体は、好ましくは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を含む。ヒト化抗体は、レシピエント抗体でも、移入した C D R 又はフレームワーク配列のいずれでも認められない残基を含んでもよい。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも 1 つ、通常は 2 つの変域ドメインの実質的に全てを含むことになり、ここで C D R 領域内のアミノ酸の全て又は実質的に全ては非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、そして F R 領域内のアミノ酸の全て又は実質的に全てはヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体は、最適には、免疫グロブリン定常領域 ( F c ) の少なくとも一部分（典型的にはヒト免疫グロブリンのもの）も含む [ J o n e s e t a l . , N a t u r e , 3 2 1 : 5 2 2 - 5 2 5 , 1 9 8 6 ; R i e c h m a n n e t a l . , N a t u r e , 3 3 2 : 3 2 3 - 3 2 9 , 1 9 8 8 ; 及び P r e s t a , C u r r . O p . S t r u c t . B i o l . , 2 : 5 9 3 - 5 9 6 , 1 9 9 2 ] 。

#### 【 0 1 0 2 】

ヒト化抗体は、当該技術分野で日常的に用いられている方法を使用してインビトロ突然変異誘発（又は、ヒト I g 配列に対する遺伝子導入動物を用いる場合、インビボ体細胞突然変異誘発）に付してもよく、この場合、ヒト化組換え抗体の H C V R 及び L C V R 領域のフレームワーク領域アミノ酸配列は、ヒトの生殖系 H C V R 及び L C V R 配列に関連するものに由来するが、インビボでヒト抗体生殖系レパートリー内に天然で存在しないかもしれない配列である。ヒト化組換え抗体の H C V R 及び L C V R フレームワーク領域のこのようなアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系配列と少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 8 % 又は最も好ましくは少なくとも 9 9 % 一致することが企図される。好ましくは、会合部位構造を維持又はこれに影響を及ぼす親抗体（例えば、マウス抗体、又は通常、ヒト化抗体が誘導される抗体）のそれらフレームワーク残基は保持されることになる。これらの残基は、例えば、親抗体又は F a b 断片の X 線結晶学によって同定し、これにより抗原結合部位の三次元構造を同定してもよい。抗体をヒト化する一戦略では、ドナー C D R を受け取るフレームワークとして親抗体のフレームワークと最高の相同性を有するヒト生殖系配列を選択する。この生殖系列アプローチは、最良適合戦略と同じ原理に基づくが、生殖系列配列のみがデータベースで検索される。

#### 【 0 1 0 3 】

本発明のヒト化抗体は、ヒト生殖細胞系軽鎖フレームワークを含んでも、又はこれに由来してもよい。特定の実施形態で、軽鎖生殖細胞系配列は、限定しないが A 1、A 1 0、A 1 1、A 1 4、A 1 7、A 1 8、A 1 9、A 2、A 2 0、A 2 3、A 2 6、A 2 7、A 3、A 3 0、A 5、A 7、B 2、B 3、L 1、L 1 0、L 1 1、L 1 2、L 1 4、L 1 5、L 1 6、L 1 8、L 1 9、L 2、L 2 0、L 2 2、L 2 3、L 2 4、L 2 5、L 4 / 1 8 a、L 5、L 6、L 8、L 9、O 1、O 1 1、O 1 2、O 1 4、O 1 8、O 2、O 4 及び O 8 を含む、ヒト V K 配列から選択される。一部の実施形態で、この軽鎖ヒト生殖細胞系フレームワークは、V 1 - 1 1、V 1 - 1 3、V 1 - 1 6、V 1 - 1 7、V 1 - 1 8、V 1 - 1 9、V 1 - 2、V 1 - 2 0、V 1 - 2 2、V 1 - 3、V 1 - 4、V 1 - 5、V 1 - 7、V 1 - 9、V 2 - 1、V 2 - 1 1、V 2 - 1 3、V 2 - 1 4、V 2 - 1 5、V 2 - 1 7、V 2 - 1 9、V 2 - 6、V 2 - 7、V 2 - 8、V 3 - 2、V 3 - 3、V 3 - 4、V 4 - 1、V 4 - 2、V 4 - 3、V 4 - 4、V 4 - 6、V 5 - 1、V 5 - 2、V 5 - 4、及び V 5 - 6 から選択される。

#### 【 0 1 0 4 】

他の実施形態で、本発明のヒト化抗体は、ヒト生殖細胞系重鎖フレームワークを含んでも、又はこれに由来してもよい。特定の実施形態で、この重鎖ヒト生殖細胞系フレームワークは、VH1-18、VH1-2、VH1-24、VH1-3、VH1-45、VH1-46、VH1-58、VH1-69、VH1-8、VH2-26、VH2-5、VH2-70、VH3-11、VH3-13、VH3-15、VH3-16、VH3-20、VH3-21、VH3-23、VH3-30、VH3-33、VH3-35、VH3-38、VH3-43、VH3-48、VH3-49、VH3-53、VH3-64、VH3-66、VH3-7、VH3-72、VH3-73、VH3-74、VH3-9、VH4-28、VH4-31、VH4-34、VH4-39、VH4-4、VH4-59、VH4-61、VH5-51、VH6-1、及びVH7-81から選択される。異なる生殖細胞系配列の説明については、PCT WO 2005/005604を参照のこと。

10

**【0105】**

特定の実施形態で、軽鎖可変領域及び/又は重鎖可変領域は、フレームワーク領域、又はフレームワーク領域の少なくとも一部分（例えば、FR2及びFR3などの、2つ又は3つの小領域を含んでいる）を含む。一部の実施形態で、少なくともFRL1、FRL2、FRL3、又はFRL4は、完全にヒトのものである。他の実施形態で、少なくともFRH1、FRH2、FRH3、又はFRH4は、完全にヒトのものである。いくつかの実施形態で、少なくともFRL1、FRL2、FRL3、又はFRL4は、生殖細胞系配列（例えば、ヒト生殖系列）であるか、又は特定のフレームワークに対するヒトコンセンサス配列を含む。他の実施形態で、少なくともFRH1、FRH2、FRH3、又はFRH4は、生殖細胞系配列（例えば、ヒト生殖系列）であるか、又は特定のフレームワークに対するヒトコンセンサス配列を含む。好ましい実施形態で、フレームワーク領域の全てが、ヒトのフレームワーク領域である。

20

**【0106】**

一般に、ヒト化抗体は、抗体（例えば、マウス抗体、又は本発明のIL-17エピートプを結合するハイブリドーマによって作製される抗体）のHCVR及びLCVRをコードする核酸配列を得、そのHCVR及びLCVR（非ヒト）中のCDRを同定し、そして、かかるCDRをコードする核酸配列を、選択されたヒトフレームワークをコードする核酸配列に移植することによって生産してもよい。任意に、CDR領域のフレームワーク領域内への移植に先駆けて、CDRの1以上のアミノ酸を異なるアミノ酸で置換するために、CDR領域を無作為に、又は特定の位置で突然変異誘発することによって最適化してもよい。あるいは、CDR領域は、当業者が利用できる方法を使用し、ヒトフレームワーク領域内への挿入に続いて最適化してもよい。好ましくは、ヒトフレームワークアミノ酸配列は、結果として生じる抗体がヒトでのインビボ投与に適しやすいうように選択される。これは、例えば、このようなヒトフレームワーク配列を含む抗体を先に使用した結果に基づいて決定できる。好ましくは、ヒトフレームワーク配列は、それ自体有意に免疫原性でないものとされる。

30

**【0107】**

あるいは、ヒト化すべき抗体に対するフレームワークのアミノ酸配列を、CDR移植に用いるべき既知のヒトフレームワーク配列のものと比較し、それらが含んでいる、親抗体（例えば、IL-17に結合するマウス抗体（例えば、配列番号：270のHCVRを含み、更に配列番号：271のLCVRを含む抗体））のものと類似性が高い配列に基づいて選択してもよい。多数のヒトフレームワーク配列が単離されており、それらの配列が当該技術分野で報告されている。これにより、親（例えば、マウス）のCDR、又は選択したヒトフレームワークに移植した親抗体の最適化されたCDRを（及び、おそらくはヒト定常領域も）含む、得られるCDR移植ヒト化抗体は、抗原結合構造を実質的に保持することになり、よって親抗体の結合親和性を保持する尤度が高くなる。抗原結合親和性をかなりの程度保持するために、選択されるヒトフレームワーク領域は、好ましくは、インビボの投与に適していると考えられる、すなわち免疫原性でないものである。

40

**【0108】**

50

いずれの方法でも、好ましいマウス抗 I L - 1 7 抗体の H C V R 及び L C V R 領域をコードする D N A の配列が得られる。免疫グロブリンをコードする核酸配列をクローニングするための方法は、当該技術分野で知られている。かかる方法は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) により適切なプライマーを使用して、クローニングすべき免疫グロブリンコーディング配列を増幅することを含んでもよい。免疫グロブリン核酸配列、特にマウスの H C V R 及び L C V R 配列を増幅するために好適なプライマーは、文献で報告されている。このような免疫グロブリンコーディング配列をクローニングした後、当該技術分野で知られた方法によってそれらの配列決定を行う。

#### 【 0 1 0 9 】

C D R コーディング配列を、選択したヒトフレームワークをコードする配列に移植した後、「ヒト化」可変重鎖及び可変軽鎖配列をコードする、得られた D N A 配列を次いで発現させて、I L - 1 7 を結合するヒト化 F v 又はヒト化抗体を生産する。ヒト化 H C V R 及び L C V R は、全体の抗 I L - 1 7 抗体分子の一部として、すなわち、ヒト定常ドメイン配列を有する融合タンパクとして発現してもよく、それをコードする D N A 配列は、市販のライブラリから得られたものか、若しくは、例えば、D N A 配列を得るための前記方法のうちの 1 つを使用して得られたもの、又は当該技術のものである。しかし、H C V R 及び L C V R 配列は、ヒト化抗 I L - 1 7 F v を生産すべく、定常配列の非存在下に発現させることもできる。そうではあるが、可変領域へのヒト定常配列の融合は、結果的に得られるヒト化抗 - I L - 1 7 抗体がヒトエフェクター機能を保有し得るので、潜在的に望ましい。

#### 【 0 1 1 0 】

既知配列のタンパク質をコードする D N A を合成するための方法は、当該技術分野でよく知られている。このような方法を使用して、対象のヒト化 H C V R 及び L C V R 配列 ( 定常領域は有無のいずれか ) をコードする D N A 配列を合成し、その後、組換え抗体の発現に好適なベクター系にて発現させる。これは、ヒト定常ドメイン配列との融合タンパク質として発現すべき、そして会合して機能性 ( 抗原結合性 ) 抗体又は抗体断片を生産する、対象のヒト化 H C V R 及び L C V R 配列を提供するいずれのベクター系にて実行してもよい。

#### 【 0 1 1 1 】

ヒト定常ドメイン配列は、当該技術分野で知られており、文献にて報告されている。好ましいヒト定常軽鎖配列は、及び 定常軽鎖配列を含む。好ましいヒト定常重鎖配列として、ヒト I g G <sub>1</sub>、ヒト I g G <sub>2</sub>、ヒト I g G <sub>3</sub>、ヒト I g G <sub>4</sub> ( 例えば、配列番号 : 2 5 7 ~ 2 6 0 を、それぞれ参照のこと ) や、例えば、インビボの半減期増大、F c 受容体結合の低減、アミド分解プロファイルの改変などの、変更されたエフェクター機能をもたらすそれらの変異型が挙げられる。

#### 【 0 1 1 2 】

存在するのであれば、ヒトフレームワーク領域は、抗原結合領域ドナー ( すなわち、親抗体 ) の類似又は等価領域と配列類似性を有するヒト抗体可変領域に由来するのが好ましい。ヒト化抗体のヒト起源の部分に対するフレームワーク領域の他の供給源は、ヒト可変コンセンサス配列を含む ( 例えば、K e t t l e b o r o u g h , C . A . e t a l . , P r o t e i n E n g i n e e r i n g 4 : 7 7 3 - 7 8 3 ( 1 9 9 1 ) ; C a r t e r e t a l . , W O 9 4 / 0 4 6 7 9 号参照 ) 。例えば、非ヒト部分を得るために用いる抗体又は可変領域の配列は、K a b a t e t a l . , S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t 、第 5 版、N I H , U . S . G o v e r n m e n t P r i n t i n g O f f i c e ( 1 9 9 1 ) に記載のヒト配列と比較できる。特に好ましい実施形態で、ヒト化抗体鎖のフレームワーク領域は、ヒト以外のドナーの可変領域と、少なくとも約 6 0 % の全体の配列同一性、好ましくは少なくとも約 7 0 % 、8 0 % 、又は 9 0 % の全体の配列同一性、より好ましくは少なくとも約 8 5 % の全体の配列同一性を有するヒト可変領域に由来する。ヒト部分は、使用されている特定の部分 ( 例えば、F R ) の中で、ヒト以外のドナーの等価部分

10

20

30

40

50

(例えば、FR)と比較した場合に、少なくとも約65%の配列同一性、好ましくは少なくとも約70%の配列同一性を有するヒト抗体に由来することもできる。

#### 【0113】

使用してもよいヒト化マウス抗体に関わる方法を更に記載している文献は、例えば、Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2869, 1991; 米国特許第5693761号; 米国特許第4816397号; 米国特許第5225539号; Levitt, M., J. Mol. Biol. 168:595-620, 1983に記載のコンピュータプログラムABMOD及びENCADであり、; ヒト化は本質的に、Winter及び共同研究者(Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988; Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988)の方法に従って実施できる。

#### 【0114】

##### ヒト抗体

ヒト化に代わるものとして、ヒト抗体を作製できる。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリー(Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381, 1991; Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581, 1991)を含め、当該技術分野で知られた様々な技術を使用して生産できる。Cole et al.及びBoerner et al.の技術も、ヒト単クローン抗体の調製に利用可能である(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)及びBoerner et al., J. Immunol., 147:86-95, 1991)。同様に、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を、例えば、内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的又は完全に不活化されているマウスなどの遺伝子導入動物に導入することによって作製できる。例えば本発明の免疫原性エピトープを含む抗原での免疫化に際し、ヒト抗体生産の全長レパートリーを得るが、これは遺伝子再編成、構築及び抗体レパートリーを含め、あらゆる点でヒトにて認められるものに酷似している。このアプローチは、例えば、米国特許第5545807号; 第5545806号; 第5569825号; 第5589369号; 第5591669号; 第5625126号; 第5633425号; 第5661016号、及び以下の科学刊行物: Marks et al., Biotechnology 10:779-783, 1992; Lonberg et al., Nature 368:856-859, 1994; Morrison, Nature 368:812-13, 1994; Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-51, 1996; Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)及びJobkobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551, 1993に記載されている。

#### 【0115】

マウスに導入され、その結果ヒト配列を有する抗体に対する抗原に応答できる遺伝子導入マウスが作出されるヒト免疫グロブリン遺伝子は、Bruggemann et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6709-6713, 1989)にも記載されている。ヒト抗体を生産する哺乳動物の作製のために、種々の戦略が存在している。特に、Ig遺伝子座からの断片(例えば、個々の遺伝子)を含ませることによって外因性Ig遺伝子座を模倣する「ミニ遺伝子座」アプローチ(例えば、米国特許第5545807号、第5545806号、第5625825号、第5625126号、第5633425号、第5661016号、第5770429号、第5789650号、及び第5814318号、第5612205号、第5721367号、第5789215号参照)、Ig遺伝子座の大きく且つ実質的に生殖系列の断片のYAC導入(Mend

ez et al. Nature Genetics 15:146-156, 1997; Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495, 1998 参照)、及び微小核体の使用による全体又は実質的に全体の遺伝子座の導入(欧州特許出願第 E P 0 8 4 3 9 6 1 A 1 号参照)がある。

#### 【0116】

当業者が利用できる方法を用いれば、本発明の抗 IL - 17 抗体を生産するために、ヒト配列を有する抗体での免疫化に応答できるいかなる遺伝子導入マウスを使用してもよく、例えばこのようなマウスを本発明の免疫原性エピトープを含むポリペプチドで免疫化してもよい。

#### 【0117】

##### 用途

本発明の抗体は、本願明細書に記載の、治療、予防、診断、及び研究用途に有用である。本発明の抗体は、ヒト IL - 17 の発現に関連する障害又は疾患を診断するために使用してもよい。同様に、本発明の抗体は、IL - 17 関連症状について試験すべき被検者での IL - 17 レベルをモニターするためのアッセイにて使用できる。研究適用には、本発明の抗体及び標識を利用して、試料中、例えば、ヒト体液中、又は、細胞若しくは組織抽出物中の IL - 17 を検出する方法が包含される。本発明の抗体は、修飾して使用しても、又は修飾せずに使用してもよく、検出可能な部分の共有的又は非共有的付着によってラベルされる。検出可能な部分は、直接的、又は間接的のいずれかで検出可能な信号を発生できる、いずれのものであることもできる。例えば、検出可能な部分は、例えば、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、若しくは<sup>125</sup>Iなどの放射性同位元素；フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、若しくはルシフェリンなどの蛍光若しくは化学発光化合物；又はアルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、若しくはセイヨウワサビペルオキシダーゼなどの酵素でもよい。検出可能な部分に抗体を別々に接合させるために、当該技術分野で知られたいずれの方法を使用してもよく、その方法として、Hunter, et al., Nature 144:945, 1962; David, et al., Biochemistry 13:1014, 1974; Pain, et al., J. Immunol. Meth. 40:219, 1981; 及び Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30:407, 1982 に記載の方法が挙げられる。

#### 【0118】

例えば、ELISA、RIA、及びFACSを含め、IL - 17 を測定するための様々な従来のプロトコルが当該技術分野で知られており、IL - 17 発現の改変レベル又は異常レベルを診断するための基礎が提供される。正常又は標準的な発現値は、当該技術分野で知られたいずれの技術を用いても、例えば、IL - 17 ポリペプチドを含む試料を、例えば、抗原：抗体複合体を形成するのに好適な条件下で抗体と組み合わせることによって確立される。抗体は、結合又は非結合抗体の検出を容易にするために、検出可能な物質で直接的又は間接的にラベルされる。好適な検出可能物質として、様々な酵素、接合団、蛍光物質、発光性物質及び放射性物質が挙げられる。好適な酵素の例として、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；好適な接合団複合体の例として、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンが挙げられ；

好適な蛍光物質の例として、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、又はフィコエリトリンが挙げられ；発光性物質の例として、ルミノールが挙げられ、

そして、放射性物質の例として、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>35</sup>S、又は<sup>3</sup>Hが挙げられる(例えば、Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) 参照)。形成される標準複合体の量は、様々な方法、例えば、測光手段によって定量化する。試料中で

10

20

30

40

50

発現される IL - 17 ポリペプチドの量は、その後基準値と比較する。

#### 【0119】

便宜上、本発明の抗体は、キット（所定量の試薬と、診断アッセイを実行するための説明書との梱包された併合品）にて提供できる。抗体が酵素でラベルされる場合、キットは、基質と、酵素が必要とする補助因子（例えば、検出可能な発色団又は蛍光体をもたらす基質前駆体）とを含むものとされよう。加えて、安定化剤、緩衝液（例えば、ブロッキング用緩衝液又は溶解用緩衝液）等の他の添加剤を含んでもよい。様々な試薬の相対量は、アッセイの感度を実質的に最適化する試薬の溶液中濃度を提供するように、広く変動してもよい。特に、試薬は、乾燥粉（通常は凍結乾燥されたもの）として、溶解時に適切な濃度を有する試薬溶液を提供することになる賦形剤を含めて提供してもよい。

10

#### 【0120】

##### 抗体に対する治療用途

IL - 17 は、体循環内でなく、炎症の部位で活性化された T 細胞によって分泌される、炎症誘発性サイトカインであり、これは、健康人の血清又は組織では容易に検出できない。IL - 17 は、接着分子をアップレギュレートし、滑膜細胞、軟骨細胞、繊維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞を含む様々な細胞型からの複数の炎症性サイトカイン及びケモカインの生産を誘導し、これにより炎症部位への抗中球の補充が誘導され、プロスタグランジン及びメタロプロテイナーゼの生産を刺激して、プロテオグリカン合成を阻害する。更に、IL - 17 は、造血前駆細胞の成熟で重要な役割を果たす。IL - 17 は、肺、関節軟骨、骨、脳、造血細胞、腎臓、皮膚及び腸を含む、異なる器官及組織でのシグナル伝達の役割を備えている。IL - 17 は、IL - 17 B、C 及び E と 15 ~ 27 % のアミノ酸相同性、IL - 17 D 及び F と 44 ~ 50 % のアミノ酸相同性を有する。IL - 17 は低親和性（約 1 nM）で IL - 17 受容体に結合するが、他の IL - 17 ファミリーメンバーは IL - 17 受容体に結合しない。

20

#### 【0121】

IL - 17（すなわち、IL - 17 A）レベルの増加は、気道炎症、RA、骨関節炎、骨浸食、腹腔内膿瘍及び接着、IBD、同種異系移植片拒絶、乾癬、特定の型の癌、脈管形成、アテローム性動脈硬化及び MS を含む種々の症状と関連している。IL - 17 及び IL - 17 R は双方とも、RA 患者の滑液組織にてアップレギュレートされる。IL - 17 は、IL - 1 - 及び TNF - 依存性及び非依存性経路による RA の病原で、その役割を発揮する。IL - 17 は、他のサイトカイン及びケモカイン、例えば、TNF - 、IL - 1 - 、IL - 6、IL - 8 及び Gr o - の分泌を刺激する。IL - 17 は直接、RA で疾患の進行に関与する。IL - 17 のマウス膝への注射は、IL - 1 活性と無関係に関節破壊を促進する（Ann . Rheum . Dis . 59 : 529 - 32 , 2000）。抗 IL - 1 抗体は、IL - 17 によって誘発された炎症及び関節破壊に対して効果を有しない（J . Immunol . 167 : 1004 - 1013 , 2001）。SCW によって誘発されたマウス関節炎モデルにて、IL - 17 は、野生型、並びに IL - 1 ノックアウト及び TNF - ノックアウトマウスでの炎症細胞浸潤及びプロテオグリカン枯渇を誘導した。IL - 17 ノックアウトマウスは、抗原のチャレンジがなければ表現型として正常であるが、II 型コラーゲンでの免疫化の後に、関節炎が顕著に減少する（J . Immunol . 171 : 6173 - 6177 , 2003）。

30

40

#### 【0122】

多発性硬化症（「MS」）は、軸索を包囲している髄鞘への損傷を伴う中枢神経系（「CNS」）炎症によって特徴付けられる自己免疫疾患である。MS の特徴は、T 細胞が CNS に浸潤する点にある。MS は、米国では 350,000 名、世界中では 25,000,000 名を超える人々に発症している。多くの型があり、最も一般的なものでは、再発 / 寛解疾患（「RRMS」）に二次進行期が続く。現在の治療は、インターフェロン - （AVONEX、BETASERON 及び REBIF）からなり、再発 / 悪化率を 31 % ~ 34 % 低下させるが、インフルエンザ様症状及び / 又は中和抗体の合成を生じることがある（例えば、AVONEX を摂取している約 15 % の患者で、18 ヶ月以内に中和抗

50

体が生じる)。T Y S A B R I は、R R M S に対して F D A が承認しているが、その後 C N S 免疫抑制の懸念のために市場から姿を消した。M S の治療に、まだ応じられていない医学的必要性が依然として存在している。I L - 1 7 m R N A は、M S 病変内、並びに M S 患者からの血液及び脳脊髄液中の単核細胞 ( M N C ) 内で増加する。M S 臨床的悪化の際に、寛解の際と比較してより多くの数の I L - 1 7 m R N A を発現する血液 M N C が検出される ( M u l t i p l e S c l e r o s i s , 5 : 1 0 1 - 1 0 4 , 1 9 9 9 ) 。更に、M S に対する前臨床動物モデルである、実験的自己免疫脳脊髄炎 ( 「 E A E 」 ) は、I L - 1 7 ノックアウトマウスで有意に抑制される。

#### 【 0 1 2 3 】

従って、本発明の抗 I L - 1 7 単クローン抗体を含む医薬組成物は、限定しないが、気道炎症、喘息、R A 、骨関節炎、骨浸食、腹腔内膿瘍及び接着、I B D 、同種異系移植片拒絶、乾癬、特定の型の癌、脈管形成、アテローム性動脈硬化及び M S や、エリテマトーデス、アレルギー曝露に対する応答、ピロリ菌関連の胃炎、気管支喘息及び同種異系移植片拒絶 (例えば、腎臓)、全身性エリテマトーデス及びループス腎炎を含む他の炎症性障害、疾患又は症状を包含する、I L - 1 7 の存在によって望ましくない病理学的影響が生じるか若しくはこれに寄与する、又は I L - 1 7 活性の低下が哺乳動物、好ましくはヒトで治療上の利点をもたらす症状の治療又は予防に有用であり得る。I L - 1 7 活性が有害である前記障害の少なくともいずれかを治療若しくは予防に利する、又は生理活性 I L - 1 7 レベルの低下のためになる、本発明の抗 I L - 1 7 単クローン抗体の使用が、本発明で企図される。加えて、前記障害の少なくともいずれかの治療用の薬剤の製造で用いるための、本発明の抗単クローン抗体の使用が企図される。

#### 【 0 1 2 4 】

本願明細書で、「治療」「治療する」等の用語は、所望の薬理学的効果及び/又は生理学的効果を得ることを指す。その効果は、完全に若しくは部分的に、その疾患若しくは症候を防止する点から予防的であってもよく、且つ/又は、この疾患に起因し得る疾患及び/若しくは悪影響に対する部分的若しくは完全治癒の点から治療的であってもよい。本願明細書で「治療」は、哺乳動物、特にヒトで疾患又は症状を治療するための、本発明の化合物の投与を包含し、そして

( a ) 当該疾患に罹患しやすいかもしれないが、未だそれに罹患していると診断はされていない被検者で、その疾患が発症するのを防止すること；

( b ) 当該疾患を阻止する、すなわち、その発生をくい止めること；及び

( c ) 当該疾患を軽減する、すなわち、その疾患若しくは障害の退行を引き起こす、又はその症候若しくは合併症を緩和すること、が含まれる。投与計画は、所望される最適の応答 (例えば、治療的又は予防的応答) がもたらされるように調整してもよい。例えば、単一のボラスを投与してもよいし、いくつかに分けた用量を長期間投与してもよいし、又は治療の状況の緊急性による示唆に応じて用量を比例的に増減してもよい。

#### 【 0 1 2 5 】

##### 医薬組成物

本発明の抗体は、被検者への投与に好適な医薬組成物に組み込むことができる (例えば、実施例 1 4 参照)。本発明の化合物は、単回、又は複数回用量にて、単独、又は薬理的に許容できる担体、希釈剤、及び/若しくは賦形剤と組み合わせて投与してもよい。投与用の医薬組成物は、選択された投与様式に適切となるように設計され、分散剤、緩衝液、界面活性剤、保存剤、可溶化剤、等張化剤、安定剤等の、薬理学的に許容できる希釈剤、担体、及び/又は賦形剤を適宜に用いる (例えば、本願明細書の実施例 1 4 参照)。前記組成物は、例えば、熟練技術者に一般的に知られている製剤技術の概論を提供する、R e m i n g t o n , T h e S c i e n c e a n d P r a c t i c e o f P h a r m a c y , 第 1 9 版、G e n n a r o 編、M a c k P u b l i s h i n g C o . , E a s t o n , P A , 1 9 9 5 に示されるような従来技術に従って設計される。

#### 【 0 1 2 6 】

本発明の抗 I L - 1 7 単クローン抗体を含む医薬組成物は、経口、静脈内、腹腔内、皮

下、肺内、経皮、筋肉内、鼻腔内、口腔内、舌下、又は座剤投与を含む標準的な投与技術を使用して、本願明細書の病態を呈するか、又はその危険がある被検者に投与できる。

【0127】

本発明の医薬組成物は、好ましくは「治療上有効な量」又は「予防上有効な量」の本発明の抗体を含む。「治療上有効な量」とは、投与量にて、且つ必要な時間で所望の治療結果を成し遂げるのに有効な量を指す。抗体の治療上有効な量は、個体の病状、年齢、性、及び体重等の因子、並びに個体で所望される応答を誘発する抗体又は抗体部分の能力に従って変動してもよい。治療上有効な量は、抗体による毒性又は有害効果のいずれよりも、その治療的に有益な効果が上回る量でもある。「予防上有効な量」とは、投与量にて、且つ必要な時間で所望の予防的結果を成し遂げるのに有効な量を指す。典型的には、予防的投与量は、病気になる前又は病気の初期段階の被検者に用いるので、予防上有効な量は、治療上有効な量よりも少ないであろう。

10

【0128】

治療上有効又は予防上有効な量は、治療的な利点を被検者に与えるのに必要な、活性剤の少なくとも最小の用量であるが、毒性用量を下回る。換言すると、本発明の抗体の治療上有効な量は、哺乳動物、好ましくはヒトでIL-17レベルの低下が有益な治療効果をもたらす場合に、又はIL-17の存在が望ましくない病理学的効果を引き起こすか若しくはこれに寄与する場合に、哺乳動物、好ましくはヒトで、例えばIL-17Rへ結合してIL-17生物活性を低下させる量である。

【0129】

20

本発明の抗体の投与の経路は、経口的、非経口的、吸入による、又は局所的であってもよい。好ましくは、本発明の抗体は、非経口投与に好適な医薬組成物に組み込むことができる。本願明細書の非経口的という用語には、静脈内、筋肉内、皮下、直腸内、腔内、又は腹腔内投与が包含される。静脈内又は腹腔内又は皮下注射による、末梢的全身送達为好ましい。このような注射のための好適な媒体は、当該技術分野で簡単に理解される。

【0130】

医薬組成物は通常、例えば密封バイアル又はシリンジなどの提供される容器での貯蔵、及び製造の条件下に安定で、且つ無菌でなければならない。従って、医薬組成物は、製剤を作製した後滅菌濾過してもよいし、又はそうでなく、微生物学的に許容できるように作製してもよい。静脈内注入用の典型的な組成物は、滅菌リンゲル液、生理食塩水、デキストロース溶液、及びハックス溶液などと、治療上有効な用量の抗体濃度（例えば、1~100mg/ml以上）を含む、250~1000ml程度の液体容量であることができる。用量は、疾患の型及び重症度に応じて変動してもよい。医療技術分野でよく知られているとおり、誰か1人の被検者に対する用量は、患者のサイズ、体表面積、年齢、投与すべき特定の化合物、性、投与の時間及び経路、全身の健康、並びに同時に投与されている他の薬物を含め、多くの因子に依存する。典型的な用量は、例えば、0.001~1000mgの範囲であることができるが、

30

この例示典範囲を下回る、又はこれを上回る用量も、特に前記の因子を考慮して想定される。毎日の非経口投与計画は、1日当たり、約0.1mg/kg~約100mg/kg総体重、好ましくは約0.3mg/kg~約10mg/kg、より好ましくは約1mg/kg~1mg/kg、更に一層好ましくは約0.5~10mg/kg体重であることができる。進行を、定期的な評価によってモニターしてもよい。少なくとも数日以上にわたる反復投与については、症状に応じて、疾患症候の所望の抑制が起こるまで治療が繰り返される。しかし、他の投与計画が有用であることもあり、本発明から除外されることはない。熟練技術者が成し遂げたいと望む薬物動態学的減衰のパターンに応じて、抗体の単回のボーラス投与により、複数回のボーラス投与により、又は継続的注入投与により、所望の投与量を送達できる。

40

【0131】

抗体のこれら指示量は、相当な治療上の裁量を前提とする。適切な用量の選択及びスケジュール設定の際の主要な要因は、得られる結果である。これに関連して考慮される因子

50

には、治療される特定の障害、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床症状、障害の原因、抗体の送達の部位、抗体の特定のタイプ、投与の方法、投与のスケジュール設定、及び熟練技術者に知られた他の因子が含まれる。

#### 【 0 1 3 2 】

本発明の治療剤は、貯蔵用に凍結又は凍結乾燥し、使用前に好適な無菌の担体中で再構成してもよい。凍結乾燥及び再構成で、抗体活性損失の程度の変化を導くことができる。投与量は、補償するように調整しなければならないことがある。通常、6 から 8 の間の pH が好ましい。

#### 【 0 1 3 3 】

#### 製造品

本発明の別の実施形態で、前記障害又は症状の治療又は予防に有用なものを含む製造品が提供される。製造品は、容器及びラベルを具備している。好適な容器としては、例えば、瓶、バイアル、シリンジ、及び試験管が挙げられる。容器は、ガラス又はプラスチックなどの様々な材料で形成してもよい。容器は、障害又は症状を防止又は治療するのに有効な本発明の抗体の組成物を保持し、無菌のアクセス口を有してもよく、例えば、容器は、静脈内輸液バッグ、又は皮下注射針によって穿孔できるストッパを有するバイアルであってもよい。組成物中の活性剤は、本発明の抗 IL - 17 抗体である。容器上の、又は添付されるラベルは、選択した症状を治療するために組成物が用いられることを示す。製造品は、リン酸塩緩衝食塩水、リンゲル液、及びデキストロース溶液などの、薬理学的に許容できる緩衝液を含む第二容器を更に含んでもよい。それは更に、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ及び使用のための説明を記載した添付文書を含め、商業的、及び使用者の観点から望ましい他のものを更に含んでもよい。

#### 【 0 1 3 4 】

以下の実施例は、例示目的のみで提供し、いかようにも本発明の範囲を限定することは意図しない。

#### 【 0 1 3 5 】

表 1 配列番号

#### 【表 1】

Fab #	LCVR	軽鎖 CDR1	軽鎖 CDR2	軽鎖 CDR3	HCVR	重鎖 CDR1	重鎖 CDR2	重鎖 CDR3
1	178	122	150	168	56	11	29	33
2	179	122	150	169	57	11	29	34
3	180	123	150	168	56	11	29	33
4	181	124	150	168	58	11	29	35
5	179	122	150	169	59	11	29	36
6	182	124	150	169	60	11	29	37
7	183	125	150	170	56	11	29	33
8	184	124	150	171	61	11	29	38
9	185	124	150	170	62	11	29	39

10	178	122	150	168	60	11	29	37
11	181	124	150	168	61	11	29	38
12	186	124	150	172	63	11	29	40
13	187	123	150	169	64	11	29	41
14	188	123	150	173	65	11	29	42
15	189	124	150	174	66	11	29	43
16	181	124	150	168	62	11	29	39
17	187	123	150	169	61	11	29	38
18	181	124	150	168	67	11	29	44
19	190	124	150	175	56	11	29	33
20	178	122	150	168	68	12	29	33
21	178	122	150	168	69	13	29	33
22	178	122	150	168	70	14	29	33
23	178	122	150	168	71	15	29	33
24	178	122	150	168	72	16	29	33
25	178	122	150	168	73	17	29	33
26	178	122	150	168	74	18	29	33
27	178	122	150	168	75	19	29	33
28	178	122	150	168	76	20	29	33
29	178	122	150	168	77	21	29	33
30	178	122	150	168	78	22	29	33
31	178	122	150	168	79	23	29	33
32	178	122	150	168	80	24	29	33
33	178	122	150	168	81	11	30	33
34	178	122	150	168	82	11	31	33
35	178	122	150	168	83	11	32	33
36	178	122	150	168	58	11	29	35
37	178	122	150	168	84	11	29	45
38	178	122	150	168	85	11	29	261
39	178	122	150	168	86	11	29	47
40	178	122	150	168	87	11	29	48
41	178	122	150	168	88	11	29	49
42	178	122	150	168	89	11	29	50
43	178	122	150	168	90	11	29	51
44	178	122	150	168	91	11	29	52
45	178	122	150	168	92	11	29	53
46	178	122	150	168	93	11	29	54

10

20

30

40

47	191	125	150	168	56	11	29	33
48	192	126	150	168	56	11	29	33
49	193	127	150	168	56	11	29	33
50	194	128	150	168	56	11	29	33
51	195	129	150	168	56	11	29	33
52	196	130	150	168	56	11	29	33
53	197	131	150	168	56	11	29	33
54	198	132	150	168	56	11	29	33
55	199	133	150	168	56	11	29	33
56	200	134	150	168	56	11	29	33
57	201	135	150	168	56	11	29	33
58	202	136	150	168	56	11	29	33
59	203	137	150	168	56	11	29	33
60	204	138	150	168	56	11	29	33
61	205	139	150	168	56	11	29	33
62	206	140	150	168	56	11	29	33
63	199	133	150	168	56	11	29	33
64	207	141	150	168	56	11	29	33
65	208	142	150	168	56	11	29	33
66	209	143	150	168	56	11	29	33
67	210	144	150	168	56	11	29	33
68	211	122	151	168	56	11	29	33
69	212	122	150	176	56	11	29	33
70	213	122	150	177	56	11	29	33
71	214	145	150	168	94	25	29	46
72	191	125	150	168	95	26	29	46
73	215	146	150	168	96	26	29	55
74	199	133	150	168	97	26	29	48
75	178	122	150	168	95	26	29	46
76	199	133	150	168	95	26	29	46
78	178	122	150	168	98	26	29	47
79	195	129	150	168	99	27	29	46
80	195	129	150	168	97	26	29	48
82	199	133	150	168	98	26	29	47
84	199	133	150	168	100	26	29	52
85	191	125	150	168	98	26	29	47
86	191	125	150	168	95	26	29	46

10

20

30

40

87	216	147	150	168	95	26	29	46
88	199	133	150	168	94	25	29	46
89	196	130	150	168	100	26	29	52
91	195	129	150	168	97	26	29	48
92	216	147	150	168	97	26	29	48
93	195	129	150	168	101	27	29	48
94	199	133	150	168	95	26	29	46
95	217	130	152	168	98	26	29	47
96	218	125	153	168	102	26	32	46
97	219	145	154	168	97	26	29	48
98	199	133	150	168	98	26	29	47
99	199	133	150	168	95	26	29	46
100	220	125	155	168	103	26	32	33
101	221	133	156	168	95	26	29	46
102	222	148	157	168	95	26	29	46
103	223	130	158	168	104	26	32	46
104	224	145	159	168	104	26	32	46
105	225	130	150	169	105	26	32	47
106	226	133	160	168	106	26	29	47
107	227	130	161	169	107	25	32	48
108	228	133	162	169	108	25	29	47
109	229	130	163	168	109	27	32	46
110	230	131	164	169	100	26	29	52
111	231	146	165	168	95	26	29	46
112	232	125	166	168	97	26	29	48
113	199	133	150	168	110	27	29	47
114	233	129	159	168	106	26	29	47
115	234	133	167	168	106	26	29	47
116	235	149	167	168	110	27	29	47
117	236	125	167	168	111	28	32	53
118	234	133	167	168	112	26	30	53
119	237	122	167	168	100	26	29	52
120	238	122	167	169	112	28	30	46
121	239	147	167	169	113	28	32	46

10

20

30

122	237	122	167	168	114	26	30	53
123	236	125	167	168	115	26	29	53
124	240	131	167	168	116	11	30	53
125	178	122	150	168	117	26	32	52
126	241	131	167	168	118	26	30	52
127	241	131	167	168	106	26	29	47
128	242	129	167	169	119	27	30	47
129	236	125	167	168	120	26	30	52
130	243	129	167	168	119	27	30	47
131	236	125	167	168	117	26	32	52
132	236	125	167	168	121	27	30	52

【 0 1 3 6 】

表 2 重鎖 C D R アラインメント

【表 2】

Fab#	CIR1	配列番号	CIR2	配列番号	CIR3	配列番号
1	<u>GYSFTDYNM</u> <u>N</u>	11	<u>VINPNYGT</u> <u>TDYNQ</u> <u>REFKG</u>	29	<u>YDYATGTG</u> <u>AY</u>	33
2	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDY <u>W</u> TGTG <u>G</u> Y	34
3	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTGAY	33
4	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDY <u>W</u> TGTGAY	35
5	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTG <u>L</u> Y	36
6	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTG <u>G</u> Y	37
7	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTGAY	33
8	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTG <u>V</u> Y	38
9	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDY <u>H</u> TGTG <u>G</u> Y	39
10	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTG <u>G</u> Y	37
11	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTG <u>V</u> Y	38
12	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTG <u>T</u> Y	40
13	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDY <u>F</u> TGTG <u>G</u> Y	41
14	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDY <u>F</u> TGTG <u>P</u> Y	42
15	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTG <u>G</u> Y	43
16	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDY <u>H</u> TGTG <u>G</u> Y	39
17	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTG <u>V</u> Y	38
18	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDY <u>S</u> TGTG <u>G</u> Y	44
19	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTGAY	33
20	GYSFTDYN <u>I</u> N	12	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTGAY	33
21	GYSFTDYN <u>L</u> N	13	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTGAY	33
22	GYSF <u>G</u> DYNM	14	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTGAY	33
23	GYSF <u>R</u> DYNM	15	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTGAY	33
24	GYSFT <u>W</u> YMN	16	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTGAY	33
25	GYSF <u>N</u> DYNM	17	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTGAY	33
26	GYSFTDYNM <u>S</u>	18	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTGAY	33
27	GYSFTDYN <u>T</u> N	19	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTGAY	33
28	GYSF <u>P</u> DYNM	20	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTGAY	33
29	<u>H</u> YSFTDYNM	21	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTGAY	33
30	G <u>H</u> FTDYNM	22	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTGAY	33
31	G <u>P</u> FTDYNM	23	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTGAY	33
32	GYSFTD <u>F</u> NM	24	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDYATGTGAY	33
33	GYSFTDYNM	11	VINP <u>M</u> YGTTDYNQREFKG	30	YDYATGTGAY	33
34	GYSFTDYNM	11	VINP <u>A</u> YGTTDYNQREFKG	31	YDYA TGTGAY	33
35	GYSFTDYNM	11	VINP <u>E</u> YGTTDYNQREFKG	32	YDYATGTGAY	33
36	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDY <u>W</u> TGTGAY	35
37	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YDY <u>S</u> TGTGAY	45
38	GYSFTDYNM	11	VINPNYGTTDYNQREFKG	29	YD <u>A</u> <u>F</u> TGTGAY	261

10

20

30

40

39	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
40	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48
41	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDY <u>L</u> TGTGAY	49
42	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYAT <u>S</u> TGAY	50
43	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYA <u>P</u> GIGAY	51
44	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDY <u>F</u> TGTG <u>V</u> Y	52
45	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDY <u>Y</u> TGTG <u>V</u> Y	53
46	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YD <u>P</u> ATGTGAY	54
47	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
48	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
49	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
50	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
51	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
52	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
53	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
54	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
55	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
56	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
57	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
58	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
59	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
60	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
61	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
62	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
63	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
64	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
65	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
66	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
67	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
68	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
69	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
70	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDYATGTGAY	33
71	GYSFTDY <u>H</u> L <u>G</u>	25	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
72	GYSFTDY <u>H</u> H	26	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
73	GYSFTDY <u>H</u> H	26	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDY <u>H</u> TGTG <u>V</u> Y	55
74	GYSFTDY <u>H</u> H	26	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48
75	GYSFTDY <u>H</u> H	26	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
76	GYSFTDY <u>H</u> H	26	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
78	GYSFTDY <u>H</u> H	26	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
79	GYSFTDY <u>H</u> M <u>S</u>	27	VINPNYGTDDYNQREKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46

10

20

30

40

80	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>HT</u> GTGAY	48
82	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>YT</u> GTGAY	47
84	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>FT</u> GTG <u>VY</u>	52
85	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>YT</u> GTGAY	47
86	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>FT</u> GTGAY	46
87	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>FT</u> GTGAY	46
88	GYSFTDY <u>HIG</u>	25	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>FT</u> GTGAY	46
89	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>FT</u> GTG <u>VY</u>	52
91	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>HT</u> GTGAY	48
92	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>HT</u> GTGA Y	48
93	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>HT</u> GTGAY	48
94	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>FT</u> GTGAY	46
95	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>YT</u> GTGAY	47
96	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINP <u>EY</u> GTDDYNQRFKG	32	YDY <u>FT</u> GTGAY	46
97	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>HT</u> GTGAY	48
98	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>YT</u> GTGAY	47
99	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>FT</u> GTGAY	46
100	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINP <u>EY</u> GTDDYNQRFKG	32	YDYATGTGAY	33
101	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>FT</u> GTGAY	46
102	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>FT</u> GTGAY	46
103	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINP <u>EY</u> GTDDYNQRFKG	32	YDY <u>FT</u> GTGAY	46
104	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINP <u>EY</u> GTDDYNQRFKG	32	YDY <u>FT</u> GTGAY	46
105	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINP <u>EY</u> GTDDYNQRFKG	32	YDY <u>YT</u> GTGAY	47
106	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>YT</u> GTGAY	47
107	GYSFTDY <u>HIG</u>	25	VINP <u>EY</u> GTDDYNQRFKG	32	YDY <u>HT</u> GTGAY	48
108	GYSFTDY <u>HIG</u>	25	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>YT</u> GTGAY	47
109	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINP <u>EY</u> GTDDYNQRFKG	32	YDY <u>FT</u> GTGAY	46
110	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>FT</u> GTG <u>VY</u>	52
111	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>FT</u> GTGAY	46
112	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>HT</u> GTGAY	48
113	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>YT</u> GTGAY	47
114	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>YT</u> GTGAY	47
115	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>YT</u> GTGAY	47
116	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>YT</u> GTGVY	47
117	GYSFTD <u>YHIS</u>	28	VINP <u>EY</u> GTDDYNQRFKG	32	YDY <u>YT</u> GTG <u>VY</u>	53
118	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINP <u>MY</u> GTDDYNQRFKG	30	YDY <u>YT</u> GTG <u>VY</u>	53
119	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>FT</u> GTG <u>VY</u>	52
120	GYSFTDY <u>HIS</u>	28	VINP <u>MY</u> GTDDYNQRFKG	30	YDY <u>FT</u> GTGAY	46
121	GYSFTDY <u>HIS</u>	28	VINP <u>EY</u> GTDDYNQRFKG	32	YDY <u>FT</u> GTGAY	46
122	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINP <u>MY</u> GTDDYNQRFKG	30	YDY <u>YT</u> GTG <u>VY</u>	53

10

20

30

40

123	GYSFTDY <u>HH</u>	26	VINPNYGTTDYNQREKG	29	YDY <u>Y</u> TGIG <u>V</u> Y	53
124	GYSFTDYNMN	11	VINP <u>M</u> YGTTDYNQREKG	30	YDY <u>Y</u> TGIG <u>V</u> Y	53
125	GYSFTDY <u>HH</u>	26	VINP <u>E</u> YGTTDYNQREKG	32	YDY <u>F</u> TGIG <u>V</u> Y	52
126	GYSFTDY <u>HH</u>	26	VINP <u>M</u> YGTTDYNQREKG	30	YDY <u>F</u> TGIG <u>V</u> Y	52
127	GYSFTDY <u>HH</u>	26	VINPNYGTTDYNQREKG	29	YDY <u>Y</u> TGIGAY	47
128	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINP <u>M</u> YGTTDYNQREKG	30	YDY <u>Y</u> TGIGAY	47
129	GYSFTDY <u>HH</u>	26	VINP <u>M</u> YGTTDYNQREKG	30	YDY <u>F</u> TGIG <u>V</u> Y	52
130	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINP <u>M</u> YGTTDYNQREKG	30	YDY <u>Y</u> TGIGAY	47
131	GYSFTDY <u>HH</u>	26	VINP <u>E</u> YGTTDYNQREKG	32	YDY <u>F</u> TGIG <u>V</u> Y	52
132	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINP <u>M</u> YGTTDYNQREKG	30	YDY <u>F</u> TGIG <u>V</u> Y	52

10

## 【 0 1 3 7 】

コンセンサス：

## 【 表 3 】

配列番号：244	配列番号：245	配列番号：246
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> EX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> X <sub>9</sub> X <sub>10</sub>	VINEX <sub>5</sub> YGTTDYNQREKG	YDX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> TGX <sub>9</sub> Y
X <sub>1</sub> はH又はG	X <sub>5</sub> はN,A,M 又はE	X <sub>3</sub> はY,A 又はP
X <sub>3</sub> はS,H 又はP		X <sub>4</sub> はY,F,H,S,W,L 又はA
X <sub>5</sub> はG,R,T,N 又はP		X <sub>5</sub> はT 又はP
X <sub>6</sub> はD 又はW		X <sub>6</sub> はG 又はS
X <sub>7</sub> はY 又はF		X <sub>9</sub> はA,G,L,V,P 又はT
X <sub>8</sub> はN 又はH		
X <sub>9</sub> はM,T,L 又はI		
X <sub>10</sub> はN,G,H 又はS		

20

## 【 0 1 3 8 】

表 3 軽鎖 C D R アラインメント

30

【表 4】

Fab#	CIR1	配列番号:	CIR2	配列番号:	CIR3	配列番号:
1	<u>RSSQSLVHSRGNTYLH</u>	122	<u>KVSNRFS</u>	150	<u>SQSTHLPFT</u>	168
2	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
3	RSSQSLVHS <u>H</u> GNTYLH	123	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
4	RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
5	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
6	RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
7	RSSQSLVHS <u>Y</u> GNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTH <u>I</u> PFT	170
8	RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQ <u>L</u> HVPFT	171
9	RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTH <u>I</u> PFT	170
10	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
11	RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
12	RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTH <u>E</u> PFT	172
13	RSSQSLVHS <u>H</u> GNTYLH	123	KVSNRFS	150	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
14	RSSQSLVHS <u>H</u> GNTYLH	123	KVSNRFS	150	<u>N</u> QSTH <u>V</u> PFT	173
15	RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQ <u>T</u> IHVPFT	174
16	RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
17	RSSQSLVHS <u>H</u> GNTYLH	123	KVSNRFS	150	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
18	RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
19	RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQ <u>M</u> HVPFT	175
20	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
21	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
22	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
23	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
24	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
25	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
26	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
27	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
28	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
29	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
30	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
31	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
32	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
33	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
34	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
35	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
36	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
37	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
38	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168

10

20

30

40

39	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
40	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
41	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
42	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
43	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
44	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
45	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
46	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
47	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
48	RSSQ <u>S</u> VVHSRGNTYLH	126	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
49	<u>V</u> SSQSLVHSRGNTYLH	127	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
50	RSS <u>A</u> SLVHSRGNTYLH	128	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
51	RSSQSL <u>K</u> HSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
52	RSSQSL <u>R</u> HSRGNTYLH	130	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
53	RSS <u>R</u> SLVHSRGNTYLH	131	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
54	RS <u>H</u> QSLVHSRGNTYLH	132	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
55	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> IH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
56	RSSQSLVH <u>N</u> RGNTYLH	134	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
57	RSSQSLVHSRG <u>R</u> TYLH	135	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
58	RSSQSLVH <u>R</u> PGNTYLH	136	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
59	RSSQSLVHSRGNTY <u>T</u> H	137	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
60	RSSQSLVHSRGNTY <u>S</u> H	138	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
61	RSSQSLVHSRGNTY <u>H</u> H	139	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
62	RSSQSLVH <u>A</u> RGNTYLH	140	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
63	RSSQSLVHSRGNTY <u>F</u> H	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
64	RSSQSLVHSRGNT <u>W</u> IH	141	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
65	RSSQSLVHSRGN <u>V</u> YLH	142	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
66	RSSQSLVHSRG <u>K</u> TYLH	143	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
67	RSSQSLVH <u>L</u> RGNTYLH	144	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
68	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTHLPFT	168
69	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQ <u>T</u> HLPFT	176
70	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQST <u>S</u> LPFT	177
71	RSS <u>K</u> SLVHSRGNT <u>F</u> IH	145	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
72	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
73	RSSQSL <u>R</u> HSRGNT <u>F</u> IH	146	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
74	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> IH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
75	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
76	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> IH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
78	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
79	RSSQSL <u>K</u> HSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168

10

20

30

40

80	RSSQSL <u>K</u> HSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
82	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> IH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
84	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> IH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
85	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
86	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
87	RSSQSL <u>K</u> HSRGNT <u>F</u> IH	147	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
88	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> IH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
89	RSSQSL <u>R</u> HSRGNTYLH	130	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
91	RSSQSL <u>K</u> HSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
92	RSSQSL <u>K</u> HSRGNT <u>F</u> IH	147	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
93	RSSQSL <u>K</u> HSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
94	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> IH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
95	RSSQSL <u>R</u> HSRGNTYLH	130	KVSNRF <u>H</u>	152	SQSTHLPFT	168
96	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KV <u>A</u> NRFS	153	SQSTHLPFT	168
97	RSS <u>K</u> SLVHSRGNT <u>F</u> IH	145	KV <u>S</u> <u>V</u> RFS	154	SQSTHLPFT	168
98	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> IH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
99	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> IH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
100	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSN <u>N</u> ES	155	SQSTHLPFT	168
101	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> IH	133	KV <u>D</u> NRFS	156	SQSTHLPFT	168
102	RSS <u>R</u> SLVHSRGNT <u>F</u> IH	148	KV <u>T</u> NRFS	157	SQSTHLPFT	168
103	RSSQSL <u>R</u> HSRGNTYLH	130	KVSN <u>I</u> ES	158	SQSTHLPFT	168
104	RSS <u>K</u> SLVHSRGNT <u>F</u> IH	145	KV <u>S</u> <u>T</u> RFS	159	SQSTHLPFT	168
105	RSSQSL <u>R</u> HSRGNTYLH	130	KVSNRFS	150	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
106	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> IH	133	KV <u>R</u> NRFS	160	SQSTHLPFT	168
107	RSSQSL <u>R</u> HSRGNTYLH	130	KV <u>P</u> NRFS	161	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
108	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> IH	133	KVSNRF <u>V</u>	162	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
109	RSSQSL <u>R</u> HSRGNTYLH	130	KVSNR <u>I</u> S	163	SQSTHLPFT	168
110	RSS <u>R</u> SLVHSRGNTYLH	131	KVSNRF <u>T</u>	164	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
111	RSSQSL <u>R</u> HSRGNT <u>F</u> IH	146	KVSNR <u>N</u> S	165	SQSTHLPFT	168
112	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KV <u>H</u> NRFS	166	SQSTHLPFT	168
113	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> IH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
114	RSSQSL <u>K</u> HSRGNTYLH	129	KV <u>S</u> <u>T</u> RFS	159	SQSTHLPFT	168
115	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> IH	133	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTHLPFT	168
116	RSSQSL <u>K</u> H <u>S</u> <u>H</u> GNTYLH	149	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTHLPFT	168
117	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTHLPFT	168
118	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> IH	133	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTHLPFT	168
119	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTHLPFT	168
120	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
121	RSSQSL <u>K</u> HSRGNT <u>F</u> IH	147	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
122	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTHLPFT	168

10

20

30

40

123	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTHLPFT	168
124	RSS <u>R</u> SLVHSRGNTYLH	131	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTHLPFT	168
125	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRF	150	SQSTHLPFT	168
126	RSS <u>R</u> SLVHSRGNTYLH	131	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTHLPFT	168
127	RSS <u>R</u> SLVHSRGNTYLH	131	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTHLPFT	168
128	RSSQSL <u>K</u> HSRGNTYLH	129	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
129	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTHLP FT	168
130	RSSQSL <u>K</u> HSRGNTYLH	129	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTHLPFT	168
131	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTHLPFT	168
132	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTHLPFT	168

10

20

30

40

コンセンサス：

【表 5】

配列番号：247

X<sub>1</sub>SX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>SX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>HK<sub>9</sub>X<sub>10</sub>GX<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>H

X<sub>1</sub>はR又はV

X<sub>3</sub>はS又はH

X<sub>4</sub>はQ,K,R 又はA

X<sub>6</sub>はV又はL

X<sub>7</sub>はR,V 又はK

X<sub>9</sub>はS,N,R,A 又はL

X<sub>10</sub>はH,R,N 又はY

X<sub>12</sub>はN,K 又はR

X<sub>13</sub>はT又はV

X<sub>14</sub>はF,Y 又はW

X<sub>15</sub>はL,T,S,H 又はF

配列番号：248

X<sub>1</sub>VX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>RX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>

X<sub>1</sub>はK又はI

X<sub>3</sub>はS,A,D,T,R,H 又はP

X<sub>4</sub>はN,V 又はT

X<sub>5</sub>はR,I 又はN

X<sub>6</sub>はF,I 又はN又は

X<sub>7</sub>はS,H,I,T 又はV

配列番号：249

X<sub>1</sub>QX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>PFT

X<sub>1</sub>はS又はN

X<sub>3</sub>はS又はT

X<sub>4</sub>はT,L 又はM

X<sub>5</sub>はH又はS

X<sub>6</sub>はL,I,V,E 又はY

10

【実施例】

【0140】

実施例1 ELISA I：様々な種のIL-17への抗体結合

20

IL-17に対する抗体の結合を測定するための代表的なELISAアッセイでは、ウェル当たり50μlの1.0μg/mlヒトIL-17(R&D Systems、#317-IL/CF)の炭酸塩コーティング緩衝液(50mM炭酸ナトリウム(pH9.0))溶液で4に overnight コーティングされる密封Costar 3366マイクロタイタープレートを使用する。あるいは、マウス、ラット、ウサギ又はカニクイザルIL-17を使用する。ヒトIL-22(R&D Systems)を、対照抗原として使用する。ウサギ及びカニクイザルIL-17は市販されていないので、図2(配列番号：9及び10)に示す様々な種のIL-17のアミノ酸配列を活用し、当該技術分野で知られた方法に従ってクローニング及び発現、又は人工的に合成する必要がある。さまざまな種のIL-17をコードする代表的なヌクレオチド配列を、配列番号：250~254に示す。

30

【0141】

プレートはその後、100μlブロッキング緩衝液(Pierce #37515)を添加することによって、ブロックする。プレートを37で1時間インキュベートし、その後洗浄用緩衝液(PBS(pH7.4)、0.05%ツイーン)で3回洗浄する。次いで、試料抗体又は対照抗体(PBS(pH7.4)で、例えば2、0.4、0.08、0.016、0.0032及び0のμg/mlの様々な濃度に希釈)のいずれかの50μlを各ウェルに添加し、プレートを更に37で1時間インキュベートする。プレートは次いで、洗浄用緩衝液で3回洗浄し、その後PBS(pH7.4)で1:1000に希釈した、ウェル当たり50μlの抗ヒト-アルカリホスファターゼ接合体を添加する。測定試料を、37で1時間インキュベートする。その後、p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム塩(PNPP、Pierce #37620)を、製造業者の説明書に従ってジエタノールアミン基質緩衝液に溶解することにより新たに作製し、50μlを各ウェルに添加する。発色は室温で約10分間進行させ、その後、適切なELISAプレートリーダーのいずれかを使用して405nmの吸光度で色信号を測定する。結合の程度は、色信号の発生に比例する。

40

【0142】

本発明の抗体は、本願明細書のELISAアッセイでヒトIL-17に結合するが、ラット又はマウスIL-17には結合しない。本発明の抗体がヒト及びサルIL-17に結合することを立証している実施例4のピアコアデータを考えると、本発明の抗体は本願明細書に記載のELISAアッセイにてサルIL-17への結合も立証されるであろうこと

50

が予測される。

#### 【0143】

実施例2 ELISA II: IL-17のファミリータンパク質への抗体結合  
本発明の抗体が選択的且つ/又は優先的に特定のヒトIL-17メンバー(例えば、IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E若しくはIL-17F)、又はヒトIL-22(陰性対照)に結合するかどうかを計るために、ELISAを用いる。

#### 【0144】

代表的なアッセイで、ELISAプレートウェル(Nunc Immuno Maxi sorp)は、100 $\mu$ l(1Xコーティング緩衝液(BioF x)中、0.5 $\mu$ g/ml)のIL-17ファミリーメンバータンパク質(R&D Systems)で被覆し、密封して4で一晩インキュベートする。ウェル内の溶液を軽く叩いて除去し、ブロッキング用緩衝液(1.5%BSAのPBS溶液、200 $\mu$ l)を添加する。プレートは、室温で30分間、回転式振盪機でインキュベートする。その後、ウェル当たり100 $\mu$ lの被検抗体を、濃度を変えて(例えば、2、0.4、0.08、0.016、0.0032及び0 $\mu$ g/ml)添加する。プレートは、再び一晩インキュベート(4)し、その後、回転式振盪機で加温する(室温で60分間)。各プレートのウェルはその後、緩衝液(1Xish緩衝液、BioF x)で5回洗浄する。洗浄後に、適切な市販のHRP接合二次抗体(1.5%BSAを含むPBS中1:2000)を添加する(100 $\mu$ l/ウェル)。プレートは、回転式振盪機(60分、室温)で再度インキュベートし、その後前記のとおり緩衝液(5X)で洗浄する。比色定量信号を、飽和するまで(約3~5分)TMB(100 $\mu$ l/ウェル)を添加することによって生じさせ、その後、更なる信号発生は、停止液(100 $\mu$ l/ウェル、BioF x)を添加することによって停止する。色信号は、適切なELISAプレートリーダーのいずれかを使用して450nmの吸光度で測定する。結合の程度は、色信号の生成に比例する。本発明の抗体(例えば、表1に示すFab 103、104、118、121、126及び131)は、ヒトIL-17(すなわちIL-17A)に特異的に結合するが、同様の条件下でヒトIL-17B、ヒトIL-17C、ヒトIL-17D、ヒトIL-17E、ヒトIL-17F、マウスIL-17又はヒトIL-22にバックグラウンドレベルを上回って結合することはない。

#### 【0145】

実施例3 IL-17をクローニングするための細胞の単離及び活性化

##### A. ラット脾細胞

CO<sub>2</sub>吸入により屠殺したラットの脾臓を、無菌鉗子及びハサミを使用して取り出し、その脾臓を5mlのRPMI 1640培地+10%ウシ胎児血清及びペニシリン/ストレプトマイシン(培地溶液)を含む試験管の中に入れる。試験管の内容物を10cmシャーレに注ぎ入れ、脾臓から脂肪を除去する。完全に艶消し処理され、予め高圧蒸気滅菌した一对の鏡検スライドを用いて、脾臓を穏やかにホモジナイズする。培地溶液を用いてスライドから細胞を洗い出し、数回ピペティングして、細胞濾過器(Fisher Scientif ic)を通して細胞を濾過する。培地溶液で細胞を一度洗浄して細胞を計数し、80ml中、2 $\times$ 10<sup>7</sup>細胞/mlの最終濃度にそれらを再懸濁する。細胞溶液をT150フラスコに加え、コンカナバリンAを3 $\mu$ g/mlの終濃度となるように添加し、37にて約15時間インキュベートする。細胞を収集してPBSで洗浄し、ドライアイス上で細胞ペレットを凍結して、直ちに標準的なRNA単離手順に進める。

#### 【0146】

##### B. カニクイザル及びウサギ末梢血単核細胞(PBMC)

カニクイザルからの全血約7ml、又はニュージーランド白色種ウサギからの全血10mlを、全血からの単核細胞分離用のBD Vacutainer(商標)CPT(商標)Systemに付す。水平スイングバケットロータで、1500x重力にて20分間、CPT細胞調製試験管を遠心分離する。界面でリンパ球及び単球を集め、培地溶液で2回洗浄し、計数して、10<sup>6</sup>細胞/mlの終濃度で培地溶液に再懸濁させる。コンカナバリ

ンAを終濃度 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ まで添加し、37 にて約15時間インキュベートする。細胞を収集してPBSで洗浄し、ドライアイス上で細胞ペレットを凍結して、直ちに標準的なRNA単離手順に進める。

#### 【0147】

#### 実施例4 結合速度常数の測定

BIACORE（登録商標）2000器具を用いて、抗原抗体結合速度常数及び親和性を測定する。この器具は、表面プラスモン共鳴の光学的性質を利用して、デキストランバイオセンサマトリクス内で相互作用している分子のタンパク質濃度の変化を検出する。注記する場合を除き、すべての試薬及び材料は、BIACORE（登録商標）ABから購入する。すべての測定は、25 で実施する。試料は、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ （150mM塩化ナトリウム、3mM EDTA、0.005%（重量/容量）界面活性剤P-20、及び10mM HEPES（pH7.4））の終濃度に、HBS-EP緩衝液にて再懸濁させる。プロテインAは、アミンカップリングキットを使用し、500応答単位のレベルでCM4センサチップのフローセル1～4に固定化する。

#### 【0148】

結合は、複数の分析サイクルを使用して評価する。各サイクルは、 $50\mu\text{l}/\text{分}$ の流速で実行し、以下の工程：[100～200の応答単位の捕獲を目的として $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗体組成物を約 $20\mu\text{l}$ 注入；ヒトIL-17、カニクイザルIL-17、ニュージーランド白色種ウサギIL-17、ラットIL-17又はマウスIL-17（10nMで開始し、各サイクルにつき2倍系列希釈を使用）を $250\mu\text{l}$ 注入し、その後20分間解離；そして $30\mu\text{l}$ の10mMグリシン塩酸（pH1.5）を使用した再生]からなる。各サイクルに対する会合及び解離率は、BIAevaluationソフトウェアでの「1：1物質移動」結合モデルを使用して評価する。

#### 【0149】

IgG<sub>4</sub> Fc領域を有する全長のmAb103、104、118、121、126及び131（表1参照）は、5pM未満の $K_D$ 、 $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ より遅い $k_{off}$ 、及び少なくとも $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の $k_{on}$ で、ヒトIL-17への、そしてサルIL-17への高親和性結合を呈する。マウス可変領域[配列番号：261（2321のVH）、262（2321のVL）]、ヒトIgG<sub>4</sub>重鎖定常領域（配列番号：260）及び軽鎖定常領域（配列番号：272）を含むFab2321mAb（例えばFab103及び104などの親Fab）よりも、これらの変異mAbでは、 $K_D$ 及び $k_{off}$ が改善されている（すなわち、 $K_D$ が低下し、 $k_{off}$ が遅くなっている）。本発明の抗体は、マウスIL-17又はラットIL-17に、バックグラウンドを上回るレベルの結合を呈さず、200nMのマウスIL-17まで結合が検出されず、1pMのラットIL-17まで結合が検出されない。全長のmAb103、104、121及び126を前記条件下にカニクイザルIL-17及びウサギIL-17への結合について試験すると、ウサギIL-17への結合は弱く、且つ二相性であり、サルIL-17への結合はヒトへの結合に類似している。このアッセイにて試験した場合の、本発明の特定のmAbに対する具体的な数値（数値は平均±平均の標準誤差として報告）を、以下の表4に列挙する。IgG<sub>4</sub>のもの以外のFc領域は、 $K_D$ 及び $k_{off}$ に有意に影響を及ぼさないであろうと考えられる。

#### 【0150】

表4

10

20

30

40

【表 6】

ヒトIL-17	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D(pM)$
mAb 103	$11(\pm 2) \times 10^6$	$1.5(\pm 0.7) \times 10^{-5}$	$1.4(\pm 0.7)$
mAb 104	$7.7(\pm 0.6) \times 10^6$	$1.1(\pm 0.5) \times 10^{-5}$	$1.7(\pm 0.9)$
mAb 118	$5 \times 10^6$	$2 \times 10^{-5}$	3.9
mAb 121	$10(\pm 0.9) \times 10^6$	$1.5(\pm 0.3) \times 10^{-5}$	$1.6(\pm 0.4)$
mAb 126	$7.5(\pm 0.4) \times 10^6$	$1.3(\pm 0.2) \times 10^{-5}$	$1.8(\pm 0.3)$
mAb 131	$5.4 \times 10^6$	$1.6 \times 10^{-5}$	2.9
*親2321 mAb	$2.7 \times 10^6$	$6 \times 10^{-5}$	7
カニクイザルIL-17	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D(pM)$
mAb 103	$8.8 \times 10^6$	$1.1 \times 10^{-5}$	1.3
mAb 104	$9.4 \times 10^6$	$0.5 \times 10^{-5}$	0.5
mAb 121	$7.8(\pm 0.3) \times 10^6$	$0.7(\pm 0.2) \times 10^{-5}$	$1.1(\pm 0.04)$
mAb 126	$7.9(\pm 0.3) \times 10^6$	$0.7(\pm 0.6) \times 10^{-5}$	$0.8(\pm 0.8)$
ウサギIL-17 <sup>a</sup>	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D(pM)$
mAb 103	$1.8 \times 10^5$	$3.6 \times 10^{-4}$	2
	$10.6 \times 10^6$	$19.2 \times 10^{-2}$	18.1
mAb 104	$1.0(\pm 0.1) \times 10^5$	$1.8(\pm 1.0) \times 10^{-4}$	$1.9(\pm 1.3)$
	$4.0(\pm 2) \times 10^6$	$7.0(\pm 2) \times 10^{-2}$	$20(\pm 6)$
mAb 121	$8(\pm 6) \times 10^5$	$4(\pm 3) \times 10^{-4}$	$0.51(\pm 0.13)$
	$17(\pm 11) \times 10^6$	$2.1(\pm 0.2) \times 10^{-2}$	$1.5(\pm 1.0)$
mAb 126	$1.5(\pm 0.6) \times 10^5$	$1.7(\pm 0.5) \times 10^{-4}$	$1.3(\pm 0.6)$
	$9(\pm 3) \times 10^6$	$11(\pm 2) \times 10^{-2}$	$14(\pm 4.0)$

<sup>a</sup> 結合は二相性であり、データは2種の親和性を示す異種リガンド結合モデルに適合する。

## 【0151】

## 実施例5 IL-17受容体/抗IL-17抗体結合競合研究

本実施例は、本発明の抗体がIL-17受容体とIL-17への結合について競合することを立証する。

## 【0152】

BIA CORE 結合研究は、IL-17受容体Fc融合タンパク質(R&D #177-IR)を使用して実施する。IL-17受容体Fc融合タンパク質がヒトIL-17に結合することを立証するために、BIA CORE 結合緩衝液(HBS-EP) + 1mg/ml BSAにおいてBIA CORE 2000器具で25にてBIA COREアッセイを実施する。チップのフローセル1、2及び3に約600応答単位のプロテインAを固定化したCM4チップを使用する。約100応答単位のIL-17受容体Fc融合タンパク質が、チップのフローセル2に捕獲される。その後、600nMから9.4nMの範囲の濃度でヒトIL-17をフローセル1及び2に曝露する。ヒトIL-17を各々250μl注入した後、チップ全体に緩衝液を流して約12分間、複合体を解離させる。解離が終了した後、次の結合サイクルを開始する前に、20μlの100mMグリシン(pH1.5)の注入を用いてチップを再生させる。フローセル1を、参照フローセルとして使用する。データは、BIA evaluation Version 3.2ソフトウェアの「Bivalent analyte」モデルを用いて適合させる。その結果から、この相互作用は $1.06 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ の結合速度、 $20.3 s^{-1}$ の高解離速度、及び $1.63 \times 10^{-4} s^{-1}$ の低解離速度を有することが示される。従って、この相互作

用は、ヒトIL-17に対する本発明の抗体の結合親和性よりも非常に弱い、 $1.5\text{ nM}$ 及び $0.19\text{ mM}$ の $K_D$ 又は結合親和性を有する。

#### 【0153】

競合実験に対する結合も、CM4チップを備えたBIACORE2000器具で、25にてHBS-EP+ $1\text{ mg/ml}$  BSAにおいて測定する。約1000応答単位の本発明の抗体を、チップのフローセル2、3及び4に固定化し、フローセル1はブランクにしておく。 $50\text{ }\mu\text{l/ml}$ の流速を用いて、 $25\text{ }\mu\text{l}$ の $500\text{ nM}$ ヒトIL-17を4つのフローセル全てにわたって注入し、抗体：抗原複合体をチップの表面上に形成させる。注入が完了して複合体が形成された後、 $250\text{ }\mu\text{l}$ の $500\text{ nM}$ ヒトIL-17受容体Fc融合タンパク質を4つのフローセル全てにわたって注入する。この注入の終了時に、 $25\text{ }\mu\text{l}$ の $100\text{ mM}$ グリシン( $\text{pH}1.5$ )の注入でチップを再生させる。その後、IL-17受容体Fc融合タンパク質でなく $250\text{ }\mu\text{l}$ の緩衝液の注入で同じ結合実験を繰り返す。

#### 【0154】

抗体：抗原複合体に対する受容体注入と、抗体：抗原複合体に対する緩衝液対照の注入との双方についての結合プロファイルは、同一である。これは、本発明の抗体に一旦結合すると、その受容体にダイマーのIL-17が結合するために利用できる結合部位がないことを示している。この結果はまた、一旦複合体が形成されると、受容体は抗体のいずれからIL-17を「引き」剥がすことはできないことも示している。これらの抗体は、ヒトIL-17がその受容体に結合するのを阻害でき、従って、ヒトIL-17の生物学的活性を中和する。

#### 【0155】

##### 実施例6A インビトロIL-8レポーターアッセイ

本発明の抗体がIL-17生物活性を中和又は拮抗する能力を試験するために、本願明細書のIL-8レポーター分析を利用できる。この方法は、細胞ベースのアッセイで本発明のFab又はmAbの作用強度を定量するのに用いることもできる。ヒトHS27細胞系(ATCC #CRL-1634)は、IL-17にตอบสนองしてIL-8を分泌する。IL-17によって誘導されたIL-8分泌は、抗IL-17中和抗体によって阻害される(J. Imm. 155:5483-5486, 1995、又はCytokine 9:794-800, 1997参照)。従って、抗IL-17中和抗体の非存在下に十分なIL-17をHS27細胞へ添加すれば、IL-17によって誘導されるIL-8分泌は拘束されることなく進行するはずである。

#### 【0156】

HS27細胞を、アッセイ培地( $10\%$ ウシ胎児血清、 $4\text{ mM}$  L-グルタミン、 $1\text{ mM}$ ピルビン酸ナトリウム、ペニシリンG( $100\text{ U}/500\text{ ml}$ )及びストレプトマイシン( $100\text{ }\mu\text{g}/500\text{ ml}$ )を含みフェノールレッド不含のDMEM高グルコース培地(Invitrogen #31053-028))中で維持する。細胞を、アッセイの日に約80~90%の集密度になるまで、T150フラスコで生育する。ヒトIL-17(R&D Systems、#317-IL-050)は、 $\text{Ca}^{2+}$ 及び $\text{Mg}^{2+}$ 不含の無菌PBSで再構成して凍結保存し、使用のために新たに解凍して、アッセイ培地で $200\text{ ng/ml}$ に希釈する。希釈したIL-17の $50\text{ }\mu\text{l}$ 分割量を96穴平底組織培養プレート(Falcon #35-3072)の各ウェルに添加するが、外側のウェルは空のままにしておく。培地のみの対照( $100\text{ }\mu\text{l}$ /ウェル)及びIL-17のみの対照( $100\text{ }\mu\text{l}$ /ウェル)用に、二重のウェルを使用する。試験は、二重又は三重にて行う。無菌の全長mAbタンパク質を、アッセイ培地中 $24\text{ }\mu\text{g/ml}$ の最高濃度に希釈する。系列希釈(通常、1:5)を別々のアッセイプレートで作製して、様々な希釈率のFab試料 $50\text{ }\mu\text{l}$ を、IL-17を含むウェルに添加し、その後37で1時間インキュベートする。アッセイ培地単独を、陰性対照として用いる。

#### 【0157】

HS27細胞( $100\text{ }\mu\text{l}$ アッセイ培地中、通常、約20,000個の細胞)を、Fa

10

20

30

40

50

b + IL - 17 (又は対照)を含むプレートの各ウェルに加え、37 で約48時間インキュベートする。次いで、500x重力で5分間、96穴プレートを遠心分離した後、培地上清を集め、アッセイ培地にて1:15又は1:10に希釈する。市販のELISAキット(R&D Systems、ELISA D-8000C又はR&D DuoSet ELISA #DY208hIL-8)を使用し、アッセイ培地を標準希釈液に置換して、更に基質容量を100µl/ウェルとしたことを除いては製造業者の説明書に従い、上清のIL-8量の定量によってIL-17中和のレベルを測定する。ELISA測定(450nm)は、マイクロプレートリーダーで行う。標準的な統計技術を用いて校正曲線から定量するIL-8値(pg/ml)での4-パラメーターロジスティック適合を使用して、校正曲線を得る。IC<sub>50</sub>値は、標準的な統計技術を使用して得る。

10

#### 【0158】

IgG<sub>4</sub>Fc領域を備えた本発明の全長mAb103、104、121及び126は、記載のアッセイで試験する場合(2~4の複製)、365から618pMの間の全測定範囲で、450と500pMの間の平均IC<sub>50</sub>(各mAbに対し150kDの推定分子量に基づく)を有する。

#### 【0159】

##### 実施例6B インビトロGRO レポーターアッセイ

本発明の抗体がIL-17生物活性を中和又は拮抗する能力を試験するために、以下の細胞ベースのアッセイを利用できる。

IL-17は、上皮細胞及び他の細胞を刺激して、GRO を分泌させることができる。本発明の抗体が、ヒト結腸直腸腺癌上皮細胞系HT-29からの、IL-17で誘導されるGRO 分泌を中和する能力を、このアッセイで試験する。

20

#### 【0160】

HT-29細胞からのGRO 分泌をヒトIL-17が用量依存的に誘導したか否かを試験するために、組換えIL-17(R&D Systems #317-IL-050/CF; Ca<sup>2+</sup>及びMg<sup>2+</sup>不含の無菌ダルベッコPBS(D-PBS)で再構成)を、アッセイ/培養培地(McCoy's 5A(Invitrogen); 10%FBS(Invitrogen); ペニシリンG(100U/500ml); 及びストレプトマイシン(100µg/500ml))で、4.5µg/ml(3X最高試験濃度)に希釈する。IL-17は、連続的に(1:5)アッセイ培地で更に希釈する。様々な濃度(0.096ng/ml~1,500ng/ml; 3.0pM~46,875pM)のIL-17を、組織培養処理した96穴プレートの内側ウェルに、50µlずつ分配する。アッセイ培地(50µl)を、「培地単独」の処理用の3つのウェルに分配する。試験は、三重(一処理につき3つのウェル)で行う。アッセイ培地にIL-17を含むプレートを、HT-29細胞を添加する前に37 で5%CO<sub>2</sub>にて約60~90分間インキュベートする。

30

#### 【0161】

本発明の抗体(例えば、IgG<sub>4</sub>Fc領域を有するmAb126)の評価のために、HT-29細胞からの最高のGRO 分泌の約70%をもたらしたIL-17の濃度(60ng/ml)を用いる。組換えヒトIL-17(R&D Systems)は、アッセイ/培養培地で240ng/ml(4X作用濃度)に希釈する。希釈したIL-17は、組織培養処理した96穴プレート(Becton Dickinson Falcon #35-3072)の、60の別々の内側ウェルに、50µlずつ分配する。アッセイ培地(50µl)を、「培地単独」の処理用の3つのウェルに分配する。

40

#### 【0162】

本発明の被検抗体の用量範囲は、通常2.56~40,000pMである。別々の希釈プレートで、本発明の抗体及び対照抗体(無菌、1XPBS(pH7.4)中)を、アッセイ培地で160,000pMまで希釈する。本発明の抗体及び対照抗体は、連続的に(1:5)アッセイ培地で更に希釈する。

次いで、各試験濃度の本発明の被検抗体を、IL-17を含むウェルに50µl添加する

50

。試験は通常、三重で行う。アッセイ培地単独（50  $\mu$ l）を「培地単独」及び「IL - 17単独」の対照用使用する。IL - 17と本発明の抗体との混合液を含むプレートと、HT - 29細胞を添加する前に、37、5%CO<sub>2</sub>で60～90分間インキュベートする。

#### 【0163】

HT - 29細胞（ヒト結腸直腸腺癌上皮細胞、ATCC #HTB - 38）は、組織培養処理したフラスコにて培養/アッセイ培地中で標準的な技術を使用して維持する。HT - 29細胞は、アッセイの日に約50～80%の集密度になるまで、組織培養フラスコで生育する。アッセイの日に、細胞をHBSS（Cambrex #CC - 5024）で濯ぎ、トリプシン+EDTAでフラスコから剥離させる。トリプシンは、完全なアッセイ培地地で不活性化する。HT - 29細胞は次いで、室温にて500Xgで5分間遠心分離する。細胞ペレットはその後、アッセイ培地に再懸濁させ、20,000のHT - 29細胞（100  $\mu$ l中）を96穴プレートの各処理ウェルに加える。等容量のD - PBSを、蒸発に起因するエッジ効果を低減するために、未使用の縁部ウェル（細胞なし）の各々に添加する。96穴プレートは、組織培養恒温器（37、5%CO<sub>2</sub>）に約48時間入れた。

#### 【0164】

アッセイ終了時に、プレートを遠心分離（500Xgで室温にて5分間）し、細胞培地をポリプロピレン96穴プレートに移す。GRO レベルは、標準希釈剤としてアッセイ培地を使用すること、BioFX Labsからの1XELISA洗浄用緩衝液を使用すること、ウェル当たり50  $\mu$ lの容量の試料及び標準液を使用すること、BioFX Labsからの基質（HRP基質、#TMBW - 1000 - 01）を使用すること、並びにBioFX Labsからの停止液（#LSTP - 1000 - 01、ウェル当たり100  $\mu$ l）を使用することを除いては製造業者の説明書に従って、GRO サンドイッチELISA（R+D Systems DuoSet #DY275）によって測定する。ELISA反応の終了時に、プレートをマイクロプレートリーダーで450nmにて読み取る。GRO に対する校正曲線は、4 - パラメーターロジスティック適合を実行することによって得る。試料に対するGRO 値（pg/mlの濃度）は、校正曲線から得る。IL - 17で刺激した場合、ヒト結腸直腸腺癌上皮細胞系HT - 29は、用量依存的にGRO を分泌した（表5）。対照ヒトIgG4は、IL - 17で誘導されるGRO 分泌の減少を引き起こさなかった。これらの結果（表6）は、前記条件を用いて、インビトロでHT - 29細胞から、ヒトIL - 17で誘導されるGRO 分泌をmAb126が完全に中和できることを立証している。このアッセイでのmAb126に対するIC<sub>50</sub>値は、約560pMである。

#### 【0165】

表5

#### 【表7】

ヒトIL-17(ng/ml)	平均GRO $\alpha$ (pg/ml)	標準偏差
1,500.00	2,420.4	311.8
300.00	2,047.5	509.9
60.00	1,556.0	209.0
12.00	960.0	24.9
2.40	502.5	12.3
0.48	297.9	6.3
0.10	205.8	4.8
0	149.2	16.7

略語：AVG＝平均；STDEV＝標準偏差

#### 【0166】

表6

【表 8】

抗体濃度、pM	mAb 126		IgG <sub>4</sub> 陰性対照	
	平均GRO $\alpha$ 、pg/ml	標準偏差	平均GRO $\alpha$ 、pg/ml	標準偏差
40,000.0	123.8	1.4	1,297.3	29.4
8,000.0	134.1	6.4	1,419.9	133.4
1,600.0	151.3	9.5	1,370.4	114.7
320.0	1,170.6	56.0	1,388.6	54.1
64.0	1,340.8	59.1	1,380.4	36.0
12.8	1,362.0	21.1	1,346.2	81.6
2.56	1,280.9	56.1	1,243.4	118.3
0(IL-17単独)	1,201.4	66.1		
培地単独	117.2	10.0		

10

略語：c o n c. =濃度；A V G =平均；S T D E V =標準偏差

## 【0167】

## 実施例7 h I L - 17インビボでの中和

ヒトIL-17は、マウスIL-17受容体に結合して刺激することができ、マウスKC(CXC1)ケモカインの上昇とこれに続く分泌を導く。時間及び用量レンジング実験を行なって、マウスKCの誘導に至適なヒトIL-17の用量及び至適な時間を同定する。これらの実験で、150 $\mu$ g/kgのヒトIL-17の用量、及びIL-17投与後2時間の時間が、マウス血清で最高レベルのKCを与えることが示される。ヒトIL-17の皮下注射の1時間前に、本発明の全長抗体(例えば、ヒトIgG<sub>4</sub>Fc、配列番号：260[又は配列番号：278]に作動可能に連結されたHCVR、及びヒト定常領域、配列番号：263[又は配列番号：277]に作動可能に連結されたLCVRを有する、Fab126又はFab121)を、1、10、100及び1000 $\mu$ g/kgでマウスに静脈内投与する。ヒトIL-17投与後2時間でマウスを屠殺し、KCレベルを、市販のキット(KC Quantikine、R&D)を使用し、製造業者の説明書に従ってELISAによって定量する。アイソタイプが一致する抗体を、陰性対照として使用する。前記抗体は、ヒトIL-17がマウスIL-17受容体を刺激する能力を阻止し、用量依存的にマウスKCの上昇の阻害を導く。Mab126(Fab126を含む完全長抗体)は、前記条件下に20 $\mu$ g/マウスの用量で、効果を有しなかった対照抗体と比較して約4倍、平均KCレベルを低下させる。Mab121は、前記条件下に20 $\mu$ g/マウスの用量で、対照抗体と比較して約3倍、平均KCレベルを低下させる。

20

30

## 【0168】

## 実施例8 エピトープマッピング

マウス親Fab(2321、配列番号：261及び262)のヒト化及び最適化が、当該親のヒト化及び最適化に起因してFabのエピトープ結合能を変化させないことを確認すべく、抗IL-17抗体のうちの2つ(Fab126及びFab104)を用いる。ヒト化し、最適化したFabは、標準的な競合ELISAによって、又はエピトープマッピングのためのH-D交換及び質量スペクトル分析(例えば、Hoofnagle, A. et al., Methods Mol. Biol. 250:283-298, 2004; Hoofnagle, A. et al., Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 32:1-25, 2003; Baerga-Ortiz, A. et al., Protein Sci. 11:1300-8, 2002参照)によって調べた場合に、マウス親Fabと同じエピトープに結合するので、同じ親Fabに由来する本発明のFab1~132は、同じエピトープに結合することが予測されよう。

40

## 【0169】

エピトープをマッピングするのにH-D交換及び質量スペクトルアッセイ(H/DXMS)を使用して、ヒトIL-17(配列番号：1)の80から89の間のアミノ酸[AD

50

G N V D Y H M N (配列番号：275) ] が、本発明の抗体が結合する不連続なエピトープの中に含まれることが確認される。D G N V D Y H (配列番号：276) は、異なる種類の I L - 17 の配列の変動と結合能力の比較に基づき、本発明の抗体が結合する不連続なエピトープの中に含まれる必須配列である。配列番号：276 のアミノ酸配列を、I L - 17 配列全体に照らして変化させることで、変化した I L - 17 への本発明の抗体による検出可能な結合が起こらなくなる。本発明の抗体は、対照抗体を上回るレベルで、ラット又はマウス I L - 17 に結合することはない。

#### 【0170】

H / D X M S アッセイを用いて、本発明の抗体が結合する I L - 17 の領域を同定する。アミド水素交換の速度は、アミド水素の溶媒接触性及び構造に依存する。水中で遊離の I L - 17 又は I L - 17 : 抗体複合体を重水 ( $D_2O$ ) と混合し、重水素によるアミドプロトンの交換を許容する。タンパク質結合に関与する骨格アミド基は、交換から保護され、プロトン化されたままである。これらの領域は、その後、LC 及びエレクトロスプレーイオン化質量分析を組み合わせて、消化的タンパク分解によって同定する。C 末端 H i s 及び F l a g タグを含むヒト I L - 17 (I L - 17 - F l i s) を発現させ、G S - C H O 細胞から I M A C カラムを用いて精製する。I L - 17 - F l i s 溶液の  $10 \mu g$  分割量の 2 つ ( $7.7 \mu l$ ) を 2 M i c r o c o n に移し、m A b 104 又は m A b 126 のいずれか  $100 \mu g$  (I L - 17 / m A b = 1 / 2 のモル比) を M i c r o c o n に加える。I L - 17 - F l i s 溶液の  $20 \mu g$  を別の M i c r o c o n に移し、これには抗体を添加しない。その後、 $1 \times P B S$  緩衝液を、 $\sim 180 \mu l$  の最終容量まで各々の M i c r o c o n に加え、 $14,000 g$  で 14 分間遠心分離する。その後、 $150 ml$  の  $1 \times P B S$  緩衝液を各々の M i c r o c o n に加え、 $14,000 g$  で 14 分間遠心分離する。これらの工程は、遊離抗原及び抗原：抗体複合体が同一の緩衝条件にあることを確実にするのに必要である。

#### 【0171】

タンパク質部分を集め、最終容量を  $1 \times P B S$  で  $50 \mu l$  (複合体) 又は  $80 \mu l$  (I L - 17 - F l i s のみ) に調整する。 $6 \mu l$  の I L - 17 - F l i s、又は I L - 17 - F l i s と m A b の複合体を、マイクロプラスチックバイアルに移し、 $14 \mu l$  の  $100\% D_2O$  をそれに加える。この結果、試料中の  $D_2O$  は  $70\%$  になる。溶液を、外界温度で 10 分間インキュベートする。交換を直ちにクエンチし、 $20 \mu l$  の  $1\%$  ギ酸溶液及び  $2 \mu l$  の  $2 mg/ml$  のペプシン溶液を添加することにより消化して、外界温度で 30 秒間、又は 0 で 10 分間インキュベートする。消化物は、手動でカラムへ直ちに注入する。W a t e r s 2795 H P L C 及び M i c r o m a s s L T C P r e m i e r をすべてのアッセイに用いる。以下の設定 (カラム温度：0 ; 移動相 C : H  $2O$  中  $0.15\%$  ギ酸、D : A C N 中  $0.12\%$  ギ酸 ; 実行時間：23 分) の下で実行する Z o r b a x C 18 カラム ( $2.1 \times 50 mm$ ) に、手動インジェクタ、そして金属管 (約  $1 ml$ ) に、H P L C ポンプからの H P L C 流を接続する。カラムは、 $0.2 ml/分$  の流速で、 $98\%$  の A ( $0.15\%$  ギ酸水溶液) 及び  $2\%$  の B (アセトニトリル中  $0.12\%$  ギ酸) で平衡化する。勾配溶出は、 $0.5$  分かけて  $2\%$  から  $10\%$  の B まで、その後、 $14.5$  分かけて  $40\%$  の B まで、次いで  $1$  分かけて  $90\%$  の B まで実施して 2 分間保持し、その後  $1$  分かけて  $2\%$  の B に戻す。H P L C からの試料は、以下の設定 (イオンモード：ポジティブ ; 質量走査範囲： $300 \sim 2000$  ; 試料コーン電圧：80 ; 脱溶媒化ガス流 (L / 時間) :  $700$  ; 脱溶媒化温度： $300$  ) で作動する質量分析計によって分析する。金属管、インジェクター及びカラムは、アッセイの間中、氷水に沈めておく。I L - 17 の各消化ペプチドの質量スペクトルは、試験される抗 I L - 17 m A b の存在下又は非存在下での H / D 交換の後に得られる。小ペプチドについては、各ペプチドの平均質量は、その同位体イオン及び強度に基づいて算出する。大ペプチドについては、平均質量は、内部校正の後、逆重畳積分した質量スペクトルから得られる。

#### 【0172】

抗体が I L - 17 と複合体を形成すると、I L - 17 の結合領域 (エピトープ) は溶媒

10

20

30

40

50

から保護される。これにより、IL-17単独の場合と比較して、より遅いアミド水素交換速度がもたらされる。重水素交換後に遊離のものからのペプチドと、複合体からのペプチドとの質量の比較によると、複合体形成により保護されるペプチドは、遊離IL-17の対応するペプチドと異なるはずである。下記の表7に、IL-17の消化ペプチドに対するH/DXMSによって得られる質量の差を列挙する。これらの消化ペプチドは、IL-17-Flisの配列全体をカバーする。表のデータが立証するとおり、複合体とそれ自体との間のIL-17-Flisペプチドの質量差は、試験した両抗体で類似しており、すなわち、それらは同じエピトープに結合する。主たる質量差は、消化ペプチド24-87+117-133（すなわち、IL-17のアミノ酸24～87と117～133）、及び66-87+117-134に認められるが、これら2つのペプチドはジスルフィド結合で接続されており、これらの領域内の残基が結合に関係していることを示唆している。それらの消化ペプチドはかなり大きいので、他の酵素消化が、結合に関係する特異的なアミノ酸残基を絞るのに必要である。このデータに加えて、本発明の抗体は、IL-17ファミリーの他のメンバー（IL-17B、C、D、E及びF）に結合せず、それらはマウス又はラットIL-17にも結合しない。配列比較及びIL-17相同構造モデルの検査と共に、これらのデータは、本発明の抗体が結合するIL-17の非線形エピトープの中に残基80～89が含まれていることを示唆する。

【0173】

表7

【表9】

消化ペプチド	IL-17-Flis +mAb 104		IL-17-Flis+ mAb 126	
	平均(n=3)	SD	平均(n=3)	SD
1-23+98-116	-0.36	0.61	-0.78	0.59
24-43	-0.79	0.13	-0.44	0.65
27-42	-0.56	0.17	-0.56	0.38
24-65	-1.32	0.54	-1.17	0.19
54 to 65	-0.17	0.37	-0.53	0.25
24-87+117-133	-3.60	0.38	-4.09	0.29
66-87+117-134*	-1.94		-2.38	
88-97	-0.30	0.08	-0.29	0.14
111-116	-0.08	0.07	-0.17	0.08
135-151	-0.14	0.03	-0.12	0.12

注記：デルタ質量は、IL-17-Flisの消化ペプチド平均質量をIL-17-Flis及び抗体複合体の対応するペプチド平均質量だけから減算することによって得られる。\*このデータは、0で10分の消化からのものである（n=1）。その他はすべて、外界での0.5分間の消化からのものである。

【0174】

実施例9 癌組織でのIL-17発現

様々なヒト非癌性及び癌性細胞可溶化物を、IL-17タンパク質の存在について試験する。組織（約50～100mg断片）を、ドライアイスで急速凍結し、氷上で解凍し、セラミック溶解ビーズを含む管（Qbiogene #6913-050；2.0mlの管に、1.4mmのセラミックビーズ）に含まれる、プロテアーゼ阻害剤（Pierce #78410）及びホスファターゼ阻害剤を含有する350μlのTPER緩衝液（Pierce #78510）にて溶解する。管は、5～10分間氷上に置き、その後4で10分間、13,000×重力にて遠心分離し、新しい管へ材料を移して壊死組織片を除去する。前記のとおり再度遠心分離して、新しい管に移す。タンパク質濃度は、標準BSA法を使用して定量する。試料は、市販のIL-17 ELISAキット（R&D #DY317、BioFX Labsからの洗浄用緩衝液、基質溶液及び停止液を使用）を用い、製造業者の説明書に従って分析する。IL-17レベルは、総タンパク濃度に標

準化する。IL-17レベルは、正常の結腸組織（63の試料を試験）と比較して、癌性結腸組織（60の試料を試験）で2倍から3倍の間で増加している。IL-17レベルは、正常の腎組織（21の試料を試験）と比較して、癌性腎組織（21の試料を試験）で平均3～4倍増加している。癌性前立腺組織（44の試料を試験）のIL-17レベルは、正常の前立腺組織（7の試料を試験）と比較して増加している。IL-17レベルは、乳房、頸部、肺、喉頭、甲状腺、舌、卵巣及び脳を含め、試験した他の型の腫瘍組織では上昇していなかった。

#### 【0175】

実施例10 ミクログリア細胞のIL-17活性化

IL-17は、マウス脳ミクログリア細胞系（BV-2）を誘導して、IFN及びIL-12p70を分泌させる。BV-2マウスミクログリア細胞系[最初にそれらを単離した(E. Blasi et al., J. Immunology, 1990, 27: 229-237)、Elisabetta Blasi (Microbiology University of Perugia, Italy)からの許可を得、Sciosから入手]を、2mM L-グルタミン(Invitrogen/GIBCO #25030-081)、10% FBS(熱不活性化; Invitrogen/GIBCO #10082-147)、1mMピルビン酸ナトリウム(Invitrogen/GIBCO #11360-070)、100µg/ml Normocin(InvivoGen)を含む高グルコースDMEM(Invitrogen #31053-028)中で60%以下の集密度まで、ポリ-D-リジンが被覆された組織培養フラスコにて37、5%CO<sub>2</sub>で培養する。

#### 【0176】

アッセイの第0日に、BV-2細胞を濯ぎ(Ca<sup>2+</sup>及びMg<sup>2+</sup>不含のダルベッコPBS; Invitrogen)、剥離し(0.25%トリプシン+EDTA)、次いでトリプシンを失活させた後遠心分離する(室温で500Xg、5分)。この結果得られる細胞ペレットを、~7,000細胞数/100µl培地の細胞密度に再懸濁させる。100µlの細胞懸濁液を、ポリ-D-リジンが被覆された組織培養処理した96穴プレートの、60の別々の内側ウェルに分配する。記載のとおり、IL-17で処理する前に約48時間、プレートをインキュベートしておく。

#### 【0177】

アッセイ第2日に、Ca<sup>2+</sup>及びMg<sup>2+</sup>を含まない無菌のダルベッコPBSで再構成した組換えマウスIL-17(mIL-17)(無担体; R&D Systems)を、ポリプロピレンプレートにて培地で1.5µg/ml(最高試験濃度)に希釈する。マウスIL-17は、ポリプロピレンプレートにて更に連続的に希釈する。正の対照は、培地で1µg/ml(最高試験濃度)に希釈したLPSである。アッセイ培地を、陰性対照として用いる。培地は、処理液(150µl/ウェル)を添加する前に、細胞から穏やかに吸引する。試験は三重に(一処理当たり3つのウェル)行う。別々の複製プレートを、37、5%CO<sub>2</sub>で、24時間又は48時間のいずれかの時間インキュベートする。

#### 【0178】

アッセイの第3日及び第4日にプレートを遠心分離し(室温、500Xgで5分)、次いで細胞培養培地を、ポリプロピレン96穴プレートに移し、これを封止して凍結する(-80)。培地試料を解凍し、マウス22-plex多重化キット(Linco)を用い、キットに含まれるフィルタープレートを黒壁ポリカーボネートフィルタープレート(Millipore)に換えること以外は製造業者の説明書に従って、サイトカイン及びケモカインレベルをアッセイする。蛍光を、Luminex(登録商標)器具(ビーズセット当たり50ビーズ、低RP1ゲイン設定)で読み取る。データを以下の表8に示す。

#### 【0179】

標準曲線は、4-又は5-パラメーターロジスティック適合を使用して得る。IFN及びIL-12p70値(pg/ml)は、標準的な統計技術を使用し、標準曲線から決定する。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 8 0 】

表 8

I L - 1 7 での処理後 2 4 時間

【 表 1 0 】

mIL-17の濃度、 $\mu$ g/ml	平均IFN $\gamma$ 、pg/ml	平均IL-12p70、pg/ml
1.5	125.87	65.58
0.375	123.89	59.63
0.0938	125.61	67.87
0.0059	58.91	38.12
0.0015	18.78	12.34
培地のみ、対照	検出限界未満	検出限界未満
LPS、1 $\mu$ g/ml	5.11	51.11
LPS、0.25 $\mu$ g/ml	5.07	49.00

10

## 【 0 1 8 1 】

I L - 1 7 での処理後 4 8 時間

【 表 1 1 】

mIL-17の濃度、 $\mu$ g/ml	平均IFN $\gamma$ 、pg/ml	平均IL-12p70、pg/ml
1.5	134.38	61.48
0.375	124.99	58.65
0.0938	119.96	58.15
0.0059	47.07	27.87
0.0015	13.97	9.44
培地のみ、対照	検出限界未満	検出限界未満
LPS、1 $\mu$ g/ml	5.20	46.37
LPS、0.25 $\mu$ g/ml	4.30	36.36

20

## 【 0 1 8 2 】

## 実施例 1 1 過敏性腸症候群の D S S 誘導モデル

I B D は、クローン病及び潰瘍性大腸炎を含む慢性の炎症性疾患である。潰瘍性大腸炎及びクローン病患者からの血清や結腸組織で、I L - 1 7 タンパク質レベルは有意に上昇する。しかし、I L - 1 7 は、正常個体、又は感染性大腸炎若しくは虚血性大腸炎の患者からの血清では検出できない。D S S (デキストラン硫酸ナトリウム)モデルは、過敏性腸疾患 (I B D) の最も古いく最も代表的な臨床前モデルの 1 つである。D S S モデル (F A S E B J o u r n a l . 2 0 0 4 ; 1 8 : 1 5 5 0 - 1 5 5 2 参照) では、急性及び慢性双方の炎症性病変が誘発される。マウスは、体重低下及び結腸長短縮を伴う病変の高度な均一性を有する。個々のマウス間で、時間経過及び重症度に関して再現性がある。疾患を誘導するために、マウスに飲料水中 5 % D S S ( 3 0 ~ 4 0 K d ) を 7 日間与える。潜血陽性又は直腸出血、軟便及び体重低下 ( 5 ~ 8 % ) を含む疾患活動係数 ( D A I ) を、第 8 日頃に観察する。マウスの体重は、2 週間、毎日モニターする。マウスは、第 1 2 日 ~ 1 5 日頃に屠殺する。I L - 1 7 タンパク質は、未処置の結腸に対し D S S 処置した結腸で有意に増加する。I L - 1 7 抗体での処置は、疾患活動係数を低減し得る。

30

40

## 【 0 1 8 3 】

## 実施例 1 2 多発性硬化症に対する E A E モデル

E A E は、ヒトの M S に対するモデルとして役立つ中枢神経系 ( C N S ) の C D 4 + T 細胞媒介脱髄性疾患である。E A E 発症の病原機序には、抗原特異的 T 細胞活性化及び T h 1 分化とそれに続く C N S への T 細胞及びマクロファージ浸潤が関わる。I L - 1 7 は

50

、多発性硬化症 (MS) の病理に關与する。ヒト患者のMS病巣のマイクロアレイ分析で、IL - 17 の増加が立証されている (Lock, et al. Nat. Med. 8 : 500 - 508, 2002)。血液及び脳脊髄液中の、IL - 17 mRNA を発現している単核細胞 (MNC) は、MS患者でその数が有意に上昇し、またMSの臨床的緩解の間に比べて悪化の間の方が、IL - 17 mRNA を発現している血液MNCが多数検出された (Matusevicius, et al. Multiple Sclerosis. 5 : 1 - 1 - 104, 1999)。EAEは、IL - 17 ノックアウトマウスで有意に抑制される (Nakae et al., J. Immun. 171 : 6173 - 6177)。  
【0184】

本願明細書の実施例は、IL - 17 タンパク質がEAEマウスの脊髄で増加すること、そして抗マウスIL - 17 抗体での処置が活性EAEモデルでのEAEスコアを低減することを立証する。疾患誘導のために、8 ~ 9 週齡の雌性C57BL/6マウスを、(i) 200 µl の5 mg / ml 百日咳毒素 (PT) 及び完全フロインドアジュバント (CFA)、又は(ii) PT、CFA 及び300 µg / 200 µl のMOG35 - 55 (5 mg / ml の熱失活結核菌を含有する、CFA中に乳化したミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質) のいずれかで、第0日に皮下に免疫化する。第2日に、マウスを再度、PTで処置する。マウスは、麻痺のレベルにつき研究の間中評点する。MOGを与えている群で、疾患が予想される。ラット抗マウスIL - 17 単クローンIgG<sub>1</sub> 抗体又はアイソタイプ対照抗体は、第1、7 及び15日にマウスに投与する (ラット抗マウスIL - 17 抗体については、BD Biosciences)。臨床スコアが、0 ~ 4 の4段階評価で1 ~ 3に達すると、MOGを与えているマウスは屠殺するが、これは、下記の表9の研究1の場合第14 ~ 31日の間、また下記の表10の研究2の場合第14 ~ 16日の間である。疾患の臨床徴候は、第10日頃に現れる。個々の動物を、少なくとも2名の採点者が、独立して主観的に評点し、臨床的なCNS疾患重症度に従い処置群の同一性について盲検化する。グレード0は、正常である；  
グレード1では、尾部が完全に柔弱になっている；  
グレード2では、片側の後肢が部分的に虚弱である；  
グレード3では、後肢が完全に麻痺している；そして、  
グレード4は、瀕死である。(J. Exp. Med. 194 : 873 - 881, 2001 参照)。対照マウスは、MOG処置マウスと同じ日に屠殺する。脊髄を屠殺時に単離し、ELISAによるIL - 17 タンパク質分析に使用すべく瞬間冷凍する。IL - 17 抗体処置群は、アイソタイプ対照群と比較して、疾患スコアが有意に低い。

【0185】

各脊髄全体の溶解液を、セラミックビーズ (溶解マトリックスD、QBiogene #6913050) を含む2 ml のチューブとFast Prep 器具 (Bio101) にて、5.5のスケールで30秒間、完全プロテアーゼ阻害剤 (Roche Applied Science #11697498) を用い、1 ml (下記表9の研究1) 又は0.4 ml (下記表7の研究2) のTPERタンパク質抽出試薬 (Pierce #78510) で作製する。溶解後に、試料は遠心分離 (微量遠心管で14,000 rpm、5分) して壊死組織片を除去する。上清は、新しい微量遠心管に移す。各溶解液の総タンパク濃度を、製造業者のマイクロプレートプロトコルを使用し、BCAタンパク質アッセイキット (Pierce #23225) を用いて定量する。溶解液は、凍結して - 80 で保存する。

【0186】

氷上で溶解液を解凍し、遠心分離によって明澄化した後、製造業者の説明書に従いELISA (R&D Quantikine #M1700) によって、原液試料中のマウスIL - 17 レベルを測定する。標準曲線は、4 - パラメーターロジスティック適合を使用して得る。IL - 17 値は、標準的な統計技術を使用して、標準曲線から求める。IL - 17 レベルは、各試料のタンパク質濃度に標準化し、下記の表9及び10の各溶解液のIL - 17 / ml 総タンパク質 (pg) として表す。表のデータによって示されるとおり、

IL-17のレベルの増加がEAEマウスで検出された。

【0187】

表9

研究1

【表12】

群	mIL-17値の 範囲、pg/mg	平均mIL-17、 pg/mg (+/- SE)	屠殺時の臨床 スコアの範囲	屠殺時の平均 臨床スコア (+/- SE)
未処置(n=7)	3.63 - 10.06	5.19 +/- 0.87	N/A	N/A
CFA(n=14)	3.16 - 7.51	4.31 +/- 0.33	N/A	N/A
CFA+MOG(n=14)	4.12 - 16.62	8.57 +/- 1.01	0.9 - 3.0	1.74 +/- 0.20

10

すべてのIL-17 ELISA値は、ELISAの検出範囲内にあった。二重実験の平均

【0188】

表10

研究2

【表13】

群	mIL-17値の 範囲、pg/mg	平均mIL-17、pg/mg (+/- SE)	屠殺時の臨床 スコアの範囲	屠殺時の平均 臨床スコア (+/- SE)
CFA(n=6)	1.88 - 2.78	2.24 +/- 0.14	N/A	N/A
CFA+MOG(n=8)	1.78 - 5.42	3.34 +/- 0.45	2.75 - 3.20	2.94 +/- 0.06

20

すべてのIL-17 ELISA値は、ELISAの検出範囲内にあった。二重実験の平均

【0189】

実施例13 コラーゲンで誘発した関節炎モデル

コラーゲンで誘発した関節炎(CIA)は、慢性関節リウマチ(「RA」)の広く使用されている齧歯類モデルであり、ヒトのRAと共通の組織病理学的特徴を有する。実験的な関節炎は、II型コラーゲンのエマルジョンでの免疫化及び追加免疫によってDBA/1マウスで誘発されるが、小関節の炎症並びに軟骨及び骨の進行性浸食によって特徴付けられる多発関節炎疾患である(Trentham, D, et al, J. Exp. Med. 146: 857-858, 1977)。近年、Lubberts, et al (Arthritis & Rheumatism, 50: 650-659, 2004; 本願明細書で援用)は、多クローンウサギ抗マウスIL-17抗体を、マウスCIAの発症時又は後期のいずれかに投与すると関節炎の臨床徴候が寛解することを証明した。

30

【0190】

CIAモデルで、腹腔内にラット抗マウスIL-17 IgG2a mAbの単回注射(8mg/kg、R&D、MAB421クローン50104.11)をしたマウスは、16mg/kgの対照ラットIgG2aを注射したマウスよりも有意に低い臨床スコアを示す。急性期反応物であるC反応性タンパク質(CRP)は、RA患者の疾患活動性の認容された指標である。CRPと同様に、マウスネ血清アミロイドタンパク質(SAP)は、マウスCIAモデルでの疾患の指標として役立つ(Bliven, M., et al, Arthritis & Rheumatism, 29: 1131-1138, 1986)。8mg/kgの抗マウスIL-17で処置した動物では、SAPレベルが、対照抗体で処置したものより有意に低かった。更に、臨床スコア及びSAP値の減少は、正の対照として使用する抗マウスIL-17群(8mg/kg)と同等である。最後に、対照抗体で処置したマウスの場合と比較して、8mg/kg抗体での滑液炎症及び16mg/kg抗体での骨再吸収の有意な減少が見られる。用量応答研究は、抗マウスIL-17抗体(例

40

50

えば、0.1、1及び8mg/kg)でCIAモデルにて行ってもよい。ラット抗マウスIL-17に対する臨床スコアは、用量応答性の傾向を示す。類似のアッセイを、本発明の抗体を使用し、RAのモデルとして、カニクイザルで実施してもよい。

#### 【0191】

##### 実施例14 抗IL-17 mAb精製

本発明のmAbを発現するベクターを、標準的な手順を用いて適切な宿主細胞(例えば、CHO DG44(dhfr-)細胞(Chasin)又はNSO細胞)に安定的に組み込み、Protein Aアフィニティーカラムを使用して精製する。簡単に説明すると、明澄化した馴化培地を、PBS(pH7.4)で平衡化したおいた5mlのHiTrap Protein AセファローズFFカラム(Amersham Biosciences)に付す。カラムは、非特異的結合成分を洗い落とすために、110cm/時の流速で、5倍カラム容量の平衡化緩衝液で洗浄する。結合した抗体は、直線pH勾配(0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.8から0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液、pH2.5まで)を使用して溶出する。溶出での主要なタンパク質ピークを集めて、そのpHを1Mトリス緩衝液(pH8.5)で中性に調整する。タンパク質プールを、10K Vivaspinn膜(Vivasciences)を使用して1~2mg/mlに濃縮し、無菌濾過(0.45µm)して、その後4℃で貯蔵する。

#### 【0192】

本発明のmAbの大量調製のために、無細胞濃縮物を、3つの連続クロマトグラフィーカラム(プロテインA、陰イオン交換、及び疎水性相互作用クロマトグラフィー)を通して精製する。これらのクロマトグラフィー工程後のmAbの純度は、サイズ排除分析クロマトグラフィーによって評価すると99%を上回る。抗体の濃度に依存して、以下に列举するとおりmAbを緩衝液内に交換する。化学的安定性の結果は、6.0と7.0の間(包含)が好ましいpHであることを示すが、20mg/ml調製物では、pHは5.5と7.0の間(例えば、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、又は7.0を包含)でもよい。凍結乾燥品については、90~30mM(90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35若しくは30mM、又は30mMと90mMの間のあらゆる値)の塩化ナトリウムレベルが好ましいが、液体製剤(例えば、皮下に投与するもの)については、100~150mM(100、110、120、130、140、若しくは150mM、又は100mMと150mMの間のあらゆる値)の塩化ナトリウムレベルが好ましい。生成品は次いで、約10、20又は25mg/ml(あるいは、さらに高く、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150mg/ml以上)の終濃度に濃縮して無菌濾過する。濾過した生成品は、直ちに-70℃で凍結しても、又は凍結乾燥してもよい。安定な凍結乾燥製剤では、溶解保護剤(例えばスクロース又はトレハロース)に対する抗体の重量比を最低1:2とすることが必要であるが、液体製剤では、これが必要とされるわけではない。加えて、0.02%(重量/容量)界面活性剤、すなわち、ポリソルベート-80を、液体製剤、及び凍結乾燥する溶液の双方に添加する。凍結乾燥した材料は、投与前に、注射用無菌水又は無菌の0.9%塩化ナトリウムに再懸濁する。

#### 【0193】

表11

【表 1 4】

mAb 濃度	緩衝液	pH	NaCl (mM)
10mg/ml	10 mM クエン酸 (Na)	6.0	30、50-150
20mg/ml	10 mM クエン酸塩	5.5	50-150
20mg/ml	10 mM クエン酸塩	6.0	50-150
20mg/ml	10 mM クエン酸塩	6.5	50-150
20mg/ml	10 mM クエン酸塩	7.0	50-150
20mg/ml	10 mM ヒスチジン	6.5	150
>50mg/ml	10 mM クエン酸塩	5.5	50-150
>50mg/ml	10 mM クエン酸塩	6.0	50-150
>50mg/ml	10 mM クエン酸塩	6.5	50-150
>50mg/ml	10 mM ヒスチジン	6.5	150

10

## 【0194】

## 実施例 15 抗体のインビボ半減期

本発明の抗体（例えば、mAb 126 及び 121 [それぞれ Fab 126 又は 121 を有する IgG4Fc 領域]）の血清薬物動態を、雄性カニクザルの静脈内又は皮下投与後に調べる。血清の抗体濃度は、プレートにヒト IL-17 で被覆し、結合した血清抗体を抗 IgG<sub>4</sub> 二次抗体を使用して検出する、標準的な抗原捕獲 ELISA アッセイを用いて定量する。1 mg/kg を静脈内投与した後、mAb 126 は 6.5 日の平均半減期で除去され、mAb 121 は約 11 日の平均半減期で除去される。1 mg/kg の皮下投与後に、mAb 126 の平均除去半減期は 10.3 日であり、mAb 121 の平均除去半減期は 13 日である。

20

## 【0195】

## 実施例 16 腫瘍異種移植片モデル

本発明の抗 IL-17 抗体の抗腫瘍活性を試験する腫瘍異種移植片モデルを確立するために、500 万個の HCT 116 結腸直腸癌細胞をマトリゲルと混合し、56 週齢の雌性無胸腺 (nu/nu) マウス (Charles River laboratories, Wilmington, MA) の左横腹に皮下注射する。マウスは、対照抗体（例えば、ヒト IgG4 及びマウス IgG1）、4 mg/kg 抗ヒト IL-17、8 mg/kg 抗マウス IL-17、又は 4 mg/kg 抗ヒト IL-17 と 8 mg/kg 抗マウス IL-17 の組合せを、7 日毎に 4 週間、皮下注射によって処置する。最初の抗体投与は、細胞を移植する 1 日前に開始する。腫瘍はキャリパで毎週二回測定し、体重は週に 2 回モニターする。第 34 日に各マウスから血漿を収集し、KC ELISA キットを使用して、製薬業者の説明書 (R&D System) に従い KC レベルを測定する。対照 IgG を注射したマウスと比較して、抗ヒト IL-17 抗体と抗マウス IL-17 抗体との組合せで処置したマウスの腫瘍体積は有意に低減している。更に、抗ヒト IL-17 抗体及び抗マウス IL-17 抗体の両方で処置したマウスで、血漿 KC は劇的に低減している。4 mg/kg 抗ヒト IL-17 抗体又は 8 mg/kg 抗マウス IL-17 抗体のいずれかで処置したマウスでは、腫瘍体積及び血漿 KC レベルの有意な低減は明示されなかった。データを本願明細書の表 12 及び 13 に示す。

30

40

## 【0196】

腫瘍の IL-17 レベルを測定するために、マウス異種移植片モデルからの腫瘍を、概ね実施例 9 に記載のとおり調製する。タンパク質測定のために、ポリプロピレン 96 穴希釈プレートにて腫瘍溶解液を TPER + 1X Halt で 1:10 に希釈する。タンパク質濃度は、Coomassie Plus Protein Assay (Pierce #23236) のマイクロプレートプロトコルを用いて定量する。BSA 標準は、TPE

50

R + H a l t で希釈する。I L - 1 7 タンパク質レベルは、製造業者の説明書に従い、R & D S y s t e m のヒト及びマウス I L - 1 7 E L I S A キット ( ヒト I L - 1 7 D u o S e t E L I S A , R + D S y s t e m s , C a t . # D Y 3 1 7 ; マウス I L - 1 7 E L I S A , R + D S y s t e m , C a t . # 4 2 1 ) を用いて定量する。ヒト及びマウス I L - 1 7 の双方とも、H 4 6 0 肺腫瘍異種移植片モデルと比較して、H C T 1 1 6 及び H T 2 9 結腸腫瘍異種移植片モデルからの腫瘍で増加していた。

【 0 1 9 7 】

表 1 2 腫瘍体積

( n = 1 0 )

【 表 1 5 】

時間、日数 (HCT-116細胞の移植後)	ラットIgG1 + ヒトIgG4 アイソタイプ対照 (MEAN +/- SE)	抗マウスIL-17+ 抗ヒトIL-17 (MEAN +/- SE)
8	101.4 +/- 6.7	91.5 +/- 9.4
14	149.2 +/- 9.2	123.9 +/- 16.2
17	162.1 +/- 12.4	134.6 +/- 14.7
20	177.7 +/- 17.1	152.8 +/- 18.7
24	279.2 +/- 22.8	222.4 +/- 35.4
28	323.3 +/- 22.5	244.6 +/- 32.8
31	405.8 +/- 33.4	275.1 +/- 36.6
34	537.7 +/- 50.7	339.8 +/- 46.3

腫瘍体積は、L o g V o l 、 A R 法を使用して算出する。

【 0 1 9 8 】

表 1 3 血漿の K C ケモカインレベル

移植後 3 5 日

( n = 1 0 )

【 表 1 6 】

群	KC値の範囲、 pg/ml	平均KC、pg/ml (+/- SE)
Rat IgG1 + ヒトIgG4アイソタイプ対照	76.3 - 168.4	112.5 +/- 10.0
抗マウスIL-17+ 抗ヒトIL-17	55.6 - 110.5	84.7 +/- 5.7
KC差の平均パーセント (抗IL-17群、アイソタイプ対照群と比較) :-24.7%		

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 9 9 】

【 図 1 】 タンパク質のヒト I L - 1 7 ファミリーのメンバー ( I L - 1 7 、 I L - 1 7 B 、 I L - 1 7 C 、 I L - 1 7 D 、 I L - 1 7 E 及び I L - 1 7 F ) のアミノ酸配列アラインメントを示す。

【 図 2 】 ヒト、ウサギ、ラット、カニクイザル及びマウス種からの I L - 1 7 のアミノ酸配列アラインメントを示す。

## 【図 1】

IL-17ファミリー (ヒト)

```
1 40
IL-17 MTPGKTSLSVS LLLLLSLEAI VKAGITIPR- NPGCPNSEDK
IL-17B ----MDWPHN LLFLTTSIF LGLG1P4WP- KWKRKGQGRP
IL-17C ----MTLLPG LLFLTWLHTC LAHHDPSLRG HPHSHGTPHC
IL-17D ----MLV AGFLALFES WAGAGAPRGR RPARPRGAD
IL-17E MREPRRLGED SSLISLFLGV VAFLAMVMGT HTYSHWPSGC
IL-17F --MVKYLLES ILGLAFLSEA AARKIPKVG- HTPFQKPESC

41 80
IL-17 NFPRTMVMNL NIHNRTNTN P-----
IL-17B GPLAPGPHQV PLDLVSRMKP YARMEEYERN IEEMVAQLRN
IL-17C YSAEELPLQA PPHLIARGAK WQALPVALV SSLEAASHRG
IL-17D RPEELLEQLY GRLAAGVLSA FHHTLQLGPR EQARNASCPA
IL-17E PSKGQDTSEE LLRWSTVPVP PLEPARPNRH PESCRAS---
IL-17F

81 120
IL-17 -----KR SSDYYNRSTS PWNLHRNEDP
IL-17B SSELAQRKCE VN-----LQ LWMNKRSLS PWGYSINRDP
IL-17C RHERESATTQ CPVLRPEEVL EADTHQRSIS PWRVRVDDE
IL-17D GGRPADR---RFPPTNLRVS FWAYRISYDP
IL-17E -----E DGFLNSRAIS PWRYELDRDL
IL-17F -----SM SRNIESRSTS PWNITVTWDP

121 200
IL-17 ERYPSVIWEA KCRHLGCINA D--GNVDYHM NSVPIQQEIL
IL-17B SRIPVDLPEA RCLCLGCVNP FT-MWEDRSM VSVPVFSQVP
IL-17C DRYPQKLAF ECLCRGCIDA RT-GRETAAL NSVRLLQSL
IL-17D ARYPRLPEA YCLCRGCLTG LF-GEEDVRF RSAPVYMPTV
IL-17E NRLPQDLVHA RCLCPHCVS L QTGGHMDPRG NSELVYHNQT
IL-17F NRYPSFVVQA QCRNLGCINA Q--GKEDISM NSVPIQQETL

161 200
* *
IL-17 VLRRPFPHP NS-----FRLEKILVS VGCTCVTPIV
IL-17B VRRRLCPPPP RTG-----PC RGRAVMETIA VGCTCIP---
IL-17C VLRRPFCSD GSGLPTPGAF AHTETIHPV VGCTCVLPRS
IL-17D VLRRTPACAG GRS-----VYTEAYVTIP VGCTCVPEPE
IL-17E VFYRRPCHGE KGTHKG---Y CLEFFLYRVS LACVCVRPRV
IL-17F VVRRKHQGCS VS-----FQLEKVLVT VGCTCVTPVI

201 228
IL-17 HHVA----- ( 配列番号: 1)
IL-17B ----- ( 配列番号: 2)
IL-17C V----- ( 配列番号: 3)
IL-17D KDADSINSSI DKQAKLLLG PNDAPAGP ( 配列番号: 4)
IL-17E MG----- ( 配列番号: 5)
IL-17F HHVQ----- ( 配列番号: 6)
```

## 【図 2】

IL-17

```
* * * * *
マウス MSPGRASSVSLMLLLSLAATVKAAAI PQSSACPNTAKDFLQNVKVNLIKVPNSLGAK
シット MSPRIPISMCI MLLLLNLEATVKAALIPQSSVCPNABANNFLQNVKVNLIKVINSLSSK
ウサギ MSLGRISVSLSL--LLLLCLVATVKNGIAMPRNPGCPNABEDKNFPQNVKVSILNINL--S
ヒ ト MTPGKTSLSVSL--LLLLSLEAIVKAGITIPRNPGPCPNABEDKNFPRTVMVNLNIHNR-NTN
サ ル MTPGKTSLVLL--LLLLSLEAIVKAGITIPRNPGPCPNABEDKNFPRTVMVNLNIHNR-NTS

* * * * *
マウス VSSRRPSDYLRNSTSPWTLHRNEDPDRYPYSVIWEAQCRHQRCVNAEGKLDHMHMSVLIQQ
シット ASSRRPSDYLRNSTSPWTLNRNEDPDRYPYSVIWEAQCRHQRCVNAEGKLDHMHMSVLIQQ
ウサギ VNSRRPSDYLRNSTSPWTLHRNEDPDRYPYSVIWEAKCRHLGCVNAEGNFDHMHMSVPIQQ
ヒ ト TNPKRSSDYLRNSTSPWNLHRNEDPDRYPYSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMSVPIQQ
サ ル TNPKRSSDYLRNSTSPWNLHRNEDPDRYPYSVIWEAKCRHLGCVKADGNVDYHMSVPIQQ

*****
マウス EILVLKREPESCPTFRVERKMLVGVGCTCVASIVRQAA- (配列番号: 7)
シット EILVLKREPCKCPTFRVERKMLVGVGCTCVSSIVRHAS- (配列番号: 8)
ウサギ EILVLRRPSQHCPSFRLEKMLVAVGCTCVTPIIHHMAX (配列番号: 9)
ヒ ト EILVLRRPFPHPCNPSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA- (配列番号: 1)
サ ル EILVLRRPFPHPCNPSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVAX (配列番号: 10)
```

## 【配列表】

0005063612000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/08	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 11/06	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	A 6 1 P 11/06	
		C 1 2 P 21/08	

- (72)発明者 バレット・アラン  
アメリカ合衆国 9 2 0 2 4 カリフォルニア州エンシニタス、サン・ディエゴ・ドライブ 5 4 2 番
- (72)発明者 チ・キン・チョウ  
アメリカ合衆国 4 6 2 3 7 インディアナ州インディアナポリス、ウィンザー・レイクス・ドライブ 7 3 4 8 番
- (72)発明者 リファ・ファン  
アメリカ合衆国 4 6 0 3 2 インディアナ州カーメル、コーシャム・サークル 3 5 6 3 番
- (72)発明者 リュー・リン  
アメリカ合衆国 4 6 0 3 2 インディアナ州カーメル、キルケニー・サークル 3 3 9 3 番
- (72)発明者 ジロン・ル  
アメリカ合衆国 4 6 0 3 2 インディアナ州カーメル、ストーン・ドライブ 1 3 7 9 3 番
- (72)発明者 キングマン・ング  
アメリカ合衆国 4 6 0 3 2 インディアナ州カーメル、プットナム・ブレイス 1 0 7 4 5 番
- (72)発明者 ジョナサン・ウェンデル・テトロールト  
アメリカ合衆国 4 6 2 2 8 インディアナ州インディアナポリス、デベロー・ドライブ 3 2 3 2 番
- (72)発明者 アンドリュー・ゴードン・ワーナー  
アメリカ合衆国 4 6 2 6 0 インディアナ州インディアナポリス、ノースブルック・ドライブ 1 5 5 0 番

審査官 神谷 昌男

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 4 / 1 0 6 3 7 7 ( W O , A 1 )  
特表 2 0 0 4 - 5 0 0 3 2 5 ( J P , A )

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
C12N15/00-15/90  
CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
UniProt/GeneSeq